

**Table 6**  
Adjusted ORs (95% CIs) versus quartile 1 of congener levels as quartiles for otitis media.

		Adjusted						p value for trend <sup>a</sup>
		Quartile 2		Quartile 3		Quartile 4		
		OR	(95% CI)	OR	(95% CI)	OR	(95% CI)	
Concentrations								
All								
PCDDs	OCDD	3.42	(1.38–8.47) <sup>*</sup>	2.77	(1.09–7.03) <sup>*</sup>	2.63	(1.01–6.87) <sup>*</sup>	0.120
PCDFs	2,3,4,7,8-PeCDF	1.62	(0.68–3.88)	2.04	(0.88–4.77)	2.81	(1.20–6.59) <sup>*</sup>	0.015
Non-ortho PCBs	33'44'-TCB (#77)	2.40	(0.99–5.85)	1.42	(0.61–3.29)	3.38	(1.57–7.29) <sup>*</sup>	0.006
Mono-ortho PCBs	233'44'5'-HxCB (#157)	2.39	(1.04–5.51) <sup>*</sup>	1.08	(0.43–2.73)	2.51	(1.07–5.89) <sup>*</sup>	0.157

Adjusted for maternal educational level, parity, duration of breast-feeding, infant gender, environmental tobacco exposure, day care attendance, and blood sampling period in the logistic-regression model.

<sup>a</sup> Quartiles applied to ordinal variables in the model.

\*  $p < 0.05$ .

significantly increased with exposure to DL PCBs in the second and/or third quartiles compared with references. The inter-relationship between food allergy and asthma and eczema is known as the atopic march (Schroeder et al., 2009). The onset of infections, especially those with respiratory symptoms, may be a risk factor for developing allergies (Aberg et al., 1996). Moreover, a marginally positive significant trend was observed for PCDFs in the risk of asthma. However, these observations may be partly explained by misclassification of food allergies, because mothers may not be able to distinguish food allergies from other symptoms such as food intolerance. Therefore, from our results, we speculate that prenatal DLC exposure may help to provoke allergic symptoms after birth.

The Rotterdam study suggested that increased infections in early life may stimulate maturation of the immune system, resulting in decreased development of allergies (Weisglas-Kuperus et al., 2000, 2004). However, the current study found a significant association between DLC levels and otitis media but a weak association between DLC levels and allergic symptoms. Therefore, the results of the current study suggest that DLC exposure may impair immune function, resulting in decreased resistance to infections after birth. This idea is consistent with a previous study in which DLC levels correlated inversely with IgE levels (Washino et al., 2007). However, the current study may not provide sufficient evidence for this hypothesis because biological markers such as lymphocyte immunophenotypic distributions and Ig levels at 18 months of age were not measured.

Based on maternal parity, infants that were the second born or later were considered to have a sibling. Multivariate analyses were adjusted for risk factors commonly reported to influence infections or allergies (ten Tusscher et al., 2003; Weisglas-Kuperus et al., 2000, 2004). In an additional model, adjusting for the frequency of fish and meat intake, season of birth, distance of home from a highway, or alcohol intake did not change the relationships in this study. This prospective cohort study led to minimal recall bias. We defined the development of allergies with ISSAC or ATC-DLD questionnaires, which are internationally standardized procedures. Infants that had been diagnosed or treated by a doctor were defined as having developed infections. These facts provided validity for the criteria for developing illness. However, we could not exclude the possibility that we underestimated the onset of infant illness because we did not use medical records or a diary for collecting data.

Our results have several limitations. First, our sample size was small for evaluating the low frequency of infant illnesses. Second, despite the small sample size in our study, it was still possible to observe significant relationships although there was a trend towards larger CIs. Third, selection bias may have occurred

because this cohort was derived from a single area maternity hospital. Fourth, we could not obtain postnatal information for newborns who had birth anomalies because those newborns were transferred to other facilities. Finally, the participation rate was low (29%), partially because we excluded pregnant women who had decided to enroll in the Japanese cord blood bank (22% of those of approached) or who delivered their baby at another hospital (3% of those of approached). These exclusions may limit the extrapolation of our results to the general population.

In further studies, follow-up into later childhood will be needed, because increased reliability of allergy diagnosis due to immune maturation occurs. A larger population study may allow us to evaluate low-frequency infant health events. Furthermore, the effects of postnatal DLC exposure via breast milk or foods and the relationship to allergies and infections should also be evaluated. In conclusion, prenatal exposure to environmental levels of DLCs may alter immune function and increase the risk of infections in infancy, especially among males. The compound 2,3,4,7,8-PeCDF may be responsible for this.

#### Acknowledgments

We thank the medical staff at Sapporo Toho Hospital and the participants.

#### References

- Aberg, N., Sundell, J., Eriksson, B., Hesselmar, B., Aberg, B., 1996. Prevalence of allergic diseases in schoolchildren in relation to family history, upper respiratory infections, and residential characteristics. *Allergy* 51, 232–237.
- Chao, W.Y., Hsu, C.C., Guo, Y.L., 1997. Middle-ear disease in children exposed prenatally to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans. *Arch. Environ. Health* 52, 257–262.
- Dallaire, F., Dewailly, E., Muckle, G., Vezina, C., Jacobson, S.W., Jacobson, J.L., et al., 2004. Acute infections and environmental exposure to organochlorines in Inuit infants from Nunavik. *Environ. Health Perspect.* 112, 1359–1365.
- Dallaire, F., Dewailly, E., Vezina, C., Muckle, G., Weber, J.P., Bruneau, S., et al., 2006. Effect of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls on incidence of acute respiratory infections in preschool Inuit children. *Environ. Health Perspect.* 114, 1301–1305.
- Hara, I., 1985. Health status and PCBs in blood of workers exposed to PCBs and of their children. *Environ. Health Perspect.* 59, 85–90.
- Heilmann, C., Grandjean, P., Weihe, P., Nielsen, F., Budtz-Jorgensen, E., 2006. Reduced antibody responses to vaccinations in children exposed to polychlorinated biphenyls. *PLoS Med.* 3, e311.
- Hertz-Picciotto, I., Jusko, T.A., Willman, E.J., Baker, R.J., Keller, J.A., Teplin, S.W., et al., 2008. A cohort study of in utero polychlorinated biphenyl (PCB) exposures in relation to secondary sex ratio. *Environ. Health* 7, 37.
- ISAAC Steering Committee, 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 351, 1225–1232.

- Kaneko, H., Matsui, E., Shinoda, S., Kawamoto, N., Nakamura, Y., Uehara, R., et al., 2006. Effects of dioxins on the quantitative levels of immune components in infants. *Toxicol. Ind. Health* 22, 131–136.
- Kishi, R., Sasaki, S., Yoshioka, E., Yuasa, M., Sata, F., Saijo, Y., et al., in press. Cohort Profile: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health in Japan. *International Journal of Epidemiology*. doi:10.1093/ije/dyq071.
- Konishi, K., Sasaki, S., Kato, S., Ban, S., Washino, N., Kajiwara, J., et al., 2009. Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ. Res.* 109, 906–913.
- Luebke, R.W., Chen, D.H., Dietert, R., Yang, Y., King, M., Luster, M.I., 2006. The comparative immunotoxicity of five selected compounds following developmental or adult exposure. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 9, 1–26.
- Mastueda, T., Kajiwara, J., Iwamoto, S., Iida, T., Izuno, C., Yoshimura, T., 2007. Analysis of residual nature of dioxins in blood of Yusho patients and controls in relation to the Yusho oil and food as respective exposure routes [in Japanese]. *Fukuoka Igaku Zasshi* 98, 196–202.
- 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.
- Mocarelli, P., Brambilla, P., Gerthoux, P.M., Patterson Jr., D.G., Needham, L.L., 1996. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 348, 409.
- Nagayama, J., Tsuji, H., Iida, T., Nakagawa, R., Matsueda, T., Hirakawa, H., et al., 2007. Immunologic effects of perinatal exposure to dioxins, PCBs and organochlorine pesticides in Japanese infants. *Chemosphere* 67, S393–398.
- Nakai, S., Hashimoto, O., Yoshida, K., Nakanishi, J., 2001. Estimation of half-lives of 2,3,4,7,8-chlorine substituted dioxins and furans and dioxin-like PCBs in humans. *Organohalogen Compd.* 52, 330–333.
- Nishima, S., Chisaka, H., Fujiwara, T., Furusho, K., Hayashi, S., Hiraba, K., et al., 2009. Surveys on the prevalence of pediatric bronchial asthma in Japan: a comparison between the 1982, 1992, and 2002 surveys conducted in the same region using the same methodology. *Allergol. Int.* 58, 37–53.
- Park, H.Y., Hertz-Picciotto, I., Petrik, J., Palkovicova, L., Kocan, A., Trnovec, T., 2008. Prenatal PCB exposure and thymus size at birth in neonates in Eastern Slovakia. *Environ. Health Perspect.* 116, 104–109.
- Rogan, W.J., Gladen, B.C., Hung, K.L., Koong, S.L., Shih, L.Y., Taylor, J.S., et al., 1988. Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science* 241, 334–336.
- Schechter, A., Gasiewicz, T.A. (Eds.), 2003. *Dioxins and Health* second ed. Wiley, Hoboken, NJ.
- Schroeder, A., Kumar, R., Pongracic, J.A., Sullivan, C.L., Caruso, D.M., Costello, J., et al., 2009. Food allergy is associated with an increased risk of asthma. *Clin. Exp. Allergy* 39, 261–270.
- Smialowicz, R.J., DeVito, M.J., Williams, W.C., Birnbaum, L.S., 2008. Relative potency based on hepatic enzyme induction predicts immunosuppressive effects of a mixture of PCDDs/PCDFs and PCBs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227, 477–484.
- Sonneborn, D., Park, H.Y., Petrik, J., Kocan, A., Palkovicova, L., Trnovec, T., et al., 2008. Prenatal polychlorinated biphenyl exposures in eastern Slovakia modify effects of social factors on birthweight. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 22, 202–213.
- Sunyer, J., Torrent, M., Munoz-Ortiz, L., Ribas-Fito, N., Carrizo, D., Grimalt, J., et al., 2005. Prenatal dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and asthma in children. *Environ. Health Perspect.* 113, 1787–1790.
- ten Tusscher, G.W., Steerenberg, P.A., van Loveren, H., Vos, J.G., von dem Borne, A.E., Westra, M., et al., 2003. Persistent hematologic and immunologic disturbances in 8-year-old Dutch children associated with perinatal dioxin exposure. *Environ. Health Perspect.* 111, 1519–1523.
- Todaya, T., Hirakawa, H., Kajiwara, J., Hori, T., Tobiishi, K., Yasutake, D., et al., 2010. Relationship between the concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in maternal blood and those in breast milk. *Chemosphere* 78, 185–192.
- Todaya, T., Hirakawa, H., Tobiishi, K., Iida, T., 2003. New protocol of dioxins analysis in human blood. *Fukuoka Igaku Zasshi* 94, 148–157.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., 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, 223–241.
- Washino, N., Saijo, Y., Konishi, K., Kato, S., Sasaki, S., Ban, S., et al., 2007. Proceeding from the effect of prenatal exposure to dioxins on cord serum IGE. In: *Proceedings of the 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants*, 2–7 September 2007, Tokyo.
- Weisglas-Kuperus, N., Patandin, S., Berbers, G.A., Sas, T.C., Mulder, P.G., Sauer, P.J., et al., 2000. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environ. Health Perspect.* 108 (1203–1207).
- Weisglas-Kuperus, N., Vreugdenhil, H.J., Mulder, P.G., 2004. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. *Toxicol. Lett.* 149, 281–285.
- Yoshizawa, K., Heatherly, A., Malarkey, D.E., Walker, N.J., Nyska, A., 2007. A critical comparison of murine pathology and epidemiological data of TCDD, PCB126, and PeCDF. *Toxicol. Pathol.* 35, 865–879.
- Yu, M.L., Hsin, J.W., Hsu, C.C., Chan, W.C., Guo, Y.L., 1998. The immunologic evaluation of the Yucheng children. *Chemosphere* 37, 1855–1865.

## COHORT PROFILE

# Cohort Profile: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health in Japan

Reiko Kishi,<sup>1\*</sup> Seiko Sasaki,<sup>1</sup> Eiji Yoshioka,<sup>1</sup> Motoyuki Yuasa,<sup>2</sup> Fumihiko Sata,<sup>3</sup> Yasuaki Saijo,<sup>4</sup> Norie Kurahashi,<sup>5</sup> Junko Tamaki,<sup>6</sup> Toshiaki Endo,<sup>7</sup> Kazuo Sengoku,<sup>8</sup> Katsuya Nonomura<sup>9</sup> and Hisanori Minakami,<sup>10</sup> for the Hokkaido Study on Environment and Children's Health<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Department of Public Health Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan, <sup>2</sup>Department of Public Health, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan, <sup>3</sup>Department of Epidemiology, National Institute of Public Health, Wako, Japan, <sup>4</sup>Department of Health Science, School of Medicine, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan, <sup>5</sup>Epidemiology and Prevention Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center, Tokyo, Japan, <sup>6</sup>Department of Public Health, School of Medicine, Kinki University, Osaka, Japan, <sup>7</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan, <sup>8</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan, <sup>9</sup>Department of Renal and Genitourinary Surgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan and <sup>10</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan

\*Corresponding author. Department of Public Health Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine, North 15 West 7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan. E-mail: rkishi@med.hokudai.ac.jp

<sup>†</sup>The members of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health are listed in Appendix 1

Accepted 24 March 2010

## How did the study come about?

The Hokkaido study of Environment and Children's Health is an ongoing cohort study that began in 2002. The study consists of two prospective birth cohorts: the Toho hospital cohort with one obstetric hospital in Sapporo City, and the Hokkaido large-scale cohort with 37 hospitals and clinics in Hokkaido prefecture. Hokkaido is the northernmost and the second largest island of Japan: it has an area of ~78 417 km<sup>2</sup>, equivalent to that of Austria. Its population is 5 546 559, which is similar to that of Finland.

Persistent organic pollutants (POPs) including polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs), as well as perfluorooctanoate sulphinate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA), the final metabolites of fluorinated organic compounds (FOCs), may accumulate in the human body. These environmental chemicals may contribute to numerous adverse health effects including growth retardation of fetuses and infants, disturbances of the neurodevelopment, thyroid, immune and reproductive systems and may exert genetic or epigenetic effects when metabolized. In the USA, lower level PCB exposure during pregnancy was associated with decreased birth weight.<sup>1–3</sup> In Finland, total toxic equivalent (TEQ) levels of PCDDs/PCDFs in breast milk negatively correlated with birth weight, especially of boys.<sup>4</sup> In a Dutch report, negative effects of prenatal dioxin

and PCB exposure on cognitive and motor development were found in school-age children.<sup>5</sup> An assessment of childhood play behaviour at 9 years of age correlated higher prenatal PCB levels with less masculinized play in boys and with more masculinized play in girls. Higher prenatal dioxin levels were associated with more feminized play in both boys and girls.<sup>6</sup> Concerning the immunological effects of environmental exposure, prenatal PCB exposure was associated with less shortness of breath with wheezing; postnatal PCB exposure was associated with a higher prevalence of recurrent otitis media.<sup>7,8</sup> Two studies reported correlations between prenatal PFOS/PFOA exposure and reduced birth weight.<sup>9,10</sup>

Congenital malformations such as hypospadias are speculated to be related to genetic variations in the synthesis and metabolism of steroids combined with environmental factors. Hypospadias are a common congenital malformation caused by incomplete fusion of the urethral folds. Recently, a number of reports indicate an increased prevalence of hypospadias in various countries including Japan; this trend is speculated to be related to endocrine-disrupting chemicals.<sup>11</sup> Previous studies were limited to assess either genetic or environmental contributions to its etiology; for example, case-control studies reported genetic polymorphisms associated with hypospadias and nested case-control studies reported an association of hypospadias with agricultural exposures.<sup>12–15</sup>

Several birth cohorts have been established worldwide in recent years; however, few reports have been published on the relationship between low-level environmental exposures and adverse birth outcomes. In the field of infant development, variations in the human genome and their modifications on the effect of hazardous environmental exposures (gene-environment interaction) have not been thoroughly investigated.

The study was established to investigate the effects of environmental exposure combined with genetic predisposition in the development and health in prenatal period, infancy and early childhood.<sup>16</sup>

### What does the study cover?

The aims of the study are the following: (i) to examine possible negative effects of perinatal environmental factors on birth outcomes including congenital anomalies and growth retardation; (ii) to follow the prevalence of allergic diseases or neurodevelopmental disorders, and perform longitudinal observation of child development; (iii) to identify a high-risk group classified by genetic susceptibility to environmental chemicals; and (iv) to identify additive effects of various chemicals encountered in the daily environment.

In particular, the Toho hospital cohort has focused on the association between child growth, neurodevelopment and allergy, and low-level exposure to environmental chemicals during pregnancy and infancy. The Hokkaido large-scale cohort was established primarily to assess the prevalence of congenital anomalies including cleft lip and palate, congenital heart defects, hypospadias and cryptorchidism, and has explored the possible causes of these malformations. This cohort also follows the prevalence of childhood allergies and neurodevelopmental disorders such as attention deficit hyperactivity disorder (ADHD).

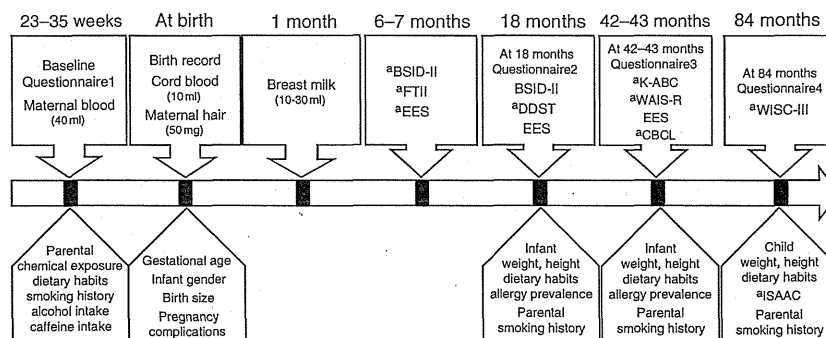
### Who are in the sample?

The Institutional Ethical Board for Human Gene and Genome studies at Hokkaido University Graduate School of Medicine approved the study protocol. The study was conducted with the informed consent of all subjects. The enrolment of the Toho hospital cohort was conducted from July 2002 to October 2005. Of 1796 potentially eligible women, 514 agreed to participate. The subjects were women who enrolled at 23–35 weeks of gestation and delivered at the Toho hospital. All the subjects were resident in Sapporo City or surrounding areas. Since February 2003, the Hokkaido large-scale cohort has conducted enrolment of women in early pregnancy (<13 weeks of gestational age) that visited one of associated hospitals or clinics in the study area for prenatal health care at the maternity unit. The total number of infants whose congenital anomalies were surveyed in the cohort was 9335 until 2006. This cohort will consist of 20 000 children. Each cohort will follow its participants up to school age.

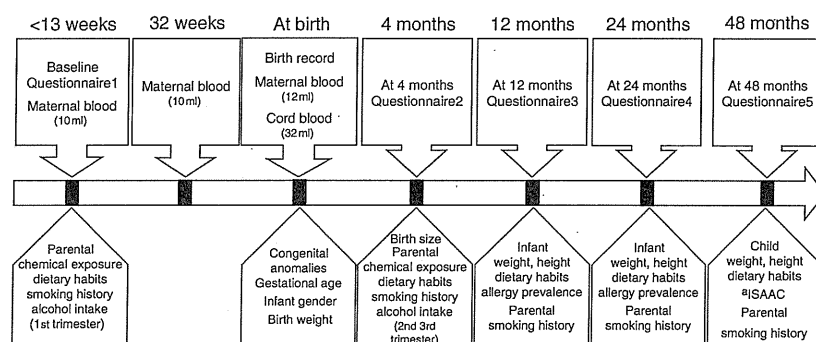
### What has been measured?

The protocol for study design and exposure measurement items is presented in Figures 1 and 2, and Table 1.

In the Toho hospital cohort, a self-administered questionnaire was completed at the time of enrolment to obtain baseline information including parental demographic characteristics, dietary habits including the amount and species of fish consumed, exposure to chemical compounds in their daily life, smoking history, alcohol consumption, caffeine intake and household income. Information on pregnancy complications, gestational age at birth, infant gender and birth size was obtained from maternal and infant medical records. Maternal blood samples were



**Figure 1** Study design of the Toho hospital cohort. BSID-II: The Bayley Scales of Infant Development second edition; FTII: The Fagan Test of Infant Intelligence; K-ABC: The Kaufman Assessment Battery for Children; WAIS-R: The Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised; WISC-III: The Wechsler Intelligence Scale for Children third edition; EES: The Evaluation of Environmental Stimulation; DDST: The Denver Developmental Screening Tests; CBCL, the Child Behaviour Checklist; ISAAC: International Study of Asthma and Allergies in Childhood



**Figure 2** Study design of the Hokkaido large-scale cohort. ISAAC: International Study of Asthma and Allergies in Childhood

**Table 1** Items measured in the Hokkaido study of Environment and Children's Health

Measurement	Description
<b>Exposure measurement</b>	
PCDDs, PCDFs	Maternal blood, cord blood and breast milk
PCBs	Maternal blood, cord blood and breast milk
OH-PCBs	Maternal blood, cord blood and breast milk
PFOS, PFOA	Maternal blood, cord blood and breast milk
BPA, NP	Maternal blood, cord blood and breast milk
DEHP	Maternal blood, cord blood, and breast milk
Pesticides	Maternal blood, cord blood and breast milk
Heavy metals	Maternal blood, cord blood and breast milk
MeHg	Maternal blood, cord blood and maternal hair
Cotinine	Maternal blood, cord blood and maternal hair
<b>Other biochemical measurements</b>	
TSH, FT4	Maternal blood and infant blood
Folic acid	Maternal blood and cord blood
IgE, IgA	Cord blood

OH-PCBs: hydroxylated polychlorinated biphenyls; BPA: bisphenol A; NP: nonylphenol; DEHP: Di(2-ethylhexyl)phthalate; MeHg: methylmercury; TSH: thyroid stimulating hormone; FT4: free thyroxine.

collected in late pregnancy, usually after the 30th week of gestation. Cord blood and placenta were taken immediately after birth. Maternal hair samples were also collected within 5 days after delivery, and breast milk from nursing mothers was collected within 4 weeks following birth.

The levels of PCDDs/PCDFs and PCBs in maternal blood and breast milk were measured using a high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometre (HRGC/HRMS) at Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences.<sup>17-20</sup> PFOS and PFOA levels in maternal blood, cord blood and breast milk were analysed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) at Hoshi University.<sup>21,22</sup> Total mercury levels in maternal

hair samples were measured by an oxygen combustion-gold amalgamation method using an atomic absorption detector at National Institute for Minamata Disease.<sup>23</sup> Cord serum immunoglobulin E (IgE) and immunoglobulin A (IgA) were also determined. In order to avoid the possibility of maternal blood contamination, we regarded any cord serum IgA > 10 mg/dl sample as inappropriate. Thyroid stimulating hormone (TSH) and FT4 levels of mother and newborn were measured as a mass screening programme in Sapporo City. For these examinations, a maternal blood sample was collected in the first trimester and a neonate blood sample on filter paper was collected between 4 and 7 days of age. Maternal serum cotinine concentration in maternal blood was

measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit to evaluate smoking exposure levels. Genetic polymorphisms were determined by means of the TaqMan (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) polymerase chain reaction (PCR) method, using minor groove binder (MGB) probes.

A follow-up questionnaire was also used at 18, 42 and 84 months of age to obtain relevant information including allergy prevalence, dietary habits and smoking history of mother and the partner. In addition, the Toho hospital cohort has assessed the influence of low-level intrauterine exposure of toxic chemicals on childhood neurodevelopment. The Bayley Scales of Infant Development second edition (BSID-II) was used to at 6–7 and 18 months of age. The Fagan Test of Infant Intelligence (FTII) was performed to measure visual recognition memory and cognitive ability on infants aged 6–7 months. To examine developmental progress, the Japanese version of the Denver Developmental Screening Tests (DDST) was used at age 18 months. At 42 months of age, child and maternal intelligence were measured by Japanese version of the Kaufman Assessment Battery for Children (K-ABC) and the Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised (WAIS-R), respectively. The Wechsler Intelligence Scale for Children third edition (WISC-III) was used to assess the attention and motor function of children at 84 months of age. The questionnaire of home environment, the Evaluation of Environmental Stimulation (EES), was used to investigate the environmental conditions of children at 6, 18 and 43 months of age. The Japanese version of the Child Behavior Checklist (CBCL) was used to collect information on child behaviour at age 43 months.

In the Hokkaido large-scale cohort, a baseline questionnaire survey was conducted at the time of enrolment during the first trimester to obtain parental information such as demographic characteristics, medical and obstetric history, dietary supplement intake during pregnancy and chemical exposure at work. Perinatal data such as birth weight, infant gender, mode of delivery, multiple births and prevalence of congenital anomalies were obtained from birth records completed by an obstetrician. The congenital anomalies were classified into 55 markers according to the criteria. The first follow-up questionnaire was used on infants at 4 months of age to obtain relevant data including birth size, gestational age at birth and parental smoking history in the second and third trimester. The follow-up questionnaire was administered at age 12, 24 and 48 months to obtain relevant information such as child weight and height measured at regular health checkups, vaccination history, dietary habits, parental smoking history and allergy prevalence using the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). The CBCL was used to investigate association between perinatal exposure and developmental

disorder. Maternal blood was collected three times: between 6 and 14 weeks of gestational age as an organogenetic period; during the third trimester; and at delivery. Cord blood was taken immediately after birth. Maternal serum was used to measure folic acid level and plasma cotinine concentration.

## What has the study found?

A total of 514 mothers were registered in the Toho hospital cohort and 16 306 mothers were registered in the Hokkaido large-scale cohort up to the end of November 2009. Table 2 shows characteristics of mothers and infants in the Toho hospital cohort, and Table 3 shows those of the Hokkaido large-scale cohort. These two cohorts did not show significant difference in characteristics of mothers and infants.

### Effects of PCDD/PCDF and dioxin-like PCB exposure on birth weight

We measured 29 congener levels of PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in maternal blood to examine an association between these concentrations and infant

**Table 2** Characteristics of mothers and infants in the Toho hospital cohort

	<i>N</i> = 484 <i>n</i> (%) or mean ± SD
<b>Maternal characteristics</b>	
Age (years)	30.7 ± 4.9
Parity	
0	230 (47.5)
≥ 1	254 (52.5)
Educational level (years)	
< 10	14 (2.9)
10–13	201 (41.5)
13–17	261 (53.9)
≥ 17	8 (1.7)
Household income (million yen)	
< 3	93 (19.2)
3–5	241 (49.8)
≥ 5	150 (31.0)
Smoking status during pregnancy	
Non-smoker	289 (59.7)
Quitter	105 (21.7)
Smoker	90 (18.6)
<b>Infant characteristics</b>	
Birth weight (g)	3065 ± 375
Gestational age (weeks)	39.0 ± 1.4

SD: standard deviation.

**Table 3** Characteristics of mothers and infants in the Hokkaido large-scale cohort

	N=2777 n (%) or mean $\pm$ SD
<b>Maternal characteristics</b>	
Age (years)	29.9 $\pm$ 4.6
Parity (n=2515)	
0	992 (39.4)
$\geq 1$	1523 (60.6)
Educational level (years, n=2752)	
<10	137 (5.0)
10-13	1294 (47.0)
13-17	1089 (39.6)
$\geq 17$	232 (8.4)
Household income (million yen, n=2297)	
<3	487 (21.2)
3-5	1055 (45.9)
$\geq 5$	755 (32.9)
Smoking status during pregnancy	
Non-smoker	625 (61.5)
Quitter	265 (26.1)
Smoker	126 (12.4)
<b>Infant characteristics</b>	
Birth weight (g)	3041 $\pm$ 411
Gestational age (weeks)	38.9 $\pm$ 1.5

birth weight in the Toho hospital cohort. The mean TEQ level was 17.5 TEQ pg/g lipid in maternal blood. We found a 272.7-g decrease in birth weight with a 10-fold increase in total PCDF levels [95% confidence interval (CI) -505.8 to -39.5] after adjustment for potential covariates such as infant gender, gestational age, parity, maternal age and maternal smoking status during pregnancy. Total PCDD TEQ (-231.5 g, 95% CI -417.4 to -45.6), total PCDF TEQ (-258.8 g, 95% CI -445.7 to -71.8), total PCDD/PCDF TEQ (-256.4 g, 95% CI -448.6 to -64.2) and total TEQ (-220.5 g, 95% CI -399.2 to -41.9) levels were significantly negatively associated with birth weight among all infants. Among male infants, significant adverse associations with birth weight were found for total PCDD TEQ level, total PCDD/PCDF TEQ level and total TEQ level; however, these significant adverse associations were not found among female infants. Moreover, we found significantly negative association with the levels of 2,3,4,7,8-PeCDF (-24.5 g, 95% CI -387.4 to -61.5). Our findings suggest that prenatal low-level exposure to PCDDs and PCDFs may result in lower birth weight, which may accumulate in the placenta and retard important placental functions.<sup>24</sup>

### Effects of PFOS and PFOA exposure on birth weight

We examined a correlation between maternal serum PFOS and PFOA concentrations and infant birth weight in the Toho hospital cohort. Concentrations ranged from 1.3 to 16.2 ng/ml for PFOS and from below the detection limit to 5.3 ng/ml for PFOA (both detection limits were 0.5 ng/ml). A log<sub>10</sub>-unit increase in PFOS levels correlated with a decrease in birth weight of 148.8 g (95% CI 297.0 to 0.5) after adjusting for confounders; however, no correlation was observed between PFOA levels and birth weight. Our results indicate that *in utero* exposure to relatively low levels of PFOS negatively correlates with birth weight.<sup>25</sup>

### Low birth size in relation to maternal smoking and genetic polymorphisms

The effects of maternal smoking and genetic polymorphisms on infant birth size were examined in the Toho hospital cohort. Birth weight and length were significantly lower among infants born to smokers with the aryl hydrocarbon receptor (*Ahr*) GG genotype, the cytochrome P-450 1A1 (*CYP1A1*) TC/CC genotype or the glutathione S-transferase T1 (*GSTM1*) null genotype. When combinations of these genotypes were considered, birth weight and length were significantly lower for infants of continuously smoking women with the *Ahr* GG genotype and *CYP1A1* TC/CC genotype (-315 g and -1.7 cm, respectively) and with the *CYP1A1* TC/CC genotype and *GSTM1* null genotype (-237 g and -1.3 cm, respectively). For polymorphisms in gene-encoding N-nitrosamine-metabolizing enzymes -NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*)- birth weight, birth length and birth head circumference were significantly reduced (-199 g, -0.8 cm and -0.7 cm, respectively) among infants born to smokers with the *NQO1* CC genotype. This genotype did not confer adverse effects among women who had never smoked or who quit smoking during the first trimester. Our results suggest an important modulating role for polymorphisms in metabolizing enzyme genes in concert with adverse effects of maternal smoking on infant birth size.<sup>26,27</sup>

### Effects of PCDD/PCDF and dioxin-like PCB exposure on neurodevelopment

We used the BSID-II to evaluate a correlation between maternal PCDD/PCDF and dioxin-like PCB levels and the mental and motor development of their 6-month-old infants in the Toho hospital cohort. The mean mental development index (MDI) and psychomotor development index (PDI) scores were 91.9 and 89.3, respectively. After adjustment for potential confounding variables, total PCDDs, total PCDDs/PCDFs and 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD were significantly negatively associated with MDI. Total 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD,

2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF and 1,2,3,6,7,8-HxCDF were significantly negatively associated with PDI. However, the total levels of PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs were not significantly associated with PDI, and the TEQ values were not significantly associated with MDI or PDI. Our results suggest that the low-level exposure of several congeners of PCDDs/PCDFs during pregnancy affect the neurodevelopment of 6-month-old infants.<sup>28</sup>

### The prevalence of congenital anomalies

We estimated the prevalence of congenital anomalies in Hokkaido prefecture. Among 9335 infants included in the Hokkaido large-scale cohort between 2003 and 2006, there were 215 infants with congenital anomalies. The most frequent congenital anomaly was congenital heart defects, followed by Down syndrome, hydronephrosis, polydactyly and cryptorchidism (Table 4). The total prevalence of congenital anomalies was similar to nationwide data reported by the Japan Association of Obstetricians & Gynecologists (JAOG); however, the number of serious cases was less than that of the JAOG. Members of JAOG consist of university and tertiary hospitals, whereas those of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health are general hospitals and clinics.

### What are the main strengths and weaknesses of the study?

The design of our study is a prospective cohort study intended to collect data on environmental exposures during the fetal period and to control for potential confounders. The detailed measurements are adequate to detect various effects of perinatal environmental and genetic determinant on outcomes in childhood. The Toho hospital cohort study has conducted face-to-face examinations for neurodevelopment assessment. The Hokkaido large-scale cohort is the largest birth cohort in Japan. Potential problems with both cohorts include the fact that they are hospital-based studies, which may result in selection bias. Some levels of attrition related to individuals moving outside the study area has occurred, though we send participants periodical newsletters to maintain the profile of study.

### Can I get hold of the data?

Additional information about the Hokkaido study is available at the study website: <http://www.med.hokudai.ac.jp/~pubmed-w/EnglishHP/e%20research%20groups%202.htm>. All collected source data are maintained and stored at the Department of Public Health Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine. Initial approaches or enquiries

**Table 4** Prevalence of congenital anomalies in the Hokkaido large-scale cohort (2003–06)

	Hokkaido large-scale cohort (in 10 000 persons)	JAOG (2006) (in 10 000 persons)
<b>Head</b>		
Anencephaly	2.8	–
Microcephaly	0.7	–
Hydrocephaly	2.1	6.5
Holoprosencephaly	1.4	–
<b>Ear</b>		
Microtia	1.4	–
Meatal atresia	1.4	–
Cryptotia	2.1	–
Low-set ears	1.4	10.8
<b>Orofacial</b>		
Cleft lip	4.2	8.4
Cleft plate	4.9	6.4
Cleft lip and cleft plate	7.0	15.1
<b>Upper limb</b>		
Polydactyly	7.7	6.5
Syndactyly	2.8	5.1 <sup>b</sup>
<b>Trunk</b>		
Myelomeningocele (spina bifida)	2.1	5.0
Omphalocele	2.1	4.3
Gastroschisis	2.8	–
Other abdominal wall defects	7.7	–
<b>Heart</b>		
Congenital heart disease	26.4	–
<b>Digestive organ</b>		
Esophageal atresia	1.4	–
Anorectal anomaly	3.5	–
Intestinal atresia	2.8	6.8
Doudenal atresia	2.1	–
<b>Urinary and genital organs</b>		
Hydronephrosis	9.0	–
Renal dysplasia	2.8	–
Hypospadias <sup>a</sup>	8.3	3.7 <sup>b</sup>
Cryptorchidism <sup>a</sup>	12.5	–
Ambiguous genitalia	5.6	–
<b>Leg</b>		
Polydactyly	2.8	4.7 <sup>b</sup>
Syndactyly	2.8	–
Cleft foot	0.7	–
<b>Syndromes or chromosomal aberration</b>		
Down syndrome	9.7	9.7
Trisomy 18 syndrome	2.1	–

Dashes represent data not surveyed.

<sup>a</sup>Male infants only, the prevalence rate shown in the Table is per 10 000 male infants.

<sup>b</sup>Data from 1997 to 2005.



regarding the study can be made to the principal investigator (rkishi@med.hokudai.ac.jp).

## Funding

Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare; the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; and the Japan Society for the Promotion of Science.

## Acknowledgements

The authors would like to express special gratitude for all the personnel in hospitals and clinics that collaborated with the study: Aoba Ladies Clinic, Akiyama Memorial Hospital, Asahikawa Medical College Hospital, Asahikawa Red Cross Hospital, Engaru-Kosei General Hospital, Endo Kikyō Maternity Clinic, Ohji General Hospital, Obihiro-Kyokai Hospital, Obihiro-Kosei General Hospital, Kitami Red Cross Hospital, Kitami Lady's Clinic, Kin-ikyō Sapporo Hospital, Kushiro Red Cross Hospital, Kushiro Rosai Hospital, Keiai Hospital, Kohnan Hospital, Gorinbashi Hospital, Sapporo City General Hospital, Sapporo Medical University Hospital, Sapporo-Kosei General Hospital, Sapporo Tokushukai Hospital, Shibetsu City General Hospital, Shiroishi Hospital Tenshi Hospital, Nakashibetsu Municipal Hospital, Nakamura Hospital, Nayoro City General Hospital, Nikko Memorial Hospital, Hakodate City Hospital, Hakodate Goryoukaku Hospital, Hakodate Central General Hospital, Hashimoto Clinic, Hoyukai Sapporo Hospital, Hokkaido University Hospital, Memuro Municipal Hospital, Hokkaido Monbetsu Hospital and Wakkanai City Hospital.

## References

- Karmaus W, Zhu X. Maternal concentration of polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichlorethylene and birth weight in Michigan fish eaters: a cohort study. *Environ Health* 2004;**3**:1.
- Hertz-Picciotto I, Charles MJ, James RA, Keller JA, Willman E, Teplin S. In utero polychlorinated biphenyl exposures in relation to fetal and early childhood growth. *Epidemiology* 2005;**16**:648–56.
- Sagiv SK, Tolbert PE, Altshul LM *et al*. Organochlorine exposures during pregnancy and infant size at birth. *Epidemiology* 2007;**18**:120–29.
- Vartiainen T, Jaakkola JJ, Saarikoski S *et al*. Birth weight and sex of children and the correlation to the body burden of PCDDs/PCDFs and PCBs of the mother. *Environ Health Perspect* 1998;**106**:61–66.
- Vreugdenhil HJ, Lanting CI, Mulder PG *et al*. Effects of prenatal PCB and dioxin background exposure on cognitive and motor abilities in Dutch children at school age. *J Pediatr* 2002;**140**:48–56.
- Vreugdenhil HJ, Slijper FM, Mulder PG *et al*. Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in Dutch children at school age. *Environ Health Perspect* 2002;**110**:593–98.
- Weisglas-Kuperus N, Patandin S, Berbers GA *et al*. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environ Health Perspect* 2000;**108**:1203–7.
- Weisglas-Kuperus N, Vreugdenhil HJ, Mulder PG. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. *Toxicol Lett* 2004;**149**:281–85.
- Apelberg BJ, Witter FR, Herbstman JB *et al*. Cord serum concentrations of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Perspect* 2007;**115**:1670–76.
- Fei C, McLaughlin JK, Tarone RE, Olsen J. Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish National Birth Cohort. *Environ Health Perspect* 2007;**115**:1677–82.
- Kurahashi N, Murakumo M, Kakizaki H *et al*. The estimated prevalence of hypospadias in Hokkaido, Japan. *J Epidemiol* 2004;**14**:73–77.
- Kurahashi N, Sata F, Kasai S *et al*. Maternal genetic polymorphisms in CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 and the risk of hypospadias. *Mol Hum Reprod* 2005;**11**:93–98.
- Ban S, Sata F, Kurahashi N *et al*. Genetic polymorphisms of ESR1 and ESR2 that may influence estrogen activity and the risk of hypospadias. *Hum Reprod* 2008;**23**:1466–71.
- Carbone P, Giordano F, Nori F *et al*. The possible role of endocrine disrupting chemicals in the aetiology of cryptorchidism and hypospadias: a population-based case-control study in rural Sicily. *Int J Androl* 2007;**30**:3–13.
- Weidner IS, Moller H, Jensen TK *et al*. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* 1998;**106**:793–96.
- Kishi R, Sata F, Yoshioka E *et al*. Exploiting gene-environment interaction to detect adverse health effects of environmental chemicals on the next generation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;**102**:191–203.
- Iida T, Todaka T. Measurement of dioxins in human blood: improvement of analytical method. *Ind Health* 2003;**41**:197–204.
- Todaka T, Hirakawa H, Tobiihi K *et al*. New protocol of dioxins analysis in human blood. *Fukuoka Igaku Zasshi* 2003;**94**:148–57.
- Todaka T, Hirakawa H, Kajiwara J *et al*. Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 195 pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere* 2007;**69**:1228–37.
- Todaka T, Hori T, Hirakawa H *et al*. Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 195 pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere* 2008;**73**:923–31.
- Inoue K, Okada F, Ito R *et al*. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:1204–7.
- Inoue K, Okada F, Ito R *et al*. Determination of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoate and

- perfluorooctane sulfonylamide in human plasma by column-switching liquid chromatography-electrospray mass spectrometry coupled with solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;**810**: 49–56.
- <sup>23</sup> Konishi K, Sasaki S, Kato S *et al.* Effect of prenatal exposure to dioxins on birth weight. *Persistent Organic Pollutants (POPs) Research in Asia* 2008;362–67.
- <sup>24</sup> Konishi K, Sasaki S, Kato S *et al.* Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res* 2009;**109**:906–13.
- <sup>25</sup> Washino N, Saijo Y, Sasaki S *et al.* Correlation between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect* 2009;**117**: 660–67.
- <sup>26</sup> Sasaki S, Kondo T, Sata F *et al.* Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, *CYP1A1* and *GSTM1* affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:77–83.
- <sup>27</sup> Sasaki S, Sata F, Katoh S *et al.* Adverse birth outcomes associated with maternal smoking and polymorphisms in the N-nitrosamine-metabolizing enzyme genes *NQO1* and *CYP2E1*. *Am J Epidemiol* 2008;**167**:719–26.
- <sup>28</sup> Nakajima S, Saijo Y, Kato S *et al.* Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at 6 months of age. *Environ Health Perspect* 2006;**114**: 773–78.

### Appendix 1: Members of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health

Members of the Hokkaido Study are: Drs K. Cho, T. Yamada, S. Ban, A. Kanazawa, N. Washino, K. Konishi, S. Katoh, A. Uno, T. Baba, T. Yila, C. Miyashita, T. Braimoh, I. Kashino, E. Okada, S. Kobayashi, Y. Otake, and M. Limpar, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo; S. Nakajima and T. Baba, Sapporo Medical University, Sapporo; T. Miyamoto, Asahikawa Medical College, Asahikawa; N. Maeda, Toho Obstetrics & Gynecology Hospital, Sapporo; and H. Haruyama and K. Okuyama, Sapporo City Hospital, Sapporo.

## 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<sup>1)</sup>, 小林 祥子<sup>1)</sup>, 岸 玲子<sup>1)</sup>

### 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くれている。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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>、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<sup>4)</sup>、米国<sup>5)</sup>、台湾<sup>6)</sup>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<sup>7)</sup>。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、最初に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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>。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

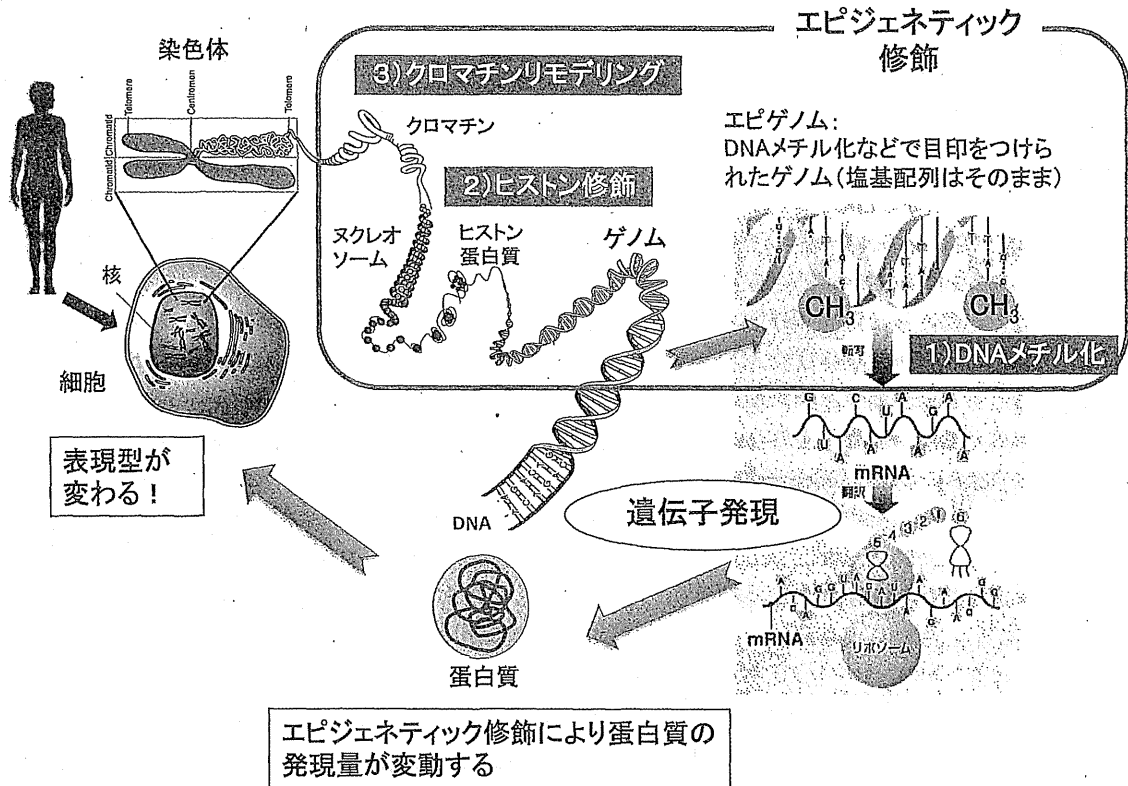


図1 エピジェネティクスのしくみ (National Human Genome Research Instituteのイラストを用いて作成)

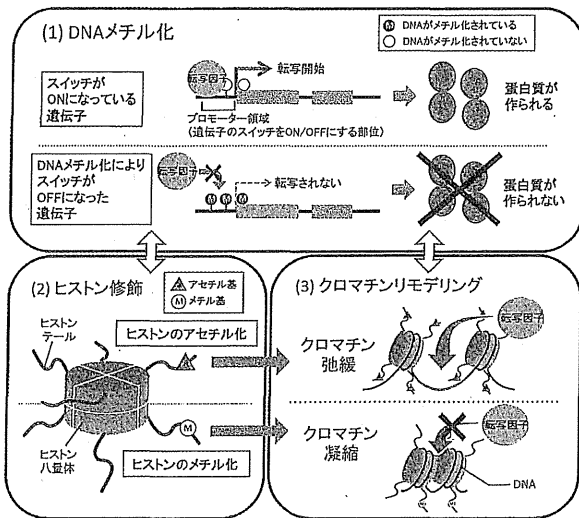


図2 エピジェネティック修飾による遺伝子発現制御機構

継がれていくことが知られている<sup>10)</sup>。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<sup>11)</sup>。また、マウスでは、母親が葉酸・ビタミンB<sub>12</sub>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<sup>12, 13)</sup>。

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<sup>14)</sup>。

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<sup>8, 15)</sup>。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<sup>13)</sup>、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<sup>16)</sup>。ヒトにおいても同様の影響を調べるため、出生コ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<sup>17-20)</sup>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<sup>27-29)</sup>、有機フッ素化合物(PFCs)<sup>21)</sup>、有機塩素系化合物(DDE)<sup>30)</sup>が各1報、天然由来のヒ素(3報)<sup>31-33)</sup>および鉛<sup>34)</sup>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 <sup>17)</sup>	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 <sup>18)</sup>	後ろ向きコホート 小児(4~7歳児) ①2272名 ②348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 <sup>19)</sup>	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 <sup>20)</sup>	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 <sup>21)</sup>	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 <sup>22)</sup>	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 <sup>23)</sup>	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	[ <sup>3</sup> 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/ $\mu$ g表記のため、値が大きいかほどメチル化は低い
	Wilhelm-Benartziら/2012/USA <sup>24)</sup>	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 <sup>25)</sup>	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 $\times 10^{-7}$ ) ・母コチニン高濃度群・喫煙曝露群双方でAHRR 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 <sup>26)</sup>	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), AHRR (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 <sup>27)</sup>	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 <sup>28)</sup>	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 <sup>29)</sup>	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 $\gamma$ プロモーター	・妊婦PAHs曝露レベルと児臍帯血IFN $\gamma$ 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 <sup>20)</sup>	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 <sup>30)</sup>	2つの出生コホート46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)(パ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 <sup>31)</sup>	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(パ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 <sup>32)</sup>	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 <sup>33)</sup>	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([ <sup>3</sup> H]-methyl-incorporation assay, パ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 <sup>34)</sup>	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(パ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  $\gamma$  (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) <sup>17)</sup>
<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 <sup>17)</sup>
<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) <sup>23)</sup> 、もしくは低メチル化 (胎盤) <sup>20)</sup>
<i>AHR</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 <sup>23)</sup>
<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 <sup>23)</sup>
<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 <sup>18)</sup>
<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 <sup>31)</sup>
<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 <sup>23)</sup>
<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 <sup>18)</sup>
<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 <sup>19)</sup>
<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 <sup>27)</sup>
<i>IFN γ</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 <sup>29)</sup>
<i>ALOX12</i>	アラキドン酸-12-リボキシゲナーゼ arachidonate 12-lipoxygenase <sup>11)</sup>	リボキシゲナーゼ (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 <sup>20)</sup>
<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 <sup>31, 32)</sup>
<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) <sup>24)</sup> もしくは低メチル化 (口腔細胞) <sup>19)</sup> 、 または関連なし 鉛曝露により低メチル化 <sup>30)</sup> ヒ素曝露により高メチル化傾向 <sup>33)</sup>
<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 <sup>22)</sup>

\*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<sup>35, 36)</sup>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<sup>17)</sup>。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<sup>37)</sup>。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<sup>18)</sup>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<sup>19)</sup>、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<sup>20)</sup>。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<sup>20)</sup>。

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<sup>21)</sup>。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<sup>22)</sup>。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<sup>18, 23)</sup>。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<sup>18)</sup>。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<sup>5)</sup>、LINE-1のメチル化は変化しないとの報告もあり<sup>24)</sup>、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  $p<0.0019$ )<sup>25)</sup>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、HKR1遺伝子の低メチル化などが新たに見出された<sup>26)</sup>。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<sup>27)</sup>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ければ、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],  $p = 0.05$ )<sup>28)</sup> が、IFN  $\gamma$  遺伝子のメチル化との間には正の相関 ( $\beta = 0.107$ ,  $p < 0.01$ )<sup>29)</sup> 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 ( $r = -0.35$ ,  $\beta = -7.59$ ,  $p = 0.06$ )<sup>20)</sup>。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 ( $p = 0.033$ )<sup>30)</sup>。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<sup>31)</sup>。これらの仔マウスでは、細胞増殖や癌化を促進するER  $\alpha$  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  $\alpha$  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<sup>31-33)</sup>。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<sup>34)</sup>。

#### 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, Lotfipour 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, Håberg 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- $\gamma$  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.