

綜 説

環境要因, 特に汚染物質の曝露による DNA メチル化変化と
小児の健康への影響堺 温哉^{1)*} 稲葉 雄二²⁾

1) 信州大学医学部衛生学公衆衛生学講座

2) 信州大学医学部小児医学講座

Alteration of DNA Methylation Status by Environmental Factors,
Especially Environmental Contaminants and Effects on Child HealthHaruya SAKAI¹⁾ and Yuji INABA²⁾1) *Department of Preventive Medicine and Public Health, Shinshu University School of Medicine*2) *Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine***Key words** : DNA methylation, contaminants, in utero exposure

DNA メチル化, 環境汚染物質, 子宮内曝露

I はじめに

近年, 小児の心身の健康状態の悪化を示すデータが報告されている。文部科学省の学校保健統計調査によると, 1967年度の幼稚園, 小学校, 中学校, 高校の児童・生徒における喘息罹患率はそれぞれ0.29, 0.25, 0.08, 0.03%であったが, その後経時的に増加し, 2011年度には2.79, 4.34, 2.83, 1.94%といずれの年齢層でも増加した。また, 厚生労働省の調査によると, 1996年の5-9歳児と10-14歳児における精神および行動の障害による受療率は, 人口10万人当たりそれぞれ23人と30人だったのが, 2008年には66人と72人と増加した。このような小児の健康状態の急激な悪化は, 遺伝的な要因だけではなく, 環境汚染物質の曝露など環境要因が強く影響していると考えられる。

環境汚染物質による健康への影響には様々な要因があるが, 近年の分子遺伝学的な手法の発達・普及により, エピジェネティクスな影響についての知見が集積されつつある。生体へのエピジェネティクスな影響の1つとして, DNA メチル化の変化が挙げられる。DNA メチル化は, S-アデノシルメチオニンをメチル基供給源として, DNA メチル化酵素により CpG 配列のシトシンをメチル化する反応である (図1)。

DNA 脱メチル化に関しては不明な点が多いが, DNA メチル化酵素をブロックすることで脱メチル化を行う (受動的脱メチル化), またはメチル化シトシン塩基の除去 (能動的脱メチル化) などのモデルが提唱されている。DNA メチル化は遺伝子の発現調節や X染色体の不活化など, 遺伝子の発現調節を通して生命活動に重要な役割を担っている¹⁾。また, DNA メチル化に関与する酵素の異常が, ICF 症候群²⁾や Rett 症候群³⁾などの疾患の発症や, 2q23.1欠失症候群⁴⁾などの病態にも関与していることが知られている。

DNA のメチル化パターンは, 環境因子によっても変化することが明らかとなっている。例えば, 一卵性双生児における DNA メチル化パターンが異なっていたり⁵⁾, 加齢による影響も報告されている⁶⁾。一般環境における, 環境汚染物質によるヒトの DNA メチル化変化の報告は, Bollati ら⁷⁾が benzen 曝露を受ける成人を対象として初めて報告した。現在までにヒト成人に関して, 環境中の粒子状物質 (PM) や多環芳香族化合物 (PAH), 残留性有機化合物 (POPs) 曝露による DNA メチル化変化が報告されている⁸⁾⁻¹¹⁾。本稿では, DNA メチル化の解析方法について概説し, 次に環境汚染物質等の胎生期および新生児・乳幼児期曝露による DNA メチル化変化に関する報告を取りまとめ, 最後に DNA メチル化異常によって引き起こされる, 小児の健康への影響について考察する。

* 別刷請求先: 堺 温哉 〒390-8621

松本市旭3-1-1 信州大学医学部衛生学公衆衛生学講座

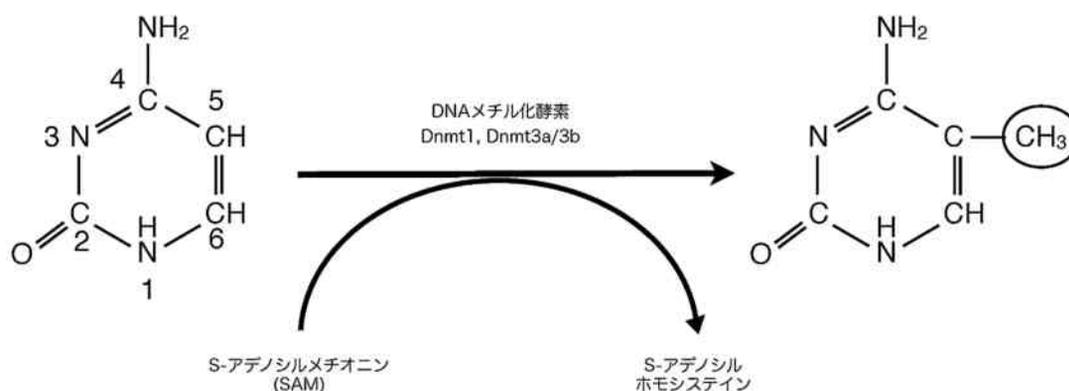


図1 シトシンのメチル化

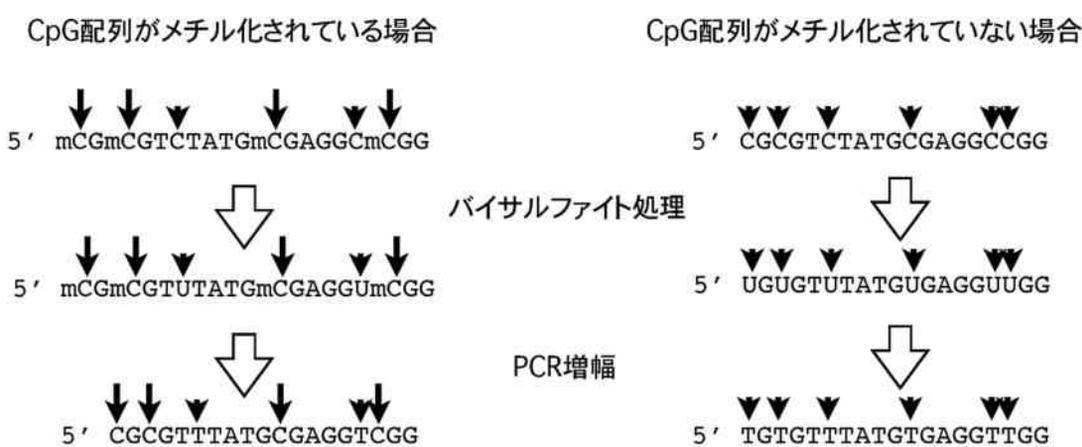


図2 バイサルファイト法
矢印はメチル化シトシン、矢頭は非メチル化シトシン

II DNA メチル化解析方法

DNA のメチル化解析には、特定ゲノム領域のメチル化を解析するための方法と、網羅的な DNA メチル化を解析する方法がある。解析方法の詳細に関する説明は他稿¹²⁾に委ね、ここでは代表的な手法について概説する。

A 特定ゲノム領域の DNA メチル化解析

1 バイサルファイトシーケンス法

試料を一定時間バイサルファイト処理することで、DNA 中の非メチル化シトシンはウラシルに変換され、その後の PCR でチミンに変換される。一方メチル化シトシン (mC) は変換されない。このことから、バイサルファイト処理を行うことでメチル化シトシンと非メチル化シトシンを区別することが出来る (図2)。バイサルファイトシーケンス法はバイサルファイト処理ののちに、特定領域を PCR で増幅し、クローニング後にこのクローンをシーケンスする。複数の

クローンのシーケンス結果からメチル化シトシンの出現頻度を解析する。

2 パイロシーケンス法

パイロシーケンス法は、DNA ポリメラーゼによる塩基伸長反応によって DNA にヌクレオチドが取り込まれる時に放出するピロリン酸を、ATP に変化させて発色反応に用いることで、ヌクレオチドがどれくらい DNA に取り込まれたかを定量する原理に基づき、塩基配列決定を定量的に行う手法である。例えば、対象配列内にモザイク変異がある場合、それぞれの変異アレルの頻度は発光強度から解析することが出来る。メチル化解析の場合、バイサルファイト処理と PCR によりメチル化シトシンと非メチル化シトシンを C/T の塩基の差異に変換して、この C/T の比率を定量的に解析する。得られた C/T の比から DNA メチル化比率を定量的に解析する¹³⁾。パイロシーケンス法は、バイサルファイトシーケンス法と比較してクローニングを行う必要がないことから、短時間で定量的に

メチル化頻度を解析することが出来るが、解析できる DNA 塩基配列長は後者よりも一般に短い。

3 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法

バイサルファイト処理後に PCR 増幅を行い、メチル化 DNA と非メチル化 DNA で配列が異なる箇所を認識する制限酵素で処理することで解析を行う¹⁴⁾。特別な装置も必要なく、簡便にメチル化状態を解析することが出来るが、制限酵素サイトの CpG 配列だけが解析対象となり、定量性は乏しい。

また、特定ゲノム領域の解析からゲノム全体のメチル化頻度 (ゲノムグローバルなメチル化頻度) を推測する方法として、LINE-1配列もしくは *AluI* 配列のメチル化頻度を解析する方法が現在よく用いられている。LINE-1ならびに *AluI* はどちらもゲノム全体に広く分布するリピート配列であり、それぞれゲノム全体に対する比率は17.3%と10.7%であるため¹⁾、これらの解析でゲノム全体のメチル化状態を推測できる。手法としてはバイサルファイトシーケンスもしくはパイロシーケンスが用いられている。また、通常これらのリピート配列は高度にメチル化されている。

B 遺伝子網羅的なメチル化解析

DNA マイクロアレイや次世代シーケンサーを用いて、全遺伝子について網羅的にメチル化解析を行う手法が開発されている¹²⁾。試料の前処理として、メチル化 DNA 結合タンパク質を用いてゲノム DNA がメチル化されている領域を濃縮する Methylated CpG Island Recovery Assay (MIRA)¹⁵⁾や、抗メチル化シトシン抗体を用いてメチル化領域を濃縮する Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP)¹⁶⁾が報告されている。これらの前処理法によって濃縮した DNA を、マイクロアレイもしくは、次世代シーケンサーを用いてメチル化解析する。次世代シーケンサーはアレイ解析に比べ1解析当たりのコストが高いが、DNA 断片に個体を識別するバーコードタグを付加することで複数検体を同時に解析することが可能となり¹⁷⁾、この技術を用いることで検体当たりの解析コストを抑えることが出来る。

III 胎児・新生児期における環境汚染物質の曝露による DNA メチル化の影響

種々の環境汚染物質が DNA メチル化に変化をもたらしていることが報告されている。また一般に、哺乳類の健康への影響は、胎児期や幼少期でより大きいと

考えられる。以下に、最近の知見を列挙する。

Wu ら¹⁸⁾は、着床前のマウス胚 (1-cell stage から blastocyst stage) に10 nM 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2, 3, 7, 8-TCDD) を培養系で曝露させた後に、仮親に移植することで、発生初期における 2, 3, 7, 8-TCDD の影響について明らかにした。2, 3, 7, 8-TCDD 曝露を受けた群は、成長に関連するインプリンティング遺伝子 *H19* と *Igf2* の発現が低下し、胎生14日の体重が有意に低かった。さらに、*H19/Igf2* のインプリンティングコントロール領域における DNA メチル化を調査したところ、曝露群において高メチル化状態であった。すなわち、TCDD の胎生期曝露によって、遺伝子特異的に DNA の高メチル化状態が起り、成長に関連する遺伝子の発現が抑制されて、胎仔が低体重となることが示された。

胎生期の環境汚染物質曝露による DNA メチル化の変化は、幼小児期にとどまらず成熟後まで維持され、成人期の健康へも影響する可能性があることが、実験動物を用いた研究で報告されている。大迫¹⁹⁾は、胎生期に TCDD 曝露されたマウスの肝臓における薬物代謝酵素 CYP1A1遺伝子のプロモーター領域が、120日齢の成熟期まで低メチル化状態が維持されていることを示した。さらにヒストン H3と H4のアセチル化、H3K4メチル化も増加し、成熟期まで持続していることを明らかにした。これらのことから環境汚染物質の胎児期曝露が、器官発達過程において DNA メチル化変化を含むエピゲノムの変化をもたらし、これが原因となって病態発症に影響をもたらすことを示唆された。なお、TCDD およびポリ塩化ビフェニル (PCBs) の胎児期曝露による、成熟後の化学発がん感受性、および薬物代謝酵素発現の変化についてはこれまでも報告されているが²⁰⁾⁻²²⁾、大迫の報告¹⁹⁾から DNA メチル化変化が関与していることが示唆される。また、Armenti ら²³⁾は胎生期・新生仔期における methoxychlor (MXC) の曝露は、成熟後の子宮に、ER β の発現変化をとまなう機能障害を生じることを報告している。この ER β の発現変化は、ER β のプロモーター領域が胎生期 MXC 曝露によって高メチル化状態に変化したことが原因である²⁴⁾。

ヒトに関しても、胎児期もしくは新生児期の化学物質曝露による DNA メチル化変化が報告されている。例えば Guerrero-Preston ら²⁵⁾は母親の喫煙ならびに perfluorinated alkyl 化合物 (PFCs) 蓄積が、胎児の

ゲノム DNA をグローバルな低メチル化状態に変化させることを報告している。また、Breton ら²⁶⁾は親の喫煙状況とゲノム DNA のメチル化頻度との関連について調査し、親の喫煙が子どものゲノム DNA のグローバルな低メチル化状態への変化をきたすことを報告している。別の項で詳細に述べるが、Perera ら²⁷⁾は母親の PAHs 曝露による児の DNA メチル化異常について報告している。

Ⅳ 親の DNA メチル化異常と次世代への影響

哺乳類におけるゲノム DNA のメチル化は、生殖細胞で全て脱メチル化されることから、インプリンティング領域を除き、一般には次世代には遺伝しないと考えられている。しかし、汚染物質曝露による DNA メチル化変化が、複数世代にまで影響を与えることを示す研究が報告されている。例えば Anway ら²⁸⁾は子宮内で殺菌剤 Vinclozolin に曝露された F1 ラット、ならびに曝露されていない F2 から F4 ラットを対照群と比較すると、F1 から F4 雄ラット全てにおいて精原細胞のアポトーシスが有意に増加し、精子数と精子の運動能が有意に低いことを明らかとした。また少なくともゲノム上の 25 箇所までメチル化変化を確認し、この DNA メチル化の変化と生殖細胞の機能異常との関連を示唆している。

また、Ng ら²⁹⁾は父親ラットの慢性的な高脂肪食摂取による次世代への影響について明らかにしている。すなわち、高脂肪食摂取の父ラットを親に持つ雌ラットは、対照群と比較して、インスリン分泌低下およびグルコース耐性障害が早期発症して時間とともに増悪し、豚島において 642 個の遺伝子の発現が変化していることを明らかにした。これら遺伝子のうち発現量に最も大きな差が認められた Jak-Stat シグナル伝達系に関連する *Il13ra2* (1.76 倍の増加) では、プロモーター領域にある CpG のメチル化率が対照群と比較して有意に低く、発現量の変化が DNA メチル化変化の影響であることを明らかとした。母の高脂肪食摂取によって次世代に脂肪過多や代謝障害など有害な影響を与えることは報告があるが³⁰⁾、仔マウスの栄養状態に直接影響を与えない父からの影響を報告したのはこの報告が初めてである。

Ⅴ ゲノムメチル化変化と小児への影響

胎生期および新生児・幼児期における環境汚染物質の曝露によって DNA メチル化が変化し、これが原因

と考えられる健康への影響について、近年いくつか報告されている。

多くのプラスチック製品に使われ代表的な内分泌攪乱物質である Bisphenol A (BPA) による胎生期曝露は、DNA メチル化状態を変化させ、脳形成・発達に影響をもたらす可能性があることが報告されている。Dolinoy ら³¹⁾は雌の variable yellow agouti マウスに、妊娠前から授乳期間を通して BPA を投与すると、出生仔の毛色が変化することを示した。これは毛色決定に関与する Agouti 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を、BPA 曝露により低メチル化状態に変化させたためであり、BPA が DNA メチル化に変化を与えることを明らかにした。また Yaoi ら³²⁾は胎生期 BPA 曝露したマウスの前脳における DNA メチル化変化を網羅的に調査し、48 領域において DNA のメチル化頻度に変化 (高メチル化・低メチル化) があることを認め、低メチル化が明らかとなった 2 つの遺伝子については、遺伝子発現が亢進していたことを明らかにしている。また、胎仔マウス前脳におけるメチル化状態の変化は、発生段階特異的に発現変動を示す遺伝子のプロモーター領域にもあり、機能遺伝子の転写を異常に制御している可能性を指摘している³²⁾³³⁾。

汚染物質の曝露による DNA メチル化変化と喘息発症との関連についても報告されている。Perera ら²⁷⁾は母親の PAHs 曝露と、子どものメチル化変化について調査し、PAHs 曝露レベルが高い母親から生まれた子供ほど、脂肪酸代謝に関与する *acyl-CoA synthetase longchain family member 3 (ACSL3)* のプロモーター領域が高メチル化していることを明らかとした。PAHs 曝露による *ACSL3* プロモーター領域のメチル化は、同じ論文内で H1299 細胞を用いたベンツ [a] ピレン (PAHs の代表的な化学物質) 曝露実験でも確認している。これまで *ACSL3* の機能と喘息発症との関連についてほとんど明らかにされていないが、新生児において *ACSL3* プロモーター領域が高メチル化されている子どもは、そうでない子どもと比較して、5 歳児までに喘息が発症する頻度が高いことを報告している。

Nadeau ら³⁴⁾は大気汚染と小児喘息の発症に関して、制御性 T 細胞 (T-reg) 分化へのマスター遺伝子である *Foxp3* のメチル化変化の関与について報告している。彼らは高大気汚染地域に居住する小児喘息患者と非喘息患者、ならびに低大気汚染地域に居住する小児喘息患者と非喘息患者の 4 グループについて、T-reg

機能を調査するとともに、T-reg からゲノム DNA を抽出し、*Foxp3* のプロモーター領域のメチル化頻度を解析した。その結果、大気汚染物質の曝露により *Foxp3* プロモーター領域が高メチル化状態になり、*Foxp3* 発現が抑制され、T-reg の機能不全が生じることを明らかにし、喘息の発症には汚染物質の曝露による DNA メチル化変化が関与することを示唆した。また、Nadeau ら³⁴⁾は PAHs 曝露が高い検体ほど、*Foxp3* のメチル化が亢進していることを報告している。

VI おわりに

本稿では、環境因子、特に環境汚染物質の曝露によるゲノム DNA メチル化の変化と、それにとまう小児の健康への影響についてこれまでの報告をまとめ、概説した。これら研究の多くは、最近数年間に発表されたもので、pyrosequencer などメチル解析技術の進歩と普及によるところが大きい。

環境汚染物質の曝露による DNA のメチル化変化は、遺伝子の発現抑制もしくは発現亢進、染色体構造の安定性に影響を与えることが推測される (図 3)。臓器や脳神経の発達段階である胎生期および幼少時期において、遺伝子発現のプログラムが崩されると、これらの正常な発達が阻害されさまざまな悪影響が生じるものと考えられる。成人病胎児期発症説 (Fetal Origins of Adult Disease) は胎児期の環境がその後の疾患発症に大きく影響を与えることを示し³⁵⁾、一部には DNA メチル化異常の関与も示唆されている³⁶⁾³⁷⁾。本稿で紹介したように、主に動物実験で汚染物質の子宮内曝露により、胎児 (仔) において DNA メチル化異常が生じ、出生後もその影響が持続していることが明らかとなってきた。しかし、ヒトにおける環境汚染物質の曝露と DNA メチル化の変化、さらに健康への影響についての研究はまだ少ない。胎生期から小児期を通じて成人に至るまでの長期的な観察が必要であるうえに、微量かつ膨大な種類の環境汚染物質についての解析が必要とされるため、その研究は容易ではない。

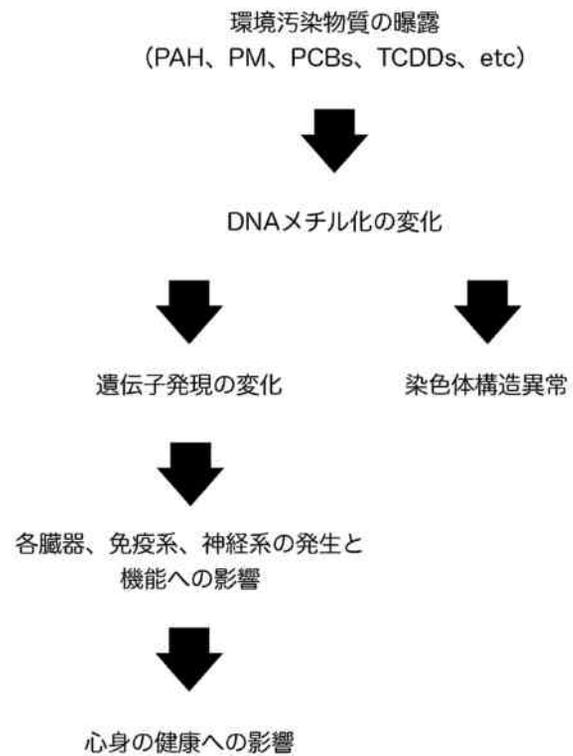


図 3 胎生期・小児期における環境汚染物質の曝露による DNA メチル化変化と生体への影響 (推測)

冒頭に述べた通り、現在小児の心身の健康に関して看過できない状態が進行している。特に発達障害に関しては、医療のみならず教育・社会的にも重要な問題となり、様々な対応が迫られている³⁸⁾。このような中、2011年から環境省による「子どもの環境と健康に関する全国調査 (エコチル調査)」が開始された。この調査は全国10万組の親子を対象にした大規模コホート調査で、化学物質の曝露や生活環境が、胎児から小児の健康に与える影響について明らかにすることを目的とした調査である。信州大学医学部では小児環境保健疫学研究センターを設置し、上伊那地域を対象に調査を開始している³⁹⁾。本調査によって、胎生期・新生児期の化学物質の曝露による、長期的な健康影響が解明されることが期待される。

文 献

- 1) Strachan T, Read AR: Human Molecular Genetics. 3rd ed, 2005 (松村正實, 木南 凌 (監訳) ヒトの分子遺伝学. 第3版, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2005)
- 2) Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM: The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 14412-14417, 1999

- 3) Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY : Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23 : 185-188, 1999
- 4) Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K : Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome : report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *Am J Med Genet A* 158A : 861-868, 2012
- 5) Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M : Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 : 10604-10609, 2005
- 6) Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, Sparrow D, Vokonas P, Baccarelli A : Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 130 : 234-239, 2009
- 7) Bollati V, Baccarelli A, Hou L, Bonzini M, Fustinoni S, Cavallo D, Byun HM, Jiang J, Marinelli B, Pesatori AC, Bertazzi PA, Yang AS : Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res* 67 : 876-880, 2007
- 8) Pavanello S, Bollati V, Pesatori AC, Kapka L, Bolognesi C, Bertazzi PA, Baccarelli A : Global and gene-specific promoter methylation changes are related to anti-B [a] PDE-DNA adduct levels and influence micronuclei levels in polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed individuals. *Int J Cancer* 125 : 1692-1697, 2009
- 9) Rusiecki JA, Baccarelli A, Bollati V, Tarantini L, Moore LE, Bonefeld-Jorgensen EC : Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ Health Perspect* 116 : 1547-1552, 2008
- 10) Kim KY, Kim DS, Lee SK, Lee IK, Kang JH, Chang YS, Jacobs DR, Steffes M, Lee DH : Association of low-dose exposure to persistent organic pollutants with global DNA hypomethylation in healthy Koreans. *Environ Health Perspect* 118 : 370-374, 2010
- 11) Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, Zanobetti A, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J : Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med* 179 : 572-578, 2009
- 12) Laird PW : Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet* 11 : 191-203, 2010
- 13) Yamamoto E, Toyota M, Suzuki H, Kondo Y, Sanomura T, Murayama Y, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Ashida M, Fujii K, Sasaki Y, Hayashi N, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y : LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in *Helicobacter pylori*-related enlarged-fold gastritis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 : 2555-2564, 2008
- 14) Bird AP, Southern EM : Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation : I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J Mol Biol* 118 : 27-47, 1978
- 15) Rauch T, Li H, Wu X, Pfeifer GP : MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells. *Cancer Res* 66 : 7939-7947, 2006
- 16) Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schubeler D : Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 37 : 853-862, 2005
- 17) Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Yamashita Y, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Miyake N, Masuda M, Matsumoto N : Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods : resequencing microarray technology and next-generation sequencing. *Hum Genet* 131 : 591-599, 2012
- 18) Wu Q, Ohsako S, Ishimura R, Suzuki JS, Tohyama C : Exposure of mouse preimplantation embryos to 2, 3, 7, 8-

- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes H19 and Igf2. *Biol Reprod* 70 : 1790-1797, 2004
- 19) 大迫誠一郎：ダイオキシンの胎生期曝露による生後の化学発癌感受性亢進とエピゲノム変化．2009年日本環境変異原学会大会プログラム講演要旨集 87, 2009
 - 20) Holcomb M, Safe S : Inhibition of 7, 12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor growth by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Lett* 82 : 43-47, 1994
 - 21) Wakui S, Yokoo K, Takahashi H, Muto T, Suzuki Y, Kanai Y, Hano H, Furusato M, Endou H : CYP1 and AhR expression in 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary carcinoma of rats prenatally exposed to 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl. *Toxicology* 211 : 231-241, 2005
 - 22) Wakui S, Yokoo K, Takahashi H, Muto T, Suzuki Y, Kanai Y, Hano H, Furusato M, Endou H : Prenatal 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl exposure modulates induction of rat hepatic CYP 1A1, 1B1, and AhR by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene. *Toxicol Appl Pharmacol* 210 : 200-211, 2006
 - 23) Armenti AE, Zama AM, Passantino L, Uzumcu M : Developmental methoxychlor exposure affects multiple reproductive parameters and ovarian folliculogenesis and gene expression in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 233 : 286-296, 2008
 - 24) Zama AM, Uzumcu M : Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology* 150 : 4681-4691, 2009
 - 25) Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, Lebron C, Witter FR, Apelberg BJ, Hernandez-Roystacher M, Jaffe A, Halden RU, Sidransky D : Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics* 5 : 539-546, 2010
 - 26) Breton CV, Byun HM, Wenten M, Pan F, Yang A, Gilliland FD : Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *Am J Respir Crit Care Med* 180 : 462-467, 2009
 - 27) Perera F, Tang WY, Herbstman J, Tang D, Levin L, Miller R, Ho SM : Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One* 4 : 2009
 - 28) Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK : Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308 : 1466-1469, 2005
 - 29) Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ : Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467 : 963-966, 2010
 - 30) Dunn GA, Bale TL : Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology* 150 : 4999-5009, 2009
 - 31) Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL : Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 : 13056-13061, 2007
 - 32) Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S : Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 376 : 563-567, 2008
 - 33) 伊藤恭子：脳形成・発達と環境化学物質．*日児誌* 116 : 10-19, 2012
 - 34) Nadeau K, McDonald-Hyman C, Noth EM, Pratt B, Hammond SK, Balmes J, Tager I : Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 126 : 845-852, e810, 2010
 - 35) Barker DJ : The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261 : 412-417, 2007
 - 36) Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL, Lane RH : Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285 : R962-970, 2003
 - 37) Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, Thurston A, Huntley JF, Rees WD,

Maloney CA, Lea RG, Craigon J, McEvoy TG, Young LE : DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. Proc Natl Acad Sci U S A 104 : 19351-19356, 2007

- 38) 稲葉雄二, 新美妙美, 石田修一 : 軽度発達障害児の支援を目的とした学校への outreach clinic の実践. 脳と発達 42 : 267-272, 2010
- 39) 堺 温哉, 津田洋子, 塚原照臣, 日高義彦, 稲葉雄二, 金井 誠, 福嶋義光, 野見山哲生 : 上伊那地域における「子どもの健康と環境に関する全国調査」. 信州公衛誌 6 : 101-106, 2012

(H 24. 5. 7 受稿)
