

蛍光 pH 指示薬を用いたフローサイトメトリーによる細胞内 pH の測定と 温熱およびアミロライド誘導体の細胞内 pH への影響

浅海淳一¹⁾ 川崎祥二 黒田昌宏¹⁾ 竹田芳弘¹⁾ 平木祥夫¹⁾

要 約

エールリッヒ腹水癌細胞とそのアドリアマイシン耐性細胞において蛍光 pH 指示薬 2', 7'-bis-(2-carboxyethyl) carboxyfluorescein] (BCECF) の蛍光量をフローサイトメトリーで測定することによって細胞内 pH の検量曲線を作成することができた。このことより、これらの細胞において BCECF の蛍光量で細胞内 pH の変化を簡易に比較できることを示唆した。

さらに、温熱、 Na^+/H^+ exchanger の阻害剤であるアミロライド [3, 5-diamino-6-chloro-N-(diaminomethylene) pyrazinecarboxamide], およびアミロライド誘導体 MH-12-43 [N-amidino-3-amino-6-chloro-5-(N-ethylisopropylamino) pyrazinecarboxamide] の細胞内 pH への影響をエールリッヒ腹水癌細胞で観察した。37°C では、0.5mM アミロライド、0.05mM MH-12-43により細胞内 pH は減少し、42°C 処理によりさらに減少した。42°C において、0.05mM MH-12-43による細胞内 pH の減少は、0.5mM アミロライドによる減少より大きかった。

キーワード: BCECF, 細胞内 pH, フローサイトメトリー, アミロライド, MH-12-43

緒 言

細胞内 pH は細胞の種々の反応あるいは活性化などに影響を与えている。アドリアマイシン (ADR) の細胞内蓄積量も pH6.2から pH7.6の範囲で細胞外 pH の増加にしたがって増加する¹⁾ことから、その例外ではないと考えられる。したがって、細胞内 pH の変化を知ることは ADR の細胞内蓄積量への影響を考える上でも重要なことと思われる。近年、蛍光 pH 指示薬 BCECF [2', 7'-bis-(2-carboxyethyl) carboxyfluorescein] を用いて個々の細胞の蛍光量をフローサイトメトリーによって測定することによって細胞内 pH が測定できることが示されている²⁻⁴⁾。

今回、著者らはエールリッヒ腹水癌細胞およびその ADR 耐性細胞において BCECF の蛍光量をフローサイトメトリーで測定することによって

pH の検量曲線を作成することを試みた。一方、3, 5-diamino-6-chloro-N-(diaminomethylene) pyrazinecarboxamide (アミロライド) は Na^+/H^+ exchanger を阻害剤^{5,6)}、細胞内 pH を下げる。また、N-amidino-3-amino-6-chloro-5-(N-ethylisopropylamino)-pyrazinecarboxamide (MH-12-43) はその誘導体である。今回、エールリッヒ腹水癌細胞において温熱およびアミロライド、MH-12-43を作用させた時の細胞内 pH をその検量曲線から求めた。

材 料 と 方 法

1. 細胞および培養

実験にはエールリッヒ腹水癌細胞および当教室で樹立したその ADR 耐性細胞を使用した。継代培養は以前に報告したと同様に行った⁷⁾。

2. 薬剤

今回の実験には、BCECFのtetraacetoxyl ester (BCECF-AM)をDimethyl sulfoxide (DMSO) solutionで溶解した製剤(Dojin, Kumamoto)をDMSOで $10\mu\text{M}$ に調整して冷凍保存し、実験のつど解凍してただちに使用した。BCECFの使用はyellow light下で行った。アミロライド(Sigma Chemical Co.)およびMH-12-43(大塚製薬)は蒸留水で 20mM 濃度になるように溶解した。これらの濃度は実験時にDulbecco's modified Eagle medium (DMEM)でそれぞれの濃度に調節した。

3. 細胞内BCECF量の測定

蛍光pH指示薬BCECFは 488nm で励起すると 515nm をピークとする曲線を描く(図1)。

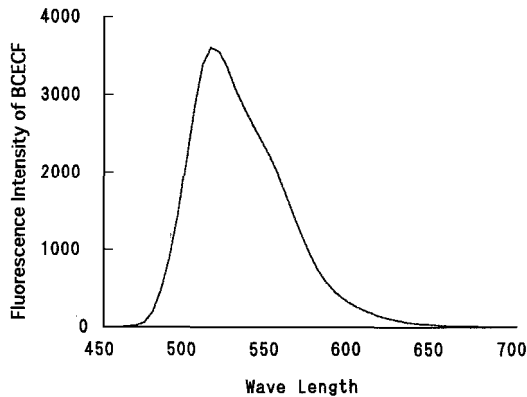


図1 BCECF [2', 7'-bis-(2-carboxyethyl) carboxy-fluorescein]の蛍光曲線 励起光 488nm

それゆえ、BCECFの細胞内蛍光量は、フローサイトメトリーを用いて測定できる。今回の実験には、フローサイトメトリーはEPICS PROFILE IIを用い、 488nm で励起し、 $525\text{--}575\text{nm}$ の蛍光量を $20,000$ 個の細胞で測定した。そして、得られたヒストグラムから細胞1個あたりの平均細胞内蛍光量を求め、この値からコントロールの平均蛍光量を差し引いた量を平均細胞内BCECF量とした。

4. nigericin/ K^+ 法による calibration

細胞内BCECFの蛍光量と細胞内pH値との関係を示す検量曲線はThomas⁹⁾らによるniger-

icin/ K^+ 法によって決定した。すなわち、まず初めに K^+A 液(141mM KCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM glucose, 20mM Tris)と K^+B 液(141mM KCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM glucose, 20mM 2-[N-morpholino ethane-sulfonic acid])を混合することによって、それぞれpHが 6.2 , 6.4 , 6.6 , 6.8 , 7.0 , 7.2 , 7.4 , 7.6 のpH calibration solutionを準備した³⁾。次に、DMEMに浮遊させた細胞をmediumのBCECF濃度を親株は $0.1\mu\text{M}$ 、ADR耐性細胞は $1\mu\text{M}$ に調整し、 37°C で15分間incubationした。これらの浮遊細胞を遠心しDMEMで3回洗浄した後、それぞれのpH calibration solutionに浮遊させ、 $10\mu\text{g/ml}$ のnigericinを加えた。さらに、室温で5分間放置した後、遠心し、 $40\text{-}\mu\text{m}$ のナイロンメッシュでろ過し、直ちにフローサイトメトリーで測定した。

5. 温熱およびアミロライド、MH-12-43の細胞内pHに対する影響

まず初めに、 1N 塩酸でpH 7.3 に調節したtest tube内のDMEMに浮遊させたエールリッヒの腹水癌細胞に 0.5mM のアミロライドあるいは 0.05mM のMH-12-43を加え栓をした後、 37°C および 42°C に調節された恒温層に直接浸けた。60分後、test tubeを恒温層より取り出し、細胞をDMEMで2回洗浄し、再びpH 7.3 に調節したDMEMに浮遊させBCECF-AMを 37°C で15分間負荷させた。DMEMで3回洗浄しフローサイトメトリーで蛍光量を測定し、検量曲線よりpH値を求めた。

結 果

1. エールリッヒ腹水癌細胞およびアドリアマイシン耐性細胞における細胞内pHとBCECF細胞内蛍光量の関係

エールリッヒ腹水癌細胞では $0.1\mu\text{M}$ 、ADR耐性細胞では $1\mu\text{M}$ のBCECF-AMを負荷することによってフローサイトメトリーの設定条件がほぼ同条件でほぼ同様の検量曲線を得ることができた(図2)。

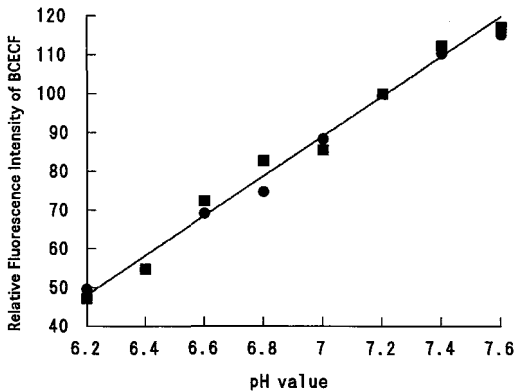


図2 BCECFの蛍光量と細胞内pHとの関係
 エールリッヒ腹水癌細胞 (●)
 アドリアマイシン耐性細胞 (■)

2. エールリッヒ腹水癌細胞における細胞内pHに対する温熱およびアミロライド, MH-12-43の影響

細胞内pHは37°Cにおいて, 0.5mMアミロライド, 0.05mM MH-12-43を加えることによって低下した。また, 42°Cの温熱によっても低下し, 温熱, アミロライド誘導体を併用することによってさらに低下した(表1)。

表1 エールリッヒ腹水癌細胞における細胞内pH変化に対する温熱およびアミロライド誘導体の効果

Treatment	1hr incubation at 37°C	1hr heating at 42°C
without drugs	7.24±0.07	7.08±0.10
0.5mM amiloride	6.85±0.004	6.67±0.07
0.05mM MH-12-43	6.88±0.03	6.53±0.03

考 察

ADRは, その細胞内濃度が, その抗腫瘍効果に大きな影響を与える要因の一つであると考えられる⁹⁾。ADRの細胞内への流入と細胞からの排泄にはさまざまな要因が影響している。著者らも, その中で細胞外pHおよびNa⁺/H⁺の交換を阻害するアミロライドがADRの細胞内流入に影響していることを報告し, H⁺の細胞からの排泄あるいはNa⁺/H⁺exchangerの活性が関係していることを示唆した¹⁾。これらのことは, 細胞内のpH変

動がADRの細胞内への流入量の増減の要因の一つとなり得ることを示唆している。今回, 著者らはエールリッヒ腹水癌細胞とそのADR耐性細胞においてBCECFの蛍光量をフローサイトメトリーで測定することによってpHの検量曲線を作成することができた。このことは, これらの細胞においてBCECFの蛍光量で細胞内pHの変化を比較できることを示している。したがって, ADRの細胞内蓄積量が変化し, それが排泄によるものでない場合にADRの流入量の中のpH変化によるものかどうかを知る手だてとなりうると考えられる。ADR耐性細胞で同程度の細胞内蛍光量を得るために親株よりも10倍高濃度のBCECFを必要とした。これはADR耐性細胞で発現されるP-glycoproteinによる選択性の低さによって, ADRと同様にBCECFが排泄されたためと考えられた。しかしながら, BCECF濃度を10倍にすることによって細胞内の蛍光量のほぼ同量にでき, 同様の検量曲線を得られたことは, 細胞によってBCECF濃度を変えることによって, 種類の異なる細胞でBCECFによる細胞内pHの測定が可能であることを示している。

一方, エールリッヒ腹水癌細胞において温熱およびアミロライドとMH-12-43の細胞内pHに対する影響を観察したところ, 細胞内pHは42°C温熱により低下し, 0.5mMアミロライド, 0.05mM MH-12-43により低下した。また, 両者を併用することによってさらに低下した(表1)。これらのpH変化は同処理を行った時の同細胞の生存率変化の結果とよく一致しており⁸⁾, 温熱およびアミロライド誘導体が及ぼす生存率低下の原因のひとつが細胞内pHの低下であることを示唆していた。

文 献

- 1) Asami J, Kawasaki S, Nishikawa K, Kuroda M and Hiraki Y: Influence of the extracellular pH, an inhibitor of Na⁺/H⁺ exchanger and an inhibitor of Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger on adriamycin accumulation. *Anticancer Res* 15: 71-75, 1995.
- 2) 米山彰子, 中原一彦: フローサイトメトリーによる細胞内pHの測定. *Med Immunol* 18: 813-817, 1989.

- 3) 田坂哲哉, 三尾康子, 松島早月, 松崎 潤, 池田忠子, 渡辺 卓, 米山彰子, 中原一彦: 白血球細胞内pH (pHi) の各分画同時測定法. *Cytometry Res* 1: 136-141, 1991.
- 4) 永田憲司, 赤木 清, 宇田光伸, 今村正浩, 板垣 康, 大嶋太一, 北田憲彦, 田中敬正: 蛍光 pH 指示薬を用いた細胞内 pH 測定と温熱による細胞内 pH へ影響. *Cytometry Res* 2: 12-17, 1992.
- 5) Mahnensmith RL and Aronson PS: The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological processes. *Circ Res* 56: 773-788, 1985.
- 6) Rotin D, Wan P, Grinstein S and Tannock I: Cytotoxicity of compounds that interfere with the regulation of intracellular pH: A potential new class of anticancer drugs. *Cancer Res* 47: 1497-1504, 1987.
- 7) Asaumi J, Kawasaki S, Nishikawa K, Kuroda M and Hiraki Y: Effects of hyperthermia and cepharanthine on adriamycin accumulation with changes extracellular pH *Int J. Hyperthermia* 11: 27-35, 1995.
- 8) Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A and Rackner E: Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated *in situ*. *Biochemistry* 18: 2210-2218, 1979.
- 9) Gao XS, Asaumi J, Kawasaki S, Nishikawa K, Kuroda M, Li M, Takeda Y, Hiraki Y, Ihara M and Ohnishi T: Effect of cepharanthin and hyperthermia on the intracellular accumulation of adriamycin in the 3T3 cell lines transfected with oncogenes accompanied by pSV2neo vector. *Anticancer Res* (in press)
- 10) Asaumi J, Kawasaki S, Nishikawa K, Kuroda M, Hiraki Y: Effects of amiloride derivatives on the thermosensitivity of an adriamycin-resistant strain of Ehrlich ascites tumor cells. *Anticancer Res* 14: 805-808, 1994.

Measurement of intracellular pH by flow cytometry using pH sensitive fluorescence dye, and influence of hyperthermia and amiloride derivatives on the intracellular pH

Jun-ichi ASAUMI¹⁾, Shoji KAWASAKI²⁾, Masahiro KURODA¹⁾, Yoshihiro TAKEDA¹⁾
and Yoshio HIRAKI¹⁾

Abstract

We examined relationship between intensity of intracellular fluorescence of [2', 7'-bis-(2-carboxyethyl) carboxyfluorescein] (BCECF) and intracellular pH in Ehrlich ascites tumor cells and their adriamycin-resistant strain, and found a good correlation between them at both strains. This suggests that changes in the intracellular pH on these strains may be obtained through measurement of intracellular fluorescence of BCECF by flow cytometry.

Further, we examined influence of hyperthermia, 3, 5-diamino-6-chloro-N-(diaminomethylene) pyrazinecarboxamide (amiloride), an inhibitor of Na⁺/H⁺ exchanger, and its derivative; N-amidino-3-amino-6-chloro-5-(N-ethylisopropylamino) pyrazinecarboxamide (MH-12-43) on the intracellular pH in Ehrlich ascites tumor cells. The treatment of 0.5mM amiloride or 0.05mM MH-12-43 reduced intracellular pH at 37°C, while the more reduction was observed by the treatment at 42°C. The reduction of intracellular pH by 0.05mM MH-12-43 was more substantial than that of 0.5mM amiloride at 42°C.

Key words : BCECF, Intracellular pH, Flow Cytometry, Amiloride, MH-12-43

1) Department of Radiology, Okayama University Medical School

2) School of Health Sciences, Okayama University