

I . 総合研究報告書

2019/1/28 修正

10 ページ 図 3 : 数値軸の誤記 (-5~5 であるところ
0~10 になっていた) を修正

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

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 室長

研究要旨

平成 20-22 年度に実施された厚生労働科学研究（H20-化学-一般-002）^{*1}において、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）が検出されたことを受け、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。受精卵の一般的な発生指標や出生後の一般所見に加え、網羅的遺伝子発現解析や DNA メチル化解析を実施した。更に、出生前のフタル酸類曝露が子の情動認知行動に影響を及ぼす報告^{*2}があることから、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情動認知行動試験バッテリーによる解析を実施した。このバッテリー試験には、毒性学的評価に耐える定量性と再現性を確保する為に開発した防音閉鎖式の測定器材（観測者を含む観測環境の影響を排除する為にビデオカメラ等によるコンピュータ制御下での遠隔測定による）、及び、測定プロトコル・アルゴリズムを用いた。また、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、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 年度は本研究の実施に必要な基盤研究、(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^{*3}の改良）を行った。

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、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マイクロアレイによる遺伝子発現解析及び次世代シーケンサーによる全ゲノム網羅的 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の情動認知行動解析（12～13 週齢時）を実施し、非曝露受精卵のそれと比較した。その結果、MEHP 曝露受精卵（0.5 μ M 及び 5.0 μ M）に由来するマウスにおいて条件付け学習記憶試験による音-連想記憶能が非曝露受精卵に由来するマウスに比して、低下することが示唆された。

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（0.2 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 に著減する^{*4}ことを確認し、一般的な手法による不妊治療であれば、ヒト体外受精培養液に混入した DEHP による受精卵曝露は母体血清中濃度レベルに留まっている可能性が示唆された。

平成 28 年度は、MEHP について、引き続き網羅的 DNA メチル化解析や、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を 2 回、独立に実施し、平成 27 年度と同様に MEHP 曝露受精卵（0.5 μ M 及び 5.0 μ M）に由来するマウスにおいて条件付け学習記憶試験による音-連想記憶能が、非曝露受精卵に由来するマウスに比して低下する傾向を確認した（平成 27～28 年度にて合計 3 回実施し、うち 2 回で有意差あり）。

また、DEHP については、流動パラフィンを重層しない場合、培養期間（3 日間）を通じて初期濃度の 25%以上の DEHP が培養液中に残留すること、及び、その結果、胚発生が阻害され、それ以降の発生段階の解析が実施できないことを確認した。

動物実験で観察された異常所見が、そのままの形でヒトに引き起こされると直ちに結び付けて考えるべきではないが、体外受精時のフタル酸類への曝露は、ヒトの不妊治療においても避けるべき事象と考えられる。特に、フタル酸類の作用は、PPAR 等の核内受容体を介したシグナル伝達に起因していることが予想されることから、明らかな閾値の設定は困難であることが想定され、その為、フタル酸類の濃度を可能な限り下げることが重要である。またヒトにおいてどのような影響が現れるかを明らかにするには、種差に基づく感受性や反応の性質の差異を分子レベルで比較検討すると共に、不妊治療で産まれた子どもに対し適切な疫学調査を実施すること、が有効と考えられる。

(*1) 研究課題：化学物質へ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

(*2) Stephanie M.E. *et. al.* ” Prenatal Phthalate Exposure Is Associated with Childhood Behavior and Executive Functioning” Environ Health Perspect 118:565-571 (2010)

(*3) 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

(*4) 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。平成 28 年度にこれを間接的に証明した。

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、室長）

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℃、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 雌マウス（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) を用いて収量及び品質を確認した。

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、平成 26 年度に、胚盤胞を構成する細胞数を実測し、プールした胚盤胞数 (50~100 個) からサンプル中の細胞数を推測する最適化プロトコルの開発を行い、平成 27 年度以後はこれを利用した。

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

上記 i)、ii)、iii) 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

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) 法と、最近 Swift 社から発売された Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を導入し、平成 26~27 年度において両手法の性能比較を行った。この結果平成 27~28 年度では Accel-NEG Methyl-Seq DNA Library Kit を採用し、次世代シーケンサー NextSeq (Illumina) を使用して全ゲノム bisulfite シーケンス (WGBS) を実施した。得られたデータは bsc2fastq ソフトウェア (Illumina) により fastq ファイルに変換した後、BSMap ソフトウェア ([code/google.com/archive/p/bsmap](http://code.google.com/archive/p/bsmap)) によりマウスゲノム配列 (mm10) にマッピングし、同梱ソフトウェアの methyratio.py によりメチル化塩基を検出した。さらに R パッケージ methylKit (github.com/al2na/methylKit) を用いて Differential methylation analysis を実施した。

vi) マウス体外受精卵の 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 (eCG

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 $0\ \mu\text{M}$, $0.5\ \mu\text{M}$, $5.0\ \mu\text{M}$) 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 $0\ \mu\text{M}$, $0.5\ \mu\text{M}$, $5.0\ \mu\text{M}$) した KSOMaa 培養液 (Millipore, Lot No. 40530-1) に移し、さらに 48 時間培養した。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。

なおマウス体外受精卵の MEHP 曝露実験においては、胚培養期間を通して流動パラフィン重層のうえ、培養を実施した。

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した。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した。これらの各試験には、毒性学的評価に耐える定量性と再現性を確保する為に研究分担者らが開発し、関連研究においてその安定的性能が確認されている、防音閉鎖式の測定器材 (観測術者を含む観測環境の影響を排除する為にビデオカメラ等によるコンピ

ュータ制御下での遠隔測定による)、と、これに最適化した測定プロトコル・アルゴリズムを用いた。

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 eCG (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 ($100\ \mu\text{l}$) 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 $0\ \mu\text{M}$, $0.05\ \mu\text{M}$, $0.5\ \mu\text{M}$, $5.0\ \mu\text{M}$) の成熟培地 ($10\ \mu\text{l}$) 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°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、評価指標の最適化を実施した。

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スケット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った。

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

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

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。

この結果の原因の可能性として、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。

平成 27 年度、最適化した受精卵培養系で微量曝露が可能であった MEHP について曝露実験 (V 群 0 μ M、L 群 0.5 μ M 及び H 群 5.0 μ M) を進めたところ、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 回の実験のいずれにおいても V、L、H 各群間に有意な差は見られなかった。

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

さらに遺伝子発現ネットワークレベルの解析を行うべく、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 μ M、0.5 μ M、5.0 μ 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。

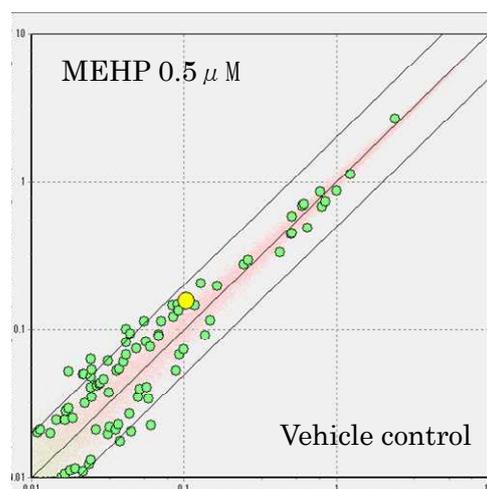


図 1 MEHP 曝露による遺伝子発現変動 (緑点、黄点は $p < 0.05$)。薄赤点は有意差のない遺伝子。黄点は一例として DNA メチル化に関する M111 遺伝子を示す。対角線上下の 2 倍変動線を越えるものはほとんど無かった。

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 15 遺伝子 (Exoc6, Ptgr2, Vamp4, Ttc37, Zfp639, Slc25a19, Zfp322a, Sgpl1, M111, Zfp42, Vps37a, Mcmbp, Nup54, Nus1, Ev1)、及び発現抑制される 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 (M111) や、細胞分裂 (Mcmbp、Csnk2a2)、形態形成 (Sgpl1、Nus1、Senp2、Runx1)、精子形成 (Zfp42)、神経系発達 (Ev1、Runx1、Nkx6-2) 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僅かであった。

平成 28 年度、MEHP 曝露 (0 μ M、0.5 μ M、5.0 μ M) 受精卵を母胎に移植して生ま

れたマウスを14週齢まで飼育し、その海馬における網羅的遺伝子発現解析を行い、 $0.5\mu\text{M}$ 曝露群及び $5.0\mu\text{M}$ 曝露群で共通して有意に発現量が増加していた18遺伝子 (Arr3, Arrdc2, Blnk, Cacna2d4, Camk2a, Cep68, Ccno, Fcgr3, Hhip11, Iahl, Mfsd2a, Nrip1, Pigc, Polr3e, Runx2, Scrt2, Xdh, Zfyve)、及び発現量が低下していた7遺伝子 (Bmp6, Col1a1, Col1a2, Igf2, Kcnj13, Pcolce, Slc2a12) を抽出した。顕著な変動を呈する遺伝子は無かったが、海馬にも発現し、postsynaptic density、long-term potentiation に関与して、学習機能に影響を与える Camk2a が発現誘導され、また、内向き整流カリウムチャンネルの一種で海馬の pyramidal 細胞層に高発現して神経細胞の静止膜電位の維持に関与する Kcnj13 が発現抑制を受けるなど、別途観察された行動異常との関連性が示唆される結果を得た。

DNA メチル化状態の精密解析

DNA メチル化状態の精密解析に関しては、平成26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、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った(フタル酸曝露による受精卵発育不全の可能性あり)ため、平成27年度はより微量の 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 PBAT 法と同様の検討を行った。その結果、Accel-NGS

Methyl-Seq DNA Library Kit では 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。

平成28年度は Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を採用し、MEHP 曝露 (V 群 $0\mu\text{M}$ 、L 群 $0.5\mu\text{M}$ 及び H 群 $5.0\mu\text{M}$) の受精卵を3日間培養した胚盤胞、及びそれを母胎に移植して生まれたマウスの14週齢時の海馬をサンプルとして、全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を実施した。

まず胚盤胞については、各群間におけるゲノム DNA のメチル化状況に相関性が低く (0.4 以下)、個々の CpG サイトについてもメチル化率が様々であることが分かった(図 2a)。一方、MEHP 曝露胚盤胞を母胎に移植して生まれたマウスの14週齢時の海馬では、各群間におけるゲノム DNA メチル化状況の相関性は高く (0.75 以上)、また多くの CpG サイトがメチル化修飾を受けていることが分かった(図 2b)。

全ゲノムを塩基単位でメチル化状況を検査したところ、部分的な変動は検出されているものの、広範囲に及ぶメチル化状況異常は観察されていない。

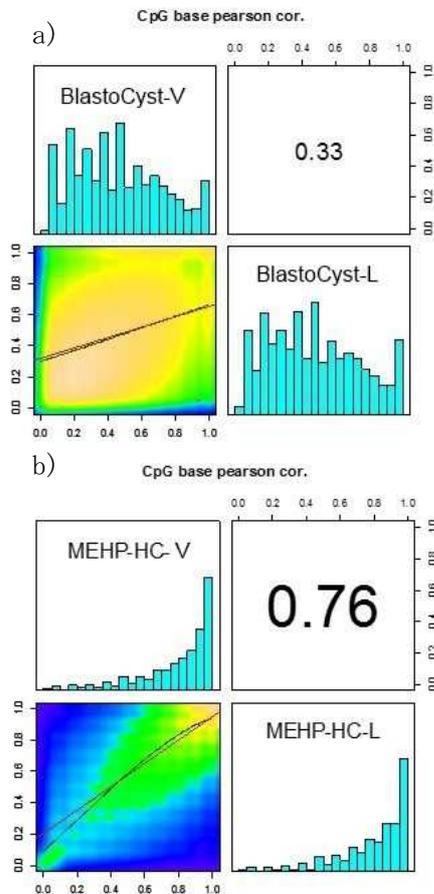


図 2 MEHP 曝露胚盤胞及び、それを母胎に移植し生まれ、成熟したマウスの海馬（14 週齢時）における CpG サイトのメチル化状況。

MEHP 曝露は左上横軸及び左下縦軸が V 群 $0 \mu\text{M}$ 、右下横軸及び左下横軸が L 群 $0.5 \mu\text{M}$ （受精卵培養液中濃度相当）。a は胚盤胞、b が海馬での解析結果を示す。右上が相関係数、左上、右下のヒストグラムは横軸をメチル化率とする CpG サイトのメチル化率分布を、左下は CpG サイト毎の 2 サンプルでのメチル化率を座標としてプロットしたヒートカラーマップで、青→緑→黄の順に少数→多数を示す。

情動認知行動解析

情動認知行動解析用のマウス個体は MEHP 曝露（最終濃度 V 群 $0 \mu\text{M}$ 、L 群 $0.5 \mu\text{M}$ 及び H 群 $5.0 \mu\text{M}$ ）の有無に拠らず順調に成育し、合計で V 群 38 匹、L 群 33 匹、H 群 31 匹の雄マウスを得た。この際、一般行動（通常飼育時の挙動、摂食・飲水行動、体毛・表皮の状態など）や発育状態（体重増加等）に有意な差は見られなかった。

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）を実施した結果、用量相関を持って、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。

平成 28 年度に同条件で情動認知行動解析を独立に 2 回、独立に実施したところ、条件付け学習記憶試験による音-連想記憶能の低下傾向があり、うち一方では $p < 0.05$ の有意差が認められた（図 3 は 3 回の試験結果の集計（3 回のデータを集め、1 群 $8 \times 3 = 24$ として計算）を示す）。

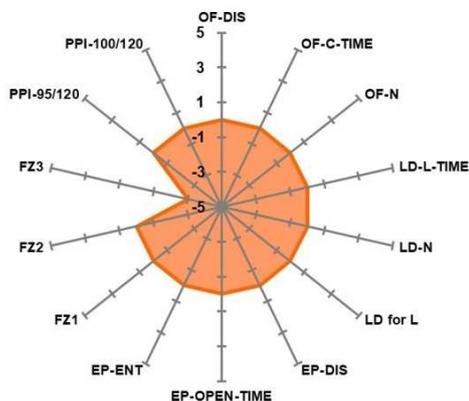


図3 体外受精時 MEHP 曝露 (0.5 μM) による産仔マウスの成熟期情動認知行動解析 (第1~3回の集計)

オープンフィールド試験

OF-DIS : 総移動量

OF-C-TIME : 中央部滞在時間

OF-N : 総移動回数

明暗往来試験

LD-L-TIME : 明所滞在時間

LD-N : 総移動数

LD for L : 初移動潜在時間

高架式十字迷路試験

EP-DIS : 総移動量

EP-OPEN-TIME : 開放部滞在時間

EP-ENT : 総アーム選択数

条件付け学習記憶試験

FZ1 : 条件付け (短期記憶形成度)

FZ2 : 場所-連想記憶度

FZ3 : 音-連想記憶度

プレパルス驚愕反応抑制

PPI-95/120 : 95db/ 120db

PPI-100/120 : 100db/ 120db

PPI-105/120 : 105db/ 120db

+/-4: p<0.001

+/-3: p<0.01

+/-2: p<0.05

+/-1: p<0.1

0: p>0.1

体外成熟/受精/培養系における卵母細胞影響解析

平成 26~28 年度の試験のいずれに於いても同様に、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 (5μM、50μM) 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、いずれの試験に於いても紡錘体形成不全の誘発を認めた (図 4)。

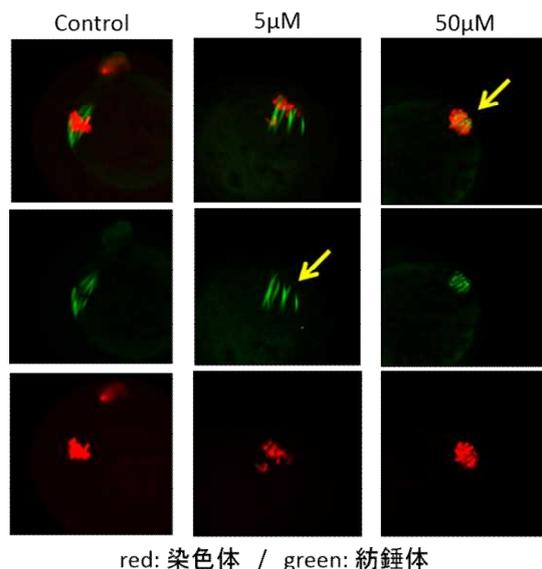


図4 未受精卵母細胞の MEHP 曝露による紡錘体形成不全例 (赤 : 染色体、緑 : 紡錘体)

マウス ES 細胞と EpiS 細胞の比較

平成 26 年度より培養条件の最適化と増殖曲線の確定を行った。この結果、細胞増殖が非常に遅く、デリケートで培養環境条件の影響を受けやすい性質が判明したため、平成 27 年度では本研究にて実施する化学物質曝露実験に十分な量の凍結ストック細胞を一括作製した。平成 28 年度、ES 細胞及び EpiS 細胞を MEHP (0.5 μM) 及び DEHP (0.2 μM) に曝露しサンプリングした。これらを用い、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析及び次世代シーケンサ

一による全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析 (対照群及び MEHP 曝露群のみ) を実施した。2 倍以上の変動を示し t-test $p < 0.01$ で有意差のある遺伝子を抽出した結果、通常培養時の遺伝子発現が ES 細胞 > EpiS 細胞であるもの 1277ps、ES 細胞 <

EpiS 細胞であるもの 3728ps を得た。同様に MEHP (0.5 μM) 曝露では ES 細胞 > EpiS 細胞: 1685ps、ES 細胞 < EpiS 細胞: 2816ps、DEHP (0.2 μM) 曝露では ES 細胞 > EpiS 細胞: 1213ps、ES 細胞 < EpiS 細胞: 4374ps を得た。

DEHP 曝露実験 (流動パラフィン重層なし)

また流動パラフィン重層を行わずに体外受精培養を行った場合は DEHP が培養液中に残留するため、平成 28 年度には、流動パラフィン重層無し状態で DEHP による曝露実験 (0 μM , 0.2 μM , 2.0 μM) を実施した。その結果、DEHP は胚発生を阻害することが確認された (図 5)。

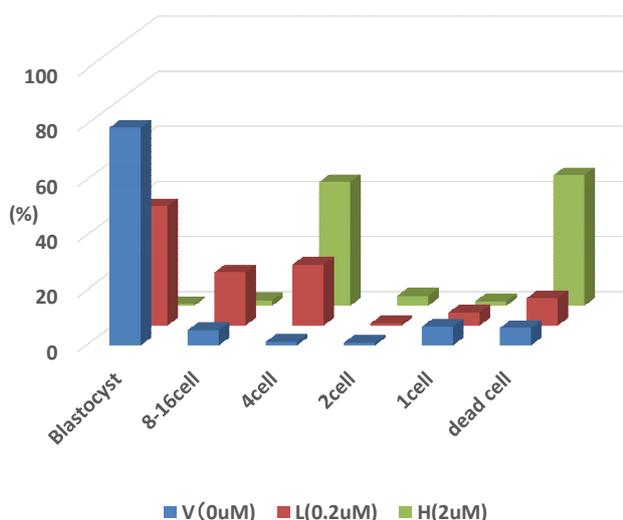


図 5 DEHP 曝露胚の発生状況
72 時間培養時。通常であれば V 群 (青) の様に胚盤胞まで発生するが、DEHP 曝露 (赤、緑) により胚発生が阻害されている。

なお、流動パラフィン重層培養での DEHP 曝露実験では、プレインキュベーション 6 時間、DEHP 2.0 μM の条件では有意な胚発生阻害は見られなかった。

一方、平成 27 年度までに実施した MEHP 曝露実験では、流動パラフィン重層の有無に関わらず、有意な胚発生阻害は見られなかった。

MEHP と同様に、DEHP についても曝露受精卵を母胎移植し仔マウスの出生を試みたが、DEHP 2.0 μM では受精卵を胚盤胞まで培養できず、DEHP 0.2 μM でも胚盤胞到達率、着床率、出生率が低く、情動認知行動解析に必要な最低限のマウス匹数を確保出来なかった。

D. 考察

ヒト体外受精で用いられる培養液中のフタル酸類 (DEHP 及び MEHP) の濃度 (*1 による。正常妊娠の妊婦の血清中平均濃度の 10 倍以上) は、従来から研究者等によって報告されている曝露実験での濃度域より 1 桁以上低い濃度であり、初期胚培養という特殊な環境における挙動は明らかになっていなかった。平成 27、28 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、セットアップ後、1 時間では初期濃度の 70% 前後の DEHP が培養液中に残留するものの、一般的にはセットアップしてから培養を開始するまで 5~12 時間ほどプレインキュベーションするため、受精卵培養開始時には培養液中 DEHP は少なくとも半減していると推測された。

これは、DEHP が流動パラフィンへ移行しているための結果と推測され、一般的な流動パラフィン重層法による不妊治療であれば、ヒト体外受精培養液に混入した濃度 (0.2 μ M、*1 の厚労科学研究にて測定) の DEHP は、24 時間プレインキュベーションする事で母体血清中濃度レベルまで低下し、この後に培養を開始すれば受精卵への影響を防ぐことが出来ると考えられる。流動パラフィンを重層しない場合、培養期間(3 日間)を通じて初期濃度の 25%以上の DEHP が培養液中に残留することを確認しており、この培養条件下では胚発生が阻害される(図 5)ことから、受精卵への影響を避けるため、DEHP の受精卵や胚への接触について十分な注意が必要と考えられる。

MEHP に関しては計画通り、受精卵への曝露実験を進めた。出生前のフタル酸類曝露が子の情動認知行動に影響を及ぼす報告(*2)があることから、MEHP 曝露受精卵を母胎に移植して生まれたマウスが 12~13 週齢に達した際の情動認知行動影響解析を実施したところ、条件付け学習記憶試験による音-連想記憶能の低下傾向が認められた。この所見は、独立に実施した 3 回の試験のうち 2 回の試験では $p<0.05$ の有意差を確認した。このことから、動物実験において体外受精時の MEHP 曝露の影響が示唆された。

未成熟卵母細胞の体外成熟培養中の MEHP 曝露による紡錘体形成不全についても、高濃度曝露(母体血清中濃度の 10~100 倍)ながら平成 26~27 年度に繰り返し確認された。この異常誘発要因

としては染色体制御因子制御異常が疑われるが、より低濃度(受精卵培養液混入濃度相当)での影響発現との関連性は低いと考えられた。

MEHP 曝露受精卵における網羅的な遺伝子発現解析を実施したところ、発現変動幅は微弱であるものの、DNA メチル化(Mll1)や、細胞分裂(Mcmbp、Csnk2a2)、形態形成(Sgpl1、Nus1、Senp2、Runx1)、精子形成(Zfp42)、神経系発達(Evl、Runx1、Nkx6-2)に関わる遺伝子の発現変動が確認され、上記の未成熟卵母細胞での曝露実験結果(細胞分裂異常)や情動認知行動解析結果(神経系発達・機能の異常)との分子機序レベルでの関連性が示唆された。

MEHP 曝露受精卵を母胎に移植して生まれたマウスの 14 週齢時の海馬における網羅的な遺伝子発現解析を実施したところ、顕著な変動を呈する遺伝子は無かったが、海馬に発現し、postsynaptic density、long-term potentiation に関与して、学習機能に影響を与える Camk2a が発現誘導される一方、内向き整流カリウムチャンネルの一種で、海馬の pyramidal 細胞層に高発現して神経細胞の情報伝達機能に必要な静止膜電位の維持に関与する Kcnj13 が発現抑制を受けるなど、上記の情動認知行動解析結果との関連性が示唆された。

MEHP 曝露受精卵、及びそれを母胎に移植して生まれたマウスの 14 週齢時の海馬における、全ゲノム網羅的 DNA メチル

化解析の結果、少なくとも 14 週まで成育したマウスの海馬には広範囲の DNA メチル化異常は残っていなかった。仮説としては、この遅発性影響を誘発する原因となる DNA 配列部位の異常なメチル化が誘発されていて、生育後の機能異常を起こしているか、或いは初期胚での DNA メチル化異常が発達過程で何らかの二次的な異常を起こして成育後の機能異常を残した可能性がある。

動物実験で観察された異常所見が、そのままの形でヒトに引き起こされると直ちに結び付けて考えるべきではないが、本研究の結果は科学的に無視できないものであり、その発現機構から、ヒトでも何らかの影響を誘発することを否定できず、従って、体外受精時のフタル酸類への曝露は、ヒトの不妊治療においても避けるべき事象であると考えられる。特に、フタル酸類の作用は、PPAR 等の核内受容体を介したシグナル伝達に起因していることが予想されることから、明らかな閾値の設定は困難であることが想定される。その為、フタル酸類の濃度を可能な限り低減することが重要であると考えられる。

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は、本研究の結果からは、培養受精卵へ何らかの影響を与えていることが示唆された。即ち、流動パラフィンの有無による胚盤胞の着床率・満期発育率の変動、流動パラフィンの有無による培養液中の DEHP の濃度の変化（吸着材として作用）である。

現状、流動パラフィンは培養試薬の 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、胚に影響を与える可能性のある試薬として、不妊治療における品質管理に、更なる注意が必要となる可能性が示唆された。

体外受精における受精卵培養が個体発生初期の外的刺激に対する高感度期間に行われることに鑑み、不妊治療において培養液に触れる培養用品（流動パラフィンを含む）については、相応の品質管理を行う事が望ましいと考えられる。

今後、DEHP, MEHP 以外の成分が問題となった場合は、本研究で確立し、有用性が明らかになった評価試験系、即ち網羅的遺伝子発現解析を中心とした複合技術が、有害性をスクリーニングするバイオアッセイ系として利用可能であろう。

マウス ES 細胞とマウス EpiS 細胞の比較解析については、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 細胞とでは、形状や増殖曲線といった細胞の一般性質はもちろん、定常状態や化学物質曝露に対する反応においても、かなりの差違があることを明らかにした。今後、これらの細胞を評価系において利用する際は、安易に同一視せず、本研究で取得したそれぞれのトランスクリプトーム情報（公開予定）を参照して実施、評価するのが適切と考えられる。

E. 結論

動物実験で観察された異常所見が、そのままの形でヒトに引き起こされると直ちに結び付けて考えるべきではないが、本研究の結果は科学的に無視できないものであり、その発現機構から、ヒトでも何らかの影響を誘発することを否定できず、従って、体外授精時のフタル酸類への曝露は、ヒトの不妊治療においても避けるべき事象と考えられる。特に、フタル酸類の作用は、PPAR 等の核内受容体を介したシグナル伝達に起因していることが予想されることから、明らかな閾値の設定は困難であることが想定される。その為、フタル酸類の濃度を可能な限り下げることが重要であると考えられる。

現実には、フタル酸類は人の生活環境中に遍在しており、完全除去は困難であるが、受精卵培養系への混入は、容器等からのフタル酸類の混入がない血清やフタル酸類を含有しない培養用品を不妊治療において用いることで、少なくとも、母体血清中濃度レベル (DEHP 0.03 μ M 以下、MEHP 0.01 μ M 以下) まで低減させることは可能であると考えられる。

なお体外受精に用いる培養液や培養用品については、海外では医療機器に分類されており、公的に規制している国・地域が多い。例えば米国では FDA 501(k) の医療機器 (クラス II, special controls) として、EU では 93/42/EEC 指令の下、CE マークの医療機器 (クラス III) に指定されている (Elpink

Chronopoulou et.al., “IVF culture media: past, present and future” Human Reproduction Update 21:39-55, 2015)。これに対して、国内では未分類のままで、国内の適用法令はなく、フタル酸類等、化学物質の混入防止策を実施する法的根拠がない状況であり、早期の規制整備とそれによる培養液、培養用品の品質管理が望ましいと考えられる。

ヒトにおいてどのような影響が現れるかを明らかにするには、種差に基づく感受性や反応の性質の差異を分子レベルで比較検討し、また不妊治療で生まれた子どもに対し適切な疫学調査を実施すること、が有効であり、今後、これらを展開する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study., The 52nd Congress of EUROTOX (第 52 回欧州毒性学会、EUROTOX2016) (2016.9.6)、Seville, Spain, poster

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(ASLATOX2015)
(2015.6.24), Jeju, Korea

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)

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

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)

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)

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi
Kitajima, Percellome Toxicogenomics,
50th Congress of the European Societies
of Toxicology (EUROTOX2014)
(2014.9.9)Edinburgh, UK, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi
Kitajima, Percellome toxicogenomics
project as the 3R-toxicology and the
foundation of in vitro and in
silico-toxicology, the 9th World Congress
on Alternatives and Animal Use in the
Life Sciences (WC9) (2014.8.27), Prague,
Czech Republic, Oral

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現
から見た毒性学—Percellome トキシコゲノ
ミクスの進捗—、第 36 回日本中毒学会総

会・学術集会(2014. 7. 25) 東京、シンポジ
ウム

北嶋 聡、種村健太郎、菅野 純、毒性の網
羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク
描出と動的バイオマーカー抽出、第 41 回日
本毒性学会学術年会(2014. 7. 2) 神戸、シン
ポジウム

種村健太郎
生殖細胞系列における微小管随伴タンパ
ク；タウの動態、第 157 回日本獣医学会学
術集会 (2014. 9.)

猪股大貢、星野由美、種村健太郎
体外成熟培養系における卵母細胞へのアセ
タミプリド(ACE)曝露影響、第 157 回日本獣
医学会学術集会 (2014. 9.)

平舘裕希、井上弘貴、小倉淳郎、種村健太
郎
マウス卵子減数分裂過程における Tau のリ
ン酸化動態、第 157 回日本獣医学会学術集
会 (2014. 9.)

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