

図1. 喫煙歴別の母乳中PCDDsレベル (幾何平均値: TEQ)

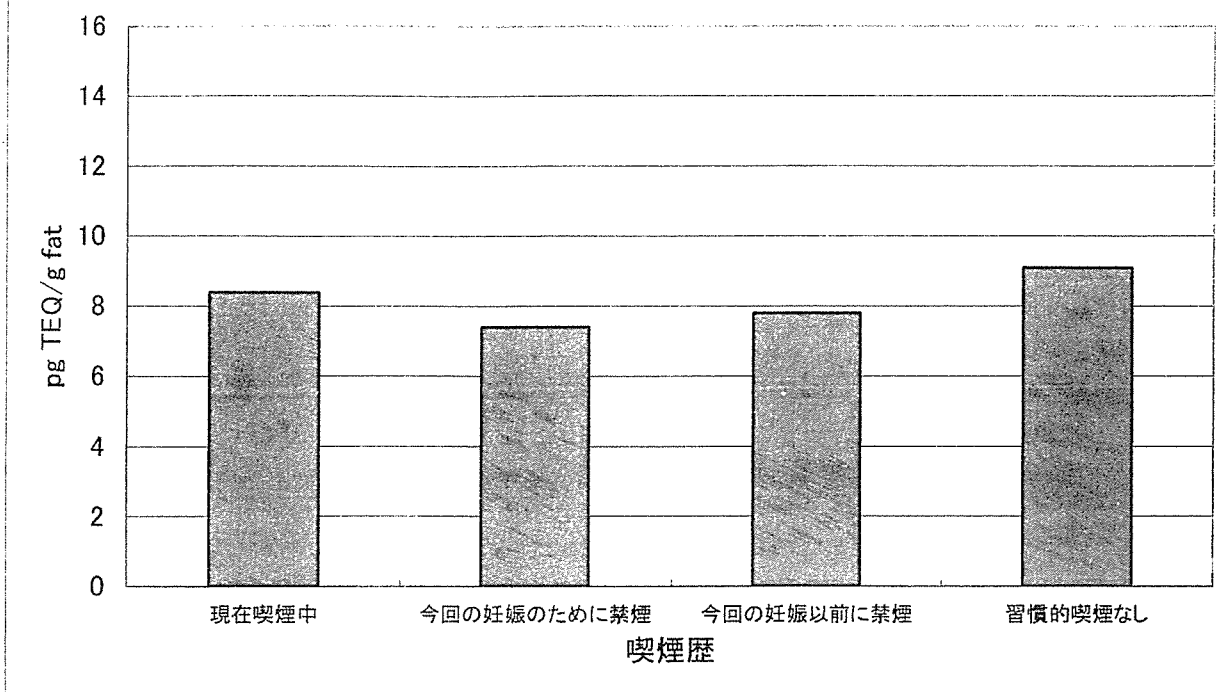


図2. 喫煙歴別の母乳中PCDFsレベル (幾何平均値: TEQ)

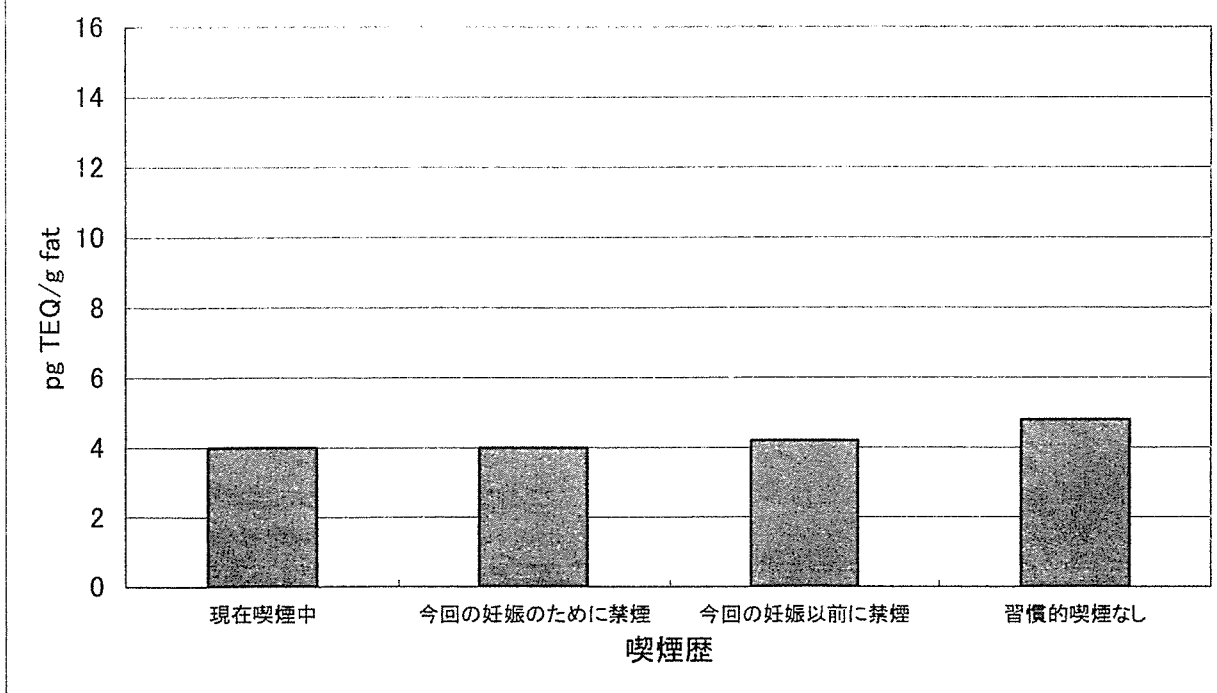


図3. 喫煙歴別の母乳中PCDDs+DFsレベル (幾何平均値: TEQ)

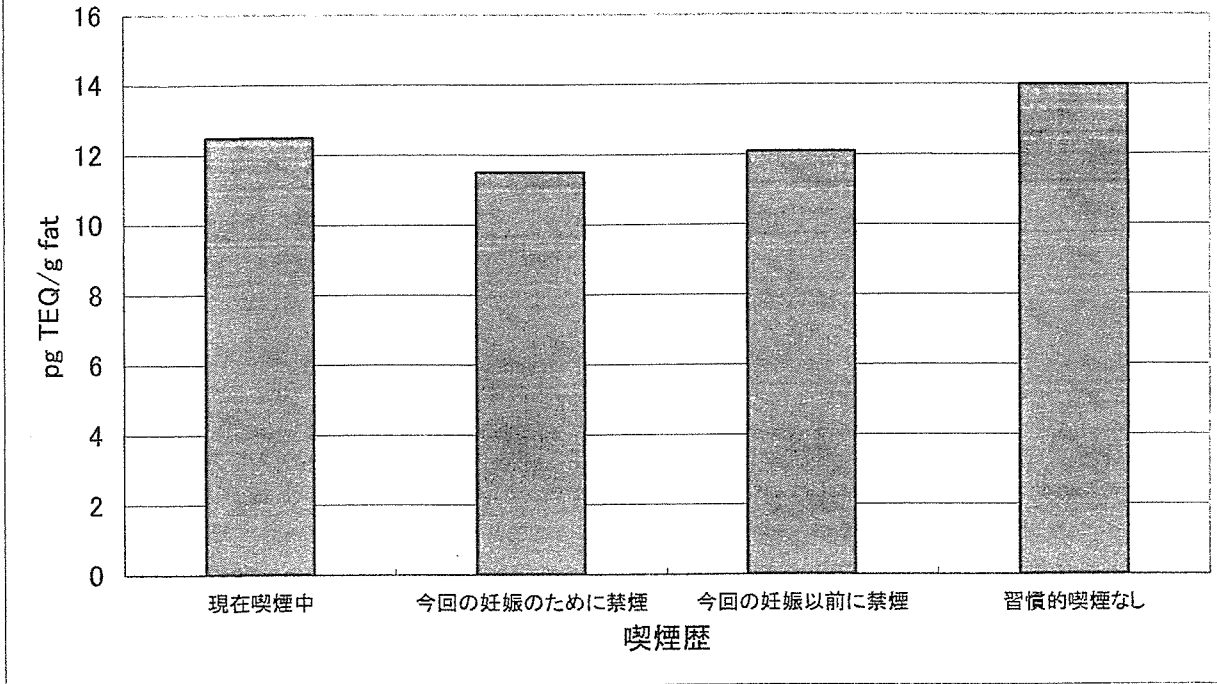


図4. 喫煙歴別の母乳中Co-PCBsレベル (幾何平均値: TEQ)

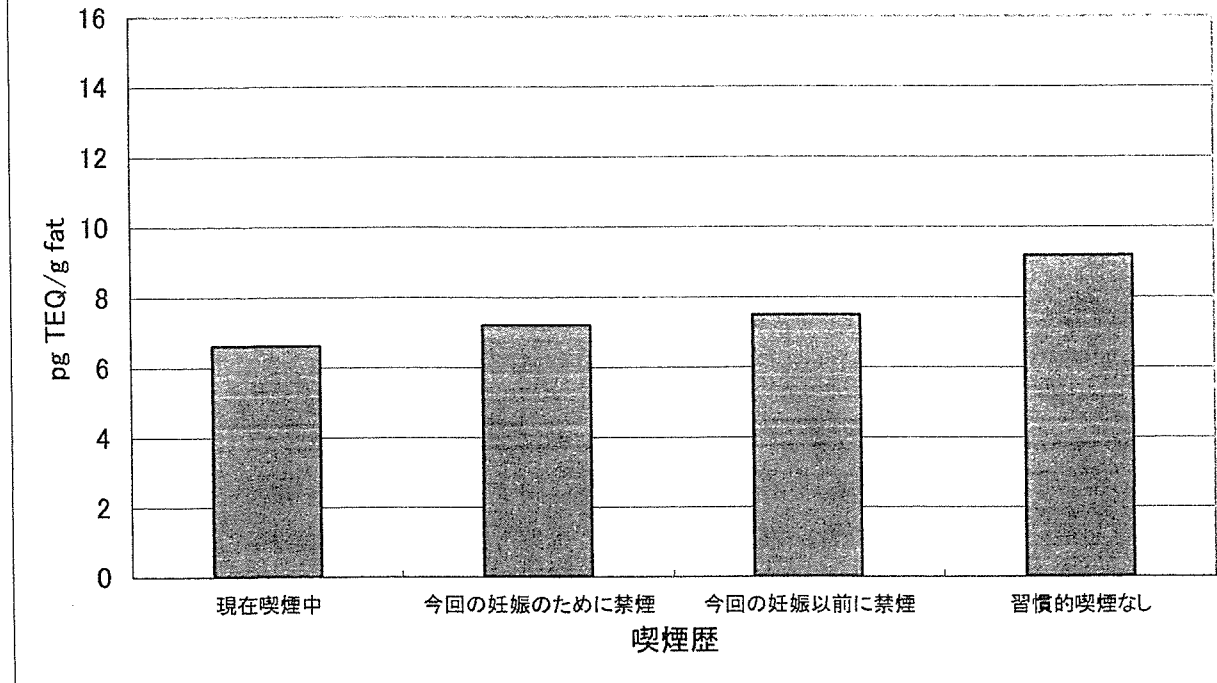
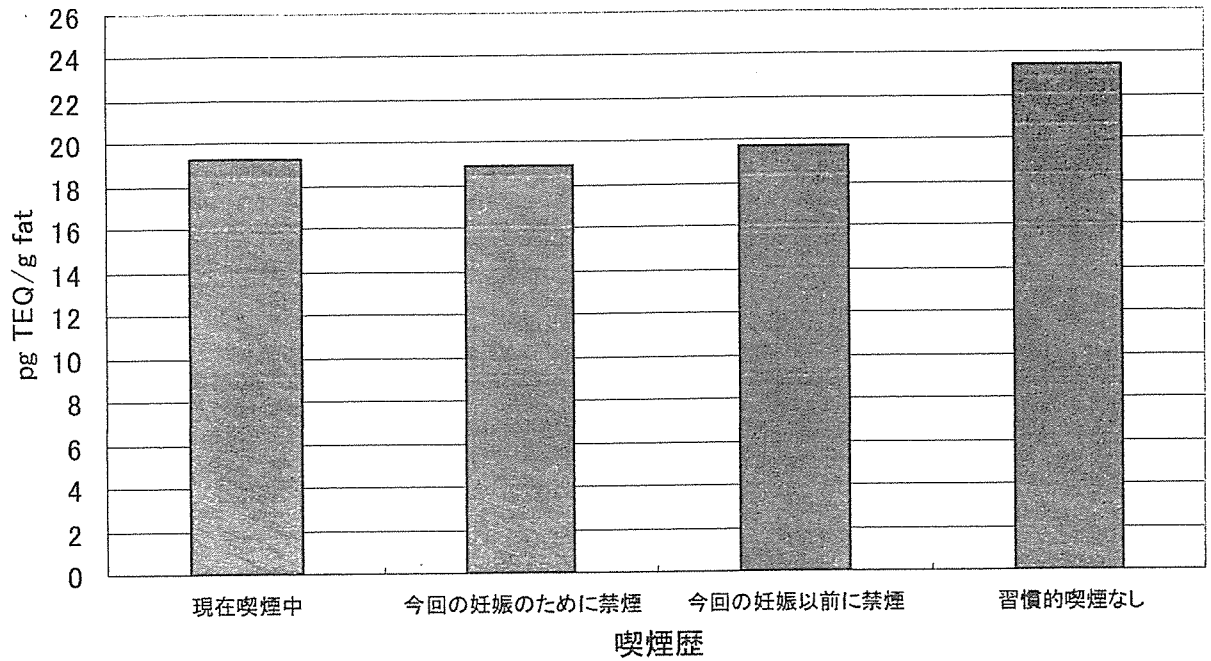


図5. 喫煙歴別の母乳中total dioxinsレベル (幾何平均値: TEQ)



ダイオキシンの乳幼児への影響その他の汚染実態の解明に関する研究—特に母乳中のダイオキシン類濃度の経年的変化とその乳幼児発達に及ぼす影響—
(主任研究者 多田 裕)

分担研究報告書

分担研究：先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）を出産した母親の母乳中ダイオキシン類濃度-ダイオキシン類はクレチン症の原因物質か—
分担研究者 聖徳大学人文学部児童学科 松浦信夫

研究要旨

環境ホルモンの汚染による自然界への影響は社会問題になっている。特に母乳に含まれるダイオキシン類が胎児、新生児期の成長発達、甲状腺・免疫機能に影響を及ぼしているとの報告に対し、その事実を明らかにするために研究班が結成され、現在まで研究が続けられている。更に、クレチン症を出産した母親の母乳中ダイオキシン濃度が高いとの報告がされた。今回はこの因果関係を明らかにするために、クレチン症を出産した母親から母乳を採取し、今までのこの研究班が蓄えた正常児を出産した母親のダイオキシン類濃度とを比較した。症例数は十分ではないが、クレチン症母親のダイオキシン類濃度が明らかに高い事実は認められなかった。

研究協力者

北里大学医学部小児科	横田行史
	柴山啓子
札幌市衛生研究所	福士 勝
	藤田晃三

先天性甲状腺機能低下症（以下クレチン症）は出生新生児約 3,000 人に一人の割合で発見される頻度の多い疾患である。一部の本症は遺伝子異常を伴った、ホルモン合成障害によるが、多くの症例は形成異常によることが明らかにされている。形成異常のごく一部は TTF-1, TTF-2, Pax 8 等の遺伝子異常により発症することが明らかにされているが、多くの症例は原因が明らかではない。多くは何らかの環境因子が関係していると考えられているが、その因子は明らかではない。Nagayama らは、母乳中のダイオキシン類が新生児の甲状腺機能、免疫系に影響を与えていると報告した³⁾。更に最近、一部の新聞にクレチン症を出産した母親の母乳中ダイオキシン類濃度が高かったと報告し、近年クレチン症の発見頻度が高くなったのは、ダイオキシン類が関与

A. 研究目的

内分泌攪乱物質(ER)は自然生物界のみでなく、ヒトに対しても、その甲状腺機能、免疫機能、成長などに影響を及ぼす可能性が報告されている¹⁾。我々は母乳中のダイオキシン類が胎児、新生児甲状腺機能に及ぼす影響について研究を行ってきた²⁾。ダイオキシン類は種々の機序を介して甲状腺機能に影響することが知られている。一方、形態学的面からも、一部の鳥類、実験動物においてダイオキシン類は甲状腺の組織学的な変化をもたらすことが報告されている。

していることを示唆している⁴⁾。
 このような現状を明らかにするために、
 クレチン症を出産した母親の協力を得
 て、分娩後1か月の母乳を採取し、その
 ダイオキシン類濃度を分析した。

B. 対象と方法

1. 対象クレチン症

対象は非常に甲状腺機能低下症が高度で、甲状腺腫を認めない症例、すなわち形成異常によるものとした。出生直後であり、病型診断は不能であるので、診断時の甲状腺機能低下症が高度（血清 TSH 値 30 μ U/ml 以上）で甲状腺腫を認めないものとした。スクリーニングで発見された症例の母親に協力を求め、1か月検診時に母乳を採乳した。在胎週数、出生時体重、身長、大腿骨遠位端骨核の有無などを評価し、併せて出生順位をも記録した。

2. 母乳中のダイオキシン濃度

既に本研究で行った方法で測定し PCDDs, PCDFs, Co-PCBs 及びその総和を求めた²⁾。対照として本研究において得られた、正常児を出生した母親の母乳中ダイオキシン類濃度を比較した。
 (倫理面への配慮) 本研究は北里大学医学部・病院B倫理委員会および研究協力施設における倫理委員会の承認を受けて実施し、書面による同意書をとって行った。

C. 研究結果

1. 対象となったクレチン症例

今回、4例の母乳の採取が出来たが、この報告書作成の時点では3例のダイオキシン類濃度しかでていないので、3例の報告とする。3例とも第1子であった。診断時の甲状腺機能、大腿骨遠位端骨核等のデータを表1に示した。何れも著しい機能低下を認めており、また甲状腺腫

を認めないところから、形成不全が考えられる。

C. 研究結果

1. 児の甲状腺機能

今回対象とした症例は総て男児で第1子であった。表1に児の背景を示した。満期産、成熟児で胎児期の発育には異常を認めていない。新生児仮死など周産期の異常は認めなかった。甲状腺機能低下の割に、症例1の大腿骨遠位端骨核は正常に発育していた。新生児の甲状腺機能を表2に示した。いずれの症例も TSH 値は高値で FT₄ 値は低下していた。

表1. 対象児の背景

症例	性	在胎週数	BW	BL	EDF
症例1	M	41W+4d	3,170	50cm	10x12mm
症例2	M	41W+5d	3,458	50cm	4x6mm
症例3	M	40W	3,814	49cm	0x0mm

BW: 出生時体重、BL: 出生時身長、
 EDF: 大腿骨遠位端骨核

表2. 対象児の精検時甲状腺機能

症例	TSH (μ U/ml)	FT ₃ (pg/ml)	FT ₄ (ng/dl)
症例1	28.9	3.12	0.92
症例2	856.5	2.08	0.55
症例3	724	1.40	0.31

2. 母乳中のダイオキシン類濃度

生後1か月時の母乳中のダイオキシン類濃度を表3に示した。対照として正常第1子を出産した母親401人を対照とした。クレチン症群3例の平均値および標準偏差値は 20.7 \pm 7.6 (pg TEQ/g fat)であり、一方正常対照群は 24.0 \pm 8.3であり、両群に有意な差は見られなかった。また、この数値は一昨年¹⁾の報告、外性器異常児を出産した母親5名の値、15.9 \pm 6.0よりやや高い値ではあるが、両群間に有意差は認められなかった。

表 3. 母乳中のダイオキシン類単位脂肪当たりの濃度 (pg TEQ/g fat)

症例	Total (PCDDs+PCDFs+Co-PCBs)
症例1	12
症例2	26
症例3	24
対照 (n=401)	24.0±8.3

D. 考案

今回は、現在までに3例の採乳しかできなかったが、対照に比しやや低い値で、少なくとも高値であったとの報告とは異なっていた。新聞報道なので、詳細は分からないが、色々問題が存在する。1つは対象の選択である。クレチン症といってもいろいろな病因により発症する。ダイオキシンの作用機序からすると、形成不全に関与する可能性が考えられる。しかし、症例を提供した小児科医の話によると、十分な説明が無く、疑い症例を含め検討の対象になったとのことである。ダイオキシン類とクレチン症発症に関する報告はない。ただ、環境因子として、一部の地域の地下水に含まれているPerchlorate(過塩素酸塩)の関与が示唆されている⁵⁾。この物質は甲状腺ホルモン合成のいろいろな部位(ヨード濃縮、有機化など)に関与すると考えられる。

ダイオキシン類が甲状腺機能に影響する機序としては少なくとも3つの考えがある。1つは甲状腺に直接毒性に働くとの考えである⁶⁾。2つ目の考え方はT₄とダイオキシン類の構造が似ているため、甲状腺ホルモン受容体または転送蛋白と競合するため、T₄の作用が阻害され機能低下になるとの考えである。3つめの考えはAryl hydrocarbon receptor (AhR)を介しての抑制である。AhRノックアウトマウスを用いた検討でこれを証明している^{7,8)}。以上のようにダイオキシン類は甲状腺機能に影響することは知られている。

一方形態学的な影響としては、琵琶湖と東京湾に住む鵜の甲状腺組織の変化が報告されている。ダイオキシン汚染の多い東京湾の鵜により多くの組織学的変化が見られている⁹⁾。一方、Nishimuraらはラットの妊娠中に異なる量のダイオキシンを投与し、その甲状腺組織はダイオキシン量に応じて変化が見られた¹⁰⁾。しかしながら、甲状腺の形成を阻害するとの報告は見られなかった。

E. 結論

重い甲状腺機能低下を伴ったクレチン症を出生した母親の乳汁中ダイオキシン濃度を測定した。対照に比し、ダイオキシン類濃度が多いとの所見は認めなかった。最後に採乳に協力を頂いた、岐阜大学小児科松永先生、埼玉県小児医療センターの先生に深謝します。

F. 引用論文

1. Boas M, et al: Environmental chemicals and thyroid function. *Eur J Endocrinol* 154: 599-611, 2006
2. Matsuura N, et al: Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls(PCBs) on thyroid function in infants born in Japan- The second report from research on environmental health. *Chemosphere* 45 (8) : 1167-1171, 2001
3. Nagayama J, et al: Effects of lactational exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on thyroid functions in Japanese Babies. *Organohalogen Comp* 33: 446-450, 1997
4. 長山淳一：一部の新聞に掲載。
5. Scinicariello F, et al: Genetic factors that might lead to different responses in individuals exposed to perchlorate. *Environ Health Perspect* 113: 1479-1484, 2005

6. Porterfield SP: Thyroidal dysfunction and environmental chemicals-Potential impact on brain development. *Environ Health Perspect* 108: 433-438, 2000
7. Nishimura N, et al: Altered thyroxine and retinoid metabolic response to 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Arch Toxicol* 79: 260-270, 2005
8. Pocar P, et al: AhR-agonist-induced transcriptional changes of genes involved in thyroid function in primary porcine thyrocytes. *Toxicol Sci* 89: 408-412, 2006
9. Saita E, et al: Histologic changes in thyroid glands from Great Cormorant (*Phalacrocorax carbo*) in Tokyo Bay, Japan: Possible association with environmental contaminants. *Wildl Dis* 40: 763-768, 2004
10. Nishimura N, et al: Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p dioxin. *Endocrinology* 144: 2075-2083, 2003

G. 健康危害情報
特に認めない。

H. 研究発表

1. 論文発表
 1. Hideo Kaneko, et al: Effects of dioxin on the quantitative levels of immune components in infants. *Toxicology and Industrial Health* 22:131-136, 2006
 2. Uehara R, et al: Human milk survey for dioxins in the general population in Japan. *Chemosphere* 62:1135-1141,2006
 3. Hishinuma A, et al: Haplotype analysis reveals founder effects of thyroglobulin gene mutations C1058R and

C1977S in Japan. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Aug;91(8):3100-4.

4. 伊藤尚志、他: 濾紙血 TSH、freeT4 同時測定によるクレチン症スクリーニング-当院における5年間の結果-。日本マスキング学会誌 16(3):45-51, 2006
5. 松浦信夫、柴山啓子: 新生児 TSH、FT4 スクリーニングの意義-発見される中枢性甲状腺機能低下症の病態-。日本マスキング学会誌 16(3):33-42, 2006
6. 松浦信夫: 新生児バセドウ病の発症-その危険性と防御策、治療法-。日本臨床 64(12):2303-2307,2006
7. 松浦信夫: 新生児甲状腺機能亢進症と甲状腺中毒症。日本臨床別冊領域別症候群シリーズ No.1 : 271-275,2006

2. 学会発表

1. Keiko Shibayama, Nobuo Matsuura, Yukifumi yokota, Shouhei Harada: Severe tertiary hypothyroidism detected by new born free T4 screening. The 6th meeting of the International Society for Neonatal Screening. September 16-19, 2006. Awaji, Hyogo & Tokushima, Japan. p123(Abstracts)
2. Nobuo Matsuura, Yukifumi Yokota: Significance of serum and dried blood free T4 measurements in newborn period. Luncheon Seminar. The 6th meeting of the International Society for Neonatal Screening. September 16-19,2006. Awaji, Hyogo & Tokushima, Japan. p62(Abstracts)
3. 伊藤尚志、横田行史、下浜真理子、田久保憲行、柴山啓子、石井正浩、松浦信夫: 早産低出生体重児における TRH 負荷試験と甲状腺剤補充療法。第79回日本内分泌学会学術集会。平成18年5月19日(金)~21日(日)。神戸市。日本内分泌誌 82(1):101, 2006

表 3. 母乳中のダイオキシン類単位脂肪当たりの濃度 (pg TEQ/g fat)

症例	Total (PCDDs+PCDFs+Co-PCBs)
症例1	12
症例2	26
症例3	24
対照 (n=401)	24.0±8.3

D. 考案

今回は、現在までに3例の採乳しかできなかったが、対照に比しやや低い値で、少なくとも高値であったとの報告とは異なっていた。新聞報道なので、詳細は分からないが、色々問題が存在する。1つは対象の選択である。クレチン症といってもいろいろな病因により発症する。ダイオキシンの作用機序からすると、形成不全に関与する可能性が考えられる。しかし、症例を提供した小児科医の話によると、十分な説明が無く、疑い症例を含め検討の対象になったとのことである。ダイオキシン類とクレチン症発症に関する報告はない。ただ、環境因子として、一部の地域の地下水に含まれているPerchlorate(過塩素酸塩)の関与が示唆されている⁵⁾。この物質は甲状腺ホルモン合成のいろいろな部位(ヨード濃縮、有機化など)に関与すると考えられる。

ダイオキシン類が甲状腺機能に影響する機序としては少なくとも3つの考えがある。1つは甲状腺に直接毒性に働くとの考えである⁶⁾。2つ目の考え方はT₄とダイオキシン類の構造が似ているため、甲状腺ホルモン受容体または転送蛋白と競合するため、T₄の作用が阻害され機能低下になるとの考えである。3つめの考えはAryl hydrocarbon receptor (AhR)を介しての抑制である。AhRノックアウトマウスを用いた検討でこれを証明している^{7,8)}。以上のようにダイオキシン類は甲状腺機能に影響することは知られている。

一方形態学的な影響としては、琵琶湖と東京湾に住む鵜の甲状腺組織の変化が報告されている。ダイオキシン汚染の多い東京湾の鵜により多くの組織学的変化が見られている⁹⁾。一方、Nishimuraらはラットの妊娠中に異なる量のダイオキシンを投与し、その甲状腺組織はダイオキシン量に応じて変化が見られた¹⁰⁾。しかしながら、甲状腺の形成を阻害するとの報告は見られなかった。

E. 結論

重い甲状腺機能低下を伴ったクレチン症を出生した母親の乳汁中ダイオキシン濃度を測定した。対照に比し、ダイオキシン類濃度が多いとの所見は認めなかった。最後に採乳に協力を頂いた、岐阜大学小児科松永永子先生、埼玉県小児医療センターの望月 弘先生に深謝します。

F. 引用論文

1. Boas M, et al: Environmental chemicals and thyroid function. *Eur J Endocrinol* 154: 599-611, 2006
2. Matsuura N, et al: Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls(PCBs) on thyroid function in infants born in Japan- The second report from research on environmental health. *Chemosphere* 45 (8) : 1167-1171, 2001
3. Nagayama J, et al: Effects of lactational exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on thyroid functions in Japanese Babies. *Organohalogen Comp* 33: 446-450, 1997
4. 長山淳一：一部の新聞に掲載。
5. Scinicariello F, et al: Genetic factors that might lead to different responses in individuals exposed to perchlorate. *Environ Health Perspect* 113: 1479-1484, 2005

厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

母乳中のダイオキシン類濃度と免疫機能、アレルギーに関する検討
分担研究者：近藤 直実（岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学 教授）

研究要旨

母乳中のダイオキシン類の濃度と生活環境因子との関連を明らかにするとともに、母乳中のダイオキシン類が乳児におよぼす健康への影響の評価を行うことを目的として研究をおこなった。母乳中のダイオキシン類が、免疫機能、アレルギー症状の発症にどのように関わっているかについて検討するために、母乳中のダイオキシン類濃度を測定した児が1歳になった時点で採血をおこない、免疫機能、アレルギー検査に及ぼす影響について検討した。総じて免疫機能、アレルギー検査所見とダイオキシン類の濃度には有意な関連は見られなかった。

研究協力者

川本典生 岐阜大学医学部附属病院
小児科 医員
松井永子 岐阜大学大学院医学系研究科
小児病態学 兼任講師
金子英雄 岐阜大学医学部附属病院
小児科 講師

対象は、厚生科学研究「母乳中のダイオキシン類に関する研究」に参加し、母乳中のダイオキシン類濃度等の測定することに対して同意の得られた母親の母乳で哺育された1歳児とした。

対象者より、1歳時に採血を行い、母乳を用いて測定したダイオキシン類の推計摂取量と免疫、アレルギー検査との関連を検討した。

各地の母乳中のダイオキシン類濃度を比較するため、母乳採取地域を岩手県、千葉県、新潟県、石川県、大阪府、鳥取県の6府県とし、出産後30日の母乳の採取を依頼した。ダイオキシン濃度は、母乳約100mlを採取し、母乳中の脂肪含有量と脂肪1g当たりのPCDD7種類、PCDF10種類、CoPCB12種類を測定した。

採血による検討項目は、Tリンパ球系、Bリンパ球系、血清免疫グロブリン値、特異的

A. 研究目的

母乳中のダイオキシン類が乳児の健康に及ぼす影響を評価することを目的としている。本研究では、乳児の健康への影響の中でも、特に免疫機能、アレルギー反応に対する影響について検討することを目的とする。母乳中のダイオキシンが1歳時の免疫機能、アレルギー検査、特に卵白、牛乳、ハウスダスト2に対する抗原特異的IgEについて検討を加えた。

B. 研究方法

IgE とした。

C. 研究結果

1) Tリンパ球系として、CD3 陽性細胞、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞の各細胞の割合および CD4/CD8 比について、縦軸にダイオキシン濃度、横軸にそれぞれの細胞の割合をとった (図 1)。いずれも相関関係はみられなかった。

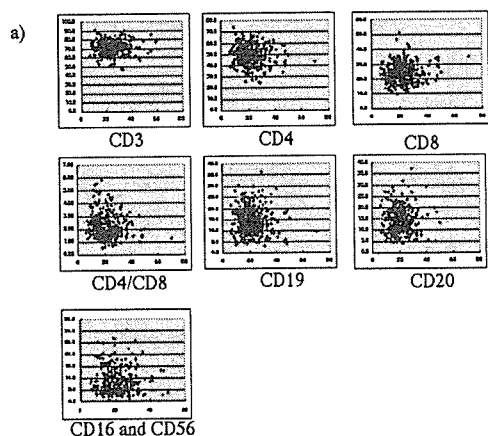


図 1 ダイオキシン類濃度と各細胞の割合に関する検討

2) Bリンパ球として CD19 陽性細胞、CD20 陽性細胞の割合を検討した (図 1) が、ダイオキシン濃度と各細胞の割合に一定の傾向はみられなかった。

3) 血清免疫グロブリン値 (IgM, IgG, IgA, IgE) についても比較検討した (図 2) が、いずれも有意な差はなかった。

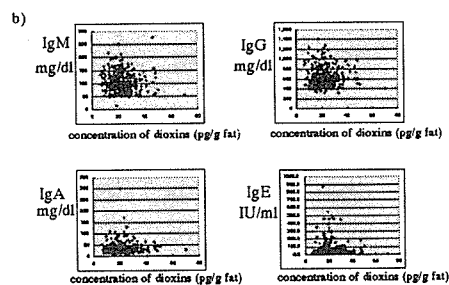


図 2 ダイオキシン類濃度と免疫グロブリン

4) 特異的 IgE 抗体については、卵白、牛乳、ハウスダスト 2 について検討した。それぞれの結果を図 3、4、5 に示す。

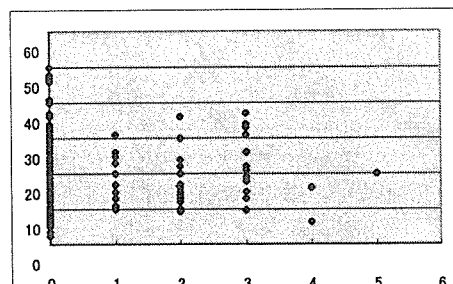


図 3 卵白特異的 IgE とダイオキシンについて

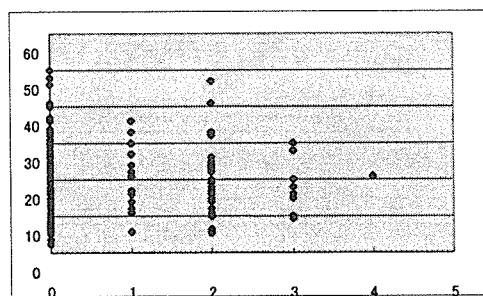


図 4 牛乳特異的 IgE とダイオキシンについて

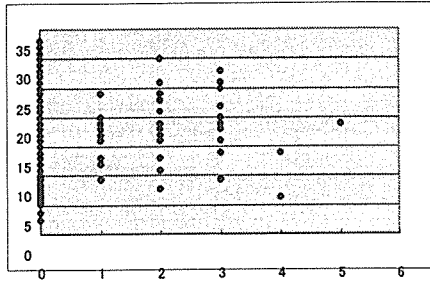


図5 ハウスダスト2特異的IgE とダイオキシンについて

いずれもダイオキシン濃度を縦軸に、それぞれの特異的 IgE 抗体のクラスを横軸に示したが、有意な関係は見られなかった。

D. 考察

今回は、母乳中のダイオキシン類濃度が、1歳時の免疫機能、アレルギー検査とどのように関連しているかについて検討を行った。

母乳中のダイオキシン類の濃度と、免疫機能、アレルギー検査結果の間に有意な関連を認めたものはなかった。このことより、母乳中のダイオキシン類が1歳時の免疫機能、アレルギー検査に影響を与えているとは現時点では結論づけられなかった。

E. 結論

アレルギー症状の有無と母乳中のダイオキシン類の濃度との関連について検討した。母乳中のダイオキシン類が1歳時の免疫機能、アレルギー検査に影響を与えているとは現時点では結論づけられなかった。

F. 研究発表

<論文発表>

松井永子 近藤直実 金子英雄 篠田紳司
川本典生 中村好一 松浦信夫 多田裕：
母乳栄養とダイオキシン—母乳中のダイオキシンが母乳栄養児の免疫アレルギー反応に与える影響の有無について— 小児科診療 68, 3, 533-536 (2005)

Kaneko H., Matui E., Shinoda S, Kawamoto N, Nakamura Y, Uehara R, Matsuura N, Morita M, Tada H, Kondo N.: Effects of dioxins on the immune function in infants Tox Ind Health 22:131-136 (2006)

G. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得、実用新案登録 特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Uehara R, Guan P, Nakamura Y, Matsuura N, Kondo N, Tada H	Dioxins in human milk and smoking of mothers.	Chemosphere		in press	2007
多田裕	母乳と環境汚染:母乳を科 学する	産婦人科の実際	56(3)	339-342	2007
Uehara R, Peng G, Nakamura Y, et al	Human milk survey for dioxins in the general population in Japan.	Chemosphere	62	1135-1141	2006
Guan P, Tajimi M, Uehara R, Watanabe M, Oki I, Ojima T, Nakamura Y.	congener profiles of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in the breast milk samples in Tokyo Japan.	Chemosphere	62(7)	1161-1166	2006
Hishinuma A, Fukata S, Nishiyama S, et al	Haplotype analysis reveals founder effects of thyro- globulin gene mutations C1058R and C1977S in Japan.	J Clin Endocrinol Metab.	91(8)	3100- 3004	2006
H Kaneko, E Matsui, S Shioda, N Kawamoto, Y Nakamura, R Ueharai, N Matsuura, M Morita, H Tada, and N Kondo	Effects of dioxins on the quantitative levels of immune components in infants	Toxicology and Industrial Health	22	131-136	2006
伊藤尚志、横田行史、柴山 啓子、大津成之、下浜真理 子、狐崎雅子、剣持 学、 野渡正彦、松浦信夫、川上 祐次、石井正浩	濾紙血TSH、freeT4同時測 定によるクレチン症スク リーニング-当院における5 年間の結果-	日本マススクリー ニング学会誌	16(3)	45-51	2006
松浦信夫	新生児TSH、FT4スクリー ニングの意義-発見される 中枢性甲状腺機能低下症の	日本マススクリー ニング学会誌	16(3)	33-42	2006
松浦信夫	新生児バセドウ病の発症- その危険性と防御策、治療 法-	日本臨床	64(12)	2303-2307	2006
松浦信夫	新生児甲状腺機能亢進症と 甲状腺中毒症	日本臨床別冊領域 別症候群シリーズ		271-275	2006
小西良昌、田中之雄、堀伸 二郎、多田裕	ダイオキシン類による母乳汚 染の経年推移	環境化学	16(4)	677-689	2006

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊



Dioxins in human milk and smoking of mothers

Ritei Uehara^{a,*}, Yosikazu Nakamura^a, Nobuo Matsuura^b,
Naomi Kondo^c, Hiroshi Tada^d

^a Department of Public Health, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

^b Department of Pediatrics, School of Medicine, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Sagamihara, Kanagawa 228-8555, Japan

^c Department of Pediatrics, School of Medicine, Gifu University, 40 Tsukasacho, Gifu 500-8705, Japan

^d Department of Neonatology, School of Medicine, Toho University, 6-11-1 Omorinishi, Ota, Tokyo 143-8540, Japan

Received 25 August 2006; received in revised form 19 December 2006; accepted 22 January 2007

Abstract

Background: The relation between the levels of dioxins in human breast milk and the smoking habits of the mothers is controversial. To clarify this relationship, we analyzed data from the human milk survey in Japan.

Methods: The human milk survey has been conducted in Japan since 1997. Healthy pregnant women aged 20–39 years were recruited and 50 ml of breast milk was collected from them at 30 days after delivery. PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs were measured by using GC/MS. The smoking habits of the mothers were established by interviewing them soon after delivery and were classified into four categories: current smokers, ever smokers who quit smoking at the pregnancy, ever smokers who quit smoking before the pregnancy, and never smokers. The levels of dioxins in breast milk were compared in the four categories of smoking among 853 primiparas. In addition, we analyzed the association between dioxin levels and passive smoking among never smokers. The geometric means of the dioxin concentrations were calculated in order to compare the differences between dioxins.

Results: The geometric means of dioxin-like PCBs in milk of never smokers was the highest (9.2 pg TEQ/g fat); followed by ever smokers who quit smoking before the pregnancy, ever smokers who quit smoking at the pregnancy, and current smokers (7.5, 7.2, and 6.6 pg TEQ/g fat, respectively). The differences between these levels were statistically significant (ANOVA, $p < 0.001$). No significant difference was observed between the level of dioxins in milk from never smokers subjected to passive smoking status and those who had not experienced passive smoking.

Conclusion: The levels of dioxin-like PCBs in human milk were negatively related to the smoking habits of mothers.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cigarette smoking; Dioxins; Dioxin-like PCBs; Epidemiology; Human milk; Passive smoking

1. Introduction

The dioxin burden in the human body especially that of infants and children, has caused particular concern in recent years. A human milk survey has been conducted to monitor the levels of dioxins in the general population in Japan (Uehara et al., 2006). When the level of dioxins in human milk is being investigated, the smoking habits

of the mothers should be considered to be a confounding factor, because dioxins, especially PCDDs, are contained in cigarette smoke (Muto and Takizawa, 1989). In addition, smoking during pregnancy is an important risk factor for maternal and fetal outcomes (Cnattingius, 2004). It is important to elucidate the association between cigarette smoking among mothers and dioxin levels in their milk. While dioxin levels in human milk among active smokers were lower than those among non-smokers (Fürst et al., 1992; Bates et al., 1994; Takekuma et al., 2004; Hedley et al., 2006), other studies showed no relation between smoking habits and dioxin levels (Rogan et al., 1986; Plum

* Corresponding author. Tel.: +81 285 58 7338; fax: +81 285 44 7217.
E-mail address: u-ritei@jichi.ac.jp (R. Uehara).

et al., 1993). To elucidate the relationship between cigarette smoking among mothers and dioxin levels in their breast milk, we analyzed the data from The Human Milk Survey carried out in Japan.

2. Methods

2.1. Human milk survey in Japan

The human milk survey has been conducted in several prefectures and cities in Japan since 1997. The details of the survey carried out in various areas have been described in a previous report (Uehara et al., 2006). Healthy pregnant women aged between 20 and 39 years were recruited by public health nurses. A signed informed consent form was submitted to the public health nurses by all participants; 50 ml of breast milk was then collected manually from each participant at 30 days after delivery. PCDDs (seven isomers), PCDFs (10 isomers), and dioxin-like PCBs (12 isomers) were measured using gas chromatography and mass spectrometry at the Japan Food Research Laboratory. In brief, the milk samples were mixed with an aqueous solution of sodium oxalate, diethyl ether and ethanol and the mixture was extracted with hexane. The fat content was determined gravimetrically. Thereafter, a three-step clean-up procedure was performed by passing the sample through a column filled with silica gel, then through another column containing aluminum oxide, and finally through an activated charcoal column. After concentrating the sample, gas chromatography and mass spectrometry were employed to measure the contents. A mixture of ^{13}C -labelled PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs was used as an internal standard. The levels of dioxins were described on a fat basis and the toxic equivalence (TEQs) values were calculated by using toxic equivalent factors (TEFs) of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin, which has previously been documented by WHO (Van den Berg et al., 1998). We analyzed the data of primiparas from 1998 to 2004 because only three isomers of dioxin-like PCBs had been measured in 1997. In this study, we only investigated data obtained from primiparas because the parity of nursing mothers was considered to be a confounder and the number of secundiparas was small.

2.2. Smoking habits of the mothers

The public health nurses interviewed the mothers soon after delivery to establish their smoking habits. Smoking was classified into four categories as current smokers, ever smokers who quit smoking at the start of pregnancy, ever smokers who quit smoking before the pregnancy, and never smokers. In addition, in order to establish their status as passive smokers, participants were asked whether they shared their home with anyone who was currently a regular smoker. We also analyzed the association between passive smoking and dioxin levels in milk among never smokers.

2.3. Statistical analysis

Because of the skewed distribution of dioxins in human milk, we analyzed log transformed values of PCDDs, PCDFs, the sum of PCDDs and PCDFs (PCDDs + PCDFs), dioxin-like PCBs, and the total of these compounds (total dioxins), and calculated the geometric means of these compounds. First, we compared these dioxins in human milk among the four categories of smoking habits by using one-way analysis of variance (ANOVA). The Bonferroni method was used to compare the dioxin levels between two groups among those four categories. Next, we also compared dioxins among the same categories by age of primiparas because the age of mother was considered to be a confounding factor. We divided the primiparas into two groups: women aged 29 years or younger, and those aged 30 years or older. Finally, the age related dioxin content of breast milk was compared between two groups of mothers who were never smokers, one group being exposed to passive smoking and the other not. Probabilities less than 0.05 were considered to be statistically significant. These statistical analyses were performed by using SPSS[®] 11.0J for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

The total number of participants in the human milk survey from 1998 through 2004 was 963. We excluded both mothers whose levels of dioxins in their milk could not be measured ($n = 5$) and secundiparas ($n = 105$) from the total number of participants, therefore, 853 primiparas were analyzed. The numbers of current smokers, ever smokers who quit smoking at the pregnancy, ever smokers who quit smoking before the pregnancy, and never smokers by age of mothers are shown in Table 1. The prevalence of current smokers, ever smokers, and never smokers among all the primiparas was 3.9%, 25.7%, and 70.0%, respectively.

When we compared the means of log transformed values of dioxins among the four smoking habit groups, all the differences in PCDDs, PCDFs, PCDDs + PCDFs, dioxin-like PCBs, and total dioxins were statistically significant (ANOVA, $p < 0.001$). The geometric mean of dioxin-like PCBs in the milk of never smokers was the highest among the four categories of smoking habits (9.2 pg TEQ/g fat); followed by ever smokers who quit smoking before the pregnancy, ever smokers who quit smoking at the pregnancy, and current smokers (7.5, 7.2, and 6.6 pg TEQ/g fat, respectively) (Fig. 1). In comparison to the means of log transformed values between two groups among the four smoking habit groups, the differences in the levels of dioxin-like PCBs between never smokers and other smoking habit groups were statistically significant. Regarding PCDDs and PCDDs + PCDFs, the differences between never smokers and the two groups of ever smokers were statistically significant; however, the difference between never smokers and current smokers was not significant

Table 1
Number of participants by age and smoking habits of mothers

Age of mothers	n (%)					Total
	Current smokers	Ever smokers 1 ^a	Ever smokers 2 ^b	Never smokers	n/a ^c	
20–29 years old	22 (4.9)	87 (19.4)	30 (6.7)	307 (68.5)	2 (0.4)	448 (100)
30–39 years old	11 (2.7)	64 (15.8)	38 (9.4)	290 (71.6)	2 (0.5)	405 (100)
Total	33 (3.9)	151 (17.7)	68 (8.0)	597 (70.0)	4 (0.5)	853 (100)

^a Ever smokers who quit smoking at the pregnancy.

^b Ever smokers who quit smoking before the pregnancy.

^c No answer.

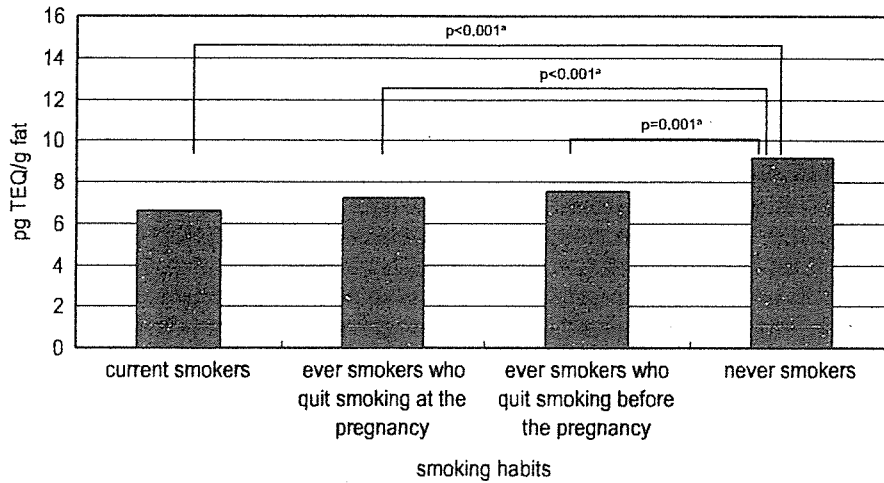


Fig. 1. The geometric means of dioxin-like PCBs (TEQ) in human milk in relation to the smoking habits of primiparas. ^aBonferroni method.

($p = 1.00$) (Fig. 2). The difference in PCDFs only between never smokers and ever smokers who quit smoking at the pregnancy was significant. In terms of total dioxins, the differences between never smokers and other smoking habit

groups were significant; however, the geometric mean of current smokers was not the lowest.

The differences in the means of log transformed values of PCDDs, PCDFs, PCDDs + PCDFs, dioxin-like PCBs,

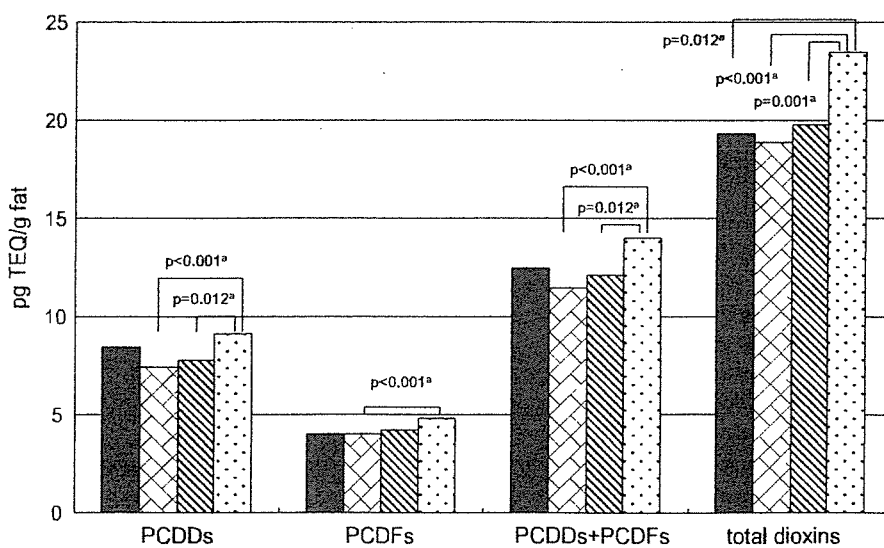


Fig. 2. The geometric means of PCDDs, PCDFs, PCDDs + PCDFs, and total dioxins (PCDDs + PCDFs + dioxin-like PCBs: TEQ) in human milk in relation to the smoking habits of primiparas. Black bar represents current smokers. Cross-hatched bar represents ever smokers who quit smoking at the pregnancy. Oblique-lined bar represents ever smokers who quit smoking before pregnancy. Dotted bar represents never smokers. ^aBonferroni method.

Please cite this article in press as: Uehara, R. et al., Dioxins in human milk and smoking of mothers, Chemosphere (2007), doi:10.1016/j.chemosphere.2007.01.050

and total dioxins among the four categories of smoking habits compared by age of the mothers were also statistically significant (ANOVA). In terms of dioxin-like PCBs, never smokers among both mothers aged 29 years or younger and mothers aged 30 years or older had the highest levels of these compounds; however, the difference between never smokers and current smokers of only mothers aged

30 years or older was significant (Table 2). Although no statistical significance was observed, the levels of all the dioxins and dioxin-like PCBs of current smokers among mothers aged 30 years or older were lower than those of current smokers among mothers aged 29 years or younger. On the other hand, among the other two groups of ever smokers or never smokers, the levels of all the dioxins

Table 2
Comparison between dioxins levels in human milk among four categories of mothers' smoking habits by age

Dioxins (pg TEQ/g fat) age of mothers	Geometric mean (95% confidence interval)				p Value ^c
	Current smokers	Ever smokers 1 ^a	Ever smokers 2 ^b	Never smokers	
PCDDs					
20–29 years old (n = 448)	8.5 (7.3–10.0)	7.1 (6.6–7.7)	7.4 (6.5–8.4)	8.4 (8.1–8.8)	0.001
30–39 years old (n = 405)	8.1 (6.4–10.2)	7.9 (7.2–8.7)	8.2 (7.0–9.6)	9.8 (9.4–10.2)	<0.001
PCDFs					
20–29 years old (n = 448)	4.2 (3.5–5.0)	3.8 (3.6–4.1)	4.1 (3.4–4.9)	4.5 (4.3–4.7)	0.004
30–39 years old (n = 405)	3.8 (3.0–4.8)	4.2 (3.8–4.7)	4.3 (3.8–5.0)	5.1 (4.9–5.4)	<0.001
PCDDs + PCDFs					
20–29 years old (n = 448)	12.8 (10.9–14.9)	11.0 (10.3–11.8)	11.6 (10.1–13.3)	13.1 (12.5–13.6)	0.001
30–39 years old (n = 405)	12.0 (9.8–14.7)	12.2 (11.1–13.5)	12.6 (10.9–14.5)	15.1 (14.5–15.6)	<0.001
Dioxin-like PCBs					
20–29 years old (n = 448)	6.7 (5.4–8.3)	6.6 (6.1–7.1)	6.7 (5.7–7.8)	8.5 (8.1–8.9)	<0.001
30–39 years old (n = 405)	6.3 (4.6–8.5)	8.0 (7.2–9.0)	8.3 (7.3–9.4)	10.1 (9.7–10.5)	<0.001
Total dioxins					
20–29 years old (n = 448)	19.7 (16.9–23.1)	17.8 (16.7–19.0)	18.5 (16.2–21.2)	21.8 (20.9–22.6)	<0.001
30–39 years old (n = 405)	18.6 (14.9–23.2)	20.6 (18.7–22.7)	21.0 (18.4–23.9)	25.4 (24.5–26.3)	<0.001

^a Ever smokers who quit smoking at the pregnancy.

^b Ever smokers who quit smoking before the pregnancy.

^c One way analysis of variance (ANOVA).

Table 3
Relation between dioxins levels in human milk among never smokers and passive smoking habits by age

Dioxins (pg TEQ/g fat) age of mothers	Passive smoke				p Value ^a
	Yes		No		
	Geometric mean	Mean of log transformation	Geometric mean	Mean of log transformation	
PCDDs					
20–29 years old (n = 307)	8.8	2.18	8.2	2.10	0.10
30–39 years old (n = 290)	9.7	2.27	9.9	2.29	0.56
All mothers (n = 597)	9.2	2.22	9.0	2.20	0.38
PCDFs					
20–29 years old (n = 307)	4.6	1.53	4.5	1.50	0.56
30–39 years old (n = 290)	5.0	1.60	5.2	1.66	0.26
All mothers (n = 597)	4.8	1.57	4.8	1.58	0.76
PCDDs + PCDFs					
20–29 years old (n = 307)	13.5	2.61	12.8	2.55	0.18
30–39 years old (n = 290)	14.7	2.69	15.3	2.73	0.35
All mothers (n = 597)	14.1	2.65	13.9	2.63	0.66
Dioxin-like PCBs					
20–29 years old (n = 307)	9.0	2.19	8.2	2.10	0.05
30–39 years old (n = 290)	10.0	2.30	10.2	2.30	0.56
All mothers (n = 597)	9.4	2.25	9.1	2.21	0.27
Total dioxins					
20–29 years old (n = 307)	22.7	3.12	21.2	3.06	0.10
30–39 years old (n = 290)	24.9	3.21	25.7	3.20	0.37
All mothers (n = 597)	23.7	3.17	23.3	3.15	0.51

^a The results from comparison with means of log transformation of dioxins levels by *t* test.

Please cite this article in press as: Uehara, R. et al., Dioxins in human milk and smoking of mothers, Chemosphere (2007), doi:10.1016/j.chemosphere.2007.01.050

and dioxin-like PCBs in mothers aged 30 years or older tended to be higher than those in mothers aged 29 years or younger.

The number of never smoking mothers with passive smoking status was 237. When compared with the means of log transformed values of PCDDs, PCDFs, PCDDs + PCDFs, dioxin-like PCBs, and total dioxins in the milk of never smokers who were not exposed to passive smoking, those of never smokers who were exposed to passive smoking were not significantly different (Table 3). Similar results were obtained when the age related dioxin levels in mothers who were exposed to passive smoking were compared to those in mothers who had negative passive smoking status.

4. Discussion

The levels of dioxins, especially dioxin-like PCBs, in human breast milk of primiparas were associated with cigarette smoking. The levels of dioxin-like PCBs in milk were the highest among never smokers followed by ever smokers and current smokers. This association was also observed among mothers aged 30 years or older. Passive smoking by mothers was less likely to affect the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in human milk. It is interesting that the levels of all the dioxins and dioxin-like PCBs in mothers aged 30 years or older were lower than those of mothers aged 29 years or younger among current smokers. This finding indicates that cigarette smoking appears to be counteracting the effect of age in the association with the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in human milk. Flesch-Janys et al. (1996) showed that some isomers of PCDDs or PCDFs in the blood of smokers decayed significantly faster than those in the blood of non-smokers and ex-smokers. They suggested that cigarette smoking might increase the rate of dioxin elimination in humans. In our study, the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in the milk of never smokers were the highest among the four categories of smoking habits. The differences in the levels of dioxin-like PCBs between never smokers and the other two groups of ever smokers or current smokers were statistically significant. These findings appear to support the hypothesis of Flesch-Janys et al. (1996). In addition, it may be hypothesized that the elimination of dioxins due to cigarette smoking would be enhanced in older mothers.

To determine the relationship between the duration of the smoking-free period before pregnancy and the levels of dioxins in breast milk, we divided the ever smokers into two groups: ever smokers who quit smoking at the start of pregnancy and those who quit smoking before the pregnancy. However, the differences in the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in the breast milk of the two groups of ever smokers were not significant. Among ever smokers, the duration of the smoking-free period until pregnancy was not associated with the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in breast milk. When compared with the levels of dioxins in the milk of never smokers who were not exposed

to passive smoking, those of never smokers exposed to passive smoking were not significantly different. On the other hand, Fürst et al. (1992) reported that the levels of PCDDs and PCDFs in the milk of mothers exposed to passive smoking were significantly lower than those of non-exposed mothers. Further studies relating passive smoking to dioxin levels in human milk will be needed since there is currently a paucity of such studies.

We had to consider several limitations of this study. First, we obtained information regarding the smoking habits of participants by interview and participants may have been tempted to answer incorrectly because of negative attitudes towards smoking during pregnancy. The prevalence of current smokers aged 29 years or younger in our study was 4.9%, which was smaller than the prevalence reported in Sweden (Cnattingius, 2004) and in another cohort in Japan (Tanaka et al., 2005). Even if this information bias remained, however, it probably underestimated the relationship between smoking habits of mothers and levels of dioxins in breast milk. Next, among the four categories of smoking habits, current smokers had the lowest levels of dioxin-like PCBs; however, the differences between current smokers and the other two groups of ever smokers were not statistically significant. The small sample size of the current smokers may have influenced this result. Finally, we did not collect biochemical markers related to cigarette smoking, for example, cotinine concentration in the urine of mothers. The measurement of these markers as well as smoking habits may significantly clarify the relationship between cigarette smoking and dioxins levels in human breast milk.

In conclusion, the levels of dioxin-like PCBs in human milk were negatively related to the smoking habits of the mothers; in addition, the age of the mothers affected this relationship. We speculate that cigarette smoking may induce some biological mechanisms for the elimination of dioxins from the human body.

Acknowledgement

This study was supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan.

References

- Bates, M.N., Hannah, D.J., Buckland, S.J., Taucher, J.A., van Maanen, T., 1994. Chlorinated organic contaminants in breast milk of New Zealand women. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 1), 211–217.
- Cnattingius, S., 2004. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine. Tob. Res.* 6 (Suppl. 2), S125–S140.
- Flesch-Janys, D., Becher, H., Gurn, P., Jung, D., Konietzko, J., Manz, A., Pöpke, O., 1996. Elimination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. *J. Toxicol. Environ. Health* 47, 363–378.
- Fürst, P., Fürst, C., Wilmers, K., 1992. PCDDs and PCDFs in human milk – statistical evaluation of a 6-years survey. *Chemosphere* 25, 1029–1038.

- Hedley, A.J., Wong, T.W., Hui, L.L., Malisch, R., Nelson, E.A.S., 2006. Breast milk dioxins in Hong Kong and Pearl River Delta. *Environ. Health Perspect.* 114, 202–208.
- Muto, H., Takizawa, Y., 1989. Dioxins in cigarette smoke. *Arch. Environ. Health* 44, 171–174.
- Pluim, H.J., Kramer, I., van der Slikke, J.W., Koppe, J.G., Olie, K., 1993. Levels of PCDDs and PCDFs in human milk: dependence on several parameters and dietary habits. *Chemosphere* 26, 1889–1895.
- Rogan, W.J., Gladen, B.C., McKinney, J.D., Carreras, N., Hardy, P., Thullen, J., Tingelstad, J., Tully, M., 1986. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: effects of maternal factors and previous lactation. *Am. J. Public Health* 76, 172–177.
- Takekuma, M., Saito, K., Ogawa, M., Matumoto, R., Kobayashi, S., 2004. Levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in human milk in Saitama, Japan, and epidemiological research. *Chemosphere* 54, 127–135.
- Tanaka, K., Miyake, Y., Sasaki, S., Ohya, Y., Miyamoto, S., Matsunaga, I., Yoshida, T., Hirota, Y., Oda, H. The Osaka Maternal and Child Health Study Group, 2005. Active and passive smoking and tooth loss in Japanese women: baseline data from the Osaka Maternal and Child Health Study. *Ann. Epidemiol.* 15, 358–364.
- Uehara, R., Guan, P., Nakamura, Y., Matsuura, N., Kondo, N., Tada, H., 2006. Human milk survey for dioxins in the general population in Japan. *Chemosphere* 62, 1135–1141.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., Rolaf van Leeuwen, F.X., Liem, A.K.D., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Wærn, F., Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775–792.