

【結果】

1. 一般状態

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

体重の測定結果を Table 1-1 および 1-2 に示す。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、それぞれ体重増加が有意に抑制された。

3. 性周期

性周期観察の結果を Table 2-1 から 2-4 に示す。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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では 10 例中 4 例で、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では 10 例中 9 例の動物で、発情期像が認められなかった。

4. 血中ホルモン濃度

血中ホルモン濃度の測定結果を Table 3-1 および 3-2 に示す。エストラジオール濃度は、雌においては 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、測定限界 (6.67 pg/mL) を下回る例数が増加したことから、この投与量では低下傾向にあるものと判断した。雄においては対照群においても測定限界を下回る例が多く、被験物質投与による変化を捉え得なかった。

黄体形成ホルモン濃度は、雄においては 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で有意に増加したが、雌においては変化は認められなかった。一方、卵胞刺激ホルモン濃度は、雌においては 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で有意に増加したが、雄においては変化はみられなかった。また、雄のテストステロン濃度は、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で有意に低下した。

プロラクチン濃度は、雄においては 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で有意に、雌においても 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、いずれも増加した。

コルチコステロン濃度は、雌雄とも群間に有意差を認めなかった。

5. 血液学的検査

血液学的検査結果を Table 4-1 および 4-2 に示す。雌雄ともいずれの投与群においても、赤血球数、血色素量、平均赤血球容積、ヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度に変化は認められず、白血球数ならびに白血球分類にも影響はみられなかった。

雌の 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においてはプロトロンビン時間の延長が認められたが、雄においては変化がみられなかった。雌雄ともいずれの投与群においても、血小板数には変化が認められなかった。

6. 血液生化学的検査

血液生化学的検査結果を Table 5-1 および 5-2 に示す。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たが、雄においてはその傾向はみられなかった。

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群でカルシウム濃度の低下が認められ、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が、雄ではいずれの項目にも変化は認められなかった。また、雌においては 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で塩素濃度の増加がみられたが、雄では認められなかった。

雄においては GOT 活性の有意な低下がみられたが、変化の方向から毒性学的意義は小さいと考えられた。

この他、ブドウ糖濃度、尿素窒素濃度、クレアチニン濃度、GPT 活性、LDH 活性、 γ -GTP 活性、無機リン濃度、ナトリウム濃度ならびにカリウム濃度には、雌雄とも変化が認められなかった。

7. 病理学的検査

1) 剖検所見

剖検所見を Table 9-1 および 9-2 に示す。雄では精囊の小型化が 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 4 例、対照群の 1 例で、前立腺の小型化が 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 3 例で観察された。その他には、肺の暗色点が対照群で、一側の腎臓の腎盂の拡張が 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で、一側の腎臓の陥凹部が 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で、それぞれ 1 例認められた。

雌では 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で卵巣の小型化が 4 例、子宮の小型化が 1 例それぞれ認められた。

2) 器官重量

器官重量の測定結果を Table 6-1 および 6-2 に、その最終体重当たりの相対重量を Table 7-1 および 7-2 に示す。雄においては 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で下垂体重量の有意な低下が認められ、雌においては 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で下垂体ならびに腎臓重量が有意に低下したが、いずれも相対重量を求めると対照群との間に差はみられなかった。

腎臓重量は雄においては差が認められなかったが、相対重量を求めると有意な増加がみられた。

雌雄とも甲状腺重量には差が認められなかった。一方、雌雄とも副腎重量には差が認められなかったが、相対重量を求めると雌雄とも 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で有意な増加が認められた。

肝臓重量は雄においては 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で、雌においては 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。相対重量を求めると、このうち雌では低下が確認されたが、雄では 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で有意な増加がみられた。

精巣重量には対照群との間に差はみられなかった。相対重量を求めると 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において有意に増加した。

精巣上体重量は 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において有意に低下したが、相対重量を求めると対照群との間に差はみられなかった。

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、相対重量を求めると 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においてのみ有意な低下がみられた。

凝固腺を含む精囊重量は 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で有意に低下した。

前立腺（腹葉）重量には対照群との間に差はみられなかった。

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、いずれも有意な低下が認められた。

3) 病理組織所見

病理組織学検査所見を Table 10-1 および 10-2 に示す。前立腺では軽微から軽度のリンパ球の浸潤が対照群を含む各群の 5 から 7 例に、形質細胞浸潤が各被験物質投与群の少数例に認められた。

雌では卵巣の黄体数の減少が 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の全例、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 4 例、12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 1 例でみられ、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群ではその変化の程度が強く、閉鎖卵胞および間質腺の増加も全例で認められた。

子宮では内膜の萎縮が 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 7 例ならびに 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 3 例で観察され、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群ではその発現頻度および変化の程度が増強し、子宮腺の減少、子宮内毛細血管の増加も認められた。内膜上皮細胞の肥大が、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の全例、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 5 例、12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 4 例ならびに対照群の 1 例に観察され、用量依存的にその発現頻度ならびに程度が増強する傾向がみられた。さらに、子宮内膜上皮細胞の分裂像が対照群では 9 例に認められるのに対し、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では 3 例、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では 2 例、12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では 4 例にのみみられ、被験物質投与群で発現頻度が減少する傾向が認められた。子宮内膜上皮細胞の細胞破砕を伴う空胞化が 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で、子宮腺上皮細胞の細胞破砕を伴う空胞化が 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で、それぞれ増加した。また、子宮内膜および子宮筋層の好酸球浸潤は、対照群に比較して 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で増強する傾向が、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では減弱傾向がそれぞれ認められた。

膣では、粘液分泌期の上皮が対照群の 2 例に対し 200 ならびに 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では各 9 例に、12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では 8 例にみられ増加する傾向を示した。膣内腔の好酸性の細胞破砕が各被験物質投与群の 8 から全例に観察され、変化の程度は容量に依存して増強する傾向を示した。さらに、膣上皮細胞の分裂像が対照群に比較して各被験物質投与群で減少し、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では上皮の角化像の発現頻度が対照群に比較して有意に増加し

た。

この他、雄の精巣、精巣上体、精嚢ならびに凝固腺、雌の卵管、子宮、子宮頸部ならびに乳腺、雌雄の脳、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、消化管、膀胱、坐骨神経、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓、顎下腺ならびに舌下腺では、被験物質投与によると考えられる所見は認められなかった。

8. 精子検査

精子検査の結果を Table 8 に示す。精子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。

精巣上体内の精子数は 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で減少したが、用量依存的な変化ではないことから被験物質投与による影響ではないと判断した。

【考察】

タモキシフェンをラットあるいはマウスに反復投与した場合の毒性については、渡辺らの報告があり¹⁵⁾、ラットでは一般状態で食べこぼしの増加、立毛、軟毛がみられ、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が認められ、血液生化学検査の結果、脂質ならびに蛋白濃度、コリンエステラーゼ活性の低下、血糖値の増加がみられている。また、剖検の結果、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、雌では卵巢ならびに子宮の萎縮がみられ、器官重量は体重の低下に伴って多くの器官で重量に変化がみられたが、体重比重量では変化の認められないものが多く、両者をあわせて考えると明確に変化の認められた器官は、副腎の重量増加、雄で精巣、精囊ならびに前立腺の重量低下、雌で子宮の重量低下であった。また、病理組織学的には、雄では精巣における精子の形成障害、精細管上皮の消失、前立腺における上皮の偏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、雌では卵巢内の成熟卵胞の増加と顆粒膜細胞の増加、黄体の減少、膣では上皮の粘液変性、子宮では萎縮、内膜の部分的偏平上皮化成、筋層の線維化が報告されている。また、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。本試験においては、これら既報の毒性試験での変化のうち、体重の増加抑制、雌におけるプロトロンビン時間の延長、総蛋白、トリグリセライド濃度の低下、雌雄の総コレステロールの低下、剖検所見における雄の精囊および前立腺の小型化、雌の卵巢および子宮の小型化、副腎の体重あたりの重量の増加、精巣上体の実重量の低下、精囊重量の低下、子宮重量の低下が認められた。病理組織学的には卵巢の黄体数の減少が認められている。

子宮重量に関する検討では、エストロゲン様作用によって増加するとの報告が多いが^{3,9-14)}、岡本らはSD系ラットにタモキシフェンを反復筋肉内投与した時、発情期像を示す日数が対照群に比較して減少し、子宮の重量は低下を示した事を報告している¹⁸⁾。一方、岡本らの報告でも卵巢摘出ラットにおいては、タモキシフェンの投与によって子宮重量が増加している。また、タモキシフェンによる子宮の肥大はエストロゲンによるそれとは形態が異なるとする報告も認められる¹⁾。一方、タモキシフェンは卵巢摘出ラットにおけるエストロゲンによるプロラクチンの分泌を阻害する作用があり^{19,20)}、血中LHレベルを低下させるとする報告もある¹⁾。雄においてはLHレベルを低下させるとする報告が認められる²¹⁾。ラットにおいてタモキシフェンはdiestrusを延長させ⁹⁾、高用量の長期投与では雌の生殖能力に影響があることが報告されている¹⁾。また、妊娠の初期にはエストロゲン依存性の着床を阻害すること²²⁾、あるいはエストラジオールの生合成阻害によって^{23,24)}、妊娠の中断を引き起こすことが、妊娠末期に投与すると低用量では分娩の遅延、高用量では分娩の促進を起こすことが報告されている¹⁾。また、雄では生殖器ならびに副生殖器重

量の低下や³⁾、性行動の障害を引き起こすことが報告されている²⁵⁾。

本試験においては、卵巣重量ならびに子宮重量の低下が認められ、卵巣の黄体数の低下、閉鎖卵胞および間質腺の増加、子宮の内膜の萎縮、子宮腺の減少、子宮内毛細血管の増加、内膜上皮細胞の肥大が認められ、子宮内膜上皮細胞の分裂像の減少傾向がみられた。また、性周期の延長が観察された。卵巣の機能は下垂体の性腺刺激ホルモンの支配下であり、性腺刺激ホルモンの分泌はエストロゲンの影響を受けている。卵胞期に分泌されたエストロゲンは、卵胞刺激ホルモンならびに黄体形成ホルモンの分泌を抑制し、排卵直前の血中エストロゲンの上昇は卵胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンの分泌を促進する。本試験における卵巣の所見は、血中卵胞刺激ホルモンの増加が認められることから、タモキシフェンの抗エストロゲン作用によって下垂体でのネガティブフィードバックが抑制されている一方で、排卵を誘発する黄体形成ホルモンの急激な上昇も抑えられたことにより、排卵ならびに黄体の形成が阻害された結果と考えられる。

この他、本試験では既報にはないものとして雄における肝臓実重量、下垂体実重量の有意な低下、腎臓および副腎の相対重量の増加、雌におけるカルシウム濃度の低下と塩素濃度の増加、肝臓実重量、下垂体実重量ならびに腎臓実重量の低下、副腎の相対重量の増加が認められたが、いずれも当研究所ならびに同系統のラットを使用している他の試験施設の背景値の変動範囲内と考えられることから、被験物質投与の影響ではないと判断した²⁶⁻³¹⁾。

「EMSG Proposal for Testing of Adequacy of an enhanced OECD 407 Protocol」(1998年10月15日)に従って実施した試験によって、既報の所見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。

【参考文献】

- 1) Furr,B.J.A., Jordan,V.C.: The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacology and Therapeutics*. 25: 127-205 (1984)
- 2) Lagha,S.S., Carter,S.K.: Antiestrogens in the treatment of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 3: 205-216 (1976)
- 3) Harper,M.J.K., Walpole,A.L.: A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 13: 101-119 (1967)
- 4) Black,L.J., Goode,R.L.: Uterine bioassay of tamoxifen, trioxifene and a new estrogen antagonist (LY117019) in rats and mice. *Life Sciences*. 26: 1453-1458 (1980)
- 5) Terenius,L.: Structure-activity relationships of antioestrogens with regard to interaction with 17β -oestradiol in the mouse uterus and vagina. *Acta Endocrinologica*. 66: 431-447 (1971)
- 6) Emmens,C.W.: Compounds exhibiting prolonged antiestrogenic and antifertility activity in mice and rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 26: 175-182 (1971)
- 7) Emmens,C.W, Carr,W.L.: Further studies of compounds exhibiting prolonged antiestrogenic and antifertility activity in mice and rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 34: 29-40 (1973)
- 8) Terenius,S.: Two models of interaction between oestrogen and antioestrogen. *Acta Endocrinologica*. 64: 47-58 (1970)
- 9) Marois,M., Marois,G.: Action of an antioestrogen tamoxifen, on the uterus and the vagina of the ovariectomized rat. *C.R. Seance Society of Biology*. 171: 280-286 (1977)
- 10) Jordan,V.C.: Antiestrogenic and antitumor properties of tamoxifen in laboratory

animals. *Cancer Treatment Reviews*. 60: 1409-1419 (1976)

- 11) Jordan, V.C., Rowsby, L., Prestwich, G.: Studies on the mechanism of action of the non-steroidal antiestrogen tamoxifen (ICI 46474) in the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 7: 177-192 (1977)
- 12) Clark, E.R., Dix, C.J., Jordan, V.C., et al.: A comparison, at the cellular and subcellular levels, of the effects of tamoxifen and oestradiol benzoate on the immature rat uterus. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. 62: 442p-443p (1978)
- 13) Dix, C.J., Jordan, V.C.: Modulation of rat uterine steroid hormone receptors by estrogen and antiestrogen. *Endocrinology*. 107: 2011-2020 (1980)
- 14) Ljungkvist, I., Ternius, L.: Attachment reaction of rat uterine luminal epithelium. V suppression of the attachment reaction by some antifertility agents. *Contraception*. 5: 473-488 (1972)
- 15) 渡辺満利、田中寿子、小泉治子ら: 小動物における tamoxifen の急性および経口亜急性、慢性毒性試験. 実験動物中央研究所・前臨床研究報. 6: 1-36 (1980)
- 16) Chamness, G.C., Bannayan, G.A., Landry, L.A., et al.: Abnormal reproductive development in rats after neonatally administered antiestrogen (Tamoxifen) *Biology of reproduction*. 21: 1087-1090 (1979)
- 17) Treinen, K.A., Rehm, S., Wier, P.J. : An evaluation of the novel selective estrogen receptor modulator, idoxifene, for effects on reproduction in rats and rabbits. *Toxicological Sciences*. 41: 199-207 (1998)
- 18) 岡本良平、左雨秀治、坂本忍ら: 抗エストロゲン剤の作用. 日本不妊学会雑誌. 30: 1-4 (1985)
- 19) Jordan, V.C., Koerner, S., Robinson, C.: Inhibition of oestrogen-stimulated prolactin release by antiestrogens. *Journal of Endocrinology*. 65: 151-152 (1975)
- 20) Jordan, V.C., Koerner, S.: Tamoxifen as an anti-tumour agent: role of oestradiol and

prolactine. *Journal of Endocrinology*. 68: 305-310 (1976)

- 21) Bartke,A., Mason,M., Dalterio,S., et al.: Effects of tamoxifen on plasma concentrations of testosterone and gonadotropins in the male rat. *Journal of Endocrinology*.79: 239-240 (1978)
- 22) Harper,M.J.K., Walpole,A.L.: Mode of action of ICI 46474 in preventing implantation in rats. *Journal of Endocrinology*. 37: 83-92 (1967)
- 23) Watson,J., Alam,M.: Oestrogen synthesis during delayed implantation in the rat. *Contraception*. 13: 101-107 (1976)
- 24) Watson,J., Anderson,F.B., Alam,M., et al.: Plasma hormones and pituitary luteinizing hormone in the rat during the early stage of pregnancy and after post-coital treatment with tamoxifen (ICI 46474). *Journal of Endocrinology*. 65: 7-17 (1975)
- 25) Beyer,C., Morali,G., Larsson,K., et al.: Steroid regulation of sexual behavior. *Journal of Steroid Biochemistry*. 7: 1171-1176 (1976)
- 26) Kojima,K., Tanaka,A., Watanabe,C., et al.: A comparison of general toxicological parameters between the Crj:CD(SD) rats and Crj:CD(SD)IGS rats, at the 4- and 26-week time points. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1999." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1999) pp.125-137
- 27) Yamamoto,T., Kakamu,S., Suzuki,K., et al.: Mortality, body weight, food consumption, clinical laboratory test and pathological examination in Crj:CD(SD)IGS rats in subchronic and chronic toxicity study. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1998." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1998) pp.39-42
- 28) Furukawa,S., Nishide,M., Takeuchi,R.: Changes in body weight, food intake and blood biochemical parameters in Crj:CD(SD)IGS rats. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1998." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1998) pp.43-49
- 29) Suwa,T., Murakami,N., Kitagaki,M., et al.: Characteristics of Crj:CD(SD)IGS rats

- compared with Crj:CD(SD) rats based on repeated dose toxicity study. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1998." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1998) pp.82-89
- 30) Yamaguchi,M., Sakurada,K., Yoshihara,K., et al.: Changes in body weight and organ weight with growth in Crj:CD(SD) IGS rats. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1998." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1998) pp.90-94
- 31) Naeshiro,I., Fukuda,R., Miyamoto,S., et al.: Crj:CD(SD)IGS rats and the effects of a commercial low protein diet on the biological parameters used in repeated-dose toxicity studies. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1998." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1998) pp.108-120
- 32) Inoue,E., Motomura,I., Takagi,S., et al.: Background data for clinical and pathological parameters in Crj:CD(SD)IGS rats bred for long time. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1998." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1998) pp.121-130
- 33) Saitoh,T., Shibuya,K., Kizaki,H., et al.: Comparison of hematological parameters between Crj:CD(SD)IGS and Crj:CD(SD) rats. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1998." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1998) pp.139-142
- 34) Takahashi,H., Kondou,K., Ashino,K., et al.: Background data of general toxicological parameters in Crj:CD(SD) rats. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1999." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1999) pp.46-51
- 35) Nagayabu,T., Kitazaki,T., Kandori,H., et al.: Crj:CD(SD)IGS rats and the effects of a commercial low protein diet on the biological parameters used in repeated-dose toxicity studies at the Hikari branch, drug safety research laboratories in Takeda chemical industries, Ltd. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1999." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1998) pp.89-104
- 36) Maeda,H., Omori,M., Miyajima,H.: Comparison of historical data between Crj:CD(SD)IGS and Crj:CD(SD) rats. "Biological Reference Data on CD(SD)IGS rats-1999." CD(SD)IGS study group. Yokohama. (1998) pp.105-118