

イホスファミドのモルモット膀胱に対する急性毒性

斎藤俊之*・内藤 綾*・土谷弘子*

安藤克幸*・竹野 一*

平成元年5月31日受付

Acute Toxicity of Ifosfamide on the Guinea Pig Urinary Bladder

Toshiyuki SAITO*, Aya NAITO*, Hiroko TSUCHIYA*,
Katsuyuki ANDO* and Kazu TAKENO*

Ifosfamide, an anti-tumore agent, is observed to induce the urinary bladder lesion in rats and human beings. We studied the adverse effect of ifosfamide on the urinary bladder for reference to a bracken poisoning in guinea pigs.

(1) A single *ip* dose of 150 mg/Kg of ifosfamide induced the edema and hemorrhage in the urinary bladder and its surrounding tissues similar to a bracken poisoning in guinea pigs. Water content in the organ increased twice as much in 24 hours after ifosfamide. (2) Determination of vascular leakage of Evans blue showed that vascular permeability in the urinary bladder markedly increased in 4 hours, but reduced to its control level in 24 hours after ifosfamide. (3) Ligation of both ureters abolished the urinary bladder lesion by ifosfamide.

Based on these results, we discussed the mechanism of the urinary bladder lesion by ifosfamide.

緒 言

ワラビ (*Pteridium aquilinum*) を採食することによって、ウシやヒツジなどの家畜やモルモットは重篤なワラビ中毒を起すことが知られている^{7,12,18}。モルモットにおいては急性中毒症状として膀胱の浮腫・出血性的変化を起すことが報告されている^{16,23,24}。一方、ウシあるいはモルモット、ラットなどの実験小動物において、ワラビやその抽出物の長期投与によって、消化管、膀胱などに腫

瘍を発現することが報告されている^{6,8,10,11,24}。

われわれは、ワラビ地下茎より単離される各種の配糖体、Braxin A 1, A 2, B, Cのいずれもがモルモット膀胱にワラビ中毒の特徴的な急性症状である浮腫や出血性的変化を起すことから、これらの物質はいずれもワラビ中毒の原因物質であると推測している。しかし、これらの物質の毒性発現の機序については未だよく分っていない。

一方、イホスファミドは、ナイトロジェンマスタード

* 鳥取大学農学部獣医学科家畜薬理学講座

* Department of Veterinary Pharmacology, Faculty of Agriculture, Tottori University

系に属する抗癌剤であり、生体内で活性化され、抗腫瘍効果を発揮することが明らかにされている¹⁴⁾。また、イホスファミドの毒性作用についてはラットにおける実験報告^{3,4,17)}があり、ワラビ中毒におけるものとよく似た出血性膀胱炎を起すことが示されている。本研究においては、ワラビ毒の作用発現機序を理解するための対照薬として、イホスファミドのモルモット膀胱に対する急性毒性作用及びその作用発現機序について検討した。

実験材料及び方法

1. 供試動物

体重、200~250gのハートレー系モルモットを雌雄の別なく実験に供した。

2. 投与

(1) イホスファミド (塩野義製薬) (Fig. 1)

40mgずつサンプル管に分注し、真空パックして冷蔵庫に保存した。

(2) 投与量及び方法

投与は1回とし、イホスファミドを生理食塩水に溶解し(40mg/ml)、150mg/kgの用量を腹腔内に注射した。

3. 検査項目

(1) 一般観察及び剖検

薬物投与後、経時的に一般状態及び行動を観察した。

剖検は、投与24時間後にエーテル麻酔で放血殺後後に特に膀胱の浮腫・出血に注意して肉眼的に観察した。

ifosfamide

Name: (±)-3-(2-chloroethyl)-2- [(2-chloroethyl)amino] tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxide

Molecular Formula: C₇H₁₅Cl₂N₂O₂P

Molecular Weight: 261.09

Structure:

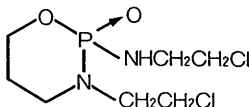


Fig. 1 The formal name and the structural formula of ifosfamide

(2) 膀胱水分含量の測定

膀胱素を含まないように注意しながら膀胱を摘出し、氷冷した生理食塩水でよく洗滌したのち濾紙で付着する水分を吸い取った。膀胱を予め重量を秤っておいたサンプル瓶に入れて湿重量を計量し、凍結乾燥後乾燥重量を計量した。水分含量は湿重量から乾燥重量を差し引いて求めた。

(3) 膀胱血管透過性の測定

この測定は、イホスファミドを投与してから4時間後と24時間後に行った。放血殺する1時間前に、ネンブタール麻酔下で2%エバンスブルー生理食塩水(20mg/kg)を耳静脈内へ注射した。放血殺後、膀胱を摘出し、HiROMURAらの方法²²⁾に準じて血管より漏出した色素を抽出、定量した(Fig. 2)。すなわち、膀胱組織を試験管に入れ、1%ヘモゾール溶液(Haemosol Inc)を1.5ml加えて高速ホモジナイザー(Polytron PT 10/35型 Kinematika)により22000rpmで1分間ホモジナイズした。次にアセトン2mlを加えて更に1分間、ホモジナイズした後、アセトンを追加して全量を10mlにして密栓した。これを-20°Cで60分間、静置した。次に2400×g、15分間の遠心分離を行い、上清を得た。

上清の色素量は、分光光度計(124型、日立ダブルビーム型分光光度計)により620nmにおける吸光度を測定し、Fig. 3に示した検量曲線より算定した。本法は従来のものより簡便で、抽出効率も満足すべきものであった。

(4) エバンスブルーの検量曲線の作成

エバンスブルーを秤量のうへ蒸留水に溶解し、0.1、

Urinary bladder	1% Haemosol homogenize 22000r.p.m.	1.5ml 2'
Homogenate	Acetone homogenize 22000r.p.m.	2.0ml 1'
	Acetone homogenize 22000r.p.m.	5.0ml 1'
Extract	make up stand centrifuge 2400×g	10.0ml -20°C 60' 15'
Supernate	Spectrophotometric assay Wave length 620nm	

Fig. 2 Dye Extraction

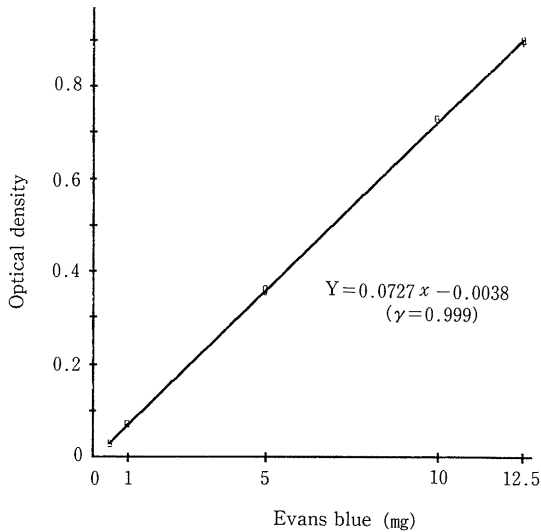


Fig. 3 Calibration curve for determination of Evans blue. Wave length 620 nm.

0.5, 1, 5, 10, 12.5 μ g/mlの各種の濃度に調整し、それぞれを分光光度計により620nmにおける吸光度を測定して検量曲線を作成した。

(5) 組織内エバンスブルー測定用試薬

- 生理食塩水
(0.9%塩化ナトリウム)
- 2%エバンスブルー生理食塩水
- 1.5%ヘモゾール溶液
- 再留したアセトン

(6) 尿管結紮によるイホスファミドの作用に関する実験

ネブタール(30mg/kg)を筋肉内注射して麻酔し、腹部皮膚を正中線に沿って皮膚及び腹膜を約4cm切開した。腸管を生理食塩水で湿らせたガーゼで保護しながら取り出して尿管を確めた後、両側共結紮した。このモルモットにイホスファミド(150mg/kg)を投与し、そして腸管を傷付けないよう注意しながら元へ戻し、鉗子で腹膜・皮膚を一緒に鉗圧固定した。そして6時間後に放血殺して膀胱を観察した。同時に膀胱を摘出して水分含量の測定に供した。対照として尿管無結紮の実験も行った。

(7) 実験成績の統計処理

平均値の差の検定はStudent t検定¹⁵⁾によった。

実験成績

1. 一般症状及び剖検所見

イホスファミド投与の10例中2例に血尿が認められ、うち1例には顕著な立毛が認められた。その他の8例には特記すべき変化は認められなかった。しかし、24時間後の剖検においては10例の全例に膀胱、膀胱索の浮腫が認められた。(Fig. 4と5)。しかも、膀胱索は著しく腫脹し、10例中4例に漿膜及び粘膜に点状出血が認められた。なお、肺、肝臓などの諸臓器及び腹腔内脂肪などには記すべき異常は認められなかった。

投与後4時間経過のモルモットにおいても膀胱及び膀胱索に軽度の浮腫があり、膀胱壁の腫脹が認められた(Table 1)。

2. 膀胱組織水分含量の変化

イホスファミド投与による膀胱組織水分含量の変化をTable 2に示した。イホスファミド投与動物の膀胱水分含量は、対照の約2倍に増加し、また乾燥重量もわずかながら増加の傾向を示した(Fig. 6)。

3. 膀胱の血管透過性のイホスファミドによる変化

イホスファミドによる浮腫の発現に直接に関与すると

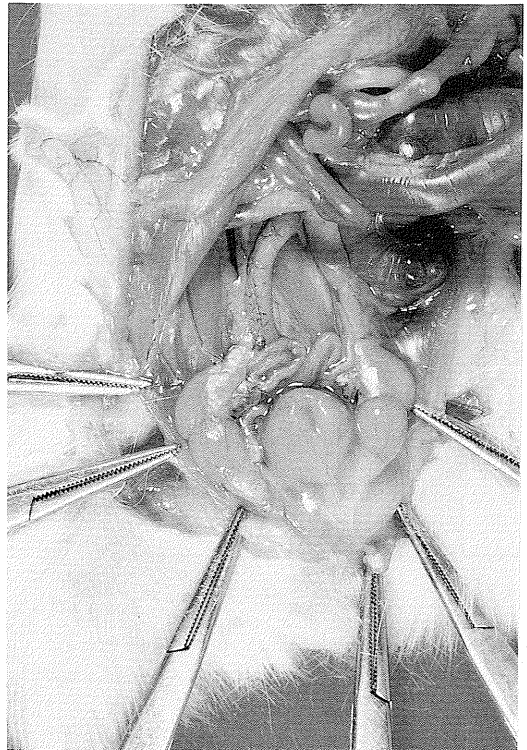


Fig. 4 Slight edematous changes in the urinary bladder and its ligaments of guinea pigs about 24 hr after *ip* ifosfamide(150mg/kg).

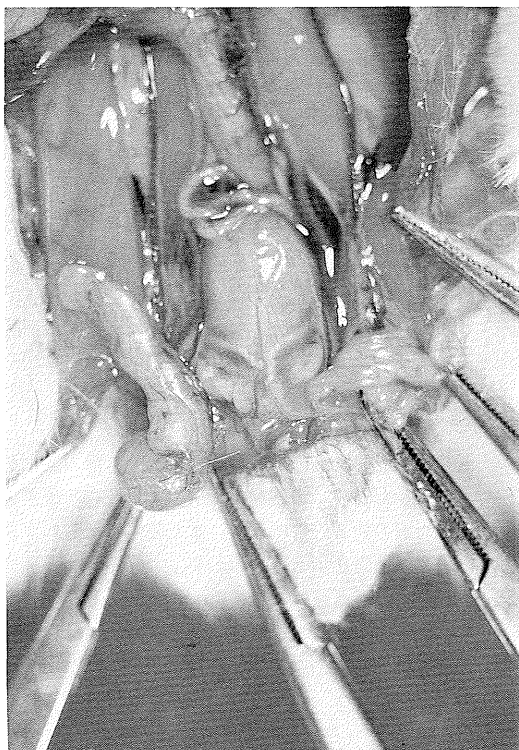


Fig. 5 Intense edematous changes in the urinary bladder and its ligaments of guinea pigs showing hematuria about 24 hr after *ip* ifosfamide (150mg/kg)

考えられる血管透過性の変化が、どのような時間経過で変化するかを色素漏出法により検討した。

イホスファミドの投与後4時間と24時間後の膀胱血管における色素漏出量を対照モルモットのそれと比較した。

対照モルモットの色素漏出量は 11 ± 4.93 mg (n=3)であるのに対して、投与後4時間の色素漏出量は $46.3 \pm$

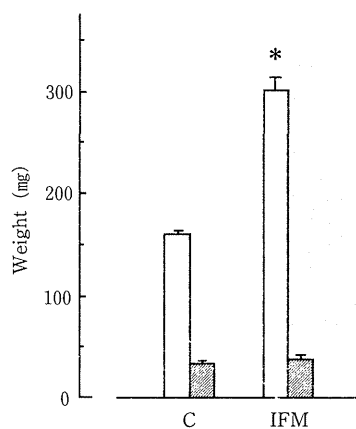


Fig.6 Changes in urinary bladder weight with ifosfamide (IFM). Open column, water content. Dotted column, dry tissue weight. Each column and bar represent the mean \pm SE (n=5). *: P<0.001

Table 1 Symptoms in guinea pigs after *ip* ifosfamide (150mg/kg)

No.	Body weight (g)	Edema in Bladder	Edema in Ligaments	Mucosal Thickening	Serosal Hemorrhage	Mucosal Hemorrhage	Hematuria
1	207	+++	+++	+++	±	±	-
2	220	+++	+++	+++	+	+	-
3	207	+++	+++	+++	+	+	-
4	234	+++	+++	+++	±	±	-
5	200	+++	+++	+++	±	±	-
6	183	+++	+++	+++	±	±	-
7	215	+++	+++	+++	±	±	-
8	208	+++	+++	+++	±	±	-
9	235	+++	+++	+++	++	+	+
10	216	+++	+++	+++	++	+	±
* 1	252	+	+	+	-	-	-
* 2	247	+	+	+	-	-	-
* 3	242	+	++	+	-	-	-

*, 4hr after drug

Table 2 Urinary bladder weight (mg) after *ip* ifosfamide (150mg/kg)

Drugs	Hr after drug		Dry weight	Wet weight	Water content	No. of exper.
Saline	24		33.28±1.43	194.58±3.62	161.3±2.95	n = 5
ifosfamide	24		38.02±12.40	342.12±12.40	304.1±10.49	n = 5
ifosfamide	6	Ligation of ureters	31.47±2.77	183.10±13.38	151.63±11.21	n = 3
ifosfamide	6	Non	37.67±3.15	285.73±22.40	248.07±19.95	n = 3

1.74mg (n = 3), 24時間後では11.83±1.74mg (n = 3)であった(Fig. 7と8), 投与後4時間では水分含量は有意に増加しているが, 24時間では有意な差はみられなかった。

なお, 投与後24時間で血尿を示した2例では膀胱色素漏出量は84, 128mgであった。

4. 尿管結紮モルモットにおけるイホスファミドの膀胱

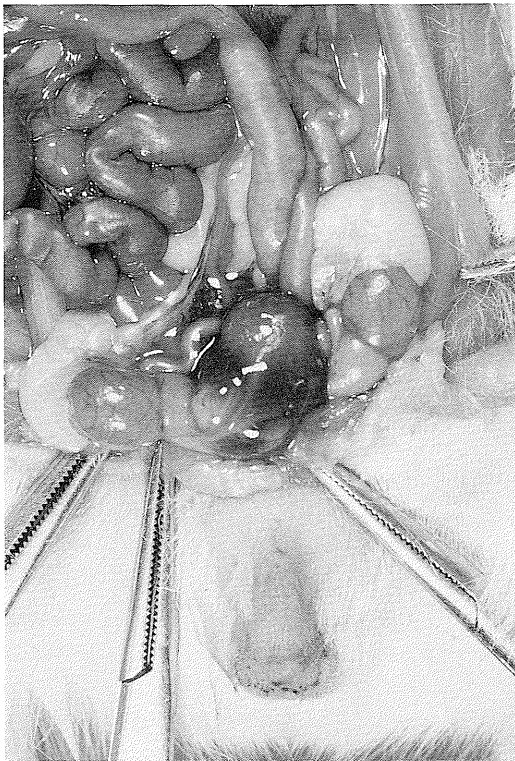


Fig. 7 The urinary bladder stained strongly with evans blue at 4 hr after *ip* ifosfamide (150 mg/kg). Evans blue was injected *iv* 1 hr before sacrifice.

への作用

イホスファミドによる膀胱への作用は, その代謝物質が膀胱粘膜側から作用することにより発現するとされている¹⁷⁾。一方, 同時に組織内血管側より作用する可能性も考えられる。本実験ではこの点を検討する目的で尿管結紮を施したモルモット及び尿管無結紮モルモットにそれぞれイホスファミドを投与し, 6時間後に剖検した。その結果, 無結紮モルモットでは膀胱及び膀胱索に浮腫が観察されるが, 尿管結紮モルモットでは膀胱及び膀胱索

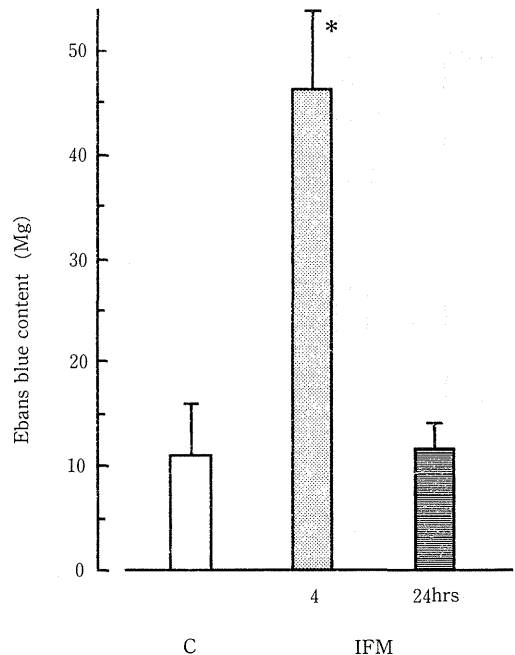


Fig.8 Effect of ifosfamide (IFM) on vascular permeability at 4 and 24 hrs after *ip* IFM. Open column, control with saline only. Dotted column, 4 hrs, hatched column, 24 hrs after IFM. Each column and bar represent the mean ± S.E. (n=3), *: P<0.05

には異常は観察されなかった。ただし、結索上部尿管および周辺に水腫がみられた (Table 3)。これらの所見と一致して、膀胱の水分含量は対照では有意に増加するが、

尿管結紮したモルモットではイホスファミドによる有意な増加は認められなくなった (Fig. 9)。

Table 3 Influence of ureter ligation on adverse effect of ifosfamide (150mg/kg) .

No.	Body weight (g)	Edema in Bladder	Edema in Ligament	Mucosal Thickening	Serosal Hemorrhage	Mucosal Hemorrhage	Hematuria
1	231	±	-	±	-	-	-
2	210	±	-	±	-	-	-
3	200	-	-	-	-	-	-
4	237	-	-	-	-	-	-
* 1	233	++	+	++	-	-	-
* 2	235	++	+	++	-	-	-
* 3	219	++	+	++	-	-	-

*, Non-ligation

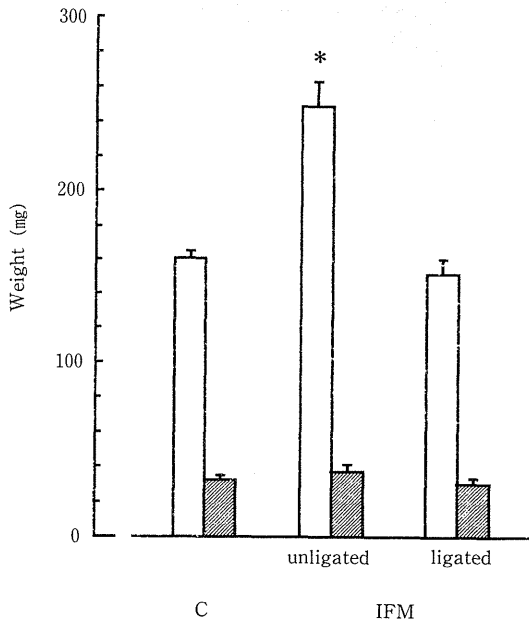


Fig.9 Changes in urinary bladder weight with ifosfamids (IMF) when ureters were ligated or not. Open column, water content. Dotted column, dry weight. Each column and bar represent the mean \pm S.E. (n=3~5). *: P<0.01.



Fig.10 Edematous and petechial hemorrhagic changes in the urinary bladder and its ligaments of rats at 24 hr after *ip* ifosfamide (150mg/kg)

考 察

イホスファミドの急性毒性作用についてはラット、イヌにおいて出血性膀胱炎が報告されている^{1,2,3,4,5,17,21})。本研究においてもイホスファミド (150mg/kg) をラット腹腔内に1回投与することによって、膀胱・膀胱索の浮腫及び漿膜面に点状の出血が認められた (Fig. 10)。膀胱における同様の病変がモルモットにおいても150mg/kgの用量で認められることから、イホスファミドはモルモットにおいても選択的に出血性膀胱炎を起こすことが確認された。一方、ワラビ毒のモルモットに対する急性毒性の特徴が、膀胱及びその周囲組織における浮腫・出血性の変化、即ち出血性膀胱炎であることが示されており^{16,21,23,24})、イホスファミドのそれと極めて類似している。

BROCKら (1981)³⁾は、イホスファミド投与による膀胱の浮腫の程度を湿重量の変化により評価している。その成績によると、投与後数時間以内に血管透過性の亢進にともなう浮腫が発現し、その変化は24時間ぐらいでピークに達する。従って本研究では、イホスファミドの投与24時間後の膀胱の湿重量を測定した。その結果、BROCKらのラットにおける成績³⁾と同様に、モルモットにおいても湿重量は対照の約1.8倍に達した。しかし、湿重量の増加分には組織水分のほかにも出血した血液成分や浸出性細胞等も含まれることが考えられるので、膀胱組織水分含量及び乾燥組織重量の測定を試みた。その結果、イホスファミド投与の膀胱組織水分含量は、対照の約2倍に増加しており、乾燥組織重量の方はわずかながら増加の傾向を示した (Fig. 6)。このことから、浮腫の変化をより定量的に評価するには湿重量よりも水分含量の方がより適切であると考えられた。

浮腫は、血液の液状成分が血管壁から組織内へ漏出して貯留する状態をいうが、この液体成分の漏出は主として血管透過性の亢進によるものとされてある。そこで、イホスファミド投与後4時間と24時間における膀胱の血管透過性を検討した (Fig. 8)。その成績によると、投与後4時間においては膀胱及び膀胱索の浮腫は軽度であるが、色素漏出量は対照の約4倍に達し、顕著な浮腫のみられる24時間後では色素漏出量は対照のそれとほぼ同じレベルを示した。これらの成績は、イホスファミドにより血管透過性は投与後4時間で著しく亢進していること、しかし24時間後では既に終息していることを示唆している。なお、尿管を示した例では24時間後でも著しい色素の漏出がみられたが、このことは血管の破綻によると考えられた。

BROCKら (1981)³⁾は、イホスファミドの選択的な膀胱毒性発現機構について次のような仮説を提起している。すなわち、膀胱内へイホスファミドを注入しても浮腫を起さないが、その代謝物であるアクロレインを注入すると顕著な浮腫を起すことから、イホスファミドの膀胱毒性はその代謝物が膀胱の粘膜面より作用することによって発現することが示唆されている。この仮説はMURAOKA (1987)¹⁷⁾のラットを用いた同様の実験により確認され、さらに尿管結紮したラットではイホスファミドによる出血性膀胱炎がみられなくなることを報告している。本研究でもモルモットにおいてこの点を確認するために尿管結紮したモルモットにイホスファミドを投与した。その結果、結紮部位上部の尿管及びその周囲組織に浮腫が認められるが、膀胱及び膀胱索には異常は認められなかった。膀胱組織水分含量も対照のモルモットのそれとほぼ同じであった。これらの成績は、イホスファミドによる出血性膀胱炎がその代謝物の膀胱粘膜面からの作用により発現するというBROCKらの仮説³⁾を支持する。

またBROCKら³⁾はイホスファミドの作用がpH依存性で、尿のpHが酸性よりもアルカリ性の場合にその毒性が強くなると述べている。ワラビの毒性においてもHOVENら (1983)¹³⁾は、ワラビによる発癌が最もアルカリ性の強い回腸末端に多発することから、ワラビの発癌物質がこの部位で強化されると推測している。さらに、イホスファミドの抗腫瘍効果はそのアルキル化作用によっている。ワラビより発癌物質として単離されたブタキロサイドの作用もアルキル化作用によることが示唆されている^{9,19)}。

以上のように、イホスファミドはモルモットにワラビ毒によるものとよく類似した出血性膀胱炎を起す。その作用機序としては、その代謝物質が膀胱の粘膜面よりの作用が主であると考えられる。

文 献

- 1) Anderson, E. E., Cobb, O. E. and Glenn, J. F.: Cyclophosphamide Hemorrhagic Cystitis. *J. Urol.*, 97 857-858 (1967)
- 2) Bellin, H. J., Cherry, J. M. and Koss, L. G.: Effects of a Single Dose of Cyclophosphamide. *Laboratory Investigation*, 30(1) 43-47 (1974)
- 3) Brock, N., Pohl, J. and Steakar, J.: Studies on the Urotoxicity of Oxazaphosphorine Cytostatics and its prevention. 1. Experimental Studies on the Urotoxicity of Alkylating Compounds. *Eur. J. Cancer*, 21 1577-1589 (1981)

- 4) Brock, N., Steaker, J., Pohl, J., Niemeyer, U. and Scheffler, G.: Acrolein, the causative factor of urotoxic side effects of Cyclophosphamide, Ifosfamide, Trofosfamide and Sufosfamide. *Arzneim. Forsch. / Drug Res.*, 29(1) 659-661 (1979)
- 5) Droller, M. J., Sara, R. and Santos, G.: Prevention of Cyclophosphamide-induced Hemorrhagic Cystitis. *Urology*, 10 256-258 (1982)
- 6) Evans, I. A., Mason, J.: Carcinogenic activity of bracken. *Nature*, 208 913-914 (1965)
- 7) Evans, W. C., Patel, M. C., Koohy, Y.: Acute bracken poisoning in hemogastric and ruminant animals. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 81B 29-64 (1982)
- 8) Evans, I. A., Prorock, J. H., et al: The carcinogenic, mutagenic and teratogenic toxicity of bracken. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 81B 65-77 (1982)
- 9) Fujimoto, M., Ogino, H. and Hirono, I.: Influence of Ptaquiloside on the development of newborn mice. *J. Toxicol. Sci.*, 12 135-145 (1987)
- 10) 広野 巖：天然発癌物質を追って。学術会報 1 37-41 (1985)
- 11) Hirono, I., Fushimi, K., Mori, H., Niwa, T., Haga, M.: Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50 5 (1973)
- 12) Hirono, I., Kono, Y., Takahashi, K., et al: Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. *Vet. Rec.*, 115 375-378 (1984)
- 13) Hoven, J. C. M., Lagerveij, W. J., Posthumus, M. A., Veldhuizen, M. A. and Holterman, H. A. J.: Aquilide A, a new mutagenic compound isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum*(L.)-Kuhn). *Carcinogenesis*, 12 1587-1590 (1983)
- 14) 伊藤 宏・三須 良実: Pharmacology. 栄光堂 (1983)
- 15) 岸根 卓郎：理論応用統計学。養賢堂 (1970)
- 16) 松川 清, 牛島 純一, 岡田雅昭, 他：モルモットにおけるワラビの急性毒性について。第74回日本獣医学会講演要旨, 173 (1972)
- 17) Muraoka, Y., Watanabe, H. et al.: Ifosfamide-induced urinary bladder lesion and its inhibition *J. Toxicol. Sci.*, 12 576 (1978)
- 18) 中村 良一：牛のワラビ中毒と慢性血尿症の研究動向と問題点(1). 畜産の研究, 34(7) 825-830 (1980)
- 19) Ojika, M., Wakamatsu, K., Niwa, H. and Yamada, K.: Ptaquiloside, a potent carcinogen isolated from bracken fern *Pteridium Aquilinum* var. *Latusculum*: Structure elucidation based on chemical and spectral evidence, and reactions with Amino acids, Nucleosides, and Nucleotides. *Tetrahedron*, 43 5261-5274(1987)
- 20) Philips, F. S., Strenberg, S. S., Cronin, A. P. and Vidal, P. M.: Cyclophosphamide and Urinary Bladder toxicity. *Cancer Res.*, 21 1577-1589 (1961)
- 21) Saito, T., Takeno, K., Kawata, J. and Urano, Y.: Isolation of Toxic Constituents from Bracken Rhizomes. V. *International Congress of Toxicology Abstract*, 61 Brighton, (1989)
- 22) Hiromura, K. and Fukushima, T.: A New Method for the Rapid Determination of Azovan Blue Leaked into the Skin. *J. Pharm. Pharmac.*, 24 837-838 (1972)
- 23) Ushijima, J., Matsuoka, K., Yuasa, A. and Okada, M.: Toxicities of bracken fern in guinea pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 45 593-620 (1983)
- 24) 牛島 純一, 大滝 清, 松川 清：ワラビの毒性因子によって急性に現われるモルモットの膀胱浮腫について。第87回日本獣医学会講演要旨, 173 (1979)