

表 9-1、ガルシニアパウダーを 4 週間投与したラット精巣細胞のセルソーターによる解析結果(絶対値、 $\times 10^6$ 個) (9 週齢ラット)

群	Sub-n	n	2n	4n
0 %	9.9 $\pm$ 2.7	102 $\pm$ 17	47.2 $\pm$ 7.0	16.7 $\pm$ 4.6
1 %	8.5 $\pm$ 2.1	99 $\pm$ 12	45.0 $\pm$ 4.2	17.4 $\pm$ 3.6
5 %	6.5 $\pm$ 2.4 *	55 $\pm$ 17 **	32.7 $\pm$ 3.6 **	12.7 $\pm$ 2.8

*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり

表 9-2 ガルシニアパウダーを 4 週間投与したラット精巣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 %	9.9 $\pm$ 2.7	11.7 $\pm$ 3.4	90 $\pm$ 15	22.1 $\pm$ 3.5	25.1 $\pm$ 3.8
1 %	8.5 $\pm$ 2.1	10.6 $\pm$ 1.7	88 $\pm$ 12	21.0 $\pm$ 2.3	24.0 $\pm$ 2.9
5 %	6.5 $\pm$ 2.4 *	4.3 $\pm$ 1.3 **	50 $\pm$ 16 **	14.8 $\pm$ 1.6 **	18.0 $\pm$ 2.5 **
群	4nL	4nR			
0 %	6.8 $\pm$ 2.1	9.9 $\pm$ 2.8			
1 %	7.2 $\pm$ 2.0	10.2 $\pm$ 1.9			
5 %	5.2 $\pm$ 1.6	7.4 $\pm$ 1.8			

*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり

3.5.4. 投与 4 週休薬 2 週後のセルソーター解析

4 週間投与し、2 週間回復期間を置いた検査の精巣細胞 DNA 量のヒストグラム解析の相対値においては、5%群のみに n 分画で有意な減少、2n 分画及び 4n 分画で有意な増加を示すが(データは示さず)、表 10-1 のように絶対数では 5%群の sub-n 分画、n 分画及び 2n 分画さらに 4 週まで変化のなかった 4n 分画の全ての分画で有意な減少を示した。4 週からの 2 週間の休薬による効果は顕著に認められず、さらに 4n 分画まで有意の減少を示し、2 週間の休薬期間ではまだその影響が持続していることが示唆された。

また、FSC-DNA 量プロットによる解析において、表 10-2 のように 5%群の精巣細胞の絶対数は、4 週まで変化のなかった 4nL, 4nR 分画を含む全ての分画で有意な減少を示した。

表 10-1、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細胞のセルソーターによる解析結果(絶対値、 $\times 10^6$ 個) (11 週齢ラット)

群	Sub-n	n	2n	4n
0 %	62.3 $\pm$ 22.7	231 $\pm$ 39	94.9 $\pm$ 18.4	32.0 $\pm$ 9.6
1 %	46.2 $\pm$ 24.1	216 $\pm$ 45	88.8 $\pm$ 13.2	33.1 $\pm$ 6.9
5 %	25.4 $\pm$ 17.1 **	81 $\pm$ 36 **	58.4 $\pm$ 13.0 **	18.3 $\pm$ 7.4 **

*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり

表 10-2 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
精巣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 %	62.3 $\pm$ 22.7	44.7 $\pm$ 10.2	187 $\pm$ 32	47.5 $\pm$ 9.4	47.3 $\pm$ 9.5
1 %	46.2 $\pm$ 24.1	36.2 $\pm$ 14.4	180 $\pm$ 33	44.3 $\pm$ 7.6	44.5 $\pm$ 6.4
5 %	25.4 $\pm$ 17.1 **	9.2 $\pm$ 5.1 **	72 $\pm$ 31 **	29.4 $\pm$ 4.7 **	29.0 $\pm$ 9.0 **
群	4nL	4nR			
0 %	12.7 $\pm$ 3.6	19.3 $\pm$ 6.2			
1 %	12.8 $\pm$ 3.0	20.3 $\pm$ 4.1	*: 5%で有意差あり、 **: 1%で有意差あり		
5 %	8.1 $\pm$ 2.7 *	10.2 $\pm$ 4.8 **			

3.5.5. セルソーターによる解析結果のまとめ

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%では精巣細胞総数及び 4n 分画以外つまり 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%ガルシニア混餌投与において、精巣細胞総数及び 2n 分画を含むすべての分画の減少は認められなかったが、5%投与群では投与 2 週のものと同様な結果であった。尚、休薬 2 週後では、1%投与群では変化がないが、5%投与群では精巣細胞総数及び 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 週投与の精巣から、2n 分画および sub-n 分画、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、精巣細胞全体の数を減じているものと考えられた。今回認められた以上のような諸変化の原因の特定は困難であるが、その可能性の一つとして、2n 分画に属し哺育細胞であるセルトリ細胞が先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られることができる。

ガルシニア投与の回復性については、5%ガルシニア混餌投与(4 週間)後 2 週間の休薬期間においても、対照群に比較して有意な変化が認められ、障害の改善は認められなかった。

4. 考察及びまとめ

ガルシニアパウダーを 4 週間投与することにより、5%投与の、体重では 1 及び 2 週で低値、摂餌量は、2.5 及び 3 週で高値を示し、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 週間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があった。4 週投与後 2 週間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先ず影響を受け、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。

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、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。

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。

別表 1 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										
Atrophy of seminiferous tubulus	—	6	7	4	7	4	5	5	3	1
	±	2	1	4	1	4	2	3	5	5
	+	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Edema of intertubular space	—	5	6	6	3	2	1	7	7	4
	±	3	2	2	5	6	7	1	1	4
Sloughing (+desquamation) of germ cell	—	7	5	1	5	2	3	4	1	0
	±	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
	±	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
	+	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
	±	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
	±	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
	±	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										
Sperm contents	++	0	0	0	8	8	7	8	8	2
	+	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
	±	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

±: slight, +: mild, ++: moderate, +++: severe

a) Recovery group: 2 weeks recovery period after 4 weeks treatment

b) Number of animals with lesion

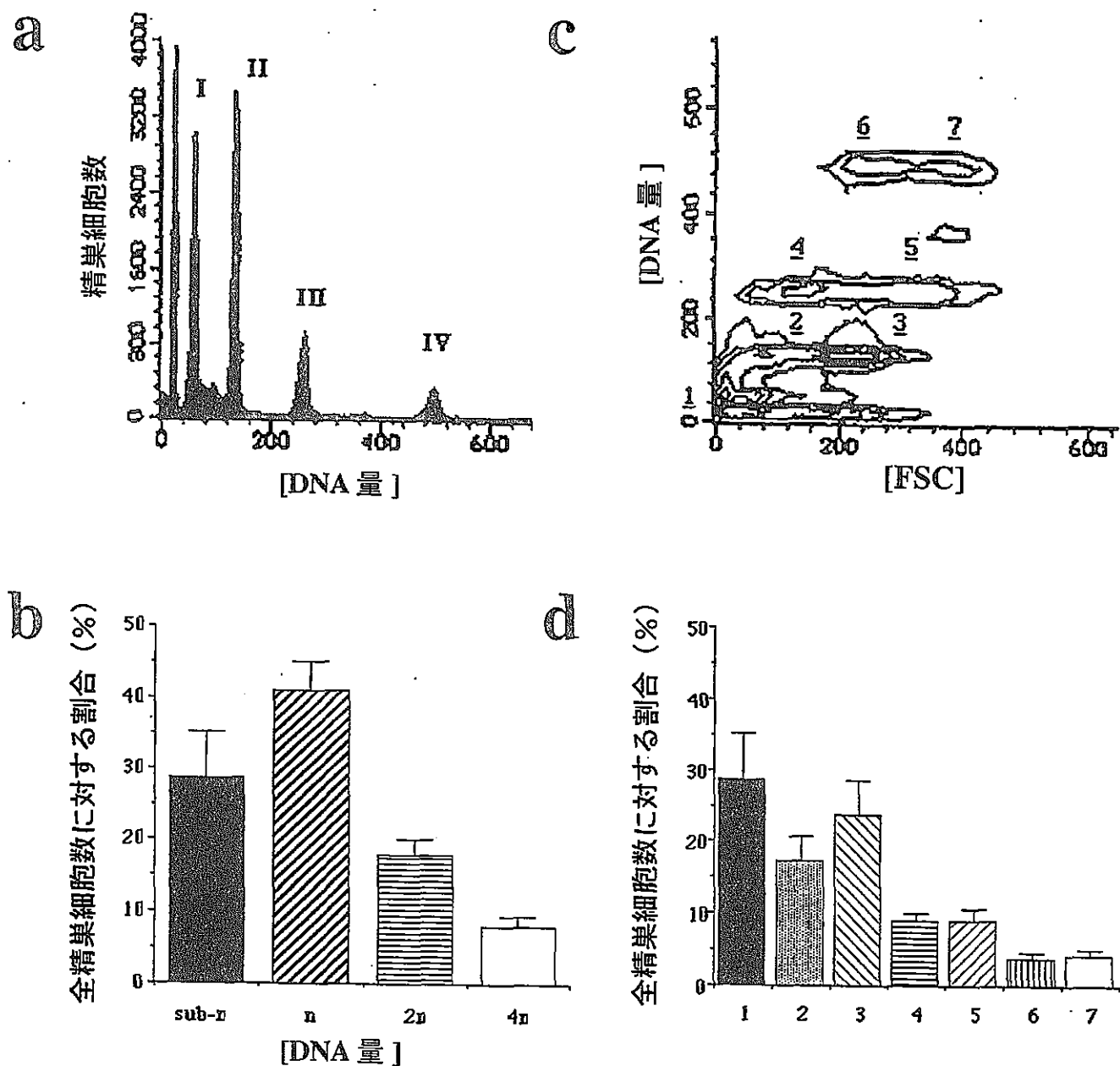


図 1. SD ラット (13 週齢) 単離精巣細胞を用いた、セルソーター解析結果 (背景データ)

a: DNA 量 (propidium iodide 染色) のヒストグラム。それぞれのピーク (I, II, III, IV) は、細胞の DNA 量 (sub-n, n, 2n, 4n) に対応する。b: a の定量図。平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=22$)。c: FSC (前方散乱光) - DNA 量プロット。精巣細胞は、少なくとも 7 つのサブクラスに、分類できた。d: c の定量図。平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=22$)。各数字は、c のグラフ中の各数字に対応する。