

抗癌剤投与による肝細胞障害に対する Coenzyme Q₁₀ 併用に関する実験的研究

山田 真一・北出 文男¹⁾・岡田 勝彦
 革島 康雄・加藤 佳典・岡島 邦雄²⁾

大阪医科大学一般・消化器外科

藤 本 守²⁾

同第二生理学教室

1) 講師 2) 教授

(昭和 53 年 12 月 13 日受付)

二連型 K⁺ 微小電極は、同時に細胞膜電位と細胞内 K⁺ 濃度を測定することが可能であり、これらの値は、細胞生理学的見地から、細胞内エネルギー代謝の 1 評価となる。抗癌剤投与時に Rat 肝細胞膜電位と細胞内 K⁺ 濃度は、その投与量、投与濃度に比例して低下し、投与中止により 1~2 週間で、正常レベルに回復する。本論文では、抗癌剤投与により生じる細胞内エネルギー代謝障害に対し、抗癌剤投与時に、代謝賦活剤である Coenzyme Q₁₀ を併用投与し、細胞内エネルギー代謝に及ぼす影響につき検討した。抗癌剤としては Mitomycin C を用い、溶媒だけの Placebo を併用投与した群を対照として比較検討すると、Coenzyme Q₁₀ を併用した群の、ラット肝細胞膜電位と肝細胞内 K⁺ 濃度値は有意に低下が抑制されており、Coenzyme Q₁₀ を併用投与することにより、抗癌剤投与により生じる肝細胞内エネルギー代謝の低下が抑制されると考えられた。さらに、Sarcoma 180 solid type tumor を用い、抗癌剤に Coenzyme Q₁₀ を併用投与することによる抗癌剤の制癌効果への影響を検討し、制癌効果を抑制することはなく、Coenzyme Q₁₀ の併用は有意義と考えられた。

緒 言

癌化学療法の当面する大きな問題の 1 つは、現在使用されている種々の抗癌剤は悪性腫瘍細胞だけに特異的な選択毒性を示すものが極めて少なく¹⁾、その毒性が正常細胞にも及ぶことにより、有効な治療量に到る前にその投与を中止せざるを得ない場合が多いことにある。癌化学療法は、薬剤—腫瘍—宿主相関のもとに行なわれるべきであることは、以前から指摘されているところであり、抗癌剤の宿主正常細胞への影響に関する実態を、適確に把握し、できうる限りその障害を予防して、安全に有効な投与計画が遂行されることが、癌化学療法を行うために必要である。今回われわれは抗癌剤による正常細胞への障害を微小イオン電極法を用いて機能的な面から検討した。二連型カリウム選択性微小イオン電極は、細胞膜電位と細胞内カリウムイオン濃度を同時に測定することができるという利点を有するものである。これによって測定された細胞膜電位 (以下 PD) と細胞内カリウムイオン濃度 (以下 Ck) は、細胞内エネルギー代謝の 1 評価となりうるものであり、これらの測定を通じ、細胞内エネルギー代謝の障害と、その回復を知ることが可能である。抗癌剤投与により、Rat 肝細胞の PD と Ck

がその投与量の増加に比例して低下し、その投与を中止することにより、回復することはすでに報告したが²⁾、本論文ではヒト肝、心、脾、膵、副腎に比較的高濃度に含まれ³⁾、細胞内 Mitochondria の respiratory chain に介在し、energy 産生に関与するといわれている Coenzyme Q₁₀ (以下 CoQ₁₀) を使用し、抗癌剤とともに Rat に併用投与することによる細胞内エネルギー代謝への影響を検討し、さらに併用投与による腫瘍細胞への影響を、Sarcoma 180 solid type tumor を用い検討を加えた。

I. 実験方法

1) 実験動物

Wistar 系雄性 Rat (体重 150g 前後) 38 匹を使用した。そのうち、15 匹は二連型微小電極による PD、Ck 測定用とし、他 23 匹は血清学的検査に用いた。さらに実験腫瘍としては、41 匹の ddN 系雄マウスに移植継代された Sarcoma 180 solid type tumor を使用した。

2) 実験装置

穿刺操作に用いた顕微鏡は、双眼立体顕微鏡 (Leitz TS 型 10~320 倍) を用いて直視下に行い、電極からの電位導出は Ag-AgCl wire を使用した。二連型電極に

より得られる電位は差動エレクトロメーター (Keithley Instruments 604 型) の入力に連結させ、さらにその出力はデジタル (Keithley Instruments 160 型) 表示と、アナログ (東亜電波 EPR3T 型) 記録とした。

3) 二連型微小カリウムイオン電極の作製

FUJIMOTO & KUBOTA^{4,5)} (1976), 岡田⁶⁾ (1977) の方法により作製した。作製法の詳細はこれら論文を参照されたい。その概略は、外径 1 mm の薄肉 Pyrex ガラス毛細管 2 本を並列させ、二連電極用ブラー (成茂科学 PD-5 型) にマウントし、一部を溶解軟化し、180° 回転させた後、機械のソレノイド作用で引き伸ばす。この一脚の Stem からアセトンを入れて先端を満たし、他脚は Trichlorethylene (半井化学, 電子工学用 特級) にて 0.3% に希釈したシリコン (信越化学, KF-96) 溶液に先端を浸す。この毛細管を電熱器 (三田村理研, MRK) 上にて 250°C 30 分間加熱乾燥すると、二連型の一脚だけの先端がシリコナイズされる。このシリコナイズされた先端に、液体カリウムイオン交換剤 (Corning Glass Work, No. 477317) を定着させ、0.5 M KCl 溶液を充填する。他脚には 1.0 M NaCl 溶液を充填し、空泡は軽く手指にてタッピングして除去し作製した (Fig. 1)。実験に使用したカリウム電極としては Table 1 に示した基準を充たすものを使用した。

Fig. 1 Double-barreled K⁺ microelectrode

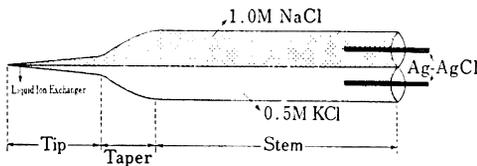
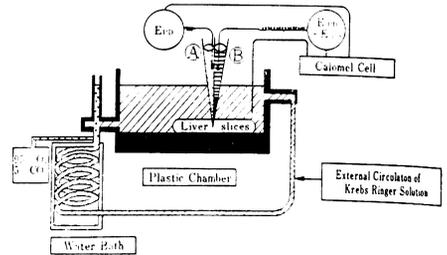


Table 1 The double-barreled K⁺-selective microelectrodes which were used in the present study complied with the following standard

1. Reactivity to K (slope of the curve of EMF (mV) arising from a 10-fold change in K⁺ activity) : 50 mV or more.
2. K⁺-selectivity (reactivity to K⁺ as compared to that to the same molality of Na⁺ ions) : 80/1 or more.
3. Response time (rise time of potential record when the microelectrode is immersed in the standard solution, that is, the time required for the maximum reaction amplitude to change from 5% to 95%) : 2 sec or less.
4. Outer diameter of the microelectrode : 1 μ or less.
5. Tip potential : 5 mV or less.

Fig. 2 Schematic diagram of the perfusion system in the rat liver slices



4) 微小穿刺法

Rat はエーテル麻酔下に開腹し、肝の一部を切除摘出した後、厚さ 1 mm 以下の Slice 肝を作製し、ただちに Chamber 内灌流液中に浸した。灌流液は Krebs-Ringer bicarbonate 溶液を用い、pH は 7.4 に、温度は Water bath にて 31°C に調整し、95% O₂, 5% CO₂ 混合ガスにて bubbling し灌流した (Fig. 2)。微小穿刺は、マイクロマニプレーター (成茂科学, MM 3 型に MO 81 型ステップモーター駆動装置を装置したもの) を用いて静かに行う。Reference code は、3% 寒天を含む 3 M KCl の電橋を用いた。この Reference code を細胞外におき電極を細胞内に穿刺すると、膜電位とカリウムイオン電極が同時に反応し、矩形波を示す。Fig. 2 に示したように、A 脚から得られる電位は細胞膜電位で、B 脚からは細胞膜電位にイオン電位を加えた電位が得られ、そこでこれら両者の差がイオン電位となる。なお選択常数やイオン活量の決定は、WALKER⁷⁾, FUJIMOTO & KUBOTA⁸⁾ に従い次式により算定した。

$$a_{i,ICF} = (a_{i,ECF} + K_{ij}a_{j,ECF}) 10^{(E_T - E_{Mem})/\alpha_i - K_{ij}a_{j,ICF}}$$

E : EMF (起電力, mV)

$a_i a_j$: i 番目, j 番目のイオン活量

ICF : Intracellular fluid

ECF : Extracellular fluid

K_{ij} : i 番目のイオンと比較した j 番目のイオンに対する選択常数

E_T : 細胞内に穿刺した際にイオン電極によって示される電位

E_{Mem} : 細胞膜電位

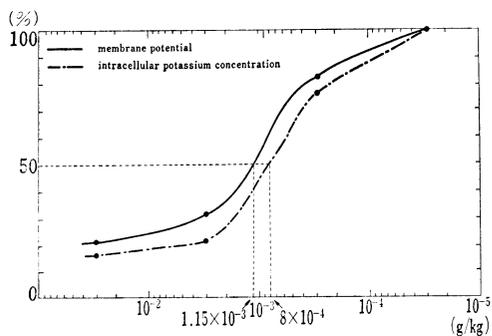
α_i : i 番目のイオン活量の 10 倍変化に対する起電力の勾配

またイオン活量から濃度への換算は ROBINSON & STOKES⁹⁾ による活量係数 0.75 を使用した。

II. 実験成績

1) Mitomycin C (以下 MMC) (1 mg/kg) 投与に伴用する CoQ₁₀ の濃度変化による PD, C_K への効果

Fig. 3 Dose-response curve of the coenzyme Q₁₀ on the membrane potential and intracellular potassium concentration in the affected liver cell by mitomycin C (1 mg/kg)



MMC (1 mg/kg) に併用投与する CoQ₁₀ の濃度を 30 mg/kg, 3 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.03 mg/kg の 4 群に分け、それぞれ 4 日間連日尾静脈から静注し、投与終了後の翌日に測定した。

Fig. 3 はこれにより作製した Dose-response curve である。縦軸は、CoQ₁₀ の濃度が 3 × 10⁻⁵ g/kg の時の PD と C_K の減少率を 100% として表わし、横軸は CoQ₁₀ の濃度を対数で示した。CoQ₁₀ の濃度の減少に伴い、PD と C_K の減少率が増加し (多分 S 字型)、half maximal response はそれぞれ 1.15 × 10⁻³ g/kg, 8 × 10⁻⁴ g/kg であった。

2) CoQ₁₀ 3 mg/kg 併用群と Placebo 併用群との比較検討

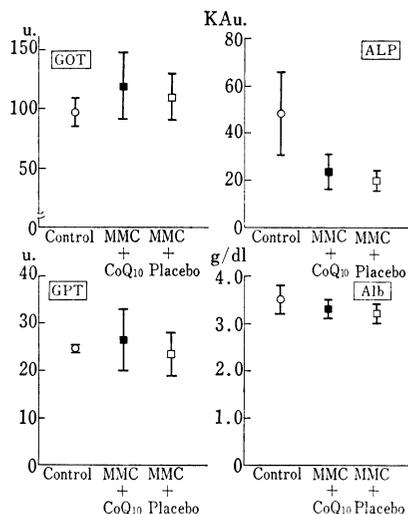
MMC (1 mg/kg) 投与群を、CoQ₁₀ (3 mg/kg) 併用群 (N=3)、溶媒だけの Placebo 併用群 (N=3) に分け、それぞれ尾静脈から 4 日間連日投与し、さらに生食だけ投与した群を Control 群 (N=3) とし、比較検討した (Fig. 4)。Control 群における PD と C_K はそれぞれ -27.4 ± 2.4 mV, 136.2 ± 8.8 mEq/L (n=36, Mean ± S.D.) であった。これに対し、MMC (1 mg/kg) に

Fig. 4 Comparison of effects of MMC and CoQ₁₀ on the membrane potential and potassium concentration in the rat liver cell

		Membrane Potential (-mV)	Potassium Concentration (mEq/L)
Control (n=36)		27.4 ± 2.4	136.2 ± 8.8
MMC (1mg/kg) 4 days injection	Placebo (n=40)	23.4 ± 2.2	113.3 ± 11.0
	CoQ ₁₀ (n=32)	25.9 ± 2.0 *	132.2 ± 13.8 **

Statistical difference between treatments of CoQ₁₀ and Placebo (Mean ± S.D.)
*, ** P < 0.001

Fig. 5 Laboratory examination of the rat administered with MMC + CoQ₁₀

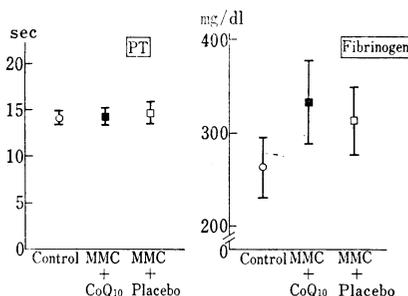


Placebo を併用し、4 日間連日静脈内投与した群の PD, C_K はそれぞれ、-23.4 ± 2.1 mV, 113.3 ± 11.0 mEq/L (n=32, Mean ± S.D.) で Control 群に比し、PD は 4 mV の、C_K は 22.9 mEq/L の有意 (P < 0.001) の低下が認められ、細胞内エネルギー代謝の低下が示唆された。次に MMC (1 mg/kg) に CoQ₁₀ (3 mg/kg) を併用投与した群における PD, C_K はそれぞれ -25.9 ± 2.0 mV, 132 ± 13.8 mEq/L (n=32, Mean ± S.D.) と Placebo 群に比し、PD は 2.5 mV, C_K は 18.9 mEq/L の低下の抑制 (P < 0.005) が認められ、CoQ₁₀ 併用投与により、細胞内エネルギー代謝の低下に抑制的に働いたものと考えられる。

3) 血液検査成績

GOT, GPT, Alkaliphosphatase, Albumin, Prothrombin time, Fibrinogen 値につき、Control 群 (N=5), MMC + CoQ₁₀ 併用群 (N=9), MMC + Placebo 群 (N=

Fig. 6 Laboratory examination of the rat administered with MMC + CoQ₁₀



10) に分け、それぞれ 4 日間尾静脈内投与し、投与終了後翌日採血し検査に供した (Fig. 5, 6)。

GOT, GPT 値は、Control 群, MMC+CoQ₁₀ 群, MMC+Placebo 群のそれぞれに有意差は認めない。Alkaliphosphatase 値は、Control 群に比し、MMC 投与群で有意 ($P < 0.05$) の低下が認められるが、CoQ₁₀ 併用群と Placebo 群の間には有意差を認めない。Albumin 値は Control 群に比し、MMC 投与群で低下の傾向が認められるが有意差は認められない。Prothrombin time も各群間に有意差は認められず、Fibrinogen 値は MMC+CoQ₁₀ 群で上昇が認められる。

4) CoQ₁₀ 併用による MMC の抗腫瘍効果におよぼす影響

実験は、4 週令体重 20 g の ddN 系統系雄マウスに、直径 3 mm 大の Sarcoma 180 solid type tumor をトラカール針によりマウスの右腋窩部に移植して行なった。移植後 24 時間目から、①Control 群 (N=14), ②MMC (1 mg/kg)+CoQ₁₀ (3 mg/kg) (N=13), ③MMC (1 mg/kg)+Placebo 群 (N=14) の 3 群に分け、それぞれ連日 10 日間腹腔内投与し、11 日目に動物を屠殺して腫瘍を摘出し、その重量を直視天秤により測定して各群の平均重量を求め、それぞれ有意差検定を行なった。Control 群における腫瘍重量は 0.28 ± 0.19 g (N=14, Mean \pm S.D.) であったのに対し、MMC+CoQ₁₀ 併用群では 0.15 ± 0.14 g (N=13, Mean \pm S.D.), MMC+Placebo 群では、 0.10 ± 0.17 g (N=14, Mean \pm S.D.) で Control 群に比し、MMC+CoQ₁₀ 群, MMC+Placebo 群で有意 ($P < 0.05$) に腫瘍重量が小さかったが、CoQ₁₀ 併用群と Placebo 群との間には有意差は認められなかった。以上から CoQ₁₀ 併用により MMC の抗腫瘍性効果が抑制されるとは考えられない。

考 案

CoQ₁₀ は各種動物に広く分布し、人では肝臓に最も多く存在し、心臓、脾臓、腎臓、副腎にも高く分布する Ubiquinone 類³⁾である。CoQ₁₀ の作用^{9,10)}については、Succinoxidase system と NADH-oxidase system の間に介在し、呼吸の本質的な electron transfer process と coupled oxidative phosphorylation において、絶対必要な物質であり、CoQ₁₀ の不足により、これらの反応部位が不活性になるだろうと述べられているように、CoQ₁₀ は Mitochondria における呼吸鎖による energy 産生に重要な役割を果たしていると考えられる。AIYAR と SREENIVASEN¹¹⁾ はラットに CCl₄ 肝障害をおこし、この時、肝 Mitochondria の Ubiquinone 含量の低下を認め、また障害肝では ¹⁴C-acetate あるいは ¹⁴C-mevalonate から ubiquinone への ¹⁴C のとりこみが減

少していることから、ubiquinone 合成能が低下していると報告している。

細胞膜は、細胞内を負として電気的に分極し、これは細胞膜電位と呼ばれている。この膜電位は、細胞内外のイオンの濃度差による拡散^{12,13)}によって生じ、主として Na-K_{pump} による能動輸送によって維持される。この Na⁺ の細胞外駆出と K⁺ の細胞内摂取は代謝エネルギーを必要とし、主として細胞内の energy rich phosphate (主として ATP) によって供給¹⁴⁻¹⁶⁾され、細胞内で産生された energy の 30~40%¹⁷⁾は、この能動輸送に消費される。細胞が障害を受け、energy の産生が低下すると、Na-K_{pump} も障害を受け、従って病的な細胞においては細胞内カリウムイオン濃度の低下と膜電位の低下をきたすと考えられる²⁾。一般に、体中の K⁺ は細胞内に最も多く分布し、その意義はカチオンとして細胞内浸透圧維持や静止電位の発生に寄与するだけでなく、解糖系の pyruvic kinase の活性化¹⁸⁾や蛋白質合成の場である Ribosome の活性化において、それに関与する諸酵素は強く K⁺ を要求することが知られている¹⁹⁾。従って膜電位と細胞内 K⁺ 濃度は、細胞膜の機能的透過性の指標であると同時に、細胞内エネルギー代謝の指標にもなりうるわけで、これらを同時に測定することは、細胞の病態の把握に意義をもつと考えられる。

ラット肝細胞において、膜電位と細胞内 K⁺ 濃度²⁰⁾は OUABAIN 等の Na-K ATPase の特異的阻害剤、7-フ化合物のような酸化還元系の代謝阻害剤、Mitomycin C, 5-Fu 等の核酸合成阻害剤の投与により、これらの値は低下し、また投与中止により、回復することは、われわれの実験データから明らかである²¹⁾。MMC は現在最も広く、最も多く使用されている濃度依存性の抗癌性抗生物質であり、癌細胞に接触する濃度が高いほど、その効果は大きい。しかし濃度がませば、その濃度に比例して、宿主正常細胞も障害を受けることとなる。これに対し、間歇投与や多剤併用による副作用軽減を初めとし、副作用防止に関する研究も現在まで数多くなされているが、その実体はまだ不明である。MMC 投与により、肝細胞膜電位と細胞内 K⁺ 濃度は低下し、肝細胞内エネルギー代謝は低下するが、CoQ₁₀ 併用により、これらの値は、低下が有意に抑制されており、エネルギー代謝の低下が防止されると考えられ、この観点から CoQ₁₀ を併用投与することは有意義であると考えられる。しかし、CoQ₁₀ の併用投与により、抗癌剤の抗腫瘍効果が減弱するのであれば、抗癌剤との併用の意義が失なわれるのであるが、Sarcoma 180 を用いた実験から、抗癌剤の抗腫瘍効果が損なわれることはなく、CoQ₁₀ 併用は有意義と考えられる。

文 献

- 1) 塚越茂：制癌剤の作用機序。内科 38(6)：904～910, 1976
- 2) 山田真一, 岡田勝彦, 他：Mitomycin C, 5-Fluorouracil Dry Syrup 投与による肝障害に関する研究, とくに微小イオン電極を用いた細胞生理学的研究。臨床生理 8(5)：428～433, 1978
- 3) PAUL H. GALE, FRANK R. KONIUSZY, *et al.* : Coenzyme Q. XXIV. On the significance of coenzyme Q₁₀ in human tissues. Arch. Biochem. Biophys. 93 : 211～213, 1961
- 4) 藤本守, 窪田隆裕, 菱田明：微小イオン電極法。生物物理 15 : 331～335, 1975
- 5) FUJIMOTO, M. & T. KUBOTA: Physicochemical properties of a liquid ion exchanger microelectrode and its application to biological fluids. Jap. J. Physiol. 26 : 631～650, 1976
- 6) 岡田勝彦：食用蛙腎近位尿管におけるカリウム輸送に関する利尿剤の効果。日腎会誌 19 : 1～19, 1977
- 7) WALKER, J. L. : Ionic specific liquid ion exchanger microelectrodes. Anal. Chem. 43 : 89A～93A, 1971
- 8) ROBINSON, R. A. & STOKES : Electrolyte Solution, 2nd ed., Butterworth, London, 1970
- 9) LENAZ, G.; DARES, G. D., Jr. & K. FOLKERS : Organic structural specificity and sites of coenzyme Q in succinoxidase and DPNH-oxidase systems. Arch. Biochem. Biophys. 123 : 539～550, 1968
- 10) ERNSTER, L., *et al.* : Studies with ubiquinone-depleted submitochondrial particles. European J. Biochem. 9 : 299～310, 1969
- 11) AIYAR, A. S. & A. SREENIVASEN : Intracellular distribution and biosynthesis of ubiquinone in rat liver in carbon tetrachloride liver injury. 82 : 179～182, 1962
- 12) 北里宏：細胞膜内外の電位差, 岩瀬善彦編, 生物電気, 南江堂, 東京, 1970, p. 8～24
- 13) GUYTON, A. C. : Transport through the cell membrane. Textbook of medical physiology, 5th ed. W. B. Saunders company, Philadelphia, London, Toronto, 1976, p. 40
- 14) 葛西道生：膜, 大沢文夫編：細胞の機能。朝倉書店, 東京, 1976, p. 207～292
- 15) GUYTON A. C. : Membrane potentials, Action potentials, Excitation, and Rhythmicity. Textbook of medical physiology, 5th ed. W. B. Saunders company, Philadelphia, London, Toronto, 1976, p. 112
- 16) SHIBA, Y. *et al.* : Energy requirement for the maintenance of membrane potential in rat liver cell *in situ*. Jap. J. Physiol. 27 : 185～193, 1977
- 17) 中尾真：エネルギーの物理的利用, 生体とエネルギー。岩波書店, 東京, 1966
- 18) 藤本守：カリウム異常と酸塩基平衡。総合臨床 20(12) : 2836～2848, 1971
- 19) 巖佐耕三：エネルギー代謝, 大沢文夫編, 細胞の機能, 朝倉書店, 東京, 1976, p. 50～133
- 20) 岡田勝彦, 山田真一, 他：微小電極法による肝の細胞内 K⁺ 濃度と電位の測定について。日生誌 40(4) : 86～88, 1978
- 21) 岡田勝彦, 北出文男, 他：ラット肝細胞におけるカリウム代謝とその輸送機構について。臨床生理 (投稿中)

COENZYME Q₁₀ TREATMENT FOR THE LIVER DAMAGE INDUCED BY ANTINEOPLASTIC DRUGS

SHIN-ICHI YAMADA, FUMIO KITADE, KATSUHIKO OKADA,
YASUO KAWASHIMA, YOSHINORI KATO and KUNIO OKAJIMA,
Department of Surgery, Osaka Medical College

MAMORU FUJIMOTO
Department of Physiology, Osaka Medical College

It is known that the membrane potential difference and intracellular K concentration (C_K) in rat liver cells can be progressively depressed by increasing doses of antineoplastic drugs, further the stop of drug administration usually leads to a complete restoration of these values to their control levels in 1 or 2 weeks.

This report is concerned with an effect of Coenzyme Q₁₀ treatment on the membrane PD and C_K of the affected liver cells by antineoplastic drugs.

Male Wistar rats weighing 150~200g were anesthetized by ether, and a part of the liver was excised. Slices of 1 mm in thickness were immersed in Krebs-Ringer bicarbonate solution, which is kept at 31°C, pH of 7.4 and continuously aerated with gas mixture (95% O₂ and 5% CO₂). Micropuncture experiment was performed on these slices with double-barreled K⁺ selective microelectrodes. Prior to the experiment, Co Q₁₀ or Placebo were injected intravenously with Mitomycin C (1 mg/kg) for 4 days.

The mean values of the membrane PD and C_K of the control rat liver cell were -27.4 ± 2.3 mV and 136.2 ± 8.8 mEq/L (Mean \pm S.D.) respectively, and those which were injected with MMC+Placebo were -23.4 ± 2.1 mV and 113.0 ± 11.0 mEq/L respectively, the data being statistically significant ($P < 0.001$). In contrast, the mean values for the PD and C_K of the Coenzyme Q₁₀ treated rat liver cells were -25.9 ± 2.0 mV and 132.2 ± 13.8 mEq/L respectively, both values being statistically significant between treatment Co Q₁₀ and Placebo.

It is suggested, therefore, that Co Q₁₀ would prevent the rat from the liver damage induced by antineoplastic drugs with respect to the cellular electrolyte metabolism.