

**厚生労働行政推進調査事業費（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）**

**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（フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP) 0.2 μM 及びフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP) 0.5 μM）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取得するため、マウスを用いた研究開発を行った。

平成 28 年度は、MEHP 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（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、平成 27 年度実施の初回に引き続き、2 回独立に実施するとともに、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(5μM) 影響解析を続けた。

**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、MEHP 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と 体外成熟-受精-培養系（IVM/F/C）における卵母細胞曝露影響解析を検討する。

**B . 研究方法**

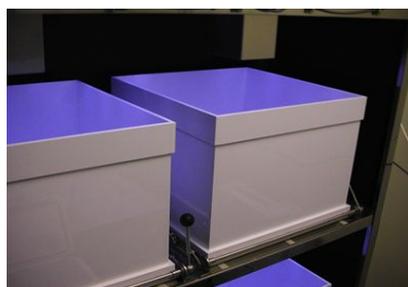
**MEHP 曝露受精卵を母胎に移植して生まれたマウスにおける情動認知行動解析**  
C57BL/6CrSlc 雌を過排卵処理（PMSG 5units/匹 腹腔内投与、48 時間後に hCG

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MEHPを添加(最終濃度0 $\mu$ M,0.5 $\mu$ M,5.0 $\mu$ M)した洗浄培地に移した。24時間後(2細胞期)に胚を、MEHPを添加(最終濃度0 $\mu$ M,0.5 $\mu$ M,5.0 $\mu$ M)したKSOMaa培養液(Millipore, Lot No. 40530-1)に移し、さらに48時間培養した(MEHP曝露は計3日間)。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平成27年度実施の初回に引き続き、2回独立に実施した。

以下に各行動試験の概要と主要の評価項目を記載する。

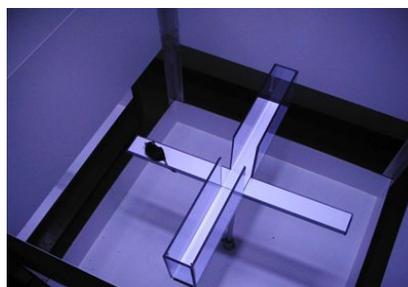
**オープンフィールド試験**:新規環境下におけるマウスの自発的な活動性(探索行動性)を測定する試験。総移動量、中央部滞在時間、総移動回数を主たる評価項目とする。



**明暗往来試験**:マウスが新規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、暗所潜在時間(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。

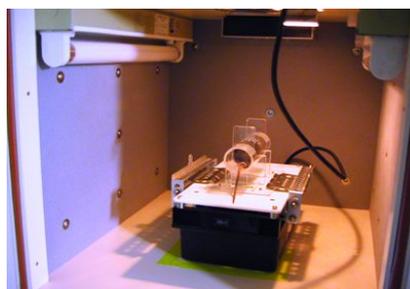


**条件付け学習記憶試験**:マウスに場所や音、光などの条件刺激と電気刺激などの無条件刺激を組み合わせることで条件づけした後、条件刺激を再度提示

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) における卵母細胞暴露影響解析

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  $\mu$ 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 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M、5 $\mu$ M、50 $\mu$ M) の成熟培地 (10  $\mu$ 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、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 -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「動物実験等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

### MEHP 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

#### -第 1 回目施行：2016 年 2 月中旬実施-

MEHP 低用量 (0.5  $\mu$ M) 投与群において、オープンフィールド試験から総移動量の減少および移動回数の減少が、明暗往来試験から明所滞在時間の減少が、また条件付け学習記憶試験から空間-連想記憶度および音-連想記憶度の低下が有意 ( $p < 0.05$ ) に認められた。また、MEHP 高用量 (5.0  $\mu$ M) 投与群においては、明暗往来試験における暗所潜在時間の減少と条件付け学習記憶試験から音連想記憶度の低下が有意 ( $p < 0.05$ ) に認められた。

#### -第 2 回目施行：2016 年 11 月上旬実施-

MEHP 低用量 (0.5  $\mu$ M) 投与群および MEHP 高用量 (5.0  $\mu$ M) 投与群において、音連想記憶度の低下傾向は見られたが、統計処理上、有意差は認められなかった。

#### -第 3 回目施行：2016 年 11 月下旬実施-

MEHP 低用量 (0.5  $\mu$ M) 投与群において、高架式十字迷路試験から総移動量の減少およびアーム選択数の減少が有意 ( $p < 0.05$ ) に認められた。また、MEHP 高用量 (5.0  $\mu$ M) 投与群においては、明暗往来試験における暗所潜在時間の減少と、高架式十字迷路試験における総移動量の減少およびアーム選

択数の減少、さらに条件付け学習記憶試験から音-連想記憶度の低下が有意 ( $p < 0.05$ ) に認められた。

3 回の行動解析試験を統合 (3 回のデータを集め、1 群  $8 \times 3 = 24$  として計算) し、統計処理を行った結果、MEHP 低用量 (0.5  $\mu$ M) 投与群および MEHP 高用量 (5.0  $\mu$ M) 投与群において、条件付け学習記憶試験から音-連想記憶度の低下が有意 ( $p < 0.05$ ) に認められた。

### 体外成熟-受精-培養系 (IVM/F/C) における卵母細胞曝露影響解析

卵母細胞の体外成熟に関して、引き続き、MEHP 曝露影響検討を行った結果、平成 26 年度および 27 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 $\mu$ M、50 $\mu$ 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。しかしながら、チューブリン抗体を用いた免疫細胞化学からは、紡錘体形成不全像の検出には至らなかった。

## D . 考察

### MEHP 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

体外受精時における MEHP 曝露によって、不安関連行動影響と、学習記憶能への影響が生じる恐れのあることが示された。特に、条件付け学習記憶試験における音-連想記憶度の低下は 3 回の施行のうち、2 回で有意に検出されており、かつ統合解析結果においても認められたことから、MEHP 曝露によって影響を受けやすい行動解析項目と考えられた。

恐怖条件付け学習記憶試験において空間-連想記憶能は「海馬-扁桃体」依存性が高いとされ、また音-連想記憶能は「扁桃体」依存性が高いとされることから、MEHP 暴露によって影響を受けやすい脳部位は「扁桃体」が中心であると推察される。扁桃体に深刻な異常が生じた場合は、学習記憶能のみならず、重篤な情動行動異常を伴う精神神経疾患が疑われるが、我々の行った行動解析試験からは、統合失調症モデルマウスが示す所見であるプレパルス驚愕反応抑制試験での異常は認められず、また不安関連行動への影響も、他の精神疾患モデルマウスで報告されてきたレベルにはないと考えられた。しかしながら、扁桃体への影響が強く疑われることに変わり無く、今後、分子レベル解析を含めて、神経科学的物証の確認が必要であると考えられた。

#### **体外成熟-受精-培養系 (IVM/F/C) における卵母細胞暴露影響解析**

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 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。また、顕著な紡錘体形成異常が確認されない卵母細胞においても、紡錘体形成チェックポイント因子の制御異常や、早期染色分体分離などの異常が生じている恐れが考えられる為、特に微小管制御因子に焦点を合わせた評

価指標の設定が必要と考えられた。

## **E . 結論**

MEHP 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から、扁桃体依存性が高いとされる条件付け学習記憶試験の音-連想記憶に対する影響が疑われた。特に扁桃体を中心とした詳細な解析が必要であると考えられた。

体外成熟-受精-培養系 (IVM/F/C) における卵母細胞影響解析については、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、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 . 研究発表**

### **1 . 論文発表**

1) 書籍 なし

### **2) 雑誌**

Ohtani N, Iwano H, Suda K, Tsuji E, Tanemura K, Inoue H, Yokota H. Adverse effects of maternal exposure to bisphenol F on the anxiety- and depression-like behavior of offspring. J Vet Med Sci. 2016 Dec 25. doi: 10.1292/jvms.16-0502.

Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related

DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. PLoS One. 2016 Nov 23;11(11):e0167127. doi: 10.1371/journal.pone.0167127.

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period. Front Neurosci. 2016 Jul 20;10:339. doi: 10.3389/fnins.2016.00339.

Inoue H, Ogonuki N, Hirose M, Hatanaka Y, Matoba S, Chuma S, Kobayashi K, Wakana S, Noguchi J, Inoue K, Tanemura K, Ogura A. Mouse D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 16;478(2):592-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.109.

Umezu K, Hiradate Y, Oikawa T, Ishiguro H, Numabe T, Hara K, Tanemura K. Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle. J Reprod Dev. 2016 Aug 25;62(4):409-14. doi: 10.1262/jrd.2016-055.

Lee S, Hiradate Y, Hoshino Y, Ko YG, Tanemura K, Sato E. Localization and quantitative analysis of Cx43 in porcine oocytes during in vitro maturation.

Zygote. 2016 Jun;24(3):364-70. doi: 10.1017/S0967199415000271.

## 2. 学会発表

Late effects on CNS with behavioral disturbance induced by early exposure of environmental chemicals.

Kentaro Tanemura

Neuro 2016, 神奈川、2016年7月20-22日

Neurobehavioral toxicity at adult period Induced by pesticide exposure at juvenile period

Kentaro Tanemura and JUN Kanno

ICT XIV, メキシコ、メリダ、2016年10月2-6日

Norio Kobayashi, Hiroaki Okae, Hitoshi Hiura, Hatsune Chiba, Yoshiki Shirakata, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, Takahiro Arima

Temporal alternations in DNA methylation patterns of spermatozoa in early young mice,

The 17th AAAP Societies Animal Science Congress, Kyushu Sangyo University, 福岡、2016年8月20-25日

Norio Kobayashi, Hiroaki Okae, Hitoshi Hiura, Hatsune Chiba, Yoshiki Shirakata, Kenshiro Hara, Kentaro Tanemura, Takahiro Arima

Age-related changes in DNA methylation patterns of spermatozoa in mice, BLUEPRINT/IHEC conference, Crowne Plaza Brussels, Brussels, Belgium, 2016年9月8-9日

小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、千葉初音、白形芳樹、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎

性成熟から繁殖期を通じたマウス精子DNAメチル化様式の変齢性変化、第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川、2016年9月11-15日

小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、千葉初音、白形芳樹、原健士朗、種村健太郎、有馬隆博

繁殖期におけるマウス精子 DNA メチル化様式の変齢性変化、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日

斉藤洋克、井上弘貴、小林記緒、白形芳樹、岡江寛明、樋浦仁、原健士朗、有馬隆博、種村健太郎

ビタミンE欠乏給餌によるマウス精巣影響と精子DNAメチローム変化  
第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川、2016年9月11-15日

梅津康平，平舘裕希，原健士朗，種村健太郎

ニューロテンシンはウシ凍結精液の受精能獲得および先体反応を促進する

第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川、2016年9月11-15日

後藤萌 斉藤洋克 白形芳樹 原健士朗 種村健太郎

浸透圧変動に対するMII期卵母細胞の細胞膜状態についてのマウス系統間の差違  
第109回日本繁殖生物学会相模原大会、麻布大学、神奈川、2016年9月11-15日

梅津康平，平舘裕希，原健士朗，種村健太郎

ウシ精子機能へのニューロテンシンの影響  
第159回日本獣医学会大会、日本大学、神奈川、2016年9月6-8日

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純：

キシレン吸入暴露によるマウスへの中枢機能影響解析

第159回日本獣医学会大会、日本大学、神奈川、2016年9月6-8日

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純：

キシレンの経気道吸入暴露によるマウス行動影響解析

第 43 回日本毒性学会学術年会 2016 年 6 月 30 日

## 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 |