抗悪性腫瘍薬**Carboplatin**の生殖に及ぼす影響（第3報）
—ラットにおける周産期及び授乳期静脈内投与試験—

甲斐 修一, 河村 寿, 石川 克己, 竹内友佳子
太田 敏, 黒柳 幸司, 門田 利人, 河野 茂生
近沢 弘隆, 近藤 博志, 酒井 篤子, 高橋 紀光

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 CARBOPLATIN(III)

**—Intravenous administration to rats during
the perinatal and lactation periods—**

Shuichi KAI, Hisashi KOHMURA, Katsmi ISHIKAWA,
Yukako TAKEUCHI, Satoshi OHTA, Kohji KUROYANAGI,
Toshihito KADOTA, Shigeo KAWANO, Hirotaka CHIKAZAWA,
Hiroshi KONDO, Atsuko SAKAI and Norimitsu TAKAHASHI

Drug Safety Research Department, Preclinical Research Laboratories, Bristol-Myers Research
Institute, Ltd. No. 1, Futagoyama, Sakazaki, Kohta-cho, Nukata-gun, Aichi 444-01, Japan

Accepted April 20, 1988

Abstract.....Carboplatin, an oncostatic drug, was administered intravenously to pregnant Crj : CD (Sprague-Dawley) rats from day 17 of gestation through day 21 of postpartum at dose levels of 1, 2 and 4 mg/kg/day.

The summarized results obtained are as follows :

1. Maternal body weight gains were suppressed during the former part of the lactation period at carboplatin 2 mg/kg and higher.
2. Thymic weights were decreased and lung weights were increased in dams (F_0) at carboplatin 2 mg/kg and higher. Further, ovarian weights were reduced in dams (F_0) at carboplatin 4 mg/kg.
3. Carboplatin failed to affect the parturition of F_0 dams.
4. Carboplatin did not affect the viability of newborns (F_1), and postnatal differentiations, early behavioral developments, learning ability, motor activity or emotional development in F_1 animals.
5. Carboplatin 4 mg/kg brought a suppression of pituitary weights after mating

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 甲斐 修一

in F₁ male rats and decreases of adrenal and genital organ weights at weaning in F₁ female rats, but failed to affect their reproductive ability.

6. Influences on prenatal development were not apparently observed for F₂ fetuses derived from F₁ rats whose dams had ever received carboplatin during the perinatal and lactation periods.

Based on these results, the no-effect dose level of carboplatin under the present experimental condition was estimated to be 1 mg/kg/day against dams and 2 mg/kg/day against their offspring.

Key words : Oncostatic drug, carboplatin, peri- and postnatal study, intravenous administration, rat.

緒 言

Carboplatinは米国Bristol-Myers社で開発された抗腫瘍性白金錯化合物cisplatinの誘導体であり、ある種の実験腫瘍及びヒト腫瘍に対し抗腫瘍活性を有することが報告されている (Bradner et al., 1980; Wolpert-DeFilippes, 1980; Evans et al., 1983; Smith et al., 1985)。今回、著者らはcarboplatin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周産期及び授乳期投与試験を実施したので、その結果について前報 (甲斐ら, 1988a, b) に引き続き報告する。

試験材料及び方法

1. 使用薬物

Carboplatinは化学名cis-diammine (1, 1-cyclobutanedicarboxylato) platinum(II)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 (甲斐ら, 1988a) で詳述した。本試験にはJohnson Matthey Service社製Lot No. 0008/851202を使用した。なお、溶媒としては注射用蒸留水 (大塚製薬製Lot No. K 6 G97T) を用いた。

2. 使用動物及び飼育条件

生後11週齢のCrj: CD (SD)雌雄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。交配開始時の体重は雄367~446g, 雌221~265gであった。各動物は室温23±2℃, 湿度50±10%に設定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

胎子の器官形成期投与試験における投与量を設定するために、1用量段階あて6~7匹とした12週齢のCrj: CD (SD)妊娠ラットにcarboplatinを0.5, 1, 2, 4及び8 mg/kgの割合で妊娠7から17日目までの11日間静脈内投与した。その結果、2 mg/kg以下の投与群では明らかな影響を認めないが、4 mg/kg以上の投与により母獣の摂餌量の減少を伴う体重の増加抑制が認められた。また、これらの動物を妊娠20日目に剖検したところ、8 mg/kg

Peri- and postnatal study of carboplatin in rats by intravenous administration

群で着床痕及び吸収胚の発現率が高く、これを反映して平均生存胎仔数が減少した。更に、4 mg/kg以上の投与群で胎盤重量及び生存胎仔の体重・体長が低値であった。以上の結果を参考にして、本試験におけるcarboplatinの最大投与量を4 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		20 females
Carboplatin	1mg/kg/day	22 females
Carboplatin	2mg/kg/day	22 females
Carboplatin	4mg/kg/day	22 females

4. 投与液の調製及び投与方法

対照群の動物には注射用蒸留水（大塚製薬製）を2 ml/kg体重、carboplatin 1, 2及び4 mg/kg群にはcarboplatinを0.5, 1.0及び2.0mg/ml含有するよう注射用蒸留水で溶解した水溶液を2 ml/kg体重の割合で、各動物の尾静脈より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、雌ラットに妊娠17日目より分娩後21日目まで投与した。

6. 親動物の交配方法

雌雄ラットを任意に1対1に割りあて終夜同居させた。膣垢を連日採取・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。

7. 観察・検査項目

母獣の症状観察及び体重・摂餌量・摂水量の測定：一般症状は投与期間中は毎日観察し、異常があれば記録に残した。体重及び摂餌量は妊娠動物については妊娠0, 3, 7, 10, 14日目及び妊娠17日目から分娩日まで連日、更に分娩後1, 4, 8, 11, 15, 18及び22日目に測定した。また、摂水量については妊娠及び哺育期間中とも週1回測定した。

母獣の自然分娩状況及び哺育能：妊娠動物全例を自然分娩させ、分娩後直ちに死亡仔数及び新生仔について生存仔数と生存仔の性別・体重・外表異常の有無を調べた。なお、死亡仔については、肺を摘出して水に浮かせ、浮くものを生後死亡仔、沈むものを死産仔と区別した。次いで、生後4日目に各腹あたり雌雄各4匹の新生仔を選択した後、また雌雄いずれかが4匹に満たない場合は雌雄を問わず合計8匹になるように調整した後、これらを離乳時（分娩後22日目）まで哺育させこの間の生育状況を観察した。

離乳時には、母獣及び各腹あたり雌雄各2匹を除いた残りの新生仔をether麻酔下で放血致死させ、母獣については着床痕数を調べた後、全動物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。

育成仔（F₁）の分化状況：育成仔について、耳介開展、切歯萌出、毛生、眼瞼開裂、精巢下降及び膣開口に至る日数を観察した。

育成仔（F₁）の初期行動発達：育成仔の正向反射については、平面上に背位に置いた育成仔が2秒以内に腹位に復するようになるまでの日数を、生後4日目から12日目まで観察した。背地走性については、角度30°、長さ約30cmの斜面上に底部から約10cmの位置に頭を下向きにして置いた育成仔が60秒以内に180°向きを変えて上方へ登るようになるまでの日数を、生後6日目から12日目まで観察した。嗅覚性指向反応については、哺育中のケージの床敷を入れたシャーレを置くための区画、未使用の床敷を入れたシャーレを置くための区画及び両区画を結ぶ通路の3区画に区切った透明アクリル製の試験装置を用い、通路の中央部に、未使用の床敷を入れたシャーレを置いた区画の方向に頭を向けて置いた育成仔が、哺育中のケージの床敷を入れたシャーレを置いた区画に90秒以内に入るようになるまでの日数を、生後9日目から15日目まで観察した。聴覚性驚愕反応については、ガルトン・ホイッスルで12,000Hzの音を発生させ、育成仔に2秒間隔で3回聞かせて3回とも驚愕反応を示すようになるまでの日数を、生後10日目から15日目まで観察した。自由落下反射については、背位にした育成仔を約50cmの高さから床敷上に自由落下させ、空中で向きを変えて腹位で着地できるようになるまでの日数を、生後12日目から17日目まで観察した。更に、視覚性置き直り反応については、尾の中央を持ち頭を下にしてつり下げた育成仔を机やケージの端に向かって降ろして行き、対象物に対して頭をもちあげ前肢を伸展する姿勢をとるようになるまでの日数を、生後15日目から22日目まで観察した。

育成仔（F₁）の体重・摂餌量・摂水量の測定：哺育中の育成仔については、生後1, 4, 8, 11, 15, 18及び22日目に体重を測定した。離乳後の育成仔については、体重及び摂餌量は12週齢、摂水量は11週齢に至るまで週1回測定した。

F₁ラットのシャトル・ボックス条件回避試験：各腹から得られた5週齢の雌雄各10匹のF₁ラットについて、高さ約6.5cmのハードルにより中央で2つの部屋に仕切られた往復式シャトル・ボックス（岡崎産業製ANAC-3000）を用い、条件刺激として光及び音、無条件刺激として電気ショック（100V, 3 mA, D. C.）を選択し、条件回避学習試験を行なった。試験方法は条件刺激のみを5秒間提示した後、無条件刺激を条件刺激とともに5秒間与え、その後動物を20秒間休息させ、条件刺激提示中に隣室へ移動した場合を回避成立とした。試験は1日に30試行、5日間連続して実施し、各動物の1日毎の回避率を以下の計算式により求めた。

$$\text{回避率（\%）} = (\text{回避数} / \text{1日の試行数}) \times 100$$

F₁ラットの自発運動量の測定：各腹から得られた6から9週齢の雌雄各10匹のF₁ラットについて、自発運動量測定装置（コロンバス社製AUTOMEX-II-2SD）を用い、暗室で16:00から翌日8:00までの16時間にわたり各動物の1時間毎の自発運動量を測定した。なお、自発運動量測定中のF₁ラットには餌及び滅菌水を自由に給与した。

F₁ラットの10週齢時剖検：生殖能を調べる予定の各腹あたり雌雄各1匹を除いた残りの動物を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。

Peri- and postnatal study of carboplatin in rats by intravenous administration

F₁ラットの生殖能：12週齢の各腹あたり雌雄各1匹の動物を兄妹交配を避け、同一投与群内で1対1で最長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。交尾が確認された全ての動物については、体重及び摂餌量を妊娠0, 3, 7, 10, 14, 17及び20日目に、摂水量を週1回測定した。

F₁ラットの妊娠末期剖検：妊娠動物全例を妊娠20日目にether麻醉下で放血致死させ、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、吸収胚及び浸軟仔に分け、更に吸収胚は吸収の時期により初期吸収胚と後期吸収胚とに区別した。

また、交配に使用した雄及び交尾の成立しなかった雌は交配期間終了後屠殺し、内臓異常の有無を肉眼的に観察した後主要器官重量を測定した。

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、離乳前の新生仔体重、育成仔の分化状況及び初期行動発達については一腹毎に計算した。死亡胎仔発現率、生存胎仔の性比と外表異常の発現率、死産仔の発現率、出生率、新生仔の性比と外表異常の発現率並びに新生仔の生後4日目及び離乳時における生存率については、出現度数5以下を含む場合はFisherの直接確率計算法(Gad and Weil, 1982)により、その他の場合はYatesの補正を施したカイ2乗検定(Gad and Weil, 1982)によりcarboplatin投与群と対照群とを比較した。育成仔の分化状況及び初期行動発達については、Kruskal-Wallisの方法(Gad and Weil, 1982; 広津, 1983)により解析し、有意な群間差が認められた場合、Dunnett型の順位和検定(広津, 1983)により各投与群と対照群との比較を行なった。また、上記以外の各項目については、Bartlettの方法(Gad and Weil, 1982; 広津, 1983)により分散の状態を調べ、等分散のものについては一元配置分散分析(Gad and Weil, 1982; 広津, 1983)により解析し、有意な群間差が認められた場合、Dunnettの方法(Dunnett, 1955; Dunnett, 1964; 広津, 1983)により各投与群と対照群との比較を行なった。一方、不等分散のものについてはKruskal-Wallisの方法(Gad and Weil, 1982; 広津, 1983)によって解析し、有意な群間差が認められた場合、Dunnett型の順位和検定(広津, 1983)により各投与群と対照群との比較を行なった。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62年1月から11月の間に実施された。

試験結果

1. 親動物 (F₀) に及ぼす影響

1. 1 症状観察

対照群及びcarboplatin各投与群とも明らかな毒性症状は観察されなかった。

1. 2 体重変動, 摂餌量及び摂水量 (Fig. 1)

体重については, 妊娠期間中はcarboplatin各投与群と対照群との間で差異はみられなかった。また, 哺育期間中は2 mg/kg群で分娩後4から8日目, 4 mg/kg群で分娩後4から11日目に増加抑制が認められたが, 1 mg/kg群と対照群との間で差異はみられなかった。

摂餌量については, 妊娠期間中はcarboplatin各投与群と対照群との間で差異はみられなかった。また, 哺育期間中は4 mg/kg群で分娩後1から7日目に対照群を下回ったが, 2 mg/kg以下の投与群と対照群との間で差異はみられなかった。

摂水量については, 妊娠期間及び哺育期間中ともcarboplatin各投与群と対照群との間で差異を認めなかった。

1. 3 器官重量及び剖検所見

母獣の器官重量については, carboplatin 2 mg/kg群で胸腺実・比重量の減少と肺実・比重量の増加, 4 mg/kg群で胸腺及び卵巢実・比重量, 副腎比重量の減少と肺実・比重量の増加が認められたが, 1 mg/kg群と対照群の間では差異は認められなかった。

一方, 剖検所見については, 特記すべき異常は認められなかった。

2. 次世代 (F₁) に及ぼす影響

2. 1 出生状況及び生存率 (Table 1)

新生仔の出生状況については, 出生率 (出産生存仔数/着床痕数×100) がcarboplatin 2 mg/kg群で高値であったが, 平均着床痕数, 死産仔数, 平均生存仔数と生存仔の性比・体重及び妊娠期間にはcarboplatin各投与群と対照群との間で差異を認めなかった。また, 新生仔の外表異常としては水頭 (Photo. 1) が1 mg/kg群で2例みられた。

育成仔の生存率については, 出生後4日目及び離乳時ともcarboplatin各投与群と対照群との間で差異を認めなかった。

なお, 出産率 (生存仔出産雌数/妊娠雌数×100) は対照群及びcarboplatin各投与群とも100%であった。

2. 2 新生仔の分化の状況 (Table 2)

新生仔の分化の状況については, 毛生に至る日数がcarboplatin 4 mg/kg群で延長したが, これ以外の指標である耳介開展, 切歯萌出, 眼瞼開裂, 精巣下降及び膻開口に至る日数にはcarboplatin各投与群と対照群との間で差異を認めなかった。

2. 3 育成仔の初期行動発達 (Table 3)

育成仔の初期行動発達については, 正向反射, 背地走性, 嗅覚性指向反応, 聴覚性驚愕反応, 自由落下反射及び視覚性置き直り反応のいずれの指標にもcarboplatin各投与群と対

Peri- and postnatal study of carboplatin in rats by intravenous administration

Fig. 1 Body weight changes and food consumption in pregnant and lactating rats receiving carboplatin intravenously during the perinatal and lactation periods.

Table 1 Effects of carboplatin on states of delivery of F₀ dams and postnatal viability of F₁ pups.

Groups		Control	Carboplatin (mg/kg/day, i.v.)		
			1	2	4
No. of dams examined		20	22	22	22
Length of gestation	Mean $\pm$ S.D., day	22.2 $\pm$ 0.4	22.2 $\pm$ 0.4	22.0 $\pm$ 0.2	22.1 $\pm$ 0.3
Implantation sites	Total	302	338	336	339
	Mean $\pm$ S.D. per litter	15.1 $\pm$ 1.6	15.4 $\pm$ 1.5	15.3 $\pm$ 1.9	15.4 $\pm$ 1.4
Stillborn pups	Total	2	4	0	2
	(% per implantation sites)	(0.7)	(1.2)		(0.6)
Live pups at birth	Total	275	315	323	318
	(% per implantation sites)	(91.1)	(93.2)	(96.1) #	(93.8)
	Mean $\pm$ S.D. per litter	13.8 $\pm$ 2.2	14.3 $\pm$ 1.6	14.7 $\pm$ 1.9	14.5 $\pm$ 1.6
	Sex ratio (males/females)	0.98 (136/139)	0.91 (150/165)	0.87 (150/173)	0.96 (156/162)
	Body weight $\pm$ S.D., g	6.46 $\pm$ 0.49	6.25 $\pm$ 0.57	6.13 $\pm$ 0.38	6.22 $\pm$ 0.43
Live pups on postnatal day 4	Total	272	313	319	309
	(% per live pups at birth)	(98.9)	(99.4)	(98.8)	(97.2)
Live pups at weaning	Total/total adjusted pups	154/160	173/176	171/176	170/176
	on postnatal day 4 (%)	(96.3)	(98.3)	(97.2)	(96.6)
External malformations	Hydrocephaly (%)	0	2 (0.6)	0	0

P<0.05 : Significant difference from controls (Chi-square test or Fisher exact test).

Peri- and postnatal study of carboplatin in rats by intravenous administration

Photo. 1 Hydrocephaly in a rat newborn (F_1) from a dam (F_0) receiving carboplatin 1 mg/kg/day i. v. during the perinatal and lactation periods.

Table 2 Effects of carboplatin on postnatal differentiations in F_1 rats.

Groups	Control	Carboplatin (mg/kg/day, i. v.)		
		1	2	4
No. of rats examined	20	22	22	22
Pinnae detachment	3.2 ± 0.5 (160)	2.9 ± 0.5 (176)	3.1 ± 0.3 (176)	3.0 ± 0.3 (176)
Presence of hair	9.9 ± 0.5 (156)	10.0 ± 0.6 (175)	10.1 ± 0.3 (174)	$10.4 \pm 0.6^{**}$ (173)
Incisor eruption	10.6 ± 0.7 (159)	10.5 ± 0.8 (174)	10.9 ± 0.4 (174)	10.7 ± 0.8 (174)
Eye opening	14.5 ± 0.4 (154)	14.5 ± 0.6 (173)	14.5 ± 0.4 (172)	14.5 ± 0.6 (170)
Testicular descent	26.5 ± 0.7 (40)	26.2 ± 0.9 (44)	26.4 ± 0.8 (44)	26.1 ± 0.9 (44)
Vaginal opening	33.2 ± 0.9 (40)	33.5 ± 1.4 (43)	33.2 ± 1.0 (44)	33.2 ± 1.3 (44)

Each value shows mean $\pm$ S. D. (days).

Parentheses show the number of F_1 rats examined.

** $P < 0.01$: Significant difference from controls (Dunnett's test).

Table 3 Effects of carboplatin on early behavioral developments in F_1 rats.

Groups	Control	Carboplatin (mg/kg/day, i. v.)		
		1	2	4
No. of rats examined	20	22	22	22
Surface righting	5.7 ± 0.6 (159)	5.6 ± 0.6 (176)	6.1 ± 0.5 (176)	5.9 ± 0.6 (176)
Negative geotaxis	7.3 ± 0.7 (159)	7.7 ± 0.7 (176)	7.3 ± 0.5 (174)	7.6 ± 0.6 (176)
Olfactory orientation	11.7 ± 0.8 (154)	11.3 ± 0.9 (173)	11.5 ± 0.7 (172)	11.6 ± 0.8 (171)
Auditory startle	13.6 ± 0.7 (154)	13.4 ± 0.7 (173)	13.4 ± 0.7 (172)	13.6 ± 0.6 (170)
Air righting	15.5 ± 0.4 (154)	15.6 ± 0.5 (173)	15.3 ± 0.4 (172)	15.6 ± 0.4 (170)
Visual placing	20.6 ± 0.7 (154)	20.8 ± 0.8 (173)	20.8 ± 0.5 (171)	21.0 ± 0.7 (170)

Each value shows mean $\pm$ S. D. (days).

Parentheses show the number of F_1 rats examined.

Fig. 2 Body weight changes and food consumption in F_1 rats whose dams have received carboplatin intravenously during the perinatal and lactation periods.

照群との間で差異を認めなかった。

2. 4 育成期間中の体重変動, 摂餌量及び摂水量 (Fig. 2)

体重については, 雄の場合carboplatin 1 mg/kg群で4から6週齢, 4 mg/kg群で1から2週齢及び6週齢時に, また雌の場合1 mg/kg群で4週齢時にそれぞれ増加抑制が認められた。

摂餌量については, carboplatin各投与群と対照群との間で雌雄とも全期間を通じ差異は認めなかった。

摂水量については, 雄の場合4 mg/kg群で11週齢時に対照群を下回ったが, 雌ではcarboplatin各投与群と対照群との間で全期間を通じ差異を認めなかった。

2. 5 シャトル・ボックス条件回避試験 (Table 4)

Carboplatin各投与群の雌雄とも対照群と同様に, 試験を重ねる毎に各動物の回避率は上昇した。なお, 各試験日毎の回避率については, 2 mg/kg以上の投与群の雄で第4日目に回避率の低下がみられたが, 雌ではcarboplatin各投与群と対照群との間で差異は認められなかった。

2. 6 自発運動量 (Table 5)

Carboplatin 4 mg/kg群の雄で2から3時間目の自発運動量が増加したが, 雌では各時間

Table 4 Effects of carboplatin on avoidance rates of shuttle box avoidance test in F₁ rats.

Groups		Control	Carboplatin (mg/kg/day, i. v.)		
			1	2	4
	No. of rats examined	10	10	10	10
Male	Day 1	24.7±28.1	14.3±10.6	14.0±19.5	9.7± 4.8
	2	41.3±33.9	39.7±24.9	27.3±25.0	17.0±17.2
	3	63.0±23.7	69.0±22.5	51.0±28.6	41.3±28.9
	4	83.0±15.7	80.7±12.4	56.7±23.4*	56.3±28.9*
	5	89.7± 9.5	89.3± 8.6	68.7±24.4	73.3±25.3
	No. of rats examined	10	10	10	10
Female	Day 1	20.3±24.8	14.3±17.1	29.0±20.4	15.7±13.8
	2	43.0±39.0	35.4±28.9	58.7±29.9	50.0±34.7
	3	69.0±25.2	54.0±31.2	69.0±31.5	66.0±29.6
	4	84.0±15.2	68.7±28.4	83.3±23.3	80.0±21.7
	5	90.7±21.5	78.3±20.0	91.0±15.1	85.3±20.0

Each value shows mean ± S.D. (%).

*P<0.05: Significant difference from controls (Dunnett's test).

Table 5 Effects of carboplatin on spontaneous motor activity in F₁ rats.

Groups		Control	Carboplatin (mg/kg/day, i.v.)		
			1	2	4
	No. of rats examined	10	10	10	10
Male	Hours 0-1	549± 526	807± 551	675± 559	463± 658
	1-2	713± 607	563± 366	483± 497	446± 640
	2-3	439± 389	504± 306	639± 455	984± 452*
	3-4	1446± 685	1423± 983	1081± 648	761± 428
	4-5	1343± 868	1393± 480	1206± 410	988± 321
	5-6	1441±1017	1233± 825	1676± 356	1671±1107
	6-7	997± 653	1028±1141	983± 751	899± 590
	7-8	1095± 815	498± 442	691± 576	533± 662
	8-9	608± 430	843± 819	645± 577	771± 728
	9-10	745± 655	834± 758	615± 575	1410± 692
	10-11	769± 600	1249± 563	1039± 745	1161± 919
	11-12	1425± 757	720± 538	1295± 818	1488±1147
	12-13	1412± 855	1181± 735	1100± 706	1292± 794
	13-14	1499± 869	1036± 687	1019± 588	967± 635
	14-15	436± 390	255± 296	385± 563	137± 244
	15-16	397± 427	453± 589	321± 491	254± 292
	Total	15314±5462	14018±3207	13852±3751	14223±4788
	No. of rats examined	10	10	10	10
Female	Hours 0-1	1594± 566	1003± 854	939± 600	1099± 961
	1-2	995±1084	793± 737	719± 741	770± 460
	2-3	704± 644	971± 777	867± 694	630± 534
	3-4	987± 466	1134± 818	1045± 705	1117± 502
	4-5	2063± 911	1459± 641	1554± 426	1502± 801
	5-6	1534± 623	1125± 705	1089± 829	1330±1047
	6-7	936± 770	702± 511	669± 678	1226± 930
	7-8	274± 346	797± 756	686± 727	833± 907
	8-9	546± 652	1376±1024	929± 533	899± 874
	9-10	982± 822	1196± 582	1314± 647	1255± 698
	10-11	1198± 859	1255± 779	1316± 664	1174± 794
	11-12	836± 599	791± 892	1049± 905	912± 733
	12-13	807± 592	802± 384	922± 729	1080± 756
	13-14	1132± 817	874± 510	905± 671	837± 941
	14-15	803± 699	461± 575	456± 309	196± 307
	15-16	561± 641	915± 908	432± 490	631± 991
	Total	15952±6579	15653±5109	14890±5203	15488±6763

Each value shows mean ± S.D. (counts).

*P<0.05: Significant difference from controls (Dunnett's test).

Peri- and postnatal study of carboplatin in rats by intravenous administration

毎の自発運動量及び16時間の総運動量にはcarboplatin各投与群と対照群との間で差異を認めなかった。

2. 7 生殖能 (Table 6)

F₁ラットの交尾率及び受胎率については、雌雄ともcarboplatin各投与群と対照群との間で差異を認めなかった。

2. 8 器官重量及び剖検所見

F₁ラットの器官重量については、離乳時剖検において、carboplatin 2 mg/kg群の雌で生殖器実重量の減少、4 mg/kg群の雄で胸腺・肺・腎・副腎・生殖器実重量の減少、雌で副腎及び生殖器実・比重量の減少がみられた。10週齢時剖検において、2 mg/kg群の雄で副腎実重量の減少がみられた。交配後の剖検において、4 mg/kg群の雄で下垂体実・比重量及び胸腺・腎・副腎実重量の減少がみられた。

一方、F₁ラットの剖検所見については、離乳時に1 mg/kg群の雄で水頭の動物が1例みられた。また、育成期間中に瀕死の状態に陥り4週齢時に剖検した1 mg/kg群の雌1例も水頭であった。これ以外にはいずれの時期の剖検においてもcarboplatin各投与群とも対照群と比較し特記すべき異常はみられなかった。なお、生殖能の検査において交尾し得なかった個体は、対照群、1、2及び4 mg/kg群の雌でそれぞれ4、1、3及び1例存在したが、これらの動物の生殖器・副生殖器の重量及び肉眼所見には異常を見出し得なかった。

2. 9 妊娠期間中の体重変動、摂餌量及び摂水量 (Fig. 3)

妊娠期間中のF₁ラットの体重及び摂餌量にはcarboplatin各投与群と対照群との間で差異を認めなかった。

Table 6 Effects of carboplatin on reproductive performance in F₁ rats.

Groups		Control	Carboplatin (mg/kg/day, i.v.)		
			1	2	4
No. of rats mated	Male	20	22	22	22
	Female	20	22	22	22
No. of copulations	Male	20	22	22	22
	Female	16	21	19	21
% copulations/mated	Male	100	100	100	100
	Female	80.0	95.5	86.4	95.5
No. of males impregnating		17	19	21	21
% impregnatings/copulations		85.0	86.4	95.5	95.5
No. of females pregnant		13	18	17	20
% pregnant/copulations		81.3	85.7	89.5	95.2

Fig. 3 Body weight changes and food consumption in pregnant F₁ rats whose dams have received carboplatin intravenously during the perinatal and lactation periods.

Table 7 Effects of carboplatin on prenatal development in F₂ rat fetuses.

Groups	Control	Carboplatin (mg/kg/day, i.v.)			
		1	2	4	
No. of dams examined	13	18	17	20	
Corpora lutea Total	207	297	251	288	
Mean $\pm$ S.D. per litter	15.9 $\pm$ 2.3	16.5 $\pm$ 2.6	14.8 $\pm$ 2.1	14.4 $\pm$ 4.1	
Implantations Total	180	242	232	252	
Mean $\pm$ S.D. per litter	13.8 $\pm$ 3.8	13.4 $\pm$ 3.0	13.6 $\pm$ 3.6	12.6 $\pm$ 4.6	
Empty implantation sites (%)	7 (3.9)	15 (6.2)	27 (11.6)##	16 (6.3)	
Early resorption sites (%)	2 (1.1)	0	1 (0.4)	1 (0.4)	
Late resorption sites (%)	0	1 (0.4)	0	0	
Dead fetuses (%)	0	0	0	0	
Total deaths (%)	9 (5.0)	16 (6.6)	28 (12.1) #	17 (6.7)	
Live fetuses Total	171	226	204	235	
Mean $\pm$ S.D. per litter	13.2 $\pm$ 3.8	12.6 $\pm$ 3.8	12.0 $\pm$ 4.1	11.8 $\pm$ 4.6	
Sex ratio (males/females)	0.84 (78/93)	1.02 (114/112)	1.15 (109/95)	1.24 (130/105)	
Placental weight $\pm$ S.D., g	0.53 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.05	0.54 $\pm$ 0.10	0.55 $\pm$ 0.13	
Fetal weight $\pm$ S.D., g	3.69 $\pm$ 0.32	3.79 $\pm$ 0.38	3.80 $\pm$ 0.27	3.86 $\pm$ 0.24	
Crown-rump distance $\pm$ S.D., cm	3.76 $\pm$ 0.13	3.77 $\pm$ 0.17	3.77 $\pm$ 0.11	3.79 $\pm$ 0.11	
Tail length $\pm$ S.D., cm	1.50 $\pm$ 0.03	1.50 $\pm$ 0.04	1.48 $\pm$ 0.03	1.50 $\pm$ 0.03	
External malformations					
Omphalocele	1 (0.6)	0	0	0	

P<0.05, ## P<0.01 : Significant difference from controls (Chi-square test or Fisher exact test).

一方、摂水量については、1 及び 4 mg/kg群で妊娠 1 週目に対照群を下回った。

3. 胎仔 (F_2) に及ぼす影響 (Table 7)

妊娠20日目の母獣 (F_1) を屠殺し子宮内の発育状況を調べた結果、carboplatin 2 mg/kg群で着床痕の発現率が高値であり、これを反映して死亡胎仔の総計が高値であったが、平均黄体数及び平均着床数にはcarboplatin各投与群と対照群との間で差異を認めなかった。更に、胎盤重量及び平均生存胎仔数と生存胎仔の性比・体重・体長・尾長にはcarboplatin各投与群と対照群との間で差異はみられなかった。

胎仔の外表異常については、臍帯ヘルニア (Photo. 2) が対照群で 1 例みられた。

Photo. 2 Omphalocele in a rat fetus (F_2) from a control F_1 dam.

考 察

抗悪性腫瘍薬carboplatinを母獣 (F_0) に妊娠 17 から分娩後 21 日まで連日静脈内投与すると、体重は 2 mg/kg群で分娩後 4 から 8 日目に、4 mg/kg群で分娩後 4 から 11 日目に増加抑制、摂餌量は 4 mg/kg群で分娩後 1 から 7 日目に対照群を下回り、carboplatin投与との関連をうかがわせた。

母獣 (F_0) の器官重量については、carboplatin 2 mg/kg以上の投与群で胸腺実・比重量の減少と肺実・比重量の増加、4 mg/kg群で卵巣実・比重量及び副腎比重量の減少が認められ、carboplatin投与との関連をうかがわせた。

新生仔 (F_1) の出生状況については、carboplatin 2 mg/kg群で出生率が高値であったが、これは用量相関を伴わないことから、carboplatin投与の影響とは考えられなかった。

育成仔 (F_1) の生後 4 日目及び離乳時における生存率には、carboplatin投与の影響はみ

られなかった。Carboplatinの類縁白金化合物であるcisplatinは生後3日目の育成仔の生存率を低下させるため(穴吹ら, 1982), この点に関してはcarboplatinはcisplatinと趣を異にする。

育成仔(F₁)の外表面異常については、水頭がcarboplatin 1 mg/kg群で2例みられ、1例は離乳時に剖検し、1例は4週齢時に瀕死の状態に陥り剖検したが、これらは同腹仔であり出現率も低いことから偶発的なものと考えられた。

育成仔(F₁)の分化の状況については、carboplatin 4 mg/kg群で毛生に至る日数が10.4 ± 0.6日(対照群9.9 ± 0.5日)と延長したが、当施設におけるCDラットの毛生に至る日数の背景データは9.7 ± 0.5 (n=12) から10.6 ± 0.4日 (n=11) であり、胎仔の器官形成期投与試験(甲斐ら, 1988b)においては4 mg/kg群で毛生に至る日数に短縮傾向がみられたことから、本試験における毛生に至る日数の延長はcarboplatin投与による影響とは結論し得なかった。

育成仔(F₁)の初期行動発達を示す各指標にはcarboplatin各投与群と対照群との間で差異がみられないことから、carboplatinは新生仔の初期行動発達には悪影響を及ぼさないと考えられた。

育成仔(F₁)の体重については、carboplatin 4 mg/kg群の雄で1, 2及び6週齢時に、雌で4週齢時にそれぞれ一時的な増加抑制がみられたが、他の時期には対照群との間で差異を認めないためcarboplatin投与に基因する変化とは結論し得なかった。また、1 mg/kg群の雄で4から6週齢時に増加抑制がみられたが、これは用量相関を伴わないことからcarboplatin投与の影響とは考えられなかった。摂水量は4 mg/kg群の雄で11週齢時に一時的に対照群を下回ったが、他の時期には対照群との間に有意差がみられないためcarboplatin投与の影響とは考え難かった。

F₁ラットの学習能力の指標となるシャトル・ボックス条件回避試験において、carboplatin 2 mg/kg以上の投与群で第4日目に回避率の低下がみられたが、他の4日間では対照群との間に有意差が認められないことから、carboplatin投与の影響とは考えられなかった。

F₁ラットの運動性及び情動性の指標となる自発運動量については、carboplatin 4 mg/kg群の雄で2から3時間目の運動量が増加したが、他の時間及び16時間の総運動量には対照群との間に有意差を認めないことからcarboplatin投与の影響とは考えられなかった。

F₁ラットの生殖能については、交尾率及び受胎率ともcarboplatin各投与群と対照群との間で差異を認めないことから、carboplatinはF₁動物の生殖能には悪影響を及ぼさないものと考えられた。

F₁ラットの器官重量については、carboplatin 4 mg/kg群の雄で交配後の剖検において甲状腺実・比重量、雌で離乳時の剖検において副腎及び生殖器実・比重量の減少がみられ、carboplatin投与との関連をうかがわせた。また、4 mg/kg群の雄で離乳時の剖検において胸腺・肺・腎・副腎・生殖器実重量、交配後の剖検において腎・副腎実重量、2 mg/kg群の雌で離乳時の剖検において生殖器実重量の減少が認められたが、これらはいずれも比重量

には対照群との間で有意差がみられないことから体重の増加抑制を反映した変化と考えられた。なお、2 mg/kg群の雄で10週齢時の剖検において副腎実重量の減少がみられたが、これは用量相関を伴わないことからcarboplatin投与の影響とは考えられなかった。

妊娠期間中のF₁ラットの体重及び摂餌量には、carboplatin各投与群と対照群との間で差異はみられなかった。摂水量については、1及び4 mg/kg群で妊娠1週目に対照群を下回ったが、これは一時的な変化であり、用量相関を伴わないことからcarboplatin投与の影響とは考え難かった。

妊娠F₁ラットより得られた胎仔(F₂)については、carboplatin 2 mg/kg群で着床痕の発現率が高値であり、これを反映して死亡胎仔の総計が高値であったが、これは用量相関を伴わないためcarboplatin投与の影響とは考えられなかった。一方、胎仔(F₂)の外表面異常として対照群で臍帯ヘルニアが1例みられたが、carboplatin各投与群では胎仔の外表面異常は観察されなかった。

以上の結果から、本試験におけるcarboplatinの無影響量は母動物に対しては1 mg/kg/日、次世代(F₁)に対しては2 mg/kg/日と考えられた。今回実施したラットの生殖試験におけるcarboplatinの無影響量は、妊娠前及び妊娠初期投与試験(甲斐ら, 1988a)では親動物及び次世代(F₁)に対して1 mg/kg/日、胎仔の器官形成期投与試験(甲斐ら, 1988b)では親動物及び次世代(F₁)に対して2 mg/kg/日、周産期及び授乳期投与試験では親動物に対しては1 mg/kg/日、次世代(F₁)に対しては2 mg/kg/日と3試験で異なる結果が得られた。これは投与期間が妊娠前及び妊娠初期投与試験では雄で交配前63日間、雌で交配前14日間、交配期間中及び妊娠0から7日目まで(22~25日間)、周産期及び授乳期投与試験では妊娠17日から分娩後21日目まで(26~27日間)であるのに対し、胎仔の器官形成期投与試験では妊娠7日から17日目まで(11日間)と投与期間が短いため、他の2試験に比べcarboplatinの総投与量が少ないことに基因する差と考えられた。

要 約

抗悪性腫瘍薬carboplatinを1, 2及び4 mg/kg/日の割合で妊娠Crj: CD (SD)ラットに妊娠17日目より分娩後21日目まで反復静脈内投与し、概略次の結果を得た。

1. 母獣(F₀)の体重はcarboplatin 2 mg/kg群で分娩後4から8日目に、4 mg/kg群で分娩後4から11日目に増加抑制がみられ、摂餌量は4 mg/kg群で分娩後1から7日目に対照群を下回った。

2. Carboplatin 2 mg/kg以上の投与群で母獣(F₀)の胸腺重量の減少と肺重量の増加、4 mg/kg群で卵巣重量の減少が認められた。

3. 新生仔(F₁)の出生に対するcarboplatinの影響はみられなかった。

4. 育成仔(F₁)の生存率、分化の状況、初期行動発達、学習能力、運動性及び情動性に及ぼすcarboplatinの影響はみられなかった。

5. Carboplatin 4 mg/kg群の雄F₁ラットで交配後の剖検において甲状腺重量、雌F₁ラッ

Peri- and postnatal study of carboplatin in rats by intravenous administration

トで離乳時の剖検において副腎及び生殖器重量の減少が認められたが、生殖能に対するcarboplatinの影響はみられなかった。

6. 妊娠F₁ラットより得られた胎仔 (F₂) に対するcarboplatinの影響はみられなかった。

以上のように、ラットの周産期及び授乳期に投与されたcarboplatinは2 mg/kg以上の投与量で母獣の体重増加抑制、胸腺重量の減少と肺重量の増加が認められ、4 mg/kgで母獣の摂餌量の減少と卵巣重量の減少、交配後の剖検においてF₁雄ラットの甲状腺重量の減少、離乳時の剖検においてF₁雌ラットの副腎及び生殖器重量の減少を誘起するが、F₁ラットの機能、行動的発達及び生殖能には影響を及ぼさないことが示唆された。従って、本試験におけるcarboplatinの無影響量は母動物に対しては1 mg/kg/日、次世代(F₁)に対しては2 mg/kg/日と考えられた。

文 献

- 穴吹一広, 北島省吾, 香田 繁, 他 (1982): シスプラチンの生殖試験 (第4報)ーラットにおける周産期および授乳期投与試験ー. 薬理と治療, **10**, 703-721.
- Bradner, W. T., Rose, W. C. and Huftalen, J. B. (1980): Antitumor activity of platinum analogs. In Cisplatin ; Current Status and New Developments (A. W. Prestayko, S. T. Crooke and S. K. Carter, ed.), p.171-182, Academic Press, New York.
- Dunnett, C. W. (1955): A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, 1096-1121.
- Dunnett, C. W. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, **51**, 482-491.
- Evans, B. D., Raju, K. S., Calvert, A. H. et al. (1983): Phase II study of JM 8, a new platinum analog, in advanced ovarian carcinoma. Cancer Treat. Rep., **67**, 997-1000.
- Gad, S. C. and Weil, C. S. (1982): Statistics for toxicologists. In Principles and Methods of Toxicology (A. W. Hays, ed.), p.273-320, Raven Press, New York.
- 広津千尋 (1983): 一元配置実験. 統計的データ解析, p.47-71, 日本規格協会, 東京.
- Smith, I. E., Harland, S. J., Robinson, B. A. et al. (1985): Carboplatin : A very active new cis-platin analog in the treatment of small cell lung cancer. Cancer Treat. Rep., **69**, 43-46.
- 甲斐修一, 河村 寿, 高橋紀光, 他 (1988a): 抗悪性腫瘍薬Carboplatinの生殖に及ぼす影響 (第1報)ーラットにおける妊娠前及び妊娠初期静脈内投与試験ー. J. Toxicol. Sci., **13**, Suppl. II, 23-34.
- 甲斐修一, 河村 寿, 高橋紀光, 他 (1988b): 抗悪性腫瘍薬Carboplatinの生殖に及ぼす影響 (第2報)ーラットにおける胎仔の器官形成期静脈内投与試験ー. J. Toxicol. Sci., **13**, Suppl. II, 35-61.
- 高野喜一, 菊地康基, 飯島貞二, 他 (1975): 胎児毒性試験. 薬物の特殊毒性-1 ; 胎児毒性と遺伝毒性 (高木博司監修), p. 9-53, 南江堂, 東京.
- Wolpert-DeFilippes, M. K. (1980): Antitumor activity of cisplatin analogs. In Cisplatin ; Current Status and New Developments (A. W. Prestayko, S. T. Crooke and S. K. Carter, ed.), p.183-190, Academic Press, New York.