

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。

2017 年度は DNA メチル化変化と環境化学物質曝露との関連を調べるため、研究仮説に基づいて選択した胎児発育に重要な遺伝子 IGF2/H19 , および、遺伝子全体のメチル化指標となる LINE1 遺伝子にターゲットを絞り、パイロシーケンスにより臍帯血 DNA のメチル化率を測定した。 PCB およびダイオキシン類への胎児期曝露との関連を検討した

ところ、PCB 異性体の DecaCB 濃度と H19 の DNA メチル化率、および HeptaCB 異性体と LINE-1 メチル化率との正の関連が認められた。その傾向は女児で顕著だった。この結果から、胎児期の PCB 類曝露によって、児の DNA メチル化が影響を受ける可能性が考えられた (Toxicology 2017)。しかし、強い負の健康影響を示すダイオキシン類では関連が見られず、DNA メチル化変化を介さない健康影響への生物学的機序、あるいは IGF2/H19、LINE1 以外の遺伝子の DNA メチル化変化の関与が示唆された。またわれわれは、胎児期の有機フッ素化合物 (PFAS) の 1 つである PFOA 曝露が IGF2 の低メチル化を介して胎児の成長に影響を及ぼす可能性を示した (J Expo Sci Environ Epidemiol 2017)。PFAS 曝露により影響を受ける他の遺伝子のメチル化変化を仮説なしに明らかにするため、エピゲノム網羅的解析を行った。解析した 45 万 CpG 部位全体のメチル化変化としては、PFOS 曝露では高メチル化、PFOA 曝露では低メチル化が見られた。また、同定した DNA メチル化変化領域を有する遺伝子については、成長後の喘息と関連する SMAD3 や肥満と関連する GFPT2、PFAS 曝露によりその機能が影響を受ける CYP2E1 等が含まれていた。さらに、胎児期の喫煙曝露により変化する DNA メチル化領域を同定し、次世代シーケンサーにより定量的なメチル化検証を行った。喫煙経験のない非喫煙群 (n = 124)、妊娠前から妊娠中まで喫煙を継続した喫煙群 (n = 46)、妊娠がわかって喫煙を止めた喫煙中止群 (n = 77) の 3 群を対象とし解析を行ったところ、喫煙を中止することにより DNA メチル化状態が非喫煙者と同等レベルになる 9CpGs、喫煙を中止しても変化しない 1CpG を見出すことができた。また、次世代シーケンサーによる再現性検証を行なった結果、8CpGs のうち 7CpGs で網羅的解析結果と同様のメチル化変化が確認できた。このことから、次世代シーケンサーを用いた多サンプルの定量的メチル化解析が可能であると考えられた。

2018 年度は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), MY01G (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、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、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。

2019年度は、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 cg0122841Q (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、GFI1 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 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 . 胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 *IGF2*・*H19*・*LINE1* メチル化との関連

札幌市内 1 産科病院外来を受診し同意を得た妊娠後期の 169 名の妊婦を対象に、出生前向きコホート研究を実施した。妊娠後期に母体血を採取し、高分解能ガススペクトロメトリー・高分解能マスペクトロメーター (GS-MS) を使って PCB 類を分析した。出生時に臍帯血を採取し、DNA を抽出した。バイサルファイト処理した上で、*IGF2* DMR0 (chr11p15.5, site 1: 2109519; site 2: 2109516), *H19* DMR (chr11p15.5, site 1: 1964257; site 2: 1964259; site 3: 1964257; site 4: 1964254), *LINE1* の 3 領域を Pyromark Q24

system (Qiagen)を使って、DNA メチル化率を定量した。母体血中 PCB 類濃度(Log_{10} 変換値)と *IGF2*, *H19*, および *LINE1* メチル化率 (Log_{10} 変換値)との関連は交絡因子で調整した重回帰分析で検討した。交絡因子は、母の年齢、母の身長、妊娠前体重、妊娠後期喫煙状況、出産歴、教育歴、世帯収入、妊娠中近海魚摂取、妊娠中遠洋魚摂取、妊娠中アルコール摂取、DNA メチル化率分析のバッチ差、過去の流産歴(*IGF2* メチル化率がアウトカムの時のみ)、妊娠中の練り物摂取(*H19* メチル化率がアウトカムの時のみ)、*IGF2* メチル化率(*H19* および *LINE1* メチル化率がアウトカムの時のみ)とした。

2. 胎児期有機フッ素化合物 (PFASs) 曝露の臍帯血 DNA 網羅的エピゲノム解析

初期調査票・出産時カルテ情報・出産前母体血中 PFASs (PFOS および PFOA) 濃度・臍帯血がそろった北海道スタディ札幌コホートの 190 母児ペア (discovery cohort), および、Taiwan Maternal and Infant Cohort Study (TMICS) の 37 母児ペア (replication cohort) を対象とした。PFAS 濃度は LC-MS/MS で測定した。臍帯血 DNA を抽出後、Infinium HumanMethylation450 BeadChip (イルミナ社)により 45 万 CpG 部位のメチル化を解析した。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。臍帯血中細胞組成をメチル化値から推定した (Bakulski et al. 2016)。メチル化値と \log_{10} 変換した PFAS 濃度との関連を robust linear regression (Fox and Weisberg 2011), 経験ベイズ法 (Smyth 2004) を用いて解析し、メチル化変化部位 (differentially methylated position; DMP) を同定した。Discovery cohort では、母の年齢、出産歴、出産前

BMI, 教育歴, 妊娠中喫煙, 採血時期, 児の性別, 在胎週数, および, 細胞組成値, replication cohort では, 母の年齢, 児の性別, および, 細胞組成値で調整した。また, robust linear regression と同じモデルを用いて, メチル化変化領域 (differentially methylated region; DMR) を bump hunter 法 (Jaffe et al, 2012) により同定した。

3. 胎児期の喫煙曝露により変化する DNA メチル化領域の同定, および次世代シーケンサーによる定量的なメチル化検証手法の確立

北海道スタディ札幌コホート参加者から 291 名を対象とし, 喫煙経験のない非喫煙群 ($n = 124$), 妊娠中も喫煙を継続した喫煙群 ($n = 46$), 妊娠がわかって喫煙を止めた喫煙中止群 ($n = 77$) の 3 群を解析対象とした。網羅的な DNA メチル化は Infinium HumanMethylation450 BeadChip (イルミナ社) により約 45 万 CpGs のデータを取得し, 先行文献を参考にデータの前処理 (標準化, バッチ効果補正など), 統計モデル (細胞組成, 母年齢, 児性別, 母教育歴で調整) を構築し, 喫煙曝露により変化するメチル化領域 (CpG) の同定を行った。同定された CpG 領域の再現性を検証するため, 同一のサンプルを Ion PGM 次世代シーケンサー (サーモフィッシャー社) を用いたバイサルファイトシーケンス法によりメチル化率を測定した。

4. 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イ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 1 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 2 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 1 と 2 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。

5. 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。

6 . 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解析

初期調査票・出産時カルテ情報・臍帯血 BPA 濃度がそろそろ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。

7 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

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 のそろそろ母児 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 46CpGs から 14CpGs (9 遺伝子) 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 システムを用いた。

8 . 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。

9. 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。

10. 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。

11. 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。

12. 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 として、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 . 胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 IGF2・H19・LINE1メチル化との関連

PCB 類と IGF2メチル化率との関連はなかった。DecaCB 異性体濃度が10倍増えると、H19メチル化率の Log₁₀ 変換値が全児で0.017増加(95% CI: 0.003, 0.031) , 女児で0.029増加した(95% CI: 0.010, 0.051)。HeptaCB 異性体濃度が10倍増えると、LINE1メチル化率の Log₁₀ 変換値が

全児で 0.005 増加 (95% CI: 0.000, 0.010), 女児で 0.008 増加した (95% CI: 0.002, 0.015)。LINE1 メチル化率との関連で, HeptaCB 異性体 10 種類のうち, 2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (#178), 2,2',3,4,4',5,6-HeptaCB (#182), 2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (#180), および 2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (#170) の 4 種類が女児において関連が認められた。

2. 胎児期有機フッ素化合物 (PFASs) 曝露の臍帯血 DNA 網羅的エピゲノム解析

解析した 45 万 CpG 部位全体のメチル化変化としては, PFOS 曝露との関連ではメチル化の増加 (高メチル化), PFOA 曝露ではメチル化の減少 (低メチル化) が認められた。

個々の CpG 部位におけるメチル化変化では, 多重比較補正後も統計学的に有意な DMP は, PFOS 曝露, PFOA 曝露それぞれ 2 つずつあった (false discovery rate < 0.05)。discovery cohort で最も有意な P 値を示した上位 20 の DMPs のうち, ZBTB7A (cg16242615), TCP11L2 (cg00173435), ZNF33BP1 (cg07661167), および NTN1 (cg18901140) に位置する 4 つの DMP が replication cohort でも同じメチル化変化の方向を示し, P 値が 0.05 以下であった。DMR に関しては, PFOA 曝露と関連する 21 個の CpG 部位を含む ZFP57 の領域が family-wise error rate < 0.1 を示した。PFOS および PFOA それぞれとの関連において discovery cohort で最も有意な P 値を示した上位 5 の DMRs のうち, ZFP57 に加え, CYP2E1, SLC17A9, SMAD3, DUSP22, TCERG1L, および GFPT2 に位置する 7 領域が replication cohort でも同じメチル化変化の方向を示した。

3. 胎児期の喫煙曝露により変化する DNA メチル化領域の同定, および次世代シーケンサーによる定量的なメチル化検証手法の確立

ゲノムワイド有意水準 (FDR < 0.05) かつメチル化変化の大きさ ($|$ 偏回帰係数 $|$ > 0.02) の条件で, 非喫煙群と喫煙群の比較で 46CpGs 領域 (27 遺伝子) が同定された。従来の報告と同様に AHRR, MYO1G などの遺伝子が含まれる一方で, シナプス関連分子である SHANK2 やタンパク質の分解に関連する TRIM36 など, これまで報告されてない領域を同定することができた。また同様の条件で非喫煙群と中止群の比較で 15CpGs 領域 (5 遺伝子), 中止群と喫煙群の比較で 64CpGs 領域 (38 遺伝子) をそれぞれ同定した。これらの 3 つの解析から共通する CpGs を抽出することにより, 喫煙を中止することにより DNA メチル化状態が非喫煙者と同等レベルになる 9CpGs, 喫煙を中止しても変化しない 1CpG を見出すことができた。さらに同一の DNA サンプルを用いて次世代シーケンサーによる再現性検証を行なった結果, 8CpGs のうち 7CpGs でマイクロアレイの結果と同様のメチル化変化が確認できた。

4. 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。

5. 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。

6. 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解析

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。

7. 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。

8 . 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。

9 . 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。

10 . 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。

11. 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。

12 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 . 胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 IGF2・H19・LINE1 メチル化との関連

胎児期 PCB 類濃度と H19 および LINE1 メチル化との関連が認められ, 男女別では女児で有意な違いがあった。女児では, DecaCB 異性体 (2,2',3,3', 4,4', 5,5',6,6' -DecaCB [#209]) が 10 倍増えると H19 メチル化率の Log₁₀ 変換値が 0.029 増加し (≈1.07% 増加に相当), HeptaCBs 異性体が 10 倍増えると LINE1 メチル化率の Log₁₀ 変換値が 0.008 増加した (≈1.02% 増加に相当)。先行研究では, PCB 類濃度と H19 遺伝子発現との関連 (Kappil et al. *Environ Epigenet.* 2016) および IGF2/H19 メチル化と胎児発育との

関連 (Koukoura et al. *Int J Mol Med*. 2011; Koukoura et al. *Mol Med Rep*. 2012) が報告されている。*H19* および *LINE1* メチル化率との関連で認められた PCB 異性体のうち、PCB#170 と PCB#180 の生体内における作用の一部は既に報告されているものの (Shin et al. *Mutagenesis*. 2010; Uslu et al. *Hum Exp Toxicol*. 2013; Wolff et al. *Environ Health Perspect*. 1997), PCB#178, PCB#182, および PCB#209 は疫学研究, 動物実験および細胞実験での報告がまだない。

LINE1 メチル化率が 7%-9% 増加するごとに在胎週数が 3.3 日短くなった報告 (Burris et al. *Epigenetics*. 2014), *H19* メチル化率が約 1.4 倍増えるごとに妊娠中期から出産までの胎児の体重増加が 0.51g 減少した報告 (Bouwland-Both et al. *PLoS One*. 2013), 臍帯血中 PCB#153 が 100pg/mL 増えるごとに出生体重が 118g 減少した報告が既にある (Verner et al. *Environ Health Perspect*. 2013)。これらの先行研究と本研究の結果から, 胎児期 PCB 類濃度によって, *H19* および *LINE1* メチル化が影響される可能性が考えられたものの, 胎児期 PCB 類濃度が *H19* および *LINE1* メチル化を介して, 出生体重の減少に及ぼす影響は比較的小さいと予想された。

一方, 強い健康影響を示すダイオキシン類では関連が認められなかった。メチル化変化を介さないアウトカムへの影響メカニズム, あるいは, *IGF2/H19*, *LINE1* 以外の遺伝子のメチル化変化の関与が示唆されるため, 今後, 網羅的メチル化解析により検討する。

2. 胎児期有機フッ素化合物 (PFASs) 曝露の臍帯血 DNA 網羅的エピゲノム解析

網羅的 DNA メチル化解析により, 胎児

期 PFAS 曝露で影響を受ける可能性のあるメチル化部位が示された。

メチル化変化全体としては, PFOS 曝露では高メチル化, PFOA 曝露では低メチル化が見られ, 曝露による global methylation が示唆された。我々は, 様々なアウトカムに対する PFOS と PFOA の影響の違いを示してきた。この作用の違いや, 曝露濃度, あるいは胎盤透過性の違いが, メチル化変化への影響の違いをもたらしている可能性が考えられる。

Replication cohort でも同様にメチル化変化が確認された 4 つの DMP が位置する遺伝子のうち, *ZBTB7A* は methyl-CpG-binding domain protein 3 と結合するガン原性転写因子をコードしている (Choi et al. 2013)。*TCP11L2* は精子受精能や先体反応で役割を果たす *TCP11* の類似タンパク質をコードしている。*ZNF33BP1* は lncRNAs に分類される。*NTN1* がコードする Netrin 1 は軸索ガイド分子として同定されたラミニン様タンパク質である。

また, 同定した 7 つの DMR の遺伝子のうち, *ZFP57* は imprinting control region でのエピゲノム修飾維持に必要なタンパク質をコードしている (Riso et al. 2016)。*SMAD3* の出生時メチル化変化は, 成長後の喘息と関連することが示唆されている (DeVries et al. 2016)。*GFPT2* の臍帯血 DNA メチル化変化は成長後の肥満との関連が示されている (Kresovich et al. 2017)。*CYP2E1*, *DUSP2*, および, *TCERG1L* のメチル化はリュウマチや大腸がんとの関連が示唆されている (Mok et al. 2017, (Bae et al. 2014))。また, 動物実験により PFAS 曝露は *CYP2E1* 活性に影響を及ぼすことが示されている (Narimatsu et al. 2011)。

今後, これらのメチル化変化がどのア

ウトカムに影響するか、介在の大きさを含めて明らかにする。

3 .胎児期の喫煙曝露により変化する DNA メチル化領域の同定、および次世代シーケンサーによる定量的なメチル化検証手法の確立

本研究結果から喫煙曝露により DNA メチル化が変化する遺伝子を新たにいくつか見いだすことが出来た。特に *SHANK2* 遺伝子は自閉症の原因とされる遺伝子の 1 つとして報告されていることから、喫煙曝露による神経発達障害発症メカニズムに関与しているかもしれない。大規模コホートにおける多サンプルの解析では網羅的メチル化解析はコスト面から現実的ではない。そこで特異的な領域に対して多サンプルの定量的解析が求められる。本研究において同一 DNA サンプルを用いて次世代シーケンサーによるメチル化解析を行いデータの再現性を検証した。その結果、8CpGs のうち 7CpGs で同様のメチル化変化が確認できたことから、結果の妥当性ならびに次世代シーケンサーによるメチル化解析法が確立できた。しかしながら 1CpG については網羅的解析の偽陽性である可能性と次世代シーケンサー解析の影響も考えられることから更なる検証を行う必要がある。今後、大規模コホートを用いて、化学物質の影響を受ける特定の DNA メチル化領域について様々な疾患との関与について解析していく予定である。

4 . 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。

5. 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 , MECPP : 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ですが、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。

6. 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解析

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す,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な影響とメ

チル化変化の関連を明らかにする必要がある。

7. 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性があると考えられる。

8. 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 $Q1/Q2_{\text{sample}}$ が $Q1/Q2_{\text{RM}}$ より求めた基準範囲 (上限: $Q1/Q2_{\text{RM}} \times 1.3$, 下限: $Q1/Q2_{\text{RM}} \times 0.7$) 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、おお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。

9. 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ポNDERAL 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。

10. 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。

11. 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ことが示唆されている。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。

12. 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

胎児期 PCB 類濃度と *H19* および *LINE1* メチル化に正の相関がみられ，その関係は女兒で顕著だった。有機フッ素化合物と関連が認められた DNA メチル化部位には imprinting control region でのエピゲノム修飾維持に必要である *ZFP57*，成長後の喘息と関連する *SMAD3*，肥満と関連する *GFPT2*，曝露によりその機能が影響を受ける *CYP2E1* 等が含まれていた。次世代シーケンサーによるメチル化解析により，エピゲノム網羅的解析結果の妥当性を示すことが出来た。このことにより，次世代シーケンサーによる多検体のメチル化定量が可能と考えられた。

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。

フタル酸エステル類の 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，出生児のポ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., Bastiaensen 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., Bastiaensen 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) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Itoh S., Baba T., Yuasa M., Miyashita C., Kobayashi S., Araki A., Sasaki S., Kajiwara J., Hori 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Miyashita C., Araki A., Mitsui T., Itoh S., Goudarzi H., Sasaki S., Kajiwara J., Hori 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Miura R, Araki A, Miyashita C, *et al*. 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.
- 29) Miyake K, Kawaguchi A, Miura R, *et al*. 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.
- 30) Kobayashi S., Sata F., Miyashita C., *et al*.; Gender-specific association of exposure to non-dioxin-like polychlorinated biphenyls during pregnancy with methylation levels of H19 and long interspersed nuclear element-1 in cord blood in the Hokkaido study. *Toxicology*. 390: 135-145, 2017.
- 31) Kishi R., Araki A., Minatoya M., *et al*.; The Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile - updated 2017. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 22: 46, 2017.

2. 論文発表 (和文・総説)

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 岸玲子, 湊屋街子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第24回 誰もが健康な人生のスタートを-世界で進むコホート研究, 公衆衛生, 81(2), 175-183, 2017.
- 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)

3. 学会発表(国際)

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総合研究報告書

- 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 Sciencs, Hokkido University, Sapporo. (2019.7.5)
- 12) Yamazaki K., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Ikeno T., Nakajima S., Kajiwara J., Hori 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).
- 13) Minatoya M., Araki A., Miyashita C., 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)
- 14) 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)
- #### 4. 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gres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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 小林澄貴，佐田文宏，宮下ちひろほか．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)
- 18) 三宅邦夫，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．妊娠中の喫煙曝露における臍帯血を用いた DNA メチル化変化領域の同定．第 46 回日本環境変異原学会．東京都千代田区。(2017.11.6.-7)

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし