

第6回日本生殖発生毒性フォーラム案内（2）

初夏の候、益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

第6回日本生殖発生毒性フォーラムのご案内を下記の通りご連絡申し上げます。本年は、国立オリンピック記念青少年総合センターで開催することに決定いたしました。今回は「**雄性生殖毒性**」を企画しており、興味ある内容になると思います。また、同企業、同施設の方にもお知らせいただければ幸いです。なお、当フォーラムの参加には**事前登録**をお願いします。

当フォーラム翌日より開催される第64回日本先天異常学会学術集会（会期：2024年7月26～27日）もぜひご参加賜りますようお願い申し上げます。

敬具

記

名称： 第6回日本生殖発生毒性フォーラム

日時： 2024年7月25日（木）13時30分～17時00分（受付：13時10分～）

会場： 国立オリンピック記念青少年総合センター センター棟 310号室

東京都渋谷区代々木神園町3-1

参宮橋駅下車 徒歩約7分

アクセス:[国立オリンピック記念青少年総合センター \(niye.go.jp\)](http://niye.go.jp)

（第64回日本先天異常学会学術集会の会場とは異なりますのでご注意ください）

参加費： 2,000円

懇親会費： 5,500円

アクセス:[イルキャンティ代々木公園 | マップ \(chianti.co.jp\)](http://chianti.co.jp)

参加方法：参加をご希望の方は7月16日までに本案内をお送りしている担当者（日本生殖発生毒性フォーラム幹事）宛へ電子メールにて、①氏名、②企業名・団体名、③メールアドレス④「参加のみ」、「参加及び懇親会」あるいは「懇親会のみ」をお知らせ頂き、下記口座へ参加費及び懇親会費をまとめてのご入金をお願い致します。入金確認後、領収書をe-mailで発行致します。ご所属名でお振込みの際は、参加者お一人ごとに領収書を発行しますので、参加者全員の氏名及びメールアドレスのご連絡をお願いします。

急遽当日に参加をご希望される場合は受付にお申し付け下さい。

➤ 振込口座

➤ <ゆうちょ銀行からお振込みの場合>

記号 14030, 番号 56566431

名前：ニホンセイショクハッセイドクセイフォーラム

<他金融機関からのお振込みの場合>

店名 408, 店番 408, 普通, 口座番号 5656643

入金の際は下記の点にご注意いただきますよう、よろしくお願い致します。

*振込手数料はご負担ください。

*振込は個人名でお振込ください。

*ご所属名でお振込みの際は、担当幹事までメールでご氏名、ご所属、振込日、振込金額をご連絡下さい。

プログラム

1. 教育講演

(1) 「精巣」

茶谷 文雄 先生 (株式会社新日本科学)

(2) 「雄性生殖発生毒性評価における New Approach Methods (NAMs) の開発研究」

横田 理 先生 (国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)

2. 話題提供

(1) 「精巣器官培養系を用いた毒性評価への可能性」

中桐 英明 先生 (花王株式会社 安全性科学研究所)

気軽な服装でご参加下さい。なおフォーラム終了後、2時間程度の懇親会を予定しております。

以上

基礎教育講演 (1)

精巣

株式会社新日本科学

茶谷 文雄

哺乳類の精巣は雄の性腺であり（雌の性腺は卵巣）、機能として精子形成とホルモン合成の二つがあげられ、医薬品の精巣に関する安全性試験としては一般毒性試験と生殖毒性試験がある。一般毒性試験では交配成績や妊孕性（雌動物に胎児などを得る）は評価できず、生殖毒性試験では一般に病理組織検査を実施しないので精巣の形態変化は把握できない。精巣の毒性評価が一般的には容易ではないと考えられている理由としては、①精子形成細胞の形態（病理組織像）が多彩で変化が速い、②各種ホルモンの支配下にある、③若齢と成熟動物の齢により異なる組織像などがある。多くの動物種（ヒトやラットのみならず、犬、猫、馬、豚など）では精子形成は体温よりも数度低い温度が最適である。精巣の冷却の仕組みとしては、ラットでは、①精巣を入れる陰嚢が体外に位置する、②陰嚢の壁が薄い、③精巣表面を精巣動脈が蛇行、④動脈と静脈が蔓状で対向するなどによる。ラット精巣は、輪切り断面で約 700 本の精細管が見えるが、精祖細胞（精原細胞、spermatogonia）、精母細胞（spermatocytes）、円形精子細胞（round spermatids）、伸長精子細胞（elongated spermatids）、精子（spermatozoa, sperms）、セルトリ細胞（支持細胞）、ライディヒ細胞（間細胞）などから構成される。精巣の固定液としては、10%中性緩衝ホルマリン液に代わって 1990 年代からブアン液（ホルマリン：ピクリン酸液：酢酸）、改変ダビドソン液（ホルマリン：エタノール：酢酸）、FSA（ホルマリン：スクロース：酢酸）などが推奨されているが、ブアン液は免疫染色などの In Situ Hybridization には不向きなことがある。ラット精巣はステージングに注目した病理組織検査をすれば精子形成の全期間である 9 週間もの被験物質投与は不要であり 4 週間投与でいいこと、ステージングに着目した精巣の病理組織検査実施と生殖毒性試験の Segment II と III の投与期間が合体されることが規定された ICH S5 ガイドラインが 1993 年に公表された（日本国内では 1994 年）。1998 年には日本の製薬企業 28 社が共同で 24 被験物質の 2 週間投与でラット精巣の病理組織変化を調べた結果として 2 週間投与も承認された。精子形成はラットでは PAS-HE 染色で円形精子細胞を区別して 14 ステージであり、マウスとサルは 12 ステージ、イヌは 8 ステージに分類される。精巣毒性物質は多く、精細管を構成する各細胞に対する作用が異なり、精上皮の石灰沈着、セルトリ精細管、萎縮、多核巨細胞、核空胞化、好酸性物質沈着、精子遊離障害、精上皮脱落、細胞質空胞化、リン脂質症（間質）、ライディッヒ細胞消失、出血、精子肉芽腫などの病理組織写真を示したい。被験物質投与で精祖細胞が消失すれば長期間休薬しても回復性はない。最近では精巣の培養系が用いられ、培養液中のインヒビン濃度などがバイオマーカーとされている。精巣毒性評価用のカニクイザルは理想としては成熟動物として約 5 歳（体重約 5 kg、片側精巣は

オーキドメーター測定で8g) であるが、諸説ある。精巣毒性のまとめ評価としては、成熟度、固定方法、ステージング、メカニズム解析が重要である。

基礎教育講演 (2)

雄性生殖発生毒性評価における New Approach methods (NAMs) の開発研究

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

横田 理

医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン ICH S5 (R3) : 受胎能及び初期胚発生 (FEED) 試験において、HE 染色を用いた精巢の病理組織学的評価や精子の性状評価、受胎能評価により、次世代影響までを考慮した雄性生殖毒性評価を行うことが記載されています。しかし、現状のげっ歯類の精子性状評価と受胎能評価のみではヒトへの外挿性に課題が残されていることや、近年の多様化する創薬モダリティを考慮すると、現状の評価に加えて、雄性生殖を介した発生毒性リスク予測の迅速化・高精度化が急務の課題と感じています。

これらの課題に対応するため、より詳細な雄性生殖毒性評価として、例えば、従来の精巢の病理解析のみでは診断が難しいセルトリ細胞骨格や精子形成サイクルに着目した組織細胞生物学的評価、小動物用 MRI を用いた非侵襲的毒性評価、精子ゲノム解析の改良等が有用な手法として期待されます。将来的には、ヒト多能性幹細胞 (ヒト ES 細胞、iPS 細胞) から精巢オルガノイドの再構築に関する研究が進み、*in vitro* スクリーニング評価系の構築についても期待されますが、現段階の技術では精粗細胞への分化が限界であり、毒性評価に適用できる段階にはないと考えます。

前段階として、我々は、齧歯類の精巢組織片を用いた *in vitro* 評価系を毒性試験用に改良し、医薬品の開発スクリーニングに適用できないかと考え、現在実験を進めているところで。その内容についても一部紹介します。

本講演において、動物実験と動物代替の双方を組み合わせた雄性生殖発生毒性評価に関する New Approach methodology の開発研究について、レギュラトリーサイエンスに還元できるよう皆様と議論を交わし、意見の交換・情報の共有を行う場として本フォーラムを活用できればと考えております。

話題提供 (1)

精巣器官培養系を用いた毒性評価への可能性

花王株式会社 安全性科学研究所

中桐 英明

不妊症は世界的な社会問題となっており最近の研究では男性側に不妊症の原因があるケースは約 50%に及ぶという。男性不妊の主要な原因の一つとして造精障害があり、後天的要因として常習化した過度の飲酒や喫煙などの生活習慣や糖尿病などの疾患に加え、ケモセラピーや毒性物質等の曝露が含まれるが、これら障害の詳細な機序は明らかにはなっていない。

精子形成は精原細胞の連続的な増殖から始まり、精母細胞の減数分裂による染色体の組換え、精子細胞のダイナミックな形態変化そして核内タンパク質の変化などが続く。これらの過程は非常に複雑であるが精緻に制御されている。精子形成に関わる分子および細胞の役割を解明、あるいはその障害を理解するためには *in vitro* で精子形成を再現できるシステムを開発することが重要である。

近年、Sato らは古典的な気液界面法を原理とした精巣器官培養システム (TOCS) を用い、これまで長い間にわたり不可能であった *in vitro* における精子形成の再現に成功した。その後、TOCS の改良が進み様々な形態のものが報告される中、我々は近年開発されたシリコン樹脂で成形されたチップを用いた気液界面法を原理とした PC 法に注目した。一般的に *in vitro* の系では培養組織ごとに培地中の様々な物質の濃度や暴露時間を制御することが可能である。PC 法は上記に加え、長期間にわたって精子形成を維持することが可能であることから、培養組織を連続的かつ詳細に観察することに優れているといえる。特に毒性物質が精子形成に及ぼす影響を研究する場合、これらは利点となる。

これまでに PC 法に対して精子形成過程で GFP を発現する Acro3-EGFP マウスの精巣片を供することで、培養下の組織体積の変動のみならず GFP 発現を指標とした精子形成への影響を解析可能な系を確立するに至っている。

本話題提供では、PC 法が造精障害の検出および機序解明に向け有用なプラットフォームであることを示すため、造精障害を引き起こすことが知られるブスルファン (Bu) をモデルケースとして、経時的な組織観察および組織学的評価に加え、Bu の標的となる生殖細胞の挙動を解析した結果を紹介させていただく。