

別添 1

厚生労働行政推進調査事業費補助金
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 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

平成 29 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	13
2. 発生工学手法を用いた初期胚への <i>in vitro</i> 影響解析研究		
安彦 行人	20
3. 情動認知行動評価技術を用いた個体における <i>in vivo</i> 影響解析研究、及び 生殖工学技術を用いた <i>in vitro</i> 影響解析研究		
種村 健太郎	26
・ 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5)	33

I . 総括研究報告書

2019/1/28 修正

6 ページ 図番号	: 図 2 → 図 1
6 ページ 本文左段 最下行	: 図 2a → 図 1a
6 ページ 本文右段 6 行目	: 図 2b → 図 1b
7 ページ 図番号	: 図 3 → 図 2
7 ページ 数値軸	: 誤記 (-5~5 であるところ、 0~10 になっていた) を修正
7 ページ 本文左段下から 3 行目	: 図 3 → 図 2
8 ページ 図番号	: 図 5 → 図 3
8 ページ 本文左段最下行	: 図 5 → 図 3
9 ページ 本文左段下から 2 行目	: 図 5 → 図 3

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 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 μ M 及びフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP) 0.5 μ M) 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 26~27 年度は(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）、(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、これらを基盤として、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

一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。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、ヒト体外受精に用いる培養液に混入した DEHP による受精卵曝露は限定的であ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、そのままの形で高頻度にヒトに引き起こされると直接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

本研究においては、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) 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。

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。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、本研究では平成 26 年度に、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し、以後利用した。

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。そこで平成 26~27 年度に Post-bisulfite adaptor-tagging (PBAT) 法と、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift 社) を比較検討し、

後者を採用した。

微量のゲノム DNA サンプルから Accel-NEG Methyl-Seq DNA Library Kit により作成したライブラリを、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) 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](https://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。

v) 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。

vi) 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 v 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。

vii) 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 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、0.05 μ M、0.5 μ M、5.0 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 をいれ、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。

viii) 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。

ix) 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。

x) 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 μ M (DEHP)、0.0072 μ M (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

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

MEHP 曝露 ($0 \mu\text{M}$, $0.5 \mu\text{M}$, $5.0 \mu\text{M}$) 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, Iah1, 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, Col8a1, Col8a2, 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

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 1a)。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 1b)。

全ゲノムを塩基単位でメチル化状況を探したところ、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なかった。

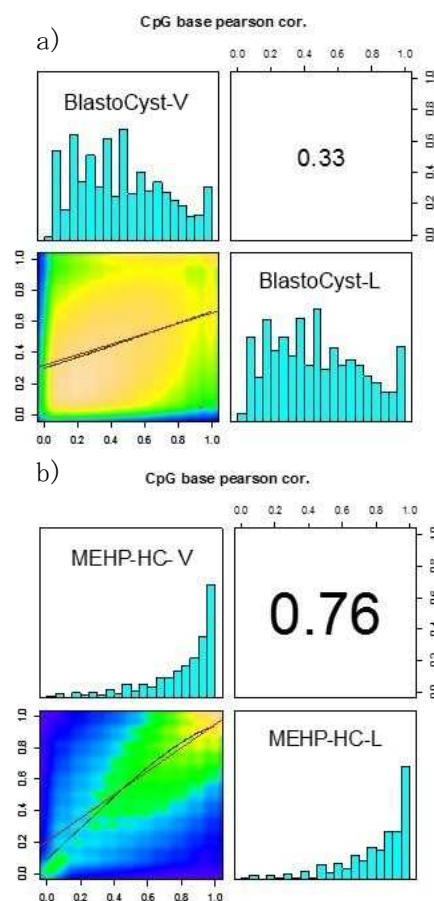


図 1 MEHP 曝露胚盤胞及び、それを母胎に移植し生まれ、成熟したマウスの海馬 (14 週齢時) における CpG サイトのメチル化状況。

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、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 27 年度に 1 回実施）。

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 2 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）。

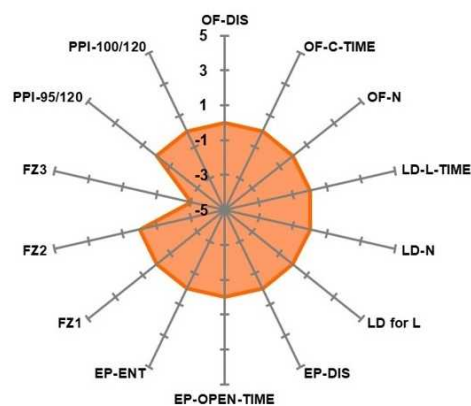


図 2 体外受精時 MEHP 曝露 ($0.5 \mu\text{M}$) による産仔マウスの成熟期情動認知行動解析（第 1～3 回の集計）

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: $p > 0.1$

マウス ES 細胞と EpiS 細胞の比較

実験に用いる細胞状態の差異を最小限にするために平成 27 年度に一括作成した凍結ストックした細胞を用い、ES 細胞及び EpiS 細胞を MEHP (0.5 μ M) 及び DEHP (0.2 μ M) 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ー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。網羅的遺伝子発現解析 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 μ M) 曝露では ES 細胞 > EpiS 細胞 : 1685ps、ES 細胞 < EpiS 細胞 : 2816ps、DEHP (0.2 μ M) 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)

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ことが推測されたため、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 μ M, 0.2 μ M, 2.0 μ M) を実施した。その結果、DEHP は培養期間を通じて初期濃度の 25%以上が残留し、胚発生を阻害することが確認された (図 3)。

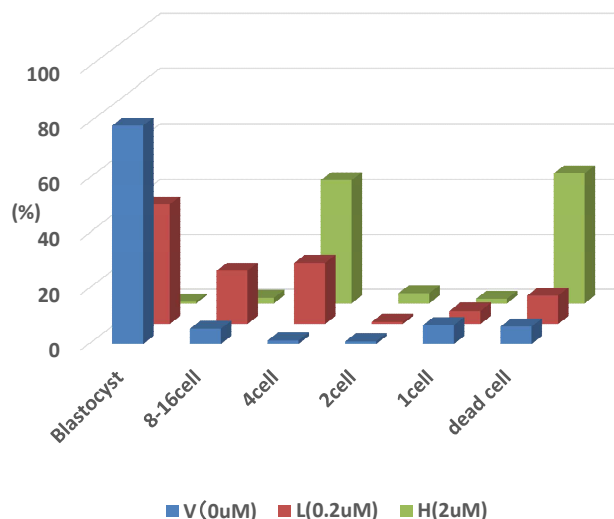


図 3 DEHP 曝露胚の発生状況
72 時間培養時。通常であれば V 群 (青) の様に胚盤胞 (Blastocyst) まで発生するが、DEHP 曝露 (赤、緑) により胚発生が阻害されている。

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 μ M 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 μ M では受精卵を胚盤胞まで培養できず、DEHP 0.2 μ M 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 3) 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。

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、流動パラフィンには培養試薬の 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 (Elpinki 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、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. 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(ASIATOX2015) (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抽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.)

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

別添 4

. 分担研究報告書

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
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

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）において^{*1}、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うに際し、その分担研究として受精卵及び受精卵を母胎に移植して生まれたマウスの海馬における網羅的遺伝子発現解析や DNA メチル化解析を実施した。なお海馬の解析については別途行われた MEHP 曝露胚盤胞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に対応するものである。

安定した微量曝露が可能であった MEHP については計画通り曝露胚盤胞及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 メチル化解析を行うこととした。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に依らず培養終了時(3 日後)には培養液中 DEHP 濃度が著減する^{*3}ことが判明したため、流動パラフィンを重層せずに受精卵の DEHP 曝露実験を行うこととした。

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の海馬におけるマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析及び次世代シーケンサーを用いた全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析、及び ES 細胞、EpiS 細胞におけるマイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した。海馬の遺伝子発現解析では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、別途観察された行動異常(音-連想記憶能の低下)との関連性が示唆される結果を得た。一方、DEHP は胚発生を阻害するためサンプリングした細胞の状態が悪いことから^{*4}、DEHP 0, 0.2, 2.0 μM の各サンプルでマイクロアレイによる

遺伝子発現の解析を実施したものの、細胞増殖、細胞死関連のシグナルが強く誘導され、その原因となる初期シグナルの検出が困難であった。

-
- (*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) 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
 - (*3) 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。
 - (*4) 死細胞が多く、またほとんどが胚盤胞に到達していなかった。

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、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) 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。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、本研究では平成 26 年度に、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し、以後利用した。

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

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。そこで平成 26~27 年度の評価結果より 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、BMAP ソフトウェア ([code/google.com/archive/p/bimap](https://code.google.com/archive/p/bimap/)) 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 methratio.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。

v) マウス海馬からの DNA, RNA 採取

RNA についてはマウス海馬組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に浸し、そのまま 4℃ で一晩浸漬した RNase を不活化する。その後、RNA 抽出操作までは -80℃ にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RN easy キット (キアゲ

ン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RN easy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

DNA については、同マウス海馬組織を採取後、Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。

vi) GeneChip による網羅的遺伝子発現解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃ にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。得られたデータについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対化手法) を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。

vii) 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うえで、i, ii に準じて RNA を抽出し、GeneChip により網羅的遺伝子発現解析を実施した。

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

マイクロアレイによる遺伝子発現解析

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 μ M 曝露群及び 5.0 μ M 曝露群で共通して有

意に発現量が増加していた 24 遺伝子、及び発現量が低下していた 7 遺伝子を抽出した。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、別途観察された行動異常(音-連想記憶能の低下)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

Accel-NGS Methyl -Seq DNA Library Kit を採用し、MEHP 曝露(V 群 0 μ M、L 群 0.5 μ M 及び H 群 5.0 μ 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)、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)。

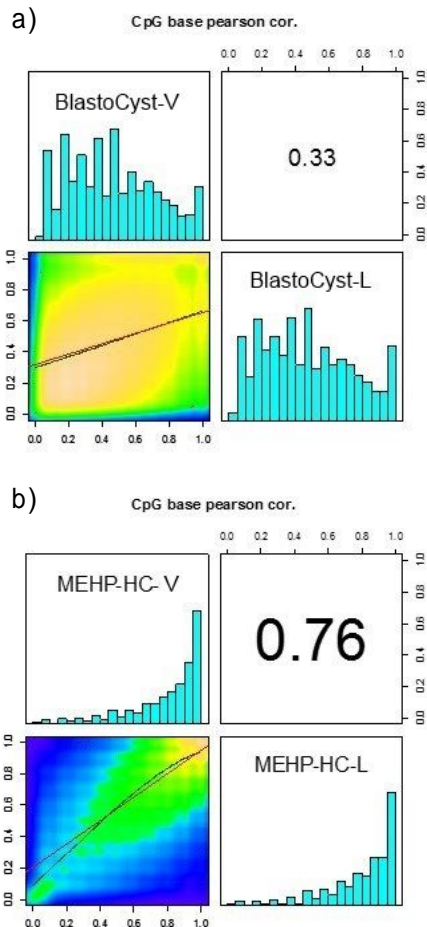


図 2 MEHP 曝露胚盤胞及び、それを母胎に移植し生まれ、成熟したマウスの海馬（14 週齢時）における CpG サイトのメチル化状況。

MEHP 曝露は左上横軸及び左下縦軸が V 群 0 μM、右下横軸及び左下横軸が L 群 0.5 μM（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。

さらに全ゲノムを塩基単位でメチル化状況を探したが、広範囲に及ぶメチル化状況異常は観察されなかった。

DEHP 曝露実験（流動パラフィン重層なし）

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。DEHP が胚発生を阻害するため細胞状態が悪く、多くは死細胞でほとんど胚盤胞に到達していなかった。DEHP 0, 0.2, 2.0 μM の各サンプルでマイクロアレイによる遺伝子発現の解析を実施したものの、細胞増殖、細胞死関連のシグナルが強く誘導され、その原因となる初期シグナルの検出は困難な状態であった。

マウス ES 細胞と EpiS 細胞の比較

ES 細胞、EpiS 細胞の比較では、溶媒群、DEHP 曝露（0.2 μM）、MEHP 曝露（0.5 μM）群のそれぞれで、誘導・抑制された遺伝子が 4000～5000ps となり、元となった受精卵の分化段階の差異により、ES 細胞と EpiS 細胞とはトランスクリプトームレベルで比較的大きな差異があることが示された。

D. 考察

MEHP に関しては計画通り、受精卵への曝露実験を進め、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 メチル化解析を実施した。ま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（Stephanie M.E. *et. al.* "Prenatal Phthalate Exposure Is Associated with Childhood Behavior and Executive Functioning" *Environ Health Perspect* 118:565-571 (2010)）があることから実施した MEHP 曝露受精卵を母胎に移植して生まれたマウス（14 週齢）におけるマ

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 メチル化解析を実施した。

網羅的な遺伝子発現解析においては、発現変動幅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確認された。また全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析の結果、14 週時のマウスの海馬には広範囲の DNA メチル化異常は残っており、仮説としては、小規模だが遅発性の発達異常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。これを明らかにするためには塩基単位の詳細なメチル化解析に加え、発生、発達の各段階での網羅的遺伝子発現解析及び DNA メチル化解析が必要と考える。

E . 結論

MEHP については研究計画通り曝露実験を進め、胚盤胞レベル及び生体マウスの海馬組織での網羅的遺伝子発現や全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を実施し、いくつかの候補遺伝子を抽出した。これらはフタル酸類による受精卵曝露の毒性分子機序に関わると考えられる。

F . 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(ASIATOX2015) (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

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

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

分担研究：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 μ M 及びフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP) 0.5 μ M）が検出^{*1}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。本年度までに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実験を 3 回実施し、いずれにおいても情動認知行動解析に十分な匹数のマウス個体を確保した。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・マウス個体作出を試みたところ、培養液中の DEHP が胚発生を強く阻害することを示す結果を得た。またマウス ES 細胞とマウス EpiS 細胞^{*2}の比較解析を実施した。

（*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）ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞と性質が近いと考えられている。

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（*1）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) マウス体外受精卵の 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、MEHP の培養液中濃度は安定であるが、DEHP は培養液中に保持されないことから、流動パラフィン重ね培養系に於いては、MEHP 曝露を実施した。C57BL/6CrSlc 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、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. 022417) 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 (L 群 50 μ M、H 群 500 μ M) 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 35mm プラスチックシャーレ (住友ベークライト株式会社、MS-11350) 上に 100 μ l 培養液滴を各 4 個作製し、液滴あたり胚数 20 個で実施した。培養液滴には流動パラフィン (ナカライテスク、Lot No. M4P3642) をシャーレあたり 4ml 重ねた。培養前および培養後の培養液サンプルを回収保存し、GC/MS/MS により MEHP 濃度を検出下限 0.0072 μ M にて測定した (国

立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部・河上強志博士の協力)。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、17 日後に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 4-5 匹、里親自身の子 5-6 匹の計 10 匹に数を統一) して哺育させた。出生 14 日目に里親マウスを処分して離乳させ、1 ケージあたり 4 匹にて情動認知行動解析実施 (12 週齢) まで飼育した。飼育中、少なくとも 2 週に 1 回の割合で全マウス個体の体重測定を実施した。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 (3 日) 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) 流動パラフィン非重ね培養系による DEHP 曝露下マウス胚培養・個体作製

前年度までの研究により、培養液滴に重ねる流動パラフィンが DEHP を強く吸着することが疑われたため、流動パラフィンを重ねない培養条件での DEHP 曝露下マウス胚培養を試みた。35mm プラスチックシャーレ (住友ベークライト株式会社、MS-11350) に KSOMaa 培地 2ml を加えてマウス胚を培

養した。操作時間を極小化し、流動パラフィン相が存在しないことによる温度・pH など培養液パラメーターの変動を最小限とするため、培養中の未受精卵・死亡胚の選別・除去は実施しなかった。DEHP(東京化成工業、Lot No. JH45M-DF) 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 0.2 μ M、H 群 2 μ M とした。DEHP エタノール溶液(L 群 2mM、H 群 20mM) 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. 022417) 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 (L 群 20 μ M、H 群 200 μ M) 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 DEHP 添加培養液を調製した。培養前および培養後の培養液サンプルを回収保存し、GC/MS/MS により DEHP 濃度を検出下限 0.0095 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)。培養中 DEHP 濃度の経時変化を観察するため、シャーレへの注入後 1 時間、24 時間、72 時間目に培養液を回収する実験も実施し、DEHP 濃度測定を行った。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、17 日後に帝王切開を行い着床率・満期発育率を評価した。

iii) 同一系統マウス由来 ES 細胞・EpiS 細胞のフタル酸曝露実験

ヒト ES 細胞、iPS 細胞と性質が近いと考えられるマウス細胞である EpiS 細胞と、より胎児に近いと考えられるマウス ES 細胞との間で、DEHP や MEHP に対する差

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を実施した。東京大学医科学研究所、正木英樹博士より提供を受けた BDF1 系統マウス由来 ES 細胞・EpiS 細胞を、それぞれの指摘培養液にてフタル酸存在下・非存在下で培養し、核酸回収のため細胞を凍結保存した。培養には 25cm² 培養ボトル (Corning、430168) 各 3 本を使用し、ボトルあたり 0.2 x 10⁶ 個 (ES 細胞) または 0.25 x 10⁶ 個 (EpiS 細胞) を播種し、培養開始後 24、48、72、84 時間目に培養液を除去した上で、新しいフタル酸添加済み培養液 (ボトルあたり 5ml) を添加して培養し、96 時間培養後に細胞を回収した。

C. 研究結果

i) マウス体外受精卵の 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、胚盤胞移植により個体作出を独立して 3 回行った結果、2 細胞期到達率・胚盤胞到達率・着床率・移植胚数に対する出生率、出生個体の体重増加率、途中死亡率に V、L、H 各群間で顕著な差は見られなかった。3 回の実験で V 群 30-42 匹、L 群 25-35 匹、H 群 31-49 匹の マウスが得られ、情動認知行動解析のための必要数 (各群 8 匹) を満たすことができた。1 回目の実験においては、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 子マウスの作出も行ったが、この対照群の体重増加率と比べても MEHP 曝露群との間に顕

著な差は見られなかった。

ii) 流動パラフィン非重層培養系による DEHP 曝露下マウス胚培養・個体作製

胚培養液に添加した DEHP は、流動パラフィンを重層する通常の胚培養条件下では速やかに培養液中から失われる（流動パラフィンへ移行するものと考えられる）のに対し、流動パラフィン非重層では培養開始後 72 時間においても初期添加量の 25% 程度の濃度を維持していた。流動パラフィン非重層でのマウス体外受精胚培養を実施したところ、DEHP 添加群において多くの胚が 4 細胞期で発生を停止し死亡することが観察された。培養胚に占める発生停止・死亡胚の割合は DEHP 濃度依存的に増加した。胚盤胞まで発生した DEHP 曝露胚（L 群のみ）を偽妊娠 マウスに移植し、産子を得ることを試みたが、着床率および出生率は対照群の 1/3 程度と大きく低下し、情動認知行動解析の必要数を満たす産子数は得られなかった。出生児の体重増加率に、対照群との顕著な差は見られなかった。

流動パラフィン非重層下、MEHP 添加培養液で体外受精胚を培養したところ、胚発生の停止・死亡は見られず、発生率は対照群と同等であった。DEHP 曝露の影響を「1 細胞期から 2 細胞期まで」および「2 細胞期から胚盤胞期」で比較したところ、前者では発生停止・死亡は見られなかったが、後者の群では発生停止と死亡が確認された。

iii) 同一系統マウス由来 ES 細胞・EpiS 細胞のフタル酸曝露実験

前年度に作製したストック細胞を用い、増加曲線をもとに開始細胞数をボトルあたり 0.2×10^6 個（ES 細胞）、 0.25×10^6 個（EpiS 細胞）と決定してフタル酸曝露実験を実施した。実験群は Vehicle（アルブミンのみ）、DEHP(0.2 μ M)、MEHP(0.5 μ M)、DEHP(0.2 μ M)+MEHP(0.5 μ M)とし、対照群との細胞増加率比較および細胞回収を行った。ES 細胞、EpiS 細胞とも、フタル酸添加群の細胞増加率（最終細胞数）に、対照群との顕著な差は確認されなかった。

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ことから、本研究でも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。

本年度までの実験で、体外受精から胚盤胞期まで培養した胚を母胎に移植し、マウス個体を作成する過程において、受精率・胚盤胞期までの発生率・着床および出生率・出生児の体重増加率・途中死亡率については、MEHP 曝露の有無および用量間に顕著な差は見られなかった。

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に加え、MEHP 曝露胚盤胞サンプルを用いて遺伝子発現変動、DNA メチル化の変動解析を行い、安全性評価法開発のためのデータ収集を進めた。

DEHP について、流動パラフィン非重層での曝露実験を実施したところ、DEHP が濃度依存的に胚発生を阻害し、4 細胞期での発生停止・死亡をもたらすことが明らかとなった。稀に発生停止せず胚盤胞まで発生した胚においても、着床率・出生率は大きく低下していた。2 細胞期以後の DEHP 曝露では発生停止率に対照群との差がないことから、DEHP に高感受性であるのは第一卵割までの時期であると考えられた。流動パラフィン重層下では培養液中 DEHP 濃度は急速に低下することから、プレインキュベーション時間を十分に取れば培養開始時には培養液中の DEHP 濃度は低下し、胚発生への影響は抑制されると考えられた。

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、同一系統マウス由来であっても形状や増殖曲線といった細胞の一般性質において、かなりの差異があることを明らかにした。DEHP や MEHP を添加した群の細胞増加率（最終細胞数）に、対照群との顕著な差は確認されなかったが、他の分担研究（相崎担当）で

実施した網羅的遺伝子発現解析では、大きな差異が確認されている。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

MEHP については、MEHP 曝露受精卵を母胎に移植してマウスを作出する過程において、受精率・胚盤胞期までの発生率・着床および出生率・出生児の体重増加率・途中死亡率については、MEHP 曝露の有無および用量間に顕著な差は見られなかった。DEHP については、流動パラフィン非重層下での曝露実験により、マウス胚発生が強く阻害されることを確認したが、他方、不妊治療に於いて一般的に採用されている流動パラフィン重層培養を行えば DEHP の培養液中濃度は急速に低下することを明らかにした。従って、十分なプレインキュベーション時間を取れば培養開始時における DEHP 濃度は下がり、DEHP による胚発生への影響は抑制されると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

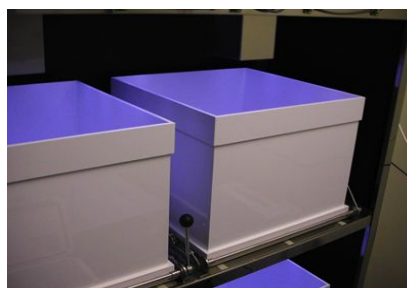
MEHP 曝露受精卵を母胎に移植して生まれたマウスにおける情動認知行動解析
C57BL/6CrSlc 雌を過排卵処理（PMSG 5units/匹 腹腔内投与、48 時間後に hCG

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 μ M,0.5 μ M,5.0 μ 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 μ M,0.5 μ M,5.0 μ 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。

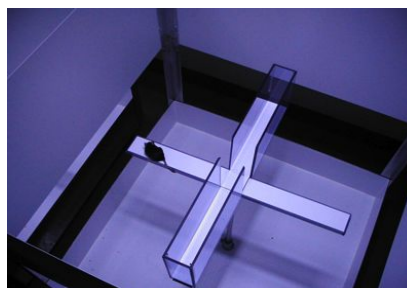
オープンフィールド試験:新規環境下におけるマウスの自発的な活動性(探索行動性)を測定する試験。総移動量、中央部滞在時間、総移動回数を主たる評価項目とする。



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。

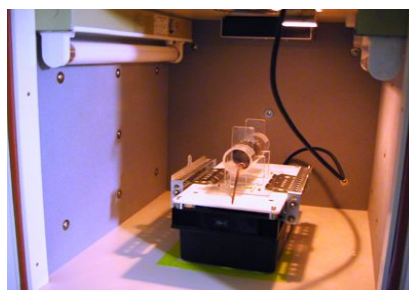


条件付け学習記憶試験:マウスに場所や音、光などの条件刺激と電気刺激などの無条件刺激を組み合わせることで条件づけした後、条件刺激を再度提示

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 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、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 μ 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 μ 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 μ M) 投与群および MEHP 高用量 (5.0 μ 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 μ 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 μ 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 μ M) 投与群および MEHP 高用量 (5.0 μ 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 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。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と疑われることに変わりなく、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

齊藤洋克、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 齊藤洋克 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 |

・研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年