

## 第9回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

## 化学物質の毒性からみた原始卵胞

代田真理子

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所 毒性部毒性学第1研究室

原始卵胞は、卵母細胞を発育休止状態のまま卵巣に温存する貯蔵庫の役割を担っている。加齢動物の卵巣内に数えられる原始卵胞は、幼若期と比べると著しく減少するが、化学物質の中には、原始卵胞や発育を開始したばかりの卵胞を選択的に障害し、その数を減少させ、若齢で枯渇に導くものがある。発がん物質として知られている benzo [a] pyrene (BP) や、3-methylcholanthrene (3-MC), 7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA), あるいは、合成ゴムなどの製造過程で生じる 4-vinylcyclohexene (VCH) は、実験動物に対して、このような選択毒性を示す代表的な化学物質である<sup>1)</sup>。これらの化学物質は、いずれもマウスの卵巣に明瞭な毒性を示す一方で、ラットの卵巣に及ぼす影響は少ない。これらの化学物質に見られる毒性の種差や、毒性標的となる卵胞の選択性は、全てが理解されているわけではないが、Texas 大学の Hoyer と Sipes のグループは、VCH の卵巣毒性に関する研究を精力的に展開している。本セミナーでは、彼らの研究の中でも、生殖生物学では馴染みの少ない、「代謝と解毒」という観点から行われた研究を紹介し、さらに、BP や 3-MC と同様に aryl hydrocarbon 受容体 (AhR) のアゴニストであるコプラナー PCB の影響について、我々が麻布大学ハイテクリサーチプロジェクト研究で行っている研究の一部を紹介したい。

## VCH の卵巣毒性にみられる種差と肝臓による代謝活性化

VCH は反復投与によって、マウスの原始卵胞あるいは発育を開始したばかりの卵胞を障害するが、これをラットに長期間反復して投与してもマウスに見

られるような影響は認められない<sup>2)</sup>。体内に取り込まれた化学物質は、代謝を受けて化学構造が変化するが、元の物質より作用や毒性の強い代謝物に変化することがある。このような代謝物を活性代謝物といい、活性代謝物を生成する代謝酵素の分子種の違い、あるいは組織分布の違いが、毒性の種差や性差、あるいは組織選択性を生み出していることが多い、VCH も代謝を受けて活性代謝物に転換される。マウスの肝臓では、3種類の活性代謝物が生成されるが、それらのうちの 4-vinylcyclohexene-1,2-monoepoxide (1,2-VCME) と 4-vinylcyclohexene-7,8-monoepoxide (7,8-VCME) は中間代謝物で、最終的な活性代謝物は 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) である<sup>3)</sup>。これらの活性代謝物をラットとマウスに反復して投与すると、VCH より低い用量でマウスの卵胞を減少させるだけでなく、ラットの原始卵胞や発育を開始したばかりの卵胞も減少させることが明らかになり、活性代謝物、中でも VCD が最終的な毒性物質であると考えられている<sup>4)</sup>。VCH を投与したマウスの肝ミクロゾームは、VCH を基質として VCD を生成するが、ラットでは VCD は殆ど生成されてこないことから、ミクロゾームの代謝酵素による VCD 生成とその代謝の程度が種差の要因のひとつになっている<sup>5)</sup>。

## 卵胞の選択毒性と卵巣における代謝

原始卵胞や発育を開始したばかりの卵胞が選択的に障害を受ける理由はまだ解明されていない。透明帯や莖膜の有無といった形態学的特性やステロイドホルモン合成能の有無といった内分泌学的特性も要因としてあげられるが、卵胞の代謝能も、選択毒性に関与すると考えられている。化学物質の曝露を受

けると、活性代謝物を生成する酵素や、それをさらに無害な物質へと代謝する酵素が誘導されてくる。BPや3-MCを代謝活性化する酵素もそうであるが、VCHをVCDに転換する酵素も、肝臓だけでなく、卵巣にも誘導されてくる。VCHあるいはVCD投与を受けたマウスから採取した卵巣を酵素処理して、卵胞の大きさによって分画し、分画ごとに、VCHをVCDに転換する酵素のmRNAを定量すると、VCDの影響を受ける発育段階の卵胞が含まれる分画で発現が有意に上昇し、この段階の卵胞は、VCDを生成し易い可能性が示唆されている<sup>6)</sup>。VCDは、VCDのepoxide構造を水酸化するepoxide hydrolase (EH)によって解毒されると考えられている。VCHあるいはVCDの投与を受けたマウスの卵巣では、EHの活性もVCDの影響を受ける卵胞の分画で増強され、VCDの生成により解毒酵素も誘導されていることが伺われる<sup>7)</sup>。代謝活性化と解毒という観点からみると、VCDによる選択毒性は、卵胞の発育段階による、活性代謝物の生成量とその解毒とのバランスが関係すると考えられる。

コプラナーPCB (PCB 126) の経胎盤経乳汁曝露は出生児の原始卵胞に影響を及ぼすか？

BPや3-MCは、ダイオキシン類と同様にaryl hydrocarbon受容体(AhR)のアゴニストである。AhRにこれらのアゴニストが結合するとAhRは活性化され、CYP1A1を始めとする酸化酵素や、生成された代謝物をさらに代謝する酵素を誘導する。AhRのアゴニストである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)やPCB126は、BPや3-MCと同様にCYP1A1などの代謝酵素を誘導するが、TCDDやPCB126自身は代謝を受けにくい。BPも3-MCもDMBAも、VCHと同様にそれらの活性代謝物が原始卵胞を障害するが、AhRノックアウトマウスの卵巣における原始卵胞数は野生型より多いとの報告<sup>8)</sup>があり、AhR自身の活性化も原始卵胞に影響を及ぼす可能性が考えられる。PCB 126はAhRのアゴニストとしてAhRを活性化する。雌ラットに対し、PCB 126を妊娠前から妊娠期間中ならびに分娩後の哺育期間中に亘って毎日反復して経口投与すると、出生児の卵巣にはAhRによって誘導されるCYP1A1mRNAが増加し、卵胞の形成前から形成後、

少なくとも胞状卵胞に発育するまで、児の卵巣におけるAhRは活性化されていたと考えられる<sup>9)</sup>。このような処置を受けた動物では、春機発動が遅延し、初回排卵数が減少傾向を示し、大型の胞状卵胞で退行が顕著に認められる<sup>9)</sup>。それを裏付けるように、卵巣における遺伝子発現も、インヒビンの各サブユニットやFSH受容体など、発育卵胞の顆粒層細胞に発現するタンパク質のmRNAに減少が認められる<sup>10)</sup>。一方、卵母細胞に発現するc-kitやgrowth differentiation factor (GDF)-9, bone morphogenetic protein (BMP) -15のようなペプチドをコードするmRNA量には曝露の影響が認められなかった<sup>10)</sup>。反復投与より高い用量のPCB 126を妊娠15日に1回経口投与しても、出生児の卵巣に同様の影響が認められるが、卵巣内の原始卵胞あるいは発育を開始したばかりの卵胞を数えても曝露の影響は認められなかった(Sakurada et al. 未発表)。これらのことから、我々は、PCB 126の経胎盤および経乳汁曝露が原始卵胞に及ぼす影響は乏しく、影響があったとしても、個体差の中に含まれる程度であると考えている。

以上のように、化学物質の毒性から原始卵胞をみると、生殖生物学では「休止」に近い状態と考えられている卵胞にも、化学物質の代謝能を始めとして様々な能力が備わっていることが分かる。若齢での原始卵胞の枯渇は、生殖能力の早期減退だけでなく、最終的には内分泌によるホメオスタシスを攪乱し、女性の健康に悪影響を及ぼす可能性を有している。化学物質に内在するこのようリスクを見出し、管理することが求められるが、評価方法も含めて、原始卵胞を対象とした多角的な研究が望まれる。

#### 引用文献

- 1) Hoyer, B.P., Sipes, I.G.: Assessment of follicle destruction in chemical induced ovarian toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 307-331 (1996)
- 2) Collins, J. J., Montali, R. J., Manus, A. G.: Toxicological evaluation of 4-vinylcyclohexene. II. Induction of ovarian tumors in female B6C3F1 mice by chronic oral administration of 4-vinylcyclohexene. *J. Toxicol. Environ Health* 21: 507-524 (1987)
- 3) Smith, B. J., Mattison, D. R., Sipes, I. G.: The role of epoxidation in 4-vinylcyclohexene-induced ovarian toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 105: 372-381 (1990)

- 4) Smith, B. J., Carter, D. E., Sipes, I. G.: Comparison of the disposition and in vitro metabolism of 4-vinylcyclohexene in the female mouse and rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 105: 364-371 (1990)
- 5) Fontaine, S. M., Hoyer, P. B., Halpert, J. R., Sipes, I. G.: Role of induction of specific hepatic cytochrome P450 isoforms in epoxidation of 4-vinylcyclohexene. *Drug Metab Dispos* 29: 1236-1242 (2001)
- 6) Cannady, E. A., Dyer, C. A., Christian, P. J., Sipes, I. G., Hoyer, P. B.: Expression and activity of cytochromes P450 2E1, 2A, and 2B in the mouse ovary: the effect of 4-vinylcyclohexene and its diepoxide metabolite. *Toxicol. Sci.* 73: 423-430 (2003)
- 7) Cannady, E. A., Dyer, C. A., Christian, P. J., Sipes, I. G., Hoyer, P. B.: Expression and activity of microsomal epoxide hydrolase in follicles isolated from mouse ovaries. *Toxicol. Sci.* 68: 24-31 (2002)
- 8) Benedict, J.C., Lin, T.-M., Loeffler, I.K., Richard, E., Peterson, E., Flaw, J.A.; Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol. Sci.* 56: 382-388 (2002)
- 9) Shirota, M., Mukai, M., Sakurada, Y., Doyama, A., Inoue, K., Haishima, A., Akahori, F., Shirota, K.: Effects of Vertically Transferred 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB-126) on the Reproductive Development of Female Rats. *J. Reprod. Dev.* in press.
- 10) Sakurada, Y., Shirota, M., Mukai, M., Inoue, K., Akahori, F., Watanabe, G., Taya, K., Shirota, K.: Effects of vertically transferred 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on gene expression in the ovary of immature Sprague-Dawley rats. submitted