

Figure 1. 網羅的 DNA メチル化解析のフローチャート

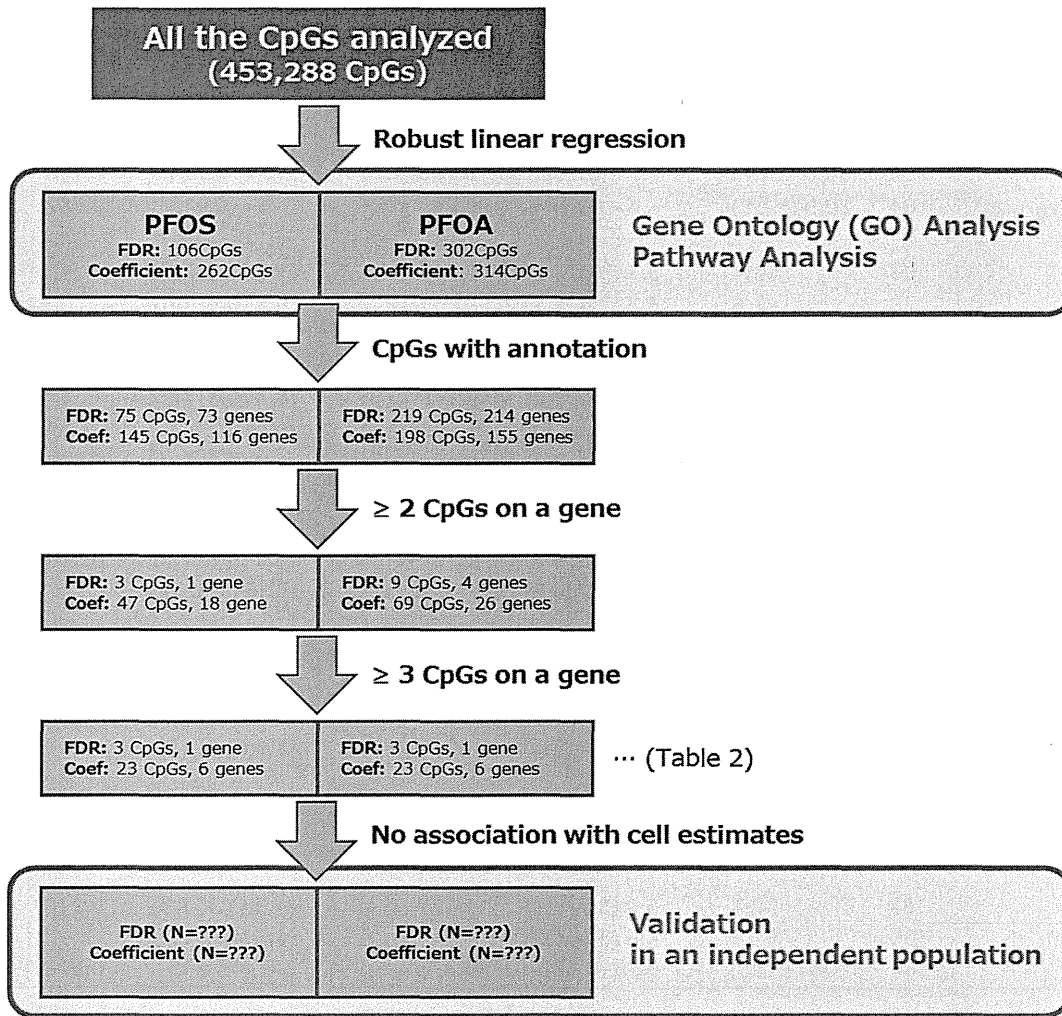
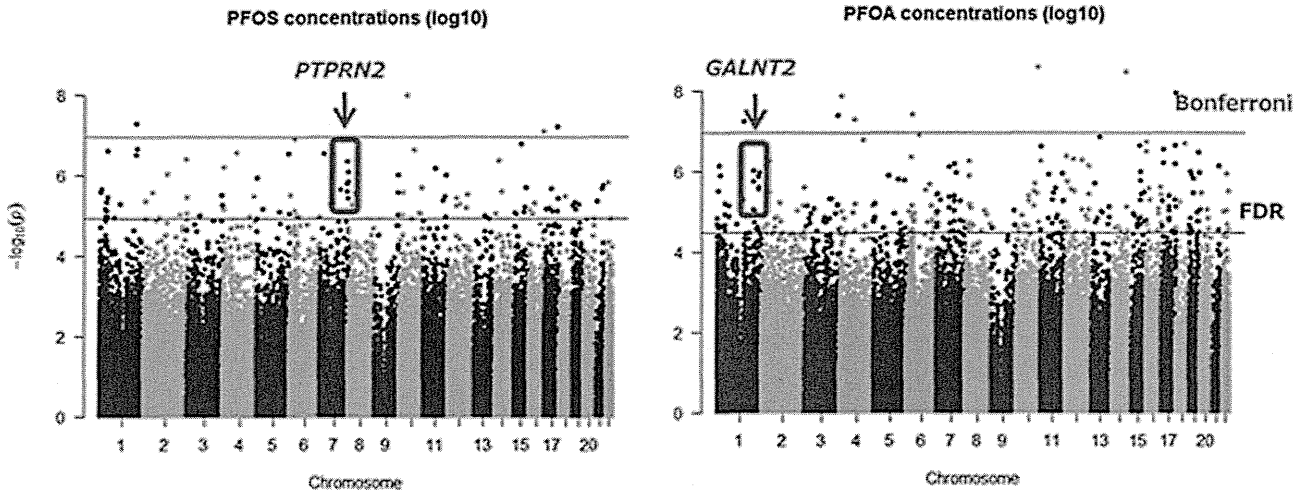


Figure 2. PFAAs 曝露と 45 万 CpGs メチル化との関連

(A) マンハッタン・プロット



横線(上) ボンフェローニ法での有意基準 ($p < 1.1 \times 10^{-7}$)
横線(下) False-discovery rate での有意基準

(B) ボルケーノ・プロット

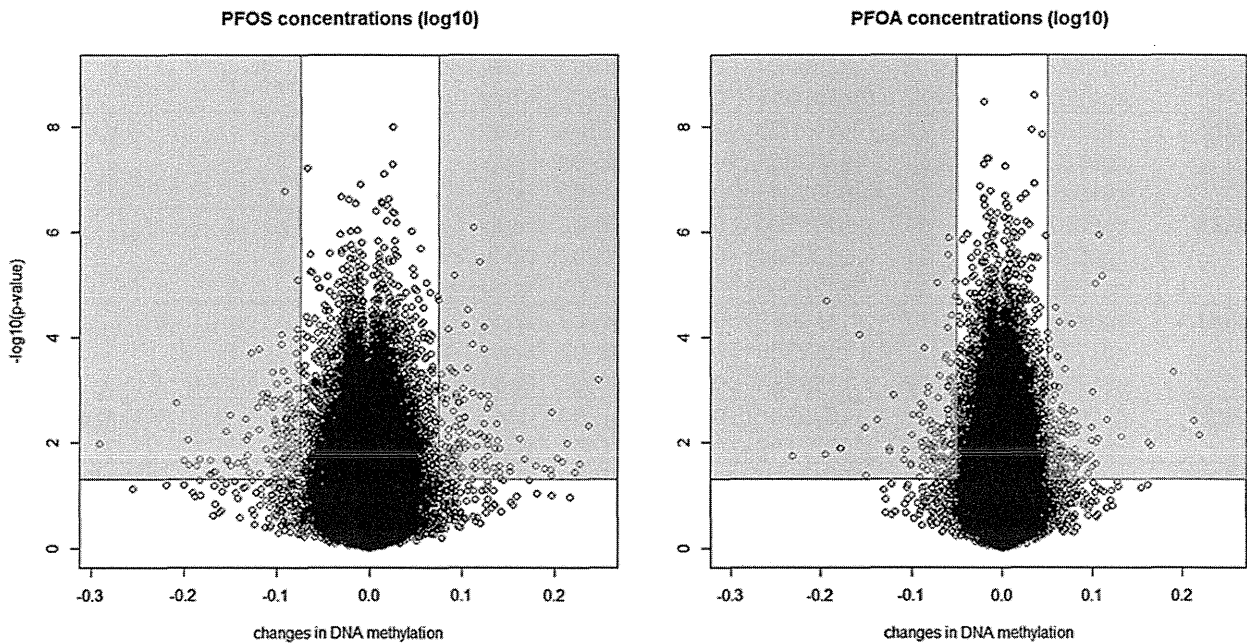


Figure 3. 抽出された CpGs の特徴

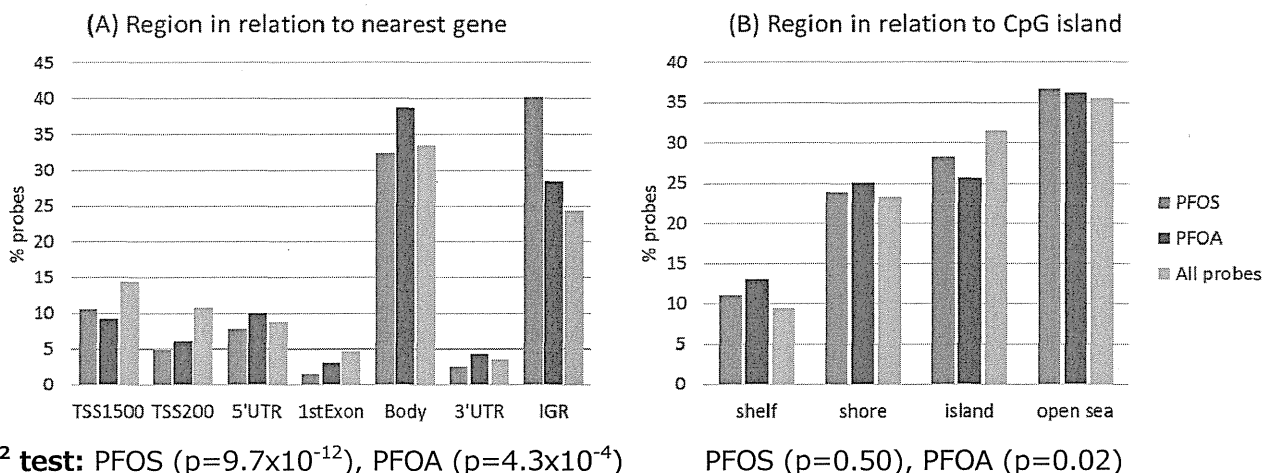


Table 2. Differentially methylated positions associated with PFOS and PFOA concentrations.

(A) PFOS

Gene name	Probe ID	CHR	MAPINFO	Coef	P	feature	CpGI	method ¹⁾	cell ²⁾
<i>PTPRN2</i>	cg20528787	7	158032352	0.12	6.3E-05	Body	open sea	c	
	cg23066280	7	158032496	0.25	6.3E-04	Body	open sea	c	
	cg06715136	7	158046025	0.12	3.7E-06	Body	open sea	p	
	cg02770061	7	158046166	0.12	1.3E-03	Body	open sea	c	
	cg06400119	7	158046222	0.11	8.1E-07	Body	open sea	p	
	cg23759393	7	158110405	0.13	1.3E-03	Body	shore	c	
	cg09756125	7	158250978	-0.15	2.7E-02	Body	shore	c	
	cg17429772	7	158269409	0.13	2.2E-03	Body	open sea	c	
	cg17812313	7	158270995	0.01	1.5E-06	Body	open sea	p	
<i>DNHD1</i>	cg11185456	11	6592066	-0.10	7.4E-04	Body	island	c	
	cg01833234	11	6592585	-0.10	3.8E-03	Body	island	c	
	cg10208301	11	6592745	-0.09	3.6E-03	Body	island	c	
<i>KLHL35</i>	cg06329735	11	75139390	0.13	1.8E-02	Body	shore	c	
	cg05353869	11	75139544	0.15	2.8E-02	Body	island	c	
	cg10909185	11	75139736	0.21	1.0E-02	Body	island	c	
<i>RPH3AL</i>	cg04897931	17	152089	0.08	1.9E-02	Body	shore	c	
	cg17316718	17	152308	0.09	3.1E-02	Body	island	c	
	cg17193961	17	152350	0.09	1.2E-02	Body	island	c	
<i>HOOK2*</i>	cg04657146	19	12876947	-0.17	4.1E-02	Body	island	c, b	CD8T, Bcell
	cg23899408	19	12877188	-0.17	3.7E-02	Body	shore	c, b	
<i>FRG1B</i>	cg07753967	20	29611652	0.08	2.5E-02	TSS1500	island	c	CD8T, NK
	cg14815891	20	29611903	0.14	4.4E-03	Body	island	c	
	cg20811988	20	29611924	0.12	6.8E-03	Body	island	c	
<i>RFPL2</i>	cg01124132	22	32599511	0.10	1.1E-02	TSS200	open sea	c	CD4T, Gran
	cg12906381	22	32599516	0.12	4.3E-03	TSS200	open sea	c	
	cg13405775	22	32599648	0.10	9.4E-04	TSS200	open sea	c	

1) method: c (coefficient based), p (p-value based), b (Bumhunter)

2) cell: cell proportion that was associated with methylation levels (Spearman's correlation > ±0.1)

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

(B) PFOA

Gene name	Probe ID	CHR	MAPINFO	Beta	P	feature	CpGI	method ¹⁾	cell ²⁾
PRKCZ	cg00653281	1	1991051	-0.01	2.0E-05	Body	island	p	
	cg13918804	1	2043761	0.10	1.1E-03	5'UTR	shelf	c	
	cg12718519	1	2058417	-0.07	2.3E-02	5'UTR	open sea	c	
C1orf109	cg24088508	1	38156462	0.22	7.3E-03	TSS1500	shore	c	CD8T
	cg12339802	1	38156545	0.07	4.5E-03	TSS1500	shore	c	
	cg06917450	1	38156652	0.17	1.1E-02	TSS1500	shore	c	
LGR6	cg04811114	1	202172778	0.08	1.6E-02	TSS200	open sea	c	
	cg26347746	1	202172848	0.07	3.1E-02	TSS200	open sea	c	CD8T, CD4T, NK, Bcell, Gran
	cg05044291	1	202172867	0.06	4.9E-02	TSS200	open sea	c	
GALNT2	cg05697274	1	230415377	-0.04	1.4E-06	3'UTR	island	p	CD8T, NK, Mono
	cg24250902	1	230415547	-0.06	1.3E-06	3'UTR	island	p	
	cg03144619	1	230415668	-0.05	1.2E-03	3'UTR	island	c	
	cg24401487	1	230416880	-0.03	2.5E-06	3'UTR	shore	p	
PAX8	cg21482265	2	113992762	0.07	4.3E-02	Body	shore	c	CD8T, NK
	cg12889195	2	113992843	0.07	3.1E-02	Body	shore	c	
	cg11763394	2	113992921	0.07	1.8E-02	Body	shore	c	
	cg21550016	2	113992930	0.06	2.3E-02	Body	shore	c	
	cg07772999	2	113993052	0.05	2.7E-02	Body	shore	c	
	cg19083407	2	113993142	0.07	3.4E-02	Body	shore	c	
	cg07594247	2	113993304	0.06	3.2E-02	Body	island	c	
	cg17445212	2	113993313	0.06	3.8E-02	Body	island	c	
	cg09704166	2	114031854	-0.10	2.8E-02	Body	shore	c	
	HDAC4	cg08825699	2	239983929	-0.09	1.0E-02	Body	open sea	c
cg20784693		2	239984030	-0.10	2.9E-03	Body	open sea	c	
cg09155776		2	239984105	-0.05	8.2E-03	Body	open sea	c	
cg06583077		2	240090977	-0.02	2.9E-05	Body	open sea	p	
LRPAP1	cg00356499	4	3516065	0.06	1.9E-02	Body	shore	c	CD4T, Bcell, Mono, Gran
	cg26401028	4	3516534	0.06	4.4E-02	Body	island	c	
	cg04857395	4	3516637	0.08	1.7E-02	Body	island	c	
	cg27321949	4	3516692	0.06	1.9E-02	Body	island	c	
TNXB	cg01337207	6	32063835	0.05	1.2E-02	Body	island	c	CD8T, CD4T
	cg10365886	6	32063874	0.06	4.7E-02	Body	island	c	
	cg07524919	6	32063901	0.05	3.7E-02	Body	island	c	
	cg00872984	6	32063991	0.05	2.1E-02	Body	island	c	
DDO	cg19196401	6	110721138	0.07	2.0E-02	Body	island	c	
	cg01119278	6	110721349	0.06	4.5E-02	Body	island	c	
	cg23891903	6	110725439	0.01	2.9E-06	Body	shelf	p	
PRKAR1B	cg11064039	7	766100	-0.11	1.4E-02	5'UTR	island	c	CD8T, CD4T
	cg06242242	7	766104	-0.09	2.9E-02	5'UTR	island	c	
	cg05729249	7	766119	-0.07	4.2E-02	5'UTR	island	c	
EBF3	cg05636467	10	131669406	-0.08	1.1E-02	Body	shelf	c	
	cg04043455	10	131669461	-0.12	1.3E-02	Body	shelf	c	
	cg09252806	10	131669630	-0.09	2.1E-03	Body	shelf	c	
TK2	cg03448915	16	66583078	-0.08	4.3E-03	Body	shore	c	
	cg07127456	16	66583081	-0.06	2.4E-03	Body	shore	c	
	cg09238666	16	66584358	-0.05	8.6E-04	TSS200	shore	c	

Table 3. Differentially methylated regions indicated by Bumphunting method.

CHR	Start (Mb)	Gene	CpGs	Probes	Features	CGI	Area	p-value (area)	FDR (area)
<i>PFOS log₁₀-transformed</i>									
19	12.9	HOOK2	3	cg04657146* cg06417478 cg11738485 cg23899408*	Body	island/shore	0.83	0.0001	0.112
<i>PFOS (1st vs. 4th Quartiles)</i>									
19	12.9	HOOK2	3	cg04657146* cg06417478 cg11738485	Body	island/shore	0.38	0.0056	0.037
22	24.3	GSTTP1	3	cg11141652 cg15242686 cg22666875	TSS1500	open sea	0.33	0.0108	0.072

*cg0457146, cg23899408 は robust linear regression でもスクリーニングされた CpGs

Table 4. Estimated cell proportion in cord blood and their relation to PFAAs concentration (N=164).

	Proportion		PFOS		PFOA	
	Median	(25th, 75th)	ρ	p-value	ρ	p-value
Lymphocytes						
CD8 ⁺ T	0.064	(0.049, 0.083)	-0.043	0.585	-0.068	0.384
CD4 ⁺ T	0.116	(0.091, 0.142)	0.057	0.468	-0.037	0.638
NK cells	0.024	(0.000, 0.053)	0.103	0.188	0.128	0.101
B cells	0.101	(0.074, 0.120)	0.020	0.800	0.035	0.656
Myeloid cells						
Monocytes	0.109	(0.097, 0.120)	-0.214	0.006*	-0.053	0.505
Granulocytes	0.603	(0.566, 0.649)	-0.022	0.784	0.054	0.494

ρ : Spearman's correlation coefficient

Figure 4. Spearman's correlation between cell proportion estimates and DNA methylation at selected CpGs.

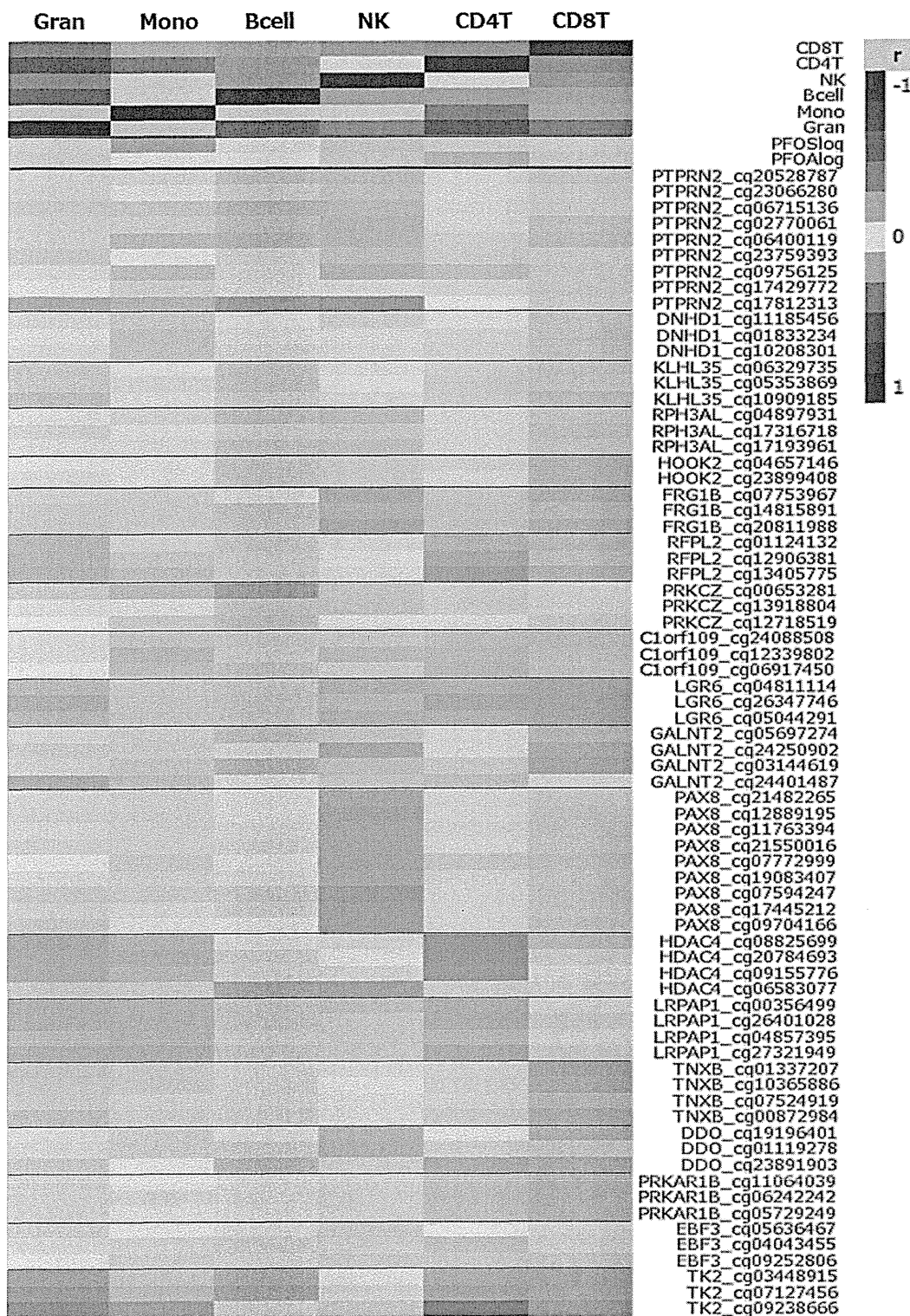
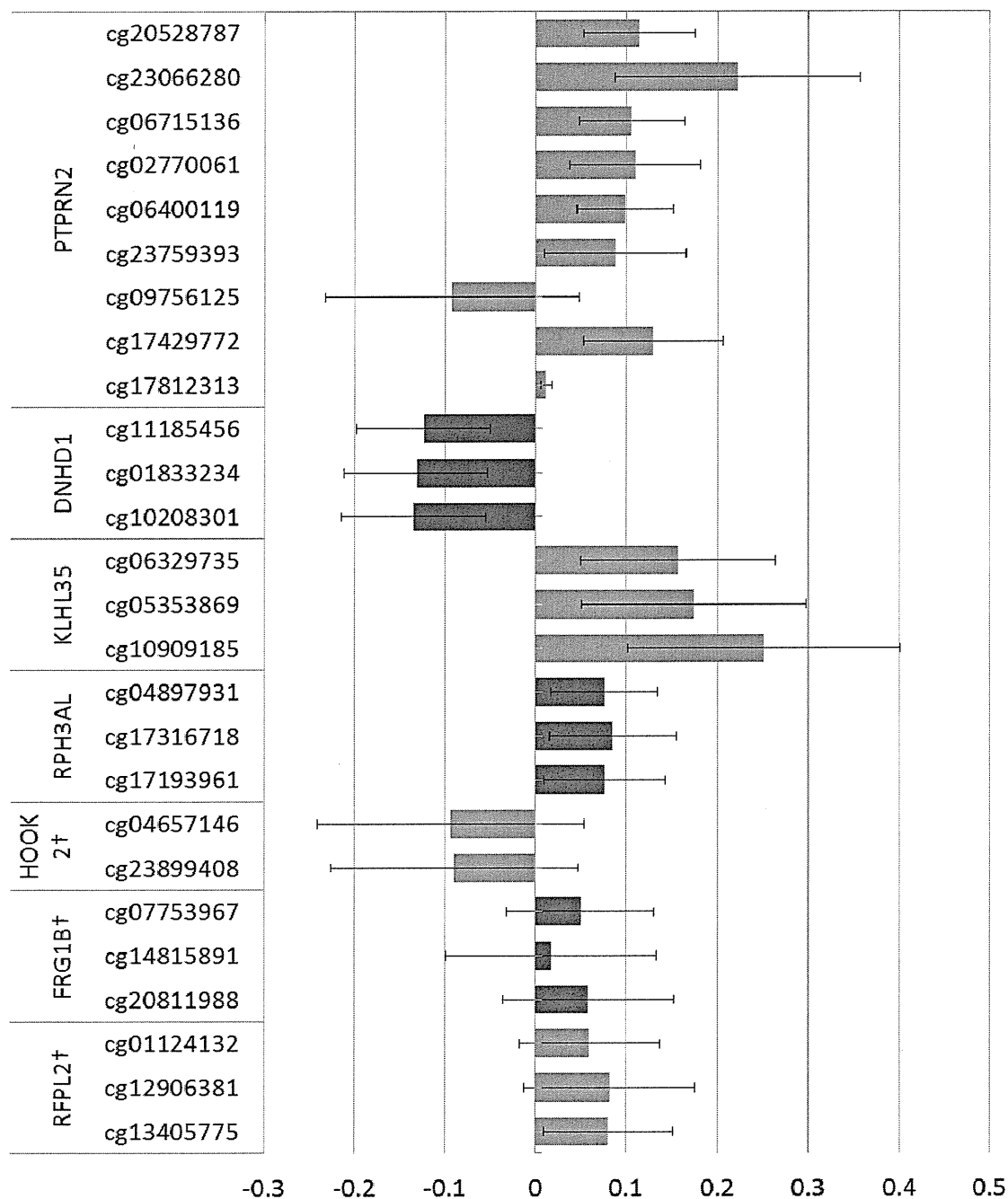


Figure 5. Changes in methylation with log₁₀-unit increase in PFOS and PFOA concentrations with adjustment for estimated cell proportion.

(A) PFOS

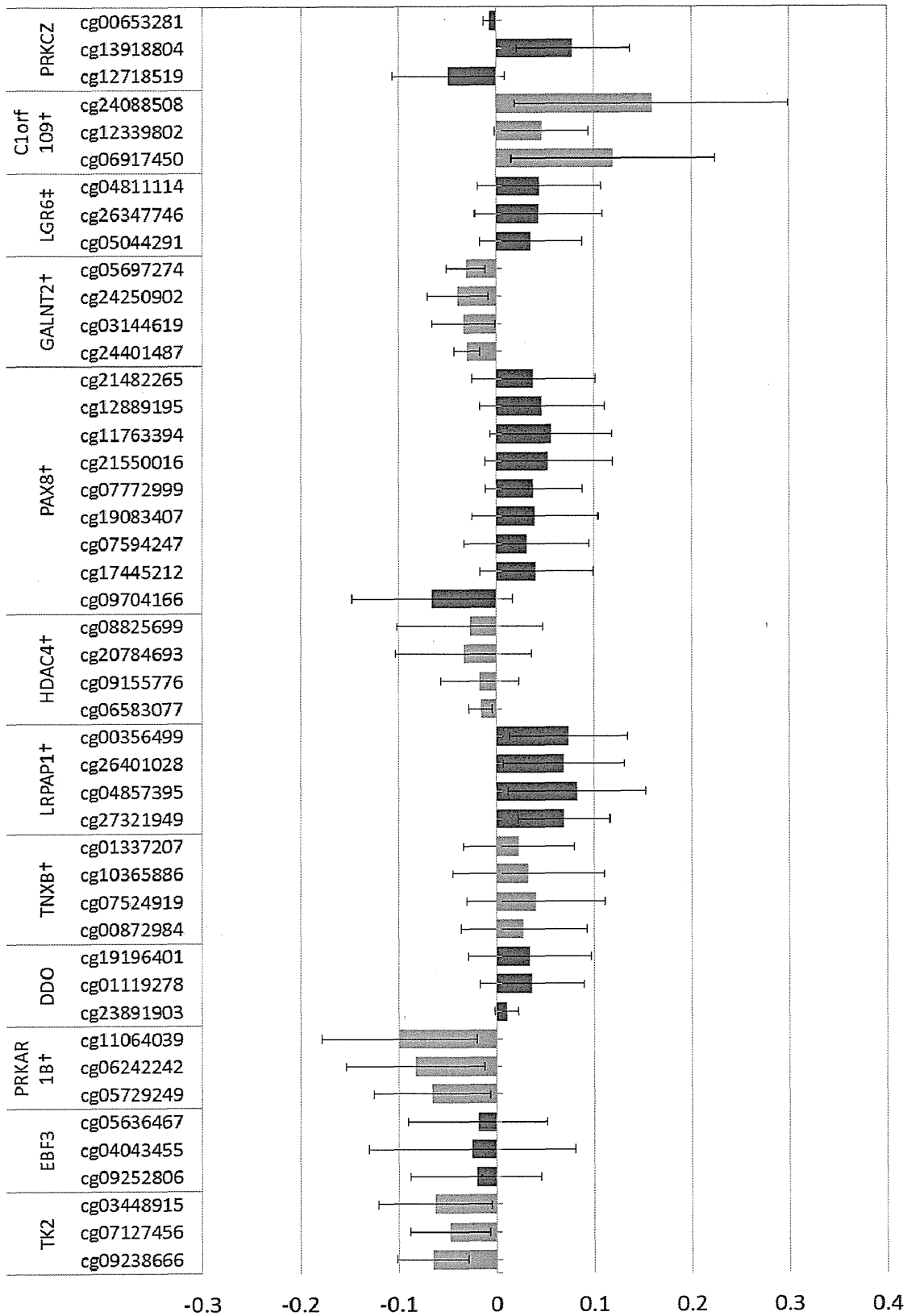


Adjusted for maternall age, infants sex, maternal blood sampling period, (†estimated cell proportion)

Error bars indicates 95% confidence intervals.

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

(B) PFOA



胎児期のメチル水銀とフタル酸エステル類曝露が児の DNA メチル化に及ぼす影響

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 特別招へい教授
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 教授

研究要旨

背景：胎児期環境要因の影響は、その持続性からエピジェネティックな変化をもたらしていると考えられてきている。しかし、胎児期環境要因としての化学物質曝露については、動物実験において DNA メチル化などのエピジェネティクス機構への影響が示されているが、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。

目的：本研究では、環境化学物質の胎児期曝露が DNA メチル化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、曝露要因として水銀・フタル酸エステル曝露とゲノム全体のメチル化指標である LINE1 遺伝子、および、胎生環境と DNA メチル化との関連性を示すマーカー遺伝子座 IGF2/H19 のメチル化変化との関連を検討した。

方法：札幌の一産科病院で 2002 年から 2005 年にリクルートし、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、臍帯血 DNA、母毛髪水銀(N=244)もしくはフタル酸エステル代謝物である MEHP の母体血中濃度(N=187)のそろそろ母児ペアを対象とした。IGF2/H19, LINE1 遺伝子領域の臍帯血メチル化はパイロシークエンス法を用いて定量し、得られた DNA メチル化率と母の毛髪水銀濃度および MEHP の血中濃度との関連を重回帰分析で検討した。

結果：交絡因子調整後、母毛髪水銀量と LINE1 メチル化との間に有意な正の関連がみられた($\beta=0.7$, $p=0.04$)。MEHP 濃度については、H19 メチル化との間に有意な負の関連がみられた($\beta=-1.3$, $p=0.02$)。男女別解析では、母毛髪水銀量と LINE1 メチル化、MEHP 濃度と H19 メチル化、どちらも男児のみで有意な関連がみられた。また、それぞれの曝露濃度を 4 分位に分けて解析を行なった結果、MEHP 濃度と H19 メチル化との関連で有意な濃度依存性が見られた (p for trend = 0.02)。水銀と LINE1 メチル化との関連では有意ではないが濃度依存傾向がみられ、特に、男児でその傾向が強かった。

結論：水銀、フタル酸エステルの胎児期曝露による LINE1, H19 のメチル化への影響が認められ、環境化学物質の胎児期曝露により、児の DNA メチル化が影響を受けることが示唆された。

研究協力者

三浦 りゅう，小林祥子，小林澄貴
（北海道大学環境健康科学研究教育センター）
中澤 裕之
（星薬科大学薬品分析化学教室）
那須 民江（中央大学生命健康科学部）
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

エピジェネティクスは環境影響による可塑性を示し、胎児期環境と生後の表現型を結ぶ重要な因子であると考えられている (Baccarelli and Bollati, 2009)。一方、環境に蔓延している化学物質の胎児期曝露は児の健康へのリスクファクターとなっている。その影響は成長後まで持続することから、児の DNA メチル化を始めとするエピジェネティクス機構への影響が考えられ、動物実験による報告が急増している。しかし、現在のところ疫学研究での報告、特に胎児期曝露によるエピジェネティクスへの影響を評価した報告は少ない。

DNA メチル化は最も研究が進んでいるエピジェネティクス機構の一つであり、ゲノムのおよそ 17%を占める反復配列の LINE1 遺伝子がゲノム全体のメチル化指標として用いられている (Ruiz-Hernandez et al. 2015)。Insulin-like growth factor 2 (IGF2) と、IGF2 の発現制御に関わっている H19 は、胎児発達や細胞分化に重要な役割を果たしており、2つの遺伝子が並んだ IGF2/H19 遺伝子座は、胎生環境と DNA メチル化との関連性を示すマーカーとなるインプリンティング遺伝子座である (Cui et al. 2002; Hoyo et al. 2012)。

一方、環境化学物質については、魚介類摂取が主な曝露源となるメチル水銀は胎盤を通過し、児の神経系などへの影響が懸念されている (Bukulski et al. 2015)。フタル酸エステルはプラスチックの可塑剤として使用されている化学物質であり、様々な製品に汎用されているため、恒常的かつ長期的な曝露による健康影響が懸念されている (Zhao et al. 2015)。

そこで本研究では、環境化学物質の胎児期曝露が DNA メチル化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、水銀およびフタル酸エステルの胎児期曝露と臍帯血の LINE1, IGF2/H19 領域の DNA メチル化変化との関連について出生コホートを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 対象

札幌の一産科病院で 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、臍帯血 DNA、母毛髪水銀 (N=244) もしくはフタル酸エステル代謝物である MEHP の出産前母体血中濃度 (N=187) のそろそろ母児ペアを対象とした。

2. 方法

臍帯血全血 400 μ L から Maxwell[®] 16 DNA Purification Kit (Promega 社) を用いて DNA 抽出を行った。得られた臍帯血 DNA を Epiect Plus Bisulfite Kit (Qiagen 社) にてバイサルファイト処理後、Pyromark Q24 system (Qiagen 社) を用いたパイロシークエンス法により、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 領域につ

いて DNA メチル化解析を行った。母の毛髪を出産後 5 日以内に採取し、メチル化水銀の曝露指標として毛髪中の総水銀濃度を酸化燃焼金アマルガム法（AAS 法）で測定した。母体血中 MEHP 濃度は GC-MS で測定を行った。曝露濃度を \log_{10} 変換し、重回帰分析により統計解析を行った。

（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

本研究に用いた集団の臍帯血 DNA メチル化率の平均値（ \pm SD）は、IGF2 が 48.7%（ \pm 2.9）、H19 が 52.3%（ \pm 2.0）、LINE1 が 75.8%（ \pm 1.1）であった。母毛髪中水銀量の中央値は $1.42 \mu\text{g/g}$ （最小値-最大値：0.30-7.55）、出産前に採血を行った 187 名の母体血中 MEHP 濃度の中央値は 10.4 ng/ml （最小値-最大値：3.4-64.0）であった。表 1 に解析に用いた集団の母児の属性、および、母毛髪中水銀濃度・母体血中 MEHP 濃度との関連を示した。母毛髪中水銀濃度と魚摂取量、母体血中 MEHP 濃度と採血時期および児のポンドラル指数との有意な相関が認められた。

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（表 2）、母毛髪水銀量との関連については、

母年齢・世帯年収・妊娠中喫煙・魚摂取量・パーマの有無・児性別で調整後、LINE1 メチル化との間に有意な正の関連がみられた（ $\beta=0.7$, $p=0.04$ ）。MEHP 濃度については、母年齢・学歴・妊娠中喫煙・児性別・母体血採血時期で調整後、H19 メチル化との間に有意な負の関連がみられた（ $\beta=-1.3$, $p=0.02$ ）。性別での層別解析を行なったところ、母毛髪水銀量と LINE1 メチル化、MEHP 濃度と H19 メチル化、どちらも男児のみで有意な関連がみられた（表 3）。また、濃度依存性を見るために、それぞれの曝露濃度を 4 分位に分けて解析を行った。図 1 に示すように、MEHP 濃度と H19 メチル化との関連で有意な濃度依存性が見られた（ $p \text{ for trend} = 0.02$ ）。一方、水銀と LINE1 メチル化との関連では有意な濃度依存は見られなかったが（図 2-a）、男児において水銀濃度が増加するにつれて、メチル化率が高くなっていた（図 2-b）。しかし、表 4 に示すように、LINE1、および、H19 のメチル化率共に、児の出生時体格との相関は見られなかった。

D. 考察

胎児期水銀曝露によるゲノム全体のメチル化指標である LINE1 の高メチル化、フタル酸エステル曝露による胎生環境とメチル化との関連指標である H19 の低メチル化、およびそれらの影響の性差が示された。

本研究において、90%以上の対象者の毛髪水銀濃度は、次世代影響が認められる可能性がある下限値： $2.75 \mu\text{g/g}$ 未満であるにも関わらず、ゲノム全体への DNA メチル化への影響が示された。これは、出産後の母の爪の水銀レベルと臍帯血 DNA のメチル化との関連において、CpG アイランド

上流に位置する CpG サイトの高メチル化が認められた結果 (Cardenas et al. 2015) と一致するものである。しかし、LINE1 メチル化と児の出生時体格との関連は見られなかったことから、一般環境レベルである水銀曝露と関連する DNA メチル化変化は出生時体格に影響を及ぼすレベルではない可能性がある。あるいは、出生時体格以外のアウトカムに影響を及ぼす可能性も考えられ、検討が必要である。

フタル酸エステル曝露の影響については、妊娠中の曝露が胎盤の LINE1 (Zhao et al. 2015), IGF2/H19 (LaRocca et al. 2014) のメチル化に影響するという報告があるが、胎児の DNA メチル化に関する疫学研究での報告はない。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、遺伝子特異的に H19 の低メチル化が認められ、その影響に性差および濃度依存性が見られた。H19 は IGF2 の発現制御に関わっているが、H19 メチル化と出生時体格との間に有意な関連は認められなかった。しかし、IGF2 の役割は胎児の発育のみに限られたものではなく、また、H19 は細胞分化において重要な役割を果たしており、出生時体格以外の表現型に影響している可能性がある。水銀曝露と同様に、フタル酸エステル曝露で観察されたメチル化変化と関連する児のアウトカムを検討していく必要がある。

我々はこれまでにフタル酸エステル曝露のほか、PFCs, ダイオキシン・PCBs の胎児期曝露による IGF2/H19 メチル化への影響を明らかにした (Kobayashi et al. submitted)。これは、胎児期環境としての化学物質曝露が DNA メチル化変化と関連することを示している。DNA メチル化変化は時間・組織特異的に制御されていること

から (Bale TL. 2015)、環境化学物質曝露の影響を受ける特異的メチル化部位の存在が考えられる。現在、その特異的メチル化部位を特定するため、HumanMethylation450 BeadChip (Illumina 社) を用いた網羅解析を行っている。今後、特異的メチル化部位とその変化に伴う成長発育・アレルギー・神経発達等のアウトカムとの関連を明らかにしていく。

E. 結論

本研究で、水銀の胎児期曝露によるゲノム全体のメチル化の亢進、および、フタル酸エステル曝露による H19 のメチル化への負の影響が認められ、胎児期の環境化学物質曝露が胎児に与える影響に DNA メチル化変化が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. Baccarelli A and Bollati V. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 21:243-251.
2. 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.
3. Hoyo C, Fortner K, Murtha AP, Schildkraut JM, Soubry A, Demark-Wahnefried W, Jirtle RL, Kurtzberg J, Forman MR, Overcash F, Huang Z, Murphy SK. 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.
 4. Ruiz-Hernandez A, Kuo CC, Rentero-Garrido P, Tang WY, Redon J, Ordovas JM, Navas-Acien A, Tellez-Plaza M. 2015. Environmental chemicals and DNA methylation in adults: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Clin Epigenetics*. 29;7(1):55.
 5. Bakulski KM, Lee H, Feinberg JI, Wells EM, Brown S, Herbstman JB, Witter FR, Halden RU, Caldwell K, Mortensen ME, Jaffe AE, Moye J Jr, Caulfield LE, Pan Y, Goldman LR, Feinberg AP, Fallin MD. 2015. Prenatal mercury concentration is associated with changes in DNA methylation at TCEANC2 in newborns. *Int J Epidemiol*. 44(4):1249-62
 6. Zhao Y, Shi HJ, Xie CM, Chen J, Laue H, Zhang YH. 2015. Prenatal phthalate exposure, infant growth, and global DNA methylation of human placenta. *Environ Mol Mutagen*. 56(3):286-92.
 7. Cardenas A, Koestler DC, Houseman EA, Jackson BP, Kile ML, Karagas MR, Marsit CJ. 2015. Differential DNA methylation in umbilical cord blood of infants exposed to mercury and arsenic in utero. *Epigenetics*. 10(6):508-15
 8. LaRocca J, Binder AM, McElrath TF, Michels KB. 2014. The impact of first trimester phthalate and phenol exposure on IGF2/H19 genomic imprinting and birth outcomes. *Environ Res*. 2014 Aug;133:396-406.
 9. Kobayashi S, Azumi K, Itoh S, Goudarzi H, Sasaki S, Ishizuka M, Nakazawa H, Kobayashi S, Miyashita C, Ikeno T, Araki A, Kishi R. Effects of Prenatal Perfluorinated Chemicals Exposure on Cord Blood *IGF2/H19* Methylation and Ponderal Index: The Hokkaido Study. Submitted.
 10. Bale TL. 2015. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*. 16(6):332-44.

表1. 母毛髪水銀濃度・母体血中MEHP濃度と母児の属性との関連

	N=244		Total Hg (μg/g)				N=187		MEHP (ng/ml)			
	Mean ± SD	ρ	25th	75th	p	Mean ± SD	ρ	25th	75th	p		
	N (%)	Median				N (%)	Median					
Maternal Characteristic												
Maternal age (year) ^a	30.0 ± 4.8	ρ= 0.032			0.619	29.9 ± 4.9	ρ= 0.042				0.565	
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	20.9 ± 2.9	ρ=-0.033			0.606	21.1 ± 2.9	ρ= 0.059				0.425	
Parity ^b												
0	132 (54.1)	1.42	0.99	1.89	0.945	103 (55.1)	10.15	5.68	15.06		0.465	
≥ 1	112 (45.9)	1.44	0.95	2.02		84 (44.9)	10.46	6.28	15.47			
Educational level (year) ^b												
≤ 12	107 (43.9)	1.47	0.95	1.89	0.691	85 (45.5)	10.37	5.99	14.34		0.886	
> 12	137 (56.1)	1.42	1.01	1.97		102 (54.5)	10.49	5.69	15.42			
Annual household income ^b												
≤ 5,000,000	169 (69.3)	1.48	0.97	1.89	0.592							
> 5,000,000	75 (30.7)	1.42	1.01	2.08								
Smoking during pregnancy ^b												
No	205 (84.0)	1.44	0.99	1.93	0.209	156 (83.4)	10.44	5.99	15.36		0.273	
Yes	39 (16.0)	1.30	0.96	1.61		31 (16.6)	9.96	5.12	14.38			
Alcohol consumption during pregnancy ^b												
No	165 (67.6)	1.42	0.96	1.92	0.666	121 (64.7)	10.48	5.96	15.33		0.854	
Yes	79 (32.4)	1.44	1.03	1.89		66 (35.3)	10.35	5.63	15.09			
Caffein in take during pregnancy (mg/day) ^b	149.9 ± 125.0	ρ=-0.026			0.686	145.9 ± 127.3	ρ= 0.043				0.562	
Blood sampling period ^c												
< 28 weeks						17 (9.1)	14.18	8.84	17.35		0.013*	
28-36 weeks						109 (58.3)	10.87	6.45	15.38			
≥ 36 weeks						61 (32.6)	7.13	5.24	13.96			
Fish consumption (g/day) ^a												
Inshore fish	47.1±32.3	ρ= 0.244			0.0001**							
Deep-sea fish	36.8 ± 27.6	ρ= 0.257			<.0001**							
Hair permanemt ^b												
No	172 (70.5)	1.44	0.96	1.93	0.579							
Yes	72 (29.5)	1.40	0.99	1.70								
Infant Characteristic												
Geatation age (week) ^a	39.8 ± 1.0	ρ= 0.004			0.954	39.8 ± 1.0	ρ= 0.0002				0.998	
Sex ^b												
Male	115 (47.1)	1.48	0.97	1.97	0.484	88 (47.1)	10.48	5.68	16.27		0.528	
Female	129 (52.9)	1.36	0.97	1.87		99 (52.9)	9.86	6.37	14.26			
Birth weight (g) ^a	3129.2 ± 333.4	ρ= 0.007			0.909	3130.7 ± 335.4	ρ= -0.091				0.217	
Birth length (cm) ^a	48.4 ± 1.6	ρ=-0.080			0.214	48.5 ± 1.6	ρ= 0.071				0.338	
Ponderal Index (kg/m ³) ^a	27.5 ± 2.3	ρ= 0.100			0.121	27.4 ± 2.2	ρ= -0.166				0.023*	

^aSpearman's correlation, ^bMann-Whitney U-test, ^cKruskal-Wallis test

*p < 0.05. **p < 0.01

表 2. 水銀・フタル酸エステルの胎児期曝露による DNA メチル化への影響 (重回帰分析)

	IGF2 methylation (%)			H19 methylation (%)			LINE1 methylation (%)		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Total Hg (log₁₀)									
Crude	0.034	(-1.783, 1.851)	0.971	0.707	(-0.509, 1.922)	0.253	0.649	(-0.026, 1.324)	0.060
adjusted ^a	0.041	(-1.829, 1.911)	0.965	0.364	(-0.880, 1.608)	0.565	0.704	(0.047, 1.361)	0.035*
MEHP (log₁₀)									
Crude	0.548	(-1.014, 2.109)	0.490	-1.341	(-2.385, -0.297)	0.012*	-0.199	(-0.798, 0.400)	0.513
adjusted ^b	0.524	(-1.072, 2.120)	0.518	-1.309	(-2.355, -0.22)	0.015*	-0.097	(-0.665, 0.472)	0.738

^aAdjusted for maternal age, annual house income, smoking during pregnancy, fish consumption, hair permanemt, infant's sex

^bAdjusted for maternal age, maternal education, smoking during pregnancy, blood sampling period, infant's sex

β : partial regression coefficient

*p < 0.05

表 3. 水銀曝露の LINE1 メチル化およびフタル酸エステル曝露の H19 メチル化に及ぼす影響の性差

	N	LINE1 methylation (%)				N	H19 methylation (%)		
		β	(95% CI)	p			β	(95% CI)	p
Total Hg (log₁₀)^a				MEHP (log₁₀)^b					
Male	115	1.019	(0.060, 1.978)	0.038*	Male	88	-2.817	(-4.335, -1.298)	<0.001**
Female	129	0.379	(-0.576, 1.334)	0.434	Female	99	-0.707	(-2.163, 0.750)	0.338

^aAdjusted for maternal age, annual house income, smoking during pregnancy, fish consumption, hair permanemt

^bAdjusted for maternal age, maternal education, smoking during pregnancy, blood sampling period

β : partial regression coefficient

*p < 0.05, **p < 0.01

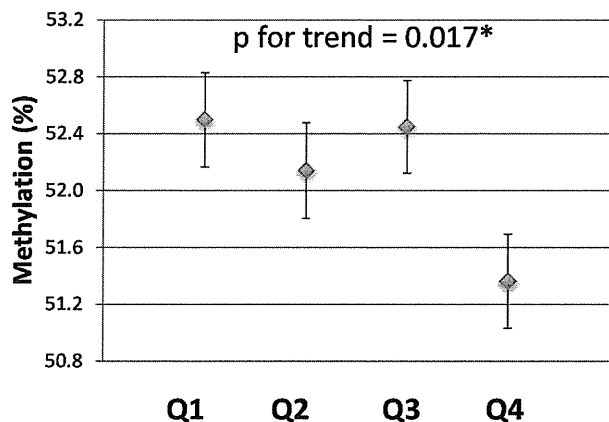


図1. 母体血 MEHP と臍帯血 H19 メチル化変化との関連の濃度依存 (N=187)

Q1: < 5.9 ng/ml
Q2: 5.9 - 10.4 ng/ml
Q3: 10.4 - 15.2 ng/ml
Q4: > 15.2 ng/ml

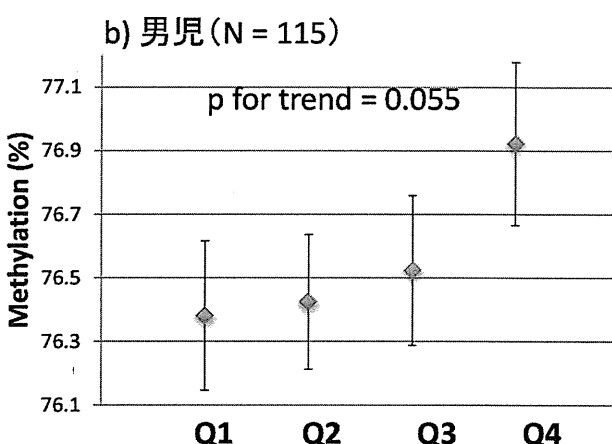
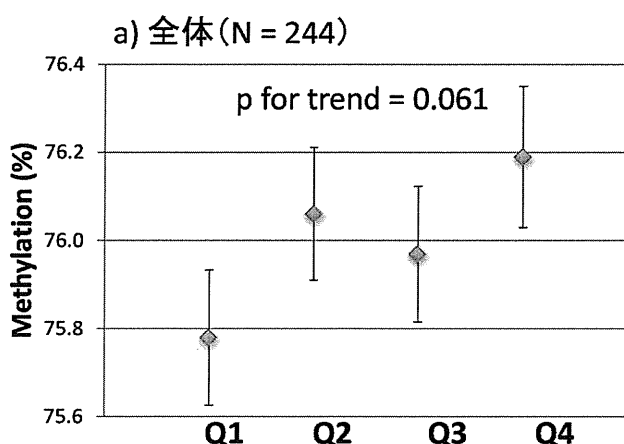


図2. 母毛髪水銀と臍帯血LINE1メチル化変化との関連の濃度依存

Q1: < 0.97 μg/g, Q2: 0.97 - 1.42 μg/g, Q3: 1.42 - 1.91 μg/g, Q4: > 1.91 μg/g

	LINE1 methylation (%), N=244			H19 methylation (%), N=187		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Birth weight (g)						
adjusted ^a	7.943	(-28.01, 43.90)	0.664	2.673	(-20.72, 26.06)	0.822
adjusted ^b	-8.061	(-45.14, 29.01)	0.669	4.554	(-19.15, 28.25)	0.705
Birth length (cm)						
adjusted ^a	-0.003	(-0.179, 0.172)	0.970	0.041	(-0.071, 0.152)	0.472
adjusted ^b	-0.114	(-0.296, 0.069)	0.221	0.043	(-0.067, 0.154)	0.440
Ponderal index (kg/m ³)						
adjusted ^a	0.109	(-0.151, 0.369)	0.408	-0.044	(-0.203, 0.116)	0.587
adjusted ^b	0.150	(-0.125, 0.425)	0.284	-0.032	(-0.192, 0.129)	0.699

^aAdjusted for gestational age

^bAdjusted for gestational age, maternal age, parity, maternal education, pre-pregnancy BMI, smoking during pregnancy, infant's sex

β: partial regression coefficient, *p < 0.05

表4. LINE1およびH19DNAメチル化と出生時体格との相関

IV 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Goudarzi, S. Nakajima, T. Ikeno, S. Sasaki, S. Kobayashi, C. Miyashita, S. Ito, A. Araki, H. Nakazawa and R. Kishi	Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and neurodevelopment in early infancy: The Hokkaido Study	The Science of the total environment	541	1002-1010	2016
M. A. Verner, A. E. Loccisano, N. H. Morken, M. Yoon, H. Wu, R. McDougall, M. Maisonet, M. Marcus, R. Kishi, C. Miyashita, M. H. Chen, W. S. Hsieh, M. E. Andersen, H. J. Clewell, 3rd and M. P. Longnecker	Associations of Perfluoroalkyl Substances (PFASs) with Lower Birth Weight: An Evaluation of Potential Confounding by Glomerular Filtration Rate Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK)	Environmental health perspectives	doi: 10.1289/ehp. 1408837		2015
C. Miyashita, S. Sasaki, Y. Saijo, E. Okada, S. Kobayashi, T. Baba, J. Kajiwara, T. Todaka, Y. Iwasaki, H. Nakazawa, N. Hachiya, A. Yasutake, K. Murata and R. Kishi	Demographic, behavioral, dietary, and socioeconomic characteristics related to persistent organic pollutants and mercury levels in pregnant women in Japan	Chemosphere	133	13-21	2015
C. Miyashita, S. Sasaki, T. Ikeno, A. Araki, S. Ito, J. Kajiwara, T. Todaka, N. Hachiya, A. Yasutake, K. Murata, T. Nakajima and R. Kishi	Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and polyunsaturated fatty acids on birth size	The Science of the total environment	533	256-265	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Mitsui, A. Araki, A. Imai, S. Sato, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi and K. Nonomura	Effects of prenatal leydig cell function on the ratio of the second to fourth digit lengths in school-aged children	PloS one	10 (3)	e0120636	2015
R. Kishi, T. Nakajima, H. Goudarzi, S. Kobayashi, S. Sasaki, E. Okada, C. Miyashita, S. Itoh, A. Araki, T. Ikeno, Y. Iwasaki and H. Nakazawa	The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Essential and Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of their Offspring: The Hokkaido Study	Environmental Health Preventives	123 (10)	1038-1045	2015
S. J. Hanley, E. Yoshioka, Y. Ito and R. Kishi	HPV vaccination crisis in Japan	Lancet (London, England)	385 (9987)	2571	2015
Y. Ait Bamai, A. Araki, T. Kawai, T. Tsuboi, E. Yoshioka, A. Kanazawa, S. Cong and R. Kishi	Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families	International journal of hygiene and environmental health	218 (5)	461-470	2015
X. Jia, T. Tagawa, H. Yatsuya, H. Naito, Y. Hayashi, Y. Husna, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, T. Ikeno, R. Kishi and T. Nakajima	Association of maternal whole blood fatty acid status during the prenatal period with term birth dimensions: a cross-sectional study	Journal of Perinatal Medicine	43 (5)	565-575	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
X. Jia, Y. Harada, M. Tagawa, H. Naito, Y. Hayashi, H. Yetti, M. Kato, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, T. Ikeno, R. Kishi and T. Nakajima	Prenatal maternal blood triglyceride and fatty acid levels in relation to exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: a cross-sectional study	Environmental health and preventive medicine	20 (3)	168-78	2015
小林澄貴, 荒木敦子, 佐々木成子, 池野多美子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 岸玲子	胎児期の母の受動喫煙と児の出生体重に関する最近の研究動向	北海道公衆衛生学雑誌	28 (2)	37-48	2015
岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】 第1回 「奪われし未来」にしない	公衆衛生	79	193-199	2015
梶原淳睦	【講座 子供を取り巻く環境と健康】 第3回 POPs (ダイオキシン・PCB類)の曝露実態	公衆衛生	79	347-352	2015
荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】 第5回 短半減期化学物質の曝露実態	公衆衛生	79	485-490	2015
佐々木成子, 小林澄貴, 岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】 第7回 喫煙, 受動喫煙による児への影響	公衆衛生	79	637-643	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
湊屋街子, 岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】 第8回 胎児期の環境化学物質曝露が 出生体重と生後発育へ与える影響	公衆衛生	79	719-724	2015
宮下ちひろ, 岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】 第9回 乳幼児のアレルギー・感染症へ のダイオキシン類, 有機フッ素系化学 物質曝露による影響	公衆衛生	79	805-810	2015
荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健 康】 第10回 乳幼児のアレルギーと胎 児期・小児期の可塑剤・難燃剤曝露	公衆衛生	79	876-881	2015
岸玲子	世界における出生コホート研究の現 状	Endocrine Disrupter News Letter	18	1	2015
宮下ちひろ, 岸玲子	胎児期のPCBsダイオキシン類による出 生体重とアレルギー感染症に与える影 響	Endocrine Disrupter News Letter	18	2	2015
荒木敦子, 宮下ちひろ, 岸玲子,	胎児期の有機フッ素化合物曝露による 児の健康への影響	Endocrine Disrupter News Letter	18	5	2015
三井貴彦, 武田正之, 篠原信雄, 野々村克也, 荒木敦子, 岸玲子	環境化学物質がホルモン環境および身 体的変化に与える影響について	Endocrine Disrupter News Letter	18	6	2015