

【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-エピゲノム交互作用の解明  
(H26~H28)

岸 玲子 (北海道大学)

## 1. 研究開発目的

胎児期の環境化学物質曝露による児の神経行動発達への影響が示唆されているが、我が国ではまったく研究がなされていない。本研究では、胎児期および幼少期のビスフェノール A (BPA) やフタル酸エステル曝露による神経系への影響を解明することを目的とする。神経発達アウトカムとしては、ASD (Autism spectrum disorders; 自閉症スペクトラム) のスクリーニングツールである日本語版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) を採用した。M-CHAT は ASD の早期発見・早期支援を目的に開発され、近年その有用性が確認されている。M-CHAT をエコチル追加調査として実施し、1.5 歳での ASD 疑いのスクリーニング結果と今後のエコチル本体調査で実施する 5 歳児での ASD 調査の結果を組み合わせる。併せて幼少期の化学物質曝露評価に用いることを目的として、児の尿サンプルを収集する。なお、本調査では養育者の育児不安を少なくするため、地域行政の子育て支援担当部署や、小児精神発達専門の医療機関、発達支援センター等と協力し、大学・医療・教育・福祉面を含めたエコチル調査のフォローアップ体制を構築することも目的の一つとした。また、エコチル調査に先立ち 2002 年に立ち上げた北海道スタディコーホートを用いて、6 か月、18 か月の神経行動発達 (BSID-II) の Mental Development Index および Psychomotor Development Index への、胎児期 BPA、フタル酸エステル DEHP 曝露による影響を明らかにする。5~6 歳の就学前の ASD、ADHD 関連症状を SDQ、DCDQ、SCQ、ADHD-RS を用いて評価するとともに、妊娠中に採取・保存している母体血中 BPA、フタル酸エステル類濃度を測定することで、胎児期曝露による児の行動発達への影響を明らかにする。環境化学物質の胎児期曝露との遺伝環境交互作用を明らかにするために、異物代謝や神経発達に関連する遺伝子多型解析を母体血および臍帯血 DNA を用いて解析する。さらに 450 万カ所の CpG 配列の DNA メチル化網羅的解析ツール (Infinium Human Methylation 450 BeadChip) を用いて、胎児期の環境化学物質や喫煙曝露による児の DNA メチル化変化への影響を明らかにし、特に神経発達障害発症リスクを高めるかを解明する。

## 2. 研究の進捗状況

### (1) サブテーマ 1

エコチル追加調査として北海道ユニットセンター札幌地区および北見地区の調査参加 1.5 歳児に M-CHAT を実施する。これまでに調査票を 1,861 名に送付、1,472 名から回収した (回収率 79.1%) (平成 27 年 5 月末日付)。また、採尿に同意を得た 1,362 名のうち 709 名 (52.1%) に採尿キットを送付し、430 名 (60.6%) から回収した。今後も追跡調査を継続し、最終的に 3 年間で約 3,400 名の調査と尿約 2,200 検体の収集が計画通り実施できる予定である。胎児期の環境化学物質曝露による生後 6 か月および 18 か月児の精神運動発達への影響については、札幌コーホートで既に測定済みの母体血中フタル酸エステル DEHP 代謝物 MEHP、および臍帯血中 BPA 濃度と発達スコア (BSID-II) との関連を解析した。この結果、本研究の BPA 濃度は他のアジア諸国や欧米の報告よりも低く、この濃度レベルでは 6 か月、18 か月児の BSID-II に影響を与えないことが示唆された。一方、MEHP 濃度はこれまでの先行研究よりも高濃度だったが、6 か月、18 か月児の BSID-II への影響はなかった。今後、3.5 歳、7 歳の発達 (K-ABC、CBCL、WISC-III など) への影響を解明する。胎児期の環境化学物質曝露による ASD、ADHD 関連症状への調査は、北海道大規模コーホートの 5 歳と 6 歳児で実施する。5 歳児では 2,692 名に調査票を送付し 1,815 名 (67.4%) から返送、6 歳児は 1288 名に調査票を送付し 846 名 (65.7%) から返送を得た。このうち、平成 26 年度は 5 歳児に実施した Strength and Difficulty Questionnaire (SDQ) スコア 13 点をカットオフ値とし、要支援群 110 名、対照群 (Sub-cohort) 154 名、合計 264 名の妊娠初期母体血中 BPA 濃度を測定した。この結果、要支援群に分類されるリスクは、母体血中 BPA 低濃度群と比較して高濃度群では 2.4 倍高く、比較的低濃度レベルでも胎児期の BPA 曝露は 5 歳児の行動発達

に負の影響を与える可能性を示唆した。フタル酸エステル類は、DEHP と DiNP の血中代謝物 6 化合物の分析条件を確立した。平成 27 年に母体血中濃度を測定して曝露評価を実施する。5 歳、6 歳の追跡調査を継続し、最終的には要支援群 165 名、Sub-cohort 230 名について曝露測定を行い、ASD 関連症状に加えて ADHD 関連症状への影響についても明らかにする。また、要支援群と全 Sub-cohort 4,869 名の遺伝子抽出を行い、化学物質受容体遺伝子や神経発達に関連する 34 SNPs について、Fluidigm 社製 EP1 システム遺伝子解析を行っており、遺伝-環境交互作用についても解明する。サブテーマ 2 と共同で実施した網羅的 DNA メチル化について、胎児期 BPA 曝露との関係を、外れ値に強く現時点で最も妥当な手法のひとつである robust linear regression で解析し、3 か所の CpG サイトがスクリーニングされた。しかしこの方法では、臍帯血細胞組成の違いによるメチル化を反映できない点が限界である。そこで、近年新たに発表された、潜在的な要因が調整できるリファレンスフリー EWAS 解析方法を現在試みており、今後、両者の解析結果から、BPA 胎児期曝露の影響を受ける確実な CpG サイトを明らかにする。

## (2) サブテーマ 2

札幌コーホートの臍帯血 DNA 292 サンプルを用いて網羅的 DNA メチル化解析を行った。得られた各 CpG におけるメチル化値を標準化した後に統計解析を行った結果、臍帯血 DNA のメチル化変化は、喫煙歴のない群に比べて妊娠前から継続して喫煙していた群では、社会階層や母の年齢などで調整後も *Aryl hydrocarbon receptor repressor (AHRR)* 遺伝子内の CpG が有意に低メチル化し、*Myosin 1G (MYO1G)* 遺伝子内の CpG が有意に高メチル化されることを解明した。また、解析で得られたデータの実証のため、メチル化値が既知のサンプルを次世代シーケンサー法で解析し、従来のバイサルファイト・シーケンス法と同等のメチル化値が示されることを確認した。今後 喫煙を妊娠前に止めた群を用いて、禁煙によりメチル化変化が予防できるかを確認するとともに、BeadChip 解析で得た結果を次世代シーケンサー解析で実証する。

## 3. 環境政策への貢献（研究代表者による記述）

臨床では、M-CHAT で ASD 疑いと分類された児には電話等で第 2 段階スクリーニングを行うが、大規模な調査では実施が難しい。本研究では、行政による乳幼児健診受診の有無を同時に確認することで、市との協力関係を含めた地域における参加者支援体制の構築を行うことによりエコチル追加調査として M-CHAT 実施を実現し、疑いのある児を早期にケアし、発達調査の円滑な推進に寄与できる。また、M-CHAT により発達に伴う ASD 傾向を詳細に調査し生後早期の ASD 疾病像や成長に伴う精神神経発達の軌跡をとらえ、エコチル本体調査を補完する。臍帯血中 BPA 濃度は諸外国と比較してやや低かったが、母体血濃度と同レベルで、胎児移行による影響が懸念された。6 か月と 18 か月児の BSID-II には、本研究の曝露レベルでは影響は与えなかったが、5 歳児の行動発達には負の影響を与える可能性を示唆した。母体血中 MEHP 中央値 11.8 ng/ml は、先行研究で報告されている濃度より高かったが、6 か月と 18 か月児の BSID-II への影響はなかった。日本で使用量が多い DEHP と、その代替物質として使用量が増加している DiNP について、血液中代謝物各 3 化合物の一斉分析が可能になったため、引き続き曝露評価を行う。本研究で明らかになる胎児期の BPA やフタル酸エステル類の曝露実態は、今後化学物質の規制に関するガイドライン等を作成する際の基礎データとして、環境政策に貢献しうる。神経系への曝露影響評価は、ヒトでは我が国初の結果となり、ASD・ADHD 関連症状や疑いに関与する疾患感受性遺伝子、化学物質代謝や受容体、ステロイド代謝酵素の遺伝子多型解析により、環境-遺伝交互作用に基づくハイリスク群の発見が可能になる。胎児期の喫煙曝露による化学物質の解毒に関わる遺伝子等の有意なメチル化変化が示され、さらに胎児期 BPA 曝露による網羅的メチル化解析は世界的に初めての試みであり、環境物質の胎児への影響について重要な知見が期待できる。また、我が国の出生コーホートで初の網羅的エピゲノムデータにより、エコチル調査で検討すべき化学物質や遺伝子に関する詳細なデータを提供し、環境省「エコチル調査」の課題解明に大きく貢献することができる。

#### 4. 委員の指摘及び提言概要

環境化学物質曝露による影響の解明は困難な仕事であるが、着実に成果が出ていると思われる。社会的な意味も大きい重要な研究であり、エコチル調査を補強する研究としてさらなる成果を期待したい。BPAの影響等興味深い中間結果が得られている。予算と試料量から可能であれば、血液中の化学物質濃度とエコチル本体調査での尿中濃度の関連の解明が望まれる。

#### 5. 評点

総合評点： A