



ラット培養卵胞を用いた化合物の卵巣毒性評価に関する研究

稲田, 拓

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2012-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5638

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005638>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 稲田 拓

専攻・講座 資源生命科学専攻 応用動物学講座

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

ラット培養卵胞を用いた化合物の卵巣毒性評価に

関する研究

指導教員 宮野 隆

本研究では、医薬品の非臨床安全性試験に汎用されるラットを選択し、顆粒膜細胞、莢膜細胞および卵母細胞全てを含む卵胞を用いて、医薬品の卵巣に及ぼす影響を評価する試験系の確立を目指した。まず、ラット卵胞の培養法について検討した後、陽性対照化合物として Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) を用いた卵巣毒性評価を実施し、本評価法の有効性について検討した。次に、この試験系を用いて、ヒトに多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) 様の卵巣毒性を誘発することが知られているバルプロ酸ナトリウム (VPA) の卵巣毒性作用とそのメカニズムについて検討した。

1) ラット培養卵胞を用いた卵巣毒性評価法の検討

ラットの培養卵胞を用いた試験系を組み立てるにあたって、卵胞の単離に Collagenase 処理条件下または非処理条件下のどちらが適しているかを検討した。卵胞は、Collagenase 処理群、非処理群ともに培養時間の経過とともに発達したが、Collagenase 処理群における発達は、非処理群と比較して良好であった。Collagenase 非処理群では培養期間を通じて卵母細胞の卵胞からの排出は全く認められなかったのに対し、処理群では培養開始 24 時間後までに 40% の卵胞から卵母細胞が排出された。しかし、その後、新たな卵母細胞の卵胞からの排出は認められなかった。また、Collagenase 処理群では全ての卵胞において高い生存性が維持されたが、非処理群では卵胞の生存性の顕著な低下が認められた。これらの結果から、培養時間の経過とともに卵胞が発達し、培養 72 時間後まで卵胞の高い生存性が維持できる Collagenase 処理による卵胞単離法がラット卵胞の培養には有効と考えられた。また、Collagenase 処理により培養開始 24 時間後までに 40% の卵胞から卵母細胞が排出されたが、その後、新たな排出が認められなかったことから、前培養 24 時間後に卵胞を選別し、その後、被験物質を添加することにより、卵巣毒性評価が行えると考えられた。

Collagenase 処理によって単離したラットの卵胞を培養し、陽性対照化合物 MEHP の卵胞に及ぼす影響を調べた。MEHP 10, 30 および 100 $\mu\text{g/ml}$ の添加により、培養液中の Progesterone, Androstenedione, Testosterone および Estradiol 濃度の合計値が上昇した。この上昇は、MEHP が卵胞における Cholesterol の *de novo* 合成経路を含む Cholesterol から Progesterone への合成経路を活性化したことを示唆している。MEHP 10 および 30 $\mu\text{g/ml}$ の添加によって、Progesterone, Androstenedione, Testosterone および Estradiol 濃度はいずれも上昇した。一方、100 $\mu\text{g/ml}$ においては、Progesterone 濃度は上昇したが、Androstenedione, Testosterone および Estradiol 濃度は低下した。100 $\mu\text{g/ml}$ では、Progesterone / Androstenedione 比は顕著に上昇したことから、MEHP が Progesterone から Androstenedione への変換を阻害し、その結果、Androstenedione, Testosterone および Estradiol の濃度が低下したと考えられた。MEHP 100 $\mu\text{g/ml}$ では、ラット卵胞の生存性の低下と顆粒膜細胞のアポトーシスを伴う卵胞の発達抑制が認められたが、MEHP による Estradiol 濃度の顕著な低下が顆粒膜細胞のアポトーシスと

関連している可能性が考えられた。

2) ラット培養卵胞を用いた抗てんかん薬 VPA の卵巣毒性評価

ヒトに月経異常、高アンドロゲン血症、多嚢胞性卵巣や肥満など、PCOS に類似した副作用を誘発することが知られている VPA について、ラットの培養卵胞を用いて、卵胞発達およびステロイドホルモン合成に及ぼす影響を調べた。VPA (0.2, 1.0 および 5.0 mM) により、ラット卵胞培養液中の Progesterone, Androstenedione, Testosterone および Estradiol 濃度の合計値は低下した。この低下は、VPA が卵胞の Cholesterol の *de novo* 合成経路を含む Cholesterol から Progesterone への合成経路を阻害したことを示唆している。Estradiol 濃度は VPA の添加濃度に依存して低下したが、この変化は Testosterone / Estradiol 比の上昇を伴っていた。このことは、VPA が卵胞における Testosterone から Estradiol への変換を阻害したことを示唆している。対照群の卵胞では Aromatase は顆粒膜細胞に局限して発現していたが、全ての VPA 添加群で Aromatase 発現が抑制された。これらの結果より、VPA は顆粒膜細胞の Aromatase 発現抑制作用を介して Testosterone から Estradiol への変換を阻害していると考えられた。VPA 5.0 mM においては、Androstenedione, Testosterone および Estradiol 濃度の低下に加えて、Progesterone 濃度の顕著な上昇が認められた。この上昇は Progesterone / Androstenedione および Androstenedione / Testosterone 比の上昇を伴っていたことから、VPA は Progesterone から Androstenedione, Androstenedione から Testosterone への変換をともに阻害したと考えられた。VPA は添加濃度に依存して卵胞の発達を抑制し、また、5.0 mM における発達抑制は卵胞の生存性の低下を伴っていた。卵胞の発達抑制には Androstenedione および Testosterone 合成阻害作用が関連していると考えられた。また、VPA 5.0 mM における卵胞の生存性の低下には Estradiol 合成阻害による顆粒膜細胞のアポトーシスが関連していると考えられた。

Aromatase の発現および活性は Prostaglandin E₂ (PGE₂) によって制御される可能性があることから、ラット培養卵胞を用いて、VPA の PGE₂ 合成に及ぼす影響を検討した。また、PGE₂ の合成経路であるアラキドン酸カスケードに及ぼす VPA の影響を調べるため、Cyclooxygenase-1 (COX-1), Cyclooxygenase-2 (COX-2) および 5-Lipoxygenase (5-LO) 活性に及ぼす影響についても検討した。VPA (0.008, 0.04 および 0.2 mM) により、ラット卵胞培養液中の PGE₂ 濃度は添加濃度に依存して低下した。また、VPA は、5-LO を活性化したが、COX-1 および COX-2 には影響しなかった。これらのことから、VPA は、5-LO を活性化し、相対的に COX-1 および COX-2 を介して合成される PGE₂ 量を低下させることにより、顆粒膜細胞における Aromatase の発現や活性を低下させる可能性が考えられた。

以上の研究から、Collagenase 処理によって単離したラット卵胞を用いた卵巣毒性評価が可能であることがわかる。本試験系において陽性対照化合物 MEHP の影響を調べた結果、

MEHP は卵胞の生存性の低下と顆粒膜細胞のアポトーシスを伴う卵胞の発達抑制、Estradiol の合成阻害および Progesterone の合成亢進を引き起こすことが明らかとなった。また、抗てんかん薬 VPA の卵巣毒性作用を調べた結果、VPA は卵胞の生存性の低下を伴う卵胞の発達抑制および Aromatase 阻害作用に関連したステロイドホルモン合成異常を誘発し、その Aromatase 阻害メカニズムの 1 つとして、5-LO 活性化作用に起因した相対的な PGE₂ 合成阻害が関連している可能性が示唆された。

ラット培養卵胞を用いた評価では、医薬品や化学物質の卵巣毒性について、少量の化合物で、しかも短時間で、卵胞発達や病理組織学的検査を含む卵胞形態に及ぼす影響を評価できるばかりでなく、培養された卵胞には Cholesterol 合成から Estradiol 合成までの全ステロイドホルモン合成経路が含まれることから、動物個体を用いた場合の視床下部・下垂体・性腺軸におけるフィードバック機構による影響が存在しない条件下で、ステロイドホルモン合成に及ぼす影響を詳細に評価できることが明らかとなった。今後の医薬品開発において有用なツールとなり得ると考えられる。

氏名	稲 田 拓		
論文 題目	ラット培養卵胞を用いた化合物の卵巣毒性評価に関する研究		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	宮 野 隆
	副 査	教 授	三 宅 正 史
	副 査	教 授	星 信 彦
	副 査		
	副 査		
要 旨			
医薬品の安全性試験の一環として、ラットなどの実験動物に薬物を一定期間投与することによって、生殖機能に対する毒性が調べられる。本研究は、ラットの卵巣から採取した卵胞を培養し、薬物を培養液中に添加することによって薬物の卵巣に対する毒性作用を調べる評価系の確立を目指している。 第1章では、卵巣における卵胞の発達過程と卵胞によるステロイドホルモン合成について述べるとともに、医薬品の安全性試験における現行の卵巣毒性評価法を説明し、体外培養したラットの卵胞を用い、新規な卵巣毒性評価系を確立しようとする本研究の目的を述べている。 第2章では、ラット卵胞の培養系を組み立てるにあたって、卵胞の単離法について、顕微鏡下で直接卵胞を切り出す方法と、コラゲナーゼ処理後に卵胞を切り出して採取する方法を比較している。コラゲナーゼ処理によって単離した卵胞は、直接切り出した卵胞に比べて培養後高い生存性を維持し、培養時間の経過とともに発達すること、また、コラゲナーゼ処理によって採取した卵胞では培養24時間後までに、破損したと考えられる一部の卵胞から卵母細胞が排出されるが、その後、新たな排出が起こらないことを観察し、コラゲナーゼ処理によって採取した卵胞を24時間前培養した後に選別し、その後、培養液に被験薬物を添加することにより、卵胞に対する毒性評価が行えるとしている。 次いで、ラットへの投与実験でその前駆体である Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) が卵巣毒性を示し、培養細胞でステロイド合成に異常を引き起こすことが報告されているフタル酸の一種である Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) を陽性対照化合物として、ラット培養卵胞に及ぼす影響を検討し、この評価系の有効性を試験している。卵胞には卵巣のステロイドホルモン合成に関与する顆粒膜細胞と莖膜細胞(卵胞膜細胞)がともに含まれており、体内の卵巣と同様にコレステロールから Progesterone, Androstenedione, Testosterone および Estradiol に至るステロイドホルモンが合成される。MEHP (10, 30 および 100 µg/ml) を培養液に添加すると、培養液中の Progesterone, Androstenedione, Testosterone および Estradiol 濃度の合計値は上昇した。また、MEHP 10 および 30 µg/ml 添加によって、Progesterone, Androstenedione, Testosterone および Estradiol 濃度はいずれも上昇したが、100 µg/ml では、Progesterone 濃度は上昇したものの Androstenedione, Testosterone および Estradiol 濃度は低下した。これらのことから、MEHP は卵胞のコレステロールから Progesterone への合成経路を活性化すが、100 µg/ml ではこの作用に加え、Progesterone から Androstenedione への変換を阻害することを示唆している。また、高用量の MEHP に、卵胞の生存性の低下と、顆粒膜細胞のアポトーシスを伴う卵胞の発達抑制作用を認めている。以上の作用のうち顆粒膜細胞に対する影響や Estradiol の合成阻害は、ラットに MEHP 前駆体の DEHP を長期間投与した場合に、また Estradiol 合成阻害は培養顆粒膜細胞で誘起されることが報告されており、ラット培養卵胞を用いた評価系は、DEHP の活性代謝物である MEHP の卵巣毒性作用と同様に検出し得ること、さらにこれらの実験では認められていない Progesterone の合成亢進作用を検出したことから、ラット培養卵胞を用いた本評価系は、薬物の卵巣毒性評価系として有効であると結論づけている。 第3章では、ヒトに月経異常、高アンドロゲン血症、多嚢胞性卵巣や肥満などの多嚢胞性卵巣症候群様			

氏名	稲 田 拓
の卵巣毒性を副作用として誘発することが知られている抗てんかん薬、バルプロ酸ナトリウム (Sodium valproate : VPA) について、ラット培養卵胞を用いて、その発達およびステロイドホルモン合成に及ぼす影響を調べている。VPA (0.2, 1.0 および 5.0 mM) は、用量依存的に培養液中の Estradiol 濃度を低下させ、顆粒膜細胞に局在する Testosterone から Estradiol への変換酵素である Aromatase の発現を抑制した。また、5.0 mM においては、Progesterone から Androstenedione, Androstenedione から Testosterone への変換をとともに阻害し、Progesterone 濃度の顕著な上昇を引き起こした。さらに、VPA は添加濃度に依存して卵胞の発達を抑制し、5.0 mM では卵胞の生存性を低下させた。これらのことから、VPA は卵胞の生存性の低下を伴う卵胞の発達抑制と Aromatase 発現抑制を介した Estradiol 合成阻害などのステロイドホルモン合成異常を誘発することを明らかにしている。 次に、Aromatase の発現と活性が Prostaglandin E₂ (PGE₂) によって制御される可能性があることから、ラット培養卵胞を用いて、VPA の PGE₂ 合成に及ぼす影響と、PGE₂ の合成経路であるアラキドン酸カスケードの上流に位置する Cyclooxygenase-1 (COX-1), Cyclooxygenase-2 (COX-2) および 5-Lipoxygenase (5-LO) の活性に及ぼす影響を調べている。その結果、VPA (0.008, 0.04 および 0.2 mM) は、ラット卵胞培養液中の PGE₂ 濃度を用量依存的に低下させること、VPA は 5-LO を活性化すが、PGE₂ 合成経路の上流に位置する COX-1 と COX-2 には影響しないことを認め、VPA は 5-LO を活性化し、相対的に COX-1 と COX-2 を介して合成される PGE₂ 量が低下することによって、顆粒膜細胞における Aromatase の発現や活性が低下する可能性を示唆している。 第4章では、本研究の結果をまとめるとともに、ラット培養卵胞を用いた評価系を用いれば、少量の被検薬物で、短時間に、卵胞の発達や病理組織学的検査を含む卵胞の形態に及ぼす影響を評価できるほか、卵巣のステロイドホルモン合成に及ぼす影響を詳細に評価できると結論づけている。 以上のように、本研究は、体外培養したラット卵胞を用いた化合物の卵巣毒性評価系を開発するとともに、この系を用いて、陽性対照化合物としての MEHP と抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウムの卵巣毒性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。 よって、学位申請者の稲田拓は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。	