

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）

「エチニルエストラジオールのラットにおける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	17

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、エチニルエストラジオールの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[Crl: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）、3、12 および48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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、死亡ならびに異常な一般状態は観察されなかった。
2. 雌雄とも体重増加には被験物質投与による影響は認められなかった。
3. 性周期観察の結果、48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で観察期間中に発情期がまったく現れなかった動物が2例認められた。
4. 血中ホルモン濃度測定の結果、雄においては48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群でプロラクチン濃度の増加ならびにエストラジオール濃度の増加傾向が認められたが、雌においては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。
5. 血液学的検査の結果、雌雄とも12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群ではプロトロンビン時間の延長が観察された。
6. 血液生化学的検査の結果、雌雄とも血中総コレステロール濃度の低下がエチニルエストラジオール投与全群で認められた。雄においては12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群でトリグリセライド濃度の増加が、48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群ではALP活性の増加がそれぞれみられ、雌においては48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で尿素窒素濃度が低下し、 γ -GTP活性が増加した。また、雌においては12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で総蛋白濃度が、48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群ではアルブミン濃度がそれぞれ低下した。
7. 器官重量測定の結果、副腎重量の増加が雄では48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で、雌では12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群でそれぞれみられた。また、雄の下垂体重量が48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で増加したが、雌では変化は認められなかった。一方、雌雄ともに生殖器重量には変化は認められなかった。甲状腺重量は雌の48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で、肝臓重量は雄の12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以

上、雌の 48 μ g/kg 投与群でそれぞれ増加した。

8. 剖検の結果、雄の 48 μ g/kg 投与群で副腎の腫大ならびに暗色化が認められた以外、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。
9. 病理組織学検査の結果、雄では 48 μ g/kg、雌では 12 μ g/kg 以上の投与群で副腎皮質束状帯細胞の肥大が認められた。雄性生殖器の病理組織学検査結果には、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。一方、雌性生殖器では、12 μ g/kg 以上の投与群の卵巢で黄体数の低下、子宮に内膜および筋層の肥大が観察された。これらの例のなかには、卵巢にルテイン細胞の肥大した黄体と子宮内膜上皮細胞および乳腺の過形成を呈し、子宮内膜および筋層に好酸球の顕著な減少を示す例が認められた。また、12 μ g/kg 以上の投与群の膈では上皮に角化が観察される例が減少し、粘液細胞化の観察される例がやや増加する傾向がみられた。
10. 精子検査の結果、精子運動能ならびに精巣内の精子頭部の数および精巣上体内の精子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、エチニルエストラジオールの反復経口投与によるエストロゲン作用を、大筋において確認することが可能であった。本試験において低用量から認められた変化は、副腎皮質束状帯細胞の肥大と血中コレステロール濃度の低下であり、最も低用量から認められた変化は、血中コレステロール濃度の低下であった。

【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、この強化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。

【方法】

1. 被験物質

(名称) エチニルエストラジオール
(化学名) 19-Nor-17-alpha-pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol
(CAS No.) 57-63-6
(英名) Ethinylestradiol
(ロット番号) 57H1178
(純度) 98%
(分子量) 296.44
(分子式) $C_{20}H_{24}O_2$
(保管条件) 遮光、室温

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、168.2 ~193.4 g; 雌、144.9 ~167.6 g
(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、239.3~269.5 g; 雌、174.3~201.4 g
(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。
(温湿度) 温度、23.0~25.0°C; 湿度、44~83%
(設定換気回数) 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 水溶液で懸濁させた。

(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8日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ならびに均一性を測定した結果、各濃度の検体中のエチニルエストラジオールの平均含量は、調製指示値の99.7, 97.2 および96.6%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99.0~102%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	エチニルエストラジオール	3	5	0.06	11 ~ 20	51 ~ 60
中用量群	エチニルエストラジオール	12	5	0.24	21 ~ 30	61 ~ 70
高用量群	エチニルエストラジオール	48	5	0.96	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、エチニルエストラジオールの $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ をラットに 5 日間にわたり反復経口投与した場合、内分泌系に対する影響が認められており¹⁾、雄ラットに対する $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ の 14 日間の経口投与では、精巢、精巢上体、前立腺、精囊等に対する影響がみられている²⁾。一方、雌では交配前に $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ を 11 日間反復投与することにより、受胎率が低下したとの報告がある³⁾。生殖系以外の毒性作用としては、 $10 \text{ mg}/\text{kg}$ の 27 日間投与あるいは $1200 \mu\text{g}/\text{kg}$ の 90 日間の投与によって肝臓や血液系に対する影響が報告されている^{4,5)}。以上の結果より、28 日反復投与によりエチニルエストラジオールの生殖系以外に対する作用を検出するには $1 \sim 10 \text{ mg}/\text{kg}$ 前後の量を要すると考えられる一方、28 日間の反復投与により生殖系に対して影響を与える最低量は雄では $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下、雌では $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下であることが推定される。従って、本試験におけるエチニルエストラジオールの投与量は、生殖系に対する影響も含め、雌雄ラットに影響を与えない可能性が考えられる量である $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ を低用量に、公比 4 で、中ならびに高用量として 12 ならびに $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 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-PLUSIV(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 IV(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 G 1.DH 法で尿素窒素濃度(BUN)を、Jaffe 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)を用いたイオン電極法で、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ージの膣スメ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。スメア像には変化は認められるものの周期が一定せず、diestrus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、精巣上部、副生殖腺（精嚢＋前立腺）、卵巣ならびに子宮（内容物を除く）の重量を測定し、副生殖腺については測定後、精嚢と前立腺を分離し、凝固腺を含む精嚢重量ならびに前立腺（腹葉）重量を個別に測定した。また、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、精巣上部、前立腺（背側、腹側）、精嚢、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、精巣および精巣上部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的検査を実施した。また、精巣、精巣上部、前立腺、精嚢、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、右側の精巣上部内の精子を採取して運動ならびに数を観察した。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部については病理組織学的検査を実施した。

精子運動能検査：精巣上部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：精巣および精巣上部（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、分散が一様でない場合は 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%）。

【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観察されなかった。

2. 体重

体重の測定結果を Table 1-1 および 1-2 に示す。雌の 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においては投与開始日から対照群に比較して有意に低値を示し、投与開始日から両群間に有意差が認められたが、投与開始日以降の体重増加量には差はみられなかった。雄においては被験物質投与による影響は認められなかった。

3. 性周期

性周期観察の結果を Table 2-1 から 2-4 に示す。48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では発情期がまったく現れなかった動物が 2 例認められたが、これら以外の動物の性周期には全て正常な周期性が認められた。

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。雄においてはプロラクチン濃度の増加が 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で認められ、エストラジオール濃度については 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では測定限界以下であった例数が低下したことからエストラジオール濃度が増加傾向にあるものと考えられた。雌においては、プロラクチンならびにエストラジオール濃度に変化は認められなかった。

LH 濃度は雌において 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で有意に低下したが用量依存性のない変化であった。雄のテストステロン濃度、雌雄の FSH 濃度ならびにコルチコステロン濃度には、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。

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。雌雄ともプロトロンビン時間の延長が 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群でみられた。雄においては、平均赤血球血色素濃度の増加が 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で認められたが、用量依存性のない変化であり、他の赤血球関連の測定項目ならびに平均恒数に変化が認められないことから被験物質投与による影響ではないものと判断した。雌雄とも白血球数および白血球分類には変化は認められなかった。

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。雌雄とも血中総コレステロール濃度の低下がエチニルエストラジオール投与全群で認められた。雄においては $12 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群でトリグリセライド濃度の増加が、 $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では ALP 活性の増加がそれぞれみられ、雌においては $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で尿素窒素濃度の低下ならびに γ -GTP 活性の有意な増加がそれぞれ認められた。また、雌においては $12 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で総蛋白濃度の、 $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群ではアルブミン濃度の有意な低下あるいは低下傾向が認められたが、雄においては変化はみられず、雌雄とも A/G 比には変化は認められなかった。

GOT、GPT ならびに LDH 活性、クレアチニン、無機リン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、塩素ならびにブドウ糖濃度には変化は認められなかった。

7. 病理学的検査

1) 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。副腎重量が雌雄とも $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で増加し、相対重量は雄では $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で、雌では $12 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で増加が認められた。また、雄の下垂体重量が $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で増加した。下垂体重量には雌では変化はみられなかった。

一方、雄の精巣、精巣上体、凝固腺を含む精嚢、前立腺ならびに精嚢と前立腺を合わせた副生殖腺の重量に変化はみられなかった。また、雌の卵巣ならびに子宮重量にも変化は認められなかった。さらに、雌雄の腎臓重量には変化はみられなかった。甲状腺および肝臓重量は雌雄とも対照群に比較して差は認められなかったが、体重あたりでは甲状腺重量は雌の $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で有意な増加が、肝臓重量は雄の $12 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群ならびに雌の $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群でそれぞれ有意な増加が、みられた。

2) 剖検所見

剖検所見を Table 8-1 および 8-2 に示す。対照群で精巣および精巣上体の、 $12 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では前立腺の、いずれも小型化が各 1 例みられたほかには、精嚢・凝固腺、卵巣、子宮および膣に異常は認められなかった。

副腎は $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の雄 3 例で腫大や暗色化が、肝臓では雌の 2 例で小葉構造の明瞭化を伴う腫大あるいは黄色化がそれぞれ認められた。

その他、雄の各被験物質投与群および雌の対照群で肺の暗赤色点が、腎臓では $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群に腎盂の拡張がそれぞれみられた。

3) 病理組織学検査所見

病理組織学検査所見を Table 9-1 および 9-2 に示す。精巣では $48 \mu\text{g}/\text{kg}$ および 3μ

g/kg 投与群ならびに対照群の各 2 例、12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 3 例に精細管の萎縮がみられたが、これらのうち、変化の程度の大きい例は対照群に認められた。この例では、精細管内に多核巨細胞、ライディヒ細胞のびまん性の過形成がみられたほか、精巣上体では精子数の低下および管腔内の細胞残屑が、精囊・凝固腺では内容液の低下を伴う萎縮が認められた。他の例においても、同様の変化が精巣あるいは精巣上体で認められる例もあったが、最も変化の著しかった対照群の例と比較するといずれも軽度であった。

前立腺では各群の間質にリンパ球浸潤がみられ、上皮にリンパ球および形質細胞が浸潤している例も認められたが、各群間で変化の程度および頻度に差は認められなかった。

卵巢では 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 3 例、12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 2 例、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 1 例に卵胞の閉鎖の亢進や黄体数の低下がみられ、このうち 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 2 例、12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 1 例では、ルテイン細胞が肥大している黄体が認められた (Photo 1)。その他、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では変性した卵細胞の鉍質沈着がみられた。

子宮では 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 5 例、12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 1 例に内膜および筋層の肥大がみられ、このうち、卵巢にルテイン細胞の肥大が観察された 3 例では、腔上皮細胞の過形成が認められた (Photo 2)。さらに、この 3 例では乳腺腺房細胞の過形成も認められた (Photo 3)。また、各群のほとんどの例で腔上皮細胞や子宮腺上皮細胞に細胞残屑を含む空胞、内膜および筋層に好酸球浸潤がみられたが、この 3 例においては他の例に比較して軽度あるいは観察されなかった。

膈では 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 3 例、12 および 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の各 1 例の上皮に粘液細胞化がみられ、卵巢にルテイン細胞の肥大が観察された例のうち 2 例は、他の例と比較して程度が増強していた (Photo 4)。また、48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 1 例、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 4 例、対照群の 3 例の上皮では角化が認められた。

副腎では 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の雄 8 例、雌 9 例に、12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の雌 4 例に皮質細胞の肥大が認められ、雌の 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においては、12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群と比較して変化の強い例が増加する傾向が認められた。

腎臓では雌雄の各群に好塩基性の尿細管、雄の各群に eosinophilic body がみられたが対照群と各被験物質投与群との間に程度および頻度の差は認められなかった。その他、雌雄で腎盂の拡張、雄の例の皮髄境界部に嚢胞の形成あるいは被膜下にリンパ球の浸潤を伴った限局性の線維化、雌では被膜下に限局性の線維化あるいは皮質の間質にリンパ球浸潤がみられた。

脾臓では、雌雄の全例で髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、対照群と各被験物質投与群との間に程度の差はみられなかった。

肺では雌雄の各群で限局性の泡沫細胞の集簇がみられたが、対照群と各被験物質投与群との間に頻度および程度の差は認められなかった。また、雌雄に動脈の鉍質沈着、

好酸球浸潤、骨化生、限局性の出血がみられた。

その他、雄では肝臓に限局性の壊死層、心臓に限局性の心筋変性／線維化、下垂体にラトケ嚢の拡張、胃の漿膜面に肉芽組織が、雌では肝臓に小肉芽腫、甲状腺に異所性の胸腺組織、胸腺に限局性の出血が認められた。

脳、脊髄、眼球、上皮小体、気管、気管支、肺、副腎、腸管、卵管、子宮頸部、乳腺、膀胱、坐骨神経、下顎リンパ節ならびに腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓、顎下腺および舌下腺には異常は認められなかった。

8. 精子検査

精子検査の結果を Table 10 に示す。精子運動能ならびに精巣内の精子頭部の数および精巣上体内の精子数には変化は認められなかった。

【考察】

エチニルエストラジオールを雌雄ラットに反復投与した報告は既に認められ、中山らはSD系ラットにエチニルエストラジオールを0.1、1.0および10 mg/kgの用量で27日間、反復経口投与した結果、0.1 mg/kg以上の投与群で、体重ならびに摂餌量の低下、尿中へのナトリウムおよびカリウムの排泄抑制、ヘモグロビン量ならびにヘマトクリット値の低下、総コレステロール濃度、トリグリセライド濃度、リン脂質濃度、A/G比の低下、テストステロン濃度の低下、下垂体ならびに副腎重量の増加、精巣、精囊、前立腺、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、胸腺、顎下腺重量の低下を用量依存的に認め、さらに10 mg/kg投与群では赤血球数および白血球数の低下、血中ナトリウム濃度、BUN濃度が増加したことを報告している⁴⁾。また、病理組織学検査の結果、用量依存的に肝臓における小葉中心性の肝細胞の空胞変性、赤脾髄のヘモジデリン沈着、精細管の萎縮と精子の形成不全、前立腺および精囊の上皮細胞の扁平化ならびに腺腔の狭小化、乳腺腺房上皮細胞の染色性の増加、副腎皮質束状層の肥厚、下垂体前葉における好塩基細胞の萎縮および細胞数の低下を認め、さらに高用量群では肝小葉中心性に脂肪変性、精巣間質細胞の萎縮、下垂体前葉における色素嫌性細胞が増加したと述べている。同じグループは、SD系雌ラットへのエチニルエストラジオールの1.2および12 mg/kgの3ヶ月間反復投与の結果、上記の成績に加え、被毛状態の悪化、GPT活性の増加、血糖値の低下および卵巣重量の低下、腎臓における色素沈着、胸腺皮質の細胞密度の低下、卵巣萎縮や排卵の抑制、子宮内膜上皮細胞の肥厚や空胞化、子宮上皮の化生を報告している⁵⁾。一方、この試験では、先の27日間反復投与試験で認められた尿中へのナトリウムおよびカリウムの排泄抑制、白血球数の低下、トリグリセライド濃度、リン脂質濃度の低下、副腎重量の低下等の所見は、投与期間が延長したにもかかわらず、明瞭ではなかった。また、副腎の皮質には肥厚がみられたが、各層の比率には差がみられなかった。膣スメア像は連続的に間期像を示した。これら、高用量での試験結果のうち、今回の強化407試験において認められた所見は主に副腎の変化ならびに血中総コレステロール濃度の低下であり、これらのうち、最も低用量から観察されたのは、血中総コレステロール濃度の低下であった。エストロゲンによる血中コレステロールやLDL濃度の低下は以前から知られており⁶⁻¹²⁾、Keらの報告によるとエチニルエストラジオールの作用によって、卵巣摘出ラットでは3 μg/kgの4週間投与により血中コレステロール濃度の低下を認めているが¹³⁾、本試験の結果、これと同じ3 μg/kgの4週間の投与によって、無処置雌雄ラットにおいてもコレステロール濃度が低下することが明らかになった。一方、中山らの報告を始め、エストロゲンの作用によって、トリグリセライドやリン脂質濃度等にも変化を認めた報告がみられるが^{4,7-12)}、本試験の結果、雄においては12 μg/kg以上の投与群でトリグリセライド濃度の増加が認められたものの、雌ではあきらかではなかった。

今回の 28 日反復投与試験においては、雌雄で副腎重量が増加し、剖検の結果、副腎は高用量群の少数例で腫大や暗色化がみられ、さらに病理組織学的検査では、副腎皮質細胞の肥大が認められた。これはエストロゲン作用によるコルチコイドの生合成抑制ならびに肝臓でのコルチコイドの分解促進等により、血中コルチコイド濃度の低下が起こり、このフィードバックのために下垂体から ACTH が分泌されるためと説明されている。今回の試験においては、コルチコイド濃度の変化は捉え得なかったが、雄の個体別の成績を見ると、各群の中間の動物番号の動物が比較的低値を示している様に考えられる。これは、採血順が関係し、ストレスによるコルチコイドの増加がノイズとなって被験物質の影響をかくしてしまった可能性も考えられる。

エストロゲンによって閉経期のヒトやラットで肝内胆汁鬱滞が起こることが知られている^{14,17)}。本試験においては、肝臓に病理組織学的所見は認められなかったものの、血液生化学所見において ALP 活性の増加がみられたことは、この所見を裏づけるものと考えられる。Trauner や Koopen の報告においては鬱滞の発現用量は 5 mg/kg であり^{15,17)}、本試験で ALP 活性の増加がみられた 48 μ g/kg とは 100 倍以上の開きがある。

今回の 28 日反復投与試験では、雄における下垂体重量の増加ならびにプロラクチン濃度の増加がみられた。Clifton らはエストロゲンの皮下投与によって下垂体におけるプロラクチン分泌細胞の増加を認めており¹⁶⁾、本試験においても病理組織学的には著変はなかったものの、下垂体におけるプロラクチン分泌の増加があったものと考えられる。雄においては、エストラジオール濃度の増加傾向もみられたものの、テストステロン濃度には変化はみられず、病理組織学検査の結果、精巣、精巣上体および前立腺に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。精子検査の結果にも変化は認められなかった。

一方、雌のホルモン濃度、生殖器重量には変化はみられなかったが、病理組織学的には、卵巣における卵胞の閉鎖の亢進や黄体数の低下、子宮の内膜および筋層の肥大が用量依存的に認められた。さらに、これらのうち変化の著明な例では黄体のルテイン細胞の肥大、子宮腔上皮細胞や乳腺腺房細胞の過形成が認められたほか、他のほとんどの例でみられた子宮腔上皮細胞や子宮腺上皮細胞における細胞残屑を含む空胞化ならびに子宮内膜および筋層の好酸球浸潤が減少する傾向にあった。また、膣では上皮の角化が観察される例数が減少しており、粘液細胞化のみ認められた例もあった。新生児期のマウスにエストロゲンを投与すると膣上皮の持続性増殖と角化ならびに子宮上皮の不可逆な多層化と角化が認められることが知られている^{18,20)}。また、胎児期にエチニルエストラジオールを投与されたラットでは、卵巣における変性卵胞の増加、子宮内膜の偏平上皮化を伴う増殖、卵胞の閉鎖の亢進、膣上皮の各化の亢進等が認められたことが報告されている²¹⁾。今回の病理組織学検査においては、子宮内膜および筋層の肥大は軽度で、膣上皮の角化傾向に減少がみられている。これらの動物では、下垂体からのプロラクチン分泌が亢進され、黄体が維持されたことから、この黄体からのプロジェステロンの作用によって子宮、膣や乳腺における変化が引き起こされたものと考えられる。中山らの成績は 100 μ g/kg を上回る投与量で

の成績であり⁴⁾、全身的な変化も本試験よりはるかに強い。本試験における所見はエストロゲンの弱いが継続的な作用に対する二次的な反応が認められたものと判断される。性周期観察の結果、48 μ g/kg 投与群では発情期がまったく現れなかった動物が2例認められた。日井らによれば、エチニルエストラジオールの反復投与により、性周期観察で連続間期像や連続発情期像の混在を認めており、本試験におけるこの2例の変化は、被験物質のエストロゲン作用に基づくものと判断される。

以上に記載した通り、強化407プロトコールに従った今回の試験によって、エチニルエストラジオールの反復経口投与によるエストロゲン作用を、大筋において確認することが可能であった。

【参考文献】

- 1) Messiha, F.S.: Effect of pharmacologic interventions on aldehyde dehydrogenase in the rat testicles. *Journal of Applied Toxicology*. 1: 297-299 (1981)
- 2) McGinty, D.A.: Some chemical and biological properties of 19-nor-17 α - ethynyltestosterone. *Annals of the New York Academy of Science*. 71: 500-515 (1958)
- 3) Watnick, A.S., Gibson, J., Vinagra, M. et al.: Ethynyl estradiol: A potent orally active contraceptive in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 116 : 343-347 (1964)
- 4) 中山隆治、臼井哲夫、堀内敏ら : Ethinylestradiol および hexestrol のラットにおける亜急性毒性試験. *薬理と治療*. 7: 3340-3354 (1979)
- 5) 臼井哲夫、中山隆治、堀内敏ら : Hexestrol, ethinylestradiol および estriol 3-benzoate 16,17-diacetate のラットにおける長期投与の影響. *薬理と治療*. 7: 3355-3372 (1979)
- 6) Wallentin, L., Varenhorst, E.: Cholesterol ester metabolism in plasma during estrogen and antiandrogen treatment in men with carcinoma of the prostate. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 98 906-916 (1981)
- 7) Haarbo, J., Hassager, C., Jensen, S.B., et al.: Serum lipids, lipoproteins, and apolipoproteins during postmenopausal estrogen replacement therapy combined with either 19-nortestosterone derivatives or 17-hydroxyprogesterone derivatives. *American Journal of Medicine*. 90: 584-589 (1991)
- 8) Fewster, M.E., Pirrie, R.E., Turner, D.A.: Effect of estradiol benzoate on lipid metabolism in the rat. *Endocrinology*. 80: 263-271 (1967)
- 9) Hay, R.V., Pottenger, L.A., Reingold, A.L., et al.: Degradation of I125 labelled serum low density lipoprotein in normal and estrogen-treated male rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 44: 1471-1477 (1971)

- 10) Davis, R.A., Roheim, P.S.: Pharmacologically induced hypolipidemia. *Atherosclerosis*. 30: 293-299 (1978)
- 11) Mérola, A.J., Arnold, A.: Estrone inhibition of cholesterol biosynthesis at the mevalonic acid stage. *Science*. 144: 301-302 (1964)
- 12) Eriksson, M., Berglund, L., Rudling, M., et al.: Effects of estrogen on low density lipoprotein metabolism in males. *Journal of Clinical Investigations*. 84: 802-810 (1989)
- 13) Ke, H.Z., Chen, H.K., Simmons, H.A., et al.: Comparative effects of droloxifene, tamoxifen, and estrogen on bone, serum cholesterol, and uterine histology in the ovariectomized rat model. *Bone*. 20: 31-39 (1997)
- 14) Bossard, R., Stieger, B., O'Neill, B., et al.: Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *Journal of Clinical Investigations*. 91: 2714-2720 (1993)
- 15) Trauner, M., Arrese, M., Soroka, C.J., et al.: A molecular basis for jaundice in intrahepatic and extrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 26: 1682-1684 (1997)
- 16) Trauner, M., Arrese, M., Soroka, C.J., et al.: The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology*. 113: 255-264 (1997)
- 17) Koopen, N.R., Wolters, H., Havinga, R., et al.: Impaired activity of the bile canalicular organic anion transporter (Mrp2/cmoat) is not the main cause of ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Hepatology*. 27: 537-545 (1998)
- 18) Clifton, K.H., Meyer, R.K.: Mechanism of anterior pituitary tumor induced by estrogen. *Anatomical Record*. 125: 65-81 (1956)
- 19) Takasugi, N.: Vaginal cornification in persistent-estrous mice. *Endocrinology*. 72: 607-619 (1963)
- 20) Kimura, T., Basu, S.L., Nandi, S.: Nature of induced persistent vaginal cornification

in mice. 1. Effect of neonatal treatment with various doses of steroids. *Journal of Experimental Zoology*. 165: 71-88 (1967)

21) Yasuda, Y., Kihara, T., Nishimura, H.: Effect of prenatal treatment with ethinyl estradiol on the mouse uterus and ovary. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 127: 832-836 (1977)