

色素の細胞膜透過性について

第一報

色素の濾紙電気泳動並に濾紙クロマトグラフィーと腫瘍細胞、
培養細胞を含む種々細胞の超生体染色所見

岡山大学医学部病理学教室（指導：妹尾左知丸教授）

専攻生 天 野 勲

〔昭和33年11月11日受稿〕

緒 言

先に始尾、大口¹⁾及び大口^{2), 3), 4), 5)}は細胞膜の透過性を色素に依る超生体染色像から判定する事を考え之に就て広範な研究結果を発表している。彼等は細胞内への色素の侵入が時間のある函数である点に注目し、之を一定にする方法をとってこの様な条件下に pH の変動が色素の透過性を大きく左右する事を指摘している。即ち塩基性色素はアルカリ側で酸性色素は酸性側でそれぞれ細胞膜をよく透過する事が示されている。一方彼等は又濾紙電気泳動法に依つて各 pH に於ける色素の荷電を調べ、色素の透過はその荷電と関係し荷電が低下し而も凝集沈澱を起さない点に於て最も強い透過が認められる点に着目して細胞膜の分子構造とその色素透過の機構に就て論じている。この様な細胞の代謝と直接関係のない色素の如きものを用いて透過性を観察する事は細胞膜の物理化学的性格を知るためのよい方法である事は納得される。過去に於てこの様な試みが多く行われ而もそれが充分目的を果していない事は超生染に於て時間を一定にするという方法を見つけて得なかつたためと考えられ、此の点に於て彼等の実験は一応成功したと言えよう。然し彼等の行つた色素の電気泳動法には尙不十分な点がある。と言うのは用いた色素の濃度がかなり濃いため pH の変化に依る荷電の低下と同時に起る色素粒子の粗大化が荷電の変化と共に泳動像に現われている危険がある。著者はこの点に注目して色素の濾紙電気泳動像の pH による変化を再検討し又大口、妹尾等の方法に従つて彼等の血液細胞で得た結果を再吟味すると共に腫瘍細胞に就て色素の透過性を調べたのでその結果を報告する。

1) 材料及び方法

pH の変動による色素の電気泳動の観察には大口²⁾

等の方法を採用した。装置は教室の内海、戸倉⁷⁾の考案した硫酸銅、塩化カリの不分極電導子を有する泳動装置で 3～4 本 (40×3.85cm²) の濾紙が泳動出来、而もそれ等は直列に連結して夫々の濾紙にかかる電流及び電圧が一定になる様にしたもので、この装置では各々の濾紙の電圧電流が一定となり、同時に展開した数枚の濾紙上の色素の泳動度を泳動距離から正確に比較する事が出来る。

展開溶媒には McIlvaine の緩衝液を用いた。pH 2.2, 3.2, 4.0, 4.8, 5.6, 6.2, 7.6, 8.0 のものを作り、それ等のイオン強度を一定にするため pH 2.2 のものは原液、pH 3.2 の液は 5.5 倍に、pH 4.0 のものは 7 倍に、pH 4.8 のものは 9.5 倍に、pH 6.2 のものは 11 倍に pH 7.0 のものは 12.5 倍に、pH 8.0 のものは 15 倍に夫々稀釈して使用した。電圧は 400V、電流は 1.5～2.0mA/cm で 3 時間泳動し数枚の濾紙の中その 1 つは常に pH 2.2 或は 8.0 とし之の泳動距離を一定に保つ様に最後の時間を調整し、各々濾紙上の泳動距離を比較する様にした。展開に使用した色素液は 1% 及び 0.01% の割合に各々緩衝液に溶かしたもので之を 0.05cc づつ展開した。

一方色素の展開が只その荷電のみによるものかどうかを調べるために別に Paperchromatography⁷⁾を行つた。即ち一般に使用される上昇法を利用し電気泳動に用いた溶液を展開溶媒にして展開した。この場合溶媒が水溶液であるために展開に先立ち各々の濾紙は夫々、色素の溶液と同じ pH、イオン強度をもつ夫々の溶媒に浸して後、充分乾燥したものに 1%, 0.01% の色素液 0.005cc をつけ展開した。展開濾紙は Carl-Schleicher の 3.85×40cm のものを使用した。

2) 細胞膜透過性の観察の対象として用いた細胞は、健康白鼠末梢血顆粒球及び骨髓細胞、吉田肉腫細

胞、腹水肝癌細胞 (AH-130), L 細胞, 健康白鼠の腹水単球の 6 種であり吉田腫瘍細胞, 腹水肝癌細胞は夫々移植後 6 日目, 10 日目のものを, 又 L 細胞は培養 1 週間後のものを使用した。

細胞の超生染には Nile blue を使用し, 色素液の pH は 0.1%~0.01% Nile blue 生理的食塩水溶液 0.9cc を McIlvaine 緩衝液 0.1cc とよく混じり夫々 2.2, 3.2, 4.0, 4.8, 5.6, 6.2, 7.0, 7.6, 8.0 の pH を有する色素液を作り使用した。この液 9 容と細胞浮游液 1 容を混和し室温 (15°C~20°C) で正確に 1 分間両液をゆるやかに振盪しながら超生体染色をする。1 分後その 1 滴を予め 50°C に孵卵器で温められたスライドガラス上に塗抹し速かに風乾後ホルマリン蒸気 (室温) で 1 分間細胞を固定する。この操作によつて超生染時顆粒を染めていた色素は細胞内に瀰漫性に拡散する。観察は大口が示したと同様に直ちにシダーオイルを細胞上におき油浸レンズで観察を行い細胞をその染色度に応じて一, 土, 十, 卅の 4 つの段階に分け, 観察した全細胞数 100~200 個に対する各々の百分率を求め, その各々に夫々 0, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1 を乗じたものの和をもつて細胞膜透過性の指標とした。この乗数は夫々の染色度に相当する細胞を顕微分光測光法⁹⁾で 6000Å の光を使用し 1 Spot の点光のみで測定した値の比 (透過率比は一, 土, 十, 卅に対し細々 0, 0.23, 0.5, 1.0 に成る) から求めた。(表 1)

表 1

	細胞数	透過率	吸光度	比%
—		100	0	0
土	10	91.5	0.039	22.9
+	10	8.25	0.082	49.3
卅	10	6.75	0.171	100

実験結果

1% の色素溶液を用いて色素の電気泳動像を観察した場合, 色素の濾紙電気泳動像は pH の変化によつて明らかに相違し, 塩基性色素はアルカリ側で, 又酸性色素は酸性側で伸展度が減少する。この点は大川, 妹尾^{1) 2)} の観察結果と一致する。然し通電しない普通の濾紙クロマトグラフィーに於ても同一の結果が得られた。この事実は電気泳動に於て見られた差が本実験で用いた程度の電圧では, 必ずしも色素の荷電のみに左右されるものでない事を示している。即ち図 1, 2, 3, に示す如くメチレン青, ナイル青, エオジンでは何れも同様の結果が得られている。

然し色素濃度を稀薄にし色素同志の重合, 或は沈澱

図 1 1% Nile blue 電気泳動度及びクロマトグラフ Rf 値と染色媒液 pH との関係

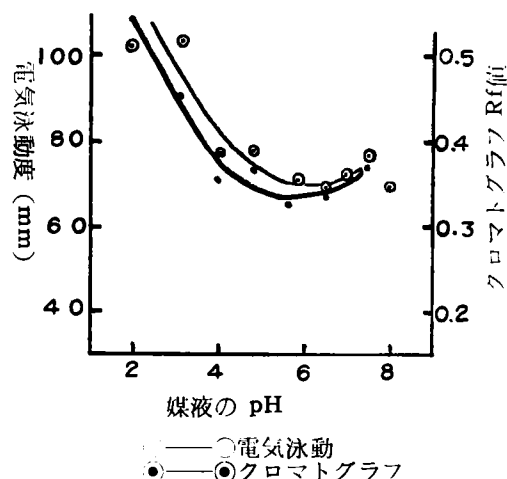


図 2 1% Eosin の電気泳動度及びクロマトグラフ Rf 値と媒液 pH との関係

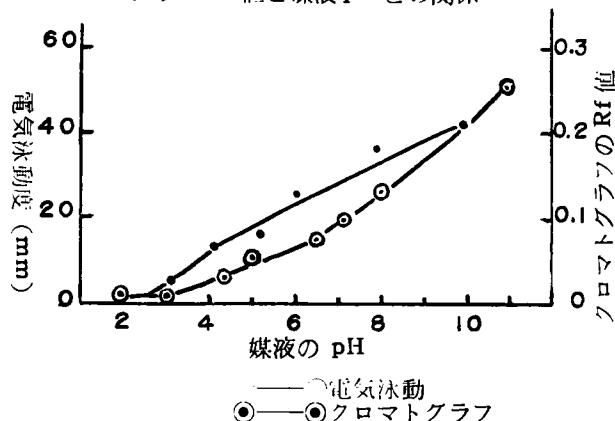
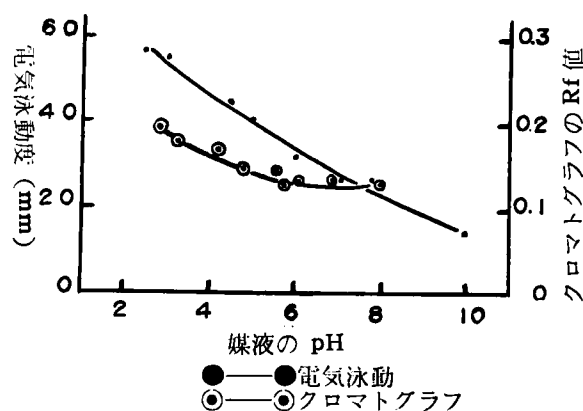


図 3 1% Methylen blue の電気泳動度及びクロマトグラフ Rf 値と染色溶液 pH との関係



を起し難いと考えられる濃度 (0.01%) では色素の濾紙クロマトグラフィーと濾紙電気泳動像の間に変化が見られ, 濾紙クロマトグラフィーで pH の変動による移動度の変化がやや大であることが示された。(図 4, 5, 6)

図4 0.01% Nile blue の電気泳動度及びクロマトグラフRf値と染色溶液の関係

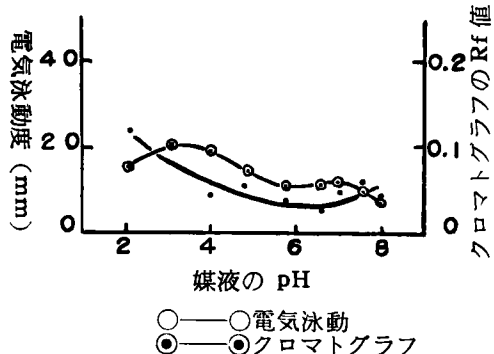


図5 0.01% Ecsin の電気泳動度及びクロマトグラフRf値と染色媒液pHとの関係

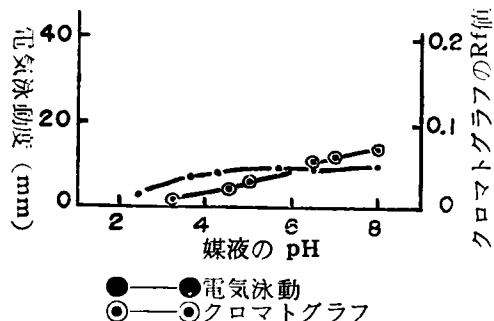
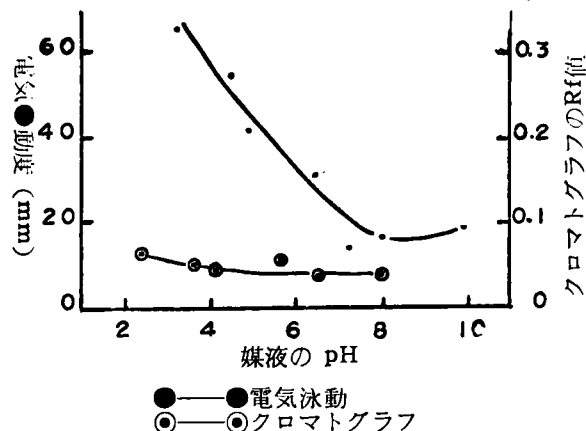


図6 0.01 Methylene blue の電気泳動度及びクロマトグラフRf値と染色媒液pHとの関係



即ち色素の泳動は荷電の変化と明らかに関係している。このような差は特にメチレン青の時に顕著に認められた。濾紙クロマトグラフィーで認められた像は主として色素の粒子の粗大化と関係しているものと考えられ、之が電気泳動像に影響する事は明らかである。

次にナイル青に依る細胞超生体染色結果を見るに同一種の細胞でもその染色性は個々の細胞に依り、極めて区々であり、pH4.0 或はそれ以下で、或る細胞では5.0以下の液中では細胞の変性が可成り見られ、細胞質、核共に濃染する細胞が次第に増加して来る。之

は明らかに生きている細胞の膜透過性の範囲に入れるべきではないが、之等をも測定して細胞変性の指標とした。

図7, 8, 9, 10, 11, 12に見られる如くアルカリ性の液中では何れの場合にもナイル青によく染る。

染色度はpHの低下と共に低下し一定のpH域を境にして再び濃染する様になる。之は上述の細胞変性に基くもので極端に濃染する細胞が酸性の亢進と共に増加する。この様な曲線に就て各細胞種に依つて比較検討すると、正常顆粒白血球に比して骨髓細胞を始め他の5種の細胞のナイル青による超生染色度は何れも高い。その中でもL細胞が最も高い値を示し次に肝癌細胞AH-130、骨髓細胞、腹水単球、吉田肉腫細胞の順

図7 白血球の超生体染色率と染色媒液pHとの関係

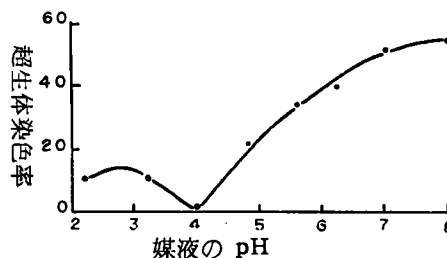


図8 骨髓細胞の超生体染色率と媒液pHとの関係

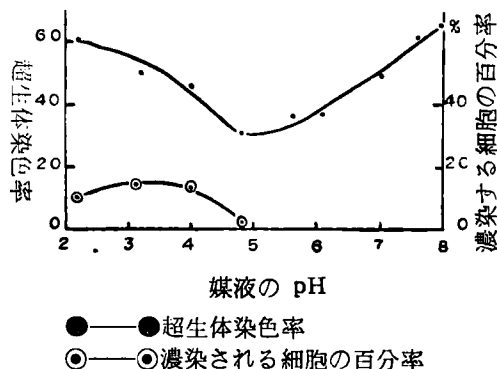


図9 腹水細胞の超生体染色率と媒液pHの関係

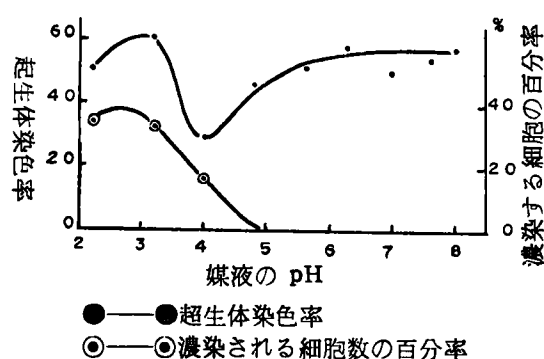


図10 L細胞の超生体染色率と媒液pHの関係

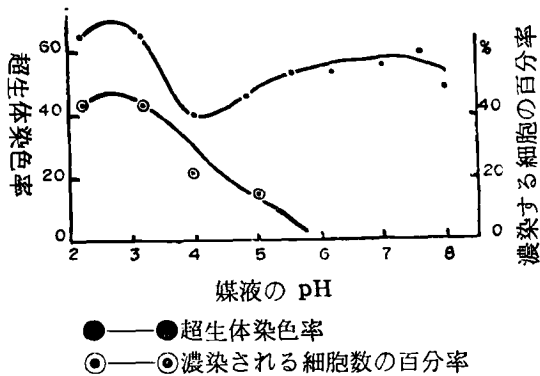


図11 吉田肉腫細胞の超生体染色率と媒液 pH の関係

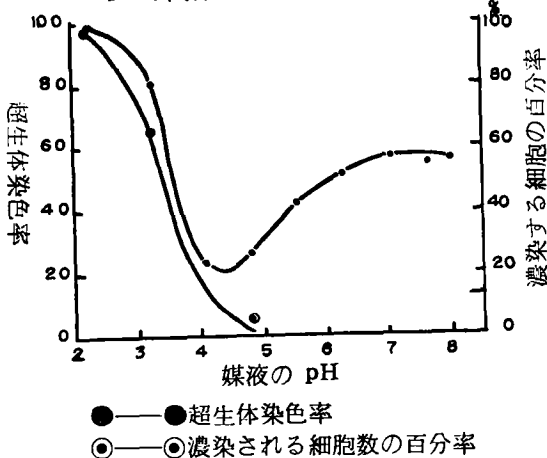
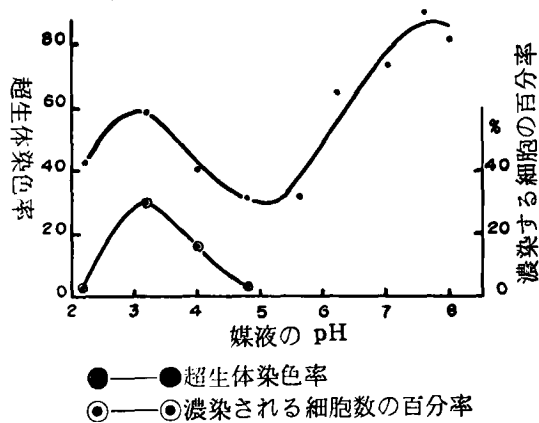


図12 腹水肝癌細胞(AH-130)の超生体染色率と媒液のpHの関係



に染色性が低くなる。pHの低下による濃染、即ち細胞の破壊と思われる像を6種の細胞と比較するとAH-130が既にpH5に於て変化を示し、吉田肉腫細胞、L細胞、骨髓細胞が多少相違はあるがpH4~5の間で、末梢血顆粒白血球と腹水単球はpH4.0を限界に変性による染色を示す、この様に濃く染色されても細胞輪廓の整つたものでは核の内部は染色されていない

ものが多く細胞膜の破壊が核の変化に先立つて起る事を示している。又極度の酸性及びアルカリ側で即 pH 2.2, 3.2, 及び8.0ではむしろ超生染色性は低下する傾向にあるが、この部分の染色は健康な細胞膜の透過性とは関係がないものと思はれる。

考 案

先づ色素の電気泳動に就ては濃度の濃い場合その泳動度は色素粒子の荷電に依るよりも粒子の大きさに依つて支配される様であり、濃度の薄い場合にのみ荷電との平行関係が認められる。然し荷電の減少が色素粒子を大きくする事が考えられ、一応その粒子の大きさと荷電の大きさの間にも平行関係が考えられ、此処に使用された色素は明らかに pH の変化に伴い荷電が大きく変化する事はうたがいない。

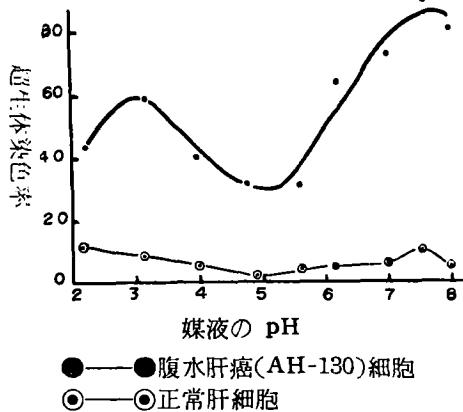
而も細胞膜を透過する色素の粒子は、その透過速度から考えて非常に小さいもののみ可能であると考えられるので、著者の実験の如くナイル青が pH の上昇と共にその染色度を増す現象は、大口²⁾が言う如く荷電が低下する程細胞膜の透過性がよくなるという様に考えてよい様に思われる。即ち塩基性色素ではアルカリ性液中で荷電が減るのであり、pH の上昇と平行して透過性の亢進しているのは、この事実を示すものと理解され、この傾向は観察した全ての細胞に於て同様に現れる。

腫瘍細胞と正常細胞では、前者は pH の変化に依る染色度の変化が著しく、特に pH の低下に鋭敏で pH の低い処では著しく濃染され、核迄も染色される細胞の数が急激に増加する。然るに正常細胞は pH の低下に対して割合安定である。

L細胞はこの点でむしろ腫瘍細胞に近い性格を示した。pH の変化に依る染色性の差異が認められる点は概ね4にある(骨髓細胞は例外的でこの場合非常に染色性の強い赤芽球が混入して来るので、分界点が不明瞭になるし、又 pH の高い方にずれる)然るに腫瘍細胞ではこの分界点が pH の高い方へずれて来るのが認められた。この傾向は AH-130で顕著に認められ、吉田肉腫では僅にずれる。然しナイル青に対する透過性が一般の正常細胞に比して、腫瘍細胞に於て特に高いと言う様な事は認められなかつた。細胞はその種類に依り、代謝の形式も非常に違うと考えられるので、この比較は癌細胞の発生した母組織の細胞との比較に於て意義のあるものと考えられる。この様に考えると正常肝細胞のそれに比して腹水肝癌細胞は非常に高い透過性を示すものと云えよう。(図13)

然し吉田肉腫細胞の透過性は pH 5~6の間に於て

図13 超生体染色液 pH の変化にともなう正常肝細胞と腹水肝癌細胞の超生体染色率の比較



その母組織と考えられる腹水単球に比してむしろ低下している。尤もこの場合腹水単球が母組織であるかどうかは疑問であるが、中胚葉性の幼若な細胞としてL細胞を対照にして見ても結論は同じである。即ちナイル青に対して腫瘍細胞の透過性が正常細胞に比し常に高いと言う結論はこの実験からは得られない。

腫瘍細胞の非常に旺盛な発育から見て蛋白構成要素としてのアミノ酸、或は磷酸化したグルコースの透過性は極めて高いものであろう事は理論的にも肯ける所である。然しこれ等の物質は細胞内に入ると、容易に高分子化合物に合成されるか、或は分解されるのであろうから膜の構造とは無関係に只浸透圧が変化する事に依つて透過が促進される事も考えられる。この様な点を考えるとアミノ酸、グルコース等の透過は必しも膜の変化と関係はないかも知れない。然し之が若し膜の変化を多少でも伴っていると云う事であれば、膜の無極性成分の低下と云う事、或はリピド成分がより親水性のものに置き換えられていると云う事が考えられる。この事を細胞膜の構造説から見れば Danielli¹⁰⁾の学説、又は色素透過性に関する妹尾、大口¹¹⁾の説を借りて理解される事は有極性原子団に囲まれる穴が非常に多くなっているか(リピド成分の減少)又はリピドそのものの性格の変化に依るものである。リピドそのものの量的減少に就ては腫瘍に就て多くの報告もある。11) 12) 13) 14) 15) 之等の中には減少していると云う報告が可成り多い^{14) 15)}が増加していると云う報告もある。^{12) 13)} 然しここに特筆すべき事は最近神前氏に依つて見出された腫瘍細胞に特有なリピッド Malignolipin である¹⁶⁾。この物質は只一つの脂酸の

一端に極性の原子団を可成多くもっており、従来知られているリピッドに比し著しく親水性の強いものである事が想像される。この事はアミノ酸、磷酸化グルコース等の極性物質の透過の亢進に膜そのものの変化が関係している事を示唆している様に思はれる。ここで再び著者のナイル青に就て考えるに、この物質は従来脂質の染色に使用される程色素の中では可成極性は弱いものであるが、その極性原子団に依つて一方に相当な親水性を示す物質である。膜が非常に親水性基を多くもつ様に変化していると考えられる細胞に対してこの様な性格の色素が果してその性格の判定に好適なものであるかどうかは別としてこの様な膜の構造の変化に応じてある程度の感受性をもつて反応するものと想像してこの実験を行つた。腫瘍細胞と云えども細胞が生きている以上、細胞膜の性格に極端な変化はゆるされない筈であり、この様なナイル青の性格は好適な資料であると考えられる。本実験で著明な差が正常細胞との間に認められなかつた事は、恐らく実験方法がその差を判定するに精度に於て不充分である事を示すものとする。

結 論

1) 白鼠の末梢血顆粒白血球、正常腹水単球、骨髓細胞、吉田肉腫細胞、腹水肝癌細胞 AH 130、L細胞の細胞膜透過性をナイル青の超生体染色度を基準にして種々の pH 域に於て観察した。

2) AH-130、吉田細胞の超生染色は pH の変化に対して敏感であり、アルカリ性の上昇と共に染色度は急激に増加するが、酸性側に至ると、正常細胞に比し細胞は非常に破壊され易い。この様な性格はL細胞に於ても著明に認められた。

3) 正常細胞は pH 4.0 を境にしてその染色性を变化するがこの点が腫瘍細胞ではアルカリ側にずれる。

4) 透過性の程度に就ては腫瘍細胞が正常細胞に比し特に色素の透過性が高いと云う結果は得られなかつた。即ち吉田肉腫細胞、腹水肝癌細胞は正常腹水単球、L細胞、多核白血球等の間には顕著な差は認められなかつた。この様に差異の認められなかつた事は、測定方法がその差異を見つけ出すに充分でなかつた事にあると考えられる。

稿を終えるに臨み終始御懇切なる御指導と御校閲を頂いた妹尾左知丸教授に深謝する。

献

1) S. Seno, M. Oguchi, K. Yoshizawa : Lu Sang XXVIII, 687. 1957.

2) 大口基光 : 岡山医学会雑誌 68, 1708, 1956.

3) 大口基光 : 岡山医学会雑誌 68, 1721, 1956.

文

- 4) 大口基光：岡山医学会雑誌 68, 1727, 1956.
- 5) 大口基光：岡山医学会雑誌 68, 1733, 1956.
- 6) 戸倉又晴：岡山医学会雑誌 印刷中.
- 7) 桑田智：クロマトグラフィー. 広川書店, 東京, 1952.
- 8) 直良博人：科学 26, 615, 1956.
- 9) Caspersson, T.: Cell growth and Cell function, Norton Co. New York, 1950.
- 10) Davson, H & Danielli J. F.: The permeability of natural membrane, Cambridge Univ. press. London, 1952.
- 11) Allison J. B., M. T. Spoerlein, and R. W. Wannemacher: Cancer Res. 4 (2), 275, 1944.
- 12) Yasuda, M. and Bloor, W. R.: J. Clin. Invest. 11, 677, 1932.
- 13) Bloor, R. and Haven, F. L.: Cancer Res. 15, 173, 1955.
- 14) Fuziwara, I., Nakahara, W. and Kishi, S.; Gan 31, 51, 1937.
- 15) Aoki, J.: Gan 32, 100, 1938.
- 16) Kosaki, T. et al.: Science 127, 1176, 1958.

Studies on the Permeability of Cell Membrane

I. Permeability Test of Cells by Supravital Staining and the Patterns of Paper-electrophoresis and Paperchromatography of the Dye in the Varied pH Media

Isao Amano

Department of Pathology, Okayama University Medical School
(Director: S. Seno)

A new method of permeability test of cell membrane by supravital staining has been introduced by Seno and Oguchi. According to their data the dye permeability to the cell membrane is enhanced in such media as the electric charge of the dye is reduced. But in their experiment the grade of the charge of dye has been observed by electropaperchromatography of dye in a high concentration, 1 percent. The author has found that the electrophoretic picture of dye on a paper is largely dependent upon its concentration, i. e. the size of particle which seems to increase with the reduction of the charge as is clearly seen by paperchromatography. But the test on a diluted dye solution, 0.01 percent, showed that the electrophoresis of dye goes on parallel to the charge of dye or the pH of media, where the paperchromatography gives almost constant picture by changing pH.

Using Nile blue the author has observed the permeability of various cells (normal monocytes, white blood cells, bone marrow cells, Yoshida tumor cells, ascites hepatoma cells (AH-130) and L-cells at various pH's (2.2-8.6) and the following results have been obtained.

In ascites hepatoma cell (AH-130) and Yoshida tumor cell the permeability to the dye is deeply influenced by the changing pH of media and the depressed permeability till around pH 4.5.

The further increase of H ion concentration results in the increased damage of cell with the increased number of the deeply stained cells. L cell also showed the same tendency in the permeability to the dye. The effects of the change of pH on the permeability of the dye were marked on tumor cells and L-cells compared to those on the normal cells.