

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

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター

井上 達

関田 清司
菅野 純
北嶋 聡
内田 雄幸
鈴木 幸子
小川 幸男

要約

〔背景と目的〕 今回検討対象となったガルシニアでは、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、その結果のみでは当該の障害の発生時期と、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。そこで精巣への障害発生の時期及び発現機構を検討するため、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い、精巣毒性発現の時期を特定すると共に、組織障害の初期像ならびに影響を受ける細胞分画を捕捉することとした。すなわち、ガルシニアパウダーの投与による精巣細胞への作用の、探索的な実験である。また、短期間の範囲で精巣障害の回復性をも検討した。尚、補足的に血清中ホルモン濃度の測定及び元素分析なども行ったが、これについては結果の整理を行うに十分なデータが得られなかったので、後日、必要なデータの追加を待って別途報告することとする。

〔病理学的検索〕 ガルシニアパウダーを投与することにより、5%投与群で、精巣の実重量及び比重量では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。2週の休薬期間を置いても5%のみならず1%においても、精巣及び精巣上体の比重量に有意の低値が認められた。病理組織学的検査では、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。以上、ここで見られる所見は、比較的広範な生殖細胞分化系列に影響が及び、これらの生育と密接な関係をもつセルトリ細胞そのものにも要因のほぼ特定できない空胞変性が認められることに鑑みて、その標的はセルトリ細胞にあるものと推定される。

〔セルソーター解析〕 セルソーター解析では、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。

ガルシニア投与の影響を受ける細胞分画としては、5%ガルシニア2週投与の解析結果から、2n分画、sub-n分画及びn分画と考えられた。その後、最終的には、精母細胞分画である4n分画が影響を受け、精巣細胞全体の数の減少に通じているものと考えられた。この種の作用の可能性の特定は、困難であるが、2n分画に属し哺育細胞であるセルトリ細胞がまず影響を受け、その後、二次的に精子細胞(sub-n、n分

画)及び精母細胞(4n 分画)が影響を受けたものと考えることには矛盾がない。

〔考察〕 以下、病理組織学的検索結果に、セルソーター解析の結果を参考として加えて考察をおこなう。

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、結果的に精子細胞の減少、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、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。すなわち実験はこの間、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、精巣重量の変化、組織学的所見、参考資料としてのセルソーター解析における変化は、この対数性の成熟発達経過を考慮して、また、併せて、十分な幅を以って考察される必要のあることが示唆されているものと思われる。

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。

「F344 ラットによるガルシニアパウダーの 1 年間反復投与毒性試験法による長期投与の効果」(以下、「慢性毒性試験」という。)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、短期間投与試験で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。

1. 目的

本実験の目的は限定的な目的、すなわち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ことにある。この目的のために、雄性 F344 ラット (5 週齢) に、5%、1% 及び 0% のガルシニアパウダーを、2 及び 4 週間混餌投与するとともに、4 週間投与後休薬 2 週間を置く実験を行い、各時期に精巣及び精巣上体の病理組織学的検査とあわせて、我々が開発したセルソーターを用いる精子形成過程解析を行った。また、セルソーター解析と同時に、単離精巣細胞総数を測定した。

尚、病理組織学的検索に比べ、セルソーター解析の結果は、より鋭敏であると思われるが、その結果を直ちにリスク評価に利用できるか否かについては確定しておらず、今後の更なるバリデーション等の研究を待たねばならないことに、留意する必要がある、当面、今回の実験目的の範囲でのみ参考とすることが肝要である。

2. 材料及び方法

2. 1. 動物

4 週齢の F344/DuCrj ラット(SPF) 雄 83 匹を日本チャールスリバーより購入し、一週間順化の後、健康状態が良好で、試験開始日体重及び入荷時からの体重増加量がいずれも平均的な動物 72 匹を選択して用いた。群分けは、各群の平均体重がほぼ等しくなるように体重層別無作為割り当てにより行った。1 群中の動物数は 24 匹とし、被験物質の項で述べるように 1.0 及び 5.0% の 2 投与群、及び対照群(0%) の計 3 群に振り分けた。

飼育は、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、照明サイクル 12 時間(照明 5:00~17:00)の SPF 飼育室で、ポリカーボネート製ケージに 4 匹ずつ収容し、市販の動物用飼料(オリエンタル酵母工業、東京)と水道水を自由に摂取させた。実験開始時の 5 週齢雄ラットの平均体重は、81.8g(77~86g)であった。

2. 2. 被験物質及び投与量

慢性毒性試験で使用した、ガルシニアパウダー(ヒドロキシクエン酸約 66.2%含有、カルシウム塩タイプ、やや黄褐色を帯びる白色粉末、Lot No.10.06.08-001)を用いた。ガルシニアパウダーは、乾燥果皮から水で抽出したエキスをカルシウムを加えてヒドロキシクエン酸を安定化した後、乾燥粉末化したものである。

慢性毒性試験において 26 週で精巣重量に影響の見られた高用量 5%、26 週では影響の見られない中用量 1%を投与量として設定し、これに基礎飼料のみを与える対照(0%)群を含め、計 3 群とした。

添加飼料の製造は隔週毎に行い、0、1 及び 5%の割合でガルシニアパウダーをラット飼育用粉末飼料(オリエンタル酵母工業製)に添加混合した。これらの飼料を、5 週齢より各群の 24 匹のラットに 4 週間自由に摂取させ、2 週間の休薬期間にはガルシニアパウダー無添加の粉末飼料を自由に摂取させた。

2. 3. 体重及び摂餌量の測定

0、1 及び 5%添加飼料を 4 週間投与し、その後無添加の粉末飼料で飼育し、2 週間の休薬期間を置き影響の回復性を検討した。その間、体重及び摂餌量を毎週測定するとともに、毎日動物の一般状態を観察し、死亡や瀕死の動物の早期発見に努めた。

2. 4. 病理検査

投与 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 週目に各群 8 匹のラットを屠殺し、剖検を行なった。精巣、精巣上体、副腎及び下垂体(固定後)については重量を測定、10%ホルマリン液で固定し、精巣については右側をブアン液により固定し、常法によりパラフィン組織標本を作成し、病理組織学的検査を行なうこととした。左精巣については、セルソーターによる精巣細胞解析を行った。重量を測定した臓器については、体重比重量を求めた。

4 週投与後 2 週間の休薬期間を置いた各群 8 匹のラットは、屠殺 1 時間前に、ブロムデオキシウリジン(BrdU, SIGMA, Lot.108H0544, 純度 99%)を生理的食塩液で 1%に溶解し、その 50mg/kg を腹腔内投与し、右精巣を急速ホルマリン固定後、正中 2 分割して半分はブアン液により固定、残り半分をホルマリン固定し、薄切標本作成後に精巣の細胞増殖活性部位を明確にさせる染色を可能にする。

2. 5. セルソーターによる精巣細胞解析

2.5.1. セルソーター解析の特徴

セルソーターは、懸濁させた単離細胞が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、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、細胞の解析・定量・分取ができる装置である。このセルソーター解析により、細胞表面抗原の分析・分取や、細胞の大きさによる分類・定量、細胞の DNA 量の分析などが可能となる。

ラットの精子形成サイクルは、14 のステージに分けられており、その過程の把握は、これまで複雑なステージ解析等の形態学的観察・形態計測に基づいていた。

セルソーターを用いることにより、形態学的検索に比較し、より短時間で、また感度よく定量解析が可能となる。

これまでに我々は、精巣細胞の単離法ならびにそのセルソーター解析の確立を行っており、その結果、細胞の DNA 量のヒストグラム解析および前方散乱光 (FSC) DNA 量プロットによる解析の結果、精巣摘出後約 5 時間で、少なくとも 7 つの精巣細胞のサブクラスの検出ができ、また各々の定量化もできることを示してきた (図 1; 加藤ら、J Toxicol Sci、投稿中)。この FSC は、細胞の大きさを反映するパラメーターであり、FSC の値が大きいほど、細胞が大きいことを表わす。背景データとして、13 週齢の SD ラット単離精巣細胞を用いたセルソーター解析の場合を挙げると、各 DNA 量(sub-n, n, 2n,4n)に該当する精巣細胞の、精巣細胞総数に対する相対的な割合は、それぞれ 29%、41%、18%、8%であった。また、FSC-DNA 量プロット上の 7 つの分画 (以下、DNA-FSC で表現し、FSC については、細胞が大きい分画を R、小さい分画を L とする) での精巣細胞の相対的な割合は、sub-n: 29%、n-L: 17%、n-R: 24%、2n-L: 9%、2n-R: 9%、4n-L: 4%、4n-R: 4%、であった。さらに、セルソーティング後の観察により、各サブクラスの細胞に相同性が認められ各々のアドレスを決定している。具体的には、DNA 量に対する細胞集団は、sub-n:精子細胞の内 elongated spermatid、n: 精子細胞の内 round spermatid および elongating spermatid、2n: 精粗細胞および体細胞であるセルトリ細胞、ライディヒ細胞、4n: 精母細胞であった。また、FSC-DNA 量プロット上の 7 つの分画に対応する細胞集団は、sub-n: 精子細胞の内 elongated spermatid、n-R: 精子細胞の内 round spermatid、n-L: 精子細胞の内 elongating spermatid、4n-R:精母細胞の内パキテン期精母細胞およびザイゴテン期精母細胞、4n-L:精母細胞の内ザイゴテン期精母細胞およびレプトテン期精母細胞と考えられた。

2.5.2. 方法

雄性 F344 ラットの左側精巣を摘出し、0.25%コラゲナーゼ処理及びナイロンメッシュによるろ過により単離精巣細胞を得た。各左側全単離精巣細胞数を測定するとともに、単離精巣細胞を 70%冷メタノールで 4℃、1 時間固定し、PBS で洗浄後、4℃で保存した。翌日、0.25% RNase 処理を施し、50 μ g/ml propidium iodide (PI) による DNA の染色をおこなった。その後、 2×10^6 (cells/ml) の単離精巣細胞サンプルに対し、セルソーター(FACSCalibur, Becton Dickinson) を用いて、DNA 量と細胞の大きさに基づき、30 万個の単離精巣細胞をカウントし、7 つのサブクラスに分類、定量することにより解析した。

2.5.3. 統計処理

平均値と標準偏差(S.D.)で示した。検定は、Student's *t*-test を用い、 $P<0.05$ の場合を有意差ありと判断した。

3. 結果及び考察

3. 1. 体重及び摂餌量

体重では、5%群で1週及び2週で、対照群に比べ有意の低値を示したが、1%群では変化が認められなかった。5%群の低値は、表1に示すように、4~6g 程度であった。

各群の1匹の1日当たりの平均摂餌量は、表2のごとくに2.5週より4週まで5%群で1g程度の増加を示した。

表1、ガルシニアパウダーを投与したラットの6週までの体重

群	0 week	1 week	2 week	2.5 week	3 week
0 %	86.4±3.1	119.6±5.1	149.3±5.6	174.7±6.5	187.9±6.4
1 %	86.3±3.0	119.8±5.1	149.0±7.0	175.3±9.5	188.5±9.8
5 %	86.0±2.4	114.8±4.0**	143.1±5.7**	168.4±7.7	182.8±8.0
群	3.5 week	4 week	4.5 week	5 week	5.5 week
0 %	203.4±6.9	210.7±6.5	224.5±7.5	232.6±7.4	244.0±9.2
1 %	203.2±10.5	210.9±11.2	231.3±13.4	241.5±14.5	251.5±14.8
5 %	197.9±8.7	205.9±8.8	219.5±9.2	227.6±10.5	238.0±9.2
群	6 week				
0 %	248.9±8.0				
1 %	256.8±15.7	*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり			
5 %	242.6±9.8				

表2、ガルシニアパウダーを投与したラットの6週までの摂餌量

群	1 week	2 week	2.5week	3 week	3.5week
0 %	12±0.2	14±0.2	15±0.2	16±0.2	16±0.5
1 %	12±0.2	14±0.3	15±0.6	16±0.5	16±0.7
5 %	12±0.3	14±0.6	16±0.6 *	17±0.2**	17±0.2
群	4 week	4.5week	5 week	5.5week	6 week
0 %	16±0.5	16±0.8	16±0.8	16±0.0	16±0.4
1 %	16±0.5	15±0.4	17±0.2	17±0.8	16±0.3
5 %	17±0.8	16±0.1	16±0.0	16±0.6	16±0.9

*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり

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1日の体重1kg当たりの平均値(mg/kg/day)は、表3のごとくである。慢性毒性試験では52週の期間で体重が400gまで増加したため、平均検体摂取量が1.0%群で462.6mg/kg、5.0%群で2460.9mg/kgとなったが、本試験では体重が200g程度であったため、体重当たりの平均摂取量が倍になったものである。

表 3、ガルシニアパウダーを投与したラットのガルシニア摂取量		
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±92	4657±400

3. 2. 臓器重量

3.2.1. 投与 2 週

5%群に精巣の実及び比重量で有意の低値が認められ、1%群においても有意差は認められないものの、用量に伴った減少傾向が見られた。しかしながら、5%群において1例対照群の平均値と同様の1.78gの精巣を有する例や、対照群においても1例に1%群の平均値を下回る1.42gの精巣を有する例も見られた。

表 4、ガルシニアパウダーを2週間投与したラットの精巣及び精巣上体重量

群	最終体重	精巣 ^{a)}	精巣 ^{b)}	精巣上体 ^{a)}	精巣上体 ^{b)}
0%	145.3±6.9	1.76±0.16	1.21±0.10	0.21±0.04	0.14±0.02
1%	144.9±6.2	1.57±0.23	1.08±0.14	0.18±0.02	0.13±0.02
5%	139.0±6.7	1.33±0.31**	0.95±0.20 *	0.18±0.04	0.13±0.02

a): 実重量(g)、b): 比重量(g%)、*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり

3.2.2. 投与 4 週

5%群に精巣の実及び比重量で有意の低値が認められたが、1%群においては対照群と同様の値を示した。しかしながら、5%群には1例対照群の平均値に近い2.48gの精巣を有する例や、対照群においても1例に5%群の平均値と同じ2.22gの精巣を有する例も見られた。

慢性毒性試験で低下が認められた精巣上体は、2週および4週間投与した5%群で若干低値を示したが有意差はなかった。

表 5、ガルシニアパウダーを4週間投与したラットの精巣及び精巣上体重量

群	最終体重	精巣 ^{a)}	精巣 ^{b)}	精巣上体 ^{a)}	精巣上体 ^{b)}
0%	203.5±5.9	2.55±0.15	1.26±0.07	0.38±0.05	0.19±0.02
1%	200.9±8.0	2.58±0.26	1.29±0.12	0.39±0.04	0.20±0.02
5%	199.3±10.0	2.22±0.30 *	1.11±0.14 *	0.34±0.04	0.17±0.02

a): 実重量(g)、b): 比重量(g%)、*: 5%で有意差あり

3.2.3. 投与 4 週休薬 2 週

5%群に精巣の実及び比重量で有意の低値が認められ、1%群においては比重量で有意の低値が認められた。しかしながら、1%群には1例0%群の平均値を上回る3.05gの精巣を有する例が見られた。

慢性毒性試験で低下が認められた精巣上体は、2週および4週間投与した5%群で若干低値を示すものの大きな影響はなかったが、6週において実及び比重量で有意の低値が5%群に認められ、1%群においても比重量で有意の低値が認められ、精子の産生が低減していることを示唆していた。

表 6、ガルシニアパウダーを 4 週間投与し、2 週間休薬期間を置いたラットの精巣及び精巣上体重量

群	最終体重	精巣 ^{a)}	精巣 ^{b)}	精巣上体 ^{a)}	精巣上体 ^{b)}
0%	241.5±9.3	2.92±0.12	1.21±0.03	0.71±0.07	0.29±0.03
1%	250.1±16.2	2.82±0.16	1.13±0.04**	0.62±0.10	0.25±0.03 *
5%	235.6±10.0	2.18±0.53 *	0.93±0.22 *	0.50±0.05**	0.21±0.03**

a): 実重量(g)、b): 比重量(g%)、*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり

3. 3. 病理解剖学的所見

2 週検査で 5%群は 6 例(6/8)に、1%群では 2 例(2/8)に両側性の精巣の小型化が観察された。しかしながら、対照群の 1 例(1/8)に小型化(1%群の平均的な大きさを下回る)した精巣を有する例も見られた。

4 週検査で 5%群の 1 例(1/8)に、両側性の精巣の小型化が観察された。しかし、2 週目で見られた 5%群の全体的な両側性の精巣の小型化傾向は、明確には観察されなかった。

4 週間投与し 2 週の休薬期間を置いた 6 週の検査では、1%群に小型化した精巣はみられず、5%群に両側性の精巣の小型化が 4 例(4/8)観察された

3. 4. 病理組織学的所見(別表 1)

別表 1 にその詳細を示したように、5%群の精巣及び精巣上体では、対照群で見られる変化のより程度が強いもの、あるいは例数の多い所見が多く見られ、以下では対照群で見られるより変化の程度が強いものあるいは例数の多い所見を中心に結果を示した。

3.4.1. 投与 2 週目の変化

精巣の 5%群では、精細管に生殖細胞のいわゆる *sloughing* と呼ばれる間質の細胞を伴った変性像が 7 例、生殖細胞の *exfoliation* が 8 例、生殖細胞の発育(*development*)不全が 8 例に認められた。また、セルトリ細胞そのものの空胞変性も 5 例、ライデッヒ細胞の成熟不全像が 6 例に見られた。1%群においても精巣の精細管に生殖細胞の *sloughing* が 3 例、セルトリ細胞の空胞変性が 1 例に見られ、5%群に比しやや軽度ながら同様の变化であった。1%群における精細管の萎縮や浮腫については、対照群にも認められる境界領域に属する変化であった。

精巣上体の滞留変性細胞残屑の増加については、5%群で 4 例に観察された。尚、この週齢の雄ラットにおいては、精子は成熟しておらず、従って精巣上体にも通常認められないものである。

3.4.2. 投与 4 週の変化

精巣では、5%群の精細管に萎縮が 1 例、生殖細胞の *exfoliation* が 6 例、生殖細胞の発育(*development*)不全が 6 例、セルトリ細胞の空胞変性が 4 例、ライデッヒ細胞の成熟不全が 4 例、巨細胞の出現が 4 例に見られた。1%群では生殖細胞の *sloughing* が 2 例、生殖細胞の *exfoliation* が 1 例、生殖細胞の発育(*development*)不全が 1 例、セルトリ細胞の空胞変性が 3 例、ライデッヒ細胞の成熟不全が 4 例に認められた。しかしながら、精細管の萎縮や浮腫については、対照群にも認められる境界領域に属する程度の変化であった。

精巣上体の精子の減少は 5%群の 1 例で強く観察され、滞留細胞残屑の変性精子の

増加は、5%群で3例、その他の変性細胞の増加では6例に見られた。1%群では、滞留変性細胞残屑の増加が2例に見られた。

3.4.3. 投与4週+休薬2週における変化

精巣では、5%群の精細管の萎縮が2例、精細管の浮腫が4例、生殖細胞の sloughing が7例、生殖細胞の exfoliation が3例、セルトリ細胞の空胞変性が2例、1%群では精細管の生殖細胞の sloughing が1例認められた。対照群でも生殖細胞の発育 (development) 不全、ライデッヒ細胞の成熟不全、セルトリ細胞の空胞変性がそれぞれ観察されており、これらは境界領域に属する程度の変化であった。

精巣上体では、精子の減少は5%群の6例で観察され、滞留細胞残屑の変性精子の増加は、5%群で8例、その他の細胞の増加では4例に見られた。

投与4週後に休薬期間を2週置いたが、5%群の精巣及び精巣上体の障害の程度は、あまり改善されていないものと思われた。

ブロムデオキシユリジン(BrdU)染色の結果、対照群ならびに投与群の各群間の精巣の生殖細胞に BrdU 取り込みの差はみられなかった。しかし、5%群の生殖細胞の間に不規則な BrdU 取り込み、すなわち染色性のばらつきが認められた。

3.4.4. 病理組織学的所見のまとめ

5%のガルシニアパウダーを2週間摂取すると、精巣ではの生殖細胞の sloughing、生殖細胞の exfoliation、セルトリ細胞の空胞変性、ライデッヒ細胞の成熟不全が見られ、精巣上体では生殖細胞残屑のその他の細胞の増加が起こる。2週間1%の摂取でも、5%に比し弱いながらも、同様の変化が発現する。しかし、摂取期間が延びるに連れ、変化の程度はそれほど強くなるものではなかった。4週投与後2週の休薬期間を置いても、変化の程度はあまり改善されない。これは、精巣の生殖細胞の修復にはさらに長期間を要することが知られており、2週の休薬後に検査を行った所見に対して回復性を論ずることはできない。

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し、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、哺育している成熟により近い精子あるいは精子細胞から順次離脱(生殖細胞の剥離)させ、結果として、成熟した精子の産生は減少し、精巣及び精巣上体の重量は低減する。一方、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ようになったものと考えられる。

3. 5. セルソーターによる精巣細胞解析

3.5.1. 左精巣単離細胞の総数

左精巣からコラゲナーゼにより単離された精巣細胞の総数は、2週検査では、投与量に応じてその数を減じ、1及び5%群で有意差を示した。

4週検査では、5%群でのみ有意の減少を示し、1%群においては、対照群と差はなかった。

4週投与し休薬2週後の検査では、4週検査時に比し0及び1%群でその数の増加が著しいが、5%群ではわずかな増加に止まり、4週からの2週間の休薬による回復性は良好ではなかった。

表 7、ガルシニアパウダーを投与したラットの総単離精巢細胞数($\times 10^8$ 個)

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

*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり

3.5.2. 投与 2 週後のセルソーター解析

2 週のセルソーターによる精巢細胞の DNA 量のヒストグラム解析では、相対値(一定数の細胞に対する割合)においては、5%群のみに n 分画で有意の減少、2n 分画及び 4n 分画で有意の増加を示すが、表 8-1 のように精巢細胞の絶対数においては 5%群の sub-n 分画、n 分画、2n 分画で有意の減少、1%群では 2n 分画に有意の減少を示した。

また、FSC-DNA 量プロットによる解析では、表 8-2 のように 5%群の絶対数において、4nL 分画、4nR 分画以外の分画の全てで有意な減少を示した。また、1%群においても、2n R 分画において有意な減少が認められた。

表 8-1、ガルシニアパウダーを 2 週間投与したラット精巢細胞のセルソーターによる FSC-DNA 量プロット解析結果(絶対値、 $\times 10^6$ 個) (7 週齢ラット)

群	Sub-n	n	2n	4n
0 %	5.7 $\pm$ 2.6	56.0 $\pm$ 16.0	31.6 $\pm$ 6.0	14.1 $\pm$ 4.9
1 %	3.6 $\pm$ 1.8	42.3 $\pm$ 14.4	24.3 $\pm$ 5.3 *	10.7 $\pm$ 4.5
5 %	2.1 $\pm$ 1.8 **	26.3 $\pm$ 12.8 **	20.8 $\pm$ 4.3 **	11.5 $\pm$ 4.7

*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり

表 8-2 ガルシニアパウダーを 2 週間投与したラット精巢細胞のセルソーターによる FSC-DNA 量プロット解析結果 (絶対値、 $\times 10^6$ 個)

群	Sub-n	nL	nR	2nL	2nR
0 %	5.7 $\pm$ 2.6	4.3 $\pm$ 2.3	51.7 $\pm$ 16.8	17.6 $\pm$ 4.2	14.1 $\pm$ 4.1
1 %	3.6 $\pm$ 1.8	2.9 $\pm$ 1.8	39.4 $\pm$ 14.0	14.2 $\pm$ 3.5	10.1 $\pm$ 2.8 *
5 %	2.1 $\pm$ 1.8 **	1.6 $\pm$ 0.9 **	33.1 $\pm$ 14.5 *	13.1 $\pm$ 2.7 *	7.7 $\pm$ 2.5 **
群	4nL	4nR			
0 %	5.3 $\pm$ 2.2	8.7 $\pm$ 3.0			
1 %	4.3 $\pm$ 2.1	6.5 $\pm$ 2.6			
5 %	5.5 $\pm$ 2.2	6.0 $\pm$ 2.7			

*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり

3.5.3. 投与 4 週後のセルソーター解析

4 週では、精巢細胞 DNA 量のヒストグラム解析の相対値において、5%群のみに n 分画で有意の減少、2n 分画及び 4n 分画で有意の増加を示すが、表 9-1 のように精巢細胞の絶対数において 5%群の sub-n 分画、n 分画及び 2n 分画で有意の減少を示した。1%群においては、0%群と大きな差はなく、2 週検査時点から回復していた。

また、FSC-DNA 量プロットによる解析において、表 9-2 のように 5%群の精巢細胞の絶対数は、2 週投与の結果と同様、4nL, 4nR 以外の分画の分画全てで有意な減少を示した。