

平成10年度 厚生科学研究費補助金研究（生活安全総合研究事業）

「タモキシフェンのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験」

【目次】

	頁
要 約	1
緒 言	3
方 法	4
1. 被験物質	4
2. 使用動物	4
3. 飼料	5
4. 飲料水	5
5. 投与検体の調製	5
6. 投与方法	5
7. 試験操作・検査・測定	6
8. データの解析法	8
結 果	10
1. 一般状態	10
2. 体重	10
3. 性周期	10
4. 血中ホルモン濃度	10
5. 血液学的検査	10
6. 血液生化学的検査	11
7. 病理学的検査	11
8. 精子検査	13
考 察	14
文 献	16
Table 1～10	
Photo. 1～4	

【要約】

OECD内分泌攪乱物質検査及び評価ワーキンググループ（EDTA）の検討を踏まえて実施される国際共同バリデーションプロジェクトの一環として、タモキシフェンの28日間反復経口投与毒性試験を、「EMSG Proposal for Testing of Adequacy of an Enhanced OECD 407 Protocol」（1998年10月15日）に従って、雌雄のSprague-Dawley系[Crj:CD(SD)IGS,SPF]ラットを用いて実施した。投与量は、雌雄とも0（溶媒対照群、0.5%CMC-Na水溶液）、12.5、50および200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、1群10例で雄については28回投与の翌日に剖検した。雌については、投与期間の末期に性周期を観察し、28回以上投与後の発情休止期に剖検した。結果は以下の様に要約される。

1. 雌雄とも全投与期間を通じて、死亡ならびに一般状態の異常は認められなかった。
2. 体重は雄においては50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、雌においては200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で抑制された。
3. 性周期観察の結果、12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で性周期の延長が観察された。さらに、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群では発情期の認められない動物が観察された。
4. 血中ホルモン濃度は、雄では50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で黄体形成ホルモンならびにプロラクチンの増加とテストステロンの低下が、雌ではエストラジオールの低下と、卵胞刺激ホルモンならびにプロラクチンの増加がそれぞれ認められた。雄のプロラクチン濃度の増加は、12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においてもみられた。
5. 血液学的検査の結果には、雌の200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においてプロトロンビン時間の延長が認められた以外、雌雄ともいずれの投与群においても、被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。
6. 血液生化学的検査の結果、雄においては12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、雌においては50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、総コレステロール濃度の低下がみられた。雌においては12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、トリグリセライド濃度の低下も認められた。
雌においては、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群でアルブミン濃度、総蛋白濃度およびA/G比の低下が認められ、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においてはALP活性の有意な増加が認められた。
7. 剖検の結果、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の雄では精囊ならびに前立腺の小型化が、雌では卵巣ならびに子宮の小型化が、いずれもそれぞれ少数例で認められた。

8. 器官重量測定の結果、精巢上体重量ならびに凝固腺を含む精囊重量は 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において低下した。精囊と前立腺を合わせた副生殖腺重量は 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で有意な低下がみられたが、体重あたりの重量を求めると 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においてのみ低下が認められた。卵巣重量は 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で、子宮重量は 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、いずれも低下が認められた。
9. 病理組織検査の結果、雄では前立腺における形質細胞の浸潤が各被験物質投与群の少数例に認められた。一方、雌では卵巣の黄体数の減少が 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群でみられ、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では閉鎖卵胞および間質腺の増加も認められた。子宮は内膜上皮細胞の肥大が 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、内膜の萎縮が 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で観察され、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では子宮腺の減少、子宮内毛細血管の増加、子宮内膜上皮細胞の細胞破碎を伴う空胞化も認められた。子宮内膜上皮細胞の分裂像は 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で減少する傾向が認められた。膣は、粘液分泌期の上皮が用量依存的に増加する傾向を示し、膣内腔の好酸性の細胞破碎の程度が 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で用量に依存して増強した。さらに、膣上皮細胞の分裂像が 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で減少した。
10. 精子の運動能ならびに精巣内の精子頭部の数には変化は認められなかった。
11. 強化 TG407 プロトコールに従った今回の試験によって、既に報告されているタモキシフェンの影響を再現することが可能であった。低用量から認められた変化は、性周期の異常、血液中の脂質の変化、雌性生殖器における病理組織学的変化であった。

【緒言】

1998年10月15日、OECDの「Endocrine Disrupter Testing and Assessment」に関するワーキンググループ（EDTA）より、「OECD 化学物質試験法ガイドライン [407]げっ歯類を用いた28日間反復経口投与毒性試験 強化案（強化TG407）」が提示された。

本試験は、この改正案において新たに追加された内分泌攪乱作用に関する検査法の第1段階バリデーション試験として行うもので、「内分泌攪乱物質の健康影響に関する調査研究費（平成10年度予算）」に拠り実施した。

検討に使用したタモキシフェンは、臨床的には乳癌や子宮内膜癌の治療目的に用いられる合成非ステロイド抗エストロゲン剤^{1,2)}、ヒトやラットにおいて核内のエストロゲンレセプターでエストロゲンと拮抗的に作用することが知られているが、その作用は抗エストロゲン作用だけでなく、動物種や器官によってエストロゲン様に働くなど複雑な様相を示す。マウスにおいてはエストロゲン様作用を示すとする報告が多く認められ³⁻⁷⁾、抗エストロゲン作用はないとする報告も認められるが⁸⁾、マウスにおいても高用量のタモキシフェンは膺上皮の角化を引き起こす¹⁾。モルモットではマウスと同様にエストロゲン様作用が強いが、ハムスターはラット類似で、器官や測定手法によってエストロゲン様作用が現れたり抗エストロゲン作用が強くなったりするとされる¹⁾。ラットにおいては、膺ではタモキシフェンを単独投与した場合には上皮の角化を促進するが、エストラジオールと併用した場合にはエストラジオールによる上皮の角化を抑制するとの報告がある⁹⁾。子宮重量に関する検討や上皮に対する病理組織学的検討の結果からは、エストロゲン様作用を示唆する報告が多い^{3, 10-14)}。

一方、タモキシフェンの毒性学的作用はかなり弱く、渡辺らはラットの反復投与の結果、体重増加ならびに摂餌量の抑制、尿比重の低下、プロトロンビン時間、部分トロンボプラスチン時間の延長、雄における血小板数の低下、脂質ならびに蛋白濃度、コリンエステラーゼ活性の低下、血糖値の増加、副腎の肥大および雄では精巣、精囊ならびに前立腺の萎縮、雌では卵巣ならびに子宮の萎縮等を報告している。また、同報告においては病理組織学的変化として、雄では精子の形成障害、精細管上皮の消失、前立腺における上皮の扁平化と分泌物の減少、間質ならびに基底膜の線維化、精囊の萎縮、雌では卵巣内の成熟卵胞の増加と顆粒膜細胞の増加、黄体の減少、膺では上皮の粘液変性、子宮では萎縮、内膜の部分的扁平上皮化成、筋層の線維化が報告され、副腎では束状帯の肥厚、下垂体β細胞の萎縮、腎近位尿細管の脂肪化がみられている¹⁵⁾。

以上の様にタモキシフェンはその毒性が弱く、内分泌系に関する作用が現れることから、今回のバリデーション試験の被験物質として設定された。

【方法】

1. 被験物質

(名称) タモキシフェン

(化学名) Ethylamine, N,N-dimethyl-2-(*p*-(1,2-diphenyl-1-butenyl)phenoxy)-, (*z*)-
(CAS No.) 10540-29-1

(英名) Tamoxifen

(ロット番号) 28H1033

(純度) 99%

(分子量) 371.56

(分子式) C₂₆H₂₉N O

(保管条件) 遮光、冷蔵

2. 使用動物

(種、系統、品質) ラット、Sprague-Dawley (SD) 系 [Crj:CD (SD) IGS, SPF]

(動物の選定理由) 1) 毒性試験で一般的に用いられる動物種である。

2) 毒性試験に関する背景データがある系統である。

(生産所) 日本チャールス・リバー筑波飼育センター

(購入動物数) 雄、45匹；雌、45匹

(入荷時週齢) 雄、6週齢；雌、6週齢

(入荷時体重範囲) 雄、179.7~200.1g；雌、148.4~173.4g

(検疫並びに馴化期間) 入荷後約1週間検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間、外観および一般状態を観察して異常の認められなかった動物を使用した。

(投与開始時週齢) 雄、7週齢；雌、7週齢

(投与開始時体重範囲) 雄、235.8~271.8g；雌、180.3~206.4g

(群数) 雄、4群；雌、4群

(群分け法) 検疫終了時の測定体重をもとに体重別層化無作為抽出法により群分けした。

(動物数) 各群、雄10匹；雌10匹

(標識方法-動物) 耳パンチにより一連の個体番号を標識した。

(標識方法-飼育ケージ) 群ごとに色彩の異なったラベルを用い、試験計画番号、性別、群(投与量)、動物番号等を記入し、飼育ケージに掛けた。

(基準温湿度) 温度、23.5~24.5℃；湿度、48~66%

(換気回数) 約15回/時

(明暗サイクル) 12時間(7:00~19:00)点灯、12時間(19:00~7:00)消灯

(ケージ) 金属製金網床ケージ(220w×270d×190h)

(飼育密度) 1匹/ケージ

3. 飼料

(種類) CRF1 固型

(販売業者) 日本チャールス・リバー

(給餌方法) 自由摂取

(混入物) 使用ロットの混入物の化学分析については東京顕微鏡院で、微生物学的検査および組成分析については日本チャールス・リバーで行った結果、試験に支障をきたす可能性が考えられる混入物は認められなかった。

4. 飲料水

(種類) 水道水 (秦野市水道局給水)

(給水方法) 給水瓶により自由摂取

(混入物) 秦野研究所において定期的 (4回/年) に実施する実験動物用飲料水の水質試験成績を、水道法に基づく水質基準に従って確認した結果、試験に支障をきたす可能性が考えられる混入物は認められなかった。

5. 投与検体の調製

(調製法) 被験物質を秤量し、0.5%CMC-Na 水溶液に懸濁させた。

(保管条件) 遮光、冷蔵

(安定性、含量測定) 投与開始に先立ち、0.5%CMC-Na 水溶液懸濁液中の1週間の安定性を確認した。また、初回調製検体の被験物質含量および媒体中の均一性を測定した結果、各濃度の検体中のタモキシフェンの平均含量は、調製指示値の98.0, 97.5 および 96.5%であり、試料の各測定値のばらつきもそれぞれの平均値の98.9~101%であった。

6. 投与方法

(投与経路および方法) 胃管による強制経口投与

(投与経路選択理由) OECD ガイドラインに準じた。正確な量を投与するため、強制経口投与とした。

(投与用量、群構成、動物番号)

群	投与物質	投与用量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	投与液量 (mL/kg)	濃度 ($\text{w}/\text{v}\%$)	動物番号	
					雄	雌
溶媒対照群	0.5%CMC-Na 水溶液	0	5	0	1~10	41~50
低用量群	タモキシフェン	12.5	5	0.0025	11~20	51~60
中用量群	タモキシフェン	50	5	0.01	21~30	61~70
高用量群	タモキシフェン	200	5	0.04	31~40	71~80

(投与液量) 雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に算出した。

(投与用量設定理由) 情報検索の結果、タモキシフェンの $70\ \mu\text{g}/\text{kg}$ を 5 週間反復経口投与した場合体重増加の抑制が認められ、病理組織学的検査の結果、精子の形成抑制がみられたが、これらの変化は $7\ \mu\text{g}/\text{kg}$ では認められていない¹⁵⁾。また、雌に $25\ \mu\text{g}/\text{kg}$ を 3 日間皮下投与あるいは $250\ \mu\text{g}/\text{kg}$ を 14 日間反復筋肉内投与した場合、性周期に対する影響がみられたとする報告がある^{14, 16)}。

一方、タモキシフェンの構造類似物質であり、その薬理作用がタモキシフェンの 2.5 から 5 倍程度強いとされる idoxifen においては、 $30\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の 14 日間の経口投与で性周期に対する影響や雌の交配成績の低下、 $300\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の 9 週間の投与で精囊、前立腺の重量低下が認められている¹⁷⁾。以上の結果から、本試験におけるタモキシフェンの投与量は、28 日間の投与により確実な作用を発現する量であると推定される $200\ \mu\text{g}/\text{kg}$ を高用量に、公比 4 で減じて、中ならびに低用量として 50 ならびに $12.5\ \mu\text{g}/\text{kg}$ を設定した。

(投与回数、時刻) 1 日 1 回、1 週 7 回、毎日 9:00~12:00 に投与した。

(投与期間) 雄は 28 日間、雌は解剖の前日まで投与した。

7. 試験操作・検査・測定

(一般状態の観察) 毎日 1 回 (投与後)、全例の生死の確認を行い、一般状態を観察した。

(体重測定) 投与第 1 週では、投与第 1 日の投与直前に全例の体重を測定し、投与第 4 日にも測定を行った。第 2 週以降は毎週 2 回 (投与第 8、11、15、18、22 および 25 日) の頻度で測定した。また、投与期間終了日 (投与第 28 日) および剖検日にも体重を測定した。

(雌の性周期観察) 投与第 22 日以降剖検日まで毎日、雌全例の膣垢を採取し塗抹標本作製して性周期の確認を行なった。

(血中ホルモン濃度測定) エーテル麻酔下で、定期解剖例 (投与期間終了時屠殺剖検例)

全例の腹部大動脈から無処置乾燥注射筒を用いて採血した血液から血清を分離し、テストステロン、エストラジオール、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、プロラクチンならびにコルチコステロン濃度を測定した。測定はテストステロンならびにエストラジオールについては Diagnostic Systems Laboratories 製の、FSH、LH ならびにプロラクチンについてはアマシャムファルマシアバイオテック製の、それぞれの測定キットを用いてエンザイムイムノアッセイ法で、コルチコステロンについてはアマシャムファルマシアバイオテック製の測定キットを用いてラジオイムノアッセイ法で実施した。ただし、テストステロンの測定は、雄についてのみ行った。

(血液学的検査) 前述の血中ホルモン濃度測定のための採血に引き続き、エーテル麻酔下で、定期解剖例全例の腹部大動脈から、抗凝固剤としてクエン酸 Na を用いて採取した血液について、自動血液凝固測定装置 CA-1000(東亜医用電子)を用いて光散乱検出法によりプロトロンビン時間(PT)を測定し、次いで抗凝固剤として EDTA-2K を用いて採血した血液を用いて、以下に示す検査項目について血液学的検査を実施した。すなわち、Coulter Counter Model S-PLUS(コールターエレクトロニクス)を用いて、電気抵抗法で赤血球数(RBC)ならびに平均赤血球容積(MCV)を測定し、吸光度法によって血色素量(Hb)を求めた、また、これらの3者から計算によって、ヘマトクリット値(Ht, $RBC \times MCV \times 0.001$)、平均赤血球血色素量(MCH, $Hb \times 1000 / RBC$)、平均赤血球血色素濃度(MCHC, $Hb \times 100 / Ht$)を求めた。さらに、Coulter Counter Model S-PLUS(コールターエレクトロニクス)を用いて、電気抵抗法で白血球数(WBC)ならびに血小板数を測定した。一方、白血球分類については、血液塗抹標本を Wright-Giemsa 染色し、光学顕微鏡を用いて視算して求めた。

(血液生化学的検査) 前述の血液学的検査のための採血に引き続き、エーテル麻酔下で、腹部大動脈から、抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、血漿を分離して以下に示す検査項目について血液生化学的検査を実施した。すなわち、遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA(ロシュ)を用いて、ピウレット法で総蛋白濃度を、BCG法でアルブミン濃度を、COD・DAOS法で総コレステロール濃度を、グルコキナーゼ G6PDH法でブドウ糖濃度を、ウレアーゼ Gl.DH法で尿素窒素濃度(BUN)を、Jaff法(Rate)でクレアチニン濃度を、GSCC法でALP活性を、IFCC法でGOTならびにGPT活性を、Wroblewski-La Due法でLDH活性を、 γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法で γ -GTP活性を、GPO・DAOS法でトリグリセライド濃度を、モリブデン酸直接法で無機リン濃度(Inorg.phos.)を、OCPC法でカルシウム濃度をそれぞれ測定し、総蛋白濃度とアルブミン濃度からA/G比を計算により求めた。

また、全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)によるイオン電極法で、ナトリウム、カリウムならびに塩素の各濃度を測定した。

(病理学的検査) 投与第28日以降に生存していた雌のうち、性周期観察の結果、diestrousであると判断された例は、同日、剖検を実施した。また、5日以上持続して同一ステ

一ジの膣スミア像が観察された例は、無発情あるいは連続発情であると判断し、剖検を実施した。スミア像には変化は認められるものの、周期が一定せず、diestrousの像が認められない例では投与第33日の翌日、剖検を実施した。一方、全ての雄は投与第28日の翌日剖検した。剖検においては、主要器官・組織の肉眼的観察を実施するとともに、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精囊+前立腺、卵巣ならびに子宮（内容物を除く）の重量を測定し、精囊+前立腺については測定後、精囊と前立腺を分離し、凝固腺を含む精囊重量ならびに前立腺（腹葉）重量を個別に測定した。剖検当日の体重を基に比体重値（相対重量）を算出した。

脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、気管、気管支、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上体、前立腺（背側、腹側）、精囊、凝固腺、卵巣、卵管、子宮、子宮頸部、膣、乳腺、膀胱、坐骨神経、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓、顎下腺、舌下腺ならびに病変部を摘出して、精巣および精巣上体はブアン液で固定し（保存は70%アルコール溶液を使用した）、その他の器官・組織は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン液に固定した後、定期解剖例の溶媒対照群および高用量群では、上記の器官・組織について、組織学検査を実施した。また、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、凝固腺、副腎、腎臓、肝臓、脾臓、肺、心臓、下垂体、胃、卵巣、卵管、子宮、膣、乳腺、甲状腺および上皮小体、肺、腎臓、肝臓、脾臓および胸腺については、全例の病理組織学的検査を実施した。

- (精子検査) 雄の定期解剖例のうち5匹から、右側の精巣上体内の精子を採取して運動および数を観察した。また、右側精巣内の精子頭部を計数した。精子検査を実施した反対側の精巣および精巣上体については、病理学的検査を実施した。
- 精子運動能検査：精巣上体の尾部から精子塊を採取し、M199液（BSA添加量は1%とした）中で5～8分間培養後、精子運動能解析装置（HTM-IVOS、ハミルトン・ソーン）を用いて運動能を検査した。
- 精子数測定：精巣および精巣上体（精子運動観察に用いた残り）をホモジナイズし、その希釈液を用いて精子頭部数を計数するとともに、ホモジナイズ液1mL中の精子数を算出した。

8. データの解析法

体重ならびに定期解剖例の血液学検査、生化学検査、血中ホルモン濃度の測定値、精子数、運動精子率および器官重量は、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。次いで、Bartlettの方法により分散の一様性について検定（有意水準：5%）を行い、分散が一様である場合には一元配置型の分散分析を行い、対照群と投与群の間

に有意性が認められる（有意水準：5%）場合は、Dunnett 法により多重比較を行った。一方、分散が一樣でない場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性（有意水準：5%）が認められる場合には、Dunnett 型の検定法で多重比較を行った。但し、いずれかの群で分散が0となった場合には、Bartlett の検定は行わずに Kruskal-Wallis の順位検定を行い、その結果、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。病理組織所見では、グレード分けしたデータは Mann-Whitney のU検定により、また陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により、溶媒対照群と各被験物質投与群との間の有意差検定を行った（有意水準：5%）。