

分担研究報告書

分担課題:子宮重量を指標とした生体試験

分担研究者 藤井 治 三菱化学安全科学研究所鹿島研究所・取締役所長

研究要旨

17-ethinyl oestradiol (EE) および ZM 189.154 (ZM) を卵巣摘出した成熟雌性 SD 系ラットに皮下投与し、EE の子宮重量に対する用量反応性ならびに ZM の抗エストロゲン活性を確認した。卵巣摘出は 6 週齢で実施し、8 日後(7 週齢)に投与を開始した。投与回数は 1 日 1 回、3 日間とし、最終投与後約 24 時間に解剖を行った。与量は、EE 用量反応性の検討では、0.01、0.03、0.10、0.30、1.00、3.00、10.00 $\mu\text{g/kg}$ の 7 用量とし、対照群として、未処置対照群と溶媒対照群(9.95%エタノール含有ゴマ油)を設定した。ZM の抗エストロゲン活性の確認では、EE 0.30 $\mu\text{g/kg}$ 群を対照群とし、ZM 0.1 および 1.0 mg/kg を EE と同時に投与した。1 群 6 匹の動物を用いた。一般状態、体重および子宮重量(内液を含む場合、含まない場合)について観察・測定した。溶媒対照群、EE 0.10 および 0.30 $\mu\text{g/kg}$ については子宮および膣の病理組織学的検査を実施した。

A. 研究目的

- (1) 17-ethinyl oestradiol を卵巣摘出成熟ラットに皮下投与し、子宮重量の用量反応性を確認する。
- (2) 施設間差を検討するためのデータとする。
- (3) PROTOCOL A (幼若ラット、経口投与)、PROTOCOL B (幼若ラット、皮下投与) および PROTOCOL C' (卵巣摘出成熟ラット、7 日間皮下投与) で得られる結果と比較するためのデータとする。
- (4) ZM 189.154 の抗エストロゲン活性を確認する。

B. 研究方法

1. 試験物質

reference oestrogen として 17-ethinyl oestradiol (EE、CAS No.: 57-63-6、Schering AG、ロット番

号: 29052944、純度: 97.0% 以上)、reference

anti-oestrogen として ZM189.154 (ZM、CAS No.: 101908-22-9、Zeneca、ロット番号: 174321、純度: 推定 98% 以上) を使用した。

2. 試験動物

動物(4.5 週齢の Crj:CD (SD) IGS ラット雌 83 匹) 入荷後、12 日間検疫・馴化し、健康状態が良好であることを確認し、6 週齢で、チオペンタール麻酔下で両側の卵巣を摘出した(卵巣摘出手術において 1 匹が死亡)。卵巣摘出手術後 7 日に膣垢検査ならびに群分けを実施した。術後の回復が良好であり、発情休止期にあることを確認した動物のうち 66 匹を体重別層化無作為抽出法によって各群の体重がほぼ均一になるように群分けした。体重範囲は 188.5~217.8 g であった。なお、危険率 5% で群間に有意差のないことを確認した。投与開始時

(群分けの翌日)の週齢は7週齢、体重範囲は197.0～232.5 gであった。動物は油性インクで尾に番号付けをして個体識別し、ケージには試験番号、ケージ番号、試験物質名、群番号、動物番号、試験種、性別、用量、投与期間、系統及び動物種を記載したラベルを付けた。

3.動物飼育

検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度 22 ± 2℃ (許容範囲 19～25℃)、相対湿度 55 ± 15% (許容範囲 35～70%)、換気約 15 回／時、照明 12 時間／日(7:00～19:00)に自動調節した飼育室を使用した。

4.投 与

1日1回、3日間、被験物質投与液を皮下投与し

た。3日間ほぼ同時刻に、同順序で投与した。ZMの評価の場合には、ZMの投与直後にEEを投与した。投与用量は群構成の項に示す。投与液量は2 mL/kgとし、至近日に測定した体重に基づいて算出した。なお、EEとZMとを投与する場合には各1 mL/kgとした。被験物質は所定量を秤量し、99.5 %エタノール(EtOH、和光純薬工業㈱、ロット番号:ACG2697)に溶解した後、99.5 %EtOH およびゴマ油(関東化学㈱、ロット番号:101G1899)を用いて希釈し、所定濃度の投与液(溶媒は9.95%EtOH 含ゴマ油となるように)を調製した。EEの調製は投与開始前日に行い、投与に供するまで冷蔵・暗所に保存した。ZMは用時調製した。

5. 群構成

以下のとおりである。

群名	N	用量		経路	動物番号
		EE (microgram/kg)	ZM (milligram/kg)		
1 (溶媒対照)	6	0	0	s.c.	50101-50106
2	6	0.01	0	s.c.	50201-50206
3	6	0.03	0	s.c.	50301-50306
4	6	0.10	0	s.c.	50401-50406
5	6	0.30	0	s.c.	50501-50506
6	6	1.00	0	s.c.	50601-50606
7	6	3.00	0	s.c.	50701-50706
8	6	10.00	0	s.c.	50801-50806
9	6	0.3	0.1	s.c.	50901-50906
10	6	0.3	1.0	s.c.	51001-51006
11 (未処置対照)	6	0	0	非適用	51101-51106

6. 観察・測定項目

下記の項目を検査した。なお、日の表記は投与開始日を第1日とした。

6.1 一般状態

投与期間は1日2回(午前、午後)、それ以外の日には1日1回午前中に観察した。

6.2 体重

全例の体重を、上皿電子天秤(PM3000、メトラー・トレド(株))を用いて、群分け日から解剖日まで毎日0.1g単位で測定した。

6.3 病理学的検査

1) 器官重量

最終投与日の約24時間後に、全例をチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後、上皿電子天秤(AE260、メトラー・トレド(株))を用いて、子宮重量を0.1mg単位で測定した(まず、子宮の外側の水分をガーゼで軽くぬぐい重量測定した。次に、子宮角の上端にハサミを入れ、内腔液をガーゼ上で抜き取ってから重量測定した)。また、解剖日の体重に基づいて相対重量(対体重比)を算出した。

2) 病理組織学的検査

全動物の子宮および膣を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。なお、EE 0.10 μ g/kg 群の1例(動物番号: 50402)で、同群の他の動物と比べて子宮重量が著しく高かったことから、この原因を明らかにするために、子宮および膣について病理組織

学的検査を実施した。すなわち、溶媒対照群、EE 0.10 μ g/kg 群、EE 0.30 μ g/kg 群の全例の子宮および膣について脱水、パラフィン包埋を行った後、パラフィン包埋ブロックを5 μ mの厚さに薄切し、スライド貼付切片を作製した。常法に従いヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、鏡検した。

7. 統計学的解析

1~11 群間の比較の場合には、F 検定で等分散の検定を行い、分散が等しい場合には t 検定、分散が等しくない場合には Welch の検定を行った。1~8 群間ならびに 5、9、10 群間の比較の場合には、多重比較検定法で統計学的有意性を解析した。すなわち Bartlett 法による等分散の検定を行い、分散が等しい場合は一元配置分散分析、分散が等しくない場合は Kruskal-Wallis の検定を行った。群間に有意な差が認められた場合は Dunnett 法または Dunnett 型の多重比較検定を行った。

なお、EE 0.30 μ g/kg 群の子宮重量は溶媒対照群に比して約2倍であり、値の偏差も小さいにも関わらず、1~8 群間で比較した場合には統計学的有意性が得られなかった。そこで、1~5 群間での検定を追加実施した。

C. 研究結果

1. 一般状態

検疫・馴化および投与期間を通じて、いずれの動物にも異常は認められなかった。

2. 体重(Table 1)

EE 投与群では、EE 3.00 μ g/kg および 10.00 μ g/kg 群で解剖日の体重に低値が認められた。ZM 投与群は、対照群(EE 0.30 μ g/kg 群)と同様に推移した。溶媒対照群と未処置対照群の間に有意な差は認められなかった。

3. 子宮重量 (Table 2、3)

3.1 内液を含まない場合

未処置対照群と溶媒対照群の間に有意な差は認められなかった。

EE の用量反応性の検討では、EE 1.00 μ g/kg 以上の群で(1~8 群間で検定した場合)、子宮絶対重量および相対重量の高値が認められた。なお、EE 0.30 μ g/kg 群の子宮重量は溶媒対照群に比して約 2 倍であり、1~5 群間で検定した場合には、絶対重量および相対重量の高値が認められた。

ZM の用量反応性の検討では、EE 0.30 μ g/kg 群に対し、EE 0.30 μ g/kg + ZM 0.1 mg/kg 群および EE 0.30 μ g/kg + ZM 1.0 mg/kg 群で絶対重量および相対重量の低値が認められた。

3.2 内液を含む場合

EE 1.00 μ g/kg 以上の群で、内液を含む場合の子宮重量は、内液不含の場合に比して2倍以上と、著しい内液の貯留が認められた。値の偏差も大であったが、統計学的有意性は内液不含の場合と同様の結果であった。

4. 病理組織学的検査 (Table 4、Appendix 1)

子宮では内膜過形成が EE 0.10 μ g/kg 群の 1 例および 0.30 μ g/kg 群の全例に見られ、このう

ち 3 例は白血球の浸潤を伴っていた。

膣では粘膜上皮の過形成が EE 0.10 μ g/kg 群の 5 例および 0.30 μ g/kg 群の全例に見られたが、0.30 μ g/kg 群ではその程度が強く、全例の上皮表面に角質化が認められた。このほか溶媒対照群を含む各群で粘膜における白血球浸潤と粘膜上皮の粘液細胞化が認められたが、発現状況と用量の関連は明瞭でなかった。

子宮重量が高値を示した EE 0.10 μ g/kg 群の 1 例(動物番号:50402)では子宮内膜過形成および膣粘膜上皮の過形成が認められ、膣上皮の角質化が認められなかったことを除いて 0.30 μ g/kg 群と同様な組織所見であった。したがって、本例では 0.30 μ g/kg 群に匹敵する反応性を示すことが病理組織学検査でも確認できたが、その原因を明らかにすることはできなかった。

D. 考 察

EE の用量反応性の検討では、0.30 μ g/kg 以上の群で子宮重量の高値が認められた。PROTOCOL A(幼若ラット、経口投与)においては 1.00 μ g/kg 以上の群で、PROTOCOL B(卵巣摘出成熟ラット、皮下投与)においては 0.30 μ g/kg 以上の群で、PROTOCOL C'(卵巣摘出成熟ラット、7日間皮下投与)においては 0.10 μ g/kg 以上の群で子宮重量の高値が認められている。なお、内液の貯留に関して PROTOCOL C'との大きな相違が認められた。すなわち、3 日間投与で EE 1.00 μ g/kg 以上の群の全例で著しい内液の貯留が認められたのに対し、7 日間

投与では EE 10.00 μ g/kg 群の数例で内液の貯留が認められたにすぎなかった。

なお、EE 0.10 μ g/kg 群において膣の粘膜上皮の過形成が 6 例中 5 例認められたことから、膣の病理組織所見が検出力の高いパラメータであり、重要な知見を与えるものと考えられた。ZM の抗エストロゲン活性の検討において対照とした EE 0.30 μ g/kg 群の子宮重量は溶媒対照群に対して約 2 倍であり、抗エストロゲン活性を評価するのに適当な用量であると考えられる。ZM 0.1 mg/kg 群で子宮重量の低値が認められたが、これは対照とした EE 0.30 μ g/kg 群の偏差が小さいことが寄与していると考えられる。さらに、ZM の用量が 1.0 mg/kg の場合には子宮重量は溶媒対照群のレベルにまで低下した。ZM 1.0 mg/kg 群における子宮重量は、PROTOCOL A では溶媒対照群のレベルにまで低下していないが、PROTOCOL B および C' においては溶媒対照群のレベルになっている。また、卵巣摘出動物を用いる場合には、動物選択の上で何らかの基準を設けるべきであると考えられる。

E. 結論

一般状態は、検疫・馴化および投与期間を通じて、いずれの動物にも異常は認められなかった。

体重は、EE 投与群では、EE 3.00 および 10.00 μ g/kg 群で解剖日に低値が認められた。ZM 投与群は、対照群 (EE 0.30 μ g/kg 群) と同様に推

移した。溶媒対照群と未処置対照群の間に有意な差は認められなかった。

EE の子宮重量に対する用量反応性が認められ、EE 0.30 μ g/kg 以上の群で、内液を含む場合、含まない場合のいずれにおいても子宮絶対重量および相対重量の高値が認められた。

また、病理組織学的検査の結果、子宮では内膜過形成が EE 0.10 μ g/kg 群の 1 例および 0.30 μ g/kg 群の全例に見られた。膣では粘膜上皮の過形成が EE 0.10 μ g/kg 群の 5 例および 0.30 μ g/kg 群の全例に見られ、0.30 μ g/kg 群では全例の上皮表面に角質化が認められた。

ZM の抗エストロゲン活性の確認では、ZM 0.1 mg/kg 以上の群において、内液を含む場合、含まない場合のいずれにおいても子宮絶対重量および相対重量の低値が認められた。

F. 研究発表

なし

Table 1		Body Weight - Summary					Unit : g
		Mature Ovariectomised Rats with s.c. 3Days					
Group		Day	-1	1	2	3	4
1 EE 0 µg/kg [control(A)]	Mean		202.9	216.0	221.5	227.5	235.2
	S.D.		9.9	11.7	12.0	12.2	12.8
	n		6	6	6	6	6
2 EE 0.01 µg/kg	Mean		202.1	212.0	218.0	223.7	230.8
	S.D.		8.8	10.8	10.9	8.5	9.3
	n		6	6	6	6	6
3 EE 0.03 µg/kg	Mean		203.5	215.3	220.7	226.8	232.2
	S.D.		8.8	10.4	8.6	8.8	8.3
	n		6	6	6	6	6
4 EE 0.10 µg/kg	Mean		203.9	216.8	221.5	224.2	228.1
	S.D.		8.7	10.3	11.0	11.3	11.0
	n		6	6	6	6	6
5 EE 0.30 µg/kg [control(B)]	Mean		203.9	216.0	221.6	224.3	228.9
	S.D.		9.1	9.4	10.6	10.3	12.8
	n		6	6	6	6	6
6 EE 1.00 µg/kg	Mean		203.0	213.8	219.9	218.0	218.9
	S.D.		10.2	10.0	11.2	13.1	12.2
	n		6	6	6	6	6
7 EE 3.00 µg/kg	Mean		202.3	212.0	216.5	211.8	211.7 **
	S.D.		8.7	8.2	10.2	11.4	10.9
	n		6	6	6	6	6
8 EE 10.00 µg/kg	Mean		203.1	214.6	216.9	214.4	212.4 **
	S.D.		10.2	11.1	11.0	10.0	10.7
	n		6	6	6	6	6
9 EE 0.30 µg/kg + ZM 0.1 mg/kg	Mean		202.5	213.9	219.7	222.6	225.5
	S.D.		9.6	11.0	10.4	10.1	8.8
	n		6	6	6	6	6
10 EE 0.30 µg/kg + ZM 1.0 mg/kg	Mean		202.9	212.0	216.9	218.8	221.0
	S.D.		7.8	7.5	8.8	9.9	11.0
	n		6	6	6	6	6
11 Non-Treat.	Mean		203.0	213.7	220.7	225.6	231.7
	S.D.		9.8	9.3	10.2	10.3	11.4
	n		6	6	6	6	6

Significantly different from control (A) : *,P<0.05; **,P<0.01. (comparison among group 1-8)

Significantly different from control (B) : #,P<0.05; ##,P<0.01. (comparison among group 5,9,10)

Table 2

Uterine Weight - Summary

Unit : mg

Group		Mature Ovariectomised Rats with s.c.	3Days
		Wet Weight	Blotted Weight
1 EE 0 µg/kg [control(A)]	Mean	121.6	115.9
	S.D.	6.5	5.3
	n	6	6
2 EE 0.01 µg/kg	Mean	110.5	106.4
	S.D.	15.5	14.5
	n	6	6
3 EE 0.03 µg/kg	Mean	124.5	118.6
	S.D.	3.8	3.6
	n	6	6
4 EE 0.10 µg/kg	Mean	151.1	144.4
	S.D.	55.7	54.1
	n	6	6
5 EE 0.30 µg/kg [control(B)]	Mean	231.3 (*)	214.0 (*)
	S.D.	21.6	13.0
	n	6	6
6 EE 1.00 µg/kg	Mean	656.5 *	326.1 **
	S.D.	177.4	60.2
	n	6	6
7 EE 3.00 µg/kg	Mean	1001.5 **	378.4 **
	S.D.	146.8	20.8
	n	6	6
8 EE 10.00 µg/kg	Mean	899.7 **	354.4 **
	S.D.	322.2	54.8
	n	6	6
9 EE 0.30 µg/kg + ZM 0.1 mg/kg	Mean	170.3 ##	163.3 ##
	S.D.	16.8	14.8
	n	6	6
10 EE 0.30 µg/kg + ZM 1.0 mg/kg	Mean	111.2 ##	106.4 ##
	S.D.	16.0	14.6
	n	6	6
11 Non-Treat.	Mean	122.3	117.7
	S.D.	5.5	5.5
	n	6	6

Significantly different from control (A) : *, P<0.05; **, P<0.01. (comparison among group 1-8)

: (*), P<0.05; (**), P<0.01. (comparison among group 1-5)

Significantly different from control (B) : #, P<0.05; ##, P<0.01. (comparison among group 5,9,10)

Table 3

Relative Uterine Weight - Summary

Unit : $\times 10^{-3}\%$

		Mature Ovariectomised Rats with s.c.		3Days
Group		Wet Weight		Blotted Weight
1	EE 0 $\mu\text{g/kg}$ [control(A)]	Mean	51.8	49.4
		S.D.	3.4	3.3
		n	6	6
2	EE 0.01 $\mu\text{g/kg}$	Mean	47.8	46.1
		S.D.	5.9	5.6
		n	6	6
3	EE 0.03 $\mu\text{g/kg}$	Mean	53.7	51.1
		S.D.	2.2	2.1
		n	6	6
4	EE 0.10 $\mu\text{g/kg}$	Mean	66.8	63.8
		S.D.	26.2	25.5
		n	6	6
5	EE 0.30 $\mu\text{g/kg}$ [control(B)]	Mean	101.5 (*)	93.8 (*)
		S.D.	13.3	9.1
		n	6	6
6	EE 1.00 $\mu\text{g/kg}$	Mean	298.0 *	148.2 *
		S.D.	71.9	20.9
		n	6	6
7	EE 3.00 $\mu\text{g/kg}$	Mean	475.4 **	179.2 **
		S.D.	80.1	13.6
		n	6	6
8	EE 10.00 $\mu\text{g/kg}$	Mean	422.4 **	166.8 **
		S.D.	146.9	24.5
		n	6	6
9	EE 0.30 $\mu\text{g/kg}$ + ZM 0.1 mg/kg	Mean	75.7 ##	72.5 ##
		S.D.	8.3	7.4
		n	6	6
10	EE 0.30 $\mu\text{g/kg}$ + ZM 1.0 mg/kg	Mean	50.3 ##	48.1 ##
		S.D.	6.6	6.1
		n	6	6
11	Non-Treat.	Mean	53.0	51.0
		S.D.	4.2	4.3
		n	6	6

Significantly different from control (A) : *, $P<0.05$; **, $P<0.01$. (comparison among group 1-8): (*), $P<0.05$; (**), $P<0.01$. (comparison among group 1-5)Significantly different from control (B) : #, $P<0.05$; ##, $P<0.01$. (comparison among group 5,9,10)