

氏名(本籍)	下村和裕(愛知県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第418号
学位授与年月日	平成20年3月11日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 赤堀文昭 (副査) 山本雅子 柏崎直巳

論文内容の要旨

ネフィラセタムは、脳機能改善薬として新規に合成されたピロリドン系誘導体である。本薬の薬理作用は、神経細胞の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を介し、脳におけるタンパク合成を増強することにある。ネフィラセタムは、各種モデル動物の記憶消失を減弱させ、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。

一方、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が、13週間反復投与毒性試験では、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(ラットでは480 mg/kg/day投与しても変化は認められなかった)。このようにほとんどの毒性試験において問題は見つからなかったものの、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することを目的とした。

第1章ではラットを用いて、精巣の組織およびホルモンについてネフィラセタム投与後の初期変化を経時的に検討した。ラット(SD)にネフィラセタム1,500 mg/kg/dayを経口投与し、投与1および3日、ならびに1、2、3および4週に剖検を行い、精巣の組織標本を作製した。そして、精巣中の精細管を精子形成ステージ(I~XIV)に分類して病理組織学的検査を行なった。また、別に1週間経口投与し、精巣、精巣上体および前立腺の重量を測定するとともに、精巣中の精子数を計測した。ホルモン測定には単回経口投与0.5、1、2、4、6、8、12および16時間後に血液と精巣を採取し、血清中のテストステロン、LH、FSH、Inhibinならびに精巣中のテストステロン濃度を測定した。

その結果、投与後1週間でステージIXからXIIの精細管にステップ19の精子細胞の分化の停滞が認

められた。また、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の円形精子細胞の核の濃染をともなう変性が観察された。また、体重、精巣、精巣上体、前立腺の重量および精巣中精子頭部数は、いずれも減少した。血清および精巣中テストステロンは単回投与後、2、4および6時間では有意に ($p \leq 0.05$) 低下した。また、血清中LHに有意な ($p = 0.05$) 低下はみられなかったが、投与後12時間目では有意な ($p \leq 0.05$) 上昇がみられた。血清中FSHおよびInhibinには、変化は認められなかった。

以上、ネフィラセタム投与により、ラットの血清および精巣中のテストステロン濃度の低下がみられ、精巣組織もテストステロン低下時に特徴的な精子細胞の分化の停滞およびパキテン期精母細胞の変性がみられたことから、ネフィラセタムの精巣毒性メカニズムはテストステロンの低下によるものと考えられた。しかし、LHに持続的な変化が認められないことから、中枢を介したテストステロンの低下ではないことが示唆された。

第2章では、ビーグル犬を用いて精子性状およびホルモンへの影響を検討した。すなわち、ネフィラセタム180または300 mg/kg/dayをビーグル犬に4週間経口投与し、毎週、血液および精液を採取し、最終投与翌日に剖検、精巣の重量測定および病理組織検査を行った。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。精巣精子数、精子の運動性、精子の生存性および形態を観察した。また、ネフィラセタム300 mg/kg/dayをビーグル犬に単回および1週間経口投与し、血清および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。

その結果、血清中テストステロンは180および300 mg/kg/dayともに投与1から4週目で低下または低下傾向がみられた。血清中エストラジオールは180 mg/kg/dayの投与4週および300 mg/kg/dayの投与1、2、3および4週で有意な ($p \leq 0.05$) 上昇がみられた。血清中LH、FSHおよびInhibinでは300 mg/kg/dayの投与3週で偶発的なFSHの上昇がみられた以外に変化は認められなかった。精子検査では300 mg/kg/dayの投与4週目で精子の運動性が低下し、形態異常精子の割合が増加した。精子数および精子の生存性には変化はなかった。精巣中のプロジェステロンは上昇傾向、テストステロンは低下または低下傾向、エストラジオールは低下がみられた。

以上の結果より、ビーグル犬においてもネフィラセタム投与により血清および精巣中のテストステロンの低下がみられ、LHに変化が認められないことから、ネフィラセタムの精巣毒性メカニズムは中枢を介さない、精巣ライディッヒ細胞におけるテストステロン生合成が抑制されることによるテストステロンの低下であることが示された。また、精巣中テストステロンおよびエストラジオールが減少したものの、プロジェステロンの減少はみ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におけるステロイドホルモン生合成経路のプロジェステロンからテストステロンの間の経路を阻害する可能性が示された。

第3章ではカニクイザルを用いて精子性状およびホルモンへの影響ならびに回復性の検討を行った。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 週間の回復期間をおいて剖検を行った。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。

その結果、血清中ホルモンおよび精子検査では投薬の影響を検出することはできなかったが、60 mg/kg/day 以上の投与で精巣サイズが減少し、投与終了時に精巣重量の減少および精細管の萎縮が認められた。これらの変化は、32 週間の休薬後には認められなかった。

以上から、サルにおいてもネフィラセタムの精巣毒性が認められ、精巣サイズがマーカーとなりうることを、さらに精巣の変化は可逆性であることが確認された。

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た。ネフィラセタム未変化体またはその主要な代謝物 4 種類を別々に培養液に添加し、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、ネフィラセタムおよび 3 種類の代謝物を培養液へ添加することにより、培養液中テストステロン濃度の減少が認められた。このことから、ネフィラセタムおよび代謝物が、*in vitro* におけるライディッヒ細胞のテストステロン生合成を抑制することが明らかとなった。

さらに、プロジェステロンからテストステロンの過程に関与する 2 種類の酵素に対するネフィラセタムの影響を検討した。すなわち、ラットにネフィラセタム 1,500 mg/kg/day を経口単回投与し、投与 1、3、6 および 24 時間後に剖検を行い、精巣を摘出した。精巣から、総 RNA を抽出、精製し、次いで、逆転写を行った。そして RT-PCR 法により mRNA 量を定量し、P450c17 ならびに 17 β HSD 遺伝子の発現量を調べた。

その結果、投与 1 および 3 時間後の 17 β HSD 遺伝子の相対的な mRNA レベルの減少傾向が認められた。従って、ネフィラセタムはステロイドホルモン生合成過程のうち 17 β HSD を阻害し、テストステロン合成を抑制していることが示唆された。

以上、ネフィラセタムの精巣毒性メカニズムとして、(1) 中枢神経系を介さない、(2) 精巣のステロイド合成系酵素のうち 17 β HSD を直接阻害することによってテストステロン生合成が抑制される、(3) 低レベルのテストステロンが精子形成を抑制する、ことが解明された。また、異なる動物種を用いてネフィラセタムの精巣毒性を検討した結果、ネフィラセタムの精巣毒性に質的な違いはないが、ネフィラセタムに対する感受性は、イヌ>サル>ラットと異なることが明らかとなった。

本研究を通して確立した精巣毒性メカニズムの評価系は、ネフィラセタムのみならず、汎用的に用いることができる。この評価系により今後の精巣毒性研究を効率的にすすめることが可能となり、精巣毒性が問題となって滞っていた医薬品の開発において、ブレークスルーにつながると考えられる。また、現在、トキシコロジーの領域で研究活動を担っている多くの獣医師の知識および技術の向上にも貢献できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

ネフィラセタムのようなピロリドン系化合物はその薬理作用として、神経細胞のCa²⁺チャンネル(N/L型)を賦活化し、結果的にGABAおよびコリン作動性神経系を介して、脳におけるタンパク質合成を増強することから、脳機能改善薬として期待されている。

一方、ネフィラセタムには遺伝毒性、がん原性および催奇形性などの重篤な毒性は確認されていないものの、イスおよびサルでの13週間反復投与毒性試験で精子低形成が認められている。このことは、新たに開発される医薬品の持つ毒性が、時として市販後に明らかになる可能性を示唆している。そこで著者は、一般毒性試験では見逃される危険のある精巣毒性について、スクリーニング試験として、簡便、かつ精度の高い評価系が必要であり、そして、有用な評価系を確立するためには、まず、精巣毒性発現メカニズムを解明することが重要であると考えた。

そこで、本研究は、ネフィラセタムの精巣毒性メカニズムの解明とその毒性の動物種差(ラット、ビーグル犬、カニクイザル)を明らかにすることを目的としている。

第1章ではラットにおけるネフィラセタムの精巣毒性とそのメカニズムを解明するため、ネフィラセタムのラットで投与可能な最大投与量1,500 mg/kg/day(ラット一般毒性試験での通常の投与量では精巣毒性は発現していないことから)を単回経口投与し、経時的に病理組織学的検査ならびに血清中(テストステロン、LH、FSH、Inhibin)および精巣中(テストステロン)のホルモンレベルを測定している。

その結果、投与後1週間で精細管での精子形成ステージIXからXIIにおいて、ステップ19の精子細胞の分化の停滞およびステージVIIの精細管でのパキテン期精母細胞とステップ7の円形精子細胞の核の濃染をとともなう変性を確認している。なお、この時点では体重、精巣、精巣上体、前立腺の重量減少および精巣中精子頭部数の減少も確認している。すなわち、ラットでも高用量投与では精巣毒性のあることを明らかにした。一方、血清中および精巣中テストステロン濃度は単回投与後、2、4および6時間では有意に($P \leq 0.05$)低下することを確認している。しかし、血清中LHは投与後12時間目に有意($P \leq 0.05$)な上昇を認めているが、その後の血清中テストステロンには変化のないことから、また、血清中FSHおよびInhibinにも変化のないことから、血清中および精巣中のテストステロンの減少は中枢を介したものではないと考えている。

このように、著者はラットへのネフィラセタム高用量投与試験により、ネフィラセタムは血清中お

および精巣中のテストステロン濃度低下を誘発し、加えて、精巣組織に特徴的な（テストステロン低下時の）精子細胞の分化の停滞、およびパキテン期精母細胞の変性を引き起こすことから、ネフィラセタムの高用量投与による精巣毒性はテストステロンの低下とそれに伴う形態学的変化であることを立証している。また、この血清中および精巣中テストステロンの低下は血中LHレベルに持続的な変化やLHを含む他のホルモンレベルにも特徴的変動が認められなかったことから、中枢を介したテストステロンの低下ではないことを示唆している。

第2章では、ビーグル犬にネフィラセタム180または300 mg/kg/dayを4週間経口投与し、経時的に精液中の精子性状（精巣精子数、精子の運動性、精子の生存性および形態）ならびに血清中テストステロン、エストラジオール、LH、FSHおよびInhibin濃度を調べている。また、最終投与（4週間経口投与）翌日に剖検し、精巣の重量測定および病理組織検査を行っている。

加えて、血清中と精巣中と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レベルを比較するため、ネフィラセタム300 mg/kg/dayをビーグル犬に単回および1週間経口投与する試験系を設定している。

その結果、血清中テストステロンはいずれの投与量（180および300 mg/kg/day）でも投与1週目から試験期間中（4週目まで）、低下傾向または低下（ $P \leq 0.05$ ）することを観察している。一方、血清中エストラジオールでは用量依存性の変化として、180 mg/kg/day投与では4週目に、300 mg/kg/day投与では1週目から試験期間を通して、有意な（ $P \leq 0.05$ ）上昇がみられている。しかし、血清中LH、FSHおよびInhibinでは300 mg/kg/day投与でも生物学的に有意な変化は認められていない。また、精子検査では精子数および精子の生存性に変化はないものの、300 mg/kg/dayの投与群で4週目に精子の運動性の低下、形態異常精子の割合が増加したことを観察している。

他方、精巣中のホルモンの変化はプロジェステロンの上昇傾向、テストステロンの低下または低下傾向、エストラジオールの低下を観察している。

このように、ビーグル犬においてもネフィラセタム投与により血清中および精巣中のテストステロンの低下がみられ、ラットと同様LH等に変化が認められないことから、ネフィラセタムの精巣毒性のメカニズムは中枢を介さないものと考えている。また、精巣中テストステロンおよびエストラジオールが減少したものの、プロジェステロンの減少はみられなかったことから、精巣ライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン生合成経路のプロジェステロンからテストステロンの間の経路を阻害することによるテストステロンの低下であることを示唆している。

第3章ではカニクイザルにネフィラセタム30、60または180 mg/kg/dayを13週間経口投与し、経時的に精液中の精子性状（精液重量、精子濃度、運動性、生存性および形態）、精巣サイズおよび血清中ホルモン（テストステロン、エストラジオール、LH、FSHおよびInhibin）への影響を検討している。また、最終投与翌日に片側の精巣を摘出し、病理組織学的検査を行うとともに、動物は投与終了後、

32週間の回復期間において剖検を行っている。

その結果、血清中ホルモンおよび精子検査では投薬の影響を判断することができなかった（例数の少ないこと、個体のバラツキの大きいことから）が、60 mg/kg/day以上の投与で精巣サイズが減少し、13週間の投与終了時に精巣重量の減少および精細管の萎縮を観察している。また、これらの変化は、32週間の休薬後には消失しており、ネフィラセタムの3か月程度の投与では、その精巣毒性は可逆的であることを立証している。

このように、サルを用いたネフィラセタムの精巣毒性の評価では、精巣サイズがマーカーとなることを明らかにした。

第4章では、第1章および第2章の成績から、ネフィラセタムが精巣テストステロン生合成能を抑制することが示唆されたので、その毒性メカニズムを解明するために *in vitro* 評価系（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培養法）を用いて調べている。すなわち、ネフィラセタム未変化体、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、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、24時間後の培養液中テストステロン濃度を測定している。

その結果、ネフィラセタムおよび3種類（5-ヒドロキシ-2-ピロリジノン体、3-ヒドロキシ-2,6-キシリジン体、4-ヒドロキシ-2-ピロリジノン体）の代謝物は、培養液中テストステロン濃度を有意（ $P \leq 0.05$ ）に減少させることを確認している。このことから、著者はネフィラセタムおよび代謝物が、*in vitro* におけるライディッヒ細胞のテストステロン生合成を抑制することを立証した。

加えて、プロジェステロンからテストステロンの過程に関与する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検討している。すなわち、第1章の試験方法と同様に、ラットにネフィラセタム 1,500 mg/kg/day を単回経口投与し、投与1、3、6および24時間後に摘出した精巣を試料として（総RNAを抽出、精製し、次いで、逆転写を行った）、RT-PCR法によりmRNA量を定量し、P450c17ならびに17 β HSD 遺伝子の発現量を調べている。

その結果、投与1および3時間後の17 β HSD 遺伝子の相対的なmRNAレベルは減少傾向を示していた。このことから、著者はネフィラセタムの精巣テストステロン低下の毒性発現機序はステロイドホルモン生合成過程のうち17 β HSDを阻害し、テストステロン合成を抑制している可能性を示唆した。

以上、ネフィラセタムの精巣毒性メカニズムは、(1) 中枢神経系を介さない、(2) 精巣のステロイド合成系酵素のうち17 β HSDを直接阻害することによってテストステロン生合成を抑制する、および(3) 精巣テストステロンの濃度低下が精子形成を抑制することにあることを明らかにした。また、併せて、動物種差の面からも検討し、ネフィラセタムの精巣毒性には動物種による質的な違いはないが、感受性には種差（イヌ>サル>ラット）のあることを立証し、ラットを用いる一般毒性試験では新規候補薬物の精巣毒性が検出されてこない場合のあることを示した。