

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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

平成30年度 総括・分担研究報告

研究代表者

北海道大学環境健康科学研究教育センター

岸 玲子

研究分担者

山梨大学大学院総合研究部医学域社会医学講座

三宅 邦夫

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教室

石塚真由美

中央大学保健センター

佐田 文宏

北海道大学環境健康科学研究教育センター

荒木 敦子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

宮下ちひろ

北海道大学環境健康科学研究教育センター

伊藤佐智子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

山崎 圭子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

三浦りゅう

福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課

堀 就英

いであ株式会社環境創造研究所

松村 徹

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

松浦 英幸

北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室

篠原 信雄

平成31(2019)年 3月

目 次

. はじめに	1
. 総合研究報告書	
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 岸 玲子ほか	2
. 分担研究報告書	
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 岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ, 堀 就英	16
2. 血液中フタル酸モノエステル類の分析 岸 玲子, 松村 徹, 荒木 敦子, 伊藤 佐智子	23
3. 胎児期ビスフェノール A 曝露の臍帯血 DNA 網羅的エピゲノム解析 岸 玲子, 三浦りゅう, 山崎 圭子, 松浦 英幸, 篠原 信雄	33
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 岸 玲子, 三宅 邦夫, 石塚 真由美, 佐田 文宏	53
. 研究成果の刊行に関する一覧表	61

はじめに

PCBs・ダイオキシン類や有機フッ素化合物などは、環境での蓄積性や残留性が強いことから、いわゆる POPs (Persistent Organic Pollutants) として、世界的に生産や使用が制限されていますが、半減期が長いため、私たちの体内から容易にはなくなりません。さらにプラスチック可塑剤として使われているフタル酸エステル類などは、半減期は短いのですが広範囲に使用されているため、多くの人々の血液から検出されます。このような化学物質は、大人よりも脆弱な胎児や小児に与える健康影響が大きいことが懸念されています。たとえば尿道下裂・停留精巣をはじめとする先天異常は、その原因が器官形成期のアンドロゲンの作用に依存しますので、いわゆる環境ホルモン作用を示すといわれる PCBs・ダイオキシン類などとの関係を調べる必要があります。しかし、世界的にも多様な環境化学物質による胎児期曝露が引き起こす、次世代影響の全体像および詳細について未だ明らかになっていません。また、次世代影響の環境リスクを評価することがなされていませんでした。

そこで、私たちは 2002 年から 2 つの前向き研究を立ち上げて研究を行っています。そのうち札幌市の 1 産院で説明し同意を得た妊婦様 514 人の母体血とお子様の臍帯血について、PCBs・ダイオキシン類、有機フッ素化合物 (PFOS・PFOA)、フタル酸エステル類などの測定を行い、種々のアウトカムとの関係を調べています。また、北海道全域の北海道(大規模)コホートでは、母子ペアで参加者が 20926 名になりました。妊娠初期に同意を得た妊婦について母体血の環境化学物質の測定を行い、成長・発達、甲状腺ホルモン、アレルギー・感染症、および性ホルモン・第二次性徴への影響を研究し、先天異常や疾病との関係について解析を進めています。

一方、最近のゲノム研究の進歩から、化学物質の影響の強さは、曝露された個体の異物(薬物)代謝酵素類の遺伝子多型や疾病感受性遺伝子等によっても修飾されることが考えられます。このような研究は、同じ曝露濃度でも遺伝的ハイリスク群である場合、より予防的な対応を進める必要があります。今後、行政が化学物質曝露による次世代影響を検討する上で、どのような動物実験や *in vitro* によるエピゲノム試験法や技術開発が重要か、それらをヒトでの解析データから示すことにもつながります。

本研究は臨床家と環境疫学、および、環境化学物質の測定専門家の協力で進めています。このような地域をベースに胎児期から立ち上げ、環境リスク評価を行っている研究は、最近増えてきていますが、本研究はその先駆け的な位置づけになります。今後、遺伝と環境の両面からのアプローチで予防医学的な数多くの成果が出ることが期待されますので、引き続き皆様のご協力をお願い申し上げます。

最後に多くの皆様のご尽力により研究を継続することができ、本年度報告書をこのようにまとめることができましたことに対して、衷心より御礼申し上げます。

平成 31 年 3 月

研究代表者 岸 玲子

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. 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) 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.,

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)

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・ハウマヌ, 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

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

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授
研究分担者 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
研究分担者 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
研究分担者 堀 就英 福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課 課長

研究要旨

北海道内の医療機関で 94 名の妊産婦から採取され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。臍帯血 94 例のうちダイオキシンは 92 例、PCBs は 94 例すべての定量結果が得られた。定量値を過去の報告事例と比較したところ同等かやや低い濃度となり、職業性の曝露等に由来する特異的な高濃度事例は認められなかった。結果として 94 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。

研究協力者

安武 大輔，平川 博仙，新谷 依子
（福岡県保健環境研究所）

A . 研究目的

ダイオキシン類及びその関連物質である PCBs は難分解性の有機塩素系化学物質であり、環境中で長期間にわたり安定かつ持続的に残留することが知られている。一般的にダイオキシン類・PCBs の摂取経路は食品であり、日常的に摂取された当該物質の殆どは体内に吸収・蓄積され、代謝排泄される量は極めて僅かである。これらの化学物質は妊娠期に胎盤を經由して母親から胎児へ、出産後は母乳を介して乳児に移行することが明らかにされている。近年、胎児の発育や発達、さらに小児期から青年期にかけての健康は胎児期における環境要因に影響を受けることが示唆されている。よって生体防御機構の未発達な胎児や乳児期におけるダイオキシン類・PCBs 曝露のリスク、影響等を解明する必要がある。そこで本研究では、ダイオキシン類・PCBs による次世代の健康影響評価に資するため、北海道内の医療機関で採取された臍帯血試料中のダイオキシン類・PCBs の異性体定量

分析を実施した。

B . 研究方法

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。臍帯血を採取した時点での妊産婦 94 名の年齢、出産歴は下記のとおりであった。

<u>年齢(歳)</u>	最低	18
	最高	39
	平均	30.7
	中央値	31
<u>出産歴(人)</u>	初回	54
	1回	30
	不明	10

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

分担研究報告書

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¹⁾。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/JEOLJMS-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 種化合物）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²⁾。

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。

（倫理面への配慮）

本研究は，北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定ならびに福岡県保健環境研究所疫学研究に関する倫理規定に従って実施した。インフォームド・コンセントは研究代表者が行い，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。臍帯血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個人情報と連結不可能な ID のみが記載されている。よって福岡県保健環境研究所で個人情報を取り扱うことはない。

C．結果及び考察

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³⁾⁴⁾。

表 1 にダイオキシン類（29 化合物）の

分担研究報告書

定量結果の概要を示す。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。

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⁵⁾。

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)³⁾。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。

PCBs(81 化合物)の定量結果の概要を表 2 に示した(脂肪重量あたり濃度のみ)。臍帯血 94 例中の Total PCBs 濃度は、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⁶⁾。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。図 1 に脂肪重量あたりの Total dioxin 濃度及び Total PCBs 濃度との相関を示した。両者に良好な正の相関($R^2 = 0.9049$)が得られた。

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

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。

D. 結論

94名の妊産婦から提供された臍帯血中のダイオキシン類及びPCBsの定量値を国内の分析事例と比較したところ、濃度は同等かやや低い結果となり、職業性の曝露等に由来する特異的な高濃度の事例は認められなかった。94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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

参考文献

1. Todaka T, Hirakawa H, et al. New protocol for dioxin analysis of human blood. *Fukuoka Acta Med.* 2007; 94: 148-157.
2. 新谷依子, 堀就英ほか. 血液中ダイオキシン類およびPCB濃度測定のカロスチェック. 福岡医誌 2017; 108: 83-93.
3. Nakamura T, Nakai K, et al.

Determination of dioxins and polychlorinated biphenyls in breast milk, maternal blood and cord blood from residents of Tohoku, Japan. *Sci. Total Environ.* 2008; 394: 39-51.

4. 環境省請負調査「平成 16 年度ヒト臍帯におけるダイオキシン類等化学物質の蓄積・曝露状況の継続的調査」報告書. 平成 17 年 3 月.
5. 環境省環境研究・技術開発推進費研究「妊婦におけるダイオキシン摂取が胎児健康に及ぼす影響のリスク評価に関する研究」成果報告書. 平成 21 ~ 23 年度.
6. 環境省「ヒト臍帯におけるダイオキシン類等化学物質の蓄積・曝露状況の継続的調査」平成 11 年度より平成 16 年度総括報告書. 平成 17 年 3 月.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 1 . 臍帯血（92 例）のダイオキシン類濃度測定結果

同族体名	脂肪重量あたり濃度 (pg/g lipid)				全血重量あたり濃度 (pg/g whole)			
	定量下限値	平均	最小	最大	定量下限値	平均	最小	最大
2,3,7,8-TCDD	1	0.66	ND	4.1	0.003	0.0019	ND	0.011
1,2,3,7,8-PeCDD	1	0.63	ND	3.6	0.003	0.0019	ND	0.010
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2	1.2	ND	5.0	0.006	0.0036	ND	0.018
1,2,3,6,7,8-HxCDD	2	2.8	ND	14	0.006	0.0090	ND	0.033
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2	1.1	ND	5.0	0.006	0.0033	ND	0.012
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	2	12	ND	56	0.006	0.037	ND	0.17
OCDD	4	88	22	310	0.01	0.27	0.094	0.96
2,3,7,8-TCDF	1	ND	—	—	0.003	ND	—	—
1,2,3,7,8-PeCDF	1	2.1	ND	8.3	0.003	0.0065	ND	0.018
2,3,4,7,8-PeCDF	1	2.0	ND	8.1	0.003	0.0063	ND	0.019
1,2,3,4,7,8-HxCDF	2	1.1	ND	4.4	0.005	0.0031	ND	0.010
1,2,3,6,7,8-HxCDF	2	1.1	ND	5.6	0.005	0.0030	ND	0.013
2,3,4,6,7,8-HxCDF	2	ND	—	—	0.005	ND	—	—
1,2,3,7,8,9-HxCDF	2	ND	—	—	0.005	ND	—	—
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2	1.4	ND	8.8	0.005	0.0039	ND	0.020
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	2	ND	—	—	0.005	ND	—	—
OCDF	4	ND	—	—	0.01	ND	—	—
3,4,4',5'-TCB (CB81)	10	ND	—	—	0.03	ND	—	—
3,3',4',4'-TCB (CB77)	10	13	ND	33	0.03	0.040	ND	0.095
3,3',4,4',5'-PenCB (CB126)	10	7.0	ND	28	0.03	0.021	ND	0.066
3,3',4,4',5,5'-HxCB (CB169)	10	5.2	ND	17	0.03	0.015	ND	0.039
2',3,4,4',5'-PeCB (CB123)	10	16	ND	150	0.03	0.048	ND	0.46
2,3',4,4',5'-PeCB (CB118)	10	1400	120	9500	0.03	4.3	0.62	22
2,3,4,4',5'-PeCB (CB114)	10	92	ND	700	0.03	0.27	ND	1.6
2,3,3',4,4'-PeCB (CB105)	10	290	ND	1800	0.03	0.88	ND	4.1
2,3',4,4',5,5'-HxCB (CB167)	10	130	ND	1300	0.03	0.38	ND	3.1
2,3,3',4,4',5-HxCB (CB156)	10	420	ND	2700	0.03	1.3	ND	6.2
2,3,3',4,4',5'-HxCB (CB157)	10	120	ND	700	0.03	0.35	ND	1.6
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (CB189)	10	30	ND	450	0.03	0.086	ND	1.4
Total PCDDs		110	27	380		0.33	0.12	1.2
Total PCDFs		13	10	37		0.037	0.025	0.087
Total PCDD/PCDFs		120	37	390		0.37	0.15	1.2
Total non-ortho PCBs		30	20	64		0.091	0.060	0.16
Total mono-ortho PCBs		2600	410	17000		7.6	1.2	40
Total dioxin-like PCBs		2600	430	17000		7.7	1.2	40
Total dioxins		2700	480	18000		8.1	1.4	41
Total PCDDs-TEQ		2.0	1.3	5.4		0.0059	0.0040	0.017
Total PCDFs-TEQ		1.2	0.64	3.9		0.0034	0.0017	0.0092
Total PCDDs/PCDFs-TEQ		3.1	2.0	7.4		0.0093	0.0057	0.022
Total non-ortho PCBs-TEQ		0.86	0.65	3.3		0.0025	0.0020	0.0078
Total mono-ortho PCBs-TEQ		0.076	0.0065	0.52		0.00023	0.000035	0.0012
Total dioxin-like PCBs-TEQ		0.94	0.66	3.9		0.0028	0.0020	0.0090
Total-TEQ		4.0	2.6	11		0.012	0.0077	0.026

(ND : 定量下限値未満)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

表 2 . 臍帯血（94 例）の PCBs 濃度測定結果（ND：定量下限値未満）

同族体名	脂肪重量あたり濃度 (pg/g lipid)				同族体名	脂肪重量あたり濃度 (pg/g lipid)			
	定量下限値	平均	最小	最大		定量下限値	平均	最小	最大
2,2',6-TCB(CB19)	10	150	ND	2400	2,2',3,4,5,5'-HxCB(CB141)	10	50	ND	280
2,2',5-TCB(CB18)	10	830	ND	2600	2,2',3,4,4',5-HxCB(CB137)	10	180	ND	1100
2,4,5-TrCB(CB29)	10	120	ND	950	2,2',3,3',4,5'-HxCB(CB130)	10	190	ND	1600
2,4,4'-TrCB(CB28)	10	1200	220	2900	2,3,3',4',5',6-HxCB(CB164)	10	1100	110	8800
2,3',4'-TrCB(CB33)	10	990	ND	2300	2,2',3,4,4',5'-HxCB(CB138)	10	2700	160	23000
2,3,4'-TrCB(CB22)	10	530	ND	1400	2,3,3',4,4',6-HxCB(CB158)	10	42	ND	400
3,4,4'-TrCB(CB37)	10	220	ND	1600	2,2',3,3',4,4'-HxCB(CB128)	10	61	ND	400
2,2',6,6'-TeCB(CB54)	10	8.2	ND	130	2,3',4,4',5,5'-HxCB(CB167)	10	130	ND	1300
2,2',5,5'-TeCB(CB52)	10	1600	580	4000	2,3,3',4,4',5-HxCB(CB156)	10	420	ND	2700
2,2',4,5'-TeCB(CB49)	10	470	120	1700	2,3,3',4,4',5'-HxCB(CB157)	10	110	ND	700
2,2',4,4'-TeCB(CB47)	10	380	ND	1500	2,2',3,4',5,6,6'-HpCB(CB188)	10	5.3	ND	32
2,2',3,5'-TeCB(CB44)	10	700	170	1600	2,2',3,3',5,6,6'-HpCB(CB179)	10	33	ND	280
2,3',4',6-TeCB(CB71)	10	340	95	1200	2,2',3,3',5,5',6-HpCB(CB178)	10	280	ND	2800
2,3,4',5-TeCB(CB63)	10	44	ND	230	2,2',3,4,4',5,6-HpCB(CB182)	10	1200	100	15000
2,4,4',5-TeCB(CB74)	10	1000	250	3000	2,2',3,4,4',5',6-HpCB(CB183)	10	300	ND	3200
2,3',4',5-TeCB(CB70)	10	530	85	1600	2,2',3,4,4',5,6-HpCB(CB181)	10	5.6	ND	66
2,3',4',5'-TeCB(CB76)	10	ND	—	—	2,2',3,3',4',5,6-HpCB(CB177)	10	270	ND	3400
2,3',4,4'-TeCB(CB66)	10	510	75	1600	2,2',3,3',4,4',6-HpCB(CB171)	10	100	ND	1000
2,3,3',4',-/2,3,4,4'-TeCBs(CB56/60)	10	310	49	1100	2,2',3,3',4,5,5'-HpCB(CB172)	10	170	ND	1800
2,2',4,6,6'-PeCB(CB104)	10	9.2	ND	170	2,2',3,4,4',5,5'-HpCB(CB180)	10	2200	140	21000
2,2',3,5',6-PeCB(CB95)	10	900	206	3400	2,3,3',4,4',5',6-HpCB(CB191)	10	16	ND	180
2,2',3,5,5'-PeCB(CB92)	10	190	5	500	2,2',3,3',4,4',5-HpCB(CB170)	10	790	ND	7700
2,2',4,5,5'-PeCB(CB101)	10	840	190	2000	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(CB189)	10	29	ND	450
2,2',4,4',5-PeCB(CB99)	10	970	120	5400	2,2',3,3',5,5',6,6'-OoCB(CB202)	10	100	ND	1100
2,3',4,4',6-PeCB(CB119)	10	21	ND	140	2,2',3,3',4,5',6,6'-OoCB(CB201)	10	12	ND	260
2,3,4',5,6-PeCB(CB117)	10	140	ND	620	2,2',3,3',4,4',5,5',6'-OoCB(CB200)	10	8.4	ND	140
2,2',3,4,5'-PeCB(CB87)	10	190	ND	620	2,2',3,3',4,5,5',6-/2,2',3,3',4,5',6,6'-OoCB(CB198/199)	10	310	ND	3500
2,2',3,4,4'-PeCB(CB85)	10	120	ND	320	2,2',3,4,4',5,5',6-OoCB(CB203)	10	150	ND	2300
2,3,3',4',6-PeCB(CB110)	10	200	ND	720	2,2',3,3',4,4',5,6-OoCB(CB195)	10	61	ND	550
2,3,3',4',5-PeCB(CB107)	10	100	ND	470	2,2',3,3',4,4',5,5'-OoCB(CB194)	10	400	ND	2500
2',3,4,4',5-PeCB(CB123)	10	16	ND	150	2,3,3',4,4',5,5',6-OoCB(CB205)	10	24	ND	390
2,3',4,4',5-PeCB(CB118)	10	1400	120	9500	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-NoCB(CB208)	10	24	ND	640
2,3,4,4',5-PeCB(CB114)	10	91	ND	700	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-NoCB(CB207)	10	10	ND	270
2,3,3',4,4'-PeCB(CB105)	10	290	ND	1800	2,2',3,3',4,4',5,5',6-NoCB(CB206)	10	280	ND	2000
2,2',3,5,5',6-HxCB(CB151)	10	10	ND	130	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DeCB(CB209)	10	69	ND	410
2,2',3,3',5,6'-HxCB(CB135)	10	76	ND	400	Total TrCBs		4000	730	9500
2,2',3,4',5,6-HxCB(CB147)	10	30	ND	340	Total TeCBs		5900	2200	16000
2,2',3,4,4',6-HxCB(CB139)	10	160	ND	720	Total PeCBs		5500	1100	23000
2,2',3,3',5,6-HxCB(CB134)	10	19	ND	200	Total HxCBs		10000	820	92000
2,3,3',5,5',6-HxCB(CB165)	10	ND	—	—	Total HpCBs		5400	430	57000
2,2',3,4',5,5'-HxCB(CB146)	10	800	60	8200	Total OoCBs		1100	40	10000
2,2',3,3',4,6'-HxCB(CB132)	10	8.4	ND	330	Total NoCBs		310	15	2300
2,2',4,4',5,5'-HxCB(CB153)	10	4400	320	43000	Total PCBs (ng/g)		33	6.6	200
2,3',4,4',5,5'-HxCB(CB168)	10	ND	—	—					

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

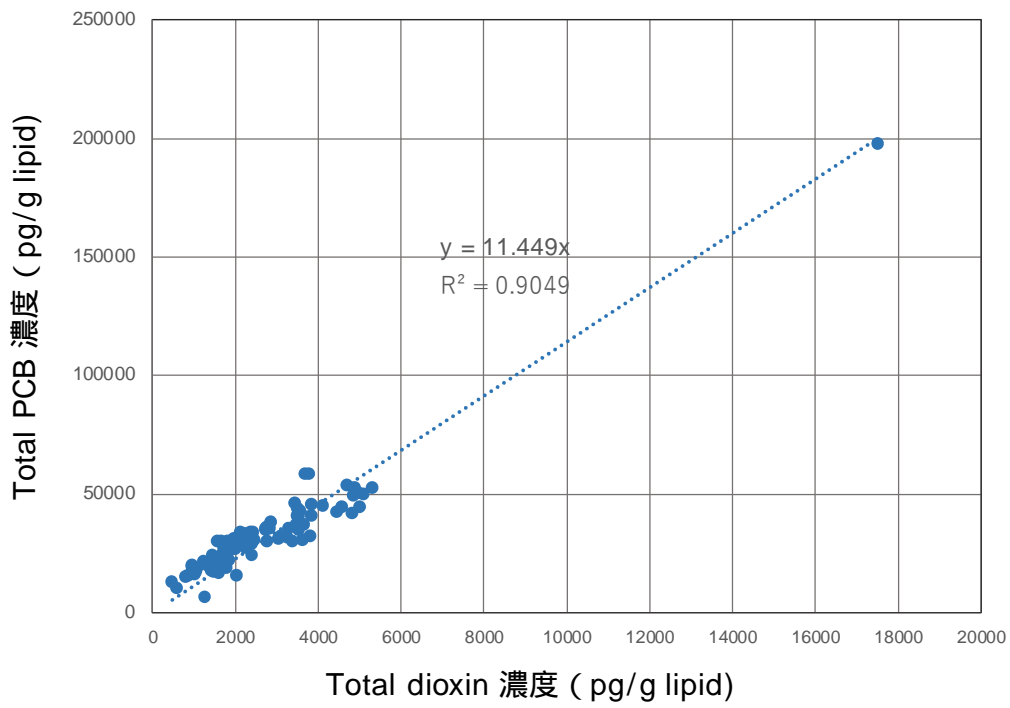


図 1 . 臍帯血中 Total dioxin 濃度と Total PCB 濃度の相関

分担研究報告書

血液中フタル酸モノエステル類の分析

研究代表者	岸 玲子	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特別招へい教授
研究分担者	松村 徹	いであ株式会社環境創造研究所	常務取締役
研究分担者	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
研究分担者	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

研究要旨

血液中のフタル酸モノエステル類 7 種 (Monobutyl phthalate (MnBP) Mono iso butyl phthalate (MiBP) Monobenzyl phthalate(MBzP)、Mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP) Mono (2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate (MECPP) Mono (4-methyl-7-carboxyheptyl) phthalate(cx-MiNP)) の分析法を確立し、試料 20 検体の分析を行った。

研究協力者

山本 潤
(いであ株式会社環境創造研究所)

A . 研究目的

フタル酸エステル類は、プラスチック可塑剤や医療材料、香料、化粧品原料をはじめとして、身近で多様な製品に使われている。これらは半減期が短いものの、小児、胎児期での影響が大きい事が懸念されている。

近年、喫煙、ヒ素や鉛などの重金属の胎児期暴露による児のメチル化への影響が報告されているが、その中でこれらフタル酸エステル類や、有機フッ素化合物、PCB 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、世界的にも報告事例が少なく、これらの研究を進めるに当たっては、生体試料中の微量化学物質の正確な濃度の把握が必要となる。

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。

B . 研究方法

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。

分析フローを図 1 に、LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示す。

C . 研究結果

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。

標準液の繰り返し測定の結果を表 2、繰り返し分析の結果を表 3 に示す。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

分担研究報告書

0.11ng/mL、cx-MiNP0.12ng/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（表 4 および表 5 参照）。

血液試料 20 検体の分析の結果を表 6 に示す。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。

F . 研究発表

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

該当なし

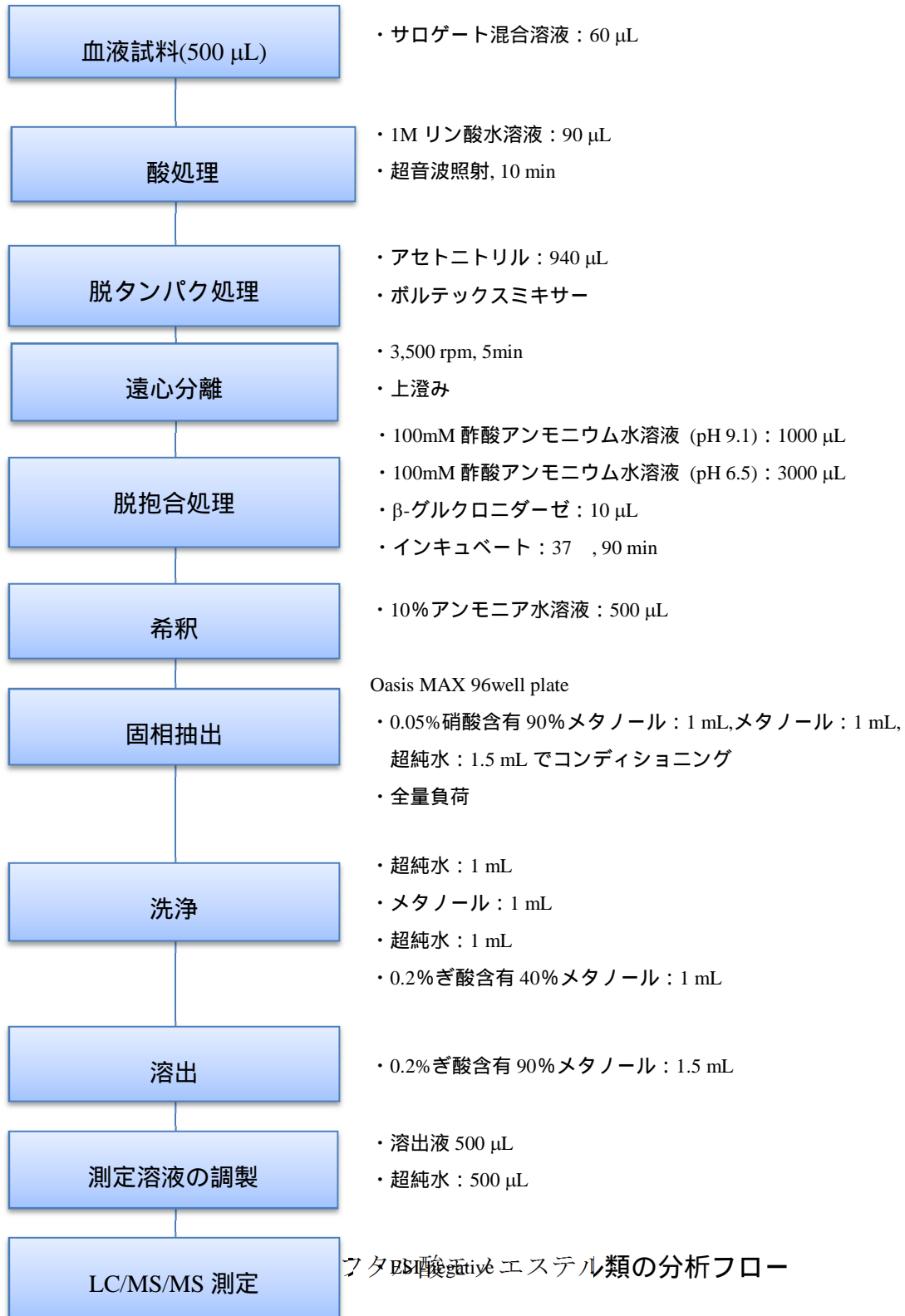
G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

参考文献

1. Hanne Frederiksen et al., Correlations Between Phthalate Metabolites in Urine, Serum, and Seminal Plasma from Young Danish Men Determined by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology 2010, Vol. 34, 400-410
2. Xiaofang Jia et.al., Prenatal maternal blood triglyceride and fatty acid levels in relation to exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: a cross-sectional study, Environmental Health and Preventive Medicine 2015, 20, 168-178.
3. Jee Yeon JEON et al., Determination of Phthalate Metabolites in Human Serum and Urine as Biomarkers for Phthalate Exposure Using Column-Switching LC-MS/MS, Safety and Health at Work 2011, 2, 57-64
4. Erin P. Hines et al., Concentrations of Phthalate Metabolites in Milk, Urine, Saliva, and Serum of Lactating North Carolina Women, Environmental Health Perspectives 2009, vol.117, 86-92
5. Kayoko Kato et al., Quantitative Detection of Nine Phthalate Metabolites in Human Serum Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization- Tandem Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology 2003, vol.27, 284-289
6. P Monica Lind et al., Serum concentrations of phthalate metabolites are related to abdominal fat distribution two years later in elderly women, Environmental Health 2012, 11:21
7. Manori J. Silva et al., Automated Solid-Phase Extraction and Quantitative Analysis of 14 Phthalate Metabolites in Human Serum using Isotope Dilution-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology 2005, vol.29, 819-824

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 1. フタル酸モノエステル類の分析における LC/MS/MS 測定条件

測定装置	LC : ACQUITY UPLC H-Class (Waters 社製) MS : QTRAP 6500 (AB SCIEX 社製)
分析カラム	BEH Phenyl (2.1×50 mm, 1.7 μm, Waters 社製)
リテンションギ ャップカラム	Atlantis T3 (2.1×50 mm, 3μm, Waters 社製)
溶離液	A : 0.02% アンモニア水含有 5mM 酢酸アンモニウム含有水溶液 B : アセトニトリル
グラジエント(B)	2%(0min-0.5min)→7.5%(2.0-5.0min)→15%(6.5min-11min)→40%(11.5min-15min) →80%(15.1min-18min) →2%(18.1min-24min)
注入量	60μL
カラム温度	40
モード	ESI-Negative
m/z	MnBP および MiBP : 220.98 > 76.89 (定量用), 220.98 > 177.02 (確認用) MBzP : 254.89 > 182.96 (定量用), 254.89 > 76.93 (確認用) MEHP : 276.99 > 133.91 (定量用), 276.99 > 126.96 (確認用) MEHHP : 292.95 > 145.08 (定量用), 292.95 > 120.95 (確認用) MECPP : 306.81 > 158.95 (定量用), 306.81 > 112.99 (確認用) cx-MiNP : 320.88 > 173.01 (定量用), 320.88 > 120.88 (確認用) MnBP- <i>d</i> ₄ : 224.98 > 80.95 MiBP- <i>d</i> ₄ : 224.98 > 80.95 MBzP- <i>d</i> ₄ : 258.96 > 187.01 MEHP- <i>d</i> ₄ : 280.99 > 138.03 MEHHP- ¹³ C ₄ : 296.97 > 144.97 MECPP- ¹³ C ₄ : 310.92 > 158.94 cx-MiNP- <i>d</i> ₄ : 324.73 > 173.02

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 2. フタル酸モノエステル類の IDL

物質名	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
試料量 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
希釈係数	3	3	3	3	3	3	3
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
注入濃度 (ng/mL)	0.5	0.2	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02
装置注入量 (μL)	60	60	60	60	60	60	60
結果 1 (ng/mL)	0.511	0.224	0.0483	0.0499	0.0214	0.0205	0.0189
結果 2 (ng/mL)	0.512	0.221	0.0488	0.0504	0.0244	0.0202	0.0194
結果 3 (ng/mL)	0.488	0.207	0.0484	0.0500	0.0216	0.0207	0.0202
結果 4 (ng/mL)	0.496	0.183	0.0498	0.0501	0.0224	0.0223	0.0192
結果 5 (ng/mL)	0.471	0.218	0.0506	0.0466	0.0234	0.0195	0.0192
結果 6 (ng/mL)	0.511	0.200	0.0453	0.0452	0.0212	0.0197	0.0180
結果 7 (ng/mL)	0.516	0.201	0.0500	0.0495	0.0226	0.0200	0.0186
平均値 (ng/mL)	0.501	0.208	0.049	0.049	0.022	0.020	0.019
標準偏差 (ng/mL)	0.0167	0.0146	0.0017	0.0021	0.0012	0.0009	0.0007
IDL (ng/mL)	0.065	0.057	0.0070	0.0090	0.0046	0.0036	0.0028
IDL 試料換算値 (ng/mL)	0.39	0.34	0.042	0.054	0.028	0.022	0.017
CV (%)	3.3	7.0	3.6	4.2	5.2	4.5	3.6

$$IDL = t_{(n-1,0.05)} \times s \times 2$$

s は低濃度標準溶液の繰り返し測定結果より得られた標準偏差、 $t_{(n-1,0.05)}$ は自由度 n-1 および有意水準 = 0.05 における t 値を示す。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 3. 血液試料中フタル酸モノエステル類の MDL および MQL

物質名	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
試料量 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
希釈係数	3	3	3	3	3	3	3
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
装置注入量 (μL)	60	60	60	60	60	60	60
結果 1 (ng/mL)	5.58	2.38	1.08	0.899	1.08	0.666	0.398
結果 2 (ng/mL)	5.91	2.37	1.08	0.836	1.10	0.645	0.443
結果 3 (ng/mL)	5.60	2.35	1.09	0.890	0.953	0.685	0.399
結果 4 (ng/mL)	5.97	2.06	0.953	0.709	1.07	0.663	0.420
結果 5 (ng/mL)	5.74	2.24	1.08	0.725	1.06	0.723	0.409
結果 6 (ng/mL)	5.70	2.26	1.04	0.830	1.11	0.688	0.406
結果 7 (ng/mL)	5.74	2.21	1.05	0.735	1.13	0.645	0.479
平均値 (ng/mL)	5.75	2.27	1.05	0.803	1.07	0.674	0.422
標準偏差 (ng/mL)	0.146	0.112	0.0479	0.0797	0.0568	0.0277	0.0294
MDL (ng/mL)	0.57	0.44	0.19	0.31	0.23	0.11	0.12
MQL (ng/mL)	1.5	1.2	0.50	0.80	0.57	0.28	0.30
CV (%)	2.5	5.0	4.6	9.9	5.3	4.1	7.0
サロゲート回収率 (%)	66	63	55	63	51	53	44

$$\text{MDL} = t_{(n-1,0.05)} \times s \times 2$$

$$\text{MQL} = s \times 10$$

s は低濃度添加試料の繰り返し測定結果より得られた標準偏差、 $t_{(n-1,0.05)}$ は自由度 n-1 および有意水準 = 0.05 における t 値を示す。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 4. 血液試料中フタル酸モノエステル類の BL 試験

物質名	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
試料量 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
希釈係数	3	3	3	3	3	3	3
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
装置注入量 (μL)	60	60	60	60	60	60	60
結果 1 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.11)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 2 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.21)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 3 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.16)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 4 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.17)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 5 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.17)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 6 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.15)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 7 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.18)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
平均値 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.17)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 5. 血液試料中フタル酸モノエステル類の添加回収試験

物質名	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
試料量 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
希釈係数	3	3	3	3	3	3	3
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
添加量 (ng)	6	6	6	6	6	6	6
調製試料濃度 (ng/mL)	12	12	12	12	12	12	12
装置注入量 (μL)	60	60	60	60	60	60	60
無添加試料 (ng/mL)	0.72	0.00	0.00	0.80	0.31	0.67	0.09
結果 1 (ng/mL)	11.5	13.7	13.1	12.5	11.7	12.0	11.1
結果 2 (ng/mL)	12.4	13.2	12.4	11.3	11.3	13.1	12.1
結果 3 (ng/mL)	13.0	12.9	13.2	12.7	11.4	12.2	11.9
結果 4 (ng/mL)	12.9	13.0	12.8	12.3	12.5	11.3	12.14
結果 5 (ng/mL)	12.4	13.6	13.6	11.7	11.9	12.2	13.23
結果 6 (ng/mL)	12.3	13.0	12.7	12.0	10.3	12.9	13.2
結果 7 (ng/mL)	12.4	13.2	12.8	12.0	11.4	13.3	14.5
平均値 (ng/mL)	12.4	13.2	12.9	12.1	11.5	12.4	12.6
標準偏差 (ng/mL)	0.490	0.308	0.384	0.483	0.656	0.741	1.143
CV (%)	4.0	2.3	3.0	4.0	5.7	6.0	9.1
回収率 (%)	97	110	108	94	93	98	104
サロゲート回収率 (%)	71	72	63	66	68	55	60

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 6. 血液中のフタル酸モノエステル類の分析結果

No.	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
001	37	6.4	<0.19	8.0	<0.23	0.38	<0.12
002	30	7.1	<0.19	7.8	<0.23	0.20	<0.12
003	18	3.9	<0.19	0.75	<0.23	0.18	<0.12
004	33	10	<0.19	8.6	<0.23	0.35	<0.12
005	12	5.2	<0.19	6.4	<0.23	0.21	<0.12
006	27	8.6	<0.19	<0.31	<0.23	0.28	<0.12
007	27	6.2	<0.19	0.32	<0.23	0.19	<0.12
008	25	8.5	0.74	1.8	0.54	3.1	<0.12
009	27	6.4	<0.19	<0.31	<0.23	<0.11	<0.12
010	38	11	<0.19	0.42	<0.23	0.28	<0.12
011	14	5.2	<0.19	<0.31	<0.23	0.12	<0.12
012	28	12	<0.19	0.58	<0.23	0.38	<0.12
013	18	7.2	<0.19	<0.31	<0.23	0.15	<0.12
014	4.8	1.7	<0.19	<0.31	<0.23	0.16	<0.12
015	6.7	3.3	<0.19	0.34	<0.23	0.46	<0.12
016	8.3	3.8	<0.19	<0.31	<0.23	0.15	<0.12
017	7.4	2.6	<0.19	<0.31	<0.23	0.27	<0.12
018	7.4	3.6	<0.19	0.52	<0.23	0.47	<0.12
019	11	4.6	<0.19	0.39	<0.23	0.35	<0.12
020	19	5.6	<0.19	18	<0.23	0.15	<0.12

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 7. 二重測定結果

項目	本測定 (ng/mL)	二重測定 (ng/mL)	測定値差 (%)
MnBP	30	31	3.3
MiBP	7.1	7.6	6.8
MBzP	<0.19	<0.19	-
MEHP	7.8	8.0	2.5
MEHHP	<0.23	<0.23	-
MECPP	0.20	0.19	5.1
cx-MiNP	<0.12	<0.12	-

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
**An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations
in relation to prenatal bisphenol A exposure**

研究代表者	岸 玲子	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特別招へい教授
研究分担者	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
研究分担者	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
研究分担者	松浦 英幸	北海道大学大学院・農学研究院	教授
研究分担者	篠原 信雄	北海道大学大学院・医学研究院	教授

研究要旨

Background: Exposure to bisphenol A (BPA) *in utero* is associated with adverse health outcome of the offspring. Differential DNA methylation at specific CpG sites may link BPA exposure to health impacts.

Objective: To investigate cord blood DNA methylation changes associated with prenatal exposure to BPA.

Methods: We assessed DNA methylation in cord blood samples from 277 mother-child pairs from the Sapporo cohort of the Hokkaido Study using the *Illumina HumanMethylation 450 BeadChip*.

Results: We observed that a large portion of BPA-associated differentially methylated CpGs with p -value <0.0001 was hypomethylated among all newborns (91%) and female infants (98%), as opposed to hypermethylation (88%) among males. We found 27 and 16 CpGs with a false discovery rate (FDR) <0.05 in the analyses for males and females, respectively. Genes annotated to FDR-corrected CpGs clustered into an interconnected genetic network among males, while they rarely exhibited any interactions in females. In contrast, none of the enrichment for gene ontology (GO) terms with FDR <0.05 was observed for genes annotated to the male-specific CpGs with $p < 0.0001$, whereas the female-specific genes were significantly enriched for GO terms related to cell adhesion.

Conclusion: Our epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylations implies potential sex-specific epigenome responses to BPA exposure.

研究協力者

湊屋 街子・アイツバマイ ゆふい・小林 澄貴
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

A . 研究目的

Bisphenol A (BPA) is a chemical widely used in consumer products, including plastics, dental sealants, food containers, and thermal receipts (Vandenberg *et al.* 2007). Biomonitoring studies reported BPA was

detectable in the dust, air particles, and water (Asimakopoulou *et al.* 2012). Humans are exposed to this compound through their diet, inhalation of house dust, and skin contact (Vandenberg *et al.* 2012). As a result, BPA is widely found in different populations including children and pregnant women (Covaci *et al.* 2015; Yamamoto *et al.* 2016). BPA is a known endocrine-disrupting chemical (EDC). Due to its widespread human exposure and endocrine-disrupting effects, developmental BPA exposure could have adverse effects on human health. Epidemiological studies have shown that prenatal BPA exposures are associated with various health outcomes including altering birth size (Chou *et al.* 2011; Philippat *et al.* 2012), disruption of hormone balance (Minatoya *et al.* 2017a; Romano *et al.* 2015), obesity (Harley *et al.* 2013; Vafeiadi *et al.* 2016), immune function impairment (Gascon *et al.* 2015; Spanier *et al.* 2014), and neurobehavioral problems (Braun *et al.* 2017a; Braun *et al.* 2017b; Minatoya *et al.* 2017b; Minatoya *et al.* 2018; Miodovnik *et al.* 2011; Perera *et al.* 2012; Roen *et al.* 2015), and most of these effects were sex-specific.

The actual mechanisms accounting for long-term effects of early-life exposure to BPA remain unclear. One hypothesis is that prenatal exposure to BPA might lead to health outcomes in the offspring through epigenetic alterations *in utero* because epigenetics is an *intrinsic* biological mechanism that can be affected by *extrinsic* environmental factors in humans.

DNA methylation is among the most studied mechanisms of epigenetic regulation

(Mileva *et al.* 2014). It occurs by the addition of a methyl group to a cytosine mostly at cytosine-guanine dinucleotide (CpG) loci and acts like a gene expression switch (Hackett and Surani 2013). Evidence from experimental studies suggests that DNA methylation changes in the offspring can occur in response to developmental BPA exposure (Alonso-Magdalena *et al.* 2016; Ideta-Otsuka *et al.* 2017; Mileva *et al.* 2014; Singh and Li 2012a). Previous human cohort studies showed that prenatal BPA exposure associated with DNA methylation profiles of fetal liver genes (Faulk *et al.* 2016; Nahar *et al.* 2014; Nahar *et al.* 2015) and metabolism-related genes of the offspring (Goodrich *et al.* 2016; Montrose *et al.* 2018). Furthermore, it has been shown that BPA-induced epigenetic effects are usually sex-specific (McCabe *et al.* 2017; Montrose *et al.* 2018).

Genome-wide methylation analysis allows a hypothesis-free assessment of epigenetic alterations in relation to the environmental factors (Christensen and Marsit 2011); however, only one cohort study from Germany showed an association between maternal urinary BPA levels (low levels with <7.6 ng/mg creatinine; $n=102$ and high levels with >15.9 ng/mg creatinine; $n=101$) and genome-wide DNA methylation in cord blood samples regardless of infant's sex (Junge *et al.* 2018). We aimed to examine cord blood DNA methylation changes in association with BPA exposure by an epigenome-wide association study (EWAS) in a Japanese cohort. In addition, analyses were also performed to determine sex-specific differences in BPA exposure-associated methylation profiles.

B . 研究方法

450K DNA methylation analysis. We assessed DNA methylation in cord blood samples from 277 mother-child pairs from the Sapporo cohort of the Hokkaido Study using the *Illumina HumanMethylation 450 BeadChip*. After quality control (Aryee *et al.* 2014), functional normalization (Fortin *et al.* 2014) was applied to the raw data, and normalized beta (β) values, ranging from 0-1 for 0% to 100% methylated, were obtained. We applied the ComBat method to adjust methylation data for sample plate to reduce a potential bias due to batch effects (Leek *et al.* 2012). Combat-transformed *M*-values (logit-transformed β -values) were back-transformed to β -values that were used for subsequent data analyses.

Exposure assessment. BPA levels were measured in cord blood by using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-LC/MS/MS) at IDEA Consultants, *Inc.* (Shizuoka, Japan) as described previously (Yamamoto *et al.* 2016). The LOQ of BPA was 0.04 ng/mL.

Data analysis. For the 87 samples below the LOQ (0.04 ng/mL), we assigned a value of half the detection limit (0.02 ng/mL). Cord blood cell proportion was estimated by the method implemented in the R/Bioconductor package *minfi* (Bakulski *et al.* 2016). Using *limma* package in R, robust linear regression analyses (Fox and Weisberg 2011) were applied to determine the associations of β -value at each CpG site with BPA natural log (*ln*)-transformed concentrations, adjusted for maternal age, educational levels, pre-pregnancy BMI, smoking during pregnancy,

gestational age, infant sex, and cord blood cell estimates for CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, granulocytes, monocytes, B cell and nucleated red blood cells. For multiple comparisons, *p*-values were adjusted by the false discovery rate (FDR) to obtain *q*-values. We further stratified the analysis by infant sex and compared CpGs with uncorrected *p*-value <0.0001 to confirm the sex-specific effect on DNA methylation changes as we had too few FDR-significant findings. Statistical analyses were performed using *minfi*, *sva*, and *limma* packages in R *ver.* 3.3.2 and Bioconductor *ver.* 3.3.

To further analyze underlying genetic networks of BPA-associated CpGs, we imported and analyzed genes related to DMPs surviving an FDR <0.05 using GeneMANIA (Warde-Farley *et al.* 2010) (<https://genemania.org/>) bioinformatics software with default parameters. We also assessed the differentially methylated CpGs with *p*-value <0.0001 for functional enrichment with GO terms and KEGG pathways (Kanehisa *et al.* 2002) via the *gometh* function in the *missMethyl* package in R/Bioconductor (Phipson *et al.* 2016).

Replication study. Eleven mother-infant pairs from a Taiwanese cohort had both BPA levels in maternal urine samples and β -values at 450K CpGs from cord blood DNA. Details of the study population have been published elsewhere (Huang *et al.* 2017). Linear regression analyses adjusted for child sex were applied to determine the associations of the β -value with *ln*-transformed BPA levels. Due to the very small sample size (n=11), we did not stratify the analysis by sex.

（倫理面への配慮）

Written informed consents were obtained from all participants. The institutional Ethical Board for human gene and genome studies at the Hokkaido University Graduate School of Medicine and the Hokkaido University Center for Environmental and Health Science approved the study protocol. The study protocol of Taiwan cohort was approved by the Institutional Review Board of Cathay General Hospital (CGH) in Taipei, Taiwan. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

C . 研究結果

Study characteristics. Maternal and infant characteristics and their relationship to BPA concentrations in cord blood are described in Table 1. BPA was detected in 68.6 % of cord blood samples. The median of cord blood BPA was 0.050 ng/mL (Interquartile range (IQR): < the limit of quantification (LOQ) – 0.075). The average \pm standard deviation (s.d.) age of the mothers was 30.0 ± 4.9 years. Of the 277 newborns, 123 (44.4%) were male. None of the characteristics shown in Table 1 were significantly associated with BPA levels.

The median level of BPA, maternal characteristics, and gestational age were not significantly different between the infant sexes. The percentage of subjects with BPA values below the LOQ among the females (32.5%) was slightly higher than that among the males (30.1%).

Epigenome-wide association study. Volcano plots of EWAS analyses for all newborns, male infants, and female infants showed a different

imbalance in positive versus negative methylation changes (Figure 1A), suggesting sex-specific global methylation shifts. We compared CpGs with uncorrected p -value < 0.0001 (45 CpGs in all newborns, 269 CpGs in male infants, and 291 CpGs in female infants) and observed a large portion of these were hypomethylated among all newborns (91%) and female infants (98%) (Figure 1B). In contrast, of the 269 CpGs among male infants, 236 CpGs (88%) became hypermethylated (Figure 1B).

Next, we studied differentially methylated probes (DMPs) with epigenome-wide significant methylation changes; a false discovery rate (FDR) q -value < 0.05. Figure 2 shows Manhattan plots of genome-wide analyses of the association between cord blood DNA methylation and BPA exposure. The male- and female-specific DMPs are listed in Tables 2 and 3, respectively. In the male-only analysis, BPA levels in cord blood were associated with hypermethylation of 22 DMPs and hypomethylation of 6 DMPs. Among the female infants, BPA levels were associated with hypomethylation of 16 DMPs. There were no CpGs with FDR < 0.05 in all newborns (Figure 2A); however, the directions of methylation changes at DMPs observed in all infants were consistent with those observed in the sex-stratified analyses (see Tables 2 and 3).

We explored whether FDR-significant DMPs identified in the Sapporo cohort also showed the same direction of methylation change in a Taiwan cohort (the right columns in Tables 2 and 3). Of the DMPs, one male- and two female-specific DMPs were not available for the analysis. Ten of the fourteen female-

specific DMPs showed the same direction of methylation changes (hypomethylation) in both cohorts, whereas the direction of methylation changes in the male-specific DMPs was not reproducible (9 of 27 male-specific DMPs).

Network analysis of DMPs. Genes annotated to DMPs (28 male-specific and sixteen female-specific genes) were analyzed by network analysis using GeneMANIA (Warde-Farley *et al.* 2010) (<https://genemania.org/>) that is based on known genetic and physical interactions, shared pathways and protein domains as well as protein co-expression data. Two male-specific genes (*LOC401242* and *LOC441455*) were not available for GeneMANIA analysis; therefore, only 26 of the 28 male-specific genes were included in this analysis. The analyses showed that all male-specific genes, except one (*C6orf52*), formed a compact cluster showing co-expression, genetic interaction, and colocalization (see Figure 3). Conversely, among the 16 female-specific genes, only six genes showed three disperse clusters of co-expression (Figure 4). The rest of the genes showed no interaction with others.

Gene ontology analysis. We also investigated the underlying biology that may be affected by BPA-associated variations in a sex-specific manner. As we had too few FDR-significant findings to perform an enrichment analysis on only those hit (28 DMPs in males and 16 DMPs in females), we tested for gene ontology (GO) terms and Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) pathways (Kanehisa *et al.* 2002) enrichment among the CpGs associated with BPA levels with $p < 0.0001$. Four GO terms among the female infants were

significant at an FDR < 0.05 as shown in Table 4. None of the GO terms among the males were significant at the FDR threshold. In contrast, the gene set for both sexes were enriched with genes from numerous KEGG pathways. The top ten enriched pathways ranked by the lowest p -value, excluding the pathways for diseases, are shown in Table 5. Among males, six of ten pathways are involved in signal transduction – MAPK signaling pathway, AMPK signaling pathway, Rap1 signaling pathway, Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells, mTOR signaling pathway, and Phospholipase D signaling pathway. Among the ten pathways enriched among the female, three pathways were associated with the endocrine system – estrogen signaling pathway, relaxin signaling pathway, parathyroid hormone synthesis, secretion and action.

D . 考察

Even though BPA levels in this study were relatively lower (Minatoya *et al.* 2017b) than those in the previous studies on cord blood BPA levels (Aris 2014; Chou *et al.* 2011; Kosarac *et al.* 2012), we found substantial sex differences in methylation changes associated with BPA exposure. Among males, BPA exposure was more frequently associated with hypermethylation than with hypomethylation, whereas it was associated predominantly with hypomethylation among female infants. Genes annotated to these CpGs also showed sex differences in the genetic network and functional enrichment analyses. Our results suggest that even at low levels, BPA exposure may impact DNA methylation status at birth in

a sex-specific manner.

Methylation changes derived from exposures to BPA showed notable sex-specific differences – the inversed direction of effects on methylation changes might be responsible for the lack of significant changes among all newborns. The observed preference of BPA-induced hypomethylation in females, as opposed to hypermethylation among males, is consistent with the findings from studies on blood-based methylation alterations that showed BPA-induced hypomethylation in women (Hanna *et al.* 2012) and in young girls (Kim *et al.* 2013).

While ten of the 14 female-specific DMPs (71%) had the same direction of methylation changes (hypomethylation) in both Sapporo and Taiwanese cohorts, only nine of the 27 male-specific DMPs showed the same direction of methylation changes in both cohorts (Tables 2 and 3). Effects of BPA on DNA methylation in the male infants has not been clarified (Martin *et al.* 2018). Further studies would be required to evaluate its effects among the males.

In addition to the opposed direction of effect between sexes, the network analyses of genes annotated to FDR-corrected DMPs showed the sex-difference (Figures 3 and 4). The male-specific genes clustered into a complex interconnected network, whereas the female-specific genes were isolated. In contrast, with regard to the gene pathways, the female-specific CpGs with p -value <0.0001 included genes that were significantly enriched for GO terms related to cell adhesion (FDR <0.05) – homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules, cell-cell

adhesion via plasma membrane adhesion molecules, cell-cell adhesion, and calcium ion binding (Table 4). On the other hand, genes annotated to the male-specific probes were not enriched in any GO terms with an FDR threshold. With respect to KEGG pathways, it should be noted that enrichment in the MAPK signaling pathway and the estrogen signaling pathway were observed among the genes annotated to male- and female-specific probes, respectively. According to Singh and Li (Singh and Li 2012b), mitogen-activated protein (MAPK) and estrogen receptor (ESR) were included in most frequently curated BPA-interacting genes/proteins.

E . 結論

In conclusion, this epigenome-wide study suggested that even relatively low levels of exposure to BPA impact DNA methylation status at birth in a sex-specific manner. There may be a potential susceptibility difference in relation to BPA exposure between males and females. Further studies are needed to confirm our findings and to investigate their relevance to sex-specific adverse health outcomes.

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 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) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

2. 学会発表

1. 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)
2. 小林澄貴, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 三浦りゅう, ゴウダルジ・ハウマヌ, 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. 東京工科大学蒲田
キャンパス（東京都大田区）.
(2018.3.22-24)

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

参考文献

1. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. 2007. Human exposure to bisphenol a (bpa). *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY) 24:139-177.
2. Asimakopoulos AG, Thomaidis NS, Koupparis MA. 2012. Recent trends in biomonitoring of bisphenol a, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Toxicology letters* 210:141-154.
3. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, *et al.* 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews* 33:378-455.
4. Covaci A, Den Hond E, Geens T, Govarts E, Koppen G, Frederiksen H, *et al.* 2015. Urinary bpa measurements in children and mothers from six european member states: Overall results and determinants of exposure. *Environmental research* 141:77-85.
5. Yamamoto J, Minatoya M, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Matsumura T, *et al.* 2016. Quantifying bisphenol a in maternal and cord whole blood using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry and maternal characteristics

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

- associated with bisphenol a. *Chemosphere* 164:25-3.
6. Chou WC, Chen JL, Lin CF, Chen YC, Shih FC, Chuang CY. 2011. Biomonitoring of bisphenol a concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: A birth cohort study in taiwan. *Environmental health : a global access science source* 10:94.
 7. Philippat C, Mortamais M, Chevrier C, Petit C, Calafat AM, Ye X, *et al.* 2012. Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environmental health perspectives* 120:464-470.
 8. Minatoya M, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Yamamoto J, *et al.* 2017a. Cord blood bisphenol a levels and reproductive and thyroid hormone levels of neonates: The hokkaido study on environment and children's health. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 28 Suppl 1:S3-s9.
 9. Romano ME, Webster GM, Vuong AM, Thomas Zoeller R, Chen A, Hoofnagle AN, *et al.* 2015. Gestational urinary bisphenol a and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: The home study. *Environmental research* 138:453-460.
 10. Harley KG, Aguilar Schall R, Chevrier J, Tyler K, Aguirre H, Bradman A, *et al.* 2013. Prenatal and postnatal bisphenol a exposure and body mass index in childhood in the chamacos cohort. *Environmental health perspectives* 121:514-520.
 11. Vafeiadi M, Roumeliotaki T, Myridakis A, Chalkiadaki G, Fthenou E, Dermitzaki E, *et al.* 2016. Association of early life exposure to bisphenol a with obesity and cardiometabolic traits in childhood. *Environmental research* 146:379-387.
 12. Gascon M, Casas M, Morales E, Valvi D, Ballesteros-Gomez A, Luque N, *et al.* 2015. Prenatal exposure to bisphenol a and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 135:370-378.
 13. Spanier AJ, Kahn RS, Kunselman AR, Schaefer EW, Hornung R, Xu Y, *et al.* 2014. Bisphenol a exposure and the development of wheeze and lung function in children through age 5 years. *JAMA pediatrics* 168:1131-1137.
 14. Braun JM, Muckle G, Arbuckle T, Bouchard MF, Fraser WD, Ouellet E, *et al.* 2017a. Associations of prenatal urinary bisphenol a concentrations with child behaviors and cognitive abilities. *Environmental health perspectives* 125:067008.
 15. Braun JM, Yolton K, Stacy SL, Erar B, Papandonatos GD, Bellinger DC, *et al.* 2017b. Prenatal environmental chemical exposures and longitudinal patterns of child neurobehavior. *Neurotoxicology* 62:192-199.
 16. Minatoya M, Araki A, Nakajima S, Sasaki S, Miyashita C, Yamazaki K, *et al.* 2017b. Cord blood bpa level and child neurodevelopment and behavioral problems: The hokkaido study on environment and children's health. *The Science of the total environment* 607-

- 608:351-356.
17. Minatoya M, Itoh S, Yamazaki K, Araki A, Miyashita C, Tamura N, *et al.* 2018. Prenatal exposure to bisphenol a and phthalates and behavioral problems in children at preschool age: The hokkaido study on environment and children's health. *Environ Health Prev Med* 23:43.
 18. Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, Ye X, Soorya LV, Silva MJ, *et al.* 2011. Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology* 32:261-267.
 19. Perera F, Vishnevetsky J, Herbstman JB, Calafat AM, Xiong W, Rauh V, *et al.* 2012. Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort. *Environmental health perspectives* 120:1190-1194.
 20. Roen EL, Wang Y, Calafat AM, Wang S, Margolis A, Herbstman J, *et al.* 2015. Bisphenol a exposure and behavioral problems among inner city children at 7-9 years of age. *Environmental research* 142:739-745.
 21. Mileva G, Baker SL, Konkle AT, Bielajew C. 2014. Bisphenol-a: Epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *International journal of environmental research and public health* 11:7537-7561.
 22. Hackett JA, Surani MA. 2013. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 368:20110328..
 23. Alonso-Magdalena P, Rivera FJ, Guerrero-Bosagna C. 2016. Bisphenol-a and metabolic diseases: Epigenetic, developmental and transgenerational basis. *Environmental epigenetics* 2:dvw022.
 24. Ideta-Otsuka M, Igarashi K, Narita M, Hirabayashi Y. 2017. Epigenetic toxicity of environmental chemicals upon exposure during development - bisphenol a and valproic acid may have epigenetic effects. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 109:812-816.
 25. Singh S, Li SS. 2012a. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *International journal of molecular sciences* 13:10143-10153..
 26. Faulk C, Kim JH, Anderson OS, Nahar MS, Jones TR, Sartor MA, *et al.* 2016. Detection of differential DNA methylation in repetitive DNA of mice and humans perinatally exposed to bisphenol a. *Epigenetics* 11:489-500.
 27. Nahar MS, Kim JH, Sartor MA, Dolinoy DC. 2014. Bisphenol a-associated alterations in the expression and epigenetic regulation of genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes in human *fet al* liver. *Environmental and molecular mutagenesis* 55:184-195.
 28. Nahar MS, Liao C, Kannan K, Harris C, Dolinoy DC. 2015. In utero bisphenol a concentration, metabolism, and global DNA methylation across matched placenta, kidney, and liver in the human fetus. *Chemosphere* 124:54-60.
 29. Goodrich JM, Dolinoy DC, Sanchez BN, Zhang Z, Meeker JD, Mercado-Garcia A, *et al.* 2016. Adolescent epigenetic profiles

- and environmental exposures from early life through peri-adolescence. *Environmental epigenetics* 2:dvw018.
30. Montrose L, Padmanabhan V, Goodrich JM, Domino SE, Treadwell MC, Meeker JD, *et al.* 2018. Maternal levels of endocrine disrupting chemicals in the first trimester of pregnancy are associated with infant cord blood DNA methylation. *Epigenetics* 13:301-309.
31. McCabe C, Anderson OS, Montrose L, Neier K, Dolinoy DC. 2017. Sexually dimorphic effects of early-life exposures to endocrine disruptors: Sex-specific epigenetic reprogramming as a potential mechanism. *Current environmental health reports* 4:426-438.
32. Christensen BC, Marsit CJ. 2011. Epigenomics in environmental health. *Frontiers in genetics* 2:84.
33. Junge KM, Leppert B, Jahreis S, Wissenbach DK, Feltens R, Grutzmann K, *et al.* 2018. Mest mediates the impact of prenatal bisphenol a exposure on long-term body weight development. *Clinical epigenetics* 10:58. *Environment International* 62:104-112.
34. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, *et al.* 2014. Minfi: A flexible and comprehensive bioconductor package for the analysis of infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30:1363-1369.
35. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, *et al.* 2014. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biology* 15:503.
36. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. 2012. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 28:882-883.
37. Bakulski KM, Feinberg JI, Andrews SV, Yang J, Brown S, S LM, *et al.* 2016. DNA methylation of cord blood cell types: Applications for mixed cell birth studies. *Epigenetics* 11:354-362.
38. Fox J, Weisberg S. 2011. Robust regression in r. Thousand Oaks, CA.:Sage.
39. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, *et al.* 2010. The genemania prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research* 38:W214-220.
40. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Nakaya A. 2002. The kegg databases at genomnet. *Nucleic acids research* 30:42-46.
41. Phipson B, Maksimovic J, Oshlack A. 2016. Missmethyl: An r package for analyzing data from illumina's humanmethylation450 platform. *Bioinformatics (Oxford, England)* 32:286-288.
42. Huang YF, Pan WC, Tsai YA, Chang CH, Chen PJ, Shao YS, *et al.* 2017. Concurrent exposures to nonylphenol, bisphenol a, phthalates, and organophosphate pesticides on birth outcomes: A cohort study in taipei, taiwan. *The Science of the total environment* 607-608:1126-1135.
43. Aris A. 2014. Estimation of bisphenol a

- (bpa) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in eastern townships of Canada. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY) 45:8-13.
44. Kosarac I, Kubwabo C, Lalonde K, Foster W. 2012. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol a in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 898:90-94.
45. Hanna CW, Bloom MS, Robinson WP, Kim D, Parsons PJ, vom Saal FS, *et al.* 2012. DNA methylation changes in whole blood is associated with exposure to the environmental contaminants, mercury, lead, cadmium and bisphenol a, in women undergoing ovarian stimulation for ivf. *Human reproduction* (Oxford, England) 27:1401-1410.
46. Kim JH, Rozek LS, Soliman AS, Sartor MA, Hablas A, Seifeldin IA, *et al.* 2013. Bisphenol a-associated epigenomic changes in prepubescent girls: A cross-sectional study in gharbiah, Egypt. *Environmental health : a global access science source* 12:33.
47. Martin, E. M. & Fry, R. C. 2018. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure- Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annual review of public health* **39**, 309-333.
48. Singh S, Li SS. 2012b. Bisphenol a and phthalates exhibit similar toxicogenomics and health effects. *Gene* 494:85-91.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 1. Maternal and infant characteristics and their relationship with cord blood BPA levels (ng/mL).

	N (%) or Mean \pm SD	Median (25th, 75th) or correlation ()	ρ
BPA Concentration in cord blood (ng/ml)	0.056 \pm 0.03	0.05 (0.020, 0.075)	
Maternal Characteristic			
Maternal Age (year) ^a	30.0 \pm 4.9	= -0.031	0.613
Prenatal-BMI (kg/m ²) ^a	20.9 \pm 2.9	= -0.031	0.605
Parity ^b	0 145 (52.3)	0.054 (0.020, 0.076)	0.407
	1 132 (47.7)	0.047 (0.020, 0.074)	
Educational level (year) ^b			0.990
	12 123 (44.4)	0.050 (0.020, 0.076)	
	> 12 154 (55.6)	0.052 (0.020, 0.070)	
Annual household income (million yen) ^c			0.829
	< 3 51 (18.5)	0.055 (0.020, 0.072)	
	3-5 144 (52.4)	0.053 (0.020, 0.076)	
	5-7 59 (21.5)	0.048 (0.020, 0.068)	
	> 7 21 (7.6)	0.044 (0.020, 0.085)	
Smoking during pregnancy ^b			0.941
	No 234 (84.5)	0.051 (0.020, 0.075)	
	Yes 43 (15.5)	0.056 (0.020, 0.072)	
Alcohol consumption during pregnancy ^b			0.831
	No 183 (66.1)	0.052 (0.020, 0.075)	
	Yes 94 (33.9)	0.047 (0.020, 0.075)	
Caffeine intake during pregnancy (mg/day) ^a	148.7 \pm 121.9	= -0.012	0.843
Infant Characteristic			
Gestational age (week) ^a	39.8 \pm 1.0	= -0.003	0.964
Sex ^b	Male 123 (44.4)	0.056 (0.020, 0.075)	0.429
	Female 154 (55.6)	0.047 (0.020, 0.073)	
Birth weight (g) ^a	3131.3 \pm 333.5	= 0.060	0.324

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

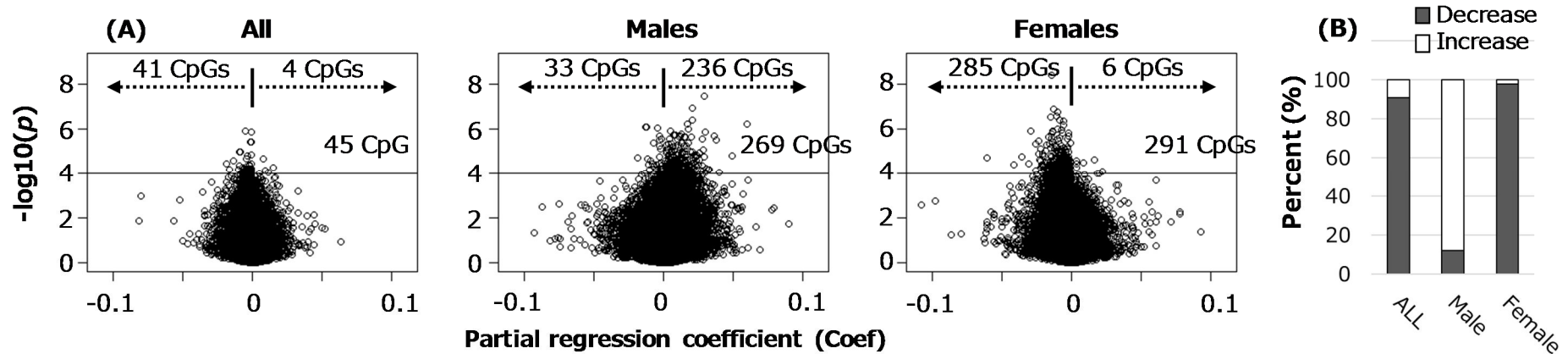


Figure 1. (A) Volcano plots of the $\log_{10}(p\text{-values})$ versus the magnitude of effect (Coef) for the genome-wide analysis of the association between BPA exposure and DNA methylation in cord blood among all newborns, male infants, and female infants. Horizontal lines represent a $p\text{-value} < 0.0001$. (B) The percentage of decreased- and increased-CpGs with $p < 0.0001$ found in the analyses for all, male, and female infants.

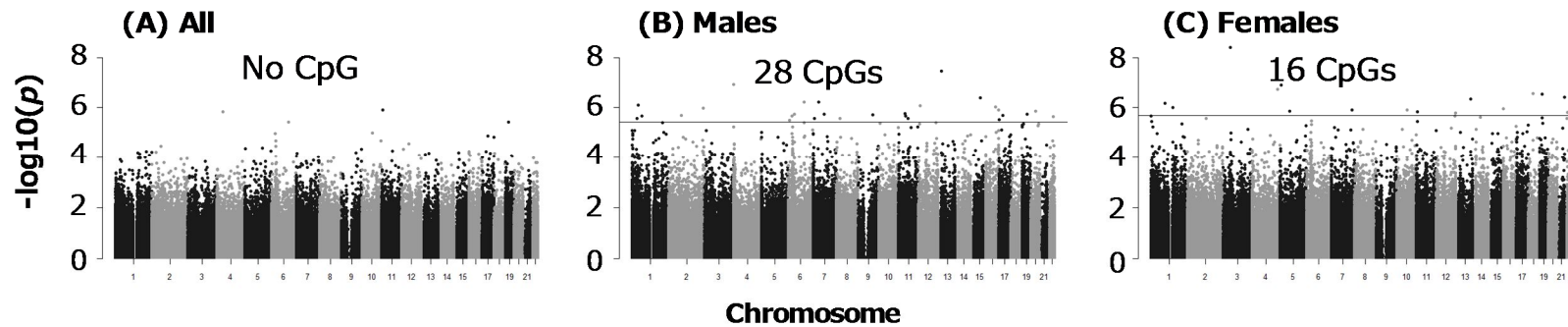


Figure 2. Manhattan plots of $p\text{-value}$ associations between BPA exposure and DNA methylation across chromosomes in analyses for (A) all newborns, (B) male infants, and (C) female infants. Horizontal lines represent the significance threshold of FDR $q < 0.05$.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 2. 28 CpGs with DNA methylation levels in cord blood associated with BPA concentrations with FDR $q < 0.05$ in analysis for male infants

CpG	CHR	Gene	Relation to gens	Relation to island	Sapporo				Taiwan ^a		Replicated for the direction
					Male infants ^b		All newborns ^c		All newborns		
					Coef ^d	<i>p</i> -Value	Coef ^d	<i>p</i> -Value	Coef ^d	<i>p</i> -Value	
cg25275331	1	ZMPSTE24	1stExon	island	-0.013	7.91E-07	-0.003	0.100	0.015	0.239	
cg21115004	1	SLC35D1	TSS1500	shore	0.015	2.15E-06	0.002	0.241	0.011	0.614	✓
cg02920421	1	KPNA6	TSS1500	shore	0.010	2.70E-06	0.004	0.034	0.002	0.584	✓
cg04627863	2	HJURP	IGR	open sea	0.018	1.01E-06	0.009	0.001	0.001	0.930	✓
cg08527179	2	TMSB10	TSS1500	island	0.012	1.98E-06	0.004	0.005	-0.022	0.713	
cg23605991	4	PDE6B	TSS1500	shore	0.021	1.19E-07	0.005	0.085	0.003	0.644	✓
cg01119278	6	DDO	Body	island	0.060	5.83E-07	0.017	0.094	-0.009	0.567	
cg00050375	6	ABCC10	Body	open sea	0.009	1.78E-06	0.002	0.189	-0.003	0.253	
cg20620326	6	LOC401242	IGR	open sea	0.020	2.20E-06	0.003	0.487	-0.006	0.603	
cg02330394	6	C6orf52	TSS1500	island	-0.003	3.19E-06	-0.001	0.050	0.006	0.703	
cg22674202	7	GPR141	IGR	open sea	0.017	5.97E-07	0.005	0.079	-0.007	0.124	
cg17833862	7	CLIP2	Body	island	0.007	1.85E-06	0.003	0.032	-0.001	0.684	
cg00507727	7	ICA1	TSS200	island	-0.002	2.65E-06	-0.001	0.002	0.017	0.362	
cg14253670	8	NEFL	IGR	shelf	0.028	2.63E-06	0.010	0.008	-0.005	0.217	
cg13481969	9	LOC441455	IGR	island	-0.003	1.94E-06	-0.002	6.28E-05	0.038	0.542	
cg03470671	11	PRDM11	1stExon	open sea	0.012	1.71E-06	0.004	0.021	-0.004	0.168	
cg07637188	11	MADD	Body	open sea	0.011	2.19E-06	0.004	0.014	-0.000	0.872	
cg03687707	11	COX8A	IGR	shelf	0.004	2.68E-06	0.002	0.022	-0.002	0.072	
cg21372595	12	ATF7IP	IGR	shore	-0.012	8.53E-07	-0.005	0.013	0.000	0.898	
cg20981000	13	MTMR6	IGR	open sea	0.030	3.44E-08	0.004	0.313	0.001	0.949	✓
cg20796298	15	IGDCC4	Body	shore	0.021	3.97E-07	0.006	0.069	-0.000	0.997	
cg00120998	16	CENPT	TSS200	island	-0.005	9.42E-07	-0.002	0.023	0.020	0.406	
cg07130392	16	SPG7	Body	island	0.005	1.20E-06	0.001	0.187	0.000	0.658	✓
cg23798387	17	KIAA0100	TSS1500	shore	0.036	1.99E-06	0.008	0.203	0.014	0.595	✓
cg06126721	17	SLC43A2	3'UTR	island	0.038	3.01E-06	0.007	0.234	-0.009	0.394	
cg17922329	19	FXD5	5'UTR	island	0.007	1.77E-06	0.002	0.077	0.043	0.148	✓
cg13636640	20	DNMT3B	TSS1500	shore	0.030	1.38E-06	0.011	0.010	NA		NA
cg19353578	22	PDGFB	Body	shelf	0.016	2.23E-06	0.003	0.141	0.002	0.769	✓

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Abbreviations: Chr: chromosome, IGR: intergenic region, TSS: transcription start site, TSS200: 200 bases from TSS, TSS1500: 1500 bases from TSS, body: gene body, UTR: untranslated region, NA: not available.

^a Linear regression analyses adjusted for child sex were applied to determine the associations of DNA methylation levels with *ln*-transformed BPA levels in Taiwan cohort.

^b Adjusted for maternal age, maternal educational levels, maternal pre-pregnancy BMI, maternal smoking during pregnancy, gestational age, and cord blood cell estimates

^c Adjusted for maternal age, maternal educational levels, maternal pre-pregnancy BMI, maternal smoking during pregnancy, gestational age, infant sex, and cord blood cell estimates.

^d Partial regression coefficient indicates absolute DNA methylation change per *ln*-unit increase in BPA concentration.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 3. 16 CpGs with DNA methylation levels in cord blood associated with BPA concentrations with FDR $q < 0.05$ among female infants.

CpG	Chr	Gene	Relation to gens	Relation to island	Sapporo				Taiwan ^a		Replicated for the direction
					Female infants ^b		All newborns ^c		All newborns		
					Coef ^d	p-Value	Coef ^d	p-Value	Coef ^d	p-Value	
cg12061021	1	RWDD3	TSS200	shore	-0.006	6.55E-07	-0.004	0.000	-0.006	0.784	✓
cg21461470	1	HIST2H2AA4	TSS1500	shore	-0.010	1.01E-06	-0.006	0.001	0.005	0.864	
cg22927302	3	SEMA3B	TSS1500	open sea	-0.015	4.00E-09	-0.005	0.014			NA
cg23603782	4	GALNTL6	Body	open sea	-0.010	1.81E-07	-0.006	0.000	-0.001	0.636	✓
cg27629673	5	ADCY2	Body	open sea	-0.013	1.27E-07	-0.005	0.029	-0.000	0.925	✓
cg22465281	5	NLN	TSS1500	shore	-0.014	1.36E-06	-0.005	0.036			NA
cg19734222	7	PRSS58	IGR	open sea	-0.030	1.25E-06	-0.011	0.030	0.003	0.710	
cg11820931	10	DDX21	Body	shore	-0.013	1.23E-06	-0.009	1.00E-05	-0.006	0.348	✓
cg08710564	11	ST5	5'UTR	open sea	-0.007	1.45E-06	-0.005	1.24E-06	-0.001	0.366	✓
cg17339927	12	FBRSL1	IGR	shore	-0.014	1.63E-06	-0.007	0.006	-0.005	0.245	✓
cg15193473	13	BIVM	5'UTR	island	-0.006	4.53E-07	-0.003	0.000	0.030	0.388	
cg27624753	16	CRAMP1L	Body	shelf	-0.007	1.10E-06	-0.005	6.65E-05	-0.005	0.092	✓
cg27638035	18	BRUNOL4	Body	open sea	-0.011	2.68E-07	-0.004	0.049	-0.003	0.333	✓
cg03636183	19	F2RL3	Body	shore	-0.016	2.81E-07	-0.005	0.067	-0.005	0.375	✓
cg07964219	21	COL18A1	Body	shore	-0.009	3.90E-07	-0.005	0.008	0.000	0.983	
cg15477600	22	SDF2L1	TSS1500	island	-0.002	1.57E-06	-0.001	0.004	-0.009	0.726	✓

Abbreviations: Chr: chromosome, IGR: intergenic region, TSS: transcription start site, TSS200: 200 bases from TSS, TSS1500: 1500 bases from TSS, body: gene body, UTR: untranslated region, NA: not available.

^a Linear regression analyses adjusted for child sex were applied to determine the associations of DNA methylation levels with *ln*-transformed BPA levels in Taiwan cohort.

^b Adjusted for maternal age, maternal educational levels, maternal pre-pregnancy BMI, maternal smoking during pregnancy, gestational age, and cord blood cell estimates

^c Adjusted for maternal age, maternal educational levels, maternal pre-pregnancy BMI, maternal smoking during pregnancy, gestational age, infant sex, and cord blood cell estimates.

^d Partial regression coefficient indicates absolute DNA methylation change per *ln*-unit increase in BPA concentration.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

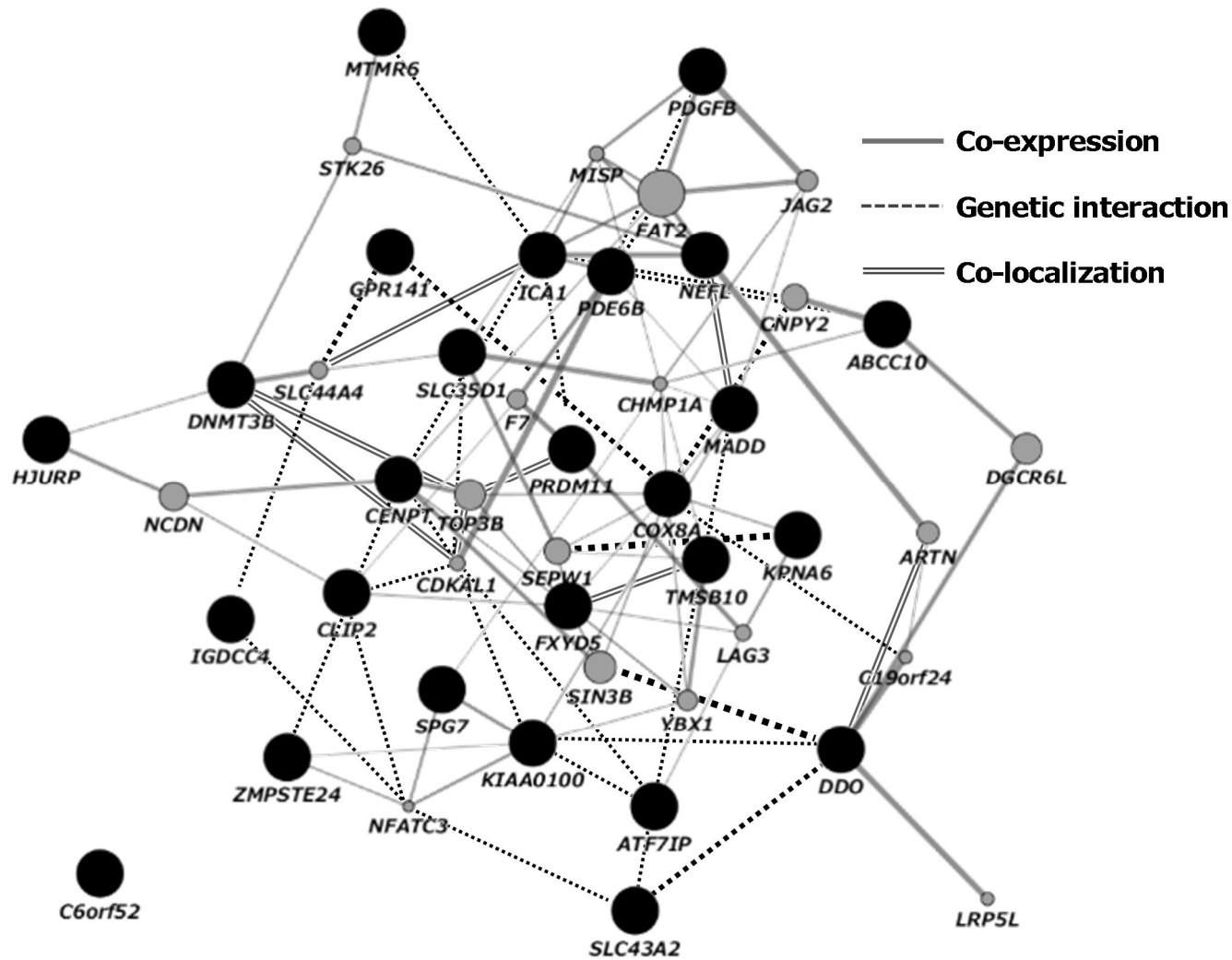


Figure 3. Gene network analysis using GeneMANIA. Dark circles represent genes associated with the 26 DMPs found to be related to BPA exposure in the male-only analysis. Light circles represent additional genes predicted by GeneMANIA based on genetic and physical interactions.

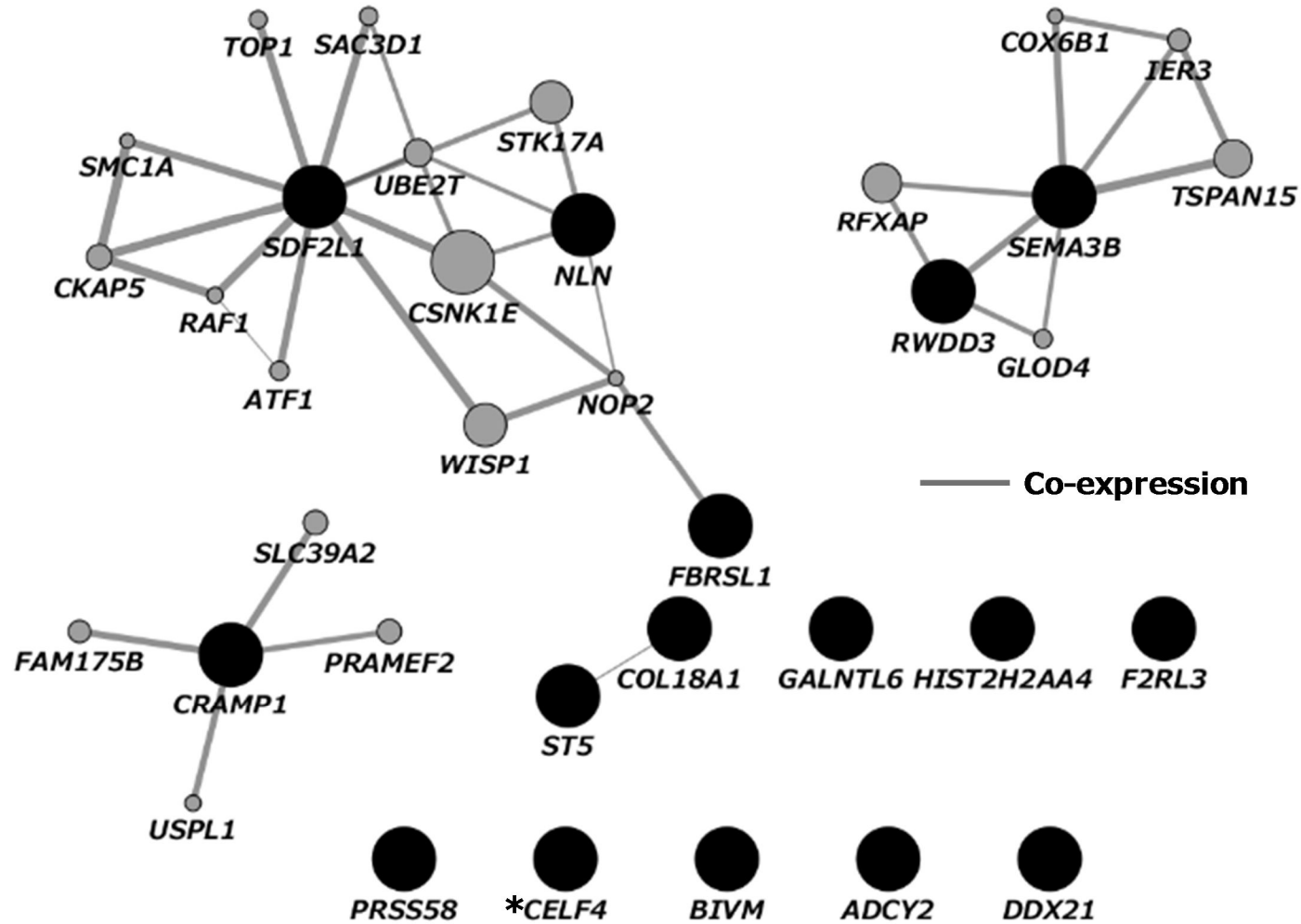


Figure 4. Gene network analysis using GeneMANIA. Dark circles represent genes associated with the 16 DMPs found to be related to BPA exposure in the female-only analysis. Light circles represent additional genes predicted by GeneMANIA based on genetic and physical interactions.

**CELF4*, an alias for *BRUNOLA4*

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

Table 4. Significantly enriched GO terms (FDR <0.05) for the CpGs with *p*-value <0.0001 from the female-only analysis.

GO term	Ontology	N	DE	p-Value	FDR
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	BP	149	22	4.57E-12	9.46E-08
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	BP	210	22	5.28E-10	5.46E-06
cell-cell adhesion	BP	845	38	1.92E-07	0.001
calcium ion binding	MF	652	30	2.17E-06	0.011

N: number of genes represented by a GO term, DE: number of genes from the GO term that were included in the CpGs with *p* <0.0001, FDR: FDR-adjusted *p*-value for enrichment, BP: biological process, MF: molecular function

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

Table 5. Top 10 enriched KEGG pathways ranked by the lowest p -value associated with genes annotated to the CpGs with $p < 0.0001$ from the male- and female-only analyses.

KEGG pathway description	N	DE	P.DE	FDR
Male only analysis				
Phagosome	142	5	3.85E-05	0.002
MAPK signaling pathway	283	7	6.28E-05	0.002
AMPK signaling pathway	117	5	7.51E-05	0.002
Focal adhesion	191	6	8.16E-05	0.002
Rap1 signaling pathway	203	6	8.60E-05	0.002
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	135	5	1.35E-04	0.003
mTOR signaling pathway	147	5	1.59E-04	0.003
Cellular senescence	153	5	1.72E-04	0.003
Phospholipase D signaling pathway	142	5	2.07E-04	0.003
Natural killer cell mediated cytotoxicity	105	4	2.29E-04	0.003
Female only analysis				
cAMP signaling pathway	192	8	9.13E-07	1.5E-04
Estrogen signaling pathway	136	7	9.36E-07	1.5E-04
Relaxin signaling pathway	125	6	1.19E-05	0.001
Th17 cell differentiation	102	5	3.43E-05	0.001
Wnt signaling pathway	140	6	3.54E-05	0.001
Cell cycle	121	5	7.76E-05	0.002
Platelet activation	122	5	9.80E-05	0.002
B cell receptor signaling pathway	68	4	1.20E-04	0.003
Parathyroid hormone synthesis, secretion and action	105	5	1.21E-04	0.003
Cytokine-cytokine receptor interaction	265	5	2.64E-04	0.004

N: total genes in the KEGG pathway, DE: the number of genes within the CpGs with $p < 0.0001$, FDR: FDR-adjusted p -value for enrichment

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

研究代表者	岸 玲子	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特別招へい教授
研究分担者	三宅 邦夫	山梨大学大学院総合研究部	准教授
研究分担者	石塚 真由美	北海道大学大学院獣医学研究院	教授
研究分担者	佐田 文宏	中央大学保健センター	医療管理者

研究要旨

背景: 胎児期や乳幼児期の化学物質曝露が児の神経発達障害リスクに影響することが報告されている。その分子メカニズムとしてエピゲノム 特に DNA メチル化異常の関与が考えられているが、これまで日本人集団で大規模な出生コホートによる DNA メチル化解析はなされていない。

目的: 本研究では、大規模コホートにおける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 の関連を検討することを目的とした。

方法: 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 のそろう母児 562 名(ケース:245 名、コントロール:317 名)を対象とし、質問票(非喫煙群(n = 276)、喫煙群(n = 38))もしくは母体コチニン濃度(高濃度群(n = 48)、中程度濃度群(n = 200)、低濃度群(n = 262))へ群別化した。昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析から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)を解析遺伝子領域とし、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析は ThermoFisher 社の IonPGM システムを用いた。

結果: 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、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、有意差は認めなかった。

考察: 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。

A. 研究目的

近年、神経発達障害が世界的に増加していると報告されている(米国 CDC)。その要因は単一ではないが、胎児期や乳幼児期の化学物質曝露による影響が指摘されている(Tran et al., 2017)。これまで出生コホート研究から妊娠中の喫煙曝露が子供の ADHD のリスクを増加させること(Melchior M et al., 2015, Joelsson P et al., 2016)が報告されている。動物実験においても胎児期のタバコ煙が仔の記憶・学習障害、情動異常を示すこと(Zhu J et al., 2012, Yochum C et al., 2014)が報告されている。このような先行研究から胎児期・乳幼児期の喫煙曝露が脳神経発達に影響を及ぼしていると考えられる。その間を結びつける分子メカニズムとしてエピゲノム 特に DNA のメチル化が指摘されているが、これまで日本人集団で大規模な出生コホートによる DNA メチル化解析はほとんどなされていない。そこで本研究では、大規模コホートにおける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 の関連を検討することを目的とする。

B. 研究方法

1. 対象

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 のそろう母児 562 名(ケース:245 名、コントロール:317 名)を対象とした。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)、喫煙経験がある群については禁煙時期が明確でなかったため解析から除外した。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。血清コチニン濃度が測定されていない対象者は解析から除外した。ま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。

2. 方法

昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析から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。具体的な方法は以下に示す。臍帯血をバイサルファイト 処理した後、各 CpG を含むプライマーで PCR 増幅した。各 PCR 産物を検体ごとに混ぜ、エンドリペア、ニックリペア、アダプター・バーコード配列付加によりライブラリーを作成し、リアルタイム PCR により濃度を測定した。シーケンス用半導体チップ(Ion 318 chip)を用いて 96 検体/ chip でテンプレート調整(Ion Chef)、Ion PGM によるシーケンスランを行った。平均カバレッジ $>2500 \times$ 、ターゲット領域のカバレッジ $>500 \times$ になるようにシーケンス回数を調整した。取得したシーケンスデータは Thermo Fisher 社の Torrent Suite Software ver 5.0 を用いてベースコールを行い、Methylation Analysis Amplicon プラグインを用いて、各遺伝子標的領域における各 CpG サイトのメチル化率を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科及び山梨大学医学部の倫理委員会の承認を得た。本研究によって得られた個人

名及び個人データの漏洩については、データの管理保管に適切な保管場所を確保するなどの方法により行うとともに、研究者の道義的責任に基づいて個人データをいかなる形でも本研究の研究者以外の外部の者に触れられないように厳重に保管し、取り扱った。

C. 研究結果

質問票により群別化した非喫煙群、喫煙群間とも正規性が認められないため、ウィルコクソンの順位和検定により、非喫煙群と喫煙群の間にメチル化率の差の統計的検定を行った結果を図1に示す。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結果を図2に示す。*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た。

質問表による喫煙曝露とADHD疑い群との関連を検討するための分割表を表1に示す。この分割表における喫煙曝露による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疑い群の関連を検討するための分割表を表2に示す。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(図3)。

D. 考察

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(Morales E et al., 2016, Joubert BR et al., 2016, Küpers LK et al., 2015)。*AHRR*, *MYO1G*, *GF11*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。考えられる理由は以下の通りである。1つ目に450K網羅的解析の偽陽性である。統計的有意差があるとはいえその変化は数%と微妙であることから偽陽性であった可能性が考えられる。2つ目に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。3つ目に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によるメチル化解析において、サンプル間でカバレージ数がばらついてしまったことから外れ値が多くなってしまったことが考えられる。バイサルファイトDNAを使用する場合、PCR増幅長を短く設計することによりシーケンス効

率が上がることも考えられるため、今後はプライマーの再設計、PCR 増幅長を短くして検討していく予定である。

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

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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*. 2018; 8: 5654.

2. 学会発表

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. Tran NQV, Miyake K. Neurodevelopmental Disorders and Environmental Toxicants: Epigenetics as an Underlying Mechanism. *Int J Genomics*. 2017; 2017: 7526592.
2. Melchior M, Hersi R, et al. Maternal tobacco smoking in pregnancy and children's socio-emotional development at age 5: The EDEN mother-child birth cohort study. *Eur Psychiatry*. 2015; 30(5): 562-8.
3. Joelsson P, Chudal R, et al. Prenatal smoking exposure and neuropsychiatric comorbidity of ADHD: a finnish nationwide population-based cohort study. *BMC Psychiatry*. 2016; 16: 306.
4. Zhu J, Zhang X, et al. Prenatal nicotine exposure mouse model showing hyperactivity, reduced cingulate cortex volume, reduced dopamine turnover, and responsiveness to oral methylphenidate treatment. *J Neurosci*. 2012; 32(27): 9410-8.
5. Yochum C, Doherty-Lyon S, et al. Prenatal cigarette smoke exposure causes hyperactivity and aggressive behavior: role of altered catecholamines

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

- and BDNF. *Exp Neurol.* 2014; 254: 145-52.
6. Morales E, Vilahur N, et al. Genome-wide DNA methylation study in human placenta identifies novel loci associated with maternal smoking during pregnancy. *Int J Epidemiol.* 2016; 45(5): 1644-1655.
7. Joubert BR, Felix JF et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet.* 2016; 98(4): 680-96.
8. Küpers LK, Xu X et al. DNA methylation mediates the effect of maternal smoking during pregnancy on birthweight of the offspring. *Int J Epidemiol.* 2015; 44(4): 1224-37.

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

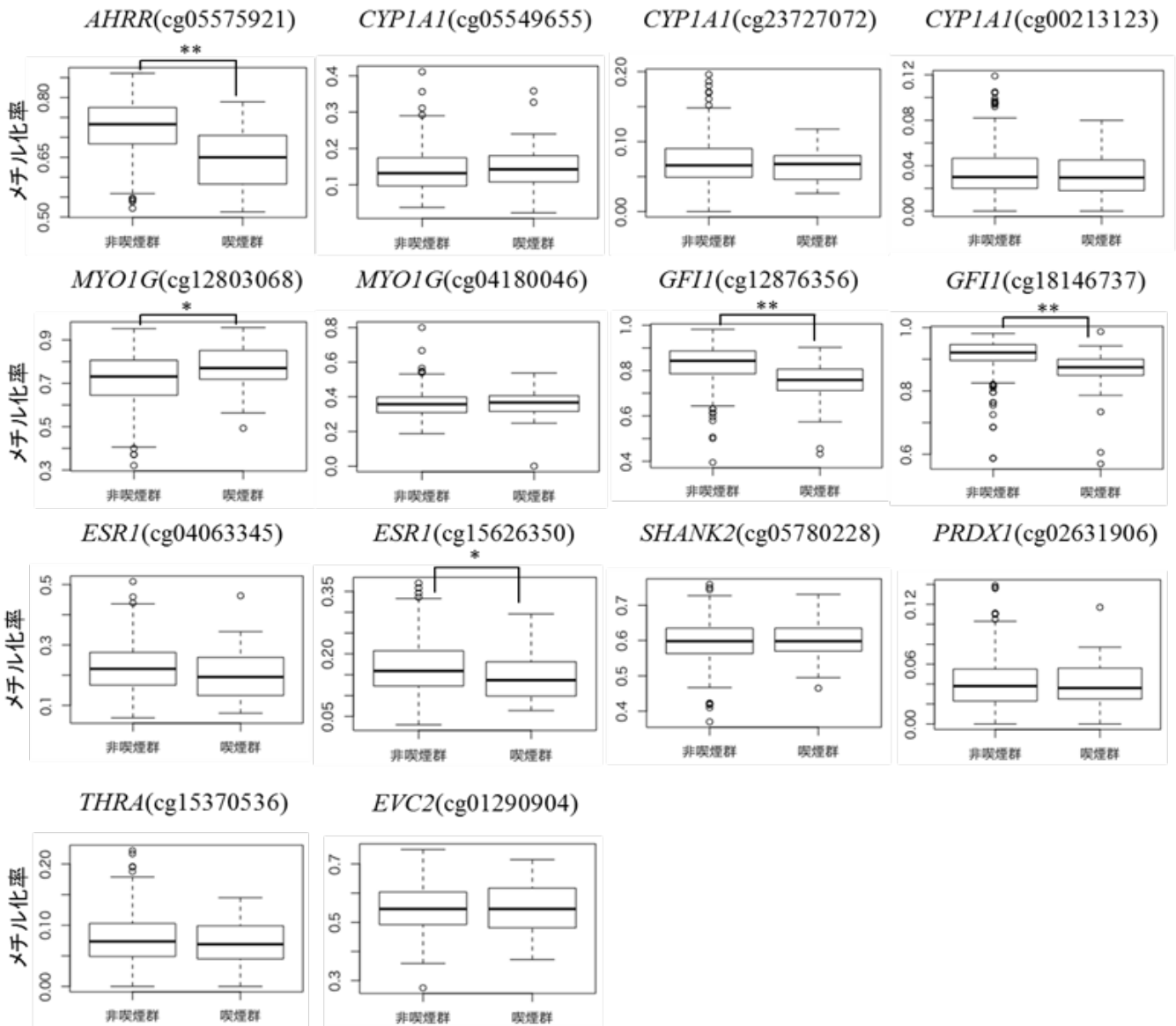


図 1. 質問票による群別化 (非喫煙群、喫煙群) における DNA メチル化率比較. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

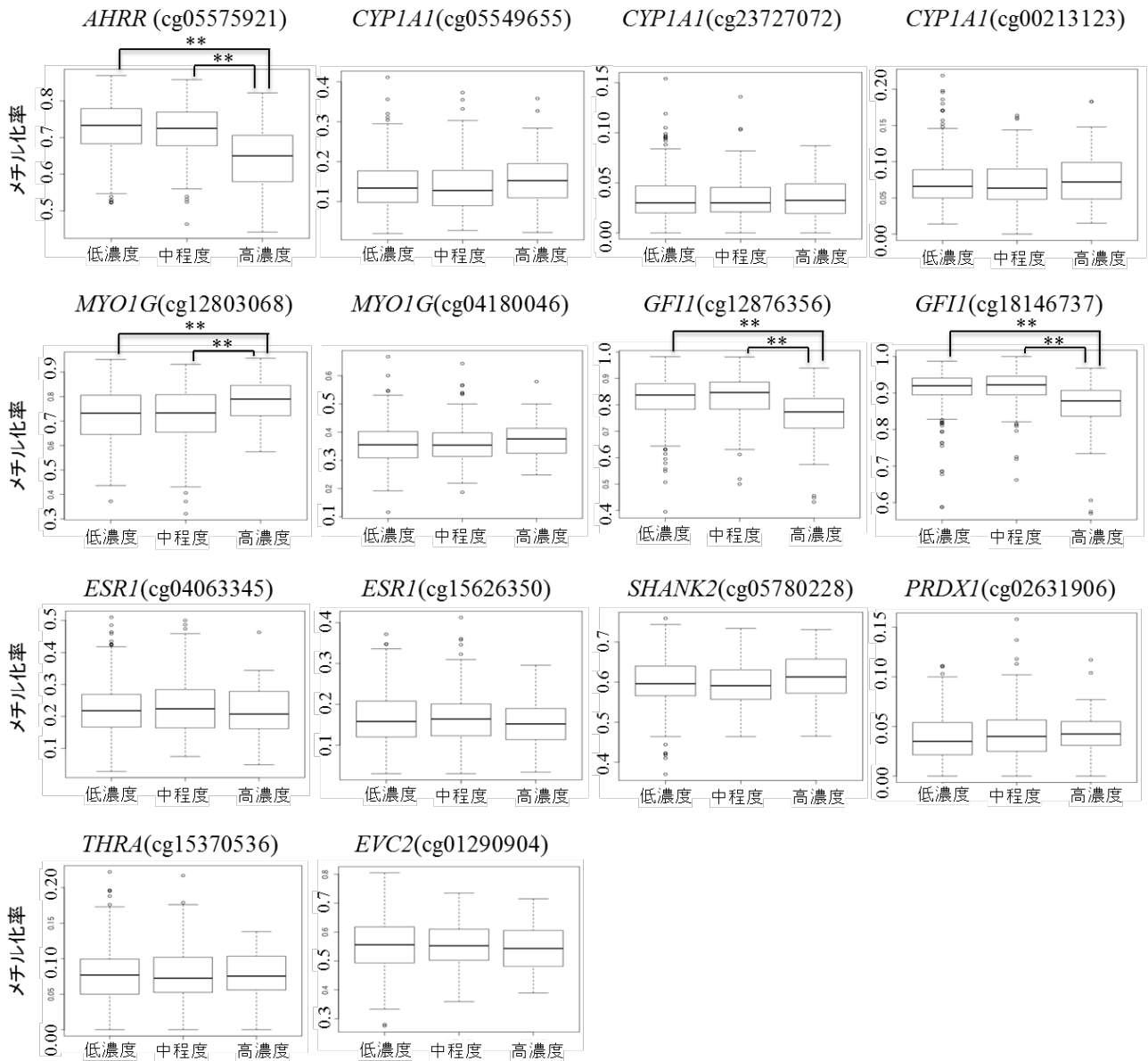


図 2. コチニン濃度による群別化 (低濃度群、中程度濃度群、高濃度群) における DNA メチル化比較. (**P<0.01)

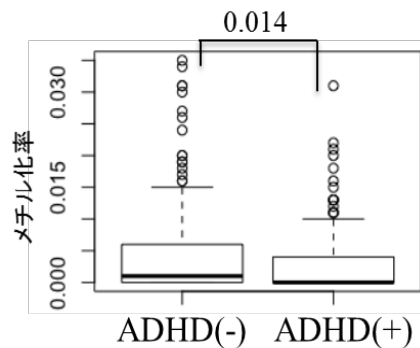


図 3. コントロール群(ADHD(-))、ADHD 疑い群(ADHD(+))における *CYP1A1* の 1CpG のメチル化比較

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

表1. 質問票による喫煙曝露とADHD疑い群の分割表

	対照群	ADHD(疑い)	合計
非喫煙群	164	112	276
喫煙群	19	19	38
合計	183	131	314

表2. コチニン濃度による喫煙曝露とADHD疑い群の分割表

	対照群	ADHD(疑い)	合計
低濃度群	157	105	262
中程度群	105	95	200
高濃度群	24	24	48
合計	286	224	510

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miura R, Araki A, Minatoya M, <i>et al.</i>	An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylations reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A	Sci Rep.			Under revision
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	doi:10.1136/bmjopen-2018-023200		2019
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
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
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
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
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	1-14	2018
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

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	DOI: 10.1002/ajhb.23127		2018
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
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
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
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
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
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
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	doi:10.3390/ijerph15020369		2018
Minatoya M, Araki A, Miyashita C, <i>et al.</i>	Association between prenatal bisphenol A and phthalate exposures and <i>fet al</i> metabolic related biomarkers: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health	Environ Res	161	505-511	2018

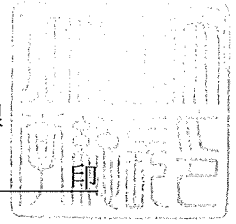
Minatoya M, Itoh S, Yamazaki K, <i>et al</i>	Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and behavioral problems in children at preschool age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health	Environtal Health and Preventive Medicine	23	43	2018
--	---	---	----	----	------

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職 名 総長職務代理

氏 名 笠原 正典



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 環境健康科学研究教育センター・特別招へい教授
(氏名・フリガナ) 岸 玲子・キシ レイコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

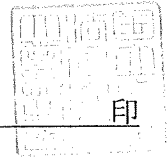
平成31年1月24日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿

機関名 山梨大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 島田 眞路



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 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 (H29-化学一般-002)
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院総合研究部医学域・准教授
(氏名・フリガナ) 三宅 邦夫・ミヤケ クニオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	山梨大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	山梨大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職 名 総長職務代理

氏 名 笠原 正典

印

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 獣医学研究院・教授
(氏名・フリガナ) 石塚 真由美・イシヅカ マユミ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

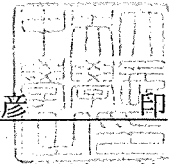
2019年3月11日

厚生労働大臣 殿

機関名 中央大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 福原 紀彦



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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 (H29-化学一般-002)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 保健センター・常勤嘱託医師
(氏名・フリガナ) 佐田 文宏・サタ フミヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

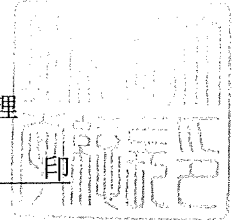
(留意事項) ・該当する口をチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職 名 総長職務代理

氏 名 笠原 正典



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 環境健康科学研究教育センター・准教授
(氏名・フリガナ) 荒木 敦子・アラキ アツコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

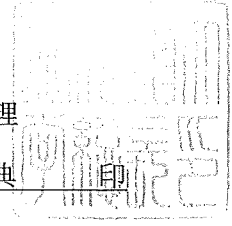
(留意事項) ・該当する口をチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職 名 総長職務代理

氏 名 笠原 正典



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 環境健康科学研究教育センター・特任准教授
(氏名・フリガナ) 宮下 ちひろ・ミヤシタ チヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

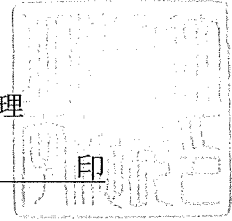
(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職名 総長職務代理

氏名 笠原 正典



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 環境健康科学研究教育センター・特任講師
(氏名・フリガナ) 伊藤 佐智子・イトウ サチコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

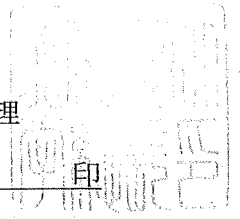
(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職 名 総長職務代理

氏 名 笠原 正典



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 環境健康科学研究教育センター・特任講師
(氏名・フリガナ) 山崎 圭子・ヤマザキ ケイコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

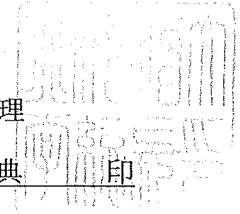
(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職 名 総長職務代理

氏 名 笠原 正典 印



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 環境健康科学研究教育センター・特任助教
(氏名・フリガナ) 三浦 りゅう・ミウラ リュウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

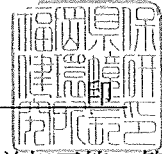
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 福岡県保健環境研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 香月 進



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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 (H29-化学一般-002)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 保健科学部生活化学課長
(氏名・フリガナ) 堀 就英 (ホリ ツグヒデ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学、福岡県保健環境研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

31年1月24日

厚生労働大臣 殿

機関名 **いであ株式会社**

所属研究機関長 職名 代表取締役社長 **細田昌広**

氏名 _____ 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 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 (H29-化学-一般-002)
- 研究者名 (所属部局・職名) 海外事業戦略室 環境創造研究所・常務取締役 海外事業戦略室室長 環境創造研究所長
(氏名・フリガナ) 松村徹・マツムラトオル

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由：別紙添付)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：北海道大学)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職名 総長職務代理

氏名 笠原正典 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 農学研究院・教授
(氏名・フリガナ) 松浦 英幸・マツウラ ヒデユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

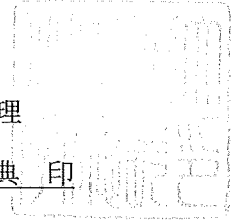
(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 北海道大学

所属研究機関長 職名 総長職務代理

氏名 笠原 正典 印



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学研究院・教授
(氏名・フリガナ) 篠原 信雄・シノハラ ノブオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	北海道大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 30 年 7 月 3 日

いであ株式会社・環境創造研究所
常務取締役・所長 松村 徹 様

理事・副学長
利益相反審査会会長
笠原 正典

平成 30 年度 AMED 事業及び厚生労働科学研究における
利益相反の審査結果について（通知）

標記のことについて、北海道大学利益相反マネジメント室で確認した結果、下記の研究
課題について利益相反に抵触するところはないと判断したので、お知らせいたします。

今後とも自己申告書の提出等ご協力方よろしく申し上げます。

記

課題番号：H29-化学一般-002

研究課題：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

区分：研究分担者

H30-33

※担当

研究推進部 産学連携課

利益相反・安全保障輸出管理担当

内線：9197

E-mail：sangaku@research.hokudai.ac.jp

平成 30 年 4 月 2 日

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
「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」と
いであ株式会社との関連について

いであ株式会社は、本研究事業の研究分担者・松村徹の所属先であり、社会インフラ整備、および、環境分野のコンサルタント事業を行っている企業である。

私は、いであ株式会社の常務取締役であり、経営当事者意識向上を目的として、弊社の公開株式を 2,000 株所有している。

本研究は、複合的な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ヒトで実験的に明らかにすることにより次世代影響の試験法の開発に資することである。

私は研究分担者として、弊社が所有する LC/MS/MS を用いて、生体試料中の微量 BPA の測定方法の開発を行い、その成果を研究代表者に報告する。分析結果は、本研究にのみ必要なデータであり、弊社の直接的な利益を得るものではない。

また、私は弊社の株式を所有することにより、年 4 回配当の利益を得るが、それは本研究の研究分担者であることに起因するものではない。

なお、研究分担金については、新たに預金口座を開設し分担金を入金しており、弊社の経費とは完全に切り分けて執行・管理している。

いであ株式会社
環境創造研究所
松村 徹