

論 文 要 旨

Testicular Development in Cynomolgus Monkeys

カニクイザルにおける精巣の発達

春山 恵美子

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

最近の医薬品開発の傾向はバイオ製剤の比率が増加している。これらのバイオ製剤ではげっ歯類に活性を示さないものも多く、その場合はサルを用いた毒性評価が主流となる。生殖発生毒性評価として、このような医薬品ではサルでの精巣毒性評価が期待されている。

そこで、新日本科学において2008年8月～2009年8月の1年間に実施された反復投与毒性試験で使用された対照群の雄カニクイザル136例について、それらの性成熟度を精子形成過程の発達状況及び精巣上体の精子貯留状況から、6段階(1: Immature, 2: Pre-pubertal, 3: Onset of puberty, 4: Pubertal, 5: Early adult, 6: Adult)にグレード分けし、性成熟グレードと年齢、体重及び精巣重量との関連性について検討した。

【材料および方法】

動物種：カニクイザル (*Macaca fascicularis*)

年齢: 38 ～ 83 ヲ月齡, 体重: 3.03 ～ 6.89 kg

2008年8月～2009年8月の1年間に実施された反復投与毒性試験で使用された対照群の雄カニクイザル136例を使用

精巣は重量測定後、ブアン液に固定し、翌日あるいは翌々日に10%中性緩衝ホルマリン液に再固定した。精巣上体、前立腺及び精嚢は10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。これらの器官は定法に従い、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。精巣及び精巣上体を観察し、精巣での精子形成過程の発達状況及び精巣上体の精子貯留状況から6段階に分類した。

性成熟グレードについては、年齢、体重、精巣重量のそれぞれに関してロジスティック回帰分析を行った。

【結 果】

グレード1では、ほとんどの精細管はセルトリ細胞と精祖細胞のみであり、精母細胞はほとんどみられなかった。また、精細管の管腔はほとんど形成されていない。この段階の精巣上体には精子はみられず、数例で軽微な debris が観察された。グレード2では、精細管には精祖細胞、精母細胞及び円形精子細胞が観察されたが、伸長精子細胞はほとんどみられなかった。精母細胞や精子細胞の精細管での発現は全精細管でほぼ同等であり、Clermont の精子形成ステージを想定する様なサイクルはみられなかった。精細管の管腔は形成が始まっており、一部の個体で desquamation が観察された。精巣上体にはまだ精子はみられず、観察した半数例で軽微ないし軽度に debris が観察された。グレード3では、精子形成が開始され、全体として精祖細胞から Step14 の精子細胞まですべての精原細胞が観察された。

が、精細管は細く、細胞数も少なかった。また、一部では Step14 の精子細胞の見られない個体もみられた。軽微ないし軽度な desquamation が 25 例中 12 例に観察された。精巣上体には精子が観察されたが、数的には少なく、軽微ないし軽度であった。また、ほとんどの個体で debris が観察され、その程度も他のグレードと比べて多く、精巣での desquamation と合わせ、セルトリ細胞の機能が未熟であることを示唆していると考えられ、このグレードの精巣では精巣毒性の評価は困難と考えられた。グレード 4 では、精巣での精子形成発達はほぼ完了した組織像ではあるが、精細管はやや細く、生殖細胞も全体としてやや少なかった。精巣上体に精子は観察されるが、多くは軽度であり、一部に軽微あるいは中等度の精子がみられた。また、軽微な debris が少数例に観察された。精子形成発達はほぼ完了し、ある程度の精子が精巣上体に観察されていることから、精巣毒性の評価は可能と考えられた。グレード 5 については、精子形成発達は完了しており、活発な精子形成過程が観察された。精細管はやや細いが、精巣上体には概ね中等度（軽度～重度）の精子が観察された。グレード 6 は、最も成熟度の高い動物であり、精巣の組織像は mature を示唆し、精巣上体には中等度ないし重度の精子が観察された。これらの動物では精巣の病理組織学的な毒性評価に加え、射出精子を用いた精子検査による経時的な精子形成機能及び精子運動能の評価も可能と考えられた。

性成熟グレードと年齢及び体重の関係については、個体差が大きく、5 歳以上の動物の約 95%、5kg 以上の動物は全例がグレード 4 以上であったが、4 歳でも約 35% の動物が、4kg では半数例以上の動物がグレード 4 以上であり、これらの年齢及び体重ではグレード 1～6 までの動物が混在していた。一方、精巣重量については、7g 未満の動物は全てグレード 3 以下であり、7g 台になるとグレード 3 と 4 の動物がみられ、8g 以上では全ての動物がグレード 4 以上であった。さらに 19g 以上では全ての動物がグレード 6 であった。さらに、性成熟グレードを予測する上で、年齢、体重、精巣重量のいずれがよい指標となるかを検討するために、性成熟グレードを、年齢、体重、精巣重量のそれぞれに関してロジスティック回帰分析したところ、精巣重量では各曲線がほぼ垂直になっており、年齢や体重よりも、精巣重量の方がより明確に、しかもほぼ完全に性成熟グレードを予測できることが分かった。

【結論及び考察】

グレード 3 では Step14 の精子細胞を含む全ての生殖細胞が存在したが、desquamation of germ cells や debris が他のグレードと比較して多く見られ、セルトリ細胞の機能が未熟であると考えられた。グレード 4 になると精子形成発達はほぼ完了し、ある程度の精子が精巣上体に観察されていることから、精巣毒性の評価は可能と考えられた。精巣の病理組織学的成熟度と精巣重量には明確な相関がみられたが、年齢や体重との関連では個体間でのバラつきが大きいことから、成熟動物を選別する際は精巣容積を考慮することが望ましいと考えられた。

(Toxicologic Pathology, in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 196 号	学位申請者	春山 恵美子
審査委員	主査	米澤 傑	学位 博士 (医学)
	副査	中川 昌之	副査 堂地 勉
	副査	堀内 正久	副査 東 美智代
Testicular Development in Cynomolgus Monkeys (カニクイザルにおける精巣の発達)			
<p>前臨床試験では精巣毒性の評価が困難な若齢のサルが使用されるケースが多いとの報告がある。ラットの精子形成開始時期が各個体でほぼ同時期であるのに比べ、サルは個体差が大きく、同じ年齢でも成熟した精巣を持つ個体もいれば、未成熟な個体もいる。そこで、学位申請者らは雄カニクイザル 136 例について、精巣はブアン固定後ホルマリン固定、精巣上体はホルマリン固定後に HE 染色を施し、光学顕微鏡で観察した。それらの性成熟度を精子形成過程の発達状況及び精巣上体の精子貯留状況から、6 段階にグレード分けし、性成熟グレードと年齢、体重及び精巣重量との関連性について検討した。</p> <p>その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 136 例中 36 例が精子形成が未発達で精巣上体に精子が見られない Grade 1 と 2 であり、25 例が Step14 の精子細胞まで見られる Grade 3 の動物であった。 2) Grade 3 の動物については全ての成熟段階の生殖細胞は確認されたが、精巣には生殖細胞の剥離、精巣上体には残渣が他の Grade に比べて多く観察された。 3) Grade 4 以上の動物は 136 例中 75 例であった。これらの個体では精巣における精子形成発達は完了し、精巣上体には精子が確認された。 4) 性成熟 Grade と年齢、体重、精巣重量に関してロジスティック回帰分析したところ、精巣重量では各曲線がほぼ垂直になっており、年齢や体重より明確に性成熟 Grade を予測できることが分かった。 <p>Grade 3 では生殖細胞の剥離や精巣上体における残渣が他の Grade と比較して多く見られ、Grade 3 までの動物は精巣毒性の評価は困難と考えられた。Grade 4 になると精子形成発達はほぼ完了し、精子が精巣上体に観察されていることから、精巣毒性の評価は可能と考えられた。Grade 6 の個体では、精巣の病理組織学的な毒性評価に加え、射出精子を用いた精子検査による経時的な精子形成機能及び精子運動能の評価も可能であると考えられた。精巣の病理組織学的成熟度と精巣重量には明確な相関がみられたが、年齢や体重との関連では個体間でのバラつきが大きいことから、成熟動物を選別する際は精巣重量と良く相関すると報告されている精巣容積を考慮することが望ましいと考えられた。</p> <p>本研究は、医薬品の開発に必要な一般毒性試験で使用される雄カニクイザルの性成熟度について、精子形成過程の発達状況及び精巣上体の精子貯留状況から 6 段階にグレード分けし、性成熟グレードと年齢、体重及び精巣重量との関連性について検討したものであり、その結果成熟度と精巣重量には明確な相関がみられたが、年齢や体重との関連では個体間でのバラつきが大きいことが示され、成熟動物を選別する際は精巣重量と良く相関する精巣容積を考慮すべきであることが示唆された。カニクイザルは常時繁殖可能であることから生殖毒性の評価に適しており、近年バイオ製剤の開発が増加していることからサルでの生殖機能評価が期待されている。世界的にみてもこれだけ多くの未熟～成熟カニクイザルの生殖器の背景データはなく、意義のあるものになると考えられる。</p> <p>よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。</p>			

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 196 号	学位申請者	春山 恵美子
審査委員	主査	米澤 傑	学位 博士 (医学)
	副査	中川 昌之	副査 堂地 勉
	副査	堀内 正久	副査 東 美智代
<p>主査および副査の5名は、平成24年6月11日、学位申請者 春山恵美子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 従来の前臨床試験の評価では対照群を設定する際に何をマッチングさせていたか？年齢か？ (回答) サルを用いた一般毒性試験では、3~7歳齢の動物を使用するケースが多く、対照群と被験物質群に割り当てる際は各群の平均体重が同等になるように割り付けている。群分け時に年齢を考慮することはほとんどない。</p> <p>質問2) 若齢のサルは毒性評価に適切ではないということか？ (回答) 若齢の場合、精巣毒性以外の全身毒性の評価は可能であるが、未熟精巣は精子形成が不完全なため精巣のどの生殖細胞に影響しているか判断が困難であるため精巣毒性には不向きである。</p> <p>質問3) 精巣重量と容積は相関があるのか？ (回答) 精巣重量と容積については相関性が高いとの論文もあり、相関性はあると考えている。</p> <p>質問4) 雌の卵巣についての同様データはないのか？ (回答) 雌の卵巣については、一般毒性試験で実施されている病理組織学的検査の背景データはあるが、今回の雄の生殖器のようなグレード分けを行っての検討は実施していない。なお、雌は月経の有無で判断が可能。</p> <p>質問5) 今回の検討では精巣は両方とも摘出するのか？ (回答) 左右両方とも摘出している。一般毒性試験では、剖検し、全ての臓器を摘出している。</p> <p>質問6) 本研究の価値はどこにあるのか？こういった内容は既に報告されているのではないのか？ (回答) サルを多数保有している研究施設が少なく、多数のサルを使用しての検討データはないことから、これだけの多くのサルから得られたデータは貴重であると考えている。</p> <p>質問7) サルはカニクイザルだけではなく、ニホン猿、アカゲ猿、チンパンジー等もいるが、それらのサル類でも同様な精巣変化がみられるか？ (回答) おそらくそうだろうと考える。</p> <p>質問8) アカゲザルやチンパンジーなどは前臨床試験に使用しないのか？ (回答) アカゲザルは前臨床試験に使用されることもあるが、繁殖に季節性があることから今回の検討には不向きと考え、カニクイザルで検討を行った。チンパンジーについては倫理的な問題で使用は難しい。</p> <p>質問9) サルの精巣重量に若干の左右差があるが、組織像に左右差はなかったのか？ (回答) 精巣重量はやや差があるが、組織像には差はない。</p> <p>質問10) 精巣の未熟例と薬剤誘発病変例の病理像は判別可能か？ (回答) 毒性変化の場合、生殖細胞の変性、壊死、空胞化等の所見が見られる、あるいは精子遊離不全等の通常で</p>			

はみられない組織像が見られることから、判別は可能である。

質問 11) サルの寿命はどのくらいか？サル 5 歳は人では 15 歳くらいか？

(回答) カニクイザルの寿命は 30~35 年くらいである。5 歳齢のサルは概ねそのくらいになる。

質問 12) 成熟度の指標は体重よりも身長のほうが重要なのではないか？

(回答) 技術的な問題になるが、サルでの身長測定は麻酔が必要になる等容易ではないため実施していない。

質問 13) 精巣の成熟を示す特異的なバイオマーカーはないか？

(回答) そういったバイオマーカーは現時点ではない。

質問 14) サルの Blood Testis Barrier はどの段階で形成されるか？また、その検出法はあるか？

(回答) グレード 3 付近で形成が始まると考えている。検出方法としてはランタンを注入し電顕観察を行う。

質問 15) 過去に薬剤を投与した毒性試験で精巣毒性がみられた経験はあるか？精巣毒性は他の毒性よりも出やすいのか？

(回答) 過去に経験した一般毒性試験で精巣毒性がみられた経験があり、抗癌剤では良く見られる。ラットの一般毒性試験では 1~2 割の試験で見られる。一方、卵巣毒性は稀である。なお、精巣毒性よりも肝毒性の方が多い。

質問 16) 今回の検討に使用した動物は媒体等を投与した Negative control を用いたということか？

(回答) 今回の検討では、過去に実施された一般毒性試験の対照群の動物を使用した。これらの対照群の動物には薬剤の調製時に使用する媒体等を投与をした。

質問 17) 精巣の固定液にブアン液を使用した理由は？

(回答) 精巣は、ホルマリン固定では細胞がばらけるためブアン液を使用した。ブアン液は 15 年くらい前から世界的に使用されている。

質問 18) 精巣の固定について、ブアン固定後にホルマリン固定する理由は？

(回答) ブアン液に長時間固定すると精巣が固くなり、標本作製が困難になるため。最近ではブアン液に代わる Davidson 液も使用している。

質問 19) 毒性試験では、精巣毒性の評価は HE 染色のみの標本で行っているのか？

(回答) 通常的一般毒性試験では HE 染色のみのケースが多いが、精巣に影響が出る可能性がある場合は PAS 染色等も行うこともある。

質問 20) 今回の検討では精巣は丸ごと採取しているのか？精巣には被膜があり、固定しにくいはずだが表面に傷を付ける等固定液が浸漬しやすいような工夫をしているのか？

(回答) 一般毒性試験では、精巣は丸ごと採材しているが、固定する際は割を入れている。

質問 21) 今回の結果では Grade 4 で精細管が開いているが、固定時のアーティファクトでは？

(回答) 精細管管腔の拡張は Grade 4 のみでみられているが、同時に固定した他のグレードでは一切みられておらず、成熟過程で見られるものであり、固定不良ではないと考えている。なお、Grade 4 のみで何故管腔の拡張がみられるのかについては今後の検討課題になる。

質問 22) 分子標的薬開発関連で、サルとヒトとの homology はあるのか？

(回答) 薬物代謝では高い相関性がみられ、抗がん剤代謝もラットよりはサルの方が類似している。

質問 23) サルは成熟すると何キロくらいになるか？

(回答) 雄では概ね 5 kg 以上になり、大きい個体では 7~8kg くらいになることもある。

質問 24) 薬剤を幼若時に投与した影響を 2~3 年間おいて成熟時に評価 (長期に渡った評価) することはないのか？

(回答) 5 年前に欧州ガイドラインが出て、ラットに生後 1 週目で投与しアダルトになるまで評価するといった試験はあるが、サルではまだ少ない。なお、対象薬が小児適応等の場合は、幼若サルを使用する試験もあるが、長期間みることはない。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。