

Methotrexate および Cyclophosphamide投与ラットの 臓器毒性および臨床検査値の研究

永瀬 澄香¹ 佐藤 彰一¹ 渡辺 悟² 斉藤 泰一³

¹川崎医療短期大学 臨床検査科

²川崎医科大学 薬理学教室

³川崎医療福祉大学 医療福祉学部 保健看護学科

(平成8年9月11日受理)

A Study of Organ Toxicity and Laboratory Values in Rats Treated with Methotrexate and Cyclophosphamide

Sumika NAGASE¹, Shoichi SATO¹, Satoru WATANABE²
and Taiichi SAITO³

¹Department of Medical Technology, Kawasaki College
of Allied Health Professions

²Department of Pharmacology, Kawasaki Medical School

³Department of Nursing Faculty of medical Welfare
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, Okayama 701-01, Japan
(Accepted on Sep. 11, 1996)

Key words : 制癌剤, Methotrexate, cyclophosphamide, 臨床検査値

概 要

Methotrexate (MTX) および Cyclophosphamide (CYP) を投与したラットの体重、臓器重量および臨床検査値がどのような影響を受けるか検討した。

MTX 投与群では、コントロール群 (CON) に比較して、胸腺と脾臓で重量の減少が見られた。さらに血液検査から貧血が認められた。

CYP 投与群では、まずラット体重増加の抑制が見られ、前立腺、精囊、胸腺、脾臓、腎臓および心臓の重量が有意な減少を示した。特にこれらの臓器の内、胸腺と脾臓は著しく萎縮し(約70%)強い毒性を示した。臨床検査値は、白血球数が著しく減少し、血清酵素のグルタミン酸オキザロ酢酸転移酵素、アルカリホスファターゼ、乳酸脱水素酵素およびアミラーゼ活性が有意な低下を示した。

1. はじめに

現在、癌の化学療法剤として多くの制癌剤が臨床や実験に広く用いられるようになり、さまざまな癌の治療に役立っている。しかし、今日では強力な制癌剤の使用による毒性作用が多く

経験されるようになったのも事実である。また、その作用機序については薬剤の単独使用に限らず、互いに多種併用して用いられているため、より複雑になってきている¹⁾²⁾。従って、短期間のうちに出現する毒作用だけでなく、後期毒作用の頻度やその重要性についても注目されるよ

うになってきた。

制癌剤の急性な副作用として、貧血、嘔吐、粘膜炎、脱毛症、骨髄抑制などがある。遅延性ならびに量依存性の副作用としては、肝疾患、肺疾患、心毒性があり、時として制癌剤による治療後、数年して二次性癌が発生することが知られており重要な問題になっている³⁾⁻⁵⁾。

著者らの研究においても、ある種の制癌剤投与では特定臓器の細胞増殖は抑制するが、逆に癌細胞増殖や転移に関係すると言われている Polyamine 濃度を増加させる可能性が示唆された⁶⁾⁻⁸⁾。現在我々は、癌再増殖回避のため、組織別の制癌剤選択基準の作製を目的として、種々の制癌剤について検討している。

本研究では、MTX および CYP をラットに投与して実験を行った。

Methotrexate および Cyclophosphamide は急性白血病などのさまざまな癌治療の化学療法剤として広く使用されている制癌剤である。MTX は核酸合成に必要な活性葉酸を産生させる DHFR (dihydrofolate reductase) の働きを阻止して細胞増殖を抑制する⁹⁾。

また、CYP は DNA の立体構造変化や DNA 複製を阻害し、殺癌細胞作用を示すことが知られている¹⁰⁾。

制癌剤治療をするうえでは、副作用を最小限に抑えて、いかにして標的臓器の癌を効果的に治療できるかが重要になってくる。そのためには、頻回に臨床検査(血液検査や生化学検査を含む)を行うなど、患者の状態を十分に観察する必要があり、異常が認められた場合には減量や休薬等の適切な処置が大切である¹¹⁾。

制癌剤 (MTX, CYP) 投与による各臓器重量の影響に関する研究は未検討な部分が多い。そこで、今回我々は、特に制癌剤投与ラットの7臓器を全摘出し、臓器毒性および臨床検査値にどのような影響を及ぼすか検討したので報告する。

2. 実験方法

1) 試薬

本実験には、シグマ社から購入した MTX および CYP の2種類の制癌剤を用いた。

2) 実験動物

実験には、体重140g前後の5週齢SD系雄ラットを使用した。ラットは CON 群, MTX 投与群, CYP 投与群の3群に分け、各群共に7匹ずつ用いた。

3) 薬剤投与方法

各々の制癌剤は生理食塩水で溶解し、MTX 投与群は2.5mg/kg, CYP 投与群では50mg/kgを5日間連続腹腔内注射した。CON 群には生理食塩水を投与した。

4) 臓器摘出法および採血

各群のラットは、投与前に体重測定を行い、最終投与24時間後に再度体重測定を行って、エーテル麻酔下で下大静脈を穿刺し、採血した。その後、前立腺、精囊、睪丸、胸腺、脾臓、腎臓および心臓の7臓器を全臓器摘出した。摘出した臓器はただちに湿重量を測定した。

採血した血液は、全血を血液学的検査用、遠心し血清分離したものを生化学的検査用として用いた。

5) 血液学的、生化学的検査の測定項目

血液検査では白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン (Hb), ヘマトクリット (Ht), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球血色素量 (MCH), 平均赤血球色素濃度 (MCHC) の測定を行った。

生化学検査では総蛋白 (TP, 測定法: ビウレット法), アルブミン (ALB: BCG 法), コレステロール (Cho: COD-POD 法), 尿素窒素 (BUN: ウレアーゼ UV 法), クレアチニン (CRN: Jaffe 変法), グルタミン酸オキザロ酢

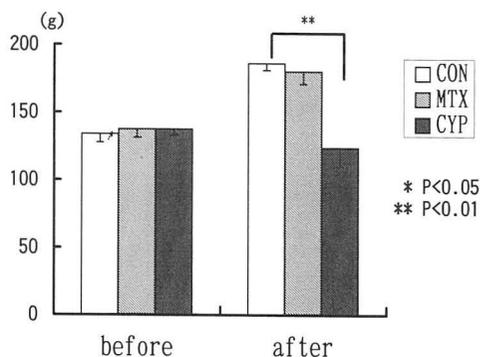


Fig. 1 Effect of Methotrexate (MTX) and Cyclophosphamide (CYP) on weight of rats.

酸転移酵素(GOT:UV法), アルカリホスファターゼ(ALP:Bessey Lowry法), 乳酸脱水素酵素(LDH:UV法), コリンエステラーゼ(ChE:p-ヒドロキシベンゾイルコリン基質法), アミラーゼ(AMY:合成基質法)について測定した。

3. 結 果

1) ラット体重および臓器湿重量について
 投与前と投与後のラット体重変化を見ると, CON群では39%, MTX群で31%の増加を示したが, 逆にCYPでは9.9%の減少を示した。CYP

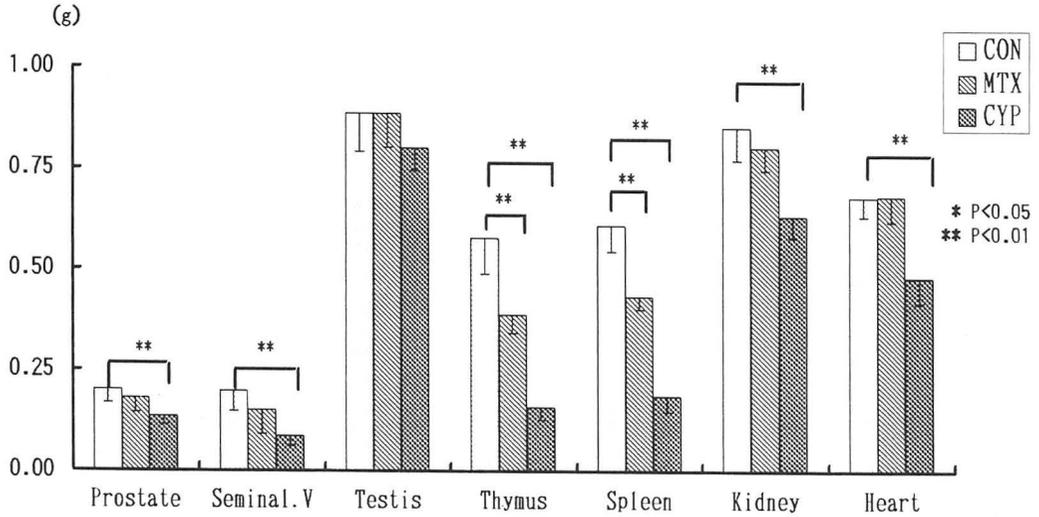


Fig. 2 The wet weight of the prostate, seminal vesicles, testis, thymus, spleen, kidney and heart in rats given MTX and CYP for 5 days.

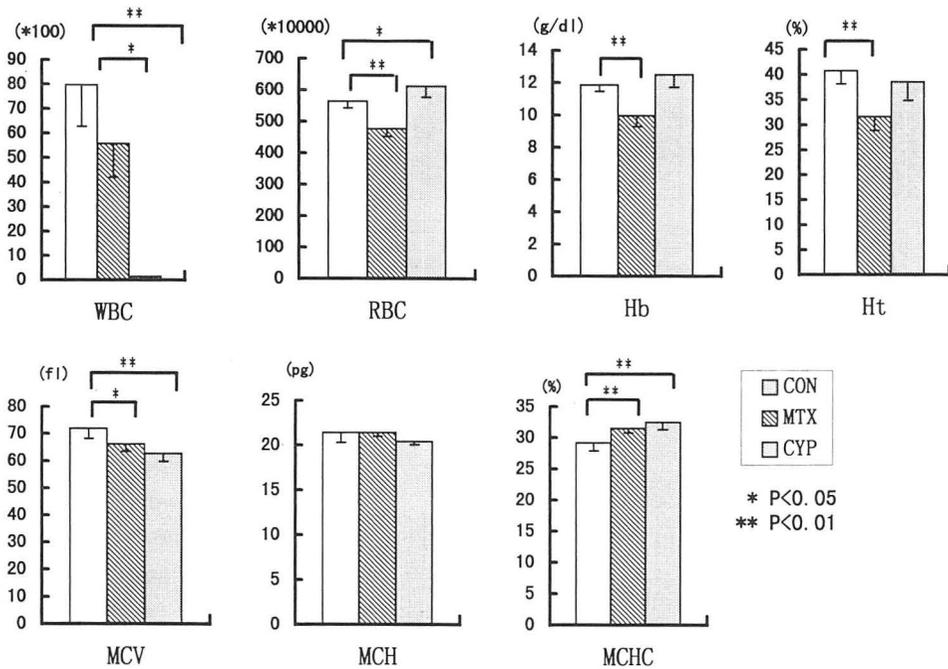


Fig. 3 Blood test in rats given MTX and CYP.

群の最終体重は CON 群に比べて33%の有意な減少 ($p < 0.01$)が見られ、体重増加を強く抑制した (Fig. 1)。

7臓器に対する薬剤の影響をみると、MTX 投与では CON 群に比較して、胸腺で26%、脾臓で21%の有意な減少 ($p < 0.01$)が見られた。CYP 投与では、前立腺33%、精囊56%、胸腺73%、脾臓70%、腎臓26%および心臓29%で有意な減少を示し、睾丸以外すべての湿重量が減少し、特に胸腺、脾臓において強い毒性を示した (Fig. 2)。

2) 臨床検査値について

血液検査では、MTX 投与群で WBC 30%、RBC 16%、Hb 16%、Ht 22%の減少を示し、平均赤血球恒数を示す MCV で8.1%、MCHC で7.9%の増加が見られた。

CYP 投与群では、特に WBC が98%減少し、RBC は8.3%増加を示した。Hb および Ht の有意な変化は認められなかった。MCV は12.8

%、MCHC では11.2%の増加が見られた (Fig. 3)。

生化学検査では、MTX 投与群においてTPの減少、A/G比の増加が認められた。その他の検査項目では有意な変化は認められなかった。CYP 投与群では、Cho で増加を示し、血清酵素の GOT で45%、ALP で52%、LDH で67%、AMY で54%の有意な減少 ($p < 0.01$)を示した。ALB、BUN、CRN については何の変化も認められなかった (Fig. 4)。

4. 考 察

ラット体重変化では、MTX および CYP の両制癌剤をそれぞれ5日間連続腹腔内投与した結果、CON 群に比べて MTX 投与群では体重増加に影響を及ぼさなかった。しかし、CYP 投与群は強く体重増加を抑制した。CYP は癌細胞の DNA 合成を阻害して増殖抑制を起こすことが判明していることから、体重増加の抑制も当

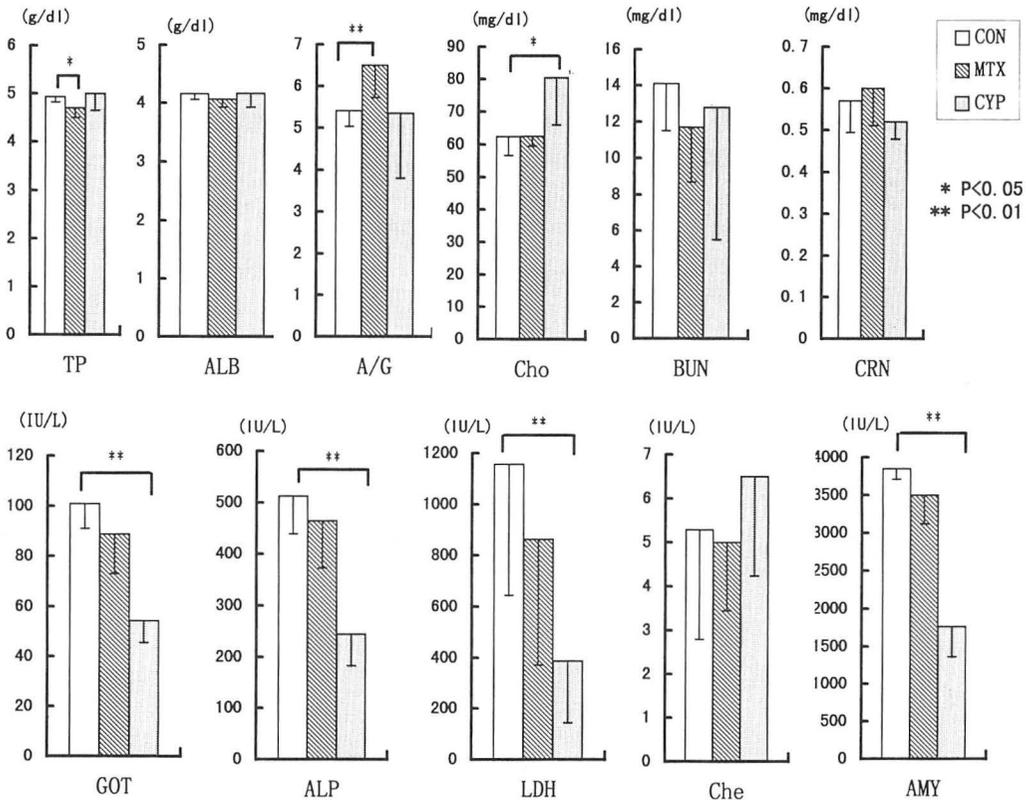


Fig. 4 Laboratory values in rats given MTX and CYP.

然起こるものと考えられる。

ラットの各臓器重量に対する制癌剤の影響を見ると、MTX 投与群は特に CON 群に比較して胸腺と脾臓では低値を示した。しかし、前立腺、精囊、辜丸などの性腺臓器には影響しなかった。

MTX 投与群の血液検査では、白血球、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット値が有意な減少を示し、貧血が認められた。このことは連続投与により、MTX の薬理作用による葉酸の欠乏が起こり骨髄の造血機能が強く障害されたものと考えられる。生化学検査においても血清蛋白が減少し、A/G 比の増加によりグロブリンの減少見られ、貧血による軽度の低蛋白を起していると思われる。腎臓における臓器重量は、CON 群に比べて変化が認められず、腎機能の指標となる BUN, CRN 値も有意な変化が見られなかった。また、酵素 GOT, LDH や ALP においても変化が認められないため、肝機能への影響はないものと思われる。

MTX については、中枢神経系に対する影響が報告されており¹²⁾、この制癌剤の長期大量投与は脳症を引き起こすなど、潜在的に危険をはらんでいる。その研究は未開発な点があり、予知試験の研究がすすめられている。我々は、制癌剤と癌の進行とともに上昇する Polyamine との関係を解明するため、現在脳についても更に細かく分類し、脳各部位（小脳、海馬など）の湿重量変化と Polyamine 量に及ぼす影響を検討している。

一方、CYP の副作用としてときに無精子症が現れることがある。CYP 投与群は、前立腺、精囊で有意な減少を示し、性腺臓器への強い毒性が示唆された。今回測定しなかったが、前立腺癌の時に増加する酸性ホスファターゼの測定も前立腺への影響をみるためには必要と思われる。その他、腎臓、心臓でも重量の減少が見られたが、生化学検査の BUN, CRN 値より腎機能の異常は認められなかった。心臓への影響の有無は、今後 GOT や LDH の測定に加えて、これらの酵素のアイソザイムを測定し確認する必要がある。

今回、特に CYP 投与群の胸腺および脾臓は萎縮し、重量が著しく低下していた。そして、

血液検査においても、白血球数が極端に減少していることから、骨髄機能の抑制を含め、細網内皮系臓器への影響が示唆され、これらの臓器に対する強い毒性が考えられる。

CYP と MTX の血液検査値を比較して見ると、特徴ある点は CYP は白血球のみ減少し、赤血球は逆にやや増加を示し、貧血の影響が認められなかったことである。渡辺ら¹¹⁾は、入院時に著しい貧血と好中球の減少が見られた LGL 白血病（慢性リンパ性白血病の一つ）の患者に少量の CYP を投与し、LGL 白血病細胞の減少後、休薬すると貧血および好中球減少の改善が見られた症例を報告している。今回の実験で、CYP が白血球数を特異的に減少させていることから、CYP の投与量と投与期間をうまく治療に応用すれば、白血病の治療時にしばしば問題となる制癌剤の副作用による貧血を軽減できる可能性が考えられ、大変興味深い。

生化学検査では、CYP 投与群でコレステロール値が有意に増加を示している。コレステロールの上昇は肝での代謝排泄障害あるいはフィードバックの調節障害により、脂質合成が亢進するためとも考えられ、制癌剤がこれらの調節機能に何らかの影響を与えているものと思われる。

また、GOT, ALP, LDH の各酵素が著明に減少していることから、CYP の強い細胞毒性が示唆され、酵素合成障害をひき起こしていると考えられる。CYP は肝で代謝され、活性代謝物を生じ、さらに細胞崩壊を受けやすい細胞では、ともに強い毒性をもつホスホラミドマスタードやアクロレインの代謝物を生成すると言われて¹³⁾いる。CYP の代謝物のどれが治療効果や毒性の主成分になっているのかは明確になっていないが、アクロレインは酵素の賦活剤となる SH 化合物と反応する。従って、アクロレインによる SH 化合物の障害も酵素活性低下の一因になっていると考えられる。

これらの CYP の代謝物が毒性を示し、肝臓をはじめ、各臓器に影響を及ぼしている可能性があると考えられる。ただし、今回肝臓は全臓器摘出をしていないため、臓器毒性を考えるためには肝を全摘出し、臓器重量を比較検討する必要がある。

酵素類の中でも、特に LDH の減少が著しか

った。LDHは多くの臓器(肝, 心, 骨格筋など)に比較的少量に含まれている普遍的酵素であり, 肝疾患, 白血病, 心筋梗塞などで高値を示す。ラット LDH 活性値はヒト血清に比べ, かなり高値を示し, 長期間安定でアイソザイムパターンも変化しにくいことから, 肝障害の程度を示す指標として, また心臓障害との区別をするためにもアイソザイムの測定が有用と考えている。

ChE 活性値は, 今回の測定ではCON 群ともに3~10IU/ℓ 範囲で低い値を示した。このことはラット ChE が系統差, 性差の他に年齢によっても影響されやすいことと, さらに酵素測定法の基質特異性がヒトと異なるためである。肝機能の指標として, ChE の測定は重要と考える。

今回我々は, 7 臓器の臓器毒性と臨床検査値について検討を行ったが, その他に脳の各部位と肺, 肝, 胃, 舌, 小腸および大腸などを含めて, 今後さらに臓器中 Polyamine 濃度を測定し, 各臓器に対する制癌剤の影響を明らかにしたいと考えている。

謝 辞

稿を終えるに当たり, 本研究にご協力いただいた臨床検査科第21期生中村裕子, 中川裕子および重川真里枝氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Malpas, J. S : The Effect of Treatment on Lymphomas and Childhood Solid Tumours. *J. Roy. Coll. Phycns*, **10**, 183, 1976.
- 2) Ernst A., et al : Fluorouracil Catabolism in the Combination Treatment of Cyclophosphamide. Methotrexate and Fluorouracil. *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 1102-1107, 1992.
- 3) Gonzalez, F., Trujillo, J. M. and Alexanian, R. : Acute Leukemia in Multiple Myeloma. *Ann. intern. Med.*, **86**, 440-443, 1977.
- 4) Li, F. P., Cassady, J. R. and Jaffe, N. : Risk of Second Tumours in Survivors of Childhood Cancer. *Cancer*, **35**, 1230-1235, 1975.
- 5) R. M. Bremnes, et al : Acute Hepatotoxicity after High-Dose Methotrexate Administration to Rats. *Pharmacology & Toxicology*, **69**, 132-139, 1991.
- 6) Satoru Watanabe, Shoichi Sato, Sumika Nagase, Taiichi Saito : A Novel Note on the Effect of Ara-C on the Polyamine Content of the Male Accessory organs of the Rat. *Biochemical Pharmacology*, **44**, 593-596, 1992.
- 7) Satoru Watanabe, Shoichi Sato, Sumika Nagase, Taiichi Saito : Polyamine Increase in Rat Tissues Treated with 1-β-D-arabinosylcytosine and 5-Fluorouracil. *Anti-Cancer Drugs*, **4**, 345-350, 1993.
- 8) Satoru Watanabe, Shoichi Sato, Sumika Nagase, Taiichi Saito : Therapeutic Significance of the Polyamine Level in Tissues of rats Treated with Adriamycin and Cisplatin. *Anti-Cancer Drugs*, **7**, 114-120, 1996.
- 9) Hemant Takle, et al : Conformational Analysis of Methotrexate. **50**, 233-243, 1985.
- 10) M. S. Poblador, et al : The Effects of Cyclophosphamide on the Gonadotrophic Cell of the Normal rat. **5**, 173-180, 1990.
- 11) 渡辺滋夫他 : シクロホスファミドの少量投与により貧血及び好中球減少の改善をみた LGL 白血病の1例. 徳島市民病院医学雑誌, **8**, 45-48, 1994.
- 12) Judith J. Ochs, M. D. : Neurotoxicity Due to Central Nervous System Therapy for Childhood Leukemia. *The American. J. Pediatric Hematology/Oncology*, **11**, 93-105, 1989.
- 13) J. M. Patel : Metabolism and Pulmonary Toxicity of Cyclophosphamide. *Pharmac. Ther.*, **47**, 137-146, 1990.