

Table 2
Genotype frequency of *AHR*, *AHRR*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, and *CYP1B1* polymorphisms among pregnant women in Sapporo, Hokkaido, Japan.

Genotype	Pregnant women (n=421) (%)
<i>AHR</i> (G>A, Arg554Lys, dbSNP ID: rs2066853)	
GG	142 (33.7)
GA	195 (46.3)
AA	84 (20.0)
GG+GA	337 (80.0)
GA+AA	279 (66.3)
G allele	479 (56.9)
A allele	363 (43.1)
<i>AHRR</i> (C>G, Pro185Ala, dbSNP ID: rs2292596)	
CC	145 (34.4)
CG	217 (51.5)
GG	59 (14.0)
CC+CG	362 (86.0)
CG+GG	276 (65.6)
C allele	507 (60.2)
G allele	335 (39.8)
<i>CYP1A1</i> (T>C, MspI, dbSNP ID: rs4646903)	
TT	176 (41.8)
TC	201 (47.7)
CC	44 (10.5)
TT+TC	377 (89.5)
TC+CC	245 (58.2)
T allele	553 (65.7)
C allele	289 (34.3)
<i>CYP1A1</i> (A>G, He462Val, dbSNP ID: rs1048963)	
AA	253 (60.1)
AG	150 (35.6)
GG	18 (4.3)
AA+AG	403 (95.7)
AG+GG	168 (39.9)
A allele	656 (77.9)
G allele	186 (22.1)
<i>CYP1A2</i> (A>C, <i>CYP1A2</i>*1F, dbSNP ID: rs762551)	
AA	169 (40.1)
AC	191 (45.4)
CC	61 (14.5)
AA+AC	360 (85.5)
AC+CC	252 (59.9)
A allele	529 (62.8)
C allele	313 (37.2)
<i>CYP1B1</i> (C>G, Leu432Val, dbSNP ID: rs1056836)	
CC	317 (75.3)
CG	95 (22.6)
GG	9 (2.1)
CC+CG	412 (97.9)
CG+GG	104 (24.7)
C allele	729 (86.6)
G allele	113 (13.4)

for 2,3',4,4',5-PenCB (IUPAC No. 118) concentration, $P=0.014$ and $P=0.002$ for 2,3,3',4,4'-PenCB (IUPAC No. 105) concentration, and $P=0.043$ and $P=0.013$ for 2,3',4,4',5,5'-HexCB (IUPAC No. 167) concentration, respectively. Furthermore, 2,3,4,7,8-PeCDF TEQs of the *CYP1A1* (T>C, *MspI*) genotype model and dominant model were significantly different (genotype model TT vs. CC and dominant model [TT+TC] vs. CC): $P=0.045$ and $P=0.028$, respectively (Fig. 2).

In contrast, no significant differences were obtained for dioxin concentrations or TEQs among the *AHRR* (rs2292596), *CYP1A1* (rs1048963), *CYP1A2* (rs762551), and *CYP1B1* (rs1056836) polymorphisms (data not shown).

4. Discussion

Recent investigations from the "Hokkaido Study on Environment and Children's Health" have indicated that prenatal exposure to dioxins affects birth weight (Konishi et al., 2009), mental and motor development at the age of 6 months (Nakajima et al., 2006),

and otitis media at the age of 18 months (Miyashita et al., 2011). Furthermore, maternal smoking and metabolism-related genes such as *AHR*, *CYP1A1*, *GSTM1*, NADPH dehydrogenase, quinone 1 (*NQO1*), methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), and CYP2 subfamily E polypeptide 1 (*CYP2E1*) affect infant birth size (Sasaki et al., 2006, 2008; Yila et al., 2012).

TCDD is the most toxic of all dioxin compounds. TCDD is used as a standard to evaluate the TEF value of dioxins and dioxin-like congeners to indicate the degree of toxicity. This TEF is determined by the sensitivity of AHR (Van den Berg et al., 1998). Dioxins including TCDD are sensitive to AHR. Although the toxic effects of TCDD have been studied for several decades, the detailed molecular mechanisms are still poorly understood except for the TCDD-mediated transcriptional regulation of AHR and its binding with AHR nuclear translocator (Gim et al., 2010). TCDD accumulates in fatty tissue, stimulates AHR activation, and causes transcription of *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, and *AHRR* (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003). *CYP1A1* is the most potently induced gene following AHR activation (Barouki et al., 2007). *CYP1A1* is associated with metabolic activation of hydrophobic molecules such as PCDDs (Ziegler, 1991). The catalytic activities of *CYP1B1* overlap with those of *CYP1A1* and *CYP1A2* (Shimada et al., 1997).

TCDD modulates the induction of DNA strand breaks and poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase-1 activation by 17 β -estradiol in human breast carcinoma cells by altering *CYP1A1* and *CYP1B1* expression (Lin et al., 2008). *CYP1A1* and *CYP1B1* mediate the transformation of 17 β -estradiol (E_2)/estrone (E_1) to the biologically active metabolites 2-hydroxyestradiol (2-OH- E_2) and 4-hydroxyestradiol (4-OH- E_2) (Hayes et al., 1996; Martucci and Fishman, 1993; Spink et al., 1997). TCDD enhances the biotransformation of E_2 to 2-OH- E_2 and 4-OH- E_2 in human MCF-7 breast cancer cells (Lavigne et al., 2001). Both 2-OH- E_2 and 4-OH- E_2 induce oxidative damage in purified DNA and break DNA into single strands (Miura et al., 2000; Lin et al., 2003). Cells treated with E_2 and 2-OH- E_2 exhibit a significant decrease in the estrogen-induced response (Gupta et al., 1998).

TCDD mediates estrogen receptor α (ER α) signaling in MCF-7 cells under moderately hypoxic conditions (Seifert et al., 2009). In the mouse uterus and in breast cancer cells, ER α levels are significantly lower after treatment with estradiol plus TCDD than with TCDD alone, indicating that AHR-mediated inhibition occurs by estradiol-induced transactivation. TCDD induces an interaction between AHR and ER α in the presence of estradiol (Wormke et al., 2003).

E_2 -ER α inhibits thyroid-stimulating hormone, β subunit (*TSH β*) expression (Nagayama et al., 2008). Transcriptional repression of *TSH β* is specific to triiodothyronine (T_3) and its receptor. The proinflammatory cytokine interleukin-1 β decreases transcription of the thyroid hormone receptor α gene in liver cells (Kwakkel et al., 2007).

An adequate supply of cerebral T_3 is needed by the fetus. Thyroid hormone-dependent neurodevelopment begins in the second half of the first trimester of pregnancy. The reserves of the fetal gland are low during this period, and thus most of the thyroid hormones needed by the fetus before birth are contributed by the mother (Skeaff, 2011). Effects that are due to a lack of thyroid hormones in pregnant women with poor dioxin-metabolizing enzyme activity may impair fetal brain development and contribute to hypothyroidism in the fetus.

To the best of our knowledge, this is the first study to show different dioxin blood levels in women with both *AHR* (rs2066853) and *CYP1A1* (rs4646903) polymorphisms. Activation mediated by AHR and *CYP1A1* is an important mechanism for metabolizing dioxins. The homozygous *AHR* (rs2066853) variant genotype (AA) is associated with significantly lower mRNA expression of *AHR*, *ARNT*, and *CYP1B1* (Helmig et al., 2011). *AHR* AA may thus reduce AHR activity

Table 3Adjusted means in the generalized linear model of total PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs among *AHR* polymorphisms (G > A, Arg554Lys, dbSNP ID: rs2066853) of pregnant women in Sapporo, Hokkaido, Japan.

Model ^a	GG ^b	GA ^b	AA ^b	GA+AA ^b	GG+GA ^b	P-value
Concentration (pg/g lipid)						
PCDDs						
Genotype ^a	478.5 (444.1–512.9)	519.7 (490.5–548.9)	526.3 (481.6–570.9)			0.097
Dominant ^a	478.5 (444.1–512.9)			521.7 (497.3–546.0)		0.047*
Recessive ^a			526.3 (481.6–570.9)		502.4 (480.3–524.5)	0.355
PCDFs						
Genotype ^a	19.2 (17.3–21.1)	21.0 (19.4–22.7)	20.2 (17.7–22.7)			0.365
Dominant ^a	19.2 (17.3–21.1)			20.8 (19.4–22.1)		0.189
Recessive ^a			20.2 (17.7–22.7)		20.3 (19.0–21.5)	0.968
Non-ortho PCBs						
Genotype ^a	74.6 (67.7–81.5)	83.4 (77.6–89.3)	86.1 (77.2–95.1)			0.079
Dominant ^a	74.6 (67.7–81.5)			84.2 (79.4–89.1)		0.028*
Recessive ^a			86.1 (77.2–95.1)		79.7 (75.3–84.2)	0.216
Mono-ortho PCBs						
Genotype ^a	11,266.3 (10,265.9–12,266.8)	13,146.5 (12,297.1–13,995.9)	12,948.9 (11,650.1–14,247.7)			0.016*
Dominant ^a	11,266.3 (10,265.9–12,266.8)			13,087.0 (12,379.6–13,794.4)		0.004*
Recessive ^a			12,948.9 (11,650.1–14,247.7)		12,356.1 (11,709.3–13,003.3)	0.434
Total dioxins						
Genotype ^a	11,838.7 (10,820.5–12,856.9)	13,770.7 (12,906.1–14,635.2)	13581.5 (12,259.1–14,904.3)			0.014*
Dominant ^a	11,838.7 (10,820.5–12,856.9)			13,713.7 (12,993.7–14,433.7)		0.004*
Recessive ^a			13581.5 (12,259.1–14,904.3)		12,958.9 (12,300.1–13,617.0)	0.419
TEQ (pg/g lipid)						
PCDDs						
Genotype ^a	7.003 (6.513–7.493)	7.465 (7.050–7.881)	7.472 (6.837–8.108)			0.323
Dominant ^a	7.003 (6.513–7.493)			7.467 (7.121–7.814)		0.132
Recessive ^a			7.472 (6.837–8.108)		7.271 (6.957–7.585)	0.583
PCDFs						
Genotype ^a	2.505 (2.342–2.668)	2.598 (2.460–2.736)	2.571 (2.359–2.782)			0.696
Dominant ^a	2.505 (2.342–2.668)			2.590 (2.475–2.705)		0.410
Recessive ^a			2.571 (2.359–2.782)		2.559 (2.455–2.664)	0.927
Non-ortho PCBs						
Genotype ^a	4.179 (3.769–4.590)	4.809 (4.460–5.157)	4.693 (4.160–5.226)			0.068
Dominant ^a	4.179 (3.769–4.590)			4.774 (4.484–5.064)		0.022*
Recessive ^a			4.693 (4.160–5.226)		4.544 (4.280–4.809)	0.633
Mono-ortho PCBs						
Genotype ^a	0.338 (0.308–0.368)	0.394 (0.369–0.420)	0.388 (0.350–0.427)			0.016*
Dominant ^a	0.338 (0.308–0.368)			0.393 (0.371–0.414)		0.004*
Recessive ^a			0.388 (0.350–0.427)		0.371 (0.351–0.390)	0.434
Total dioxins						
Genotype ^a	14.025 (13.056–14.995)	15.267 (14.443–16.090)	15.124 (13.865–16.383)			0.145
Dominant ^a	14.025 (13.056–14.995)			15.224 (14.538–15.910)		0.050
Recessive ^a			15.124 (13.865–16.383)		14.745 (14.121–15.369)	0.604

The generalized linear model was adjusted for maternal age, maternal height, maternal weight before pregnancy, caffeine intake during pregnancy, alcohol consumption during pregnancy, parity, maternal smoking status during pregnancy, maternal educational level, annual household income, inshore fish intake during pregnancy, deep-sea fish intake during pregnancy, and blood sampling period.

^a Model types are as follows: Genotype, genotype model; Dominant, dominant genotype model; Recessive, recessive genotype model.

^b 95% CI, 95% confidence interval.

* Statistically significant values ($P < 0.05$).

and decrease metabolism by CYP1. CYP1A1 activity is significantly higher in people with the CYP1A1 (rs4646903) TC or CC genotype (Landi et al., 1994). Dioxin levels may be influenced by CYP1A1 activity or CYP1A1 expression.

In our previous studies, we noted a decrease in birth weight of 231.5 g and 258.8 g with a 10-fold increase in the TEQ levels of total PCDDs and PCDFs, respectively (Konishi et al., 2009). In addition, total PCDD concentrations were significantly negatively associated with Bayley scales of infant development-II mental development

index scores at 6 months of age [$\beta = -0.234$ was the point increase in development score per total PCDD level (natural logarithm)] (Nakajima et al., 2006). The odds ratio was 2.50 for otitis media for the 75–100th percentiles of TEQ (3.06–7.77 TEQ pg/g lipid) of total PCDFs increases as compared with the 0–25th percentiles of TEQ (0.64–1.79 TEQ pg/g lipid) (Miyashita et al., 2011). With respect to different polymorphisms, decreases in birth weight and length of 211 g and 1.2 cm, respectively, were noted for infants born to women who smoked during pregnancy with *AHR* (G > A,

Table 4

Adjusted means in the generalized linear model of total PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs among *CYP1A1* polymorphisms (T>C, *MspI*, dbSNP ID: rs4646903) of pregnant women in Sapporo, Hokkaido, Japan.

Model ^a	TT ^b	TC ^b	CC ^b	TC+CC ^b	TT+TC ^b	P-value ^c
Concentration (pg/g lipid)						
PCDDs						
Genotype ^a	529.8 (499.3–560.3)	497.2 (468.6–525.7)	461.9 (400.6–523.1)			0.097
Dominant ^a			461.9 (400.6–523.1)		512.4 (491.6–533.2)	0.127
Recessive ^a	529.8 (499.3–560.3)			490.9 (465.0–516.7)		0.057
PCDFs						
Genotype ^a	20.8 (19.1–22.5)	20.4 (18.8–21.9)	17.9 (14.4–21.3)			0.324
Dominant ^a			17.9 (14.4–21.3)		20.5 (19.4–21.7)	0.144
Recessive ^a	20.8 (19.1–22.5)			19.9 (18.5–21.3)		0.454
Non-ortho PCBs						
Genotype ^a	85.5 (79.4–91.6)	78.6 (72.9–84.3)	74.0 (61.6–86.3)			0.139
Dominant ^a			74.0 (61.6–86.3)		81.8 (77.6–86.0)	0.240
Recessive ^a	85.5 (79.4–91.6)			77.8 (72.6–83.0)		0.061
Mono-ortho PCBs						
Genotype ^a	12,748.0 (11,851.9–13,644.0)	12,354.8 (11,517.0–13,192.7)	11,911.9 (10,112.4–13,711.4)			0.666
Dominant ^a			11,911.9 (10,112.4–13,711.4)		12,538.3 (11,928.2–13,148.3)	0.518
Recessive ^a	12,748.0 (11,851.9–13,644.0)			12,275.6 (11,517.7–13,033.5)		0.431
Total dioxins						
Genotype ^a	13,384.0 (12,472.0–14,296.1)	12,951.0 (12,098.2–13,803.8)	12,465.6 (10,634.0–14,297.2)			0.623
Dominant ^a			12,465.6 (10,634.0–14,297.2)		13,153.0 (12,532.0–13,774.1)	0.486
Recessive ^a	13,384.0 (12,472.0–14,296.1)			12,864.1 (12,092.7–13,635.6)		0.394
TEQ (pg/g lipid)						
PCDDs						
Genotype ^a	7.616 (7.183–8.049)	7.225 (6.821–7.630)	6.480 (5.611–7.349)			0.062
Dominant ^a			6.480 (5.611–7.349)		7.408 (7.113–7.703)	0.048*
Recessive ^a	7.616 (7.183–8.049)			7.092 (7.182–8.049)		0.072
PCDFs						
Genotype ^a	2.653 (2.510–2.797)	2.545 (2.411–2.680)	2.267 (1.978–2.555)			0.061
Dominant ^a			2.267 (1.978–2.555)		2.596 (2.498–2.694)	0.035*
Recessive ^a	2.653 (2.510–2.797)			2.495 (2.373–2.617)		0.103
Non-ortho PCBs						
Genotype ^a	4.730 (4.363–5.096)	4.496 (4.154–4.839)	4.300 (3.564–5.035)			0.490
Dominant ^a			4.300 (3.564–5.035)		4.605 (4.356–4.855)	0.441
Recessive ^a	4.730 (4.363–5.096)			4.461 (4.152–4.771)		0.273
Mono-ortho PCBs						
Genotype ^a	0.382 (0.356–0.409)	0.371 (0.346–0.396)	0.357 (0.303–0.411)			0.666
Dominant ^a			0.357 (0.303–0.411)		0.376 (0.358–0.394)	0.518
Recessive ^a	0.382 (0.356–0.409)			0.368 (0.346–0.391)		0.431
Total dioxins						
Genotype ^a	15.381 (14.521–16.242)	14.638 (13.833–15.442)	13.403 (11.676–15.131)			0.111
Dominant ^a			13.403 (11.676–15.131)		14.985 (14.398–15.571)	0.090
Recessive ^a	15.381 (14.521–16.242)			14.417 (13.688–15.146)		0.095

^a Model types are as follows: Genotype, genotype model; Dominant, dominant genotype model; Recessive, recessive genotype model.

^b 95% CI, 95% confidence interval.

* Statistically significant values ($P < 0.05$).

Arg554Lys) GG as compared with those born to women who did not smoke during pregnancy with *AHR* GA+AA. Decreases in birth weight and length of 170 g and 0.8 cm, respectively, were noted for infants born to women who smoked during pregnancy with *CYP1A1* (T>C, *MspI*) TC+CC as compared with those born to women who did not smoke during pregnancy with *CYP1A1* TT. Decreases in birth weight and length of 315 g and 1.7 cm, respectively, were noted for infants born to women who smoked during pregnancy with *AHR* GG, *CYP1A1* TC+CC as compared with those born to women who did not smoke during pregnancy with *AHR* GA+AA, *CYP1A1* TT (Sasaki et al., 2006).

In 82 children aged 6–10 years who were attending schools near an industrial area in Mexico, Sánchez-Guerra et al. (2012) investigated the association among *CYP1A1**2C, *CYP1B1**3, *GSTM1**0, and *GSTT1**0 polymorphisms, urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP; a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure), and DNA adducts. They observed higher urinary 1-OHP concentrations in those with *CYP1A1**2C AG+GG as compared with those with *CYP1A1**2CAA (0.23 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine for AA vs. 0.45 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine for AG+GG).

In human full-term placental trophoblast cultures, after archetype *AHR* ligands/activators (2,3,7,8-TCDD and

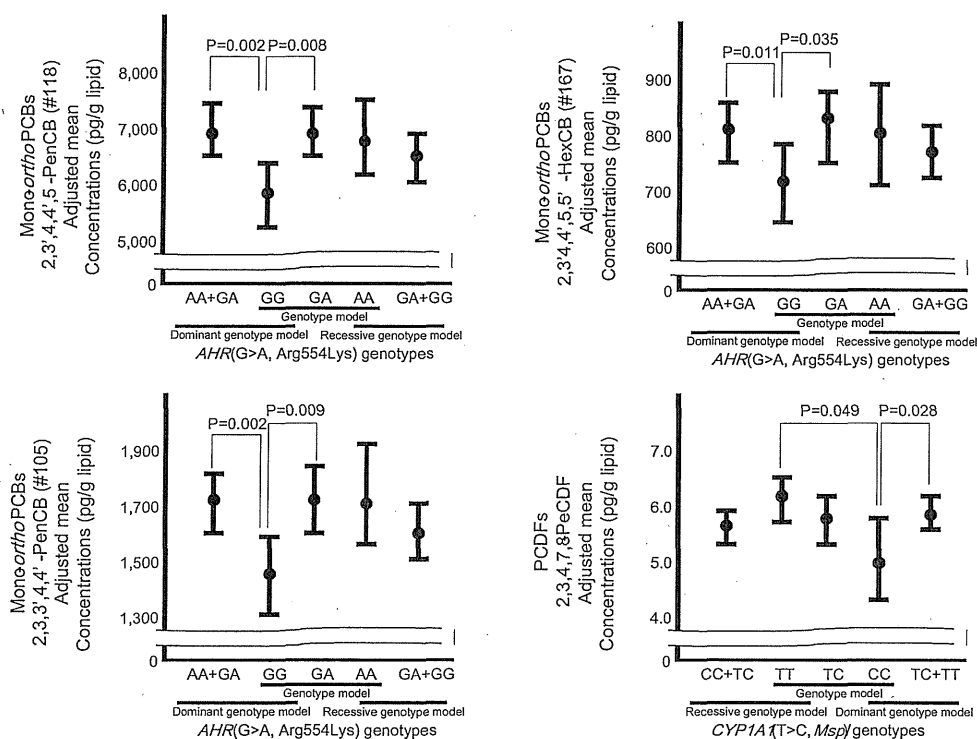


Fig. 1. Concentrations for 2,3',4,4',5'-PenCB (IUPAC No. 118), 2,3,3',4,4',-PenCB (IUPAC No. 105), 2,3',4,4',5,5'-HexCB (IUPAC No. 167) and 2,3,4,7,8-PeCDF in the generalized linear model of dioxin congeners among *AHR* and *CYP1A1* polymorphisms of pregnant women in Sapporo, Hokkaido, Japan.

Dots and bars are the adjusted means and 95% confidence intervals, respectively. The means were adjusted for maternal age, maternal height, maternal weight before pregnancy, caffeine intake during pregnancy, alcohol consumption during pregnancy, parity, maternal smoking status during pregnancy, maternal educational level, annual household income, inshore fish intake during pregnancy, deep-sea fish intake during pregnancy, and blood sampling period in the generalized linear model.

3-methylcholanthrene) were added, *CYP1A1* mRNA, but not *CYP1A2*, *CYP1B1*, *AHR*, or *AHRR* mRNA, was significantly induced (Stejskalova et al., 2011). In the present study, dioxin-like PCB concentrations and TEQ were associated with a significant reduction in the frequency of *AHR* (G>A, Arg554Lys) GA+AA as compared with GG. PCDFs were associated with a significant reduction in the frequency of *CYP1A1* (T>C, *MspI*) TC+CC as compared with TT. After adjusting for smoking status during pregnancy, changes in dioxin concentrations and TEQ were significantly decreased in association with *AHR* and *CYP1A1* polymorphisms, but not with *AHRR*, *CYP1A2*, or *CYP1B1*. Compared with previous studies by Sasaki et al. (2006), Sánchez-Guerra et al. (2012), and Stejskalova et al. (2011), we observed statistically significant differences only in *AHR* and *CYP1A1*, and not in *AHRR*, *CYP1A2*, or *CYP1B1*, which is similar to the previous three reports. It may be that the chemical effects of tobacco smoke, which include polycyclic aromatic hydrocarbons, are more important confounding factors for *AHR* and *CYP1A1* genotypes in pregnant women who are exposed to low levels of dioxins. However, the importance of associations between the *AHR* (G>A, Arg554Lys) or *CYP1A1* (T>C, *MspI*) genotype and dioxin concentrations in humans remains unclear. In our study, we observed differences of ~1.1-fold in dioxin TEQs and concentrations according to genotypes. Based on our previous study (Konishi et al., 2009), changes in birth weight of about -20 to -25 g (maximum levels) will predict a 1.1-fold increase in the levels of dioxins. For pregnant Japanese women, TEQs of 2,3',4,4',5'-PenCB (IUPAC No. 118), 2,3,3',4,4',-PenCB (IUPAC No. 105), and 2,3',4,4',5,5'-HexCB (IUPAC No. 167) showed significant differences in the *AHR* genotypes. The metabolism and pharmacokinetics of 2,3',4,4',5'-PenCB (IUPAC No. 118), 2,3,3',4,4',-PenCB (IUPAC No. 105), and 2,3',4,4',5,5'-HexCB (IUPAC No. 167) are unclear in

humans, but some mouse studies have been performed. Typically, one dose-response relationship was observed for induction of *CYP1A1* and *CYP1A2* enzyme activity. The relative potency differs by an order of magnitude in female mice following subchronic exposure to 2,3,3',4,4',-PenCB (IUPAC No. 105) (DeVito et al., 2000). Neither spleen weight nor thymus weight changes, but the liver weight is significantly increased by 2,2',4,4',5,5'-HexCB treatment in pregnant mice (Mattsson et al., 1981).

The TEQ of 2,3,4,7,8-PeCDF showed significant differences for the *CYP1A1* (rs4646903) genotypes. The pharmacokinetics of 2,3,4,7,8-PeCDF have been studied in humans. In Yucheng patients in Taiwan who had been exposed to high levels of 2,3,4,7,8-PeCDF, this dioxin was the greatest contributor to the toxic effects because it accounted for 70% of the total dioxin TEQ in maternal blood (Masuda, 2001). Matsueda et al. (2007) examined the dioxin levels and congener distributions in blood samples of Yusho patients in Japan and normal controls, especially in relation to their respective exposure routes. They reported that the absorptivity and rate of metabolism and elimination for dioxin congeners depend on the exposure source. Further work is needed to confirm these findings for *AHR* and *CYP1A1* in dioxin congener studies in humans, especially in pregnant women, because chronic exposure to low levels of 2,3',4,4',5'-PenCB (IUPAC No. 118), 2,3,3',4,4',-PenCB (IUPAC No. 105), 2,3',4,4',5,5'-HexCB (IUPAC No. 167), and 2,3,4,7,8-PeCDF in the environment could be causally confirmed by epidemiological studies.

Although genetic polymorphisms cannot be changed, adverse health effects of dioxins could be prevented by modulating exposure levels, especially among individuals with increased genetic susceptibility, because dioxins may be a modifiable environmental pollutant. For example, one way to reduce dioxin exposure in

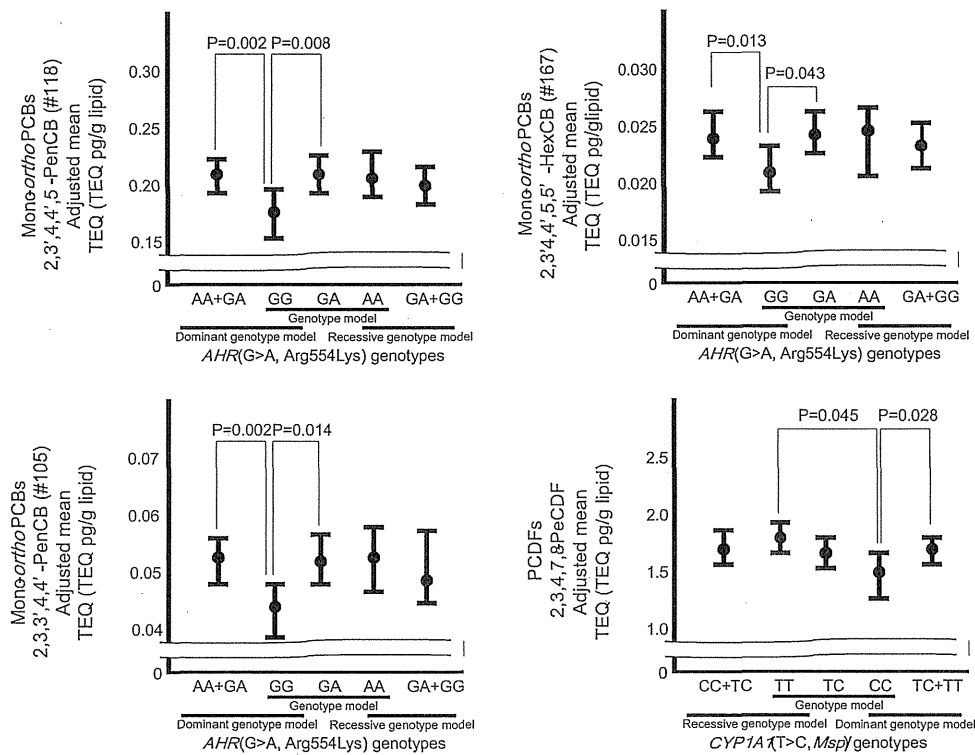


Fig. 2. TEQs for 2,3',4,4',5'-PenCB (IUPAC No. 118), 2,3,3',4,4'-PenCB (IUPAC No. 105), 2,3',4,4',5,5'-HexCB (IUPAC No. 167) and 2,3,4,7,8-PeCDF in the generalized linear model of dioxin congeners among *AHR* and *CYP1A1* polymorphisms of pregnant women in Sapporo, Hokkaido, Japan.

Dots and bars are the adjusted means and 95% confidence intervals, respectively. The means were adjusted for maternal age, maternal height, maternal weight before pregnancy, caffeine intake during pregnancy, alcohol consumption during pregnancy, parity, maternal smoking status during pregnancy, maternal educational level, annual household income, inshore fish intake during pregnancy, deep-sea fish intake during pregnancy, and blood sampling period in the generalized linear model.

pregnant women is to minimize consumption of inshore fishes such as horse mackerels and sardines, which contain large quantities of dioxin.

The main strength of this study is that the dioxin concentrations were very accurate because we used highly sensitive methods for dioxin measurement. The present study also has a few limitations. First, we did not measure any metabolites of dioxins or placental *AHR* and *CYP1A1* activity. Some metabolites are produced from one dioxin congener, and distinguishing the metabolites from the congeners was difficult. Thus, we could not measure them. Second, the functional consequences of the Pro/Ala substitution in *AHRR* remain largely unknown. A novel human *AHRR* complementary DNA that lacks the exon with the Pro185Ala polymorphism represses *AHR* (Karchner et al., 2009), but further studies are needed to confirm whether this mutation has any functional consequences.

In the present study, differences in dioxin blood concentrations were relatively low. Despite this, partial differences in health effects may exist, depending on the genetic polymorphism. Consequently, further longitudinal cohort studies should be carried out to confirm our findings. Moreover, further studies are also needed to investigate the effects of dioxins on developing school-age children. We are currently following the children of the mother–infant pairs in our study up to school age to determine whether exposure to low levels of dioxins during gestation affects their neurodevelopment, growth or risk of developing allergies. The results are forthcoming. We will also focus our attention not only on dioxin-metabolizing genes but also on the effects of polymorphisms on sex hormone production. Additional molecular and genetic epidemiological studies are needed to further elucidate the effects of both environmental and genetic factors in humans in the current and subsequent generations.

Funding

This work was supported in part by Grants-in-aid for Scientific Research from the Japan Society for Promotion of Science and the Japan Ministry of Health, Labour and Welfare.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank the medical staff at Sapporo Toho Hospital, the technical staff at Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, and all the participants. We also acknowledge Dr. Sharon J.B. Hanley (Department of Public Health Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine) for her enormous help in the check-up of this article, and are indebted to Dr. Eisaku Okada (Department of Public Health Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine) for excellent statistical assistance.

References

- Babu, K.A., Rao, K.L., Kanakavalli, M.K., Suryanarayana, V.V., Deenadayal, M., Singh, L., 2004. *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* genetic polymorphism is associated with susceptibility to polycystic ovaries in South Indian women. *Reproductive Biomedicine Online* 9, 194–200.
- Barouki, R., Coumoul, X., Fernandez-Salguero, P.M., 2007. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Letters* 581, 3608–3615.
- Berwick, M., Matullo, G., Song, Y.S., Guarnera, S., Dominguez, G., Orlov, I., Walker, M., Vineis, P., 2004. Association between aryl hydrocarbon receptor genotype and survival in soft tissue sarcoma. *Journal of Clinical Oncology* 22, 3997–4001.

- Chao, H.R., Wang, S.L., Lin, L.Y., Lee, W.J., Pöpke, O., 2007. Placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in Taiwanese mothers in relation to menstrual cycle characteristics. *Food and Chemical Toxicology* 45, 259–265.
- Delpisheh, A., Brabin, L., Topping, J., Reyad, M., Tang, A.W., Brabin, B.J., 2009. A case-control study of CYP1A1, GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms, pregnancy smoking and fetal growth restriction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 143, 38–42.
- DeVito, M.J., Ménache, M.G., Diliberto, J.J., Ross, D.G., Birnbarm, L.S., 2000. Dose–response relationships for induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzyme activity in liver, lung, and skin in female mice following subchronic exposure to polychlorinated biphenyls. *Toxicology & Applied Pharmacology* 167, 157–172.
- Kim, J., Kim, H.S., Kim, J., Choi, M., Kim, J.R., Chung, Y.J., Cho, K.H., 2010. A system-level investigation into the cellular toxic response mechanism mediated by AhR signal transduction pathway. *Bioinformatics* 26, 2169–2175.
- Gupta, M., McDougal, A., Safe, S., 1998. Estrogenic and antiestrogenic activities of 16 α - and 2-hydroxy metabolites of 17 β -estradiol in MCF-7 and T47D human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 67, 413–419.
- Hayes, C.L., Spink, D.C., Spink, B.C., Cao, J.Q., Walker, N.J., Sutter, T.R., 1996. 17 β -estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proceedings of National Academy of Science of United States of America* 93, 9776–9781.
- Helmig, S., Seelinger, J.U., Döhrel, J., Schneider, J., 2011. RNA expressions of AHR, ARNT and CYP1B1 are influenced by AHR Arg554Lys polymorphism. *Molecular Genetics & Metabolism* 104, 180–184.
- Karchner, S.I., Jenny, M.J., Tarrant, A.M., Evans, B.R., Kang, H.J., Bae, I., Sherr, D.H., Hahn, M.E., 2009. The active form of human aryl hydrocarbon receptor (AHR) repressor lacks exon 8, and its Pro¹⁸⁵ and Ala¹⁸⁵ variants repress both AHR and hypoxia-inducible factor. *Molecular & Cellular Biology* 29, 3465–3477.
- Kim, S.H., Choi, Y.M., Lee, G.H., Hong, M.A., Lee, K.S., Lee, B.S., Kim, J.G., Moon, S.Y., 2007. Association between susceptibility to advanced stage endometriosis and the genetic polymorphisms of aryl hydrocarbon receptor repressor and glutathione-S-transferase T1 genes. *Human Reproduction* 22, 1866–1870.
- Kishi, R., Sasaki, S., Yoshioka, E., Yuasa, M., Sata, F., Saijo, Y., Kurahashi, N., Tamaki, J., Endo, T., Sengoku, K., Nonomura, K., Minakami, H., Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2007. Cohort profile: the Hokkaido study on environment and children's health in Japan. *International Journal of Epidemiology* 40, 611–618.
- Klein, K., Winter, S., Turpeinen, M., Schwab, M., Zanger, U.M., 2010. Pathway-targeted pharmacogenomics of CYP1A2 in human liver. *Frontiers in Pharmacology* 1, 129.
- Konishi, K., Sasaki, S., Kato, S., Ban, S., Washino, N., Kajiwara, J., Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Yasutake, D., Kishi, R., 2009. Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environment Research* 109, 906–913.
- Kwakkel, J., Wiersinga, W.M., Boelen, A., 2007. Interleukin-1 β modulates endogenous thyroid hormone receptor alpha gene transcription in liver cells. *Journal of Endocrinology* 194, 257–265.
- Landi, M.T., Bertazzi, P.A., Shields, P.G., Clark, G., Lucier, G.W., Garte, S.J., Cosma, G., Caporaso, N.E., 1994. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. *Pharmacogenetics* 4, 242–246.
- Lavigne, J.A., Goodman, J.E., Fonong, T., Odwin, S., He, P., Roberts, D.W., Yager, J.D., 2001. The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer Research* 61, 7488–7494.
- Lin, P.H., Lin, C.H., Huang, C.C., Fang, J.P., Chuang, M.C., 2008. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates the induction of DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation by 17 β -estradiol in human breast carcinoma cells through alteration of CYP1A1 and CYP1B1 expression. *Chemical Research Toxicology* 21, 1337–1347.
- Lin, P.H., Nakamura, J., Yamaguchi, S., Asakura, S., Swenberg, J.A., 2003. Aldehydic DNA lesions induced by catechol estrogens in calf thymus DNA. *Carcinogenesis* 24, 1133–1141.
- Longnecker, M.P., Klebanoff, M.A., Brock, J.W., Guo, X., 2005. Maternal levels of polychlorinated biphenyls in relation to preterm and small-for-gestational-age birth. *Epidemiology* 16, 641–647.
- Luo, C., Zou, P., Ji, G., Gu, A., Zhao, P., Zhao, C., 2013. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) 1661G>A polymorphism in human cancer. A meta-analysis. *Gene* 513, 225–230.
- Martucci, C.P., Fishman, J., 1993. P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* 57, 237–257.
- Masuda, Y., 2001. Fate of PCDF/PCB congeners and change of clinical symptoms in patients with Yusho PCB poisoning for 30 years. *Chemosphere* 43, 925–930.
- Matsueda, T., Kajiwara, J., Iwamoto, S., Iida, T., Izuno, C., Yoshimura, T., 2007. Analysis of residual nature of dioxins in blood of Yucho patients and controls in relation to the Yusho oil and food as respective exposure routes. *Fukuoka Igaku Zasshi. Fukuoka Acta Medica* 98, 196–202 (in Japanese).
- Mattsson, R., Mattsson, A., Kihlström, J., Lindahl-Kiessling, K., 1981. Effects of a hexachlorinated biphenyl on lymphoid organs and resorption of fetuses in pregnant mice. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology* 10, 281–288.
- Miller, K.P., Borgeest, C., Greenfield, C., Tomic, D., Flaws, J.A., 2004. In utero effects of chemicals on reproductive tissues in female. *Toxicology & Applied Pharmacology* 198, 111–131.
- Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta* 1619, 263–268.
- Miura, T., Muraoka, S., Fujimoto, Y., Zhao, K., 2000. DNA strand break and 8-hydroxyguanine formation induced by 2-hydroxyestradiol dispersed in liposomes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 74, 93–98.
- Miyashita, C., Sasaki, S., Saijo, Y., Washino, N., Okada, E., Kobayashi, S., Konishi, K., Kajiwara, J., Todaka, T., Kishi, R., 2011. Effects of prenatal exposure to dioxin-like compounds on allergies and infections during pregnancy. *Environment Research* 111, 551–558.
- Nagayama, K., Sasaki, S., Matsushita, A., Ohba, K., Iwaki, H., Matsunaga, H., Suzuki, S., Misawa, H., Ishizuka, K., Oki, Y., Noh, J.Y., Nakamura, H., 2008. Inhibition of GATA2-dependent transactivation of the TSH β gene by ligand-bound estrogen receptor alpha. *Journal of Endocrinology* 199, 113–125.
- Nakajima, S., Saijo, Y., Kato, S., Sasaki, S., Uno, A., Kanagami, N., Hirokawa, H., Hori, T., Tobiishi, K., Todaka, T., Nakamura, Y., Yanagiya, S., Sengoku, Y., Iida, T., Sata, F., Kishi, R., 2006. Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at 6 months of age. *Environment Health Perspective* 114, 773–778.
- Nishijo, M., Tawara, K., Nakagawa, H., Honda, R., Kido, T., Nishijo, H., Saito, S., 2008. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 18, 246–251.
- Piedrafito, B., Erceg, S., Cauli, O., Monfort, P., Felipo, V., 2008. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls PCB153 or PCB126 impairs learning ability in young but not in adult rats. *European Journal of Neuroscience* 27, 177–182.
- Qiu, L., Yao, L., Mao, C., Yu, K., Zhan, P., Chen, B., Yuan, H., Zhang, J., Xue, K., Hu, X., 2010. Lack of association of CYP1A2-164 A/C polymorphism with breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 17,600 subjects. *Breast Cancer Research & Treatment* 122, 521–525.
- Ranade, A., Chang, M.S., Ting, C.T., Pei, D., Hsiao, C.F., Olivier, M., Pesich, R., Hebert, J., Chen, Y.D., Dzau, V.J., Curb, D., Olshen, R., Risch, N., Cox, D.R., Botstein, D., 2001. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Research* 11, 1262–1268.
- Sánchez-Guerra, M., Pelallo-Martínez, N., Díaz-Barriga, F., Rothenberg, S.J., Hernández-Cadena, L., Faugeton, S., Oropeza-Hernández, L.F., Guaderrama-Díaz, M., Quintanilla-Vega, B., 2012. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. *Mutation Research* 742, 66–71.
- Sasaki, S., Kondo, T., Sata, F., Saijo, Y., Katoh, S., Nakajima, S., Ishizuka, M., Fujita, S., Kishi, R., 2006. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects. *Molecular Human Reproduction* 12, 77–83.
- Sasaki, S., Sata, F., Katoh, S., Saijo, Y., Nakajima, S., Washino, N., Konishi, K., Ban, S., Ishizuka, M., Kishi, R., 2008. Adverse birth outcomes associated with maternal smoking and polymorphisms in the N-nitrosoamine-metabolizing enzyme genes NQO1 and CYP2E1. *American Journal of Epidemiology* 167, 719–726.
- Seifert, A., Taubert, H., Hombach-Klonisch, S., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2009. TCDD mediates inhibition of p53 and activation of ER α signaling in MCF-7 cells at moderate hypoxic conditions. *International Journal of Oncology* 35, 417–424.
- Shimada, N., Iwasaki, M., Kasuga, Y., Yokoyama, S., Onuma, H., Nishimura, H., Kusama, R., Hamada, G.S., Nishimoto, I.N., Iyeyasu, H., Motola Jr., J., Laginha, F.M., Kurahashi, N., Tsugane, S., 2009. Genetic polymorphisms in estrogen metabolism and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Journal of Human Genetics* 54, 209–215.
- Shimada, T., Gillam, E.M., Sutter, T.R., Strickland, P.T., Guengerich, F.P., Yamazaki, H., 1997. Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. *Drug Metabolism & Disposition* 25, 617–622.
- Singh, A.P., Pant, M.C., Ruwali, M., Shah, P.P., Prasad, R., Mathur, N., Parmar, D., 2010. Polymorphism in cytochrome P450 1A2 and their interaction with risk factors in determining risk of squamous cell lung carcinoma in men. *Cancer Biomarkers* 8, 351–359.
- Skeaff, S.A., 2011. Iodine deficiency in pregnancy: the effect on neurodevelopment in the child. *Nutrients* 3, 265–273.
- Song, N., Tan, W., Xing, D., Lin, D., 2001. CYP 1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. *Carcinogenesis* 22, 11–16.
- Sonneborn, D., Park, H., Petrik, J., Kocan, A., Palkovicova, A., Trnovec, T., Nguyen, D., Hertz-Picciotto, I., 2008. Prenatal polychlorinated biphenyl exposures in eastern Slovakia modify effects of social factors on birthweight. *Paediatr Perinat. Epidemiol.* 22, 202–213.
- Spink, D.C., Spink, B.C., Cao, J.Q., Gierthy, J.F., Hayes, C.L., Li, Y., Sutter, T.R., 1997. Induction of cytochrome P450 1B1 and catechol estrogen metabolism in ACHN human renal adenocarcinoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 62, 223–232.
- Sram, R.J., Binkova, B., Dejmejk, J., Chvatalova, I., Solansky, I., Topinka, J., 2006. Association of DNA adducts and genotypes with birth weight. *Mutation Research* 608, 121–128.
- Stejskalova, L., Vecerova, L., Mesa Peréz, L., Vrzal, R., Dvorak, Z., Nachtigal, P., Pavek, P., 2011. Aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon nuclear translocator expression in human and rat placenta and transcription activity in human trophoblast cultures. *Toxicological Science* 123, 26–36.
- Su, P.H., Huang, P.C., Lin, C.Y., Ying, T.H., Chen, J.Y., Wang, S.L., 2012. The effect of in utero exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls on reproductive development in eight year-old children. *Environment International* 39, 181–187.

- Sugimura, H., Hamada, G.S., Suzuki, I., Iwase, T., Kiyokawa, E., Kino, I., Tsugane, S., 1995. CYP1A1 and CYP2E1 polymorphism and lung cancer, case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Pharmacogenetics* 5, S145–S148.
- Tajimi, M., Uehara, R., Watanabe, M., Oki, I., Ojima, T., Nakamura, Y., 2005. Relationship of PCDD/F and Co-PCB concentrations in breast milk with infant birthweights in Tokyo, Japan. *Chemosphere* 61, 383–388.
- Todaka, T., Hirakawa, H., Tobiishi, K., Iida, T., 2003. New protocol of dioxins analysis in human blood. *Fukuoka Acta Medica* 41, 197–204.
- Tsuchiya, M., Katoh, T., Motoyama, H., Sasaki, H., Tsugane, S., Ikenoue, T., 2005. Analysis of the AhR, ARNT, and AhRR gene polymorphisms: genetic contribution to endometriosis susceptibility and severity. *Fertility & Sterility* 84, 454–458.
- Tsukimori, K., Uchi, H., Mitoma, C., Yasukawa, F., Chiba, T., Todaka, T., Kajiwara, J., Yoshimura, T., Hirata, T., Fukushima, K., Wake, N., Furue, M., 2012. Maternal exposure of high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by Yusho disease. *Environment International* 38, 79–86.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environment Health Perspective* 106, 775–792.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fieder, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterson, R.E., 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological Science* 93, 223–241.
- White, S.S., Birnbaum, L.S., 2009. An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. *Journal of Environmental Science and Health Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* 27, 197–211.
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., Safe, S., 2003. The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Molecular & Cellular Biology* 23, 1843–1855.
- Xie, Y., Liu, G., Miao, X., Liu, Y., Zhou, W., Zhong, D., 2012. CYP1B1 Leu432Val polymorphism and colorectal cancer risk among Caucasians: a meta-analysis. *Tumor Biology* 33, 809–816.
- Yila, T.A., Sasaki, S., Miyashita, C., Braimoh, T.S., Kashino, I., Kobayashi, S., Okada, E., Baba, T., Yoshioka, E., Minakami, H., Endo, T., Sengoku, K., Kishi, R., 2012. Effects of maternal 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and tobacco smoking on infant birth weight in a Japanese population. *Journal of Epidemiology* 22, 91–102.
- Yu, L., Sun, L., Jiang, Y., Lu, B., Sun, D., Zhu, L., 2012. Interactions between CYP1A1 polymorphisms and cigarette smoking are associated with the risk of hepatocellular carcinoma: evidence from epidemiological studies. *Molecular Biology Reports* 39, 6641–6646.
- Ziegler, D.M., 1991. Bioactivation of xenobiotics by flavin-containing monooxygenases. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 283, 41–50.

環境化学物質曝露の次世代影響の解明における エピジェネティクス研究

安住 薫¹⁾, 小林 祥子¹⁾, 岸 玲子¹⁾

要 旨

環境化学物質の胎児期の曝露が、児の発育・発達、疾病に影響を及ぼすことが明らかになりつつある。その作用機序の解明に、最近、エピジェネティクスが注目されている。2012年までに報告された、胎児期環境化学物質曝露が児ゲノムDNAのメチル化に与える影響を調べた疫学研究の文献レビューを行った結果、喫煙由来や多環芳香族炭化水素などの環境化学物質の曝露により、児ゲノムDNAのメチル化状態が変化することが確認された。曝露要因の中では、妊娠中の母親の喫煙がDNAメチル化に与える影響を調べた報告が最も多かった。DNAメチル化の変化は蓄積することによって遺伝子発現を変化させるため、胎児期の化学物質曝露によって生じる児ゲノムDNAメチル化の変化は、胎児の発育・発達への影響のみならず、出生後の児の健康リスクに影響を及ぼすことが示唆された。

Key words: 環境化学物質, 胎児期曝露, エピジェネティクス, DNAメチル化, 喫煙

1. はじめに

現代の先進国では、多種多様な化学物質を原材料とした化学製品が、私たちに便利で快適な生活を提供している。一方で、私たちは環境中の化学物質に常に曝露されており、これらの化学物質の人体への影響が懸念されている。特に胎児期においては、母体経由の化学物質への曝露が胎児の発育、あるいは出生後の児の健康に影響を及ぼすことがColbornらにより指摘され

た¹⁾。また、Barkerらは、胎児期の低栄養などの環境が、成人後の循環器疾患や2型糖尿病などの生活習慣病罹患率に影響を及ぼす「胎児プログラミング仮説」を提唱した²⁾。この仮説は、GluckmanとHansonらによって、胎児期に加えて乳幼児期の環境もその後の健康に影響する「Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)」の概念となり³⁾、これらの仮説を検証する研究が精力的になされている。さらに最近では、胎児期のプログラミングのメカニズムを明らかにするために、遺伝要因と環境要因の交互作用の解析への関心も高まっている。

欧州⁴⁾、米国⁵⁾、台湾⁶⁾ではすでに複数の出生コホートが立ち上がり、両親のライフスタイルや妊娠中の母親への環境化学物質曝露が児の健康に及ぼす影響を解明する研究がなされているが、日本においては、我々のグループが初めて2001年に「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」を立ち上げ、これまでに、札幌市内514人の小規模コホートおよび北海道全域20,000人の大規模コホートの二つの追跡型疫学研究を実施してきた⁷⁾。この研究により、母親血液中のダイオキシン類濃度が高いほど、児の出生体重が有意に低く、また、生後の中耳炎罹患率が有意に高いこと、この影響は男児で顕著であることが明らかになった。さらに、母親の妊娠中の喫煙によって児の出生体重が有意に低下し、化学物質の解毒に関与する母親AHR遺伝子とCYP1A1遺伝子、CYP1A1遺伝子とGSTM1遺伝子の特定の塩基配列の組み合わせで児の出生体重への影響が大きいことなどが明らかになった。これらの成果からも、遺伝要因と環境要因の相互作用が児の発育に影響を及ぼすことが示唆されている。

このように、生活環境中の化学物質に胎児期に曝露することにより、胎児、あるいは出生後の児の健康に負の影響が生じることが明らかになりつつあるが、その分子メカニズムについては、まだ詳細は明らかではない。しかしながら、その作用機序の解明の一つのアプローチとして、エピジェネティクスが注目を集めている。

本稿では、最初エピジェネティクスと健康影響につ

1) 北海道大学環境健康科学研究教育センター
 連絡先：安住 薫
 〒060-0812 札幌市北区北12条西7丁目
 北海道大学中央キャンパス総合研究棟1号館
 北海道大学環境健康科学研究教育センター
 TEL : 011-706-4748
 FAX : 011-706-4725
 E-mail : kaoru@pharm.hokudai.ac.jp

いて基礎的な解説を行い、次いで、最近、報告が急増している、胎児期の環境化学物質曝露とエピジェネティクスに関する疫学研究を紹介し、最後に、今後の研究課題について考察する。

II. エピジェネティクスと健康影響

近年、ゲノムワイドな一塩基多型 (SNPs) 解析法を用いて、疾患の原因遺伝子の探索が精力的になされているが、単一、あるいは数個の遺伝子の異常のみで説明のつく疾患はごくわずかである。一方、遺伝子は正常であるにもかかわらず、その発現を調節する後天的 (エピジェネティック) な制御が異常なために発症する疾患がわかってきた。

エピジェネティクスは、一般的に「DNAの塩基配列の変化を伴わずに、後天的な修飾により遺伝子の発現を調節するしくみ (に基づいた遺伝学)」と定義されている⁹⁾。生物の体は設計図である遺伝子によって作られるが、必要な遺伝子を必要なタイミングで働かせる「遺伝子発現制御」のしくみがあることによって、1個の受精卵から、同じ遺伝情報を持つにもかかわらず、形や機能の異なる様々な組織や臓器が作り出され、その状態が維持されている。この「後天的な修飾による遺伝子発現制御」のメカニズムを解明するのがエピジェネティクス研

究といえる。エピジェネティックな遺伝子発現制御のしくみを模式的に図1、2に示した。エピジェネティックな修飾機構は、1) DNAのメチル化 (ゲノムDNA中のCpG配列中のシトシンをメチル化して、転写因子などの結合を阻害することによって遺伝子の転写や発現を調節)、2) ヒストンの翻訳後修飾 (ヒストンをアセチル化またはメチル化することにより、クロマチン構造を変化させ、遺伝子の転写や発現を調節)、3) クロマチンリモデリング (クロマチン構造を凝縮、あるいは弛緩させることにより、転写因子などの結合を調節して遺伝子の転写や発現を制御)、で成り立っており、このようなエピジェネティックに修飾されたゲノムはエピゲノム (epigenome) と呼ばれている⁹⁾。本稿では、エピジェネティックな修飾として最もよく調べられている「DNAメチル化」に焦点をあてた。

「DNAメチル化」は遺伝子を働かせるスイッチをON/OFFにする際の目印の役目をしている。ゲノム上には、遺伝子の発現を制御している部分 (プロモーター) があり、その部分がメチル化されると転写因子などが結合することが阻害され、結果としてその遺伝子から蛋白質は作られなくなる (図2)。細胞が分裂し、DNAが複製される際には、メチル化されている部位も同様に複製され、エピジェネティックな目印も細胞分裂と共に受け

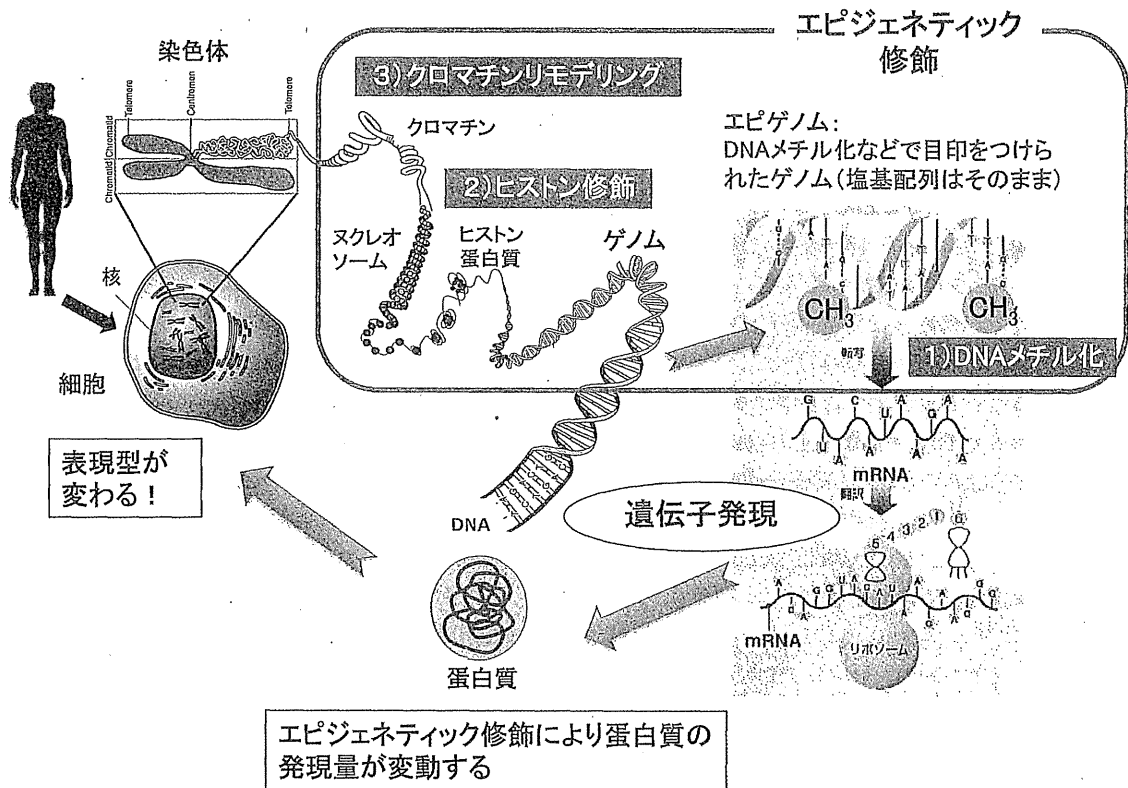


図1 エピジェネティクスのしくみ (National Human Genome Research Instituteのイラストを用いて作成)

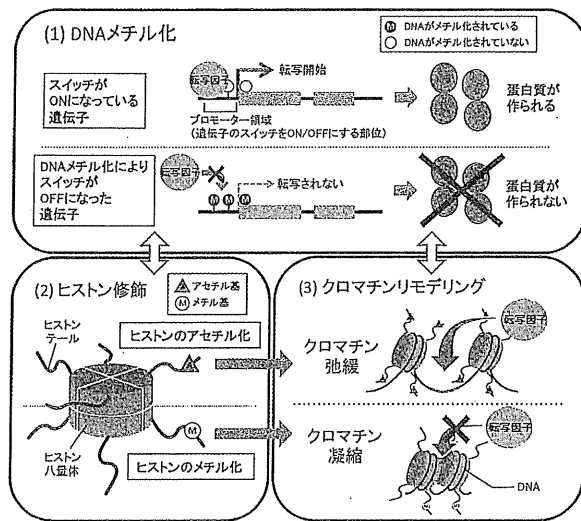


図2 エピジェネティック修飾による遺伝子発現制御機構

継がれていくことが知られている¹⁰⁾。ゲノムDNAに目印のメチル基をつけるしくみについては、核内のメチル基転移酵素が、ゲノム上のCpGという2塩基配列の内、C (シトシン) にメチル基を結合させることがわかっている。このCpGが連続した部位はCpGアイランドと呼ばれ、ほ乳類のゲノム上に広く存在し、特にヒトの遺伝子では、約6割の遺伝子プロモーターにこのCpGアイランドが存在しているといわれている¹¹⁾。また、マウスでは、母親が葉酸・ビタミンB₁₂などメチル基供与体を過剰に摂取することで、胎内で仔の遺伝子が過剰にメチル化され、仔の表現型が大きく変化することも報告されている^{12, 13)}。

エピジェネティックな修飾の特徴として、外的な環境因子の影響を受けやすいことが知られている。たとえば、一卵性双生児では、ゲノムの遺伝情報が同じであるにもかかわらず、その身体的特徴および性格や嗜好に違いが見られ、病気の発症の有無や症状の程度に差が見られる。これらの両者の「違い」は幼少期には小さく、成長するに従って大きくなる。この違いを生じさせているのが、環境因子によるエピジェネティックな修飾状態の違いと考えられている。事実、一卵性双生児の血液DNAのメチル化パターンを調べた研究では、同一家庭で生育していた3歳児の時には、両者のゲノムDNAのメチル化パターンはよく似ていたが、成長して別々の環境で過ごした50歳時の血液ゲノムDNAのメチル化パターンは大きく異なっていた¹⁴⁾。

エピジェネティックな修飾の異常と病気との関連についても近年、精力的に研究されている。環境や生活習慣などの外部からの刺激や老化により、エピジェネティックな修飾状態に変化が生じ、通常とは異なる遺伝子発現

の状態になり、がんなどの病気が発生することがわかってきた。特にがん組織では、1) ゲノム全体のDNAメチル化レベルが低下して染色体の不安定性が増大すること、2) がん抑制遺伝子のプロモーター領域が特異的に高メチル化され、がん抑制遺伝子の発現が抑制されていること、3) メチル化シトシンからチミンへの自然変換が遺伝子の変異の30%程度を占めることなどが明らかになっている^{8, 15)}。これらの結果からも、がん細胞には先天的な遺伝子異常に加えて、様々なエピジェネティックな異常が蓄積していることが推測される。また、ゲノム全体の低メチル化と特定の遺伝子のプロモーターが高メチル化される現象は、一見矛盾するようであるが、制御メカニズムが異なるためと考えられている。

エピジェネティックな修飾の異常の次世代への影響については、化学物質に胎内で曝露した仔のゲノムにエピジェネティックな修飾状態の変化が生じ、仔の表現型が変化すること¹³⁾、その影響は孫世代へも受け継がれる可能性があることなどが動物実験で明らかになりつつある¹⁶⁾。ヒトにおいても同様の影響を調べるため、出生コーホートを有するいくつかの国で、疫学研究が始まっている。以下に、環境化学物質の胎児期曝露とゲノムのDNAメチル化に関する疫学研究の文献調査結果を示す。

III. 胎児期環境化学物質曝露とDNAメチル化に関する疫学研究

(1) 疫学研究の動向

英語の原著論文については、PubMedを用いて「DNA methylation exposure cord blood」および「methylation exposure (pregnancy OR birth)」(2000年以降2012年まで)で検索した。多数ヒットしたが、胎児期化学物質曝露のDNAメチル化への影響を調べた疫学研究は19報であった(総説等は除いた)。日本語論文については、医中誌データベースを用い、「メチル化 曝露 化学物質」のキーワードで同一期間の検索を行ったが、該当する日本語の原著論文および、国内外の疫学研究を網羅した総説はなかった。

英語原著論文19報の中で、曝露要因としては、妊娠中の喫煙(能動喫煙)が10報¹⁷⁻²⁰⁾と最も多く(表1)、喫煙以外の曝露では、多環芳香族炭化水素(PAHs)が3報²⁷⁻²⁹⁾、有機フッ素化合物(PFCs)²¹⁾、有機塩素系化合物(DDE)³⁰⁾が各1報、天然由来のヒ素(3報)³¹⁻³³⁾および鉛³⁴⁾があった(表2)。この分野の疫学研究の報告はまだ多くはないが、2008年から2011年まで年に1~4報だった報告が、2012年には8報と急に増えており、今後、各国でさらに精力的に研究が行われていくことが予想される。また、現時点では、日本で行われた研究の

表1 タバコ由来化学物質(喫煙)の胎児期曝露とDNAメチル化

	著者/年/国	対象者	曝露評価	DNAメチル化解析(測定方法)	DNA抽出組織	対象メチル化領域	結果
遺伝子特異的DNAメチル化	Murphyら/2012/USA ¹⁷⁾	前向き出生コホート 母児418組	妊娠中の喫煙の有無(質問票) (※生涯の喫煙本数が100本未満の場合=非喫煙者に分類)	臍帯血遺伝子領域のメチル化率(パイロシーケンス法)	臍帯血	IGF2 DMR H19 DMR	・胎児期喫煙曝露で、非喫煙者・元喫煙者群と比べIGF2 DMRが2.86%、3.63%高メチル化(p=0.002, p=0.001) ・男女別で男児でのみ喫煙曝露でIGF2高メチル化(vs妊娠中禁煙群 +6.5%, p<0.0001; vs非喫煙群 +4.7%, p=0.0002) ・H19 DMRは有意差なし
	Bretonら/2009/USA ¹⁸⁾	後ろ向きコホート 小児(4~7歳児) ①②272名 ③348名	妊娠中の喫煙の有無(質問票) (調整因子として妊娠中の受動喫煙状況)	①メチル化レベルに差のあるCpGサイトのスクリーニング(Illumina GoldenGate Cancer methylation panel, Illumina社) ②③パイロシーケンス法	口腔細胞	①807遺伝子, 1505CpGサイト ②遺伝子特異的メチル化(AXL, PTPRO) ③ゲノム全体のDNAメチル化レベル(Alu, LINE-1)	・胎児期喫煙曝露で小児口腔細胞AXL高メチル化($\beta=0.37$, p=0.005), PTPRO高メチル化($\beta=0.34$, p=0.02) ・胎児期喫煙曝露でAlu低メチル化($\beta=-0.31$, p=0.03)、LINE-1メチル化は影響なし(妊娠中の受動喫煙状況で調整しても上記結果は変わらなかった)
	Toledo-Rodriguezら/2010/UK ¹⁹⁾	後ろ向きコホート 思春期男女156名(カナダ)	妊娠中の喫煙(中期以降1日1本以上)の有無(質問票)	バイサルファイトシーケンス法	末梢血	BDNF-6	・胎児期喫煙曝露によりBDNF-6エクソン高メチル化($\chi^2(1, 4081) = 10.16$, p=0.0014)
	Suterら/2010/USA ²⁰⁾	前向き出生コホート 母児34組	妊娠中(登録時)の喫煙の有無(質問票)	バイサルファイトシーケンス法	胎盤	CYPファミリープロモーター領域	・胎児期喫煙曝露でCYP1A1プロモーターXRE領域が9.7%低メチル化(p=0.027) ・CYP1A1 XRE領域メチル化は胎盤CYP1A1遺伝子発現と負の相関($r=-0.737$, p=0.007)
ゲノム全体のDNAメチル化	Guerrero-Prestonら/2010/USA ²¹⁾	前向き出生コホート 母児30組	臍帯血血清中のコチニン濃度(LCタンデム質量分析)	臍帯血血清中のグローバルDNAメチル化率(ELISA法)	臍帯血血清	ゲノム全体のDNAメチル化レベル(5mC)	・臍帯血コチニン濃度とゲノム全体のDNAメチル化率に負の相関($r=-0.62$, p<0.001; 未調整モデル)
	Flomら/2011/USA ²²⁾	前向き出生コホート 成人女性90名(1959-63年 出生)	妊娠中の喫煙の有無(出生時質問票) ※1959-63年時	MethylLight法(メチル化・非メチル化CpG識別)	末梢血	ゲノム全体のDNAメチル化レベル(Sat2, Alu, LINE-1)	・胎児期喫煙曝露と43歳時末梢血Sat2メチル化とは負の相関($\beta=-0.22$, 95%CI= [-0.40, -0.03]) ・LINE-1・Aluメチル化とは有意な関連なし
	Terryら/2008/USA ²³⁾	前向き出生コホート 成人女性85名(1959-63年 出生)	妊娠中の喫煙の有無(出生時質問票) ※1959-63年時	[³ H]-methyl acceptance assay	末梢血	ゲノム全体のDNAメチル化レベル	・胎児期喫煙曝露により、43歳時末梢血ゲノム全体が高メチル化($\beta=-0.38$, 95%CI= [-0.70, -0.07]) ※メチル化測定結果はln DPM/ μ g表記のため、値が大きいほどメチル化は低い
	Wilhelm-Benartziら/2012/USA ²⁴⁾	前向き出生コホート 母児 ①380組 ②184組	妊娠中の喫煙の有無(質問票)	①パイロシーケンス法 ②網羅的メチル化解析(Infinium HumanMethylation27 BeadChip, Illumina社, 14,000遺伝子, 27,000CpGサイト搭載)	胎盤	①ゲノム全体のDNAメチル化レベル(Alu, LINE-1) ②ポリコム関連遺伝子群(ヒストン修飾など)に関与)	・胎児期喫煙曝露により胎盤Aluが1.4%高メチル化(p<0.01) ・LINE-1は有意差なし ・Aluメチル化とポリコム関連遺伝子群メチル化率は関連あり(p<0.01)
網羅的DNAメチル化解析	Joubertら/2012/USA ²⁵⁾	前向き出生コホート 2つのコホートの母児 ①1062組(ノルウェー) ②36組(USA, 母喫煙: 非喫煙=1:1)	妊婦血液中のコチニン濃度(LCタンデム質量分析) 妊娠中の喫煙の有無(質問票)	網羅的メチル化解析(Infinium HumanMethylation450 BeadChip, Illumina社, 45万CpGサイト搭載)	臍帯血	ゲノムDNAの全メチル化サイト	・10個の遺伝子上の26カ所のCpGサイトのメチル化レベルと母体血中コチニン濃度に強い関連性あり(p<1.06 \times 10 ⁻⁹) ・母コチニン高濃度群・喫煙曝露群双方でAHRH 1CpGサイト($\beta=-0.198$)・GFII 2CpGサイト($\beta=0.188$, -0.198)低メチル化、CYP1A1 2CpGサイト($\beta=0.044$, 0.065)が高メチル化(全てp<0.0019)
	Suterら/2011/USA ²⁶⁾	コホート内コホート研究 母児 ①36組: Discovery cohort ②18組: Validation cohort (各母喫煙: 非喫煙=1:1)	妊娠中の喫煙の有無(質問票)	①②網羅的メチル化解析(Infinium HumanMethylation27 BeadChip, Illumina社, 14,000遺伝子, 27,000CpGサイト搭載)	胎盤	ゲノムDNAのメチル化サイト	・胎児期喫煙曝露により623の遺伝子発現と1024CpGサイトが有意に変化 ・うち10%以上メチル化が変化していたCpGは38ヶ所 ・38CpG中、6ヶ所は喫煙による低体重に関連

遺伝子等名称: IGF2 DMR (Insulin-like growth factor 2 differentially methylated region), H19 DMR (H19 differentially methylated region), AXL (AXL receptor tyrosine kinase), PTPRO (protein tyrosine phosphatase, receptor type, O), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), CYP (cytochrome P450 family 1 subfamily A polypeptide 1), XRE (xenobiotic response element), AHRH (aryl-hydrocarbon receptor repressor), GFII (growth factor independent 1 transcription repressor)

表2 喫煙以外の環境化学物質の胎児期曝露とDNAメチル化

曝露物質	著者/年/国	対象者	曝露評価	DNAメチル化解析(測定方法)	DNA抽出組織	対象メチル化領域	結果
多環芳香族炭化水素(PAH)	Pereraら/2009/USA ²⁷⁾	出生コホート ①母児20組(ケーススタディ) ②5歳児56名	妊婦PAHs(大気中)曝露レベル (GC質量分析)	臍帯血DNAのメチル化部位を網羅的に解析(methylation sensitive restriction fingerprinting法)	臍帯血	ゲノムDNAの全メチル化サイト	・PAH高曝露群でACSL3遺伝子高メチル化(OR=13.8, 95%CI=[3.8, 50.2], p<0.001) ・PAH曝露濃度はACSL3高メチル化群>低メチル化群(p<0.001)、高メチル化群で5歳までの喘息発症リスクが高くなる(OR=3.9, 95%CI=[1.1, 14.3], p=0.03)
	Herbstmanら/2012/USA ²⁸⁾	縦断的コホート 母児164組	妊婦PAHs(大気中)曝露レベル (GC質量分析)	臍帯血DNAのメチル化レベル(ELISA法) 臍帯血中のBaP-DNA付加体濃度(HPLC)	臍帯血	ゲノム全体のDNAメチル化レベル(5mC)	・胎児期PAH曝露は、臍帯血DNAメチル化レベルと弱い負の相関($\beta = -0.11$, 95% CI=[-0.21, 0.00], p=0.05)
	Tangら/2012/USA ²⁹⁾	前向き出生コホート 母児53組	妊婦PAHs(大気中)曝露レベル (GC質量分析)	臍帯血DNAのメチル化(バイサルファイトシークエンス法)	臍帯血	IFN γ プロモーター	・妊婦PAHs曝露レベルと児臍帯血IFN γ プロモーター2領域のメチル化率は正の相関あり($\beta = -0.107$, p<0.01; $\beta = -0.115$, p<0.001)
有機フッ素化合物(PFCs)	Guerrero-Prestonら/2010/USA ³⁰⁾	前向き出生コホート 母児30組	臍帯血血清中の有機フッ素化合物濃度(LCタンデム質量分析)	臍帯血血清中のグローバルDNAメチル化率(ELISA法)(臍帯血血清から単離したDNAのメチル化シトシンをELISA法で定量)	臍帯血血清	ゲノム全体のDNAメチル化レベル(5mC)	・臍帯血血清DNAメチル化率は、血清PFOA濃度と負の関連があったが有意ではなかった($r = -0.35$, $\beta = -7.59$, p=0.06; 未調整モデル) ・PFOS濃度とは相関はなし
DDE	Moralesら/2012/Spain ³¹⁾	2つの出生コホート4-6歳児 ①Menorca(122名) ②Sabadell(236名)	臍帯血血清DDE濃度 (GC質量分析)	喘鳴の症状の有無4歳児血液DNA網羅的DNAメチル化解析(Illumina GoldenGate Panel I)(バイロシークエンス法)	4歳児血液	ゲノムDNAの全メチル化サイト	・喘鳴症状のある児で、ALOX12が有意に低メチル化(p=0.003) ・①では臍帯血血清中のDDE高濃度群で、ALOX12が3.5%低メチル化した(p=0.033)が、②では有意差なし(p=0.377)
ヒ素	Kileら/2012/Taiwan ³²⁾	前向き出生コホート(バンガラディッシュ) 母児113組	飲料水および妊婦尿中のヒ素濃度(ICP質量分析)	母体血、臍帯血DNAメチル化率(バイロシークエンス法)	母体血 臍帯血	ゲノム全体のDNAメチル化レベル(Alu, LINE-1) がん抑制遺伝子(p16, p53)プロモーター	・母尿中ヒ素高濃度群で、LINE-1が臍帯血で1.36%(p=0.002)、母体血で1.08%(p=0.04)、高メチル化 ・母尿中ヒ素・飲料水中ヒ素曝露とAluメチル化とは関連なし ・ヒ素曝露によりがん抑制遺伝子p16プロモーターが臍帯血で高メチル化の傾向(有意ではない)
	Intarasunanontら/2012/Thailand ³³⁾	2重コホート研究 母児71組(ヒ素曝露55組、非曝露16組)	飲料水および臍帯血、母の爪、毛髪中のヒ素濃度(ICP質量分析)	臍帯血DNAメチル化率(COBRA法, HPLC-MS/MS)	臍帯血	ゲノム全体のDNAメチル化レベル(LINE-1) がん抑制遺伝子(p53)プロモーター	・爪のヒ素検出量とp53プロモーター領域のメチル化に正の相関あり(足の爪 $r = 0.25$, p<0.05; 手の爪 $r = 0.15$, p<0.05) ・ヒ素曝露とLINE-1メチル化は関連なし
	Pilsnerら/2012/USA ³⁴⁾	前向き出生コホート(バンガラディッシュ) 母児101組	母尿、血液、臍帯血中のヒ素濃度(ICP質量分析)	母体血、臍帯血DNAメチル化率([³ H]-methyl-incorporation assay, バイロシークエンス法, LUMA法)	母体血 臍帯血	ゲノム全体のDNAメチル化レベル(Alu, LINE-1)	・母尿中のヒ素濃度の増加は、臍帯血DNAゲノム全体のメチル化率の増加と関連 ・ヒ素曝露とAlu, LINE-1, LUMAのメチル化との正の相関が男児で示唆(p>0.05)、女児ではなし
鉛	Pilsnerら/2009/USA ³⁵⁾	出生コホート(メキシコ) 母児103組	母体骨鉛レベル(蛍光X線分析)	臍帯血DNAメチル化率(バイロシークエンス法)	臍帯血	ゲノム全体のDNAメチル化レベル(Alu, LINE-1)	・母体骨の鉛レベルと臍帯血Aluのメチル化に負の相関あり($\beta = -0.027$, p=0.01)、LINE-1のメチル化とは負の関連が示唆($\beta = -0.025$, p=0.08)

遺伝子等名称: ACSL3 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 3), IFN γ (interferon, gamma), ALOX12 (arachidonate 12-lipoxygenase), DDE (dichlorodiphenyldichloroethylene)

表3 胎児期環境化学物質曝露でDNAメチル化状態が変化する遺伝子

遺伝子・領域	正式名称	役割	関連のあるアウトカム	胎児期曝露
<i>IGF2</i>	インスリン様成長因子2 Insulin-like growth factor 2	有糸分裂促進因子 (母由来アレルで高メチル化)	胎児期成長制限	喫煙曝露により高メチル化 (男児) ¹⁷⁾
<i>H19</i>	H19	IGF2転写調節 (父由来アレルで高メチル化)	胎児期成長制限	喫煙曝露と関連なし ¹⁷⁾
<i>CYP1A1</i>	シトクロムP450 cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	薬物代謝経路 (有毒な親水性DNA付加体への変換)	胎児期成長制限 がん	喫煙曝露により高メチル化 (臍帯血) ²³⁾ 、もしくは低メチル化 (胎盤) ²⁰⁾
<i>AHRR</i>	芳香族炭化水素受容体レセプター aryl-hydrocarbon receptor repressor	薬物代謝経路 (AhRを負に調節、CYP1A1転写抑制)	胎児期成長制限 がん	喫煙曝露により低メチル化 ²³⁾
<i>GFI1</i>	growth factor independent 1 transcription repressor	ヒストン修飾 (造血細胞・内耳・肺神経内分泌系の 発生過程に関与)	がん 自己免疫疾患	喫煙曝露により低メチル化 ²³⁾
<i>AXL</i>	AXL receptor tyrosine kinase	Gas6/Axlシグナル経路 (抗アポトーシス・細胞分裂促進・細胞 移動などに関与)	がん 循環器疾患 自己免疫疾患	喫煙曝露により高メチル化 ¹⁸⁾
<i>p16</i>	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 2A Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	がん抑制遺伝子 (細胞周期調節)	がん	ヒ素曝露により高メチル化傾向 ³¹⁾
<i>p53</i>	protein 53	がん抑制遺伝子 (細胞周期調節)	がん	ヒ素曝露により高メチル化 ³²⁾
<i>PTPRO</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	胎児期のニューロンの分化・軸索伸長 に関与	神経系発達	喫煙曝露により高メチル化 ¹⁸⁾
<i>BDNF-6</i>	脳由来神経栄養因子6 Brain-derived neurotrophic factor 6	ニューロンの軸索伸長 (学習・記憶・脳の可塑性に関与)	神経系発達	喫煙曝露により高メチル化 ¹⁸⁾
<i>ACSL3</i>	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	脂肪酸代謝	喘息	PAHs曝露により高メチル化 ²⁷⁾
<i>IFNγ</i>	インターフェロン γ Interferon γ	Th1サイトカイン (Th2細胞分化抑制)	喘息	PAHs曝露により高メチル化 ²⁹⁾
<i>ALOX12</i>	アラキドン酸-12-リポキシゲナーゼ arachidonate 12-lipoxygenase ¹⁾	リポキシゲナーゼ (アラキドン酸を12[S]-HETEに代謝)	喘息	DDE曝露により低メチル化 ³⁰⁾
<i>LINE-1*</i>	長鎖散在反復配列 long interspersed nucleotide element	レトロトランスポゾン型 長鎖散在反 復配列 (LINEs) ゲノム全体の約20%を占める	—	ヒ素曝露により高メチル化 ^{31,33)}
<i>Alu*</i>	短鎖散在反復配列 の一種 short interspersed nucleotide element	レトロトランスポゾン型 短鎖散在反 復配列 (SINE) ゲノム全体の約10%を占める	—	喫煙曝露により高メチル化 (胎盤) ²⁴⁾ もしくは低メチル化 (口腔細胞) ¹⁹⁾ 、 または関連なし 鉛曝露により低メチル化 ³⁰⁾ ヒ素曝露により高メチル化傾向 ³²⁾
<i>Sat2*</i>	juxtacentromeric satellite 2	セントロメア近傍の反復配列	—	喫煙曝露により低メチル化 ²³⁾

*は遺伝子をコードしていない領域

報告はまだなく、遺伝的背景の違いによりエピジェネティックな制御に差がみられる^{35, 36)}ことを鑑みても、日本人で同様の研究を進めることが必要である。

DNAメチル化を調べた19報の疫学研究のうち、ゲノム全体のDNAメチル化状態を調べたものが11報と一番多く、メチル化シトシンに対する抗体を用いたELISA法でゲノム全体のDNAメチル化率を調べる方法や、LINE-1、Aluなどの反復配列 (ゲノムの半分以上を占める、遺伝子をコードしていない領域) のメチル化率をゲノム全体のDNAメチル化率の指標として測定する方法が用いられている。また、ヒトゲノム上のメチル化されるほぼすべてのCpGアイランド (45万カ所) を1枚の基盤上に搭載したDNAチップが開発されており、化学物質曝露によってメチル化が変化する遺伝子の網羅的探索を行った研究もすでに4報あった。胎児期の環境化学物質曝露でDNAメチル化が変化する遺伝子の詳細は

表3にまとめた。

DNAメチル化解析の対象とした組織については、19報の内10報で、臍帯血のDNAメチル化を測定し、胎児期曝露の影響を評価していた。5報では、出生以後 (小児期、思春期、成人後) の末梢血や口腔細胞からDNAを抽出してメチル化を測定し、胎児期曝露による影響を評価していた。また、3報では、胎児の発育との関連から、胎盤のDNAメチル化の変化に着目していた。

(2) 喫煙曝露

胎児期喫煙曝露による低出生体重に関わるメカニズムのひとつとして、IGF2など胎児の発育に関与し、ゲノムインプリンティング制御 (父方・母方由来の染色体で異なるメチル化制御) を受ける遺伝子のDNAメチル化状態の変化が考えられている。Murphyらは2012年、臍帯血DNA (418名) を用いて、妊娠中の母親が喫煙してい

た群では、非喫煙群に比べて男児のIGF2遺伝子のメチル化率が4.7%亢進する ($p=0.0002$) ことを報告した¹⁷⁾。この曝露により、2,500g未満の低体重児が生まれるリスクが4倍以上になることが示された。また、同じコホートでの研究で、臍帯血IGF2遺伝子メチル化率と臍帯血血清IGF2蛋白質濃度との間に負の相関 ($\beta = -9.49$, $p=0.03$) があること、IGF2蛋白質濃度と出生体重との間に正の相関 ($\beta = 0.275$, $p=0.0003$) があることが報告されている³⁷⁾。これらの結果から、男児においては、胎児期喫煙曝露により胎児ゲノムDNAのIGF2遺伝子が高メチル化され、胎児血液中のIGF2蛋白質濃度が低下し、子宮内での胎児発育抑制につながる可能性が示唆された。また、IGF2遺伝子の高メチル化状態は出生後も維持されるため、出生後の健康へのリスクも懸念される。

その他の遺伝子では、胎児期喫煙曝露により、小児 (4~6歳) 口腔細胞でAXL遺伝子 ($\beta = 0.37$, $p=0.005$) およびPTPRO遺伝子 ($\beta = 0.34$, $p=0.02$) の高メチル化¹⁸⁾の報告があった。また、思春期男女末梢血のBDNF-6遺伝子が高メチル化するとの報告もあり¹⁹⁾、胎児期喫煙曝露によりBDNF-6遺伝子の発現量が低下し、眼窩前頭皮質の薄化 (思春期の薬物使用行動と関連) が進行する可能性も指摘されている³⁸⁾。このような、出生後の年数を経た児の血液を用いたメチル化解析の場合は、出生後の環境曝露について質問票等で把握し、重回帰分析の際に交絡要因として調整した上で胎児期の曝露評価をしている。しかしながら、出生後に曝露される様々な環境要因全てを考慮 (調整) して解析することは難しく、臍帯血を使用する場合に比べ、解析精度の低下は否めない。また、母体胎盤組織で解毒酵素であるCYP1A1遺伝子プロモーター領域のメチル化率が9.7%低下し ($p=0.027$)、それによる遺伝子発現の亢進 ($r=-0.737$, $p=0.007$) の報告もあった²⁰⁾。

ゲノム全体のDNAメチル化状態の変化を調べた報告は5報あり、うち1報は臍帯血、3報は出生以後の末梢血・口腔細胞、1報は胎盤を使用していた。臍帯血血清を使用してELISA法でメチル化シトシンを定量した研究では、血清コチニン濃度とゲノム全体のDNAメチル化レベルとの間に負の相関 ($r=-0.62$, $p<0.001$) が見られた²¹⁾。また、成人女性の末梢血を用いた解析では、胎児期喫煙曝露の有無とセントロメア近傍配列Sat2メチル化との間に負の相関 ($\beta = -0.22$, $95\%CI=[-0.40, -0.03]$) が確認されたが、反復配列であるLINE-1やAluメチル化との間には有意な相関は見られなかった²²⁾。また、同じコホートで、三重水素標識メチル基を用いる手法で、胎児期喫煙曝露によりゲノム全体が高メチル化されるとの結果も出されたが、解析手法が一般的でないため、結

果の信頼性に疑問もある^{18, 23)}。小児の口腔細胞を用いた解析では、胎児期喫煙曝露の有無と反復配列Aluのメチル化との間に負の相関 ($\beta = -0.31$, $p=0.03$) がみられた¹⁸⁾。反対に胎盤では、胎児期喫煙曝露によりAluのDNAメチル化率は1.4%亢進される ($p<0.01$) が、LINE-1のメチル化は変化しないとの報告もあり²⁴⁾、組織によって化学物質に対する感受性やエピジェネティックな制御が異なる可能性も考えられる。

さらに、DNAチップを用いた網羅的な解析では、臍帯血DNAで、CYP1A1遺伝子の高メチル化および、AHRR遺伝子やGFII遺伝子の低メチル化 ($\beta = 0.044$, -0.198 , -0.188 , いずれも $p<0.0019$)²⁵⁾が新たに検出された。胎盤では、喫煙曝露によって、623個の遺伝子の発現と、1024カ所のCpGサイトのメチル化が有意に変化していた。この内、メチル化率が10%以上変動したCpGは38カ所あり、低体重に関連する6カ所のCpGサイトが含まれていた。また、PURA, GTF2H2, GCA, GPR135遺伝子の高メチル化および、HKRI遺伝子の低メチル化などが新たに見出された²⁶⁾。喫煙曝露によるこれらの遺伝子のエピジェネティックな変化が、児の発育・発達や疾病にどのような影響を与えるのか、今後の研究が期待される。

(3) 喫煙以外の環境化学物質曝露

Pereraら²⁷⁾は、米国ニューヨーク市の児の喘息罹患率が高い (25%) 原因の一つとして、交通車両から排気される多環芳香族炭化水素 (PAH) への胎児期曝露を考え、700人の出生コホートを用い、PAH曝露レベルの高い妊婦グループと低いグループの各10児の臍帯血DNAのメチル化部位を網羅的に解析して比較した。その結果、PAH曝露レベルが高い児の臍帯血では、脂質代謝に関与するACSL3遺伝子のプロモーター領域が著しく高メチル化 ($OR=13.8$, $95\%CI=[3.8, 50.2]$, $p<0.001$) されており、胎盤でのACSL3蛋白質の発現量も有意に減少していることを見出した。さらに同一コホートの56児で、臍帯血ACSL3遺伝子のメチル化と曝露PAHレベル、5歳時の喘息発症に、いずれも正の関連があることを明らかにした ($OR=3.9$, $95\%CI=[1.1, 14.3]$, $p=0.03$)。これらの結果から、ACSL3遺伝子のDNAメチル化がPAH曝露のエピジェネティックマーカーとなりうると考察している。環境化学物質曝露リスク、あるいは疾病発症リスクを示すエピジェネティックマーカーが見つかれば、曝露のモニタリングや疾病予防に有益である。このようなエピジェネティックマーカーの実用性の証明や、遺伝的背景の異なる人種間での共通性などの検討は、今後の重要な研究課題であろう。

上記以外にも、妊婦の多環芳香族炭化水素 (PAHs) 曝露と臍帯血DNAメチル化を調べた報告は2報あり、PAHs曝露レベルと、臍帯血ゲノム全体のDNAメチル化レベルとの間には弱い負の相関 ($\beta = -0.11$, 95% CI = [-0.21, 0.00], $p = 0.05$)²⁸⁾ が、IFN γ 遺伝子のメチル化との間には正の相関 ($\beta = 0.107$, $p < 0.01$)²⁹⁾ が示されているが、アウトカムとの関連については調べていなかった。

有機フッ素化合物 (PFOS, PFOA) 曝露によるDNAメチル化への影響を調べた報告は1報のみで、臍帯血血清PFOA濃度とゲノム全体のDNAメチル化レベルの間に弱い負の関連が示唆された ($r = -0.35$, $\beta = -7.59$, $p = 0.06$)²⁹⁾。ただし、この報告のサンプルサイズは $N = 30$ と小さいため、規模の大きいコーホートで再確認する必要がある。

かつて殺虫剤として大量に使用され、環境中に残留している有機塩素系化合物の一種DDEについては、あるコーホート臍帯血血清中のDDE高濃度群で、ALOX12遺伝子のメチル化率が3.5%低下していた ($p = 0.033$)³⁰⁾。ALOX12遺伝子は、喘息症状のある4歳児とない児の血液DNAを用いてメチル化部位の網羅的な解析の結果、見出された遺伝子で、喘息症状を持つ児で有意に低メチル化されていた ($p = 0.003$)。ALOX12遺伝子も、化学物質曝露のエピジェネティックマーカーになりえるかもしれない。

東南アジアには、土壌や飲料水から高濃度のヒ素に曝露される地域が存在する。ヒ素には発がん性があるが、肝臓がんを発症しやすい系統のマウスで、妊娠中の母親マウスに無機ヒ素を含む水を摂取させると、生まれたオスの仔の肝臓の発症率が増加することが報告された³¹⁾。これらの仔マウスでは、細胞増殖や癌化を促進するER α 遺伝子のプロモーター領域が低メチル化されており、かつ、ER α 遺伝子の発現も亢進されていることから、無機ヒ素がエピジェネティックな作用を介して発癌に関与すると考えられている。飲料水からの胎児期ヒ素曝露による臍帯血DNAのメチル化の変化を調べた3報の疫学研究では、母体のヒ素曝露濃度の高さと、臍帯血DNAの反復配列LINE-1, Alu, がん抑制遺伝子p53プロモーターのいずれもの高メチル化が相関することが報告されている³¹⁻³³⁾。鉛曝露については、母体骨の鉛レベルと臍帯血の反復配列Alu ($\beta = -0.027$, $p = 0.01$) に負の相関が見られている³⁴⁾。

IV. まとめ

近年、生命科学分野でエピジェネティクス研究が急激に進展した背景には、解析技術の著しい進歩が挙げられる。ゲノム上のメチル基が結合している部位の同定に、

パイロシーケンス法などが考案され、ハイスループットな解析機器も開発されている。また、ヒトゲノム上のメチル化されうるほぼ全部のCpG配列が搭載されたDNAチップを用いて、短時間で、細胞あるいは組織ゲノム全体のDNAメチル化パターンを知ることにもできるようになった。しかしながら、今回の文献レビューを通して、現段階では、胎児期の環境化学物質曝露によるエピジェネティックな変化の統一的な見解はまだ得られていないと思われた。疫学研究の多くでは、動物実験の結果のように化学物質の曝露による遺伝子のメチル化の変化と、蛋白質レベルの変化、あるいはアウトカム (表現型) の変化が必ずしもすぐには結びつかず、遺伝的、環境的背景が異なるヒトの集団を対象にした疫学研究の難しさも考えられる。遺伝子の突然変異は、その部位が蛋白質の機能発現に重要な場合、ストレートに表現型の変化が現れる。一方、エピジェネティックな遺伝子発現制御は、メチル化部位に変化が多少生じてはすぐには影響が現れず、それらが蓄積され、閾値を越えると遺伝子発現に影響が出ると考えられている。胎児期に環境化学物質に曝露することにより生じた、児ゲノムへのエピジェネティックな「変化」は、出生後の成長過程でさらに様々な環境要因に曝露されることにより蓄積され、将来、疾病発症リスクへとつながる可能性がある。

V. 今後の課題

環境化学物質の児の健康影響の解明におけるエピジェネティクス研究はまだ緒についたばかりである。今後の基礎研究の課題としては、1) DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化とメチル化、およびそれらの逆反応の詳細な分子メカニズムの解明、2) モデル動物やヒト細胞株を用いた、組織ごとのエピジェネティックな制御機構の解明が重要である。また、疫学研究としては、環境化学物質による胎児期曝露の結果生じた児ゲノム上のエピジェネティックな変化が、出生後の児の成長過程でどのように維持、あるいは変化していくのか、また、発育・発達や疾病とどのように関わるのか、肥満・がん・ADHD・生活習慣病などをアウトカムに設定したコーホート研究や症例対象研究などで追跡することが必要であろう。そのような地道な研究の積み重ねの上に、将来、児の臍帯血のメチル化パターンから、成長後の健康リスクの評価ができるようになり、かつ、DNAメチル化の可逆性を利用した (メチル化状態を正常に戻す) 薬の開発や、栄養・運動エクササイズ、あるいは禁煙などの行動変容を含むヘルスプロモーション等、有効な予防策を講じることもできるようになると考えられる。

引用文献

- 1) Colborn T, Dumanoski D, Myers JP. Our Stolen Future. Dutton, New York, 1996.
- 2) Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986 ; 1 : 1077-1081.
- 3) Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004 ; 305 : 1733-1736.
- 4) Govarts E, Nieuwenhuijsen M, Schoeters G, et al. Birth weight and prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) : a meta-analysis within 12 European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect* 2012 ; 120 (2) : 162-170.
- 5) Goodman JE, Kerper LE, Boyce CP, Prueitt RL, et al. Weight-of-evidence analysis of human exposures to dioxins and dioxin-like compounds and associations with thyroid hormone levels during early development. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010 ; 58 (1) : 79-99.
- 6) Hsieh CJ, Hsieh WS, Su YN, et al. The Taiwan Birth Panel Study: a prospective cohort study for environmentally-related child health. *BMC Res Notes* 2011 ; 12 (4) : 291.
- 7) 岸玲子, 佐々木成子. 環境化学物質の次世代影響に関するわが国における研究事例—北海道スタディの概要とこれまでの成果. *医学のあゆみ* 2010 ; 235 : 1117-1121.
- 8) 中尾光善. 特集を読むまえに 基礎の基礎 (特集 疾患 エピジェネティクス—解明の糸口はゲノム情報の表現にあり). *細胞工学* 2009 ; 28 (6) : 522-527.
- 9) Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007 ; 128 (4) : 635-638.
- 10) Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, et al. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res* 2003 ; 13 (5) : 868-874.
- 11) Allis CD, Jenuwein T, Danny R, et al. *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York, 2009 ; 345-346.
- 12) Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 (15) : 5293-300.
- 13) Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 ; 104 (32) : 13056-13061.
- 14) Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Nat Acad Sci* 2005 ; 102 (30) : 10413-10414.
- 15) 豊田実, 鈴木拓, 甲斐正広. 疾患とエピゲノム解析. *生化学* 2010 ; 82 (8) : 693-701.
- 16) Rehan VK, Liu J, Naeem E, et al. Perinatal nicotine exposure induces asthma in second generation offspring. *BMC Med* 2012 ; 10 (1) : 129.
- 17) Murphy SK, Adigun A, Huang Z, et al. Gender-specific methylation differences in relation to prenatal exposure to cigarette smoke. *Gene* 2012 ; 494 (1) : 36-43.
- 18) Breton CV, Byun HM, Wenten M, et al. Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 ; 180 (5) : 462-467.
- 19) Toledo-Rodriguez M, Lotfpour S, Leonard G, et al. Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010 ; 153B (7) : 1350-1354.
- 20) Suter M, Abramovici A, Showalter L, et al. In utero tobacco exposure epigenetically modifies placental CYP1A1 expression. *Metabolism* 2010 ; 59 (10) : 1481-1490.
- 21) Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, et al. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics* 2010 ; 5 (6) : 539-546.
- 22) Flom JD, Ferris JS, Liao Y, et al. Prenatal smoke exposure and genomic DNA methylation in a multiethnic birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011 ; 20 (12) : 2518-2523.
- 23) Terry MB, Ferris JS, Pilsner R, et al. Genomic DNA methylation among women in a multiethnic New York City birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 ; 17 (9) : 2306-2310.
- 24) Wilhelm-Benartzi CS, Houseman EA, Maccani MA, et al. In utero exposures, infant growth, and DNA methylation of repetitive elements and developmentally related genes in human placenta. *Environ Health Perspect* 2012 ; 120 (2) : 296-302.

- 25) Joubert BR, Häberg SE, Nilsen RM, et al. 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2012 ; 120 (10) : 1425-1431.
- 26) Suter M, Ma J, Harris A, et al. Maternal tobacco use modestly alters correlated epigenome-wide placental DNA methylation and gene expression. *Epigenetics* 2011 ; 6 (11) : 1284-1294.
- 27) Perera F, Tang WY, Herbstman J, et al. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One* 2009 ; 4 (2) : e4488.
- 28) Herbstman JB, Tang D, Zhu D, et al. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[a]pyrene-DNA adducts, and genomic DNA methylation in cord blood. *Environ Health Perspect* 2012 ; 120 (5) : 733-738.
- 29) Tang WY, Levin L, Talaska G, et al. Maternal Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and 5'-CpG Methylation of Interferon- γ in Cord White Blood Cells. *Environ Health Perspect* 2012 ; 120 (8) : 1195-1200.
- 30) Morales E, Bustamante M, Vilahur N, et al. DNA hypomethylation at ALOX12 is associated with persistent wheezing in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 2012 ; 185 (9) : 937-943.
- 31) Kile ML, Baccarelli A, Hoffman E, et al. Prenatal arsenic exposure and DNA methylation in maternal and umbilical cord blood leukocytes. *Environ Health Perspect* 2012 ; 120 (7) : 1061-1066.
- 32) Intarasunanont P, Navasumrit P, Waraprasit S, et al. Effects of arsenic exposure on DNA methylation in cord blood samples from newborn babies and in a human lymphoblast cell line. *Environ Health* 2012 ; 11 : 31.
- 33) Pilsner JR, Hall MN, Liu X, et al. Influence of prenatal arsenic exposure and newborn sex on global methylation of cord blood DNA. *PLoS One* 2012 ; 7 (5) : e37147.
- 34) Pilsner JR, Hu H, Ettinger A, et al. Influence of prenatal lead exposure on genomic methylation of cord blood DNA. *Environ Health Perspect* 2009 ; 117 (9) : 1466-1471.
- 35) McKay JA, Groom A, Potter C, et al. Genetic and non-genetic influences during pregnancy on infant global and site specific DNA methylation: role for folate gene variants and vitamin B12. *PLoS One* 2012 ; 7 (3) : e33290.
- 36) Heijmans BT, Kremer D, Tobi EW, et al. Heritable rather than age-related environmental and stochastic factors dominate variation in DNA methylation of the human IGF2/H19 locus. *Hum Mol Genet* 2007 ; 16 (5) : 547-554.
- 37) Hoyo C, Fortner K, Murtha AP, et al. Association of cord blood methylation fractions at imprinted insulin-like growth factor 2 (IGF2), plasma IGF2, and birth weight. *Cancer Causes Control* 2012;23(4) : 635-645.
- 38) Lotfipour S, Ferguson E, Leonard G, et al. Orbitofrontal cortex and drug use during adolescence: role of prenatal exposure to maternal smoking and BDNF genotype. *Arch Gen Psychiatry* 2009 ; 66 (11) : 1244-1252.
- 39) Waalkes MP, Liu J, Chen H, et al. Estrogen signaling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero. *J Natl Cancer Inst* 2004 ; 96 (6) : 466-774.

【Best Articles of the Year】

妊婦のダイオキシン類代謝酵素遺伝子多型と母体血中ダイオキシン類濃度との関連

小林 澄貴¹ 佐田 文宏² 佐々木成子¹ 坂 晋³ 宮下ちひろ⁴ 岡田恵美子¹ Mariko Limpar¹
 吉岡 英治⁵ 梶原 淳睦⁶ 戸高 尊⁷ 西條 泰明⁵ 岸 玲子⁴

¹北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野, ²国立保健医療科学院生活環境研究部, ³鹿鹿医療科学大学薬学部
⁴北海道大学環境健康科学研究教育センター, ⁵旭川医科大学医学部健康科学講座地域保健疫学分野, ⁶福岡県保健環境研究所
⁷九州大学大学院医学研究院外科学講座皮膚科学分野

【背景と目的】ダイオキシン類は難分解性の物質で1970年代以降排出規制が行われている。しかし、これらは未だに一般生活環境中に残存しヒトの体内から広く検出される。ダイオキシン類は血液胎盤関門を通過し胎児へ移行する。妊娠中における曝露は出生体格に影響を及ぼす報告がある一方 (Konishi 2009), 及ぼさない報告もあり (Nishijo 2008), ヒトの妊娠中以降の児の発育遅延に対して結果が一致していない。結果が異なる理由の一つとして、ダイオキシン類の代謝に関与する遺伝的感受性の影響が考えられた。ダイオキシン類は多環芳香族炭化水素受容体 (AHR) を介しシトクロム P450 (CYP) 1系代謝酵素によって代謝され、これらの遺伝子多型は疾患リスクの調整に影響を及ぼすことが知られているが (Berwick 2004), 一般生活環境レベルのダイオキシン類濃度との関連を検討した報告はまだない。そこで本研究の目的は妊婦のダイオキシン類代謝酵素遺伝子多型と母体血中ダイオキシン類濃度との関連を検討することとした。

【対象と方法】対象者は2002年7月～2005年10月に札幌市内の1産科病院で実施した前向きコホート研究 (環境と子どもの健康に関する北海道スタディ) で参加同意が得られた妊婦514名である。自記式質問票で妊婦の教育歴, 世帯収入, 飲酒状況, 喫煙状況を調査し, 出産時には医療診療録から妊婦の分娩情報を収集した。妊娠中～後期に採血を行い, 母体血中ダイオキシン類濃度を異性体別に高分解能ガスクロマトグラフ・高分解能マススペクトロメーターで測定した。また, 出産時に母体血を採取した後DNAを抽出し, AHR (db SNP ID: rs2066853), AHRリプレッサー (AHR) (rs2292596), CYP1A1 (rs4646903およびrs1048963), CYP1A2 (rs762551), およびCYP1B1遺伝子型 (rs1056836) をリアルタイム-PCR法で解析した。妊婦の遺伝子型とダイオキシン類濃度のデータがそろった対象者421名について, 一般化線形モデルで交絡因子を調整し統計解析した。

【結果】母体血中ダイオキシン類濃度について, PCDDs, Non-ortho PCBs, およびMono-ortho PCBs濃度はAHR (rs2066853) GA + AA型と比べてGG型で有意に低かった (PCDDs, 521.7対478.5 pg/g lipid; Non-ortho PCBs, 84.2対74.6 pg/g lipid; Mono-ortho PCBs, 13,087.0対11,266.3 pg/g lipid) (表1)。また母体血中ダイオキシン類毒性等価量について, PCDDsおよびPCDFs毒性等価量はCYP1A1 (rs4646903) TT + TC型と比べてCC型で有意に低かった (PCDDs, 7.408対6.480 TEQ pg/g lipid; PCDFs, 2.596対2.267 TEQ pg/g lipid) (図1)。しかし, AHR, CYP1A1 (rs1048963), CYP1A2, およびCYP1B1遺伝子型について有意差は示さなかった (表なし)。

表1. 札幌市妊婦のAHR (rs2066853) 遺伝子型における母体血中ダイオキシン類濃度と毒性等価量

AHR (rs2066853) 遺伝子型	GA + AA 型 (95%信頼区間)	GG 型 (95%信頼区間)	P 値
母体血中濃度 (pg/g lipid)			
PCDDs濃度	521.7 (497.3-546.0)	478.5 (444.1-512.9)	0.047
PCDFs濃度	20.8 (19.4-22.1)	19.2 (17.3-21.1)	0.189
Non-ortho PCBs濃度	84.2 (79.4-89.1)	74.6 (67.7-81.5)	0.028
Mono-ortho PCBs濃度	13,087.0 (12,379.6-13,794.4)	11,266.3 (10,265.9-12,266.8)	0.004
全ダイオキシン類濃度	13,713.7 (12,993.7-14,433.7)	11,838.7 (10,820.5-12,856.9)	0.004
母体血中毒性等価量 (TEQ pg/g lipid)			
PCDDs毒性等価量	7.467 (7.121-7.814)	7.003 (6.513-7.493)	0.132
PCDFs毒性等価量	2.590 (2.475-2.705)	2.505 (2.342-2.668)	0.410
Non-ortho PCBs毒性等価量	4.774 (4.484-5.064)	4.179 (3.769-4.590)	0.022
Mono-ortho PCBs毒性等価量	0.393 (0.371-0.414)	0.338 (0.308-0.368)	0.004
全ダイオキシン類毒性等価量	15.224 (14.538-15.910)	14.025 (13.056-14.995)	0.050

妊娠年齢, 妊婦の身長, 妊娠前体重, 妊娠中カフェイン摂取, 妊娠中アルコール摂取, 出産歴, 妊娠中喫煙状況, 教育レベル, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取, 妊娠中遠洋魚摂取, 血液採取時期で調整した一般化線形モデル

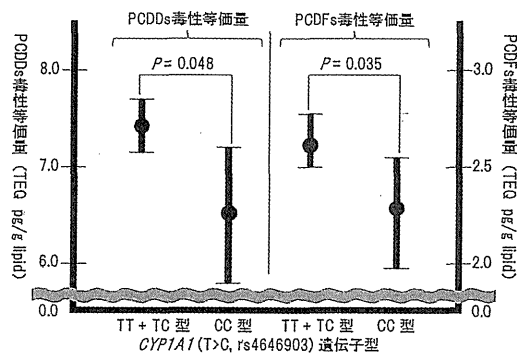


図1. 札幌市妊婦のCYP1A1 (rs4646903) 遺伝子型における母体血中ダイオキシン類 (PCDDsとPCDFs) 毒性等価量。妊娠年齢, 妊婦の身長, 妊娠前体重, 妊娠中カフェイン摂取, 妊娠中アルコール摂取, 出産歴, 妊娠中喫煙状況, 教育レベル, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取, 妊娠中遠洋魚摂取, 血液採取時期で調整した一般化線形モデル。

【考察】妊婦のAHR (rs2066853) およびCYP1A1 (rs4646903) 遺伝子型は母体血中ダイオキシン類濃度との関連があった。日本人妊婦の遺伝子型によるダイオキシン類濃度の違いは最大1.1倍だったので, ダイオキシン類の代謝に関わる遺伝子型による濃度差は小さいことが示唆された。しかしながら, 妊婦の遺伝子型に依存して児の発育に負の健康影響をもたらす可能性は否定できなかったため, さらに長期的な前向きコホート研究によって解明する必要がある。本研究は一般生活環境レベルのダイオキシン類濃度とCYP 1系代謝酵素遺伝子多型との関連を疫学研究で検討した初めての報告であり, 今後, 代謝に続く抱合反応に関わる遺伝子多型についても検討する予定である。

本稿は, Genetic association of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1) polymorphisms with dioxin blood concentrations among pregnant Japanese women. Toxicol Lett 2013; 219: 269-278. の内容を要約したものである (文責: 小林澄貴)。

