

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表1 タバコ由来化学物質（喫煙）の胎児期曝露とエピジェネティクス

	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 メ チ ル 化	Murphyら /2012/USA ⁸⁾	前向き出生コホート 新生児418名	妊娠中の喫煙の 有無(質問票)	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	・H19 DMRに喫煙者とは喫 煙者の間で違いなし ・IGF2 DMRは喫煙者の方が 高メチル化(2.9-3.7%) ・男女で層別化した場合、喫 煙曝露で男児のみIGF2高 メチル化
	Bretonら /2009/ USA ⁹⁾	後ろ向きコホート 小児(4-7歳児) ①348名 ②272名	妊娠中の喫煙・ 受動喫煙の有無 (質問票)	①②パイロシーク エンス法 ②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)	口腔細胞	①ゲノムDNA 全体のメチル 化レベル(Alu, LINE-1) ②807遺伝 子, 1505CpG サイト	・胎児期喫煙曝露により、 Alu低メチル化($\beta = -0.31$, $p=0.03$) ・GSTM1 null genotypeで LINE-1に喫煙の影響あり ・曝露によりAXL高メチル化 ($\beta = 0.37$, $p=0.005$)、 PTPRO高メチル化($\beta =$ 0.34, $p=0.02$)
	Toledo- Rodriguezら /2010/UK ¹⁰⁾	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	BDNF6	・胎児期喫煙曝露により BDNF-6エクソン高メチル化
	Suterら /2010/ USA ¹¹⁾	前向き出生コホート 新生児34名	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	CYP1A1プロ モーター	・胎児期喫煙曝露により、 CYP1A1プロモーター領域が 低メチル化(喫煙あり55.6% vs. なし45.9%, $p=0.027$) ・上記メチル化は胎盤 CYP1A1遺伝子発現と相関 あり($r=0.737$, $p=0.007$)
ゲ ノ ム 全 体 の メ チ ル 化	Guerrero- Prestonら /2010/USA ¹²⁾	前向き出生コホート 新生児30名	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DNA全 体のメチル化 レベル(5mC)	・臍帯血血清DNAメチル化率 は、血清コチニン濃度と濃度 依存的な負の相関を示した ($p<0.001$)。
	Flomら /2011/USA ¹³⁾	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DNA全 体のメチル化 レベル(Sat2, Alu, LINE-1)	・胎児期喫煙曝露と43才時 末梢血Sat2メチル化とは負 の相関($\beta = -0.22$) ・LINE-1・Aluメチル化とは有 意な相関なし
	Terryら /2008/USA ¹⁴⁾	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DNA全 体のメチル化 レベル	・胎児期喫煙曝露により、高 メチル化
網 羅 的 メ チ ル 化 解 析	Wilhelm- Benartziら /2012/USA ¹⁵⁾	前向き出生コホート 新生児 ①380名 ②184名	妊娠中の喫煙の 有無(質問票)	①パイロシーク エンス法 ②網羅的メチル化 解析(Infinium HumanMethylatio n27 BeadChip, Illumina社, 14,000遺伝子, 27,000CpGサイト 搭載)	胎盤	①ゲノムDNA 全体のメチル 化レベル(Alu, LINE-1) ②ポリコーム 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Alu 高メチル化(喫煙あり66.2% vs. なし64.8%, $p<0.01$)、 LINE-1有意差なし($p=0.10$) ・Aluメチル化とポリコーム関 連遺伝子群メチル化との間に 正の相関
	Joubertら /2012/USA ¹⁶⁾	前向き出生コホート 2つのコホートの母 児 ①Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa), 1062 組 ②Newborn Epigenetics Study (NEST)36名(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)	網羅的メチル化解 析(Infinium HumanMethylatio n450 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 -value < 1.06×10^{-7}) ・喫煙曝露によりAHRRが高 メチル化、CYP1A1, GFI1が 低メチル化
	Suterら /2011/ USA ¹⁷⁾	コホート内コホート 研究 新生児 ①36名; Discovery cohort ②18名; 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 HumanMethylatio n27 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

遺伝子略称; 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), CYP1A1 (cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), AHRR (aryl-hydrocarbon receptor repressor), GFI1 (growth factor independent 1 transcription repressor)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表2 喫煙以外の環境化学物質の胎児期曝露とエピジェネティクス							
著者／年／国	対象者	曝露物質	曝露評価	測定項目（測定方法）	DNA抽出組織	対象メチル化領域	結果
Pereraら /2009/U SA ¹⁸⁾	出生コーホート ①母児20組 (ケーススタディ) ②5歳児56名	多環芳香族炭化水素(PAH)	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, 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, p=0.03)
Herbstmanら /2012/U SA ¹⁹⁾	縦断的コーホート 母児164組	PAH	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DNA全体のメチル化レベル(5mC)	・胎児期PAH曝露は、臍帯血DNAメチル化レベルと弱い負の関連あり(p=0.05) ・臍帯血DNAメチル化レベルは、臍帯血中のBaP(ベンゾピレン)-DNA付加体と正の相関あり(p=0.01) (PAH曝露がメチル化を介してDNA付加体の生成に影響を及ぼしている可能性あり)
Tangら /2012/U SA ²⁰⁾	前向き出生コーホート(Columbia Center for Children's Environmental Health cohort) 母児53組	PAH	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ケンス法)	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 プロモーターのメチル化率は正の相関あり
Guerrero-Prestonら /2010/U SA ¹²⁾	前向き出生コーホート 母児30組	有機フッ素化合物(PFOS, PFOA)	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DNA全体のメチル化レベル(5mC)	・臍帯血血清DNAメチル化率は、血清PFOA濃度と負の相関(r=-0.35, p=0.06) ・PFOS濃度とは相関はなし
Moralesら /2012/Spain ²¹⁾	2つの出生コーホート4-6歳児 ①Menorca(122名) ②Sabadell(236名)	DDE(dichlorodiphenyldichloroethylene, POPs)	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 1)(バイロシーケンス法)	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) ・臍帯血血清中の高DDE濃度は、ALOX12の低メチル化と関連あり(p=0.033)
Kileら /2012/Taiwan ²²⁾	前向き出生コーホート(バングラディッシュ) 母児113組	ヒ素	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(バイロシーケンス法)	母体血および臍帯血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(Alu, LINE-1) 癌抑制遺伝子(p16, p53)プロモーター	・母親尿中ヒ素濃度の高い群では、母体血(1.36%)、臍帯血(1.08%)両者のDNAでLINE-1が有意に高メチル化、臍帯血癌抑制遺伝子p16プロモーターも高メチル化の傾向あり
Intarasunantontら /2012/Thailand ²³⁾	2重コーホート研究 新生児71名(ヒ素曝露55名、非曝露16名)	ヒ素	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DNA全体のメチル化レベル(LINE-1) 癌抑制遺伝子(p53)プロモーター	・ヒ素曝露群ではp53プロモーターが高メチル化、爪のヒ素濃度と正の相関あり(p<0.05)
Pilsnerら /2012/U SA ²⁴⁾	前向き出生コーホート(バングラディッシュ) 母児101組	ヒ素	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, バイロシーケンス法, LUMA法)	母体血 臍帯血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(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あり、女児ではなし
Pilsnerら /2009/U SA ²⁵⁾	出生コーホート(メキシコ) 母児103組	鉛	母体骨鉛レベル(蛍光X線分析)	臍帯血DNAメチル化率(バイロシーケンス法)	臍帯血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(Alu, LINE-1)	・母体骨の鉛レベルと児臍帯血Alu, LINE1には負の相関

遺伝子略称: ACSL3 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 3), IFN γ (interferon, gamma), ALOX12 (arachidonate 12-lipoxygenase)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表3 胎児期環境化学物質曝露でDNAメチル化レベルが変化する遺伝子				
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) ⁸⁾
<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 ⁸⁾
<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) ¹⁶⁾ , もしくは低メチル化(胎盤) ¹¹⁾
<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 ¹⁶⁾
<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 ⁹⁾
<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 ¹⁰⁾
<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 ¹⁸⁾
<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 ²⁰⁾
<i>ALOX12</i>	アラキドン酸-12-リポキシゲナーゼ; arachidonate 12-lipoxygenase	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 ²¹⁾
<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 ^{22, 23)}
<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 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 ¹⁶⁾
<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 ⁹⁾
<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 ^{22, 23)}
<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) ¹⁵⁾ , もしくは低メチル化(口腔細胞) ⁹⁾ , 鉛曝露により低メチル化 ²⁵⁾ , ヒ素曝露により高メチル化 ¹⁵⁾
<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 ¹³⁾
*は遺伝子をコードしていない領域				

胎児期の環境化学物質曝露が児の IGF2/H19 メチル化に及ぼす影響

研究分担者 安住 薫 北海道大学環境健康科学研究教育センター 客員研究員

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授

研究分担者 佐々木 成子 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 助教

研究分担者 石塚 真由美 北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学分野 教授

研究要旨

DNA メチル化はエピジェネティック制御機構のひとつで、胎児期の環境と後生の表現型を結ぶ重要な要素だと考えられている。動物実験により環境化学物質曝露のメチル化への影響が示唆されているが、現在のところ疫学研究での報告、特に胎児期曝露の影響を評価した報告は少ない。そこで、本研究では、胎児期の環境化学物質曝露が臍帯血の IGF2/H19 領域、および LINE1 の DNA メチル化に及ぼす影響について検討した。

札幌の 1 産科病院でリクルートし同意を得た妊婦のうち、初期調査票・出産時カルテ情報・臍帯血の得られた 267 名を対象とし、パイロシーケンス法を用いて IGF2/H19、LINE1 遺伝子領域の臍帯血 DNA メチル化について定量を行った。胎児期の曝露要因として PFOS・PFOA、MEHP、PCBs・ダイオキシン類、メチル水銀の影響について重回帰分析で検討を行った。

重回帰分析で交絡因子を調整した結果、胎児期の環境化学物質曝露の臍帯血 DNA メチル化への影響については、PFOA 曝露による IGF2 低メチル化 ($\beta = -1.61$, 95% CI: -3.00 to -0.22)、MEHP 曝露による H19 低メチル化 ($\beta = -0.86$, 95% CI: -1.70 to -0.02)、メチル水銀曝露による LINE1 高メチル化 ($\beta = 0.75$, 95% CI: 0.11 to 1.39) が認められ、PFOS・PFOA、MEHP の胎児期曝露による IGF2/H19 領域メチル化への影響、メチル水銀曝露によるゲノム全体のメチル化の亢進が示唆された。

研究分担者

梶原 淳睦

(福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課)

宮下 ちひろ、池野 多美子、荒木 敦子

(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

研究協力者

小林 祥子

(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

小林 澄貴

(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)

中澤 裕之 (星薬科大学薬品分析化学教室)

那須 民江 (中部大学生命健康科学部

スポーツ保健医療学科)

蜂谷 紀之

(環境省国立水俣病総合研究センター)

安武 章 (熊本大学大学院自然科学研究科)

A. 研究目的

近年、胎児期の化学物質曝露等の外的環境が、児の DNA メチル化を始めとするエピジェネティック制御機構に及ぼす影響が懸念されている。DNA メチル化は遺伝子発現・細胞分化に関わっており、細胞独自のメチル化パターンは細胞分裂後も維持されることから、胎児期の環境と後生の表現型を結ぶ重要な因子だと考えられている。な

かでも Insulin-like growth factor 2 (IGF2) は胎児発育に重要な成長因子で、これまでにこの領域のメチル化異常と出生時体重のほか、乳幼児期の肥満、また成人後の大腸がんなどの発症リスクとの関連も報告されており早期の曝露影響を測る「バイオセンサー」としての役割も提唱されている (Cui et al. 2002; Hoyo et al. 2012)。これまでに DNA メチル化は妊娠中の葉酸摂取や胎児期の飢餓曝露のほか (Dominguez-Salas et al. 2012; Heijmans et al. 2008)、喫煙曝露 (Knopik et al. 2012) などの外的要因の影響を受けることが報告されている。また、動物実験等の報告によると環境化学物質曝露の影響も示唆されているが (Baccarelli and Bollati. 2009)、現在のところ疫学研究での報告、特に胎児期曝露の影響を評価した報告は少ない(表 1)。そこで本研究では、胎児期の環境化学物質曝露が臍帯血の IGF2/H19 領域、および LINE1 の DNA メチル化に及ぼす影響について出生コホートのサンプルを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 対象

札幌の 1 産科病院で 2002 年 7 月から 2005 年 10 月までにリクルートし、同意を得た妊婦 514 名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報がそろった母児から、臍帯血の得られた 267 名を対象とした。

2. 方法

臍帯血 400 μ L から Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega 社) を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA を Epiect Plus Bisulfite Kit (Qiagen 社) にてバイサルファイト処理を行い、IGF2 DMR0 (chr11p15.5, site 1: 2,109,519; site 2: 2,109,516; NCBI Human Genome

Build 37.1), H19 DMR (chr11p15.5, site 1: 1,964,261; site 2: 1,964,259; site 3: 1,964,257; site 4: 1,964,254), LINE1 の 3 遺伝子領域について、Pyromark Q24 system (Qiagen 社) にて DNA メチル化の定量を行った。

母体血中 PFOS・PFOA 濃度は LC-MS/MS、MEHP 濃度は GC-MS、PCBs・ダイオキシン類濃度は HRGC/HRMS により測定された。母毛髪中の総水銀濃度は酸化燃焼金アマルガム法 (AAS 法) により測定された。

曝露影響評価の統計解析には重回帰分析を用い、曝露濃度は \log_{10} 変換した値を用い、また濃度が検出下限値以下の場合はその半値を代入した。

ダイオキシン総量は毒性等量 (TEQ) に従い算出した (Van den Berg et al. 2005)。 Σ Dioxin-TEQ は PCDDs 7 異性体、PCDFs 10 異性体、Non-ortho PCBs 4 異性体、Mono-ortho PCBs 10 異性体の総量、 Σ PCBs は 58 種類の PCB 異性体の総量から計算した。

(倫理面への配慮)

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび北海道大学大学院医学研究科・医の倫理委員会の承認を得た。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏洩については、データの管理保管に適切な保管場所を確保するなどの方法により行うとともに、研究者の道義的責任に基づいて個人データをいかなる形でも本研究の研究者以外の外部の者に触れられないように厳重に保管し、取り扱った。

C. 研究結果

表 2 に本集団における母児の属性について

て示した。母の年齢の平均は 30.0 才 (± 4.9)、出生時体重の平均は 3,133 g (± 334) であった。また、臍帯血 DNA メチル化率の平均値 (\pm SD) は、IGF2 が 48.7% (± 2.9)、H19 が 52.3% (± 2.0)、LINE1 が 75.8% (± 1.1) であった。また、母体血中化学物質濃度の中央値 (最小値、最大値) は、PFOS 5.00 ng/mL (1.40 to 16.20)、PFOA 1.40 ng/mL (0.25 to 5.30)、MEHP 0.033 nmol/mL (0.012 to 0.365)、 Σ Dioxins-TEQ 14.2 pg/g lipid (3.2 to 42.9)、 Σ PCBs 100.4 ng/g lipid (16.0 to 326.8)、22'44'55'-HxCB (#153) 22.7 ng/g lipid (2.9 to 77.2)、母毛髪中のメチル水銀は 1.43 ppm (0.30 to 7.55) であった。

表 3 に母体血中化学物質濃度および母毛髪中メチル水銀濃度と、母児の属性との関連について示した。 Σ Dioxin-TEQ と Σ PCBs で母の年齢との間に有意な関連が見られた。また有意ではなかったが、PFOS・PFOA では母の年齢との間に負の関連が認められた。母の学歴・世帯収入といった社会経済要因と、PFOA (母の学歴)、 Σ Dioxin-TEQ・ Σ PCBs (世帯収入) との間に有意な関連が認められた。魚摂取量は Σ Dioxin-TEQ・ Σ PCBs・メチル水銀との間にそれぞれ有意な関連がみられた。母体血の採血時期は PFOS・PFOA、MEHP、 Σ Dioxin-TEQ、 Σ PCBs との間に有意な関連が認められた。

表 4 にそれぞれの曝露による DNA メチル化への影響を重回帰分析で検討した結果を示した。母年齢、妊娠前 BMI、世帯収入、児の性別、妊娠中喫煙、魚摂取量 (Σ Dioxin-TEQ・ Σ PCBs・メチル水銀)、母のパーマ歴 (メチル水銀) で調整した結果、母体血中 PFOA 濃度 (\log_{10} 変換) と臍帯血 IGF2 メチル化率との間に有意な負の相関

が認められた ($\beta = -1.61$, 95% CI: -3.00 to -0.22)。また、有意ではなかったが、PFOS でも同様の傾向が認められた ($\beta = -1.16$, 95% CI: -2.97 to 0.66)。母体血中 MEHP 濃度 (\log_{10} 変換) と H19 メチル化率との間には有意な負の相関が認められた ($\beta = -0.86$, 95% CI: -1.70 to -0.02)。母毛髪中メチル水銀量 (\log_{10} 変換) と LINE1 メチル化との間には有意な正の相関がみられた ($\beta = 0.75$, 95% CI: 0.11 to 1.39)。その他、ダイオキシン (TEQ)、PCBs の総量と 3 遺伝子領域のメチル化との間に有意な関連は認められなかった。

D. 考察

本研究により、胎児期の環境化学物質曝露の児の DNA メチル化への影響については、PFOA 曝露による IGF2 低メチル化 ($\beta = -1.61$, 95% CI: -3.00 to -0.22)、MEHP 曝露による H19 低メチル化 ($\beta = -0.86$, 95% CI: -1.70 to -0.02)、またメチル水銀曝露による LINE1 高メチル化 ($\beta = 0.75$, 95% CI: 0.11 to 1.39) が示された。

先行研究では、横断研究により臍帯血中 PFOA 濃度とゲノム全体のメチル化 (ELISA 法) との間の負の相関が報告されており (Guerrero-Preston et al. 2010)、本研究の IGF2 メチル化と同様の傾向を示した。

MEHP 曝露の影響については、現在のところ疫学研究での報告はない。動物実験ではマウスへの DEHP 曝露により精巣のゲノム全体のメチル化の亢進、およびメチル基転移酵素の発現の増加が報告されている (Wu et al. 2010)。本研究では、ゲノム全体のメチル化の指標として用いた LINE1 には有意な影響は見られず、また遺伝子特異的に H19 の低メチル化が観察された。

DNA メチル化には種間・組織間の差異も考えられるので、さらなる検討が必要である。

メチル水銀曝露による影響については、現在のところ疫学研究での報告はない。動物実験では、胎児期曝露により、マウス海馬の脳由来神経栄養因子 (*BDNF*) のメチル化の減少 (Onishchenko et al. 2008)、ラット肝臓のメチル基転移酵素の発現低下が報告されており (Desaulniers et al. 2009)、曝露によりメチル化が亢進するとの報告はなく、本研究の結果とは一致しない。種間・組織間の差異もあり得るが、メチル水銀曝露と交絡している要因の影響も考えられるため、今後さらなる検討が必要である。

その他、ダイオキシン (TEQ)、PCBs の総量と今回調べた 3 遺伝子領域のメチル化との間に有意な関連は認められなかった。疫学先行研究では、PCB 等の POPs 曝露によりゲノム全体のメチル化レベルの低下が報告されている。曝露濃度の違いのほか、本研究ではサンプルサイズが小さくパワーが足りず、有意な影響が観察できなかった可能性も考えられる。

本研究の限界として、曝露評価を行った母体血の採血時期が妊娠 24 週目から産後と人によって幅があり、測定値への影響が考えられる点が挙げられる。重回帰分析の際、採血時期を共変量に投入して解析したもののその影響は調整しきれていない可能性は考えられる。また、本研究では侵襲性の問題から、臍帯血の DNA メチル化を測定しており、IGF2 が実際に発現している肝臓等の組織のメチル化とは異なる可能性も考えられる。さらに、サンプルサイズが小さく十分なパワーが得られていないため、今回の結果には偽陰性のものも含まれていることが考えられるため、今後十分なサンプルサイズでの検討が必要だと考えられる。

最後に、IGF2/H19 領域のメチル化により調節されている IGF2 タンパク質は胎児期の成長に重要であり、また、小児期の肥満との関連も報告されている (Perkins et al. 2012)。今後は本研究で観察された化学物質曝露によるメチル化の変化が、具体的な児のアウトカムをどれだけ説明できるか、検討していく予定である。

E. 結論

本研究により、胎児期の環境化学物質曝露の臍帯血 DNA メチル化への影響については、PFOA 曝露による IGF2 低メチル化 ($\beta = -1.61$, 95% CI: -3.00 to -0.22)、MEHP 曝露による H19 低メチル化 ($\beta = -0.86$, 95% CI: -1.70 to -0.02)、メチル水銀曝露による LINE1 高メチル化 ($\beta = 0.75$, 95% CI: 0.11 to 1.39) が認められ、PFOS・PFOA、MEHP の胎児期曝露による IGF2/H19 領域メチル化への影響、メチル水銀曝露によるゲノム全体のメチル化の亢進が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 安住薫, 小林祥子, 岸玲子; 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. 北海道公衆衛生学雑誌. 26(2):29-38, 2012.

2. 学会発表

- 1) 小林祥子, 安住薫, 宮下ちひろ, 小林澄貴, 佐々木成子, 石塚真由美, 岸玲子; 環境化学物質の胎児期曝露が臍帯血 IGF2DNA メチル化に及ぼす影響. 第 83 回日本衛生学会学術総会. 金沢. (2013.03.24-26)

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

- 1) Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. 2002. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res.* 15;62(22):6442-6.
- 2) Hoyo C, Fortner K, Murtha AP, Schildkraut JM, Soubry A, Demark-Wahnefried W et al. 2012. Association of cord blood methylation fractions at imprinted insulin-like growth factor 2 (IGF2), plasma IGF2, and birth weight. *Cancer Causes Control.* 23(4):635-45.
- 3) Dominguez-Salas P, Cox SE, Prentice AM, Hennig BJ, Moore SE. 2012. Maternal nutritional status, C(1) metabolism and offspring DNA methylation: a review of current evidence in human subjects. *Proc Nutr Soc.* 71(1):154-65.
- 4) Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES et al. 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4;105(44):17046-9.
- 5) Knopik VS, Maccani MA, Francazio S, McGeary JE. 2012. The epigenetics of maternal cigarette smoking during pregnancy and effects on child development. *Dev Psychopathol.* 24(4):1377-90.
- 6) Baccarelli A, Bollati V. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 21(2):243-51.
- 7) Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, et al. 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci.* 93(2): 223-41.
- 8) Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, Lebron C, Witter FR et al. 2010. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics.* 16;5(6):539-46.
- 9) Wu S, Zhu J, Li Y, Lin T, Gan L, Yuan X et al. 2010. Dynamic effect of di-2-(ethylhexyl) phthalate on testicular toxicity: epigenetic changes and their impact on gene expression. *Int J Toxicol.* 29(2):193-200.
- 10) Onishchenko N, Karpova N, Sabri F, Castrén E, Ceccatelli S. 2008. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury.

J Neurochem. 106(3):1378-87.

- 11) Desaulniers D, Xiao GH, Lian H, Feng YL, Zhu J, Nakai J et al. 2009. Effects of mixtures of polychlorinated biphenyls, methylmercury, and organochlorine pesticides on hepatic DNA methylation in prepubertal female Sprague-Dawley rats. Int J Toxicol. 28(4):294-307.

- 12) Perkins E, Murphy SK, Murtha AP, Schildkraut J, Jirtle RL, Demark-Wahnefried W et al. 2012. Insulin-like growth factor 2/H19

methylation at birth and risk of overweight and obesity in children. J Pediatr. 161(1):31-9

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1. 環境化学物質曝露の DNA メチル化への影響を調べた疫学研究

【Perinatal】				
Author	Study Design	Exposure	Outcome	Results
Guerrero-Preston, 2010	N = 30 cross sectional	PFOS, <i>PFOA</i> (in cord blood)	Global methylation (ELISA)	Decreased ▼
Morales, 2012	N = 122 cross sectional	<i>DDE</i> (in cord blood)	<i>ALOX12 promotor</i>	Decreased ▼
Huen, 2013	N = 358 (at birth, 9 yr) birth cohort	POPs (2 <i>OCPs</i> , 10 <i>BDEs</i>)	Global methylation (Alu, LINE1)	Decreased ▼
【Adult】				
Author	Study Design	Exposure	Outcome	Results
Rusiecki, 2008	N = 70 (19-67 yr) cross sectional	POPs (14 <i>PCBs</i> , 10 <i>OCPs</i>)	Global methylation (Alu, LINE1)	Decreased ▼
Kim, 2010	N = 86 (56.2±7 yr) cross sectional	POPs (17 <i>PCBs</i> , 9 <i>OCPs</i> , 2 <i>BDEs</i>)	Global methylation (Alu, LINE1)	Decreased ▼
Lind, 2013	N = 524 (70 yr) cross sectional	POPs (16 <i>PCBs</i> , 5 <i>OCPs</i> , <i>OCDD</i> , <i>BDE</i>)	Global methylation (LUMA)	Increased △

Abbreviation: *POPs* persistent organic pollutants, *OCPs* organochlorine pesticides, *BDEs* brominated diphenyl ether

表 2. 対象母児の属性 (N = 267)

	N (%)	Mean (±SD)		N (%)	Mean (±SD)
Maternal characteristics			Maternal characteristics (continued)		
Maternal age (year)	267	30.0 (±4.9)	Fish consumption	247	47.0 (±32.1)
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	267	20.9 (±2.9)	Blood sampling period		
Maternal weight gain (kg)	254	10.6 (±3.9)	Before delivery	193 (72.6)	
Parity (times)			After delivery	73 (27.4)	
0	94 (35.2)		missing	1	
≥ 1	173 (64.8)		Blood sampling (days)		
Educational level (year)			All	266	246.7 (±29.5)
≤ 12	120 (44.9)		Before delivery	193	234.5 (±25.3)
> 12	147 (55.1)		After delivery	73	278.9 (±6.7)
Annual household income			Hair permanent		
< 3	48 (18.1)		No	174 (70.4)	
3-5	136 (51.3)		Yes	73 (29.6)	
5-7	60 (22.6)		missing	20	
> 7	21 (7.9)		Infant characteristics		
missing	2		Gestational age (week)	267	39.4 (±1.0)
Smoking during pregnancy			Sex		
No	220 (82.4)		Male	125 (46.8)	
Yes	47 (17.6)		Female	142 (53.2)	
Alcohol consumption			Birth weight (g)	267	3133 (±334)
No	176 (65.9)				
Yes	91 (34.1)				

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 3. 母体血中化学物質・母毛髪水銀濃度と母児の属性との関連

	PFOS (ng/ml)			PFOA (ng/ml)			MEHP (nmol/ml)			Σ Dioxin-TEQ (pg/g lipid)			Σ PCBs (ng/g lipid)			Hg (µg/g)		
	N	r	p	N	r	p	N	r	p	N	r	p	N	r	p	N	r	p
Maternal characteristics																		
Maternal age (year) ^a	234	r=-0.123	0.061	234	r=-0.059	0.370	257	r=0.047	0.456	238	r=0.293	<0.001**	239	r=0.455	<0.001**	246	r=0.044	0.494
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	234	r=-0.059	0.367	234	r=-0.105	0.108	257	r=0.032	0.614	238	r=0.022	0.731	239	r=-0.049	0.447	246	r=-0.042	0.514
Maternal weight gain (kg) ^a	223	r=-0.009	0.894	223	r=0.085	0.207	244	r=-0.025	0.697	229	r=-0.204	0.002**	230	r=-0.187	0.004**	240	r=0.041	0.527
Parity (times) ^b																		
0	83	6.26 (5.68, 6.85)	0.001**	83	1.89 (1.71, 2.07)	<0.001**	90	0.045 (0.036, 0.053)	0.954	85	16.5 (15.1, 17.8)	0.048*	86	111.1 (99.2, 122.9)	0.618	87	1.49 (1.35, 1.64)	0.737
≥ 1	151	5.02 (4.59, 5.45)		151	1.29 (1.15, 1.42)		167	0.045 (0.038, 0.051)		153	14.6 (13.6, 15.6)		153	106.6 (97.7, 115.5)		159	1.50 (1.40, 1.61)	
Educational level (year) ^b																		
≤ 12	108	5.40 (4.88, 5.92)	0.875	108	1.41 (1.25, 1.58)	0.041*	115	0.042 (0.035, 0.050)	0.521	101	14.4 (13.2, 15.6)	0.115	102	104.3 (93.4, 115.2)	0.13	108	1.48 (1.36, 1.61)	0.764
> 12	126	5.51 (5.03, 6.00)		126	1.57 (1.42, 1.73)		142	0.046 (0.040, 0.053)		137	15.9 (14.8, 16.9)		137	111.1 (101.7, 120.5)		138	1.51 (1.40, 1.63)	
Annual household income ^c																		
< 3	45	5.96 (5.15, 6.76)	0.775	45	1.63 (1.38, 1.89)	0.135	47	0.040 (0.029, 0.052)	0.677	37	13.8 (11.8, 15.8)	0.009**	37	87.9 (70.3, 105.5)	0.002**	46	1.45 (1.25, 1.64)	0.754
3-5	119	5.27 (4.78, 5.77)		119	1.41 (1.26, 1.57)		133	0.046 (0.039, 0.053)		123	14.6 (13.5, 15.7)		124	102.8 (93.2, 112.4)		123	1.48 (1.36, 1.60)	
5-7	50	5.21 (4.45, 5.97)		50	1.47 (1.23, 1.72)		56	0.050 (0.039, 0.060)		57	16.8 (15.2, 18.4)		57	125.9 (111.7, 140.1)		56	1.55 (1.38, 1.73)	
> 7	18	5.92 (4.65, 7.19)		18	1.88 (1.47, 2.28)		19	0.032 (0.013, 0.050)		21	17.4 (14.7, 20.1)		21	127.9 (104.5, 151.2)		20	1.59 (1.30, 1.89)	
Smoking during pregnancy ^b																		
No	196	5.54 (5.15, 5.93)	0.421	196	1.54 (1.42, 1.66)	0.106	212	0.045 (0.039, 0.050)	0.645	203	15.4 (14.6, 16.3)	0.178	203	107.9 (100.2, 115.6)	0.401	203	1.53 (1.43, 1.62)	0.186
Yes	38	5.06 (4.18, 5.94)		38	1.29 (1.01, 1.57)		45	0.044 (0.032, 0.056)		35	14.2 (12.1, 16.2)		36	109.7 (91.4, 128.0)		43	1.38 (1.18, 1.58)	
Alcohol consumption during pregnancy ^b																		
No	159	5.54 (5.11, 5.97)	0.776	159	1.50 (1.36, 1.64)	0.798	171	0.046 (0.039, 0.053)	0.801	158	15.0 (14.0, 16.0)	0.757	158	104.7 (96.0, 113.4)	0.088	168	1.54 (1.43, 1.66)	0.723
Yes	76	5.32 (4.70, 5.94)		76	1.50 (1.30, 1.69)		87	0.045 (0.036, 0.055)		81	15.7 (14.3, 17.1)		81	115.0 (102.8, 127.1)		79	1.48 (1.31, 1.66)	
Fish consumption	220	r=-0.079	0.251	220	r=-0.079	0.243	237	r=-0.113	0.083	221	r=0.148	0.028*	222	r=0.217	0.001**	246	r=0.230	0.000**
Blood sampling period ^b																		
Before delivery	176	5.74 (5.34, 6.15)	0.000**	176	1.55 (1.42, 1.68)	0.278	184	0.046 (0.040, 0.051)	0.009**	169	15.6 (14.6, 16.6)	0.205	170	109.9 (101.5, 118.4)	0.418	176	1.49 (1.39, 1.59)	0.648
After delivery	58	4.61 (3.91, 5.31)		58	1.33 (1.11, 1.56)		73	0.043 (0.033, 0.052)		68	14.4 (12.9, 15.9)		68	104.4 (91.1, 117.8)		69	1.54 (1.38, 1.70)	
Blood sampling (days) ^b																		
All	234	r=-0.361	<0.001**	234	r=-0.190	0.004**	257	r=-0.254	<0.001**	237	r=-0.087	0.183	238	r=-0.064	0.325			
Before delivery	176	r=-0.311	<0.001**	176	r=-0.224	0.003**	184	r=-0.224	0.002**	169	r=-0.057	0.459	170	r=-0.061	0.430			
After delivery	58	r=-0.078	0.562	58	r=-0.072	0.590	73	r=-0.031	0.794	68	r=0.027	0.830	68	r=0.019	0.881			
Hair permanent ^b																		
No		-			-			-			-			-		173	1.53 (1.43, 1.63)	0.668
Yes		-			-			-			-			-		73	1.44 (1.28, 1.59)	
Infant characteristics																		
Gestational age (week) ^a	234	r=0.031	0.636	234	r=0.048	0.470	257	r=-0.011	0.858	238	r=0.061	0.346	239	r=0.091	0.162	246	r=0.006	0.922
Sex ^b																		
Male	105	5.62 (5.09, 6.15)	0.395	105	1.58 (1.42, 1.75)	0.101	120	0.042 (0.035, 0.050)	0.979	111	15.2 (14.0, 16.4)	0.761	112	106.1 (95.7, 116.5)	0.848	115	1.44 (1.32, 1.56)	0.307
Female	129	5.34 (4.86, 5.81)		129	1.43 (1.28, 1.58)		137	0.047 (0.040, 0.053)		127	15.3 (14.2, 16.4)		127	110.0 (100.3, 119.8)		131	1.55 (1.44, 1.67)	

^a Spearman's correlation, ^b Mann-Whitney U-test, ^c Kruskal-Wallis

*p < 0.05, **p < 0.01

表 4. 環境化学物質曝露による DNA メチル化への影響（重回帰分析）

	N	IGF2 DMR methylation (%)			H19 CTCF1 methylation (%)			LINE1 methylation (%)		
		β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Smoking										
Crude	267	0.34	(-0.13, 0.80)	0.155	-0.28	(-0.60, 0.03)	0.079	0.04	(-0.13, 0.22)	0.610
Adjusted ^a	265	0.26	(-0.21, 0.73)	0.272	-0.30	(-0.62, 0.02)	0.062	-0.02	(-0.19, 0.14)	0.771
PFOS (log₁₀)										
Crude	235	-1.69	(-3.45, 0.07)	0.059	0.01	(-1.19, 1.21)	0.984	-0.09	(-0.74, 0.56)	0.786
Adjusted ^b	233	-1.16	(-2.97, 0.66)	0.210	-0.12	(-1.36, 1.13)	0.852	0.04	(-0.58, 0.66)	0.897
PFOA (log₁₀)										
Crude	235	-1.78	(-3.16, -0.40)	0.012*	-0.58	(-1.52, 0.36)	0.227	-0.03	(-0.54, 0.48)	0.904
Adjusted ^b	233	-1.61	(-3.00, -0.22)	0.023*	-0.59	(-1.55, 0.37)	0.226	-0.16	(-0.64, 0.32)	0.511
MEHP (log₁₀)										
Crude	258	-0.08	(-1.32, 1.17)	0.903	-0.81	(-1.65, 0.03)	0.058	-0.19	(-0.65, 0.27)	0.412
Adjusted ^b	256	0.02	(-1.23, 1.26)	0.978	-0.86	(-1.70, -0.02)	0.045*	-0.16	(-0.58, 0.27)	0.477
Dioxin-TEQ (log₁₀)										
Crude	239	0.20	(-1.84, 2.24)	0.848	0.25	(-1.09, 1.60)	0.713	0.39	(-0.36, 1.14)	0.304
Adjusted ^c	221	-0.08	(-2.33, 2.17)	0.947	-0.18	(-1.67, 1.32)	0.815	0.17	(-0.64, 0.97)	0.683
ΣPCBs (log₁₀)										
Crude	239	0.82	(-0.92, 2.56)	0.353	1.09	(-0.05, 2.23)	0.060	0.67	(0.03, 1.30)	0.039*
Adjusted ^c	221	0.48	(-1.54, 2.51)	0.638	0.51	(-0.83, 1.86)	0.451	0.35	(-0.38, 1.07)	0.346
Me-Hg (log₁₀)										
Crude	247	0.16	(-1.64, 1.96)	0.864	0.77	(-0.46, 2.00)	0.219	0.64	(-0.02, 1.31)	0.059
Adjusted ^d	246	0.17	(-1.68, 2.02)	0.857	0.38	(-0.86, 1.62)	0.545	0.75	(0.11, 1.39)	0.023*

^a Adjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, Annual household income, infant's sex

^b Adjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, Annual household income, infant's sex, smoking during pregnancy, blood sampling period

^c Adjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, Annual household income, infant's sex, smoking during pregnancy, blood sampling period, **fish consumption**

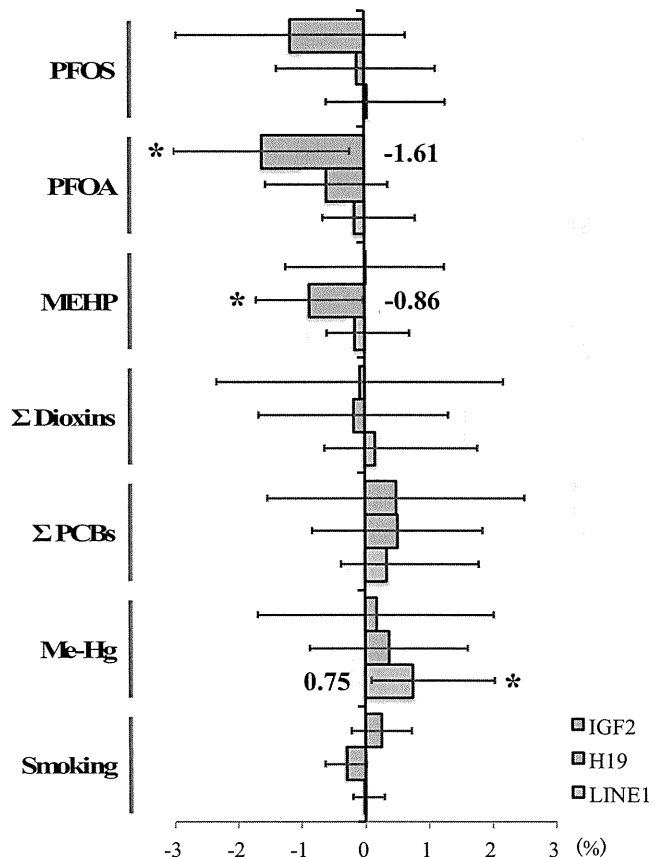
^d Adjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, Annual household income, infant's sex, smoking during pregnancy, **fish consumption, hair permanent**

図 1. 環境化学物質のメチル化への影響

（表 4）の重回帰分析の β の値（曝露濃度 10 倍ごとのメチル化率の変化）を棒グラフで示した。

エラーバーは 95%信頼区間を表す。

アスタリスク（*）がついているものが本研究で有意であった結果を表す。



注意欠損・多動性障害(ADHD)の発症に関わる脳内神経伝達物質と養育環境要因の関係

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター センター長・特任教授
研究分担者 佐々木 成子 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 助教
研究分担者 吉岡 英治 旭川医科大学医学部健康科学講座地域保健疫学分野 准教授

研究要旨

注意欠損・多動性障害(Attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD)の発症には脳内神経伝達物質の関係が示唆されているが、遺伝的素因だけでなく養育環境要因も関与すると考えられる。ADHDの化学物質リスク評価において、これら脳内神経伝達物質および化学物質以外の環境について明らかにしておく必要があると考え、本研究では先行研究を整理することを目的とした。方法はPubMedを用いて文献検索を行った。養育環境要因では、母性的暖かさや授乳期間、ダイエットがADHDの症状を緩和・改善する一方で、TVやDVDの視聴時間が発症リスクに影響していた。脳内神経伝達物質と養育環境の交互作用では9編の論文があり、ドーパミン系あるいはセロトニン系物質の候補遺伝子多型について検討していた。前向きコホート研究は4編と少なく、いずれも児の遺伝的解析のみだった。今後は、出生前後それぞれの養育環境要因と脳内神経伝達物質のADHD関連遺伝子の関連を明らかにする必要がある。

研究協力者

池野 多美子
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)
小林 澄貴, 馬場 俊明
(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)

A. 研究目的

注意欠損・多動性障害(Attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD)は、注意持続の困難あるいは年齢にそぐわない衝動性や多動性を特徴とする行動障害で、児童期において自閉症スペクトラムや学習障害(LD)などに比べて頻度の高い疾患である。

ADHDの有病率は、DSM-IV-TRでは3~7%と報告されている。学童期に診断を受けた者の30~50%前後が成人期にも移行するとの報告があり¹⁾、児の学校生活適応だけ

でなく、成人期の就労や社会生活適応も含め社会的問題となっている。

ADHDは衝動性に対する薬物効果などから、前頭前野でのカテコールアミン系神経伝達物質の機能が十分に発揮されないことが示唆され、それらの物質のADHD関連遺伝子の研究が進んできた。Faraoneらはメタアナリシスにより、双生児研究において発症要因の76%を規定すること、ADHD関連遺伝子としてカテコールアミン系とセロトニン系の神経伝達物質が強く関与していることを報告している²⁾。また、Gizerらは、小児のADHD関連の候補遺伝子についてメタアナリシスにより分析した結果、神経伝達物質受容体のDRD4, DRD5, HTR1B, 神経伝達物質トランスポーターのDAT1, 5-HTT, セロトニン系のシナプトソーム関連タンパクのSNAP-25に有意な関連があったと報告している(図1)³⁾。しかし、遺伝的素因と環境の影響は、もともと

両親から受け継いだ遺伝的素因が強く影響しているものか、出生前後の環境要因が関連しているのか、相互に影響し合うものであるのか、完全に分離できるものではない。一般環境の化学物質リスク評価に際しては、これら神経伝達物質と環境要因の関与について明らかにしておく必要がある。本研究では、ADHD 発症に関連する養育環境要因(喫煙、飲酒の曝露を除く)および脳内神経伝達物質の ADHD 関連遺伝子との交互作用について先行研究を整理することを目的とした。

B. 研究方法

英文の引用文献は、PubMed のデータベースを用いて検索した。検索キーワードは、[MeSH] を使い “Attention Deficit Hyperactivity Disorders” および “home or life or social environment” とした。脳内神経伝達物質との交互作用では、“genes”, “interaction” を追加して検索した。日本語論文は、医中誌データベースを用い、同一の検索キーワードを用いた。期間は 2011 年までの 10 年間とした。

C. 研究結果

海外の論文から、ADHD と養育環境要因の関連を検討したものは 4 編であった。養育環境要因と脳内神経伝達物質の交互作用を検討した報告は 9 編であった。日本における研究は見当たらなかった。養育環境要因は、母親の温かさ(Tullu ら)⁴⁾ や授乳期間の長さ(Julvetz ら)⁵⁾ が ADHD 症状の緩和に関連していた。テレビやゲームの視聴時間は注意機能に関連しており、その影響は青年期も同様に認められた(Swing ら)⁶⁾。また、Pelsser らはダイエットと ADHD との関連について無作為化対照試験を実施し⁷⁾、ADHD 児への介入プロ

グラムとしての可能性を報告していた(表 1)。

養育環境と脳内神経伝達物質との交互作用では、夫婦間の葛藤・自己非難の曝露が、*DRD4* リスク型において ADHD の不注意症状と関連していた⁸⁾。経済状況に絡んでは 3 編の報告があった。Nikolas らは経済的困難と両親の不仲に関する自責感と *SLC4AC* との関連を⁹⁾、Lasky-Su らは経済状況と *BNTF10SNPs* との関連を¹⁰⁾、Nobile らは経済状況と *COMT Val158Met* との関連を報告していた¹¹⁾。母親のぬくもりや批判と言った愛情の曝露と遺伝交互作用では関連が認められなかった¹²⁾。社会認識能力と *OXTR5SNPs* との関連が¹³⁾、人生上の出来事と *NET*, *COMT*, *SERTPR* との関連が¹⁴⁾、心理的ストレスと *DAT1* との関連が¹⁵⁾、しつけの質と *DRD4VNTR* との関連が¹⁶⁾ 1 編ずつ報告されていた(表 2)。

D. 考察

養育環境では、母親の温かさ⁴⁾ や授乳期間⁵⁾ という養育態度そのものが、ADHD 症状を緩和あるいは改善することが明らかとなり、母児間の接触の重要性を示唆している。しかしながら、ADHD と養育環境の研究は少なく、報告された 4 編については遺伝的素因の検討がなされていない限界がある。一方ダイエットの RCT 研究から⁷⁾、食生活も症状に関連していたことは、ADHD 傾向を示す児童への介入方法としての可能性を示唆しているだろう。

養育環境と脳内神経伝達物質との交互作用の研究は 9 編であった。ドーパミン系あるいはセロトニン系物質を中心に候補遺伝子の多型について検討していたが、前向きコーホート研究は 4 編のみであること、環境曝露要因が様々な観点から設定されていること、すべて児の遺伝子多型しか調べていないことなど、交互作用について結論付

けることは難しい。特に経済状況のように胎児期から影響が考えられる環境要因は、前向きコーホート研究で出生前後の経済状況を考慮する必要がある。また虐待など出生後の養育環境が二次的に ADHD 発症に影響しうる可能性を考えると、母児ペアの候補遺伝子と環境要因との関連を検討する必要がある。さらに、今後は ADHD 発症に関連する遺伝的素因を有していても発症を予防するあるいは症状を緩和する環境要因について研究を蓄積することが求められる。

E. 結論

ADHD と養育環境との関連については研究が少なく、脳内神経伝達物質と養育環境の交互作用についての研究が近年蓄積されてきている。しかし日本での研究は未だ報告がない。今後は、環境化学物質曝露の影響も含め、ADHD 発症と関連する出生前後の養育環境要因もさらに検討することで、ADHD 発症予防や症状を緩和できる要因が明らかになると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 池野多美子, 小林澄貴, 馬場俊明, 岸玲子.
注意欠損/多動性障害(ADHD)の有病率と養育環境要因に関する文献 Review. 北海道公衆衛生学雑誌. 25 (2):53-59, 2012.

2. 学会発表

(1) 池野多美子, 小林澄貴, 馬場俊明, 岸玲子.
注意欠損・多動性障害に関する文献 Review(1)-有病率と発生に関する要因. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 京都市. Mar.24-26, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

- (1) Roy-Byrne, P., Scheele, L., Ward, N. et al. Adult attention-deficit hyperactive disorder. Assessment guideline based on clinical presentation to a specialty clinic.
- (2) Faraone, S.V., R.H. Perilis, et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*. 2005;57(11):1313-1323.
- (3) Gizer, I.R., C. Ficks, et al. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*. 2009;126(1):51-90.
- (4) Tully Lucy A, Arseneault, Avshalom et al. Does Maternal Warmth Moderate the Effects of Birth Weight on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) Symptoms and Low IQ? *J of Consulting and Clinical Psychology*. 2004;72(2):218-226.
- (5) Jordi Julvetz, Nuria Ribas-Fito, et al. Attention behaviour and hyperactivity at age 4 and duration of breast-feeding. *Acta Paediatrica*. 2007;96(6):842-847.
- (6) Swing, E. L., D. A. Gentile, et al. Television and video game exposure and the development of attention problems. *Pediatrics*. 2010;126(2):214-221.
- (7) Pelsser, Lidy M., Franken Klass, et al. Effects a restricted elimination diet on the behavior of children with attention-deficit hyperactivity disorder (INCA study): a randomized controlled trial. *Lancet*. 2011;377:494-503.
- (8) Martel MM, Nikolas M, Jarnigan K, et al. The dopamine receptor D4 gene (DRD4) moderates family

- environmental effects on ADHD. *J Abnorm Child Psychol.* 2011;39:1-10.
- (9) Nikolas M, Friderici K, Waldman I, et al. Gene x environment interactions for ADHD: synergistic effect of 5HTTLPR genotype and youth appraisals of inter-parental conflict. *Behav Brain Funct.* 2010;6:23.
- (10) Nobile M, Rusconi M, Bellina M, et al. COMT Val158Met polymorphism and socioeconomic status interact to predict attention deficit/hyperactivity problems in children aged 10-14. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2010;19: 549-557.
- (11) Lasky-Su J, Faraone SV, Lange C, et al. A study of how socioeconomic status moderates the relationship between SNPs encompassing BDNF and ADHD symptom counts in ADHD families. *Behav Genet.* 2007;37: 487-497.
- (12) Sonuga-Barke EJ, Lasky-Su J, Neale BM, et al. Does parental expressed emotion moderate genetic effects in ADHD? An exploration using a genome wide association scan. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B: 1359-1368.
- (13) Park J, Willmott M, Vetuz G, et al. Evidence that genetic variation in the oxytocin receptor (OXTR) gene influences social cognition in ADHD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010;34: 697-702.
- (14) Müller DJ, Mandelli L, Serretti A, et al. Serotonin transporter gene and adverse life events in adult ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B:1461-1468.
- (15) Laucht, M., M.H. Skowronek, et al. Interacting effects of the dopamine transporter gene and psychosocial adversity on attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms among 15-years-olds from a high-risk community sample. *Arch Gen Psychiatry.* 2007;64(5):585-590.
- (16) Sheese BE, Voelker PM, Rothbart MK, et al. Parenting quality interacts with genetic variation in dopamine receptor D4 to influence temperament in early childhood. *Dev Psychopathol.* 2007;19:1039-1046.

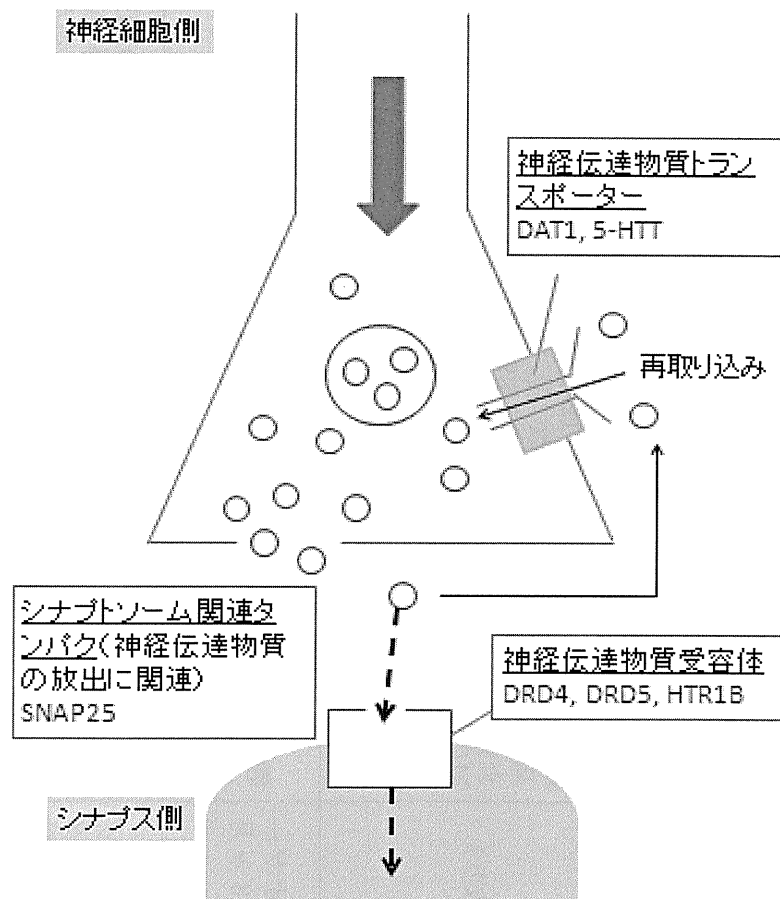


図1 神経伝達物質のADHD関連遺伝子
(Gizerら,2009.を改変)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1. 養育環境要因と ADHD(あるいは ADHD 関連症状)との関連

著者／国／年	研究デザイン	対象者	曝露評価	ADHD の評価	結果
Tully et al., 2004 UK	後ろ向き コーホー ト	低体重出生の 双子の 5 歳児 2232 組	母性的温かさ(ビデオ 撮影された子どもの 反応からコード化し た感情表現)	教員と養育者による ADHD 症状の調査 票	ADHD 得点において、児の体重と母性的 温かさの間に有意な交互作用があった。 IQ とは関係しなかった。
Jurvetz et al., 2007 Spain	前向き出 生コーホ ート	4 歳児 500 名 (2 箇所のコ ーホート)	授乳期間(聞き取り)	ADHD-DSM-IV に 基づく教員による調 査票 MCSA(神経心理学 検査) 教員による CPSCS	授乳 12 週以上は ADHD 得点と社会適応 の改善が認められた (ADHD RR=0.56;95%CI.0.37-0.85; 社会適応 RR=0.57;95%CI.0.52-0.66)。 授乳 20 週以上は実行機能と関連があっ た(RR=0.49;95%CI.0.6-9.2)。 交絡要因調整後も効果は維持した。
Swing et al., 2009 USA	縦断研究	6 歳から 12 歳 1323 名	テレビやビデオゲー ムの視聴時間(13 ヶ月 間)	教員による注意機能 の評価	テレビやビデオゲームの視聴は注意機能 と非常に関連している (OR=1.81, 95%CI.1.56-2.11)。
Pelsser et al., 2011 Netherlands	クロスオ ーバーの RCT	ADHD と診断 された 4~8 歳 児 100 名	ダイエット(厳格なダ イエットと健康的ダ イエットの指導を受 ける対照群)	小児科医による ADHD-RS と Conners、SDQ、SPI	ダイエット群は対照群に比べ、ADHD 症 状評価指標の ADHD-RS 得点が 23.7(95%CI 18.6-28.8; p<0.0001)差があ り、両群を交差した結果、30 人中 16 人 (63%)に症状のぶり返しが認められた。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 2. 脳内神経伝達物質と養育環境要因の交互作用と ADHD(あるいは ADHD 関連症状)

著者/ 地域/ 出版年	対象者/ 対象者年齢/ 男児割合/ 研究デザイン	養育環境評価指標 対象/ 評価方法	遺伝評価指標 対象/ 遺伝子多型	結果
<葛藤・自己非難曝露(夫婦間)>				
Martel ら/ アメリカ/ 2011	548 名/ 6-18 歳/ 59%/ 前向きコーホート	父母/ インタビュー調査	児 / <i>DRD4</i> プロモーター VNTR	<i>DRD4</i> リスク型において、一貫したしつげがない群はある群と比べて ADHD の不注意症状が多い($t=2.26$, $P<0.025$, $R^2=0.04$)。 <i>DRD4</i> リスク型において、夫婦間葛藤自己非難が高い群は低い群と比べて ADHD の不注意症状が多い $t=2.82$, $P<0.01$, $R^2=0.07$)。
<経済状況曝露(経済的困難さ・両親の不仲)>				
Nikolas ら/ アメリカ/ 2010	304 名/ 6-18 歳/ 56.6%/ 前向きコーホート	父母/ CPIC 調査	児 / <i>SLC4AC</i> プロモーター A>G	自己非難と <i>SLC4AC</i> 高活性遺伝子型をもつ ADHD との間に正相関 ($r=0.32$, $P<0.001$)。 自己非難と <i>SLC4AC</i> 低活性遺伝子型をもつ ADHD との間に正相関 ($r=0.40$, $P<0.001$)。
<経済状況曝露(社会的経済状況)>				
Lasky-Su ら/ アメリカ/ 2007	701 名/ 12 歳/ 60.9%/ 症例-対照研究	父母/ Hollingshead によって開発された 5 点スケール評価	児 / <i>BNTF</i> 10SNPs	低い社会的経済状況の中で不注意症状と rs1013442 A アレルとの交互作用による有意な増加が認められた($P=0.012$)。 不注意症状と rs1387144 C アレルとの交互作用による有意な増加が認められた($P=0.009$)。
Nobile ら/ イタリア/ 2010	575 名/ 10-14 歳/ 51.5%/ 横断研究	父母/ Hollingshead によって開発された 9 点スケール評価	児 / <i>COMT</i> Val158Met	親の社会的状況が低く、 <i>COMT</i> Val/Val の児のなかで、 <i>COMT</i> と社会的経済状況の交互作用が ADHD に影響を及ぼした ($F=5.693$, $P=0.004$)。
<愛情曝露(母のぬくもり・批判)>				
Sonuga-Barke ら/ ヨーロッパ7カ国/ 2008	958 名/ 5-17 歳/ 86.99%/ 横断研究	父母/ インタビュー調査	児 / 600,000 SNPs*	関連なし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

<社会認識能力曝露>				
Park ら/ イギリス, アイルランド/ 2010	450名/ 16-70歳/ 不明/ 横断研究	児/ CAPA を用いたインタビュー調査	児 / <i>OXTR</i> 5SNPs	ADHD 児において, rs53576 AA 遺伝子型は, AG 遺伝子型と比べて, 社会能力が高かった ($F=5.24, P=0.007$). ADHD 児において, rs13316193 CC 遺伝子型は, TT 遺伝子型と比べて, 社会能力が低かった ($F=3.09, P=0.05$).
<有害な人生の出来事曝露>				
Müller ら/ カナダ/ 2008	110名/ 17-56歳/ 64.5%/ 横断研究	児/ インタビュー調査	児 / <i>NET, COMT, SERTPR</i> (A>G)	<i>SERTPR</i> Long 型変異は, ADHD のうちの感情干渉の管理について有意な増加を示した ($\beta=0.97, P=0.001$).
<強い心理社会的ストレス>				
Laucht ら/ ドイツ/ 2007	305名/ 15歳/ 47.9%/ 前向きコーホート	父母/ the Rutter family adversity index	児/ <i>DAT1</i>	<i>DAT1 10-repeat allele</i> の発症リスクは, 不注意型と多動/衝動型に有意に高かった (不注意型 OR=3.28, CI 1.24-8.68; 多動/衝動型 OR=3.70, CI 1.32-10.40).
<しつけの質曝露>				
Sheese ら/ アメリカ/ 2007	45名/ 4歳/ 64.4%/ 前向きコーホート	児/ 10 分間介護士と交わせる(ビデオ撮影) 父母/ 児のビデオテープを見せた観察的評価方法を用いた調査	児 / <i>DRD4</i> VNTR	7-repeat アレルをもつ児はしつけの質に影響を及ぼし, 低いしつけの質は高い感情の探求と関連あり ($F(1.39)=6.63, P=0.01$).

*; 600,000 SNPs の遺伝子: *NR4A2, PER2, SLC6A1, DRD3, SLC9A9, HES1, ADRA2C, ADRB2, ADRA1B, DRD1, HTR1E, DDC, STX1A, ADRA1A, NFIL3, ADRA2A, ADRB1, SLC18A2, TPH1, BDNF, FADS1, FADS2, ADRBK1, ARRB1, DRD2, HTR3B, TPH2, SYT1, HTR2A, SLC6A2, ARRB2, PER1, PNMT, CHRNA4, COMT, ADRBK2, CSNK1E*.