

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670291

研究課題名(和文) ADHD発症リスクの解明：エピジェネティクス及び環境遺伝相互作用

研究課題名(英文) To assess the risk of Attention Deficit/ Hyper Activity Disorder cause by Epigenetic action and gene environment interaction.

研究代表者

岸 玲子 (Kishi, Reiko)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任教授

研究者番号：80112449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大規模出生コホートの8歳児に、調査票を用いADHD症状をConners3PとADHD-RSで評価し、胎児期の喫煙や葉酸摂取など環境因子のリスクを検討した。回答者2,545名について解析した結果、妊娠中の喫煙曝露によりADHD傾向が強くなり胎児期の喫煙のリスクが有意に高かった(OR=2.2;95%CI,1.002-4.631)。さらにコホート内症例対照研究デザインで、ADHD疑い症例群138名と対照群について、EP1システム(Fludigm社製)で神経伝達関連遺伝子(DRD4, DAT1, HTR1B, COMT, SNAP25)と脳由来神経栄養因子(BDNF)についてSNPs解析を200名分終了した。

研究成果の概要(英文)：Concerning 8 year old children who participated in Hokkaido study on Environmental and Children's health, we investigated with the Conner3P Japanese version (attention deficit hyperactivity disorder), ADHD-RS and clarified the risk of environmental factors. For example, smoking during pregnancy, taking the folic acid supplements etc. The result of the 2,545 collected questionnaires was that smoking during pregnancy increased the prevalence of the ADHD trend (OR=2.2;95%CI,1.002-4.631). Furthermore, the ADHD -suspected group (N=138) and control group in nested case control study, the SNPs of neurotransmitter related gene (DRD4, DAT1, HTR1B, COMT, SNAP25) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were investigated by EP1 system (Fludigm.com). Analyzing 200 cases have completed and 190 cases are ongoing analyzing SNPs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：環境疫学 ADHD 喫煙曝露 環境遺伝相互作用 葉酸

1. 研究開始当初の背景

注意欠陥/多動性障害(ADHD)は、発達障害の中でも最も有病率が高く、アジア、アフリカを含めた全世界では有病率 5.3 %と報告されている(Polanczyk ら、2007)。わが国では小規模な調査で有病率 10.5%とされたが(Sugawara ら、1999)本格的な疫学調査は実施されていない。先行研究では、ADHD の評価指標や医師の診断基準の違いなども疫学調査を難しくしている。特に国際的に汎用されている ADHD 調査票 (Conners3P)をわが国で初めて大規模コホートで使用することで ADHD の研究環境を国際的水準へと整備する。地域の出生コホートで ADHD 発症の要因を明らかにすることは疾病予防に大きく寄与し、広汎性発達障害の早期治療への道を開くことが期待される。

ADHD は、遺伝性が高い小児期精神疾患として、そのリスクに関連する遺伝子が探索されてきたが、ADHD 発症に関与するリスク遺伝子として DAT1、DRD4 遺伝子などの多型が候補とされたが、発症原因のごく一部しか説明できず、また、結果も一致していないので環境要因の関与が示唆されてきた。欧米では鉛曝露、妊娠中の喫煙や飲酒などがリスクとして報告され (Millichap, 2008)、特に、妊婦の喫煙による ADHD 発症のリスク上昇は約 3 倍であった (Linnet ら、2003)。葉酸は生体内でメチル基供与体として胎児発育に重要な役割を有し、神経管閉鎖不全予防のためサプリメントとしても摂取が奨励されている。近年、葉酸摂取量が低い場合 ADHD 症状の多動や不注意に対しハイリスクとなり (Schultz, 2009) 児の情緒と問題行動のリスク要因になる (Graaff, 2012) と報告されたが機序はまだ解明されていない。環境要因が遺伝子に与える影響は、DNA のメチル化のようなエピジェネティックな変化を介すると示唆され (Parent ら、2005, Diorio and Meaney, 2007)、ADHD 発症リスク解明には胎児期と小児期の受動喫煙を含めた遺伝環境交互作用を評価する必要性が示唆されるが、これまで ADHD 発症と後天的エピゲノム修飾、遺伝環境交互作用を検討した研究はない。

2. 研究の目的

(1) 大規模出生コホートの 8 歳児に対し、国際的に使用されている Conners3P と ADHD-RS(ADHD-Rating Scale)、生活環境等について調査票により、胎児期の母の喫煙や学童期の受動喫煙、妊娠中の葉酸摂取など環境因子のリスクを検討する。

(2) さらにコホート内症例対照研究デザインで ADHD に関与する神経伝達遺伝子多型解析を行うことにより、ハイリスク者の発見や

環境遺伝交互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 8 歳時調査票ベースの ADHD 環境リスク要因の検討

対象は、出生前向き研究「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」に登録した 20,929 人のうち、2003 年 8 月から 2006 年 9 月に北海道内の産科にて出産し、子どもが 8 歳時まで追跡可能であった母児である。8 歳時調査票約 4250 件に発送し回収できた 2,545 件 (回収率 60%) を解析対象とした。喫煙曝露の評価は、妊娠後期に採血した母体血の血漿コチニン濃度を ELIZA 法により測定した。妊娠初期の質問票における「妊娠中の喫煙の有無」、学童期の児の受動喫煙曝露については、7 歳時質問票での「母親の喫煙習慣の有無」に対する回答を用いた。葉酸摂取の曝露評価は、妊娠初期に採血した母体血血清葉酸濃度を化学発光免疫測定法 (CLIA 法) により測定し、葉酸サプリメント摂取状況を妊娠初期調査票により聴取した。アウトカム評価として、ADHD 関連症状をスクリーニングする Conners3P と ADHD-RS を用いた。その他の環境要因や調整因子として、社会経済状況、両親教育歴、家族構成や兄弟姉妹の有無、飲酒など調査票で回答を得た。

統計解析に関しては、上記の ADHD-RS の得点を算出し、下位尺度のカットオフ値を用いて児の ADHD 傾向を分類し、ADHD 疑い群と定義した。児が ADHD 疑い群であるか否かを従属変数とし、妊娠中の喫煙、および、児の受動喫煙曝露を独立変数とし、ロジスティック回帰分析を実施した。調整因子としては、性別、出生時体重、出産時母年齢、母学歴、世帯収入、母 BMI、妊娠初期血中葉酸値 (log 値)、在胎週数を用いた。

(2) コホート内症例対照研究による ADHD に関与する神経伝達遺伝子多型解析

大規模出生コホートに参加している 2006 年 8 月までに生まれた 8 歳児 2,548 名を遺伝子多型の解析対象とした。既に回収した ADHD-RS 質問票から、(1) に記したように ADHD 疑い群と定義した。統計学的パワーが最大になるように症例群 : 対照群 (サブコホートから無作為抽出) = 1 : 2 で、コホート内症例対照研究をおこなうこととし、母児の環境遺伝交互作用と SNPs 解析による遺伝的リスクを検討することとした。血液からの DNA 抽出は、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) を使っておこなった。一塩基多型 (SNPs) の解析は、Fludigm 社製 SNP ジェノタイピングユーザーガイドに従って、Fludigm 社製マイクロフリューディック遺

伝子解析 EP1 システムでおこなった。神経伝達関連遺伝子であるドパミン受容体 4 型 (*DRD4*; C>T, dbSNP ID: 1800955)、トランスポーター 1 型 (*DAT1*; C>T, dbSNP ID: 27072 および G>A, dbSNP ID: 40184)、セロトニン受容体 1B 型 (*HTR1B*; G>C, dbSNP ID: 6296) カテコール-O-メチル基転移酵素 (*COMT*; G>A, dbSNP ID: 4680)、シナプトソーム関連タンパク質 25 (*SNAP25*; A>C, dbSNP ID: 362987) および脳由来神経栄養因子 (*BDNF*; A>G, dbSNP ID: 6265) の解析を一部行った。

4. 研究成果

(1) 8 歳時調査票ベースの ADHD 環境リスク要因の検討

解析した 2545 件は、母親の出産年齢 30.9 歳 (SD=4.5)、非喫煙者が 54.1%、妊娠初期に葉酸を摂取していた母親は 14.0%であった。児は男児 51.3%、在胎週数 38.8 週 (SD=1.4) 出生体重 3040.9g (SD=385.0)であった。ADHD-RS はカットオフ値により、混合型 (N=6)、多動型 (N=26)、不注意型 (N=64)、分類不能型 (N=42)に分けられ、ADHD 疑い群の合計 138 名であった。

ロジスティック回帰分析の結果、妊娠中の母親の喫煙は ADHD 疑い群で有意に影響した (OR=2.2; 95%CI, 1.002-4.631)。一方、児の受動喫煙の関連は示されなかった。本結果は、妊娠中の喫煙曝露が ADHD 傾向のリスクを増加させるが、学童期の児の受動喫煙は児の ADHD 傾向と関連が無いことを示唆するものであった。

(2) コホート内症例対照研究による ADHD に関与する神経伝達遺伝子多型と臍帯血メチル化の測定

(1) で得られた ADHD 疑い群 138 名を症例群とした。統計学的パワーが最大になるようにすると、症例群 130 名と対照群 260 名の合計 390 名となった。現在までに SNPs の解析が 390 名のうち 200 名終了した。残り 190 名は現在も SNPs 解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

(1) Miyashita C., Sasaki S., Saijo Y., Okada E., Kobayashi S., Baba T., Kajiwara J., Todaka T., Iwasaki Y., Nakazawa H., Hachiya N., Yasutake A., Murata K., Kishi R.
Demographic, behavioral, dietary, and socioeconomic characteristics related to persistent organic pollutants and mercury levels in pregnant women in Japan.

Chemosphere, 査読有, 2015, 133, 13-21

DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.062

(2) Okumura, Y., Kasai, T., and Murohashi, H. Attention that covers letters is necessary of the left-lateralization of an early print-tuned ERP in Japanese hiragana. *Neuropsychologia*, 査読有, 2015, 69, 22-30.

DOI: 10.1016/j.neuropsychologia.2015.01.026.

(3) 岸玲子 【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

公衆衛生 2014. 78 (8):547-552. 査読無

(4) Okumura, Y., Kasai, T., and Murohashi, H. Early print-tuned ERP response with minimal involvement of linguistic processing in Japanese Hiragana strings. *Neuroreport*, 査読有, 2014, 25(6), 410-414.

DOI: 10.1097/WNR.0000000000000110

(5) 室橋春光

発達障害におけるワーキングメモリー特性を生かした学習支援

LD 研究-研究と実践, 2014, 23(2), 134-141.

査読無

(6) 室橋春光

発達とは何か-特別支援教育の視点から 子ども発達臨床研究, 2014, 6, 49-53. 査読無

(7) Otake Y., Nakajima S., Uno A., Kato S., Sasaki S., Yoshioka E., Ikeno T., Kishi R. Association between maternal antenatal depression and infant development: a hospital-based prospective cohort study. *Environ Health Prev Med*, 査読有, 2014, 19, 30-45.

DOI: 10.1007/s12199-013-0353-7

(8) Shiraishi H., Haginoya K., Nakagawa E., Saitoh S., Kaneko Y., Nakasato N., Chan D., Otsubo H. Magnetoencephalography localizing spike sources of atypical benign partial epilepsy

Brain Dev, 2014 査読有, 36(1), 21-27.

DOI: 10.1016/j.braindev.2012.12.011

(9) Yamada T., Morikawa M., Yamada T., Kishi R., Sengoku K., Endo T., Saito T.

Cho K., Minakami H. First-trimester serum folate levels and subsequent risk of a abortion and preterm birth among Japanese women with singleton pregnancies. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 査読有, 287, 9-14

DOI: 10.1007/s00404-012-2501-5

(10) Kishi R., Kobayashi S., Ikeno T., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Sasaki S., Okada E., Kobayashi S., Kashino I., Itoh K., Nakajima S., The members of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health Ten Years of Progress in the Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: Cohort Profile - Updated 2013. *Environ Health Pr*

ev Med. 2013,18 査読有,429-450

DOI: 10.1007/s12199-013-0357-3

(11)豊巻敦人, 渡辺隼人, 柳生一自, 室橋春光

MEGによるfunctional connectivityの解析-Default Mode Networkモデルに関連した Autism Spectrum Disorder, I:定型発達の比較-, 心理学と精神生理学. 査読有. 31(1), 2013, 41-49 DOIコード: <http://doi.org/10.5674/jjppp.1305s1>

[学会発表](計17件)

(1)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.

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.

第85回日本衛生学会学術総会
和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市)
. 2015.3.26. -3.28.

(2)小林澄貴, 宮下ちひろ, 佐々木成子, 荒木敦子, 佐田文宏, 坂晋, 梶原淳睦, 戸高尊, 岸玲子.

ダイオキシン類曝露と胎児発育との関連: 遺伝的なリスクについて 北海道スタディ
. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市) 2015. 3.26. -3.28.

(3) Hideaki Shiraishi, Kiyoshi Egawa, Kosuke Otsuka, Midori Nakajima, Tomoshiro Ito, Masashi Narugami, Shingo Nakane, Kayoko Takahashi
Not all but the most patients with CSWS are Atypical Benign Partial Epilepsy in Childhood. 2014 AES 68th Annual Meeting in Seattle, Washington at the Washington State Convention Center. (Seattle, USA.) December 5 - 9

(4)小林澄貴, 佐々木成子, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子;
胎児期の母の受動喫煙が児の出生時体格に及ぼす影響: 遺伝環境交互作用について.
第66回北海道公衆衛生学会. 北海道大学・学術交流会館(北海道・札幌市)(2014.12. 02.)

(5)Reiko Kishi, Atsuko Araki;
Hokkaido Study on Environment and Children's Health: Cohort profile and findings of perinatal Perfluoroalkyl acid (PFAAs) exposure and various health outcomes.

2014 Conference of International Society for Environmental Epidemiology Asia Chapter. Xinhua Hospital (Shanghai, China.) (2014.11.30-12.02)

(6)室橋春光

認知的機能のアンバランスな子どもの教育
日本LD学会第23回大会 大阪国際会議場

(大阪府・大阪市) 2014.11.23-11.24

(7)小林澄貴, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 池野多美子, 伊藤佐智子, 伊藤久美子, Goudarzi Houman, 田村菜穂美, 岸玲子;

北海道における妊婦の職域における化学物質曝露・受動喫煙および飲酒習慣が児の出生時体格に及ぼす影響. 平成26年度日本産業衛生学会北海道地方会. 札幌市医師会館・(北海道・札幌市). (2014.10.18.)

(8)Kishi R.;

Twelve years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: malformation, development and allergy.

International Symposium of Environmental Medicine Program.

National Taiwan University, (Taipei, Taiwan.) (2014.10.16-17.)

(9)Kishi R.;

Twelve Years of Progress in the Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: Focused on Dioxins and PFCs.

Summit on Child Health and the Environment 2014.

Hong Kong Academy of medicine Building, (Hong Kong, China)(2014.10.11-13.)

(10)白石秀明

てんかんと睡眠: 睡眠中にみられるてんかん発作~発達期. 第48回日本てんかん学会学術集会. 京王プラザホテル(東京都/新宿区) 平成26年10月2日~3日

(11)Kobayashi S., Azumi K., Sasaki S., Ishizuka M., Nakazawa H., Okada E., Kobayashi S., Goudarzi H., Itoh S., Miyashita C., Ikeno T., Araki A., Kishi R.;

The effects of perfluoroalkyl acids (PFAAs) exposure in utero on IGF2/H19 DNA methylation in cord blood.

26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference University of Washington, (Seattle, USA.) (2014.08.24-28)

(12)小林澄貴, 佐々木成子, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子

妊婦の受動喫煙が児の出生時体格へ及ぼす影響: 遺伝的なハイリスク群について - 環境と子どもの健康に関する北海道スタディ - .
北海道小児保健研究会 平成26年度総会.
札幌医科大学・(北海道・札幌市.) (2014.05.24)

(13)池野多美子, 喜多歳子, 小林澄貴, 岸玲子

妊婦葉酸値左8歳時ADHD関連症状の関係: 環境左子どもの健康に関する北海道スタディ.
第65回北海道公衆衛生学会

札幌市生涯学習センターちえりあ(北海道・札幌市)

2013年11月 14日 2013年11月 15 日

(14)白石秀明, 竹内文也, 大塚耕右, 柳生一自, 朝比奈直子, 香坂忍, 両橋香代子, 中根進児

脳磁場計測を用いた乳児・小児障害脳における百語機能獲得の予後評価

第43回日本臨床神経生理学会

高知県立県民文化ホール(高知県・高知市)

2013年11月 07日 2013年11月 09 日

(15)池野多美子, 小林澄貴, 喜多歳子, 中島そのみ, 岸玲子

8歳の注意欠損多動性障害に関する要因 環境と子どもの健康に関する北海道スタディ

第72回日本公衆衛生学会総会

二重県総合文化センター(三重県・津市)

2013年10月23日 2013年10月25 日

(16)喜多歳子, 池野多美子, 中島そのみ, 小林澄貴, 岸玲子. 親の世帯収入と48か月児の知的能力(K-A B C)との関連; 環境と子どもの健康に関する前向きコホート研究(北海道スタディ)の結果

第72回日本公衆衛生学会総会. 二重県総合文化センター(三重県・津市).

2013年10月23日 - 2013年10月 25 日

(17)Murohashi, H., Itagaki S., Yokoyama, S., Yagyū K.

Multi-measured assessment for developmental dyslexia

International Association for the Scientific Study of Intellectual and Developmental Disabilities(IASSID) Asia-Pacific Congress

Waseda Univ.(東京都・新宿区)

2013年08月24日 2013年08月24日

〔図書〕(計3件)

(1)白石秀明(著) 千葉茂(編集)

ライフサイエンス

睡眠とてんかん: 睡眠と小児てんかん

11(73-83)2015

(2)白石秀明(著) 日本臨床(編集). 日本臨床社

別冊 日本臨床 神経症候群(第2版)VI

5(436-440)2014

(3)白石秀明(著) 千葉茂(編集)

ライフサイエンス

睡眠中にみられるてんかん発作・発達期「睡眠医療JVo1. 7 No.2

7(195-201)2013

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/>

<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/hiroba/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸 玲子(KISHI REIKO)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任教授

研究者番号: 80112449

(2)研究分担者

室橋 春光(MUROHASHI HARUMITSU)

北海道大学・大学院教育学研究院・教授

研究者番号: 00182147

白石 秀明(SHIRAISHI HIDEAKI)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号: 80374411

池野 多美子(IKENO TAMIKO)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任講師

研究者番号: 80569715

宮下 ちひろ(MIYASHITA CHIHIRO)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任講師

研究者番号: 70632389

(3)連携研究者

花岡 知之(TOMOYUKI HANAOKA)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・教授

研究者番号: 00228503

佐々木 成子(SEIKO SASAKI)

北海道大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 30448831