

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

発生工学手法を用いた初期胚への *in vitro* 影響解析研究

分担研究者 安彦 行人

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・第四室

主任研究官

研究要旨

ヒト生殖補助医療における体外受精・胚移植で用いられる培養液類から高濃度のフタル酸類（DEHP・MEHP）が検出されたことに鑑み、その胚発生および情動認知行動への影響を動物実験により詳細に解析することを目的に研究を行った。本年度はマウス体外受精胚を MEHP 曝露条件下で胚盤胞まで培養し、仮親に移植して出生させることで、情動認知行動解析に十分な匹数のマウス個体を得ることに成功した。あわせて DNA メチル化解析・遺伝子発現解析のための胚盤胞サンプルも採取した。DEHP については、培養液に流動パラフィンを重ねる通常の培養条件下では、培養液中に保持されないことから培養条件の再検討を行い、DEHP を吸着することが疑われる流動パラフィンを使用せずに胚培養・マウス個体作出を検討した。ヒト ES・iPS 細胞を用いて得られた結果をヒト初期胚に敷衍するための基盤データとしてマウス ES・EpiS 細胞の比較系樹立も進めており、*in vitro* 曝露実験のための、細胞増殖曲線の作成および凍結細胞ストックの作製を行った。

A. 研究目的

生殖補助医療において、体外受精で出生する児の数は近年急激に増加しており、2013 年には 42554 人と全出生数の 4.1% を占めるに至っている。

平成 24 年度厚労科研費・化学物質リスク研究事業（牧野班）の調査により、ヒト体外受精に用いられる精子調製液、受精卵培養液および添加用ヒト血清アルブミン溶液から、高濃度（母体血清中濃度の数百～数千倍）の DEHP および MEHP が検出され

た。これらフタル酸類が個体におよぼす影響につ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

i) マウス人工受精卵の MEHP 曝露による胚盤胞期胚およびマウス個体の作出  
培養液に流動パラフィンを重ねる通常のマウス胚培養条件では、DEHP が培養液

中に保持されないことから、フタル酸類曝露実験については添加量通りの曝露量が得られる MEHP を先行させた。C57BL/6CrSlc 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、MEHP (和光純薬、Lot No. TSM0238) を添加した培養液中で胚盤胞まで培養した。MEHP は媒精 3 時間後に用いる洗浄培地から添加し、用量は V 群 0 $\mu$ M、L 群 0.5 $\mu$ M、H 群 5 $\mu$ M とした。MEHP エタノール溶液 (L 群 5mM、H 群 50mM) を調製し、ヒト・リコンビナントアルブミン溶液 (Vitrolife G-MM, Lot No. 10038) 500 $\mu$ l に対し 5 $\mu$ l の割合で添加して 100 倍濃度ストック溶液とした。KSOMaa 培地 (Millipore、Lot No. 40530-1) にストック溶液 1/100 容を添加して MEHP 添加培養液を調製した。胚培養は 100 $\mu$ l 培養液滴あたり胚数 20 個で行い、流動パラフィン (ナカライテスク、Lot No. M4P3642) を重層した。培養前および培養後の培養液サンプルを保存し、GC/MS/MS により MEHP 濃度を検出下限 0.0072 $\mu$ M にて測定した (当所生活衛生化学部・河上強志主任研究官の協力)。培養により得られた胚盤胞 (受精後 3 日) のうち 80-100 個を 20 個/匹の割合で偽妊娠 MCH 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。情動認知行動解析に十分な数のマウス個体を確

実に得るため、体外受精から胚培養、胚移植・胚サンプリング、帝王切開に至る実験は 3 セット連続で、同一個体 由来の精子 および同一ロット マウス由来の未受精卵を用いて行った。

また遺伝子発現解析および DNA メチル化解析のため、1 サンプルあたり 70-100 個の胚盤胞を、RLT バッファー (QIAGEN) にて溶解し、-80 にて保存した。

ii) ガラスシャーレ・流動パラフィン非重層培養系によるマウス胚培養・個体作製の試み

培養に用いる流動パラフィンおよびプラスチックシャーレが DEHP を強く吸着することが疑われたことから、ガラスシャーレを用い流動パラフィンを重層しない条件でのマウス胚培養を試みた。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 、16 時間焼成し、KSOMaa 培地 2ml を加えてマウス胚を培養した。対照として通常法のプラスチックシャーレ・流動パラフィン使用、および流動パラフィンを重層しないプラスチックシャーレ (培養液 2ml) での培養を行った。プラスチックシャーレは住友ベークライト、MS-11350 を使用した。得られた胚盤胞 (受精後 3 日) を偽妊娠 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。

iii) マウス ES 細胞、EpiS 細胞の比較を行う実験系の確立

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 ES・EpiS 細胞を用いた曝露実験系の確立を行った。曝露実験を適確に実施するために、これら細胞の増殖曲線の作成および凍結細胞ストックの作製を行った

### C. 研究結果

i) マウス人口受精卵の MEHP 曝露による胚盤胞期胚およびマウス個体の作出  
MEHP 添加培養液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、いずれも 3 回の実験において V、L、H 各群間に有意な差は見られなかった。合計で V 群 38 匹、L 群 33 匹、H 群 31 匹の マウスが得られ、情動認知行動解析のための必要数を十分に満たせると考えられた。情動認知行動解析実験の対照群として、自然交配・自然分娩による C57BL/6CrSlc 子マウスの作出もを行い、14 匹を得ている。

ii) ガラスシャーレ・流動パラフィン非重層培養系によるマウス胚培養・個体作製の試み  
ガラスシャーレを用いた流動パラフィン非重層培養において胚盤胞までの発生率は 9 割を超え、オイルを用いた培養と遜色なかった。しかし現行法(流動パラフィン重層) ガラス

シャーレ法(流動パラフィン無し)それぞれで培養した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、現行法では 44%の満期発育胎児が得られたのに対し、ガラスシャーレ法では 1.6%に留まった(いずれも recipient 数 3、各々 20-21 個の胚盤胞を移植)。ガラスシャーレ法で満期発育胎児率が悪かった原因として、高温焼成により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、等の仮説を立て、焼成後ガラス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。一方、流動パラフィン非重層プラスチックシャーレを用いた培養では出生率 21%で、対照の流動パラフィン重層群の出生率 29%と同等であった。

iii) マウス ES 細胞、EpiS 細胞の比較を行う実験系の確立

本年度は遺伝子発現解析および DNA メチル化解析のための必要核酸量(細胞数)から、播種細胞数およびタイムコースの確定のため、ES・EpiS 細胞それぞれの増殖曲線を作成した。あわせて、曝露実験スタートに必要な凍結ストック細胞の作製もを行い、十分量のストックを得ることができた。

### D. 考察

生殖補助医療においては胚盤胞までの比較的長期の培養を行う手技が主流となっているため、本研究ではマウス胚盤胞を主たる解析対象とした。

初期胚の体外培養が DNA メチル化割合の変化などエピジェネティックな変化をもたらすことを示唆する報告があるが、その機構や原因物質は明らかでなく、個体の発生や情動認知など生後の機能に及ぼす影響も不明である。

本年度の実験で、受精直後から胚盤胞期まで MEHP に曝露した胚から、マウス個体を情動認知行動解析に十分な匹数得ることができた。受精率・胚盤胞期までの発生率・着床および出生率については、MEHP 曝露の有無および用量間に有意な差は見られなかった。今後、得られた個体について体重増加の観察および情動認知行動解析を進める。同様に MEHP 曝露胚盤胞サンプルを得て、遺伝子発現変動、DNA メチル化の変動解析を行い、安全性評価法開発のためデータ収集を進める。

一方、DEHP については、きわめて低い水溶性のため、通常の培養条件では培養液中から流動パラフィン相に急速に移行すると考えられ、胚培養では曝露実験を行うことができないことが明らかになった。培養液中 DEHP 濃度の維持が可能な培養法を検討したが、ガラスシャーレ使用・流動パラフィン非重層での培養では胚盤胞はできるものの、胚盤胞移植による出生個体がほとんど得られなかった。プラスチックシャーレ使用であれば流動パラフィン非重層培養での個体作出が可能と予想されるが、培養液中 DEHP 濃度の変動について改めて検討が必要である。

多能性幹細胞研究の進展を受け、化学物

質の初期胚への影響を評価するため ES 細胞・iPS 細胞が用いられるケースが出てきているが、ヒトの ES・iPS 細胞はマウスでいう EpiS 細胞に相当するやや分化が進んだステージであり、初期胚の代用とすることは必ずしも適切でない。より分化段階が低く初期胚をよく模倣すると考えられるマウス ES 細胞を、マウス EpiS 細胞と同一生物種内で比較することで、ヒト ES・iPS 細胞を用いた実験結果をより適切にヒト胚に敷衍できると考えられる。

#### E. 結論

MEHP については曝露胚盤胞移植によるマウス生産に成功し、今年度内に情動認知行動解析を実施する。DEHP 曝露については曝露濃度安定化のために培養プロトコルの最適化を進めつつ、胚培養開始から DEHP が流動パラフィンに移行するまでの短期間の曝露でも胚に影響を与えるか否か、検討が必要である。マウス ES・EpiS 細胞の比較系については曝露実験プロトコルを確立し、近く解析に入る。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

## H. 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