

氏名(本籍)	小林大起(東京都)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第80号
学位授与年月日	令和3年9月30日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	糖尿病治療薬を用いた精巣毒性の機序検討
論文審査委員	(主査) 落合秀治 (副査) 勝俣昌也 伊藤潤哉

論文内容の要旨

背景

医薬品開発では、臨床研究段階の前に実験動物を用いた毒性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。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。

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。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少ない。そこで、実験動物における低血糖の精巣への影響を評価する必要があると考えられた。

第一章及び第二章では、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、異なるメカニズムを持つ2種類の血糖低下薬(インスリン及びglucokinase活性化剤TMG-123)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及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。さらに、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、第三章では、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、糖尿病モデル動物にTMG-123を反復投与して、血糖値測定及び精巣の病理組織学的検査を実施した。

第一章 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

【材料及び方法】

インスリンを雄性SDラットの各群20例に0(溶媒対照群)、100、200及び400 U/kg/日(5 mL/kg、1日2回約4時間間隔)の投与量で4週間反復皮下投与した。溶媒対照群には生理食塩液を投与した。

検査項目は、一般状態、体重、剖検、器官重量、病理組織学的検査、血糖値及び精子検査の算出とした。

【結果及び考察】

血糖値測定の結果、一般的にヒ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、インスリン投与群の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。精子検査の結果、400 U/kg 投与群において、精子濃度及び精子形態異常総発現率にそれぞれ低値及び高値傾向がみられた。

生殖細胞は、グルコース、及びセルトリ細胞によってグルコースから変換され供給されるラクトースを必要とすることが知られている。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、病理組織学的検査及び精子検査において変化がみられた可能性が考えられた。

第二章 正常ラットにおける glucokinase 活性化剤 TMG-123 投与に関する検討

【材料及び方法】

実験① (single dose study)

TMG-123 を雄性 SD ラットの各群 6 例に 0 (陰性対照群及び溶媒対照群)、5、20、100、200 及び 300 mg/kg/日 (10 mL/kg、1 日 1 回) の投与量で単回経口投与した。陰性対照群には注射用水、溶媒対照群にはポリエチレングリコール 400 とゲルシア 44/14 の容量比 3:2 での混合物を投与した。検査項目は、血糖値、血中インスリン濃度及び TMG-123 の血中曝露とした。

実験② (4-week repeated dose toxicity study)

TMG-123 を雄性 SD ラットの各群 10 例に 0 (陰性対照群及び溶媒対照群)、5、20 及び 100 mg/kg/日 (10 mL/kg、1 日 1 回) の投与量で 4 週間反復経口投与した。検査項目は、一般状態、体重、剖検、器官重量、病理組織学的検査及び TMG-123 の血中曝露とした。

実験③ (13-week repeated dose toxicity study)

TMG-123 を雄性 SD ラットの各群 8 例に 0 (陰性対照群及び溶媒対照群)、5、20 及び 100 mg/kg/日 (10 mL/kg、1 日 1 回) の投与量で 13 週間反復経口投与した。検査項目は、一般状態、体重、剖検、器官重量、病理組織学的検査、TMG-123 の血中曝露及び血糖値とした。さらに、投与後 8 週間休薬したときの回復性を評価した (溶媒対照群及び 100 mg/kg 群、6 例/群)。

実験④ (13-week repeated dose fertility study)

TMG-123 を雄性 SD ラットの各群 20 例に 0 (陰性対照群及び溶媒対照群)、5、20 及び 100 mg/kg/日 (10 mL/kg、1 日 1 回) の投与量で 13 週間反復経口投与した。検査項目は、精子検査とした。さらに、雄の投与 71 日以降に、同薬剤を同用量・用法にて 15 日以上投与した雌と 1 対 1 で最長 16 日間同居させ、交尾能と受胎能を検討した。

【結果】

実験①

単回投与後の血糖値は、いずれの TMG-123 投与群において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。単回投与後の血漿中 TMG-123 の AUC_{0-24h} 及び C_{max} は、100 mg/kg にて頭打ちであった。

実験②

血糖値測定の結果、被験物質投与群において用量の増加に応じた持続的な血糖値の低値を示した。血漿中 TMG-123 の AUC_{0-24h} 及び C_{max} は、用量の増加に伴って増加した。病理組織学的検査では、100 mg/kg 投与群において、精巣における散在性の精細管変性が観察され、それら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観察された。

実験③

血糖値測定の結果、被験物質投与群において用量の増加に応じた持続的な血糖値の低値を示した。血漿中 TMG-123 の AUC_{0-24h} 及び C_{max} は、用量の増加に伴って増加した。病理組織学的検査では、投与期間終了時の 20 mg/kg 及び 100 mg/kg 投与群において、精巣における散在性の精細管変性が観察され、それら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観察された。さらに、休薬期間終了時においても、精巣及び精巣上体に投与期間終了時と同様の所見が観察された。

実験④

100 mg/kg 群で精子形態異常発現率に高値が認められ、精子濃度及び精子自動性指数に低値傾向がみられた。一方、交尾能と受胎能については、いずれの被験物質投与群にも被験物質投与の影響は認められなかった。

【考察】

血糖値について、実験①の単回投与、実験②の 4 週間反復投与及び実験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 及び 100 mg/kg の 4 及び 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、精巣の病理組織学的変化及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。第一章及び第二章において、インスリン及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及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。

第三章 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

【材料及び方法】

TMG-123 を糖尿病モデルラットである Goto-Kakizaki (GK) ラットの各群 10 例 (雄性) に 0 (溶媒対照群)、12.5、25 及び 50 mg/kg/日 (10 mL/kg、1 日 1 回) の投与量で 4 週間反復経口投与した。検査項目は、血糖値、病理組織学的検査及び TMG-123 の血中曝露とした。

【結果及び考察】

TMG-123 の AUC_{0-24h} 及び C_{max} は、12.5 mg/kg から 50 mg/kg にかけて用量の増加に伴って増加した。GK ラットに TMG-123 50 mg/kg を投与した場合の AUC_{0-24h} は、第二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} と同程度であった。

投与 1 及び 28 日目の血糖値は、12.5 mg/kg から 50 mg/kg 投与群において用量の増加に応じた低下が認められた。25 及び 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、ヒトにおいて低血糖とされる基準の一つである 50 mg/dL 以下となる個体は認められなかった。

病理組織学的検査において、TMG-123 投与に起因した変化は認められなかった。

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。

総括及び結論

第一章及び第二章にて用いた 2 種類の血糖低下薬は、異なるメカニズムを持つものの、正常ラットに反復投与した両検討において持続的な血糖値低下及び精巣・精巣上体の病理組織学的変化がみられた。また、休薬期間終了時にも、同様の病理組織学的変化がみられた。さらに、精子検査における異常がみられた。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、雄性生殖細胞はその分化の各段階において、グルコースをエネルギー源として使用する。したがって、第一章及び第二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。

第三章では、上記の可能性をさらに検討するために、血糖低下薬を投与しても低血糖が起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 を反復投与した。その結果、TMG-123 の曝露は、第二章において正常ラットで低血糖及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、病理組織学的検査において、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、精巣毒性はみられないことが確認された。

以上より、ラットにおいて持続的な低血糖状態を惹起することにより、二次的な毒性として精巣毒性が引き起こされる可能性が示唆された。

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.
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.

論文審査の結果の要旨

1. 学術的背景

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数々の非臨床研究段階を通過しなければならない。実験動物を用いる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。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い。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。血液中のグルコース濃度が低下する低血糖は、特に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。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 報のみで詳細は不明である。このことから、低血糖条件下において、精巣への影響を評価することはきわめて貴重な情報を提供しうると考えた。

2. 論文の内容

第一章では、毒性試験において汎用される動物である正常な雄ラットを用いて、糖尿病治療薬であるインスリン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及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。

第二章ではインスリンと異なるメカニズムを持つ血糖低下薬（glucokinase 活性化剤 TMG-123）を

投与した際の血糖値を評価するとともに、同様に精巣の病理組織学的検査及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。

第一章、第二章で確認された散在性の精巣管変性と精巣上皮細胞の剥離などの精巣毒性は TMG-123 の直接的（一次的）な影響かそれとも低血糖による二次的な影響によるものかを検討するために、第三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、糖尿病モデル動物に TMG-123 を反復投与して、血糖値測定及び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、第二章において正常ラットで低血糖及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。さらに、病理組織学的検査において、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、第一章、第二章で確認された精巣毒性は無かったことが確認された。

3. 論文の審査

1) テーマの立て方

本研究では、毒性試験において汎用されるラットを用いて、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た。高血糖モデル動物である Goto-Kakizaki ラットを用いることで低血糖と精巣毒性の関係解明を試みた。

2) 研究の方法

第一章及び第二章にて用いた 2 種類の血糖低下薬は、異なるメカニズムを持つものの、正常ラットに反復投与した両検討において持続的な血糖値低下及び精巣・精巣上体の病理組織学的を行っている。休薬期間終了時にも、同様の病理組織学的変化がみられた。次に第一章及び第二章でみられた精巣毒性の原因を追究するための実験計画も適切に構成されていた。

3) 研究の結果

ラットにおいて持続的な低血糖状態を惹起することにより、二次的な毒性として精巣毒性が引き起こされる可能性が示唆された。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。本論文の実験結果は、適切に図表にまとめられており、統計学的な検定法も適切に適用されている。

4) 考察結論

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明らかにされた。

5) 参考文献

本論文におけるテーマの学問的背景や考察においても適切な文献が引用されていた。

4. 審査の結果

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。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、持続的な低血糖による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。本研究成果により、医薬品候補物質の毒性試験において精巣毒性がみられた場合でも、その毒性は物質そのものがもつ毒性ではなく、低血糖に起因する毒性である可能性もあり、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することができる。それにより医薬品候補物質の開発を続行できることにつながり、有益な医薬品が世の中に出ることの可能性を高めた。

本研究に関する主な成果の学術論文としての *J.Toxicol.Sci.* (2021) および *Fundam. Toxicol. Sci.* (2021) 誌に筆頭著者として受理されている。本論文の内容、専門分野および外国語の学力、また論文発表会における質疑応答に対する適切な回答等を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有すると認められる。さらに主査、副査による口頭試問（リモート）により、わずかに残っていた研究上の疑問点も解消された。以上のことから、本研究は動物応用科学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（学術）の学位を授与するに相応しいと判定した。