

学位申請論文

糖尿病治療薬を用いた精巣毒性の機序検討

(The study of the mechanism of testicular toxicity
by using antidiabetic agents)

2021年8月

麻布大学大学院 獣医学研究科
動物応用科学専攻 博士後期課程

DA1861 小林 大起

目次

| | |
|------------------|----|
| 目次..... | 2 |
| 序論..... | 3 |
| 第 1 章..... | 7 |
| 緒言..... | 8 |
| 実験材料および実験方法..... | 10 |
| 実験結果..... | 15 |
| 考察..... | 23 |
| 小括..... | 26 |
| 第 2 章..... | 27 |
| 緒言..... | 28 |
| 実験材料および実験方法..... | 29 |
| 実験結果..... | 37 |
| 考察..... | 51 |
| 小括..... | 54 |
| 第 3 章..... | 55 |
| 緒言..... | 56 |
| 実験材料および実験方法..... | 58 |
| 実験結果..... | 61 |
| 考察..... | 64 |
| 小括..... | 66 |
| 総括ならびに結論..... | 67 |
| 謝辞..... | 71 |
| 引用文献..... | 72 |
| 要旨..... | 82 |
| Abstract..... | 85 |

序論

医薬品開発では、ヒトにおいて有効性や安全性などを評価する臨床研究段階の前に、動物を用いて実験する非臨床研究段階が存在する。この非臨床研究段階では、薬理試験、薬物動態試験、および毒性試験を実施することにより候補化合物の特性を調べる。このうち毒性試験は、標的となる臓器、用量相関性、変化と曝露の関係、変化の回復性などの毒性学的な兆候を明らかにすることを目的に、医薬品規制調和国際会議（ICH：International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）によって定められたガイドラインに準拠して実施される。毒性試験の中でも、候補化合物を繰り返し投与する反復投与試験は主要な試験の一つである。この試験を通して、薬剤を繰り返し投与した時にみられる毒性変化を把握し、ヒトに安全に投与できる用量や投与期間の推定を行う。

医薬品が開発されるまでには長い期間と膨大な実験が必要であり、ヒトで有効性と安全性が認められて承認を取得できるのは、合成された化合物のうち数万分の 1 程度で、多くの候補化合物はヒトに投与される臨床研究段階に行きつくことができない[日本製薬工業協会 2018]。開発段階のうち非臨床段階で医薬品の開発が中止となる理由の多くは毒性がみられるためであり、国際的な製薬企業の 1 社では中止理由の 82%が毒性の問題であったとの報告がある[Cook *et al.* 2014]。

毒性試験においてしばしばみられる毒性の一つに精巣毒性がある[Chatani 2009]。精巣毒性は臨床でモニターするための適切なバイオマーカーがなく[Dere *et al.* 2013a]、臨床における精子検査は個体差や日内変動のためにデータ解釈が困難であり[Sasaki *et al.* 2011]、また精巣毒性の種類によっては回復性に乏しい場合もある[Creasy 2001]。このため、医薬品による毒性の中でも精巣毒性は特に注意

が必要である。このことは、米国の規制当局である Food and Drug Administration (FDA) から精巣毒性に関する評価ガイドラインが近年発出され[FDA 2018]、精巣毒性に対して規制当局が高い関心を示していることからもうかがえる。したがって、精巣毒性についてより深い理解を得ることは、医薬品の開発を助けることとなり、ひいては社会にとって有益であると考えられる。

精巣は様々な要因により影響を受けることが知られている。直接障害の例としては、種々の抗がん剤が細胞障害や細胞周期の停止により生殖細胞の障害を引き起こすことが知られている[Dere *et al.* 2013b; Vakalopoulos *et al.* 2015; Allen *et al.* 2018]。また、ホルモンを介した間接的な障害として、ゴナドトロピン (FSH および LH) 分泌を抑制するアナボリックステロイドおよびテストステロン合成を阻害するスピロラクトンなどが知られている[Takahashi and Matsui 1993; Campion *et al.* 2012]。さらに、栄養素のうちビタミン A、ビタミン E および亜鉛などの欠乏により精巣は傷害を受けることが報告されている[Sobhon *et al.* 1979; Livera *et al.* 2002; Bensoussan *et al.* 1998; Mason *et al.* 1982; Merker and Günther 1997]。

栄養素という観点において、グルコースは精巣のエネルギー代謝に重要な役割を果たす。精巣を構成する細胞の一つである雄性生殖細胞はグルコース、およびセルトリ細胞によりグルコースから代謝されるラクテートをエネルギー源として使用する[Rato *et al.* 2012; Robinson and Fritz 1981]。具体的には、精祖細胞は ATP 産生にグルコースを利用する[Boussouar and Benahmed 2004]。精母細胞はグルコースおよびラクテートを利用することが報告されている[Jutte *et al.* 1982; Bajpai *et al.* 1998]。成熟が進んだ生殖細胞についても、細胞外に存在する、又はセルトリ細胞から供給されるラクテートに依存しており、例えば精子では、RNA やタンパク質合成がラクテートによって刺激されることが報告されている[Boussouar and Benahmed 2004; Jutte 1981]。

血液中のグルコース濃度が低下する低血糖は、糖尿病治療薬を使用する際に注意しなければならない副作用である[厚生労働省 2011]。多くの、また様々な機序の糖尿病治療薬について、代表的な副作用として低血糖が挙げられている [ノボノルディスクファーマ株式会社 2020; アストラゼネカ株式会社 2020; 大日本住友製薬株式会社 2020; ノバルティスファーマ株式会社 2020]。低血糖は、臨床症状として、頻脈および発汗などの交感神経症状、並びに嗜眠および意識障害などの中枢神経症状を引き起こすことが知られている[Erturk *et al.* 1998; Pozzessere *et al.* 1997; Cox *et al.* 1993; Cryer *et al.* 2003]。また、非臨床試験においては、低血糖が二次的な毒性として神経に器質変化を引き起こすことが報告されている[Jensen *et al.* 2016; Pettersen *et al.* 2014]。

上記のように、グルコースの欠乏、すなわち低血糖に起因する様々な変化が知られているものの、グルコースを主たるエネルギー源とする生殖細胞について、低血糖が引き起こす二次的な毒性が存在するかを検討した報告は過去に 1 報のみである[Mancine *et al.* 1960]。このため、低血糖条件下において、精巣への影響を評価する必要があると考えられた。

本研究では、毒性試験において汎用される動物であるラットを用いて、血糖低下薬を投与した際の血糖値を評価するとともに、精巣の病理組織学的検査および精子検査や交配検査を実施し、低血糖と精巣毒性の関係を検討した。第 1 章では、糖尿病治療薬として広く用いられているインスリンを正常ラットに反復投与して、血糖値を測定するとともに、精巣の病理組織学的検査、および精子検査を実施した。第 2 章では、第 1 章とは異なるタイプの血糖低下薬として glucokinase 活性化剤である TMG-123 をラットに反復投与し、第 1 章と同様の評価を行った。第 3 章では、精巣毒性は TMG-123 の直接的な影響ではなく低血糖による二次的な影響であることを検討するために、血糖低下薬を反復投与しても低血糖が起こらない条件として糖尿病モデル動物に TMG-123 を反復投与し

て、血糖値測定および精巣の病理組織学的検査を実施した。これらの結果から、低血糖による二次的な毒性として精巣毒性が起こる可能性を考察した。

第 1 章

正常ラットにおける糖尿病治療薬インスリン投与に関する検討

緒言

医薬品開発では、ヒトにおいて有効性や安全性などを評価する臨床研究段階の前に、動物を用いて評価する非臨床研究段階が存在する。その中でも毒性試験は、標的となる臓器、用量相関性、変化と曝露の関係、変化の回復性などの毒性学的な兆候を明らかにすることを目的とする。毒性試験には複数の試験があり、候補化合物を繰り返し投与する反復投与試験は主要な試験の一つである。この試験を通して、薬剤を繰り返し投与した時にみられる毒性変化を把握し、ヒトに安全に投与できる用量や投与期間の推定を行う。

毒性試験においてしばしばみられる毒性の一つに精巣毒性がある[Chatani 2009]。精巣毒性は臨床でモニターするための適切なバイオマーカーがなく[Dere *et al.* 2013a]、臨床における精子検査は個体差や日内変動のためにデータ解釈が困難であり[Sasaki *et al.* 2011]、また精巣毒性の種類によっては回復性に乏しい場合もある[Creasy 2001]。このため、精巣毒性は頻度が多くなくても注意すべき毒性であり、精巣毒性についてより深い理解を得ることは医薬品の開発を助けることとなり、ひいては社会にとって有益であると考えられる。

精巣を構成する細胞の一つである生殖細胞はグルコースをエネルギー源として使用する[Rato *et al.* 2012; Robinson and Fritz 1981; Boussouar and Benahmed 2004; Jutte *et al.* 1982; Bajpai *et al.* 1998; Jutte *et al.* 1981]。低血糖による様々な変化が知られているものの、グルコースを主たるエネルギー源とする生殖細胞について、低血糖が引き起こす二次的な毒性が存在するかを検討した報告は過去に 1 報のみである[Mancine *et al.* 1960]。このため、低血糖条件下において、精巣への影響を評価する必要があると考えられた。

そこで本章では、臨床において広く使用されている血糖低下薬であるインスリンを代表的な実験動物であるラットに反復投与することによって、低血糖を惹起させた後に、病理組織学的検査および精子検査を行うことにより、精巣に及ぼす影響を評価した。

実験材料および実験方法

動物

実験には日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan) より入手した雄性 Sprague Dawley ラット (以下 SD ラット) を使用した。動物の飼育は、クリーンエリア動物実験室 (室温 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、12 時間明暗周期) にて行った。固型飼料 CE-2 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を使用し、自由摂取させた。帝人ファーマ株式会社生物医学総合研究所の承認を得て実施した (承認番号: A11-214)。

化合物

インスリン製剤であるノボリン®R 注 100 単位/mL (Novo Nordisk Pharma Ltd., Tokyo, Japan) を購入して用いた。目的の濃度となるように、生理食塩液を用いて希釈した。

実験プロトコル

動物を 4 週齢で搬入し、6 週齢で以下の通り群分けした。

| 群 | 投与物質 | 用量 | 例数 |
|----------|-------|-------------|-------------------------------|
| 溶媒対照投与群 | 生理食塩液 | - | 毒性試験群: 雄 20 例 採血評価群: 雄 6 例 |
| インスリン投与群 | インスリン | 100 IU/kg/日 | 毒性試験群: 雄 20 例 採血評価群: 雄 6 例 |
| | インスリン | 200 IU/kg/日 | 毒性試験群: 雄 20 例 採血評価群: 雄 6 例 |
| | インスリン | 400 IU/kg/日 | 毒性試験群: 雄 20 例 採血評価群: 雄 6 例 |

インスリンの投与量は予備試験の結果を参考に設定した。生理食塩液又はインスリンを 4 週間

(28 又は 29 日間)、1 日 2 回 (約 4 時間間隔) 皮下投与 (投与容量 : 5 mL/kg/回) した。

一般状態観察および体重測定

全例について、一般状態は毎日観察し、体重は 1 週間に 2 回測定した。

血糖値測定

投与 1 および 28 日目に無麻酔下で採血評価群の尾静脈から 9 ポイント/日 (1 回目投与前、1 回目投与後 0.5、1、2、4、5、6、8 および 24 時間) を採血した。抗凝固剤 (ヘパリンナトリウム) で処理した翼付静注針およびシリンジを用いて採血し、遠心分離 (4°C、1,200 g、15 min) 後得られた血漿を使用した。血糖値の測定は、自動分析装置 7180 (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Japan) を用いて実施した。

剖検および器官重量

各毒性試験群の動物について、半分は投与 28 日目の翌日に剖検され、残りは投与 29 日目の翌日に剖検された。通常、毒性試験では剖検前に絶食を実施することから、その条件と合わせるために、剖検前の毒性試験群について溶媒対照群、100 IU/kg 投与群および 200 IU/kg 投与群は、すべての動物を約 16 時間 (最終投与の約 4 時間後に開始) 絶食させた。毒性試験群の 400 IU/kg 投与群については、投与 28 日目に絶食した 10 匹のうち 5 匹が翌日の剖検日 (29 日目) に死亡しているのが発見された。そこで、投与 29 日目に絶食予定であった同群の残り 10 匹について、剖検前日の絶食を取りやめた。毒性試験群の動物は、剖検の日に体重を測定し、ペントバルビタールナトリウムの

腹腔内注射による麻酔下で放血安楽死させた。すべての動物で外見、内臓および組織を肉眼的に観察した。その後、精巣、精巣上部、前立腺および精嚢（凝固腺を伴う）、並びに下垂体の重量を測定した。相対的な器官重量は、剖検日の体重を使用して計算した。

病理組織学的検査

死亡動物を除くすべての毒性試験群の動物について、精巣上部、下垂体および前立腺・精嚢は10%中性緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定した。精巣の固定液は、精上皮細胞が離解するホルマリン液固定は不適切であることが知られている[Chatani 2009]ため、精巣はブアン固定液で浸漬固定した。右側精巣上部は尾部液採取後に固定した。これら器官についてパラフィン包埋および薄切を行い、HE染色を実施した。死亡例を除く全例のHE染色標本を用いて病理組織学的に検査した。

精子検査

器官重量測定後、右側精巣上部尾部から5 μ Lの精巣上部尾部液を採取し、625 μ LのDulbecco's modified Eagle medium (pH 7.1~7.2に調整)で希釈した(以下、精子液という)。この精子液を1時間37°Cでインキュベートした後、冷蔵で保管した。全例の剖検終了後に、精子形態の観察および精子濃度の算出を行った。まず、精子液をスライドグラスに塗抹し、乾燥後ギムザ染色し、各動物につき200個の精子の形態を光学顕微鏡下で観察した。観察結果から、精子形態異常発現率を算出した。さらに、精子液を生理食塩液で最終倍率3,024倍となるように希釈し、その希釈液中の精子数をBurker-Turk血球計算盤を用いて光学顕微鏡下で計数した。計数したチャンバー容積と希釈倍率から、精巣上部尾部液中の精子濃度を算出した。

400 IU/kg 投与群の 5 例の死亡例については、精子を採取しなかった。また、400 IU/kg 投与群の 4 例および 200 IU/kg 投与群の 5 例について、精子液中に精子凝集塊が認められた。これら精子凝集塊の存在は、精液採取又は精液希釈時の手技に起因するものと考えられ、かつ正確な精子検査結果を表すものではないと判断し、測定対象から除外した。

統計解析

各評価項目の結果について、統計解析に供するインスリン投与群を以下のように設定した。

先述のように各投与群の 28 日間投与動物（各 10 例）では計画剖検日前日から絶食を実施したが、絶食開始から剖検日当日までの間に 400 IU/kg 投与群の 5/10 例（絶食動物）が死亡した。そのため、翌日剖検であった 400 IU/kg 投与群の 29 日間投与動物（10 例）では絶食を実施しなかった。したがって、溶媒対照群、並びに 100 及び 200 IU/kg 投与群の解析対象例数に対して、400 IU/kg 投与群は同一条件での解析対象例数が少数であったことから、この群を含んだ統計学的解析を行うことは不適切と判断し、毒性試験群の器官重量（絶対および相対重量）、精子濃度および精子形態異常発現率については、溶媒対照群と 100 および 200 IU/kg 投与群の間で下記のように統計解析を実施した。毒性試験群の体重については、計画剖検日前日までのデータを採用するため、溶媒対照群と 400 IU/kg 投与群を含めた各インスリン投与群との間で下記のように統計解析を実施した。

体重および器官重量（絶対および相対重量）について、Bartlett 法により等分散性の検定（有意水準：5%）を実施した結果、等分散性が認められたことから Dunnett 法（パラメトリック）を用いて、溶媒対照群とインスリン投与群との間で多重比較検定を実施した（有意水準：5%）。解析の対象は、毒性試験群の各群について試験期間を通して生存した動物のうち、StatLight（Yukms Co., Ltd,

Kanagawa, Japan) によってランダムに割り当てられた動物番号の若いものから 10 例とした。

精子濃度について、Bartlett 法により等分散性の検定（有意水準：5%）を実施した結果、等分散性が認められたことから Dunnett 法（パラメトリック）を用いて、溶媒対照群とインスリン投与群との間で多重比較検定を実施した。精子形態異常発現率については、平均順位の差について Dunnett 型（ノンパラメトリック）を用いて、溶媒対照群とインスリン投与群との間で多重比較検定を実施した（有意水準：5%）。

統計解析には SAS 9.2（SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan）を用いた。

実験結果

一般状態および体重

一般状態について、投与期間中にインスリン投与に関連した所見はみられなかった。

各群の 28 日間投与動物（10 例／群）について、剖検日前日から絶食を実施したところ、絶食開始から剖検日当日までの間に 400 IU/kg 投与群の 5/10 例が死亡した。この死亡動物では死亡後の観察所見として鼻又は口周囲の汚れ、紅涙、および／又は下腹部の汚れが認められた。400 IU/kg 投与群の計画解剖日前日から絶食を実施した動物 10 例のうち生存した 5 例においても、剖検日当日の観察所見として同様の所見が認められた。

上記の結果から、400 IU/kg 投与群の 29 日間投与動物 10 例については、剖検日前日の絶食を実施しなかった。その結果、これら 400 IU/kg 投与群の非絶食動物では、死亡および上記の所見は認められなかった。

上記以外の所見として、頸背部の痂皮形成および頸背部の脱毛が認められたが、これらの所見は投与期間中の一過性の変化であったことから、毒性学的に重要な所見ではないと考えられた。

体重測定の結果を Figure 1-1 に示す。体重について、投与期間中を通して、溶媒対照群と比較してインスリン投与群で統計学的に有意な変動は認められなかった。

血糖値

血糖値測定の結果を Figure 1-2 に示す。

投与初日の各群における平均血糖値は、投与後 0.5 から 8 時間において、溶媒対照群では 142～

155 mg/dL、100 IU/kg 投与群では 52～97 mg/dL、200 IU/kg 投与群では 44～55 mg/dL、400 IU/kg 投与群では 40～60 mg/dL の範囲であった。また、投与最終日の同測定ポイントにおける平均血糖値は、溶媒対照群では 140～152 mg/dL、100 IU/kg 投与群では 38～61 mg/dL、200 IU/kg 投与群では 35～54 mg/dL、400 IU/kg 投与群では 30～56 mg/dL の範囲であった。

低血糖であるとヒト[Rosenstock *et al.* 2001; Bonds *et al.* 2010; International Hypoglycaemia Study Group 2017]およびラット[Jensen *et al.* 2017; McNay and Sherwin 2004; Borg *et al.* 1997]で判断される 50 mg/dL 以下を示す個体は、投与初日において、100 IU/kg 投与群では 1 回目投与後 1、2 および 6 時間の時点で、200 IU/kg 投与群では 1 回目投与後 0.5 時間から 8 時間の時点まで、400 IU/kg 投与群では 1 回目投与後 1 時間から 8 時間の時点まで認められた。投与最終日において、すべてのインスリン投与群の 1 回目投与後 1 時間から 8 時間の時点まで認められた。

剖検および器官重量

剖検の結果、400 IU/kg 投与群の死亡動物 5 例において、肺の色調変化（暗赤色）、頸背部皮下における限局性の色調変化（暗赤色）、胃（腺胃）における限局性の色調変化（暗赤色）、鼻又は口周囲の汚れ、紅涙、下腹部の汚れ、および／又は膵臓の色調変化（暗赤色）が認められた。400 IU/kg 投与群の計画解剖日前日から絶食を実施した動物 10 例のうち生存した 5 例においても同様の所見が認められた。

200 および 100 IU/kg 投与群においても、胃（腺胃）における限局性の色調変化（暗赤色）が認められた。胃（腺胃）における限局性の色調変化（暗赤色）については、絶食下ラットへのインスリン投与により胃潰瘍が誘発されるという報告[Axelsson *et al.* 1987]があることから、本試験において

も同様の変化が観察されたと考えられた。

200 IU/kg 投与群の 1 例で精巣 (左側) の小型が認められたが、片側のみの変化であることから、インスリン投与に起因した所見ではないと考えられた。

溶媒対照群を含むすべての群において、頸背部皮下における限局性の色調変化が認められた。

器官重量測定の結果を Table 1-1 に示す。溶媒対照群と比較して、インスリン投与群 (100 および 200 IU/kg 投与群) の精巣、精巣上体、前立腺および精嚢、並びに下垂体のいずれについても統計学的に有意な変動は認められなかった。

病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果、精巣 (両側) の散在性の精細管変性 (軽微) が、100 IU/kg 投与群で 1/20 例、200 IU/kg 投与群で 2/20 例、400 IU/kg 投与群で 4/15 例 (絶食動物 2/5 例、非絶食動物 2/10 例) に認められた (Figure 1-3)。精巣の断面では、いくつかの隣接する精細管に組織病理学的変化が散在していたが、精細管のかなりの部分はほぼ正常であった。変化がみられた精細管は、多核巨細胞 (Figure 1-3F および 3H)、好酸球性細胞質および核凝縮を伴う生殖細胞 (Figure 1-3F)、限局性の精細管空胞形成 (Figure 1-3G)、または精子遊離障害 (spermatid retention) 等を含んでいた。いずれのステージの精巣においても病理組織学的変化がみられ、この変化はステージ特異的ではなかった。また、精巣の変化が観察された動物において、精巣上体 (両側) の管腔内に精上皮細胞の剥離 (軽微) が認められた (Figure 1-3I)。溶媒対照群には、これらの変化は認められなかった。

精子検査

精子検査の結果を Table 1-2 に示す。

100 および 200 IU/kg 投与群の精子濃度および精子形態異常総発現率について、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な変動は認められなかった。なお、400 IU/kg 投与群（絶食動物 2 例および非絶食動物 9 例）は統計解析対象外としたが、精子濃度および精子形態異常総発現率（平均値±標準偏差）は、それぞれ $1,003 \pm 198 \times 10^6/\text{mL}$ および $2.6 \pm 1.3\%$ であり、それぞれ低値および高値傾向を示した。

第 1 章の図表

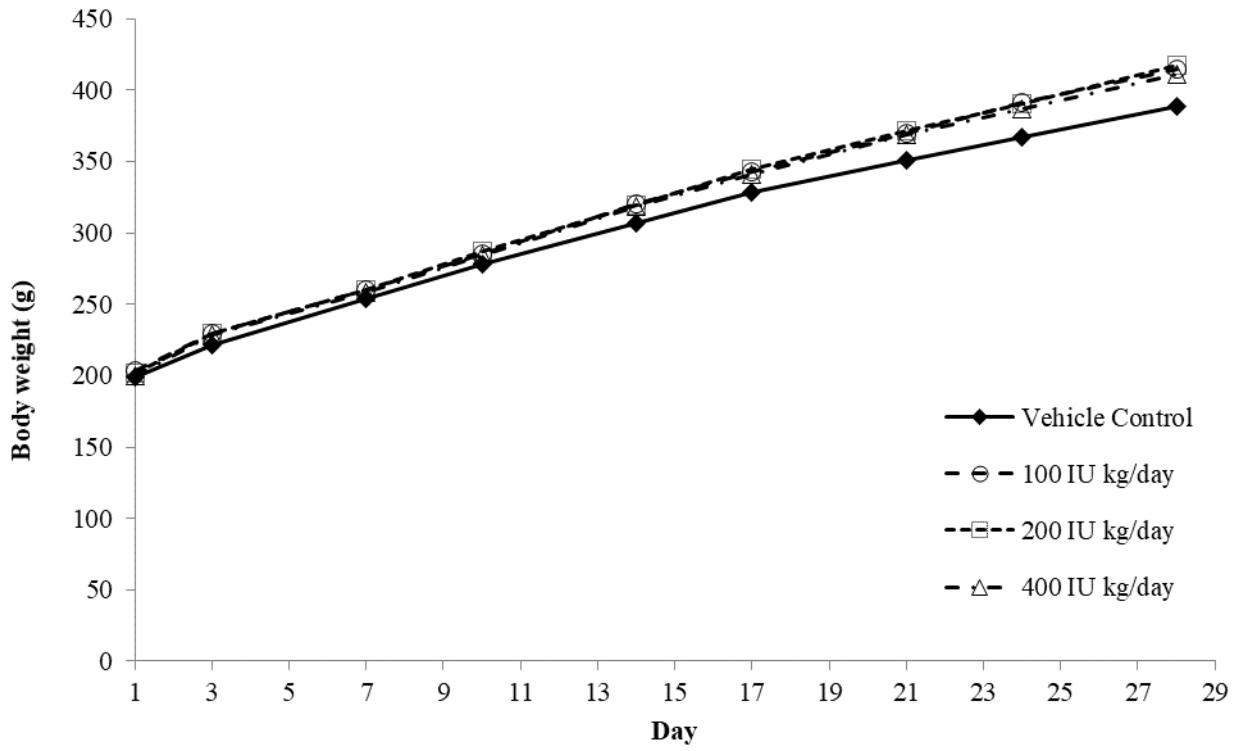


Figure 1-1 Body weight. The data are presented as the mean (n = 10).

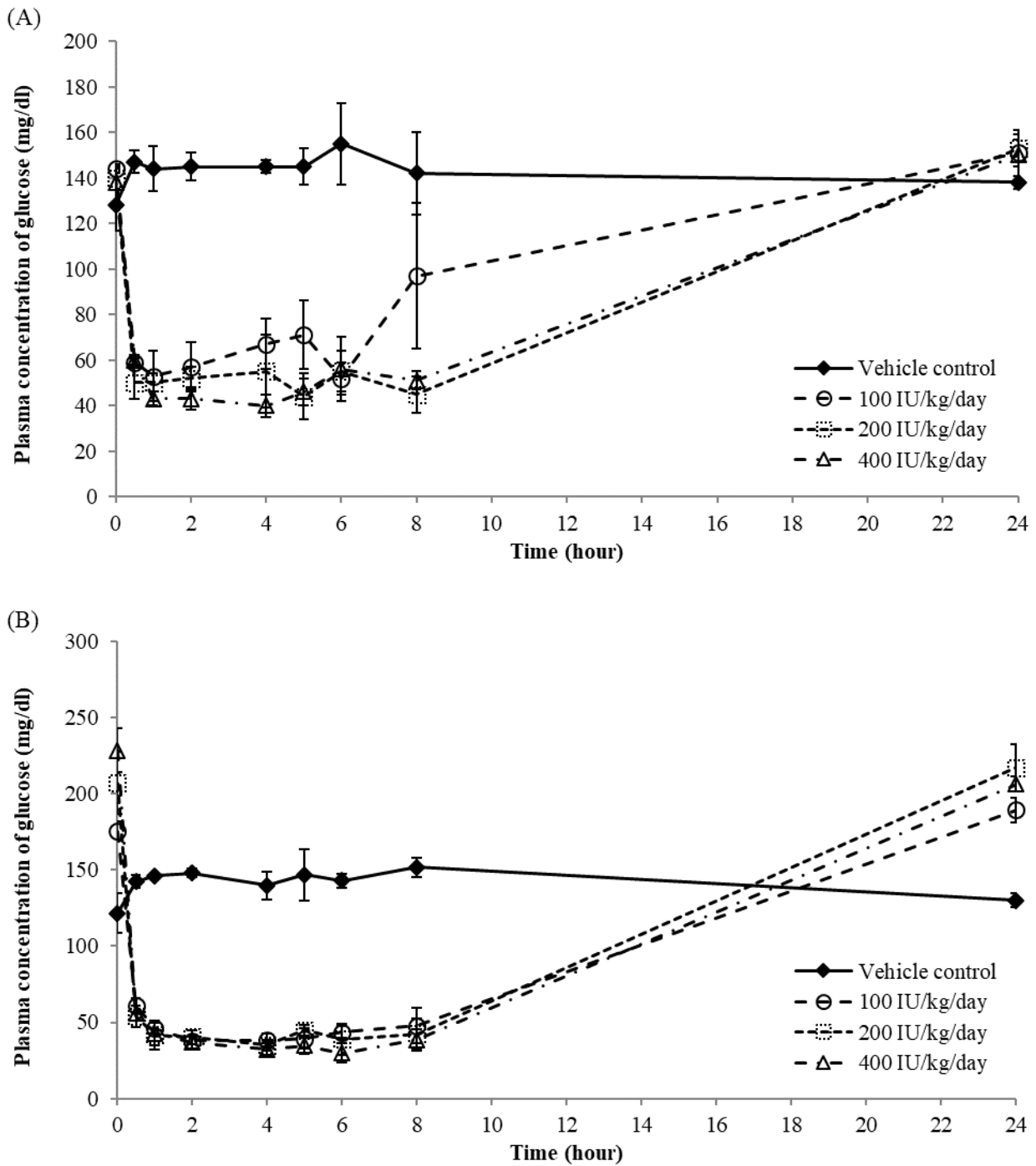


Figure 1-2 Plasma glucose levels on the first (A) and final (B) treatment days. Insulin was administered twice a day with 4 hours between doses and blood samples were obtained at 0, 0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, and 24 hours after first administration. The data are presented as the mean \pm S.D. (n = 3).

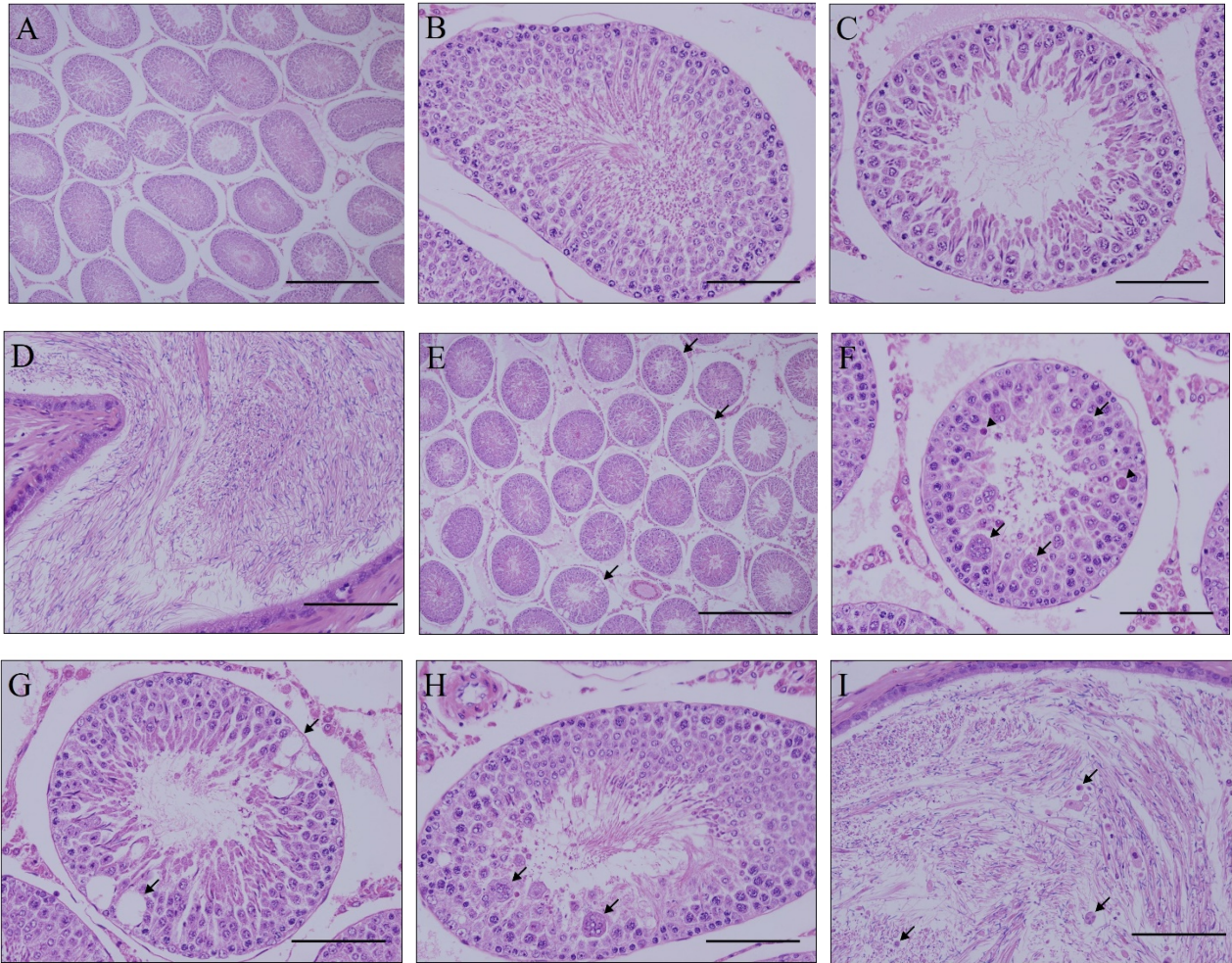


Figure 1-3 Representative histopathological images (hematoxylin and eosin staining) of testes and epididymides. Images of a control testis at low (A) and high magnification (B and C), and an epididymis at low magnification (D). No abnormalities were observed in the control tissues. Images of a testis at low (E) and high magnification (F to H), and an epididymis at low magnification (I) from an animal treated with 400 IU/kg/day insulin. Degenerated seminiferous tubules were observed sporadically (arrows in E). The tubules contained multinucleated giant cells (arrows in F and H), germ cells with eosinophilic cytoplasm and nuclear condensation (arrowheads in F), focal tubular vacuolation (arrows in G), germ cell loss, and disorganization of the germ cells. The epididymis exhibited exfoliation of germ cells in the lumen (arrows in I). The scale bars in A and E represent 500 μm , and the scale bars in B to D and F to I represent 100 μm .

Table 1-1 Organ weights in rats treated with the vehicle control or insulin.

| Dose (IU/kg/day) | | 0 | 100 | 200 | 400 ^a |
|-------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| No. of animals | | 10 | 10 | 10 | 5 |
| Testis ^b | (g) | 3.0357 ± 0.3103 | 3.1092 ± 0.1979 | 3.1954 ± 0.2059 | 3.0673 ± 0.3192 |
| | (%) ^c | 0.8447 ± 0.0825 | 0.7938 ± 0.0774 | 0.8107 ± 0.0879 | 0.8169 ± 0.0967 |
| Epididymis ^b | (g) | 0.8527 ± 0.0910 | 0.8524 ± 0.0470 | 0.8595 ± 0.0606 | 0.7835 ± 0.0695 |
| | (%) ^c | 0.2375 ± 0.0264 | 0.2172 ± 0.0148 | 0.2176 ± 0.0189 | 0.2080 ± 0.0133 |
| Prostate and seminal vesicles | (g) | 1.8466 ± 0.3032 | 1.9201 ± 0.2778 | 2.0189 ± 0.3038 | 1.9803 ± 0.4060 |
| | (%) ^c | 0.5165 ± 0.0998 | 0.4867 ± 0.0524 | 0.5098 ± 0.0743 | 0.5247 ± 0.0984 |
| Pituitary gland | (g) | 0.0097 ± 0.0016 | 0.0102 ± 0.0011 | 0.0105 ± 0.0016 | 0.0089 ± 0.0007 |
| | (%) ^c | 0.0027 ± 0.0003 | 0.0026 ± 0.0002 | 0.0026 ± 0.0003 | 0.0024 ± 0.0001 |

Values are mean ± S.D.

a : Data were calculated from animals which were fasted on the day before necropsy and survived on the day of necropsy. Data were not statistically analyzed.

b : The sum of right and left organ weights.

c : Ratio of organ weight to body weight (relative organ weight).

Table 1-2 Sperm analysis in rats treated with the vehicle control or insulin.

| Dose (IU/kg/day) | 0 | 100 | 200 | 400 ^a |
|--|-------------|-------------|-------------|------------------|
| No. of animals examined | 20 | 20 | 15 | 11 |
| The sperm concentration ($\times 10^6/\text{ml}$) | 1,219 ± 138 | 1,263 ± 151 | 1,102 ± 186 | 1,003 ± 198 |
| The incidences of sperm malformations (%) ^b | | | | |
| Total | 1.5 ± 0.9 | 1.8 ± 1.2 | 2.0 ± 1.4 | 2.6 ± 1.3 |
| Head | 0.3 ± 0.4 | 0.5 ± 0.6 | 0.6 ± 0.6 | 1.0 ± 0.7 |
| Neck | 0.9 ± 0.8 | 1.1 ± 0.9 | 1.2 ± 1.3 | 1.4 ± 1.6 |
| Middle piece | 0.1 ± 0.3 | 0.0 ± 0.1 | 0.0 ± 0.1 | 0.0 ± 0.2 |
| Tail | 0.1 ± 0.3 | 0.2 ± 0.3 | 0.2 ± 0.3 | 0.2 ± 0.3 |

Values are mean ± S.D.

a : Data were not statistically analyzed.

b : The incidences were calculated in each region: head, neck, middle piece, and tail.

考察

第 1 章では、インスリンをラットに投与することで低血糖を惹起し、その条件下で雄性生殖器への影響を評価した。

インスリン投与群の平均血糖値は、投与初日および投与最終日ともに 1 回目投与後直ちに低下した。前述のように、ヒトおよびラットにおいて血糖値が 50 mg/dL を下回ることが低血糖と判断する基準の一つとされている。ヒトにおいて、50 mg/dL を下回るとは非糖尿病患者の生理条件下では起こらず、またこの閾値を下回ると認知機能障害が生じるとされている [International Hypoglycaemia Study Group 2017]。当該実験下において 50 mg/mL を下回る血糖値を示した個体は、投与初日では、100 IU/kg 投与群の 1 回目投与後 1、2 および 6 時間の時点において、200 IU/kg 投与群では 1 回目投与後 0.5 時間から 8 時間の時点まで、400 IU/kg 投与群では 1 回目投与後 1 時間から 8 時間の時点まで認められた。投与最終日では、すべてのインスリン投与群の 1 回目投与後 1 時間から 8 時間の時点まで認められた。したがって、当該試験条件下では、持続的な低血糖が引き起こされていたことが確認された。

いずれのインスリン投与群においても、自由摂餌下の投与期間中にはインスリン投与に関連した一般状態の変化および体重の変動は認められなかった。しかし、計画剖検日前日の絶食後から剖検日当日までの間に、400 IU/kg 投与群の 5/10 例（絶食動物）が死亡した。これら個体の剖検では、投与期間中の持続的な状態悪化を示唆する所見が認められなかったことから、インスリンの血糖低下作用に絶食の影響が加わったことによる血糖値の過度な低下又は持続が死因に関与していると推察された。計画剖検日前日から絶食を実施しなかった 400 IU/kg 投与群の 10 例では、死亡は認めら

れず、一般状態の変化も認められなかった。

病理組織学的検査の結果、インスリン投与群において精巣に散在性の精細管変性が認められ、同一個体の精巣上体の管腔内には精細管変性に関連すると考えられる精上皮細胞の剥離が認められた。これら所見は、投与量が高い群ほど発生頻度が高かった。また、これら所見は、絶食動物と非絶食動物のいずれにおいてもみられたことから、絶食とは関係なく投与期間中に発生した変化であると考えられた。さらに、これら所見は溶媒対照群には認められず、インスリン投与群においてのみ認められたことから、インスリン投与に起因した変化であると考えられた。

精子検査の結果、400 IU/kg 投与群において精子濃度および精子形態異常総発現率はそれぞれ低値および高値傾向を示した。

生殖細胞はグルコースをエネルギー源として必要とする[Rato *et al.* 2012; Robinson and Fritz 1981; Boussouar and Benahmed 2004; Jutte *et al.* 1982; Bajpai *et al.* 1998; Jutte *et al.* 1981]。したがって、インスリンによって惹起される低血糖が精子形成に影響を及ぼし、その結果、病理組織学的検査および精子検査において変化がみられた可能性がある。

上記以外にも精巣に影響がみられた原因として、内分泌に異常が生じ、性ホルモンの分泌が変化したという可能性も考えられる。しかし、性ホルモン濃度に高い感受性を有することが知られている前立腺・精囊の器官重量[OECD 2009; Creasy 2001; Haschek and Rousseaux 1998]に変化はなかったことから、性ホルモンが変化していた可能性は低いと考えられた。

さらに、ストレスが精巣に影響を与えることも知られている[Greaves 2007]。しかしながら、精巣に変化がみられた個体において、投与期間中には一般状態の異常や体重変化はみられていない。

なお、剖検において胃に限局性の色調異常がみられたが、絶食状態のラットにインスリンを投与す

ることで胃潰瘍がみられることが知られているため[Axelsson *et al.* 1987]、胃で見られた変化は精巣の変化とは関係ないと考えられた。

また、1型糖尿病モデルである streptozotocin 誘導糖尿病ラットおよび Akita マウスでは、精巣の細胞でアポトーシスや精子形成の障害がみられるが、これらの動物にインスリンを投与することにより、正常に精子形成が起こることが報告されている[Samadian *et al.* 2019; Schoeller *et al.* 2012]。したがって、糖尿病モデル動物において精子形成を正常化するインスリンが、本実験では直接的な精巣毒性を持ち、その結果として精巣変化がみられたという可能性は低いと考えられた。

以上の結果より、インスリンをラットに1日2回4週間反復皮下投与することにより、投与日における1回目の投与後8時間まで持続的な低血糖を惹起させること、また雄性生殖器への影響として精巣に散在性の精細管変性およびその二次的な変化として精巣上体の管腔内に精上皮細胞の剥離が認められることが確認された。これら精巣毒性は低血糖に起因する二次的な精巣毒性であると考えられた。

小括

本試験では、インスリンをラットに 0（生理食塩液）、100、200 および 400 IU/kg/日の用量で 1 日 2 回（約 4 時間間隔）4 週間反復皮下投与し、インスリン投与後の血糖値推移および雄性生殖器への影響を評価した。

投与初日および投与最終日の血糖値を測定した結果、一般的にヒトおよびラットにおいて低血糖とされる 50 mg/dL 以下を示す個体がインスリン投与群において認められた。病理組織学的検査の結果、インスリン投与群において精巣に散在性の精細管変性が認められ、同一個体の精巣上体の管腔内には精細管変性に関連すると考えられる精上皮細胞の剥離が認められた。精巣でみられた変化は、低血糖が引き起こす二次的な毒性変化である可能性が考えられた。

第2章

正常ラットにおける **glucokinase** 活性化剤 **TMG-123** 投与に関する検討

緒言

第 1 章では、インスリンをラットに 4 週間反復投与することにより、低血糖が惹起されること、および精巣に毒性変化が生じることを確認した。次に、本章では、第 1 章で用いたインスリンとは異なるタイプの血糖低下薬を投与することによって、低血糖を引き起こした時の精巣への影響を評価することとした。血糖低下薬としては、glucokinase 活性化剤である TMG-123 を使用した。

glucokinase はヘキソキナーゼファミリーに属し、ヘキソキナーゼIVとも呼ばれ、糖代謝において重要な役割を担っており、グルコースからグルコース 6-リン酸への変換を触媒する[Wilson 1995; Massa *et al.* 2011]。glucokinase は膵臓、肝臓、脳および消化管などに主に存在している[Matschinsky 2009; Efanov *et al.* 2005]。glucokinase は肝臓におけるグリコーゲン合成の促進、および膵β細胞からのインスリン分泌増加により、血糖値を低下させる[Matschinsky 1990; Matschinsky 2009; Ferre *et al.* 1996]。

glucokinase 活性化剤である TMG-123 の *in vitro* および *in vivo* 薬理学的特性は Tsumura らにより報告されている[Tsumura *et al.* 2017]。TMG-123 は様々な 2 型糖尿病モデル動物（Goto-Kakizaki ラット、db/db マウス、ZDF ラット）において血漿中インスリン濃度を上昇させずに、血糖低下作用を示した。それゆえ、TMG-123 は肝作用優位型であり、膵臓のインスリン分泌刺激ではなく、肝臓の糖取り込み増加によって耐糖能を改善すると考えられている。

本章では、glucokinase 活性化剤である TMG-123 をラットに単回経口投与、並びに 4 週間および 13 週間反復経口投与して、血糖値を測定するとともに、病理組織学的検査、精子検査および交配検査を実施して、精巣に与える影響を評価した。

実験材料および実験方法

動物

第2章は、実験1~4に分けて実施し、日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan) より入手した雄性 Sprague Dawley ラット (以下 SD ラット) を使用した。実験1および2の動物飼育は、クリーンエリア動物実験室 (室温 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、12時間明暗周期) で、固型飼料 CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd., Chiba, Japan) を使用し、自由摂取させた。実験3の動物飼育は、クリーンエリア動物実験室 (室温 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、12時間明暗周期) で、固型飼料 CE-2 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を使用し、自由摂取させた。実験4の動物飼育は、クリーンエリア動物実験室 (室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、12時間明暗周期) で、固型飼料 NMF (Oriental Yeast Co., Ltd., Chiba, Japan) を使用し、自由摂取させた。帝人ファーマ株式会社生物医学総合研究所の承認を得て実施した (承認番号: A11-078)。

化合物

TMG-123 は杏林製薬株式会社にて合成した標品を用いた。溶媒は、ゲルシア 44/14 (Gattefossé Corporation, Saint-Priest, France) およびポリエチレングリコール 400 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) が質量比 3 : 2 になるように混合した混合液 (以下、PEG/Gel とする) を用いた。投与直前まで約 40°C の恒温水槽中で攪拌した。

実験プロトコル

実験 1 では、雄動物を 5 週齢で搬入し、6 週齢で以下の通り群分けした。

| 群 | 投与物質 | 用量 | 例数 |
|-------------|---------|-----------|-------|
| 陰性対照群 | - | - | 雄 6 例 |
| 溶媒対照投与群 | 溶媒 | - | 雄 6 例 |
| TMG-123 投与群 | TMG-123 | 20 mg/kg | 雄 6 例 |
| | TMG-123 | 100 mg/kg | 雄 6 例 |
| | TMG-123 | 200 mg/kg | 雄 6 例 |
| | TMG-123 | 300 mg/kg | 雄 6 例 |

実験 2 では、雄動物を 4 週齢で搬入し、6 週齢で以下の通り群分けした。

| 群 | 投与物質 | 用量 | 例数 |
|-------------|---------|-----------|------------------------------|
| 陰性対照投与群 | 注射用水 | - | 毒性試験群：雄 10 例 |
| 溶媒対照投与群 | 溶媒 | - | 毒性試験群：雄 10 例 採血評価群：雄 8 例 |
| TMG-123 投与群 | TMG-123 | 5 mg/kg | 毒性試験群：雄 10 例 採血評価群：雄 16 例 |
| | TMG-123 | 20 mg/kg | 毒性試験群：雄 10 例 採血評価群：雄 16 例 |
| | TMG-123 | 100 mg/kg | 毒性試験群：雄 10 例 採血評価群：雄 16 例 |

実験 3 では、雄動物を 7 週齢で搬入し、8 週齢で以下の通り群分けした。

| 群 | 投与物質 | 用量 | 例数 |
|-------------|---------|-----------|-----------------------------|
| 陰性対照投与群 | 注射用水 | - | 毒性試験群：雄 8 例 |
| 溶媒対照投与群 | 溶媒 | - | 毒性試験群：雄 8 例 採血評価群：雄 6 例* |
| TMG-123 投与群 | TMG-123 | 5 mg/kg | 毒性試験群：雄 8 例 採血評価群：雄 6 例 |
| | TMG-123 | 20 mg/kg | 毒性試験群：雄 8 例 採血評価群：雄 6 例 |
| | TMG-123 | 100 mg/kg | 毒性試験群：雄 8 例 採血評価群：雄 6 例* |

*：投与期間終了後に 8 週間の休薬期間を設け、回復性の評価に用いた。

実験 4 では、雄動物および雌動物をそれぞれ 7 週齢および 5 週齢で入荷し、8 週齢および 9 週齢で以下の通り群分けした。

| 群 | 投与物質 | 用量 | 例数 |
|-------------|---------|-----------|---------------|
| 陰性対照投与群 | 注射用水 | - | 雄 20 例、雌 20 例 |
| 溶媒対照投与群 | 溶媒 | - | 雄 20 例、雌 20 例 |
| TMG-123 投与群 | TMG-123 | 5 mg/kg | 雄 20 例、雌 20 例 |
| | TMG-123 | 20 mg/kg | 雄 20 例、雌 20 例 |
| | TMG-123 | 100 mg/kg | 雄 20 例、雌 20 例 |

各実験では注射用水、溶媒又は TMG-123 を以下の期間経口投与（投与容量：10 mL/kg/回）した。

| 実験番号 | 投与期間 |
|------|--------------------------|
| 実験 1 | 単回 |
| 実験 2 | 4 週間 |
| 実験 3 | 13 週間 |
| 実験 4 | 雄；13 週間、雌；5 週間（妊娠 7 日まで） |

一般状態観察および体重測定

実験 1～4 では、全例について、一般状態の観察を 1 日に 1 回、および体重測定を 1 週間に 1 回以上行った。

血糖値測定、血中インスリン濃度測定およびトキシコキネティクス

実験 1、2 および 3 について、無麻酔下で採血評価群の鎖骨下静脈又は尾静脈から 7 ポイント/日（1 回目投与前、1 回目投与後 0.5、1、2、4、8 および 24 時間）を採血した。採血日は、実験 1 の投与 1 日目、実験 2 の投与 1 及び 28 日目、実験 3 の投与 28 および 90 日目とした。抗凝固剤（ヘパリンナトリウム）で処理した注射針およびシリンジを用いて採血し、遠心分離（実験 1：4°C、8,300

g、1 min、実験 2 : 4°C、8,300-9,500 g、1 min、実験 3 : 4°C、1,200 g、15 min) 後得られた血漿を使用した。

血糖値の測定は、実験 1 では自動分析装置 TBA-120FR (CANON MEDICAL SYSTEMS CORPORATION, Tochigi, Japan)、実験 3 では自動分析装置 7180 (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Japan) を用いてヘキソキナーゼ法によって実施した。血中インスリン濃度の測定は、超高感度ラットインスリン測定キット (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Kanagawa, Japan) およびマイクロプレートリーダー MTP-32 (CORONA ELECTRIC Co., Ltd., Ibaraki, Japan) を用いて ELISA 法によって実施した。

実験 1、2 および 3 では血漿中 TMG-123 濃度を下記に示す LC-MS/MS 法により測定し、 C_{\max} (maximum concentration)、 T_{\max} (time to maximum concentration) および AUC_{0-24h} (area under the plasma concentration-time curve) の各パラメータを算出した。

TMG-123 濃度測定

氷浴中で測定試料各 25 μ L に 0.1 vol% ぎ酸 500 μ L および 50 vol% アセトニトリル 25 μ L を添加、攪拌した。内標準物質 (TMG-123- d_4 、5,000 ng/mL) 25 μ L を添加、攪拌した後、*tert*-ブチルメチルエーテル 2 mL を添加、攪拌した。遠心分離 (2,150 \times g、4°C、10 min) した上清を分取し、アルミブロック恒温槽 (設定温度: 25°C) を用いて窒素ガス気流下で濃縮乾固した。アセトニトリル/ぎ酸 (1,000:1、v/v) 80 μ L を添加、攪拌した後、10 mmol/L ぎ酸アンモニウム水溶液 320 μ L を添加、攪拌した後、LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS は Agilent 1100 system (Agilent Technologies, Inc, CA, USA) と API4000 (AB Sciex LLC, MA, USA) を用いた。分析条件は、分析カラムとして Inertsil ODS-4 (2.1 mm I.D.

×50 mm、粒径 3 μm、GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を用い、カラム温度は 40℃とした。移動相として 10 mmol/L ぎ酸アンモニウム溶液-アセトニトリル/ぎ酸 (1,000:1, v/v, 950:50, v/v) (移動相 A) とアセトニトリル/ぎ酸 (1,000:1, v/v) (移動相 B) を使用し、以下のグラジエント条件で溶離した (流速 0.35 mL/min)。

| Time (min) | A (%) | B (%) |
|------------|-------|-------|
| 0.00 | 70 | 30 |
| 3.50 | 30 | 70 |
| 3.51 | 10 | 90 |
| 5.50 | 10 | 90 |
| 5.51 | 70 | 30 |
| 7.50 | 70 | 30 |

イオン化法は Electrosprayionization (ESI) 法で行い、ポジティブイオンモードで検出した。モニタリングイオンについて、TMG-123 は m/z 494.3→ m/z 476.1 とし、内標準物質は m/z 498.3→ m/z 480.3 とした。

剖検および器官重量

実験 2 および 3 について、剖検および器官重量測定を実施した。通常、毒性試験では剖検前に絶食を実施することから、その条件と合わせるために、毒性試験群を剖検前日に約 16 時間絶食させた。剖検日に体重を測定し、イソフルランの吸入又はペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射による麻酔下で放血安楽死させた。すべての動物で外見、内臓および組織を肉眼的に観察した。その後、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢 (凝固腺を伴う)、並びに下垂体の重量を測定した。相対的な器官重量は、剖検日の体重を使用して計算した。

病理組織学的検査

実験 2 および 3 において、器官重量測定後の器官を用いて病理組織学的検査を実施した。実験 2 では、精巣および精巣上体はホルマリン-酢酸液で、下垂体、前立腺および精嚢は 10%緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定した。実験 3 では、精巣はブアン固定液で、精巣上体、下垂体および前立腺・精嚢は 10%中性緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定した。これら器官についてパラフィン包埋および薄切を行い、HE 染色を実施した。全例の HE 染色標本を用いて病理組織学的に検査した。

精子検査

実験 4 において、器官重量測定後、右側精巣上体尾部から、5 μ L の精巣上体尾部液を採取し、625 μ L の Dulbecco's modified Eagle medium (pH 7.1~7.2 に調整) で希釈した (以下、精子液という)。この精子液を 1 時間 37°C でインキュベートした後、精子自動性指数を Sperm Quality Analyzer IIC-P (Medical Electronic System Ltd., Caesarea, Israel) を用いて測定し、残った精子液を生理食塩液で更に最終倍率 3,024 倍となるように希釈し、その希釈液中の精子数を Burkert-Turk 血球計算盤を用いて光学顕微鏡下で計数した。計数したチャンバー容積と希釈倍率から、精巣上体尾部液中の精子濃度を算出した。精子液をスライドガラスに塗抹し、乾燥後ギムザ染色し、各動物につき約 200 個の精子の形態を光学顕微鏡下で観察した。観察結果から、精子形態異常発現率を算出した。

交配検査

実験 4 において、雄の投与 71 日目以降に、同薬剤を同用量・用法にて 15 日間投与した雌と 1 対 1 で最長 16 日間同居させた。膣垢中に精子が認められた場合又は膣内に膣栓が認められた場合に

交尾成立とした。雌動物を妊娠 13 日に帝王切開して、交尾能と受胎能を算出した。

統計解析

実験 2 について、毒性試験群の溶媒対照群と TMG-123 投与群の体重および器官重量（絶対および相対重量）のデータについて、Bartlett 法により等分散性の検定を実施した。等分散性が認められた場合は 1 元配置分散分析を行い、有意差が認められれば Dunnett の多重比較検定法を実施した。等分散性が認められなかった場合は Kruskal-Wallis 検定を行い、有意差が認められれば Dunnett 型順位和検定を実施した。なお、有意水準は、Bartlett 法は 1%、その他の検定は両側 5%とした。

実験 3 について、毒性試験群の溶媒対照群と TMG-123 投与群の体重および器官重量（絶対および相対重量）のデータについて、Bartlett 法により等分散性の検定を実施した。等分散性が認められた場合は Dunnett 法を、等分散性が認められなかった場合は、Steel の検定を用いて、それぞれ溶媒対照群と TMG-123 投与群との間で多重比較を実施した。なお、有意水準は、Bartlett 法は 5%、その他の検定は両側 5%および 1%とした。採血評価群の溶媒対照群と TMG-123 投与群の体重および器官重量（絶対および相対重量）のデータについて、F 検定により等分散性の検定を実施した。等分散性が認められた場合は t 検定を、等分散性が認められなかった場合は、Aspin-Welch の t 検定を、溶媒対照群と TMG-123 投与群との間で実施した。なお、有意水準は、F 検定は 5%、その他の検定は両側 5%および 1%とした。

実験 4 について、体重、交尾成立までの日数、精子自動性指数および精子濃度は、Bartlett 法により等分散性の検定（有意水準 5%）を行って、等分散性が認められた場合は Dunnett 法を、等分散性が認められなかった場合は平均順位の差について Dunnett 型の検定を行った。精子形態異常発現

率については、平均順位の差について Dunnett 型の検定を行った。交尾率および授胎率については χ^2 検定を用いて検定した。

実験 2 の統計解析には LATOX-F computer system (FUJITSU ADVANCED ENGINEERING LIMITED, Tokyo, Japan) を用いた。実験 3 の統計解析には SAS 9.2 (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。実験 4 の統計解析には Provantis (Instem, Stone, UK) を用いた。

実験結果

一般状態および体重（実験 1～4）

一般状態について、実験 1～4 のいずれも、溶媒対照群および TMG-123 投与群において軟便および／又は泥状便がみられた。PEG400 の反復投与は、ラットにおいて膨張性下剤作用を起こすことが知られているため[Hermansky *et al.* 1995; Ueda Y *et al.* 2011]、上記所見は TMG-123 投与とは関係ない溶媒投与に起因した変化と考えられた。

体重測定の結果を Figure 2-1～2-4 に示す。体重について、実験 1～4 のいずれも試験期間中を通して、TMG-123 投与に関する変化は認められなかった。

血糖値（実験 1 および 3） および血中インスリン濃度（実験 1）

血糖値および血中インスリン濃度測定の結果を Figure 2-5～2-7 に示す。

実験 1 において、単回投与後の血糖値はいずれの TMG-123 投与群でも速やかに低下した。また、単回投与後の血中インスリン濃度について、投与に関連した変化はみられなかった。

実験 3 において、投与 28 および 90 日目の血糖値は投与量が高い群ほど低値であった。投与 28 および 90 日目における TMG-123 投与後の血糖値推移は同様であった。5 mg/kg 投与群において、血糖値が 50 mg/dL 以下の個体は認められなかった。一方、20 mg/kg 投与群では投与 4 時間後まで、また 100 mg/kg 投与群では投与 8 時間後まで血糖値が 50 mg/dL 以下の個体が認められた。

トキシコキネティクス (実験 1、2 および 3)

トキシコキネティクスの結果を Table 2-1~2-3 に示す。

実験 1 において、単回投与後の血漿中 TMG-123 の AUC_{0-24h} および C_{max} は、100 mg/kg にて頭打ちであった。

実験 2 において、血漿中 TMG-123 の AUC_{0-24h} および C_{max} は、投与量が高い群ほど高値であった。投与 1 日目の TMG-123 の AUC_{0-24h} および C_{max} は 28 日目と同程度であった。

実験 3 において、血漿中 TMG-123 の AUC_{0-24h} および C_{max} は、投与量が高い群ほど高値であった。投与 28 日目の TMG-123 の AUC_{0-24h} および C_{max} は 90 日目と同程度であった。

剖検および器官重量 (実験 2 および 3)

剖検の結果、実験 2 において、溶媒対照群およびすべての TMG-123 投与群にて、脾臓の色調異常 (白色) がみられた。

実験 3 において、投与期間終了時の溶媒対照群およびすべての TMG-123 投与群の全例で盲腸の液状内容物貯留および大型が観察された。

器官重量測定の結果を Table 2-4 および 2-5 に示す。

実験 2 では、溶媒対照群と TMG-123 投与群の比較において、いずれの TMG-123 投与群にも統計的に有意な変動は認められなかった。

実験 3 において、投与期間終了時に 20 mg/kg 投与群の下垂体の絶対および相対重量は、溶媒対照群と比較して統計的に有意に低値であった。20 mg/kg 投与群の精巣の絶対重量は、溶媒対照群と比較して統計的に有意に低値であった。これらは、用量相関性のない変化であったことから偶

発的な変動であると考えられた。休薬期間終了時に、統計学的に有意な変動は認められなかった。

病理組織学的検査（実験 2 および 3）

病理組織学的検査の結果、実験 2 において、両側精巣に精細管変性（軽微）が、100 mg/kg 投与群の 3/10 例に観察された。それらの両側精巣上体の管腔内には、精上皮細胞の剥離（軽微）が観察された。

実験 3 において、投与期間終了時の両側精巣に散在性の精細管変性が、20 mg/kg 投与群の 1/8 例（軽微）、100 mg/kg 投与群の 2/8 例（軽微 1 例、軽度 1 例）に観察された（Fig. 2-8）。これらの精細管は、散在性の空胞形成、多核巨細胞、好酸球性細胞質および核凝縮を伴う生殖細胞、精子遊離障害（spermatid retention）、並びに生殖細胞の喪失等を含んでいた。また、同動物の両側精巣上体の管腔内には、精上皮細胞の剥離（軽微）が観察された。休薬期間終了時においても、100 mg/kg 投与群の 2/6 例で両側精巣に散在性の精細管変性（軽微）がみられ、それらの両側精巣上体の管腔内には、精上皮細胞の剥離（軽微）が観察された。

精子検査（実験 4）

精子検査の結果を Table 2-6 に示す。

溶媒対照群と TMG-123 投与群の比較において、100 mg/kg 投与群で精子形態異常発現率に統計学的に有意な高値が認められた。また、同投与群では、統計学的に有意な変動ではないが精子濃度（ $1599 \times 10^6/\text{mL}$ ）および精子自動性指数（212）に低値傾向がみられ、試験実施施設の背景データ範囲（精子濃度: $1,715 \sim 2,463 \times 10^6/\text{mL}$ 、精子自動性指数: 229～287）を下回る数値であった。20 mg/kg 以

下の群では統計学的に有意な変動および変動傾向は認められなかった。

交配検査（実験 4）

交配検査の結果を Table 2-7 に示す。

溶媒対照群と TMG-123 投与群の比較において、交尾率、受胎率および交尾成立までの日数に、いずれの TMG-123 投与群にも統計学的に有意な変動は認められなかった。

第 2 章の図表

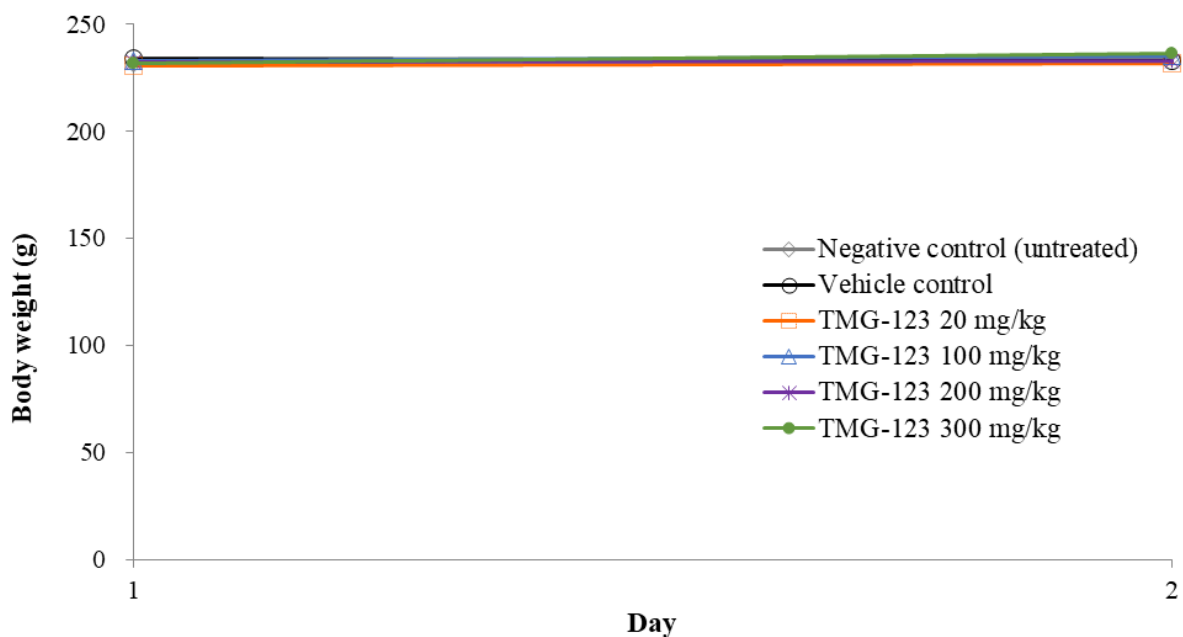


Figure 2-1 Body weight in experiment 1 (single dose study). The data are presented as the mean (n = 6).

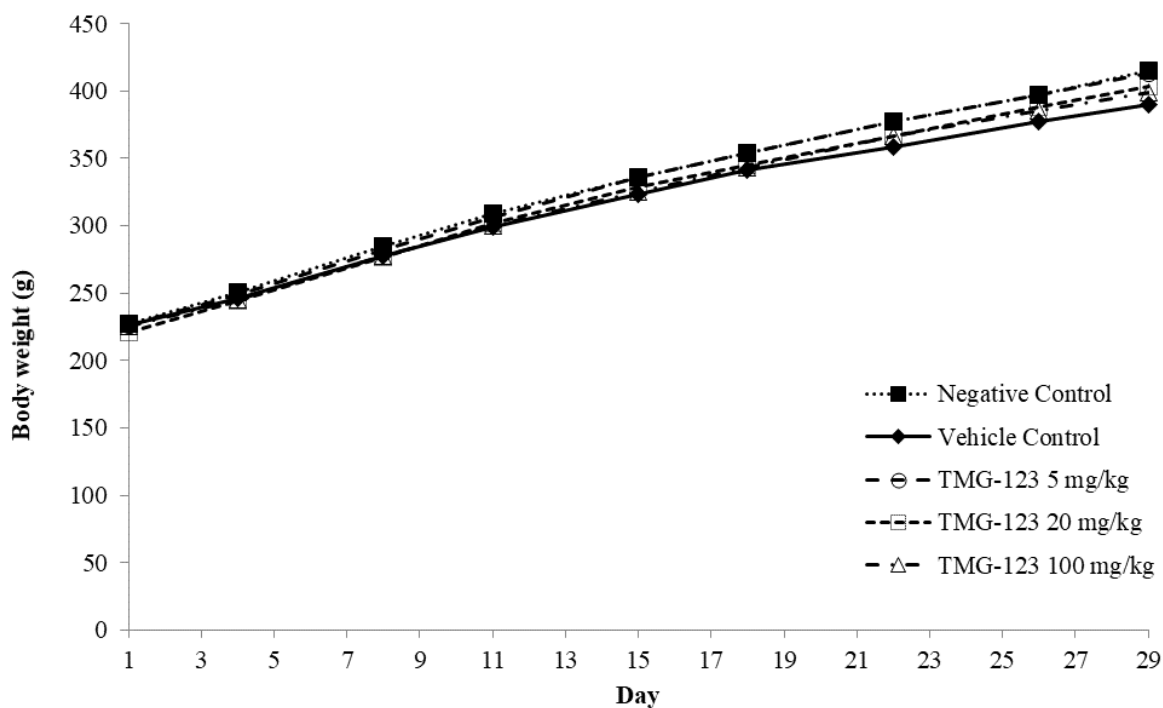


Figure 2-2 Body weight in experiment 2 (4-week repeated dose toxicity study). The data are presented as the mean (n = 10).

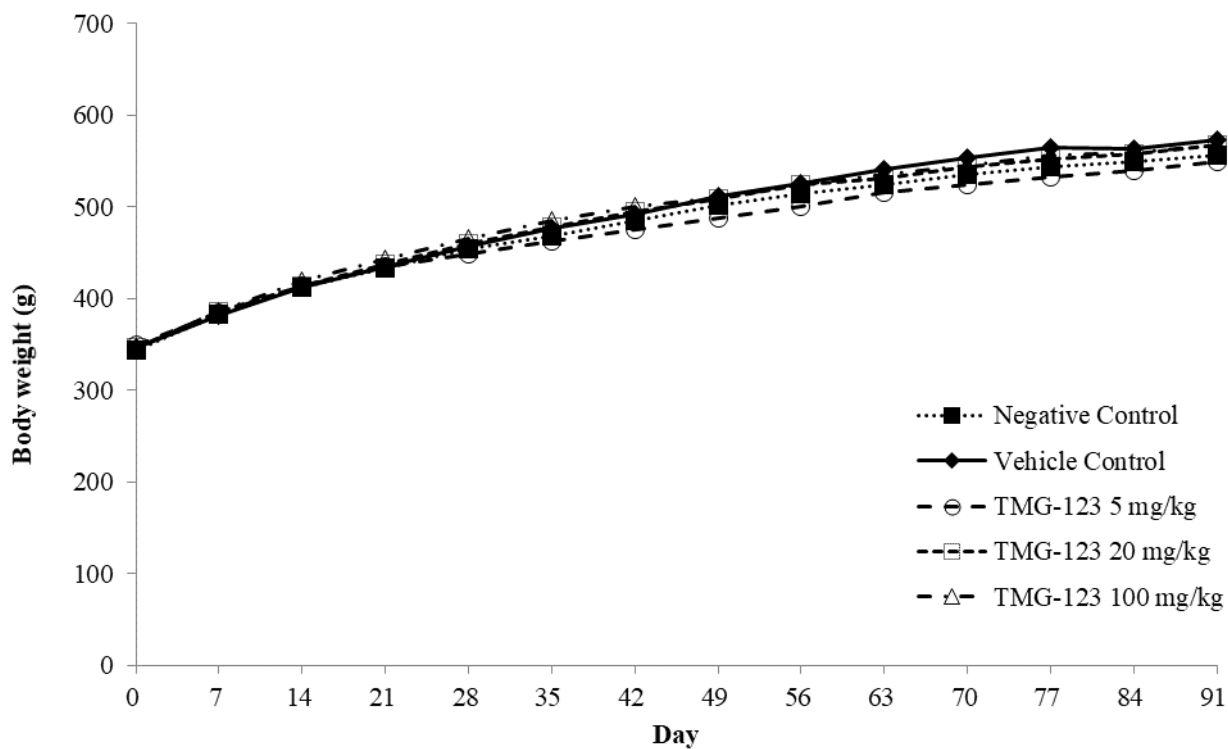


Figure 2-3 Body weight in experiment 3 (13-week repeated dose toxicity study). The data are presented as the mean (n = 8).

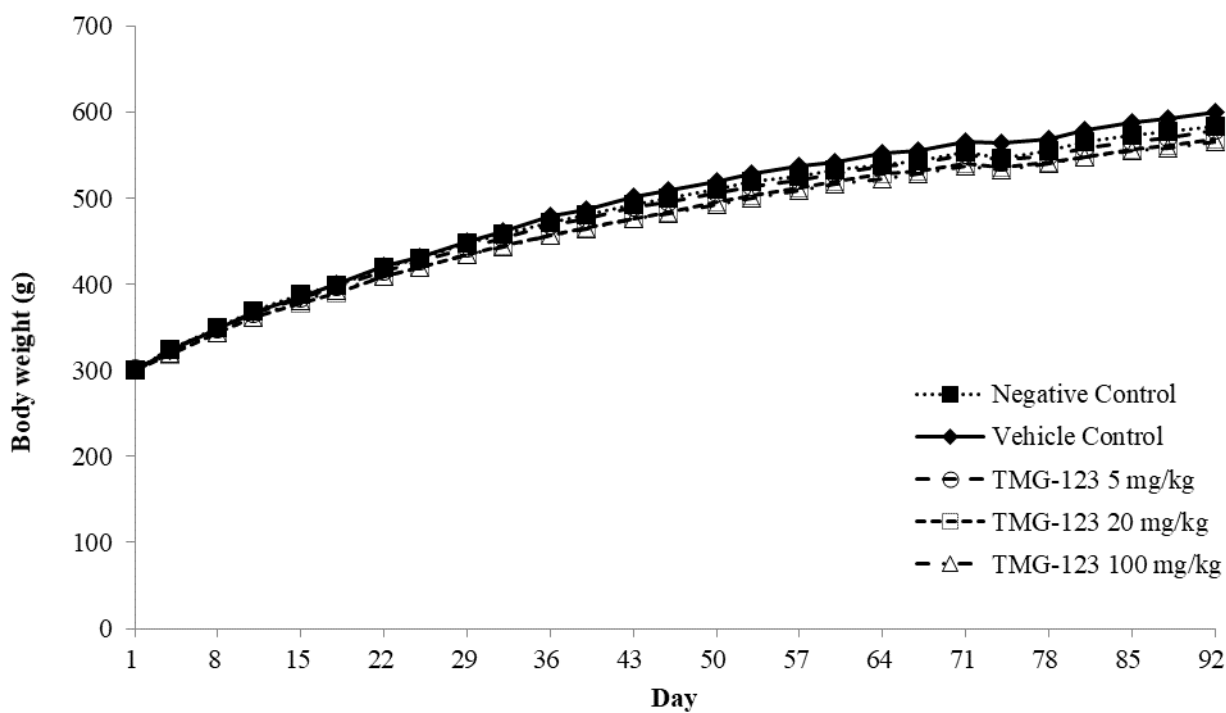


Figure 2-4 Body weight in experiment 4 (13-week repeated dose fertility study). The data are presented as the mean (n = 20).

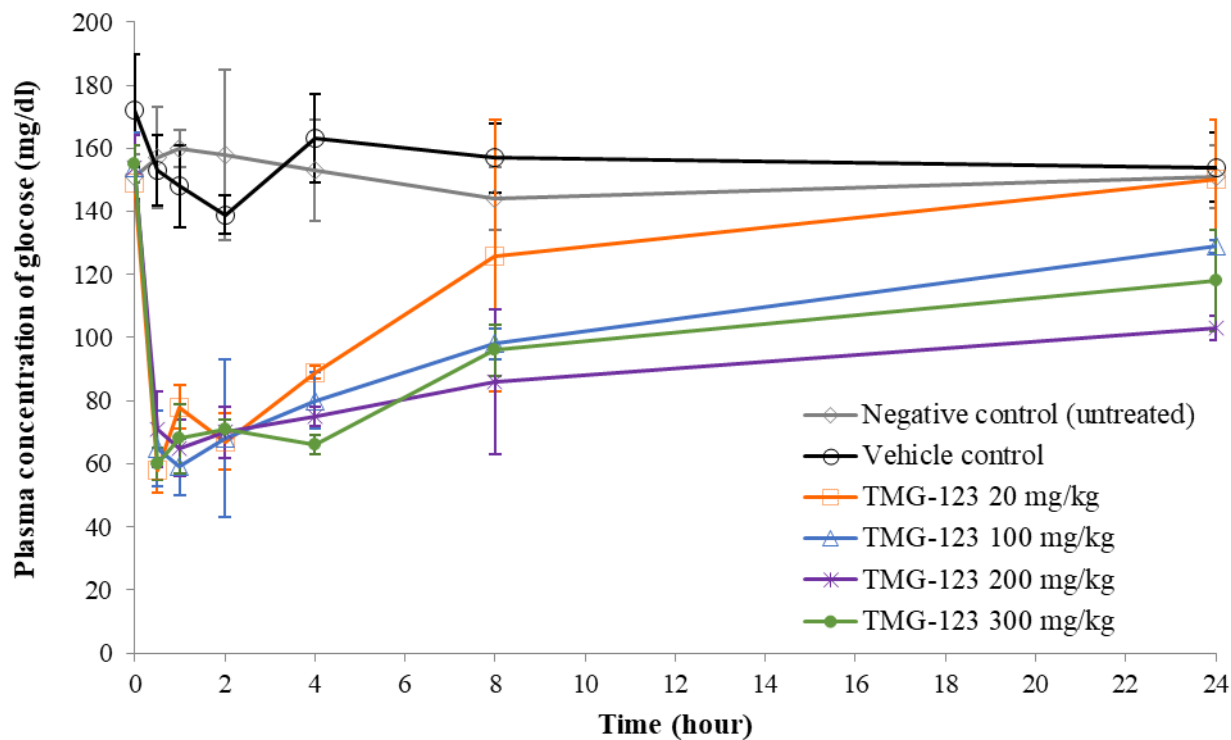


Figure 2-5 Plasma glucose levels after single dose in experiment 1 (single dose study). Blood samples were obtained at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 h after administration of vehicle or TMG-123. The data are presented as the mean \pm S.D. (n = 3).

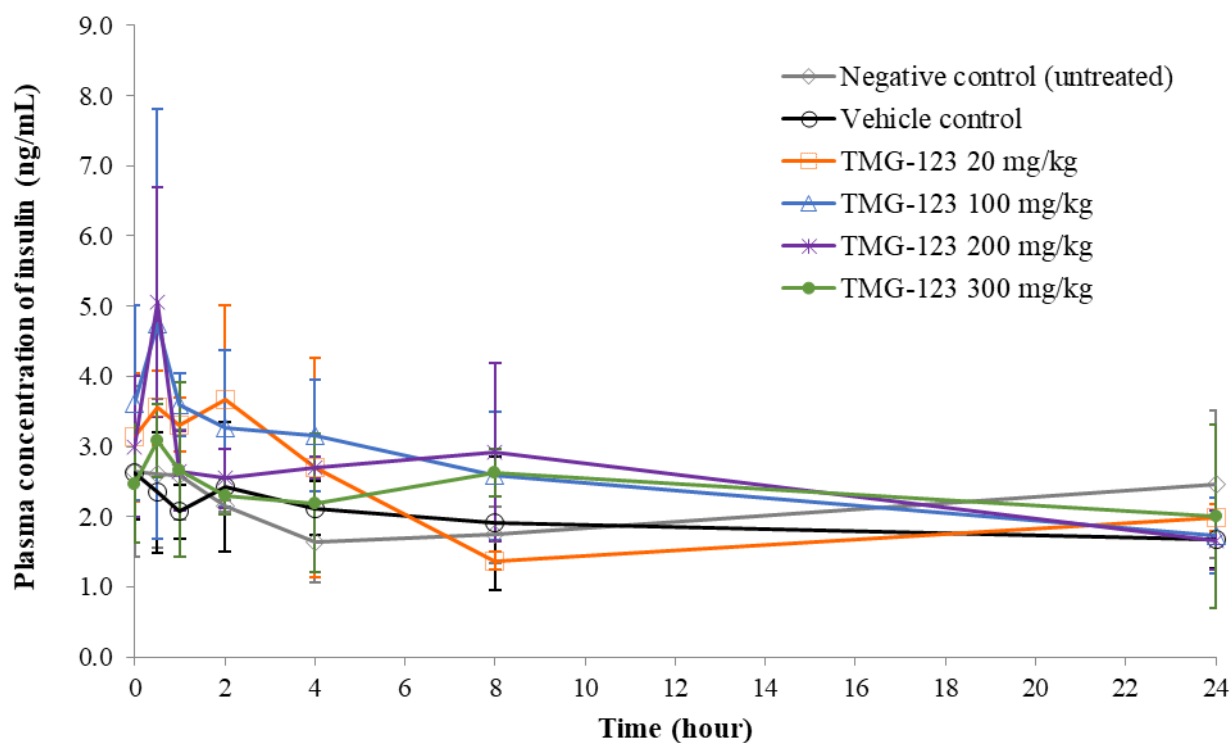


Figure 2-6 Plasma insulin levels after single dosing in experiment 1 (single dose study). Blood samples were obtained at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 h after administration of vehicle or TMG-123. The data are presented as the mean \pm S.D. (n = 3).

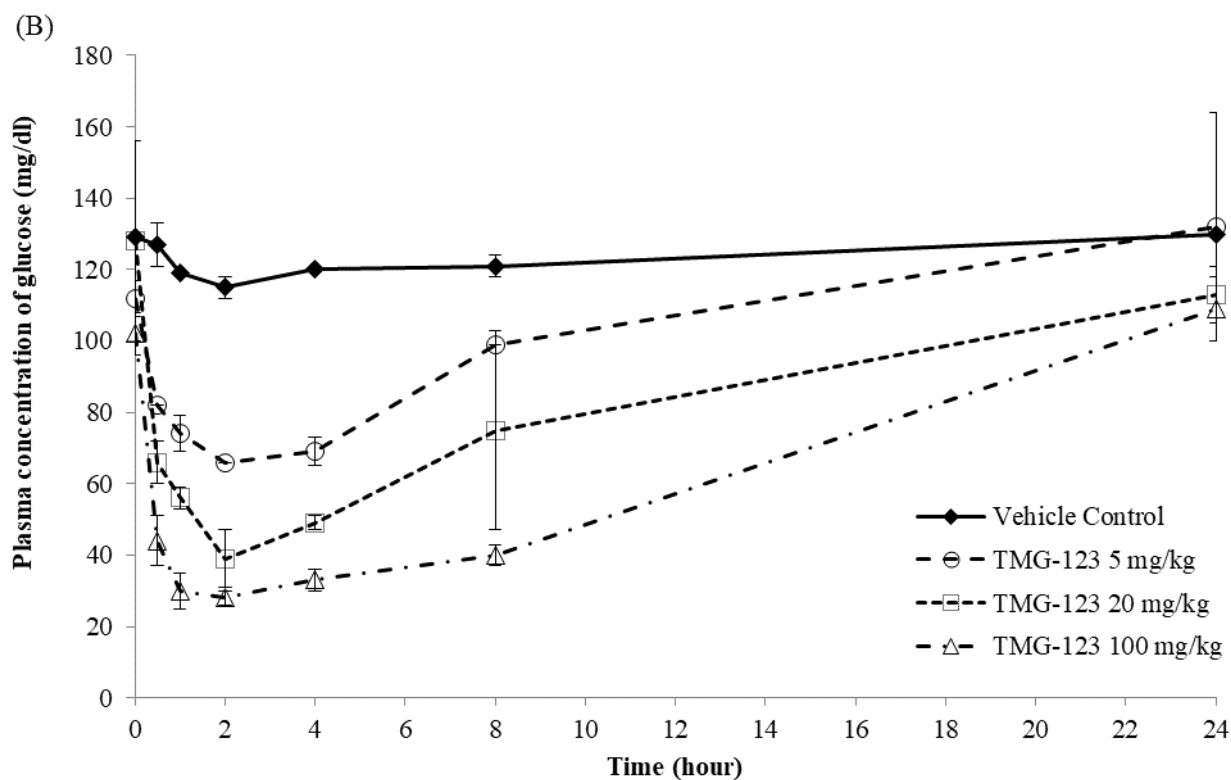
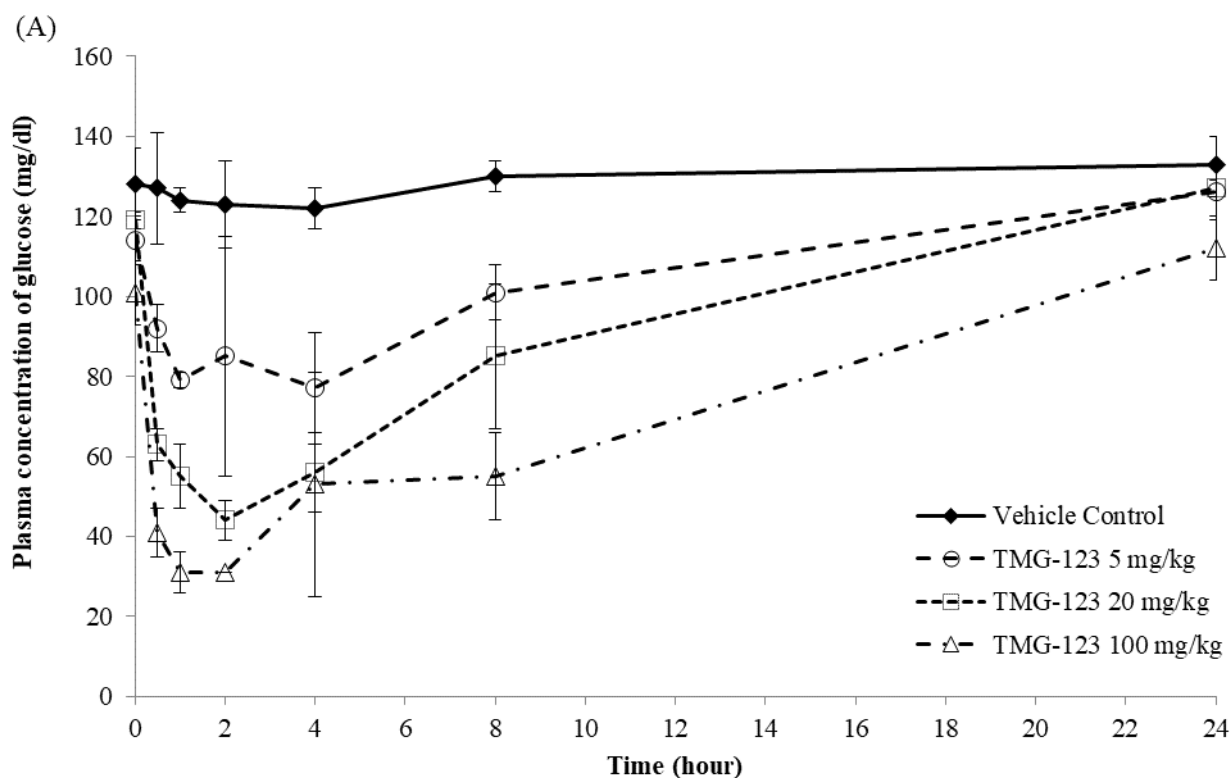


Figure 2-7 Plasma glucose levels on Day 28 (A) and Day 90 (B) of dosing in experiment 3 (13-week repeated dose toxicity study). Blood samples were obtained at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 h after administration of vehicle or TMG-123. The data are presented as the mean \pm S.D. (n = 2 or 3).

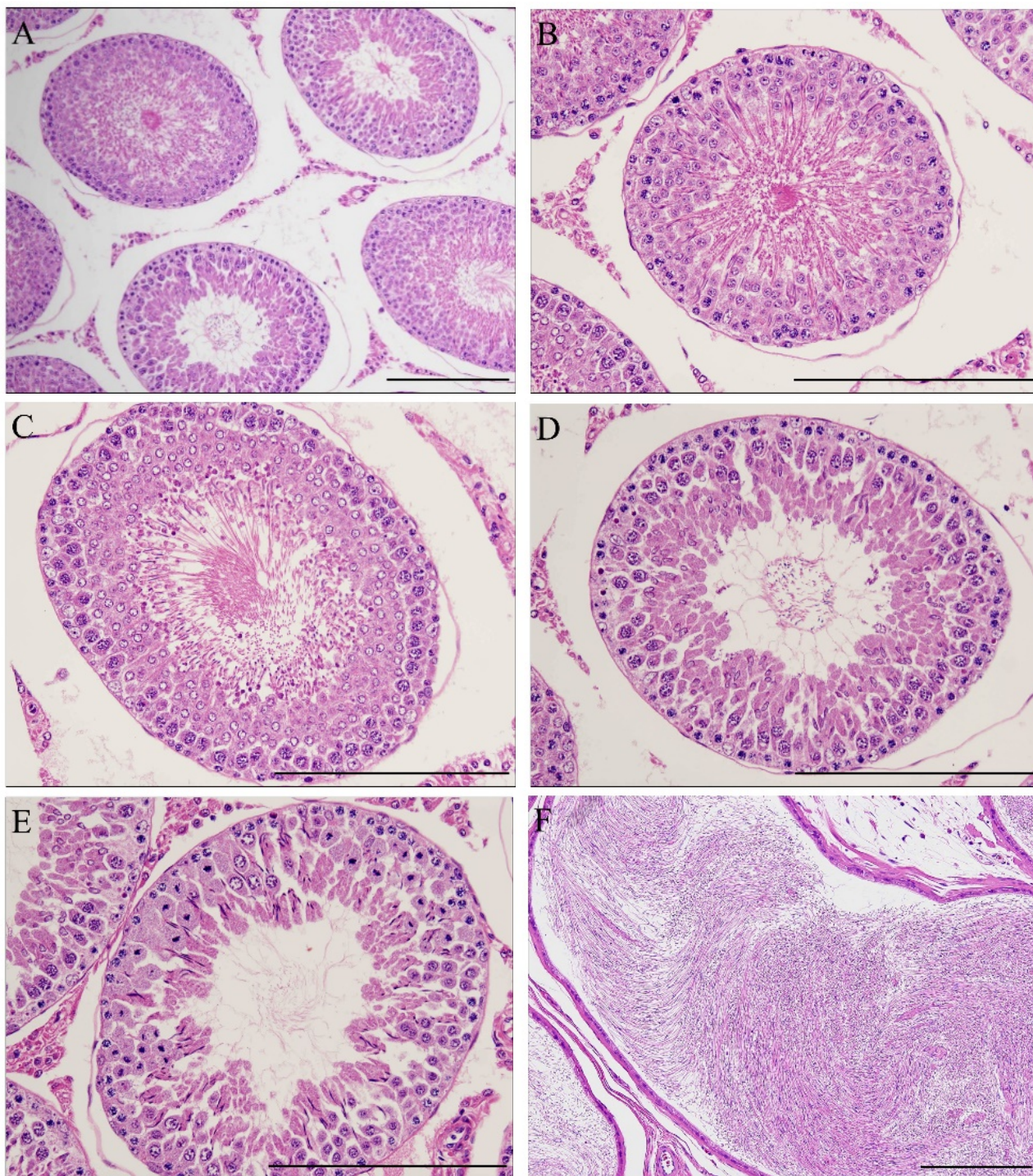


Figure 2-8 Representative histopathological images (hematoxylin and eosin staining) of testes and epididymides in experiment 3 (13-week repeated dose toxicity study). Images of a control testis at low (A) and high magnification (B to E), and an epididymis at low magnification (F). No abnormalities were observed in the control tissues. Images of a testis at low (G and H) and high magnification (I), and an epididymis at low magnification (J) from an animal treated with TMG-123 100 kg/kg after a 13-week dosing period. Degenerated seminiferous tubules were observed sporadically. The tubules contained germ cells with eosinophilic cytoplasm and nuclear condensation (arrowheads in G), relatively large and discrete tubular vacuolation (arrows in G), multinucleated giant cells (arrows in H), retention of mature spermatids (arrows in I), germ cell

loss, and disorganization of the germ cells. The epididymis exhibited exfoliation of germ cells in the lumen (arrows in J). Images of a testis (K) and an epididymis at low magnification (L) from an animal treated with TMG-123 100 kg/kg after an 8-week recovery period. Degeneration of seminiferous tubules and exfoliation of germ cells were still observed. The scale bars represent 200 μm .

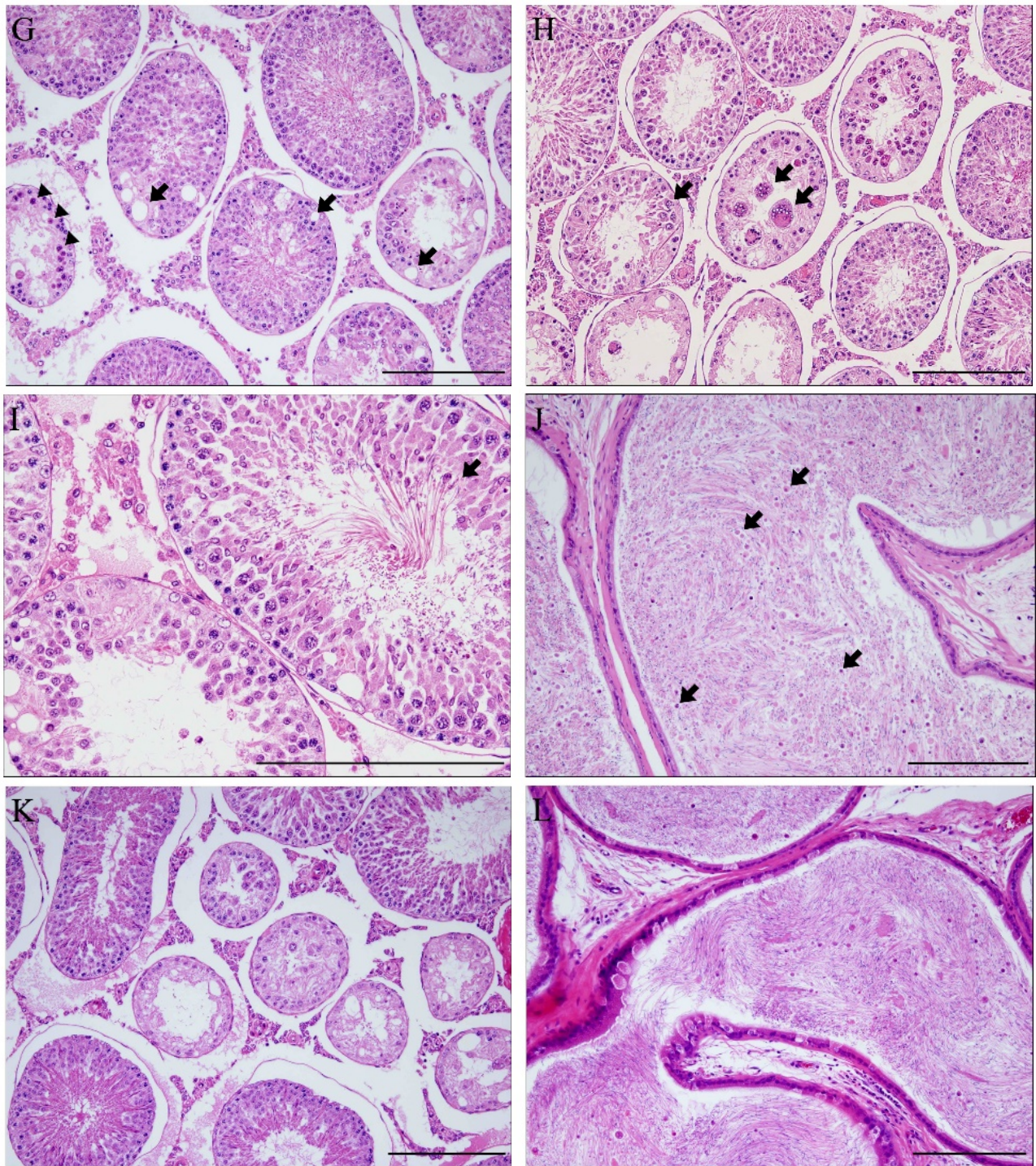


Figure 2-8 Representative histopathological images (hematoxylin and eosin staining) of testes and epididymides in experiment 3 (13-week repeated dose toxicity study) (Continued).

Table 2-1 Toxicokinetics parameters of TMG-123 in experiment 1 (single dose study).

| | 20 mg/kg | 100 mg/kg | 200 mg/kg | 300 mg/kg |
|---------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| | Day 1 | Day 1 | Day 1 | Day 1 |
| T _{max} (hr) | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| C _{max} (ng/mL) | 1,960 | 8,020 | 5,060 | 1,940 |
| AUC _{0-24h} (ng·hr/mL) | 7,970 | 24,200 | 23,400 | 14,500 |

n=3

Table 2-2 Toxicokinetics parameters of TMG-123 in experiment 2 (4-week repeated dose toxicity study).

| | 5 mg/kg | | 20 mg/kg | | 100 mg/kg | |
|---------------------------------|---------|--------|----------|--------|-----------|--------|
| | Day 1 | Day 28 | Day 1 | Day 28 | Day 1 | Day 28 |
| T _{max} (hr) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 |
| C _{max} (ng/mL) | 342 | 647 | 1,660 | 1,850 | 8,180 | 9,400 |
| AUC _{0-24h} (ng·hr/mL) | 2,180 | 2,630 | 9,160 | 11,600 | 35,500 | 25,400 |

n=3

Table 2-3 Toxicokinetics parameters of TMG-123 in experiment 3 (13-week repeated dose toxicity study).

| | 5 mg/kg | | 20 mg/kg | | 100 mg/kg | |
|---------------------------------|---------|--------|----------|--------|-----------|--------|
| | Day 28 | Day 90 | Day 28 | Day 90 | Day 28 | Day 90 |
| T _{max} (hr) | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 |
| C _{max} (ng/mL) | 439 | 357 | 1,930 | 1,790 | 6400 | 5,910 |
| AUC _{0-24h} (ng·hr/mL) | 2,430 | 2,420 | 8,950 | 9,780 | 29,200 | 28,500 |

n=2 or 3

Table 2-4 Organ weights in experiment 2 (4-week repeated dose toxicity study)

| Group | | Negative Control | Vehicle Control | TMG-123 5 mg/kg | TMG-123 20 mg/kg | TMG-123 100 mg/kg |
|-------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|
| No. of animals | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Testis ^a | (g) | 3.203 ± 0.133 | 3.294 ± 0.180 | 3.267 ± 0.146 | 3.338 ± 0.195 | 3.212 ± 0.316 |
| | (%) ^b | 0.754 ± 0.037 | 0.817 ± 0.072* | 0.790 ± 0.099 | 0.821 ± 0.070 | 0.980 ± 0.070 |
| Epididymis ^a | (g) | 0.980 ± 0.061 | 0.990 ± 0.058 | 0.967 ± 0.085 | 0.949 ± 0.044 | 0.949 ± 0.133 |
| | (%) ^b | 0.231 ± 0.015 | 0.246 ± 0.022 | 0.234 ± 0.033 | 0.233 ± 0.018 | 0.236 ± 0.029 |
| Prostate | (g) | 1.246 ± 0.137 | 1.201 ± 0.103 | 1.303 ± 0.153 | 1.215 ± 0.231 | 1.177 ± 0.178 |
| | (%) ^b | 0.294 ± 0.036 | 0.298 ± 0.036 | 0.314 ± 0.045 | 0.299 ± 0.061 | 0.291 ± 0.035 |
| Seminal vesicles | (g) | 0.361 ± 0.076 | 0.347 ± 0.032 | 0.336 ± 0.041 | 0.321 ± 0.041 | 0.337 ± 0.040 |
| | (%) ^b | 0.085 ± 0.018 | 0.086 ± 0.013 | 0.081 ± 0.013 | 0.078 ± 0.009 | 0.084 ± 0.011 |
| Pituitary gland | (g) | 0.013 ± 0.002 | 0.012 ± 0.002 | 0.013 ± 0.003 | 0.012 ± 0.002 | 0.012 ± 0.003 |
| | (%) ^b | 0.003 ± 0.000 | 0.003 ± 0.001 | 0.003 ± 0.001 | 0.003 ± 0.000 | 0.003 ± 0.001 |

Values are mean ± S.D.

a : The sum of right and left organ weights.

b : Ratio of organ weight to body weight (relative organ weight).

*: p < 0.05 (Significantly different from Vehicle Control)

Table 2-5 Organ weights in experiment 3 (13-week repeated dose toxicity study)

| Group | | Negative Control | Vehicle Control | TMG-123 5 mg/kg | TMG-123 20 mg/kg | TMG-123 100 mg/kg |
|-------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|
| No. of animals | | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Testis ^a | (g) | 3.459 ± 0.358 | 3.582 ± 0.082 | 3.239 ± 0.346 | 3.228 ± 0.341* | 3.474 ± 0.246 |
| | (%) ^b | 0.652 ± 0.061 | 0.656 ± 0.091 | 0.608 ± 0.052 | 0.586 ± 0.043 | 0.637 ± 0.078 |
| Epididymis ^a | (g) | 1.493 ± 0.141 | 1.448 ± 0.072 | 1.407 ± 0.229 | 1.413 ± 0.111 | 1.413 ± 0.158 |
| | (%) ^b | 0.282 ± 0.032 | 0.265 ± 0.041 | 0.263 ± 0.034 | 0.257 ± 0.020 | 0.259 ± 0.037 |
| Prostate and seminal vesicles | (g) | 3.030 ± 0.482 | 3.178 ± 0.447 | 3.031 ± 0.4967 | 3.027 ± 0.394 | 2.920 ± 0.233 |
| | (%) ^b | 0.570 ± 0.081 | 0.575 ± 0.047 | 0.570 ± 0.093 | 0.554 ± 0.101 | 0.533 ± 0.036 |
| Pituitary gland | (g) | 0.013 ± 0.002 | 0.015 ± 0.002 | 0.014 ± 0.002 | 0.012 ± 0.001* | 0.015 ± 0.002 |
| | (%) ^b | 0.003 ± 0.000 | 0.003 ± 0.000 | 0.003 ± 0.000 | 0.002 ± 0.000** | 0.003 ± 0.000 |

Values are mean ± S.D.

a : The sum of right and left organ weights.

b : Ratio of organ weight to body weight (relative organ weight).

*: p < 0.05, **: p < 0.01 (Significantly different from Vehicle Control)

Table 2-6 Sperm analysis in experiment 4 (13-week repeated dose fertility study)

| Group | Negative Control | Vehicle Control | TMG-123 5 mg/kg | TMG-123 20 mg/kg | TMG-123 100 mg/kg | |
|--|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|
| No. of animals | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | |
| Sperm motility index | 269 ± 21 | 256 ± 45 | 271 ± 24 | 269 ± 27 | 212 ± 87 | |
| The sperm concentration (×10 ⁶ /ml) | 1,953 ± 225 | 1,895 ± 233 | 1,989 ± 264 | 1,911 ± 245 | 1,599 ± 516 | |
| The incidences of sperm malformations (%) ^a | | | | | | |
| Total | 0.4 ± 0.5 | 0.8 ± 0.6 | 0.6 ± 0.6 | 0.7 ± 0.5 | 2.7 ± 1.9** | [19] ^b |
| Head | 0.2 ± 0.3 | 0.2 ± 0.3 | 0.2 ± 0.3 | 0.2 ± 0.3 | 0.7 ± 0.8* | [19] ^b |
| Neck | 0.2 ± 0.3 | 0.5 ± 0.6 | 0.3 ± 0.4 | 0.5 ± 0.5 | 1.6 ± 1.6** | [19] ^b |
| Middle piece | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | [19] ^b |
| Tail | 0.1 ± 0.2 | 0.1 ± 0.2 | 0.1 ± 0.2 | 0.1 ± 0.2 | 0.4 ± 0.7 | [19] ^b |

Values are mean ± S.D.

a: The incidences were calculated in each region: head, neck, middle piece, and tail.

b: Number of animals in TMG-123 100 mg/kg group. One male was excluded since sperm morphology could not be evaluated because of incidental changes

*: p < 0.05, **: p < 0.01 (Significantly different from Vehicle Control)

Table 2-7 Mating ability and fertility in experiment 4 (13-week repeated dose fertility study)

| Dose (mg/kg) | Negative Control | Vehicle Control | TMG-123 5 mg/kg | TMG-123 20 mg/kg | TMG-123 100 mg/kg |
|--|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|
| Number of males mated | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Number of males with successful copulation (%) ^{a)} | 20 (100.0) | 20 (100.0) | 20 (100.0) | 20 (100.0) | 20 (100.0) |
| Number of males impregnating (%) ^{b)} | 20 (100.0) | 19 (95.0) | 18 (90.0) | 18 (90.0) | 19 (95.0) |
| Pre-coital period (days) Mean ± S.D. | 2.4 ± 1.4 | 2.9 ± 1.3 | 3.0 ± 1.5 | 2.9 ± 2.2 | 3.5 ± 3.4 |

a): Copulation Index (%) = Number of males with successful copulation / Number of males mated x 100

b): Fertility Index (%) = Number of males impregnating / Number of males with successful copulation x 100

Not significantly different from Vehicle control-group

考察

第 2 章では、第 1 章のインスリンとは異なるタイプの血糖低下薬である glucokinase 活性化剤 TMG-123 をラットに投与する複数の実験を行った。

血糖値について、実験 1 の単回投与、実験 2 の 4 週間反復投与および実験 3 の 13 週間反復投与後に速やかに低下することが確認された。特に、20 および 100 mg/kg の 4 および 13 週間反復経口投与後の血糖値は、インスリン投与時と同様に、ヒトおよびラットにおいて低血糖とされる基準の一つである 50 mg/dL を下回る血糖値を示した個体がいたことから、TMG-123 の反復投与後に持続的な低血糖が引き起こされることが確認された。

また、実験 1 の単回投与後において、血中インスリン濃度に TMG-123 投与による影響はみられなかった。TMG-123 は肝作用優位型であり、膵臓のインスリン分泌刺激ではなく、肝臓の糖取り込み増加によって耐糖能を改善する特性を持つことが報告されており [Tsumura *et al.* 2017]、今回の結果はこの報告と相違ないものであった。

病理組織学的検査の結果、実験 2 の 4 週間投与時の 100 mg/kg 投与群、並びに実験 3 の 13 週間投与時の 20 および 100 mg/kg 投与群において、散在性の精細管変性が精巣にみられ、その二次的な変化と考えられる精上皮細胞の剥離が精巣上体に観察された。これらの精細管は、散在性の空胞形成、多核巨細胞、好酸球性細胞質および核凝縮を伴う生殖細胞、精子遊離障害 (spermatid retention)、および生殖細胞の喪失等を含んでいた。さらに、回復期間終了後においても同様の所見がみられたことから、これら変化は回復性に乏しいと考えられた。

また、精細管の散在性の空胞形成は、セルトリ細胞が損傷を受けた場合に一般的にみられる所見

の一つである[Creasy 2001]。したがって、こうした特徴を考慮すると、セルトリ細胞が損傷を受け、精子形成をサポートできなくなった可能性[Creasy 2001]が考えられた。精原細胞とセルトリ細胞にみられる精巣の損傷は不可逆的である傾向があると一般的に報告されているため[Nolte *et al.* 1995]、精巣の変化に回復性が乏しいことを示す今回の結果は、文献報告されたデータと一致していた。

実験 2 および 3 のいずれの TMG-123 投与群においても、自由摂餌下の投与期間中に TMG-123 投与に関連した一般状態の変化および体重の変動は認められなかった。また、器官重量に TMG-123 投与の影響はみられなかった。これらのことから、精巣の病理組織学的変化は、ストレス又は性ホルモンの変動による影響ではないと考えられた。

さらに、実験 4 の精子検査において、精子形態異常発現率の高値並びに精子濃度および精子自動性指数の低値傾向が認められた。一方、交尾率および受胎率に TMG-123 投与の影響は認められなかった。ラットでは精子数減少が交配能に与える影響は小さいことが知られており、精子数が 90% 減っても交配能に影響はないとの報告がある[Robaire *et al.* 1984; Bieber *et al.* 2006]。本実験条件下において低血糖による精子への影響は、交配能に影響を与えるほど顕著ではないと考えられた。

第 2 章では、インスリンとは異なるタイプの血糖低下薬である glucokinase 活性化剤の反復投与により、第 1 章と同様に、持続的な低血糖がみられ、精巣の病理組織学的変化が認められた。精子形成は、グルコース代謝に大きく依存することがよく知られている[Rato *et al.* 2012; Bajpai *et al.* 1998; Boussouar and Benahmed, 2004; Jutte *et al.* 1982; Robinson and Fritz 1981]。したがって、血糖低下薬の直接的な影響ではなく、血糖低下薬の反復投与により惹起された低血糖が、精巣毒性を引き起こした可能性が考えられた。

以上の結果より、膵臓作用優位型である TMG-123 をラットに 4 および 13 週間反復経口投与す

ることにより、第 1 章のインスリン投与時と同様に、持続的な低血糖が惹起されることが確認された。一方、血中インスリン濃度は TMG-123 投与による影響がないことから、TMG-123 は肝作用優位型であるとの報告と矛盾しない結果が得られた。また、雄性生殖器への影響として精巣に散在性の精細管変性およびその二次的な変化として精巣上体の管腔内に精上皮細胞の剥離が認められることが確認された。これら精巣でみられた変化は、低血糖に起因する二次的な毒性変化であると考えられた。

小括

第 2 章では、第 1 章のインスリンとは異なるタイプの血糖低下薬である glucokinase 活性化剤 TMG-123 をラットに投与する実験を行った。

本章では、TMG-123 投与によってインスリン投与時と同様に低血糖状態が惹起されることが確認された。一方、血中インスリン濃度は TMG-123 投与による影響がないことから、TMG-123 は肝作用優位型であるとの報告と矛盾しない結果が得られた。さらに、精巣の病理組織学的変化および精子検査の異常がみられ、精子形成への影響が示唆された。第 1 章および第 2 章において、インスリンおよびそれとは異なる作用点を持つ TMG-123 の両薬剤を投与した際に、いずれの場合も持続的な低血糖および精巣毒性がみられたこと、並びに精子形成はグルコース代謝に大きく依存することがよく知られていることから、精巣でみられた変化は、低血糖が引き起こす二次的な毒性変化である可能性が考えられた。

第3章

糖尿病モデルラットにおける glucokinase 活性化剤 TMG-123 投与に関する検討

緒言

第1章および第2章では、正常ラットにインスリン又は肝作用優位型 glucokinase 活性化剤である TMG-123 を投与すると、両剤において持続的な低血糖が惹起され、さらに同様の精巣毒性がみられることを確認した。これらのデータから、血糖低下薬による直接的な毒性ではなく、低血糖により二次的な毒性として精巣毒性が引き起こされる可能性を考えた。この仮説が正しければ、投与前から血糖値が高いために血糖低下薬を反復投与しても低血糖が起こらない糖尿病モデル動物では、精巣毒性が起こらないと考えられた。そこで、第3章では、糖尿病モデル動物である Goto-Kakizaki ラット (GK ラット) を用いた検討を行った。

GK ラットは、非肥満型 2 型糖尿病モデルの代表的なモデル動物である。このラットは Wistar ラットを基に、経口ブドウ糖負荷試験において耐糖能が低下している個体を選択的に交配させることにより確立された系統である [Tourrel *et al.* 2002; King 2012]。当該モデル動物は、糖負荷時にはインスリン分泌不全を示し、血糖値は著しく上昇する [King 2012; Koyama *et al.* 1998]。一方、飽食時の血中インスリン値はむしろ高値を示すことが報告されている [Sugiyama *et al.* 1989; Berthelie *et al.* 1997]。

Tsumura らによって、GK ラットを用いた TMG-123 の薬効評価が報告されている [Tsumura *et al.* 2017]。その報告では、TMG-123 を投与された GK ラットは糖負荷後の血糖値上昇が、溶媒を投与された GK ラットと比較して用量依存的に減少した。また、この際の血糖値低下は、高用量でも 70 mg/dL までで下げ止まっていた。このことから、GK ラットを用いることにより、TMG-123 を投与しても低血糖にならない条件で、精巣への影響を評価できると考えられた。

そこで本章では、糖尿病モデル動物である GK ラットに TMG-123 を反復経口投与し、血糖値を測定するとともに、精巣の病理組織学的検査を行うことにより、血糖低下薬を投与しても低血糖が起こらない条件において、精巣毒性が発現するかを検討した。

実験材料および実験方法

動物

実験には日本 SLC 株式会社 (Hamamatsu, Japan) より入手した雄性 GK ラットを使用した。動物の飼育は、動物実験室 (室温 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、12 時間明暗周期) で行った。固型飼料 CE-2 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を使用し、自由摂取させた。帝人ファーマ株式会社生物医学総合研究所の承認を得て実施した (承認番号: A11-134)。

化合物

TMG-123 は杏林製薬株式会社にて合成した標品を用いた。溶媒は、ゲルシア 44/14 (Gattefossé Corporation, Saint-Priest, France) およびポリエチレングリコール 400 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) が質量比 3 : 2 になるように混合した混合液 (以下、PEG/Gel とする) を用いた。投与直前まで約 40°C の恒温水槽中で攪拌した。

実験プロトコル

動物を 5 週齢で搬入し、6 週齢で以下の通り群分けした。

| 群 | 投与物質 | 用量 | 例数 |
|-------------|---------|------------|-------------------------------|
| 溶媒対照投与群 | 溶媒 | - | 毒性試験群: 雄 10 例 |
| TMG-123 投与群 | TMG-123 | 12.5 mg/kg | 毒性試験群: 雄 10 例 採血評価群: 雄 5 例 |
| | TMG-123 | 25 mg/kg | 毒性試験群: 雄 10 例 採血評価群: 雄 5 例 |
| | TMG-123 | 50 mg/kg | 毒性試験群: 雄 10 例 採血評価群: 雄 5 例 |

溶媒又は TMG-123 を 4 週間反復経口投与 (投与容量: 10 mL/kg/回) した。

血糖値測定および血中曝露評価

投与 1 および 28 日目に無麻酔下で採血評価群の尾静脈から 7 ポイント/日 (投与前、投与後 0.5、1、2、4、8 および 24 時間) を採血した。採血時には、外側尾静脈を剃刀で傷つけ、血液をヘパリン処理されたガラス毛細管 1 本に約 40 μL 回収した。回収した血液を遠心 (室温、12,000 min^{-1} 、3 分間) して、血漿を得た。

血漿中の血糖値はグルコース CII-テストワコー (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を用いて測定した。

血漿中 TMG-123 濃度は下記に示す LC-MS/MS 法により測定し、 C_{max} (maximum concentration)、 T_{max} (time to maximum concentration) および $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ (area under the plasma concentration-time curve) の各パラメータを算出した。

TMG-123 濃度測定

氷浴中で測定試料各 10 μL に 50 vol%アセトニトリル溶液 10 μL および内標準溶液 (TMG-123- d_4 、10 mg/mL) 50 μL を添加、攪拌した後、遠心分離 (18,700 $\times g$ 、5 min、4 $^{\circ}\text{C}$) した。得られた上清 50 μL に超純水 40 μL を添加、攪拌した後、その 20 μL を LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS には LC-10ADvp HPLC システム (Shimadzu, Kyoto, Japan) と API4000 (AB SCIEX, CA, USA) を用いた。分析条件は、分析カラムとして Gemini C18 (2.0 mm I.D. \times 50 mm、粒径 5 μm 、Phenomenex, CA, USA) を用い、カラム温度は 30 $^{\circ}\text{C}$ とした。移動相として 10 mmol/L ぎ酸アンモニウム水溶液 (pH 4.0) (移動相 A) とアセトニトリル (移動相 B) を使用し、以下のグラジエント条件で溶離した (流速: 0.5 mL/min)。

| Time (min) | A (%) | B (%) |
|------------|-------|-------|
| 0.00 | 85 | 15 |
| 0.20 | 85 | 15 |
| 5.00 | 35 | 65 |
| 5.01 | 5 | 95 |
| 6.00 | 5 | 95 |
| 6.01 | 85 | 15 |
| 8.00 | 85 | 15 |

イオン化法は Electrosprayionization (ESI) 法で行い、ポジティブイオンモードで検出した。モニタリングイオンについて、TMG-123 は m/z 494.3 \rightarrow m/z 205.6 とし、内標準物質は m/z 498.3 \rightarrow m/z 209.6 とした。

病理組織学的検査

剖検日に毒性試験群の体重を測定し、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射による麻酔下で放血安楽死させた。精巣および精巣上体を採取し、精巣はブアン固定液で、精巣上体は 10%中性緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定した。これら器官についてパラフィン包埋および薄切を行い、HE染色を実施した。全例の HE 染色標本を用いて病理組織学的に検査した。

実験結果

血中曝露評価

血中曝露評価の結果を Table 3-1 に示す。

血漿中 TMG-123 の AUC_{0-24h} および C_{max} は、12.5 mg/kg から 50 mg/kg にかけて投与量が高い群ほど高値であった。

血糖値

血糖値測定の結果を Figure 3-1 に示す。

投与 1 および 28 日目の血糖値は、12.5 mg/kg から 50 mg/kg 投与群において投与量が高い群ほど低値であった。25 および 50 mg/kg においては、投与前の値と比較して 50%以上の低下を示したが、血糖値が 50 mg/dL 以下となる個体は認められなかった。

病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Table 3-2 に示す。

TMG-123 投与に起因した変化は認められなかった。

いくつかの所見がみられたものの、それら所見は片側のみでみられ投与量と関連性のない変化、あるいは溶媒投与群にも認められた変化であるため、TMG-123 投与との関連はないと考えられた。

第3章の図表

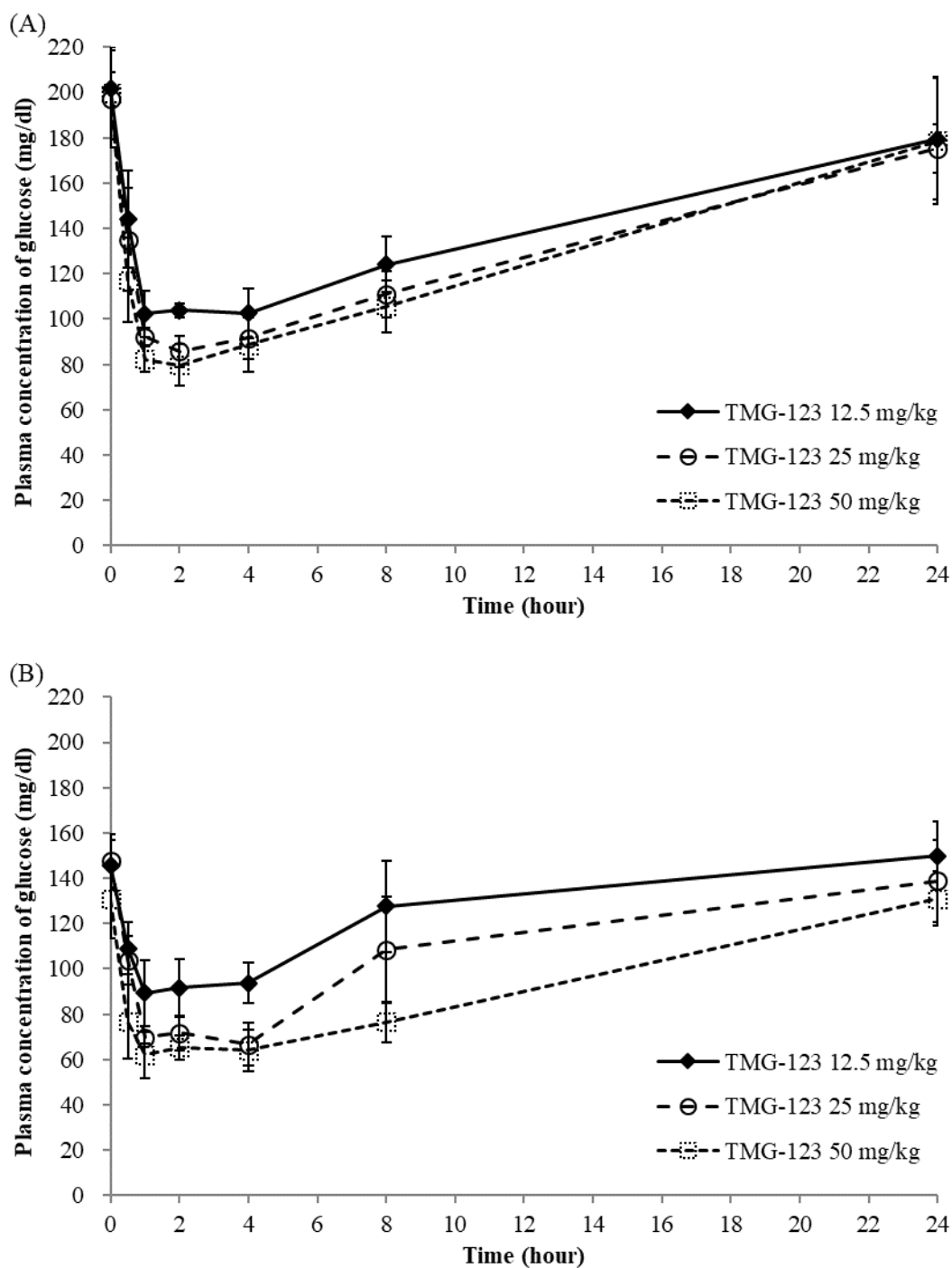


Figure 3-1 Plasma glucose levels on Day 1 (A) and 28 (B) of dosing. Blood samples were obtained at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 h after administration of TMG-123. The data are presented as the mean \pm S.D. (n = 5).

Table 3-1 Exposure parameters of TMG-123.

| | 12.5 mg/kg | 25 mg/kg | 50 mg/kg |
|---------------------------------|------------|----------|----------|
| | Day 28 | Day 28 | Day 28 |
| T _{max} (hr) | 1.6 | 1.2 | 1.4 |
| C _{max} (ng/mL) | 1,096 | 2,363 | 4,453 |
| AUC _{0-24h} (ng·hr/mL) | 7,198 | 16,714 | 29,956 |

n=5

Table 3-2 Histopathological findings.

| | Vehicle* | TMG-123 | | |
|--|----------|------------|----------|----------|
| | | 12.5 mg/kg | 25 mg/kg | 50 mg/kg |
| Testis | | | | |
| Hypoplasia, seminiferous tubules, unilateral | | | | |
| no finding | 9/9 | 9/10 | 9/10 | 9/10 |
| minimal | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| mild | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| moderate | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| severe | 0/9 | 1/10 | 1/10 | 1/10 |
| Dilation, seminiferous tubules, unilateral | | | | |
| no finding | 9/9 | 10/10 | 10/10 | 9/10 |
| minimal | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 1/10 |
| mild | 1/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| moderate | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| severe | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| Epididymis | | | | |
| Sperm loss, ductus epididymides, unilateral | | | | |
| no finding | 9/9 | 9/10 | 9/10 | 9/10 |
| minimal | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| mild | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| moderate | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| severe | 0/9 | 1/10 | 1/10 | 1/10 |

*: One animal was euthanized because of misadministration and was excluded from this study.

考察

第 1 章および第 2 章では、インスリンおよび TMG-123 を用いて正常ラットに低血糖状態を惹起させ、その条件下において精巣毒性が発現することを確認した。精巣毒性が低血糖に起因する二次的な変化であることを確認するために、第 3 章では、血糖低下薬を反復投与しても低血糖が起こらない条件として、糖尿病モデル動物である GK ラットに TMG-123 を 4 週間反復投与して、精巣の病理組織学的検査を実施した。

本章では、まず TMG-123 の血中曝露を評価した結果、GK ラットに TMG-123 50 mg/kg を投与した場合の AUC_{0-24h} (29,956 ng·h/mL) は、第 2 章において評価した正常ラットに TMG-123 100 mg/kg を投与した場合の AUC_{0-24h} (実験 2 の投与 28 日目: 25,400 ng·h/mL、実験 3 の投与 28 日目: 29,200 ng·h/mL、投与 90 日目: 28,500 ng·h/mL) と同程度であることが確認された。したがって、本章における投与量は、ラットにおいて低血糖を惹起しうる曝露を達成していたことが確認された。

血糖値を評価した結果、投与初日および最終日ともに血糖値は TMG-123 投与後に速やかに低下し、投与 28 日目における 50 mg/kg 投与群の低下幅は 69 mg/dL であり、これは正常ラットに 13 週間反復投与した後の低下幅 (70 mg/dL) と同程度であった。したがって、TMG-123 は GK ラットにおいても、正常ラットと同様に薬理作用を働いていたと考えられた。しかし、GK ラットでは、TMG-123 投与後にヒトおよびラットにおいて低血糖と判断される 50 mg/dL を下回る血糖値を示した個体はみられなかった。したがって、第 2 章と同程度の曝露を達成しているものの、投与前の血糖値が高い糖尿病モデル動物の GK ラットでは、低血糖状態になっていなかったと考えられた。

精巣の病理組織学的検査について、第 1 章では、精巣に散在性の精細管変性およびその二次的

な変化として精巣上体の管腔内に精上皮細胞の剥離が 100 IU/kg の 20 例中 1 例、200 IU/kg の 20 例中 2 例、および 400 IU/kg の 15 例中 4 例で認められた。また、第 2 章では、4 週投与時の 100 mg/kg で 10 例中 3 例に、並びに 13 週投与時の 20 mg/kg で 8 例中 1 例および 100 mg/kg で 8 例中 2 例にみられた。一方、本章では、正常ラットの 100 mg/kg と同様の曝露となる 50 mg/kg まで、精巣に TMG-123 投与に起因した変化はみられなかった。生殖細胞は、エネルギー源としてグルコースを用いることが知られていることから[Rato *et al.* 2012; Robinson and Fritz 1981; Boussouar and Benahmed 2004; Jutte *et al.* 1982; Bajpai *et al.* 1998; Jutte *et al.* 1981]、正常ラットと異なり GK ラットに TMG-123 を反復投与しても精巣毒性がみられなかったのは、低血糖が惹起されなかったためと考えられた。

以上、本章において血糖低下薬を反復投与しても低血糖が惹起されない条件下では精巣毒性がみられなかったことから、第 1 章および第 2 章でみられた精巣毒性は血糖低下薬の直接的な影響ではなく、低血糖に起因する二次的な影響であるとの仮説が支持された。

小括

第3章では、血糖値が高い糖尿病モデル動物である GK ラットを用いて、TMG-123 を投与しても低血糖が起こらない条件において精巣毒性がみられるかを検討した。

GK ラットにおける TMG-123 の血中曝露は、第2章において正常ラットで低血糖および精巣毒性がみられた曝露と同程度であることが確認されたものの、低血糖を示す個体はみられなかった。

また、病理組織学的検査の結果、精巣に TMG-123 投与に起因した所見はみられなかった。

以上より、血糖低下薬を反復投与しても低血糖が惹起されない条件下では、血糖低下薬による精巣毒性はみられないことが確認された。

総括ならびに結論

本研究では、低血糖と精巣毒性の関係を検討するため、以下に示す第1～3章の実験を実施した。

第1章では、正常ラットにインスリンを投与することで低血糖を惹起し、その条件下で雄性生殖器官への影響を評価した。その結果、インスリン投与後に、ヒトおよびラットにおいて低血糖と判断される基準の一つである 50 mg/dL を下回る血糖値を示す個体がみられ、持続的な低血糖が引き起こされることが確認された。また、病理組織学的検査の結果、インスリン投与群において精巣に散在性の精細管変性が認められ、同一個体の精巣上体の管腔内には精細管変性に関連すると考えられる精上皮細胞の剥離が認められた。さらに、精子検査の結果、400 IU/kg 投与群において精子濃度および精子形態異常総発現率はそれぞれ低値および高値傾向を示した。

また、第2章では、第1章のインスリンとは異なるタイプの血糖低下薬である glucokinase 活性化剤 TMG-123 を正常ラットに投与する複数の実験を行った。TMG-123 は肝作用優位型であり、膵臓のインスリン分泌刺激ではなく、肝臓の糖取り込み増加によって耐糖能を改善すると考えられている[Tsumura *et al.* 2017]。まず、血糖値測定の結果、単回投与、並びに 4 および 13 週間反復経口投与後に血糖値は速やかに低下することが確認された。特に、20 および 100 mg/kg の 4 および 13 週間反復経口投与後の血糖値は、インスリン投与時と同様に、ヒトおよびラットにおいて低血糖と判断される基準の一つである 50 mg/dL を下回る血糖値を示す個体がいたことから、TMG-123 の反復投与後に持続的な低血糖が引き起こされることが確認された。さらに、病理組織学的検査の結果、4 週間投与時の 100 mg/kg 投与群、並びに 13 週間投与時の 20 および 100 mg/kg 投与群において、散在性の精細管変性が精巣にみられ、その二次的な変化と考えられる精上皮細胞の剥離が精巣上体に観察さ

れた。さらに、回復期間終了後においても同様の所見がみられたことから、これら変化は回復性に乏しいと考えられた。また、精子検査において、精子形態異常発現率の高値並びに精子濃度および精子自動性指数の低値傾向が認められた。

精子形成は、グルコース代謝に大きく依存していることがよく知られており、雄性生殖細胞はグルコースをエネルギー源として使用する[Rato *et al.* 2012; Robinson and Fritz 1981; Boussouar and Benahmed 2004; Jutte *et al.* 1982; Bajpai *et al.* 1998; Jutte *et al.* 1981]。したがって、第1章および第2章でみられた精巣毒性は、血糖低下薬による直接的な毒性ではなく、低血糖に起因する二次的な毒性である可能性が考えられた。

第3章では、血糖低下薬を投与しても低血糖が起こらない条件において精巣毒性がみられるかを検討するために、糖尿病モデル動物であるGKラットにTMG-123を4週間反復投与して、精巣の病理組織学的検査を実施した。その結果、TMG-123の曝露は、第2章において正常ラットで低血糖および精巣毒性がみられた曝露と同程度であることが確認されたものの、低血糖を示す個体はみられなかった。また、病理組織学的検査の結果、精巣にTMG-123投与に起因した所見はみられなかった。これらのことから、血糖低下薬を反復投与しても低血糖が惹起されない条件では、血糖低下薬による精巣毒性はみられないことが確認された。

以上より、血糖低下薬を反復投与することにより、持続的な低血糖に起因する二次的な毒性として精巣毒性が惹起されることが示唆された。

医薬品の毒性評価においては、被験物質を哺乳動物に繰り返し投与した時に、明らかな毒性変化を惹起する用量とその変化の内容を評価することが求められており、臨床使用条件よりも高用量を投与して試験する必要がある。このため、治療用量では低血糖を引き起こさない医薬品でも、非

臨床毒性評価では高用量投与時に低血糖が発生する可能性がある。このような条件下において精巣毒性が起こった場合、それが被験物質による直接的な影響であるのか、二次的な影響であるのかを区別することは重要である。特に、精巣毒性は回復性が乏しいことが知られているため、精巣毒性の有無が医薬品の開発を続行するか中止するかという判断に大きく影響する。もし、ある医薬品の毒性試験において精巣毒性がみられたとしても、その毒性は低血糖に起因する二次的な毒性であり、血糖値をモニターすることにより臨床における毒性発現は回避可能であると示すことができれば、その医薬品の開発を続行できる可能性が高まり、有益な医薬品が世の中に出ることに繋がると考えられる。

当該研究が明らかとした持続的な低血糖により二次的な精巣毒性が発生するという研究成果は、医薬品の非臨床毒性試験において、その候補品の毒性ポテンシャルを正確に評価する上で考慮すべき重要な情報であると考えられる。

本論文の一部は以下に公表した。

1. Kobayashi, T., Shimomoto, T., Tamura A., Namekawa, J., Iijima T., Ochiai H. (2021): A novel glucokinase activator TMG-123 causes long-lasting hypoglycemia and impairs spermatogenesis irreversibly in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 46, 115-123.

DOI: 10.2131/jts.46.115

2. Kobayashi, T., Shimomoto, T., Namekawa, J., Kanou, M., Kato, H., Sakamoto, S., Iijima, T., Ochiai, H. (2021): Antidiabetic agent did not impair spermatogenesis in spontaneously hyperglycemic and diabetic rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 8, 97-101.

DOI: 10.2131/fts.8.97

謝辞

本稿作成に際し、懇篤なご指導、ご助言を賜りました、麻布大学生物科学総合研究所 落合秀治 教授に深甚の謝意を表します。また、論文をご精読いただきました栄養学研究室 勝俣昌也 教授および動物繁殖学研究室・動物資源育種学研究室 伊藤潤哉 教授に深謝致します。また、本研究の遂行にあたり、ご支援、ご配慮を賜りました帝人ファーマ株式会社 下元貴澄 博士および滑川淳一 博士をはじめとした安全性研究部の方々に深く感謝致します。加えて、TMG-123 の共同研究を行って下さった杏林製薬株式会社の松本千香江 氏に心から御礼申し上げます。

引用文献

- Allen, C.M., Lopes, F., Mitchell, R.T. and Spears, N. (2018): How does chemotherapy treatment damage the prepubertal testis? *Reproduction*, 156, R209-R233.
- Axelsson, J., Håkanson, R. and Hedenbro, J.L. (1987): Insulin-induced gastric ulcers in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.*, 22, 737-742.
- Bajpai, M., Gupta, G. and Setty, B.S. (1998): Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *Eur. J. Endocrinol.*, 138, 322-327.
- Bensoussan, K., Morales, C.R. and Hermo, L. (1998): Vitamin E deficiency causes incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rat. *J. Androl.*, 19, 266-288.
- Berthelier, C., Kergoat, M. and Portha, B. (1997): Lack of deterioration of insulin action with aging in the GK rat: a contrasted adaptation as compared with nondiabetic rats. *Metabolism*, 46, 890-896.
- Bieber, A.M., Marcon, L., Hales, B.F. and Robaire, B. (2006): Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *J. Androl.*, 27, 189-200.
- Bonds, D.E., Miller, M.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Byington, R.P., Cutler, J.A., Dudl, R.J., Ismail-Beigi, F., Kimel, A.R., Hoogwerf, B., Horowitz, K.R., Savage, P.J., Seaquist, E.R., Simmons, D.L., Sivitz,

W.I., Speril-Hillen, J.M. and Sweeney, M.E. (2010): The association between symptomatic, severe hypoglycaemia and mortality in type 2 diabetes: retrospective epidemiological analysis of the ACCORD study. *Br. Med. J.*, 340, b4909.

Borg, M.A., Sherwin, R.S., Borg, W.P., Tamborlane, W.V. and Shulman, G.I. (1997): Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *J. Clin. Invest.*, 99, 361-365.

Boussouar, F. and Benahmed, M. (2004): Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol. Metab.*, 15, 345-350.

Campion, S., Catlin, N., Heger, N., McDonnell, E.V., Pacheco, S.E., Saffarini, C., Sandrof, M.A. and Boekelheide, K. (2012) Male reprotoxicity and endocrine disruption. *Exp. Suppl.*, 101, 315-360.

Chatani, F. (2009): Drug-induced testicular toxicity. *Folia Pharmacologica Japonica*, 133, 82-86.

Cook, D., Brown, D., Alexander, R., March, R., Morgan, P., Satterthwaite, G. and Pangalos, M.N. (2014): Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 13, 419-431.

Cox, D.J., Gonder-Frederick, L., Antoun, B., Cryer, P.E. and Clarke, W.L. (1993): Perceived symptoms in the recognition of hypoglycemia. *Diabetes Care*, 16, 519-27.

Creasy, D.M. (2001): Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol. Pathol.*, 29, 64-76.

Cryer, P.E., Davis, S.N. and Shamon, H. (2003): Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care*, 26, 1902-12.

Dere, E., Anderson, L.M., Coulson, M., McIntyre, B.S., Boekelheide, K. and Chapin, R.E. (2013a): SOT symposium highlight: Translatable indicators of testicular toxicity: Inhibin B, microRNAs, and sperm signatures. *Toxicol. Sci.*, 136, 265-273.

Dere, E., Anderson, L.M., Hwang, K. and Boekelheide, K. (2013b): Biomarkers of chemotherapy-induced testicular damage. *Fertil. Steril.*, 100, 1192-1202.

Efanov, A.M., Barrett, D.G., Brenner, M.B., Briggs, S.L., Delaunois, A., Durbin, J.D., Giese, U., Guo, H., Radloff, M., Gil, G.S., Sewing, S., Wang, Y., Weichert, A., Zaliani, A. and Gromada, J. (2005): A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology*, 146, 696-701.

Erturk, E., Jaffe, C.A. and Barkan, A.L. (1998): Evaluation of the integrity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by insulin hypoglycemia test. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 2350-2354.

Food and Drug Administration (2018): Testicular toxicity: evaluation during drug development guidance for industry.

Ferre, T., Riu, E., Bosch, F. and Valera, A. (1996): Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J.*, 10, 1213-1218.

Greaves, P. (2007): Male Genital Tract, In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies*, pp.661-716, Elsevier.

Haschek, W.M. and Rousseaux, C.G. (1998): Male Reproductive System, In *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, pp.443-484, Academic Press, San Diego.

Hermansky, S.J., Neptun, D.A., Loughran, K.A. and Leung, H.W. (1995): Effects of polyethylene glycol 400 (PEG 400) following 13 weeks of gavage treatment in Fischer-344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 33, 139-149.

International Hypoglycaemia Study Group (2017): Glucose concentrations of less than 3.0 mmol/l (54 mg/dl) should be reported in clinical trials: a joint position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*, 60, 3-6.

Jensen, V.F.H., Mølck, A.M., Chapman, M., Alifrangis, L., Andersen, L., Lykkesfeldt, J. and Bøgh, I.B. (2017): Chronic Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia in Rats Is Accompanied by Increased Body Weight, Hyperleptinaemia, and Decreased Neuronal Glucose Transporter Levels in the Brain. *Int. J. Endocrinol.*, 2017, 7861236.

- Jensen, V.F.H., Mølck, A.M., Heydenreich, A., Jensen K.J., Bertelsen, L.O., Alifrangis, L., Andersen, L., Søbørg, H., Chapman, M., Lykkesfeldt, J. and Bøgh, I.B. (2016): Histopathological nerve and skeletal muscle changes in rats subjected to persistent insulin-induced hypoglycemia. *J. Toxicol. Pathol.*, 29, 17–30.
- Jutte, N.H., Grootegoed, J.A., Rommerts, F.F. and van der Molen H.J. (1981): Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J. Reprod. Fertil.*, 62, 399-405.
- Jutte, N.H., Jansen, R., Grootegoed, J.A., Rommerts, F.F., Clausen, O.P. and van der Molen, H.J. (1982): Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. *J. Reprod. Fertil.*, 65, 431-438.
- King, A.J. (2002): The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.*, 166, 877-894.
- Koyama, M., Wada, R., Sakuraba, H., Mizukami, H. and Yagihashi, S. (1998): Accelerated loss of islet beta cells in sucrose-fed Goto-Kakizaki rats, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Pathol.*, 153, 537-545.
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C., Levacher, C. and Habert, R. (2002): Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction*, 124, 173-180.
- Mancine, R.E., Penhos, J.C., Izquierdo, I.A. and Heinrich, J.J. (1960): Effects of acute hypoglycemia on rat testis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104, 699-702.

Mason, K.E., Burns, W.A. and Smith, J.C. Jr. (1982): Testicular damage associated with zinc deficiency in pre- and postpubertal rats: response to zinc repletion. *J. Nutr.*, 112, 1019-1028.

Massa, M.L., Gagliardino, J.J. and Francini, F. (2011): Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity. *IUBMB Life*, 63, 1-6.

Matschinsky, F.M. (1990): Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic betacells and hepatocytes. *Diabetes*, 39, 647-652.

Matschinsky, F.M. (2009): Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8, 399–416.

McNay E.C. and Sherwin R.S. (2004): Effect of recurrent hypoglycemia on spatial cognition and cognitive metabolism in normal and diabetic rats. *Diabetes*, 53, 418-425.

Merker, H.J. and Günther, T. (1997): Testis damage induced by zinc deficiency in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 11, 19-22.

Nolte, T., Harleman, J.H. and Jahn, W. (1995): Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 47, 267-286.

OECD. (2009): Guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests in rodents, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 106, ENV/JM/MONO(2009)11.

Pettersen, J.C., Litchfield, John., Neef, Natasha., Schmidt, S.P., Shirai, N., Walters, K.M., Enerson, B.E., Chatman, L.A. and Pfefferkorn, J.A. (2014): The relationship of glucokinase activator-induced hypoglycemia with arteriopathy, neuronal necrosis, and peripheral neuropathy in nonclinical studies. *Toxicol. Pathol.*, 42, 696-708.

Pozzessere, G., Valle, E., D'Alessio, C., Soldati, G., Pierelli, F., Leonetti, F., Foniciello, M. and Tamburrano, G. (1997): Effects of spontaneous chronic hypoglycemia on central and peripheral nervous system in insulinoma patients before and after surgery: a neurophysiological follow-up. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 1447-1451.

Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Duarte, A.I., Cavaco, J.E. and Oliveira, P.F. (2012): Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat. Rev. Urol.*, 9, 330-338.

Robaire, B., Smith, S. and Hales, B.F. (1984): Suppression of spermatogenesis by testosterone in adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol. Reprod.*, 31, 221-230.

Robinson, R. and Fritz, I.B. (1981): Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol. Reprod.*, 24, 1032-1041.

Rosenstock, J., Schwartz, S.L., Clark, C.M. Jr., Park, G.D., Donley, D.W. and Edwards, M.B. (2001): Basal insulin therapy in type 2 diabetes: 28-week comparison of insulin glargine (HOE 901) and NPH insulin. *Diabetes Care*, 24, 631-636.

Samadian, Z., Azar, J.T., Moshari, S., Razi, M. and Tofighi, A. (2019): Moderate-intensity Exercise Training in Sole and Simultaneous Forms with Insulin Ameliorates the Experimental Type 1 Diabetes-induced Intrinsic Apoptosis in Testicular Tissue. *Int. J. Sports Med.*, 40, 909-920.

Sasaki, J.C., Chapin, R.E., Hall, D.G., Breslin, W., Moffit, J., Saldutti, L., Enright, B., Seger, M., Jarvi, K., Hixon, M., Mitchard, T. and Kim, J.H. (2011): Incidence and nature of testicular toxicity findings in pharmaceutical development. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.*, 92, 511-525.

Schoeller, E.L., Albanna, G., Frolova, A.I. and Moley, K.H. (2012): Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in Akita diabetic mice and restores male fertility. *Diabetes*, 61, 1869–1878.

Sobhon, P., Mitranond, V., Tosukhowong, P. and Chindaduangrat, W. (1979): Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. II. Ultrastructural study of the seminiferous tubules. *Acta Anat.*, 103, 169-183.

- Sugiyama, Y., Odaka, H., Shimura, Y., Ikeda, H., Matsuo, T., Abe, S., Suzuki, K. and Goto, Y. (1989): Role of hepatic insulin sensitivity in development of hyperglycemia of spontaneously diabetic GK rats. *J. Jap. Diab. Soc.*, 32, 593-599.
- Takahashi, M. and Matsui, H. (1993): Mechanisms of testicular toxicity. *J. Toxicol. Pathol.*, 6, 161-174.
- Tourel, C., Bailbe, D., Lacorne, M., Meile, M.J., Kergoat, M. and Portha, B. (2002): Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes*, 51, 1443-1452.
- Tsumura, Y., Tsushima, Y., Tamura, A., Hasebe, M., Kanou, M., Kato, H. and Kobayashi, T. (2017): TMG-123, a novel glucokinase activator, exerts durable effects on hyperglycemia without increasing triglyceride in diabetic animal models. *PLoS One*, 12, e0172252.
- Ueda, Y., Tsuboi, M., Ota, Y., Makita, M., Aoshima, T., Nakajima, M. and Narama, I. (2011): Gastric mucosal changes induced by polyethylene glycol 400 administered by gavage in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 36, 811-815.
- Vakalopoulos, I., Dimou, P., Anagnostou, I. and Zeginiadou, T. (2015): Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. *Hormones (Athens)*, 14, 579-589.
- Wilson, J.E. (1995): Hexokinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 126, 65-198.

アストラゼネカ株式会社 (2020): フォシーガ, 医薬品インタビューフォーム (第 10 版).

ノバルティスファーマ株式会社 (2020): エクア, 医薬品インタビューフォーム (第 18 版).

ノボノルディスクファーマ株式会社 (2020): ノボリン, 医薬品インタビューフォーム (第 12 版).

厚生労働省 (2011): 重篤副作用疾患別対応マニュアル低血糖.

大日本住友製薬株式会社 (2020): メトグルコ, 医薬品インタビューフォーム (第 13 版).

日本製薬工業協会 (2018): てきすとぶっく 製薬産業 2018—2019.

要旨

医薬品開発では、臨床研究段階の前に実験動物を用いた非臨床試験を実施することにより、候補化合物の特性を評価する。非臨床試験の一つに毒性試験があり、標的となる臓器、用量相関性、変化と曝露の関係、変化の回復性などの毒性学的な兆候を明らかにする目的で実施される。毒性試験においてしばしばみられる毒性の一つに精巣毒性がある。精巣毒性についてより深い理解を得ることは医薬品の開発を助け、社会に有益であると考えられる。

精巣を構成する細胞の一つである生殖細胞はグルコースをエネルギー源として使用する。血液中のグルコース濃度が低下する低血糖が生殖細胞に及ぼす影響を評価した報告は過去に 1 報のみである。そこで、実験動物において低血糖が精巣に及ぼす影響を評価する必要があると考えられた。本研究では、低血糖による精巣への影響を検討するために、以下に示す第1～3章の実験を実施した。

第 1 章では、正常ラットにインスリンを投与することで低血糖を惹起し、その条件下で雄性生殖器への影響を評価した。その結果、インスリン投与後に、ヒトおよびラットにおいて低血糖と判断される基準の一つである 50 mg/dL を下回る血糖値を示す個体がみられ、持続的な低血糖が引き起こされることが確認された。また、病理組織学的検査の結果、インスリン投与群において精巣に散在性の精細管変性が認められ、同一個体の精巣上体の管腔内には精細管変性に関連すると考えられる精上皮細胞の剥離が認められた。さらに、精子検査の結果、400 IU/kg 投与群において精子濃度および精子形態異常総発現率はそれぞれ低値および高値を示した。

また、第 2 章では、第 1 章のインスリンとは異なるタイプの血糖低下薬である glucokinase 活性化剤 TMG-123 をラットに投与する複数の実験を行った。TMG-123 は肝作用優位型であり、膵臓の

インスリン分泌刺激ではなく、肝臓の糖取り込み増加によって耐糖能を改善すると報告されている。

まず、血糖値について、単回投与、並びに 4 および 13 週間反復投与後に速やかに低下することが確認された。特に、20 および 100 mg/kg の 4 および 13 週間反復投与後において、インスリン投与時と同様に、ヒトで低血糖と判断される基準の一つである 50 mg/dL を下回る血糖値を示す個体があったことから、TMG-123 の反復投与後に持続的な低血糖が引き起こされることが確認された。さらに、病理組織学的検査の結果、4 週間投与後の 100 mg/kg 投与群、並びに 13 週間投与後の 20 および 100 mg/kg 投与群において、精巣に散在性の精細管変性がみられ、その二次的な変化と考えられる精上皮細胞の剥離が精巣上体に観察された。さらに、回復期間終了後においても同様の所見がみられたことから、これら変化は回復性に乏しいと考えられた。また、精子検査において、精子形態異常発現率の高値並びに精子濃度および精子自動性指数の低値傾向が認められた。

精子形成は、グルコース代謝に大きく依存していることがよく知られており、雄性生殖細胞はグルコースをエネルギー源として使用する。したがって、第 1 章および第 2 章でみられた精巣毒性は、血糖低下薬による直接的な毒性ではなく、低血糖に起因した二次的な毒性である可能性が考えられた。

第 3 章では、血糖低下薬を反復投与しても低血糖が起こらない条件において精巣毒性がみられるかを検討するために、糖尿病モデル動物である Goto-Kakizaki ラット (GK ラット) に TMG-123 を 4 週間反復投与して、精巣の病理組織学的検査を実施した。その結果、TMG-123 の曝露は、第 2 章において正常ラットで低血糖および精巣毒性がみられた曝露と同程度であることが確認されたものの、低血糖を示す個体はみられなかった。また、病理組織学的検査の結果、精巣に TMG-123 投与に起因した所見はみられなかった。これらのことから、血糖低下薬を反復投与しても低血糖が惹起

されない条件では、血糖低下薬による精巣毒性はみられないことが確認され、第1章および第2章でみられた精巣毒性は血糖低下薬の直接的な影響ではなく、低血糖に起因する二次的な影響であるとの仮説が支持された。

本研究において、持続的な低血糖に起因する二次的な毒性として精巣毒性が惹起されることが示唆された。医薬品の毒性評価においては、被験物質を哺乳動物に繰り返し投与した時に、明らかな毒性変化を惹起する用量とその変化の内容を評価することが求められており、臨床使用条件よりも高用量を投与して試験する必要がある。このため、治療用量では低血糖を引き起こさない医薬品でも、非臨床毒性評価では高用量投与時に低血糖が発生する可能性がある。このような条件下において精巣毒性が起こった場合、それが被験物質による直接的な影響であるのか、二次的な影響であるのかを区別することは重要である。特に、精巣毒性は回復性が乏しいことが知られているため、毒性試験において精巣毒性がみられた場合、その医薬品の開発を続行するか中止するかという判断に大きく影響する。もし、精巣毒性は低血糖に起因する二次的な毒性であり、血糖値をモニターすることにより臨床における毒性発現は回避可能であると示すことができれば、その医薬品の開発を続行できる可能性が高まり、有益な医薬品が世の中に出ることに繋がりと考えられる。

当該研究が明らかとした持続的な低血糖により二次的な精巣毒性が発生するという研究成果は、医薬品の非臨床毒性試験において、その候補品の毒性ポテンシャルを正確に評価する上で考慮すべき重要な情報であると考えられる。

Abstract

In pharmaceutical development, the characteristics of candidate compounds are evaluated by conducting non-clinical studies using laboratory animals before the clinical research stage. Toxicity study is one of the non-clinical studies, which is conducted to clarify toxicological signs such as target organs, dose dependency, relationship between changes and exposures, and reversibility of changes. Testicular toxicity is one of the most common toxicities. Gaining a deeper understanding of testicular toxicity will help pharmaceutical development and be beneficial to society.

Germ cells use glucose as an energy source. There is only 1 report evaluating the effect of hypoglycemia, which lowers the glucose concentration in the blood, on germ cells. Therefore, it was considered necessary to evaluate the effect of hypoglycemia on the testis in laboratory animals. In this study, in order to investigate the effect of hypoglycemia on the testis, the experiments in the Chapters 1 to 3 shown below were carried out.

In the Chapter 1, insulin was administered to normal rats, and the effects on the male reproductive organs were evaluated. As a result, in some animals the blood glucose levels were lower than 50 mg/dL, which is one of the criteria judged to be hypoglycemia in human and rat, and therefore it was confirmed that long-lasting hypoglycemia was induced. In addition, as a result of histopathological examination, scattered seminiferous tubule degeneration was observed in the testes in insulin-treated groups, and in the same animals exfoliation of germ cells in the lumen of epididymides, which was considered to be related to tubule degeneration, was observed. Furthermore, as a result of sperm analysis, a decrease in the sperm concentration and an increase in the incidence of sperm malformation were observed in the 400 IU/kg group.

In the Chapter 2, multiple experiments in which normal rats were administered TMG-123 were conducted. TMG-123 is a glucokinase activator, which is an antidiabetic agent different from insulin used in the Chapter 1. TMG-123 is reported to affect on glucokinase mainly in liver and improve glucose tolerance by increasing hepatic glucose uptake rather than stimulating insulin secretion in the pancreas. First, it was confirmed that the blood glucose levels decreased rapidly after single administration and repeated administrations for 4 and 13 weeks. In particular, the blood glucose levels in some animals after repeated administration of 20 and 100 mg/kg for 4 and 13 weeks were below 50 mg/dL, which is one of the criteria judged to be hypoglycemia in human and rat, as in the case of insulin administration and therefore it was confirmed that long-lasting hypoglycemia was caused after repeated administration of TMG-123. Furthermore, as a result of histopathological examination, scattered seminiferous tubule degeneration was observed in the testes in the 100 mg/kg group after 4 weeks administration and the 20 and 100 mg/kg groups after 13 weeks administration. Exfoliation of germ cells in the lumen of epididymides, which was considered to be a secondary change, was also observed. Furthermore, similar findings were observed at the end of the recovery period, suggesting that these changes were poorly reversible. In addition, the sperm analysis showed an increase in the incidence of sperm malformation and decreases in the sperm concentration and the motility index.

It is well known that spermatogenesis is highly dependent on glucose metabolism and male germ cells use glucose as an energy source. Therefore, it is likely that the testicular toxicity observed in the Chapters 1 and 2 was secondary toxicity caused by hypoglycemia rather than direct toxicity from hypoglycemic drugs.

In the Chapter 3, in order to investigate whether testicular toxicity was observed under conditions where

hypoglycemia did not occur even when hypoglycemic drugs were repeatedly administered, TMG-123 was repeatedly administered to Goto-Kakizaki rats (GK rats), which are diabetic model animals, for 4 weeks and histopathological examination of testes were conducted. As a result, it was confirmed that the exposure of TMG-123 was similar to those that caused hypoglycemia and testicular toxicity in normal rats in the Chapter 2, but no individual showed hypoglycemia. In addition, as a result of histopathological examination, no findings due to administration of TMG-123 were found in the testis. Based on these findings, it was confirmed that testicular toxicity by the antidiabetic agent was not observed under the condition that hypoglycemia was not induced even after repeated administration of the antidiabetic agent. Therefore, the hypothesis that the testicular toxicity seen in the Chapters 1 and 2 was not a direct effect of hypoglycemic agents but a secondary effect due to hypoglycemia was supported.

In this study, it was suggested that testicular toxicity was induced as a secondary toxicity due to long-lasting hypoglycemia. In the toxicity evaluation of pharmaceutical products, it is required to evaluate the toxic changes and the dose level that causes the changes when a test article is repeatedly administered to mammals and higher doses than clinical uses should be administered in nonclinical studies. Therefore, there is a possibility that a drug causes hypoglycemia at high dose in nonclinical toxicity studies although the drug does not cause hypoglycemia at the therapeutic dose. When testicular toxicity occurs in such a condition, it is important to distinguish whether it is a direct effect or a secondary effect of the test article. In particular, testicular toxicity is known to be poorly reversible, and if testicular toxicity is observed in toxicity studies, it greatly affects the decision to continue or discontinue the development of pharmaceutical candidates. If it can be indicated that testicular toxicity is a secondary toxicity caused by hypoglycemia and the toxicity can be

avoided in clinical by monitoring blood glucose levels, it could be possible to continue the development of the pharmaceutical candidates, leading to the launch of beneficial medicines to the world.

The findings that long-lasting hypoglycemia causes testicular toxicity as a secondary toxicity in this study are believed important for accurately assessing the toxicity potential of pharmaceutical candidates in nonclinical toxicity studies.