

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妊娠初期血清 1786 検体を用いて代謝物であるフタル酸モノエステル類 (cx-MiNP) の再分析を実施した。DiNP は他のフタル酸エステル類と異なり、化合物そのものが DiNP-1 と DiNP-2 および DiNP-3 の異性体の混合物であることが知られている (European Union Commission, 2003)。そのため製品を通して曝露した DiNP の

混合体は、体内で代謝され、一次代謝物のモノ体、二次代謝物のカルボキシ体およびヒドロキシ体についてもそれぞれ構造異性体をもつことが報告されている(Koch et al., 2007)。これまで北海道スタディでは、母体血中 DiNP 代謝物として、カルボキシ体である cx-MiNP の曝露評価を実施してきたが、いくつかある構造異性体のうちの1つである mono-(4-methyl-7-carboxyheptyl)phthalate のみの定量であり、その他の mono-(7-carboxyoctyl)phthalate や他のカルボキシ体の構造異性体は考慮されていなかった。EU のバイオモニタリンググループである Human Biomonitoring for EU (HB4EU) においても、1つの構造異性体のみでの曝露評価ではなく、複数の構造異性体を含めた DiNP 代謝物の定量法を用いており、北海道スタディにおいても、同様の評価をすべきと考えた。再定量により、実情に即した曝露データとなるとともに HB4EU など、世界と比較可能なデータとして用いることが可能となった。次に、フタル酸エステル類の胎児期曝露について、臍帯血 DNA メチル化のエピゲノム網羅的解析を行った。その結果、曝露により代謝系に関わる遺伝子のメチル化が影響を受けていること、それらのメチル化変化は出生時のボンデラル指数の低下と関連していることを明らかにした。さらに、媒介分析により、胎児期曝露による出生児のボンデラル指数低下への影響にそれらのメチル化変化が関与している可能性を示唆した。

臍帯血試料を対象にダイオキシン類・PCBs の異性体定量分析を実施した。定量結果の平均値及び濃度範囲を過去の報告事例と比較したところ、脂肪重量当たりのダイオキシン類濃度は同等となり、PCBs 濃度はやや低い傾向が認められた。85名の妊産婦から採取された臍帯血試料は、本研究事業の主たる目的である一般的なヒトの集団におけるダイオキシン類・PCBs の次世代影響評価に適切な試料であると考えられた。続いて、エピゲノム網羅的 DNA メチル化変化と胎児期ダイオキシン類曝露との関連を検討した。ダイオキシン類濃度と関連があった CpG (遺伝子) は男児の cg01228410 (SLC9A3, FDR = 0.041) のみで、女児では同定されなかった。メチル化変化部位 (differentially methylated position; DMP) 解析から $p < 2.50E-04$ 水準で男児 317CpG, 女児 262CpG が抽出された。男児で高メチル化の割合が高く、男児でより DNA 高メチル化変化量 (logFC) は大きかった。ダイオキシン類の胎児期曝露による出生体重や生後の免疫への影響には性差があり、男児に影響が顕著に認められることを既に報告しており、本研究から、エピゲノム変化も性差がある可能性が示唆された。

2018 度から継続した研究で、次世代シーケンサーを実施した ADHD ケース・サブコホート 1263 名に解析対象を拡大した結果、妊娠後期コチニン濃度で分類した 3 群のうち、能動喫煙群で 6 歳 ADHD 傾向の有意な増加が認められた。コチニン 3 群における一元配置分散分析の結果 AHRR は 5CpGs, CYP1A1 は 6CpGs, MYO1G は 20CpGs, GF11 は 21CpGs で有意差 ($P < 0.05$) を認めたが、ESR1 は全ての CpGs で有意差が認められなかった。ロジスティック回帰分析の結果、6 歳 ADHD 傾向と出産歴 (OR = 0.51; 95% CI [0.34, 0.76]), 世帯年収 (OR = 0.39; 95% CI [0.25, 0.60]), 能動喫煙 (OR = 2.51; 95% CI [1.32, 4.75]) と有意な関連が認められた。妊婦 (能動) の喫煙と ADHD 疑いの関連において AHRR のメチル化の媒介 (mediation) を分析した結果、AHRR の CpG_34 は間接効果の傾向が見られ、CpG_57 は有意に間接効果が認められた。妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。

<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毒性
学教室，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，特任准教授
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，常務取締役
松浦 英幸
北海道大学大学院農学研究院生物有
機化学研究室，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 Human Methylation 450 BeadChip (450K)、および、Methylation EPIC 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関与するのか、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 . 異性体を含めたヒト生体試料中 Diisononyl phthalate (DiNP) 代謝物の定性・定量

高速液体クロマトグラフ タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) の Product ion Scan モードによって OH-MiNP (Precursor ion : m/z 307) の product ion spectrum を得た。得られた結果より、 m/z 121 や 77 のフラグメントが強い強度で確認された。各フラグメントの質量数から、それらの構造は安息香酸部およびベンゼン部であることが明らかとなり、これらのフラグメントは、異性体共通で発生すると考えられた。すなわち、OH-MiNP のモニターイオ

ンを m/z 307>121 (定量イオン: Q1), 307>77 (確認イオン: Q2) とした場合, それぞれは同様のクロマトグラムパターンであり, これらは全異性体に共通して確認できると推測される。同様のクロマトグラムパターンが得られる範囲を全異性体の検出範囲とし, Mono (4-methyl-7-hydroxyoctyl) phthalate の標準物質を用いた同位体希釈法により, 異性体を含む総 OH-MiNP を定量した。cx-MiNP, MiNP についても確認し, 同様の手法で定量することとした。各 *total* 体の定性は, 検量線試料および実試料の Q1 と Q2 のピーク面積比 ($Q1/Q2_{RM}$, $Q1/Q2_{sample}$) を算出して確認した。検量線試料は各 *single* 体の標準物質を用いて調製した。

2. 胎児期 DEHP 曝露の臍帯血 DNA エピゲノム網羅的メチル化解析

リクルート時調査票・出産時カルテ情報・母体血中 MEHP (DEHP の一次代謝物) 濃度がそろった北海道スタディ札幌コホートの 203 母児ペアを対象とした。MEHP 濃度は GC-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 MEHP 濃度との関連を, 母の年齢, 出産前 BMI, 教育歴, 採血時期, 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。さらに, KEGG pathways (Kanehisa et al. 2002) を用いた Gene Ontology (GO) 解析を行った。また, GO 解析で明らかになった代謝系に関わる遺伝子のメチル化と出生時のポンド

ラル指数 (PI) との関連を重回帰分析により解析した。調整因子には母の年齢, 出産歴, 出産前 BMI, 教育歴, 妊娠中喫煙, 児の性別を用いた。次に, MEHP 濃度と PI 低下との関連にメチル化変化が関与しているか, 媒介分析 (Hayes 2013) により検討した。調整因子は上記に採血時期を加えた。

3. 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 85 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。

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。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。

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を確認した。

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。

4. PCB/dioxin と網羅的メチル化解析

出生前向きコホート北海道スタディ (札幌コホート) において、1 産科病院を受診した妊婦 514 名から参加同意を得た。妊娠中期から後期の母体血中ダイオキシン類を、高分解能ガススペクトロメトリ・高分解能マスマスペクトロメーター (GS-MS) を用いて分析した。出生時の臍帯血を用いて網羅的メチル化解析を実施した。抽出した臍帯血 DNA をバイサルファイト処理し、45 万 CpG 部位の網羅的メチル化を解析した (Infinium HumanMethylation450 BeadChip (イルミナ社))。網羅解析から得られたメチル化値を標準化後、バッチ間の補正を行った。メチル化値と log10 変換したダイオキシン類濃度との関連を robust linear regression (Fox and Weisberg 2011), 経験ベイズ法 (Smyth 2004) による多変量解析を用いて、メチル化変化部位 (differentially methylated position; DMP) を同定した。多変量解析では、母の出産歴、妊娠中喫煙、採血時期、児の性別 および、メチル化値から推定した (Bakulski et al. 2016) 細胞組成値で調整した。児の性別で層別化した解析も実施した。さらに同じ多変量解析モデルを用いてメチル化変化領域 (differentially methylated region; DMR) を bumpHunter 法 (Jaffe et al, 2012) により同定した。

5. 次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析と ADHD の関連

胎児期の喫煙が 6 歳 ADHD 傾向に与える影響について、エピゲノムの関与を明らかにすることを目的に、北海道スタディ大規模コホートで 2016 年 5 月までの 6 歳質問票が回収された 1959 名のうち、6 歳質問票、妊娠後期コチニン、臍帯血 DNA、妊娠初期調査票 (ベースライン調査票) が揃い、データに欠損がない 1263 名を対象とした。曝露は、妊娠後期 (約 8 ヶ月) での母体の血清コチニン濃度 (Sasaki 2011) により、能動喫煙群 (≥ 11.49)、受動喫煙群 (0.22-11.48 ng/mL)、非受動喫煙群 (≤ 0.21) の 3 群とした。6 歳 ADHDRS で ADHD 傾向あり (ADHDRS スコア (男児 ≥ 14.9 , 女児 ≥ 9.4)) の児をアウトカムとした。曝露を妊娠後期血漿中コチニンの 3 群、アウトカムを 6 歳 ADHDRS とし、世帯年収、妊娠中の母の飲酒と喫煙、出産歴、児の性別で調整したロジスティック回帰分析を実施した。

(倫理面への配慮)

本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、福岡県保健環境研究所、山梨大学の倫理委員会、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。福岡県保健環境研究所は臍帯血試料と試料リストを取り扱う。生体試料が入った容器及び試料リストには、研究代表者によって匿名化された ID のみを記載した。すべての実験・研究は、北海道大学

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 . 異性体を含めたヒト生体試料中 Diisononyl phthalate (DiNP) 代謝物の定性・定量

過去に分析したヒト血清試料 (1,786 検体) および尿試料 (232 検体) を対象に、異性体を含む DiNP 代謝物濃度を算出した。対象項目は cx-MiNP (血清 , 尿) , MiNP (尿) および OH-MiNP (尿) とした。血清試料において、*single-* および *total-cx-MiNP* の平均濃度はいずれも MDL 未満であったが、検出率を比較すると、前者の 0.39% に対し後者は 22% であった。尿試料では、各 *single* 体の平均濃度は全て MDL 未満であったのに対し、*total* 体では全項目とも MDL 以上 (*total-MiNP*; 0.59 ng/mL , *total-OH-MiNP* ; 1.7 ng/mL , *total-cx-MiNP* ; 1.2 ng/mL) であった。特に *total-OH-MiNP* , *total-cx-MiNP* の検出率は高く、それぞれ 92% , 97% であった。これらの結果より、ヒト生体試料に含まれる DiNP 代謝物は 4-メチルオクチル側鎖構造以外のものが主であることが確認された。

2 . 胎児期 DEHP 曝露の臍帯血 DNA エピゲノム網羅的メチル化解析

DEHP 曝露と 45 万 CpG を解析したところ、2 つの CpG (cg26409978; PARP12, cg00564857; SDK1) が多重比較補正後も統計学的に有意だった (false discovery rate (FDR) < 0.05) 。 また、メチル化変化全体では、曝露によりメチル化増加の方向に変化していることが明らかになった。

そこで、 $P < 2.5E-04$ の高メチル化にシフトした 253CpG 部位について G0 解析を行ったところ、代謝、シグナル伝達、および、内分泌系と関連する遺伝子上のメチル化が、MEHP 濃度と関連して変化していた。最も有意な関連を示した代謝系の CpG を選び PI と重回帰分析を実施した。解析した 16CpG のうち 12CpGs のメチル化が PI と負の関連を示し、特に 3 つの CpG (PIK3CG , ACAA1 , FUT9) が優位な関連 ($P < 0.1$) を示した。MEHP 濃度と PI 低下との関連にそれら 3 つの CpG のメチル化変化が関与しているか、媒介分析により検討した。各 CpG それぞれは優位な介在 (Sobel test p-value < 0.05.) を示さなかったが、各メチル化率を平均した場合、メチル化の介在は有意となり (Sobel test p-value = 0.04) , DEHP 曝露の PI への影響のうち、30.4% をメチル化により説明できることが示された。

3 . 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

臍帯血試料 (85 検体) の抽出脂肪量 (含量) は、臍帯血重量あたり平均 0.26% (範囲 0.17% ~ 0.35%) であった。当研究所における過去の分析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 85 例のダイオキシン類濃度 (Total TEQ) は、平均 5.5 pg/g lipid (範囲 2.9 ~ 28 pg/g lipid) であった。全血重量あたりの濃度に換算した Total TEQ 値は、平均 0.014 pg/g whole (範囲 0.0085 ~ 0.046 pg/g whole) であった。

臍帯血 85 例中の Total PCBs 濃度は、平均 49 ng/g lipid (範囲 14 ~ 190 ng/g lipid) であった。全血重量あたり濃度は、平均 120 pg/g whole (範囲 41 ~ 440 pg/g whole) であった。臍帯血 85 例の Total dioxin 濃度と Total PCBs 濃度 (脂肪重量あたり) の

間に良好な正の相関 ($R^2 = 0.913$) が認められた。また 85 例のうち 4 例は顕著に高い濃度域に分布していた。該当の 4 名はいずれも初産者であった。

4. PCB/dioxin と網羅的メチル化解析

PCB/dioxin による臍帯血中 DNACpG メチル化の変化を多変量解析して FDR が 0.1 未満であった DMP の結果を CpG 番号 (FDR の水準, 遺伝子) で示す。ダイオキシン類では cg05392644 (FDR=0.069, IDH3A), ダイオキシン類を児の性別で層別化した場合は, 男児の群: cg01228410 (FDR= 0.010, SLC9A3), cg18267081 (FDR= 0.010, TSSC1), cg04086002 (FDR= 0.095, MIR4269), 女児の群: cg06048605 (FDR= 0.053, ABCA2) の部位が臍帯血 45 万か所の CpG から抽出された。PCB では cg16848072 (FDR= 0.018, ANAPC13), PCB を児の性別で層別化した場合は, 男児の群: cg05392644 (FDR= 0.0003, IDH3A), cg08181060 (FDR= 0.0024, ADAT2), 女児の群: cg12468238 (FDR= 0.080, IRX1), cg00418150 (FDR= 0.080, ALX4), cg14178895 (FDR= 0.080, C6orf105), cg01115668 (FDR= 0.080, BUD31), cg23614229 (FDR= 0.080, CACNA1G), cg11697588 (FDR= 0.099, CALCA) の部位が臍帯血 45 万か所の CpG から抽出された。

5. 次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析と ADHD の関連

妊娠後期血漿中コチニンで 3 群に分類したうち, 非受動喫煙群をリファレンスとした能動喫煙群の 6 歳 ADHD 傾向のオッズは有意に増加した (OR=1.79, 95%CI=1.09-2.95)。さらに児の性別で層別化した場合, 男児のみの群で 6 歳 ADHD 傾向のオッズは有意に増加し (OR=2.17, 95%CI=1.11-4.24), 非受動喫煙群, 受動

喫煙群, 能動喫煙群のトレンド p 値は 0.025 と有意であった。

現在 妊娠後期コチニン 3 群と 6 歳 ADHD 傾向の有意な関連が認められた 1263 名において, 去年からサンプルサイズを拡大し, 次世代シーケンサーの解析を進めている。メチル化解析のターゲットは別集団の約 45 万 CpGs の臍帯血 DNA メチル化データ 450K (イルミナ社) から喫煙と関連した CpG を抽出し (Scientific Reports 2018), さらに去年実施した 562 名の ADHD ケース・サブコホート解析で, 胎児期の喫煙曝露と有意に関連した DNA メチル化変化した 4 つの CpGs (AHRR (cg05575921), MYO1G (12803068), GF11 (cg12876356, cg18146737), ESR1 (cg15626350)) および, ADHD 傾向とサブコホート (コントロール) の群間で有意な差がみられた CYP1A1 の 1CpG を選択した。次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス解析は ThermoFisher 社の IonPGM システムを用いる。

D. 考察

1. 異性体を含めたヒト生体試料中 Diisononyl phthalate (DiNP) 代謝物の定性・定量

Frederiksen らの報告において, 血清中 cx-MiNP 濃度 (平均) と検出率はそれぞれ 0.67 ng/mL と 43.3% であり, 本研究結果と比較すると両者とも高い値を示している。また, 尿中 MiNP, OH-MiNP および cx-MiNP 濃度はそれぞれ 1.01 ng/mL, 6.31 ng/mL, 8.85 ng/mL と本研究よりも 2 ~ 5 倍高い。一方で尿中検出率はそれぞれ 35%, 95%, 92% と同様の結果であった。

また, total 体の定性については Q1/Q2_{sample} が Q1/Q2_{RM} より求めた基準範囲 (上限: Q1/Q2_{RM} × 1.3, 下限: Q1/Q2_{RM}

×0.7)内であるかどうかを確認した(表2および図3~6)。ここでは、MDLまたはMQL以上の検体を対象とした。血清試料中 *total-cx-MiNP* では、基準範囲内であった検体数の割合が MDL 以上で 65%、MQL 以上で 89%であった。尿試料中 *total-MiNP*、*total-OH-MiNP* および *total-cx-MiNP* では、MDL 以上でそれぞれ 9.6%、51%、76%、MQL 以上で 50%、51%、78%であった。両媒体の *total-cx-MiNP* については MQL 以上の検体であれば、およそ定性確認の基準範囲内であると考えられた。

一方で、尿試料中 *total-MiNP*、*total-OH-MiNP* では基準範囲内の検体数が MQL 以上でも約 50%と低かった。特に *total-OH-MiNP* では、約 170 検体がクロマトグラムベースラインやピーク形状不良によって正確な定性が困難であった。尿試料中 *total-MiNP*、*total-OH-MiNP* については、試料前処理におけるクリーンアップ方法の改善、測定における夾雑ピークとの分離改善など選択性の向上が今後の課題と考えられる。

2. 胎児期 DEHP 曝露の臍帯血 DNA エピゲノム網羅的メチル化解析

本エピゲノム網羅的解析から、一般環境レベルの DEHP 曝露でさえも、児の DNA メチル化に影響を与えることが明らかになった。特に高メチル化への変化が顕著であり、それらは代謝に関わる遺伝子に多く見られた。高メチル化は遺伝子発現の低下を誘導すると考えられ、胎児の発育・発達に影響を及ぼす可能性がある。実際、胎児期曝露による出生児のボンデラル指数低下への影響にメチル化変化が関与している可能性が示唆された。

また、代謝系に加え、シグナル伝達、内分泌系などに関連する遺伝子のメチル

化が影響を受けていることから、今後、DEHP 曝露による性ホルモンや成長に対する影響とメチル化変化の関連を明らかにする必要がある。

3. 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

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)濃度を測定している。本分担研究と福岡県調査の結果比較では、ともに初産及び出産 2 回目の妊産婦に該当する測定値のみを抽出して行った。本調査研究では出産歴不明の 1 名を除く 84 例、福岡県調査では 29 例中 26 例のデータを用いた。両集団の平均年齢はともに 32 歳で同等であった。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)を比較した結果、本分担研究で平均 5.3 pg/g lipid (範囲 2.8~27 pg/g lipid)、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、両集団間で顕著な差は認められなかった。

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 85 例の Total PCB 濃度は過去の分析事例と比較して低い傾向を示した。

4. PCB/dioxin と網羅的メチル化解析

ダイオキシン類で FDR(False Discovery Rate) 0.05 未満の有意水準であったのは、児の性別で層別化した男児の群のみであった。全体および女児の群では FDR

の有意水準に達した CpG サイトはなかった。男児の群で 2 カ所の CpG が FDR の有意水準を満たした (cg01228410 (FDR=0.010, SLC9A3), cg18267081 (FDR=0.010, TSSC1))。SLC9A3 は先天異常および糖やナトリウム代謝に関与する遺伝子である。TSSC1 は腫瘍抑制遺伝子の領域に含まれることが示唆されている。

PCB で FDR が 0.05 未満の有意水準であったのでは、全体と、児の性別で層別化した男児の群であった。女児の群では FDR の有意水準に達した CpG サイトはなかった。全体では 1 カ所の CpG, 男児の群で 2 カ所の CpG が FDR の有意水準を満たした (全体:cg16848072 (FDR=0.018, ANAPC13), 男児:cg05392644 (FDR=0.0003, IDH3A), cg08181060 (FDR=0.0024, ADAT2))。ANAPC13 は細胞分裂とその周期を調整する遺伝子である。ADAT2 は tRNA プロセッシングに関与する示唆されている。IDH3A に含まれる CpG がダイオキシン類では cg05392644 (FDR=0.069), PCB では男児で cg05392644 (FDR=0.0003) で抽出されており、この遺伝子が関与する経路が、PCB/dioxin の児の健康影響に関与する可能性が示唆された。ダイオキシン類や PCB 類の胎児期曝露による出生体重や生後の免疫への影響には性差が報告されており (EHP. 2006, Environ. Res.2009, Environ. Res.2011), エピゲノム変化も性差がある可能性が示唆された。

5 次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析と ADHD の関連

平成 30 年度までの報告で、次世代シーケンサーを実施した ADHD ケース・サブコホート 562 名について、喫煙と ADHD のオッズ比が有意ではなく、サンプルサイズの不足が示唆された。令和元年は 1263 名に解析対象を拡大した結果、妊娠後期

コチニン濃度で分類した 3 群のうち、非受動喫煙群と比較し能動喫煙群で 6 歳 ADHD 傾向の有意な増加が認められた。この関連は男児でさらに顕著となった。妊娠中の母の喫煙と生後の児の ADHD リスクについて報告があるが (Psychiatry Research 2017), この作用機序にエピゲノムが関与するかどうか、交絡となる可能性がある共変量で調整して多変量解析で検討した報告はいまだない。本研究では、領域の解析が可能である次世代シーケンサーを用いて、別集団の札幌のコホートの網羅解析 (450k) および大規模コホート 562 名で、妊娠中の喫煙と有意に関与する CpG を既に抽出しており ADHD リスク増加にエピゲノム変化が介在するか、妥当性のある結果を得ることができると考えている。年度末までに 1263 名全体の NGS 解析を完了し、妊娠中の喫煙が児の ADHD リスクに、エピゲノムが関与するか明らかにする。

E . 結論

本研究では、DiNP 代謝物の再定量の必要性について検討し、ヒト血清 1,786 検体および尿 232 検体を対象に、異性体を含む cx-MiNP (血清および尿), MiNP (尿), OH-MiNP (尿) について定量した。再定量後、全ての代謝物について検出率および中央値濃度が増加し、健康影響との関連について統計解析に用いることが可能となった。一般環境レベルの DEHP 曝露でも、出生児のボンデラル指数低下への影響にメチル化変化が関与している可能性が示唆された。今後、DEHP 曝露による性ホルモンや生後の健康影響とメチル化変化の関連を明らかにする必要がある。85 名の妊産婦から採取された臍帯血試料は、本研究の主たる目的である一般的なヒトの集団におけるダイオキシン類・PCBs の次

世代影響評価に適切な試料であると考えられた。ダイオキシン類や PCB の胎児期曝露によるエピゲノム変化は性差がある可能性が示唆された。

サンプルサイズを拡大することで妊娠中の喫煙による児の ADHD リスクの増加を明らかにした。次世代シーケンサーを用いた特異的遺伝子領域の DNA メチル化解析により、妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。将来的に、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) Araki A., Ait Bamai Y., Bastiaansen M., Vanden Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Miyashita C., Itoh S., Goudarzi H., Konno S., Covaci A., Kishi R.; Combined exposure to phthalate esters and phosphate flame retardants and plasticizers and their associations with wheeze and allergy symptoms among school children. *Environmental Research*. 183, 109212, 2020
- 2) Kashino I., Sasaki S., Okada E., Matsuura H., Goudarzi H., Miyashita C., Okada E., Ito Y. M., Araki A., Kishi R.; Prenatal exposure to 11 perfluoroalkyl substances and fetal growth: A large-scale, prospective birth cohort study. *Environment International*. 136, 105355, 2020
- 3) Miura R., Araki A., Minatoya M., Miyake K., Chen M.-L., Kobayashi S., Miyashita C., Yamamoto J., Matsumura T., Ishizuka M., Kubota T., Kishi R.; An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylation reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A. *Scientific Report*. 2019.
- 4) Itoh S., Araki A., Miyashita C., Yamazaki K., Goudarzi H., Minatoya M., Ait Bamai Y., Kobayashi S., Okada E., Kashino I., Yuasa M., Baba T., Kishi R.; Association between perfluoroalkyl substance exposure and thyroid hormone/thyroid antibody levels in maternal and cord blood: The Hokkaido Study. *Environment International*. 133, Part A, 2019.
- 5) Minatoya M., Araki A., Itoh S., Yamazaki K., Kobayashi S., Miyashita C., Sasaki S., Kishi R.; Prenatal tobacco exposure and ADHD symptoms at pre-school age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 24, Article number 74, 2019.
- 6) Ait Bamai Y., Bastiaansen M., Araki A., Goudarzi H., Konno S., Ito S., Miyashita C., Yao Y., Covaci A., Kishi R.; Multiple exposures to organophosphate flame retardants alter urinary oxidative stress biomarkers among children: The Hokkaido Study.

- Environmental International. 131, 105003, 2019.
- 7) Saijo Y., Ito Y., Yoshioka E., Minatoya M., Araki A., Miyashita C., Kishi R.; Identifying a risk score for childhood obesity based on predictors identified in pregnant women and 1-year-old infants: an analysis of the data of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Clin Pediatr Endocrinol. 28 (3):81-89, 2019.
- 8) Bastiaansen M., Ait Bamai Y., Araki A., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Kishi R., covaci A.; Biomonitoring of organophosphate flame retardants and plasticizers in children: associations with house dust and housing characteristics in Japan. Environ Res. 172 543-551, 2019.
- 9) Mitsui T., Araki A., Miyashita C., Ito S., Ikeno T., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.; Effects of prenatal sex hormones on behavioral sexual dimorphism. Pediatrics International. 61 140-146, 2019.
- 10) 小林澄貴, 佐田文宏, 花岡知之, チチローラ・プライモー, 伊藤久美子, 田村菜穂美, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 宮下ちひろ, 岸玲子; 胎児期の受動喫煙曝露が正期産の Small-for-gestational-age(SGA)に及ぼす影響: 前向き出生コホート研究(北海道スタディ), 北海道公衆衛生学雑誌. 33(2), 10-1, 2020.
- 11) 岸玲子; 日本で初めての本格的な出生コホート研究(環境と子どもの健康に関する北海道スタディ)17年の成果と環境省エコチル研究について. 日本小児呼吸器学会雑誌. 30 (1), 63-66, 2019.
- 12) 荒木敦子, 伊藤佐智子, 宮下ちひろ, 湊屋街子, 岸玲子; 環境化学物質による次世代の性ホルモンへの影響. 衛生学雑誌. 73 313-321, 2018.
- ## 2. 学会発表(国際)
- 1) Minatoya M., Miyashita C., Araki A., Kishi R.; Tobacco smoke exposure during pregnancy and early childhood and child anthropometric outcomes at school age: the Hokkaido Study. DOHaD 2019. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia. (2019.10.20-23)
- 2) Minatoya M., Araki A., Kishi R.; Environmental Chemical Exposures and Health Studies for Sustainable Development Goals. ISEE-ISES AC 2019. Hotel Inter-Burgo Daegu, Daegu, Korea. (2019.10.17-19)
- 3) Minatoya M., Miyashita C., Ait Bamai Y., Araki A., Kishi R.; Prenatal exposure to phthalates and childhood anthropometric and metabolic related outcomes: the Hokkaido Study. ISEE-ISES AC 2019. Hotel Inter-Burgo Daegu, Daegu, Korea. (2019.10.17-19)
- 4) Araki A., Miyashita C., Itoh S., Mitsui T., Goudarzi H., Cho K., Moriya K., Nakajima T., Iwasaki Y., Hori T., Kajiwara J., Shinohara N., Kishi R.; Mixture Chemical

- Exposure in Utero and Boys Reproductive Hormone Levels at Birth; the Hokkaido Study. ISESISEE-AC 2019. Daegu, Korea. (2019.10.16-19)
- 5) Araki A., Miyashita C., Minatoya M., Kishi R.; The Hokkaido Study on Environment and Children's Health: Overview of the study and collaboration with cohort in Asia. ISESISEE-AC 2019. Daegu, Korea. (2019.10.16-19)
- 6) Gys C., Ait Bamai Y., Araki A., Noelia C. C., Kishi R., Covaci A.; Monitoring exposure levels to bisphenols in Japanese schoolchildren 11th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health Park Inn Hotel, Leuven, Belgium. (2019.8.28-30)
- 7) Miyashita C., Kishi R.; Effect on prenatal exposure to persistent organic pollutants on children's health in the Hokkaido study on environment and children's health. DIOXIN2019 39th international symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. Kyoto International Conference Center. (2019.8.25-30)
- 8) Ait Bamai Y., Goudarzi H., Okada E., Araki A., Miyashita C., Matsuura H., Kishi R.; Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances (PFAS) on Childhood Allergies and Infectious Diseases - Hokkaido Study -. DIOXIN2019 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. (2019.8.25-30)
- 9) Araki A., Aitbamai Y., Kishi R.; Exposure to organophosphate esters in Japan: associations among their concentrations in house dust, urinary metabolite levels, and allergies. ISESISIAQ2019 Joint meeting of the International Society of Exposure Science and the International Society of Indoor Air Quality and Climate—The built, natural, and social environments: impacts on exposures, health and well-being. Žalgirio Arena, Kaunas, Lithuania. (2019.8.18-22)
- 10) Gys C., Ait Bamai Y., Araki A., Noelia C. C., Covaci A.; Monitoring exposure levels to alternative bisphenols for Japanese schoolchildren. ISESISIAQ2019. Kaunas, Lithuania. (2019.8.18-22)
- 11) Ketema Rahel Mesfin, Ait Bamai Yu, Araki Atsuko, Saito Takeshi, Kishi Reiko; Urinary phthalate metabolites And oxidative stress biomarkers in 7 years old children from Hokkaido. The 4th FHS International Conference. Graduate School of Health Sciences, Hokkido University, Sapporo. (2019.7.5)
3. 学会発表(国内)
- 1) 小林澄貴, 佐田文宏, ホウマヌ・グ

- ウダルジ, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 佐々木成子, 岡田恵美子, 岩崎雄介, 那須民江, 岸玲子; 胎児期有機フッ素化合物曝露と脂肪酸濃度: 遺伝子との相互作用の影響 - 北海道スタディ, 第 90 回日本衛生学会学術総会. 盛岡市. (2020.3.26-28) 誌上開催
- 2) 西條泰明, 佐藤遊洋, 吉岡英治, 小林澄貴, 宮下ちひろ, 湊屋街子, 荒木敦子, 岸玲子; 環境と子どもの健康に関する北海道研究(北海道スタディ)からの小児気管支喘息リスクスコア作成 第 90 回日本衛生学会学術総会 盛岡市. (2020.3.26-28) 誌上開催
- 3) 湊屋街子, 胎児期の環境要因ばく露による出生体重, 体格への影響とそのメカニズム. 第 90 回日本衛生学会学術総会 盛岡市. (2020.3.26-28) 誌上開催
- 4) 小林澄貴, 佐田文宏, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, グウダルジ, ホウマヌ, 岩崎雄介, 三井貴彦, 守屋仁彦, 篠原信雄, 長和俊, 岸玲子; 妊娠中有機フッ素化合物曝露と臍帯血中の性ホルモン濃度との関連: 遺伝子環境相互作用の影響 - 北海道スタディ 第 30 回日本疫学会学術総会. 京都大学, 京都市. (2020.2.20-22)
- 5) 岸玲子; 有機フッ素化合物(PFASs)の胎児期曝露が児の健康へ及ぼす多様な影響 第 22 回環境ホルモン学会研究発表会. 東京大学弥生講堂(東京都文京区本郷) (2019.12.12-14)
- 6) 湊屋街子, 宮下ちひろ, 三浦りゅう, 荒木敦子, 岸玲子; 学童期の肥満に関連する要因の検討: 北海道スタディ. 第 71 回北海道公衆衛生学会. 札幌保健医療大学, 札幌. (2019.11.30)
- 7) 湊屋街子, 須山聡, 岸玲子; アトピー性皮膚炎と子どもの行動発達の関連の検討: 北海道スタディ 第 78 回日本公衆衛生学会総会. 高知市文化プラザかるぽーと, 高知市, 高知県. (2019.10.23-25)
- 8) 小林澄貴, 佐田文宏, 西條泰明, 湊屋街子, 岸玲子; わが国の妊婦のカフェイン摂取量と児の出生時体格との量依存的な関連: エコチル調査. 第 78 回日本公衆衛生学会総会. 高知市文化プラザかるぽーと, ホテル日航高知旭ロイヤル, 高知会館, 高知新聞放送会館, 高知市, 高知県. (2019.10.23-25)
- 9) 岸玲子; アジアにおける出生コホート連携 特に Birth Cohort Consortium of Asia (BiCCA) これまでの歴史と活動について. 第 8 回日本 DOHaD 研究会学術集会 東京日本橋コングレスクエア (2019.8.8-9)
- 10) 荒木敦子, 伊藤佐智子, アイツバマイゆふ, 宮下ちひろ, 木村孔一, 今野哲, 岸玲子; Contrasting associations of maternal smoking and pre-pregnancy BMI with wheeze and eczema in children. 第 1 回日本アレルギー学会北海道支部地方会. 札幌市教育文化会館, 札幌市. (2019.6.23)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし