

網羅的エピゲノム解析を用いた化学物質による次世代影響の解明：
新しい試験スキームへの基礎的検討

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

<研究要旨>

胎生期から乳幼児期にいたる発達期の環境要因により DNA の化学修飾を伴う後天的遺伝子制御・エピゲノム変化が起こり、成長後の健康リスクをもたらすという疾病の胎児期/乳幼児期起源(DOHaD)仮説が注目されている (Science 2004; Nature 2004; Trends Genet 2017)。エピゲノムは塩基配列の変化なしに遺伝情報を分裂後の細胞に伝える生体機能に必須のメカニズムである。欧米諸国ではコンソーシアムが形成されるなど、エピゲノムを介したメカニズム解明は世界的に注目され、環境リスク評価や健康障害の予防にとって重要な課題となっている (Int J Environ 2017)。

一方、エピゲノム変化の1つである DNA メチル化の解析法として、近年エピゲノム網羅的メチル化解析の技術開発が進んでいる。また、世界的に製造・使用量が増加し、健康影響が懸念されている合成化学物質の胎児期曝露に関する網羅的メチル化解析研究の報告がなされるようになってきた (Environ Res 2017, 2018; Environ Mol Mutagen 2017)。しかし、サンプルサイズが小さい、validation(妥当性検証)実験を行っていないなどの欠点がみられる。さらに、曝露によるエピゲノム変化が関与する次世代影響を疫学的に検討した報告はほとんどない (Clin Epigenetics. 2018)。

本研究は新しい次世代影響試験法スキームの開発として、種々の環境化学物質曝露による多様なアウトカムが発現する機序についてエピゲノム変化を介する毒性メカニズムを遺伝的差異や多様なライフスタイルをもつヒト集団で明確にする。具体的には、まず化学物質曝露により変化する DNA メチル化領域を 45 万か所 (450K) のメチル化部位 (CpG 部位) の網羅的解析により同定し、どのような機能を持つ遺伝子・経路が影響を受けるかを明らかにする。DNA メチル化網羅的解析はスクリーニング法であり、結果の妥当性検証が必須である。そこで、次世代シーケンサーによる多サンプルメチル化検証法を確立する。また 海外のコホートとの共同研究により、我々の結果を Discovery cohort, 海外のコホートを Replication cohort として妥当性の検証の効率化を図る。

介在解析 (Mediation analysis) により、それぞれの曝露に起因する DNA メチル化変化が、どの健康影響に関与するのか、その影響の何% (介在の大きさ) を DNA メチル化変化で説明できるのかを明確にする。遺伝子多型 (SNPs) の影響を母児ペアで検討し、遺伝的差異を背景にもつヒト集団でのメチル化変化を感受性素因との関係から明らかにする。以上の検討により、胎児期の化学物質曝露がエピゲノム変化を介して成長後の疾病発現に影響を与えるエピゲノム試験法の開発につなげる。

胎児期曝露評価として人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析を実施した。臍帯血 94 検体を用いてダイオキシン類 29 異性体、および PCBs56 異性体の whole および lipid ベースの濃度を測定した。ダイオキシン類 29 異性体について毒性等価係数 TEF を使用して毒性等価量 TEQ を算出した。また妊娠初期血清 20 検体を用いて代謝物で

あるフタル酸モノエステル類 7 種 (MnBP、MiBP、MBzP、MEHP、MEHHP、MECPP、cx-MiNP) の分析を実施した。

次に、エピゲノム網羅的 DNA メチル化変化と胎児期ビスフェノール A(BPA)曝露との関連を検討した。解析した 45 万 CpG 部位全体のメチル化変化としては、男児ではメチル化増加、女児ではメチル化減少が顕著であった。また、メチル化変化を示す遺伝子のネットワーク形成や機能にも男女間で差異が見られ、BPA 曝露によるメチル化への作用機序に性差による違いがあることが示唆された (Sci Rep. under revision)。

また、北海道スタディ大規模コホートにおける ADHD ケース・サブコホートを用いて、次世代シーケンサーを用いた DNA 解析手法の検証、喫煙曝露と DNA メチル化および ADHD の関連を検討した。ケース: 245 名、コントロール: 317 名の臍帯血 DNA を用い、昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析において胎児期の喫煙曝露により有意に DNA メチル化変化した 46CpGs の中から 14CpGs (9 遺伝子) を選択し、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析 (Thermo Fisher 社の IonPGM システム) を行った。質問票により群別化した非喫煙群、喫煙群間で 5 つの CpGs (AHRR (cg05575921), MYO1G (12803068), GF11 (cg12876356, cg18146737), ESR1 (cg15626350)) については 450K の結果同様、喫煙曝露によるメチル化変化に統計的有意差 ($P < 0.05$) を認めた。コチニン濃度で群別化した結果、ESR1 以外の 4 つの CpGs は質問票と同様に低濃度および中程度濃度群と比較して高濃度群で有意な差が認められ、次世代シーケンサーを用いた特異的遺伝子領域の DNA メチル化解析法から喫煙曝露の影響を受けやすい遺伝子領域の検証ができた。一方、喫煙曝露による ADHD 疑い群の危険率の指標としてのオッズ比は約 1.5 であったが、有意の関連は認めなかった。サンプルサイズを増やし、今後引き続き検討が必要と考えられた。

< 研究分担者 >

三宅 邦夫

山梨大学大学院総合研究部医学域
社会医学講座，准教授

石塚 真由美

北海道大学大学院獣医学研究院環境
獣医科学講座毒性学分野，教授

佐田 文宏

中央大学保健センター，医療管理者

荒木 敦子

北海道大学環境健康科学研究教育セ
ンター，准教授

宮下 ちひろ

北海道大学環境健康科学研究教育セ
ンター，特任准教授

伊藤 佐智子

北海道大学環境健康科学研究教育セ
ンター，特任講師

山崎 圭子

北海道大学環境健康科学研究教育セ
ンター，特任講師

三浦 りゅう

北海道大学環境健康科学研究教育セ
ンター，特任助教

堀 就英

福岡県保健環境研究所保健科学部，
課長

松村 徹

いであ株式会社環境創造研究所，常
務取締役

松浦 英幸

北海道大学大学院農学研究院応用生
命科学部門生命有機化学分野，教授

篠原 信雄

北海道大学大学院医学研究院腎泌尿
器外科学教室，教授

A . 研究目的

遺伝子を構成する DNA やヒストンタンパク質の化学修飾であるエピゲノムは，塩基配列の変化なしに遺伝情報を分裂後の細胞に伝える個体発生や生体機能維持に必須のメカニズムである。母体の環境要因による児のエピゲノム変化が後世の健康・疾病リスク発現に関与していることが示唆されているため，エピゲノムを介したメカニズム解明は環境リスク評価や健康障害の予防にとって重要である。

DNA のシトシン塩基 (C) とグアニン塩基 (G) が連続する 2 塩基配列 (CpG) 上のシトシンに生ずる DNA メチル化修飾は，最も研究されているエピゲノム変化の 1 つである (Int J Epidemiol 2017)。DNA メチル化修飾により，DNA の三次構造の変化やメチル基結合タンパク質との相互作用，転写因子の結合あるいは阻害などが起こり，遺伝子発現が制御される。近年，母のストレス (Genet Epigenet 2014)，社会経済要因 (Am J Public Health 2014)，毒性物質曝露 ((EHP 2012, 2013; Environ Mol Mutagen 2014; Epigenetics 2015)，栄養因子 (Epigenetics 2011)，母の BMI (Environ Mol Mutagen 2014) などの胎児期環境要因により児の DNA メチル化が影響を受けることが疫学研究により報告されている。

DNA メチル化の解析法としては，ゲノム全体の DNA メチル化をまとめて測定する手法 (グローバル DNA メチル化解析) と，数個の CpG 部位をターゲットとして解析する手法 (ターゲット CpG 解析) がある。グローバル DNA メチル化解析は，ゲノム全体への影響が検討できるが，実際に異常なメチル化変化を起こしている CpG 部位の特定はできない。ターゲット CpG 解析は，研究仮説に基づいて選択した CpG のメチル化変化を個別に検討できる。しかし，ヒトのゲノム上には約 2800 万か所の CpG 部位，また，1 つの遺伝子上にも数十個から数百個の CpG 部位が存在し，それを 1 つ 1 つ検討するのは不可能である。そこで，近年 DNA メチル化を広範囲かつ迅速に獲得できるエピゲノム網羅的メチル化解析の技術が開発されてきた。その中で，イルミナ社の Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450K)，および，MethylationEPIC BeadsChip (850K) はヒト全遺伝子調節領域の DNA メチル化情報を迅速に獲得できる解析システムとして，多くの研究に使用されている (EHP 2017)。

化学物質では，喫煙，ヒ素や鉛などの重

金属の胎児期曝露による児のメチル化への影響について、網羅的解析による報告が多くなされている(Int J Epidemiol 2017; EHP 2016; Chemosphere 2015)。一方、世界的に製造・使用量が増加し、健康影響が懸念されている合成化学物質への胎児期曝露とメチル化との関連に関しては、ターゲット CpG 解析、グローバルメチル化解析により、有機フッ素化合物、PCB 類やフタル酸エステル類と臍帯血や胎盤組織の *IGF2/H19*, *AHRR*, *LINE1* 遺伝子などのメチル化との関連が示された(J Expo Sci Environ Epidemiol 2017; Repro Toxicol 2017; Sci Rep 2016; Environ Res 2016)。しかし、網羅的メチル化解析に関しては、世界的にも非常に少数の報告のみである(Environ Res 2017, 2018; Environ Mol Mutagen 2017)。さらに、曝露によるエピゲノム変化が関与する次世代影響については未だ明らかにされていない。

本研究は、種々の環境化学物質曝露による次世代の多様な疾病エンドポイントへの影響を解明するために、網羅的エピゲノム解析により、化学物質がエピゲノム変化を介して影響する新規の毒性メカニズムを遺伝的差異や多様なライフスタイルをもつヒト集団で明らかにし、次世代影響の試験法の開発に資する。具体的には、1) *IGF2/H19*, *LINE1* のターゲット CpG メチル化解析により、環境化学物質曝露が児のメチル化変化に影響を及ぼすことを示したが、曝露により影響を受ける次世代の多様な疾病エンドポイントに対応した様々なメチル化変化が起こっていると考えられる。そこで、エピゲノム網羅的メチル化解析により、環境化学物質曝露に起因するメチル化変化を同定し、どのような機能を持つ遺伝子・経路が影響を受けるかを明らかにする。2) 網羅的 DNA メチル化解析はスクリーニング法であり、また、データの複雑性から偽陽性を抽

出してしまいう可能性もあることから、解析結果の妥当性検証が必須である。そこで、次世代シーケンサーによる多サンプルのメチル化検証法を確立し、さらに、海外のコホートとの共同研究により検証の効率化を図る。3) それぞれの化学物質曝露に起因するメチル化変化がどの健康影響に關与するのか、その影響の何%(介在の大きさ)をメチル化変化で説明できるのかを介在解析(Mediation analysis; Int J Epidemiol 2016)で明確にする。4) 遺伝子多型(SNPs)の影響を母児ペアで検討し、遺伝的差異を背景にもつヒト集団でのメチル化変化を明らかにする。

以上の検討により、胎児期の化学物質曝露がエピゲノム変化を介して成長後の疾病発現に影響を与えるエピゲノム試験法の開発につなげる。

B. 研究方法

1. 人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析ならびに測定方法の開発

2002~2012年に北海道内の医療機関を受診し、調査の同意を得た妊産婦94名について、分娩時に臍帯血を採取して調査試料とした。採取後の臍帯血は密閉可能な容器に移され、北海道大学で冷凍保存された。測定は福岡県保健環境研究所で実施した。アセトン、ヘキサン等の有機溶媒は関東化学製のダイオキシン分析用を用いた。硝酸銀シリカゲルは富士フィルム和光純薬製のダイオキシン分析用を、濃硫酸は同社製の有害金属測定用をそれぞれ使用した。活性炭(ナカライテスク製)はトルエンで約30時間還流洗浄し、無水硫酸ナトリウムに対して0.1%(w/w)になるよう混合して用いた。

臍帯血の抽出には高速溶媒抽出装置 ASE-350(Thermo製)を使用した。冷凍状態の臍

帯血試料を室温で解凍し、その約 6 g を ASE-350 用の抽出セルに秤量した。凍結乾燥を行った後、クリーンアップスパイクを添加し、抽出溶媒にアセトン/ヘキサン(1:3, v/v)を用いて抽出した。抽出条件の詳細は既報の通りであった。得られた抽出液を減圧濃縮し、風袋を量った秤量瓶に移して乾燥し、脂肪重量を測定した。

脂肪重量を確定後、脂肪を少量のヘキサンで溶解し、硫酸処理を行った。次に硝酸銀シリカゲル及び活性炭カラム等による精製を行い、non-ortho PCBs を除く PCBs と non-ortho PCBs を含むダイオキシン類の 2 つの画分を得た。各画分を濃縮して 1.5 mL 容の濃縮バイアルに移し、各々にシリンジスパイクを添加して高分解能 GC/MS (HRGC/HRMS) の測定試料とした。

画分 の最終検液量は 100 μ L であり、このうちの 1 μ L を HRGC/HRMS (Agilent 6890/ JEOL JMS-800D) に注入して測定した。一方、画分 の最終検液量は全量 200 μ L とし、このうち 100 μ L を大量試料注入装置 (アイスティサイエンス製 LVI-S200) 付き HRGC/HRMS (Agilent 6890 / Micromass AutoSpec Premier) に注入して測定した。上記 と から得られた SIM クロマトグラムを解析し、ダイオキシン類 (29 異性体) 及び PCBs (約 70 種類の 3~10 塩素化体) を定量した。

本分担研究の実施にあたり、臍帯血中のダイオキシン類・PCBs の定量精度の確保を目的として、国内の 6 機関と共同で分析精度管理を実施した。結果として、当研究所の測定値は他の測定機関とよく一致しており、測定精度が確保されていることが確認できた。

ダイオキシン類及び PCBs 濃度は脂肪重量あたりの濃度 (lipid weight basis) または全血重量あたりの濃度 (whole blood weight basis) で表記した。ダイオキシン

類濃度 (pg/g) の 2,3,7,8-TCDD 毒性当量 (TEQ) への換算には、2,3,7,8-TCDD 毒性等価係数 (WHO-TEF (2005)) を用いた。定量下限値未満となった化合物の濃度は、定量下限値の 1/2 値として取り扱い、TEQ を算出した。

2. 血液中フタル酸モノエステル類の分析

フタル酸エステル類については、ヒトがばく露されると代謝物が生じることが分かっている。今回は、小児、胎児期における影響を調べるため、代謝物であるモノエステル類 7 種 (MnBP、MiBP、MBzP、MEHP、MEHHP、MECPP、cx-MiNP) について血液試料の分析法を確立し、実試料の測定を行った。開発した同位体希釈法-液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (以降、LC-MS/MS) をヒト血液試料 20 検体に適応した。対象とするそれぞれの項目の安定同位体をクリーンアップスパイクとして添加し、濃度の計算に用いた。

3. 胎児期ビスフェノール A (BPA) 曝露の臍帯血 DNA エピゲノム網羅的メチル化析

初期調査票・出産時カルテ情報・臍帯血 BPA 濃度がそろった北海道スタディ札幌コホートの 277 母児ペアを対象とした。BPA 濃度は LC-MS/MS で測定した。約 45 万 CpGs の臍帯血 DNA メチル化データは 450K (イルミナ社) により取得し、標準化後、バッチ間の補正を行った。メチル化値と自然対数変換した BPA 濃度との関連を、母の年齢、出産前 BMI、教育歴、妊娠中喫煙、児の性別、在胎週数、および、メチル化値から推定した細胞組成値 (Bakulski et al. 2016) で調整した robust linear regression (Fox and Weisberg 2011)、経験ベイズ法 (Smyth 2004) により解析した。結果の検証は台湾の出生コホート (Huang, 2010) の 11 母児ペアで行った。さらに、男女層別解析、遺伝子

ネットワーク解析 (Warde-Farley et al. 2010), Gene Ontology (GO) 解析を行った。

4. 大規模コホートにおける次世代シークエンサーを用いた領域特異的メチル化解析

北海道スタディ大規模コホートにおける ADHD ケース・サブコホートのうち臍帯血 DNA のそろり母児 562 名 (ケース: 245 名、コントロール: 317 名) を対象とした。質問票により、喫煙経験のない非喫煙群 ($n = 276$)、妊娠中も喫煙を継続した喫煙群 ($n = 38$) に群別化した。また、産後期 (約 8 ヶ月) での母体の血清コチニン濃度 (Sasaki 2011) により、血清コチニン高濃度群 (≥ 11.49 , $n = 48$)、中程度濃度群 ($0.22-11.48$ ng/mL, $n = 200$)、低濃度群 (≤ 0.21 , $n = 262$) へ群別化した。プライマリーエンドポイントとして 6 歳の ADHD-RS スコア (男児 ≥ 14.9 、女児 ≥ 9.4) により ADHD 疑い群 ($n = 224$)、健常者群 ($n = 286$) が解析対象者となった。昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析において、胎児期の喫煙曝露により有意に DNA メチル化変化した 46 CpGs から 14 CpGs (9 遺伝子) を選択した。次世代シークエンサーを用いたバイサルファイトシークエンス解析は ThermoFisher 社の IonPGM システムを用いた。

倫理面への配慮

疫学調査は北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科、山梨大学の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会および共同研究施設の倫理規定に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮し、対象者のプライバシー

の保持には細心の注意を払った。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科で規定されている「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従い、本研究は倫理面の十分な配慮のうえ行った。

C. 研究結果

1. 人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析ならびに測定方法の開発

妊産婦 94 名から採取した臍帯血試料の分析を実施した。このうち 2 例についてはダイオキシン類の測定中に装置の不具合が発生したためデータを取得することができなかった。結果として、ダイオキシン類は 92 例、PCBs は 94 例について定量結果が得られた。

臍帯血試料 (94 例) を ASE-350 で抽出して得られた脂肪の含量は、重量あたり平均 0.33% (範囲 0.22% ~ 0.56%) であった。当研究所における臍帯血試料の抽出事例や他の報告事例と同等の脂肪含量が得られた。臍帯血 92 例のダイオキシン類濃度 (Total TEQ) は、平均 4.0 pg/g lipid (範囲 2.6 ~ 11 pg/g lipid) であった。また、全血重量あたりの濃度で表すと、Total TEQ 値は平均 0.012 pg/g whole (範囲 0.0077 ~ 0.026 pg/g whole) であった。

2. 血液中フタル酸モノエステル類の分析

血液中のフタル酸モノエステル類 7 種の分析法を確立し、標準液の繰り返し測定、繰り返し分析、操作ブランク試験、添加回収試験等を実施し、必要となる精度管理データを収集した。また、本分析法により 20 名分の血液試料の分析を実施した。血液中のフタル酸モノエステル類 7 種の検出下限値は、MnBP 0.57ng/mL、MiBP 0.44ng/mL、MBzP 0.19ng/mL、MEHP 0.31ng/mL、MEHHP 0.23ng/mL、MECPP 0.11ng/mL、cx-MiNP

0.12ng/mLであった。本分析法における操作ブランクはすべての項目で下限値未満、各対象物質を6ng添加した回収試験では、回収率が93~110%であった。その内の1検体で二重測定(同一試料の分析)を実施した。それぞれの項目における差は、最大で6.8%であった。

3. 胎児期ビスフェノールA(BPA)曝露の臍帯血DNAエピゲノム網羅的メチル化析

P値<0.0001のメチル化変化のうち、全体で91%、女児で98%がメチル化減少、反対に、男児では88%がメチル化増加を示した。また、女児特異的メチル化変化を示す14CpGsにつき台湾コホート(n=11)で検証した結果、10CpGsでメチル化減少を示したが、27CpGsの男児特異的メチル化変化については、9CpGsのみが札幌コホートの結果と一致した。一方、FDR<0.05のCpGを有する遺伝子(男児:27遺伝子、女児:16遺伝子)についてネットワーク解析を行ったところ、男児では遺伝子同士が相互に連結する1つのクラスターを形成していたのに対し、女児では、それぞれの遺伝子が孤立していた。一方、P値<0.0001の遺伝子のGO解析においては、男児では有意に(FDR<0.05)蓄積する遺伝子群は見られなかったが、女児では細胞接着に関連する遺伝子群がBPA曝露に影響を受けていることが明らかとなった。

4. 大規模コホートにおける次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析

質問票により群別化した非喫煙群、喫煙群間において、5つのCpGs(AHRR(cg05575921), MYO1G(12803068), GF11(cg12876356, cg18146737), ESR1(cg15626350))については450Kの結果同様、喫煙曝露によるメチル化変化に統計的有意差(P<0.05)を認めた。しかし、その他の遺伝子領域では統計的有意差は認められ

なかった。

コチニン濃度で群別化した解析では、ERS1以外の4つのCpGsは質問票と同様に低濃度および中程度濃度群と比較して高濃度群で有意な差が認められた。

質問表による喫煙曝露とADHD疑い群との関連を検討した。喫煙曝露によるADHD疑い群の危険率の指標としてのオッズ比は約1.5であったが、カイ二乗検定による比率の差の検定のP値=0.3052と喫煙曝露とADHD疑い群との関連に有意差は認めなかった。また、母体血清コチニン濃度とADHD疑い群との関連もP値=0.1889と有意差は認めなかった。

コントロール群とADHD疑い群間比較においてDNAメチル化に差があるCpGを解析した結果、CYP1A1の1CpGで有意な差があった。

D. 考察

1. 人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析ならびに測定方法の開発

これまでの調査研究で、臍帯血や胎盤組織等のダイオキシン類・PCB濃度は妊産婦の出産歴と関連があり、出産回数が多いほど濃度が低くなる傾向が認められている。これは母親の体内に蓄積していたダイオキシン類・PCBsが出産に伴う授乳や胎盤の摘出等によって体外に排出されたためと考えられる。

福岡県保健環境研究所では2009~2011年度に福岡県内在住の妊産婦(29名、平均年齢32.0才)を対象に臍帯血中のダイオキシン類(mono-ortho PCBを除く21化合物)濃度を測定しており、これらを今回の臍帯血の分析結果と比較した。ここでは本分担任研究及び福岡県調査ともに初産及び出産2回目の妊産婦に該当する測定値を選び、データを比較した。本研究で92例中82例、

福岡県調査では 29 例中 26 例の妊産婦が当該条件に一致した。

上記の条件でダイオキシン類濃度 (mono-ortho PCB を除く 21 化合物, Total TEQ) を比較すると, 本分担研究で平均 3.9 pg/g lipid (範囲 2.6~9.1 pg/g lipid) となり, 福岡県調査では平均 6.5 pg/g lipid (範囲 3.1~18 pg/g lipid) となり, 平均値及び濃度範囲ともに本研究が低い値となっていた。一般的に生体試料中のダイオキシン類濃度は加齢に伴い増加する傾向が認められるが, 両集団の平均年齢はともに約 31 歳で同等であった。

さらに臍帯血中ダイオキシン類濃度の国内調査事例として, 東北地方で 49 名の妊産婦から採取された試料について平均 10 pg/g lipid (範囲 3.2~23 pg/g lipid) と報告されている(2008 年)。本研究の結果はこの調査結果と比較しても低い傾向であった。

臍帯血 94 例中の Total PCBs (81 化合物) 濃度(脂肪重量あたり濃度のみ)は, 平均 33 ng/g lipid (範囲 6.6~200 ng/g lipid) であった。全血重量あたり濃度は, 平均 98 pg/g whole (範囲 25~460 pg/g whole) であった。臍帯血中の PCBs 濃度については, 過去に環境省の調査事例(1999~2004 年)がある。これによると, 臍帯血 49 例中の Total PCBs 濃度は平均 81 ng/g lipid (範囲 30~390 ng/g lipid) であり, 全血重量あたりでは平均 98 pg/g whole (範囲 25~460 pg/g whole) であった。本研究で測定した臍帯血 49 例中の Total PCB 濃度は, ダイオキシン類濃度と同様に過去の分析事例と比較して低い傾向であった。

一方, Total PCBs 濃度(脂肪重量あたり)について 94 例の分布を見ると, 93 例が 60 ng/g lipid 未満であったのに対し, 残る 1 例のみが 200 ng/g lipid と高くなっていた。当該の妊産婦については, ダイオキシン類濃度も測定しており, 他の妊産婦に対し

て同様に濃度が高かった。

環境中のダイオキシン類と PCBs の起源は異なり, 前者は主に焼却や燃焼等の非意図的過程であり, 後者は過去に工業製品として製造された意図的産物に由来する。臍帯血中の Total dioxin 濃度及び Total PCB 濃度について, 1 名の臍帯血が他者と比べて高い濃度を示したが, Total dioxin と Total PCB 間の濃度相関は全員でほぼ一致していた。このことから, 本今回の事例は試料採取や分析操作中の汚染や被験者の一時的な高濃度曝露に起因するものでなく, 日常的な食事を介した持続的な摂取に由来したものと考えられる。

2. 血液中フタル酸モノエステル類の分析

フタル酸エステル類の検出率は MnBP : 100%、MiBP : 100%、MEHP : 65.0%、さらに二次代謝物の MECPP : 95.0% であった。一方、MBzP の検出率は 5.0%、MEHHP の検出率は 5.0%、cx-MiNP の検出率は 0% と検出率が低かった。可塑剤工業会によると 2014 年の国内可塑剤出荷量の構成比は DEHP が 47%、DiNP が 26%、および DBP を含むその他が 4% で、本研究の対象集団は DEHP や DBP に加えて DiNP にも曝露されていることが推察されるが、本研究の測定では血清中の DiNP 代謝物はほとんど検出されなかった。

フタル酸エステル類濃度の中央値 (ng/ml) は MnBP : 18.5、MiBP : 5.9、MEHP : 0.405、さらに二次代謝物の MECPP : 0.24 であった。これまでに同じ集団の妊娠初期血清を用いて、既に 648 名のフタル酸エステル類濃度を測定している。この 648 名のフタル酸エステル類濃度の中央値 (ng/ml) は MnBP : 47、MiBP : 3.4、MEHP : 7.2、さらに二次代謝物の MECPP : 0.37 であった。今回の測定では MnBP および MEHP の中央値濃度が過去の測定より低く、MiBP の中央値濃度が今回の測定のほうが高かった。この原因と

して、今回の測定が 20 件のみとサンプル数が少ないこと、フタル酸エステル類濃度と関係する採血した西暦や生活環境が異なる可能性が考えられた。

妊娠中の血中フタル酸エステル類濃度を報告した先行研究では、イタリアの妊婦 84 名の妊娠後期血清中 MEHP は $0.52 \pm 0.61 \mu\text{g/mL}$ (平均値 \pm SD) であった (EHP 2003)。オーストラリアの妊婦 123 名の妊娠初期血清中フタル酸エステル代謝物の中央値 (ng/ml) は MiBP: 1.77、MnBP: 2.46、MBzP: 1.26、MEHP: 1.18、MECCP: 1.64、および MiNP: <LOD であった (Reproduction 2014)。本測定では DEHP の一次代謝物である MEHP は先行研究より血中濃度が低いが、DnBP、DiBP の一次代謝物である MnBP、MiBP の血中濃度が先行研究より高レベルであった。これは、「油脂、脂肪性食品を含有する食品に接触する器具および容器包装の禁止」(平成 14 年厚生労働省告示第 267 号、2002 年)や玩具(平成 22 年厚生労働省告示第 336 号、2010 年)などの使用規制により生体への DEHP 曝露量が減少したが、一方で、DBP は玩具への使用は禁止されているものの、日用品にも広く使用されており、諸外国の先行研究より本研究対象集団は曝露レベルが高い可能性が示された。

3. 胎児期ビスフェノール A (BPA) 曝露の臍帯血 DNA エピゲノム網羅的メチル化析

本エピゲノム網羅的解析から、一般環境レベルの BPA 曝露でも男女特異的に児の DNA メチル化に影響を与えることが明らかになった。

男児ではメチル化増加が見られたのに対し、女児ではメチル化減少が顕著であった。BPA 曝露によるメチル化減少は成人女性 (Hanna, 2012) や思春期の女児 (Kim, 2017) での先行研究と一致する。BPA 曝露は女児では優先的にメチル化減少を誘導すると考え

られているが、男児のメチル化変化についてはまだ明らかにされていない (Martin, 2018)。

一方、メチル化変化部位を有する遺伝子のネットワーク解析、および、GO 解析においても性差が認められた。我々は札幌コホートにおいて BPA の胎児期曝露が児の生殖ホルモンレベル (Minatoya, 2017)、問題行動 (Minatoya, 2017)、および、代謝関連マーカーであるアディポカインレベル (Minatoya, 2018) に男女特異的に影響を及ぼすことを示した。他の疫学研究においても BPA 曝露の性特異的影響が報告されている (Harley, 2013; Mustieles, 2015; Giesbrecht, 2017)。男女によるメチル化変化の違いは遺伝子発現に違いをもたらし、BPA 曝露の性特異的影響に寄与しているのかもしれない。今後、BPA 曝露による性特異的影響とメチル化変化の関連を明らかにする必要がある。

4. 大規模コホートにおける次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析

大規模コホートにおいて多検体の DNA メチル化解析手法を確立することは重要である。その手法の 1 つとして次世代シーケンサーの利用が考えられる。本研究において、網羅的メチル化解析を行った集団(北海道スタディ札幌コホート)とは別集団である北海道スタディ大規模コホートを用いて次世代シーケンサーによるメチル化解析の妥当性を検証した。その結果、これまでに喫煙曝露による影響が数多く報告されている *AHRR*, *MYO1G*, *GF11* (Morales E et al., 2016, Joubert BR et al., 2016, Küpers LK et al., 2015) については、本研究においても有意にメチル化変化することがわかった。これらの遺伝子は喫煙曝露の影響を受けやすい領域であることが示唆される。しかしながらその他の遺伝子領域では有意

差は認められなかった。原因として、450K 網羅的解析の偽陽性であることが考えられる。また、今回の集団においては非喫煙群 (n = 276)、喫煙群 (n = 38) とサンプルサイズの違いが大きく、十分な検出力が得られなかったことも原因の1つと推測される。別の原因として、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析において、サンプル間でカバレッジ数がばらつき、外れ値が多くなってしまったことが考えられる。

今回の集団において有意差は認められなかったが、質問表による喫煙曝露と ADHD 疑い群のオッズ比からは喫煙曝露が ADHD 発症に比較的強く寄与することを示唆された。喫煙曝露に関係なくコントロール群と ADHD 疑い群間比較において *CYP1A1* の1つの CpG で有意差があったが、外れ値も多いためさらなる検討が必要である。本研究では ADHD の有病率の小ささもあり、サンプルサイズの大きさやバイアスを考慮できていなかったことから、今後はサブコホート集団を再検討することにより喫煙曝露と ADHD 発症の関連さらには DNA メチル化変化との関連を解析できる可能であると考えられる。

E . 結論

曝露評価として臍帯血中 PCB ダイオキシン類を測定したところ mono-ortho PCB を除く 21 化合物の Total TEQ は平均 3.9 pg/g lipid (範囲 2.6~9.1 pg/g lipid) となり、福岡県内在住の妊産婦 (平均 6.5 pg/g lipid (範囲 3.1~18 pg/g lipid)) と比較して平均値及び濃度範囲ともに本測定結果のほうが低かった。妊娠初期血清中フタル酸エステル類の測定では DEHP の一次代謝物である MEHP は諸外国の先行研究より血中濃度が低い、DnBP、DiBP の一次代謝物である MnBP、MiBP の血中濃度が先行研究より高レベルであった。これは国内の使用

規制により生体への DEHP 曝露量が減少したが、一方で、DBP は日用品にも広く使用されていることが関係する可能性が考えられた。

一般環境レベルの BPA 曝露でも男女特異的に児の DNA メチル化に影響を与えることが明らかになった。次世代シーケンサーを用いた特異的遺伝子領域の DNA メチル化解析法の妥当性を検討し、喫煙曝露の影響を受けやすい遺伝子領域を検証することができた。次世代シーケンサーによるメチル化解析の精度についてはさらなる検証が必要である。

今後、化学物質曝露に誘引される DNA メチル化変化がどのアウトカムに影響するかを介在の大きさを含めて明らかにし、胎児期の化学物質曝露と成長後の疾病発現をつなぐ分子メカニズムとして、エピゲノム試験法開発につなげる。

F . 研究発表

1) 論文発表 (原著・総説 査読有)

1. Miura R, Araki A, Minatoya M, *et al.* An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylations reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A. *Sci Rep.* under revision.
2. Kobayashi S., Sata F., Hanaoka T., Braimoh T. S., Ito K., Tamura N., Araki A., Ito S., Miyashita C., Kishi R.; Association between maternal passive smoking and increased risk of delivering small-for-gestational-age infants at full-term using plasma cotinine levels from the Hokkaido Study: a prospective birth cohort. *BMJ*

- Open. 2019.
3. Ito K., Hanaoka T., Tamura N., Sasaki S., Miyashita C., Araki A., Ito S., Minakami H., Cho K., Endo T., Baba T., Miyamoto T., Sengoku K., Tamakoshi A., Kishi R.; Association between maternal serum folate concentrations in the first trimester and the risk of birth defects: the Hokkaido Study of Environment and Children's Health. *Journal of Epidemiology*. 29(4), 164-171, 2019.
 4. Nishimura Y., Moriya K., Kobayashi S., Araki A., Sata F., Mitsui T., Itoh S., Miyashita C., Cho K., Kon M, Nakamura M., Kitta T., Murai S., Kishi R., Shinohara N.; Association between ESR1 polymorphisms and second to fourth digit ratio in school-aged children in the Hokkaido Study. *Steroids*. 141 55-62, 2019.
 5. Yamazaki K., Araki A., Nakajima S., Miyashita C., Ikeno T., Itoh S., Minatoya M., Kobayashi S., Mizutani F., Chisaki Y., Kishi R.; Association between prenatal exposure to organochlorine pesticides and the mental and psychomotor development of infants at ages 6 and 18 months: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Neurotoxicology*. 69 201-208, 2018.
 6. Itoh S., Baba T., Yuasa M., Miyashita C., Kobayashi S., Araki A., Sasaki S., Kajiwara J., Horii T., Todaka T., Fujikura K., Nakajima S., Kato S., Kishi R.; Association of Maternal Serum Concentration of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls with Maternal and Neonatal Thyroid Hormones: The Hokkaido Birth Cohort Study Environmental Research. 167, 583-590, 2018.
 7. Tsai M.-S., Miyashita C., Araki A., Itoh S., Ait Bamai Y., Goudarzi H., Okada E., Kashino I., Matsuura H., Kishi R.; Determinants and temporal trends of perfluoroalkyl substances in pregnant women: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15 (5) 989, 2018.
 8. Goudarzi H., Konno S., Kimura H., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Ait Bamai Y., Kimura H., Shimizu K., Suzuki M., Ito Y. M., Nishimura M., Kishi R.; Contrasting associations of maternal smoking and pre-pregnancy BMI with wheeze and eczema in children. *Science of the Total Environment*. 639. 1601-1609, 2018.
 9. Mitsui T., Araki A., Goudarzi H., Miyashita C., Ito S., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.; Relationship between adrenal steroid hormones in cord blood and birth weight: The Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *American Journal of Human Biology*. e23127, 2018.

10. Miyashita C., Araki A., Mitsui T., Itoh S., Goudarzi H., Sasaki S., Kajiwara J., Horii H., Cho K., Moriya K., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.; Sex-related differences in the associations between maternal dioxin-like compounds and reproductive and steroid hormones in cord blood: the Hokkaido Study. *Environment International*. 117 175-185, 2018.
11. Miyake K., Kawaguchi A., Miura R., Kobayashi S., Tran N. Q. V., Koybayashi S., Miyashita C., Araki A., Kubota T., Yamagata Z., Kishi R.; Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Scientific Report*. 8: 5654, 2018.
12. Araki A., Miyashita C., Mitsui T., Goudarzi H., Mizutani F., Chisaki Y., Itoh S., Sasaki S., Cho K., Moriya K., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.; Prenatal organochlorine pesticide exposure and the disruption of steroids and reproductive hormones in cord blood: The Hokkaido study. *Environ Int*. 110 1-13, 2018.
13. Hanaoka T., Tamura N., Ito K., Sasaki S., Araki A., Ikeno T., Miyashita C., Ito S., Minakami H., Cho K., Endo T., Baba T., Miyamoto T., Sengoku K., Kishi R., Health other members of the Hokkaido Study on Environment and Children's; Prevalence and Risk on Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study; the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *J Epidemiol*. 28 (3) 125-132, 2018.
14. Kishi R., Araki A., Minatoya M., Itoh S., Goudarzi H., Miyashita C.; Birth cohorts in Asia: The importance, advantages, and disadvantages of different-sized cohorts. *Science of the Total Environment*. 615 1143-1154, 2018.
15. Miura R., Araki A., Miyashita C., Kobayashi Su., Kobayashi Sa., Wang SL., Chen CH., Miyake K., Ishizuka M., Iwasaki Y., YM. Ito, Kubota T., Kishi R.; An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: the Hokkaido study. *Environment International*. 115: 21-28, 2018.
16. Tamura N., Hanaoka T., Ito K., Araki A., Miyashita C., Ito S., Minakami H., Cho K., Endo T., Sengoku K., Ogasawara K., Kishi R.; Different Risk Factors for Very Low Birth Weight, Term-Small-for-Gestational-Age, or Preterm Birth in Japan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15 (369):2018.
17. Minatoya M, Araki A, Miyashita C, *et al*. Association between prenatal bisphenol A and phthalate exposures and *fet al* metabolic related biomarkers: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Environ Res*. 161 505-511, 2018.
18. Minatoya M, Itoh S, Yamazaki K, *et al*. Prenatal exposure to bisphenol

A and phthalates and behavioral problems in children at preschool age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 23:43 2018.

Itoh S., Kobayashi S., Yamazaki K., Ait Bamai Y., Miura R., Tamura N., Kishi R.; Update and the recent findings from the Hokkaido Study. The 9th International Conference on Children's Health and the Environment (INCHES). Hoam Faculty House, Seoul National University, Seoul, Korea. (2018.6.27-29)

2) 論文発表 (和文・総説)

1. 岸玲子, 荒木敦子; わが国で初めての本格的な出生コホート研究から見た環境化学物質の濃度レベルと次世代影響 (特集: これまでの環境リスクとこれからの環境リスク). *保健医療科学*. 67(3), pp292-305, 2018.
2. 岸玲子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 湊屋街子, 小林澄貴, 山崎圭子, アイツバマイゆふ, 三浦りゅう, 田村菜穂美「2万人規模の出生コホートと, 500人規模の小コホートからなる北海道スタディが目指してきたもの: 環境と子どもの健康 先天異常・発達・アレルギーの15年におよぶ経験と成果」, *日本衛生学雑誌*, 73(2), 164-177, 2018.

3. Yamazaki K., Itoh S., Araki A., Miyashita C., Minatoya M., Tamura N., Goudarzi H., Okada E., Kashino I., Kishi R.; Prenatal exposure to perfluorinated alkyl substances and childhood ADHD risk at 6 years old: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *ISEE/ES AC2018 (International Society for Environmental Epidemiology/International Society of Exposure Science Asia Chapter 2018)*. School of Public Health, National Taiwan University, Taipei, Taiwan (2018.6.21-25)

3) 学会発表 (国際)

1. Yamazaki K., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Ikeno T., Nakajima S., Kajiwara J., Horii T., R Kishi; ERP P3 of school age children and prenatal exposure to dioxin: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *IOP 2018 (International organization of psychophysiology)*. IMT School for Advanced Studies. Lucca, Italy. (2018.9.4-8).
2. Minatoya M., Araki A., Miyashita C.,

4) 学会発表 (国内)

1. 小林澄貴, 佐田文宏, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 佐々木成子, 坂晋, 岩崎雄介, 岸玲子; 胎児期有機フッ素化合物濃度と出生体重との関連: 異物代謝酵素遺伝型の修飾による影響 - 北海道スタディ. 第29回日本疫学会学術総会. 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区), 国立がん研究センター(東京都中央区). (2019.1.30-2.1)
2. 三宅邦夫, 川口章夫, 三浦りゅう, 小林祥子, 小林澄貴, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 山縣然太郎, 岸玲子. 胎児期喫煙曝露による臍帯血における DNA メチ

ル化変化領域の同定. 第 12 回日本エピ
ジェネティクス研究会年会.
(2018.5.24.-25)

3. 新谷依子, 堀就英ほか. 血液中 PCB 濃度分析
のクロスチェック (2017 年度): 第 27 回環
境化学討論会. 那覇市. 2018.5.22.-25.
4. 山崎圭子, 荒木敦子, 中島そのみ, 宮
下ちひろ, 池野多美子, 伊藤佐智子,
湊屋街子, 水谷太, 菅木洋一, 岸玲
子; 胎児期の有機塩素系農薬曝露が
3.5 歳の児の知的機能に及ぼす影響-
北海道スタディ. 第 88 回日本衛生学会
学術総会. 東京工科大学蒲田キャン
パス(東京都大田区). (2018.3.22-24)
5. 田村菜穂美, 花岡知之, 伊藤久美子,
伊藤佐智子, 宮下ちひろ, 荒木敦子,
小笠原克彦, 岸玲子; 両親の教育歴と

児の Small for gestational age との
媒介要因分析: 北海道スタディ. 第 88
回日本衛生学会学術総会. 東京工科大
学蒲田キャンパス(東京都大田区).
(2018.3.22-24)

6. 小林澄貴, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 三
浦りゅう, ゴウダルジ・ホウマヌ, 荒
木敦子, 梶原淳睦, 堀就英, 岸玲子;
胎児期の PCB 類曝露による児の *H19*・
LINE-1 の DNA メチル化への影響: 北海
道スタディ. 第 88 回日本衛生学会学術
総会. 東京都大田区. (2018.03.22.-
24)

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし