

抗腫瘍剤投与による正常および担癌ラット胎仔の 奇形発生に関する比較

長谷川 嘉成, 石川 信雄

Comparative Studies with Normal Pregnant and Tumor-bearing Pregnant Rat Fetuses following an Antitumor Drug Administration

YOSHINARI HASEGAWA and NOBUO ISHIKAWA

*Hoshi College of Pharmacy*¹⁾

It has been done comparison of malformations in fetuses of normal pregnant and tumor-bearing Donryu rats following an antitumor drug administration. Rat ascites hepatoma AH-130 tumor cells and DBM (dibromomannitol, 1,6-dibromo-1,6-dideoxy-D-mannitol) were used in the experiment. The drug, given in a single dose of 350 mg/kg or 500 mg/kg to the rats, was orally administered at the critical stages (8~13 days) of pregnancy. The tumor cells were inoculated intraperitoneally 3 days before the drug administration. The fetuses were extracted on day 20 of pregnancy. Frequencies of resorptions and dead fetuses of the tumor-bearing pregnant rats were more increased than those of the normal pregnant rats, and body weight of live fetuses of the tumor-bearing was decreased than that of the normal. Frequencies of the external and the skeletal malformations in live fetuses of the tumor-bearing were also higher than those of the normal.

抗腫瘍剤のなかには催奇形作用を有するものが多い。しかしながら従来報告では、担癌妊娠母体という病態動物を用いた催奇形の研究は極めて少なく、正常妊娠動物だけを対象として行なわれている。増殖速度の速い2つの生物系が1つの宿主内で成育する過程において薬剤を投与された場合、生物系に如何なる影響が現われるか興味深い。

慢性骨髄性白血病の治療剤であるDBM (dibromomannitol, 1,6-dibromo-1,6-dideoxy-D-mannitol)²⁾が催奇形作用を有することは、すでにWistar系ラットおよびICR-JCL系マウスを用いて確認されている³⁾。一方、DBMがラット腹水肝癌AH-130に対して抗腫瘍作用を有することは、著者らの予試験で確かめられた。

著者らは上記抗腫瘍剤と腹水肝癌AH-130を組

1) Location: *Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo*

2) S. Eckhardt, C. Sellei, I.P. Horvath, L. Institoris, *Cancer Chemotherapy reports*, **33**, 57 (1963); C. Sellei, S. Eckhardt, *Rev. Franc. Etude. Clin. Biol.*, **8**, 483 (1963).

3) 細見次郎, 鈴木 博, 石山 登, 佐野佳子, 入倉 勉, *基礎と臨床*, **6**, 30 (1972).

合わせ、Donryu 系ラットを用いて催奇形の実験を行なった。すなわち、正常妊娠および AH-130 胆癌妊娠ラットに DBM を投与すると胎子の奇形発生に如何なる差異が生じるかを比較検討した。

実験の部

動物は日本ラット社供給による体重 150~200 g の Donryu 系雄性および未経産雌性ラットを用いた。日本クレア社製の CA-1 固型飼料と水を自由に与え空調下 (温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 相対湿度 $55 \pm 5\%$) で飼育した。

妊娠の判定は発情期の雌と雄ラットをケージ中に一匹ずつ一夜同居させ、翌朝雌動物膈内の精子確認をもって妊娠 0 日とした。妊娠後の雌ラットは 1 ケージ中に 5~6 匹ずつ同居させた。

Donryn 系ットの腹腔内で継代している腹水肝癌 AH-130 腫瘍細胞を移植 4~5 日後に採取して、 10^4 , 10^5 または 10^6 個の細胞を計数して実験に供した。

抗腫瘍剤の DBM は 0.5% Tween 80 を用いて懸濁したものを腹腔内腫瘍移植後 3 日目に 1 回経口投与した。薬物投与量は、胎子に奇形作用が完全に現われる 500 mg/kg と、それよりもやや少量の 350 mg/kg を選んだ。

妊娠動物は、無処置群、腫瘍移植群、薬物投与群および腫瘍移植後薬物投与群の 4 群に分割した。本研究の実験計画を Fig. 1 に示す。

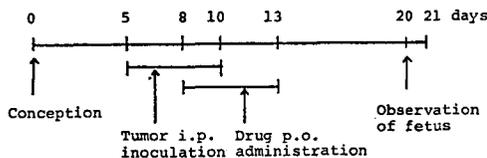


Fig. 1. Scheme for Treatment Schedules.

DBM given in a single dose of 350 mg/kg or 500 mg/kg to the rats, was orally administered at the critical stages (8~13 days) of pregnancy.

Rat ascites hepatoma AH-130 tumor cells (10^6) were inoculated intraperitoneally 3 days before the drug administration.

各妊娠ラットは妊娠20日目に屠殺開腹して着床痕、吸収胚芽、死亡胎子および生存胎子の総数を記録した。生存胎子は体重を測定し、外表奇形をルーペ下で観察した。観察を終えた胎子は2群に分け、1群は95%エタノールに固定し、透徹アリザリン染色により骨格標本を作製し、ルーペを用いて骨格異常、化骨状態を観察した。他の1群はブアン液に10日間固定後、胎子の全体をカミソリを用いて2~3 mmの厚さに連続切断して、内臓奇形を巨視的に観察した。

結果と考察

移植腫瘍細胞数の検討

腫瘍移植3日後に薬物を投与することは癌化学療法上から適当であると考えた。したがって臨界期 (ラット妊娠8日目から13日目までの薬物感受期) に薬物1回投与を行なう場合、Fig. 1 に示したごとく腫瘍移植を3日前になるように計画した。この場合、担癌動物が出産日まで生存することが前提条件となるので、移植腫瘍細胞数を定める必要がある。そこで、細胞数 10^4 , 10^5 および 10^6 個を移植して生存日数を求めた。

TABLE I. Life Prolongation Experiments on AH-130 by Oral Administration of DBM.

Group	Inoculum size	Survivor		Median survival days
		20 days	40 days	
Control	10^4	3/8	3/8	18
	10^5	2/8	0/8	17
	10^6	0/8	0/8	13
Treated	10^4	8/8	8/8	>40
	10^5	6/8	1/8	23
	10^6	5/8	0/8	27

DBM was given in a dose of 100 mg/kg once at 3 days after i.p. inoculation.

Table I に示すごとく、 10^5 個細胞を移植すると、40日以内に全ての動物は腫瘍死して、平均生存日数17日を示した。これは移植が完全に成功し、しかも15日以上生存日数を満足するもので

TABLE II. Effect of a Single Administration of DBM on Developing Normal and Tumor-bearing Rat Fetuses Observed on Day 30.

Treated day	Dose (mg/kg)	Mother animal	Total implantation	Resorption	Dead fetus	Live fetus
Control		3	30	2 (6.6)	0 (0)	28 (93.4)
5 tumor alone		4	45	1 (2.2)	0 (0)	44 (97.8)
7 tumor alone		6	80	11 (13.7)	0 (0)	69 (86.3)
9 tumor alone		5	67	4 (5.9)	1 (1.5)	62 (92.6)
8	500 + T**	8	87	18 (20.7)	2 (2.3)	67 (77.0)
		5	59	46 (77.9)	1 (1.7)	12 (20.3)
9	500 + T	9	113	41 (36.3)	0 (0)	72 (63.7)
		5	55	26 (47.3)	1 (1.8)	28 (50.9)
10	350 + T	5	61	1 (1.6)	1 (1.6)	59 (96.8)
		6	90	9 (10.0)	1 (1.1)	80 (88.9)
	500 + T**	6	82	58 (70.7)	4 (4.9)	20 (24.4)
		6	71	70 (98.6)	0 (0)	1 (1.4)
11	350 + T**	7	85	12 (14.1)	1 (1.2)	72 (84.7)
		6	76	61 (80.2)	5 (6.6)	10 (13.2)
	500 + T*	4	44	40 (90.9)	4 (9.1)	0 (0)
12	350 + T**	5	65	62 (95.4)	0 (0)	3 (4.6)
		6	83	12 (14.5)	3 (3.6)	68 (81.9)
	500 + T	6	71	12 (16.9)	18 (25.4)	41 (57.7)
13	500 + T	3	31	13 (41.9)	15 (48.4)	3 (9.7)
		4	43	18 (41.8)	18 (41.9)	7 (16.3)
	500 + T**	5	59	5 (8.5)	0 (0)	54 (91.5)
		5	57	12 (21.1)	17 (29.8)	28 (49.1)

+ T: Tumor was inoculated 3 days before drug administration.

Significantly different from drug only performed group by chi square ($\phi=2$).

*: $\alpha=0.05$ **: $\alpha=0.01$

Figures in parentheses refer to value of percentages.

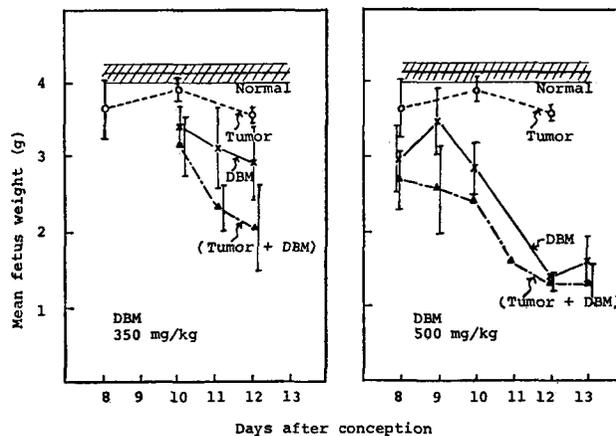


Fig. 2. Fetus Weight of Rat on Day 20 after Conception. Vertical bars show a standard deviation.

TABLE III. Incidence of External Malformations in Normal and Tumor-bearing Rat Fetuses following DBM Administration.

Treated day	Dose (mg/kg)	Fetuses examined	Exencephalia	Meningo-encephalocele	Cephalocele	Open eye-lid	Hare-lip	Cleft palate	Anencephalia	Microstomia	Micromelia	Poly-dactyly (finger)	3rd finger short	3rd finger deficiency	Club-foot	Poly-dactyly (toe)	3rd toe short	3rd toe deficiency	Thin tail	Tail less	Short tail	Kinky tail	Abdominal hernia	
Control		28																						
5 tumor alone		44																						
7 tumor alone		69																						
9 tumor alone		62																						
8	500	67		5			9	1	4						3				6	15	1			
	+T	12		2			1		2						3				3	5	1		1	
9	500	72													3					9		1		
	+T	28									1				2									
10	350	59																						
	+T	80																						
	500	20																			1	1		
	+T	1																						
11	350	72																						
	+T	10																						
	500	0																						
	+T	3																						
12	350	68		5	8							1	2	8				3	10					
	+T	41	2	22	5	14					22	25	3	1	7							3	1	
	500	3		2		1					2	1		2										
	+T	7	7			2					7	1			3									
13	500	54	9	2		10		9																
	+T	28	5			5					5				5									

Blanks refer to no malformations observed.

ある。さらに DBM 処置群では、いずれの群でも抗腫瘍性による延命効果を示しており、 10^6 個細胞移植による薬物処置群も対照群より平均生存日数が 6 日延長している。このことから、移植細胞数を 10^6 個に定めることは、本実験の条件として適切なものであると考えた。

奇形発生の比較

着床痕数の比較を Table II に示す。総着床数は子宮内胚芽吸収数、死亡胎仔数および生存胎仔数の和である。吸収死胚は薬物投与だけの群よりも、腫瘍移植後薬物投与を行なった群の方で高頻度に見られた。DBM 500 mg/kg 投与群よりも

TABLE IV. Incidence of Skeletal Malformations in Normal and Tumor-bearing Rat Fetuses following DBM Administration.

Treated day	Dose (mg/kg)	Fetuses examined	Fused cervical vertebra	Fused thoracic vertebra	Fused lumbar vertebra	Deficiency of caudal & sacral vertebrae	Segmentation of vertebral body	Fused rib	Waved rib	Micromelia of forelimb	Deficiency of fibula
	Control	18									
	5 tumor alone	22									
	7 tumor alone	34									
	9 tumor alone	31									
8	500	33	17	2	3	14	18	16			
	+ T	5	3	1	1	4	5	5			
9	500	28	1	12	2	6	13	4			
	+ T	13		4			6				
10	350	50									
	+ T	47									
	500	10	4		2		3				
	+ T	1					1				
11	350	45									
	+ T	4									
	500	0									
	+ T	2									
12	350	35	2						2		
	+ T	19	10						3	9	8
	500	0									
	+ T	9*							2		
13	500	33							33		
	+ T	4							4		

* Two dead fetuses are included in the figure.

350 mg/kg 投与群の方が吸収死胚数は少ないが、両投与群とも担癌体と非担癌体の間で大きな差が見られる。差が特に著しいのは妊娠8日、10日および11日目である。死亡胎子の頻度は例数は少ないが、12日目 (350 mg/kg) と13日目 (500 mg/kg) で腫瘍移植後薬物投与群の方に薬物投与だけの群より多く見られた。8日目から13日目までの薬物投与群と腫瘍移植後薬物投与群との有意差

は、 χ^2 分布による検定 (自由度 $\phi=2$) で次のとき結果を得られた。すなわち、危険率 $\alpha=0.05$ で有意なものは11日目の 500 mg/kg 投与群、また危険率 $\alpha=0.01$ で有意なものは8日目の 500 mg/kg 群、10日目の 500 mg/kg 群、11日目の 350 mg/kg 群、12日目の 350 mg/kg 群および13日目の 500 mg/kg であった。したがって腫瘍を移植することにより、6/9 の組合わせの群で胎仔

の生死および吸収死胚の出現率が大きく異なっていることが判明した。

生存胎仔の体重を測定したものが Fig. 2 である。これに比して担癌体ではわずかに減少しているが、DBM 投与群では 350 mg/kg および 500 mg/kg のいずれにおいても胎仔体重の著明な減少が経日的に観察された。それと並行して腫瘍移植後 DBM を投与した群ではさらに体重減少を示した。すなわち、正常群から腫瘍移植群、DBM 投与群、腫瘍移植後 DBM 投与群の順に体重減少が見られた。妊娠母獣を担癌体にした場合、吸収死胚および生存胎仔の体重におよぼす影響は極めて大きいことが判る。

次に生存胎仔の外表、骨格および内臓奇形について検索した。生存胎仔の外表奇形については、外脳症、髄膜脳瘤、脳瘤、裸眼、多指症(手)、第三指短症、第三指欠損症、薄尾症、尾欠損、短尾症、変形尾症および腹壁ヘルニアの各所見について比較検討を加えた。Table III に示すごとく、最も顕著な差が得られたのは妊娠 12 日目に DBM を 350 mg/kg 投与した群においてである。ほとんど全ての場合、担癌体群で多くの奇形が発生しているが、非担癌体群で逆に第三指欠損傾向が見られた。

骨格奇形は頸椎溶解、胸椎溶解、腰椎溶解、尾仙椎骨の欠損、椎体核の分離および肺骨欠損に関して比較した (Table IV)。外表奇形と同様、妊娠 12 日目の DBM 350 mg/kg 投与群で担癌体群の奇形が多く見られた。

内臓奇形としては、無眼球症、小頭症、鼻中隔異常、結合腎、腎形成不全および小耳症をしらべた。内臓奇形は妊娠 8 日目に多く現われたが、今回の実験例数から確実な差異は認められなかった (Table V)。

以上の結果より、担癌ラットに DBM を投与した群の胎仔は、総じて外表および骨格奇形の頻度が高いことが判明した。

TABLE V. Incidence of Internal Malformations in Normal and Tumor-bearing Rat Fetuses following DBM Administration.

Treated day	Dose (mg/kg)	Fetuses examined	Anophthalmia	Microphthalmia	Hydrocephalia	Abnormal septum nasi	Combined kidney	Renal deficiency	Microear
	Control	10							
	5 tumor alone	22							
	7 tumor alone	35							
	9 tumor alone	31							
8	500	29	10	1	4	4			
	+ T	4	3	1	1				1
9	500	40					2		
	+ T	15							
10	350	5							
	+ T	32							
	500	9						4	
	+ T	0							
11	350	26							
	+ T	5							
	500	0							
	+ T	1							
12	350	27							
	+ T	20							
	500	3							
	+ T	0							
13	500	30							
	+ T	24							

水谷ら⁴⁾は、吉田肉腫移植 Donryu 系ラットおよび Ehrlich 腹水癌移植 CF-1 系マウスの妊娠母体に Mitomycin C を投与すると、本薬物の胎仔に対する致死作用および催奇形作用を著しく軽減し、また異常の種類も減少することを認めた。その原因として彼等は、薬物が腫瘍細胞に移行するため母体血中に吸収される Mitomycin C 量が

4) 水谷正寛, 伊藤敏夫, 田中省二, 第 9 回日本先天異常学会, 京都, 講演抄録集, p. 18 (6969).

減少することによると論じている。しかしながら今回の著者らの結果では、彼等の成績とは逆に催奇形作用発現の増加が担癌体群で確かめられた。水谷らと著者らの二つの実験で、宿主は同一のラットであるが吉田肉腫と腹水肝癌 AH-130 の相違はある。この差は成績を左右するのに決定的な因子ではなかろう。一方、薬物は Mitomycin C と DBM の違いがある。これらの薬物の相違は代謝

の面から生物に作用する上に大きな差異となり得るであろう。同一悪性腫瘍細胞に対して感受性を有する種々の薬物を多く使用して比較検討することは、これらの疑問点を解明するのに役立つと思われる。同時にこれらの実験を通して、別の観点から、発生学上の新知見を得られれば意義深いものとなるだろう。

(Received Nov. 31, 1975)