

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

- ～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～

研究分担者 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 27 年度は、人工授精時 MEHP 曝露による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) を行った。その結果、低用量 MEHP (0.5 μM) 曝露群に、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。しかしながら、高用量 MEHP (5.0 μM) 曝露群には、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るに留まった。また 昨年度に行った体外成熟培養マウス卵母細胞 (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) への MEHP 曝露 (5 μM) 影響解析を続けるとともに、その評価の検討と、体外受精への影響検討を開始した。

A . 研究目的

ヒト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。特に、本分担研究では、人工授精時フタル酸類曝露 (今年度は MEHP を検討) による産仔マウスの情動認知行動影響解析と

体外成熟-受精-培養系 (IVM/F/C) におけるフタル酸類曝露影響 (今年度は MEHP を検討) を検討する。

B . 研究方法

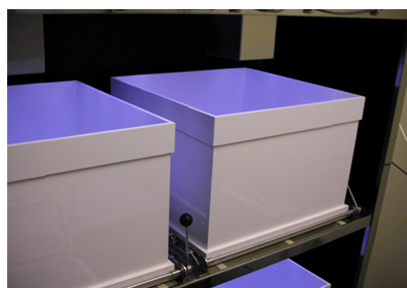
人工授精時フタル酸類曝露 (今年度は MEHP を検討) による産仔マウスの情動認知行動影響解析
C57BL/6CrSlc 雌を過排卵処理 (PMSG

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 $0\mu\text{M}$, $0.5\mu\text{M}$, $5.0\mu\text{M}$) 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 (分担研究者: 安彦との共同研究)。

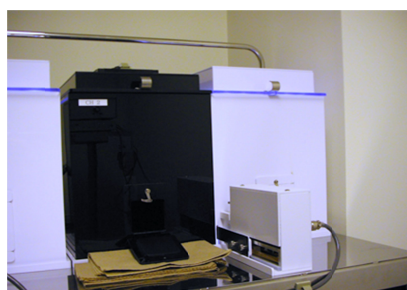
得られた産仔マウスを生後 4 週齢時に離乳し、生後 12 週齢時にオープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験からなるバッテリー式行動解析を行った。その際、自然分娩群を設定し、MEHP 非曝露群、低用量 MEHP ($0.5\mu\text{M}$) 曝露群、高用量 MEHP ($5.0\mu\text{M}$) 曝露群とともに解析を行った。

以下に各行動試験の概要と主要の評価項目を記載する。

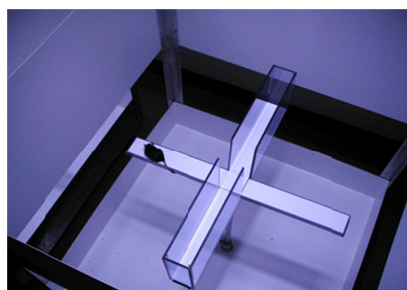
オープンフィールド試験：新規環境下におけるマウスの自発的な活動性 (探索行動性) を測定する試験。総移動量、中央部滞在時間、総移動回数を主たる評価項目とする。



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。明所滞在時間、暗所滞在時間、明暗往来数、暗所滞在時間 (暗所から初めて明所に移動するまでに要する時間) を主たる評価項目とする。

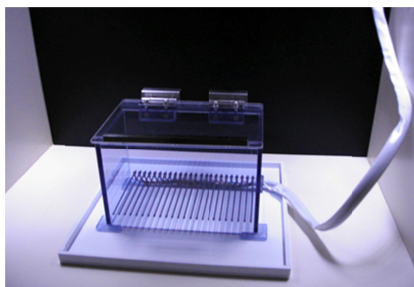


高架式十字迷路試験：マウスが壁際を好み、高所を避けるという性質を利用した不安関連行動を評価する試験。本装置における総移動量、開放アーム部滞在時間、総アーム滞在時間を主たる評価項目とする。

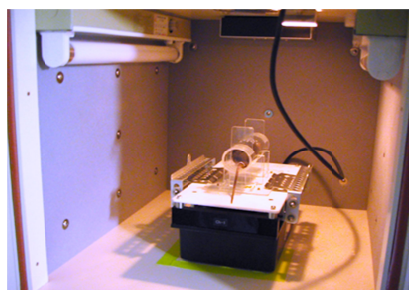


条件付け学習記憶試験：マウスに場所や音、光などの条件刺激と電気刺激などの無条件刺激を組み合わせることで条件づけした後、条件刺激を再度提示

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。短期記憶形成過程を包括するとされる条件付けの過程におけるすくみ反応（1日目）、場所と電気刺激を受けた経験を連想することによって生じるすくみ反応（2日目）、警報音と電気刺激を受けた経験を連想することによって生じるすくみ反応（3日目）を主たる評価項目とする。



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驚愕反応（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。本系においては加速度計による測定を行っている。また、大きな音刺激の数ミリ秒前に比較的小さい音刺激を提示することによって驚愕反応が抑制されること（プレパルス驚愕反応抑制）が知られているが、ヒトの統合失調症において、このプレパルス驚愕反応抑制不全が生じることが多く、統合失調症患者の呈する生理反応の1つとされている。120dB に対して、プレパルスを 90、95、100、105dB 提示した場合の驚愕反応抑制率を評価指標とする。



体外成熟-受精-培養系（IVM/F/C）におけるフタル酸類曝露影響解析

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（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、0.5 μ M、5 μ M、50 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 を入れ、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。

昨年度に引き続き、一部の卵母細胞について、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。

また一部の成熟卵母細胞については、体外受精-発生へのフタル酸曝露影響を検討すべく、評価指標の最適化を行って

いる。

(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「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」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

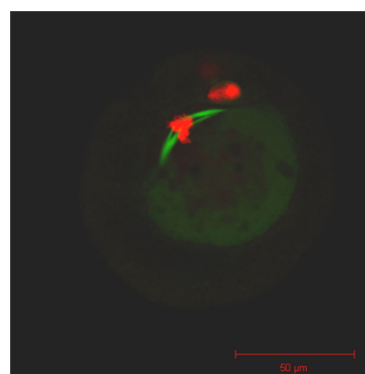
人工授精時フタル酸類曝露(今年度はMEHPを検討)による産仔マウスの情動認知行動影響解析

自然分娩群、MEHP非曝露群、低用量MEHP(0.5 μ M)曝露群、高用量MEHP(5.0 μ M)曝露群ともに通常飼育環境下において異常行動は確認されなかった。

自然分娩群に比較しMEHP非曝露群はオープンフィールド試験における総移動距離が有意に上昇していたが、その程度は低く、他の行動試験の解析項目を含めて両者に重篤な行動様式の違いは認められなかった為、MEHP非曝露群に対する、低用量MEHP(0.5 μ M)曝露群および高用量MEHP(5.0 μ M)曝露群について検討を行った。その結果、低用量MEHP(0.5 μ M)曝露群に、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。しかしながら、高用量MEHP(5.0 μ M)曝露群には、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るに留まった。

体外成熟-受精-培養系(IVM/F/C)におけるフタル酸類曝露影響解析

体外成熟に関して、引き続き、MEHP曝露影響検討を行った結果、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像を確認した(次図)。



未受精卵母細胞のMEHP曝露による紡錘体形成不全像。前年度の所見に加え、図のような染色体散開が不十分な像も観察した。

D. 考察

人工授精時フタル酸類曝露(今年度はMEHPを検討)による産仔マウスの情動認知行動影響解析

MEHP非曝露群に対する低用量MEHP(0.5 μ M)曝露群および高用量MEHP(5.0 μ M)曝露群の行動様式影響としては、低用量MEHP曝露群に影響が大きく用量依存性が認められなかった。低用量MEHP曝露群では、不安関連行動の更新と音-連想記憶異常のみならず場所-連想記憶異常が認められたにも関わらず、高用量MEHP曝露群では、音-連想記憶異常が認められるに留まった。こ

の理由については不明であるが、不安亢進の程度にばらつきが生じ、解析結果に影響を与えた恐れが考えられた。しかしながら、音-連想記憶異常については、低用量および高用量 MEHP 曝露群ともに認められており、動物実験における人工授精時の MEHP 曝露の影響と考えられた。

体外成熟-受精-培養系 (IVM/F/C) におけるフタル酸類曝露影響解析

マウス未成熟卵を用いた体外成熟に関して、昨年度同様に MEHP 曝露により成熟率の低下と減数分裂時の異常を検出した。本実験での有意な曝露影響は、ヒト体外受精培養液に混入した MEHP 濃度の 10 倍量の曝露において観察された結果であるが、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。今年度、新たに観察された紡錘体形成パターン異常を加え検討した結果、少なくとも中心体の機能不全を伴うもの (H26 年度報告) と、染色体の配列不全を伴うものの存在が明らかになった。また、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。

尚、DEHP についても同様の影響評価を行う予定であるが、実際の不妊治療においては、流動パラフィン重層胚培養法が一般的である為、一定量までであれば混入 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と考えられる為、条件を再設定する必要があると考えられた。

E . 結論

本年度は、人工授精時フタル酸類曝露 (今年度は MEHP を検討) による産仔マウスの情動認知行動影響解析から、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指摘された。

体外成熟-受精-培養系 (IVM/F/C) フタル酸類曝露による卵母細胞影響解析から、MEHP 曝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、紡錘体形成チェックポイント因子の制御異常や、早期染色分体分離を含めて、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 . 健康危険情報 なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

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.

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.

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.

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.

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.

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

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)

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 回日本毒性学会学術集会、2015 年 6 月(金沢市)

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)

関根雅史、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、平館裕樹、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)

内藤秋、記緒、斉藤隼人、沼邊孝、平館裕希、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)

関根雅史、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、平館裕希、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(十和田市)

平館裕樹、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)

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 F R E T 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)

小林記緒、白形芳樹、平館裕希、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)

白形芳樹、小林記緒、平館裕希、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)

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)

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)

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)

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 |