新規抗悪性腫瘍薬 S-1 の生殖・発生毒性試験 (第 1 報)

— ラット経口投与による妊娠前および妊娠初期投与試験 —

四宮 充普, 今村 健二, 泉 勝彦

大鵬薬品工業株式会社 製薬センター 安全性研究所

〒771-01 徳島市川内町平石夷野224-2

REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY STUDY OF A NEW ANTINEOPLASTIC AGENT, S-1 (I)

— Fertility Study in Rats by Oral Administration —

Mitsuhiro SHINOMIYA, Kenji IMAMURA and Katsuhiko IZUMI

Drug Safety Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.

224-2 Ebisuno, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan.

(Received May 28, 1996 ; Accepted October 12, 1996)

ABSTRACT — S-1 is a newly developed antineoplastic agent consisting of the mixture of tegafur (FT), 5-chloro-2, 4-dihydropyridine (CDHP), and potassium oxonate (Oxo) in a molar ratio of 1 : 0.4 : 1. As part of a reproductive and developmental toxicity study of S-1, a fertility study was carried out in Sprague-Dawley rats. Twenty-four male rats were administered S-1 orally starting at 64 days before mating and 24 female rats were administered S-1 orally from 15 days before mating to day 7 of pregnancy at doses of 0, 1, 4, or 7 mg/kg/day (as a dose of FT) in order to investigate the effect of S-1 on the reproductive ability and development of embryos and fetuses.

There were no dose-related changes in clinical signs. Body weight gains and food consumption were decreased and were associated with the decreased weights of thymus, testis and epididymis in male rats receiving S-1 at the 7 mg/kg/day group. In females, the only organ affected was the kidney at 7 mg/kg/day.

There were no dose-related changes in copulation, fertility, pre-implantation loss and implantation.

Decreases in live fetal body weight and retardation of fetal ossification were observed in the 7 mg/kg/day group. There were no dose-related changes in post-implantation loss, and no fetal malformations were observed.

連絡先：〒771-01 徳島市川内町平石夷野224-2

大鵬薬品工業株式会社 製薬センター 安全性研究所

四宮 充普

The results suggest that the non-observed effects dose level of S-1 for general toxicity in male and female rats is 4 mg/kg/day, for reproductive toxicity in adults is more than 7 mg/kg/day, and for developmental toxicity in utero is 4 mg/kg/day.

KEY WORDS : S-1, Antineoplastic agent, Fertility study, Rats

緒 言

S-1 は制がん作用を持つ 5-fluorouracil (以下 5-FU と略) のプロドラッグである tegafur (以下 FT と略) に, 5-FU 分解阻害剤である 5-chloro-2, 4-dihydroxypyridine (以下 CDHP と略) と 5-FU のリン酸化を阻害する potassium oxonate (以下 Oxo と略) を 1 : 0.4 : 1 のモル濃度で配合した新規経口フツ化ピリミジン系抗悪性腫瘍薬である。S-1 は CDHP の作用により 5-FU の高い血中濃度を長時間維持し, 制がん効果を高め, さらに消化管組織に高濃度に分布した Oxo の作用で 5-FU の活性化を阻害し, 消化管の副作用を軽減させることを目的として開発された (Shirasaka *et al.*, 1996)。

今回, 我々は S-1 の安全性試験の一環として, ラット経口投与による妊娠前および妊娠初期投与試験を実施したので, その結果を報告する。

実験材料および方法

1. 被験物質

S-1 の配合成分である FT, CDHP, Oxo の化学構造式を Fig. 1 に示した。

FT は化学名 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furanyl)-2, 4

Fig. 1. Chemical structure of FT, CDHP and Oxo.

(1*H*, 3*H*)-pyrimidinedione で, 分子量 200.17 であり, メタノールにやや溶けやすく, 水またはエタノールにやや溶けにくい白色の結晶性の粉末である。CDHP は化学名 5-chloro-2, 4-dihydroxypyridine で, 分子量 145.55 であり, ジメチルホルムアミドに溶けやすく, メタノールにやや溶けにくく, 無水エタノールに溶けにくい白色の結晶性の粉末である。Oxo は化学名 potassium 1, 3, 5-triazine-2, 4 (1*H*, 3*H*)-dione-6-carboxylate で, 分子量 195.18 であり, 水に溶けにくく, メタノールまたは無水エタノールにほとんど溶けない白色の結晶性の粉末である。

なお, S-1 の投与量は他の毒性試験, 薬効試験, 臨床試験などの表示と一致させ, また FT や FT と uracil の配合剤である UFT などの類薬との比較を容易にするために本薬に含有される FT 量として表示した。

2. 使用動物および飼育条件

動物は, 日本チャールス・リバーから, Crj: CD (SD) SPF ラットの 5 週齢雄 120 匹および 11 週齢雌 130 匹を購入し, 7 日間以上の検疫・馴化期間中に一般状態の観察および体重測定を実施し, 健康と判断されたもの (6 週齢の雄および 12 週齢の雌) を試験に供した。入荷時の体重範囲は, 雄 104~127 g および雌 191~248 g であった。

飼育は, 試験期間中, 温度 20~26℃ および湿度 30~70% に空調され, 照明時間 12 時間 (午前 6 時点灯~午後 6 時消灯) および換気回数 10 回以上/時間に設定した飼育室にて行った。

動物は, 試験期間中, ステンレス製ブラケットケージ R- I S タイプを使用し, 検疫・馴化期間中は 1~3 匹/ケージ, 交配期間の同居中は 2 匹/ケージあるいは無処置雌との同居中は 2~3 匹/ケージ, その他の試験期間中は 1~2 匹/ケージで飼育した。

飼料として CA-1 (日本クレア) を, 飲水として水

道水を自由に摂取させた。

3. 群構成および投与量

投与量は、先に実施した S-1 ラットを用いた経口投与による13週間反復投与毒性試験（林ら, 1996）および S-1 のラット経口投与による胎児の器官形成期投与試験（柚木山ら, 1996）の結果を参考にして設定した。すなわち, 1.5, 5 および 15 mg/kg/day を雌雄ラットに13週間投与した結果, 15 mg/kg/day 投与群で, 雌雄の一般状態の悪化, 体重増加抑制および臨床検査値の異常がみられ, 雄の18匹中13匹が死亡した。5 mg/kg/day 投与群では, 胸腺の萎縮がみられた以外影響はなかった。また, S-1 の 1, 3, 5 および 7 mg/kg/day を妊娠 7 から17日まで妊娠ラットに投与した結果, 7 mg/kg/day 投与群で母獣の体重増加抑制がみられ, 胚致死の増加傾向がみられた。また, 5 mg/kg/day 以上の投与群で胎児の発育抑制がみられた。

従って, 本試験では親動物に影響がみられることが予想される 7 mg/kg/day を最高用量とし, 以下 4 および 1 mg/kg/day をそれぞれ中間および最低用量とした。対照群には, 媒体として用いた 0.5% hydroxypropyl methylcellulose（以下 HPMC と省略; メトローク®, 信越化学工業）溶液のみを投与した。

各群の動物数は雌雄それぞれ24匹とした。群分けは, 雌雄とも投与開始前日に, 体重をもとに無作為に行った。

4. 被験液の調製, 投与期間および投与方法

S-1 は 0.5% HPMC 溶液に懸濁し, 被験液を調製した。

被験液は, 雄については交配前64日間（投与 0 日から63日まで）と交配期間を含め解剖日まで, 雌については交配前15日間（投与 0 日から14日まで）と交配期間を含め妊娠 7 日まで, 1 日 1 回, 金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

投与液量を 0.5 ml/100 g B.W. とし, 交配前期間中および交配期間中は最新体重により, 雌の妊娠期間は妊娠 0 日の体重により, それぞれ算出した。

5. 観察および検査

1) 親動物

(1) 一般状態観察, 体重および摂餌量測定

一般状態観察および生死の確認を試験期間中は毎日

1 回以上実施した。体重を交配前期間中の雄では投与 -1, 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63日に, 雌では投与 -1, 0, 7, 14日に, および交配期間中の雌雄では週 1 回, また妊娠期間中の雌では妊娠 0, 3, 5, 7, 9, 12, 16 および 20 日にそれぞれ測定した。摂餌量を交配前期間中の雄では投与 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63日に, 雌では投与 0, 7, 14日に, また妊娠期間中の雌では妊娠 1, 3, 5, 7, 9, 12, 16 および 20 日に前日からの 1 日量を測定した。

(2) 交配検査

雌動物の性周期観察は, 交配の開始前 8 日間（投与 7 ~14 日）に行った。

第 1 期交配として, 同投与群内の雌雄を 1 対 1 で, 交尾が確認されるまで最長14日間同居させた。第 2 期交配として, 第 1 期交配で交尾しなかった雌を, 同投与群内の受胎能の確認された雄と, 交尾が確認されるまで最長 3 日間同居させた。第 3 期交配として, 第 1 期交配で交尾しなかった雄, あるいは相手の雌が未受胎であった雄を, 1 ~ 2 匹の無処置雌と交尾が確認されるまで最長 8 日間同居させた。腔栓あるいは腔スミア検査で精子が確認された雌を妊娠動物とみなし, その日を妊娠 0 日として起算した。

交配検査が終了した雄は, エーテル麻酔下で断頭放血致死させた後剖検し, 胸腺, 脾臓, 肝臓, 腎臓および精巣・精巣上体の重量を測定した。第 3 期交配に用いた雌は, 交尾確認日あるいは最終交配日から14日後にエーテル麻酔下で頸椎脱臼にて屠殺し, 妊娠成立の有無を観察した。

(3) 帝王切開時検査

妊娠 20 日に, 母獣をエーテル麻酔下で頸椎脱臼にて屠殺後, 妊娠成立の有無および主要臓器の異常の有無を観察し, 胸腺, 脾臓, 肝臓および腎臓の重量を測定した。妊娠例は, 着床数および黄体数を算定し, 生存胎児, 吸収胚あるいは死亡胎児の位置および数を観察した。吸収胚および死亡胎児は, 吸収進行度により着床痕（着床した痕跡の認められるもの）, 胎盤遺残（胚が完全に吸収され胎盤のみ残るもの）, 早期吸収胚（四肢指放線の不明瞭な吸収胚）, 後期吸収胚（四肢指放線の明瞭な吸収胚）, 浸軟胎児（水分を吸収し膨軟化した胎児）および死亡胎児（機械的刺激に反応しない

胎児)に区分した。生存胎児は、外表観察、体重測定および性別判定を行った後、一腹あたり約半数例を内臓観察用にブアン液で、残りを骨格観察用として95%エタノール液で固定した。

(4) 胎児の標本観察

内臓観察は、頭部および腹部については Wilson 法 (Wilson, 1965) で、胸部は顕微解剖法 (西村, 1974) で行い、異常および変異の有無を観察した。骨格観察は、Inouye 法 (Inouye, 1976) を参考にして作製した硬・軟骨二重染色標本について行い、異常および変異の有無および骨化進行度を観察した。

6. 統計学的方法

体重、体重増加量、摂餌量および臓器重量・重量比は Bartlett の検定を行い、等分散であれば一元配置分散分析、不等分散であれば Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意で各群の例数が等しい場合は Dunnett の多重比較を、例数が等しくない場合は Dunn の多重比較を行なった。交尾率、受胎率、剖検時異常母獣数および性比は、Fisher-Irwin の検定を行った。その他のデータは Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意で各群の例数が等しい場合は Dunnett の多重比較を、例数が等しくない場合は Dunn の多重比較を行なった。性比を除く胎児データは litter 単位で扱い、有意水準を 5%未満とした。

実験結果

1. 雄親動物に及ぼす影響

1) 一般状態

死亡例は対照群を含むいずれの投与群にもなかった。

一般状態では、対照群で、外傷が交配前期間14日から、頸部、前肢あるいは腹部の軽度な脱毛が交配前期間26日から、および切歯の折損が交配41日から剖検日まで散見された。1 mg/kg/day 群で、外傷が交配前期間14日から32日まで、胸部の軽度な脱毛が交配前期間25日から33日まで、切歯の白色化が交配前期間39日から交配期間 8 日まで、切歯の脱落が交配前期間36日から43日まで散見されたが投与期間中に回復した。また、頸部の腫瘤が交配前期間26日から剖検日まで、および

切歯の折損が剖検日に散見された。4 mg/kg/day 群で、切歯の白色化が交配前期間16日から52日まで、切歯の脱落あるいは折損が交配期間36日から43日まで、外傷が交配前期間21日から52日まで散見されたが投与期間中に回復した。また、皮膚のびらんあるいは痂皮形成が交配期間27日から剖検日まで散見された。7 mg/kg/day 群で、切歯の白色化が交配前期間16日から52日まで、皮膚の痂皮形成が交配前期間50日から交配期間 4 日まで、軟便が交配前期間 8 日に散見されたが投与期間中に回復した。また、外傷が交配前期間32日から、あるいは前肢の軽度な脱毛が交配前期間49日から剖検日まで散見された。

2) 体重および摂餌量 (Fig. 2, 3)

体重および増加量では、7 mg/kg/day 群で交配前期

Fig. 2. Body weight changes of male rats treated with S-1. Significant difference from control (**: $p < 0.01$).

Fig. 3. Food consumptions of male rats treated with S-1. Significant difference from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

間の投与7日から63日まで有意な低値が認められた。また、交配期間にも低値傾向がみられた。摂餌量では、7 mg/kg/day 群で交配前期間を通じて低値傾向がみられ、投与7, 42および56日に有意差が認められた。他のS-1投与群には対照群との間に有意差はみられなかった。

3) 剖検および臓器重量 (Table 1)

剖検では、頸部の膿瘍、副脾、水腎および精巣と精

巣上体の小型化が1 mg/kg/day 群で各1例みられた。4 mg/kg/day 群で脂肪肝、精巣の小型化と軟化および精巣上体の小型化が各1例みられた。7 mg/kg/day 群で胸腺の萎縮が2例、精巣の小型化と軟化および精巣上体の小型化が1例みられた。なお、7 mg/kg/day 群の精巣および精巣上体に異常のみられた動物には受胎能がなかった。

臓器重量では、7 mg/kg/day 群で胸腺、精巣および

Table 1. Absolute and relative organ weights of male rats treated with S-1 orally.

Compound		S-1			
Dosage (mg/kg/day)		Control	1	4	7
No. of animals examined		24	24	24	24
Body weights	(g)	593.4±59.5 ^{a)}	609.1±40.1	603.1±53.1	547.2±36.6
Thymus	(g)	0.291±0.054	0.275±0.069	0.262±0.074	0.153±0.065**
	(g%)	0.049±0.008	0.045±0.010	0.043±0.010	0.028±0.011**
Liver	(g)	20.293±3.031	21.540±2.106	22.495±3.455	21.301±2.997
	(g%)	3.369±0.203	3.490±0.216	3.674±0.337**	3.872±0.491**
Spleen	(g)	0.841±0.166	0.838±0.081	0.805±0.105	0.778±0.117
	(g%)	0.140±0.020	0.136±0.014	0.133±0.014	0.141±0.019
Right kidney	(g)	1.879±0.191	1.900±0.158	1.961±0.196	2.040±0.270
	(g%)	0.314±0.021	0.308±0.022	0.322±0.026	0.371±0.050**
Left kidney	(g)	1.881±0.181	1.932±0.145	1.942±0.183	2.038±0.288
	(g%)	0.314±0.019	0.314±0.023	0.319±0.025	0.371±0.055**
Right testis	(g)	1.728±0.138	1.648±0.249	1.703±0.131	1.596±0.216*
	(g%)	0.291±0.039	0.267±0.042	0.281±0.030	0.291±0.040
Left testis	(g)	1.735±0.158	1.679±0.154	1.676±0.203	1.597±0.241*
	(g%)	0.292±0.040	0.273±0.029	0.276±0.038	0.291±0.044
Right epididymis	(g)	0.698±0.069	0.664±0.127	0.681±0.053	0.608±0.077**
	(g%)	0.117±0.016	0.108±0.022	0.112±0.012	0.111±0.013
Left epididymis	(g)	0.685±0.075	0.666±0.056	0.651±0.095	0.605±0.079**
	(g%)	0.115±0.016	0.108±0.012	0.107±0.016	0.110±0.013

Significant difference from control (* : P<0.05, ** : P<0.01).

a) : Values represent mean±SD.

精巣上体の有意な低値が認められた。また臓器重量比では、4 mg/kg/day 群で肝臓に有意な高値が、7 mg/kg/day 群で胸腺に有意な低値が、肝臓および腎臓に有意な高値が認められた。

2. 雌親動物に及ぼす影響

1) 一般状態

死亡例は対照群を含むいずれの投与群にもなかった。

一般状態では、対照群で、切歯の白色化が交配前期間1日から、および前肢の軽度な脱毛が交配期間12日から帝王切開日まで散見された。切歯の白色化が、1 mg/kg/day 群で交配前期間0日から妊娠1日まで、および4 mg/kg/day 群で交配前1日から帝王切開日まで散見された。7 mg/kg/day 群では著変はみられなかった。

2) 体重および摂餌量 (Fig. 4, 5)

体重では、7 mg/kg/day 群で交配前期間の投与7日に有意な高値が、また投与0日からの体重増加量においても、4 mg/kg/day 群で投与7日および14日に、7 mg/kg/day 群で投与7日にそれぞれ有意な高値が認められた。摂餌量では、1 mg/kg/day 群で交配前期間の投与14日に、4 mg/kg/day 群で交配前期間の投与7日および14日、および妊娠9日に、および7 mg/kg/day 群で交配前期間の投与7日および14日にそれぞれ有意な高値が認められた。

3) 剖検および臓器重量 (Table 2)

帝王切開動物の剖検では、1 mg/kg/day 群で腎臓の大型化が1例にみられた。交尾が成立したが不妊であった1および7 mg/kg/day 群各3例の雌の剖検では、卵巣および子宮に著変はみられなかった。

臓器重量および重量比では、7 mg/kg/day 群で腎臓重量および重量比に有意な高値が認められた。

3. 交配に及ぼす影響 (Table 3)

性周期については、対照群およびS-1投与群の全例に、正常な周期性がみられた。

第1期交配の結果、対照群の1組を除く全例に交尾が確認された。これら交尾能が確認された雌動物では、1および7 mg/kg/day 群の各3例を除く全例に妊娠が成立した。第1期交配で交尾しなかった対照群の雄1例、および受胎が確認されなかった1および7 mg/kg/day

群の雄各3例について、無処置の雌と第3期交配を行った結果、全例に交尾が確認され、7 mg/kg/day 群の1例以外の全例に受胎が確認された。第1期交配で交尾しなかった対照群の雌1例について、受胎能が確認された同群内の雄と交配させた結果、受胎が確認された。

これらの結果、雄の交尾率は全群100%であり、受胎率は、7 mg/kg/day 群で95.8%であった以外、各群とも100%を示した。雌の交尾率は全群100%であり、受胎率は対照群、1、4および7 mg/kg/day 群で、それぞれ100、87.5、100および87.5%を示し、1および7 mg/kg/day 群で軽度低下したが、有意差はみられなかった。

また、雌雄の交尾までに要した日数に、対照群とS-1投与群との間に差はみられなかった。

4. 胎児に及ぼす影響

1) 帝王切開時検査 (Table 4)

7 mg/kg/day 群で生存胎児体重の有意な低値が認められた。しかし、黄体数、着床数、着床率、胚・胎児死亡率、生存胎児数および性比には、対照群とS-1投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 外表観察 (Table 4)

外表異常として、対照群で短軀および無尾の合併が1例、短軀および痕跡尾の合併が2例の合計3例に、4 mg/kg/day 群で短軀および痕跡尾の合併が1例にみられた。

3) 内臓観察 (Table 5)

内臓異常として、対照群では無腎および癒合腎が各1例の合計2例にみられた。1 mg/kg/day 群では眼異常（硝子体・水晶体形成不全）および眼瞼開存の合併が1例と肺分葉異常が1例の合計2例にみられた。4 mg/kg/day 群では小眼球、水腎および尿管の合併が1例、奇静脈欠損、肺分葉異常、横隔膜ヘルニアおよび癒合腎の合併が1例と水腎および尿管の合併が1例の合計3例にみられた。7 mg/kg/day 群では水頭および心室中隔欠損が各1例の合計2例にみられた。発生頻度には対照群とS-1投与群との間に有意差はなかった。

内臓変異として、胸腺頸部遺残および右奇静脈がみられた。これら変異を有した胎児の発生頻度には対照

Fig. 4. Body weight changes of female rats treated with S-1. Significant difference from control (*: $p < 0.05$).

Fig. 5. Food consumptions of female rats treated with S-1. Significant difference from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Table 2. Absolute and relative organ weights of female rats treated with S-1 orally.

Compound			S-1			
			Control	1	4	7
Dosage (mg/kg/day)						
No. of animals examined			24	24	24	24
Body weights	(g)	420.7 ± 26.7^a		405.3 ± 37.8	426.7 ± 23.6	404.2 ± 44.0
Thymus	(g)	0.220 ± 0.060		0.225 ± 0.047	0.241 ± 0.050	0.233 ± 0.059
	(g%)	0.053 ± 0.015		0.057 ± 0.016	0.057 ± 0.013	0.060 ± 0.022
Liver	(g)	15.434 ± 1.256		14.995 ± 2.082	15.955 ± 1.271	15.563 ± 2.167
	(g%)	3.668 ± 0.184		3.691 ± 0.282	3.742 ± 0.252	3.845 ± 0.302
Spleen	(g)	0.655 ± 0.087		0.618 ± 0.114	0.681 ± 0.091	0.639 ± 0.096
	(g%)	0.156 ± 0.021		0.152 ± 0.022	0.160 ± 0.021	0.158 ± 0.018
Right kidney	(g)	0.940 ± 0.077		0.985 ± 0.184	0.964 ± 0.075	$1.024 \pm 0.095^*$
	(g%)	0.224 ± 0.017		0.246 ± 0.060	0.226 ± 0.019	$0.257 \pm 0.040^{**}$
Left kidney	(g)	0.920 ± 0.077		0.955 ± 0.182	0.953 ± 0.060	$0.997 \pm 0.097^{**}$
	(g%)	0.219 ± 0.018		0.238 ± 0.058	0.224 ± 0.018	$0.250 \pm 0.041^{**}$

Significant difference from control (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

a) : Values represent mean $\pm$ SD.

Table 3. Reproductive performance in rats treated with S-1 orally.

Compound		S-1		
Dosage (mg/kg/day)	Control	1	4	7
Male				
No. of animals examined	24	24	24	24
Copulation index(%) ^{a)}				
1st	23 (95.8)	24 (100.0)	24 (100.0)	24 (100.0)
3rd	1 (100.0)	3 (100.0)	0	3 (100.0)
Total	24 (100.0)	24 (100.0)	24 (100.0)	24 (100.0)
Fertility index (%) ^{b)}				
1st	23 (100.0)	21 (87.5)	24 (100.0)	21 (87.5)
3rd	1 (100.0)	3 (100.0)	0	2 (86.7)
Total	24 (100.0)	24 (100.0)	24 (100.0)	23 (95.8)
Mating period (Days)				
Mean±SD	3.8±3.3	2.7±1.4	2.9±1.4	2.8±1.3
Female				
No. of animals examined	24	24	24	24
Copulation index (%) ^{a)}				
1st	23 (95.8)	24 (100.0)	24 (100.0)	24 (100.0)
2nd	1 (100.0)	0	0	0
Total	24 (100.0)	24 (100.0)	24 (100.0)	24 (100.0)
Fertility index (%) ^{b)}				
1st	23 (100.0)	21 (87.5)	24 (100.0)	21 (87.5)
2nd	1 (100.0)	0	0	0
Total	24 (100.0)	21 (87.5)	24 (100.0)	21 (87.5)
Mating period (Days)				
Mean±SD	3.8±3.1	2.7±1.4	2.9±1.4	2.8±1.3
Estrous phase (%) ^{c)}				
Mean±SD	24.5±4.5	24.0±5.1	24.0±6.3	26.0±3.5

a) : Copulation index = No. of animals with successful copulation / No. of mated animals×100.

b) : Fertility index = No. of pregnant animals / No. of animals with successful copulation×100.

c) : Estrous phase = Proportion of estrous phase in estrous cycle.

群と S-1 投与群との間に有意差はなかった。

4) 骨格観察 (Table 6, 7)

骨格異常として、1 mg/kg/day 群で二分肋骨が 1 例、4 mg/kg/day 群では波状肋骨が 3 例、7 mg/kg/day 群では波状肋骨が 3 例および波状肋軟骨が 1 例の合計 4 例にみられた。発生頻度には対照群と S-1 投与群との間に有意差はなかった。

骨格変異として、13肋骨痕、胸椎のダンベル状および分離、腰椎の仙椎化もしくは肋軟骨の分離などが、また骨化進行に関連した変異として頭骨、頸椎弓、恥

骨もしくは坐骨の骨化遅延などがみられた。これら変異を有した胎児の発生頻度には、対照群と S-1 投与群との間に有意差はみられなかった。なお、4 mg/kg/day 群で13肋骨痕が有意に減少した。

骨化進行度については、4 mg/kg/day 群で胸骨核が、7 mg/kg/day 群では中手骨、胸骨核および仙尾椎の骨化数がそれぞれ有意に減少した。

Table 4. Casarean section findings in rats treated with S-1 orally.

Compound	S-1			
	Control	1	4	7
Dosage (mg/kg/day)				
No. of animals examined	24	24	24	24
No. of non-pregnant animals	0	3	0	3
No. of pregnant animals	24	21	24	21
No. of corpora lutea	439	386	432	380
Mean $\pm$ SD	18.3 $\pm$ 3.1	18.4 $\pm$ 2.4	18.0 $\pm$ 2.8	18.1 $\pm$ 3.0
No. of implantation sites	374	312	366	305
Mean $\pm$ SD	15.6 $\pm$ 2.7	14.9 $\pm$ 4.0	15.3 $\pm$ 3.6	14.5 $\pm$ 4.2
Implantation rate (%) ^{a)}				
Mean $\pm$ SD	86.4 $\pm$ 13.6	81.4 $\pm$ 21.1	85.8 $\pm$ 18.8	80.6 $\pm$ 24.3
Post implantation loss (%)				
Mean $\pm$ SD	4.8 $\pm$ 5.8	7.7 $\pm$ 8.3	5.9 $\pm$ 6.9	4.1 $\pm$ 5.9
No. of dead-resorbed fetuses	18	25	23	13
Metrial glands	11	8	7	3
Placental remnant	6	15	14	10
Early resorbed	1	1	0	0
Late resorbed	0	0	2	0
Macerated	0	1	0	0
Dead	0	0	0	0
No. of live fetuses	356	287	343	292
Mean $\pm$ SD	14.8 $\pm$ 2.8	13.7 $\pm$ 3.8	14.3 $\pm$ 3.4	13.9 $\pm$ 4.2
Male / Female	180/176	136/151	168/175	142/150
Sex ratio	1.02	0.90	0.96	0.95
Body weight of live fetuses				
Male (Mean $\pm$ SD)	3.36 $\pm$ 0.22	3.30 $\pm$ 0.51	3.25 $\pm$ 0.27	3.14 $\pm$ 0.29**
Female (Mean $\pm$ SD)	3.21 $\pm$ 0.25	3.12 $\pm$ 0.43	3.09 $\pm$ 0.27	2.94 $\pm$ 0.20**
External examination				
No. of fetuses examined	356	287	343	292
No. of fetuses with anomalies	3 ^{b)}	1	1 ^{c)}	0
(%) (Mean $\pm$ SD)	0.9 $\pm$ 4.4	0.0 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 1.4	0.0 $\pm$ 0.0

Significant difference from control (** : P<0.01).

a) : Implantation rate = No. of implantation sites / No. of corpora lutea $\times$ 100.

b) : Anury (1), vestigial tail (2), and short trunk (3).

c) : Vestigial tail (1) and short trunk (1).

考 察

S-1 のラット経口投与による妊娠前および妊娠初期投与試験を、0, 1, 4 および 7 mg/kg/day の用量で実施し、S-1 の親動物および胚・胎児に及ぼす影響を検討した。

雄親動物については、一般状態観察で S-1 投与群に散見された切歯の白色化は、投与期間中に回復したことから、および S-1 の 13 週間反復投与毒性試験 (林ら, 1996) では発現しなかったことから、S-1 投与に起因する変化か否かは明らかではなかった。その他、外傷、脱毛、痂皮形成、軟便、腫瘍などが散見されたが、いずれも少数例あるいは一過性であり、S-1 投与により増加す

Table 5. Visceral findings of live fetuses from rat dams treated with S-1 orally.

Compound Dosage (mg/kg/day)	Control	S-1		
		1	4	7
No. of fetuses examined	180 (24) ^{a)}	145 (21)	170 (24)	148 (21)
No. of fetuses with anomalies	2 (1.2) ^{b)}	2 (1.7)	3 (1.5)	2 (1.5)
Hydrocephaly	0	0	0	1 (1.0)
Hypoplasia of lens and hyaloid	0	1 (1.2)	0	0
Microphthalmia	0	0	1 (0.5)	0
Open eyelids	0	1 (1.2)	0	0
Abnormal lobation of lung	0	1 (0.5)	1 (0.6)	0
Diaphragmatic hernia	0	0	1 (0.6)	0
Renal agenesis	1 (0.6)	0	0	0
Fused kidney	1 (0.6)	0	1 (0.6)	0
Hydronephrosis	0	0	2 (0.9)	0
Hydroureter	0	0	2 (0.9)	0
Absence of azygous vein	0	0	1 (0.6)	0
Ventricular septal defect (VSD)	0	0	0	1 (0.6)
No. of fetuses with variations	7 (3.5)	5 (3.1)	12 (6.3)	3 (2.3)
Thymic remnant in the neck	7 (3.5)	5 (3.1)	12 (6.3)	2 (1.4)
Azygous vein anomaly	0	0	0	1 (1.0)

a) : Values in parentheses represent number of litters examined.

b) : Values in parentheses represent average percentage of one litter.

る傾向もなかったことから、S-1 投与と関連しない偶発所見と判断された。体重増加抑制および摂餌量の有意な低値が 7 mg/kg/day 群で認められた。S-1 中に配合されている CDHP および Oxo の妊娠前および妊娠初期投与試験（古橋ら, 1996 a, b）において、いずれも 2000 mg/kg/day 群で体重増加抑制あるいは摂餌量の減少が認められている。しかし、無影響量はそれぞれ 400 および 80 mg/kg/day であり、本試験の 7 mg/kg/day に配合されている CDHP および Oxo の量はそれぞれ 2 および 6.9 mg/kg/day と量的に少ないことから、これらの結果は S-1 中の FT による影響と考えられた。また、FT と uracil の配合剤である UFT の妊娠前および妊娠初期投与試験（浅野間ら, 1981）では、UFT（FT として 20 mg/kg/day）投与群で体重増加抑制と摂餌量の低下がみられている。含有する FT 量で比較すると、S-1 は UFT よりも少量で影響が発現した。S-1 および UFT には、FT の活性代謝物である 5-FU の分解阻害の目的で、それぞれ CDHP あるいは

uracil が配合されているが、uracil よりも 5-FU の分解を強く阻害する CDHP により（Tatsumi, K., et al., 1987），血中 5-FU 濃度が高濃度に長時間持続し、S-1 で 5-FU の影響がより強く発現したものと考えられた。剖検では脾臓、腎臓あるいは生殖器等に異常がみられたが、少数例の発現であり S-1 投与により増加する傾向はなかった。胸腺、精巣および精巣上体重量の有意な低値、胸腺重量比の有意な低値ならびに肝臓および腎臓重量比の有意な高値が 7 mg/kg/day 群で、また肝臓重量比の有意な高値が 4 mg/kg/day 群で認められた。S-1 の 13 週間反復投与毒性試験（林ら, 1996）において、5 mg/kg/day 以上の群の雄で胸腺の重量および重量比の有意な低値、15 mg/kg/day 群の雄で精巣・精巣上体重量の有意な低値がみられていることより、胸腺および精巣・精巣上体の萎縮性の変化は、S-1 による影響と考えられた。なお、CDHP および Oxo の妊娠前および妊娠初期投与試験（古橋ら, 1996 a, b）では、いずれも 2000 mg/kg/day 群でもこ

Table 6. Skeletal findings of live fetuses from rat dams treated with S-1 orally.

Compound Dosage (mg/kg/day)	Control	S-1		
		1	4	7
No. of fetuses examined	176 (24) ^{a)}	142 (21)	173 (24)	144 (20)
No. of fetuses with anomalies	0	1 (0.8) ^{b)}	3 (1.5)	4 (2.9)
Bifid rib	0	1 (0.8)	0	0
Wavy rib	0	0	3 (1.5)	3 (2.1)
Wavy costicartilage	0	0	0	1 (0.7)
No. of fetuses with variations	28 (15.3)	25 (18.9)	46 (25.5)	30 (19.9)
Retarded ossification of nasal bone	0	0	1 (0.5)	0
Retarded ossification of frontal bone	0	1 (1.2)	2 (0.9)	1 (0.7)
Retarded ossification of parietal bone	0	0	2 (0.9)	4 (2.9)
Retarded ossification of supracoccipital bone	0	1 (1.2)	3 (1.5)	1 (0.7)
Retarded ossification of cervical vertebral arch	2 (1.1)	7 (6.2)	23 (12.9)	11 (7.8)
Dumbbell shape of thoracic vertebral body	8 (4.6)	4 (3.1)	9 (5.6)	5 (3.2)
Separation of thoracic vertebral body	2 (1.2)	2 (1.9)	2 (1.1)	3 (1.8)
Retarded ossification of thoracic vertebral body	0	3 (3.6)	0	1 (0.7)
Separation of thoracic vertebral arch	0	2 (1.1)	0	0
Retarded ossification of thoracic vertebral arch	0	3 (2.6)	0	0
5 lumbar vertebrae	1 (0.5)	2 (1.6)	0	0
7 lumbar vertebrae	1 (0.6)	0	0	0
Sacralization of lumbar vertebra	0	1 (1.2)	1 (0.5)	2 (1.3)
Lumbar vertebral variation	1 (0.6)	0	0	0
Retarded ossification of sacral vertebral arch	0	0	1 (0.7)	4 (2.9)
Rudimentary 13th rib	4 (2.2)	1 (0.8)	0*	0
Rudimentary lumbar rib	0	0	0	1 (0.6)
Separation of costicartilage	12 (6.1)	5 (3.2)	11 (5.7)	3 (2.1)
Separation of sternebra	0	2 (1.2)	0	1 (0.8)
Sternebra variation	0	1 (0.6)	0	1 (0.8)
Retarded ossification of pubis	2 (1.2)	6 (6.0)	8 (4.1)	12 (7.2)
Retarded ossification of ischium	1 (0.6)	4 (4.8)	5 (2.7)	1 (0.5)

Significant difference from control (* : $P < 0.05$).

a) : Values in parentheses represent number of litters examined.

b) : Values in parentheses represent average percentage of one litter.

れらの変化はみられていないことより、FT による影響と考えられた。しかし、肝臓および腎臓の重量比増加は、実重量には差はなく、S-1 の13週間反復投与毒性試験（林ら、1996）の雄においてもみられていないことより、S-1 投与の影響は明らかでなかった。

雌親動物については、S-1 投与群において、体重、体重増加量あるいは摂餌量の増加が交配前期間から妊娠期間にかけて散見された。このような増加はS-1 の

投与量増加に伴った変化ではないこと、S-1 の13週間反復投与毒性試験（林ら、1996）および器官形成期投与試験（柚木山ら、1996）ならびに UFT の妊娠前および妊娠初期投与試験（浅野間ら、1981）でみられていないことより、偶発的な変化と考えられた。臓器重量では、7 mg/kg/day 群で腎臓重量および重量比の増加がみられた。これは、S-1 の13週間反復投与毒性試験（林ら、1996）の15 mg/kg/day 群の雌においてもみ

Table 7. Ossifications of live fetuses from rat dams treated with S-1 orally.

Compound Dosage (mg/kg/day)	Control	S-1		
		1	4	7
No. of fetuses examined	176 (24) ^{a)}	142 (21)	173 (24)	144 (20)
No. of vertebrae				
Cervical	7.0±0.0 ^{b)}	7.0±0.0	7.0±0.0	7.0±0.0
Thoracic	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0
Lumbar	6.0±0.0	6.0±0.1	6.0±0.0	6.0±0.0
Sacro-coccygeal	7.3±0.5	6.9±1.2	7.0±0.5 ^{f)}	6.7±0.6 ^{**}
No. of ribs				
Right	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0
Left	13.0±0.0	13.0±0.0 ^{c)}	13.0±0.0	13.0±0.0
No. of sternebrae	4.9±0.6	4.3±1.0	4.4±0.7 [*]	4.2±0.8 ^{**}
No. of metacarpi				
Right	3.1±0.3	2.9±0.6	3.0±0.3	2.9±0.2 [*]
Left	3.1±0.2	2.9±0.6	3.0±0.2	2.9±0.3 [*]
No. of metatarsi				
Right	4.0±0.1 ^{e)}	3.8±0.8	3.9±0.2 ^{f)}	3.9±0.2
Left	4.0±0.1	3.8±0.8	3.9±0.2 ^{f)}	3.9±0.3 ^{g)}
No. of carpal proximal phalanges				
Right	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Left	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
No. of tarsal proximal phalanges				
Right	0.0±0.0 ^{d)}	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Left	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

Significant difference from control (* : P<0.05, ** : P<0.01).

a) : Values in parentheses represent number of litters examined.

b) : Values represent mean±SD.

No. of fetuses examined are c) : 174, d) : 175, e) : 141, f) : 172 and g) : 143.

られていることより、S-1投与に起因する可能性が示唆された。

交配検査において、各群とも性周期、交尾に要した日数、交尾率および受胎率に著変がみられず、また、帝王切開検査においても黄体数、着床数および着床率に差はなかったことより、雌雄動物の生殖能力にS-1投与の影響はないものと考えられた。

胎児に対しては、各群の胚・胎児死亡率および生存胎児数に有意差はなく胚・胎児致死作用はみられなかった。7 mg/kg/day群で生存胎児体重の有意な低値がみられた。また、骨格検査において、7 mg/kg/day群で胸骨核、仙尾椎骨および前肢基節骨の骨化数に減少がみられたことより、S-1には胎児発育抑制作用があるものと考えられた。しかし、胎児発育抑制作用は、

同じ 5-FU 系の Doxifluridine (清水ら, 1985) および Emitefur (大井ら, 1994) の妊娠前および妊娠初期投与試験においてもみられていることより, S-1 特有のものではないものと考えられた。なお, 4 mg/kg/day 群でも胸骨核の骨化数に減少がみられたが, 他の部位の骨化数に差はなく生存胎児体重に有意差がみられないことより, S-1 投与の影響は明らかでなかった。S-1 投与群で発現した外表異常, 骨格および内臓の異常および変異は, いずれも低頻度であり背景データ (Morita, H., et al., 1987) とともに差はなく, また S-1 投与により増加する傾向もないことから自然発生的な異常と考えられた。

以上のことより, 今回の試験条件下では, S-1 の親動物に対する一般毒性学的無影響量は, 雌雄とも 4 mg/kg/day, 生殖能力に対する無影響量は 7 mg/kg/day 以上, 胚・胎児に対する無影響量は 4 mg/kg/day であると推定された。

要 約

抗悪性腫瘍薬 S-1 は, FT, CDHP および Oxo をモル比 1 : 0.4 : 1 で配合したフッ化ピリミジン (5-FU) 系の配合剤である。今回, S-1 の安全性試験の一環として, S-1 のラット経口投与による妊娠前および妊娠初期投与試験を, 0, 1, 4 および 7 mg/kg/day の用量で雌雄各 24 匹の Crj : CD (SD) ラットを用いて実施し, S-1 の親動物および胚・胎児に及ぼす影響を検討した。

1. 親動物に対する一般毒性学的影響

一般状態観察では, S-1 に起因すると思われる変化はみられなかった。

7 mg/kg/day 群の雄で, 投与期間中に, 体重増加抑制および摂餌量の低下がみられた。

7 mg/kg/day 群の雄で, 胸腺の重量・重量比および精巣・精巣上体の重量に低値, および雌で腎臓の重量・重量比に高値がみられた。

2. 親動物の生殖能力に対する影響

交配検査において, 交尾率および受胎率の低下および着床阻害はみられず, S-1 投与に起因する影響はみられなかった。

3. 胚・胎児に対する影響

胚・胎児死亡数および率の増加はみられなかった。

7 mg/kg/day 群で, 生存胎児体重の低値および骨化進行度の遅延がみられ, 胎児の発育抑制がみられた。

S-1 投与に起因する奇形の発現はなかった。

4. 以上のことより, 本試験条件下では, S-1 の親動物に対する一般毒性学的無影響量は雌雄とも 4 mg/kg/day, 生殖能力に対する無影響量は 7 mg/kg/day 以上, 胚・胎児に対する無影響量は 4 mg/kg/day であると推定された。

参考文献

- 浅野間光治, 吉田良一, 森田健一 (1981): Tegafur-Uracil 配合剤 (UFT) の生殖試験 (第 2 報) ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験. 応用薬理, 22(1), 75-83.
- 古橋忠和, 加藤真之, 藤村高志, 内藤一嘉 (1996 a): CDHP の生殖・発生毒性試験-1. ラット経口投与による妊娠前および妊娠初期投与試験 (Seg 1) - 社内資料.
- 古橋忠和, 加藤真之, 藤村高志, 内藤一嘉, 小井田雅弘 (1996 b): Oxo の生殖・発生毒性試験-1. ラット経口投与による妊娠前および妊娠初期投与試験 (Seg 1) - 社内資料.
- 林泰司, 長谷川浩之, 田中剛太郎, 大前重男 (1996): 新規抗悪性腫瘍薬 S-1 のラット経口投与による 13 週間反復投与毒性試験. J. Toxicol. Sci., 21 (Suppl. III), 505-526.
- Inouye, M. (1976): Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by Alcian Blue and Arizarin Red S. Cong. Anom., 16, 171-173.
- Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Hasegawa, Y., Miyamoto, M. and Watanabe, T. (1987): Spontaneous malformations in laboratory animals. frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. Cong. Anom., 27, 147-206.
- 西村耕一 (1974): マウスおよびラット胎児の胸部内臓奇形観察のための顕微解剖法. Cong. Anom., 14, 23-40.
- 清水万律子, 堀井郁夫, 佐藤正伸, 竹内裕幸, 宇高奎二, 斎藤実, 奈良間功 (1985): Doxifluridine の毒性に関する研究 (第 8 報) ラットにおける妊娠前および妊娠初期投与試験. 薬理と治療, 13 (Suppl. 2), 265-275.
- 大井明英, 入口清孝, 浜刈拓也, 西大條亮一, 玉川実 (1994): 新規抗悪性腫瘍薬 Emitefur の生殖・発生毒性試験 (第 1 報) - ラットにおける妊娠前および妊娠初期経口投与試験-1. 薬理と治療, 22(1), 191-200.

- Shirasaka, T., Shimamoto, Y., Ohshima, H., Yamaguchi, M., Kato, K., Yonekura, K. and Fukushima, M. (1996): Development of a novel form of an oral 5-fluorouracil derivative directed to the potentiation of the tumor selective cytotoxicity of 5-fluorouracil by two biochemical modulators. *Anti-Cancer Drugs*, **7**, 548–557.
- Tatsumi, K., Fukushima, M., Shirasaka, T. and Fujii, S. (1987): Inhibitory effects of pyrimidine, barbituric acid and pyridine derivatives on 5-fluorouracil degradation in rat liver extracts. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 748–755.
- 柚木山史郎, 四宮充普, 池渕一也 (1996): 新規抗悪性腫瘍薬 S-1 の生殖・発生毒性試験—ラット経口投与による胎児の器官形成期投与試験—. *J. Toxicol. Sci.*, **21** (Suppl. III), 603–618.
- Wilson, J. G. (1965): *Teratology, Principles and Techniques*. Univ. of Chicago, Illinois, 262–277.