

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

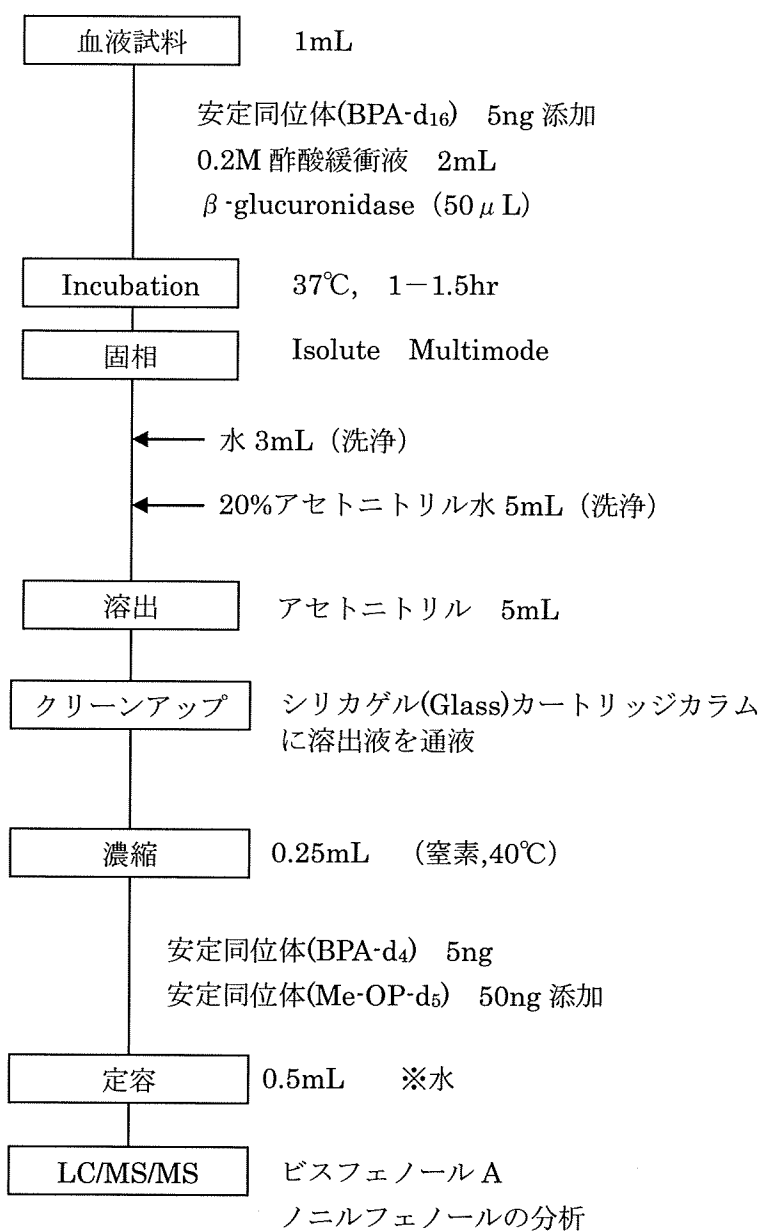


図 1. 血液中の BPA、NP の分析フロー

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. ビスフェノールA及び4-ノニルフェノールのLC/MS/MSを用いた測定条件

【BPAの測定条件】		
測定装置	LC	Agilent-1100
	MS	API-4000
分析カラム		Agilent Eclipse XDB-C8 2.1×150mm, 5 μm
溶離液	A	水
	B	アセトニトリル
グラジエント(B)		20%(0min) → 20%(1min) → 100%(17min) → 100%(23min) → 20%(23.1min) → 20%(31min)
注入量		20 μL
カラム温度		40°C
モード		ESI-Negative
m/z		226.9 > 132.9 (BPA)
		241.0 > 142.0 (BPA-d16)
		231.0 > 94.9 (BPA-d4)
【NPの測定条件】		
測定装置	LC	Agilent-1100
	MS	API-4000
分析カラム		Agilent Eclipse XDB-C8 2.1×150mm, 5 μm
溶離液	A	水
	B	アセトニトリル
グラジエント(B)		50%(0min) → 100%(17min) → 100%(22min) → 50%(22.1min) → 50%(30min)
注入量		20 μL
カラム温度		40°C
モード		ESI-Negative
m/z		219.0 > 132.9 (NP)
		224.0 > 122.5 (Me-OP-d5)

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. 血液中の BPA、NP の添加回収試験結果

物質名	操作ブランク (ng/mL)	試料 1		試料 2	
		無添加 (ng/mL)	添加 (ng/mL)	無添加 (ng/mL)	添加 (ng/mL)
BPA	0.06	0.16	0.69	0.14	0.70
NP	6.4	3.6	35	2.9	32

備考 1) 添加量…BPA : 0.5ng、NP : 30ng

備考 2) NP は内標準物質による補正なし

表 3. 標準溶液繰り返し測定による IDL の算出

項 目	BPA (ng/mL)	NP (ng/mL)
試料 1	0.102	1.33
試料 2	0.0959	1.34
試料 3	0.105	1.67
試料 4	0.106	1.50
試料 5	0.116	1.59
試料 6	0.105	1.48
試料 7	0.0897	1.45
平 均	0.103	1.48
標準偏差	0.00838	0.123
IDL	0.0326	0.477
IDL 試料換算値	0.0163	0.239

備考 1) $IDL = (\text{標準偏差}) \times t \text{ 値} \times 2$ 、 $t=1.943$

備考 2) IDL 試料換算値は試料量 1mL、最終液量 0.5mL として計算した

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 4. 操作ブランクの繰り返し測定による下限値の算出

項 目	BPA (ng/mL)	NP (ng/mL)
試料 1	0.0709	1.43
試料 2	0.0764	2.15
試料 3	0.0821	3.32
試料 4	0.0762	1.19
試料 5	0.0509	1.79
試料 6	0.0791	1.09
試料 7	0.0926	1.24
平均	0.0754	1.74
標準偏差	0.0128	0.789
検出下限値	0.0497	3.07
定量下限値	0.128	7.90

備考 1) 検出下限値 = (標準偏差) × t 値 × 2、t=1.943

備考 2) 定量下限値 = (標準偏差) × 10

表 5. 検討試料の BPA、NP の分析結果

試料名	BPA (ng/mL)	NP (ng/mL)
操作ブランク 1	0.085	2.7
操作ブランク 2	0.114	2.3
採血管ブランク (緑)	0.049	2.9
採血管ブランク (茶)	0.050	1.9
試料 1	0.211	2.8
試料 2	0.119	5.1
試料 3	0.107	3.3
試料 4	0.090	5.0
試料 5	0.810	2.5
試料 6	0.240	3.8
試料 7	0.678	2.7
試料 8	0.167	2.2
試料 9	0.545	3.1
試料 10	0.173	2.7

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 6. NP の溶媒ブランク

溶媒の種類	試料 1	試料 2	試料 3	平均
メタノール(HPLC 用)	0.24	0.23	0.17	0.21
アセトニトリル(HPLC 用)	0.24	0.31	0.22	0.26
アセトニトリル(HPLC 用)	0.17	—	—	0.17
アセトニトリル(LC/MS 用)	0.19	—	—	0.19
アセトン (残農 300)	0.19	0.18	—	0.18
ジクロロメタン(残農 5000)	5.00	5.28	—	5.14
クロロホルム	6.95	7.39	—	7.17
ヘキサン (残農 5000)	3.80	4.12	—	3.96
ヘキサン (ダイオキシン用)	4.43	4.73	—	4.58
ヘキサン (フタル酸エステル用)	4.11	4.29	—	4.20
トルエン (残農 5000)	24.85	—	—	24.85
トルエン (試薬特級を蒸留)	20.40	—	—	20.40

表 7. NP のブランクに関する検討

検討項目	試料 1 (ng/mL)	試料 2 (ng/mL)	試料 3 (ng/mL)	平均 (ng/mL)
① アセトニトリル	1.21	0.90	1.00	1.04
② カートリッジ	0.91	0.88	0.94	0.91
③ 水(Front)	1.07	0.90	1.02	0.99
④ 水(Back)	1.01	1.03	1.02	1.02

① アセトニトリル：アセトニトリルを濃縮したもの

② カートリッジ：カートリッジを通液したアセトニトリルを濃縮したもの

③ 水 10mL を用いた後、アセトニトリルで溶出、濃縮を行ったもの

※ 評価は内標として Me-OP-d5 を添加し、内標準法を用いて計算した。

※ 結果は、試料 1mL を使用して前処理を行ったときにそれぞれの操作で含まれる NP の量を試料換算したもので評価を行った。

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 8. 固相抽出用カートリッジ(M-M)からのBPA、NPの溶出

物質名	0～1mL (%)	1～2mL	2～3mL	3～4mL	4～5mL	Total
BPA	24.3	74.0	1.7	0	—	100
NP	6.1	89.0	3.7	0.7	0.5	100

※ 5分画の合計を100%とした

表 9. 濃縮率によるBPAの感度低下

	標準液	Blank	血液	Blank (0.2mL)	血液 (0.2mL)
BPA-d4のArea	100	79.4	61.1	72.2	42.3

※ 評価は内標準物質 BPA-d4 を用い、標準液中の BPA-d4 の Area を 100(%) とし、各試料の BPA-d4 の Area と比較した。

妊婦の妊娠初期葉酸値の経年変化および喫煙の影響
(First trimester serum folate status of Japanese women in Hokkaido)

研究代表者 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
研究分担者 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 助教

研究要旨

The first trimester serum folate status of Japanese women was evaluated with demographic and lifestyles factors that determine folate levels.

Results showed that one-third of the population had low folate status and that the highest mean folate levels were found among periconceptional folate supplements users. Major determinants of serum folate status identified were maternal age, use of periconceptional folate supplements, and active or passive cigarette smoking.

Two thirds of the study participants had adequate folate status and that folate supplement use is the single most important positive determinant of folate status while cigarette smoking is a negative predictor of folate status.

研究協力者

Yila Thamar、佐々木 成子、坂 晋、
金澤 文子、鷺野 考揚、小西 香苗、
馬場 俊明、宮下 ちひろ、Brimoh
Titilola、檜野 いく子、岡田 恵美
子、小林 澄貴、大竹 裕子、Mariko
Limpar
(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)

supplement use in the prevention of neural tube defects (NTDs) and other adverse pregnancy outcomes has been well documented.¹ Health policy regarding folate supplement use has been adopted by various countries including Japan.

However, a number of investigations relating to folate intake and status in pregnant Japanese women has yielded inconsistent findings partly due to inadequate study power^{2, 3, 4}

This study was aimed at determining the first trimester folate status and identifying the demographic and lifestyle determinants of folate status.

A. 研究目的

Folate, a cofactor in one carbon metabolism, is very essential in all cellular processes. Folate is widely available in regular diets but is highly heat labile and several other factors interfere with its absorption. Therefore, deficiency is very common, mainly due to inadequate dietary intake, defective absorption, abnormal metabolism or increased requirements as in pregnancy.

The proven efficacy of folate

B. 研究方法

4487 mothers (529 folate supplement users and 3958 nonusers) from the ongoing prospective cohort of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health

were examined. Data collected by means of self-reported questionnaires and hospital records. Maternal blood samples were collected during the first trimester for serum folate concentration measurements, and this was quantified using the chemiluminescence method (SRL Corporation). Briefly, serum obtained from non-EDTA containing whole blood was collected from respondents and assayed for folate levels. The assay method used was the Automated competitive protein binding (CPB) chemiluminescence assay technique. Specific technique was Advia Centaur which operates on the principle of acridinium ester-labelled folate and a biotin-labelled folate binding protein, with a calibration curve to determine the concentrations. The method specific reference range is between 3.6-12.9ng/ml. Cut-off points for this research were the cut-off points established by the manufacturers of folate immunoassay kits DPC, Los Angeles, CA, USA. Below 3.6 ng/ml is considered by the USA, Canada and Japan as critical for supplementation.

Values <3.0ng/ml were defined as deficient levels, 3.0-6.0ng/ml as low levels and >6.0ng/ml as normal levels. Folate levels >30.0ng/ml were excluded due to possible hemolysis of initial specimens. Other cases excluded were those on medications or with medical conditions that independently interfere with folate levels.

Periconceptional folate supplement use was defined as “any report of the use of folate (vitamin B9) supplement

or other B-vitamins before or after conception,” and maternal smoking status during pregnancy was defined as “those who continue to smoke after conception.”

Statistical tests used included Chi square tests for categorical variables, non parametric Kruskal- Wallis test and ANOVA to compare means. Multivariable linear regression analysis with adjustment for potential confounders such as maternal age, parity, maternal educational level, annual income, alcohol intake before pregnancy, other types of supplements and cigarette smoking was performed. Data analyses was performed using SPSS version 16.0 for Windows. *p* value <0.05 was considered statistically significant.

(倫理面への配慮)

This study was conducted with the informed consent of all subjects. The study protocol was approved by the institutional ethical board for human gene and genome studies of the Hokkaido University Graduate School of Medicine.

C. 研究結果

In this population, overall mean serum folate was 7.69 ± 3.1 ng/ml. The median (min-max) folate level was 7.0 (2.7-30.0 ng/ml) (Figure1). Folate deficiency (<3.0ng/ml) accounted for 0.4%, low folate status (3.0- 6.0ng/ml) was 30.4% while normal folate status (>6.0ng/ml) comprised 69.2% of the population. Maternal age, educational level, annual income, alcohol intake, cigarette smoking and folate

supplement use were strongly associated with folate status (Table 1).

Univariate analysis further identified the above mentioned factors as strongly related to folate status. Post-hoc tests further revealed higher maternal age ($p = 0.002$), higher educational level ($p < 0.0005$), and higher income ($p < 0.001$) as favourable determinants of folate status. Folate supplement use and alcohol intake also favoured folate status. Only cigarette smoking ($p < 0.0005$) proved to be detrimental to folate status (Table 2 a).

Further analyses using a multivariable regression model identified folate supplement use [Beta (95%CI)] = [0.213 (1.53, 2.68)] and higher maternal age [Beta (95%CI)] = [0.041 (0.07,-0.65)] as major positive predictors of folate status while active smoking in pregnancy [Beta (95%CI)] = [- 0.066 (-1.14,-0.35)] and exposure to environmental tobacco smoke at home [Beta (95%CI)] = [- 0.072 (- 0.70, -0.26)] as negatively associated with folate status (Table 2 b).

Overall prevalence of folate supplement use was 12.0% with an increase in the yearly incidences (6.7%, 10.3%, 15.0% and 16.5% in 2003, 2004, 2005 and 2006 respectively) (Figure2). Among periconceptional folate supplement users (N = 529), mean serum folate was 11.3 ± 3.1 ng/ml with a median (min-max) of 10.8 (3.5-30.0). Among non-users (N = 4441), mean serum folate was 7.1 ± 2.4 with a median (min-max) of 6.8 (2.7-27.0).

D. 考察

In this study, the majority of pregnant women in Hokkaido had normal folate status (69.2%), while about one-third had low folate status. In contrast, Matsuzaki et al (2008) reported a high prevalence of low folate status (79.3%) in pregnant women in Tokyo, in a cross-sectional study³. Various factors could explain this disparity, one of which is the research methods. To reduce systematic bias in this study, efforts were made to exclude those with concurrent medical conditions and on certain drugs known to interfere directly with folate status. Such conditions include inflammatory bowel diseases, epilepsy, diabetes, hypertension, systemic lupus erythematosus and drugs like anticonvulsants, antimicrobials and chemotherapeutics.

Major demographic and lifestyle factors that positively predicted folate status were higher maternal age and folate supplement usage, while cigarette smoking and passive exposure to cigarette smoke ranked the highest in predicting a negative effect on folate status. Other investigators have reported that older women are more likely to take supplements than younger women, and this may explain the link with higher folate status.^{5, 6} The inverse association between cigarette smoking and folate status has been reported in several other studies^{7,8}.

In this study, serum folate status was most impaired among non-folate supplement users. This is biologically plausible since exogenous folate is

known to increase serum folate levels.¹ The prevalence of periconceptional folate usage was 12.0%. This agrees with the findings reported by two other investigators, 12.0% and 11.8% respectively.³

One other major determining factor that was not considered is polymorphisms in the genes coding for folate metabolizing enzymes. This will be accounted for in future research plans.

E. 結論

Two thirds of the study participants had adequate folate status and folate supplement use was the single most important positive determinant of folate status. Health care providers should emphasize the importance of its use in pregnancy.

F. 研究発表

1.論文発表

None

2.学会発表

1. Thamar Ayo Yila, Seiko Sasaki, Toshiaki Baba, Chichiro Miyashita, Titilola Serifat Braimoh, Ikuko Kashino, Sumitaka Kobayashi, Emiko Okada, Yuko Otake, Mariko Limpar, Eiji Yoshioka, Reiko Kishi: Effects of maternal smoking and 5, 10-MTHFR C677T polymorphism on infant's birthweight – the impact of folate supplementation – (Proceedings of The 3rd Annual Conference on Genomics of Common Diseases, 23rd – 26th Sept. 2009, Cambridge, UK.)

G. 知的財産権の出願・登録状況

None

参考文献

1. Charles DHM, Ness AR, Campbell D, Smith DG, Whitley E, Hall MH: Folate supplements in pregnancy and birth outcome: re-analysis of a large randomised controlled trial and update of Cochrane Review. Paediatric and Perinatal Epidemiology 2005, 19, 112–124.
2. Mito N, Takimoto H, Umegaki K, Ishiwaki A, Kusama K, Fukuoka H, Ohta S, Abe S, Yamawaki M, Ishida H, Yoshiike N: Folate intakes and folate biomarker profiles of pregnant Japanese women in the first trimester. European Journal of clinical nutrition (2007) 61, 83 -90..
3. Matsuzaki M, Haruna M, Ota E, Satoshi S, Yasushi N, Murashima S: Dietary folate intake, use of folate supplements, lifestyle factors, and serum folate levels among pregnant women in Tokyo, Japan. J.Obstet.Gynaecol. Res. Vol. 34, No. 6: 971 -979, December 2008.
4. Ihara H, Watanabe T, Aoki Y, Nagamura Y, Totani M, Hashizume N: Dietary folate intake and serum folate status in Japanese women of childbearing age. Journal of Analytical Bio-Science Vol. 32, No. 2 (2009).
5. Rasmussen LB, Ovesen L, Bülow I, Knudsen N, Laurberg P, Perrild H: Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in younger and older women1–3. Am J Clin Nutr 2000; 72:1156–63.
6. Kirk SFL, Cade JE, Barrett JH, Conner M: Diet and lifestyle

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

- characteristics associated with dietary supplement use in women. *Public Health Nutr* 1999; 2: 69–73.
7. McDonald SD, Perkins SL, Jodouin CA, MLT, Walker MC: Folate levels in pregnant women who smoke: An important gene/environment interaction. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 620-625.
8. Hobbs CA, James JS, Jernigan S, BS, Stepan Melnyk, Lu Y, MS, Malik S, Cleves MA: Congenital heart defects, maternal homocysteine, smoking, and the 677C>T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: Evaluating gene-environment interactions. *Am J Obstet Gynecol* 2006:194, 218-224.

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

Table 1: Characteristics of participants by maternal serum folate status during pregnancy

Characteristics	Maternal serum folate			<i>p</i> value
	< 3.0(ng/ml) n = 16 (0.4%)	3.0 – 6.0(ng/ml) n = 1366 (30.4%)	>6.0(ng/ml) N = 3105 (69.2%)	
	Mean (SD)	Mean (SD)		
Maternal age (years)	27.0 (8.7)	27.8 (8.0)	28.4 (8.6)	0.001§
Gestational age at booking (weeks)	10.1(3.8)	10.6 (8.0)	10.4 (4.8)	0.122§
Maternal BMI (kg/m ²)	20.5 (7.0)	21.5 (8.0)	21.4 (7.8)	0.649§
Infant head circumference (cm)	32.9 (1.4)	32.8 (3.8)	32.8 (3.8)	0.065§
Infant chest circumference (cm)	31.4 (1.9)	31.5 (3.8)	31.5 (4.2)	0.028§
Infant Birthlength (cm)	48.8 (2.5)	48.8 (4.0)	48.8 (4.3)	0.098
Birth weight (g)	2920.5 (414.3)	3038.9 (447.3)	3065.3 (430.5)	0.005§
	N (%)	N (%)		
Infant gender				
Male	12 (75.0)	653 (47.8)	1532 (49.0)	0.162†
Female	4 (25.0)	701 (51.0)	1535 (51.3)	
Parity				
0	7 (43.7)	648 (47.4)	1473 (47.4)	0.505†
≥1	8 (50.0)	702(51.3)	1593 (51.3)	
Educational level (years)				
<10	2 (12.5)	60 (4.3)	100 (3.2)	0.001†
10- < 13	10 (62.5)	680 (49.7)	1329 (42.8)	
13- < 17	4 (25.0)	495 (86.0)	1320(42.5)	
≥ 17	0 (0)	118 (8.6)	330 (10.6)	
Annual income (million yen)				
< 3	8 (50.0)	451 (33.0)	29 (23.0)	0.028†
3- < 5	8 (50.0)	834 (61.0)	1894 (61.0)	
≥ 5	0(0)	70(5.1)	947 (30.5)	
Alcohol intake before pregnancy				
No	9 (56.3)	586 (42.8)	1106 (35.6)	0.0001†
Yes	7 (43.7)	768 (56.2)	1971 (63.4)	
Periconceptional folate supplement use				
Non-user	16 (100.0)	1303 (95.3)	2593 (85.0)	0.0001†
User	0 (0)	54 (3.9)	475 (15.0)	
Smoking during pregnancy				
Non smoker	7 (43.7)	894 (65.4)	2370 (76.3)	<0.0001†
Quitter	2 (12.5)	236 (17.2)	403(12.9)	
Smoker	7(43.7)	236 (17.2)	332 (10.6)	

§Kruskal- Wallis test, †χ²-test In some variables, values may not add up to 100% due to non- response.

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

Table 2a: Variances in serum folate levels according to known demographic determinants.

Factor	N (%)	Serum folate status Mean ±SD	F	Post Hoc Test ^a	Eta Squared
Periconceptional Folate supplement ^b use					
No	3912 (88.0)	7.2 (2.4)	973.087***	-	0.18 [#]
Yes	529 (12.0)	11.3 (5.1)			
Alcohol intake before pregnancy ^b					
No	1701 (38.3)	7.5 (3.1)	4.157**	-	0.0009
Yes	2746 (61.7)	7.7 (3.1)			
Cigarette smoking during pregnancy ^b					
No	3912 (87.2)	7.8 (3.2)	49.501***	-	0.01
Yes	575 (12.8)	6.7 (2.6)			
Maternal age (yrs) ^c					
≤19	25 (0.6)	5.9 (1.3)	9.244***	0.002	0.004
20-35	3707 (88.1)	7.6 (3.1)		0.003	
>35	477 (11.3)	8.1 (3.5)			
Educational attainment (yrs) ^c					
<10	162 (3.6)	6.9 (2.6)	20.298***	0.0005	0.00001
10 - <13	2064 (46.4)	7.4 (3.0)		0.0005	
13 - <17	1819 (40.9)	7.8 (3.1)		0.0005	
>17	403 (9.1)	8.5 (3.9)			
Annual income (million yen) ^c					
<3	488 (11.5)	7.2 (2.8)	13.334***	0.001	0.007
3 - <5	2736(64.5)	7.6 (3.2)		0.010	
≥ 5	1017 (24.0)	8.0 (3.3)			

^bt-test, ^cANOVA ^aTukey HSD [#]large effect size ***P < 0.0005 **P < 0.05

Table 2b: Demographic and lifestyle factors that predict serum folate levels.

Characteristic	N (%)	Standardized coefficients (Beta)	95% CI
Periconceptional folate supplement use			
No	3912 (88.0)	reference	-
Yes	529 (12.0)	0.213	1.53, 2.68***
Alcohol intake before pregnancy			
No	1701 (38.3)	reference	-
Yes	2746 (61.7)	0.030	- 0.02, 0.43*
Cigarette smoking during pregnancy			
Non Smoker	3271 (73.0)	reference	-
Quitter	641 (14.2)	- 0.047	- 0.58, - 0.08***
Smoker	575 (12.8)	- 0.066	- 1.14, - 0.35***
ETS exposure at home ^a			
No	1510 (34.0)	reference	-
Yes	2977 (66.0)	-0.072	- 0.70, - 0.26***
Maternal age (yrs)			
≤19	25 (0.6)	- 0.018	- 2.14, 0.63
20-35	3707 (88.1)	reference	-
>35	477 (11.3)	0.041	0.07, - 0.65**
Annual income (million yen)			
<3	488 (11.5)	-1.453	-0.30, 0.02*
3 - <5	2736 (64.5)	reference	-
≥ 5	1017 (24.0)	1.457	-0.02, 0.20*

Multivariable linear regression model. ***P < 0.0005 **P < 0.05 *P < 0.1 . R square = 0.22.

Adjusted for folate supplement use, Other types of supplements use, alcohol intake, cigarette smoking, ETS exposure, maternal age, educational level and annual income.

ETS^a = Environmental tobacco smoke.

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

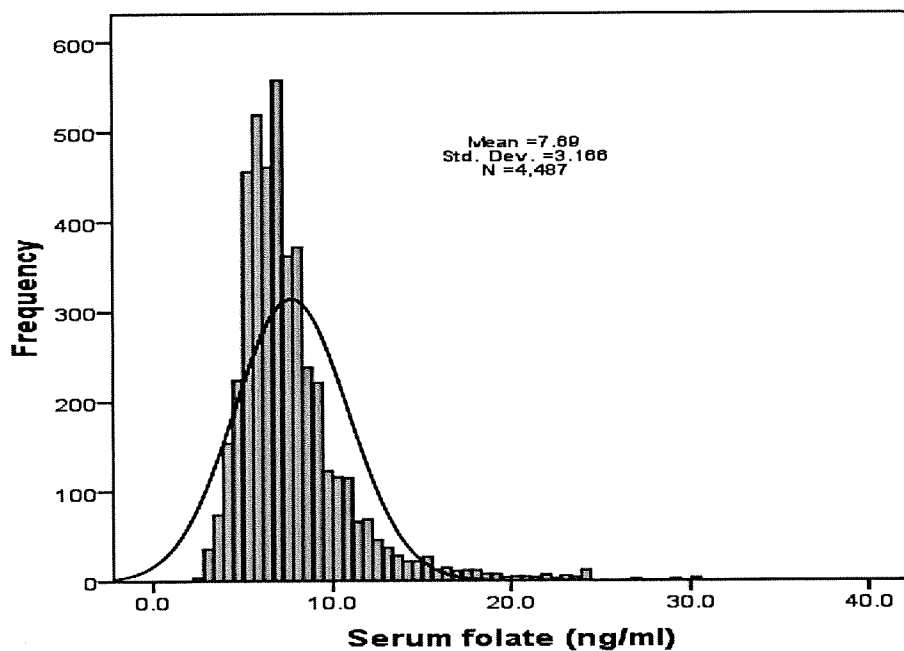


Figure 1: Distribution of first trimester serum folate levels.

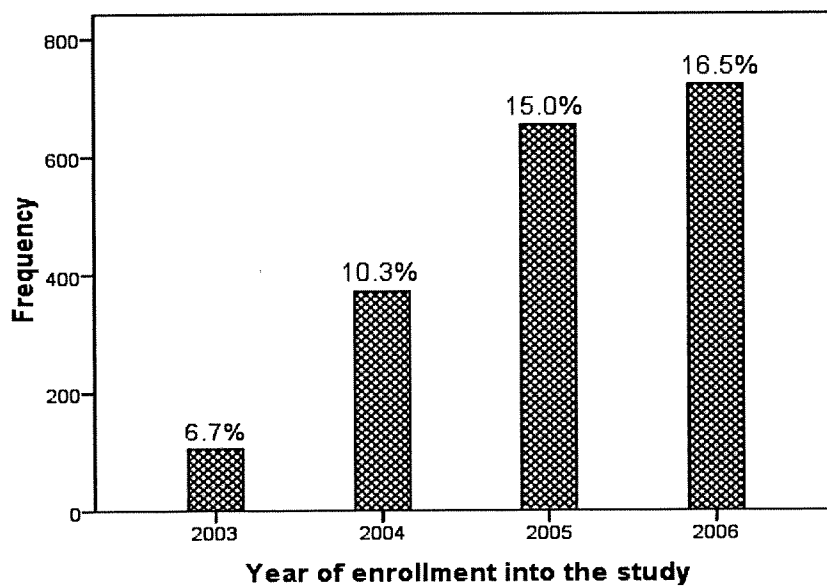


Figure 2: Annual incidence rates of periconceptional folate supplements use.

妊婦の喫煙と血中ダイオキシン類濃度との関連

研究代表者 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
研究分担者 梶原 淳睦 福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課 専門研究員
研究分担者 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 助教

研究要旨

ダイオキシン類と称される Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs) は、母から児への子宮内曝露や母乳を介した曝露も懸念されている。また、喫煙による体内のダイオキシン類濃度が低下することが指摘されている。そのため、本研究では、妊娠中の喫煙状況と妊娠中の血中ダイオキシン類濃度との関連を異性体レベルで調べた。その結果、喫煙による血中 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD (adjusted e^{β} = 0.809, 95% CI; 0.677 to 0.967), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD (adjusted e^{β} = 0.742, 95% CI; 0.645 to 0.851), 2, 3, 7, 8-TCDF (adjusted e^{β} = 0.843, 95% CI; 0.710 to 1.000), 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF (adjusted e^{β} = 0.817, 95% CI; 0.678 to 0.985), 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF (adjusted e^{β} = 0.809, 95% CI; 0.669 to 0.979), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF (adjusted e^{β} = 0.733, 95% CI; 0.558 to 0.964), 33' 44' -TCB(#77) (adjusted e^{β} = 0.802, 95% CI; 0.663 to 0.969), 33' 44' 5-PeCB(#126) (adjusted e^{β} = 0.640, 95% CI; 0.518 to 0.792), 2' 344' 5-PeCB(#123) (adjusted e^{β} = 0.602, 95% CI; 0.478 to 0.760), 23' 44' 5-PeCB(#118) (adjusted e^{β} = 0.773, 95% CI; 0.638 to 0.935) および 233' 44' -PeCB(#105) (adjusted e^{β} = 0.745, 95% CI; 0.614 to 0.904) の 11 異性体濃度への有意な負の影響がみられた。また、妊娠 13 週以前の喫煙による血中 2, 3, 7, 8-TCDD (adjusted e^{β} = 0.799, 95% CI; 0.680 to 0.939), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD (adjusted e^{β} = 0.873, 95% CI; 0.779 to 0.978), 2, 3, 7, 8-TCDF (adjusted e^{β} = 0.852, 95% CI; 0.740 to 0.981) および 33' 44' 5-PeCB(#126) (adjusted e^{β} = 0.809, 95% CI; 0.679 to 0.964) の 4 異性体濃度に対する有意な負の影響も明らかになった。今後、妊娠中の喫煙によるダイオキシン類濃度の低下に対する詳細な機構を明らかにする必要がある。

研究協力者

坂 晋、佐々木 成子、金澤 文子、
鷺野 考揚、小西 香苗、馬場 俊明、
宮下 ちひろ、Yila Thamar、Braithmoh
Titilola、櫻野 いく子、岡田 恵美子、
小林 澄貴、大竹 裕子、Mariko Limpar
(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)
吉村 健清、千々和 勝己、黒川 陽一
平川 博仙、堀 就英、中川 礼子、

芦塚 由紀、新谷 依子、小野塚 大介
飛石 和大、安武 大輔
(福岡県保健環境研究所)
戸高 尊
(九州大学医学部)
飯田 隆雄
(北九州生活科学センター)

A. 研究目的

ダイオキシン類と称される Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs)は、その構造から環境中に蓄積し、催奇形性、神経発達低下、内分泌かく乱、発がんなど様々な影響が示されているばかりでなく、母から児への子宮内曝露や母乳を介した曝露も懸念されている。

たばこの煙には、200種以上の毒物ならびに20種以上の発がん物質をはじめとした4000種以上の化学物質が含有されている。また、喫煙による体内のダイオキシン類濃度が低下することが指摘されている。

これらのことから、本研究では、妊娠中の喫煙状況と妊娠中の血中ダイオキシン類濃度との関連を異性体レベルで調べた。

B. 研究方法

1. 対象ならびに方法

対象者は2002-2004年に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妊娠23週-35週の妊婦である。リクルート時に自記式調査票にて、対象者の基本属性を得るとともに、妊娠中期における喫煙状況（妊娠時に非喫煙、妊娠判明時に禁煙、喫煙）の情報を得た。血清コチニン値をCozart EIA cotinine Kit (Cozart)を用いたELISA法により2回測定を行い、平均値を用いた。また、採血した血液を用いて、血中ダイオキシン類を測定した。血中ダイオキシン類の測定を実施した426名のうち、異常値を示した者(1名)、出産後に採血した者(130名)を本研究から除外した。また、妊娠14週以降に禁煙した者(10名)、血清コチニン値不明者(12名)、自記式調査票における喫煙状況と血清コチニン値が一致しない者(10名)を除外した。その結果、263名を本研究の解析対象者とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、北海道大学大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定に従って実施し、インフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行った。

C. 研究結果

対象者の基本属性をTable 1に示した。対象者の平均年齢は30.6±4.4歳であった。非喫煙者、妊娠13週以前に禁煙した者、喫煙者はそれぞれ173名(65.8%)、53名(20.2%)および37名(14.1%)であった。これら3群間における教育歴ならびに世帯収入において、有意な差が認められた($p < 0.01$ ならびに $p < 0.05$)。また、喫煙群のカフェイン摂取量が、他の2群と比較して有意に高い結果が得られた。年齢、BMI、アルコール摂取量、推定魚介類摂取量および測定年に関して、3群間で有意な差は認められなかった。

対象者の血中ダイオキシン類濃度を測定した結果をTable 2に示した。血中のPCDDs、PCDFs、PCDD/PCDFs、*non-ortho* PCBs、*mono-ortho* PCBs、DL-PCBsおよびtotal dioxinsの幾何平均濃度(範囲)(pg/lipid)はそれぞれ501.4(101.5-1602.4)、19.8(9.5-192.4)、522.3(112.4-1637.4)、73.4(20.0-281.7)、10925.7(1777.8-36382.2)、11028.4(1797.8-36569.8)および11603.6(2105.0-37694.5)であった。また、PCDDs、PCDFs、PCDD/PCDFs、*non-ortho* PCBs、*mono-ortho* PCBs、DL-PCBsおよびtotal dioxinsのWHO2005TEQ換算濃度(範囲)(TEQ pg/lipid)の幾何平均(範囲)はそれぞれ6.8(1.6-17.5)、2.5(0.6-7.8)、9.3(2.5-25.1)、4.0(0.6-23.2)、0.3(0.0-1.1)、4.3(0.7-23.9)および13.8(3.2-42.9)であった。

Table 3に喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響に対する重回帰分析の結果を示した。喫煙による血中PCDFs

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

(adjusted $e^\beta=0.854$, 95% CI; 0.749 to 0.972)、*non-ortho* PCBs (adjusted $e^\beta=0.797$, 95% CI; 0.686 to 0.927)、*mono-ortho* PCBs (adjusted $e^\beta=0.836$, 95% CI; 0.702 to 0.996)、DL-PCBs (adjusted $e^\beta=0.836$, 95% CI; 0.702 to 0.995)、total dioxins (adjusted $e^\beta=0.826$, 95% CI; 0.715 to 0.953) 濃度への有意な負の影響がみられた。また、喫煙による血中 *non-ortho* PCBs TEQ (adjusted $e^\beta=0.704$, 95% CI; 0.579 to 0.856)、*mono-ortho* PCBs TEQ (adjusted $e^\beta=0.832$, 95% CI; 0.698 to 0.992)、DL-PCBs TEQ (adjusted $e^\beta=0.714$, 95% CI; 0.589 to 0.866)、total dioxins TEQ (adjusted $e^\beta=0.826$, 95% CI; 0.715 to 0.953) 濃度への有意な負の影響も明らかになった。禁煙群における血中ダイオキシン類濃度への影響は認められなかった。Table 4 に喫煙による血中ダイオキシン類各異性体濃度への影響に対する重回帰分析の結果を示した。1, 2, 3, 7, 8-PeCDF, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF, 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF, OCDF, and 344' 5-TCB(#81)の各異性体では、それぞれ 90%以上のサンプルが下限値以下であったため、本解析では使用しなかった。解析の結果、喫煙による血中 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD (adjusted $e^\beta=0.809$, 95% CI; 0.677 to 0.967), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD (adjusted $e^\beta=0.742$, 95% CI; 0.645 to 0.851), 2, 3, 7, 8-TCDF (adjusted $e^\beta=0.843$, 95% CI; 0.710 to 1.000), 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF (adjusted $e^\beta=0.817$, 95% CI; 0.678 to 0.985), 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF (adjusted $e^\beta=0.809$, 95% CI; 0.669 to 0.979), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF (adjusted $e^\beta=0.733$, 95% CI; 0.558 to 0.964), 33' 44' -TCB(#77) (adjusted $e^\beta=0.802$, 95% CI; 0.663 to 0.969),

33' 44' 5-PeCB(#126) (adjusted $e^\beta=0.640$, 95% CI; 0.518 to 0.792), 2' 344' 5-PeCB(#123) (adjusted $e^\beta=0.602$, 95% CI; 0.478 to 0.760), 23' 44' 5-PeCB(#118) (adjusted $e^\beta=0.773$, 95% CI; 0.638 to 0.935)および 233' 44' -PeCB(#105) (adjusted $e^\beta=0.745$, 95% CI; 0.614 to 0.904)の11異性体濃度への有意な負の影響がみられた。また、妊娠13週以前の喫煙による血中 2, 3, 7, 8-TCDD (adjusted $e^\beta=0.799$, 95% CI; 0.680 to 0.939), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD (adjusted $e^\beta=0.873$, 95% CI; 0.779 to 0.978), 2, 3, 7, 8-TCDF (adjusted $e^\beta=0.852$, 95% CI; 0.740 to 0.981) および 33' 44' 5-PeCB(#126) (adjusted $e^\beta=0.809$, 95% CI; 0.679 to 0.964)の4異性体濃度に対する有意な負の影響も明らかになった。

D. 考察

本研究は、妊娠期の喫煙状況と妊娠におけるダイオキシン類濃度との関連を異性体レベルで、初めて明らかにした。

これまで、妊婦において、喫煙者では非喫煙者と比較して、出生後の母乳中ダイオキシン濃度が有意に低いことが報告されている (Takekuma *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2007)。本研究においても、喫煙者では非喫煙者と比較して、妊娠中の多くの血中ダイオキシン類濃度が有意に低いことが明らかになったことから、ダイオキシン濃度を低下させる妊娠中における喫煙の影響は、妊娠中に既に開始し出産後まで持続すると考えられる。

喫煙による妊婦のダイオキシン類濃度低下の理由として、大きくふたつ考えられる。ひとつは、妊婦以外の一般人を対象とした研究で示されているように、喫煙による CYP1A1 や CYP1A2 誘導によるダイオキシン類代謝の活性化である

(Flesch-Janys *et al.*, 1996; Zevin and Benowitz, 1999; Chen *et al.*, 2005)。もうひとつの理由として、有機塩素化合物である PCB や HCB では、妊婦の喫煙によって、出生直後の新生児の血中濃度が増加することが報告されていることから、胎児へのダイオキシン類移行量増加の可能性が考えられる (Lackmann *et al.*, 2000)。そのため、今後、妊娠中の喫煙によるダイオキシン類濃度の低下に対する詳細な機構を明らかにする必要がある。

本研究では、異性体レベルで妊娠中の喫煙と妊娠 13 週以前の喫煙による影響を調べた結果、喫煙による 10 異性体の血中濃度への有意な負の影響ならびに妊娠 13 週以前の喫煙による 4 異性体の血中濃度への有意な負の影響も明らかになった。これらのことから、喫煙による血中ダイオキシン類への負の影響は、異性体ごとに影響の持続性が異なり、2,3,7,8-TCDD、1,2,3,4,6,7,8-HpCDD、2,3,7,8-TCDF、33' 44' 5-PeCB (#126) などでは、長期にわたってその影響がみられることが示されたことから、妊娠以前における喫煙の影響についても懸念される。

E. 結論

本研究では、妊娠中の喫煙ならびに妊娠 13 週以前による妊娠中の血中ダイオキシン類濃度との負の関連を異性体レベルで明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. 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, 127-35.
2. Uehara, R., Nakamura, Y., Matsuura, N., Kondo, N., Tada, H., 2007. Dioxins in human milk and smoking of mothers. *Chemosphere*. 68, 915-20.
3. Flesch-Janys, D., Becher, H., Gurn, P., Jung, D., Konietzko, J., Manz, A., Papke, O., 1996. Elimination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. *J Toxicol Environ Health*. 47, 363-78.
4. Benowitz, N. L., 1999. Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. *Environ Health Perspect*. 107 Suppl 2, 349-55.
5. Chen, H. L., Liao, P. C., Su, H. J., Guo, Y. L., Chen, C. H., Lee, C. C., 2005. Profile of PCDD/F levels in serum of general Taiwanese between different gender, age and smoking status. *Sci Total Environ*. 337, 31-43.
6. Lackmann, G. M., Angerer, J., 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

Table 1. Maternal characteristics

Characteristics	Overall (n = 263)	Smoking status			p-value
		Non-smoking (n = 173)	Quitting at the pregnancy (n = 53)	Continuous smoking (n = 37)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Age (year)	30.6 ± 4.4 ^b	31.0 ± 4.4 ^b	30.0 ± 3.7 ^b	29.5 ± 5.1 ^b	0.120
BMI (kg/m ²)	21.4 ± 3.5 ^b	21.3 ± 3.3 ^b	21.5 ± 4.0 ^b	21.8 ± 3.6 ^b	0.701
Parity					
0	137 (52.1)	86 (49.7)	30 (56.6)	21 (56.8)	
≥ 1	126 (47.9)	87 (50.3)	23 (43.4)	16 (43.2)	0.563
Educational level (years)					
≤ 12	114 (43.3)	63 (36.4)	26 (49.1)	25 (67.6)	
≥ 13	149 (56.7)	110 (63.6)	27 (50.9)	12 (32.4)	0.002**
Annual household income (yen)					
< 5,000,000	176 (66.9)	106 (61.3)	41 (77.4)	29 (78.4)	
≥ 5,000,000	87 (33.2)	67 (38.7)	12 (22.6)	8 (21.6)	0.026*
Alcohol intake during pregnancy					
No	185 (70.3)	123 (71.1)	40 (75.5)	22 (59.5)	
Yes	78 (29.7)	50 (28.9)	13 (24.5)	15 (40.5)	0.245
Alcohol consumption of drinkers (g/day)	1.2 (0.4-19.2) ^c	1.2 (0.4-19.2) ^c	1.8 (0.5-5.6) ^c	2.3 (0.5-14.8) ^c	0.158
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)	108.8 (2.0-640.0) ^c	99.0 (2.0-640.0) ^c	108.8 (15.0-283.0) ^c	149.5 (17.0-542.5) ^c	0.007**
Estimate fish consumption (g/day) ^a	25.0 (1.2-150.0) ^c	25.0 (1.2-150.0) ^c	25.0 (1.2-150.0) ^c	37.5 (7.5-87.5) ^c	0.551
Measurement period (year)					
2003	75 (28.5)	49 (28.3)	13 (24.5)	13 (35.1)	
2004 1st	31 (11.8)	20 (11.6)	8 (15.1)	3 (8.1)	
2004 2nd	28 (10.6)	20 (11.6)	4 (7.5)	4 (10.8)	
2005	41 (15.6)	28 (16.2)	10 (18.9)	3 (8.1)	
2006	59 (22.4)	36 (20.8)	13 (24.5)	10 (27.0)	
2007	29 (11.0)	20 (11.6)	5 (9.4)	4 (10.8)	0.894
Serum cotinine (ng/ml)	5.0 (5.0-389.4) ^c	5.0 (5.0-5.0) ^c	5.0 (5.0-5.0) ^c	86.8 (11.4-389.4)	< 0.001***

BMI; body mass index. ^aMissing data; estimate fish consumption (33). ^bMean ± SD. ^cMedian (min-max).

Statistically significant differences using the Spearman's correlation test and Kruskal-Wallis test were denoted by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.01$.

Table 2. Dioxin concentrations in maternal blood among three smoking groups

	Smoking status				<i>p</i> -value
	Non-smoking (n = 173)		Continuous smoking (n = 37)		
	Geometric mean (95% CI)	Geometric mean (95% CI)	Geometric mean (95% CI)	Geometric mean (95% CI)	
^a Dioxins (pg/g lipid)					
<Total>					
Total PCDDs	517.5 (301.3, 971.7)	485.9 (229.5, 942.9)	452.1 (214.4, 915.1)	0.127	
Total PCDFs	20.6 (11.8, 37.1)	18.4 (12.0, 32.4)	18.2 (11.3, 39.2)	0.044*	
Total PCDDs/PCDFs	539.2 (313.6, 1000.2)	505.2 (244.4, 970.7)	471.1 (227.2, 953.4)	0.113	
Total non-ortho PCBs	77.6 (33.8, 140.8) [#]	69.2 (36.1, 126.2)	61.1 (34.6, 148.7) [#]	0.006**	
Total mono-ortho PCBs	11475.8 (5125.6, 26795.8)	10509.1 (4385.2, 21676.8)	9330.1 (4298.4, 26529.2)	0.060	
Total dioxin-like PCBs	11556.5 (5161.6, 26930.1)	10572.4 (4429.3, 21785.5)	9395.6 (4337.3, 26635.5)	0.059	
Total dioxins	12161.1 (5541.4, 28141.5)	11125.6 (4999.0, 22651.9)	9907.0 (4628.6, 27200.8)	0.054	
<WHO-2005>					
Total PCDDs TEQ	7.0 (3.5, 13.5)	6.7 (3.3, 14.4)	6.0 (3.2, 15.4)	0.143	
Total PCDFs TEQ	2.5 (1.2, 4.7)	2.4 (1.3, 4.3)	2.2 (1.2, 4.9)	0.181	
Total PCDDs/PCDFs TEQ	9.6 (4.8, 18.3)	9.1 (4.8, 18.0)	8.3 (4.3, 20.3)	0.129	
Total non-ortho PCBs TEQ	4.3 (1.5, 9.4) [#]	3.6 (1.5, 8.1)	3.0 (1.4, 8.6) [#]	0.001**	
Total mono-ortho PCBs TEQ	0.3 (0.2, 0.8)	0.3 (0.1, 0.7)	0.3 (0.1, 0.8)	0.055	
Total dioxin-like PCBs TEQ	4.7 (1.7, 10.2) [#]	3.9 (1.7, 8.6)	3.3 (1.6, 9.1) [#]	0.002**	
Total dioxins TEQ	14.5 (7.8, 26.6) [#]	13.2 (7.0, 23.9)	11.8 (6.0, 29.2) [#]	0.019*	

TEQ; toxicity equivalency quantity. WHO; World Health Organization.

^aThe means of log transformation of dioxin levels were used for calculation for the one-way ANOVA and tukey method.

[#]Statistically significant differences in each other using the tukey method ($p < 0.05$).

Statistically significant differences using the one-way ANOVA were denoted by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.