

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。本分担研究では、必要に応じて基本的なプロトコルやデータ解析アルゴリズムの開発を行い、以てデータ解析を行う。

B. 研究方法

本研究班に於いては、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を行うが、これらに相対し、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ために、以下の研究開発を行う。

i) マウス胚盤胞からの DNA、RNA 採取

体外受精卵から培養作製・プールした胚盤胞サンプルから、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品質 (分解の程度や夾雑物の有無) を評価した。

ii) 微量サンプルへの Percellome 法適用

Percellome 法とは mRNA 発現量を細胞 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、本研究への適用に際しては、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推測するためのプロトコルの作成を中心に、胚盤胞を 50~100 個プールしたサンプルへの最適化を行った。

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

標準的な 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 標準プロトコルで指定の 1000 分の 1 量である 5ng、若しくは 250 分の 1 量である 20ng) を元に、微量 RNA 増幅キットの 1 つである Ovation RNA Amplification System V2 (NuGEN) を利用して逆転写及び 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。

iv) 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、Percellome法と同時実施するためのプロトコル最適化を行った。

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 濃度は薄く、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、大量の胚盤胞を用意すれば Percellome 遺伝子発現解析と DNA メチル化解析を同時に進めら

れるものと考えられた。

ii) 微量サンプルへの Percellome 法適用

実際には高品質を保ったまま胚盤胞を大量生産することは難しいため、Percellome 法プロトコルを一部調整し、微量サンプルに最適化する必要がある。とりわけ 50~100 個の胚盤胞プールの破碎液は、既存の Picogreen 試薬を用いた 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と予想されたため、プールした胚盤胞数をサンプル破碎液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(安彦分担研究者の解析による)。

この計測結果を Percellome 用の外部 RNA スパイクの添加量を計算する際の指標とすべく、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 個当たりのゲノム DNA 量の推定値を元に、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(詳細な展開式は別添参照)。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。

iii) 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、増幅効率性の高いOvation RNA Amplification System V2 (NuGEN)を利用してサンプル調製を行い、GeneChip Mouse Genome 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、順位変動のような非線型の大きな差異は中～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-ii)の胚盤胞数を基準とした計算式により外部RNAスパイクを適量添加してtotal RNAを抽出、以後、上記と同じプロトコルにて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。

iv) 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ケ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。

D. 考察

一部プロトコルの新規開発と既存のプロトコルの改良により、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。

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解析プロトコル開発、改良を進め、条件設定を完了した。今後、計画を実施し、分子機序の解析に基づく安全性評価研究を行う。

F. 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.

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

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

胚盤胞プールサンプルへの GSC 添加量計算

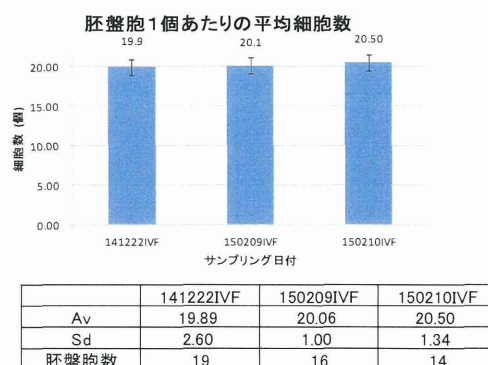
IVF による胚盤胞作出では、収集可能なサンプリング量が少なく、通常の GeneChip 解析で実施している DNA 含有量測定 (PicoGreen 法) の適用が困難である。胚盤胞を 50~100 個プールしたサンプルに対して Percellome 法を適用するために、プールした胚盤胞数に応じて GSC 添加を行うプロトコル開発を検討した。

1) 胚盤胞 1 個あたりの細胞数

3 回の独立したマウス体外受精 (IVF) により得られた胚盤胞を蛍光核染色し、構成細胞数を計測した。

その結果、

- ①サンプリング間で構成細胞数に有意差が無いこと
(安定して胚盤胞を作出できていること)、
- ②胚盤胞 1 個あたりの平均細胞数は 20.1 個であること、
が判明した。



2) 平均細胞数からの胚盤胞プールサンプルの DNA 量の推定

マウスのゲノム遺伝子長を $2.5e9$ bp/cell、1 塩基対の分子量を 600 Da とすると、アボガドロ定数が $6.02e23$ mol⁻¹ であるから、2 倍体の細胞 1 個あたりのゲノム DNA 量は、

$$\frac{2.5e9 \times 600 \times 2}{6.02e23} = 4.98e-12 \cong 5.0e-12 \text{ g}$$

3) 胚盤胞 1 個あたりに添加すべき GSC 量

1,2 より、胚盤胞 1 個あたりの DNA 量は $1e-10$ g と推定される。

whole embryo の SpikeFactor は 0.02 L/g であることから、胚盤胞を n 個プールしたサンプルに添加すべき GSC 量は、

$$1e-10 \times n \times 0.02 \text{ L} = 2n \cdot 1e-6 \text{ uL}$$

である。

例) 胚盤胞 50 個のプールサンプルに対しての GSC 添加量は $1e-4$ uL となる。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

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)

分担研究課題「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

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

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 および MEHP）が検出されたため、受精卵およ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。

平成 26 年度は、①人工授精と体外培養で取得されたマウス胚盤胞から、情動認知行動解析に必要となる多数のマウス個体を一期的に取得する技術、②定量的遺伝子発現解析およびゲノム DNA メチル化解析に適する高品質の DNA・RNA をマウス胚盤胞から同時に回収する技術を確立し、③細胞数を基準とした定量的遺伝子発現解析の実施のため、マウス胚盤胞を構成する細胞数の直接計数を行った。また④ヒト ES 細胞と発生段階が類似するとされるマウス EpiS 細胞を導入し、マウス ES 細胞との比較を行うための培養技術を確立し、フタル酸類の暴露実験に備えて凍結細胞ストックを取得した。さらに⑤実験環境中のフタル酸類定量体制を整え、胚培養環境下にてマウス胚培養液に添加したフタル酸類の定量分析を行い、DEHP が胚培養液中から培養期間終了を待たずに失われることを見いだした。

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製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かつ高感受性の安全性評価手法を開発する。特に本分担研究では、①人工授精と体外培養で取得されたマウス胚盤胞から

の高効率での個体の取得、②マウス胚盤胞からの DNA・RNA 回収、③細胞数を基準とした定量的遺伝子発現量解析の実施のための胚盤胞構成細胞数計測、④ES 細胞との比較のためのマウス EpiS 細胞の培養技術導入、⑤胚培養環境中のフタル酸類の定量、以上 5 点を対象とする。

B. 研究方法

①人工授精と体外培養で取得されたマウス胚盤胞からの高効率での個体の取得

先行研究により確立した高感度情動認知行動解析システムを用いて胚培養環境中フタル酸類の影響を解析するためには、人工授精と体外培養により取得されたマウス胚盤胞を母胎に移植し、十分な数のマウス個体を取得すること（具体的には 1 群あたり 8 匹 1 物質あたり最低 3 群のため、計 24 匹の雄マウス）が必要である。同様に、Percollome 法を基盤として確立した網羅的な定量・高感度遺伝子発現解析システムにより胚盤胞のトランスクリプトームを解析するには、用いる胚盤胞が個体へと発生しうる能力を有していることを確認することが必要である。これらのためにマウス人工授精・胚操作作業の工程を注意深く検討し、新潟大学脳研究所・笹岡邦宏教授および小田佳奈子技官の助言も受け、胚発生率および個体出生率の最大化を図った。

人工授精は FERTIUP 精子前培養培地、CARD medium 高性能マウス体外受精用培地（ともに九動株式会社）を使用し、添付マニュアルに従って実施した。マウス凍

結精子は 12 週齢 C57BL/6CrSlc 雄マウス（日本エスエルシー）から採取し、FERTIUP マウス精子凍結保存液（九動株式会社）を用いて添付マニュアルに従い調製・保存した。具体的には、雄マウスを安楽死の後、精巣上体尾部を摘出し、周囲組織を除去後、35mm ペトリディッシュ中、流動パラフィンを重ねた FERTIUP マウス精子凍結保存液 120 μ l のドロップに沈め、検鏡下で眼科バサミにて 4-5 箇所を切開した。37 $^{\circ}$ C ウォームプレート上で 1 分ごとに 15 秒間激しく震盪しつつ 3 分間保温し、保存液中に精子を遊離させた。得られた精子懸濁液を精子凍結保存ストロー (IMV Technologies) に 10 μ l/本の割合で吸い上げ、両端をニクロム線シーラーで封じた後、液体窒素上に浮かべた筒型フロート中に 10 分間静置して凍結した。

採取した卵、精子、受精卵、胚の培養はすべて CO₂ インキュベーター（37 $^{\circ}$ C、5%CO₂）で行い、操作のためインキュベーター外に出す時間は必要最小限とした。全ての卵および胚操作はマウスピースに接続したガラスキャピラリー (Drummond 社製マイクロピペットを細引き加工) で行った。

【過排卵処理】3 週齢 C57BL/6CrSlc 雌マウス(日本エスエルシー)に妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG、帝国臓器) 5units/匹を腹腔内投与し、48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG、帝国臓器) 5units/匹を腹腔内投与して過排卵処理を行った。

【精子前培養】35mm ペトリディッシュ(岩城硝子)に FERTIUP 精子前培養培地 90 μ l

のドロップを置き、流動パラフィン（細胞培養グレード、ナカライテスク）4ml を重層して CO₂ インキュベーター内で 30 分間平衡化した。凍結ストロー中のマウス精子（10 μ l）を 37 $^{\circ}$ C 温水中で 10 分間加温・融解し、前培養培地に加えて 37 $^{\circ}$ C、1.5 時間培養した（授精能獲得）。

【未受精卵採取、媒精】35mm ペトリディッシュに CARD medium 90 μ l のドロップを作製、流動パラフィン 4ml を重層して CO₂ インキュベーター内で 10 分間平衡化した。過排卵処理した雌マウスを安楽死させ、手早く卵管膨大部を採取し、CARD medium シャーレの流動パラフィン中で膨大部を破り、未受精卵と卵丘細胞からなる塊を CARD medium ドロップに導入した。ただちに、前培養した精子液 10 μ l を塊に吹き付けるように添加し、CO₂ インキュベーター内 37 $^{\circ}$ C で培養した。

【受精卵洗浄、培養】媒精 3 時間後、受精卵を CARD medium からガラスキャピラリーで拾い出し、HTF 培地（九動株式会社。80 μ l のドロップを 35mm ペトリディッシュ 1 枚当たり 4 個作製し、4ml 流動パラフィンを重層、1 時間以上 CO₂ インキュベーター内で平衡化）で 3 回洗浄した。HTF 培地でさらに 3 時間培養後、KSOM+アミノ酸培地（ミリポア社製 KSOM 培地に GIBCO 製アミノ酸ストック溶液を混合、100 μ l のドロップを、35mm ペトリディッシュ 1 枚当たり 6 個作製し、4ml 流動パラフィンを重層、1 時間以上 CO₂ インキュベーター内で平衡化）にドロップ 1 個当たり

20 個の割合で移し、胚盤胞まで培養した。

【レシピエントマウスへの胚盤胞移植】12 週齢以上の MCH 雌マウス群から発情期の個体を選び出し、精管結紮 MCH 雄マウスと 1 晩同居させ、翌朝膣栓が確認されたものをレシピエントマウスとした。72 時間培養後の胚盤胞を、M2 培地（SIGMA）で 2 回洗浄した後、膣栓確認後 2.5 日のレシピエントマウスに 1 匹当たり 16~18 個の割合で移植した。

【マウス産仔の回収】胚盤胞を移植したレシピエントマウスから、自然分娩または帝王切開にて産仔を得た。帝王切開に先立ち、予定日前日に出生するよう交配した里親 MCH 雌マウスを準備した。帝王切開は胚盤胞移植後 17 日目（受精後 20 日目）に実施した。

① マウス胚盤胞からの高品質 DNA・RNA の同時回収

体外受精卵から培養取得・プールした胚盤胞サンプルから、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。

② 細胞数を基準とした定量的遺伝子発現量解析のための胚盤胞構成細胞数計測

胚盤胞を構成する細胞数の計測方法は小田ら(2013)に従った。人工授精後 72 時間培養した胚盤胞を、PB1 培地 (三菱化学メディアエンス) 100 μ l で 3 回洗浄し、4 %パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) を含むリン酸緩衝液中、室温で 40 分固定した。固定後の胚を 0.1%Triton-X100 (和光純薬) と 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI, 同仁化学研究所) 1 μ g/ml を含むリン酸緩衝液 100 μ l で室温、15 分間染色した。染色後の胚を 0.1%Triton-X100 を含むリン酸緩衝液で 3 回洗浄し、2 μ l の洗浄液とともにスライドガラスに乗せ、カバーガラスを被せて標本とした。標本はオールインワン蛍光顕微鏡 BioZero BZ-8000 (キーエンス) で DAPI フィルター下、倍率 200 倍にて 2 μ m 刻みで連続断層撮影した。得られた画像 25-40 枚を顕微鏡付属の画像閲覧ソフトで連続観察し細胞数を計測した。

③ マウス EpiS 細胞の導入及び培養技術確立

東京大学医科学研究所幹細胞治療研究分野・正木 英樹博士より、下記 2 系統のマウスに由来する ES 細胞(ESC)および EpiS 細胞(EpiSC)のセット、計 4 種の凍結ストック細胞バイアル各 2 本の分与を受けた。(カッコ内、P の後の数字は分与時点の東大医科学研究所での継代数)

C57BL/6 x DBA2 F1 マウス由来

BDF1-ESC(P4), BDF1-EpiSC(P6)

129 系統マウス由来

EB3DR-ESC(P5), EB3DR-EpiSC(P10)

凍結ストック細胞のバイアルはドライアイス (-80 $^{\circ}$ C) 中に冷凍保存し東大医科学研究所から国立医薬品食品衛生研究所毒性部に輸送し、到着後、直ちに液体窒素 (-196 $^{\circ}$ C) 中に保管した。ESC および EpiSC の取り扱いは、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究分野の方法に従った (培養プロトコルをそれぞれ付録 1、付録 2 に、ESC・EpiSC 凍結保存プロトコルを付録 3 に示した)。

④ 胚培養環境中のフタル酸類定量

本研究では環境中フタル酸類の平均的存在量以下の高感度測定を行うために、実験計への環境中フタル酸類の混入を極力排除した。具体的には、容器や器具は可能な限りガラス製、金属製のものをを用い、事前に 250 $^{\circ}$ C で 12 時間以上加熱して、フタル酸類を除去した。培養液など液体の採取、保存に際しては、全てにおいてフタル酸類除去済みのガラス容器を用いることに加え、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。

⑤-1 : 培養液へのフタル酸類添加

本研究で用いるフタル酸類、DEHP、MEHP は親水性が低く、微量暴露の場合、培養液への精密な添加が難しく、実際の暴露量の確認が不可欠である。同時に、DEHP、MEHP は生活・実験環境中に大量に存在するため、混入否定のための測定も適宜行う。具体的には以下の通り。

フタル酸類は水溶性が低く、胚培養液に直

接加えても溶解しないことが予想された。ヒト胚培養液に混入していたフタル酸類は、培養液成分として加えられたヒト献血由来アルブミンに吸着した状態で含まれていたと考えられる。以上のことからマウス胚培養液へのフタル酸添加は、アルブミン溶液にフタル酸類を混和したストック溶液を、胚培養液に加える形で行うこととした。アルブミン溶液は、血液由来のフタル酸混入を防ぐため、遺伝子組換え大腸菌から精製されたヒト・リコンビナントアルブミンを使用した。

ヒト人工授精胚培養液で検出されたフタル酸類の最大値が DEHP 0.2 μ M、MEHP 0.5 μ M であったことから、マウス胚培養液への添加量は
低用量(L)群 : DEHP 0.2 μ M・MEHP 0.5 μ M、
高用量(H)群 : DEHP 2 μ M・MEHP 5 μ M とした。

まず DEHP 200mM、MEHP 500mM のエタノール溶液を調製し原液とした。DEHP (東京化成工業、分子量 390.56、比重 0.986) 78 μ l、MEHP (和光純薬、分子量 278.37、比重 1.07) 139 μ l をピペットで計り取り、それぞれエタノール(和光純薬)で最終容積 1ml となるよう溶解した。この原液をエタノールで希釈し、10000 倍濃度 (DEHP-L 群 2mM、H 群 20mM、MEHP-L 群 5mM、H 群 50mM) の中間ストック液を調製した。10000 倍濃度中間ストック液をヒト・リコンビナントアルブミン溶液 (Vitrolife) 500 μ l に対し 5 μ l の割合で添加し、100 倍濃度ワーキングストック溶液とした。

エタノール 5 μ l をアルブミン溶液 500 μ l に加えたものを vehicle 群用ワーキングストック溶液とした。

KSOM 培地 (メルクミリポア) にワーキングストック溶液 1/100 容を添加したものを、フタル酸暴露実験用マウス胚培養液とした。実験群は Vehicle、DEHP-L、DEHP-H、MEHP-L、MEHP-H の計 5 群とし、35mm ペトリディッシュ 1 枚当たり 100 μ l の培養液ドロップ 6 個を作製して 4ml の流動パラフィンで覆った胚培養シャーレを、各群 2 枚ずつ用意した。胚培養シャーレを 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で 4 日間インキュベートした後、培養液ドロップを群ごとにガラスバイアルに回収し、インキュベート前の試料とともに DEHP および MEHP 定量分析に供した。

⑤・2 : DEHP、MEHP の測定

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) を用いて行った。

【試薬等】分析に使用した DEHP および DEHP 重水素化体 (DEHP-d₄) は関東化学社製の環境分析用を、MEHP は林純薬工業製の環境分析用を、MEHP 重水素化体 (MEHP-d₄) は CDN Isotope 製をそれぞれ用いた。ジエチルエーテルおよびヘキサンは関東化学製の残留農薬分析用を、無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウムおよび濃塩酸は和光純薬工業製のフタル酸エステル・PCB 分析用、残留農薬・PCB 分析用

および有害分析測定用をそれぞれ用いた。試験に使用した水は超純水製造装置 Milli-Q Advantage A10 (日本ミリポア) により作製した超純水を用いた。試験に使用したガラス器具類については、250°Cで 12 時間以上焼成した後に使用した。

【分析方法】 Haishima et al. (2004) の方法を一部改変して以下の通り分析を行った。

DEHP 分析： 飲水投与に供試した水および培地では 0.5 mL、血液試料では 0.2 mL をそれぞれねじ口試験管に採取した。そこに、内部標準物質として DEHP-d4 を 100 ng 添加した後に、塩化ナトリウム 25 mg および水 2 mL を加え攪拌した。次に、ジエチルエーテル 3 mL を加え 20 分間振とうした後に、3000 rpm で 15 分間遠心分離した。溶媒相を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、乾燥窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をヘキサン 0.2 mL に溶解させた後、ガスクロマトグラフ三連質量分析計 (GC/MS/MS) にて測定した。

MEHP 分析： 飲水投与に供試した水および培地では 0.5 mL、血液試料では 0.2 mL をそれぞれねじ口試験管に採取した。そこに、内部標準物質として MEHP-d4 を 100 ng 添加した後に、塩化ナトリウム 25 mg および 0.01 mol/L 塩酸 2 mL を加え攪拌した。次に、ジエチルエーテル 3 mL を加え 20 分間振とうした後に、3000 rpm で 15 分間遠心分離した。溶媒相を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、乾燥窒素気流下

で溶媒を留去した。残渣を少量のジエチルエーテルに溶解した後、ジアゾメタンを用いてメチル誘導体化処理を行った。その後、乾燥窒素気流下で溶媒を再度留去した後に、ヘキサン 0.2 mL に溶解させた後、ガスクロマトグラフ三連質量分析計 (GC/MS/MS) にて測定した。なお、標準溶液についても試料と同様にジアゾメタンで誘導体化して測定し、検量線を取得した。

【 GC/MS/MS 分析 】 Thermo Fisher Scientific 社製の Trace GC/Quantum XLS を用いて分析を行った。キャピラリーカラムは DB-5MS (長さ 30 m、内径 0.25 μ m、膜厚 0.25 μ m: J&W-Agilent 社製) 用いた。キャリアーガスには He を用い、流量は 1 ml/min に設定した。注入口、トランスファーラインおよびイオンソース温度はそれぞれ 250° C に設定し、スプリットレスモードで試料溶液 1 μ l を注入した。カラムオープン温度プログラムは、初期温度 60° C で 2 分間保持した後、310° C まで 20° C /min で昇温させ、310° C で 10 分間保持した。イオン化法は Electron Ionization (EI) 法、イオン化電圧は 70 eV とした。測定は、selected reaction monitoring (SRM) 法で行い、コリジョンガスには Ar (0.13 pa) を用いた。各化合物の GC/MS/MS 条件を表 1 に示した。

表 1. GC/MS/MS 条件

Chemicals	Retention time (min)	Q1 [m/z]	Q2 [m/z]	CE (V)
MEHP	12.32	163	133	10
DEHP	14.54	167	149	4
MEHP-d ₄	12.30	167	137	10
DEHP-d ₄	14.53	171	153	4

Q1: Precursor ion

Q2: Product ion

CE: Collision energy

(参考文献)

Haishima Y, Matsuda R, Hayashi Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T.: Risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC blood circuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy, *Int. J. Pharm.*, 274, 119-129, 2004

牧野恒久・中澤裕之・高取聡・阿久津和彦・近藤文雄: 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明, 平成20年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)分担報告書(課題名: 化学物質の子供への健康影響に関するエピジェネティクス評価法の開発), 29-41, 2008

C. 研究結果

- ① 人工授精と体外培養で取得されたマウス胚盤胞からの高効率での個体の取得

まず人工授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、人工授精胚が胚盤胞まで発生する率を、使用した未受精卵の60%まで引き上げた。

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の見直しを進め、延べ985個の胚盤胞を53匹の偽妊娠雌マウスに子宮移植して検討した結果、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(表2参照)。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。

*1細胞期・2細胞期ではなく、胚盤胞まで培養して子宮移植する理由は、ヒト体外受精の現状を反映させるためであり、また遺伝子発現解析などのサンプル量を確保するためである。

表2 人工授精～胚培養～移植による出生成績

人工授精日	移植胚数	移植胚日 齢	仮親数	仮親日 齢	分娩方法	出生数 (%)	着床総数 (%)	備考
14.06.10	113	3.5	6	3	自然	9 (8)	-	
14.06.23	48	3.5	3	4	自然	0 (0)	-	妊娠せず
	102	3.5	7	3	自然	7 (7)	-	
14.07.01	96	3.5	6	3	自然	0 (0)	-	透明帯除去
14.07.22	48	4	3	2.5	自然	0 (0)	-	妊娠せず
14.07.28	100	3	5	2.5	自然	4 (4)	-	
	40	3	2	2.5	帝王切開	10 (25)	確認せず	里親用意せず
14.08.04	132	3	6	2.5	自然	18 (14)	-	
14.08.12	20	3	1	2.5	自然	6 (30)	-	
	60	3	3	2.5	帝王切開	10 (17)	34 (57)	
14.08.18	32	3	1	2.5	自然	5 (16)	-	
	52	3	2	2.5	帝王切開	2 (4)	17 (33)	
14.09.16	32	3	2	2.5	帝王切開	7 (22)	23 (72)	
	16	3.5	1	2.5	自然	8 (50)	-	自然交配、8cell 採取 →一晩培養で胚盤胞に
14.10.28	94	3	5	2.5	帝王切開	18 (19)	55 (59)	里親 ICR (妊娠動物購入)

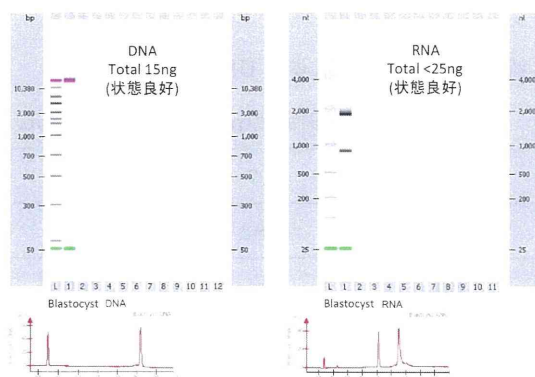
② マウス胚盤胞からの高品質 DNA・RNA の同時回収

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 法・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考えられた。(図 1)

図 1 胚盤胞 65 個から回収した DNA・RNA の品質評価



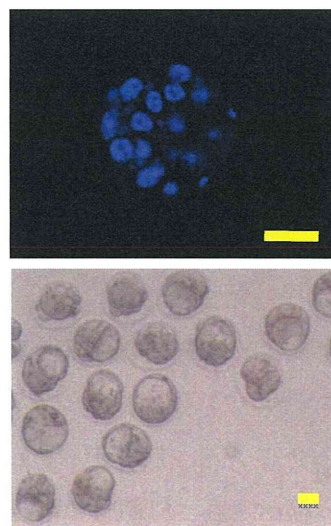
*Percollome 法では、サンプル中細胞数の代替として DNA 含量を外部スパイク添加の際の指標とする。

③ 細胞数を基準とした定量的遺伝子発現量解析のための胚盤胞構成細胞数計測
計数は 3 回の独立した人工授精から得られた胚盤胞、各 14・19 個について、計 3 回行った。結果は表 3、図 2 に示した。3 回、計 49 個の胚盤胞での計数から得られた細胞数の平均値は 19.9・20.5、標準偏差は 1.0・2.6 であった。

表 3 胚盤胞を構成する細胞数の直接計数

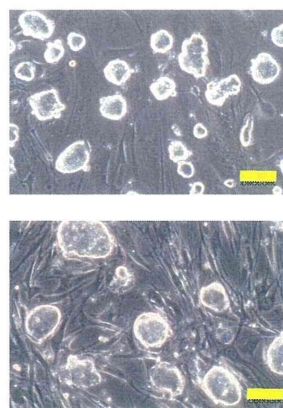
	胚盤胞数	平均細胞数	標準偏差
1 回目	19	19.9	2.6
2 回目	16	20.1	1.0
3 回目	14	20.5	1.3

図 2 DAPI 染色した胚盤胞の蛍光像 (上)、明視野像 (下)。スケールバーは 50μm



④ マウス EpiS 細胞の導入・培養技術確立
分与を受けた凍結ストック細胞を培養し、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) を取得できた。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 (図 3 参照)。

図 3 マウス ESC (上)、EpiSC (下) の位相差顕微鏡像。スケールバーは 100μm



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。

⑤ 胚培養環境中のフタル酸類定量

(分析法について) 操作ブランクについて試験を行ったところ、DEHPは 1.2 ± 0.12 ng (n=4) 検出され、MEHPは定量可能な濃度では検出されなかった。DEHPについて、牧野ら(2008)の方法(定量下限値=空試験値+5×標準偏差)に従い定量下限値を算出したところ、培養液では3.7 ng/mLであった。また、MEHPの定量下限値については、今回は検量線の下限值(1 ng/mL)を定量下限値としたところ、培養液では2.0 ng/mLであった。DEHPを培養液に5 ng添加してその回収率を求めた(n=3)ところ、114% (CV=6.5%)であった。一方、MEHPを培養液に2 ng添加して回収率を求めたところ(n=3) 98% (1.6%)であった。

DEHPはVehicleおよびDEHP添加試料、MEHPはVehicle、MEHP添加試料、DEHP添加試料について分析した。その結果、MEHPについてはほぼ添加した通りの量が測定されたが、DEHPは4日インキュベートした後の試料からはバックグラウンドレベルしか検出されなかった。DEHP添加群におけるMEHP量は定量下限値

(2.0ng/mL)以下であった。表4および表5に結果を示した。

表4 マウス胚培養液に添加したDEHPの濃度

添加濃度(ppb)	培養前 DEHP 測定値(ppb)	培養後 DEHP 測定値(ppb)
vehicle	17	8.8
800	282	9.8
80	44	5.6

表5 マウス胚培養液に添加したMEHPの濃度

添加濃度(ppb)	培養前 MEHP 測定値(ppb)	培養後 MEHP 測定値(ppb)
vehicle	<2.0	<2.0
1400	1970	1440
140	184	136

D. 考察

平成26年度の研究により、移植した胚盤胞数の25%程度のマウス個体を出生させられる胚培養・移植技術を得た。これにより平成27年度以降、情動認知行動解析に供するマウス個体の取得を行える技術基盤が整ったと考えられる。人工授精による個体取得には、一般に雑種1代目(例えばC57BL/6とDBA/2のF1であるBDF1)マウスが、受精率、出生率いずれも良好であることが知られている。しかし本研究においては、出生個体の情動認知行動解析ならびに網羅的遺伝子発現解析を実施するため、過去に

蓄積された知見との整合性を最優先とし、今後も C57BL/6 マウスを使用する方針である。

高感度の分子生物学的解析に必須となる高品質な DNA、RNA のマウス胚盤胞からの同時回収に成功し、平成 27 年度以降、Percellome 法を用いた定量的遺伝子発現解析を行う予定である(MEHP 暴露胚盤胞の遺伝子発現解析は先行実施中)。Percellome 法はサンプル中の細胞数を基準に定量化する手法だが、通常の方法(ホモジナイズ液中の DNA 含量から細胞数を推定)は、胚盤胞に含まれる DNA が極めて微量であったため、通常法の適用は不可能であった。この問題は胚盤胞を蛍光顕微鏡で観察し、核を計数して胚盤胞を構成する細胞数を直接計測することで解決した。複数回行った計数で、胚盤胞 1 個当たりの細胞数は誤差の範囲で一致しており、再現性良く均質な胚盤胞が取得できているものと考えられる(表 2)。

2 系統のマウス由来の ES 細胞(ESC)、EpiS 細胞(EpiSC)のうち 1 系統分(EB3DR-ESC、EB3DR-EpiSC)は不安定であったため、まず BDF1-ESC、BDF1-EpiSC を用いて ESC と EpiSC の比較実験を行うこととした。

河上強志博士の協力を得てフタル酸類の微量測定を行い、環境中フタル酸類の混入に細心の注意を払った結果、検出感度、バックグラウンドレベルともに本研究で目標とする水準を達成できた。MEHP については培養期間を通じてほぼ添加した通りの濃

度で検出されたものの、DEHP は培養 4 日目のサンプルではバックグラウンドレベルまで濃度が低下した。これは、DEHP の水への分配係数が MEHP よりも 10^4 - 10^5 低いことから、培養液ドロップに重層した流動パラフィンへと DEHP が移行した可能性が高い。胚操作の容易化のため流動パラフィンは広く一般に用いられるが、DEHP 暴露実験のためには、流動パラフィンを用いない培養技術を確立する必要があると思われる。また、流動パラフィンはヒト人工授精においても常用されることから、ヒト胚培養条件下での培養液中 DEHP の動態についても実験・調査が必要と考えられる。

E. 結論

培養胚盤胞からの個体取得、DNA・RNA 回収、EpiSC 培養技術、培養液中フタル酸類測定について、いずれも研究に必要な水準を達成した。平成 27 年度は MEHP 暴露実験を先行して進める一方、DEHP 暴露方法について検討を継続する。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

付録1 マウス/ラット ES 細胞の培養方法

<基礎培地組成>

DMEM/F-12 medium (Gibco, 10565018)	240ml
Neurobasal medium (Gibco, 21103049)	240ml
Glutamax (Gibco, 35050079)	5ml
Non-essential amino acid (Gibco, 11140050)	5ml
N2 supplement (Gibco, 17502048)	2.5ml
B27 supplement (Gibco, 0080085SA)	5ml
2-Mercaptoethanol (Gibco, 21985-023)	500ul

(ペニシリン、ストレプトマイシン添加)

<使用時に添加する因子>

PD0325901: 1mM に Dimethyl sulfoxide で suspend. -20°C で保存。

Working は 4°C で保存。Final conc. 1uM で使用。

CHIR99021: 3mM に Dimethyl sulfoxide で suspend. -20°C で保存。

Working は 4°C で保存。Final conc. 3uM で使用。

Mouse LIF (Chemicon): final 1000Unit/ml で使用。

<手順>

0.1% Geratin/DDW で培養プレートのコートする。

室温で 5-30 分程度放置後、吸引し、乾燥させる。

↓

細胞を培地と同量の PBS で洗浄し、吸引。

↓

0.05% trypsin を加え、37°C にて 1-3 分放置。

↓

5 倍量の 10% FBS 含有培地 (Factor 不含) を加え、細胞懸濁液を回収。

遠心管に回収し、200g x 3min で遠心。

↓

上清を吸引し、ペレットを新しい培地に懸濁。

1x10⁴-5x10⁴ cell/cm² 程度の密度で細胞を播種。

付録 2 Human ESC / iPSC, rodent EpiSC の培養方法

< 基礎培地組成 >

Knockout DMEM (Gibco, 10829-018)	500ml
Knockout Serum Replacement (Gibco)	90ml
Glutamax (Gibco, 35050079) or L-glutamin	6ml
Non-essential amino acid (Gibco, 11140050)	6ml
2-Mercaptoethanol (Gibco, 21985-023)	600ul

< 使用時に添加する因子 >

human bFGF (Peprotech or R&D): final 10ng/ml

< Dissociation Solution >

2.5% Trypsin	10ml
10mg/ml Collagenase IV	10ml
KSR	20ml
100mM CaCl ₂	1ml
1x PBS	59ml

< Y-27632 1000x solution >

培地にて 10 mM に suspend し、分注。-20°Cにて保存。

< 手順 >

継代前日

0.1% Geratin/DDW で細胞を継代する培養プレートのコートする。

室温で 5-30 分程度放置後、吸引し、乾燥させる。

↓

あらかじめ暖めておいた 10%FBS/DMEM に mitomycin C 処理した MEF を懸濁。2-3e4 cell/cm² 前後に播種。

継代当日

継代する細胞から培養上清を吸引。

培地と同量の PBS で洗浄し、吸引。

↓

dissociation solution を加え、37°Cにて 3・5 分放置。

↓

5 倍量の培地 (bFGF 不含) を加え、細胞懸濁液を回収。
遠心管に回収し、200g x 3min で遠心。

↓

上清を吸引し、ペレットを新しい培地に懸濁。

ペレットを砕きすぎないように留意。

細胞の増殖速度に応じて、1:3:1:20 に希釈し、MEF coat したプレート/ディッシュに細胞を播種。