

悪性胚細胞腫瘍に用いられる抗癌剤の卵巣毒性に関する研究

富山医科薬科大学医学部産科婦人科学教室

脇 博樹 伏木 弘 泉 陸一

Study on Ovarian Toxicity of Chemotherapeutic Agents
Applied to Malignant Germ Cell Tumors

Hiroki WAKI, Hiroshi FUSHIKI and Rikuichi IZUMI

*Department of Obstetrics and Gynecology,**Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama*

概要 卵巣悪性胚細胞腫瘍の癌化学療法に用いられている多剤併用療法を構成している各種抗癌剤の単剤ならびに多剤併用時の卵巣障害に関する基礎的検討を行った。

原始卵胞に対する毒性については、10週齢マウスの抗癌剤投与前に摘出した一側卵巣と投与後に摘出した他側卵巣について算出した原始卵胞数の遺残率を検討した。単剤では、1/5LD₅₀の1回投与を行ったところ、peplomycin (PLM), cyclophosphamide (CPM), cisplatin (CDDP)で有意な低下を、actinomycin D (ACD)で低下傾向を認め、vincristine (VCR), vinblastine (VLB), etoposide (VP-16)では有意な差を認めなかった。多剤併用では、臨床常用量を体重当たりに換算して投与した。6回投与では、PVP療法、PEP療法はVAC療法に比較し有意に原始卵胞の遺残率が高かった。

顆粒膜細胞に対する毒性については、過排卵刺激した3週齢ラットより顆粒膜細胞を採取し、MTT assayを用いて検討した。単剤で障害性が明らかになったのは、VP-16, CPM, ACD, CDDPであり、VLB, VCR, bleomycin (BLM), PLMは明らかでなかった。多剤併用では、PVP療法は、PEP療法、VAC療法に比較し有意に障害性が弱かった。

抗癌剤投与後の排卵能力については、10週齢マウスを用いて、PLM1/5LD₅₀投与後10週、20週の時点で過排卵刺激による排卵卵子数を求め検討した。排卵卵子数は、10週後、20週後とともに対照とした生食群の約20%に減少した。

以上より、若年女性の卵巣悪性胚細胞腫瘍に対して、癌化学療法を行う場合のregimenの選択は、妊孕性温存の点からは、VAC療法に比較し、PVP(B)療法又はPEP療法の方が望ましいことが示唆された。しかし、この場合PEP療法は顆粒膜細胞に対する障害が強いことに留意する必要があると思われた。

Synopsis The toxic effect of anti-cancer agents on ovarian functions was investigated.

The toxic effect on primordial follicles was estimated by microscopical counting of preserved oocytes after a single dose of 1/5LD₅₀ of each agent or a combination regimen weekly, 6 weeks for mice. The rate of preservation of oocytes was significantly low for peplomycin (PLM), cyclophosphamide (CPM) and cisplatin (CDDP), but not for actinomycin D (ACD), vincristine (VCR), vinblastine (VLB) or etoposide (VP-16). The rate after a combination regimen was significantly lower for VAC than for PVP or PEP.

The toxic effect on granulosa cells from immature rats was estimated by MTT assay following after co-incubation with each of the agents or a combination regimen. Significant toxicity was demonstrated for VP-16, CPM, ACD and CDDP but not for VLB, VCR, bleomycin (BLM) or PLM. It was more intense for PEP and VAC than for PVB.

The toxic effect of PLM1/5LD₅₀ on ovulation capacity was estimated. At 10 and 20 weeks after the administration of PLM to 10-week mice, the numbers of oocytes ovulated by superinduction with PMS had decreased 80% compared with control animals.

Among the combination regimens for malignant germ cell tumors, PVP (B) and PEP are the less

toxic regimen with respect to the preservation of ovarian functions and fecundity.

Key words: Ovarian toxicity • Malignant germ cell tumor • Chemotherapeutic agents • Granulosa cells • MTT assay

緒 言

若年女性に多く発生する卵巣悪性胚細胞腫瘍は、これまでは極めて予後不良の疾患であった¹⁾。しかし、近年 VAC 療法²⁾、PVB 療法³⁾、BEP 療法⁴⁾ など癌化学療法の進歩により、これまでは期待できなかった長期生存あるいは完全治癒症例が次第に増加してきている⁵⁾。ヒトでは、出生時数十万個あるとされる原始卵胞は⁶⁾、新生されることなく、減少の一途をたどるとされ、抗癌剤投与により原始卵胞の破壊が促進され⁷⁾、すべて消失すると患者自身の卵細胞による妊娠は不可能となる。今日、quality of life (QOL) の観点からこの妊孕性の温存の問題が重要となってきた。

しかしながら抗癌剤の卵巣障害については、いまだ研究が乏しく、不明な点が多いのが現状である。特に多剤併用時の卵巣障害に関する報告はなく、このことを明らかにすることの意義は極めて大きい。

今回著者らは、卵巣悪性胚細胞腫瘍の癌化学療法に用いられる VAC 療法、PVP (B) 療法、PEP 療法を構成する各種抗癌剤の単剤投与ならびに上記の 3 剤投与における卵巣障害に関する検討を以下のごとく行い基礎的知見を得たので報告する。

研究方法

1. 抗癌剤のマウス原始卵胞に対する毒性の検討

1) マウス卵巣における原始卵胞数の測定とその左右差の検討

12匹の ICR マウスの左右卵巣を摘出、10%ホルマリン液で固定、パラフィン包埋し、厚さ 5μ で連続切片を作成し、20切片ごとにマウントして HE 染色した。卵巣内の原始卵胞数は、各卵巣ごとに、染色した全切片内の Pedersen and Peters⁸⁾ の基準による小卵細胞数で表現した。左右卵巣の原始卵胞数について Pearson の相関係数を求めその有意性を検討した。

2) 抗癌剤投与による毒性の検討

前記の実験成績から、左右卵巣の原始卵胞数はほぼ同数であることが確認されたので、抗癌剤投与前に摘出した一側卵巣と抗癌剤投与後摘出した他側卵巣について、上記連続切片作成法から算出した原始卵胞数を求め遺残率を検討した。

① 単剤投与の方法

10週齢の C57BL/6 雌マウスの片側卵巣を摘出し、1週後に抗癌剤を腹腔内単回投与し、その1週後に残存卵巣を摘出した。使用した抗癌剤は、vincristine (VCR), actinomycin D (ACD), cyclophosphamide (CPM), cisplatin (CDDP), vinblastine (VLB), peplomycin (PLM), etoposide (VP-16) の 7 種類で、投与量は、マウス LD₅₀ の 1/5 とした。対照群には、生理食塩水を投与した。各群のマウスは、6~10匹を用いた。

② 多剤併用投与の方法

併用投与として、VAC (VCR+ACD+CPM) 療法、PVP (CDDP+VLB+PLM) 療法、PEP (PLM+VP-16+CDDP) 療法を行った。10週齢の C57BL/6 雌マウスの片側卵巣を摘出、1週後より腹腔内投与を開始した。投与量は、臨床に近づけるため、臨床常用量を表 1 のように定め、それを体重当たりに換算した量とした。1週間ごとの 3

表 1 VAC 療法, PVP 療法, PEP 療法のヒトにおける 1 クールの臨床常用量とマウス投与量

| | ヒトの 1 クールの 臨床常用量 | マウス投与量 (mg/20g) |
|--------|---------------------------|--------------------|
| VAC 療法 | | |
| VCR | 1.5mg/m ² | 0.0008 |
| ACD | 0.5mg/day×5 | 0.0009 |
| CPM | 6.0mg/kg/day×5 | 0.6 |
| PVP 療法 | | |
| CDDP | 50.0mg/m ² | 0.027 |
| VLB | 4.0mg/m ² ×2 | 0.0044 |
| PLM | 7.0mg/m ² /W×3 | 0.012 |
| PEP 療法 | | |
| CDDP | 50.0mg/m ² | 0.027 |
| VP-16 | 100.0mg/m ² ×2 | 0.11 |
| PLM | 7.0mg/m ² /W×3 | 0.012 |

回投与実験と6回投与実験を行った。最終投与より1週後に残存卵巣を摘出した。対照群には、生理食塩水を投与した。各群のマウスは、8~10匹を用いた。

③ 毒性の評価方法

マウスごとに抗癌剤投与後の原始卵胞の遺残率を求め、各投与群での毒性は、遺残率の平均値±標準偏差で表した。なお投与前の原始卵胞数が、平均値-標準偏差未満の場合には検討から除外した。有意差検定は、生食群との比較には Student's t-検定又は Welch's t-検定を用い、VAC療法、PVP療法、PEP療法の3群間の比較には one-way ANOVA (Scheffe's F 検定) を用いた。p<0.05を有意差ありとし、p<0.1を傾向ありとした。

2. 抗癌剤のラット顆粒膜細胞に対する毒性の検討

酵素活性法の一つである MTT assay⁹⁾¹⁰⁾を用いて毒性を検討した。

1) ラット顆粒膜細胞の採取¹¹⁾¹²⁾

3週齢の雌ウィスター系ラットに PMSG 40IU を腹腔内投与し、48時間後に両側卵巣を摘出した。摘出卵巣は、まず6.8mM EGTA 加 MEM 中で室温15分間培養、さらに5mM EGTA+0.5M sucrose 加 MEM 中で5分間培養した後、5mM EGTA 加 MEM 中に移し卵胞穿刺により顆粒膜細胞を採取した。採取された顆粒膜細胞は、MEM にて2回遠心(250g, 10分間)洗浄し、ニグロシン色素排除法により生細胞数を算定した。

2) 抗癌剤の種類とその濃度(表2)

培養液中に表2に示す8種類の抗癌剤を単剤も

しくは3剤(VAC療法、PVB療法、PEP療法)を加えて行った。なお、CPMとしては活性型の4-hydroperoxycyclophosphamide を用いた。抗癌剤の最終濃度は、臨床常用量経静脈投与時の最高血中濃度(Peak Plasma Concentration: PPC)を1.0とした場合の0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0の6段階濃度とした。

3) MTT assay

96穴平底マイクロプレートに1穴当たり 1.0×10^5 個/135 μ lの顆粒膜細胞を入れ、先に示した各種抗癌剤を最終濃度の10倍濃度で15 μ lずつ加え、37°C, 5%CO₂下で24時間連続接触培養した。なお培養液には10%FCS加MEMを用いた。培養終了4時間前に0.5%MTT溶液を各穴に10 μ lずつ加えた。培養終了時上清を100 μ lずつ吸引排除しdimethylsulfoxideを150 μ lずつ加え、生成されたMTT formazanを溶解させ、scanning multiwell spectrophotometerを用いて540nmで吸光度を測定した。以上のassayを同一薬剤同一濃度につき3穴ずつ行った。単剤では3回、3剤では2回繰り返し、コントロールとして用いた生理食塩水の吸光度に対する百分率を求め、用量反応曲線を作成した。

VAC療法、PVB療法、PEP療法の3群間の比較には、two-way ANOVA (Scheffe's F 検定) を用いた。

3. 抗癌剤投与後のマウス排卵能力に関する検討

抗癌剤としてPLMを選択し、過排卵刺激による排卵卵子数を求めた。10週齢のC57BL/6雌マウスを用いて、抗癌剤非投与群とPLM1/5LD₅₀腹腔内投与後10週、20週の時点で過排卵刺激を行った。対照として、非投与群と生理食塩水投与10週後群、20週後群の3群を用いた。各群は、それぞれ8匹とした。過排卵刺激は、PMSG 10IU、その48時間後のhCG 10IU腹腔内投与により行った。hCG投与から15時間後に卵管を摘出、実体顕微鏡下に卵管膨大部を切開し、卵子を採取しその個数を数えた。

有意差検定は、Student's t-検定により行った。

表2 MTT assay に使用した抗癌剤とそのPPC

| 抗癌剤 | PPC(μ g/ml) |
|-------|------------------|
| VCR | 0.01 |
| ACD | 0.5 |
| CPM | 3.0 |
| CDDP | 4.0 |
| VLB | 0.1 |
| BLM | 2.0 |
| VP-16 | 30.0 |
| PLM | 2.0 |

表3 抗癌剤投与後の原始卵胞遺残率(単剤投与)

| 抗癌剤 | マウス数 | 原始卵胞遺残率(%) 平均値±標準偏差 | 生食投与との比較 |
|-------|------|------------------------|----------|
| PLM | 6 | 6.0±4.8 | p<0.01 |
| CPM | 8 | 62.1±22.7 | p<0.01 |
| CDDP | 10 | 76.5±18.7 | p<0.01 |
| ACD | 7 | 80.6±22.1 | p<0.1 |
| VCR | 8 | 97.4±25.8 | N.S. |
| VLB | 6 | 100.2±20.8 | N.S. |
| VP-16 | 5 | 114.1±20.4 | N.S. |
| 生食 | 8 | 99.4±10.1 | |

結 果

1. 抗癌剤のマウス原始卵胞に対する毒性

1) マウス卵巣における原始卵胞数の左右差の検討

左右卵巣の原始卵胞数の散布を図1に示す。Pearsonの相関係数は、 $r=0.70$ であり、 $p<0.01$ で有意であった。

2) 抗癌剤投与による毒性の検討

① 単剤投与実験

実験結果を表3に示した。生食群 $99.4\pm 10.1\%$ ($n=8$)と比較し、PLM群 $6.0\pm 4.8\%$ ($n=6$)、CPM群 $62.1\pm 22.7\%$ ($n=8$)、CDDP群 $76.5\pm 18.7\%$ ($n=10$)では有意 ($p<0.01$) な低下を認め、ACD群 $80.6\pm 22.1\%$ ($n=7$)で低下傾向 ($p<0.1$) を認めた。

② 多剤併用投与実験

実験結果を図2に示した。VAC療法群、PVP療法群、PEP療法群の3者の比較では3回投与の原始卵胞遺残率はそれぞれ $65.5\pm 18.9\%$ ($n=8$)、 $83.4\pm 9.6\%$ ($n=5$)、 $76.7\pm 18.4\%$ ($n=8$)であり有意な差を認めなかったが、6回投与においてVAC療法群は $32.2\pm 18.8\%$ ($n=9$)であり、PVP療法群、PEP療法群の $50.6\pm 8.8\%$ ($n=8$)、 $52.9\pm 10.0\%$ ($n=7$)に比較し原始卵胞の有意 ($p<0.05$) な減少を認めた。PVP療法群とPEP療法群の間には有意な差を認めなかった。

また3群ともに投与回数の増加に伴い原始卵胞遺残率が減少した。

2. 抗癌剤のラット顆粒膜細胞に対する毒性

ラット顆粒膜細胞に対する各種抗癌剤の用量反

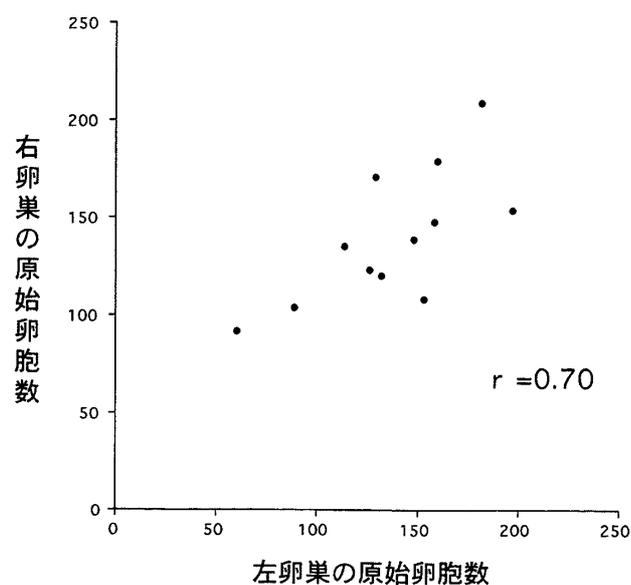


図1 左右卵巣内の原始卵胞数(ICRマウス)

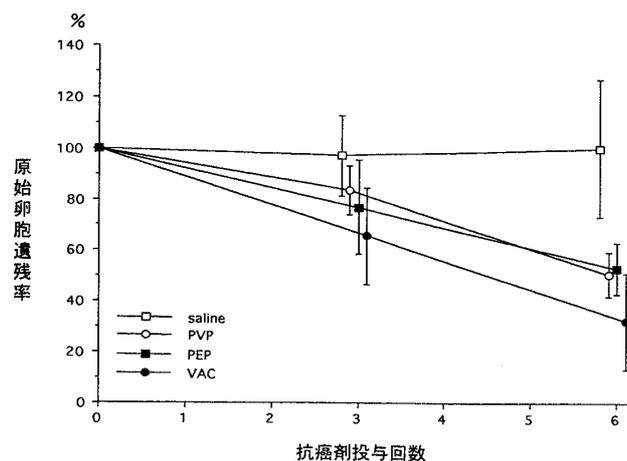


図2 VAC療法、PVP療法、PEP療法のマウス卵巣原始卵胞に対する毒性

応曲線を図3に示す。縦軸は生細胞数を表す吸光度をコントロールに対する百分率で示し、横軸は抗癌剤濃度をPPC比で示した。単剤において

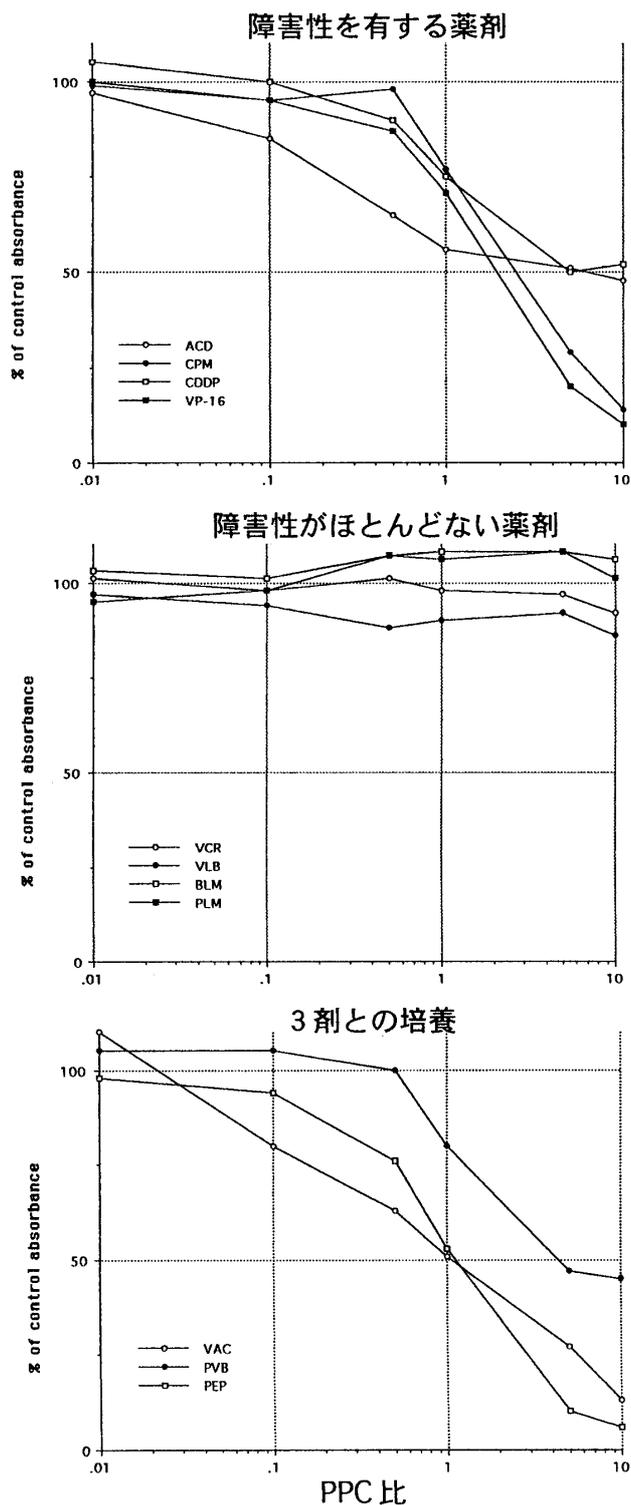


図3 ラット顆粒膜細胞に対する各種抗癌剤の毒性

PPC比1.0で障害性が明らかになったACD, CPM, CDDP, VP-16では、濃度が5.0, 10.0と上昇するに従いさらに障害性が増加した。一方、VLB, VCR, BLM, PLMは、障害性が明らかでないと判定され、濃度上昇に伴う変化もみられな

かった。3剤との培養では、濃度上昇に従いさらに障害性が増加した。VAC療法, PVB療法, PEP療法の3群間の比較では、PEP療法, VAC療法はPVB療法に比較し $p < 0.01$ で有意に障害性が強かった。

3. 抗癌剤投与後の排卵能力の検討

表4に示すごとく、抗癌剤投与群は、生食群に比し10週後、20週後でも有意($p < 0.01$)な減少を示した。また抗癌剤投与10週後では8匹中3匹が、抗癌剤投与20週後では8匹中6匹が無排卵となった。

考 案

抗癌剤のマウス原始卵胞に対する毒性の検討は、個々のマウスの抗癌剤投与後の原始卵胞の遺残率によって評価する方法を用いた。マウス卵巣の原始卵胞数は、個体差が著しいが、左右卵巣間では有意に相関しており、この方法はより妥当と考えられる。今までこのような実験方法はみられないので今回の成績はより信頼性が高いものと思われる。

今回著者らは、マウス腹腔内に多剤併用投与を行い、各療法間の差を検討した。多剤併用投与の6回投与実験の結果より、VAC療法は、PVP療法, PEP療法に比し明らかに原始卵胞に対する毒性が強かった。治療効果の点から現在主流となっているのはPVP(B)療法, PEP療法であるが、原始卵胞に対する毒性の点からもPVP(B)療法, PEP療法が好ましいと考えられた。また、各併用投与ともに、投与回数が3回、6回と増えるに従い卵胞毒性を増したのは、臨床において、進行癌に対する癌化学療法の施行回数増加に伴い原始卵胞に対する障害を増す危険性を示唆していると考えられる。単剤投与実験の結果より、 $1/5LD_{50}$ を投与した場合、原始卵胞に対し明らかに障害性を有するものはPLM, CPM, CDDPであり、障害性を有する傾向を認めたものはACDであり、VCR, VLB, VP-16では証明できなかった。滝沢ら¹³⁾もヒトに対する潜在的卵巣毒性を1回常用投与量に対する小卵細胞の50%破壊投与量の倍率で評価したところ、VAC療法, PEP療法, PVP療法に用いられる7剤のうち検討されなかったVCRを除く

表4 PLM投与後の排卵卵子数

| | 非投与群 | 投与10週後群 | | 投与20週後群 | |
|-----|-------|---------|-------|---------|-------|
| | | PLM群 | 生食群 | PLM群 | 生食群 |
| 平均 | 18.5 | 3.6* | 19.4 | 3.3* | 15.4 |
| 範囲 | 10~38 | 0~17 | 12~27 | 0~15 | 10~24 |
| 無排卵 | 0/8 | 3/8 | 0/8 | 6/8 | 0/8 |

*p<0.01

6剤についてCPM, CDDPは毒性が強く, PLMは中間的, ACD, VLB, VP-16は弱かったと報告している。

顆粒膜細胞に対する毒性実験においては, 発育卵胞内の顆粒膜細胞を対象とした。本成績は必ずしもすべての段階の顆粒膜細胞に共通しているとはいえないが, 顆粒膜細胞が強く障害されれば, 以後の卵胞の存続や発育が二次的に強く障害されるものと推定される。多剤併用療法の実験結果より, PEP療法はPVB療法に比し顆粒膜細胞に対する毒性が強いことが示された。多剤併用療法はいずれも濃度上昇に伴って障害性を増したことから, 臨床的に抗癌剤の大量投与が行われた場合に顆粒膜細胞に対する障害を増す危険性を示唆していると考えられた。なお多剤療法における各薬剤の毒性の増強効果を検討したところ, 明らかな相乗効果はみられなかった。Ataya et al.¹⁴⁾はCPMで, Teaff et al.¹⁵⁾はVLBでラット顆粒膜細胞に対する障害性を報告しているが, 今回のように多数の抗癌剤についての報告はみられない。

抗癌剤投与マウスの排卵能力の検討成績より, 遺残原始卵胞が著しく減少した場合には排卵能も減少することが示された。また抗癌剤投与後10週では8匹中3匹が, 20週後では8匹中6匹が無排卵となったことより, 抗癌剤投与による原始卵胞の著しい減少は, premature ovarian failureの危険因子となる可能性が示唆された。

今回の結果をそのままヒトにあてはめることは妥当ではないが, 若年女性の卵巣悪性胚細胞腫瘍に対し, 癌化学療法を行う場合のregimenの選択は, 妊孕性温存の点からは, VAC療法に比較し, PVP(B)療法又はPEP療法の方が望ましいことが示唆された。しかし, この場合PEP療法は顆粒

膜細胞に対する障害が強いことに留意する必要があると思われる。また, 妊孕性温存の立場からすると, 原始卵胞は投与回数に伴って障害も増大することが示されたこと, さらには排卵誘発実験の成績より癌化学療法後の原始卵胞数の減少はpre-mature ovarian failureの危険因子となる可能性が示唆されたことより, 抗腫瘍効果を最優先に考慮すべきではあるが, 臨床での投与回数の設定は, 慎重を要するものと思われる。しかしながら以上の基礎的検討成績を臨床に適用するには, 今後多くの臨床的成績の集積と検討が必要であることを重ねて指摘しておきたい。

文 献

1. 加藤 俊. 全国卵巣悪性腫瘍調査成績第1報. 日本産科婦人科学会卵巣腫瘍登録委員会, 1982
2. Slayton RE, Park RC, Silverberg SG, Shingleton H, Creasman WT, Blessing JA. Vincristine, dactinomycin, and cyclophosphamide in the treatment of malignant germ cell tumors of the ovary. A gynecologic oncology group study (A final report). Cancer 1985; 56: 243-248
3. Einhorn LH, Donohue J. Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. Ann Intern Med 1977; 87: 293-298
4. Williams SD, Blessing JA, Moore DH, Homesley HD, Adcock L. Cisplatin, vinblastine, and bleomycin in advanced and recurrent ovarian germ-cell tumors. A trial of the gynecologic oncology group. Ann Intern Med 1989; 111: 22-27
5. 佐々木寛, 寺島芳輝. 16施設共同研究による卵巣胚細胞腫瘍の臨床像一特に新分類から見た治療成績について. 日婦病理・コルポ誌 1991; 8: 95-106
6. 武田佳彦, 滝沢 憲. 卵巣の生理と病理(1988年版) II 正常卵巣の形態, 機能および代謝 卵胞

- 期, 排卵期および黄体期の形態変化. 産科と婦人科 1988; 55: 525—528
7. *Shiromizu K, Thorgeirsson SS, Mattison DR.* Effect of cyclophosphamide on oocyte and follicle number in Sprague-Dawley rats, C57BL/6N and DBA/2N mice. *Pediatr Pharmacol* 1984; 4: 213—221
 8. *Pedersen T, Peters H.* Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 1968; 17: 555—557
 9. 作永穂高, 坂本 優, 原 譲, 佐藤博己, 島 峰雄, 根岸能之, 秋谷 清. MTT assay による制癌剤感受性試験. 婦人科悪性腫瘍化学療法研究会会誌 1988; 4: 456—465
 10. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55—63
 11. *Campbell KL.* Ovarian granulosa cells isolated with EGTA and hypertonic sucrose: Cellular integrity and function. *Biol Reprod* 1979; 21: 773—786
 12. *Clark MR.* Stimulation of progesterone and prostaglandin E accumulation by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1982; 110: 146—152
 13. 滝沢 憲, 横尾郁子, 島由美子, 稻生由紀子, 佐藤美枝子, 井口登美子, 武田佳彦. 抗癌剤の腹腔内投与によるマウス卵巣卵細胞破壊・毒性の定量的研究. 日産婦誌 1989; 41: 715—722
 14. *Ataya AJR, Ataya KM, Subramanian MG, Struck RF.* The effect of “activated” cyclophosphamide on rat granulosa cells in vitro. *Reprod Toxicol* 1988; 2: 99—103
 15. *Teaff NL, Savoy-Moore RT, Subramanian MG, Ataya KM.* Vinblastine reduces progesterone and prostaglandin E production by rat granulosa cells in vitro. *Reprod Toxicol* 1990; 4: 209—213

(No. 7845 平9・4・3 受付)