

(参考資料)

「ガルシニアパウダーによる F344 ラットの精巣毒性発生時期と初期像の捕捉
1 及び 5%投与 2,4 週及び 4 週投与 2 週回復検査」の結果概要について

長期投与効果に係る試験と併せ、標記の試験が実施された。その結果等の概要は下記のとおりである。

記

1 目的

1 年間の長期毒性試験において精巣障害が引き起こされたが、その結果のみではその障害の発生時期や影響を受ける標的細胞分画を特定することは困難であることから、ガルシニアパウダー投与による精巣毒性発生時期と組織障害の初期像を把握する。

2 方法

F344/DuCrj ラット(SPF)を用い、長期毒性試験の経過を考慮しつつガルシニアパウダーの 1%及び 5%を混餌経口投与し、2 及び 4 週目、また 4 週投与後 2 週間の休薬期間を置いた 6 週目の各群に対して精巣の病理組織学的検査及び精巣細胞のセルソーター解析[※]を行った。

3 試験結果等の要約

ガルシニアパウダーを投与することにより、5%群の精巣重量は、2 週、4 週及び 4 週投与+2 週の休薬で有意の低値が認められた。1%群においても 4 週投与+2 週の休薬で精巣及び精巣上体の比重量に有意の低値が認められた。

病理組織学的検査においては、投与 2 週目の 5%群の精巣で、セルトリ細胞の空胞化を伴った細胞変性、ライディッヒ細胞の成熟不全や、精巣上体での滞留変性細胞の増加等が認められ、1 %群においても、5 %群にくらべた時の程度は軽微ながら、同様の所見が観察された。

ガルシニアパウダー摂取の影響については、精子細胞を哺育するセルトリ細胞に影響を及ぼし、結果的に精子細胞減少、ひいては精巣及び精巣上体重量の低減につながってゆくものと考えられた。セルソーター解析による結果は、基本的にこうした変化を裏付けるものであった。

[項目別]

- ① 投与期間中に各群の動物が摂取したガルシニアパウダーの
体重 1 kg 当たりの 1 日平均摂取量

ガルシニアパウダー 添加濃度	1.0%	5.0%
平均摂取量 (mg/kg/day)	865	4,657

② 精巣及び精巣上体重量

	0 %群	1.0%群	5.0%群
実重量 (g)			
精巣 2 週目	1.76±0.16	1.57±0.23	1.33±0.31**
4 週目	2.55±0.15	2.58±0.26	2.22±0.30*
4 週 + 2 週休薬	2.92±0.12	2.82±0.16	2.18±0.53*
精巣上体 2 週目	0.21±0.04	0.18±0.02	0.18±0.04
4 週目	0.38±0.05	0.39±0.04	0.34±0.04
4 週 + 2 週休薬	0.71±0.07	0.62±0.10	0.50±0.05**
比重量 (g%)			
精巣 2 週目	1.21±0.10	1.08±0.14	0.95±0.20*
4 週目	1.26±0.07	1.29±0.12	1.11±0.14*
4 週 + 2 週休薬	1.21±0.03	1.13±0.04**	0.93±0.22*
精巣上体 2 週目	0.14±0.02	0.13±0.02	0.13±0.02
4 週目	0.19±0.02	0.20±0.02	0.17±0.02
4 週 + 2 週休薬	0.29±0.03	0.25±0.03*	0.21±0.03**

注：*及び**は、0 %群と比べてそれぞれ 5%、1 %の危険率で有意差があるもの。

③ 病理組織学的検査 (別表)

2 週投与の 5%群の精巣で、生殖細胞のいわゆる sloughing、剥離(exfoliation)、発育(development)不全が認められ、セルトリ細胞では、空胞化を伴った細胞変性が認められた。これに伴って、ライディッヒ細胞の成熟不全や、精巣上体での滞留変性細胞の増加が認められ、それらは、5%群にくらべた時の程度は軽微ながら、2 週間投与の 1%においても同様に観察された。4 週投与の各群の変化についても、以上の 2 週投与における変化と同様であり、投与期間の延長により障害の程度が亢進するという事は必ずしも認められず、むしろ、セルトリ細胞の空胞変性など、変化の軽減傾向の認められるものもあった。4 週投与後 2 週の休薬期間を置いた各群での所見は、以上の変化と大きな相違は認められず、短期レベルでの明瞭な回復はないものと考えられたが、これは、生殖細胞の修復に要すると考えられている約 60 日の回復期間との関連から見ると至当な結果と思われる。

精巣上体では、精細管で脱落した生殖細胞が流入すると共に、成熟精子の流入が減少し、滞留変性細胞残屑の増加と精子の減少が観察される。今回の結果でも精巣障害の強いケースでは、精子滞留が極度に低下していた。

④ セルソーター解析

投与2週後に1%ガルシニア混餌投与で、対照群に比較して精巣細胞総数及び2n分画に、5%投与群ではSub-n、n及び2n分画に有意な減少が認められた。投与4週後では、1%投与群に精巣細胞総数及び2n分画の減少は認められなかったが、5%

投与群では投与2週のものと同様の減少が認められた。尚、休薬2週後には、5%投与群において精巣細胞総数及び4n分画を含む全ての分画で有意の減少を示し、この時点でそうした細胞数の減少は改善しなかった。

表④-1 ラット精巣から単離した細胞総数 ($\times 10^8$ 個)

	2 週	4 週	6 週
0 %	1.15 ± 0.26	1.89 ± 0.30	4.49 ± 0.79
1 %	$0.86 \pm 0.24 *$	1.82 ± 0.18	4.09 ± 0.87
5 %	$0.65 \pm 0.19 **$	$1.14 \pm 0.25 **$	$1.97 \pm 0.75 **$

注：*及び**は、0%群と比べて、それぞれ5%、1%の危険率で有意差があるもの。

表④-2 ラット精巣細胞のセルソーターによる DNA 量のヒストグラム解析結果
(絶対値、 $\times 10^6$ 個)

		Sub-n	n	2 n	4 n
2 週	0 %群	5.7 ± 2.6	56.0 ± 16.0	31.6 ± 6.0	14.1 ± 4.9
	1.0 %群	3.6 ± 1.8	$42.3 \pm 14.4 *$	24.3 ± 5.3	10.7 ± 4.5
	5.0 %群	$2.1 \pm 1.8 **$	$26.3 \pm 12.8 **$	$20.8 \pm 4.3 **$	11.5 ± 4.7
4 週	0 %群	9.9 ± 2.7	102 ± 17	47.2 ± 7.0	16.7 ± 4.6
	1.0 %群	8.5 ± 2.1	99 ± 12	45.0 ± 4.2	17.4 ± 3.6
	5.0 %群	$6.5 \pm 2.4 *$	$55 \pm 17 **$	$32.7 \pm 3.6 **$	12.7 ± 2.8
4 週 + 2 週休薬	0 %群	62.3 ± 22.7	231 ± 39	94.9 ± 18.4	32.0 ± 9.6
	1.0 %群	46.2 ± 24.1	216 ± 45	88.8 ± 13.2	33.1 ± 6.9
	5.0 %群	$25.4 \pm 17.1 **$	$81 \pm 36 **$	$58.4 \pm 13.0 **$	$18.3 \pm 7.4 **$

注：*及び**は、0%群と比べてそれぞれ5%、1%の危険率で有意差があるもの。

⑤ 考察

ガルシニアパウダーを摂取すると、精子細胞を哺育するセルトリ細胞に影響を及ぼす。これにより、セルトリ細胞の壊死もしくは変性(セルトリ細胞の空胞変性)が生じ、精細管に滞留したセルトリ細胞は、影響の程度により、成熟型により近い精子細胞から順次変性離脱(生殖細胞の剥離)を惹きおこし、結果的に精子細胞減少、ひいては精巣及び精巣上体重量の低減につながってゆくものと考えられる。セルソーターによる検索結果は、参考データではあるが、基本的にそうした変化を定量的に裏付けている。

2 週投与の各群における変化が、その後継続投与された 4 週群にくらべてむしろ変化が顕著であったことは、性成熟の急速に進行しつつある 7~11 週齢のラットを用いて行われており、この時期の性成熟の急速な進展に関連するものと考えられる。

慢性毒性試験で認められた、5%群の病理組織学的検査における両側性の精細管の萎縮と生殖細胞の剥離あるいは消失は、今回の 4 週間投与試験で認められた精

細管のセルトリ細胞の空胞変性から始まる障害が、慢性的に極度に進行し最終的に精巣機能が疲弊して起こった結果と考えられる。そしてその定性的初期変化は、5%群の投与2週で明らかに観察され、また、1%群においてもその影響の有無の総合的評価には確定し得ない面がありつつも、無視できない変化と考えられる。

注：セルソーター解析

セルソーターは、微細なノズルを通過する際に、個々の試料細胞にレーザー光を照射してその試料細胞から発せられる散乱光や蛍光の観測を経て、特定の細胞集団の解析・定量・分取ができる装置である。この試験では、セルソーターにより、単離した精巣細胞を DNA 量と細胞の大きさにより分類し、分類された細胞集団へのガルシニアパウダー摂取の影響を定量的に解析した。

別表 ガルシニアパウダーを4週間投与したラットの病理組織学的所見

Group of animals examined		2 week			4 week			Recovery ^{a)}			
		0%	1%	5%	0%	1%	5%	0%	1%	5%	
		8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Organ / Finding											
Testis											
(精巣)	Atrophy of seminiferous tubulus	—	6	7	4	7	4	5	5	3	1
	(精細管の萎縮)	±	2	1	4	1	4	2	3	5	5
	Edema of intertubular space	—	5	6	6	3	2	1	7	7	4
	(精細管間隙の水腫)	±	3	2	2	5	6	7	1	1	4
	Sloughing (+desquamation) of germ cell	—	7	5	1	5	2	3	4	1	0
(生殖細胞のいわゆる sloughing)		±	1	3	7	3	4	5	4	6	1
		+	0	0	0	0	2	0	0	1	7
	Exfoliation of germ cell	—	0	0	0	2	1	0	0	0	0
(生殖細胞の exfoliation)		±	8	8	0	6	6	2	6	3	1
		+	0	0	8	0	1	6	2	5	4
		++	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	Development of germ cell	++	0	0	0	8	7	2	1	1	1
(生殖細胞の発育)		+	7	8	0	0	0	5	5	7	7
		±	1	0	8	0	1	1	2	0	0
		—	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vacuolar degeneration of Sertoli cells	—	7	6	2	7	5	4	6	8	3
(セルトリ細胞の空胞変性)		±	1	1	1	1	3	4	2	0	3
		+	0	1	5	0	0	0	0	0	2
	Maturation of Leydig cell	+	7	8	2	7	4	4	4	5	5
(ライディッヒ細胞の成熟)		±	1	0	6	1	4	3	4	3	3
		—	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Appearance of giant cell	—	8	8	8	8	8	4	8	8	8
(巨細胞の出現)		±	0	0	0	0	0	2	0	0	0
		+	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		++	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Epididymis (精巣上体)											
	Sperm contents	++	0	0	0	8	8	7	8	8	2
(精子の滞留量)		+	0	0	0	0	0	0	0	0	2
		±	0	0	0	0	0	0	0	0	2
		—	8	8	8	0	0	1	0	0	2
	Cell debris	—	7	8	8	4	5	0	2	0	0
(滞留する精子と その他の細胞の 変性残屑)	Sperm	±	1	0	0	4	3	5	6	8	0
		+	0	0	0	0	0	3	0	0	2
		++	0	0	0	0	0	0	0	0	6
	Others	—	5	6	1	8	6	2	3	2	0
		±	3	2	3	0	1	3	5	6	4
		+	0	0	2	0	1	3	0	0	3
		++	0	0	2	0	0	0	0	0	1

± 極軽度、+ 軽度、++ 中等度、+++ 高度

a) Recovery group: 投与4週+2週休薬の群

b) 障害を伴った動物数