

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 編

クロロキンの担腫瘍動物肝カタラーゼ活性に及ぼす影響について

(本論文要旨は第21回日本癌学会総会に於いて発表した)

岡山大学医学部平木内科 (主任: 平木 潔教授)

副 手 小 谷 秀 成

〔昭和40年6月26日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒 言	
第2章 正常マウス肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について	
第1節 実験方法	
1) クロロキン投与実験	
2) クロロキン添加実験	
3) 肝カタラーゼ活性測定法	
第2節 実験成績	
第3節 小 括	
第3章 Bashford 癌マウス肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について	
第1節 実験方法	
第2節 実験成績	
第3節 小 括	
第4章 Ehrlich 癌マウス肝カタラーゼ活性に及	

ぼすクロロキンの影響について

第1節 実験方法	
第2節 実験成績	
第3節 小 括	
第5章 吉田肉腫ラッテ肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について	
第1節 実験方法	
第3節 実験成績	
第6章 Brown-Pearce 癌家兎肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について	
第1節 実験方法	
第2節 実験成績	
第3節 小括	
第7章 総括並びに考按	
第8章 結 論	

第1章 緒 言

悪性腫瘍とカタラーゼ活性度の関係については、これまでに多くの業績が報告されている。1910年 Blumenthal¹⁾ は人の肝癌組織や肝癌周囲の健康組織のカタラーゼ活性度が減少を示すことを報告したが、以来悪性腫瘍と肝カタラーゼ活性について Brahn²⁾, Rosenthal³⁾, Magat⁴⁾ ら多数の報告がみられ、以上の事実を明らかにしている。更に悪性腫瘍においては肝カタラーゼ活性低下以外に腎のカタラーゼ活性低下⁵⁾、血液カタラーゼ活性低下⁶⁾⁷⁾ もあることが報告されに至り、本酵素が癌により系統的に影響を受けることが証明されたのである。1941年 Greenstein⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ は担癌動物の肝カタラーゼ活性について輝かしい業績を発表したが、その中であらゆる悪性腫瘍において、その腫瘍の種類動物の種類を問わない普遍的な現象として肝カタラーゼ活性

の低下を認めると共に、逆に腫瘍の完全剔出や自然治癒で再び肝カタラーゼ活性が正常化すること、及び再移植で再びその低下をみることを明らかにし、肝カタラーゼ活性低下が現在までに証明された唯一の悪性腫瘍特有の生物学的変化であると述べた。以来悪性腫瘍と肝カタラーゼの関係が一段と注目されるに至った。本邦においても田崎¹²⁾、井口¹³⁾ は癌患者において肝カタラーゼ活性の低下を観察し、山形¹⁴⁾¹⁵⁾、井口¹³⁾ はその血液カタラーゼの低下を認めている。又井口¹³⁾ は手術可能な癌患者の術後に血液カタラーゼの上昇をみることを指摘した。なお以上の事柄との関連でこの肝カタラーゼ活性低下を中心の指標として、癌腫の毒素、悪液質の研究が今日まですすめられているが、中原¹⁶⁾¹⁷⁾ の「トキソホルモン」、中川¹⁸⁾¹⁹⁾ の「癌尿エキス」、佐藤²⁰⁾²¹⁾ の「癌腫毒」等は何れも肝カタラーゼ活性低下の作用を有し、癌腫そのものか或いはこれらの物質が除

かれた場合はカタラーゼ活性の上昇を来すことが報告されている。

著者は上記の如く、悪性腫瘍の肝カタラーゼ活性が著明に低下し、腫瘍の剔出後正常値に戻ると云う諸家の報告に注目し、もし担腫瘍動物に抗腫瘍剤を使用したならば、その肝カタラーゼ活性に同じ様な改善像が期待出来るものと考えた。さて第1編に述べた如くクロロキンは Brown-Pearce 癌家兎に対して延命、腫瘍の発育抑制等の効果を有し、又 Bashford 癌マウスに対しても同様の傾向を示した²²⁾が、著者は更にクロロキンの抗腫瘍性の効果判定上の1つの手段として、担腫瘍動物 (Bashford 癌マウス、Ehrlich 癌マウス、吉田肉腫ラッテ及び Brown-Pearce 癌家兎) の肝カタラーゼ活性に及ぼす影響を観察するべく以下の実験を行ない、クロロキンの腫瘍発育抑制の作用を肝カタラーゼ活性の変化から探知せんとした。

第2章 正常マウス肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について

クロロキンは腫瘍の発育を抑制し得る投与量に於いて、正常動物の肝カタラーゼ活性に如何なる影響を及ぼすかを検索することは酵素学的見地より必要と考えられる。そこで先づ正常マウスの肝カタラーゼ活性を測定し、*in vivo*において、クロロキンを正常マウスに投与した場合の肝カタラーゼ活性の変化と比較検討した。次に直接肝細胞に如何なる影響を及ぼすかについて、*in vitro*でクロロキンを1定時間添加した場合の肝カタラーゼ活性の変動について観察し、その作用力を追求したのでそれらについて述べる。

第1節 実験方法

1) クロロキン投与実験

実験動物としては Strong A 系雄性マウス (体重 20g 前後) を実験に供した。実験群には磷酸クロロキン 25mg/kg (5%液5倍稀釈しその 0.05cc) を1日1回腹腔内投与を行ない、対照群には蒸留水 0.05cc を同様投与し乍ら、1週間、2週間、3週間目のそれぞれについてその肝カタラーゼ活性を測定した。測定法は後述の方法によつた。

2) クロロキン添加実験

実験動物としては C₃H 系雄性マウス (体重 20g 前後) を実験に供した。即ちその新鮮肝について 250mg 宛秤量したものを2群作り、それぞれホモゲナイズする。1つの群には磷酸クロロキン 200γ

/cc を添加、0°C 1時間 incubate し、実験群となし、他の群には蒸留水添加して対照とする。以上の両群についてその肝カタラーゼ活性を後述の測定法により調べ、*in vitro*におけるクロロキンの影響を観察した。

3) 肝カタラーゼ活性測定法

肝カタラーゼ活性の測定は Euler Josephson²³⁾, Bonischen²⁴⁾ 等の方法に準拠して次の如く実施した。即ち測定前24時間は絶食せしめ、断頭失血致死後直ちに肝を取出し、血液を充分除去し、その 250mg を秤量し、可及的 0°C (0°~5°C) のもとにて 1/15 M 磷酸緩衝液で20倍容としホモゲナイズ、遠沈 (3000γpm, 10M) の操作を行ない、その上清をとり1000倍稀釈酵素液を作る。次にカタラーゼ緩衝液 (磷酸緩衝液に H₂O₂ を終濃度 0.01N になるように加えたもの) を予め5本の試験管に 5ml 宛とり、これら試験管を恒温槽中で 37°C に加温しておき、ピペットを用いて試験管内に稀釈酵素液 1cc を早く吹き込む。15秒の反応時間を計つた後 2 NH₂SO₄ 5cc を直ちに加え反応を停止させる。残り3本の試験管に上記同様稀釈酵素液を加え30, 45, 60秒反応させ H₂SO₄ を加えて反応を停止させる。最初の過酸化水素濃度を知る為に第5番目の試験管に稀釈酵素液を加える前に H₂SO₄ を入れておく。各試験管中の過酸化水素濃度は 0.005NKMnO₄ を用い滴定法によつて測定した。カタラーゼ活性の尺度として使用出来る Kcat (反応速度定数) は

$$Kcat = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x} \quad (\text{sec}^{-1})$$

よつて計算する。この式では a は KMnO₄ の ml 単位で表わした最初の H₂O₂ 濃度であり、 $a-x$ は t 時間に対応する滴定値である。4つの測定値の平均値を 10³ 倍したものを肝カタラーゼ活性を表わすものとして使用した。

第2節 実験成績

i) クロロキン投与実験

正常マウス (Strong A 系雄性マウス) に磷酸クロロキン 25mg/kg を連日適用した場合の肝カタラーゼ活性の Kcat 値の消長をみると、まず1週間投与群では 4.29, 3.89, 4.18, 4.35 (平均 4.18) で対照群の 4.48, 3.96, 4.21, 4.59, (平均 4.3) に比し 3.1% の減少を、次に2週間投与群では 5.08, 4.56, 3.94, 5.65 (平均 4.81) で対照群の 4.86, 4.38, 4.62, 4.42 (平均 4.58) に比し 5.0% の増加を、又3週間投与群では 4.99, 5.24, 4.99, 5.03 (平均

5.06) で対照群の4.78, 5.14, 4.55, 4.45, (平均4.73) に比し6.9%の増加をそれぞれ示した。即ち磷酸クロロキンの1週間投与では、肝カタラーゼ活性は軽度の低下が示されたが、2～3週間投与で逆に軽度の増加が認められた。(表1)

(表1) 正常マウス肝カタラーゼ活性に及ぼす
磷酸クロロキンの影響 (Kcat)

(Strong A 系 ♂ マウス・25mg/kg 連続腹腔
内投与)

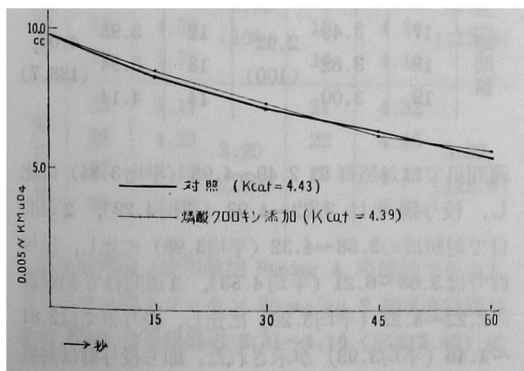
例数	対照群	1週間 投与群	対照群	2週間 投与群	対照群	3週間 投与群
1	4.48	4.29	4.86	5.08	4.78	4.99
2	3.96	3.89	4.38	4.56	5.14	5.24
3	4.21	4.18	4.62	3.94	4.55	4.99
4	4.59	4.35	4.42	5.65	4.45	5.03
平均値	4.31	4.18	4.58	4.81	4.73	5.06
%	100	96.9	100	105.0	100	106.9

ii) クロロキン添加実験

invitro において直接磷酸クロロキンで incubate された正常マウスの肝についてその KMnO_4 の消費量と反応時間の関係を表わすと対照では0秒9.8(cc), 15秒8.3, 30秒7.2, 45秒6.20, 60秒5.25, 磷酸クロロキン添加では0秒9.8, 15秒8.4, 30秒7.25, 45秒6.25, 60秒5.35で両者の間に殆んど差を認めない。従つて又 Kcat 値も対照の4.43に比し4.39と有意の差を認めないことが示された。即ち invitro において、クロロキンは肝カタラーゼ活性に直接何ら影響を及ぼさないことが認められた。(図1)

(図1) 正常マウス肝カタラーゼ活性 (invitro)
に及ぼす磷酸クロロキンの影響
(KMnO_4 消費量)

(Strong A系マウス肝に200 γ /cc0°C 1h. incubate)



第3節 小 括

正常マウスに磷酸クロロキン 25mg/kg を連日投与し、経時的にその肝カタラーゼ活性 (Kcat) を測定すると、その都度観察された対照群に比し、1週間投与群では軽度の低下が、2～3週間投与群ではむしろ多少の増加傾向が示されたが、殆んど生理的動揺範囲内にあると思われた。又肝組織に直接磷酸クロロキン 200 γ /cc を添加1定時間 incubate しておいても、肝カタラーゼ活性には何ら影響を及ぼさないことが判明した。即ちクロロキンは、腫瘍の発育を抑制し得る投与量では正常マウスの肝カタラーゼ活性に大きな変化を及ぼさないことが判明した。

第3章 Bashford 癌マウス肝カタラーゼ活性 に及ぼすクロロキンの影響について

クロロキンは担癌動物、特に Bashford 癌マウスの延命及び腫瘍の発育抑制に効果の示されることは既に教室において報告されているが、本章ではかかる Bashford 癌マウスの肝カタラーゼ活性にクロロキン投与が如何なる変動を及ぼすかについて生化学的立場よりその抗腫瘍性について検索を行なつた。

第1節 実験方法

実験動物には Strong A 系雄性マウス及び Rf 系雄性マウス (何れも体重 20g 前後) に移植後10日目の Bashford 癌を無菌的に背部皮下に移植針で移植したものを実験に供した。投与方法は、移植後24時間目より磷酸クロロキン 25mg/kg (クロロキン量として6～15mg/kg) を毎日1回定まつた時間に腹腔内投与を行ない、対照群には蒸留水腹腔内投与を行ない乍ら、1群4匹として1週間目、2週間目、3週間目に、致死せしめて肝をとり出し、肝カタラーゼ活性を測定した。又同時に正常同系マウスについても同様その肝カタラーゼ活性を測定してこれらと比較検討した。肝カタラーゼ活性測定法は前述の如く Euler-Josephson²³⁾²⁴⁾の方法に準拠して行なつた。なお正確を期す為、前後4回に亘る実験を行なつた。

第2節 実験成績

1) 正常マウスの肝カタラーゼ活性

正常マウス (Strong A 系雄性マウス 20g 前後) の肝カタラーゼ活性 Kcat 値は4.89, 5.76, 5.48, 6.03平均5.54を示した。

2) クロロキン投与による Bashford 癌マウス肝カタラーゼ活性の変動

第1回実験 (使用動物 Strong A 系雄性マウス)

において、磷酸クロロキン 25mg/kg 連日投与後、1週間目、2週間目、3週間目の肝カタラーゼ活性 Kcat 値をみると、先づ1週間目では対照群の 3.81~6.13 (平均5.05) に比し投与群では 5.00~7.34 (平均 6.49), 次に2週間目では対照群の 4.31~5.61 (平均4.90) に比し、投与群では 4.24~5.62 (平均 4.86), 更に3週間目では対照群の 2.57~4.93 (平均3.28) に比し、投与群では 2.36~6.04 (平均3.81) が示された。そして各週の対照をそれぞれ100とすると投与群は1週間目で128.5, 2週間目で99.2, 3週間目で116.1の値が示された。即ち投与群は対照に比し1週間目で28.5%, 3週間目で16.1%だけ肝カタラーゼ活性の低下抑制が認められたことになる。(表2, 図2)

(表2) Basford 癌マウス肝カタラーゼ活性に及ぼす磷酸クロロキンの影響
(Strong A 系マウス・25mg/kg
(実験1) 連続腹腔内投与)

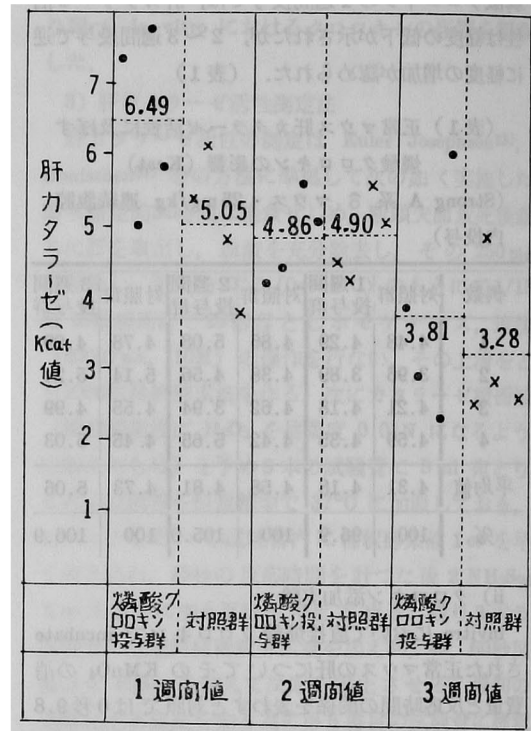
	対 照 群		磷酸クロロキン投与群	
	マウス番号	Kcat 平均(%)	マウス番号	Kcat 平均(%)
一週間値	10	5.44	86	7.34
	23	6.13	87	5.00
	84	4.83	92	7.77
	88	3.81	94	5.85
二週間値	6	4.62	9	4.24
	11	4.31	14	4.45
	15	5.61	16	5.62
	98	5.08	93	5.04
三週間値	17	2.57	22	3.89
	33	4.93	31	2.94
	42	2.98	41	2.36
	46	2.65	97	6.04

第2回実験(使用動物 Rf 系雄性マウス)では Kcat 値は磷酸クロロキン 25mg/kg 投与後1週間目で、対照群の 2.57~4.56 (平均3.41) に比し、投与群では 3.10~4.46 (平均3.27), 2週間目では対照群の 1.38~3.49 (平均2.92) に比し投与群では 3.93~4.19 (平均4.05) が示された。即ち投与群は各週の対照に比し、1週間目で10.5%, 2週間目で38.5%だけそれぞれ肝カタラーゼ活性低下の抑制が認められた事になる。(表3, 図3)

第3回実験(使用動物 Strong A 系雄性マウス)では Kcat 値は磷酸クロロキン 25mg/kg 投与後1

(図 2)

(実験1)



(表3) Bashford 癌マウス肝カタラーゼ活性に及ぼす磷酸クロロキンの影響

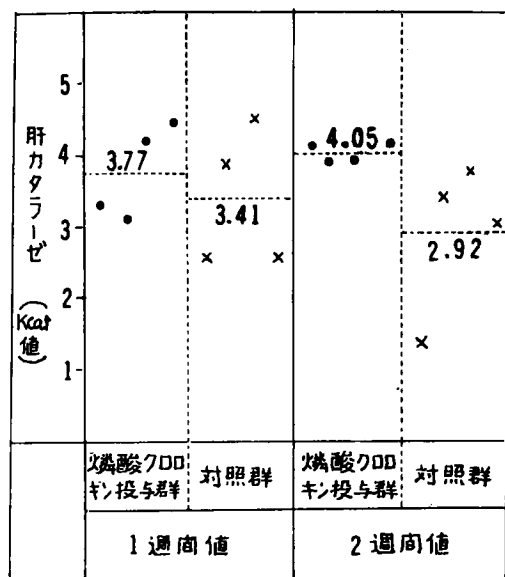
(Rf 系マウス・25mg/kg 連続腹腔内投与)
(実験2)

	対 照 群		磷酸クロロキン投与群	
	マウス番号	Kcat 平均(%)	マウス番号	Kcat 平均(%)
一週間値	6	2.57	1	3.30
	7	3.93	2	3.10
	8	4.56	3	4.22
	9	2.57	4	4.46
二週間値	16	1.38	11	4.19
	17	3.49	12	3.93
	18	3.82	13	3.94
	19	3.00	14	4.14

週間目では対照群の 2.49~4.95 (平均3.84) に比し、投与群では 3.22~4.93 (平均4.29), 2週間目では対照群の 3.58~4.32 (平均3.98) に比し、投与群では 3.68~6.21 (平均4.53), 3週間目では対照群の 2.22~4.23 (平均3.20) に比し、投与群では 2.81~4.46 (平均3.93) が示された。即ち投与群は対照

(図 3)

(実験 2)



に比し、1週間目で11.7%、2週間目で13.8%、3週間目で22.8%それぞれ肝カタラーゼ活性低下の抑制が認められた。(表4、図4)

(表4) Bashford 癌マウス肝カタラーゼ活性に及ぼすリン酸クロロキンの影響

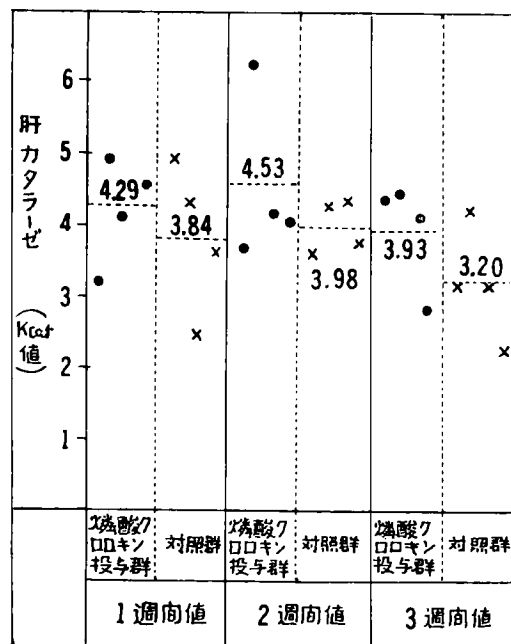
(Strong A 系 ♂ マウス・25mg/kg 連続腹腔内投与)

	対 照 群		リン酸クロロキン投与群	
	マウス番号	Kcat 平均(%)	マウス番号	Kcat 平均(%)
一週間値	5	4.95	1	3.22
	6	4.28	2	4.93
	7	2.49	3	4.11
	8	3.66	4	4.60
二週間値	15	3.58	11	3.68
	16	4.27	12	6.21
	17	4.32	13	4.14
	18	3.78	14	4.10
間三週間値	25	3.17	21	4.32
	26	4.23	22	4.46
	27	3.19	23	4.12
	28	2.22	24	2.81

第4回実験(使用動物 Strong A 系雄性マウス)でオロチン酸クロロキン 30mg/kg 2週間連続投与後の Kcat は対照群の 2.31~4.16 (平均3.40) に

(図 4)

(実験 3)



比し、投与群では 3.41~4.43 (平均3.95) が示された。即ち投与群は対照に比し16.1%の肝カタラーゼ活性低下の抑制が認められた。(表5、図5)

(表5) Bashford 癌マウス肝カタラーゼ活性に及ぼすオロチン酸クロロキンの影響

(Strong A 系 ♂ マウス・30mg/kg 連続腹腔内投与)

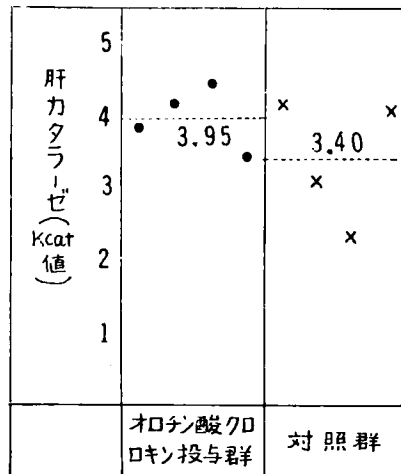
	対 照 群		オロチン酸クロロキン投与群	
	マウス番号	Kcat 平均(%)	マウス番号	Kcat 平均(%)
二週間値	5	4.16	1	3.83
	6	3.06	2	4.15
	7	2.31	3	4.43
	8	4.80	4	3.41

第3節 小 括

Strong A 系雄性及び Rf 系雄性マウスの Bashford 癌にリン酸クロロキン 25mg/kg 及びオロチン酸クロロキン 30mg/kg を連日投与してその肝カタラーゼ活性に及ぼす影響を検索したところ、第1回実験においては第1週において既に可成りの低下抑制を認め、第2週においてはほぼ同程度の低下がみられたが第3週で再び著しい低下抑制の傾向が示された。第2回実験では、対照群で日数経過と共に肝カ

(図 5)

(実験 4)



ターゼ活性低下が顕著となるのに対して投与群では第2週においてむしろ肝カタラーゼ活性の軽度の上昇すら認めた。第3回実験においても第1週においても可成りの低下抑制を認め、更に日数の経過と共に著明となる傾向にあり、又何れも腫瘍の発育状況との間に明らかな関連が認められた。なおオロチン酸クロロキン投与の場合も磷酸クロロキン投与における同様の成績が示された。

第4章 Ehrlich 癌マウス肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について

クロロキンは Ehrlich 腹水癌マウスに対して延命効果はみられないが、腹水貯溜及び腹水細胞増殖には抑制的に作用することが教室の研究により知られている。本章では、かかる態度を示すクロロキンを使用した Ehrlich 腹水癌マウスについてその肝カタラーゼ活性の消長を検索した。

第1節 実験方法

実験動物には Ehrlich 癌の R Ⅲ系雄性マウス (体

重20g 前後)を用いた。Ehrlich 腹水癌の移植法は移植後7日目の Ehrlich 腹水癌細胞100万個を被験マウスの腹腔内に接種する方法によつた。投与方法は移植後24時間より磷酸クロロキン 25mg/kg を毎日1回腹腔内投与を行ない、対照群には蒸留水腹腔内投与を行ない乍ら、1群4匹として第7日目に前以つて24時間絶食後致死せしめて、その新解肝についてそのカタラーゼ活性を測定した。又同時に正常マウスの肝についても同様測定し、これらと比較検討した。なお肝カタラーゼ活性測定法は第2章で述べた如き方法によつたが、クロロキンの肝カタラーゼ活性値に及ぼす効果は正常マウスの肝カタラーゼ活性に対する実験マウスのそれ、即ち低下率を以つて比較検討した。

第2節 実験成績

肝カタラーゼ活性 Kcat 値をみると、先づ正常マウスでは 4.06~7.34 (平均5.52) が示された。次にクロロキン投与第7日目において対照群では2.28~3.82 (平均3.21) が示されたのに対して、投与群でも2.44~3.85 (平均2.86) と可成り著明な低下がみられ、両者の間に殆んど差が認められなかつた。即ち肝カタラーゼ活性の低下率は対照の42.1%に比し投与群の48.2%が示された。(表6、図6)

第3節 小 括

クロロキン1週間投与後の Ehrlich 腹水癌マウスの肝カタラーゼ活性は可成り著明な低下が示され、対照との間に殆んど差が認められなかつた。即ち延命効果の認められない Ehrlich 腹水癌マウスにおいては、肝カタラーゼ活性にも低下の抑制は見出され得なかつた。

第5章 吉田肉腫ラッテ肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について

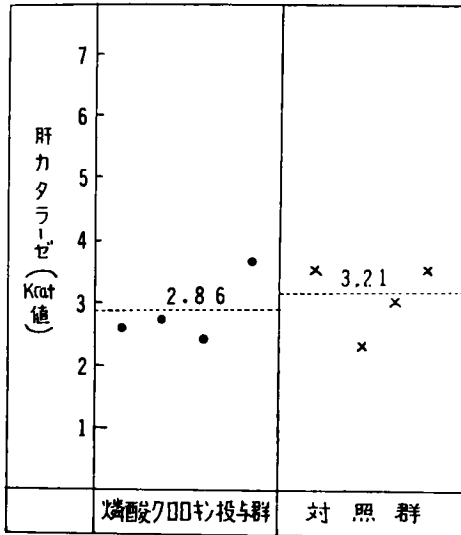
第一編に述べた如く、クロロキンは吉田肉腫ラッテに対して、その腹水腫瘍細胞の発育には抑制的に

(表6) Ehrlich 腹水癌マウス肝カタラーゼ活性に及ぼす磷酸クロロキンの影響。

(RⅢ系 ♂ マウス、25mg/kg 連続腹腔内投与)

マウス番号	正 常 マ ウ ス			Ehrlich 癌					
	磷酸クロロキン投与群			磷酸クロロキン投与群			対 照 群		
	腹 囲	腹水量	肝カタラーゼ	腹 囲	腹水量	肝カタラーゼ	腹 囲	腹水量	肝カタラーゼ
1	7.3		5.50	7.0	1.2	2.50	9.8	3.2	3.82
2	8.5		4.60	9.2	2.6	2.66	9.5	2.4	2.28
3	8.7		7.34	9.0	4.2	2.44	9.0	4.2	3.02
4	8.0		5.80	7.3	0.5	3.85	9.2	2.4	3.74
			平均 5.52				平均 3.21		

(図6) Ehrlich 腹水癌マウス肝カタラーゼ活性に及ぼす磷酸クロロキンの影響
(RⅢ系♂マウス・25mg/kg 連続腹腔内投与)



働くが、延命効果には有意の差を認めない結果を得た。本章では生物学的には同じ腹水腫瘍の Ehrlich 癌マウスと同様の成績を示した吉田肉腫ラットについてクロロキンの肝カタラーゼ活性に及ぼす影響を検索した。

第1節 実験方法

実験動物には吉田肉腫を移植した雑系雄性ラット (体重 100g 前後) を用いた。吉田肉腫の移植方法は移植後5日目の吉田肉腫細胞100万個を 0.2ml 中に含まれるように計算して、被検ラットの腹腔内に移植する方法によった。投与方法は移植後24時間目より磷酸クロロキン 25mg/kg 毎日1回腹腔内投与を行ない、又対照群には蒸留水腹腔内投与を行ない乍ら、1群4匹として第7日目に致死せしめ (前以つて24時間絶食後) その新鮮肝について肝カタラーゼ活性を測定した。又同時に正常ラットの肝についても同様測定し、吉田肉腫ラットの肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響を検索した。なお肝カタラーゼ活性測定法及び効果の検討は第4章第1節で述べた如き方法によった。

第2節 実験成績

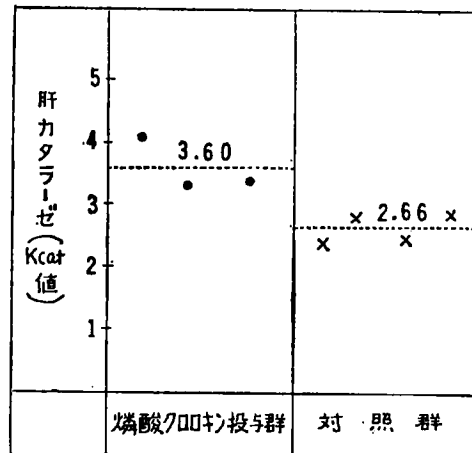
肝カタラーゼ活性 Kcat 値をみると、先づ正常ラットでは4.0~4.76 (平均4.34) が示された。次にクロロキン投与第7日目において、対照群では2.46~2.86 (平均2.66) が示されたのに対して、投与群では3.30~4.08 (平均3.60) が認められた。即ち対

照群においては38.8%, 投与群では17.1%の肝カタラーゼ活性低下率がみられ、従つてクロロキン投与群においては対照に比し21.7%の低下の抑制が認められたことになる。(表7, 図7)

(表7) 吉田肉腫ラット肝カタラーゼ活性に及ぼす磷酸クロロキンの影響
(雑系雄性ラット・25mg/kg 連続腹腔内投与)

正常ラット			対 照 群			磷酸クロロキン投与群		
ラット番号	Kcat	平均 (%)	ラット番号	Kcat	平均 (%)	ラット番号	Kcat	平均 (%)
11	4.28		1	2.46		5	4.08	
12	4.00	4.34	2	2.80	2.66	6	3.30	3.60
13	4.76 (100)		3	2.52 (61.2)		7	3.24 (82.9)	
			4	2.86		8	—	

(図7) 吉田肉腫ラット肝カタラーゼ活性に及ぼす磷酸クロロキンの影響
(雑系雄性ラット・25mg/kg 連続腹腔内投与)



第3節 小 括

Ehrlich 癌マウスにおけると同様クロロキンにより顕著な延命効果の示されない吉田肉腫ラットについて、その肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響を検索したところ、対照に比し明らかに肝カタラーゼ活性低下の抑制を見出すことが出来た。

第6章 Brown-Pearce 癌家兎肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について

第一編においてクロロキンは Brown-Pearce 癌家兎の腫瘍の発育抑制及び延命に効果を有することが認められたが、本章ではその肝カタラーゼ活性に及

ばす影響について述べる。なお Brown-Pearce 癌家兎のうち緩徐な発育を示し、クロロキン投与により発育抑制の認められたものについては測定し得ず、ここでは特に腹水貯溜をみる悪性度のより増加した発育に差異を認めなかつたものについてしか検索の機会を得なかつた。

第1節 実験方法

実験動物には Brown-Pearce 癌の雄性白色家兎を用いた。移植法は本腫瘍の移植後3週間目の睾丸部腫瘍を無菌的に細切し、2～3倍の生理的食塩水で以つて所謂腫瘍粥を作り、その1mlを被検家兎の片側睾丸実質に注入する方法によつた。投与方法は移植後24時間目より磷酸クロロキン 10mg/kg を毎日1回耳静脈より注射し、又対照群には蒸留水静脈内投与を行ない乍ら、1群5例として投与2週間目に瀉血致死せしめ（前以つて24時間絶食）、その新鮮肝について肝カタラーゼ活性を測定した。又同時に正常家兎の肝についても同様測定し、これらと比較検討した。なお肝カタラーゼ活性測定法、効果の判定は第4章第1節で述べた如き方法によつた。

第2節 実験成績

肝カタラーゼ活性 Kcat 値をみると、先づ正常家兎では 4.59～5.84 (平均5.27) が示された。次にクロロキン投与2週間目において対照群では2.94～4.64 (平均3.92) が示されたのに対し、クロロキン投与群でも 3.18～4.98 (平均 3.86) と可成りの低下がみられた。即ち正常家兎に比し対照群では27.4%, クロロキン投与群では26.8%の肝カタラーゼ活性低下率を示し、両者間には殆んど有意の差は認められなかつた。(表8, 図8)

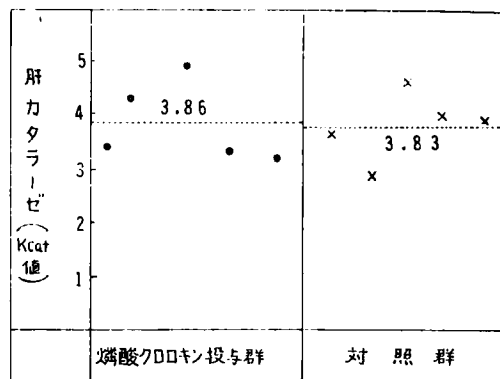
(表8) Brown-Pearce 癌家兎肝カタラーゼ活性に及ぼす磷酸クロロキンの影響
(白色雄性家兎・10mg/kg 連続静脈内投与)

正常家兎			対 照 群			磷酸クロロキン投与群		
家兎番号	Kcat	平均 (%)	家兎番号	Kcat	平均 (%)	家兎番号	Kcat	平均 (%)
11	5.32		1	3.68		6	3.48	
12	5.22		2	2.94		7	4.34	
13	5.84	5.27	3	4.64	3.83	8	4.98	3.86
14	5.41	(100)	4	4.00	(72.6)	9	3.32	(73.2)
15	4.59		5	3.92		10	3.18	

第3節 小 括

腹水貯溜を認める、悪性度のより増加した Brown-Pearce 癌家兎における肝カタラーゼ活性に及ぼす

(図8) Brown-Pearce 癌家兎肝カタラーゼ活性に及ぼす磷酸クロロキンの影響
(白色雄性家兎10mg/kg 連続静脈内投与)



クロロキンの影響を検索したところ、Ehrlich 癌マウスにおけると同様、対照との間に差を認め得ず、肝カタラーゼ活性低下の抑制は示されなかつた。

第7章 総括並びに考按

悪性腫瘍と肝カタラーゼ活性の關係は緒言にも述べた如く、これが担癌状態を特徴づけるものとして Blumenthal¹⁾, Brahn²⁾ により見出され、Greenstein⁵⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ により集大成された。Greenstein は皮下移植肝癌31の肝カタラーゼ性の最低は正常の1/20であり、これの剔出後肝カタラーゼ活性は正常値に復し、再移植で、又減少すること、又 Jensen 肉腫を用いた実験でも同様なことを認めている²⁰⁾。更にマウスの尾に肉腫37を移植した場合、肝カタラーゼ活性は漸次低下するが、腫瘍を切斷するか或いは腫瘍の増大で尾が自然に離斷した場合、肝カタラーゼ活性は正常値に戻ることに、又腫瘍の発育を抑制することによりその低下の抑制がみられること等が知られている⁵⁾。さてクロロキンが担癌動物の延命、腫瘍発育の抑制に好影響を示すことは既に教室の研究により明らかにされ²²⁾、著者も第1編において Brown-Pearce 癌家兎、吉田肉腫に及ぼす影響について述べたが、本編では更にクロロキンの抗腫瘍性を判定する一つの指標として、肝カタラーゼ活性に及ぼす影響をとりあげ、諸種担癌動物についてそれを追述した。

周知の如く、諸種制癌剤が担癌動物の肝カタラーゼ活性低下を抑制することは既に多数報告されている。即ち石原²⁶⁾ は吉田肉腫、腹水肝癌(ラッテ)に Nitro nin, 8-Azaguanine, 6-Mercaptopurine を、

石川²⁷⁾は Ehrlich 癌マウスに Sarkomycin, Carzinophylin, Nitromin を, 山元²⁸⁾は吉田肉腫に Nitromin, 8-Azaguanine, 6-Mercaptopurine を, 飯島²⁹⁾らは Ehrlich 癌に Hg-hematoporphyrin を, 伊藤³⁰⁾らは Ehrlich 癌に Mitomycin を, 黒川³¹⁾らは Ehrlich 癌に Chromomycin A-3 をそれぞれ適用し, 該動物の肝カタラーゼ活性低下を抑制し得ることを述べている。即ちこれらの物質を使用した担腫瘍動物に於ける肝カタラーゼ活性低下の抑制は最も重要な生化学的変化であり, 組織学的或いは細胞学的に抗腫瘍性を示す物質はすべて肝カタラーゼ活性にも好影響が示されるようである。ひるがえつて前述の如く, クロロキンは Bashford 癌マウス, Brown-Pearce 癌家兎等の担腫瘍動物に対して, 腫瘍の発育抑制等の治療効果を示したが, 又実験成績に示すように肝カタラーゼ活性にも諸種制癌剤による治療成績とほぼ同様な結果が得られた。しかし乍ら延命及び腫瘍の発育抑制が著明でなかつた Ehrlich 癌マウスでは肝カタラーゼ活性にも有意の差を認めなかつたが, 同じ腹水腫瘍の吉田肉腫ラッテでは肝カタラーゼ活性の抑制が示された。次に個々の成績を検討してみることとする。

正常マウス肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について

正常マウスにクロロキンを持続的に投与した場合, 実験成績が示す如く, その肝カタラーゼ活性に大きな変動はみられないが, 長期投与(3週間)においては, 多少増加する作用を有することが認められた。

しかし invitro において直接クロロキンを添加した実験では, 肝カタラーゼ活性に何ら影響を及ぼさないことが判明した。さて正常動物に抗腫瘍性物質を使用して, その肝カタラーゼ活性に与える影響を追求した実験が諸家により報告されているが, 石川²⁷⁾は正常マウスに Carzinophylin, Actinomycin, Nitromin, Sarkomycin を, 石原²⁸⁾は正常ラッテに 8-Azaguanine, Nitromin, 6-Mercaptopurine を投与して, その肝カタラーゼの変動を検索している。それらの成績によると前者では Carzinophylin, 後者では Nitromin が肝カタラーゼ活性の著し低下作用を示すが, その他の物質は軽度の低下作用を有すること, 及び invitro では何れも何ら変化を及ぼさないことを報告している。又これとは別にマウス肝カタラーゼ活性低下因子に関する検索について中原福岡¹⁶⁾は「ミトキソホルモン」を正常マウスに注射して肝カタラーゼ活性の低下することを発表したが,

Greenfield³²⁾, Price³³⁾らはこれは invitro ではその低下作用がなく, invivo においてのみ作用すると報告している。以上のように正常マウスの肝カタラーゼ活性に変動を及ぼす物質は何れも invitro においては, 作用を有せず, invivo においてのみ影響を及ぼすようである。さてクロロキンは以上の物質に比べ invitro で変化を及ぼさないことは全く同じ態度であるが, invivo では肝カタラーゼ活性の低下は来さず, 所謂制癌剤の殆んどが示す如き, 軽度の影響を及ぼすにとどまっていることが特徴的である。即ちクロロキンは腫瘍の発育を抑制し得る投与量では, 正常マウスの肝カタラーゼ活性には大きな変動を来さず, invitro で直接肝組織に作用させても, 酵素学的に肝細胞自体に何ら影響を及ぼさないものと考えられる。

担腫瘍動物の肝カタラーゼ活性に及ぼすクロロキンの影響について

Bashford 癌マウスの肝カタラーゼ活性の変動について, 本実験においては対照群の示すように, 移植後1週間では肝カタラーゼ活性低下率は約10%と緩徐な下降曲線をたどるが, その後は更に顕著に低下し, 4週間目では正常の1/2位迄下降するのが特徴的である。この様な経過を辿る本腫瘍に対して, クロロキン投与を行なうと, 3回に亘る実験に示さる如く第1週目において既に可成りの肝カタラーゼ活性低下の抑制を認め, 更に日数の経過と共にその低下の抑制率が著明となる傾向がみられ, 腫瘍の発育との間に明らかな関連が認められた。次に Ehrlich 癌マウスにおける肝カタラーゼ活性は癌移植後3日目から低下の傾向を示し, 日を追つて低下が著しくなることが知られている³⁴⁾。このことは著者らの実験でも同様のことが認められている。この様な Ehrlich 癌マウスに対してクロロキンは延命にも効果の見出されなかつたように, その肝カタラーゼ活性低下の抑制にも好影響は示され得なかつた。更に吉田肉腫ラッテについては鈴木³⁵⁾, 小菅³⁶⁾, 石原²⁸⁾らの報告の示すように, 肝カタラーゼ活性は死亡する迄漸減することが知られているが, 著者らの実験でもほぼ同様の事実を認めている。そしてこれらに対するクロロキンの影響については同じ腹水腫瘍の Ehrlich 癌マウスと異なり, 肝カタラーゼ活性の低下の抑制が示されたことは第1編にも述べた如くクロロキンにより顕著な延命こそないが, 腹水腫瘍細胞の発育抑制が示されたこと等と考え合わせ理解出来ることである。最後に Brown-Pearce 癌家兎の肝

カタラーゼ活性についての文献はみられないが、著者らの実験によれば、腹水貯溜を認める悪性度のより増加したものでは早期に著しく低下し、生存日数の比較的長いものでは前者と比し低下が緩徐であることが示されている。そしてこの場合、悪性度の強いものに対して、クロロキンの投与を行なつてもその肝カタラーゼ活性は何ら影響を受けないことが判明した。以上のように担腫瘍動物においては程度の差こそあるが、その肝カタラーゼ活性は何れも低下することが示されたが、Begg³⁷⁾ らによれば、その肝カタラーゼ活性低下の度合はそれがより悪性か否かにより異なることを報告している。即ち腫瘍の発育速度が速く、生存日数の短いもの程、肝カタラーゼ活性の低下率は著明であるように考えられる。クロロキンは腫瘍の発育速度の早い、生存日数の短かい、従つて悪性度の強い、担腫瘍動物 Ehrlich 癌マウスや腹水貯溜の Brown-Pearce 癌家兎等に対しては、その肝カタラーゼ活性に何ら好影響を及ぼさず、Bashford 癌マウス等比較的経過の長いものにおいて、その肝カタラーゼ活性低下の抑制を示した事は腫瘍の発育抑制、及び延命効果等と相俟つてクロロキンの抗腫瘍性の判定上注目すべき問題と考えられる。

第8章 結 論

1) 正常マウスに連日磷酸クロロキン 25mg/kg を投与しても、その肝カタラーゼ活性には大きな変

化を及ぼさなかつた。

2) 又正常マウスの肝組織に直接磷酸クロロキン 2007/cc 1時間添加作用させても、そのカタラーゼ活性には殆んど影響を及ぼさないことが判明した。

3) Bashford 癌マウスに連日磷酸クロロキン 25mg/kg を投与した場合、その肝カタラーゼ活性は既に第1週目において可成り低下抑制を認め、更に日数の経過と共に著明となる傾向がみられた。

4) Ehrlich 癌マウスに1週間磷酸クロロキンを投与した場合、その肝カタラーゼ活性の低下の抑制はみられなかつた。

5) 同じ腹水腫瘍の吉田肉腫ラッテに1週間同様クロロキンを投与した場合、その肝カタラーゼ活性の低下は抑制された。

6) 腹水貯溜を認める、悪性度のより増加した Brown-Pearce 癌家兎に磷酸クロロキン 10mg/kg 2週間投与した場合、その肝カタラーゼ活性は Ehrlich 癌マウスの場合と同様低下の抑制がみられなかつた。

7) 以上クロロキンは正常マウスの肝カタラーゼ活性には何ら影響を及ぼさないが、担腫瘍動物に対しては、何れも腫瘍の発育の抑制されたものに於いて、その肝カタラーゼ活性の低下の抑制が認められた。

擲筆するに当たり御指導と御校閲を賜りたる恩師平木深教授に深甚の謝意を表わすと共に、終始御助言、御援助下さった木村郁郎講師に深謝致します。

文

- 1) F. Blumenthal: Zeitschrift für Krebsforschung 8, 436, 1910.
- 2) B. Brahn: Zeitschrift für Krebsforschung 16, 112, 1919.
- 3) E. Rosenthal: Deutsche Medizinische Wochenschrift Jg. 38, 2270, 1912.
- 4) J. Magat: Zeitschrift für gesamte experimentelle Medizin, 42, 95, 1924.
- 5) J. P. Greenstein, H. B. Andervont & J. W. Thompson: Journal of the National Cancer Institute, 2: 345, 1942.
- 6) Zerver: Zeitschrift für Krebsforschung, 19, 1922.
- 7) L. Deutsh u. J. Fränkel: Zeitschrift für Krebsforschung, 40, 98, 1934.
- 8) J. P. Greenstein: Journal of the National

献

- Cancer Institute, 2, 283, 1941.
- 9) J. P. Greenstein: Journal of the National Cancer Institute, 2, 345, 1942.
- 10) J. P. Greenstein: J. A. M. A., 148, 699, 1952.
- 11) J. P. Greenstein: Biochemistry of Cancer, New York, 1954.
- 12) 田崎勇三他: 日消会誌, 51, 79, 1954.
- 13) 井口良治: 岡山医誌, 64, 274, 1952.
- 14) 山形敬一: 日消会誌, 46, 54, 1949.
- 15) 山形敬一: 日消会誌, 42, 391, 1943.
- 16) Nakahara, W., and Fukuoka, F.: Jap. Med. J., 1: 271, 1948.
- 17) Nakahara, W., and Fukuoka, F.: Gann, 40: 45, 1959.
- 18) 中川諭他: 癌, 42: 103, 1951.
- 19) 中川諭他: 月本内科誌, 40: 6, 1951.

- 20) 佐藤八郎他：癌，42：99，1951.
 21) 佐藤八郎他：鹿児島医大紀要，3：314，1951.
 22) 平木 潔・木村郁郎：綜合臨床，11，1807，1962.
 23) Euler, H. V. & Josephson, K.: Über Katalase. I., Ann., 452:158, 1927.
 24) R. K. Bonnichsen; B., Chance, H. Theorell: Catalase activity. Acta Chemica Scandinavica 1:685, 1947.
 25) J. P. Greenstein; Biochemistry of Cancer, New York, 1947.
 26) 石原 実：日産婦会誌，8：243，1956.
 27) 石川 隆：広島医誌，12：1389，1959.
 28) 山元清一他：癌，46：444，1955.
 29) 飯島登他：癌化学療法の研究，（マーフィリン 文献集）
 30) 伊藤一二他：Mytomycin C の抗腫瘍性に関する研究（マイトマイシン文献集）
 31) 黒川利雄他：癌の臨床，6：220，1960.
 32) R. E. Greenfield and A. Meister: Journal of the National Cancer Institute, 11:997, 1951.
 33) V. E. Price and R. E. Greenfield: J. Biol. Chem. 209:363, 1954.
 34) 安藤不二夫：大阪市大医誌，1295，1959.
 35) 鈴木 他：北海道医誌，26：78，1952.
 36) 小菅 他：北海道医誌，29：1183，1954.
 37) Begg, Dickenson, Miller: Canadian J. of Med. Sciences, 31:315, 1953.

Studies on the Treatment of Malignant Tumors with Fibroblast-Inhibiting Agent

Part 2 Effects of Chloroquine on Liver Catalase Activity of Animals Bearing Tumors

By

Hidenari KODANI

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

Because catalase activity is thought an important indication in chloroquine efficiency against malignant tumors, changes of the catalase activity of the liver in the animals bearing malignant tumors was observed by chloroquine administration.

1) No significant changes were noted in the catalase activity of the liver of the normal healthy mice by administration of chloroquine diphosphate of daily dosis of 25mg/kg.

2) It was clearly demonstrated that catalase activity of liver tissue of the normal mice was scarcely influenced to direct addition administration of 200 γ /ml/hr of chloroquine diphosphate.

3) In the mice bearing Bashford cancer given daily dosis of 25 mg/kg of chloroquine diphosphate, lowering of liver catalase activity was observed to be considerably inhibitory in the first week and tended to show more remarkable with passage of the dates.

4) No inhibition of the decreasing liver catalase activity was observed by one week administration of chloroquine diphosphate in the mice bearing Ehrlich carcinoma.

5) Decreasing of the liver catalase activity was suppressed by one week administration of chloroquine in the rats bearing Yoshida sarcoma.

6) No inhibition of the decreasing liver catalase activity was observed by 2 weeks administration of 10 mg/kg of chloroquine diphosphate in the rabbits bearing Brown-Pearce cancer which demonstrated far advanced cancerous involvement and ascites accumulation.

7) It is clear from these data that chloroquine does not influence to the liver catalase activity of normal animals, and inhibition of decreasing liver catalase activity is observed in the animals bearing tumors which growth is inhibited by chloroquine administration.
