

# 磷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 2 編

### 磷酸クロロキンの肉芽腫線維芽細胞に及ぼす形態学的 変化の電顕的研究

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. 対照肉芽腫内に認められた線維芽細胞

##### 2. 磷酸クロロキン処置肉芽腫内に認められた線維芽細胞

#### IV 総括並びに考按

#### V 結 語

#### I 緒 言

第1編において線維芽細胞抑制剤によつて癌の間質成分を障害することにより、2次的に癌そのものを治癒せしめようという理念のもとに、線維芽細胞、吉田肉腫および Ehrlich 腹水癌細胞、人癌細胞および人血液細胞等に対する磷酸クロロキンの影響を観察し、腫瘍細胞にはほとんど変化を与えぬ量においても線維芽細胞に対しては著明な変化を惹起せしめ、細胞変性を招来せしめることを実験的に証明し、我々の理念に実験的根拠を与えることに成功した。第1編において、線維芽細胞に惹起せしめたこの変化は一般的細胞変性と異なるところがないことを位相差顕微鏡、塗抹染色および細胞化学的反応において明らかにしたが、この問題を更に詳細に検討するために本編においては電子顕微鏡により、磷酸クロロキン処置を行なつた線維芽細胞を観察し、線維芽細胞の変化を細胞微細構造のレベルで観察したのでその結果を報告する。因に、磷酸クロロキンの細胞におよぼす形態学的影響の電顕的観察は未だ行なわれていないようである。

#### II 研究材料並びに研究方法

肉芽腫: Wister 系雄ラットの両側背部皮下に各々2cc宛, 1/10M 磷酸緩衝液 (pH 7.5) で4%に

溶解した寒天を注入し、注入後24時間目より連日磷酸クロロキンをクロロキン量として15mg/KGを尾静脈より投与し、15日後に屠殺して肉芽腫をとり出し材料とした。対照としては無処置の肉芽腫を用いた。

電子顕微鏡観察: とり出した肉芽腫を細切し、Palade 固定液<sup>2)</sup>により4°Cで約1時間固定し、固定液を捨てた後、70%、90%、95%ならびに無水アルコールで漸次脱水し、メチルおよびブチルメタクリル1対4の混合液に移し包埋を行なつた。

出来上つたブロックはライツ製ウルトラミクロトームで超薄切片とし、醋酸ウラニルの飽和溶液で電子染色後日立H U11型電子顕微鏡により観察した。

#### III 研究成績

1. 対照肉芽腫内に認められた線維芽細胞は円形に近く径約12 $\mu$ 程度の細胞であり(写真1, 2), 細胞の辺縁は比較的凹凸に富み、隣接細胞と密に接している。

核はほぼ細胞の中心部に存在し極めて凹凸に富み、かなり深い核膜の陥入を認める。核膜は内外2重の膜より構成せられ、核膜に接する核質の部は、他の核質部分に比べて電子密度が大である。核質は微細顆粒状物質よりなり、後述の核膜に接する部位をのぞいては、ほぼ同一の電子密度で、著明な核質

結節等を認めることは出来ない。

核小体は全体として核質より電子密度が高く、微細な顆粒より構成されている。その一部では径約200 $\mu$ mの紐状構造が認められる。

細胞質は核に比べて電子密度がやや低く、少数の ribosome が散在性、時に小集合を作つて存在する。

小胞体はよく発達しており、空胞状あるいは管状の滑面小胞体が細胞質内全体にわたつて多数認められる。粗面小胞体はむしろ少ない。

糸粒体は少数細胞質内にみられ、多くは円形で cristae mitochondriales はほぼ平行に配列しているが、時に配列の乱れが認められる。糸粒体内には顆粒は少ない。

細胞質内には電子密度の高い、限界膜にかこまれた円形の顆粒を少数認める。直径約500 $\mu$ mである。

空胞は細胞質内に多数みられ1重の限界膜にかこまれ、内部には均一な電子密度の低い物質を含んでいる。多くは円形であるが、まれには複雑な管状構造を呈している。

正常の線維芽細胞内には少数の myelin figure 様の層構造が認められる。その多くは未発達で、電子密度の高い円形像として認められることが多い。

Golgi 体はあまり発達していないようである。

## 2. 燐酸クロロキン処置肉芽腫内に認められた線維芽細胞

細胞の基本構造は前述の対照線維芽細胞と変りない(写真3)。認められた変化について述べると先ず、核については対照線維芽細胞の核質が核内にはほぼ均一に存在するにもかかわらず、燐酸クロロキンにより処置した線維芽細胞では核質が処々小集合を成して存在する。細胞質内構造についてみられる著明な変化は顆粒、myelin figure 様層構造および空胞の増加である。

顆粒は数が増加すると共に、電子密度も高くなり、内部に点状あるいはリング状の構造がみられる。myelin figure 様の層構造は対照線維芽細胞に認められるものよりよく発達し、数層が数えられるようになる。

空胞も数が増加し、形も多形性となり、内部も均一な物質と共に電子密度の高い円形の構造が認められる。著明なことは内部がほとんど空虚に見える大きい空胞、直径約2 $\mu$ m程度が出現することである。この空胞には2重の限界膜がみられ、形は多くは円形であるが、多形性を呈するものもあり、内部には

形態のはつきりしない、電子密度の高い顆粒を少数含んでいる。一部の空胞は限界膜が破壊しており、この種の空胞はおそらく細胞変性の結果生じたものと思はれる。

糸粒体も膜構造が不明瞭となり、Cristae mitochondriales の破壊も部分的にみられる。

## IV 総括並びに考按

肉芽腫に認められる線維芽細胞は正常の結合組織内にみられる線維芽細胞(4,5,6)とは形態的にやや異なつていふように思はれる。すなわち、正常組織の線維芽細胞は細胞全体が細長く、コラーゲン合成に関係が深いと考えられる粗面小胞体、ribosome<sup>7)</sup>等が細胞質内に充満しているが、肉芽腫を形成する線維芽細胞では細胞の形態がむしろ円形に近く、粗面小胞体、ribosome も少ない。また、細胞の周囲のコラーゲン線維の量も少ない。おそらく肉芽腫内の線維芽細胞は細胞のコラーゲン合成能が低下しているのではないかと考えられる。

燐酸クロロキンを投与した肉芽腫では対照に比べて、若干核質に変化を来し、細胞質内構造では顆粒の増加、myelin figure 様の層構造の増加、糸粒体の膜構造の不明瞭化等が観察される。この様な核の変化は一般に変性途上の細胞に認められ、又各種の薬剤で処置した細胞にもみることが出来、燐酸クロロキンで処置することにより線維芽細胞の核に軽度の変性を来したのではないかと考えられる。顆粒、myelin figure 様の層構造等はその大きさおよびオスミウム酸に親和性の強いことより考えて、前編の研究において、光学顕微鏡により認めることの出来た、脂肪滴ではないかと考えられ、これらの構造物が細胞の変性を示すことは、線維芽細胞の組織培養時培養の後期になると同じ構造物が増加してくるといふ Goldberg らの研究<sup>7)</sup>等からも明らかであろう。

燐酸クロロキン処置線維芽細胞に特徴的に出現した、内容が空虚な空胞はおそらく燐酸クロロキンが細胞質を障害することにより細胞質の一部が溶解流出して生じたものであろう。

燐酸クロロキン処置を受けた線維芽細胞内の糸粒体は膜構造が不明瞭となり、Cristae mitochondriales の部分的破壊も認められるが、これらも細胞変性の徴であることは Rouiller<sup>8)</sup>、Nimwegen<sup>10)</sup>等も記している通りである。

以上を要約すると燐酸クロロキンが線維芽細胞に

及ぼす形態学的影響は、核ならびに細胞質およびその構造物に対するゆるやかな変性作用であるということが出来、抗癌剤等で見られる細胞に対する強力な障害作用とは趣を異にし、前編で述べた様に細胞の一般的退行性変化に極めて近似したものであるということが出来る。

### V 結 語

磷酸クロロキンを投与した肉芽腫内にみられる線維芽細胞は対照に比べ次の様な変化を認めることが出来た。

- 1) 核質が処々小集合を形成していた。
- 2) 顆粒並びに myelinfigure 様の層構造が細胞内に増加した。

- 3) 内部に均一な物質を入れる空胞が増加した。
- 4) 内部が空虚な大型の空胞が出現した。
- 5) 糸粒体の膜構造が不明瞭となり、Cristae mitochondriales の部分的破壊がみられた。

以上より磷酸クロロキンの線維芽細胞に及ぼす形態学的変化は細胞に対するゆるやかな変性作用であるということが出来る。

擱筆に臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師平木潔教授、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) 平岡敏延：磷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，岡山医学会雑誌，79，1967.
- 2) Peace, D. C.: Histological techniques for electron microscopy, Academic Press, New York and London, 1963
- 3) Watson, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals, J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 475, 1958.
- 4) Rhodin J. A. G.: An atlas of ultrastructure, W.B. Saunders Co. Philadelphia and London, 1963.
- 5) Porter, K. R. and Pappas, G. D.: Collagen formation by fibroblasts of the chick embryo dermis, J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 153~166, 1959.
- 6) Chapman, J. A.: Morphological and chemical studies of collagen formation, I. The fine structure of guinea pig granulomata, J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 639, 1961.
- 7) Goldberg, B. and Green, H.: An analysis of collagen secretion by established mouse fibroblast lines, J. Cell Biology, 227, 1964.
- 8) Schoefl, G. I.: The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus, J. Ultrastructure Research, 10, 224, 1964.
- 9) Rouiller, C.: Physiological and Pathological Changes in mitochondrial morphology, Intern. Rev. Cytol. 9, 227, 1960.
- 10) Van Nimwegen, D. and Sheldon, H.: Early postmortem changes in cerebellar neurons of the rat, J. Ultrastructure Research, 14, 36, 1966.

### 写 真 説 明

1. 対照線維芽細胞  
n: 核小体, N: 核, M: 糸粒体, L: myelin figure 様の層構造, V: 空胞, 倍率 ×12,500
2. 対照線維芽細胞  
倍率 ×12,500
3. 磷酸クロロキンにより処置された線維芽細胞  
DV: 変性空胞 倍率 ×12,500

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

### II. Electron Microscopic Study on Morphological Effects of Chloroquine Diphosphate on the Fibroblasts in Granulom

Toshinobu HIRAOKA

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

When compared with control, fibroblasts in granulom which was previously in vivo treated with chloroquine diphosphate showed the following changes.

- 1) The nucleoplasm partially formed abnormal, scattered, small conglomerates.
- 2) The granules and intracytoplasmic membraneous bodies resembling myelin figure increased in number.
- 3) Vacuoles containing homogeneous substance increased in number.
- 4) Large empty vacuoles increased in number.

In summary, it may be concluded that the effect exerted by chloroquine diphosphate on the morphology of fibroblasts in granulom is a change of their ultrastructures suggesting a mild cellular degeneration.

---

