

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860433

研究課題名(和文) 妊婦の葉酸摂取が後天的遺伝子修飾を介して小児喘息発症リスクに与える影響

研究課題名(英文) Effect of maternal folate status in early pregnancy on childhood asthma through epigenetic modulation

研究代表者

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・特任准教授

研究者番号：70632389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：北海道出生コホート研究の参加者1262人の妊娠初期の母体血清葉酸値は7.3 ng/ml(中央値)で、7歳喘息群と非喘息群で有意な差はなかった。血清葉酸値(連続値)または葉酸サプリメント摂取と7歳喘息リスクに関連はなかった。本研究では、妊娠中の葉酸摂取による生後の免疫への負の影響は認められなかった。全体で葉酸と喘息の関連が明確でなかったが、遺伝要因については、DNA抽出や唾液の採取を実施しており、今後さらに血清葉酸値の欠乏・低値・充足群に層別化して検討する。

研究成果の概要(英文)：Subjects of 1262 mother-child pairs who have been recruited on the Hokkaido birth cohort study, were included in this study. The median concentration of folic acid during first trimester in maternal serum was 7.3 ng/ml, and there was no significant difference between a case group of developing asthma and a control group of non-asthma at 7 years old children. There were no associations between concentration of serum folate (continuous), or folic acid supplement intake (categorical) and risk of asthma at 7 years old children. In this study, we could not observe the adverse effect of folic acid state during pregnancy on risk of asthma at 7 years old children. In a future study, we will stratify subjects into 3 groups of deficient, insufficient, or sufficient serum folate levels and analyze genetic factor using children saliva and DNA samples with a larger sample size.

研究分野：環境疫学

キーワード：環境疫学

### 1. 研究開始当初の背景

1990年代から欧米を中心に妊娠中の葉酸サプリメント摂取が先天性疾患(二分脊椎などの神経管閉鎖障害)リスクを低減させると報告された(Medical Research Council 1991; De-Regilら2010)。日本では、厚生労働省が平成12年度より妊婦の推奨葉酸摂取量を0.4mg/日と策定(旧厚生省勧告2000)して以降、近藤ら(2011)は2003年~2008年で9.6%から43.0%の約4.5倍に増加したと報告している。中嶋ら(2004)も妊娠可能年齢女性の血清葉酸値は基準値以上が妊婦でも非妊婦でも多かったと報告した。よって我が国では現在、葉酸摂取量が比較的高い、または推奨量以上に摂取する妊婦集団が存在することが予測できる。今後はさらに、妊娠可能年齢女性の葉酸摂取量と葉酸サプリメント摂取率は上昇するものと考えられる。

一方、日本の小学生児童の喘息罹患率は1967年に0.25%だったが2010年は4.19%で約17倍に増加し(文部科学省学校保健統計調査)、遺伝要因のみならず環境要因の重要性が示唆される。葉酸摂取の利点とは対照的な妊娠中の母の葉酸摂取と出生後の小児アレルギー疾患増加との関連について、2000年代から疫学研究で報告され始めた。葉酸の小児喘息への影響についての論文が発表された(Pfefferleら, Amer J Epi. 2010)。作用機序として葉酸は生体内でメチル基供与体として、遺伝子プロモーター領域の後天的修飾(エピジェネティクス)・DNAメチル化を促進し、遺伝子発現を不活化することにより胎児の免疫系発達を阻害し、出生後の免疫アレルギー疾患リスクを増加させると示唆された(Hollingsworthら2008)。小児アレルギー疾患に関して世界でも研究が開始されたばかりで、現時点では疫学研究で、妊娠中の葉酸摂取が出生後の小児喘息やアトピー性皮膚炎を増加させる(Bekkersら2012, Granellら2008, Håbergら2011;2009, Martinussenら2012)、あるいは低下させる(Magdelijnsら2011)、または関連が認められない(Martinussenら2012, Miyakeら2011, Whitrowら2009)など一致した結果が得られていない。

### 2. 研究の目的

妊婦の過剰な葉酸摂取が後天的遺伝修飾を介して、学童期の小児喘息発症リスクに与える影響を、環境-遺伝交互作用を含めて明らかにし、日本人のライフスタイルや遺伝的素因を踏まえた妊婦の葉酸摂取指針や、小児喘息の予防対策のために科学的エビデンスを提供し、遺伝的ハイリスク群に対する予防医学的対応策を明示する。

### 3. 研究の方法

出生前向きコホート「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」で、平成2015年7月までに4714名から7歳調査票を回収した。

妊娠初期調査票、妊娠初期血清葉酸値、7歳の調査票が揃う1262人を本研究の対象とした。妊娠初期の母体血清葉酸濃度を化学発光免疫測定法により測定した((株)SRL)。

WHOの基準に従い、血清葉酸値が4ng/ml未満は葉酸欠乏群、4-5.9ng/mlは低値群、6ng/ml以上は充足群の3群に分類した。7歳ISAAC質問票で「最近の1年間で喘息症状がある」または「最近の1年間で喘息と医師に喘息と診断された」と回答した小児を喘息ケースとした。本研究の対象者のうち、唾液採取に協力すると回答が得られた316人に喘息質問票と唾液採取のキット(Oragene DNA OG-500)を郵送して271人から各2mlの唾液を採取した(回収率85.8%)。小児喘息発症に関連する遺伝子である、気管支の脆弱性や小児喘息発症関連するOLMDL3, Th2系細胞の活性と関連するIL13, および自然免疫関連分子で、微生物、内毒素と結合するCD14などの遺伝子について、臍帯血中DNAを用いて一塩基多型(SNPs)を解析した。

妊娠初期の血清葉酸値(連続量)、葉酸値が欠乏群・低値群・充足群の3群、および葉酸サプリメント摂取を曝露、7歳の喘息ケースをアウトカムとして、潜在的交絡要因を調整した多変量解析を実施した。欠乏群・低値群・充足群の3群間の量-反応関連を検討するため3群を連続としてp for trendを解析した。

### 4. 研究成果

妊娠初期の血清葉酸値は全体で7.3ng/ml(中央値)で、7歳喘息群(n=156)と非喘息群(n=1106)で有意な差はなかった。血清葉酸値を基準にした葉酸欠乏群は2.5%、低値群は20.8%、充足群は76.7%であり、充足群が最も多かった。妊娠初期の血清葉酸値は、母の出産時年齢、妊娠初期の飲酒と喫煙、および葉酸サプリメント摂取と有意に関連した。7歳の児の喘息は児の性別、両親の喘息既往歴、7歳時の兄弟の有無と有意に関連した。臍帯血中の喘息関連遺伝子多型と喘息リスクに関連は認められなかった。妊娠初期の葉酸値(連続値)、血清葉酸値の欠乏・低値・充足の3群、または葉酸サプリメント摂取を曝露、7歳の喘息リスクをアウトカムにして、上記の母児の属性で調整したロジスティック回帰分析を実施した。妊娠初期葉酸値の低値群と充足群では、欠乏群と比較して7歳喘息リスクが低下する傾向が認められた(オッズ(OR)比, 95%信頼区間(CI): 低値群=0.38, 0.16-0.91, 充足群=0.44, 0.20-1.0, p for trend = 0.51)。しかし、妊娠初期の血清葉酸値(連続値)(OR比, 95%CI = 0.59, 0.22-1.64)および葉酸サプリメント摂取(OR比, 95%CI = 1.1, 0.73-1.71)と7歳喘息リスクの間に関連は認められなかった。したがって、本研究では、諸外国の先行研究による「葉酸が生後の児の喘息リスクを増加させる」という、妊娠中の葉酸摂取による生後の

免疫への負の影響は認められなかった。さらに、血清葉酸値が 6ng/ml 以上である充足群本では 7 歳喘息リスクが低下する傾向が認められ、本研究の妊娠中葉酸レベルでは児のアレルギーリスクを低下させる可能性が示された。本研究では、葉酸と喘息の関連が明確でなくサンプルサイズが不足した可能性がある。今後、対象者人数を拡大し、遺伝要因については、対象集団から DNA 抽出や唾液の採取を実施しており、今後さらに血清葉酸値の欠乏・低値・充足群に層別化して検討し、葉酸と喘息に関連が認められた群について、遺伝的要因を検討する。

#### 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 5 件)

- 1) Miyashita C, Sasaki S, Ikeno T, Araki A, Itoh S, Kajiwara J, Todaka T, Hachiya N, Yasutake A, Murata K, Nakajima T, Kishi R. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and polyunsaturated fatty acids on birth size. *Science of the Total Environment* 2015, 533: 256-265. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.108. 査読有
- 2) 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* 2015; 133 13-21. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.062. 査読有
- 3) Verner MA, Loccisano AE, Morken NH, Yoon M, Wu H, McDougall R, Maisonet M, Marcus M, Kishi R, Miyashita C, Chen MH, Hsieh WS, Andersen M, Clewell HJ 3rd, Longnecker MP. Associations of Perfluoroalkyl Substances (PFASs) with Lower Birth Weight: An Evaluation of Potential Confounding by Glomerular Filtration Rate Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK). *Environmental Health Perspectives*. 2015, 123: 1317-1324. DOI:10.1289/ehp.1408837. 査読有
- 4) Kishi R, Nakajima T, Goudarzi H, Kobayashi S, Sasaki S, Okada E, Miyashita C, Itoh S, Araki A, Ikeno T, Iwasaki Y, Nakazawa H. The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with

Maternal Essential and Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of their Offspring: The Hokkaido Study Environmental Health Perspectives. 2015, 123:1038-45. DOI: 10.1289/ehp.1408834. 査読有

- 5) Okada E, Sasaki S, Kashino I, Matsuura H, Miyashita C, Kobayashi S, Itoh K, Ikeno T, Tamakoshi A, Kishi R. Prenatal exposure to perfluoroalkyl acids and allergic diseases in early childhood. *Environment international*. 2014; 65: 127-34. Doi:10.1016/j.envint.2014.01.007. 査読有

[学会発表](計 8 件)

- 1) 宮下ちひろ, 荒木敦子, 三井貴彦, 伊藤佐知子, 佐々木成子, 戸高尊, 梶原淳睦, 長和俊, 野々村克也, 岸玲子. 胎児期ダイオキシン類曝露による臍帯血中性ホルモンへの影響: 環境と子供の健康北海道スタディ. 第 67 回北海道公衆衛生学会; 2015.10.17; 旭川医科大学(北海道・旭川市).
- 2) M. Minatoya, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, J. Yamamoto, T. Matsumura and R. Kishi, Prenatal BPA exposure and cord blood adipokines, birth weight and child growth: the Hokkaido Study of Environment and Children's health, ISEE 2015, Brazil, San Paulo, 2015.8.30.-9.3.
- 3) S. Kobayashi, C. Miyashita, S. Sasaki, A. Araki, F. Sata, S. Ban, J. Kajiwara, T. Todaka and R. Kishi, Effects of maternal AHR, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and dioxins on infant birth weight: The Hokkaido Study, ISEE 2015, Brazil, San Paulo, 2015.8.30.-9.3.
- 4) 宮下ちひろ, 金澤文子, 佐々木成子, 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: 有機塩素系農薬が乳幼児の免疫に与える影響 環境と子どもの健康北海道スタディ. 第 85 回日本衛生学会学術総会; 2015.03.26-28; 和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市).
- 5) 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; 2015.03.26-28; 和歌山県民文化会館(和歌山県・和歌山市).

- 6) 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; 2015.03.26-28; 和歌山県民文化会館 (和歌山県・和歌山市).
- 7) 宮下ちひろ, 金澤文子, 池野多美子, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 小林澄貴, 湊屋街子, Houman Goudarzi, 小林祥子, 田村菜穂美, 水谷太, 菅木洋一, 岸玲子: 胎児期の有機塩素系農薬が小児アレルギー発症に与える影響 環境と子どもの健康北海道スタディー. 第 66 回北海道公衆衛生学会; 2014.12.02; 北海道大学 (北海道・札幌市).
- 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, 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 - From Local to Global: Advancing Science for Policy in Environmental Health, USA, Seattle, 2014.8.24-28.

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学 環境健康科学研究教育センター

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

北海道スタディ

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

環境と健康ひろば

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

福岡県保健環境研究所

<http://www.fihes.pref.fukuoka.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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・

特任准教授

研究者番号: 70632389