

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

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

大 学 院 守 谷 欣 明
医学研究科

【昭和 40 年 9 月 28 日受稿】

内 容 目 次

I 緒 言	クロロキン剤の影響
II 実験方法	3. L細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影 響
1. 鶏胎児心線維芽細胞に対する増生抑制効果	4. L細胞の呼吸に及ぼす磷酸クロロキンの影 響
2. L細胞に対する増生抑制効果	5. 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす各種薬 剤の影響
3. L細胞に対する呼吸抑制効果	IV 総括並びに考按
III 実験成績	V 結 語
1. 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす磷酸ク ロロキンの影響	
2. 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす各種ク ロロキンの影響	

I 緒 言

クロロキンは1934年, Andersag¹⁾により抗マ
ラリヤ剤として合成されたキノリン誘導体であるが,
1951年, Page²⁾は同じキノリン核を有するアクリ
ナミンをエリテマトーデス及び関節リウマチに使用
して優れた効果を報告し, 続いて1953年, Goldman
ら³⁾はクロロキンをエリテマトーデスに使用し, ま
た Haydu⁴⁾は関節リウマチに使用して好成績を報
告した。その後クロロキンはさらに多くの寄生虫疾
患⁵⁾, 皮膚疾患⁷⁾, 眼疾患⁸⁾あるいは腎疾患⁹⁾等に
応用され, これら慢性, 難治性疾患に対する新治療
剤として異色の地位を築きつつあることは周知の通
りである。一方これら適応疾患の開拓とともにクロ
ロキンの複雑な作用機序が解明され, 病原体に対す
る作用⁶⁾の他に抗ヒスタミン作用⁷⁾, 抗アセチル
コリン作用⁷⁾, 抗炎症作用¹⁰⁾, 抗アレルギー作用⁷⁾
¹¹⁾等の多くの興味ある薬理作用が報告されている

が, その一つとして本剤の線維芽細胞に対する抑制
作用が注目を集めている。

私は前編においてクロロキンを気管支喘息の治療
に応用し, 従来の治療法に比し可成り優れた成績を
得ることが出来たが, さらにクロロキンの薬理作用
について抗ヒスタミン作用, 抗炎症作用, 抗アレル
ギー作用を認めることが出来た。気管支喘息に対す
るクロロキンの作用機序について, 以上の薬理作用
及び平滑筋弛緩作用¹²⁾, 抗体不活性化作用¹⁰⁾とと
もに線維芽細胞に対するクロロキンの作用は肺線維
化を来たす本症において重視すべきものと考えられ
る。私はクロロキンの線維芽細胞抑制作用について,
鶏胎児心線維芽細胞及びマウス皮下組織由来の線維
芽細胞であるL細胞¹³⁾の組織培養により線維芽細
胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンあるいは各種ク
ロロキン剤の影響について検討を行なつた。またL細
胞の呼吸に及ぼす磷酸クロロキンの影響について検
討を行ない, さらに鶏胎児心線維芽細胞の組織培養

により各種薬剤について線維芽細胞抑制作用の検索を行なった。

II 実験方法

1. 鶏胎児心線維芽細胞に対する増生抑制効果

1) 培養組織

鶏胎児心組織を使用し、組織片より増生する初代培養線維芽細胞について実験を行なった。鶏胎児心組織は9日目の孵化鶏卵より保温 Ringer 液中に鶏胎児心を切り出し、グレーフェエ刃を用いて約 1 mm³ 大に辺縁を鋭利に切断して実験に供した。

2) 培 地

鶏血漿、鶏胎児圧搾液及び Ringer 液の等量よりなる培地を使用した。鶏血漿は絶食せしめた雄成鶏の翼下静脈よりヘパリン加血液として採血し、3000 回転 5 分間遠沈して血漿を分離した。また鶏胎児圧搾液は9日目の鶏胎児を Ringer 液中に取り出し、眼球を除去した後、圧搾器にて粥状にし、2000 回転 15 分間遠沈して上清を採取した。

3) 培養方法

教室考案になる組織培養盤 No. 2 (Depth 0.600 mm) を用いて血漿包埋法により組織培養を行なった。先ず培養盤の円形凹高部分にツベルクリン用注射器を用いて鶏血漿 2 滴を落とし、その中央に細切した鶏胎児心組織を置き、さらに同型の注射器を用いて鶏胎児圧搾液と被検薬物を含む Ringer 液を等量に混和して 4 滴を加え、直ちにカバーガラスを渡して被覆し、周囲をパラフィンで密封した後、37°C の孵卵器に納めて静置培養を行なった。

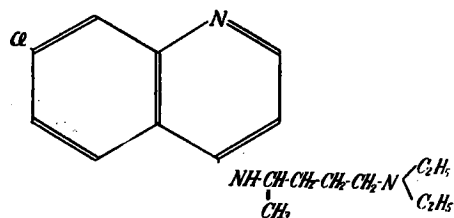
被検薬物は Ringer 液に溶解希釈して添加を行ない、被検薬物を含ませ培地を対照にした。被検薬物を含む培地の pH は 7.3~7.6 である。被検薬物磷酸クロロキン (Bayer) は 5γ/dl, 500γ/dl, 50000γ/dl, の各培地濃度に添加を行なった。また磷酸クロロキンの他にオロチン酸クロロキン、コンドロイチン硫酸クロロキン、クロロキンポリガラクトウロネート (小野) の各種クロロキン剤についてクロロキン量として各 2γ/dl の培地濃度に添加を行なった。

(図 1)

さらに各種薬剤について線維芽細胞抑制作用の検索を行ない、テトラヒドロオキシキノロン (武田)、ビタミン K₁ (フィトナジオン, エーザイ), ACTH (Organon), プレドニゾロン (塩野義), マファルゾール (塩酸オキソフェナルシン, 第一) 及びアルゼノベンゾールナトリウム (アルスフェナミンナト

リウム, 第一) の添加を行なった。なおテトラヒドロオキシキノロン及びビタミン K₁ についてはポリオキシエチレングリコールを主成分とする界面活性剤を加えて溶解した。また以上の実験材料の取扱い及び培養の操作はすべて無菌的且敏速に行ない、実験器具は 15 ポンド 20 分間高压蒸気滅菌あるいは 180°C 30 分間乾熱滅菌を行なった。

図 1 クロロキンの構造式



7-クロロ-4-(4'-エチルアミノ-1'-メチルアミノ)-キノリン

4) 観察方法

培養開始後 12 時間, 24 時間, 36 時間, 48 時間, 72 時間と経時的に保温箱に装置した明視野顕微鏡を用いて培養組織の細胞の増生を面積測定法により測定し、また細胞の密度指数を測定して、各濃度の被検薬物添加による細胞の成長度を検討した。

増生面積の測定は顕微鏡に Abbe 描写器を装着して培養組織及び増生細胞のひろがりを描画し、その面積をプランメーターにより計測して全体の面積から母組織の面積を減じたもの、すなわち絶対成長値の原面積に対する比率を比較成長値とした。また細胞密度の測定は細胞増生帯を母組織より中心部、中間部、周辺部に区分し、各々について接眼レンズ 15 倍、対物レンズ 40 倍にて 1 視野内の全細胞数を計算し、その和を密度指数とした。なお磷酸クロロキン及び各種クロロキンについては各群 10 例平均値を示し、またその他の薬剤については各群 5 例平均値を示した。

2. L細胞に対する増生抑制効果

1) 培養細胞

マウス皮下組織由来の固定細胞株線維芽細胞である L 細胞を使用した。L 細胞は角型培養瓶を用いて 5% 牛血清加 YLE 培地にて予め大量に培養を行ない、ラバークリナーを用いて細胞を培養液中に採取し、さらにピペットを用いて吸引圧出し、均等な細胞浮游液にして 0.5 cc 宛分注して実験に供した。各培養管の接種細胞数は 8×10^4 である、

2) 培養液

5%牛血清加 YLE 培地を使用した。YLE(Yeast extract-Lactalbumin-Earle) 培地はブドウ糖濃度を 0.45%とした Earle 緩衝塩類溶液¹³⁾に 0.80%の酵母エキスと 4.00%のラクトアルブミン水解物を加え、Seitz 型濾過器にて濾過滅菌を行なった。また牛血清は屠殺場から得た牛血液より血清を分離し、同じく濾過滅菌した後、60°C 30 分間加温して非働化を行なった。YLE 培地は氷室に、また牛血清は凍結して保存し、用に臨んで 37°C に加温した後、YLE 培地に 5%の牛血清を加えて培養液を作製した。

3) 培養方法

外径 15mm 長さ 150mm の培養試験管を用いて単層培養法により組織培養を行なった。先ず L 細胞の均等浮游液を正確に 0.5cc 宛培養管に分注し、5%牛血清加 YLE 培地 1.5cc を加えてダブルゴム栓を施した後、5 度傾斜の台架に並べ、37°C 孵卵器に納めて静置培養を行なった。次に培養開始 24 時間後に培養液の交換を行ない、旧培養液 0.5cc を残し、被検薬物を含む培養液 1.5cc を加えて培養を継続した。被検薬物磷酸クロロキンは YLE 培地に溶解稀釈し、クロロキン量として 2 γ /dl, 200 γ /dl, 20000 γ /dl の各培地濃度に添加を行ない、被検薬物を含ませ培養液を対照にした。被検薬物を含む培養液の pH は 7.4~7.8 である。また以上の実験材料の取扱い及び培養の操作はすべて培養室中で無菌的に行ない、培養器具は高圧蒸気滅菌あるいは乾熱滅菌を行なった。

4) 観察方法

被検薬物添加後 24 時間毎に 7 日まで経時的に培養細胞の増生を核数計算法により測定し、各濃度の被検薬物添加による細胞の成長度を検討した。先ず培養液を捨て、ラバークリナーを用いて細胞を剝離した後、0.3% EDTA (Ethylenediamine tetraacetate) 溶液約 5cc を加え、37°C に保ち 30 分間振盪して細胞を単離した。次にこの細胞浮游液を目盛付遠沈管に移し、1000 回転 5 分間遠沈して沈渣 0.5cc を残し、これに 0.5% クリスタル紫クエン酸溶液 4.0cc を加えて再び 37°C にて 30 分間振盪した後、1000 回転 10 分間遠沈し、正確に 1.0cc を残して上清を捨て、沈渣を均等に攪拌して Bürker-Türk 血球計算盤に移し、染色された核数を計算して培養管当りの細胞数を算出した。なお各観察時間について各群 3 例平均値を示した。

3. L 細胞に対する呼吸抑制効果

1) 培養細胞

マウス皮下組織由来の線維芽細胞である L 細胞を使用した。すなわち継代培養された L 細胞を多数の角型培養瓶を用いて 5%牛血清加 YLE 培地にて単層培養法により培養を行ない、大量の細胞を採取して実験に供した。L 細胞はラパークリナーを用いて少量の Ringer 液中に採取し、ピペットを用いて機械的に細胞を単離した後、目盛付遠沈管に集めて 1000 回転 5 分間遠沈し、沈渣の細胞層を均等に攪拌して 0.2cc 宛分注した。各検圧容器中の細胞数は 3×10^7 である。また細胞を採取してから検圧開始までの時間は約 60 分である。

2) 浮游液

Ringer 重曹液を使用した。Ringer 液の組成は 9.0g/l NaCl 100.0cc, 11.5g/l KCl 2.0cc, 12.2g/l CaCl₂ 2.0cc よりなり、重曹液は 13.0g/l NaHCO₃ である。重曹液は用に臨んで調整し、Ringer 液 100.0cc に重曹液 2.0cc を混和して浮游液を作製した。

3) 検圧方法

Warburg 検圧計を用いて直接法により酸素消費量の測定を行なった。先ず内容約 10cc の円錐状検圧容器の主室に均等に攪拌した L 細胞を正確に 0.2cc 宛注入して Ringer 重曹液 0.8cc を加え、副室には 10% KOH 0.3cc を入れて炭酸ガスを吸収せしめた。次に検圧容器を検圧計に装着して酸素を充填し、充分な液相気相間のガス平衡を得るため細胞浮游液を振盪しながら 1 本の検圧容器につき約 2l の酸素を通じた。恒温槽の温度は 37.5°C、振盪回数は毎分 120 回、振巾は 5cm とし、15 分間の予備振盪の後検圧を開始して、検圧開始 30 分後に被検薬物の添加を行なった。被検薬物磷酸クロロキンは Ringer 液に溶解稀釈し、クロロキン量として 2 γ /dl, 20 γ /dl, 200 γ /dl, 2000 γ /dl の各濃度に添加を行ない、被検薬物を含ませ浮游液を対照にした。

4) 測定方法

先ず被検薬物を含ませ浮游液にて 10 分毎に 30 分まで検圧を行ない、次に被検薬物添加後同じく 10 分毎に 30 分まで検圧を行なって、各々ガス圧の変化より酸素消費量を測定し、被検薬物添加前後 30 分間の酸素消費量の比率を求めて、各濃度の被検薬物添加による呼吸作用の変化を検討した。

III 実 験 成 績

1. 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影響

組織培養により鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影響を経時的に測定した結果、対照では比較成長値において 0.66, 1.55, 2.80, 3.95, 4.47 の細胞成長度を示したのに比し、磷酸クロロキン 5 γ /dl の培地濃度では密度指数においては対照との間に差を示さなかつたが、比較成長値において 0.55, 1.09, 1.87, 2.76, 3.17 と細胞成長度の低値を示し、細胞の増生抑制が認められた。また磷酸クロロキン 500 γ /dl の培地濃度では密度指数においても低値を示したが、比較成長値において 0.32, 0.70, 1.10, 1.35, 1.52 と細胞成長度は明らかに低値を示し、著明な細胞の増生抑制が認められた。さらに磷酸クロロキン 50000 γ /dl の培地濃度では密度指数及び比較成長値において細胞の増生は認められなかつた。すなわち磷酸クロロキンは 5 γ /dl 以上の培地濃度で培養鶏胎児心線維芽

図 2 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影響

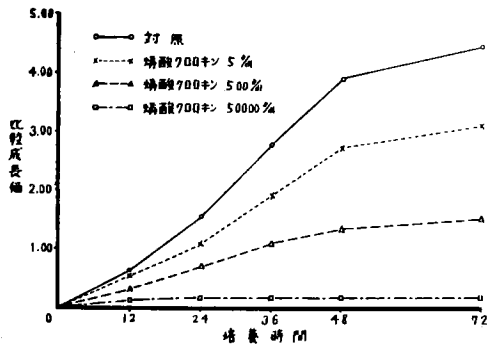
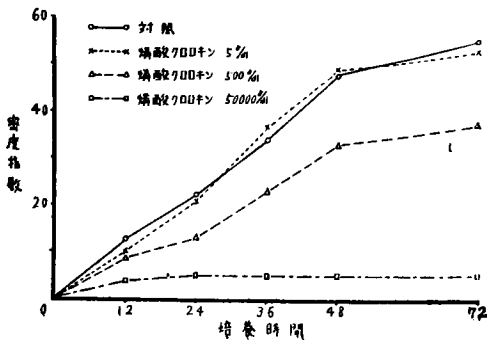


図 3 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影響



細胞に対して増生抑制効果を示し、磷酸クロロキンの強力な線維芽細胞抑制作用を明らかにすることが出来た。(図 2, 3)

2. 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす各種クロロキン剤の影響

組織培養により鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす各種クロロキン剤の影響を経時的に測定した結果、各 2 γ /dl のクロロキン濃度で、密度指数においては対照との間に著明な差を示さなかつたが、比較成長値において対照では 0.62, 1.23, 4.51, 8.53, 10.62 の細胞成長度を示したの比し、磷酸クロロキンでは 0.48, 1.17, 4.11, 7.20, 8.84 と細胞成長度の低値を示し、またオロチン酸クロロキンでは 0.45, 1.09, 1.95, 5.85, 6.43, コンドロイチン硫酸クロロキンでは 0.38, 1.07, 2.66, 5.03, 6.36, さらにクロロキンポリガラクトウロネートでは 0.38, 0.95, 2.01, 3.69, 4.48 といずれも細胞成長度の低値を示し、細胞の増生抑制が認められた。すなわち磷酸クロロキンの他、オロチン酸

図 4 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす各種クロロキン剤の影響

(クロロキン濃度各 2 γ /dl)

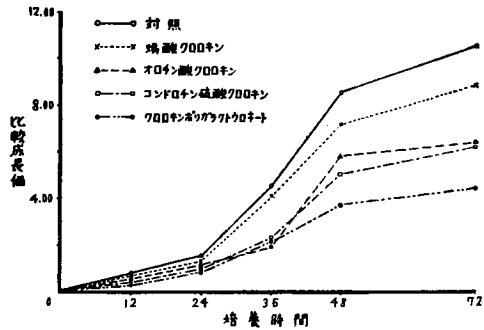
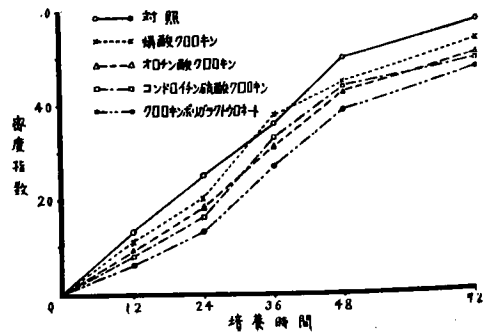


図 5 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす各種クロロキン剤の影響

(クロロキン濃度各 2 γ /dl)

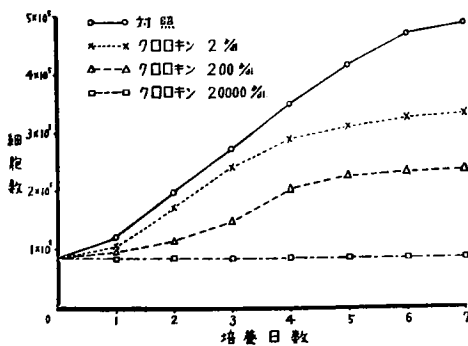


クロロキン, コンドロイチン硫酸クロロキン, クロロキンポリガラクトウロネートの各種クロロキン剤はクロロキン量として 2 γ /dl の低濃度において培養鶏胎児心線維芽細胞に対して増生抑制効果を示し, これらすべてのクロロキン剤が同様に強力な線維芽細胞抑制作用を有することを明らかにすることが出来た。(図4, 5)

3. L細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影響

組織培養によりマウス皮下組織由来の線維芽細胞であるL細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影響を経時的に測定した結果, 細胞数($\times 10^4$)において, 対照では 11.8, 20.0, 27.1, 34.9, 41.8, 47.3, 48.8 の成長曲線を示したのに比し, 2 γ /dl のクロロキン濃度では 10.4, 12.8, 24.2, 28.8, 31.1, 32.4, 33.3 と成長曲線の低値を示し, 細胞の増生抑制が認められた。また 200 γ /dl のクロロキン濃度では 9.8, 11.8, 15.0, 20.1, 22.3, 23.1, 23.5 と成長曲線は明らかに低値を示し, 著明な細胞の増生抑制が認められ, さらに 20000 γ /dl のクロロキン濃度では細胞の増生は認められなかつた。すなわち磷酸クロロキンは 2 γ /dl 以上のクロロキン濃度で培養L細胞に対しても増生抑制効果を示し, 同じく磷酸クロロキンの強力な線維芽細胞抑制作用を明らかにすることが出来た。(図6)

図6 L細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影響

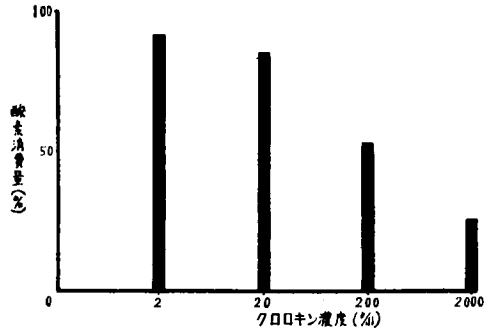


4. L細胞の呼吸に及ぼす磷酸クロロキンの影響

Warburg 検圧計によりマウス皮下組織由来の線維芽細胞であるL細胞の呼吸に及ぼす磷酸クロロキンの影響を検討した結果, 磷酸クロロキンの添加によりL細胞の酸素消費量は減少を示し, 対照に対して酸素消費量は 2 γ /dl のクロロキン濃度では91.8%に, 20 γ /dl のクロロキン濃度では85.7%に, 200 γ /dl のクロロキン濃度では53.3%に, また 2000 γ /dl のク

ロロキン濃度では26.3%に減少し, L細胞の呼吸抑制が認められた。すなわち磷酸クロロキンによりL細胞の酸素消費量は著明な減少を示し, 磷酸クロロキンの線維芽細胞に対する呼吸抑制作用を明らかにすることが出来た。(図7)

図7 L細胞の呼吸に及ぼす磷酸クロロキンの影響



5. 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす各種薬剤の影響

鶏胎児心線維芽細胞の組織培養により各種薬剤について線維芽細胞抑制作用の検索を行なつた結果, 比較成長価において, 先ずテトラヒドロオキシキノンは 200 γ /dl 以上の培地濃度で細胞の増生抑制が認められ, またビタミン K₁ では 10 γ /dl 以上の培地濃度で同じく細胞の増生抑制が認められ, これらキノ誘導体にクロロキンに相当する強力な線維芽細胞抑制作用を明らかにすることが出来た。また ACTH では 8IU/dl の培地濃度でも細胞の増生に影響を認めなかつたが, プレドニゾロンでは 40 γ /dl 以上の培地濃度で細胞の増生抑制が認められ, ステロイドホルモンにクロロキン程強力ではないが, 線維芽細胞抑制作用を明らかにすることが出来た。さらにマフェルゾールでは 10 γ /dl 以上の培

図8 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼすテトラヒドロオキシキノンの影響

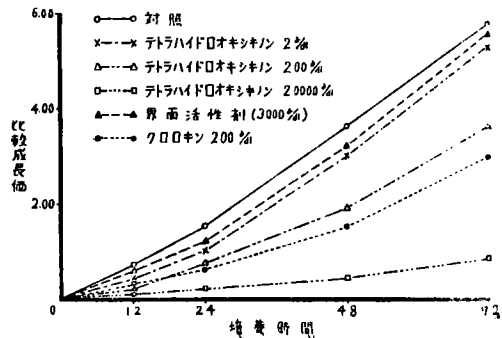


図9 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす
ビタミン K₁ の影響

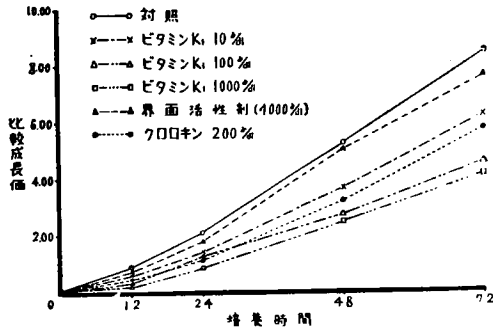


図10 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす
ACTH の影響

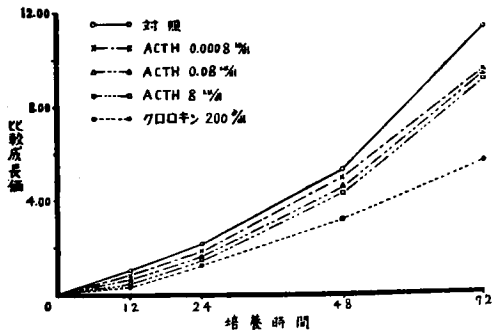
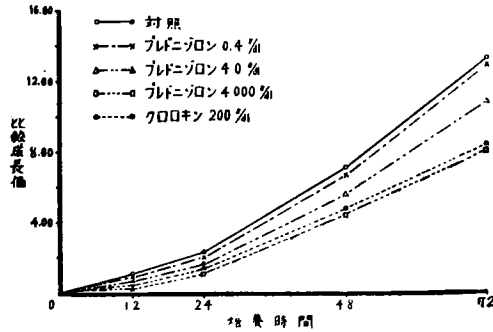


図11 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす
プレドニゾンの影響



地濃度で細胞の増生抑制が認められ、またアルゼノベンゾールナトリウムでは 1γ/dl 以上の培地濃度で同じく細胞の増生抑制が認められ、これら砒素剤にクロロキンと同様の強力な線維芽細胞抑制作用を明らかにすることが出来た。(図 8, 9, 10, 11, 12, 13)

IV 総括並びに考按

組織培養により線維芽細胞の増生に及ぼすクロロキン影響について検討を行なった結果、クロロキン

図12 鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす
マファルゾールの影響

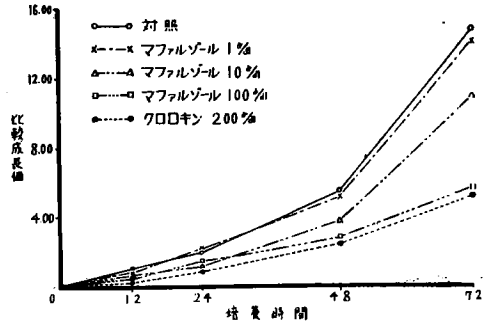
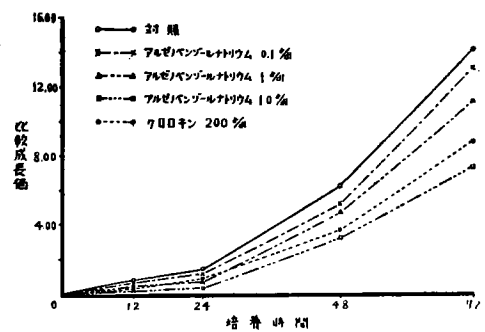


図13 鶏胎児心線維細胞の増生に及ぼす
アルゼノベンゾールナトリウムの影響



の強力な線維芽細胞抑制作用を明らかにすることが出来た。すなわち磷酸クロロキンは鶏胎児心線維芽細胞に対して強力な線維芽細胞抑制作用を示し、血漿包埋法による組織培養において、磷酸クロロキンの添加により著明な線維芽細胞の増生抑制が認められた。また磷酸クロロキンの他、オロチン酸クロロキン、コンドロイチン硫酸クロロキン、クロロキンポリガラクトウロネートの各種クロロキン剤も鶏胎児心線維芽細胞に対して同じく強力な線維芽細胞抑制作用を示し、血漿包埋培養法において、各種クロロキン剤の添加により低濃度で線維芽細胞の増生抑制が認められた。一方磷酸クロロキンはマウス皮下組織由来の線維芽細胞である L 細胞に対しても同様に強力な線維芽細胞抑制作用を示し、単層培養法による組織培養において、磷酸クロロキンの添加により著明な線維芽細胞の増生抑制が認められた。

また Warburg 検圧計により L 細胞の呼吸に及ぼす磷酸クロロキンの影響について検討を行なった結果、磷酸クロロキンの添加により著明な酸素消費量の減少が認められ、クロロキンの線維芽細胞抑制作用について呼吸抑制作用を明らかにすることが出

来た。

さらに血漿包埋法による鶏胎児心線維芽細胞の組織培養により各種薬剤について線維芽細胞抑制作用の検索を行なった結果、プレドニゾロンの他、テトラヒドロオキシキノロン、ビタミン K₁ のキノロン誘導体及びマファルゾール、アルゼノベンゾールナトリウムの砒素剤に可成り強力な線維芽細胞抑制作用を認めることが出来た。

クロロキンは抗マラリヤ剤として合成されたキノリン誘導体であるが¹⁾、寄生虫疾患⁵⁾⁶⁾にとどまらず、エリテマトーデス³⁾、関節リウマチ⁴⁾等の疾患に広く応用され、これら慢性、難治性疾患に対する新治療剤として近年特に注目を集めていることは周知の通りである。一方これらの臨床効果と関連して漸次クロロキンの複雑な作用機序が解明され、病原体に対する作用⁵⁾⁶⁾の他に抗ヒスタミン作用⁷⁾、抗アセチルコリン作用⁷⁾、抗炎症作用¹⁰⁾、抗アレルギー作用¹¹⁾あるいは抗体不活性化作用¹⁰⁾等の多くの興味ある薬理作用が報告されているが、さらに核酸代謝、酵素系に対する作用¹⁰⁾¹⁴⁾¹⁵⁾も指摘されて、本剤の作用機序はその適応疾患の開拓とともに一層多方面にわたる傾向にある。

ところでクロロキンの線維芽細胞抑制作用については、既にアクリナミンや類似のキノリン誘導体が組織培養あるいは生体において細胞の増生を抑制することが知られていたが、1959年、Haberlandら¹⁰⁾は組織培養において磷酸クロロキンは線維芽細胞の増生を抑制する作用を有することを観察した。すなわち彼らは抗リウマチ剤の細胞増生に及ぼす影響について検討を行ない、磷酸クロロキンは培養鶏線維芽細胞に対して1:40000の濃度で、また培養ラット線維芽細胞に対して1:4000の濃度で細胞の増生を完全に抑制し、しかも磷酸クロロキンの線維芽細胞増生抑制作用はプレドニゾロン、フェニールブタゾンに比し可成り強力であり、またその細胞増生抑制作用は線維芽細胞、網内系細胞及び骨髄細胞に対してのみ特異的に認められることを報告した。

私は鶏胎児心線維芽細胞及びマウス皮下組織由来の線維芽細胞であるL細胞の組織培養により、磷酸クロロキンについてHaberlandらの報告よりもさらに低濃度において強力な線維芽細胞抑制作用を認めることが出来たが、磷酸クロロキンの他、オロチン酸クロロキン、コンドロイチン硫酸クロロキン、クロロキンポリガラクトウロネートの各種クロロキン剤についても同様に強力な線維芽細胞抑制作用を

認めることが出来た。また私はWarburg検圧計により磷酸クロロキンについてL細胞の呼吸抑制作用を認めることが出来た。

一方線維芽細胞に及ぼすクロロキンの形態学的変化について、教室の木村及び平岡ら¹⁶⁾は回転培養法により短冊上に血漿包埋した鶏胎児心線維芽細胞の組織培養を行ない、磷酸クロロキンの添加による影響を位相差顕微鏡により観察した結果、200 μ /dlのクロロキン濃度において細胞の核には著変を認めなかつたが、胞体に大小不同の空胞が増加し、特に小空胞が融合したと思われる大空胞の出現を認め、形態学的に著明な変化を明らかにした。

さらにクロロキンの線維芽細胞抑制作用は生体においても認められ、教室の平木及び渋谷ら¹⁷⁾はラットの背部皮下に作成した寒天肉芽腫の発育に及ぼすクロロキンの影響を検討した結果、磷酸クロロキンの他、オロチン酸クロロキン、コンドロイチン硫酸クロロキン、クロロキンポリガラクトウロネートの各種クロロキン剤について、いずれも肉芽腫の重量の低値を認め、また組織学的にも寒天を取囲む結合織の発育が不良で、膠原線維の生成も少なく、クロロキンによる線維芽細胞の増生抑制像を認めた。また教室の木村及び山名ら¹⁸⁾はラットのガラスローマポーチに及ぼす磷酸クロロキンの影響を検討した結果、ポーチの総重量及び壁重量の低値を認め、またポーチ壁の肉芽組織に分布するクロロキン量が正常皮下組織に比し高値を示すことを明らかにした。さらにHaberlandら¹⁰⁾は磷酸クロロキンはラットの綿球による肉芽腫の発育を抑制することを報告し、クロロキンは組織培養のみならず生体においても同様に強力な線維芽細胞抑制作用を有することが明らかにされた。

私は前編においてクロロキンを気管支喘息の治療に応用し、最高4年に亘り600余例の本症患者についてクロロキンの長期投与療法を行ない、長期に亘る経過観察の結果、重篤な副作用なく、あらゆる種類の喘息発作に対して一様に90%前後に奏効する成績を得、特に40%を上廻る症例に喘息発作を消失せしめることが出来た。また私はクロロキンの長期経口投与を行なった気管支喘息患者の血漿及び剖検例の諸臓器についてクロロキンの定量を行ない、本療法における血漿中クロロキン濃度がほぼ一定の値を維持し、肝、脾、肺の諸臓器に多く分布することを明らかにしたが、さらにクロロキンの薬理作用についてモルモットの摘出腸管、ラッテ後足の炎症性

浮腫及びモルモットの受働性皮膚過敏症により検討を行なった結果、抗ヒスタミン作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用を明らかにすることが出来た。

気管支喘息の成因については、現在のところ本症には一定の遺伝的、体質的因子が素因として存在し、さらにアレルギー、感染、自律神経失調、内分泌異常、心因あるいは適応失調等諸種の外因性あるいは内因性の病因が関与することにより種々の喘息発作が発症するものと考えられる。いずれにしても喘息発作を来す病理的基盤は気管支壁粘膜の腫脹、気管支内腔の分泌液の貯留及び気管支平滑筋の攣縮による末梢気管支の狭窄ないし閉塞であり、また剖検上、気管支粘膜及び粘膜下組織の浮腫、浸潤あるいは気管支基底膜、筋層及び同血管壁の変性、肥厚が認められ、さらに慢性化するにしたがい肺線維化等の変化が認められている¹⁹⁾。従つて気管支喘息に対するクロロキンの作用機序について、本剤が肺に多く分布し、抗ヒスタミン作用、抗アセチルコリン作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、平滑筋弛緩作用あるいは抗体不活性化作用に加うるに線維芽細胞抑制作用を有することは、本症に対するクロロキン療法法の優れた効果を裏付けるものであり、特に気管支喘息における肺線維化の阻止に対して、クロロキンの強力な線維芽細胞抑制作用が作用機序の一つとして重視すべき場合が考えられる。

V 結 語

1. 組織培養により鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影響を検討した結果、5 γ /dl以上の培地濃度で増生抑制を認め、磷酸クロロキンの強力な線維芽細胞抑制作用を明らかにすることが

出来た。

2. また磷酸クロロキンの他、オロチン酸クロロキン、コンドロイチン硫酸クロロキン、クロロキンポリガラクトウロネートについて、鶏胎児心線維芽細胞の増生に及ぼす影響を検討した結果、各2 γ /dlのクロロキン濃度で各種クロロキン剤が同様に強力な線維芽細胞抑制作用を有することを明らかにすることが出来た。

3. 次に組織培養によりマウス皮下組織由来の線維芽細胞であるL細胞の増生に及ぼす磷酸クロロキンの影響を検討した結果、2 γ /dl以上のクロロキン濃度で増生抑制を認め、同じく磷酸クロロキンの強力な線維芽細胞抑制作用を明らかにすることが出来た。

4. 一方 Warburg 検圧計によりL細胞の呼吸に及ぼす磷酸クロロキンの影響を検討した結果、2 γ /dl以上のクロロキン濃度で酸素消費量の減少を認め、磷酸クロロキンが線維芽細胞に対して呼吸抑制作用を有することを明らかにすることが出来た。

5. さらに鶏胎児心線維芽細胞の組織培養により諸種薬剤について線維芽細胞抑制作用の検索を行なった結果、ACTHでは細胞の増生に影響を認めなかつたが、プレドニゾロンの他、テトラヒドロオキシキノロン、ビタミンK₁、マファルゾール、アルゼノベンゾールナトリウムに可成り強力な線維芽細胞抑制作用を認めることが出来た。

擱筆に臨み御指導、御校閲を賜つた恩師平木潔教授に深甚の謝意を表するとともに、終始御懇篤なる御指導を賜つた木村郁郎講師に深謝します。

[本論文の要旨は第22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 Ewtwicklung des Malaria-Heilmittles, *Medizine 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 rational and the use of chloroquine diphosphate, *Am. J. M. So.*, 225, 71~75, 1953.
- 5) Fu, H. F. and Ma, K. C.: Chloroquine in the treatment of clonorchiasis, *Chinese M. J.*, 71, 135~138, 1953.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 土屋 一: 眼科領域に於ける Resochin の使用経

- 験, 臨床眼科, 14, 313~320, 1960.
- 9) 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.
- 10) Haberland, G. L. et al.: Pharmakologische Untersuchungen zur Wirkungsweise von Anti-phlogistika, Zeitsch. f. Pneumaforschung, 18, 220~232, 1959.
- 11) 加藤浩志他: 抗リウマチ剤 Resochin の臨床効果並びにその作用機序, 診断と治療, 49, 1411~1417, 1961.
- 12) 木村郁郎他: キノリン誘導体の消化器系に及ぼす影響 (第一報), 日本消化器病学会雑誌, 60, 918~919, 1963.
- 13) Earle, W. R.: Changes induced in a strain of fibroblasts from a strain C₃H mouse by the action of 20-methylcholanthrene. J. Nat. Cancer Inst., 3, 555~558, 1943.
- 14) 水島裕: 白血球の酵素学的作用と抗炎症剤の作用機構に関する実験的研究, リウマチ, 3, 165~177, 1961.
- 15) Green, H. V. et al: Biological Action of the Adenine Nucleosides, London, H. K. Lewis, 1950.
- 16) 木村郁郎他: クロロキンの線維芽細胞抑制作用とその悪性腫瘍細胞に及ぼす影響について, 日本消化器病学会雑誌, 60, 741~742, 1963.
- 17) 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, 岡山医学会雑誌, 75, 297~316, 1963.
- 18) 木村郁郎他: 慢性肝障害に於けるクロロキン療法的作用機序について, 日本消化器病学会雑誌, 60, 79, 1963
- 19) Unger, L: Bronchial Asthma, Charles C. Thomas, Illinois, 1946.

Studies on Treatment of Bronchial Asthma with Chloroquine and its Pharmacological Actions

Part. 3. Studies on Fibroblast-inhibiting Action of Chloroquine

By

Yoshiaki Moritani

Postgraduate School of Medicine, Okayama University
(Director; Prof. K. Hiraki)

The effects of chloroquine on the growth and oxygen consumption of cultured fibroblasts were investigated.

1) Chloroquine diphosphate inhibited the growth of chick embryo heart fibroblasts in tissue culture medium containing 5 γ /dl and also other chloroquine derivatives such as chloroquine diorotate, chloroquine chondroitine sulfate, chloroquine polygalacturonate showed same result in medium containing 2 γ /dl of chloroquine too.

2) Furthermore, chloroquine diphosphate inhibited the growth of L strain cell in tissue culture medium containing 2 γ /dl of chloroquine.

3) Effects of chloroquine on respiratory functions were observed in L strain cells with using Warburg's apparatus, showing a decrease of oxygen consumption of the cells in the concentration of 2 γ /dl of chloroquine.

4) Also fibroblast-inhibiting action was observed by administrating several drugs in the cultured chick embryo heart fibroblasts. The growth of the cells was not influenced by ACTH administration but several drugs such as tetrahydroxyquinone, phytonadione or oxophenarsine hydrochloride, arsphenamine sodium as well as prednisolone showed considerably potent fibroblast-inhibiting action.

As mentioned above marked inhibition of the growth of fibroblasts was definitely demonstrated by chloroquine administration and this fibroblast-inhibiting action of chloroquine is thought to be important mechanism of action to the treatment of bronchial asthma with lung fibrosis.