

201428022A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

受精卵培養液中のフタル酸類の
受精卵及び出生児に対する影響評価研究
(H26-化学-指定-002)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

平成 27(2015)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

受精卵培養液中のフタル酸類の受精卵及び出生児に対する
影響評価研究
(H26-化学-指定-002)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

平成 27(2015)年 3 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

受精卵培養液中のフタル酸類の受精卵及び出生児に対する
影響評価研究

(H26-化学-指定-002)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

平成 27(2015)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添 3)

受精卵培養液中のフタル酸類の受精卵及び出生児に対する影響評価研究 相崎 健一	1
---	-------	---

II. 分担研究報告書(別添 4)

1. Percellome トキシコゲノミクス技術を用いた分子機構解析研究 相崎 健一	39
2. 受精卵、胚、ES 細胞操作等、発生工学手法を用いた初期胚への in vitro 影響解析研究、及び ES/EpiS 比較解析研究 安彦 行人	47
3. 吸入暴露影響の情動認知行動解析と神経科学的物証の収集 種村 健太郎	77

III. 研究成果の刊行に関する一覧表(別添 5) 97

IV. 研究成果の刊行物・別刷(別添 6) 101

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

受精卵培養液中のフタル酸類の受精卵及び出生児に対する影響評価研究

(H26-化学-指定-002)

研究代表者 相崎 健一

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 第一室長

研究要旨

ヒト体外受精で用いられる培養液中から、正常妊娠の妊婦の血清中平均濃度の10倍以上のフタル酸類（DEHP及びMEHP）が検出されたため、受精卵及び出生児に及ぼす影響の評価に資する科学的情報を、マウスを用いた各種の実験により取得するための研究開発を行う。厳密で見落としの無い安全性評価に必要な科学的情報を得るために、本研究では特に①実験環境中に存在するフタル酸類の混入排除、②個体発生能のある体外受精由来の胚の安定取得、③微量サンプルからの網羅的且つ高精度の遺伝子発現及びDNAメチル化の定量解析、の達成に留意した。評価対象とする胚のステージは、実際のヒト生殖補助医療での普及状況と、DNA、RNAサンプルの収量に鑑み、受精後72時間の胚盤胞とした。

平成26年度は基盤となる実験プロトコルの最適化を集中的に行い、サンプルや実験環境中のDEHP、MEHPの高感度測定系を準備した上で、(i)マウス体外受精から胚盤胞までの培養条件の最適化、(ii)胚移植による個体の安定取得、(iii)微量サンプルからの高品質DNA、RNAの同時抽出法の最適化、(iv)微量サンプルの網羅的遺伝子発現のための定量プロトコル開発（Percellome法*の改良）、(v)微量サンプルのDNAメチル化解析を実現するPost-bisulfite adaptor-tagging(PBAT)法の導入と最適化、の研究を実施する一方、コントロール実験として、交配時のフタル酸類飲水投与による*in vivo*経胎盤初期胚暴露を実施し、その影響をマウスの情動認知行動解析（オープンフィールド試験、明暗往來試験、条件付け学習記憶試験）を含めて解析した。また暫定的な実験結果ながら、マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養（ヒト生殖補助医療で導入が始まっている卵子の体外成熟培養(IVM)を模した実験）の過程で、培養液へのMEHP添加(5 μ M)により、成熟率の低下と減数分裂時の紡錘体形成異常を検出した。

.....
(*） mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。特許第4415079号

研究分担者

安彦 行人 (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、主任研究官)

種村 健太郎 (東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野、教授)

研究協力者

河上 強志 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)

山本 雅也 (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、主任研究官)

A. 研究目的

体外受精操作中に用いる培養液に混入したフタル酸類 (DEHP及びMEHP) が、受精卵及び出生児に及ぼす影響の安全性評価に資する科学的情報を、マウスを用いた各種の実験により取得すると共に、それらの方法を基に初期胚の化学物質暴露に対する短期間且つ高感受性の安全性評価手法を開発する。

B. 研究方法

本研究に於いては、一般的な病理検査に加え、高感度系として情動認知行動試験や、フタル酸類が結合する核内受容体の存在が知られていることを踏まえた Percellome トキシコゲノミクス技術による網羅的遺伝子発現解析やエピゲノム解析を行う。

i) マウス体外受精および胚盤胞移植による個体取得

C57BL/6CrSlc 雌マウス(日本エスエル

シー) を過排卵処理 (妊馬血清性腺刺激ホルモン PMSG 5units/匹を腹腔内投与、48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン hCG 5units/匹を腹腔内投与) して得た未受精卵を、同系統の凍結精子を用いて体外受精させ、胚盤胞まで培養した。得られた胚盤胞を偽妊娠 MCH 雌マウスに移植し、自然分娩または帝王切開にて産仔を得た。

ii) マウス胚盤胞からの DNA、RNA 採取

胚盤胞から、Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) 或いは ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics) を用いて DNA 及び RNA を同時に採取した。得られた DNA、RNA は BioAnalyzer (Agilent Technology)、Qubit Fluorometer (Life Technologies)、Nanodrop (Thermo Scientific) を用いて収量および分解の程度を評価した。

iii) 微量サンプルへの Percellome 法適用

Percellome 法とは mRNA 発現値を細胞 1 個当たりのコピー数として絶対定量する技術 (特許第 4415079 号) であり、遺伝子発現を網羅的且つ高精度に解析するために必須の技術であるが、本研究での利用に際しては、細胞数にして 10^3 個オーダーの微量サンプルへの最適化が必要である。特にサンプルに含まれる細胞数を測定するためのプロトコルの調整を中心に、胚盤胞を 50~100 個プールしたサンプルでの最適化を行った。

iv) 微量サンプルからの GeneChip Expression Array 解析

Percellome 法を適用して調整したサンプル由来の微量 total RNA (Affymetrix 社 GeneChip 標準プロトコルの 1000 分の 1 程度の量である 5ng、20ng) を元に、Ovation RNA Amplification System V2 (NuGEN) を利用して cDNA 増幅を行い、GeneChip MouseGenome 430 2 (Affymetrix) による網羅的遺伝子発現解析を行った。得られたデータは Percellome 法により絶対量化し、既存のデータとの品質比較を実施した。

v) Post-bisulfite adaptor-tagging(PBAT)法の導入

DNA メチル化状態を厳密に評価するためには bisulfite 法による解析が必要だが、オリジナルプロトコルでは大量のゲノム DNA を必要とするため、受精卵や胚盤胞のような微量サンプルへの適用が難しかった。そこで近年、国際ヒトエピゲノムコンソーシアムで開発された改良法 Post-bisulfite adaptor-tagging(PBAT)法を導入し、同一の微量サンプルから Percellome 法による遺伝子発現解析と PBAT 法によるゲノム DNA メチル化解析を並行実施するためのプロトコル最適化を行った。

vi) 交配時の飲水投与による *in vivo* 経胎盤初期胚 DEHP、MEHP 暴露個体の取得、及び雄産仔マウスにおける情動認知行動解析

C57BL/6CrSlc マウスを DEHP 又は MEHP の飲水投与下で交配し、プラグ

チェックを行った。群構成は Vehicle 群、DEHP-L(2 μ M)群、DEHP-H(20 μ M)群、MEHP-L(5 μ M)群、MEHP-H(50 μ M)群の 5 群とした(カッコ内は飲水中の各物質添加濃度)。DEHP、MEHP の添加濃度は、マウスの 1 日飲水量を 1 匹あたり 3ml とし、100%が生体中に取り込まれると仮定して、各 L 群の体内濃度がヒト胚培養液で検出された最大値になるよう設定した。飲水投与は交配日の午後 5 時、交配開始と同時に開始し交尾後 4.5 日まで行った。DEHP、MEHP の血中濃度測定のため投与終了時に雄マウスから麻酔(アバチン腹腔内注射)下に採血した。

得られた産仔マウスを生後 12 週齢時にオープンフィールド試験、明暗往來試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験からなるバッテリー式行動解析に供した。

vii) マウス ES 細胞、EpiS 細胞の比較を行うための培養系確立

マウス ES 細胞は化学物質等の安全性評価においてヒト ES 細胞の代用として用いられることがあるが両者の間には発生ステージに差異があるとされ、化学物質に対する反応様態や感受性に差異があるのは、このためである可能性がある。ヒト ES 細胞と同様の発生ステージと考えられているのは、マウス EpiS 細胞(胚盤葉上層由来幹細胞)であり、この細胞と、より受精卵に近いと考えられるマウス ES 細胞との間で、DEHP や MEHP を含む化学物質に対す

る反応の差異を検討するため、同系統マウス由来の ES、EpiS 細胞を入手し培養系を確立する。

viii) マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養過程における MEHP 暴露影響

未受精卵母細胞については、4 週齢の C57BL/6CrSlc 雌マウスに PMSG(5IU) を腹腔内投与後、46 時間後に頸椎脱臼により安楽死させ卵巣を採取、37℃の操作培地(0.1% polyvinyl alcohol, 4mM hypoxanthine を含む Libovitz's L-15 培地)内で、26G 針付きシリンジで卵胞を裂き、卵丘細胞 - 卵母細胞複合体(COC)として採取した。COC を成熟培地(Waymouth+Hypoxanthine)のドロップ(100 μ l)に移し、さらに3つのドロップ間を移動させ洗浄した。を添加した各群の成熟培地(10 μ l)をセットしたハンギングドロップカルチャープレートの各穴に、ひとつずつ COC を入れ、カルチャープレートを逆さまにし、37℃インキュベーター内で18時間培養した。

培養後、卵丘細胞を除去し、卵母細胞を α -Tubulin 及び核相染色して、共焦点レーザー顕微鏡にて、紡錘体及び染色体(核)を観察した。

ix) 環境中フタル酸類の除去(実験器具、容器の前処理)

本研究では高感度測定を行うために、環境中フタル酸類の混入を極力排除した。特に容器や器具は原則的にガラス製、金属製のものをを用い、事前に 250℃で16時間加熱して、フタル酸類を除去し

た。血液など液体の採取や保存に際しては、フタル酸類除去済みのガラス容器を用いる上、さらに蓋と容器の間にガスケットとしてフタル酸類除去済みテフロンシートを挟み封するなど、細心の注意を払った。

x) DEHP、MEHP の濃度測定

DEHP、MEHP は親水性が低く、微量の場合、培地やマウス飲水への精密な添加が難しいため、実際の暴露量の確認が不可欠である。またフタル酸類は生活・実験環境中に大量に存在するため、混入否定若しくはバックグラウンドレベルの把握のための測定を適宜行う。

DEHP、MEHP の測定は、河上強志博士(国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)に依頼し、GC/MS/MS(GS: TraceGC, MS/MS: Quantum XLS, Thermo Scientific)を用いて検出下限 2.53e-2 μ M (DEHP)、7.69e-3 μ M (MEHP)にて測定する。

倫理面への配慮

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成19年4月版)及び国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子組換え実験安全管理規則の承認を受けて行う。)

C. 研究結果

i) マウス体外受精および胚盤胞移植による 個体取得

まず人工受精した受精卵から安定して胚盤胞を得るために培養条件等のプロトコルを最適化した結果、人工受精胚が胚盤胞まで発生する率は 60%を達成した。

当初、1細胞期・2細胞期での子宮移植では、移植数の 20%-50%の産仔が自然分娩で得られるが、同様の培養条件や飼育環境において、胚盤胞での胚の子宮移植では自然分娩による産仔がほとんど得られなかった。そこで培養条件や飼育環境を見直し、受精後 72 時間の胚(胚盤胞)を交尾後 2.5 日の偽妊娠雌マウスに 1 腹 16-18 個移植し、出生予定日に帝王切開することで移植胚数の約 25%の仔マウスを安定して得られるようになった。この改善は発育数が少ないことによる分娩困難、及び産仔数が少ないことによる食殺、を回避したことによると考えられた。

ii) マウス胚盤胞からの DNA、RNA 採取

受精後 72 時間の胚盤胞、約 60 個のプールサンプルから、最大 15ng の DNA を採取することができたが破碎液中の DNA 濃度は少なく、Percellome 標準法で細胞数を推定するための、Picogreen による DNA 含量測定プロトコルの定量限界以下であった。また RNA 収量も Nanodrop、Qbit といった計測機器の検出限界以下であった。ただし BioAnalyzer による電気泳動では、DNA・RNA とも分解像は確認されず品

質は良好であったため、多数の胚盤胞を用意すれば問題なく遺伝子発現解析や DNA メチル化解析を進められるものと判断された。

iii) 微量サンプルへの Percellome 法適用

実際には胚盤胞の大量生産は難しいため、Percellome 法を一部調整し、微量サンプルに最適化する必要がある。とりわけ 60~120 個の胚盤胞の破碎液は、既存の DNA 含量測定プロトコルで処理するには薄すぎるため、サンプルに含まれる細胞数を示す新たな指標が必要であった。受精後 72 時間の胚盤胞はほぼ一定数の細胞から構成されることが予想されたため、プールした胚盤胞数をサンプル中の細胞数の指標とすべく、胚盤胞を DAPI にて核染色し、蛍光顕微鏡下にて構成細胞数を計測したところ、平均 20 個(標準偏差 1)であることが判明した。

この計測結果は比較的安定していたので、Percellome 用の外部 RNA スパイクの添加量を計算する指標としての利用を試みた。具体的には、Percellome 標準法で ES 細胞や全胚サンプルに対して設定している添加量係数と、細胞 1 個あたりのゲノム DNA 量を元に、胚盤胞 1 個(細胞 20 個から構成)あたりに添加すべき量、 1×10^{-4} μL を算出した。実際に GeneChip で胚盤胞サンプルを解析して、外部 RNA スパイク添加量が適切であることを確認した。

iv) 微量サンプルからの GeneChip Expression Array 解析

GeneChip の標準プロトコルに比べ 1000 分の 1 量の total RNA で網羅的な遺伝子発現解析を行うべく、増幅効率の高い Ovation RNA Amplification System V2 (NuGEN)を利用してサンプル調製を行い、GeneChip MouseGenome 430 2 (Affymetrix)にてトランスクリプトームデータを取得した。同一サンプルを用い GeneChip 標準プロトコルにて取得したトランスクリプトームデータと比較したところ、両者の間には発現レベルに応じて増幅効率にかなりの差があったが、順位変動のような大きな差異は中～高発現域には少なく、適切な情報処理を行えばある程度の精度で相互比較が可能と考えられた。

実際に胚盤胞を約 50 個プールしたサンプルに対して、C-iii)の胚盤胞数を基準とした計算方法により外部 RNA スパイクを適量添加して total RNA を抽出、以後、上記と同様のプロトコルにて GeneChip 解析を行い、正常にデータを取得できることを確認した。

v) Post-bisulfite adaptor-tagging(PBAT)法の導入

DNA メチル化状態の精密評価に関しては、約 60 個の胚盤胞から PBAT 法で処理可能な量のゲノム DNA を取得できているため、本年度は Percellome 法に最適化した DNA、RNA 抽出操作が PBAT 法に問題を起こさないかどうかの検証を中心に、試験測定を実施した。

具体的にはマウス肝および全脳サンプルを用いて、PBAT 法による次世代シ

ークエンサ用ライブラリを作成し、MiSeq (Illumina)にて解析した結果、ライブラリ作成手技的にもデータ品質的にも特に問題なくデータを取得可能であることが確認された。

vi) 交配時の飲水投与による *in vivo* 経胎盤初期胚 DEHP、MEHP 暴露個体の取得、及び雄産仔マウスにおける情動認知行動解析

各群 20 匹の雌マウスを、雄マウス 1 匹に対し雌マウス 2 匹の割合で交配し、翌朝プラグチェックを行った。各群 13～15 匹の雌マウスにプラグを確認できたが、妊娠雌マウス数は Vehicle 群 7 匹・DEHP-L(2 μ M)群 10 匹に対し、DEHP-H(20 μ M)群 4 匹・MEHP-L(5 μ M)群 3 匹・MEHP-H(50 μ M)群 4 匹であった。

雄産仔マウスは 12 週齢まで育て、情動認知行動バッテリー試験(オープンフィールド試験による検定項目(総移動量、中央部滞在率、総移動回数)、明暗往来試験による検定項目(明所滞在時間、明暗往来数、暗所滞在時間)、高架式十字迷路試験による検定項目(総移動量、オープンアーム滞在時間、アーム選択数)、条件付け学習記憶試験による検定項目(学習率、空間連想記憶、音連想記憶)、プレパルス驚愕反応抑制試験による検定項目(プレパルス 90、95、100、105dB における 120dB 驚愕反応抑制率))を実施したが、DEHP 暴露群、MEHP 暴露群いずれも溶媒投与対象群と比較し、異常は認められなかった。

ただし、交配に用いた雄マウス(雌マウスと同様に飲水投与を受けた)より血

液を採取し、DEHP 及び MEHP の血中濃度を測定（上記 B-x）の通り、国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 河上強志博士に依頼）したところ、DEHP 血中濃度は DEHP 投与群であっても溶媒対照群と同等で、MEHP 血中濃度は、MEHP 投与群では溶媒対照群に比し優位に高かったが、飲水中に含まれる MEHP 濃度の 1/100~1/1000 と極めて低かった。また暴露実験終了後の給水瓶中の水溶液における DEHP,MEHP 濃度を測定したところ、調整時の 1/3~1/80 程度となっており、分解若しくは容器(ガラス製給水瓶)への吸着が想定された。

vii) マウス ES 細胞、EpiS 細胞の比較を行うための培養系確立

東京大学医科学研究所の正木英樹博士より、同系統のマウスに由来する ES 細胞(ESC)と EpiS 細胞(EpiSC)のセット 2 組 (C57BL/6 x DBA2 F1 マウス由来の BDF1-ESC, BDF1-EpiSC 及び 129 系統 マウス由来の EB3DR-ESC, EB3DR-EpiSC) の分与を受けた。DNA, RNA 採取に必要な凍結ストック細胞の取得作業を進め、BDF1-ESC について 16 本、BDF1-EpiSC について 24 本の新たな凍結ストック (1 本あたり 5×10^6 細胞) を取得した。これらは培養中の細胞外観は良好で、未分化性を保っていることが推測できた。一方、EB3DR-ESC、EB3DR-EpiSC については、分化が進行したことを示すと思われる形態の異なった細胞が高頻度で出現した上、増殖が極めて悪く、植え継ぎを重ねても次第に

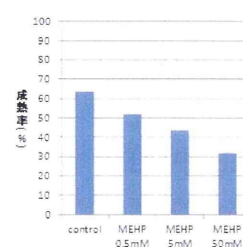
細胞数が減少するなど、安定性が悪いため、引き続き培養方法の検討を続け、これを最適化することとした。

viii) マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養過程における MEHP 暴露影響

観察数が十分でなく暫定的な実験結果ながら、MEHP 添加(5 μ M、50 μ M)により、成熟率の低下(対照群と比し 20~30%低下)と減数分裂時の紡錘体形成異常を検出した(右図)。蛍光顕微鏡写真は、左の正常像に比

し、右の MEHP5 μ M 群の像では紡錘体(緑)

の配列が染色体(赤)から離れ、且つ乱れており、減数分裂異常とそれに起因する諸影響の発生が示唆されている。



D. 考察

ヒト体外受精で用いられる培養液中に混入したフタル酸類 (DEHP 及び MEHP) は、正常妊娠の妊婦の血清中平均濃度の 10 倍以上とはいえ、DEHP で 0.2~0.3 μ M、MEHP で 0.5~1.0 μ M と微量であり、その暴露影響を正確に評価するためには、実験環境に普遍的に存在するフタル酸類の混入を徹底的に排除しなければならない。

交配中の飲水投与による *in vivo* 初期胚胎内暴露実験により、少量の DEHP、

MEHP が飲水経由(既報論文 Albro PW ら, Environ. Health Persp., 4, 19-25, 1982 及び Albro PW ら, Environ. Health Persp. 65, 293-298, 1986.より、経口経由でも同様と推測される)で混入したとしても、生体に吸収されるフタル酸は検出限界以下～極微量であることを確認した。B-x)の DEHP, MEHP 定量法の測定限界以下～極微量暴露では、情動認知行動解析にて有意な異常所見が出ないことを C-vi)で確認したことで、万一動物飼育環境など実験環境から環境中 DEHP、MEHP を除去できなかった場合でも、混入した微量 DEHP, MEHP が今後計画している *in vivo* 実験(人工受精中に DEHP, MEHP に暴露した胚を母胎に移植し、生産したマウスにおける各種解析)においては、大きな誤差要因とならないと考えられた。

本年度の検討により、試薬・器具からの混入を可能な限り抑え、またバックグラウンド量とその極微量混入時の誤差の発生程度も把握することで厳密な評価を実施できるようになった。

また初期発生における分子レベルでの暴露影響調査のために必要となる *in vitro* 実験においては、材料となる受精卵・胚盤胞の品質を整える必要がある。これは移植で出生したマウスを使用する *in vivo* 実験と異なり、個々の胚が正常に個体発生するものであったか否かは不明であるためである。本年度の研究により、受精卵から胚盤胞までの培養条件と、子宮移植～出産までの飼育条件を最適化することで、期待し得る最高レベ

ルの生産効率を達成し、安定化させることに成功した。

さらに、既存のプロトコルを改良することにより、本研究体制で生産することの出来る胚盤胞プールサンプルに相当する 10^3 個オーダーの細胞から定量的で網羅的な遺伝子発現解析および DNA メチル化解析の実施を可能とした。一般的な single cell analysis と異なり、十分量の RNA サンプルを元に生成したトキシコゲノミクスデータと比較可能な高精度データを得るプロトコルを整えたことは、我々が構築した世界有数規模のトキシコゲノミクスデータベース (Percellome データベース)を本研究で活用可能とするものであり、解析の精度、効率を高める。

これらの成果により、来年度からの本実験を厳密且つ効率的に実施する準備が整ったと考えられる。

既に開始している実験においては、DEHP、MEHP の影響を示唆する結果を得つつある。暫定的な実験結果ながら、未成熟卵母細胞の体外成熟培養に於いて、MEHP 暴露により成熟率の低下と減数分裂時の異常を検出しており、引き続き DEHP についても同様の影響評価を行う予定である。現時点で、本実験での有意な暴露影響は、ヒト体外受精培養液より濃い MEHP 濃度での結果であるが、同レベルの MEHP 濃度でも成熟率の低下傾向が示されていることから、成熟過程における減数分裂以外への影響を含め、厳密な評価を行う必要があると考えられる。

E. 結論

本年度は、微量の混入化学物質による暴露影響を厳密に実施するための条件設定を完了した。また一部の暴露実験を開始し、高用量域では暫定的ながら陽性反応を得つつある。観察された暴露影響が臨床的に問題となるか否かの判断に必要とされる精緻なデータを得るため、引き続き研究計画に則ったDEHP/MEHPの暴露実験と、分子機序の解析を行う。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J and Nakamura T, Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. *Genomics Data* (2014); 2: 296-298.

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest.* (2014);124(7):3061-74.

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR γ signaling is required for vertebrate axial elongation. *Development.* (2014);141(11):2260-70.

Ohtake J, Sakurai M, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Expression of focal adhesion kinase in mouse cumulus-oocyte complexes, and effect of phosphorylation at Tyr397 on cumulus expansion. *Mol Reprod Dev.* 2015 Mar;82(3):218-31.

Shirakata Y, Hiradate Y, Inoue H, Sato E, Tanemura K. Histone h4 modification during mouse spermatogenesis. *J Reprod Dev.* 2014;60(5):383-7.

Hiradate Y, Inoue H, Kobayashi N, Shirakata Y, Suzuki Y, Gotoh A, Roh SG, Uchida T, Katoh K, Yoshida M, Sato E, Tanemura K. Neurotensin enhances sperm capacitation and acrosome reaction in mice. *Biol Reprod.* 2014 Aug;91(2):53.1-9.

Inoue H, Hiradate Y, Shirakata Y, Kanai K, Kosaka K, Gotoh A, Fukuda Y, Nakai Y, Uchida T, Sato E, Tanemura K. Site-specific phosphorylation of Tau protein is associated with deacetylation of microtubules in mouse spermatogenic cells during meiosis. *FEBS Lett.* 2014 May 29;588(11):2003-8.

Ishikawa S, Machida R, Hiraga K, Hiradate Y, Suda Y, Tanemura K. Hanging drop monoculture for selection of optimal antioxidants during in vitro maturation of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim.* 2014 Apr;49(2):e26-30.

2. 学会発表

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014) (2014.9.9)Edinburgh, UK, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the

Life Sciences (WC9) (2014.8.27), Prague, Czech Republic, Oral

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現から見た毒性学—Percellome トキシコゲノミクスの進捗—、第 36 回日本中毒学会総会・学術集会(2014. 7. 25) 東京、シンポジウム

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス—化学構造が異なる 3 物質の比較—、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014. 7. 3) 神戸、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗—新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析—、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014. 7. 2) 神戸、シンポジウム

北嶋 聡、種村健太郎、菅野 純、毒性の網羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク描出と動的バイオマーカー抽出、第 41 回日本毒性学会学術年会(2014. 7. 2) 神戸、シンポジウム

菅野 純、評価と管理の分界に関する考察、平成 26 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム(2014. 5. 24) 東京

平賀孔、種村健太郎
マウスへのネオニコチノイド系農薬アセタミプリド単回曝露による遅発中枢影響の性差、第 41 回 日本毒性学会学術年会(2014. 7.)

種村健太郎
生殖細胞系列における微小管随伴タンパク；タウの動態、第 157 回日本獣医学会学術集会 (2014. 9.)

斉藤洋克、植松未知、白形芳樹、種村健太郎
幼若期雄マウスへのペルメトリン暴露による遅発生

殖機能影響解析、第 157 回日本獣医学会学術集会 (2014. 9.)

猪股大貢、星野由美、種村健太郎
体外成熟培養系における卵母細胞へのアセタミプリド(ACE)曝露影響、第 157 回日本獣医学会学術集会 (2014. 9.)

平舘裕希、井上弘貴、小倉淳郎、種村健太郎
マウス卵子減数分裂過程における Tau のリン酸化動態、第 157 回日本獣医学会学術集会 (2014. 9.)

種村健太郎、菅野 純
ネオニコチノイド系農薬による中枢神経影響解析および生殖機能影響解析、第 17 回環境ホルモン学会、第 17 回環境ホルモン学会 (2014. 12.)

斉藤洋克、植松未知、白形芳樹、種村健太郎
幼若期雄マウスへのペルメトリン投与による遅発生殖機能影響解析、第 17 回環境ホルモン学会 (2014. 12.)

猪股大貢、種村健太郎
Hanging Drop 法を用いた体外成熟培養系におけるマウス卵母細胞へのアセタミプリド(ACE)曝露影響、第 17 回環境ホルモン学会 (2014. 12.)

植松未知、井上弘貴、斉藤洋克、種村健太郎
幼若期雄マウスへのアセフェート投与による遅発生殖機能影響解析、第 17 回環境ホルモン学会 (2014. 12.)

平賀孔、種村健太郎
マウスへのネオニコチノイド系農薬アセタミプリド単回曝露による遅発中枢影響の性差、第 17 回環境ホルモン学会 (2014. 12.)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

受精卵培養液中のフタル酸類の 受精卵及び出生児に対する影響評価研究

(H26-化学-指定-002)

相崎 健一

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 第一室 室長

1

研究体制

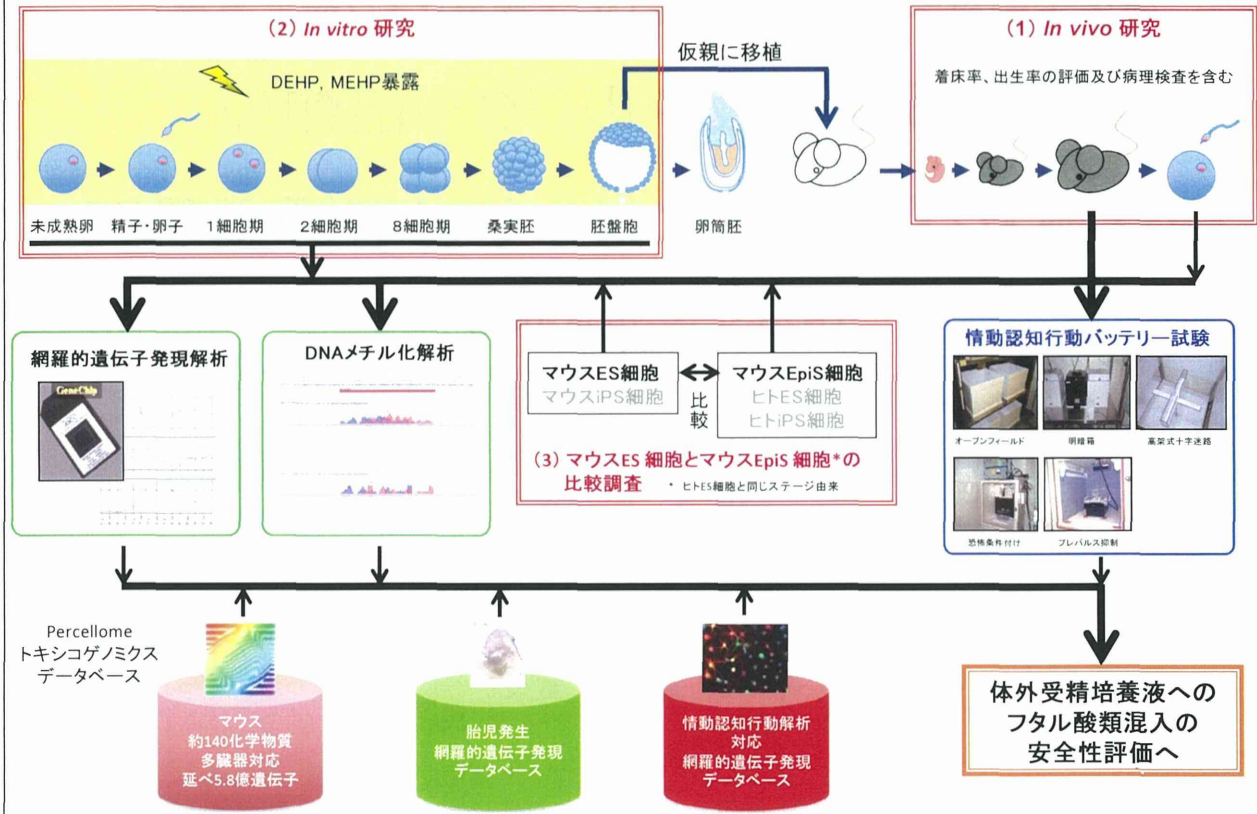
- 研究分担者
 - 相崎 健一(総括、遺伝子発現データ解析)
 - 安彦 行人(人工受精、受精卵移植、DNAメチル化解析)
 - 種村 健太郎(情動認知行動評価解析)
- アドバイザー・解析協力
 - 菅野 純
 - 北嶋 聡
- 協力研究者
 - 河上 強志(国衛研・生活衛生化学部)
- 研究協力者
 - 古川 佑介
 - 森山 紀子
 - 池野 絵里子

2

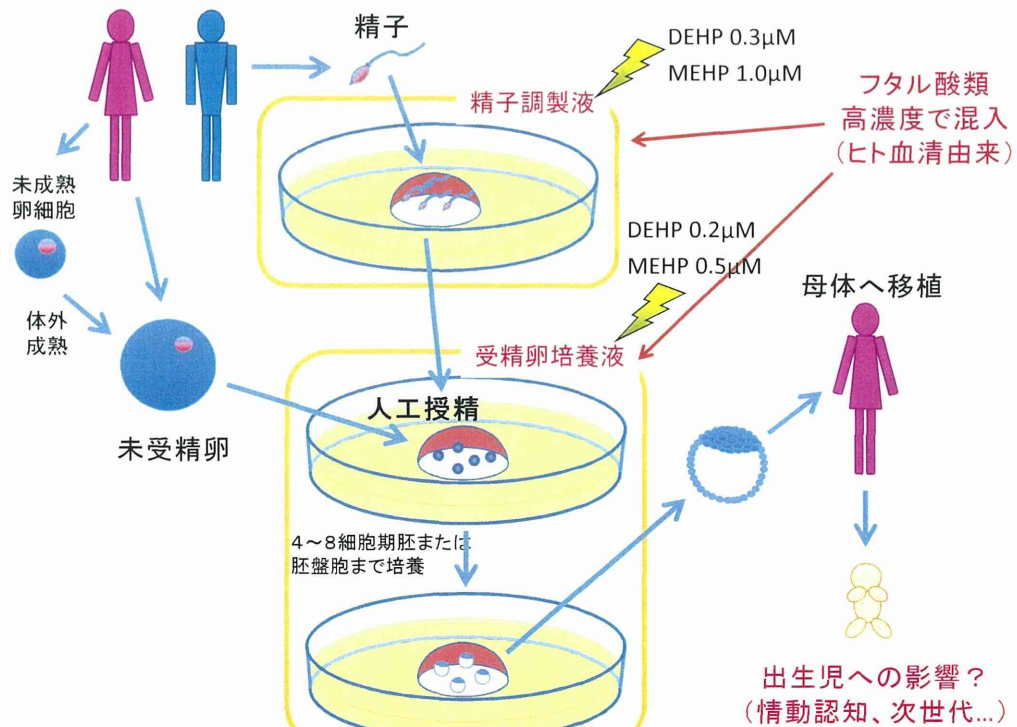
受精卵培養液中のフタル酸類の受精卵及び出生児に対する影響評価研究

(H26-化学-指定-002)

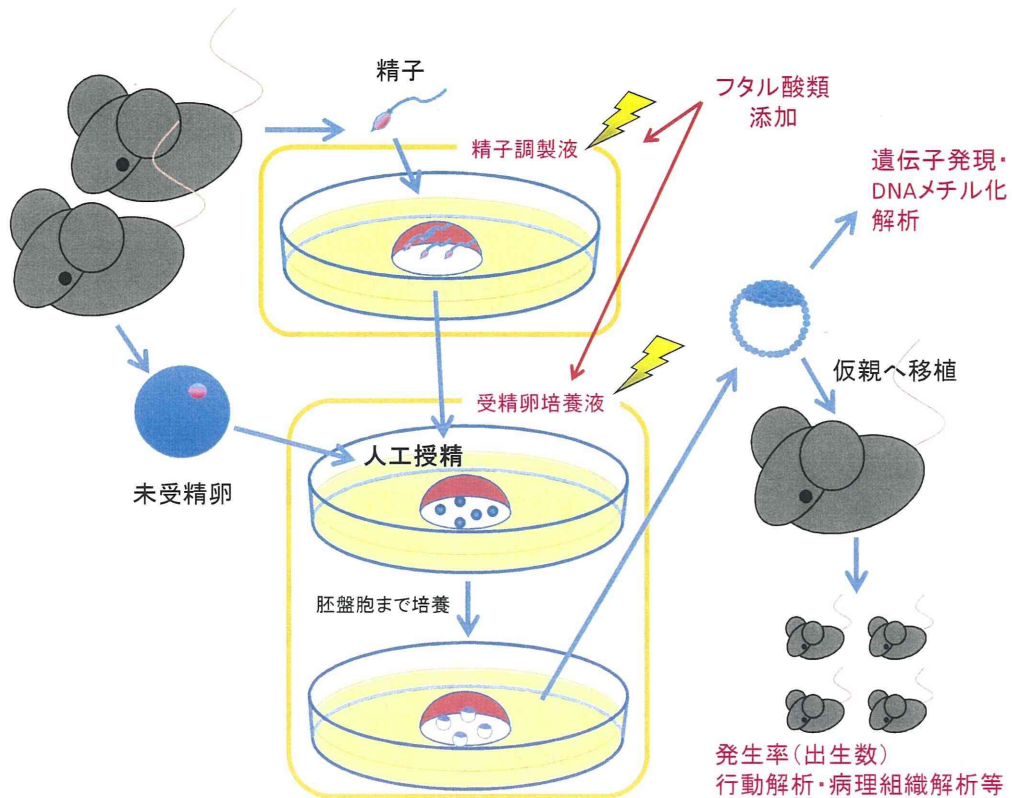
体外受精における培養液中のフタル酸類(DEHP及びMEHP)が、受精卵及び出生児に及ぼす影響の安全性評価において不足する科学的情報をマウスを用いて取得すると共に、初期胚の化学物質暴露に対する短期間且つ高感受性の安全性評価手法を開発する。



受精卵培養液へのフタル酸類混入



動物実験による影響評価



5

厳密で見落としの無い安全性評価に必要な科学的情報を得るために

- ① 実験環境中に存在するフタル酸類の混入排除
- ② 個体発生能のある体外受精由来の胚の安定作出
- ③ 微量サンプルからの網羅的且つ高精度の遺伝子発現及びDNAメチル化の定量解析の実現

6

技術導入・開発

① 実験環境中に存在するフタル酸類の混入排除

- サンプルや実験環境中のDEHP、MEHPの高感度測定系の準備

② 個体発生能のある体外受精由来の胚の安定作出

- マウス体外受精から胚盤胞までの培養条件の最適化
- 胚移植による個体の安定作出

③ 微量サンプルからの網羅的且つ高精度の遺伝子発現及びDNAメチル化の定量解析

- 微量サンプルからの高品質DNA/RNAの同時抽出法の最適化
- 微量サンプルの網羅的遺伝子発現のための定量プロトコル開発 (Percellome法の改良)
- 微量サンプルのDNAメチル化解析を実現するPBAT(Post-bisulfite adaptor-tagging)法の導入と最適化

7

H26実施の動物実験

- 交配時のフタル酸類の飲水投与によるin vivo初期胚暴露実験及び出生マウスの情動認知行動解析（オープンフィールド試験、明暗往来試験、条件付け学習記憶試験を予定）
- マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養実験*
 - 培養液へのMEHP添加(5 μ M)により、成熟率の低下と減数分裂時の紡錘体形成異常を検出した。

* ヒト生殖補助医療で導入が始まっている卵子の体外成熟培養(IVM)を模した実験

8