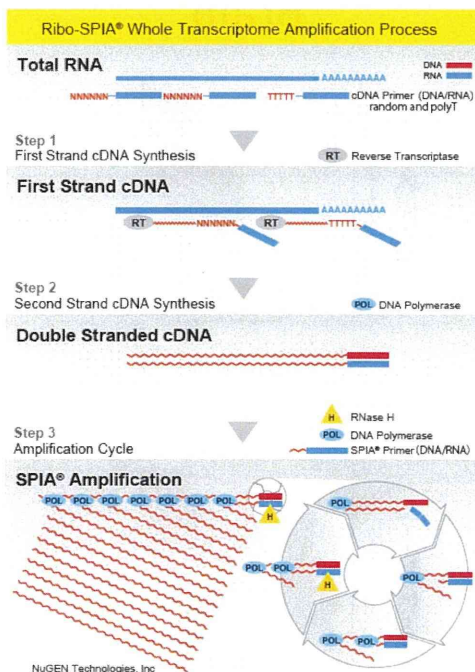


# 技術的問題点

- サンプル量が極く微量
  - 増幅効率
  - 外部RNA Spike添加のための指標変更
- DNAメチル化解析と網羅的遺伝子発現解析を同一サンプルで実施
  - ホモジナイズバッファの変更
  - 外部RNA Spike添加のための指標変更

9

## 微量RNAの高増幅プロトコル

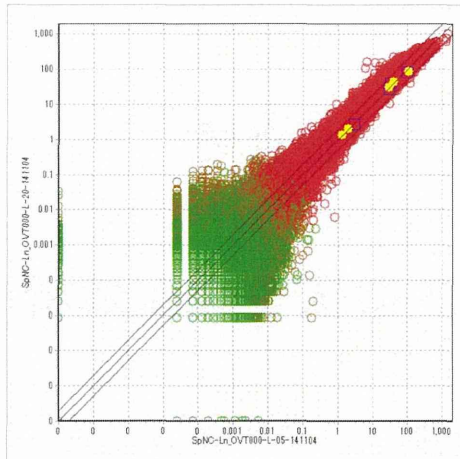


SPIA=Single Primer Isothermal amplification  
500pg~100ngのtotal RNAから逆転写・増幅し、  
μgオーダーのcDNAを得ることが出来る  
(NuGEN社)。

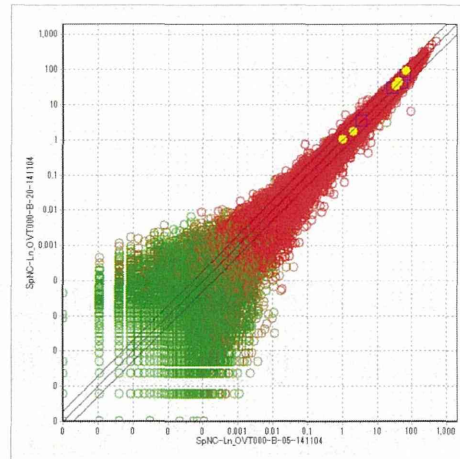
10

# 高増幅プロトコルの利用例

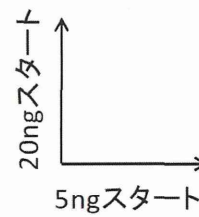
Liver



Brain

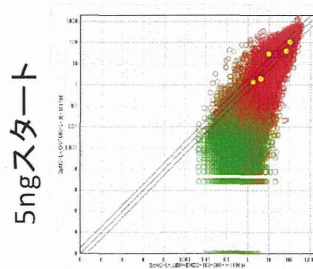


- ■ Percellome用Spike
- 発現確度の高い(Presence)データ
- 発現確度の低い(Absence)データ



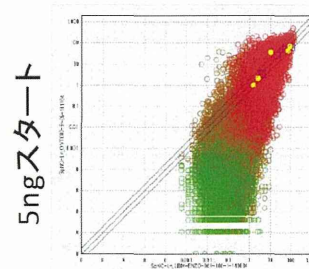
# 低増幅データと高増幅データの比較

Liver

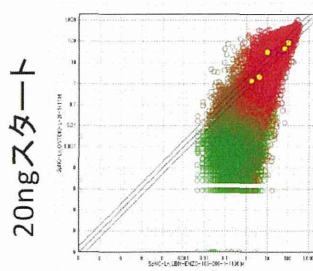


5000ngスタート

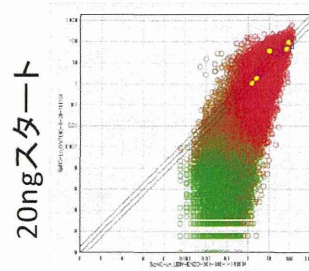
Brain



5000ngスタート

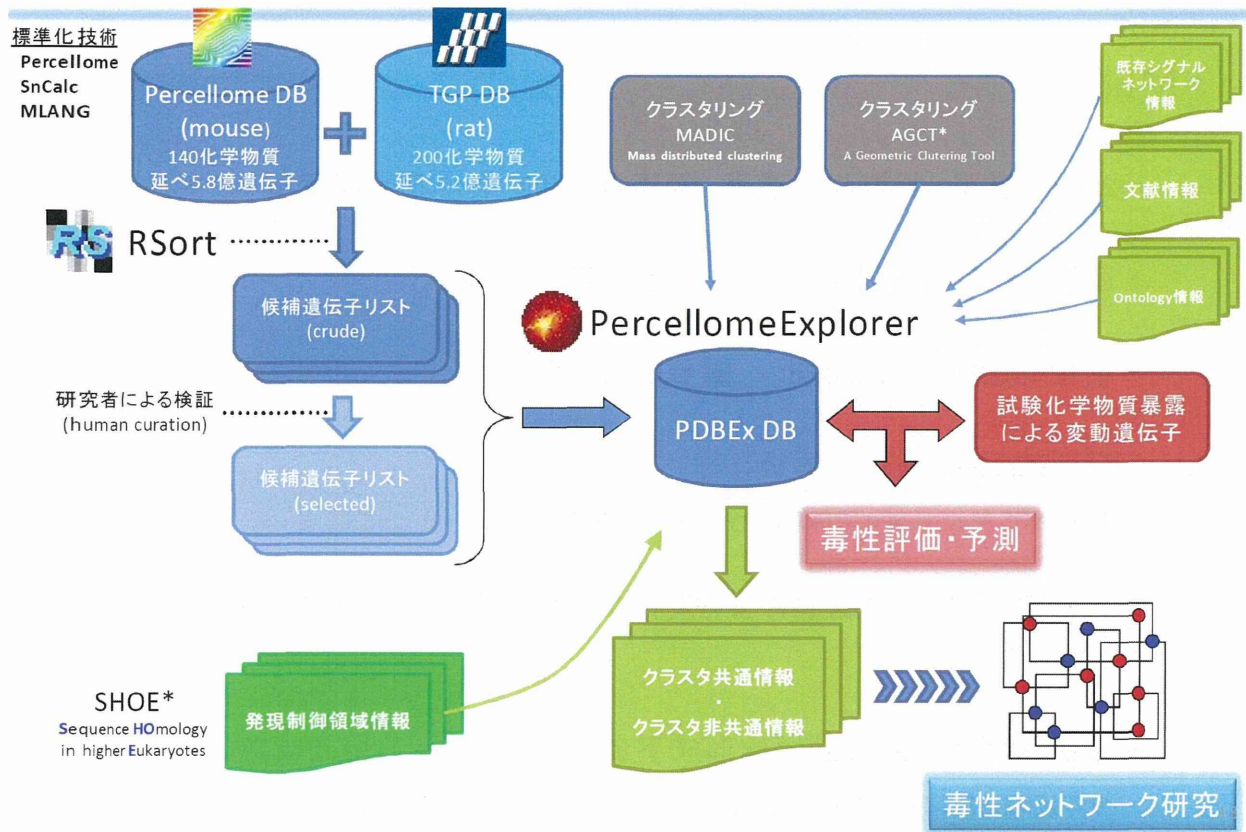


5000ngスタート



5000ngスタート

# Percellome技術による解析システム



## 次世代シーケンサーデータ 解析計算サーバーの整備

### ● Hardware

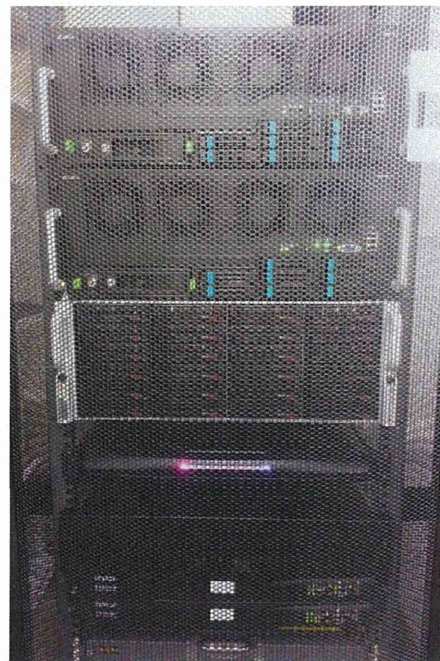
Takeru Large Memory Servreベース  
(ナベインターナショナル製)

Xenon E5-4650 (8core ,2.7GHz) x4  
memory 128GB  
HDD(data) 3TBx43(RAID60+HotSpere)

### ● Software

OS : Linux CentOS ver 6.5

galaxyを始め、オープンソースのバイオツールを  
多数インストール済み





## H27年度のサマリー(1)

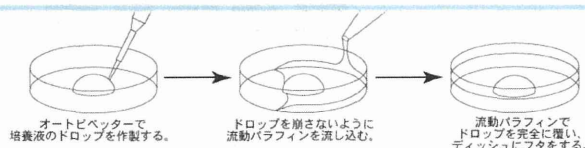
### • MEHP

- 2cell到達率、胚盤胞到達率、着床率、出生率： 有意差無し
- 産仔マウスの生後体重増加曲線： 有意差無し
- 網羅的遺伝子発現解析： 顕著な変動無し
- 網羅的DNAメチル化解析：  
Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit導入。実施中
- 人工授精時MEHP暴露による産仔マウスの情動認知行動解析：  
2016年2月実施
- 未受精卵母細胞の紡錘体形成不全：  
今年度の追試においても再現(ただし受精卵培養液混入MEHPの10倍濃度)

15

## H27年度のサマリー(2)

### • DEHP



- 実際の不妊治療において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)  
→ DEHPによる受精卵暴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、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や、及びその際の僅かな暴露のみでも有害な影響がある可能性を否定しきれない。  
→ 受精初期の受精卵がDEHPの短時間暴露された場合の影響を重点的に検討する(平成28年度)。

16



## H27年度のサマリー(3)

---

- 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、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。

平成24年度化学物質に係る調査  
家庭用品等試験検査費

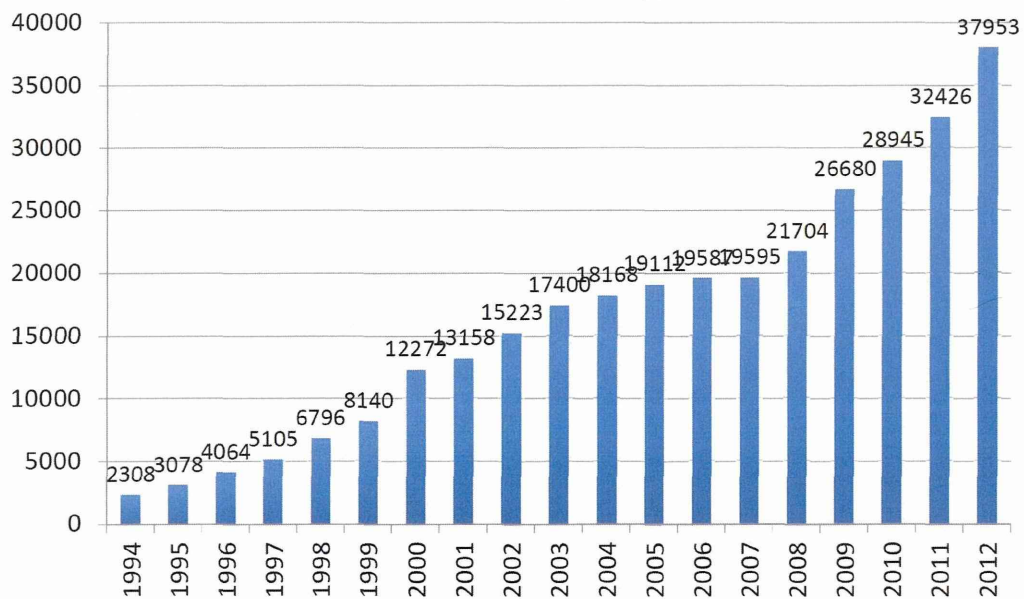
ヒト受精卵培養液中のフタル酸類の  
受精卵及び出生児に対する影響関連情報  
及びそのリスク評価・管理に必要な要件の調査

菅野 純

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 部長

1

体外授精による出生数

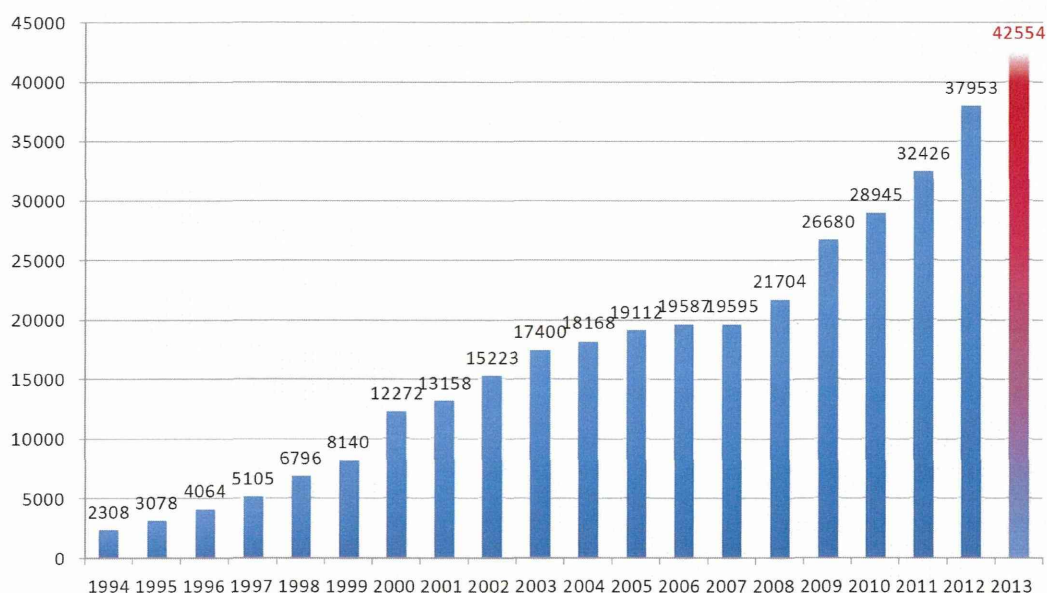


近代出版「胚培養の理論と実際」(2011)より(2008-12分データ加筆)

2012年の総出生数: 1,037,231  
体外授精による出生児の割合: 3.7%

2

## 背景：体外受精による出生数が増加している



近代出版「胚培養の理論と実際」(2011)より(2008-13分、データ加筆)

2013年の総出生数: 1,029,816  
体外授精による出生児の割合: 4.1%

3

## ヒト胚培養液中のフタル酸(DEHP, MEHP)

### ・厚労科研費・牧野班※による調査(平成22年度)

最大検出濃度	DEHP	MEHP
受精卵培養液:	0.2 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
精子調製液:	0.3 $\mu$ M	1.0 $\mu$ M
添加用ヒト血清アルブミン	2.5 $\mu$ M	6.6 $\mu$ M
参考値: 母体血清(中央値)	<0.03 $\mu$ M	<0.01 $\mu$ M

人体への影響の有無を推定するための知見が少ない。

動物を用いた安全性試験が必要

※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」

4





## 国会での活動報告

>>>過去の活動報告はこちらから

### 国会での活動報告詳細

2012年8月3日

【質問主意書】体外受精培養液に含まれる化学物質の安全性に関する質問主意書

●体外受精培養液に含まれる化学物質の安全性に関する質問主意書

(内閣参質180第205号)

(平成24年7月26日提出、政府答弁書8月3日)

昨年、プラスチックを加工しやすくする化学物質「フタル酸エステル類」が人の体外受精で必要となる培養液に高い濃度で含まれていることが、厚生労働省研究班の調査で分かった。妊婦の血液から検出される濃度の最大で約百倍に相当する。動物の胎児の生殖機能に影響を与える濃度の千分の一ほどだが、マウスの細胞の遺伝子には異常が起きるレベルで、受精卵や胎児への影響が懸念されるとの内容であった。

日本産科婦人科学会の集計によれば、平成二十一年の新生児の四十人に一人は、体外受精や顕微授精などの高度医療生殖補助によって生まれている。

この現状を踏まえ、以下質問する。

一 前述の厚生労働省研究班による調査結果に関して、政府の見解を示されたい。

(政府答弁)

一について



※バックナンバーはこちらから



やまたにブログ  
山あり谷あり日記



やまたにヒストリー



後援会員募集



ネット献金

た。妊婦の血液から検出される濃度の最大で約百倍に相当する。動物の胎児の生殖機能に影響を与える濃度の千分の一ほどだが、マウスの細胞の遺伝子には異常が起きるレベルで、受精卵や胎児への影響が懸念されるとの内容であった。

日本産科婦人科学会の集計によれば、平成二十一年の新生児の四十人に一人は、体外受精や顕微授精などの高度医療生殖補助によって生まれている。

この現状を踏まえ、以下質問する。

一 前述の厚生労働省研究班による調査結果に関して、政府の見解を示されたい。

(政府答弁)

一について

御指摘の厚生労働科学研究費補助金による「化学物質の子ども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」(以下「評価法開発研究」という。 )の平成二十年度から平成二十二年度までの総合研究報告書及び同年度の総括・分担研究報告書(以下「総合研究報告書等」という。 )によると、一部の人工授精用の培養液から妊婦の血清中濃度の平均値と比較して数十倍の濃度のフタル酸エステル類が検出され、また、妊婦の血清中濃度の平均値と比較して十倍の濃度のフタル酸エステル類を、マウスの胚性幹細胞に暴露させたときには遺伝子の活性の変化が観察されたが、ヒト人工多能性幹細胞に暴露させたときには遺伝子の活性の変化は観察されなかった。これらのことを踏まえ、厚生労働省としては、引き続き、化学物質の子供への影響評価に関する研究を実施し、知見の集積に努めていきたい。

DEHPの受精卵に対する影響に関する文献調査

No.	検索単語	動物・系統	試験系	暴露対象	暴露物質	用量	エンドポイント	影響	文献	コメント
1	[phthalate, oocyte], [phthalate, sperm]	B6D2F1 マウス(卵子、精子), ICR マウス(胎児受容性、借親動物)	体外受精、胚培養、胚移植、胎児発達	精子、受精卵、2細胞胚	DEHP	1 µg/ml (28 µM), 30 min [精子]	【精子暴露】: 前核形成 ↓、 2細胞胚 ↓、 桑実/胚盤胞形成 ↓、 出生率 ↓、 【受精卵暴露】: 2細胞胚 ↓、 桑実胚 ↓、 胚盤胞形成 ↓	【精子暴露】: 前核形成 ↓、 2細胞胚 ↓、 桑実/胚盤胞形成 ↓、 出生率 ↓、 【受精卵暴露】: 2細胞胚 ↓、 桑実胚 ↓、 胚盤胞形成 ↓	Huang, X. F., Y. Li, et al. (2012). "The Effects of Di-(2-ethylhexyl)-phthalate Exposure on Fertilization and Embryonic Development In Vitro and Testicular Genomic Mutation In Vivo." <i>PLoS One</i> 7(11): e50465.	2細胞胚期の培養液中のDEHP添加では胚発達に影響がないことから、作用windowは、受精から第1卵割ではないかと考察している。DEHP処理した精子による受精卵のうき床化したものは、胎児として正常に発育した。
2	[phthalate, oocyte]	牛	体外受精	卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COCs)	DEHP	50 µM, 8 days	体外受精/胚培養-受精後2細胞/4細胞胚 (42-44時間後)、胚盤胞 (受精後7-8日後)	胚盤胞 ↓	Grossman, D., D. Kalo, et al. (2012). "Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on in vitro developmental competence of bovine oocytes." <i>Cell Biol Toxicol</i> 28(6): 383-396.	卵胞から卵母細胞を回収する際、卵細胞前核を脱出し、減数分裂、成熟がはじめてしまうので、暴露の時期は、第一減数分裂中期 (MI期) の未成熟卵と考察している。
3	[phthalate, oocyte]	馬	体外成熟培養 (in vitro maturation; IVM)	卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COCs)	DEHP	0.12, 12, 1200 µM, 28-30 h, (ATP含量: 12 µMのみ)	卵丘細胞: アポトーシス (0.12以上)、ROS、卵母細胞: MI期核成熟、成熟卵母細胞: ミトコンドリア、ATP含量、ROS、SOT	卵丘細胞: アポトーシス (0.12以上)、ROS ↓: 0.12, ROS ↑: 12以上、卵母細胞: MI期核成熟阻害: 0.12, ATP含量 ↑: 12	Ambruosi, B. M. F. Uranio, et al. (2011). "In vitro acute exposure to DEHP affects oocyte meiotic maturation, energy and oxidative stress parameters in a large animal model." <i>PLoS One</i> 6(11): e27452.	DEHP低濃度 (0.12 µM) 処理では、DNA断裂を伴わない染色凝集/断片化、細胞内ROSの減少を伴いCOCsのアポトーシスが増加しており、卵丘細胞の生存が障害され、結果として卵母細胞のMI期核成熟が阻害されたと考察。高用量 (12, 1200 µM) でもCOCsのアポトーシスの増加はみられるが、DNA断片化、細胞内ROS上昇と現象が異なり、卵母細胞核成熟にも影響はない。
4	[phthalate, oocyte]	豚	体外成熟培養 (in vitro maturation; IVM)	卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COCs)、卵母細胞 (denuded oocytes)	DEHP	0.0001, 0.01, 1, 100 µM, 24 h, 44 h	【COCs暴露】: FSH刺激-卵丘細胞-ヒアルロン酸産生、卵母細胞核成熟、プロゲステロン産生、【卵母細胞暴露】: 核成熟	【COCs暴露】: FSH刺激-プロゲステロン産生 ↓: DEHP 1 µM	Mlynarcikova, A., E. Nagova, et al. (2009). "Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes." <i>Toxicol In Vitro</i> 23(3): 371-377.	卵巣中で第一減数分裂前期 (GV) の状態で停止した卵細胞前核期の卵母細胞に与える影響の検討。臨床の課題では、大多数は第二減数分裂中期 (MII期) の成熟卵がほとんどであり、また、第一減数分裂中期 (MI期) の未成熟卵を用いることもある。しかし、GV卵を用いるのはまれ。
5	[phthalate, stem]	C57BL/6J 雌マウス	細胞培養	卵前球由来ES細胞株	DEHP	150, 300, 500, 1000 µM, 12-48 h	細胞生存率 (MTT assay)	影響なし	Lim, C. K., S. K. Kim, et al. (2009). "Differential cytotoxic effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on blastomere-derived embryonic stem cells and differentiating neurons." <i>Toxicology</i> 264(3): 145-154.	新しく樹立した細胞株の実験で、高濃度での細胞死のみで、参考程度。

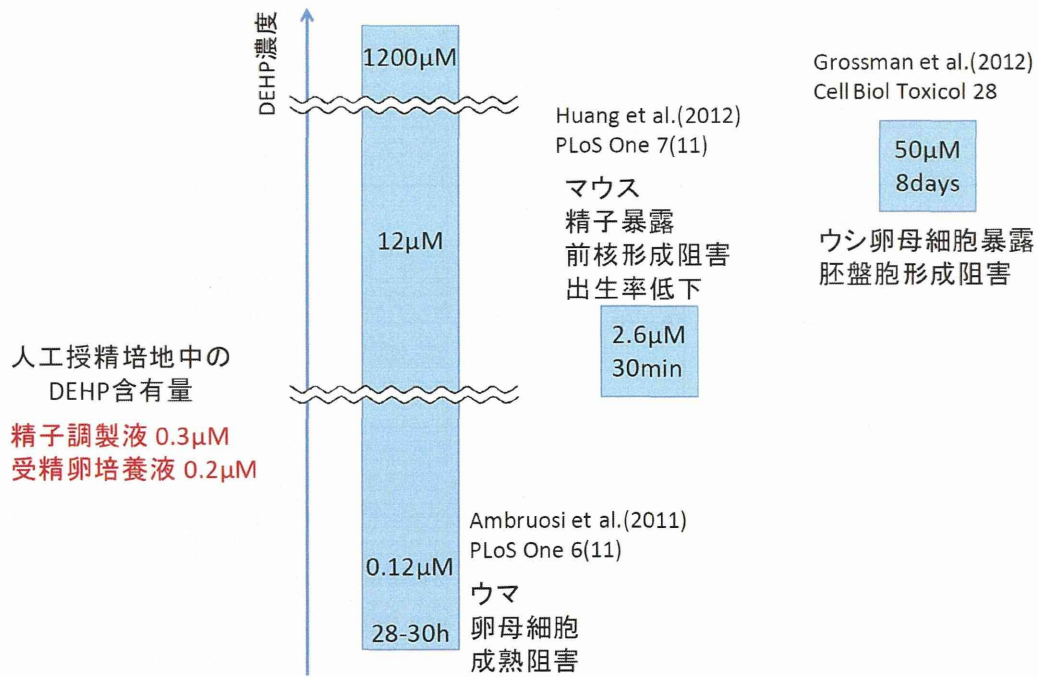
7

6		Wistarラット	全胚培養	全胚細胞	DEHP	1, 10, 100 mg/ml	morphological scoring	Yolk sac diameter ↓、Somite number ↓、Total score ↓: 1以上、Crownrump length ↓、Head length ↓: 100、	Seek Rhee, G., S. Hee Kim, et al. (2002). "Comparison of embryotoxicity of ESBO and phthalate esters using an in vitro battery system." <i>Toxicol In Vitro</i> 16(4): 443-448.	全胚培養 (whole-embryo culture) 暴露で参考程度
7	[phthalate, embryo]	Syrian ハムスター	一次胚細胞培養	一次胚細胞	DEHP	5-75 µM, 7 days	悪性形質転換試験、ギャップ結合阻害	悪性形質転換試験: +、ギャップ結合 ↓	Rhedal, E., S. O. Mikkelsen, et al. (2000). "Morphological transformation and effect on gap junction intercellular communication in Syrian hamster embryo cells as screening tests for carcinogens devoid of mutagenic activity." <i>Toxicol In Vitro</i> 14(2): 185-192.	ハムスターの一次胚細胞を暴露し、発癌性を意図した実験で参考程度
8		Syrian ハムスター	細胞培養	胚細胞 (Syrian hamster embryo; SHE) 細胞	DEHP	10, 25, 50 µM, 24 h	アポトーシス、遺伝子発現変化 (bcl-2, bax, c-myc)	アポトーシス阻害: 50, bcl-2 ↑、c-myc ↓: 50	Maire, M.A., Rast, C. and Vasseur, P. (2005). Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) increases Bcl-2/Bax ratio and modifies c-myc expression in Syrian hamster embryo (SHE) cells. <i>Toxicology letters</i> 158: 237-245.	ハムスター胚細胞の悪性形質転換実験の系で、アポトーシスをみており、参考程度
9		マウス (経口投与)	immature oocytes were retrieved from mice treated, then then fertilized in vitro and cultured for 96 hours.	4-6週齢NMRIマウス	DEHP	orally 50, 100, and 200 µl of 2.95 µM solution for 12 days			Eimani H, D. A., Sepehri H, Kazemi S, Hassani F, et al. (2005). "Effect of DEHP (di-(2-ethylhexyl) phthalate) on resumption of meiosis and in vitro maturation of mouse oocytes and development of resulting embryos." <i>Yakhteh Medical Journal</i> 7: 56-61.	経口投与のマウスの卵巣から取り出した未受精卵による実験。

BBP: benzyl butyl phthalate  
DEHP: di-(2-ethylhexyl) phthalate  
DBP: dibutyl phthalate  
ES細胞: 胚性幹細胞  
MBzP: monobenzyl phthalate  
MBuP: monobutyl phthalate  
MEHP: mono-(2-ethylhexyl) phthalate  
MMP: monomethyl phthalate  
ROS: reactive oxygen species

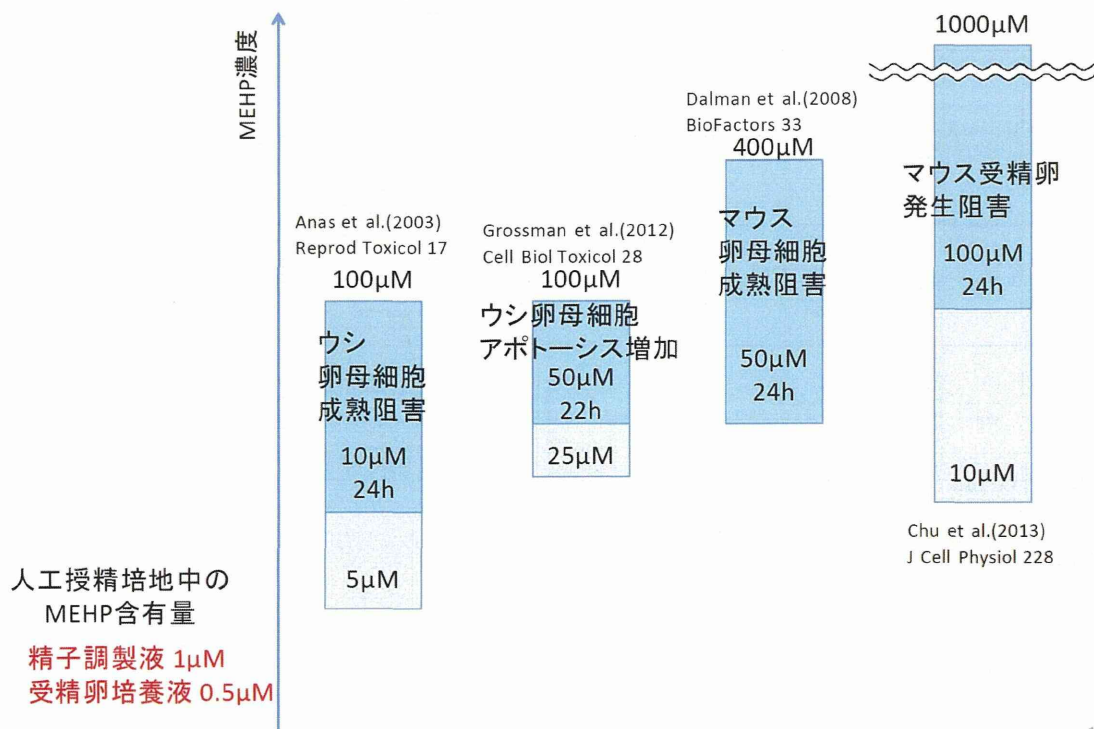
8

## DEHP暴露による発生への影響に関する文献報告



9

## MEHP暴露による発生への影響に関する文献報告



10



(参考)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可能性を示唆する知見

- ・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-Russell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。

## ヒト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を評価するために

- ・ 人体への影響の有無を推定するための知見が少ない。
- ・ 動物を用いた安全性試験が必要。
- ・ 培養液中と同レベルの暴露濃度における試験の実施。
- ・ 病理検査等、従来の項目に加え、エピジェネティクスや情動認知行動\*への影響を検討すべき。

\*フタル酸類の生体内受容体の一つであるPPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)が脳において重要な機能を有するため

起案

*In vitro* 研究

体外受精培養液中にDEHP、MEHPを、ヒト培養液で検出された濃度範囲で添加し、培養中に生じる変化を、前核胚、2細胞胚、8細胞胚、桑実胚、胚盤胞形成などの各ステージを追って評価する。

その際にフタル酸類の受容体がDNA結合機能を有する核内受容体等のリガンド依存的転写調節因子であることを踏まえ、遺伝子発現変化、エピミュータゲン性について網羅的に評価する。

*In vivo*研究(厚生労働科研究費:神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究(H23-化学一般-004)準拠):含、施設複製増設)

胚移植段階における影響として、着床率、出生率を評価する。

出生児について詳細な病理検査を実施する。

成長過程及び成長後の情動認知行動試験等による高次中枢神経機能に対する影響評価。(バッテリー試験、マイクロアレイ解析等)

マウスES細胞とヒトiPS細胞との発生的・生物学的な関係について

マウスES細胞とマウスEpiS細胞の反応性の差異の検討

培養時の増殖分化能  
数量的、形態的指標  
タンパク発現指標  
遺伝子発現指標

ESとEpiSの差を勘案しての、ES暴露後の発生期、発達期、胎児期、成熟期影響推測能力の確認実験

13

## 基盤技術

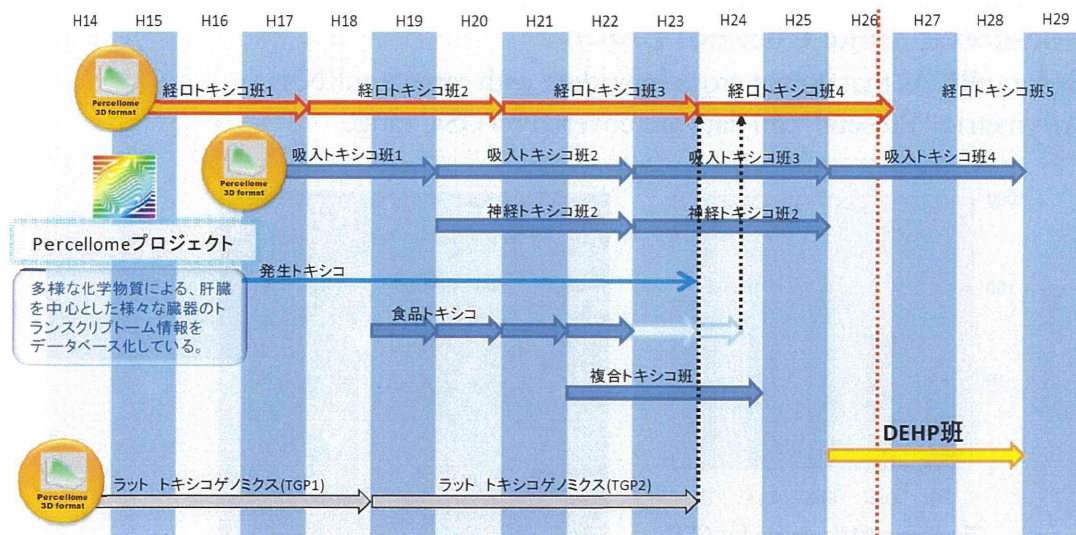
# Percellomeトキシコゲノミクス



遺伝子発現量を細胞1個あたりのmRNAコピー数で表し、大量のトランスクリプトームデータを高精度で取り扱うことを可能とする。

14

# 毒性部が展開するトキシコゲノミクス研究



これらすべての研究が絶対値化したデータを利用し、利点: 相互の直接比較が可能である

15

## Percellome法

**BMC Genomics**



Methodology article

**Open Access**

**"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays**

Jun Kanno\*<sup>†1</sup>, Ken-ichi Aisaki<sup>†1</sup>, Katsuhide Igarashi<sup>1</sup>, Noriyuki Nakatsu<sup>1</sup>, Atsushi Ono<sup>1</sup>, Yukio Kodama<sup>1</sup> and Taku Nagao<sup>2</sup>

Address: <sup>1</sup>Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and <sup>2</sup>President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Email: Jun Kanno\* - kanno@nihs.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nihs.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nihs.go.jp; Noriyuki Nakatsu - nakatsu@nihs.go.jp; Atsushi Ono - atsushi@nihs.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nihs.go.jp; Taku Nagao - nagao@nihs.go.jp

\* Corresponding author †Equal contributors

**Open Access**

**on line journal: BMC Genomics. 2006 Mar 29;7(1):64**

**PMID: 16571132**

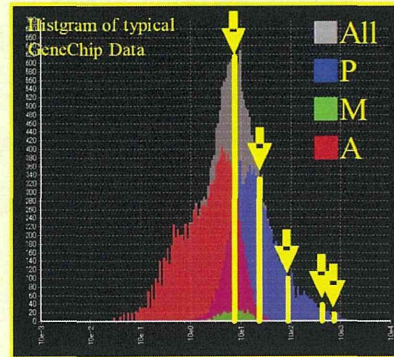
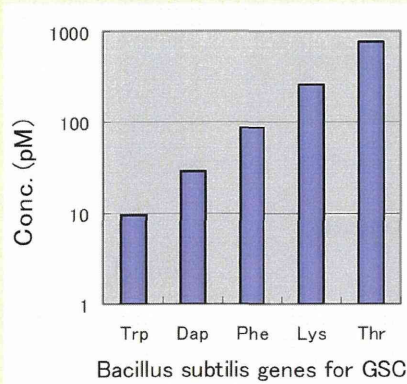
16



## Percellome用 外部SpikeRNA (GSC)

### \* Grade-dosed Spike Cocktail (GSC)

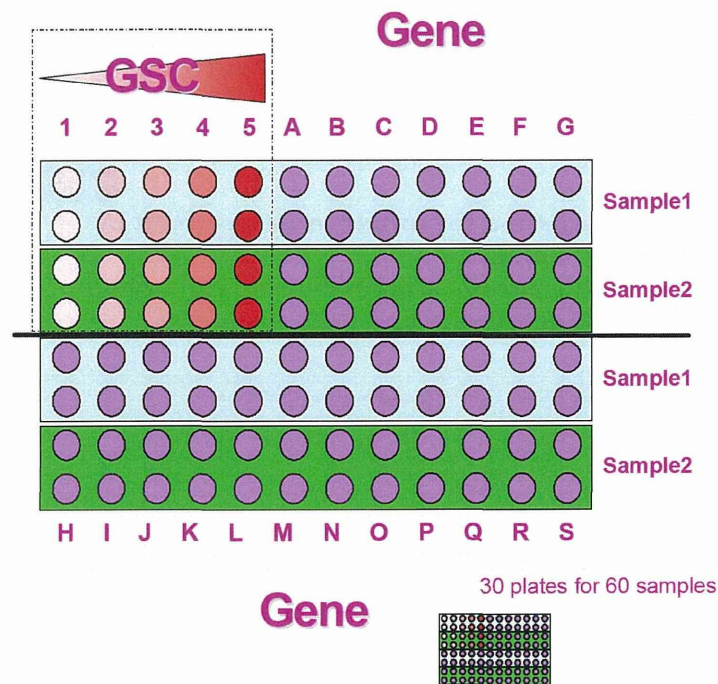
- Spike mRNAs that do not cross-hybridize with sample mRNA
- Affymetrix “Present” call data are covered by GSC range



17

## Percellome Quantitative-PCR

(by ABI PRISM 7900HT / SYBR Green)

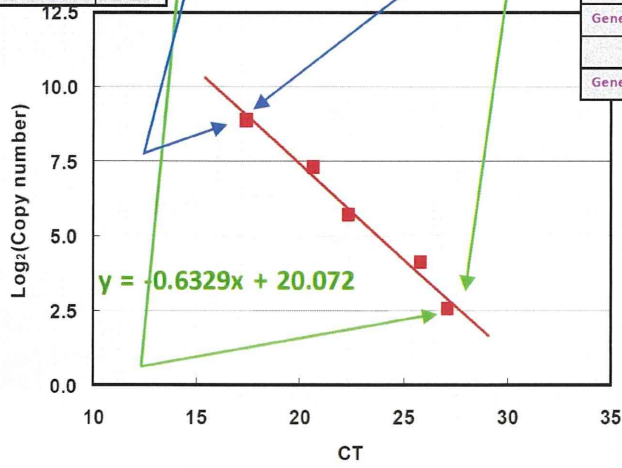


18

# Percellome Q-PCR normalization

GSC1:AFFX-TrpnX-3_at	5.8
GSC2:AFFX-DapX-3_at	17.4
GSC3:AFFX-PheX-3_at	52.2
GSC4:AFFX-LysX-3_at	156.6
GSC5:AFFX-ThrX-3_at	469.8
GeneA	???

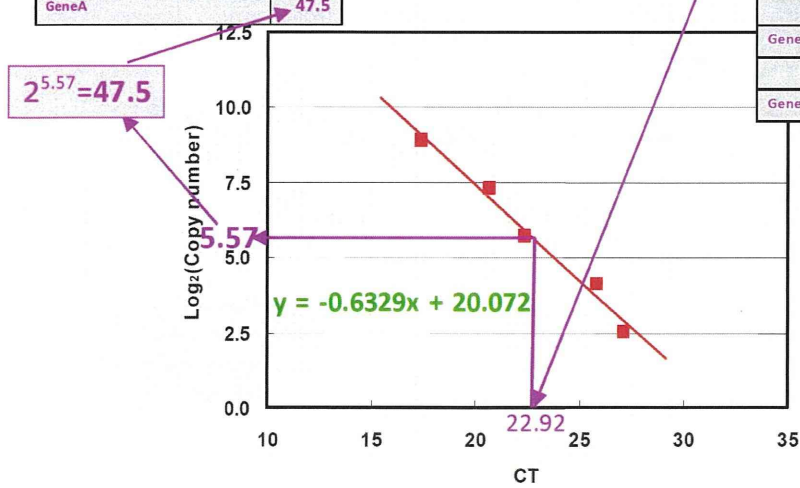
GSC1:AFFX-TrpnX-3_at	27.13
GSC2:AFFX-DapX-3_at	25.85
GSC3:AFFX-PheX-3_at	22.38
GSC4:AFFX-LysX-3_at	20.72
GSC5:AFFX-ThrX-3_at	17.41
GeneA	22.92
GeneB	22.34
GeneC	24.47
GeneX	28.44
GeneS	22.30



19

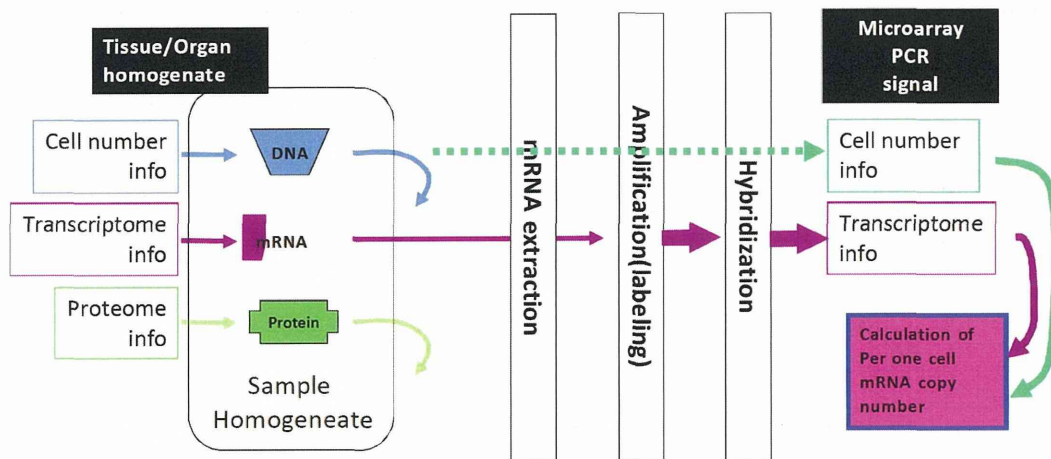
GSC1:AFFX-TrpnX-3_at	5.8
GSC2:AFFX-DapX-3_at	17.4
GSC3:AFFX-PheX-3_at	52.2
GSC4:AFFX-LysX-3_at	156.6
GSC5:AFFX-ThrX-3_at	469.8
GeneA	47.5

GSC1:AFFX-TrpnX-3_at	27.13
GSC2:AFFX-DapX-3_at	25.85
GSC3:AFFX-PheX-3_at	22.38
GSC4:AFFX-LysX-3_at	20.72
GSC5:AFFX-ThrX-3_at	17.41
GeneA	22.92
GeneB	22.34
GeneC	24.47
GeneX	28.44
GeneS	22.30



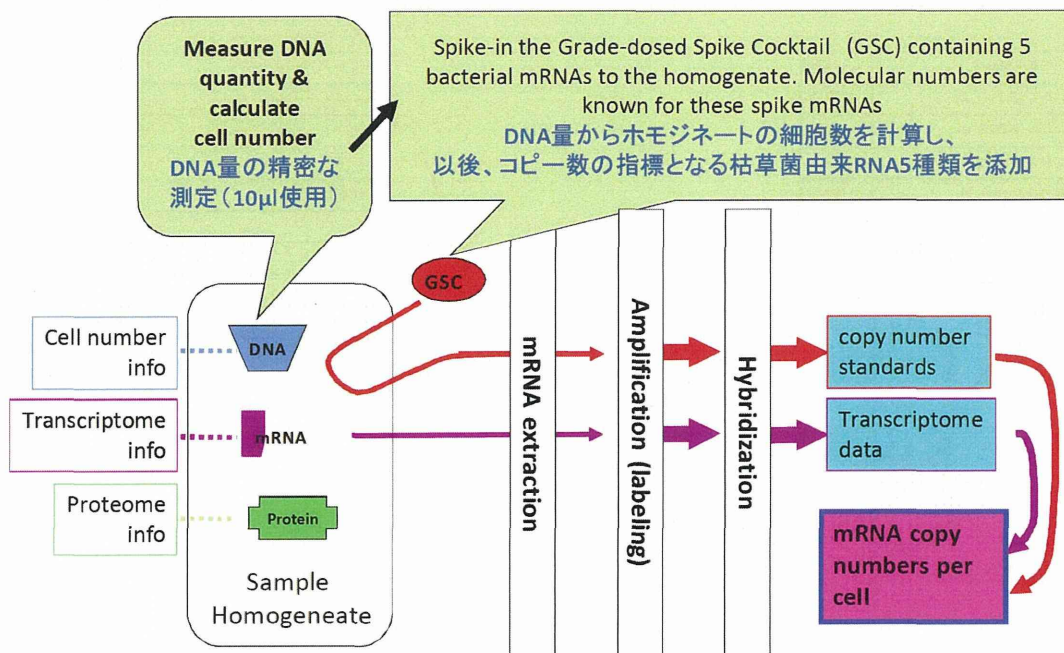
20

## Percellome法の原理



21

## Percellome法の原理



22



## Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human

Yasuhiro Takashima,<sup>1,2</sup> Ge Guo,<sup>1</sup> Remco Loos,<sup>1,3</sup> Jennifer Nichols,<sup>1,4</sup> Gabriella Ficz,<sup>5</sup> Felix Krueger,<sup>6</sup> David Oxley,<sup>6</sup> Fatima Santos,<sup>6</sup> James Clarke,<sup>1</sup> William Mansfield,<sup>1</sup> Wolf Reik,<sup>6,7,8</sup> Paul Bertone,<sup>1,3,9,\*</sup> and Austin Smith<sup>1,10,\*</sup>

<sup>1</sup>Wellcome Trust-Medical Research Council Stem Cell Institute, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QR, UK

<sup>2</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama, 332-0012, Japan

<sup>3</sup>European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton CB10 1SD, UK

<sup>4</sup>Department of Physiology, Development, and Neuroscience, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 3EG, UK

<sup>5</sup>Centre for Haemato-Oncology, Barts Cancer Institute, University of London, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK

<sup>6</sup>Babraham Institute, Babraham, CB22 3AT, UK

<sup>7</sup>Centre for Trophoblast Research, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 3EG, UK

<sup>8</sup>Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton CB10 1SA, UK

<sup>9</sup>Genome Biology and Developmental Biology Units, European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg, Germany

<sup>10</sup>Department of Biochemistry, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1GA, UK

\*Correspondence: bertone@ebi.ac.uk (P.B.), austin.smith@csr.cam.ac.uk (A.S.)

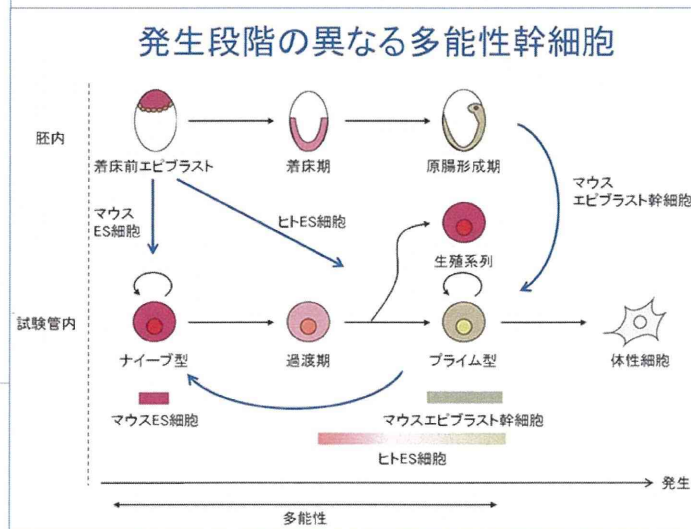
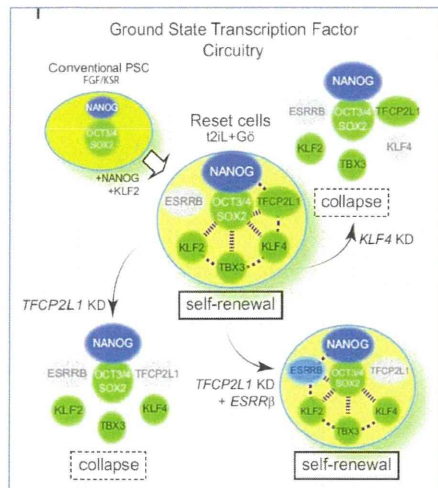
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.029>

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

### SUMMARY

Current human pluripotent stem cells lack the transcription factor circuitry that governs the ground state of mouse embryonic stem cells (ESC). Here,

23



24

## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究（H26-化学-指定-002）  
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

分担研究報告書

Percellome トキシコゲノミクス技術を用いた分子機構解析研究

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、本分担研究では(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、を実施した。さらに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を実施し、現在、DNA メチル化解析を進めている。

-----  
(\*) 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

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) 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。

ii) 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、サンプル DNA 濃度測定によるサンプル中の細胞数推定が困難であるため、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。

iii) 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。

iv) 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 社からリリースされた Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を導入し、比較検討を行った。

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の配慮を十分行い、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))

C. 研究結果

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

MEHP を添加 (最終濃度  $0 \mu\text{M}$ ,  $0.5 \mu\text{M}$ ,  $5.0 \mu\text{M}$ ) 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  $n=3$ ) のサンプルを得