

無血清培養下における正常上皮細胞ならびに 癌細胞の脂質合成能に関する研究

新 木 恒 猪

Lipid metabolisms of normal epithelial cells and cancer cells derived
from oral region in serum-free culture

Tsunei Shinki

(平成7年2月28日受付)

緒 言

細胞膜の動的性状は、細胞の分化や増殖の調節に重要な役割をしており^{1,2)}、特に、細胞膜の脂質組成はその動的性状を決定する重要な要素である³⁾。培養細胞の脂質合成能は増殖、分化過程で変化するものの、各分化段階で種々の脂質の組成は動的な平衡状態である定常状態へ到達する。

一方、ある種の細胞増殖因子には、正常細胞や形質転換細胞の増殖や分化を制御する働きがあること^{4,5)}が明らかとなってきている。したがって、正常上皮細胞および口腔癌細胞の脂質合成能および脂質合成能に及ぼす細胞増殖因子の影響を検討することは、細胞の増殖、分化や癌化と脂質合成能の関係を解明する上で重要である。

従来、培養細胞の脂質組成や脂質合成能の研究に、血清添加培地が用いられてきた⁶⁻⁸⁾。しかし、血清中にはリポ蛋白を中心とした脂質や未知の因子が存在している⁹⁾。またその組成は血清のロットによって変化するので、血清存在下では細胞が本来もつ脂質合成能を正確に検討することが困難である。

一方、D. Barnes および G.H. Sato ら^{10,11)}は血清の主な役割は細胞の増殖にとって必要なホルモン、細胞増殖因子を細胞に供給することであるという仮説をもとに、基礎培地に既知の細胞増殖因子やホルモンを加えた無血清培地を用いて、動物細胞の増殖のみならず分化機能をも維持することに成功し、無血清培養法を確立した。したがって、脂質を含まない無血清培地を用いることにより細胞の脂質合成能を追究することが望まれる。

本研究では無血清培養系を用いて、正常上皮細胞および癌細胞の脂質組成と脂質合成能を検討し、さらに脂質合成能に及ぼす細胞増殖因子の影響を検討した。

研究材料ならびに方法

1. 培養細胞

癌細胞として、当科で樹立したヒト口腔由来扁平上皮癌細胞株 KA¹²⁾、NA^{13,14)}、UE^{12,15)}、ヒト外陰部由来扁平上皮癌細胞株 A 431¹⁶⁾ 由来の無蛋白、無脂質培地で増殖可能な AJC クローン¹⁷⁾、ヒト唾液腺由来腺癌細胞株 HSG¹⁸⁾、HSY¹⁹⁾ (徳島大学歯学部口腔外科学第二講座佐藤光信教授より供与)、正常上皮細胞としてヒト口腔粘膜由来正常上皮細胞およびヒト唾液腺由来正常上皮細胞を用いた。正常上皮細胞の分離培養法は II-3 に示した。

広島大学歯学部口腔外科学第一講座 (主任: 高田和彰教授) 本論文の要旨は平成4年9月の第51回日本癌学会総会 (大阪) および平成5年10月の第52回日本癌学会総会 (仙台) において発表した。

本研究において以下の略号を用いた。

PL, phospholipid; NL, neutral lipid; FCh, free cholesterol; FFA, free fatty acid; TG, triglycerid; ChE, cholesterol ester; PS, phosphatidylserine; PC, phosphatidyl choline; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidylethanolamine; SM, sphingo-myeline; NL/PL, the ratio of NL over PL; FCh/PL, the ratio of FCh over PL; 5F, 2-mercaptoethanol + 2-aminoethanol + sodium selenite + human transferrin + crystallin bovine insulin; RD5F, RD medium + 5F; m-MCDB5F, modified-MCDB 153 medium + 5F; EGF, epidermal growth factor; FGF-1, fibroblast growth factor-1

2. 無血清培地

RPMI 1640 medium (極東製薬) と Dulbecco's modified Eagle medium (極東製薬) の 1:1 の混合液²⁰⁾ (以下, RD と略す) あるいは, modified-MCDB 153 medium²¹⁾ (m-MCDB 153, 極東製薬) に, sodium pyruvate (110 mg/L) (片山化学), N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid (15 mM, HEPES, 同人化学), kanamycin sulfate (90 mg/L) (明治製薬), aminobenzylpenicillin (90 mg/L) (明治製薬) を加え, sodium bicarbonate は RD に 2 g/L, m-MCDB 153 に 1.2 g/L (和光純薬) 添加し, pH 7.4 に調整後, 0.2 μ m フィルター (Acrocap; Gelman Science Inc.) を用いて濾過滅菌し基礎培地とした。これら基礎培地に crystalline bovine insulin (10 μ g/ml), human transferrin (5 μ g/ml), 2-aminoethanol (10 μ M) (以上, Sigma Chemical Co., USA), 2-mercaptoethanol (10 μ M), sodium selenite (10 nM) (以上, 片山化学) (5F と略す) を加え無血清培地²²⁾ を調整した。培地中のカルシウム濃度は, RD が 1.12 mM, m-MCDB が 0.03 mM である。増殖因子として epidermal growth factor (mouse EGF, Receptor Grade, U.B.I. N.Y. USA) および fibroblast growth factor-1 (FGF-1) を用いた。なお, FGF-1 は, Crabb ら²³⁾ の方法に従い, 牛脳抽出液よりヘパリンセファロースアフィニティー クロマトグラフィーと逆層系 HPLC を用いて当科で精製した。

3. 正常細胞の分離培養方法

1) ヒト口腔粘膜由来正常上皮細胞

外来小手術時に切除した口腔粘膜より分離し培養した。切除した口腔粘膜から結合組織を可及的に除去後, 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 片山化学) を含む Dulbecco's Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate buffered saline (CMF-PBS, NaCl 8.0 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g/L, pH 7.2) 中で 30 分間処理後, 0.05% trypsin (Difco, USA) を含む CMF-PBS 中で 4°C 下一昼夜作用させた後²⁴⁾, 0.1% trypsin inhibitor (type IIs, Sigma Chemical Co., USA) を含む m-MCDB 153 培地中で, 実体顕微鏡 (オリンパス, K.K.Xr) 下に自家製ブラシを用いて基底細胞を分離した²⁵⁾。分離した基底細胞は, Type I コラーゲン (cell matrix type I-a, 新田ゼラチン) 処理した 60 mm 径のプラスチックプレート (住友ベークライト K.K.) を用いて m-MCDB5F に 1 nM の FGF-1 を添加した条件で初代培養を行った。実験には継代 4 代から 5 代目の細胞を用いた。

2) ヒト唾液腺由来正常上皮細胞

ヒト唾液腺由来正常上皮細胞は, 悪性腫瘍あるいは

唾石症の手術時に摘出した病理組織学的に正常な顎下腺より分離した。摘出した顎下腺組織を 70% エタノールにて消毒後, CMF-PBS で洗浄し細切後, コラーゲン処理した 60 mm 径プラスチックプレートを用いて, RD5F に 1 nM の EGF または 1 nM の FGF-1 を添加した条件で初代培養を行った²⁶⁾。実験には, 継代 2 代目の細胞を用いた。

4. 培養条件および培養細胞の採取方法

各種細胞は, 5% CO₂ 37°C の条件下, TE-HER 型インキュベーター (平沢製作所) 内で静置培養を行った。各条件で培養した細胞を, 冷却した CMF-PBS で 3 回洗浄し, ラバーポリスマンで細胞を採取後遠心し, 沈査を試料とした。同試料のタンパク定量は試料の一部を 0.1 N NaOH で溶解後, Bradford ら²⁷⁾ の方法を用いて行った。

5. 細胞分画法

4. で得た試料を凍結融解処理後, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中で超音波破碎器 (UR-200P, トミー精工) を用いて破碎し全細胞画分とした。さらに, 1,200 \times g で 5 分間遠心 (Himac Centrifuge SCT15B, 日立 Ltd.) 後, その沈査を核画分とした。その上清を 10,000 \times g で 10 分間遠心し, 沈査をミトコンドリア画分とした。上清をさらに 90,000 \times g で 60 分遠心 (Automatic Preparation Ultracentrifuge 65P-7, 日立 Ltd.) し, その沈査をミクロゾーム画分, 上清を可溶性画分とした。

6. 全脂質の抽出法

全脂質の抽出は Bligh & Dyer 法²⁸⁾ に準じて行った。4.5. で得た試料を凍結融解処理後, 蒸留水 (5 ml) を加え超音波破碎器にて破碎し, メタノール (10 ml), クロロホルム (5 ml) を加え 15 分間振とうした。ついでクロロホルム (5 ml) を再度加え, 10 分間振とう後蒸留水 (5 ml) を加え, さらに 5 分間振とうした。1,000 \times g で 5 分間遠心後下層のクロロホルム層を回収した。さらに残液にクロロホルム (10 ml) を加え, 15 分間振とうし 1,000 \times g で 5 分間遠心後下層のクロロホルム層を再度回収し, 先に得られたクロロホルム画分とともにロータリーエバポレーター (Mrk-Heidolph, Vacuum Evaporator, 三田村理研工業) にて濃縮乾燥後, クロロホルム (1 ml) を加え試料とした。

7. 脂質組成の分析法

6. で得た試料を薄層クロマトグラフィー (TLC) 法を用いて分離分析した。phospholipid (PL) と free

cholesterol (FCh), free fatty acid (FFA), triglyceride (TG), cholesterol ester (ChE) 等の neutrallipid (NL) の分離²⁹⁾ は、順層系薄層クロマトグラフィー法で行った。TLC Plate (silicagel 60, Merck) を用い、hexane/diethylether/acetic acid (80:20:1) の溶媒系³⁰⁾ で分離した。分離した脂質をヨードを用いて発色後、EpScanMac (Seiko Epson Corp) にて TLC 画像を取り込み、NIH-image (National Institute of Health Research Service Branch, NIMH Wayne) にて Apple コンピューター (II Ci) を用いて画像解析を行い、脂質の定量を行った。各脂質の標準物質として、L- α -phosphatidylcholine, oleic acid, 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol, cholesterol oleate (以上, Sigma Chemical Co., USA), cholesterol (和光純薬) を用いた。

8. 脂質合成能の分析法

各細胞の脂質合成能を [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate (1.94 GBq/mmol, 7.40 MBq/ml, Amersham UK.) の脂質画分への取り込みを指標として検討した。各細胞に [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate (18.5 KBq/ml) を添加し、正常細胞は24時間、癌細胞は6時間標識後細胞を採取し、6.7.の方法に準じて分析を行った。また、同試料の一部を液体シンチレーター (シンチゾール EX-H, 和光純薬) と混和後、その放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-900) にて計測し全放射活性を得た。さらに、sphingomyeline (SM), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE) 等の各 PL は high-performance TLCplate (silica gel 60, Merck) を用い、chloroform/methanol/acetic acid/water (100:60:6:4) の溶媒系⁶⁾ を用いて分離した。分離後、各画分の放射活性をラジオクロマナイザー (Aloka) にて測定し、脂質合成能を検討した。

9. 脂質合成能の測定

1) 口腔粘膜由来正常上皮細胞および唾液腺由来正常上皮細胞の脂質合成能

3-1)の方法で培養し、増殖期の細胞を RD5F に培地交換後、 [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate を 18.5 KBq/ml の濃度で添加し、24時間インキュベートした。

2) 癌細胞の脂質合成能

コラーゲン処理した 100 mm 径のプラスチックプレートで、RD5F の条件で各種癌細胞を3日間培養した。サブコンフルエントに達した培養細胞に [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate を 18.5 KBq/ml の濃度で添加後、6時間インキュベートし、脂質合成能を検討した。

10. 口腔粘膜由来正常上皮細胞の分化に伴う脂質合成能の変化

3-1)の方法で培養しコンフルエントに達した細胞を、1.12 mM のカルシウムを含む RD5F で分化を誘導する条件、対照として 0.03 mM のカルシウムを含む m-MCDB5F で分化を抑制した条件での脂質合成能を検討した。交換直後および24時間後に、 [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate を 18.5 KBq/ml の濃度で添加して、それぞれ24時間インキュベートした。また、分化抑制条件と分化誘導条件での形態学的変化を位相差顕微鏡 (Phase Contrast-2, Nikon) により観察した。

11. EGF の細胞増殖に及ぼす影響

1) 口腔粘膜由来正常上皮細胞の増殖に及ぼす EGF の影響

口腔粘膜由来正常上皮細胞を m-MCDB5F の条件下、コラーゲン処理した24ウエルプレートに1ウエル当り 1×10^4 /ml の細胞密度で1ml ずつ播種し、各濃度の EGF を加え、10日後に細胞数を計測した。なお、培地は2日に1回交換し、その都度 EGF も加えた。

2) 癌細胞の細胞増殖に及ぼす EGF の影響

扁平上皮癌細胞 AJC および唾液腺由来腺癌細胞 HSG を用いて検討した。各細胞を RD5F の条件下、コラーゲン処理した24ウエルプレートに1ウエル当り AJC は 1×10^4 /ml, HSG は 2×10^4 /ml の細胞密度で1ml ずつ播種し、各濃度の EGF を加え4日後の細胞数を計測した。

12. 口腔粘膜由来正常上皮細胞の脂質合成能に及ぼす EGF の影響

m-MCDB5F の条件でコンフルエントに達した細胞を、m-MCDB5F+EGF (10 nM) に培地交換し、さらに24時間培養後、RD5F あるいは m-MCDB5F に培地交換した。交換直後、24時間後、48時間後に [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate を 18.5 KBq/ml の濃度で添加し、それぞれ24時間の脂質合成能を検討した。

13. 癌細胞の脂質合成能に及ぼす EGF の影響

扁平上皮癌細胞 AJC および唾液腺由来腺癌細胞 HSG を、コラーゲン処理した 100 mm 径のプラスチックプレートに RD5F の条件で播種し、3日間培養した。サブコンフルエントに達した細胞に EGF (10 nM) を添加し、18時間、42時間、66時間後に [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate を 18.5 KBq/ml の濃度で添加し、さらに6時間インキュベートした。

結 果

1. 培養細胞の脂質組成

1) 全細胞画分の脂質組成

口腔粘膜由来正常上皮細胞では、PL が全脂質の44.3%、FCh と TG を中心とした NL が55.7%であった。一方、扁平上皮癌細胞 KA, NA, UE, AJC では PL が全脂質の73.9%から85.6%と大部分を占めた。唾液腺由来正常上皮細胞、唾液腺由来腺癌細胞 HSG, HSY では、TG を中心とした NL が全脂質の約50%から60%を占め、唾液腺由来正常上皮細胞と唾液腺由来腺癌細胞の脂質組成は類似していた。しかし、扁平上皮癌細胞と唾液腺由来腺癌細胞の脂質組成は大きく相違していた (表1)。各細胞の PL に対する NL の比率 (以下、NL/PL と略す) は、口腔粘膜由来正常上皮細胞、唾液腺由来正常上皮細胞および唾液腺由来腺癌細胞では1.1 から1.3 と高値を示したが、扁平上皮癌細胞では0.3 から0.4 と低値であった (図1)。

表1 培養細胞の脂質組成 (%)

	KC	KA	NA	UE	AJC	SE	HSG	HSY
PL	44.3	78.9	77.1	85.6	73.9	38.2	43.6	47.4
FCh	21.6	16.4	19.6	9.9	19.4	15.3	10.8	10.6
FFA	6.9	5.9	3.4	4.5	5.1	2.8	7.1	6.9
TG	24.5	trace	trace	trace	trace	38.1	38.5	35.1
ChE	2.7	ND	ND	ND	ND	5.6	trace	trace

PL: phospholipid FCh: free cholesterol
 FFA: free fatty acid TG: triglyceride
 ChE: cholesterol ester

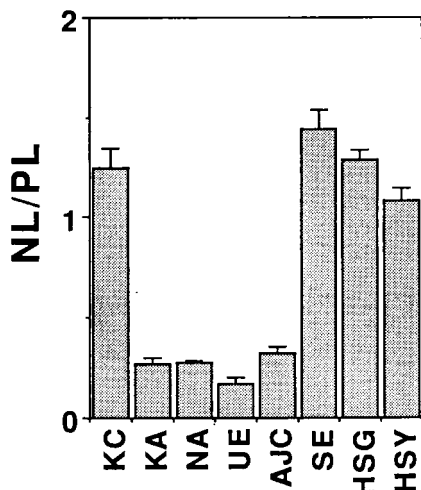


図1 各培養細胞の脂質組成における NL/PL。
 (各値は3試料の平均値±標準偏差)

2) 膜画分の脂質組成

すべての細胞において、ミトコンドリア画分およびマイクロソーム画分の脂質組成は、全細胞画分の脂質組成をほぼ反映していた (表2, 表3)。また、両画分の脂質組成は正常細胞と癌細胞で大きく異なっていた。さらに、両画分の NL/PL は、口腔粘膜由来正常上皮細胞、唾液腺由来正常上皮細胞および唾液腺由来腺癌細胞では2.3~4.0 と高値を示したが、扁平上皮癌細胞ではいずれも0.4~0.6 と低値を示した (図2, 図3)。また、これら細胞間における NL/PL の差は、全細胞画分における差よりも顕著であった。

表2 ミトコンドリア画分の脂質組成 (%)

	KC	KA	NA	UE	AJC	SE	HSG	HSY
PL	25.5	63.7	62.9	80.9	75.5	25.5	23.2	21.1
FCh	34.7	36.3	37.1	19.1	15.7	17.3	7.1	9.9
FFA	trace	trace	trace	trace	trace	7.2	28.7	25.1
TG	39.3	trace	trace	trace	trace	49.5	41.2	43.9
ChE	trace	ND	ND	ND	ND	trace	trace	trace

PL: phospholipid FCh: free cholesterol
 FFA: free fatty acid TG: triglyceride
 ChE: cholesterol ester

表3 ミクロソーム画分の脂質組成 (%)

	KC	KA	NA	UE	AJC	SE	HSG	HSY
PL	27.9	62.9	62.9	61.2	71.3	29.1	19.7	16.4
FCh	32.7	37.1	37.1	38.9	28.4	16.7	9.4	11.5
FFA	trace	trace	trace	trace	trace	3.3	22.7	24.9
TG	37.5	trace	trace	trace	trace	21.1	35.3	31.3
ChE	trace	ND	ND	ND	ND	trace	12.9	15.8

PL: phospholipid FCh: free cholesterol
 FFA: free fatty acid TG: triglyceride
 ChE: cholesterol ester

2. 培養細胞の脂質合成能

1) PL 合成能

今回検討した培養細胞においては、合成された PL のうち PC 合成能が最も高く、続いて PE であった。各細胞間で合成された各種の PL の全 PL 合成能に対する比率は類似していた (表4)。

2) 全脂質合成能

口腔粘膜由来正常上皮細胞では、PL 合成能 (48.1%) が最も高く、続いて FCh (40.9%) であった。唾液腺由来正常上皮細胞では、PL 合成能 (57.1%) が最も高く、続いて FCh (23.1%), TG (13.4%) であった。扁平上皮癌細胞で合成された脂質の75%以上

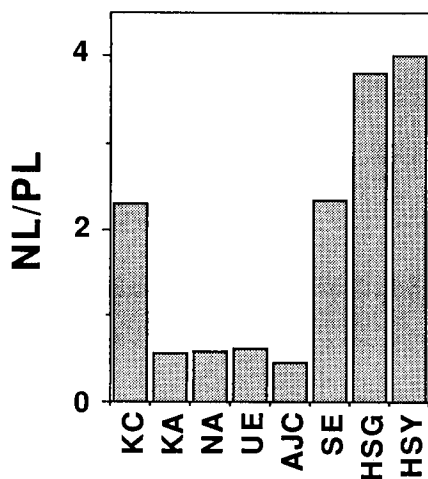


図2 ミトコンドリア画分の脂質組成における NL/PL.

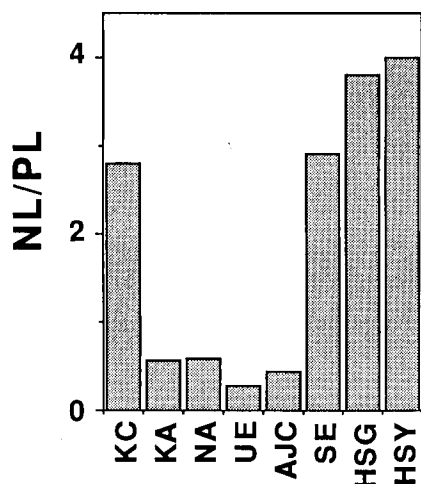


図3 ミクロゾーム画分の脂質組成における NL/PL.

表4 培養細胞における $[2-^{14}C]$ acetate の各 phospholipid への取り込み率 (%)

	KC	KA	NA	UE	AJC	HSG	HSY
SM	3.1	7.6	4.8	7.2	10.5	7.4	8.6
PC	50.9	56.3	53.8	60.7	69.8	63.1	45.1
PS+PI	14.4	11.7	14.8	13.3	10.3	14.1	17.2
PE	31.6	26.1	26.4	19.3	9.5	15.6	30.2

SM: sphingomyelin PC: phosphatidylcholine
 PS: phosphatidylserine PI: phosphatidylinositol
 PE: phosphatidylethanolamine

は PL であったが、唾液腺由来腺癌細胞の PL 合成能は43~47%と低値を示したものの、TG 合成能は35~38%と高値を示した。また、これら脂質合成能は、1. で示した各細胞の脂質組成を反映していた (表5)。また、重層扁平上皮組織では癌化に伴い NL/PL 値が減少したが、唾液腺組織では癌化に伴い同値が上昇した (図4)。

表5 培養細胞における $[2-^{14}C]$ acetate の各脂質への取り込み率 (%)

	KC	KA	NA	UE	AJC	SE	HSG	HSY
PL	48.1	75.3	75.4	82.5	75.6	57.1	43.5	47.4
FCh	40.9	16.9	19.6	11.9	19.2	23.1	18.2	10.6
FFA	2.9	10.7	4.9	4.5	5.8	3.6	9.6	6.9
TG	6.8	1.5	1.1	1.9	1.7	13.4	28.7	35.1
ChE	1.4	ND	ND	ND	ND	2.7	trace	trace

PL: phospholipid FCh: free cholesterol
 FFA: free fatty acid TG: triglyceride
 ChE: cholesterol ester

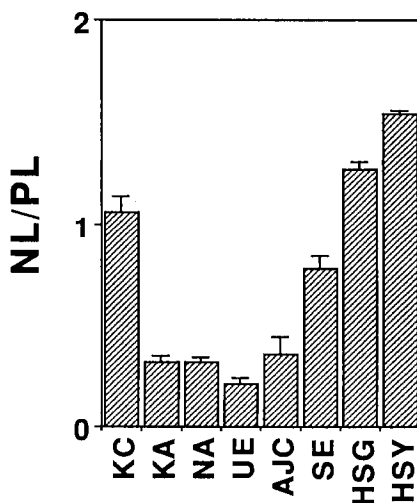


図4 各細胞の脂質合成能における NL/PL. (各値は3試料の平均値±標準偏差)

3. 口腔粘膜由来正常上皮細胞の分化に伴う脂質合成能の変化

1) 分化に伴う形態学的変化

分化を抑制した条件と分化を誘導して48時間後の口腔粘膜由来正常上皮細胞の形態学的変化を位相差顕微鏡により観察した。分化を抑制した条件では、上皮細胞は単層ではほぼ均一な多角形を呈し、明瞭な細胞間隙を認めた (図5)。一方、分化を誘導すると上皮細胞の平坦化と細胞間隙の消失さらに重層化が観察された

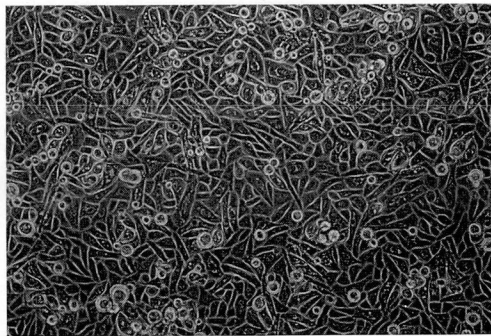


図5 口腔粘膜由来正常上皮細胞の分化抑制条件での位相差顕微鏡像。×200

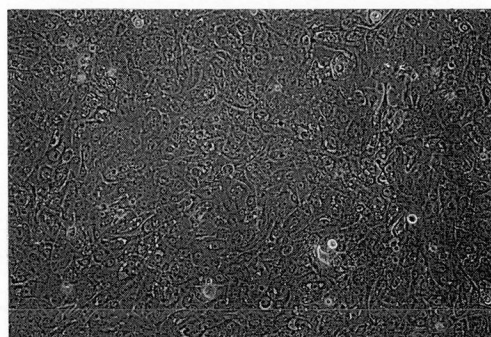


図6 口腔粘膜由来正常上皮細胞の分化誘導条件での位相差顕微鏡像。×200

(図6)。

2) 分化に伴う脂質合成能の変化

m-MCDB5F 培地で分化を抑制した条件では、PL 合成能が59.9%と最も高く、続いて FCh が17.5%、TG が16.5%であった。しかし、RD5F 培地で分化を誘導すると、24時間後には FCh 合成能が40.9%と著明に増大し、PL は48.1%、TG は6.8%までともに低下した。また、分化誘導後の48時間でも同様の変動が観察された(表6)。分化抑制条件と分化過程での NL/PL を比較すると、分化抑制条件では24時間後0.65、48時間後0.62であったが、分化過程では24時間後1.05、48時間後1.01まで上昇した(図7)。

4. EGF の細胞増殖に及ぼす影響

口腔粘膜由来正常上皮細胞の増殖は EGF により促進され、その効果は 10 pM で最大となった(図8)。一方、扁平上皮癌細胞 AJC の増殖は、1 nM 以上の EGF により著明に抑制された(図9)。唾液腺由来腺癌細胞 HSG の増殖は、EGF により濃度依存的に促進されその最大増殖促進濃度は 3 nM であった(図10)。

表6 口腔粘膜由来正常上皮細胞の分化過程での $[2-^{14}C]$ acetate の各脂質への取り込みの変化 (%)

	24h		48h	
	MCDB	RD	MCDB	RD
PL	59.9	48.1	60.6	48.9
FCh	17.5	40.9	22.6	34.4
FFA	3.4	2.9	2.6	5.3
TG	16.8	6.8	12.5	9.8
ChE	1.4	ND	0.7	ND

MCDB: Ca^{2+} , 0.03 mM RD: Ca^{2+} , 1.12 mM

PL: phospholipid FCh: free cholesterol

FFA: free fatty acid TG: triglyceride

ChE: cholesterol ester

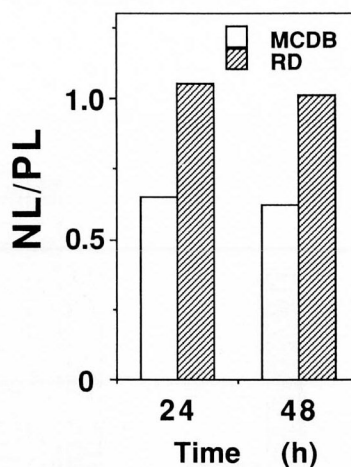


図7 口腔粘膜由来正常上皮細胞の分化誘導に伴う NL/PL の変化。

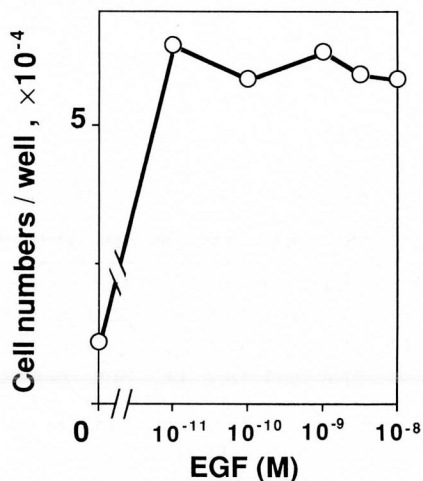


図8 口腔粘膜由来正常上皮細胞の細胞増殖に及ぼす EGF の影響。

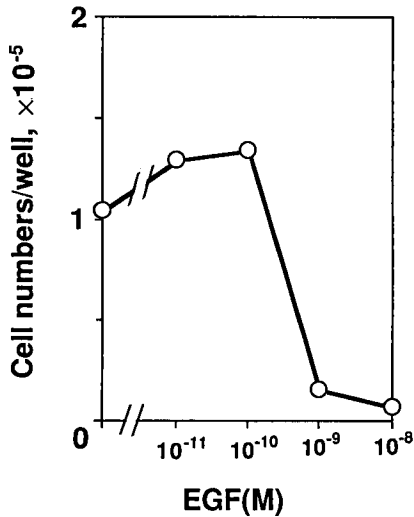


図9 扁平上皮癌細胞 AJC の細胞増殖に及ぼす EGF の影響.

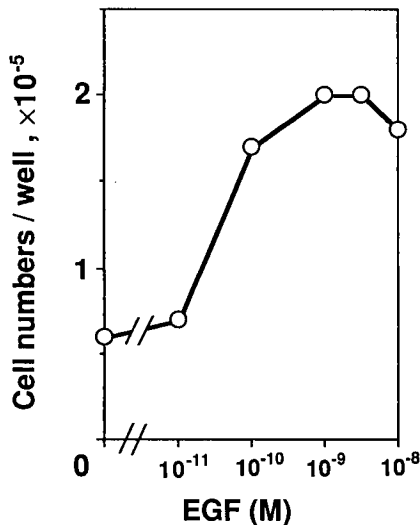


図10 唾液腺由来腺癌細胞 HSG の細胞増殖に及ぼす EGF の影響.

5. 口腔粘膜由来正常上皮細胞の脂質合成能に及ぼす EGF の影響

1) 分化抑制条件での脂質合成能に及ぼす EGF の影響

EGF 処理により, 24時間 (EGF 処理後48時間) から72時間 (同, 96時間) まで対照と比較して PL 合成能の上昇と FCh および TG の低下が観察された (表7)。また, NL/PL 値は EGF 処理により, 対照と比較して低値を示した (図11)。

表7 分化抑制条件での口腔粘膜由来正常上皮細胞における $[2-^{14}C]$ acetate の各脂質への取り込みに及ぼす EGF の影響 (%)

	24h(48h)		48h(72h)		72h(96h)	
	control	EGF	control	EGF	control	EGF
PL	67.6	73.9	68.1	75.7	69.3	75.1
FCh	21.3	17.3	20.3	16.3	19.5	17.2
FFA	4.6	3.9	5.1	3.3	3.7	3.7
TG	4.8	3.3	4.7	3.6	5.7	3.1
ChE	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.2

EGF: 10 nM MCDB: Ca^{2+} , 0.03 mM

() 内は EGF 処理後の時間を示す

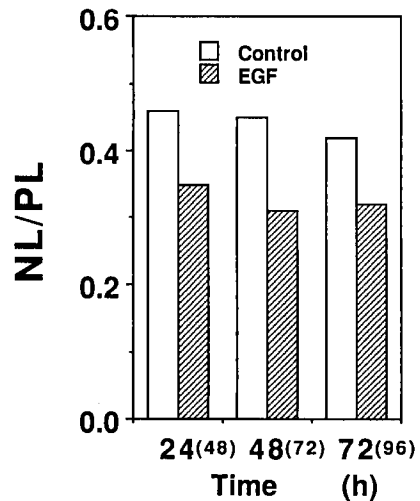


図11 分化抑制条件での口腔粘膜由来正常上皮細胞の NL/PL に及ぼす EGF の影響 () 内は EGF 処理後の時間を示す.

2) 分化過程での脂質合成能に及ぼす EGF の影響

EGF 処理により, 分化24時間 (EGF 処理後48時間) から72時間 (同, 96時間) まで対照と比較して, PL 合成能の上昇と FCh, TG の低下が観察された (表8)。また, EGF 処理により, NL/PL 値は対照と比較して低値を示した。なお, 対照群, EGF 処理群いずれの NL/PL 値もこの実験期間中経時的に上昇した (図12)。

6. 癌細胞の脂質合成能に及ぼす EGF の影響

1) 扁平上皮癌細胞 AJC の脂質合成能に及ぼす EGF の影響

EGF 処理により, 72時間まで対照と比較して PL 合成能は低下し FCh 合成能は上昇した (表9)。また, NL/PL 値は72時間まで対照と比較して持続的に

表8 分化誘導条件での口腔粘膜由来正常上皮細胞における [2-¹⁴C] acetate の各脂質への取り込みに及ぼす EGF の影響 (%)

	24 h(48 h)		48 h(72 h)		72 h(96 h)	
	control	EGF	control	EGF	control	EGF
PL	72.1	74.7	68.5	72.9	65.2	70.5
FCh	22.1	19.5	22.6	20.7	23.8	20.2
FFA	4.2	4.2	5.6	3.7	4.3	4.2
TG	1.2	1.1	2.3	1.9	5.7	5.4
ChE	0.1	0.2	0.3	0.2	0.6	0.6

EGF: 10 nM RD: Ca²⁺, 1.12 mM
() 内は EGF 処理後の時間を示す

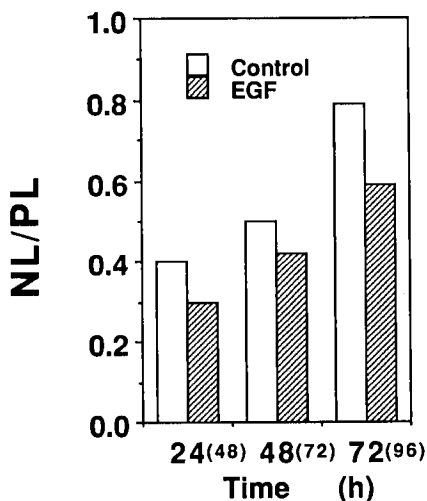


図12 分化誘導条件での口腔粘膜由来正常上皮細胞の NL/PL に及ぼす EGF の影響 () 内は EGF 処理後の時間を示す。

表9 扁平上皮癌細胞 AJC における [2-¹⁴C] acetate の各脂質への取り込みに及ぼす EGF の影響 (%)

	24 h		48 h		72 h	
	control	EGF	control	EGF	control	EGF
PL	74.1	62.1	77.7	51.6	66.8	48.6
FCh	16.4	32.3	14.1	42.9	24.6	34.6
FFA	1.8	1.6	1.5	1.4	1.7	3.7
TG	4.9	2.1	4.2	1.7	3.9	4.6
ChE	1.7	0.8	1.5	0.4	1.4	2.2

EGF: 10 nM

上昇し、EGF の作用は不可逆的であった (図13)。

2) 唾液腺由来腺癌細胞 HSG の脂質合成能に及ぼす EGF の影響

EGF 処理により、対照と比較して PL 合成能は24時間、48時間では低下したが72時間では対照値に回復した。FCh, TG 合成能は24時間、48時間では上昇したが72時間では対照のレベルまで低下した (表10)。また、EGF 処理により NL/PL 値は48時間まで上昇したが、72時間後には対照レベルに低下し、EGF の作用は一過性であった (図14)。

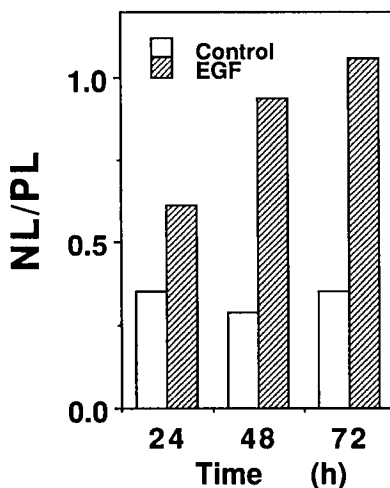


図13 扁平上皮癌細胞 AJC の NL/PL に及ぼす EGF の影響。

表10 唾液腺由来腺癌細胞 HSG における [2-¹⁴C] acetate の各脂質への取り込みに及ぼす EGF の影響 (%)

	24 h		48 h		72 h	
	control	EGF	control	EGF	control	EGF
PL	57.9	44.7	36.9	11.2	24.5	30.7
FCh	15.5	25.1	20.9	24.7	19.8	13.4
FFA	7.5	6.7	7.9	7.4	7.9	5.7
TG	13.2	17.2	26.2	43.2	36.6	38.7
ChE	4.4	4.8	8.9	12.1	11.1	10.4

EGF: 10 nM

考 察

細胞の増殖、分化や癌化と脂質合成能の関係を明らかにする目的で、脂質をまったく含まない無血清培地を用いて、正常上皮細胞の分化に伴う脂質合成能の変化およびそれより由来した癌細胞の脂質組成、脂質合

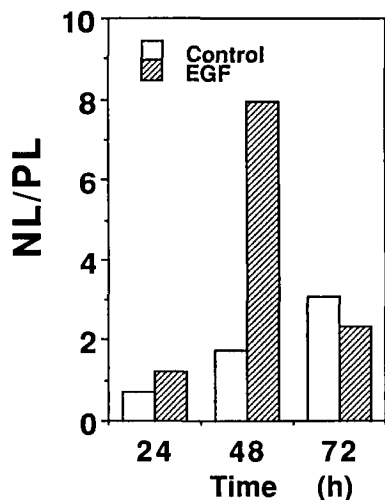


図14 唾液腺由来腺癌細胞 HSG の NL/PL に及ぼす EGF の影響。

成能を検討した。

従来、培養表皮 keratinocyte の分化の指標としては、ケラチン³¹⁾、インボルクリン³²⁾等のタンパク質マーカーが主に用いられてきた。一方、上皮細胞の分化と脂質組成、脂質合成能に関する研究も散見され、Lampe ら³³⁾はヒト表皮の脂質を定量し、基底層、顆粒層、角化層となるに従って、PL 量は減少し NL 量が增大することをまた、Williams ら³⁴⁾は培養ヒト表皮由来 keratinocyte においては、長期培養に伴う分化とともに ceramide, cholesterol sulfate や NL が增大することを報告している。Hennings ら³⁵⁾は、*in vitro* におけるマウス表皮由来 keratinocyte の増殖と分化が培地中のカルシウム濃度により制御可能であることを、Peehl と Ham ら³⁶⁾はヒト表皮由来 keratinocyte が低カルシウムの無血清培地を用いて培養可能であることを報告した。Hennings らの培養系を用いて Okamoto ら²⁵⁾は、マウス表皮由来 keratinocyte の分化に伴い cholesterol の中間代謝産物である lathosterol が蓄積することを明らかにしている。また、Ponec ら^{6,8)}も同様の培養系を用いて、ヒト表皮由来 keratinocyte の分化に伴い脂質組成、脂質合成能いずれにおいても PL に対する NL の比率が上昇することを報告している。これらの報告は上皮細胞の分化と脂質合成能が密接に関係していることを示唆している。しかし、これらの報告は10%牛胎児血清を含む培地を用いて行われた結果であり、細胞がもつ本来の脂質合成能を反映していないと考える。そこで本研究では、脂質をまったく含まない無血清培地²²⁾を用いて口腔粘膜由来正常上皮細胞を培養しカルシウムにより誘導さ

れた同細胞の分化に伴う脂質合成能の変動を検討した。その結果、同細胞の分化に伴い PL 合成能の低下と FCh 合成能の上昇を認め、NL/PL 値は分化に伴い上昇した。したがって、同値は口腔粘膜由来上皮細胞の分化の指標となりうることが示唆された。ヒト口腔粘膜由来正常上皮細胞を m-MCDB153 から RD5F に培地交換し培養すると細胞の平坦化、細胞間隙の消失、重層化が起こった。また、RD5F 培地で同細胞を長期間にわたり培養した結果、約10層程度まで重層化した (Y. Myoken, et al submitted)。したがって、今回用いた培養系で上皮細胞は *in vivo* に類似した分化が誘導されていると考えられた。Ponec ら⁶⁾は表皮由来 keratinocyte においては PL の合成能が最も高く、FCh は全脂質合成能の23%以下であると報告しているが、本研究の結果では40.9%と高い FCh 合成能を認めた。これは Ponec らの実験系では、血清中の cholesterol が cholesterol 合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素³⁷⁾の活性を抑制したためであると考えられる。口腔粘膜由来上皮細胞の分化は複雑な生化学的反応がプログラムにそって規則正しく営まれた結果であり、蛋白合成、脂質合成、糖質合成が相互に綿密に調整されていなければならない。今回観察された口腔粘膜由来上皮細胞の脂質代謝の変動はこの分化プログラムの進行に関連したものである。

一方、口腔由来扁平上皮癌細胞、唾液腺由来腺癌細胞の全細胞画分および膜画分の脂質組成を分析した結果、扁平上皮癌細胞では PL が全脂質の74~85%と大部分を占め、NL/PL 値は0.3~0.4と低値を示した。唾液腺由来腺癌細胞では TG と FCh 等の NL が全脂質の50%~60%を占め、NL/PL 値は1.1~1.3と高値を示し、両細胞間で脂質組成に大きな差を認めた。さらにこれら癌細胞の脂質合成能は、前述した全脂質画分の脂質組成とほぼ同様であった。したがって両細胞間で脂質合成能にも大きな差があることが明らかとなった。先に述べたように口腔粘膜由来上皮細胞や唾液腺由来上皮細胞の NL/PL 値は0.8~1.1であったことから、重層扁平上皮組織では癌化に伴い NL/PL 値は減少を、唾液腺組織では癌化に伴い同値は上昇することが明らかとなった。このように両組織における癌化は脂質組成ならびに脂質合成能を指標とすると質的に大きく異なっていた。本研究で用いた唾液腺由来正常上皮細胞は免疫組織化学的検討の結果、アミラーゼ, secretory component, ラクトフェリン等の分泌蛋白陽性であること³⁸⁾、さらに唾液腺由来腺癌細胞においてもアミラーゼ陽性であること^{15,16)}が明らかとなっている。唾液腺細胞における脂質合成能に関しては他に報告がないので断定できないが、唾液腺細胞に

おける高い NL/PL はこの組織の特徴である外分泌機能に関係しているかもしれない。

動物細胞の細胞膜を構成する PL は、主に PC, PS, PI, PE, SM の 5 種類である³⁹⁾。本研究で用いた培養細胞において、合成された PL の大部分は PC で続いて PE であり、正常細胞と癌細胞間で、あるいは扁平上皮癌細胞と唾液腺由来腺癌細胞間でその比率に差がなかった。

細胞膜の流動性は、一般に FCh や PL の含量、また PL の構成成分である飽和型 fatty acid と不飽和型 fatty acid の占める比率によって影響される⁴⁰⁻⁴²⁾。特に、PL に対する FCh の比率 (FCh/PL) が上昇すると膜の流動性は低下する⁴¹⁾。本研究の結果では、扁平上皮癌細胞の FCh/PL は正常上皮細胞と比較して低下していたことから、癌化に伴い膜の流動性が上昇していることが示された。また、膜の流動性の変化に伴い膜の透過性も変化すること^{43,44)}が報告されている。虎谷^{45,46)}、古江⁴⁷⁾らは、著者が用いた扁平上皮癌細胞と唾液腺由来腺癌細胞の間で、疎水性の異なる種々の抗癌剤に対する感受性に差があること、さらに、その差は細胞内への薬剤の受動輸送による取り込み能の相違を反映していることを報告した。本研究で示した膜画分の脂質組成の差は、これら薬剤の透過性の相違を説明するものである。また、ミトコンドリア画分の脂質組成が正常細胞と癌細胞間で大きく異なっていたことから、ミトコンドリアの膜の性状が癌化によって変化していることが示唆された。Horikoshi⁴⁸⁾も、ミトコンドリアを特異的に染色するローダミン 6G およびローダミン 123 を用いてマウス胎児細胞のミトコンドリアの形態を観察した結果、化学発癌剤により悪性転換した細胞は、ミトコンドリアの膜の性状が正常細胞と明らかに異なっていることを報告している。

細胞増殖因子は、正常細胞や形質転換細胞の増殖や分化を制御する働きをしている^{4,5)}。口腔粘膜由来正常上皮細胞では、分化抑制条件および、分化誘導条件のいずれにおいても、EGF は増殖を促進するとともに NL/PL 値を低下させた。また、扁平上皮癌細胞と唾液腺由来腺癌細胞に対しても EGF は NL/PL を上昇させた。しかし、EGF の作用は質的には大きく異なり、唾液腺由来腺癌細胞に対しては増殖を促進し PL の低下と FCh, TG, ChE の一過性の上昇を示したが、扁平上皮癌細胞に対しては増殖を抑制し PL の低下と FCh のみの持続的上昇を示し、正常上皮細胞の分化誘導時の脂質合成能の変化と同様の変化を引き起こした。

近年、ras proto-oncogene の産物である p 21^{ras} 蛋

白⁴⁹⁾は細胞の増殖、分化、悪性転換に関与していることが示唆されている。また、p 21^{ras} 蛋白⁴⁹⁾はファルネシル化、c 末端アミノ酸の除去、c 末端カルボキシル基のメチル化、パルミチン酸の付加という 4 種類の反応からなる翻訳後修飾⁵⁰⁻⁵²⁾を受けることが判明している。特に、ファルネシル化は、ras 産物の膜移行と活性化に必須である。ras 産物に付加するファルネシル基はメバロン酸代謝経路の中間体であるファルネシロピロリン酸に由来する。Schafer^ら⁵²⁾は、cholesterol 合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素³⁷⁾の阻害剤により ras 蛋白のファルネシル化も阻害されることを見いだしている。したがって、重層扁平上皮組織の分化に伴う FCh 合成能の上昇は ras 蛋白の活性化に関連しているかもしれない。今後、重層扁平上皮組織の分化と HMG-CoA 還元酵素ならびにファルネシル プロテイン トランスフェラーゼ⁵⁰⁻⁵²⁾の活性や発現等を検討する必要がある。

以上、無血清培養系を用い、正常上皮細胞および癌細胞の脂質組成、脂質合成能を検討し、それらが細胞の分化や癌化と密接な関係にあることが示唆された。また、重層扁平上皮組織の分化の指標として NL/PL が有用であること、さらに、正常および癌細胞の脂質代謝に対して細胞増殖因子が強力な作用を有することが示唆された。

総 括

無血清培養下で、正常および口腔癌細胞の脂質組成および脂質合成能を比較した。また、脂質合成に及ぼす EGF の影響を検討し以下の結果を得た。

1. 扁平上皮癌細胞では全脂質の70%以上が PL であった。一方、口腔粘膜由来正常上皮細胞、唾液腺由来正常上皮細胞および唾液腺由来腺癌細胞では、FCh と TG 等の NL が50%以上を占めた。また、各細胞の膜画分の脂質組成は全細胞画分の組成と類似していた。
2. 扁平上皮癌細胞においては、合成された脂質の75%以上は PL であった。一方、唾液腺由来腺癌細胞では、合成された脂質の50%以上は TG を中心とした NL であり、扁平上皮癌細胞と唾液腺由来腺癌細胞の脂質合成能は相違していた。
3. 本研究に用いたほとんどの培養細胞において、合成された PL のうち PC の合成が最も高く、つづいて PE であった。各細胞間で、合成された各種 PL の全 PL 合成に対する比には差がなかった。
4. 低濃度のカルシウム (0.03 mM) を含む培地で口腔粘膜由来正常上皮細胞の分化を抑制した条件では、合成された脂質の59%以上は PL であった。一

方、通常濃度のカルシウム (1.12 mM) を含む培地で同細胞の分化を誘導した条件では、FCh 合成能が上昇し、PL と TG は低下した。したがって、PL 合成能に対する NL 合成能の比率 (NL/PL) は、口腔粘膜由来正常上皮細胞の分化に伴い上昇した。

5. EGF は口腔粘膜由来正常上皮細胞の増殖を促進した。EGF 処理により同細胞の PL 合成能は上昇し、FCh 合成能は低下した。

6. EGF は扁平上皮癌細胞の増殖を抑制した。EGF 処理により同細胞の PL 合成能は低下し、FCh 合成能は上昇した。

7. EGF は唾液腺由来腺癌細胞の増殖を促進した。EGF 処理により同細胞の PL 合成能は低下し、FCh と TG の合成能は一過性に上昇した。

以上の結果は、口腔粘膜由来上皮細胞および唾液腺由来上皮細胞の脂質合成能が細胞分化および癌化にともない著明に変動することを示している。

謝 辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った広島大学歯学部口腔外科学第一講座高田和彰教授に深厚なる謝意を表します。また、御助言、御校閲をいただいた本学歯科薬理学講座、土肥敏博教授ならびに本学口腔生化学講座、加藤幸夫教授に心から御礼申し上げます。

なお、本研究を進めるに際し、多大の御高配、御指導を賜りました本学口腔外科学第一講座、岡本哲治講師に深謝致します。

最後に御協力いただきました本学口腔外科学第一講座医局員の皆様に感謝致します。

引 用 文 献

- 1) 箱守仙一郎：癌細胞膜。代謝 17, 1403-1416, 1980.
- 2) 小島清秀：癌一細胞膜をめぐる一。現代医学 30, 45-53, 1982.
- 3) Shinitzky, M. and Henkart, P.: Fluidity of cell membranes—current concepts and trends. *Int. Rev. Cytol.* 60: 121-147, 1971.
- 4) Deul, T.F.: Polypeptide growth factors: Roles in normal and abnormal growth. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 443-492, 1987.
- 5) Chao, M.V.: Growth factor signaling; Where is the specificity? *Cell* 68, 955-997, 1992.
- 6) Ponec, M., Kempenaar, J., and Boonstra, J.: Regulation of lipid synthesis in relation to keratinocyte differentiation capacity. *Biochim. Biophys. Acta.* 921, 512-521, 1987.
- 7) Williams, M.L., Rutherford, S., Ponec, M., Hin-

cenbergs, M., Placecek, D.R. and Elias, P.M.: Density-dependent variations in the lipid content and metabolism of cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 91, 86-91, 1988.

- 8) Ponec, M., Weerheim, A., Kempenaar, J., Elias, P.M. and Williams, M.L.: Differentiation of cultured human keratinocytes: Effect of culture conditions on lipid composition of normal vs. malignant cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25, 689-696, 1989.
- 9) Spector, A.A., Mathur, S.N., Kaduce, T.L. and Hyman, B.T.: Lipid nutrition and metabolism of cultured mammalian cells. *Prog. Lipid Res.* 19, 155-186, 1981.
- 10) Barnes, D. and Sato, G.: Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 22, 649-655, 1980.
- 11) Barnes, D. and Sato, G.: Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.* 102, 255-270, 1980.
- 12) Wu, D., Kan, M., Sato, G., Okamoto, T. and Sato, D.: Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. *J. Biol. Chem.* 266, 16778-16785, 1991.
- 13) Miyauchi, S., Moroyama, T., Kyoizumi, S., Asakawa, J., Okamoto, T. and Takada, K.: Malignant tumor cell lines produce interleukin-1-like factor. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24, 753-758, 1988.
- 14) 宮内 忍, 諸山隆正, 阪本知二, 岡本哲治, 高田和彰: ヒト口腔癌由来細胞株 (Ueda-1) の樹立。日口外誌 31, 1347-1351, 1985.
- 15) 宮内 忍, 諸山隆正, 高田和彰: 頬粘膜扁平上皮癌由来細胞株によるインターロイキン-1様物質の産生。日口外誌 34, 7-14, 1988.
- 16) Fabricant, R.N., De Larco, J.E. and Todaro, G.: Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 565-569, 1977.
- 17) Myoken, Y., Kayada, Y., Okamoto, T., Kan, M., Sato, G.H., and Sato, J.D.: Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5819-5823, 1991.
- 18) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 48, 745-752, 1981.
- 19) Yanagawa, T., Hayashi, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yura, Y., and Sato, M.: Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonal cells grown in athymic nude mice. *Virchows Arch [B]* 51, 187-195, 1986.

- 20) Sato, J.D., Kawamoto, T. and Okamoto, T.: Cholesterol requirement of P 3-X 63-Ag 8 and X 63-Ag 8.653 mouse myeloma cells for growth *in vitro*. *J. Exp. Med.* **165**, 1761-1766, 1987.
- 21) Tsao, M.C., Walthall, B.J., and Ham, R.G.: Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. Cell. Physiol.* **110**, 219-229, 1982.
- 22) Myoken, Y., Okamoto, T., Osaki, T., Yabumoto, M., Sato, G.H., Takada, K., and Sato, J.D.: An alternative method for the isolation of NS-1 hybridomas using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse myeloma cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **25**, 477-480, 1989.
- 23) Crabb, J.W., Armes, L.G., Johnson, C.M., and Mckeehan, W.L.: Characterization of multiple forms of prostatropin from bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 1155-1161, 1986.
- 24) Kitano, Y. and Hara, S.: The human epidermal cells infected with herpes simplex virus *in vitro*. *Arch. Derm. Forsch.* **245**, 203-210, 1972.
- 25) Okamoto, T., Moroyama, T., Morita, T., Yoshiga, K., Takada, K. and Okuda, K.: Differentiation of cultured epidermal keratinocytes related to sterol metabolism and its retardation by chemical carcinogens. *Biochim. Biophys. Acta.* **805**, 143-151, 1984.
- 26) 尾崎輝彦, 岡本哲治, 藪本正文, 明見能成, 高田和彰: 口腔由来正常上皮細胞及び口腔癌細胞の無血清培養下での増殖に及ぼす EGF, FGF の影響ならびにこれら細胞における受容体解析. *日口外誌* **37**, 1454-1465, 1991.
- 27) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254, 1976.
- 28) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917, 1959.
- 29) Murray, R.K., Granner, D.K., Mayer, P.A. and Rodwell, V.W.: Harper's biochemistry. 21 st Ed., Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut / San Mateo, California, 1988. p 130
- 30) Anders, P. and Armand, G.: Solvents for thin layer chromatography of blood serum lipids. *Nature* **212**, 402-403, 1966.
- 31) Fuchs, E. and Green, H.: Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* **25**, 617-625, 1981.
- 32) Watt, F.M. and Green, H.: Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature* **295**, 434-436, 1982.
- 33) Lampe, M.A., Williams, M.L. and Elias, P.M.: Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J. Lipid Res.* **24**, 131-141, 1983.
- 34) Williams, M.L., Brown, B.E., Monger, D.J., Grayson, S. and Elias, P.M.: Lipid content and metabolism of human keratinocyte cultures grown at the air-medium interface. *J. Cell. Physiol.* **136**, 103-110, 1988.
- 35) Hennings, H., Michael, P., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K. and Yuspa, S.H.: Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**, 245-254, 1980.
- 36) Peehl, D.M. and Ham, R.G.: Clonal growth of human keratinocyte with small amounts of dialyzed serum. *In Vitro* **16**, 526-540, 1980.
- 37) Goldstein, J.L. and Brown, M.S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 897-930, 1977.
- 38) 藪本正文, 岡本哲治, 尾崎輝彦, 明見能成, 高田和彰: 正常マウス顎下腺上皮細胞の無血清培養下における株化. *日口外誌* **36**, 791-801, 1990.
- 39) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.: Molecular biology of the cell. 2nd Ed., Garland Publishing Inc. New York & London, 1989. p 280.
- 40) Tanigawa, T., Mimata, H., Takeshita, M. and Ogata, J.: Membrane fluidity and composition of rat testicles in experimental cryptorchidism. *Urol. Int.* **45**, 302-309, 1990.
- 41) Schwartz, S.M., Lambert, S.L. and Medow, M.S.: Ontogeny of proximal colon basolateral membrane lipid composition and fluidity in the rabbit. *Biochim. Biophys. Acta.* **1107**, 70-76, 1992.
- 42) Shinitzky, M.: Membrane fluidity in malignancy: adversative and recuperative. *Biochim. Biophys. Acta.* **738**, 251-261, 1984.
- 43) Bialecki, R.A. and Tulenko, T.N.: Excess membrane cholesterol alters calcium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **257**, C306-C314, 1989.
- 44) Gleason, M.M., Meadow, M.S. and Tulenko, T.N.: Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells. *Circulation Res.* **69**, 216-227, 1991.
- 45) 虎谷茂昭: 新しい光感受性色素 (フェオフォバイドーa) を用いた光力学療法の基礎的研究. *日口外誌* **38**, 1-10, 1992.
- 46) 虎谷茂昭, 岡本哲治, 新木恒猪, 高田和彰: 新しい光感受性色素 (フェオフォバイドーa) を用いた口腔癌細胞に対する光力学療法の基礎的研究. *日口外誌* **38**, 729-736, 1992.
- 47) 古江美保: 腫瘍細胞におけるシスプラチン耐性の温熱による克服. *日口外誌* **37**, 1217-1233,

- 1991.
- 48) Horikoshi, T., Yoshioka, T., Kubota, Y. and Yanagisawa, K.: Fluorescent dye monitoring of mitochondrial changes associated with malignant cell transformation. *Cell Struct. Funct.* 12, 525-537, 1987.
- 49) Barbacid, M.: ras Genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 779-827, 1987.
- 50) Casey, P.J., Soliski, P.A., Der, C.J. and Buss, J.E.: p 21^{ras} is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8323-8327, 1989.
- 51) Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E. and Marshall, C.J.: All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57, 1167-1177, 1989.
- 52) Schafer, W.R., Kim, R., Sterne R., Thorner, J., Kim, S.H. and Rine, J.: Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in RAS genes of RNA genes of yeast and humans. *Science* 245, 379-385, 1989.