抗悪性腫瘍薬 **VP 16-213** の生殖に及ぼす影響 (第5報)

—ラットにおける妊娠前及び妊娠初期静脈内投与試験—

高橋 紀光, 甲斐 修一, 河村 寿, 石川 克己
田中 隆, 黒柳 幸司, 浜島 義規, 太田 敏
門田 利人, 河野 茂生, 太田 恵子, 竹内友佳子
ブリストル・マイヤーズ研究所株式会社
前臨床研究所

REPRODUCTION STUDIES OF VP 16-213 (V)

—Intravenous administration to rats prior
to and in the early stages of pregnancy—

Norimitsu TAKAHASHI, Shuichi KAI, Hisashi KOHMURA,
Katsumi ISHIKAWA, Takashi TANAKA, Kohji KUROYANAGI,
Yoshinori HAMAJIMA, Satoshi OHTA, Toshihito KADOTA,
Shigeo KAWANO, Keiko OHTA and Yukako TAKEUCHI

Animal Experiment Department, Preclinical Research
Support Laboratories, Bristol-Myers Research Institute, Ltd.
1 Futagoyama, Sakazaki, Kohta-cho, Nukata-gun, Aichi 444-01, Japan

Accepted December 12, 1985

Abstract.....VP 16-213 (etoposide, abbr. to VP), an oncostatic drug, was administered intravenously to male Crj: CD (Sprague-Dawley) rats for 61 days and to female rats of the same strain for 14 days prior to mating at dose levels of 0.05, 0.2 and 0.8 mg/kg/day. These animals were then mated under the consecutive administration of this drug and the females confirmed to be copulated were further dosed from day 0 through 7 of gestation.

The summarized results obtained are as follows:

1. Body weight increases were suppressed at the dose level of VP 0.8 mg/kg in males and females.
2. VP 0.2 and 0.8 mg/kg decreased the thymic weight and 0.8 mg/kg decreased testicular and epididymal weight in males showing macroscopic atrophy of these organs, but these doses failed to affect the reproductive ability and so on in parent rats.

連絡先: ☎444-01 愛知県額田郡幸田町大字坂崎字双子山1番地

ブリストル・マイヤーズ研究所株式会社・前臨床研究所 高橋 紀光

3. As for fetuses, VP 0.8 mg/kg elevated the mortality, decreased the number of survivors and suppressed their growth. Furthermore, this dose raised the incidences of anophthalmia, microphthalmia, dilated lateral ventricles and unossified 5th and 6th sternums, as well as brought retarded ossification of sternums, cervical vertebrae, sacral and coccygeal vertebrae, metacarpus and thoracic vertebrae.

Based on these results, the no-effect dose levels of VP under the present experimental condition were estimated to be 0.05 mg/kg/day against parent rats of both sexes and 0.2 mg/kg/day against their offspring.

Key words: Oncostatic drug, VP 16-213, fertility, intravenous administration, rat.

緒 言

VP 16-213 (VP) はスイス Sandoz 社で開発された半合成 podophyllotoxin 誘導体であり、ある種の実験腫瘍やヒト腫瘍に対し抗腫瘍活性を有すると報告されている (Stahelin, 1973; Grieder et al., 1977; Issell and Crooke, 1979)。今回、著者らは VP の安全性評価の一環として、ラットを用いた静脈内投与による妊娠前及び妊娠初期投与試験を実施したので、その結果について前報 (高橋ら, 1986a, b, c, d) に引き続き報告する。

試験材料及び方法

1. 使用薬物

VP (一般名: Etoposide) は化学名 4'-demethylepipodophyllotoxin 9-(4, 6-O-ethylidene- β -D-glucopyranoside) と称し、その化学構造式、物理化学的性状等については第 1 報 (高橋ら, 1986a) で詳述した。本試験には VP を 1 アンプル中 100 mg/5 ml 含有する Bristol-Myers 社製臨床用アンプル剤 (Lot No. 003G9) を使用した。なお、その組成は以下の通りである。

Etoposide	0.020 g
Citric acid anhydrous	0.0020 g
Benzyl alcohol	0.030 g
Polysorbate 80	0.080 g
Polyethylene glycol 300	0.650 g
Ethanol dehydrated, to	1.0240 g

2. 使用動物及び飼育条件

生後 5 週齢の Crj:CD (SD) 雄ラット及び 9 週齢の同系雌ラットを日本チャールス・リバー社より入手し、1 週間予備飼育した後本試験に供した。投与開始時の体重は雄 193~224 g, 雌 198~223 g であった。各動物は室温 23 ± 2 °C, 湿度 55 ± 10 % とした動物室内で金網製ケージ内に収容し、固型飼料 (オリエンタル酵母工業製 CRF-1) 及び滅菌水を自由に給与した。

3. 投与量及び使用動物数

VP を 0.15, 0.5, 1.5 及び 4.5 mg/kg の割合で 6 週齢の Crj:CD (SD) 雌雄ラットに 1 箇

Fertility study of VP 16-213 in rats by intravenous administration

月間静脈内投与した亜急性毒性試験（高橋ら，1986e）の結果，0.15 及び 0.5 mg/kg 群では明らかな毒性症状は認められなかったが，1.5 mg/kg 群では雌雄とも体重増加の抑制がみられ，4.5 mg/kg 群では雌雄とも体重増加の抑制，更に雄では20例中 8 例が投与期間中に死亡あるいは瀕死の状態に陥った。一方，13～14週齢の同系妊娠ラットに VP を 0.15，0.5 及び 1.5 mg/kg の割合で妊娠 7 から17日目まで静脈内投与した予試験では，0.5 mg/kg 以下の投与群は明らかな影響を示さないが，1.5 mg/kg 群では体重増加の抑制及び胚胎仔死亡率の有意な上昇が認められた。以上の結果に基づき，VP の最大投与量を 0.8 mg/kg/日と決め，それ以下の各投与量及び使用動物数を次のように定めた。

Control		22 males	20 females
VP	0.05 mg/kg/day	22 males	20 females
VP	0.2 mg/kg/day	22 males	20 females
VP	0.8 mg/kg/day	22 males	20 females

4. 投与液の調製及び投与方法

対照群の動物には生理食塩液（大塚製薬製）を 0.5 ml/100 g 体重，VP 0.05，0.2 及び 0.8 mg/kg 群には VP を 0.01，0.04 及び 0.16 mg/ml 含有するように臨床用アンプルを生理食塩液で希釈した溶液をそれぞれ 0.5 ml/100 g 体重の割合で，各動物の尾静脈に 27G 注射針を用いて 1 日 1 回反復投与した。

5. 投 与 期 間

常法に従い，雄ラットの場合交配前61日間及び交配期間中，雌ラットの場合交配前14日間，交配期間中及び妊娠 0 日目より 7 日目まで投与した。

6. 交 配 方 法

雄では61日間，雌では14日間の投与が終了した時点で，同一投与群内の雌雄を任意に 1 対 1 に割りあて，最長 2 週にわたり終夜同居させた。この間陰垢を連日採取・検査し，精子を確認した時点で交尾が成立したものとみなして雌雄を分離し，この日を妊娠 0 日と定めた。

なお，2 週間以内に交尾が成立しなかった場合，更に 1 週にわたり雄は無処置の雌と，また雌は既に授精能が確認されている同一投与群内の雄と同居せしめ，同様に交尾の有無を調べた。

7. 観 察 ・ 検 査 項 目

親動物の症状観察及び体重・摂餌量・摂水量の測定：一般症状は毎日観察し，異常があれば記録に残した。体重及び摂餌量は，雄では交配前の投与期間中に週 2 回，雌では交配前の投与期間中に週 2 回，交尾確認後 8 日目までは連日，それ以降妊娠20日目までは隔日に測定した。摂水量は，雄では交配前の投与期間中，雌では投与期間中及び妊娠期間中にいずれも週 1 回測定した。

雄ラットの剖検：すべての雄ラットは交配期間終了後15～17週齢時に ether 麻酔下で放血致死させ、内臓異常の有無を肉眼的に観察し、主要器官重量を測定した。

母獣の妊娠末期剖検：交尾が確認されたすべての雌ラットは妊娠20日目に ether 麻酔下で放血致死させ、妊娠黄体数、着床数、死亡胎仔数、生存胎仔数と生存胎仔の性別・体重・体長・尾長・外表異常の有無及び胎盤重量を調べた後、母獣の内臓異常の有無を肉眼的に観察し、主要器官重量を測定した。なお、死亡胎仔については、高野らの成書（1975）を参考に着床痕、胎盤遺残及び浸軟仔に分け、更に浸軟仔は死亡時期により初期死亡と後期死亡とに区別した。

胎仔の骨格及び内臓検査：各腹あたり約 1 / 2 の生存胎仔を95% ethanol で固定した後、Dawson 法（1926）により alizarin red S 染色透明骨格標本を作製し、骨格検査に供した。また、残り約 1 / 2 は Bouin 液で固定した後 Wilson の粗大切片法（1965）により、胸部は顕微解剖法（西村，1974）を参考にして内臓検査に付した。

8. 統計処理

各検査・測定項目について得られたデータの解析にあたっては、胎仔の体重・体長・尾長、胎盤重量及び胸骨・頸椎・仙尾椎・中手骨・前肢末節骨・中足骨・腰椎数については一腹毎に計算し、VP 投与群と対照群との間の差の検定に際しては、t- 検定あるいは χ^2 - 検定を用いた。なお、有意水準は $p < 0.05$ 及び 0.01 とした。

9. 試験期間

本試験は昭和58年9月から昭和59年6月の間に実施された。

試験結果

1. 親動物に及ぼす影響

1. 1 症状観察

対照群及び VP 各群とも明らかな毒性症状は認められなかった。

1. 2 体重変動、摂餌量及び摂水量 (Figs. 1, 2)

体重については、雄では VP 0.8 mg/kg 群で投与5日目より終了時まで増加抑制がみられたが、0.2 mg/kg 以下の群では対照群との間で差異は認められなかった。雌では 0.2 mg/kg 群で交配前投与10から14日目、妊娠0日目及び3から14日目、0.8 mg/kg 群で交配前投与7日目から妊娠20日目にそれぞれ増加抑制を認めたが、0.05 mg/kg 群と対照群との間では有意差はみられなかった。

摂餌量については、雄では 0.2 mg/kg 群で投与16から19日目及び30から36日目、0.8 mg/kg 群で1から19日目に対照群を下回った。雌では 0.2 mg/kg 群で交配前投与1から7日目、11から13日目、妊娠2及び4日目、0.8 mg/kg 群で交配前投与全期間、妊娠1, 2日目及び4から7日目に対照群を下回ったが、0.05 mg/kg 群と対照群との間では雌雄とも全期間を通じ有意差は認められなかった。

摂水量については、雄では 0.8 mg/kg 群で全期間にわたって対照群を上回ったが、0.2 mg/kg 以下の群と対照群との間では有意差はみられなかった。雌では 0.05 mg/kg 群で妊娠1

Fertility study of VP 16-213 in rats by intravenous administration

Fig. 1 Body weight changes and food consumption in male rats receiving VP 16-213 intravenously for 61 days before mating.

週目に対照群を上回り, 0.8 mg/kg 群で交配前投与 1 週目に下回り, 妊娠 1 及び 2 週目に上回ったが, 0.2 mg/kg 群と対照群との間では有意差はみられなかった。

1. 3 生殖能 (Table 1)

雌雄動物ともに交尾率及び受胎率に VP 各群と対照群との間で差異を認めなかった。

1. 4 剖検所見及び器官重量

剖検所見については, VP 0.8 mg/kg 群の雄で胸腺及び精巣の萎縮が全例, 精巣上体の萎縮が 21 例に認められたが, 0.2 mg/kg 以下の群の雄及び VP 各群の雌では特記すべき異常はみられなかった。

一方, 器官重量については, 0.2 mg/kg 群の雄で胸腺実・比重量, 肝実重量の減少, 脳・腎比重量の増加が認められたが, 雌では対照群との間で有意差はみられなかった。0.8 mg/kg 群の雄では胸腺・脾・精巣・精巣上体実・比重量及び心・肝・甲状腺実重量の減少, 脳・肺・

Fig. 2 Body weight changes and food consumption in female rats receiving VP 16-213 intravenously during the pre-mating, mating and early gestation periods.

Fertility study of VP 16-213 in rats by intravenous administration

Table 1 Reproductive performance in rats.

Groups			Control	VP 16-213 (mg/kg/day i.v.)		
				0.05	0.2	0.8
No. of pairs mated			20	20	20	20
No. of copulations	Week 1		20	20	20	19
	Week 2		0	0	0	0
	Week 3 (remating)	Male	0	0	0	1
		Female	0	0	0	1
	Total	Male	20	20	20	20
Female		20	20	20	20	
% copulations/mated	Male	100	100	100	100	
	Female	100	100	100	100	
No. of males impregnating			18	19	19	19
% impregnatings/copulations			90.0	95.0	95.0	95.0
No. of females pregnant			18	19	19	18
% pregnant/copulations			90.0	95.0	95.0	90.0

腎・副腎比重量の増加, 雌では子宮実重量の減少, 脳・心・肺・腎比重量の増加が認められた。なお, 0.05 mg/kg 群では雌雄とも対照群との間で有意差はみられなかった。

2. 胎仔に及ぼす影響

2. 1 胎仔の発育 (Table 2)

妊娠20日目の母獣を屠殺し子宮内の胎仔の状況を調べた結果, VP 0.8 mg/kg 群で平均生存胎仔数が低値, 着床痕の発現率及び死亡胎仔の総計が高値であった。しかし, 0.2 mg/kg 以下の群と対照群との間ではいずれの指標にも差異は認められなかった。一方, 生存胎仔については, 0.8 mg/kg 群で胎盤重量, 体重, 体長及び尾長が低値であったが, 0.2 mg/kg 以下の群では有意差はみられず, 更に生存胎仔の性比には VP 各群と対照群との間で差異は認められなかった。

2. 2 外表及び内部異常 (Table 3)

胎仔の外表異常は, 全群を通じ見出し得なかった。

一方, 内部異常については, 側脳室の軽度及び重度拡張 (Photo. 1) が VP 0.8 mg/kg 群でそれぞれ2及び3例, 第3脳室の中等度拡張 (Photo. 1) が0.8 mg/kg 群で3例, 無眼 (Photo. 2) が0.8 mg/kg 群で1例, 小眼 (Photo. 2) が0.8 mg/kg 群で5例, 胸腺の頸部残留 (Photo. 3) が対照群, 0.05, 0.2 及び0.8 mg/kg 群でそれぞれ6, 4, 9 及び3例, 横隔膜ヘルニア (Photo. 4) が0.2 及び0.8 mg/kg 群でそれぞれ1例ずつ, 腎盂の軽度拡張が0.05 及び0.8 mg/kg 群でそれぞれ2 及び1例, 軽度尿管水腫が対照群, 0.05 及び0.2 mg/kg 群でそれぞれ2, 1 及び2例, 完全内臓逆位 (Photo. 5) が0.05 mg/kg 群で1例みられた。このうち, 0.8 mg/kg 群の脳及び眼の異常については, 側脳室・第3脳室拡張, 無眼・小眼の合併が1例, 側脳室・第3脳室拡張と小眼の合併が1例, 側脳室拡張と小眼の合併が1例, 側脳室・第3脳

Table 2 Prenatal development in rat fetuses.

Groups	Control	VP 16-213 (mg/kg/day i.v.)		
		0.05	0.2	0.8
No. of pregnant sacrificed	18	19	19	18
Corpora lutea	280	317	305	283
Means $\pm$ S.D. per litter	15.6 $\pm$ 1.8	16.7 $\pm$ 2.4	16.1 $\pm$ 1.5	15.7 $\pm$ 2.3
Implantations	260	280	279	256
Means $\pm$ S.D. per litter	14.4 $\pm$ 1.8	14.7 $\pm$ 2.1	14.7 $\pm$ 1.6	14.2 $\pm$ 1.6
Dead fetuses	17 (6.5)	14 (5.0)	21 (7.5)	53 (20.7)##
Implantation sites (%)	5 (1.9)	2 (0.7)	1 (0.4)	7 (2.7)
Placental remnants (%)	0	0	0	1 (0.4)
Early deaths (%)	0	0	0	0
Late deaths (%)	22 (8.5)	16 (5.7)	22 (7.9)	61 (23.8)##
Total (%)	238	264	257	195
Live fetuses	13.2 $\pm$ 2.2	13.9 $\pm$ 2.1	13.5 $\pm$ 1.5	10.8 $\pm$ 2.2**
Sex ratio (males/females)	0.90 (113/125)	1.10 (138/126)	0.99 (128/129)	1.10 (102/ 93)
Placental weight $\pm$ S.D., g	0.50 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.04*
Body weight $\pm$ S.D., g	3.49 $\pm$ 0.28	3.44 $\pm$ 0.29	3.57 $\pm$ 0.24	3.00 $\pm$ 0.21**
Body length $\pm$ S.D., cm	3.70 $\pm$ 0.14	3.68 $\pm$ 0.15	3.74 $\pm$ 0.11	3.48 $\pm$ 0.13**
Tail length $\pm$ S.D., cm	1.48 $\pm$ 0.03	1.47 $\pm$ 0.04	1.49 $\pm$ 0.05	1.43 $\pm$ 0.05**

* Significantly different from controls at $p < 0.05$ (t-test); **, Significantly different from controls at $p < 0.01$ (t-test);##, Significantly different from controls at $p < 0.01$ (χ^2 -test).

Table 3 External and internal malformations in rat fetuses.

Groups	Control	VP 16-213 (mg/kg/day i.v.)		
		0.05	0.2	0.8
External malformations				
No. of fetuses examined	238	264	257	195
Abnormal fetuses	0	0	0	0
Internal variations or malformations				
No. of fetuses examined	115	126	124	93
Dilatation of lateral ventricles				
Slight (%)	0	0	0	2(2.2) ^{a)}
Severe (%)	0	0	0	3(3.2) ^{a)}
Dilatation of third ventricle				
Moderate (%)	0	0	0	3(3.2) ^{a)}
Anophthalmia (%)	0	0	0	1(1.1) ^{a)}
Microphthalmia (%)	0	0	0	5(5.4) ^{#, a)}
Thymic remnant in the neck (%)	6(5.2)	4(3.2)	9(7.3)	3(3.2)
Diaphragmatic hernia (%)	0	0	1(0.8)	1(1.1)
Dilatation of renal pelvis				
Slight (%)	0	2(1.6)	0	1(1.1)
Hydrourerter	2(1.7)	1(0.8)	2(1.6)	0
Situs inversus totalis	0	1(0.8)	0	0

^{a)}, Ano- and microphthalmia and dilatation of lateral and third ventricles, one fetus; microphthalmia and dilatation of lateral and third ventricles, one fetus; microphthalmia and dilatation of lateral ventricles, one fetus; dilatation of lateral and third ventricles, one fetus; microphthalmia, two fetuses; dilatation of lateral ventricles, one fetus. The incidence of dilatation of lateral ventricles in fetuses from dams treated with VP 16-213 0.8mg/kg/day was significantly higher than that of controls at $p < 0.05$ (χ^2 -test).

[#], Significantly different from controls at $p < 0.05$ (χ^2 -test).

Table 4 Skeletal examinations in rat fetuses.

Groups	Control	VP 16-213 (mg/kg/day i.v.)			
		0.05	0.2	0.8	
No. of fetuses examined	123	138	133	102	
Degree of ossification:					
Supraoccipital	15(12.2)	9(6.5)	11(8.3)	5(4.9)	
Hyoid body	5(4.1)	3(2.2)	1(0.8)	10(9.8)	
Sternebra	21(17.1)	33(23.9)	24(18.0)	5(4.9)##	
Av. no. of ossified sternbrae ± S.D.	5.73±0.35	5.74±0.28	5.91±0.13	5.30±0.55**	
Unossified	2(1.6)	0	0	4(3.9)	
1st-4th (%)	22(17.9)	35(25.4)	12(9.0)#	51(50.0)##	
5th (%)	4(3.3)	2(1.4)	1(0.8)	19(18.6)##	
6th (%)	6(4.9)	7(5.1)	1(0.8)	36(35.3)##	
1st-4th (%)	81(65.9)	81(58.7)	94(70.7)	43(42.2)##	
5th (%)	83(67.5)	100(72.5)	90(67.7)	79(77.5)	
6th (%)					
Cervical vertebra	1.28±0.72	1.04±1.00	1.51±1.38	0.48±0.40**	
Poorly ossified arches (%)	4(3.3)	4(2.9)	1(0.8)	7(6.9)	
Unossified centers (%)	1(0.8)	0	0	6(5.9)	
Poorly ossified centers (%)	0	0	0	5(4.9)#	
Sacral and caudal vertebra	8.15±0.56	7.97±0.33	8.26±0.43	7.53±0.43**	
Av. no. of ossified vertebrae ± S.D.					
Unossified (%)	1(0.8)	0	0	0	
Poorly ossified (%)	3(2.4)	4(2.9)	2(1.5)	7(6.9)	
Poorly ossified (%)	1(0.8)	0	0	0	
Ischium					
Forelimbs	3.76±0.27	3.71±0.28	3.83±0.19	3.40±0.26**	
metacarpus ± S.D.	3.73±0.28	3.68±0.31	3.82±0.20	3.35±0.22**	
Av. no. of ossified	4.98±0.08	5.00±0.00	5.00±0.00	4.98±0.08	
distal phalanges ± S.D.	4.98±0.08	5.00±0.00	5.00±0.00	4.98±0.08	
Hindlimbs	3.99±0.04	4.00±0.00	4.00±0.00	3.97±0.07	
Av. no. of ossified	3.99±0.04	4.00±0.00	4.00±0.00	3.97±0.07	
metatarsus ± S.D.					
Variations:					
Ribs	1(0.8)	2(1.4)	6(4.5)	2(2.0)	
Cervical ribs	0	1(0.7)	1(0.8)	2(2.0)	
Lumbar ribs	0	0	1(0.8)	7(6.9)#	
Right (%)	1(0.8)	1(0.7)	4(3.0)	7(6.9)#	
Left (%)	0	6(4.3)	4(3.0)	1(1.0)	
Thoracic vertebra	11(8.9)	16(11.6)	17(12.8)	18(17.6)	
Bipartite centers (%)	6.00±0.00	5.99±0.03	6.00±0.00	5.99±0.03	
Dumbbell-shaped centers (%)	1(0.8)	0	0	0	
Av. no. of ossified vertebrae ± S.D.					
Bipartite centers (%)					
Lumbar vertebra					
Malformation (%)	1(0.8)	0	0	0	
Cleft palate (%)	0	0	0	1(1.0)	

** Significant different from controls at $p < 0.01$ (t-test); #, Significantly different from controls at $p < 0.05$ (χ^2 -test); ##, Significantly different from controls at $p < 0.01$ (χ^2 -test).

Fertility study of VP 16-213 in rats by intravenous administration

Photo. 1 Dilatation of lateral and third ventricles in a rat fetus from a dam receiving VP 16-213 0.8 mg/kg/day i.v. during the premating period and early stage of gestation.

Photo. 2 Unilateral anophthalmia and microphthalmia in a rat fetus from a dam receiving VP 16-213 0.8 mg/kg/day i.v. during the premating period and early stage of gestation.

Photo. 3 Thymic remnant in the neck in a rat fetus from a dam receiving VP 16-213 0.8 mg/kg/day i.v. during the premating period and early stage of gestation.

Photo. 4 Diaphragmatic hernia in a rat fetus from a dam receiving VP 16-213 0.8 mg/kg/day i.v. during the premating period and early stage of gestation.

室拡張の合併が1例、側脳室拡張のみが1例、小眼のみが2例であり、小眼及び側脳室拡張の発現率は対照群と比較し高値であった。

2. 3 骨格検査 (Table 4)

骨化進行度については、VP 0.8 mg/kg 群で第5及び6胸骨未骨化の発現率が高値であり、これを反映して平均胸骨数が低値であった。更に、平均頸椎体数、平均仙尾椎体数及び左右の平均中手骨数も0.8 mg/kg 群で低値であった。また、第5胸骨未骨化の発現率が0.2 mg/kg 群で、舌骨体及び第5胸骨骨化不全の発現率が0.8 mg/kg 群でそれぞれ低値であり、第1～4胸骨及び胸椎体骨化不全の発現率が0.8 mg/kg 群で高値であった。しかしながら、これ以外の指標である上後頭骨・恥骨・坐骨・後肢の骨化状況にはVP各群と対照群との間で差異は認められなかった。

骨格変異については、左右腰肋の発現率が0.8 mg/kg 群で高値であったが、これ以外の指標である頸肋・胸椎・腰椎の変異にはVP各群と対照群との間で差異を認めなかった。

骨格奇形については、胸椎弓及び肋骨欠損を伴う椎骨奇形 (Photo. 6) が対照群で1例、口蓋裂 (Photo. 7) が0.8 mg/kg 群で1例みられた。

Photo. 5 Situs inversus totalis in a rat fetus from a dam receiving VP 16-213 0.05 mg/kg/day i.v. during the premating period and early stage of gestation.

Photo. 6 Vertebral malformation in a rat fetus from a control dam.

Photo. 7 Cleft palate in a rat fetus from a dam receiving VP 16-213 0.8 mg/kg/day i.v. during the premating period and early stage of gestation.

考 察

抗悪性腫瘍薬 VP 16-213 (VP) を雄ラットに61日間連日静脈内投与すると、0.8 mg/kg 群で投与5日目より終了時まで体重増加の抑制が認められ、摂餌量は投与初期に減少した。一方、雌ラットについては、交配前15日間、交配期間中及び妊娠7日目まで連日静脈内投与すると0.2 mg/kg 群で交配前投与10日目から妊娠14日目までは概して体重増加の抑制がみられ、摂餌量も投与初期より妊娠初期にかけて減少した。更に、0.8 mg/kg 群では交配前投与7日目から妊娠20日目まで体重増加の抑制がみられ、摂餌量は投与期間中概して減少を示した。従って、VP 0.8 mg/kg の投与では雌雄とも摂餌量の減少を伴う体重増加の抑制が誘起されるものと考えられた。なお、0.8 mg/kg 群の雄で摂水量が増加したが、この原因は明らかにし得なかった。

雌雄動物の生殖能については、交尾率及び受胎率ともに VP 各群と対照群との間で有意差がみられないことから、VP は雌雄動物の生殖能に悪影響を及ぼさないものと考えられた。

雄ラットの器官重量については、VP 0.8 mg/kg 群で精巣及び精巣上体重量の減少が認められ、剖検所見においても精巣・精巣上体の萎縮がみられ、1あるいは3箇月間静脈内投与による毒性試験（高橋ら、1986e,f）、妊娠前及び妊娠初期経口投与試験（高橋ら、1986a）の高用

量投与群と類似する成績が得られていることから、VP は高用量で雄性生殖器官の萎縮を誘起するものと考えられた。しかしながら、上述のように雄の生殖能には有意差が認められていないことから、VP 0.8 mg/kg 投与による雄性生殖器官の萎縮は雄ラットの交尾能及び授胎能には影響を及ぼさないものと考えられた。抗悪性腫瘍薬が雄ラットの生殖器官重量及び授胎能に及ぼす影響については、hexamethylmelamine (HMM) を交配前に60日間以上投与すると精巣重量の減少、精巣萎縮及び精子形成不全が誘起されると報告されている (Thompson et al., 1984)。しかしながら、HMM では精巣萎縮を誘起する用量で授胎能も抑制されており、VP とは趣を異にしている。また、胸腺は 0.2 mg/kg 以上の群の雄で用量依存的な重量減少、0.8 mg/kg 群全例で肉眼的な萎縮を示した。ただし、試験条件が類似する前記 1 あるいは 3 箇月間静脈内投与による毒性試験 (高橋ら, 1986e, f) においては、0.5 mg/kg 群で初めて胸腺重量の減少が観察されたことから、用量的な不一致が若干みられている。更に、0.8 mg/kg 群の雄で脾実・比重量の減少が認められたが、脾比重量の当施設における背景データは 0.14 ± 0.01 (n=10) から 0.15 ± 0.02 g (n=10) であるため、本試験における値 0.14 ± 0.01 g は正常範囲内にあり、実重量については体重の増加抑制を反映した変動と考えられた。また、0.8 mg/kg 群で心・肝・甲状腺実重量の減少及び脳・肺・腎・副腎比重量の増加がみられたが、これらはいずれも体重増加の抑制に基づく変動と考えられた。なお、これら以外にも 0.2 mg/kg 群で肝実重量が 14.72 ± 1.81 g (対照群 15.85 ± 1.88 g) と減少、脳比重量が 0.44 ± 0.03 g (対照群 0.42 ± 0.02 g) と増加がみられたが、肝実重量及び脳比重量の当施設における背景データは 14.73 ± 1.90 (n=10) から 17.02 ± 1.35 g (n=10) 及び 0.35 ± 0.03 (n=15) から 0.44 ± 0.04 g (n=22) であることから、これらはいずれも正常範囲内の値と考えられた。一方、雌ラットの器官重量については、0.8 mg/kg 群で子宮実重量の減少、脳・心・肺・腎比重量の増加が認められたが、これらはいずれも体重の増加抑制を反映した変動と考えられた。

死亡胎仔については、VP 0.8 mg/kg 群で着床痕の発現率及び死亡胎仔の総計が高値であり、これを反映して平均生存胎仔数が低値であった。更に、生存胎仔については、体重、体長、尾長が 0.8 mg/kg 群で低値であり、前記妊娠前及び妊娠初期経口投与試験 (高橋ら, 1986a) の高用量群と類似する成績が得られていることから、VP 0.8 mg/kg をラットの妊娠初期に投与すると胎仔は発生初期に死亡するか、あるいは妊娠後期まで生存し得た場合でも発育が抑制されることが考えられた。更に、同群で胎盤重量が低値であったが、これも VP 投与の影響と考えられた。

胎仔の内部異常については、VP 0.8 mg/kg 群で側脳室の軽度及び重度拡張がそれぞれ 2 及び 3 例、第 3 脳室の中等度拡張が 3 例、無眼が 1 例、小眼が 5 例みられたが、このうち無眼、小眼をあわせた眼の異常及び側脳室拡張の発現率は高値であった。文献的には、VP はマウスで中枢神経系及び眼の異常を誘起すると報告されており (Sieber et al., 1978)、また抗悪性腫瘍薬 vincristine (DeMyer, 1965; Tamaki et al., 1967; Sieber et al., 1978) 及び vinblastine (DeMyer, 1964) についても VP と同様の奇形を誘起することが知られている。更に、妊娠前及び妊娠初期あるいは器官形成期経口投与試験 (高橋ら, 1986a, b) においても高用量

Fertility study of VP 16-213 in rats by intravenous administration

群で眼の異常及び側脳室の拡張がみられていることから、これらの変化はVP投与によるものと考えられた。なお、これら以外にも胸腺の頸部残留が全群を通じて3～9例、横隔膜ヘルニアが0.2及び0.8 mg/kg群でそれぞれ1例ずつ、腎盂の軽度拡張が0.05及び0.8 mg/kg群でそれぞれ2及び1例、軽度尿管水腫が対照群、0.05及び0.2 mg/kg群でそれぞれ2、1及び2例、完全内臓逆位が0.05 mg/kg群で1例みられたが、これらはいずれも用量相関を伴わず発現率も低いことから偶発的なものと考えられた。

胎仔の骨化進行度については、VP 0.08 mg/kg群で第5及び6胸骨未骨化の発現率が高値であり、これを反映して平均胸骨数が低値であった。更に、平均頸椎体数、平均仙尾椎体数及び左右の平均中手骨数が低値であり、第1～4胸骨及び胸椎体骨化不全の発現率が高値、第5胸骨骨化不全の発現率が低値であった。胎仔の骨化遅延は低体重と密接に関連していることが知られているため (Knight and Roe, 1978; John et al., 1979; Ariyuki et al., 1980; Ariyuki et al., 1982; Kanoh et al., 1982), 0.8 mg/kg群におけるこれらの骨化遅延は、前記妊娠前及び妊娠初期あるいは器官形成期経口投与試験 (高橋ら, 1986a, b) と同様VPによる胎仔の発育抑制に基因するものと考えられた。なお、これら以外にも0.2 mg/kg群で第5胸骨未骨化、0.8 mg/kg群で舌骨体骨化不全の発現率が低値であったが、これはいずれも用量相関を示さないことからVP投与に基づく変化とは考え難かった。

胎仔の骨格変異については、VP 0.8 mg/kg群で左右腰肋の発現率が高値であったが、CDラットにおけるこの自然発生率は8～40% (Palmer, 1972) あるいは3.1～14.6% (水谷ら, 1980) と報告されているため、本試験における左右腰肋の発現率6.9%は正常範囲内にあると考えられた。

胎仔の骨格奇形については、対照群で椎骨奇形が1例、0.8 mg/kg群で口蓋裂が1例みられたが、これらはいずれも発現率が低いことから偶発的なものと考えられた。

要 約

抗悪性腫瘍薬VP 16-213 (VP) を0.05, 0.2及び0.8 mg/kg/日の割合でCrj:CD (SD) ラットに、雄では61日間、雌では14日間連日静脈内投与した後投与を継続しながら雌雄を同居させ、妊娠の成立した雌には更に妊娠0から7日目まで投与を続け、概略次の結果を得た。

1. 雄ラットの体重はVP 0.8 mg/kg群で投与5日目より投与終了時まで、雌ラットの体重は0.2 mg/kg群で交配前投与10日目より妊娠14日目まで、0.8 mg/kg群で交配前投与7日目より妊娠20日目まで増加抑制が認められた。

2. VP 0.2 mg/kg以上の投与は雄ラットの胸腺重量を、0.8 mg/kgの投与は精巣・精巣上体重量を減少させ、肉眼的にもこれらの器官の萎縮を誘起したが、親動物の生殖能等には影響を及ぼさなかった。

3. VP 0.8 mg/kg群で胎仔死亡率の上昇と生存胎仔数の減少及び生存胎仔の発育抑制が認められた。更に、同群で胎仔の無眼・小眼・側脳室拡張の発現率が上昇し、第5・6胸骨未骨化の発現率が高く、胸骨・頸椎・仙尾椎・中手骨・胸椎の骨化遅延が認められた。

以上のように、ラットの妊娠前及び妊娠初期に投与された VP は 0.2 mg/kg 以上の投与量で母獣の体重増加を抑制し、雄ラットの胸腺の萎縮、更に 0.8 mg/kg の投与量で雄ラットの生殖器の萎縮、胎仔死亡率の上昇、眼及び脳の異常、骨化遅延を伴う発育抑制を誘起したが、0.2 mg/kg 以下の投与量では胎仔の発育は影響を受けないことが示唆された。従って、本試験における親動物及び胎仔に対する VP の無影響量はそれぞれ 0.05 及び 0.2 mg/kg/日と考えられた。

文 献

- Ariyuki, F., Higaki, K. and Yasuda, M. (1980): A study of fetal growth retardation in teratological test: An examination of the relationship between body weight and ossification of coccygeal vertebra in mouse and rat fetuses. *Teratology*, **22**, 43-49.
- Ariyuki, F., Ishihara, H., Higaki, K. et al. (1982): A study of fetal growth retardation in teratological test: Relationship between body weight and ossification of the skeleton in rat fetuses. *Teratology*, **26**, 263-267.
- Dawson, A. B. (1926): A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizalin red S. *Stain Technol.*, **1**, 123-124.
- DeMyer, W. (1964): Vinblastine-induced malformations of face and nervous system in two rat strains. *Neurology*, **14**, 806-808.
- DeMyer, W. (1965): Cleft lip and jaw induced in fetal rats by vincristine. *Arch. Anat.*, **48**, 179-186.
- Grieder, A., Maurer, R. and Stahelin, H. (1977): Comparative study of early effects of podophyllo-toxin derivatives and other cytostatic agents on mastocytoma cultures. *Cancer Res.*, **37**, 2998-3005.
- Issell, B. F. and Crooke, S. T. (1979): Etoposide (VP 16-213). *Cancer Treat. Rev.*, **6**, 107-124.
- John, J. A., Blogg, C. D., Murray, F. J. et al. (1979): Teratogenic effects of the plant hormone indol-3-acetic acid in mice and rats. *Teratology*, **19**, 321-326.
- Kanoh, S., Itami, T. and Ema, M. (1982): Effects of maternal starvation on alkaline phosphatase and fetal growth in rats. *Cong. Anom.*, **22**, 369-373.
- Knight, E. and Roe, D. A. (1978): Effects of salicylamide and protein restriction in skeletal development of the rat fetus. *Teratology*, **18**, 17-22.
- 水谷正寛, 井筒 稔, 橋本 豊, 他 (1980): CD (SD) ラットの自然発生奇形. 秦野研究所年報, **3**, 56-58.
- 西村耕一 (1974): マウスおよびラット胎仔の胸部内臓奇形観察のための顕微解剖法. 先天異常, **14**, 23-40.
- Palmer, A. K. (1972): Sporadic malformations in laboratory animals and their influence on drug testing. In *Drugs and Fetal Development* (M. A. Klingberg, A. Abramovici and J. Chemke, ed.), p. 45-60, Plenum Press, New York.
- Perraud, J. (1976): Levels of spontaneous malformations in the CD rat and the CD-1 mouse. *Laboratory Animal Science*, **26**, 293-300.
- Sieber, S. M., Whang-Peg, J., Botkin, C. et al. (1978): Teratogenic and cytogenetic effects of some plant-derived antitumor agents (vincristine, colchicine, maytansine, VP 16-213 and VM-26) in mice. *Teratology*, **18**, 31-48.

Fertility study of VP 16-213 in rats by intravenous administration

- Stahelin, H. (1973): Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. *Europ. J. Cancer*, **9**, 215-221.
- 高橋紀光, 甲斐修一, 河村 寿, 他 (1986a): 抗悪性腫瘍薬 VP 16-213の生殖に及ぼす影響 (第1報). —ラットにおける妊娠前及び妊娠初期経口投与試験— *J. Toxicol. Sci.*, **11**, 177-194.
- 高橋紀光, 甲斐修一, 河村 寿, 他 (1986b): 抗悪性腫瘍薬 VP 16-213の生殖に及ぼす影響 (第2報). —ラットにおける器官形成期経口投与試験— *J. Toxicol. Sci.*, **11**, 195-225.
- 高橋紀光, 甲斐修一, 河村 寿, 他 (1986c): 抗悪性腫瘍薬 VP 16-213の生殖に及ぼす影響 (第3報). —ウサギにおける器官形成期経口投与試験— *J. Toxicol. Sci.*, **11**, 227-239.
- 高橋紀光, 甲斐修一, 河村 寿, 他 (1986d): 抗悪性腫瘍薬 VP 16-213の生殖に及ぼす影響 (第4報). —ラットにおける周産期及び授乳期経口投与試験— *J. Toxicol. Sci.*, **11**, 241-261.
- 高橋紀光, 門田利人, 河野茂生, 他 (1986e): 抗悪性腫瘍薬 VP 16-213の毒性研究 (第4報). —ラットにおける静脈内投与による亜急性毒性— *J. Toxicol. Sci.*, **11**, 89-122.
- 高橋紀光, 門田利人, 河野茂生, 他 (1986f): 抗悪性腫瘍薬 VP 16-213の毒性研究 (第5報). —ラットにおける3箇月間反復静脈内投与による毒性— *J. Toxicol. Sci.*, **11**, 123-161.
- 高野喜一, 菊池康基, 飯島貞二, 他 (1975): 薬物の特殊毒性—1; 胎児毒性と遺伝毒性 (高木博司監修), p. 28, 南江堂, 東京.
- Tamaki, M., Sugawara, T., Kameyama, Y. et al. (1967): Vincristine induced malformations in the rat embryo. *Ann. Rep. Res. Inst. Environ. Med. Nagoya Univ.*, **15**, 61-72.
- Thompson, D. J., Dyke, I. L. and Molello, J. A. (1984): Reproduction and teratology studies on hexamethylmelamine in the rat and rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **72**, 245-254.
- Wilson, J. G. (1965): Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In *Teratology; Principles and Techniques* (J. G. Wilson and J. Warkany, ed.), p. 262-277, The University of Chicago Press, Chicago and London.