

妊娠初期の血清葉酸値と **Birth defects** リスクとの関連

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 特別招へい教授
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 特任教授
研究分担者 馬場 剛 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 講師
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 有賀 正 北海道大学大学院医学研究科・小児科学分野 特任教授
研究分担者 花岡 知之 北海道大学環境健康科学研究教育センター 客員教授

研究要旨

[Background] 妊娠初期の低赤血球葉酸濃度は神経管閉鎖不全を引き起こす可能性がある。しかし、神経管と発生器官が同じである先天性心疾患や口唇裂（口蓋裂併発含む）と葉酸濃度との関連は不明のままである。そこで、妊娠初期の血清葉酸値と **birth defects** リスクとの関連を検討した。**[Methods]** 北海道スタディ大規模コホートに 2002～2012年に参加登録した 20,926 人の妊娠初期血清葉酸値を **chemiluminescent enzyme immunoassay** を使用して測定した。解析対象者は 22 週以降に出産した単胎児のうち、適格基準を満たした母子 14,763 組である。血清葉酸濃度と **birth defects** リスクとの評価は **multivariate logistic regression analysis** によって解析した。**[Results]** 妊娠初期血清葉酸値の中央値（四分位範囲）は 16.5 (13.4-21.5) nmol/L, **deficiency (<10.0 nmol/L)**, **possible deficiency (10.0-13.4 nmol/L)**, **optimal levels (≥13.5 nmol/L)** はそれぞれ 6.6%, 19.7%, 73.7%であった。**optimal levels** に対する **deficiency levels** の **any birth defects** リスクは、交絡要因調整後 1.23 (95% confidence interval [CI]: 0.81, 1.87), **circulatory system 1.23 (95% CI: 0.81, 1.87)**, **genital organs 1.31 (95% CI: 0.68, 2.55)**, **urinary system 2.36 (95% CI: 0.77, 7.24)**, そして **musculoskeletal system 1.39 (95% CI: 0.49, 3.99)**, **all CHDs 1.39 (95% CI: 0.72, 2.71)**, **septal heart defects 1.30 (95% CI: 0.55, 3.06)**, **ventricular septal defects 1.72 (95% CI: 0.72, 4.11)** であったでリスク上昇傾向がみられた。口唇裂の調整後 OR は 0.26 (95% CI: 0.03, 2.03) でリスク低下があった（口唇裂 **cases** は少数であった）。しかし、いずれも有意な差はみられなかった。**[Conclusions]** 本研究では、妊娠初期の血清葉酸値濃度と **birth defects** リスクとの有意な関連はみられなかった。しかし、本研究は妊娠初期の血清葉酸濃度と **birth defects** との関連を説明する基礎的研究になると考える。

研究協力者

伊藤 久美子

(北海道大学大学院医学研究科
社会医学講座公衆衛生学分野)

宮下 ちひろ, 小林 澄貴, 田村 菜穂美
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

長 和俊, 山田 俊

(北海道大学病院周産母子センター)

宮本 敏伸

(旭川医科大学産婦人科学講座)

研究協力機関

青葉産婦人科クリニック, 秋山記念病院, 旭川医科大学病院, えんどう桔梗マタニティクリニック, 王子総合病院, 帯広協会病院, 帯広厚生病院, 北見赤十字病院, 勤医協札幌病院, 釧路赤十字病院, 慶愛病院, 五輪橋産科婦人科小児科病院, 市立札幌病院, 札幌医科大学附属病院, 札幌東豊病院, 札幌徳州会病院, 白石産科婦人科病院, 中標津町立病院, 名寄市立総合病院, 函館五稜郭病院, 函館中央病院, はしもとクリニック, 朋佑会札幌産科婦人科, 北海道大学病院, 公立芽室病院, 市立稚内病院

A. 研究目的

Birth defects は新生児死亡の主要死因であり, **birth defects** を持つ子どもだけではなく, その家族の **quality of life** をも脅かす公衆衛生上の重要な課題である。^{1, 2} **Birth defects** の病因は染色体異常や遺伝子によるものよりも多因子遺伝によるものが多いが, その病因の多くは不明のままである。

葉酸はメチオニンサイクルに不可欠な一炭素単位転移, および **DNA** メチル化に必要なメチル基ドナーとしても必須の栄養素である。³ 葉酸は多因子遺伝によって

引き起こされる神経管閉鎖不全の原因となる遺伝子発現を調節・阻止したり, あるいは胚の生存を高め, 正常な器官形成を維持するための葉酸輸送障害による悪影響を克服するのに役立つ。⁴ 葉酸欠乏はホモシステイン増加を引き起こし, 高ホモシステインレベルは葉酸の機能を妨げる。その結果, **DNA** メチル化パターンの不規則な発達が器官発生期における胚の致死および発達異常を導く。³

妊娠前の葉酸摂取は神経管閉鎖不全の子どもを出産するリスクを減少させることが **1980~90** 年代の世界各地での大規模疫学研究によって報告された。⁵⁻⁷ そのためアメリカ, カナダ, コスタリカでは **1998** 年から穀物への葉酸添加が義務付けられ, その後 **3-6** 年で **NTDs** の子どもの出生が **19-46%** 減少した。⁸ しかし, 神経管が発生する神経堤細胞から発生する **congenital heart defects (CHDs)**⁹⁻¹² や **orofacial clefts**¹³⁻¹⁶ と葉酸摂取との関連はまだ明確ではない。¹⁷ つまり, 器官形成期の葉酸レベルと **NTDs** 以外の **birth defects** との関連は不明のままである。妊婦の葉酸摂取と **birth defects** との関連評価した研究の殆どは **case-control studies**^{5-15, 18, 20-22} であり, 出産後に妊娠中の葉酸摂取情報を得ている。これには **recall bias** を含む可能性がある。また, 葉酸摂取の評価では体内葉酸量を正確に反映しているとは言い難い。他にも **case-control study** により出産後の血清あるいは赤血球葉酸値を測定し **CHDs** や **orofacial clefts**^{21, 23-30} との関連を評価した研究もある。しかし, 出産後の葉酸濃度測定では, 器官形成期の葉酸濃度との関連を評価できるものではない。**2** つの前向きコホート研究が妊娠期の血清葉酸値と **birth defects** との関連を評価している。一つは

妊娠中期（妊娠第 15–18 週）の血清葉酸値と CHDs や **cleft lip with/without cleft palate (CL ± P)**^{14,24} との関連を評価し、いずれも関連はみられないと報告している。もう一つの前向き研究では、妊娠初期の血清葉酸値(中央値)は **birth defects** のある子どもの母親は、**birth defects** のない子どもの母親よりも有意に低かったことを報告している。²⁵ 妊娠期の葉酸値と **birth defects** との関連は議論の余地が大いにある。日本においては、前向き研究により葉酸濃度と **birth defects** との関連を評価した研究はない。そこで、我々は前向き **birth cohort study** により妊娠初期血清葉酸値と **birth defects** との関連を明らかにすることを目的に研究を行った。

B . 研究方法

1 . 対象

北海道スタディに 2002 年 2 月から 2012 年 5 月までに北海道の大学病院からクリニックなどの 37 産科施設を受診している妊娠初期（妊娠第 13 週末満）の参加登録妊婦 20,926 名。

2 . 方法

(1) Data collection

ベースライン時に自記式質問紙調査により年齢、出産回数、社会経済状況（教育年数、世帯年収）、既往歴、既往妊娠歴、妊娠前の身長・体重、妊娠初期の喫煙習慣、飲酒習慣、服薬およびビタミンサプリメントの使用、生殖医療の経験、そして **birth defects** 家族歴についての情報を得た。妊娠前後のサプリメントに関する情報は、種類、回数、期間を得た。本研究では葉酸サプリメントを葉酸単独サプリメント（厚生労働省の推奨量が 1 日で摂取できる葉酸

を主要成分としたサプリメント）、マルチビタミン剤を含む何らかの葉酸を含有しているサプリメント（葉酸含有サプリメント）、葉酸含有のマルチビタミン剤に分類した。

妊娠初期の血清葉酸値を測定するために空腹時静脈血を採取した。血清葉酸値は外部委託（SRL, Inc. Tokyo, Japan）により **the ADVIA Centaur technique** を使用し、**chemiluminescent enzyme immuno-assay (CLEIA)** によって測定した。

出生児情報は出生 7 日以内に、出生結果（**miscarriage, stillbirth and live birth, singleton or multiple**）、性別、出生時体重、在胎週数、**birth defects** 有無を出産施設の産婦人科医師から得た。さらに、生後 1 歳、

2 歳時の母親への調査票を使用して **birth defects** 情報を得た。本研究では、多胎出産および妊娠第 22 週末満の出産は解析から除外した。

(2) Definition and Classification of Birth Defects

Birth defects は **the International Classification of Disease 10th revision (ICD 10)**¹⁶ により分類した。また、CHD は次の 5 **subgroups** に分類した；**1) isolated septal defects**（単独の心室中隔欠損症、単独の心房中隔欠損症）、**2) conotruncal heart defects**（大血管転移症、**Fallot** 四徴症、総動脈幹症、両大血管右室起始症）、**3) left-sided obstructive malformation**（大動脈弁狭窄症、左心室低形成症、大動脈縮窄症、大動脈弓離断症）、**4) right-sided obstructive malformations**（肺動脈弁狭窄、肺動脈閉鎖症、三尖弁閉鎖症、**Ebstein** 奇形）、**5)**

other CHDs（重複心奇形，単心室，単独の動脈管開存症）。^{7,8,10} さらに，**folate-related birth defects** として神経堤細胞から発生する器官の **birth defects** である **NTDs**，⁵⁻⁷ **CHDs**，^{9,8} **orofacial clefts**，^{15,17} **hypospadias**，²⁶ **limb reduction defects**²⁷ を設定した。

Birth defects 有無が不明瞭，染色体異常，遺伝子病，副耳や鼠径ヘルニア等の微細な形態異常だけの場合，**birth defects** の発生器官が 2 つ以上の場合は解析から除外した。**Birth defect** 選択・分類は新生児医師の助言を受けて実施した。最終的な解析対象者は 14,763 組の母子である。

(3) Statistical Analysis

血清葉酸値を **deficient (<10.0 nmol/L)**，**possibly deficient (10.0-13.4 nmol/L)**，**optimal (≥13.5 nmol/L)** の 3 分類にした。²⁸ 母親の出産時年齢は <20，20-24，25-29，30-34，≥35 歳に区分した。妊娠前 **BMI(kg/m²)** は，**underweight (<18.5 kg/m²)**，**normal weight (18.5-24.9 kg/m²)**，**obese (≥25.0 kg/m²)** に分類した。その他の母親の背景因子は，教育年数(≤12 years，>12 years)，世帯年収(<5 million yen，≥5 million yen)，出産経験(0，≥1)，妊娠初期の飲酒習慣 (yes, no)，妊娠初期の喫煙習慣の有無 (yes, no)，生殖補助医療の使用 (yes, no)，糖尿病既往 (yes, no)，習慣性流産既往(yes, no)，**birth defects** 家族歴 (yes, no)，妊娠初期の服薬の有無 (yes, no)，妊娠初期の葉酸単独サプリメント使用の有無(yes, no)，葉酸含有サプリメント使用の有無 (yes, no)，マルチビタミン剤使用の有無 (yes, no)である。

妊娠初期の血清葉酸レベルと **birth defects** リスクとの関連では **any birth defects**，**ICD 10th** による器官別，

folate-related birth defects とその主要な **phenotype** を解析した。

血清葉酸値レベルと母親属性との検討では，**Chi-squared**，**Fisher's exact tests**，**one-way analysis of variance (ANOVA)**を使用した。血清葉酸レベルと **birth defects** リスクとの評価では，**optimal level** をリファレンスとして，**deficiency, possibly deficiency level** のリスクを二項多重ロジスティック回帰分析により **odds ratios (ORs)** と **95% confidence intervals (CIs)** を算出した。交絡因子は出産時年齢 (**continuous variable**)，出産回数，教育年数，妊娠前の **BMI (continuous variable)**，妊娠初期の喫煙習慣，飲酒習慣，服薬である。有意水準は両側検定による **P values <0.05**，**95% CIs** は **1.0** を含まないものとした。統計解析には **SPSS for Windows (version 21.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA)**を使用した。

（倫理面への配慮）

本研究は，北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび北海道大学大学院医学研究科・医の倫理委員会の承認を得た。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏洩については，データの管理保管に適切な保管場所を確保するなどの方法により行うとともに，研究者の道義的責任に基づいて個人データをいかなる形でも本研究の研究者以外の外部の者に触れられないように厳重に保管し，取り扱った。

C. 研究結果

1. 母親の属性と妊娠初期血清葉酸レベル
血清葉酸値の中央値（四分位範囲）は **16.5 (13.4 – 21.5) nmol/L**，血清葉酸レベ

ルの **deficient** , **possible deficient** , **optimal levels** の人数(%)はそれぞれ **981名(6.6%)** , **2,906名(19.7%)** , **10,876名(73.7%)**であった (**Table 1**)。出産時年齢が **24歳未満**は **optimal levels** よりも **deficiency levels** が多かった (**P < 0.001**)。 **Deficient** は有意に教育年数や世帯年収が少なく (**P < 0.001**) , 生殖医療の使用者 (**P < 0.001**) や習慣性流産の既往 (**P = 0.019**) , 妊娠初期の喫煙者が多かった (**P < 0.001**)。 **Obese mothers** は **underweight** や **normal weight mothers** よりも有意に **deficient** が多かった (**P < 0.001**)。妊娠初期の葉酸含有サプリメント使用者は **22.7%** で , **deficient** は葉酸含有サプリメントの不使用者に有意に多かった (**P < 0.001**) が , 葉酸含有サプリメント使用者の中でも **deficient** が **67名(2.0%)** いた。

2. Birth defects と血清葉酸レベル

Birth defects を持つ児は **342名**であった。 **ICD 10th** 分類では **circulatory system defects** が最も多く **130名** , 次に **genital organ defects** **63名**であった (**Table 2**)。疾患では **ventricular septal defects** が **61名**で最も多かった。 **birth defects** を持つ子どもの母親と **birth defects** を持たない子どもの母親の妊娠初期血清葉酸値の中央値はそれぞれ **16.6 nmol/L** , **16.5 nmol/L** で有意な差はみられなかった (**P = 0.691**)。

Optimal levels に対する **deficient** と **possible deficiency levels** の調整前後の **ORs (95% CI)**を示した。 **Any birth defects** の調整後 **ORs** は **deficient 1.23 (95% CI: 0.81, 1.87)**でリスク上昇傾向があった。 **ICD 10th** 分類毎の **optimal levels** に対する **deficiency levels** の調整後 **ORs** は , **circulatory system 1.23 (95%**

CI: 0.81, 1.87) , **genital organs 1.31 (95% CI: 0.68, 2.55)** , **urinary system 2.36 (95% CI: 0.77, 7.24)** , そして **musculoskeletal system 1.39 (95% CI: 0.49, 3.99)**でリスク上昇傾向がみられた。一方 , **nervous system** , **cleft lip and cleft palate** , **digestive system** の **possible deficiency levels (nervous system と digestive system は deficiency levels は該当者なしのため possible deficiency levels の結果)**の調整後 **ORs** は , それぞれ **0.76 (95% CI: 0.09, 6.70)** , **0.44 (95% CI: 0.15, 1.68)** , **0.48 (95% CI: 0.11, 2.13)**でリスク低下傾向がみられた。しかし , いずれも有意な差はみられなかった (**Table 2**)。

folate-related birth defects と血清葉酸レベルとの関連も評価した (**Table 3**)。 **NTDs** や **limb reduction defects** を持つ子どもは **2名**だけで , その母親は全員が **optimal levels** であった。 **optimal levels** に対する **deficiency levels** の調整後 **ORs** は **all regarding folate-related birth defects 1.11 (95% CI: 0.59, 2.09)** , **all CHDs 1.39 (95% CI: 0.72, 2.71)** , **septal heart defects 1.30 (95% CI: 0.55, 3.06)** , **ventricular septal defects 1.72 (95% CI: 0.72, 4.11)**でリスクの上昇傾向がみられた。一方 , **CL ± P (deficiency levels は該当者なしのため possible deficiency levels の結果)**と単独 **cleft palate** の調整後 **ORs** はそれぞれ **0.26 (95% CI: 0.03, 2.03)** , **2.25 (95% CI: 0.25, 20.06)**でリスク減少傾向がみられた。しかし , いずれも有意な差はみられなかった。

Birth defect リスクと妊娠初期の葉酸サプリメント使用との関連も評価したが有意な関連性はみられなかった。 (**not shown**)。

D．考察

本研究では **optimal levels** に対する **deficiency levels** の調整後 ORs は, **any birth defects**, **skin system defects**, **CHDs**, **septal heart defects**, **conotruncal heart defects**, **left ventricle outflow obstruction**, **ventricular septal defect** で上昇傾向が, **oral cleft defects** では減少傾向がみられたが, いずれも有意な差ではなかった。

CHDs や **CL±P** リスクと葉酸レベルとの関連を評価した前向き研究のうち, **Saudi Arabia** での研究では, 妊娠初期の血清葉酸値と **birth defects** との関連を評価した結果, **congenital malformations** の子どもを持つ母親 48 名の平均血清葉酸値は **40.85nmol/L**, **congenital malformations** のない子どもを持つ母親 961 名では **50.50 nmol/L** で **congenital malformations** の子どもを持つ母親の血清葉酸値は有意に低かった (**P < 0.001**)。しかし, 彼らの研究では交絡因子が調整されていなかった。²⁵ **Shaw et al.** ^{16,24} は **California** において, **conotruncal heart defects** や **CL±P** と妊娠 15-18 週の血清葉酸レベルとの関連を評価した。**conotruncal heart defects** の子どもを持つ母親 140 名と **birth defects** のない子どもの母親 280 名, **CL±P** の子どもを持つ母親 89 名と **birth defects** のない子どもの母親 409 名との血清葉酸値の評価では, いずれも血清葉酸値とそれぞれの **birth defects** リスクとの関連はみられなかったことを報告している。本研究でも同様に **conotruncal heart defects** や **CL±P** を含め, それ以外の **birth defects** でも血清葉酸値との関連はみられなかった。アメリカでは 1998 年から穀物への葉酸添加が義務

化され, その後の 1999-2006 年における出産年齢にある女性の低血清葉酸値 (<3 ng/mL or 6.8 nmol/L) 割合は約 0.8% であった。⁸ **Shaw et al.** の研究期間は,すでに葉酸添加が開始されているため, 研究対象者における低血清葉酸値割合は低かったことが考えられる。

本研究では, 血清葉酸値が **optimal levels** が大多数であったことが, **birth defects** と妊娠初期の血清葉酸値との関連に有意な結果が得られなかった理由として考えられる。日本人の妊婦 118 名を対象とした 2008 年報告の調査では, **optimal levels** (≥ 6.0 ng/mL; ≥ 13.5 nmol/L)²⁹ は 33.0% で, 本研究の半分程度であった。イランでは小麦への葉酸添加後の出産年齢にある女性の平均血清葉酸値は **18.1 nmol/L**³⁰ であり, 本研究の結果とほぼ等しかった。本研究期間のほぼ中間にあたる 2007 年の国民健康・栄養調査では, 20-39 歳の日本人女性の 1 日当たりの平均葉酸摂取量は **236-253 μ g/day** (推奨量 **240 μ g/day**) であり, ほぼ推奨量を満たしている。³¹ 本研究では葉酸サプリメント使用者は 23.2% と少なかったが, **optimal levels** が大多数であることから, 食事から十分な葉酸摂取ができていたことが考えられる。

葉酸は DNA 合成のためのピリミジンおよびプリンおよび S-アデノシルメチオンを生成する一炭素単位転移にとって必要不可欠である。さらに, 葉酸は発達の早期段階で細胞増殖に影響を及ぼし, それによって後方神経管発達を助長する。^{31,32} 葉酸欠乏は DNA メチル化やヌクレオチド合成のためのメチル基の生体利用効率に影響を及ぼすことによって, **congenital malformations** リスクを修飾するのかも

しれない。葉酸欠乏は神経堤細胞に影響を及ぼすことで、この細胞から発生する神経管、心臓、口唇、四肢の発達を妨げる可能性があり、葉酸はこれらの領域から発生する異常な発達を予防する役割があるかもしれない。⁴ これらの悪影響は低葉酸状態で起こるが、本研究では **deficiency levels** の対象者が少なかったことが葉酸レベルと **birth defects** リスクとの関連評価に影響を及ぼしたと考える。

本研究の強みは、妊娠初期から開始した出生コホート研究であることである。殆どの先行研究は **case control study** であるため妊娠期の葉酸レベルの代用として葉酸摂取を使用しているが、本研究では器官形成期の葉酸レベルを測定した。また、妊娠初期の喫煙、飲酒、服薬などの交絡因子情報を妊娠初期に収集しているので **recall bias** を除外して解析することができた。次に、研究対象者は、北海道の3大学病院のような基幹病院だけではないクリニック、産科病院などの産科施設の受診者も多く含まれている。つまり、本研究の **birth defects** 割合は北海道の一般集団を反映していると考えられる (Hanaoka T et al. **Prevalence and the risk of birth defects according to selected maternal factors observed in a prospective birth cohort study; the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Submitted to the Journal of Epidemiology**).

しかし、本研究にはいくつかの弱みもある。第1に、**birth defects** 情報を出生時の医療記録に加え、母親への1歳時、2歳時調査票からも得ているが、**birth defects** 情報は医療記録ではないため **cases** や **birth defect phenotypes** に

misclassification が生じた可能性がある。第2に、本研究では葉酸状態の指標として血清葉酸値を測定したが、一般的に赤血球葉酸値は血清葉酸値よりも長期間の葉酸レベルを示す。しかし、赤血球葉酸測定は複雑であり、本研究のような大規模疫学研究では血清葉酸を測定している。2015年にNTD予防のための赤血球葉酸レベル閾値が>906 nmol/L設定された。³³ しかし、血清葉酸値での閾値はまだ設定されていない。最後に、本コホートは比較的大規模の研究であるが、**birth defects** を持つ児の出生は多くはなかった。**Birth defects cases** の少なさが、妊娠初期の血清葉酸値と **birth defects** との関連を評価する上で影響した可能性がある。

E. 結論

本研究は前向き研究によって妊娠初期の血清葉酸レベルと **birth defects** リスクとの関連を評価した。**deficiency levels** は全体の6.6%であった。本研究では、妊娠初期の血清葉酸の **optimal levels** に比較して **deficiency levels** で有意なリスク上昇はみられなかった。しかし、本研究は妊娠早期の葉酸レベルと **birth defects** リスクとの関連を説明する基礎的研究となると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kumiko Ito et al. **Association between maternal serum folate levels in the first trimester and the risk of birth defects: the Hokkaido study of Environment and Children's Health. (Submitted to Paediatric and Perinatal Epidemiology. 2017.01.06)**

2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

1. Bortolus R, Blom F, Filippini F, et al. Prevention of congenital malformations and other adverse pregnancy outcomes with 4.0 mg of folic acid: community-based randomized clinical trial in Italy and the Netherlands. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14:166.
2. World Health Organization. World Health Organization Media centre Congenital anomalies Fact sheet Updated September 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/en/>. Accessed November 20, 2016.
3. McKay JA, Williams EA, Mathers JC. Folate and DNA methylation during in utero development and aging. *Biochem Soc Trans*. 2004;32:1006-1007.
4. Rosenquist TH. Folate, homocysteine and the cardiac neural crest. *Dev Dyn*. 2013;242:201-218.
5. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention [corrected; erratum to be published]. *N Engl J Med*. 1999;341:1485-1490.
6. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*. 1991;338:131-138.
7. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*. 1992;327:1832-1835.
8. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients*. 2011;3:370-384.
9. Smedts HP, Rakhshandehroo M, Verkleij-Hagoort AC, et al. Maternal intake of fat, riboflavin and nicotinamide and the risk of having offspring with congenital heart defects. *Eur J Nutr*. 2008;47:357-365.
10. van Beynum IM, Kapusta L, Bakker MK, den Heijer M, Blom HJ, de Walle HE. Protective effect of periconceptional folic acid supplements on the risk of congenital heart defects: a registry-based case-control study in the northern Netherlands. *Eur Heart J*. 2010;31:464-471.
11. Li X, Li S, Mu D, et al. The association between periconceptional folic acid supplementation and congenital heart defects: a case-control study in China. *Prev Med*. 2013;56:385-389.
12. Czeizel AE, Vereczkey A, Szabó I. Folic acid in pregnant women associated with reduced prevalence of severe congenital heart defects in

- their children: a national population-based case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015;193:34-39.
13. George Wehby, Jeffrey CM. Folic Acid and Orofacial Clefts: A Review of the Evidence. *Oral Diseases.* 2010;16:11-19.
14. Shaw GM, Vollset SE, Carmichael SL, et al. Nested case-control study of one-carbon metabolites in mid-pregnancy and risks of cleft lip with and without cleft palate. *Pediatr Res.* 2009;66:501-506.
15. Li S, Chao A, Li Z, et al. Folic acid use and nonsyndromic orofacial clefts in China: a prospective cohort study. *Epidemiology.* 2012;23:423-432.
16. Rozendaal AM, van Essen AJ, te Meerman GJ, et al. Periconceptional folic acid associated with an increased risk of oral clefts relative to non-folate related malformations in the Northern Netherlands: a population based case-control study. *Eur J Epidemiol.* 2013;28:875-887.
17. De-Regil LM, Peña-Rosas JP, Fernández-Gaxiola AC, Rayco-Solon P. Effects and safety of periconceptional oral folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(12):CD007950.
18. Hobbs CA, Cleves MA, Melnyk S, Zhao W, James SJ. Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:147-153.
19. Hobbs CA, Cleves MA, Zhao W, Melnyk S, James SJ. Congenital heart defects and maternal biomarkers of oxidative stress. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:598-604.
20. Verkleij-Hagoort AC, Verlinde M, Ursem NT, et al. Maternal hyperhomocysteinaemia is a risk factor for congenital heart disease. *BJOG.* 2006;113:1412-1418.
21. van Rooij IA, Swinkels DW, Blom HJ, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:1155-1160.
22. Little J, Gilmour M, Mossey PA, et al. Folate and clefts of the lip and palate—a U.K.-based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008;45:428-438.
23. Munger RG, Tamura T, Johnston KE, et al. Oral clefts and maternal biomarkers of folate-dependent one-carbon metabolism in Utah. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol.* 2011;91:153-161.
24. Shaw GM, Yang W, Carmichael SL, et al. One-carbon metabolite levels in mid-pregnancy and risks of conotruncal heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014;100:107-115.
25. Sahar A, Ibrahim Hammouda, Om

- Alsaad Farouk Abd Al-Halim, et al. Serum levels of some micronutrients and congenital malformations: prospective cohort study in healthy Saudi-Arabian first trimester pregnant women. *Int J Vitam Nutr Res.* 2013;83:346-354.
26. Ormond G, Nieuwenhuijsen MJ, Nelson P, et al. Endocrine disruptors in the workplace, hair spray, folate supplementation, and risk of hypospadias: case-control study. *Environ Health Perspect.* 2009;117:303-307.
27. Yang Q, Khoury M, Olney RS, Mulinare J. Does periconceptional multivitamin use reduce the risk for limb deficiency in offspring? *Epidemiology.* 1997;8:157-161
28. de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull.* 2008;29:S238-S244.
29. Matsuzaki M, Haruna M, Ota E, Sasaki S, Nagai Y, 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.* 2008;34:971-979.
30. Abdollahi Z, Elmadfa I, Djazayeri A, et al. Efficacy of flour fortification with folic acid in women of childbearing age in Iran. *Ann Nutr Metab.* 2011;58:188-196.
31. Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan in 2010. *The National Health and Nutrition Survey, in 2007.* <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou09/01.html>. Accessed September 15, 2016.
32. Ichi S, Costa FF, Bischof JM, et al. Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem.* 2010;285:36922-36932.
33. World Health Organization. Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations for Assessing Folate Status in Populations. *Vitam Miner Nutr Inf Syst.* 2015:1-7.

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

Table 1. Baseline characteristics according to serum folate status

| Characteristics | All (n = 14,763) | Serum Folate Status (nmol/L) | | | | | | P value |
|---|---------------------|--|--------|--|--------|---|--------|---------------------|
| | | Deficiency (<10.0) (n = 981; 6.6%) | | Possible Deficiency (10.0–13.4) (n = 2,906; 19.7%) | | Optimal Level (≥13.5) (n = 10,876; 73.7%) | | |
| Maternal age at delivery (years) | | | | | | | | |
| mean ± SD | | 29.0 ± 5.0 | | 29.5 ± 4.9 | | 30.7 ± 4.7 | | <0.001 ^b |
| <20 | 116 | 20 | (2.0) | 38 | (1.3) | 58 | (0.5) | <0.001 ^a |
| 20–24 | 1,650 | 174 | (17.7) | 456 | (15.7) | 1,020 | (9.4) | |
| 25–29 | 4,620 | 344 | (35.1) | 940 | (32.3) | 3,336 | (30.7) | |
| 30–34 | 5,391 | 288 | (29.4) | 1,005 | (34.6) | 4,098 | (37.7) | |
| ≥35 | 2,981 | 155 | (15.8) | 467 | (16.1) | 2,359 | (21.7) | |
| unknown | 5 | 0 | - | 0 | - | 5 | - | |
| Prepregnancy body mass index (kg/m ²) | | | | | | | | |
| mean ± SD | | 21.6 ± 4.2 | | 21.2 ± 3.3 | | 21.1 ± 3.3 | | <0.001 ^b |
| <18.5 | 2,501 | 168 | (17.7) | 524 | (18.5) | 1,809 | (17.0) | <0.001 ^a |
| 18.5–24.9 | 10,328 | 633 | (66.6) | 1,981 | (69.9) | 7,714 | (72.5) | |
| ≥25.0 | 1,599 | 149 | (15.7) | 331 | (11.7) | 1,119 | (10.5) | |
| unknown | 335 | 31 | - | 70 | - | 234 | - | |
| Education level (years) | | | | | | | | |
| ≤12 | 7,233 | 617 | (63.5) | 1,627 | (56.6) | 4,989 | (46.2) | <0.001 ^a |
| >12 | 7,416 | 355 | (36.5) | 1,250 | (43.4) | 5,811 | (53.8) | |
| unknown | 114 | 9 | - | 29 | - | 76 | - | |
| Annual household income (million yen) | | | | | | | | |
| <5 | 8,474 | 611 | (75.2) | 1,772 | (72.0) | 6,091 | (65.2) | <0.001 ^a |
| ≥5 | 4,133 | 201 | (24.8) | 688 | (28.0) | 3,244 | (34.8) | |
| unknown | 2,156 | 169 | - | 446 | - | 1,541 | - | |
| Parity (times) | | | | | | | | |
| 0 | 5,920 | 407 | (43.6) | 1,174 | (42.3) | 4,339 | (42.6) | 0.793 ^a |
| ≥1 | 7,981 | 527 | (56.4) | 1,601 | (57.7) | 5,853 | (57.4) | |
| unknown | 862 | 47 | - | 131 | - | 684 | - | |
| Drinking in early pregnancy | | | | | | | | |
| Yes | 1,929 | 100 | (10.2) | 361 | (12.6) | 1,468 | (13.6) | 0.006 ^a |
| No | 12,682 | 876 | (89.8) | 2,511 | (87.4) | 9,295 | (86.4) | |
| unknown | 152 | 5 | - | 34 | - | 113 | - | |
| Smoking in early pregnancy | | | | | | | | |
| Yes | 5,735 | 559 | (57.3) | 1,355 | (47.3) | 3,821 | (35.5) | <0.001 ^a |
| No | 8,854 | 417 | (42.7) | 1,507 | (52.7) | 6,930 | (64.5) | |
| unknown | 174 | 5 | - | 44 | - | 125 | - | |
| Assisted reproductive technology | | | | | | | | |
| Yes | 584 | 27 | (2.8) | 82 | (2.8) | 475 | (4.4) | <0.001 ^a |
| No | 14,082 | 951 | (97.2) | 2,803 | (97.2) | 10,328 | (95.6) | |
| unknown | 97 | 3 | - | 21 | - | 73 | - | |

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

| | | | | | | | | |
|---|--------|-----|--------|-------|--------|--------|--------|---------------------|
| Diabetes mellitus | | | | | | | | |
| Yes | 66 | 4 | (0.4) | 8 | (0.3) | 54 | (0.5) | 0.291 ^a |
| No | 13,909 | 916 | (99.6) | 2,725 | (99.7) | 10,268 | (99.5) | |
| unknown | 788 | 61 | - | 173 | - | 554 | - | |
| Recurrent miscarriages | | | | | | | | |
| Yes | 144 | 5 | (0.5) | 18 | (0.7) | 121 | (1.2) | 0.019 ^a |
| No | 13,831 | 915 | (99.5) | 2,715 | (99.3) | 10,201 | (98.8) | |
| unknown | 788 | 61 | - | 173 | - | 554 | - | |
| Family history of birth defects | | | | | | | | |
| Yes | 321 | 21 | (2.2) | 50 | (1.7) | 250 | (2.3) | 0.167 ^a |
| No | 14,327 | 952 | (97.8) | 2,831 | (98.3) | 10,544 | (97.7) | |
| unknown | 115 | 8 | - | 25 | - | 82 | - | |
| Medication use during early pregnancy | | | | | | | | |
| Yes | 5,517 | 381 | (39.1) | 1,078 | (37.4) | 4,058 | (37.6) | 0.607 ^a |
| No | 9,132 | 593 | (60.9) | 1,807 | (62.6) | 6,732 | (62.4) | |
| unknown | 114 | 7 | - | 21 | - | 86 | - | |
| Only folic acid supplement use during early pregnancy | | | | | | | | |
| Yes | 2,909 | 54 | (5.6) | 148 | (5.2) | 2,707 | (25.4) | <0.001 ^a |
| No | 11,592 | 907 | (94.4) | 2,716 | (94.8) | 7,969 | (74.6) | |
| unknown | 262 | 20 | - | 42 | - | 200 | - | |
| Any folic acid supplement use during early pregnancy | | | | | | | | |
| Yes | 3,357 | 67 | (7.0) | 208 | (7.3) | 3,082 | (28.9) | <0.001 ^a |
| No | 11,144 | 895 | (93.0) | 2,655 | (92.7) | 7,594 | (71.1) | |
| unknown | 262 | 19 | - | 43 | - | 200 | - | |
| Multivitamin (containing folic acid) use during early pregnancy | | | | | | | | |
| Yes | 729 | 14 | (1.5) | 68 | (2.4) | 647 | (6.0) | <0.001 ^a |
| No | 13,851 | 951 | (98.5) | 2,802 | (97.6) | 10,098 | (94.0) | |
| unknown | 183 | 16 | - | 36 | - | 131 | - | |

^a χ^2 tests and Fisher's exact tests; ^bone-way analysis of variance

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 2. Associations between all birth defects and ICD 10 birth defect codes and maternal serum folate status during the first trimester

| | Deficiency | Possible | Optimal | Crude Odds Ratios | | | Adjusted Odds Ratios | | |
|---|------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------|---------------------------|------------------------|-------------------|
| | (n = 981) | Deficiency (n = 2,906) | Levels (n = 10,876) | (95% Confidence Interval) | | | (95% Confidence Interval) | | |
| | No. | No. | No. | Deficiency | Possible Deficiency | Optimal Levels | Deficiency | Possible Deficiency | Optimal Levels |
| Any birth defect | 26 | 65 | 251 | 1.15 (0.77, 1.74) | 0.97 (0.74, 1.28) | Ref. | 1.23 (0.81, 1.87) | 1.03 (0.78, 1.36) | Ref. |
| ICD 10 Codes | | | | | | | | | |
| Nervous system (Q00-07) | 0 | 1 | 5 | - - | 0.75 (0.09, 6.41) | Ref. | - - | 0.76 (0.09, 6.70) | Ref. |
| Eye, ear, face, and neck (Q10-18) | 1 | 1 | 8 | 1.39 (0.17, 11.13) | 0.47 (0.06, 3.74) | Ref. | 1.06 (0.13, 8.81) | 0.39 (0.05, 3.19) | Ref. |
| Circulatory system (Q20-28) | 10 | 23 | 97 | 1.15 (0.60, 2.21) | 0.89 (0.56, 1.40) | Ref. | 1.31 (0.68, 2.55) | 0.96 (0.61, 1.53) | Ref. |
| Respiratory system (Q30-34) | 0 | 1 | 0 | - - | - - | Ref. | - - | - - | Ref. |
| Cleft lip and cleft palate (Q35-37) | 1 | 3 | 20 | 0.56 (0.08, 4.15) | 0.56 (0.17, 1.89) | Ref. | 0.44 (0.06, 3.39) | 0.49 (0.15, 1.68) | Ref. |
| Digestive system (Q38-45) | 0 | 2 | 16 | - - | 0.47 (0.11, 2.03) | Ref. | - - | 0.48 (0.11, 2.13) | Ref. |
| Genital organs (Q50-56) | 5 | 16 | 42 | 1.32 (0.52, 3.36) | 1.43 (0.80, 2.54) | Ref. | 1.45 (0.56, 3.74) | 1.59 (0.88, 2.86) | Ref. |
| Urinary system (Q60-64) | 4 | 2 | 18 | 2.47 (0.84, 7.32) | 0.42 (0.10, 1.79) | Ref. | 2.36 (0.77, 7.24) | 0.41 (0.10, 1.80) | Ref. |
| Musculoskeletal system (Q65-79) | 4 | 14 | 39 | 1.14 (0.41, 3.20) | 1.34 (0.73, 2.48) | Ref. | 1.39 (0.49, 3.99) | 1.57 (0.84, 2.94) | Ref. |
| Other (Q80-85) (except for syndromes, not elsewhere classified) | 1 | 2 | 4 | 2.78 (0.31, 24.91) | 1.87 (0.34, 10.21) | Ref. | 2.28 (0.24, 21.93) | 1.89 (0.37, 10.60) | Ref. |

Adjusted for maternal age (continuous variable), parity, educational level (years), smoking in early pregnancy, drinking in early pregnancy, body mass index (continuous variable), medication use in early pregnancy
CHD, congenital heart defect

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. Associations between folate-related birth defects and maternal serum folate status during the first trimester

| Groups of folate-related birth defects | Deficiency (n = 981) | Possible Deficiency (n = 2,906) | Optimal (n = 10,876) | Crude Odds Ratios (95% Confidence Interval) | | | Adjusted Odds Ratios (95% Confidence Interval) | | |
|--|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---|------------------------|-------------------|--|------------------------|-------------------|
| | No. | No. | No. | Deficiency | Possible Deficiency | Optimal Levels | Deficiency | Possible Deficiency | Optimal Levels |
| All folate-related birth defects | 11 | 28 | 118 | 1.04 (0.56, 1.93) | 0.89 (0.59, 1.93) | Ref. | 1.11 (0.59, 2.09) | 0.92 (0.61, 1.41) | Ref. |
| CHDs | 10 | 23 | 92 | 1.21 (0.63, 2.33) | 0.94 (0.59, 1.48) | Ref. | 1.39 (0.72, 2.71) | 1.02 (0.64, 1.63) | Ref. |
| CHD classification | | | | | | | | | |
| Septal heart defects | 6 | 15 | 59 | 1.13 (0.49, 2.63) | 0.95 (0.54, 1.68) | Ref. | 1.3 (0.55, 3.06) | 1.04 (0.58, 1.81) | Ref. |
| Conotruncal heart defects | 1 | 0 | 4 | 2.78 (0.31, 24.91) | - | Ref. | 4.09 (0.41, 40.53) | - | Ref. |
| Left ventricle outflow obstruction | 1 | 2 | 6 | 1.85 (0.22, 15.42) | 1.25 (0.25, 6.18) | Ref. | 1.61 (0.18, 14.50) | 1.28 (0.25, 6.54) | Ref. |
| Right ventricle outflow obstruction | 2 | 2 | 13 | 1.71 (0.39, 7.60) | 0.58 (0.13, 2.55) | Ref. | 2.24 (0.49, 10.22) | 0.66 (0.15, 2.94) | Ref. |
| Other CHDs | 0 | 4 | 10 | - | 1.50 (0.47, 4.77) | Ref. | - | 1.64 (0.49, 5.44) | Ref. |
| CHD phenotype | | | | | | | | | |
| Ventricular septal defects | 6 | 11 | 44 | 1.52 (0.65, 3.57) | 0.94 (0.48, 1.81) | Ref. | 1.72 (0.72, 4.11) | 1.01 (0.51, 1.97) | Ref. |
| Atrial septal defects | 0 | 3 | 9 | - | 1.25 (0.34, 4.61) | Ref. | - | 1.56 (0.41, 5.87) | Ref. |
| Pulmonary valve stenosis | 2 | 2 | 13 | 1.71 (0.39, 7.60) | 0.58 (0.13, 2.55) | Ref. | 2.31 (0.51, 10.52) | 0.67 (0.15, 3.01) | Ref. |
| Orofacial clefts | 1 | 3 | 20 | 0.56 (0.08, 4.15) | 0.56 (0.17, 1.89) | Ref. | 0.44 (0.06, 3.39) | 0.49 (0.15, 1.68) | Ref. |
| Orofacial cleft phenotype | | | | | | | | | |
| Cleft lip with or without cleft palate | 0 | 1 | 12 | - | 0.31 (0.04, 2.40) | Ref. | - | 0.26 (0.03, 2.03) | Ref. |
| Cleft palate (alone) | 1 | 1 | 6 | 1.85 (0.22, 15.42) | 0.62 (0.08, 5.18) | Ref. | 2.25 (0.25, 20.06) | 0.62 (0.07, 5.29) | Ref. |
| Other | 0 | 1 | 2 | - | 1.87 (0.17, 20.63) | Ref. | - | 1.55 (0.14, 17.74) | Ref. |
| Hypospadias | 0 | 2 | 2 | - | 3.70 (0.52, 26.30) | Ref. | - | 4.91 (0.66, 36.64) | Ref. |

Adjusted for maternal age (continuous variable), parity, educational level (years), smoking in early pregnancy, drinking in early pregnancy, body mass index (continuous variable), medication use in early pregnancy

CHD, congenital heart defect