

washes with 1% BSA, peroxidase substrate, tetramethylbenzidine, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). The mixture was re-incubated for 30 minutes in the dark at the same temperature and 100µl phosphoric acid was added to the wells to stop enzyme activity. The absorbance was read at a wavelength of 450nm using an ELISA reader (E<sub>max</sub>; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)

The main birth outcomes were birth weight, length and head circumference and their relationship with maternal and infants' characteristics were examined with the student's t-test, Spearman's correlation test and analysis of variance (ANOVA). Next, their associations with exposure were examined using univariate and multivariate regression models. The main exposure variable (plasma cotinine concentration) was categorized by quartiles (<0.16, 0.16 - 0.33, 0.34 - 0.80 and >0.80ng/mL). First, their crude effects were examined and later adjusted for confounding variables such as maternal age, pre-pregnancy maternal weight, height, educational level, annual household income, parity, infant gender and gestational age at delivery. The subjects with undetectable cotinine levels were assigned a value half the detection limit (0.06ng/mL). Another multiple linear regression model was used to elucidate the gender-specific

difference in the effect of SHS exposure on infant birth size by stratifying with infant gender. All statistical analyses were performed using the Statistical Packages for Social Sciences (SPSS, Inc., Chicago, USA) software for Windows version 16.0.

#### （倫理面への配慮）

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

#### C. 研究結果

In our earlier study, cut-off points for distinguishing the smoking statuses were established. Thus, those women whose plasma cotinine levels suggested active smoking (>11.48ng/mL) were excluded.

In the current study, 80.7% of the overall study population has detectable plasma cotinine levels ( $\geq 0.12$ ng/mL). Table 1 summarizes the maternal and infants' characteristics in relation to birth size. Maternal age ranged from 17 to 44 years, with a mean ( $\pm$ SD) of 30.2  $\pm$  4.4 years. Mean ( $\pm$ SD) pre-pregnancy weight and mean ( $\pm$ SD) maternal body mass index (BMI) were 52.8  $\pm$  8.6 kg and 21.1  $\pm$  3.2 kg/m<sup>2</sup> respectively. More mothers were

multi-parous (50.5%), less educated (83.3%), low-income earners (54.3%) and drank alcohol during pregnancy (61.3%). Mean ( $\pm$ SD) gestational age was  $39.1 \pm 1.1$  weeks. The associations of birth size with maternal and infants' characteristics are also shown in Table 1. Maternal height, pre-pregnancy weight, BMI and gestational age positively correlated with birth weight, birth length and head circumference ( $p < 0.001$ ). Maternal age positively correlated with birth head circumference but negatively with birth length ( $p < 0.001$ ). First infants were smaller than subsequent babies ( $p < 0.001$ ). Male infants were bigger, taller and had bigger head circumference than the females at birth ( $p < 0.001$ ).

Table 2 shows the maternal and infants' characteristics in relation to plasma cotinine levels. Mothers with the highest cotinine levels are more likely to be significantly younger, nulliparous (51.5%), less educated (56.0%), earn less than 5 million yen per annum (70.4%), have husbands who smoke more than 20 cigarettes per day (5.8%) in comparison to those in the lower cotinine quartile groups.

Figure 1 shows the mean birth weight, birth length and head circumference in relation to cotinine quartile levels respectively. The mean ( $\pm$ SD) birth weight, birth length and head circumference of infants in the highest cotinine quartile (Q4) were  $3058.8 \pm 362.6$ g,  $48.9 \pm 4.1$ cm, and

$32.9 \pm 3.8$ cm respectively; and lower in comparison to those of lower quartile groups.

Table 3 shows the multivariate regression analysis of birth size and plasma cotinine concentrations. In the adjusted model, the known risk factors of birth size from previous literature (maternal age, maternal height, maternal pre-pregnancy weight, educational level, annual household income, number of cigarettes smoked by partner per day, parity, infant gender, gestational age and delivery mode (included for head circumference)) were included. When all infants were considered, an inverse relationship of cotinine levels with infant birth weight, length and head circumference in the adjusted model was observed. Mothers in the highest quartile ( $>0.80$ ng/mL) group gave birth to babies with significantly lower birth weight (61.4g; 95%CI:-100.5, -22.3;  $p=0.002$ ), birth length (0.6cm; 95%CI:-0.9, -0.2;  $p=0.002$ ) and head circumference (0.6cm; 95%CI:-1.0, -0.1;  $p=0.007$ ) than those in the lowest quartile group ( $<0.16$ ng/mL). Significant deficits in the mean birth weight (-70g; 95%CI:-124.9, -15.2;  $p=0.012$ ) at the highest cotinine level and in the birth head circumference both at the 2nd (-0.6cm, 95%CI:-1.1, -0.1,  $p=0.011$ ) and 4th quartiles (-0.5cm, 95%CI:-1.0, -0.003,  $p=0.037$ ) of male infants were observed. On the other hand, reduction in the birth length of female infants was associated with

highest SHS exposure (-0.8cm, 95%CI:-1.3, -0.2,  $p=0.011$ ).

#### D. 考察

The major strength of this study is the use of plasma cotinine measurements for assessing SHS exposure which reduces the possibility of misclassification bias. The current study found an association of high SHS exposure during pregnancy with reduced mean birth weight, birth length and birth head circumference, before and after adjusting for potential confounding factors. Our finding of an inverse relationship of plasma cotinine concentrations with birth outcomes confirms the results of two studies which observed the greatest effect of prenatal SHS exposure on birth weight at the highest cotinine levels. A decrease of 108g in the mean birth weight of infants with mothers in the upper tertile cotinine levels (>1ng/mL) in comparison with those of lower tertile (<0.5ng/mL) mothers (Haddow et al. 1988). Also, neonates of women with cotinine levels >1.7ng/mL were 85g smaller than those of lowest quintile range (Rebagliato et al. 1995).

In a study of 263 nonsmoking African-Americans and Dominican women, high prenatal exposure to PAHs was associated with lower birth weight and smaller head circumference (Perera et al. 2003). Nicotine exposure on pregnancy causes a transient reduction in

uterine blood flow due to early morphological changes of the placenta, while carbon monoxide in tobacco smoke can result in hypoxemia. Consequently, the birth weight, birth length and head circumference of the fetus may be reduced. The fundamental mechanisms of tobacco smoke effects on fetal growth need more clarifications and may possibly be multi-factorial.

Reduction in head circumference at birth has been correlated with a lower intelligence quotient (IQ), cognitive impairment, school performance in childhood and schizophrenia.

Our study provided an evidence of a gender difference in the effect of SHS exposure during pregnancy, with the male fetuses appearing to be more vulnerable to the exposure than the female ones. Overall average increase in exposure to SHS by about 0.66ng/mL gave rise to birth weight reduction of 70g (95% CI:-124.9, -15.2) in male infants compared to 50g (95%CI:-105.9, 5.7) in female infants. There are conflicting findings in previous studies regarding the effect of gender-specific differences. While a greater negative effect of heavy smoking in girls than in boys has been reported in a study, male fetuses have been observed to be more susceptible to the negative effect of active tobacco smoke than the females in other studies (Zaren et al. 2000, Varvarigou et al. 2009). Prenatal

exposure to fine particulate matters affected the birth size of male infants more than females (Jedrychowski et al. 2009). The gender-specific effect can be explained by the fact that the growth rate of male fetuses is normally higher than the females, hence, the effect of the factors restraining fetal development could be greater in fetuses with faster intrauterine growth. Demands on blood circulation, oxygen or fuels related to faster growth rate are also greater by the male gender. Differences exist in hormonal conditions based on gender. During the second half of the second trimester of pregnancy, the vulnerability to toxic effects of tobacco smoke chemicals increases as the brain begins its growth spurt (for example, glial cells and axon growth, dendrites' branching and synapses' formation) at this period.

The design of this study as a prospective cohort reduces recall bias. Second, exclusion of preterm births eliminates confounding from pregnancy complications and concentrates on fetal development. Third, the selection of study participants from 37 hospitals within Hokkaido eradicates the possibility of selection bias.

#### E. 結論

SHS exposure obviously has adverse effects on fetal growth especially among the male fetuses. The greater vulnerability of the male

fetuses may be due to their faster intrauterine growth and different hormonal conditions. It remains unclear why the birth length of the female fetuses suffers more negative effect than that of the males. There is the need to further investigate into this in future studies.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Seiko Sasaki, Titilola S. Braimoh, Thamar A. Yila, Eiji Yoshioka, Reiko Kishi. Self-reported tobacco smoke exposure and plasma cotinine levels during pregnancy – A validation study in Northern Japan. *Science of the Total Environment* 2011; 412-413: 114-118.

##### 2. 学会発表

1. Titilola S. Braimoh, Seiko Sasaki, Thamar A. Yila, Toshiaki Baba, Chihiro Miyashita, Emiko Okada, Ikuko Kashino, Kumiko Ito, Sumitaka Kobayashi, Eiji Yoshioka, Reiko Kishi. Effects of prenatal environmental tobacco smoke exposure on infant birth size. *The American Public Health Association (APHA) 139<sup>th</sup> Annual Meeting and Exposition*. Oct 29 – Nov. 2, 2011. Washington DC, USA.
2. Titilola S. Braimoh, Seiko Sasaki, Thamar A. Yila, Toshiaki Baba, Chihiro Miyashita, Emiko Okada, Ikuko Kashino, Sumitaka Kobayashi, Eiji Yoshioka, and Reiko Kishi. Effects of exposure to

second-hand smoke during pregnancy on birth size. Women's Health Conference. April 2, 2011. New York, USA.

3. Titilola S. Braimoh, Seiko Sasaki, Thamar A. Yila, Toshiaki Baba, Chihiro Miyashita, Emiko Okada, Ikuko Kashino, Sumitaka Kobayashi, Eiji Yoshioka, and Reiko Kishi. Self-reported exposure to tobacco smoke and plasma cotinine during pregnancy - The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. The 80<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Hygiene. May 9 -11, 2010. Sendai, Japan.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

参考文献

1. Benowitz NL. Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. *Environmental Health perspectives* 1999; 107 (Suppl. 2): 349-55.
2. Haddow JE, Knight GJ, Palomaki GE, McCarthy JE. Second trimester serum cotinine levels in nonsmokers in relation to birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159(2): 481-4.
3. Hegaard HK, Kjærgaard H, Møller LF, Wachmann H, Ottesen B. The effect of environmental tobacco smoke during pregnancy on birth weight. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006; 85: 675-81.
4. Ivanovic DM, Leiva BP, Pérez HT, Olivares MG, Díaz NS, Urrutia MSC, et al. Head size and intelligence, learning, nutritional status and brain development: Head, IQ, learning, nutrition and brain. *Neuropsychologia* 2004; 42: 1118-31.
5. Jedrychowski W, Perera F, Mrozek-Budzyn D, Mroz E, Flak E, Spengler JD, et al. Gender differences in fetal growth of newborns exposed prenatally to airborne fine particulate matter. *Environmental Research* 2009; 109: 447-456.
6. Perera FP, Rauh V, Tsai WY, Kinney P, Camann D, Barr D, Bernert T, Garfinkel R, Tu YH, Diaz D, Dietrich J and Whyatt RM. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111 (2): 201-5.
7. Rebagliato M, Florey CDV, Bolumar F. Exposure to environmental tobacco smoke in nonsmoking pregnant women in relation to birth-weight. *Am J Epidemiol.* 1995; 142(5):531-7.
8. Robinson JS, Moore VM, Owens JA, McMillen IC. Origins of fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92:13-9.
9. Saito R. The smoking habits of pregnant women and their husbands, and the effect on their infants. *Jpn J Public Health* 1991; 38(2): 124-31.

10. Schwarzler P, Bland JM, Holden D, Campbell S, and Ville Y. Sex-specific antenatal reference growth charts for uncomplicated singleton pregnancies at 15–40 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004; 23: 23–29.
11. Varvarigou AA, Asimakopoulou A, Beratis NG. Impact of maternal smoking on birth size: effect of parity and sex dimorphism. *Neonatology* 2009; 95: 61–7.
12. Zaren B, Lindmark G, Bakketeig L. Maternal smoking affects fetal growth more in the male fetus. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2000; 14: 118-26.

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 and infants' characteristics in relation to birth outcomes (N= 2972)

Variables	No.	Birth weight (g)	<i>p</i> value	Birth length (cm)	<i>p</i> value	Birth head circumference (cm)	<i>p</i> value <sup>a</sup>
Maternal age (years)		<i>r</i> = -0.025	0.178	<i>r</i> = -0.042	0.023	<i>r</i> = 0.058	0.002
Maternal height (cm)		<i>r</i> = 0.173	<0.001	<i>r</i> = 0.188	<0.001	<i>r</i> = 0.154	<0.001
Pre-pregnancy maternal weight (kg)		<i>r</i> = 0.219	<0.001	<i>r</i> = 0.183	<0.001	<i>r</i> = 0.177	<0.001
Maternal BMI (kg/m <sup>2</sup> )		<i>r</i> = 0.153	<0.001	<i>r</i> = 0.105	<0.001	<i>r</i> = 0.114	<0.001
Parity							
Nulliparous	1361	3078.0 ± 354.3	0.001	49.2 (2.3)	0.046	33.0 (3.1)	0.314
Multiparous	1501	3124.8 ± 365.5		49.0 (3.6)		33.1 (3.7)	
Alcohol intake during pregnancy							
No	1126	3102.5 ± 359.8	0.725	49.0 (3.7)	0.080	33.0 (3.9)	0.345
Yes	1823	3097.7 ± 361.1		49.2 (2.8)		33.1 (3.2)	
Educational level (years)							
≤12	2477	3100.0 ± 359.1	0.809	49.2 (2.3)	0.031*	33.1 (3.1)	0.261
>12	492	3096.1 ± 366.9		48.1 (3.7)		33.0 (3.8)	
Annual household income (millions of Yen)							
<5	1615	3102.0 ± 362.3	0.736	49.1 (3.1)	0.246	33.0 (3.3)	0.780
≥5	888	3096.1 ± 366.9		49.0 (3.4)		33.1 (3.9)	
Number of cigarettes smoked by partner per day							
0	1457	3101.0 ± 373.9	0.998	49.1 (3.2)	0.500	33.0 (3.3)	0.834
1 – 9	427	3104.6 ± 368.0		49.1 (3.0)		33.0 (4.0)	
10 – 19	526	3103.4 ± 333.8		48.9 (4.1)		33.1 (3.3)	
≥20	539	3102.8 ± 380.0		49.2 (1.9)		33.2 (3.3)	
Gestational age (weeks)		<i>r</i> = 0.303	<0.001	<i>r</i> = 0.316	<0.001	<i>r</i> = 0.112	<0.001
Infant gender							
Male	1436	3146.9 ± 354.9	<0.001	49.5 (2.9)	<0.001	33.3 (3.2)	<0.001
Female	1536	3056.2 ± 360.1		48.8 (3.4)		32.8 (3.7)	

<sup>a</sup> Spearman's correlation test, Student's *t* test, ANOVA

<sup>b</sup> Mean (SD)

BMI, body mass index SD, standard deviation

Table 2. Maternal characteristics in relation to plasma cotinine levels during pregnancy (N= 2972)

Variable	<0.16ng/mL (n = 784)	0.16 - 0.33ng/mL (n = 714)	0.34 - 0.80ng/mL (n = 743)	>0.80ng/mL (n = 731)	<i>p</i> value <sup>a</sup>
Maternal age (years) <sup>b</sup>	31.1 (4.2)	30.6 (4.1)	29.8 (4.2)	29.1 (4.5)	<0.001 $\Phi$
Nulliparous	336 (43.6)	339 (48.8)	339 (46.9)	347 (51.5)	0.024
Multiparous	434 (56.4)	356 (51.2)	384 (53.1)	327 (48.5)	
Alcohol intake during pregnancy					
No	292 (37.5)	269 (38.0)	287 (39.0)	278 (38.2)	0.939
Yes	487 (62.5)	439 (62.0)	448 (61.0)	449 (61.8)	
Educational level (years)					
≤12	277 (35.7)	294 (41.4)	326 (44.2)	405 (56.0)	<0.001
>12	498 (64.3)	416 (58.6)	412 (55.8)	318 (44.0)	
Annual household income (millions of Yen)					
<5	390 (59.4)	378 (61.2)	427 (67.7)	420 (70.4)	<0.001
≥5	267 (40.6)	240 (38.8)	204 (32.3)	177 (29.6)	
Number of cigarettes smoked by partner per day					
0	565 (72.5)	385 (54.1)	308 (41.6)	203 (27.8)	<0.001
1 – 9	119 (15.3)	188 (26.4)	216 (29.2)	257 (35.3)	
10 –19	90 (11.6)	122 (17.1)	179 (24.2)	227 (31.1)	
≥20	5 (0.6)	17 (2.4)	37 (5.0)	42 (5.8)	

<sup>a</sup>Chi square test, ANOVA  $\Phi$ Kruskal Wallis test

<sup>b</sup>Mean (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

Table 3. Association of cotinine concentrations in maternal plasma with infant birth size (N = 2972)

	Birth weight (g)		Birth length (cm)		Head circumference (cm)	
	$\beta$ (95%CI)	<i>p</i> value	$\beta$ (95%CI)	<i>p</i> value	$\beta$ (95%CI)	<i>p</i> value
<b>All infants (N = 2972)</b>						
<b>SHS exposure</b>						
<0.16ng/mL	Reference		Reference		Reference	
0.16 – 0.33ng/mL	-23.7 (-61.5, 14.1)	0.797	-0.1 (-0.5, 0.2)	0.542	-0.3 (-0.7, 0.1)	0.145
0.34 – 0.80ng/mL	-32.6 (-70.4, 5.7)	0.154	-0.2 (-0.5, 0.2)	0.353	-0.3 (-0.6, 0.1)	0.198
>0.80ng/mL	-61.4 (-100.5, -22.3)	0.002	-0.6 (-1.9, -0.2)	0.002	-0.6 (-1.0, -0.1)	0.007
<b>Male infants (n = 1436)</b>						
<b>SHS exposure</b>						
<0.16ng/mL	Reference		Reference		Reference	
0.16 – 0.33ng/mL	-7.0 (-59.9, 46.0)	0.797	-0.2 (-0.6, 0.2)	0.352	-0.6 (-1.1, -0.1)	0.011
0.34 – 0.80ng/mL	-38.6 (-91.7, 14.4)	0.154	-0.3 (-0.7, 0.1)	0.166	-0.4 (-0.9, 0.1)	0.121
>0.80ng/mL	-70.0 (-124.9, -15.2)	0.012	-0.4 (-0.9, 0.1)	0.093	-0.5 (-1.0, -0.03)	0.037
<b>Female infants (n = 1536)</b>						
<b>SHS exposure</b>						
<0.16ng/mL	Reference		Reference		Reference	
0.16 – 0.33ng/mL	-35.2 (-88.6, 18.2)	0.191	-0.04 (-0.6, 0.5)	0.925	-0.02 (-0.6, 0.6)	0.962
0.34 – 0.80ng/mL	-27.7 (-81.2, 25.9)	0.331	-0.1 (-0.6, 0.5)	0.840	-0.1 (-0.8, 0.5)	0.654
>0.80ng/mL	-50.1 (-105.9, 5.7)	0.092	-0.8 (-1.3, -0.2)	0.011	-0.6 (-1.2, 0.04)	0.079

CI, confidence interval

$\beta$ : Change in birth weight after adjusting for maternal age, height, pre-pregnancy maternal weight, educational level, annual household income, parity, infant gender and gestational age.

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

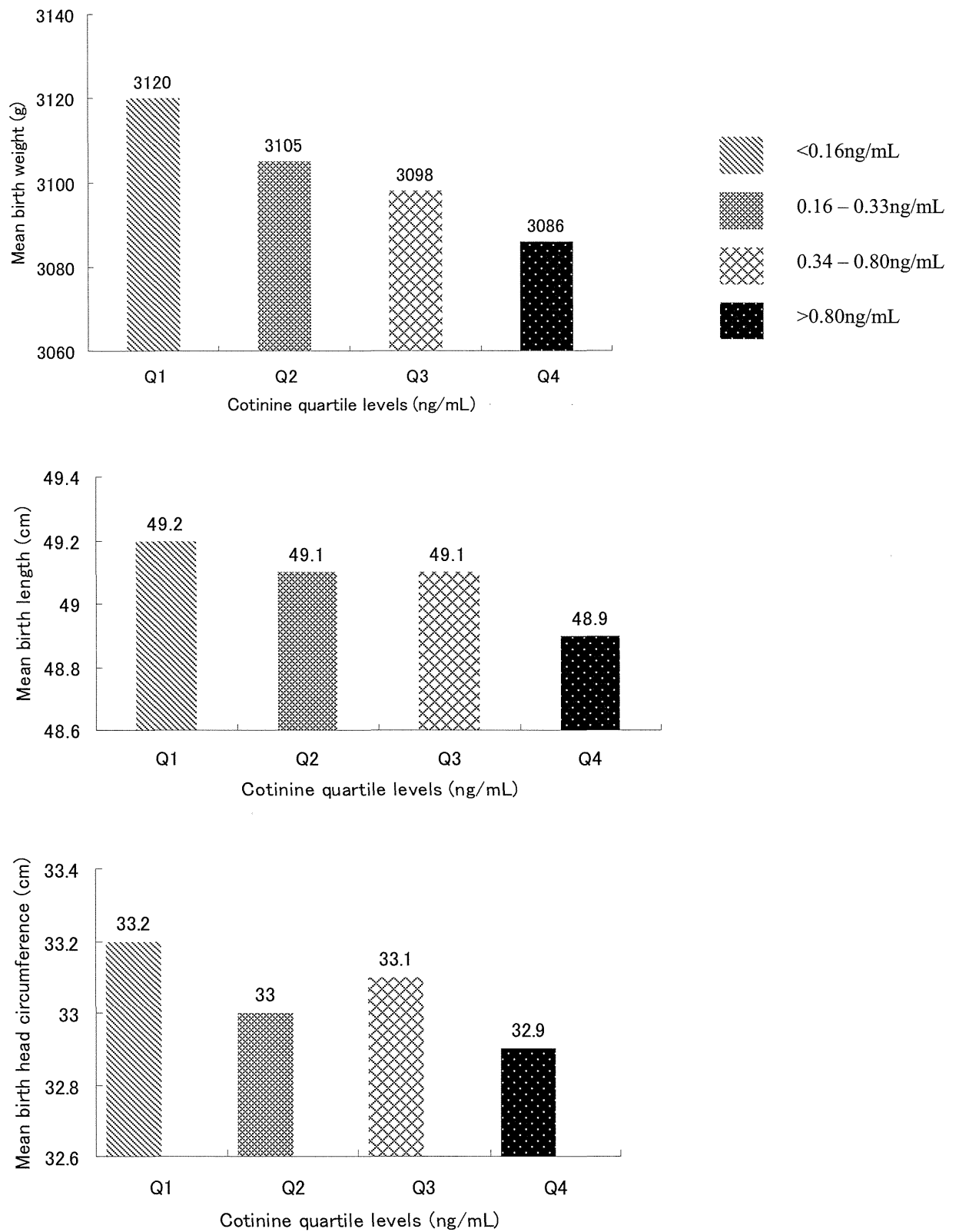


Figure 1: Fetal growth parameters and SHS exposure levels

## 妊婦の受動喫煙と多環芳香族炭化水素（PAHs）代謝関連遺伝子多型が 児の出生時体格に及ぼす影響の検討

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授  
研究分担者 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  
研究分担者 遠藤 俊明 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 准教授  
研究分担者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授  
研究分担者 吉岡 英治 旭川医科大学医学部健康科学講座 准教授

### 研究要旨

妊娠中の受動喫煙曝露は児の出生時体格に負の影響を及ぼした、あるいは及ぼさなかったなど、まだ一致した見解が得られていない。一致しない結果の一つに遺伝的感受性素因が示唆される。近年、遺伝的感受性素因による健康影響の個体差が注目され、妊婦の喫煙については、遺伝要因との交互作用が出生時体格に及ぼす影響についても報告されており、PAHs 代謝関連遺伝子多型が出生時体重の減少に関与することが示唆された。しかし、受動喫煙と遺伝-環境交互作用が児の出生時体格に及ぼす影響については報告がほとんどない。そこで本研究では、妊婦の受動喫煙と多環芳香族炭化水素（PAHs）代謝関連遺伝子多型が児の出生時体格に及ぼす影響を検討した。2003～2007年に登録した母児10,731名から1,633名を抽出し、高感度酵素結合免疫吸着法（ELISA法）で妊娠後期の母体血漿コチニン濃度を測定し、リアルタイム-PCR法あるいはマルチプレックスPCR法で遺伝子解析を行った。1,633名について、従属変数を出生時体格、独立変数を妊婦の受動喫煙状況と遺伝子多型とし、共変量で調整後、重回帰分析を行った結果、妊婦の受動喫煙は児の出生時体格に影響を及ぼし、男児で強い影響が認められた。PAHs代謝に関わる遺伝子多型で関連が認められたのは、シトクロムP450（CYP）*1A2*、*CYP1B1*およびDNA修復遺伝子の*XRCC1*遺伝子多型の3つであり、男児でより強い影響があった。今後、PAHsの他に受動喫煙の副流煙に多く含まれるN-ニトロソアミン類やカルボニル化合物類の代謝や解毒に関わる酵素の遺伝子多型についても検討していく必要がある。

### 研究協力者

伊藤 久美子、岡田 恵美子、小林 澄貴  
（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）  
長 和俊（北海道大学病院周産母子センター）  
山田 俊（北海道社会保険中央病院  
周産期医療センター）  
馬場 剛  
（札幌医科大学医学部産婦人科学講座）  
宮本 敏伸  
（旭川医科大学医学部産婦人科学講座）

### A. 研究目的

たばこ煙の中には約4,000種類の化学物質が含まれ（Brunnemann and Hoffman, 1991）、このうち60種類は発がん物質であり、多環芳香族炭化水素（PAHs）やニトロソアミン類などが含まれている（US Department of Health and Human Service, 1998）。たばこ煙は主流煙と、たばこの先端から立ち上がる副流煙に分けられ、含まれる化学物質は変わらないものの、PAHs やニトロソアミン類など主流煙より

も副流煙に多く含まれる化学物質がある（US Department of Health and Human Service, 1998; Adams et al., 1987; Borgerding and Klus, 2005）。

受動喫煙による健康影響として、成人では、非喫煙男性の配偶者と比較して、受動喫煙の配偶者の肺腺がんの発症リスクは2.03倍高いことが報告されている（Kurahashi et al., 2008）。胎児期の受動喫煙曝露では、非喫煙妊婦と比較して、受動喫煙妊婦の早産のリスクは1.56倍（Fantuzzi et al., 2007）、自然流産のリスクは1.67倍高いと報告されている（George et al., 2006）。疫学研究においては、さらに神経管欠損（Suarez et al., 2011）、口蓋裂（Li et al., 2010）、低出生時体重（Windham et al., 2000）、喘鳴（Xepapadaki et al., 2009）、中耳炎のリスク（Jacoby et al., 2008）が認められている。これらのように妊婦の受動喫煙は出生時だけでなく生後でも健康影響に及ぼすことが示唆されるため、健康影響の追跡研究が必要である。

近年、遺伝的感受性素因による健康影響の個体差が注目され、妊婦の喫煙については、遺伝要因との相互作用が出生時体格に及ぼす影響についても報告されており、PAHs代謝関連遺伝子多型が出生時体重の減少に関与することが示唆された（Wang et al., 2002; Sasaki et al., 2006; Danileviciute et al., 2012）。代謝のメカニズムとしては、細胞内に入ったPAHsは、まず芳香族炭化水素受容体（AHR）に結合して核内へと移行し、PAHsとAHRとの複合体が異物代謝酵素のチトクロムP450（CYP）1A1、CYP1A2、およびCYP1B1遺伝子に結合することで遺伝子の発現を誘導し、酵素が産生される。その後、PAHs

はCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1によってこれらの酵素が産生される。その後、PAHsはこれらによって代謝中間物質である7β,8α-ジヒドロキシ-9α,10α-エポキシ-7,8,9,10-テトラヒドロ-ベンゾ(a)ピレン（BPDE）になる（Nebert and Dalton, 2006）。このPAHsは主流煙よりも副流煙に多く含まれるが、妊婦の受動喫煙と遺伝子相互作用が児の出生時体格に及ぼす影響については報告がほとんどない。

また、化学物質による健康影響の性差も注目されていて、妊婦の化学物質曝露については、児の発育や神経発達に及ぼす影響とその性差が報告されている（Konishi et al., 2009; Washino et al., 2009; Jedrychowski et al., 2009; Miyashita et al., 2011）。しかし、妊婦の受動喫煙が児の出生時体格に及ぼす影響の性差についてはまだ報告されていない。

そこで本研究では、妊婦の受動喫煙とPAHs代謝関連遺伝子多型が児の出生時体格に及ぼす影響を解明するために、まず初めに性差を検討し、その上で遺伝-環境相互作用を検討した。

## B. 研究方法

北海道内37産科病院を受診した妊婦とその児を対象に前向きコホート研究を実施した。2003年～2007年に参加登録した母児10,731名のうち、出生時体重、出生時身長、出生時頭囲の全ての情報、母体血漿コチニン値、ゲノムDNAがあるもの6,335名から、喫煙者、双胎、妊娠高血圧症候群、妊娠性糖尿病、およびデータ欠損ありの者を除外し5,118名となった。さらに、ここからランダム抽出し1,633名を最終解析対象者とした（図1）。

妊娠初期の研究参加登録時に妊婦はペー

スライン調査票に回答した。この自記式調査票から妊婦と配偶者について、既往歴、教育歴、世帯収入、喫煙歴、飲酒歴などの基本情報を収集した。在胎週数、児の性別、出生時体重、形態異常、流産・死産、多胎、妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病などの妊娠経過および出産記録を分娩時に病院から回収した。出生時体格については、生後4か月児に自記式調査票に母子健康手帳からの転記を依頼した。

妊娠後期の母体血漿中のコチニン濃度は高感度酵素結合免疫吸着法（ELISA法）で測定され、コスミック・コーポレーション（東京）で実施された。検出限界は0.12ng/mLで、この限界以下の検体は半値の0.06ng/mLを代入した。ROC曲線解析を用いて、非喫煙妊婦から喫煙妊婦に分ける最適なカットオフ値を決定した（11.48ng/mL；特異度97%；感度81%； $\kappa = 0.79$ ）。さらに、非喫煙妊婦から受動喫煙妊婦に分けるカットオフ値を決定した（0.21ng/mL；特異度63%；感度68%； $\kappa = 0.31$ ）（Sasaki et al., 2011）（図2）。

ゲノムDNAは出産時の母体血から抽出した。そして、多環芳香族炭化水素の代謝に関与する遺伝子として、芳香族炭化水素受容体（AHR）（G>A, Arg554Lys）遺伝子多型、シトクロムP450（CYP）1A2（A>C, CYP1A2\*1F）、1B1（C>G, Leu432Val）遺伝子多型、グルタチオンS-転移酵素（GST）M1（Present/deletion）、T1（Present/deletion）遺伝子多型およびDNA修復遺伝子のX-ray cross-complementing gene 1（XRCC1）（C>T, Arg194Trp および G>A, Arg399Gln）遺伝子多型はリアルタイム-PCR法あるいはマルチプレックスPCR法で行った。

受動喫煙状況による妊婦と児の属性およ

び遺伝子多型頻度との関連はKruskal-Wallis検定および $\chi^2$ 検定を用いた。また、妊婦の受動喫煙と児の出生時体格との関連および妊婦の受動喫煙と遺伝子多型による出生時体格との関連は、妊娠年齢、妊娠前BMI、妊娠中飲酒、教育歴、出産歴、児の性別および在胎週数で調整後、重回帰分析で検討した。統計学的有意水準は $P < 0.05$ とした。ただし、多重比較の場合は、 $\alpha$ エラー（第一種の過誤）の確率を高めてしまう問題があるため、解析ごとの $\alpha$ 値は小さくして全体の $\alpha$ が0.05になるように調整する必要がある、この方法の一つとしてBonferroniの補正がある（Hulley et al., 2001）。この補正は検定回数をNとすると全体の $\alpha$ （=0.05）をNで割ったもの（ $\alpha/N$ ）を、各解析の有意水準とする方法である（Hulley et al., 2001）。妊婦の受動喫煙と1遺伝子多型の場合（4回の検定あり）は $P < 0.0125$ （=0.05/4）、妊婦の受動喫煙と2遺伝子多型との組合せの場合（8回の検定あり）は $P < 0.00625$ （=0.05/8）、妊婦の受動喫煙と3遺伝子多型との組合せの場合（16回の検定あり）は $P < 0.003125$ （=0.05/16）で有意差を認めるとした。統計解析にはSPSS ver.15およびJMP ver.10を用いた。

（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。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏洩が一切生じないよう、研究者によりデータ保管を厳重に行った。採血の方法は日常の一般診療で行われている血液生化学検査の際の採血と全く同様であり、格段の危険性

は伴わなかった。

### C. 研究結果

母の属性では、非喫煙妊婦と比較して、受動喫煙妊婦は年齢が若く ( $P < 0.001$ )、妊娠時飲酒が少なく ( $P = 0.042$ )、低学歴の割合が高く ( $P = 0.003$ )、低所得の割合が高かった ( $P = 0.002$ )。しかし、妊婦の身長、妊娠前体重、BMI および出産歴では有意な差はなかった (表 1)。

また児の属性では、非喫煙妊婦の児と比較して、受動喫煙妊婦の児は在胎週数が長かった ( $P < 0.001$ )。しかし、児の性別、出生時体重、出生時身長、出生時頭囲、低出生時体重児、および Small-for-gestational-age (SGA) では有意な差はなかった (表 2)。

妊婦の受動喫煙が出生時体格に及ぼす影響とその性差では、非喫煙妊婦の児と比較して、受動喫煙妊婦の児の出生時体格は減少した (出生時体重, 35g 減少,  $P = 0.043$ ; 出生時身長, 0.24cm 減少,  $P = 0.013$ ; 出生時頭囲, 0.15cm 減少,  $P = 0.047$ )。さらに児の性別で層別すると、受動喫煙妊婦の男児の出生時体格は減少したが (出生時体重, 71g 減少,  $P = 0.007$ ; 出生時身長, 0.48cm 減少,  $P < 0.001$ ; 出生時頭囲, 0.26cm 減少,  $P = 0.031$ )、女児では有意な差はなかった (図 3)。

妊婦の遺伝子多型による出生時体格では、*CYP1A2* (A>C) 遺伝子多型の頻度で非喫煙妊婦と受動喫煙妊婦との間に有意差が認められた ( $P = 0.023$ )。しかし、*AHR* (G>A)、*CYP1B1* (C>G)、*GSTM1* (Present/Absent)、*GSTT1* (Present/Absent)、*XRCC1* (C>T) および *XRCC1* (G>A) 遺伝子多型は有意差が認められなかった (表 3)。

妊婦の遺伝子多型による出生時体格では、妊婦の遺伝子多型による出生時体格に有意な差はなかった (表 4)。

妊婦の受動喫煙と遺伝子多型による出生時体格とその性差では、非喫煙で *CYP1A2* (A>C) 遺伝子多型の AA 型をもつ妊婦の児と比較して、受動喫煙で AC/CC 型をもつ妊婦の児の出生時頭囲は 0.28cm 減少した (95%CI; -0.49, -0.08)。次に、非喫煙で *CYP1B1* (C>G) 遺伝子多型の CC 型をもつ妊婦の児と比較して、受動喫煙で CG/GG 型をもつ妊婦の児の出生時頭囲は 0.29cm 減少した (95%CI; -0.51, -0.08)。さらに、非喫煙で *XRCC1* (C>T) 遺伝子多型の CC 型をもつ妊婦の児と比較して、受動喫煙で CT/TT 型をもつ妊婦の児の出生時身長は 0.44cm 減少した (95%CI; -0.72, -0.17)。いずれの遺伝子多型についても、遺伝-環境交互作用は有意な差が認められなかった (表 5)。

次に児の性別で層別すると、男児は、非喫煙で *CYP1B1* (C>G) 遺伝子多型の CC 型をもつ妊婦の児と比較して、受動喫煙で CG/GG 型をもつ妊婦の児の出生時身長は 0.59 cm 減少 (95%CI; -0.99, -0.19)、出生時頭囲は 0.50 cm 減少した (95%CI; -0.85, -0.15)。また、非喫煙で *XRCC1* (C>T) 遺伝子多型の CC 型を持つ妊婦の児と比較して、受動喫煙で CT/TT 型をもつ妊婦の児の出生時身長は 0.66 cm 減少し (95%CI; -1.03, -0.28)、さらに遺伝-環境交互作用が認められた ( $P = 0.009$ )。しかし、これらの遺伝子多型は女児では有意な差がなく、男児のみへの影響であることが示された (表 6)。

さらに遺伝子多型の組合せで、非喫煙で *CYP1A2* (A>C) 遺伝子多型が AA 型、*CYP1B1* (C>G) 遺伝子多型が CC 型をもつ妊婦の児と比較して、受動喫煙で

*CYP1A2* 遺伝子多型が AC/CC 型、*CYP1B1* 遺伝子多型が CG/GG 型をもつ妊婦の児の出生時頭囲は 0.41cm 減少したが（95%CI; -0.70, -0.12）、他の組合せでは関連がなく、性差も関連が認められなかった（表 7）。

最後に *CYP1A2*（A>C）、*CYP1B1*（C>G）、および *XRCC1*（C>T）の 3 つの遺伝子多型を組合せても児の出生時体格との関連は有意な差が認められなかった（表なし）。

#### D. 考察

本研究は、受動喫煙と *CYP1A2*、*CYP1B1* および *XRCC1* 遺伝子多型が出生時体格に影響を及ぼす、一部性差も認められた初めての報告である。

非喫煙妊婦の児と比較して、受動喫煙妊婦の児は出生時体格の減少を認めた。特に男児で出生時体格の減少が大きいことを認めた。本研究の結果から、受動喫煙の少ない化学物質の曝露量が出生時体格に影響を及ぼしている可能性が考えられる。妊婦の化学物質曝露が児の発育に及ぼす影響の性差で、ダイオキシン類、粒子状物質の PM2.5 および鉛は男児のみ出生時体格の減少を認めた（Konishi et al., 2009; Kishi et al., 2011; Bellinger et al., 1987; Jedrychowski et al., 2010）。この結果だけでたばこ煙の化学物質は特定できないが、妊婦の受動喫煙は胎児発育への影響にも性差があると考えられる。

*CYP1A2*（A>C, *CYP1A2\*1F*）遺伝子多型では、非喫煙で AA 型の妊婦の児と比較して、受動喫煙で AC/CC 型の妊婦の児の出生時頭囲の減少を認めた。また *CYP1B1*（C>G, Leu432Val）遺伝子多型では、非喫煙で CC 型の妊婦の児と比較して、受動喫

煙で CG/GG 型の妊婦の児の出生時頭囲の減少を認めた。*CYP1A2* 遺伝子多型の AC/CC 型および *CYP1B1* 遺伝子多型の CG/GG 型では酵素の代謝活性が高いことが報告されていることから（Wang et al., 2013; Schoket et al., 2001）、*CYP1A2* 遺伝子多型の AA 型と比較して AC/CC 型の妊婦、*CYP1B1* 遺伝子多型の CC 型と比較して CG/GG 型の妊婦は受動喫煙によってたばこ煙を体外から取り込むことで、BPDE がより生成されて、DNA 付加体が形成されやすいことにより、さらに胎盤組織の DNA が損傷し、児の出生時体格に影響を及ぼしたと考えられる。

*XRCC1*（C>T, Arg194Trp）遺伝子多型では、非喫煙で CC 型の妊婦の児と比較して、受動喫煙で CT/TT 型の妊婦の児の出生時身長減少を認めた。*XRCC1* 遺伝子多型の CC 型の妊婦と比較して、CT/TT 型の妊婦は DNA 修復能が低いために、BPDE-DNA 付加体がより多くなると考えられる。また、受動喫煙妊婦の胎盤には PAH-DNA 付加体が存在し（Zalacain et al., 2006; Sanyal et al., 2007）、ヒトの細胞実験で PAHs はヒトの細胞死を高めたとの報告から（Rorke et al., 1998）、CT/TT 型の妊婦は胎盤組織内で BPDE による DNA 損傷が多いことで胎盤機能の低下が起こり、出生時体格により強い影響が認められたと考えられる。

*AHR*（G>A, Arg554Lys）、*GSTM1*（Present/deletion）、*GSTT1*（Present/deletion）および *XRCC1*（G>A, Arg399Gln）遺伝子多型は非喫煙妊婦の児と比較して、受動喫煙妊婦の児は出生時体格に有意な差を認めなかった。妊婦の喫煙は児の出生時体重を 135g 減少させたものの（Sasaki et al., 2006）、妊婦の受動喫煙は児の出生時体

重を 35g 減少させ、出生時体重の減少量が 75% 小さかった。また、特定の遺伝子型の妊婦は少なかった。これらのことが影響して出生時体格に有意な差が認められなかったと考えられる。

妊婦の受動喫煙曝露状況は妊娠後期のコチニン濃度に基づいて判定したため、ある一時点のみの評価である。コチニンの半減期は 17.9 時間であり (Dempsey et al., 2013)、長い妊娠期間の受動喫煙曝露状況が正確に反映されていないと考えられる。しかし、先行研究では同時期に得られた質問票とコチニン濃度との正の相関が報告されている (Pichini et al., 2000)。また、同時期の自記式調査票による受動喫煙曝露状況と同じ時期に時間が異なった数回のコチニン濃度との両方が受動喫煙曝露評価分類の正確性を高められると報告されていることから、本研究においても受動喫煙状況を十分把握できていると考える。

低体重で産まれた児は小児期の肥満、成人期の生活習慣病との関連が示唆されており、生後の身体発育に及ぼす影響も追跡していく必要がある。わが国における妊婦の受動喫煙率は 53.0% と報告されていて (Yila et al., 2012)、妊婦だけでなく、配偶者や職場の同僚に禁煙教育をし、受動喫煙防止を周知していくことが重要である。

## E. 結論

妊婦の受動喫煙は児の出生時体格に影響を及ぼし、男児で強い影響が認められた。PAHs 代謝に関わる遺伝子多型で関連が認められたのは、*CYP1A2*、*CYP1B1* および *XRCC1* 遺伝子多型の 3 つであり、男児でより強い影響があった。副流煙に多く含まれる PAHs に注目し、その代謝に関連する遺伝子多型について検討したが、他に副流

煙に多く含まれる N-ニトロソアミン類やカルボニル化合物類の代謝や解毒に関わる酵素の遺伝子多型についても検討していく必要がある。また、低体重で産まれた児は小児期の肥満、成人期の生活習慣病との関連が示唆されており、生後の身体発育に及ぼす影響も追跡していく必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi SU., Sasaki S., Sata F., Miyashita C., Yila T. A., Braimoh T. S., Itoh K., Kobayashi SA., Ikeno T., Araki A., Tamakoshi A., Kishi R. Adverse effects on birth sizes among male infants associated with maternal passive smoking during pregnancy and polycyclic aromatic hydrocarbon metabolizing-enzyme polymorphisms in Japanese pregnant women. *Molecular Human Reproduction* (Submitted).

### 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) Adams J.D., et al. Toxic and carcinogenic agents in undiluted mainstream smoke and sidestream smoke of different types of cigarettes. *Carcinogenesis* 8: 729-731 (1987).
- 2) Bellinger D., et al. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive



- development. *N Engl J Med* 316: 1037-1043 (1987).
- 3) Borgerding M., Klus H. Analysis of complex mixture—cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* 57: 43-73 (2005).
  - 4) Brunnemann K.D., Hoffmann D. Analytical studies on tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit Rev Toxicol* 21: 235-240 (1991).
  - 5) Danileviciute A., et al. Low level maternal smoking and infant birthweight reduction: genetic contributions of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms. *BMC Pregnancy Childbirth* 12: 161 (2012).
  - 6) Dempsey D.A., et al. CYP2A6 genotype but not age determines cotinine half-life in infants and children. *Clin Pharmacol Ther* 94: 400-406 (2013).
  - 7) Fantuzzi G., et al. Preterm delivery and exposure to active and passive smoking during pregnancy: a case-control study from Italy. *Paediatr Perinat Epidemiol* 21: 194-200 (2007).
  - 8) George L., et al. Environmental tobacco smoke and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology* 17: 500-505 (2006).
  - 9) Hully S.B., et al. Designing clinical research: an epidemiological approach, second edition. Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA (2001).
  - 10) Jacoby P.A., et al. The effect of passive smoking on the risk of otitis media in Aboriginal and non-Aboriginal children in the Kalgoorlie-Boulder region of Western Australia. *Med J Aust* 188: 599-603.
  - 11) Jedrychowski W., et al. Gender specific differences in neurodevelopmental effects of prenatal exposure to very low-lead levels: the prospective cohort study in three-year olds. *Early Hum Dev* 85: 503-510 (2009).
  - 12) Jedrychowski W., et al. Gender differences in fetal growth of newborns exposed prenatally to airborne fine particle matter. *Environ Res* 109: 447-456 (2010).
  - 13) Kishi R., et al. Cohort profile: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health in Japan. *Int J Epidemiol* 40: 611-618 (2011).
  - 14) Konishi K., et al. Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res* 109: 906-913 (2009).
  - 15) Kurahashi N., et al. Passive smoking and lung cancer in Japanese non-smoking women: a prospective study. *Int J Cancer* 122: 653-657 (2008).
  - 16) Li Z., et al. Maternal passive smoking and risk of cleft lip with or without cleft palate. *Epidemiology* 21: 240-242 (2010).

- 17) Miyashita C., et al. Effects of prenatal exposure to dioxin-like compounds on allergies and infections during infancy. *Environ Res* 111: 551-558 (2011).
- 18) Nebert D.W., Dalton D.P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signaling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 6: 947-960 (2006).
- 19) Pichini S., et al. Cord serum cotinine as a biomarker of fetal exposure to cigarette smoke at the end of pregnancy. *Environ Health Perspect* 108: 1079-1083 (2000).
- 20) Rorke E.A., et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons enhance terminal cell death of human ectocervical cells. *Int J Oncol* 13: 557-563 (1998).
- 21) Sanyal M.K., et al. DNA adducts in human placenta exposed to ambient environment and passive cigarette smoke during pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79: 289-294 (2007)
- 22) Sasaki S., et al. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod* 12: 77-83 (2006).
- 23) Sasaki S., et al. Self-reported tobacco smoke exposure and plasma cotinine levels during pregnancy — A validation study in Northern Japan. *Sci Total Environ* 412-413: 114-118.
- 24) Schoket B., et al. Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutat Res* 482: 57-69.
- 25) Suarez L., et al. Maternal smoking, passive tobacco smoke, and neural tube defect. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91: 29-33 (2011).
- 26) US Department of Health and Human Service. *Cigar* (1998).
- 27) Wang L., et al. Association between common CYP1A2 polymorphisms and theophylline metabolism in non-smoking healthy volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112: 257-263 (2013).
- 28) Wang X., et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA* 287: 195-202 (2002).
- 29) Washino N., et al. Correlation between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect* 117: 660-667 (2009).
- 30) Windham G.C., et al. Prenatal active or passive tobacco smoke exposure and the risk of preterm delivery or low birth weight. *Epidemiology* 11: 427-433 (2000).
- 31) Xepapadaki P., et al. Association of passive exposure of pregnant women to environmental tobacco smoke with

asthma symptoms in children.  
Pediatr Allergy Immunol 20: 423-429  
(2009).

32) Yila T.A., et al. Effects of maternal  
5,10-methylenetetrahydrofolate  
reductase C677T and A1298C  
polymorphisms and tobacco smoking  
on infant birth weight in a Japanese  
population. J Epidemiol 22: 91-102  
(2012).

33) Zalacain M., et al. Effects of  
benzopyrene-7,8-diol-9,10-epoxide  
(BPDE) in vitro and of maternal  
smoking in vivo on micronuclei  
frequencies in fetal cord blood.  
Pediatr Res 60: 180-184 (2006).

図 1. 解析対象者の選出方法

