

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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

平成29年度～令和元年度 総合研究報告書

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

三宅 邦夫

北海道大学大学院獣医学研究院毒性学教室

石塚真由美

中央大学保健センター

佐田 文宏

北海道大学環境健康科学研究教育センター

荒木 敦子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

宮下ちひろ

北海道大学環境健康科学研究教育センター

伊藤佐智子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

山崎 圭子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

三浦りゅう

福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課

堀 就英

いであ株式会社

松村 徹

北海道大学大学院農学研究院生物有機化学研究室

松浦 英幸

北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室

篠原 信雄

令和2(2020)年 5月

# 目 次

. はじめに	1
. 総合研究報告書	
網羅的エピゲノム解析を用いた化学物質による次世代影響の解明：新しい試験スキームへの基礎的検討	
岸 玲子ほか	2
. 分担研究報告書	
1. 胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 <i>IGF-2</i> ・ <i>H19</i> ・ <i>LINE-1</i> メチル化との関連	
宮下 ちひろ, 佐田 文宏, 石塚 真由美, 堀 就英, 松村 徹	32
2. 胎児期有機フッ素化合物 (PFASs) 曝露の臍帯血 DNA 網羅的エピゲノム解析	
三浦 りゅう, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ, 伊藤 佐智子, 山崎 圭子, 松浦 英幸, 篠原 信雄	41
3. 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	
三宅 邦夫, 三浦 りゅう, 荒木 敦子	59
4. 人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析ならびに測定方法の開発	
岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ, 堀 就英	68
5. 血液中フタル酸モノエステル類の分析	
岸 玲子, 松村 徹, 荒木 敦子, 伊藤 佐智子	75
6. 胎児期ビスフェノール A 曝露の臍帯血 DNA エピゲノム網羅的メチル化解析	
岸 玲子, 三浦 りゅう, 山崎 圭子, 松浦 英幸, 篠原 信雄	85
7. 大規模コホートにおける次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析	
岸 玲子, 三宅 邦夫, 石塚 真由美, 佐田 文宏	105
8. 異性体を含めたヒト生体試料中 Diisononyl phthalate (DiNP) 代謝物の定性・定量	
岸 玲子, 松村 徹, 荒木 敦子, 伊藤 佐智子	113
9. 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	123

10. 人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析ならびに測定方法の開発 岸 玲子, 堀 就英, 山崎 圭子 -----	145
11. 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 -----	152
12. 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 -----	161
. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	169

## 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、半減期が長いので、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 514 人の母体血とお子様の臍帯血について、PCBs・ダイオキシン類、有機フッ素化合物 ( PFOS・PFOA )、フタル酸エステル類などの測定を行い、種々のアウトカムとの関係を調べています。また、北海道全域の北海道 ( 大規模 ) コホートでは、母子ペアで参加者が 20926 名になりました。妊娠初期に同意を得た妊婦について母体血の環境化学物質の測定を行い、成長・発達、甲状腺ホルモン、アレルギー・感染症、および性ホルモン・第二次性徴への影響を研究し、先天異常や疾病との関係について解析を進めています。

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

本研究は臨床家と環境疫学、および、環境化学物質の測定専門家の協力で進めています。このような地域をベースに胎児期から立ち上げ、環境リスク評価を行っている研究は、最近増えてきていますが、本研究はその先駆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。

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

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

2018 年度は胎児期曝露評価として人体試料中のダイオキシン類及び関連化合物の分析を実施した。臍帯血 94 検体を用いてダイオキシン類 29 異性体、および PCBs56 異性体の whole および lipid ベースの濃度を測定した。ダイオキシン類 29 異性体について毒性等価係数 TEF を使用して毒性等価量 TEQ を算出した。また妊娠初期血清 20 検体を用いて代謝物であるフタル酸モノエステル類 7 種 (MnBP, MiBP, MBzP, MEHP, MEHHP, MECPP, cx-MiNP) の分析を実施した。次に、エピゲノム網羅的 DNA メチル化変化と胎児期ビスフェノール A (BPA) 曝露との関連を検討した。解析した 45 万 CpG 部位全体のメチル化変化としては、男児ではメチル化増加、女児ではメチル化減少が顕著であった。また、メチル化変化を示す遺伝子のネットワーク形成や機能にも男女間で差異が見られ、BPA 曝露によるメチル化への作用機序に性差による違いがあることが示唆された (Sci Rep. under revision)。また、北海道スタディ大規模コホートにおける ADHD ケース・サブコホートを用いて、次世代シーケンサーを用いた DNA 解析手法の検証、喫煙曝露と DNA メチル化および ADHD の関連を検討した。ケース：245 名、コントロール：317 名の臍帯血 DNA を用い、昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析において胎児期の喫煙曝露により有意に DNA メチル化変化した 46CpGs の中から 14CpGs (9 遺伝子) を選択し、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析 (Thermo Fisher 社の IonPGM システム) を行った。質問票により群別化した非喫煙群、喫煙群間で 5 つの CpGs (AHRR (cg05575921), MY01G (12803068), GF11 (cg12876356, cg18146737), ESR1 (cg15626350)) については

450Kの結果同様、喫煙曝露によるメチル化変化に統計的有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めた。コチニン濃度で群別化した結果、ERS1 以外の4つの CpGs は質問票と同様に低濃度および中程度濃度群と比較して高濃度群で有意な差が認められ、次世代シークエンサーを用いた特異的遺伝子領域のDNAメチル化解析法から喫煙曝露の影響を受けやすい遺伝子領域の検証ができた。一方、喫煙曝露による ADHD 疑い群の危険率の指標としてのオッズ比は約 1.5 であったが、有意の関連は認めなかった。サンプルサイズを増やし、今後引き続き検討が必要と考えられた。

2019年度は、胎児期曝露評価として妊娠初期血清 1786 検体を用いて代謝物であるフタル酸モノエステル類 (cx-MiNP) の再分析を実施した。DiNP は他のフタル酸エステル類と異なり、化合物そのものが DiNP-1 と DiNP-2 および DiNP-3 の異性体の混合物であることが知られている (European Union Commission, 2003)。そのため製品を通して曝露した DiNP の混合体は、体内で代謝され、一次代謝物のモノ体、二次代謝物のカルボキシ体およびヒドロキシ体についてもそれぞれ構造異性体をもつことが報告されている (Koch et al., 2007)。これまで北海道スタディでは、母体血中 DiNP 代謝物として、カルボキシ体である cx-MiNP の曝露評価を実施してきたが、いくつかある構造異性体のうちの1つである mono-(4-methyl-7-carboxyheptyl)phthalate のみの定量であり、その他の mono-(7-carboxyoctyl)phthalate や他のカルボキシ体の構造異性体は考慮されていなかった。EU のバイオモニタリンググループである Human Biomonitoring for EU (HB4EU) においても、1つの構造異性体のみでの曝露評価ではなく、複数の構造異性体を含めた DiNP 代謝物の定量法を用いており、北海道スタディにおいても、同様の評価をすべきと考えた。再定量により、実情に即した曝露データとなるとともに HB4EU など、世界と比較可能なデータとして用いることが可能となった。次に、フタル酸エステル類の胎児期曝露について、臍帯血 DNA メチル化のエピゲノム網羅的解析を行った。その結果、曝露により代謝系に関わる遺伝子のメチル化が影響を受けていること、それらのメチル化変化は出生時のボンデラル指数の低下と関連していることを明らかにした。さらに、媒介分析により、胎児期曝露による出生児のボンデラル指数低下への影響にそれらのメチル化変化が関与している可能性を示唆した。

臍帯血試料を対象にダイオキシン類・PCBs の異性体定量分析を実施した。定量結果の平均値及び濃度範囲を過去の報告事例と比較したところ、脂肪重量当たりのダイオキシン類濃度は同等となり、PCBs 濃度はやや低い傾向が認められた。85名の妊産婦から採取された臍帯血試料は、本研究事業の主たる目的である一般的なヒトの集団におけるダイオキシン類・PCBs の次世代影響評価に適切な試料であると考えられた。続いて、エピゲノム網羅的 DNA メチル化変化と胎児期ダイオキシン類曝露との関連を検討した。ダイオキシン類濃度と関連があった CpG (遺伝子) は男児の cg0122841Q (SLC9A3, FDR= 0.041) のみで、女児では同定されなかった。メチル化変化部位 (differentially methylated position; DMP) 解析から  $p < 2.50E-04$  水準で男児 317CpG、女児 262CpG が抽出された。男児で高メチル化の割合が高く、男児でより DNA 高メチル化変化量 (logFC) は大きかった。ダイオキシン類の胎児期曝露による出生体重や生後の免疫への影響には性差があり、男児に影響が顕著に認められることを既に報告しており、本研究から、エピゲノム変化も性差がある可能性が示唆された。

2018 度から継続した研究で、次世代シーケンサーを実施した ADHD ケース・サブコホート 1263 名に解析対象を拡大した結果、妊娠後期コチニン濃度で分類した 3 群のうち、能動喫煙群で 6 歳 ADHD 傾向の有意な増加が認められた。コチニン 3 群における一元配置分散分析の結果、AHRR は 5CpGs、CYP1A1 は 6CpGs、MYO1G は 20CpGs、GFI1 は 21CpGs で有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めたが、ESR1 は全ての CpGs で有意差が認められなかった。ロジスティック回帰分析の結果、6 歳 ADHD 傾向と出産歴 ( $OR = 0.51$ ; 95% CI [0.34, 0.76]), 世帯年収 ( $OR = 0.39$ ; 95% CI [0.25, 0.60]), 能動喫煙 ( $OR = 2.51$ ; 95% CI [1.32, 4.75]) と有意な関連が認められた。妊婦(能動)の喫煙と ADHD 疑いの関連において AHRR のメチル化の媒介(mediation)を分析した結果、AHRR の CpG\_34 は間接効果の傾向が見られ、CpG\_57 は有意に間接効果が認められた。妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。

< 研究分担者 >

三宅 邦夫  
山梨大学大学院総合研究部医学域  
社会医学講座，准教授

石塚 真由美  
北海道大学大学院獣医学研究院毒性  
学教室，教授

佐田 文宏  
中央大学保健センター，医療管理者

荒木 敦子  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任准教授

宮下 ちひろ  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任准教授

伊藤 佐智子  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任講師

山崎 圭子  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任講師

三浦 りゅう  
北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任助教

堀 就英  
福岡県保健環境研究所保健科学部 課  
長

松村 徹  
いであ株式会社，常務取締役

松浦 英幸  
北海道大学大学院農学研究院生物有  
機化学研究室，教授

篠原 信雄  
北海道大学大学院医学研究院腎泌尿  
器外科学教室，教授

## A . 研究目的

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

DNA のシトシン塩基 (C) とグアニン塩

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

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

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

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

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

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

## B . 研究方法

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2002 ~ 2012 年に北海道内の医療機関を受診し, 調査の同意を得た妊産婦 94 名について, 分娩時に臍帯血を採取して調査試料とした。採取後の臍帯血は

密閉可能な容器に移され、北海道大学で冷凍保存された。測定は福岡県保健環境研究所で実施した。アセトン、ヘキサン等の有機溶媒は関東化学製のダイオキシン分析用を用いた。硝酸銀シリカゲルは富士フィルム和光純薬製のダイオキシン分析用を、濃硫酸は同社製の有害金属測定用をそれぞれ使用した。活性炭（ナカライテスク製）はトルエンで約 30 時間還流洗浄し、無水硫酸ナトリウムに対して 0.1% (w/w) になるよう混合して用いた。

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

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

画分 1 の最終検液量は 100  $\mu$ L であり、このうちの 1  $\mu$ L を HRGC/HRMS (Agilent 6890/JEOL JMS-800D) に注入して測定した。一方、画分 2 の最終検液量は全量 200  $\mu$ L とし、このうち 100  $\mu$ L を大量試料注入装置(アイスティサイエンス製 LVI-S200) 付き HRGC/HRMS (Agilent 6890 /

Micromass AutoSpec Premier) に注入して測定した。上記 1 と 2 から得られた SIM クロマトグラムを解析し、ダイオキシン類 (29 異性体) 及び PCBs (約 70 種類の 3 ~ 10 塩素化体) を定量した。

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

ダイオキシン類及び PCBs 濃度は脂肪重量あたりの濃度 (lipid weight basis) または全血重量あたりの濃度 (whole blood weight basis) で表記した。ダイオキシン類濃度 (pg/g) の 2,3,7,8-TCDD 毒性当量 (TEQ) への換算には、2,3,7,8-TCDD 毒性等価係数 (WHO-TEF (2005)) を用いた。定量下限値未満となった化合物の濃度は、定量下限値の 1/2 値として取り扱い、TEQ を算出した。

## 5. 血液中フタル酸モノエステル類の分析

フタル酸エステル類については、ヒトがばく露されると代謝物が生じることが分かっている。今回は、小児、胎児期における影響を調べるため、代謝物であるモノエステル類 7 種 (MnBP, MiBP, MBzP, MEHP, MEHHP, MECPP, cx-MiNP) について血液試料の分析法を確立し、実試料の測定を行った。

開発した同位体希釈法-液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (以降、LC-MS/MS) をヒト血液試料 20 検体に適応した。対象とするそれぞれの項目の安定同位体をクリーンアップスパイクとして添加し、濃度の計算に用いた。

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

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

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

北海道スタディ大規模コホートにおける ADHD ケース・サブコホートのうち臍帯血 DNA のそろそろ母児 562 名 (ケース: 245 名, コントロール: 317 名) を対象とした。質問票により、喫煙経験のない非喫煙群 ( $n = 276$ )、妊娠中も喫煙を継続した喫煙群 ( $n = 38$ ) に群別化した。また、産後期 (約 8 ヶ月) での母体の血清コチニン濃度 (Sasaki 2011) により、血清コチニン高濃度群 ( $\geq 11.49$ ,  $n = 48$ )、中程度濃度群 ( $0.22-11.48$  ng/mL,  $n = 200$ )、低濃度群 ( $\leq 0.21$ ,  $n = 262$ ) へ群別化した。プライマリーエンドポイントとして 6

歳の ADHD-RS スコア (男児  $\geq 14.9$ , 女児  $\geq 9.4$ ) により ADHD 疑い群 ( $n = 224$ )、健常者群 ( $n = 286$ ) が解析対象者となった。昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析において、胎児期の喫煙曝露により有意に DNA メチル化変化した 46CpGs から 14CpGs (9 遺伝子) を選択した。次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス解析は ThermoFisher 社の IonPGM システムを用いた。

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

高速液体クロマトグラフ タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) の Product ion Scan モードによって OH-MiNP (Precursor ion:  $m/z$  307) の product ion spectrum を得た。得られた結果より、 $m/z$  121 や 77 のフラグメントが強い強度で確認された。各フラグメントの質量数から、それらの構造は安息香酸部およびベンゼン部であることが明らかとなり、これらのフラグメントは、異性体共通で発生すると考えられた。すなわち、OH-MiNP のモニターイオンを  $m/z$  307>121 (定量イオン: Q1), 307>77 (確認イオン: Q2) とした場合、それぞれは同様のクロマトグラムパターンであり、これらは全異性体に共通して確認できると推測される。同様のクロマトグラムパターンが得られる範囲を全異性体の検出範囲とし、Mono (4-methyl-7-hydroxyoctyl) phthalate の標準物質を用いた同位体希釈法により、異性体を含む総 OH-MiNP を定量した。cx-MiNP, MiNP についても確認し、同様の手法で定量することとした。各 total 体の定性は、検量線試料および実試料の Q1 と Q2 のピーク面積比 ( $Q1/Q2_{RM}$ ,  $Q1/Q2_{sample}$ ) を算出して確認した。検量

線試料は各 *single* 体の標準物質を用いて調製した。

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

リクルート時調査票・出産時カルテ情報・母体血中 MEHP (DEHP の一次代謝物) 濃度がそろった北海道スタディ札幌コホートの 203 母児ペアを対象とした。MEHP 濃度は GC-MS で測定した。約 45 万 CpGs の臍帯血 DNA メチル化データは 450K (イルミナ社) により取得し、標準化後、バッチ間の補正を行った。メチル化値と自然対数変換した MEHP 濃度との関連を、母の年齢、出産前 BMI、教育歴、採血時期、妊娠中喫煙、児の性別、在胎週数、および、メチル化値から推定した細胞組成値 (Bakulski et al. 2016) で調整した robust linear regression (Fox and Weisberg 2011)、経験ベイズ法 (Smyth 2004) により解析した。さらに、KEGG pathways (Kanehisa et al. 2002) を用いた Gene Ontology (GO) 解析を行った。また、GO 解析で明らかになった代謝系に関わる遺伝子のメチル化と出生時のポンドラル指数 (PI) との関連を重回帰分析により解析した。調整因子には母の年齢、出産歴、出産前 BMI、教育歴、妊娠中喫煙、児の性別を用いた。次に、MEHP 濃度と PI 低下との関連にメチル化変化が関与しているか、媒介分析 (Hayes 2013) により検討した。調整因子は上記に採血時期を加えた。

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

2002~2012 年に北海道内の医療機関を受診し、調査の同意を得た妊産婦 85 名について、分娩時に臍帯血を採取して調査試料とした。採取後の臍帯血は密閉可能

な容器に移され、北海道大学で冷凍保存された。測定は福岡県保健環境研究所で実施した。

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

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

ダイオキシン類及び PCBs 濃度は脂肪重量あたりの濃度 (lipid weight basis) または全血重量あたりの濃度 (whole blood weight basis) で表記した。ダイオキシン類濃度 (pg/g) の 2,3,7,8-TCDD 毒性当量 (TEQ) への換算には、2,3,7,8-TCDD 毒性等価係数 (WHO-TEF (2005)) を用いた。定量下限値未満となった化合物の濃度は、定量下限値の 1/2 値として取り扱い、TEQ を算出した。

### 11. PCB/dioxin と網羅的メチル化解析

出生前向きコホート北海道スタディ (札幌コホート) において、1 産科病院を受診した妊婦 514 名から参加同意を得た。妊娠中期から後期の母体血中ダイオキシン類を、高分解能ガススペクトロメトリ・高分解能マススペクトロメーター (GS-MS) を用いて分析した。出生時の臍帯血を用いて網羅的メチル化解析を実施

した。抽出した臍帯血 DNA をバイサルファイト処理し、45 万 CpG 部位の網羅的メチル化を解析した ( Infinium HumanMethylation450 BeadChip ( イルミナ社 ))。網羅解析から得られたメチル化値を標準化後、バッチ間の補正を行った。メチル化値と log10 変換したダイオキシン類濃度との関連を robust linear regression (Fox and Weisberg 2011), 経験ベイズ法(Smyth 2004)による多変量解析を用いて、メチル化変化部位 ( differentially methylated position; DMP ) を同定した。多変量解析では、母の出産歴、妊娠中喫煙、採血時期、児の性別 および、メチル化値から推定した (Bakulski et al. 2016)細胞組成値で調整した。児の性別で層別化した解析も実施した。さらに同じ多変量解析モデルを用いてメチル化変化領域 ( differentially methylated region; DMR ) を bumpHunter 法 (Jaffe et al, 2012)により同定した。

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

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

### (倫理面への配慮)

本調査は北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科、福岡県保健環境研究所、山梨大学の倫理委員会、遺伝子解析審査小委員会および共同研究施設の倫理規定に従って実施し、インフォームド・コンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮し、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。福岡県保健環境研究所は臍帯血試料と試料リストを取り扱う。生体試料が入った容器及び試料リストには、研究代表者によって匿名化された ID のみを記載した。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科で規定されている「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従い、本研究は倫理面の十分な配慮のうえ行った。

## C . 研究結果

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

臍帯血試料 (94 例) を ASE-350 で抽出して得られた脂肪の含量は, 重量あたり平均 0.33% (範囲 0.22% ~ 0.56%) であった。当研究所における臍帯血試料の抽出

事例や他の報告事例と同等の脂肪含量が得られた。

臍帯血 92 例のダイオキシン類濃度( Total TEQ) は、平均 4.0 pg/g lipid ( 範囲 2.6 ~ 11 pg/g lipid) であった。また、全血重量あたりの濃度で表すと、Total TEQ 値は平均 0.012 pg/g whole ( 範囲 0.0077 ~ 0.026 pg/g whole) であった。

## 5. 血液中フタル酸モノエステル類の分析

血液中のフタル酸モノエステル類 7 種の分析法を確立し、標準液の繰り返し測定、繰り返し分析、操作ブランク試験、添加回収試験等を実施し、必要となる精度管理データを収集した。また、本分析法により 20 名分の血液試料の分析を実施した。血液中のフタル酸モノエステル類 7 種の検出下限値は、MnBP 0.57ng/mL, MiBP 0.44ng/mL, MBzP 0.19ng/mL, MEHP 0.31ng/mL, MEHHP 0.23ng/mL, MECPP 0.11ng/mL, cx-MiNP 0.12ng/mL であった。本分析法における操作ブランクはすべての項目で下限値未満、各対象物質を 6ng 添加した回収試験では、回収率が 93 ~ 110% であった。その内の 1 検体で二重測定(同一試料の分析)を実施した。それぞれの項目における差は、最大で 6.8% であった。

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

P 値 <0.0001 のメチル化変化のうち、全体で 91%、女児で 98% がメチル化減少、反対に、男児では 88% がメチル化増加を示した。また、女児特異的メチル化変化を示す 14CpGs につき台湾コホート (n=11) で検証した結果、10CpGs でメチル化減少を示したが、27CpGs の男児特異的メチル

化変化については、9CpGs のみが札幌コホートの結果と一致した。一方、FDR <0.05 の CpG を有する遺伝子(男児:27 遺伝子、女児:16 遺伝子)についてネットワーク解析を行ったところ、男児では遺伝子同士が相互に連結する 1 つのクラスターを形成していたのに対し、女児では、それぞれの遺伝子が孤立していた。一方、P 値 <0.0001 の遺伝子の GO 解析においては、男児では有意に (FDR <0.05) 蓄積する遺伝子群は見られなかったが、女児では細胞接着に関連する遺伝子群が BPA 曝露に影響を受けていることが明らかとなった。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

そこで ,  $P < 2.5E-04$  の高メチル化にシフ

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

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

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

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

臍帯血 85 例中の Total PCBs 濃度は , 平均 49 ng/g lipid ( 範囲 14 ~ 190 ng/g lipid ) であった。全血重量あたり濃度は , 平均 120 pg/g whole ( 範囲 41 ~ 440 pg/g whole ) であった。臍帯血 85 例の Total dioxin 濃度と Total PCBs 濃度 ( 脂肪重量あたり ) の間に良好な正の相関 (  $R^2 = 0.913$  ) が認め

られた。また 85 例のうち 4 例は顕著に高い濃度域に分布していた。該当の 4 名はいずれも初産者であった。

#### 11. PCB/dioxin と網羅的メチル化解析

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

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

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

0.025 と有意であった。

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

#### D . 考察

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

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

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

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

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

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

網羅的 DNA メチル化解析により, 胎児

期 PFAS 曝露で影響を受ける可能性のあるメチル化部位が示された。

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

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

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

今後, これらのメチル化変化がどのア

ウトカムに影響するか、介在の大きさを含めて明らかにする。

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

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

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

これまでの調査研究で、臍帯血や胎盤組織等のダイオキシン類・PCB 濃度は妊産婦の出産歴と関連があり、出産回数が多いほど濃度が低くなる傾向が認められて

いる。これは母親の体内に蓄積していたダイオキシン類・PCBs が出産に伴う授乳や胎盤の摘出等によって体外に排出されたためと考えられる。

福岡県保健環境研究所では 2009～2011 年度に福岡県内在住の妊産婦(29 名、平均年齢 32.0 才)を対象に臍帯血中のダイオキシン類(mono-ortho PCB を除く 21 化合物)濃度を測定しており、これらを今回の臍帯血の分析結果と比較した。ここでは本分担研究及び福岡県調査ともに初産及び出産 2 回目の妊産婦に該当する測定値を選び、データを比較した。本研究で 92 例中 82 例、福岡県調査では 29 例中 26 例の妊産婦が当該条件に一致した。上記の条件でダイオキシン類濃度(mono-ortho PCB を除く 21 化合物, Total TEQ)を比較すると、本分担研究で平均 3.9 pg/g lipid (範囲 2.6～9.1 pg/g lipid) となり、福岡県調査では平均 6.5 pg/g lipid (範囲 3.1～18 pg/g lipid) となり、平均値及び濃度範囲ともに本研究が低い値となっていた。一般的に生体試料中のダイオキシン類濃度は加齢に伴い増加する傾向が認められるが、両集団の平均年齢はともに約 31 歳で同等であった。さらに臍帯血中ダイオキシン類濃度の国内調査事例として、東北地方で 49 名の妊産婦から採取された試料について平均 10 pg/g lipid (範囲 3.2～23 pg/g lipid) と報告されている(2008 年)。本研究の結果はこの調査結果と比較しても低い傾向であった。

臍帯血 94 例中の Total PCBs (81 化合物)濃度(脂肪重量あたり濃度のみ)は、平均 33 ng/g lipid (範囲 6.6～200 ng/g lipid)であった。全血重量あたり濃度は、平均 98 pg/g whole (範囲 25～460 pg/g whole)であった。臍帯血中の PCBs 濃度については、過去に環境省の調査事例

(1999~2004年)がある。これによると、臍帯血 49 例中の Total PCBs 濃度は平均 81 ng/g lipid(範囲 30~390 ng/g lipid)であり、全血重量あたりでは平均 98 pg/g whole(範囲 25~460 pg/g whole)であった。本研究で測定した臍帯血 49 例中の Total PCB 濃度は、ダイオキシン類濃度と同様に過去の分析事例と比較して低い傾向であった。

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

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

## 5. 血液中フタル酸モノエステル類の分析

フタル酸エステル類の検出率は MnBP : 100% , MiBP : 100% , MEHP : 65.0% , さらに二次代謝物の MECPP : 95.0% であった。一方、MBzP の検出率は 5.0% , MEHHP の検出率は 5.0% , cx-MiNP の検出率は 0% と検出率が低かった。可塑剤工業会によると 2014 年の国内可塑剤出荷量の構成比は

DEHP が 47% , DiNP が 26% , および DBP を含むその他が 4% で、本研究の対象集団は DEHP や DBP に加えて DiNP にも曝露されていることが推察されるが、本研究の測定では血清中の DiNP 代謝物はほとんど検出されなかった。

フタル酸エステル類濃度の中央値 (ng/ml) は MnBP : 18.5 , MiBP : 5.9 , MEHP : 0.405 , さらに二次代謝物の MECPP : 0.24 であった。これまでに同じ集団の妊娠初期血清を用いて、既に 648 名のフタル酸エステル類濃度を測定している。この 648 名のフタル酸エステル類濃度の中央値 (ng/ml) は MnBP : 47 , MiBP : 3.4 , MEHP : 7.2 , さらに二次代謝物の MECPP : 0.37 であった。今回の測定では MnBP および MEHP の中央値濃度が過去の測定より低く、MiBP の中央値濃度が今回の測定のほうが高かった。この原因として、今回の測定が 20 件のみとサンプル数が少ないこと、フタル酸エステル類濃度と関係する採血した西暦や生活環境が異なる可能性が考えられた。

妊娠中の血中フタル酸エステル類濃度を報告した先行研究では、イタリアの妊婦 84 名の妊娠後期血清中 MEHP は  $0.52 \pm 0.61 \mu\text{g/mL}$  (平均値  $\pm$  SD) であった (EHP 2003)。オーストラリアの妊婦 123 名の妊娠初期血清中フタル酸エステル代謝物の中央値 (ng/ml) は MiBP : 1.77 , MnBP : 2.46 , MBzP : 1.26 , MEHP : 1.18 , MECPP : 1.64 , および MiNP : <LOD であった (Reproduction 2014)。本測定では DEHP の一次代謝物である MEHP は先行研究より血中濃度が低いですが、DnBP , DiBP の一次代謝物である MnBP , MiBP の血中濃度が先行研究より高レベルであった。これは、「油脂、脂肪性食品を含有する食品に接触する器具および容器包装の禁止」(平成 14 年厚生労働省告示第 267 号、2002

年)や玩具(平成 22 年厚生労働省告示第 336 号, 2010 年.)などの使用規制により生体への DEHP 曝露量が減少したが,一方で, DBP は玩具への使用は禁止されているものの,日用品にも広く使用されており,諸外国の先行研究より本研究対象集団は曝露レベルが高い可能性が示された。

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

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

男児ではメチル化増加が見られたのに対し,女児ではメチル化減少が顕著であった。BPA 曝露によるメチル化減少は成人女性(Hanna, 2012)や思春期の女児(Kim, 2017)での先行研究と一致する。BPA 曝露は女児では優先的にメチル化減少を誘導すると考えられているが,男児のメチル化変化についてはまだ明らかにされていない(Martin, 2018)。

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

チル化変化の関連を明らかにする必要がある。

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

大規模コホートにおいて多検体の DNA メチル化解析手法を確立することは重要である。その手法の 1 つとして次世代シーケンサーの利用が考えられる。本研究において,網羅的メチル化解析を行った集団(北海道スタディ札幌コホート)とは別集団である北海道スタディ大規模コホートを用いて次世代シーケンサーによるメチル化解析の妥当性を検証した。その結果,これまでに喫煙曝露による影響が数多く報告されている *AHRR*, *MYO1G*, *GF11* (Morales E et al., 2016, Joubert BR et al., 2016, Küpers LK et al., 2015) については,本研究においても有意にメチル化変化することがわかった。これらの遺伝子は喫煙曝露の影響を受けやすい領域であることが示唆される。しかしながらその他の遺伝子領域では有意差は認められなかった。原因として,450K 網羅的解析の偽陽性であることが考えられる。また,今回の集団においては非喫煙群( $n = 276$ ),喫煙群( $n = 38$ )とサンプルサイズの違いが大きく,十分な検出力が得られなかったことも原因の 1 つと推測される。別の原因として,次世代シーケンサーを用いたメチル化解析において,サンプル間でカバレッジ数がばらつき,外れ値が多くなってしまったことが考えられる。

今回の集団において有意差は認められなかったが,質問表による喫煙曝露と ADHD 疑い群のオッズ比からは喫煙曝露が ADHD 発症に比較的強く寄与することを示唆された。喫煙曝露に関係なくコントロ

ール群と ADHD 疑い群間比較において *CYP1A1* の 1 つの CpG で有意差があったが、外れ値も多いためさらなる検討が必要である。本研究では ADHD の有病率の小ささもあり、サンプルサイズの大きさやバイアスを考慮できていなかったことから、今後はサブコホート集団を再検討することにより喫煙曝露と ADHD 発症の関連さらには DNA メチル化変化との関連を解析できる可能性があると考えられる。

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

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

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

一方で、尿試料中 *total*-MiNP,

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

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

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

また、代謝系に加え、シグナル伝達、内分泌系などに関連する遺伝子のメチル化が影響を受けていることから、今後、DEHP 曝露による性ホルモンや成長に対する影響とメチル化変化の関連を明らかにする必要がある。

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

福岡県保健環境研究所では 2009 ~ 2011 年度に福岡県内在住の妊産婦 (29 名, 平均年齢 32.0 才) を対象に臍帯血中のダイオキシン類 (mono-ortho PCB を除く 21 化合物) 濃度を測定している。本分担研究と福岡県調査の結果比較では、ともに初産及び出産 2 回目の妊産婦に該当する測

定値のみを抽出して行った。本調査研究では出産歴不明の1名を除く84例、福岡県調査では29例中26例のデータを用いた。両集団の平均年齢はともに32歳で同等であった。上記の条件でダイオキシン類濃度(mono-ortho PCBを除く21化合物、Total TEQ)を比較した結果、本分担研究で平均5.3 pg/g lipid(範囲2.8~27 pg/g lipid)、福岡県調査では平均6.5 pg/g lipid(範囲3.1~18 pg/g lipid)となり、両集団間で顕著な差は認められなかった。

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

#### 11. PCB/dioxinと網羅的メチル化解析

ダイオキシン類でFDR(False Discovery Rate)0.05未満の有意水準であったのは、児の性別で層別化した男児の群のみであった。全体および女児の群ではFDRの有意水準に達したCpGサイトはなかった。男児の群で2カ所のCpGがFDRの有意水準を満たした(cg01228410(FDR=0.010, SLC9A3), cg18267081(FDR=0.010, TSSC1))。SLC9A3は先天異常および糖やナトリウム代謝に関与する遺伝子である。TSSC1は腫瘍抑制遺伝子の領域に含まれることが示唆されている。

PCBでFDRが0.05未満の有意水準であったのは、全体と、児の性別で層別化した男児の群であった。女児の群ではFDRの有意水準に達したCpGサイトはなかった。全体では1カ所のCpG、男児の群で2カ所のCpGがFDRの有意水準を満たした

(全体:cg16848072(FDR=0.018, ANAPC13), 男児:cg05392644(FDR=0.0003, IDH3A), cg08181060(FDR=0.0024, ADAT2))。ANAPC13は細胞分裂とその周期を調整する遺伝子である。ADAT2はtRNAプロセッシングに関与することが示唆されている。IDH3Aに含まれるCpGがダイオキシン類ではcg05392644(FDR=0.069)、PCBでは男児でcg05392644(FDR=0.0003)で抽出されており、この遺伝子が関与する経路が、PCB/dioxinの児の健康影響に関与する可能性が示唆された。ダイオキシン類やPCB類の胎児期曝露による出生体重や生後の免疫への影響には性差が報告されており(EHP. 2006, Environ. Res.2009, Environ. Res.2011)、エピゲノム変化も性差がある可能性が示唆された。

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

平成30年度までの報告で、次世代シーケンサーを実施したADHDケース・サブコホート562名について、喫煙とADHDのオッズ比が有意ではなく、サンプルサイズの不足が示唆された。令和元年は1263名に解析対象を拡大した結果、妊娠後期コチニン濃度で分類した3群のうち、非受動喫煙群と比較し能動喫煙群で6歳ADHD傾向の有意な増加が認められた。この関連は男児でさらに顕著となった。妊娠中の母の喫煙と生後の児のADHDリスクについて報告があるが(Psychiatry Research 2017)、この作用機序にエピゲノムが関与するかどうか、交絡となる可能性がある共変量で調整して多変量解析で検討した報告はいまだない。本研究では、領域の解析が可能である次世代シーケンサーを用いて、別集団の札幌のコホートの網羅解析(450k)および大規模コホート562名で、妊娠中の喫煙と有意に関与するCpG

を既に抽出しており，ADHD リスク増加にエピゲノム変化が介在するか，妥当性のある結果を得ることができると考えている。年度末までに1263名全体のNGS解析を完了し，妊娠中の喫煙が児のADHDリスクに，エピゲノムが関与するか明らかにする。

## E．結論

胎児期 PCB 類濃度と *H19* および *L1NE1* メチル化に正の相関がみられ，その関係は女兒で顕著だった。有機フッ素化合物と関連が認められた DNA メチル化部位には imprinting control region でのエピゲノム修飾維持に必要である *ZFP57*，成長後の喘息と関連する *SMAD3*，肥満と関連する *GFPT2*，曝露によりその機能が影響を受ける *CYP2E1* 等が含まれていた。次世代シーケンサーによるメチル化解析により，エピゲノム網羅的解析結果の妥当性を示すことが出来た。このことにより，次世代シーケンサーによる多検体のメチル化定量が可能と考えられた。

曝露評価として臍帯血中 PCB ダイオキシン類を測定したところ mono-ortho PCB を除く 21 化合物の Total TEQ は平均 3.9 pg/g lipid (範囲 2.6~9.1 pg/g lipid) となり，福岡県内在住の妊産婦 (平均 6.5 pg/g lipid (範囲 3.1~18 pg/g lipid)) と比較して平均値及び濃度範囲ともに本測定結果のほうが低かった。妊娠初期血清中フタル酸エステル類の測定では DEHP の一次代謝物である MEHP は諸外国の先行研究より血中濃度が低いが，DnBP，DiBP の一次代謝物である MnBP，MiBP の血中濃度が先行研究より高レベルであった。これは国内の使用規制により生体への DEHP 曝露量が減少したが，一方で，DBP は日用品にも広く使用されていることが関係する可能性が考えられた。一般環境

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

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

サンプルサイズを拡大することで妊娠中の喫煙による児の ADHD リスクの増加を明らかにした。次世代シーケンサーを用いた特異的遺伝子領域の DNA メチル化解析により，妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。将来的に，化学物質曝露に誘引される DNA メチル化変化がどのアウトカムに影響するかを介在の大きさを含めて明らかにし，

胎児期の化学物質曝露と成長後の疾病発現をつなぐ分子メカニズムとして、エピゲノム試験法開発につなげる。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表 (原著・総説 査読有)

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

- 8) Bastiaansen M., Ait Bamai Y., Araki A., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Kishi R., covaci A.; Biomonitoring of organophosphate flame retardants and plasticizers in children: associations with house dust and housing characteristics in Japan. *Environ Res.* 172 543-551, 2019.
- 9) Mitsui T., Araki A., Miyashita C., Ito S., Ikeno T., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.; Effects of prenatal sex hormones on behavioral sexual dimorphism. *Pediatrics International.* 61 140-146, 2019.
- 10) Nishimura Y., Moriya K., Kobayashi S., Araki A., Sata F., Mitsui T., Itoh S., Miyashita C., Cho K., Kon M, Nakamura M., Kitta T., Murai S., Kishi R., Shinohara N.; Association between ESR1 polymorphisms and second to fourth digit ratio in school-aged children in the Hokkaido Study. *Steroids.* 141 55-62, 2019.
- 11) Miura R, Araki A, Minatoya M, *et al.* An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylations reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A. *Sci Rep.* under revision.
- 12) Kobayashi S., Sata F., Hanaoka T., Braimoh T. S., Ito K., Tamura N., Araki A., Ito S., Miyashita C., Kishi R.; Association between maternal passive smoking and increased risk of delivering small-for-gestational-age infants at full-term using plasma cotinine levels from the Hokkaido Study: a prospective birth cohort. *BMJ Open.* 2019.
- 13) Ito K., Hanaoka T., Tamura N., Sasaki S., Miyashita C., Araki A., Ito S., Minakami H., Cho K., Endo T., Baba T., Miyamoto T., Sengoku K., Tamakoshi A., Kishi R.; Association between maternal serum folate concentrations in the first trimester and the risk of birth defects: the Hokkaido Study of Environment and Children's Health. *Journal of Epidemiology.* 29(4), 164-171, 2019.
- 14) Yamazaki K., Araki A., Nakajima S., Miyashita C., Ikeno T., Itoh S., Minatoya M., Kobayashi S., Mizutani F., Chisaki Y., Kishi R.; Association between prenatal exposure to organochlorine pesticides and the mental and psychomotor development of infants at ages 6 and 18 months: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Neurotoxicology.* 69 201-208, 2018.
- 15) Itoh S., Baba T., Yuasa M., Miyashita C., Kobayashi S., Araki A., Sasaki S., Kajiwara J., Hori T., Todaka T., Fujikura K., Nakajima S., Kato S., Kishi R.; Association of Maternal Serum Concentration of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls with Maternal and Neonatal Thyroid Hormones: The Hokkaido Birth Cohort Study *Environmental Research.* 167,

- 583-590, 2018.
- 16) Tsai M.-S., Miyashita C., Araki A., Itoh S., Ait Bamai Y., Goudarzi H., Okada E., Kashino I., Matsuura H., Kishi R.; Determinants and temporal trends of perfluoroalkyl substances in pregnant women: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15 (5) 989, 2018.
- 17) Goudarzi H., Konno S., Kimura H., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Ait Bamai Y., Kimura H., Shimizu K., Suzuki M., Ito Y. M., Nishimura M., Kishi R.; Contrasting associations of maternal smoking and pre-pregnancy BMI with wheeze and eczema in children. *Science of the Total Environment*. 639. 1601-1609, 2018.
- 18) Mitsui T., Araki A., Goudarzi H., Miyashita C., Ito S., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.; Relationship between adrenal steroid hormones in cord blood and birth weight: The Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *American Journal of Human Biology*. e23127, 2018.
- 19) Miyashita C., Araki A., Mitsui T., Itoh S., Goudarzi H., Sasaki S., Kajiwara J., Hori H., Cho K., Moriya K., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.; Sex-related differences in the associations between maternal dioxin-like compounds and reproductive and steroid hormones in cord blood: the Hokkaido Study. *Environment International*. 117 175-185, 2018.
- 20) Miyake K., Kawaguchi A., Miura R., Kobayashi S., Tran N. Q. V., Koybayashi S., Miyashita C., Araki A., Kubota T., Yamagata Z., Kishi R.; Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Scientific Report*. 8: 5654, 2018.
- 21) Araki A., Miyashita C., Mitsui T., Goudarzi H., Mizutani F., Chisaki Y., Itoh S., Sasaki S., Cho K., Moriya K., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.; Prenatal organochlorine pesticide exposure and the disruption of steroids and reproductive hormones in cord blood: The Hokkaido study. *Environ Int*. 110 1-13, 2018.
- 22) Hanaoka T., Tamura N., Ito K., Sasaki S., Araki A., Ikeno T., Miyashita C., Ito S., Minakami H., Cho K., Endo T., Baba T., Miyamoto T., Sengoku K., Kishi R., Health other members of the Hokkaido Study on Environment and Children's; Prevalence and Risk on Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study; the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *J Epidemiol*. 28 (3) 125-132, 2018.
- 23) Kishi R., Araki A., Minatoya M., Itoh S., Goudarzi H., Miyashita

- C.; Birth cohorts in Asia: The importance, advantages, and disadvantages of different-sized cohorts. *Science of the Total Environment*. 615 1143-1154, 2018.
- 24) Miura R., Araki A., Miyashita C., Kobayashi Su., Kobayashi Sa., Wang SL., Chen CH., Miyake K., Ishizuka M., Iwasaki Y., YM. Ito, Kubota T., Kishi R.; An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: the Hokkaido study. *Environment International*. 115: 21-28, 2018.
- 25) Tamura N., Hanaoka T., Ito K., Araki A., Miyashita C., Ito S., Minakami H., Cho K., Endo T., Sengoku K., Ogasawara K., Kishi R.; Different Risk Factors for Very Low Birth Weight, Term-Small-for-Gestational-Age, or Preterm Birth in Japan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15 (369):2018.
- 26) Minatoya M, Araki A, Miyashita C, *et al*. Association between prenatal bisphenol A and phthalate exposures and *fet al* metabolic related biomarkers: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Environ Res*. 161 505-511, 2018.
- 27) Minatoya M, Itoh S, Yamazaki K, *et al*. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and behavioral problems in children at preschool age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 23:43 2018.
- 28) Miura R, Araki A, Miyashita C, *et al*. An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: the Hokkaido study. *Environment International*. 115: 21-28, 2018.
- 29) Miyake K, Kawaguchi A, Miura R, *et al*. Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Scientific Report*. 8: 5654, 2018.
- 30) Kobayashi S., Sata F., Miyashita C., *et al*.; Gender-specific association of exposure to non-dioxin-like polychlorinated biphenyls during pregnancy with methylation levels of H19 and long interspersed nuclear element-1 in cord blood in the Hokkaido study. *Toxicology*. 390: 135-145, 2017.
- 31) Kishi R., Araki A., Minatoya M., *et al*.; The Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile - updated 2017. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 22: 46, 2017.

## 2. 論文発表 (和文・総説)

- 1) 小林澄貴, 佐田文宏, 花岡知之, チチローラ・プライモー, 伊藤久美子, 田

- 村菜穂美, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 宮下ちひろ, 岸玲子; 胎児期の受動喫煙曝露が正期産の Small-for-gestational-age(SGA)に及ぼす影響: 前向き出生コホート研究(北海道スタディ), 北海道公衆衛生学雑誌. 33(2), 10-1, 2020.
- 2) 岸玲子; 日本で初めての本格的な出生コホート研究(環境と子どもの健康に関する北海道スタディ)17年の成果と環境省エコチル研究について. 日本小児呼吸器学会雑誌. 30 (1), 63-66, 2019.
- 3) 荒木敦子, 伊藤佐智子, 宮下ちひろ, 湊屋街子, 岸玲子; 環境化学物質による次世代の性ホルモンへの影響. 衛生学雑誌. 73 313-321, 2018.
- 4) 岸玲子, 荒木敦子; わが国で初めての本格的な出生コホート研究から見た環境化学物質の濃度レベルと次世代影響(特集: これまでの環境リスクとこれからの環境リスク). 保健医療科学. 67 (3), pp292-305, 2018.
- 5) 岸玲子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 湊屋街子, 小林澄貴, 山崎圭子, アイツバマイゆふ, 三浦りゅう, 田村菜穂美「2万人規模の出生コホートと, 500人規模の小コホートからなる北海道スタディが目指してきたもの: 環境と子どもの健康 先天異常・発達・アレルギーの15年におよぶ経験と成果」, 日本衛生学雑誌, 73(2), 164-177, 2018.
- 6) 岸玲子, 湊屋街子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第24回 誰もが健康な人生のスタートを-世界で進むコホート研究, 公衆衛生, 81(2), 175-183, 2017.
- 1) Minatoya M., Miyashita C., Araki A., Kishi R.; Tobacco smoke exposure during pregnancy and early childhood and child anthropometric outcomes at school age: the Hokkaido Study. DOHaD 2019. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia. (2019.10.20-23)
- 2) Minatoya M., Araki A., Kishi R.; Environmental Chemical Exposures and Health Studies for Sustainable Development Goals. ISEE-ISES AC 2019. Hotel Inter-Burgo Daegu, Daegu, Korea. (2019.10.17-19)
- 3) Minatoya M., Miyashita C., Ait Bamai Y., Araki A., Kishi R.; Prenatal exposure to phthalates and childhood anthropometric and metabolic related outcomes: the Hokkaido Study. ISEE-ISES AC 2019. Hotel Inter-Burgo Daegu, Daegu, Korea. (2019.10.17-19)
- 4) Araki A., Miyashita C., Itoh S., Mitsui T., Goudarzi H., Cho K., Moriya K., Nakajima T., Iwasaki Y., Hori T., Kajiwara J., Shinohara N., Kishi R.; Mixture Chemical Exposure in Utero and Boys Reproductive Hormone Levels at Birth; the Hokkaido Study. ISESISEE-AC 2019. Daegu, Korea. (2019.10.16-19)
- 5) Araki A., Miyashita C., Minatoya M., Kishi R.; The Hokkaido Study on Environment and Children's Health: Overview of the study and collaboration with cohort in Asia. ISESISEE-AC 2019. Daegu, Korea. (2019.10.16-19)

### 3. 学会発表(国際)

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
総合研究報告書

- 6) Gys C., Ait Bamai Y., Araki A., Noelia C. C., Kishi R., Covaci A.; Monitoring exposure levels to bisphenols in Japanese schoolchildren 11th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health Park Inn Hotel, Leuven, Belgium. (2019.8.28-30)
- 7) Miyashita C., Kishi R.; Effect on prenatal exposure to persistent organic pollutants on children's health in the Hokkaido study on environment and children's health. DIOXIN2019 39th international symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. Kyoto International Conference Center. (2019.8.25-30)
- 8) Ait Bamai Y., Goudarzi H., Okada E., Araki A., Miyashita C., Matsuura H., Kishi R.; Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances (PFAS) on Childhood Allergies and Infectious Diseases - Hokkaido Study -. DIOXIN2019 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. (2019.8.25-30)
- 9) Araki A., Aitbamai Y., Kishi R.; Exposure to organophosphate esters in Japan: associations among their concentrations in house dust, urinary metabolite levels, and allergies. ISESISIAQ2019 Joint meeting of the International Society of Exposure Science and the International Society of Indoor Air Quality and Climate—The built, natural, and social environments: impacts on exposures, health and well-being. Žalgirio Arena, Kaunas, Lithuania. (2019.8.18-22)
- 10) Gys C., Ait Bamai Y., Araki A., Noelia C. C., Covaci A.; Monitoring exposure levels to alternative bisphenols for Japanese schoolchildren. ISESISIAQ2019. Kaunas, Lithuania. (2019.8.18-22)
- 11) Ketema Rahel Mesfin, Ait Bamai Yu, Araki Atsuko, Saito Takeshi, Kishi Reiko; Urinary phthalate metabolites And oxidative stress biomarkers in 7 years old children from Hokkaido. The 4th FHS International Conference. Graduate School of Health Sciencs, Hokkido University, Sapporo. (2019.7.5)
- 12) Yamazaki K., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Ikeno T., Nakajima S., Kajiwara J., Hori T., R Kishi; ERP P3 of school age children and prenatal exposure to dioxin: the Hokkaido Study on Environment and Children ' s Health. IOP 2018 ( International organization of psychophysiology). IMT School for Advanced Studies. Lucca, Italy. (2018.9.4-8).
- 13) Minatoya M., Araki A., Miyashita C., itoh S., Kobayashi S., Yamazaki K., Ait Bamai Y., Miura R., Tamura N., Kishi R.; Update and the recent findings from the Hokkaido

- Study. The 9th International Conference on Children's Health and the Environment (INCHES). Hoam Faculty House, Seoul National University, Seoul, Korea. (2018.6.27-29)
- 14) Yamazaki K., Itoh S., Araki A., Miyashita C., Minatoya M., Tamura N., Goudarzi H., Okada E., Kashino I., Kishi R.; Prenatal exposure to perfluorinated alkyl substances and childhood ADHD risk at 6 years old: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. ISEE/ES AC2018 (International Society for Environmental Epidemiology/International Society of Exposure Science Asia Chapter 2018). School of Public Health, National Taiwan University, Taipei, Taiwan (2018.6.21-25)
- #### 4. 学会発表(国内)
- 1) 小林澄貴, 佐田文宏, ホウマヌ・グウダルジ, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 佐々木成子, 岡田恵美子, 岩崎雄介, 那須民江, 岸玲子; 胎児期有機フッ素化合物曝露と脂肪酸濃度: 遺伝子との相互作用の影響 - 北海道スタディ, 第90回日本衛生学会学術総会. 盛岡市. (2020.3.26-28) 誌上開催
- 2) 西條泰明, 佐藤遊洋, 吉岡英治, 小林澄貴, 宮下ちひろ, 湊屋街子, 荒木敦子, 岸玲子; 環境と子どもの健康に関する北海道研究(北海道スタディ)からの小児気管支喘息リスクスコア作成. 第90回日本衛生学会学術総会 盛岡市. (2020.3.26-28) 誌上開催
- 3) 湊屋街子, 胎児期の環境要因ばく露による出生体重, 体格への影響とそのメカニズム. 第90回日本衛生学会学術総会 盛岡市. (2020.3.26-28) 誌上開催
- 4) 小林澄貴, 佐田文宏, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, グウダルジ, ホウマヌ, 岩崎雄介, 三井貴彦, 守屋仁彦, 篠原信雄, 長和俊, 岸玲子; 妊娠中有機フッ素化合物曝露と臍帯血中の性ホルモン濃度との関連: 遺伝子環境相互作用の影響 - 北海道スタディ, 第30回日本疫学会学術総会. 京都大学, 京都市. (2020.2.20-22)
- 5) 岸玲子; 有機フッ素化合物(PFASs)の胎児期曝露が児の健康へ及ぼす多様な影響. 第22回環境ホルモン学会研究発表会. 東京大学弥生講堂(東京都文京区本郷) (2019.12.12-14)
- 6) 湊屋街子, 宮下ちひろ, 三浦りゅう, 荒木敦子, 岸玲子; 学童期の肥満に関連する要因の検討: 北海道スタディ. 第71回北海道公衆衛生学会. 札幌保健医療大学, 札幌. (2019.11.30)
- 7) 湊屋街子, 須山聡, 岸玲子; アトピー性皮膚炎と子どもの行動発達の関連の検討: 北海道スタディ. 第78回日本公衆衛生学会総会. 高知市文化プラザかるぽーと, 高知市, 高知県. (2019.10.23-25)
- 8) 小林澄貴, 佐田文宏, 西條泰明, 湊屋街子, 岸玲子; わが国の妊婦のカフェイン摂取量と児の出生時体格との量依存的な関連: エコチル調査. 第78回日本公衆衛生学会総会. 高知市文化プラザかるぽーと, ホテル日航高知旭ロイヤル, 高知会館, 高

- 知新聞放送会館，高知市，高知県。  
(2019.10.23-25)
- 9) 岸玲子；アジアにおける出生コホート連携 特に Birth Cohort Consortium of Asia (BiCCA) これまでの歴史と活動について．第 8 回日本 DOHaD 研究会学術集会 東京日本橋コンgresクエア (2019.8.8 9)
- 10) 荒木敦子，伊藤佐智子，アイツバマイゆふ，宮下ちひろ，木村孔一，今野哲，岸玲子；Contrasting associations of maternal smoking and pre-pregnancy BMI with wheeze and eczema in children. 第1回 日本アレルギー学会北海道支部地方会 札幌市教育文化会館，札幌市。(2019.6.23)
- 11) 小林澄貴，佐田文宏，荒木敦子，宮下ちひろ，佐々木成子，坂晋，岩崎雄介，岸玲子；胎児期有機フッ素化合物濃度と出生体重との関連：異物代謝酵素遺伝型の修飾による影響 - 北海道スタディ．第 29 回日本疫学会学術総会．一橋大学一橋講堂（東京都千代田区），国立がん研究センター（東京都中央区）。(2019.1.30-2.1)
- 12) 三宅邦夫，川口章夫，三浦りゅう，小林祥子，小林澄貴，宮下ちひろ，荒木敦子，山縣然太郎，岸玲子．胎児期喫煙曝露による臍帯血における DNA メチル化変化領域の同定．第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会。(2018.5.24.-25)
- 13) 新谷依子，堀就英ほか．血液中 PCB 濃度分析のクロスチェック(2017 年度)：第 27 回環境化学討論会．那覇市。(2018.5.22.-25)
- 14) 山崎圭子，荒木敦子，中島そのみ，宮下ちひろ，池野多美子，伊藤佐智子，湊屋街子，水谷太，菅木洋一，岸玲子；胎児期の有機塩素系農薬曝露が 3.5 歳の児の知的機能に及ぼす影響- 北海道スタディ．第 88 回日本衛生学会学術総会．東京工科大学蒲田キャンパス(東京都大田区)。(2018.3.22-24)
- 15) 田村菜穂美，花岡知之，伊藤久美子，伊藤佐智子，宮下ちひろ，荒木敦子，小笠原克彦，岸玲子；両親の教育歴と児の Small for gestational age との媒介要因分析:北海道スタディ．第 88 回日本衛生学会学術総会．東京工科大学蒲田キャンパス（東京都大田区）。(2018.3.22-24)
- 16) 小林澄貴，佐田文宏，宮下ちひろ，三浦りゅう，ゴウダルジ・ハウマヌ，荒木敦子，梶原淳睦，堀就英，岸玲子；胎児期の PCB 類曝露による児の H19・LINE-1 の DNA メチル化への影響:北海道スタディ．第 88 回日本衛生学会学術総会．東京都大田区。(2018.03.22.-24)
- 17) 小林澄貴，佐田文宏，宮下ちひろほか．胎児期の PCB 類曝露による児の H19・LINE-1 の DNA メチル化への影響:北海道スタディ．第 88 回日本衛生学会学術総会．東京都大田区。(2018.03.22.-24)
- 18) 三宅邦夫，三浦りゅう，小林祥子，小林澄貴，宮下ちひろ，荒木敦子，山縣然太郎，岸玲子．妊娠中の喫煙曝露における臍帯血を用いた DNA メチル化変化領域の同定．第 46 回日本環境変異原学会．東京都千代田区。(2017.11.6.-7)

## G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 IGF-2・H19・LINE-1メチル化との関連

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	佐田 文宏	中央大学保健センター	医療管理者
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	堀 就英	福岡県保健環境研究所	課長
研究分担者	松村 徹	いであ株式会社	常務取締役

研究要旨

胎児期ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)濃度と出生体重の減少との関連、およびインスリン様成長因子である(IGF-2/H19)と *Long interspersed nuclear element-1*(LINE-1)の DNA メチル化と出生体重の減少との関連は既に報告されている。しかし、胎児期 PCB 類濃度と IGF-2/H19 および LINE-1 の DNA メチル化との関連はまだ報告されていない。そこで、これらの関連を児の性差を含めて検討することを本研究の目的とした。2002-2005 年に札幌市内 1 産科病院外来を受診し同意を得た妊娠後期の妊婦 169 名を対象に、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により母体血中の PCB 類を分析し、出生時の臍帯血 DNA を使って IGF-2/H19 および LINE-1 の DNA メチル化 3 領域をバイサルファイトシーケンス法で解析した。母体血中 PCB 類濃度と IGF-2/H19 および LINE-1 メチル化との関連は交絡因子で調整した重回帰分析で検討した。その結果、母体血中 DecaCB 異性体濃度が 10 倍増えると、H19 メチル化率の Log<sub>10</sub> 変換値が 0.017 増加(95%信頼区間[CI]: 0.003-0.031)した。また HeptaCB 異性体濃度が 10 倍増えると LINE-1 メチル化率の Log<sub>10</sub> 変換値が 0.005 増加(95% CI:0.000-0.010)した。男女別では、女兒で DecaCB 異性体濃度と H19 メチル化との関連、および HeptaCB 異性体濃度と LINE-1 メチル化との関連が認められた。本研究の結果から胎児期 PCB 類濃度と H19 および LINE-1 メチル化との関連があり、これらの関連は特に女兒で認められることが示唆された。

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

ポリ塩化ビフェニル(PCBs)類はわが国で 1970 年代に使用禁止になっているものの、現在もまだ残存している。わが国の PCB 類摂取では魚介類からの摂取が最も多く、現在でも一日あたり体重 1kg あたり 0.059μg 摂取している（厚生労働省, 2014; 東京都, 2014）。先行研究では胎児期の PCB 類曝露によって出生体重に及ぼす報告がある（Casas et al.,

2015; Konishi et al., 2009）。そして、児の成長促進に関わるインスリン様成長因子(IGF)-2/H19, および転移因子の一つである *Long interspersed nuclear element-1* (LINE-1)の DNA メチル化による出生体重に及ぼす影響もまた報告されている（Kappil et al., 2015; Michels et al., 2011; Xiao et al., 2016）。しかし、PCB 類曝露によるこれらの領域の DNA メチル化への影響の報告はほとんどない。そこで本研究では、PCB 類濃度によるこれらの領域の DNA メチル化への影響を明らかにすることを本研究の目的と

した。

## B．研究方法

札幌市内 1 産科病院外来を受診し同意を得た妊娠後期の妊婦 169 名を対象に、出生前向きコホート研究を実施した。対象者の基本的属性は自記式調査票、出生時所見は病院記録から得た。妊娠後期に母体血を採取し、高分解能ガススペクトロメトリー・高分解能マススペクトロメーターを使って PCB 類を分析した。出生時に臍帯血を採取し、DNA を抽出した。バイサルファイト処理した上で、*IGF-2* DMR0 (chr11p15.5, site 1: 2109519; site 2: 2109516), *H19* DMR (chr11p15.5, site 1: 1964257; site 2: 1964259; site 3: 1964257; site 4: 1964254), *LINE-1* の 3 領域を Pyromark Q24 system (Qiagen) を使って、DNA メチル化率を定量した。

統計解析では、男児と女児との属性の違いは *t*-検定、カイ二乗検定、Mann-Whitney の *U*-検定を使った。母体血中 Total PCBs 濃度、臍帯血中 *IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化率は Kolmogorov-Smilnov 検定で検討したところ、全て  $p < 0.05$  であり、非正規分布を示した(図 1)。このため、母体血中 PCBs 濃度と *IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化率との関連を検討する際、 $\text{Log}_{10}$  変換することとした。*IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化率と属性との関連は交絡因子を考慮しない重回帰分析で検討した。そして、母体血中 PCB 類濃度と *IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化率との関連は交絡因子で調整した重回帰分析で検討した。交絡因子は、血中 PCBs 濃度あるいは臍帯血中 DNA メチル化率との関連が既に報告されている母の年齢、母の身長、妊娠前体重、妊娠後期喫煙状況、出産歴、教育歴、世帯

収入、妊娠中近海魚摂取、妊娠中遠洋魚摂取、妊娠中アルコール摂取とした (Eguchi et al., 2017; Lee et al., 2014; Miyashita et al., 2015; Todaka et al., 2008)。さらに、*IGF-2* メチル化率と、過去の流産歴および DNA メチル化率分析のバッチ差との関連が認められた、*IGF-2* メチル化率をアウトカムとする時にこれらを交絡因子として追加した。*H19* メチル化率と、妊娠中の練り物摂取、*IGF-2* メチル化率、および DNA メチル化率分析のバッチ差との関連が認められたので、*H19* メチル化率をアウトカムとする時にこれらを交絡因子として追加した。*LINE-1* メチル化率と、*IGF-2* メチル化率と DNA メチル化率分析のバッチ差との関連が認められたので、*LINE-1* メチル化率をアウトカムとする時にこれらを交絡因子として追加した。統計解析には SPSS 22.0J を使用した。

### （倫理面への配慮）

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定に従って実施した。インフォームド・コンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行った。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏えいが一切生じないように、研究者によりデータ保管を厳重に行った。採血の方法は日常の一般診療で行われている血液生化学検査の際の採血と同様であり、格段の危険性は伴わなかった。

## C．研究結果

169 名の属性を表 1 で示す。男児の母と女児の母との間に有意な違いはなかった。男児と比較して、女児の出生頭囲は有意に小さかった ( $33.7 \pm 1.1$  cm versus  $32.9 \pm 1.2$  cm;  $p < 0.001$ )。

Non-dioxin-like PCBs 類異性体の濃度分布を表 2 で示す。Non-dioxin-like PCBs 類の全体を 100%とした場合、HeptaCB 異性体は全体の 30.743%、DecaCB 異性体は全体の 0.477%を占めた。HeptaCB 異性体の中央値は 29,622.5 pg/g lipid、DecaCB 異性体の中央値は 454.7 pg/g lipid だった。

PCBs 類と *IGF-2*, *H19*, *LINE-1* メチル化率との関連を表 3 で示す。PCBs 類と *IGF-2* メチル化率との関連はなかった。DecaCB 異性体濃度が 10 倍増えると、*H19* メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値が全児で 0.017 増加(95% CI: 0.003, 0.031)、女児で 0.029 増加した(95% CI: 0.010, 0.051)。これらの関連は量反応関係性も認められた(表 4)。HeptaCB 異性体濃度が 10 倍増えると、*LINE-1* メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値が全児で 0.005 増加(95% CI: 0.000, 0.010)、女児で 0.008 増加した(95% CI: 0.002, 0.015)。

HeptaCB 異性体 10 種類と *LINE-1* メチル化率との関連を表 5 で示す。10 種類のうち、2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (#178), 2,2',3,4,4',5,6-HeptaCB (#182), 2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (#180), および 2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (#170)の 4 種類が女児において関連が認められ、量反応関係性も認められた(表 6)。

#### D. 考察

胎児期 PCB 類濃度と *H19* および *LINE-1* メチル化との関連が認められ、男女別では女児で有意な違いがあった。しかし、胎児期ダイオキシン類濃度と *IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化との関連はみられなかった(表なし)。女児では、DecaCB 異性体(2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DecaCB [#209])が 10 倍増えると *H19* メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値が 0.029 増加し( $\approx 1.07\%$ 増加

に相当)、HeptaCBs 異性体が 10 倍増えると *LINE-1* メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値が 0.008 増加した( $\approx 1.02\%$ 増加に相当)。先行研究では、PCB 類濃度と *H19* 遺伝子発現との関連(Kappil et al., 2016)および *IGF-2/H19* メチル化と胎児発育との関連(Koukoura et al., 2011; 2012)が報告されている。PCB 異性体別で *H19* および *LINE-1* メチル化率との関連で認められた PCB#170 と PCB#180 の生体内における作用の一部は既に報告されているものの(Shin et al., 2010; Uslu et al., 2013; Wolff et al., 1997), PCB#178, PCB#182, および PCB#209 は疫学研究、動物実験および細胞実験での報告がまだない。

*LINE-1* メチル化率が 7-9%増加することにより在胎週数が 3.3 日短くなった報告(Burris et al., 2014), *H19* メチル化率が約 1.4 倍増えることにより妊娠中期から出産までの胎児の体重増加が 0.51g 減少した報告(Bouwland-Both et al., 2013), 臍帯血中 PCB#153 が 100pg/mL 増えることにより出生体重が 118g 減少した報告が既にある(Verner et al., 2013)。これらの先行研究と本研究の結果から、胎児期 PCB 類濃度が *H19* および *LINE-1* メチル化を介して、出生体重の減少に及ぼす影響は比較的小さいと予想された。

強い健康影響を示すダイオキシン類では関連が見られず、メチル化変化を介さない健康影響への生物学的機序、あるいは、*IGF2/H19*, および *LINE1* 以外の DNA メチル化変化の関与が示唆されるため、今後、網羅的 DNA メチル化解析により検討する。

本研究の強みは、母体血中に含まれる PCB 類 56 種の異性体を高分解能ガススペクトロメトリー・高分解能マスマスペクトロメーターを使って測定したことである。さらに、前向きコホートの研究デザインなので、胎児期 PCB 類濃度

と臍帯血中 *H19* および *LINE-1* メチル化率との因果関係は強い。しかし、本研究の限界点もまたある。最終的な解析対象者が 169 名とサンプルサイズが限られているものの、コホート全体の妊婦 514 名と属性に大きな違いはなかった。対象者の偏りはなかったと考えられる。

## E . 結論

胎児期 PCB 類濃度と *H19* および *LINE-1* メチル化との関連があり、これらの関連は特に女児で認められた。

## F . 研究発表

### 1) 論文発表

1. Kobayashi S, Sata F, et al. Gender-specific association of exposure to non-dioxin-like polychlorinated biphenyls during pregnancy with methylation levels of *H19* and *long interspersed nuclear element-1* in cord blood in the Hokkaido Study. *Toxicology*. 2017; 390: 135-145.

### 2) 学会発表

1. 小林澄貴, 佐田文宏ほか. 胎児期の PCB 類曝露による児の *H19*・*LINE-1* の DNA メチル化への影響: 北海道スタディ. 第 88 回日本衛生学会学術総会. 東京都大田区. 2018.03.22.-24.

## G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

## 参考文献

1. Bouwland-Both MJ, van Mil NH, et al. DNA methylation of *IGF2DMR* and

*H19* is associated with fetal and infant growth: the Generation R study. *PLoS One* 2013; 8: e81731.

2. Burriss HH, Baccarelli AA, et al. Association between length of gestation and cervical DNA methylation of *PTGER2* and *LINE-1*. *Epigenetics*. 2014; 9: 1083-1091.
3. Casas M, Nieuwenhuijsen M, et al. Prenatal exposure to PCB-153, p,p'-DDE and birth outcomes in 9000 mother-child pairs: exposure-response relationship and effect modifiers. *Environ Int*. 2015; 74: 23-31.
4. Eguchi A, Otake M, et al. Assessment of questionnaire-based PCB exposure focused on food frequency in birth cohorts in Japan. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017; 24: 3531-3538.
5. Kappil MA, Green BB, et al. Placental expression profile of imprinted genes impacts birth weight. *Epigenetics*. 2015; 10: 842-849.
6. Kappil MA, Li Q, et al. In utero exposures to environmental organic pollutants disrupt epigenetic marks linked to fetoplacental development. *Environ Epigenet*. 2016; 2: dvv013.
7. Konishi K, Sasaki S, et al. Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res*. 2009; 117: 660-667.
8. Koukoura O, Sifakis S, et al. Loss of imprinting and aberrant methylation of *IGF2* in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction. *Int J Mol Med*. 2011; 28: 481-487.
9. Koukoura O, Sifakis S et al. DNA methylation in the human placenta and

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

- fetal growth (review). *Mol Med Rep.* 2012; 5: 883-889.
10. Lee HS, Barrazza-Villarreal A, et al. Dietary supplementation with polyunsaturated fatty acid during pregnancy modulates DNA methylation at IGF2/H19 imprinted genes and growth of infants. *Physiol Genomics.* 2014; 46: 851-857.
  11. Michels KB, Harris HR, et al. Birthweight, maternal weight trajectories and global DNA methylation of LINE-1 repetitive elements. *PLoS One.* 2011; 6: e25254.
  12. Miyashita C, Sasaki S, et al. Demographic, behavioral, dietary, and socioeconomic characteristics related to persistent organic pollutants and mercury levels in pregnant women in Japan. *Chemosphere.* 2015; 133: 13-21.
  13. Shin JY, Choi YY, et al. Low-dose persistent organic pollutants increased telomere length in peripheral leukocytes of healthy Korean. *Mutagenesis.* 2010; 25: 511-516.
  14. Todaka T, Hori T, et al. Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 195 pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere.* 2008; 73: 923-931.
  15. Uslu U, Sandal S, et al. Evaluation of estrogenic effects of polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides using immature rat uterotrophic assay. *Hum Exp Toxicol.* 2013; 32: 476-482.
  16. Verner MA, McDougall R, et al., Is the relationship between prenatal exposure to PCB-153 and decreased birth weight attributable to pharmacokinetics? *Environ Health Perspect.* 2013; 121: 1219-1224.
  17. Wolff MS, Camann D, et al. Proposed PCB congener groupings for epidemiological studies. *Environ Health Perspect.* 1997; 105: 13-14.
  18. Xiao X, Zhao Y, et al. Fetal growth restriction and methylation of growth-related genes in the placenta. *Epigenomics.* 2016; 8: 33-42.

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

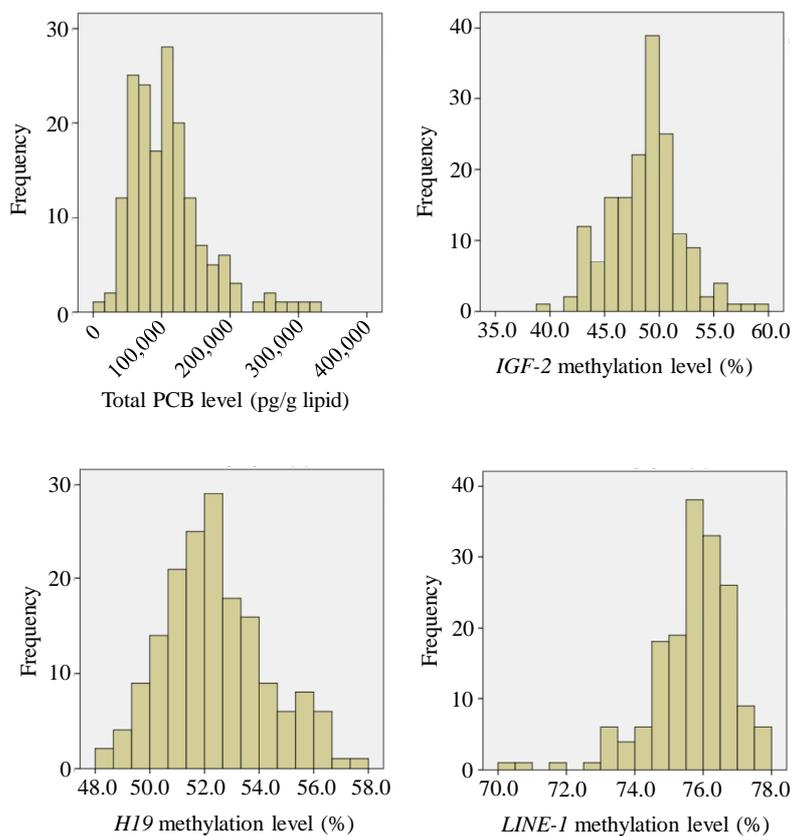


図 1. 母体血中 Total PCB 類濃度と臍帯血中 IGF-2, H19, LINE-1 メチル化率の分布

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 1. 対象者（母児）の属性

	全児 (n = 169) n (%)	男児 (n = 77) n (%)	女児 (n = 92) n (%)	p <sup>f</sup>
<b>母</b>				
年齢(歳) <sup>a,d</sup>	30.3 ± 4.8	30.5 ± 5.0	30.1 ± 4.6	0.626
身長(cm) <sup>a,d</sup>	158.7 ± 5.1	158.2 ± 5.1	158.9 ± 4.9	0.349
妊娠前体重(kg) <sup>a,d</sup>	53.6 ± 8.3	52.6 ± 8.0	54.3 ± 8.3	0.163
教育歴(≤12年) <sup>b</sup>	72 (42.6)	29 (37.7)	43 (46.7)	0.235
妊娠中労働者 <sup>b</sup>	14 (8.3)	6 (7.8)	8 (8.7)	0.832
世帯収入(<500万円) <sup>b</sup>	118 (69.8)	53 (68.8)	65 (70.7)	0.797
妊娠中食品摂取(≥1回/週)				
近海魚摂取 <sup>b</sup>	84 (49.7)	38 (49.4)	46 (50.0)	0.933
遠洋魚摂取 <sup>b</sup>	94 (55.6)	42 (54.5)	52 (56.5)	0.797
妊娠後期喫煙者				
母 <sup>b</sup>	31 (18.3)	10 (13.0)	21 (22.8)	0.988
同居者 <sup>b</sup>	31 (18.3)	11 (14.3)	20 (21.7)	0.259
	(n = 14)	(n = 6)	(n = 8)	
職場での受動喫煙者(母) <sup>b</sup>	6 (42.9)	3 (50.0)	3 (37.5)	0.640
妊娠中アルコール摂取(g/day) <sup>c,e</sup>	0.0 (0.0-51.8)	0.0 (0.0-51.8)	0.0 (0.0-14.8)	
妊娠中カフェイン摂取(mg/day) <sup>c,e</sup>	117.1 (3.0-425.5)	114.0 (10.5-356.5)	108.3 (3.0-425.5)	0.856
出産歴(経産婦) <sup>b</sup>	73 (43.2)	31 (40.3)	42 (45.7)	0.481
過去の流産歴あり <sup>b</sup>	31 (18.3)	61 (16.9)	18 (19.6)	0.642
<b>児</b>				
出生体重(g) <sup>a,d</sup>	3,141.6 ± 322.7	3,167.8 ± 280.3	3,119.6 ± 354.6	0.335
出生身長(cm) <sup>a,d</sup>	48.4 ± 1.9	48.7 ± 2.3	48.2 ± 1.5	0.106
出生頭囲(cm) <sup>a,d</sup>	33.3 ± 1.2	33.7 ± 1.1	32.9 ± 1.2	<0.001
出生胸囲(cm) <sup>a,d</sup>	31.8 ± 1.3	31.9 ± 1.1	31.7 ± 1.5	0.254
在胎週数(週) <sup>a,d</sup>	39.5 ± 1.0	39.3 ± 0.9	39.6 ± 1.1	0.072

<sup>a</sup> t検定; <sup>b</sup> カイ二乗検定; <sup>c</sup> Mann-Whitney の U検定; <sup>d</sup> 平均 ± 標準偏差; <sup>e</sup> 中央値(最小値-最大値); <sup>f</sup> 男児 versus 女児.

表 2. PCBs 類異性体の濃度分布

	寄与率 (%)	異性体濃度(pg/g lipid)					
		平均	最小値	25 パーセンタイル	中央値	75 パーセンタイル	最大値
Total PCBs	100.000	107,773.8	16,016.9	67,666.1	101,278.2	132,403.8	326,821.0
TriCBs	1.144	1,540.1	238.9	893.7	1,189.8	1,662.7	17,655.2
TetraCBs	6.134	6,796.8	1,692.9	4,610.2	6,278.5	8,130.6	24,037.5
PentaCBs	6.134	6,796.8	1,692.9	4,610.2	6,278.5	8,130.6	24,037.5
HexaCBs	47.262	49,210.1	6,120.2	30,847.8	45,523.0	60,376.2	159,214.1
HeptaCBs	30.743	34,316.8	3,658.7	19,423.4	29,622.5	43,184.4	167,252.1
OctaCBs	6.454	6,976.2	1,108.1	4,268.3	6,224.6	8,891.0	22,737.6
NonaCBs	0.876	968.5	203.6	608.9	881.3	1,206.1	3,463.2
DecaCBs	0.477	507.0	93.5	333.2	454.7	565.6	3,300.5

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. PCBs 類異性体と IGF-2, H19, および LINE-1 メチル化率との関連

PCBs 類異性体	IGF-2 <sup>a</sup>	H19 <sup>b</sup>	LINE-1 <sup>c</sup>
	β (95% CI)	β (95% CI)	β (95% CI)
全児 (n = 169)			
HeptaCBs	0.003 (-0.018, 0.023)	0.009 (-0.002, 0.021)	0.005 (0.000, 0.010)*
DecaCBs	-0.007 (-0.032, 0.018)	0.017 (0.003, 0.031)*	0.003 (-0.003, 0.009)
Total PCBs	-0.002 (-0.025, 0.020)	0.010 (-0.003, 0.023)	0.004 (-0.002, 0.009)
男児 (n = 77)			
HeptaCBs	-0.001 (-0.035, 0.034)	0.007 (-0.013, 0.026)	0.001 (-0.007, 0.009)
DecaCBs	-0.004 (-0.038, 0.030)	0.005 (-0.014, 0.024)	0.002 (-0.006, 0.010)
Total PCBs	0.002 (-0.033, 0.038)	0.004 (-0.016, 0.024)	0.000 (-0.008, 0.009)
女児 (n = 92)			
HeptaCBs	-0.003 (-0.030, 0.024)	0.010 (-0.006, 0.025)	0.008 (0.002, 0.015)*
DecaCBs	-0.009 (-0.046, 0.028)	0.029 (0.010, 0.051)*	0.005 (-0.005, 0.014)
Total PCBs	-0.011 (-0.041, 0.020)	0.013 (-0.005, 0.031)	0.007 (0.000, 0.014)

<sup>a</sup> 母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 過去の流産歴, 妊娠中アルコール摂取状況, 児の性別, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

<sup>b</sup> 母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中練り物摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, IGF-2 メチル化率, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

<sup>c</sup> 母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, IGF-2 メチル化率, 児の性別, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

β は PCB 類濃度が 10 倍増加するごとの IGF-2, H19, および LINE-1 メチル化率の Log<sub>10</sub> 変換値の変化量を表す.

\*  $p < 0.05$ .

表 4. DecaCB 異性体 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DecaCB [#209]) と H19 メチル化との量反応関係

	n	全児 (n = 169)	男児 (n = 77)	女児 (n = 92)
		β (95% CI)	β (95% CI)	β (95% CI)
第一四分位(93.5-<333.2 pg/g lipid)	42	Reference	Reference	Reference
第二四分位(333.2-<454.7 pg/g lipid)	43	0.005 (-0.002, 0.012)	0.006 (-0.005, 0.016)	0.008 (-0.003, 0.018)
第三四分位(454.7-<565.6 pg/g lipid)	42	0.006 (-0.002, 0.013)	0.012 (0.000, 0.022)	0.001 (-0.009, 0.011)
第四四分位(565.6-<3,305.5 pg/g lipid)	42	0.012 (0.004, 0.020)**	0.006 (-0.006, 0.019)	0.017 (0.005, 0.028)**
		$p$ for trend = 0.007	$p$ for trend = 0.253	$p$ for trend = 0.040

母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中練り物摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, IGF-2 メチル化率, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

β は PCB 類濃度が第一四分位と比較した H19 メチル化率の Log<sub>10</sub> 変換値の変化量を表す.

\*  $p < 0.05$ .

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

表 5. HeptaCBs 異性体と *LINE-1* メチル化との関連

HeptaCBs 異性体	全児 (n = 169) β (95% CI)	男児 (n = 77) β (95% CI)	女児 (n = 92) β (95% CI)
2,2',3,3',5,6,6'-HeptaCB (#179)	0.002 (0.000, 0.004)	0.002 (-0.001, 0.005)	0.002 (-0.001, 0.005)
2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (#178)	0.004 (-0.001, 0.008)	0.001 (-0.007, 0.008)	0.007 (0.001, 0.013)*
2,2',3,4,4',5,6-HeptaCB (#182)	0.005 (0.000, 0.009)*	0.002 (-0.005, 0.009)	0.007 (0.001, 0.013)*
2,2',3,4,4',5',6-HeptaCB (#183)	0.004 (-0.001, 0.008)	0.002 (-0.005, 0.009)	0.006 (0.000, 0.012)
2,2',3,4,4',5,6-HeptaCB (#181)	0.001 (-0.002, 0.003)	0.000 (-0.004, 0.003)	0.002 (-0.001, 0.005)
2,2',3,3',4',5,6-HeptaCB (#177)	0.003 (-0.001, 0.007)	0.001 (-0.005, 0.008)	0.006 (0.000, 0.012)
2,2',3,3',4,5,5'-HeptaCB (#172)	0.001 (-0.002, 0.005)	0.002 (-0.005, 0.010)	0.001 (-0.002, 0.005)
2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (#180)	0.005 (0.000, 0.010)*	0.000 (-0.008, 0.009)	0.009 (0.002, 0.015)**
2,3,3',4,4',5',6-HeptaCB (#191)	0.001 (-0.002, 0.003)	-0.001 (-0.006, 0.004)	0.002 (-0.002, 0.005)
2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (#170)	0.005 (0.000, 0.010)	0.000 (-0.008, 0.008)	0.008 (0.002, 0.015)*

母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, *IGF-2* メチル化率, 児の性別, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

β は PCB 類濃度が 10 倍増加するごとの *LINE-1* メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値の変化量を表す.

\*  $p < 0.05$ .

表 6 . HeptaCBs 異性体と *LINE-1* メチル化との量反応関係

	n	全児 (n = 169) β (95% CI)	男児 (n = 77) β (95% CI)	女児 (n = 92) β (95% CI)
Total heptaCBs				
第一四分位(3,658.7-<19,423.4 pg/g lipid)	42	Reference	Reference	Reference
第二四分位(19,423.4-<29,622.5 pg/g lipid)	42	-0.001 (-0.004, 0.002)	-0.004 (-0.007, 0.000)	0.001 (-0.004, 0.004)
第三四分位(29,622.5-<43,184.4 pg/g lipid)	43	0.002 (-0.001, 0.005)	0.001 (-0.007, 0.006)	0.003 (-0.001, 0.006)
第四四分位(43,184.4-167,252.1 pg/g lipid)	42	0.003 (0.000, 0.016)	-0.001 (-0.006, 0.004)	0.005 (0.001, 0.010)*
		$p$ for trend = 0.019	$p$ for trend = 0.705	$p$ for trend = 0.015
2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (#178)				
第一四分位(111.1-<907.8 pg/g lipid)	42	Reference	Reference	Reference
第二四分位(907.8-<1,334.7 pg/g lipid)	43	0.000 (-0.003, 0.002)	-0.002 (-0.006, 0.002)	0.001 (-0.003, 0.005)
第三四分位(1,334.7-<1,968.3 pg/g lipid)	42	0.002 (-0.001, 0.005)	0.002 (-0.003, 0.006)	0.003 (-0.001, 0.006)
第四四分位(1,968.3-7,130.4 pg/g lipid)	42	0.002 (-0.001, 0.005)	-0.001 (-0.006, 0.004)	0.005 (0.001, 0.009)*
		$p$ for trend = 0.065	$p$ for trend = 0.853	$p$ for trend = 0.031
2,2',3,4,4',5,6-HeptaCB (#182)				
第一四分位(741.3-<4,082.7 pg/g lipid)	42	Reference	Reference	Reference
第二四分位(4,082.7-<6,321.4 pg/g lipid)	43	0.000 (-0.003, 0.002)	-0.002 (-0.006, 0.002)	0.002 (-0.003, 0.006)
第三四分位(6,321.4-<8,726.6 pg/g lipid)	42	0.002 (-0.001, 0.005)	0.000 (-0.004, 0.005)	0.003 (-0.001, 0.007)
第四四分位(8,726.6-36,847.7 pg/g lipid)	42	0.003 (0.000, 0.006)	0.000 (-0.004, 0.005)	0.005 (0.001, 0.010)*
		$p$ for trend = 0.028	$p$ for trend = 0.624	$p$ for trend = 0.022
2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (#180)				
第一四分位(1,475.7-<8,652.3 pg/g lipid)	42	Reference	Reference	Reference
第二四分位(8,652.3-<12,976.4 pg/g lipid)	43	-0.001 (-0.003, 0.002)	-0.002 (-0.006, 0.002)	0.001 (-0.003, 0.004)
第三四分位(12,976.4-<19,913.8 pg/g lipid)	42	0.002 (-0.001, 0.005)	0.002 (-0.003, 0.006)	0.003 (-0.001, 0.007)
第四四分位(19,913.8-75,056.0 pg/g lipid)	42	0.003 (0.000, 0.007)*	0.000 (-0.006, 0.005)	0.006 (0.001, 0.011)*
		$p$ for trend = 0.015	$p$ for trend = 0.689	$p$ for trend = 0.005
2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (#170)				
第一四分位(615.2-<2,999.1 pg/g lipid)	42	Reference	Reference	Reference
第二四分位(2,999.1-<4,491.8 pg/g lipid)	42	-0.002 (-0.004, 0.001)	-0.002 (-0.007, 0.002)	-0.001 (-0.005, 0.002)
第三四分位(4,491.8-<6,462.8 pg/g lipid)	43	0.002 (-0.001, 0.005)	0.001 (-0.003, 0.006)	0.003 (-0.002, 0.007)
第四四分位(6,462.8-24,488.3 pg/g lipid)	42	0.003 (-0.001, 0.006)	-0.001 (-0.006, 0.005)	0.004 (0.000, 0.009)
		$p$ for trend = 0.031	$p$ for trend = 0.837	$p$ for trend = 0.018

母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, *IGF-2* メチル化率, 児の性別, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

β は PCB 類濃度が第一四分位と比較した *LINE-1* メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値の変化量を表す.

\*  $p < 0.05$ .

胎児期有機フッ素化合物（PFASs）曝露の臍帯血 DNA 網羅的エピゲノム解析  
**An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal  
perfluoroalkyl substance exposure**

研究代表者	岸 玲子	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特別招へい教授
研究分担者	三浦 りゅう	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特任助教
研究分担者	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	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	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
研究分担者	山崎 圭子	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特任講師
研究分担者	松浦 英幸	北海道大学大学院農学研究院	教授
研究分担者	篠原 信雄	北海道大学大学院医学研究院	教授

**研究要旨**

**Background:** Prenatal exposure to perfluoroalkyl substances (PFASs) influences fetal development and later in life.

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

**Methods:** We assessed DNA methylation in cord blood samples from 190 mother-child pairs from the Sapporo cohort of the Hokkaido Study (discovery cohort) and from 37 mother-child pairs from the Taiwan Maternal and Infant Cohort Study (replication cohort) using the Illumina HumanMethylation 450 BeadChip. We examined the associations between methylation and PFAS levels in maternal serum using robust linear regression models and identified differentially methylated positions (DMPs) and regions (DMRs).

**Results:** We found four DMPs with a false discovery rate below 0.05 in the discovery cohort. Among the top 20 DMPs ranked by the lowest *P*-values for perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure, four DMPs showed the same direction of effect and *P*-value < 0.05 in the replication assay: cg16242615 mapped to *ZBTB7A*, cg21876869 located in the intergenic region (IGR) of *USP2-AS1*, cg00173435 mapped to *TCPI1L2*, and cg18901140 located in the IGR of *NTN1*. For DMRs, we found a region associated with PFOA exposure with family-wise error rate < 0.1 located in *ZFP57*, showing the same direction of effect in the replication cohort. Among the top five DMRs ranked by the lowest *P*-values that were associated with exposure to PFOS and PFOA, in addition to *ZFP57*, DMRs in the *CYP2E1*, *SMAD3*, *SLC17A9*, *GFPT2*, *DUSP22*, and *TCERGIL* genes showed the same direction of effect in the replication cohort.

**Conclusion:** We suggest that prenatal exposure to PFASs may affect DNA methylation status at birth. Longitudinal studies are needed to examine whether methylation changes observed are associated with differential health outcomes.

**研究協力者**

湊屋 街子（北海道大学大学院保健科学研究所，  
特任講師），  
アイツバマイ ゆふ（北海道大学環境健康科学研究  
教育センター，特任講師），  
田村 菜穂美（情報・システム研究機構統計数理  
研究所医療健康データ科学研究センター，特任助  
教）

**A . 研究目的**

Perfluoroalkyl substances (PFASs) are synthetic compounds ubiquitously distributed in the environment that can disrupt endocrine system functions (Lau et al. 2007). PFASs have long half-lives in human: 5.4 years for perfluorooctane sulfonate (PFOS) and 3.8 years for perfluorooctanoic acid (PFOA) (Olsen et al. 2007). Furthermore, PFASs can pass through the placental barrier (Inoue et al. 2004). Consequently, fetuses can be exposed to PFASs via maternal circulation, which suggests a possibility of PFAS negative effects on embryonic and fetal development. Epidemiological studies have shown that prenatal exposure to PFASs has been associated with various health outcomes, including birth size reduction, disruption of hormone balance, obesity, neurodevelopmental problems, and immune function impairment (Apelberg et al. 2007; Chen et al. 2013; Grandjean et al. 2012; Halldorsson et al. 2012; Kishi et al. 2017; Olsen et al. 2009). However, the mechanisms underlying these associations are not clear. One hypothesis is that prenatal exposure to PFASs might lead to health outcomes in the offspring through epigenetic alterations *in utero* because epigenetics (i.e., chemical modification of DNA) is an *intrinsic* biological

mechanism that can be affected by *extrinsic* environmental factors in humans.

DNA methylation is an epigenetic modification that plays a role in embryonic development and cellular differentiation (Breton et al. 2017). It occurs by the addition of a methyl group to a cytosine mostly at cytosine-guanine dinucleotide (CpG) loci and acts like a gene expression switch (Hackett and Surani 2013). Human epidemiological studies, including genome-wide approaches, have indicated that environmental factors such as diet, hormones, stress, drugs, or toxicants (e.g., lead, mercury, or tobacco smoke) during prenatal development influence DNA methylation patterns in children (Breton et al. 2017). Despite a significant impact of PFASs on health outcomes, there were few epidemiological studies of epigenetic effects of PFAS exposure *in utero*. Guerrero-Preston et al. (2010) observed that cord blood PFOA concentrations negatively correlated with cord serum global DNA methylation levels. We also reported that prenatal PFOA exposure was associated with reduced *IGF2* methylation in cord blood, which could predict infant ponderal index at birth (Kobayashi et al. 2017).

Genome-wide methylation analyses allow a hypothesis-free assessment of epigenetic alterations in relation to the environmental factors (Christensen and Marsit 2011). To our knowledge, only one study showed an association between maternal PFOA levels and genome-wide DNA methylation using 44 cord blood samples (Kingsley et al. 2017). The objective of the present study was to investigate cord blood DNA methylation changes in association with prenatal exposure

to PFASs using the genome-wide approach and to determine CpG loci epigenetically vulnerable to prenatal PFAS exposure.

## B . 研究方法

**450K DNA methylation analysis.** We assessed DNA methylation in cord blood samples from 190 mother-child pairs from the Sapporo cohort of the Hokkaido Study (discovery cohort) and from 37 mother-child pairs from the Taiwan Maternal and Infant Cohort Study (replication cohort) using the Illumina HumanMethylation 450 BeadChip. After quality control (Aryee et al. 2014), signal intensities were normalized using functional normalization (Fortin et al. 2014). We applied the ComBat method to adjust methylation data for sample plate to reduce a potential bias due to batch effects (Leek et al. 2012). Beta-values were calculated from signal intensities and used for the subsequent data analyses by using the following equation (Bibikova et al. 2011):  $\beta = \text{methylated} / (\text{methylated} + \text{unmethylated} + 100)$ .

**Exposure assessment.** PFOS and PFOA levels were measured in maternal serum by using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as previously described (Lien et al. 2011; Okada et al. 2012; Washino et al. 2009).

**Data analysis.** Cord blood cell proportion was estimated by the method implemented in the R/Bioconductor package *minfi* (Bakulski et al. 2016). Using *limma* package in R, robust linear regression analyses (Fox and Weisberg 2011) and empirical Bayesian methods (Smyth 2004) were applied to determine the associations of  $\beta$ -value at each CpG site with either PFOS or

PFOA  $\log_{10}$ -transformed concentration, adjusted for maternal age, parity, maternal educational levels, maternal blood sampling period, maternal pre-pregnancy BMI, maternal smoking during pregnancy, gestational age, infant sex, and cord blood cell estimates. Due to the small sample size of the replication cohort, we used only maternal age, infant sex, and cord blood cell estimates as covariates. For multiple comparisons, *P*-values were adjusted by the false discovery rate (FDR) to obtain *q*-values. Successful replication for differentially methylated positions (DMPs) was defined as having the same direction of effect with those observed in the discovery cohort and *P*-value  $< 0.05$ . We also identified differentially methylated regions (DMRs) associated with PFAS exposures using *bumphunter* function in R/Bioconductor (Jaffe et al, 2012) and the same models as those in the linear regression analyses. *P*-values were adjusted by the family-wise error rate (FWER). Statistical analyses were performed using *minfi*, *sva*, and *limma* packages in R ver. 3.3.2 and Bioconductor ver. 3.3.

**Gene ontology analysis.** We identified the enrichment of genes corresponding to the DMPs with *P*-value  $< 0.001$  in Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) pathways (Kanehisa et al. 2002) using *missMethyl* package in R/Bioconductor (Phipson et al. 2016)

## （倫理面への配慮）

The study was conducted with the informed consent of all subjects in the written form. The institutional Ethical Board for human gene and genome studies at the Hokkaido University

Graduate School of Medicine and the Hokkaido University Center for Environmental and Health Science approved the study protocol. The Human Ethics Committee of the National Health Research Committee of Taiwan approved the study of the replication cohort.

### C . 研究結果

***Epigenome-wide association study in the discovery cohort.*** Maternal and infant characteristics and their relationship to PFOS and PFOA concentrations are described in Table 1. Median (25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentiles) of PFOS and PFOA concentrations in maternal blood were 5.2 ng/mL (3.8 to 7.1) and 1.4 ng/mL (0.9 to 2.1), respectively. The average ( $\pm$  SD) age of the mothers was  $29.7 \pm 4.8$  years. Of the 190 newborns, 84 (44.2%) were male. We observed statistically significant differences in both PFOS and PFOA levels by parity, maternal blood sampling periods, and smoking during pregnancy. Additionally, PFOA level was significantly higher among mothers with male infants, and PFOS levels were marginally affected by the educational level.

Figure 1 shows the results of genome-wide analyses of the association between cord blood DNA methylation and prenatal PFOS (Figure 1A) or PFOA (Figure 1B) exposure. The volcano plots (Figure 1) showed imbalance in positive versus negative methylation changes, suggesting global methylation shifts due to PFAS exposure.

***Differentially methylated positions (DMPs).*** We found epigenome-wide significant associations (FDR  $q$ -value  $< 0.05$ ) between

PFOS exposure and DNA methylation for two CpGs: one located in the intergenic region (IGR) of *CXADRP3* (cg02044327), and another mapped to *SNAPIN* (cg25705526). In addition, significant associations between PFOA exposure and DNA methylation for another two CpGs were found: one located in the IGR of *AC002480.3* (cg11260715), and another mapped to *GPR126* (cg04461802). Top 20 DMPs ranked by the lowest  $P$ -value for the association with exposure to PFOS and PFOA are shown in Table 2. Among them, four DMPs met the criteria for replication that showed the same direction of effect and  $P$ -value  $< 0.05$  in the replication assay: cg16242615 mapped to *ZBTB7A* for PFOS; cg21876869 located in the IGR of *USP2-AS1*, cg00173435 mapped to *TCP11L2*, and cg18901140 located in the IGR of *NTN1* for PFOA.

***Differentially methylated regions (DMRs).*** Next, we assessed DMRs associated with prenatal PFAS exposures using *bumphunter* function (Jaffe et al, 2012). We found one region associated with PFOA exposure with FWER  $< 0.1$  that was located in the IGR of *ZFP57* and included 21 CpGs. We showed top five regions for PFOS and PFOA exposures ranked by the smallest  $P$ -value (Table 3). We also compared the direction of methylation changes in the discovery and replication cohorts (Table 4), in which we averaged methylation levels of each site because those were highly correlated (data not shown). A DMR in *CYP1E2* was observed for both PFOS and PFOA exposures. Eight of the ten regions showed the same direction of methylation changes in the replication cohort.

**Gene ontology analysis.** Lastly, we tested for the enrichment of KEGG pathways (Kanehisa et al. 2002) among the genes with annotated CpGs showing  $P$ -value  $< 0.001$ . Among the 323 pathways analyzed, 31 and 26 KEGG pathways were significantly enriched after Bonferroni correction among the genes affected by for PFOS and PFOA exposures, respectively. Gene Ontology analyses of the data obtained using 450K chip are known to be biased for cancer-related genes (Haper et al. 2013). Human disease pathways, including cancer, were therefore excluded from the list of the pathways affected by PFAS exposures (Figure 2). Enrichments in the pathways involved in signal transduction and signal molecules and interactions were observed among the genes affected by both PFOS and PFOA exposures

#### D . 考察

Few studies have focused on the epigenetic effects of prenatal exposure to PFASs. In this study, median concentrations of PFOS and PFOA were 5.2 and 1.4 ng/mL, respectively, which were lower than those reported in the United States (PFOS: 8.2, PFOA: 2.9 ng/mL) (Stein et al. 2012), Canada (PFOS: 16.6, PFOA: 2.1 ng/mL) (Monroy et al. 2008), Denmark (PFOS: 21.5, PFOA: 3.7 ng/mL) (Huang et al. 2012), Norway (PFOS: 13, PFOA: 2.2 ng/mL) (Starling et al. 2014), South Korea (PFOS: 9.3, PFOA: 2.6 ng/mL) (Lee et al. 2013), and China (PFOS: 6.7, PFOA: 4 ng/mL) (Jiang et al. 2014). Despite the low levels of exposure, we showed suggestive evidence for the presence of CpGs epigenetically vulnerable to PFAS exposure *in*

*utero*.

We observed potential global methylation shifts resulting from prenatal PFAS exposure (see volcano plots in Figure 1): up-methylation for PFOS exposure and down-methylation for PFOA exposure. This was consistent with previous reports for prenatal PFOA exposure (Guerrero-Preston et al. 2010; Kingsley et al. 2017). Two studies in adult populations have suggested a possibility of PFAS exposure effect on global methylation (Leter et al. 2014; Watkins et al. 2014).

We then focused on the changes at specific regions and found four DMPs with FDR  $< 0.05$ : cg02044327 (*CXADRP3*), cg25705526 (*SNAPIN*), cg11260715 (*AC002480.3*), and cg04461802 (*GPR126*) (Figure 1), although these DMPs did not meet the criteria for replication (Table 2). Among 20 DMPs with lowest  $P$ -values for PFOS and PFOA exposures (Table 2), four DMPs were replicated: cg16242615 (*ZBTB7A*), cg21876869 (*USP2-ASI*), cg00173435 (*TCP11L2*), and cg18901140 (*NTN1*). *ZBTB7A* (Zinc finger and BTB domain containing 7A) encodes a proto-oncogenic transcription factor that interacts directly with MBD3 (methyl-CpG-binding domain protein 3) in the nucleus (Choi et al. 2013). *TCP11L2* (T-Complex 11 Like 2) codes for the TCP11 like protein. TCP11 plays a role in the process of sperm capacitation and acrosome reactions. *USP2-ASI* (USP2 Antisense RNA 1) belongs to the non-coding RNAs. Netrin 1 (NTN1) is a secreted laminin-like protein identified as an axon guidance molecule.

Next, we explored DMRs that are potentially more informative than individual

CpG sites (Solomon et al. 2017). We found one down-methylated region with FWER < 0.1, which was located in the IGR of *ZFP57* (*ZFP57* Zinc Finger Protein) (Table 4). *ZFP57* is necessary for maintaining repressive epigenetic modifications at imprinting control regions (Riso et al. 2016). We observed down-methylation of this region in the replication cohort (Table 4). In addition to a DMR in *ZFP57*, we reported six DMRs in *CYP2E1*, *SMAD3*, *SLC17A9*, *GFPT2*, *DUSP22*, and *TCERGIL* that showed the same direction of methylation change in the replication cohort (Table 4). Among them, methylation of *SMAD3* (SMAD Family Member 3) at birth has been previously linked to asthma in children of asthmatic mothers (DeVries et al. 2016). Cord blood DNA methylation of *GFPT2* (Glutamine-Fructose-6-Phosphate Transaminase 2) was associated with adiposity in childhood (Kresovich et al. 2017). Furthermore, methylations of *CYP2E1* (Cytochrome P450 Family 2 Subfamily E Member 1), *DUSP2* (Dual Specificity Phosphatase 2), and *TCERGIL* (transcription elongation regulator 1-like) were associated with rheumatoid arthritis (Mok et al. 2017) and colon tumors (Bae et al. 2014). Additionally, PFOS inhibited the oxidation reaction of *CYP2E1 in vitro* (Narimatu et al. 2011).

Gene ontology analysis showed that differentially methylated genes were enriched in multiple KEGG pathways (Figure 2), including signal transduction, signaling molecules and interaction, endocrine system, and immune system. However, in this assay we used genes with annotated CpGs with *P*-value < 0.001, i.e., not achieving epigenome-wide

significance. It remains to be seen whether identified DNA methylation changes are functionally relevant.

Methylation changes derived from the exposures to PFOS and PFOA were different. We have reported that PFOS and PFOA differentially affected health outcomes related to these pathways. Prenatal exposure to PFOS, but not PFOA, was negatively associated with the levels of maternal fatty acids (Kishi et al. 2015), possibly disrupted both maternal and infant thyroid hormone levels (Kato et al. 2016), and showed an inverse relationship with cord blood levels of glucocorticoids (Goudarzi et al. 2017). Dehydroepiandrosterone level was positively associated with the exposure to PFOS and negatively associated with the exposure to PFOA (Goudarzi et al. 2017). PFOS and PFOA showed both positive and inverse associations with the levels of several reproductive and steroid hormones (Ito et al. 2016). The observed different potencies and modes of action may partly account for the distinct patterns of methylation changes. The differences in PFOS and PFOA concentrations and/or placental permeability could be an alternative explanation.

## E . 結論

In this epigenome-wide study, we suggested that even relatively low levels of prenatal exposure to PFASs impacted DNA methylation status at birth. Further study is needed to examine the persistence of DNA methylation changes due to prenatal exposure throughout life, and the associations of these changes with health outcomes causally linked to PFAS exposure in longitudinal studies.

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Kishi R., Araki A., Minatoya M., et al.;  
The Hokkaido birth cohort study on  
environment and children's health:  
Cohort profile – updated 2017.  
Environmental Health and Preventive  
Medicine. 22-46, 2017.
- 2) 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.

### 2 . 学会発表

- 1) Kobayashi, S., R. Miura, C. Miyashita, A.  
Araki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, Y. M.  
Ito, T. Kubota, R. Kishi, Epigenome-wide  
Pathway Analyses of Prenatal  
Perfluoroalkyl Acids Exposure on Cord  
Blood DNA Methylation: The Hokkaido  
Study, ISEE-ISES AC2016, Sapporo,  
Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
- 2) Kobayashi, S., R. Miura, C. Miyashita, A.  
Araki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, Y. Ito,  
T. Kubota, R. Kishi, Epigenome-wide  
analyses of prenatal perfluoroalkyl acids  
exposure on cord blood DNA  
methylation: the Hokkaido study,  
ISEE2016: 28th Annual Conference  
International Society for Environmental  
Epidemiology, (2016.9.1-4)

## G . 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

## 参考文献

1. Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D,  
Pfähles-Hutchens A, Seed J. 2007.  
Perfluoroalkyl acids: A review of  
monitoring and toxicological findings.  
Toxicological Sciences 99:366-394.
2. Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ,  
Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et  
al. 2007. Half-life of serum elimination of  
perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanes  
ulfonate, and perfluorooctanoate in retired  
fluorochemical production workers.  
Environmental Health Perspectives  
115:1298-1305.
3. Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S,  
Nakajima S, et al. 2004. Perfluorooctane  
sulfonate (pfos) and related perfluorinated  
compounds in human maternal and cord  
blood samples: Assessment of pfos  
exposure in a susceptible population  
during pregnancy. Environmental Health  
Perspectives 112:1204-1207.
4. Apelberg BJ, Witter FR, Herbstman JB,  
Calafat AM, Halden RU, Needham LL, et  
al. 2007. Cord serum concentrations of  
perfluorooctane sulfonate (pfos) and  
perfluorooctanoate (pfoa) in relation to  
weight and size at birth. Environmental  
Health Perspectives 115:1670-1676.
5. 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  
infinium humanmethylation450  
microarray. Epigenetics 8:203-209.
6. Grandjean P, Andersen EW, Budtz-  
Jorgensen E, Nielsen F, Molbak K, Weihe  
P, et al. 2012. Serum vaccine antibody

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

- concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *Jama* 307:391-397.
7. Halldorsson TI, Rytter D, Haug LS, Bech BH, Danielsen I, Becher G, et al. 2012. Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: A prospective cohort study. *Environmental Health Perspectives* 120:668-673
8. 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. *Environmental Health and Preventive Medicine* 22.
9. Olsen GW, Butenhoff JL, Zobel LR. 2009. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: An epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reproductive toxicology* 27:212-230.
10. Breton CV, Marsit CJ, Faustman E, Nadeau K, Goodrich JM, Dolinoy DC, et al. 2017. Small-magnitude effect sizes in epigenetic end points are important in children's environmental health studies: The children's environmental health and disease prevention research center's epigenetics working group. *Environmental Health Perspectives* 125:511-526.
11. Hackett JA, Surani MA. 2013. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 368:20110328.
12. Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, LeBron C, Witter FR, et al. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics* 2010;5(6):539-46.
13. Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, et al. 2017. Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood igf2/h19 methylation and ponderal index: The Hokkaido study. *Journal of Exposure Science & Environmental epidemiology* 27:251-259.
14. Christensen BC, Marsit CJ. 2011. Epigenomics in environmental health. *Frontiers in Genetics* 2:84.
15. Kingsley SL, Kelsey KT, Butler R, Chen A, Eliot MN, Romano ME, et al. 2017. Maternal serum pfoa concentration and DNA methylation in cord blood: A pilot study. *Environmental Research* 158:174-178.
16. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. 2014. Minfi: A flexible and comprehensive bioconductor package for the analysis of infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30:1363-1369.
17. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, et al. 2014. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biology* 15:503.
18. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. 2012. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments.

- Bioinformatics 28:882-883.
19. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. 2011. High density DNA methylation array with single cpG site resolution. *Genomics* 98:288-295.
  20. Lien GW, Wen TW, Hsieh WS, Wu KY, Chen CY, Chen PC. 2011. Analysis of perfluorinated chemicals in umbilical cord blood by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 879:641-646.
  21. Okada E, Sasaki S, Saijo Y, Washino N, Miyashita C, Kobayashi S, et al. 2012. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and relationship with allergies and infectious diseases in infants. *Environmental Research* 112:118-125.
  22. Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, et al. 2009. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environmental Health Perspectives* 117:660-667.
  23. 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.
  24. Fox J, Weisberg S. 2011. *Robust regression in r*. Thousand Oaks, CA.:Sage.
  25. 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.
  26. Jaffe AE, Murakami P, Lee H, Leek JT, Fallin MD, Feinberg AP, Irizarry RA, 2012. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *International journal of epidemiology* 41:200-209.
  27. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Nakaya A. 2002. The kegg databases at genomnet. *Nucleic Acids Research* 30:42-46.
  28. Phipson B, Maksimovic J, Oshlack A. 2016. Missmethyl: An r package for analyzing data from illumina's humanmethylation450 platform. *Bioinformatics* 32:286-288.
  29. 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 and Prevention* 22:1052-60.
  30. Stein CR, Wolff MS, Calafat AM, Kato K, Engel SM. 2012. Comparison of polyfluoroalkyl compound concentrations in maternal serum and amniotic fluid: A pilot study. *Reproductive Toxicology* 34:312-316.
  31. Monroy R, Morrison K, Teo K, Atkinson S, Kubwabo C, Stewart B, et al. 2008. Serum levels of perfluoroalkyl compounds in human maternal and umbilical cord blood samples. *Environmental Research* 108:56-62.
  32. Huang PC, Su PH, Chen HY, Huang HB, Tsai JL, Huang HI, et al. 2012. Childhood blood lead levels and intellectual development after ban of leaded gasoline in taiwan: A 9-year prospective study.

- Environment International 40:88-96.
33. Starling AP, Engel SM, Whitworth KW, Richardson DB, Stuebe AM, Daniels JL, et al. 2014. Perfluoroalkyl substances and lipid concentrations in plasma during pregnancy among women in the norwegian mother and child cohort study. Environment International 62:104-112.
34. Lee YJ, Kim MK, Bae J, Yang JH. 2013. Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in korea. Chemosphere 90:1603-1609.
35. Jiang W, Zhang Y, Zhu L, Deng J. 2014. Serum levels of perfluoroalkyl acids (pfaas) with isomer analysis and their associations with medical parameters in chinese pregnant women. Environment International 64:40-47.
36. Leter G, Consales C, Eleuteri P, Uccelli R, Specht IO, Toft G, et al. 2014. Exposure to perfluoroalkyl substances and sperm DNA global methylation in Arctic and European populations. Environmental and Molecular Mutagenesis 55:591-600.
37. Watkins DJ, Wellenius GA, Butler RA, Bartell SM, Fletcher T, Kelsey KT. 2014. Associations between serum perfluoroalkyl acids and LINE-1 DNA methylation. Environment International 63:71-76.
38. Choi WI, Jeon BN, Yoon JH, Koh DI, Kim MH, Yu MY, et al. 2013. The proto-oncoprotein FBI-1 interacts with MBD3 to recruit the Mi-2/NuRD-HDAC complex and BCoR and to silence p21WAF/CDKN1A by DNA methylation. Nucleic Acids Research 41:6403-6420.
39. Solomon O, Yousefi P, Huen K, Gunier RB, Escudero-Fung M, et al 2017. Prenatal phthalate exposure and altered patterns of DNA methylation in cord blood. Environmental Molecular Mutagenesis 58:398-410.
40. Riso V, Cammisa M, Kukreja H, Anvar Z, Verde G, Sparago A, et al. 2016. ZFP57 maintains the parent-of-origin-specific expression of the imprinted genes and differentially affects non-imprinted targets in mouse embryonic stem cells. Nucleic Acids Research. 44:8165-78.
41. DeVries A, Wlasiuk G, Miller SJ, Bosco A, Stern DA, Lohman IC, et al. 2016. Epigenome-wide analysis links SMAD3 methylation at birth to asthma in children of asthmatic mothers. Journal of Allergy Clinical Immunology 140:534-542.
42. Kresovich JK, Zheng Y, Cardenas A, Joyce BT, Rifas-Shiman SL, Oken E, et al. 2017. Cord blood DNA methylation and adiposity measures in early and mid-childhood. Clinical Epigenetics 9:86.
43. Mok A, Rhead B, Holingue C, Shao X, Quach HL, Quach D et al. 2017. Hypomethylation of CYP2E1 and DUSP22 promoters associated with disease activity and erosive disease among rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheumatology (in press) doi:10.1002/art.40408.
44. Bae JH, Park J, Yang KM, Kim TO, Yi JM; IBD study group of Korean Association for Study of Intestinal Diseases (KASID). Molecular Medicine Reports 9:725-9.
45. Narimatsu S, Nakanishi R, Hanioka N, Saito K, Kataoka H. 2011 Characterization of inhibitory effects of perfluorooctane

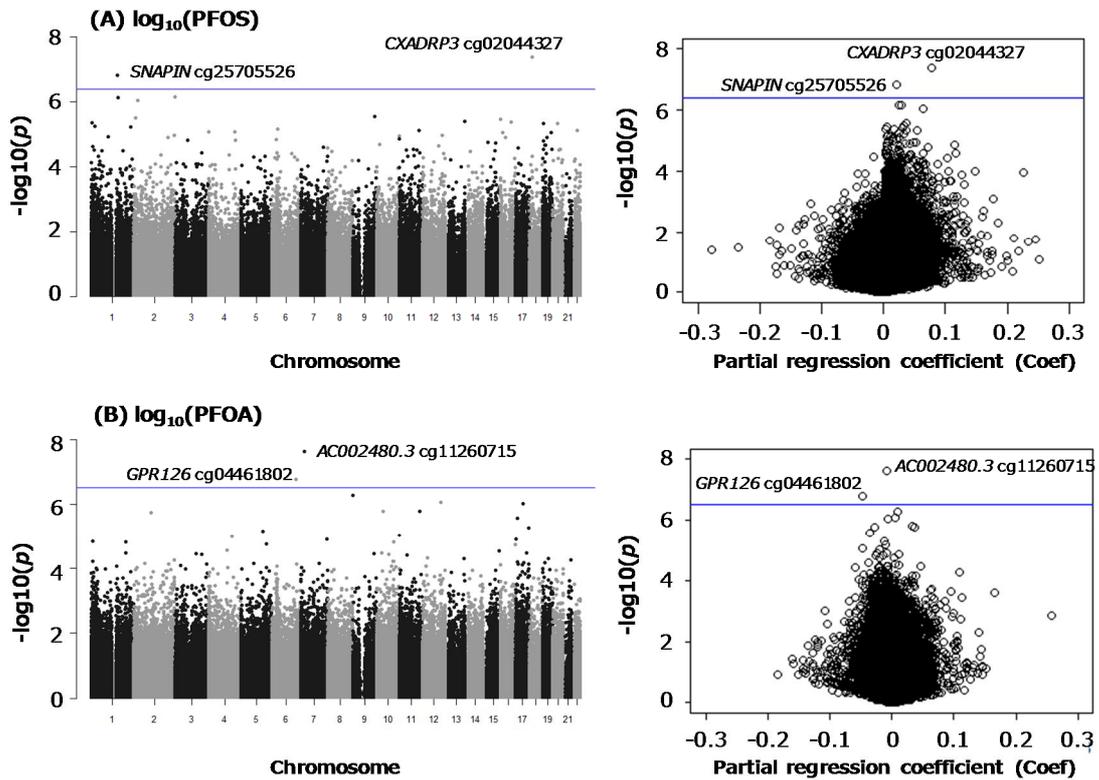
- sulfonate on human hepatic cytochrome P450 isoenzymes: focusing on CYP2A6. *Chemico-Biological Interactions* 194:120-126. international 94:51-59.
46. Kishi R, Nakajima T, Goudarzi H, Kobayashi S, Sasaki S, Okada E, et al, 2015. The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Essential and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of Their Offspring: The Hokkaido Study. *Environmental Health Perspectives* 123:1038-45.
47. Kato S, Itoh S, Yuasa M, Baba T, Miyashita C, Sasaki S, et al. 2016. Association of perfluorinated chemical exposure in utero with maternal and infant thyroid hormone levels in the sapporo cohort of Hokkaido study on the environment and children's health. *Environmental Health and Perspective Medicine* 21:334-344.
48. Goudarzi H, Araki A, Itoh S, Sasaki S, Miyashita C, Mitsui T, et al. 2017. The association of prenatal exposure to perfluorinated chemicals with glucocorticoid and androgenic hormones in cord blood samples: The Hokkaido study. *Environmental Health Perspectives* 125:111-118.
49. Itoh S, Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Goudarzi H, Sasaki S, et al. 2016. Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the Hokkaido study on environment and children's health. *Environment*

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

**Table 1** Characteristics of study population of the discovery cohort ( $n=190$ ).

	n	Mean $\pm$ SD (%)	PFOS (ng/mL)		PFOA (ng/mL)	
			Median (25th, 75th) or correlation <sup>a</sup>	P	Median (25th, 75th) or correlation <sup>a</sup>	P
Concentration in maternal blood						
	190		5.2 (3.8, 7.1)		1.4 (0.9, 2.1)	
Maternal characteristics						
Maternal age (year) <sup>a</sup>	190	29.7 $\pm$ 4.8	$\rho = -0.087$	0.233	$\rho = -0.041$	0.579
Pre-pregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	190	21.2 $\pm$ 3.1	$\rho = -0.018$	0.803	$\rho = -0.056$	0.444
Parity (times) <sup>b</sup>						
0	104	54.7	5.7 (4.2, 8.0)	0.002	1.6 (1.2, 2.4)	<0.001
$\geq 1$	86	45.2	4.7 (3.1, 6.2)		1.0 (0.7, 1.5)	
Blood sampling period <sup>c</sup>						
< 28 weeks	74	38.9	5.8 (4.6, 7.5)	<0.001	1.7 (1.2, 2.3)	0.004
28–36 weeks	47	24.7	5.6 (4.0, 8.5)		1.3 (0.8, 1.8)	
36 weeks	69	36.3	4.6 (2.8, 5.7)		1.2 (0.8, 1.8)	
Educational level (year) <sup>b</sup>						
$\leq 12$	89	46.8	5.2 (4.1, 7.0)	0.966	1.3 (0.8, 1.8)	0.072
> 12	101	53.2	5.3 (3.6, 7.4)		1.5 (1.0, 2.3)	
Annual household income (million yen) <sup>c</sup>						
< 3	38	20	5.4 (3.9, 8.0)	0.878	1.4 (0.8, 2.2)	0.541
3–5	95	50	5.1 (3.5, 7.0)		1.4 (0.9, 1.8)	
5–7	40	21.1	5.4 (4.2, 6.9)		1.4 (0.9, 2.1)	
> 7	15	7.9	5.1 (3.0, 8.8)		2.3 (0.8, 2.4)	
missing	2	1.1	7.8 (4.5, 11.1)			
Smoking during pregnancy <sup>b</sup>						
No	157	82.6	5.3 (4.0, 7.3)	0.039	1.4 (0.9, 2.2)	0.011
Yes	33	17.4	4.3 (2.5, 6.8)		1.0 (0.7, 1.6)	
Alcohol consumption during pregnancy <sup>b</sup>						
No	130	68.4	5.2 (3.9, 7.2)	0.954	1.4 (0.9, 2.1)	0.821
Yes	60	31.6	5.3 (3.7, 7.1)		1.4 (0.9, 2.2)	
Infant characteristics						
Sex <sup>b</sup>						
Male	84	44.2	5.1 (3.3, 7.0)	0.117	1.6 (1.0, 2.4)	0.025
Female	106	55.8	5.4 (4.1, 7.5)		1.3 (0.8, 1.9)	
Gestational age (week) <sup>a</sup>	190	39.9 $\pm$ 1.0	$\rho = 0.031$	0.675	$\rho = 0.093$	0.203
Birth weight (g) <sup>a</sup>	190	3131 $\pm$ 330	$\rho = -0.122$	0.095	$\rho = -0.118$	0.104

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



**Figure 1.** Manhattan (left panels) and volcano plots (right panels) of the genome-wide associations of DNA methylation with prenatal exposure to PFOS (A) or PFOA (B) in the discovery cohort.

Left panels: Manhattan plots of  $P$ -value for the associations between prenatal PFAS exposures and DNA methylation across chromosomes. Right panels: Volcano plots showing  $P$ -values versus the magnitude of effect (Coef) on DNA methylation associated with prenatal PFAS exposures. Horizontal lines represent the significance threshold of a  $\text{FDR} < 0.05$ .

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

**Table 2.** Top 20 CpGs ranked by the smallest *P*-value from the epigenome-wide analysis of the association between prenatal PFAS exposure and cord blood DNA methylation.

Probe ID	Gene	Chr	Feature <sup>a</sup>	Discovery cohort		Replication cohort		Replicated <sup>d</sup>
				Coef <sup>b</sup>	P-Value	Coef <sup>b</sup>	P-Value	
log <sub>10</sub> (PFOS)								
cg25705526	<i>SNAPIN</i>	1	TSS200	0.020	1.48E-07 <sup>FDR, d</sup>	-0.006	0.425	
cg04928693	<i>MTX1</i>	1	TSS1500	0.024	7.19E-07	-0.003	0.737	
cg18155888 <sup>c</sup>	<i>MORN1</i>	1	Body	0.017	4.32E-06	0.023	0.277	
cg17086204	<i>PLA2G5</i>	1	3'UTR	0.025	5.56E-06	0.000	0.955	
cg10504365	<i>TRIM67</i>	1	TSS1500	0.032	5.84E-06	-0.022	0.003	
cg01889773 <sup>c</sup>	<i>GPC1</i>	2	Body	0.030	6.92E-07	0.008	0.538	
cg16845265	<i>KLHL29</i>	2	IGR	0.065	8.73E-07	-0.019	0.528	
cg25808157	<i>GREB1</i>	2	Body	0.034	3.13E-06	-0.002	0.926	
cg21969395	<i>LRAT</i>	4	TSS200	0.016	8.23E-06	-0.001	0.870	
cg22953687	<i>ZFYVE28</i>	4	Body	0.025	8.25E-06	-0.018	0.117	
cg12215478	<i>SRPK1</i>	6	Body	0.008	6.93E-06	-0.002	0.421	
cg14369981 <sup>c</sup>	<i>LMX1B</i>	9	IGR	0.037	2.81E-06	0.007	0.705	
cg17918227 <sup>c</sup>	<i>CADM1</i>	11	Body	0.012	7.56E-06	0.005	0.336	
cg14120075 <sup>c</sup>	<i>TFDP1</i>	13	Body	0.031	3.94E-06	0.008	0.626	
cg03097541 <sup>c</sup>	<i>ZNF213</i>	16	5'UTR	0.006	3.38E-06	0.002	0.131	
cg01718742	<i>CDH8</i>	16	TSS200	0.003	4.06E-06	-0.001	0.651	
cg02044327 <sup>c</sup>	<i>CXADRP3</i>	18	IGR	0.078	4.06E-08 <sup>FDR, d</sup>	0.036	0.142	
cg16242615 <sup>c</sup>	<i>ZBTB7A</i>	19	5'UTR	0.037	4.54E-06	0.035	0.028	✓
cg15815607	<i>HM13</i>	20	Body	0.053	4.57E-06	-0.008	0.645	
cg12700033	<i>YWHAH</i>	22	TSS200	0.006	7.41E-06	0.000	0.958	
log <sub>10</sub> (PFOA)								
cg23049737	<i>RERE</i>	1	3'UTR	0.011	1.43E-05	-0.009	0.056	
cg00567854 <sup>c</sup>	<i>BTG2</i>	1	TSS1500	-0.025	1.48E-05	-0.009	0.214	
cg10403518	<i>SLC9A4</i>	2	Body	0.038	1.75E-06	-0.014	0.083	
cg22325921	<i>DUX2</i>	4	IGR	-0.020	9.90E-06	0.002	0.719	
cg05158146 <sup>c</sup>	<i>MIR4460</i>	5	IGR	-0.010	6.75E-06	0.000	0.931	
cg23917868 <sup>c</sup>	<i>MIR145</i>	5	TSS200	-0.020	1.76E-05	-0.006	0.289	
cg04461802	<i>GPR126</i>	6	5'UTR	-0.046	1.65E-07 <sup>FDR, d</sup>	0.008	0.456	
cg11260715 <sup>c</sup>	<i>AC002480.3</i>	7	IGR	-0.008	2.32E-08 <sup>FDR, d</sup>	-0.002	0.247	
cg12105980 <sup>c</sup>	<i>EN2</i>	7	IGR	-0.023	1.24E-05	-0.008	0.220	
cg13951074	<i>DMRT2</i>	9	IGR	0.010	5.09E-07	0.000	0.888	
cg07661167 <sup>c</sup>	<i>ZNF33BP1</i>	10	IGR	0.032	1.62E-06	0.015	0.065	
cg01486146	<i>PAX2</i>	10	IGR	-0.014	1.50E-05	0.005	0.088	
cg21876869 <sup>c</sup>	<i>USP2-AS1</i>	11	IGR	-0.027	1.64E-06	-0.024	0.000	✓
cg17114584	<i>IRF7</i>	11	Body	-0.047	9.01E-06	0.001	0.928	
cg00173435 <sup>c</sup>	<i>TCP11L2</i>	12	TSS200	0.006	8.52E-07	0.003	0.001	✓
cg16475925 <sup>c</sup>	<i>SPG7</i>	16	TSS200	0.003	1.82E-05	0.002	0.095	
cg00897875	<i>MAP3K14</i>	17	5'UTR	-0.006	9.16E-07	0.004	0.077	
cg18901140 <sup>c</sup>	<i>NTN1</i>	17	IGR	-0.036	2.66E-06	-0.029	0.000	✓
cg01426818 <sup>c</sup>	<i>CBX4</i>	17	IGR	-0.012	5.20E-06	-0.002	0.720	
cg18002862 <sup>c</sup>	<i>RAP1GAP2</i>	17	Body	-0.008	1.22E-05	-0.002	0.146	

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

Abbreviations: Chr, chromosome; IGR, intergenic region; TSS, transcription start site; TSS200, 200 bases from TSS; TSS1500, 1500 bases from TSS; body, gene body; UTR, untranslated region.

<sup>a</sup>Gene feature category of the methylation locus.

<sup>b</sup>Partial regression coefficient; the magnitude of the effect on DNA methylation.

<sup>c</sup>CpG that showed the same direction of effect in both the discovery and replication cohorts.

<sup>d</sup>Genome-wide significance threshold (FDR  $q < 0.05$ ).

<sup>e</sup>Successful replication defined as having the same direction of effect and a  $P$ -value  $< 0.05$  in the discovery cohort.

**Table 3.** TOP5 of differentially methylated regions indicated by the bumphunting method.

Gene	Chr	Start	End	Number of Probes	Features <sup>a</sup>	CGI <sup>b</sup>	P-value
log <sub>10</sub> (PFOS)							
<i>CYP2E1</i>	10	135342560	135343280	6	Body	island/shore	3.75E-04
<i>KLHL35</i>	11	75139390	75139736	4	Body	island/shore	8.86E-04
<i>SMAD</i>	15	67356310	67356942	5	TSS1500/IGR	shore	1.09E-03
<i>HOOK2</i>	19	12876846	12877188	4	Body	island/shore	1.65E-04
<i>SLC17A9</i>	20	61590751	61591209	4	Body	island/shore	4.83E-04
log <sub>10</sub> (PFOA)							
<i>GFPT2</i>	5	179740743	179741120	4	Body	island	2.03E-03
<i>ZFP57</i>	6	29648225	29649084	21	IGR	open sea	1.00E-04 <sup>FWER,c</sup>
<i>DUSP22</i>	6	291687	293285	10	Body	island	7.87E-04
<i>CYP2E1</i>	10	135342560	135343280	6	Body	island/shore	3.72E-04
<i>TCERG1L</i>	10	132910868	132911152	4	Body	open sea	1.52E-03

Abbreviations: Chr, Chromosome; body, gene body; IGR, intergenic region; TSS, transcription start site; TSS1500, 1500 bases from TSS, FWER, family-wise error rate

<sup>a</sup>Gene feature category of the methylation locus.

<sup>b</sup>Relation to CpG island.

<sup>c</sup>FWER  $< 0.1$

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.** The average partial regression coefficient of TOP5 DMRs in the discovery and replication cohorts.

Gene	Chr	Discovery cohort		Replication cohort	
		Average Coef <sup>a</sup>	Direction <sup>b</sup>	Average Coef <sup>a</sup>	Direction <sup>b</sup>
<b>log<sub>10</sub>(PFOS)</b>					
<i>CYP2E1</i>	10	0.040	+	0.059	+
<i>KLHL35</i>	11	0.134	+	-0.127	-
<i>SMAD</i>	15	0.128	+	0.027	+
<i>HOOK2</i>	19	-0.212	-	0.290	+
<i>SLC17A9</i>	20	0.165	+	0.163	+
<b>log<sub>10</sub>(PFOA)</b>					
<i>GFPT2</i>	5	-0.100	-	-0.035	-
<i>ZFP57</i>	6	-0.112	-	-0.052	-
<i>DUSP22</i>	6	-0.030	-	-0.113	-
<i>CYP2E1</i>	10	0.112	+	0.007	+
<i>TCERG1L</i>	10	0.025	+	0.009	+

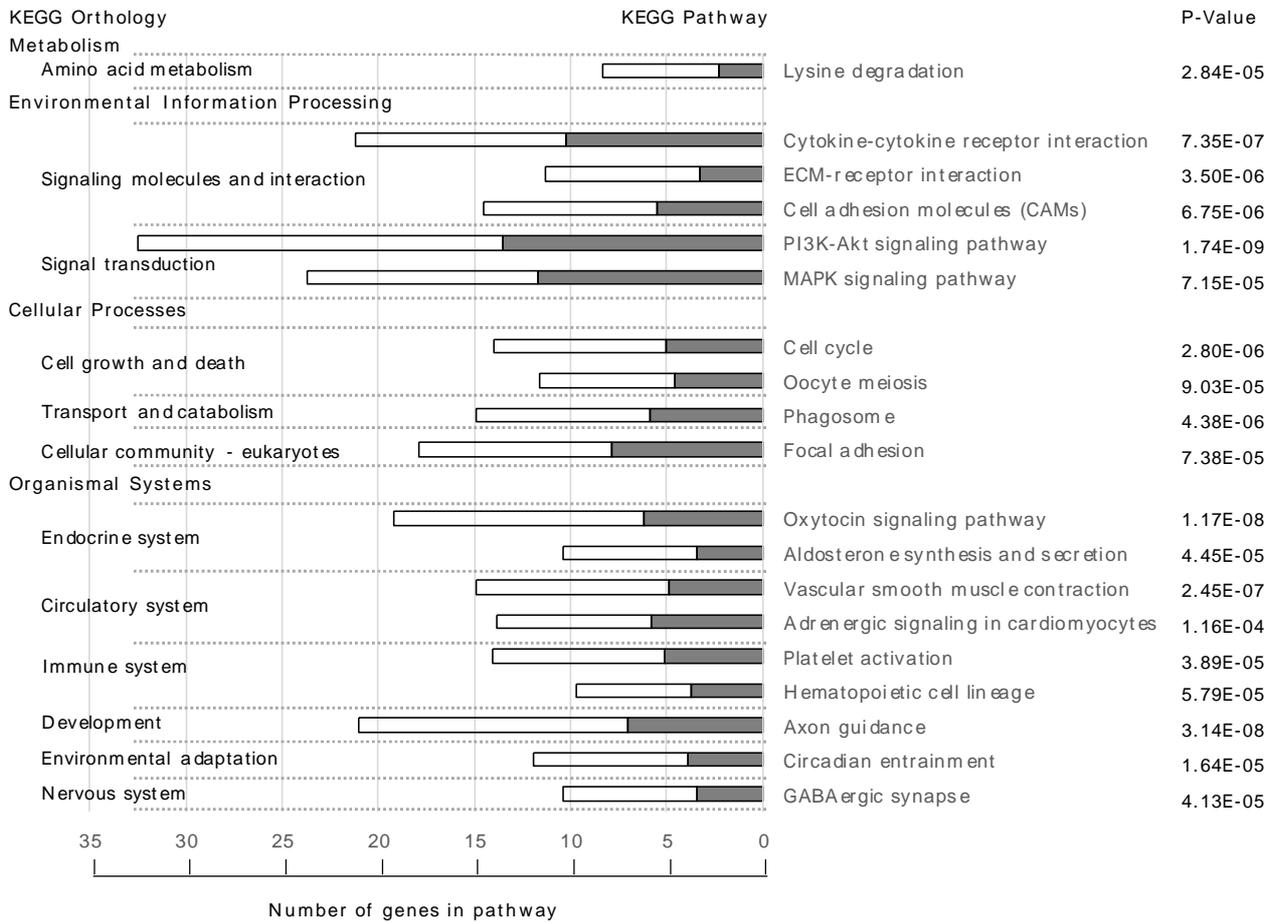
Abbreviations: Chr, Chromosome.

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

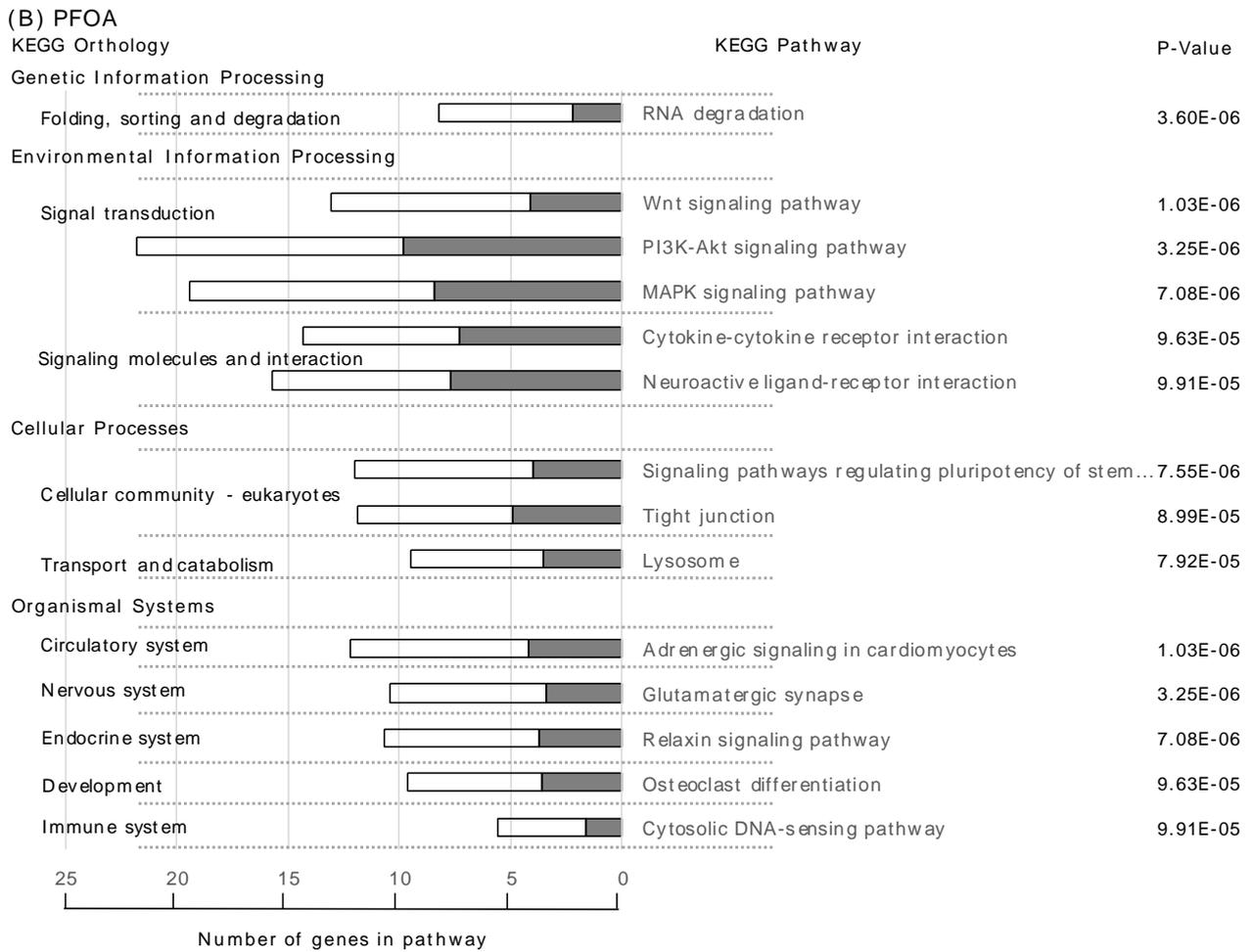
<sup>b</sup>direction of methylation change: +, up-methylated, -, down-methylated.

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

(A) PFOS



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書



**Figure 2.** Significantly enriched pathways among the genes with differentially methylated CpGs associated with the exposures to PFOS (A) and PFOA (B).

White bars, observed number of genes; black bars, expected number of genes in each pathway.  $P < 0.001$  vs. the expected number of genes.

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
研究分担者	三宅 邦夫	山梨大学大学院総合研究部医学域	准教授
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

### 研究要旨

**背景：**胎児期や乳幼児期の化学物質曝露が子供の様々な疾患リスクに影響することが報告されている。その分子メカニズムとして DNA メチル化形成異常が関与している可能性が考えられているが、これまで疫学研究、特に日本人集団での検討はあまりなされていない。

**目的：**本研究は、胎児期の喫煙曝露により影響を受ける DNA メチル化領域を同定し、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析による検証法を確立することを目的とした。

**方法：**北海道スタディ札幌コーホート参加者 514 名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報、臍帯血 DNA のそろそろ母児ペア 291 名を対象とし、喫煙経験のない非喫煙群 (n = 124)、妊娠中も喫煙を継続した喫煙群 (n = 46)、妊娠がわかって喫煙を止めた喫煙中止群 (n = 77) の 3 群を解析対象とした。Infinium HumanMethylation450 BeadChip による網羅的解析から喫煙曝露と DNA メチル化変化を解析し、再現性の検証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法でメチル化率を算出した。

**結果：**非喫煙群と喫煙群の比較で 46 CpGs 領域 (27 遺伝子) が同定された。さらに喫煙を中止することにより DNA メチル化が非喫煙者と同等レベルになる 9 CpGs、喫煙を中止しても変化しない 1 CpG を見出すことができた。再現性検証を行なった結果、8 CpGs のうち 7 CpGs で網羅的 DNA メチル化解析結果と同様のメチル化変化が確認でき、スピアマンの相関係数は  $> 0.6$  で高い相関を示した。

**考察：**以上の結果から、別の大規模集団において次世代シーケンサーを用いた DNA メチル化解析の利用が可能であると考えられる。

### A . 研究目的

胎児期の化学物質曝露が子供の様々な疾患リスクに影響することが報告されている (Tran et al., 2017)。将来的ながんや喘息のリスクだけでなく、近年、自閉症スペクトラム障害 (ASD) や注意欠陥多動性障害 (ADHD) などの発達障害のリスクを増加させる可能性も指摘されている (Melchior et al., 2015, Joelsson et al., 2016)。胎児期曝露の影響が児の健康リスクに影響を及ぼすメカニズムとしてエピジェネティクスの中心的メカニズムであ

る DNA メチル化変化の関与が考えられている。DNA メチル化の形成は胎児期や乳幼児期で特に重要 (臨界期) (Lister et al., 2015) であることから、この時期の化学物質曝露と疾患発症リスクをつなぐ分子メカニズムとして DNA メチル化形成異常が関与している可能性が考えられるが、これまで疫学研究、特に日本人集団での検討はあまりなされていない。

網羅的エピゲノム解析は全遺伝子領域を含む約 45 万 CpG を解析できる一方で、偽陽性を検出する可能性も考えられる。ま

た疫学研究のような大規模集団において全て網羅的解析を行うことは費用面から考えても困難であり、網羅的解析により同定された特定の遺伝子領域について別手法による検証法の確立が必要である。

そこで本研究では、胎児期の喫煙曝露に着目し、網羅的 DNA メチル化解析により喫煙曝露により変化する DNA メチル化領域を同定し、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析による検証法を確立することを目的とし、胎児期喫煙曝露と子供の疾患リスクをつなぐ DNA メチル化領域を明らかにする。

## B．研究方法

### 1．対象

北海道スタディ札幌コーホート参加者 514 名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報、臍帯血 DNA のそろう母児ペア 291 名を対象とし、喫煙経験のない非喫煙群 (n = 124)、妊娠中も喫煙を継続した喫煙群 (n = 46)、妊娠がわかって喫煙を止めた喫煙中止群 (n = 77) の 3 群を解析対象とした。なお妊娠前喫煙中止群 (中止群) (n = 44) については、禁煙時期が妊娠時を基準とした時期から対象者毎に異なるため解析から除外した。

### 2．方法

網羅的な DNA メチル化は Infinium HumanMethylation450 BeadChip (イリミナ社) により約 45 万 CpGs のデータを取得し、先行文献を参考にデータの前処理 (標準化、バッチ効果補正など) (Aryee et al., 2014, Fortin et al., 2014, Chen et al., 2013, Touleimat et al., 2012, Leek et al., 2012), 統計モデル (細胞組成、母年齢、児性別、母教育歴で調整) を構築 (Fox et al., 2012, Smyth et al., 2004, Houseman et al., 2014), 喫煙曝露によりメチル化変

化する領域 (CpG) の同定を行った。同定された CpG 領域の再現性を検証するため、同一サンプルの DNA をバイサルファイト PCR, エンドリペア, アダプター・バーコード付加によりライブラリー調整を行い、IonChef によるテンプレート調整後、Ion PGM 次世代シーケンサー (サーモフィッシャー社) を用いてシーケンスデータの取得し、各 CpG サイトのメチル化率を算出した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科及び山梨大学医学部の倫理委員会の承認を得た。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏洩については、データの管理保管に適切な保管場所を確保するなどの方法により行うとともに、研究者の道義的責任に基づいて個人データをいかなる形でも本研究の研究者以外の外部の者に触れられないように厳重に保管し、取り扱った。

## C．研究結果

網羅的エピゲノム解析から、ゲノムワイド有意水準 (FDR < 0.05) かつメチル化変化の大きさ ( $|\text{偏回帰係数}| > 0.02$ ) の条件で、非喫煙群と喫煙群の比較で 46CpGs 領域 (27 遺伝子) が同定された。また同様の条件で非喫煙群と中止群の比較で 15CpGs 領域 (5 遺伝子)、中止群と喫煙群の比較で 64CpGs 領域 (38 遺伝子) をそれぞれ同定した。これらの 3 つの解析から共通する CpGs を抽出することにより、喫煙を中止することにより DNA メチル化が非喫煙者と同等レベルになる 9CpGs (Figure 1)、喫煙を中止しても変化しない

1CpG (Figure 2)を見出すことができた。

さらに同一のDNAサンプルを用いて次世代シーケンサー(NGS)による再現性検証を行った結果、8CpGsのうちAHRR (cg21161138)を除く7CpGsで網羅的DNAメチル化解析(450K)結果と同様のメチル化変化が確認でき、450KとNGSのスピアマンの順位相関係数は $> 0.6$ で高い相関を示した(Figure 3)。

網羅的メチル化解析では設計されていない周辺CpGについてのメチル化状態を次世代シーケンサー解析により検討した結果、多くのCpGで同方向にメチル化変化していることが確認できた(Table 1)。

#### D．考察

本研究により、胎児期喫煙曝露により影響を受ける遺伝子として従来の報告と同様にAHRR, CYP1A1, MYO1Gなどが含まれる一方で、シナプス関連分子であるSHANK2やタンパク質の分解に関連するTRIM36などこれまで報告されていない新たな遺伝子領域を同定することができた。特にSHANK2遺伝子は自閉症の原因とされる遺伝子の1つとして報告されていることから、喫煙曝露による神経発達障害発症メカニズムに関与しているかもしれない。また妊娠が分かって喫煙を中止することによりDNAメチル化が非喫煙者と同等レベルになる遺伝子を多数見いだせたことから、妊娠初期に喫煙を止めればDNAメチル化レベルで影響を及ぼさない可能性が示唆された。

大規模コーホートにおける多サンプルの解析では網羅的メチル化解析はコスト面からも現実的ではない。そこで特異的な領域に対して多サンプルの定量的解析が求められる。本研究において同一DNAサ

ンプルを用いて次世代シーケンサーによるメチル化解析を行いデータの再現性を検証した。その結果、8CpGsのうち7CpGsで同様のメチル化変化が確認できたことから結果の妥当性ならびに次世代シーケンサーによるメチル化解析法が確立できた。しかしながら、1CpGについては網羅的解析の偽陽性である可能性と次世代シーケンサー解析の影響も考えられることから更なる検証を行う必要がある。今後、大規模コーホートを用いて、化学物質の影響を受ける特定のDNAメチル化領域について様々な疾患との関与について解析していく予定である。

#### E．結論

網羅的エピゲノム解析から、胎児期の喫煙曝露により影響を受ける遺伝子を同定することができた。次世代シーケンサーを用いて特異的な遺伝子領域のメチル化解析法を確立し、同定されたほとんどのCpGで再現性が確認できた。

#### F．研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

三宅邦夫, 三浦りゅう, 小林祥子, 小林澄貴, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 山縣然太郎, 岸玲子. 妊娠中の喫煙曝露における臍帯血を用いたDNAメチル化変化領域の同定. 第46回日本環境変異原学会. 東京都千代田区. 2017.11.6.-7.

#### G．知的財産権の出願・登録状況

該当なし

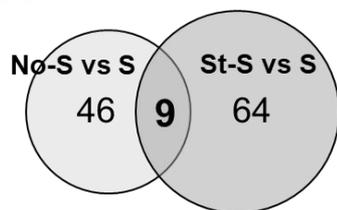
## 参考文献

1. Tran NQV, Miyake K. 2017. Neurodevelopmental Disorders and Environmental Toxicants: Epigenetics as an Underlying Mechanism. *Int J Genomics*. 2017:7526592.
2. Melchior M, Hersi R, van der Waerden J, Larroque B, Saurel-Cubizolles MJ, Chollet A, Galéra C; EDEN Mother-Child Cohort Study Group. 2015. Maternal tobacco smoking in pregnancy and children's socio-emotional development at age 5: The EDEN mother-child birth cohort study. *Eur Psychiatry*. 30(5):562-8.
3. Joelsson P, Chudal R, Talati A, Suominen A, Brown AS, Sourander A. 2016. Prenatal smoking exposure and neuropsychiatric comorbidity of ADHD: a finnish nationwide population-based cohort study. *BMC Psychiatry*. 16:306.
4. Lister R, Mukamel EA. 2015. Turning over DNA methylation in the mind. *Front Neurosci*. 9:252.
5. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, Irizarry RA. 2014. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 30:1363-1369.
6. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, Greenwood CM, Hansen KD. 2014. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biol*. 15: 503..
7. Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, Gallinger S, Hudson TJ, Weksberg R. 2013. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics*. 8: 203-209.
8. Touleimat, N. & Tost, J. 2012. Complete pipeline for Infinium((R)) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*. 4: 325-341.
9. Leek, J. T., Johnson, W. E., Parker, H. S., Jaffe, A. E. & Storey, J. D. 2012. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 28: 882-883.
10. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. 2011. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 98: 288-295.
11. Fox, J. & Weisberg, S. 2011. Robust Regression in R: *An Appendix to An R Companion to Applied Regression*.

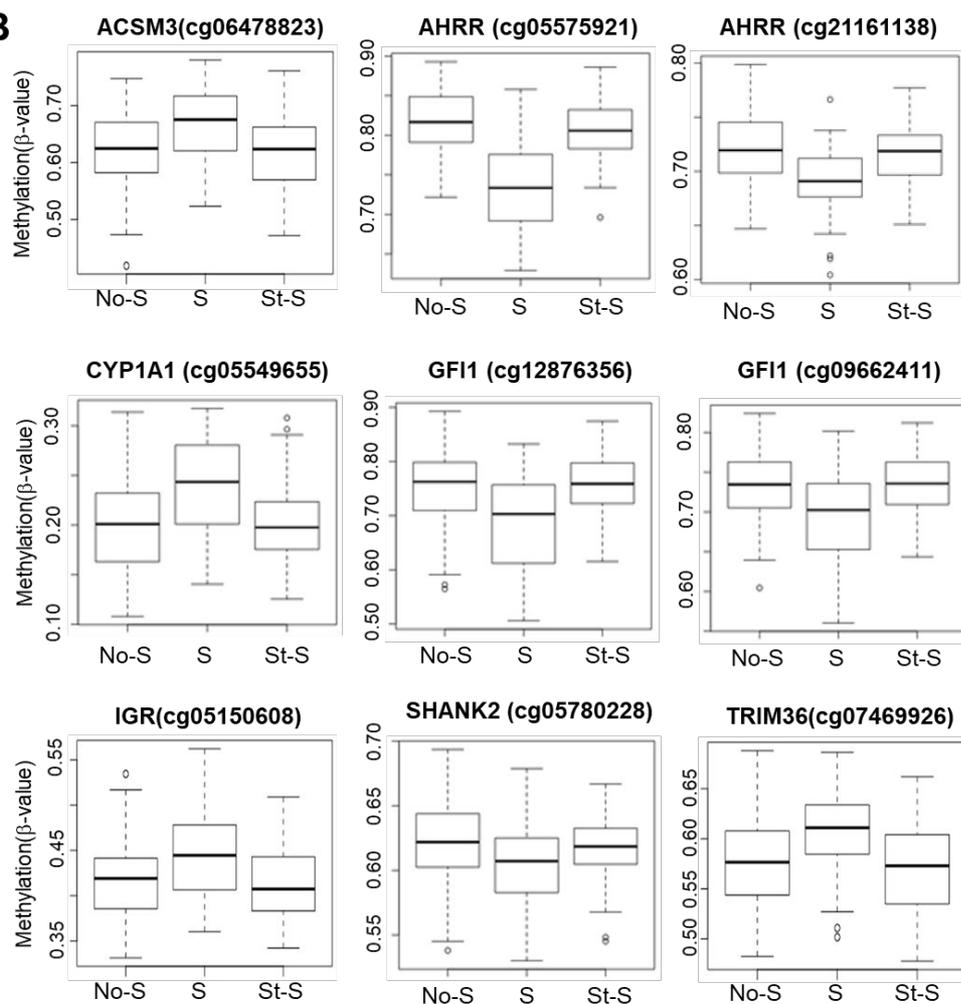
2nd edn.

12. Smyth, G. K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: Article3.
- C.J. 2014. Reference-free cell mixture adjustments in analysis of DNA methylation data. *Bioinformatics*. 30:1431-9.
13. Houseman, E.A., Molitor, J., Marsit,

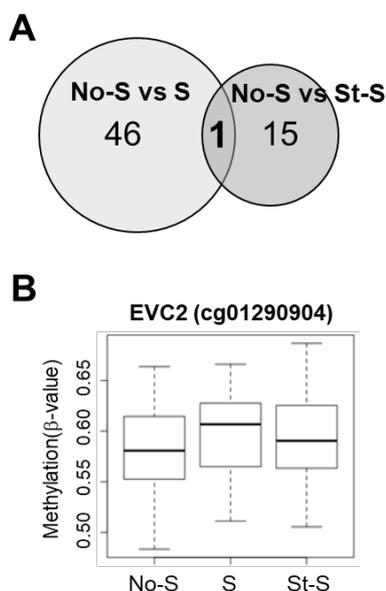
**A**



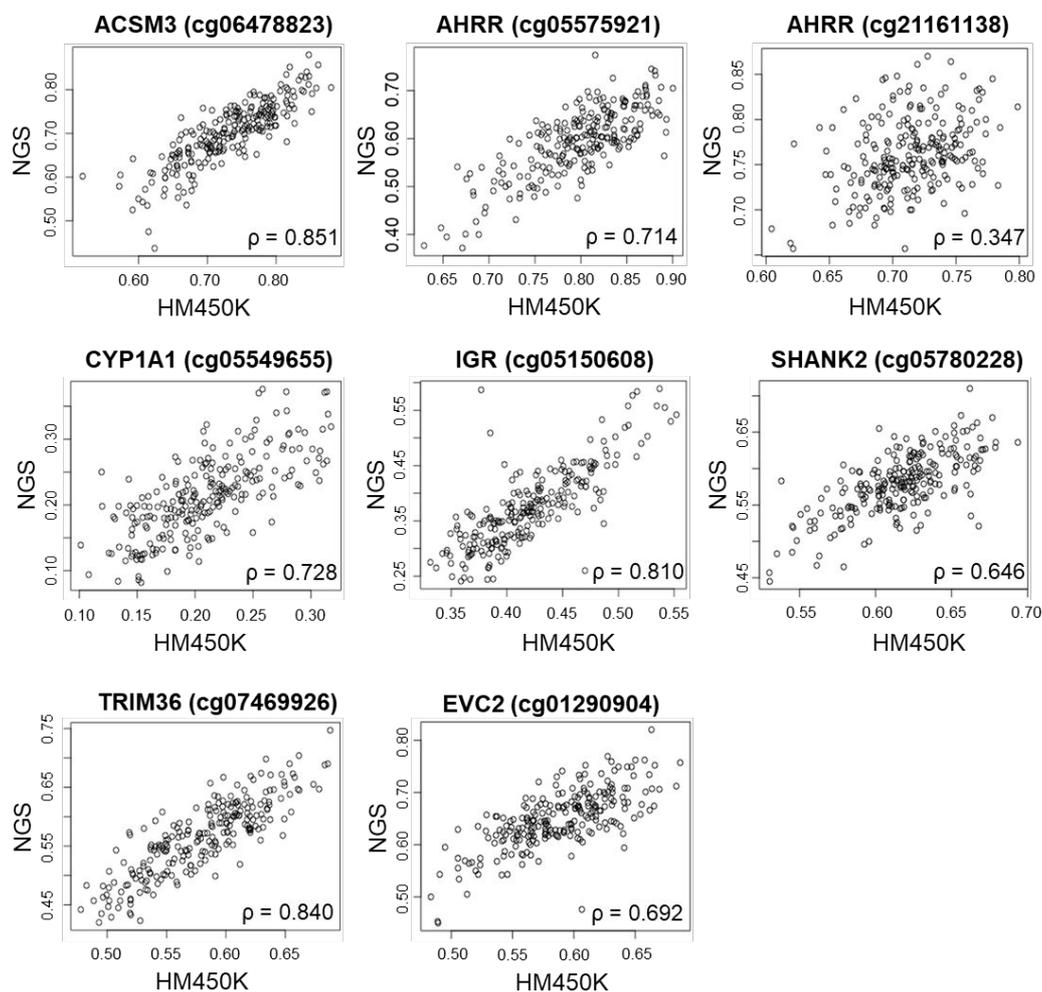
**B**



**Figure 1.** Secondary comparison of differentially methylated CpG sites identified in the Ne-S vs. Su-S comparison relative to those identified in the St-S vs. Su-S comparison. (A) Venn diagram showing 9 CpG sites that were common between the Ne-S vs. Su-S comparison (46 sites) and the St-S vs. Su-S comparison (64 sites). (B) Box plots showing methylation rates ( $\beta$ -value) at 9 common CpG sites.



**Figure 2.** Secondary comparison of differentially methylated CpG sites identified in the Ne-S vs. Su-S comparison relative to those identified in the Ne-S vs. St-S comparison. (A) Venn diagram showing one CpG site that was common between the Ne-S vs. Su-S comparison (46 sites) and the Ne-S vs. St-S comparison (15 sites). (B) Box plots showing methylation rates ( $\beta$ -value) at one common CpG site.



**Figure 3.** Correlation between HumanMethylation450K array (HM450K) and next generation sequencing (NGS) data analysis for the DNA methylation status of eight CpG sites after removing outliers. Values of Spearman correlation coefficient ( $\rho$ ) are indicated.

**Table 1.** Verification result for selected CpG sites using Next Generation Sequencing

Gene region	CpG site <sup>a</sup>	P-value			Mean (SD <sup>e</sup> ) methylation (ratio)		
		Ne-S <sup>b</sup> vs Su-S <sup>c</sup>	Ne-S vs St-S <sup>d</sup>	St-S vs Su-S	Ne-S	St-S	Su-S
ACSM3	cg59 (cg06478823)	0.032 *	0.728	0.033 *	0.700 (0.062)	0.690 (0.078)	0.722 (0.080)
AHRR	cg26	1.17E-10 **	0.258	1.55E-08 **	0.644 (0.052)	0.636 (0.049)	0.564 (0.068)
	cg28	6.64E-12 **	0.205	6.24E-09 **	0.640 (0.054)	0.630 (0.050)	0.549 (0.067)
	cg51 (cg05575921)	1.05E-11 **	0.625	9.76E-11 **	0.615 (0.060)	0.609 (0.050)	0.519 (0.072)
	cg71	3.73E-12 **	0.587	1.48E-10**	0.738 (0.064)	0.733 (0.057)	0.611 (0.097)
	cg96	1.33E-10**	0.388	6.18E-08 **	0.679 (0.058)	0.670 (0.057)	0.579 (0.082)
AHRR	cg26	0.964 (0.984)	0.768 (0.826)	0.980 (0.980)	0.854 (0.034)	0.851 (0.037)	0.854 (0.035)
	cg56	0.007 ** (0.656)	0.827 (0.892)	0.042* (0.429)	0.785 (0.150)	0.814 (0.111)	0.768 (0.150)
	cg79 (cg21161138)	0.064 (0.064)	0.669 (0.576)	0.280 (0.350)	0.767 (0.040)	0.755 (0.063)	0.749 (0.046)
CYP1A1	cg26 (cg05549655)	8.47E-04 **	0.941	7.06E-04 **	0.210 (0.061)	0.202 (0.053)	0.245 (0.061)
	cg31	0.008 **	0.986	0.005 **	0.242 (0.066)	0.236 (0.054)	0.274 (0.060)
	cg42	0.009 **	0.312	3.67E-04 **	0.480 (0.081)	0.461 (0.073)	0.518 (0.071)
	cg49	0.166	0.288	0.007 **	0.470 (0.070)	0.453 (0.065)	0.491 (0.070)
	cg57	8.93E-4 ** (0.002 **)	0.781 (0.781)	7.07E-5 ** (2.19E-04 **)	0.566 (0.077)	0.558 (0.064)	0.604 (0.069)
IGR	cg26	0.72 (0.849)	0.600 (0.600)	0.303 (0.422)	0.371 (0.076)	0.367 (0.070)	0.374 (0.087)
	cg75 (cg05150608)	0.024 *	0.736	0.010 *	0.368 (0.066)	0.365 (0.071)	0.403 (0.080)
	cg77	0.044 *	0.707	0.041 *	0.376 (0.078)	0.372 (0.085)	0.415 (0.110)
SHANK2	cg39 (cg05780228)	2.50E-04 ** (1.98E-04 **)	0.287 (0.246)	0.034 * (0.034 *)	0.590 (0.042)	0.579 (0.040)	0.558 (0.046)
	cg67	0.09 (0.120)	0.986 (0.964)	0.163 (0.163)	0.937 (0.018)	0.938 (0.013)	0.932 (0.017)
	cg74	0.025 *	0.793	0.022 *	0.848 (0.027)	0.849 (0.028)	0.837 (0.027)
TRIM36	cg26	0.003 **	0.777	0.003 **	0.549 (0.085)	0.538 (0.088)	0.602 (0.098)
	cg38	0.031 *	0.562	0.009 **	0.569 (0.082)	0.556 (0.087)	0.606 (0.088)
	cg40 (cg07469926)	0.005 **	0.678	0.002 **	0.563 (0.057)	0.551 (0.065)	0.595 (0.063)
EVC2	cg34 (cg01290904)	0.007 ** (0.007) **	0.0526 (0.042 *)	0.429 (0.527)	0.637 (0.056)	0.658 (0.088)	0.667 (0.054)

<sup>a</sup>CpG sites are numbered according to their position on the sequencing products, overlapped CpG sites with Human Methylation 450K array are indicated in parentheses.  
<sup>b</sup>Never-smoker. <sup>c</sup>Sustained-smoker. <sup>d</sup>Stopped-smoker. <sup>e</sup>Standard deviation.  
Steel-Dwass tests. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01, P value from analysis before removal of outliers are indicated in parentheses.

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

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

**研究要旨**

北海道内の医療機関で 94 名の妊産婦から採取された臍帯血試料を対象にダイオキシン類・PCBs の異性体定量分析を実施した。臍帯血 94 例のうちダイオキシンは 92 例、PCBs は 94 例すべての定量結果が得られた。定量値を過去の報告事例と比較したところ同等かやや低い濃度となり、職業性の曝露等に由来する特異的な高濃度事例は認められなかった。結果として 94 名の妊産婦から採取された臍帯血試料は、本研究事業の主たる目的である一般的なヒトの集団におけるダイオキシン類・PCBs の次世代影響評価に適切な試料であると考えられた。

**研究協力者**

安武 大輔（福岡県保健環境研究所、  
専門研究員）  
平川 博仙（福岡県保健環境研究所、  
専門研究員）、新谷 依子  
（福岡県保健環境研究所、研究員）

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。

**A . 研究目的**

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

**B . 研究方法**

2002 ~ 2012 年に北海道内の医療機関を受診し、調査の同意を得た妊産婦 94 名について、分娩時に臍帯血を採取して調査試料とした。採取後の臍帯血は密閉可能な容器に移され、北海道大学で冷凍保存された。測定は福岡県保健環境研究所で実施した。臍帯血を採取した時点での妊産婦 94 名の年齢、出産歴は下記のとおりであった。

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

アセトン、ヘキサン等の有機溶媒は関東化学製のダイオキシン分析用を用いた。硝酸銀シリカゲルは富士フィルム和光純薬製のダイオキシン分析用を、濃硫酸は同社製の有害金属測定用をそれぞれ使用

## 分担研究報告書

した。活性炭（ナカライテスク製）はトルエンで約 30 時間還流洗浄し、無水硫酸ナトリウムに対して 0.1%（w/w）になるよう混合して用いた。

臍帯血の抽出には高速溶媒抽出装置 ASE-350（Thermo 製）を使用した。冷凍状態の臍帯血試料を室温で解凍し、その約 6 g を ASE-350 用の抽出セルに秤量した。凍結乾燥を行った後、クリーンアップスパイクを添加し、抽出溶媒にアセトン/ヘキサン（1:3, v/v）を用いて抽出した。抽出条件の詳細は既報の通りであった<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、各々にシリンジスパイクを添加して高分解能 GC/MS（HRGC/HRMS）の測定試料とした。

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

本分担研究の実施にあたり、臍帯血中のダイオキシン類・PCBs の定量精度の確保を目的として、国内の 6 機関と共同で分析精度管理を実施した。結果として、

当研究所の測定値は他の測定機関とよく一致しており、測定精度が確保されていることが確認できた<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大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定ならびに福岡県保健環境研究所疫学研究に関する倫理規定に従って実施した。インフォームド・コンセントは研究代表者が行い、福岡県保健環境研究所は臍帯血試料と試料リストを取り扱う。臍帯血が入った容器及び試料リストには、研究代表者によって匿名化され個人情報と連結不可能な ID のみが記載されている。よって福岡県保健環境研究所で個人情報を取り扱うことはない。

## C．結果及び考察

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

臍帯血試料（94 例）を ASE-350 で抽出して得られた脂肪の含量は、重量あたり平均 0.33%（範囲 0.22%～0.56%）であった。当研究所における臍帯血試料の抽出

## 分担研究報告書

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 92 例のダイオキシン類濃度（Total TEQ）は、平均 4.0 pg/g lipid（範囲 2.6～11 pg/g lipid）であった。また、全血重量あたりの濃度で表すと、Total TEQ 値は平均 0.012 pg/g whole（範囲 0.0077～0.026 pg/g whole）であった。

これまでの調査研究で、臍帯血や胎盤組織等のダイオキシン類・PCB 濃度は妊産婦の出産歴と関連があり、出産回数が多いほど濃度が低くなる傾向が認められている。これは母親の体内に蓄積していたダイオキシン類・PCBs が出産に伴う授乳や胎盤の摘出等によって体外に排出されたためと考えられる<sup>5)</sup>。

福岡県保健環境研究所では 2009～2011 年度に福岡県内在住の妊産婦（29 名、平均年齢 32.0 才）を対象に臍帯血中のダイオキシン類（mono-ortho PCB を除く 21 化合物）濃度を測定しており、これらを今回の臍帯血の分析結果と比較した。ここでは本分担研究及び福岡県調査ともに初産及び出産 2 回目の妊産婦に該当する測定値を選び、データを比較した。本研究で 92 例中 82 例、福岡県調査では 29 例中 26 例の妊産婦が当該条件に一致した。

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

さらに臍帯血中ダイオキシン類濃度の

国内調査事例として、東北地方で 49 名の妊産婦から採取された試料について平均 10 pg/g lipid（範囲 3.2～23 pg/g lipid）と報告されている（2008 年）<sup>3)</sup>。本研究の結果はこの調査結果と比較しても低い傾向であった。

PCBs（81 化合物）の定量結果の概要を表 2 に示した（脂肪重量あたり濃度のみ）。臍帯血 94 例中の Total PCBs 濃度は、平均 33 ng/g lipid（範囲 6.6～200 ng/g lipid）であった。全血重量あたり濃度は、平均 98 pg/g whole（範囲 25～460 pg/g whole）であった。臍帯血中の PCBs 濃度については、過去に環境省の調査事例（1999～2004 年）がある<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 49 例中の Total PCB 濃度は、ダイオキシン類濃度と同様に過去の分析事例と比較して低い傾向であった。

一方、Total PCBs 濃度（脂肪重量あたり）について 94 例の分布を見ると、93 例が 60 ng/g lipid 未満であったのに対し、残る 1 例のみが 200 ng/g lipid と高くなっていた。当該の妊産婦については、ダイオキシン類濃度も測定しており、他の妊産婦に対して同様に濃度が高かった。図 1 に脂肪重量あたりの Total dioxin 濃度及び Total PCBs 濃度との相関を示した。両者に良好な正の相関（ $R^2 = 0.9049$ ）が得られた。

環境中のダイオキシン類と PCBs の起源は異なり、前者は主に焼却や燃焼等の非意図的過程であり、後者は過去に工業製品として製造された意図的産物に由来する。臍帯血中の Total dioxin 濃度及び Total PCB 濃度について、1 名の臍帯血が他者と比べて高い濃度を示したが、Total

## 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

dioxin と Total PCB 間の濃度相関は全員でほぼ一致していた。このことから、本今回の事例は試料採取や分析操作中の汚染や被験者の一時的な高濃度曝露に起因するものでなく、日常的な食事を介した持続的な摂取に由来したものと考えられる。

#### D. 結論

94 名の妊産婦から提供された臍帯血中のダイオキシン類及び PCBs の定量値を国内の分析事例と比較したところ、濃度は同等かやや低い結果となり、職業性の曝露等に由来する特異的な高濃度の事例は認められなかった。94 名の妊産婦から採取された臍帯血試料は、本研究の主たる目的である一般的なヒトの集団におけるダイオキシン類・PCBs の次世代影響評価に適切な試料であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. 新谷依子, 堀就英ほか. 血液中 PCB 濃度分析のクロスチェック(2017 年度): 第 27 回環境化学討論会. 那覇市. 2018.5.22.-25.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

#### 参考文献

1. Todaka T, Hirakawa H, et al. New protocol for dioxin analysis of human blood. *Fukuoka Acta Med.* 2007; 94: 148-157.
2. 新谷依子, 堀就英ほか. 血液中ダイオキシン類および PCB 濃度測定のコ

スチェック.福岡医誌 2017; 108: 83-93.

3. Nakamura T, Nakai K, et al. Determination of dioxins and polychlorinated biphenyls in breast milk, maternal blood and cord blood from residents of Tohoku, Japan. *Sci. Total Environ.* 2008; 394: 39-51.
4. 環境省請負調査「平成 16 年度ヒト臍帯におけるダイオキシン類等化学物質の蓄積・曝露状況の継続的調査」報告書. 平成 17 年 3 月.
5. 環境省環境研究・技術開発推進費研究「妊婦におけるダイオキシン摂取が胎児健康に及ぼす影響のリスク評価に関する研究」成果報告書.平成 21 ~ 23 年度.
6. 環境省「ヒト臍帯におけるダイオキシン類等化学物質の蓄積・曝露状況の継続的調査」平成 11 年度より平成 16 年度総括報告書.平成 17 年 3 月.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
 分担研究報告書

表 1 . 臍帯血（92 例）のダイオキシン類濃度測定結果

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

(ND : 定量下限値未満)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

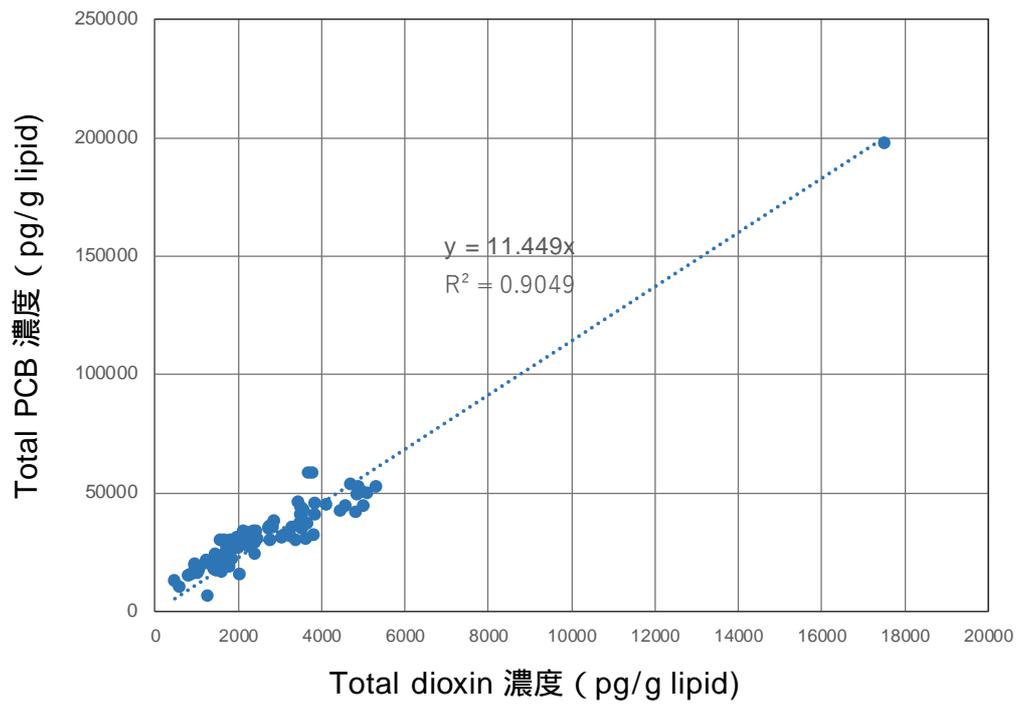


図 1 . 臍帯血中 Total dioxin 濃度と Total PCB 濃度の相関

### 血液中フタル酸モノエステル類の分析

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

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

#### 研究協力者

山本 潤  
(いであ株式会社環境創造研究所, 主査研究員)

モノエステル類 7 種 ( MnBP、MiBP、MBzP、MEHP、MEHHP、MECPP、cx-MiNP ) について血液試料の分析法を確立し、実試料の測定を行った。

#### A . 研究目的

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

近年、喫煙、ヒ素や鉛などの重金属の胎児期暴露による児のメチル化への影響が報告されているが、その中でこれらフタル酸エステル類や、有機フッ素化合物、PCB 類と臍帯血や胎盤組織の IGF2/H19, AHRR, LINE1 遺伝子などのメチル化との関連が示された ( J Expo Sci Environ Epidemiol 2017; Repro Toxicol 2017; Sci Rep 2016; Environ Res 2016 )。しかし、網羅的メチル化解析に関しては、世界的にも報告事例が少なく、これらの研究を進めるに当たっては、生体試料中の微量化学物質の正確な濃度の把握が必要となる。

フタル酸エステル類については、ヒトがばく露されると代謝物が生じることが分かっている。今回は、小児、胎児期における影響を調べるため、代謝物である

#### B . 研究方法

開発した同位体希釈法-液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(以降、LC-MS/MS)をヒト血液試料 20 検体に適応した。対象とするそれぞれの項目の安定同位体をクリーンアップスパイクとして添加し、濃度の計算に用いた。

分析フローを図 1 に、LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示す。

#### C . 研究結果

血液中のフタル酸モノエステル類 7 種の分析法を確立し、標準液の繰り返し測定、繰り返し分析、操作ブランク試験、添加回収試験等を実施し、必要となる精度管理データを収集した。また、本分析法により 20 名分の血液試料の分析を実施した。

標準液の繰り返し測定の結果を表 2、繰り返し分析の結果を表 3 に示す。血液中のフタル酸モノエステル類 7 種の検出下限値は、MnBP 0.57ng/mL、MiBP 0.44ng/mL、MBzP 0.19ng/mL、MEHP

分担研究報告書

0.31ng/mL、MEHHP 0.23ng/mL、MECPP 0.11ng/mL、cx-MiNP 0.12ng/mLであった。本分析法における操作ブランクはすべての項目で下限値未満、各対象物質を6ng添加した回収試験では、回収率が93～110%であった（表4および表5参照）。

血液試料20検体の分析の結果を表6に示す。その内の1検体で二重測定（同一試料の分析）を実施した。それぞれの項目における差は、最大で6.8%であった。

## F．研究発表

### 1.論文発表

該当なし

### 2.学会発表

該当なし

## G．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

## 参考文献

1. Hanne Frederiksen et al., Correlations Between Phthalate Metabolites in Urine, Serum, and Seminal Plasma from Young Danish Men Determined by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology 2010, Vol. 34, 400-410
2. Xiaofang Jia et al., Prenatal maternal blood triglyceride and fatty acid levels in relation to exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: a cross-sectional study, Environmental Health and Preventive Medicine 2015, 20, 168-178.
3. Jee Yeon JEON et al., Determination of Phthalate Metabolites in Human Serum and Urine as Biomarkers for Phthalate Exposure Using Column-Switching LC-

MS/MS, Safety and Health at Work 2011, 2, 57-64

4. Erin P. Hines et al., Concentrations of Phthalate Metabolites in Milk, Urine, Saliva, and Serum of Lactating North Carolina Women, Environmental Health Perspectives 2009, vol.117, 86-92
5. Kayoko Kato et al., Quantitative Detection of Nine Phthalate Metabolites in Human Serum Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology 2003, vol.27, 284-289
6. P Monica Lind et al., Serum concentrations of phthalate metabolites are related to abdominal fat distribution two years later in elderly women, Environmental Health 2012, 11:21
7. Manori J. Silva et al., Automated Solid-Phase Extraction and Quantitative Analysis of 14 Phthalate Metabolites in Human Serum using Isotope Dilution-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology 2005, vol.29, 819-824

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
 分担研究報告書

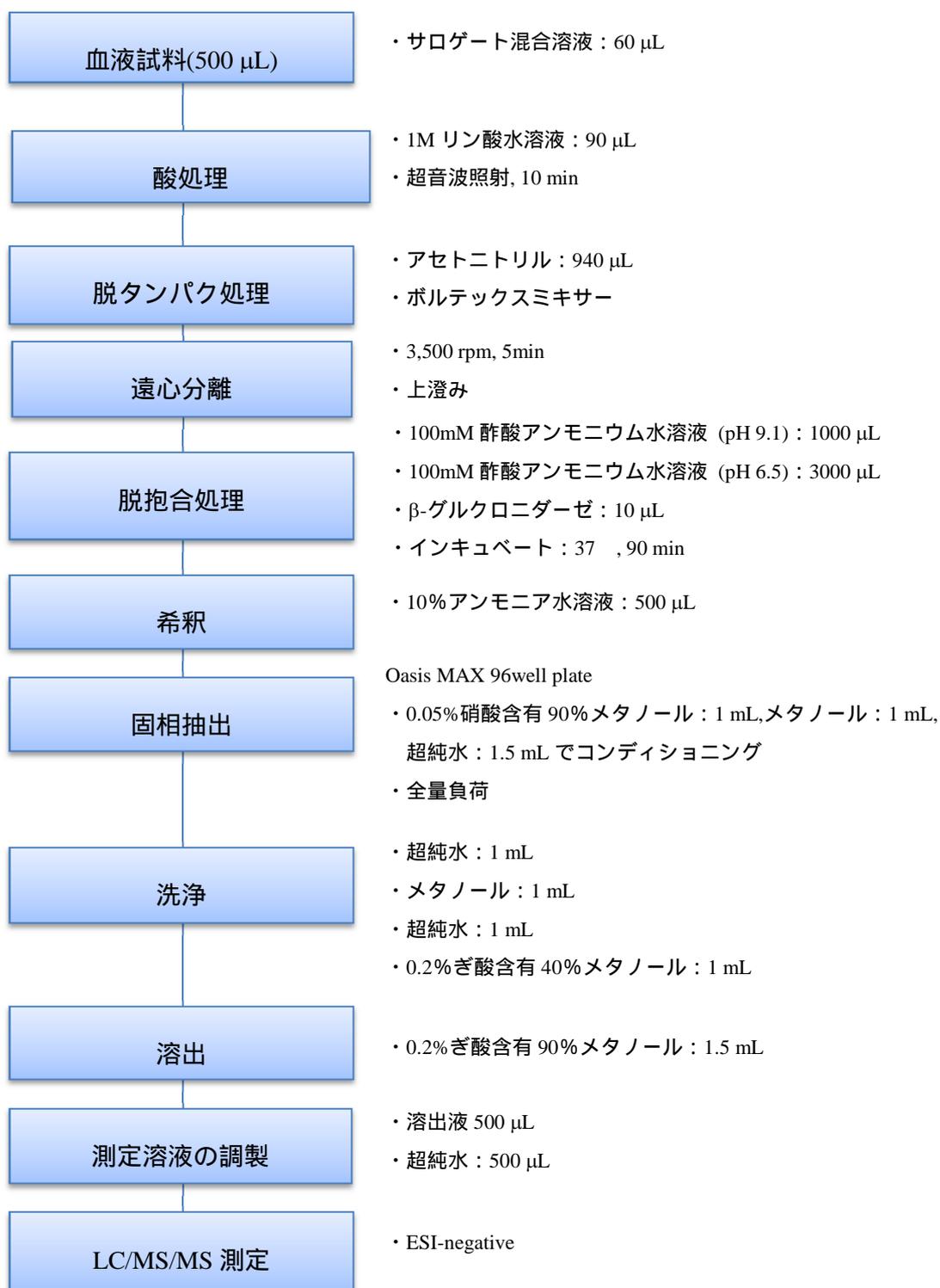


図 1. 血液中のフタル酸モノエステル類の分析フロー

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
 分担研究報告書

表 1. フタル酸モノエステル類の分析における LC/MS/MS 測定条件

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
 分担研究報告書

表 2. フタル酸モノエステル類の IDL

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

表 3. 血液試料中フタル酸モノエステル類の MDL および MQL

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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

表 4. 血液試料中フタル酸モノエステル類の BL 試験

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
 分担研究報告書

表 5. 血液試料中フタル酸モノエステル類の添加回収試験

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
 分担研究報告書

表 6. 血液中のフタル酸モノエステル類の分析結果

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

表 7. 二重測定結果

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

胎児期ビスフェノール A（BPA）曝露の臍帯血 DNA エピゲノム網羅的メチル化析  
**An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations  
in relation to prenatal bisphenol A exposure**

研究代表者	岸 玲子	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特別招へい教授
研究分担者	三浦 りゅう	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特任助教
研究分担者	山崎 圭子	北海道大学環境健康科学研究教育センター	特任講師
研究分担者	松浦 英幸	北海道大学大学院農学研究院	教授
研究分担者	篠原 信雄	北海道大学大学院医学研究院	教授

### 研究要旨

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

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

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

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

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

### 研究協力者

湊屋 街子（北海道大学大学院保健科学研究  
院，特任講師），  
アイツバマイ ゆふ，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

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

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

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

DNA methylation is among the most

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

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

associated methylation profiles.

## B . 研究方法

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

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

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

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

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

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

stratify the analysis by sex.

#### （倫理面への配慮）

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

### C . 研究結果

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

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

**Epigenome-wide association study.** Volcano plots of EWAS analyses for all newborns, male

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

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

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

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

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

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

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

#### D . 考察

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

may impact DNA methylation status at birth in a sex-specific manner.

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

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

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

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

## E . 結論

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

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Miura R, Araki A, Minatoya M, *et al.* An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylations reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A. Sci Rep. under revision.
- 2) Kishi R., Araki A., Minatoya M, Itoh S, Goudarzi H, Miyashita C; Birth cohorts in Asia: The importance, advantages, and

disadvantages of different-sized cohorts.  
Science of the Total Environment. 615  
1143-1154, 2018.

- 3) Miura R, Araki A, Miyashita C, *et al.* An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: the Hokkaido study. Environment International. 115: 21-28, 2018.
- 4) Minatoya M, Araki A, Miyashita C, *et al.* Association between prenatal bisphenol A and phthalate exposures and *fet al* metabolic related biomarkers: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Environ Res. 161 505-511, 2018.
- 5) Minatoya M, Itoh S, Yamazaki K, *et al.* Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and behavioral problems in children at preschool age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health Environmental Health and Preventive Medicine. 23:43 2018.

## 2. 学会発表

1. Minatoya M., Araki A., Miyashita C., itoh S., Kobayashi S., Yamazaki K., Ait Bamai Y., Miura R., Tamura N., Kishi R.; Update and the recent findings from the Hokkaido Study. The 9th International Conference on Children's Health and the Environment (INCHES). Hoam Faculty House, Seoul National University, Seoul, Korea. (2018.6.27-29)
2. 小林澄貴, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 三浦りゅう, ゴウダルジ・ハウマヌ, 荒木敦子, 梶原淳睦, 堀就英, 岸玲子; 胎児期の PCB 類曝露による児の

H19・LINE-1 の DNA メチル化への影響：北海道スタディ. 第 88 回日本衛生学会学術総会. 東京工科大学蒲田キャンパス（東京都大田区）.  
(2018.3.22-24)

## G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

## 参考文献

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

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

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

- Science of the total environment 607-608:351-356.
17. Minatoya M, Itoh S, Yamazaki K, Araki A, Miyashita C, Tamura N, *et al.* 2018. Prenatal exposure to bisphenol a and phthalates and behavioral problems in children at preschool age: The hokkaido study on environment and children's health. *Environ Health Prev Med* 23:43.
  18. Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, Ye X, Soorya LV, Silva MJ, *et al.* 2011. Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology* 32:261-267.
  19. Perera F, Vishnevetsky J, Herbstman JB, Calafat AM, Xiong W, Rauh V, *et al.* 2012. Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort. *Environmental health perspectives* 120:1190-1194.
  20. Roen EL, Wang Y, Calafat AM, Wang S, Margolis A, Herbstman J, *et al.* 2015. Bisphenol a exposure and behavioral problems among inner city children at 7-9 years of age. *Environmental research* 142:739-745.
  21. Mileva G, Baker SL, Konkle AT, Bielajew C. 2014. Bisphenol-a: Epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *International journal of environmental research and public health* 11:7537-7561.
  22. Hackett JA, Surani MA. 2013. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 368:20110328..
  23. Alonso-Magdalena P, Rivera FJ, Guerrero-Bosagna C. 2016. Bisphenol-a and metabolic diseases: Epigenetic, developmental and transgenerational basis. *Environmental epigenetics* 2:dvw022.
  24. Ideta-Otsuka M, Igarashi K, Narita M, Hirabayashi Y. 2017. Epigenetic toxicity of environmental chemicals upon exposure during development - bisphenol a and valproic acid may have epigenetic effects. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 109:812-816.
  25. Singh S, Li SS. 2012a. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *International journal of molecular sciences* 13:10143-10153..
  26. Faulk C, Kim JH, Anderson OS, Nahar MS, Jones TR, Sartor MA, *et al.* 2016. Detection of differential DNA methylation in repetitive DNA of mice and humans perinatally exposed to bisphenol a. *Epigenetics* 11:489-500.
  27. Nahar MS, Kim JH, Sartor MA, Dolinoy DC. 2014. Bisphenol a-associated alterations in the expression and epigenetic regulation of genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes in human *fet al* liver. *Environmental and molecular mutagenesis* 55:184-195.
  28. Nahar MS, Liao C, Kannan K, Harris C, Dolinoy DC. 2015. In utero bisphenol a concentration, metabolism, and global DNA methylation across matched placenta, kidney, and liver in the human fetus. *Chemosphere* 124:54-60.
  29. Goodrich JM, Dolinoy DC, Sanchez BN, Zhang Z, Meeker JD, Mercado-Garcia A,

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

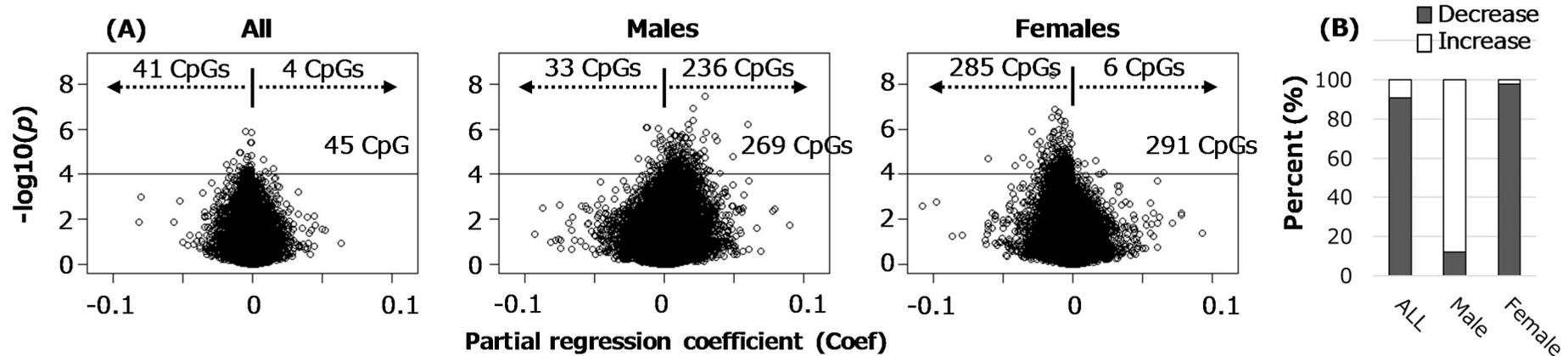
43. Aris A. 2014. Estimation of bisphenol a (bpa) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in eastern townships of canada. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY) 45:8-13. phthalates exhibit similar toxicogenomics and health effects. *Gene* 494:85-91.
44. Kosarac I, Kubwabo C, Lalonde K, Foster W. 2012. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol a in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 898:90-94.
45. Hanna CW, Bloom MS, Robinson WP, Kim D, Parsons PJ, vom Saal FS, *et al.* 2012. DNA methylation changes in whole blood is associated with exposure to the environmental contaminants, mercury, lead, cadmium and bisphenol a, in women undergoing ovarian stimulation for ivf. *Human reproduction* (Oxford, England) 27:1401-1410.
46. Kim JH, Rozek LS, Soliman AS, Sartor MA, Hablas A, Seifeldin IA, *et al.* 2013. Bisphenol a-associated epigenomic changes in prepubescent girls: A cross-sectional study in gharbiah, egypt. *Environmental health : a global access science source* 12:33.
47. Martin, E. M. & Fry, R. C. 2018. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure- Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annual review of public health* **39**, 309-333.
48. Singh S, Li SS. 2012b. Bisphenol a and

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

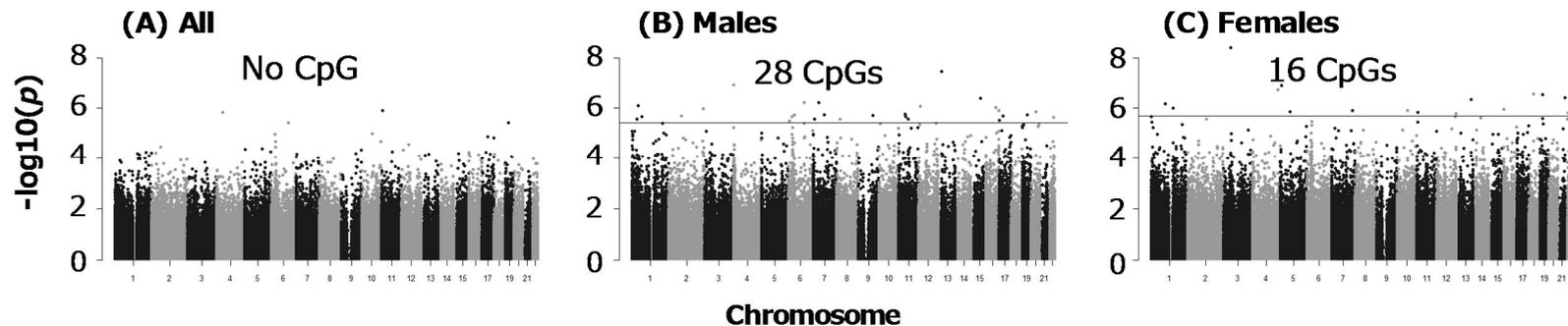
**Table 1.** Maternal and infant characteristics and their relationship with cord blood BPA levels (ng/mL).

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

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



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



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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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

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

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

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

<sup>d</sup> Partial regression coefficient indicates absolute DNA methylation change per *ln*-unit increase in BPA concentration.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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

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

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

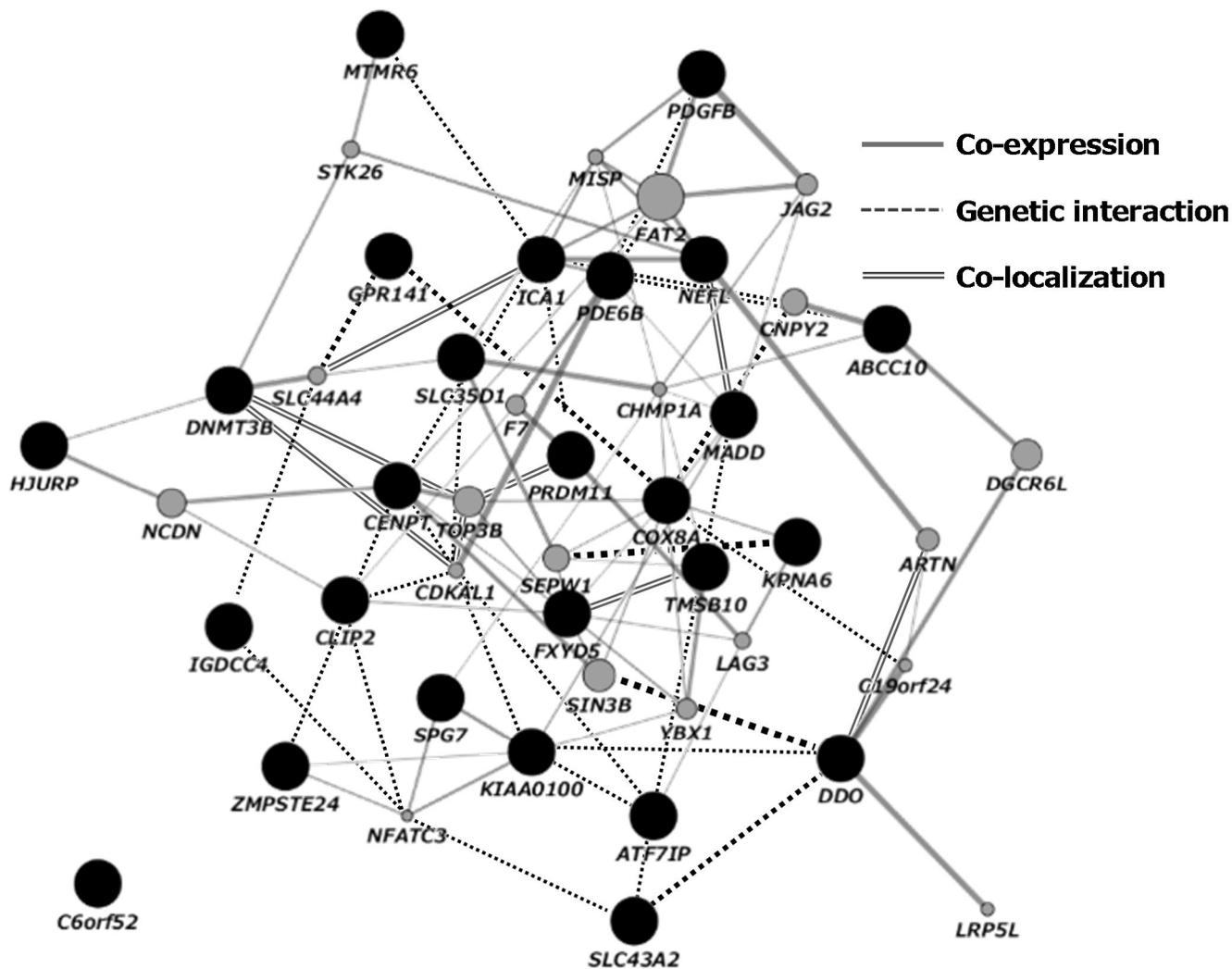
<sup>a</sup> Linear regression analyses adjusted for child sex were applied to determine the associations of DNA methylation levels with  $\ln$ -transformed BPA levels in Taiwan cohort.

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

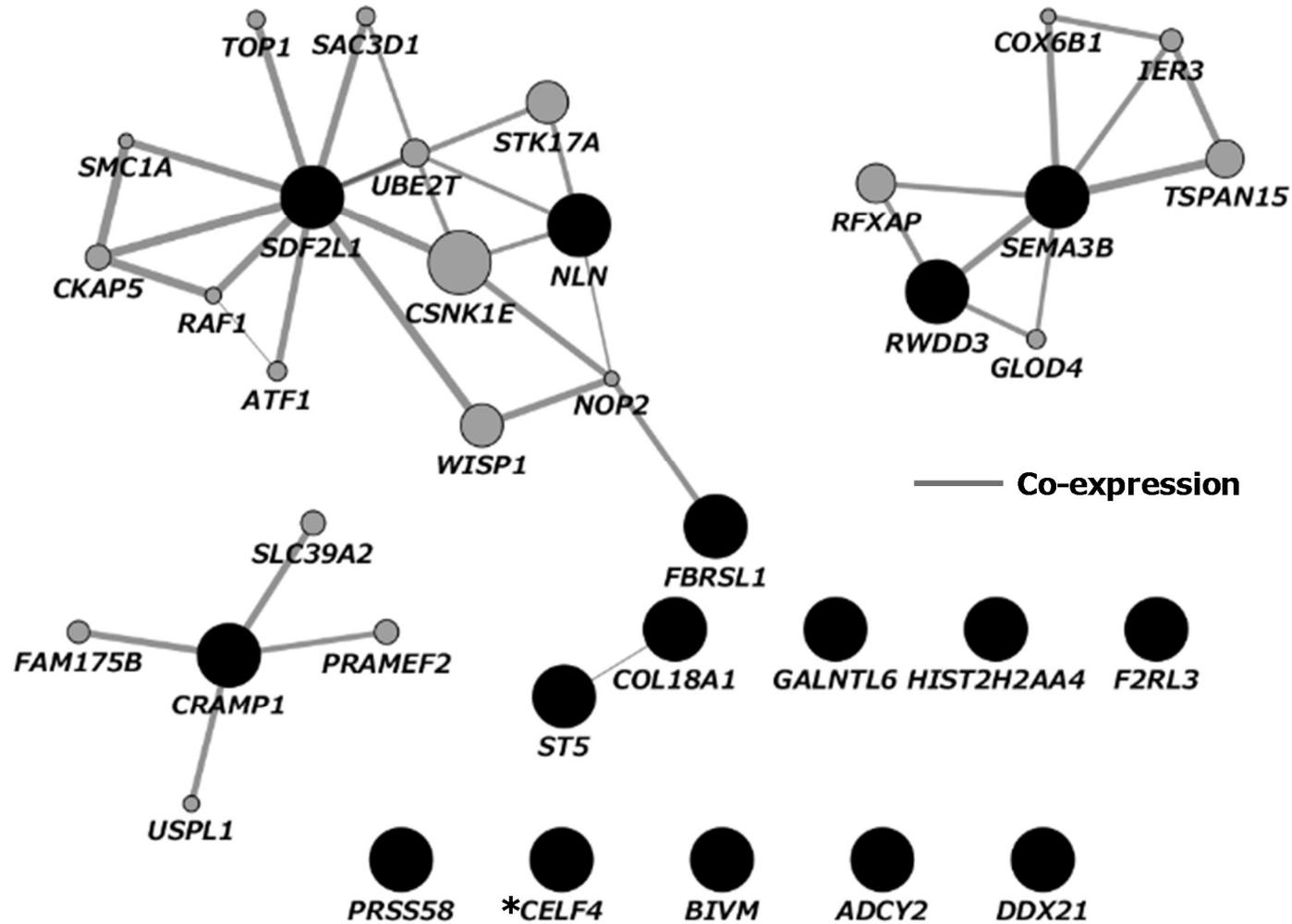
<sup>c</sup> Adjusted for maternal age, maternal educational levels, maternal pre-pregnancy BMI, maternal smoking during pregnancy, gestational age, infant sex, and cord blood cell estimates.

<sup>d</sup> Partial regression coefficient indicates absolute DNA methylation change per  $\ln$ -unit increase in BPA concentration.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書



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



**Figure 4.** Gene network analysis using GeneMANIA. Dark circles represent genes associated with the 16 DMPs found to be related to BPA exposure in the female-only analysis. Light circles represent additional genes predicted by GeneMANIA based on genetic and physical interactions. \**CELF4*, an alias for *BRUNOLA*

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
 分担研究報告書

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
 分担研究報告書

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

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

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

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

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

#### 研究要旨

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

**目的**：本研究では、大規模コホートにおける次世代シーケンサーを用いた DNA 解析手法の検証、喫煙曝露と DNA メチル化および ADHD の関連を検討することを目的とした。

**方法**：北海道スタディ大規模コホートにおける ADHD ケース・サブコホートのうち臍帯血 DNA のそろう母児 562 名( ケース：245 名、コントロール：317 名)を対象とし、質問票(非喫煙群(n = 276)、喫煙群(n = 38))もしくは母体コチニン濃度(高濃度群(n = 48)、中程度濃度群(n = 200)、低濃度群(n = 262))へ群別化した。昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析から胎児期の喫煙曝露により有意に DNA メチル化変化した 46CpGs から 14CpGs(9 遺伝子)を解析遺伝子領域とし、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析は ThermoFisher 社の IonPGM システムを用いた。

**結果**：質問票により群別化した非喫煙群、喫煙群間で 5 つの CpGs( AHRH (cg05575921), MYO1G (12803068), GF11 (cg12876356, cg18146737), ESR1 (cg15626350))については 450K の結果同様、喫煙曝露によるメチル化変化に統計的有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めた。コチニン濃度で群別化した結果、ESR1 以外の 4 つの CpGs は質問票と同様に低濃度および中程度濃度群と比較して高濃度群で有意な差が認められた。喫煙曝露による ADHD 疑い群の危険率の指標としてのオッズ比は約 1.5 であったが、有意差は認めなかった。

**考察**：次世代シーケンサーを用いた特異的遺伝子領域の DNA メチル化解析法から喫煙曝露の影響を受けやすい遺伝子領域の検証ができた。

## A. 研究目的

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

## B. 研究方法

### 1. 対象

北海道スタディ大規模コホートにおける ADHD ケース・サブコホートのうち臍帯血 DNA のそろそろ母児 562 名(ケース: 245 名、コントロール: 317 名)を対象とした。喫煙経験のない非喫煙群( $n = 276$ )、妊娠中も喫煙を継続した喫煙群( $n = 38$ )、喫煙経験がある群については禁煙時期が明確でなかったため解析から除外した。妊娠後期(約 8 ヶ月)での母体の血清コチニン濃度(Sasaki 2011)により血清コチニン

高濃度群( $\geq 11.49$ ,  $n = 48$ )、中程度濃度群( $0.22-11.48$  ng/mL,  $n = 200$ )、低濃度群( $\leq 0.21$ ,  $n = 262$ )へ群別化した。血清コチニン濃度が測定されていない対象者は解析から除外した。またプライマリーエンドポイントとして 6 歳の ADHD-RS スコア(男児  $\geq 14.9$ 、女児  $\geq 9.4$ )により ADHD 疑い群( $n = 224$ )、健常者群( $n = 286$ )が解析対象者となった。

### 2. 方法

昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析から胎児期の喫煙曝露により有意に DNA メチル化変化した 46CpGs から 14CpGs (9 遺伝子)を選択した。次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス解析は ThermoFisher 社の IonPGM システムを用いた。具体的な方法は以下に示す。臍帯血をバイサルファイト処理した後、各 CpG を含むプライマーで PCR 増幅した。各 PCR 産物を検体ごとに混ぜ、エンドリペア、ニックリペア、アダプター・バーコード配列付加によりライブラリーを作成し、リアルタイム PCR により濃度を測定した。シーケンス用半導体チップ(Ion 318 chip)を用いて 96 検体/ chip でテンプレート調整(Ion Chef)、Ion PGM によるシーケンスランを行った。平均カバレッジ  $>2500 \times$ 、ターゲット領域のカバレッジ  $>500 \times$  になるようにシーケンス回数を調整した。取得したシーケンスデータは Thermo Fisher 社の Torrent Suite Software ver 5.0 を用いてベースコールを行い、Methylation Analysis Amplicon プラグインを用いて、各遺伝子標的領域における各 CpG サイトのメチル化率を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科及び山梨大学医学部の倫理委員会の承認を得た。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏洩については、データの管理保管に適切な保管場所を確保するなどの方法により行うとともに、研究者の道義的責任に基づいて個人データをいかなる形でも本研究の研究者以外の外部の者に触れられないように厳重に保管し、取り扱った。

### C . 研究結果

質問票により群別化した非喫煙群、喫煙群間とも正規性が認められないため、ウィルコクソンの順位和検定により、非喫煙群と喫煙群の間にメチル化率の差の統計的検定を行った結果を図1に示す。5つのCpGs (*AHRR* (cg05575921), *MYO1G* (12803068), *GF11* (cg12876356, cg18146737), *ESR1* (cg15626350)) については450Kの結果同様、喫煙曝露によるメチル化変化に統計的有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めた。しかし、その他の遺伝子領域では統計的有意差は認められなかった。

コチニン濃度で群別化した解析結果を図2に示す。ERS1以外の4つのCpGsは質問票と同様に低濃度および中程度濃度群と比較して高濃度群で有意な差が認められた。

質問表による喫煙曝露とADHD疑い群との関連を検討するための分割表を表1に示す。この分割表における喫煙曝露によるADHD疑い群の危険率の指標としてのオッズ比は約1.5であったが、カイ二乗検定による比率の差の検定のP値 = 0.3052と喫煙曝露とADHD疑い群との関連に有意差は認めなかった。また母体血清コチニン濃度

とADHD疑い群の関連を検討するための分割表を表2に示す。母体血清コチニン濃度とADHD疑い群との関連もP値 = 0.1889と有意差は認めなかった。

コントロール群とADHD疑い群間比較においてDNAメチル化に差があるCpGを解析した結果、CYP1A1の1CpGで有意な差があった(図3)。

### D . 考察

大規模コホートにおいて多検体のDNAメチル化解析手法を確立することは重要である。その手法の1つとして次世代シーケンサーの利用が考えられる。本研究において、網羅的メチル化解析を行った集団(北海道スタディ札幌コホート)とは別集団である北海道スタディ大規模コホートを用いて次世代シーケンサーによるメチル化解析の妥当性を検証した。その結果、これまでに喫煙曝露による影響が数多く報告されている(Morales E et al., 2016, Joubert BR et al., 2016, Küpers LK et al., 2015)。AHRR, MYO1G, GF11については本研究においても有意にメチル化変化することがわかった。これらの遺伝子は喫煙曝露の影響を受けやすい領域であることが示唆される。しかしながらその他の遺伝子領域では有意差は認められなかった。考えられる理由は以下の通りである。1つ目に450K網羅的解析の偽陽性である。統計的有意差があるとはいえその変化は数%と微妙であることから偽陽性であった可能性が考えられる。2つ目に今回の集団においては非喫煙群(n = 276)、喫煙群(n = 38)とサンプルサイズの違いが大きく、十分な検出力が得られなかったことも原因の1つと推測される。3つ目に次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシー

クエンスによるメチル化解析において、サンプル間でカバレッジ数がばらついてしまったことから外れ値が多くなってしまったことが考えられる。バイサルファイト DNA を使用する場合、PCR 増幅長を短く設計することによりシークエンス効率上がることも考えられるため、今後はプライマーの再設計、PCR 増幅長を短くして検討していく予定である。

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

## E . 結論

次世代シークエンサーを用いた特異的遺伝子領域の DNA メチル化解析法の妥当性を検討し、喫煙曝露の影響を受けやすい遺伝子領域を検証することができた。次世代シークエンサーによるメチル化解析の精度についてはさらなる検証が必要である。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

Miyake K., Kawaguchi A., Miura R., Kobayashi S., Tran N. Q. V.,

Koybayashi S., Miyashita C., Araki A., Kubota T., Yamagata Z., Kishi R. Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Scientific Report. 2018; 8: 5654.

### 2. 学会発表

三宅邦夫, 川口章夫, 三浦りゅう, 小林祥子, 小林澄貴, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 山縣然太郎, 岸玲子. 胎児期喫煙曝露による臍帯血における DNA メチル化変化領域の同定. 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会. (2018.5.24.-25)

## G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 参考文献

1. Tran NQV, Miyake K. Neurodevelopmental Disorders and Environmental Toxicants: Epigenetics as an Underlying Mechanism. Int J Genomics. 2017; 2017: 7526592.
2. Melchior M, Hersi R, et al. Maternal tobacco smoking in pregnancy and children's socio-emotional development at age 5: The EDEN mother-child birth cohort study. Eur Psychiatry. 2015; 30(5): 562-8.
3. Joelsson P, Chudal R, et al. Prenatal smoking exposure and neuropsychiatric comorbidity of ADHD: a finnish nationwide

- population-based cohort study. BMC Psychiatry. 2016; 16: 306.
4. Zhu J, Zhang X, et al. Prenatal nicotine exposure mouse model showing hyperactivity, reduced cingulate cortex volume, reduced dopamine turnover, and responsiveness to oral methylphenidate treatment. J Neurosci. 2012; 32(27): 9410-8.
  5. Yochum C, Doherty-Lyon S, et al. Prenatal cigarette smoke exposure causes hyperactivity and aggressive behavior: role of altered catecholamines and BDNF. Exp Neurol. 2014; 254: 145-52.
  6. Morales E, Vilahur N, et al. Genome-wide DNA methylation study in human placenta identifies novel loci associated with maternal smoking during pregnancy. Int J Epidemiol. 2016; 45(5): 1644-1655.
  7. Joubert BR, Felix JF et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. Am J Hum Genet. 2016; 98(4): 680-96.
  8. Küpers LK, Xu X et al. DNA methylation mediates the effect of maternal smoking during pregnancy on birthweight of the offspring. Int J Epidemiol. 2015; 44(4): 1224-37.

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

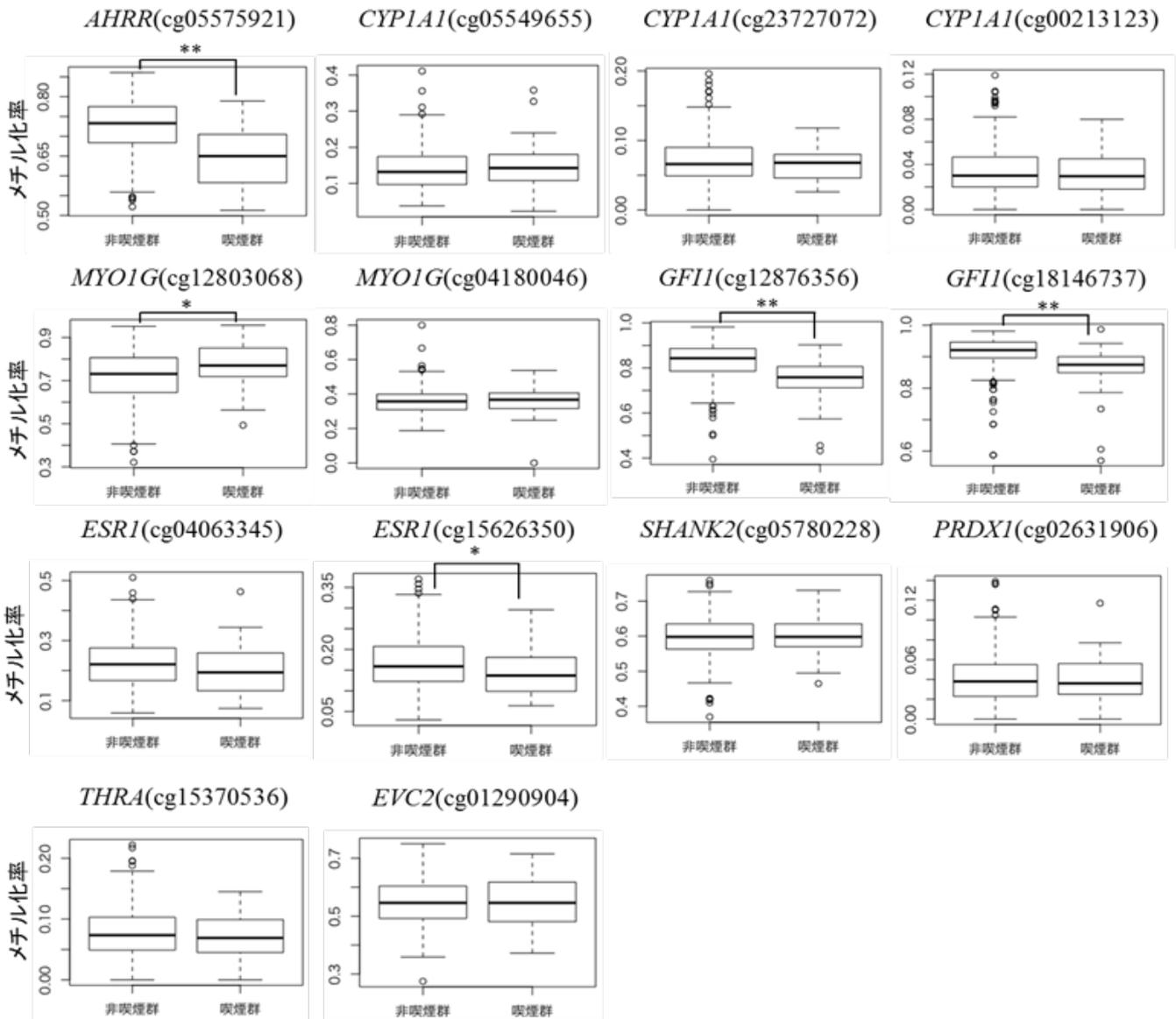


図 1. 質問票による群別化 (非喫煙群、喫煙群) における DNA メチル化率比較. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

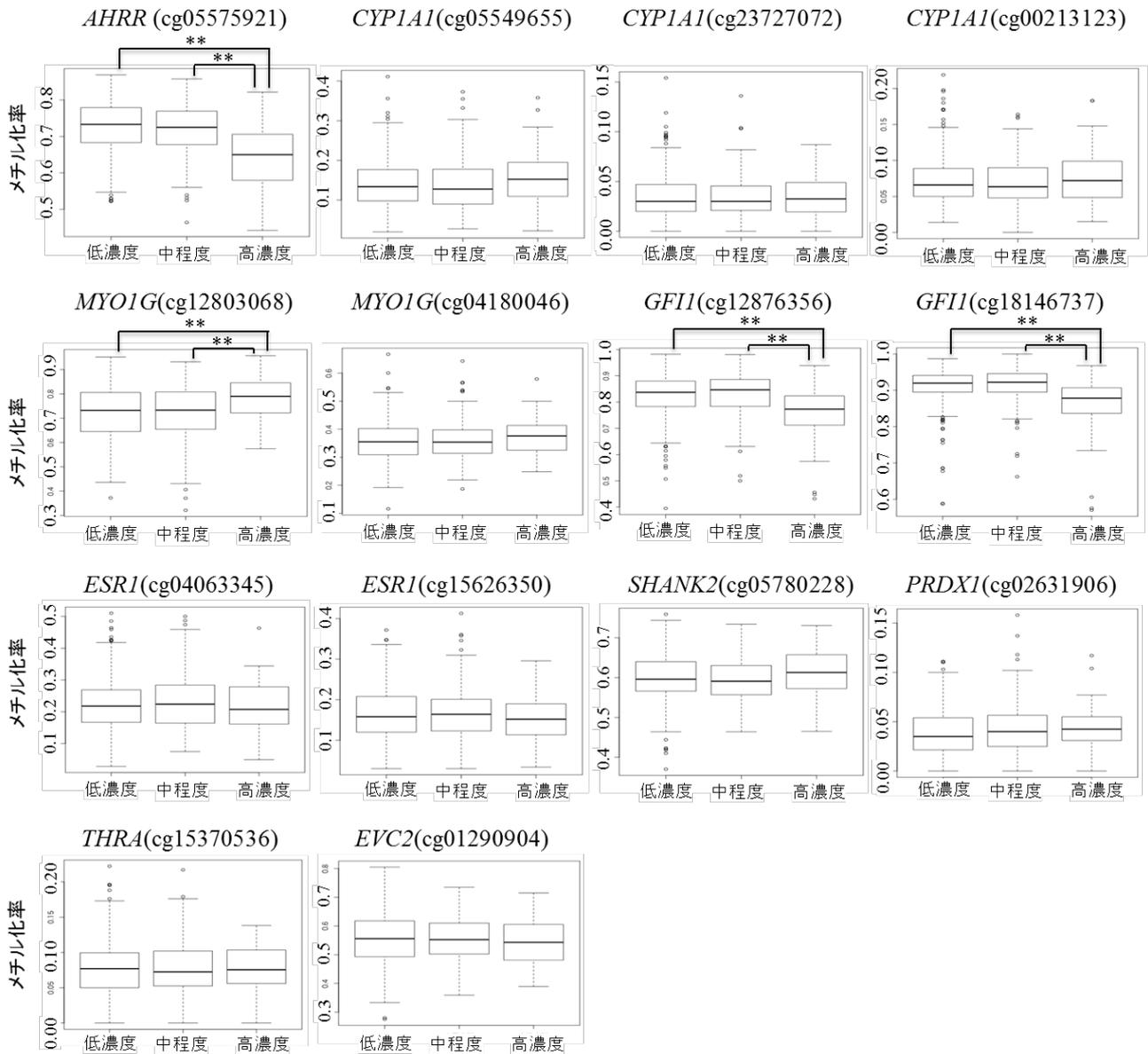


図 2. コチニン濃度による群別化 (低濃度群、中程度濃度群、高濃度群) における DNA メチル化比較. (\*\*P<0.01)

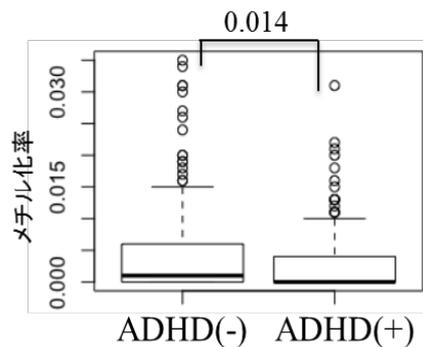


図 3. コントロール群(ADHD(-)), ADHD 疑い群(ADHD(+))における *CYP1A1* の 1CpG のメチル化比較

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

表1. 質問票による喫煙曝露とADHD疑い群の分割表

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

表2. コチニン濃度による喫煙曝露とADHD疑い群の分割表

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

## 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<sub>RM</sub>、Q1/Q2<sub>sample</sub>）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タイルを表.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

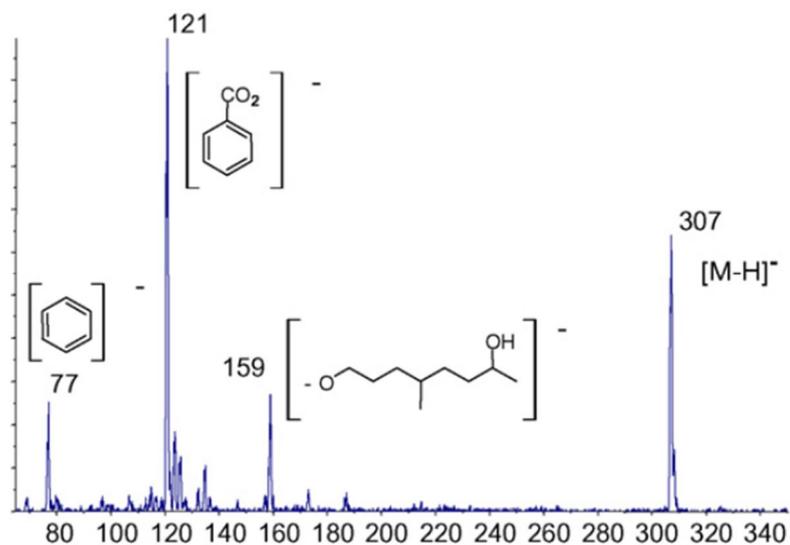


図.1 OH-MiNP の product ion spectrum

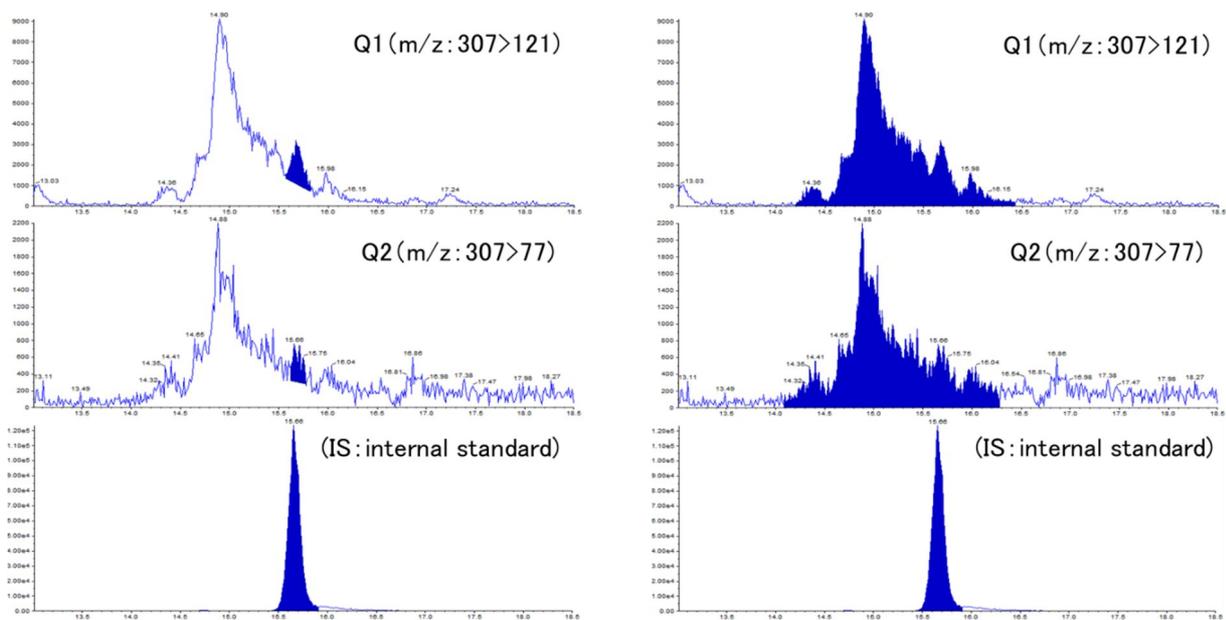


図.2 尿中 OH-MiNP のクロマトグラム  
 （左：従来の定性，右：異性体を含めた定性）

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

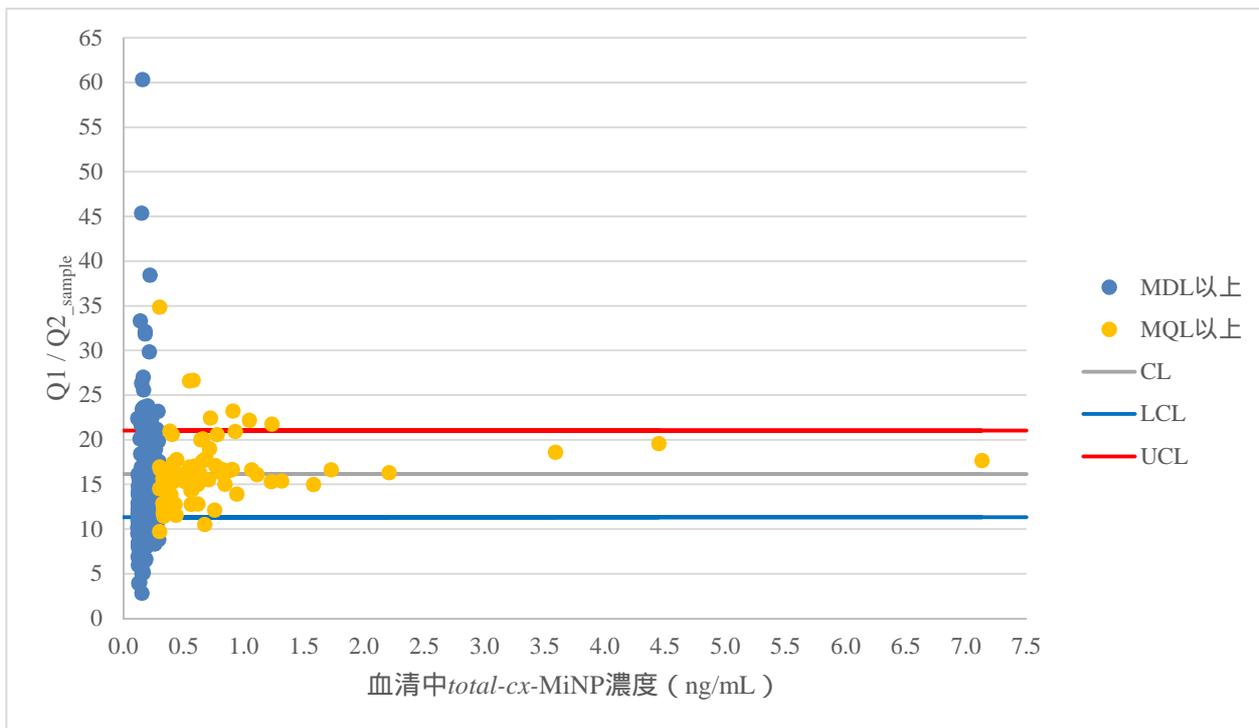


図.3 血清試料中 *total-cx-MiNP* 濃度と  $Q1/Q2_{sample}$  の関係

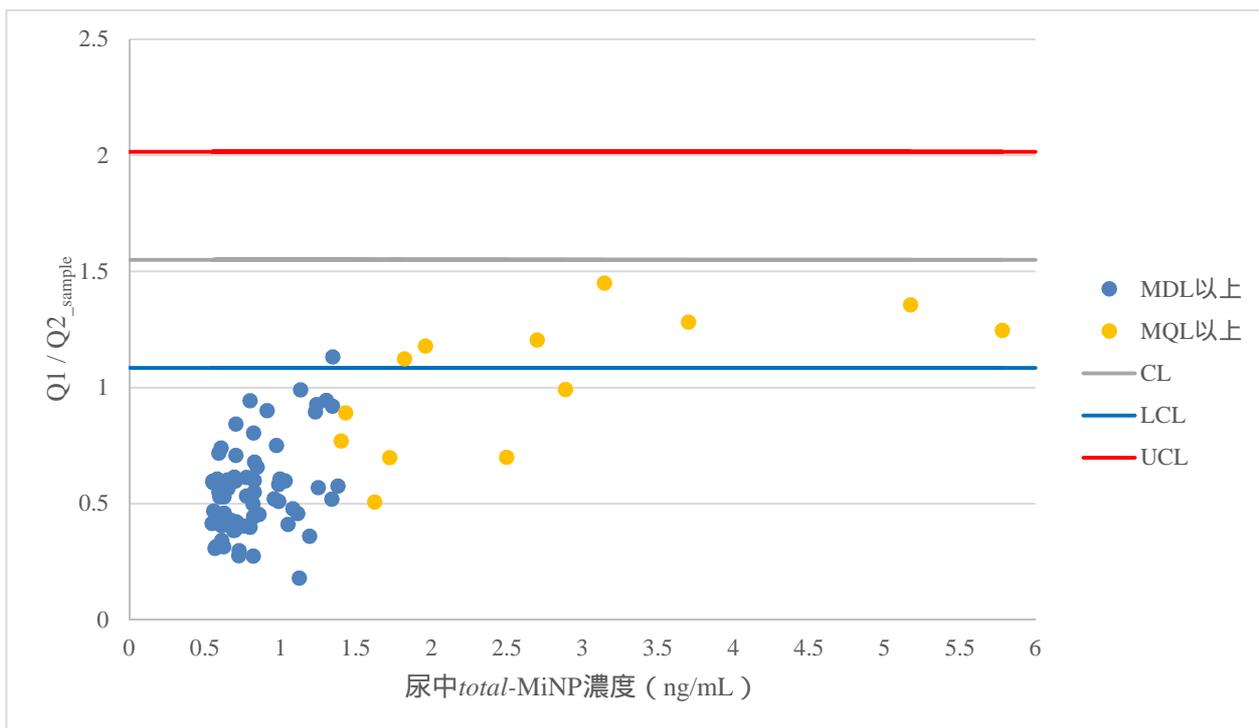


図.4 尿試料中 *total*-MiNP 濃度と  $Q1/Q2_{sample}$  の関係

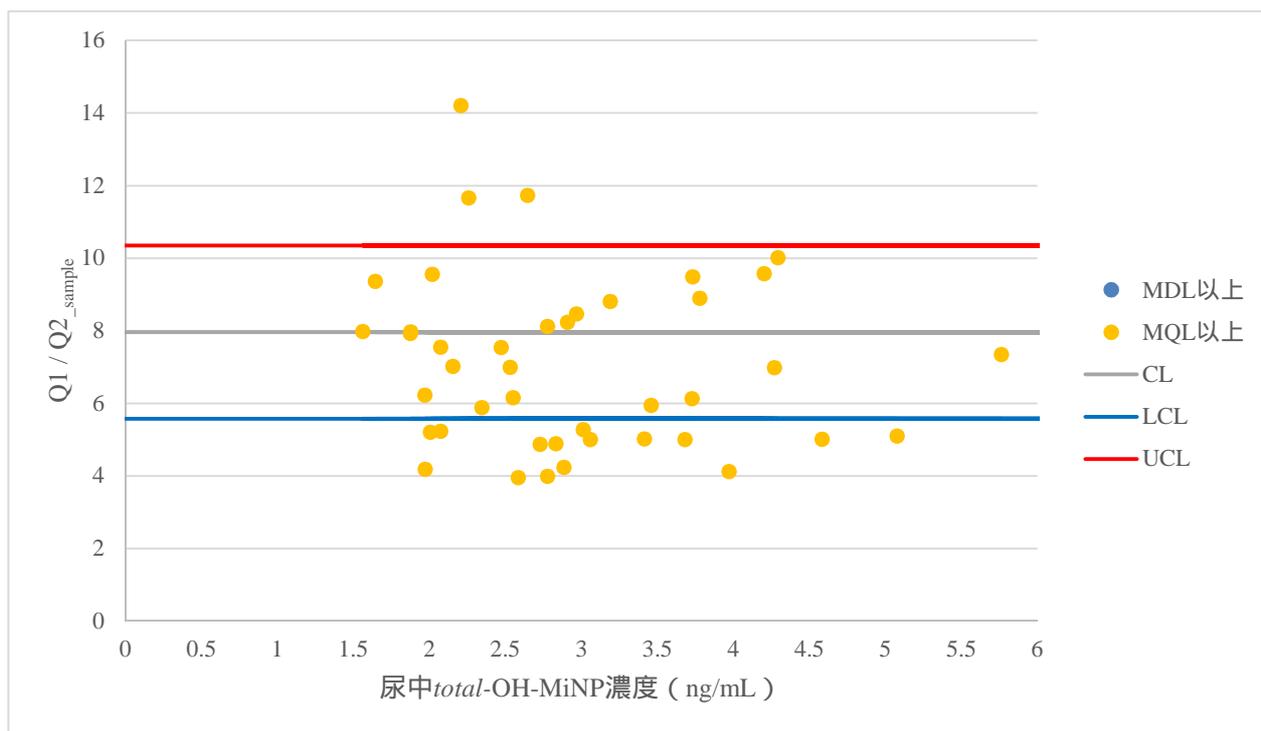


図.5 尿試料中 *total*-OH-MiNP 濃度と  $Q1/Q2_{sample}$  の関係

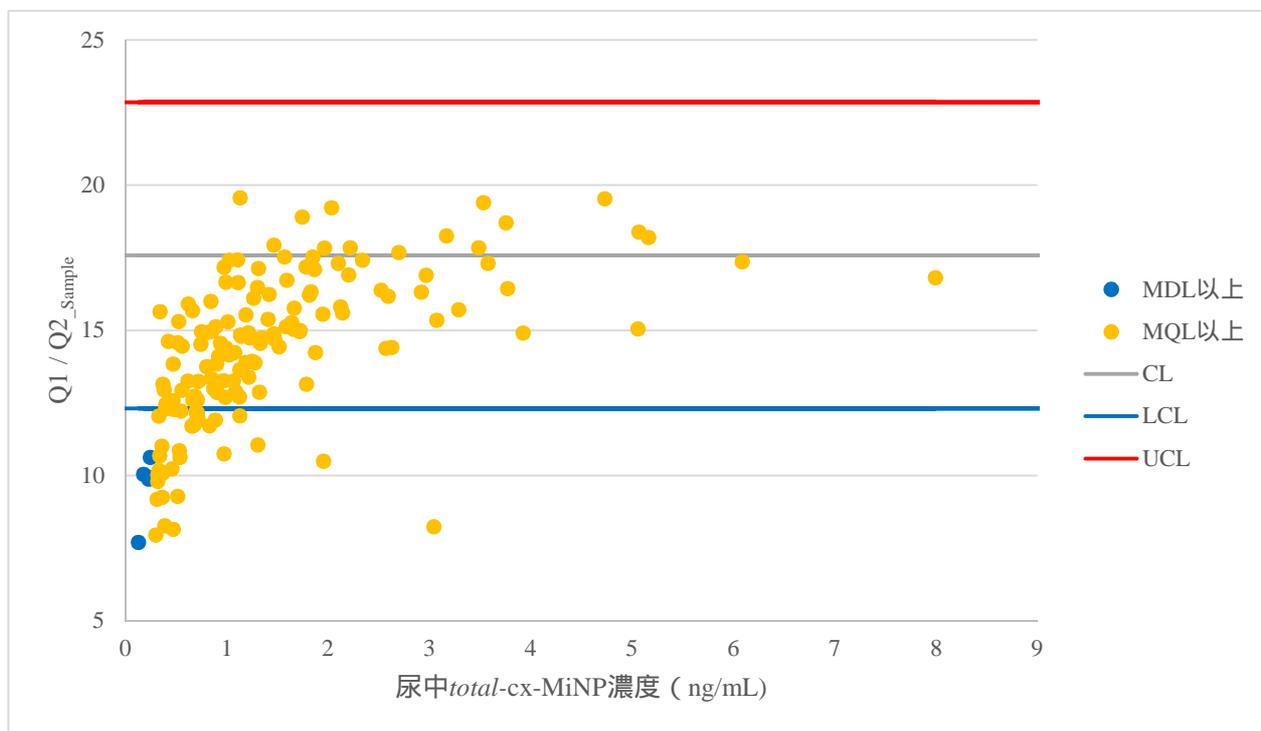


図.6 尿試料中 total-cx-MiNP 濃度と  $Q1/Q2_{\text{sample}}$  の関係

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)	
	total-cx-MiNP	total-MiNP	total-OH-MiNP	total-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
対象検体数	384	93	213	225
MDL 以上				
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
対象検体数	81	14	213	151
MQL 以上				
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 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 . After DNA extraction using a Maxwell® 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 -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 -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 -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 *Environ 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 *Imf1* 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 *alu* 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 *alu* 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	

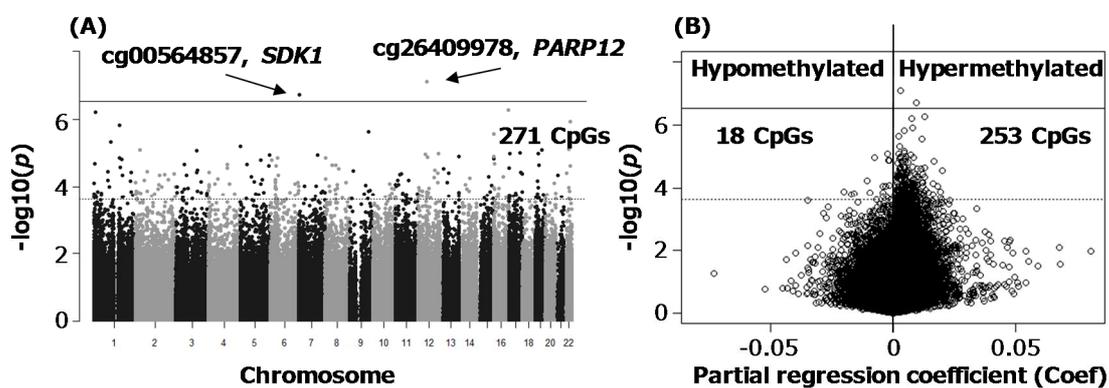
Ponderal Index ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )<sup>a</sup>

$27.4 \pm 2.2$

$\rho = -0.133$

0.059

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

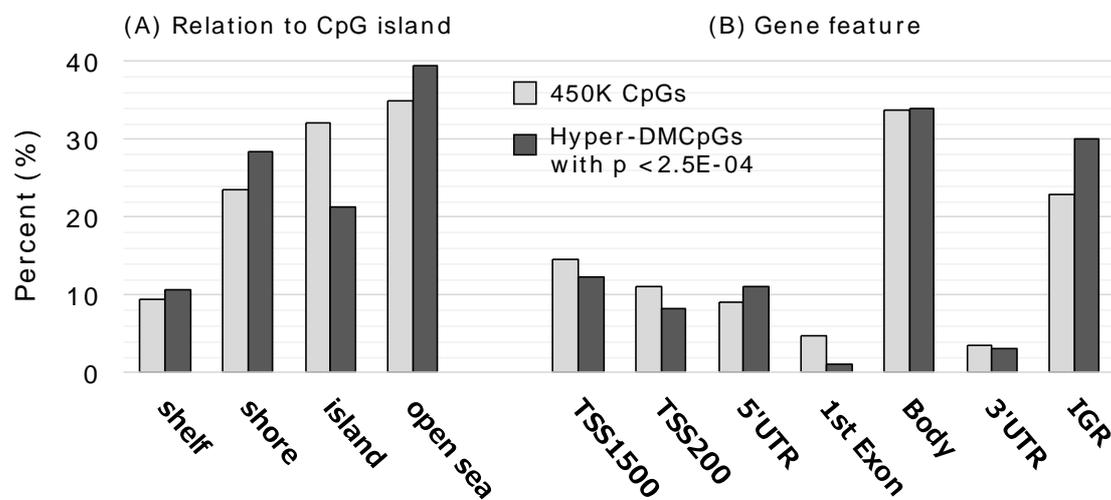


**Figure 1.** Manhattan (A) and Volcano (B) plots of the genome-wide associations of DNA methylation with prenatal exposure to DEHP.

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.

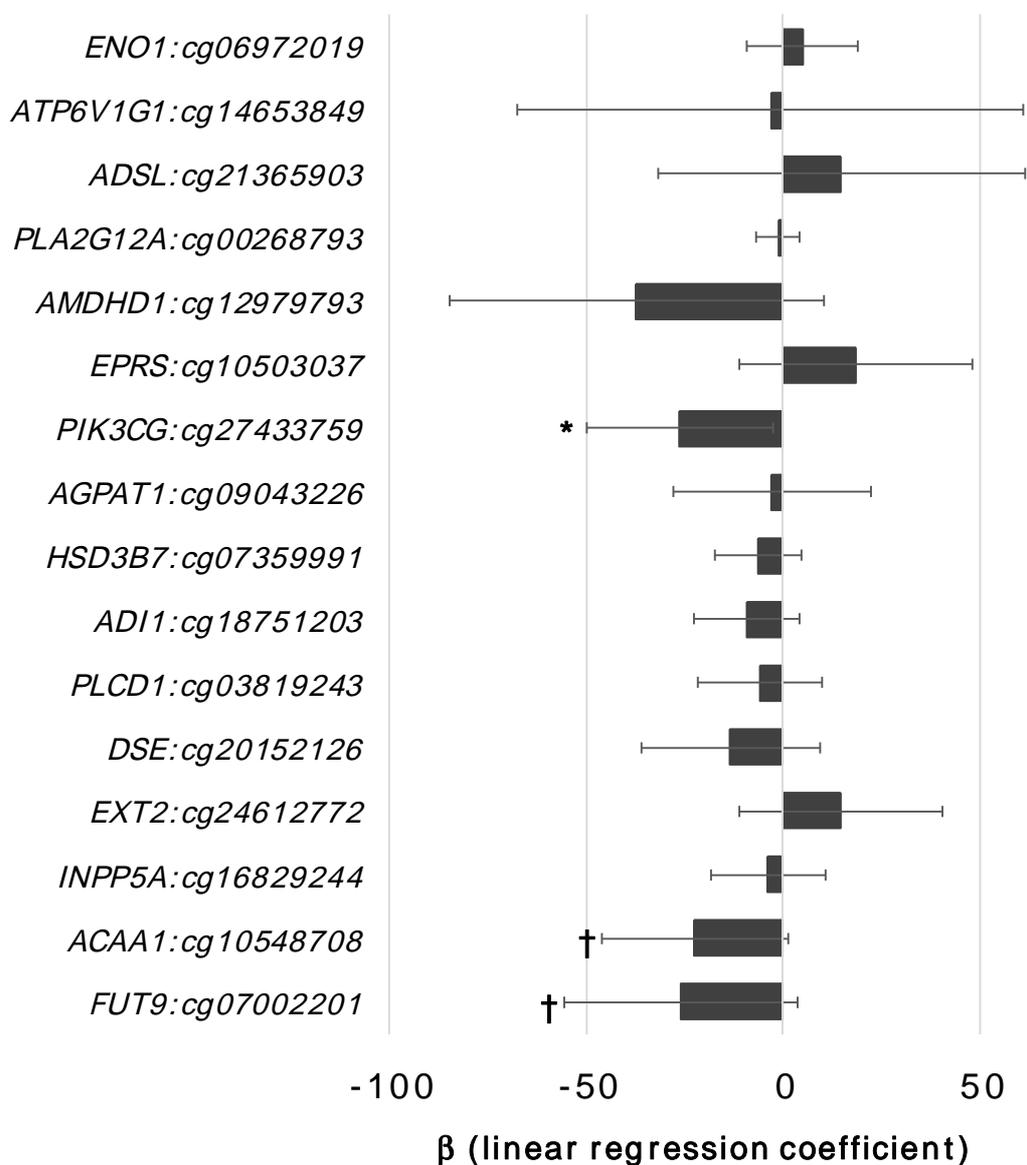
<sup>c</sup>Direction of methylation change: +; increased, -; decreased.

<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)			
	-0.56 (-1.02, -0.11)*			
Methylation at CpG	Direct effect	Indirect effect		Mediation % (Indirect/Total)
	$\beta^b$ (95% CI)	$\beta^c$ (Bca CI)	Sobel <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、各々にシリンジスパイクを添加して高分解能GC/MS（HRGC/HRMS）の測定試料とした。

画分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（アイステイサイエンス製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 OxCBs		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

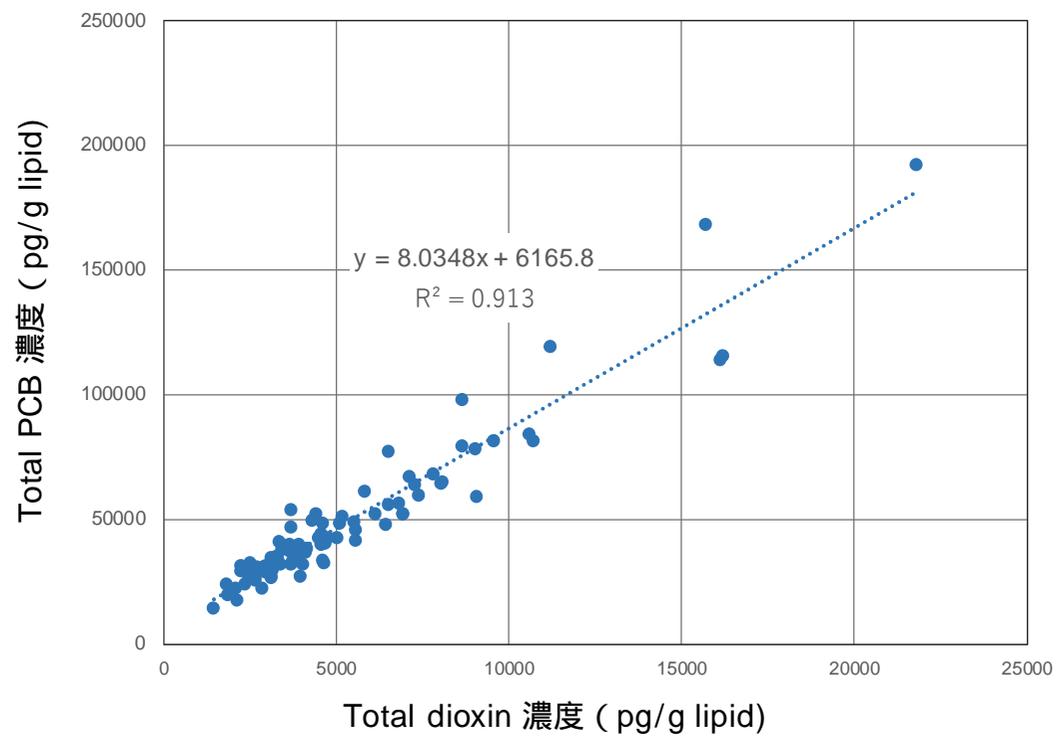


図1 . 臍帯血中 Total dioxin 濃度と Total PCB 濃度の相関

## 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に実施した。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

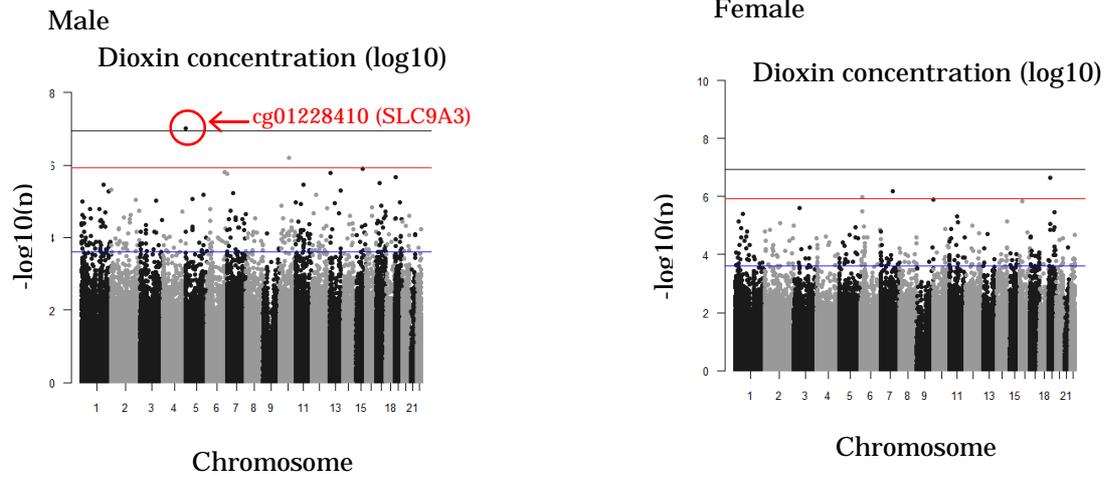
1. Bakulski, K. M., J. I. Feinberg, S. V. Andrews, J. Yang, S. Brown, L. McKenney S, F. Witter, J. Walston, A. P. Feinberg, and M. D. Fallin. 2016. 'DNA methylation of cord blood cell types: Applications for mixed cell birth studies', *Epigenetics*, 11: 354-62.
2. Bianco-Miotto, T., J. M. Craig, Y. P. 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.

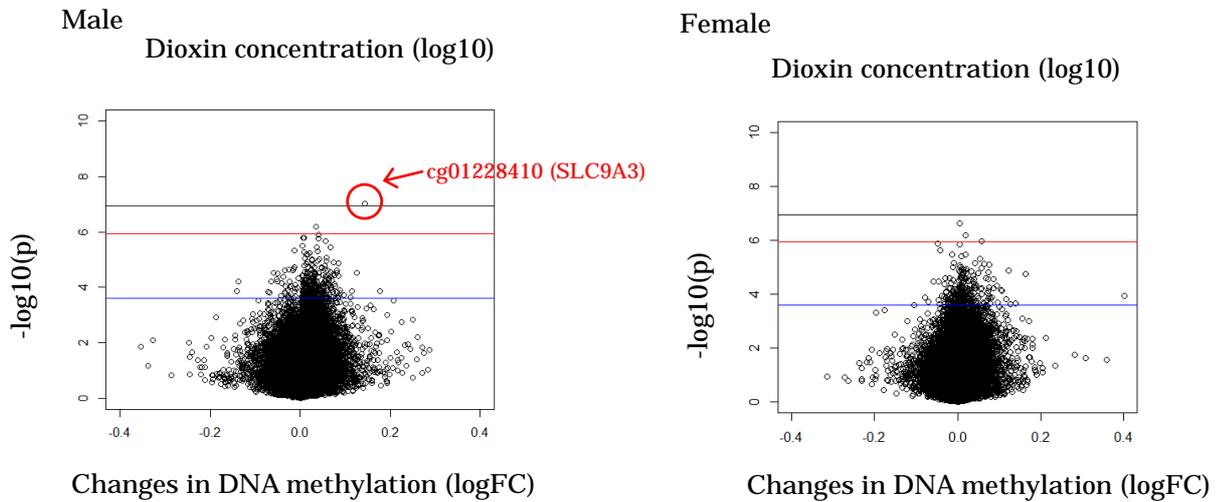
13. Smyth, G. K. 2004. 'Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments', Stat Appl Genet Mol Biol, 3: Article3.
14. Yu, X., B. Zhao, Y. Su, Y. Zhang, J. Chen, W. Wu, Q. Cheng, X. Guo, Z. Zhao, X. Ke, W. Danzeng, B. Zhao, and Q. Ma. 2018. 'Association 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:  $q(\text{FDR}) < 0.05$ , Red line:  $q(\text{FDR}) < 0.1$ , Blue line:  $p < 2.50\text{E}-04$

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

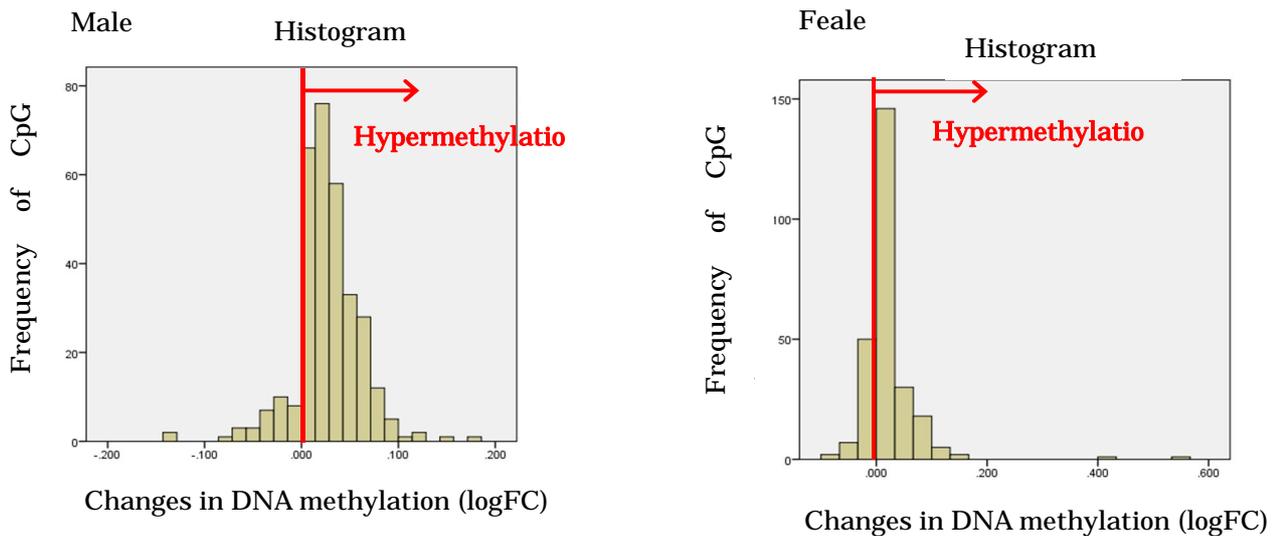
DMP から  $p < 2.50E-04$  の水準で抽出された CpG sites

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，GFI）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（ $P < 0.05$ ）を認めしたが，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

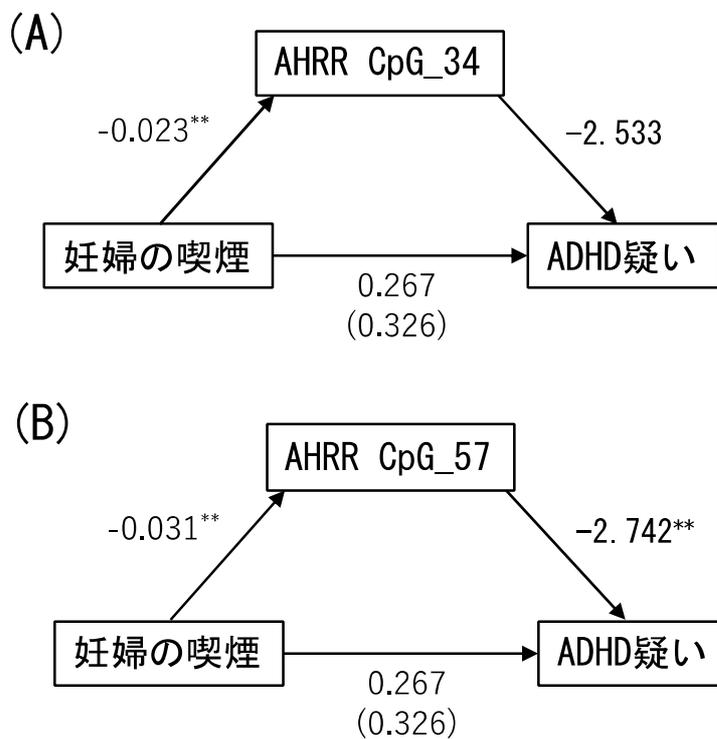


図1. 妊婦の喫煙とADHD疑いの関連におけるAHRRメチル化の媒介解析

## 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
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
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
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
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
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
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi S., Sata F., Hanaoka T., Braimoh T. S., Ito K., Tamura N., Araki A., Ito S., Miyashita C., Kishi R.	Association between maternal passive smoking and increased risk of delivering small-for-gestational-age infants at full-term using plasma cotinine levels from the Hokkaido Study: a prospective birth cohort	BMJ Open	doi:10.1136/bmjopen-2018-023200		2019
Ito K., Hanaoka T., Tamura N., Sasaki S., Miyashita C., Araki A., Ito S., Minakami H., Cho K., Endo T., Baba T., Miyamoto T., Sengoku K., Tamakoshi A., Kishi R.	Association between maternal serum folate concentrations in the first trimester and the risk of birth defects: the Hokkaido Study of Environment and Children's Health	Journal of Epidemiology	29(4)	164-171	2019
Nishimura Y., Moriya K., Kobayashi S., Araki A., Sata F., Mitsui T., Itoh S., Miyashita C., Cho K., Kon M., Nakamura M., Kitta T., Murai S., Kishi R., Shinohara N.	Association between ESR1 polymorphisms and second to fourth digit ratio in school-aged children in the Hokkaido Study	Steroids	141	55-62	2019
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
Miyake K, Kawaguchi A, Miura R, et al.	Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health	Scientific Report	8	5654	2018
Yamazaki K., Araki A., Nakajima S., Miyashita C., Ikeno T., Itoh S., Minatoya M., Kobayashi S., Mizutani F., Chisaki Y., Kishi R.	Association between prenatal exposure to organochlorine pesticides and the mental and psychomotor development of infants at ages 6 and 18 months: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health	Neurotoxicology	69	201-208	2018
Itoh S., Baba T., Yuasa M., Miyashita C., Kobayashi S., Araki A., Sasaki S., Kajiwara J., Hori T., Todaka T., Fujikura K., Nakajima S., Kato S., Kishi R.	Association of Maternal Serum Concentration of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls with Maternal and Neonatal Thyroid Hormones: The Hokkaido Birth Cohort Study	Environmental Research	167	583-590	2018
Tsai M.-S., Miyashita C., Araki A., Itoh S., Ait Bamai Y., Goudarzi H., Okada E., Kashino I., Matsuura H., Kishi R.	Determinants and temporal trends of perfluoroalkyl substances in pregnant women: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health	International Journal of Environmental Research and Public Health	15(5) 989	1-14	2018
Goudarzi H., Konno S., Kimura H., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Ait Bamai Y., Kimura H., Shimizu K., Suzuki M., Ito Y. M., Nishimura M., Kishi R.	Contrasting associations of maternal smoking and pre-pregnancy BMI with wheeze and eczema in children	Science of the Total Environment	639	1601-1609	2018

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., Goudarzi H., Miyashita C., Ito S., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.	Relationship between adrenal steroid hormones in cord blood and birth weight: The Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Children's Health	American Journal of Human Biology	DOI: 10.1002/ajhb.23127		2018
Miyashita C., Araki A., Mitsui T., Itoh S., Goudarzi H., Sasaki S., Kajiwara J., Hori H., Cho K., Moriya K., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.	Sex-related differences in the associations between maternal dioxin-like compounds and reproductive and steroid hormones in cord blood: the Hokkaido Study	Environment International	117	175-185	2018
Miyake K., Kawaguchi A., Miura R., Kobayashi S., Tran N. Q. V., Koybayashi S., Miyashita C., Araki A., Kubota T., Yamagata Z., Kishi R.	Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health	Scientific Report	8	5654	2018
Araki A., Miyashita C., Mitsui T., Goudarzi H., Mizutani F., Chisaki Y., Itoh S., Sasaki S., Cho K., Moriya K., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.	Prenatal organochlorine pesticide exposure and the disruption of steroids and reproductive hormones in cord blood: The Hokkaido study	Environ Int.	110	1-13	2018
Hanaoka T., Tamura N., Ito K., Sasaki S., Araki A., Ikeno T., Miyashita C., Ito S., Minakami H., Cho K., Endo T., Baba T., Miyamoto T., Sengoku K., Kishi R.	Health other members of the Hokkaido Study on Environment and Children's; Prevalence and Risk on Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study; the Hokkaido Study on Environment and Children's Health	J Epidemiol.	28(3)	125-132	2018
Kishi R., Araki A., Minatoya M., Itoh S., Goudarzi H., Miyashita C.	Birth cohorts in Asia: The importance, advantages, and disadvantages of different-sized cohorts	Science of the Total Environment	615	1143-1154	2018
Miura R., Araki A., Miyashita C., Kobayashi Su., Kobayashi Sa., Wang SL., Chen CH., Miyake K., Ishizuka M., Iwasaki Y., YM. Ito, Kubota T., Kishi R.	An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: the Hokkaido study	Environment International	115	21-28	2018
Tamura N., Hanaoka T., Ito K., Araki A., Miyashita C., Ito S., Minakami H., Cho K., Endo T., Sengoku K., Ogasawara K., Kishi R.	Different Risk Factors for Very Low Birth Weight, Term-Small-for-Gestational-Age, or Preterm Birth in Japan	International Journal of Environmental Research and Public Health	doi:10.3390/ijerph15020369		2018
Minatoya M, Araki A, Miyashita C, et al.	Association between prenatal bisphenol A and phthalate exposures and fetal metabolic related biomarkers: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health	Environ Res	161	505-511	2018
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi S., Sata F., Miyashita C., et al.	Gender-specific association of exposure to non-dioxin-like polychlorinated biphenyls during pregnancy with methylation levels of H19 and long interspersed nuclear element-1 in cord blood in the Hokkaido study	Toxicology	390	135-145	2017
Kishi R., Araki A., Minatoya M., et al.	The Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile - updated 2017	Environmental Health and Preventive Medicine	22	46	2017
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常産の 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
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	日本衛生学雑誌	73	313-321	2018
岸玲子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 湊屋街子, 小林澄貴, 山崎圭子, アイツバマイゆふ, 三浦りゅう, 田村菜穂美	2万人規模の出生コホートと, 500人規模の小コホートからなる北海道スタディが目指してきたもの：環境と子どもの健康 - 先天異常・発達・アレルギーの15年におよぶ経験と成果	日本衛生学雑誌	73(2)	164-177	2018
岸玲子, 荒木敦子	わが国で初めての本格的な出生コホート研究から見た環境化学物質の濃度レベルと次世代影響（特集：これまでの環境リスクとこれからの環境リスク）	保健医療科学	67(3)	292-305	2018
岸玲子, 湊屋街子, 荒木敦子, 宮下ちひろ	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第24回 誰もが健康な人生のスタートを-世界で進むコホート研究	公衆衛生	81(2)	175-183	2017

## 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	

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
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
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

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
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