

体外受精による出生児の健康及びフタル酸類の受精卵 及び出生児に対する影響に関する文献調査

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 室長
相崎 健一

1. 目的

本調査は、平成 26～28 年度に厚生労働行政推進調査事業費「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」（以下、DEHP 班と記載する）の結果、マウスにおける動物実験でフタル酸モノ-2-エチルヘキシル (MEHP) による生体影響、すなわち情動認知行動異常を検出したことを受けて実施するものである。当該結果に関連する文献、特に体外受精に関連する学術論文を調査し、臨床報告やフタル酸による生体影響の分子機序に関する情報を取りまとめて当該結果に関する問題点の現状を整理し、ヒトへの影響の有無や重症度の推測、体外受精の安全確保に向けた今後の取組に関する意見集約に供することを目的とする。特に MEHP によるマウスの情動認知行動異常がヒトにおいてどのような意味があるのかを本調査で得られた文献やこれまでの情報を基に科学的に考察するものである。

2. 調査方法

基本的に英語もしくは日本語にて記述され、全てもしくは一部が公開されている文献情報、特に上記の厚生労働行政推進調査事業（平成 26～28 年度）の事前準備として文献調査を実施した平成 26 年度(2014 年)より後に発表された学術論文を主な対象として、体外受精による出生児の健康への影響、及びフタル酸類の受精卵及び出生児に対する影響に関する情報を得るために、米国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の PubMed、及び OMIM データベースを用いて、公開文献の検索を実行した。得られた文献リストから、タイトル、要旨、インデックスを基に関連性を有すると考えられる文献を選別し、全文を収集して、情報を精査・集約した。

具体的には、フタル酸類、特にフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)とフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)の曝露影響に関する文献の抽出は、クエリー『("phthalic acid"[All Fields] OR "phthalate"[All Fields] OR "phthalates"[All

Fields]) OR ("diethylhexyl phthalate"[MeSH Terms] OR "di-(2-ethylhexyl)phthalate"[All Fields] OR "dehp"[All Fields]) OR ("mono-(2-ethylhexyl)phthalate"[All Fields] OR "mehp"[All Fields]) AND ("exposure"[All Fields] OR "toxicity"[All Fields])』を用い、4,489 件の粗抽出集合 A を定義した。このうち 2014 年 1 月 1 日以降に発表された文献は 1,642 件で、これらを優先的に評価した。ヒトの曝露指標については粗抽出集合 A とクエリー『"concentration"[All Fields]』の積集合 788 件より、5 件(#28, #43, #48, #74, #94)を参照した。フタル酸類曝露による IVF 成績への影響については粗抽出集合 A とクエリー『"outcome"[All Fields]』との積集合 107 件より、8 件(#9, #17, #18, #24, #26, #61, #75, #95, #96)を参照した。DNA メチル化やインプリンティング異常については粗抽出集合 A とクエリー『("dna methylation"[MeSH Terms] OR "genomic imprinting"[MeSH Terms])』との積集合 42 件より、具体的な記載があった 7 件(#10, #47, #54, #65, #80, #91, #100)を参照した。出生時の異常（記憶・学習異常を含む）については、粗抽出集合 A とクエリー『("behavior"[All Fields] OR "memory"[All Fields] OR "hippocampus"[All Fields] OR "ADHD"[All Fields])』との積集合件より、具体的な記載があった 7 件(#19, #32, #56, #57, #64, #85, #87)を抽出し、全文を取り寄せて内容を精査した。

生殖補助医療（ART）や体外受精（IVF）に関する文献の抽出は、クエリー『"artificial reproductive technology"[All Fields] OR "artificial reproductive technologies"[All Fields] OR "assisted reproductive technology"[All Fields] OR "assisted reproductive technologies"[All Fields] OR "artificial reproduction technology"[All Fields] OR "artificial reproduction technologies"[All Fields] OR "assisted reproduction technology"[All Fields] OR "assisted reproduction technologies"[All Fields] OR "artificial reproductive technique"[All Fields] OR "assisted reproductive technique"[All Fields] OR "artificial reproduction technique"[All Fields] OR "assisted reproduction technique"[All Fields] OR "in vitro fertilization"[All Fields] OR "in vitro fertilisation"[All Fields] OR ART[Title/Abstract] OR IVF[Title/Abstract]』を用いて 113,538 件の粗抽出集合 B を定義した。このうち 2014 年 1 月 1 日以降に発表された文献は 39,859 件で、これらを優先的に評価した。ART・IVF の治療成績について言及する論文は粗抽出集合 B とクエリー『"outcome"[All Fields]』と積集合 18949 件（特に 2014 年 1 月 1

日以降に発表された 5,714 件を中心とした) より、治療による影響や成功率の影響要因について記載があった 4 件 (#2, #37, #84, #98) を参考にした。フタル酸類曝露とは関係なく、ART・IVF による DNA メチル化異常の誘発については、粗抽出集合 B とクエリー『("dna methylation"[MeSH Terms] OR "genomic imprinting"[MeSH Terms)]』との積集合 456 件より、分子機序や異常発生率について言及していた 18 件 (#8, #12, #14, #25, #30, #34, #41, #49, #50, #53, #55, #63, #67, #71, #72, #74, #84, #93) を抽出した。フタル酸類曝露とは関係なく、ART・IVF による行動・記憶・学習といった中枢神経機能の異常誘発については、粗抽出集合 B とクエリー『("behavior"[All Fields] OR "memory"[All Fields] OR "hippocampus"[All Fields] OR "ADHD"[All Fields])]』との積集合 4,943 件より、症状や発生率を記載していた 9 件 (#5, #23, #27, #36, #42, #52, #68, #69, #90) を抽出した。ただし一般的に「学習」を示すキーワード"learning"については、近年 machine learning や deep learning のように AI に関わる論文でよく使用されているため、除外した。

DEHP 班で、MEHP 曝露による有害反応の分子機序に関わる主要な遺伝子候補として抽出された Camk2a, Kcnj13(Kir7.1), Igf2, Bmp6, Runx, Mll1(Kmt2)のヒト相同遺伝子情報は、OMIM データベースにおいて遺伝子名をキーワードとして検索し、関連論文情報(#3, #7, #11, #29, #35, #39, #44, #51, #55, #59, #62, #81, #101, #102)を抽出した。

3. 結果

3-1) 動物実験における胎生期若しくは周産期のフタル酸曝露による仔マウスへの影響

DEHP 班の実験結果の科学的な妥当性を検討すべく、DEHP 班と同様にヒト体外受精 (IVF) と同等の受精卵培養系で、培養液にフタル酸類を添加して実施した曝露実験を検索したところ、2 件の研究報告があった。1 つは DEHP 班実施以前の 2012 年にマウス精子及び卵子を対象とした体外培養系で、DEHP の曝露実験を行った論文 (#33: Huang XF et al., 2012) で、曝露濃度が $1 \mu\text{g/mL}$ ($2.6 \mu\text{M}$) と比較的高濃度 (受精卵培養液中の DEHP 濃度 ($0.2 \mu\text{M}$) の 13 倍) である。体外培養中の DEHP 曝露により胚発生が阻害され、遺伝子変異の発生率が上昇するなど、DEHP 曝露が胚

に有害性を示すことを報告した。

もう1つはウシ卵子の体外培養中の MEHP 曝露に関する論文 (#38: Kalo D, Roth Z. 2017) で、ヒト受精卵培養液中の MEHP 濃度 ($0.5 \mu\text{M}$) と同等の低濃度曝露実験 ($0.02 \sim 1.0 \mu\text{M}$) を実施しており、MEHP 曝露によりいくつかの遺伝子 (CYC1, ATP5B, SOX2, DNMT3b) の発現低下を示して、培養液中の混入物に対する一層の注意を促した。

胎生期若しくは周産期にフタル酸類を経口曝露し、出生仔の成長後に情動認知行動解析を行った動物実験としては、ラットにおいて妊娠 2 日から 21 日の間、母体へ 1.25mg/kg/day の DEHP を経口投与し、生まれたマウスが 21 月齢のときの行動解析で認知能力の低下を報告した論文 (#83: Sun W et al. 2014) 及び、マウスにおいて妊娠 7 日から離乳 (出産後 21 日) まで、母体へ 10, 50, 200 mg/kg/day の DEHP を経口投与し、仔マウスが 6 及び 12 週齢の時点で行動解析を実施し、不安行動やうつ様の行動を呈することを示した論文 (#97: Xu X et al. 2015) があった。

情動認知行動に関連性が高い海馬について、周産期や幼若期の動物個体へのフタル酸類の曝露が海馬の組織構造や神経機能へ影響を及ぼしたという論文は多数ある (#31: Holahan MR, #77: Smith CA. 2015) が、受精卵へのフタル酸類曝露による海馬への影響に関する研究はなかった。

3-2) マウス受精卵曝露による中枢神経系機能異常が遅発性に起こる分子機序

受精卵から胚盤胞の期間、即ち個体発生の最初期における曝露が成長後、遅発性影響を及ぼす分子機序としては、現在の科学知見からエピジェネティック修飾が関与する可能性が最も高い (#92: Webb WM et al. 2017)。フタル酸類曝露による DNA メチル化変動の同定を目的とした動物実験としては、交尾後 0.5 日から 18.5 日までの妊娠マウスに、DEHP を $40 \mu\text{g/kg BW/day}$ 経口投与し、胚若しくは出生仔からゲノム DNA を採取してインプリンティング遺伝子 *Igf2r*, *Peg3*, *H19* についてバイサルファイト PCR が行われ、これら遺伝子の DNA メチル化率の低下がみられることが報告されている (#54: Li L et al. 2014)。この論文は、DNA のメチル化状態が大きく変動する事が知られている個体発生初期にある個体に対し、フタル酸類の曝露がその DNA メチル化プロセスに影響を与えることを示唆している。

3-3) 候補遺伝子の機能のヒト-マウス間比較

マウスを用いた動物実験の結果をヒトに外挿するに当たっては、分子機序に基づいて検討することが重要である。DEHP 班で実施したマウスの MEHP 曝露実験において海馬で発現変動した遺伝子群に、中枢神経系機能、特に海馬において記憶機能に係わる複数の遺伝子が含まれていた(Camk2a, Kcnj13(別名 Kir7.1), Igf2, Bmp6, Runx, Mll1(別名 Kmt2)など)。これらの遺伝子は、ヒトにそのオルソログ遺伝子(共通祖先を持つ異種間の相同遺伝子)が存在しており、ヒトとマウスで同様の機能を担っている可能性が高いことが諸研究から示唆されている(#3: Alberini CM et al., 2012; #7: Cammarota M et al., 1998; #11: Chen DY et al., 2011; #29: Hinds HL et al., 1998; #35: Inoue K et al., 2008; #39: Kerimoglu C et al., 2017; #44: Küry S et al., 2017; #51: Lee Y et al., 2015; #55: Li T et al., 2005; #59: Logan TT et al., 2015; #62: McCloskey C et al., 2014; #81: Sun L et al., 2014; #101: Zhang Z et al., 2006; #102: Zhong J et al., 2006)。

3-4) ヒトにおけるフタル酸類の曝露

一般的な環境で生活しているヒトにおける生活環境中フタル酸類の曝露量についての調査研究は、ほとんどの論文で無侵襲若しくは低侵襲で調査が可能な、尿中のフタル酸類の濃度を指標とする手法が取られていた(#9: Chen CC et al., 2017; #17: Dodge LE et al., 2015; #18: Du YY et al., 2016; #26: Hauser R et al., 2016; #61: Machtinger R et al., 2018; #87: Téllez-Rojo MM et al., 2013; #95: Wu H et al., 2017; #96: Wu H et al., 2017)。溶質(ここではフタル酸類)の尿中濃度は尿の濃縮率により大きく影響を受けるため、各論文ではクレアチニン等の尿中濃度を基準に正規化しており、尿量による誤差は軽微と考えられる。

3-4-1) ヒトの尿中フタル酸類濃度と体外受精(IVF)の成績について

米国における136件のIVF施術例(#61: Machtinger R et al., 2018)と同256件のIVF施術例(#26: Hauser R et al., 2016)を対象とした疫学調査から、妊婦の尿中フタル酸類の濃度が高いほど、IVFにおける卵子の成熟度や品質、さらには受精率といったIVF成績全般に悪影響が及ぶことが報告されている。一方で、中国における112名の妊婦を対象とした疫学調査では、IVF成績と相関が見られなかったとする報告もある(#18: Du YY et al., 2016)。

また、父親の尿中フタル酸類の濃度が高い場合、精子の品質が低下し、IVF成

績が影響を受けるとの報告もあった (#95: Wu H, Ashcraft L et al., 2017; #96: Wu H, Estill MS et al., 2017)。

3-4-2) ヒトの尿中フタル酸類濃度と DNA メチル化影響について

妊婦の尿中フタル酸類の濃度と、臍帯血から採取した胎児ゲノム DNA のメチル化状態を調べ、個体発生に重要な遺伝子の DNA メチル化状態の変化を確認した論文が多数抽出された(#10: Chen CH et al., 2018 ; #65: Montrose L et al., 2018; #80: Solomon O et al., 2017; #47: LaRocca J et al., 2014)。これらの論文から、ヒトにおいて、フタル酸類の胎生期曝露によってゲノム DNA のメチル化状態に変化が起こっているものと推定された。

3-4-3) ヒトの尿中フタル酸類濃度と出生児の行動異常について

1998～2002 年に米国で行われた調査では、295 組の母子を対象とし、妊娠 25～40 週の母体の尿中でフタル酸類の濃度を計測し、出生した子について生後 5 日に運動機能等を調べた。その結果、男女でその内容が異なるものの、母体の尿中フタル酸濃度と子の運動能力などの指標との間に有意な相関が捉えられた (#19: Engel SM et al., 2009)。

1997～2003 年にメキシコで行われた調査では、135 組の母子を対象とし、妊娠 7～9 ヶ月に母体の尿中フタル酸類の濃度を計測して、子については生後 24, 30, 36 ヶ月に神経系発達や行動について試験した。その結果、男女混合ではフタル酸類の母体尿中濃度との間に有意な相関関係はなかったが、女兒においては精神発達指標と DEHP とその代謝物の母体尿中濃度との間に相関関係が、男児においては精神運動発達指標と低分子フタル酸類の母体尿中濃度との相関関係が見られた (#87: Téllez-Rojo MM et al., 2013)。

2000～2009 年に台湾で行われた調査では、122 組の母子を対象とし、妊娠 7～9 ヶ月に母体の尿中フタル酸類の濃度を計測して、子については 8 歳児の段階で行動解析を行った。その結果、MEHP 等、DEHP 代謝産物の母体尿中濃度と、子の外因化問題行動（攻撃的、他動、注意散漫など）の発現率とが正の相関を示すことが判明した (#57: Lien YJ., 2015)。

1999～2006 年に米国で行われた調査では、2000～2003 年に生まれた男児 74 名、女兒 71 名の 3 歳前後での遊戯行動とフタル酸類の母体尿中濃度の関係を調べて

いる。その結果、ジブチルフタル酸 (DBP) や DEHP の代謝産物の母体尿中濃度が高かった場合、男児の遊戯行動に変化 (男児らしさが低下) するとの報告があった (#85: Swan SH et al., 2010)。

妊娠中の曝露だけでなく、出生後の子が直接フタル酸類に曝露された場合も行動に影響を与える可能性を示す報告もあった (#32: Hu D et al., 2017)。具体的には 2015～2016 年に中国で行われた調査で、6～13 歳の健康な児童 225 名と ADHD と診断された児童 255 名を対象として尿中フタル酸類濃度を調査した結果、MEHP の尿中濃度と、子供の ADHD や注意力問題、攻撃行動や外在化問題行動に相関が見られたという。

3-5) ヒトにおける体外受精 (IVF) の操作そのものによる影響

IVF は一般的には確立された補助生殖医療 (ART) として認識されているが、専門家の中には継続的な長期評価が必要とする慎重な意見があり (#2: Abdel-Mannan O et al., 2014)、ART のより高い安全性を求めて、以下に示す、攪乱要因の同定などの各種の調査が実施されている。

3-5-1) 体外受精 (IVF) による DNA メチル化への影響

以下に引用する論文では、3-4-2 に記載した妊娠中の母子のフタル酸類曝露などの IVF 操作中における化学物質曝露に関わる要因は一切考慮せず、「IVF による出生児」と「自然妊娠による出生児」を比較検討している。

2002～2008 年に英国で実施された後ろ向きコホート研究では、IVF: 49 児、顕微授精 (ICSI) 20 児と自然妊娠 86 児の計 69 児を対象として、誕生から 7 歳までの期間、頬細胞を採取して PEG3, IGF2, SNRPN, LINE1, INS といった遺伝子についてパイロシーケンサーを用いた DNA メチル化解析を行った結果、遺伝子毎に DNA メチル化率に有意な差異を検出した (#93: Whitelaw N et al., 2014)。

2013～2015 年にフランスで実施された前向き研究では IVF: 15 児・ICSI: 36 児の計 51 児と、自然妊娠の 48 児とを対象として、胎盤や臍帯血から DNA サンプルを得て、H19/Igf2, KCNQ10T1, SNURF, DMTs, Line-1, ERVFRD, AluYa5, ERVW といった遺伝子についてパイロシーケンサーを用いた DNA メチル化解析を行った結果、IVF/ICSI 児の胎盤サンプルでは H19/Igf2, KCNQ10T1, Line-1Hs, ERVFRD でメチル化率が有意に低下していた。臍帯血では差異が見られなかったとの結果を

得て、胎盤における DNA メチル化異常による健康影響の可能性に言及している (#14: Choux C et al., 2018)。

IVF と ICSI を主とする ART と、(単なる DNA メチル化異常では無く、症状の伴う疾病としての) インプリンティング障害との関連性について、日本における大規模調査の報告がある (#12: Chiba H et al., 2013)。本研究は ART による出生児においては、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) や Angelman 症候群 (AS)、Silver-Russell 症候群 (SRS)、Prader-Wille 症候群 (PWS) といった、自然妊娠による子では非常に稀なインプリンティング障害が、より多く起こっているとの意見を検討すべく実施された。その結果、AS と PWS では ART と自然妊娠で同等の発生率だったが、BWS と SRS については、ART による子では自然妊娠の約 10 倍の発生率であった、と報告している。

このほかにも小規模な研究が多数、報告されており、DNA メチル化状態に有意な変化があったとする論文が複数あった (#50: Lazaraviciute G et al., 2014)。

3-5-2) 体外受精 (IVF) と小児がん、先天性奇形

IVF を中心とした ART の導入当初は、小児がん、先天性奇形などの併発例が報告されていたが、近年の ART における多胎率や早産率の大幅の低下に伴い妊娠率・正常出産率など ART 成績が改善したため、因果関係は不明であるが現象として小児がんや先天性奇形の併発例は減少したことから、概して ART による出生児と自然妊娠による出生児とでは有意な差異は無いとの見解に至っており (#27: Hediger ML et al., 2013)、スウェーデンにおける 1982~2006 年の長期コホート調査研究で、1982~2000 年と 2001~2006 年の比較研究結果 (#23: Finnström O et al., 2011) もこの見解と一致している。

3-5-3) 体外受精 (IVF) と情動認知行動

3-5-1 と同様に以下に引用する論文では、3-4-2 に記載した妊娠中の母子のフタル酸類曝露などの IVF 操作中における化学物質曝露に関わる要因とは一切関係なく、IVF による出生児と自然妊娠による出生児の比較検討を行っている。基礎医学・臨床医学領域では、ART が実用化された当初より神経活動への影響については慎重な態度を保っており、また、注意欠陥・多動性障害 (ADHD) 等の問題を呈する子の増加と ART の施術数の増加が同期している様に見えることもあり、以下のように継

続的に調査研究が行われている。

イスラエルにおいて、就学年齢に達した IVF による子 51 名と、自然妊娠による子 51 名を対象として、臨床検査や心理テスト、親・本人や教師によるレポートを評価したが、差異はなかった (#52: Levy-Shiff R, 1998)。

ブルガリア、デンマーク、ギリシャ、スウェーデン、英国の国際共同研究で、各国から集めた IVF : 424 児、ICSI : 511 児、自然妊娠 : 488 児を対象として、認知能力と運動能力の発達度を評価した結果、有意な差異は認められなかった (#68: Ponjaert-Kristoffersen I et al., 2005)。

スウェーデンにおいて 1982～2005 年に IVF によって生まれた 28,158 児について、ADHD の診断(投薬治療されていること)との相関を、同国の同年代の 2,417,886 児と比較検討した結果では、IVF と ADHD の間に弱い相関傾向が見られたが有意差は認められなかった (#36: Källén AJ et al., 2011)。

デンマークにおいて 1995～2003 年に IVF により出生した 33,139 児について、自然妊娠にて出生した 555,828 児を対照として、児が 8～17 歳となる 2012 年にフォローアップ調査を行った。この結果、IVF 若しくは ICSI で出生した子と自然妊娠で出生した子に大きな差異はなかった(唯一、tic 異常について境界線上的ごく弱い有意差がついた)。ただし、排卵誘発して得た卵子による子については、様々な精神異常(自閉、多動、非行、感情障害、社会性問題、tic)のリスクが上昇した (#5: Bay B et al., 2013)。

フィンランドにおいて IVF 若しくは ICSI にて出生した 255 児と自然妊娠にて出生した 278 児について、7～8 歳の時点で比較した結果、男女を合わせた全体では有意差はないが、男児に限ると IVF・ICSI による子の方が自然妊娠による子より、認識能力の低下と外在化問題行動の傾向があり、女兒に限ると逆に IVF・ICSI による子の方が自然妊娠による子より、認識能力が高かったという (#69: Punamäki RL et al., 2016)。なおこの論文では IVF 児と ICSI 児を比較して有意差がないことを確認しているとはいえ、IVF と ICSI を合わせて ART 群として自然妊娠群と比較していることに留意する必要がある。

これら以外の比較的古い論文を含め、IVF のリスクに関する論文を、リスク無しとするもの(別添 1)とリスク有りとするもの(別添 2)に分け、添付する。別添 2 にくらべ別添 1 の論文の方がより新しい傾向があり、IVF 施術の技術向上を反映した

内容になっている。

4. 考察

まず DEHP 班で実施した動物実験結果は、3-1 で引用した動物実験によるフタル酸類曝露に関する論文の研究結果と乖離するものではなく、科学的に妥当と評価される。

IVF の受精卵培養中にフタル酸類に曝露されることによりヒト受精卵においてもマウスと同様の影響が起こり得るかどうかについてであるが、本調査研究によって、①ヒトにおいても、フタル酸類の曝露によって DNA メチル化状態に変化を起こすことが複数の論文で報告されていること (3-4-2)、②DEHP 班で抽出した候補遺伝子のオルソログ (共通祖先を持つ異種間の相同遺伝子) がヒトにおいても同様の機能を有しており (3-3)、フタル酸類曝露によりこれらのオルソログ遺伝子の発現変動が誘発されれば中枢神経系の発達・機能に影響が生じる可能性を否定できないこと、からマウスと同様にヒトにおいても IVF の受精卵培養期間中のフタル酸類曝露によって遅発性影響が生じる可能性は否定できない (ただし、音一連想記憶能障害といった症状がそのままヒトで再現されるとは限らない)、と考えられる。

なお 3-4-3 では自然妊娠におけるフタル酸類の母胎内曝露に関する論文 5 件で母親の尿中フタル酸類濃度(生活環境中での曝露を想定)と子の精神・運動などの神経機能への影響との間に何らかの相関性が見いだされているが、いずれの論文も妊娠後期 (子の中枢神経系発生が進んでいる段階) における曝露を想定していること、フタル酸類の内分泌攪乱活性を念頭に男女差の有無に着目していること、から、IVF 培養期間中の受精卵のフタル酸類曝露と直接結びつけて考えることは出来ない。ただし、調査対象となった母子の生活環境が妊娠によって大きく変化していない場合は、母体内で授精～着床に至る妊娠初期においても妊娠後期と同程度のフタル酸類曝露を受けていた可能性があり、これらの論文で報告されているフタル酸類による曝露影響の一部が妊娠初期の曝露に関連している可能性があることに留意が必要である。

DEHP 班の動物実験結果のヒトへの外挿が成立するかどうかに係る未解決要因としてヒト受精卵のフタル酸類に対する感受性の検討が残っている。Pubmed で既存の論文を検索したところ、ヒト ES 細胞での MEHP 曝露実験を 1 件見いだした

(#75: Shi C et al., 2013) が、曝露濃度が 1000 μ M と高濃度で、本調査が対象とする受精卵培養液の濃度 (0.5 μ M) と同等の曝露による影響を評価するのは困難であった。このためヒトにおける感受性の検証については、ヒト ES 細胞等を用いた MEHP の低濃度曝露実験を、遅発性影響に関連する可能性がある DNA メチル化状態の変化などを指標として実施するべきと考えられる。

ここからは、受精卵培養液へのフタル酸類混入により、臨床医学的な症状が引き起こされているかどうか、既存の ART/IVF に関する調査研究を参考に考察する。

受精卵培養液へフタル酸類が混入する経路としては、製造過程若しくは使用時に添加されるヒト血清アルブミンと推定されている (#86: Takatori S et al., 2012)。このため、少なくとも培養液製品やヒト血清アルブミン製剤の製造ロットサイズの規模で、ロット毎に定まったほぼ一定濃度でのフタル酸類混入があったものと推測され、これにより臨床医学的な曝露影響がある場合は、製品シェアに応じた規模で IVF 症例に特異的な異常が観察されると予想される。

3-5-2 でまとめたとおり、ART/IVF による出生児で見られていた異常所見については近年の技術向上に従いリスクが低下したとされている。今後も慎重な経過観察が必要ではあるが、2018 年 3 月現在では、少なくとも IVF については自然妊娠との間に統計的に有意な臨床医学的な異常所見は見られないとする意見が優勢と考えられる。

従って間接的ながら、受精卵培養液に混入したフタル酸類による曝露影響は、ヒトにおいて有意な現象として把握されない軽微な影響に留まっていると考察される。

ただし、受精卵培養液への DEHP、MEHP を主としたフタル酸類の混入が 2012 年の報告 (#86: Takatori S et al., 2012) のレベルで継続する場合、DEHP 班の結果から IVF におけるフタル酸類による潜在的なリスクが残ると考えられる。このレベルでのフタル酸類の作用は、PPAR や GR 等の受容体を介したシグナル伝達に起因している可能性があることから、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、受精卵培養液中のフタル酸類濃度を可能な限り下げることが望ましいと考察される。

5. 結論

ART/IVFによる出生児で見られていた異常所見については近年の技術向上に従いリスクが低下したとされている。今後も慎重な経過観察が必要ではあるが、2018年3月現在では、少なくともIVFについては自然妊娠との間に統計的に有意な臨床医学的な異常所見は見られないとする意見が優勢であり、従って、IVF症例の部分集合となるIVF受精卵培養液中のフタル酸類曝露による影響についても、ヒトにおいて有意な現象として把握されない軽微な影響に留まっていると考えられる。ただし、受精卵培養液中のDEHP・MEHP等のフタル酸類の存在が潜在的なリスクとなる可能性があるため、将来的に得られる疫学データ等について注視する必要がある。

6. 参考文献

- 1) Abdanipour A, Noori-Zadeh A, Mesbah-Namin SA, Bakhtiyari S, Nejatbakhsh R, Anarkooli IJ. (2017) Di-(2-ethylhexyl) Phthalate-Induced Hippocampus-Derived Neural Stem Cells Proliferation. *Cell J*, 19(1), 166-172.
- 2) Abdel-Mannan O, Sutcliffe A. (2014) I was born following ART: how will I get on at school? *Semin Fetal Neonatal Med*, 19(4), 245-249.
- 3) Alberini CM, Chen DY. (2012) Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. *Trends Neurosci*, 35(5), 274-283.
- 4) Amouroux R, Nashun B, Shirane K, Nakagawa S, Hill PW1, D'Souza Z, Nakayama M, Matsuda M, Turp A, Ndjetehe E, Encheva V, Kudo NR, Koseki H, Sasaki H, Hajkova P. (2016) De novo DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nat Cell Biol*, 18(2), 225-233.
- 5) Bay B, Mortensen EL, Hvidtjørn D, Kesmodel US. (2013) Fertility treatment and risk of childhood and adolescent mental disorders: register based cohort study. *BMJ*. 347, f3978.

- 6) Benes FM, Lim B, Matzilevich D, Walsh JP, Subburaju S, Minns M. (2007) Regulation of the GABA cell phenotype in hippocampus of schizophrenics and bipolars. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10164-10169.
- 7) Cammarota M, Bernabeu R, Levi De Stein M, Izquierdo I, Medina JH. (1998) Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *Eur J Neurosci*, 10(8), 2669-2676.
- 8) Canovas S, Ivanova E, Romar R, García-Martínez S, Soriano-Úbeda C, García-Vázquez FA, Saadeh H, Andrews S, Kelsey G, Coy P. (2017) DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *eLife*, 6, e23670.
- 9) Chen CC, Wang YH, Wang SL, Huang PC, Chuang SC, Chen MH, Chen BH, Sun CW, Fu HC, Lee CC, Wu MT, Chen ML, Hsiung CA. (2017) Exposure sources and their relative contributions to urinary phthalate metabolites among children in Taiwan. *Int J Hyg Environ Health*, 220(5), 869-879.
- 10) Chen CH, Jiang SS, Chang IS, Wen HJ, Sun CW, Wang SL. (2018) Association between fetal exposure to phthalate endocrine disruptor and genome-wide DNA methylation at birth. *Environ Res*, 162, 261-270.
- 11) Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, Blitzer RD, Alberini CM. (2011) A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature*, 469(7331), 491-497.
- 12) Chiba H, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. (2013) DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Pediatr Int*, 55(5), 542-549.
- 13) Choi K, Joo H, Campbell JL Jr, Clewell RA, Andersen ME, Clewell HJ 3rd. (2012) In vitro metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by various tissues and cytochrome P450s of human and rat. *Toxicol In Vitro*, 26(2), 315-322.

- 14) Choux C, Binquet C, Carmignac V, Bruno C, Chapusot C, Barberet J, Lamotte M, Sagot P, Bourc'his D, Fauque P. (2018) The epigenetic control of transposable elements and imprinted genes in newborns is affected by the mode of conception: ART versus spontaneous conception without underlying infertility. *Hum Reprod*, 33(2), 331-340.
- 15) Chu DP, Tian S, Sun DG, Hao CJ, Xia HF, Ma X. (2013) Exposure to mono-n-butyl phthalate disrupts the development of preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev*, 25(8), 1174-1184.
- 16) Delgado RN, Lim DA. (2017) Maintenance of Positional Identity of Neural Progenitors in the Embryonic and Postnatal Telencephalon. *Front Mol Neurosci*, 10, 373.
- 17) Dodge LE, Williams PL, Williams MA, Missmer SA, Souter I, Calafat AM, Hauser R; EARTH Study Team. (2015) Associations between paternal urinary phthalate metabolite concentrations and reproductive outcomes among couples seeking fertility treatment. *Reprod Toxicol*, 58, 184-193.
- 18) Du YY, Fang YL, Wang YX, Zeng Q, Guo N, Zhao H, Li YF. (2016) Follicular fluid and urinary concentrations of phthalate metabolites among infertile women and associations with in vitro fertilization parameters. *Reprod Toxicol*, 61, 142-150.
- 19) Engel SM, Zhu C, Berkowitz GS, Calafat AM, Silva MJ, Miodovnik A, Wolff MS. (2009) Prenatal phthalate exposure and performance on the Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic birth cohort. *Neurotoxicology*, 30(4), 522-528
- 20) Field EA, Price CJ, Sleet RB, George JD, Marr MC, Myers CB, Schwetz BA, Morrissey RE. (1993) Developmental toxicity evaluation of diethyl and dimethyl phthalate in rats. *Teratology*. 48(1):33-44
- 21) Fenoglio KA, Brunson KL, Baram TZ. (2006) Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Front Neuroendocrinol*, 27(2), 180-192.

- 22) Fink JK. (2013) Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol*, 126(3), 307-328.
- 23) Finnström O, Källén B, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Olausson PO. (2011) Maternal and child outcome after in vitro fertilization--a review of 25 years of population-based data from Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 90(5), 494-500.
- 24) Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM. (2007) Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res*, 51(7), 899-911.
- 25) Ghosh J, Coutifaris C, Sapienza C, Mainigi M. (2017) Global DNA methylation levels are altered by modifiable clinical manipulations in assisted reproductive technologies. *Clin Epigenetics*, 9, 14.
- 26) Hauser R, Gaskins AJ, Souter I, Smith KW, Dodge LE, Ehrlich S, Meeker JD, Calafat AM, Williams PL; EARTH Study Team. (2016) Urinary Phthalate Metabolite Concentrations and Reproductive Outcomes among Women Undergoing in Vitro Fertilization: Results from the EARTH Study. *Environ Health Perspect*, 124(6), 831-839.
- 27) Hediger ML, Bell EM, Druschel CM, Buck Louis GM. (2013) Assisted reproductive technologies and children's neurodevelopmental outcomes. *Fertil Steril*, 99(2), 311-317.
- 28) Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. (2007) Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*, 210(5), 623-634.
- 29) Hinds HL, Tonegawa S, Malinow R. (1998) CA1 long-term potentiation is diminished but present in hippocampal slices from alpha-CaMKII mutant mice. *Learn Mem*, 5(4-5), 344-354.
- 30) Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F1, Sato A, Arima T. (2014) Imprinting methylation errors in ART. *Reprod Med Biol*, 13(4), 193-202.

- 31) Holahan MR and Smith CA. (2015) Phthalates and neurotoxic effects on hippocampal network plasticity. *Neurotoxicology*, 48, 21-34.
- 32) Hu D, Wang YX, Chen WJ, Zhang Y, Li HH, Xiong L, Zhu HP, Chen HY, Peng SX, Wan ZH, Zhang Y, Du YK. (2017) Associations of phthalates exposure with attention deficits hyperactivity disorder: A case-control study among Chinese children. *Environ Pollut*, 229, 375-385.
- 33) Huang XF, Li Y, Gu YH, Liu M, Xu Y, Yuan Y, Sun F, Zhang HQ, Shi HJ. (2012) The Effects of Di-(2-ethylhexyl)-phthalate Exposure on Fertilization and Embryonic Development In Vitro and Testicular Genomic Mutation In Vivo. *PLoS ONE*, 7(11), e50465.
- 34) Huen K, Calafat AM, Bradman A, Yousefi P, Eskenazi B, Holland N. (2016) Maternal phthalate exposure during pregnancy is associated with DNA methylation of LINE-1 and Alu repetitive elements in Mexican-American children. *Environ Res*, 148, 55-62.
- 35) Inoue K, Shiga T, Ito Y. (2008) Runx transcription factors in neuronal development. *Neural Dev*, 3, 20.
- 36) Källén AJ, Finnström OO, Lindam AP, Nilsson EM, Nygren KG, Otterblad Olausson PM. (2011) Is there an increased risk for drug treated attention deficit/hyperactivity disorder in children born after in vitro fertilization? *Eur J Paediatr Neurol*, 15(3), 247-253.
- 37) Källén B, Finnström O, Nygren KG, Otterblad Olausson P. (2013) Asthma in Swedish children conceived by in vitro fertilisation. *Arch Dis Child*. 98(2), 92-96.
- 38) Kalo D, Roth Z. (2017) Low level of mono(2-ethylhexyl) phthalate reduces oocyte developmental competence in association with impaired gene expression. *Toxicology*, 377, 38-48.
- 39) Kerimoglu C, Sakib MS, Jain G, Benito E, Burkhardt S, Capece V, Kaurani L, Halder R2, Agís-Balboa RC, Stilling R, Urbanke H, Kranz A, Stewart AF,

- Fischer A. (2017) KMT2A and KMT2B Mediate Memory Function by Affecting Distinct Genomic Regions. *Cell Rep*, 20, 538-548.
- 40) Kim JH, Jee MK, Lee SY, Han TH, Kim BS, Kang KS, Kang SK. (2009) Regulation of adipose tissue stromal cells behaviors by endogenic Oct4 expression control. *PLoS One*, 4(9), e7166.
- 41) Kohda T, Ishino F. (2013) Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1609), 20120353.
- 42) Ponjaert-Kristoffersen I, Bonduelle M, Barnes J, Nekkebroeck J, Loft A, Wennerholm UB, Tarlatzis BC, Peters C, Hagberg BS, Berner A, Sutcliffe AG. (2005) International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, in vitro fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments. *Pediatrics*, 115(3), e283-e289.
- 43) Krotz SP, Carson SA, Tomey C, Buster JE. (2012) Phthalates and bisphenol do not accumulate in human follicular fluid. *J Assist Reprod Genet*, 29(8), 773-777.
- 44) Küry S, van Woerden GM, Besnard T, Proietti Onori M, Latypova X, Towne MC, Cho MT, Prescott TE, Ploeg MA, Sanders S, Stessman HAF, Pujol A, Distel B, Robak LA, Bernstein JA, Denommé-Pichon AS, Lesca G, Sellars EA, Berg J, Carré W, Busk ØL, van Bon BWM, Waugh JL, Deardorff M, Hoganson GE, Bosanko KB, Johnson DS, Dabir T, Holla ØL, Sarkar A, Tveten K, de Bellescize J, Braathen GJ, Terhal PA, Grange DK, van Haeringen A, Lam C, Mirzaa G, Burton J, Bhoj EJ, Douglas J, Santani AB, Nesbitt AI, Helbig KL, Andrews MV, Begtrup A, Tang S, van Gassen KLI, Juusola J, Foss K, Enns GM, Moog U, Hinderhofer K, Paramasivam N, Lincoln S, Kusako BH, Lindenbaum P, Charpentier E, Nowak CB, Cherot E, Simonet T, Ruivenkamp CAL, Hahn S, Brownstein CA4, Xia F, Schmitt S, Deb W, Bonneau D, Nizon M, Quinquis D, Chelly J, Rudolf G, Sanlaville D, Parent P, Gilbert-Dussardier B, Toutain A, Sutton VR, Thies J, Peart-Vissers LELM, Boisseau P, Vincent M, Grabrucker AM, Dubourg C; Undiagnosed Diseases Network, Tan WH,

- Verbeek NE, Granzow M, Santen GWE, Shendure J, Isidor B3, Pasquier L, Redon R, Yang Y, State MW, Kleefstra T, Cogné B; GEM HUGO; Deciphering Developmental Disorders Study, Petrovski S, Retterer K, Eichler EE, Rosenfeld JA, Agrawal PB, Béziau S, Odent S, Elgersma Y, Mercier S. (2017) De Novo Mutations in Protein Kinase Genes CAMK2A and CAMK2B Cause Intellectual Disability. *Am J Hum Genet*, 101(5), 768-788.
- 45) Kwan W, Cortes M1, Frost I, Esain V, Theodore LN, Liu SY, Budrow N, Goessling W, North TE. (2016) The Central Nervous System Regulates Embryonic HSPC Production via Stress-Responsive Glucocorticoid Receptor Signaling. *Cell Stem Cell*, 19(3), 370-382.
- 46) Larimore J, Zlatic SA, Arnold M, Singleton KS, Cross R, Rudolph H, Bruegge MV, Sweetman A, Garza C, Whisnant E, Faundez V. (2017) Dysbindin Deficiency Modifies the Expression of GABA Neuron and Ion Permeation Transcripts in the Developing Hippocampus. *Front Genet*, 8, 28.
- 47) LaRocca J, Binder AM, McElrath TF, Michels KB. (2014) The impact of first trimester phthalate and phenol exposure on IGF2/H19 genomic imprinting and birth outcomes. *Environ Res*, 133, 396-406.
- 48) Larsson K, Lindh CH, Jönsson BA, Giovanoulis G, Bibi M, Bottai M, Bergström A, Berglund M. (2017) Phthalates, non-phthalate plasticizers and bisphenols in Swedish preschool dust in relation to children's exposure. *Environ Int*, 102, 114-124.
- 49) Lazaraviciute G, Kauser M, Bhattacharya S, Haggarty P, Bhattacharya S. (2014) A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. *Hum Reprod Update*, 20(6), 840-852.
- 50) Lazaraviciute G, Kauser M, Bhattacharya S, Haggarty P, Bhattacharya S. (2014) Erratum for “A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously.” *Hum Reprod Update*, 21(4), 555-557.

- 51) Lee Y, Lee YW, Gao Q, Lee Y, Lee HE, Ryu JH. (2015) Exogenous insulin-like growth factor 2 administration enhances memory consolidation and persistence in a time-dependent manner. *Brain Res*, 1622, 466-473.
- 52) Levy-Shiff R, Vakil E, Dimitrovsky L, Abramovitz M, Shahar N, Har-Even D, Gross S, Lerman M, Levy I, Sirota L, Fish B. (1998) Medical, cognitive, emotional, and behavioral outcomes in school-age children conceived by in-vitro fertilization. *J Clin Child Psychol*, 27(3), 320-329.
- 53) Li L, Le F, Wang LY, Xu XR, Lou HY, Zheng YM, Sheng JZ, Huang HF, Jin F. (2011) Normal epigenetic inheritance in mice conceived by in vitro fertilization and embryo transfer. *J Zhejiang Univ Sci B*, 12(10), 796-804.
- 54) Li L, Zhang T, Qin XS, Ge W, Ma HG, Sun LL, Hou ZM, Chen H, Chen P, Qin GQ, Shen W, Zhang XF. (2014) Exposure to diethylhexyl phthalate (DEHP) results in a heritable modification of imprint genes DNA methylation in mouse oocytes. *Mol Biol Rep*, 41(3), 1227-1235.
- 55) Li T, Vu TH, Ulaner GA, Littman E, Ling JQ, Chen HL, Hu JF, Behr B, Giudice L, Hoffman AR. (2005) IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. *Mol Hum Reprod*, 11(9), 631-640.
- 56) Li XJ, Jiang L, Chen L, Chen HS, Li X. (2013) Neurotoxicity of dibutyl phthalate in brain development following perinatal exposure: a study in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 36(2), 392-402.
- 57) Lien YJ, Ku HY, Su PH, Chen SJ, Chen HY, Liao PC, Chen WJ, Wang SL. (2015) Prenatal exposure to phthalate esters and behavioral syndromes in children at 8 years of age: Taiwan Maternal and Infant Cohort Study. *Environ Health Perspect*, 123(1), 95-100.
- 58) Lindhurst MJ, Fiermonte G, Song S, Struys E, De Leonardis F, Schwartzberg PL, Chen A, Castegna A, Verhoeven N, Mathews CK, Palmieri F, Biesecker LG. (2006) Knockout of Slc25a19 causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and

anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(43), 15927-15932.

- 59) Logan TT, Rusnak M, Symes AJ. (2015) Runx1 promotes proliferation and neuronal differentiation in adult mouse neurosphere cultures. *Stem Cell Res*, 15(3), 554-564.
- 60) Luu BE, Green SR, Childers CL, Holahan MR, Storey KB. (2017) The roles of hippocampal microRNAs in response to acute postnatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in female and male rats. *Neurotoxicology*, 59, 98-104.
- 61) Machtinger R, Gaskins AJ, Racowsky C, Mansur A, Adir M, Baccarelli AA, Calafat AM, Hauser R. (2018) Urinary concentrations of biomarkers of phthalates and phthalate alternatives and IVF outcomes. *Environ Int*, 111, 23-31.
- 62) McCloskey C, Rada C, Bailey E, McCavera S, van den Berg HA, Atia J, Rand DA, Shmygol A, Chan YW, Quenby S, Brosens JJ, Vatish M, Zhang J, Denton JS, Taggart MJ, Kettleborough C, Tickle D, Jerman J, Wright P, Dale T, Kanumilli S, Trezise DJ, Thornton S, Brown P, Catalano R, Lin N, England SK, Blanks AM. (2014) The inwardly rectifying K⁺ channel KIR7.1 controls uterine excitability throughout pregnancy. *EMBO Mol Med*, 6(9), 1161-1174.
- 63) Melamed N, Choufani S, Wilkins-Haug LE, Koren G, Weksberg R. (2015) Comparison of genome-wide and gene-specific DNA methylation between ART and naturally conceived pregnancies. *Epigenetics*, 10(6), 474-483.
- 64) Min A, Liu F, Yang X, Chen M. (2014) Benzyl butyl phthalate exposure impairs learning and memory and attenuates neurotransmission and CREB phosphorylation in mice. *Food Chem Toxicol*, 71, 81-89.
- 65) Montrose L, Padmanabhan V, Goodrich JM, Domino SE, Treadwell MC, Meeker JD, Watkins DJ, Dolinoy DC. (2018) Maternal levels of endocrine disrupting chemicals in the first trimester of pregnancy are associated with infant cord blood DNA methylation. *Epigenetics*, 13(3), 301-309.
- 66) Nabokina SM, Valle JE, Said HM. (2013) Characterization of the human

- mitochondrial thiamine pyrophosphate transporter SLC25A19 minimal promoter: a role for NF-Y in regulating basal transcription. *Gene*, 528(2), 248-255.
- 67) Petrusa L, Van de Velde H, De Rycke M. (2014) Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod*, 20(9), 861-874.
- 68) Ponjaert-Kristoffersen I, Bonduelle M, Barnes J, Nekkebroeck J, Loft A, Wennerholm UB, Tarlatzis BC, Peters C, Hagberg BS, Berner A, Sutcliffe AG. (2005) International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, in vitro fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments. *Pediatrics*, 115(3), e283-9.
- 69) Punamäki RL, Tiitinen A, Lindblom J, Unkila-Kallio L, Flykt M, Vänskä M, Poikkeus P, Tulppala M. (2016) Mental health and developmental outcomes for children born after ART: a comparative prospective study on child gender and treatment type. *Hum Reprod*, 31(1), 100-107.
- 70) Rivera FJ, Kandasamy M, Couillard-Despres S, Caioni M, Sanchez R, Huber C, Weidner N, Bogdahn U, Aigner L. (2008) Oligodendrogenesis of adult neural progenitors: differential effects of ciliary neurotrophic factor and mesenchymal stem cell derived factors. *J Neurochem*, 107(3), 832-843.
- 71) Salvaing J, Peynot N, Bedhane MN, Veniel S, Pellier E, Boulesteix C, Beaujean N, Daniel N, Duranthon V. (2016) Assessment of 'one-step' versus 'sequential' embryo culture conditions through embryonic genome methylation and hydroxymethylation changes. *Hum Reprod*, 31(11), 2471-2483.
- 72) Salvaing J, Peynot N, Bedhane MN, Veniel S, Pellier E, Boulesteix C, Beaujean N, Daniel N, Duranthon V. (2016) Erratum for "Assessment of 'one-step' versus 'sequential' embryo culture conditions through embryonic genome methylation and hydroxymethylation changes." *Hum Reprod*, 32(4), 967.
- 73) Santos F, Hyslop L, Stojkovic P, Leary C, Murdoch A, Reik W, Stojkovic M, Herbert M, Dean W. (2010) Evaluation of epigenetic marks in human embryos

derived from IVF and ICSI. *Hum Reprod*, 25(9), 2387-2395.

- 74) Schettler T. (2006) Human exposure to phthalates via consumer products. *Int J Androl*, 29(1), 134-139.
- 75) Shi C, Chen X, Cai XH, Yu WD, Liang R, Lu Q, Shen H. (2013) Cytotoxic effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human embryonic stem cells. *Chin Med J (Engl)*, 126(9), 1714-1719.
- 76) Simbulan RK, Di Santo M, Liu X1, Lin W, Donjacour A, Maltepe E, Shenoy A, Borini A, Rinaudo P. (2015) Embryonic stem cells derived from in vivo or in vitro-generated murine blastocysts display similar transcriptome and differentiation potential. *PLoS One*, 10(2), e0117422.
- 77) Smith CA, Farmer K, Lee H, Holahan MR, Smith JC. (2015) Altered Hippocampal Lipid Profile Following Acute Postnatal Exposure to Di(2-Ethylhexyl) Phthalate in Rats. *Int J Environ Res Public Health*, 12(10), 13542-13559.
- 78) Smith CA, Holahan MR. (2014) Reduced hippocampal dendritic spine density and BDNF expression following acute postnatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in male Long Evans rats. *PLoS One*, 9(10), e109522.
- 79) Smith CA, Macdonald A, Holahan MR. (2011) Acute postnatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate adversely impacts hippocampal development in the male rat. *Neuroscience*, 193, 100-108.
- 80) Solomon O, Yousefi P, Huen K, Gunier RB, Escudero-Fung M, Barcellos LF, Eskenazi B, Holland N. (2017) Prenatal phthalate exposure and altered patterns of DNA methylation in cord blood. *Environ Mol Mutagen*, 58(6), 398-410.
- 81) Sun L, Guo C, Wang T, Li X, Li G, Luo Y, Xiao S. (2014) LIMK1 is involved in the protective effects of bone morphogenetic protein 6 against amyloid- β -induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons.

- 82) Sun Y, Dykes IM, Liang X, Eng SR, Evans SM, Turner EE. (2008) A central role for *Islet1* in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nat Neurosci*, 11(11), 1283-1293.
- 83) Sun W, Ban JB, Zhang N, Zu YK, Sun WX. (2014) Perinatal exposure to Di-(2-ethylhexyl)-Phthalate leads to cognitive dysfunction and phospho-tau level increase in aged rats. *Environ Toxicol*, 29(5), 596-603.
- 84) Sunde A, Brison D, Dumoulin J, Harper J, Lundin K, Magli MC, Van den Abbeel E, Veiga A. (2016) Time to take human embryo culture seriously. *Hum Reprod*, 31(10), 2174-2182.
- 85) Swan SH, Liu F, Hines M, Kruse RL, Wang C, Redmon JB, Sparks A, Weiss B. (2010) Prenatal phthalate exposure and reduced masculine play in boys. *Int J Androl*, 33(2), 259-269.
- 86) Takatori S, Akutsu K, Kondo F, Ishii R, Nakazawa H, Makino T (2012) Di-(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in media for in vitro fertilization. *Chemosphere*, 86(5), 454-459.
- 87) Téllez-Rojo MM, Cantoral A, Cantonwine DE, Schnaas L, Peterson K, Hu H, Meeker JD. (2013) Prenatal urinary phthalate metabolites levels and neurodevelopment in children at two and three years of age. *Sci Total Environ*, 461-462, 386-390.
- 88) Tokumoto Y, Tamaki S, Kabe Y, Takubo K, Suematsu M. (2017) Quiescence of adult oligodendrocyte precursor cells requires thyroid hormone and hypoxia to activate *Runx1*. *Sci Rep*, 7(1), 1019.
- 89) Ventura-Juncá P, Irarrázaval I, Rolle AJ, Gutiérrez JI, Moreno RD, Santos MJ. (2015) In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. *Biol Res*, 48, 68.
- 90) Wagenaar K, van Weissenbruch MM, Knol DL, Cohen-Kettenis PT, Delemarre-van de Waal HA, Huisman J. (2009) Behavior and socioemotional functioning

- in 9-18-year-old children born after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 92(6), 1907-1914.
- 91) Wang IJ, Karmaus WJ, Chen SL, Holloway JW, Ewart S. (2015) Effects of phthalate exposure on asthma may be mediated through alterations in DNA methylation. *Clin Epigenetics*, 7, 27.
 - 92) Webb WM, Sanchez RG, Perez G, Butler AA, Hauser RM, Rich MC, O'Bierne AL, Jarome TJ, Lubin FD. (2017) Dynamic association of epigenetic H3K4me3 and DNA 5hmC marks in the dorsal hippocampus and anterior cingulate cortex following reactivation of a fear memory. *Neurobiol Learn Mem*, 142(Pt A), 66-78.
 - 93) Whitelaw N, Bhattacharya S, Hoad G, Horgan GW, Hamilton M, Haggarty P. (2014) Epigenetic status in the offspring of spontaneous and assisted conception. *Hum Reprod*, 29(7), 1452-1458.
 - 94) Wittassek M, Koch HM, Angerer J, Brüning T. (2011) Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach. *Mol Nutr Food Res*, 55(1), 7-31.
 - 95) Wu H, Ashcraft L, Whitcomb BW, Rahil T, Tougias E, Sites CK, Pilsner JR. (2017) Parental contributions to early embryo development: influences of urinary phthalate and phthalate alternatives among couples undergoing IVF treatment. *Hum Reprod*, 32(1), 65-75.
 - 96) Wu H, Estill MS, Shershebnv A, Suvorov A, Krawetz SA, Whitcomb BW, Dinnie H, Rahil T, Sites CK, Pilsner JR. (2017) Preconception urinary phthalate concentrations and sperm DNA methylation profiles among men undergoing IVF treatment: a cross-sectional study. *Hum Reprod*, 32(11), 2159-2169.
 - 97) Xu X, Yang Y, Wang R, Wang Y, Ruan Q, Lu Y. (2015) Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate affects anxiety- and depression-like behaviors in mice. *Chemosphere*, 124, 22-31.
 - 98) Youssef MM, Mantikou E, van Wely M, Van der Veen F, Al-Inany HG, Repping

- S, Mastenbroek S. (2015) Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev*, 11, CD007876.
- 99) Zagami CJ, Zusso M, Stifani S. (2009) Runx transcription factors: lineage-specific regulators of neuronal precursor cell proliferation and post-mitotic neuron subtype development. *J Cell Biochem*, 107(6), 1063-1072.
- 100) Zhao Y, Shi HJ, Xie CM, Chen J, Laue H, Zhang YH. (2015) Prenatal phthalate exposure, infant growth, and global DNA methylation of human placenta. *Environ Mol Mutagen*, 56(3), 286-292.
- 101) Zhang Z, Trautmann K, Artelt M, Burnet M, Schluesener HJ. (2006) Bone morphogenetic protein-6 is expressed early by activated astrocytes in lesions of rat traumatic brain injury. *Neuroscience*, 138(1), 47-53.
- 102) Zhong J, Pevny L, Snider WD. (2006) "Runx"ing towards sensory differentiation. *Neuron*, 49(3), 325-327.
- 103) 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会、器具・容器包装部会 (2010) フタル酸エステル類のトキシコキネティクス及び毒性 平成 22 年 2 月 22 日部会, 資料 1 別添 1

別添1

体外受精（IVF）による児は自然妊娠による児と同様に医学的に正常で、有意な差異はないとする論文リスト（No 列の*は本文中で引用）

No	文献
1	Barnes J, Sutcliffe AG, Kristoffersen I, Loft A, Wennerholm U, Tarlatzis BC, Kantaris X, Nekkebroeck J, Hagberg BS, Madsen SV et al. (2004) The influence of assisted reproduction on family functioning and children's socioemotional development: results from a European study. <i>Hum Reprod</i> , 19, 1480-1487.
2	Carson C, Kurinczuk JJ, Sacker A, Kelly Y, Klemetti R, Redshaw M, et al. (2010) Cognitive development following ART: effect of choice of comparison group, confounding and mediating factors. <i>Hum Reprod</i> , 25, 244-252.
3	Cederblad M, Friberg B, Ploman F, Sjoberg NO, Stjernqvist K, Zackrisson E. (1996) Intelligence and behaviour in children born after in-vitro fertilization treatment. <i>Hum Reprod</i> , 11, 2052-2057.
*4	Finnström O, Källén B, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Olausson PO. (2011) Maternal and child outcome after in vitro fertilization--a review of 25 years of population-based data from Sweden. <i>Acta Obstet Gynecol Scand</i> , 90(5), 494-500.
5	Hart R, Norman RJ. (2013) The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment. Part II--Mental health and development outcomes. <i>Hum Reprod Update</i> , 19, 244-250.
*6	Levy-Shiff R, Vakil E, Dimitrovsky L, Abramovitz M, Shahar N, Har-Even D, Gross S, Lerman M, Levy I, Sirota L, Fish B. (1998) Medical, cognitive, emotional, and behavioral outcomes in school-age children conceived by in-vitro fertilization. <i>J Clin Child Psychol</i> , 27(3), 320-329.
*7	Källén AJ, Finnström OO, Lindam AP, Nilsson EM, Nygren KG, Otterblad Olausson PM. (2011) Is there an increased risk for drug treated attention deficit/hyperactivity disorder in children born after in vitro fertilization? <i>Eur J Paediatr Neurol</i> , 15(3), 247-253.
*8	Bay B, Mortensen EL, Hvidtjørn D, Kesmodel US. (2013) Fertility treatment and risk of childhood and adolescent mental disorders: register based cohort study. <i>BMJ</i> . 347, f3978.
*9	Ponjaert-Kristoffersen I, Bonduelle M, Barnes J, Nekkebroeck J, Loft A, Wennerholm UB, Tarlatzis BC, Peters C, Hagberg BS, Berner A, Sutcliffe AG. (2005) International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, in vitro fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old

	child outcomes: cognitive and motor assessments. <i>Pediatrics</i> , 115(3), e283-9.
*10	Punamäki RL, Tiitinen A, Lindblom J, Unkila-Kallio L, Flykt M, Vänskä M, Poikkeus P, Tulppala M. (2016) Mental health and developmental outcomes for children born after ART: a comparative prospective study on child gender and treatment type. <i>Hum Reprod</i> , 31(1), 100-107.
11	Wagenaar K, Huisman J, Cohen-Kettenis PT, Delemarre-van de Waal HA. (2008) An overview of studies on early development, cognition, and psychosocial well-being in children born after in vitro fertilization. <i>J Dev Behav Pediatr</i> 29, 219-230.
12	Wagenaar K, van Weissenbruch MM, Knol DL, Cohen-Kettenis PT, Delemarre-van de Waal HA, Huisman J. (2008) Information processing, attention and visual-motor function of adolescents born after in vitro fertilization compared with spontaneous conception. <i>Hum Reprod</i> , 24, 913-921.
13	Wagenaar K, van Weissenbruch MM, Knol DL, Cohen-Kettenis PT, Delemarre-van de Waal HA, Huisman J. (2009) Behavior and socioemotional functioning in 9-18-year-old children born after in vitro fertilization. <i>Fertil Steril</i> , 92, 1907-1914.
14	Wagenaar K, van Weissenbruch MM, van Leeuwen FE, Cohen-Kettenis PT, Delemarre-van de Waal HA, Schats R, Huisman J. (2011) Self-reported behavioral and socioemotional functioning of 11- to 18-year-old adolescents conceived by in vitro fertilization. <i>Fertil Steril</i> , 95, 611-616.

別添 2

体外受精（IVF）による児において異常が有意に多いとする論文リスト（No 列の†は複数胚移植や多胎でのリスク増大に言及している論文）別添 1 の有意差がないとする論文に比べ発表年が古いものが多い。

No	文献
† 1	Brandes JM, Scher A, Itzkovits J, Thaler I, Sarid M, Gershoni-Baruch R. (1992) Growth and development of children conceived by in vitro fertilization. <i>Pediatrics</i> . 90, 424-429.
† 2	Gibson FL, Ungerer JA, Leslie GI, Saunders DM, Tennant CC. (1998) Development, behaviour and temperament: a prospective study of infants conceived through in-vitro fertilization. <i>Hum Reprod</i> , 13, 1727-1732.
† 3	Klemetti R, Sevón T, Gissler M, Hemminki (2006) E. Health of children born as a result of in vitro fertilization. <i>Pediatrics</i> . 118, 1819-1827.
4	Koivurova S, Hartikainen AL, Sovio U, Gissler M, Hemminki E, Jarvelin MR. (2003) Growth, psychomotor development and morbidity up to 3 years of age in children born after IVF. <i>Hum Reprod</i> , 18, 2328-2336.
5	Nygren KG, Olausson PO, Kallen B. (2002) Hospital care utilization of infants born after IVF. <i>Hum Reprod</i> , 17, 929-932.
6	Pinborg A, Loft A, Schmidt L, Greisen G, Rasmussen S, Andersen AN. (2004) Neurological sequelae in twins born after assisted conception: controlled national cohort study. <i>BMJ</i> , 329, 311.
7	Ponjaert-Kristoffersen I, Bonduelle M, Barnes J, Nekkebroeck J, Loft A, Wennerholm UB, et al. (2005) International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, in vitro fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments. <i>Pediatrics</i> , 115, e283-e289.
† 8	Ron-El R, Lahat E, Golan A, Lerman M, Bukovsky I, Herman A. (1994) Development of children born after ovarian superovulation induced by long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropins, and by in vitro fertilization. <i>J Pediatr</i> , 125, 734-737.
† 9	Stromberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnstrom O, Koster M, Stjernqvist K. (2002) Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilization: a population-based study. <i>Lancet</i> , 359, 461-465.
10	Zhu JL, Basso O, Obel C, Hvidtjorn D, Olsen J. (2009) Infertility, infertility treatment and psychomotor development: the Danish National Birth Cohort. <i>Paediatr Perinat Epidemiol</i> . 23, 98-106.