

Environment Research and Technology Development Fund

環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書

環境化学物質によるASD等の神経発達障害と環境遺伝ーエピゲノム相互作用の解明
(5-1454)

平成26年度～平成28年度

Environmental Chemical Exposure in Early Life and the
Neurodevelopment of Children: the Role of Environment, Gene and Epigenome

北海道大学
山梨大学

平成29年5月

環境省
総合環境政策局総務課環境研究技術室
環境保健部環境安全課環境リスク評価室
地球環境局総務課研究調査室

環境化学物質によるASD等の神経発達障害と環境遺伝ーエピゲノム交互作用の解明

(5-1454)

I. 成果の概要	・・・・・・・・・・	i
1. はじめに（研究背景等）		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発の方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた主な成果		
6. 研究成果の主な発表状況		
7. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
（1）神経発達アウトカムへの環境化学物質曝露と環境遺伝交互作用の解明 （北海道大学）		
要旨	・・・・・・・・・・	1
1. はじめに	・・・・・・・・・・	2
2. 研究開発目的	・・・・・・・・・・	3
3. 研究開発方法	・・・・・・・・・・	3
4. 結果及び考察	・・・・・・・・・・	17
5. 本研究により得られた成果	・・・・・・・・・・	48
6. 国際共同研究等の状況	・・・・・・・・・・	49
7. 研究成果の発表状況	・・・・・・・・・・	49
8. 引用文献	・・・・・・・・・・	52
（2）環境化学物質に起因するASD等の発達障害関連エピジェネティクス変化の解明 （山梨大学）		
要旨	・・・・・・・・・・	60
1. はじめに	・・・・・・・・・・	61
2. 研究開発目的	・・・・・・・・・・	61
3. 研究開発方法	・・・・・・・・・・	61
4. 結果及び考察	・・・・・・・・・・	68
5. 本研究により得られた成果	・・・・・・・・・・	86
6. 国際共同研究等の状況	・・・・・・・・・・	87
7. 研究成果の発表状況	・・・・・・・・・・	87
8. 引用文献	・・・・・・・・・・	88
III. 英文Abstract	・・・・・・・・・・	91

課題名 5-1454 環境化学物質によるASD等の神経発達障害と環境遺伝ーエピゲノム交互作用の解明
 課題代表者名 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）
 研究実施期間 平成26～28年度
 累計予算額 150,642千円（うち平成28年度：47,662千円）
 予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 環境化学物質、ASD、ADHD、神経行動発達、SNPs、環境交互作用、喫煙、
 エピジェネティクス、DNAメチル化

研究体制

- (1) 神経発達アウトカムへの環境化学物質曝露と環境遺伝交互作用の解明（北海道大学）
- (2) 環境化学物質曝露に起因するASD等の発達障害関連エピジェネティクス変化の解明（山梨大学）

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

近年、ASD(Autism spectrum disorder、自閉スペクトラム症)やADHD(Attention deficit and hyperactivity disorder、注意欠陥多動症)などの神経発達障害をもつ子どもが増加している。ASDは社会性の欠如やコミュニケーションの苦手さを特徴とし、学童期における有病割合は、米国CDC(アメリカ疾病予防管理センター)の報告で約1.5%(68人に1人)、韓国では2.6%と推定されている。ADHDは不注意や多動性を特徴とする障害で、米国CDCの報告では2011年には、両親の申告による調査で医療機関での診断率が11%と報告している。ASDやADHDの罹患率の増加の一つには診断基準の改定があるものの、それだけでは説明がつかない。一方、発症リスクには遺伝要因に加えて、胎児期の喫煙やアルコールへの曝露が指摘されている。加えて、鉛など重金属、環境化学物質として、ビスフェノールA(BPA)やフタル酸エステル類の影響が近年報告されている。BPAやフタル酸エステル類はプラスチック製品やパーソナルケア製品に含有され、これら製品の使用や食事を介して日常的に曝露している。動物実験では、BPAへの胎児期曝露によりASD症状に関わる社会認知能力低下や不安様行動の増大、ADHD症状に関わる認知機能低下、フタル酸エステル類への胎児期曝露による発達や行動への悪影響が報告された。環境化学物質への曝露は胎児期に感受性が高く、その影響が生後も続くことが懸念される。しかし、疫学研究は十分でないうえ、出生コホート研究は限られている。

ASD、ADHD発症の遺伝要因として、児の神経伝達物質代謝関連、シナプトソーム関連タンパク質25、脳由来神経栄養因子、カテコールアミン-O-メチル基転移酵素、A型モノアミン酸化酵素の遺伝子変異があげられる。さらに、有機リン系農薬や有機塩素系農薬曝露による児の神経発達や認知機能への影響が、パラオキシナーゼ1型(PON1)やグルタチオンS-転移酵素(GSTs)の遺伝子多型により異なることが報告され、環境化学物質曝露へのハイリスクグループの存在が懸念される。一方、環境化学物質曝露によるASD、ADHD発症へのメカニズムとしては、エピジェネティクスの寄与が考えられる。エピジェネティクスとは、DNA塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子制御機構のことである。たとえば、遺伝子発現のON/OFFを切り替えるスイッチの役割をしているDNAにメチル基が付くこと(メチル化)が、化学物質などの環境要因で変化し、発達を含めた健康に影響を及ぼす可能性が考えられる。マイクロアレイを用いた遺伝子発現研究で、ヒト臍帯血中BPA濃度と神経発達遺伝子発現量に負の相関がみられたことから、胎児期BPA曝露によるエピジェネティクス変化が遺伝子発現量を制御し、神経行動発達に影響を与えているのではないかと推測される。しかし、胎児期曝露によりどの遺伝子領域にエピジェネティックな変化を生じるか、それらが発達障害と関連するか、明らかになっていない。

2. 研究開発目的

本研究では、ASDやADHD等の発達障害や子どもの問題行動および知能への、胎児期のBPA、フタル酸エステル類曝露による影響をヒトで明らかにする。さらに、環境化学物質曝露による発達障害のリスクは遺伝子の多型によって異なるか、加えて化学物質曝露により影響を受けるDNAメチル化変化(エピゲノム変化)が神経発達障害の発症リスクと関連するかを解明する。

環境省が実施するエコチル調査の追加調査として、1.5歳頃の社会的行動発達をM-CHAT(Modified Checklist for Autism in Toddlers、乳幼児期自閉症チェックリスト修正版)により調査し、早期のASD兆候を明らかにし、エコチル本体調査で実施する子どもの発達調査とあわせて、子どもの発達の軌跡をとらえることを目的とする。さらに、地域や行政とも協力し、早めの支援や介入を可能とする。併せて将来子どもの生後の環境化学物質曝露を調べることを目的に、尿を収集する。

また、エコチル調査より10年早く開始した前向き出生コホート「子どもの健康と環境に関する北海道スタディ」を用いて、胎児期のBPA、フタル酸エステル類曝露による6および18か月児の精神運動発達、42か月児の知能・行動発達、5、6歳のASD、ADHD関連症状への影響を明らかにする。神経伝達物質代謝関連遺伝子や化学物質受容体関連遺伝子の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs) と、6歳児のADHD傾向との関連を明らかにする。

臍帯血DNAの45万メチル化解析により、BPA、フタル酸エステル類曝露と関連するDNAメチル化部位 (CpG=シトシンの次にグアニンが現れるタイプの2塩基配列) を同定し、曝露によるエピゲノム変化を解明する。また、抽出したCpGを含む遺伝子領域について、次世代シーケンサーを用いてメチル化変化を解析し、網羅的メチル化解析で抽出された曝露と関連するメチル化変化が神経発達に関連するかを解明する。

3. 研究開発の方法

(1) 神経発達アウトカムへの環境化学物質曝露と環境遺伝交互作用の解明

①エコチル追加調査(1.5歳の社会性発達調査)

環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)」は2011年1月にリクルートを開始したコホート研究である。本研究はエコチル追加調査として、北海道ユニットセンターの札幌、北見地区で調査に参加し、平成26年10月から29年1月末までに1.5歳～2.5歳に達した子ども3,569組を対象にM-CHATを実施した。

②環境と子どもの健康に関する北海道スタディ

本研究では、2つの出生コホート研究(札幌コホート、北海道コホート)の参加者を対象として、胎児期のBPAおよびフタル酸エステル類曝露による子どもの発達への影響を検討した。札幌コホートは、2002年7月～2005年10月に札幌市内1産科病院を受診し、同意を得た妊娠23-35週の対象者514名、北海道コホートは2003年2月～2012年3月に北海道内37産科病院を受診した妊婦のうち、同意が得られた20,926名から成る。

1) 胎児期フタル酸エステル(DEHP)、BPA曝露と子どもの発達(札幌コホート)

胎児期DEHP、BPA曝露と、6か月および18か月の精神運動発達への影響をBSID-II (Bayley Scales of Infant Development 2nd Edition) を用いて、42か月の知能、行動発達への影響を、それぞれK-ABC (Kaufman Assessment Battery for Children)、CBCL (Child Behavior Checklist) を用いて検討した。

2) 胎児期フタル酸エステル類、BPA曝露と子どもの発達(北海道コホート)

a. 5、6歳の発達調査

SDQ (Strengths and Difficulties Questionnaire、強さと困難さの質問票) による全般的な発達の問題に加え、発達障害 (ASD、ADHD、協調運動障害) に特異的な質問票を用いて評価をした。5歳でSDQとDCDQ (Developmental Coordination Disorder Questionnaire、協調運動障害質問票) を、6歳でADHD-RS (Attention Deficit Hyperactivity Disorder-Rating Scale、ADHDスクリーニング質問票) とSCQ (Social Communication Questionnaire、自閉症スクリーニング質問票) を、郵送法にてそれぞれ保護者に回答を依頼した。

b. BPA、フタル酸エステル類の分析

環境化学物質の曝露評価には妊娠初期母体血を用いて、BPAの分析はID-LC-MS/MSにて行った。フタル酸エステル類代謝物7化合物について、血液の前処理方法を含めLC-MS/MSを用いた分析法を検討・確立し、分析を行った。MDL (Method detection limit、検出下限値) 未満の値にはMDLの1/2値を代入し、統計解析に用いた。

c. 胎児期フタル酸エステル類、BPA曝露と子どもの問題行動との関連の検討

SDQの調査データがあり、かつ妊娠初期調査票、妊娠初期母体血、新生児個票、出産時の母体血および臍帯血、妊娠後期母体血、1、2、4歳調査票がそろった対象者のBPAとフタル酸エステル類の曝露評価を実施し(ケース群213名、対照群245名)、SDQ得点との関連を解析した。

d. 胎児期フタル酸エステル類、BPA曝露と子どものADHDとの関連の検討

ADHD-RSの合計点が男児14点以上、女児9.4点以上をADHD疑い(ケース群、255名)と定義し、対照群は、ADHD-RSの合計点が男児14点未満、女児9.4点未満の参加者のうち、初期調査票、初期検体、新生児個票があり、出産時母体血、臍帯血のあるものかつサブコホート集団であるものを選択したところ、330名となった。ケース群と対照群をあわせた585名について、①胎児期のBPA、フタル酸エステル類濃度の分析、②母児の遺伝子多型の解析、③臍帯血中のDNAメチル化変化の解析を行った。なおサブコホート集団は、北海道コホート全参加者(N=20,926)のうち、登録年次を考慮しランダムに抽出された4,869名(23.3%)である。

e. 一塩基多型遺伝子による影響の検討

疾患の発症に影響を及ぼす、あるいは受容体や代謝酵素の遺伝子発現が異なることで代謝能に差が生じるSNPsで、かつ遺伝子頻度の低いアレルが日本人で20%以上いる可能性が既に報告されている一塩基多型34か所を解析候補とした。母体血または臍帯血400μLからMaxwell® 16 DNA Purification Instrument (Promega社製)を用いて遺伝子を抽出し、SNPの解析はFludigm社製マイクロフリューディック遺伝子解析EP1システムで行った。その後、それぞれの遺伝子多型ごとに、曝露によるADHDへの影響を検討した。

f. 臍帯血DNAのエピゲノム解析

札幌コーホーの514名のうち、BPA、MEHPが測定済みで、かつ初期調査票と出産時カルテ情報が揃う母児292ペアの臍帯血DNAについて網羅的メチル化解析を実施した。得られた45万CpGsのメチル化値とBPA、MEHP濃度との関連をロバスト線形回帰、および、経験ベイズ法で解析し、曝露により変化するメチル化部位の抽出を行った。さらに、札幌コーホーとは別集団である北海道大規模コーホーを用いて、次世代シーケンサーにより網羅解析結果の検証を行った。具体的には、曝露によるメチル化変化と神経発達との関連を検討するため、BPA、MEHP曝露によりメチル化が変化する領域 (False Discovery Rate, FDR $q < 0.05$) から、メチル化変化が大きく、かつ神経発達に関連する遺伝子について次世代シーケンサーによるメチル化解析候補領域とした。

(2) 環境化学物質曝露に起因するASD等の発達障害関連エピジェネティクス変化の解明

① 胎児期喫煙曝露により変化するDNAメチル化領域の探索

網羅的DNAメチル化を解析した292名のうち、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。CpGの抽出は非喫煙群と喫煙継続群、妊娠後喫煙中止群と喫煙継続群、非喫煙群と妊娠後喫煙中止群において多重比較問題をBenjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR)法で補正したゲノムワイドの有意水準を基準に絞り込んだ。データ処理・統計解析は、R (ver.3.2.3)、Bioconductor (ver.3.2) の minfi、sva、limma パッケージ、Comprehensive R Archive NetworkのRefFreeEWASパッケージを用いて行った。

② 喫煙曝露と6歳のADHD-RSのスコアの関係

ADHD-RSスコアによるADHD疑い群 ($n = 224$)、対照群 ($n = 286$) を解析対象者とした。喫煙曝露は質問票による喫煙歴または母体血漿コチニン濃度のそれぞれを用いた。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 ($n = 38$) を質問表による喫煙曝露の解析対象者とした。母体血漿コチニン濃度による喫煙曝露については、妊娠後期 (約8ヶ月) での母体血漿コチニン濃度により高濃度群、中等度濃度群、低濃度群へ群別化した。それぞれの対象者数は、48名、200名、262名となった。

③ 6歳のADHD-RSのスコアとメチル化の関係

札幌コーホー集団で喫煙曝露によりメチル化が有意に変化すると同定されたCpGについて、大規模コーホー集団のADHD疑い群 ($n = 224$) とコントロール群 ($n = 286$) の間でメチル化率に差があるかを検討した。

4. 結果及び考察

(1) 神経発達アウトカムへの環境化学物質曝露と環境遺伝交互作用の解明

① エコチル追加調査 (1.5歳の社会性発達調査)

平成26年10月より平成29年1月末までに、札幌地区と北見地区で合計3,569名に質問票を送付、3,065名から回収した (回収率85.9%、平成29年1月末)。回答に不備のあった46名を除外後、M-CHAT全23項目中3項目以上の不通過、または重要10項目中1項目の不通過がある場合をASD疑いと定義したところ、ASD疑いは3,019名中577名 (19.1%) で、厚生労働省「乳幼児健康診査に係る発達障害のスクリーニングと早期支援に関する研究成果 (平成21年)」の結果 (18.9%) と近似していた。厚生労働省の調査は、対象者が317名と小規模であったが、本研究は3,500名以上を対象とした比較的大規模な調査であった。ASD疑いと対照群の母児の基本属性を比較したところ、ASD疑い群では母がASD傾向を持つ割合が高く、年収が600万円以上の割合が低かった。児の属性については、ASD疑い群では対照群と比較して第一子の割合が高かった。本調査で得られたデータは、エコチル本体調査の3歳、5歳時に実施される発達調査 (対人応答性尺度) の結果や、環境化学物質の分析データと将来的に連結させることができ、乳幼児期の発達障害に対する早期療養への応用に結び付けることができる貴重なものである。

参加者支援として、質問票の自由記述欄に記載があった741件について、比較的一般的な子育てへの不安や現状の報告などへの対応として子育てに関するトピックを集めた冊子を作成して返送した。子育ての不安のみならず、深刻な状況に陥っている可能性のある場合は、保健師による電話相談を行い、さらに不安が解決できない、およびM-CHATのよるASD疑いかつ1.5歳児健診を受けていない37件については、参加者の希望に応じて地域の乳幼児発達相談への紹介を行った。

② 環境と子どもの健康に関する北海道スタディ

1) 胎児期DEHP、BPA曝露と子どもの発達(札幌コーホート)

6、18か月いずれかの精神、運動発達の結果がある127名を解析対象とした。母体血中MEHP濃度の中央値は、10.6 ng/mLであり、MEHP濃度と子どもの6、18か月の精神(MDI)、運動発達ともに関連は見られなかった。母体血中MEHP濃度は、オーストラリアの妊婦よりもやや高かったが、本研究の濃度では18か月までの子どもの精神、運動発達には影響を与えないことがわかった。

臍帯血中BPAの検出率は69.8%で、中央値は0.051ng/mL (IQR: <LOQ-0.076ng/ml)であった。検出率は米国の報告92.6%と比較すると低かった。米国の報告は尿サンプルを用いているために直接の比較はできないものの、曝露濃度は米国より比較して低いことが考えられる。臍帯血中BPA濃度が高いと、42か月の内向的問題の増加、発達問題の増加と有意に関連した。一方、6、18か月の精神運動発達、42か月の知能との関連は認められなかった。以上から、臍帯血中BPA濃度は生後の子ども問題行動への影響の可能性が示唆された。

2) 胎児期フタル酸エステル類、BPA曝露と子どもの発達(北海道コーホート)

a. 5、6歳の発達調査

5歳調査票は5,109名に発送し、3,492名(回答率=68.3%)から、6歳調査票は3,805名に発送し、2,566名(回答率=67.4%)から回答を得た(表1)。本研究では、広く問題行動を調査するSDQに基づき、発達支援の必要性があるとされる割合は20.4%で、「幼児から青年期の問題行動など、精神発達障害はおよそ20%の割合でみられる」というWHOの報告と近似していた。また米国の統計では、ASDやADHDを含む発達障害は6人に1人と報告されており、本研究のADHD-RSに基づくADHD疑い男児17.8%、女児16.4%と同程度の割合であった。SCQに基づくASD疑いは17名(0.7%)であった。ASD疑いは韓国の報告2.6%、CDCの報告1.5%と比較すると低かった。

表1 質問票ごとの疑い(ケース)の定義とその人数

質問票	アウトカム	疑い(ケース)の定義	人数(%)
SDQ	発達支援の必要性	TDS $\geq$ 13	714/3,492 = 20.4%
DCDQ	協調運動障害疑い	得点 = 15-46	763/3,492 = 21.8%
ADHD-RS	ADHD疑い	男児) 得点 $\geq$ 14.0	228/1,278 = 17.8%
		女児) 得点 $\geq$ 9.4	209/1,276 = 16.4%
SCQ	ASD疑い	得点 $\geq$ 15	17/2,566 = 0.7%

b. 妊娠初期母体血中 BPA、フタル酸エステル類代謝物濃度

妊娠初期母体血中BPAおよびフタル酸エステル類代謝物の濃度分析(659名)を実施した(表2)。BPA濃度中央値(検出率)は、0.069 μ g/mL(80.7%)で、札幌コーホートの母体血(59名)と比較すると、検出率、濃度ともにやや増加していた。これは、札幌コーホートの採血時期が2002-2005年に対し、本研究では2008-2010年であり、BPAの使用量の増加などが背景にあると考えられる。フタル酸エステル類代謝物は、MnBP、MiBP濃度中央値はそれぞれ26.0 μ g/mL、6.8 μ g/Lで、検出率はいずれも100%だった。MEHP、MECPP濃度中央値は1.50 μ g/mL(98.0%)、0.21 μ g/mL(90.7%)で、MBzP、MEHHP、cx-MiNPの検出率は10%未満と低かった。オーストラリアの妊婦の血中濃度と比較したところ、最も使用量が多いとされるDEHPの代謝物MEHP濃度は同程度であったが、MiBP、MnBP濃度は本研究で高く、本邦ではより多くの曝露がある可能性が示唆された。

表2 母体血中BPA、フタル酸エステル類代謝物の濃度分布(濃度単位 μ g/mL)

物質	MDL	検出率(%)	中央値	IQR(25 th , 75 th)
BPA	0.004	80.7	0.069	0.030, 0.298
モノニルブチルフタル酸 (MnBP)	0.57	100.0	26.0	17.0, 35.0
モノイソブチルフタル酸 (MiBP)	0.44	100.0	6.8	4.7, 9.1
モノベンジルフタル酸 (MBzP)	0.19	7.6	<MDL	<MDL, <MDL
モノ(2-エチルヘキシル)フタル酸 (MEHP)	0.31	98.0	1.50	0.80, 9.10
モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル)フタル酸 (MEHHP)	0.23	1.5	<MDL	<MDL, <MDL
モノ(2-エチル-5-カルボキシペンチル)フタル酸 (MECPP)	0.11	90.7	0.21	0.13, 0.32
モノカルボキシイソノニルフタル酸 (cx-MiNP)	0.12	0.3	<MDL	<MDL, <MDL

c. 胎児期BPA、フタル酸エステル類曝露とSDQによる子どもの問題行動の関連の検討

母体血中BPA、フタル酸エステル類代謝物濃度は、ケース群と対照群では有意な差は見られなかった。しかし、MECPP濃度が高いと、行為障害などの問題のリスクが増加した(OR=2.97, 95% CI, 1.45-6.11)(表3)。BPA濃度が高いと、向社会性の問題のリスクが増加した(OR=1.44, 95% CI, 1.03-2.03)。さらに男女別で解析した結果、女児ではMECPP濃度が高いと、不注意・多動のリスクが増加した(OR=6.27, 95% CI, 1.47-26.7)。以上から、胎児期のBPAやフタル酸エステル類への曝露は、5歳での問題行動と関連する可能性が示唆された。

表3 母体血中フタル酸エステル類、BPA濃度と5歳での問題行動の関連

	BPA	MnBP	MiBP	MEHP	MECPP
全体 (n=458)	OR (95% CI)				
TDS(総合的問題) (≥13)	1.33 (0.97, 1.81)	0.53 (0.23, 1.21)	0.44 (0.18, 1.08)	0.95 (0.66, 1.37)	1.18 (0.60, 2.30)
行為 (≥4)	1.14 (0.83, 1.57)	1.40 (0.58, 3.38)	1.44 (0.55, 3.79)	0.82 (0.56, 1.20)	2.97 (1.45, 6.11)
多動・不注意 (≥6)	1.09 (0.76, 1.56)	1.12 (0.45, 3.15)	0.91 (0.37, 3.10)	1.27 (0.84, 1.91)	1.75 (0.80, 3.85)
情緒 (≥4)	0.95 (0.68, 1.33)	0.82 (0.34, 1.97)	0.56 (0.22, 1.45)	0.88 (0.60, 1.29)	0.64 (0.32, 1.28)
仲間関係 (≥4)	0.97 (0.63, 1.50)	0.98 (0.31, 3.10)	0.48 (0.15, 1.59)	0.79 (0.48, 1.31)	0.95 (0.38, 2.37)
向社会性 (≤5)	1.51 (1.07, 2.13)	0.98 (0.40, 2.43)	1.00 (0.38, 2.65)	0.89 (0.60, 1.34)	1.13 (0.54, 2.40)

BPA、フタル酸エステル類代謝物濃度は常用対数変換して解析

両親の年齢、母の妊娠前BMI、母の血中コチニン濃度、妊娠中の世帯年収、児の性別、出生順、SDQ回答月齢で調整

d. 胎児期BPA、フタル酸エステル類曝露と子どものADHDの関連の検討

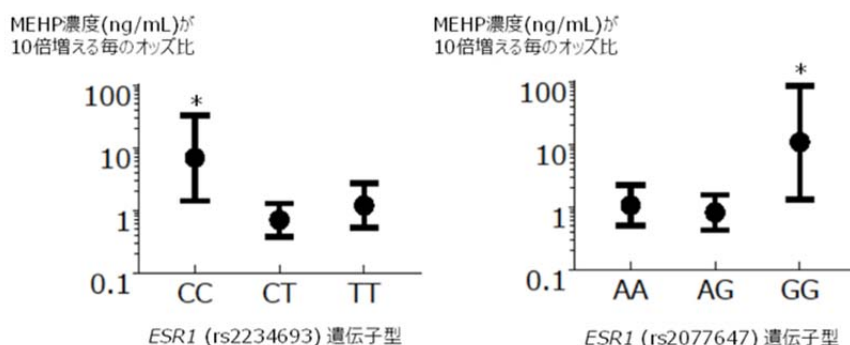
6歳でのADHD-RSの回答が得られたうち、ADHD疑い群248名と対照群311名の合計559名の児について、両親と児の基本属性を比較したところ、ADHD疑い群で初産、両親の教育歴が高校卒以下、コチニン値(ニコチンの代謝物)≥11.48ng/ml、世帯年収が500万円未満、未婚の割合が多かった。本研究で見られた初産にADHD疑い群が多いことは、第一子では内面的問題の増加、外交的問題や問題行動全般が増加するという先行研究の結果と一致した。両親の教育や世帯年収などの社会経済要因、妊娠中の喫煙や婚姻状況は、子どもの問題行動や発達と深く関連することが報告されており、本研究の集団でも先行研究と同様の結果となった。

母体血中のBPAおよびフタル酸エステル類代謝物濃度とADHD疑いとは関連が認められなかった(表4)。しかし、遺伝子多型により層別したところ、エストロゲン受容体1型; ESR1(rs2234693)遺伝子のCC型をもつ児では、MEHP濃度が10倍増えると6歳でADHD疑いになるオッズは6.86(95%CI, 1.43-33.0)で有意に高かった(図1)。一方TT型、CT型をもつ児では、MEHP濃度とADHD疑いに関連はなかった。ESR1(rs2077647)遺伝子のGG型をもつ児では、MEHP濃度が10倍増えるとオッズ比は10.8(95%CI, 1.34-87.0)で有意に高かった。一方、AA型、AG型をもつ児では、MEHPとADHD疑いに関連はなかった。ESR1遺伝子型の違いによるエストロゲンとエストロゲン受容体との親和性、MEHPとエストロゲン受容体との親和性、この受容体とADHDとの関連については、疫学研究のみならず動物実験でもまだ明らかになっていない。従って本結果についてメカニズムの面からもエストロゲン受容体1型が関与してADHDを引き起こす可能性があるのか、今後さらに検討する必要がある。

表4 BPA、フタル酸エステル類濃度とADHD疑い群となるリスク

	BPA OR (95% CI)	MnBP OR (95% CI)	MiBP OR (95% CI)	MEHP OR (95% CI)	MECPP OR (95% CI)
男児	1.1 (0.7, 1.7)	0.8 (0.2, 2.8)	0.5 (0.1, 1.6)	0.8 (0.5, 1.4)	1.0 (0.3, 2.8)
女児	1.0 (0.7, 1.6)	1.1 (0.3, 4.2)	1.2 (0.3, 5.4)	0.9 (0.5, 1.6)	1.7 (0.6, 4.3)

調整因子: 母の妊娠前BMI、出産歴、妊娠後期母のコチニン値、両親の教育歴、妊娠中と生後(6歳時)の世帯年収、婚姻状況、ADHD-RSを実施した月齢、BPAとフタル酸エステル類代謝物濃度はlog10変換



母の年齢、出産歴、妊娠後期コチニン値、教育歴(母およびパートナー)、世帯収入(妊娠中および就学前)、婚姻状況で調整したロジスティック回帰分析。

3回SNP解析しても遺伝子型が判定できなかったものは除外した。

*; P < 0.05.

図1 児のエストロゲン受容体(ESR1)遺伝子型の違いによるMEHP濃度と6歳のADHD疑いとの関連

e. 臍帯血DNAのエピゲノム解析

曝露と関連するメチル化変化部位を抽出したところ、BPA曝露では7 CpG、DEHP曝露では19 CpGがボンフェローニ(ゲノムワイド有意水準 $p=1.17 \times 10^{-7}$)補正後も有意だった(赤線上部)(図2)。

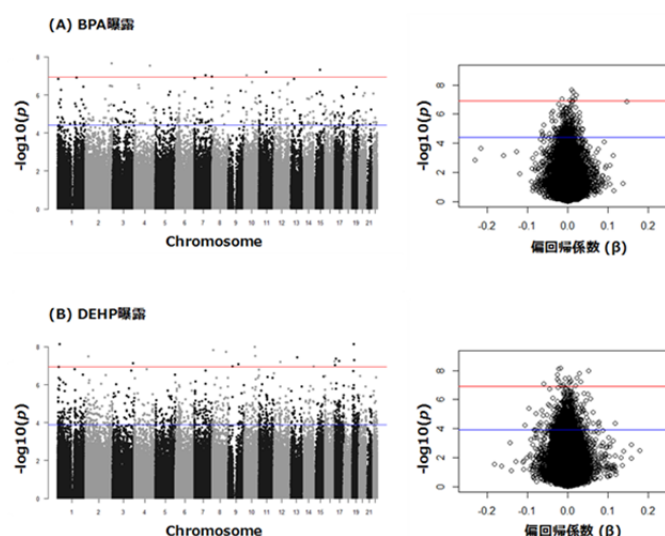


図2 BPA曝露(A)、DEHP曝露(B)と45万CpGsメチル化との関連

(左)マンハッタンプロット(横軸:染色体番号、縦軸: $-\log_{10}$ 変換したP値)

(右)ボルケーノプロット(横軸:偏回帰係数、縦軸: $-\log_{10}$ 変換したP値)

赤線:ボンフェローニ法での有意水準($p < 1.17 \times 10^{-7}$)

青線:False-discovery rateでの有意水準($FDR q < 0.05$)

BPA曝露との関連において、ボンフェローニ補正後も有意だった、7 CpGのうち、6 CpGが位置する遺伝子(*SH3BP4*、*NAA15*、*MYO1E*、*CDC42BPG*、*BHLHA15*、*DNAJB6*)は、in vitro/vivoの実験でBPA曝露によるmRNA発現への影響が報告されている。また、複数のメチル化変化部位が位置していた、5 遺伝子(*SLC1A4*、*PAX2*、*ANKRD33*、*USP29*、*GNAS*)についてもin vitro/vivoの実験でBPA曝露によるmRNA発現への影響が報告されている。DEHP曝露では、ボンフェローニ補正後も有意だった19のCpGサイトのうち、8 CpGが位置する遺伝子(*KIAA1026*、*KAZN*、*KLHL38*、*C2orf28*、*ATRAID*、*MYH10*、*RARA*、*JPH3*、*ABR*、*ENO1*)は、ラットの胎仔期にフタル酸ジブチル(DBP)に曝露すると、その後精巣でのmRNA発現変化が報告されている。複数のメチル化変化部位が位置していた6 遺伝子(*IFFO2*、*STIM2*、*SMURF1*、*TRAPPC*、*ATG101*、*EIF4A1*)についてもin vitro/vivoの実験でDBP曝露によるmRNA発現への影響が報告されている。さらに、*RPH3AL*は、in vivoの実験でDEHP曝露によるmRNA発現への影響が報告されている。このことから、胎児期曝露がメチル化への影響を介して遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が示唆される。

一方、BPA曝露と関連するCpGが位置する遺伝子のうち、*NAA15*は血管、造血、神経細胞の増殖に重要な役割を果たすN-アセチルトランスフェラーゼ活性を持つ。*DNAJB6*はニューロンでのポリグルタミン蓄積にかかわる可能性のあるDNAJファミリーに属している。*SLC6A7*は神経伝達物質輸送タンパク質をコードし、*GNAS*はASDとの関連が示唆されている。DEHP曝露との関連では、*JPH3*は脳組織に特異的に発現し、*AGTPBP1*は脱グルタミル化を触媒するカルボキシペプチダーゼであり、神経系への関連が示唆されている。また、神経細胞の分化に関与する可能性があるNF-kappa-Bのアクチベーターをコードする*TRAPPC9*、興奮性シナプス形成に関与する*NPTX2*等、脳神経系の発生や機能に関与する遺伝子が抽出され、曝露がメチル化変化を介して神経発達に影響を及ぼす可能性が考えられる。これら曝露により影響を受けたメチル化部位について、その周辺領域も含めて、ADHD疑いと対照群で差があるか、今後、次世代シーケンサーを用いたメチル解析を行い、その結果により、環境化学物質曝露の影響を受ける胎児期メチル化変化と生後のADHDとの関連の有無について検討する必要がある。

(2)環境化学物質曝露に起因するASD等の発達障害関連エピジェネティクス変化の解明

①胎児期喫煙曝露により変化するDNAメチル化領域の探索

非喫煙群と喫煙群間比較により、喫煙曝露により変化するDNAメチル化を網羅的に探索したところ、非喫煙群と喫煙群で82CpGsが抽出された。82CpGsのうち遺伝子情報が付加されている60CpGsを対象に複数のCpGが含まれる遺伝子を抽出した。その結果8つの遺伝子が抽出され、AHRR以外の遺伝子はCpG間の距離が数十～数百bpしか離れていないことから、遺伝子領域全体ではなく、特定の範囲が喫煙曝露によりメチル化変化の

影響を受けることが示唆された。続いて、喫煙曝露によるDNAメチル化変化の影響は喫煙を止めれば非喫煙者と同様のメチル化状態に戻るのかを検討した。妊娠がわかって喫煙を止めた喫煙中止群を用いて、非喫煙群と中止群で比較解析し、 $FDR < 0.05$ (青線の上)かつ偏回帰係数の絶対値 $|coef| > 0.01$ (赤線の外側)の基準で抽出を行ったところ、非喫煙群と中止群で35 CpGs サイト、中止群と喫煙群で134 CpGsであった (図3)。

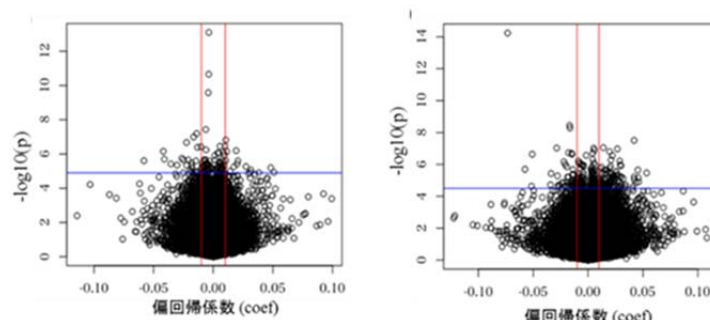


図3 非喫煙群と中止群比較(左)と中止群と喫煙群比較(右)におけるvolcanoプロット

これらの結果と、非喫煙群と喫煙群における FDR (False Discovery Rate) < 0.05 の基準で抽出されてきたCpGのリストを用いて、非喫煙群と喫煙群比較、及び、中止群と喫煙群比較で共通して抽出されるCpGを検討し、喫煙中止によりメチル化が戻る領域を探索した。その結果、11領域のCpGs、7つの遺伝子が抽出された。11領域すべてのCpGにおいて非喫煙群と喫煙群、及び、中止群と喫煙群で同方向メチル化変化を示していることから、喫煙群に対して非喫煙群と中止群は同方向にメチル化変化することが示された。喫煙を止めることによりDNAメチル化レベルでも非喫煙者と同等のメチル化程度になる遺伝子が多く見出され、分子生物学的観点から禁煙の有効性を発信できる可能性が考えられる。

続いて、網羅的DNAメチル化解析から抽出されたCpG (cg05575921)を含む AHRR遺伝子領域について次世代シーケンサーを用いたDNAメチル化解析法の確立及び再現性の確認を行った。メチル化率を3群間 (非喫煙群、喫煙継続群、喫煙中止群)の多重比較したところ、網羅的解析結果と同様に、非喫煙群と喫煙群において、cg05575921を含む全5領域のCpGで喫煙群のメチル化低下が有意に認められた。また喫煙中止群と喫煙群においても、cg05575921を含む全5領域のCpGで喫煙群のメチル化低下が有意に認められた。喫煙曝露の影響の向きも全てのCpGで一致していた。一方、非喫煙群と喫煙中止群においてはcg05575921を含む全5領域のCpGにおけるメチル化に統計学的有意差は認められず、網羅DNA解析の結果を支持した。

②喫煙曝露と6歳のADHD-RSのスコアの関係

質問表による喫煙曝露とADHD疑い群との関連を検討したところ、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、カイニ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。次に母体血漿コチニン濃度とADHD疑い群の関連を検討したところ、同様に、母体血漿コチニン濃度とADHD疑い群との関連も P 値 = 0.1889 と有意差は認めなかった。したがって本研究において喫煙曝露によるADHDとの関連に統計的有意差が認められなかったことから、DNAメチル化を介した媒介分析 (mediation analysis)を行うことができなかった。

今回の標本においても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が示唆されたが、喫煙曝露とADHD疑い群に統計的に有意な差は認められなかった。その要因として、ADHDの有病率の小ささからサンプルサイズを大きくすることが困難であったことが考えられる。近年報告されている胎児喫煙期曝露と児のADHDとの関連に関する研究におけるサンプルサイズは、Melchiorらの報告では $n=1,113$ 、Joelssonらの報告では $n=40,141$ であった。一方でObelらの報告では、胎児期喫煙曝露とADHDのリスクに関連はないことを報告している。今後サンプルサイズを大きくした追跡調査を行うことにより喫煙曝露とADHD発症に関連が認められるかどうかを慎重に検討していく必要があると思われる。また喫煙曝露と関連するメチル化変化とADHDとの関連についても今後明らかにしていく予定である。

③6歳のADHD-RSのスコアとメチル化の関係

次世代シーケンサーで解析したCpGについて、大規模コホート集団のADHD疑い群 ($n = 224$)とコントロール群 ($n = 286$)の間でメチル化率に差があるかを検討した。各CpGにおいてウィルコクソンの順位和検定を行った結果、 $P < 0.05$ で抽出されたCpGはCYP1A1の203番のCpGのみであった。しかし、外れ値が多く、今後再検証が必要である。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

- 1) エコチル追加調査として、本体調査では実施できなかったM-CHATを用いた生後早期の社会性発達調査を3,500名以上に実施し、1.5歳頃の子どものASD傾向の実態と特徴を明らかにした。これまでは明らかになっていないASD症状の軌跡を、今後、本体調査4歳以降の時点におけるASD調査と合わせて詳細に記述するためのデータを得た。
- 2) SDQ、DCDQ、ADHD-RS、SCQの結果から、広汎性発達障害や協調運動障害、ADHD疑いに関連する可能性がある社会経済要因として、妊娠中の世帯年収が低いこと、母の教育歴が低いこと、そのほかの要因として、母の妊娠前BMIが30kg/m²、第一子であること、男児であることを示した。特に、SDQは一般集団を対象とした研究ではこれまでの国内の報告の中でも最大規模であり、科学的なエビデンスの蓄積に貢献した。
- 3) BPA、フタル酸エステル類7代謝物の曝露測定結果から、日本人妊婦のBPA、フタル酸エステル類への曝露実態に関する詳細なデータを提供した。比較的低濃度ではあるがBPA、DnBP、DiBP、DEHP、の曝露が認められることを示した。
- 4) 比較的低濃度の胎児期BPA曝露であっても、42か月の問題行動への影響がある可能性が示唆された。一方、6か月、18か月での神経行動発達、42か月の知的能力との関連は認められず、胎児期曝露による影響はないことが示唆された。また、BPA、フタル酸エステル類の胎児期曝露は、6歳でのADHDとは関連がみられなかったが、遺伝子多型によって層別化したところ、MEHP濃度とADHD疑いとなるオッズに違いがみられた。曝露によるADHD発症には、遺伝子多型によるハイリスク群の可能性が示唆されたが、今後より詳細に検討する必要がある。
- 5) 292人の児の臍帯血の網羅的DNAメチル化解析を実施し、胎児期の化学物質および喫煙曝露によりメチル化が変化する遺伝子領域を示した。BPA、フタル酸エステル類の胎児期曝露への影響を遺伝子網羅的に解析した研究は国際的にも初となる。喫煙については日本で初めての研究である。胎児期のBPAやフタル酸エステル類曝露により有意にメチル化変化が起こる遺伝子が同定されたが、それらの中には、神経発達に関連する遺伝子が含まれ、曝露による神経発達への影響にDNAメチル化が関与する可能性が示された。
- 6) 喫煙曝露については、同定したメチル化部位には既報の遺伝子だけでなく、新規に神経発達関連遺伝子を見出した。また、DNAメチル化で喫煙をやめた効果が反映される遺伝子を見出すことができた。
- 7) 次世代シーケンサーを用いて、他検体・複数領域のDNAメチル化を定量的に解析する方法を確立できたことから、今後エピゲノム疫学分野での本研究方法や技術の活用が期待できる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- 1) 環境省が行うエコチル調査の目的である、「胎児期から小児期にわたる子どもたちの成長・発達に影響を与える環境要因を明らかにすること」に、妊婦の環境化学物質曝露の実態のデータ提供や、発達検査の実施を通して大きく貢献できる。M-CHATのデータは、環境省エコチル本体調査で3、5歳に実施する対人応答性尺度を用いた発達調査のデータとあわせて、子どもの生後早期の社会性発達の軌跡をとらえることにより早期治療に活用できる。また、1.5歳の社会性発達(ASD傾向)の調査により、生後早期の発達調査を実施することで、行政課題である、発見の遅れ、学校現場等において二次障がいが生じている発達障害児の発見と対応に貢献できると考えられる。
- 2) 本研究で明らかになった妊婦のフタル酸エステル類、BPAの曝露実態は、これら化学物質の規制や管理をしていくうえで、科学的根拠として用いることができる。特定の遺伝子多型を持つ児では、MEHPの濃度が増加すると、注意欠陥・多動性障害疑いとなるリスクが増加することを示唆し、この結果は行政が遺伝的ハイリスク群も考慮した化学物質濃度の規制や基準を制定するなどの環境政策の立案に活用できる。
- 3) 大規模な日本人集団において臍帯血の網羅的DNAメチル化データは初めてであり、貴重なエピゲノムデータセットとして利用可能である。網羅的DNAメチル化解析により、環境化学物質曝露によるメチル化変化がみられるCpGには、動物実験などから神経発達に関与するとされる遺伝子が含まれていた。胎児期のビスフェノールAやフタル酸エステル類)曝露がDNAメチル化を介して、ヒトの神経行動発達に影響する可能性を示唆し、この結果は環境化学物質の規制を考慮する際に科学的根拠の一つとして活用できる。
- 4) 胎児期の喫煙曝露によりDNAのメチル化が変化する遺伝子上の部位と、喫煙をやめた効果が反映される遺伝子のDNAメチル化部位を見出した。喫煙をやめることによるDNAメチル化変化への影響が示唆されたため、禁煙を推進する政策を策定する際に、DNAレベルでの禁煙の効果を国民に発信する科学的根拠とし

て活用できる。

- 5) 大規模な疫学研究において次世代シーケンサーによるDNAメチル化解析法が確立できたことから、喫煙のみならず様々な環境化学物質曝露によるDNAメチル化の解析への利用が可能である。次世代シーケンサーを用いて、多検体・複数領域のDNAメチル化を定量的に解析する方法により、今後エピゲノム疫学分野での活用が期待できる。
- 6) 胎児期喫煙曝露による神経発達障害発症へのDNAメチル化の関与の有無を明らかにすることで、DNAメチル化解析による発症リスクを持つ児の早期特定、介入を行うことが将来的に可能になる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) M. MINATOYA, S. NAKAJIMA, S. SASAKI, A. ARAKI, C. MIYASHITA, T. IKENO, T. NAKAJIMA, Y. GOTO, R. KISHI: Science of the Total Environment, 565:1037-1043 (2016) Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The Hokkaido Study in Environment and Children's Health.
- 2) M. MINATOYA, S. ITOH, A. ARAKI, N. TAMURA, K. YAMAZAKI, S. NISHIHARA, C. MIYASHITA, R. KISHI: Child; Care, Health and Development, 43(3):385-392 (2017) Associated factors of behavioral problems in children at preschool age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health.

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 小林澄貴、池野多美子、荒木敦子、山崎圭子、西原進吉、岸玲子: 北海道公衆衛生学雑誌、29(2):31-40 (2015) 環境化学物質の胎児期曝露による児の神経発達への影響に関する疫学文献レビュー: 注意欠如・多動性障害(AD/HD)・自閉症スペクトラム(ASD)を含めて
- 2) NQV. TRAN, K. MIYAKE: International Journal of Genomics, Neurodevelopmental disorders and environmental toxicants: epigenetics as an underlying mechanism. (in press)

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 岸玲子: 公衆衛生、78(8):547-522 (2014) 【公害・環境問題の変貌と新展開】環境化学物質の次世代影響 出生コホート研究による成果と今後の課題
- 2) 岸玲子: 公衆衛生、79(3):193-199 (2015) 【講座 子どもを取り巻く環境と健康・1】「奪われし未来」にしない
- 3) 荒木敦子、アイツバマイゆふ、岸玲子: 公衆衛生、79(7):485-490 (2015) 【講座 子どもを取り巻く環境と健康・5】短半減期化学物質の曝露実態
- 4) 三宅邦夫: ストレス科学シンポジウム、30(1):27-36 (2015) エピジェネティクス研究が拓くストレス科学の世界「発達障害とエピジェネティクス」
- 5) 三宅邦夫: 日本生物学的精神医学会誌、26:21-25 (2015) 特集1 エピジェネティクス機構から精神神経疾患の病態を探る「発達障害のエピジェネティクス病態の最新理解」
- 6) 池野多美子、小林澄貴、山崎圭子、西原進吉、岸玲子: 公衆衛生、80(6):445-450 (2016) 【講座 子どもを取り巻く環境と健康・16】ADHD(注意欠如・多動性障害)とASD(自閉スペクトラム症)
- 7) 宮下ちひろ、小林祥子、岸玲子: 公衆衛生、80(7): 531-537 (2016) 【講座 子どもを取り巻く環境と健康・17】胎児期の化学物質曝露による後天的な遺伝子発現制御への影響

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 8) S. KOBAYASHI, K. AZUMI, S. SASAKI, M. ISHIZUKA, H. NAKAZAWA, E. OKADA, S. KOBAYASHI, H. GOUDARZI, S. ITOH, C. MIYASHITA, T. IKENO, A. ARAKI, R. KISHI: ISEE 2014, Seattle, USA (2014.8.24-28) The effects of perfluoroalkyl acids (PFAAs) exposure in utero on IGF2/H19 DNA methylation in cord blood.
- 9) T. KUBOTA: Epigenomics & Metabolomics Symposia-2014, Boston, USA (2014.8.25) Epigenetics as a basis for diagnosis and treatment of Neurodevelopmental Disorders.
- 10) 三宅邦夫: 第30回日本ストレス学会、東京(2014.11.7) シンポジウム エピジェネティクス研究が拓くストレス科学の世界「発達障害とエピジェネティクス」
- 11) M. MINATOYA, S. SASAKI, S. NAKAJIMA, J. YAMAMOTO, A. ARAKI, S. ITOH, C. MIYASHITA, T. MATSUMURA, K. NONOMURA, T. MITSUI, K. CHO, R. KISHI: ISEE-AC 2014 Conference, Shanghai, China (2014.11.30-12.2) Effects of prenatal bisphenol A exposure on birth weight, sex hormone levels and

mental and motor development.

- 12) 久保田健夫: 第5回 岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会、岐阜(2014.12.6) 特別講演I エピジェネティクスに基づく健康戦略
- 13) 岸玲子: 第17回環境ホルモン学会、東京都(2014.12.9-12.10) 出生コホート研究で明らかになった人への環境ホルモン様作用
- 14) 湊屋街子、佐々木成子、中島そのみ、山本潤、荒木敦子、伊藤佐智子、宮下ちひろ、松村徹、野々村克也、三井貴彦、長和俊、岸玲子: 第17回環境ホルモン学会、東京都(2014.12.9-12.10) ビスフェノールAの胎児期曝露による出生体格、臍帯血中ホルモン濃度、神経発達への影響
- 15) 岸玲子: 第85回日本衛生学会学術総会、和歌山市(2015.3.26-3.28) シンポジウム6(連携研究会・生殖次世代研究会) 環境と子どもの健康に関する出生コホート研究の現状: 北海道スタディ13年の経験から
- 16) 湊屋街子、佐々木成子、中島そのみ、那須民江、後藤裕子、宮下ちひろ、荒木敦子、小林澄貴、池野多美子、岸玲子: 第85回日本衛生学会学術総会、和歌山市(2015.3.26-3.28) 胎児期MEHP曝露により神経行動発達への影響—北海道スタディ—
- 17) 小林祥子、安住薫、佐々木成子、松村徹、山本潤、石塚真由美、宮下ちひろ、池野多美子、荒木敦子、岸玲子: 第85回日本衛生学会学術総会、和歌山市(2015.3.26-3.28) 臍帯血ビスフェノールA濃度と児のIGF2 DNAメチル化との関連—北海道スタディ—
- 18) 小林祥子、三浦りゅう、川口章夫、宮下ちひろ、三宅邦夫、松村徹、山本潤、石塚真由美、荒木敦子、久保田健夫、岸玲子: 第4回日本DOHaD研究学術集会、東京(2015.8.1-2) 胎児期ビスフェノールA曝露影響に関する臍帯血DNA網羅的メチル化解析—北海道スタディ—
- 19) 湊屋街子、佐々木成子、中島そのみ、山本潤、松村徹、宮下ちひろ、荒木敦子、岸玲子: 第86回日本衛生学会学術総会、旭川市(2016.5.11-13) 臍帯血中ビスフェノールA濃度と子どもの行動発達: 北海道スタディ
- 20) M. MINATOYA, N. TAMURA, S. ITOH, S. SUYAMA, C. MIYASHITA, A. ARAKI, T. SAITO, A. NAKAI, R. KISHI: ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Japan (2016.6.26-29) Prenatal environment and Child Behavioral and Coordination Development at Preschool Age in the Hokkaido Study
- 21) M. MINATOYA, N. TAMURA, S. ITOH, C. MIYASHITA, A. ARAKI, R. KISHI: ISEE2016, Roma, Italy (2016.9.1-4) Associated prenatal factors of behavioral and emotional problems in 5-year-old children: The Hokkaido Study
- 22) S. KOBAYASHI, R. MIURA, C. MIYASHITA, A. ARAKI, M. ISHIZUKA, H. NAKAZAWA, Y. ITO, T. KUBOTA, R. KISHI: ISEE2016, Roma, Italy (2016.9.1-4) Epigenome-wide analyses of prenatal perfluoroalkyl acids exposure on cord blood DNA methylation: the Hokkaido study

7. 研究者略歴

課題代表者: 岸 玲子

北海道大学大学院医学研究科卒業、医学博士、現在、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:

- 1) 有賀 正 北海道大学医学部医学科卒業、医学博士、現在、北海道大学大学院医学研究院 特任教授
- 2) 白石 秀明 北海道大学医学部医学科卒業、医学博士、現在、北海道大学病院小児科 講師
- 3) 荒木 敦子 北海道大学大学院医学研究科卒業、博士(医学)、現在、北海道大学 環境健康科学研究教育センター 准教授
- 4) 池野 多美子 北海道大学大学院医学研究科卒業、博士(医学)、現在、北海道大学 環境健康科学研究教育センター 客員研究員
- 5) 宮下 ちひろ 北海道大学大学院医学研究科卒業、博士(医学)、現在、北海道大学 環境健康科学研究教育センター 特任准教授
- 6) 伊藤 佐智子 北海道大学大学院歯学研究科卒業、博士(歯学)、現在、北海道大学 環境健康科学研究教育センター 特任講師
- 7) ゴウダルジ ホウマヌ 北海道大学大学院医学研究科卒業、博士(医学)、現在、北海道大学大学院医学研究院 助教
- 8) 三宅 邦夫 山梨大学大学院人間環境医工学専攻、医科学博士、現在、山梨大学大学院総合研究部 講師
- 9) 久保田 健夫 昭和大学大学院卒業、医学博士 (平成26、27年度のみ)

5-1454 環境化学物質によるASD等の神経発達障害と環境遺伝ーエピゲノム交互作用の解明

(1) 神経発達アウトカムへの環境化学物質曝露と環境遺伝交互作用の解明

(北海道大学)

サブテーマ代表者：

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：

北海道大学大学院 医学研究科 有賀正

北海道大学病院 白石秀明

北海道大学 環境健康科学研究教育センター 荒木敦子、池野多美子、宮下ちひろ、
伊藤佐智子、ゴウダルジ・ハウマヌ

研究協力者：

北海道大学 環境健康科学研究教育センター 湊屋街子、小林澄貴、西原進吉、
山崎圭子、アイツバマイゆふ、小林祥子、田村菜穂美、三浦りゅう

北海道大学大学院 医学研究科 児童精神医学講座 柳生一自

札幌医科大学 保健医療学部 作業療法科 中島そのみ

札幌市保健福祉局 保健所 母子保健 歯科保健担当 請井繁樹

日本赤十字北海道看護大学 臨床医学領域 伊藤善也

興部町国民健康保険病院 花岡知之

平成26～28年度累計予算額：131,847千円（うち平成28年度：43,503千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

近年、ASD（自閉スペクトラム症）やADHD（注意欠陥多動性障害）などをもつ子どもが増加している。発達障害のリスクとしては胎児期の化学物質、喫煙やアルコールへの曝露などの環境要因が指摘されているが、その詳細は明らかでない。さらに化学物質曝露による神経発達や認知機能への影響は、遺伝子多型により異なることが報告されている。一方、環境化学物質曝露によるASD、ADHD発症には、DNAメチル化の寄与が考えられる。そこで本研究では、ASDやADHDへの影響が懸念されるビスフェノールA（BPA）やフタル酸エステル類の胎児期曝露について、子どもの発達との関係を母児の遺伝子多型も含めて検討し、さらに臍帯血のDNAメチル化変化への影響も検討した。

本調査ではまた、エコチル追加調査として、1.5歳児を対象に社会性発達（ASD傾向）の調査を実施した。3,065名から回答が得られ、乳幼児自閉症チェックリスト（M-CHAT）の得点から18.6%が「ASD疑い」であった。同時に収集した子どもの尿は、生後の環境化学物質曝露の分析に今後用いる予定で、将来、本体調査で実施する化学物質曝露評価や発達調査の結果とあわせて胎児期、生後の環境化学物質曝露による子どものASD傾向の関連を検討する。

出生コホート研究（北海道スタディ）の参加者のうち、胎児期BPA、ジ(2-エチルヘキシル)フタル酸（DEHP）曝露による発達への影響は、6か月および18か月時の精神・運動発達を評価した。さらにBPA曝露との関係は、3.5歳では知的能力と問題行動を評価した。臍帯血中BPA濃度は、18か月までの精神・運動発達および3.5歳での知能とは関連はみられなかったが、総合的および、内向

的問題行動の増加との関連がみられた。さらに、発達、不注意の問題の増加とも関係した。5、6歳に達した対象者に質問票を用いて行動発達、協調運動障害、ADHD、ASDの調査を実施した。妊娠中の母の血中フタル酸エステル類とBPAの濃度を分析し、妊婦の曝露は諸外国と比較して低濃度であることを明らかにした。一部のフタル酸エステル類とBPAの濃度は、子どもの問題行動（行為・向社会性）の増加と関連することを示した。さらに一部のフタル酸エステル類濃度とADHD疑いのリスクの上昇の関係には、エストロゲン受容体の遺伝子多型が関係する可能性を示唆した。日本初となるサンプルサイズでのDNAメチル化網羅解析により、環境化学物質の胎児期曝露に影響を受けるDNAメチル化変化を示すことができた。また、メチル化変化に影響を受けた遺伝子には神経発達に関連するものが含まれることがわかり、環境化学物質曝露がメチル化変化を介して神経発達に影響を与えることを示唆した。

[キーワード]

環境化学物質、ASD/ADHD、神経行動発達、SNPs、環境遺伝交互作用

1. はじめに

近年、ASD (Autism spectrum disorder、自閉スペクトラム症) やADHD (Attention deficit and hyperactivity disorder、注意欠陥多動性障害) などの神経発達障害をもつ子どもが増加している。ASDは社会性の欠如やコミュニケーションの苦手さを特徴とし、学童期における有病割合は、米国CDC (アメリカ疾病予防管理センター) の報告で約1.5% (68人に1人)、韓国では2.6%と推定されている¹⁾。ADHDは不注意や多動性を特徴とする障害で、米国CDCの報告では2011年には、両親の申告による調査で医療機関での診断率が11%と報告している²⁾。ASDやADHDの罹患率の増加の一つには診断基準の改定があるものの、それだけでは説明がつかない。発症リスクには遺伝要因に加えて、胎児期の喫煙やアルコールへの曝露が指摘されているが、その詳細は明らかでない。さらに、ASDやADHDへの影響が懸念される環境要因として、鉛などの重金属に加えてビスフェノールA (BPA) やフタル酸エステル類などの環境化学物質が近年報告されている³⁾。BPAやフタル酸エステル類はプラスチック製品やパーソナルケア製品に含有され、これら製品の使用や食事を介して日常的に曝露している^{4,5)}。動物実験では、BPAへの胎児期曝露によりASD症状に関わる社会認知能力低下や不安様行動の増大、ADHD症状に関わる認知機能低下⁶⁻⁸⁾、フタル酸エステル類への胎児期曝露による発達や行動への悪影響が報告された^{9,10)}。環境化学物質への曝露は胎児期に感受性が高く、その影響が生後も続くことが懸念される。しかし、疫学研究は十分でないという、出生コホート研究は限られている。

ASD、ADHD 発症の遺伝要因として、児の神経伝達物質代謝関連、シナプトソーム関連タンパク質25、脳由来神経栄養因子、カテコールアミン-O-メチル基転移酵素、A型モノアミン酸化酵素の遺伝子変異があげられる¹¹⁾。さらに、有機リン系農薬や有機塩素系農薬曝露による児の神経発達や認知機能への影響が、パラオキシナーゼ1型 (PON1) やグルタチオンS-転移酵素 (GSTs) の遺伝子多型により異なることが報告され^{12,13)}、環境化学物質曝露へのハイリスクグループの存在が懸念される。一方、環境化学物質曝露によるASD、ADHD発症へのメカニズムとしては、エピジェネティクスの寄与が考えられる¹⁴⁾。エピジェネティクスとは、DNA塩基配列の変化を伴わない後天的な遺

伝子制御機構のことである。たとえば、遺伝子発現のON/OFFを切り替えるスイッチの役割をしているDNAにメチル基が付くこと（メチル化）が、化学物質などの環境要因で変化する。マイクロアレイを用いた遺伝子発現研究で、ヒト臍帯血中BPA濃度と神経発達遺伝子発現量に負の相関がみられたことから¹⁵⁾、胎児期BPA曝露によるエピジェネティクス変化が遺伝子発現量を制御し、神経行動発達に影響を与えるのではないかと推測される。しかし、胎児期曝露によりどの遺伝子領域にエピジェネティックな変化を生じるか、それらが発達障害と関連するか、明らかになっていない。

2. 研究開発目的

本研究では、ASDやADHD等の発達障害や子どもの問題行動および知能への、胎児期のBPA、フタル酸エステル類曝露による影響をヒトで明らかにする。さらに、環境化学物質曝露による発達障害のリスクは遺伝子の多型によって異なるか、加えて化学物質曝露により影響を受けるDNAメチル化変化（エピゲノム変化）が神経発達障害の発症リスクと関連するかを解明することを目的とする。

環境省が実施するエコチル調査の追加調査として、1.5歳頃社会的行動発達調査をM-CHAT(乳幼児期自閉症チェックリスト修正版)を用いて行う。この調査は、ASD兆候を早期に明らかにし、エコチル本体調査で実施する子どもの発達調査とあわせて、子ども発達の軌跡をとらえることを目的とする。さらに、地域や行政とも協力し、早めの支援や介入を可能とした。子どもの生後の環境化学物質曝露を調べるために、尿の収集も行う。

胎児期のBPA、フタル酸エステル類曝露による幼少期の行動発達やASD、ADHD関連症状への影響を明らかにすることを目的として、平成26年度から継続して、5、6歳のASD、ADHD関連症状を4種類の質問票：SDQ、DCDQ、ADHD-RS、SCQを用いて評価し、BPAやフタル酸エステル類の胎児期曝露との関連を検討する。また、6歳児のADHD傾向と神経伝達物質代謝関連遺伝子や化学物質受容体関連遺伝子の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs）との関連を検討する。これらの研究は、エコチル調査より10年早く開始した前向き出生コホートである「子どもの健康と環境に関する北海道スタディ」を用いて実施する。

環境化学物質曝露によるエピゲノム作用、および神経発達障害への影響を検討するため、292臍帯血DNAサンプルの45万メチル化解析のデータを用いて、BPA、フタル酸エステル類曝露と関連するDNAメチル化部位（CpG）の同定を目的とする。また、抽出したCpGを含む遺伝子領域について、次世代シーケンサーを用いてメチル化変化を解析し、網羅的メチル化解析で明らかとなった曝露と関連するメチル化変化が神経発達に関連するかを検討する。

3. 研究開発方法

(1) エコチル追加調査（1.5歳の社会性発達調査）

環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」は2011年1月にリクルートを開始したコホート研究である。本研究ではエコチル追加調査として、1.5歳～2.5歳の子どもにM-CHATを実施した（図(1)-1）。

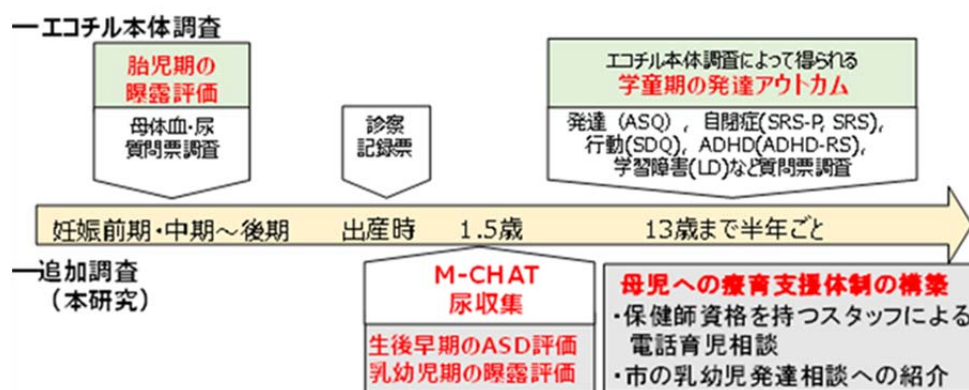
近年では、知的な遅れを伴わないASDの存在も広く知られるようになっており、子どもの社会的行動に注目することで、早期発見、早期支援の実現が試みられている¹⁶⁾。子どもの早期の社会的行動を確認するため、最も有効な検査として、乳幼児期自閉症チェックリスト修正版（Modified

Checklist for Autism in Toddlers; M-CHAT) が用いられている。M-CHATは、1歳前後の幼児を対象に、ASDのスクリーニングを目的に用いられる質問票検査である。この検査は、Baron-Cohenら¹⁷⁾によって開発された18か月児のスクリーニング検査であるCHATを、Robinsら¹⁸⁾が修正を加え発展させたものである。CHATは親に質問する9項目と、医師などの専門家が直接行動観察する5項目からなるが、M-CHATでは全23項目を親に記入してもらう質問票調査として実施する。指さしや呼び名反応などの通常頻繁に観察される社会的行動について確認することにより、ASDだけでなく臨床的ニーズのあるケースを早期発見することができる¹⁹⁾。日本語版M-CHATは、神尾と稲田²⁰⁾が作成し、1歳6か月の子どもについて、感度が高いスクリーニングが可能であることが示されている²¹⁾。全国で46の自治体が1歳6か月健診にM-CHATを採用していることも、この検査の有用性を示している²⁰⁾。しかし、環境省エコチル調査では、全国的にM-CHATを実施することは困難との理由で実施が見送られた経緯がある。

平成26年10月から29年1月末までに北海道ユニットセンター札幌および北見地区の1.5歳～2.5歳に達した子どもの保護者にM-CHAT調査票を発送した。本研究では、Kamioら²¹⁾の基準に従い、第1段階スクリーニングの基準である全23項目中3項目以上の不通過、または重要10項目中1項目の不通過の場合をASD疑いと定義した。なお、最終的なASD群の定義は、エコチル本体調査で行うSRS及びSRS-Pを用いた就学前のASDの調査結果をもって行う。

加えて、将来、乳児期の環境化学物質への曝露評価を行うため、子どもの尿を収集した。オムツ内に装着する補助パッドを送付し、およそ20mlの尿を採取した。採取した尿は補正に用いるための比重を測定後（尿比重屈折計T3-SE、ATAGO社製）、ガラス管に分注して-20℃で冷凍保存した。将来、ASDの調査結果が明らかになった後に、環境化学物質曝露評価に使用する。

本研究では参加者への療育支援体制を構築することの重要性にも着目しているため、子どもの発達に関する相談ができる専門家と連携して対応を行った。追加調査の質問票では、1.5歳健診時に発達に関する指摘やアドバイスなどを受けたか、また育児について相談したいことや困っていることはないかについて自由記述による回答を得た。参加者（養育者）からの電話による育児相談には保健師資格を持つスタッフが対応した。M-CHATのカットオフ値を超えたASD疑い群については、自治体の健診を受診したかどうかについて確認のうえ、養育者の希望に応じて行政による乳幼児精神発達相談などの窓口を紹介した。エコチル調査対象地区である札幌市および北見市では、自治体がM-CHATを基にした1.5歳健診を実施しており、回答の内容に応じて、自治体との連携により養育者の要望に沿ったフォローアップを図るようにした。紹介を行った場合には、2か月後を目途に研究者らがフォローアップ用紙、または電話にて母親にその後の状況を確認し、適切な支援のあり方を検討する資料とするよう体制を整えた。

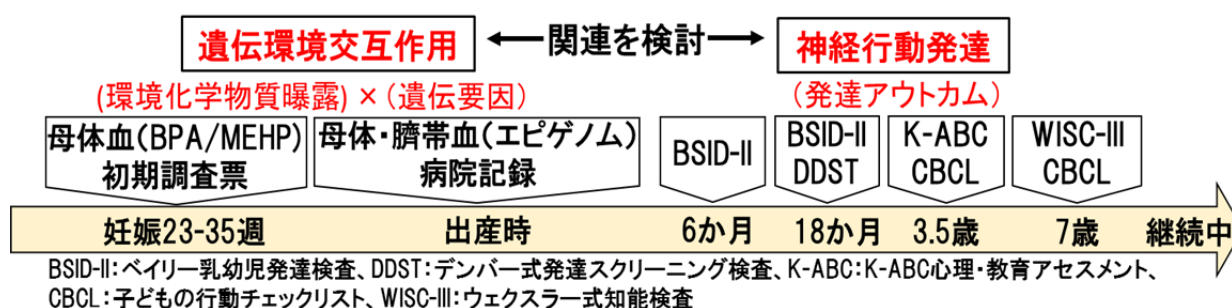


図(1)-1 エコチル追加調査および本体調査の流れ

(2) 環境と子どもの健康に関する北海道スタディ

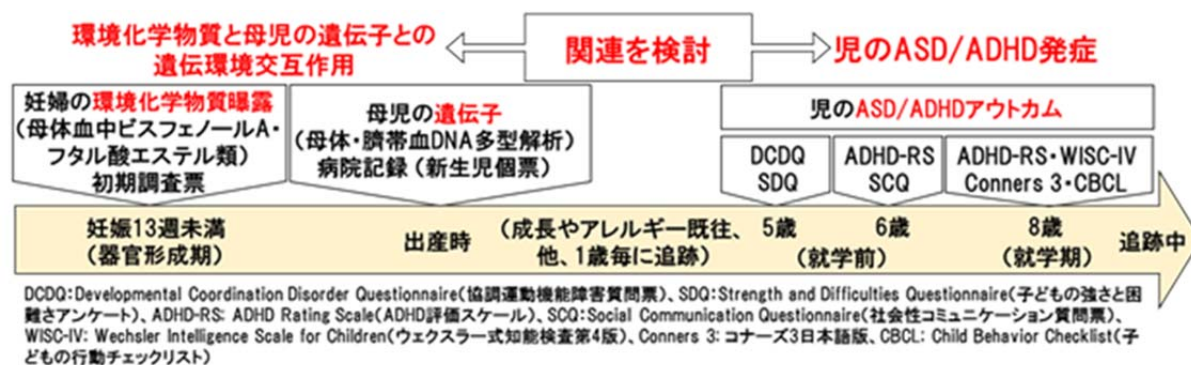
本研究では、2つの出生コホート研究（札幌コホート、北海道コホート）の参加者を対象として、胎児期のBPAおよびフタル酸エステル類曝露による子どもの発達への影響を検討した。

札幌コホート（図(1)-2）は、2002年7月～2005年10月に札幌市内1産科病院を受診し、同意を得た妊娠23-35週の対象者514名から成る。登録時に、自記式の調査票から母の年齢、体重、身長、食生活、喫煙歴、飲酒習慣、カフェイン摂取量、年収などの情報を得ている。また、病院記録から、在胎週数、児の性別、妊娠高血圧症の有無、出生時体格の情報を得ている。生後のフォローアップでは、複数回の神経行動発達調査を実施している。質問票からは、母親の産後うつ、育児環境、子どもの受動喫煙などの情報を収集済みである。



図(1)-2 札幌コホートの流れ

北海道コホート（図(1)-3）は、2003年2月～2012年3月に北海道内37産科病院を受診した妊婦のうち、同意が得られた20,926名から成る。妊娠13週未満の器官形成期の食生活、喫煙、飲酒、カフェイン摂取、社会経済状況などの情報を得ている。妊娠前期と後期には母体血を、出産時に母体血と臍帯血を採取済みである。出産時に在胎週数、出生時体格、性別、母の既往歴などの情報を病院記録から、生後4か月時に母子健康手帳からの出生時体格情報と妊娠中の喫煙状況について調査票への記載を依頼している。



図(1)-3 北海道コーホートの流れ

1) 胎児期 DEHP、BPA 曝露と子どもの発達(札幌コーホート)

a. 胎児期 DEHP 曝露と 6、18 か月の精神運動発達

胎児期 DEHP (di(2-ethylhexyl) phthalate) 曝露による影響の解析は、6 か月および 18 か月時の BSID-II (Bayley Scales of Infant Development 2nd edition) を用いて²²⁾、MDI (Mental Development Index) で年齢に応じた認知・言語・社会的発達を、PDI (Psychomotor Development Index) で微細・粗大運動発達を評価した。解析は、妊娠初期調査票、新生児個票および 6 か月、あるいは 18 か月の曝露と BSID-II のデータが揃う 127 名(6 か月)と 97 名(18 か月)を対象とした。妊娠高血圧症、多胎、1 分後アプガースコアが 6 未満、早産(37 週未満)、形態奇形、6 か月 BSID-II が生後 195 日以降に行われた者は除外している。DEHP 代謝物モノ(2-エチルヘキシル)フタル酸(MEHP)濃度は対数に変換し、線形回帰モデルを用いて、さらに性別で層別化して解析した。調整因子は、母の年齢、教育歴、妊娠中のカフェイン摂取量、採血週数、在胎週数、児の性別とした。

b. 胎児期 BPA 曝露と 6、18 か月の精神運動発達、42 か月の知能、行動発達

胎児期 BPA 曝露による影響の解析は、6 か月および 18 か月時の BSID-II (Bayley Scales of Infant Development 2nd edition) を用いて²²⁾、BSID-II の MDI で年齢に応じた認知・言語・社会的発達を、PDI で微細・粗大運動発達を評価した。3.5 歳では知的能力と問題行動を、それぞれ K-ABC (Kaufman Assessment Battery for Children)、CBCL (Child Behavior Checklist) を用いて評価した。K-ABC では、認知処理過程尺度、習得度尺度を、CBCL では、依存分離尺度、ひきこもり尺度、不安神経質尺度、発達尺度、睡眠・食事尺度、攻撃尺度、注意集中尺度、反抗尺度、その他の 8 項目の症状群尺度に加えて、内向的尺度、外向的尺度、総得点を算出した。胎児期 BPA 曝露評価には、すでに測定済みの臍帯血中 BPA 濃度を用いた。解析には、BPA 分析データがある 285 名のうち、BSID-II (6 か月 150 名、18 か月 105 名)、K-ABC (86 名) または CBCL (181 名) のデータが揃うものを対象とした。妊娠高血圧症、多胎、1 分後アプガースコアが 6 未満、早産(37 週未満)、形態奇形の子どもは解析からは除外とした。BPA 濃度は自然対数に変換し、検出下限値(LOD)以下には、LOD の 1/2 値を代入して解析を行った。調整因子は、K-ABC、CBCL を実施した月齢、母の教育歴、母の妊娠中の喫煙とした。男女で層別化した解析も行った。

2) 胎児期フタル酸エステル類、BPA 曝露と子どもの発達（北海道コーホート）

a. 5、6 歳の発達調査

発達障害は単独であられる場合ばかりでなく、併発する場合が少なくない。そこで本研究では、最初にASD、ADHDといった特定の障害に限定することなく、発達に関わる問題を広範に評価した後、それぞれの障害の特徴について詳しく検討することとした。そのため、図(1)-4に示す通り、SDQによる全般的な発達の問題の評価に加え、それぞれの発達障害に特異的な質問票を使用した。

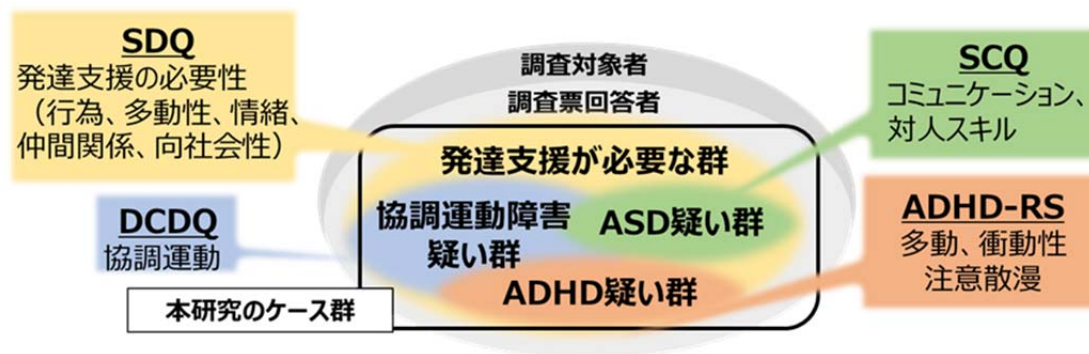
なお、参加者（養育者）への支援として、電話による育児問題についての問い合わせ、および調査票の自由記述により得た回答については保健師資格を持つスタッフが対応し、参加者の要望に応じて行政による育児相談等の窓口を紹介することとした。

以下に、本研究で用いた4つの調査票を示す。なお、本研究では多側面にわたる子どもの発達上の問題や協調運動障害をより若い時期に捉えるためにSDQとDCDQを5歳で実施し、次いでASDとADHDのスクリーニング調査票であるSCQとADHD-RSを6歳で実施した。

- **SDQ** (Strengths and Difficulties Questionnaire、強さと困難さの質問票)：広汎性発達障害・ADHD・行為障害のスクリーニングに用いる。SDQ は多側面にわたる子どもの行動上の問題を簡便に測定することができる質問票であり、ASD に特徴的な社会性・コミュニケーション能力の問題や、ADHD の特徴である多動性・衝動性についても評価できる。実際、最近のイギリスでの調査（5～15 歳を対象、N=18,232）では、ADHD の診断に SDQ が有効であることが示されている²³⁾。SDQ は一般集団を対象とした疫学研究では、世界的に最も広く使用されている質問票であり、日本においてもすでに標準化がされているため、発達障害に伴う全般的な行動の問題についてスクリーニングするために最適である。
行為面、多動性、情緒面、仲間関係、向社会性の5つの下位尺度がある。向社会性を除く4つの下位尺度の合計であるTDS (Total Difficulties Score) を算出し、TDSから支援の必要性が低いLow Need (13点未満)、支援の必要が中程度のSome Need (13-15点)、支援の必要性が高いHigh Need (16点以上) とする。本研究では、Some Needおよび、High Needを発達支援の必要性がある「発達支援必要疑い群」と定義した。
- **DCDQ** (Developmental Coordination Disorder Questionnaire：協調運動障害質問票)：協調運動障害 (DCD) のスクリーニングに用いる。ADHD と DCD を併せ持つ割合は、50%程度とされているため²⁴⁾、協調運動障害の傾向の評価には簡便かつ世界中の疫学研究で広く使用されている DCDQ を用いる。3 つの下位尺度「動作における身体統制 (6 項目)」「書字・微細運動 (4 項目)」「全般的協応性 (5 項目)」から成り、合計 15 項目に回答する。得点が高いほど協調運動機能が高いことを示し、本研究では、46 点以下を「協調運動障害疑い群」と定義した。
- **ADHD-RS** (Attention Deficit Hyperactivity Disorder-Rating Scale、ADHD スクリーニング質問票)：ADHD のスクリーニングに用いられ、「不注意」や「多動・衝動性」を詳しく評価できる。質問は 18 問で、不注意 (奇数問題項目)・多動性—衝動性 (偶数問題項目) の 2 つの下位尺度がある。2 つの下位尺度得点をあわせたものが合計点として算出される。本研究では、合計点が男児 14 点以上、女児 9.4 点以上を標準化された ADHD-RS 得点の上位 80%

と同等と判断し、「ADHD 疑い群」と定義した。

- **SCQ** (Social Communication Questionnaire、自閉症スクリーニング質問票：ASD の一次スクリーニングに用いられ、コミュニケーションスキルと対人機能を詳しく評価できる。40 問で「はい」・「いいえ」の二択で回答する。日本語版では問 5 はあてはまらないので、得点計算に含まない。SCQ 合計得点が 15 点以上の場合は診断を受けることが勧められる。本研究では、15 点以上を「ASD 疑い群」と定義した。



図(1)-4 5、6歳調査で実施した発達に関する調査の内容とアウトカムの関係

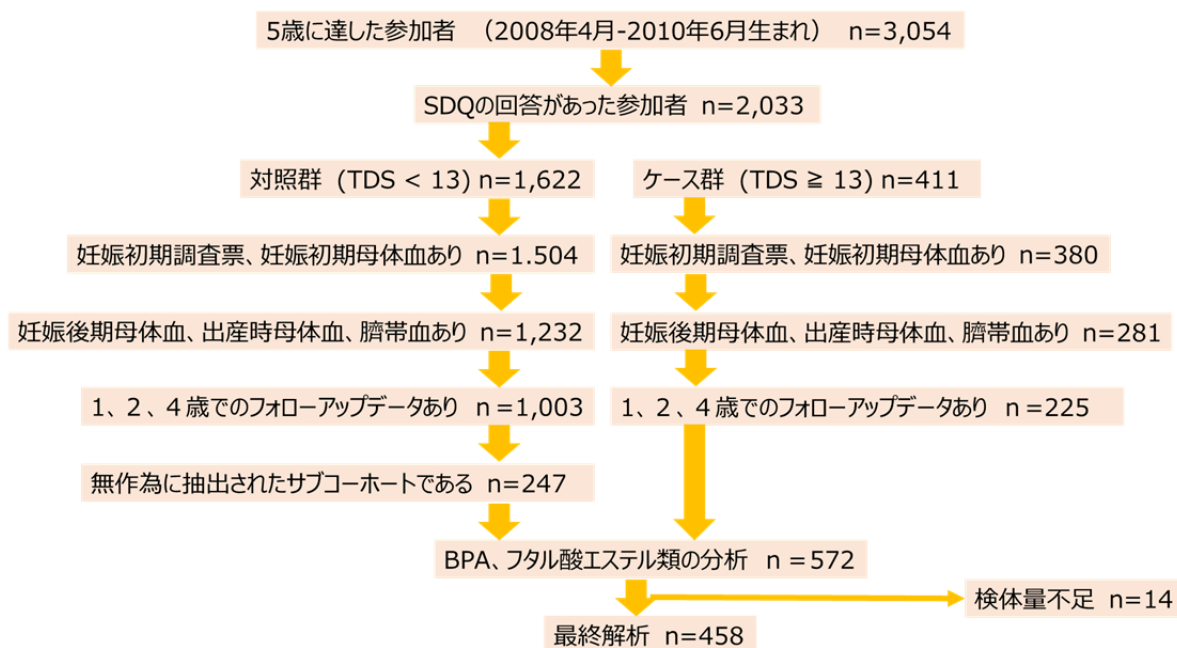
b. フタル酸エステル類、BPA の分析

環境化学物質の曝露評価には保存してある妊娠初期母体血清を用いた。BPAの分析は、同位体希釈ー液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (ID-LC-MS/MS) にて行った。定量下限値 (Method Quantification Limit; MDL) 未満の値にはMDLの1/2値を代入し、解析を行った。フタル酸エステル類は、4種類の親化合物ジ-n-ブチルフタル酸 (DnBP)、ジイソブチルフタル酸 (DiBP)、DEHP、ジイソノニルフタル酸 (DiNP) のそれぞれの代謝物モノ-n-ブチルフタル酸 (MnBP)、モノイソブチルフタル酸 (MiBP)、モノベンジルフタル酸 (MBzP)、MEHP (以上4物質は1次代謝物)、モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル)フタル酸 (MEHHP)、モノ(2-エチル-5-カルボキシペンチル)フタル酸 (MECPP)、モノカルボキシイソノニルフタル酸 (cx-MiNP) (以上3物質は2次代謝物) について、血液の前処理方法を含めLC-MS/MSを用いた分析法を検討・確立し、分析を行った。BPAおよびフタル酸エステル類代謝物の分析はいであ株式会社環境創造研究所で実施した。

c. 胎児期フタル酸エステル類、BPA 曝露と子どもの問題行動の関連の検討

子どもの問題行動については、SDQスコアをアウトカムとして、フタル酸エステル類、BPAの曝露評価を実施した。曝露評価の対象者は図(1)-5に示す通り、5歳で実施のSDQの調査データがあり、かつ妊娠初期調査票、妊娠初期(13週未満)母体血、新生児個票、出産時の母体血および臍帯血、妊娠後期母体血、1、2、4歳調査票が揃う者とした。SDQのTDSで定義されたケース群213名(TDSが13点以上)と対照群245名(サブコーホートかつ13点未満)のあわせて458名について、コーホート内ケース・コントロール研究として統計解析を行った。ロジスティック回帰モデルは、両親の年齢、母の妊娠前BMI、妊娠後期の母の母体血中コチニン値、妊娠中の世帯年収、児の性別、出生順、SDQに回答した月齢で調整した。

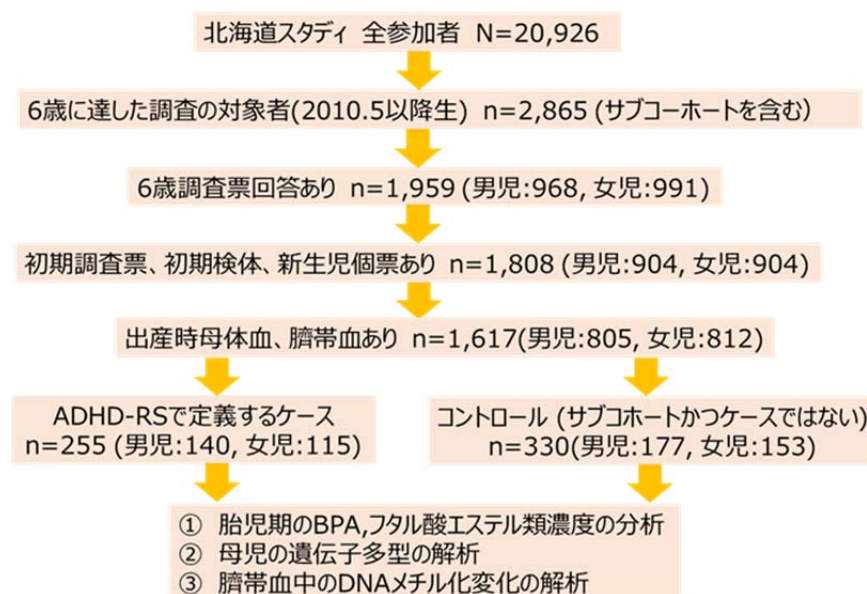
BPA、フタル酸エステル類代謝物濃度を用いて、6歳児のADHDとの関連をロジスティック回帰で解析した。分析用の試料不足の対象者を除き、最終解析は559名で行った。調整因子は、母の妊娠中のBMI、出産歴、妊娠後期の母の母体血中コチニン値、両親の教育歴、妊娠中の世帯年収と6歳調査時の世帯年収、両親の婚姻状況、ADHD-RSに回答した子どもの月齢とした。統計解析方法は、独立変数は、妊娠初期母体血中BPA、MnBP、MiBP、MBzP、MEHP、MEHHP、MECPP、cx-MiNP濃度を常用対数変換した値とした。従属変数は、6歳児のADHD-RS得点に基づくADHD疑いの有無とした。母の出産年齢、出産歴、妊娠後期母体血中コチニン値、両親の教育歴、世帯収入（妊娠中及び6歳調査時）、および両親の婚姻状況で調整した。



図(1)-5 SDQをアウトカムとした曝露評価対象者の選択フロー

d. 胎児期フタル酸エステル類、BPA曝露と子どものADHDの関連の検討

図(1)-6に示すとおり、6歳児のADHDケース・コホートスタディの対象者を選択した（平成28年5月末のデータ）。前述のとおり、ADHD-RSの合計点が男児で14点以上、女児で9.4点以上をADHD疑い（ケース）と定義したところ255名がケースとなった。対照群は、ケースと同様に6歳調査票の回答がある参加者のうち、初期調査票、初期検体、新生児個票があり、出産時母体血、臍帯血のあるものかつサブコホート集団であるものを選択したところ、330名となり、あわせて585名について、①胎児期のBPA、フタル酸エステル類濃度の分析、②母児の遺伝子多型の解析、③臍帯血中のDNAメチル化変化の解析を行った。なおサブコホート集団は、コホート全参加者（N=20,926）のうち、登録年次を考慮しランダムに抽出された4,869名（23.3%）である。



図(1)-6 ADHDケース・コホースタディの対象者

BPA、フタル酸エステル類代謝物濃度を用いて、6歳児のADHDとの関連をロジスティック回帰で解析した。分析用の試料不足の対象者を除き、最終解析は559名で行った。調整因子は、母の妊娠中のBMI、出産歴、妊娠後期の母の母体血中コチニン値、両親の教育歴、妊娠中の世帯年収と6歳調査時の世帯年収、両親の婚姻状況、ADHD-RSに回答した子どもの月齢とした。統計解析方法は、独立変数は、妊娠初期母体血中BPA、MnBP、MiBP、MBzP、MEHP、MEHHP、MECPP、cx-MiNP濃度を常用対数変換した値とした。従属変数は、6歳児のADHD-RS得点に基づくADHD疑いの有無とした。母の出産年齢、出産歴、妊娠後期母体血中コチニン値、両親の教育歴、世帯収入（妊娠中及び6歳調査時）、および両親の婚姻状況で調整した。

e. 一塩基多型遺伝子解析 (Single nucleotide polymorphisms; SNPs)

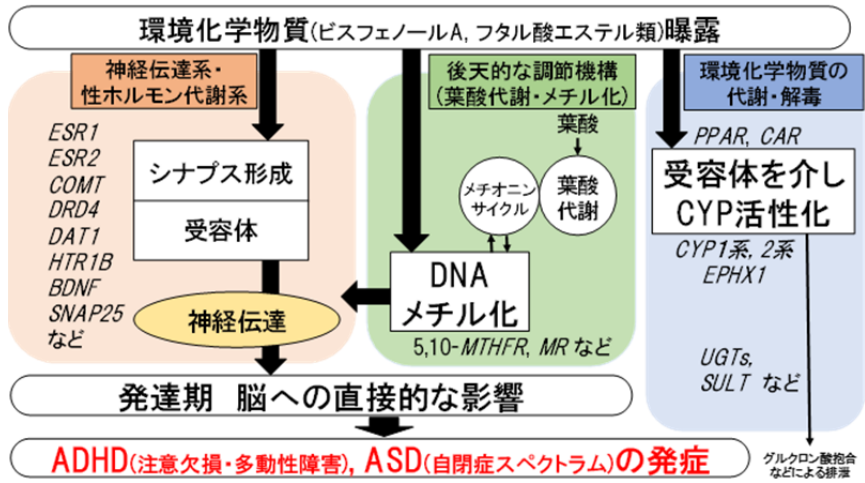
BPA やフタル酸エステル類などの環境化学物質曝露と神経発達障害発生のメカニズムとしては、これらの物質が直接神経細胞に入り、シナプス形成や神経伝達系受容体を介して神経伝達系に作用することが考えられる。胎児期以降の発達期において脳へ直接的な影響を与えることで ADHD や ASD の発症に至る可能性がある。また、環境化学物質曝露は後天性の遺伝的な調節機構である DNA メチル化にも作用し、神経シナプスや受容体遺伝子の発現を低下させる。さらに、環境化学物質は細胞にある受容体を介してシトクロム P450 (CYP) を活性化させ UDP-グルクロン酸抱合酵素 (UGTs) などを介して排泄される。これらの経路上にある遺伝子多型や DNA メチル化が、遺伝子の発現、または環境化学物質の濃度を調整し、ADHD や ASD の発症リスクを上げると仮説を立てた (図(1)-7)。これらの中から疾患の発症に影響を及ぼす、あるいは受容体や代謝酵素の遺伝子発現が異なることで代謝能に差が生じる SNPs で、かつ遺伝子頻度の低いアレルが日本人で 20% 以上いる可能性が高いことが既に報告されている遺伝子多型を解析候補とした (表(1)-1、2)。

遺伝子解析は、96 か所の SNP アッセイでかつ 96 名の DNA サンプルを使って 1 回で遺伝子型が判定できる、Fluidigm 社製マイクロフリューディック遺伝子解析 EP1 システムのダイナミックアレイ

を使っておこなった。母体血または臍帯血 400 μ L を Maxwell[®] 16 DNA Purification Kits に入れて、Maxwell[®] 16 Instrument (Promega 社製) を使用した。EP1 システムを用いたジェノタイピングの方法は図(1)-8 に示す。(Fludigm Corporation; South San Francisco, CA, USA)。ただし、3 回 SNP 解析しても遺伝子型が判定できなかったものは、統計解析の時には除外した。

胎児期フタル酸エステル類、BPAと6歳児のADHD疑いとの関連を検討したケース、対照群をあわせた585名のうち試料（母体血または臍帯血）不足であったものを除いた572名について、表(1)-1と表(1)-2に示す計34か所の一塩基多型（SNPs）を検討した。

その後、それぞれの遺伝子多型ごとに、独立変数は、妊娠初期母体血中BPA、MnBP、MiBP、MBzP、MEHP、MEHHP、MECPP、cx-MiNP濃度を常用対数変換した値とした。従属変数は、6歳児のADHD-RS得点に基づくADHD疑いの有無とした。母の出産年齢、出産歴、妊娠後期母体血中コチニン値、両親の教育歴、世帯収入（妊娠中及び6歳調査時）、および両親の婚姻状況で調整した。



図(1)-7 化学物質曝露と遺伝子多型によるADHD、ASDの発症（仮説）

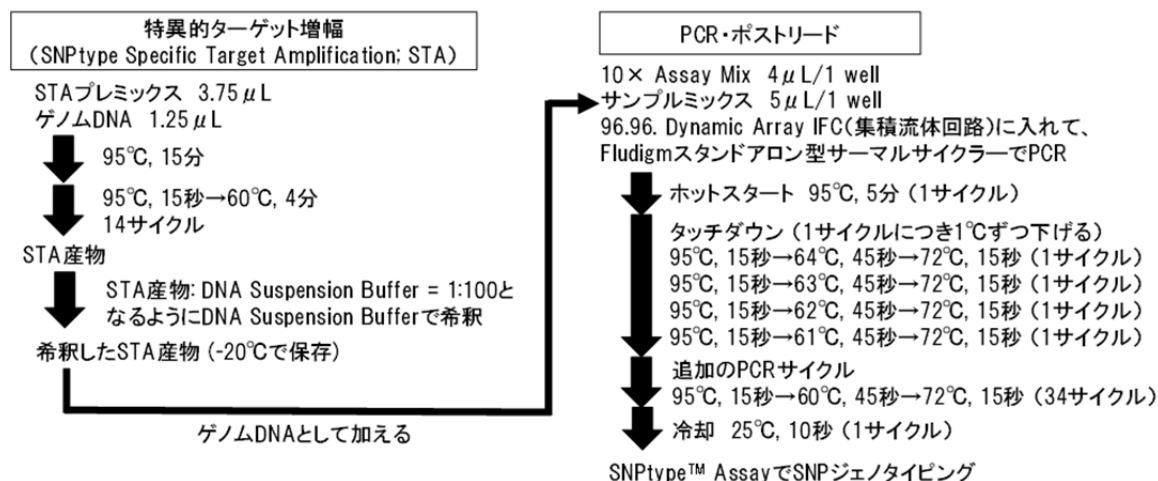
表(1)-1 母で検討した遺伝子多型

	遺伝子名	アレル	SNPデータベースID
化学物質受容体	PPARA	C/T	rs1800234
	PPARD	C/T	rs1053049
	PPARD	A/G	rs2267668
	PPARG	C/G	rs1801282
	PPARG	C/T	rs3856806
	PPARGC1A	C/T	rs2970847
	PPARGC1A	A/G	rs8192678
	CAR	A/G	rs2501873
	CAR	C/T	rs2307424
化学物質代謝・解毒経路	SULT1A1	A/G	rs9282861
	UGT1A1	A/G	rs4148323
	UGT2B10	A/G	rs4657958
	UGT2B15	G/T	rs1902023

表(1)-2 児で検討した遺伝子多型

	遺伝子名	アレル	SNPデータベースID
化学物質受容体	<i>PPARA</i>	C/T	rs1800234
	<i>PPARD</i>	C/T	rs1053049
	<i>PPARD</i>	A/G	rs2267668
	<i>PPARG</i>	C/G	rs1801282
	<i>PPARG</i>	C/T	rs3856806
	<i>PPARGC1A</i>	C/T	rs2970847
	<i>PPARGC1A</i>	A/G	rs8192678
	<i>CAR</i>	A/G	rs2501873
	<i>CAR</i>	C/T	rs2307424
化学物質受容体（性ホルモン関連）	<i>ESR1</i>	A/G	rs3020327
	<i>ESR1</i>	C/T	rs3020434
	<i>ESR1</i>	A/G	rs9340799
	<i>ESR1</i>	C/G	rs1801132
	<i>ESR1</i>	C/T	rs2234693
	<i>ESR1</i>	A/G	rs2077647
	<i>ESR1</i>	C/T	rs10475
	<i>ESR2</i>	A/G	rs1256049
化学物質代謝・解毒経路	<i>SULT1A1</i>	A/G	rs9282861
	<i>UGT1A1</i>	A/G	rs4148323
	<i>UGT2B10</i>	A/G	rs4657958
	<i>UGT2B15</i>	G/T	rs1902023
神経伝達系経路（疾患感受性遺伝子）	<i>DRD2</i>	C/T	rs1800497
	<i>DRD3</i>	C/T	rs6280
	<i>DAT1</i>	A/G	rs40184
	<i>DAT1</i>	C/T	rs27072
	<i>HTR1B</i>	C/G	rs6296
	<i>SLC30A8</i>	G/T	rs3019885
	<i>COMT</i>	A/G	rs4680
	<i>BDNF</i>	A/G	rs6265
	<i>SNAP25</i>	A/C	rs362987

PPARA, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *PPARD*, peroxisome proliferator-activated receptor delta; *PPARG*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *PPARGC1A*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; *CAR*, constitutive androstane receptor; *ESR1*, estrogen receptor 1; *ESR2*, estrogen receptor 2; *SULT1A1*, sulfotransferase 1A1; *UGT1A1*, UDP-glucuronosyltransferase 1A1; *UGT2B10*, UDP-glucuronosyltransferase 2B10; *UGT2B15*, UDP-glucuronosyltransferase 2B15; *DRD2*, dopamine receptor D2; *DRD3*, dopamine receptor D3; *DAT1*, dopamine transporter 1; *HTR1B*, 5-hydroxytryptamine (Serotonin) receptor 1B; *SLC30A8*, Solute carrier family 30, subfamily A, member 8; *COMT*, catechol-O-methyltransferase; *BDNF*, brain-derived neurotrophic factor; *SNAP25*, synaptosomal-associated protein 25.



図(1)-8 マイクロフリューイドック遺伝子解析EP1システムのプロトコール

f. 臍帯血DNAのエピゲノム解析

近年、DNA修飾に関する情報を広範囲かつ迅速に獲得できる手法が開発されてきた。その中で、イルミナ社の Infinium HumanMethylation450 BeadChip は迅速かつ経済的に、ヒトの全遺伝子の調節領域のエピゲノム (DNAメチル化) 情報を獲得できる解析システムである。具体的には、対象者の組織から抽出したDNAを化学処理し、メチル化と非メチル化の違いを塩基配列の違い (シトシンとチミン) に置き換え、同システムのビーズチップ上に吸着させ、メチル化DNAフラグメント (赤) と非メチル化DNAフラグメント (緑) から発せられる2色の蛍光輝度をスキャナー (iScan) によって読み取り、メチル化の度合いを把握する方法である。把握するゲノム上の個所は CpG 二塩基配列の約45万カ所で、約23,000のヒト全遺伝子の調節領域 (プロモーター領域内と上流と下流の近傍領域)、ならびに、一部の転写領域 (Gene body) である。

胎児期BPAおよびフタル酸エステル類曝露による児の臍帯血DNAメチル化への影響を遺伝子網羅的に検討するため、すでに臍帯血中BPAおよび母体血中フタル酸エステルDEHPの代謝物MEHPが測定済みの札幌コーホートを用いた。同意を得た妊婦514名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報がそろった母子292ペアの冷凍保存臍帯血400 μ LからMaxwell® 16 Instrument (Promega社製)、および、Maxwell® 16 DNA Purification Kitsを用いてDNAを抽出した。全292DNAサンプルについて、PicoGreen (Molecular Probes, Inc, USA) による2本鎖DNA定量と電気泳動法により過度な断片化がない良質なDNAであることを確認後、抽出した500 ngの臍帯血DNAをZymo EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) を用いて亜硝酸ナトリウムによるバイサルファイト処理を行った。HumanMethylation450 DNA Analysis Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) により、バイサルファイトDNA500ngを使用し、(1) 全ゲノム増幅、(2) 断片化処理 (300~600bp程度)、(3) HumanMethylation450 BeadChip (ヒト全遺伝子の調節領域 (プロモーター領域内およびその上流・下流の近傍領域) に存在する485,577カ所のCpG配列が搭載) 上へのハイブリダイゼーション、(4) 一塩基伸長反応、(5) 蛍光標識、(6) スキャナーによる読み取り (イルミナ社製スキャナーiScanを使用) の各工程を、G&Gサイエンス株式会社 (福島県松川町) で実施した。

i. 網羅的探索

➤ DNA網羅的メチル化データの取得

上記の工程で得られたアレイ上の485,577CpGs領域のメチル化データについて、(1) Infinium HumanMethylation450 BeadChip解析から出力されたデータの入力、(2) シグナル強度の確認、(3) QC (クオリティー・コントロール)と機能的標準化法(Functional normalization)による Normalization (正規化)²⁵⁾、(4) SNP重複プローブ、性染色体プローブ、他の部位との交差反応性の高いCross-reactive probe²⁶⁾の除去、(5) ComBat法²⁷⁾によるバッチ補正を行い、最終的に全292サンプルの426,413万CpGサイトの標準化したメチル化値(ベータ値)を得た。ベータ値は「メチル化/(メチル化+非メチル化+100)」の式で算出され、0から1の値をとる²⁸⁾。

➤ 網羅的メチル化解析

① 統計解析

標準化したメチル化値と曝露濃度との関連をロバスト線形回帰²⁹⁾、および経験ベイズ法³⁰⁾で解析した。臍帯血中BPA濃度、母体血中MEHP濃度はlog10変換後の値を用いた。BPAとの関連では母年齢、妊娠中母の喫煙、児性別、臍帯血細胞組成推定値³¹⁾、サロゲート変数³²⁾、MEHPとの関連では上記に加え母体血採血時期で調整した。多重比較補正のためにp値をBenjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR)法³³⁾により調整した。

② 曝露と関連するCpG部位の特徴

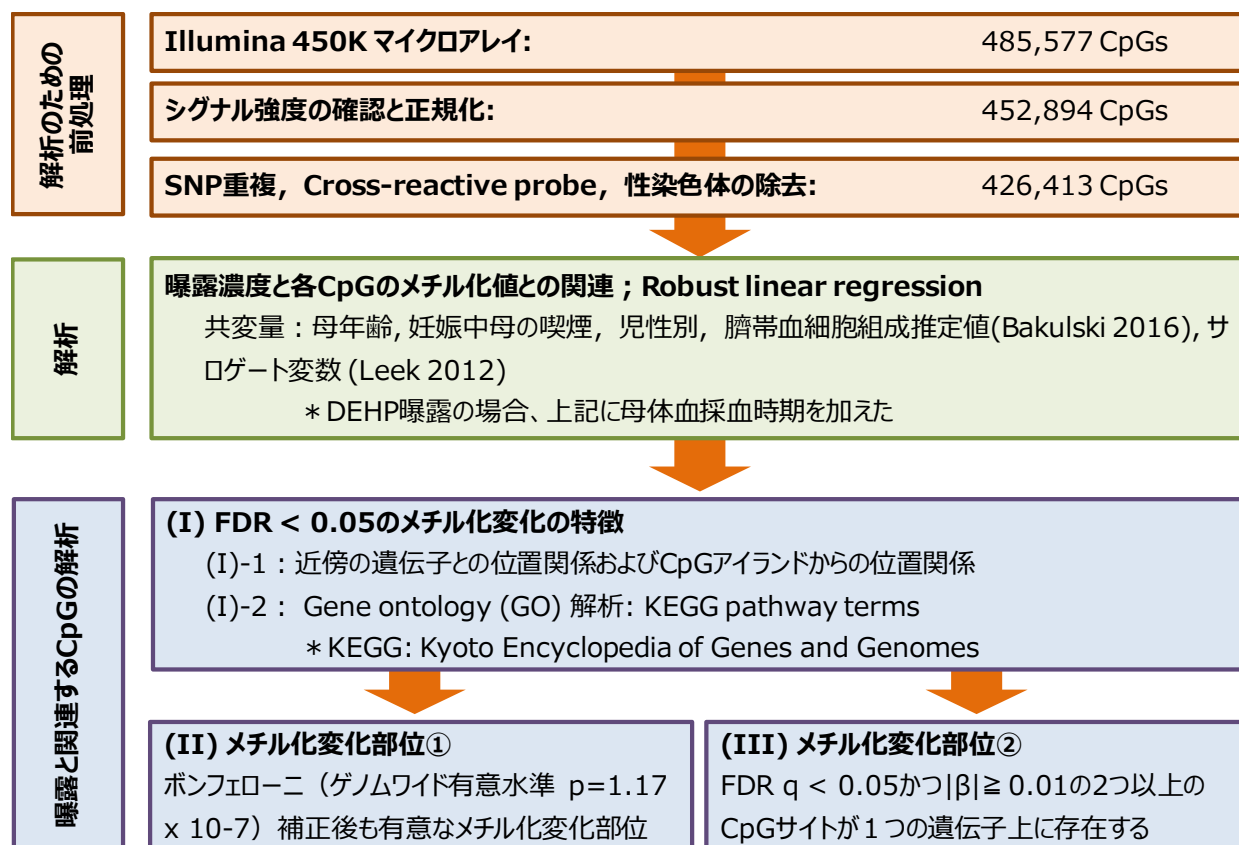
BPA、MEHP濃度との関連において、FDR $q < 0.05$ のCpGおよび426,413万CpGについての、近傍の遺伝子との位置関係、CpGアイランド(CpG配列が密集している領域)からの位置関係、さらに、メチル化変化に影響を受けやすい経路があるかを調べるため、CpG近傍遺伝子のKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathwayを調べた。

③ 曝露と関連するCpG部位の抽出

曝露と関連するメチル化変化部位を、先行研究で用いられた手法³⁴⁻⁴⁰⁾を参考に以下の抽出基準で同定した。

- メチル化変化部位：ボンフェローニ (ゲノムワイド有意水準 $p=1.17 \times 10^{-7}$) 補正後も有意なメチル化変化部位
- メチル化変化領域：FDR $q < 0.05$ でメチル化変化の方向 (メチル化増加、あるいは、減少) が同じ CpG サイトが同一遺伝子上に2つ以上存在する

網羅的メチル化解析のフローチャートを図(1)-9に示す。データ処理・統計解析は、R(ver. 3.3.2)、Bioconductor (ver.3.3) の minfi、sva、limma package、missMethyl、JMP (ver.12) を用いて行った。



図(1)-9 網羅的メチル化解析の方法

ii. 北海道コーホートでの結果検証 (Validation)

札幌コーホートとは別集団となる北海道コーホートを用いて、次世代シーケンサーによるバイサルファイトシーケンス法で網羅解析結果の検証を行った。検証するCpGサイトはメチル化変化の大きさも考慮し^{36, 41, 42)}、BPA曝露では、同一遺伝子上に位置するFDR $q < 0.05$ 、かつ、メチル化変化の方向が同じ2つ以上のCpGサイトで、抽出された複数のCpGサイトすべての偏回帰係数の絶対値 (メチル化変化の大きさ) が0.01以上である ($|\beta| \geq 0.01$) 7 CpGs領域 (3遺伝子) を検証候補とした。DEHP曝露では、上記の基準で抽出されたCpGサイト同士が隣接している領域を抽出し^{34, 37)}、IGR (Intergenic Region; 遺伝子間領域) に位置するCpGを除外した 11 CpGs領域 (4 遺伝子) を検証候補とした。検証候補選択までのフローを図(1)-10に示す。

初期調査票・出産時カルテ情報、母体血中のBPA濃度 ($n = 339$)、もしくは、MEHP濃度 ($n = 347$) のそろう母児ペアの臍帯血400 μ Lから、Maxwell® 16 Instrument (Promega社製)、および、Maxwell® 16 DNA Purification Kitsを用いてDNAを抽出した。UV法によるDNA濃度測定後、抽出した500 ngの臍帯血DNAをZymo EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) によりバイサルファイト処理を行い、メチル化率を次世代シーケンサーにより測定した。次世代シーケンサーによる解析は、ThermoFisher社製のIon Torrentシステムを使用し、①ライブラリーの調整、②テンプレート調整、③シーケンス・解析の順でアンプリコンシーケンスをサブ (2) 山梨大で行っている。

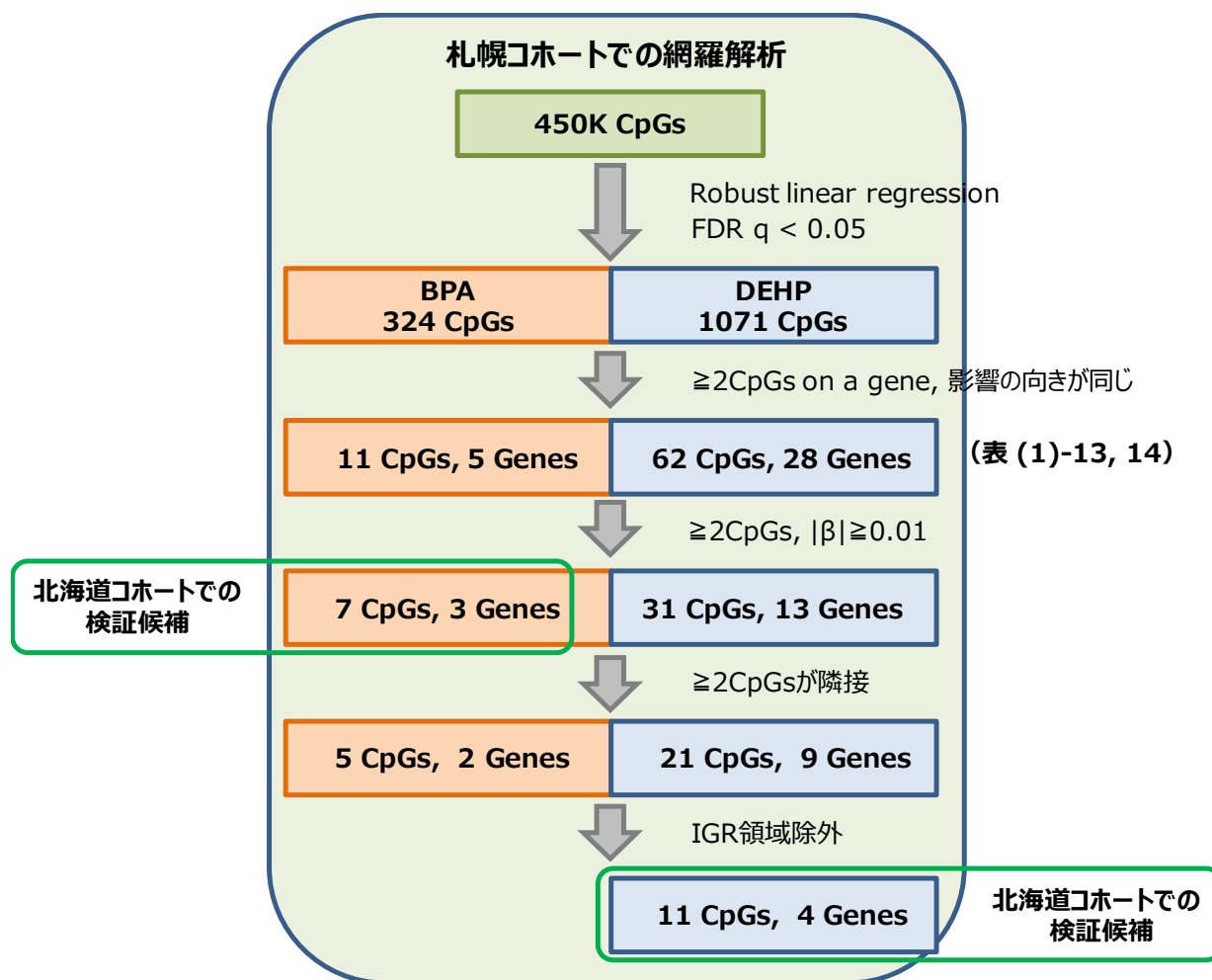


図 (1)-10 検証候補CpGサイトの選択フローチャート

iii. 曝露影響によるメチル化変化の神経発達への影響

曝露によるメチル化変化と神経発達との関連を検討するため、まず解析領域の抽出を行った。上述の検証解析候補領域に加え、曝露によりメチル化が変化する領域 (FDR $q < 0.05$) から、メチル化変化が大きく、神経発達に関連する遺伝子を抽出し解析候補領域とした。神経発達との関連については、遺伝子の機能をデータベースGeneCards (<http://www.genecards.org/>) を参考に調べ確認した。

選択したメチル化領域とADHDとの関連を検討するため、北海道コホートのADHDケース ($n = 245$)、対照群 ($n = 317$) の臍帯血DNAを用いて、次世代シーケンサーによるDNAメチル化解析をサブ (2) 山梨大で行っている。DNA抽出、バイサルファイト処理、および、次世代シーケンスは(ii)と同様に行った。また、プライマー設計、PCR増幅が出来なかった領域は除いた。

4. 結果及び考察

(1) エコチル追加調査（1.5歳の社会性発達調査）

平成26年10月より平成29年1月末までに、札幌地区と北見地区で合計3,569件に質問票を送付し、3,065件を回収した（回収率85.9%、平成29年1月末日付）。尿は2,064検体（回収率75.9%）を回収保存した。本研究の調査票回収率は85.9%と高く、これはエコチル本体調査への参加者を対象としているため、協力が得られやすかったためと考えられる。

本報告では、平成28年1月末までに回収した3,065件のうち、未回答項目があった場合を除いた2,794名の基本属性を表(1)-3に示す。ASD疑いは、2,794名中520名（18.6%）であった。厚生労働省「乳幼児健康診査に係る発達障害のスクリーニングと早期支援に関する研究成果（平成21年）」⁴³⁾によると、1歳6か月健康診査を受けた317名を調査したうち、ASD疑いは60名（18.9%）で本研究の結果と近似していた。厚生労働省の調査は、対象者が317名と小規模であったが、本研究は3,500名以上を対象とした比較的大規模な調査であった。本調査で得られたデータは、エコチル本体調査では3歳、5歳時に実施される発達調査（対人応答性尺度）の結果や、環境化学物質の分析データと将来的に連結させることができ、乳幼児期の発達障害の早期療養への応用に結び付けることができる貴重なものである。

M-CHATに基づくカットオフ値を超えるものと定義したASD疑いと対照群の母児の基本属性を比較したところ（表(1)-3）、対照群では年収が600万円以上の割合が高かった。ASD傾向への年収による影響については、ASDリスクが高い場合には高所得が多いとする米国の報告がある一方で⁴⁴⁾、低所得が多いとするスウェーデンの報告⁴⁵⁾があり、今後詳細な検討が必要である。また、ASD疑い群では母がASD傾向を持つ割合および妊娠後期にうつ傾向を持っていた割合が高かった。児の属性については、ASD疑い群では対照群と比較して第一子の割合が高かった。M-CHATは母が回答するため、第一子の場合には養育することへの関心の強さや不安が影響している可能性がある。なお、将来、エコチル本体調査のASD調査と組み合わせて、環境化学物質への曝露によるASD症状への影響について解明する予定である。

参加者支援については、回収したエコチル追加調査質問票の741件で、自由記述欄に「卒乳のタイミングがわからない」「お友達に乱暴してしまうことが多く心配」など、何らかの記載があった。そこで、比較的一般的な子育てへの不安や現状の報告などへの対応としては、子育てに関するトピックを集めた冊子を作成して返送した。一方、子育ての不安のみならず、深刻な状況に陥っている可能性のある、「いらいらして子どもをたたくなどしてしまう」「子どもをかわいと思えず今後が不安」などについては、保健師が電話するなど個別に相談に応じた。電話相談では不安が解決できなかった場合、およびM-CHATが不通過で1.5歳児健診を受けていなかった児37件については、電話による個別対応に加えて参加者の希望に応じて地域の乳幼児発達相談への紹介を行った。

表(1)-3 M-CHAT 調査の参加者の特徴

		ASD 疑い群 N=520(18.6%)		対照群 N=2274(81.4%)		<i>P</i>
母親の属性						
母年齢（歳）		31.4	±4.7	31.6	±4.8	0.93
教育歴：母（年）	≤9	76	(3.2%)	21	(3.7%)	0.30
	10-12	611	(25.5%)	162	(28.3%)	
	≥13	1711	(71.4%)	390	(68.1%)	
年収（円）	200 万未満	99	(4.3%)	30	(5.4%)	0.01
	200-400 万	799	(34.4%)	211	(37.7%)	
	400-600 万	787	(33.8%)	202	(36.1%)	
	600 万以上	641	(27.6%)	116	(20.8%)	
妊娠前期喫煙	あり	95	(3.9%)	23	(4.0%)	0.91
妊娠前期飲酒：母	あり	224	(9.3%)	44	(7.7%)	0.22
妊娠後期：母のうつ	あり	176	(7.2%)	56	(9.7%)	0.04
母の ASD 傾向（AQ）	あり	38	(1.6%)	25	(4.3%)	< 0.01
児の属性						
性別	男	1275	(52.2%)	319	(55.4%)	0.17
	女	1166	(47.8%)	257	(44.6%)	
在胎日数		274.0	±10.6	272.7	±13.1	0.24
出生体重（g）		3042.2	±417.6	2991.4	±461.5	0.20
出生順	第一子	919	(42.8%)	256	(51.0%)	< 0.01

（2）環境と子どもの健康に関する北海道スタディ

1）胎児期 DEHP、BPA 曝露と子どもの精神運動発達、知能、行動発達（札幌コーホート）

表(1)-4は各月齢で実施した発達検査とその得点分布を下位項目も含めて示したものである。BSID-IIはもともとイギリスで開発され、日本語に翻訳された検査であり、100が標準である。本集団の得点は標準よりもやや低い、BSID-IIは開発された国と文化背景が異なることが考えられる。一方K-ABCは、平均得点が100点に近かった。

表(1)-4 発達検査の得点の分布

年齢 (人数)	検査ツール	下位項目	得点範囲	平均 ± 標準偏差
6 months (n=150)	BSID-II	MDI	72-107	90.2 ± 5.9
		PDI	53-114	89.1 ± 11.2
18 months (n=105)	BSID-II	MDI	55-109	83.7 ± 11.2
		PDI	59-110	88.4 ± 11.4
42 months (n=86)	K-ABC	認知処理過程尺度	62-136	102.1 ± 14.6
		習得度尺度	65-138	100.0 ± 15.3
42 months (n=181)	CBCL	社会的適応尺度		
		総合的な問題	25-68	45.0 ± 9.4
		内向的問題	32-71	46.6 ± 8.7
		外交的問題	29-69	45.4 ± 9.2
		症状群尺度		
		不安神経質尺度	50-69	52.3 ± 4.1
		引きこもり尺度	50-74	52.2 ± 4.2
		依存分離尺度	50-70	52.2 ± 4.4
		睡眠・食事尺度	50-69	51.6 ± 3.4
		発達尺度	50-70	52.0 ± 4.3
		注意力尺度	50-100	52.4 ± 7.1
		反抗尺度	50-69	52.1 ± 4.3
		攻撃尺度	50-67	52.4 ± 4.1

BSID-II: Bayley Scales of Infant Development second edition, MDI: Mental development Index, PDI: Psychomotor development index, K-ABC: Kaufman assessment battery for children, CBCL: Child behavior checklist

a. 胎児期DEHP曝露による影響

6、18か月いずれかの精神、運動発達の結果がある127名について解析をおこなった。胎児期のDEHP曝露は、母親の妊娠中-後期血液中の一次代謝物MEHP濃度を用いた。母体血中MEHP濃度の中央値は、10.6 ng/mlであった。表(1)-5に示すとおり、MEHP濃度と子どもの6、18か月の精神、運動発達ともに関連は見られなかった。男女を層別化した場合にも、MEHP濃度との関連は認められなかった。母体血中MEHP濃度は、オーストラリアに妊婦⁴⁶⁾よりもやや高かったが、本研究の濃度では18か月までの子どもの精神、運動発達には影響を与えないことがわかった。

表(1)-5 母体血中MEHP濃度と6、18か月の精神運動発達の関連

BSID 6 month		N	β (95% CI)	p-value
MDI	全体	127	0.64 (-0.75, 2.03) ^a	0.365
	男児	64	-0.09 (-2.17, 1.98) ^b	0.929
	女児	63	1.17 (-0.83, 3.17) ^b	0.247
PDI	全体	127	-1.63 (-4.14, 0.88) ^a	0.202
	男児	64	-1.99 (-5.44, 1.47) ^b	0.254
	女児	63	-1.42 (-5.37, 2.53) ^b	0.474
BSID 18 month			β (95% CI) ^b	p-value
MDI	全体	97	0.49 (-3.19, 4.17) ^c	0.791
	男児	50	1.18 (-4.42, 6.78) ^d	0.674
	女児	47	0.28 (-5.80, 5.25) ^d	0.920
PDI	全体	97	-1.19 (-4.55, 2.17) ^c	0.483
	男児	50	0.31 (-5.23, 5.86) ^d	0.810
	女児	47	-2.86 (-7.54, 1.83) ^d	0.225

^a Adjusted for infant sex, gestational age, mother's age at delivery, maternal education, blood sampling period for MEHP measurement, caffeine intake during pregnancy (only for PDI).

^b Adjusted for gestational age, mother's age at delivery, maternal education, blood sampling period for MEHP measurement, caffeine intake during pregnancy (only for PDI).

^c Adjusted for gestational age, mother's age at delivery, maternal education, blood sampling period for MEHP measurement, family income (only for PDI), parity (only for PDI).

^d Adjusted for infant sex gestational age, mother's age at delivery, maternal education, blood sampling period for MEHP measurement, family income (only for PDI), parity (only for PDI).

BSID; Bayler Scale of Infant Development, MDI; Mental Development Index, PDI; Psychomotor Development index

b. 胎児期 BPA 曝露による影響

臍帯血中BPAの検出率は69.8%で、中央値は0.051ng/ml (IQR: <LOQ-0.076ng/ml) であった。検出率は米国の報告⁴⁷⁾92.6%と比較すると低かった。米国の報告は尿サンプルを用いたために、本研究の臍帯血中濃度と直接比較はできないが、BPAの摂取量は米国人のほうが日本人よりも高いと推定されるため⁴⁸⁾、本研究の検出率は妥当であると考えられる。臍帯血中濃度の検出下限値は、他の先行研究と比較して本研究では低く、濃度については、先行研究と比較しても低かった。

表(1)-6は臍帯血中BPA濃度と発達検査の得点の関係を示したものである。臍帯血中BPA濃度は、6、18か月の精神運動発達、42か月の知能には関連していなかった。一方、臍帯血中BPA濃度は、42か月の問題行動と関連がみられた。具体的には、総合的、内向的問題の増加、下位項目の発達、不注意の問題の増加と有意に関連し、さら外交的問題が有意ではないが増加傾向であった。

表(1)-7は子どもの性別で層別化した臍帯血中BPA濃度とCBCLの得点の関係を示したものである。臍帯血中BPA濃度と総合的な問題行動、内向的問題との関連は女兒で強かった。一方、注意力の問題との関連は男児で強かった。

以上から、臍帯血中BPA濃度は生後の子どもの発達や知能とは関連しないと考えられるが、問題行動とは関係すると考えられる。

表(1)-6 臍帯血中BPA濃度と発達検査の得点の関係

年齢 (人数)	検査ツール	下位項目	β (95% CI)
6 months (n=150)	BSID-II ^a	MDI	-1.91 (-5.31, 1.49)
		PDI	-2.15 (-8.56, 4.27)
18 months (n=105)	BSID-II ^b	MDI	0.51 (-6.72, 7.74)
		PDI	-0.55 (-8.28, 7.18)
42 months (n=86)	K-ABC ^c	認知処理過程尺度	1.92 (-8.65, 12.50)
		習得度尺度	0.14 (-10.07, 10.36)
42 months (n=181)	CBCL ^d	社会的適応尺度	
		総合的な問題	5.00 (0.35, 9.65)*
		内向的問題	4.59 (0.23, 8.94)*
		外交的問題	4.45 (-0.16, 9.06) ⁺
		症状群尺度	
		不安神経質尺度	0.79 (-1.25, 2.83)
		引きこもり尺度	1.69 (-0.44, 3.82)
		依存分離尺度	0.61 (-1.64, 2.85)
		睡眠・食事尺度	0.59 (-1.18, 2.35)
		発達尺度	2.61 (0.44, 4.78)*
		注意力尺度	3.72 (0.09, 7.34)*
		反抗尺度	1.40 (-0.75, 3.55)
		攻撃尺度	1.57 (-0.50, 3.64)

^a Adjusted for gestational age and tester.^b Adjusted for family income, paternal education, gestational age, child sex and tester.^c Adjusted for parental ages, family income, maternal smoking during pregnancy, maternal alcohol consumption, child sex and tester.^d Adjusted for maternal pre-pregnancy BMI and gestational age.* $P < 0.05$, ⁺ $p < 0.10$.

BSID-II: Bayley Scales of Infant Development second edition, MDI: Mental development Index, PDI: Psychomotor development index, K-ABC: Kaufman assessment battery for children, CBCL: Child behavior checklist

表(1)-7 子どもの性別で層別化した臍帯血中BPA濃度とCBCLの得点の関係

	男児	女児
社会的適応尺度	β (95% CI)	
総合的な問題	4.05 (-4.02, 12.11)	5.79 (0.13, 11.46)*
内向的問題	4.05 (-3.12, 11.22)	5.14 (-0.30, 10.58) ⁺
外交的問題	4.40 (-3.59, 12.38)	4.54 (-1.15, 10.22)
症状群尺度		
不安神経質尺度	2.38 (-1.17, 5.92)	-0.07 (-2.39, 2.24)
引きこもり尺度	3.31 (-0.23, 6.85)	0.61 (-1.97, 3.19)
依存分離尺度	0.28 (-3.28, 3.84)	0.95 (-2.00, 3.90)
睡眠・食事尺度	0.86 (-1.91, 3.64)	0.36 (-1.88, 2.58)
発達尺度	3.33 (-0.39, 7.06) ⁺	2.29 (-0.35, 4.93) ⁺
注意力尺度	6.71 (-0.23, 13.66) ⁺	1.85 (-1.98, 5.68)
反抗尺度	2.42 (-1.30, 6.13)	0.81 (-1.82, 3.44)
攻撃尺度	2.45 (-0.83, 5.73)	0.97 (-1.77, 3.72)

Adjusted for maternal pre-pregnancy BMI and gestational age. * $P < 0.05$, ⁺ $p < 0.10$.

CBCL: Child behavior checklist

2) 胎児期フタル酸エステル類、BPA 曝露と子どもの発達（北海道コーホート）

a. 5、6 歳の発達調査

平成28年12月末までに、5歳調査票は5,109名に発送し、3,492名から回答が得られた（回答率＝68.3%）。6歳調査票は3,805名に発送し、2,566名から回答が得られた（回答率＝67.4%）。質問票の発送は現在も継続中である。

表(1)-8はこれまでの回答を集計したものである（平成28年12月末）。WHOの報告では、幼児から青年期の問題行動など、精神発達障害はおおよそ20%の割合でみられるとされる⁴⁹⁾。本研究においても、広く問題行動を調査するSDQでの発達支援の必要性があるとされる割合は20.4%とWHOの報告と近似していた。また米国の統計では、ASDやADHDを含む発達障害は6人に1人（16.7%）で見られると報告されており⁵⁰⁾、本研究のADHD-RSの結果でも男児17.8%、女児16.4%がADHD疑い群となり、同じ程度の割合であった。SCQは2,566名のうちASD疑い群は17名（0.7%）であった。ASD疑い群は韓国の報告¹⁾2.6%、CDCの報告1.5%と比較すると低かった。

表(1)-8 質問票ごとの疑い（ケース）の定義とその人数

質問票	アウトカム	疑い（ケース）の定義	人数（%）
SDQ	発達支援の必要性	TDS ≥ 13	714/3,492 = 20.4%
DCDQ	協調運動障害疑い	得点 = 15-46	763/3,492 = 21.8%
ADHD-RS	ADHD疑い	男児) 得点 ≥ 14.0	228/1,278 = 17.8%
		女児) 得点 ≥ 9.4	209/1,276 = 16.4%
SCQ	ASD疑い	得点 ≥ 15	17/2,566 = 0.7%

SDQは子どもの問題行動や発達を広範囲にスクリーニングする一般的な質問票である。SDQの集計データ（平成27年12月末、2,553名）について、両親、子どもの基本属性を表(1)-9に、SDQのスコアを表(1)-10に示す。「TDS」、「行為」、「多動」、「仲間関係」は男児の得点が女児より高く、「情緒」、「向社会性」は女児の得点が男児より高かった。この結果は、Matsuishiら⁵¹⁾による日本の先行研究と類似していた。

表(1)-9 SDQ回答者の両親と子どもの基本属性

		人数(%) or 平均 ± 標準偏差
母の年齢 (歳)		30.9 ± 4.7
父の年齢 (歳)		33.0 ± 5.6
母の妊娠前 BMI (kg/m ²)		21.1 ± 3.3
出産歴	初産	959 (37.6)
	経産	1310 (51.3)
	不明	284 (11.1)
母の妊娠中の飲酒	はい	271 (10.6)
	いいえ	2193 (85.9)
	不明	89 (3.5)
母の妊娠中の血中コチニン値(ng/ml)	≤ 0.21	1210 (47.4)
	0.22-11.48	776 (30.4)
	≥ 11.48	199 (7.8)
	不明	368 (14.4)
母の教育歴	中学卒	87 (3.4)
	高校卒	921 (36.1)
	短大・専門学校卒	1108 (43.3)
	大卒以上	383 (15.0)
	不明	54 (2.1)
父の教育歴	中学卒	122 (4.8)
	高校卒	939 (36.8)
	短大・専門学校卒	611 (23.9)
	大卒以上	815 (31.9)
	不明	66 (2.6)
妊娠中の世帯年収 (百万円)	< 3	451 (17.7)
	3-5	952 (37.3)
	5-8	643 (25.2)
	≥ 8	186 (7.3)
	不明	321 (12.6)
5歳調査時の世帯年収 (百万円)	< 3	334 (13.1)
	3-5	892 (34.9)
	5-8	884 (34.6)
	≥ 8	313 (12.2)
	不明	130 (5.1)
5歳調査時の両親の婚姻状況	既婚	2375 (93.0)
	未婚/離婚/死別	165 (6.5)
児の性別	男児	1283 (50.3)
在胎期間 (日)		274 ± 11
出生体重 (g)		3014 ± 419
SDQを実施した月齢		65.3 (6.1)

表(1)-10 SDQ のスコア分布

	全体 (n=2553)	男児 (n=1285)	女児 (n=1268)	
	平均±標準偏差			P値
TDS (総合的問題)	8.73±5.06	9.39±5.28	8.06±4.73	<0.001
行為	2.16±1.60	2.31±1.65	2.02±1.54	<0.001
多動・不注意	3.17±2.18	3.58±2.27	2.76±2.01	<0.001
情緒	2.00±1.84	1.99±1.86	2.01±1.81	0.477
仲間関係	1.39±1.43	1.51±1.51	1.28±1.33	<0.001
向社会性	7.21±1.96	6.91±2.04	7.51±1.83	<0.001

Man-Whitney U test.

DCDQの集計データ（平成28年12月末、3,369名）のうち、総得点 ≤ 46 となった協調運動障害疑いは736名（21.8%）であった。表(1)-11に、DCD疑い群と対照群の基本属性の比較を示した。2群間で有意な差がみられたのは、母の妊娠前BMI、母の教育歴、妊娠初期の飲酒と喫煙、父の年齢、妊娠中の世帯年収であった。協調運動障害疑い群では、母の妊娠前BMIは高く、妊娠初期での飲酒、喫煙の割合は多く、高校卒以下の割合は多かった。父の年齢は有意に高く、母の年齢も有意ではないが高い傾向であった。妊娠中の世帯年収が500万円未満の割合は多かった。子どもの特徴では、協調運動障害疑い群で男児の割合が多く、在胎週数が36週以下の割合が多かった。また、5歳での世帯年収が500万円未満の割合が多かった。協調運動障害疑い群では、きょうだいを持つ割合が少なかった。また、協調運動障害疑い群では、すでに何らかの発達の問題を持つと診断を受けていたのは116名（15.8%）で、対照群の36名（1.4%）と比較すると高かった。また、SDQの得点も、SDQのスコアが13点以上であるケース群の割合は46.3%で、対照群の15.9%と比較すると多かった。

先行研究では、在胎期間の短さが協調運動障害のリスクと報告しており⁵²⁾、本研究の対象者の属性とも一致した。一方、本研究では質問票による妊娠中の母の喫煙は協調運動障害疑い群で多く、妊娠中の母のコチニン値と7歳での協調運動障害とは関連がないと報告した研究⁵³⁾とは、一致しなかった。本研究集団では、妊娠後期の母のコチニン値を測定しているので、今後はコチニン値と協調運動障害の疑いについても検討していく。

表(1)-11 協調運動障害疑い群と対照群の基本属性の比較

		対照群 (n=2,633)	疑い(ケース)群 (n=736)
両親		平均 ± 標準偏差	or 人数 (%)
母の年齢 (歳)		31.4 ± 4.7	31.7 ± 4.8
父の年齢 (歳)*		33.0 ± 5.5	33.5 ± 5.8
母の教育歴 (年)*	≤ 12	1049 (39.8)	321 (43.6)
	≥ 13	1567 (59.5)	409 (55.6)
父の教育歴 (年)	≤ 12	1121 (42.6)	315 (42.8)
	≥ 13	1478 (56.1)	411 (55.8)
妊娠中の世帯年収 (百万円)*	< 5	1462 (55.5)	444 (60.3)
	≥ 5	884 (33.6)	205 (27.9)
母の妊娠前BMI(kg/m ²)*		21.0 ± 3.1	21.6 ± 3.9
母の妊娠中の飲酒*	あり	241 (9.2)	89 (12.1)
母の妊娠中の喫煙*	あり	141 (5.4)	63 (8.6)
父の妊娠中の喫煙	あり	958 (36.4)	268 (36.4)
DCD調査時の世帯年収 (百万円)*	< 5	1228 (46.6)	389 (52.9)
	≥ 5	1272 (48.3)	304 (41.3)
子ども			
在胎期間 (日)		274.1 ± 10.2	273.3 ± 11.9
出生体重 (g)		3014 ± 404	3038 ± 450
性別*	男児	1244 (47.3)	457 (62.1)
	女児	1389 (52.8)	279 (37.9)
出生順	第一子	895 (34.0)	272 (37.0)
きょうだい*	あり	2156 (81.9)	574 (78.0)
発達障害の診断*	あり	36 (1.4)	116 (15.8)

Kruskal-Wallis test or Chi-square test, * p < 0.05

b. フタル酸エステル類、BPA の分析

平成 26～28 年の 3 年間で、659 名の母体血中のフタル酸エステル類代謝物と BPA の濃度分析を実施した。表(1)-12 には各物質の検出率と中央値、IQR を示す。MBzP、MEHHP、cx-MiNP の検出率は 10%未満と低かった。従って、以後の SDQ および ADHD との関連は検討しなかった。BPA の検出率は、札幌コホートの結果⁵⁴⁾と比較すると、検出率、濃度ともにやや増加していた。オーストラリアの妊婦⁴⁶⁾の血中濃度と比較したところ、MBzP、MECPP の濃度は本研究の対象者のほうが低く、一方 MiBP、MnBP は本研究で高かった。MEHP 濃度は同程度であった。この他の多くの先行研究では、胎児期のフタル酸エステル類、BPA 曝露は母の尿サンプルを用いて分析しているため、濃度の直接的な比較は難しい。

表(1)-12 母体血中フタル酸エステル類、BPAの濃度分布

親化合物	代謝物	MDL	検出率(%)	中央値	IQR(25 th , 75 th)
DBP	MnBP	0.57	100.0	26.0	17.0, 35.0
	MiBP	0.44	100.0	6.8	4.7, 9.1
BBzP	MBzP	0.19	7.6	<MDL	<MDL, <MDL
DEHP	MEHP	0.31	98.0	1.50	0.80, 9.10
	MEHHP	0.23	1.5	<MDL	<MDL, <MDL
	MECPP	0.11	90.7	0.21	0.13, 0.32
DiNP	cx-MiNP	0.12	0.3	<MDL	<MDL, <MDL
BPA		0.004	80.7	0.069	0.030, 0.298

c. 胎児期フタル酸エステル類、BPA曝露と子どもの問題行動(SDQ)の関連の検討

胎児期のBPA、フタル酸エステル類曝露とSDQを用いた子どもの問題行動との関連を検討した。解析にはSDQのスコアが13点未満である対照群245名と、SDQのスコアが13点以上であるケース群213名を含めた。表(1)-13には、解析に含まれた458名の基本属性をケース群と対照群別に示す。

ケース群では、両親の年齢は低かった。また、母の妊娠前のBMIは高く、母の妊娠後期コチニン値が>11.48である割合は高かった。妊娠中の世帯年収は500万円未満の割合が高かった。子どもの特徴としては、第一子である割合と男児である割合が高かった。さらに、ケース群ではSDQ回答時の両親が婚姻している割合がやや低く、世帯年収が500万円未満の割合が高い傾向であった。

表(1)-14には男女別で、SDQのTDSと項目別の対照群とケース群の人数と割合を示した。TDS、多動・不注意、向社会性について男女間で対照群とケース群の割合に有意な差がみられ、いずれの項目でも男児でケース群の割合が高かった。

表(1)-15に母体血中のBPA、フタル酸エステル類濃度を示す。全体の濃度の中央値は、BPA=0.062ng/ml、MnBP=26.0ng/ml、MiBP=7.0ng/ml、MEHP=1.40ng/ml、MECPP=0.20ng/mlであり、今回検討した中では、MnBPが最も高い濃度であった。ケース群と対照群で濃度の比較を行ったところ、BPAの濃度の中央値はケース群で対照群よりも高かった。一方、MnBPとMiBPの濃度はケース群で低い傾向であった。

表(1)-16には母体血中BPA、フタル酸エステル類濃度と5歳での問題行動の関連を示した。MECPP濃度の増加は、行為問題のリスクを増加した(OR=2.97, 95% CI, 1.45-6.11)。BPA濃度の増加は、向社会性の問題のリスクを増加した(OR=1.51, 95% CI, 1.07-2.13)。BPA濃度と、向社会性の問題のリスクの増加は男児で女児よりも強かった。さらに女児ではMECPP濃度の増加は、不注意・多動のリスクを増加させた(OR=5.74, 95% CI, 1.42-23.3)。

以上から、胎児期のフタル酸エステル類やBPAへの曝露は、5歳での問題行動と関連する可能性が示唆された。これは、札幌コーホートで臍帯血中BPA濃度が、42か月子どもの問題行動(特に内向的問題)と関連すると報告した結果とも一致する。引き続き、胎児期のフタル酸エステル類やBPAへの曝露と、生後の子どもの行動発達への影響を検討する必要があると考えられる。

表(1)-13 参加者の基本属性

		対照群 (n=245)	ケース群 (n=213)	p-value
母の年齢 (歳)		31.5 ± 4.3	29.8 ± 4.8	0.001
父の年齢 (歳)		33.4 ± 5.5	31.3 ± 5.1	<0.001
母の妊娠前BMI (kg/m ²)		20.7 ± 2.5	21.4 ± 3.3	0.038
母の妊娠後期コチニン値 (ng/ml)	≤ 0.21	151 (61.6)	97 (45.5)	0.001
	0.22-11.48	81 (33.1)	93 (43.7)	
	> 11.48	13 (5.3)	23 (10.8)	
母の教育歴 (年)	≤ 12	88 (35.9)	92 (43.2)	0.107
	≥ 13	154 (62.8)	118 (55.4)	
	不明	3 (1.2)	3 (1.4)	
父の教育歴 (年)	≤ 12	89 (36.3)	86 (40.4)	0.325
	≥ 13	154 (62.9)	123 (57.7)	
	不明	2 (0.8)	4 (1.9)	
妊娠中の世帯年収 (百万円)	< 5	125 (51.0)	133 (62.4)	0.001
	≥ 5	90 (36.7)	48 (22.5)	
	不明	30 (12.2)	32 (15.0)	
SDQ回答時の世帯年収 (百万円)	< 5M	111 (45.3)	111 (52.1)	0.083
	≥ 5M	123 (50.2)	88 (41.3)	
	不明	11 (4.5)	14 (6.6)	
SDQ実施時の両親の婚姻状況	はい	236 (96.3)	198 (93.0)	0.074
在胎期間 (日)		275.3 ± 8.2	275.4 ± 8.5	0.845
出生体重 (g)		3037 ± 339	3076 ± 383	0.392
子どもの性別	男児	122 (49.8)	128 (60.1)	0.027
	女児	123 (50.2)	85 (39.9)	
出生順	第一子	116 (47.3)	123 (57.7)	0.026
SDQ回答時月齢		67.3 ± 6.2	66.3 ± 6.3	0.117

Mean ± S.D. or n (%). Kruskal-Wallis test or Chi-square test.

表(1)-14 SDQ の項目別カットオフ値による人数

	男児 (n=250)		女児 (n=208)		p-value
	対照群	ケース群	対照群	ケース群	
TDS(総合的問題) (≥13)	122 (48.8)	128 (51.2)	123 (59.1)	85 (40.9)	0.027
行為 (≥4)	167 (66.8)	83 (33.2)	149 (71.6)	59 (28.4)	0.265
多動・不注意 (≥6)	165 (66.0)	85 (34.0)	167 (80.3)	41 (19.7)	0.001
情緒 (≥4)	173 (69.2)	77 (30.8)	131 (63.0)	77 (37.0)	0.161
仲間関係 (≥4)	210 (84.0)	40 (16.0)	184 (88.5)	24 (11.5)	0.170
向社会性 (≤5)	177 (70.8)	73 (29.2)	169 (81.3)	39 (18.7)	0.010

N (%). Chi-square test.

表(1)-15 フタル酸エステル類、BPA の濃度分布

Exposure	対照群 (n=245)		ケース群 (n=213)		P-value
	中央値	IQR (25 th , 75 th)	中央値	IQR (25 th , 75 th)	
BPA	0.054	0.022, 0.207	0.086	0.032, 0.353	0.015
MnBP	26.7	17.7, 37.6	24.7	17.0, 34.0	0.084
MiBP	7.4	5.3, 9.9	6.7	5.1, 8.9	0.089
MBzP	<MDL	<MDL, <MDL	<MDL	<MDL, <MDL	0.962
MEHP	1.42	0.82, 9.07	1.35	0.71, 9.25	0.561
MEHHP	<MDL	<MDL, <MDL	<MDL	<MDL, <MDL	0.623
MECPP	0.20	0.11, 0.30	0.21	0.12, 0.33	0.534
cx-MiNP	<MDL	<MDL, <MDL	<MDL	<MDL, <MDL	0.659

ng/ml. MDL: method detection limit. IQR: Inter quartile range.

表(1)-16 母体血中フタル酸エステル類、BPA 濃度と 5 歳での問題行動の関連

	BPA	MnBP	MiBP	MEHP	MECPP
全体 (n=458)	OR (95% CI)				
TDS(総合的問題) (≥13)	1.33 (0.97, 1.81)	0.53 (0.23, 1.21)	0.44 (0.18, 1.08)	0.95 (0.66, 1.37)	1.18 (0.60, 2.30)
行為 (≥4)	1.14 (0.83, 1.57)	1.40 (0.58, 3.38)	1.44 (0.55, 3.79)	0.82 (0.56, 1.20)	2.97 (1.45, 6.11)
多動・不注意 (≥6)	1.09 (0.76, 1.56)	1.12 (0.45, 3.15)	0.91 (0.37, 3.10)	1.27 (0.84, 1.91)	1.75 (0.80, 3.85)
情緒 (≥4)	0.95 (0.68, 1.33)	0.82 (0.34, 1.97)	0.56 (0.22, 1.45)	0.88 (0.60, 1.29)	0.64 (0.32, 1.28)
仲間関係 (≥4)	0.97 (0.63, 1.50)	0.98 (0.31, 3.10)	0.48 (0.15, 1.59)	0.79 (0.48, 1.31)	0.95 (0.38, 2.37)
向社会性 (≤5)	1.51 (1.07, 2.13)	0.98 (0.40, 2.43)	1.00 (0.38, 2.65)	0.89 (0.60, 1.34)	1.13 (0.54, 2.40)
男児 (n=250)	OR (95% CI)				
TDS(総合的問題) (≥13)	1.39 (0.89, 2.18)	0.60 (0.20, 1.85)	0.50 (0.15, 1.71)	0.85 (0.51, 1.42)	0.66 (0.25, 1.71)
行為 (≥4)	1.30 (0.84, 2.03)	1.29 (0.40, 4.13)	1.08 (0.30, 3.87)	0.81 (0.49, 1.34)	3.20 (1.19, 8.60)
多動・不注意 (≥6)	0.85 (0.52, 1.38)	1.34 (0.39, 4.58)	1.23 (0.31, 4.82)	1.15 (0.68, 1.94)	1.10 (0.41, 3.01)
情緒 (≥4)	0.97 (0.61, 1.56)	0.79 (0.24, 2.61)	0.53 (0.14, 1.93)	1.01 (0.59, 1.71)	0.63 (0.23, 1.72)
仲間関係 (≥4)	0.93 (0.51, 1.69)	0.87 (0.19, 4.07)	0.58 (0.11, 3.08)	0.70 (0.36, 1.38)	0.77 (0.22, 2.67)
向社会性 (≤5)	1.71 (1.07, 2.75)	0.77 (0.25, 2.40)	0.71 (0.20, 2.46)	1.04 (0.62, 1.75)	1.27 (0.48, 3.35)
女兒 (n=208)	OR (95% CI)				
TDS(総合的問題) (≥13)	1.30 (0.83, 2.06)	0.27 (0.07, 1.08)	0.25 (0.06, 1.10)	1.12 (0.65, 1.91)	2.33 (0.85, 6.39)
行為 (≥4)	1.05 (0.65, 1.71)	0.91 (0.20, 4.19)	1.44 (0.29, 7.26)	0.93 (0.51, 1.67)	4.03 (1.30, 12.5)
多動・不注意 (≥6)	1.67 (0.95, 2.94)	1.05 (0.17, 6.34)	0.94 (0.14, 6.41)	1.70 (0.85, 3.43)	5.74 (1.42, 23.3)
情緒 (≥4)	0.98 (0.59, 1.60)	0.46 (0.11, 2.02)	0.35 (0.07, 1.67)	0.80 (0.45, 1.42)	0.81 (0.29, 2.27)
仲間関係 (≥4)	1.13 (0.58, 2.20)	0.66 (0.09, 4.85)	0.18 (0.03, 1.37)	1.09 (0.48, 2.45)	1.20 (0.28, 5.14)
向社会性 (≤5)	1.38 (0.80, 2.38)	1.50 (0.29, 7.83)	1.70 (0.31, 9.33)	0.68 (0.34, 1.37)	0.76 (0.22, 2.67)

Adjusted for parental ages, maternal pre-pregnancy BMI, maternal cotinine levels, family income during pregnancy, child sex, birth order (first child or not), and child age at SDQ complete.

d. 胎児期フタル酸エステル類、BPA 曝露と子どもの ADHD の関連の検討

i. フタル酸エステル類、BPA濃度とADHD疑いの関連

表(1)-17は、本解析で対象とした胎児期の曝露評価と6歳でのADHD-RSの返答があったうち、ADHD疑い群の248名と対照群の311名の合計559名の児について、ADHD疑い群と対照群の両親と児の基本属性を比較したものである。ADHD疑い群と対照群では、出産歴、両親の教育、母の妊娠後期のコチニン値、妊娠中および生後の世帯年収、両親の婚姻状況に有意差が認められた。具体的には、ADHD疑い群で初産の割合が高く、両親の教育歴が高校卒までの割合が高く、コチニン値 $\geq 11.48\text{ng/ml}$ の割合が高く、世帯年収が500万円未満の割合が多く、未婚（シングルマザーまたはファザー）の割合が高い。第一子では内向的問題の増加、外交的問題や問題行動全般が増加するという先行研究とも、本研究のADHD疑い群で初産が多いことは一致した^{55, 56)}。また、両親の教育や世帯年収などの社会経済要因は、子どもの問題行動や発達とも深く関連することが報告されており、それらの先行研究と、本研究の集団におけるADHD疑いと両親の学歴や年収が低いことは同じであった⁵⁷⁾。さらに、妊娠中の喫煙⁵⁸⁾や未婚であることがリスクになる⁵⁹⁾といった先行研究の報告とも同じであった。

表(1)-18は、母体血中のフタル酸エステル類、BPA濃度をADHD疑い群と対照群で男女別に比較したものである。いずれの物質においても、ADHD疑い群と対照群で有意な濃度差はみられなかった。

表(1)-19は、ADHD疑いとなるオッズとフタル酸エステル類、BPA濃度の関連を検討した結果である。いずれの物質においても、オッズの有意な増加や減少とは関連がみられなかった。また、各物質の濃度とADHD疑いのオッズに対する児の性別による違いはみられなかった。

疫学研究では、これまでにスペインとアメリカにおける一般集団を対象とした報告では、いずれも胎児期のBPA曝露と子どものADHD傾向に関連がないことを示唆していた^{60, 61)}。本研究においても、母の妊娠中の血液中BPA濃度と、6歳での子どものADHDには関連は認められず、先行研究と同様の結果となった。

フタル酸エステル類曝露とADHDについては、先行研究は横断研究が中心だった。前向き研究は、スペインからの1報のみ⁶²⁾で、妊娠中の母の尿中の4種のDEHP 代謝物濃度の合計は、4歳、7歳でのADHD症状の減少と関連していた。一方、MBzP、MiBP、MnBP濃度は子どもの問題行動とは関連していなかった。本研究においても、検討した4種のフタル酸エステル類代謝物濃度(MnBP、MiBP、MEHP、MECPP)と、子どものADHDとは関連は見られず、先行研究と一致していた。

表(1)-17 ADHD疑い群と対照群の両親と児の基本属性の比較

属性		疑い群(n=248)	対照群(n=311)	p 値
両親		人数 (%) or	平均 ± 標準偏差	
母の年齢 (歳)		31.1 ± 4.5	31.6 ± 4.6	0.313
母の妊娠前BMI (kg/m ²)		21.1 ± 4.1	20.6 ± 3.4	0.060
出産歴	0	133 (53.6)	131 (42.1)	0.005
	≥ 1	106 (42.7)	170 (54.7)	
	不明	9 (3.6)	10 (3.2)	
母の教育歴	中学卒	11 (4.4)	4 (1.3)	0.013
	高校卒	107 (43.1)	115 (37.0)	
	短大・専門学校卒	99 (39.9)	139 (44.7)	
	大学卒以上	29 (11.7)	49 (15.8)	
	不明	2 (0.8)	4 (1.3)	
妊娠中世帯年収 (百万円)	< 300	61 (24.6)	49 (15.8)	<0.001
	300-499	93 (37.5)	108 (34.7)	
	500-799	42 (16.9)	86 (27.7)	
	> 800	10 (4.0)	28 (9.0)	
	Missing	42 (16.9)	40 (12.9)	
妊娠中の母の喫煙	あり	22 (8.9)	19 (6.1)	0.257
	なし	191 (77.0)	239 (76.8)	
	不明	35 (14.1)	53 (17.0)	
母の妊娠中飲酒	あり	35 (14.1)	39 (12.5)	0.614
	なし	208 (83.9)	263 (84.6)	
	不明	5 (2.0)	9 (2.9)	
母の妊娠中コチニン値 (ng/ml)	≤ 0.21	107 (43.1)	155 (49.8)	0.048
	0.22-11.47	94 (37.9)	101 (32.5)	
	≥ 11.48	26 (10.5)	23 (7.4)	
	不明	21 (8.5)	32 (10.3)	
婚姻状態	婚姻	201 (81.0)	286 (92.0)	0.001
	片親	25 (10.1)	12 (3.9)	
	不明	22 (8.9)	13 (4.2)	
5歳での世帯年収 (万円)	< 200	20 (8.1)	12 (3.9)	0.026
	200-299	20 (8.1)	21 (6.8)	
	300-499	84 (33.9)	106 (34.1)	
	500-799	73 (29.4)	102 (32.8)	
	> 800	18 (7.3)	44 (14.1)	
	不明	34 (13.7)	26 (8.4)	
父の年齢 (歳)		32.7 ± 5.9	33.1 ± 5.1	0.205
父の教育歴	中学卒	16 (6.5)	12 (3.9)	<0.001
	高校卒	112 (45.2)	107 (34.4)	
	短大・専門学校卒	60 (24.2)	77 (24.8)	
	大学卒以上	57 (23.0)	110 (35.4)	
	不明	3 (1.2)	5 (1.6)	
子ども				
性別	男児	133 (53.6)	161 (51.8)	0.662
	女児	115 (46.4)	150 (48.2)	
在胎週数 (日)		274.1 ± 9.3	275.2 ± 8.1	0.187
出生体重 (g)		3015 ± 370	3055 ± 348	0.173

表(1)-18 ADHD疑い群と対照群の化学物質の濃度の比較

男児	疑い群 (n=133)	対照群(n=161)	p 値
BPA (ng/ml)	0.546 ± 1.726	0.696 ± 1.945	0.699
MnBP (ng/ml)	27.57 ± 13.50	29.03 ± 17.57	0.982
MiBP (ng/ml)	7.37 ± 3.44	8.29 ± 5.34	0.576
MEHP (ng/ml)	5.46 ± 6.15	5.92 ± 6.70	0.771
MECPP (ng/ml)	0.28 ± 0.25	0.25 ± 0.17	0.216
女児	疑い群(n=115)	対照群 (n=150)	p 値
BPA (ng/ml)	0.928 ± 3.533	0.571 ± 2.633	0.530
MnBP (ng/ml)	26.45 ± 13.53	26.98 ± 15.23	0.954
MiBP (ng/ml)	7.47 ± 4.18	7.42 ± 4.35	0.955
MEHP (ng/ml)	5.33 ± 6.33	4.97 ± 7.11	0.760
MECPP (ng/ml)	0.25 ± 0.18	0.30 ± 0.74	0.499

Mann-Whitney U test.

表(1)-19 BPA、フタル酸エステル類濃度とADHD疑い群となるリスク

	BPA OR (95% CI)	MnBP OR (95% CI)	MiBP OR (95% CI)	MEHP OR (95% CI)	MECPP OR (95% CI)
男児	1.1 (0.7, 1.7)	0.8 (0.2, 2.8)	0.5 (0.1, 1.6)	0.8 (0.5, 1.4)	1.0 (0.3, 2.8)
女児	1.0 (0.7, 1.6)	1.1 (0.3, 4.2)	1.2 (0.3, 5.4)	0.9 (0.5, 1.6)	1.7 (0.6, 4.3)

調整因子：母の妊娠前BMI、出産歴、妊娠後期母のコチニン値、両親の教育歴、妊娠中と生後（6歳時）の世帯年収、婚姻状況、ADHD-RSを実施した月齢、BPAとフタル酸エステル類代謝物濃度はlog₁₀変換

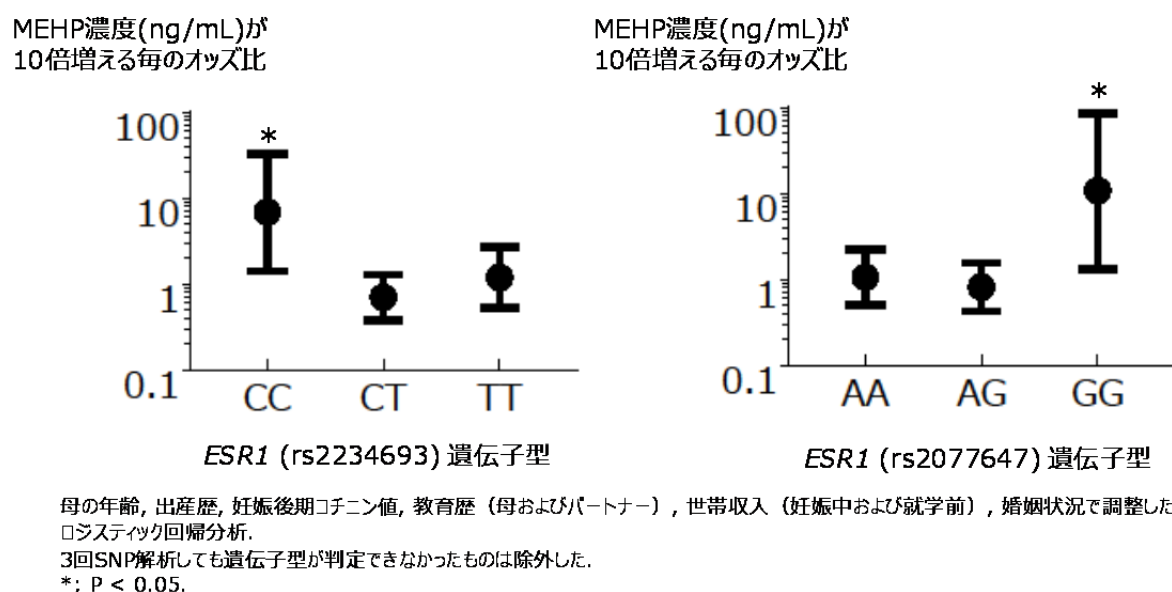
ii. 母児の遺伝子多型の解析

6歳ADHD疑いの有無は、母児の遺伝子型保有に違いはなかった（表なし）。MEHP濃度と6歳ADHDとの関連は、児のエストロゲン受容体1型（*ESR1*）遺伝子多型によって異なる可能性が示唆された（図(1)-11および表(1)-21）。*ESR1*（rs2234693）遺伝子のCC型をもつ児では、MEHP濃度が10倍増えると6歳でADHD疑いになるオッズ比は6.86（95%信頼区間（CI）：1.43-33.0）で有意に高かった。一方TT型、TC型をもつ児では、MEHP濃度と6歳のADHD疑いに有意な関連は認められなかった。*ESR1*（rs2077647）遺伝子のGG型をもつ児では、MEHP濃度が10倍増えるとオッズ比は10.8（95% CI：1.34-87.0）で有意に高かった。一方、AA型、AG型をもつ児では、MEHPとオッズ比に有意な関連は認められなかった。ただし、有意水準 $\alpha = 0.05$ の検定では、100回のうち5回は有意でないデータに対して有意（偽陽性）である結果が得られるため、本研究では31SNPsでそれぞれ3つの遺伝子型への影響を5つの化学物質濃度について検討していることを考慮すると、結果の解釈には注意する必要がある。これら以外の遺伝子型の違いによるMEHPと6歳ADHDとの関連はなかった。

MnBP、MiBPおよびBPA濃度と6歳のADHD疑いとの関連は、母児の遺伝子多型の違いによる違いは認められなかった（表(1)-20、21）。MBzP、MEHHP、およびcx-MiNPについては検出率が低かったため、検討できなかった（表なし）。

ヒトの*ESR1*（rs2234693；Pvu II）や*ESR1*（rs2077647）の遺伝子型の違いが、悪性腫瘍やB型肝炎ウイルス関連肝硬変のリスクの違いに影響を及ぼすと既に報告がある^{63, 64)}。本研究対象者では、MEHP濃度に児の*ESR1*（rs2234693およびrs2077647）の遺伝子型による差は認められなかった（表なし）。またこれらの遺伝子型と6歳ADHD疑いとの関連も認められなかった（表なし）。エストロゲンの*ESR1*遺伝子型の異なる受容体への親和性、MEHPとエストロゲン受容体への親和性と*ESR1*遺

伝子型との関連、およびこの受容体とADHDとの関連への影響については、ヒトの疫学研究のみならず動物実験でもまだ明らかになっていない。従って、本研究で見られたMEHP曝露と6歳ADHD疑いに及ぼす影響の*ESR1*(rs2234693およびrs2077647)の遺伝子型の違いについては、メカニズムの面からもエストロゲン受容体1型が関与してADHDを引き起こす可能性があるのか、今後さらに検討する必要がある。BPAについては、本研究では、母体血中BPAの中央値は0.068 ng/mL、幾何平均値は0.100 ng/mLであった。カナダの妊婦26名で母体血清および臍帯血清BPA濃度を検討した研究では、母体血清の平均値が1.36 ng/mLおよび臍帯血清の平均値が1.23 ng/mLであった⁶⁵⁾。さらにアメリカ・オハイオ州の出生コホートHOMEスタディ対象者である妊娠16週の母181名では、尿中BPAの幾何平均値は2.1 ng/mgであった。HOMEスタディの対象者では、BPA濃度の増加が脳発達に不可欠な児の甲状腺ホルモン値の低下に影響したと報告されている⁶⁶⁾。中国の労働者952名を対象にした研究では、尿中濃度 ($\mu\text{g/L}$) と静脈血清濃度 ($\mu\text{g/g}$) は近似した値をとるという報告から⁶⁷⁾、本研究の妊婦のBPA濃度はアメリカやカナダ地域の妊婦と比較して約30分の1であったと考えられる。本研究では、妊婦のBPAが低濃度であり児の脳発達に大きな影響を与えなかったため、胎児期BPA曝露と6歳ADHD疑いとの関連に影響が認められず、さらに母児の遺伝子多型の違いによる違いも認められなかったと考えられる。



図(1)-11 児のエストロゲン受容体 (*ESR1*) 遺伝子型の違いによるMEHP濃度と6歳のADHD疑いとの関連

表(1)-20 胎児期BPA、フタル酸エステル類と6歳のADHD疑いとの関連（母の遺伝子型別）

遺伝子名 (SNPデータ ベースID)	遺伝子型	人数	MnBP	MiBP	MEHP	BPA
			OR	OR	OR	OR
			(95% CI)	(95% CI)	(95% CI)	(95% CI)
<i>PPARA</i> (rs1800234)	CC	40	(-)	(-)	(-)	(-)
	CT	43	(-)	(-)	(-)	(-)
	TT	386	1.05 (0.40, 2.82)	4.47 (0.75, 26.7)	1.08 (0.70, 1.66)	0.95 (0.67, 1.34)
<i>PPARD</i> (rs1053049)	CC	24	(-)	(-)	(-)	(-)
	CT	161	3.92 (0.42, 36.5)	1.94 (0.16, 23.7)	0.70 (0.30, 1.64)	0.79 (0.38, 1.64)
	TT	282	1.40 (0.49, 4.04)	0.76 (0.24, 2.35)	1.53 (0.89, 2.62)	0.86 (0.57, 1.31)
<i>PPARD</i> (rs2267668)	AA	281	1.66 (0.57, 4.80)	0.89 (0.29, 2.76)	1.52 (0.88, 2.60)	0.86 (0.57, 1.30)
	AG	154	1.44 (0.16, 13.2)	0.65 (0.05, 8.61)	0.64 (0.27, 1.48)	0.90 (0.43, 1.85)
	GG	20	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>PPARG</i> (rs1801282)	CC	449	1.28 (0.51, 3.17)	0.79 (0.29, 2.12)	1.14 (0.75, 1.73)	0.99 (0.71, 1.38)
	CG	15	(-)	(-)	(-)	(-)
	GG	4	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>PPARG</i> (rs3856806)	CC	327	0.96 (0.33, 2.82)	0.53 (0.17, 1.70)	1.92 (1.15, 3.21)	0.91 (0.59, 1.40)
	CT	115	1.12 (0.12, 10.3)	0.61 (0.04, 8.89)	0.17 (0.05, 0.64)	0.87 (0.43, 1.79)
	TT	13	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>PPARGC1A</i> (rs2970847)	CC	278	0.89 (0.27, 2.91)	0.83 (0.24, 2.84)	1.29 (0.76, 2.19)	1.00 (0.66, 1.51)
	CT	168	2.36 (0.46, 12.2)	1.09 (0.17, 6.93)	0.85 (0.36, 2.01)	1.02 (0.53, 1.96)
	TT	21	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>PPARGC1A</i> (rs8192678)	AA	108	0.31 (0.04, 2.61)	0.30 (0.03, 2.92)	0.76 (0.28, 2.07)	0.96 (0.41, 2.42)
	AG	220	3.55 (0.71, 17.9)	1.80 (0.29, 11.3)	1.10 (0.54, 2.26)	0.80 (0.43, 1.49)
	GG	127	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>CAR</i> (rs2501873)	AA	148	1.39 (0.22, 8.70)	1.07 (0.15, 7.89)	1.15 (0.49, 2.71)	0.84 (0.41, 1.74)
	AG	252	2.85 (0.72, 11.2)	1.98 (0.44, 8.93)	1.46 (0.80, 2.67)	0.89 (0.55, 1.43)
	GG	67	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>CAR</i> (rs2307424)	CC	92	0.47 (0.03, 8.44)	0.72 (0.05, 11.3)	1.04 (0.33, 3.30)	1.24 (0.53, 2.93)
	CT	242	4.06 (1.03, 16.0)*	2.43 (0.54, 10.9)	1.69 (0.89, 3.21)	0.93 (0.55, 1.55)

	TT	121	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>SULT1A1</i> (rs9282861)	AA	0	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	124	0.54 (0.08, 3.85)	0.37 (0.03, 4.37)	1.21 (0.46, 3.15)	0.79 (0.37, 1.67)
	GG	343	2.21 (0.75, 6.50)	1.28 (0.41, 4.01)	1.25 (0.77, 2.01)	1.00 (0.67, 1.50)
<i>UGT1A1</i> (rs4148323)	AA	12	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	125	1.78 (0.27, 11.5)	0.80 (0.10, 6.40)	0.53 (0.20, 1.44)	0.55 (0.25, 1.22)
	GG	318	1.44 (0.46, 4.52)	0.93 (0.28, 3.11)	1.51 (0.90, 2.53)	0.69 (0.73, 1.21)
<i>UGT2B10</i> (rs4657958)	AA	50	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	222	1.60 (0.41, 6.24)	0.94 (0.20, 4.32)	1.07 (0.57, 2.00)	1.09 (0.62, 1.90)
	GG	194	0.73 (0.18, 3.02)	0.33 (0.07, 1.70)	1.65 (0.84, 3.26)	0.86 (0.52, 1.43)
<i>UGT2B15</i> (rs1902023)	GG	163	1.95 (0.22, 17.3)	1.92 (0.20, 18.2)	0.76 (0.35, 1.66)	0.75 (0.39, 1.43)
	GT	218	1.30 (0.40, 4.28)	0.69 (0.17, 2.72)	1.00 (0.55, 1.82)	0.82 (0.50, 1.35)
	TT	86	(-)	(-)	(-)	(-)

OR、 オッズ比. 95% CI、 95%信頼区間.

PPARA, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *PPARD*, peroxisome proliferator-activated receptor delta; *PPARG*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *PPARGC1A*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; *CAR*, constitutive androstane receptor; *SULT1A1*, sulfotransferase 1A1; *UGT1A1*, UDP-glucuronosyltransferase 1A1; *UGT2B10*, UDP-glucuronosyltransferase 2B10; *UGT2B15*, UDP-glucuronosyltransferase 2B15.

MBzP、MECPP、およびcx-MiNPは低検出率で検討できなかったのもので掲載していない.

3回SNP解析しても遺伝子型が判定できなかったものは除外した.

ORは濃度(ng/mL)が10倍増える毎のオッズ比を表す.

母の年齢、出産歴、 妊娠後期コチニン値、 教育歴（母およびパートナー）、 世帯収入（妊娠中および就学前）、 婚姻状況で調整したロジスティック回帰分析.

*, $P < 0.05$.

表(1)-21 胎児期BPA、フタル酸エステル類と6歳のADHD疑いとの関連（児の遺伝子型別）

遺伝子名	遺伝子型	人数	MnBP	MiBP	MEHP	BPA
			OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)
<i>PPARA</i> (rs1800234)	CC	3	(-)	(-)	(-)	(-)
	CT	56	(-)	(-)	(-)	(-)
	TT	424	1.46 (0.57, 3.75)	0.98 (0.35, 2.76)	1.14 (0.74, 1.75)	0.88 (0.62, 1.23)
<i>PPARD</i> (rs1053049)	CC	21	(-)	(-)	(-)	(-)
	CT	150	2.96 (0.35, 25.4)	3.70 (0.31, 43.8)	0.67 (0.28, 1.59)	1.08 (0.52, 2.24)
	TT	311	1.00 (0.35, 2.85)	0.50 (0.16, 1.56)	1.35 (0.82, 2.25)	0.86 (0.58, 1.28)
<i>PPARD</i>	AA	307	0.80	0.34	1.23	0.83

(rs2267668)	AG	131	(0.27, 2.34) 4.53 (0.45, 46.0)	(0.11, 1.12) 6.02 (0.47, 77.9)	(0.74, 2.02) 0.67 (0.27, 1.63)	(0.56, 1.23) 1.12 (0.52, 2.42)
	GG	19	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>PPARG</i> (rs1801282)	CC	454	1.40 (0.56, 3.51)	0.83 (0.31, 2.23)	1.17 (0.77, 1.78)	0.92 (0.66, 1.28)
	CG	29	(-)	(-)	(-)	(-)
	GG	0	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>PPARG</i> (rs3856806)	CC	323	1.27 (0.39, 4.16)	0.49 (0.13, 1.85)	1.31 (0.80, 2.16)	1.00 (0.67, 1.50)
	CT	122	1.22 (0.20, 7.46)	1.19 (0.17, 8.32)	0.50 (0.18, 1.43)	1.13 (0.51, 2.51)
	TT	12	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>PPARGC1A</i> (rs2970847)	CC	280	1.89 (0.55, 6.53)	1.18 (0.30, 4.65)	1.13 (0.66, 1.93)	1.03 (0.67, 1.59)
	CT	169	0.74 (0.14, 3.82)	0.39 (0.07, 2.14)	1.09 (0.48, 2.46)	0.60 (0.31, 1.16)
	TT	33	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>PPARGC1A</i> (rs8192678)	AA	95	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	237	1.91 (0.50, 7.37)	0.90 (0.23, 3.64)	0.89 (0.51, 1.57)	0.91 (0.59, 1.42)
	GG	125	0.61 (0.07, 5.71)	0.38 (0.03, 5.37)	2.15 (0.72, 6.46)	1.79 (0.73, 4.43)
<i>CAR</i> (rs2501873)	AA	164	4.01 (0.66, 24.4)	2.69 (0.35, 20.6)	1.03 (0.48, 2.21)	0.86 (0.49, 1.52)
	AG	235	1.12 (0.30, 4.25)	0.98 (0.23, 4.19)	1.39 (0.75, 2.60)	0.89 (0.53, 1.51)
	GG	83	1.41 (0.06, 35.6)	0.43 (0.01, 24.3)	0.27 (0.05, 1.44)	0.79 (0.23, 2.64)
<i>CAR</i> (rs2307424)	CC	96	0.49 (0.06, 4.10)	0.13 (0.01, 1.26)	1.01 (0.92, 1.12)	1.21 (0.83, 1.76)
	CT	235	1.60 (0.38, 6.81)	1.43 (0.30, 6.68)	1.03 (0.98, 1.08)	0.99 (0.86, 1.13)
	TT	126	1.57 (0.18, 13.4)	0.69 (0.06, 8.29)	0.97 (0.86, 1.08)	0.62 (0.28, 1.39)
<i>SULT1A1</i> (rs9282861)	AA	0	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	132	1.47 (0.18, 12.2)	1.10 (0.07, 16.6)	0.89 (0.35, 2.29)	0.95 (0.52, 1.73)
	GG	350	1.56 (0.53, 4.54)	0.97 (0.32, 3.01)	1.34 (0.82, 2.18)	0.89 (0.60, 1.33)
<i>UGT1A1</i> (rs4148323)	AA	16	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	131	1.36 (0.18, 10.2)	1.19 (0.17, 8.59)	0.97 (0.91, 1.05)	1.29 (0.84, 1.97)
	GG	310	1.11 (0.34, 3.69)	0.51 (0.14, 1.89)	1.02 (0.98, 1.07)	1.02 (0.91, 1.14)
<i>UGT2B10</i> (rs4657958)	AA	73	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	222	4.68 (0.19, 22.5)	2.95 (0.54, 16.0)	1.37 (0.67, 2.81)	1.24 (0.76, 2.01)
	GG	186	0.75	0.31	1.12	0.73

<i>UGT2B15</i> (rs1902023)	GG	157	(0.19, 2.93) 1.01 (0.13, 7.93)	(0.07, 1.52) 1.23 (0.16, 9.23)	(0.59, 2.13) 0.51 (0.22, 1.19)	(0.42, 1.29) 0.80 (0.43, 1.52)
	GT	227	1.70 (0.43, 6.69)	0.91 (0.20, 4.13)	1.21 (0.65, 2.24)	0.76 (0.46, 1.27)
	TT	98	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>ESR1</i> (rs3020327)	AA	45	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	217	2.97 (0.62, 14.2)	2.07 (0.37, 11.6)	1.00 (0.52, 1.99)	0.81 (0.49, 1.35)
	GG	195	0.86 (0.20, 3.79)	0.38 (0.08, 1.82)	1.83 (0.91, 3.67)	1.08 (0.65, 1.82)
<i>ESR1</i> (rs3020434)	CC	417	1.98 (0.72, 5.44)	1.52 (0.48, 4.86)	1.24 (0.80, 1.94)	0.97 (0.69, 1.36)
	CT	62	(-)	(-)	(-)	(-)
	TT	3	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>ESR1</i> (rs9340799)	AA	299	1.52 (0.48, 4.81)	0.83 (0.23, 2.97)	1.18 (0.72, 1.94)	0.97 (0.64, 1.46)
	AG	140	1.86 (0.28, 12.4)	0.70 (0.11, 4.68)	0.55 (0.21, 1.44)	0.74 (0.38, 1.44)
	GG	18	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>ESR1</i> (rs1801132)	CC	118	1.74 (0.20, 14.8)	0.68 (0.05, 10.0)	2.39 (0.78, 7.36)	1.08 (0.47, 2.46)
	CG	255	2.30 (0.66, 8.02)	1.18 (0.34, 4.12)	1.10 (0.63, 1.90)	0.90 (0.58, 1.38)
	GG	109	2.04 (0.14, 30.3)	2.92 (0.14, 62.3)	0.56 (0.18, 1.78)	0.67 (0.26, 1.73)
<i>ESR1</i> (rs2234693)	CC	86	0.38 (0.02, 7.57)	0.19 (0.01, 62.3)	6.86 (1.43, 33.0)*	1.39 (0.48, 3.97)
	CT	230	2.06 (0.48, 8.80)	1.36 (0.27, 6.94)	0.70 (0.38, 1.30)	1.09 (0.67, 1.76)
	TT	141	2.18 (0.31, 15.4)	0.38 (0.04, 3.32)	0.70 (0.38, 1.30)	0.55 (0.28, 1.07)
<i>ESR1</i> (rs2077647)	AA	161	1.45 (0.27, 7.87)	0.44 (0.08, 2.53)	1.07 (0.51, 2.25)	0.69 (0.38, 1.25)
	AG	212	3.11 (0.69, 14.0)	2.34 (0.42, 12.9)	0.82 (0.43, 1.55)	0.96 (0.56, 1.65)
	GG	82	0.12 (0.00, 8.28)	0.08 (0.00, 11.5)	10.8 (1.34, 87.0)*	1.58 (0.40, 6.18)
<i>ESR1</i> (rs10475)	CC	105	1.26 (0.20, 8.06)	0.87 (0.12, 6.05)	0.74 (0.24, 2.26)	0.51 (0.22, 1.20)
	CT	250	2.82 (0.76, 10.5)	2.44 (0.57, 10.4)	2.09 (1.12, 3.89)	1.04 (0.65, 1.66)
	TT	127	0.48 (0.04, 5.67)	0.04 (0.00, 0.77)	0.58 (0.25, 1.39)	1.22 (0.62, 2.41)
<i>ESR2</i> (rs1256049)	AA	42	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	202	0.57 (0.12, 2.65)	0.29 (0.06, 1.54)	0.90 (0.44, 1.85)	0.94 (0.54, 1.63)
	GG	239	2.48 (0.68, 9.01)	1.63 (0.39, 6.77)	1.19 (0.65, 2.18)	0.84 (0.52, 1.34)
<i>DRD2</i> (rs1800497)	AA	214	3.83 (0.86, 17.1)	2.55 (0.50, 13.1)	1.69 (0.86, 3.33)	1.01 (0.59, 1.73)
	AG	218	1.57	1.45	1.01	0.97

	GG	50	(0.33, 7.42) (-)	(0.27, 7.94) (-)	(0.55, 1.88) (-)	(0.60, 1.56) (-)
<i>DRD3</i> (rs6280)	CC	37	(-)	(-)	(-)	(-)
	CT	222	2.62 (0.59, 11.7)	1.37 (0.28, 6.69)	1.11 (0.57, 2.15)	1.32 (0.78, 2.23)
	TT	223	1.94 (0.49, 7.63)	1.46 (0.34, 6.38)	1.44 (0.78, 2.66)	0.74 (0.45, 1.20)
<i>DRD4</i> (rs3758653)	CC	23	(-)	(-)	(-)	(-)
	CT	155	0.64 (0.14, 3.01)	0.44 (0.08, 2.42)	1.84 (0.86, 3.97)	0.88 (0.46, 1.70)
	TT	304	4.67 (1.26, 17.4)	3.52 (0.83, 15.0)	0.99 (0.58, 1.71)	0.90 (0.60, 1.35)
<i>DAT1</i> (rs40184)	AA	12	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	131	0.91 (0.13, 6.23)	0.33 (0.05, 2.25)	0.74 (0.29, 1.94)	0.71 (0.32, 1.57)
	GG	339	2.02 (0.67, 6.11)	1.32 (0.39, 4.54)	1.51 (0.91, 2.49)	0.94 (0.64, 1.38)
<i>DAT1</i> (rs27072)	CC	290	1.61 (0.48, 5.47)	1.17 (0.32, 4.33)	1.07 (0.64, 1.79)	0.86 (0.57, 1.31)
	CT	145	1.16 (0.17, 7.78)	0.33 (0.05, 2.40)	2.77 (0.99, 7.73)	1.15 (0.57, 2.32)
	TT	48	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>HTR1B</i> (rs27072)	CC	92	9.03 (0.86, 95.1)	2.88 (0.32, 26.2)	1.57 (0.54, 4.54)	1.90 (0.85, 4.25)
	CG	250	0.46 (0.12, 1.72)	0.31 (0.06, 1.50)	0.81 (0.44, 1.50)	0.86 (0.51, 1.43)
	GG	140	1.62 (0.24, 10.8)	0.91 (0.11, 7.27)	1.59 (0.74, 4.66)	0.74 (0.38, 1.44)
<i>SLC30A8</i> (rs3019885)	GG	37	(-)	(-)	(-)	(-)
	GT	213	2.09 (0.49, 8.94)	1.33 (0.26, 6.84)	1.57 (0.82, 3.04)	0.80 (0.48, 1.34)
	TT	232	1.17 (0.30, 4.53)	0.56 (0.14, 2.28)	0.79 (0.42, 1.47)	0.96 (0.58, 1.59)
<i>COMT</i> (rs4680)	AA	36	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	188	1.03 (0.21, 5.11)	0.38 (0.06, 2.21)	1.38 (0.71, 2.72)	1.15 (0.68, 1.96)
	GG	233	0.95 (0.27, 3.41)	0.64 (0.16, 2.53)	0.78 (0.43, 1.41)	0.71 (0.44, 1.15)
<i>BDNF</i> (rs6265)	AA	65	(-)	(-)	(-)	(-)
	AG	242	3.74 (1.02, 13.7)	2.62 (0.63, 10.9)	1.38 (0.75, 2.53)	0.80 (0.49, 1.30)
	GG	176	0.36 (0.06, 2.17)	0.21 (0.03, 1.37)	0.66 (0.27, 1.58)	0.85 (0.47, 1.53)
<i>SNAP25</i> (rs362987)	AA	162	1.49 (0.29, 7.54)	1.28 (0.20, 8.08)	1.83 (0.85, 3.94)	0.71 (0.37, 1.35)
	AC	234	3.99 (0.94, 17.0)	1.47 (0.33, 6.48)	0.69 (0.37, 1.29)	0.82 (0.51, 1.31)
	CC	86	1.06 (0.05, 24.5)	1.77 (0.10, 31.9)	2.39 (0.53, 10.7)	1.23 (0.38, 4.05)

OR、オッズ比. 95% CI、 95%信頼区間.

PPARA, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *PPARD*, peroxisome proliferator-activated receptor delta; *PPARG*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *PPARGC1A*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; *CAR*, constitutive androstane receptor; *ESR1*, estrogen receptor 1; *ESR2*, estrogen receptor 2; *SULT1A1*, sulfotransferase 1A1; *UGT1A1*, UDP-glucuronosyltransferase 1A1; *UGT2B10*, UDP-glucuronosyltransferase 2B10; *UGT2B15*, UDP-glucuronosyltransferase 2B15; *DRD2*, dopamine receptor D2; *DRD3*, dopamine receptor D3; *DAT1*, dopamine transporter 1; *HTR1B*, 5-hydroxytryptamine (Serotonin) receptor 1B; *SLC30A8*, Solute carrier family 30, subfamily A, member 8; *COMT*, catechol-O-methyltransferase; *BDNF*, brain-derived neurotrophic factor; *SNAP25*, synaptosomal-associated protein 25. MBzP, MECPP、およびcx-MiNPは低検出率で検討できなかったため掲載していない。

3回SNP解析しても遺伝子型が判定できなかったものは除外した。

ORは濃度(ng/mL)が10倍増える毎のオッズ比を表す。

母の年齢、出産歴、妊娠後期コチニン値、教育歴（母およびパートナー）、世帯収入（妊娠中および就学前）、婚姻状況で調整したロジスティック回帰分析。

*; $P < 0.05$.

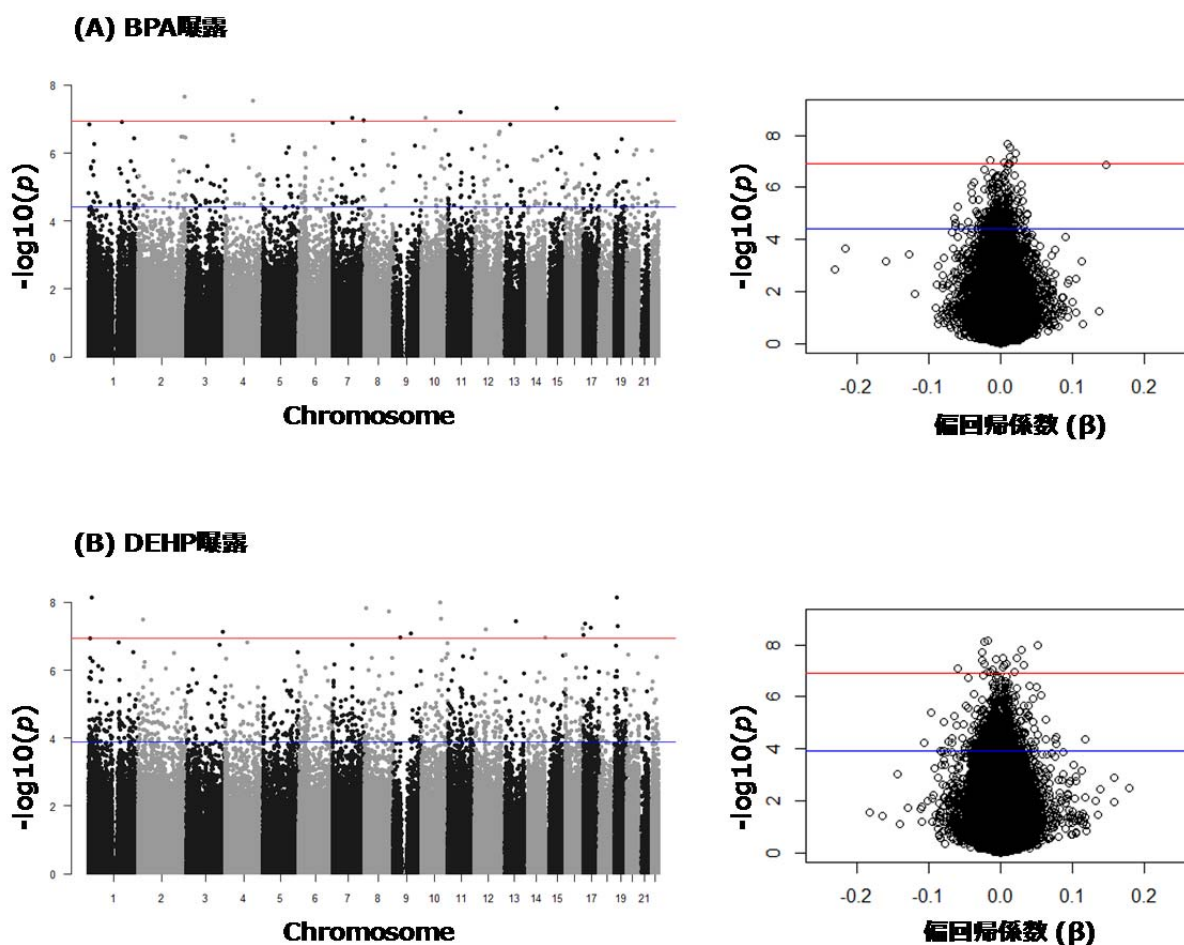
e. DNAのエピゲノム解析

i. 網羅的探索

曝露と関連するメチル化変化の特徴

臍帯血中BPA濃度（ $n=278$ ）の中央値は0.056 ng/mL（IQR: LOD-0.075）だった。BPA濃度と母児の属性との間にいずれも有意な関連は認められなかった。母体血中MEHP濃度（ $n = 204$ ）の中央値は10.34 ng/mL（IQR: 5.84-15.29）であり、母体血採血時期と有意な関連が確認された（ $p = 0.009$ ）。

図(1)-12にロバスト線形回帰によりBPA、DEHP曝露との解析を行った結果を示す（左図：マンハッタンプロット、右図：ボルケーノプロット）。BPA曝露では324 CpGs領域、DEHP曝露では1,071個のCpGs領域がFDR $q < 0.05$ （青線上部）であった。



図(1)-12 BPA曝露 (A) 、DEHP曝露 (B) と45万CpGsメチル化との関連

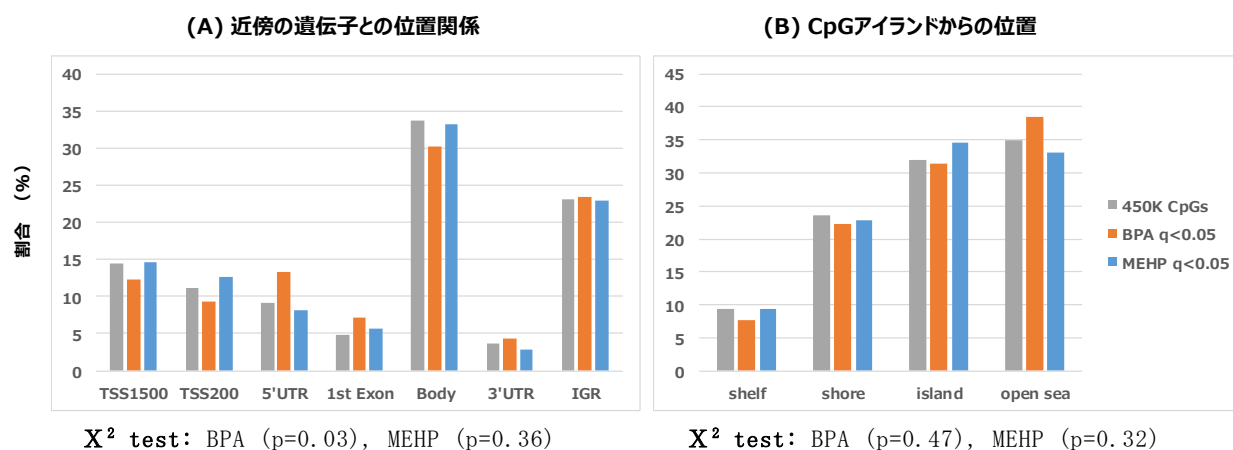
(左) マンハッタンプロット (横軸：染色体番号、縦軸： $-\log_{10}$ 変換したP値)

(右) ボルケーノプロット (横軸：偏回帰係数、縦軸： $-\log_{10}$ 変換したP値)

赤線：ボンフェローニ法での有意水準 ($p < 1.17 \times 10^{-7}$)

青線：False-discovery rateでの有意水準 (FDR $q < 0.05$)

BPA、MEHP濃度との関連において検出されたFDR $q < 0.05$ のCpGと全42万CpGsの (A) 近傍の遺伝子との位置関係、(B) CpGアイランドからの位置関係の違いについて、 χ^2 検定で確認した結果を図(1)-13に示す。BPA濃度との関連では、近傍の遺伝子との位置関係の割合が全42万CpGsの割合と異なり、転写開始点(TSS)、上流、および、bodyに位置するCpGが少ない一方、5' UTRおよび1st Exonに位置するCpGの割合が多かった。従って、プロモーター領域近傍に位置するCpGのメチル化は曝露の影響を受けにくいことが示唆された。また、CpGアイランドからの位置に関しては、有意な差は認められなかったが、open sea (CpGアイランドではない領域) に位置するCpG割合が大きかった。MEHP濃度との関連では、全45万CpGsとの構成に有意な差は見られなかったが、CpGアイランドに位置するCpGの増加、open seaに位置するCpGの減少が見られた。



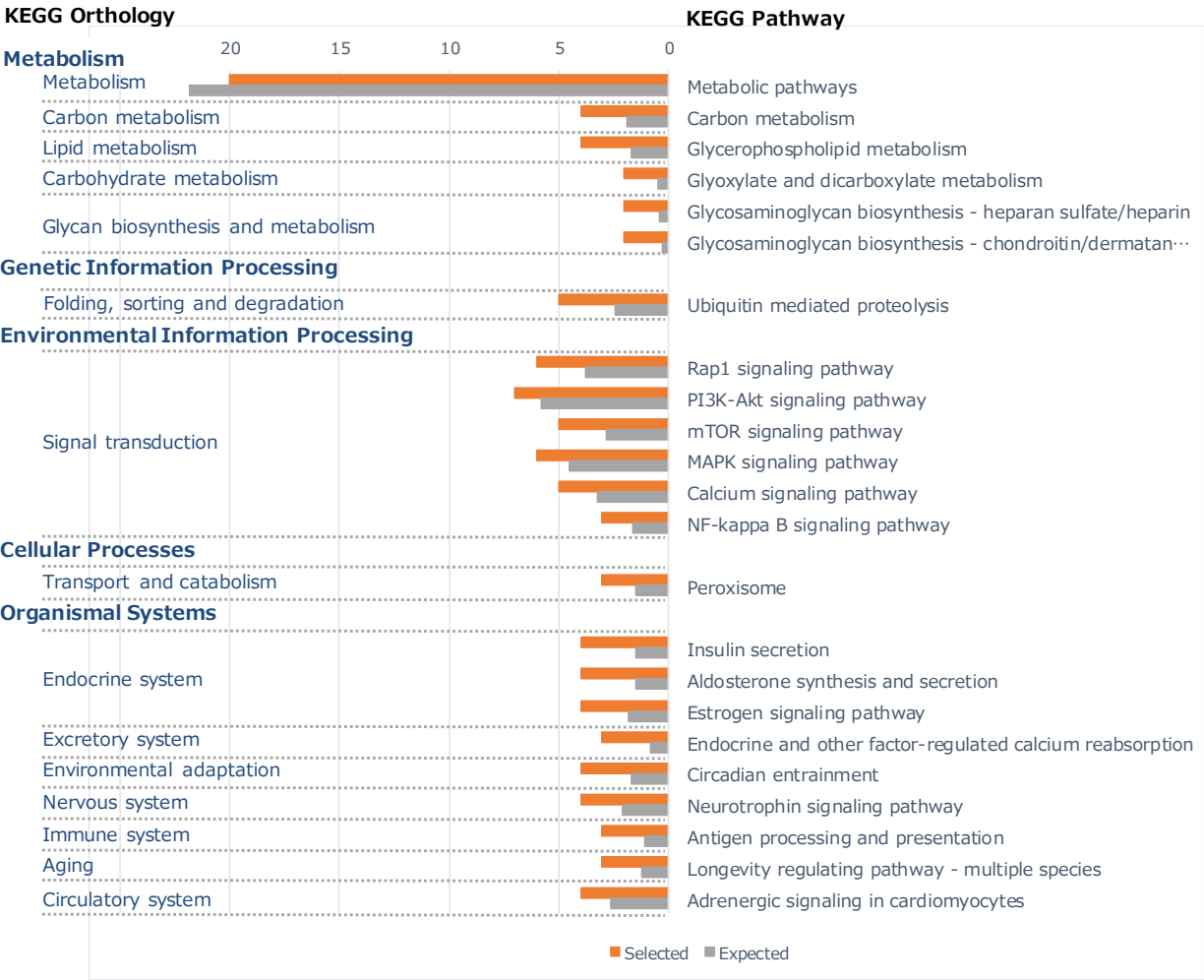
図(1)-13 BPA、DEHP曝露と関連の見られたCpGの位置の特徴

横軸：CpGの位置、縦軸：CpGの割合

次に、曝露によりメチル化変化に影響を受けやすい経路があるかを調べるため、FDR $q < 0.05$ のCpG近傍遺伝子のKEGG pathway分布を42万CpG近傍遺伝子の経路分布と比較した。結果を図(1)-14および図(1)-15に示す。BPA曝露についてはFDR $q < 0.05$ の経路、DEHP曝露に関してはFDR $q < 5 \times 10^{-4}$ の経路を示した。図の左はKEGG Orthology (分類)、右はKEGG Pathway (経路)を示す。312のKEGG pathwayの中で、BPA曝露(図(1)-14)と関連していたのは(FDR $q < 0.05$)、Human Disease分類に属するものを除いて、23経路であった。23経路を分類別に図(1)-14に示した。Signal transductionおよびEstrogen signaling pathwayを含むEndocrine systemの遺伝子増加が見られた。

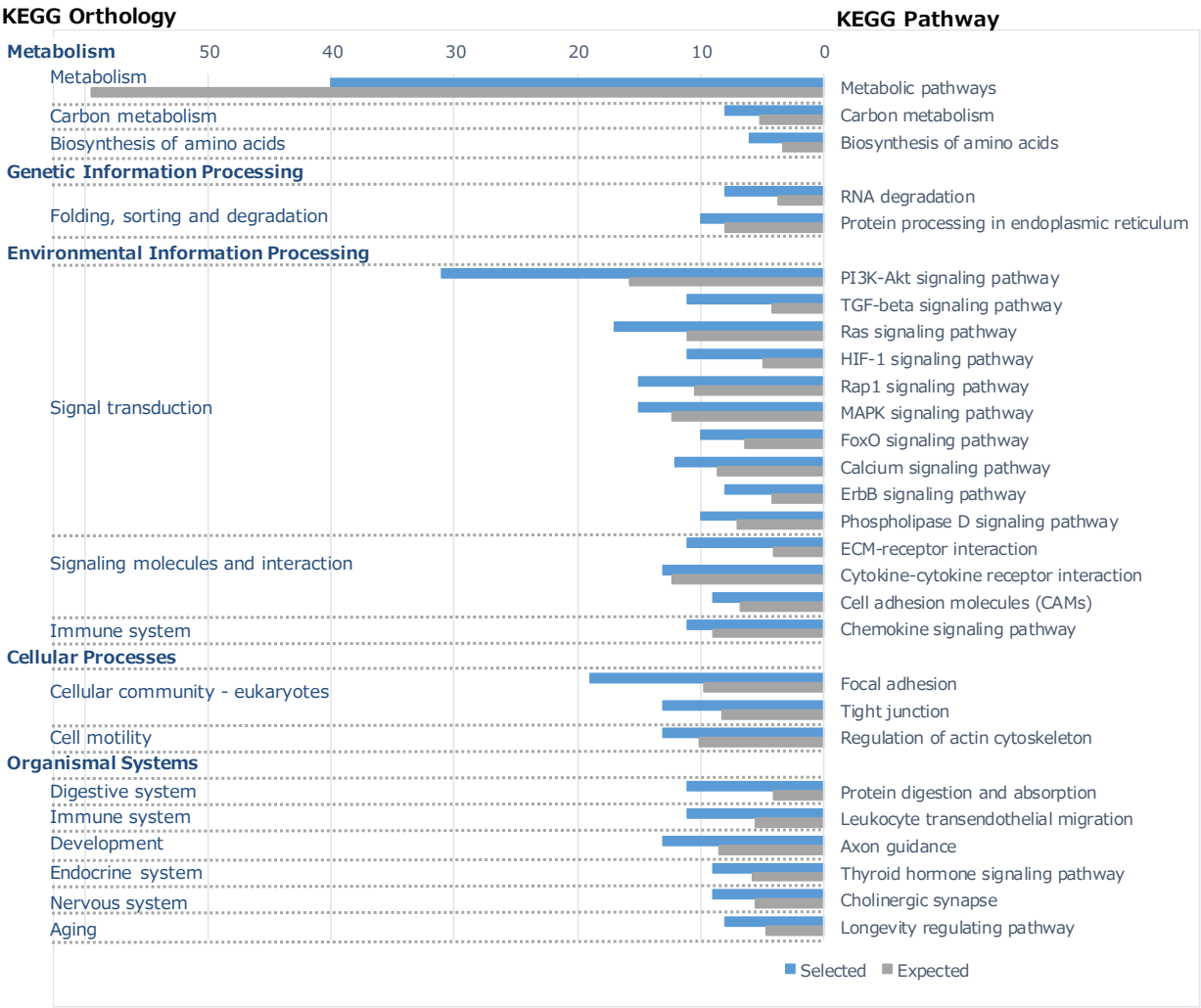
DEHP曝露では、312 KEGG pathwayの中でFDR $q < 0.05$ の経路は、Human Disease分類に属するものを除いて、88経路であった。図(1)-15には、FDR $q < 5 \times 10^{-4}$ の28経路を分類別に示した。BPA曝露同様、Metabolic pathwaysに含まれる遺伝子が減少し、Signaling transductionの遺伝子増加が見られ、DEHP曝露によっても、Signaling pathwayが影響を受けやすい可能性が考えられた。

一方、BPA曝露、DEHP曝露共にNervous systemに属する遺伝子の変動しており、また、Signaling transductionは神経系を含む様々な経路に関わっている。胎児期BPA、DEHP曝露による神経系への影響は疫学研究、in vivo/vitroの実験系で報告されており⁶⁸⁾、曝露による神経発達への影響にメチル化変化が関与する可能性が考えられる。



図(1)-14 GO (KEGG Pathway Enrichment) 解析 : BPA曝露

BPA曝露と関連する (FDR $q < 0.05$) CpG近傍遺伝子の有意に出現変動が認められた経路 (FDR $q < 0.05$) ;
左部 : KEGG Orthology (分類)、右部 : KEGG Pathway (経路)



図(1)-15 GO (KEGG Pathway Enrichment) 解析 : DEHP曝露

DEHP曝露と関連する (FDR $q < 0.05$) CpG近傍遺伝子の有意に出現変動が認められた経路 (FDR $q < 5 \times 10^{-4}$) ;
左部 : KEGG Orthology (分類)、右部 : KEGG Pathway (経路)

曝露と関連するCpG部位の抽出

曝露と関連するメチル化変化部位として、ボンフェローニ (ゲノムワイド有意水準 $p=1.17 \times 10^{-7}$) 補正後も有意なメチル化変化部位を抽出した。図12のマンハッタンプロットに示すように、BPA曝露では7 CpGs領域、DEHP曝露では19 CpGs領域がボンフェローニ補正後も有意だった (赤線上部)。それぞれの曝露により抽出されたCpGs領域を表(1)-22、23に示す。

表(1)-22 BPA曝露：ゲノム有意水準 ($p=1.17 \times 10^{-7}$) 以下の7 CpGs領域

	CpG No	遺伝子	P値	偏回帰係数 (メチル化変化)	染色体 番号	遺伝子内 領域	CpG アイランド
1	cg27273141	<i>SH3BP4</i>	2.16E-08	0.0110	2	IGR	open sea
2	cg21834908	<i>NAA15</i>	2.87E-08	0.0133	4	Body	open sea
3	cg25970356	<i>MYO1E</i>	4.68E-08	0.0207	15	Body	open sea
4	cg05109931	<i>CDC42BPG</i>	6.39E-08	0.0129	11	3'UTR	shelf
5	cg11914962	<i>BHLHA15</i>	9.02E-08	0.0185	7	1stExon	shore
6	cg16271833	<i>MIR1915</i>	9.47E-08	-0.0143	10	IGR	open sea
7	cg01410440	<i>DNAJB6</i>	1.09E-07	0.0058	7	Body	island

神経発達との関連が示唆されている遺伝子

表(1)-23 DEHP曝露：ゲノム有意水準 ($p=1.17 \times 10^{-7}$) 以下の19 CpGs領域

	CpG No	遺伝子	P値	偏回帰係数 (メチル化変化)	染色体 番号	遺伝子内 領域	CpG アイランド
1	cg16674264	<i>KIAA1026</i>	7.14E-09	-0.0166	1	Body	open sea
2	cg18039296	<i>LPPR2</i>	7.29E-09	-0.0219	19	TSS1500	shore
3	cg11380830	<i>NOC3L</i>	1.02E-08	0.0515	10	TSS1500	shore
4	cg13519851	<i>XKR6</i>	1.50E-08	0.0297	8	Body	shore
5	cg01388243	<i>KLHL38</i>	1.90E-08	-0.0248	8	1stExon	open sea
6	cg27165884	<i>MARVELD1</i>	3.07E-08	0.0231	10	TSS1500	island
7	cg10403036	<i>C2orf28</i>	3.30E-08	0.0038	2	TSS1500	island
8	cg05004337	<i>DIS3</i>	3.64E-08	-0.0056	13	TSS200	island
9	cg08461692	<i>MYH10</i>	4.15E-08	-0.0249	17	Body	open sea
10	cg21613963	<i>AKAP8</i>	5.13E-08	-0.0214	19	Body	island
11	cg24957657	<i>RARA</i>	5.58E-08	0.0086	17	TSS1500	island
12	cg26684601	<i>JPH3</i>	6.02E-08	0.0322	16	Body	shore
13	cg26409978	<i>ZC3H10</i>	6.27E-08	0.0061	12	TSS200	island
14	cg25589956	<i>ADIPOQ-AS1</i>	7.45E-08	0.0030	3	IGR	island
15	cg14079243	<i>AGTPBP1</i>	8.38E-08	-0.0588	9	TSS1500	shore
16	cg27016262	<i>ABR</i>	9.33E-08	-0.0108	17	Body	island
17	cg05158362	<i>LINC00221</i>	1.08E-07	-0.0137	14	IGR	island
18	cg13774019	<i>PAX5</i>	1.12E-07	-0.0165	9	Body	shore
19	cg06972019	<i>ENO1</i>	1.16E-07	0.0191	1	5'UTR	shore

神経発達との関連が示唆されている遺伝子

BPA曝露と関連する7つのCpGs領域のうち、6CpGs領域のメチル化変化の向きはプラス方向（メチル化増加）であった。しかし、7CpGs領域の偏回帰係数の絶対値（メチル化変化の大きさ）は0.02以下であり、メチル化変化は比較的小さかった。一方、7遺伝子には神経発達への関与が示唆される2遺伝子（*NAA15*および*DNAJB6*）が含まれていた。*NAA15*（N(Alpha)-Acetyltransferase 15）は血管、造血、神経細胞の増殖に重要な役割を果たすN-アセチルトランスフェラーゼ活性を持つと思われる。*DNAJB6*（DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B6）は特異的なニューロンでポリグルタミン蓄積にかかわる可能性のあるDNAJファミリーに属している。

DEHP曝露では、19のCpGs領域のうち、偏回帰係数の絶対値が0.02より大きなサイトが9領域あり、そのうち2CpG (*NOC3L*, *AGTPBP1*) 領域の偏回帰係数の絶対値は0.05以上であった。また、19 遺伝子のうち神経発達に関与する可能性を持つ遺伝子は2遺伝子 (*JPH3*, *AGTPBP1*) であった。*JPH3*は 結合膜構造形成に必要な分子であり、脳組織特異的に発現している。*AGTPBP1*は脱グルタミル化を触媒するカルボキシペプチダーゼであり、神経系への関連が示唆されている。

曝露によるメチル化変化への影響は1か所のCpGサイトのみではなく、複数のCpGサイトに及んでいると考えられている⁶⁹⁾。このことから、曝露と関連するメチル化変化領域として、影響の方向が同じであり、FDR $q < 0.05$ を示すCpGサイトが同一遺伝子上に2つ以上存在する領域を選択した^{34, 37-40)}。BPA曝露では、11CpGs領域、5遺伝子、DEHP曝露では、62CpGs領域、28遺伝子が抽出された(表24、25)。

表(1)-24 BPA曝露と関連するメチル化変化領域

CpG No	遺伝子	P値	偏回帰係数 (メチル化変化)	染色体 番号	遺伝子内 領域	CpG アイランド
cg26748578	SLC1A4	1.50E-05	-0.063	2	1stExon	island
cg19220282		2.11E-05	-0.045		Body	shore
cg27494338	PAX2	2.46E-05	0.007	10	IGR	island
cg11545863		2.41E-06	0.017		IGR	shelf
cg19948393	ANKRD33	8.58E-06	-0.033	12	1stExon	open sea
cg04349021		6.19E-07	-0.037		1stExon	open sea
cg17424856		2.61E-05	-0.031		1stExon	open sea
cg16547341	USP29	7.13E-06	0.029	19	TSS1500	shore
cg22338152		3.76E-05	0.009		Body	open sea
cg21938532	GNAS	3.06E-05	-0.014	20	TSS1500	island
cg12573482		2.12E-05	-0.012		TSS1500	island

北海道コーホートでの検証解析候補3領域

表(1)-25 DEHP曝露と関連するメチル化変化領域

CpG No	遺伝子	P値	偏回帰係数 (メチル化変化)	染色体 番号	遺伝子内 領域	CpGアイラ ンド
cg01560642	TTC34	9.71E-05	0.005	1	IGR	island
cg13687348		1.60E-06	0.020		IGR	open sea
cg27305255	RERE	4.99E-05	0.010	1	5'UTR	shore
cg19371916		0.000117	0.025		5'UTR	shelf
cg14014854	IFFO2	9.28E-05	-0.010	1	Body	open sea
cg16552822		5.38E-07	-0.004		Body	shelf
cg27045062	EFNA3	2.87E-05	0.003	1	Body	island
cg14848832		7.11E-06	0.007		Body	shore
cg19763809	VWA3B	7.25E-06	0.005	2	TSS200	island
cg26040244		3.20E-05	0.015		Body	open sea
cg01031312	LINC00885	3.00E-05	-0.022	3	IGR	open sea
cg27113538		4.91E-06	-0.023		IGR	open sea
cg19273995	STIM2	0.00011	-0.004	4	IGR	open sea

cg15835312		2.86E-06	-0.032		IGR	open sea
cg13891768	PITX2	0.000117	-0.011	4	IGR	shelf
cg05030680		1.50E-07	-0.005		Body	island
cg21212995	SLC6A7	4.34E-05	0.015	5	Body	shore
cg02414785		1.69E-05	0.027		Body	shore
cg08800670	OR2J2	3.62E-05	-0.018	6	IGR	open sea
cg05842943		7.79E-07	-0.036		IGR	open sea
cg24520538	TBCC	6.04E-05	0.001	6	IGR	open sea
cg21856234		5.16E-05	0.025		IGR	island
cg00020419	CRIP3	2.01E-05	0.007	6	3'UTR	shelf
cg07882836		3.87E-05	0.003		TSS200	island
cg12781778	ARID1B	1.45E-05	-0.006	6	TSS1500	open sea
cg05540473		3.24E-05	-0.006		Body	open sea
cg14526322	PRKAR1B	7.49E-05	-0.006	7	Body	shore
cg05060486		1.72E-05	-0.017		Body	island
cg18924229	SDK1	3.00E-06	-0.023	7	IGR	open sea
cg23385395		2.46E-05	-0.013		IGR	open sea
cg00564857		2.37E-06	0.017		Body	open sea
cg13153353		1.68E-05	0.047		Body	open sea
cg11543304	SMURF1	1.88E-05	-0.010	7	Body	open sea
cg17146738		7.98E-05	-0.020		Body	shore
cg22087659	TRIM4	4.12E-05	0.014	7	1stExon	island
cg13517567		9.16E-07	0.004		TSS200	island
cg11123440	NEIL2	4.50E-05	0.118	8	IGR	open sea
cg17155499		9.43E-05	0.022		3'UTR	open sea
cg04849180	ST18	7.64E-06	0.013	8	IGR	open sea
cg02356551		1.29E-05	0.004		IGR	open sea
cg23733739	GDF6	9.75E-06	-0.023	8	IGR	open sea
cg16274207		8.40E-05	-0.013		IGR	open sea
cg26048923	TRAPPC9	4.93E-06	0.039	8	Body	island
cg20071744		2.91E-05	0.052		Body	island
cg05910124		1.24E-06	0.046		Body	island
cg06693505		4.35E-07	0.050		Body	island
cg04259001		8.94E-05	0.009		Body	open sea
cg06175955	LINC01168	8.31E-06	0.011	10	IGR	open sea
cg20535067		9.76E-05	0.010		IGR	shelf
cg19132462	AMPD3	5.35E-05	-0.023	11	TSS200	shelf
cg26489413		1.12E-05	-0.028		1stExon	open sea
cg18051914	MPZL2	6.92E-05	-0.007	11	1stExon	open sea
cg15376097		7.59E-05	-0.018		TSS1500	open sea
cg27109650	ATG101	5.15E-06	-0.036	12	IGR	island
cg05124918		0.000113	-0.040		IGR	island
cg21074413	GPR133	4.37E-05	-0.018	12	Body	open sea
cg07538372		6.83E-05	-0.007		Body	shore
cg19040474	RPH3AL	5.41E-05	0.050	17	Body	shore

cg04897931		4.23E-05	0.076		Body	shore
cg17193961		6.74E-05	0.078		Body	island
cg16701467	EIF4A1	1.68E-06	0.007	17	TSS1500	shore
cg16547235		6.66E-05	0.008		Body	shelf

北海道コーホートでの検証解析候補3領域

BPA曝露との関連において、ボンフェローニ補正後も有意だった7CpG領域のうち、cg16271833 (*MIR1915*) を除く6CpG領域が位置する遺伝子 (*SH3BP4*, *NAA15*, *MYO1E*, *CDC42BPG*, *BHLHA15*, *DNAJB6*) は、*in vitro/vivo*の実験でBPA曝露によるmRNA発現への影響が報告されている⁷⁰⁻⁷⁴⁾。また、複数のメチル化変化部位が位置していた5遺伝子 (*SLC1A4*, *PAX2*, *ANKRD33*, *USP29*, *GNAS*) についても *in vitro/vivo*の実験でBPA曝露によるmRNA発現への影響が報告されている^{41, 71-73, 75-78)}。DEHP曝露との関連が見られた*RPH3AL*は、*in vivo*の実験でDEHP曝露によるmRNA発現への影響が報告されている⁷⁹⁾。また、ボンフェローニ補正後も有意だった19CpG領域のうち、8CpG領域が位置する遺伝子 (*KIAA1026*; *KAZN*, *KLHL38*, *C2orf28*; *ATRAID*, *MYH10*, *RARA*, *JPH3*, *ABR*, *ENO1*) は、ラット胎仔期フタル酸ジブチル (DBP) 曝露後、精巣でのmRNA発現変化が報告されている^{80, 81)}。複数のメチル化変化部位が位置していた6遺伝子 (*IFFO2*, *STIM2*, *SMURF1*, *TRAPPC*, *ATG101*, *EIF4A1*) についても *in vitro/vivo*の実験でDBD曝露によるmRNA発現への影響が報告されている^{80, 82)}。胎児期曝露がメチル化への影響を介して遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が示唆される。

網羅的解析結果の検証

DNAメチル化は様々な環境因子、およびSNPsを含めた個人の遺伝的背景の影響を受けており、今回観察された結果にそれら未測定因子の影響している可能性は否定できない。また、一般的に網羅解析では擬陽性を抽出してしまう可能性もあることから、別集団での結果の検証が必要である。そこで、本研究では、網羅的メチル化解析を行った集団とは別集団となる北海道コーホートを用いて、表(1)-26、27で示したBPA、DEHP曝露との関連が示唆されたCpGサイトについて、その周辺領域を含めて次世代シーケンスで解析し、今回の結果の検証を行った。

本研究に用いた対象の母体血BPA濃度 (n = 339) の中央値は0.062 ng/mL (IQR: 0.023-0.25) だった。BPA濃度と母児の属性との間にいずれも有意な関連は認められなかった。母体血中MEHP濃度 (n = 347) の中央値は1.50 ng/mL (IQR: 0.85-9.50) であり、在胎週数 (p = 0.02)、出生時体重 (p < 0.01) および出生時身長 (p < 0.01) と有意な関連が確認された。

現在、解析は進行中であり、6月中の終了を予定している。北海道コーホートで今回観察された結果が確認できれば、曝露によるDNAメチル化への影響についての結果がより強固なものとなる。重金属以外の環境化学物質について、胎児期曝露によるDNAメチル化への影響を網羅的メチル化解析により検討した疫学研究は国際的にもまだなく、本研究の結果はDNAメチル化変化を介した胎児期環境化学物質曝露の影響を考慮する上での先駆的指標となる。

iii. 曝露影響によるメチル化変化とADHD疑いへの影響

BPAおよびDEHP曝露と関連がみられたCpGが位置する遺伝子には、ボンフェローニ補正後も有意だったCpGが位置する*NAA15*, *DNAJB6*, *JPH3*, *AGTPBI*に加え、神経伝達物質輸送タンパク質をコー

ドする *SLC6A7*、ASDとの関連が示唆されている *GNAS*、神経細胞の分化に関与する可能性がある NF-kappa-Bのアクチベーターをコードする *TRAPPC9*、興奮性シナプス形成に関与する *NPTX2*等、脳神経系の発生や機能に関与する遺伝子が抽出され、曝露がメチル化変化を介して神経発達に影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで、曝露によるメチル化変化とADHD 疑いとの関連を解析するため、上述の検証解析候補領域に加え、曝露によりメチル化が変化する領域 (FDR $q < 0.05$) から、メチル化変化が大きく、神経発達に関連する可能性のある遺伝子を抽出し、解析候補とした。候補遺伝子を表(1)-26、27に示す。現在、選択したメチル化変化領域のADHDへの影響を検討するため、北海道コーホートのADHDケース (n = 245)、対照群 (n = 317) の臍帯血DNAを用いて、次世代シーケンサーによるメチル化解析をサブ(2) 山梨大で行っている。本研究により、環境化学物質曝露に影響を受ける胎児期メチル化変化と生後のADHDとの関連が示され、関連するメチル化変化はADHD早期発見・診断の指標となることが期待される。

表(1)-26 BPA曝露によるメチル化変化と神経発達との関連解析候補領域

	CpG No	遺伝子	P値	機能
1	cg26748578	<i>SLC1A4</i>	1.50E-05	ナトリウム依存性中性アミノ酸輸送タンパク. 遺伝子の欠損は発達遅延や知的障害に関連する可能性
	cg19220282		2.11E-05	
2	cg19948393	<i>ANKRD33</i>	8.58E-06	細胞骨格タンパク質・アンキリンに見られる33アミノ酸残基の反復配列を持つ. 神経発達系に関わるかは不明
	cg04349021		6.19E-07	
	cg17424856		2.61E-05	
3	cg21938532	<i>GNAS</i>	3.06E-05	膜結合型GTPアーゼ. ASDとの関連が示唆されている
	cg12573482		2.12E-05	
4	cg12458485	<i>GMPPA</i>	3.35E-07	GDP-マンノースピロホスホリラーゼ
5	cg21834908	<i>NAA15</i>	2.87E-08	血管、造血、神経細胞の増殖に関与するN-アセチルトランスフェラーゼ活性を持つ
6	cg25967418	<i>PCDHA7</i>	1.62E-05	神経発達に重要な役割を持つプロトカドヘリンの1つ
5	cg00888801	<i>PCDHGA4</i>	1.99E-05	神経発達に重要な役割を持つプロトカドヘリンの1つ
6	cg05714773	<i>TMEM176B</i>	2.23E-06	小脳顆粒細胞の発生にかかわる
7	cg26902026	<i>SNX19</i>	8.84E-06	小胞体輸送タンパク
8	cg00047050	<i>CUL5</i>	2.01E-05	E3 ユビキチンリガーゼ複合体の主要成分
9	cg12934016	<i>UBE3A</i>	3.10E-05	E3 ユビキチンリガーゼ
10	cg23016726	<i>CACNA1I</i>	2.57E-05	カルシウムチャンネル

検証解析候補領域に追加した候補である

表(1)-27 DEHP曝露によるメチル化変化と神経発達との関連解析候補領域

	CpG No	遺伝子	P値	機能
1	cg21212995	<i>SLC6A7</i>	4.34E-05	脳組織特異的アミノ酸輸送タンパク
	cg02414785		1.69E-05	
2	cg26048923	<i>TRAPPC9</i>	4.93E-06	小胞輸送に関わるNF-kappa-Bのアクチベーター、 神経発達との関連
	cg20071744		2.91E-05	
	cg05910124		1.24E-06	
	cg06693505		4.35E-07	
3	cg19132462	<i>AMPD3</i>	5.35E-05	アデノシン1-リン酸デアミラーゼ、エネルギー代 謝に関与
	cg26489413		1.12E-05	
4	cg19040474	<i>RPH3AL</i>	5.41E-05	カルシウム依存エンドサイトーシスに関与し、イン シュリン分泌と関連
	cg04897931		4.23E-05	
	cg17193961		6.74E-05	
5	cg24974729	<i>UNC93B1</i>	2.88E-04	Toll様レセプター伝達にかかわる
	cg17066594		4.29E-06	
6	cg04215511	<i>CNTNAP4</i>	1.34E-04	ニューレキシンファミリーの一つ
	cg08487455		3.84E-05	

検証解析候補領域に追加した候補である

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

- ① エコチル追加調査として、本体調査では実施できなかった M-CHAT を用いた生後早期の社会性発達調査を 4,000 名以上に実施し、1.5 歳頃の子どもの ASD 傾向の実態と特徴を明らかにした。これまでは明らかになっていない ASD 症状の軌跡を、今後、本体調査 4 歳以降の時点における ASD 調査と合わせて詳細に記述するためのデータを得た。
- ② BPA、フタル酸エステル類 7 代謝物の曝露測定結果から、日本人妊婦の BPA、フタル酸エステル類への曝露実態に関する詳細なデータを提供した。比較的低濃度ではあるが BPA、DnBP、DiBP、DEHP、の曝露が認められることを示した。
- ③ 比較的低濃度の胎児期 BPA 曝露は、6 か月、18 か月での神経行動発達への影響がなく、また 42 か月の知的能力に影響しないことが示唆された。一方、42 か月の問題行動とは関連が認められた。
- ④ SDQ、DCDQ、ADHD-RS、SCQ の結果から、広汎性発達障害や協調運動障害、ADHD 疑いに関連する可能性がある社会経済要因として妊娠中の世帯年収が低いこと、母の教育歴が低いこと、そのほかの要因として母の妊娠前 BMI が 30kg/m²、第一子であること、男児であることを示した。特に、SDQ は一般集団を対象とした研究ではこれまでの国内の報告の中でも最大規模であり、科学的なエビデンスの蓄積に貢献した。
- ⑤ 比較的低濃度の胎児期 BPA 曝露であっても、42 か月の問題行動への影響がある可能性が示唆された。一方、6 か月、18 か月での神経行動発達、42 か月の知的能力との関連は認められず、

胎児期曝露による影響はないことが示唆された。また、BPA、フタル酸エステル類の胎児期曝露は、6歳でのADHDとは関連がみられなかったが、遺伝子多型によって層別化したところ、MEHP濃度とADHD疑いとなるオッズに違いがみられた。曝露によるADHD発症には、遺伝子多型によるハイリスク群の可能性が示唆されたが、今後より詳細に検討する必要がある。

- ⑥ 網羅的DNAメチル化解析から、胎児期の化学物質曝露によりメチル化が変化する遺伝子領域を抽出することができた。さらに、次世代シーケンサーを用いた特定の遺伝子領域の定量的なDNAメチル化解析法の確立できたことから、網羅的DNAメチル化解析結果の再現性の検証ならびに別集団での解析が可能になった。
- ⑦ 292人の児の臍帯血の網羅的DNAメチル化解析を実施し、胎児期の化学物質および喫煙曝露によりメチル化が変化する遺伝子領域を示した。BPA、フタル酸エステル類の胎児期曝露への影響を遺伝子網羅的に解析した研究は国際的にも初となる。胎児期のBPAやフタル酸エステル類曝露により有意にメチル化変化が起こる遺伝子が同定されたが、それらの中には、神経発達に関連する遺伝子が含まれ、曝露による神経発達への影響にDNAメチル化が関与する可能性が示された。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- ① M-CHATのデータは、環境省エコチル本体調査で3、5歳に実施する対人応答性尺度を用いた発達調査のデータとあわせて、子どもの生後早期の社会性発達の軌跡をとらえることにより早期治療に活用できる。
- ② 特定の遺伝子多型を持つ児では、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル) (MEHP) の濃度が増加すると、注意欠陥・多動性障害疑いとなるリスクが増加することを示唆し、この結果は遺伝的にハイリスク群も考慮した環境政策の立案に活用できる。
- ③ これらのCpGには、動物実験などから神経発達に関与するとされる遺伝子が含まれ、胎児期のビスフェノールAやフタル酸エステル類曝露がDNAメチル化を介して、ヒトの神経行動発達に影響する可能性を示唆し、この結果は環境化学物質の規制を考慮する際に科学的根拠の一つとして活用できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表。

<論文(査読あり)>

- 1) M. MINATOYA, S. NAKAJIMA, S. SASAKI, A. ARAKI, C. MIYASHITA, T. IKENO, T. NAKAJIMA, Y. GOTO, R. KISHI: Science of the Total Environment, 565:1037-1043 (2016)

Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The Hokkaido Study in Environment and Children's Health.

- 2) M. MINATOYA, S. ITOH, A. ARAKI, N. TAMURA, K. YAMAZAKI, S. NISHIHARA, C. MIYASHITA, R. KISHI: Child; Care, Health and Development, 43(3):385-392 (2017)

Associated factors of behavioral problems in children at preschool age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health.

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 小林澄貴、池野多美子、荒木敦子、山崎圭子、西原進吉、岸玲子: 北海道公衆衛生学雑誌. 29(2):31-40 (2015)

環境化学物質の胎児期曝露による児の神経発達への影響に関する疫学文献レビュー: 注意欠如・多動性障害 (AD/HD) ・自閉症スペクトラム (ASD) を含めて

<その他誌上発表 (査読なし) >

- 1) 岸玲子: 公衆衛生、78(8):547-522 (2014)
【公害・環境問題の変貌と新展開】環境化学物質の次世代影響 出生コホート研究による成果と今後の課題
- 2) 岸玲子: 公衆衛生、79(3):193-199 (2015)
【講座 子どもを取り巻く環境と健康・1】「奪われし未来」にしない
- 3) 荒木敦子、アイツバマイゆふ、岸玲子: 公衆衛生、79(7):485-490 (2015)
【講座 子どもを取り巻く環境と健康・5】短半減期化学物質の曝露実態
- 4) 池野多美子、小林澄貴、山崎圭子、西原進吉、岸玲子: 公衆衛生、80(6):445-450 (2016)
【講座 子どもを取り巻く環境と健康・16】ADHD(注意欠如・多動性障害)とASD(自閉スペクトラム症)
- 5) 宮下ちひろ、小林祥子、岸玲子: 公衆衛生、80(7): 531-537 (2016)
【講座 子どもを取り巻く環境と健康・17】胎児期の化学物質曝露による後天的な遺伝子発現制御への影響

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) S. KOBAYASHI, K. AZUMI, S. SASAKI, M. ISHIZUKA, H. NAKAZAWA, E. OKADA, S. KOBAYASHI, H. GOUDARZI, S. ITOH, C. MIYASHITA, T. IKENO, A. ARAKI, R. KISHI: 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference, Seattle, USA (2014. 8. 24-28)
The effects of perfluoroalkyl acids (PFAAs) exposure in utero on IGF2/H19 DNA methylation in cord blood.
- 2) M. MINATOYA, S. SASAKI, S. NAKAJIMA, J. YAMAMOTO, A. ARAKI, S. ITOH, C. MIYASHITA, T. MATSUMURA, K. NONOMURA, T. MITSUI, K. CHO, R. KISHI: International Society for Environmental Epidemiology Asia Chapter (ISEE-AC) 2014 Conference, Shanghai, China (2014. 11. 30-12. 2)

Effects of prenatal bisphenol A exposure on birth weight, sex hormone levels and mental

and motor development.

- 3) 岸玲子：第17回環境ホルモン学会、東京都（2014.12.9-12.10）
出生コホート研究で明らかになった人への環境ホルモン様作用Adverse effects of endocrine disrupting chemicals on human: Findings from the birth cohort-the Hokkaido Study on environment and children's health-
- 4) 湊屋街子、佐々木成子、中島そのみ、山本潤、荒木敦子、伊藤佐智子、宮下ちひろ、松村徹、野々村克也、三井貴彦、長和俊、岸玲子：第17回環境ホルモン学会、東京都（2014.12.9-12.10）
ビスフェノールAの胎児期曝露による出生体格、臍帯血中ホルモン濃度、神経発達への影響
- 5) 岸玲子：第85回日本衛生学会学術総会、和歌山市（2015.3.26-3.28）
シンポジウム6（連携研究会・生殖次世代研究会）環境と子どもの健康に関する出生コホート研究の現状：北海道スタディ13年の経験から
- 6) 湊屋街子、佐々木成子、中島そのみ、那須民江、後藤裕子、宮下ちひろ、荒木敦子、小林澄貴、池野多美子、岸玲子：第85回日本衛生学会学術総会、和歌山市（2015.3.26-3.28）
胎児期MEHP曝露により神経行動発達への影響ー北海道スタディー
- 7) 小林祥子、安住薫、佐々木成子、松村徹、山本潤、石塚真由美、宮下ちひろ、池野多美子、荒木敦子、岸玲子：第85回日本衛生学会学術総会、和歌山市（2015.3.26-3.28）
臍帯血ビスフェノールA濃度と児のIGF2 DNAメチル化との関連-北海道スタディ
- 8) 山崎圭子、宮下ちひろ、中島そのみ、池野多美子、荒木敦子、伊藤佐智子、小林祥子、水谷太、菅木洋一、岸玲子：第85回日本衛生学会学術総会、和歌山市（2015.3.26-3.28）
胎児期の有機塩素系農薬曝露が6か月児の精神運動発達に及ぼす影響ー北海道スタディ
- 9) 小林祥子、三浦りゅう、川口章夫、宮下ちひろ、三宅邦夫、松村徹、山本潤、石塚真由美、荒木敦子、久保田健夫、岸玲子：第4回日本DOHaD研究学術集会、東京（2015.8.1-2）
胎児期ビスフェノールA曝露影響に関する臍帯血DNA網羅的メチル化解析ー北海道スタディ
- 10) 湊屋街子、佐々木成子、中島そのみ、山本潤、松村徹、宮下ちひろ、荒木敦子、岸玲子：第86回日本衛生学会学術総会、旭川市（2016.5.11-13）
臍帯血中ビスフェノールA濃度と子どもの行動発達：北海道スタディ
- 11) S. SUYAMA, N. TAMURA, M. MINATOYA, S. ITOH, K. YAGYU, C. MIYASHITA, A. ARAKI, T. SAITO, A. NAKAI, R. KISHI: ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Japan (2016.6.26-29)
Association between Maternal Smoking during Pregnancy and Coordination Development at Preschool Age
- 12) M. MINATOYA, N. TAMURA, S. ITOH, S. SUYAMA, C. MIYASHITA, A. ARAKI, T. SAITO, A. NAKAI, R. KISHI: ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Japan (2016.6.26-29)
Prenatal environment and Child Behavioral and Coordination Development at Preschool Age in the Hokkaido Study
- 13) M. MINATOYA, N. TAMURA, S. ITOH, C. MIYASHITA, A. ARAKI, R. KISHI: ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, Roma, Italy (2016.9.1-4)
Associated prenatal factors of behavioral and emotional problems in 5-year-old children: The Hokkaido Study

- 14) S. KOBAYASHI, R. MIURA, C. MIYASHITA, A. ARAKI, M. ISHIZUKA, H. NAKAZAWA, Y. ITO, T. KUBOTA, R. KISHI: ISEE2016, Roma, Italy (2016.9.1-4)
Epigenome-wide analyses of prenatal perfluoroalkyl acids exposure on cord blood DNA methylation: the Hokkaido study

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 北海道大学 国民との対話推進事業「北海道の人々が参加する環境と健康に関する研究」
(2014年9月26日、北海道札幌北高等学校、聴衆20人)
(2014年12月17日、北海道札幌開成高等学校、聴衆100人)
- 2) 市民講演会「環境と子どもの健康」
(2015年3月5日、札幌エルプラザ、観客50名)
- 3) WHO（世界保健機関）研究協力センター指定記念講演会 - 環境化学物質のハザードと人の健康障害の予防 - (2015年11月17日、北海道大学百年記念会館、観客約80人)
- 4) 北海道大学 国民との対話推進事業「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」
(2015年11月5日、北海道札幌東高等学校、聴衆10人)
- 5) 市民講演会「環境が与える子どもへの影響～北海道スタディとエコチル調査からわかったこと～」(2016年3月14日、札幌エルプラザ、観客約20名)
- 6) 北海道大学 国民との対話推進事業「環境と私たちの健康」
(2016年10月27日、北海道大学札幌南高等学校、2講実施、93名)
- 7) 市民講演会「～北海道スタディとエコチル調査からわかったこと～」
(2017年2月23日、かでの2.7（北海道立道民活動センター）、主催：北海道大学環境健康科学研究教育センター、観客47名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

1. Kim Y, Ha EH, Kim EJ, Park H, Ha M, Kim JH, Hong YC, Chang N, Kim BN. Prenatal exposure to phthalates and infant development at 6 months: prospective Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) study. *Environ Health Perspect* 2011;**119**(10):1495-500.
2. Visser SN, Danielson ML, Bitsko RH, Holbrook JR, Kogan MD, Ghandour RM, Perou R, Blumberg SJ. Trends in the parent-report of health care provider-diagnosed and medicated attention-deficit/hyperactivity disorder: United States, 2003-2011. *J Am*

- Acad Child Adolesc Psychiatry* 2014;**53**(1):34-46. e2.
3. Ejaredar M, Lee Y, Roberts DJ, Sauve R, Dewey D. Bisphenol A exposure and children's behavior: A systematic review. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2017;**27**(2):175-183.
 4. Geens T, Goeyens L, Covaci A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *Int J Hyg Environ Health* 2011;**214**(5):339-47.
 5. Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal* 2006;**26**(3):803-24.
 6. Xu XH, Wang YM, Zhang J, Luo QQ, Ye YP, Ruan Q. Perinatal exposure to bisphenol-A changes N-methyl-D-aspartate receptor expression in the hippocampus of male rat offspring. *Environ Toxicol Chem* 2010;**29**(1):176-81.
 7. Viberg H, Lee I. A single exposure to bisphenol A alters the levels of important neuroproteins in adult male and female mice. *Neurotoxicology* 2012;**33**(5):1390-5.
 8. Wolstenholme JT, Taylor JA, Shetty SR, Edwards M, Connelly JJ, Rissman EF. Gestational exposure to low dose bisphenol A alters social behavior in juvenile mice. *PLoS One* 2011;**6**(9):e25448.
 9. Boberg J, Christiansen S, Axelstad M, Kledal TS, Vinggaard AM, Dalgaard M, Nellemann C, Hass U. Reproductive and behavioral effects of diisononyl phthalate (DINP) in perinatally exposed rats. *Reprod Toxicol* 2011;**31**(2):200-9.
 10. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioural effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in a cross-mating toxicity study of mice. *Food Chem Toxicol* 2005;**43**(4):581-9.
 11. Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 2009;**126**(1):51-90.
 12. Eskenazi B, Kogut K, Huen K, Harley KG, Bouchard M, Bradman A, Boyd-Barr D, Johnson C, Holland N. Organophosphate pesticide exposure, PON1, and neurodevelopment in school-age children from the CHAMACOS study. *Environ Res* 2014;**134**:149-57.
 13. Morales E, Sunyer J, Castro-Giner F, Estivill X, Julvez J, Ribas-Fito N, Torrent M, Grimalt JO, de Cid R. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on cognitive functioning effects induced by p,p'-DDT among preschoolers. *Environ Health Perspect* 2008;**116**(11):1581-5.
 14. Loke YJ, Hannan AJ, Craig JM. The Role of Epigenetic Change in Autism Spectrum Disorders. *Front Neurol* 2015;**6**:107.
 15. Yang CW, Chou WC, Chen KH, Cheng AL, Mao IF, Chao HR, Chuang CY. Visualized gene network reveals the novel target transcripts Sox2 and Pax6 of neuronal development in trans-placental exposure to bisphenol A. *PLoS One* 2014;**9**(7):e100576.
 16. 神尾陽子, 稲田尚子. 1歳6か月健診における広汎性発達障害の早期発見についての予備的研究. . *精神医学* 2006;**48**(9):981-990.
 17. Baron-Cohen S, Allen J, Gillberg C. Can autism be detected at 18 months? The needle, the haystack, and the CHAT. *Br J Psychiatry* 1992;**161**:839-43.

18. Robins DL, Fein D, Barton ML, Green JA. The Modified Checklist for Autism in Toddlers: an initial study investigating the early detection of autism and pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 2001;**31**(2):131-44.
19. 稲田尚子, 神尾陽子. 自閉症スペクトラム障害の早期診断への M-CHAT の活用 (特集 最近注目されている発達障害)--(自閉症スペクトラム). *小児科臨床* 2008;**61**(12):2435-2439.
20. 日本臨床心理学会福祉領域委員会発達障害支援専門部会. 乳幼児健診における発達障害に関する市町村調査報告書. 一般社団法人 日本臨床心理学会 2012.
21. Kamio Y, Inada N, Koyama T, Inokuchi E, Tsuchiya K, Kuroda M. Effectiveness of using the Modified Checklist for Autism in Toddlers in two-stage screening of autism spectrum disorder at the 18-month health check-up in Japan. *J Autism Dev Disord* 2014;**44**(1):194-203.
22. Nakajima S, Saijo Y, Kato S, Sasaki S, Uno K, Kanagami N, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Todaka T, Nakamura Y, Yanagiya S, Sengoku Y, Iida T, Sata F, Kishi R. Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at 6 months of age. *Environmental Health Perspectives* 2006;**114**(5):773-778.
23. Algorta GP, Dodd AL, Stringaris A, Youngstrom EA. Diagnostic efficiency of the SDQ for parents to identify ADHD in the UK: a ROC analysis. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2016;**25**(9):949-57.
24. Goulardins JB, Rigoli D, Licari M, Piek JP, Hasue RH, Oosterlaan J, Oliveira JA. Attention deficit hyperactivity disorder and developmental coordination disorder: Two separate disorders or do they share a common etiology. *Behav Brain Res* 2015;**292**:484-92.
25. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, Greenwood CM, Hansen KD. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biol* 2014;**15**(12):503.
26. Chen YA, Choufani S, Grafodatskaya D, Butcher DT, Ferreira JC, Weksberg R. Cross-reactive DNA microarray probes lead to false discovery of autosomal sex-associated DNA methylation. *Am J Hum Genet* 2012;**91**(4):762-4.
27. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 2012;**28**(6):882-3.
28. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* 2011;**98**(4):288-95.
29. Fox J, Weisberg S. *An R Companion to Applied Regression*. Thousand Oaks, CA: Sage, 2011.
30. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential

- expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;**3**:Article3.
31. Bakulski KM, Feinberg JL, Andrews SV, Yang J, Brown S, S LM, Witter F, Walston J, Feinberg AP, Fallin MD. DNA methylation of cord blood cell types: Applications for mixed cell birth studies. *Epigenetics* 2016;**11**(5):354-62.
 32. Leek JT, Storey JD. Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS Genet* 2007;**3**(9):1724-35.
 33. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 2001;**125**(1-2):279-84.
 34. Walker RM, Christoforou AN, McCartney DL, Morris SW, Kennedy NA, Morten P, Anderson SM, Torrance HS, Macdonald A, Sussmann JE, Whalley HC, Blackwood DH, McIntosh AM, Porteous DJ, Evans KL. DNA methylation in a Scottish family multiply affected by bipolar disorder and major depressive disorder. *Clin Epigenetics* 2016;**8**:5.
 35. Walton E, Pingault JB, Cecil CA, Gaunt TR, Relton CL, Mill J, Barker ED. Epigenetic profiling of ADHD symptoms trajectories: a prospective, methylome-wide study. *Mol Psychiatry* 2017;**22**(2):250-256.
 36. Petrus NC, Henneman P, Venema A, Mul A, van Sinderen F, Haagmans M, Mook O, Hennekam RC, Sprikkelman AB, Mannens M. Cow's milk allergy in Dutch children: an epigenetic pilot survey. *Clin Transl Allergy* 2016;**6**:16.
 37. Huang RC, Garratt ES, Pan H, Wu Y, Davis EA, Barton SJ, Burdge GC, Godfrey KM, Holbrook JD, Lillycrop KA. Genome-wide methylation analysis identifies differentially methylated CpG loci associated with severe obesity in childhood. *Epigenetics* 2015;**10**(11):995-1005.
 38. Khulan B, Manning JR, Dunbar DR, Seckl JR, Raikkonen K, Eriksson JG, Drake AJ. Epigenomic profiling of men exposed to early-life stress reveals DNA methylation differences in association with current mental state. *Transl Psychiatry* 2014;**4**:e448.
 39. Kaut O, Schmitt I, Tost J, Busato F, Liu Y, Hofmann P, Witt SH, Rietschel M, Frohlich H, Wullner U. Epigenome-wide DNA methylation analysis in siblings and monozygotic twins discordant for sporadic Parkinson's disease revealed different epigenetic patterns in peripheral blood mononuclear cells. *Neurogenetics* 2017;**18**(1):7-22.
 40. Portales-Casamar E, Lussier AA, Jones MJ, MacIsaac JL, Edgar RD, Mah SM, Barhdadi A, Provost S, Lemieux-Perreault LP, Cynader MS, Chudley AE, Dube MP, Reynolds JN, Pavlidis P, Kobor MS. DNA methylation signature of human fetal alcohol spectrum disorder. *Epigenetics Chromatin* 2016;**9**:25.
 41. Zhang Y, Zhang XR, Park JL, Kim JH, Zhang L, Ma JL, Liu WD, Deng DJ, You WC, Kim YS, Pan KF. Genome-wide DNA methylation profiles altered by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa and blood leukocyte DNA. *Oncotarget* 2016;**7**(24):37132-37144.
 42. Maltby VE, Graves MC, Lea RA, Benton MC, Sanders KA, Tajouri L, Scott RJ, Lechner-Scott J. Genome-wide DNA methylation profiling of CD8+ T cells shows a distinct epigenetic signature to CD4+ T cells in multiple sclerosis patients. *Clin Epigenetics*

- 2015;**7**:118.
43. 乳幼児健康診査に係る発達障害のスクリーニングと早期支援に関する研究成果. In: 厚生労働省, ed, 2009.
 44. Durkin MS, Maenner MJ, Meaney FJ, Levy SE, DiGuseppi C, Nicholas JS, Kirby RS, Pinto-Martin JA, Schieve LA. Socioeconomic inequality in the prevalence of autism spectrum disorder: evidence from a U.S. cross-sectional study. *PLoS One* 2010;**5**(7):e11551.
 45. Rai D, Lewis G, Lundberg M, Araya R, Svensson A, Dalman C, Carpenter P, Magnusson C. Parental socioeconomic status and risk of offspring autism spectrum disorders in a Swedish population-based study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2012;**51**(5):467-476. e6.
 46. Hart R, Doherty DA, Frederiksen H, Keelan JA, Hickey M, Sloboda D, Pennell CE, Newnham JP, Skakkebaek NE, Main KM. The influence of antenatal exposure to phthalates on subsequent female reproductive development in adolescence: a pilot study. *Reproduction* 2014;**147**(4):379-90.
 47. Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. Association of urinary bisphenol A concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 2010;**5**(1):e8673.
 48. Schecter A, Malik N, Haffner D, Smith S, Harris TR, Paepke O, Birnbaum L. Bisphenol A (BPA) in U.S. food. *Environ Sci Technol* 2010;**44**(24):9425-30.
 49. WHO. Atlas: Child and Adolescent Mental Health Resources; Global Concerns, Implications for the Future. Geneva, 2005.
 50. Boyle CA, Boulet S, Schieve LA, Cohen RA, Blumberg SJ, Yeargin-Allsopp M, Visser S, Kogan MD. Trends in the prevalence of developmental disabilities in US children, 1997-2008. *Pediatrics* 2011;**127**(6):1034-42.
 51. Matsushita T, Nagano M, Araki Y, Tanaka Y, Iwasaki M, Yamashita Y, Nagamitsu S, Iizuka C, Ohya T, Shibuya K, Hara M, Matsuda K, Tsuda A, Kakuma T. Scale properties of the Japanese version of the Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ): a study of infant and school children in community samples. *Brain Dev* 2008;**30**(6):410-5.
 52. Faebo Larsen R, Hvas Mortensen L, Martinussen T, Nybo Andersen AM. Determinants of developmental coordination disorder in 7-year-old children: a study of children in the Danish National Birth Cohort. *Dev Med Child Neurol* 2013;**55**(11):1016-22.
 53. Christensen LH, Hoyer BB, Pedersen HS, Zinchuk A, Jonsson BA, Lindh C, Durr DW, Bonde JP, Toft G. Prenatal smoking exposure, measured as maternal serum cotinine, and children's motor developmental milestones and motor function: A follow-up study. *Neurotoxicology* 2016;**53**:236-45.
 54. Yamamoto J, Minatoya M, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Matsumura T, Kishi R. Quantifying bisphenol A in maternal and cord whole blood using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry and maternal characteristics associated

- with bisphenol A. *Chemosphere* 2016;**164**:25-31.
55. Bayer JK, Ukoumunne OC, Mathers M, Wake M, Abdi N, Hiscock H. Development of children's internalising and externalising problems from infancy to five years of age. *Aust N Z J Psychiatry* 2012;**46**(7):659-68.
 56. Wu YT, Chen WJ, Hsieh WS, Chen PC, Liao HF, Su YN, Jeng SF. Maternal-reported behavioral and emotional problems in Taiwanese preschool children. *Res Dev Disabil* 2012;**33**(3):866-73.
 57. Chittleborough CR, Lawlor DA, Lynch JW. Young maternal age and poor child development: predictive validity from a birth cohort. *Pediatrics* 2011;**127**(6):e1436-44.
 58. Zhu JL, Olsen J, Liew Z, Li J, Niclasen J, Obel C. Parental smoking during pregnancy and ADHD in children: the Danish national birth cohort. *Pediatrics* 2014;**134**(2):e382-8.
 59. Zukauskienė R, Ignataviciene K, Daukantaite D. Subscales scores of the Lithuanian version of CBCL--preliminary data on the emotional and behavioural problems in childhood and adolescence. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2003;**12**(3):136-43.
 60. Harley KG, Gunier RB, Kogut K, Johnson C, Bradman A, Calafat AM, Eskenazi B. Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children. *Environ Res* 2013;**126**:43-50.
 61. Casas M, Fornes J, Martinez D, Avella-Garcia C, Valvi D, Ballesteros-Gomez A, Luque N, Rubio S, Julvez J, Sunyer J, Vrijheid M. Exposure to bisphenol A during pregnancy and child neuropsychological development in the INMA-Sabadell cohort. *Environ Res* 2015;**142**:671-9.
 62. Gascon M, Valvi D, Fornes J, Casas M, Martinez D, Julvez J, Monfort N, Ventura R, Sunyer J, Vrijheid M. Prenatal exposure to phthalates and neuropsychological development during childhood. *Int J Hyg Environ Health* 2015;**218**(6):550-8.
 63. Yan Z, Tan W, Xu B, Dan Y, Zhao W, Deng C, Chen W, Tan S, Mao Q, Wang Y, Deng G. A cis-acting regulatory variation of the estrogen receptor alpha (ESR1) gene is associated with hepatitis B virus-related liver cirrhosis. *Hum Mutat* 2011;**32**(10):1128-36.
 64. Zhang Y, Zhang M, Yuan X, Zhang Z, Zhang P, Chao H, Jiang L, Jiang J. Association Between ESR1 PvuII, XbaI, and P325P Polymorphisms and Breast Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 2015;**21**:2986-96.
 65. Aris A. Estimation of bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada. *Reprod Toxicol* 2014;**45**:8-13.
 66. Romano ME, Webster GM, Vuong AM, Thomas Zoeller R, Chen A, Hoofnagle AN, Calafat AM, Karagas MR, Yolton K, Lanphear BP, Braun JM. Gestational urinary bisphenol A and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: the HOME Study. *Environ Res* 2015;**138**:453-60.
 67. He Y, Miao M, Herrinton LJ, Wu C, Yuan W, Zhou Z, Li DK. Bisphenol A levels in blood

- and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res* 2009;**109**(5):629-33.
68. Preciados M, Yoo C, Roy D. Estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals Influencing NRF1 Regulated Gene Networks in the Development of Complex Human Brain Diseases. *Int J Mol Sci* 2016;**17**(12).
 69. Leenen FA, Muller CP, Turner JD. DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? *Clin Epigenetics* 2016;**8**:92.
 70. Porreca I, Ulloa Severino L, D'Angelo F, Cuomo D, Ceccarelli M, Altucci L, Amendola E, Nebbioso A, Mallardo M, De Felice M, Ambrosino C. "Stockpile" of Slight Transcriptomic Changes Determines the Indirect Genotoxicity of Low-Dose BPA in Thyroid Cells. *PLoS One* 2016;**11**(3):e0151618.
 71. Tait S, Tassinari R, Maranghi F, Mantovani A. Bisphenol A affects placental layers morphology and angiogenesis during early pregnancy phase in mice. *J Appl Toxicol* 2015;**35**(11):1278-91.
 72. Ali S, Steinmetz G, Montillet G, Perrard MH, Loundou A, Durand P, Guichaoua MR, Prat O. Exposure to low-dose bisphenol A impairs meiosis in the rat seminiferous tubule culture model: a physiotoxicogenomic approach. *PLoS One* 2014;**9**(9):e106245.
 73. Villeneuve DL, Garcia-Reyero N, Escalon BL, Jensen KM, Cavallin JE, Makynen EA, Durhan EJ, Kahl MD, Thomas LM, Perkins EJ, Ankley GT. Ecotoxicogenomics to support ecological risk assessment: a case study with bisphenol A in fish. *Environ Sci Technol* 2012;**46**(1):51-9.
 74. Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, Bertrand-Michel J, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* 2012;**55**(2):395-407.
 75. Chapalamadugu KC, Vandevort CA, Settles ML, Robison BD, Murdoch GK. Maternal bisphenol a exposure impacts the fetal heart transcriptome. *PLoS One* 2014;**9**(2):e89096.
 76. Lam HM, Ho SM, Chen J, Medvedovic M, Tam NN. Bisphenol A Disrupts HNF4alpha-Regulated Gene Networks Linking to Prostate Preneoplasia and Immune Disruption in Noble Rats. *Endocrinology* 2016;**157**(1):207-19.
 77. Yin R, Gu L, Li M, Jiang C, Cao T, Zhang X. Gene expression profiling analysis of bisphenol A-induced perturbation in biological processes in ER-negative HEK293 cells. *PLoS One* 2014;**9**(6):e98635.
 78. Kang ER, Iqbal K, Tran DA, Rivas GE, Singh P, Pfeifer GP, Szabo PE. Effects of endocrine disruptors on imprinted gene expression in the mouse embryo. *Epigenetics* 2011;**6**(7):937-50.
 79. Moyer B, Hixon ML. Reproductive effects in F1 adult females exposed in utero to moderate to high doses of mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP). *Reprod Toxicol*

- 2012;**34**(1):43-50.
80. Johnson KJ, McDowell EN, Viereck MP, Xia JQ. Species-specific dibutyl phthalate fetal testis endocrine disruption correlates with inhibition of SREBP2-dependent gene expression pathways. *Toxicol Sci* 2011;**120**(2):460-74.
 81. Plummer S, Sharpe RM, Hallmark N, Mahood IK, Elcombe C. Time-dependent and compartment-specific effects of in utero exposure to Di(n-butyl) phthalate on gene/protein expression in the fetal rat testis as revealed by transcription profiling and laser capture microdissection. *Toxicol Sci* 2007;**97**(2):520-32.
 82. Gaido KW, Hensley JB, Liu D, Wallace DG, Borghoff S, Johnson KJ, Hall SJ, Boekelheide K. Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 2007;**97**(2):491-503.

2) 環境化学物質に起因するASD等の発達障害関連エピジェネティクス変化の解明

サブテーマ代表者：

山梨大学大学院総合研究部	環境遺伝医学講座	久保田健夫（平成26、27年度）
山梨大学大学院総合研究部	環境遺伝医学講座	三宅邦夫（平成28年度）

研究分担者：

山梨大学大学院総合研究部	環境遺伝医学講座	三宅邦夫（平成26, 27年度）
--------------	----------	------------------

研究協力者：

山梨大学大学院総合研究部	地域医療臨床研修学講座	川口章夫
--------------	-------------	------

平成26～28年度累計予算額：18,795千円（うち平成28年度：4,159千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

近年、胎児期の喫煙曝露が子供の自閉スペクトラム症（ASD）や注意欠陥多動性障害（ADHD）などの発達障害リスクを増加させることが報告されている。また胎児期の喫煙曝露がDNAのメチル化異常を引き起こすことが報告され、がんや喘息のリスクを増加させる可能性が示唆されている。しかしながら、胎児期の喫煙曝露と神経発達障害のリスクをつなぐ分子メカニズムとしてDNAメチル化パターンの異常の関与についての報告はなされていない。本研究は胎児期の喫煙曝露により影響を受けDNAメチル化が変化（エピゲノム変化）する部位（CpGs）を明らかにし、神経発達障害発症リスクと関連するかを解明することを目的とする。

最初に札幌コーホート292名を対象に臍帯血DNAにおける全ゲノム約45万CpGs領域について網羅的メチル解析を行い、喫煙曝露により変化するDNAメチル化部位の同定を行った。その結果、非喫煙群と喫煙群の比較においてFDR < 0.05かつ|偏回帰係数| > 0.01の条件で82CpGs領域が同定された。これらのCpGsには、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*や脳の発達や成熟に関連する*PRDX1*、*THRA*などの神経発達関連遺伝子を新たに同定することができた。また喫煙を中止することによりDNAメチル化状態が非喫煙者のレベルになる遺伝子を見出すことができた。さらに別集団である北海道コーホートを用いて次世代シーケンサーによるメチル化の検証を行った結果、*AHRR*、*MYO1G*、*GFI1*については周辺のCpGも含めて喫煙曝露によりメチル化変化していることが確認できた。しかしながら、神経発達関連遺伝子については有意な差が認められなかった。北海道コーホートによる喫煙曝露とADHD疑いの関連性を解析したところ、オッズ比は1.5であったが有意な差は認められなかった。

今後はサンプルサイズを増やしたうえで、喫煙曝露とADHDの関連を明らかにし、本研究で同定した遺伝子のメチル化が関与するかどうかを明らかにする必要がある。

[キーワード]

喫煙、臍帯血、エピジェネティクス、DNAメチル化、ADHD

1. はじめに

DNAのメチル化はエピジェネティクスにおける中心的なメカニズムである。DNAメチル化とはシトシン (C)－グアニン (G)と並んだ (CpG)塩基配列のシトシンにメチル基が結合する化学修飾で、プロモーター領域のメチル化状態は遺伝子発現のON/OFF調節に関与していることが知られている。近年、CpG以外のnon-CpG (CpA、CpC、CpT)のシトシンもメチル化修飾を受けることが報告され、遺伝子発現量の調節に関与していることが報告されている^{1),2)}。このようなエピジェネティクス機構の破綻はがん、糖尿病、心疾患、神経変性疾患などの様々な疾患の発症や病態に関与することが報告されている。さまざまな環境（栄養、運動、ストレス、薬物、感染など）要因によりDNAメチル化を含むエピジェネティクス状態が変化することが知られており、特に胎児期および乳児期はDNAのメチル化パターンが形成される臨界期であることから、この時期の環境が非常に重要であると考えられている^{3,4)}。

近年、疫学研究から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) などの発達障害リスクを増加させることが報告されている⁵⁻⁸⁾。しかしながらその分子メカニズムはよくわかっていない。一方で喫煙曝露が芳香族炭化水素受容体抑制因子である *AHR* やシトクロムP450ファミリーの *CYP1A1* などのDNAのメチル化異常を引き起こすことが報告されている⁹⁻¹¹⁾。また胎児期の喫煙曝露によって生じた *GFI1* のDNAメチル化の変化が新生児の出生体重に影響することが報告されている^{12,13)}。さらに胎児期の喫煙曝露によるDNAメチル化異常が生後も維持され、がんや喘息のリスクを増加させる可能性も示唆されている¹⁴⁾。したがって胎児期の喫煙曝露と神経発達障害のリスクをつなぐ分子メカニズムとしてDNAメチル化パターンの異常形成が関与する可能性が考えられるが、これまでに報告はなされていない。

2. 研究開発目的

本研究では、胎児期の喫煙曝露により影響を受け、DNAメチル化が変化（エピゲノム変化）する領域を明らかにし、神経発達障害発症リスクと関連するかを解明することを目的とする。

3. 研究開発方法

(1) 胎児期喫煙曝露により変化するDNAメチル化領域の探索

1) 臍帯血DNAサンプルを用いた網羅的エピゲノム解析

DNA配列の解析機器の進歩に伴い、DNA修飾に関する情報を広範囲かつ迅速に獲得できる手法が開発されてきた。その中で、イルミナ社のInfinium HumanMethylation450 BeadChipは迅速かつ経済的に、ヒトの全遺伝子領域のエピゲノム (DNAメチル化) 情報を獲得できる解析システムである。具体的には、対象者の臍帯血から抽出したDNA (500ng) を化学処理し、メチル化と非メチル化の違いを塩基配列の違い (シトシンとチミン) に置き換え、同システムのビーズチップ上に吸着させ、メチル化DNAフラグメント (赤) と非メチル化DNAフラグメント (緑) から発せられる2色の蛍光輝度をスキャナー (iScan) によって読み取り、メチル化の度合いを把握する方法である。把握できるゲノム上の個所はCpG二塩基配列の約45万カ所で、約23,000のヒト全遺伝子の調節領域 (プロモーター領域内と上流と下流の近傍領域) ならびに一部の転写領域 (Gene body) である。

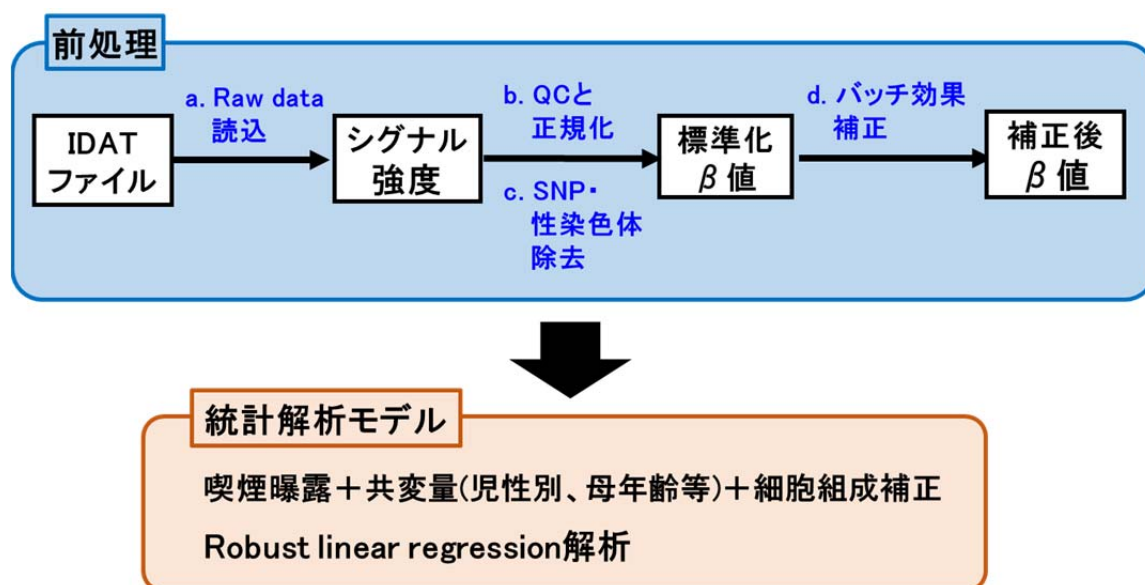
対象者は北海道スタディ札幌コーホート参加者 (N = 514) のうち、出産時カルテ情報、臍帯血DNAのある292名を対象とした。DNAメチル化解析はG&Gサイエンス株式会社 (福島県松川町美郷四

丁目1番地の1) にて行った。DNAサンプルの品質を確認するため、PicoGreen (Molecular Probes, Inc, USA) による2本鎖DNA定量、および電気泳動法で過度な断片化がないことを確認した。500 ng の臍帯血DNAをZymo EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) でバイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理後の各サンプルについて、HumanMethylation450 DNA Analysis Kit (illumina, SanDiego, CA, USA) を使用し、イルミナ社指定のプロトコール (Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide Rev. B) に従い、以下の工程にてDNAメチル化測定を実施した。①全ゲノム増幅、②断片化処理 (300~600bp程度)、③HumanMethylation450 BeadChip にハイブリダイゼーション、④一塩基伸長反応、⑤蛍光標識、⑥スキャナーによる読み取り (イルミナ社製スキャナーiScanを使用)。

2) 網羅的エピゲノム解析データ標準化の実施

Infinium HumanMethylation450 BeadChip解析で得られた生データ (IDATファイル) を、まずイルミナ社規定のソフトウェア (GenomeStudio) で各サンプルとアレイ上の位置の対応表を作成する。その上で、環境化学物質との関係性の解析に供するように標準化を行うことが必要である。

具体的には、先行研究¹⁵⁾を参考に、以下の4つのステップで生データ (IDATファイル) に対し各種補正を行った (図(2)-1)。



図(2)-1 環境化学物質との交互作用を調べる前段階のDNAメチル化データの標準化のための作業ステップ

a. Infinium HumanMethylation450 BeadChip解析から出力された生データの読込

出力されたデータをメチル化の度合いがわかるように変換する必要がある。このため、データ (IDATファイル) の赤と緑の蛍光輝度情報を、R/Bioconductorソフトウェアを用いて取り込み、約45万カ所のCpG個所のメチル化の程度を示すベータ値 (0~100の範囲で示される数値) に変換した。

b. クオリティー・コントロール (QC) と正規化 (Normalization)

Infinium HumanMethylation450 BeadChip解析において、DNAサンプルがアレイ上のビーズに結合していない場合、メチル化の程度を正しく評価することができない。このため、5%以上が正しく結合していない場合（95%以上ハイブリダイズできていない場合）、そのビーズの結果を排除した（クオリティー・コントロール）。また1スライド上で解析する12サンプルの間にハイブリダイズのばらつきを補正するために、各サンプル内の約45万個所に内部コントロールとして搭載したCpGのメチル化の程度を基準に、サンプルごとのばらつきの補正、ならびに約45万のCpGにおけるベータ値獲得のために用いた2種の方法（プローブ）の違いに基づく差異の補正によるデータの正規化をfunctional normalization¹⁶⁾にて行った。

c. SNP、性染色体除去

Infinium HumanMethylation450 BeadChip解析において、SNPを含むプローブはメチル化の程度に影響を与えることが知られている¹⁷⁾。そのため、偽陽性・偽陰性を軽減するためにそれらのプローブを解析から除去した。さらに、検出力を高くするために性染色体は解析対象から除外した。

d. バッチ効果補正

スキャナーには複数のスライドをセットし、スライドを挿入する時間は担当者のテクニックの差で異なる。これがメチル化の度合いに影響を与える場合がある。これに対して、スライドを挿入する時間などの情報を加味して、スライド間やサンプル間（バッチ）に生じたばらつきを修正代替変数法（Modified Surrogate Variables）で補正した¹⁸⁾。

以上の前処理を経て、Infinium HumanMethylation450 BeadChip解析で得られた生データに対し、実験手技や機械的要因等からくるデータのばらつきを補正した約42万CpGベータ値（DNAメチル化値）を取得した。データ処理は、統計解析ソフトR（ver. 3.1.3）、およびBioconductor（ver. 3.0）のminfi、sva packageを用いて行った。

3) 喫煙曝露により変化するCpGの抽出における統計モデル

DNAメチル化解析対象者292名のうち、喫煙経験のない非喫煙群（非喫煙群）（ $n = 124$ ）、妊娠中も喫煙を継続した喫煙群（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）（ $n = 45$ ）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ごとに異なるため解析から除外した。

前処理により得られた約42万のベータ値と母体の喫煙曝露との関連はロバスト線形回帰¹⁹⁾、経験ベイズ法²⁰⁾を用いて検討した。血液（白血球）のDNAメチル化値は細胞の種類（好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球）によって異なるため、細胞組成の違いによる解析結果への影響を軽減するために補正する必要がある。そこで成人末梢血の白血球細胞組成とメチル化に影響を受けるCpGをリファレンスとして必要としないHousemanの手法²¹⁾により潜在的共変量を推定し、モデルに加えた²²⁾。母体の喫煙曝露を従属変数に、母年齢、児性別、母教育歴、およびHousemanの手法により推定した潜在的共変量で調整した統計モデルを作成した（図(2)-1）。

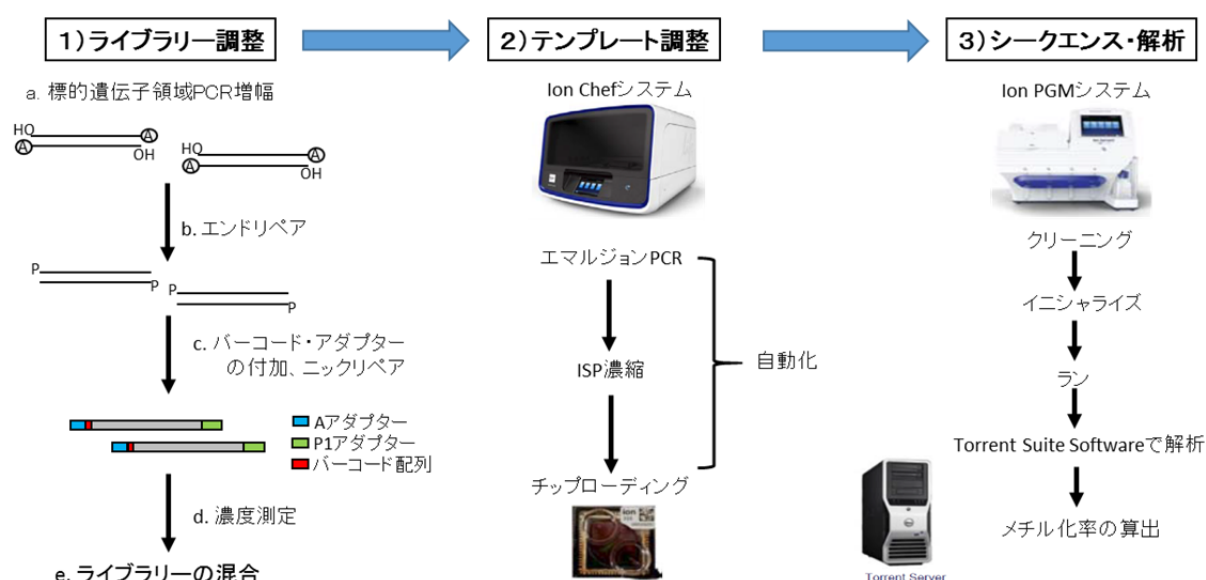
CpGの抽出は非喫煙群と喫煙継続群、妊娠後喫煙中止群と喫煙継続群、非喫煙群と妊娠後喫煙中止群において多重比較問題をBenjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR)法²³⁾で補正したゲノムワイドの有意水準を基準に絞り込んだ。また偏回帰係数を算出し、メチル化変化の大きさを偏回帰係数の絶対値で定義し、メチル化変化の方向も調べ、CpG抽出の指標とした。

以上のデータ処理・統計解析は、R (ver. 3.2.3)、Bioconductor (ver. 3.2) のminfi、sva、limmaパッケージ、Comprehensive R Archive NetworkのRefFreeEWASパッケージを用いて行った。

(2) 次世代シーケンサーを用いた特定領域のDNAメチル化解析

一般的に網羅的な解析では偽陽性を抽出してしまう可能性があることから、別の手法での検証作業が必要である。また今回は網羅的DNAメチル化解析で使用した札幌コーホートとは別集団となる北海道コーホートを用いてDNAメチル化解析を行う必要がある。そこで特定の遺伝子領域のDNAメチル化率について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解析を行った。

次世代シーケンサーによる解析は、ThermoFisher社アンプリコンシーケンスガイドに従い、ThermoFisher社製のIon Torrentシステムで行った。アンプリコンシーケンスは、c. ライブラリーの調整、b. テンプレート調整、c. シーケンス・解析からなる (図(2)-2)。



図(2)-2 次世代シーケンサーを用いたDNAメチル化解析の流れ

1) ライブラリー調整

a. 標的遺伝子領域のPCR増幅

500 ngの臍帯血DNAをZymo EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research; Irvine, CA, USA) でバイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理後の各DNAサンプルについて、プライマーセットごとにFastStart™ Taq DNA Polymerase (Roche; Basel, Switzerland) を用いて、図(2)-3に示した反応液組成及び条件でPCR反応を行った。プライマーの設計は網羅的解析により抽出されたCpGを含むようにメチル化プライマー設計ソフトウェアMethPrimer2.0

(<http://www.urogene.org/methprimer2/tester-invitation.html>)を用いて設計した (表(2)-1)。各サンプルのPCR産物は2%アガロースゲル電気泳動でバンドを確認後、画像解析ソフト (ImageJ) による輝度を測定した。同一サンプル (バイサルファイトDNA) からの各PCR産物は輝度の数値から濃度が等しくなるように1つのチューブに混ぜ、1サンプルで複数領域を解析できるよう調整し

た。

反応液 (1反応あたり)		PCR反応条件	
Template(バイサルファイトDNA: 25ng/uL)	1 μ L	95°C	4分
Primer mix (10 μ M)	0.63 μ L	95°C	30秒
10xPCR Buffer without MgCl ₂	1.25 μ L	55-60°C*	30秒
25mM MgCl ₂	1.25 μ L	72°C	60秒
dNTP(PCR Grade Nucleotide Mix)	0.25 μ L	72°C	7分
滅菌水	8.02 μ L	4°C	∞
Fast start Taq DNA Polymerase (Roche社)	0.1 μ L		
Total	12.5 μL		

*アニーリング温度は増幅領域により異なる表(2)-1に記載

図 (2)-3 バイサルファイトPCR反応液組成と反応条件

表 (2)-1 次世代シーケンサーによるDNAメチル化解析PCRプライマー

遺伝子名	CpG番号	フォワードプライマー 配列	リバースプライマー 配列	PCR産物 サイズ	CpG 数	アニーリ ング温度
AHRR	cg05575921	TATTTTGGAGAGG GTAGTTTGT	AACCACTCCC AAAACCCAC	120	5	60
CYP1A1	cg05549655/ cg00213123/ cg23727072	GTTATGTTAAATG GTATTGGGGTTT	AAACTCTTAAA AAACCAACCTC	219	17	60
MYO1G	cg12803068/ cg04180046	TTTAGAATTATTAG TTTTGGAGAAAAT	TACAACACCACC AACTAATCTCCT	286	20	55
GFI1	cg12876356/ cg18146737	TTGTTTATTGTTT TGTTTTTATAG	ATAAACACATT AACTTCTCC	237	21	55
ESR1	cg04063345/ cg15626350	TGTTAGTTATGAT GATGATTTTTTGG	AATTATTTTAAACA CTTATACTCCATAT	242	11	55
SHANK2	cg05780228	TAAGAGGGAATAT GGTTGAGTTGAT	AAACCAAAAATC AAACCAAAACTC	243	9	60
PRDX1	cg02631906	TAGTTTGGGTATT GAGGGTATAGTG	TACCTTTATAACC AATAAAAATCTC	314	26	57
THRA	cg15370536	TAGGTGGGTGGA GTTTTTTGTATT	ATATTACAAACCC CTTCCTCCTAAA	201	5	60
EVC2	cg01290904	GTTAGTTATAGTG GTGTTGAGGGTG	AACTATACAAAAC AAACCAAAAAA	273	4	60

b. エンドリペア

本ステップ以降はPrepare Amplicon Libraries without Fragmentation Using the Ion Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher; Waltham, MA, USA) のプロトコルに従ってライブラリー調整を進めた。まず、プールしたPCR産物をAMPure®XP Reagent (Beckman Coulter; Brea, CA, USA) により精製後、濃度はQubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher) を用いて定量した。平滑末端生成のためのエンドリペアは、表(2)-2に示した通りに混ぜ、室温で20分間反応させた。

表 (2)-2 エンドリペア反応液組成 (1サンプルあたり)

50ng pooled amplicons	79 μ L
5xEnd Repair Buffer	20 μ L
End Repair Enzyme	1 μ L
total	100 μ L

c. バーコード・アダプターの付加、ニックリペア

エンドリペア反応後、AMPure®XP Reagentを使用して精製し、アダプターとバーコード付加及びニックリペアの工程に進んだ。表(2)-3に示した通り反応液を混ぜたのち、サーマルサイクラーで25°C, 15分、72°C, 5分、4°C, 1時間以内で反応させた。バーコード配列は全96種類のため、全562サンプルをランダムに8群に分け、各群内でバーコードが重ならないように使用した。この作業以降は群ごとに実験を進めた。

表(2)-3 バーコード・アダプター、ニックリペア反応液組成 (1サンプルあたり)

DNA	25 µL
10x Ligase Buffer	10 µL
Ion P1 Adapter	2 µL
Ion Xpress Barcode X	2 µL
dNTP mix	2 µL
Nuclease-free Water	49 µL
DNA Ligase	8 µL
Nick Repair Polymerase	2 µL
Total	100 µL

d. 濃度測定

バーコード・アダプター、ニックリペア反応後、AMPure®XP Reagentにより精製し、ライブラリー濃度定量の工程に進んだ。ThermoFisher社のIon Library Quantitation Kitを用いて、リアルタイムPCR (StepOnePlusリアルタイムPCRシステム; ThermoFisher) で行った。各ライブラリーの定量はE. coli DH10B Control Libraryを用いた検量線から算出した。

e. ライブラリーの混合

定量結果から、各ライブラリーを100 pMになるようにLow TE Bufferで調整し、群ごとに各ライブラリーを等量混合し、1つのプールしたライブラリーを作製した。

2) テンプレート調整

テンプレート調整はThermoFisher社のIon PGM Hi-Q Chef Kitプロトコルに従って、自動化調整装置であるIon Chef装置を用いて行った。100 pMのライブラリープールはNuclease-free waterで50 pMに希釈し、プランの設定、試薬類及び半導体チップ、アダプターのセッティングを行い、約11時間の反応によりテンプレート調整を行った。半導体チップは、Ion 318 Chip Kit v2 BCを使用した。

3) シークエンス・解析

シークエンシングはThermoFisher社のIon PGM Hi-Q Chef Kitプロトコルに従って、Ion PGMシステムで行った。シークエンスを始める前に、クロライトクリーニング、水クリーニングを行った後、イニシャライズを開始し、pHを調整し、各dNTP溶液の充填を行った。イニシャライズ直後に半導体チップをセットし、シークエンスを開始した。取得したシークエンスデータは

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、標的遺伝子領域における各CpGのメチル化率を算出した。

(3) 喫煙曝露と6歳のADHD-RSのスコアの関係

北海道コホート集団を対象としたケース・コホート研究デザインから喫煙曝露がADHD疑い群と関連があるかを検討するために分割表を作成し、比率の差の検定を行った。

プライマリーエンドポイントとして6歳のADHD-RSスコア（男児 ≥ 14.9 、女児 ≥ 9.4 ）によりADHD疑い群（ $n = 224$ ）、健常者群（ $n = 286$ ）が解析対象者となった。

喫煙曝露は質問票による喫煙歴または母体血清コチニン濃度のそれぞれで検討した。同ケース・コホート集団の対象者562名のうち、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（ $n = 38$ ）が質問表による喫煙曝露の解析対象者となった（表(2)-4）。なお、妊娠がわかり禁煙した群（喫煙中止群）、妊娠のため禁煙をした群（妊娠前喫煙中止群）については、質問表からは禁煙の時期を明確に分類することができなかったため解析対象から除外した。さらに、喫煙歴が不明な対象者も解析対象から除外した。

母体血清コチニン濃度による喫煙曝露については、妊娠後期（約8か月）での母体の血清コチニン濃度²⁴⁾により血清コチニン高濃度群、中等度濃度群、低濃度群へ群別化した。それぞれの対象者数は、48名、200名、262名となった（表(2)-5）。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。

表(2)-4 質問表による喫煙曝露とADHD疑い群の分割表

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

表(2)-5 母体血清コチニン濃度とADHD疑い群の分割表

	対照群	ADHD疑い群	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

(4) 6歳のADHD-RSのスコアとメチル化の関係

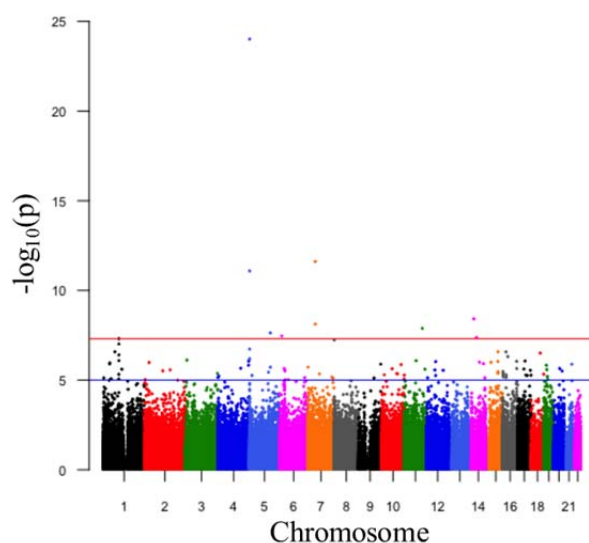
札幌コホート集団において喫煙曝露によりメチル化が有意に変化すると同定されたCpGについて、北海道コホート集団のADHD疑い群（ $n = 224$ ）とコントロール群（ $n = 286$ ）の間でメチル化率に差があるかを検討した。対象となった全てのCpGのメチル率の分布がシャピロ・ウィルク検定により正規性が棄却されたため、有意水準は0.05としてウィルコクソンの順位和検定を行った。

4. 結果及び考察

(1) 網羅的DNAメチル化データを用いた胎児期喫煙曝露により変化するDNAメチル化領域の探索

1) 非喫煙群と喫煙群間比較による喫煙曝露により変化するDNAメチル化CpGの同定

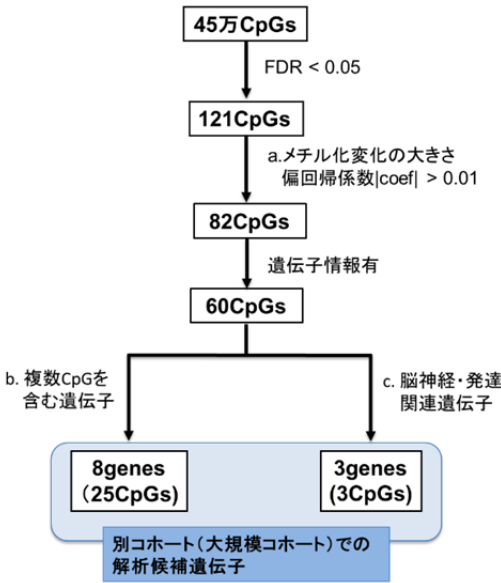
ロバスト線形回帰、経験ベイズ法、Housemanの手法による統計モデルを用いて、非喫煙－喫煙群間と約42万CpGにおける DNA メチル化との関連を解析した結果のマンハッタンプロットを図(2)-4に示す。その結果、FDR < 0.05で抽出されたCpG領域は121であった。



図(2)-4 非喫煙群と喫煙群間比較におけるマンハッタンプロット

縦軸はP値の常用対数の負値、横軸は染色体番号、赤線はボンフェローニ、青線はFDRの有意水準を示す。

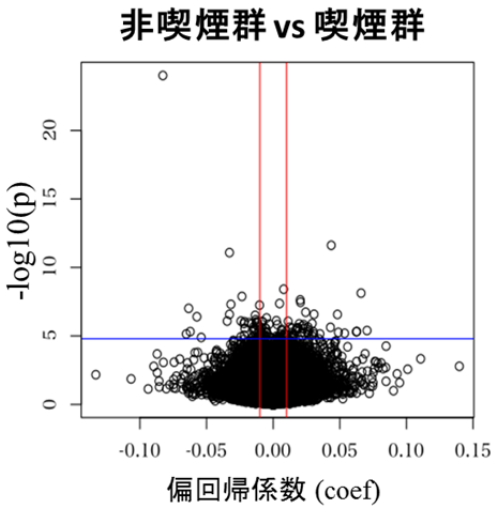
次に別コーホート（北海道コーホート）サンプルを用いて別手法によるメチル化割合の検証が必要になることから、さらなる標的遺伝子領域の絞り込みが必要である。図(2)-5にそのフローチャートを示す。



図(2)-5 喫煙曝露と関連するCpG絞り込みのフローチャート

a. メチル化変化の大きさ

偏回帰係数は2群間比較で喫煙曝露によりメチル化が高くなればプラスの値、低くなればマイナスの値を示す。ゼロに近いほど2群間でのメチル化の差が少なく、離れるほど大きくなることを意味する。縦軸をP値の常用対数の負値、横軸を偏回帰係数としたボルケーノプロットを図(2)-6に示した。FDR < 0.05（青線より上部）かつメチル化変化の大きいCpGを抽出するために偏回帰係数の絶対値 $|coef| > 0.01$ （赤線の外側）の基準で抽出を行った。その結果、非喫煙群と喫煙群で82CpGs領域が抽出された(表(2)-6)。



図(2)-6 非喫煙群と喫煙群比較における偏回帰係数とP値によるボルケーノプロット

表(2)-6 喫煙曝露によりFDR < 0.05および偏回帰係数の絶対値|coef| > 0.01で抽出されたCpG

	CpG番号	遺伝子名	染色 体番 号	CpGの遺伝子内 領域	アイラ ンドと の関係	q値	偏回帰 係数	偏回 帰係 数絶 対値
1	cg05575921	AHRR	5	Body	N_Shore	4.12E-19	-0.0828	0.0828
2	cg22549041	CYP1A1	15	TSS1500	Island	2.70E-02	0.0704	0.0704
3	cg12803068	MYO1G	7	Body	S_Shore	6.36E-04	0.0660	0.0660
4	cg04063345	ESR1	6	Body	S_Shore	3.52E-02	-0.0652	0.0652
5	cg12876356	GFI1	1	Body	Island	3.44E-03	-0.0634	0.0634
6	cg24228532		18		S_Shelf	2.90E-02	0.0628	0.0628
7	cg01215511	FLYWCH1	16	5'UTR		2.98E-02	0.0624	0.0624
8	cg09935388	GFI1	1	Body	Island	2.94E-02	-0.0623	0.0623
9	cg18146737	GFI1	1	Body	Island	9.37E-03	-0.0572	0.0572
10	cg15626350	ESR1	6	Body	S_Shore	4.75E-02	-0.0540	0.0540
11	cg26493188	FLYWCH1	16	5'UTR		3.31E-02	0.0536	0.0536
12	cg07340025		5			3.00E-02	0.0489	0.0489
13	cg06478823	ACSM3	16	TSS1500		7.18E-03	0.0483	0.0483
14	cg04180046	MYO1G	7	Body	Island	5.13E-07	0.0436	0.0436
15	cg27434149		10			2.15E-02	0.0430	0.0430
16	cg10078415	ACSM3	16	TSS1500		3.52E-02	0.0351	0.0351
17	cg09662411	GFI1	1	Body	Island	1.42E-02	-0.0345	0.0345
18	cg21161138	AHRR	5	Body		1.17E-06	-0.0328	0.0328
19	cg25189904	GNG12	1	TSS1500	S_Shore	7.18E-03	-0.0328	0.0328
20	cg06338710	GFI1	1	Body	Island	2.10E-03	-0.0317	0.0317
21	cg05549655	CYP1A1	15	TSS1500	Island	7.18E-03	0.0307	0.0307
22	cg05150608		14			3.59E-02	0.0304	0.0304
23	cg00394823	ACSM3	16	TSS200		2.98E-02	0.0303	0.0303
24	cg04584103	ASB2	14	Body	Island	1.55E-02	0.0293	0.0293
25	cg15554505		19		Island	4.11E-02	0.0290	0.0290
26	cg07469926	TRIM36	5	Body	Island	2.55E-02	0.0270	0.0270
27	cg13932501	AUH	9	Body		3.62E-02	0.0268	0.0268
28	cg23635789	SRC	20	Body	Island	2.15E-02	0.0262	0.0262
29	cg04333296	LOC653653	17	TSS200		3.00E-02	0.0260	0.0260
30	cg13492331	FAM107B	10	Body		2.98E-02	0.0257	0.0257
31	cg17924476	AHRR	5	Body	S_Shore	6.08E-03	0.0244	0.0244
32	cg20732787	NCLN	19	Body	Island	4.56E-02	-0.0243	0.0243
33	cg05780228	SHANK2	11	Body		1.42E-02	-0.0242	0.0242
34	cg01290904	EVC2	4	5'UTR;Body	N_Shore	3.15E-02	0.0235	0.0235
35	cg11778756	DDX10	11	Body		9.25E-04	-0.0234	0.0234
36	cg06612130		4			1.63E-02	0.0230	0.0230
37	cg12098750	ANKS1B	12	TSS1500;Body		2.22E-02	0.0225	0.0225
38	cg17710804	C1orf113	1	TSS1500;TSS200	Island	1.55E-02	-0.0220	0.0220
39	cg04284530	MARCH3	5	TSS1500	Island	1.97E-02	0.0219	0.0219
40	cg18316974	GFI1	1	Body	Island	3.93E-02	-0.0217	0.0217
41	cg22242148		15		N_Shelf	1.42E-02	-0.0215	0.0215
42	cg15787636	TBCD	17	Body	S_Shelf	2.98E-02	0.0214	0.0214
43	cg26098871	ENGASE	17	3'UTR		2.22E-02	-0.0213	0.0213
44	cg11898431		6			4.53E-02	0.0211	0.0211
45	cg09321403		6			1.86E-03	0.0205	0.0205
46	cg09068004	MARCH3	5	TSS1500	S_Shore	1.42E-03	0.0203	0.0203
47	cg12612445	C21orf67	21	Body	S_Shore	1.55E-02	0.0195	0.0195
48	cg06686709	CACNB4	2	Body;TSS200		2.22E-02	0.0188	0.0188
49	cg05768922	HEPACAM	11	Body	S_Shore	2.15E-02	0.0185	0.0185
50	cg04683068	DNMT3A	2	Body;		1.45E-02	-0.0180	0.0180
51	cg00213123	CYP1A1	15	TSS1500	Island	2.38E-02	0.0177	0.0177
52	cg14846292	C1QL4	12	3'UTR	N_Shore	2.22E-02	0.0176	0.0176
53	cg23727072	CYP1A1	15	TSS1500	Island	2.70E-02	0.0169	0.0169
54	cg07285276	RAPGEF1	9	TSS200		1.55E-02	-0.0160	0.0160
55	cg23742314		12			3.59E-02	0.0158	0.0158
56	cg26140366	TPO	2	Body	S_Shore	4.92E-02	-0.0156	0.0156
57	cg07420827	AGAP1	2	Body		4.56E-02	-0.0153	0.0153
58	cg08142094		16			2.15E-02	-0.0150	0.0150
59	cg25268451	GNASAS;GNAS	20	Body;TSS1500	N_Shore	4.51E-02	0.0149	0.0149
60	cg24267378		3		S_Shelf	2.78E-02	-0.0149	0.0149
61	cg07339236	ATP9A	20	Body		2.30E-02	-0.0145	0.0145
62	cg26652413	CPAMD8	19	Body	N_Shore	2.21E-02	0.0143	0.0143
63	cg03059991		12		Island	3.02E-02	0.0142	0.0142

64	cg15953616		13		S Shelf	4.75E-02	0.0136	0.0136
65	cg23757461	NEDD4L	18	5'UTR;Body	S Shore	7.87E-03	-0.0135	0.0135
66	cg10665390	HLA-DPB2	6	Body	S Shore	2.30E-02	-0.0134	0.0134
67	cg24090911	AHRR	5	Body		1.39E-02	-0.0131	0.0131
68	cg12413421	RSPO1	1	3'UTR		1.46E-02	-0.0127	0.0127
69	cg26963632		16			1.42E-02	-0.0125	0.0125
70	cg17736443	HIST1H2AJ;HIST1H2BM	6	TSS1500;1stExon	S Shore	2.15E-02	0.0123	0.0123
71	cg04590974		7		S Shore	1.97E-02	-0.0119	0.0119
72	cg23201676		15			1.45E-02	-0.0119	0.0119
73	cg23251057		14			1.45E-02	-0.0116	0.0116
74	cg02105481		2			4.11E-02	-0.0114	0.0114
75	cg12683944	ITGB3	17	TSS1500	Island	1.42E-02	0.0112	0.0112
76	cg14951488	CEP55	10	TSS200	Island	2.84E-02	-0.0109	0.0109
77	cg02613827		4		S Shore	4.77E-02	-0.0104	0.0104
78	cg24050414	PRAM1	19	3'UTR	Island	4.57E-02	0.0102	0.0102
79	cg12718582		8		S Shore	2.20E-03	-0.0102	0.0102
80	cg02631906	PRDX1	1	TSS1500	S Shore	3.85E-02	0.0102	0.0102
81	cg15370536	THRA	17	Body		2.15E-02	-0.0102	0.0102
82	cg12690496		10		N Shelf	2.81E-02	0.0101	0.0101

表(2)-6の上位CpGは喫煙によりメチル化変化の大きいCpGを示しているが、その中の *AHRR*, *CYP1A1*, *MYO1G*, *ESR1*, *GFI1*については先行研究でも喫煙によりメチル化変化が大きい遺伝子として報告^{14, 25, 26)}されていることから、本研究における網羅的メチル化解析結果が妥当であると考えられる。

b. 複数のCpGを含む遺伝子

82CpGs領域のうち遺伝子情報が付加されている60CpGsを対象に複数（2CpGs以上）のCpGが含まれる遺伝子を抽出した（表(2)-7）。Infinium HumanMethylation450 BeadChipには1つの遺伝子に複数のCpG領域がプローブ設計されていることから、複数のCpGが抽出された遺伝子は喫煙の影響を受けやすい遺伝子と考えられる。その結果、8つの遺伝子が抽出された。CpGの位置情報から *AHRR* 以外の遺伝子はCpG間の距離が数十～数百bpしか離れていないことから、遺伝子領域全体ではなく、特定の範囲が喫煙曝露によりメチル化変化の影響を受けることが示唆される。また近い位置に存在していることがマイクロアレイで測定できていない周辺のCpGを含む遺伝子領域のメチル化も変化している可能性が考えられる。

表(2)-7 複数（2CpG領域以上）のCpGが含まれる遺伝子

	CpG番号	遺伝子名	染色体番号	CpGの遺伝子内領域	CpGの位置
1	cg06478823	ACSM3	16	TSS1500	20774873
	cg10078415			TSS1500	20775011
	cg00394823			TSS200	20775166
2	cg17924476	AHRR	5	Body	323794
	cg05575921			Body	373378
	cg21161138			Body	399360
	cg24090911			Body	400732
3	cg22549041	CYP1A1	15	TSS1500	75019251
	cg05549655			TSS1500	75019143
	cg23727072			TSS1500	75019087
	cg00213123			TSS1500	75019070
4	cg04063345	ESR1	6	Body	152130058
	cg15626350			Body	152130207
5	cg01215511	FLYWCH1	16	5'UTR	2975552
	cg26493188			5'UTR	2975209
6	cg09662411	GFI1	1	Body	92946132
	cg06338710			Body	92946187
	cg18146737			Body	92946700
	cg12876356			Body	92946825

cg18316974					Body	92947035
cg09935388					Body	92947588
7	cg04284530	MARCH3	5		TSS1500	126367249
	cg09068004				TSS1500	126367284
8	cg12803068	MYO1G	7		Body	45002919
	cg04180046				Body	45002736

c. 脳神経・発達関連遺伝子

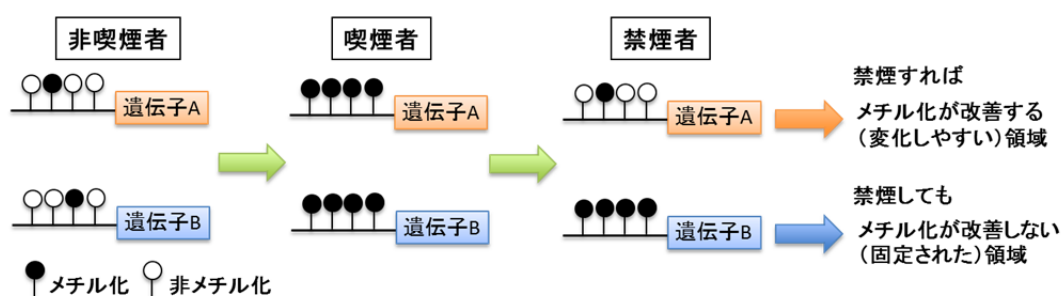
次に60CpG領域の遺伝子情報をUCSCゲノムブラウザー及びPubmedで文献検索し、脳神経・発達に関連する遺伝子を抽出した（表(2)-8）。SHANK2は神経細胞の後シナプスで働くSHANKファミリーの1つでシナプス機能に重要であり、自閉症との関連も指摘されている^{27, 28)}。PRDX1はペルオキシレドキシシンファミリーの1つで強い抗酸化作用を示すことが知られ、動物レベルでうつ病との関与が指摘されている²⁹⁾。THRAは甲状腺ホルモン受容体の1つで脳の発達・成熟過程で発現が増加することが報告されている^{30, 31)}。

表(2)-8 神経・発達関連遺伝子

	CpG番号	遺伝子名	染色体番号	CpGの遺伝子内領域	アイランドとの関係	q値	偏回帰係数	偏回帰係数絶対値
1	cg05780228	SHANK2	11	Body		1.42E-02	-0.0242	0.0242
2	cg02631906	PRDX1	1	TSS1500	S Shore	3.85E-02	0.0102	0.0102
3	cg15370536	THRA	17	Body		2.15E-02	-0.0102	0.0102

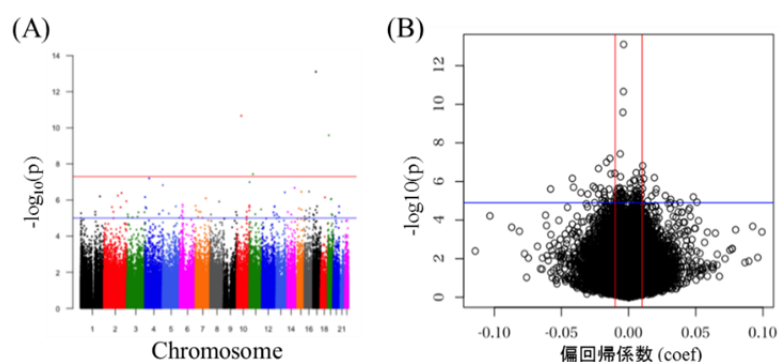
2) 喫煙を止めることによるDNAメチル化への影響

1) では非喫煙群と喫煙群で喫煙曝露によりDNAメチル化変化する領域を解析、抽出してきた。ここで喫煙曝露によるDNAメチル化変化の影響は喫煙を止めれば非喫煙者と同様のメチル化状態に戻るのか？それとも戻らず維持されているのか？を検討した。図(2)-7に示した概念図のように遺伝子Aでは喫煙によりメチル化が高くなるが、禁煙すればメチル化が戻る（改善する）のに対し、遺伝子Bでは禁煙してもメチル化が戻らないパターンが考えられる（禁煙によるメチル化の低下も同様）。この解析により禁煙の効果をDNAメチル化レベルで明らかにできる可能性がある。

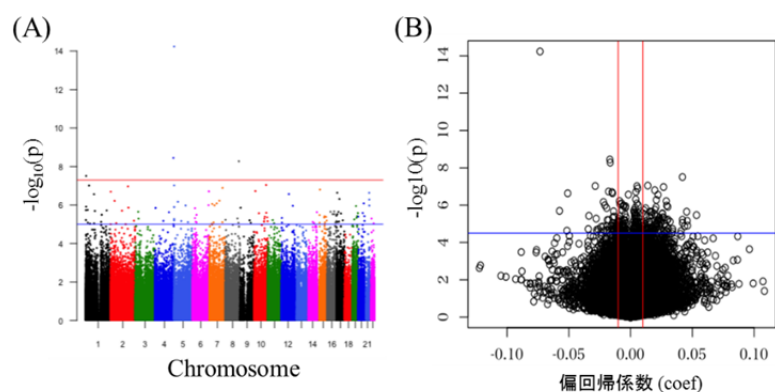


図(2)-7 妊娠がわかって喫煙を止めた喫煙中止群におけるメチル化状態の概念図

これを明らかにするために、妊娠がわかって喫煙を止めた喫煙中止群を用いて、非喫煙群と中止群で比較解析した結果を図(2)-4に、中止群と喫煙群で比較解析した結果を図(2)-8に示す。FDR < 0.05の基準で抽出されてきたCpGは非喫煙群と中止群で99CpGsサイト（図(2)-7(A)）、中止群と喫煙群で230CpGsサイト（図(2)-8(A)）であった。



図(2)-7 非喫煙群と中止群比較における (A) マンハッタンプロットと (B) ボルケーノプロット



図(2)-8 中止群と喫煙群比較における (A) マンハッタンプロットと (B) ボルケーノプロット

次に図(2)-7(B)と図(2)-8(B)に示したボルケーノプロットの結果からFDR < 0.05 (青線より上部) かつ偏回帰係数の絶対値 $|\text{coef}| > 0.01$ (赤線の外側) の基準で抽出を行った。非喫煙群と中止群で35CpGsサイト (表(2)-9)、中止群と喫煙群で134 CpGsサイト (表(2)-10)であった。

表(2)-9 非喫煙群－中止群でFDR < 0.05および偏回帰係数の絶対値 $|\text{coef}| > 0.01$ で抽出されたCpG

	CpG番号	遺伝子名	染色体番号	CpGの遺伝子内領域	アイランドとの関係	CpGの位置	q値	偏回帰係数	偏回帰係数絶対値
1	cg14418756	STK32C	10	Body	S Shore	134043618	3.09E-02	-0.0581	0.0581
2	cg26601609		8		N Shore	7883822	3.91E-02	0.0482	0.0482
3	cg05618934		4		Island	1407592	1.91E-02	-0.0419	0.0419
4	cg27173819	STK32C	10	Body	S Shore	134043635	3.09E-02	-0.0410	0.0410
5	cg05225883	STK32C	10	Body	S Shore	134043755	3.55E-02	-0.0355	0.0355
6	cg27560452		16		Island	49499385	4.33E-02	0.0314	0.0314
7	cg12594615	TBC1D8	2	Body		101643137	3.63E-02	-0.0303	0.0303
8	cg17484472		16		Island	49499189	3.80E-02	0.0274	0.0274
9	cg24055029	TNXB	6	Body	Island	32055137	3.09E-02	-0.0263	0.0263
10	cg04574346		12		Island	132976866	3.09E-02	-0.0248	0.0248
11	cg19571540		14		S Shore	102101660	1.13E-02	-0.0224	0.0224
12	cg03389650		7		S Shore	56553709	3.63E-02	-0.0223	0.0223
13	cg24586758	PCDHB3	5	TSS200	N Shore	140480200	3.09E-02	-0.0209	0.0209
14	cg01290904	EVC2	4	5'UTR;Body	N Shore	5708474	3.09E-02	0.0206	0.0206
15	cg02427511		16		N Shelf	15524851	3.55E-02	0.0200	0.0200
16	cg23490014	PTPRG	3	Body		61815085	4.48E-02	-0.0198	0.0198
17	cg13235761		1			203561580	1.91E-02	0.0192	0.0192
18	cg13010014	ROBO3	11	Body	S Shore	124740965	3.55E-02	-0.0182	0.0182
19	cg20151899	CDH4	20	Body	Island	60511914	3.65E-02	-0.0181	0.0181

20	cg02852557		15			25907264	4.89E-02	-0.0179	0.0179
21	cg03702677	RIMBP2	12	Body	N Shore	130935008	3.94E-02	-0.0176	0.0176
22	cg11497377	SFRS12	5	Body		65465543	3.87E-02	0.0172	0.0172
23	cg13649441	MUC5B	11	Body	S Shelf	1276661	7.21E-03	-0.0165	0.0165
24	cg17940902	HLA-DMA	6	TSS1500		32921233	4.79E-02	-0.0154	0.0154
25	cg03052071		10			134765099	3.09E-02	-0.0145	0.0145
26	cg02050985	TBC1D8	2	Body	N Shore	101766314	4.74E-02	0.0142	0.0142
27	cg17701100	YIPF7	4	Body		44631446	5.41E-03	-0.0139	0.0139
28	cg16628093	CALCRL	2	5'UTR		188274544	1.45E-02	-0.0133	0.0133
29	cg02853850		16		S Shelf	19900511	4.80E-02	-0.0130	0.0130
30	cg06080874		18		Island	46501625	1.91E-02	0.0113	0.0113
31	cg11549848	PCOTH;MIPEP	13	5'UTR;TSS1500	S Shore	24464707	4.79E-02	-0.0106	0.0106
32	cg07267674		5		N Shelf	1049712	9.27E-03	0.0105	0.0105
33	cg19586709		12		S Shore	133054309	3.09E-02	0.0105	0.0105
34	cg09266229		13			111697455	1.45E-02	-0.0103	0.0103
35	cg13898605	DHRS7C	17	Body	Island	9675212	3.94E-02	-0.0102	0.0102

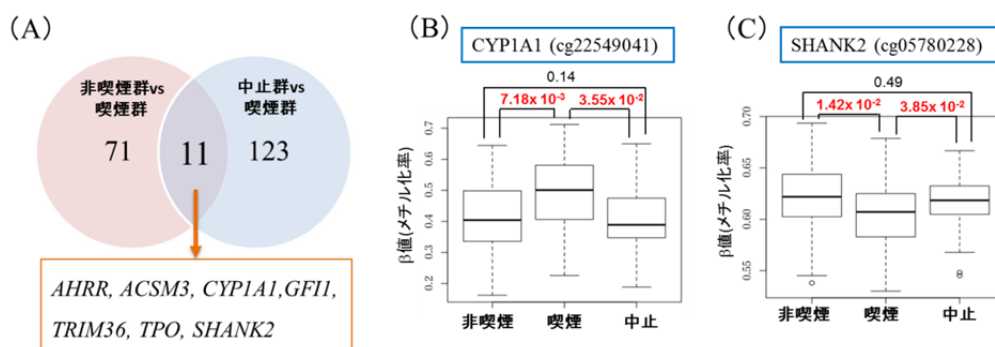
表(2)-10 中止群－喫煙群でFDR < 0.05および偏回帰係数の絶対値|coef| >0.01で抽出されたCpG

	CpG番号	遺伝子名	染色体番号	CpGの遺伝子内領域	アイランドとの関係	CpGの位置	q値	偏回帰係数	偏回帰係数絶対値
1	cg05575921	AHRR	5	Body	N Shore	373378	2.48E-09	-0.0733	0.0733
2	cg12876356	GFI1	1	Body	Island	92946825	2.07E-02	-0.0576	0.0576
3	cg08034867	ABR	17	Body		990908	2.45E-02	0.0534	0.0534
4	cg06531741	HTR3B	11	TSS200		1.14E+08	4.72E-02	-0.0515	0.0515
5	cg06463313	PFKL	21	Body	Island	45742621	6.62E-03	-0.0509	0.0509
6	cg12101586	CYP1A1	15	TSS1500	Island	75019203	3.85E-02	0.0461	0.0461
7	cg05225883	STK32C	10	Body	S Shore	1.34E+08	3.22E-02	0.0458	0.0458
8	cg04717895		16			31541298	2.12E-02	0.0454	0.0454
9	cg01590338		14		Island	1.02E+08	3.85E-02	0.0437	0.0437
10	cg23486701	SPTBN1	2	Body	S Shelf	54789491	3.35E-02	0.0420	0.0420
11	cg22066599		11		S Shelf	49917865	3.18E-02	0.0420	0.0420
12	cg16512885		1			4697919	3.32E-03	0.0420	0.0420
13	cg06478823	ACSM3	16	TSS1500		20774873	4.77E-02	0.0410	0.0410
14	cg09662411	GFI1	1	Body	Island	92946132	4.38E-02	-0.0343	0.0343
15	cg05150608		14			1.03E+08	4.82E-02	0.0342	0.0342
16	cg25223623		5		N Shore	1.41E+08	4.38E-02	0.0341	0.0341
17	cg24733560	TAF4	20	Body	N Shelf	60626293	2.55E-02	-0.0338	0.0338
18	cg08720517	LOC389333	5	1stExon	Island	1.39E+08	3.26E-02	0.0321	0.0321
19	cg01624202		15		N Shore	89958550	4.33E-02	0.0304	0.0304
20	cg12738008	MYOM2	8	Body	Island	2037954	3.17E-02	0.0302	0.0302
21	cg07807395		1			4698416	1.64E-02	0.0301	0.0301
22	cg10817554		2		S Shore	2.32E+08	3.22E-02	0.0293	0.0293
23	cg07469926	TRIM36	5	Body	Island	1.15E+08	1.56E-02	0.0292	0.0292
24	cg01290565	CUX2	12	Body	Island	1.11E+08	4.77E-02	0.0292	0.0292
25	cg02459818	VN1R4	19	1stExon		53770873	4.79E-02	0.0288	0.0288
26	cg18107006	HNRPLL	2	TSS1500	S Shore	38831166	1.24E-02	0.0288	0.0288
27	cg05901543	CDH15	16	Body		89251975	3.85E-02	0.0287	0.0287
28	cg21161138	AHRR	5	Body		399360	5.71E-03	-0.0286	0.0286
29	cg05549655	CYP1A1	15	TSS1500	Island	75019143	3.55E-02	0.0280	0.0280
30	cg14817490	AHRR	5	Body		392920	2.93E-02	-0.0278	0.0278
31	cg06780726	C13orf16	13	Body	N Shore	1.12E+08	4.48E-02	-0.0275	0.0275
32	cg03221914	HIST1H2AJ	6	TSS1500	S Shore	27783331	2.86E-02	0.0271	0.0271
33	cg12376422		9		Island	1.38E+08	4.79E-02	0.0271	0.0271
34	cg16449464	MAP1D	2	TSS1500	N Shore	1.73E+08	5.71E-03	0.0267	0.0267
35	cg15345477		10			1.3E+08	2.75E-02	0.0262	0.0262
36	cg09681977	HDAC4	2	Body	N Shore	2.4E+08	4.42E-02	-0.0261	0.0261
37	cg12537162	ITGB3	17	TSS1500	N Shore	45330878	2.22E-02	0.0258	0.0258
38	cg02793451	TOX3	16	TSS1500	S Shore	52582072	2.30E-02	0.0257	0.0257
39	cg11654024		1			85230119	3.35E-02	0.0246	0.0246
40	cg13630239	RRP12	10	3'UTR		99116547	3.26E-02	0.0244	0.0244
41	cg20284239	GPR161	1	5'UTR		1.68E+08	3.92E-02	-0.0239	0.0239
42	cg21809624		17			63569403	3.18E-02	0.0236	0.0236
43	cg19829353	HECA	6	Body		1.39E+08	4.42E-02	0.0235	0.0235
44	cg23742314		12			5282086	2.85E-02	0.0233	0.0233
45	cg18276112	FOXK1	7	Body	N Shelf	4755032	3.85E-02	0.0232	0.0232
46	cg16929104	GDF15	19	TSS200	N Shore	18496953	3.08E-02	0.0225	0.0225

47	cg10663316		12			1.25E+08	4.45E-02	0.0225	0.0225
48	cg24590430		10		S Shelf	99097076	3.22E-02	0.0224	0.0224
49	cg13060531	TTL7	1	TSS1500	S Shore	84466098	6.97E-03	0.0222	0.0222
50	cg05780228	SHANK2	11	Body		70713608	3.85E-02	-0.0221	0.0221
51	cg17126924		17			25773641	3.26E-02	0.0220	0.0220
52	cg15813594	EGFLAM	5	TSS200;Body		38445563	1.32E-02	-0.0219	0.0219
53	cg21201401	LIME1	20	TSS200	N Shore	62367884	3.22E-02	0.0218	0.0218
54	cg06682024	MERTK	2	Body		1.13E+08	3.95E-02	0.0215	0.0215
55	cg21526530	ATP8B4	15	TSS1500		50412411	4.68E-02	-0.0213	0.0213
56	cg10717610		2			394242	3.55E-02	0.0212	0.0212
57	cg00284551	SNORD115-8	15	TSS1500		25429176	3.26E-02	0.0212	0.0212
58	cg12104266	ZNF335	20	TSS1500	S Shore	44601447	3.68E-02	0.0211	0.0211
59	cg00213123	CYP1A1	15	TSS1500	Island	75019070	2.58E-02	0.0211	0.0211
60	cg10440011	DPH1	17	TSS1500	Island	1933183	3.89E-02	0.0210	0.0210
61	cg12612445	C21orf67	21	Body	S Shore	46353573	1.18E-02	0.0209	0.0209
62	cg03923789	PARK2	6	Body		1.63E+08	1.56E-02	-0.0208	0.0208
63	cg09456465		1		Island	63782395	4.38E-02	0.0206	0.0206
64	cg23067299	AHRR	5	Body	S Shore	323907	1.66E-02	0.0206	0.0206
65	cg23662331		1			20707513	2.01E-02	0.0198	0.0198
66	cg08756887	TUBA3C	13	Body	S Shelf	19754434	3.68E-02	0.0196	0.0196
67	cg19563355	HERC2	15	Body		28419658	6.60E-03	0.0196	0.0196
68	cg01583021	ANO7	2	Body	N Shore	2.42E+08	4.51E-02	-0.0195	0.0195
69	cg27027375	S100P	4	TSS1500		6695319	1.69E-02	-0.0194	0.0194
70	cg21707131	APOBEC3B	22	TSS200		39378283	4.48E-02	0.0192	0.0192
71	cg08616585	CDH1	16	Body	S Shelf	68774986	2.30E-02	0.0191	0.0191
72	cg11584200		17		S Shelf	44899957	3.85E-02	-0.0191	0.0191
73	cg25648203	AHRR	5	Body		395444	3.18E-02	-0.0189	0.0189
74	cg22013370		1			2.42E+08	4.33E-02	0.0179	0.0179
75	cg18468796	CCDC33	15	Body		74612177	4.22E-02	0.0178	0.0178
76	cg18832655	ECHDC3	10	Body		11805122	6.60E-03	-0.0178	0.0178
77	cg21167135	WNK2	9	Body	N Shore	96079169	3.18E-02	-0.0177	0.0177
78	cg25510201	PCDH24	5	5'UTR		1.76E+08	4.58E-02	-0.0177	0.0177
79	cg16421285	SAE1	19	TSS1500	N Shore	47633827	3.85E-02	0.0174	0.0174
80	cg03709297	SNORD116-2	15	TSS1500		25298516	2.40E-02	0.0173	0.0173
81	cg07450030	AHNAK2	14	Body	N Shore	1.05E+08	2.12E-02	0.0173	0.0173
82	cg06826341	LHX4	1	Body	S Shelf	1.8E+08	4.96E-02	0.0172	0.0172
83	cg24970360		4			1.84E+08	7.50E-04	-0.0168	0.0168
84	cg06853577		14		S Shore	65068854	3.26E-02	0.0167	0.0167
85	cg16001384	NDRG1	8	5'UTR	N Shore	1.34E+08	7.50E-04	-0.0165	0.0165
86	cg08857351	FBXO21	12	Body	N Shore	1.18E+08	4.68E-02	0.0162	0.0162
87	cg08164977	LOC652276	16	Body	N Shore	2672420	4.33E-02	0.0161	0.0161
88	cg15344504	STT3B	3	Body		31677078	2.12E-02	0.0161	0.0161
89	cg26888147	SP6	17	3'UTR	N Shelf	45922479	3.85E-02	-0.0159	0.0159
90	cg22675702	CYTSB	17	Body		20026062	2.12E-02	0.0157	0.0157
91	cg08947894		1		S Shore	1.55E+08	3.68E-02	0.0157	0.0157
92	cg18148726		2			46990942	4.38E-02	-0.0156	0.0156
93	cg18107425	MESP2	15	TSS200	N Shore	90319432	2.62E-02	0.0153	0.0153
94	cg05890849	PRIMA1	14	Body	N Shore	94252810	3.85E-02	-0.0153	0.0153
95	cg22697386	SLITRK6	13	1stExon;5'UTR		86373320	4.82E-02	0.0152	0.0152
96	cg20705081	PACIN1	6	Body	Island	34495308	3.26E-02	0.0152	0.0152
97	cg19787650		8		S Shelf	1.31E+08	3.26E-02	0.0151	0.0151
98	cg26140366	TPO	2	Body	S Shore	1482385	6.60E-03	-0.0151	0.0151
99	cg06632694		2		Island	2.43E+08	4.30E-02	0.0150	0.0150
100	cg01934756		1		N Shore	43352743	3.40E-02	-0.0148	0.0148
101	cg07430820	CHD3	17	Body;1stExon;5'UTR	S Shelf	7792191	6.62E-03	-0.0146	0.0146
102	cg24703661	CD79A	19	1stExon;5'UTR		42381258	2.80E-02	-0.0145	0.0145
103	cg17772163	OCN	5	TSS1500	N Shore	68787760	4.22E-02	0.0144	0.0144
104	cg01822585	IFFO1	12	Body;TSS1500	S Shore	6658846	4.48E-02	-0.0142	0.0142
105	cg06547984		19		Island	1280841	3.85E-02	-0.0140	0.0140
106	cg23047500	KIAA1598	10	TSS200	S Shore	1.19E+08	5.71E-03	0.0139	0.0139
107	cg00318436	PARD6A;ACD	16	Body;TSS1500	S Shore	67696181	2.12E-02	-0.0138	0.0138
108	cg23126152	SSH1	12	TSS200;Body		1.09E+08	4.82E-02	-0.0135	0.0135
109	cg09875326	KIAA0182	16	5'UTR;Body	N Shore	85665049	4.54E-02	0.0135	0.0135
110	cg25400358	GPR137	11	Body;1stExon	N Shore	64054159	4.33E-02	-0.0134	0.0134
111	cg15749148	C10orf79	10	TSS1500	S Shore	1.06E+08	2.61E-02	-0.0132	0.0132
112	cg24773412	KRT8	12	Body	N Shelf	53293549	3.85E-02	-0.0131	0.0131
113	cg05834728	ANTXR2	4	3'UTR		80823062	4.41E-02	0.0131	0.0131
114	cg18824556	GYS2	12	TSS1500		21759089	4.45E-02	0.0125	0.0125
115	cg26459372	ADCY1	7	TSS1500	Island	45613676	4.13E-02	-0.0125	0.0125

116	cg08884074		16			85414436	4.52E-02	0.0124	0.0124
117	cg19807656	C20orf108	20	TSS200	N_Shore	54933810	4.79E-02	0.0124	0.0124
118	cg22242770	OR2B2	6	TSS1500		27880954	1.69E-02	0.0122	0.0122
119	cg27172745	BANP	16	Body	Island	88105698	4.45E-02	0.0122	0.0122
120	cg00936728	FCRL6	1	1stExon;5'UTR		1.6E+08	2.39E-02	0.0121	0.0121
121	cg26335377		3			1.25E+08	4.33E-02	0.0121	0.0121
122	cg04718987	IRF2	4	5'UTR		1.85E+08	3.55E-02	0.0121	0.0121
123	cg05509753	TGFB11	16	TSS1500	N_Shore	31482618	3.90E-02	-0.0120	0.0120
124	cg09377572	EHD2	19	Body	Island	48220075	3.68E-02	-0.0119	0.0119
125	cg26068677	FAT3	11	Body		92282995	4.06E-02	-0.0117	0.0117
126	cg14252222	WDR37	10	Body	N_Shore	1147630	4.82E-02	-0.0116	0.0116
127	cg00052588		16			89672139	3.92E-02	-0.0116	0.0116
128	cg20028827		13		N_Shore	79169823	3.90E-02	-0.0111	0.0111
129	cg13781869	HSD11B1	1	5'UTR;TSS1500		2.1E+08	2.03E-02	0.0110	0.0110
130	cg17925308	ACTN1	14	Body	S_Shelf	69344852	4.45E-02	-0.0109	0.0109
131	cg12257830	HSPG2	1	Body	Island	22191591	3.26E-02	0.0107	0.0107
132	cg16164276	SLC6A1	3	TSS200	N_Shore	11034345	3.85E-02	0.0103	0.0103
133	cg00097038	CRB1	1	Body		1.97E+08	4.79E-02	0.0101	0.0101
134	cg22843670		3			1.5E+08	4.45E-02	0.0101	0.0101

これらの結果と、1)で行った非喫煙群と喫煙群におけるFDR < 0.05の基準で抽出されてきたCpGのリストを用いて、非喫煙群と喫煙群比較、及び、中止群と喫煙群比較で共通して抽出されるCpGを検討し、喫煙中止によりメチル化が戻る領域を探索した。その結果、図(2)-9(A)に示すように11領域のCpGs、7つの遺伝子が抽出された。11領域すべてのCpGにおいて非喫煙群と喫煙群、及び、中止群と喫煙群で同方向（プラスもしくはマイナス）の偏回帰係数を示していることから、喫煙群に対して非喫煙群と中止群は同方向にメチル化変化することが示された（表(2)-11）。例えば、*CYP1A1*は非喫煙群ならびに中止群と比較して喫煙群で有意に高メチル化（図(2)-9(B)）、*SHANK2*では逆に有意に低メチル化（図(2)-9(C)）であった。今後、中止群で非喫煙者と同等のメチル化に戻ることを数理統計学的検定により明らかにしていく。またこれらの遺伝子のうち、*AHRR*、*ACSM3*、*CYP1A1*は非喫煙群と喫煙群比較で大きく変化する領域として抽出された遺伝子であり、*SHANK2*は神経関連遺伝子として抽出した遺伝子であった。



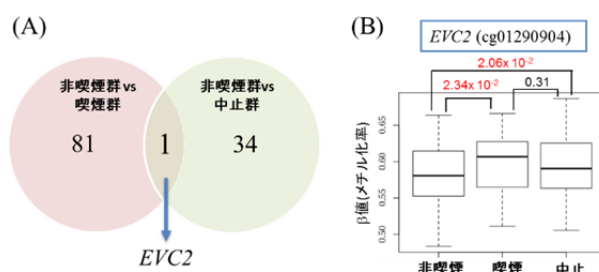
図(2)-9 (A)喫煙中止によるメチル化が戻る領域の探索及び(B) *CYP1A1* (cg22549041)と(C) *SHANK2* (cg05549655)における3群間ボックスプロット

表(2)-11 非喫煙群と喫煙群比較及び中止群と喫煙群比較で共通して抽出されたCpG

		非喫煙群 vs 喫煙群		中止群 vs 喫煙群	
CpG番号	遺伝子名	q 値	偏回帰係数	q 値	偏回帰係数
1	cg00213123 CYP1A1	2.38E-02	0.0177	2.58E-02	0.0211

2	cg05549655	CYP1A1	7.18E-03	0.0307	3.55E-02	0.0280
3	cg05575921	AHRR	4.12E-19	-0.0828	2.48E-09	-0.0733
4	cg05780228	SHANK2	1.42E-02	-0.0242	3.85E-02	-0.0221
5	cg06478823	ACSM3	7.18E-03	0.0483	4.77E-02	0.0410
6	cg07469926	TRIM36	2.55E-02	0.0270	1.56E-02	0.0292
7	cg09662411	GFI1	1.42E-02	-0.0345	4.38E-02	-0.0343
8	cg12612445	C21orf67	1.55E-02	0.0195	1.18E-02	0.0209
9	cg12876356	GFI1	3.44E-03	-0.0634	2.07E-02	-0.0576
10	cg21161138	AHRR	1.17E-06	-0.0328	5.71E-03	-0.0286
11	cg26140366	TPO	4.92E-02	-0.0156	6.60E-03	-0.0151

次に、非喫煙群と喫煙群比較、及び、非喫煙群と中止群比較で共通して抽出されるCpGを検討し、喫煙を中止してもメチル化が戻らない領域の探索を行った（図(2)-10）。その結果、1 CpGの*EVC2*遺伝子が抽出された。このCpGは非喫煙群と比較して喫煙群で有意に高メチル化、非喫煙群と中止群を比較しても有意に高メチル化であった。*EVC2*は骨や骨格の発達に関与する分子³²⁾で、神経発達とは直接的な関与はないが、喫煙曝露の影響が固定されうる領域として別集団での検証候補領域とした。



図(2)-10 (A) 喫煙中止してもメチル化が戻らない領域の探索と (B) *EVC2* (cg01290904) における3群間ボックスプロット

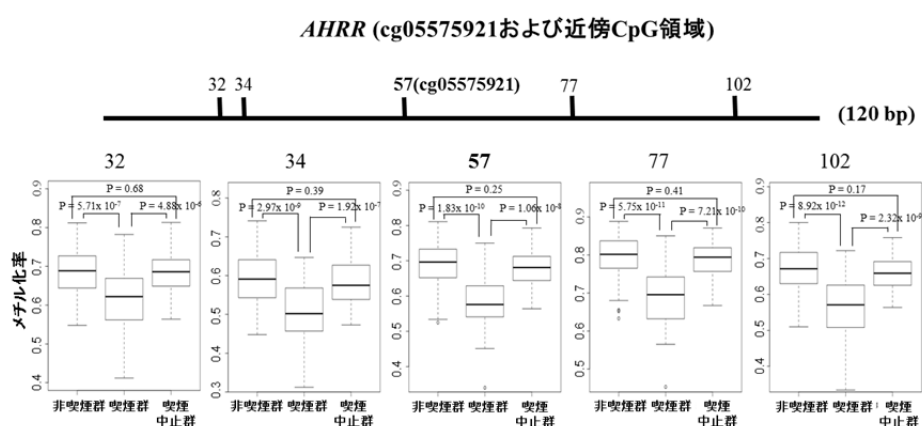
喫煙を止めることによりDNAメチル化レベルでも非喫煙者と同等のメチル化程度になる遺伝子が多く見出されたことから、分子生物学的観点から禁煙の有効性を発信できる可能性が考えられる。しかしながら非喫煙群と中止群のみで99CpGs領域（遺伝子情報があるのは69CpGs）、中止群と喫煙群のみで230CpGs領域（遺伝子情報があるのは174CpGs）が有意にメチル化変化していたことから、喫煙を止めたことに影響されるCpG領域が多く存在することが示唆される。本研究における喫煙中止群は妊娠が判明してから中止した群であり禁煙期間は同程度だと考えられるが、中止群との比較で多くのCpGが抽出されたのは、禁煙前の喫煙量や期間、受動喫煙の有無、そして妊娠初期というDNAメチル化に影響を及ぼす時期であることが影響しているかもしれない。

(2) 次世代シーケンサーを用いた喫煙曝露による*AHRR*遺伝子領域のDNAメチル化変化の検証

網羅的なDNAメチル化データ解析では偽陽性が含まれてしまう可能性が考えられ、別の手法で再現性を検証することが望ましい。網羅的DNAメチル化解析から抽出されたCpG (cg05575921) を含む *AHRR* 遺伝子領域について次世代シーケンサーを用いたDNAメチル化解析法の確立及び再現性の確認を行った。

バイサルファイトシーケンス法によるDNAメチル化解析では1つのCpGのみならず、PCR増幅範囲内の周辺CpGのメチル化率も取得することができる。これは網羅的解析では設計されていない

プローブのメチル化情報も獲得できることを意味しており、単に1つのCpGのみのメチル化変化なのか周辺の領域を含めたメチル化変化なのかを明らかにすることができる。*AHRR* cg05575921の近傍120bp内に位置する4CpGsを含めた解析領域を図(2)-11の上部に示した。メチル化率はシャピロ・ウィルク検定で正規性が棄却されたため、3群間（非喫煙群、喫煙継続群、喫煙中止群）の多重比較はゲイムズ・ホエル法で行った。その解析結果を図(2)-11の下部に示した。3群間におけるメチル化率はロバスト線形回帰での網羅的解析結果と同様に、非喫煙群と喫煙群において、cg05575921を含む全5カ所のCpGで喫煙群のメチル化低下が有意に認められた。また喫煙中止群と喫煙群においても、cg05575921を含む全5カ所のCpGで喫煙群のメチル化低下が有意に認められた。喫煙曝露の影響の向きも全てのCpGで一致していた。一方、非喫煙群と喫煙中止群においてはcg05575921を含む全5カ所のCpGにおけるメチル化に統計学的有意差は認められず、網羅解析の結果を支持した。

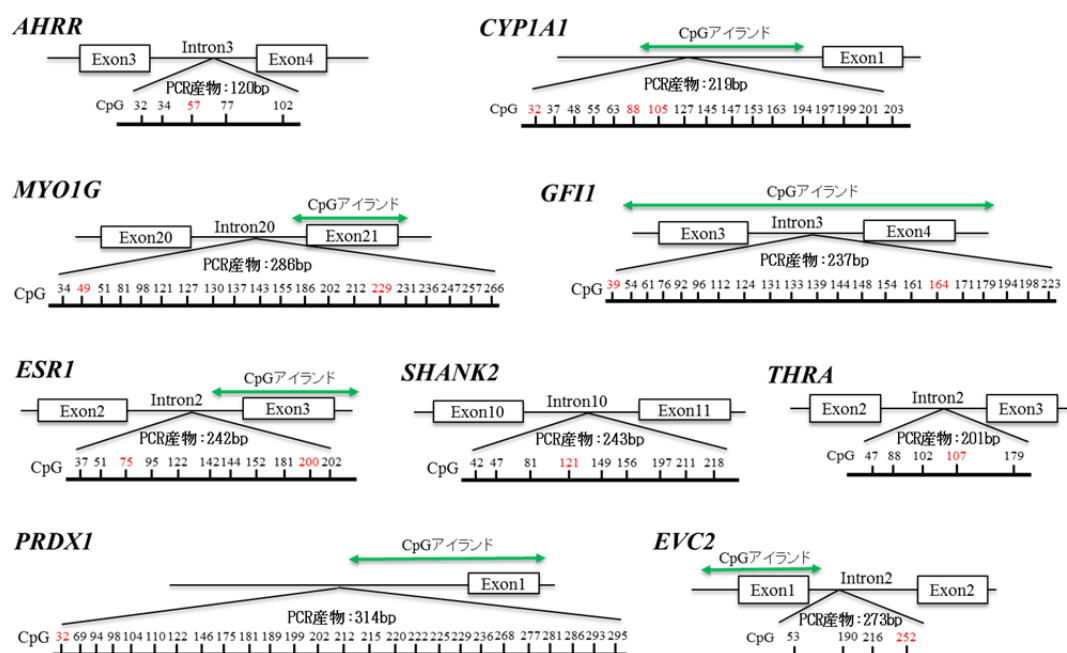


図(2)-11 cg05575921及び近傍CpGを含む*AHRR*における3群間のメチル化比較ボックスプロット

(3) 北海道コーホートを用いた喫煙曝露によるDNAメチル化変化の検証

1) 質問票から抽出した喫煙曝露の有無によるDNAメチル化変化の検証

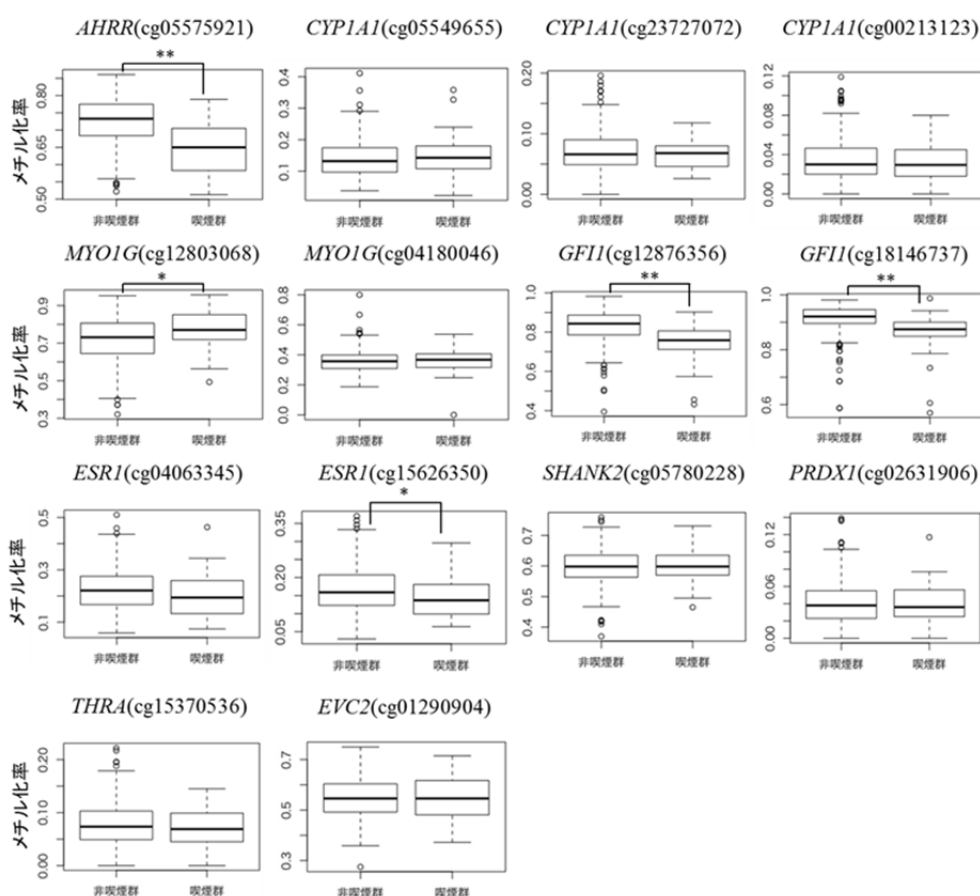
(1)の網羅的DNAメチル化解析から抽出した遺伝子領域に対して、別集団での検証およびADHDとの関連を明らかにするために次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス法によるDNAメチル化解析を行った。網羅的解析から喫煙曝露によりメチル化変化を認めた遺伝子のうちプライマー設計可能であった9遺伝子領域（CpG数 = 14カ所）を含むPCR増幅領域（表(2)-1）について次世代シーケンサーを用いメチル化率を測定した。図(2)-12に各遺伝子における解析領域とその領域に含まれるCpG番号を示す。赤字は網羅的解析で抽出されたCpGを表し、黒数字はPCR増幅領域に含まれるCpGを示しており、マイクロアレイのプローブ設計されていなかった周辺のCpGについても解析できることになる。



図(2)-12 各遺伝子における解析領域とその領域に含まれるCpGs

北海道コーホートから対象者562名のうち、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（ $n = 36$ ）が質問表による喫煙曝露の解析対象者となった。妊娠がわかって喫煙を止めた群は質問票から判明しなかったため対象外とした。

非喫煙群、喫煙群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。網羅的解析と同じ14CpGサイトに対する解析結果を図(2)-13に示した。*AHRR* (cg05575921)、*MYO1G* (12803068)、*GFII* (cg12876356, cg18146737)、*ESR1* (cg15626350)においては網羅的解析の結果同様、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。この理由として考えられることは、網羅的解析のデータ自体の偽陽性の可能性も考えられるが、今回の対象においては、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。また今回の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法によるメチル化解析において、統計的解析に十分なカバレッジ数（データ量）が取得できなかったこと、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。その原因として、バイサルファイトシークエンスの場合は通常のゲノムDNAでのシークエンスよりもPCR増幅長を短く設計するほうが良い場合がある。今回の解析ではPCR増幅長が300bpを超えるものもあり、平均PCR増幅長が平均約250bpになっていたことから、シークエンス効率が低下し、十分なデータ量が得られなかったことが考えられる。したがって現在、プライマーを再設計し、PCR増幅長を平均約150bpにして検討している。今後、統計的解析に十分なデータ量を取得し、喫煙曝露とメチル化差異について再度検証していく予定である。



図(2)-13 北海道コーホートにおける質問票による非喫煙群-喫煙群間のメチル化比較ボックスプロット (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

次に近傍のCpGのメチルについて検定したP値を表(2)-12に示す。*AHRR*(5CpGs)及び*GFII*(21CpGs)ではPCR増幅領域に含まれるすべてのCpGで有意にメチル化が低下していた。この結果から喫煙曝露により1つのCpGだけでなく領域として影響を受ける遺伝子であることが示唆される。特に*GFII*は図に示したように大きなCpGアイランド内であることからさらに周辺のCpGについても同様の挙動を示すことが考えられる。*MYO1G*及び*ESRI*の解析領域はともにCpGアイランドの少し上流に位置し、有意にメチル化変化している領域が点在していた。特に*ESRI*は有意差こそないがP値が小さいCpGが多数あることから*ESRI*に関しても領域としてメチル化変化していること、さらには解析領域の下流のCpGアイランド内でもメチル化変化していることが考えられる。*CYP1A1*は解析領域内で1つのCpGのみ有意差が認められたが、それ以外は有意な差がなかった。*CYP1A1*は網羅的解析結果および先行研究から喫煙曝露の影響を受けやすい領域と考えられていることから今後、*CYP1A1*の別の領域についても調べていく必要がある。*PRDX1*については1CpGだけ有意な差が認められたが、それ以外は有意な差がなかった。*PRDX1*解析領域はCpGアイランド内であること、転写開始点上流に位置していることから通常低メチル化(約0.1%)であることから、喫煙曝露により領域としてメチル化変化されている可能性は低いと考えられる。その他の*SHANK2*、*THRA*、*EVC2*については周辺領域も有意な差がなかったことから、偽陽性の可能性も考えられる。

表(2)-12 次世代シーケンサーによる各遺伝子解析領域の全CpGにおける質問票による非喫煙群
—喫煙群間比較

AHRR

CpG	32	34	57*	77	102
P 値	3.38E-03	1.36E-06	2.58E-08	2.22E-10	2.15E-06

CYP1A1

CpG	32*	37	48	55	63	88*	105*	127	145
P 値	0.573	0.272	0.374	0.178	0.412	0.602	0.839	0.248	0.627
CpG	147	153	163	194	197	199	201	203	
P 値	0.821	0.403	0.440	0.902	0.297	0.038	0.550	0.541	

MYO1G

CpG	34	49*	51	81	98	121	127	130	137
P 値	0.040	0.011	0.020	0.126	0.149	0.110	0.120	0.055	0.041
CpG	143	155	186	202	212	229*	231	236	247
P 値	0.137	0.035	0.931	0.029	0.067	0.457	0.120	0.016	0.058
CpG	257	266							
P 値	0.073	0.014							

GFII

CpG	39*	54	61	76	92	96	112	124	131
P 値	3.82E-08	6.94E-10	4.85E-10	7.58E-08	1.72E-04	4.77E-09	4.20E-07	2.67E-09	8.20E-08
CpG	133	139	144	148	154	161	164*	171	179
P 値	2.10E-10	3.25E-07	2.43E-08	5.90E-07	5.05E-09	5.28E-08	9.03E-08	1.64E-04	3.04E-06
CpG	194	198	223						
P 値	7.81E-06	1.31E-04	1.28E-08						

ESR1

CpG	37	51*	75	95	122	142	144	152	181
P 値	0.164	0.081	0.039	0.080	0.059	0.039	0.083	0.063	0.205
CpG	200*	202							
P 値	0.026	0.147							

SHANK2

CpG	42	47	81	121*	149	156	197	211	218
P 値	0.303	0.466	0.822	0.706	0.851	0.823	0.728	0.483	0.817

PRDX1

CpG	32*	69	94	98	104	110	122	146	175
P 値	0.726	0.126	0.033	0.502	0.668	0.596	0.469	0.108	0.976
CpG	181	189	199	202	212	215	220	222	225
P 値	0.309	0.443	0.049	0.185	0.819	0.611	0.448	0.717	0.355
CpG	229	236	268	277	281	286	293	295	
P 値	0.992	0.758	0.562	0.062	0.217	0.323	0.607	0.239	

THRA

CpG	47	88	102	107*	179
P 値	0.300	0.751	0.777	0.386	0.361

EVC2

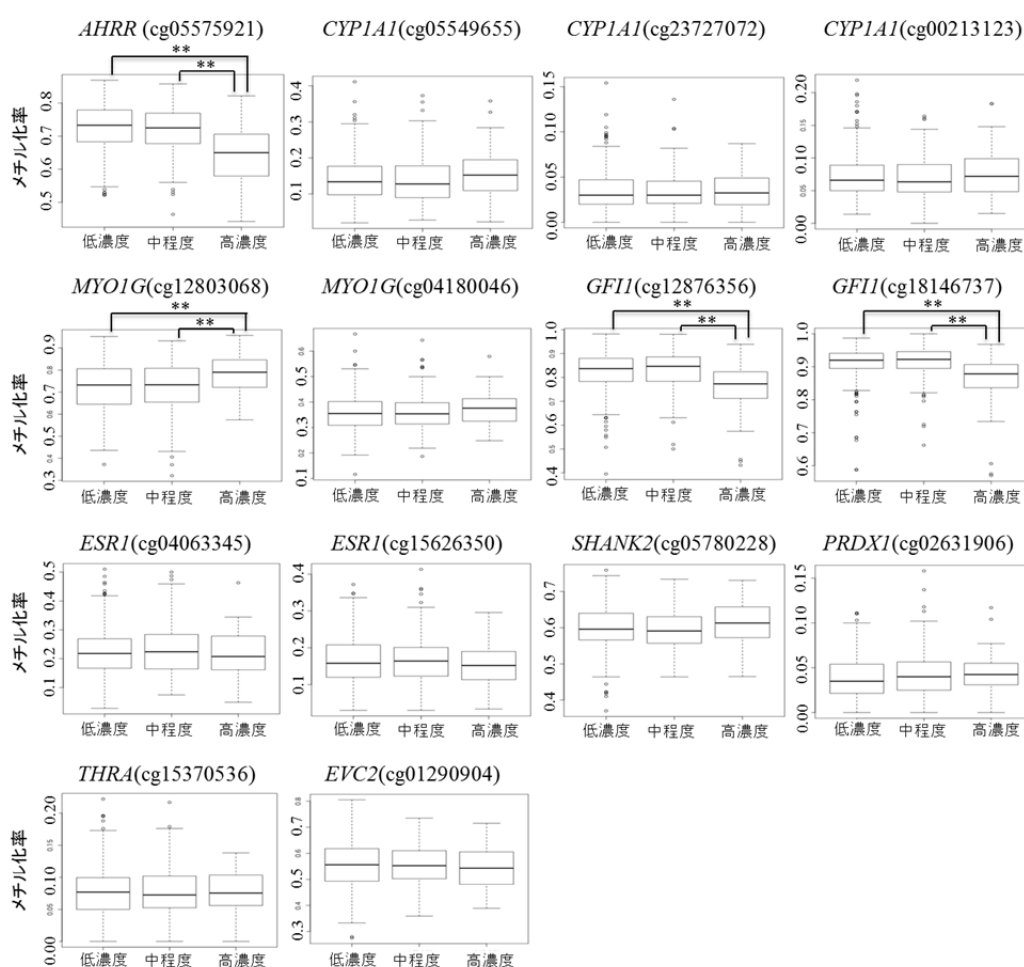
CpG	53	190	216	252*
P 値	0.709	0.948	0.228	0.888

* 網羅的解析で抽出されたCpG. 太字P<0.05.

2) コチニン濃度によるDNAメチル化変化の検証

次に北海道コーホートでは母体血清コチニン濃度の測定が行われていたことから、血清コチニ

ン高濃度群(n = 48)、中等度濃度群(n = 200)、低濃度群(n = 262)へ群別化して、DNAメチル化解析を行った(図(2)-14)。その結果、*AHRR* (cg05575921)、*MYO1G* (12803068)、*GFI1* (cg12876356, cg18146737)において低濃度群、中程度群と比較して高濃度群で有意にメチル化変化していることが分かった。質問票での喫煙曝露で有意差のあった*ESR1* (cg15626350)は有意な差はみられなかった。コチニン濃度はたばこ煙曝露の客観的な指標であり、受動喫煙による曝露の程度も評価することができる。今回の結果は高濃度群でのみ有意にメチル化変化していたことから、喫煙継続した群ではメチル化変化を引き起こしているが、中程度群に含まれると考えられる受動喫煙や禁煙した人ではメチル化変化が生じていないことが示唆される。したがって妊娠期の喫煙を継続することがDNAメチル化変化を引き起こし、その変化が維持されてしまうと考えられる。



図(2)-14 北海道コーホートにおけるコチニン濃度によるメチル化比較ボックスプロット (**P<0.01)

次に近傍のCpGのメチルについて検定したP値を表(2)-13に示す。*AHRR*(4CpGs)及び*GFI1*(21CpGs)で低濃度群—高濃度群および中程度群—高濃度群で有意にメチル化が低下していた。*ESR1*はすべてのCpGにおいて有意な差が認められず、質問票による結果との相違がみられた。一方で*MYO1G*は多くのCpGで低濃度群—高濃度群および中程度群—高濃度群で有意にメチル化が高くなっていた。

MYO1Gにおいて統計的有意差のあったCpGは、質問票での群分けは7CpGs領域であったが、コチニンでの群分けは18CpGs領域に増加していた。これらの結果、高濃度群でのみ有意にメチル化変化していたことからDNAメチル化レベルでは受動喫煙の影響は少なく、妊婦自身の喫煙による影響が大きいのではないかと考えられる。

表(2)-13 次世代シーケンサーによる各遺伝子解析領域の全CpGにおけるコチニン濃度間比較

AHRR

CpG 番号	32	34	57*	77	102
P 値(低一中)	0.241	0.723	0.501	0.496	0.534
P 値(低一高)	4.63E-03	4.12E-07	2.58E-08	5.39E-11	4.23E-06
P 値(中一高)	0.083	7.92E-06	2.05E-06	1.06E-08	1.30E-04

CYP1A1

CpG 番号	32*	37	48	55	63	88*	105*	127	145
P 値(低一中)	0.579	0.980	0.783	0.811	0.810	0.524	0.994	0.877	0.980
P 値(低一高)	0.316	0.055	0.222	0.314	0.111	0.873	0.961	0.150	0.816
P 値(中一高)	0.113	0.048	0.110	0.176	0.053	0.502	0.944	0.274	0.759
CpG 番号	147	153	163	194	197	199	201	203	
P 値(低一中)	0.771	0.607	0.082	0.466	0.996	0.834	0.004	0.986	
P 値(低一高)	0.949	0.990	0.732	0.452	0.268	0.027	0.290	0.968	
P 値(中一高)	0.995	0.905	0.863	0.878	0.307	0.012	0.918	0.989	

MYO1G

CpG 番号	34	49*	51	81	98	121	127	130	137
P 値(低一中)	0.815	0.950	0.837	0.716	0.548	0.884	0.994	0.897	0.999
P 値(低一高)	7.90E-03	2.70E-03	2.01E-02	1.78E-02	2.02E-02	2.70E-02	1.15E-02	9.54E-04	2.68E-02
P 値(中一高)	3.02E-03	1.87E-03	8.90E-03	5.21E-03	3.56E-03	1.44E-02	1.16E-02	4.79E-04	3.34E-02
CpG 番号	143	155	186	202	212	229*	231	236	247
P 値(低一中)	0.774	0.995	0.936	0.968	0.937	0.998	0.959	0.896	0.937
P 値(低一高)	6.34E-02	5.68E-03	0.493	1.91E-03	1.74E-02	0.447	1.22E-02	3.34E-03	2.33E-02
P 値(中一高)	2.56E-02	8.49E-03	0.389	4.12E-03	1.15E-02	0.443	2.38E-02	1.72E-03	1.55E-02
CpG 番号	257	266							
P 値(低一中)	0.958	0.943							
P 値(低一高)	1.19E-02	1.97E-03							
P 値(中一高)	8.75E-03	1.31E-03							

GFI1

CpG 番号	39*	54	61	76	92	96	112	124	131
P 値(低一中)	0.867	0.816	0.918	0.992	0.896	0.787	0.998	0.541	0.936
P 値(低一高)	8.03E-06	1.15E-09	1.37E-08	4.56E-06	2.86E-04	6.31E-06	7.93E-06	9.71E-08	1.79E-06
P 値(中一高)	3.12E-06	2.50E-08	1.16E-07	1.12E-05	1.39E-04	1.55E-06	1.56E-05	5.26E-09	8.78E-06
CpG 番号	133	139	144	148	154	161	164*	171	179
P 値(低一中)	0.977	0.929	0.997	0.786	0.700	0.924	0.717	0.840	0.995
P 値(低一高)	2.74E-07	3.91E-05	2.81E-05	8.59E-05	1.28E-06	1.73E-06	5.73E-07	3.77E-03	1.05E-03
P 値(中一高)	2.77E-07	2.32E-05	5.42E-05	2.31E-05	2.33E-05	9.32E-06	8.92E-08	1.38E-02	1.73E-03
CpG 番号	194	198	223						
P 値(低一中)	0.946	0.986	0.980						
P 値(低一高)	1.82E-05	4.61E-04	8.40E-06						

P 値(中一高)	1.23E-05	9.29E-04	8.25E-06
----------	-----------------	-----------------	-----------------

ESR1

CpG 番号	37	51*	75	95	122	142	144	152	181
P 値(低一中)	0.986	0.895	0.980	0.791	0.953	0.958	0.970	0.985	0.998
P 値(低一高)	0.680	0.832	0.209	0.651	0.509	0.166	0.253	0.542	0.744
P 値(中一高)	0.632	0.686	0.182	0.427	0.420	0.244	0.211	0.497	0.777
CpG 番号	200*	202							
P 値(低一中)	0.923	0.574							
P 値(低一高)	0.497	0.962							
P 値(中一高)	0.381	0.673							

SHANK2

CpG 番号	42	47	81	121*	149	156	197	211	218
P 値(低一中)	0.790	0.714	0.990	0.406	0.997	0.757	0.893	0.997	0.878
P 値(低一高)	0.164	0.557	0.419	0.507	0.349	0.836	0.968	0.249	0.866
P 値(中一高)	0.078	0.308	0.482	0.158	0.390	0.989	1.000	0.247	0.713

PRDX1

CpG 番号	32*	69	94	98	104	110	122	146	175
P 値(低一中)	0.250	0.398	0.864	0.949	0.431	0.845	0.287	0.405	0.904
P 値(低一高)	0.322	0.999	0.113	0.689	0.844	0.959	0.454	0.911	0.969
P 値(中一高)	0.884	0.705	0.225	0.808	0.414	0.998	0.099	0.482	1.000
CpG 番号	181	189	199	202	212	215	220	222	225
P 値(低一中)	0.401	0.999	0.996	0.921	0.973	0.952	0.539	0.999	0.934
P 値(低一高)	0.844	0.997	0.584	0.751	0.785	0.995	0.970	0.639	0.720
P 値(中一高)	0.396	0.999	0.569	0.620	0.864	0.961	0.919	0.669	0.602
CpG 番号	229	236	268	277	281	286	293	295	
P 値(低一中)	1.000	0.667	0.008	0.465	0.792	0.989	0.853	0.999	
P 値(低一高)	0.888	0.863	0.754	0.162	0.800	0.958	0.887	0.985	
P 値(中一高)	0.889	1.000	0.548	0.036	0.969	0.933	0.989	0.990	

THRA

CpG 番号	47	88	102	107*	179
P 値(低一中)	0.920	1.000	0.961	0.992	0.949
P 値(低一高)	0.432	0.928	0.825	0.992	0.774
P 値(中一高)	0.323	0.933	0.742	0.981	0.877

EVC2

CpG 番号	53	190	216	252*
P 値(低一中)	0.999	0.840	0.696	1.000
P 値(低一高)	0.558	0.870	0.380	0.606
P 値(中一高)	0.556	0.986	0.689	0.610

(4) 胎児期喫煙曝露と児のADHD疑い群との関連におけるDNAメチル化変化の関与**1) 胎児期喫煙曝露と児のADHD疑い群との関連解析**

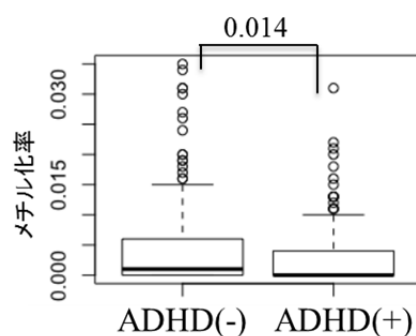
まず質問表による喫煙曝露とADHD疑い群との関連を検討するための分割表を表(2)-6に示した。この分割表における喫煙曝露によるADHD疑い群の危険率の指標としてのオッズ比は約1.5であったが、カイ二乗検定による比率の差の検定のP値 = 0.3052 と喫煙曝露とADHD疑い群との関連に有意差は認めなかった。

次に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)-7に示した。同様に、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。したがって本研究において喫煙曝露によるADHDとの関連に統計的有意差が認められなかったことから、DNAメチル化を介した媒介分析 (mediation analysis)を行うことができなかった。

今回の標本においても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が、喫煙曝露とADHD疑い群に統計的に有意な差は認められなかった。その要因として、ADHDの有病率の小ささからサンプルサイズを大きくすることが困難であったことが考えられる。近年報告されている胎児喫煙期曝露と児のADHDとの関連に関する研究におけるサンプルサイズは、Melchiorらの報告⁷⁾ではn = 1,113、Joelssonらの報告⁸⁾ではn = 40,141であった。一方でObelらの報告³³⁾では、胎児期喫煙曝露とADHDのリスクに関連はないことを報告している。今後サンプルサイズを大きくした追跡調査を行うことにより喫煙曝露とADHD発症に関連が認められるかどうかを慎重に検討していく必要があると思われる。また喫煙曝露と関連するメチル化変化とADHDとの関連についても今後明らかにしていく予定である。

2) ADHD疑い群とDNAメチル化変化の関連

次世代シーケンサーで解析したCpGについて、北海道コーホート集団のADHD疑い群 (n = 224) とコントロール群 (n = 286) の間でメチル化率に差があるかを検討した。各CpGにおいてウィルコクソンの順位和検定を行った結果を表(2)-14に示す。その結果、P < 0.05で抽出されたCpGはCYP1A1の203番のCpGのみであった。しかしながら、図(2)-15に示すボックスプロットからもわかるように外れ値が多いことから、再検証が必要であると考えている。



図(2)-15 CYP1A1の203番のCpGにおけるADHD疑い群とコントロール群間メチル化比較ボックスプロット

表(2)-14 次世代シーケンサーによる各遺伝子解析領域の全CpGにおけるADHDケース・コントロール間比較

AHRR									
CpG 番号	32	34	57*	77	102				
P 値	0.120	0.138	0.157	0.416	0.481				
CYP1A1									
CpG 番号	32*	37	48	55	63	88*	105*	127	145
P 値	0.701	0.854	0.782	0.328	0.526	0.285	0.794	0.872	0.539
CpG 番号	147	153	163	194	197	199	201	203	

P 値	0.135	0.845	0.453	0.845	0.435	0.063	0.176	0.014	
MYO1G									
CpG 番号	34	49*	51	81	98	121	127	130	137
P 値	0.527	0.932	0.267	0.972	0.616	0.418	0.618	0.498	0.170
CpG 番号	143	155	186	202	212	229*	231	236	247
P 値	0.780	0.666	0.122	0.294	0.586	0.896	0.498	0.810	0.900
CpG 番号	257	266							
P 値	0.602	0.918							
GFI1									
CpG 番号	39*	54	61	76	92	96	112	124	131
P 値	0.417	0.521	0.895	0.575	0.703	0.817	0.659	0.997	0.479
CpG 番号	133	139	144	148	154	161	164*	171	179
P 値	0.222	0.731	0.540	0.829	0.722	0.616	0.889	0.663	0.582
CpG 番号	194	198	223						
P 値	0.977	0.685	0.514						
ESR1									
CpG 番号	37	51*	75	95	122	142	144	152	181
P 値	0.486	0.466	0.811	0.767	0.928	0.992	0.318	0.674	0.756
CpG 番号	200*	202							
P 値	0.986	0.392							
SHANK2									
CpG 番号	42	47	81	121*	149	156	197	211	218
P 値	0.444	0.245	0.183	0.870	0.334	0.572	0.482	0.527	0.748
PRDX1									
CpG 番号	32*	69	94	98	104	110	122	146	175
P 値	0.218	0.932	0.751	0.722	0.116	0.172	0.338	0.848	0.819
CpG 番号	181	189	199	202	212	215	220	222	225
P 値	0.823	0.590	0.339	0.467	0.060	0.395	0.178	0.703	0.592
CpG 番号	229	236	268	277	281	286	293	295	
P 値	0.342	0.207	0.252	0.129	0.821	0.352	0.913	0.299	
THRA									
CpG 番号	47	88	102	107*	179				
P 値	0.138	0.480	0.840	0.351	0.723				
EVC2									
CpG 番号	53	190	216	252*					
P 値	0.386	0.641	0.247	0.402					

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

- ① 日本人集団における臍帯血 292 検体の網羅的 DNA メチル化データを取得し、胎児期の喫煙曝露により影響を受ける DNA メチル化部位を同定した。
- ② 同定したメチル化部位には既報の遺伝子だけでなく、新規に神経発達関連遺伝子を見いだすことができた。
- ③ DNA メチル化で喫煙をやめた効果が反映される遺伝子を見出すことができた。
- ④ 次世代シーケンサーを用いて、多検体・複数領域の DNA メチル化を定量的に解析する方法を確立でき、今後エピゲノム疫学分野での活用が期待できる。
- ⑤ 喫煙曝露と ADHD との関与でオッズ比は 1.5 であったが、有意な差はみられなかった。

(2) 環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

- ① 胎児期の喫煙曝露によりDNAのメチル化が変化する遺伝子上の部位と、喫煙をやめた効果が反映される遺伝子のDNAメチル化部位を見出した。
- ② 喫煙をやめることによるDNAメチル化変化への影響が示唆されたため、禁煙を推進する政策を策定する際に科学的根拠として活用できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

（１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

特に記載すべき事項はない。

＜査読付論文に準ずる成果発表＞

NQV. TRAN, K. MIYAKE: International Journal of Genomics, Neurodevelopmental disorders and environmental toxicants: epigenetics as an underlying mechanism. (in press)

＜その他誌上発表（査読なし）＞

- 1) 三宅邦夫：ストレス科学シンポジウム、30(1):27-36 (2015)
エピジェネティクス研究が拓くストレス科学の世界「発達障害とエピジェネティクス」
- 2) 三宅邦夫：日本生物学的精神医学会誌、26:21-25 (2015)
特集1 エピジェネティクス機構から精神神経疾患の病態を探る「発達障害のエピジェネティクス病態の最新理解」

（２）口頭発表（学会等）

- 1) T. KUBOTA: Epigenomics & Metabolomics Symposia-2014, Boston, USA (2014.8.25)
Epigenetics as a basis for diagnosis and treatment of Neurodevelopmental Disorders.
- 2) 三宅邦夫：第30回日本ストレス学会、東京 (2014.11.7)
シンポジウム エピジェネティクス研究が拓くストレス科学の世界「発達障害とエピジェネティクス」
- 3) 久保田健夫：第5回 岐阜薬科大学機能性健康食品（蜂産品）研究講演会、岐阜 (2014.12.6)
特別講演I エピジェネティクスに基づく健康戦略
- 4) 小林祥子、三浦りゅう、川口章夫、宮下ちひろ、三宅邦夫、松村徹、山本潤、石塚真由美、荒木敦子、久保田健夫、岸玲子：第4回日本DOHaD研究学術集会、東京 (2015.8.1-2)

胎児期ビスフェノールA曝露影響に関する臍帯血DNA網羅的メチル化解析－北海道スタディ

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Guo JU, et al: Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci.* 2014 Feb;17(2):215-22.
- 2) Chen L, et al: MeCP2 binds to non-CG methylated DNA as neurons mature, influencing transcription and the timing of onset for Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Apr 28;112(17):5509-14.
- 3) Lister et al: Turning over DNA methylation in the mind. *Front Neurosci.* 2015 Jul 30;9:252.
- 4) Kundakovic M, et al: The Epigenetic Link between Prenatal Adverse Environments and Neurodevelopmental Disorders. *Genes (Basel).* 2017 Mar 18;8(3). pii: E104.
- 5) Kalkbrenner AE, 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 Jul;120(7):1042-8.
- 6) Tran PL, et al: Smoking during pregnancy and risk of autism spectrum disorder in a Finnish National Birth Cohort. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2013 May;27(3):266-74.
- 7) Melchior M, 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 Jul;30(5):562-8.
- 8) Joelsson P, et al: Prenatal smoking exposure and neuropsychiatric comorbidity of ADHD: a finnish nationwide population-based cohort study. *BMC Psychiatry.* 2016 Aug 31;16:306.
- 9) Joehanes R, et al: Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circ Cardiovasc Genet.* 2016 Oct;9(5):436-447.
- 10) Joubert BR, et al: DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet.* 2016 Apr 7;98(4):680-96.
- 11) Morales E, et al: Genome-wide DNA methylation study in human placenta identifies novel loci associated with maternal smoking during pregnancy. *Int J Epidemiol.* 2016 Oct;45(5):1644-1655.
- 12) Bouwland-Both MI, et al: Prenatal parental tobacco smoking, gene specific DNA methylation, and

- newborns size: the Generation R study. *Clin Epigenetics*. 2015 Aug 11;7:83.
- 13) Küpers LK, et al: DNA methylation mediates the effect of maternal smoking during pregnancy on birthweight of the offspring. *Int J Epidemiol*. 2015 Aug;44(4):1224-37.
 - 14) Lee KWK, et al: Prenatal Exposure to Maternal Cigarette Smoking and DNA Methylation: Epigenome-Wide Association in a Discovery Sample of Adolescents and Replication in an Independent Cohort at Birth through 17 Years of Age. *Environmental health perspectives*. 2015 Feb;123(2):193-9.
 - 15) Marabita F, et al: An evaluation of analysis pipelines for DNA methylation profiling using the Illumina HumanMethylation450 BeadChip platform. *Epigenetics*. 2013 Mar;8(3):333-46.
 - 16) Fortin JP, et al: Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biol*. 2014 Dec 3;15(12):503.
 - 17) Touleimat N, et al: Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*. 2012 Jun;4(3):325-41.
 - 18) Leek JT, et al: The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 2012 Mar 15;28(6):882-3.
 - 19) Fox J, et al: Robust regression in R, in *An R Companion to Applied Regression*. 2011, Sage: Thousand Oaks, CA.
 - 20) Smyth GK: Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:Article3.
 - 21) Houseman EA, et al: Reference-free cell mixture adjustments in analysis of DNA methylation data. *Bioinformatics*. 2014 May 15;30(10):1431-9.
 - 22) Houseman EA, et al: DNA Methylation in Whole Blood: Uses and Challenges. *Curr Environ Health Rep*. 2015 Jun;2(2):145-54.
 - 23) Benjamini Y and Hochberg Y: Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc.* 1995. 57 (1): 289-300.
 - 24) Sasaki S, et al: Self-reported tobacco smoke exposure and plasma cotinine levels during pregnancy--a validation study in Northern Japan. *Sci Total Environ*. 2011 Dec 15;412-413:114-8.
 - 25) Joubert BR, et al: 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environmental health perspectives*. 2012 Oct;120(10):1425-31.
 - 26) Rotroff DM, et al: Maternal smoking impacts key biological pathways in newborns through epigenetic modification in Utero. *BMC Genomics*. 2016 Nov 25;17(1):976.
 - 27) Peter S, et al: Dysfunctional cerebellar Purkinje cells contribute to autism-like behaviour in Shank2-deficient mice. *Nature Communications*. 2016 Sep 1;7:12627.
 - 28) Lim CS, et al: Enhancing inhibitory synaptic function reverses spatial memory deficits in Shank2 mutant mice. *Neuropharmacology*. 2017 Jan;112(Pt A):104-112.
 - 29) Palmfeldt J, et al: Protein biomarkers of susceptibility and resilience to stress in a rat model of depression. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2016 Jul;74:87-95.

- 30) Wallis K, et al: The thyroid hormone receptor $\alpha 1$ protein is expressed in embryonic postmitotic neurons and persists in most adult neurons. *Molecular Endocrinology*. 2010 Oct;24(10):1904-16.
- 31) Fauquier T, et al: Purkinje cells and Bergmann glia are primary targets of the TR $\alpha 1$ thyroid hormone receptor during mouse cerebellum postnatal development. *Development*. 2014 Jan;141(1):166-75.
- 32) Badri MK, et al: Expression of Evc2 in craniofacial tissues and craniofacial bone defects in Evc2 knockout mouse. *Archives of Oral Biology*. 2016 Aug;68:142-52.
- 33) Obel C, et al : The risk of attention deficit hyperactivity disorder in children exposed to maternal smoking during pregnancy - a re-examination using a sibling design. *J Child Psychol Psychiatry*. 2016 Apr;57(4):532-7.

Environmental Chemical Exposure in Early Life and the Neurodevelopment of Children: the Role of Environment, Gene and Epigenome

Principal Investigator: Reiko KISHI

Institution: Center for Environmental and Health Sciences, Hokkaido University

Kita 12, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, Japan

Tel: +81-11-706-4749 / Fax: +81-11-706-4725

E-mail: rkishi@med.hokudai.ac.jp

Cooperated by: Yamanashi University

[Abstract]

Key Words: Environmental Chemicals, ASD, ADHD, Neurobehavioral development, SNPs, Gene-environment interaction, Smoking, Epigenetics, DNA methylation,

Exposure to ubiquitous environmental chemicals including bisphenol A (BPA) and phthalates may play roles in the development of child neurobehavioral problems. However, epidemiological studies were lacking and underlying mechanism is still largely unknown. In this study, our focus was to investigate child behavioral development and problems in association with prenatal exposures to BPA and phthalates together with genotype analyses. DNA methylation of cord blood was examined in association with prenatal exposures to tobacco smoking, BPA and phthalates.

As for an adjunct study of Japan Environment and Children's Study, we conducted study of social development of children at age 1.5 years by using M-CHAT, a widely applied screening tool for ASD, along with childcare support upon the request from the participants. Among 3,019 valid responses, 577 (19.1%) were above cutoff of primary screening as suspected ASD.

In a birth cohort study, we conducted four neurobehavioral developmental questionnaires including screening tool of ASD and ADHD at preschool age children. Maternal first trimester serum levels of BPA and seven phthalate metabolites were analyzed. Both BPA and phthalates were found to be lower levels compared to the previously reported values from other studies. Increased BPA level was associated with increased child behavioral problems in prosocial behavior. Cord blood BPA levels were also associated with child behavioral problems at 3.5 years of age. Increased MECP (metabolite of DEHP) level was associated with increased conduct problems at 5 years of age. ADHD symptoms at 6 years of age were not associated with either BPA or phthalate metabolite levels. However, we found that certain genotypes in *ESR1* gene increased odds ratio of ADHD with increased MEHP levels. This suggested existence of genetically susceptible population to environmental chemical exposures in association with

neurobehavioral problems.

Analysis of DNA methylation on 450K CpGs found that DNA methylation can be modified by prenatal exposure to BPA and DEHP. Among genes with those CpGs that showed modified DNA methylation, some might relate to neurodevelopment based on animal studies. Further investigation on DNA methylation and neurodevelopment in association with prenatal exposures to BPA and phthalates is necessary.