

## ホスホマイシン併用によるシスプラチン造精障害モデル

吉井 慎一<sup>1)</sup>・真鍋 文雄・友政 宏

大谷 幹伸・石川 博通・小磯 謙吉

筑波大学泌尿器科\*

<sup>1)</sup>現：人和病院泌尿器科

(平成元年10月16日受付・平成2年3月12日受理)

シスプラチンによるラットの造精障害のモデルを作製するため、ホスホマイシンを併用してシスプラチンの増量を試みた。シスプラチン5 mg/kgを2日間連続静注したグループではすべてのラットが死亡したのに対し、ホスホマイシン400 mg/kgを併用して静注したグループではすべてのラットが生存し得た。その結果、睾丸重量は有意に減少しており、組織学的にも精子細胞がまったく認められない精細管が出現した。ホスホマイシン400 mg/kgを単独で静注しても、組織学的に睾丸の変化は見られなかった。またシスプラチン5 mg/kgとホスホマイシン400 mg/kgを2日間静注して認められた造精障害は、8週目には軽減しており、この障害は可逆的であると思われた。ホスホマイシンがシスプラチンによる造精障害を抑制するかどうかについては、今回は知見は得られなかったが、今後シスプラチンを増量するにあたり有効な薬剤であると思われた。

**Key words :** シスプラチン, 造精障害, 腎障害, ホスホマイシン

薬剤による造精障害の実験は古くより行われており、サイクロフェスファマイド、マイトマイシン、アドリアマイシン等<sup>1-3)</sup>では比較的その障害は作製しやすいとされている。一方、シスプラチン(以下CDDPと略す)は現在では広く使用されている抗癌剤にもかかわらず、比較的腎障害に強いラットにおいても腎障害がdose limiting factorとなって造精障害のモデルは作製が困難である。今回我々は、シスプラチンの腎障害を軽減することが知られているホスホマイシン(以下FOMと略す)を併用し、シスプラチンの投与量を増やすとともに、その睾丸に対する影響をラットを使用して検討したので報告する。

## I 材料および方法

実験室の環境に順応した10週齢のFisher 334, 雄性ラット65匹を3組のコントロール群と10組の治療群に分けた。Fig. 1に実験計画を示すが、各groupはそれぞれ5匹で静注後4週目と8週目に屠殺した。静注は尾静脈を使用し、1回の静注量は3 ml以内になるようにした。シスプラチン投与量は1回6 mg/kgを1日の群と1回5 mg/kgを2日間の群とに分けた。またシスプラチン投与時に400 mg/kgのFOM投与群を設けた。コントロールとして生理食塩水投与群と

FOM 400 mg/kg 単独投与群を設けた。エーテル麻酔下に大動脈より採血し、血清の総蛋白量, BUN, CRE, NAGを測定したのち、ただちに10%ホルマリン液に固定, paraffin 包埋にて切片を作製した。染色

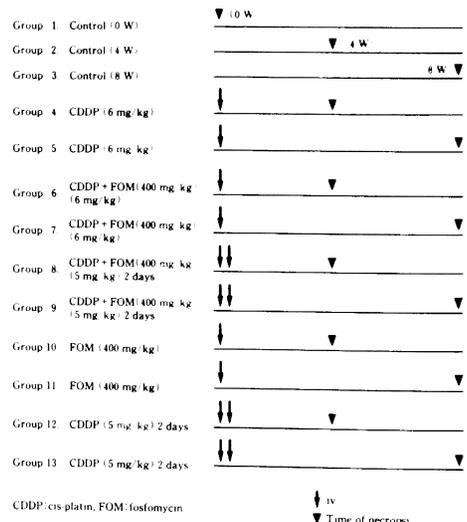


Fig. 1. Experimental design

Table 1. Testicular weight in each group

Group (4 W)	Testis BW ( $\times 10^{-5}$ )		Group (8 W)	Testis/BW ( $\times 10^{-5}$ )	
	Rt	Lt		Rt	Lt
Group 2 (Control)	464.2 ( $\pm 17.655$ )	477.2 ( $\pm 23.784$ )	Group 3 (Control)	445.0 ( $\pm 8.485$ )	453.0 ( $\pm 13.038$ )
Group 4	455.8 ( $\pm 20.548$ )	470.8 ( $\pm 19.575$ )	Group 5	438.0 ( $\pm 37.363$ )	465.8 ( $\pm 12.478$ )
Group 6	462.3 ( $\pm 32.346$ )	477.25 ( $\pm 27.969$ )	Group 7	454.0 ( $\pm 28.222$ )	459.6 ( $\pm 22.568$ )
Group 8	406.4* ( $\pm 33.739$ )	425.4* ( $\pm 29.997$ )	Group 9	430.6 ( $\pm 22.974$ )	443.8 ( $\pm 21.288$ )
Group 10	436.0 ( $\pm 33.129$ )	454.8 ( $\pm 23.467$ )	Group 11	418.6 ( $\pm 24.276$ )	433.8 ( $\pm 28.208$ )

Values are the mean  $\pm$  SD

\*:  $P < 0.01$  vs. group 2 (control)

Table 2. The weight of kidneys in each group

Group (4 W)	Kidnes/BW ( $\times 10^{-5}$ )		Group (8 W)	Kidnes/BW ( $\times 10^{-5}$ )	
	Rt	Lt		Rt	Lt
Group 2 (Control)	319.2 ( $\pm 10.159$ )	317.0 ( $\pm 20.408$ )	Group 3 (Control)	303.0 ( $\pm 20.893$ )	305.4 ( $\pm 16.742$ )
Group 4	286.4* ( $\pm 10.968$ )	284.2* ( $\pm 11.584$ )	Group 5	283.0 ( $\pm 31.008$ )	286.8 ( $\pm 33.387$ )
Group 6	296.75 <sup>b</sup> ( $\pm 17.988$ )	314.0 ( $\pm 10.231$ )	Group 7	292.2 ( $\pm 7.727$ )	297.4 ( $\pm 5.413$ )
Group 8	289.2* ( $\pm 14.342$ )	305.4 <sup>d</sup> ( $\pm 13.297$ )	Group 9	287.2 ( $\pm 10.710$ )	300.0 ( $\pm 18.466$ )
Group 10	326.6 ( $\pm 36.432$ )	312.8 ( $\pm 12.795$ )	Group 11	321.0 ( $\pm 9.354$ )	329.2* ( $\pm 5.541$ )

Values are the mean  $\pm$  SD

\*:  $P < 0.01$  vs. group 2 (control)

<sup>b</sup>:  $P < 0.05$  vs. group 2 (control)

<sup>c</sup>:  $P < 0.05$  vs. group 2 (control),  $P < 0.01$  vs. group 6

<sup>d</sup>:  $P < 0.05$  vs. group 4

<sup>e</sup>:  $P < 0.05$  vs. group 3 (control)

染色はヘマトキシリン-エオジン染色を用いた。

各グループの体重あたりの睾丸重量, 腎臓重量, さらに血清の T. P, BUN, CRE, NAG 値を比較検討した。また睾丸, 腎臓を病理組織学的に観察した。

## II. 実験結果

Group 1 から group 3 のコントロール群, group 4 から group 11 の治療群のラットはすべて生存し, 血清と組織標本が得られた。一方, CDDP 5 mg/kg を 2 日

間静注した group 12, 13 では、10 匹すべてが 1 週間以内に死亡した。体重であるが生存したラットは 4 週、8 週とコントロールと同様順調に増加した。

### 1. 睪丸重量 (Table 1)

静注後 4 週では、group 8 (CDDP 5 mg/kg×2, FOM 400 mg/kg×2) で体重あたりの睪丸重量比で、右  $406.4 \times 10^{-5}$ 、左  $425.5 \times 10^{-5}$  と、コントロールである group 2 の右  $462.2 \times 10^{-5}$ 、左  $477.2 \times 10^{-5}$  に比較して統計学的に有意に低下していた。(p<0.01)。しかし 8 週目においては、group 9 はコントロールである group 3 と統計学的に有意差は無かった。その他の治療群では 4 週、8 週ともコントロールと比較して有意差はなかった。

### 2. 腎臓重量 (Table 2)

体重あたりの腎臓の重量比をみると 4 週目において、右腎では group 4, 6, 8 が、左腎では group 4, 8 がコントロールに比べて有意に低下していた。8 週目において、group 11 で左腎がコントロールに比べて有意に増加していたが、他の group はすべてコントロールに比べ有意差は無かった。

### 3. 睪丸の病理組織所見

成熟した 10 週齢のラットでは、精子細胞の成熟度に違いはあっても、1 つの精細管に精祖細胞、精母細胞、精子細胞のいずれも含んでいる (Fig. 2-a)。コントロール群をみると、10 週齢、14 週齢、18 週齢、ともに大きな変化は認められず、加齢による影響は少ないと考

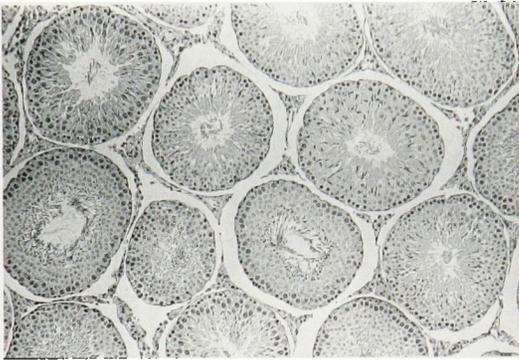


Fig. 2-a. Histologic appearance of the testis from group 2 (control, HE stain, ×100)  
There are seminiferous tubules with cells at all stages of spermatogenesis

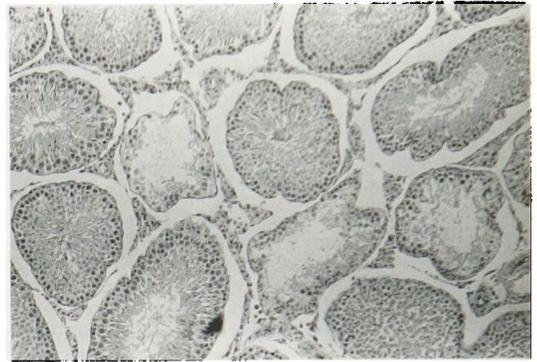


Fig. 2-b. Histologic appearance of the testis from group 8 (cis-platin 5 mg/kg×2 days, fofomycin 400 mg/kg×2 days, 4 weeks)  
There are some seminiferous tubules with hypospermatogenesis (×100)

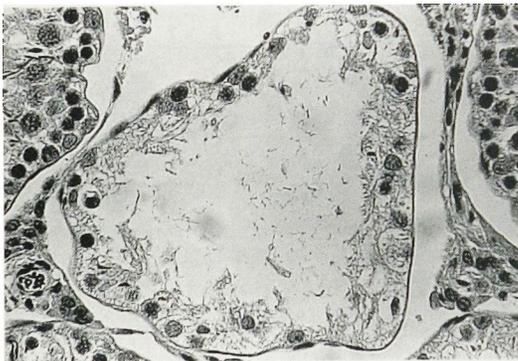


Fig. 2-c. Histologic appearance of the testis from group 8 (×400)  
There are no spermatids, and the number of spermatocytes has decreased

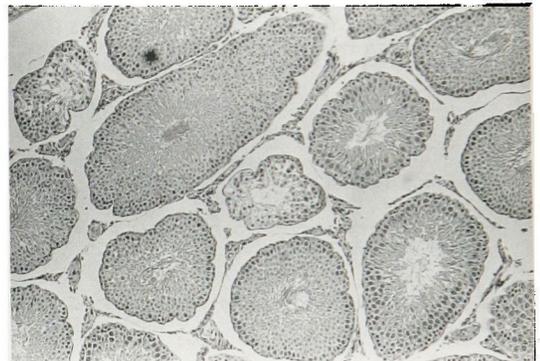


Fig. 2-d. Histologic appearance of the testis from group 9 (cis-platin 5 mg/kg×2 days, fofomycin 400 mg/kg×2 days, 8 weeks)  
Damage to seminiferous tubules has recovered 8 weeks after the treatment (×100)

Table 3. Biochemical examination of rat serum

Group (4 W)	TP (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	NAG (mg/dl)	Group (8 W)	TP (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	NAG (mg/dl)
Group 2	6.70 (±0.636)	18.68 (±1.879)	0.56 (±0.055)	18.33 (±3.826)	Group 3	6.64 (±0.336)	15.22 (±1.366)	0.54 (±0.055)	16.42 (±8.83)
Group 4	6.40 (±0.224)	19.82 (±0.773)	0.64 <sup>b</sup> (±0.055)	22.86 <sup>d</sup> (±1.544)	Group 5	6.18 <sup>a</sup> (±0.148)	22.54 (±7.990)	0.66 <sup>c</sup> (±0.089)	18.64 (±3.646)
Group 6	6.15 (±0.191)	24.25 (±11.874)	0.70 (±0.141)	23.15 (±2.515)	Group 7	6.30 (±0.216)	16.95 (±5.666)	0.50 (±0.055)	18.05 (±5.323)
Group 8	6.14 (±0.288)	20.46 (±1.352)	0.64 <sup>c</sup> (0.055)	18.00 (±3.117)	Group 9	6.26 <sup>b'</sup> (±0.055)	26.36 <sup>c'</sup> (±5.666)	0.76 <sup>f'</sup> (±0.055)	19.00 (±3.227)
Group 10	6.20 (±0.071)	14.54 <sup>a</sup> (0.568)	0.52 (0.045)	21.64 (±3.74)	Group 11	6.65 (±0.208)	23.65 <sup>d'</sup> (±1.127)	0.55 (±0.058)	14.30 (±3.271)

Values are the mean ± SD

<sup>a</sup>: P<0.01 vs. group 2 (control)

<sup>a', b', c', d'</sup>: P<0.05 vs. group 3 (control)

<sup>b, c, d</sup>: P<0.05 vs. group 2 (control)

<sup>c', d', f'</sup>: P<0.01 vs. group 3 (control)

えられた。

CDDP 6 mg/kg 投与群では、CDDP 単独投与でも、FOM 併用投与でも 4 週目、8 週目ともにすべての精細管に精子細胞が認められた。

FOM 400 mg/kg 単独投与群においても 4 週目、8 週目ともにすべての精細管に精子細胞が認められた。

CDDP 5 mg/kg, FOM 400 mg/kg の 2 日間投与群 4 週では、障害を受けた精細管がいくつかの群を作って存在していた (Fig. 2-b)。障害の程度は精細管直径の短縮と精子細胞の欠落、一部で精祖細胞のみの精細管も認めた (Fig. 2-c)。しかし障害を受けていない精細管の比率のほうがはるかに高く、副睾丸内には多くの精子が認められた。また間質の細胞には変化が認められなかった。

CDDP 5 mg/kg, FOM 400 mg/kg の 2 日間投与後 8 週では、4 週目に認められた障害を受けた精細管が減少しており、ところどころに認められる程度であった (Fig. 2-d)。

#### 4. 腎臓の病理組織所見

すべての group において糸球体の変化はほとんど認められず、また CDDP の腎障害に特徴的といわれる尿細管上皮細胞の壊死等は認められなかった。

#### 5. 血液生化学検査 (Table 3)

T. P は 4 週目ではいずれの治療群ともコントロールに比べて有意差は無かったが、8 週目では group 5

と group 9 においてコントロールに比べて有意に減少していた。BUN は 4 週目では group 10 がコントロールに比べ有意に減少しており、8 週目では group 9, group 11 がコントロールに比べて有意に増加していた。CRE が 4 週目では group 4, group 8 が、8 週目では group 5, group 9 がコントロールに比べて有意に増加していた。NAG は 4 週目で group 4 でコントロールに比べて有意に上昇しているが、その他の group はいずれもコントロールと比べて有意差は無かった。

### III. 考 察

CDDP の副作用は腎障害、造血障害、胃腸障害等が良く知られている<sup>4-6)</sup>。このうち臨床的にも腎障害は重要で、これにより使用量が制限されている。一方 FOM は、細胞壁合成阻害をもつ新しい系統の抗生物質である。FOM はラット肥満細胞に対する保護作用や、アミノグリコシド系抗生物質による腎ライソゾームの障害を軽減することが知られており<sup>7)</sup>、実際の臨床においてもアミノグリコシド系抗生物質の腎障害を軽減するとの報告が多い<sup>8-11)</sup>。

最近、同様の効果を期待して、CDDP 投与時に FOM を腎保護目的で使用する試みがなされており、動物実験でも臨床的にも腎障害が軽減されるとの報告がある<sup>12-14)</sup>。大谷らは、ラットに総量 10mg/kg の CDDP を投与したが、同時に FOM (1 回 300 mg/kg) を投

与すると、組織学的にも血液生化学的にも CDDP の腎毒性が軽減されたと報告している<sup>12)</sup>。今回の実験でも、CDDP 6 mg/kg を投与すると血清 CRE は 4 週、8 週後ともにコントロールに比べて有意に上昇し、また血清 NAG が 4 週後に有意に上昇しているのに対して、FOM (400 mg/kg) を同時に投与すると CRE、NAG ともにコントロールと比べて有意な上昇は認められなかった。

以前我々は、CDDP のラットの造精に対する影響を調べ、CDDP 3 mg/kg の 1 回投与では組織学的にはほとんど変化はなく、6 mg/kg の 1 回投与で成熟した精子細胞をもつ精細管が減少したものの精子細胞の消失がないことを報告した<sup>15)</sup>。本来はシスプラチン単独、低用量、頻回投与による造精障害の有無を検討する必要があるが、シスプラチンの頻回静注は技術的に困難を有する。そこで今回は FOM を併用し CDDP の投与量を増やし、CDDP による造精障害のモデル作製を試みた。その結果 CDDP 5 mg/kg を 2 日間、総投与量 10 mg/kg にてすべてのラットが死亡したのに対して、同時に FOM 400 mg/kg を投与するとすべてのラットが生存し得た。死亡したラットの剖検では、腸管、腎臓ともに血栓による血管障害を認めたが腎糸球体に大きな異常はみられなかった。FOM は腎障害だけではなく、多臓器障害に対しても保護的に働く可能性が示された。

睾丸重量は静注後 4 週目にコントロールと比べて有意に小さくなっており、組織学的にも精子細胞を欠く萎縮した精細管がいくつか隣接して存在していた。ほとんどの精細管は精子細胞まで含んでいるが、睾丸重量の減少と考え合わせると、造精障害が明らかに生じていることを思わせた。この組織学的変化は静注後 8 週には回復しており、一部で萎縮した精子細胞を含まない精細管を残すのみであること、また睾丸重量がコントロールと有意差がなくなっていることなど、可逆性の障害であることを示唆させた。しかし、これらの変化はあくまで CDDP と FOM を同時に投与したときの変化であり、FOM がシスプラチンの造精障害に対してどのように作用するかは明らかではない。FOM そのものの造精障害については、分子量の小さい物質であり十分に考えられるが、400 mg/kg の 1 回投与では睾丸重量も組織学的にも変化は生じなかった。また今回は総投与量 10 mg/kg の CDDP 単独例で病理組織が得られなかったため、FOM が CDDP の造精障害を軽減するか否かについての情報は得られなかった。

さらに、シスプラチンの造精障害が睾丸に直接作用するのか、下垂体系を介して作用するのかも詳細には

されていない。血清 FSH は、高度な造精障害がないと上昇しないとされている。また間質細胞は精細胞に比べ障害を受けにくく、今回も形態学的な障害は認められなかったものの血清テストステロン、LH の測定は FSH とともに今後施行すべきものと考えられる。

CDDP の抗腫瘍効果は、活性化された塩素が 2 つの反応基をつくり 2 本鎖 DNA に結合して、その結果 DNA 合成障害を生じることによると言われている<sup>16)</sup>。また CDDP の腎障害の機序については、プラチナの尿細管細胞内長期停滞が最終的に尿細管壊死を引き起こすと言われている<sup>17)</sup>。FOM がどのような機序で CDDP の腎障害を軽減するかについては詳細にはされていないが、アミノグリコシド同様、尿細管上皮のライソゾーム膜の安定化により薬剤の腎蓄積が抑制されることは考えられる。また睾丸への CDDP の蓄積も抑制し、造精障害を軽減する可能性も考えられる。これらについては今後さらに研究が必要である。

泌尿器科領域だけでなく他科領域の悪性腫瘍に対しても、CDDP は広く用いられている抗癌剤であり、特に若年者に使用されるときにその造精障害はしばしば問題となる。

臨床的には CDDP 投与の後、一過性に精液所見が悪化することはしばしば経験する。今後は FOM を併用することでさらに CDDP の投与量を増やし、CDDP による造精障害の程度とその可逆性の有無を検討していく必要がある。

#### 文 献

- 1) LUI R C, LA REGINA M C, HERBOLD D R, JOHNSON F E: Testicular cytotoxicity of intravenous doxorubicin in rats. *J. Urol.*, 136: 940-943, 1986
- 2) LUI R C, LA REGINA M C, HERBOLD D R, JOHNSON F E: The protective effect of warm ischemia on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Proceedings of Association for Academic Surgery*, P 84, 1985
- 3) WILKINSON P M, MAWER G E: The persistence of adriamycin in man and rats. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1: 241-247, 1974
- 4) DENTINO M E, YUM M N, RHON R T, EINHORN L H, LUFT F C: The long-term effect of cis-platinum diammine dichloride (CPDD) on renal function in man. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 18: 116, 1977
- 5) 新島端夫: 新抗癌剤 cis-Diamminedichloroplatinum (II) の Phase I study. *癌と化学療法* 9: 38-45, 1982
- 6) LIPPMAN A L, HELSON C, HELSON L, KLANKOFF I H: Clinical trials of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) on the allograft reaction in mice. *Cancer Chemother. Rep.* 57: 191-200, 1973

- 7) MORIN J P, BENDIRDJIAN J P, FILLASTRE J P: Interference of fosfomycin with lysosomal membrane integrity of rat kidney cells. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 4: 63~66, 1978
- 8) BERTELLI A, GIOVANNINI L, PAPARELLI A: Reduced gentamycin nephrotoxicity by fosfomycin association. *Future Trends Chemother.* 4: 429~432, 1981
- 9) NEUMAN M: Compararive study of the renal toxicity of amikacin alone and combined with fosformycin. *Int. J. Clin. Pharmacl. Res.* 11: 9~20, 1982
- 10) INOUE S, NIZATO T, TAKEDA U: Protective effect of fosfomycin on the experimental nephrotoxicity induced by dibekacin. *J. Pharm. Dyn.* 5: 659~669, 1982
- 11) INOUE S, NIZATO T, KOMIYA I: Mode of protective action of fosfomycin against dibekacin-induced nephrotoxicity in dehydrated rats. *J. Pharm. Dyn.* 5: 941~950, 1982
- 12) 大谷 巖, 他: Cisplatin の毒性に対する fosfomycin の軽減効果に関する実験的研究。癌と化学療法 11: 2400~2407, 1984
- 13) 暮部 勝, 他: Cisplatin の腎毒性に関する fosfomycin の予防効果。Jap. J. Antibiotics. 38: 62~68, 1985
- 14) 岡村州博, 他: 婦人科癌患者への cisplatin 投与及びホスホマイシン同時併用時における尿中 N-アセチル  $\beta$  D-グルコサミニダーゼ (NAG) の変動。臨産科 39: 345~348, 1985
- 15) 吉井慎一, 他: ラットの造精に対するシスプラチンの影響。日本好誌 33: 778~780, 1988
- 16) 加藤 俊, 他: シスプラチン(その臨床応用), 1: 5, 協和企画通信, 1983
- 17) PERA M F, ZOOK Jr: B C, HARDER H C: Effects of mannitol or furosemide diuresis on nephrotoxicity and physiological disposition of cisdichloro-diammineplatinum-(II) in rats. *Cancer Res.* 39: 1269~1278, 1979

## TESTICULAR CYTOTOXICITY OF INTRAVENOUS CIS-PLATIN IN COMBINATION WITH FOSFOMYCIN IN RATS

SHIN-ICHI YOSHII, FUMIO MANABE, HIROSHI TOMOMASA,  
MIKINOBU OTANI, HIROMICHI ISHIKAWA and KENKICHI KOISO

Department of Urology, School of Medicine, Tsukuba University, Ibaraki 305, Japan

In an animal model we assessed testicular cytotoxicity of intravenous cis-platin (CDDP), which was combined with fosfomycin (FOM) in order to reduce renal damage. We used 10-week-old male postpubertal Fisher 334 rats, and administered CDDP (6 mg/kg, 5 mg/kg  $\times$  2 days) alone or in combination with 400 mg/kg/day of FOM.

Four and eight weeks after the last injection, the weight of testes and kidneys and the serum levels of TP, BUN, CRE and NAG were measured. Four weeks after the last injection, the weight of testes in group 8 (CDDP 5 mg/kg  $\times$  2 days, FOM 400 mg/kg/day) had significantly decreased and histologically a few seminiferous tubules without spermatids were found. All rats in groups 12 and 13 (CDDP 5 mg/kg  $\times$  2 days) died within one week.

In group 9 (CDDP 5 mg/kg  $\times$  2 days) eight weeks after the last injection, the damaged testes recovered histologically, and their weight was not significantly different from that of controls. We considered that the testicular cytotoxicity of cis-platin was slight and reversible, and that FOM was effective in increasing the tolerable dose of cis-platin.