

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「 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」
「 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、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、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、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、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

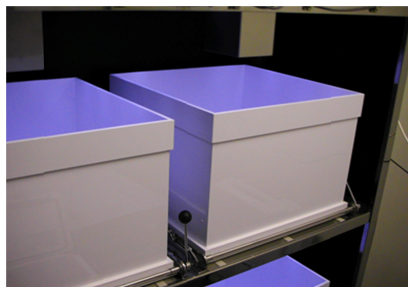
交配時の飲水投与による *in vivo* 経胎盤初期胚 DEHP、MEHP 暴露個体の取得、及び雄産仔マウスにおける情動認知行動影響解析

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。

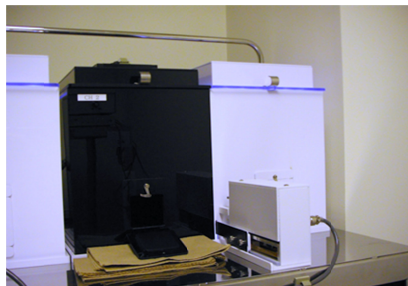
明暗周期 12 時間 (7 時点灯、19 時消灯) の飼育環境において、飲水投与は交配日の午後 5 時、交配開始と同時に開始し交尾後 4.5 日まで行った。得られた産仔マウスを生後 12 週齢時にオープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験からなるバッテリー式行動解析を行った。以下に各行動試験の概要を記載する。

オープンフィールド試験：新規環境下

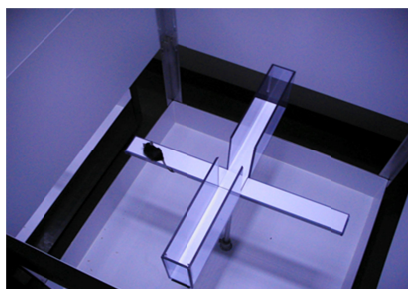
におけるマウスの自発的な活動性 (探索行動性) を測定する試験。



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。

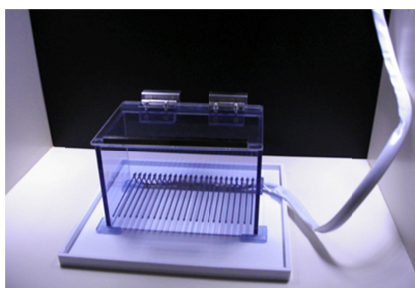


高架式十字迷路試験：マウスが壁際を好み、高所を避けるという性質を利用した不安関連行動を評価する試験。

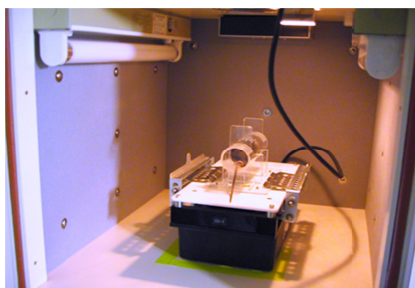


条件付け学習記憶試験：マウスに場所や音、光などの条件刺激と電気刺激などの無条件刺激を組み合わせることで条件づけした後、条件刺激を再度提示した際にマウスがすくみ反応 (フリージング) を示した時間を測定し、一定時間

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。



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の各穴に、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

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

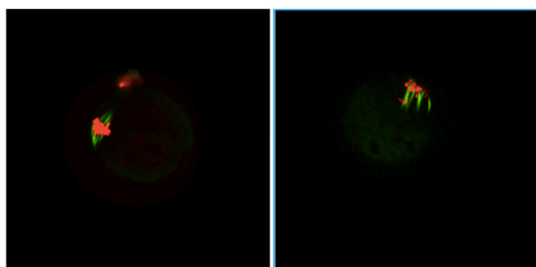
オープンフィールド試験による検定項目(総移動量、中央部滞在率、総移動回数)、明暗往來試験による検定項目(明所滞在時間、明暗往來数、暗所滞在時間)、高架式十字迷路試験による検定項目(総移動量、オープンアーム滞在時間、アーム選択数)、条件付け学習記憶試験による検定項目(学習率、空間連想記憶、音連想記憶)、プレパルス驚愕反応抑制試験による検定項目(プレパルス 90、95、100、105dBにおける120dB驚愕反応抑制率)は、DEHP暴露群、MEHP

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。

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 MEHP 5 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

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。

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、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、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

異常が検出されたことから、今後、分子メカニズムの解析に基づく安全性評価研究を行う必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 and Tanemura K, Histone h4 modification during mouse spermatogenesis. *J Reprod Dev* 60(5): 383-387, 2014.

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 and Tanemura K, Site-specific phosphorylation of Tau protein is associated with deacetylation of microtubules in mouse spermatogenic cells during meiosis. *FEBS Lett* 588(11): 2003-2008, 2014.

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

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、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研究発表会(2014.12.)

古川佑介、種村健太郎、相崎健一、北嶋聡、菅野純、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用をもつ殺虫剤の暴露による遅発性の中枢神経影響の比較、第17回環境ホルモン学会研究発表会(2014.12.10)

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研究発表会(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

