原 著

Rhodamine123 の温熱感受性マーカーとしての有用性の評価
(ミトコンドリアの機能と形態による検討)

石川 啓 田川 泰 古川泰蔵
佐藤哲也 白石円樹 下山孝俊
三浦敏夫 富田正雄 *奥村 寛

長崎大学医学部第一外科学教室

* 同原爆後障害医療研究施設

Estimation of Rhodamine 123 as a Marker of Heat Sensitivity

(Research on Mitochondrial Function and Morphology)

Hiroshi Ishikawa, Yutaka Tagawa, Taizo Furukawa, Tetuya Sato

Enjyu Shiraishi, Takatoshi Shimoyama, Toshio Miura

Masao Tomita, Yutaka Okumura*

First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Nagasaki University

*Atomic Disease Institute, Nagasaki University School of Medicine

Cationic fluorescent dye Rhodamine 123 (Rh 123) is selectively accumulated in mitochondria on living cells, reflecting the mitochondrial transmembrane potentials. A rapid redistribution of mitochondria to the perinuclear region has been showed by heat treatment. Whereas, these changes of localization after heat treatment were inhibited by addition of Cholemid. On HeLa cells and colon26 cells, we have studied the growth curve and clonogenic ability to evaluate heat sensitivity and Rh 123 uptake was estimated in concurrence. The decrease in Rh 123 uptake correlated with the loss of clonogenic ability. It was suggested that the uptake of Rh 123 is a useful marker to estimate whether the cell viability after heat treatment exists or not.

Key words:

ローダミン 123 Rhodamine 123

温熱感受性 heat sensitivity

ミトコンドリア mitochondria

はじめに

従来悪性腫瘍の治療においては、手術療法、化学療法、放射線療法、免疫療法が主体であったが、近年温熱療法の有効性が認識されるにいたつ

て第五の治療法として注目され集学的治療の一つとしてその臨床応用が進んでいる。1866年ドイツの医師 W. Busch の報告に始まる温熱療法は、その作用メカニズムや特異性が解明されるにつれ

て、低酸素組織に対して抗腫瘍性があるために化学療法、放射線療法との併用による増強効果が期待されている。臨床応用での著効例の報告もみられているが、その有効率はまだ低い、*in vitro* での培養細胞を使った実験においては細胞株間で温熱感受性の差が認められ、臨床での固形腫瘍等においても、腫瘍を構成する細胞集団の不均一性のために温熱感受性は異なってくる。つまり感受性の高い細胞が多くを占める腫瘍においては、温熱療法が有効であるが、反対に少ない腫瘍においてはその効果は低いであろう。そこで生検又は手術で得た腫瘍組織の温熱に対する感受性を調べることは患者にとって有用な情報を提供してくれるものと思われる。

温熱の細胞内における標的部位については十分解明されていないが、少なくとも単一ではなく、核、細胞質と全体におよんでいると思われる。なかでもミトコンドリアは種々のストレスの *primary target organ* ではないかと考えられ、著者らも加温直後にミトコンドリアの形態が変化し核の周囲に集積する事を確認している¹⁾。そこでミトコンドリアと特異的に結合し、その機能を反映する cationic fluorescent dye Rhodamine123²⁻⁵⁾ を用いて温熱感受性とミトコンドリアの機能との関係をフローサイトメーター (FCM) を用いて解析した。さらに加温によりミトコンドリアが核周囲に集まるメカニズムについて細胞骨格成分のいかなる要素が関与しているのかを細胞骨格阻害剤を併用し形態学的に検討した。

材料と方法

1) 細胞と培養方法

細胞は子宮頸癌株 HeLa 細胞とマウス大腸癌株 Colon26細胞を使用した。細胞培養は10%胎児牛血清 (GIBCO), RPMI-1640 培地にて5%CO₂ 37°Cで培養器 (National Appliance Co. 6100) 中で行った。

2) 増殖曲線

細胞は 0.1%トリプシン, 0.01% EDTA にてシャーレ (Corning) より剥離の後、細胞数を5×10⁴/

ml に調整した。6穴プレート (Nunc) の各々に 2 ml を播種し、加温後24, 48, 72, および96時間にトリパンブルー染色法にて生細胞数を算定した。加温方法は、プレートをナイロン袋にて真空パック包装した後、恒温槽 (ヤマト科学 KK BT-23) にて42°Cおよび、43°C1時間加温した。温度は±0.1°Cで制御した。実験は duplicate で行い3回以上繰り返した。

3) 生存率

コロニー形成率にて生存率を求めた⁶⁾。細胞数を150/ml に調整し、6穴プレートに2ml ずつ播種した。加温は2)と同様に行った。培養8日目にメタノール固定の後、ギムザ染色をおこない、50個以上の細胞集団をコロニーとして数えた。同一温度毎に triplicate をおこない、実験は3回行った。

4) フローサイトメーター

100mm シャーレ中に1.0×10⁵/ml の細胞を播種し、24時間後対数増殖期に前述のごとく加温をおこなった。加温終了後は37°C培養器中へ戻し、直後、6, 12, 24, 48, 72, および120時間後に各々のシャーレに Rhodamine 123 (Sigma Chemical) を10μg/mlの濃度になるように加え37°C20分間インキュベートした⁷⁾。PBS (-) にて2回洗浄の後、トリプシン, EDTA を用いて単離細胞とし培地中に浮遊させ、1時間以内にフローサイトメーター (Bekton Dickens FACS IV) にて測定した。488nm のアルゴンレーザーで励起し520-580 nm を緑色蛍光としてとらえる事により Rh 123の相対蛍光強度としてヒストグラムのピークチャンネル値で評価した。

5) 蛍光顕微鏡による形態の観察

100mmシャーレ中に静置したスライドグラス上で単層培養を行い、加温時には培地を満たした50ml遠沈管に移し、恒温槽中43°C1時間加温した。Rh 123は10μg/mlの濃度で培地に加え、37°C20分接触の後、PBS にて2回洗浄し Rh 123フリーの培地へ戻し蛍光顕微鏡 (オリンパス BH2-RFK) にて観察した。

6) 阻害剤併用時の形態変化

サイトカラシン D (Sigma Chemical) 2μg/ml,

10 μ g/ml, バリノマイシン (Sigma Chemical) 10ng/ml, 100ng/ml, 1 μ g/ml, コルセミド (Sigma Chemical) 0.2 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 以上の阻害剤を培地中に上記濃度にて加え37°C6時間接触させた。各々の阻害剤について、阻害剤単独での形態変化と、43°C1時間加温併用時の形態変化を蛍光顕微鏡にて観察した。

結 果

1) 加温後の増殖動態

42°Cおよび43°C1時間加温後の経時的な生細胞を算定し増殖曲線を得た。Fig 1はコントロールで37°Cであるが、72時間目迄対数関数的な増殖を認めた。42°C加温では HeLa 細胞は24時間迄細胞数が一定で、それ以降対数増殖を示した。一方 Colon 26細胞は24 hr 目にて細胞数の減少を認め

Fig. 1 Growth kinetics on HeLa and colon26 cells after heating (37°C, 1 hr) Open circles represent HeLa cell, solid circles represent colon26. Time at hours is represented on the abscissa, cell number on the ordinate.

Fig. 2 Growth kinetics on HeLa and colon26 cells after heating (42°C, 1 hr)

たが以後対数増殖期に入り72時間目で定常期に入ると思われた。(Fig 2)43°C加温においては、HeLa 細胞は24時間、48時間目で減少するが、72、96時間目で回復傾向が認められた。一方 Colon 26細胞は24時間目にて生細胞数が激減し回復の傾向は認められなかった。(Fig 3)即ち43°C加温において両細胞間の加温後増殖動態に著明な差が認められた。

2) 加温後の生存率

42°C, 43°C1時間加温後のコロニー形成率を調べた。37°Cにおけるコロニー数は HeLa 細胞128 $\pm$ 12で Colon 26 細胞, 67 $\pm$ 2であった。生存率は42°Cで HeLa 細胞57 $\pm$ 5%に対し Colon 26細胞は4.65 $\pm$ 1.05%, 又43°Cでは HeLa 細胞1.35 $\pm$ 0.25%, Colon 26細胞, 0%であり42°Cにおいては HeLa 細胞に比べ Colon 26細胞は12倍も温熱感受性が高かった。この時両細胞間において危険率1%で有意の生存率の差, つまり温熱感受性の差をみとめた。(Fig 4)

Fig. 3 Growth kinetics on HeLa and colon26 cells after heating (43°C, 1hr)

Fig. 4 Survival rate after heating for one hour. At 42°C survival rate on HeLa and colon26 are 57%, 4.65% respectively. ($P < 0.01$)

3) 加温後の Rh 123の取り込み

Rh 123は生細胞のミトコンドリアと特異的に結合する蛍光色素であり、ミトコンドリアの機能を反映する²⁻⁵⁾。HeLa 細胞, Colon 26細胞において 43°C 1hr 加温後の経時的な Rh 123の取り込みを FCM を用いて測定した。相対的蛍光量のピーク値で取り込みを表し、37°Cにおける HeLa, Colon 26のピーク値を54に設定しコントロールとした。HeLa では加温後の経時的な Rh 123取り込みによる蛍光量は30分後で49.8, 6時間後で47.0°Cと最低となり12, 24時間で回復傾向が認められ、以後120時間迄徐々に上昇した。一方 Colon 26においては、30分後で47.7, 6時間後で44.3と著しい低下を示し、12, 24時間目においては各々39.7, 39.0, と最低となり、48, 72時間目にやや回復したが、HeLa 細胞と異なりコントロール値に復する事はなかった。特に12, 24時間目においては Colon 26細胞が最低であったのに対し HeLa 細胞においては回復が認められ、24時間目において $P < 0.01$ で有意差が認められた。(Fig 5)

Fig. 5 Changes of rhodamine123 uptake in HeLa cells (●) and colon26 cells (○) after heating. (43°C 1hr) Dot line (54 channel number) indicates Rh123 uptake in cancer cells before heating.

4) 加温後のミトコンドリア形態の変化

43°C 1 時間加温後のミトコンドリアの形態の変化を HeLa 細胞を用いて検討した. Fig. 6- a) は 37°C コントロールの HeLa 細胞である. 細胞質に放射状の網状を示したミトコンドリアの蛍光を認めた. b) は加温直後であるが, ミトコンドリア

の核周囲への著名な集積が認められ, 細胞質周囲にはわずかに残っているのみであった. 6 時間後では直後にみられた核周囲への集積の程度は弱く細胞質周囲への分散傾向が認められた. (Fig 6- c) 24 時間後では核周囲への集積はなくコントロールとほぼ同様の分布を示した. (Fig 6- d)

Fig. 6 Mitochondria in HeLa cells stained with Rh123 (10 μ g/ml) $\times$ 400 (a) before heating (b) 30mins after heating (c) 6hrs after heating (d) 24hrs after heating.

5) 阻害剤併用時の加温による形態の変化

加温に伴うミトコンドリアの形態の変化がいかなるメカニズムによるものかを検討するため、ミクロフィラメント阻害剤であるサイトカラシン D, 微小管重合阻害剤であるコルセミド, またイオン流入剤であるバリノマイシンを併用し阻害剤単

独による作用と加温併用時のミトコンドリアの形態的变化について検討した。サイトカラシン D $10\mu\text{g/ml}$ 6時間接触では細胞質に放射状に認められたミトコンドリアの網状パターンは消失し, 細胞全体が非特異的に均一に染まる細胞も出現し, 全体に細胞径も不ぞろいとなり, これらの変化は

Fig. 7 Mitochondria in HeLa cells stained with Rh123 ($10\mu\text{g/ml}$) after exposure to various drugs for 6hrs (a) Cytochalasin D ($10\mu\text{g/ml}$) (b) Valinomycin (100ng/ml) (c) Colchicine ($0.2\mu\text{g/ml}$)

構造の破綻を示すものと思われた。(Fig 7- a) 低濃度のバリノマイシン (10 ng/ml) では形態上変化なく, 100ng/ml 以上になると非特異的な細胞質の蛍光が認められるようになり, 又ミトコンドリアが核の周囲に集まった細胞も認められた。(Fig 7- b) コルセミド 0.2 μ g/ml ではミトコンドリアの局

在および分布に変化は認められなかったが, フィラメントの各々に短く断裂した像が認められた。

(Fig 7- c) 次に阻害剤接触と同時に43°C1時間加温を行い加温にともなうミトコンドリアの核周囲への集積が阻害されるかについて検討した。サイトカラシン D では10 μ g/ml, 20 μ g/ml の濃度に

Fig. 8 Mitochondria in HeLa cells stained with Rh123 after heating with various drugs. (a) Cytochalasin D (10 μ g/ml)+heat (b) Valinomycin (100ng/ml)+heat (c) Colchicine (1.0 μ g/ml)+heat.

において加温後のミトコンドリア形態及び局在はコントロールと同様であり、又バリノマイシンにおいては10, 50, 100ng/ml の濃度において加温後核周囲へのミトコンドリアの集積の阻害作用は認められなかった。(Fig. 8-a, b) 一方コルセミド1.0 μ g/ml接触中に加温を併用したものについては、非特異的に強い蛍光を示した細胞も認められたが、加温後に特徴的な核周囲への集積は認められず、ミトコンドリアフィラメントの断裂を認めたのみであった。即ちコルセミドにより加温に伴うミトコンドリアの局在の変化を阻害しようと考えられた。

考 案

ミトコンドリアは細胞内における代謝産物の代謝の場でありエネルギー産生の場である。糖の分解産物やアミノ酸、脂肪酸などの分解産物はミトコンドリアのマトリックス中にある TCA 回路により酸化され一対の電子を放出する。更にこの電子は電子伝達系を転移し酸化的リン酸化によりエネルギーである ATP を産生する⁸⁾。1979年 Walsh の報告に始まる Rhodamine 色素を使った生細胞ミトコンドリアの超生体染色は、細胞を生きた状態でその機能との相関を調べつつ形態を観察できる点で画期的な方法であった⁹⁾。その後 L, V, Johnson らにより Rh 123, Rh 3B, Rh 6G が非常に特異的にミトコンドリアと結合することが報告され⁴⁾、cationic fluorescent dye であるこれらの Rh のアナログが陰性に荷電したミトコンドリアの内膜と結合する事も明らかとなった²⁾。われわれはこの研究で2つの事を明らかにした。1つは cationic laser dye である Rh 123が細胞の温熱感受性のマーカーとなり得るか否か、第二には加温後に認められるミトコンドリアの形態及び局在の変化がいかなるメカニズムによるものなのか、特に細胞骨格系の関与について阻害剤を用いて検討した。

一般にミトコンドリアは細胞に対する外的ストレス刺激に対する最初の target organ であると思われている¹⁰⁾。酸化的リン酸化の拮抗剤や電子

輸送の阻害剤により、ショウジョウバエ細胞でストレスタンパクの合成が起こったという報告¹¹⁾からも上記の考えは支持される。加温においても同様で、ミトコンドリアが、熱によって産生される細胞内シグナルの最初の target であるという実験の報告もみられる¹¹⁾。つまり加温により呼吸の阻害と酸化的リン酸化への直接の作用が早期に細胞内で起こっているというのである。Rhodamine 123は cationic laser dye で生細胞のミトコンドリアに特異的に結合し蓄積する事が報告されている²⁻⁵⁾。ミトコンドリアの特異的な Rh 123の取り込みはミトコンドリア膜の高い transmembrane potential に依存していると思われる²⁾。従って細胞を FCCP の如きミトコンドリアの membrane potential を崩すイオン流入剤や cyanide, rotenone のような呼吸阻害剤で処理すると、ミトコンドリアに蓄積した Rh 123は即座に細胞質やメディアム中に出ていくことが知られている²⁾。即ち Rh 123の取り込みは生細胞のミトコンドリア membrane potential, つまり酸化的リン酸化による ATP 産生によるエネルギー代謝の状態を反映しているわけである。HeLa 細胞においては、加温後6, 12時間において Rh 123の取り込みが一過性に減少したが24, 48時間と回復して120時間迄徐々に上昇傾向が認められた。経時的に取り込みが上昇するのは細胞周期の変化と一致した。即ち72・120時間に掛けて G₂M 期細胞の蓄積のために、細胞当たりのミトコンドリア量の増加に伴い蛍光量が増加したものと思われる。細胞周期の進行に伴う Rh 123の取り込みの上昇は RNA 量の増加と相関したという Darzynkiewicz らの報告からも上記の考えは支持される¹²⁾¹³⁾。一方 Colon 26においては6, 12時間において蛍光量の低下が著しく、つまり加温に伴う transmembrane potential の低下が強く、12, 24時間目において最低値を示し、以後やや回復するもののコントロール値には回復しなかった。両細胞間における Rh 123の取り込みの動態を比較してみると、12, 24時間において最も著名な差が認められるようである。即ち温熱感受性を評価するの

に、コロニー形成能による生存率で評価を行うと加温後長時間を要するのに比べて、Rh 123の取り込みにおいては12-24時間で十分に評価が可能であった。Bernal らは L 1210細胞を代謝拮抗剤である Ara-c, メソトレキセート, 5Fu で処理したとき即座に Rh 123の取り込みが消失することを発見し、更に取り込みの低下とコロニー形成能が相関する事を示した。又細胞膜の透過性が変化してトリンプランブルーに染色されるよりも早く Rh 123の消失が認められる事を示し、抗癌剤感受性試験への応用の有用性を報告している¹⁴⁾。

加温に伴う細胞内の最初の target organ がミトコンドリアであるとなると当然加温によりその形態的な変化が認められるはずである。電顕像において37°Cのミトコンドリアは良く器質化したクリスタを有する典型的な円柱型であるのに対し、42-43°C加温においてはミトコンドリアは膨化しクリスタが著明となり、intracristal space が明らかに大きくなる事が報告されているが¹⁰⁾、これらの所見は何れも固定細胞での観察である。一方 Rh 123はミトコンドリアの高い transmembrane potential を反映しているために生細胞のミトコンドリアのみに結合するという特異性を有している。従って Rh 123により加温後に生細胞のミトコンドリアの経時的な観察が可能になる。Fig-6に示したように加温に伴うミトコンドリアの形態、局在の変化の最大の特徴は加温直後に著しい核周囲への集積が認められる事である¹⁴⁾。この集積は6時間目にも認められるが、その程度は軽くなり24時間目にてコントロールに戻った。電顕的にも、加温後に核の近くやその周囲のミトコンドリアの数が増えていることが Welch らにより報告されている¹⁰⁾。そこで、このミトコンドリアの局在の変化にいかなる因子が関与しているのかを検討すべく、細胞骨格系の障害剤であるサイトカラシン D、コルセミドとイオン流入剤であるバリノマイシンを併用して加温実験を行った。サイトカラシン D は Fアクチンの伸長を障害するマイクロフィラメントの障害剤でサイトカラシン B と異なりグルコース輸送の障害作用はない¹⁵⁾。サイト

カラシン D を0.2 μ g/ml, 1.0 μ g/ml の濃度で6時間接触させ加温を併用したが、ミトコンドリアの核周囲への集積を阻害しなかった。コルヒチンはその1分子がチューブリン 1分子と結合し、その重合の障害作用を有する¹⁵⁾。コルヒチン0.2 μ g/ml, 1.0 μ g/ml処理にて加温を併用すると Fig 8-cのごとくミトコンドリアの核周囲への集積が阻害された。この事は細胞骨格系において微小管がミトコンドリアとその運動性において何らかの相関を示唆するものと考えられる。Smith らも電顕による neuronal axon の観察において、ミトコンドリアが微小管と非常に接近していること、更に両者間に cross bridge が存在している事を報告している¹⁶⁾¹⁷⁾。Heggeness らも正常ラット腎細胞、人 WI 38 fibroblast、マウス腹腔マクロファージを用いて間接蛍光抗体法により微小管とミトコンドリアの局在を示しているが、各細胞においてミトコンドリアは微小管に沿って並んでおり、コルセミドで微小管を破壊するとミトコンドリアも破壊されたと報告している¹⁸⁾。このようにミトコンドリアと微小管の相関を支持する報告が多い一方、Welch らは加温後にミトコンドリアが核周囲に集積するのは加温により核の周囲の intermediate filament が虚脱し凝集したためであろうと報告している¹⁰⁾。彼らは加温後における vimentin を含む intermediate filament と微小管の分布を2重染色による間接抗体法で調べた。37°Cにおいては両者の分布は同一であったのに対し、加温後においては微小管の分布に変化は認められなかったが、intermediate filament では核の周囲への虚脱凝集が認められた。更に凝集した intermediate filament の中にミトコンドリアが閉じ込められたように分布していることを報告している¹⁰⁾。この事実はミトコンドリアと intermediate filament の相関を強く示唆する所見であるが、ミトコンドリアの核周囲への配列がミトコンドリアと intermediate filament が結合しているためなのか又は単に intermediate filament が核周囲で虚脱したためなのかは彼らも指摘しているように今後の詳細な検討を待つ必要があると思われる。

今後温熱療法が幅広く応用されるに際して、その感受性を前もって評価し、個々の症例に臨むことが必要と思われる。そのためにも Rh 123を用いて加温後のミトコンドリアの障害をモニターし温熱感受性を評価する事は非常に簡便な手技で有用な情報をもたらすものと思われる。

文 献

- 1) 石川 啓, 田川 泰, 古川泰蔵, 渡部誠一郎, 佐藤哲也, 白石円樹, 富田正雄; 加温時におけるミトコンドリアの細胞内局在性の変化について. 第4回ヒト細胞研究会抄録集, 107-108, 1986.
- 2) Johnson. L. V, Walsh. M. L, Bockus. B. J, and Chen. L. B.; Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*. Vol 88, 526-535, 1981.
- 3) Evenson. D. P, Darzynkiewicz. J. L. Z, Melamed. M. R: Rhodamine123 alters the mitochondrial ultrastructure of cultured L 1210 cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Vol 33, 353-359, 1985.
- 4) Johnson. L. V, Walsh. M. L, Chen. L. B; Localization of mitochondria in living cells with Rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 77, 990-994, 1980.
- 5) Chen. L. B, Summerhayes. I.C, Johnson. L. V, Walsh. M. L, Bernal. S. D, and Lampidis. T. J: Probing mitochondria in living cells with Rhodamine 123. *Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.* 46: 141-155, 1982.
- 6) 奥村 寛; 癌細胞に対する温熱の致死効果. 皮膚病診療. Vol 4, No11; 1004-1007, 1982.
- 7) 田川 泰, 古川泰蔵, 宮下光世, 山岡憲夫, 横田美登志, 牧山隆雄, 渡部誠一郎, 富田正雄: Heated FM3A Cell による Rhodamine 123の uptake の検討. 第4回 FCM- Cell Biology 研究会1986.
- 8) 中沢 透, 浅見行一: Up Biology ミトコンドリア 東京大学出版会
- 9) Walsh, M. L. Jen, J. and Chen, L. B: *Cold Spring Harbor Conference on cell proliferation: Vol6*, 513-520, 1979.
- 10) Welch. W. J, and Suhan. J. P: Morphological study of the mammalian stress respons: characterlization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli and appearanc of intranuclear action filaments in Rat fibroblasts after heat shock treatment: *The Journal of Cell Biology*; Vol 101, 1198-1211, 1985.
- 11) Ashburner, M. and Bonner, J. J; The induction of gene activity in Drosophila by heat shock: *Cell*, 17, 241-254, 1979.
- 12) Darzynkiewicz. Z, Coico. L. S, Melamed. M. R: Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation: *Proc. Natl. Acad. USA*, Vol 78, 2383-2387, 1981.
- 13) Darzynkiewicz. Z, Traganos, F, Coico. L. S, Kapuscinski. J, and Melamed. M. R: Interactions of Rhodamine 123 with living cells studied by Flow Cytometry: *Cancer Res*, 42, 799-806, 1982.
- 14) Bernal. S. D, Shapiro. H. M, and Chen. L. B: Monitoring the effect of anti- cancer drugs on L 1210 cells by a mitochondrial probe, rhodamine 123: *Int. J. Cancer*, 30, 219-224, 1982.
- 15) 小林良二; 阻害剤研究法-細胞骨格系阻害剤. 日高弘義編. 共立出版 東京, 76- 85, 1985.

- 16) Smith, D. S. Jarlfors, U. and Cameron, B. F: Morphological evidence for the participation of microtubules in axonal transport: *Ann. N. Y. Acad. Sci* 253, 472- 506, 1975.
- 17) Smith, D. S. Jarlfors, U. and Cayer, M. L. Structural cross-bridges between microtubules and mitochondria in central axons of an insect: *J. Cell Sci.* 27, 255 – 272, 1977.
- 18) Heggeness, M. H., Simon, M, Singer, S. J: Association of mitochondria with microtubules in cultured cells: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol* 75, 3863 – 3866, 1978.