

201524017A

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 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

平成 28(2016)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 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

平成 28(2016)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 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

平成 28(2016)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	35
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	51
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	67
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)	99

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。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年度に実施した基盤研究、(a) サンプルや実験環境中のDEHP、MEHPの高感度測定系の確立、(b) マウス体外受精から胚盤胞までの培養条件の最適化、(c) 胚移植による個体の安定作出、(d) 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）を基に、平成27年度はさらに(e) 微量の胚盤胞サンプルから高品質のDNA、RNAを抽出する方法の最適化、(f) 微量DNAサンプルにおけるDNAメチル化解析技術の比較検討、(g) フタル酸類（DEHP及びMEHP）の微量曝露実験の最適化、の検討を実施した。安定した微量曝露が可能であったMEHPについては曝露受精卵の遺伝子発現解析及びDNAメチル化解析や、曝露受精卵を母胎に移植して生まれたマウスにおける情動認知行動解析を実施し、条件付け学習記憶試験による音-連想記憶能の低下が示唆された。一方、DEHPについては、実際の不妊治療で一般的に採用されている流動パラフィン重層培養法では、培養開始時の添加濃度（0 μ M、0.2 μ M、2.0 μ M）に依らず培養終了時（3日後）には培養液中DEHP濃度が0.014～0.025 μ Mになる**ため、一般的な不妊治療において、ヒト体外受精培養液に混入したDEHPによる受精卵曝露は軽微若しくは実質的に起こっていない可能性を見出した。

(*) 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

(**) 2.0 μ M以下の培養液中DEHPは、ほぼ全量が重層した流動パラフィンに移行すると推測される。

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、主任研究官)

A. 研究目的

体外受精に用いる培養液中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おいて不足している科学的情報を、マウスを用いて取得すると共に、初期胚の化学物質曝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) フタル酸類 (DEHP 及び MEHP) の微量曝露実験の最適化

曝露試験において試験期間中の検体濃度維持は試験成立の大前提である。実際の不妊治療で一般的に採用されてい

る流動パラフィン重層培養法においては、流動パラフィン及びプラスチックシャーレが使われているが、前者については親油性の高いフタル酸類が移行する可能性が、後者については環境中フタル酸類の汚染 (ガラス容器と異なり高温焼成によって汚染を除去できない) や、プラスチック素材への吸着と同素材からの溶出が懸念された。そこで実際の不妊治療で採用されている流動パラフィン重層培養法を再現 (KSOMaa 培地 (Millipore、Lot No. 40530-1)、流動パラフィン (ナカライテスク、Lot No. M4P3642)、プラスチックシャーレ (住友ベークライト、MS-11350) を使用) し、培養液中のフタル酸類 (DEHP と MEHP) の濃度を培養開始時と終了時 (3 日後) において下記 B-xi の方法により測定した。

一方、流動パラフィンを重層せず、高温焼成したガラスシャーレで受精卵培養が可能 (即ち個体発生まで可能な胚盤胞の産生が可能であること) であれば、フタル酸類の濃度管理上、より厳密な曝露実験が可能となる。そこで、ガラスシャーレとして 30mm ガラスシャーレ (東京硝子器械株式会社) をフタル酸除去のため 250°C、16 時間焼成して使用し、ガラスシャーレ+流動パラフィンなしにてマウス受精卵の培養を試みた。対照としてプラスチックシャーレ+流動パラフィンなし、及びガラスシャーレ+流動パラフィン重層での受精卵培養実験を行った。

3 日間の培養で得られた胚盤胞は偽妊娠 MCH♀ マウス (交尾後 2.5 日) に移植し、16 日後に着床率・満期発育率を評価した。

ii) 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) を用いて DNA を、また RNAeasy RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を採取した。得られた DNA、RNA は BioAnalyzer (Agilent Technology)、Qubit Fluorometer (Life Technologies)、Nanodrop (Thermo Scientific) を用いて収量及び分解の程度を確認した。

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。通常は、サンプルの DNA 濃度測定によるサンプル中の細胞数の推定を行い絶対定量を行うが、本研究に用いるサンプルは、微量であることから、この定量法の適用が困難であるため、本研究では、プールした胚盤胞数からサンプル中の細胞数を推測する最適化プロトコルを開発 (H26 年度成果) して利用した。

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

上記 i)、ii) に則り 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 法に準じて絶対量を推測し、既存の Percellome データベースとの比較を実施した。

v) 微量サンプルにおける DNA メチル化解析技術の比較検討

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い。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) 法に加え、最近 Swift 社から発売された Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を導入し、比較検討を行った。

vi) マウス人工受精卵の MEHP 曝露による胚盤胞及びマウス個体の作出

C57BL/6CrSlc 雌を過排卵処理 (PMSG 5units/匹 腹腔内投与、48 時間後に hCG 5units/匹 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、媒精 3 時間後に用いる洗浄培地から MEHP を添加 (最終濃度 0 μ M, 0.5 μ M, 5.0 μ M) した KSOMaa 培養液 (Millipore, Lot No. 40530-1) 中で 72 時間 (3 日間) 培養した。な

お培養前及び培養後の培養液サンプルを保存し、GC/MS/MSによりMEHP濃度を測定した。得られた胚盤胞を20個/匹の割合で偽妊娠MCH雌マウス(交尾後2.5日)に移植し、帝王切開にて産仔を得、自然交配により出産させたMCH系マウスに里子付け(里子4匹、里親自身の子6匹の計10匹に数を統一)して哺育させた。

vii) 体外受精におけるMEHP曝露による産仔マウスの情動認知行動解析

上記viで生まれたマウスを群飼いで育て、生後12-13週齢時に情動認知行動解析を実施する。具体的には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を実施する。

viii) 体外成熟/受精/培養系におけるMEHP曝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°Cの操作培地Libovitz's L-15培地(0.1%polyvinyl alcohol, 4mM hypoxanthineを含む)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(100 μ l)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 0 μ M、0.05 μ M、0.5 μ M、5.0 μ M)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をいれ、カルチャープレートを逆さまにし、37°Cインキュベーター内で18時間培養した。培養後、一部のCOCについては卵丘細胞を除去し、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。

受精/培養系での曝露影響については、現在、評価指標の最適化を実施中である。

ix) マウスES細胞、EpiS細胞の比較

ヒトES細胞やヒトiPS細胞と性質が近いと考えられるマウス由来のEpiS細胞と、胚盤胞の内部細胞塊由来でEpiS細胞より多能性が高いと考えられているマウスES細胞との間で、DEHPやMEHPを含む化学物質に対する、主としてエピジェネティックな反応の差異を検討するため、同系統マウス由来のEpiS細胞及びES細胞を用いた曝露実験系の確立を行った。

x) 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、金属製のものを用い、事前に250°Cで16時間加熱して、フタル酸類を検出限界以下まで除去した。血液など液体の採取、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asket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。

xi) 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く、実際の曝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、混入否定のための測定も適宜行う。

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 0.0095 μM (DEHP)、0.0072 μM (MEHP)にて測定した。

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、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・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成27年4月版)及び国立大学法人 東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会内規の承認を受けて行う。)

C. 研究結果

まず、受精卵培養系におけるフタル酸類(DEHP及びMEHP)の微量曝露実験の最適化を実施した。

実際の不妊治療で採用されている流動パラフィン重層培養法では、DEHPに

ついては培養開始時の添加濃度(0 μM 、0.2 μM 、2.0 μM)に依らず培養終了時(3日後)には培養液中 DEHP 濃度が 0.014 ~0.025 μM になった。一方 MEHP は培養期間中、添加濃度を維持した。

ガラスシャーレ+流動パラフィンなしの受精卵培養においては、胚盤胞までの発生率は9割を超え、一般的なプラスチックシャーレ+流動パラフィン重層による受精卵培養と同等の成績だった。

しかし各条件の胚盤胞を偽妊娠マウスへ移植し、着床率・発生率をチェックしたところ、プラスチックシャーレ+流動パラフィン重層では29~44%の満期発育胎児が得られたのに対し、ガラスシャーレ+流動パラフィンなしでは1.6%しか満期発育胎児が得られなかった。

高温焼成過程でガラスシャーレ表面に有害物質が付着した、ガラス表面に培地成分が吸着された、等の可能性を考え、焼成後シャーレの超純水洗浄や培地でのconditioningを行ったが、着床・出生率に改善は見られなかった。

なお、対照実験であるプラスチックシャーレ+流動パラフィンなしでは出生率21%で、ガラスシャーレ+流動パラフィン重層では出生率30%であった。

最適化した受精卵培養系で微量曝露が可能であったMEHPについて、MEHP曝露受精卵をサンプリングし、GeneChip Expression Array解析を実施した。

具体的には、MEHPを添加(最終濃度0 μM 、0.5 μM 、5.0 μM)した培地中で受精卵を3日間培養し、得られた胚盤胞を50個ずつプールして3群(各n=3)のサ

サンプルを得て B-i), ii), iii) に則り GeneChip による網羅的遺伝子発現データを得た。

MEHP 曝露により有意差 (t -test $p < 0.05$) を呈する 2518 遺伝子を対象に、群内分散が $\%CV < 100$ となる発現域にある 199 遺伝子 (図 1) について詳細な検討を行った。

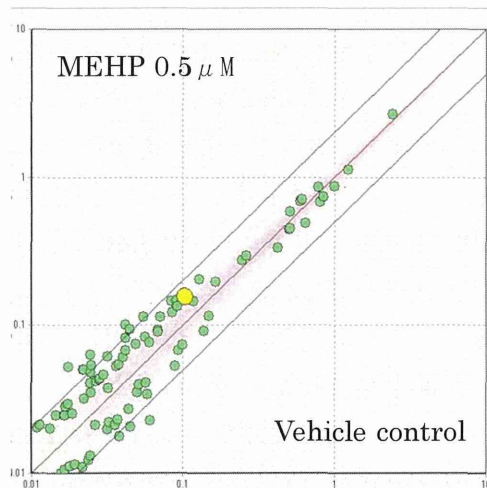


図 1 MEHP 曝露による遺伝子発現変動 (緑点、黄点は $p < 0.05$)。薄赤点は有意差のない遺伝子。黄点は一例として DNA メチル化に関与する M111 遺伝子を示す。対角線上下の 2 倍変動線を越えるものはほとんど無かった。

用量相関のある遺伝子として、MEHP 曝露により発現誘導される傾向のある 15 遺伝子 (Exoc6, Ptgr2, Vamp4, Ttc37, Zfp639, Slc25a19, Zfp322a, Sgpl1, M111, Zfp42, Vps37a, Mcmbp, Nup54, Nus1, Evl)、及び発現抑制される傾向のある 10 遺伝子 (Htatsf1, Retsat, Senp2, Csnk2a2, Smndc1, Gcnt2, Zfp212, Eras, Runx1, Nkx6-2) を最終的に抽出したが、これらの中には、DNA メチル化や、形態形成、精子形成、神経系発達に関わる遺

伝子も存在し、潜在的な標的として興味深い、発現変動量はいずれも極僅かであった。

DNA メチル化状態の精密評価に関しては、H26 年度に約 60 個の胚盤胞から抽出可能な量に相当するマウス DNA を用いて PBAT 法を試行しており、解析可能なデータを得られることを確認済みであるが、本研究で用意できる胚盤胞サンプルはさらに少量となる可能性がある (フタル酸曝露による受精卵発育不全の可能性があった) ため、より微量 DNA サンプルにも対応可能な Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift 社) についても同様の検討を行った。その結果、PBAT 法よりも多いリード数 (シーケンスした DNA 断片の数) を獲得可能であり、より信頼性の高いデータが得られることが確認できた。

現在、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用い、iii) と同等の MEHP 曝露サンプルについて網羅的 DNA メチル解析を実施中である。

マウス人工受精卵の MEHP 曝露による胚盤胞及びマウス個体の作出に関しては、まず MEHP 添加培養液 (最終濃度 V 群 $0 \mu\text{M}$ 、L 群 $0.5 \mu\text{M}$ 及び H 群 $5.0 \mu\text{M}$) を用いてマウス受精卵を培養した結果、2 細胞期到達率は 63~67%、うち胚盤胞到達率は 91~97%、着床率 37~54%、移植胚数に対する出生率は 19~21%で、3 回の実験いずれにおいても V、L、H 各群間に有意な差は見られなかった。

情動認知行動解析用のマウス個体は順調に成育（合計でV群 38 匹、L群 33 匹、H群 31 匹の♂マウス）し、一般行動や発育状態（体重増加等）に有意な差は見られていない。

これらのマウスを群飼いで育て、生後 12-13 週齢時にバッテリー式情動認知行動解析（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）を実施した結果、L 群に、オープンフィールド試験による移動量の低下と、明暗往来試験による明所滞在時間の減少、さらに条件付け学習記憶試験による場所-連想記憶能および音-連想記憶能の低下が認められた。H 群には、条件付け学習記憶試験による音-連想記憶能の低下が認められた。その他の L 群で変化の見られた項目は H 群では変化が見られなかった。

体外成熟/受精/培養系における卵母細胞影響解析については、平成 26 年度同様に溶媒対照群では順調な成熟と減数分裂像が観察され、異常所見は認められなかったが、MEHP 曝露群(5 μ M、50 μ M)では、成熟率の低下(対照群と比し 20~30%低下)が確認された。また α チューブリン抗体を用いた免疫細胞化学から、前年度と同様に紡錘体形成不全の誘発を確認した(図 2)。

マウス ES 細胞と EpiS 細胞の比較については、引き続き培養条件の最適化と増殖曲線の確定を行った。また、H28 年度に実施予定の化学物質曝露後の ES 細胞及び EpiS 細胞の網羅的電子発現解析及び DNA メチル化解析に十分な量の凍結ストック細胞

を作製した。

併せて、網羅的遺伝子発現解析のための曝露実験を準備中である。

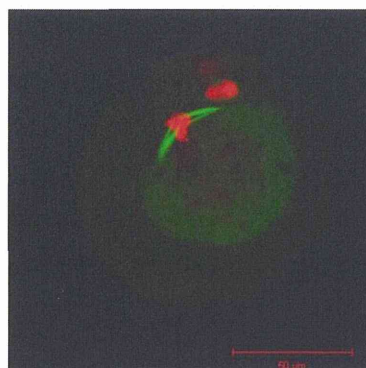


図 2 未受精卵母細胞の MEHP 曝露による紡錘体形成不全例

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) については、正常妊娠の妊婦の血清中平均濃度の 10 倍以上とはいえ、本研究以前に実施されている曝露実験の濃度域より 1 桁以上少ない量において、初期胚培養という特殊な環境における動態は明らかになっていなかった。平成 27 年度の研究成果により、DEHP については、実際の不妊治療に一般的に用いられる流動パラフィン重層培養法では、受精卵培養中に培養液中からほぼ全量が消失（流動パラフィンへ移行しているものと推測）しており、DEHP による受精卵曝露は軽微若しくは実質的に起こっていない可能性が示唆された。ただし、流動パラフィンを重層せず受精卵を培養し、不妊治療が実施されたケースも少数ながら確認されており、DEHP 曝露によ

る影響評価研究は引き続き行う。また流動パラフィンを重ねて受精卵培養を行う場合であっても、DEHP が培養開始から短時間だけでも培養液中に残っている可能性、及び、その際の僅かな曝露のみでも有害な影響がある可能性を否定しきれないため、平成 28 年度には、当初予定していた網羅的な Window 効果検索ではなく、受精初期の受精卵が DEHP に短時間曝露された場合の影響を重点的に検討することとする。

MEHP に関しては計画通り曝露実験を進めた。網羅的な遺伝子発現解析においては、発現変動は微弱であるものの、神経系発達や DNA メチル化に関与する遺伝子の発現変動があり、実施中の情動認知行動解析や DNA メチル化解析の結果を加味して総合的に評価する必要がある。

人工授精時 MEHP 曝露による産仔マウスの情動認知行動影響解析では、用量依存性は不明ながらも不安関連行動の逸脱と学習記憶異常の恐れがあり、特に音・連想記憶異常については、低用量群及び高用量群ともに認められていることから、動物実験における人工授精時の MEHP 曝露の影響が示唆された。

未受精卵母細胞の MEHP 曝露による紡錘体形成不全については、今年度の追試においても確認された(ただし平成 26 年度と同様、受精卵培養液に混入した MEHP 濃度の 10 倍量の曝露において観察されている)。異常誘発要因として染色体制御因子制御異常が疑われるため、紡錘体形成チェックポイントタンパク MAD2 の動態を解析するとともに、早期

染色体分体分離 (PCS) が生じている可能性も考慮して染色体分配異常の解析手法を検討中である。引き続き、異常出現頻度を検討するとともに、体外受精-培養系についても検討を行う予定である。

なお、実際の不妊治療で多用されている流動パラフィンについて、現状では培養試薬の 1 つとして一般的な注意しか払われていないが、今年度の結果から、培養受精卵へ影響を与えていることが示唆されている。胚操作中、培養液と直接接触することからも、化学物質の混入源となったり、培養液中の有効物質の吸着剤となったりして、胚に悪影響を及ぼしていないかどうか、検討が必要と考えられる。

E. 結論

平成 27 年度は、実際の不妊治療で一般的に採用されている流動パラフィン重層胚培養法では、混入 DEHP が培養液中から流動パラフィンに移行し、受精卵の DEHP 曝露は限定的である可能性を見出した。一方、MEHP については流動パラフィンに移行することがなく、培地中の濃度が保たれることから、計画通り曝露実験を進め、胚盤胞レベルでの網羅的遺伝子発現や DNA メチル化解析から、個体レベルでの情動認知行動解析まで実施して分子機序の解析に基づく安全性評価研究を行った。平成 28 年度は引き続き解析を進め、示唆されている曝露影響の詳細確認を実施する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K. Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. *Stem Cell Reports*. 2015 Dec 8;5(6):996-1009.

(2) Yabusaki R, Iwano H, Tsushima S, Koike N, Ohtani N, Tanemura K, Inoue H, Yokota H. Weak activity of UDP-glucuronosyltransferase toward Bisphenol analogs in mouse perinatal development. *J Vet Med Sci*. 2015 Dec 1;77(11):1479-84.

(3) Otaka K, Hiradate Y, Kobayashi N, Shirakata Y, Tanemura K. Distribution of the sex chromosome during mouse spermatogenesis in testis tissue sections. *J Reprod Dev*. 2015 Oct 21;61(5):375-81.

(4) Nakano K, Nishio M, Kobayashi N, Hiradate Y, Hoshino Y, Sato E, Tanemura K. Comparison of the effects of BPA and BPAF on oocyte spindle assembly and polar body release in mice. *Zygote*. 2015 Apr 30:1-9.

(5) Ishikawa S, Hiraga K, Hiradate Y, Tanemura K. The effects analysis of two neonicotinoid insecticides on in vitro maturation of porcine oocytes using hanging drop monoculture method. *J Vet Med Sci*. 2015 Jun;77(6):725-8.

(6) 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.

2. 学会発表

(1) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015) (2015. 6. 24), Jeju, Korea

(2) 北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純
シックハウス症候群レベルの極低濃度曝露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6. 30)

③ 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡
Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー (Dynamic Biomarker) のカタログ化とその毒性予測利用
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 7. 1)

(4) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015. 9. 15), Porto, Portugal

- (5) 北嶋聡、種村健太郎、菅野純「医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究」第 42 回日本毒理学学会学術集会、2015 年 6 月（金沢市）
- (6) 菅野純、種村健太郎「ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるか-有機リン剤等曝露後の遅発性毒性の発現実験より-」第 37 回日本中毒学会学術集会、2015 年 7 月（和歌山市）
- (7) 関根雅史、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、平舘裕樹、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「バルプロ酸の利用によるマウス精子エピゲノム改変誘導の試み」第 65 回東北畜産学会、2015 年 8 月（仙台市）
- (8) 内藤秋、記緒、斉藤隼人、沼邊孝、平舘裕希、原健士朗、種村健太郎「受精能獲得に伴うブタ精子のヒストン H4 修飾様式の変化」第 65 回東北畜産学会、2015 年 8 月（仙台市）
- (9) 関根雅史、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、平舘裕希、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「生体内におけるマウス精子エピゲノム改変の化学的誘導」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月（和田市）
- (10) 平舘裕樹、井上弘貴、小倉淳郎、種村健太郎「マウス卵成熟過程における Tau の発現とリン酸化パターンの解析」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）
- (11) 井上弘貴、種村健太郎、小倉淳郎「H2B-eGFP+H2B-mherry ダブル T G マウスを用いた FRET 法の開発およびその初期胚クロマチン動態解析への試み」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）
- (12) 小林記緒、白形芳樹、平舘裕希、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「社会的生育環境要因が惹起する雄性生殖細胞系列および次世代へのエピジェネティック影響」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）
- (13) 白形芳樹、小林記緒、平舘裕希、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎「低用量ビスフェノール類慢性曝露によるマウス雄性生殖細胞エピジェネティック修飾への影響解析」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）
- (14) 猪股大貢、原健士朗、種村健太郎「Hanging Drop 法を用いた体外成熟単培養系におけるマウス卵母細胞へのネオニコチノイド類曝露影響解析」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）
- (15) 斉藤洋克、植松未知、白形芳樹、原健士朗、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成熟期生殖機能影響解析」第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月（宮崎市）
- (16) 種村健太郎、古川祐介、斉藤洋克、白

形芳樹、原健士朗、北嶋聡、菅野純「幼若期マウスへのネオニコチノイド系農薬投与による神経行動毒性発現」第18回環境ホルモン学会、2015年12月（下野市）

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

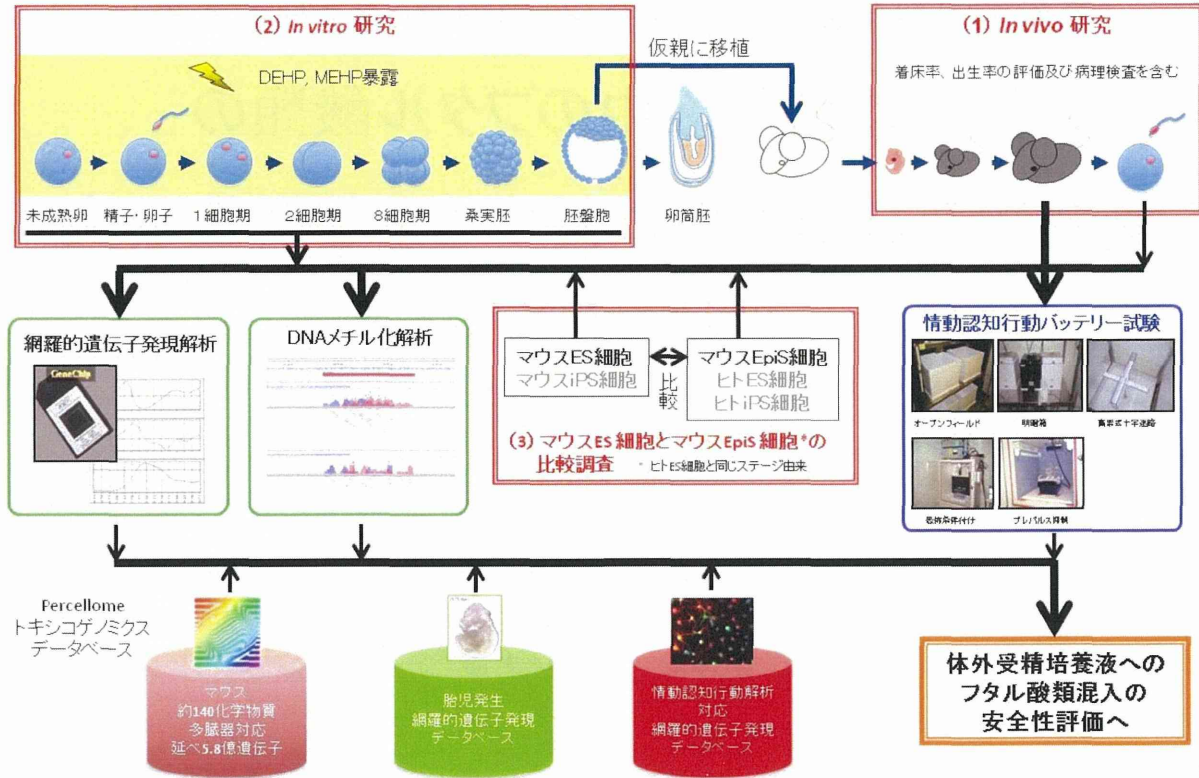
- 研究分担者
 - 相崎 健一(総括、遺伝子発現データ解析)
 - 安彦 行人(人工受精、受精卵移植、DNAメチル化解析)
 - 種村 健太郎(情動認知行動評価解析)
- アドバイザー・解析協力
 - 菅野 純
 - 北嶋 聡
- 協力研究者
 - 河上 強志(国衛研・生活衛生化学部)
- 研究協力者
 - 古川 佑介
 - 森山 紀子
 - 池野 絵里子

2

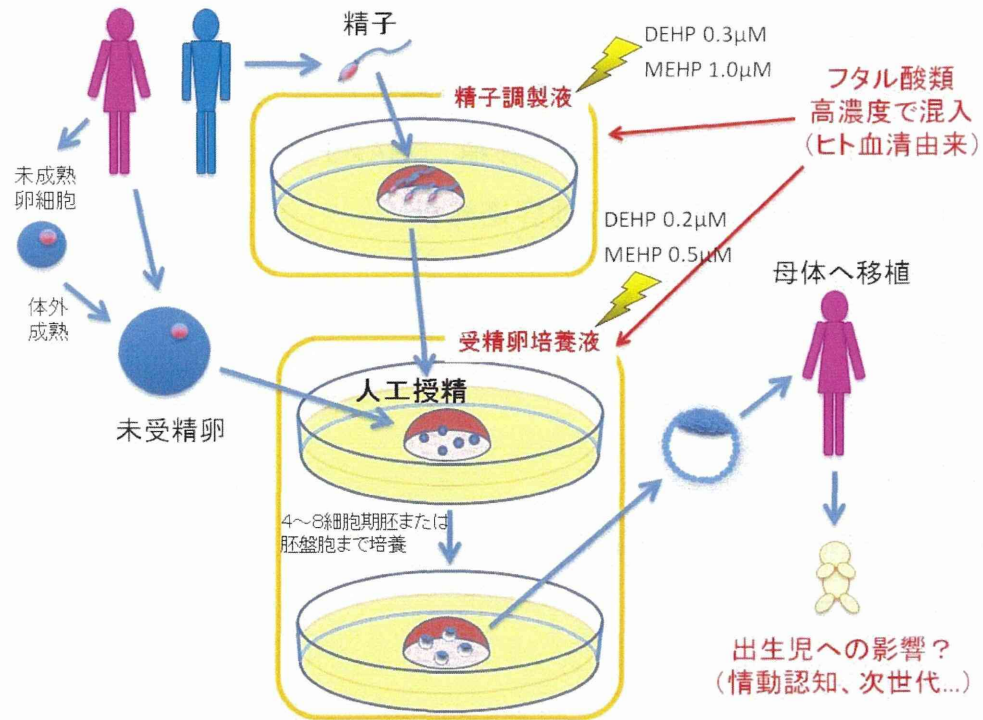
受精卵培養液中のフタル酸類の受精卵及び出生児に対する影響評価研究

(H26-化学-指定-002)

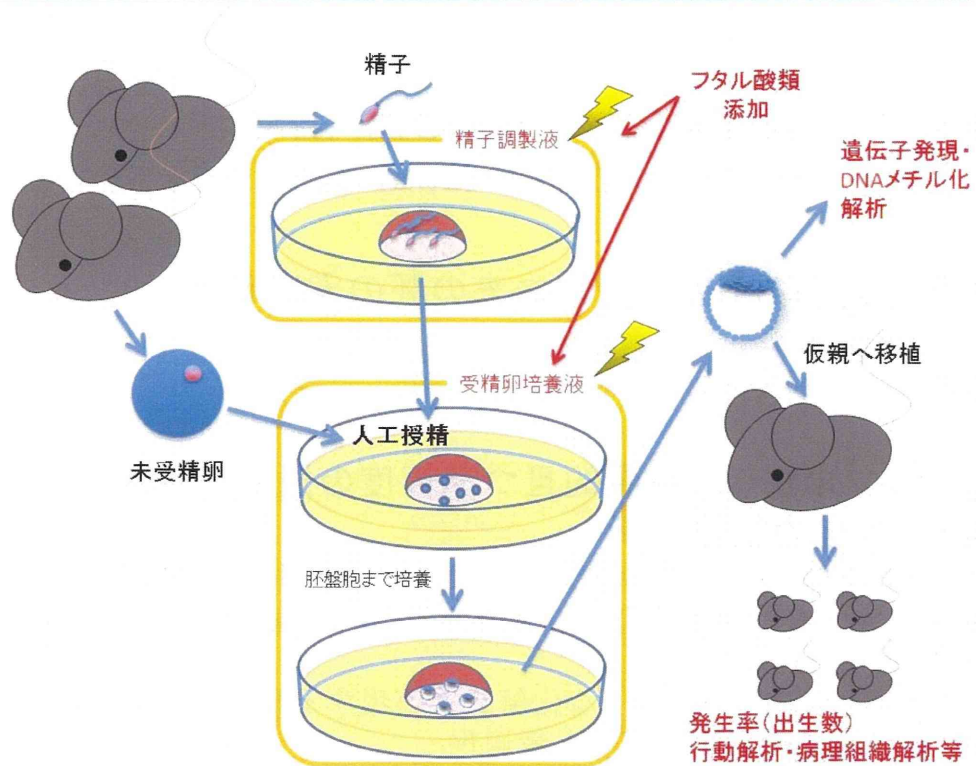
体外受精における培養液中のフタル酸類 (DEHP及びMEHP) が、受精卵及び出生児に及ぼす影響の安全性評価において不足する科学的情報をマウスを用いて取得すると共に、初期胚の化学物質暴露に対する短期間且つ高感受性の安全性評価手法を開発する。



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

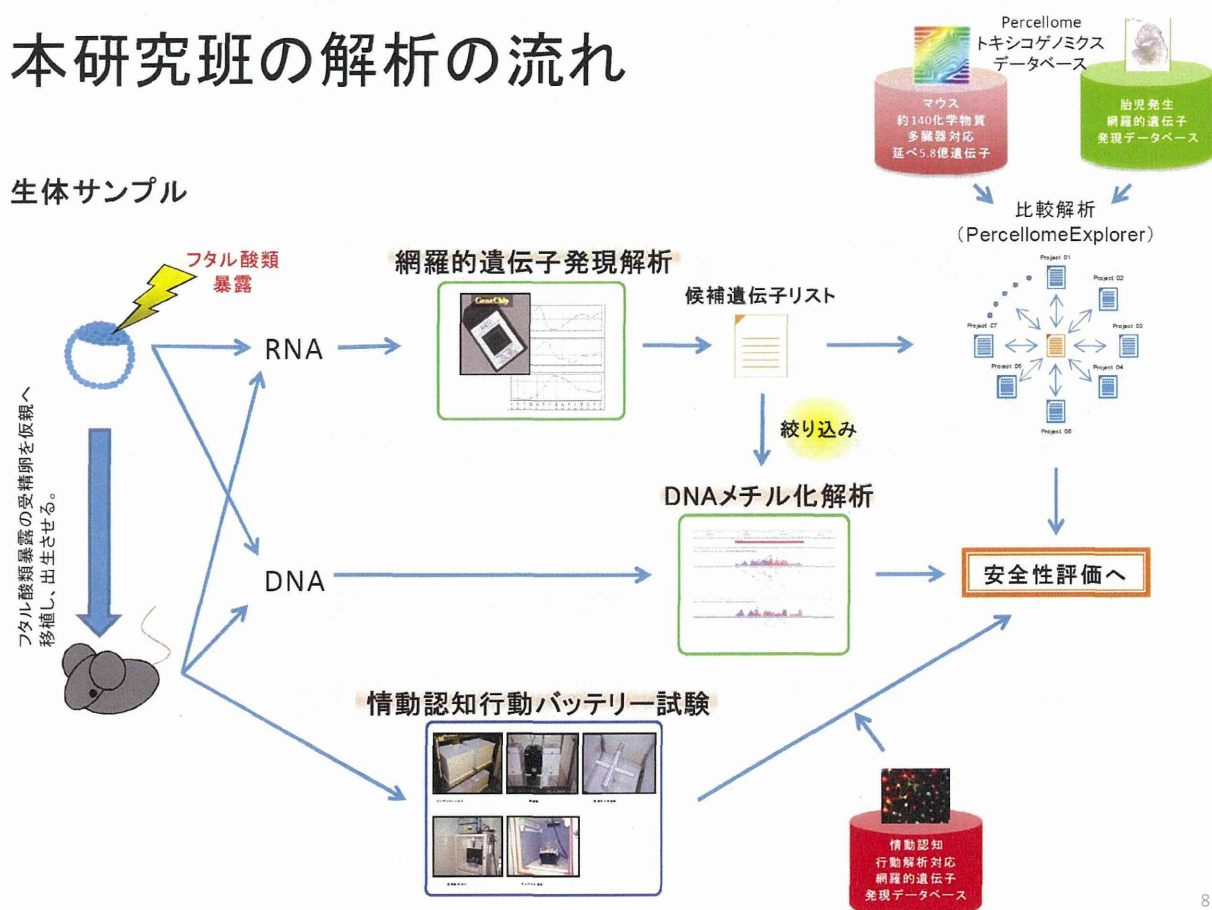
6

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

本研究班の解析の流れ



8