

ガルシニアの安全性に関する研究

—主成分ヒドロキシクエン酸のラットにおける精巣毒性に関する検討—

分担研究者 関田清司 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部室長

研究協力者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター

菅野 純, 内田雄幸, 小川幸男, 北嶋 聡 同 毒性部

本研究の目的は、報告者らがすでにラットで精巣毒性を見出したガルシニアパウダー（GP）に関して、その主成分であるヒドロキシクエン酸（HCA）投与による精巣毒性発現の有無とその毒性像を検討することにある。

その結果、HCA を 3.31%（GP5.0%相当）含む飼料を 4 週間投与したラットには明らかな精巣毒性が発生すること、変化は GP5%添加飼料を投与した群によるものと同質、同程度であることが明らかとなった。

A. 研究目的

最近、瘦身健康法の一つとして様々な「健康食品」が発売、消費されている。その「健康食品」のひとつであるガルシニアパウダー（GP）は、ガルシニア（*Garcinia Cambogia*）の乾燥果皮から水で抽出したエキスにカルシウムを加えて乾燥粉末化したもので、その主成分は（一）ヒドロキシクエン酸カルシウム（HCA）である。ガルシニアはもともとインドや東南アジアではカレーのスパイス、魚の漬け込み、ジャムなどに用いられ、長年にわたり食されてきた食品であるが、その主成分である HCA が糖質から脂肪を合成する生体内酵素である ATP クエン酸リアーゼ活性を抑制する作用を持ち、ヒトの体重減少や血中脂質改善に有効であることが報告されて脚光を浴びることとなった<sup>1,2)</sup>。

一方、GP の安全性については、長年、食品として食されてきた背景から問題はな

いものと考えられてきたが、報告者らが実施したラットによる GP(HCA66.2%含有)の 52 週間混餌投与毒性試験の結果から、GP5.0%添加飼料投与は精巣の萎縮、生殖細胞の消失などの精巣毒性を引起すことが見出された<sup>3)</sup>。さらに、その後の、GP の精巣毒性発現時期と初期像の捕捉を目的とした、1%および 5.0%添加飼料の 4 週間投与試験によっても、病理組織像として生殖細胞の剥離やセルトリ細胞の空胞変性が、また、セルソーターによる精巣の単離細胞の解析では総単離精巣細胞数の減少などが見出された<sup>4)</sup>。しかし、この GP 投与ラットに観察された精巣毒性が GP の主成分である HCA に起因するものか否かについては不明であった。

そこで本研究では、HCA 投与による精巣毒性発現の有無とその毒性像の検討を目的とし、ラットに GP 抽出の HCA および陽性対照物質として GP を 4 週間混餌投与

し、その精巢および精巢上体について、組織学的検査を行った。さらに、精巢については、より詳細な検索のために定量的ステージ分析、BrdU 免疫染色法による細胞動態解析ならびに電子顕微鏡検査も合わせて実施した。

## B. 研究方法

試験は、実行計画書（試験計画番号 C-01-010）に基づく、業務委託契約（試験契約書番号 01-契-166）により(財)食品医薬品安全性センター秦野研究所で実施した。

### 1. 被験物質

被験物質として、ガルシニア乾燥果皮より抽出した HCA ((-)-Hydroxycitric acid calcium salt、 $(C_6H_5O_8)_2Ca_3$ 、和光純薬株式会社、ロット番号：MLP9062、白色粉末、純度 99.5%) を、その陽性対照物質として GP（日本新薬株式会社、ヒドロキシクエン酸カルシウム塩 66.2% 含有、やや黄褐色を帯びる白色粉末、ロット番号：10.06.08-001）を用いた。

### 2. 動物

4 週齢の F344 系ラット雄 (F344/DuCrj、SPF、日本チャールス・リバー株式会社) 5 6 匹を購入後 7 日間検疫・馴化飼育した後、健康状態が良好で、検疫・馴化終了時体重および入荷時からの体重増加量が平均的な動物 50 匹を使用した。群分けは、検疫・馴化終了日の体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法により 5 群に分けた。実験開始時の平均体重は、97.2 g (90.6~103.6 g) であった。群構成を以下の表に示した。

動物は温度  $24 \pm 1^\circ C$ 、湿度 50~65%、換気回数約 15/時、照明 12 時間 (5~17 時点灯) に制御されたバリアーシステムの飼育室内で、ポリカーボネート製ケージ (350W×400D×180H mm) に、ケージ当たり 3 あるいは 4 匹ずつ収容し、ラット飼育用粉末飼料 (CRF-1：オリエンタル酵母工業) を基礎飼料として所定濃度の HCA あるいは GP を添加した飼料および水道水 (秦野市水道局給水) を自由に摂取させた。

群	飼料中の被験物濃度	GP 換算	匹数 (動物番号)
本試験 (精巢、精巢上体の組織学的検査、精巢の定量的ステージ分析)			
対照群	基礎飼料のみ	0 %	7 (1~7)
0.13%HCA 群	HCA : 0.13%	0.2%	7 (8~14)
0.66%HCA 群	HCA : 0.66%	1.0%	7 (15~21)
3.31%HCA 群	HCA : 3.31%	5.0%	7 (22~28)
陽性対照群	GP : 5.0 %	5.0%	7 (29~35)
サテライト (精巢の BrdU 免疫染色による細胞動態解析、電子顕微鏡検査)			
対照群	基礎飼料のみ	0 %	3 (36~38)
0.13%HCA 群	HCA : 0.13%	0.2%	3 (39~41)
0.66%HCA 群	HCA : 0.66%	1.0%	3 (42~44)

3. 31%HCA 群	HCA : 3. 31%	5. 0%	3 (45~47)
陽性対照群	GP : 5. 0 %	5. 0%	3 (48~50)

### 3. 投与飼料の調製

HCA および GP 添加粉末飼料の調製は国立医薬品食品衛生研究所で実施した。調製は、基礎飼料 (CRF-1) 中に設定濃度の HCA あるいは GP が均一に分布するよう、乳鉢と V 型飼料混合機(池田理化株式会社)を用いて行った。調製された飼料は秦野研究所に搬入後、使用時まで動物飼育室で遮光下に保管した。

### 4. 一般状態の観察、体重および摂餌量測定

一般状態の観察は投与期間を通じて全例を対象として1日に1回行った。体重測定は投与開始直前、以後週2回の頻度で全例について実施した。摂餌量は投与第 1~2 日、以降週2回の頻度で飼育ケージごとに測定し、計算により1日1匹当たりの摂餌量を求めた。

### 5. 病理組織学的検査

#### 1) 剖検および器官重量

本試験群の全例について投与観察期間終了時にペントバルビタールナトリウム麻酔下で、放血致死させた後、剖検の実施と精巣、精巣上体、副腎について、左右別に重量を測定した。また体重に対する比重量を算出した。

#### 2) 組織学的検査

器官重量を測定後、精巣および精巣上体についてはブアン液固定し、常法にしたがって、ヘマトキシリンエオジン染色標本 (HE) を作製した。この標本について光

学顕微鏡を用いて組織学的検査を行った。

#### 3) 定量的ステージ分析

精巣については、組織学的検査に加え、本試験群の全例について精子形成サイクルステージのグループ化による簡便的精巣毒性評価法<sup>5)</sup>による定量的ステージ分析を行った。すなわち、各精巣の精細管を4グループ (グループ1 : ステージ I~VI、グループ2 : ステージ VII~VIII、グループ3 : ステージ IX~XI、グループ4 : ステージ XII~XIV) に分け、各グループのセルトリ細胞数ならびにグループ1では精祖細胞、パキテン期精母細胞、精子細胞 (円形) を、グループ2では精祖細胞、プレプトテン期精母細胞、パキテン期精母細胞、精子細胞 (円形)、グループ3では精祖細胞、レプトテン期精母細胞、パキテン期精母細胞、グループ4では精祖細胞、サイゴテン期精母細胞、パキテン期精母細胞数を PAS 染色標本を用いて各グループに属する精細管を5本ずつ任意に選択して精上皮数をカウントし、グループ毎に1精細管当たりの生殖細胞数/セルトリ細胞数を算出することにより解析した。

#### 4) BrdU 免疫染色による細胞動態解析

サテライト群の各動物の精巣について実施した。精巣摘出の約1時間前にプロモデオキシウリジン (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU, Sigma Chemical Co., MO, U.S.A., 40 mg/kg、生理食塩水に溶解) を尾静脈投与し、ペントバルビタール

ナトリウム麻酔下で右側精巣を動静脈叢とともに結紮摘出した。この精巣を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン液で固定後、BrdU染色用パラフィン包埋標本作製した。BrdU免疫染色は、Cell proliferation Kit (RPN20, Amersham, U.K.)を用いた酵素抗体間接法で実施し、メチルグリーンでカウンターステインを施した。細胞動態の解析は精子形成サイクルステージVIII期の精細管について、1匹当たり5本を選抜し、精祖細胞とプレプトテン期精母細胞におけるBrdU標識率を算出することにより解析した。

#### 5) 電子顕微鏡検査

細胞動態解析に使用した動物の左側の精巣について実施した。動物は細胞動態解析用の右側精巣の摘出に引き続き、0.1Mスコリジン緩衝2%パラフォルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド混合固定液を用いて全身灌流固定した。その後、左側精巣を摘出し細切後、同緩衝2%四酸化オスミウムで後固定し、エタノール上昇系列により脱水した後、Quetol-651樹脂に包埋した。各動物の3ブロックから約1 $\mu$ mの厚切り切片を作製し、トルイジンブルー染色を行って光学顕微鏡で観察した。電子顕微鏡検査は、この観察を基に電子顕微鏡観察に適した部位をトリミングして超薄切片を作製後、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛重染色を施して日立H-7100形透過電子顕微鏡で観察した。

#### 6. 統計処理

体重、摂餌量、器官重量について、平均値、標準偏差を算出し、本試験各群の体重

および器官重量については多重比較により対照群に対する有意差検定を行った。すなわちBartlett法により分散の一様性を検定し、分散が一様の場合是一元配置型分散分析を実施し、その結果群間に有意差が認められた場合にはDunnett法による対照群と各群間の比較検定を行った。分散が一様でない場合にはKruskal-Wallisの方法により順位和検定を実施し、群間に有意差が認められた場合はDunnett法により対照群と各群間の比較を行い、有意水準は危険率5%以下とした。

病理組織学的所見については、グレード分けしたデータをMann-WhitneyのU検定により、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率法(片側)により検定し、有意水準は危険率5%以下とした。

定量的ステージ分析については対照群と各HCA投与群および陽性対照群間の比較をStudentのt検定で実施した。

### C. 研究結果

#### 1. 試験の経過

試験の信頼性に影響を及ぼすと考えられる予期せぬ事態の発生、試験計画書からの逸脱はなかった。

#### 2. 一般状態

本試験群およびサテライト群のいずれの群においても途中死亡例はなく、観察期間を通じ特記する一般状態の変化は認められなかった。

#### 3. 体重(図1、表1)

試験経過中、本試験およびサテライト群のいずれの群においても体重は漸増した。

本試験群では8～28日に陽性対照群の体重が対照群に比較して若干低値を示したが、有意差は認められなかった。サテライト群は、各測定時点で各HCA群および陽性対照群の体重が対照群に比べ若干低値を示した。

#### 4. 摂餌量および被験物質摂取量 (図1、表2-1表2-2)

1匹当たりの平均摂餌量は、投与期間中に多少の変動は見られたが各群とも増加傾向を示し、被験物質に起因すると考えられる変化は認められなかった。

本試験群における投与期間中に各群の動物が摂取したHCAの体重(kg)当たりの1日の平均摂取量(mg/kg/day)は0.13% HCA群で $117.7 \pm 4.0$ 、0.66% HCA群で $584.7 \pm 8.6$ 、3.31% HCA群で $2957.4 \pm 109.4$  および陽性対照群で $3069.67 \pm 67.6$ であった。

#### 5. 病理学組織学的検査

##### 1) 器官重量 (表3)

精巣では、実重量の有意な低値が3.31% HCA群および陽性対照群で認められた。精巣上体では、実重量および比重量の有意な低値が3.31% HCA群および陽性対照群で認められた。

##### 2) 肉眼所見

本試験およびサテライト群のいずれの動物においても、精巣および精巣上体に肉眼的変化は認められなかった。また、この他の器官でも特記するような変化は認められなかった。

##### 3) 組織学的所見 (表4、写真1-2)

精巣にはいずれの動物においても組織学的変化は指摘できなかった。精巣上体では、ごく少数の精巣上体管腔内細胞残屑が3.31% HCA群の7例中6例および陽性対照群の7例中4例に観察された。精巣上体管腔内精子量は対照群を含めいずれの動物においても中等度と判断された。

##### 4) 定量的ステージ分析 (表5)

セルトリ細胞当たりの各生殖細胞数をステージグループ間で比較すると、精祖細胞はグループ1においては対照群に比較して各HCA群でやや多く、陽性対照群では有意な増加が認められた。しかし、グループ2～4においては各HCA投与群および陽性対照群ともに対照群との間に差はなく、用量に従った一定の傾向も認められなかった。

精母細胞では、3.31% HCA群および陽性対照群のグループ1～4のパキテン期、グループ2のプレレプトテン期、グループ3のレプトテン期、グループ4のザイゴテン期においていずれも有意な減少が認められた。

精子細胞は、グループ1では対照群とHCA群および陽性対照群との間に差は認められなかったが、グループ2において3.31% HCA群および陽性対照群で対照群に比較して有意な減少が認められた。なお、計測した精細管断面当たりに観察されたセルトリ細胞数は、各投与群間およびステージグループ間でほとんど差は認められなかった。参考までにグループ1の精細管断面当たりの平均セルトリ細胞数を示すと、対照群で $31.8 \pm 2.7$ 、3.31% HCA群で $31.0$

±2.3 および陽性対照群で 31.6±2.7 であった。

#### 5) BrdU 免疫染色による細胞動態解析 (写真 3)

BrdU 免疫染色では、すべての群の精細管基底側に配列する円形あるいは楕円形の核を有する精祖細胞およびプレレプテン期精母細胞の核に、核全体あるいは核辺縁部に陽性反応が認められたが、染色態度あるいは陽性反応細胞の精細管内分布は対照群および各投与群間で差は認められなかった。このため BrdU 標識率算出を精子形成サイクルステージ VIII に分類される精細管 5 本における精祖細胞とプレレプテン期精母細胞の合計数に対する BrdU 陽性反応を示す精祖細胞およびプレレプテン期精母細胞の合計数の百分率により求めた。対照群の標識率は平均 97.6%、3.31% HCA 群では平均は 98.4% および陽性対照群では平均 98.5% と標識率に差は認められなかった。

#### 6) 電子顕微鏡検査所見 (写真 4~13)

##### (I) 厚切り切片トルイジンブルー染色による光学顕微鏡観察

対照群には精上皮細胞に若干の細胞外腔を認めるのみであったが (写真 4-A) 3.31% HCA 群および陽性対照群の全例の精子形成サイクルステージ XI の精細管では、精上皮の精細管基底側と管腔側の中間部の細胞間に空隙が多数認められた (写真 4-B, 4-C)。0.13% HCA 群および 0.66% HCA 群ではこのような空隙は認められなかった。

##### (II) 電子顕微鏡観察

上記変化を呈する部分を電子顕微鏡で観察すると、セルトリ細胞とセルトリ細胞あるいはセルトリ細胞と生殖細胞の間の細胞外腔 (ES) は拡張して空隙状を呈しており、セルトリ細胞膜には断裂するような不連続な部位が認められた (写真 5)。また、空隙には膜の崩壊物あるいは囊胞状の膜様構造物も認められた (写真 6)。この拡張した ES に隣接するセルトリ細胞には、細胞質内に拡張した滑面小胞体をやや多く有するものも認められたほか (写真 7)、拡張した ES に伸長精子細胞が露出し、精子細胞核が膨化あるいは変形するような変性性的変化を示す例も認められた (写真 8)。さらに、精細管基底部のセルトリ細胞の細胞質、すなわち核周囲細胞質においても、滑面小胞体と考えられる拡張した膜状構造物や壊死した伸長精子細胞と考えられる核遺残物も認められた (写真 9)。

精子形成サイクルステージ X~XI の精細管では、細胞外腔の拡張部と隣接するセルトリ細胞の細胞質にライソゾームの増生も認められた (写真 10)。一方、セルトリ細胞とセルトリ細胞間にある血液精巢関門を構成する ectoplasmic specialization と呼ばれる特殊装置に変化は認められなかった。

精子形成サイクルステージ I~III の精細管では、光学顕微鏡観察において伸長精子細胞の頭部が小型でやや円形を呈するものが散見され (写真 11)、電子顕微鏡観察的には、精子細胞核が伸長せずに楕円形にややクロマチン凝縮するか、あるいは核膜がくびれ状に変形する像を呈するものが認められた (写真 12)。

0.66% HCA 群では、1 例のごく少数の精細管において、セルトリ細胞の細胞質にライソゾームの軽微な増生が見られた以外に変化は認められなかった（写真 13）。対照群においては光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡観察で変化は認められなかった（写真 13）。

#### D. 考察

ラットに GP 抽出の HCA および陽性対照物質として GP を 4 週間混餌投与し、HCA 投与による精巣毒性発現の有無とその毒性像を検討した。

##### 1. HCA の精巣毒性発現の有無と GP により発現する精巣毒性との比較

精巣実重量および比重量の有意な低値が 3.31% HCA 群および陽性対照群に見られ、病理組織学検査ではごく少数の細胞残屑が 3.31% HCA 群の 7 例中 6 例、陽性対照群の 7 例中 4 例に観察された。

精巣では 3.31% HCA 群および陽性対照群ともに実重量の有意な低値が認められた。

セルトリ細胞当たりの各生殖細胞数を定量的ステージ分析により比較した結果では、3.31% HCA 群および陽性対照群では精祖細胞を除く生殖細胞の減少が認められた。

電子顕微鏡観察では、3.31% HCA 群および陽性対照群の同一ステージにセルトリ細胞とセルトリ細胞間の ES が拡張し、嚢胞状の膜様構造物が観察されたほか、セルトリ細胞膜の断裂や滑面小胞体の拡張、ライソゾームの増生、精子細胞の変性が認められる例があった。

これらの結果から、HCA は精巣毒性を引き起こすことが明らかとなった。また、3.31%

HCA 群および GP5% 添加飼料を投与した陽性対照群で観察された精巣および精巣上体の形態学的変化は、同質の変化であることが明らかとなった。従って、GP 投与により生じた精巣および精巣上体の変化は、その主成分である HCA に起因して生じた可能性が示唆された。

##### 2. HCA の精巣毒性発現用量

3.31% HCA 群での、HCA の 1 日平均摂取量 2957.4 mg/kg/day は精巣に毒性変化を引き起こす用量であり、また、0.66% HCA 群には、1 例にのみごく少数の精細管でセルトリ細胞細胞質にライソゾームの増生が認められたが、その変化の程度は軽微なものであったこと、このほかの関連ある検査では変化が認められなかったことなどを考慮し、0.66% HCA 群 (GP1.0% 添加飼料投与相当)、すなわち HCA の 1 日平均摂取量 584.7 mg/kg/day が精巣に対する影響を及ぼす可能性を否定した。

##### 3. 陽性対照群と概報の GP4 週間混餌投与試験<sup>4)</sup>との精巣毒性の比較

陽性対照群の GP の摂取量から換算した HCA の 1 日平均摂取量は 3069.9 mg/kg/day であった。これは先に報告者らが行った GP の 4 週間投与<sup>4)</sup>で GP5.0% 添加飼料投与群での HCA の 1 日平均摂取量 3082.9 mg/kg とほぼ同じであった。概報の 4 週間投与試験では、この用量で、精巣実重量と比重量の有意な低値、病理組織学的所見として生殖細胞の剥離、発育不全、セルトリ細胞の空胞変性などが認められた。今回、精巣実重量の有意な低値は認められ

たが、比重量の低値および HE 染色標本の光学顕微鏡下での組織学的変化は認められなかった。しかし、電子顕微鏡観察のために灌流固定した精巣より作製したトルイジンブルー染色標本の光学顕微鏡観察では、精細管中間部の細胞間に空隙や伸長精子細胞の変性が認められた。また、電子顕微鏡観察においてセルトリ細胞および精子細胞に変性性の変化が認められたことから、変化の程度はやや軽度なものの、今回の実験でも概報の実験と同質の変化が生じているものと推察された。

#### 4. HCA による精巣毒性発現機序

HCA および GP の 4 週間混餌投与により生じた精巣障害は、主としてセルトリ細胞の軽微な膜の変化および細胞外腔の拡張であった。生殖細胞に関しては、定量的ステージ分析において 3.31% HCA 群および陽性対照群ともにプレプトテン期精母細胞以降の生殖細胞に減少が認められたがステージ特異性は認められず、精細管当たりを観察されるセルトリ細胞数も各ステージでほぼ一定であった。

精祖細胞数は定量的ステージ分析結果においても減少はなく BrdU 免疫染色による細胞増殖活性低下も認められなかったことから、生殖細胞の減少が精祖細胞分裂阻害により生じた可能性はないものと考えられた。さらに、光学顕微鏡による生殖細胞の組織学的変化は認められず、超微形態的観察における生殖細胞の変化も伸長精子細胞に限定されていたことから、生殖細胞の減少が HCA の直接的作用で生じる可能性は低いものと考えられた。

従って今回の結果から、HCA3.31%添加

飼料および GP5.0%添加飼料の 4 週間混餌投与による精巣の初期変化はセルトリ細胞にまず発生し、その細胞膜に何らかの障害が生じ、その結果、二次的に伸長精子細胞の変性あるいは壊死性変化や生殖細胞の減少が惹起されたものと推察された。さらに長期投与の場合、これらの変化が持続することにより、生殖細胞の脱落が顕著となり、精巣上体管腔内の細胞残屑量が増加するものと推察された。

尚、GP の主成分である HCA が ATP クエン酸リアーゼ活性の抑制作用を持ち、糖から脂質の合成を阻害することが知られているが、この ATP クエン酸リアーゼ活性抑制作用と精巣あるいはセルトリ細胞膜障害との関連については不明である。

#### E. 結論

HCA3.31%添加飼料 (GP5.0%相当) を 4 週間投与したラット (HCA の平均 1 日摂取量 2957.4 mg/k g/day) には明らかな精巣毒性が発生すること、その変化および程度は GP5.0%添加飼料を投与した群による変化と同質、同程度であることが明らかとなった。このことから GP 投与による精巣毒性はその主成分である HCA により生じた可能性が示唆された。さらに、HCA0.66%添加飼料投与 (GP1.0% 相当)、すなわち HCA の 1 日平均摂取量 584.7 mg/kg/day は精巣への影響を及ぼさない量であると考えられた。なお、本研究の要約を資料 1 に付した。

#### F. 健康危険情報

ヒドロキシクエン酸カルシウムの大量投与 (1 日平均摂取量 2,957.4 mg/k g、4



週間)により、ラットで精巣毒性が発現することが明らかとなった。ヒトでの影響は不明である。

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案

なし。

##### 3. その他

なし。

#### 【参考文献】

- 1) Conte, AA: A non-prescription alternative in weight reduction therapy. Am J Bariatr Med. Summer: 17-19 1993.
- 2) Ramos RR, Saenz FJ, Alarcon A: Extract of *Garcinia cambogia* in the control of obesity. Invest Med Intern 22: 97-100 1996.
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験センター「F344 ラットによるガルシニアパウダーの1年間反復投与毒性試験法による長期投与効果(中間報告)」  
(<http://www.mhlw.go.jp/topics/2002/03/tp0304-1.html>)
- 4) 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験センター「ガルシニアパウダーによる F344 ラットの精巣毒性発生時期と初期像の捕捉 1 および 5%投与 2, 4 週および 4 週投与 2 週回復検査」

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/2002/03/tp0304-1.html>)

- 5) Matsui H, Toyoda K, Kawanishi T, Mitsumori K, Takahashi M, Fukuhara K, Miyata N: Direct toxic effects of Ethylene -1,2-Dimethanesulfonate (EDS) on the rat epididymis. J Toxicol Pathol 9:65-72 1996.

## 資料-1

### 要約

報告者らがすでにラットで精巣毒性を見出したガルシニアパウダー (GP) に関して、その主成分であるヒドロキシクエン酸 (HCA) の精巣毒性発現の有無と、その毒性像を検討する目的で、ラットに GP 抽出の HCA および GP を 4 週間反復投与する試験を実施した。試験では、5 週齢の F344 ラット雄 50 匹を 1 群 10 匹よりなる 5 群に分け、1 群には対照としてラット飼育用粉末飼料を、他の 3 群には HCA を 0.13、0.66、3.31% 混じた同飼料を、残りの 1 群には陽性対照として GP (HCA 66.2% 含有) を 5% 混じた同飼料をそれぞれ 4 週間自由に摂取させた。各群の 7 匹は本試験群として精巣の定量的ステージ分析を含む病理学的検査に供し、残りの 3 匹はサテライト群として精巣の電子顕微鏡検査および BrdU 免疫染色による細胞増殖活性解析に供した。

1. 一般状態、体重および摂餌量では、異常や群間に明らかな差は認められなかった。  
尚、3.31% HCA 群と陽性対照群の体重 (kg) 当たりの HCA の 1 日平均摂取量 (mg/kg/day) はそれぞれ  $2957.4 \pm 109.4$  と  $3069.9 \pm 67.6$  であった。
2. 器官重量では、精巣実重量の有意な低値と精巣上体の実重量および比重量の有意な低値が 3.31% HCA 群および陽性対照群で認められた。
3. 肉眼および組織学的所見では、何れの群でも精巣においては明らかな変化は認められなかった。しかし、精巣上体の組織学的検査においてはごく少数の精巣上体管腔内細胞残屑が 3.31% HCA 群の 6 例、陽性対照群の 4 例に認められた。
4. 定量的ステージ分析 (グループ 1 : ステージ I~VI、グループ 2 : VII~VIII、グループ 3 : IX~XI、グループ 4 : XII~XIV) では、3.31% HCA 群および陽性対照群のプレレプトテン期以降の精母細胞が有意な減少を示し、精子細胞についてはグループ 2 で 3.31% HCA 群および陽性対照群で有意な減少が認められた。また、精祖細胞数が各 HCA 投与群でやや多く、陽性対照群では有意な増加を示した。
5. BrdU 免疫染色による細胞増殖活性の解析では、精子形成サイクルステージ VIII 期の精細管の精祖細胞およびプレレプトテン期精母細胞に陽性反応が認められたが、対照群と 3.31% 群および陽性対照群間で標識率に差は認められなかった。
6. 電子顕微鏡観察のための樹脂包埋厚切り切片トルイジンブルー染色標本の光学顕微鏡観察で

は、3.31% HCA 群および陽性対照群ともに、精子形成サイクルステージ XI の精細管において精細管中間部の細胞間に空隙が多数認められた。

7. 電子顕微鏡観察では、3.31% HCA 群および陽性対照群のいずれの動物においても、精子形成サイクルステージ XI の精細管で、セルトリ細胞間の細胞外腔に拡張や嚢胞状膜様構造物が観察され、セルトリ細胞には膜の不連続部位、滑面小胞体の拡張やライソゾームの増生が、精子細胞の変性、伸長精子細胞の壊死とともに認められた。0.66% HCA 群では、1例のごく少数の精細管でセルトリ細胞の細胞質に軽微なライソゾームの増生が、その変化の程度は軽微なものであったこと、このほかの関連ある検査では変化が認められなかったことなどを考慮し、精巣に対する影響を及ぼす可能性を否定した。

以上の結果から、HCA を 3.31% 添加 (GP5.0% 相当) した飼料を 4 週間投与したラットには明らかな精巣毒性が発生すること、その変化および程度は GP 5% 添加投与群による変化と同質、同程度であることが明らかとなった。このことから、GP 投与による精巣毒性はその主成分である HCA により生じた可能性が示唆された。また、HCA の精巣毒性の初期変化はセルトリ細胞にまず発生し、二次的に生殖細胞に毒性影響を及ぼすものと考えられた。さらに、HCA 0.66% 添加飼料 (GP1.0% 相当) 投与、すなわち HCA の 1 日平均摂取量 584.7 mg/kg は精巣への影響を及ぼさない量であると考えられた。

表1 体重(g)  
本試験

Group Day	Vehicle control (7)	0.13% HCA (7)	0.66% HCA (7)	3.31% HCA (7)	Positive control (7)
1	99.7 ± 2.2	98.7 ± 2.5	98.0 ± 1.0	99.1 ± 2.1	98.4 ± 1.7
5	115.7 ± 6.9	119.6 ± 2.9	118.1 ± 1.6	116.8 ± 4.1	116.7 ± 3.2
8	131.0 ± 4.4	133.7 ± 4.7	132.4 ± 1.6	131.3 ± 4.4	128.5 ± 3.5
12	152.2 ± 4.1	154.1 ± 5.8	152.0 ± 3.2	151.8 ± 5.1	148.4 ± 3.6
15	166.7 ± 4.5	168.3 ± 6.2	167.2 ± 4.1	166.6 ± 6.3	166.6 ± 3.2
19	186.2 ± 4.8	188.8 ± 8.8	186.4 ± 5.0	188.3 ± 6.5	181.9 ± 4.8
22	197.4 ± 5.5	199.1 ± 9.4	199.0 ± 5.1	199.1 ± 6.7	192.9 ± 4.6
26	210.9 ± 7.3	212.6 ± 11.3	212.0 ± 4.9	213.7 ± 6.6	207.5 ± 4.6
28	220.1 ± 6.8	221.4 ± 11.0	220.4 ± 6.1	222.6 ± 6.6	214.1 ± 5.7

Parameter: Mean ± S.D. (g)  
( ): Number of animal

サテライト

Group Day	Vehicle control (3)	0.13% HCA (3)	0.66% HCA (3)	3.31% HCA (3)	Positive control (3)
1	93.9 ± 1.4	93.3 ± 2.6	92.6 ± 0.8	93.3 ± 1.1	93.8 ± 1.4
5	119.7 ± 2.2	119.3 ± 5.5	117.6 ± 1.5	117.2 ± 2.0	116.6 ± 1.1
8	135.6 ± 3.9	132.7 ± 5.7	131.6 ± 2.0	128.6 ± 1.6	130.1 ± 1.3
12	156.6 ± 5.3	153.4 ± 7.4	153.1 ± 3.5	148.8 ± 2.4	149.8 ± 1.0
15	171.9 ± 6.2	168.8 ± 5.9	168.3 ± 4.5	163.6 ± 1.6	165.2 ± 1.4
19	189.0 ± 6.0	187.5 ± 7.8	187.3 ± 4.8	183.3 ± 2.7	184.2 ± 1.1
22	202.8 ± 6.7	198.9 ± 8.7	200.0 ± 7.2	195.4 ± 2.6	198.0 ± 3.4
26	217.0 ± 6.5	211.6 ± 8.6	214.4 ± 6.5	208.8 ± 1.4	212.5 ± 4.6
28	221.4 ± 6.2	214.7 ± 8.7	217.8 ± 6.3	212.2 ± 2.3	218.0 ± 3.1

Parameter: Mean ± S.D. (g)  
( ): Number of animal

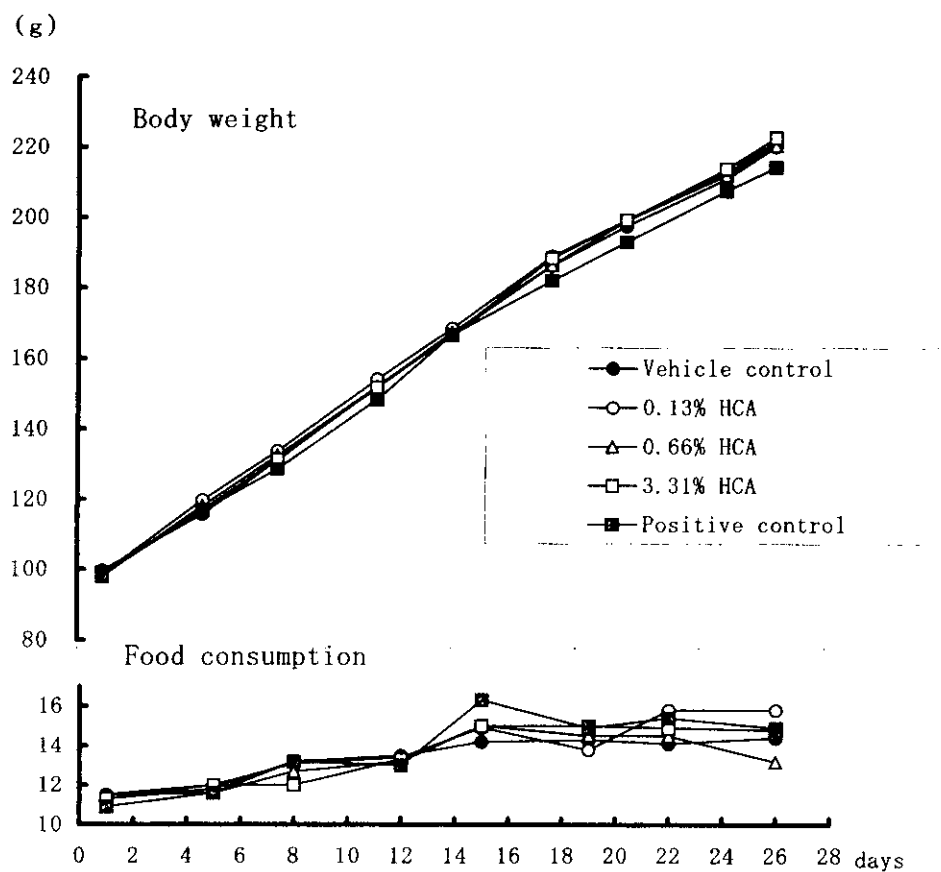


図 1 体重及び摂餌量(本試験群)

表 2-1 摂餌量(g/ラット/1日)

Group	Vehicle control	0.13% HCA	0.66% HCA	3.31% HCA	Positive control
Day	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)
1	11.3 ± 1.1	11.5 ± 0.5	11.5 ± 0.2	11.3 ± 0.1	10.9 ± 0.0
5	11.8 ± 0.9	12.0 ± 0.3	11.6 ± 0.2	12.0 ± 0.3	11.6 ± 0.3
8	13.2 ± 0.6	13.1 ± 0.3	12.7 ± 0.1	12.0 ± 0.2	13.2 ± 0.5
12	13.5 ± 0.4	13.4 ± 1.1	13.2 ± 1.5	13.3 ± 0.2	13.0 ± 0.8
15	14.2 ± 0.5	14.9 ± 0.5	15.0 ± 0.2	15.0 ± 0.6	16.3 ± 0.3
19	14.3 ± 1.1	13.8 ± 0.1	14.5 ± 1.2	15.0 ± 0.6	14.9 ± 0.4
22	14.1 ± 0.4	15.8 ± 1.0	14.5 ± 0.1	14.9 ± 0.4	15.4 ± 0.3
26	14.4 ± 0.6	15.8 ± 0.6	13.2 ± 1.6	14.8 ± 0.1	14.9 ± 0.9
Total	373.5 ± 10.9	386.2 ± 15.5	372.5 ± 2.8	378.0 ± 6.1	386.2 ± 1.7

Parameter: Mean ± S.D. (g)

( ): Number of animal

表 2-2 ヒドロキシクエン酸カルシウムの摂取量(mg/kg/日)

Group	Vehicle control	0.13% HCA	0.66% HCA	3.31% HCA	Positive control
Day	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)
1	—	151.3 ± 7.2	776.3 ± 17.6	3772.1 ± 89.6	3668.5 ± 61.4
5	—	130.7 ± 4.2	649.8 ± 14.1	3419.1 ± 184.4	3303.5 ± 135.8
8	—	127.1 ± 4.3	632.2 ± 8.8	3034.5 ± 94.7	3405.6 ± 131.7
12	—	112.6 ± 7.1	574.0 ± 73.1	2897.1 ± 111.0	2891.8 ± 186.6
15	—	115.3 ± 3.3	591.4 ± 17.4	2981.8 ± 191.6	3322.9 ± 81.5
19	—	95.5 ± 4.1	514.9 ± 38.8	2645.4 ± 145.3	2705.2 ± 111.1
22	—	103.3 ± 4.7	481.7 ± 14.2	2472.9 ± 127.0	2635.9 ± 85.8
26	—	96.8 ± 3.7	410.2 ± 46.4	2292.4 ± 69.3	2375.0 ± 146.3
Average		117.7 ± 4.0	584.7 ± 8.6	2957.4 ± 109.4	3069.9 ± 67.6

Parameter: Mean ± S.D. (mg/kg)

( ): Number of animal

表 3 器官重量

Organ	Group No. of animal	Vehicle control	0.13% HCA	0.66% HCA	3.31% HCA	Positive control
		7	7	7	7	7
<b>Absolute</b>						
Body weight (g)		207.0 ± 7.3	207.4 ± 10.1	206.4 ± 5.6	208.1 ± 6.6	201.1 ± 4.7
Testes (g)		2.72 ± 0.06	2.74 ± 0.07	2.72 ± 0.05	2.63 ± 0.07 *	2.63 ± 0.05 *
Testis, right		1.36 ± 0.03	1.35 ± 0.04	1.35 ± 0.03	1.29 ± 0.03 **	1.29 ± 0.03 **
Testis, left		1.36 ± 0.04	1.39 ± 0.04	1.37 ± 0.03	1.34 ± 0.05	1.34 ± 0.03
Epididymides (g)		0.45 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.41 ± 0.03 *	0.39 ± 0.02 **
Epididymis, right		0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.02 **	0.19 ± 0.01 **
Epididymis, left		0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02 *	0.20 ± 0.01 *
Adrenals (mg)		35.10 ± 1.50	35.80 ± 2.37	34.10 ± 2.70	32.70 ± 2.61	32.70 ± 2.40
Adrenal, right		17.00 ± 1.20	17.50 ± 1.24	16.40 ± 1.40	15.60 ± 1.78	15.50 ± 1.30
Adrenal, left		18.10 ± 1.00	18.30 ± 1.24	17.70 ± 1.70	17.10 ± 1.01	17.20 ± 1.20
<b>Relative</b>						
Testes (mg/g)		13.15 ± 0.69	13.22 ± 0.50	13.21 ± 0.49	12.63 ± 0.30	13.07 ± 0.44
Testis, right		6.56 ± 0.34	6.53 ± 0.24	6.56 ± 0.27	6.21 ± 0.13	6.40 ± 0.19
Testis, left		6.59 ± 0.37	6.69 ± 0.30	6.65 ± 0.25	6.42 ± 0.20	6.67 ± 0.28
Epididymides (mg/g)		2.19 ± 0.12	2.12 ± 0.09	2.18 ± 0.18	1.96 ± 0.13 **	1.96 ± 0.11 **
Epididymis, right		1.10 ± 0.06	1.05 ± 0.04	1.07 ± 0.09	0.97 ± 0.06 **	0.95 ± 0.05 **
Epididymis, left		1.10 ± 0.07	1.06 ± 0.05	1.11 ± 0.09	0.99 ± 0.07 *	1.00 ± 0.07
Adrenals (mg/g)		0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
Adrenal, right		0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Adrenal, left		0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.00

Parameter: Mean ± S.D.

\* : Significantly different from vehicle control, p<0.05 (by multiple comparisons)

\*\* : Significantly different from vehicle control, p<0.01 (by multiple comparisons)

表 4 病理組織学的検査(H-E標本)

Organ & Finding	Group	Vehicle control (7)	0.13% HCA (7)	0.66% HCA (7)	3.31% HCA (7)	Positive contro (7)
<b>Testis</b>						
No abnormalities						
<b>Epididymis</b>						
Sperm contents	++	7	7	7	7	7
Cell debris	±	0	0	0	6 **, ##	4 **, ##
	-	7	7	7	1	3

-, negative; ±, very slight; ++, moderate.

( ), number of animal examined.

\*\*, p<0.01 by Mann-Whitney's U-test; ##, p<0.01 by Fisher's exact probability test.

表 5 精細管におけるセルトリ細胞あたりの精細胞数

Stage group	Cell type	Vehicle control	0.13% HCA	0.66% HCA	3.31% HCA	Positive control
Group 1 (Stage I-VI)	G	0.66 ± 0.06	0.77 ± 0.22	0.77 ± 0.11	0.74 ± 0.11	0.78 ± 0.12 *
	P	1.90 ± 0.10	1.89 ± 0.13	1.89 ± 0.07	1.67 ± 0.15 **	1.71 ± 0.14 *
	T	6.36 ± 0.58	6.18 ± 0.43	6.33 ± 0.40	6.12 ± 0.63	6.31 ± 0.57
Group 2 (Stage VII-VIII)	G	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.04	0.05 ± 0.01
	R	1.78 ± 0.09	1.67 ± 0.15	1.71 ± 0.21	1.47 ± 0.10 **	1.41 ± 0.17 **
	P	2.27 ± 0.17	2.32 ± 0.17	2.30 ± 0.22	2.00 ± 0.11 **	1.93 ± 0.05 **
	T	7.09 ± 0.33	6.66 ± 0.41	6.59 ± 0.67	6.56 ± 0.44 *	6.34 ± 0.40 **
Group 3 (Stage IX-XI)	G	0.17 ± 0.07	0.13 ± 0.03	0.20 ± 0.12	0.18 ± 0.07	0.13 ± 0.04
	L	1.86 ± 0.10	1.90 ± 0.16	1.81 ± 0.32	1.54 ± 0.20 **	1.43 ± 0.17 **
	P	2.55 ± 0.18	2.44 ± 0.12	2.47 ± 0.23	2.22 ± 0.11 **	2.18 ± 0.09 **
Group 4 (Stage XII-XIV)	G	0.19 ± 0.06	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.09	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.03
	Z	1.93 ± 0.07	2.02 ± 0.12	1.95 ± 0.22	1.56 ± 0.10 **	1.53 ± 0.14 **
	P	2.55 ± 0.18	2.57 ± 0.20	2.59 ± 0.22	2.33 ± 0.18 *	2.29 ± 0.16 *

Each value represents mean ± SD for 7 animals.

G, spermatogonia; P, pachytene spermatocyte; R, preleptotene spermatocyte; Z, zygotene spermatocyte; L, leptotene spermatocyte; T, round spermatid.

\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; significant difference from control by unpaired t-test.



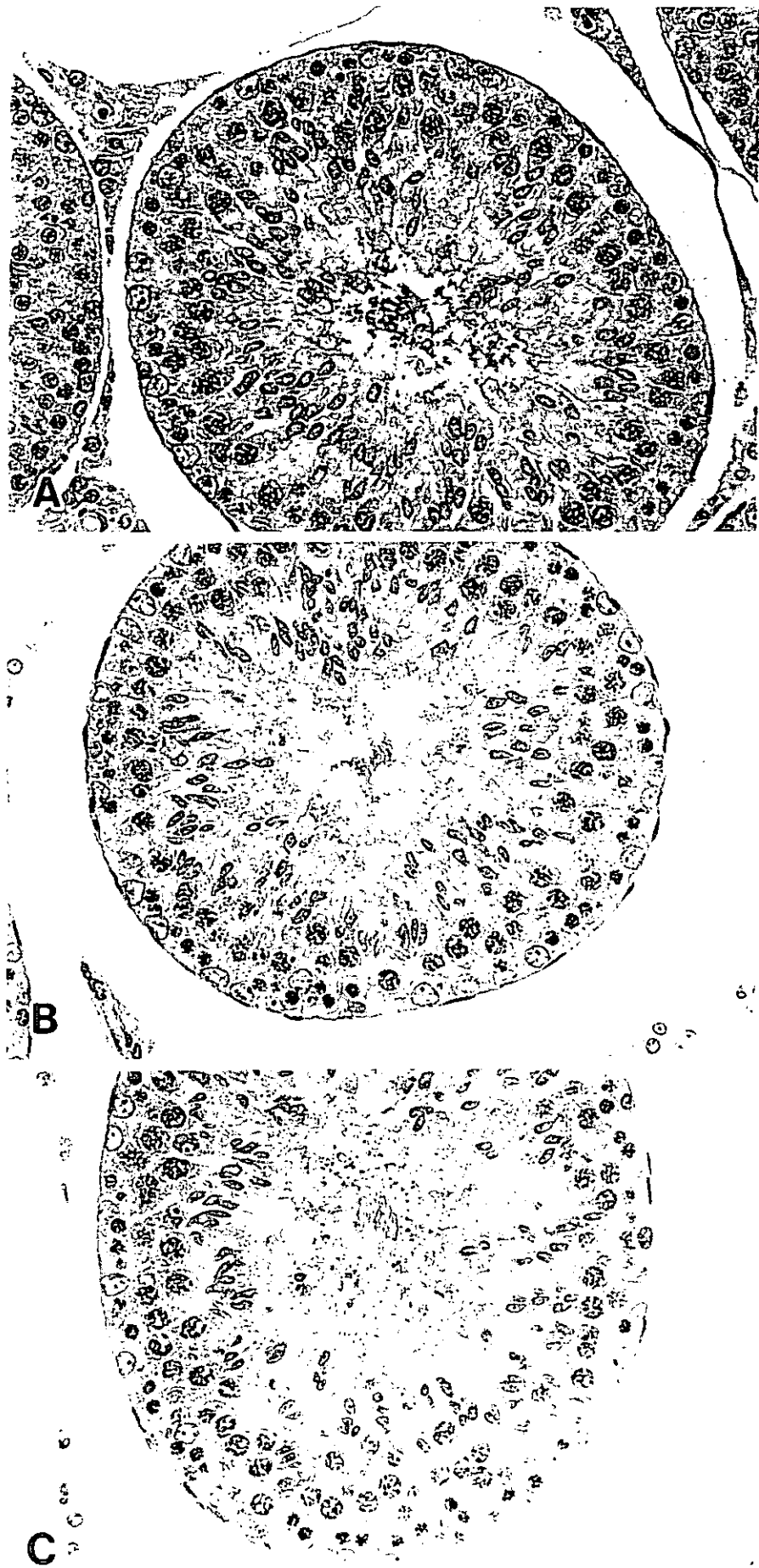


Photo 1. Light microscopic photographs of stage X seminiferous tubules showing no remarkable changes each animal. Hematoxylin-eosin stain, x 350.  
A: Control animal (basal diet).  
B: 3.31% HCA treated animal.  
C: Positive control animal (GP treated).



Photo 2. Light microscopic photographs of epididymides showing a small number of cell debris in the duct of epididymis. Hematoxylin-eosin stain, x 350.  
A: 3.31% HCA treated animal.  
B: Positive control animal.

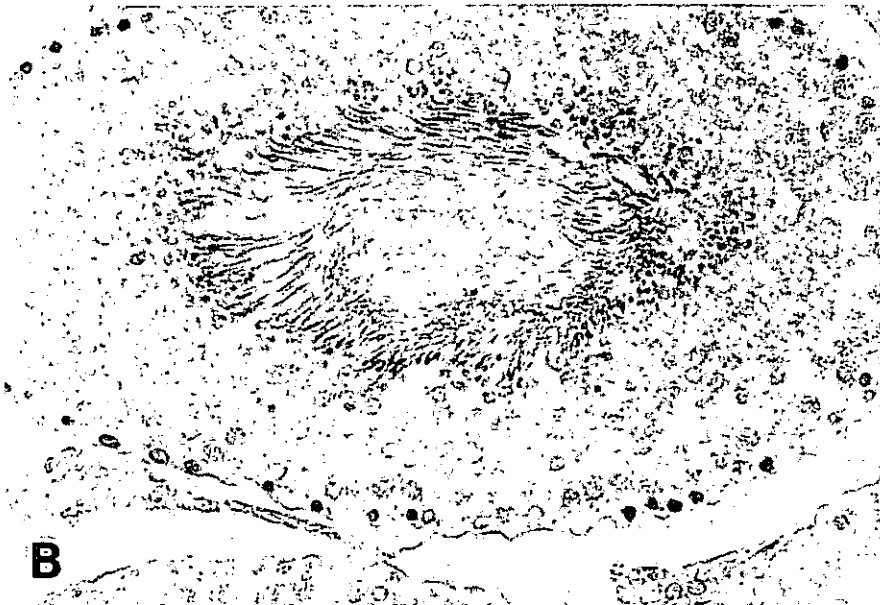
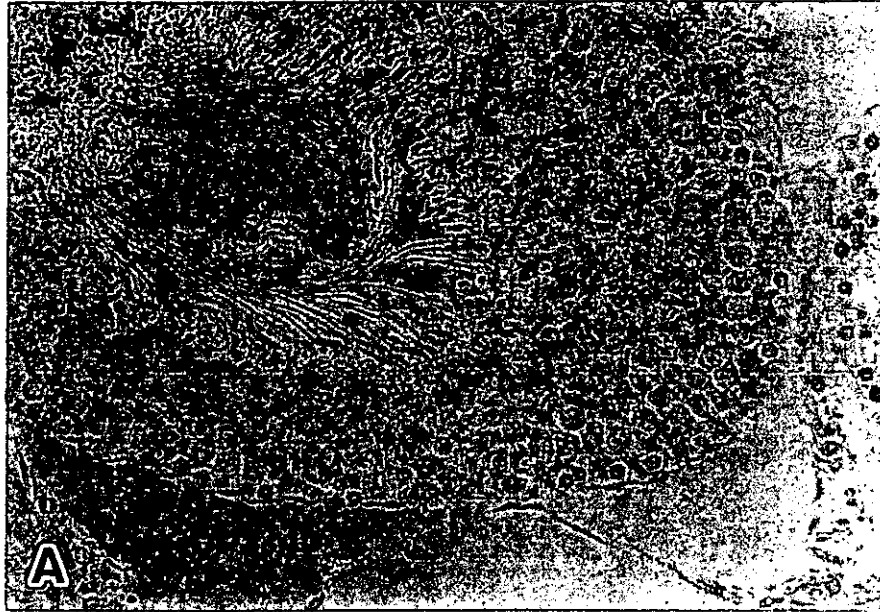


Photo 3. Light microscopic photographs of stage VIII seminiferous tubule. BrdU positive reaction is noted in spermatogonia and pre-leptotene spermatocyte of both groups. Immunohistochemical staining, x 350.

A: Control animal.

B: Positive control animal.

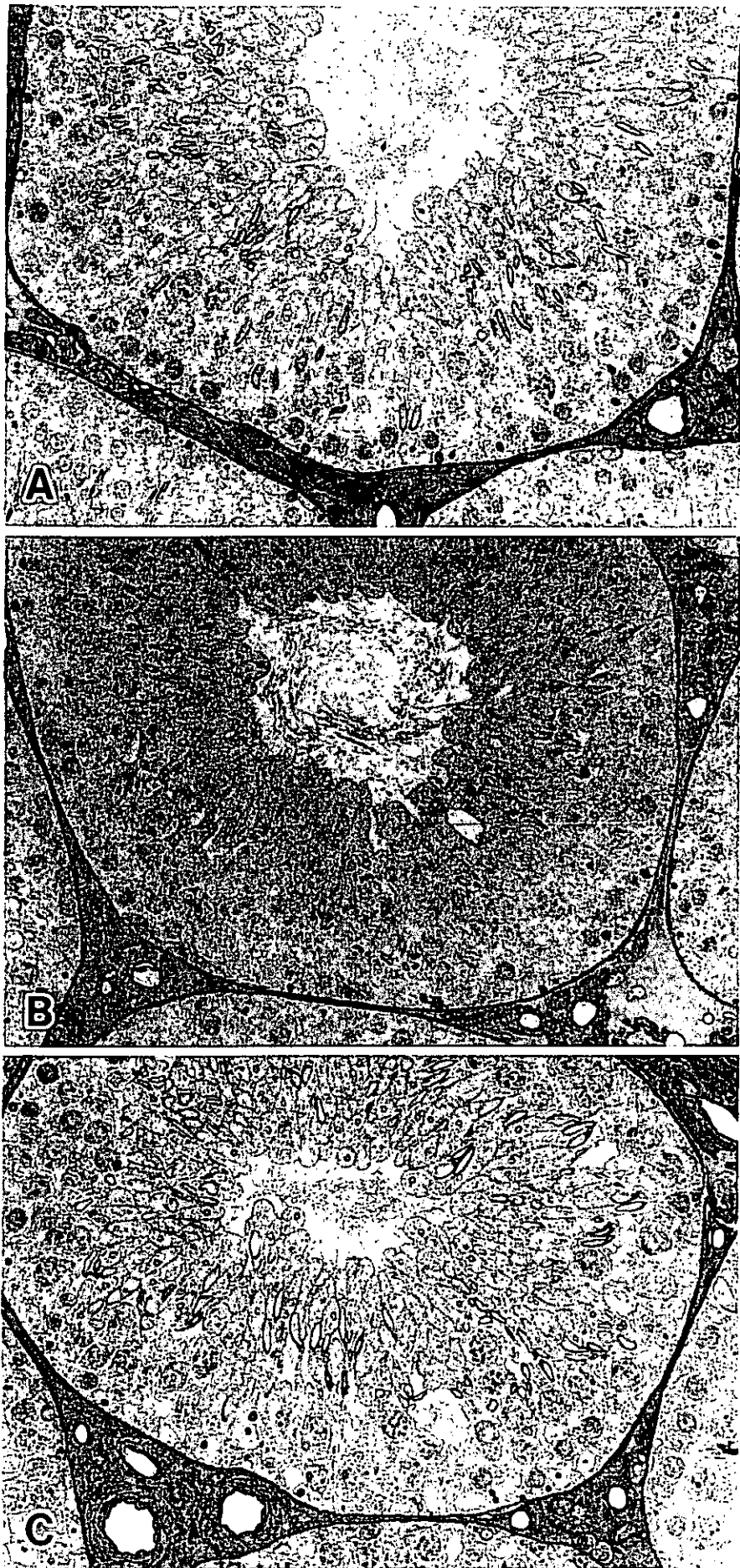


Photo 4. Light microscopic photographs of stage X seminiferous tubules.  
Semithin section, toluidine blue stain. x 175

A: Control animal. No remarkable changes in seminiferous tubule.

B: 3.31% HCA treated animal. Dilated extracellular spaces and/or vacuolar changes are observed in the midzone of the seminiferous epithelium.

C: Positive control animal. Dilated extracellular spaces and/or vacuolar changes are observed in the midzone of the seminiferous epithelium.