

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

令和元年度 総括・分担研究報告書

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

北海道大学大学院獣医学研究院毒性学教室

中央大学保健センター

北海道大学環境健康科学研究教育センター

北海道大学環境健康科学研究教育センター

北海道大学環境健康科学研究教育センター

北海道大学環境健康科学研究教育センター

北海道大学環境健康科学研究教育センター

福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課

いであ株式会社

北海道大学大学院農学研究院生物有機化学研究室

北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室

三宅 邦夫

石塚真由美

佐田 文宏

荒木 敦子

宮下ちひろ

伊藤佐智子

山崎 圭子

三浦りゅう

堀 就英

松村 徹

松浦 英幸

篠原 信雄

令和2(2020)年 5月

## 目 次

. はじめに .....	1
. 総括研究報告書	
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. 異性体を含めたヒト生体試料中 Diisononyl phthalate (DiNP) 代謝物の定 性・定量	
岸 玲子, 松村 徹, 荒木 敦子, 伊藤 佐智子 .....	16
2. フタル酸エステル類( DEHP )胎児期曝露による臍帯血 DNA メチル化の網羅 的解析と出生時体格との関連	
岸 玲子, 三浦 りゅう, 荒木 敦子, 松浦 英幸, 篠原 信雄 .....	26
3. 人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析ならびに測定方法の開 発	
岸 玲子, 堀 就英, 山崎 圭子 .....	48
4. 母体血中ダイオキシン類と臍帯血中網羅的メチル化解析の関連	
岸 玲子, 宮下 ちひろ, 堀 就英, 三浦 りゅう .....	55
5. 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 .....	64
. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	72

## 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おらず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 20,926 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。

令和 2 年 5 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妊娠初期血清 1786 検体を用いて代謝物であるフタル酸モノエステル類 ( cx-MiNP ) の再分析を実施した。DiNP は他のフタル酸エステル類と異なり、化合物そのものが DiNP-1 と DiNP-2 および DiNP-3 の異性体の混合物であることが知られている ( European Union Commission, 2003 )。そのため製品を通して曝露した DiNP の

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

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

2018 度から継続した研究で、次世代シーケンサーを実施した ADHD ケース・サブコホート 1263 名に解析対象を拡大した結果、妊娠後期コチニン濃度で分類した 3 群のうち、能動喫煙群で 6 歳 ADHD 傾向の有意な増加が認められた。コチニン 3 群における一元配置分散分析の結果 AHRR は 5CpGs, CYP1A1 は 6CpGs, MYO1G は 20CpGs, GF11 は 21CpGs で有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めたが、ESR1 は全ての CpGs で有意差が認められなかった。ロジスティック回帰分析の結果、6 歳 ADHD 傾向と出産歴 (OR = 0.51; 95% CI [0.34, 0.76]), 世帯年収 (OR = 0.39; 95% CI [0.25, 0.60]), 能動喫煙 (OR = 2.51; 95% CI [1.32, 4.75]) と有意な関連が認められた。妊婦 (能動) の喫煙と ADHD 疑いの関連において AHRR のメチル化の媒介 (mediation) を分析した結果、AHRR の CpG\_34 は間接効果の傾向が見られ、CpG\_57 は有意に間接効果が認められた。妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。

<研究分担者>

三宅 邦夫  
山梨大学大学院総合研究部医学域  
社会医学講座，准教授  
石塚 真由美  
北海道大学大学院獣医学研究院毒性  
学教室，教授  
佐田 文宏  
中央大学保健センター，医療管理者  
荒木 敦子  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任准教授  
宮下 ちひろ  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任准教授  
伊藤 佐智子  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任講師  
山崎 圭子  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任講師  
三浦 りゅう  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任助教  
堀 就英  
福岡県保健環境研究所保健科学部 課  
長  
松村 徹  
いであ株式会社，常務取締役  
松浦 英幸  
北海道大学大学院農学研究院生物有  
機化学研究室，教授  
篠原 信雄  
北海道大学大学院医学研究院腎泌尿  
器外科学教室，教授

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

## 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

ステムとして、多くの研究に使用されている (EHP 2017)。

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

本研究は、種々の環境化学物質曝露による次世代の多様な疾病エンドポイントへの影響を解明するために、網羅的エピゲノム解析により、化学物質がエピゲノム変化を介して影響する新規の毒性メカニズムを遺伝的差異や多様なライフスタイルをもつヒト集団で明らかにし、次世代影響の試験法の開発に資する。具体的には、1) *IGF2/H19*, *LINE1* のターゲット CpG メチル化解析により、環境化学物質曝露が児のメチル化変化に影響を及ぼすことを示したが、曝露により影響を受ける次世代の多様な疾病エンドポイントに対応した様々なメチル化変化が起こっていると考えられる。そこで、エピゲノム網羅的メチル化解析により、環境化学物質

曝露に起因するメチル化変化を同定し、どのような機能を持つ遺伝子・経路が影響を受けるかを明らかにする。2) 網羅的 DNA メチル化解析はスクリーニング法であり、また、データの複雑性から偽陽性を抽出してしまう可能性もあることから、解析結果の妥当性検証が必須である。そこで、次世代シーケンサーによる多サンプルのメチル化検証法を確立し、さらに、海外のコホートとの共同研究により検証の効率化を図る。3) それぞれの化学物質曝露に起因するメチル化変化がどの健康影響に関与するのか、その影響の何% (介在の大きさ) をメチル化変化で説明できるのかを介在解析 (Mediation analysis; Int J Epidemiol 2016) で明確にする。4) 遺伝子多型 (SNPs) の影響を母児ペアで検討し、遺伝的差異を背景にもつヒト集団でのメチル化変化を明らかにする。

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

## B . 研究方法

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

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

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

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

リクルート時調査票・出産時カルテ情報・母体血中 MEHP (DEHP の一次代謝物) 濃度がそろった北海道スタディ札幌コホートの 203 母児ペアを対象とした。MEHP 濃度は GC-MS で測定した。約 45 万 CpGs の臍帯血 DNA メチル化データは 450K (イルミナ社) により取得し, 標準化後, バッチ間の補正を行った。メチル化値と自然対数変換した MEHP 濃度との関連を, 母の年齢, 出産前 BMI, 教育歴, 採血時期, 妊娠中喫煙, 児の性別, 在胎週数, および, メチル化値から推定した細胞組成値 (Bakulski et al. 2016) で調整した robust linear regression (Fox and Weisberg 2011), 経験ベイズ法 (Smyth 2004) により解析した。さらに, KEGG pathways (Kanehisa et al. 2002) を用いた Gene Ontology (GO) 解析を行った。また, GO 解析で明らかになった代謝系に関わる遺伝子のメチル化と出生時のポンド

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

## 3. 人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析ならびに測定方法の開発

2002 ~ 2012 年に北海道内の医療機関を受診し, 調査の同意を得た妊産婦 85 名について, 分娩時に臍帯血を採取して調査試料とした。採取後の臍帯血は密閉可能な容器に移され, 北海道大学で冷凍保存された。測定は福岡県保健環境研究所で実施した。

臍帯血の抽出には高速溶媒抽出装置 ASE-350 (Thermo 製) を使用した。冷凍状態の臍帯血試料を室温で解凍し, その約 6 g を ASE-350 用の抽出セルに秤量した。凍結乾燥を行った後, クリーンアップスパイクを添加し, 抽出溶媒にアセトン/ヘキサン (1:3, v/v) を用いて抽出した。得られた抽出液を減圧濃縮し, 風袋を量った秤量瓶に移して乾燥し, 脂肪重量を測定した。

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

ダイオキシン類及び PCBs 濃度は脂肪重量あたりの濃度 (lipid weight basis) または全血重量あたりの濃度 (whole blood weight basis) で表記した。ダイオキシン類濃度 (pg/g) の 2,3,7,8-TCDD 毒性当量

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

#### 4. PCB/dioxin と網羅的メチル化解析

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

#### 5. 次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析と ADHD の関連

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

#### (倫理面への配慮)

本調査は北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科、福岡県保健環境研究所、山梨大学の倫理委員会、遺伝子解析審査小委員会および共同研究施設の倫理規定に従って実施し、インフォームド・コンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮し、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。福岡県保健環境研究所は臍帯血試料と試料リストを取り扱う。生体試料が入った容器及び試料リストには、研究代表者によって匿名化された ID のみを記載した。すべての実験・研究は、北海道大学

院医学研究科で規定されている「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従い、本研究は倫理面の十分な配慮のうえ行った。

## C . 研究結果

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

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

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

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

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

### 3 . 人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析ならびに測定方法の開発

臍帯血試料 ( 85 検体 ) の抽出脂肪量 ( 含量 ) は、臍帯血重量あたり平均 0.26% ( 範囲 0.17% ~ 0.35% ) であった。当研究所における過去の分析事例や他の報告事例と同等の脂肪含量が得られた。

臍帯血 85 例のダイオキシン類濃度 ( Total TEQ ) は、平均 5.5 pg/g lipid ( 範囲 2.9 ~ 28 pg/g lipid ) であった。全血重量あたりの濃度に換算した Total TEQ 値は、平均 0.014 pg/g whole ( 範囲 0.0085 ~ 0.046 pg/g whole ) であった。

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

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

#### 4. PCB/dioxin と網羅的メチル化解析

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

#### 5. 次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析と ADHD の関連

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

喫煙群, 能動喫煙群のトレンド p 値は 0.025 と有意であった。

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

#### D. 考察

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

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

また, total 体の定性については Q1/Q2<sub>sample</sub> が Q1/Q2<sub>RM</sub> より求めた基準範囲 (上限: Q1/Q2<sub>RM</sub> × 1.3, 下限: Q1/Q2<sub>RM</sub>

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

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

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

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

また、代謝系に加え、シグナル伝達、内分泌系などに関連する遺伝子のメチル

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

## 3. 人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析ならびに測定方法の開発

福岡県保健環境研究所では 2009~2011 年度に福岡県内在住の妊産婦(29 名、平均年齢 32.0 才)を対象に臍帯血中のダイオキシン類(mono-ortho PCB を除く 21 化合物)濃度を測定している。本分担研究と福岡県調査の結果比較では、ともに初産及び出産 2 回目の妊産婦に該当する測定値のみを抽出して行った。本調査研究では出産歴不明の 1 名を除く 84 例、福岡県調査では 29 例中 26 例のデータを用いた。両集団の平均年齢はともに 32 歳で同等であった。上記の条件でダイオキシン類濃度(mono-ortho PCB を除く 21 化合物、Total TEQ)を比較した結果、本分担研究で平均 5.3 pg/g lipid (範囲 2.8~27 pg/g lipid)、福岡県調査では平均 6.5 pg/g lipid (範囲 3.1~18 pg/g lipid)となり、両集団間で顕著な差は認められなかった。

臍帯血中の PCBs 濃度については、過去に環境省の調査事例(1999~2004 年)がある。これによると、臍帯血 49 例中の Total PCBs 濃度は平均 81 ng/g lipid (範囲 30~390 ng/g lipid)であり、全血重量あたりでは平均 98 pg/g whole (範囲 25~460 pg/g whole)であった。本研究で測定した臍帯血 85 例の Total PCB 濃度は過去の分析事例と比較して低い傾向を示した。

## 4. PCB/dioxin と網羅的メチル化解析

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

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

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

#### 5 次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析と ADHD の関連

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

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

#### **E . 結論**

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

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

サンプルサイズを拡大することで妊娠中の喫煙による児の ADHD リスクの増加を明らかにした。次世代シーケンサーを用いた特異的遺伝子領域の DNA メチル化解析により、妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。将来的に、化学物質曝露に誘引される DNA メチル化変化がどのアウトカムに影響するかを介在の大きさを含めて明らかにし、胎児期の化学物質曝露と成長後の疾病発現をつなぐ分子メカニズムとして、エピゲノム試験法開発につなげる。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表 (原著・総説 査読有)

- 1) Araki A., Ait Bamai Y., Bastiaansen M., Vanden Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Miyashita C., Itoh S., Goudarzi H., Konno S., Covaci A., Kishi R.; Combined exposure to phthalate esters and phosphate flame retardants and plasticizers and their associations with wheeze and allergy symptoms among school children. *Environmental Research*. 183, 109212, 2020
- 2) Kashino I., Sasaki S., Okada E., Matsuura H., Goudarzi H., Miyashita C., Okada E., Ito Y. M., Araki A., Kishi R.; Prenatal exposure to 11 perfluoroalkyl substances and fetal growth: A large-scale, prospective birth cohort study. *Environment International*. 136, 105355, 2020
- 3) Miura R., Araki A., Minatoya M., Miyake K., Chen M.-L., Kobayashi S., Miyashita C., Yamamoto J., Matsumura T., Ishizuka M., Kubota T., Kishi R.; An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylation reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A. *Scientific Report*. 2019.
- 4) Itoh S., Araki A., Miyashita C., Yamazaki K., Goudarzi H., Minatoya M., Ait Bamai Y., Kobayashi S., Okada E., Kashino I., Yuasa M., Baba T., Kishi R.; Association between perfluoroalkyl substance exposure and thyroid hormone/thyroid antibody levels in maternal and cord blood: The Hokkaido Study. *Environment International*. 133, Part A, 2019.
- 5) Minatoya M., Araki A., Itoh S., Yamazaki K., Kobayashi S., Miyashita C., Sasaki S., Kishi R.; Prenatal tobacco exposure and ADHD symptoms at pre-school age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 24, Article number 74, 2019.
- 6) Ait Bamai Y., Bastiaansen M., Araki A., Goudarzi H., Konno S., Ito S., Miyashita C., Yao Y., Covaci A., Kishi R.; Multiple exposures to organophosphate flame retardants alter urinary oxidative stress biomarkers among children: The Hokkaido Study.

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

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

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

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

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 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 特任准教授  
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

ヒト生体試料中の Diisononyl phthalate (DiNP) の代謝物について、これまでの分析法では 4-メチルオクチル側鎖構造の代謝物のみを対象に分析していたが、これは DiNP 曝露を過小評価する可能性がある。DiNP のヒト曝露実態の把握および健康影響との関連を検討するうえでは、4-メチルオクチル側鎖を有する DiNP 代謝物だけでなく、その他の異性体も含めた定性・定量を行うことが重要である。本研究では、4-メチルオクチル側鎖構造以外の異性体を含む定量方法について検討し、定量イオンおよび確認イオンのクロマトグラムについて同様のパターンが得られる範囲を全異性体の検出範囲とし、ヒト血清 1,786 検体および尿 232 検体を対象に、Mono-carboxy-isononyl phthalate (cx-MiNP；血清，尿)，Mono-isononyl phthalate (MiNP；尿)および Mono-hydroxy-isononyl phthalate (OH-MiNP；尿)について定量した。

血清および尿検体について、それぞれ対象化合物の 4-メチルオクチル側鎖構造のみ (*single*)、全異性体 (*total*) での中央値濃度および検出率を比較した。血清試料では、cx-MiNP の中央値濃度はいずれも検出下限値 (MDL) 未満であったが、検出率は、*single* が 0.39% に対し、*total* は 22% であった。一方、尿試料においては、各 *single* 体の平均濃度は全て MDL 未満であったのに対し、*total* 体では全項目とも MDL 以上 (*total*-MiNP；0.59 ng/mL，*total*-OH-MiNP；1.7 ng/mL，*total*-cx-MiNP；1.2 ng/mL) であった。特に *total*-OH-MiNP，*total*-cx-MiNP の検出率は高く、それぞれ 92%，97% であった。これらの結果より、ヒト生体試料に含まれる DiNP 代謝物は 4-メチルオクチル側鎖構造以外のものが主であることが確認された。

現在のところ、DiNP 代謝物全異性体の標準物質は市販されておらず、化学合成を行うには膨大な費用が掛かる。従って、LC-MS/MS を用いて DiNP 代謝物全異性体を分離し、全ての異性体を正確に定性・定量することは困難である。本研究の手法を用いて各 *total* 体を再定量した結果、定量下限値 (MQL) 以上であれば凡そ正確な定性が可能であることが確認できた。一方で、尿試料中 *total*-MiNP，*total*-OH-MiNP については試料前処理や測定での夾雑物の除去・分離改善、対象化合物の選択性向上などが課題となった。今後、将来的にラウンドロビン試験などにおいて DiNP 代謝物が対象化合物として加わった際には、試験に参加し本定量法の妥当性を検証する必要がある。

### 研究協力者

小野田 優 (いであ株式会社 環境創造研究所，主査研究員)，アイツバマイ ゆふ (環境健康科学研究教育センター，特任講師)

### A．研究目的

DiNP はフタル酸エステル的一种であり、フタル酸エステルはポリ塩化ビニル (PVC) を主成分とするプラスチック

の可塑剤として使用される化学物質である。DiNPは無水フタル酸とイソノニルアルコールのエステル化によって製造されるが、その化学構造は原料として用いるイソノニルアルコールによって異なる。イソノニルアルコールは種々の分岐アルコール異性体の混合物であるため、DiNPについても同様の炭素鎖異性体が存在することが報告されている<sup>[1]</sup>。

DiNPはヒト体内に吸収された後、エステル加水分解によりモノエステルであるMiNPに代謝される（一次代謝物）。さらにMiNPは酸化または-1酸化によりそれぞれcx-MiNPやOH-MiNPとなり（二次代謝物）、これら代謝物についても異性体の存在が推測される<sup>[1]</sup>。

一方、過去の研究ではイソノニルアルコールの組成として4-メチルオクタノールの割合が多いことが報告されている<sup>[2-4]</sup>。その後、4-メチルオクチル側鎖を有するDiNP代謝物の標準物質が製造され、多くの研究が当該標準物質を用いて定性・定量を行っている。過去、我々も同様に4-メチルオクチル側鎖構造のDiNP代謝物のみを対象に多くのヒト生体試料を分析した。しかし、DiNPのヒト曝露の実態を正確に把握するためには、4-メチルオクチル側鎖を有するDiNP代謝物だけでなく、その他の異性体も含めて定性・定量を行うことが重要である。

今年度の研究では、過去に分析したヒト血清試料1,786検体および尿試料232検体を対象に、異性体を含めたcx-MiNP、MiNPおよびOH-MiNPの定性方法を検討し、各代謝物の総量を求めた。

## B．研究方法

高速液体クロマトグラフ タンデム

質量分析計（LC-MS/MS）のProduct ion Scanモードによって得たOH-MiNP（Precursor ion：m/z 307）のproduct ion spectrumを図.1に示す。Product ion scanは、市販されているMono(4-methyl-7-hydroxyoctyl) phthalate（4-メチルオクチル側鎖を有するOH-MiNP）の標準物質（Mono-(4-methyl-7-hydroxyoctyl) phthalate 100 µg/mL in MTBE；CIL社）を用いて確認した。得られた結果より、m/z 121や77のフラグメントが強い強度で確認された。各フラグメントの質量数から、それらの構造は安息香酸部およびベンゼン部であることが明らかとなり、これらのフラグメントは、異性体共通で発生すると考えられた。すなわち、OH-MiNPのモニターイオンをm/z 307>121（定量イオン：Q1）、307>77（確認イオン：Q2）とした場合、それぞれは同様のクロマトグラムパターンであり、これらは全異性体に共通して確認できると推測される。同様のクロマトグラムパターンが得られる範囲を全異性体の検出範囲とし、Mono(4-methyl-7-hydroxyoctyl) phthalateの標準物質を用いた同位体希釈法により、異性体を含む総OH-MiNPを定量した（図.2）。cx-MiNP、MiNPについても確認し、同様の手法で定量することとした。

各total体の定性は、検量線試料および実試料のQ1とQ2のピーク面積比（ $Q1/Q2_{RM}$ 、 $Q1/Q2_{sample}$ ）を算出して確認した。検量線試料は各single体の標準物質を用いて調製した。

（倫理面への配慮）

本調査は北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科の倫理規定に従って実施した。分析対象者のリストは、研究代表者に

よって匿名化された ID のみを記載した。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科で規定されている「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従い、本研究は倫理面の十分な配慮のうえ行った。

### C. 研究結果と考察

過去に分析したヒト血清試料（1,786 検体）および尿試料（232 検体）を対象に、異性体を含む DiNP 代謝物濃度を算出した。対象項目は cx-MiNP（血清、尿）、MiNP（尿）および OH-MiNP（尿）とした。各媒体における検出率、平均値およびパーセントイルを表.1 に示す。

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

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

また、*total* 体の定性については

$Q1/Q2_{\text{sample}}$  が  $Q1/Q2_{\text{RM}}$  より求めた基準範囲（上限： $Q1/Q2_{\text{RM}} \times 1.3$  , 下限： $Q1/Q2_{\text{RM}} \times 0.7$ ）内であるかどうかで確認した（表 2 および図 3~6）。ここでは、MDL または MQL 以上の検体を対象とした。血清試料中 *total*-cx-MiNP では、基準範囲内であった検体数の割合が MDL 以上で 65% , MQL 以上で 89% であった。尿試料中 *total*-MiNP , *total*-OH-MiNP および *total*-cx-MiNP では、MDL 以上でそれぞれ 9.6% , 51% , 76% , MQL 以上で 50% , 51% , 78% であった。両媒体の *total*-cx-MiNP については MQL 以上の検体であれば、おおよそ定性確認の基準範囲内であると考えられた。

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

ヒト生体試料中の DiNP 代謝物の分析について、*single* 体のみを定量することは DiNP ばく露を過小評価する可能性があり、*total* 体の濃度レベルも同時に把握することが重要であると考えられる。

今後、将来的にラウンドロビン試験などにおいて DiNP 代謝物が対象化合物として加わった際には、試験に参加し再定量法の妥当性を検証する必要がある。

### D. 結論

本研究では、DiNP 代謝物の再定量の必

要性について検討し，ヒト血清 1,786 検体および尿 232 検体を対象に，異性体を含む *cx*-MiNP（血清および尿），MiNP（尿），OH-MiNP（尿）について定量した。再定量後，全ての代謝物について検出率および中央値濃度が増加し，健康影響との関連について統計解析に用いることが可能となった。本研究の手法を用いて各 *total* 体を再定量した結果，定量下限値（MQL）以上であれば凡そ正確な定性が可能であることが確認できた。一方で，尿試料中 *total*-MiNP，*total*-OH-MiNP については試料前処理や測定での夾雑物の除去・分離改善，対象化合物の選択性向上などが課題となった。今後は，他機関と協力した DiNP 代謝物分析精度の検証や，将来的に DiNP 代謝物がラウンドロビン試験に加わった際には，試験に参加し本研究の分析法の妥当性を検証する必要がある。

## E．研究発表

### 1.論文発表

該当なし

### 2.学会発表

該当なし

## F．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. 器具・容器包装評価書フタル酸ジイソノニル（DINP）2015年9月食品安全委員会 器具・容器包装専門調査会
2. ECPI (1997). European Council for Plasticizers and Intermediates (ECPI), Information letter of D. Cadogan to the Ministère de l'Environnement and to the Institute National de Recherche et

de Sécurité, on the differences between the various DINPs, Brussels, 22 sept. 1997.

3. Hellwig J. et al., Differential prenatal toxicity of one straight-chain and five branched-chain primary alcohols in rats., Food Chem Toxicol. 1997 May ; 35 (5) : 489-500.
4. Koch HM. et al., Determination of secondary, oxidised di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine representative for the exposure to commercial DINP plasticizers, J Chromatogr B. Volume 847, Issue 2, 1 March 2007, Pages 114-125
5. Frederiksen H. 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, J. Anal. Toxicol. 2010, Vol. 34, 400-410

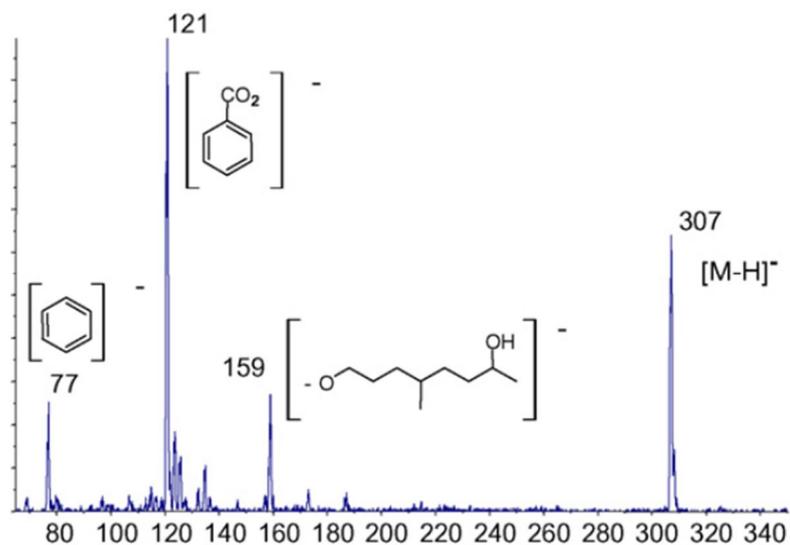


図.1 OH-MiNP の product ion spectrum

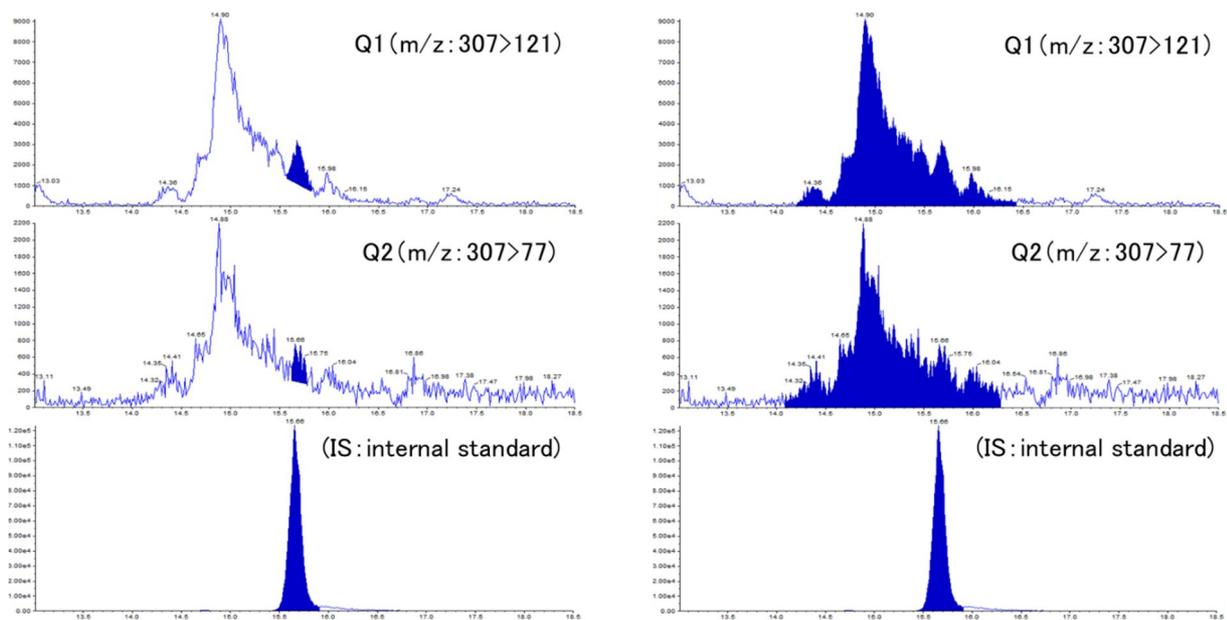


図.2 尿中 OH-MiNP のクロマトグラム  
 （左：従来の定性，右：異性体を含めた定性）

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

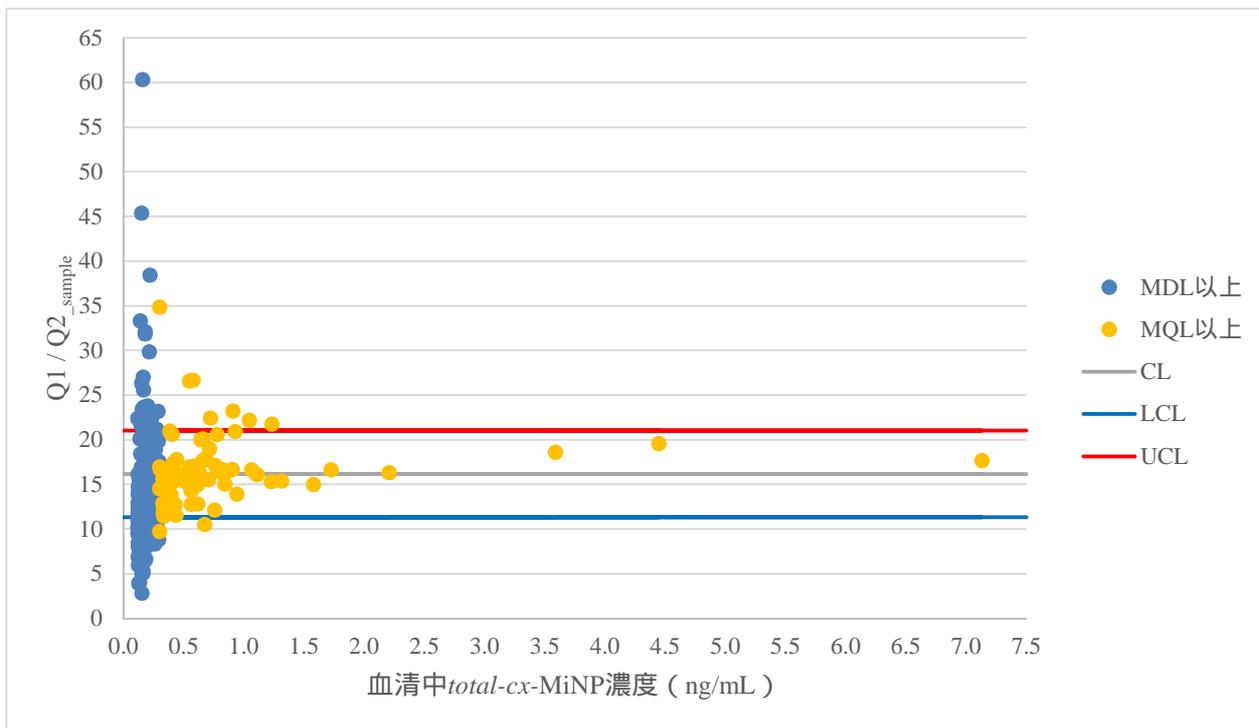


図.3 血清試料中 *total-cx-MiNP* 濃度と  $Q1/Q2_{sample}$  の関係

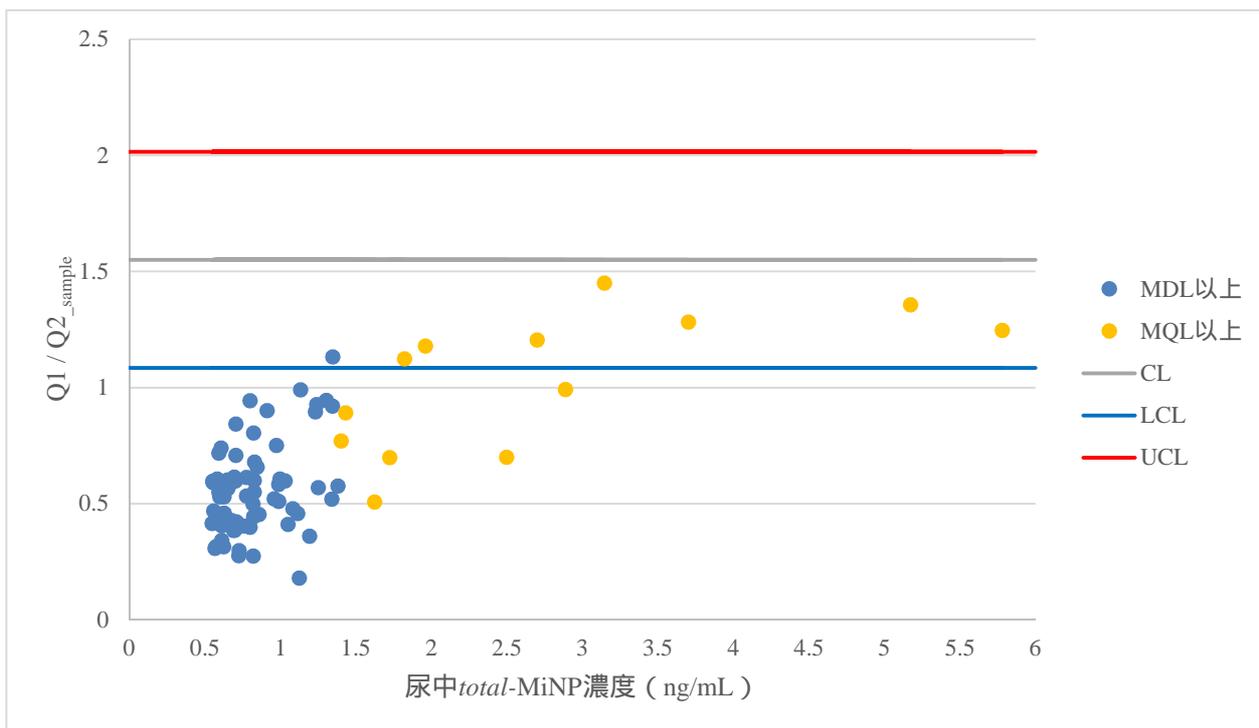


図.4 尿試料中 *total*-MiNP 濃度と  $Q1/Q2_{sample}$  の関係

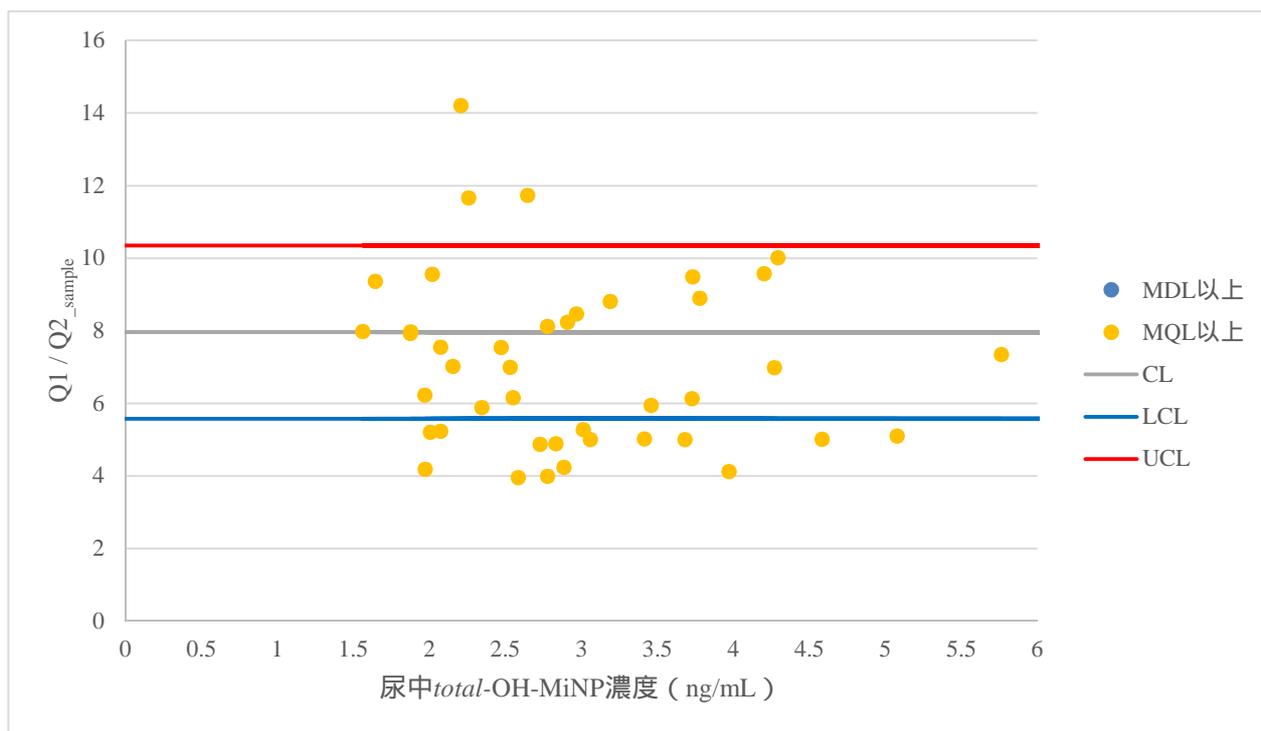


図.5 尿試料中 *total*-OH-MiNP 濃度と  $Q1/Q2_{sample}$  の関係

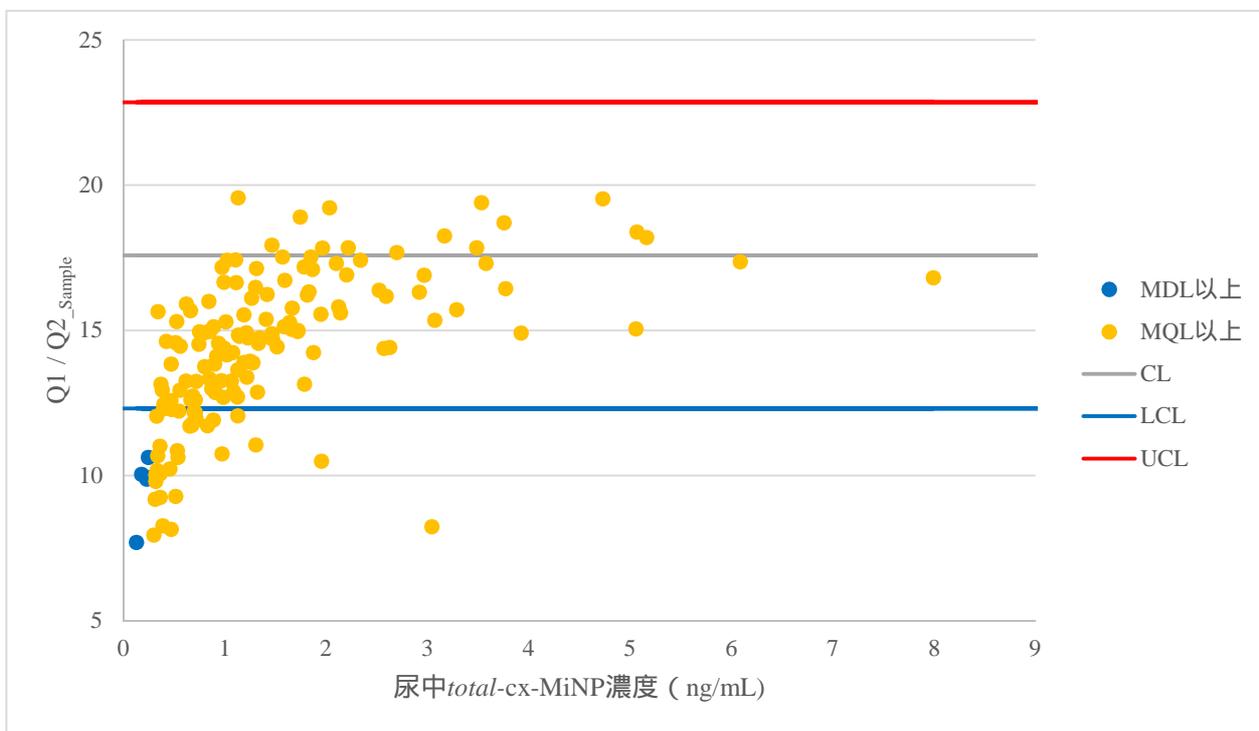


図.6 尿試料中 total-cx-MiNP 濃度と  $Q1/Q2_{\text{sample}}$  の関係

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 ヒト生体試料中 DiNP 代謝物濃度 (ng/mL)

Sample	Analyte	MDL <sup>2)</sup>	Detection		Mean <sup>3)</sup>	Minimum	Percentiles				Maximum
			N	(%)			25th	Median	75th	95th	
Serum (n=1,786)	<i>single-cx</i> -MiNP <sup>1)</sup>	0.12	7	(0.39)	<0.12					<0.12	0.46
	<i>total-cx</i> -MiNP <sup>1)</sup>		384	(22)	<0.12 (0.11)				<0.12	0.27	7.1
	<i>single</i> -MiNP	0.54	0	(0)	<0.54						<0.54
	<i>total</i> -MiNP		93	(40)	0.59			<0.54	0.70	1.4	5.8
Urine (n=232)	<i>single</i> -OH-MiNP	0.21	42	(18)	<0.21 (0.16)				<0.21	0.51	1.3
	<i>total</i> -OH-MiNP		213	(92)	1.7	<0.21	0.48	1.2	2.1	4.8	16
	<i>single-cx</i> -MiNP	0.12	14	(6.0)	<0.12				<0.12	0.12	0.36
	<i>total-cx</i> -MiNP		225	(97)	1.2	<0.12	0.39	0.78	1.4	3.5	13

1) *single*- : 4-メチルオクチル側鎖構造の DiNP 代謝物, *total*- : 異性体を含めた総 DiNP 代謝物

2) Method Detection Limit : 検出下限値

3) MDL 未満の検体については MDL の半値を用いて算出した

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 各 *total* 体の定性結果

判定基準など	血清 (n=1,786)	尿 (n=232)			
	<i>total</i> -cx-MiNP	<i>total</i> -MiNP	<i>total</i> -OH-MiNP	<i>total</i> -cx-MiNP	
MDL (ng/mL)	0.12	0.54	0.21	0.12	
MQL (ng/mL)	0.30	1.4	0.52	0.29	
Q1/Q2 <sub>RM</sub> (CL)	16.2	1.55	7.96	17.6	
Q1/Q2 <sub>RM</sub> × 0.7 (LCL)	11.3	1.09	5.57	12.3	
Q1/Q2 <sub>RM</sub> × 1.3 (UCL)	21.0	2.02	10.3	22.9	
MDL 以上	対象検体数	384	93	213	225
	Q1/Q2 <sub>sample</sub> が算出可能であった検体数 <sup>1)</sup>	384	83	49	156
	基準範囲内であった検体数 <sup>2)</sup>	249	8	25	119
	基準範囲内検体数の割合(%) <sup>3)</sup>	65	9.6	51	76
MQL 以上	対象検体数	81	14	213	151
	Q1/Q2 <sub>sample</sub> が算出可能であった検体数	81	14	49	151
	基準範囲内であった検体数	72	7	25	118
	基準範囲内検体数の割合 (%)	89	50	51	78

1) クロマトグラムおよびピーク形状不良がなく，Q1，Q2 イオンともにピーク面積を算出できた検体数

2) Q1/Q2<sub>sample</sub> 値が LCL ~ UCL の範囲内であった検体数

3) ( 基準範囲内であった検体数 ) / ( Q1/Q2<sub>sample</sub> が算出可能であった検体数 ) × 100

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

フタル酸エステル類（DEHP）胎児期曝露による臍帯血 DNA メチル化の網羅的解析と  
出生時体格との関連

Association between cord blood DNA methylations by fetal exposure of phthalates and ponderal index at  
birth in epigenome-wide study

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	荒木 敦子	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特任准教授
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**

Exposure to phthalate in utero is associated with adverse health outcome of the offspring. Differential DNA methylation at specific CpG sites may link phthalate exposure to health impacts. We examined the association of prenatal Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) exposure with genome-wide DNA methylation changes in cord blood in 203 mother-child pairs in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, using the Illumina HumanMethylation 450 BeadChip. We found that the primary metabolite of DEHP: mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) levels in maternal blood were predominantly associated with hypermethylation in cord blood DNA. The genes annotated to hypermethylated CpGs associated with maternal MEHP levels were enriched for pathways related to metabolism, endocrine system, and signal transduction. Among them, hypermethylated CpGs involved in metabolism were inversely associated with offspring's ponderal index (PI). Further, mediation analysis suggested that multiple hypermethylation changes may jointly mediate the association between prenatal DEHP exposure and offspring's PI. Although additional studies are needed to determine the functional consequences of these changes, our findings imply differential DNA methylation may link

**A. 研究目的**

**研究協力者**

増田 秀幸 (北海道大学環境健康科学研究教育センター, 特任助教)

Phthalates are widely used plasticizers (Koch et al. 2013) for consumer products including toys, food packages, personal care products, and other household items, leading to widespread exposure to these chemicals through diet, inhalation, and dermal adsorption (Ait Bamai et al. 2015; Jensen

et al. 2015). Phthalates have potential for endocrine-disrupting chemicals (EDCs) and have been found to be associated with multiple adverse effects on human health. In particular, exposure in utero has been linked to adverse birth outcomes such as decreased birth size (Minatoya et al. 2017; Song et al. 2018; Whyatt et al. 2009), preterm birth (Ferguson et al. 2017; Huang et al. 2014), pregnancy loss (Gao et al. 2017), and reduced anogenital distance of infants (Swan et al. 2015). Prenatal exposure can also affect childhood health

outcomes such as behavioral problems (Engel et al. 2009; Engel et al. 2010; Minatoya et al. 2018b; Tellez-Rojo et al. 2013), obesity (Buckley et al. 2016; Kim and Park 2014), and allergic disease (Ait Bamai et al. 2018; Jaakkola and Knight 2008; Whyatt et al. 2014). Early-life exposure to phthalates may contribute to fetal origins of disease; however, actual mechanisms accounting for long-term effects remain unclear.

As phthalates are rapidly metabolized and excreted, epigenetic modification, such as DNA methylation, may be a potential mechanism by which phthalate exposure in utero exerts the long-term effects. Accumulating evidence suggests that epigenetic alternations may link developmental EDC exposure with susceptibility to diseases later in life (Barouki et al. 2018; Ho et al. 2017; McLachlan 2016; Tapia-Orozco et al. 2017). Animal studies have demonstrated the association between developmental phthalate exposure and DNA methylation changes in the offspring (Abdel-Maksoud et al. 2015; Manikkam et al. 2013; Martinez-Arguelles and Papadopoulos 2015; Rajesh and Balasubramanian 2015; Sekaran and Jagadeesan 2015; Wu et al. 2010). Several human cohort studies showed that prenatal phthalate exposure was associated with DNA methylation in selected candidate genes using placenta (LaRocca et al. 2014; Zhao et al. 2015; Zhao et al. 2016) or cord blood samples (Huang et al. 2018; Huen et al. 2016; Montrose et al. 2018; Tindula et al. 2018). Recently, a few epigenome-wide association studies (EWASs) that can allow a hypothesis-free assessment of epigenetic alterations in relation to the environmental factors (Christensen and Marsit 2011) were published. One study reported phthalate exposure altered placental methylome and identified epidermal growth factor receptor

(EGFR) as a critical candidate gene mediating the effects of phthalates on early placental function (Grindler et al. 2018). Several differential methylation regions in cord blood associated with prenatal phthalate exposure were identified (Solomon et al. 2017). Genes with those regions were involved in inflammatory response, cancer, endocrine function, and male fertility. Another study also examined the association of genome-wide DNA methylation in cord blood with prenatal exposure to the most common phthalates, Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and suggested that DNA methylation in genes involved in the androgen response, spermatogenesis, and cancer-related pathway may be affected by prenatal phthalate exposure (Chen et al. 2018). Although existing evidence supports the role of prenatal phthalate exposure in modifying DNA methylation, little is known about potential effects of the exposure-associated methylation on fetal development and later in life. Using epigenome-wide approach, we aimed to explore association between prenatal DEHP exposure and DNA methylation changes in cord blood collected from the participants of the Hokkaido study. Furthermore, we studied whether the DNA methylation at identified loci mediated the effect of DEHP exposure in utero on ponderal index at birth as an indicator of fetal growth.

## B. 研究方法

### *Study population.*

Participants were enrolled in the Sapporo cohort of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health (Kishi et al. 2011; Kishi et al. 2013; Kishi et al. 2017). Briefly, we recruited pregnant women at 23–35 weeks of gestation between 2002 and 2005 from the Toho Hospital

(Sapporo, Japan). After the second trimester during their pregnancy, the participants completed the self-administered questionnaire containing baseline information including family income, educational level, parity history, and pregnancy health information including smoking status, alcohol consumption, and caffeine intake. Information on pregnancy complications, gestational age, infant sex, and birth size was obtained from medical records.

#### ***Measurement of the primary metabolite of DEHP.***

Maternal blood samples were obtained at the time of their hospital examination and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. Levels of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) were measured in maternal blood by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) at Nagoya university as described previously (Araki et al. 2014; Araki et al. 2017; Jia et al. 2015). The detection of limit (LOD) was 0.28 ng/mL.

#### ***450K DNA methylation analysis.***

Umbilical cord blood samples were taken immediately after birth, and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After DNA extraction using a Maxwell<sup>®</sup> 16 DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), cord blood DNA methylation at 485,577 CpGs was quantified using the Infinium HumanMethylation 450 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) by G&G Science Co., Ltd. (Fukushima, Japan). Details for the 450K methylation analysis are described elsewhere (Miura et al. 2018). Samples were run across five plate batches and were assigned randomized location across plates. After quality control (Aryee et al. 2014), functional normalization (Fortin et al. 2014) was applied to the raw data, and normalized

beta ( ) values, ranging from 0-1 for 0% to 100% methylated, were obtained for the 292 cord blood samples. Probes with a detection p-value  $>0.05$  in more than 25% of samples, single nucleotide polymorphism (SNP)-affected probes, cross-reactive probes identified by Chen et al. (Chen et al. 2013), and probes on sex chromosomes were removed. As a result, 426,413 CpG probes were included in the working set. We applied the ComBat method on M-values (logit-transformed  $\beta$ -values) to adjust methylation data for the sample plate to reduce a potential bias due to batch effects (Leek et al. 2012). The M-values were back-transformed to  $\beta$ -values that were used for subsequent data analyses.

#### ***Data analysis.***

Among the 514 participants of the Sapporo Cohort Study, 203 mother-infant pairs had both exposure and DNA methylation data. 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 analysis (Fox and Weisberg 2011) and empirical Bayesian method (Smyth 2004) were applied to determine the associations of  $\beta$ -value at each CpG site with MEHP natural log (ln)-transformed concentrations, adjusted for maternal age, educational levels, pre-pregnancy body mass index (BMI), smoking during pregnancy, blood sampling periods, gestational age, infant sex, and cord blood cell estimates for CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, granulocytes, monocytes, B cell and nucleated red blood cells. Adjustment covariates were selected from factors previously reported to be associated with exposure or cord blood DNA methylation. For multiple comparisons, p-values

were adjusted by a false discovery rate (FDR) to obtain q-values. Because of too few FDR-significant findings, we evaluated the differentially methylated CpGs (DMCpGs) with uncorrected p-value  $<2.5E-04$ . We also assessed hypermethylated DMCpGs (hyper-DMCpGs) for functional enrichment with KEGG pathways (Kanehisa et al. 2002) via the gometh function in the missMethyl package in R/Bioconductor (Phipson et al. 2016). Statistical analyses were performed using minfi, sva, and limma packages in R ver. 3.3.2 and Bioconductor ver. 3.3.

The Spearman's correlation test, Mann-Whitney U-test, and Kruskal-Wallis test were applied to determine whether maternal and offspring characteristics were associated with MEHP levels. We examined associations between methylation levels at hyper-DMCpGs and ponderal index (PI) at birth by a multivariate regression model adjusted by maternal age, educational levels, parity, pre-pregnancy BMI, smoking during pregnancy, gestational age, and infant sex, using JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). PI was calculated as follows;  $PI (kg/m^3) = \text{birth weight (kg)} / (\text{birth length (m)})^3$ . Then, we tested the CpGs for mediation in the association between MEHP levels in maternal blood and PI using PROSESS (Hayes 2013), a macro implemented in SPSS (IBM, Armonk, NY, USA). In addition to the same possible cofounders as named above, blood sampling periods were included as covariate in the mediator and outcome regression models.

### **Ethics.**

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. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

## **C. 研究結果**

### ***Study characteristics***

The characteristics of the participants with the corresponding median MEHP concentrations in cord blood are described in Table 1. The median of MEHP concentration was 10.3 ng/mL (Interquartile range (IQR): 5.8 – 15.3 ng/mL) with 100% of detection rate. The average  $\pm$  standard deviation (s.d.) age of the mothers was  $29.8 \pm 4.9$  years. Maternal blood sampling periods were significantly associated with MEHP levels. Of the 203 newborns, 94 (46.3%) were male. The mean gestational age was 39.9 weeks, birth weight was 3137.5 g, and birth length was 48.5 cm. The MEHP level was negatively correlated to PI ( $r = -0.133, p=0.059$ ).

### ***Epigenome-wide association study of DEHP exposure in utero***

In adjusted robust linear regression models, there were 2 CpGs with epigenome-wide significant methylation changes (FDR q-value  $< 0.05$ ): one located in 200 bases from transcription start site (TSS200) of *PARP12* (cg26409978), and another mapped to *SDK1* (cg00564857) as shown in Figure 1A. DEHP exposure was more frequently associated with hypermethylation than with hypomethylation as seen in volcano plots (Figure 1B). For instance, of 271 DMCpGs with uncorrected p-value  $<2.5E-04$ , 253 CpGs (93.4%) were hypermethylated (Figure 1B). We examined the location of the hyper-DMCpGs with p-value  $<2.5E-04$  in gene features and CpG islands. As

shown in Figure 2, there were statistically significant differences associated with DEHP exposure compared with the expected proportions (for gene features,  $\chi^2$  P-value = 0.004; for CpG islands,  $\chi^2$  P-value = 0.01). Decrease in island and increase in the intergenic region (IGR) were particularly observed.

Next, we considered our results in relation to a published study of association between prenatal phthalate exposure and cord blood DNA methylation using Illumina HumanMethylation450 Beads chips (Solomon et al. 2017). In the study, the authors identified seven differentially methylated regions (DMRs) associated with MEHP levels in maternal urine at 26 weeks gestation by using two differential approaches. We examined the direction of methylation changes in the DMRs identified by Solomon et al. in our data set (Table 2), in which we averaged methylation levels of each CpG site because the CpGs included in each region showed the same direction of methylation changes. Although no CpG reached statistical significance in our cohort, six of the seven DMRs showed the same direction as those identified by Solomon et al. (Table 2), of which five DMRs mapped to *MUC4*, *C5orf63*, *CNPY1*, *SVIL-AS1*, and *FIBIN* were hypermethylated, suggesting that prenatal DEHP exposure would predominantly induce hypermethylation.

#### ***Gene Ontology (GO) analysis***

To investigate the underlying biology that may be affected by DEHP-associated hypermethylation changes, we tested for Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) pathways (Kanehisa et al. 2002) enrichment among the 253 hyper-DMCpGs with  $p < 2.5E-04$ . We observed twelve enriched pathways with FDR  $< 0.05$ . GO analyses of the

data obtained using 450K chip are known to be biased for cancer-related genes (Harper et al. 2013); therefore, the enriched pathways excluded cancer and human disease pathways are listed in Table 3. The most significant pathway was “metabolic pathway” with FDR =  $2.4E-08$ . We also observed three pathways involved in endocrine system: GnRH signaling pathway, Renin secretion, and Cortisol synthesis and secretion, and two pathways involved in signal transduction: mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and Notch signaling pathway.

#### ***The methylation for mediation in the association between prenatal DEHP exposure and offspring's PI at birth***

First, we performed multiple regression analyses to examine the association between PI and methylation levels at sixteen hyper-DMCpGs on the genes involved in metabolic pathways (as shown in Table 3). Of those, methylation levels at twelve hyper-DMCpGs were inversely related to PI (Figure 3). In particular, methylation levels at cg27433759: *PIK3CG*, cg10548708: *ACAA1*, and cg07002201: *FUT9* were associated with PI with  $p$ -value  $< 0.1$ . Then, we considered averaged methylation levels at the three CpGs and observed mediate effect with Sobel test  $p$ -value  $< 0.05$  (Table 4), which explained 30.4 % of the effect of MEHP levels on PI.

#### **D. 議論**

We examined the effect of prenatal DEHP exposure on DNA methylation in cord blood and found that maternal MEHP levels were predominantly associated with hypermethylation. The genes annotated to hyper-DMCpGs were

enriched for pathways related to metabolism, endocrine system, and signal transduction. Further, mediation analysis suggested that a part of hypermethylation may mediate the association between prenatal DEHP exposure and offspring's ponderal index.

As we described previously (Araki et al. 2014), the levels of MEHP in this cohort (median = 10.3 ng/mL) were higher than those in pregnant women at 18 weeks (median = 1.18 ng/ml). Additionally, in most cases, the levels of phthalate metabolites were considerably higher in urine samples (Fredrikksen et al. 2010). We found two DMCpGs with FDR < 0.05: cg26409978 located in TSS200 of *PARP12* (poly(ADP-Ribose) polymerase family member 12; previous name: zinc finger CCCH-type domain containing 1 (*ZC3H1*)) and cg00564857 mapped to *SDK1* (Sidekick Cell Adhesion Molecule 1). Both CpGs showed hypermethylation. We also observed the preference of hypermethylation associated with MEHP levels with p-value <2.5E-04. In the previous study using the 450K platform, Salomon et al. (Solomon et al. 2017) reported the seven DMRs associated with MEHP levels in maternal urine at 26 weeks gestation (n=332, median: 3.63 µg/g-creatinine). Our study differs in sample size, matrices, collecting timing, and analysis methods; nonetheless, when we evaluated the direction of methylation changes in those DMRs, hypermethylation in the five DMRs were replicated in our data set (Table 2). Phthalate-induced hypermethylation was also consistent with a previous study that demonstrated a positive association between prenatal levels of high molecular weight phthalate and cord blood methylation region of *MEG3* (Tindula et al. 2018). It is plausible that maternal

MEHP would predominantly induce offspring's hypermethylation. However, others on cord blood methylation alterations reported prenatal phthalate-induced hypomethylation. One study demonstrated an inverse association between prenatal concentrations of monoethyl phthalate, a metabolite of diethyl phthalate (DEP), with cord blood methylation of Alu repeats, and a similar but weaker association with *LINE-1* methylation (Huen et al. 2016). Maternal urinary mono-n-butyl phthalate (MBP) and monobenzyl phthalate (MBzP) were negatively associated with Alu methylation (Huang et al. 2018). Another study showed that maternal phthalate concentrations were negatively associated with methylation on *LINE-1* and metabolism-related genes; *IGF2* and *PPARA* (Montrose et al. 2018). The differences in metabolite type, the measuring time, and level of phthalates may account for the disparities.

We also observed an enrichment of hyper-DMCpGs in the IGR, with decrease within CpG island (Figure 2). Disease associated- and environmentally induced-DMCpGs, such as obesity or exercise intervention, have been shown to be enriched within the IGR or open seas (Grundberg et al. 2013; Huang et al. 2015; Ronn et al. 2013; Zhu et al. 2018), suggesting that DNA methylation may also be dynamically regulated outside CpG islands. The enrichment of DMCpGs within the IGR may affect functional process of regulatory elements, such as enhancers or insulators, located within the IGR. Recent study showed that the methylation levels at CpGs in the IGR were anticorrelated with nearest gene expression (Zhu et al. 2018).

GO analysis showed that DEHP-associated hypermethylation was associated with metabolic

pathway, endocrine system, and MAPK signaling pathway. This is consistent with previous work. For instance, epidemiological studies showed that phthalate exposure in utero has been associated with fetal metabolic outcomes, such as birth size (Minatoya et al. 2017; Watkins et al. 2016; Whyatt et al. 2009) and adipokine levels, markers of metabolic function, in cord blood (Ashley-Martin et al. 2014; Minatoya et al. 2017; Minatoya et al. 2018a). Prenatal exposure has also been linked to steroid hormone levels in infants (Araki et al. 2014; Araki et al. 2017; Lin et al. 2011). Recently, an experimental study showed that MEHP has an impact on MAPK pathways as well as an effect on peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) transcriptional activity, which together promote disturbances in lipid metabolism and in human villous cytotrophoblast differentiation (Shoaito et al. 2019).

Given the accumulation of DEHP-induced hypermethylations in metabolic pathway, we hypothesized that those methylation changes would disrupt fetal growth. We examined the association between methylation levels at sixteen hyper-DM CpGs in metabolic pathways and PI at birth, an indicator for fetal growth, and found that methylation levels at twelve CpGs were negatively associated with PI (Figure 3). Among them, three CpGs; cg27433759: *PIK3CG*, cg10548708: *ACAA1*, and cg07002201: *FUT9*, approached significance (p-value <0.1). *PIK3CG* (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) encodes a class I catalytic subunit of PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) that phosphorylates inositol lipid and is related to the pathway affecting insulin-like growth factor (IGF1)-Akt signaling (Matheny et al. 2017) and development

erythropoietin (EPO)-induced Jak-STAT pathway (Cokic et al. 2012). *ACAA1* (Acetyl-CoA Acyltransferase 1) encodes an enzyme operative in the beta-oxidation system of the peroxisomes and is involved in fatty acid metabolism (Islam et al. 2019). *FUT9* (Fucosyltransferase 9) belongs to the glycosyltransferase family and is related to glycosphingolipid biosynthesis (Ogasawara et al. 2011). Although each CpG did not show significant mediation in the association between prenatal DEHP exposure and offspring's PI, the averaged methylation levels at the three CpGs represented significant mediate effect (Sobel test p-value <0.05) and explained 30.4 % of the effect of MEHP levels on PI (Table 4). This suggests that multiple hyper-DM CpGs may jointly contribute to effects of DEHP exposure in utero on fetal development. We assumed that there would be more DM-CpGs related to PI as not all genes hit KEGG pathways. Among thirty-eight hyper-DM CpGs with FDR < 0.25 (Supplementary Table S3), seven CpGs; cg05836256 (*LMF1*: Lipase Maturation Factor 1), cg21491711 (*DBN1*: Drebrin 1), cg01142096 (*ERICH1*: Glutamate Rich 1), cg12651645 (*PCSK6*: Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 6), cg04849589 (*CSNK1G3*: Casein Kinase 1 Gamma 3), cg01560642 (*TTC34*: Tetratricopeptide Repeat Domain 34), cg02735381 (*ALPK1*: Alpha Kinase 1) were related to PI with p-value <0.05, and two CpGs; cg26684601 (*JPH3*: Junctophilin 3), cg22493212 (*MIR4277*: MicroRNA4277), were with p-value <0.1 (Supplementary Figure S1). Notably, these genes are linked to metabolism, cell growth and development. *LMF1* is related to lipoprotein metabolism (Hosseini et al. 2012). *DBN1* encodes a cytoplasmic actin-binding protein thought to play a role in the process of

neuronal growth (Shirao and Sekino 2017). DMR at *ERICH1* was identified in multiple sclerosis patients by 450K platform (Maltby et al. 2017). There is a link between PCSK6 and obesity (Du et al. 2016; Levenson et al. 2017). CSNK1G3 is involved in the Hedgehog (Hh) signaling pathway that has numerous roles in the control of cell proliferation, tissue patterning, stem cell maintenance and development. TTC34 contains tetratricopeptide repeat domain which can regulate diverse biological processes, such as organelle targeting, protein import, and vesicle fusion (Zeytuni and Zarivach 2012). microRNAs are involved in post-transcriptional regulation in gene expression in multicellular organisms by affecting both the stability and translation of mRNAs. JPH3 provides a structural foundation for functional cross-talk between cell surface and intracellular ion channels. Although not significant mediate effect, each CpG explained 12.5 % - 23.2 % of the effect of MEHP levels on PI.

The following limitations of this study should be considered. We measured MEHP levels only once from second to third trimester. There have been concerns about using a single MEHP measurement as a representation of the long-term prenatal exposure due to the short half-life of MEHP. In addition, among several metabolites of DEHP, only MEHP levels were measured. MEHP is the primary metabolite of DEHP. Other secondary metabolites, such as mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono(2-ethyl-5-carboxyl) phthalate which have been detected in maternal serum (Hart et al. 2014), also be considered in future studies. Second, we used blood samples for exposure assessment as urine samples were not available in this study. The majority of the recent studies

assessed phthalate levels in urine samples as urine samples can avoid the influence of external contamination. In this assay, all samples were handled carefully to avoid ex vivo hydrolysis of DEHP and external contamination. We measured background levels of MEHP and confirm that the influences of external contamination were null. Third, DNA methylation was measured using unfractionated cord blood. DEHP is known to affect multiple tissues. Whether the associations observed in this study may reflect associations between prenatal DEHP exposure and the methylation at target tissues is unknown. Lastly, we included participants for whom cord blood samples were available, thus limiting the scope only to mothers who delivered vaginally. It is thus possible that relatively healthier children were included in our analysis, and we may have underestimated the effects of DEHP exposure.

Despite these potential limitation, this epigenome-wide study identified hypermethylation changes associated to prenatal DEHP exposure. The DEHP-associated hypermethylation may jointly contribute to effects of prenatal exposure on fetal development. Further studies are needed to confirm our findings and to investigate their relevance to infant long-term outcomes.

## E. 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.* 9 12369, 2019.
- 2) Kishi R., Araki A., Minatoya M, Itoh S, Goudarzi H, Miyashita C; Birth cohorts in

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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)

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)

参考文献

1. Abdel-Maksoud FM, Leasor KR, Butzen K, Braden TD, Akingbemi BT. 2015. Prenatal exposures of male rats to the environmental chemicals bisphenol a and di(2-ethylhexyl) phthalate impact the sexual differentiation process. *Endocrinology* 156:4672-4683.
2. Ait Bamai Y, Araki A, Kawai T, Tsuboi T, Yoshioka E, Kanazawa A, *et al.* 2015. Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among japanese families. *International journal of hygiene and environmental health* 218:461-470.
3. Ait Bamai Y, Miyashita C, Araki A, Nakajima T, Sasaki S, Kishi R. 2018. Effects of prenatal di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on childhood allergies and infectious diseases: The hokkaido study on environment and children's health. *The Science of the total environment* 618:1408-1415.
4. Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Nakajima T, Naito H, Ito S, *et al.* 2014. Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood: The hokkaido study on environment and children's health. *PloS one* 9:e109039.
5. Araki A, Mitsui T, Goudarzi H, Nakajima T, Miyashita C, Itoh S, *et al.* 2017. Prenatal di(2-ethylhexyl) phthalate exposure and disruption of adrenal androgens and glucocorticoids levels in cord blood: The hokkaido study. *The Science of the total environment* 581-582:297-304.

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

6. 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 illumina DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* (Oxford, England) 30:1363-1369.
7. Ashley-Martin J, Dodds L, Arbuckle TE, Ettinger AS, Shapiro GD, Fisher M, et al. 2014. A birth cohort study to investigate the association between prenatal phthalate and bisphenol a exposures and fetal markers of metabolic dysfunction. *Environmental health : a global access science source* 13:84.
8. 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.
9. Barouki R, Melen E, Herceg Z, Beckers J, Chen J, Karagas M, et al. 2018. Epigenetics as a mechanism linking developmental exposures to long-term toxicity. *Environment international* 114:77-86.
10. Buckley JP, Engel SM, Braun JM, Whyatt RM, Daniels JL, Mendez MA, et al. 2016. Prenatal phthalate exposures and body mass index among 4- to 7-year-old children: A pooled analysis. *Epidemiology* (Cambridge, Mass) 27:449-458.
11. Chen CH, Jiang SS, Chang IS, Wen HJ, Sun CW, Wang SL. 2018. Association between fetal exposure to phthalate endocrine disruptor and genome-wide DNA methylation at birth. *Environmental research* 162:261-270.
12. Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, et al. 2013. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic cpgs in the illumina ininium humanmethylation450 microarray. *Epigenetics* 8:203-209.
13. Christensen BC, Marsit CJ. 2011. Epigenomics in environmental health. *Frontiers in genetics* 2:84.
14. Cokic VP, Bhattacharya B, Beleslin-Cokic BB, Noguchi CT, Puri RK, Schechter AN. 2012. Jak-stat and akt pathway-coupled genes in erythroid progenitor cells through ontogeny. *Journal of translational medicine* 10:116.
15. Du Y, Li S, Cui CJ, Zhang Y, Yang SH, Li JJ. 2016. Leptin decreases the expression of low-density lipoprotein receptor via pcsk9 pathway: Linking dyslipidemia with obesity. *Journal of translational medicine* 14:276.
16. Engel SM, Zhu C, Berkowitz GS, Calafat AM, Silva MJ, Miodovnik A, et al. 2009. Prenatal phthalate exposure and performance on the neonatal behavioral assessment scale in a multiethnic birth cohort. *Neurotoxicology* 30:522-528.
17. Engel SM, Miodovnik A, Canfield RL, Zhu C, Silva MJ, Calafat AM, et al. 2010. Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning. *Environmental health perspectives* 118:565-571.
18. Ferguson KK, Chen YH, VanderWeele TJ, McElrath TF, Meeker JD, Mukherjee B. 2017. Mediation of the relationship between maternal phthalate exposure and preterm birth by oxidative stress with repeated measurements across pregnancy. *Environmental health perspectives* 125:488-494.
19. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW,

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

- Hudson TJ, Fertig EJ, et al. 2014. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome biology* 15:503.
20. Fox J, Weisberg S. 2011. Robust regression in r. Thousand Oaks, CA.:Sage.
21. Gao H, Zhang YW, Huang K, Yan SQ, Mao LJ, Ge X, et al. 2017. Urinary concentrations of phthalate metabolites in early pregnancy associated with clinical pregnancy loss in chinese women. *Scientific reports* 7:6800.
22. Grindler NM, Vanderlinden L, Karthikraj R, Kannan K, Teal S, Polotsky AJ, et al. 2018. Exposure to phthalate, an endocrine disrupting chemical, alters the first trimester placental methylome and transcriptome in women. *Scientific reports* 8:6086.
23. Grundberg E, Meduri E, Sandling JK, Hedman AK, Keildson S, Buil A, et al. 2013. Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements. *American journal of human genetics* 93:876-890.
24. Harper KN, Peters BA, Gamble MV. 2013. Batch effects and pathway analysis: Two potential perils in cancer studies involving DNA methylation array analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 22:1052-1060.
25. Hayes AF. 2013. Introduction to mediation, moderation, and conditional process analysis. In: *A regression-based approach*. New York, NY, USA:Guilford Press.
26. Ho SM, Cheong A, Adgent MA, Veevers J, Suen AA, Tam NNC, et al. 2017. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)* 68:85-104.
27. Hosseini M, Ehrhardt N, Weissglas-Volkov D, Lai CM, Mao HZ, Liao JL, et al. 2012. Transgenic expression and genetic variation of *lmlf1* affect *lpl* activity in mice and humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:1204-1210.
28. Huang LL, Zhou B, Ai SH, Yang P, Chen YJ, Liu C, et al. 2018. Prenatal phthalate exposure, birth outcomes and DNA methylation of *al*u and *line-1* repetitive elements: A pilot study in china. *Chemosphere* 206:759-765.
29. Huang RC, Garratt ES, Pan H, Wu Y, Davis EA, Barton SJ, et al. 2015. Genome-wide methylation analysis identifies differentially methylated *cpg* loci associated with severe obesity in childhood. *Epigenetics* 10:995-1005.
30. Huang Y, Li J, Garcia JM, Lin H, Wang Y, Yan P, et al. 2014. Phthalate levels in cord blood are associated with preterm delivery and fetal growth parameters in chinese women. *PloS one* 9:e87430.
31. Huen K, Calafat AM, Bradman A, Yousefi P, Eskenazi B, Holland N. 2016. Maternal phthalate exposure during pregnancy is associated with DNA methylation of *line-1* and *al*u repetitive elements in mexican-american children. *Environmental research* 148:55-62.
32. Islam N, Bates PD, Maria John KM, Krishnan HB, Z JZ, Luthria DL, et al. 2019. Quantitative proteomic analysis of low

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

- linolenic acid transgenic soybean reveals perturbations of fatty acid metabolic pathways. *Proteomics* 19:e1800379.
33. Jaakkola JJ, Knight TL. 2008. The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: A systematic review and meta-analysis. *Environmental health perspectives* 116:845-853.
34. Jensen MS, Anand-Ivell R, Norgaard-Pedersen B, Jonsson BA, Bonde JP, Hougaard DM, et al. 2015. Amniotic fluid phthalate levels and male fetal gonad function. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 26:91-99.
35. Jia X, Harada Y, Tagawa M, Naito H, Hayashi Y, Yetti H, et al. 2015. Prenatal maternal blood triglyceride and fatty acid levels in relation to exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: A cross-sectional study. *Environ Health Prev Med* 20:168-178.
36. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Nakaya A. 2002. The kegg databases at genomenet. *Nucleic acids research* 30:42-46.
37. Kim SH, Park MJ. 2014. Phthalate exposure and childhood obesity. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism* 19:69-75.
38. Kishi R, Sasaki S, Yoshioka E, Yuasa M, Sata F, Saijo Y, et al. 2011. Cohort profile: The hokkaido study on environment and children's health in japan. *International journal of epidemiology* 40:611-618.
39. Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, et al. 2013. Ten years of progress in the hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile--updated 2013. *Environ Health Prev Med* 18:429-450.
40. Kishi R, Araki A, Minatoya M, Hanaoka T, Miyashita C, Itoh S, et al. 2017. The hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile--updated 2017. *Environ Health Prev Med* 22:46.
41. Koch HM, Lorber M, Christensen KL, Palmke C, Koslitz S, Bruning T. 2013. Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: Results of a 48h fasting study with urine collection and personal activity patterns. *International journal of hygiene and environmental health* 216:672-681.
42. LaRocca J, Binder AM, McElrath TF, Michels KB. 2014. The impact of first trimester phthalate and phenol exposure on igf2/h19 genomic imprinting and birth outcomes. *Environmental research* 133:396-406.
43. 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 (Oxford, England)* 28:882-883.
44. Levenson AE, Shah AS, Khoury PR, Kimball TR, Urbina EM, de Ferranti SD, et al. 2017. Obesity and type 2 diabetes are associated with elevated pcsk9 levels in young women. *Pediatric diabetes* 18:755-760.
45. Lin LC, Wang SL, Chang YC, Huang PC, Cheng JT, Su PH, et al. 2011. Associations between maternal phthalate exposure and cord sex hormones in human infants. *Chemosphere* 83:1192-1199.
46. Maltby VE, Lea RA, Sanders KA, White N, Benton MC, Scott RJ, et al. 2017. Differential methylation at mhc in cd4(+) t cells is associated with multiple sclerosis independently of hla-drb1. *Clinical*

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

- epigenetics 9:71.
47. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. 2013. Plastics derived endocrine disruptors (bpa, dehp and dbp) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one* 8:e55387.
  48. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. 2015. Identification of hot spots of DNA methylation in the adult male adrenal in response to in utero exposure to the ubiquitous endocrine disruptor plasticizer di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Endocrinology* 156:124-133.
  49. Matheny RW, Jr., Carrigan CT, Abdalla MN, Geddis AV, Leandry LA, Aguilar CA, et al. 2017. Rna transcript expression of igf-i/pi3k pathway components in regenerating skeletal muscle is sensitive to initial injury intensity. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 32:14-21.
  50. McLachlan JA. 2016. Environmental signaling: From environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond. *Andrology* 4:684-694.
  51. Minatoya M, Araki A, Miyashita C, Sasaki S, Goto Y, Nakajima T, et al. 2017. Prenatal di-2-ethylhexyl phthalate exposure and cord blood adipokine levels and birth size: The hokkaido study on environment and children's health. *The Science of the total environment* 579:606-611.
  52. Minatoya M, Araki A, Miyashita C, Ait Bamai Y, Itoh S, Yamamoto J, et al. 2018a. Association between prenatal bisphenol a and phthalate exposures and fetal metabolic related biomarkers: The hokkaido study on environment and children's health. *Environmental research* 161:505-511.
  53. Minatoya M, Itoh S, Yamazaki K, Araki A, Miyashita C, Tamura N, et al. 2018b. 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.
  54. Miura R, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, Kobayashi S, Wang SL, et al. 2018. An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: The hokkaido study. *Environment international* 115:21-28.
  55. 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.
  56. Ogasawara N, Katagiri YU, Kiyokawa N, Kaneko T, Sato B, Nakajima H, et al. 2011. Accelerated biosynthesis of neolacto-series glycosphingolipids in differentiated mouse embryonal carcinoma f9 cells detected by using dodecyl n-acetylglucosaminide as a saccharide primer. *Journal of biochemistry* 149:321-330.
  57. 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.
  58. Rajesh P, Balasubramanian K. 2015. Gestational exposure to di(2-ethylhexyl)

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

- phthalate (dehp) impairs pancreatic beta-cell function in f1 rat offspring. *Toxicology letters* 232:46-57.
59. Ronn T, Volkov P, Davegardh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, et al. 2013. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS genetics* 9:e1003572.
60. Sekaran S, Jagadeesan A. 2015. In utero exposure to phthalate downregulates critical genes in leydig cells of f1 male progeny. *Journal of cellular biochemistry* 116:1466-1477.
61. Shirao T, Sekino Y. 2017. General introduction to drebrin. *Advances in experimental medicine and biology* 1006:3-22.
62. Shoaito H, Petit J, Chissey A, Auzeil N, Guibourdenche J, Gil S, et al. 2019. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (pparggamma) in mono(2-ethylhexyl) phthalate (mehp)-mediated cytotrophoblast differentiation. *Environmental health perspectives* 127:27003.
63. Smyth GK. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3:Article3.
64. Solomon O, Yousefi P, Huen K, Gunier RB, Escudero-Fung M, Barcellos LF, et al. 2017. Prenatal phthalate exposure and altered patterns of DNA methylation in cord blood. *Environmental and molecular mutagenesis* 58:398-410.
65. Song Q, Li R, Zhao Y, Zhu Q, Xia B, Chen S, et al. 2018. Evaluating effects of prenatal exposure to phthalates on neonatal birth weight: Structural equation model approaches. *Chemosphere* 205:674-681.
66. Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RH, et al. 2015. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Human reproduction (Oxford, England)* 30:963-972.
67. Tapia-Orozco N, Santiago-Toledo G, Barron V, Espinosa-Garcia AM, Garcia-Garcia JA, Garcia-Arrazola R. 2017. Environmental epigenomics: Current approaches to assess epigenetic effects of endocrine disrupting compounds (edc's) on human health. *Environmental toxicology and pharmacology* 51:94-99.
68. Tellez-Rojo MM, Cantoral A, Cantonwine DE, Schnaas L, Peterson K, Hu H, et al. 2013. Prenatal urinary phthalate metabolites levels and neurodevelopment in children at two and three years of age. *The Science of the total environment* 461-462:386-390.
69. Tindula G, Murphy SK, Grenier C, Huang Z, Huen K, Escudero-Fung M, et al. 2018. DNA methylation of imprinted genes in mexican-american newborn children with prenatal phthalate exposure. *Epigenomics* 10:1011-1026.
70. Watkins DJ, Milewski S, Domino SE, Meeker JD, Padmanabhan V. 2016. Maternal phthalate exposure during early pregnancy and at delivery in relation to gestational age and size at birth: A preliminary analysis. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)* 65:59-66.
71. Whyatt RM, Adibi JJ, Calafat AM, Camann DE, Rauh V, Bhat HK, et al. 2009. Prenatal di(2-ethylhexyl)phthalate exposure and

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

- length of gestation among an inner-city cohort. *Pediatrics* 124:e1213-1220.
72. Whyatt RM, Perzanowski MS, Just AC, Rundle AG, Donohue KM, Calafat AM, et al. 2014. Asthma in inner-city children at 5-11 years of age and prenatal exposure to phthalates: The columbia center for children's environmental health cohort. *Environmental health perspectives* 122:1141-1146.
73. Wu S, Zhu J, Li Y, Lin T, Gan L, Yuan X, et al. 2010. Dynamic effect of di-2-(ethylhexyl) phthalate on testicular toxicity: Epigenetic changes and their impact on gene expression. *International journal of toxicology* 29:193-200.
74. Zeytuni N, Zarivach R. 2012. Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure (London, England : 1993)* 20:397-405.
75. Zhao Y, Shi HJ, Xie CM, Chen J, Laue H, Zhang YH. 2015. Prenatal phthalate exposure, infant growth, and global DNA methylation of human placenta. *Environmental and molecular mutagenesis* 56:286-292.
76. Zhao Y, Chen J, Wang X, Song Q, Xu HH, Zhang YH. 2016. Third trimester phthalate exposure is associated with DNA methylation of growth-related genes in human placenta. *Scientific reports* 6:33449.
77. Zhu L, Yan F, Wang Z, Dong H, Bian C, Wang T, et al. 2018. Genome-wide DNA methylation profiling of primary colorectal laterally spreading tumors identifies disease-specific epimutations on common pathways. *International journal of cancer* 143:2488-2498.

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

**Table 1.** Characteristics of study population and their relationships with maternal serum MEHP concentrations (n=203)

	Mean ± SD N (%)	MEHP (ng/ml)			p	
		ρ Median	25th	75th		
<b>Maternal characteristics</b>						
Maternal Age (year) <sup>a</sup>	29.8 ± 4.9	ρ= 0.038			0.594	
Prenatal-BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	21.2 ± 3.0	ρ= 0.049			0.485	
Parity <sup>b</sup>	0	110 (54.2)	10.00	5.65	15.20	0.644
	1	93 (45.8)	10.37	6.00	15.65	
Educational level (year) <sup>b</sup>	12	93 (45.8)	10.37	5.92	14.66	0.831
	> 12	112 (54.2)	9.92	5.65	15.42	
	Annual household income (million yen) <sup>c</sup>	< 3	39 (19.4)	11.53	6.03	
	3-5	103 (51.2)	8.65	5.57	14.92	
	5-7	43 (21.4)	11.41	6.90	16.80	
	> 7	16 (8.0)	9.83	5.42	13.48	
Smoking during pregnancy <sup>b</sup>	No	167 (82.3)	10.41	5.92	15.55	0.424
	Yes	36 (17.7)	7.80	5.23	14.11	
Alcohol consumption during pregnancy <sup>b</sup>	No	132 (65.5)	10.37	5.96	15.72	0.638
	Yes	70 (34.5)	10.22	5.40	15.09	
Caffeine intake during pregnancy (mg/day) <sup>a</sup>	143.0 ± 125.8	ρ= 0.064			0.374	
Blood sampling period (weeks) <sup>c</sup>	< 32	77 (37.9)	11.41	6.64	15.28	0.009
	32-35	48 (23.6)	12.40	6.64	17.32	
	35	78 (38.4)	7.08	5.00	13.80	
<b>Infant characteristics</b>						
Gestational age (week) <sup>a</sup>	39.9 ± 1.0	ρ= 0.000			0.998	
Sex <sup>b</sup>	Male	94 (46.3)	9.86	6.32	14.42	0.673
	Female	109 (53.7)	10.41	5.63	16.31	
Birth weight (g) <sup>a</sup>	3137.5 ± 333.3	ρ= -0.066			0.352	
Birth length (cm) <sup>a</sup>	48.5 ± 1.5	ρ= 0.057			0.416	

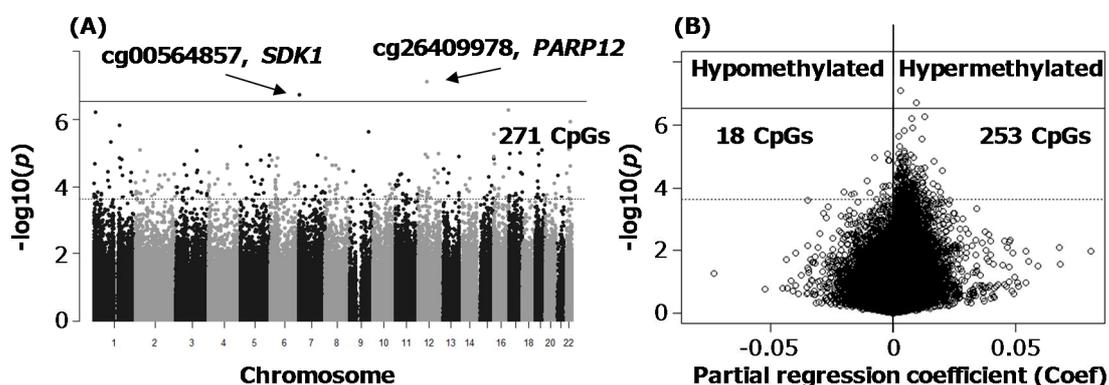
Ponderal Index (kg/m<sup>3</sup>)<sup>a</sup>

27.4 ± 2.2

$\rho = -0.133$

0.059

<sup>a</sup>Spearman's correlation test ( $\rho$ ), <sup>b</sup>Mann-Whitney U-test, <sup>c</sup>Kruskal-Wallis test

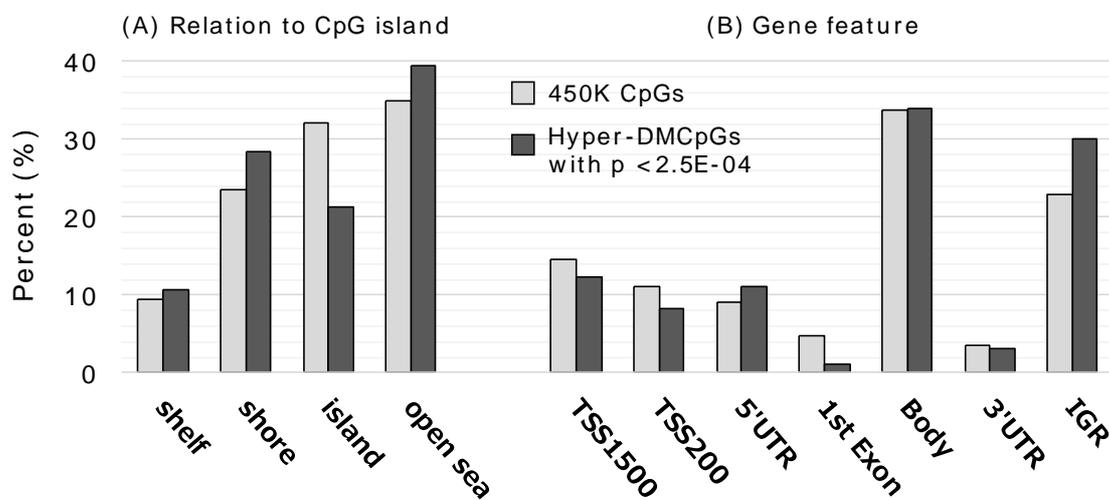


**Figure 1.** Manhattan (A) and Volcano (B) plots of the genome-wide associations of DNA methylation with prenatal exposure to DEHP.

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

Horizontal solid lines represent the significance threshold of an FDR < 0.05.

Horizontal dotted lines represent the threshold of a  $p$ -value < 2.5E-04.



**Figure 2.** Location of the differentially hypermethylated CpGs (hyper-DMCpGs) with  $p < 2.5E-04$  (253 CpGs) compared to all CpGs on the methylation array.

<sup>2</sup> test: (A)  $p=0.004$ , (B)  $p=0.01$

**Table 2.** Direction of cord blood DNA methylation changes associated with maternal MEHP levels at differentially methylated regions identified by Solomon *et al.* (2018) in the present study.

Gene	Chr	Start	End	Sapporo cohort				Salomon et al. 2017	
				Number of Probes	Average Coef <sup>a</sup>	Min p-value <sup>b</sup>	Direction <sup>c</sup>	Max bFC <sup>d</sup>	Direction <sup>c</sup>
<i>MUC4</i>	3	195489306	195490169	8	0.018	0.223	+	0.297	+
<i>C5orf63/FLJ44606</i>	5	126408756	126409553	13	0.017	0.002	+	0.250	+
<i>VTRNA2-1</i>	5	135414858	135416613	16	-0.007	0.320	-	-0.895	-
<i>RNF39</i>	6	30038254	30039801	37	0.005	0.367	+	-0.833	-
<i>CNPY1</i>	7	155283233	155284759	10	0.004	0.082	+	0.171	+
<i>SVIL-ASI</i>	10	29698152	29698685	8	0.002	0.119	+	0.390	+
<i>FIBIN</i>	11	27015519	27016671	8	0.003	0.166	+	0.231	+

<sup>a</sup>Average partial regression coefficient at CpG sites in the region.

<sup>b</sup>Minimum *p*-value within the region.

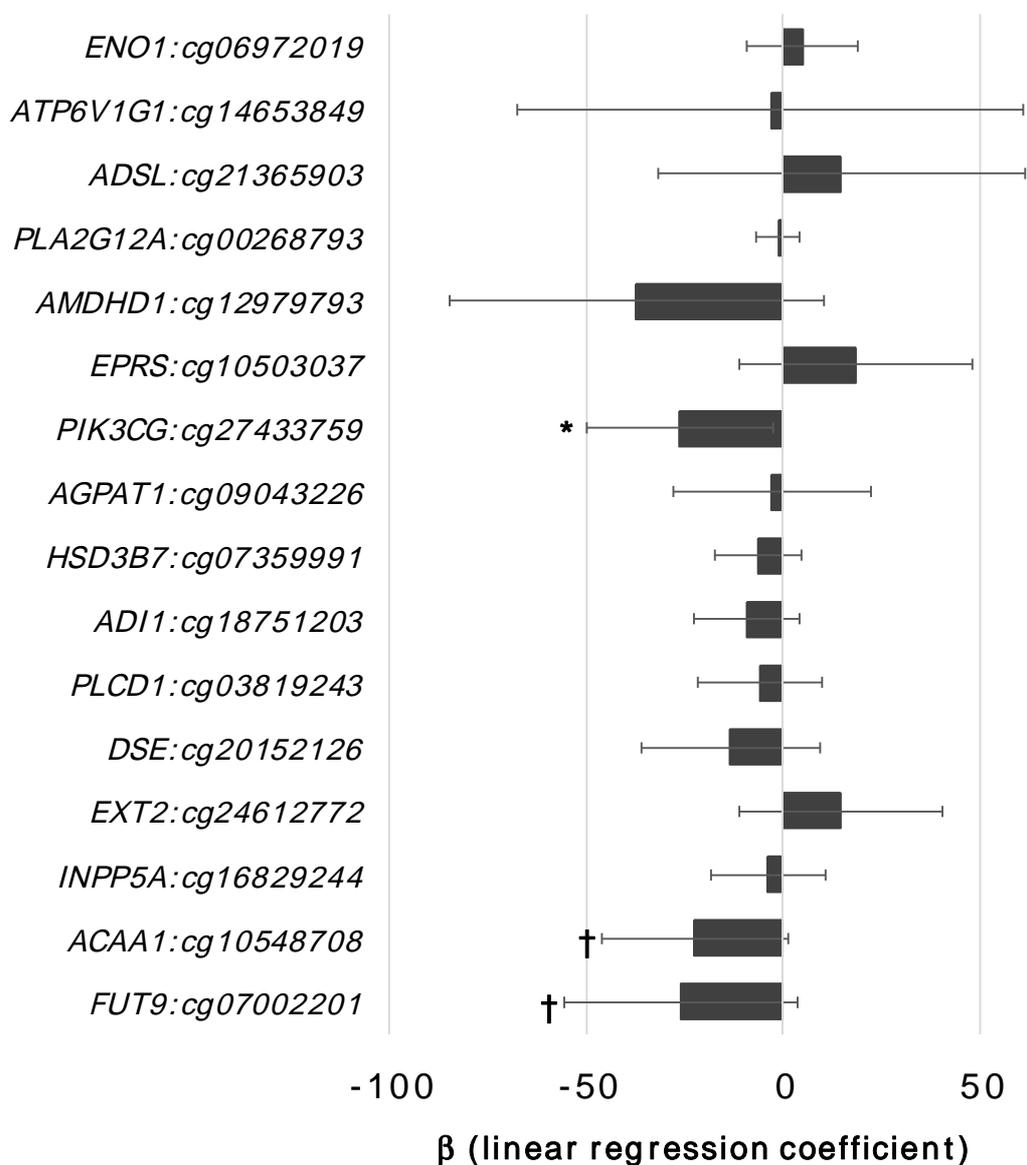
<sup>c</sup>Direction of methylation change: +; increased, -; decreased.

<sup>d</sup>Fold change in DNA methylation *M* value per log<sub>10</sub> unit increase in phthalate metabolite concentration.

**Table 3.** Significantly enriched pathways (FDR <0.05) for the gene targets of 253 differentially hypermethylated CpGs (hyper-DMCpGs) associated with MEHP levels ( $p < 2.5E-04$ ).

KEGG Orthology	KEGG Pathway	Genes*	<i>p</i> -Value
Metabolism	Metabolic pathways	<i>ENO1; ATP6V1G1; ADSL; PLA2G12A; AMDHD1; EPRS; PIK3CG; AGPAT1; HSD3B7; ADII; PLCD1; DSE; EXT2; INPP5A; FUT9; ACAA1</i>	7.3E-11
Signal transduction	MAPK signaling pathway	<i>MAP2K6; EFNA3; CACNA1D; DAXX; FGF9; DUSP4; PPM1A; DUSP10; CACNA1C; MAP3K3</i>	3.0E-07
	Notch signaling pathway	<i>NUMBL; NCOR2; RFNG; CTBP1; NOTCH1</i>	6.4E-07
Endocrine system	GnRH signaling pathway	<i>MAP2K6; CACNA1D; ITPR2; CACNA1C; MAP3K3</i>	1.3E-04
	Renin secretion	<i>CACNA1D; ITPR2; CACNA1C</i>	6.9E-04
	Cortisol synthesis and secretion	<i>CACNA1D; ITPR2; CACNA1C</i>	1.2E-03
Circulatory system	Vascular smooth muscle contraction	<i>CACNA1D; PLA2G12A; CALD1; ITPR2; CACNA1C</i>	4.0E-04
Nervous system	Dopaminergic synapse	<i>CACNA1D; TH; ITPR2; CACNA1C</i>	7.4E-04

\*Genes annotated the hyper-DMCpGs with  $p < 2.5E-04$ .



**Figure 3.** Linear regression coefficients ( $\beta$ ) of ponderal index at birth in relation to methylation levels at CpGs positively associated with MEHP with  $p$ -value  $<2.5E-04$ , mapped to the genes involved in metabolic pathways. Error bars indicate 95% confidential interval (CI). Adjusted for maternal age, educational levels, parity, pre-pregnancy BMI, smoking during pregnancy, gestational age, infant sex.

† $P < 0.1$ , \* $P < 0.05$

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 4.** Mediation analysis examining the association between prenatal exposure to DEHP and ponderal index at birth through differential methylation at CpGs by PROCESS (Hyaes, 2013)

Total effect of maternal MEHP on ponderal index at birth	$\beta^a$ (95% CI)		Sobel <i>p</i> -value	Mediation % (Indirect/Total)
	-0.56 (-1.02, -0.11)*			
Methylation at CpG	Direct effect	Indirect effect		Mediation % (Indirect/Total)
	$\beta^b$ (95% CI)	$\beta^c$ (Bca CI)	<i>p</i> -value	
<i>PIK3CG</i> :cg27433759	-0.48 (-0.95, -0.02)*	-0.08 (-0.23, -0.00)	0.16	14.3
<i>ACAA1</i> :cg10548708	-0.49 (-0.96, -0.01)*	-0.08 (-0.23, 0.03)	0.24	14.3
<i>FUT9</i> :cg07002201	-0.51 (-0.97, -0.05)*	-0.05 (-0.27, 0.01)	0.27	8.9
Average_3CpGs <sup>d</sup>	-0.39 (-0.87, 0.08)	-0.17 (-0.37, -0.05)	0.04*	30.4

<sup>a</sup>Coefficient represents total effect estimate for DEHP exposure in the model: ponderal index = MEHP levels + covariates

<sup>b</sup>Coefficient represents direct effect estimate for DEHP exposure in the model: ponderal index = MEHP levels + DNA methylation levels at CpGs + covariates

<sup>c</sup>Coefficient represents indirect effect estimate for MEHP on ponderal index through differential methylation at CpG, equals (total effect) – (direct effect).

<sup>d</sup>Average of methylation levels at three CpGs; cg27433759, cg10548708, and cg07002201  
Covariates; maternal age, parity, educational levels, pre-pregnancy BMI, smoking during pregnancy, blood sampling periods, gestational age, and infant sex

Bca CI, bias-corrected and accelerated CI

\**p* < 0.05

## 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 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

## 研究要旨

北海道内の医療機関で 85 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。85 例の定量結果の平均値及び濃度範囲を過去の報告事例と比較したところ、脂肪重量当たりのダイオキシン類濃度は同等となり、PCBs 濃度はやや低い傾向が認められた。また職業性の曝露等を原因とする特異的な高濃度事例は認められなかった。85 名の妊産婦から採取された臍帯血試料は、本研究事業の主たる目的である一般的なヒトの集団におけるダイオキシン類・PCBs の次世代影響評価に適切な試料であると考えられた。

## 研究協力者

平川 周作，新谷 依子（福岡県保健環境研究所，研究員）  
 平川 博仙，飛石 和大（福岡県保健環境研究所，専門研究員）

## A．研究目的

ダイオキシン類及びその類縁物質である 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的かつ持続的に残留することが知られている。一般人のダイオキシン類・PCBs の摂取経路は食品であり、微量ながら日常的に摂取され、殆どは体内に吸収・蓄積し、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経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。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 85 名について、分娩時に臍帯血を採取して調査試料とした。採取後の臍帯血は密閉可能な容器に移され、北海道大学で冷凍保存された。測定は福岡県保健環境研究所で実施した。臍帯血を採取した時点での妊産婦 85 名の年齢、出産歴は下記のとおりであった。

年齢（歳）	最低	20
	最高	43
	平均	32.4
	中央値	32
出産歴（人）	初回	39
	1回	45
	不明	1

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6g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<sup>1)</sup>。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、各々にシリジン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。

画分は最終検液の全量を約100 µLに調製し、1 µLをHRGC/HRMS（Agilent 6890/JEOL JMS-800D）に注入して測定した。一方、画分の最終検液は全量を約200 µLとし、100 µL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 7890 / Waters 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機関共同で分析精度管理を実施した。結果として、当研究所の測定値は他の測定機関とよく一致しており、測定精度が確保されていることを確認した<sup>2)</sup>。

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同大学院医学研究科・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た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

臍帯血試料（85検体）の抽出脂肪量（含量）は、臍帯血重量あたり平均0.26%（範囲0.17%～0.35%）であった。当研究所における過去の分析事例や他の報告事例と同等の脂肪含量が得られた<sup>3)4)</sup>。

表1にダイオキシン類（29化合物）の定量結果の概要を示す。臍帯血85例のダイオキシン類濃度（Total TEQ）は、平均5.5 pg/g lipid（範囲2.9～28 pg/g lipid）であった。全血重量あたりの濃度に換算したTotal TEQ値は、平均0.014 pg/g whole（範囲0.0085～0.046 pg/g whole）であった。

今回の臍帯血の分析結果を過去の報告事例等と比較した。

福岡県保健環境研究所では2009～2011年度に福岡県内在住の妊産婦（29

名，平均年齢 32.0 才）を対象に臍帯血中のダイオキシン類（mono-ortho PCB を除く 21 化合物）濃度を測定している。生体蓄積性の高いダイオキシン類の体内濃度は加齢に伴い増加する傾向がある一方，妊産婦の臍帯血や胎盤組織等のダイオキシン類・PCB 濃度は出産歴との関連が認められ，出産回数が多いほど濃度が低くなる傾向がある。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<sup>5)</sup>。そこで本分担研究と福岡県調査の結果比較では，ともに初産及び出産 2 回目の妊産婦に該当する測定値のみを抽出して行った。本調査研究では出産歴不明の 1 名を除く 84 例，福岡県調査では 29 例中 26 例のデータを用いた。両集団の平均年齢はともに 32 歳で同等であった。

上記の条件でダイオキシン類濃度（mono-ortho PCB を除く 21 化合物，Total TEQ）を比較した結果，本分担研究で平均 5.3 pg/g lipid（範囲 2.8 ~ 27 pg/g lipid），福岡県調査では平均 6.5 pg/g lipid（範囲 3.1 ~ 18 pg/g lipid）となり，両集団間で顕著な差は認められなかった。その他，国内の調査事例として，東北地方で 49 名の妊産婦から採取された臍帯血について平均 10 pg/g lipid（範囲 3.2 ~ 23 pg/g lipid）と報告されている（2008 年）<sup>3)</sup>。今回の調査結果は東北地方の調査結果と近似していた。

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 85 例中の Total PCBs 濃度は，平均 49 ng/g lipid（範囲 14 ~ 190 ng/g lipid）であった。全血重量あたり濃度は，平均 120 pg/g whole（範囲 41 ~ 440 pg/g whole）であった。臍帯血中の 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<sup>6)</sup>。これ

によると，臍帯血 49 例中の Total PCBs 濃度は平均 81 ng/g lipid（範囲 30 ~ 390 ng/g lipid）であり，全血重量あたりでは平均 98 pg/g whole（範囲 25 ~ 460 pg/g whole）であった。本研究で測定した臍帯血 85 例の Total PCB 濃度は過去の分析事例と比較して低い傾向を示した。

図 1 に示すように，臍帯血 85 例の Total dioxin 濃度と Total PCBs 濃度（脂肪重量あたり）の間に良好な正の相関（ $R^2 = 0.913$ ）が認められた。また 85 例のうち 4 例は顕著に高い濃度域に分布していた。該当の 4 名はいずれも初産者であった。

環境中のダイオキシン類と PCBs の発生起源は異なり，前者は主に廃棄物の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意図的に製造された産物である。両者の発生源は異なるが，通常の食事を介して人体に取り込まれる比率はほぼ一定と考えられる。高濃度の 4 例を含む臍帯血 85 例で高い濃度相関が得られていることから，今回の 4 例の結果は魚介類の多食など被験者の日常的な食事習慣を反映したものと考えられる。

#### D. 結論

85 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，ダイオキシン類濃度は同等となり，PCBs は低濃度の傾向となり，職業性の曝露等を原因とする特異的な高濃度事例は認められなかった。85 名の妊産婦から採取された臍帯血試料は，本研究の主たる目的である一般的なヒトの集団におけるダイオキシン類・PCBs の次世代影響評価に適切な試料であると考えられた。

#### E. 参考文献

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

- 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濃度測定のコロステック. 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.

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

なし

### 2 . 学会発表

- 7) 新谷依子, 堀就英ほか. 血液中ダイオキシン類分析のコロステック (2018年度): 第28回環境化学討論会. さいたま市. 2019.6.12.-14.

## G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

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（85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	0.53	ND	1.4	0.003	0.0015	ND	0.0034
1,2,3,7,8-PeCDD	1	0.75	ND	7.5	0.003	0.0021	ND	0.013
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2	1.1	ND	4.0	0.006	0.0032	ND	0.012
1,2,3,6,7,8-HxCDD	2	5.1	ND	21	0.006	0.0130	ND	0.058
1,2,3,7,8,9-HxCDD	2	1.2	ND	4.9	0.006	0.0034	ND	0.014
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	2	11	2.5	49	0.006	0.027	0.0077	0.083
OCDD	4	309	130	869	0.01	0.78	0.394	1.8
2,3,7,8-TCDF	1	1.7	ND	5.3	0.003	0.0045	ND	0.011
1,2,3,7,8-PeCDF	1	1.7	ND	5.7	0.003	0.0043	ND	0.010
2,3,4,7,8-PeCDF	1	2.8	ND	12	0.003	0.0071	ND	0.020
1,2,3,4,7,8-HxCDF	2	2.0	ND	7.0	0.005	0.0051	ND	0.012
1,2,3,6,7,8-HxCDF	2	1.4	ND	6.7	0.005	0.0034	ND	0.011
2,3,4,6,7,8-HxCDF	2	1.0	ND	2.1	0.005	ND	—	—
1,2,3,7,8,9-HxCDF	2	ND	—	—	0.005	ND	—	—
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2	1.7	ND	6.2	0.005	0.0041	ND	0.016
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	2	ND	—	—	0.005	ND	—	—
OCDF	4	2.1	ND	4.8	0.01	0.0051	ND	0.012
3,4,4',5'-TCB (CB81)	10	5.0	—	5.0	0.03	ND	—	—
3,3',4,4'-TCB (CB77)	10	15	ND	48	0.03	0.037	ND	0.083
3,3',4,4',5'-PenCB (CB126)	10	12	ND	74	0.03	0.030	ND	0.13
3,3',4,4',5,5'-HxCB (CB169)	10	6.4	ND	34	0.03	0.017	ND	0.058
2',3,4,4',5'-PeCB (CB123)	10	45	ND	220	0.03	0.12	ND	0.46
2,3',4,4',5'-PeCB (CB118)	10	2800	601	12000	0.03	7.1	1.7	24
2,3,4,4',5'-PeCB (CB114)	10	160	ND	950	0.03	0.40	ND	1.6
2,3,3',4,4'-PeCB (CB105)	10	640	162	2300	0.03	1.6	0.46	5.7
2,3',4,4',5,5'-HxCB (CB167)	10	310	ND	1400	0.03	0.79	ND	3.2
2,3,3',4,4',5'-HxCB (CB156)	10	730	161	2900	0.03	1.9	0.34	7.8
2,3,3',4,4',5'-HxCB (CB157)	10	210	ND	1000	0.03	0.53	ND	2.3
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (CB189)	10	56	ND	380	0.03	0.15	ND	1.0
Total PCDDs		330	140	960		0.83	0.43	1.9
Total PCDFs		16	10	48		0.041	0.025	0.084
Total PCDD/PCDFs		340	150	1000		0.87	0.46	2.0
Total non-ortho PCBs		39	20	160		0.099	0.060	0.28
Total mono-ortho PCBs		5000	1100	21000		13	3.3	41
Total dioxin-like PCBs		5000	1200	21000		6.4	0.060	41
Total dioxins		5400	1400	22000		7.3	0.63	42
Total PCDDs-TEQ		2.2	1.4	13		0.0061	0.0042	0.020
Total PCDFs-TEQ		1.6	0.64	6.1		0.0041	0.0017	0.010
Total PCDDs/PCDFs-TEQ		3.9	2.2	19		0.010	0.0063	0.031
Total non-ortho PCBs-TEQ		1.44	0.65	8.5		0.0036	0.0020	0.014
Total mono-ortho PCBs-TEQ		0.15	0.034	0.62		0.00038	0.000098	0.0012
Total dioxin-like PCBs-TEQ		1.6	0.69	9.1		0.0039	0.0021	0.015
Total-TEQ		5.5	2.9	28		0.014	0.0085	0.046

(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（85 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-TrCB(CB19)	10	74	ND	1100	2,2',3,4,5,5'-HxCB(CB141)	10	80	ND	460
2,2',5-TrCB(CB18)	10	730	ND	1700	2,2',3,4,4',5'-HxCB(CB137)	10	310	ND	1200
2,4,5-TrCB(CB29)	10	45	ND	360	2,2',3,3',4,5'-HxCB(CB130)	10	320	ND	1700
2,4,4'-TrCB(CB28)	10	1200	ND	2500	2,3,3',4',5',6'-HxCB(CB164)	10	2200	387	7800
2,3',4'-TrCB(CB33)	10	780	ND	2100	2,2',3,4,4',5'-HxCB(CB138)	10	5200	1178	19000
2,3,4'-TrCB(CB22)	10	410	ND	1300	2,3,3',4,4',6'-HxCB(CB158)	10	100	ND	400
3,4,4'-TrCB(CB37)	10	210	ND	1500	2,2',3,3',4,4'-HxCB(CB128)	10	120	ND	640
2,2',6,6'-TeCB(CB54)	10	15	ND	840	2,3',4,4',5,5'-HxCB(CB167)	10	310	ND	1400
2,2',5,5'-TeCB(CB52)	10	1000	66	4400	2,3,3',4,4',5'-HxCB(CB156)	10	730	161	2900
2,2',4,5'-TeCB(CB49)	10	250	ND	910	2,3,3',4,4',5'-HxCB(CB157)	10	210	ND	1000
2,2',4,4'-TeCB(CB47)	10	300	ND	2100	2,2',3,4',5,6,6'-HpCB(CB188)	10	5.5	ND	48
2,2',3,5'-TeCB(CB44)	10	410	ND	1500	2,2',3,3',5,6,6'-HpCB(CB179)	10	36	ND	220
2,3',4',6'-TeCB(CB71)	10	240	ND	1000	2,2',3,3',5,5',6'-HpCB(CB178)	10	450	ND	1900
2,3,4',5'-TeCB(CB63)	10	41	ND	250	2,2',3,4,4',5,6'-HpCB(CB182)	10	2200	466	9200
2,4,4',5'-TeCB(CB74)	10	1700	353	7600	2,2',3,4,4',5',6'-HpCB(CB183)	10	550	ND	2400
2,3',4',5'-TeCB(CB70)	10	400	103	1200	2,2',3,4,4',5,6'-HpCB(CB181)	10	5.7	ND	57
2,3',4',5'-TeCB(CB76)	10	6.2	ND	58	2,2',3,3',4',5,6'-HpCB(CB177)	10	470	ND	1700
2,3',4,4'-TeCB(CB66)	10	740	295	2700	2,2',3,3',4,4',6'-HpCB(CB171)	10	160	ND	730
2,3,3',4'-/2,3,4,4'-TeCBs(CB56/60)	10	410	121	1100	2,2',3,3',4,5,5'-HpCB(CB172)	10	260	ND	1000
2,2',4,6,6'-PeCB(CB104)	10	6.6	ND	68	2,2',3,4,4',5,5'-HpCB(CB180)	10	4100	713	22000
2,2',3,5',6'-PeCB(CB95)	10	750	251	3000	2,3,3',4,4',5',6'-HpCB(CB191)	10	44	ND	270
2,2',3,5,5'-PeCB(CB92)	10	210	ND	860	2,2',3,3',4,4',5'-HpCB(CB170)	10	1400	241	6300
2,2',4,5,5'-PeCB(CB101)	10	680	142	2600	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(CB189)	10	56	ND	380
2,2',4,4',5'-PeCB(CB99)	10	1700	434	7500	2,2',3,3',5,5',6,6'-OxCB(CB202)	10	170	ND	1200
2,3',4,4',6'-PeCB(CB119)	10	17	ND	87	2,2',3,3',4,5',6,6'-OxCB(CB201)	10	30	ND	190
2,3,4',5,6'-PeCB(CB117)	10	180	ND	910	2,2',3,3',4,5,5',6'-OxCB(CB200)	10	6.4	ND	57
2,2',3,4,5'-PeCB(CB87)	10	210	39	880	2,2',3,3',4,5,5',6'-/2,2',3,3',4,5',6,6'-OxCB(CB198/199)	10	560	ND	4700
2,2',3,4,4'-PeCB(CB85)	10	120	ND	440	2,2',3,4,4',5,5',6'-OxCB(CB203)	10	330	ND	3900
2,3,3',4',6'-PeCB(CB110)	10	260	16	970	2,2',3,3',4,4',5,6'-OxCB(CB195)	10	83	ND	600
2,3,3',4',5'-PeCB(CB107)	10	150	ND	830	2,2',3,3',4,4',5,5'-OxCB(CB194)	10	430	ND	3500
2',3,4,4',5'-PeCB(CB123)	10	45	ND	220	2,3,3',4,4',5,5',6'-OxCB(CB205)	10	8.6	ND	93
2,3',4,4',5'-PeCB(CB118)	10	2800	601	12000	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-NoCB(CB208)	10	53	ND	1100
2,3,4,4',5'-PeCB(CB114)	10	160	ND	950	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-NoCB(CB207)	10	11	ND	310
2,3,3',4,4'-PeCB(CB105)	10	640	162	2300	2,2',3,3',4,4',5,5',6'-NoCB(CB206)	10	150	ND	2200
2,2',3,5,5',6'-HxCB(CB151)	10	270	ND	950	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DeCB(CB209)	10	160	ND	1600
2,2',3,3',5,6'-HxCB(CB135)	10	100	ND	440	Total TrCBs		3300	35	7900
2,2',3,4',5,6'-HxCB(CB147)	10	46	ND	500	Total TeCBs		5500	1640	22000
2,2',3,4,4',6'-HxCB(CB139)	10	160	ND	790	Total PeCBs		8000	2200	34000
2,2',3,3',5,6'-HxCB(CB134)	10	8.5	ND	93	Total HxCBs		21000	4900	86000
2,3,3',5,5',6'-HxCB(CB165)	10	5.2	ND	23	Total HpCBs		9700	1800	42000
2,2',3,4',5,5'-HxCB(CB146)	10	1600	318	6000	Total OcCBs		1600	350	14000
2,2',3,3',4,6'-HxCB(CB132)	10	74	ND	300	Total NoCBs		220	15	3400
2,2',4,4',5,5'-HxCB(CB153)	10	9000	1971	41000	Total PCBs (ng/g)		49	14	190
2,3',4,4',5,5'-HxCB(CB168)	10	6.0	ND	54					

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

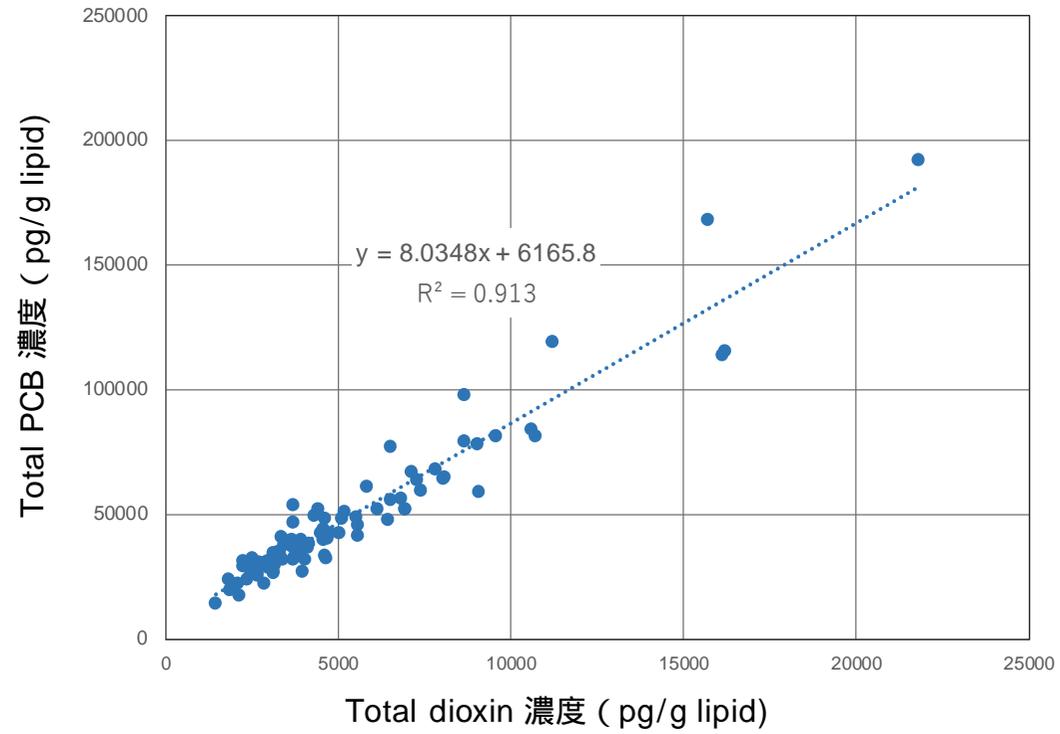


図1 . 臍帯血中 Total dioxin 濃度と Total PCB 濃度の相関

## 母体血中ダイオキシン類と臍帯血中網羅的メチル化解析の関連

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 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

### 研究要旨

PCB・ダイオキシン類は残留性有機汚染物質（POPs）に分類される環境化学物質であり，環境およびヒトの生体内に長期に残存する。PCB・ダイオキシン類は胎盤通過性であるため，胎児は子宮内で母体を介して PCB・ダイオキシン類に曝露される。未熟な胎児は外部環境に脆弱であり，子宮内で環境化学物質に曝露された影響は，生後も長期に持続することが懸念されている。しかし胎児期曝露が生後の健康影響を引き起こす生態学的機序については不明な点が多い。

一方，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。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が実施されている。本研究は胎児期のダイオキシン類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)を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。

292名の対象者のうち，児の性別は男児132名(45%)，女児160名(55%)であった。DMPの解析でFDR  $q < 0.05$ の有意水準でダイオキシン類濃度と関連があったCpG(遺伝子)は男児のcg01228410(SLC9A3, FDR= 0.041)のみで，女児では同定されなかった。DMP解析から  $p < 2.50E-04$ 水準で男児317CpG，女児262CpGが抽出された。男児で高メチル化の割合が高く，男児でよりDNA高メチル化変化量(logFC)は大きかった。ダイオキシン類やPCB類の胎児期曝露による出生体重や生後の免疫への影響には性差があり，男児に影響が顕著に認められることを既に報告しており，本研究から，エピゲノム変化も性差がある可能性が示唆された。

### 研究協力者

小林 澄貴 (北海道大学環境健康科学研究教育センター，特任講師)

### A．研究目的

我々のこれまでの研究で，有機フッ素化合物，PCB類とIGF2/H19，LINE1遺伝子などのCpGをターゲットとしたDNAメチル化との関連を報告した(Kobayashi, Azumi, et al. 2017; Kobayashi, Sata, et al.

2017)。さらに，有機フッ素化合物とBPAと臍帯血中の網羅的DNAメチル化解析に関しても報告した(Miura et al. 2019; Miura et al. 2018)。海外の網羅的DNAメチル化解析の先行研究では，有機フッ素化合物やDDTの胎児期曝露と児の網羅的DNAメチル化解析との関連について報告がある(Kingsley et al. 2017; Leung et al. 2018; Yu et al. 2018)。これらの報告は

胎児期の化学物質曝露が、一般生活で曝される低レベルであっても、胎児の DNA メチル化を変化させ、生後の健康・疾病発生に影響する可能性を示している。

しかし、残留性有機汚染物質（POPs）に分類される環境化学物質の PCB・ダイオキシン類の胎児期曝露と網羅的 DNA メチル化解析の関連を検討した報告はない。PCB・ダイオキシン類は製造禁止および発生予防対策によってヒトの曝露レベルは低下していることが報告されているが、環境およびヒトの生体内に長期に残存するため、生体影響が懸念され続けている。PCB・ダイオキシン類は胎盤通過性であるため、胎児は子宮内で母体を介して PCB・ダイオキシン類に曝露される。未熟な胎児は外部環境に脆弱であり、子宮内で環境化学物質に曝露された影響は、生後も長期に持続することが懸念されている。しかし胎児期曝露が生後の健康影響を引き起こす生態学的機序については不明な点が多い。

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 (Bianco-Miotto et al. 2017; Gluckman and Hanson 2004)。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。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が実施されている。本研究は胎児期のダイオキシン類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）を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。

## B．研究方法

出生前向きコホート北海道スタディ（札幌コホート）において、1 産科病院を受診した妊婦 514 名から参加同意を得た。妊娠中期から後期の母体血中ダイオキシン類を、高分解能ガススペクトロメトリー・高分解能マススペクトロメーター（GS-MS）を用いて分析した。抽出した臍帯血 DNA をバイサルファイト処理し、臍帯血 DNA 約 45 万 CpG のエピゲノム網羅的メチル化データ（イルミナ社 Infinium HumanMethylation450 BeadChip）を得た。母体血中ダイオキシン類の濃度によって臍帯血 DNA メチル化率に差異がある CpG（differentially methylated position; DMP）を抽出することを目的に、ロバスト線形回帰 robust linear regression (Fox and Weisberg 2011)、経験ベイズ法 (Smyth 2004) を用いて多変量解析を男女別を実施した。従属変数には臍帯血 DNA 約 45 万 CpG 網羅的メチル化データ、独立変数にダイオキシン類濃度(log10)、母の出産歴、妊娠中喫煙、採血時期、および、メチル化値から推定した細胞組成値 (Bakulski et al. 2016) を投入した。多重比較を考慮した FDR  $q < 0.05$  を有意水準とした。男女で比較的差異がある CpG サイトを群間で比較するため、DMP 解析で  $p < 2.50E-04$  水準の CpG サイトを抽出して、DNA メチル化の可変領域 (differentially methylated region; DMR) について bumpHunter 法で解析した。さらに抽出された CpG 部位が関連する遺伝子機能を明らかにするため遺伝子オントロジー (Gene Ontology (GO)) および KEGG パスウェイ解析を行った。

（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**

本研究の対象者は292名で、母親の年齢（平均±SD）は30±4.9歳、初産151名（51.7%）、学歴が高校卒業以下131名（44.9%）、世帯年収500万未満205名（70.7%）、母の妊娠中喫煙46名（15.8%）、児の性別は男児132名（45%）、女児160名（55%）であった。妊娠中の母体血中ダイオキシン類濃度は14.03（10.10-18.24）pg/g TEQ（中央値（25%th-75%th））であった。DMPの解析でFDR  $q < 0.05$ の有意水準でダイオキシン類濃度と関連があったCpG（遺伝子）は男児のcg01228410（SLC9A3, FDR=0.041）のみで、女児では同定されなかった。DMP解析から $p < 2.50E-04$ 水準で男児317CpG、女児262CpGが抽出された。それぞれのCpGが高メチル化、低メチル化されている割合を男女で比較すると、男児で高メチル化283CpG（89.3%）、低メチル化34（10.7%）、女児で高メチル化203CpG

（77.5%）、低メチル化（22.5%）と、全体的に高メチル化の割合が高く、男児でさらに顕著であった。メチル化の変化量を示すlogFCの男女別のヒストグラムを示した。高メチル化（logFC > 0）の範囲で、中央値、75%thともに男児のほうが大きい。女児では1CpGでlogFCが0.4を超えただけであった。DNA高メチル化の変化量を男女で比較すると、男児でよりDNAメチル化変化量は大きかった。男女とも有意なDNAメチル化の可変領域DMRは同定されなかった。KEGGパスウェイ解析では、男児で有意な6つの経路（Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor等）、女児では有意な2つの経路（Amino sugar and nucleotide sugar metabolism）が同定された。

**D．考察**

ダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体（AhR）を介した毒性作用を持ち、発育途中の胎児は臓器組織中のAhR活性が高いためにダイオキシン類に脆弱であると報告されている。臍帯血中のDNAメチル化は胎児が子宮内で受けた外部環境からの影響を反映しており、ダイオキシン類は胎児DNAメチル化に影響することが示唆された。DMPの解析でダイオキシン類濃度と関連があった男児のcg01228410（ $q = 0.041$ ）はSLC9A3遺伝子上に位置しており、SLC9A3は先天異常および糖やナトリウム代謝に関与する遺伝子である（Dorfman et al. 2011）。KEGGパスウェイ解析ではウイルス感染に対するサイトカイン産生に関与する経路等が抽出されており、本研究で抽出されたダイオキシン曝露による変化するCpGが生体に影響を与えるかさらに検討する必要がある。これまでの我々の研

究で、母体血中ダイオキシン類は児の臍帯血 IgE、出生体重、乳幼児期の感染症と発達、および学童期の喘鳴リスクに影響し、特に男児で顕著であることを報告した (Kishi et al. 2017)。児の性別による DNA メチル化変化の差異を明らかにするため、男女別で解析したところ、男児でのみ DMP 解析で有意な CpG が抽出され、女児と比較し男児では高メチル化の割合が高く、DNA メチル化変化量が大きく、KEGG パスウェイでより多くの経路が検出された。網羅的エピゲノム解析はスクリーニングであるが、ダイオキシン類曝露が引き起こすエピゲノム修飾には男女差があり、影響の程度は男児でより強い可能性が示唆された。

#### E . 結論

ダイオキシン類や PCB の胎児期曝露により引き起こされる胎児のエピゲノム変化には性差があり、特に男児で高メチル化に顕著である可能性が示唆された。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

Miura R, Araki A, Minatoya M, Miyake K, Chen ML, Kobayashi S, Miyashita C, Yamamoto J, Matsumura T, Ishizuka M, Kubota T, Kishi R. An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylation reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A. *Sci Rep.* 2019; 9(1):12369.

##### 2. 学会発表

Miyashita, C., and R. Kishi, Effect of prenatal exposure to persistent organic pollutants on children's health in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. DIOXIN2019, 39th International Symposium on

Halogenated Persistent Organic Pollutants, 2019.8.25-30, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

#### G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

#### 参考文献

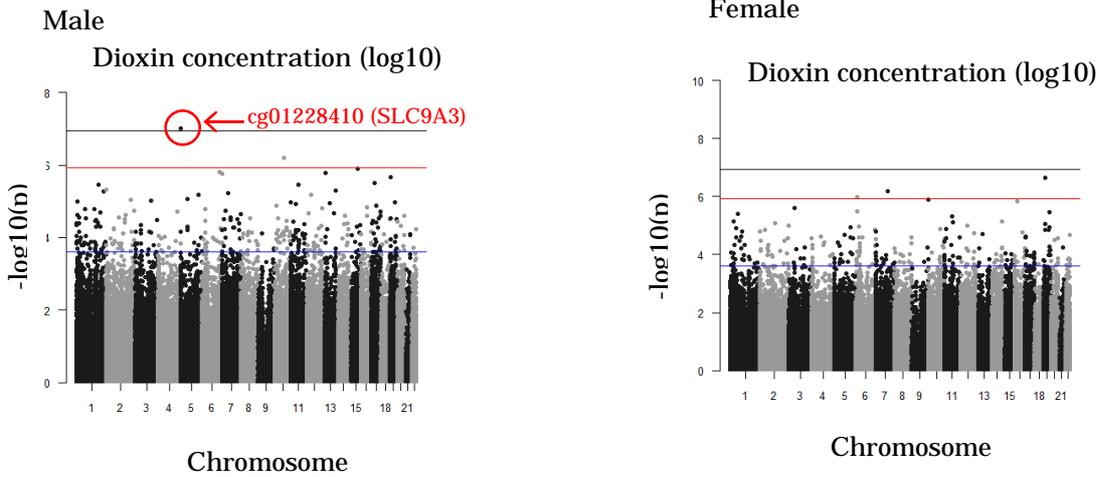
1. Bakulski, K. M., J. I. Feinberg, S. V. Andrews, J. Yang, S. Brown, L. McKenney S, F. Witter, J. Walston, A. P. Feinberg, and M. D. Fallin. 2016. 'DNA methylation of cord blood cell types: Applications for mixed cell birth studies', *Epigenetics*, 11: 354-62.
2. Bianco-Miotto, T., J. M. Craig, Y. P. Gasser, S. J. van Dijk, and S. E. Ozanne. 2017. 'Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond', *J Dev Orig Health Dis*, 8: 513-19.
3. Dorfman, R., C. Taylor, F. Lin, L. Sun, A. Sandford, P. Pare, Y. Berthiaume, M. Corey, P. Durie, J. Zielenski, and Canadian Consortium CF Genetic. 2011. 'Modulatory Effect of the SLC9A3 Gene on Susceptibility to Infections and Pulmonary Function in Children With Cystic Fibrosis', *Pediatric Pulmonology*, 46: 385-92.
4. Fox, J. and S. Weisberg, Robust regression in R, in *An R Companion to Applied Regression*. 2011, Sage: Thousand Oaks, CA.

5. Gluckman, P. D., and M. A. Hanson. 2004. 'Living with the past: Evolution, development, and patterns of disease', *Science*, 305: 1733-36.
6. Kingsley, S. L., K. T. Kelsey, R. Butler, A. Chen, M. N. Eliot, M. E. Romano, A. Houseman, D. C. Koestler, B. P. Lanphear, K. Yolton, and J. M. Braun. 2017. 'Maternal serum PFOA concentration and DNA methylation in cord blood: A pilot study', *Environ Res*, 158: 174-78.
7. Kishi, R., A. Araki, M. Minatoya, T. Hanaoka, C. Miyashita, S. Itoh, S. Kobayashi, Y. A. Bamai, K. Yamazaki, R. Miura, N. Tamura, K. Ito, H. Goudarzi, and Hokkaido Study Environm Children's. 2017. 'The Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: cohort profile-updated 2017', *Environmental Health and Preventive Medicine*, 22.
8. Kobayashi, S., K. Azumi, H. Goudarzi, A. Araki, C. Miyashita, S. Kobayashi, S. Itoh, S. Sasaki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, T. Ikeno, and R. Kishi. 2017. 'Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: The Hokkaido Study', *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 27: 251-59.
9. Kobayashi, S., F. Sata, C. Miyashita, R. Miura, K. Azumi, S. Kobayashi, H. Goudarzi, A. Araki, M. Ishizuka, T. Todaka, J. Kajiwara, T. Hori, and R. Kishi. 2017. 'Gender-specific association of exposure to non-dioxin-like polychlorinated biphenyls during pregnancy with methylation levels of H19 and long interspersed nuclear element-1 in cord blood in the Hokkaido study', *Toxicology*, 390: 135-45.
10. Leung, Y. K., B. Ouyang, L. Niu, C. Xie, J. Ying, M. Medvedovic, A. Chen, P. Weihe, D. Valvi, P. Grandjean, and S. M. Ho. 2018. 'Identification of sex-specific DNA methylation changes driven by specific chemicals in cord blood in a Faroese birth cohort', *Epigenetics*, 13: 290-300.
11. Miura, R., A. Araki, M. Minatoya, K. Miyake, M. L. Chen, S. Kobayashi, C. Miyashita, J. Yamamoto, T. Matsumura, M. Ishizuka, T. Kubota, and R. Kishi. 2019. 'An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylation reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A', *Scientific reports*, 9: 12369.
12. Miura, R., A. Araki, C. Miyashita, S. Kobayashi, S. Kobayashi, S. L. Wang, C. H. Chen, K. Miyake, M. Ishizuka, Y. Iwasaki, Y. M. Ito, T. Kubota, and R. Kishi. 2018. 'An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: The Hokkaido study', *Environ Int*, 115: 21-28.

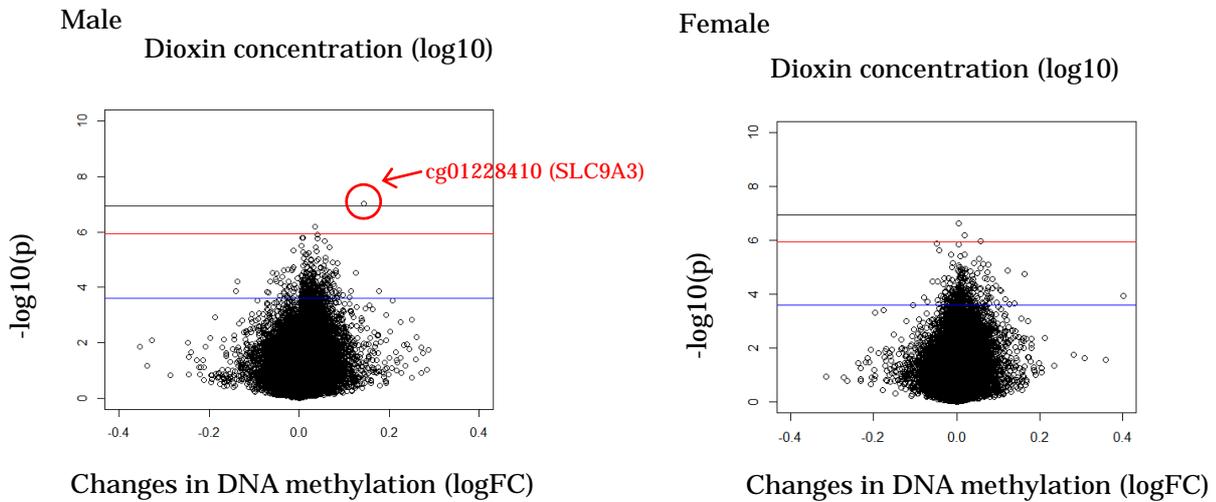
13. Smyth, G. K. 2004. 'Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments', *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3: Article3.
14. Yu, X., B. Zhao, Y. Su, Y. Zhang, J. Chen, W. Wu, Q. Cheng, X. Guo, Z. Zhao, X. Ke, W. Danzeng, B. Zhao, and Q. Ma. 2018. 'Association of prenatal organochlorine pesticide-dichlorodiphenyltrichloroethane exposure with fetal genome-wide DNA methylation', *Life Sci*, 200: 81-86.

図1. Dioxin 曝露と 45 万 CpGs メチル化(450k)との関連(DMP: differentially methylated position)

(A) マンハッタン・プロット



(B) ボルケーノ・プロット



Black line: q (FDR) < 0.05, Red line: q (FDR) < 0.1, Blue line: p < 2.50E-04

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. DNA メチル化変化量 (logFC) の男女別の高低メチル化の割合

	Hypo methylation	Hyper methylation	p
Male	34 (10.7)	283 (89.3)	0.0001
Female	59 (22.5)	203 (77.5)	

2 検定

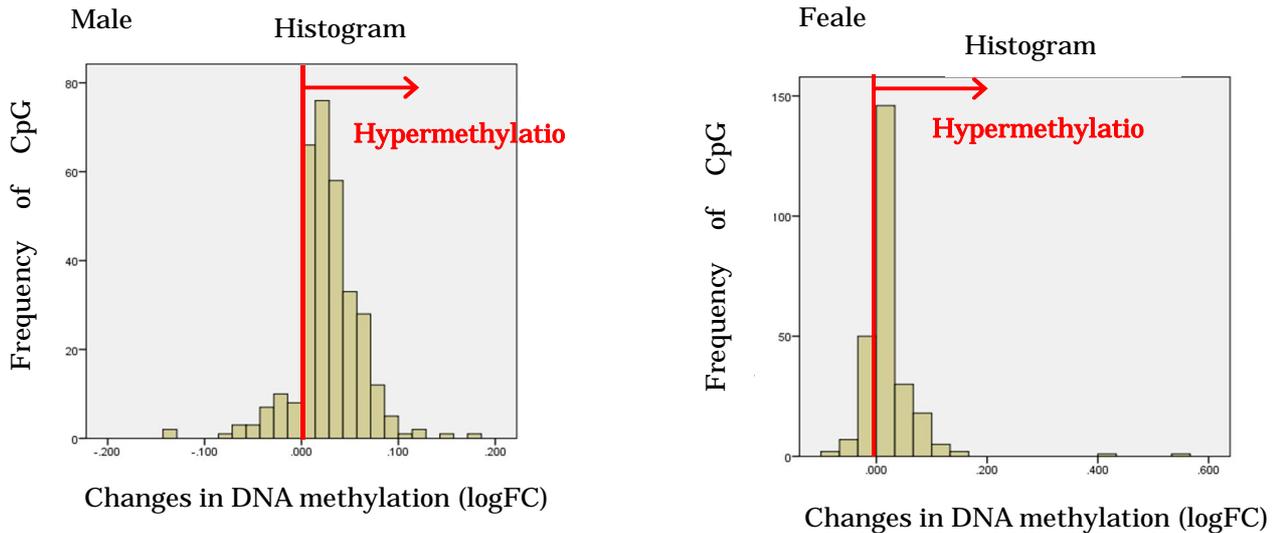
DMP から  $p < 2.50E-04$  の水準で抽出された CpG sites

表 2. DNA メチル化変化量 (logFC) の男女別の分布

	Frequency of CpG sites	minimum	25%th	59%th	75%th	maximum	p
Male	317	-0.140	0.011	0.026	0.044	0.177	0.001
Female	262	-0.079	0.003	0.010	0.030	0.563	

Mann-Whitney U test

図 2. Dioxin(log10)による DNA メチル化変化量 (logFC) の分布



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. 男女別のダイオキシン類と臍帯血中 DNA メチル化の KEGG パスウェイ ( $p < 0.05$ )

path No	Description	N	DE	P.DE	FDR
male					
path:hsa04061	Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	100	4.5	0.009589074	1
path:hsa01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	18	2	0.019418557	1
path:hsa04360	Axon guidance	181	8	0.028704492	1
path:hsa04977	Vitamin digestion and absorption	24	2	0.037293153	1
path:hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	104	4	0.042468097	1
path:hsa00020	Citrate cycle (TCA cycle)	30	2	0.045518804	1
female					
path:hsa00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	48	3	0.014026532	1
path:hsa04270	Vascular smooth muscle contraction	132	5	0.030635842	1

DMP から  $p < 2.50E-04$  の水準で抽出された CpG sites (male: 317, female: 262)

## 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：**近年，胎児期の喫煙曝露が神経発達障害のリスクを増加させ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ジェネティクス 特に DNA のメチル化の関与が指摘されているが，これまでに大規模出生コホートによる検証は行われていない。

**目的：**大規模出生コホート（北海道スタディ）を用いて，胎児期喫煙曝露と ADHD 疑いリスクとの間にどの程度 DNA メチル化が介在するかを検証することを目的とする。

**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 1300 名を解析対象とした。妊娠後期での母体の血清コチニン濃度により，非喫煙群，受動喫煙群，能動喫煙群へ群別化した。また 6 歳の ADHD-RS スコアにより ADHD 疑い群，健常者群とした。DNA メチル化は喫煙曝露により有意に DNA メチル化が変化する 5 つの遺伝子領域（AHRR，CYP1A1，MYO1G，ESR1，GFI1）を解析対象とし，次世代シーケンサー（NGS）を用いたバイサルファイトシーケンス法で解析した。NGS は Ion Torrent PGM system を用いてシーケンスを行い，MethylationAnalysis 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。統計解析は SPSS ver26 で行った。

**結果：**コチニン 3 群における一元配置分散分析の結果，AHRR は 5CpGs，CYP1A1 は 6CpGs，MYO1G は 20CpGs，GFI1 は 21CpGs で有意差（ $P < 0.05$ ）を認められたが，ESR1 は全ての CpGs で有意差が認められなかった。ロジスティック回帰分析の結果，出産歴（OR = 0.51；95% CI [0.34, 0.76]），世帯年収（OR = 0.39；95% CI [0.25, 0.60]），能動喫煙（OR = 2.51；95% CI [1.32, 4.75]）で有意な関連が認められた。妊婦（能動）の喫煙と ADHD 疑いの関連において AHRR のメチル化の媒介（mediation）分析した結果，AHRR の CpG\_34 は間接効果の傾向が見られ，CpG\_57 は有意に間接効果が認められた。

**考察：**妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。

### A．研究目的

胎児期の喫煙曝露が子供の自閉症スペクトラム障害（ASD）や注意欠陥多動性障害（ADHD）などの神経発達障害のリスクを増加させることが報告されている（Joelsson et al., 2016, Tran et al., 2013, Kalkbrenner et al., 2012）。その分子メカニズムとしてエピジェネティクス 特に DNA のメチル化の関与が指摘されている。胎児期は DNA メチル化の臨界期であり，こ

の時期の環境要因が DNA メチル化形成に影響し，成長後も維持されてしまうことが疾患リスクにつながると想定されている。

これまでに臍帯血 DNA を用いた網羅的 DNA メチル化解析から，胎児期の喫煙曝露により変化する遺伝子領域を明らかにしてきた（Miyake et al., 2018）。しかしながら，喫煙曝露による臍帯血 DNA のメチル化変化が，子供の ADHD リスクに関連するかはわかっていない。そこで本研究では，

大規模出生コホートをを用いて、喫煙曝露に影響される特異的遺伝子領域において次世代シーケンサーを用いた多検体のDNAメチル化解析を行い、“胎児期の喫煙曝露とDNAメチル化”および“DNAメチル化とADHD”の関連を解析し、胎児期喫煙曝露とADHDリスクとの間にどの程度DNAメチル化が介在するか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1300名を解析対象とした。妊娠後期（約8ヶ月）での母体の血清コチニン濃度（Sasaki et al., 2011）により、非喫煙群（ $\leq 0.21$ ）、受動喫煙群（ $0.22-11.48$  ng/mL）、能動喫煙群（ $\geq 11.49$ ）へ群別化した。また6歳のADHD-RSスコア（男児  $\geq 14.9$ , 女児  $\geq 9.4$ ）によりADHD疑い群、健常者群とした。

### 2．方法

これまでに実施した網羅的DNAメチル化解析（450K）ならびに次世代シーケンサー解析（NGS）から喫煙曝露により有意にDNAメチル化が変化する5つの遺伝子領域（AHRR, CYP1A1, MYO1G, ESR1, GFI1）を解析対象とした（表1）。DNAメチル化は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で解析した。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Ion PGM HiQ view kitを用いてテンプレート調整（Ion Chef）、シーケンスランを行った。取得したシーケンスデータはThermoFisher社のTorrent Suite Software ver5.0を用いてベースコールを行い、MethylationAnalysis Ampliconプラグインを用いて、各遺伝子標的領域おける各CpGサイトのメチル化率を算出した。統計解析はSPSS ver26で行った。

### （倫理面への配慮）

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センター、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

コチニン3群において各CpGのメチル化率に差があるかについて一元配置分散分析を行った。AHRRは5CpGs、CYP1A1は6CpGs、MYO1Gは20CpGs、GFI1は21CpGsで有意差（ $P < 0.05$ ）を認めしたが、ESR1は全てのCpGsで有意差が認められなかった。次にADHD疑い群、健常者群において各CpGのメチル化率に差があるかについて分析した。その結果、AHRRは2CpGs、CYP1A1は4CpGs、MYO1Gは17CpGs、GFI1は18CpGs、ESR1は10CpGsで有意差（ $P < 0.05$ ）を認めた。これらの2つの結果から共通して差があったAHRRの2CpGs、MYO1Gの17CpGs、

GF11 の 18CpGs についてさらなる解析を行った。

次に 6 歳児の ADHD 疑いを目的変数として、出産年齢、出産歴、世帯収入、飲酒、子の性別、NGS 実験年、回帰分析、受動喫煙、能動喫煙を説明変数としてロジスティック回帰分析を行った(表 2)。その結果、出産歴(OR = 0.51; 95% CI [0.34, 0.76])、世帯年収(OR = 0.39; 95% CI [0.25, 0.60])、能動喫煙(OR = 2.51; 95% CI [1.32, 4.75])で有意な関連が認められた。また非喫煙、受動喫煙、能動喫煙の 3 群をトレンド解析した結果の P 値=0.027 で有意であったことから量反応性が認められた。

次に胎児期喫煙と各 CpG サイトのメチル化の関連について回帰分析を行った。その結果、能動喫煙と AHRR の 2CpGs, MY01G の 17CpGs, GF11 の 18CpGs の全てで有意な関連(P < 0.01) が認められた。さらにメチル化と ADHD 疑いとの関連について回帰分析を行った結果、AHRR の 2CpGs と MY01G の 3CpGs で有意な関連(P < 0.05) が認められた。

さらに妊婦(能動)の喫煙と ADHD 疑いの関連において AHRR の 2CpGs, MY01G の 3CpGs のメチル化の媒介(mediation)を解析した。その結果、AHRR の CpG\_34(図 1A) は CpG\_34 から ADHD 疑いの経路で有意差が認められなかった(p = 0.0559)が間接効果の傾向が見られ、CpG\_57(図 1B)は有意に間接効果が認められた MY01G の 3 つの CpGs(MY01G\_143, MY01G\_186, MY01G\_212)については媒介効果の判定が困難であった。

#### D. 考察

これまでに網羅的解析により臍帯血 DNA における胎児期喫煙曝露により変化する

DNA メチル化部位を報告している(Miyake et al., 2018)。その内 5 つの遺伝子領域に着目し、次世代シーケンサーを用いたバイサルファイト シーケンス法により 1300 検体のメチル化を解析し、胎児期の喫煙曝露と ADHD 疑いの関連について DNA メチル化の媒介効果を判定することができた。

一元配置分散分析から AHRR, MY01G, GF11 の多くの CpG で CYP1A1 の一部の CpG で有意な差が認められたが、ESR1 は全ての CpG で有意差が認められなかった。AHRR, MY01G, GF11, CYP1A1 はこれまでに喫煙曝露によりメチル化が変化する遺伝子としていくつか報告(Joubert et al., 2016, Morales et al., 2016)されており、本研究においても同様の結果が示された。ESR1 については偽陽性である可能性が高いと考えられる。

ロジスティック回帰分析の結果、非喫煙者と比較して喫煙者で 6 歳児の ADHD 疑いが 2.51 倍になることがわかった。受動喫煙では 1.04 倍であることから、妊娠中の母親自身の喫煙が子供の ADHD のリスクにつながると考えられる。

本研究において妊婦の喫煙と ADHD 疑いの関連に対して AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。これまでは妊婦の喫煙と出生体重に対してメチル化が媒介することは報告(Witt et al., 2018, Küpers et al., 2015)されていたが、子供の神経発達障害に対するメチル化の媒介効果は世界で初めての報告である。MY01G の 3CpGs についても媒介分析を行ったが、直接効果(喫煙 ADHD 疑い)と間接効果(“喫煙 メチル化” × “メチル化 ADHD 疑い”)で偏回帰係数の正負が不一致となってしまったため媒介効果を判

定できなかった。今後、調整変数の選び方や他の解析手法の検討を行い、媒介効果を検証していく必要がある。

AhRR は、ダイオキシン類などのリガンドによって活性化される AhR と競合し、転写活性化を抑制する分子である。喫煙によりメチル化が変化する遺伝子として、がん、動脈硬化、喘息との関与が指摘されている（Rauschert et al., 2019, Neophytou et al., 2019）。AhRR のメチル化変化が ADHD の発症や病態メカニズムに直接関与するかはまだわかっていないが、ADHD のリスクマーカーとなる可能性がある。本研究は出生コホートをを用いて“胎児期の喫煙曝露 - 臍帯血 DNA のメチル化 - 6 歳の ADHD 疑い”の関連を明らかにしてきたが、今後の課題がいくつか考えられる。1 つ目に生後の喫煙曝露を含む環境要因を考慮できていない。2 つ目に臍帯血の DNA メチル化状態が 6 歳でも維持されているか測定できていない。3 つ目に臍帯血や末梢血の DNA のメチル化状態が ADHD の脳のメチル化と相関しているかはわからない。今後、出生コホートにおける追跡調査を進めていくだけでなく、細胞（iPS 細胞など）や動物実験での評価を含めて、胎児期喫煙曝露と ADHD リスクをつなぐ分子メカニズムの解明を行う必要がある。

## E . 結論

妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AhRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

1. Miura R, Araki A, Minatoya M, Miyake K, Chen ML, Kobayashi S, Miyashita C, Yamamoto J, Matsumura T, Ishizuka M, Kubota T, Kishi R. An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylation reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A. *Sci Rep.* 2019; 9(1):12369.
2. Itoh Y, Koinuma D, Omata C, Ogami T, Motizuki M, Yaguchi SI, Itoh T, Miyake K, Tsutsumi S, Aburatani H, Saitoh M, Miyazono K, Miyazawa K. A comparative analysis of Smad-responsive motifs identifies multiple regulatory inputs for TGF- $\beta$  transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2019; 294(42):15466-15479.
3. Ohtsubo K, Miyake K, Arai S, Fukuda K, Yanagimura N, Suzuki C, Otani S, Adachi Y, Tanimoto A, Nishiyama A, Yamashita K, Takeuchi S, Notohara K, Yoshimura K, Yano S. Aberrant Methylation of Tumor Suppressive miRNAs in Bile from Patients With Pancreaticobiliary Diseases. *Anticancer Res.* 2019; 39(10):5449-5459.

### 2. 学会発表

1. 大坪公士郎，三宅邦夫，矢野聖二．各種膵胆道疾患における胆汁中癌抑制型 miRNA のメチル化に関する検討．第 105 回日本消化器病学会総会．(2019.05.09)

2. 三宅邦夫. DOHaD 研究におけるエピジェネティクス. 第 13 回 DOHaD 疫学セミナー. (2019.06.29)
3. 渡邊 大輔, 矢ヶ崎 英晃, 成澤 宏宗, 牧野 耕一, 三井 弓子, 佐藤 和正, 佐野 友昭, 中根 貴弥, 太田 正法, 犬飼 岳史, 三宅 邦夫. 先天性甲状腺機能低下症における遺伝子解析スクリーニングの有用性. 第 53 回日本小児内分泌学会学術集会. (2019.09.27)

### G. 知的財産権の出願・登録状況

三宅 邦夫, 犬飼 岳史, 渡邊 敦, 木内 博之, 川瀧 智之, 埴原 光人, 山田 有理子. 神経膠腫の予後判定方法. 特願 2020-007686. (2020.01.21)

### 参考文献

1. 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.
2. Tran PL, Lehti V, et al. Smoking during pregnancy and risk of autism spectrum disorder in a Finnish National Birth Cohort. Paediatr Perinat Epidemiol. 2013; 27(3):266-74.
3. Kalkbrenner AE, Braun JM, et al. Maternal smoking during pregnancy and the prevalence of autism spectrum disorders, using data from the autism and developmental disabilities monitoring network. Environ Health Perspect. 2012; 120(7):1042-8.
4. Miyake K, Kawaguchi A, et al. Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on 2019.09.27)Environment and Children's Health. Scientific Report. 2018; 8: 5654.
5. Sasaki S, Braimoh TS, et al. Self-reported tobacco smoke exposure and plasma cotinine levels during pregnancy--a validation study in Northern Japan. Sci Total Environ. 2011; 412-413:114-8.
6. 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.
7. 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.
8. Witt SH, Frank J et al. Impact on birth weight of maternal smoking throughout pregnancy mediated by DNA methylation. BMC Genomics. 2018;19(1):290.
9. 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.

10. Rauschert S, Melton PE et al. Maternal Smoking During Pregnancy Induces Persistent Epigenetic Changes Into Adolescence, Independent of Postnatal Smoke Exposure and Is Associated With Cardiometabolic Risk. *Front Genet.* 2019; 10:770.
11. Neophytou AM, Oh SS et al. In utero tobacco smoke exposure, DNA methylation, and asthma in Latino children. *Environ Epidemiol.* 2019; 3(3):e048.

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. DNA メチル化解析遺伝子領域

遺伝子名	メチル化解析領域 (hg38)	CpG数	領域内に含まれる450K CpG No.
AHRR	chr5:373,213-373,332	5	cg05575921
CYP1A1	chr15:74,726,610-74,726,828	17	cg05549655/cg00213123/cg23727072
MYO1G	chr7:44,963,075-44,963,360	20	cg12803068/cg04180046
GF11	chr1:92,481,065-92,481,301	21	cg12876356/cg18146737
ESR1	chr6:151,808,879-151,809,120	11	cg04063345/cg15626350

表 2. 胎児期喫煙曝露と 6 歳児 ADHD との関係

	OR (95%CI)
出産時年齢	1.01 (0.97, 1.06)
出産歴	0.51 (0.34, 0.76)**
世帯年収	0.39 (0.25, 0.60)**
母妊娠初期飲酒	1.13 (0.64, 1.98)
子_性別	1.05 (0.71, 1.53)
NGS実験年	0.02 (0.01, 0.04)**
コチニン 受動喫煙	1.04 (0.68, 1.58)
コチニン 能動喫煙	2.51 (1.32, 4.75)**
	**p < 0.01

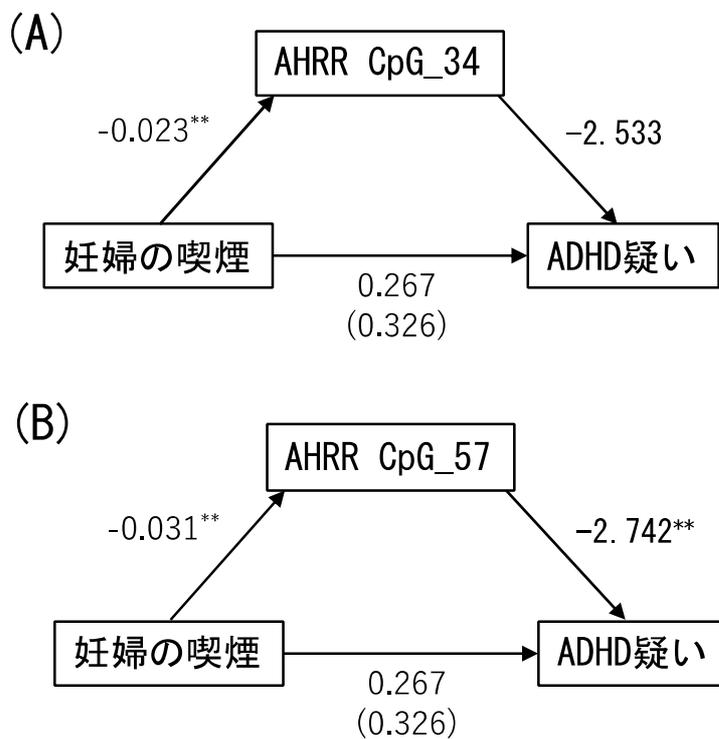


図1. 妊婦の喫煙とADHD疑いの関連におけるAHRRメチル化の媒介解析

## 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
Araki A., Ait Bamai Y., Bastiaensen M., Vanden Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Miyashita C., Itoh, S. Goudarzi H., Konno S., Covaci A., Kishi R.	Combined exposure to phthalate esters and phosphate flame retardants and plasticizers and their associations with wheeze and allergy symptoms among school children	Environmental Research	183	109212	2020
Kashino I., Sasaki S., Okada E., Matsuura H., Goudarzi H., Miyashita C., Okada E., Ito Y. M., Araki A., Kishi R.	Prenatal exposure to 11 perfluoroalkyl substances and fetal growth: A large-scale, prospective birth cohort study	Environment International	136	105355	2020
Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Araki A., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Kishi R., Covaci A.	Biomonitoring of organophosphate flame retardants and plasticizers in children: associations with house dust and housing characteristics in Japan.	Environmental Research	172	543-551	2019
Saijo Y., Ito Y., Yoshioka E., Minatoya M., Araki A., Miyashita C., Kishi R.	Identifying a risk score for childhood obesity based on predictors identified in pregnant women and 1-year-old infants: An analysis of the data of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health.	Clinical Pediatric Endocrinology	28 (3)	81-89	2019
Miura R., Araki A., Minatoya M., Miyake K., Chen M.-L., Kobayashi S., Miyashita C., Yamamoto J., Matsumura T., Ishizuka M., Kubota T., Kishi, R.	An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylation reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A.	Scientific Report	9 (1)	12369	2019
Ait Bamai Y., Bastiaensen M., Araki A., Goudarzi H., Konno S., Ito S., Miyashita C., Yao Y., Covaci A., Kishi R.	Multiple exposures to organophosphate flame retardants alter urinary oxidative stress biomarkers among children: The Hokkaido Study.	Environment International	131	105003	2019
Minatoya M., Araki A., Itoh S., Yamazaki K., Kobayashi S., Miyashita C., Sasaki S., Kishi R.	Prenatal tobacco exposure and ADHD symptoms at pre-school age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health.	Environmental Health and Preventive Medicine	24 (1)	74-82	2019
Itoh S., Araki A., Miyashita C., Yamazaki K., Goudarzi H., Minatoya M., Ait Bamai Y., Kobayashi S., Okada E., Kashino I., Yuasa M., Baba T., Kishi R.	Association between perfluoroalkyl substance exposure and thyroid hormone/thyroid antibody levels in maternal and cord blood: The Hokkaido Study	Environment International	133 Part A	105139	2019

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mitsui T., Araki A., Miyashita C., Ito S., Ikeno T., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.	Effects of prenatal sex hormones on behavioral sexual dimorphism	Pediatrics International	61	140-146	2019
小林澄貴, 佐田文宏, 花岡知之, チチローラ・プライモー, 伊藤久美子, 田村菜穂美, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 宮下ちひろ, 岸玲子	胎児期の受動喫煙曝露が正期産のSmall-for-gestational-age(SGA)に及ぼす影響：前向き出生コホート研究（北海道スタディ）	北海道公衆衛生学雑誌	33(2)	10-12	2020
岸玲子	日本で初めての本格的な出生コホート研究（環境と子どもの健康に関する北海道スタディ）17年の成果と環境省エコチル研究について	日本小児呼吸器学会雑誌	30(1)	63-66	2019

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	
Araki A., Jensen T. K.	Endocrine-Distributing Chemicals and Reproductive Function	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	101-129
Chen M.-L., Chang C.-H., Minatoya M.	Bisphenols and Alkylphenols Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	405-437
Goudarzi H., Yamazaki K.	Effects of Developmental Exposure to Perfluoroalkyl Substances on Health Outcomes in Pregnant Women and Offspring	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	301-357
Hanaoka T., Miyashita C., Itoh K., Kishi R.	Effects of Environmental Chemical Exposure on Birth Defects (Except Cryptorchidism and Hypospadias)	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	55-68

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Itoh S.	Thyroid Hormone System and Development	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	131-152
Kishi R.	Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals on Human Health with Global Perspectives.	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	3-22
Kishi R., Araki A.	Further Direction of Research and Policy Making of Environment and Children's Health	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	545-557
Minatoya M., Hanaoka T., Kishi R.	Environmental Exposures and Adverse Pregnancy-Related Outcomes	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	25-38
Mitsui T., Sata F., Kishi R.	Cryptorchidism and Hypospadias	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	69-99
Miyashita C.	Environmental Pollution and Recent Data on Asian Children's Health in Relation to Pre- and Early Post-natal Exposure to Persistent Organic Pollutants, Including PCBs, PCDD/PCDFs, and Organochlorine Pesticides	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	279-300
Sata F., Kobayashi S., Kishi R.	Gene-Environment Interactions to Detect Adverse Health Effects on the Next Generation	Kishi R., Grandjean P.	Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals	Springer Nature		2020	485-512
Kishi R., Araki A., Miyashita C., Kobayashi S., Miura R., Minatoya M.	The Hokkaido Study on Environment and Children's Health	Sata, F., Fukuoka, H., Hansen, M.	Pre-emptive Medicine: Public Health Aspects of Developmental Origins of Health and Disease	Springer		2020	145-163

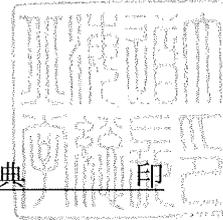
令和2年3月17日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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



次の職員の令和元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
- 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。

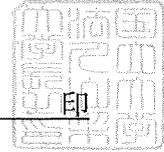
令和2年 1月23日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

機関名 山梨大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 島田 眞路



次の職員の令和元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) 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。

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 印



次の職員の令和元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) 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□にチェックを入れること。

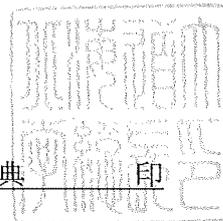
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 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



次の職員の令和元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： )

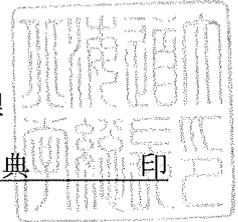
(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣  
 (国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
 (国立保健医療科学院長)

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



次の職員の令和元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) 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□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。

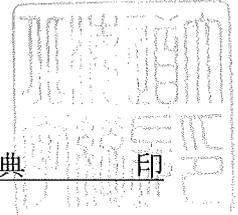
令和2年3月17日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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



次の職員の令和元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。

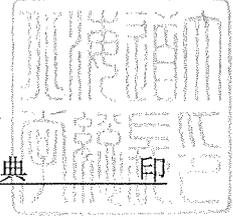
令和2年3月17日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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



次の職員の令和元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。

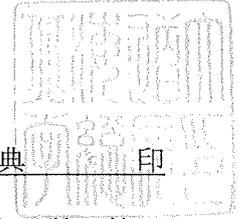
令和2年3月17日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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



次の職員の令和元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。

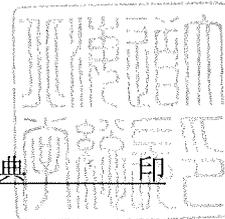
令和2年3月17日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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



次の職員の令和元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・学術研究員  
(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。

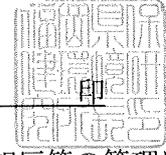
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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



次の職員の令和元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。

令和2年 3月 11日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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 田畑 彰久  
氏名 \_\_\_\_\_  


次の職員の令和元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 網羅的エピゲノムの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) 常務取締役 環境創造研究所所長 海外事業戦略室室長  
(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： )

2020年3月11日

2019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、生体試料中の微量フタル酸エステル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1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

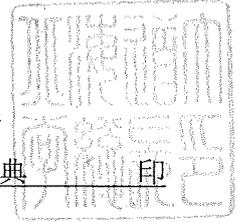
令和2年3月18日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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



次の職員の令和元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□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。

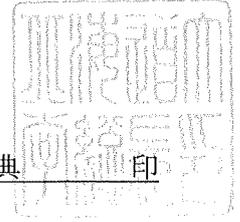
令和2年3月17日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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



次の職員の令和元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。