

F. 研究発表

1. 論文発表

Ban S, Sata F, Kurahashi N, Kasai S, Moriya K, Kakizaki H, Nonomura K and Kishi R Genetic polymorphisms of *CYP17A1*, *CYP19A1*, *ESR1* and *ESR2* that influence estrogen activity lead to increased risk of hypospadias., submitted.

2. 学会発表

1) 坂 晋、倉橋典絵、笠井世津子、守屋仁彦、柿崎秀宏、佐田文宏、野々村克也、岸 玲子、「尿道下裂リスクと胎児の *CYP17A1*、*CYP19A1*、*ESR1* 遺伝子多型との関連」第15回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会、京都、2006年7月

2) 坂 晋、倉橋典絵、笠井世津子、守屋仁彦、柿崎秀宏、佐田文宏、野々村克也、岸 玲子、「エストロゲン活性に影響を与える遺伝子多型と尿道下裂との関連」第77回日本衛生学会、大阪、2007年3月

参考文献

(1) Aschim EL, Nordenskjold A, Giwercman A, Lunden KB, Ruhayel Y, Haugen TB, Grotmol T, Giwercman YL (2004) Linkage between cryptorchidism, hypospadias and GGN repeat length in the androgen receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 5105-5109.

(2) Thai HT, Kalbasi M, Lagerstedt K, Frisen L, Kockum I, Nordenskjold A (2005) The Valine allele of the V89L polymorphism in the five-alpha reductase gene confers reduced risk for hypospadias. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 6695-6698.

(3) Dietrich W, Haitel A, Huber JC and Reiter WJ (2004) Expression of estrogen receptors in human corpus cavernosum and male urethra. *J. Histochem. Cytochem.* 52: 355-360.

(4) Castagnoli A, Maestri I, Bernardi F and Del Senno L (1987) *PvuII* RFLP inside the human estrogen receptor gene. *Nucleic. Acids Res.* 15: 866.

(5) Maruyama H, Toji H, Harrington CR, Sasaki K, Izumi Y, Ohnuma T, Arai H, Yasuda M, Tanaka C, Emson PC et al. (2000) Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 57: 236-240.

(6) Beleza-Meireles A, Omrani D, Kockum I, Frisen L, Lagerstedt K and Nordenskjold A (2006) Polymorphisms of estrogen receptor beta gene are associated with hypospadias. *J. Endocrinol. Invest.* 29: 5-10.

表1 *ESR1* の *PvuII* 部位ならびに *XbaI* 部位、*ESR2* の 2681-4A>G 部位の遺伝子多型と尿道下裂との関連

	Hypospadias (N = 87) N (%)	Control (N = 286) N (%)	OR (95% CI)	P value
<i>ESR1 PvuII</i>				
TT	36 (41.4)	92 (32.2)	1.00 (Ref.)	
TC	34 (39.1)	146 (51.0)	0.60 (0.35-1.02)	0.058
CC	17 (19.5)	48 (16.8)	0.91 (0.46-1.78)	0.772
TC + TT	51 (58.6)	194 (67.8)	0.67 (0.41-1.10)	0.114
<i>ESR1 XbaI</i>				
AA	65 (74.7)	179 (62.6)	1.00 (Ref.)	
AG	21 (24.1)	95 (33.2)	0.61 (0.35-1.06)	0.078
GG	1 (1.1)	12 (4.2)	0.23 (0.03-1.80)	0.157
AG + GG	22 (25.3)	107 (37.4)	0.57 (0.33-0.97)	0.039
<i>ESR2 2681-4A>G</i>				
AA	42 (48.3)	102 (35.7)	1.00 (Ref.)	
AG	34 (39.1)	146 (51.0)	0.57 (0.34-0.95)	0.031
GG	11 (12.6)	38 (13.3)	0.70 (0.33-1.51)	0.364
AG + GG	45 (51.7)	184 (64.3)	0.59 (0.37-0.97)	0.035

Thick letters are significantly different at $P < 0.05$.

表2 *ESR1* ハプロタイプと尿道下裂との関連

	Overall (N = 746) Frequency (%)	Control (N = 572) Frequency (%)	Hypospadias (N = 174) Frequency (%)	Chi Square	P value
<i>ESR1 PvuII- XbaI</i>					
TA	58.3	57.5	60.9	0.642	0.423
CA	22.7	21.7	25.9	1.319	0.251
CG	18.9	20.6	13.2	4.763	0.029
TG	0.2	0.2	0.0	0.290	0.590

Thick letters are significantly different at $P < 0.05$.

母体血中 PFOS・PFOA 濃度と出生時体格との関連

主任研究者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座
産科・生殖医学分野
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室

研究要旨

有機フッ素化合物（PFOS・PFOA）のバックグラウンドレベルの汚染による次世代影響を検討する目的で、母体血中における PFOS・PFOA 濃度と出生時体格（体重・身長・胸囲・頭囲）との関連を検討した。その結果、母体血中 PFOS 濃度と出生時体重にて有意な負の相関が認められた。以上より、胎内におけるバックグラウンドレベルの PFOS 曝露は胎内発育を抑制する可能性が示唆された。

【研究協力者】

斉藤 貢一、伊藤 里恵、岩崎 雄介、
仲田 尚生、勝又 常信、中田 彩子
（星薬科大学薬品分析化学教室）
岸 玲子、鷺野 考揚、佐田 文宏、
坂 晋、小西 香苗
（北海道大学大学院医学研究科社会医学
専攻公衆衛生学分野）

A. 研究目的

有機フッ素化合物（PFOS・PFOA）は難分解性で、環境中への蓄積が問題とされ、ヒトへの影響が懸念されている物質である。動物実験においては、出生体重の減少、先天奇形の発生、甲状腺機能への影響、内分泌攪乱作用が報告されているが、ヒトへの健康影響は報告も少なく不明で、化学物質に感受性の高い胎児期の影響を見た報告はほとんどない。有機フッ素化合物の次世代影響を検討する目的で、バックグラウンドレベルでの母体血中有機フッ素化合物濃度の新生児体格への影響を検討した。

B. 研究方法

札幌市内において調査協力が得られた産婦人科医院で、妊婦と小児を対象に前

向きコホート研究を実施した。曝露評価は、妊娠中期から後期に採取した母体血とした。貧血で妊娠中採血できなかった場合、出産後の入院中に血液を採取した。母体血中の PFOS・PFOA 濃度は、LC/MS/MS 法で測定され、これらの測定は全て星薬科大学薬品分析化学教室で実施された。447 名の母体血中 PFOS・PFOA 濃度が測定されたが、そのうち双胎、妊娠中毒症、糖尿病、高血圧、胎盤機能不全、胎児心不全を除外した 382 例にて検討した。母体血中 PFOS・PFOA 濃度を対数変換し、交絡要因を調整し、重回帰分析を行った結果を表 2 に示す。なお、PFOA 濃度の検出限界以下に関しては、検出限界の半値 0.25ng/ml で解析を行った。

C. 研究結果

母親、父親、子の属性を表 1 に、PFOS・PFOA 濃度と出生時体格の関連を調べるため、母年齢、母学歴、妊娠中喫煙、母 BMI、妊娠週数、出産回数（第 1 子か否か）、児の性、採血時期にて調整した偏回帰係数を表 2 に示す。PFOS と出生時体重で有意な負の相関が得られた。

D. 考察

有機フッ素化合物製造従事者における健康影響は、血液・脂質・肝機能・甲状腺、尿検査において影響は見られなかったとの報告が見られる¹⁾が、化学物質に感受性の高い胎児期の検討が必要である。

胎内曝露影響を見た報告は過去に 2 報告のみ^{2) 3)}で、1 報告は 19 例の母乳中の有機フッ素化合物濃度と出生時体重の検討²⁾をし、もう 1 報告は臍帯血の有機フッ素化合物濃度と出生時体重の検討³⁾をしており、いずれも有機フッ素化合物濃度と出生時体重との間に関連は認められなかったと報告しているが、いずれもサンプルサイズが小さいこと、また出生体重に明らかに影響を及ぼす妊娠週数などの調整要因に関して検討を行っておらず、結論が得られていないのが現状である。本研究は、サンプルサイズを増やし、調整を行って有機フッ素化合物濃度と出生時体格との検討を行った世界で初めての報告である。

表 2 より重回帰分析の結果、母体血中 PFOS 濃度と出生時体格のうち体重において有意な負の相関が得られた。(p=0.032) 一方、母体血中 PFOA 濃度と新生児体格には有意な相関は得られなかった。井上ら²⁾はバックグラウンドレベルでの有機フッ素化合物曝露において PFOS は臍帯血中で検出されたものの、PFOA は臍帯血中では検出されなかったとの知見を得ており、解析結果が胎盤透過性を反映したものである可能性が示唆された。

以上より胎内におけるバックグラウンドレベルの PFOS 曝露は胎内発育を抑制する可能性が示唆された。一方、PFOA との負の相関は有意なものではなかった。これらとの関連をより明らかにするためにはさらに大きいサンプルサイズでの研究が必要であると考えられた。

E. 引用文献

- 1) Olsen GW, Burris JM, Burlew MM, Mandel JH. Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *J Occup Environ Med.* 2003 Mar;45(3):260-70.
- 2) So MK, Yamashita N, Yaniyasu S, Jiang Q, Giesy JP, Chen K, Lam PK. Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China. *Environ Sci Technol.* 2006 May 1;40(9):2924-9.
- 3) Koichi Inoue, Fumio Okada, Rie Ito, Shizue Kato, Seiko Sasaki, Sonomi Nakajima, Akiko Uno, Yasuaki Saijyo, Fumihito Sata, Yoshihiro Yoshimura, Reiko Kishi, Hiroyuki Nakazawa. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2004 Aug;112(11):1204-7.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

鷺野考揚 小西香苗 加藤静恵 佐々木
成子 中島そのみ 坂晋 松澤重行 西
條泰明 佐田文宏 仲田尚生 勝又常信
中田彩子 岩崎雄介 伊藤里恵 斉藤貢一
中澤裕之 前田信彦 岸玲子：「母体血
有機フッ素化合物濃度の新生児体格への
影響」、第17回日本疫学会学術総会、広
島（2007. 1. 26-27）

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1 対象者の基本的属性 (n=382)

母親の年齢 (歳)	30.5±4.8
母親の BMI	20.9±2.8
母親の学歴 (通学年数)	
9年間	7 (1.8)
10-12年間	168 (44.0)
13-16年間	201 (52.6)
17年以上	6 (1.6)
出産回数	
第1子	180 (47.1)
第2子以降	202 (52.9)
在胎週数(日)	275.5±9.8
妊娠中の母親の喫煙	
なし	318 (83.2)
あり	64 (16.8)
妊娠中の母親の受動喫煙 (同居者喫煙)	
なし	97 (25.4)
あり	285 (74.6)
母親のアルコール摂取量(g/日)	1.2±6.1
母親のカフェイン摂取量 (mg/日)	147.6±108.9
父親の BMI	23.2±3.5
世帯年収 ^a	
300万未満	77 (20.3)
300-500万	191 (50.4)
500-700万	76 (20.1)
700-1000万	32 (8.4)
1000万以上	3 (0.8)
子の性別	
男	182 (47.6)
女	200 (52.4)
子の体重 (g)	3051.1±366.3
子の身長 (cm)	48.0±1.9
子の胸囲 (cm)	31.4±1.6
子の頭囲 (cm)	33.2±1.3
採血時期	
妊娠中	283 (74.1)
出産後	99 (25.9)

a、n=379

人 (%) もしくは平均±SD

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 2 有機フッ素化合物濃度と出生時体格との関連

	体重			身長		
	β	95%CI	p 値	β	95%CI	p 値
PFOS	-169.4	-323.8,-15.0	0.032*	-0.411	-1.28,0.456	0.352
PFOA	-66.3	-185.6,53.0	0.275	-0.129	-0.796,0.539	0.705
	胸囲			頭囲		
	β	95%CI	p 値	β	95%CI	p 値
PFOS	-0.510	-1.185,0.165	0.138	-0.200	-0.800,0.401	0.514
PFOA	-0.092	-0.612,0.429	0.729	-0.057	-0.520,0.405	0.808

* $p < 0.05$

重回帰分析。母 BMI、母教育歴、採血時期、母喫煙、在胎週数、児の性別、採血時期にて調整

妊婦の喫煙状態・遺伝子多型と PCB・ダイオキシン類濃度との関連

主任研究者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座
産科・生殖医学分野 教授

研究要旨

妊婦の喫煙によって、母と胎児へ悪影響を及ぼすことが知られている。代謝酵素の遺伝子多型とその活性については多くの報告があるものの、このような遺伝子多型と PCB やダイオキシン類濃度との関連についての報告は数少ない。そこで、低曝露レベルと考えられる一般集団の妊婦を対象にして、喫煙状態（喫煙、受動喫煙、非喫煙）と化学物質代謝に関与する遺伝子多型（*AhR* R554K, *CYP1A1* I462V, *CYP1B1* L432V, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* I105V）と血中の PCB・ダイオキシン類濃度との関連について調べた。その結果、Lys アレルを有する非喫煙群と比べ、Arg/Arg 型の喫煙群では、Total non-ortho PCBs TEQ、Total mono-ortho PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ が低い値であるとともに、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ について、Lys アレルを有する喫煙群では有意に低い結果が得られた。さらに、Lys アレルを有する非喫煙群と比べて、Arg/Arg 型の受動喫煙群では、Total non-ortho PCBs TEQ ならびに Total coplanar PCBs TEQ が有意に低い値であった。このことから、*AhR* R554K 多型と喫煙による血中 PCB TEQ 値への負の複合影響が明らかになった。また、この複合影響には、非喫煙、喫煙だけではなく、受動喫煙による影響も考慮する必要がある。

研究協力者

岸 玲子、坂 晋、小西 香苗、
鷺野 考揚

北海道大学大学院医学研究科予防医学
講座公衆衛生学分野

梶原 淳睦、吉村 健清、中川 礼子、
平川 博仙、堀 就英、芦塚 由紀、
村田さつき、松枝 隆彦、飛石 和大、
安武 大輔

福岡県保健環境研究所

ては多くの報告があるものの、このような遺伝子多型と PCB やダイオキシン類濃度との関連についての報告は数少ない。そのひとつとして、*CYP1B1* L432V 多型と職業性ダイオキシン類曝露との関連がみられることが最近報告されているが、その一方で、*CYP1B1* L432V 多型とダイオキシン類曝露との間に関連がみられなかったとの報告もあり、その関連については定かではない（5, 6）。

そこで、低曝露レベルと考えられる一般集団の妊婦を対象にして、喫煙状態（喫煙、受動喫煙、非喫煙）と化学物質代謝に関与する遺伝子多型（*AhR* R554K, *CYP1A1* I462V, *CYP1B1* L432V, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* I105V）と血中の PCB・ダイオキシン類濃度との関連について調べた。

B. 研究方法

対象者は、札幌市内の産科において、インフォームドコンセントを得られた 23 週

A. 研究目的

妊婦の喫煙によって、母と胎児へ悪影響を及ぼすことが知られている（1）。タバコの煙には、ニコチン、多環芳香族炭化水素（PAHs）などをはじめとした 4000 以上もの化学物質を含んでいる。*Ah* レセプターは、PAHs や TCDD などの受容体として知られ、*CYP1A1* や *CYP1B1*、*GST* などを誘導する（2, 3, 4）。

代謝酵素の遺伝子多型とその活性につい

-35 週の妊婦 263 名である。リクルート時に自記式調査票にて、妊娠初期における対象者ならびにパートナーの喫煙の有無を調べ、対象者を非喫煙群（80 名）、受動喫煙群（89 名）、喫煙群（94 名）の 3 群に区分した。また、各遺伝子多型判定ならびに血中ダイオキシン類濃度を測定するために、血液を採取した。

対象者の血液から抽出した DNA を用いて、TaqMan 法により、*AhRR554K*, *CYP1A1 I462V*, *CYP1B1 L432V*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1 I105V* の各遺伝子多型を判定した。

各統計解析には、SPSS12.0J を使用した。

（倫理面への配慮）

北海道大学医学研究科・医の倫理委員会および研究協力施設の研究倫理委員会に諮り、承認を得たうえで実施した。

C. 研究結果

対象者の基本属性ならびに各遺伝子多型の頻度はそれぞれ表 1, 表 2 のようになった。

喫煙、各遺伝子多型と血中 PCB・ダイオキシン類値との関連を調べた。Total PCDDs TEQ、Total PCDFs TEQ、Total PCDD/PCDFs TEQ について、非喫煙群に比べ喫煙群 Total PCDFs TEQ において有意に減少していたが、その他の関連はみとめられなかった（表 3）。一方、Total non-*ortho* PCBs TEQ、Total mono-*ortho* PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ については、*CYP1A1 I462V*, *CYP1B1 L432V*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1 I105V* 多型との間に有意な関連はみられなかった。しかし、*AhRR554K* 多型との間には、Lys アレルを有する集団に比べ、Arg/Ars 型の集団では、Total non-*ortho* PCBs TEQ、Total mono-*ortho* PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ が有意に低い値であった（それぞれ $P=0.010$, 0.005 , 0.006 , 0.023 ）。また、Total non-*ortho* PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ は、非喫煙群に比べ、喫煙群において有意に低い値であり（それぞれ $P<0.001$, 0.001 , $P=0.002$ ）、

Total mono-*ortho* PCBs TEQ についても有意ではなかったが低い傾向がみられた（表 4）。

血中 PCB 量に影響のみられた AhR 多型と喫煙との組み合わせと血中 PCB・ダイオキシン類 TEQ 値との関連を調べたところ、Lys アレルを有する非喫煙群と比べ、Arg/Arg 型の喫煙群では、有意に Total PCDDs TEQ、Total PCDFs TEQ、Total PCDD/PCDFs TEQ が低い値であった（それぞれ $P=0.009$, 0.003 , 0.003 ）（表 5）。また、同様に、Lys アレルを有する非喫煙群と比べ、Arg/Arg 型の喫煙群では、Total non-*ortho* PCBs TEQ、Total mono-*ortho* PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ が低い値であるとともに（ $P<0.001$, $=0.001$, <0.001 , <0.001 ）、Total non-*ortho* PCBs TEQ、Total coplanar PCBs TEQ、Total TEQ について、Lys アレルを有する喫煙群（それぞれ $P=0.006$, 0.012 , 0.024 ）では有意に低い結果が得られた。さらに、Lys アレルを有する非喫煙群と比べて、Arg/Arg 型の受動喫煙群では、Total non-*ortho* PCBs TEQ ならびに Total coplanar PCBs TEQ が有意に低い値であった（それぞれ $P=0.021$, 0.026 ）。

D. 考察

本研究の結果から、妊婦の喫煙状況が血中の PCB・ダイオキシン類 TEQ 値に影響を与えることが明らかになった。本研究では、喫煙により妊婦の喫煙状況が血中の PCB・ダイオキシン類 TEQ 値が低下する結果が得られたが、Choi AL らの報告における対象集団においても、非喫煙群と比較して喫煙群において、Total PCB 値が有意に低いことが示されている（7）。これらの結果の原因は不明であるが、喫煙による PCB・ダイオキシン類代謝系の亢進、血中タンパク質の影響などが考えられる。また、喫煙により血中 PCB・ダイオキシン類濃度が低下することによる健康影響についても明らかではないが、近年、喫煙群の母親より出生した新生児の血中 PCB 濃度は、受動喫煙群、非喫煙群の母親より出生した新生児と比較

して、有意に高いことが報告されていることから、妊婦の喫煙による PCB・ダイオキシン類の胎児への蓄積性が懸念される（8）。

本研究では、*AhR* R554K 多型が Arg/Arg 型の場合、Lys アレルを有する型と比較して、血中 PCB TEQ 値が低いことが示された。また、この遺伝子多型と喫煙による血中 PCB TEQ 値への複合的影響が明らかになった。本研究の結果では、Total non-ortho PCBs TEQ ならびに Total coplanar PCBs TEQ について、Lys アレルを有する非喫煙群と比較した場合、喫煙群は Lys アレルを有する群、Arg/Arg 型の群のどちらにおいても有意に低い値が得られた。ところが、受動喫煙群は Lys アレルを有する群の場合は影響がみられなかったのに対し、Arg/Arg 型の対象群の場合、Total non-ortho PCBs TEQ ならびに Total coplanar PCBs TEQ が有意に低い値となった。このことから、*AhR* R554K 多型と喫煙の血中 PCB TEQ 値複合影響については、非喫煙、喫煙だけではなく、受動喫煙も考慮する必要がある。受動喫煙と血中 PCB・ダイオキシン類濃度との関連についての報告はこれまでにないため、今後、さらなる解析が必要であると考えられる。

E. 結論

AhR R554K 多型と喫煙による血中 PCB TEQ 値への負の複合影響が明らかになった。また、この複合影響には、非喫煙、喫煙だけではなく、受動喫煙による影響も認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

参考文献

- 1) Cnattingius S (2004) The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob. Res.* 6: S125-S140.
- 2) Antilla S, Tuominen P, Hirvonen A, Nurminen M, Karjalainen A, Hankinson O and Elovaara E (2001) CYP1A1 levels in lung tissue of tobacco smokers and polymorphisms of CYP1A1 and aromatic hydrocarbon receptor. *Pharmacogenetics* 11: 501-509.
- 3) Harper PA, Wong JMY, Lam MSM and Okey AB (2002) Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem. Biol. Interact.* 141: 161-187.
- 4) Lin P, Hu SW and Chang TH (2003) Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (*AhR*), hydrocarbon receptor nuclear translocator (*Arnt*), cytochromes P4501A1 (*CYP1A1*) and 1B1 (*CYP1B1*), and inducibility of *CYP1A1* and *CYP1B1* in human lymphocytes. *Toxicol. Sci.* 71: 20-26.
- 5) Hu SW, Chen CC, Kuo CY and Lin P (2006) Increased cytochrome *P4501B1* gene expression in peripheral leukocytes of municipal waste incinerator workers. *Toxicol. Lett.* 160: 112-120.
- 6) Baccarelli A, Pesatori AC, Masten SA, Patterson Jr. DG, Needham LL, Mocarelli P, Caporaso NE, Consonni D, Grassman JA, Bertazzi PA and Landi MT (2004) Aryl-hydrocarbon receptor-dependent pathway and toxic effects of TCDD in humans: a population-based study in Seveso, Italy. *Toxicol. Lett.* 149: 287-293.
- 7) Choi AL, Levy JI, Dockery DW, Ryan LM, Tolbert PE, Altshul LM and Korrick SA (2006) Does living near a Superfund site contribute to higher polychlorinated biphenyl (PCB) exposure? *Environ. Health Perspect.* 114: 1092-1098.
- 8) lackmann GM, Angerer J and Tollner U (2000) Parental smoking and neonatal serum levels of polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene. *Pediatr. Res.* 47: 598-601.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表1 対象者の基本属性

Maternal characteristics	Maternal smoking status when pregnancy turns out			
	Non-Smoking (N = 80)	Passive-Smoking (N = 89)	Smoking (N = 94)	P-value
Maternal age, mean (SD), years	32.11 (4.39)	31.39 (5.17)	30.17 (4.76)	0.038
Maternal height, mean (SD), cm	158.99 (5.21)	158.26 (5.45)	158.62 (4.93)	0.560
Maternal weight before pregnancy, mean (SD), kg	53.16 (8.44)	53.25 (8.50)	54.67 (9.25)	0.387
Parity, n (%)				
0	39 (48.8)	38 (42.7)	51 (54.3)	
≥1	41 (51.2)	51 (57.3)	43 (45.7)	0.296
Kidney dysfunction n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Liver dysfunction n (%)	0 (0.0)	1 (1.1)	0 (0.0)	0.376
Diabetes n (%)	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (1.1)	0.593
Educational level, years (%)				
≤9	1 (1.3)	2 (2.2)	2 (2.1)	
10-12	19 (23.8)	34 (38.2)	44 (46.8)	
13-16	56 (70.0)	52 (58.4)	46 (48.9)	
≥17	4 (5.0)	1 (1.1)	2 (2.1)	0.004
Economic status; annual income (yen)				
< 3,000,000	7 (8.8)	16 (18.0)	21 (22.3)	
3,000,000 – 5,000,000	33 (41.3)	34 (38.2)	50 (53.2)	
5,000,000 – 7,000,000	24 (30.0)	23 (25.8)	18 (19.1)	
7,000,000 – 10,000,000	15 (18.8)	13 (14.6)	4 (4.2)	
> 10,000,000	1 (1.3)	3 (3.4)	1 (1.1)	0.001
Alcohol intake before pregnancy (SD), g/day	7.58 (11.88)	13.97 (39.08)	29.89 (85.41)	0.002
Alcohol intake during pregnancy (SD), g/day	1.37 (6.16)	1.21 (2.86)	0.57 (1.18)	0.421
Caffeine intake during pregnancy (SD), mg/day	117.49 (75.96)	129.78 (84.71)	164.87 (111.59)	0.005
Blood sampling period				
During pregnancy	57 (71.3)	69 (77.5)	74 (78.7)	
After delivery	23 (28.8)	20 (22.5)	20 (21.3)	0.477

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 2 対象者における遺伝子型の頻度

Maternal genotypes, n(%)	Maternal smoking status when pregnancy turns out			P-value
	Non-Smoking (N = 80)	Passive-Smoking (N = 89)	Smoking (N = 94)	
<i>AhR</i> R554K				
Arg/Arg	33 (41.3)	27 (30.3)	21 (22.3)	
Arg/Lys	32 (40.0)	48 (53.9)	46 (48.9)	
Lys/Lys	15 (18.8)	14 (15.7)	27 (28.7)	0.020
Arg/Lys + Lys/Lys	47 (58.8)	62 (69.7)	73 (77.7)	
<i>CYP1A1</i> I462V				
Ile/Ile	42 (52.5)	55 (61.8)	57 (60.6)	
Ile/Val	36 (45.0)	32 (36.0)	33 (35.1)	
Val/Val	2 (2.5)	2 (2.2)	4 (4.3)	0.462
Ile/Val + Val/Val	38 (47.5)	34 (38.2)	37 (39.4)	
<i>CYP1B1</i> L432V				
Leu/Leu	66 (82.5)	58 (65.2)	72 (76.6)	
Leu/Val	14 (17.5)	27 (30.3)	21 (22.3)	
Val/Val	0 (0.0)	4 (4.5)	1 (1.1)	0.022
Leu/Val + Val/Val	14 (17.5)	31 (34.8)	22 (23.4)	
<i>GSTM1</i>				
Present	37 (46.3)	44 (49.4)	45 (47.9)	
Null	43 (53.8)	45 (50.6)	49 (52.1)	0.918
<i>GSTT1</i>				
Present	47 (58.8)	55 (61.8)	50 (53.2)	
Null	33 (41.3)	34 (38.2)	44 (46.8)	0.490
<i>GSTP1</i> I105V				
Ile/Ile	55 (68.8)	68 (76.4)	66 (70.2)	
Ile/Val	22 (27.5)	21 (23.6)	28 (29.8)	
Val/Val	3 (3.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.436
Ile/Val + Val/Val	25 (31.3)	21 (23.6)	28 (29.8)	

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表3 喫煙、各遺伝子多型と PCDD/PCDF TEQ 値との関連

Total sample	No.	Total PCDDs TEQ (pg/g lipid)			Total PCDFs TEQ (pg/g lipid)			Total PCDDs/PCDFs TEQ (pg/g lipid)		
		β	t	p	β	t	p	β	t	p
Maternal smoking status during pregnancy										
Non-smoking	80	Ref.			Ref.			Ref.		
Passive-smoking	89	-0.047	-0.716	0.475	-0.030	-0.434	0.665	-0.043	-0.646	0.519
Smoking	94	-0.156	-2.303	0.022	-0.145	-2.041	0.042	-0.161	-2.352	0.019
<i>AhR</i>										
Arg/Lys + Lys/Lys	81	Ref.			Ref.			Ref.		
Arg/Arg	182	-0.086	-1.512	0.132	-0.103	-1.734	0.084	-0.097	-1.705	0.089
<i>CYP1A1</i> I462V										
Ile/Ile	154	Ref.			Ref.			Ref.		
Ile/Val + Val/Val	109	-0.014	-0.257	0.798	-0.069	-1.182	0.238	-0.031	-0.553	0.581
<i>CYP1B1</i> L432V										
Leu/Leu	154	Ref.			Ref.			Ref.		
Leu/Val + Val/Val	109	0.026	0.466	0.642	0.007	0.116	0.908	0.019	0.346	0.729
<i>GSTM1</i>										
Present	137	Ref.			Ref.			Ref.		
Null	126	-0.085	-1.549	0.123	-0.023	-0.404	0.686	-0.070	-1.262	0.208
<i>GSTT1</i>										
Present	152	Ref.			Ref.			Ref.		
Null	111	0.053	0.955	0.340	-0.057	-0.989	0.324	0.018	0.321	0.748
<i>GSTP1</i> I105V										
Ile/Ile	189	Ref.			Ref.			Ref.		
Ile/Val + Val/Val	74	-0.076	-1.365	0.173	-0.068	-1.173	0.242	-0.079	-1.409	0.160

Multile linear regression model

Adjusted for maternal age, height, weight before pregnancy, parity, educational level, and economic status.

表4 喫煙、各遺伝子多型と PCB TEQ 値との関連

Total sample	No.	Total non-ortho PCBs TEQ (pg/g lipid)			Total mono-ortho PCBs TEQ (pg/g lipid)			Total coplanar PCBs TEQ (pg/g lipid)			Total TEQ (pg/g lipid)		
		β	t	p	β	t	p	β	t	p	β	t	p
Maternal smoking status during pregnancy													
Non-smoking	80	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Passive-smoking	89	-0.075	-1.111	0.268	-0.014	-0.223	0.824	-0.059	-0.889	0.375	-0.047	-0.728	0.468
Smoking	94	-0.302	-4.304	0.000	-0.125	-1.897	0.059	-0.256	-3.742	0.000	-0.215	-3.197	0.002
<i>AhR</i>													
Arg/Lys + Lys/Lys	81	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Arg/Arg	182	0.154	2.581	0.010	0.152	2.811	0.005	0.160	2.765	0.006	0.130	2.294	0.023
<i>CYP1A1</i> I462V													
Ile/Ile	154	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Ile/Val + Val/Val	109	-0.026	-0.444	0.657	-0.015	-0.281	0.779	-0.027	-0.474	0.636	-0.034	-0.619	0.537
<i>CYP1B1</i> L432V													
Leu/Leu	196	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Leu/Val + Val/Val	109	-0.052	-0.877	0.381	-0.047	-0.874	0.383	-0.053	-0.921	0.358	-0.012	-0.214	0.830
<i>GSTM1</i>													
Present	137	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Null	126	-0.003	-0.055	0.957	-0.019	-0.356	0.722	-0.003	-0.059	0.953	-0.048	-0.861	0.390
<i>GSTT1</i>													
Present	152	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Null	111	-0.114	-1.945	0.053	-0.050	-0.942	0.347	-0.099	-1.749	0.081	-0.037	-0.666	0.506
<i>GSTP1</i> I105V													
Ile/Ile	189	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Ile/Val + Val/Val	74	0.012	0.205	0.838	-0.021	-0.397	0.691	-0.004	-0.071	0.943	-0.048	-0.853	0.394

Multile linear regression model

Adjusted for maternal age, height, weight before pregnancy, parity, educational level, and economic status.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表5 喫煙、各遺伝子多型の組わせと PCDD/PCDF TEQ 値との関連

Total sample	No.	Total PCDDs TEQ (pg/g lipid)			Total PCDFs TEQ (pg/g lipid)			Total PCDDs/PCDFs TEQ (pg/g lipid)			
		β	t	p	β	t	p	β	t	p	
<i>AhR</i>											
	Non-Smoking	47	Ref.		Ref.		Ref.				
Arg/Lys + Lys/Lys	Passive-Smoking	62	-0.035	-0.480	0.631	-0.016	-0.211	0.833	-0.034	-0.463	0.644
	Smoking	73	-0.133	-1.740	0.083	-0.092	-1.155	0.249	-0.129	-1.680	0.094
	Non-Smoking	33	-0.044	-0.650	0.516	-0.029	-0.405	0.686	-0.047	-0.687	0.493
Arg/Arg	Passive-Smoking	27	-0.092	-1.405	0.161	-0.067	-0.980	0.328	-0.087	-1.331	0.184
	Smoking	21	-0.168	-2.638	0.009	-0.201	-3.024	0.003	-0.191	-2.975	0.003

Multiple linear regression model

Adjusted for maternal age, height, weight before pregnancy, parity, educational level, and economic status.

表6 喫煙、各遺伝子多型の組わせと PCB TEQ 値との関連

Total sample	No.	Total non-ortho PCBs TEQ (pg/g lipid)			Total mono-ortho PCBs TEQ (pg/g lipid)			Total coplanar PCBs TEQ (pg/g lipid)			Total TEQ (pg/g lipid)			
		β	t	p	β	t	p	β	t	p	β	t	p	
<i>AhR</i>														
	Non-smoking	47	Ref.		Ref.		Ref.		Ref.					
Arg/Lys + Lys/Lys	Passive-Smoking	62	-0.018	-0.237	0.813	-0.011	-0.158	0.874	-0.021	-0.287	0.774	-0.028	-0.380	0.704
	Smoking	73	-0.217	-2.799	0.006	-0.097	-1.322	0.188	-0.192	-2.537	0.012	-0.171	-2.270	0.024
	Non-smoking	33	-0.026	-0.373	0.710	-0.079	-1.213	0.226	-0.051	-0.756	0.450	-0.054	-0.816	0.415
Arg/Arg	Passive-Smoking	27	-0.154	-2.320	0.021	-0.103	-1.649	0.100	-0.145	-2.242	0.026	-0.116	-1.809	0.072
	Smoking	21	-0.322	-4.982	0.000	-0.209	-3.428	0.001	-0.296	-4.689	0.000	-0.248	-3.953	0.000

Multiple linear regression model

Adjusted for maternal age, height, weight before pregnancy, parity, educational level, and economic status.

妊婦の血清葉酸値が児の体重に及ぼす影響

主任研究者

水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野教授

共同研究者

岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授

佐田 文宏 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野助教授

吉岡 英治 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野助手

坂 晋 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

金澤 文子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

鷺野 考揚 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

小西 香苗 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

鈴木 佳奈 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

東 倫子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

松澤 重行 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

研究要旨

これまでの研究により葉酸欠乏状態は神経管閉鎖不全などの先天奇形や、子宮内発育遅延を引き起こすことが知られている。しかし、日本人女性における、母体血中葉酸値と出生時体重における関連はほとんど知られていない。

本研究では、北海道における妊婦の妊娠初期の血清葉酸値が新生児の体格に及ぼす影響に関して検討を行った。

本研究は、北海道大学、札幌医科大学、旭川医科大学と各大学の関連病院（計 39 病院）に通院する妊婦を対象とする“環境と子どもの健康に関する北海道スタディ”参加者のうち、平成 15 年 11 月から平成 16 年 12 月までの葉酸サプリメントを摂取していない単胎児を出産した 3295 人を対象とした。

全妊婦の血清葉酸値を 4 分位にわけ、全妊婦の血清葉酸値の平均である 7.3ng/ml を含む群を基準とし、重回帰分析を行ったところ、血清葉酸値 5.6ng/ml 以下の群で児の出生時体重との関連がみられた（ $\beta = -0.062, p = 0.004$ ）。在胎週数、児性別、出産歴、母親の妊娠前 BMI、出産時年齢、母親の教育歴、母親の妊娠初期喫煙状況を調整してもなお、血清葉酸値 5.7ng/ml 以下の群で児の出生時体重と有意な関連がみられた（ $\beta = -0.042, p = 0.02$ ）。

A. 研究目的

近年、欧米を中心とした疫学調査によって妊娠前から妊娠初期の葉酸の十分な摂取が神経管欠損症（NTD）やその他の先天異常（先天性心疾患）に対しての予防効果が

報告されたことや、葉酸欠乏状態は早産や低出生体重になるリスクが上昇することが報告されている。ICBDMS（国際先天異常監視機構）によると、わが国の二分脊椎の発症率が増加傾向にあることが報告された

ことや、今後、わが国の食生活の多様化により、食物摂取の個人格差が大きくなり、葉酸摂取不足が拡大する可能性があることから、日本においても妊娠可能な女性に対して葉酸摂取の必要性を認識させることは重要な検討課題と考えられる。本研究では、北海道における妊婦の妊娠初期の血清葉酸値が新生児の体重に及ぼす影響に関して検討を行った。

B. 研究方法

本研究は、北海道大学、札幌医科大学、旭川医科大学と各大学の関連病院（計 39 病院）に通院する妊婦を対象とする“環境と子どもの健康に関する北海道スタディ”参加者のうち、平成 15 年 11 月から平成 16 年 12 月までに、血液検体が溶血していた者（57 人）、先天異常を持つ児を出産した者（96 人）、内分泌障害の既往歴がある者（42 人）、データ不足の者（426 人）、葉酸代謝にかかわるサプリメントを服用している者（466 人）を除外し最終的に 3295 人を解析対象とした。

妊婦の血清葉酸値測定は妊娠初期（13 週未満）の血清 800 μ l を用いて、化学発光免疫測定法（CLIA 法）で測定した（株）エスアールエル）。

妊娠初期（13 週未満）に自記式質問票により質問紙調査を行った。質問項目は、妊婦の基本的属性（出産時年齢、妊娠前身長、妊娠前体重、教育歴、世帯収入、既往歴、出産歴、葉酸サプリメントの摂取、妊娠初期の喫煙習慣）である。児の属性（新生児性別、在胎週数、出産時体重、奇形の有無）については、出産時に医療機関で記載された新生児個票から情報を得た。

妊娠初期の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響を検討するために、児の出生

時体重を従属変数とし、在胎週数、児性別、出産時年齢、母親の教育歴、出産歴、妊娠前 BMI、妊娠初期喫煙状況、血清葉酸値（4 分位にわけたもの）を独立変数とし、変数固定法で重回帰分析を行った。統計解析には The Statistical Package for Social Science (SPSS) for Windows ver. 12.0 (SPSS Inc.) を用いて行い、有意水準はいずれも $p < 0.05$ とした。

（倫理面への配慮）

本研究は、研究協力機関または代表研究機関の倫理委員会において承認のうえ実施している。インフォームドコンセントは「疫学研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行っている。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮し、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払っている。

C. 研究結果

（1）対象者の基本的属性（table 1）

対象妊婦の血清葉酸値の中央値は 6.8ng/ml であった。低出生体重児（出生時体重が 2500g 未満）は 196 人（5.9%）であった。

（2）妊娠初期の血清葉酸値が児の出生時体重に及ぼす影響（table 2）

全妊婦の血清葉酸値を 4 分位にわけ、全妊婦の血清葉酸値の平均である 7.3ng/ml を含む群を基準とし、重回帰分析を行ったところ、血清葉酸値 5.6ng/ml 以下の群で児の出生時体重との関連がみられた（ $\beta = -0.062, p = 0.004$ ）。在胎週数、児性別、出産歴、母親の妊娠前 BMI、出産時年齢、母親の教育歴、母親の妊娠初期喫煙状況を調整

してもなお、血清葉酸値 5.7ng/ml 以下の群で児の出生時体重と有意な関連がみられた ($\beta = -0.042$, $p = 0.02$)。

D. 考察

1. 日本人妊婦の血清葉酸値レベルについて

全妊婦の血清葉酸値の平均値は 7.2ng/ml であった。ほとんどの妊婦の血清葉酸値は、基準参考値である 3.6-12.9ng/ml 内に分布していた。欧米と比較して神経管欠損の発生率が低い本邦では、葉酸摂取にあまり関心が向けられてこなかったためか、妊婦はもとより、成人女性を対象とした血清葉酸値についての分析報告は少ない。近藤らによると、18 歳以上の女性 194 人を対象に、CLIA 法で血清葉酸値を測定したところ、平均値は 8.1ng/ml であった。このうち、17 人が妊婦で、血清葉酸値の平均値は 11.9ng/ml であった。葉酸サプリメント服用者を除外した結果であるが、本研究の対象者の平均値に比べるとかなり高い値であった(1)。これは、対象者が看護婦や二分脊椎症患者を含めた不均一の集団であることと、サンプル数が小さいことが原因だと考えられる。また、高村らによると、子供を持つ日本人女性 60 例の血清葉酸値の平均値は 9.1 ng/ml であり、本研究の対象者の平均値よりも高かった(2)。これは、対象者の平均年齢は 42.9 才と本研究の対象者に比べ年齢が高く、食事を含めた生活習慣の違いによる可能性が考えられる。

本研究では、葉酸サプリメントの服用者は 9.1%にすぎず、服用開始時期は、妊娠がわかってから服用した者 63.5%、葉酸サプリメントの服用をはじめたのは平均妊娠 2.3 週からであった。一方、妊娠前から服用していると答えた妊婦は、平均妊娠前 4.6

ヶ月から服用していた。2002 年から母子健康手帳の改正により葉酸摂取について記載されていること、葉酸を含むサプリメントが入手しやすい環境にあることなどから、我が国の妊娠可能な女性への葉酸摂取の重要性を、いっそう周知させる必要があると考えられる。

2. 妊婦の妊娠初期の血清葉酸値と児の出生時体重との関連

妊婦の血清葉酸値を 4 分位に分け、6.9-8.3 ng/ml の群を基準として解析を行ったところ、血清葉酸値が 5.6ng/ml 以下の群において、出生時体重との間に有意な負の関連がみられた。

出産時の妊婦の血清葉酸値と児の出生時体重との間に有意な関連がみられることが報告されている(3,4)。また、血清葉酸値よりも長期的な指標とされる、妊娠初期の妊婦の赤血球葉酸濃度と児の出生時体重に有意な関連がみられたとする報告がある(5)。妊婦の妊娠初期の血清葉酸値と児の出生時体重との関連を検討している研究は少なく、Weerd らによれば、妊娠 10-16 週の妊婦の血清葉酸値と児の出生時体重には有意な関連は見られなかった(6)。

血清葉酸値は短期間の食事摂取状況に影響されるため、出生時体重への影響を検討するためには、妊娠初期の血清葉酸値だけではなく、胎児が最も成長する時期である妊娠後期の血清葉酸値の評価、もしくは長期的な指標である赤血球葉酸値の評価が必要であると考えられる。

3. 本研究の限界と課題

本研究では、妊婦の妊娠後期の血清葉酸値、長期的指標である赤血球葉酸値のデータを取っていなかったため、胎児の発育と

葉酸の役割を十分に明らかにすることができなかつた。妊娠週数がすすむにつれて、妊婦の血清葉酸値は低下することが報告されているので(7)、児の出生時体重に及ぼす影響を検討するためには、妊娠初期の血清葉酸値のみでは不十分であると考えられる。今後は赤血球葉酸値との胎児発育の関連をより詳細に検討することにより、子宮内発育遅延の予防の一端を担うことができると考えられる。

血清葉酸値は短期の食生活に影響されるが、妊婦の詳細な食事調査は実施していず、葉酸摂取量は正確に把握できなかつたため、経口摂取量との関連を検討することはできなかつた。葉酸の栄養摂取量の基準は、2000年に公表された5訂日本食品標準成分表により、食事調査から把握することができるので、今後、葉酸サプリメントの服用状況に基づき、経口摂取量との関連を検討していくことが可能であると考えられる。

さらに、臍帯血の血清葉酸値を測定していないことがあげられる。Lindblad らによれば、通常、母体血の血清葉酸値が高いと、児の血清葉酸値も高くなるが、子宮内発育遅延の児ではこのような関連はみられなかつた(5)。従って、妊婦の葉酸値に加えて、臍帯血の葉酸値を検討することにより、胎盤を通して葉酸が胎児に与える影響を、より詳細に検討することができると考えられる。

E. 結論

前向きコホート研究に参加した北海道の妊婦を対象に、妊婦の血清葉酸値と児の出生時体重との関連を検討した結果、葉酸値が5.7ng/ml以下であると、児の出生時体重に有意な負の関連がみられた。本邦においても妊娠中のみならず、妊娠を計画してい

る女性に対しては妊娠前からの適切な健康管理の重要性を周知させることが必要である。妊娠中の妊婦の健康と胎児の健やかな発育のためには、栄養バランスのとれた食生活や葉酸摂取の意義について、情報提供していくことが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし（準備中）

2. 学会発表

- (1) 松澤重行, 鈴木佳奈, 坂晋, 東倫子, 鷺野考揚, 小西香苗, 金澤文子, 佐田文宏, 岸玲子. 前向きコホート研究による先天異常モニタリングとそのリスク要因の解明 ～その1 マーカー奇形の発生率. 第 65 回日本公衆衛生学会総会, 富山, 平成 18 年 10 月.
- (2) 東倫子, 鈴木佳奈, 鷺野考揚, 松澤重行, 小西香苗, 金澤文子, 坂晋, 佐田文宏, 岸玲子. 環境と子どもの健康に関する北海道 study : その 2 妊婦の葉酸サプリメント摂取状況による児への影響. 第 65 回日本公衆衛生学会総会, 富山, 平成 18 年 10 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

[参考文献]

1. Takamura N, Kondoh T, Ohgi S, Arisawa K, Mine M, Yamashita S, Aoyagi K. Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in Japan. *Eur J Nutr.* 2004 ; 43(5):285-7. Epub 2004 Jan 6.
2. Ozerol E, Ozerol I, Gokdeniz R, Temel I, Akyol O. Effect of smoking on serum concentrations of total homocysteine, folate, vitamin B12, and nitric oxide in pregnancy: a preliminary study. *Fetal Diagn Ther.* 2004 ; 19(2):145-8.
3. Ek J. Plasma and red cell folate in mothers and infants in normal pregnancies. Relation to birth weight. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1982 ; 61(1):17-20.
4. Relton CL, Pearce MS, Parker L. The influence of erythrocyte folate and serum vitamin B12 status on birth weight. *Br J Nutr.* 2005 May;93(5):593-9.
5. Lindblad B, Zaman S, Malik A, Martin H, Ekstrom AM, Amu S, Holmgren A, Norman M. Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in South Asian women with growth-retarded fetuses. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005 ; 84(11):1055-61.
6. Ronnenberg AG, Goldman MB, Chen D, Aitken IW, Willett WC, Selhub J, Xu X. Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. *Am J Clin Nutr.* 2002 ; 76(6):1385-91.
7. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med.* 1992 ; 327(26):1832-5