

脳機能改善薬ネフィラセタムの精巢毒性メカニズムの解明

2008.03

下村和裕

脳機能改善薬ネフィラセタムの精巣毒性メカニズムの解明

2008. 03

下村和裕

目次

緒言

第1章 SD ラットを用いた精巣の初期組織学的変化およびホルモンの検討

1. はじめに
2. 実験材料および実験方法
3. 結果
4. 考察
5. 小括

第2章 ビーグルイヌにおけるホルモン生合成および精巣毒性予知マーカーの検討

1. はじめに
2. 実験材料および実験方法
3. 結果
4. 考察
5. 小括

第3章 カニクイザルにおける精巣毒性予知マーカーおよび回復性の検討

1. はじめに
2. 実験材料および実験方法
3. 結果
4. 考察
5. 小括

第4章 ライディッヒ細胞のテストステロン生合成およびステロイドホルモン変換酵素の検討

第1節 培養ライディッヒ細胞のテストステロン生合成の検討

1. はじめに
2. 実験材料および実験方法
3. 結果
4. 考察
5. 小括

第2節 ラット精巣におけるステロイドホルモン変換酵素の遺伝子発現の検討

1. はじめに
2. 実験材料および実験方法
3. 結果
4. 考察
5. 小括

総括

謝辞

引用文献

Abstract

本論文においては以下の略語を用いた。

GABA	Gamma-aminobutyric acid
mg/kg/day	mg/ body weight (kg)/day
SD	Sprague Dawley
LH	Luteinizing hormone
FSH	Follicle-stimulating hormone
PAS	Periodic acid Schiff
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
mRNA	Messenger ribonucleic acid
p450c17	17 α -Hydroxylase/17-20 Lyase
17 β HSD	17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase
SHC	Sperm head count
SMI	Sperm motility index
BSA	Bovine serum albumin
M199	Medium 199
Cmax	Maximum drug concentration
M3	Metabolite No. 3、5-ヒドロキシ-2-ピロリジノン体
M11	Metabolite No. 11、カルボン酸体
M18	Metabolite No. 18、3-ヒドロキシ-2,6-キシリジン体
M20	Metabolite No. 20、4-ヒドロキシ-2-ピロリジノン体
P450scc	Cytochrome P450 side chain cleavage
3 β HSD	3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase

緒 言

ネフィラセタムは、脳機能改善薬としての開発を目的に新規に合成されたピロリドン系誘導体である。本薬の薬理作用として、神経細胞の長時間持続型のCa²⁺チャンネル(N/L型)の賦活化により神経伝達物質の放出を増加させ(Yoshii et al., 1994)、GABA およびコリン作動性神経系に反応し、脳におけるタンパク質合成を増強する(Nabeshima et al., 1991)ことが知られている。

ネフィラセタムは薬理的試験において、(1)スコポラミン(Sakurai et al., 1989) およびアポモルフィン(Nabeshima et al., 1994)により惹起された記憶消失を減少させ、(2)ニューロトキシンAF64A(Abe et al., 1994)、前頭基底部の電解質による傷害(Nishizaki et al., 1998) および低酸素(Hiramatsu et al., 1992)により誘発された記憶消失を減少させ、(3)老齢ラットの認識能力を促進させる(Nabeshima, 1994)、ことが証明されている。

毒性試験ではネフィラセタムに *in vitro* および *in vivo* における遺伝毒性(Shimada et al., 1994)、マウスおよびラットを用いてのがん原性(Kajimura et al., 1994)、ラットおよびウサギを用いての催奇形性(Watanabe et al., 1994)は認められなかった。13 および 52 週間反復投与毒性試験では、ラットでは 300 mg/kg/day を投与しても変化は認められなかったが(Jindo et al., 1994; Hooks et al., 1994b)、イヌでは 60 mg/kg/day 以上の投与で精子低形成がみられた(Sugawara et al., 1994; Hooks et al., 1994a)。なお、臨床試験では泌尿器系に副作用は認められなかった(Murasaki et al., 1994; Otomo et al., 1994)。このようにネフィラセタムには各種の毒性試験において特に問題となる毒性は検出されなかったが、精子形成への抑制作用が確認されたことから、精巣毒性について、メカニズム解明を含めた詳細な検討は、本薬の安全性を確固たるものにする上で、必須の事項であると思われた。

医薬品の毒性の種類は肝毒性、腎毒性および神経毒性など多様であるが、近年、精巣毒性も重要な評価項目となっている。それはカールソンの「沈黙の春」において成人男性の精子数がこの50年間に半減したという報告や、日本人新生児の65人に1人は生殖補助技術等（少ない精子数でも受精が可能となる）を用いた体外受精児（2003年、日本産科婦人科学会調査）であることに、社会的関心が集まっていることによるものと考えられる。実際に非臨床試験ステージで開発候補物質に精巣毒性がみつかって、ドロップアウトすることが少なからずある。

精巣毒性は男性の生殖能に医薬品の悪影響が現れることであり、不妊をもたらす可能性も考えられる。毒性の標的としては精子だけでなく、精子を産生する精巣、精子が成熟する場である精巣上体および射精に関与する前立腺などの生殖器官があげられる。また、精子形成にはホルモンが重要な役割を果たしており、この内分泌を支配している視床下部および下垂体など中枢神経系の器官も毒性の標的となる。しかし、最終的に毒性変化が精巣に現れることが多いため一般的に精巣毒性として検査が行われる。精巣毒性に関する検討は一般毒性試験の中で精巣、精巣上体および前立腺の重量測定および病理組織検査として行われ、生殖毒性試験では雌動物との交配検査により、雄動物が交尾能力を有しているか、雌を妊娠させることが可能かを指標としてスクリーニング評価されている。現状では、精巣毒性に関して定型的なスクリーニング試験内で評価されているだけであり、さらに踏み込んだ精巣毒性の発現過程やメカニズム解明までを包含する評価方法は確立されていない。非臨床試験ステージにおける毒性メカニズムの解明は臨床試験でのバイオマーカーの探索につながり、その後の医薬品開発において極めて重要な意義を持つ。バイオマーカーは毒性変化が起こる前の前兆的な変化であり、ヒトへの投薬開始後、もしバイオマーカーに変化がみられたら、すぐに投薬を中止することにより毒性の発現を未然に防ぐことが可能となる。毒性メカニズムの解明によって探し出されたバイオマー

カーは安全な臨床試験の実施および市販後の適正な使用を明確にすることなど非常に重要な役割を果たす。すなわち、メカニズム解明の評価法が確立されれば、これまですばらしい薬効を持ちながらドロップアウトしていた開発候補物質を市場に出すことができる可能性があり、医薬品の開発期間の短縮やより安全な医薬品の開発が可能となることが期待されている。

そこで、本研究は、ネフィラセタムによる精巣毒性メカニズムの解明を試みるとともに、動物種差（ラット、ビーグルイヌ、カニクイザル）を明らかにすることを目的とした。

第1章では Sprague Dawley (SD)ラットを用いて、ネフィラセタム投与後の精巣の病理組織、生殖器重量、精巣中精子数について初期変化を経時的に検討し、さらに血清中テストステロン、Luteinizing hormone (LH)、Follicle stimulating hormone (FSH)、Inhibin ならびに精巣中テストステロンについて検討した。

第2章では、ビーグルイヌを用いてネフィラセタム投与後、ホルモンでは血清中テストステロン、エストラジオール、LH、FSH および Inhibin 濃度を測定した。精液検査では精液量、精子数、精子の運動性、生存性および形態を観察した。また、精巣中プロジェステロン、テストステロンおよびエストラジオールを測定した。

第3章ではカニクイザルを用いてネフィラセタム投与後の精巣サイズ、血清中ホルモン変動の観察のためテストステロン、エストラジオール、LH、FSH および Inhibin 濃度を測定した。精子検査としては精液重量、精子濃度、運動性、生存性および形態を観察した。さらに32週間後の回復性の検討を行った。

第4章では、ネフィラセタムが精巣におけるテストステロン生合成に与える影響を *in vitro* 評価系を用いて調べた。すなわち、ラット精巣からパーコール法により分離したライディッヒ細胞を培養液中で培養し、ネフィラセタムまたはその主要な代謝物4種類（5-ヒドロキシ-2-ピロリジノン体、カルボン酸体、3-ヒドロキシ-2,6-キシリジン体および4-ヒドロキシ-2-ピロリジノン体）を別々

に培養液に添加した後の培養液中テストステロン濃度を測定した。

さらに、ネフィラセタムのステロイドホルモン生合成阻害を詳細に検討するため、プロジェステロンからテストステロンへの生合成過程に関与する2種類の酵素（P450c17、17 β HSD）に対するネフィラセタムの影響を Reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）により検討した。

本研究のすべての章の試験操作は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和48年10月1日法律第105号、平成11年12月22日および平成17年6月22日一部改正）および「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和55年3月27日総理府告示第6号、平成14年5月28日一部改正）に従って行った。

第 1 章 SD ラットを用いた精巣の初期組織学的変化
およびホルモンの検討

1. はじめに

ネフィラセタムの 13 週間反復投与毒性試験においてイヌ (Sugawara et al., 1994) およびサルでは 60 mg/kg/day 以上の投与で精子低形成がみられたにもかかわらず、ラットでは 480 mg/kg/day を投与しても変化は認められなかった (Jindo et al., 1994)。そこで、ネフィラセタムはラットにおいて精巣毒性を惹起するか否かを検討するため、ネフィラセタムの投与薬液の調製限界の濃度である 1500 および 500 mg/kg/day を 4 または 9 週間経口反復投与し、その後、交配検査を実施した。その結果、1500 mg/kg/day では交尾率には影響はなかったが、受胎率、着床率、胎児死亡率、精巣・精巣上体・前立腺の重量、精巣中精子数および精子の運動性の減少ならびに重度の精巣の変性がみられた。500 mg/kg/day では 4 または 9 週間のいずれの投与期間でも、精巣中精子数および精巣上体・前立腺の重量減少がみられ、精巣の組織検査では精子細胞の停滞が認められた (Harada et al., 1995)。しかし、この試験ではネフィラセタムの精巣毒性メカニズムは不明のままであった。そこで、本章では SD ラットにネフィラセタムの 1500 mg/kg/day を経口反復投与して精巣毒性を惹起する試験系を用いて、精巣の病理組織、生殖器重量、精巣中精子頭部数について初期変化を経時的に検討し、さらに血清中テストステロン、LH、FSH、Inhibin ならびに精巣中テストステロンについて精査した。

2. 実験材料および実験方法

・被験物質：

ネフィラセタム (*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-(2-oxo-1-pyrrolidinyl) acetamide) は脳機能改善薬候補物質であり、第一製薬株式会社（東京）で合成された。Fig. 1-1 に示す化学構造を有し、分子量 246.31 の白色の結晶または結晶性の粉末である。

・動物

雄ラット (Slc:SD) を日本 SLC (静岡) より入手した。試験開始時の体重は 307~465 g で、10~13 週齢であった。動物は室温 21~25℃、湿度 35~75%、12 時間照明の動物室で金網ケージに個別に収容された。市販の固形飼料 (MB-1、船橋農場、船橋) および飲用水は自由に摂取できるようにした。

・経時的組織病理学的変化

ネフィラセタムは溶媒 (0.5%カルボキシルメチルセルロース水溶液) に投与薬液の調製限界である 150 mg/mL の濃度で懸濁し、ラット用胃ゾンデを用いて 1500 mg/kg/day の用量でラットに単回、3 日間、1、2、3 または 4 週間経口反復投与した。投与期間は精巣において重度の変性が投与 4 週間後にみられていたことから (Harada et al., 1995)、4 週までの間、経時的に変化を観察できるように設定した。

各投与期間の最終投与翌日に各 3 匹のラットをエーテル麻酔下で放血屠殺し

た。対照群として溶媒のみを単回、3日間および1週間、各3匹に投与した。精巣を摘出し、ブアン固定液で固定し、パラフィン包埋後、薄切し、PAS染色を施した組織標本を作製した。そして光学顕微鏡にて観察し、精巣中の精細管をI~XIVの精子形成ステージ(Hess RA, 1990; Russell et al., 1990)に分類して、生殖細胞およびセルトリ細胞を含む精細管ならびにライディッヒ細胞について病理組織学的検査を行った。所見の程度は軽度(+)、中等度(++)および重度(+++)に分類した。

・1週間投与後の体重、臓器重量および精巣中精子頭部数

精巣組織以外の初期変化を観察するための実験もあわせて行なった。予備検討において、精巣中精子頭部数は単回および3日間投与では変化は認められなかったため、投与期間は1週間とした。ネフィラセタムおよび溶媒を各15匹のラットに投与し、最終投与4時間後に体重を測定し、屠殺した。精巣、精巣上体および前立腺を摘出して重量を測定した。精巣中精子頭部数は白膜を除去した精巣をメスシリンダーに入れ、蒸留水で12 mLにメスアップした。ディスペンサーミキサーで10秒間、細切・分散処置した後、超音波粉碎器で5分間、粉碎処置した。その精子懸濁液の一部をマクラーのチャンバー(Sefi-Medical Instruments, Israel)にとり、全区画中の精子頭部数をカウントした。その数値を120万倍し、1精巣中精子頭部数とした。また、精巣1g中の精子頭部数も算出した(Meistrich, 1989)。

・血清および精巣中ホルモン濃度

ネフィラセタムまたは溶媒の投与前および単回投与0.5、1、2、4、6、8、12および16時間後に各6匹のラットからエーテル麻酔下で血液および精巣を採取

した。ホルモン測定用に血清を血液から分離した。

インヒビン濃度は2重抗体ラジオイムノアッセイ法により測定した (Hamada et al., 1989)。標準物質は精製ウシ インヒビン (32 kDa) を使用した。このアッセイ系では α サブユニットモノマーからなる二量体インヒビンを区別できないため、測定値は inhibin a および b の合計量とした。アッセイ内およびアッセイ間の変動係数は 9.8 および 10.6% で、検出感度は 2.2 pg/tube であった。

テストステロン濃度は ^{125}I でラベルされた radioligand を用いた 2 重抗体ラジオイムノアッセイ法により測定した (Taya et al., 1985)。テストステロン抗体 (GDN 250) は Dr. G. D. Niswender (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO) より入手した。アッセイ内およびアッセイ間の変動係数は 6.8 および 17.1% で、検出感度は 1.5 pg/tube であった。

LH および FSH の測定には National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK; Bethesda, MD) ラジオイムノアッセイキットを用いた (Taya et al., 1990)。LH のアッセイ内およびアッセイ間の変動係数は 5.4 および 6.9% で、検出感度は 1.9 pg/tube であり、FSH ではそれぞれで 4.8%、11.4% および 7.8 pg/tube あった。

精巣中のテストステロン測定には各サンプル採取時の精巣から、精巣中精子頭部数測定用の精子懸濁液と同様の方法で作製した液を 1300 g、15 分間遠心分離して得た上清を用いた。また、1 週間投与後の精巣中精子頭部数測定用のラットから採取した血液および精巣についてもテストステロンを測定した。

・統計学的方法

体重、臓器重量、精巣中精子頭部数およびホルモン濃度のデータは群の平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) で示し、対照群とネフィラセタム群との比較を有意水準

5%で検定した。群間比較はまず、 F 検定を行い、等分散の場合は Student の t 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。

3. 結果

・経時的組織病理学的変化

投与期間 1 および 3 日間ではラットの精巣にはネフィラセタム投与の影響は認められなかったが、投与期間が 1 週間以上のラットでは精巣に以下の変化がみられた (Table 1-1)。

1 週間投与後ではステージ IX から XII の精細管に散発的なステップ 19 の精子細胞の停滞が軽度に見られた。ステージ VII の精細管では少数のパキテン期精母細胞およびステップ 7 の円形精子細胞に核の濃染をともなう変性が見られた。(Fig. 1-2)

2 週間投与後では 1 週間後の変化に加え、伸長精子細胞の不整列の小さい異常が見られた。後半の精細管ステージ、特にステージ XII で伸長精子細胞の頭部が異常 (先端が薄く、頭部腹側角および背側角が不明確) を示すものが見られた (Fig. 1-3)。さらに精子細胞のステップと精細管のステージの不一致が見られた。すなわち、ステージ XIV の精細管にステップ 12 の精子細胞が認められた (Fig. 1-4)。

3 週間投与後では 2 週間後の変化の頻度および程度がさらに進行した。精細管の一部の領域では伸長精子細胞が見られず、精上皮における円形細胞および精子細胞 (有核または無核) の残渣も見られた (Fig. 1-5)。また、精子細胞の増加が全体的な精細胞の層を厚く、精細管円腔を狭くしており、この特徴的な像により精細管ステージ分類は困難であった。

4 週間投与ではこれらの変化の程度が著しく増悪した。多数の多核巨細胞の形成、精細管萎縮、セルトリ細胞のみを残し、ほとんどの生殖細胞が消失した多くの精細管が見られた (Fig. 1-6)。

- ・ 1 週間投与後の体重、臓器重量および精巣中精子頭部数

精巣組織以外の初期変化としてネフィラセタム投与群では対照群に比較して体重の減少がみられた。精巣、精巣上体および前立腺は絶対重量は減少したが、相対重量は増加もしくは変化は認められなかった。精巣中精子頭部数にも減少がみられた。ネフィラセタム投与群の1精巣当たりの精子頭部数は 227×10^6 であり、対照群 (285×10^6) の約 80% であった。精巣 1 g 中の精子頭部数でも対照群の 175×10^6 に対して、ネフィラセタム投与群では 146×10^6 と減少がみられた (Table 1-2)。

- ・ 血清および精巣中ホルモン濃度

ネフィラセタムの単回投与後 2、4 および 6 時間で血清および精巣中テストステロン濃度に有意な低下がみられた。しかし、他の時間では対照群との間に差はみられなかった (Fig. 1-7)。血清中 LH は投与後 12 時間で有意な上昇がみられた以外に、対照群との間に差はみられなかった (Fig. 1-8)。また、血清中 FSH および Inhibin にはいずれの採血時間においても明らかな変化は認められなかった (Fig. 1-9)。ネフィラセタム 1 週間投与後の精巣中テストステロン濃度は対照群と比較して有意な減少がみられた。血清中テストステロンにも減少傾向がみられた。(Fig. 1-10)

4. 考察

本章ではネフィラセタムによる生殖細胞の組織病理学的変化を経時的に観察した。最も初期の変化は投与後1週間にみられたステップ19の精子細胞の停滞、ステージVIIの精細管の散発的なパキテン期精母細胞およびステップ7の円形精子細胞の変性ならびに精巣中精子頭部数の減少であった。投与後1および3日間では組織学的変化はみられなかった。

投与2週後では精子細胞の停滞が著明となり、円形精子細胞の不整列がみられ、ステージXIV精細管にステップ12の精子細胞が含まれるようになった。投与3週目では生殖細胞の脱落が著明となり、円形精子細胞の部分的消失および円形精子細胞および精母細胞の残渣がみられた。投与4週ではこれらの変化はさらに増悪し、多核巨細胞の形成、生殖細胞のない精細管萎縮がみられるようになった。このようにネフィラセタムの精巣毒性は高用量の連日の反復投与によってもゆっくり進行することが特徴であると考えられた。

ネフィラセタムは単回投与2から6時間後に血清および精巣中テストステロンを低下させることが示されたが、その後は対照群のレベルにまで回復した。血清中LHは投与後1および2時間後では低下傾向を示し、投与後12時間後では有意な増加がみられた。投与後の早い時間のLHの低下傾向とテストステロン減少の関係は明確ではなかったが、12時間後の増加はテストステロン低下のリバウンドによるものと考えられる。これらのことから、テストステロン減少と組織学的変化には関連があるものと考えられる。これまでに数多くの方法でテストステロンを実験的に減少させた時の精巣における組織学的変化が報告されている。たとえば合成エストラジオールを動物に投与すると、ネガティブフィードバックで動物自身のテストステロン産生を抑制したモデルを作製することが可能となる (Shimomura et al., 2005)。テストステロンを減少させ、精子形

成を抑制するために、高用量のテストステロン投与後のテストステロンおよびエストラジオールの低用量を同時に投与が多くの研究に用いられている。

テストステロンおよびエストラジオールの低用量を同時に投与した後の精巣組織像では、処理開始後、1週目でステージ VIII から XIII の伸長精子細胞が増加し、2週目ではステップ 17 から 18 の精子細胞およびステージ VIII から XIII のパキテン精母細胞が減少した。第3週ではステージ VII と VIII の円形精子細胞の変換、円形精子細胞産生率、ステージ I から VII のパキテン期精母細胞数が減少した。また、初期の組織変化はステップ 19 精子細胞の変性および放出不全であり、主要な変化としてはステージ VII から VIII への移行の抑制と精子細胞の脱落であった (O'Donnell et al., 1994; O'Donnell et al., 1996a; O'Donnell et al., 1996b; Saito et al., 2000)。

また、テストステロンを産生するライディッヒ細胞に特異的な毒性物質であるエタンジメタンスルホネイトの 75 mg/kg の単回腹腔内投与により、急激かつ完全なテストステロンの減少を惹起させることが可能である。その初期変化としてパキテン期精母細胞およびステージ VII のステップ 7 円形精子細胞の壊死、また、頻度は少ないがセルトリ細胞の精細管基底部にステップ 19 精子の停滞がみられた (Kerr et al., 1993)。

さらに、下垂体切除、LH の中和、抗アンドロジェンの投与によるテストステロンの減少にともなう初期変化 (処置の約 3 から 5 日後) として、ステージ VII の生殖細胞の変性の発現がみられており、これはテストステロンが不十分である時の最も鋭敏な指標であるとされている。(Russell et al., 1981; Sharpe 1944)。

ネフィラセタムによる初期の変化はステップ 19 の精子細胞の停滞、ステージ VII の精細管のパキテン期精母細胞およびステップ 7 の円形精子細胞の変性ならびに円形精子細胞の脱落であり、これら文献と一致した。

ネフィラセタム投与後 3 日では変化は認められなかったが、投与 1 週間後で

はステージ IX から XII の精細管にステップ 19 の精子細胞の停滞がみられた。精子形成サイクルの各ステージを通過するのに要する時間から遡って考えると、ステージ VI の後期またはステージ VII の伸長精子細胞は3日間の投与では影響を受けないことが示唆される、しかし、その後ステージ VI~VIII の精子細胞になんらかの異常が生じ、停滞することになると考えられる。テストステロンはステージ VII から VIII への円形精子細胞の変換に重要な役割を果たしており (O'Donnell et al., 1994)、ステージ VII がテストステロンの低下に感受性が高い (O'Donnell et al., 1996b) ことから、ネフィラセタムの影響もおそらくステージ VII に特異的であることが考えられる。このようにネフィラセタムによる初期変化は精巣中テストステロンの減少に関連することが考えられる。しかし、精巣中テストステロンレベルはテストステロンおよびエストラジオールの低用量の同時投与では対照群の 2~4% のレベルで維持されるのに対して、ネフィラセタムの単回投与後では約 35% に一時的に低下するものの同日中に回復する程度のものであった。この明らかなテストステロンの違いからすると、テストステロンの減少は初期の変化は引き起こすが、後の障害の進行には他の要因も付加的に関与しているかもしれない。

また、栄養障害も下垂体-精巣系のホルモン支配に影響を及ぼすことが知られている (Glass et al., 1982)。ネフィラセタムの 4 週間反復投与では、ラットの体重は投与 1 週目に対照群の 73% にまで減少したが、その後はしだいに増加傾向を示した (Harada et al., 1995) が、今回の試験における体重減少は対照群の 89% であった。制限給餌により 30% の体重減少があった場合でも精子形成には影響の無いことが知られているため (Shimada et al., 1996)、今回のネフィラセタムの精巣毒性には栄養障害は関与していないと考えられる。

以上、ネフィラセタムによる精巣毒性の初期変化は投与後 1 週間にみられたステップ 19 の精子細胞の停滞、ステージ VII の精細管のパキテン期精母細胞およびステップ 7 の円形精子細胞の変性であり、これらにはテストステロンの減

● 少が関与していると考えられた。

5. 小括

脳機能改善薬ネフィラセタムの精巣毒性について雄ラット（Slc:SD）を用いて検討した。ネフィラセタムを4週間経口反復投与し、投与期間中動物を経時的に屠殺して、精巣組織、精巣中精子頭部数およびホルモンの変化を観察した。ネフィラセタムの精巣毒性の初期変化としては投与1週間投与後にステップ19の精子細胞の停滞がみられ、ステージVIIの精細管ではパキテン期精母細胞およびステップ7の円形精子細胞の変性ならびに精巣中精子頭部数の減少がみられた。これらの変化は投与期間が長くなるに従い次第に増悪し、投与後4週には多核巨細胞をともなう精細管の萎縮へと進行した。血清および精巣中テストステロンレベルは単回投与後に減少したが、その日のうちに対照群のレベルにまで回復した。また、投与1週間後でもテストステロンの減少は継続していた。以上の結果から、ネフィラセタムによる精巣毒性の初期変化は精巣中テストステロンの減少によるものと考えられた。

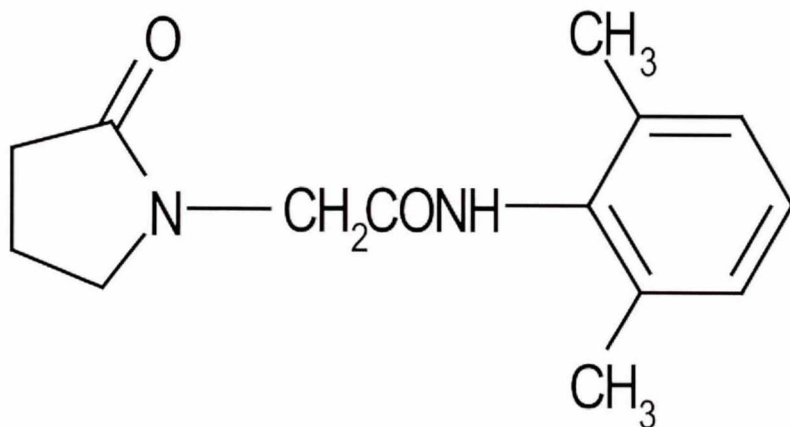


Fig. 1-1 Chemical structure of nefiracetam

Table 1-1 Time course of histopathological changes in the testes of rats receiving oral nefiracetam 1500 mg/kg/day for 4 weeks

Findings	Administration period (week)			
	1	2	3	4
	3	3	3	3
	Number of animals			
Retention of step 19 spermatids in stage IX-XII seminiferous tubules	1 ^a (+)	1 (+)	3 (+, +-+++)	NE
Degeneration of germ cells	1 (+)	1 (+)	2 (+, ++)	3 (++++)
Mismatch of spermatid steps with seminiferous tubule stages	0	1 (+)	2 (+)	NE
Desquamation of round spermatids/focal loss of elongated spermatids	0	0	2 (+, ++)	NE
Formation of multinucleated giant cells	0	0	0	3 (+, +++)
Atrophy of seminiferous tubules/loss of germ cells	0	0	0	2 (++++)

Grade: +, mild; ++, moderate; +++, severe. NE, not examined because of other severe changes.

^a Number of animals showing the findings.

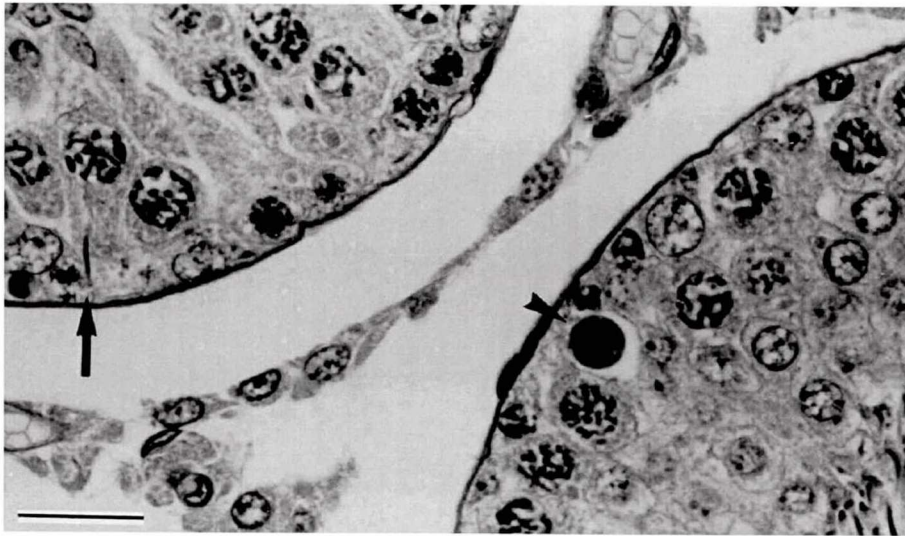


Fig. 1-2 The testis from a rat killed 1 day after 1 week oral administration of nefiracetam 1500 mg/kg/day. Retention of a step 19 elongated spermatid (arrow) in a stage IX seminiferous tubule and a degenerated pachytene spermatocyte (arrowhead) in the stage VII are seen. Bar = 20 μ m.

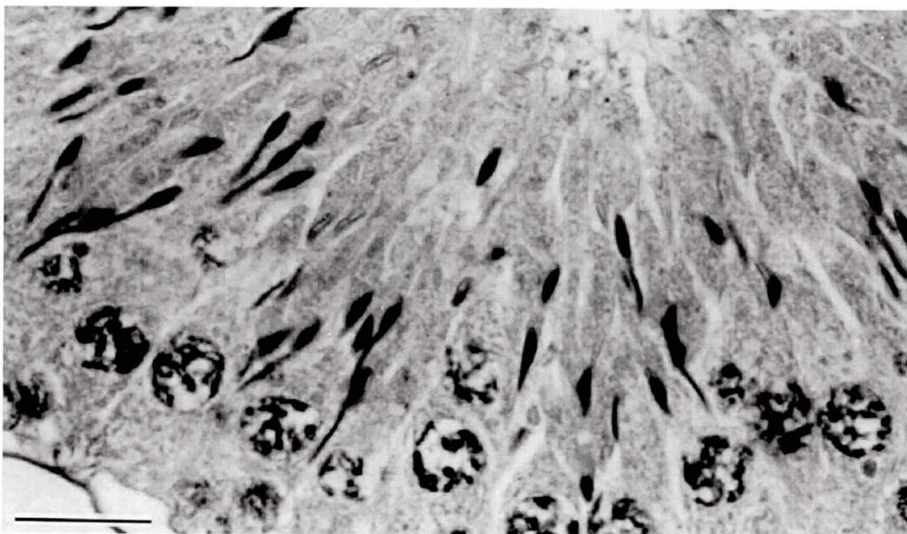


Fig. 1-3 The testis from a rat killed 1 day after 2-week oral administration of nefiracetam 1500 mg/kg/day. The stage XII seminiferous tubule contains elongated spermatids having abnormally shaped heads: the tips are thinned and the dorsal and ventral angles are unclear. Bar = 20 μ m.

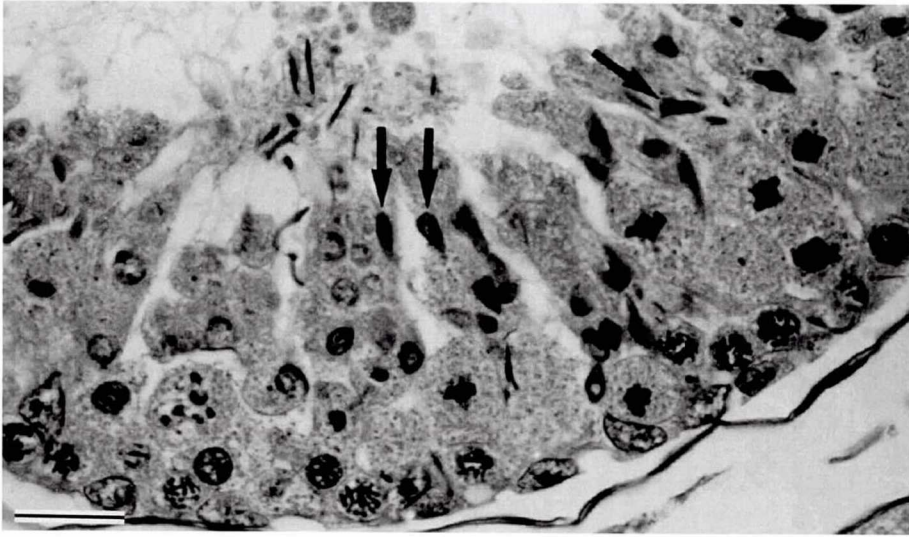


Fig. 1-4 The testis from a rat killed 1 day after 2-week oral administration of nefiracetam 1500 mg/kg/day. A mismatch of the step of spermatids and the stage of a seminiferous tubule: step 12 spermatids (arrows) are seen in a stage XIV tubule. Bar = 20 μ m.

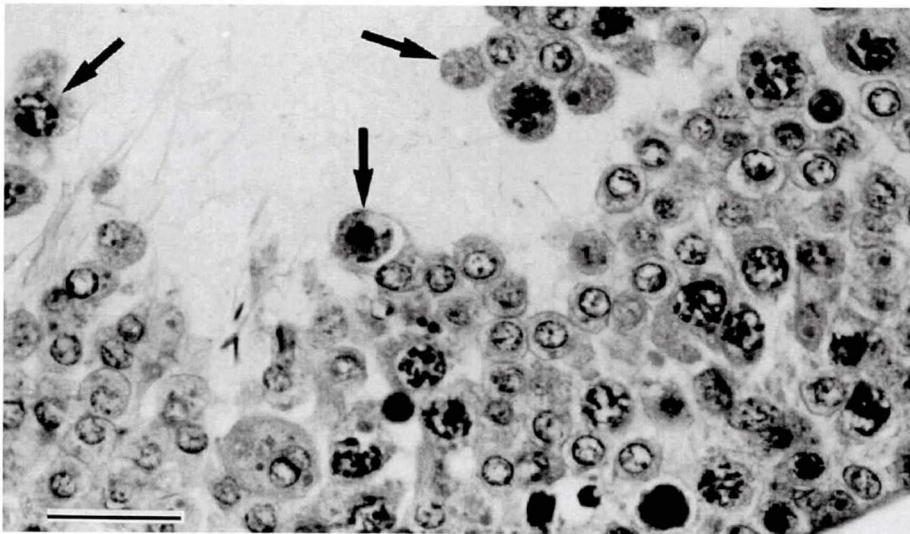


Fig. 1-5 The testis from a rat killed 1 day after 3-week oral administration of nefiracetam 1500 mg/kg/day. Desquamation of round spermatids and spermatocytes with or without nuclei into the lumen (arrows) are seen. Bar = 30 μ m.

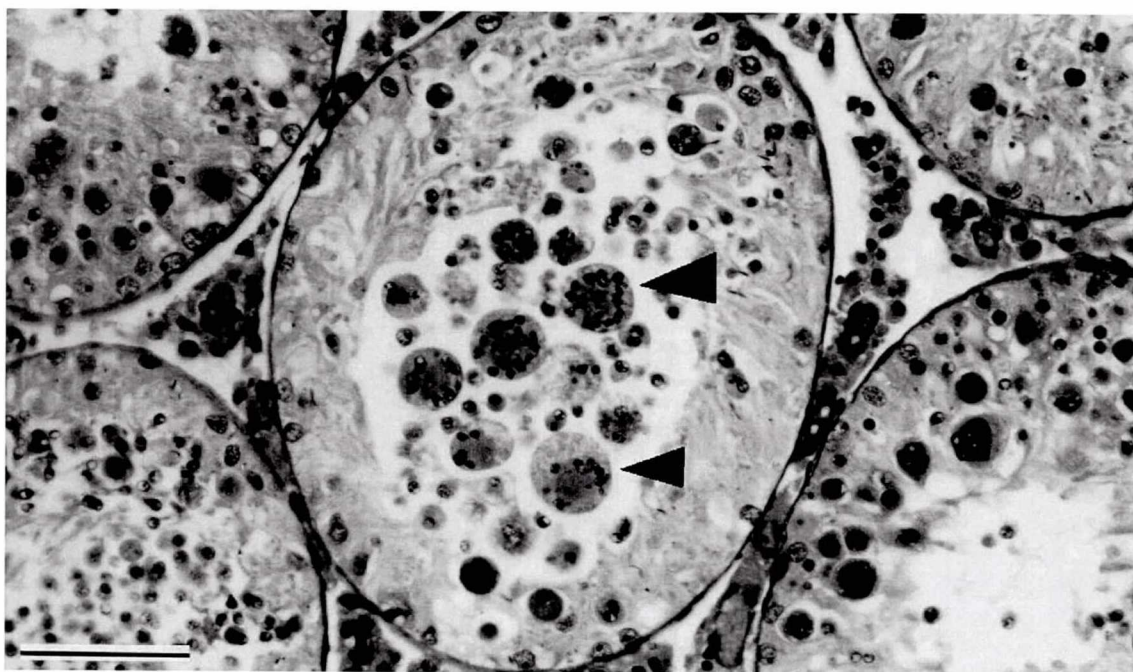


Fig. 1-6 The testis from a rat killed 1 day after 4-week oral administration of nefiracetam 1500 mg/kg/day. Formation of multinucleated giant cells (arrowhead) and marked loss of germ cells are seen in atrophied seminiferous tubules. Bar = 80 μ m.

Table 1-2 Body and organ weights, and testicular sperm head counts in rats receiving oral nefiracetam 1500 mg/kg/day for 1 week

Group (n=15)	Control	Nefiracetam, 1500 mg/kg
Body weight (g)	361.8 ± 9.5 ^a	322.0 ± 24.3*
Testis (g) ^b	3.23 ± 0.17	3.08 ± 0.15*
Testis (% bw) ^b	0.89 ± 0.04	0.96 ± 0.08*
Epididymis (g) ^b	1.00 ± 0.05	0.90 ± 0.07*
Epididymis (% bw) ^b	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.02
Prostate (g)	0.37 ± 0.10	0.29 ± 0.06*
Prostate (% bw)	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.01
SHC (10 ⁶ per testis)	285.3 ± 32.4	227.6 ± 24.8*
SHC (10 ⁶ per g testis)	175.2 ± 16.7	146.7 ± 15.0*

* $P < 0.05$ significant difference from control.

^a Mean ± S.D.

^b Weight of bilateral tissues.

SHC: Sperm head count

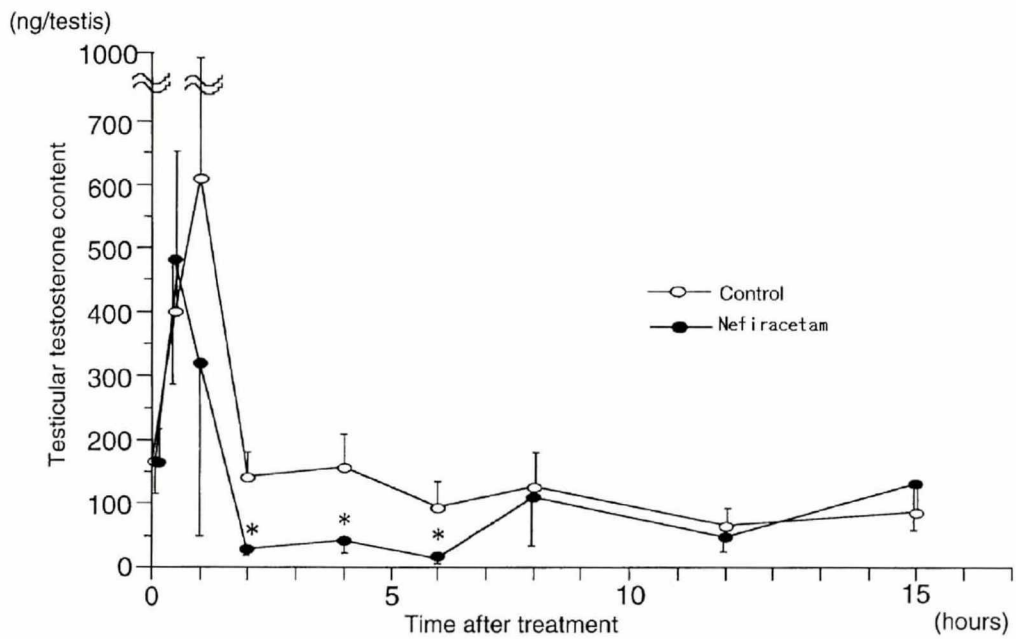
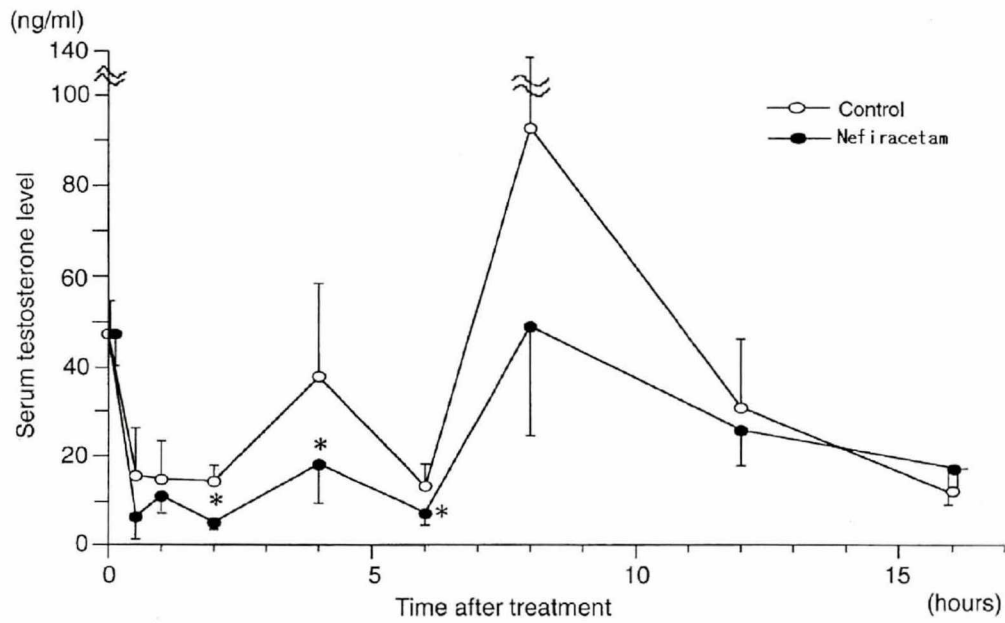


Fig. 1-7 Time course changes of serum and testicular testosterone concentrations after single oral administration of nefiracetam in rats. Serum and testicular testosterone concentrations were measured in six rats each killed 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 16 h following a single oral administration of nefiracetam 1500 mg/kg/day or vehicle (control). Vertical bars represent S.D. * $P < 0.05$ significant difference from control.

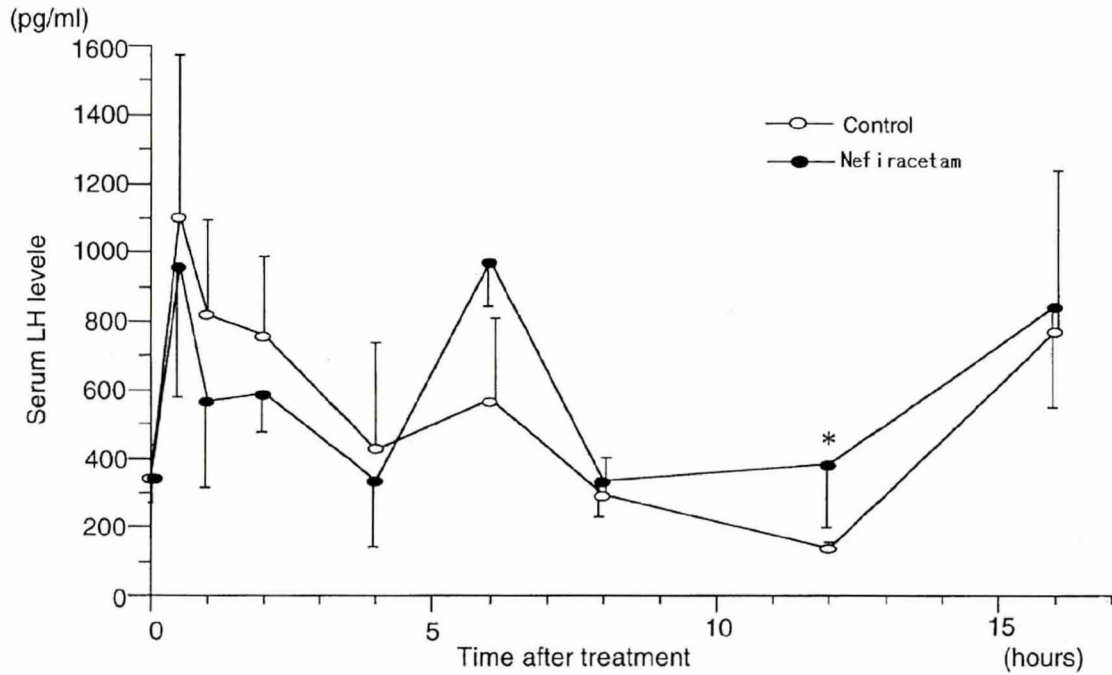


Fig. 1-8 Time course changes of serum LH concentrations after single oral administration of nefiracetam in rats. Serum LH concentrations were measured in six rats each killed 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 16 h following a single oral administration of nefiracetam 1500 mg/kg/day or vehicle (control). Vertical bars represent S.D. * $P < 0.05$ significant difference from control.

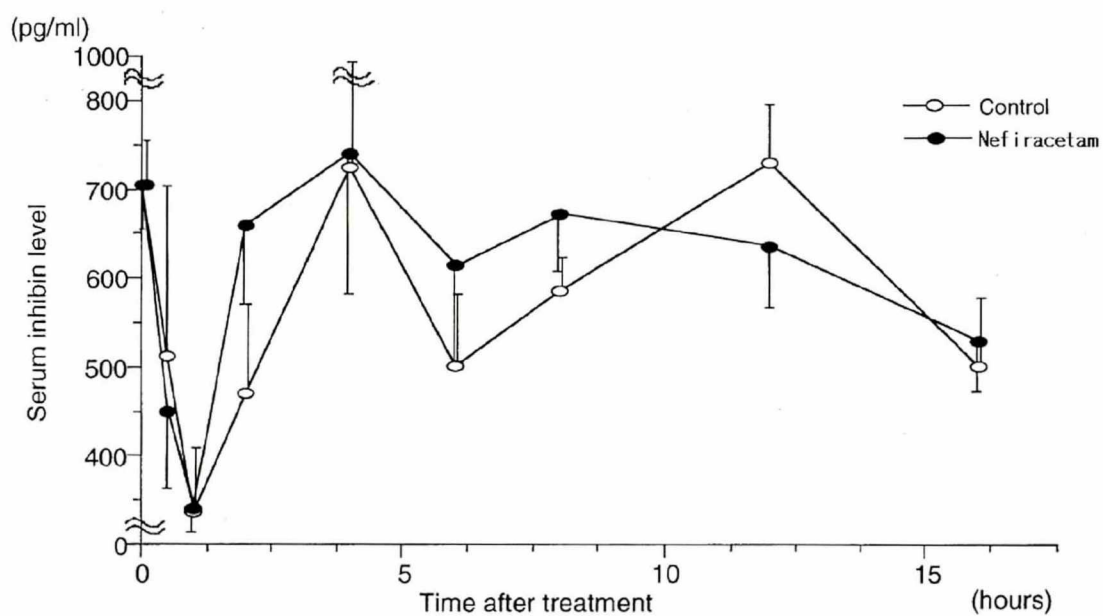
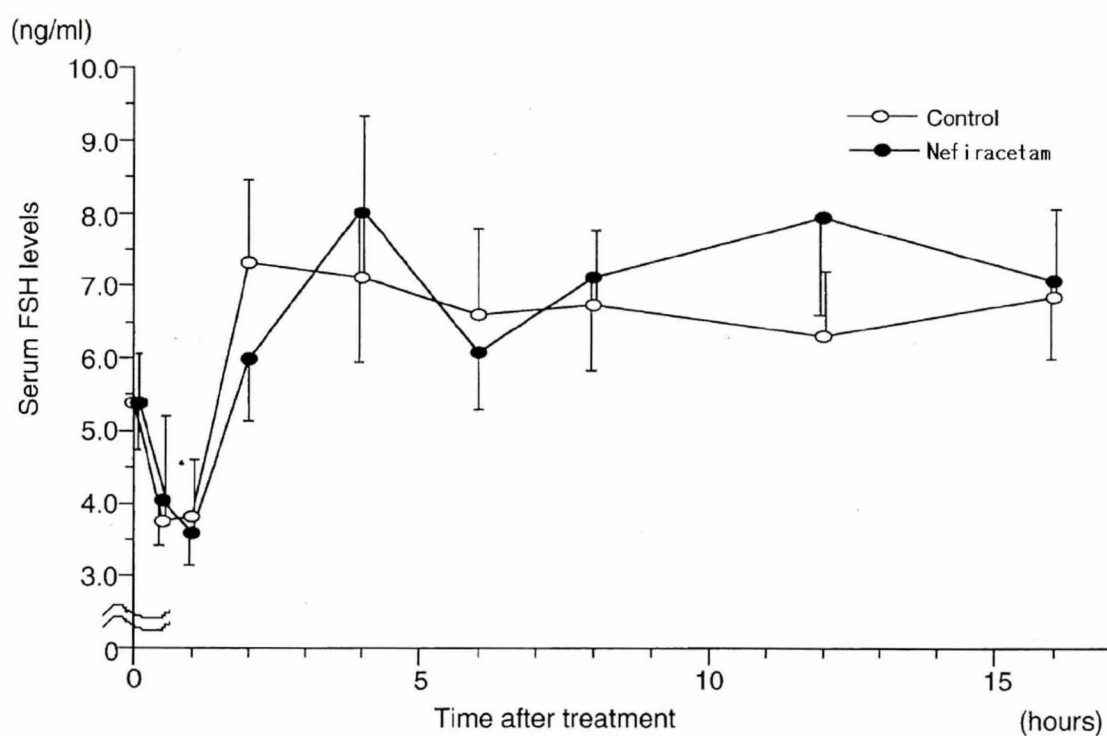


Fig. 1-9 Time course changes of serum FSH and Inhibin concentrations after single oral administration of nefiracetam in rats. Serum FSH and Inhibin b concentrations were measured in six rats each killed 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 16 h following a single oral administration of nefiracetam 1500 mg/kg/kg or vehicle (control). Vertical bars represent S.D.

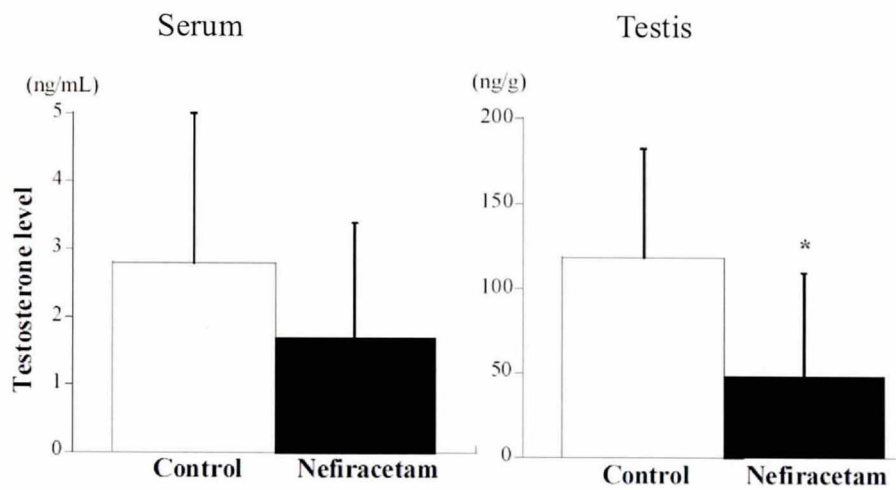


Fig. 1-10 Serum and testicular testosterone concentrations after 7-day oral administration of nefiracetam in rats. Serum and testicular testosterone concentrations were measured in 15 rats killed 4 h after the last administration of nefiracetam 1500 mg/kg/day or vehicle (control). Vertical bars represent S.D. * $P < 0.05$ significant difference from control.

第2章 ビーグルイヌにおけるホルモン生合成および
精巣毒性予知マーカーの検討

1. はじめに

第1章ではネフィラセタム 1500 mg/kg/day をラットに経口反復投与した時、精巣組織における初期変化は投与1週間後のステップ19の精子細胞の停滞、ステージVII精細管のパキテン期精母細胞およびステップ7円形精子細胞の変性であり、また、ネフィラセタムは精巣中テストステロンを単回および1週間投与で減少させることが明らかとなった。したがって、テストステロンの減少はラットにおけるネフィラセタムの精巣毒性メカニズムである可能性が考えられた。ラットでは先におこなわれた13週間反復投与試験では480 mg/kg/dayにおいても精巣毒性がみられず (Jindo et al., 1994)、第1章では1500 mg/kg/day という高用量を投与して精巣毒性を惹起したが、イヌでは60 mg/kg/day の13週間投与で精子形成の抑制がみられており (Sugawara et al., 1994)、ラットに比べてネフィラセタムの精巣毒性に対して感受性が高いと考えられる。

そこで、本章ではイヌを用いてネフィラセタムの精巣毒性に及ぼすホルモンの影響およびヒトにおいて精巣毒性の発現を予知できる感度の高いマーカーを検討した。すなわち、予備的な検討で明確な精巣組織の変化のみられた4週間ネフィラセタムをイヌに経口反復投与し、その間、血清中テストステロン変化および射出精液中の精子の機能および形態を調べた。さらに、ラットでみられた変化がイヌでもみられるかどうか、ラットと同じ投与期間である単回および1週間投与後の精巣中ホルモンについて調べた。

2. 実験材料および実験方法

・ 被験物質

第1章に示したネフィラセタムを用いた。

・ 動物

雄ビーグルイヌは4週間投与試験用にはハムリー（茨城）から入手し、13ヶ月齢、体重9.1～12.3 kgで使用した。ホルモン検討試験用には加商（東京）より入手し、28～29ヶ月齢、体重9.1～13.6 kgで使用した。動物は室温21～25℃、湿度35～75%、12時間照明の動物室で金属性ケージに個別に収容された。市販の固形飼料（DS、オリエンタル酵母、東京）を1日300 g与え、飲用水は自由に摂取できるようにした。

・ 試験デザイン

本章では4週間投与試験およびホルモン検討試験の2試験を実施した。4週間投与試験には対照群、ネフィラセタム180および300 mg/kg/day群を設定し、それぞれ6、3および6匹のイヌを割り付けた。投与期間および投与量は予備検討で300 mg/kg/dayの4週間投与では重度の、180 mg/kg/dayでは中等度の精巣組織変化がみられていたことから設定した。ホルモン検討試験には対照群、ネフィラセタム300 mg/kg/dayの単回投与群および1週間投与群の3群を設定し、各5匹のイヌを割り付けた。単回および1週間投与は第1章のラットでテストステロンが減少していることから設定した。対照群の動物には空の1/2 オンス

ゼラチンカプセル (Torpac Inc., NJ, USA) を、投薬群の動物には各用量のネフィラセタム粉末を封入したカプセルを投与した。それぞれの投与終了後、動物はペントバルビタール (大日本製薬、大阪) 50 mg/kg の静脈内投与による麻酔下で放血屠殺した。

・血清中ホルモン濃度

4 週間投与試験では投与期間の開始前ならびに投与 1、2、3 および 4 週間後に、ホルモン検討試験では最終投与日に、その日の投与の前と 4 時間後に約 3 mL の血液を前肢の静脈から採取した。遠心分離 (1200 g、10 分間、4°C) により得られた血清は測定まで -80°C で保管した。血清中テストステロン、エストラジオールおよびプロジェステロン (ホルモン検討試験のみ) の測定には免疫蛍光測定用 DELFIA® テストステロン (R050-101)、エストラジオール (R056-101) およびプロジェステロン (R066-101) キット (アマシャム ファルマシア バイオテック、東京) を用いた。また、4 週間投与試験では血清中 LH、FSH および Inhibin の測定も第 1 章と同じ方法で行なった。

・精巣中ホルモン濃度

ホルモン検討試験では最終投与の 4 時間後に、動物を屠殺し精巣を摘出した。精巣は白膜を除去した後メスシリンダーに入れ、蒸留水で 20 mL にメスアップした。ディスパーズミキサーで 10 秒間、細切・分散処置した後、超音波粉碎器で 5 分間、粉碎処置した。その精子懸濁液を遠心分離 (1200 g、10 分間) して得た上清を精巣中ホルモン測定に使用した。精巣中テストステロン、エストラジオールおよびプロジェステロンの測定は血清中ホルモン測定と同じ方法で行なった。

・精液検査

4 週間投与試験では精液検査として精液量、精子数、精子の運動性、生存性、奇形率を観察した。

血液採取と同じ時期に用手法で各イヌから精液を採取した。精液は精子の含まれる第 2 分画のみを採取し、ピペットを用いて量を測定した。その後、その一部をとり、5%中性緩衝ホルマリンで 20 倍希釈しマクラーのチャンバーを用いて顕微鏡下で精子数をカウントし、精液 1 mL あたりの精子数を算出した。また、精液の別の一部を生理食塩液で 50 倍に希釈して、精液性状分析機 (Sperm Quality Analyzer、Medical Electronic Systems Ltd.、Migdal Haemek、Israel) を用いて精子の運動性を測定した。運動性は Sperm Motility Index (SMI) 値で示された。精液をエオシンおよびニグロシン液で染色し無作為の 100 精子中の生存精子 (白色) および死亡精子 (赤色) をカウントし生存率を算出した。また、他の 100 精子につき精子の形態を観察して、精子奇形率を算出した。

・臓器重量および組織学的検査

それぞれの試験の投与終了後、4 週間投与試験では右精巣を、ホルモン検討試験の 1 週間投与群の動物については左精巣および前立腺を摘出し、重量測定後、ホルマリン酢酸固定液で固定し、パラフィン包埋後、薄切し、PAS 染色を施して光学顕微鏡にて観察を行った。所見の程度は軽微 (±)、軽度 (+)、中等度 (++) および重度 (+++) に分類した。

- ・統計学的方法

定量データは平均値±標準偏差 (S.D.) で示した。群間比較はまず、Bartlett test を行い、等分散の場合は生データを、不等分散の場合は log 変換したデータを Dunnett の t-test で検定した。有意水準は 5%とした。

3. 結果

・ 4 週間投与試験

血清中ホルモン濃度：

ネフィラセタムの 180 または 300 mg/kg/day を投与したイヌの投与後 1 および 2 週の血清中テストステロンが有意に減少した (Fig. 2-1)。この減少には用量相関はみられなかった。投与後 3 および 4 週の血清中テストステロンもほぼ投与 2 週間後と同様の値を示したが、対照群との間に有意な差はみられなかった。一方、血清中エストラジオールは 180 mg/kg/day 群では投与後 4 週に、300 mg/kg/day 群ではいずれの週においても対照群と比較して高値を示した。この変化には用量相関が見られ、投与後 4 週では特に顕著であった。しかし、各週のその日の投与前の血清中テストステロンおよびエストラジオールの値は対照群との間に差は認められなかった。また、投与後 3 週の血清中 FSH にわずかな増加がみられたのを除き、血清中 LH、FSH および Inhibin には薬物投与に関連した変化は認められなかった (Fig. 2-2, 2-3)。

精液検査：

対照群に比較してネフィラセタム 300 mg/kg/day 群の投与後 4 週で精子の運動性が有意に減少し、奇形率が増加した (Fig. 2-4)。精液量、精子数および精子の生存性はいずれの投与群のいずれの検査時点でも投薬に関連した変化は認められなかった。

精巣重量および組織学的検査：

ネフィラセタム 300 mg/kg/day 群の投与後 4 週の精巣の絶対重量が有意に減少した。組織学的検査では生殖細胞の変性および減少、多核巨細胞の形成、精細管の細胞の空胞化、萎縮精細管の伸長精子細胞の消失みられた (Table 2-1, Fig. 2-5)。しかし、セルトリ細胞およびライディッヒ細胞に形態学的変化は認められなかった。ネフィラセタム 180 mg/kg/day 群の組織学的変化の程度は 300 mg/kg/day 群の変化に比べると軽度であった。

・ ホルモン検討試験

血清中テストステロンは単回および 1 週間反復投与のいずれにおいても有意で明らかな減少を示した。しかし、精巣中テストステロンは単回投与では減少したものの、1 週間投与後では対照群に比べて明らかに低値であったが有意な差はみられなかった。一方、血清中プロジェステロンは単回投与後に有意な増加がみられたが、精巣中プロジェステロンには変化は認められなかった。精巣中エストラジオールは単回および 1 週間投与とともに同程度に有意に減少したが、血清中エストラジオールは 1 週間投与後のみ対照群に比べ有意に増加した (Fig. 2-6)。

投与 1 週間後の精巣重量は対照群とネフィラセタム投与群で同程度であった。ネフィラセタム投与群の前立腺重量は有意ではないが、対照群に比べて小さかった。組織学的検査では精巣には変化は認められなかったが、前立腺には萎縮が認められた (Table 2-2)。

4. 考察

まず、イヌにおけるネフィラセタムの精巣毒性に及ぼすホルモンの影響を調べるために、経時的なホルモンの変化を観察した。血清中 LH、FSH および Inhibin ならびに精巣中におけるステロイドホルモン合成経路でテストステロンの上流のプロジェステロンおよび下流のエストラジオールについて検討を行なった。血清中テストステロンは投与後 1 および 2 週で有意に減少した。また、3 および 4 週では有意ではないものの明らかな減少がみられた。一方、エストラジオールは全期間を通して増加がみられた。しかし、血清中 LH および FSH は投与期間中、テストステロンが減少した投与後 4 時間の時点では減少は認められず、これらのホルモンはネフィラセタムの精巣毒性メカニズムには関与しないと考えられた。なお、テストステロンの減少に対するフィードバックとして LH が増加する可能性が考えられるが、投与後 4 時間では増加傾向は認められなかった。第 1 章のラットの実験では単回投与後 2 から 6 時間の血清および精巣中テストステロンが減少し、投与後 12 時間の血清 LH の増加がみられていた。本章のイヌの実験では投与後 4 時間のみの採血であったが、テストステロン減少のフィードバックによる LH の変化を観察するためには、テストステロンが減少してから、さらに時間の経過した後の採血が必要と考えられた。また、断続的ではあってもテストステロンが 4 週間という長期的にわたり減少した場合、LH が投与後 4 時間も含めて連続的に増加する可能性が考えられるが、投与 4 週目においても LH の変化は認められなかった。このことは視床下部—下垂体—精巣系のホルモン支配に何らかの異常が起こっている可能性が考えられる。

次の実験では単回および 1 週間投与後の血清および精巣中テストステロン、プロジェステロンおよびエストラジオール初期の変化に焦点をあてた。初期変化としてはネフィラセタムの単回投与後、ラットでみられた変化と一致して、

血清および精巣中のテストステロンがイヌでも減少した (Shimada et al., 2003)。さらに精巣中エストラジオールの増加および血清中プロジェステロンの増加が同時にみられた。テストステロンは精子形成に重要な役割を果たすが、テストステロンを減少させるメカニズムは2週類に分類される。ひとつはエタンジメタンスルホネートの暴露によりみられるライディッヒ細胞に対する直接的な細胞傷害であり (Nandi et al., 1999)、他方は酢酸ブセレリン暴露により引き起こされる下垂体からの LH の分泌の抑制である (Tremblay et al., 1984)。ネフィラセタムは1および4週間の投与においてもライディッヒ細胞に組織学的変化は認められなかった。また、血清中 LH にも変化はみられなかった。精巣中テストステロンが減少したにもかかわらず、精巣中プロジェステロンには変化が認められなかったことから、ネフィラセタムはライディッヒ細胞の組織学的形態に変化は与えずに、プロジェステロンから 17-OH-プロジェステロンおよびアンドロステネジオンを経てテストステロンに変換する経路を障害するものと考えられた。血清プロジェステロンと精巣毒性の関係は不明であった。精巣中エストラジオールも減少したが、テストステロンはセルトリ細胞でエストラジオールおよびジヒドロテストステロンに変換されるため精巣中テストステロン低下に伴う変化と考えられた。

ラットでは血清および精巣中テストステロンの減少は投与した日のうちに対照群のレベルにまで回復した。また、この減少は1週間後でも継続して見られた (Shimada et al., 2003)。今回のイヌの実験では単回および1週間後の血清中テストステロンは減少したにもかかわらず、4週間反復投与試験の投与開始後1、2、3および4週後のそれぞれ1日の投与前の血清テストステロンは対照群と同程度であった。これらのことから、血清および精巣中テストステロンはネフィラセタム投与後に低下するが、翌日までには回復し、この一時的な減少は投与期間中毎日繰り返されることが考えられた。ラット同様イヌにおいてもネフィラセタムは精巣中テストステロンを減少させることが明らかとなり、この減少

はライディッヒ細胞におけるプロジェステロンからテストステロンへの変換の障害によるものと考えられた。

ネフィラセタム 300 mg/kg/day の単回投与後の血清中テストステロンは減少し、1 週および 2 週においても減少は継続した。その後も血清中テストステロンの減少は継続したが、対照群と比較して有意な差ではなかった。血清中エストラジオールは投与開始後 1 週間から増加を示し、その高値は投与期間中継続してみられた。血清中のエストラジオールの増加は血清中のテストステロンの減少がみられていることから、血液中におけるテストステロンからエストラジオールへの変換が促進された可能性も考えられる。また、さらに血清中エストラジオールの増加は脂肪組織における生合成増加による可能性も考えられる。

第 1 章の結果から、ラットにおいてネフィラセタム 1500 mg/kg/day の投与後 1 週間にみられた精巣組織の初期変化はステップ 19 の精子細胞の停滞、ステージ VII の精細管のパキテン期精母細胞およびステップ 7 の円形精子細胞の変性であり、この変化はテストステロン減少時にみられる変化と類似していた。これらの変化は徐々に進行し、投与後 4 週間では多核巨細胞の形成を伴う精細管の萎縮となった。これら組織学的変化と精巣中テストステロンの一時的な減少から、精巣中テストステロンの減少が初期の組織学的変化をひきおこしたが、ラットにおける後期の変化には関連がないと考えられた。しかし、本章のイヌの試験では 4 週間投与後ではラット同様、多核巨細胞の形成を伴う精細管の萎縮が一般的に認められるのに対して、1 週間投与後では精巣の組織に変化は認められなかった。なお、多核巨細胞は一次精母細胞の減数分裂における異常を意味していると考えられる (Rotter et al., 1993)。ネフィラセタム 1 週間投与後にラットでは初期変化として精子細胞の停滞および精母細胞の変性がみられたのに対してイヌでは観察されなかった。この相違は標的細胞の感受性の違いが原因として考えられた。精巣中テストステロンの減少の影響は精巣に対しては、投与後 1 週間の初期変化として組織に変化はみられなかったが、前立腺に対し

では重量低下をともなった萎縮としてみられた。ラットでは精巣中テストステロンの減少が初期の精巣における組織学的変化の発現の引き金となったと考えられるが、今回のイヌにおけるネフィラセタムの精巣毒性に関しては同様の変化は認められなかった。

ネフィラセタム 180 および 300 mg/kg/day の 4 週間投与では血清中テストステロンが投与後 1 および 2 週で有意に減少した。血清中テストステロンの減少は 300 mg/kg/day の単回投与でも認められた。しかし、精子の運動性低下および精子奇形率の増加は 180 mg/kg/day 群では認められず、300 mg/kg/day 群の投与後 4 週目にのみ認められた。組織学的検査では 180 mg/kg/day 群では軽度の、300 mg/kg/day 群では伸長精子細胞の消失を含む重度の変化が認められた。これらのことから、血清中テストステロン濃度はヒトにおけるネフィラセタム精巣毒性を予知できる感度の高いマーカーであると考えられる。もし、ヒトへのネフィラセタムの単回投与後に血清中テストステロンが減少したら、投与を中止することで精巣毒性を回避できると考えられた。反対に、精液検査では軽度の組織変化を検出することはできず、精液検査で変化がみられる時には精巣の組織障害はかなり進行してしまっていると考えられた。

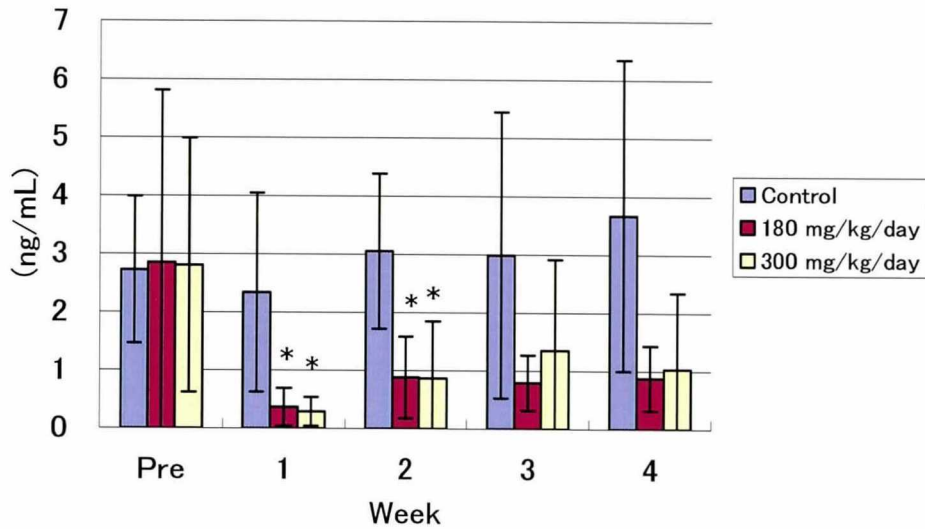
以上、ネフィラセタムはイヌにおいて単回経口投与後に精巣中テストステロンを減少させ、4 週間投与後では多核巨細胞を含む精細管の萎縮を引き起こすことが明らかとなった。

5. 小括

ネフィラセタムの精巣毒性メカニズムおよび精巣毒性を予知できる感受性の高いマーカーを検討するために、雄ビーグルイヌにネフィラセタムの 180 および 300 mg/kg/day を単回、1 および 4 週間経口反復投与した。血清および精巣中テストステロン、精液検査ならびに精巣の組織学的検査を経時的に実施した。精巣中テストステロンはネフィラセタム 300 mg/kg/day の単回投与後に低下したが、その時点で精巣中プロジェステロンには変化は認められなかった。血清中テストステロンは単回、1 および 2 週投与後に減少した。反対に、血清中エストラジオールは投与後 1 から 4 週で増加した。血清中 LH、FSH および Inhibin には実験期間中、変化は認められなかった。精子運動率の減少および精子奇形率の増加は投与 4 週後で初めて変化として捉えられた。精巣の組織検査では 1 週間投与では変化は認められなかったが、投与 4 週後では 180 mg/kg/day 群では軽度な精細管の萎縮が、300 mg/kg/day では多核巨細胞の形成をともなう重度の精細管萎縮がみられた。

これらの結果から、ネフィラセタムは高用量の単回経口投与後に精巣中テストステロンを減少させ、4 週間投与後では精巣組織に重度の形態学的変化を引き起こすことが明らかとなった。このテストステロンの減少はネフィラセタムがライディッヒ細胞におけるプロジェステロンからテストステロンへの変換を阻害することによるものであると考えられ、精巣毒性を検出するための感受性の高いマーカーであることが明らかとなった。

Serum Testosterone



Serum estradiol

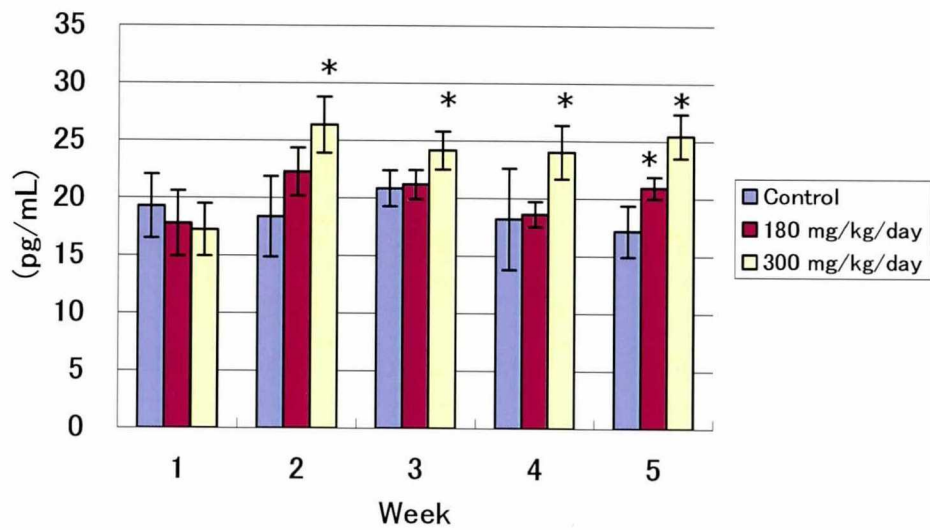
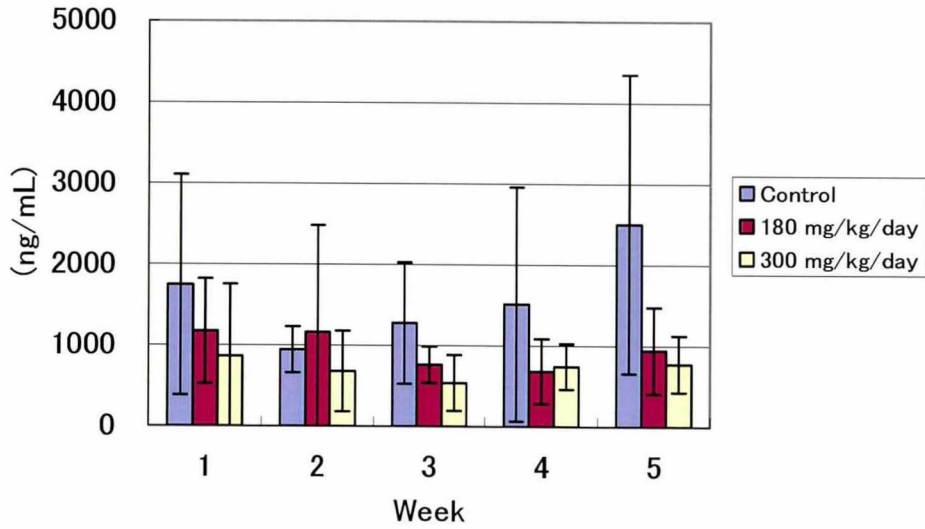


Fig. 2-1 Serum testosterone and estradiol levels 4 h after the last administration for the week in male dogs orally treated with 180 or 300 mg/kg/day for 1, 2, 3, or 4 weeks.

*Significantly different from the control, $P < 0.05$ (Dunnett's t-test).

Serum LH



Serum FSH

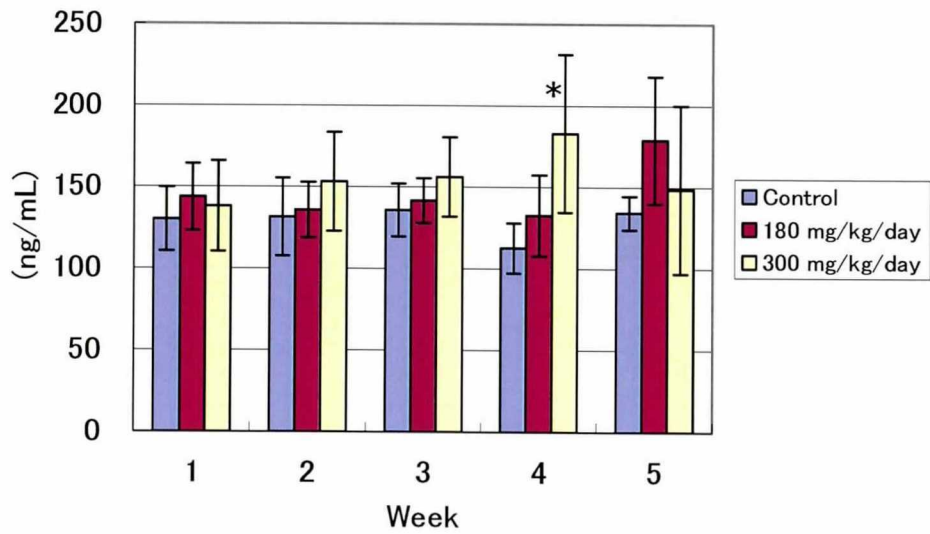


Fig. 2-2 Serum LH and FSH levels 4 h after the last administration for the week in male dogs orally treated with 180 or 300 mg/kg/day for 1, 2, 3, or 4 weeks. * Significantly different from the control, $P < 0.05$ (Dunnett's t-test).

Serum inhibin

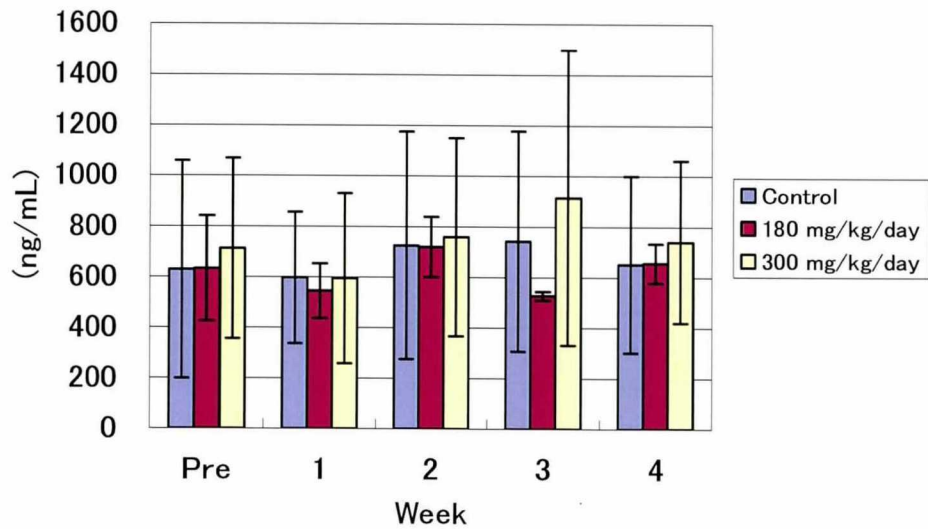
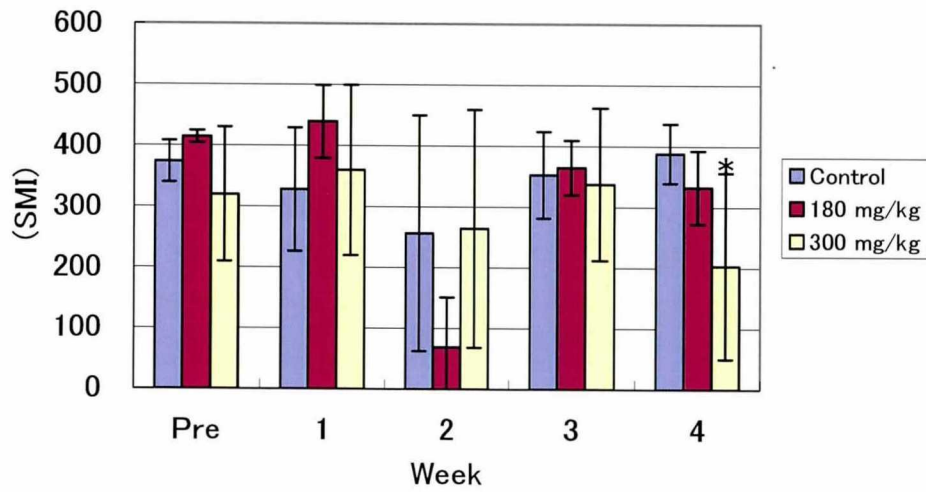


Fig. 2-3 Serum inhibin levels 4 h after the last administration for the week in male dogs orally treated with 180 or 300 mg/kg/day for 1, 2, 3, or 4 weeks. *Significantly different from the control, $P < 0.05$ (Dunnett's t-test).

Sperm motility index



Malformed sperm

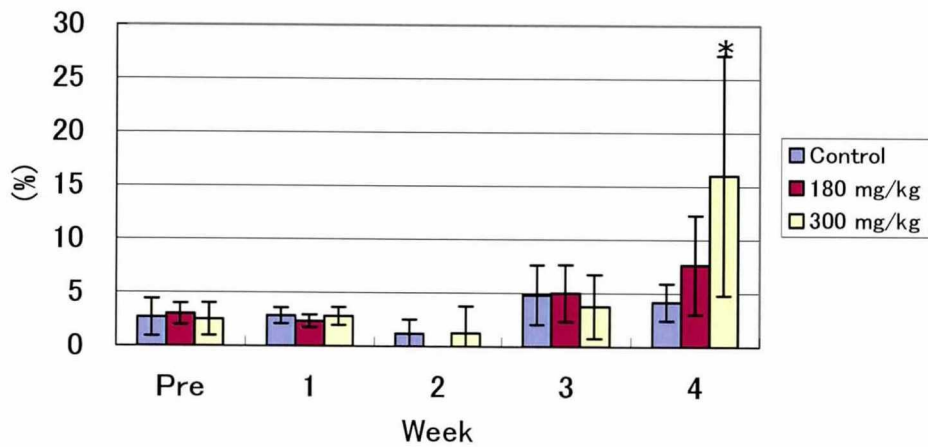


Fig. 2-4 Sperm motility and number of malformed sperms in the semen of male dogs orally administered 180 or 300 mg/kg/day for 4 weeks.

*Significantly different from the control, $P < 0.05$ (Dunnett's t-test).

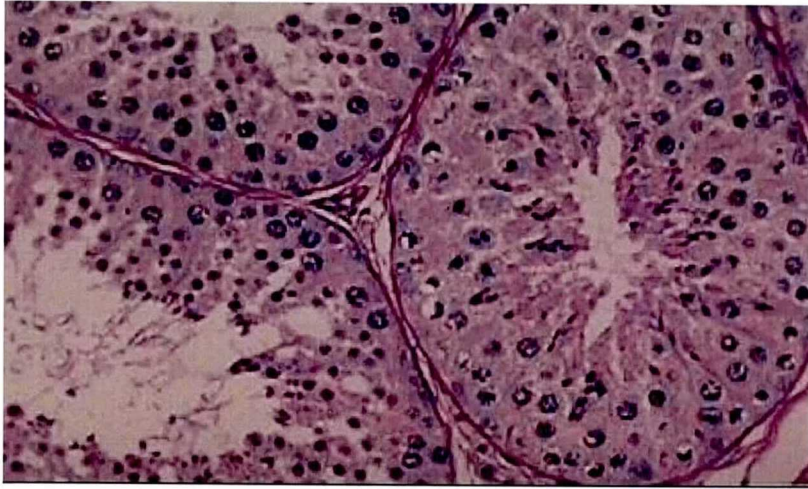
Table 2-1 Absolute weight and microscopic findings in the testis of male dogs given oral nifiracetam at 180 and 300 mg/kg/day for 4 weeks

Item	Control		Nifiracetam	
	180 mg/kg per day	300 mg/kg per day	180 mg/kg per day	300 mg/kg per day
Number of dogs	6	6	3	6
Absolute weight (g)	7.665 ± 1.173	5.284 ± 0.987*	7.306 ± 1.182	
Findings				
Degeneration and decreased number of germ cells	- (6)	3+ (6)	2+ (3)	
Multinuclear giant cell formation	- (6)	+ (2); 2+ (4)	± (1); + (1); 2+ (1)	
Vacuolation of seminiferous cells	- (6)	± (2); + (1)	- (2); + (1)	
Loss of elongated spermatids	- (6)	3+ (6)	+ (2); 2+ (1)	

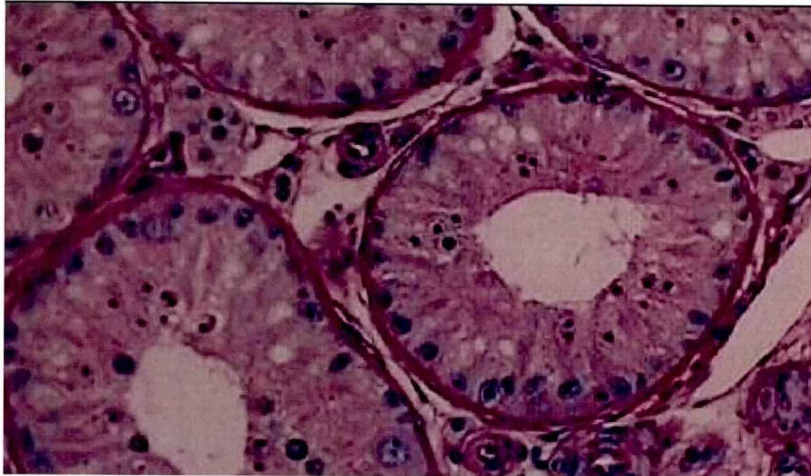
Values show the mean ± S.D.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$ (Dunnett's *t*-test).

-, normal; ±, very slight; +, slight; 2+, moderate; 3+, severe. Parentheses show the number of dogs affected.



A



B

Fig. 2-5 Photomicrographs of the testes from male dogs. A: Dog from control group, no histologic change; B: Dog given 300 mg/kg/day for 4 weeks. The number of germ cells in the seminiferous tubules from the treated animal is markedly reduced and degenerated.

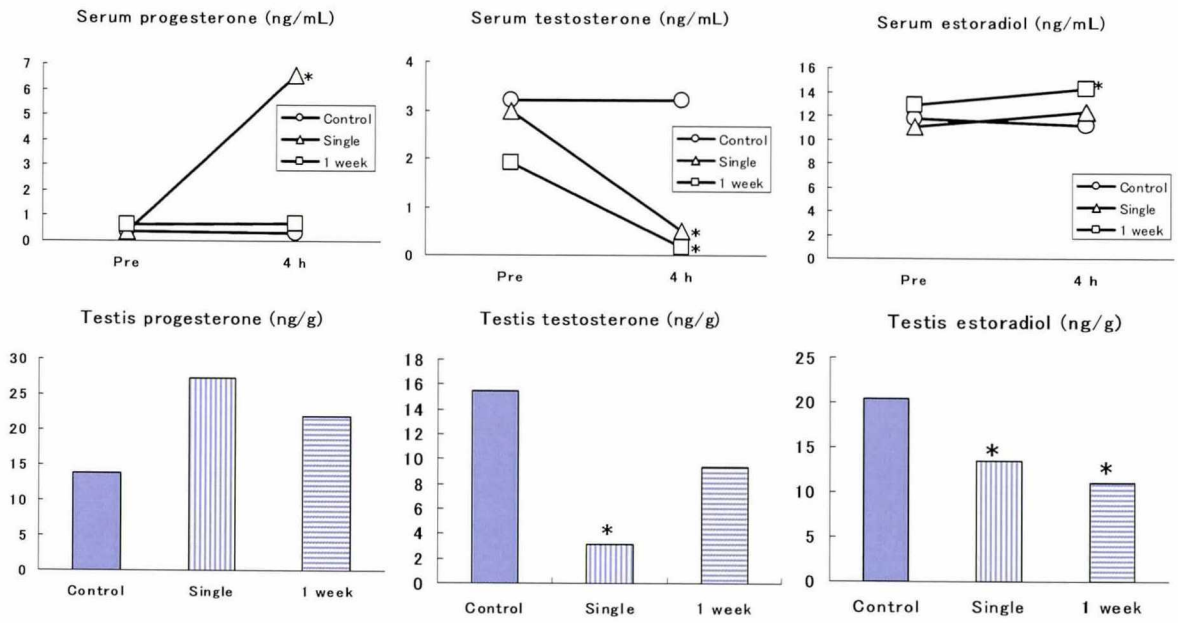


Fig. 2-6 Serum and testis progesterone, testosterone and estradiol levels in male dogs orally administered 300 mg/kg/day singly or for 1 week. *Significantly different from the control, $P < 0.05$ (Dunnett's t-test).

Table 2-2 Absolute weight and microscopic findings in the reproductive organs of male dogs given oral nefiracetam at 300 mg/kg/day singly or for 1 week

Item	Control		Nefiracetam (300 mg/kg per day)	
	Single	1 week	Single	1 week
Number of dogs	5	5	5	5
Absolute weight (g)				
Testis	19.113 ± 3.214	15.965 ± 1.838	16.594 ± 4.084	
Prostate	9.834 ± 1.468	8.525 ± 3.132	6.922 ± 4.443	
Findings				
Testis				
Degeneration of germ cells	1	NE	2	
Desquamated epithelial cells in ductal lumen	4	NE	4	
Cellular infiltration in interstitium	1	NE	0	
Prostate				
Cellular infiltration in interstitium	1	NE	1	
Atrophy	0	NE	3	

Values show the mean ± S.D. NE, not examined.

第3章 カニクイザルにおける精巣毒性予知マーカー
および回復性の検討

1. はじめに

これまでにネフィラセタムの精巣毒性を SD ラットおよびビーグルイヌで検討してきた。ラットではネフィラセタム 1500 mg/kg/day の 1 週間投与で精巣中テストステロンを減少させ、精子細胞の停留、パキテン期精母細胞および円形精子細胞の変性を起こすことが明らかとなった。イヌにおいては 180 mg/kg/day の 1 週間投与で血清中テストステロンを減少させ、4 週間後では生殖細胞の変性や減少ならびに多核巨細胞の形成が認められた。ラットとイヌでは精巣毒性を引き起こすネフィラセタムの用量に差が認められ、動物種によって感受性の違いがある可能性が考えられた。そこで、この章ではカニクイザルを用いてネフィラセタムの精巣毒性に対する感受性を調べるとともに、イヌと同様に精巣毒性を予知できるマーカーの検討を行なった。また、発現した精巣毒性の回復性についても検討した。すなわち、ネフィラセタム 30、60 または 180 mg/kg/day をカニクイザルに 13 週間経口投与し、最終投与翌日に片側の精巣を摘出し、重量測定および病理組織検査を行った。投与量はイヌとの感受性の比較を考慮して、イヌ 13 週間投与試験 (Sugawara et al., 1994) と同一の 60 および 180 mg/kg/day ならびにさらに低用量の 30 mg/kg/day を設定した。動物は投与終了後、32 週間の回復期間をおいて剖検し、精巣の検査を行った。実験期間中、精巣サイズを測定するとともに経時的に血液および精液を採取した。ホルモンは、血清中テストステロン、エストラジオール、LH、FSH および Inhibin 濃度を測定した。精子検査として精液重量、精子濃度、運動性、生存性および形態を観察した。

2. 実験材料および実験方法

・ 被験物質

第1章に示したネフィラセタムを用いた。

・ 動物

雄カニクイザルは A.T. Viri Inc. (Philippine) から入手し、7 歳以上、体重 6.1 ~8.6 kg で使用した。動物は室温 23.8~26.7℃、湿度 41.4~79.6%、12 時間照明の動物室で金属性ケージに個別に収容された。市販の固形飼料 (Certified Primate Diet No. 5048、PMI Feeds Inc.、IN、USA) を 1 日 100 g 与え、補助食としてバナナ約 30 g も与えた。飲用水は自由に摂取できるようにした。

・ 13 週間反復投与 32 週間回復試験

試験には対照群、ネフィラセタム 30、60 および 180 mg/kg/day 群を設定し、それぞれ 3 匹のサルを割り付けた。ネフィラセタムは溶媒 (0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液) に 15、30 および 90 mg/mL の濃度で懸濁し、胃チューブを用いてサルに 13 週間経口反復投与した。対照群には溶媒のみを投与した。最終投与翌日にすべてのサルからケタミン麻酔下で左精巣を摘出した。その後すべてのサルは 32 週間の回復期間の後にケタミンおよびペントバルビタール麻酔下で放血屠殺し、右精巣を摘出した。精巣は重量測定後、ブアン固定液で固定し、パラフィン包埋後薄切し、PAS 染色を施して光学顕微鏡にて観察を行った。なお、実験期間中、毎週 1 回、右精巣の長径および短径を陰囊の上から

ノギスを用いて計測し、精巣サイズを楕円の面積として以下の式を用いて算出した。

$$\text{精巣サイズ } \text{mm}^2 = 3.1416 \times (\text{長径}/2) \text{ mm} \times (\text{短径}/2) \text{ mm}$$

・血清中ホルモン濃度

投与期間開始前ならびに投与 2、4、6、8、10 および 13 週間後ならびに回復 4、8 および 12 週の 1 日の投与の前と投与 2 および 6 時間後に約 3 mL の血液を後肢の静脈から採取した。遠心分離 (1200 g、10 分間、4°C) により得られた血清は測定まで -80°C で保管した。血清中テストステロン、エストラジオール、LH、FSH および Inhibin の測定は第 2 章と同じ方法で行なった。

・精液検査

精液検査では精液重量、精子数、精子の運動性、生存性、奇形率を観察した。血液採取と同じ実施時期に直腸の電気刺激法で各サルから精液を採取した。電子天秤を用いて精液重量を測定した。精液は体外受精用培地 TYH 液に希釈して顕微鏡下で精子数をカウントし、不動精子および運動精子の観察から生存率を算出した。精子の運動性については光川法 (Mitsukawa, 1979) により測定した。

・統計学的方法

データは平均値 ± 標準偏差 (S.D.) で示した。動物数が各群 3 例であるため群間比較は行なわなかった。

3. 結果

・ 13 週間反復投与 32 週間回復試験

ネフィラセタム 60 および 180 mg/kg/day 投与群で投与期間中精巣サイズが徐々に減少した。投与終了後は回復傾向を示した (Fig. 3-1)。投与期間終了時の精巣の絶対および相対重量は 60 および 180 mg/kg/day 群において減少が認められた (Table 3-1)。しかし、回復期間終了時には変化は認められなかった。投与期間終了時の 60 mg/kg/day 群の 3 例中 1 例および 180 mg/kg/day 群の全例に精細管の萎縮および精子細胞の減少に伴う精子形成不全が認められた。回復期間終了時にはこれらの変化は 60 および 180 mg/kg/day のいずれの群においても認められなかった (Table 3-2, Fig. 3-2)。

・ 血清中ホルモン濃度

血清中テストステロン、エストラジオール、LH、FSH および Inhibin 濃度は動物間および検査時期の間で非常にバラツキが大きく、1 群の動物数が 3 例と少ないため、投与期間および回復期間を通して一定の傾向は認められなかった。

・ 精液検査

精液重量、精子濃度、精子の運動性、精子生存性および精子奇形率についてもバラツキが大きく一定の傾向は認められなかった。

4. 考察

このカニクイザルの試験ではネフィラセタムの 13 週間経口反復投与後に 60 および 180 mg/kg/day 群で精巣重量の減少、精細管の萎縮および精子細胞の減少に伴う精子形成不全が認められた。精巣の組織で認められた変化はラットおよびイヌで認められた変化と質的な違いはなかった。投与期間中に精巣サイズ、血清中ホルモン測定および精液検査を経時的に行なったが、精巣サイズでは 60 mg/kg/day 以上の投与で減少が認められたものの、血清中ホルモン濃度および精液検査では個体差が大きく、1 群の例数が少なかったことから、明確な変化を把握することはできなかった。

ラット、イヌおよびサルにナフィラセタム 180 mg/kg/day を 3 週間経口投与した場合の血漿中ネフィラセタム濃度は 3 動物種ではほぼ同程度であることが知られている (Tsuchiya et al., 2003)。したがって、ネフィラセタムの精巣毒性に対する感受性を用量および変化のみられた指標およびその程度から比較すると、イヌ>サル>ラットの順であり、イヌが最も感受性が高く、ラットは明らかに他の 2 種に比べ精巣毒性を引き起こすためにネフィラセタムの高用量を投与する必要があった。

精巣毒性の評価に用いられる動物種としてはラットが一般的であるが、生殖発生毒性試験法ガイドラインでは、継続的に精液検査のできることから、ウサギおよびイヌの有用性も高いと推奨している。また、ウサギ (Ypsilantis et al., 2003) およびイヌ (Takagi et al., 2001) を用いた精巣毒性評価法もそれぞれ報告されている。精巣毒性を複数の動物種で比較した報告としては、ジニトロベンゼンでは SD ラットおよびゴールデンシリアンハムスターによる比較で代謝能力の差が精巣毒性の差となった (McEuen et al., 1991)。Cyclohexylamine のラットおよびマウスにおける比較では、ラットの血漿中薬物濃度がマウスより高く、

精巣毒性に対する感受性も高かった (Roberts et al., 1989)。種差の原因として代謝物、トランスポーター、グルタチオンの状態、TK による違いが考えられている。

今回の試験では毎週、精巣サイズを測定したところ、精巣重量および組織学的変化のみられた 60 および 180 mg/kg/day 群で精巣サイズの減少がみられた。陰嚢上からノギスで精巣を測定する方法は動物またはヒトに対して浸襲の無いため、精巣毒性を予知するマーカーとしては有用であると考えられた。また、回復性の検討では 13 週間投与後にみられた精巣組織における変化は 32 週間の回復期間終了後では認められなくなり、ネフィラセタムの精巣毒性は可逆的な変化であることが明らかとなった。

5. 小括

ラットとイヌでは精巣毒性を引き起こすネフィラセタムの用量に差が認められ、動物種によって感受性の違いがある可能性が考えられた。そこで、カニクイザルを用いてネフィラセタム精巣毒性に対する感受性を調べるとともに、精巣毒性の予知マーカーおよび回復性の検討を行なった。すなわち、ネフィラセタム 30、60 または 180 mg/kg/day をカニクイザルに 13 週間経口投与し、最終投与翌日に片側の精巣を摘出し、重量測定および病理組織検査を行った。動物は投与終了後、32 週間の休薬期間をおいて剖検し、精巣の検査を行った。実験期間中、精巣サイズを測定するとともに経時的にホルモン測定および精液検査を実施した。

その結果、13 週間投与後に 60 および 180 mg/kg/day 群で精巣重量の減少、精細管の萎縮および精子細胞の減少に伴う精子形成不全が認められた。精巣サイズは 60 mg/kg/day 以上の投与で減少が認められたものの、血清中ホルモン濃度および精液検査では明確な変化は認められなかった。また、ネフィラセタムの精巣毒性は 32 週間で回復し、可逆的な変化であることが明らかとなった。

以上、ネフィラセタム 60 および 180 mg/kg/day のカニクイザルへの 13 週間投与で精巣重量の減少、精細管の萎縮および精子形成不全が認められたが、投与終了後 32 週間で回復することが明らかとなった。ネフィラセタムの精巣毒性に対する感受性はイヌ>サル>ラットの順であると考えられた。

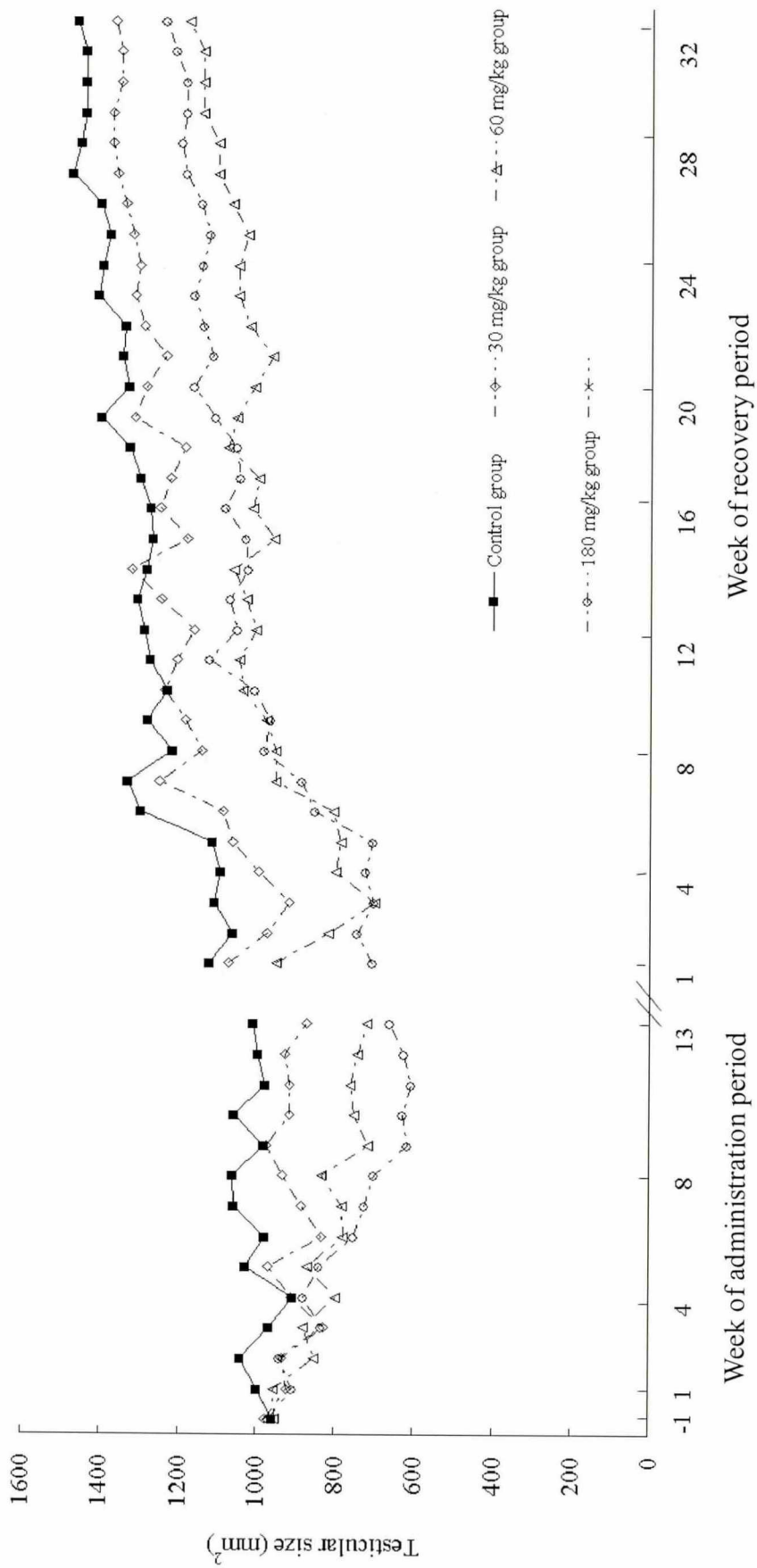


Fig. 3-1 Changes of testicular size in cynomolgus monkeys administered orally with nefiracetam for 13 weeks

Table 3-1 Testicular weights in cynomolgus monkeys administered orally with nefiracetam for 13 weeks

Group	Dose Level (mg/kg/day)	End of administration period			End of recovery period		
		Body weight (kg)	Weight of testis (g) (g %)		Body weight (kg)	Weight of testis (g) (g %)	
0	Mean	7.02	30.47	0.4296	7.47	41.17	0.5500
	SD	0.75	8.16	0.0703	0.42	5.67	0.0494
30	Mean	6.58	25.53	0.3860	6.95	38.84	0.5649
	SD	0.44	7.13	0.0964	1.00	8.50	0.1328
60	Mean	7.03	17.10	0.2508	7.08	30.76	0.4265
	SD	1.36	1.22	0.0594	1.31	10.37	0.0715
180	Mean	6.10	15.09	0.2485	6.57	37.05	0.5655
	SD	0.30	1.92	0.0427	0.60	10.49	0.1574

Table 3-2 Microscopic findings in the testis of male cynomolgus monkeys given oral nefiracetam for 13 weeks

Findings	End of administration period		End of recovery period
	Atrophic seminiferous tubules	Decreased spermatogenesis	Atrophic seminiferous tubules
Control	0 ^a	0	1 (±)
30 mg/kg/day	1 (±)	0	0
60 mg/kg/day	1 (+)	1 (+)	1 (±)
180 mg/kg/day	2 (+), 1(++)	2 (+), 1(++)	0

^a Number of animals showing the findings.

±: Minimal change

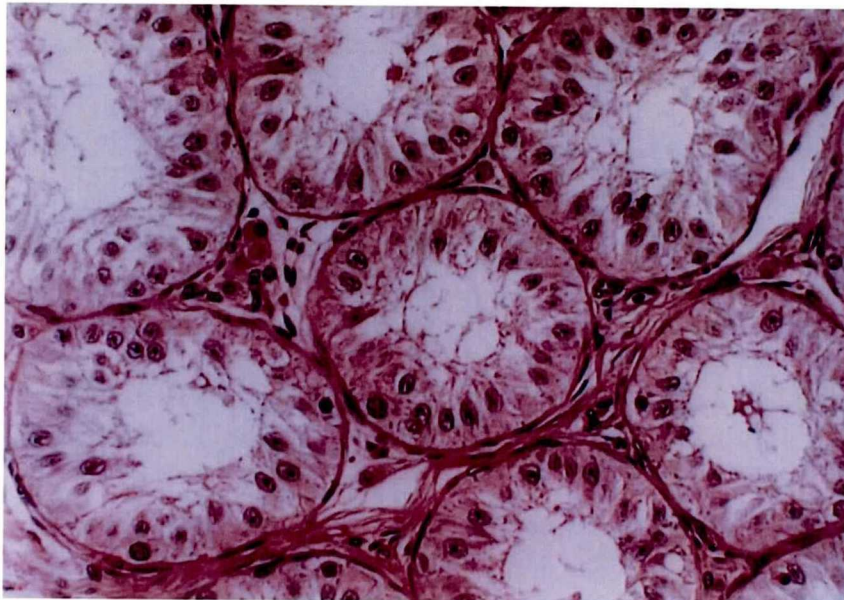
+: Mild change

++: Moderate change

+++: Severe change.



(A)



(B)

Fig. 3-2 Photomicrographs of the testes from male monkeys. A: Monkey from control group, no histologic change; B: Monkey given 180 mg/kg/day for 13 weeks. The number of germ cells in the seminiferous tubules from the treated animal is markedly reduced and degenerated.

第4章 ライディッヒ細胞のテストステロン生合成および
ステロイドホルモン変換酵素の検討

第1節 培養ライディッチ細胞のテストステロン生合成の検討

1. はじめに

これまでにラットではネフィラセタムの 1500 mg/kg/day、イヌでは 300 mg/kg/day の経口投与で血清および精巣中テストステロンの低下が確認され、ネフィラセタムの精巣毒性メカニズムとして関与していることが示された。しかし、ラットおよびイヌのいずれにおいても下垂体前葉からの性腺刺激ホルモンである LH には明確な変化はみられなかった。また、イヌにおいてはライディッチ細胞におけるプロジェステロンからテストステロンへの変換が抑制され、テストステロンが減少することが示された (Shimomura et al., 2005)。したがって、ネフィラセタムによるテストステロン低下はネフィラセタムが視床下部および下垂体に影響して、その2次的変化としてテストステロンが減少するのではなく、直接、精巣に作用してテストステロンを減少させることが考えられる。しかし、動物を用いた *in vivo* 評価系では完全に中枢の影響を排除して精巣局所でのテストステロンの低下について評価することは困難である。また、*in vivo* 評価系では毒性変化を惹起する活性本体が投与した薬物の未変化体なのか、代謝物なのか、数多くある代謝物のうちのどの代謝物なのかを明らかにすることは難しい。そこで、この節では *in vitro* 試験系でネフィラセタムおよびその代謝物のライディッチ細胞におけるテストステロン生合成に及ぼす影響を検討するために、精巣からパーコール法によりライディッチ細胞を分離し、ネフィラセタムまたはその代謝物を含む培養液中で培養し、培養液中のテストステロン濃度を測定した。

2. 実験材料および実験方法

・被験物質

第1章に示したネフィラセタムを用いた。ネフィラセタムの代謝物 (Fig 4) である 5-ヒドロキシ-2-ピロリジノン体 (M3)、カルボン酸体 (M11)、3-ヒドロキシ-2,6-キシリジン体 (M18) および 4-ヒドロキシ-2-ピロリジノン体 (M20) は第一製薬株式会社 (東京) で合成された。

・動物

雄ラット (CrI:CD(SD)) を日本チャールスリバー (横浜) から入手した。実験に使用時は 15 週齢で、体重は 300~500 g の範囲内であった。動物は室温 21~25°C、湿度 35~75%、12 時間照明の動物室に個別で金網ケージに収容された。市販の固形飼料 (MB-1) および飲用水は自由に摂取できるようにした。

・ライディッチ細胞の分離

CO₂ ガスを吸入させて動物を屠殺し、精巣を摘出した。コラゲナーゼおよび Bovine serum albumin (BSA) をそれぞれ 0.025% および 0.1% 含む Medium 199 (M199) の 1 mL を精巣表面の血管から注入し、血管内の血液を洗い出した。精巣は白膜を除去し、精巣 1 個あたり 9 mL の上記コラゲナーゼおよび BSA 含有 M199 中に入れた。振盪機を用いて 34°C、80~100 cycle/min で 20 分間、細胞を分散させた。振盪後、上記の細胞分散液からポアサイズ 100 μm のナイロンメッシュにて精細管を除去し、ろ液を 4°C、300 g で 10 分間遠心した。沈殿

物に BSA0.1%含有 M199 を 3 mL 加え懸濁し、30%、40%および 50%と積層されたパーコールの上に静かに滴下した。4℃、830 g で 20 分間遠心した。パーコール 40%層と 50%層の間の細胞を採取した。細胞に 5 mL の BSA 含有 M199 を加えた後、4℃、300 g で 10 分間遠心し、BSA 含有 M199 に再懸濁することによりパーコールを除去した (Browning et al., 1981)。

- ・被験物質処理およびサンプル採取

細胞数 10^6 /mL に調製し、ネフィラセタム、M3、M11、M18 および M20 を 0、1、2 および 4 mM を含む M199 (0.1%BSA 含有) で 34℃、5% CO² のインキュベーター内で 24 時間培養した。各濃度、3 サンプルの処理を行った。24 時間培養後、培養液を採取し、測定まで-80℃で保存した。なお、1 mM はネフィラセタム 1500 mg/kg/day をラットに経口投与した時のほぼ血清中最高濃度 (Cmax) に相当する。

- ・テストステロン測定

培養液中のテストステロン濃度は第 2 章と同じ方法で測定した。

- ・統計学的方法

データは群の平均値を対照群に対する%で示した。群間比較は実測値を用いて、まず、Bartlett test を行い、等分散の場合は生データを、不等分散の場合は log 変換したデータを Dunnett の t-test で検定した。有意水準は 5%とした。

3. 結果

ネフィラセタム、代謝物 M3 および M20 処理群では 1、2 および 4 mM のすべての処理濃度において対照群と比較してテストステロン濃度の減少がみられた。M18 処理群では 1 mM では対照群との間に有意な差はみられなかったが、2 mM 以上の処理濃度ではテストステロン濃度の減少がみられた。いずれも処理濃度の増加にともないテストステロン濃度が減少する傾向がみられた。4 mM 処理のテストステロン濃度は、M3 では対照群の 65.3%であり、検討を行った被験物質の中で最も低値を示した。ネフィラセタム、M18 および M20 では、対照群の 73.0%、72.4%および 72.5%でありほぼ同程度の低下がみられた。M11 ではテストステロン濃度の低下は認められなかった (Table 4)。

4. 考察

ラット精巣からパーコール法により分離したライディッチ細胞を BSA 含有 M199 培養液中で培養し、ネフィラセタムまたはその代謝物 4 種類を別々に添加し、24 時間後の培養液中テストステロン濃度を測定した。

その結果、代謝物 M11 ではテストステロン生合成の低下作用は認められなかったが、ネフィラセタム、M3、M18 および M20 処理群で処理濃度の増加にともないテストステロン生合成にたいする抑制作用がみられた。したがって、ネフィラセタムが精巣でのテストステロン生合成を抑制することが、*in vitro* 評価系においても確認された。

精巣におけるテストステロン産生を抑制する化学物質として、エタンジメタンスルホネイト (Nandi et al., 1995)、降圧薬であるスピノロラクトン (Menard et al., 1978)、抗けいれん薬であるアミノグルチミド (Lacoste et al., 1989) などが知られているが、その原因としては細胞毒性、生合成の抑制、代謝機能の乱れなどが考えられており一様ではないことが知られている。

テストステロンはコレステロールを原料としてステロイドホルモン生合成経路 (Schema 4) の各ホルモンに変換されていく。つまり、コレステロールからプレグネノロンを経て、プロジェステロン、テストステロン、エストラジオールなどに変換されていき、この変換には P450_{scc}、P450_{c17}、3 β HSD、17 β HSD および Aromatase などの変換酵素が関与している。また、コレステロールからプレグネノロンまでの経路はライディッチ細胞のミトコンドリアでプレグネノロン以下の経路は主に滑面小胞体で行われることが知られている。したがって、テストステロンの生合成抑制は異なる部位または酵素が原因で抑制される可能性がある。

また、動物に薬物を投与する *in vivo* 評価系では動物体内で薬物が代謝される

ため毒性変化を起こす原因が薬物の未変化体か、またはいずれの代謝物であるかを確定することはできない。しかし、今回の *in vitro* での評価方法ではネフィラセタム、M-18 および M-20 で同程度に、M-3 ではさらに強いテストステロンの生合成抑制作用があるが、M-11 では抑制作用はないことが解明された。

5. 小括

ネフィラセタムおよびその 4 種類の代謝物 (M3、M11、M18 および M20) のライディッチ細胞におけるテストステロン生合成に及ぼす影響を *in vitro* 試験系で検討するために、精巣からパーコール法によりライディッチ細胞を分離し、ネフィラセタムまたはその代謝物を含む培養液中で培養し、培養液中のテストステロン濃度を測定した。

その結果、M11 ではテストステロン生合成の低下作用は認められなかったが、ネフィラセタム、M3、M18 および M20 処理群で処理濃度の増加にともないテストステロン濃度の減少がみられた。したがって、ネフィラセタムが視床下部および下垂体に関与せず、直接、精巣におけるテストステロン生合成を抑制することが、*in vitro* 評価系においても確認された。

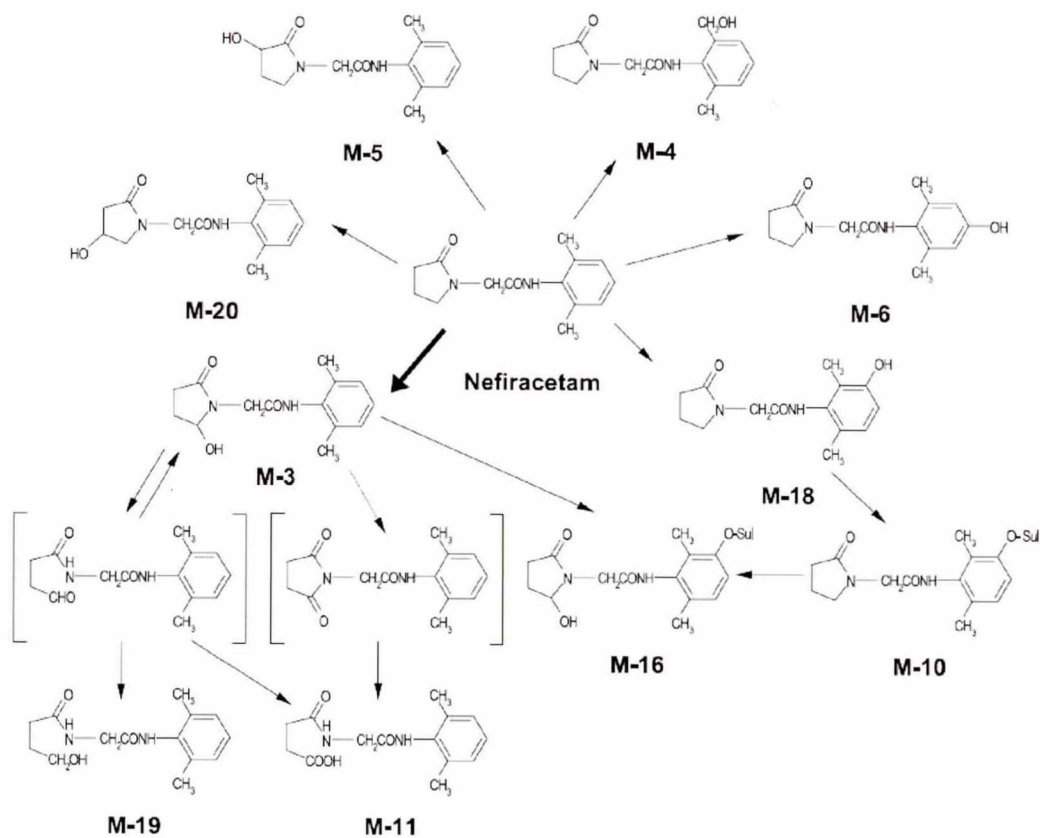


Fig. 4 The major metabolic pathways of nefiracetam. M: metabolite.

Table 4 Testosterone levels (% against control) after 24 hours treatment of nefiracetam and its metabolites (M3, M11, M18 and M20)

Test article	Control	Treatment (mM)		
		1	2	4
Nefiracetam	100.0	89.1*	81.9*	73.0*
M3	100.0	90.6*	80.8*	65.3*
M11	100.0	96.5	108.1	99.1
M18	100.0	94.5	89.5*	72.4*
M20	100.0	85.0*	84.8*	72.5*

* Significantly different from the control based on the actual measurement values, $P < 0.05$ (Dunnett's *t*-test).

第2節 ラット精巣におけるステロイドホルモン変換酵素の遺伝子発現の検討

1. はじめに

ネフィラセタムの 1500 mg/kg/day のラットへの投与および 300 mg/kg/day のイヌへの経口投与により、血清および精巣中テストステロンは減少したが、血清中 LH には明らかな変化は認められなかった。また、*in vitro* 評価系においてネフィラセタムは培養ライディッチ細胞のテストステロン生合成を阻害することも明らかとなった。イヌにネフィラセタム 300 mg/kg/day を単回または 1 週間反復経口投与した実験では、ネフィラセタムが精巣中のプロジェステロンからテストステロンへの変換経路を阻害することが示されている。プロジェステロンからテストステロンへの変換経路は、ステロイドホルモン変換酵素 P450c17 により、プロジェステロンから 17-OH-プロジェステロンを経てアンドロステネジオンに至る経路および別のステロイドホルモン変換酵素 17 β HSD によりアンドロステネジオンからテストステロンに変換される経路に分けられる。そこで、ネフィラセタムはいずれの経路を阻害するかを検討するため、ラットに投与可能限界量であるネフィラセタム 1500 mg/kg/day を経口単回投与し、投与 1、3、6 および 24 時間後に精巣を摘出し、RNA の抽出、精製および逆転写を行った。そして、ステロイドホルモン変換酵素 P450c17 および 17 β HSD の mRNA を定量した。

2. 実験材料および実験方法

・ 被験物質

第1章に示したネフィラセタムを用いた。

・ 動物

雄ラット (CrI:CD(SD)) を日本チャールスリバー (横浜) から入手した。実験に使用時は19週齢で、体重は511~700 gの範囲内であった。動物は室温20~26℃、湿度30~70%、12時間照明の動物室に個別で金属性ケージに収容された。市販の固形飼料 (Certified Rodent Diet 5002, PMI Nutrition International Inc., MO, USA) および飲用水は自由に摂取できるようにした。

・ 投与

ネフィラセタムは溶媒 (0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液) に150 mg/mLの濃度で懸濁し、ラット用胃ゾンデを用いて1500 mg/kg/dayの用量でラットに単回経口反復投与した。なお、投与量の1500 mg/kg/dayは投与可能限界量であり、ラットへの単回で血清および精巣中テストステロンを減少させることから設定した。対照群には溶媒のみを投与した。投与後1、3、6および24時間後に各3匹のラットをエーテル麻酔下で放血屠殺した。右精巣を摘出し、RNA抽出まで液体窒素に凍結保存した。

- TaqMan PCR

精巢サンプルの一部から、TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、製品添付プロトコールにしたがって総 RNA を抽出した。40 U の RNase inhibitor (TOYOBO, Osaka, Japan) を含む最終容量 50 μ L の製品添付バッファー中で、1 U の DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) により 7-13 μ g の総 RNA を処理し、フェノールクロロフォルム法により精製した。次いで、0.1 M dithiothreitol、10 mM dNTPs、200 U の Superscript II (Invitrogen) および 40 U RNase inhibitor を含む最終容量 40 μ L の製品添付バッファー中で、DNase I 処理した 2 μ g の総 RNA を Oligo(dT)12-18primer (Invitrogen) により逆転写した。リアルタイム定量 PCR に用いた 3 遺伝子、P450c17 (CYP17A1; Rn00562601_m1)、17 β HSD (Rn00588942_m1) ならびに β -actin (Rn00667869_m1) のプライマーおよびプローブは Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。定量 RT-PCR は qPCR[™] Mastermix Plus (Eurogentec, Philadelphia, PA, USA) を用いて実施し、mRNA 量は 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により製品添付プロトコールにしたがって定量した。 β -actin 遺伝子との比較により、P450c17 ならびに 17 β HSD 遺伝子の相対的な mRNA レベルをすべての個体についてそれぞれ算出した。

- 統計学的方法

データは群の平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) で示し、対照群とネフィラセタム群との比較を有意水準 5% で検定した。群間比較はまず、*F* 検定を行い、不等分散の場合は Student の *t* 検定、等分散の場合は Aspin-Welch の *t* 検定を行った。

3. 結果

CYP17A1 遺伝子の相対的な mRNA レベルは投与後 1、3、6 および 24 時間後のいずれの時点においても対照群に比べてネフィラセタム投与群で高い傾向がみられた。17 β HSD の mRNA レベルは投与 6 時間後を除いた 1、3 および 24 時間後で対照群に比べてネフィラセタム投与群で低い傾向がみられた (Fig. 4)。

4. 考察

薬物の精巣毒性には精巣を構成する細胞に対する直接的な傷害、ホルモンを介する間接的な精子形成阻害、完成した精子への傷害 (Kawaguchi et al., 2004; Shimomura et al., 1999) および循環障害 (Francavilla et al., 1981) など多種のメカニズムが知られている。精巣を構成する細胞に対する直接的な傷害としては、精粗細胞 (Toppari et al., 1990) や精母細胞 (Lee et al., 1989) など生殖細胞に対する傷害、生殖細胞の養育機能を担う (Shimomura et al., 2008) セルトリ細胞に対する傷害 (Foster et al., 1989)、ホルモン合成を行なうライディッヒ細胞 (Kelce et al., 1993) の壊死などが知られている。しかし、今回のネフィラセタムの精巣毒性メカニズムはホルモンを介する間接的な精子形成阻害であると考えられる。

ネフィラセタムは精巣中ライディッヒ細胞におけるプロジェステロンからテストステロンへの変換経路を阻害することが第 3 章のイヌにネフィラセタム 300 mg/kg/day を単回および 1 週間経口反復投与し、精巣中のプロジェステロン、テストステロンおよびエストラジオールを測定した実験で示されている。本章の実験ではラットにネフィラセタム 1500 mg/kg/day を経口単回投与し、プロジェステロンからテストステロンへの変換経路に存在する 2 種類のステロイドホルモン変換酵素 P450c17 および 17 β HSD の mRNA 発現量を観察した。

その結果、プロジェステロンから 17-OH-プロジェステロンを経てアンドロステネジオンに至る経路に存在するステロイドホルモン変換酵素 P450c17 遺伝子の相対的な mRNA レベルは対照群に比べてネフィラセタム投与群で高い傾向がみられた。その下流のアンドロステネジオンからテストステロンへの経路に存在する 17 β HSD の mRNA レベルはネフィラセタム投与群で低い傾向がみられた。このことから、ネフィラセタムはステロイド変換酵素 17 β HSD の遺伝子の発現を抑制することで、アンドロステネジオンからテストステロンへの変換を

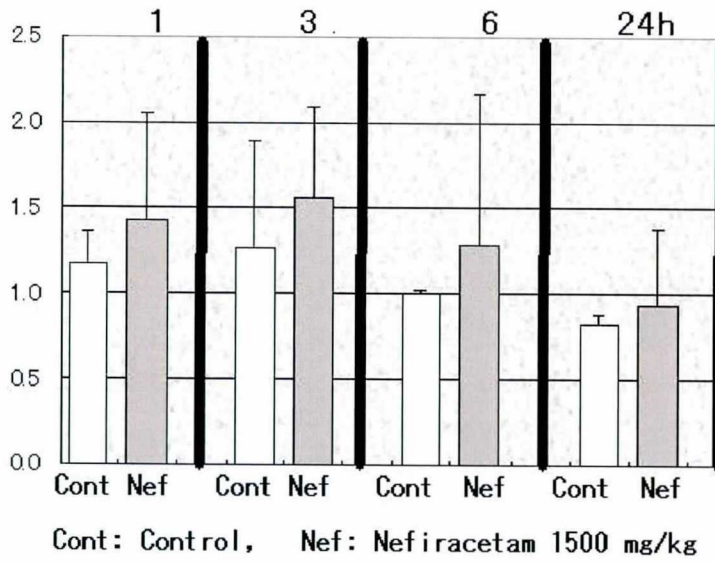
阻害し、精巣中のテストステロン濃度を減少させる可能性が考えられた。

5. 小括

ネフィラセタムはプロジェステロンからテストステロンへの変換経路のうち、ステロイドホルモン変換酵素 P450c17 により、プロジェステロンから 17-OH-プロジェステロンを経てアンドロステネジオンに至る経路または 17 β HSD によりアンドロステネジオンからテストステロンに変換される経路いずれの経路を阻害するかを検討するため、ラットにネフィラセタム 1500 mg/kg/day を経口単回投与し、投与 1、3、6 および 24 時間後に精巣を摘出し、RNA の抽出、精製および逆転写を行った。そして、ステロイドホルモン変換酵素 P450c17 および 17 β HSD の mRNA を定量した。

その結果、P450c17 遺伝子の相対的な mRNA レベルはネフィラセタム投与群で高い傾向がみられ、17 β HSD の mRNA レベルは低い傾向がみられた。したがって、ネフィラセタムはステロイド変換酵素 17 β HSD の遺伝子の発現を抑制することで、アンドロステネジオンからテストステロンへの変換を阻害し、精巣中のテストステロン濃度を減少させる可能性が考えられた。

P450c17



17 β HSD

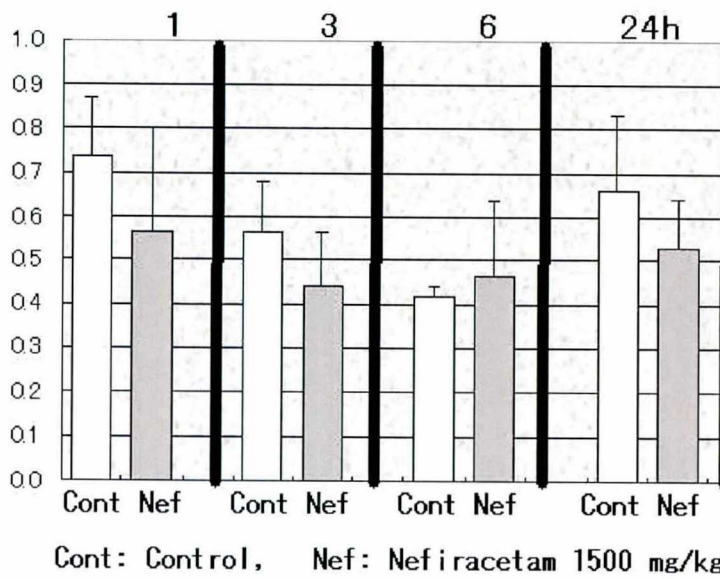


Fig. 4 P450c17 and 17 β HSD mRNA levels after 1, 3, 6 and 24 h treatment of nefiracetam

総 括

ネフィラセタムは、脳機能改善薬としての開発を目的に新規に合成されたピロリドン系誘導体である。本剤の薬理作用として、神経細胞の長時間持続型のCa²⁺チャンネル(N/L型)の賦活化により神経伝達物質の放出を増加させ、GABAおよびコリン作動性神経系に反応し、脳におけるタンパク質合成を増強することが知られている。

ネフィラセタムは薬理的試験において、各種モデル動物の記憶消失を減少させ、老齢ラットの認識能力を促進させることが証明されている。毒性試験ではネフィラセタムに遺伝毒性、がん原性および催奇形性は認められなかった。13週間以上の反復投与毒性試験では、ラットでは300 mg/kg/dayを投与しても変化は認められなかったが、イヌおよびサルでは60 mg/kg/day以上の投与で精子低形成がみられた。以上の様にほとんどの毒性試験においてほぼ問題は見つからなかったが、精子形成への抑制作用が確認されたことから、この作用についての詳細な検討は、本剤の安全性を確固たるものにする上で、必須の事項であると思われる。

本研究は、ネフィラセタムによる精巣毒性メカニズムの解明を試みるとともに、異なる動物種（ラット、ビーグルイヌ、カニクイザル）を用いてその作用を検討し、広範な考察を行うことを目的とした。

第1章ではネフィラセタムの精巣毒性について雄ラット（Slc:SD）を用いて検討した。ネフィラセタムを4週間経口反復投与し、投与期間中動物を経時的に屠殺して、精巣組織、精巣中精子頭部数およびホルモンの変化を観察した。初期変化として投与1週間投与後にステップ19の精子細胞の停留がみられ、ステージVIIの精細管ではパキテン期精母細胞およびステップ7の円形精子細胞の変性ならびに精巣中精子頭部数の減少がみられた。これらの変化は次第に増悪し、投与後4週には多核巨細胞をともなう精細管の萎縮に進行した。血清および精巣中テストステロンは単回投与後に減少したが、その日のうちに対照群

のレベルにまで回復した。また、投与1週間後でもテストステロンの減少は継続していた。以上の結果から、ネフィラセタムによる精巣毒性の初期変化は精巣中テストステロンの減少によるものと考えられた。

第2章ではネフィラセタムの精巣毒性メカニズムおよび精巣毒性を予知できる感受性の高いマーカーを検討するために、雄ビーグルイヌにネフィラセタムの180および300 mg/kg/dayを単回、1および4週間経口反復投与した。血清および精巣中テストステロン、精液検査ならびに精巣の組織学的検査を経時的に実施した。

精巣中テストステロンはネフィラセタム300 mg/kg/dayの単回投与後に低下したが、その時点で精巣中プロジェステロンには変化は認められなかった。血清中テストステロンは単回、1および2週投与後に減少した。反対に、血清中エストラジオールは投与後1から4週で増加した。血清中LH、FSHおよびInhibinには実験期間中、変化は認められなかった。精子運動率の減少および精子奇形率の増加は投与4週後で初めて変化として捉えられた。精巣の組織検査では1週間投与では変化は認められなかったが、投与4週後では180 mg/kg/day群では軽度な精細管の萎縮が、300 mg/kg/dayでは多核巨細胞の形成をともなう重度の精細管萎縮がみられた。

これらの結果から、ネフィラセタムは高用量の単回経口投与後に精巣中テストステロンを減少させ、4週間投与後では精巣組織に重度の形態学的変化を引き起こすことが明らかとなった。このテストステロンの減少はネフィラセタムがライディッヒ細胞におけるプロジェステロンからテストステロンへの変換を阻害することによるものであると考えられ、精巣毒性を検出するための感受性の高いマーカーであることが明らかとなった。

ラットとイヌでは精巣毒性を引き起こすネフィラセタムの用量に差が認めら

れ、動物種によって感受性の違いがある可能性が考えられた。そこで、第3章ではカニクイザルを用いてネフィラセタム精巣毒性に対する感受性を調べるとともに、精巣毒性の予知マーカーおよび回復性の検討を行なった。すなわち、ネフィラセタム 30、60 または 180 mg/kg/day をカニクイザルに 13 週間経口投与し、最終投与翌日に片側の精巣を摘出し、重量測定および病理組織検査を行った。動物は投与終了後、32 週間の休薬期間をおいて剖検し、精巣の検査を行った。実験期間中、精巣サイズを測定するとともに経時的にホルモン測定および精液検査を実施した。

その結果、13 週間投与後に 60 および 180 mg/kg/day 群で精巣重量の減少、精細管の萎縮および精子細胞の減少に伴う精子形成不全が認められた。精巣サイズは 60 mg/kg/day 以上の投与で減少が認められたものの、血清中ホルモン濃度および精液検査では明確な変化は認められなかった。また、ネフィラセタムの精巣毒性は 32 週間で回復し、可逆的な変化であることが明らかとなった。

以上、ネフィラセタム 60 および 180 mg/kg/day のカニクイザルへの 13 週間投与で精巣重量の減少、精細管の萎縮および精子形成不全が認められたが、投与終了後 32 週間で回復することが明らかとなった。ネフィラセタムの精巣毒性に対する感受性はイヌ>サル>ラットの順であると考えられた。

第4章ではまず、ネフィラセタムおよびその4種類の代謝物(M3、M11、M18 および M20) のライディッヒ細胞におけるテストステロン生合成に及ぼす影響を *in vitro* 試験系で検討するために、精巣からパーコール法によりライディッヒ細胞を分離し、ネフィラセタムまたはその代謝物を含む培養液中で培養し、培養液中のテストステロン濃度を測定した。

その結果、M11 ではテストステロン生合成の低下作用は認められなかったが、ネフィラセタム、M3、M18 および M20 処理群で処理濃度の増加にともないテストステロン濃度の減少がみられた。したがって、ネフィラセタムが視床下部

および下垂体に関与せず、直接、精巣におけるテストステロン合成を抑制することが、*in vitro* 評価系においても確認された。

次いで、ネフィラセタムはプロジェステロンからテストステロンへの変換経路のうち、ステロイドホルモン変換酵素 P450c17 により、プロジェステロンから 17-OH-プロジェステロンを経てアンドロステネジオンに至る経路または 17 β HSD によりアンドロステネジオンからテストステロンに変換される経路いずれの経路を阻害するかを検討するため、ラットにネフィラセタム 1500 mg/kg/day を経口単回投与し、投与 1、3、6 および 24 時間後に精巣を摘出し、RNA の抽出、精製および逆転写を行った。そして、ステロイドホルモン変換酵素 P450c17 および 17 β HSD の mRNA を定量した。その結果、P450c17 遺伝子の相対的な mRNA レベルはネフィラセタム投与群で高い傾向がみられ、17 β HSD の mRNA レベルは低い傾向がみられた。したがって、ネフィラセタムはステロイド変換酵素 17 β HSD の遺伝子の発現を抑制することで、アンドロステネジオンからテストステロンへの変換を阻害し、精巣中のテストステロン濃度を減少させる可能性が考えられた。

以上、ネフィラセタムの精巣毒性メカニズムの解明およびネフィラセタムの精巣毒性に対するラット、イヌ、サル感受性の比較から、

(1) 中枢に作用する薬物で、ホルモン中枢支配に影響せずに直接精巣のテストステロン合成を阻害する精巣毒性薬物であることを初めて証明した。

(2) 精巣のステロイド変換酵素 17 β HSD の直接阻害というメカニズムを持つ初めての精巣毒性薬物であることを証明した。

(3) 新たに構築した精巣中の 3 ホルモン同時測定による評価系により、これまで困難であった (2) のようなメカニズムを持つ精巣毒性薬物の検出を可能とした。

(4) ネフィラセタムは同質の精巣毒性を示しながら、イヌおよびサルに比較し

てラットで著しく感受性が低い希少な精巣毒性薬物であることを証明した。

(5) (1) から (4) の結果はトキシコロジーおよび獣医学の発展に大きく貢献するものと考ええる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、始終ご指導、ご鞭撻を賜りました麻布大学獣医学部薬理学教室の赤堀文昭教授、同大学解剖学第二研究室の山本雅子教授、同大学動物繁殖学研究室の柏崎直巳教授および研究活動を支援していただいた第一三共株式会社安全性研究所長の真鍋淳博士、同研究所第六グループ長の三分一所厚司博士、同研究所第一グループの加藤道幸博士、岩手大学獣医学課程獣医薬理学教室の古濱和久教授、慈恵医大医学部の柳田知司客員教授に謹んで感謝の意を表します。また、さまざまなご協力をいただいた第一三共株式会社安全性研究所の生殖発生毒性担当の皆様にご礼申し上げます。

引用文献

- Abe, E., Murai, S., Saito, H., Masuda, Y., Takasu, Y., Shiotani, T., Tachizawa, H. and Itoh, T. (1994): Effects of nefiracetam on deficits in active avoidance response and hippocampal cholinergic and monoaminergic dysfunctions induced by AF 64A in mice. *J. Neural. Transm.*, **95**, 179-193.
- Browning, J. Y., D'agata, R. and Grotjan, H. E. (1981): Isolation of purified rat leydig cells using continuous percoll gradients. *Endocrinology*, **109**, 667-669.
- Francavilla, S., Moscardelli, S., Francavilla, F., Casasanta, N., Properzi, G., Martini, M. and Santiemma, V. (1981): Acute cadmium intoxication: influence of cyproterone acetate on the testis and epididymis of the rat. *Arch. Androl.*, **6**, 1-11.
- Foster, P.M. (1989): M-dinitrobenzene: studies on its toxicity to the testicular Sertoli cell. *Arch. Toxicol. Suppl.*, **13**, 3-17.
- Glass, A.R., Steinberger, A., Swerdloff, R. and Vigersky, R.A. (1982): Pituitary-testicular function in protein-deficient rats. Follicle-stimulating hormone hyperresponse to castration and supersensitivity of gonadotropin secretion to androgen negative feedback. *Endocrinology*, **110**, 1542.
- Hamada, T., Watanabe, G., Kokuho, T., Sasamoto, S., Hasegawa, Y., Miyamoto, K. and Igarashi, M. (1989): Radioimmunoassay of inhibin in various mammals. *J.*

Endocrinol., **122**, 697-704.

Harada, S., Sakaguchi, Y., Shimada, M., Matsubishi, K., Kakihata, K., Nomura, M. and Takayama, S. (1995): Male reproductive toxicity study of nefiracetam in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **20**, 309-317.

Hess RA. (1990): Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol Reprod.*, **43**, 525-42.

Hiramatsu, M., Koide, T., Ishihara, S., Shiotani, T., Kameyama, T. and Nabeshima, T. (1992): Involvement of the cholinergic system in the effects of nefiracetam (DM-9384) on carbon monoxide (CO)-induced acute and delayed amnesia. *Eur. J. Pharmacol.*, **216**, 279-285.

Hooks, W.N., Burford, P., Begg, S., Gopinath, C., Inage, F., Kato, M. and Takayama, S. (1994a): Fifty-two-week oral toxicity study of the new cognition-enhancing agent nefiracetam in dogs. *Arzneimittelforschung*, **44**, 228-238.

Hooks, W.N., Colman, K.A., Gopinath, C., Inage, F., Kato, M. and Takayama, S. (1994b): Fifty-two-week oral toxicity study of the new cognition-enhancing agent nefiracetam in rats. *Arzneimittelforschung*, **44**, 220-228.

Jindo, T., Shimizu, Y., Kato, M. and Takayama, S. (1994): Thirteen-week oral toxicity study of the new cognition-enhancing agent nefiracetam in rats.

Arzneimittelforschung, **44**, 214-216.

Kajimura, T., Satoh, H., Rajasekaran, D., Spicer, E.J., Nakashima, N. and Takayama, S. (1994): Oncogenicity studies of the cognition-enhancing agent nefiracetam in mice and rats. *Arzneimittelforschung*, **44**, 254-259.

Kawaguchi, T., Kawachi, M., Morikawa, M., Kazuta, H., Shibata, K., Ishida, M., Kitagawa, N., Matsuo, A., Kadota, T. (2004): Key parameters of sperm motion in relation to male fertility in rats given alpha-chlorohydrin or nitrobenzene. *J. Toxicol. Sci.*, **29**, 217-31.

Kelce, W.R. and Zirkin, B.R. (1993): Mechanism by which ethane dimethanesulfonate kills adult rat Leydig cells: involvement of intracellular glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **120**, 80-88.

Kerr, J.B., Millar, M., Maddocks, S. and Sharpe, R.M. (1993): Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *Anat. Rec.*, **235**, 547-559.

Lacoste, D., Caron, S., Bélanger, A. and Labrie, F. (1989): Effect of 3-week treatment with [D-Trp⁶, des-Gly-NH¹⁰⁽²⁾]LHRH ethylamide, aminoglutethimide, ketoconazole or flutamide alone or in combination on testicular, serum, adrenal and prostatic steroid levels in the dog. *J. Steroid. Biochem.*, **33**, 233-242.

Lee, K.P. and Kinney, L.A. (1989): The ultrastructure and reversibility of testicular

- atrophy induced by ethylene glycol monomethyl ether (EGME) in the rat. *Toxicol. Pathol.*, **17**, 759-773.
- McEuen, S.F. and Miller, M.G. (1991): Metabolism and pharmacokinetics of 1,3-dinitrobenzene in the rat and the hamster. *Drug Metab. Dispos.*, **19**, 661-666.
- Meistrich, M.L. (1989): Evaluation of reproductive toxicity by testicular sperm head counts. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, **8**, 551-567.
- Menard, R.H., Loriaux, D.L., Bartter, F.C. and Gillette, J.R. (1978): The effect of the administration of spironolactone on the concentration of plasma testosterone, estradiol and cortisol in male dogs (1). *Steroids*, **31**, 771-782.
- Mitsukawa, S. (1979): A new method for determining sperm motility: the clinical application of sperm motile efficiency. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, **70**, 1221-1231.
- Murasaki, M., Inami, M., Ishigooka, J., Wakatabe, H., Utsumi, M., Matsumoto, T., Fukuyama, Y., Miura, S., Tachizawa, H., Sudo, K. and Fujimaki, Y. (1994): Phase I study on DM-9384 (nefiracetam). *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **22**, 3539-3587.
- Nabeshima, T., Tohyama, K., Murase, K., Ishihara, S., Kameyama, T., Yamasaki, T., Hatanaka, S., Kojima, H., Sakurai, T., Takasu, Y. and Shiotani, T. (1991): Effects of DM-9384, a cyclic derivative of GABA, on amnesia and decreases in

- GABAA and muscarinic receptors induced by cycloheximide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 271-275.
- Nabeshima, T. (1994): Ameliorating effects of nefiracetam (DM-9384) on brain dysfunction. *Drug Today*, **30**, 357-379.
- Nabeshima, T., Nakayama, S., Ichihara, K., Yamada, K., Shiotani, T. and Hasegawa, T. (1994): Effects of nefiracetam on drug-induced impairment of latent learning in mice in a water finding task. *Eur. J. Pharmacol.*, **255**, 57-65.
- Nandi, S., Banerjee, P.P. and Zirkin, B.R. (1999): Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas? *Biol. Reprod.*, **61**, 70-75.
- Nishizaki, T., Matsuoka, T., Nomura, T., Sumikawa, K., Shiotani, T., Watabe, S. and Yoshii, M. (1998): Nefiracetam modulates acetylcholine receptor currents via two different signal transduction pathways. *Mol. Pharmacol.*, **53**, 1-5.
- O'Donnell, L., McLachlan, R.I., Wreford, N.G. and Robertson, D.M. (1994): Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology*, **135**, 2608-2614.
- O'Donnell, L., McLachlan, R.I., Wreford, N.G., de Kretser, D.M. and Robertson, D.M. (1996a): Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.*, **55**, 895-901.

- O'Donnell, L., Stanton, P.G., Wreford, N.G., Robertson, D.M. and McLachlan, R.I. (1996b): Inhibition of 5 α -reductase activity impairs the testosterone-dependent restoration of spermatogenesis in adult rats. *Endocrinology*, **137**, 2703-2710.
- Otomo, E., Kogure, K., Hirai, S., Goto, F., Hasegawa, K., Tazaki, Y., Ito, E., Nishimura, T., Fujishima, M., Inanaga, K. and Ogawa, N. (1994): Clinical evaluation of DM-9384 in the treatment of cerebrovascular disorders: early Phase II study. *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **22**, 3589-3624.
- Roberts, A., Renwick, A.G., Ford, G., Creasy, D.M. and Gaunt, I. (1989): The metabolism and testicular toxicity of cyclohexylamine in rats and mice during chronic dietary administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **98**, 216-229.
- Rotter, V., Schwartz, D., Almon, E., Goldfinger, N., Kapon, A., Meshorer, A., Donehower, L.A. and Levine, A.J. (1993): Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9075-9079.
- Russell, L.D., Ettl R.A., Hikim, A.P.S. and Clegg, E.D. (1990): Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press.
- Russell, L.D., Malone, J.P. and Karpas, S.L. (1981): Morphological pattern elicited by agents affecting spermatogenesis by disruption of its hormonal stimulation. *Tissue Cell*, **13**, 369-380.

- Saito, K., O'Donnell, L., McLachlan, R.I. and Robertson, D.M. (2000): Spermiation failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats. *Endocrinology*, **141**, 2779-2785.
- Sakurai, T., Ojima, H., Yamasaki, T., Kojima, H. and Akashi, A. (1989): Effects of N-(2,6-dimethylphenyl)-2-(2-oxo-1-pyrrolidinyl) acetamide (DM-9384) on learning and memory in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, **50**, 47-53.
- Sharpe, R.M. (1994): Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neil, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1363-1434.
- Shimada, H., Hattori, C., Tanaka, N. and Takayama S. (1994): Mutagenicity study of the new cognition-enhancing agent nefiracetam. *Arzneimittelforschung*, **44**, 251-253.
- Shimada, M., Shikanai, Y., and Harada, S. (1996): Effects of food restriction on spermatogenesis in rats. *J. Reprod. Dev.*, **42**, 69-75.
- Shimada, M., Shikanai, Y., Shimomura, K., Harada, S., Watanabe, G., Taya, K., Kato, M. and Furuhashi, K. (2003): Investigation of testicular toxicity of nefiracetam, a neurotransmission enhancer, in rats. *Toxicol. Lett.*, **143**, 307-315.
- Shimomura, K. and Sato T. (1999): Effects of exposure of a surfactant, polyoxyethylene(10)nonylphenyl ether (NP-10), to sperm on embryonic and fetal development in rabbits. *J Toxicol Sci.*, **24**, s141-148.

- Shimomura, K., Shimada, M., Hagiwara, M., Harada, S., Kato, M. and Furuham, K. (2004): Testicular toxicity induced in dogs by nefiracetam, a neurotransmission enhancer. *Reprod. Toxicol.*, **18**, 423-430.
- Shimomura, K., Shimada, M., Hagiwara, M., Harada, S., Kato, M. and Furuham, K. (2005): Insights into testicular damage induced by ethinylestradiol in rats. *Reprod. Toxicol.*, **20**, 157-163.
- Shimomura, K., Sakurai, K., Shimada, M., Hagiwara, M., Kato, M. and Furuham, K. (2008): Occurrence of headless sperm in adolescent rat urine. (2008): *Laboratory Animals*, in press.
- Sugawara, T., Kato, M., Suzuki, N., Akahane, K. and Takayama, S. (1994): Thirteen-week oral toxicity study of the new cognition-enhancing agent nefiracetam in dogs. *Arzneimittelforschung*, **44**, 217-219.
- Takagi, H., Kurihara, A., Inoue, T., Nakamura, I. and Kimura, M. (2001): Investigation of usefulness of sperm analyses in dogs for male fertility study. *J. Toxicol. Sci.*, **26**, 313-321.
- Taya, K. and Sasamoto, S. (1990): Involvement of the adrenal gland in the suckling-induced decrease in LH and FSH secretion and the concomitant increase in prolactin secretion in the rat. *J. Endocrinol.*, **125**, 279-285.
- Taya, K., Watanabe, G. and Sasamoto, S. (1985): Radioimmunoassay for progesterone, testosterone, and estradiol-17 β using ¹²⁵I-iodohistamine radioligands. *Jpn. J.*

- Anim. Reprod., **31**, 186-197.
- Toppari, J., Bishop, P.C., Parker, J.W., Ahmad, N., Girgis, W., diZerega, G.S. (1990): Cytotoxic effects of cyclophosphamide in the mouse seminiferous epithelium: DNA flow cytometric and morphometric analysis. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **15**, 44-52.
- Tremblay, Y., Belanger, A., Labrie, F., Frenette, G., Dube, J.Y. and Tremblay, R.R. (1984): Characteristics of the inhibitory effect of chronic treatment with an LHRH agonist on testicular steroidogenesis in the dog., *Prostate*, **5**, 631-638.
- Tsuchiya, Y., Takahashi, Y., Jindo, T., Furuhashi, K. and Suzuki, K.T. (2003): Comprehensive evaluation of canine renal papillary necrosis induced by nefiracetam, a neurotransmission enhancer. *Eur J Pharmacol.*, **475**, 119-128.
- Watanabe, T., Matsushashi, K., Shimada, M., Harada, S., Tawara, K. and Takayama, S. (1994): Reproductive toxicity studies of the new cognition-enhancing agent nefiracetam in rats and rabbits. *Arzneimittelforschung*, **44**, 239-242.
- Yoshii, M. and Watabe, S. (1994): Enhancement of neuronal calcium channel currents by the nootropic agent, nefiracetam (DM-9384), in NG108-15 cells. *Brain. Res.*, **642**, 123-131.
- Ypsilantis, P., Papaioannou, N., Psalla, D., Politou, M. and Simopoulos, C. (2003): Effects of single dose administration of ifosfamide on testes and semen characteristics in the rabbits. *Reprod. Toxicol.*, **17**, 237-245.

Investigation of testicular toxicity mechanism of nefiracetam, a neurotransmission enhancer

[ABSTRACT]

Nefiracetam (N-(2,6-dimethylphenyl)-2-(2-oxo-1-pyrrolidinyl) acetamide, a pyrrolidone derivative, is being developed to treat a neurotransmission enhancer.

In pharmacological studies, this agent has been shown to increase the release of neurotransmitters by activating long-lasting N/L-type Ca²⁺ channels, to interact with GABA-ergic and ACh-ergic neuronal systems, and to enhance protein synthesis in the brain.

In toxicity studies, nefiracetam is not mutagenic either in vitro or in vivo, and is not oncogenic in mice and rats or teratogenic in rats and rabbits. Results from general oral dose toxicity studies show that nefiracetam induces testicular toxicity in male dogs and monkeys given 60 mg/kg per day or more for 13 weeks. However, this toxicity was not observed in rats following a 13-week treatment with 480 mg/kg per day.

In the present study, to clarify the mechanism of testicular toxicity induced by nefiracetam, its pathogenesis was analyzed in the in vivo systems using rats, dogs and monkeys, and in vitro systems.

Chapter 1 Investigation of the earliest histopathological and hormonal changes in SD rats

Testicular toxicity of nefiracetam was investigated in male Slc:SD rats. Nefiracetam was orally administered daily at 1500 mg/kg for 4 weeks, and the animals were sacrificed sequentially during the course of administration to determine testicular histopathological changes and sperm head counts (SHC), and hormonal changes.

Retention of step 19 spermatids, sporadic degeneration of pachytene spermatocytes and step 7 spermatids in the stage VII seminiferous tubules, and a decrease in SHC were seen as earliest changes after 1 week of administration. These changes gradually advanced up to atrophy of seminiferous tubules with multinucleated-giant-cell formation after 4-week administration. Serum and testicular testosterone levels were decreased, but recovered to the control levels within a day following a single administration, and the decreases were repeated after 1-week administration.

These results suggest that nefiracetam-induced earliest changes could be caused by the decreased level of testicular testosterone.

Chapter 2 Investigation of the hormone biosynthesis and predictive markers for testicular toxicity in beagle dogs

To investigate mechanisms of the testicular toxicity of nefiracetam and to find sensitive parameters to predict the toxicity, male beagle dogs were orally administered 180 or 300 mg/kg per day of the drug once and for 1 and 4 weeks. Time-course changes in serum and/or testicular hormone levels and semen parameters, and testicular morphology were examined.

The testicular testosterone level was decreased 4 h after single administration of nefiracetam at 300 mg/kg per day, but the progesterone level showed no change at that time. The serum testosterone level was decreased after single, 1-week or 2-week treatment. In contrast, the serum estradiol level was increased from 1- to 4-week treatment. No changes in serum LH, FSH and inhibin B levels were observed throughout the experimental period. Decreased sperm motility and increased number of malformed sperms were first observed in semen after 4-week treatment. Histopathological examination of the testis revealed moderate and severe seminiferous atrophy with multinucleated giant cell formation at 180 and 300 mg/kg per day, respectively, after 4-week treatment, but not 1-week treatment.

These results show that nefiracetam decreases testicular testosterone level in dogs following single oral administration of a high dose, and induces severe morphologic changes after 4-week treatment. This reduction is shown to be a sensitive parameter to detect the toxicity, and is suggested to be induced by the impaired conversion of progesterone to testosterone in Leydig cells.

Chapter 3 Investigation of the reversibility and predictive markers for testicular toxicity in cynomolgus monkeys

This study was conducted to elucidate the developmental process and its reversibility for the testicular toxicity of nefiracetam and to estimate some of the markers in male cynomolgus monkeys. Four groups of 3 male monkeys received oral doses of 0 (control), 30, 60 or 180 mg/kg/day of nefiracetam for 13 weeks by gastric intubation and had a 32-week recovery period. During the administration and recovery

periods, testicular size measurement, hormone assay and spermatozoa/seminal fluid examinations were performed. The left testis was removed by orchietomy in all the animals at the end of administration period. The right testis was collected at the necropsy of the end of recovery period. The weight of the testes and the histopathological changes were examined.

There were no test article treatment-related changes in the semen analysis and hormone assays. The testicular size was decreased at 60 and 180 mg/kg/day. At the end of administration period, the testicular weights of the left testes were decreased at the 60 mg/kg/day or more. Atrophy of seminiferous tubules associated with decreased spermatogenesis was noted at 60 and 180 mg/kg/day. Full recovery from the testicular damage was noted in the animals treated with 60 and 180 mg/kg/day during and at the end of recovery period.

These results suggest that the testicular size could be a parameter for monitoring of the testicular toxicity, and testicular toxicity of nefiracetam was reversible.

Chapter 4 Evaluation of the testosterone biosynthesis in the Leydig cell and steroid hormone converting enzymes

The present study was performed to examine the effects of nefiracetam and its metabolites on testosterone biosynthesis.

The Leydig cells were isolated from the testis using Percoll density gradient separation methods, and cultured in the M199 medium containing BSA. Nefiracetam and 4 metabolites were added into the cultured medium. Testosterone concentrations of the medium were assayed 24 h after the addition.

Decreased testosterone concentrations were observed in nefiracetam and 3 metabolites (M3, M18 and M20), but not M11.

These findings show that nefiracetam and its metabolites have direct action to inhibit the testosterone biosynthesis in the Leydig cells.

To estimate the inhibition site on the steroid hormone biosynthesis pathway, nefiracetam was orally administered to rats at 1500 mg/kg, and the testes were removed 1, 3, 6 and 24 h after a single administration. The mRNA levels of steroid hormone converting enzymes, P450c17 and 17 β HSD, in the testis were analyzed. Increased relative P450c17 mRNA levels and decreased 17 β HSD mRNA levels were noted in the testis of nefiracetam treated rats.

These results show that nefiracetam decreases mRNA levels of 17 β HSD and then the inhibition of testosterone biosynthesis is occurred on the pathway between progesterone and testosterone in the Leydig cell.

In conclusion, the achievements of the present study can be summarized as follows;

(1) Nefiracetam has actions on central nervous system, and shows testicular toxicity. It has effects on the testosterone biosynthesis in the testis, but not on the hypothalamo-pituitary-gonadal system control.

(2) Decreased testosterone levels caused by the direct inhibition of the 17 β HSD, steroid hormone converting enzyme, are considered to be a mechanism of testicular toxicity of nefiracetam.

(3) A new evaluation system established in the present study is thought to be useful to detect the testicular toxicant that has a mechanism described in (2).

(4) The present study shows that there are some species differences in the susceptibility to the nefiracetam testicular toxicity, dogs>monkeys>rats, however, quality of the toxicity changes were considered to be identical.

(5) These results can be expected to contribute greatly to the advancement of toxicology science and veterinary science.