

# 燐酸クロロキンの線維芽細胞および腫瘍細胞に 及ぼす影響の形態学的研究

## 第 1 編

### 位相差顕微鏡並びに細胞化学的研究

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木潔教授)

副 手 平 岡 敏 延

〔昭和42年10月13日受稿〕

#### 内 容 目 次

- I 緒 言
- II 研究材料および研究方法
- III 研究成績
  - 1. 線維芽細胞に及ぼす影響
  - 2. 吉田肉腫および Ehrlich 腹水癌細胞に及

- ぼす影響
- 3. 人癌細胞および人血液細胞に及ぼす影響
- IV 総括並びに考按
- V 結 語

#### I 緒 言

燐酸クロロキン [7-chlor-4-(4'-diethylamino-1'-methylbutylamino)-chinolin-diphosphat] は 1934 年 Andersag 等<sup>1)</sup> によつて合成され, Walther, Kikth により 1938 年抗マラリア剤として有効なことが立証された。1951 年 Page<sup>2)</sup>, 等が本剤と側鎖が同じであるアクリジン誘導体の Quinacrine をエリテアトードス, リウマチ性関節炎に使用して好成績を得たが, 1953 年 Goldman<sup>3)</sup> は燐酸クロロキンを亜急性紅斑性狼瘡を有する患者に使用し, 全身症状の軽快を記載し, 同年 Haydu<sup>4)</sup> はリウマチ性関節炎における治療効果を報告した。その後本剤は上記の所謂膠原病の他に気管支喘息<sup>5)</sup>, 種々の寄生虫疾患<sup>6)7)</sup>, 皮膚疾患<sup>8)</sup>, 眼疾患<sup>9)</sup>, 腎疾患<sup>10)</sup>, 癲癇<sup>11)</sup> 等にも使用され, それぞれ相当の治療効果が認められている。このようにクロロキンが病因的にも症候的にも非常に異なる疾患群に対して効果が認められるということは, その作用機序や作用部位の複雑さ, 多様性をうかがはずに十分である。現に燐酸クロロキンの作用機序に関しては, 病原体に対する作用は別として, 血管透過性抑制作用<sup>12)</sup>, 抗アレルギー作用<sup>8)</sup>, 抗ヒスタミン作用<sup>8)</sup>, 抗アセチルコリン作用<sup>8)</sup>, 酵素系に及ぼす作用<sup>13)</sup>, 抗炎症作用<sup>14)</sup>, ローチゾン様作用, 核酸代謝に及ぼす作用を推察さすものなど多面的検索がなされているが, 未だ決定的な

解答は与えられていない。その中でも線維芽細胞に及ぼす抑制作用は Haberland<sup>14)</sup>, 守谷<sup>15)</sup> の報告に示されている如く非常に顕著である。著者等はこのクロロキンの線維芽細胞抑制作用に注目し, 従来 Fischer<sup>16)</sup>, 吉田<sup>17)</sup>, 柴田<sup>18)</sup>, その他多くの報告に述べられている如く, 悪性腫瘍と間質成分の密接な関連, 悪性腫瘍と線維芽細胞との共生の重要性を考慮し, 悪性腫瘍の間質の発育を阻止することにより間接的に悪性腫瘍の発育を障害させることも可能ではないかと考えるに到つた。以下著者はこのための基礎的実験として, 又クロロキンの作用機序, および作用部位の解明の目的のために, 種々の細胞学的, 組織化学的方法を用いて本剤の線維芽細胞, 悪性腫瘍細胞, 一部人血液細胞におよぼす影響を形態学的に観察し, かなりの新知見を得ることが出来たので報告する。

#### II 研究材料及び研究方法

##### 1. 研究材料

###### 1) 線維芽細胞

a. in vivo 実験の線維芽細胞として, マウスの大網を用いた。即ち Strong A 系マウス雄, 体重 20~25g に燐酸クロロキン 25mg/KG 連日 5 日間筋注し, 最終の注射を終えて 24 時間後に殺し, 速やかに大網小片を切り取り, Ringer 液中で伸張標本を作成し, 同時にクロロキンの稀釈に用いた Ringer

液のみ筋注した Strong A 系<sup>19)</sup>マウス雄の大綱を対照とした。

b. *in vitro* 実験として、鶏胎児心組織を培養して用いた。9日目の孵化鶏卵より無菌的に鶏胎児心を Ringer 液中に取出し、約 1mm<sup>3</sup> 大の細切し、12×40mm の短冊型カバーガラス上に Plasma clot 法により心細片を 2個 2cm 間隔に附着せしめ、長さ 150mm 外径 15mm の丸型培養試験管にそれぞれ背中合せに 2枚宛カバーガラスを挿入し、培養液を各々 2cc 注入、ダブルゴム栓で密栓し、約 5° に傾斜した 1時間 10回転、37°C の孵卵器内の台架に並べ、廻転培養を行なつた。

培養液は Hank 氏液、鶏血清、鶏胎児圧搾液を 6 : 3 : 1 の比に混合して用いた。鶏血清は雄成鶏の翼下静脈より採血し、凝固したものを遠沈して血清を分離した。鶏胎児圧搾液は 9日目の鶏胎児の眼球を除去し、圧搾器で粥状にしたものを 3000r. p. m. で 30分間遠沈し、上清を採取した。

被験薬物磷酸クロロキンは Ringer 液で希釈し、培養開始時より、動物実験により適当と考えられる 27/dl, 207/dl, 2007/dl の培地濃度に添加し、被験薬物を含まない Ringer 液のみを培地に加えたものを対照とした。培養開始時の培地の pH は phenol red を指示薬として測定したが 7.2~7.6 の間にあつた。観察は 6, 12, 24, 48, 72時間目に行ない、対照と比較した。

## 2) 吉田肉腫および Ehrlich 腹水癌細胞

a. 吉田肉腫に及ぼす磷酸クロロキ連続投与の影響をみるために、岐阜系雑種ラッテ雄、体重 100~120g に吉田肉腫(岡山大学癌源施設保存)移植後 5日目の腹水を採取し、腹水 0.2cc 中に腫瘍細胞 100~200万個が含まれるように生理食塩水で希釈し、腹腔内に移植した<sup>19)</sup>。

被験薬物磷酸クロロキンは Ringer 液で希釈し、24時間後より、当教室平木、木村<sup>20)</sup>の方法に従い、連日 25mg/KG, 5日間腹腔内投与を行ない、最終投与後 24時間目に腹水腫瘍細胞を取出して観察した。対照はクロロキンを含まない Ringer 液のみ投与した吉田肉腫移植後 7日目のものを用いた。

b. 上記実験に対する *in vitro* 実験として、吉田肉腫移植 5日目の腹水を取出し、1000r. p. m. で遠沈し、沈渣をラッテ血漿で固定し、約 1mm<sup>3</sup> 大に細切、孵化 9日目の鶏胎児心細片と共に短冊型カバーガラス上に 2cm 間隔で 2個併置、Plasmaclot 法で固定し、背中合せに 2個、各ローラーチューブ内

に入れ廻転培養を行なつた。

培地は Hank 氏液、鶏血清、腫瘍細胞を含む吉田肉腫腹水を 6 : 3 : 1 の比に加え混和し、氷室に 24時間保存したものを 3000r. p. m., 15分間遠沈、上清をザイツ濾過器で濾過し、濾液 1.5cc に鶏胎児圧搾液の 0.5cc を加え、各管 2cc 宛とした。なお、吉田肉腫腹水を培地に加えたのは Lag-phase を防止するためである。

被験薬物磷酸クロロキンは Ringer 液で希釈し培養開始時より 27/dl, 207/dl, 2007/dl の濃度に添加し、Ringer 液のみ添加したものを対照とした。観察は 12, 24, 48時間目に行なつた。

c. Ehrlich 腹水癌細胞におよぼす磷酸クロロキ連続投与の影響をみるために、Ehrlich 腹水癌を、Strong A 系マウス雌、体重 20~25g に移植し、24時間後より Ringer 液希釈磷酸クロロキ連日 25mg/KG, 5日間腹腔内投与を行ない、最終投与 24時間後に腹水腫瘍細胞を取出して観察した。対照はクロロキンを含まない Ringer 液のみ投与した Ehrlich 腹水癌移植後 7日目のものとした。

d. 吉田肉腫に及ぼす磷酸クロロキ大量 1回投与の影響をみるために、岐阜系雑種ラッテ雄、体重 100~120g を使用し、吉田肉腫移植後 5日目に、磷酸クロロキ 100mg/KG を腹腔内に投与し、1, 6, 24時間目に腹水を取出して観察を行なつた。

e. Ehrlich 腹水癌細胞に及ぼす磷酸クロロキ大量一回投与の影響をみるために、Strong A 系マウス雌、体重 20~25g に Ehrlich 腹水癌を移植後 5日目に、磷酸クロロキ 100mg/KG を腹腔内に投与し、1, 6, 24時間目に腹水を取り出して観察した。

なお Lindner<sup>21)</sup>によれば、マウス、ラッテには 100mg/KG の量は、ほぼ致死量に相当する。

## 3) 人癌細胞および人血液細胞<sup>22)</sup>

a. 人癌細胞として胃癌および膀胱癌による癌性腹膜炎患者に、磷酸クロロキ連日 5日間 250mg 静注投与後、24時間目にその腹水を採取して癌細胞を観察し、クロロキ投与前の癌細胞と比較した。

b. 気管支喘息治療のため、磷酸クロロキ 1日 250mg, 3~12ヶ月、連日長期経口投与中の患者 5名の末梢血を観察し、健康成人末梢血を対照として比較した。

## 2. 研究方法

形態学および細胞化学的観察に使用した方法を列挙すると次の通りである。

1) 塗抹染色: May-Giemsa 染色, Jenna-Giemsa 染色. 2) 位相差顕微鏡観察, 対物レンズは DLL, BM を用い, 腹水の場合は圧挫法で, 短冊培養の場合は載物ガラス上に直接短冊カバーガラスを置き, 周囲をパラフィンで封入し, 保温器内で観察した. 3) 生体染色: 中性赤, ヤーヌス緑染色. 4) アミノ酸と蛋白質のための Millon 反応 (Bensley-Gersh 氏法). 5) 炭水化物のための PAS 反応 (Mc Manus 氏法). 6) 糖原のための唾液消化試験. 7) 脂質と脂蛋白のための Sudan Black B 染色 (Lison 氏法). 8) DNA のための Feulgen 反応 (Feulgen et Rosenbeck 氏法). 9) リポイド顆粒染色 (Ciaccio 氏法).

なお, 4) 以下の細胞化学的研究方法は, 岡本等<sup>22)</sup>の著書に従った.

### III 研究成績

#### 1. 線維芽細胞に及ぼす影響

a. 生体内投与例対照群の位相差顕微鏡所見で線維芽細胞は紡錘形, 細胞膜明瞭, 胞体は屈光性の強い少数の脂肪顆粒と少数の空胞, それらよりずつと小さい糸粒体と思われる顆粒が多数認められる. 核は楕円形, 核膜は明瞭なめらかで, 核小体は1~2個明瞭である(写真1).

クロロキン投与群では細胞の形, 細胞膜には差異は認められないが, 胞体内に明らかに空胞の増加と形の大小不同, 大型空胞の出現が認められ, 脂肪顆粒も大きさ, 数の増加が認められるが, 核には変化は見られない(写真2).

b. 培養線維芽細胞対照群, 細胞の形は紡錘形を主体とし, 三角形, 長方形, 種々の多核形のものそれぞれ数個の長い錐状突起を持つて多彩な外形を示している. 胞体は非常に菲薄で, 強屈光性の球形で大きさの整った脂肪顆粒があり, 主として核の周りに集合している. 糸粒体は粒状から短糸状のものも見られるが, はなはだ長い糸状のものが特徴的で, みみずのようにくねつて動くのが観察される. 粒状のものは活発に細胞の長軸にそつて往復運動をしている. この他に粒状, 糸粒体大で, DLL で暗色のコントラストの強い lysosome と思われる顆粒が多数あり, 活発に運動しているのが認められる. 核は正円形~楕円形, 核膜は明瞭, なめらかである. 核小体は通常2~3個で, 不整円形をしている. クロマチンは常常認められない(写真3). 核分裂像は各期のものが認められる.

経時的变化の概略を述べると, 6時間後, 培養原

組織の一部より少数の紡錘形の細胞が放射線状に伸び出している. 胞体内には極く少数の強屈光性の脂肪顆粒があり, 特徴的である. 空胞は未だ認められない. 12時間後, 原組織の全周より放射線状に細胞が伸び出している. 個々の細胞では前回観察時よりも胞体内の脂肪顆粒がやや増加している. 24時間後, 増生帯の先端部の細胞は前回観察時と大差はない. 原組織に近い細胞では脂肪顆粒がやや増加, 一部融合して出来たとみられるやや大きな脂肪滴が認められる. 核には変化は認められない. 48時間後, 増殖は活発で, 個々の細胞については前回観察時と大差はない. 72時間後, 原組織の近くには大きな脂肪滴, 空胞を有する変性の進んだ細胞が増加しているが, 先端部ではなお増殖は活発である.

磷酸クロロキン 27/dl 投与群 6時間後, 胞体内の脂肪顆粒の数が対照群に比しやや多い他は差異は認められない. 12時間後, 増生帯の大きさ, 密度, 細胞の形には殆んど差異は認められないが, 胞体内の脂肪顆粒の数はやや増加している. 24, 48時間後, 対照群に比し胞体内の脂肪顆粒の数が増加し, 原組織近くの細胞にやや大型の脂肪滴, 空胞の増加が認められる. 糸粒体, 核および核小体には差異は認められない. 72時間後は48時間目のものと大差は認められない.

207/dl 投与群, 各時間を通じて増生帯の大きさはおいて対照群よりわずかに小さい. 個々の細胞の形, 大きさには対照群との差異はみられないが, 6, 12時間後, 胞体内の脂肪顆粒の増加, 24時間以後では, 脂肪顆粒の大きさの不揃い, 大型脂肪滴, 空胞の増加が認められる. 糸粒体, 核, 核小体には差異は認められない(写真4). 核分裂像は各期のものが認められるが異常分裂は認められない.

2007/dl 投与群, 6, 12時間後, 増生帯の大きさ, 細胞密度に明らかに低下が認められる. 個々の細胞では, 線維芽細胞特有の細長い突起の伸びがやや悪く, 増生帯先端部の若い細胞にも脂肪顆粒の増加があり, 少数の大型脂肪滴が認められる. 糸粒体では, 線維芽細胞に特有のはなはだ長い糸粒体の数がやや減少し, 短糸状の糸粒体が多くみられる. 又長い糸粒体の活発な, みみずのようにくねつて動く運動がややにぶつている. 核, 核小体には差異は認められない. 24, 48時間後, 増生帯の大きさ, 密度の正常に比べての相対的低下は一層著明になり, 個々の細胞では, 細胞の細長い突起の伸びが悪く, 胞体内の脂肪顆粒は全般に大きさを増し, 核周に大きな

空胞を有する細胞が多数みられる。糸粒体は脂肪滴や空胞に覆われ十分観察することが出来ないが、長糸状および顆粒状糸粒体共運動がにぶっている。核膜は今迄より一層明瞭となるが、核の形、数、核小体に変化は認められない。核分裂像は各期のものが認められるが、その比率には著明な差異は認められない(写真5)。異常分裂の増加も認められない。一部には死滅したとみられる細胞残骸がみられる。72時間後、増生帯の大きさ、密度は48時間のものとは大差はないが、線維芽細胞は突起が著しく短くなり、巨大な空胞や脂肪滴が胞体を充して内部構造は判別困難となる。認められる限りでは核膜は今迄より明瞭であるが、核の形、核小体には明らかな差異はない。

## 2. 吉田肉腫および Ehrlich 腹水癌細胞に及ぼす影響

a. 吉田肉腫対照群、移植7日目の細胞、位相差顕微鏡所見では、胞体はほぼ正円形、胞体縁は整、明瞭で偽足突起はなく、胞体には顆粒が比較的少なく清明であるが、屈光性の強いリポイド顆粒が数個乃至十数個みられる。核陥凹部にはゴルジ装置がみられ、これを中心として猫の鬚状に糸粒体が配列され、小さく動いているのが特徴的である。糸粒体は大部分小糸状で、顆粒状のものは極く少数である。核は多くのものは腎形で、分葉を示すものは少数である。核膜は明瞭であるが厚くはなく、なめらかである。核小体は類円形で1~3個あり、1個のものが多い(写真6)。分裂像は Prophase~Telophase に到る各期のものが認められ、一部には多極分裂に基づく多核性巨態細胞もある。Metaphase では染色体の周りに糸粒体が配列され、Telophase では染色体の周りに糸粒体が入って密集しているのが認められる。

中性赤染色では、初め中性赤顆粒が核陥凹部に集合して現れ、しばらくして顆粒数が増加し、ロゼットを形成する。染色後約1時間で全細胞にロゼットが認められ、その後は中性赤顆粒の染色態度の変化は殆んど認められない。

ヤーヌス緑染色では糸粒体がよく染色され、糸粒体は核周にあり、特に1~2個所に集合している。形は糸状のものが多く、小顆粒状のものは極く少数である。

PAS 反応では大部分の細胞は陰性で、約1%程度に、あたかも好中球の PAS 陽性顆粒状に、小顆粒が胞体を満している細胞を認める(写真8)。

糖原のための唾液消化試験でも PAS 反応は陽性、即ち糖原は証明されない。

Millon 反応は、細胞質、核、核小体いずれも陰性である。

Feulgen 反応では、核が紫赤色に明瞭に染色され微細なクロマチン構造をあらわすが、胞体および核小体は陰性である。

Sudan Black B 染色では、リポイド顆粒が暗紫色~黒色に強く染色され、胞体内に微細な陽性顆粒を持つ細胞を一部に認めるが、核および核小体は染色されない。

リポイド顆粒染色では、胞体内に橙黄色に染る顆粒を認め、その大きさ、形、数、分布状態より、位相差顕微鏡で観察された強屈光性の顆粒は、リポイド顆粒と同定することが出来る。

燐酸クロロキン投与群は、胞体縁整、明瞭、形は正円形で対照群と変りないが、強屈光性のリポイド顆粒の数がやや増加し、顆粒の大きさも少し大型のものが増加し、不揃いである。核陥凹部のゴルジ体は、変化は認められない。糸粒体は、ゴルジ野を中心として花冠状に配列し、大部分のものは小糸状で小さく動いており、対照群と殆んど差異は認められない。核および核小体も対照群との差異は認められない(写真7)。核分裂像は1~2%で対照群と明らかな差異は認められない。多極分裂、非対称性分裂、過色質性分裂、減色質性分裂等の異常分裂像も数%に認められるが、対照群と有意の差は認められない。

中性赤、ヤーヌス緑による超生体染色でも対照群との差異は殆んど認められない。

PAS 反応は、大部分の細胞で陰性であるが、対照群にみられた陽性細胞は、明らかに増加し、数%に達する(写真9)。

糖原のための唾液消化試験でも PAS 反応陽性、即ち糖原は証明されない。

Millon 反応は対照群と同様、胞体、核、核小体いずれも陰性である。

Feulgen 反応も核は陽性であるが、対照群と差異は認められない。

Sudan Black B 染色では、胞体内の暗紫色~黒色に染まるリポイド顆粒が、対照群に比し、わずかに増加し、顆粒の大きさもやや大型のものが認められる。核および核小体は、対照群と同様染色されない。

リポイド顆粒染色でも、陽性顆粒の増加が認めら

れる。

b. 培養吉田肉腫細胞，位相差顕微鏡観察所見，対照群は，12，24時間後共腹腔内におけるものと差異は殆んど認められないが，分裂像は腹腔内におけるもの以上に多数認められる。48時間後，分裂は盛んなため，pH はやや低下しはじめ，胞体縁に凹凸が生じはじめ，リポイド顆粒および空胞がやや増加し，糸粒体は核周に分散ようになる（写真11）。なお，同時に併置培養した線維芽細胞は，各観察時間を通じ，線維芽細胞単独で培養したものと殆んど同所見である。

磷酸クロロキン 27/dl 投与群は，全実験期間を通じて，対照群と有意の差異は認められない。

207/dl 投与核も，対照群と殆んど差異は認められない。

2007/dl 投与群，12時間後，胞体内のリポイド顆粒，空胞およびその他の小顆粒がやや増加し，個々の顆粒の大きさも増大している。糸粒体は，核陥凹部に多くみられ，小さく動いている。24時間後，胞体内の顆粒は漸次増加，増大して対照群と明らかな差異を示し，糸粒体は核周に均等に分散するようになり，長糸状の糸粒体が減少し，顆粒状のものが増加している。核，核小体および分裂像に差異は認められない（写真12）。48時間後，胞体縁は不整化しはじめ，胞体内には大小不同の顆粒，空胞の増加が著明となり，核を圧迫している。糸核体は，一部顆粒や空胞に被われ認め難くなっているが，糸状のものが減少し，顆粒化を示し，核周に分散している。核はやや分業化の傾向がみられ，核小体は縁が不整化し，不明瞭となる。核分裂像は対照群と明らかな差異は認められない。なお，同時に併置培養した線維芽細胞は，磷酸クロロキンの各濃度，各観察時間について見ると，同一濃度，同じ観察時間の線維芽細胞単独培養のものに比べ，明らかに空胞，脂肪顆粒の増加が認められる。

c. Ehrlich 腹水癌の位相差顕微鏡所見，対照群は吉田肉腫に比し，全体にやや大型で，やや菲薄，胞体内には数個の脂肪顆粒を認め，糸粒体は糸状～顆粒状で，核周に瀰漫性に分布して小さく動いている。核膜は吉田肉腫のそれよりやや厚く，明瞭である。核小体は不整円形，明瞭で2～3個認められる（写真13）。

PAS 反応では，吉田肉腫の場合と同様，数%の細胞において強陽性を示す。

Sudan BlackB 染色は，脂肪顆粒のみ強陽性であ

る（写真15）。

Millon 反応は，核，核小体，胞体共陰性である。

Feulgen 反応は，核のみ陽性である。

リポイド顆粒染色では陰性である。

磷酸クロロキン投与群は，吉田肉腫の場合に認められた変化とほぼ同じ性質，同じ程度のものである。即ち，胞体内の脂肪顆粒の増加および増大，空胞の増加（写真14），PAS 反応陽性細胞の増加，Sudan Black B 染色陽性顆粒の増加が認められる（写真16）。

d. 磷酸クロロキン 100mg/KG 投与群，吉田肉腫細胞の位相差顕微鏡観察所見では，細胞は全体に肥大，扁平化し，胞体縁に不規則な凹凸を生じ，空胞，脂質顆粒共に増加，増大し，糸粒体は顆粒状化，減少の傾向にあり，その運動も不活発になる。

塗抹染色では，核，胞体共肥大し，淡染性の細胞が増加し，一部には濃縮した細胞もみられるが，胞体の軟化融解したものもみられる。空胞は全般に増加している。

PAS 反応では，陽性顆粒の増加が認められる（写真10）。

Sudan Black B 染色でも陽性顆粒の増加が認められる。

Millon 反応，Feulgen 反応は対照群と差異は認められない。

以上の変化は，磷酸クロロキン 25mg/KG，5日間投与群より一層著明であり，注射後1時間目よりみられ，24時間後にはほぼ常態にもどる。

e. 磷酸クロロキン 100mg/KG 投与時の，マウスの Ehrlich 腹水癌細胞に認められる変化も，上記ラットの吉田肉腫細胞に認められた一般的退行性変化を主体とするものであり，特異的な変化は認められなかったが，PAS 反応陽性細胞の増加は，この場合にも同様に認められる。

### 3. 人癌細胞および人血液細胞におよぼす影響

a. 胃癌および膀胱癌患者腹水の位相差顕微鏡，塗抹染色，細胞化学的検査所見では，対照群との差異は認められなかった。

b. 磷酸クロロキン長期投与患者，5名中3名の末梢血塗抹染色では，胞体内に中毒顆粒に類似した。微細な顆粒を持つ好中球を多数認めた。細胞化学的検査所見では，対照群との差異は認められなかった。

## IV 総括並びに考按

線維芽細胞, 吉田肉腫細胞, および Ehrlich 腹水癌細胞に関する形態学的研究並びに細胞化学的研究はこれまでに多数行なわれている。新島<sup>23)</sup>によれば, 線維芽細胞の特徴は, その形はきわめて可塑的で, 三角形, 長方形, 多角形を基本として, これに種々な程度に錐状突起が加わって複雑な外形を示し, 胞体内には, はなはだ長い糸状の糸粒体を有することが特徴で, この他粒状の糸粒体, 粒状糸粒体によく似ているが位相差顕微鏡で糸粒体よりもコントラストの強い lysosome, 核の近くには球状の脂質滴を有することが特徴的である。私も *in vivo* 並びに *in vitro* で同様の特徴を認めた。

吉田肉腫細胞については吉田<sup>17)</sup>の研究によると, 同細胞は円形で, 核は一方に偏在して楕円形乃至腎形を呈する。核小体は大きく, 且つ鮮明である。核胞体比は大で腫瘍細胞の特徴を示し, 胞体内には少数の光輝性の強いリポイド顆粒があり, May-Giemsa 染色では濃青色に染まり, RNA が胞体内に豊富であることが推定されている。又異常細胞分裂が多数認められる。Ehrlich 腹水癌細胞に関する武田<sup>24)</sup>の研究によれば, Ehrlich 腹水癌細胞は円形で, 核は楕円形, 円形で核小体は明瞭である。糸粒体は吉田肉腫のそれに比し数がやや少ない。私もほぼ同様の所見を認めたが, Ehrlich 腹水癌細胞は吉田肉腫細胞に比しやや大型で, 位相差顕微鏡では, やや厚みが少なく, 核小体の数がやや多い。

吉田肉腫細胞, Ehrlich 腹水癌細胞の超生体染色についても多数の研究がなされているが, 中性赤染色について武田<sup>24)</sup>によれば, 吉田肉腫では, 糸粒体が放射線状に配列した中心部に, 粗大な多数の中性赤空胞が現われる。Ehrlich 腹水癌では, 比較的少数の顆粒が, 胞体内に瀰漫性に現われ, 前者のように時間と共に増大することがないと述べている。ヤーヌス緑染色について吉田<sup>17)</sup>によれば, その染色性は非常に弱く, 顆粒は一定の部位になく, 原形質内に広く散乱している。ただし中性赤顆粒の存在する部位に重なり合うことなく, 常にその周囲に散在している。私も同様の所見を認めた。

吉田肉腫, Ehrlich 腹水癌の PAS 染色については, 内海<sup>25)</sup>, 田代等<sup>26)</sup>によれば, 数%の細胞には陽性の顆粒が胞体内に充満しているが, 核では陰性である。私の実験でもほぼ同様の成績を認めた。

Fenlgen 反応では, 吉田肉腫 Ehrlich 腹水癌共,

核が明らかに染色され, その他は陰性である。

Millon 反応では, 吉田肉腫, Ehrlich 腹水癌共, 核胞体両方に陰性である。

吉田肉腫の Sudan Black B 染色では, 吉田<sup>17)</sup>によれば陰性であるが, 私は胞体内に強陽性の顆粒を認めた。Ehrlich 腹水癌の Sudan Black B 染色でも, 吉田肉腫の場合とほぼ同様, 胞体内に強陽性の顆粒を認めた。

吉田肉腫のリポイド顆粒染色については, 柴田<sup>27)</sup>は, 胞体内に陽性顆粒を認めている。私も同様の結果を得た。Ehrlich 腹水癌のリポイド顆粒染色では陰性であり, 吉田肉腫のそれが陽性であることと比較し興味ある所見である。

線維芽細胞, 吉田肉腫細胞および Ehrlich 腹水癌細胞に及ぼす磷酸クロロキンの影響は, 共に高濃度では, 細胞にかなりの細胞障害作用が認められるが, 培養線維芽細胞では 27/dl の低濃度でも細胞障害が認められ, 生体内投与では 25 mg/KG, 連日 5 日間投与で障害作用が認められる。同一条件の実験では癌細胞には細胞障害は認められないか, あつても極く軽度である。

当教室の守谷<sup>16)</sup>によれば鶏胎児心由来の培養線維芽細胞では, 磷酸クロロキン 27/dl の低濃度で成長抑制作用が認められている。私の成績では, 同一濃度では, 極く軽度であるが細胞変性作用を認め, 207/dl の濃度では, 明瞭に細胞変性作用が現われ, 守谷の認めた成長抑制作用は, 細胞障害作用によるものであることを明らかにすることが出来た。

線維芽細胞と吉田肉腫の併置培養では, 線維芽細胞は吉田肉腫細胞より早期に変性に陥ることを認めた。

平木<sup>20)28)29)</sup>は悪性腫瘍の実質と間質成分の密接な関係より考え, 悪性腫瘍の間質成分の発育を阻止することにより, 間接的に悪性腫瘍の発育を障害することが可能ではないかと推定し, 悪性腫瘍の患者にクロロキン剤を投与している。私の実験では生体で達成出来ると思われる濃度である磷酸クロロキン 207/dl の濃度では, 癌細胞には殆んど細胞障害作用は認められないが, 線維芽細胞にはかなりの細胞障害作用を及ぼすことが可能であつた。この成績は平木の推論に対して一つの根拠を与えるものであると考えられる。

吉田肉腫に及ぼす大量 1 回投与の場合, 吉田肉腫の細胞学的変化は, 磷酸クロロキン投与 1 時間後よ

り明らかに現れ、6時間後には変化は最高に達するが、24時間後にはその変化は大部分消失する。これは一つには、磷酸クロロキシンが腹腔より生体全体に拡がり、一部排泄されること、一つには障害された細胞が比較的すみやかに破壊されたり、食細胞により貪喰されるためである。食細胞に障害された細胞を処理する作用のあることは、吉田もその著書“吉田肉腫”<sup>17)</sup>の中で詳しく述べている。

磷酸クロロキシン投与群吉田肉腫のPAS染色では、対照群に比し明らかに胞体内に、陽性顆粒の充満した細胞が増加する。磷酸クロロキシン100mg/KG 1回投与群では、その変化は一層著明となる。内海<sup>25)</sup>のMEPAを吉田肉腫に投与した実験、Nitogen Mustardを用いた田代等<sup>26)</sup>の実験では、吉田肉腫のPAS陽性顆粒の著明な増加を認めている。なお、内海はこの陽性顆粒を多糖類とし、田代等はこの陽性顆粒は大部分グリコゲンで、一部多糖類に属するとしている。私はこの陽性顆粒は、唾液消化試験でも消失しないことから考え、多糖類であると考え。以上の如く、一般に細胞障害作用の強い薬物を吉田肉腫に投与する場合には、PAS陽性細胞は増加する傾向にあるようである。

磷酸クロロキシンの線維芽細胞に及ぼす影響は、培養細胞ではわずか2γ/dlの濃度から現われ、その濃度に比例して影響は強くなる。その変化は、胞体の空胞と脂肪顆粒の増加、増大を主とし、200γ/dlの濃度では、線維芽細胞特有の突起の伸びが悪く、糸粒体も特有の細長い糸状のものがやや減少し、その運動もややよくなる。核、核小体、核分裂にはいずれの濃度でもその影響は認められない。以上の変化は、生体内投与の場合でも同性質、同程度のものである。

一般に、細胞変性に際してみられる細胞学的変化は、細胞内空胞形成<sup>30)</sup>、細胞の変形<sup>30)</sup>、核変形<sup>30)</sup>、細胞運動能低下<sup>30)</sup>、核、細胞の融解<sup>30)</sup>等が観察されている。これに比べると、磷酸クロロキシン投与に際して現われる変化は、一般的細胞変性の範疇にはいるが、程度は非常に軽いものと考えられる。

磷酸クロロキシンの人癌細胞に及ぼす細胞学的変化は、生体内投与では殆んど認めることが出来なかつ

た。これは静脈内投与であり、腹水中の濃度が低かつたことが一因と考えられる。磷酸クロロキシンを人体に長期にわたり投与する場合、Bäumer<sup>31)</sup>は白血球の胞体内に、変性顆粒が多数認められると述べている。私も同様の所見を認めているが、それも勿論、磷酸クロロキシンによる細胞の変性を示すものといえる。

## V 結 語

磷酸クロロキシンを投与し、線維芽細胞、吉田肉腫細胞、Ehrlich 腹水癌細胞、人癌細胞および人白血球に認められる形態学的変化を位相差顕微鏡観察と細胞化学的方法により研究して次の所見を得た。

1) 線維芽細胞、in vivo 25mg/KG/日、5日間投与群では、胞体内に空胞、脂肪顆粒の増加、増大が認められた。in vitro では、わずか2γ/dlの濃度で胞体内に脂肪顆粒の増加が認められ、濃度を増すに従つて、胞体内の脂肪顆粒の増加、増大、空胞の増加、増大、糸粒体の断裂が認められた。

2) 吉田肉腫、Ehrlich 腹水癌細胞に認められる変化は、in vivo、in vitro 共胞体内空胞、脂肪顆粒の増加を主とし、同濃度では線維芽細胞に認められる変化に比し、はるかに軽度であつた。

3) 吉田肉腫および Ehrlich 腹水癌のPAS染色では、軽度の陽性顆粒の増加を認めた。

4) 吉田肉腫および Ehrlich 腹水癌の脂肪染色では、陽性顆粒の増加、増大を認めた。

5) 人癌細胞では変化が認められなかつたが、長期経口投与患者の好中球胞体内に、中毒顆粒を多数認めた。

6) 以上の如く、磷酸クロロキシンは諸種の細胞に作用し、胞体に形態学的変化を与えるが、その変化は通常の細胞退行性変化の範疇に入るものと考えられる。

拙筆に臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師平木潔教授、木村郁郎講師並びに太田善介講師に深く感謝致します。

[本論文の要旨は第21回日本癌学会総会において発表した.]

## 主 要 文 献

1) Andersag, H. et al.: Zur Entwicklung des Malaria-Heilmittels, *Medicine und Chemie*, 5,

168~173, 1956.

2) Page, F.: Treatment of lupus erythematosus

- with Mepacrine, *Lancet*, **261**, 755~758, 1951.
- 3) Goldman, L. et al.: Chloroquine diphosphate in treatment of discoid lupus erythematosus, *J. A. M. A.*, **152**, 1428~1429, 1953.
  - 4) Haydu, G. G.: Rheumatoid arthritis therapy: A rationale and the use of chloroquine diphosphate, *Am. J. M. Sc.*, **225**, 71~75, 1953.
  - 5) 平木潔他: 気管支喘息に対する新治療法の提唱—磷酸クロロキンの長期投与療法について, *総合臨床*, **10**, 325~331, 1961.
  - 6) Fu, H. F. and Ma, K. C.: Chloroquine in the treatment of clonorchiasis, *Chincse M. J.*, **71**, 135~138, 1953.
  - 7) 木村郁郎他: 若菜病に対する新治療法の提唱—クロロキン (レゾヒン) 療法を中心として—, *総合臨床*, **8**, 796~803, 1959.
  - 8) 石原勝: 抗マラリヤ剤 Chloroquine の諸種皮膚疾患に対する治療効果並びに作用機序について, *日本皮膚科学会雑誌*, **69**, 132~149, 1959.
  - 9) 土屋一: 眼科領域における Resochin の使用経験, *臨床眼科*, **14**, 313~320, 1960.
  - 10) 辻昇三他: 腎炎の薬物療法—特に Chloroquine 療法について—, *総合臨床*, **7**, 2324~2351, 1958.
  - 11) 和田豊治他: 難治性てんかんの Resochin 治療, *脳と神経*, **13**, 49, 1961.
  - 12) Blaiich, W. und Gerlach, U.: Zum Wirkungsmechanismus des Resochin beim Erythematodes. *Hautarzt*, **6**, 267~271, 1955.
  - 13) Green, H. V. et al.: Biological Action of the Adenine Nucleoides, London, H. K. Lewis, 1950.
  - 14) Haberland, G. L. et al.: Pharmakologische Untersuchungen zur Wirkungsweise von Anti-phlogistika, *Zeitsch. f. Rheumaforschung*, **18**, 220~232, 1959.
  - 15) 守谷欣明: クロロキンによる気管支喘息の臨床的並びに薬理学的研究, 第3編, クロロキンの線維芽細胞抑制作用に関する研究, *岡山医学会雑誌*, **77**, 1257~1264, 1965.
  - 16) Fischer, A.: Cytoplasmic growth principles of tissue cells, *Arch. exp. Zellforsch.* **1**, 369~377, 1925.
  - 17) 吉田富三: 吉田肉腫, 寧楽書房, 東京, 1949.
  - 18) 柴田凡夫: 吉田肉腫細胞の組織培養による形態学的研究, 第1編, 細胞浮游液培養法の検討, *岡山医学会雑誌*, **73**, 877~883, 1961.
  - 19) 山本正: 医学研究動物実験法, 朝倉書店, 東京, 1956.
  - 20) 平木潔, 木村郁郎: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の治療に関する研究 (第1報), *総合臨床*, **11**, 1807~1820, 1962.
  - 21) Lindner, J.: Resochin-Symposium, *レゾヒン*, 文献集, 第4輯, 15~24, 吉富製薬, より引用.
  - 22) 岡本耕造他: 顕微鏡的組織化学, 医学書院, 東京, 1955.
  - 23) 新島勉夫他: 組織培養, 朝倉書店, 東京, 1964.
  - 24) 武田進: 腫瘍細胞, 永井書店, 大阪, 1956.
  - 25) Utsumi, K. R.: Cytological Effect of Chemicals on Tumors. XXVII. Cytological and Cytochemical Aspects on the Effect of N-(3-Oxapentamethylene)-N', N''-diethylenphosphoramidate (MEPA) on Yoshida Sarcoma Cells, *Gann*, **56**, 555~566, 1965.
  - 26) Tashiro, T. et al.: Increase of Glycogen and Oligosaccharide Contents in Ascites Tumor Cells by the Action of Nitrogen Mustard, *Gann*, **57**, 53~61, 1966.
  - 27) 柴田凡夫: 吉田肉腫細胞の組織培養による形態学的研究, 第2編, 細胞浮游培養時における細胞学的変化, *岡山医学会雑誌*, **73**, 885~892, 1961.
  - 28) 平木潔他: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の治療に関する研究 (第2報)—各種癌患者におけるクロロキンの効果について—, *総合臨床*, **15**, 340~348, 1966.
  - 29) 平木潔他: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の治療に関する研究 (第3報)—悪性淋巴性腫瘍に対するクロロキンの効果, *総合臨床*, **15**, 1170~1173, 1966.
  - 30) 品川晃二: 骨髄体外組織培養における人白血球の退行性変化に関する研究, 第1編, 健康人白血球の退行性変化について, *岡山医学会雑誌*, **73**, 261~284, 1961.
  - 31) Bäumer, A.: Darstellung von Resochin bzw. Resochin-Derivaten in Geweben, *Zeitschrift f. Rheumaforschung*, **18**, 433~442, 1959.

写 真 説 明

1. マウス大網の線維芽細胞, 対照群
2. マウス大網の線維芽細胞, クロロキン 25 mg/KG/日, 5 日間投与群
3. 培養線維芽細胞, 対照群
4. 培養線維芽細胞, クロロキン 20  $\gamma$ /dl, 投与群
5. 培養線維芽細胞, クロロキン 200  $\gamma$ /dl, 投与群
6. 吉田肉腫細胞, 移植後 7 日目
7. 吉田肉腫細胞, クロロキン 25 mg/KG/日, 5 日間投与群
8. 吉田肉腫細胞の PAS 反応 (対比染色なし)
9. 吉田肉腫細胞の PAS 反応 (対比染色なし), クロロキン 25 mg/KG/日, 5 日間投与群
10. 吉田肉腫細胞の PAS 反応 (対比染色なし), クロロキン 100 mg/KG, 1 回投与群
11. 吉田肉腫と線維芽細胞併置培養, 対照群
12. 吉田肉腫と線維芽細胞併置培養, クロロキン 200  $\gamma$ /dl, 投与群
13. Ehrlich 腹水癌細胞, 移植後 7 日目
14. Ehrlich 腹水癌細胞, クロロキン 25 mg/KG/日, 5 日間投与群
15. Ehrlich 腹水癌細胞の Sudan Black B 染色 (対比染色なし)
16. Ehrlich 腹水癌細胞の Sudan Black B 染色 (対比染色なし), クロロキン 25 mg/KG/日, 5 日間投与群

Morphological Studies of Effects of Chloroquine Diphosphate  
on Fibroblasts and Tumor Cells

I. Phase Contrast Microscopic and Cytochemical Study

Toshinobu HIRAOKA

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School Okayama  
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Effects of chloroquine diphosphate on fibroblasts, Yoshida sarcoma cells, Ehrlich ascites tumor cells and human neutrophils were investigated morphologically by phase contrast microscopy and cytochemical methods.

The following results were obtained.

1) **Fibroblasts:** The fibroblasts obtained from mice previously administered with 25 mg of chloroquine diphosphate per kilogram body weight for five days showed increase of vacuoles and fat droplets in the cytoplasm. The cultured fibroblasts displayed increase of intracytoplasmic fat droplets by addition of such small amount of chloroquine diphosphate as 2 $\gamma$  per 100 ml to the culture medium. As the concentration of chloroquine became high, increase in size and number of the intracytoplasmic lipid droplets and vacuoles and fragmentation of the mitochondria were observed.

2) The main morphological changes of Yoshida sarcoma cells and Ehrlich ascites tumor cells were increased of intracytoplasmic vacuoles and lipid droplets both in in vivo and in vitro chloroquine treatment. However, these changes of tumor cells were considerably mild when compared with those of fibroblasts which underwent the same treatment.

3) By the treatment of chloroquine, Yoshida sarcoma cells and Ehrlich ascites tumor cells disclosed a slight increase of the granules positive in PAS staining.

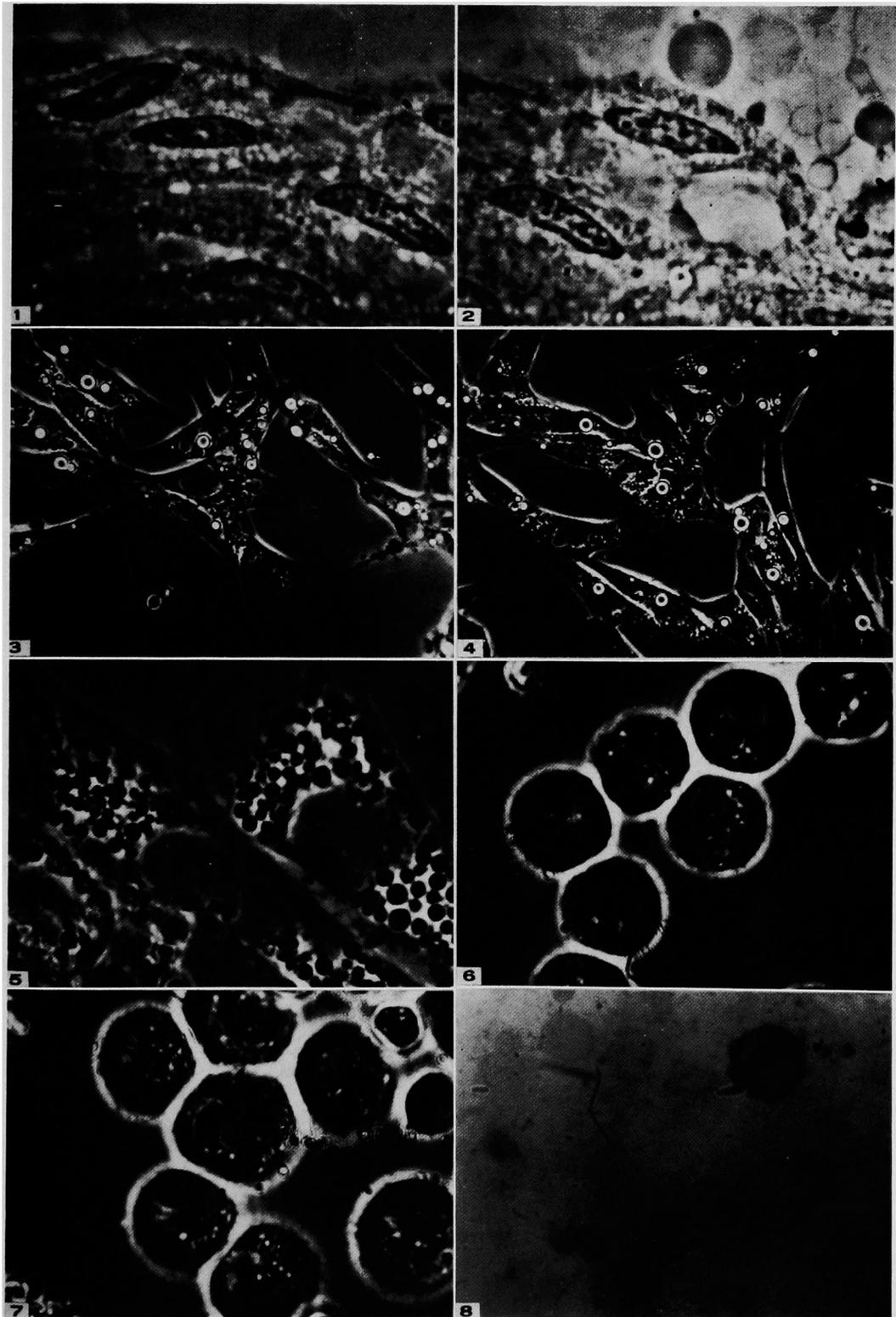
4) When treated with chloroquine, fat granules of Yoshida sarcoma cells and Ehrlich ascites tumor cells were observed to be increased in size and number in lipid staining.

5) Numerous granules were observed in neutrophils of patients who were administered with chloroquine diphosphate for a long period. However, patient's tumor cells showed no morphological changes.

6) In summary, chloroquine diphosphate can exert morphological alteration on various cells which was considered to be non-specific cellular degeneration.

---

平岡論文附图



平岡論文附図

