原 著

実験的および臨床的葉酸欠乏細胞について

城端厚生病院産婦人科 同 中央検査部病理

松井 亮 堀 隆

富山県立中央病院産婦人科

館野 政也 北川 義彦 舌野 徹
林 義則 中曾根敬一

同 中央検査部病理

福村 健 林 喜代志

山梨病院産婦人科

松田 稔

Wistar 系メスラットに大量の Methotrexate を投与して葉酸欠乏状態を作り出し、その腔スミア中の葉酸欠乏細胞を探した。その結果、多核大型細胞、細胞質内空胞の所見が認められた。しかし葉酸欠乏症に特徴的とされる好中球の核過剰分葉現象は認められなかった。

また Methotrexate を投与している乳癌患者の腔スミアを観察したところ、大型細胞、細胞質内空胞、細胞質のしわが認められた。

ラットにあらわれた細胞変化の程度はヒトにあらわれた細胞変化より強かった。これはラットに投与された Methotrexate の量が極めて多かったためと思われた。ラットの場合もヒトの場合も細胞の変化が日ごとに増強していく印象はなかった。

Key words: Wistar rat—Methotrexate—Folic acid deficiency—Cytology

Cytological studies on the experimental and clinical folic acid deficiency

Makoto MATSUI, M.D.

Dept. Obst. & Gynec.

Takashi HORI, M.T.

Dept. of Central Laboratory, Division of Pathology, Johana Municipal Hospital

Masaya TATENO, M.D., Yoshihiko KITAGAWA, M.D.,

Toru SHITANO, M.D., Yoshinori HAYASHI, M.D.,

Keiichi NAKASONE, M.D.

Dept. Obst. & Gynec.

Ken FUKUMURA, M.T., Kiyoshi HAYASHI, M.T.

Dept. of Central Laboratory, Division of Pathology,

Toyama Prefectural Central Hospital

Minoru MATSUDA, M.D.

Dept. of Obst. & Gynec. Yamanashi Hospital

論文別刷請求先 ☎ 939-18 富山県東砺波郡城端町 4302 城端厚生病院産婦人科

昭和56年10月16日受付

緒 論

ヒトでは葉酸欠乏状態は悪性貧血、溶血性貧血、Methotrexate 治療時、小腸悪性腫瘍、小腸 by-pass 切除時、特発性脂肪下痢症、食餌療法結果、心疾患、肝疾患などの場合におこるといわれている⁹⁾。またこの際には細胞学的に特徴ある葉酸欠乏細胞が出現するといわれている。しかし葉酸欠乏細胞を細胞学的にとらえることははなはだ難しく、従来からいわれている特徴的な細胞(表1)²⁾の出現はヒトではまれなように思われる。われわれは過去に絨毛性疾患患者の治療に Methotrexate を使用し、その腔スミアを観察したが二核細胞が認められただけであり、多核大型細胞、空胞形成、好中球核過剰

表 1 葉酸欠乏細胞の特徴

核	大型化 多核
細胞質	大型化 空胞形成 しわやひだが出現
その他	核・細胞質比は変化しない 好中球核過剰分葉

図 1

分葉等の所見はみられなかった。そこで今回われわれはラットを用い、大量の Methotrexate を投与して実験的に葉酸欠乏状態を作り出し、その腔スミアに特徴的な葉酸欠乏細胞が果たして出現するか否かを検索した。またこの実験のあと、Methotrexate 投与中の乳癌患者の腔スミアを観察する機会を得たので、ヒトの場合と併せて葉酸欠乏細胞について検討を加えてみたいと思う。

実験材料および方法

Wistar 系メスラット 11 匹を用いた。まずこの 11 匹のラットの腔スミアを 4 日間連続採取して正常性周期の細胞像を観察した。スミア採取にあたっては妊娠反応採尿用の直径 3 mm のポリエチレンチューブ (図 1) をスポイドとしてこれに少量の生理的食塩水を吸引し、それをラットの腔内に注入した後 3, 4 回 pumping して再びその液をチューブ内に吸引し、それをスライドガラスに塗抹し、小綿球でたいて余分な水分をとり、アルコール固定、Papanicolaou 染色を施して鏡検した。

次いでこれら 11 匹のラットを 3 グループに分け、3 匹に Estrogen Depot 5 mg を 1 回筋注、他の 3 匹に Progesteron Depot 62.5 mg を 1 回筋注、残る 5 匹に図 2 のとき構造式の Methotrexate を 1 mg/日の量で連日 8 日間筋注した。注射開始の翌日から全ラットの腔スミアを前述の方法で毎日採取して染色、観察した。Estrogen Depot 筋注ラットと Progesteron Depot 筋注ラットを control 群として Methotrexate 筋注ラットの腔スミアと比較した。

図 2

表 2

ラット	Methotrexate 投与日(開始日=0)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
No 1			○	●			● ○	○	死亡
No 2			● ○		●	● ○	●	死亡	
No 3			○			●		死亡	
No 4			○	● ○				死亡	
No 5				●		●		死亡	

実験成績

Methotrexate 投与を開始してから 8 日目に 4 匹のラットが死亡し、9 日目には残る 1 匹も死亡したので計 8 日間の腔スミアを観察したにとどまった。死亡した Methotrexate 投与群のラットはいずれも消化管出血をおこしていた。

1) control 群のスミアには大型細胞や細胞質内空胞、多核細胞はみられなかったが、二核細胞は少数認められた。したがって二核細胞は比較の対象とはしなかった。

2) Methotrexate 投与群では投与 3 日目から 8 日目までの間、すべてのスミアとはいえないが、細胞質内空胞、多核大型細胞の出現が認められた。空胞形成は 5 匹中 4 匹に出現、多核大型細胞は 5 匹全例に認められた。空胞はいわゆる大型空胞ではなく、多発する小空胞であった。

3) 好中球の分葉核については、薬物投与前、control 群、Methotrexate 投与群の間で明確な違いは認められなかった。

4) 大型化した細胞は正常細胞の 3~5 倍の大きさがあり、核の数も二核から数 10 個までさまざまであった。大きい細胞ではいわゆるツートンカラーに染まるものもあった (写真 1~3)。

5) 細胞質内空胞は比較的大きく、多発していた (写真 4~7)。

6) 細胞質にしわのある細胞はみられなかった。

7) 同一ラットで日を追って細胞の変化が増強するよ

写真 1 ラットにみられた多核大型細胞 (×400)

写真 2 ラットにみられた多核大型細胞 (×400)

写真 3 ラットにみられた多核大型細胞
細胞質はツートンカラーに染まり、核の数は20個以上である。(×400)

写真 4 ラットにみられた細胞質内空胞 (×400)

写真 5 写真4の強拡大 (×1,000)
個々の空胞自体が大きく、細胞質を充満している。 写真 6 ラットにみられた細胞質内空胞 (×1,000)
核が圧排されている。

うな傾向はみられなかった。

またこの実験の後、乳癌術後の患者で Methotrexate を投与している症例の膣スミアを採取、観察する機会を得たのでヒトの場合についても述べたいと思う。この患者は化学療法剤として Methotrexate 10 mg, cyclo-

phosphamide 100 mg, 5-FU 250 mg を週 2 回投与されていた。表 3 に示すごとく昭和 55 年 6 月 10 日 (Methotrexate 40 mg 投与後), 7 月 12 日 (Methotrexate 110 mg 投与後), 8 月 9 日 (Methotrexate 220 mg 投与後) の 3 回にわたって膣スミアを採取し、葉酸欠乏細胞の出

写真7 ラットにみられた細胞質内空胞 (×1,000)

写真8 ヒトスミア中の大型細胞 (×400)

核, 細胞質ともに増大し, 細胞質内にしわがみられる。

写真10 ヒトスミア中の大型二核細胞 (×400)

周囲の表層型細胞に比べて, きわだって大きい。

現の有無を検討した。

6月10日のスミアでは特徴的な細胞はみられなかった。7月12日のスミアには写真8のような核, 細胞質ともに大型化し, 細胞質内にしわのある細胞が認められた。8月9日のスミアでは写真9~11のように大型二核

表 3

55年6月10日 Methotrexate 40 mg 投与後	特徴的細胞なし
55年7月12日 Methotrexate 110 mg 投与後	細胞質のしわ 大型細胞
55年8月9日 Methotrexate 220 mg 投与後	細胞質のしわ 大型細胞 二核細胞 空胞形成

写真9 ヒトスミア中の大型二核細胞 (×400)

核, 細胞質ともに増大した中層型細胞で, 軽度の空胞形成もみられる。

写真11 ヒトスミア中の大型二核細胞 (×400)

細胞質内にひだがみられる。

細胞, 細胞質内にしわのある細胞が認められた。

また写真12~14にみられるような細胞質内空胞が出現した。

考 按

葉酸欠乏細胞の特徴的所見については表1(前述)のごとくまとめられている。葉酸欠乏症は北アメリカでは

写真 12 ヒトスミア中の空胞形成細胞 (×400)

細胞質内に小空胞が多発している。左側の細胞では小空胞が連なって核周囲に大空胞を形成する兆しがみえる。

写真 13 ヒトスミア中の空胞形成細胞 (×400)

核周囲にできた大空胞

写真 14 ヒトスミア中の空胞形成細胞 (×1,000)

最もよくみられるビタミン欠乏症であるといわれている¹⁾。しかし現代では日本において臨床的に本症を発見することは極めてまれであると思われる。したがって細胞学的にも本症に関する研究報告はほとんど見当たらない。わずかに「本症では好中球の核過剰分葉現象がある」⁸⁾とか「大赤血球性貧血」⁹⁾についての報告がみられるにすぎない。葉酸 (folic acid) は肝で tetrahydrofolic acid となり、さらに炭素をうけとって N⁵-formyl-tetrahydrofolate (citrivorum factor), N⁵-methyltetrahydrofolate になり、さらに N⁵-methenyltetrahydrofolate, N¹⁰-methenyltetrahydrofolate などの活性物質になって thymidilic acid 合成に働くとされている⁷⁾。強力な葉酸拮抗剤である Methotrexate は葉酸から citrivorum factor への転化を阻止したり、核酸合成に直接関与する酵素を阻害する作用がある。したがって DNA 合成が阻害され、細胞分裂が遅延することにより macrocyte が出現するものと考えられている⁷⁾。今回われわれはラットに大量の Methotrexate を投与して高度

の葉酸欠乏状態を作りだしたが、これは過去に常用量の Methotrexate を投与した絨毛性疾患患者では特徴的な葉酸欠乏細胞があまりみられなかったことからこの実験を行ったわけである。ラットに Methotrexate を投与し始めてから3日目5匹中4匹の腔スミアに細胞質内空胞と多核大型細胞が認められたが、これは極めて早い出現といえるだろう。大型化した細胞は正常細胞の3~5倍の大きさがあり、核の数も単核から数10個をもつものまであった。細胞質内空胞も1個ではなく複数であった。また特徴的所見とされる細胞質のしわはラットの細胞ではみられなかった。同じく特徴的所見とされる好中球の核過剰分葉現象については、今回の実験では Methotrexate 投与前後の好中球を比較してみても特に分葉の亢進は認められなかった。

一方、乳癌患者において第1回目採取のスミアに葉酸欠乏細胞と思われるものが認められなかったのは、Methotrexate 投与量が少なかったためと思われる。第2回目採取のスミアには核、細胞質ともに正常細胞の約3倍の大きさの、しわのある大型細胞が出現した。第3回目採取のスミアには単核、二核大型細胞、細胞質内多発小空胞、それらが癒合してできたと思われる大きい空胞がみられた。この二核細胞と空胞を除けば、第2回目と第3回目のスミアの間で葉酸欠乏細胞の所見が特に進展している印象はなかった。ラットの場合も葉酸欠乏細胞が出始めてからその所見が日ごとに増強することではなく、ほぼ一定の変化しか認められなかった。また多核大型細胞はラットではみられたが、ヒトの場合では認められず、細胞質内空胞についてもヒトの場合よりラットの方に大型かつ輪郭明瞭なものが多数観察された。ヒトとラットのスミアを比較することは異論のあるところかも知れないが、このようにラットの葉酸欠乏細胞の所見の

方が強くでたのはラットへの1mg/日というMethotrexate投与量が致死量に近い量であったためであろう。ヒトの場合も、今回みられた葉酸欠乏細胞より強い変化をみるためには、常用量を超えるMethotrexateの投与が必要なのではないだろうか。細胞の変化はDose-responseであると思われるが、時間をかけて投与された場合には細胞学的所見の増強はあまりみられない印象を受けた。

現在わが国において婦人の膣細胞診で葉酸欠乏細胞を見い出すことは極めてまれであり、またこれに該当するような細胞が出現してもそれが果して臨床的に意味をもつかどうかは疑問である。今後われわれは絨毛性疾患で化学療法継続中の患者について、さらに症例を集め、ヒトにおける典型的な葉酸欠乏細胞の出現を詳細に観察し、研究を続けたいと思う。

結 語

1) 大量のMethotrexateを投与したラットの膣スミアにおいて多核大型細胞、細胞質内空胞が出現した。好中球の核過剰分葉現象は認められなかった。

2) Methotrexate投与中のヒトの膣スミアには単核、二核大型細胞、細胞質内空胞、細胞質のしわが出現したが、多核大型細胞はみられなかった。

3) ヒトよりラットの細胞に、より強い変化があらわれたのはラットに投与されたMethotrexateが極めて大量であったためであると思われる。

4) ヒトの場合もラットの場合も、日ごとに細胞の変化が増強していく傾向はなかった。

本論文の要旨は仙台市における、第19回日本臨床細胞学会秋期大会において発表した。

Summary

A large quantity of Methotrexate was injected to the Wistar rats (female) so that artificial folic acid deficiency would be made in order to find the folic acid deficient cells.

As a result, multinucleated large cells and intracytoplasmic vacuolation were found. But nuclear hypersegmentation of neutrophil, which is a specific phenomenon of

the folic acid deficiency, was not found.

On the other hand, the vaginal smears of the patient who had been injected Methotrexate against her breast cancer were observed.

In consequence, large cells, intracytoplasmic vacuolation and crumples of cytoplasm were confirmed in her vaginal smears.

Morphologic change of the folic acid deficient cells of the rats was more prominent in comparison with that of the patient of breast cancer. It is probably because the dose of Methotrexate injected to the rats was extremely large.

The changes of the folic acid deficient cells of both rats and the patient were not seemed to increase day by day.

文 献

- 1) Bills, T., Spatz, I.: Neutrophilic Hypersegmentation as an Indicator of Incipient Folic Acid Deficiency, *Am. J. Clin. Pathol.*, 68: 263~267, 1977.
- 2) Botez, M.I.: Hypotonia and folate deficiency in children, *The Journal of PEDIATRICS*, 96 NO 4: 774, 1980.
- 3) Chanarin, I.: Effects of Anticonvulsant Drugs: Folic Acid in Neurology, Psychiatry, and Internal Medicine, 75~80, Raven Press, New York, 1979.
- 4) Kaplan, S.S., Basford, R.E.: Effect of Vitamin B12 and Folic Acid Deficiencies on Neutrophil Function, *Blood*, 47 NO 5: 801~805, 1976.
- 5) 吉利 和, 訳: 巨赤芽球性貧血の病態生理, ハリソン内科書, 下巻, pp. 1863~1864, 東京, 1972.
- 6) Lindenbaum, J.: Folate and Vitamin B12 Deficiencies in Alcoholism, *Seminars in Hematology*, 17 NO 2: 119~129, 1980.
- 7) Makki, K.A., Perucca, E., Richens, A.: Stimulation of drug metabolism by folate replacement in folate-deficient epileptic patients, *Proceedings of the B.P.S.*, 17th~19th, December, 1979.
- 8) Ozsoylu, S.: Diagnosis and management of folate deficiency in low birthweight infants, *Archives of Disease in Childhood*, 55: 81, 1980.
- 9) 田中 昇・他: 葉酸欠乏症 (Folic Acid Deficiency) における細胞変化, 細胞診教本, p. 64, 東京, 1979.