

課題【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-エピゲノム相互作用の解明**

研究代表者：岸 玲子
北海道大学 環境健康科学研究教育センター

研究実施期間：平成26年度～28年度

累積予算額：150,642,000円

研究体制

**サブテーマ1：
神経発達アウトカムへの環境化学物質曝露と
環境遺伝相互作用の解明**

北海道大学 環境健康科学研究教育センター

岸玲子、荒木敦子、池野多美子、宮下ちひろ、伊藤佐智子、ゴウダルジ・ホウマヌ

北海道大学大学院 医学研究科小児科学分野

有賀正

北海道大学病院

白石秀明

**サブテーマ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**

山梨大学大学院 医学工学総合研究部 環境遺伝医学講座

三宅邦夫

研究開発背景と目的

環境化学物質曝露

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曝露がASDやADHDのリスク要因のひとつとして懸念される*

遺伝子多型

環境化学物質曝によるASDやADHDの発症に遺伝子多型による違いがあるか、明らかになっていない

DNAメチル化変化

環境化学物質曝露によるDNAメチル化変化がASDやADHDに關与するか、明らかになっていない

BPA、フタル酸エステル類曝露によるASD、ADHDなどの神経発達障害と環境-遺伝-エピゲノム相互作用を解明する

*Mustieles et al., 2015; Polanska et al., 2012

エコチル追加調査（社会性発達調査）

エコチル調査参加者に、札幌・北見地区の1.5歳児を対象とし、北海道ユニットセンターの追加調査として実施

※M-CHAT（乳幼児自閉症チェックリスト修正版）を用いて、乳幼児期のASD傾向を評価、（23項目のうち3項目以上で不通過の児が「ASD疑い」）

追加調査

- ・3,065名(85.9%)が回答（平成29年1月末）
- ・ASD疑い18.6%⇒平成21年厚労省調査と同程度の割合
- ・幼児期の化学物質曝露評価のために尿を採取し保存

※化学物質の分析は今後行う

参加者支援

ASD疑い児、育児困難へのフォローを実施

北海道スタディ：研究デザイン

妊娠中

胎児期の化学物質曝露評価

- ・質問調査票
- ・妊婦の血液

出産時

遺伝子・エピゲノム解析

- ・臍帯血の採取
- ・母体血の採取
- ・病院記録

生後

発達検査

6ヶ月

18ヶ月

- ・精神・行動発達(BSID-II)

3.5歳

- ・知能(K-ABC)
- ・問題行動(CBCL)

5歳

- ・発達支援必要性(SDQ)
- ・協調運動障害(DCDQ)

6歳

- ・ADHD(ADHD-RS)
- ・ASD(SCQ)



BSID-II; Bayley Scales of Infant Development 2nd edition,
K-ABC; Kaufman Assessment Battery for Children
CBCL; Child Behavior Checklist,
SDQ; Strength and Difficulty Questionnaire,
ADHD-RS; ADHD rating scale
SCQ; Social Communication Questionnaire,
DCDQ; Developmental Coordination Disorder Questionnaire

方法：調査対象者

生後フォローアップ対象者(n=19,579)

5,6歳の発達調査対象者(n=5,109) (平成28年12月現在)

5歳質問票の回答あり(n=3,492)

6歳質問票の回答あり(n=2,566)

ケース
(発達支援必要群)

コントロール群

ケース
(ADHD疑い群)

コントロール群

妊娠初期フタル酸エステル類・BPA濃度測定(LC/MS/MS法)

6歳のADHD調査のケースとコントロール群を対象に、
遺伝子多型(SNPs)解析(ダイナミックアレイ)
+
臍帯血DNAメチル化解析(Illumina 450K)



結果：胎児期DEHP,BPA曝露による3.5歳までの発達への影響

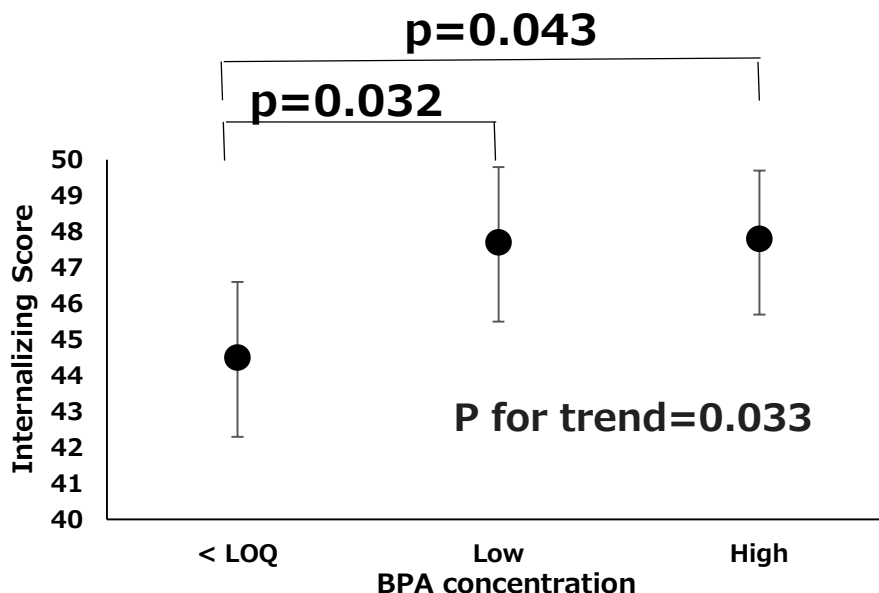
➤ BPA曝露による影響(285名)

中央値 = 0.051ng/ml

BPAは先行研究と比較して低濃度

生後早期の精神・運動発達には影響はなかったが、3.5歳での内向的問題(不安・うつなど)のスコアが増加

Minatoya et al., submitted



➤ DEHP曝露による影響(328名)

中央値 = 9.95ng/ml

DEHPは先行研究の妊婦濃度よりやや高いが、生後早期の精神・運動発達、幼児期の問題行動とは関連なし

Minatoya et al., 2016

結果：5,6歳の発達にかかわるケース（疑い）群の割合

5歳質問票(SDQ,DCDQ) = 回答率**68.3%**

6歳質問票(ADHD-RS,SCQ) = 回答率**67.4%**

SDQ
TDS \geq 13
20.4%

SCQ
得点 \geq 15
0.7%

発達支援が必要な群

協調運動障害 疑い群
ASD疑い群

ADHD疑い群

ADHD-RS
男児) 得点 \geq 14
17.8%
女児) 得点 \geq 9.4
16.4%

DCDQ
得点 = 15-46
21.8%

SDQ; Strength and Difficulty Questionnaire
ADHD-RS; ADHD rating scale
SCQ; Social Communication Questionnaire
DCDQ; Developmental Coordination Disorder Questionnaire

なんらかの発達の問題を有する児童は20%とするWHOの報告とも同程度の割合だった

結果：フタル酸エステル類, BPAの濃度

デンマーク、オーストラリア、韓国の先行研究と比べて、低濃度だった

(659名)

親化合物	代謝物	MDL	検出率 (%)	中央値	IQR (25 th , 75 th)
BPA	—	0.004	80.7	0.069	0.030, 0.298
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

ng/ml, MDL: Method detection limit, IQR: Inter quartile range

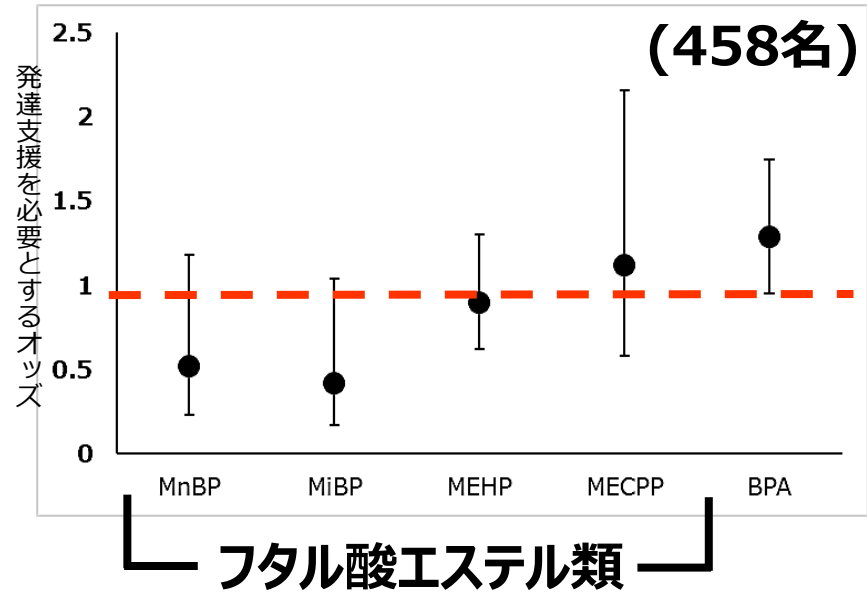
妊娠初期の血液中の濃度を、LC-MS/MSで分析

結果：胎児期フタル酸エステル類、BPA曝露と子どもの発達

発達支援を必要とするリスクのオッズ比

BPA濃度が上がると、発達支援を必要とするリスクが上がる傾向がみられたが、有意ではなかった

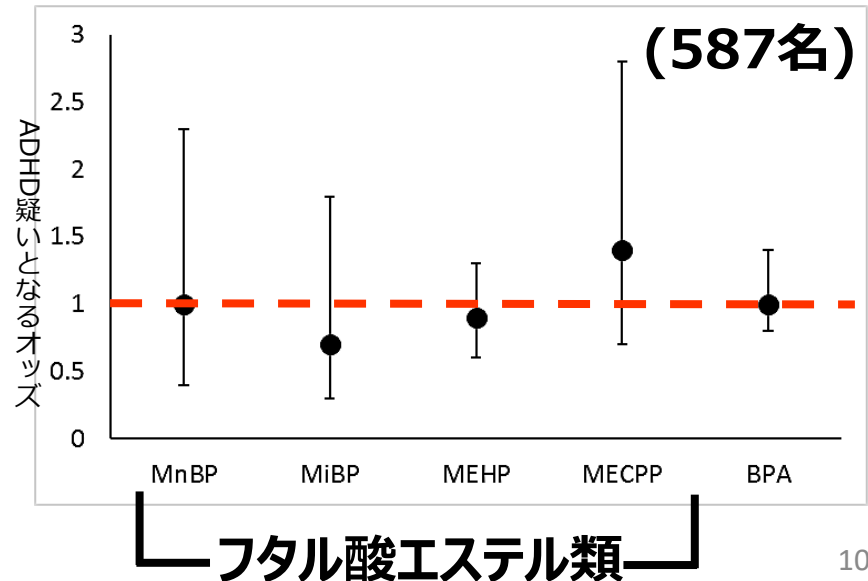
フタル酸エステル類, BPA濃度はlog10変換、両親の年齢、年収、母の妊娠中コチニン値、児の性別、SDQ回答月齢で調整



ADHD疑いのオッズ比

フタル酸エステル類、BPA濃度とADHD調査の結果には、関連なし

フタル酸エステル類BPA濃度はlog10変換
出産歴、母の妊娠中コチニン値、両親の教育歴、妊娠中・生後の年収、婚姻状況、児の性別、ADHD-RSを実施した月齢で調整



検討した遺伝子の種類と数

31SNP s を検討

化学物質と
関連する
遺伝子
(母児)

- ✓ ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(*PPAR*);7
- ✓ 構成的アンドロスタン受容体(*CAR*);2
- ✓ UDP-グルクロン酸転移酵素(*UGT*);1
- ✓ 硫酸転移酵素(*SULT*);3

✓ エストロゲン受容体 (*ESR*);8

児のみ

両方に着目をして解析
する遺伝子を選択

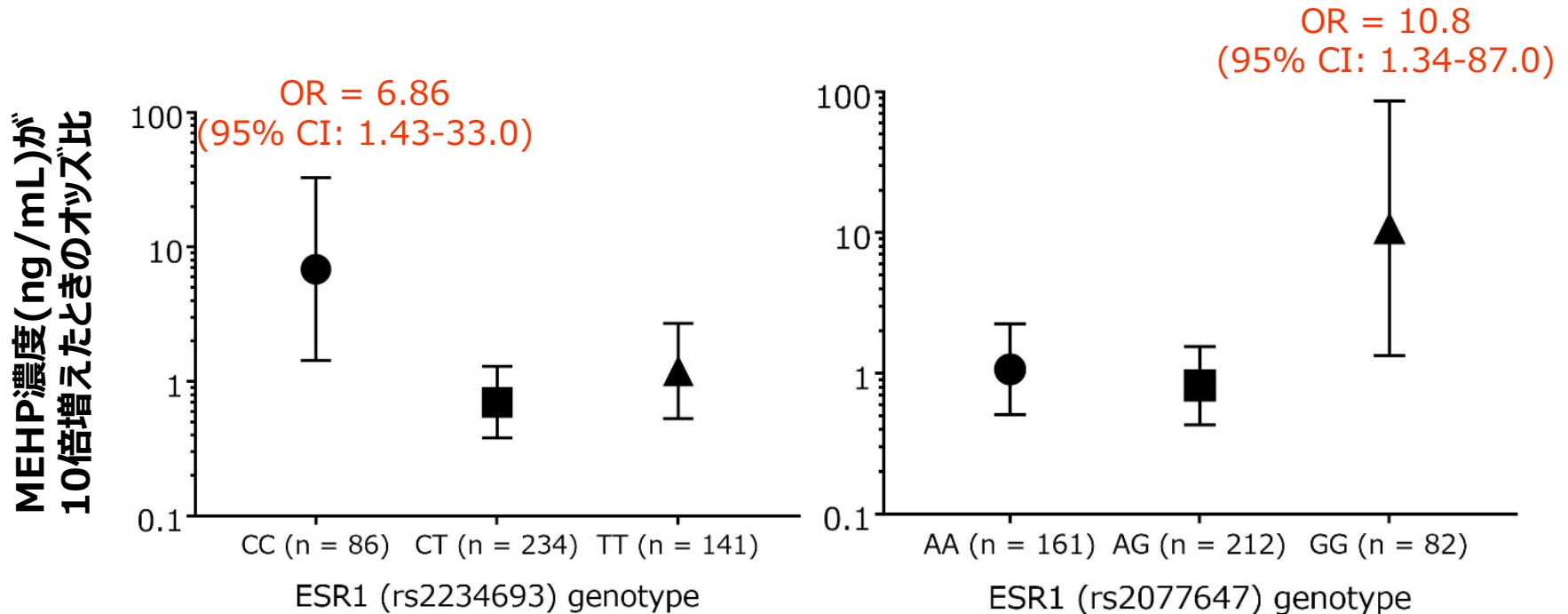
神経伝達に
関連する
遺伝子
(児のみ)

- ✓ カテコール-O-メチル基転移酵素(*COMT*);1
- ✓ ドパミン受容体(*DRD*);3
- ✓ ドパミントランスポーター(*DAT*);2
- ✓ セロトニン受容体(*HTR*);2
- ✓ シナプトソーム関連タンパク質25(*SNAP25*);1
- ✓ 脳由来神経栄養因子(*BDNF*);1

結果：母児の遺伝子型によるADHD疑いへの影響

BPA曝露は、母児の遺伝子型によるADHD疑いへの影響の違いは明確でなかった

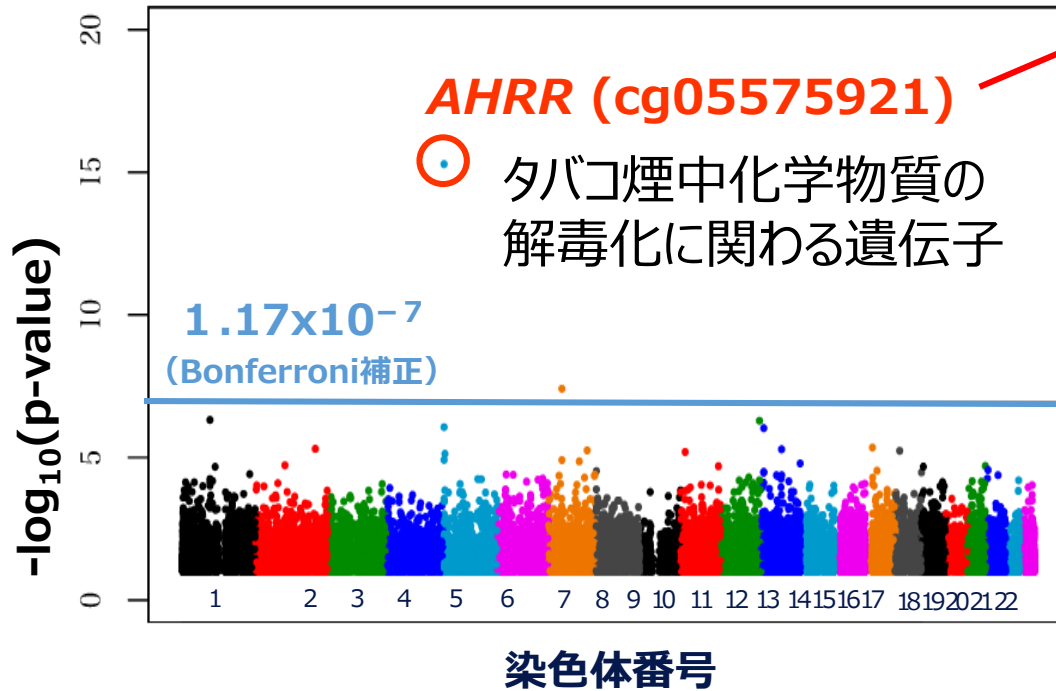
DEHP曝露は、*ESR1*(エストロゲン受容体1)*rs2234693*はCC型で、*rs2077647*はGG型で、ADHD疑いのリスクを増加させたが、引き続き検討が必要



母の年齢、出産歴、妊娠後期コチニン値、教育歴（母・パートナー）、世帯収入（妊娠中・就学前）、既婚歴で調整し、遺伝子型で層別したロジスティック回帰分析

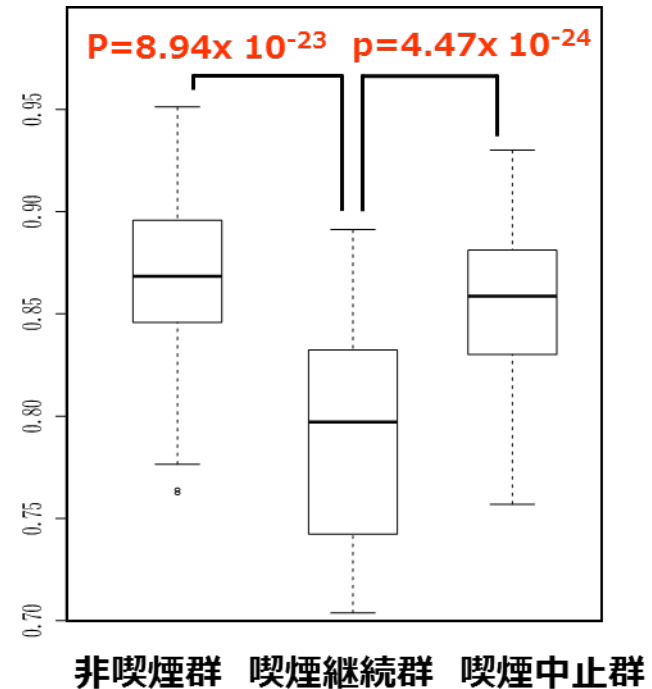
結果：喫煙・喫煙中止・非喫煙群間のメチル化比較

450Kによる網羅的解析



(児性別, 母年齢, 母学歴, サロゲート変数で調整)

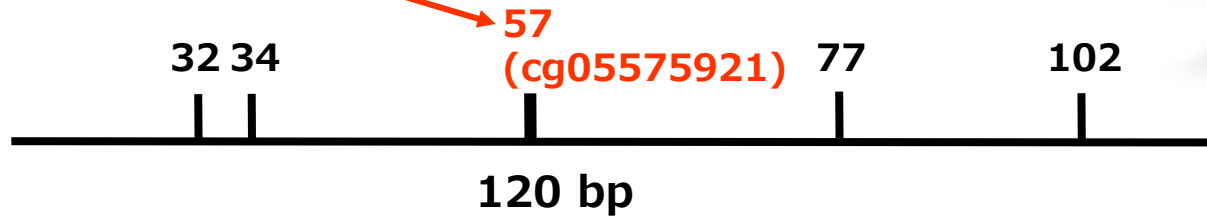
特に p 値が小さかった
AHRR (cg05575921) について
メチル化を3群間で比較



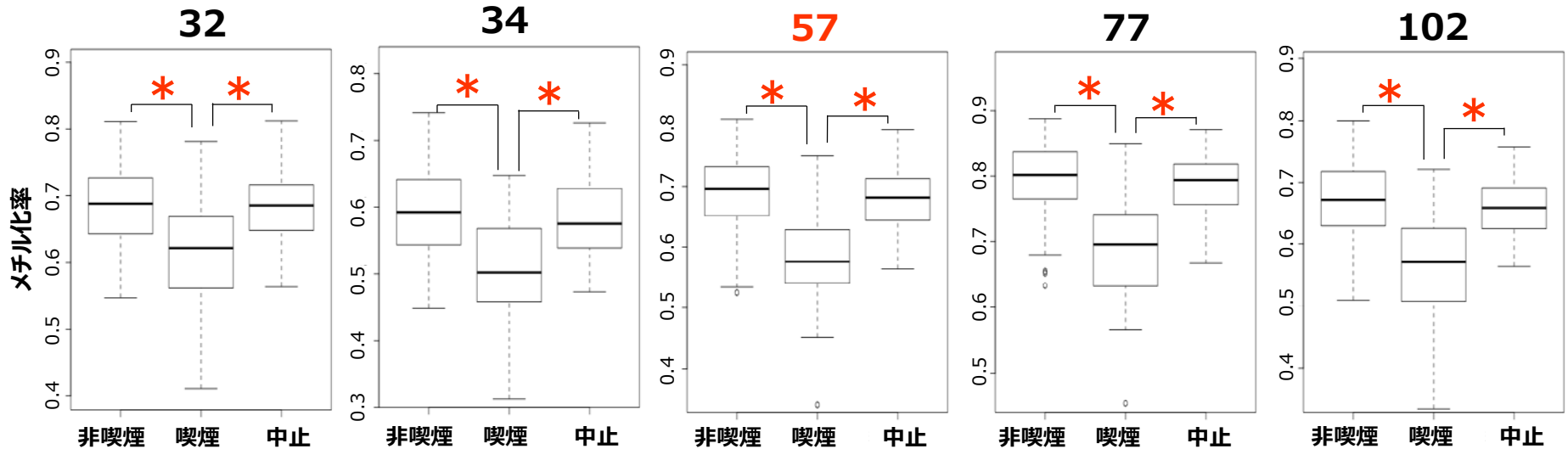
非喫煙群は喫煙継続群と比較して、メチル化程度が有意に高かったが、喫煙中止群とはメチル化程度に有意な差は見られなかった

結果：次世代シーケンサーによるAHRR領域のメチル化解析

喫煙曝露によるメチル化への影響が最も大きい
AHRR (cg05575921)および近傍CpG領域)



* $p < 1.17 \times 10^{-7}$



次世代シーケンサーの結果は、450Kで得られた結果と同様なメチル化変化を示したため、450K解析結果は妥当であることが確認できた

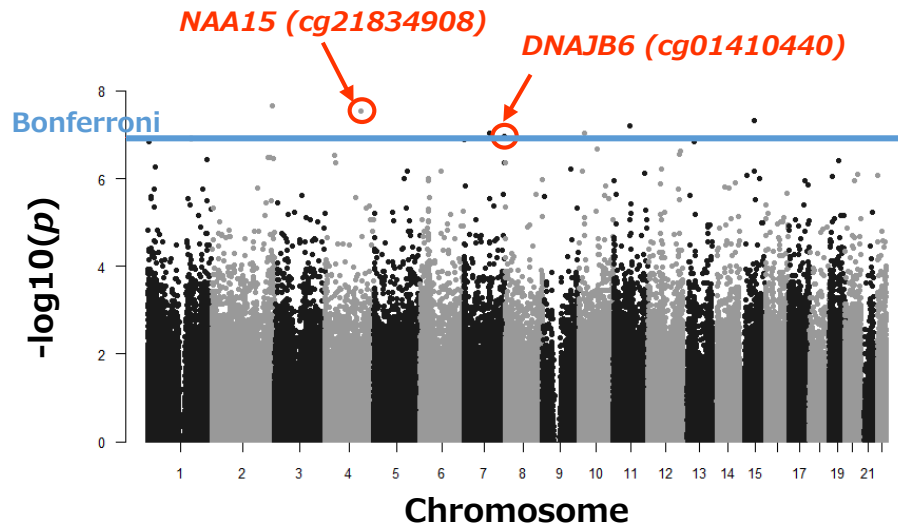
3群間のメチル化変化は周辺のCpGにおいても同様の傾向であった

胎児期BPA曝露による児のDNAメチル化への影響

マンハッタンプロット

Bonferroniで有意であるCpGを選択

- 7CpGが有意なメチル化変化を示し、うち神経発達に
関与する可能性のある遺伝子が **2CpG**

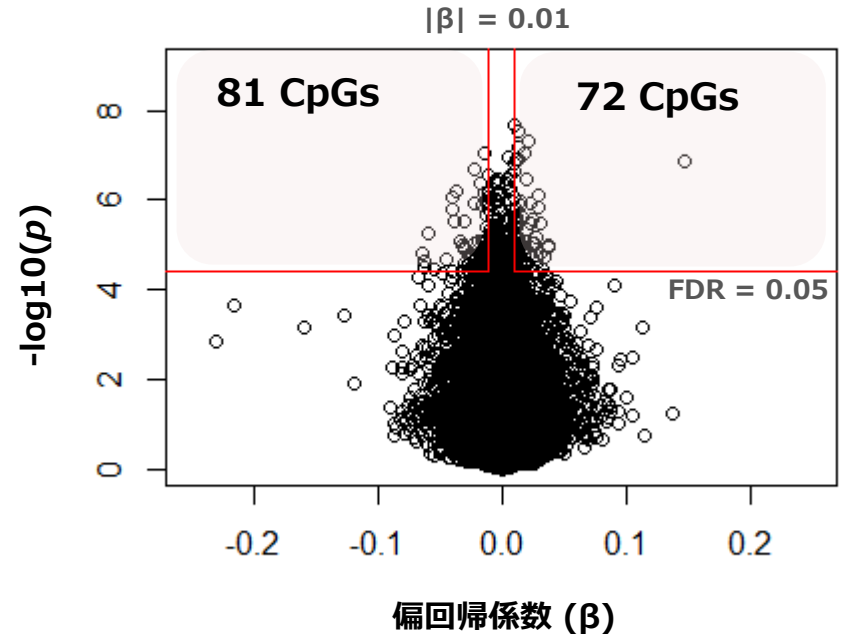


- **NAA15 (cg21834908)** : 他種との類似性から血管、造血、神経細胞の増殖に重要な役割を果たすN-アセチルトランスフェラーゼ活性を持つと思われる
- **DNAJB6 (cg01410440)** : 特異的ニューロンでポリグルタミン蓄積にかかわる可能性のあるDNAJファミリーに属する

ボルケーノプロット

FDR < 0.05かつ、 $|\beta| > 0.01$ のCpGサイトを選択

- 153CpGが有意なメチル化変化を示した

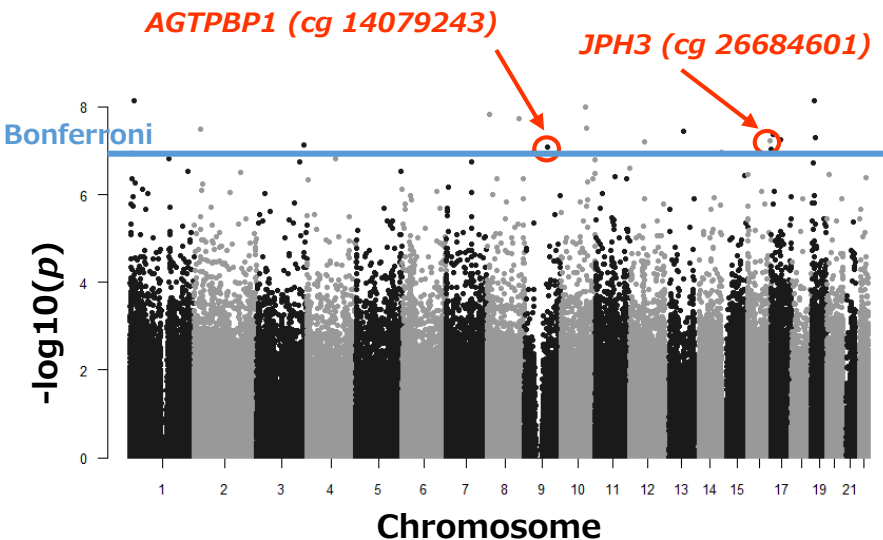


胎児期DEHP曝露による児のDNAメチル化への影響

マンハッタンプロット

Bonferroniで有意であるCpGを選択

- 19CpGが有意なメチル化変化を示し、うち神経発達に関与する可能性のある遺伝子は**2遺伝子**

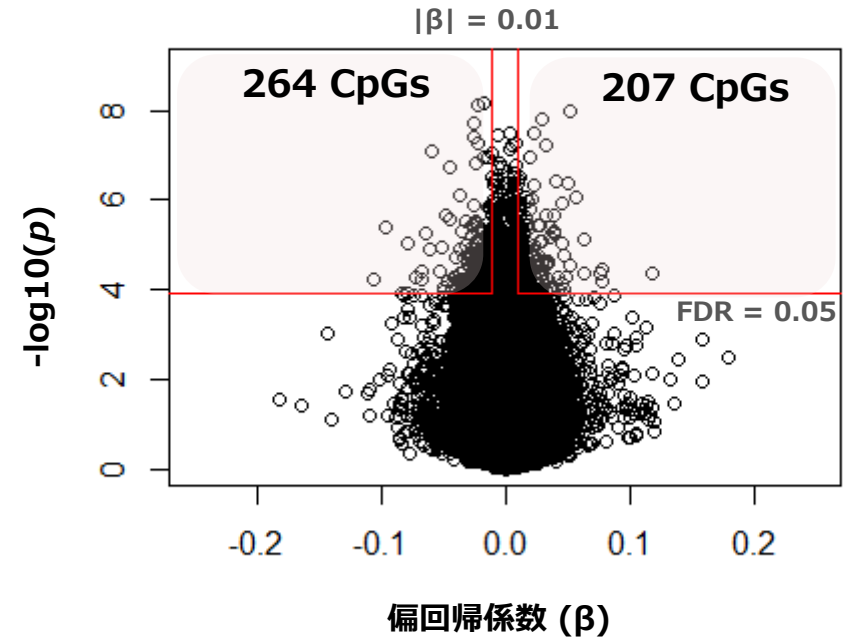


- **JPH3 (cg26684601)** : 結合膜構造形成に必要な分子であり脳組織特異
- **AGTPBP1 (cg14079243)** : 脱グルタミル化を触媒するカルボキシペプチダーゼであり、神経系への関連が示唆されている

ボルケーノプロット

FDR < 0.05かつ、 $|\beta| > 0.01$ のCpGサイトを選択

- 471CpGが有意なメチル化変化を示した



曝露と関連する遺伝子メチル化解析候補

ADHDのケース（245名）とコントロール（317名）を対象に以下のCpGを次世代シーケンサーで解析し、周辺領域も含めて曝露-メチル化変化-ADHDの関係を解明

BPA

*	CpG No.	P値	遺伝子	機能
1	cg26048923	4.93E-06	TRAPPC9	小胞輸送に関わるNF-kappa-Bのアクチベーターとして機能し、その変異は精神発達遅滞と関連している
	cg20071744	2.91E-05	TRAPPC9	
2	cg21212995	4.34E-05	SLC6A7	脳特異的L-プロリントランスポーター
3	cg17066594	4.29E-06	UNC93B1	Toll様レセプター伝達にかかわる
4	cg08487455	3.84E-05	CNTNAP4	ニューレキシンファミリーの1つ
5	cg04897931	4.23E-05	RPH3AL	カルシウム依存エンドサイトーシスに関与
6	cg22905511	0.00015	FLJ44606	機能は不明. TSS200に位置し、CpGアイランドであるため、選択
	cg10812634	0.000669	FLJ44606	

DEHP

*	CpG No.	P値	遺伝子	機能
1	cg26748578	1.50E-05	SLC1A4	ナトリウム依存性中性アミノ酸輸送タンパク. この遺伝子の欠損は発達遅延や知的障害に関連している
	cg19220282	2.11E-05	SLC1A4	
2	cg19948393	8.58E-06	ANKRD33	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	ANKRD33	
3	cg21938532	3.06E-05	GNAS	膜結合型GTPアーゼ
4	cg26902026	8.84E-06	SNX19	小胞体輸送タンパク
5	cg12458485	3.35E-07	GMPPA	GDP-マンノースピロホスホリラーゼ
6	cg00047050	2.01E-05	CUL5	E3 ユビキチンリガーゼ複合体の主要成分
7	cg05714773	2.23E-06	TMEM176B	小脳顆粒細胞の発生にかかわる
8	cg23016726	2.57E-05	CACNA1I	カルシウムチャンネル
9	cg25967418	1.62E-05	PCDHA7	神経発達に重要な役割を持つプロトカドヘリンの1つ
10	cg00888801	1.99E-05	PCDHGA4	神経発達に重要な役割を持つプロトカドヘリンの1つ

本研究により得られた主な成果

- **BPA、フタル酸エステル類の胎児期曝露濃度**は、諸外国と比較して**比較的 low 濃度**であった
- 種々の検査ツールを用いて、幼少期の神経行動発達を疫学調査で経時的に追跡し、**低濃度**でも**BPA曝露が内向的問題の得点を増加**させた
- DEHP曝露によるADHDへの影響には、児の**エストロゲン受容体遺伝子型**による違いがみられたが、**さらに詳細な検討**が必要である
- 臍帯血292検体の網羅的DNAメチル化データを取得し、**曝露でDNAメチル化変化を示した遺伝子には、神経発達に関連する遺伝子**が含まれた
- 環境化学物質曝露と発達障害に、**DNAメチル化が関与するか**、次世代シーケンサーで検討中である

本研究で得られた知見は環境政策の基礎データとなる

研究成果を用いた、日本国民との科学・科学技術対話の活動(研究開始～プレゼン前日まで)

①小・中・高等学校の特別授業での特別授業

実施日	学校名等	所在地	説明した「研究成果」、「実生活との関連」等
H26.9.26	札幌北高等学校1、2年生	北海道	・「北海道の人々が参加する環境と健康に関する研究」について、北海道スタディからわかったこと、住環境を含む身の回りの環境にある化学物質と私たちの健康について説明。
H26.12.17	札幌開成高等学校2年生	北海道	・「北海道の人々が参加する環境と健康に関する研究」について、北海道スタディからわかったこと、住環境を含む身の回りの環境にある化学物質と私たちの健康について説明。
H27.11.5	札幌東高等学校1～3年生	北海道	「北海道の人々が参加する環境と健康に関する研究」について、身の回りにおける環境化学物質の健康影響について、今後出産や育児を経験する可能性のある高校生に対して説明。
H28.10.27	札幌南高等学校1年生	北海道	「環境と私たちの健康」について、具体的な例とともに身近な環境化学物質への曝露と、それによる健康影響について説明。

③大学・研究機関の一般公開での研究成果の講演を推進する活動

実施日	主催者名	講座名	開催地	参加者数	講演した「研究成果」、「参加者との対話の結果」等
H27.11.17	北海道大学環境健康科学研究教育センター（主催）	WHO（世界保健機関）研究協力センター指定記念講演会	北海道	80名	<ul style="list-style-type: none"> ・「環境化学物質のハザードと人の健康障害の予防」につき講演。 ・参加者から「環境汚染の状況がよくわかり大変、勉強になった」、「一般市民への誰でもわかりやすいお話を企画されていることに感謝します」とコメントをいただいた。

研究成果を用いた、日本国民との科学・科学技術対話の活動(研究開始～プレゼン前日まで)

④一般市民を対象としたシンポジウム、博覧会、展示場での研究成果の講演・説明

実施日	主催者名	シンポ名	開催地	参加者数	講演した「研究成果」、「参加者との対話の結果」等
H27.3.5	北海道大学 環境健康科学研究教育センター（主催）	「環境と子どもの健康」	北海道	50名	<ul style="list-style-type: none"> ・「環境と子どもの健康」につき講演。 ・参加者からは「家族の健康のために今日の話を取り入れたい」、「研究調査について日本内外のものを聞けるのを楽しみにしている」との感想があった。
H28.3.14	北海道大学 環境健康科学研究教育センター（主催）	「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～」	北海道	20名	<ul style="list-style-type: none"> ・「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～」につき講演。 ・参加者からは、今後も環境が子どもに与える影響を中心に、エコチル調査や北海道スタディの進捗や成果を聞きたいという声が多数あった。
H29.2.23	北海道大学 環境健康科学研究教育センター（主催）	『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～	北海道	50名	<ul style="list-style-type: none"> ・「男の子らしさ？女の子らしさ？を科学する－胎児性腺に対する環境ホルモンの影響－」について説明。 ・「住環境と子どもの喘息やアレルギーについて」を説明。 ・「幼児期初期の自閉症スペクトラム傾向と母児の特徴」について説明。 ・参加者から住環境において、注意すべき点などの質問があった。

⑤インターネット上での研究成果の継続的な発信

開始日	種類	アクセス/参加者数	発信した「研究成果」等
H22.4.1	ホームページ		・北海道大学環境健康科学研究教育センターの成果として発信。

本課題の成果に係る「査読付」論文（国際誌・国内誌）の発表

執筆者名	発行年	論文タイトル	ジャーナル名等
Minatoya M <i>et al.</i>	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.	Science of the Total Environment, 565:1037-1043.
Minatoya M <i>et al.</i>	2016	Associated factors of behavioural problems in children at preschool age: the Hokkaido study on environment and children's health.	Child: care health and development, 2016

他0本。 以上は全て、脚注又は謝辞に「環境省」・「環境研究総合推進費」・「課題番号」を記載。

本課題の成果に係る「査読付論文に準ずる成果発表」論文の発表 又は 本の出版

執筆者名	発行年	タイトル	ジャーナル・出版社名等
小林澄貴ら	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.	北海道公衆衛生学雑誌

他0本・冊。

マスコミ発表（プレスリリース、新聞掲載、TV出演、報道機関への情報提供等）

種類	年月	概要	その他特記事項(あれば)
該当なし			

他0件。 以上は全て「環境省」・「環境研究総合推進費」・「課題番号」の掲載を情報提供先に依頼。

国内外における口頭発表（学会等）

学会等名称	年月	発表タイトル	その他特記事項
ISEE-ISES AC2016	2016.6	Association between Maternal Smoking during Pregnancy and Coordination Development at Preschool Age	
ISEE-ISES AC2016	2016.6	Prenatal environment and Child Behavioral and Coordination Development at Preschool Age in the Hokkaido Study	

他5件。 以上は全て「環境省」・「環境研究総合推進費」・「課題番号」を明示。

知的財産権

知的財産権の種類	概要（簡潔に）	その他特記事項
特許権、実用新案登録権	なし	

行政ニーズに即した 環境政策への貢献事例

概要（簡潔に）	その他特記事項
WHO(世界保健機構)西太平洋地域事務局（WPRO）の政策アドバイザーとして西太平洋地域の環境政策会議にて、WHOメンバーに環境化学物質と健康について説明	
WHOヨーロッパ事務局主催の“Identification of risks of endocrine”にて、環境化学物質の胎児期曝露評価について説明	

他2件。

行政ニーズに即した 今後の環境政策への貢献「見込み」

概要（簡潔に）	その他特記事項
妊婦のBPA、フタル酸エステル類への曝露実態を明らかにすることは、わが国の基礎データに貢献できる	
環境化学物質の胎児期曝露によるエピゲノム変化を明らかにすることは、知見の提供に貢献できる	