

付録3 ESCおよび他の pluripotent stem cell の凍結方法

<Freezing media 最終組成>

各細胞用 expansion medium 50%

Knockout Serum Replacement 40%

Dimethyl sulfoxide(DMSO) 10%

<手順>

20% DMSO/80% KSR を作製。混合後、氷上静置。

↓

細胞を継代時と同様に剥離し、遠心。ペレットを増殖用培地 (growth factor 不含) で懸濁する。

↓

冷 20% DMSO/80% KSR を等量加え、ゆるやかに攪拌する。

↓

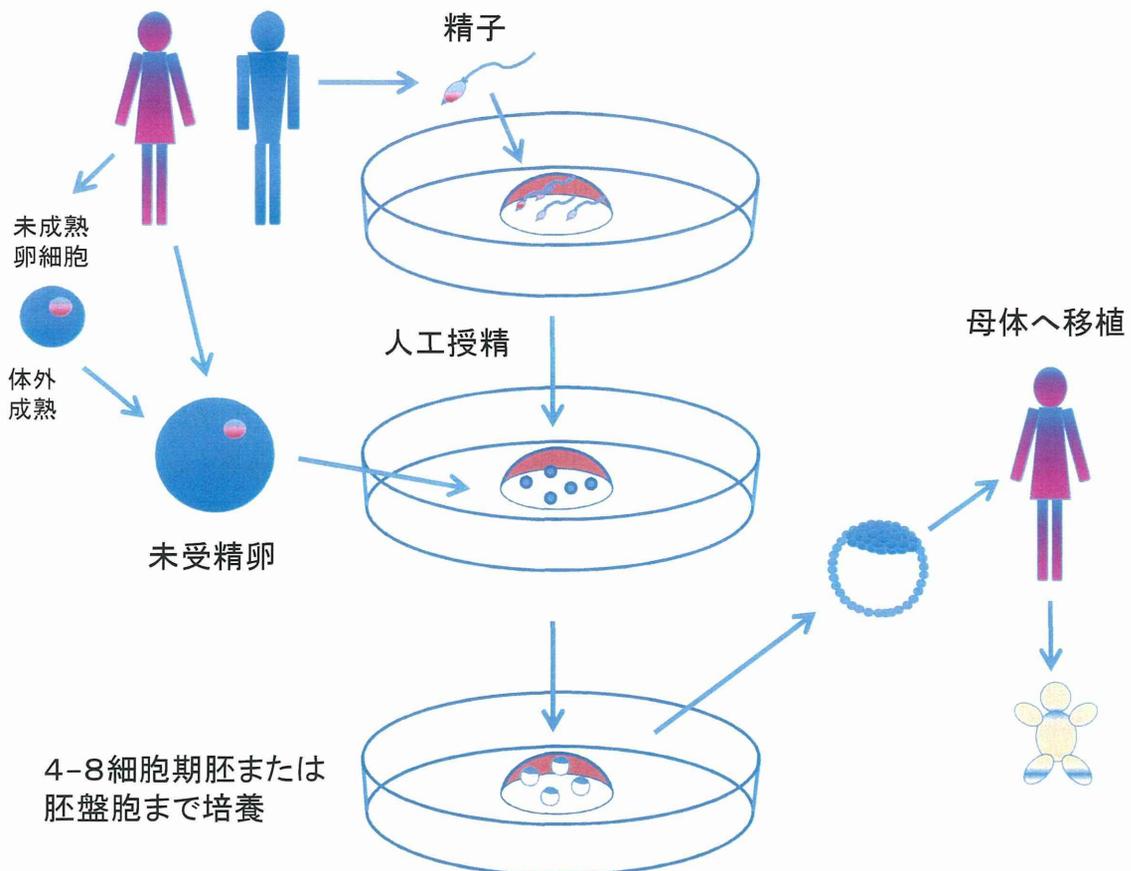
Cryogenic vial に分注し、簡易細胞凍結容器 (ex. NALGENE #5100-0001) に入れ、-80℃にて数時間から一晩かけて凍結。

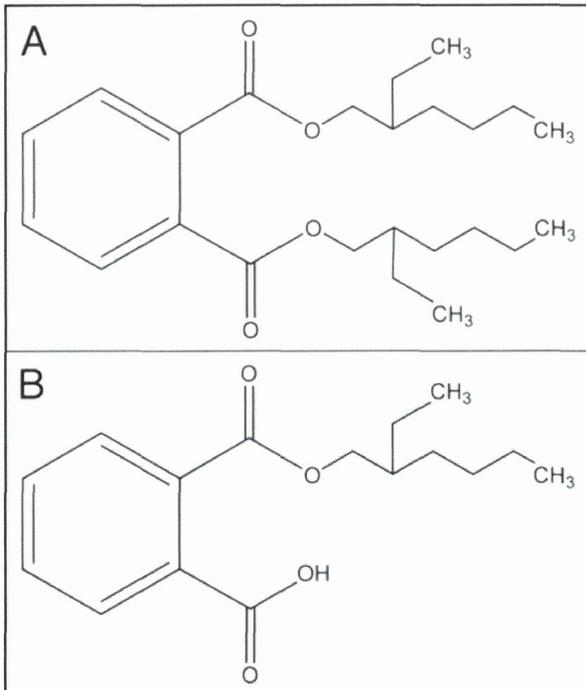
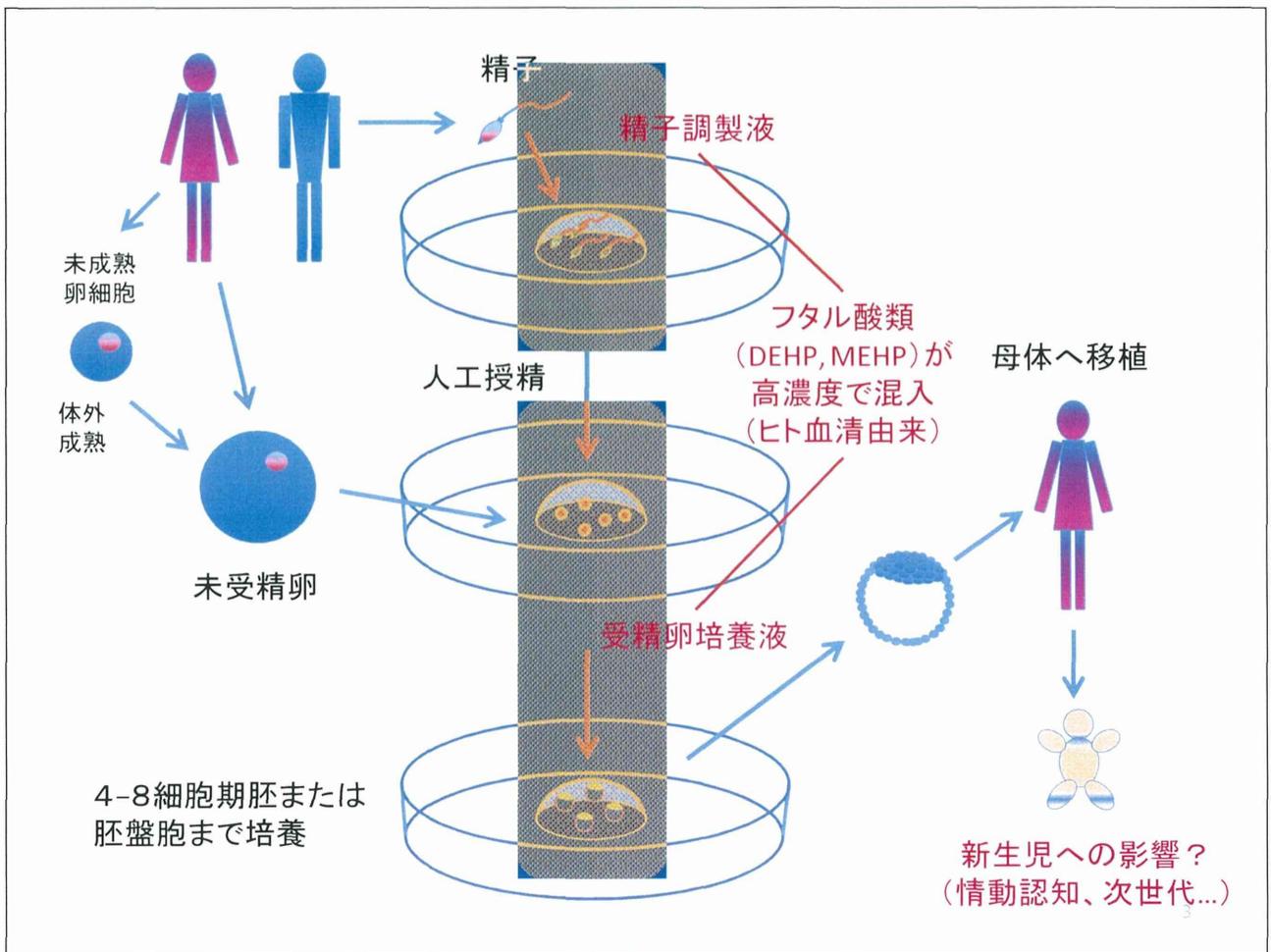
↓

液体窒素タンク中または-150℃にて保管。

発生工学的手法を用いた マウス初期胚へのフタル酸類影響の解析

安彦 行人





A: DEHP

和名 フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)

CAS No. 117-81-7

2010年国内出荷量 140,389トン

用途: プラスチック可塑剤

生殖発生毒性(マウス) NOAEL 14mg/kg/day

発がん性 グループ2B

(発がん性を有する可能性がある)

TDI(耐容1日摂取量) 30µg/kg/day

(平成25年、食品安全委員会)

医療用ポリ塩化ビニル製品(血液バッグ等)

...代替が遅れている

曝露量: 輸血(成人) 8500µg/kg/day

(新生児) 22600µg/kg/day

B: MEHP

和名 フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)

DEHPの代謝産物

背景： ヒト胚の培養液中に高濃度で フタル酸類(DEHP, MEHP)が混入していた

- 厚労科研費・牧野班※(平成22年度)での測定結果

最大検出量

受精卵培養液:	DEHP 65.2µg/l MEHP 131µg/l
精子調製液:	DEHP 112µg/l MEHP 252µg/l
(母体血清 中央値):	DEHP<12µg/l MEHP<2.8µg/l)

添加用ヒト血清アルブミン: DEHP 982µg/l MEHP 1840µg/l

※化学物質リスク研究事業「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に関する研究」

人体への影響の有無を推定するための知見が少ない。

動物を用いた実験が必要

5

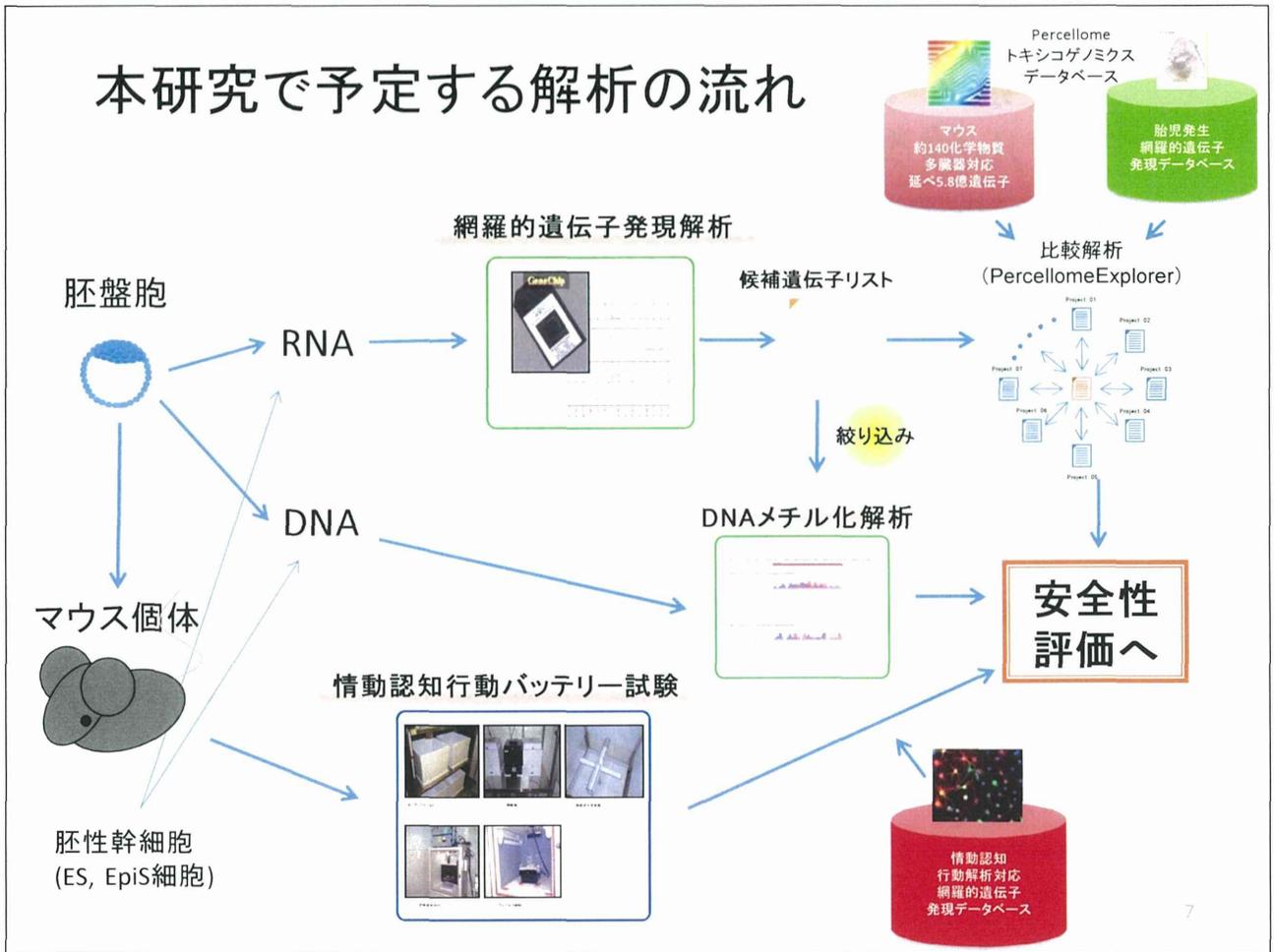
人工授精で出生した児に、DNAメチル化の 変化が生じていることを示唆する知見

- ゲノムDNAメチル化の異常によると思われる先天性異常の増加
インプリンティング異常症(Beckwith-Wiedemann症候群、Silver-Russel症候群)増加
H19遺伝子のメチル化低下(Hiura *et al.*, *Hum Reprod* 27, 2012)
- 出生時体重の変化(成長因子の発現に変化がある?)
凍結胚移植で出生した児の出生時体重増加
(Nakashima *et al.*, *Fertility and sterility* 99, 2013)
培養液の種類(メーカー)により児の出生時体重に差がある
(Nelissen *et al.*, *Hum Reprod* 27, 2012)

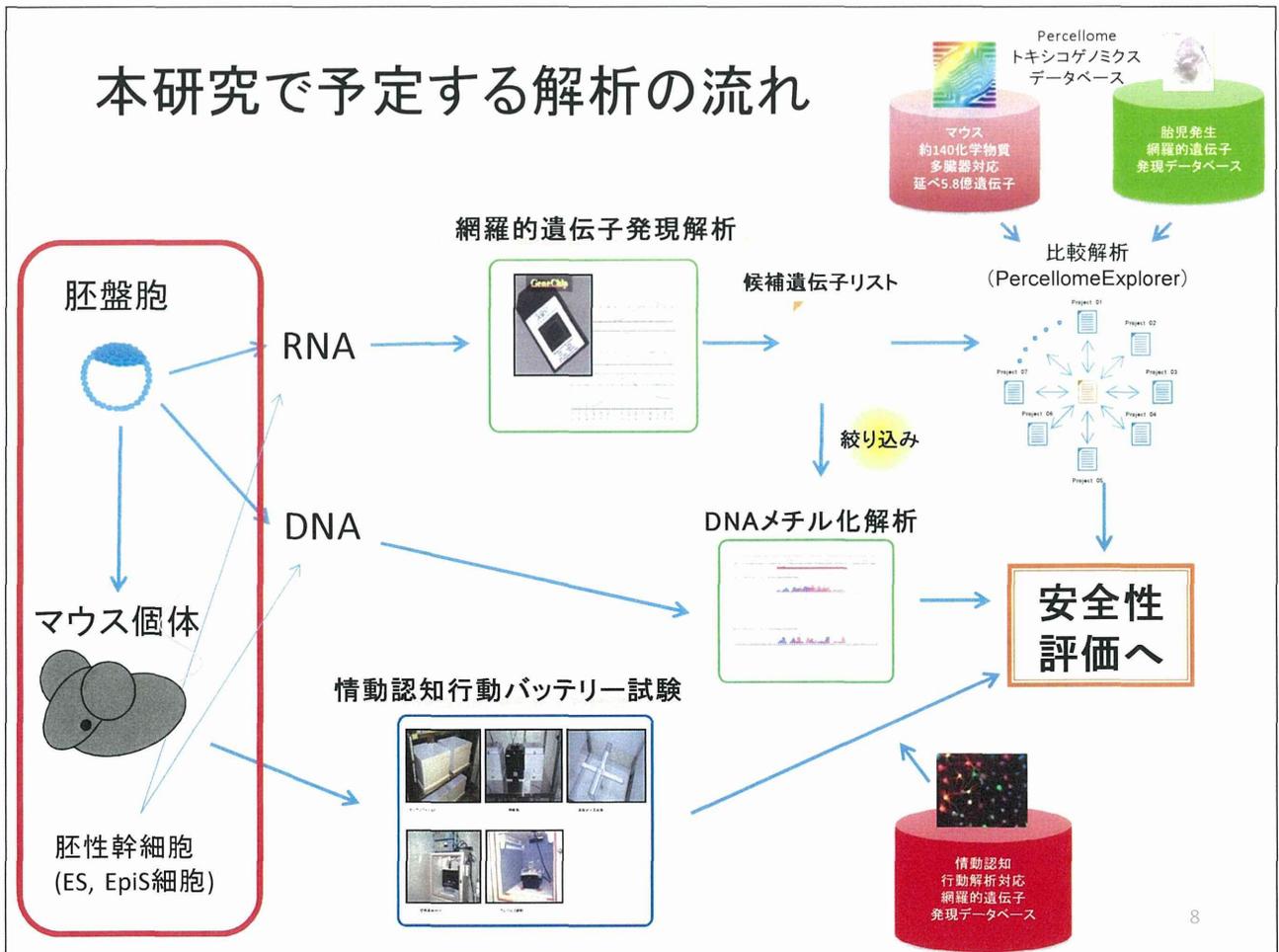
H19遺伝子のメチル化低下が成長因子IGF2の発現上昇をもたらし、
体重増加の原因となっている可能性が考えられる。

人工授精により得られた胚・個体の
DNAメチル化状態を解析し、DEHP/MEHP混入の
影響の有無を調べる必要がある。

本研究で予定する解析の流れ



本研究で予定する解析の流れ

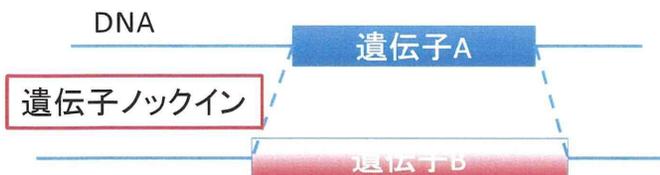
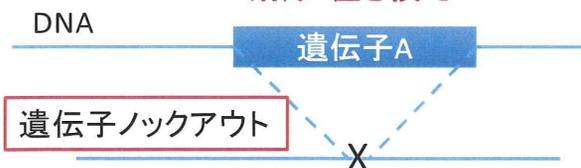
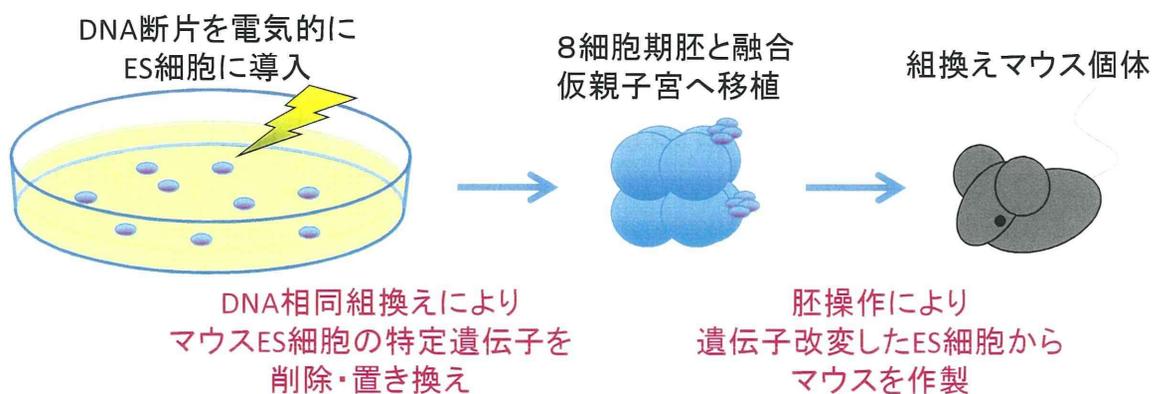


人工授精、遺伝子改変マウス作製工程が常時稼働



約60系統の遺伝子改変マウスを樹立(約4系統/年)
 生体で維持するほか、凍結精子、凍結受精卵として保管

DNA相同組換えによる遺伝子ノックアウト・ノックイン (目的遺伝子のみを破壊・ほかの遺伝子で置き換え)



最近の業績: 核内受容体ヒト型化マウス

Development of humanized steroid and xenobiotic receptor mouse by homologous knock-in of the human steroid and xenobiotic receptor ligand binding domain sequence.

Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J.

J Toxicol Sci. 2012;37(2):373-80.

実験1: 培養胚盤胞の子宮移植によるマウス個体作製

実験2: 飲水投与による着床前フタル酸曝露マウス個体の作出

実験3: マウス胚性幹細胞(ES細胞、EpiS細胞)を用いた
化学物質曝露影響比較系の樹立

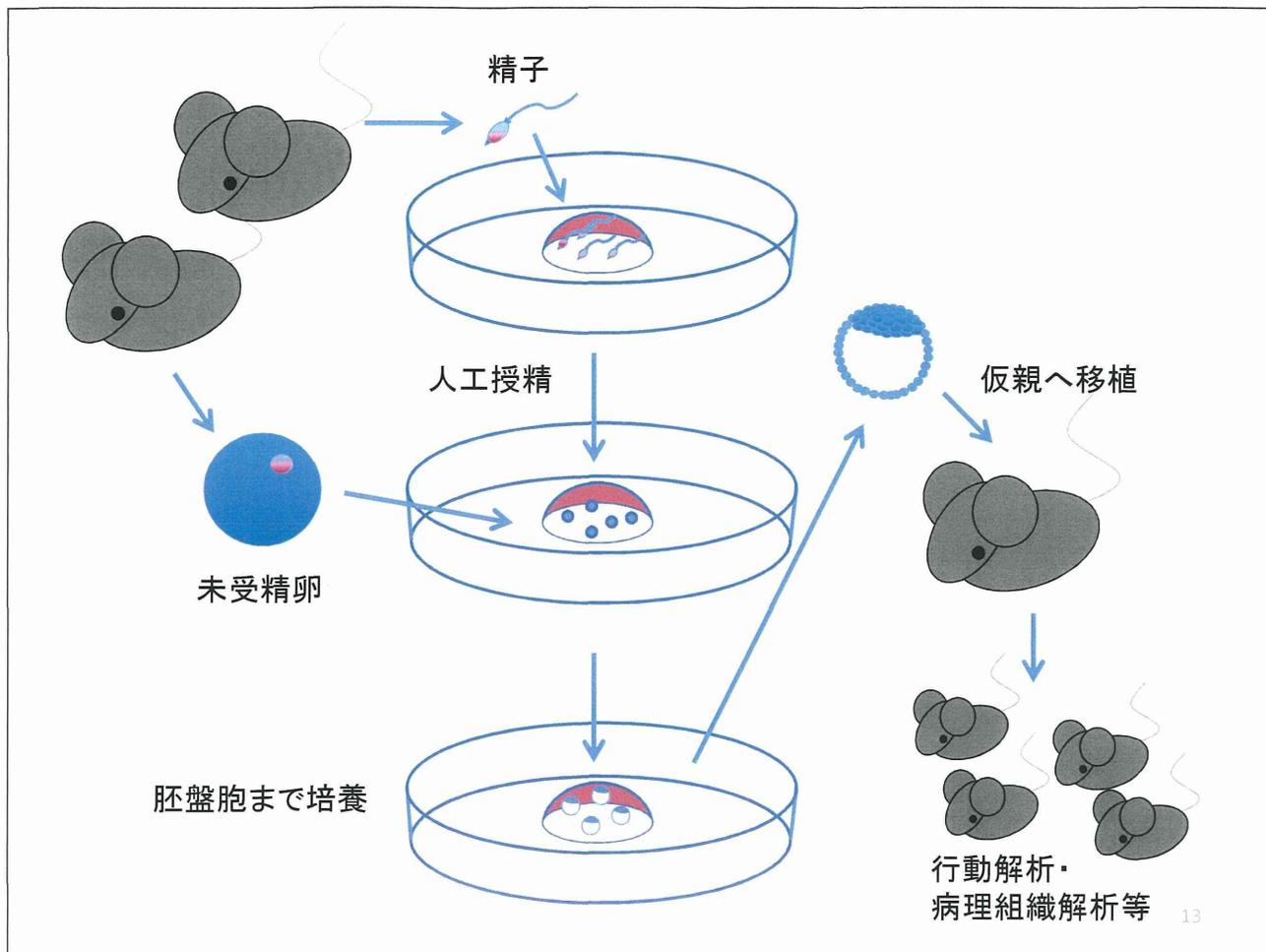
11

実験1: 培養胚盤胞の子宮移植によるマウス個体作製

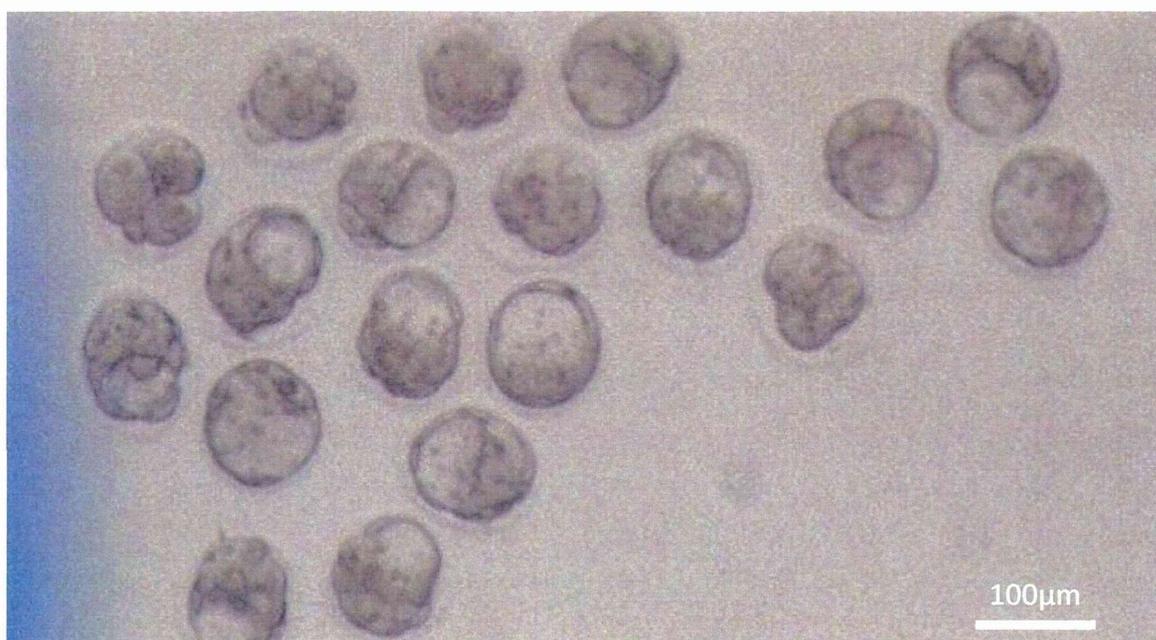
実験2: 飲水投与による着床前フタル酸曝露マウス個体の作出

実験3: マウス胚性幹細胞(ES細胞、EpiS細胞)を用いた
化学物質曝露影響比較系の樹立

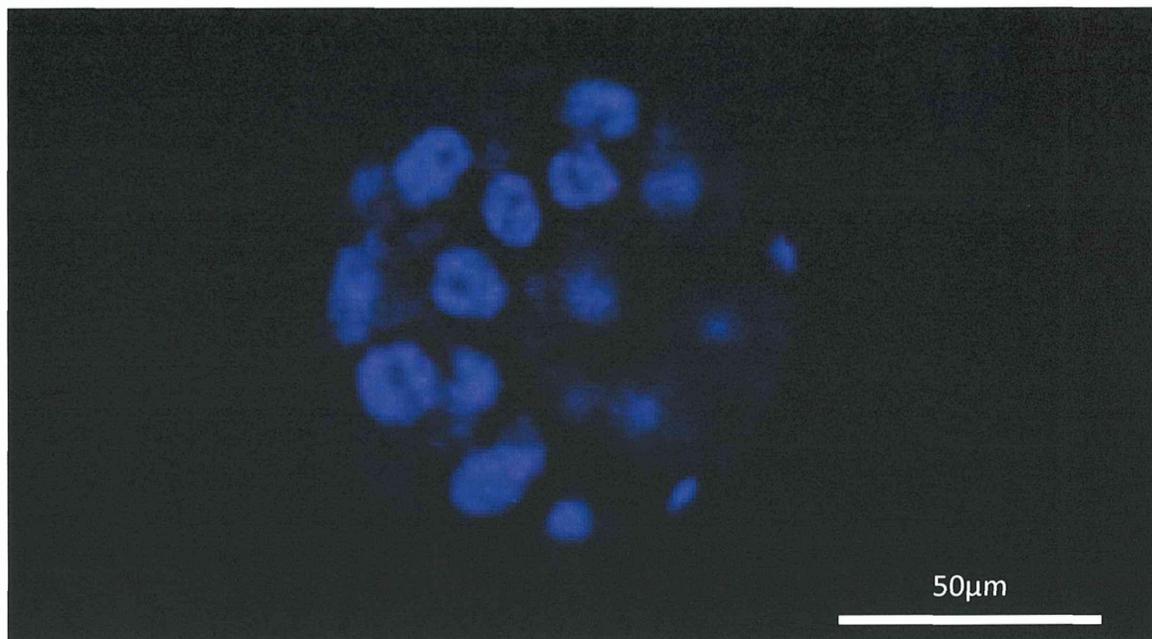
12



人工授精後72時間培養したマウス胚盤胞



人工授精後72時間培養したマウス胚盤胞 (細胞核をDAPIで染色した蛍光像)



15

人工授精-胚培養-胚移植による出生成績

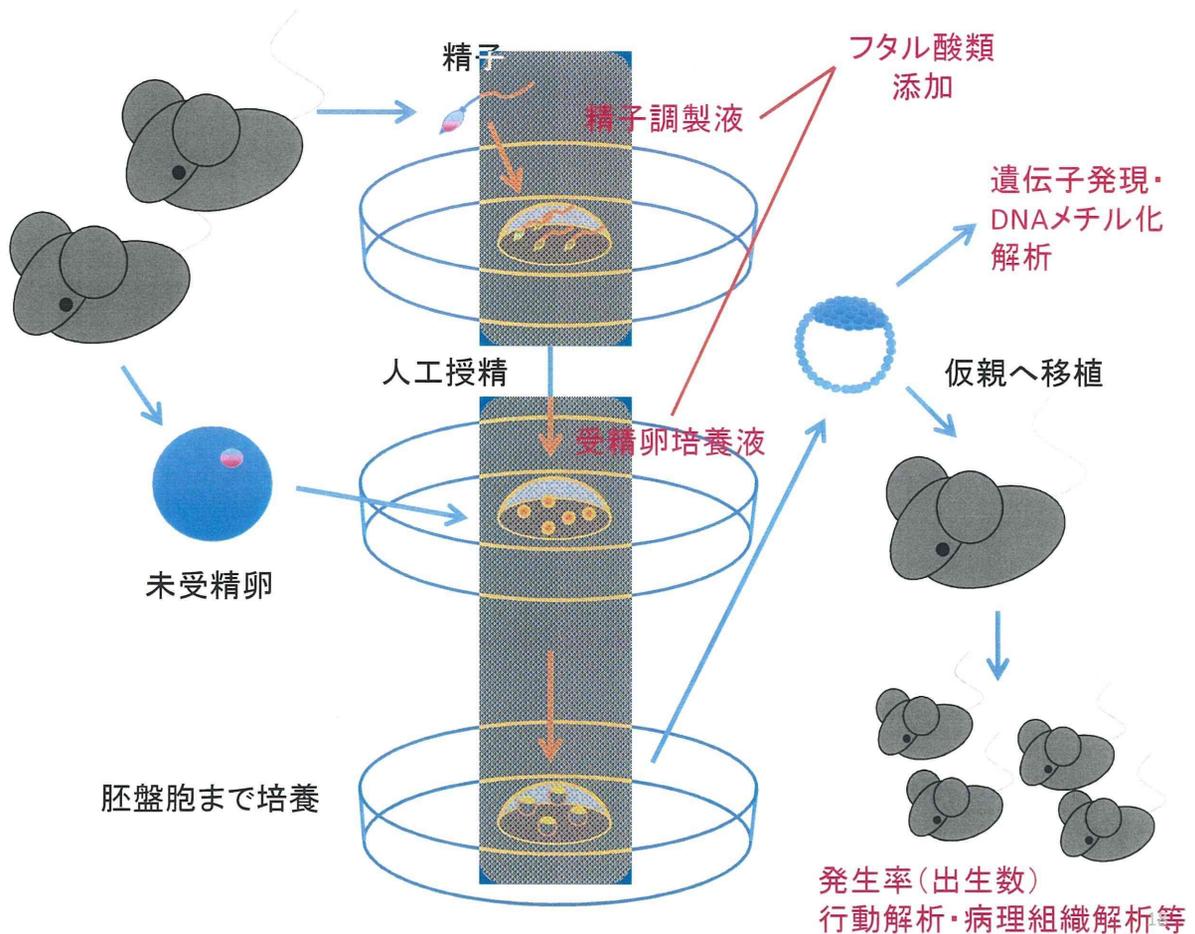
人工授精日	移植胚数	移植胚日齢	仮親数	仮親日齢	分娩方法	出生数(%)	着床数(%)	備考
14.06.10	113	3.5	6	3	自然	9(8)	-	
14.06.23	48	3.5	3	4	自然	0(0)	-	妊娠せず
14.06.23	102	3.5	7	3	自然	7(7)	-	
14.07.01	96	3.5	6	3	自然	0(0)	-	透明帯除去
14.07.22	48	4	3	2.5	自然	0(0)	-	妊娠せず
14.07.28	100	3	5	2.5	自然	4(4)	-	
14.07.28	40	3	2	2.5	帝王切開	10(17)	確認せず	
14.08.04	132	3	6	2.5	自然	18(14)	-	
14.08.12	20	3	1	2.5	自然	6(30)	-	
14.08.12	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)	-	
14.08.18	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)	
14.09.16	16	3.5	1	2.5	自然	8(50)	-	自然交配 8cellを培養
14.10.28	94	3	5	2.5	帝王切開	18(19)	55(59)	

16

人工授精-胚培養-胚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
14.06.23	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)	-	
14.07.28	40	3	2	2.5	帝王切開	10(17)	確認せず	
14.08.18	32	3	1	2.5	自然	5(16)	-	
14.08.18	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)	
14.09.16	16	3.5	1	2.5	自然	8(50)	-	自然交配 8cellを培養
14.10.28	94	3	5	2.5	帝王切開	18(19)	55(59)	

移植した胚盤胞数の2割は産仔が得られる。
(フタル酸曝露実験に入れるレベルを達成)



マウス胚盤胞・個体生産計画

過排卵誘発♀マウス20匹から未受精卵採取(600個)



人工授精(受精率:70%)



胚盤胞まで培養(90%) →移植(378個)



出生76匹(20%) うち♂38匹
→溶媒(V)群、低用量(L)群、高用量(H)群へ
各12匹割り当て可能

19

人工授精胚・フタル酸曝露実験へ向けて

- フタル酸添加方法の検討

DEHP、MEHPとも極めて水に難溶。

アルブミン(遺伝子組み換えで製造されたもの)溶液に混合し、タンパク質分子に吸着させた状態で培養液に加える。

- フタル酸濃度が培養期間を通して安定しているか？
→濃度測定を実施中

当所・生活衛生化学部、河上 強志主任研究官の協力を得た。

20

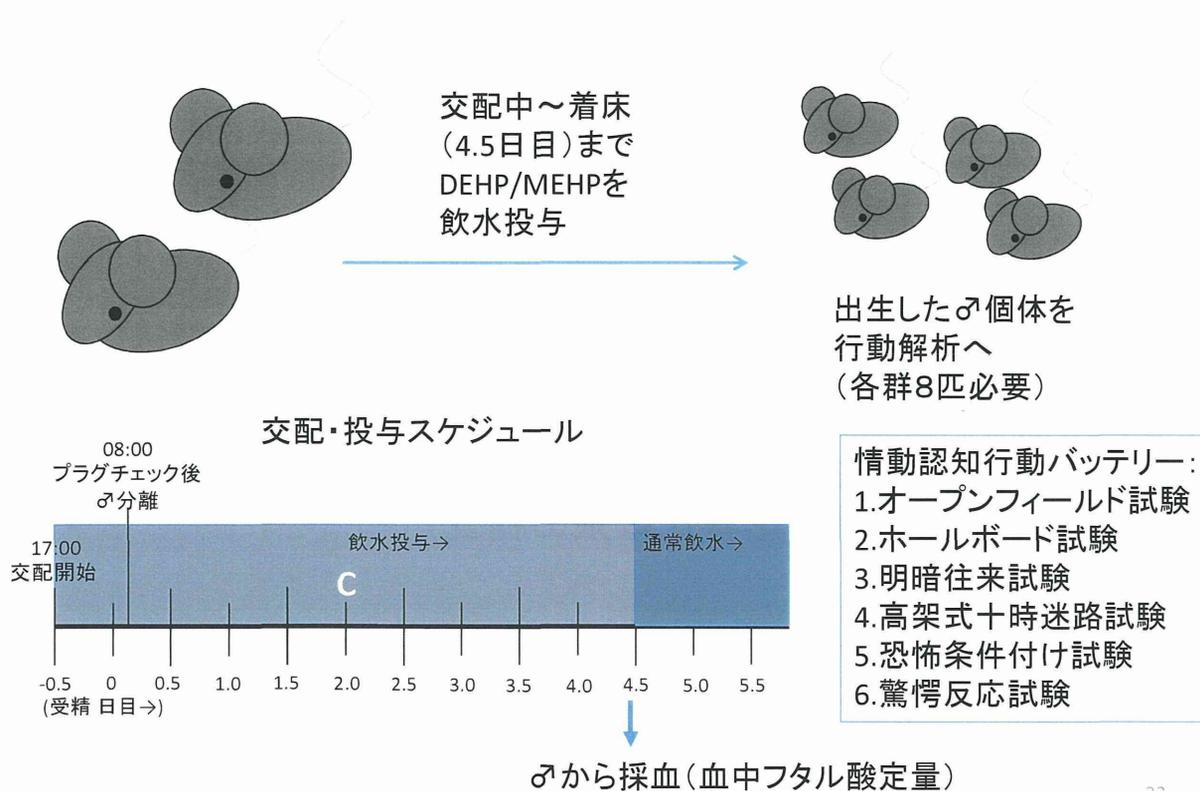
実験1: 培養胚盤胞の子宮移植によるマウス個体作製

実験2: 飲水投与による着床前フタル酸曝露マウス個体の作出

実験3: マウス胚性幹細胞 (ES細胞、EpiS細胞) を用いた
化学物質曝露影響比較系の樹立

21

実験2: 飲水投与による着床前フタル酸曝露マウス個体の作出



22

群構成と交配・出生成績

飲水中の濃度(添加量からの計算値)

DEHP-L: 5 μ M

DEHP-H: 50 μ M

MEHP-L: 2 μ M

MEHP-H: 20 μ M

マウス体重30g/匹、1日飲水量3gとし
フタル酸がすべて体内に吸収されると仮定して
L群の体内フタル酸濃度が、胚培養液で検出された
最大濃度と等しくなるよう設定した。

	Vehicle	DEHP-L	DEHP-H	MEHP-L	MEHP-H
交配♀数	20	20	20	20	20
プラグあり	14	14	14	13	15
妊娠数	7	10	4	3	4
♂出生数	24	40	15	11	15

いずれの群も行動解析に必要な♂個体数は確保できた。

体内MEHP濃度が高いと思われるDEHP-H, MEHP-L, MEHP-H群で
妊娠数、出生数が少ない傾向が見られる。

23

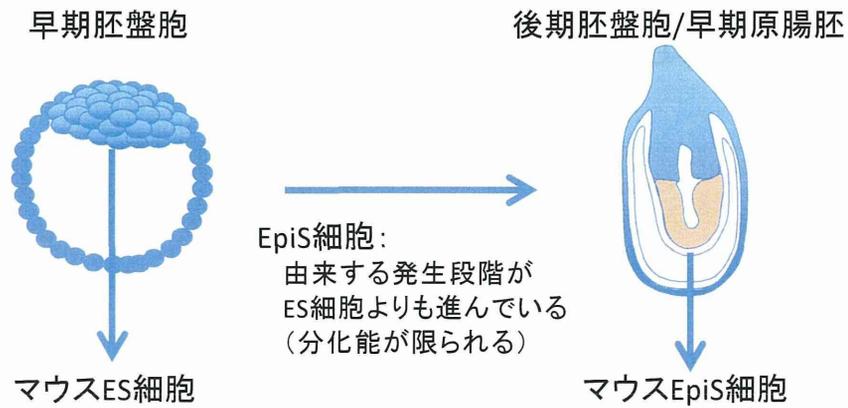
実験1: 培養胚盤胞の子宮移植によるマウス個体作製

実験2: 飲水投与による着床前フタル酸曝露マウス個体の作出

実験3: マウス胚性幹細胞(ES細胞、EpiS細胞)を用いた
化学物質曝露影響比較系の樹立

24

胚性幹細胞：ES細胞とEpiS細胞

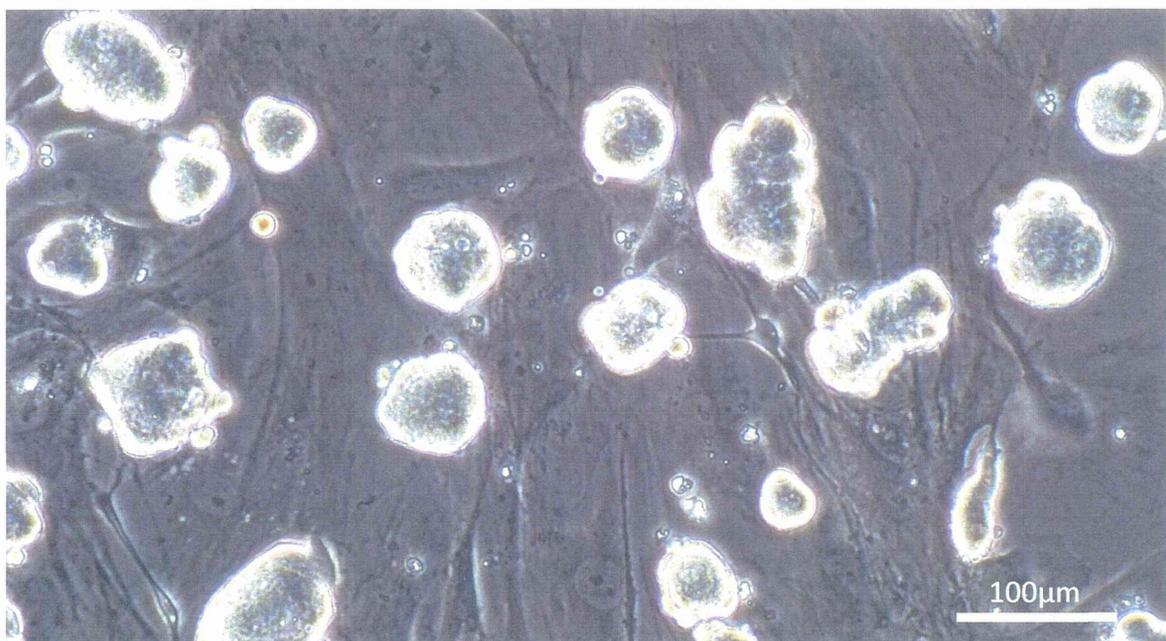


ヒトES/iPS細胞はマウスES細胞よりも
マウスEpiS細胞に近い特徴を持つ

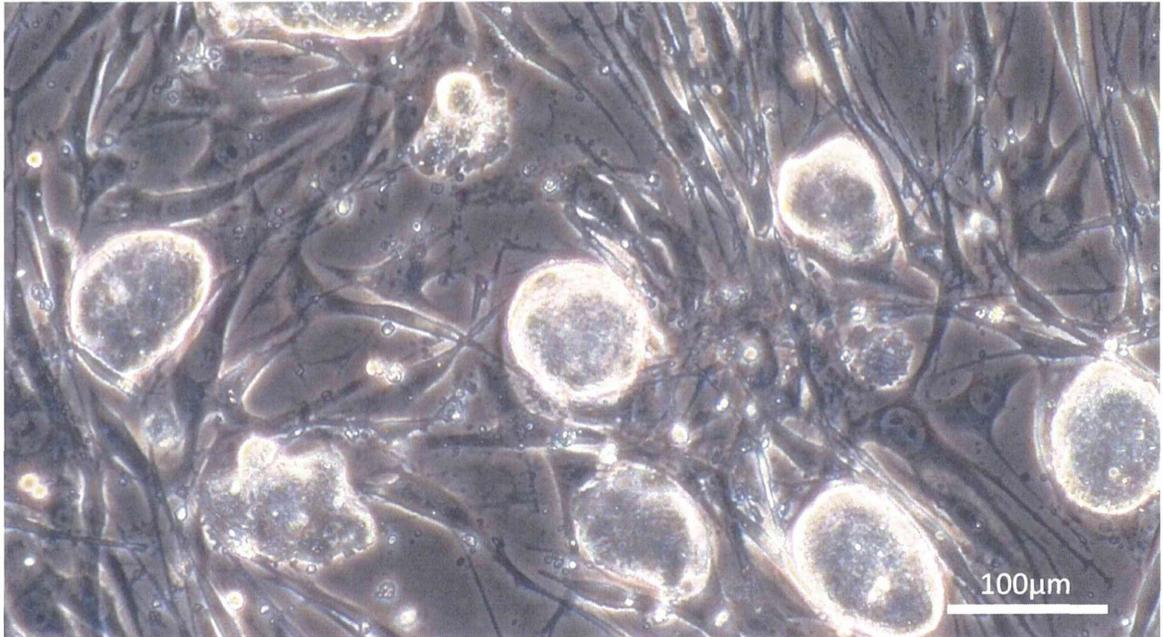
	マウスES細胞	マウスEpiS細胞	ヒトES/iPS細胞
分散に対する耐性	あり	なし	なし
要求する成長因子	LIF	bFGF, Activin	bFGF, Activin
生殖細胞への分化能	あり	なし	(確認不能)

→ヒトES/iPS細胞を、初期胚の代わりに薬剤応答性等の評価に用いるには
マウスES細胞とEpiS細胞を比較した知見が必要

ES細胞(BDF1マウス由来)



EpiS細胞(BDF1マウス由来)



まとめ

- 人工授精後、胚盤胞まで培養した胚の子宮移植により、移植胚の2割前後の産仔を安定して得られる見通しがついた。
- 網羅的遺伝子発現解析・DNAメチル化解析に使用可能な品質の胚盤胞を供給できる体制が整った。
- DEHP/MEHPを交配日から4.5日目まで飲水投与したマウスから、情動認知行動解析に十分な数の♂仔マウスが得られた。
- 同系統マウス由来のES細胞、EpiS細胞株をセットで入手し、培養・維持が可能となった。

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「①情動認知行動評価技術を用いた個体における *in vivo* 影響解析研究」
「②生殖工学技術を用いた *in vitro* 影響解析研究」

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。そこで受精卵及び出生児に及ぼす影響の評価に不足している科学的情報を、マウスを用いて取得するための研究開発を行う。

平成26年度は、実験条件を定めるための予備試験として、①交配時のフタル酸類（DEHP および MEHP）の飲水投与による *in vivo* 経胎盤初期胚暴露実験を実施し、その影響を産仔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、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）を含めて解析した。その結果、飲水投与個体の血中濃度は飲水中濃度の1/50～1/1000であり、得られた雄産仔マウスに行動異常は認められないことを確認した。また、②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）の過程における、MEHP 暴露(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。

A. 研究目的

ヒト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。特に、本分担研究では、①交配時のフタル酸類の飲水投与による胎内暴露実験及び出生マウスの情動認知行動影響と、②体外成熟培養系におけるフタル酸類暴露による卵母細胞影響を対象とする。

B. 研究方法

①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影響解析

生後 10 週齢 C57BL/6CrSlc マウス（日本 SLC）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量）。DEHP、MEHP の添加量は、マウスの 1 日飲水量を 1 匹あたり 3ml とし、添加した DEHP、MEHP が 100% 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。なお検体は、DEHP、MEHP 共、100% エタノールを溶媒とした 1000 倍濃度のストック溶液を作成した後、所定濃度の水溶液を作成した。全ての操作はガラス器具を用いて行った。飲水投与に当たっては、溶出や吸着を避けるため、清浄なガラス製給水瓶を用いた。

明暗周期 12 時間（7 時点灯、19 時消灯）の飼育環境において、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。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、明暗往来試験、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を行った。以下に各行動試験の概要を記載する。

○オープンフィールド試験：新規環境下

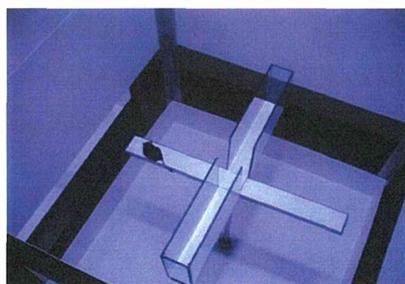
におけるマウスの自発的な活動性（探索行動性）を測定する試験。



○明暗往来試験：マウスが新奇環境下で探索行動を行う性質と、明るい環境を避ける性質とを利用し、不安関連行動を評価する試験。

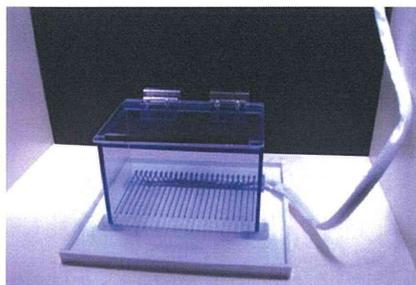


○高架式十字迷路試験：マウスが壁際を好み、高所を避けるという性質を利用した不安関連行動を評価する試験。

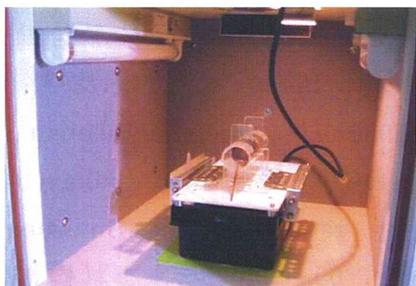


○条件付け学習記憶試験：マウスに場所や音、光などの条件刺激と電気刺激などの無条件刺激を組み合わせることで条件づけした後、条件刺激を再度提示した際にマウスがすくみ反応（フリージング）を示した時間を測定し、一定時間

あたりのフリージング持続時間を記憶能力の指標とする試験。



○プレパルス驚愕反応抑制試験：突発的に大きな音刺激をマウスに呈示したときに生じる反射（全身の筋肉収縮）による体動を、加速度計や静電気検出器などによって測定する試験。



②体外成熟培養系におけるフタル酸類暴露による卵母細胞影響解析

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針付きシリンジを用いて卵胞を裂き、卵丘細胞-卵母細胞複合体(COC)として採取した。

引き続き、採取したCOCを成熟培地(Waymouth+Hypoxanthine)のドロップ(100μl)に移した。さらに3つのドロップ間を移動させ洗浄した後、各群

(MEHP 0μM、0.5μM、5μM、50μM)の成熟培地(10μl)をセットしたハンギングドロップカルチャープレート各穴に、ひとつずつCOCをいれ、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。

(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、国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」及び東北大学の「東北大学における動物実験に関する規定とその解説第10版」が定める動物実験に関する指針を遵守し遂行した。

C. 研究結果

①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影響解析

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)は、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 の濃度を測定（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）への吸着が疑われた。

②体外成熟培養系におけるフタル酸類暴露による卵母細胞影響解析

溶媒対照群では順調な成熟と減数分裂像が観察されたが、MEHP 暴露群(5 μ M、50 μ M)では、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。また蛍光顕微鏡写真では、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た。



D. 考察

①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影響解析

交配に用いた雄マウスの飲水投与実験後の血中濃度は、飲水投与された DEHP 及び MEHP に比し極めて低濃度であって、性差があるとしても、飲水中の DEHP、MEHP はほとんど生体に取り込まれていなかったと考えられる。Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. (1982) Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. Environ. Health Persp., 4, 19-25.及び、Albro PW (1986) Absorption, metabolism, and excretion of di(2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. Environ. Health Persp. 65, 293-298.によれば、500mg/kg 前後の大量投与の場合は DEHP であっても体内に取り込まれるが、多くの DEHP は小腸内の消化酵素により MEHP や 2-ethylhexanol に分解されると報告されている (Lhuguenot JC and Cornu MC (1993) Metabolism of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and di-(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) and their relationship to peroxisome proliferation in different species. In Peroxisomes: Biology and Importance in Toxicology and and Medicine, pp. 465-483. Albro PW. and Thomas RO. (1973) Enzymatic hydrolysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate by lipases. Biochim. Biophys. Acta, 360, 380-390.)。MEHP は特に分解

されず、消化管にて吸収されるとあり、経口若しくは飲水投与時においては、DEHPよりも吸収量が多いと考えられ、今回の実験結果とも整合する。また暴露実験終了後の給水瓶中の水溶液における DEHP、MEHP 濃度が調整当初より大幅に低下している(分解若しくは容器(ガラス製給水瓶)への吸着が推定される)が、このことも実験個体の血中濃度に影響していると考えられる。

これらの結果から、実験環境がフタル酸類で汚染されているとしても、少なくとも飲水による実験環境中のフタル酸類量では生体に吸収されるフタル酸は検出限界以下～極微量であり、今後計画している *in vivo* 実験(人工授精中に 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ことを確認した(既存論文より環境中フタル酸類の経口摂取の場合も同様と考えられる)。

同時に、溶媒対照群におけるフタル酸類血中濃度(検出限界以下～極低濃度)では、情動認知行動に影響を与えない*ことが確認されたことから、今後、環境中フタル酸類の混入を一層厳重に排除して実施する *in vivo* 実験(上記)で有意所見が見られた場合、それは環境中フタル酸類の混入ではなく、体外受精時の DEHP、MEHP 暴露によるものである確率が極めて高いと言える。

* 本研究に用いた行動解析バッテリーは、これまでにドーモイ酸やイボテン酸の自然毒、農薬やビスフェノール類による行動影響を高精度に検出することに成功してきた実績があることから、陰性所見も有意である。

②体外成熟培養系におけるフタル酸類暴露による卵母細胞影響解析

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た。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、ヒト体外受精培養液と同レベルの MEHP 濃度でも成熟率の低下傾向があり、成熟過程においては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。

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が、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)においては、フタル酸類暴露による影響に留意する必要性が示唆された。

E. 結論

本年度は、①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影響解析から、今後実施する本試験(人工授精中に 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、混入防止措置を適切に行えば、普遍的に存在する環境中フタル酸類の微量混入の影響を無視できることを確認すると共に、②体外成熟培養系におけるフタル酸類暴露による卵母細胞影響解析から、高用量の MEHP 暴露により成熟率の低下と減数分裂時の