

厚生労働科学研究費補助金

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)

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

平成 28(2016)年 3 月

目 次

・ 総括研究報告書 (別添 3)	
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	
相崎 健一 1
・ 分担研究報告書(別添 4)	
1. Percellome トキシコゲノミクス技術を用いた分子機構解析研究	
相崎 健一 35
2. 受精卵、胚、ES 細胞操作等、発生工学手法を用いた初期胚への in vitro 影響解析研究、及び ES/EpiS 比較解析研究	
安彦 行人 51
3. 吸入暴露影響の情動認知行動解析と神経科学的物証の収集	
種村 健太郎 67
・ 研究成果の刊行に関する一覧表(別添 5) 97
・ 研究成果の刊行物・別刷(別添 6) 99

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

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 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 実験環境中に存在するフタル酸類の混入排除、 個体発生能のある体外受精由来の胚の安定作出、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（Perce llome 法^{*}の改良）を基に、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、の検討を実施した。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遺伝子発現解析及び 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における情動認知行動解析を実施し、条件付け学習記憶試験による音-連想記憶能の低下が示唆された。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 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 になる^{**}ため、一般的な不妊治療において、ヒト体外受精培養液に混入した DEHP による受精卵曝露は軽微若しくは実質的に起こっていない可能性を見出した。

(*) 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

(**) 2.0 μM 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。

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、主任研究官)

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Perce llome 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 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) を用いて収量及び分解の程度を確認した。

iii) 微量サンプルへの Perce llome 法適用

Perce llome 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、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。

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

上記 i)、ii) に則り Perce llome 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 Perce llome 法に準じて絶対量を推測し、既存の Perce llome 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 社から発売された Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を導入し、比較検討を行った。

vi) マウス人工受精卵の 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 (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 μ M, 0.5 μ M, 5.0 μ 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。

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に育て、生後12-13週齢時に情動認知行動解析を実施する。具体的には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実施する。

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(100µl)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 0µM、0.05µM、0.5µM、5.0µM)の成熟培地(10µl)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をいれ、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。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-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、現在、評価指標の最適化を実施中である。

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、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℃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asket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う。

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

まず、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を実施した。

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。

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、等の可能性を考え、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。

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、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 μM 、0.5 μM 、5.0 μM) 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。

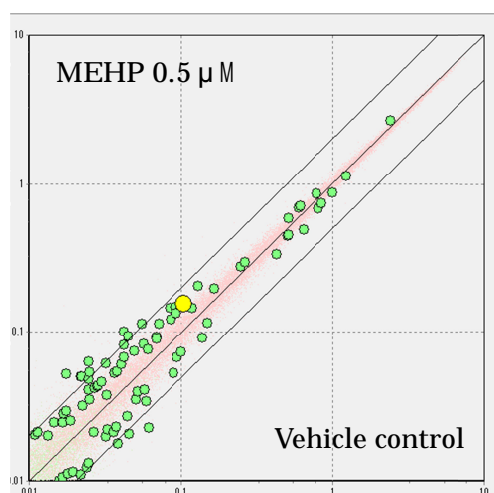


図 1 MEHP 曝露による遺伝子発現変動 (緑点、黄点は $p < 0.05$)、薄赤点は有意差のない遺伝子。黄点は一例として DNA メチル化に關与する MII1 遺伝子を示す。対角線上下の 2 倍変動線を越えるものはほとんど無かった。

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傾向のある 15 遺伝子 (Exoc6, Ptgr2, Vamp4, Ttc37, Zfp639, Slc25a19, Zfp322a, Sgpl1, Mii1, Zfp42, Vps37a, Mcmbp, Nup54, Nus1, Evl) 及び発現抑制される傾向のある 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 メチル化や、形態形成、精子形成、神経系発達に關わる遺

伝子も存在し、潜在的な標的として興味深いが、発現変動量はいずれも極僅かであった。

DNA メチル化状態の精密評価に関しては、H26 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 法を試行しており、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る (フタル酸曝露による受精卵発育不全の可能性があった) ため、より微量 DNA サンプルにも対応可能な Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift 社) についても同様の検討を行った。その結果、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。

現在、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用い、iii) と同等の MEHP 曝露サンプルについて網羅的 DNA メチル解析を実施中である。

マウス人工受精卵の MEHP 曝露による胚盤胞及びマウス個体の作出に関しては、先ず MEHP 添加培養液 (最終濃度 V 群 $0 \mu\text{M}$ 、L 群 $0.5 \mu\text{M}$ 及び H 群 $5.0 \mu\text{M}$) 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、3 回の実験いずれにおいても V、L、H 各群間に有意な差は見られなかった。

情動認知行動解析用のマウス個体は順調に育成（合計でV群38匹、L群33匹、H群31匹のマウス）し、一般行動や発育状態（体重増加等）に有意な差は見られていない。

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）を実施した結果、L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。H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た。その他のL群で変化の見られた項目はH群では変化が見られなかった。

体外成熟/受精/培養系における卵母細胞影響解析については、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、異常所見は認められなかったが、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の誘発を確認した（図2）。

マウスES細胞とEpiS細胞の比較については、引き続き培養条件の最適化と増殖曲線の確定を行った。また、H28年度に実施予定の化学物質曝露後のES細胞及びEpiS細胞の網羅的電子発現解析及びDNAメチル化解析に十分な量の凍結ストック細胞

を作製した。

併せて、網羅的遺伝子発現解析のための曝露実験を準備中である。

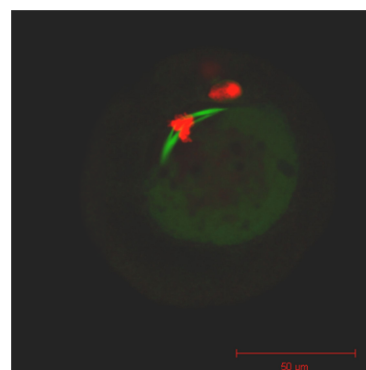


図2 未受精卵母細胞のMEHP曝露による紡錘体形成不全例

D. 考察

ヒト体外受精で用いられる培養液中に混入したフタル酸類（DEHP及びMEHP）については、正常妊娠の妊婦の血清中平均濃度の10倍以上とはいえ、本研究以前に実施されている曝露実験の濃度域より1桁以上少ない量において、初期胚培養という特殊な環境における動態は明らかになっていなかった。平成27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、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）しており、DEHPによる受精卵曝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、流動パラフィンを重層せず受精卵を培養し、不妊治療が実施されたケースも少数ながら確認されており、DEHP曝露によ

る影響評価研究は引き続き行う。また流動パラフィンを重ねて受精卵培養を行う場合であっても、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、及び、その際の僅かな曝露のみでも有害な影響がある可能性を否定しきれないため、平成 28 年度には、当初予定していた網羅的な Window 効果検索ではなく、受精初期の受精卵が DEHP に短時間曝露された場合の影響を重点的に検討することとする。

MEHP に関しては計画通り曝露実験を進めた。網羅的な遺伝子発現解析においては、発現変動は微弱であるものの、神経系発達や DNA メチル化に關与する遺伝子の発現変動があり、実施中の情動認知行動解析や DNA メチル化解析の結果を加味して総合的に評価する必要がある。

人工授精時 MEHP 曝露による産仔マウスの情動認知行動影響解析では、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あり、特に音-連想記憶異常については、低用量群及び高用量群ともに認められていることから、動物実験における人工授精時の MEHP 曝露の影響が示唆された。

未受精卵母細胞の MEHP 曝露による紡錘体形成不全については、今年度の追試においても確認された(ただし平成 26 年度と同様、受精卵培養液に混入した MEHP 濃度の 10 倍量の曝露において観察されている)。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。

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、今年度の結果から、培養受精卵へ影響を与えていることが示唆されている。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、検討が必要と考えられる。

E . 結論

平成 27 年度は、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胚培養法では、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可能性を見出した。一方、MEHP については流動パラフィンに移行することがなく、培地中の濃度が保たれることから、計画通り曝露実験を進め、胚盤胞レベルでの網羅的遺伝子発現や DNA メチル化解析から、個体レベルでの情動認知行動解析まで実施して分子機序の解析に基づく安全性評価研究を行った。平成 28 年度は引き続き解析を進め、示唆されている曝露影響の詳細確認を実施する。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

(1) 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.

(2) 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.

(3) 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.

(4) 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.

(5) 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.

(6) 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

(1) 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(ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

(2) 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)

③ 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)

(4) 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

- (5) 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 回日本毒理学学会学術集会、2015 年 6 月（金沢市）
- (6) 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）
- (7) 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）
- (8) 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）
- (9) 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）
- (10) 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）
- (11) 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 FRET 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）
- (12) 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）
- (13) 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）
- (14) 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）
- (15) 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）
- (16) 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）

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

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
Perce llome 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 実験環境中に存在するフタル酸類の混入排除、 個体発生能のある体外受精由来の胚の安定作出、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（Perce llome 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 Perce llome 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))

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 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。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傾向のある 15 遺伝子 (Exoc6, Ptgr2, Vamp4, Ttc37, Zfp639, Slc25a19, Zfp322a, Sgp11, Mll1, Zfp42, Vps37a, Mcmbp, Nup54, Nus1, Evl) 及び発現抑制される傾向のある 10 遺伝子 (Htatsf1, Retsat, Senp2, Csnk2a2, Smndc1, Gcnt2, Zfp212, Eras, Runx1, Nkx6-2) を最終的に抽出した。これらの中には、DNA メチル化や、形態形成、精子形成、神経系発達に関わる遺伝子が存在し、潜在的な標的として興味深い、発現変動量はいずれも極僅かであった。

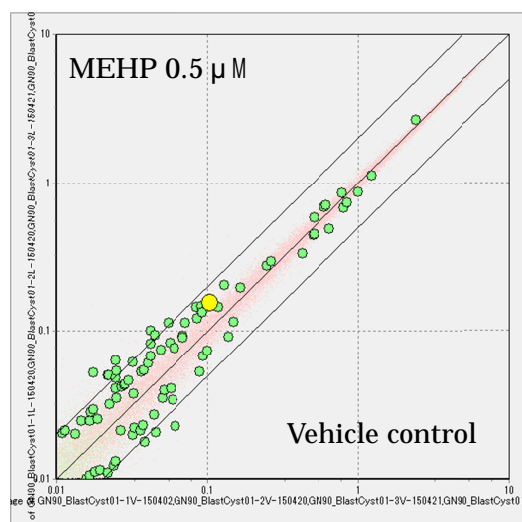


図 1 MEHP 曝露による遺伝子発現変動 (緑点、黄点は $p < 0.05$), 薄赤点は有意差のない遺伝子。黄点は一例として DNA メチル化に関与する Mll1 遺伝子を示す。対角線上下の 2 倍変動線を越えるものはほとんど無かった。

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 メチル化状態の精密評価に関しては、H26 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 法を試行しており、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る (フタル酸曝露による受精卵発育不全の可能性があった) ため、より微量 DNA サンプルにも対応可能な Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift 社) についても同様の検討を行った。その結果、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。

現在、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用い、iii) と同等の MEHP 曝露サンプルについて網羅的 DNA メチル化解析を実施中である。

D. 考察

MEHP に関しては計画通り曝露実験を進めているが、網羅的な遺伝子発現解析の結果、発現変動は極僅かであった。ただし発現変動のあった遺伝子の中には神経系発達や DNA メチル化に関与するものもあり、実施中の情動認知行動解析や DNA メチル化解析の結果を加味して総合的に評価する必要がある。

E. 結論

MEHP については平成 27 年度計画通り

曝露実験を進め、胚盤胞レベルでの網羅的遺伝子発現や DNA メチル化解析から、個体レベルでの情動認知行動解析まで実施して分子機序の解析に基づく安全性評価研究を行った。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest.* (2014);124(7):3061-74.

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR signaling is required for vertebrate axial elongation., *Development.* (2014);141(11):2260-70.

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y. (2013) Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci.* 38(4):643-54.

2 . 学会発表

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(ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

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)

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

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

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 μ M、L 群 0.5 μ M、H 群 5 μ 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 μ l に対し 5 μ 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 μ 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 μ 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

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

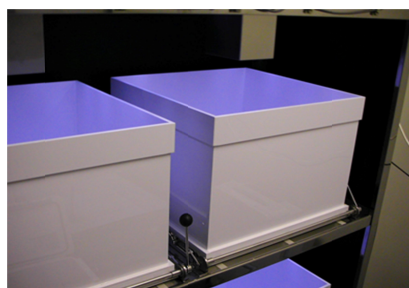
人工授精時フタル酸類曝露 (今年度は MEHP を検討) による産仔マウスの情動認知行動影響解析
C57BL/6CrSlc 雌を過排卵処理 (PMSG

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)。

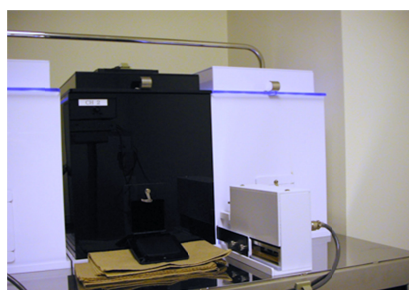
得られた産仔マウスを生後 4 週齢時に離乳し、生後 12 週齢時にオープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、条件付け学習記憶試験、プレパルス驚愕反応抑制試験からなるバッテリー式行動解析を行った。その際、自然分娩群を設定し、MEHP 非曝露群、低用量 MEHP ($0.5\mu\text{M}$) 曝露群、高用量 MEHP ($5.0\mu\text{M}$) 曝露群とともに解析を行った。

以下に各行動試験の概要と主要の評価項目を記載する。

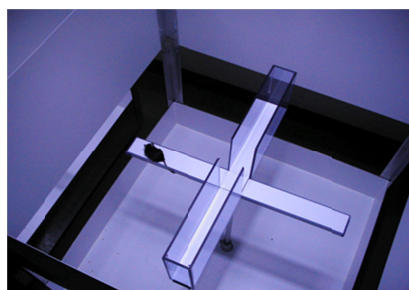
オープンフィールド試験：新規環境下におけるマウスの自発的な活動性 (探索行動性) を測定する試験。総移動量、中央部滞在時間、総移動回数を主たる評価項目とする。



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。

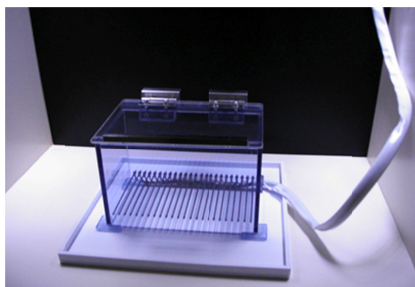


高架式十字迷路試験：マウスが壁際を好み、高所を避けるという性質を利用した不安関連行動を評価する試験。本装置における総移動量、開放アーム部滞在時間、総アーム滞在時間を主たる評価項目とする。

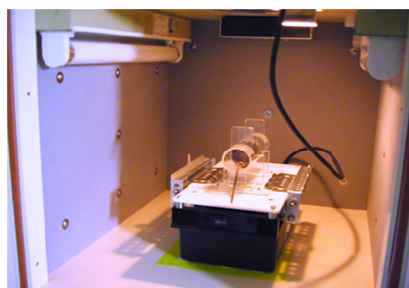


条件付け学習記憶試験：マウスに場所や音、光などの条件刺激と電気刺激などの無条件刺激を組み合わせることで条件づけした後、条件刺激を再度提示

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

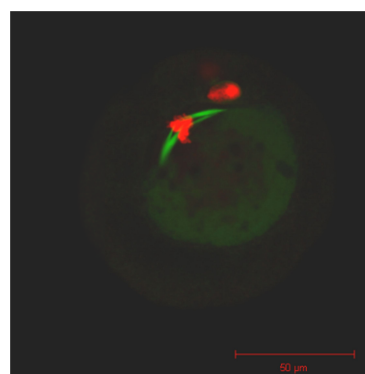
人工授精時フタル酸類曝露(今年度はMEHPを検討)による産仔マウスの情動認知行動影響解析

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 |

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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	5 (6)	996 - 1009	2015
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.	77 (11)	1479 - 1484	2015
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.	61 (5)	375 - 381	2015
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.	30	1 - 9	2015
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.	77 (6)	725 - 728	2015

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.	82 (3)	218 - 231	2015
---	--	-----------------	-----------	-----------------	------