

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

前向きコホート研究に基づく先天異常、免疫アレルギー
および小児発達障害のリスク評価と
環境化学物質に対する遺伝的感受性の解明

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

北海道大学環境健康科学研究教育センター

岸 玲子

研究分担者

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

水上 尚典

札幌医科大学医学部産婦人科学講座

遠藤 俊明

旭川医科大学医学部産婦人科学講座

千石 一雄

北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野

野々村克也

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座小児科学分野

有賀 正

福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課

梶原 淳睦

いであ株式会社環境創造研究所

松村 徹

北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門生命有機化学分野

松浦 英幸

北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学教室

石塚真由美

北海道大学環境健康科学研究教育センター

花岡 知之

東京医科歯科大学難治疾患研究所

佐田 文宏

北海道大学環境健康科学研究教育センター

池野多美子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

荒木 敦子

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

佐々木成子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

宮下ちひろ

平成 28 (2016) 年 3 月

目 次

. はじめに
. 総合研究報告書	
前向きコホート研究に基づく先天異常、免疫アレルギーおよび小児発達障害のリスク評価と環境化学物質に対する遺伝的感受性の解明 (岸 玲子ほか)
. 分担研究報告書	
1. 先天異常の発生状況とケースコホート研究デザインによる曝露リスク評価に関する研究 (岸 玲子, 水上 尚典, 遠藤 俊明, 千石 一雄, 梶原 淳睦ほか)
2. Predictors of folate status among pregnant Japanese women: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2002 -2012 (岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ, 池野 多美子, 水上 尚典ほか)
3. Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children (岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ)
4. Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Risk of Infectious Diseases in Early Life (岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ)
5. The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study (岸 玲子, 荒木 敦子, 野々村 克也)
6. 胎児期の有機塩素系農薬曝露による児の臍帯血中性ホルモンへの影響 (岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ, 佐々木 成子, 野々村 克也ほか)
7. 胎児期の有機塩素系農薬(OCP)曝露が母児の甲状腺ホルモンに及ぼす影響 (岸 玲子, 松村 徹, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ)
8. Prenatal MEHP, BPA exposure and cord bold adipokine leels (岸 玲子, 松村 徹, 佐々木 成子)
9. 胎児期における喫煙曝露と学童期の注意欠陥/多動性障害 (ADHD) 傾向との関連 (岸 玲子, 池野 多美子)
10. 妊婦の喫煙が母の遺伝子多型を介して児の出生時体格に及ぼす影響 (岸 玲子, 佐田 文宏, 佐々木 成子)

11. 胎児期有機フッ素化合物曝露影響の臍帯血網羅的エピゲノム解析
(岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ, 佐々木 成子, 石塚 真由美)
12. 胎児期のメチル水銀とフタル酸エステル類曝露が児の DNA メチル化に及ぼす影響
(岸 玲子, 石塚 真由美)
- . 研究成果の刊行に関する一覧表

はじめに

PCBs・ダイオキシン類や有機フッ素化合物、有機塩素系農薬などは、環境での蓄積性や残留性が強いことから、いわゆる POPs (Persistent Organic Chemicals) として、世界的に生産や使用が制限されていますが、半減期が長いため、私たちの体内から容易にはなりません。さらにプラスチック可塑剤などとして使われているフタル酸エステル類やビスフェノール A などは、半減期は短いのですが広範囲に使用されているため、多くの人々の血液から検出されます。このような化学物質の人への影響は、大人よりも小児、胎児期に大きいことが懸念されています。たとえば尿道下裂・停留精巣をはじめとする先天異常は、その原因が器官形成期のアンドロゲンの作用に依存しますので、いわゆる環境ホルモン作用を示すといわれる PCBs・ダイオキシン類などとの関係を調べる必要があります。しかし、世界的にも次世代への直接的な影響と因果関係は、未だ解明されるには至っておりません。さらに、ADHD など小児の軽度発達障害、あるいはアレルギーは、最近各国で増加していると報告されていますが、わが国では地域の一定集団を対象に環境リスクを評価することが全くなされていませんでした。

そこで、私たちは 2002 年から 2 つの前向き研究を立ち上げて研究を行っています。そのうち札幌市の 1 産院で説明し同意を得た妊婦様 514 人の母体血とお子様の臍帯血について、PCBs・ダイオキシン類、水酸化 PCB 類、有機フッ素化合物 (PFOS・PFOA)、農薬、フタル酸エステル類およびビスフェノール A の測定を行い、種々のアウトカムとの関係を調べています。また、北海道全域の北海道 (大規模) コーホートでは、母子ペアで参加者が 20929 名になり 2 万組を超えました。妊娠初期に同意を得た妊婦様全員の葉酸、コチニン (ニコチンの代謝物) 濃度を測定し、母体血の有機フッ素化合物もより詳しく PFDA・PFNA・PFHxS・PFUnDA など 11 種類の測定を行い、成長・発達、甲状腺ホルモン、アレルギー・感染症、および性ホルモン・第二次性徴への影響を研究し、今後は先天異常や疾病との関係について解析を進めます。いずれのコーホートも、次世代影響を評価するために思春期まで追跡させていただくよう、参加者の皆様をお願いしています。

一方、最近のゲノムおよびエピゲノム研究の進歩から、化学物質の影響の強さは、曝露された個体の異物 (薬物) 代謝酵素類の遺伝子多型や疾病感受性遺伝子等によっても修飾されることが考えられます。このような研究は、同じ曝露濃度でも遺伝的ハイリスク群である場合、より予防的な対応を進める必要があります。

本研究は臨床家と環境疫学専門家の協力で進めています。このような地域をベースに胎児期から立ち上げ、環境リスク評価を行っている研究は、最近増えてきていますが、本研究はその先駆的な位置づけになります。今後、遺伝と環境の両面からのアプローチで予防医学的な数多くの成果が出ることを期待されますので、引き続き皆様のご協力をお願い申し上げます。

最後に多くの皆様のご尽力により研究を継続することができ、本年度報告書をこのようにまとめることができましたことに対して、衷心より御礼申し上げます。

平成 28 年 3 月

研究代表者 岸 玲子

前向きコホート研究に基づく先天異常、免疫アレルギーおよび小児発達障害のリスク評価と環境化学物質に対する遺伝的感受性の解明

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

<研究要旨>

本研究は妊娠中の環境化学物質曝露が胎児期および小児期に与える健康影響を環境-遺伝相互作用を含めてリスク評価し、障害を予防する方策を明らかにすることを目的とする。2つの前向きコホートのうち、地域ベースの37医療機関における大規模コホートでは、妊娠初期の12週までに同意を得た妊婦を対象に、母体血および臍帯血のPCBs・ダイオキシン類や有機フッ素化合物(PFAAs)、ビスフェノールA(BPA)、フタル酸エステル類などの環境化学物質濃度を測定し、曝露による先天異常、Small for Gestational Age(SGA)および低出生体重(LBW)、免疫アレルギーへの影響と児の神経発達への直接的因果関係を評価する。平成25年度に登録妊婦は20,926名に達し、これまで新生児個票が得られた19,280名(多胎児含む)の妊娠転帰は、生産18,938名(98.24%)、死産(妊娠22週以降)64名(0.33%)、自然流産209名(1.08%)、人工流産56名(0.29%)であった。先天異常総数は330件(1.7%)、そのうちマーカー奇形238件であった。最も頻度が高かったのは心室中隔欠損症33人、次いで停留精巣・非触知精巣14人、ダウン症候群20人、口唇・口蓋裂35人、水腎症18人などであった。また、514人の小規模コホートの児については、詳細な発達調査を実施している。

化学物質曝露評価と先天異常については、超微量血液からPCBs・ダイオキシン類・OH-PCB類の一斉分析ができる方法を開発し、分析精度の信頼性を確認した。ケースコントロール研究で先天性心疾患をアウトカムに、PCBs・ダイオキシン類について先天性疾患182名コントロール182名合計364名が測定済みである。あわせて有機フッ素化合物(PFAAs)は先天性心疾患145名コントロール290名合計435名が測定済みである。尿道下裂・停留精巣をアウトカムに、ケース74名コントロール148名合計222名で妊娠初期(器官形成期)のBPA・フタル酸エステル類および胎児期の性腺機能の指標となる臍帯血中の性ステロイドホルモン108名について測定した。今後、母親の年齢や出産年でマッチングしたコントロール群と比較解析し化学物質が内分泌かく乱作用を介して先天異常リスクに与える影響を明らかにする。生後の曝露評価は、7歳の1,467名から尿を回収して全件で尿中コチニン濃度を測定しており、今後、化学物質曝露評価を実施する。

コホート全体を追跡し、1歳、2歳、4歳、7歳時点のアレルギー・感染症罹患および体格(身長・体重)、1歳半、3歳、5歳、6歳、8歳でASD/ADHD等の神経行動発達を評価している。7歳6,600名のうち喘息(741例)、アトピー性皮膚炎(853例)、および8歳5,608名からADHD疑い(241例)と化学物質の関連を検討する。化学物質の胎児期曝露が脂質代謝に与える影響を検討するため、臍帯血中アディポネクチン(264名)、レプチン(257名)濃度を測定し、胎児のアディポサイトカイン濃度に影響するか、またアディポサイトカインの変化が出生時の体格、生後の発育にどのように関連するかを検討する。

有機フッ素化合物(PFAAs)11種類(PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxS, PFOS)の一斉分析の測定系を確立して検討した結果、2003年から2011年で母体血中PFOS, PFOA濃度は有意に減少した一方で、PFNA, PFDA濃度は有意に上昇したことを既に報告した。炭素鎖が長いために半減期が長く生体影響が持続すると考えられるPFAAsの代替物質の影響も含めて、胎児期PFAAs曝露が出生後の4歳のアレルギー症状および感染症発症リスクとの関連を2003年~2009年に登録した母児1,558名について検討した。母体血中PFDoDA, PFTrDA濃度は高いほど4歳児のアレルギー発症リスクが量反動的に低下することを示した。性別で層別化して解析したところ男児のみで有意な関連が認められた。さらに、母体血中PFOS, PFHxS濃度が高いほど4歳の感染症リスクが増加した。長鎖のPFAAsの胎児期曝露は児の免疫アレルギーに対して抑制的に作用し、性特異的な影響を及ぼす可能性が示唆された。しかし、炭素鎖の長いPFAAsが生体に及ぼす影響に関しては、世界的にデータが乏しく、性差のメカニズムは不明であることから、一般集団を対象に長鎖のPFAAs曝露の

影響を詳細に検討し、免疫毒性および性差について明らかにする必要がある。また、平成 26 年 12 月までに 7 歳の調査が終了した 2,807 名のうち 1,066 名については、近年アトピー性皮膚炎の要因として知られる皮膚のバリア機能に關与するフィラグリン遺伝子 (*FLG*) 変異についてシーケンスを行っている。2 歳、4 歳時のアトピー性皮膚炎は *FLG* 遺伝子変異があるとオッズ比がそれぞれ 1.55 (95%信頼区間(CI): 1.08 - 2.22), 1.47 (95%CI: 1.03 - 2.09) だったことから、アトピー性皮膚炎については今後 *FLG* 遺伝子変異の有無も考慮して曝露の影響を検討する必要がある。

胎児期の環境化学物質曝露により、胎内でのホルモン環境が変化する内分泌かく乱作用が懸念される。母への環境化学物質の濃度を曝露因子とし、化学物質濃度と胎内のホルモン環境との関連について検討を行った。胎児期の PFOS・ダイオキシン類曝露により男児の臍帯血中のコルチゾール・コルチゾンが低下し、エストラジオール (E2), DHEA が増加した。テストステロン (T) /E2 比は低下したことから、アロマターゼ活性亢進の可能性が示唆された。また、Inhibin B は低下し、動物実験同様にセルトリ細胞への負の影響が見られた。女児でもプロゲステロンとプロラクチン (PRL) が低下し、内分泌かく乱作用が見られた。DEHP 曝露は男児で Inhibin B および insulin like factor-3 (INSL3) が有意に低下したことから、生活レベルの曝露でも動物実験同様にフタル酸エステル類 (DEHP) 曝露は精巢のセルトリ細胞・ライディヒ細胞の増殖抑制や減少を促す可能性が示された。ビスフェノール A (BPA) はテストステロンやプロゲステロン等のステロイドホルモン値を上げる結果が得られていることから、PFC やフタル酸エステル類とは異なる作用機序で内分泌かく乱作用を引き起こしているといえる。

母体血中有機塩素系農薬 29 種類 (ジクロロジフェニルトリクロロエタン類 6 種、ドリノ類 3 種、クロルデン類 5 種、ヘプタクロル類 3 種、ヘキサクロロシクロヘキサン類 4 種、マイレックス、トキサフェン 6 種、ヘキサクロロベンゼン) を測定したところ、国内で使用実績のない農薬マイレックス、トキサフェン (Parlar-26, Parlar-50) が検出され、輸入工業製品や生活環境からの曝露が示唆された。男児では母体血中のクロルデン系農薬の濃度が高くなると T, PRL, Inhibin B 値が低下した。一方、女児では、DDE および DDT 濃度が高いと、E2 が低く、p-p'-DDE は T/E2 比が増加した。従って、これら胎生期の性腺機能への影響が、その後の性役割行動や第二次性徴発来のタイミングなどの性分化にも影響を与えるのか、ヒトの疫学研究で明らかにする必要がある。胎児期には甲状腺ホルモンが身体や脳の発育に重要な役割を有することが知られている。一方、高濃度の有機塩素系農薬への胎児期曝露は児の発達に悪影響を与えることが指摘されている。そこで本研究では、有機塩素系農薬の胎児期曝露が母児の甲状腺ホルモンの濃度に影響するか検討したところ、母体血中有機塩素系農薬が増加するほど、母の FT4 が有意に低下し (o,p'-DDE: $=-.03, p<.05$, o,p'-DDT: $=-.06, p<.05$, Dieldrin: $=-.08, p<.05$)、一方で新生児の FT4 は有意に増加した (cicNonachlor: $=.04, p<.05$, p,p'-DDT: $=.04, p<.05$, Parlar50: $=.04, p<.05$)。有機塩素系農薬の中で DDT, Dieldrin, cicNonachlor, および Parlar50 はより母児の甲状腺機能に影響する可能性が示唆された。

8 歳に達した 3,258 名について注意欠陥/多動性障害の評価スケール (ADHD-RS) を用い、胎児期の喫煙曝露 (妊娠初期・中期・後期の喫煙状況と妊娠後期母体血中コチニン値) と出生後の受動喫煙曝露 (1 歳から 7 歳までの両親の喫煙状況) による注意欠陥/多動性障害 (ADHD) 症状への影響を検討した。ADHD-RS のカットオフと診断を基に定義した ADHD 疑い群 (501 名) と対照群に分けて解析したところ、全ての妊娠期間で母親の喫煙は非喫煙に比べリスクが上昇した (初期= オッズ比 (OR) (95%CI): 1.8 (1.3-2.5); 中期= 1.6 (1.1-2.2); 後期= 1.6 (1.1-2.3))。母親の妊娠後期コチニン値で分類した非喫煙群は能動喫煙群に対してリスクが上昇した (1.4 (1.1-2.1))。また妊娠中に喫煙を継続していた母親に比べ、妊娠中に禁煙した場合の ADHD 発症への影響は、非喫煙および妊娠初期の禁煙でリスクを低下させた (非喫煙= 0.62 (0.41-0.94), 妊娠初期禁煙= 0.57 (0.35-0.90))。その一方で、妊娠中の父親の喫煙状況や出生後の受動喫煙の影響は認められなかった。

環境-遺伝交互作用について、Fluidigm 社 EP1 システムを用いて化学物質の代謝酵素 (CYP2A6, UGT1A1 等)、核内受容体 (PPAR, CAR 等)・疾患感受性関連 (DRD4, DAT1 等) の遺伝子領域の母児の遺伝子多型、および QIAGEN 社パイロシーケンサーを用いて、胎児期発育に必須であるインスリン様成長因子遺伝子 IGF2 等の臍帯血 DNA メチル化

と内分泌かく乱物質の曝露濃度との関連を網羅的に解析し環境遺伝相互作用を明らかにした。また、臍帯血 DNA(N=292)の Illumina 社 HumanMethylation450 BeadChip を用いた網羅的 DNA メチル化解析を行い、胎児期 PFAAs 曝露による児のエピゲノム変化の全容を明らかにした。化学物質の解毒代謝遺伝子多型の解析について、妊婦の遺伝子多型の違いによって、児の出生時体格との関連に有意な差は認められなかった。妊婦の喫煙状況において、非喫煙者の児と比較して、喫煙者の児では、出生体重が 71g 有意に小さかった(95%CI; -103, -40; $P < 0.001$)。さらに、妊婦の遺伝子多型と喫煙状況の組合せにおいて、AHR(G>A, Arg554Lys)-GA/AA 型, CYP1A1-(A>G, Ile462Val)-AA 型でかつ XRCC1(C>T, Arg194Trp)-CC 型をもつ非喫煙者の児と比較して、AHR-GG 型, CYP1A1-AG/GG 型でかつ XRCC1-CT/TT 型をもつ喫煙者の児では、出生体重が 145g 有意に小さかった(95%CI; -241, -50; $P = 0.003$)。AHR-GG 型, CYP1A1-AG/GG 型および XRCC1-CT/TT 型をもつ妊婦では、(BPDE)代謝物や BPDE-DNA 付加体が、それぞれの Reference 群よりも多く生成されると予想される。そして、これらの遺伝子多型と妊娠中の喫煙が組合わさると出生体重の平均が 145g 小さくなる可能性が示唆された。エピゲノム解析は母年齢・世帯年収・妊娠中喫煙・魚摂取量・パーマの有無・児性別で調整後、母毛髪水銀量と LINE1 メチル化との間に有意な正の関連がみられた ($r = 0.7$, $p = 0.04$)。MEHP 濃度については、母年齢・学歴・妊娠中喫煙・児性別・母体血採血時期で調整後、H19 メチル化との間に有意な負の関連がみられた ($r = -1.3$, $p = 0.02$)。

胎児期環境化学物質曝露が影響を与えるメチル化部位のさらなる特定のため、HumanMethylation450 を用いた網羅的 DNA メチル化解析を実施している。これまでに、G&G 社にて解析された札幌コーホート臍帯血 DNA での網羅的メチル化データ(N=292)の前処理・バッチ間の補正、および robust linear regression を用いて PFAAs 濃度との関連を解析した。今後は網羅的解析でスクリーニングされた PFAAs 濃度と関連の見られた遺伝子メチル化について、北海道コーホートで再現性を確認する。また、PCBs・ダイオキシン、水銀等の環境化学物質曝露が影響をおよぼすメチル化部位、その変化に伴う成長発育・アレルギー・神経発達等のアウトカムとの関連を明らかにする。

< 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

遠藤 俊明
札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌器科，准教授

千石 一雄
旭川医科大学医学部産婦人科学講座，教授

野々村 克也
北海道大学大学院医学研究科 腎泌尿器外科学分野，名誉教授

有賀 正
北海道大学大学院医学研究科・小児科学分野，教授

梶原 淳睦
福岡県保健環境研究所保健科学部，部長

松村 徹
いであ株式会社環境創造研究所 取締役・環境創造研究副所長

松浦 英幸
北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門生命有機化学分野，准教授

石塚 真由美
北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学分野，教授

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

佐田 文宏
東京医科歯科大学，疫学，公衆衛生学非常勤講師

池野 多美子
北海道大学環境健康科学研究教育センター，特任講師

荒木 敦子
北海道大学環境健康科学研究教育センター，准教授

佐々木 成子
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，助教

宮下 ちひろ
北海道大学環境健康科学研究教育センター，特任講師

研究協力機関

慶愛病院，えんどう桔梗マタニティクリニック，白石産科婦人科病院，公立芽室病院，青葉産婦人科クリニック，帯広協会病院，秋山記念病院，札幌医科大学附属病院，北海道大学病院，北見赤十字病院，朋佑会札幌産科婦人科，札幌東豊病院，五輪橋産科婦人科小児科病院，はしもとクリニック，旭川医科大学病院，函館中央病院，王子総合病院，町立中標津病院，札幌徳州会病院，旭川赤十字病院，市立稚内病院，釧路労災病院，札幌厚生病院，市立土別総合病院，日鋼記念病院，市立札幌病院，幌南病院，市立函館病院，道立紋別病院，天使病院，函館五稜郭病院，中村病院，勤医協札幌病院，北見レディースクリニック，遠軽厚生病院，釧路赤十字病院，名寄市立総合病院，帯広厚生病院。

A．研究目的：

ヒトでの科学的な根拠が乏しかった PCBs・ダイオキシン類や有機フッ素化合物（PFAAs）などの環境化学物質による先天異常や Small for Gestational Age（SGA）および低出生体重（LBW），免疫アレルギーや発達への影響について日本の疫学データをもって応えるために，北海道全域の 37 の地域病院の協力を得て，母体血および臍帯血の採取保存，化学物質曝露量の測定を行い，前向きコホート研究を実施する。本研究は，前向きコホート研究で，研究参加に同意した妊婦 20,926 名について，先天異常（マーカー奇形・異常 55 疾患）モニタリングを実施し，地域の病院ベースにおける先天異常発生率を把握する。

PCBs・ダイオキシン類を代表とする残留性有機汚染物質は人体への健康影響が懸念され，胎児期曝露による低出生体重，ホルモン値の変動，精神行動発達などの関連が示されてきた。先天異常については，動物実験においてダイオキシン類の胎児期曝露が心奇形を引き起こすことが報告された（Kopf et al. 2009）。日本の疫学研究においては，母親がゴミ焼却炉から 2km 以内に居住する場合，その母親から生まれた先天性疾患を伴う児の死亡リスクが増加した（Tango et al. 2004）。フランスでは，妊娠初期のダイオキシン濃度が高い群で停留精巣リスクが増加（Cordier et al. 2010），デンマーク・フィンランド研究でも尿道下裂・停留精巣発症群の曝露濃度が対照群より高い傾向を認めた。しかし，これまでの疫学研究

は、生体試料を用いた胎児期の曝露評価が不十分で、異性体レベルで測定した研究もなかった。特に、生体影響が PCBs より高いと懸念される OH-PCB に関する疫学報告は内外でほとんどない。

一方、PFOS、PFOA に代表される有機フッ素化合物 (PFAAs) は、絶縁性・撥水撥油性をはじめとする優れた特性を有することから、衣類・建材・界面活性剤など幅広い分野で使用されている。人は主に飲料水や赤肉、魚介類を通して曝露され、胎児への影響が懸念されているが、十分な研究が行われていない。わが国でも 2010 年に PFOS、PFOA が化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律の第一種特定化学物質(一部用途以外の製造・輸入禁止)に指定された。そこで、PFOS、PFOA 以外の代替品で長鎖の化合物を含めた PFAAs の妊婦の曝露評価を行う必要がある。本研究では、UPLC/MS/MS を用いた一斉分析法を確立して、11 種類の PFAAs 濃度を測定し曝露評価を行い、先天異常、成長発育、免疫、神経行動発達への影響を検討する。

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネートやエポキシ樹脂などの原料として、フタル酸エステルはプラスチックの可塑剤として使用されている化学物質である。ヒトは主に経口摂取によって曝露されるが、その大部分が消化管から吸収されグルクロン酸抱合体となり速やかに尿中へ排泄されるが、様々な製品に汎用されているため、恒常的かつ長期的な曝露による健康影響が懸念されている。動物実験でエストロゲン類似作用やアンドロゲン阻害作用を表すことが示唆されている。近年、げっ歯類の動物実験で、従来の毒性試験で NOEL とされた用量より低い用量の BPA 胎児期曝露で、仔の思春期早発や神経発達への影響などが報告されたが、ヒトでのデータはまだ少ない。本研究では、微量試料中 BPA およびフタル酸エステル類の高精度測定法を開発して、母体血中の BPA・フタル酸エステル類濃度を測定し、胎児期 BPA・フタル酸エステル類曝露による先天異常、性腺機能、成長発育、免疫、神経行動発達への影響を検討する。

難分解性の有機塩素系農薬は内分泌かく乱作用を持つと懸念されている。胎児期には甲状腺ホルモンが身体や脳の発育を調整することが知られている。一方、高濃度の有機塩素系農薬への胎児期曝露は児の発達に悪影響を与えることが指摘されている。そこで本研究では、有機塩素系農薬の胎児期曝露が

母児の甲状腺ホルモンの濃度に影響を与えるかどうかについて検討する。

我々は、生活環境における低レベルの胎児期ダイオキシン類濃度が出生時体重を低下させることを既に小規模コーホートで示したが (Konishi et al., 2009), 遺伝的素因の関係は調べられていない。ダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体 (AHR) に結合し、シトクロム P450 (CYP) 1A1・CYP1A2・CYP1B1 によって代謝され、また、転写抑制因子である AHR リプレッサー (AHRR) を刺激する。AHR・AHRR・CYP1 系遺伝子多型は、種々の疾患リスクに影響することが知られている。そこでダイオキシン類曝露とその代謝に関する妊婦の遺伝子多型を解析し、出生時体重に与える影響を検討する。細胞内に入ったダイオキシン類は、芳香族炭化水素受容体 (AHR) を介しシトクロム P450 (CYP) 1A1 および GSTM1 などのグルタチオン S-転移酵素によって代謝され、体外へ排泄される。非喫煙の妊婦と比較して、喫煙している妊婦は児の出生時体格に影響を及ぼし、AHR、CYP1A1、GSTM1 遺伝子多型による遺伝的感受性があったと報告されているものの、ダイオキシン類についての報告はまだない。そこで本研究では、胎児期のダイオキシン類曝露が児の出生時体格に及ぼす影響の AHR (G>A, Arg554Lys), CYP1A1 (T>C, MspI) および GSTM1 (Present/Absent) 遺伝子多型による遺伝的感受性について検討する。

胎児期化学物質曝露などが児の DNA メチル化を始めとするエピジェネティクスに及ぼす影響が懸念されている。DNA メチル化は胎児期の環境と後生の表現型を結ぶ重要な因子だと考えられている。なかでも Insulin-like growth factor 2 (IGF2) は胎児発育に重要な成長因子で、これまでにこの領域のメチル化異常と出生体重のほか、乳幼児期の肥満、また成人後の生活習慣病、肥満、大腸がんリスクとの関連も報告されている。本研究では、胎児期の内分泌かく乱物質曝露が臍帯血の IGF2/H19 領域、および LINE1 の DNA メチル化に及ぼす影響について検討する。また、胎児期環境化学物質曝露が影響を与えるメチル化部位のさらなる特定のため、Illumina 社 HumanMethylation450 BeadChip を用いた網羅的 DNA メチル化解析を実施した。このメチル化解析ツールはゲノム上の 99% の遺伝子をカバーしており、45 万メチル化部位について網羅的に解析を行える。この方法により、網羅的に探索を行い曝露によ

てより強く影響を受けるメチル化部位を特定するとともに、その変化に伴う成長発育・アレルギー・神経発達等のアウトカムとの関連を明らかにしていく。これまでの研究成果を発展させる形で、今後は出生コホート研究を学齢期から思春期まで追跡し、第二次性徴、発育、発達障害、アレルギー・感染症に焦点をあてて、小児疾患予防のための研究を継続する。

B. 研究方法

1. 先天異常の発生状況とケースコホート研究デザインによる曝露リスク評価に関する研究

北海道内の産科 37 施設で妊娠初期から妊婦 20,926 名の協力を得て登録し、平成 27 年 12 月末までに新生児個票の情報が得られた全分娩(流産・死産を含む) 19,280 名を対象とした。まず分娩後に医療機関で記載された新生児個票から、生死産、流産(自然・人工)を集計した。次いで生産児について、性比と単多胎数、在胎週数、出生体重を算出した。妊娠中の疾患について発生状況を調べた。先天異常については、心奇形・尿道下裂・停留精巣等の先天異常(マーカー奇形・異常 55 疾患)、流死産、妊娠中の疾患について発生率を算出した。環境化学物質の曝露評価をケースコホート研究デザインで実施するため、大規模出生コホートからサブコホートを抽出した。先天異常のケースは出生時の新生児個票と生後の質問票から抽出し、コントロールはケースを除いたサブコホート群から出産病院、出産年、母親の出産時年齢、児の在胎週数からマッチングして抽出した。

2. Predictors of folate status among pregnant Japanese women: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2002 -2012

Study location and population

Participants of this study were pregnant women recruited during their first trimester (<13 weeks of gestation) from thirty-seven health facilities across Hokkaido Prefecture. They are participants of the ongoing large-scale birth cohort of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Data was

generated from these participants by means of baseline questionnaires, biochemical assays, hospital birth records, and four months post-partum health records. Totally, 15266 participants with available baseline questionnaires, folate and cotinine levels were included in this study.

Biochemical assays

Non-fasting whole maternal blood samples were collected from participants and sera were stored promptly at 4 °C until folate assay. Folate is quantified by direct chemiluminescent acridinium ester technology¹³ adopted by World Health Organization's (WHO) classification guidelines¹⁵. In this study, we used plasma cotinine concentrations to quantitatively classify active and passive smoking status as previously reported¹⁶.

Definition of variables

The dependent variable was folate status. Serum folate status was classified as: folate deficiency, (<6.80nmol/L); suboptimal status (6.80 -13.59 nmol/L) and optimal folate status (\geq 13.60 nmol/L)¹⁵. We merged folate deficiency and suboptimal category in one group. Active and passive exposure to tobacco smoking statuses were classified based on plasma cotinine cut-off points established in a previous report¹⁶. A non-smoker was defined as having plasma cotinine concentration of less than 1.19 nmol/L. A person exposed to environmental tobacco smoke (ETS) as having 1.19 - 65.21 nmol/L; and active smoker as having greater than

65.21 nmol/L of plasma cotinine concentration. Self-reported active tobacco smoking was categorized based on the number of cigarette sticks smoked per day. Light smokers (<10 cigarette sticks per day); moderate smokers (10-19 cigarette sticks per day); and heavy smokers (≥ 20 cigarette sticks per day). ETS exposure at home and work place was assessed.

Statistical analyses

Skewed serum folate and plasma cotinine concentrations were log-transformed during the preliminary descriptive analyses, thereafter back-transformed. We used Bayesian logistic regression and fitted the model to the $m = 10$ imputed data set, with dichotomized folate status as the outcome variable, and the followings as potential predictor variables: age, BMI, parity, educational level, income, occupation, region, year of enrollment, season of the year at enrollment, folic acid supplements use, other nutritional supplements use, alcohol intake, active cigarette smoking, and exposure to environmental tobacco smoke (ETS) both at home and work place. We used results of plasma cotinine concentration to quantitatively classify active smoking and passive exposure to tobacco products, and regressed against folate status, with adjustment for all other potential predictors. We reported pooled estimates for the main effects of the predictor variables in the

model. P-values for testing for the presence of a linear trend are also reported for predictor variables with more than two categories. Reported effects, confidence intervals and p-values are pooled over the $m = 10$ imputed data sets.

Statistical analyses were performed using JMP 11 Pro Statistical Software Package and binary logistic regression model which required multiple imputation of missing data and was performed using R version 3.2.2. An alpha level of significance was set at <0.05.

3 . Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children

Mother-infant pairs who enrolled in the Hokkaido large cohort Study on Environment and Children's Health in 2003-2009 were included in this study. 11 PFAAs including PFHxA, PFHpA, PFHxS, PFOS, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA and PFTeDA were measured in maternal plasma taken at 28-32 weeks of gestation using ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. Information on characteristics of participants was obtained from medical birth records, and self-administered questionnaires obtained during pregnancy and after delivery. Allergic diseases including eczema, rhinoconjunctivitis and wheezing were defined using a modified part of the Japanese version of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three questionnaire at 4 years of age. Associations of PFAA quartiles with allergic outcomes were examined using logistic models (n=1558).

4 . Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Risk of

Infectious Diseases in Early Life

Mother-infant pairs who enrolled in the Hokkaido large cohort Study on Environment and Children's Health in 2003-2009 were included in this study. We measured concentrations of 11 PFAAs: PFASs (perfluoroalkane sulfonates) including PFHxS, PFOS; and PFCAs (perfluorinated carboxylic acids) including perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA) in maternal plasma samples obtained at 3rd trimester of pregnancy using ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. The method detection limits (MDLs) were: PFNA and PFOS (0.3 ng/mL), PFOA and PFHxS (0.2 ng/mL), and the other PFAAs (0.1 ng/mL). Information on characteristics of participants was obtained from medical birth records, and self-administered questionnaires obtained during pregnancy and after delivery. Information on infectious diseases including otitis media, pneumonia, RSV, varicella, febrile seizure were extracted from report of mothers in questionnaire at 4 years of age. Totally 1,558 mother child pairs who had information on infectious diseases and prenatal PFAA measurements were used for analysis. Associations of PFAA quartiles with allergic outcomes were examined using logistic models.

5 . The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study

We conducted a hospital-based birth cohort study between July 2002 and October 2005 in Sapporo, Japan (n=514). In total, 251 mother-infant pairs were included in this study. The prenatal PFOS and PFOA levels were measured in maternal serum samples by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry (LC-MS-MS). Cord blood levels of glucocorticoid (cortisol and cortisone) and androgenic hormones (dehydroepiandrosterone (DHEA) and androstenedione) were also measured by LC-MS-MS.

6 . 胎児期の有機塩素系農薬曝露による児の臍帯血中性ホルモンへの影響

札幌コーホートに登録した母児を対象とした。379名の母体血中 DDT 類 6 物質, Drin 類 3 物質, Chlordane 類 5 物質, Heptachlor 類 3 物質, Hexachlorocyclohexane(HCH)類 4 異性体, Toxaphene 6 物質, および Mirex, Hexachlorobenzene(HCB)の合計 29 化合物を, GC/NCI MS および GC/HRMS で分析した。臍帯血中エストラジオール, 総テストステロン(T), プロゲステロン, 黄体形成ホルモン(LH), 卵胞刺激ホルモン, 性ホルモン結合グロブリン, プロラクチン, インヒビン B, Insulin-like factor3 を測定した。検出率 80%以上の 14 化合物について, 性ホルモンとのデータがそろった男児 106 名, 女児 126 名を解析に用いた。

7 . 胎児期の有機塩素系農薬 (OCP) 曝露が母児の甲状腺ホルモンに及ぼす影響

2002年から2005年に札幌市の一産院で妊婦 514 名をリクルートし, 札幌市衛生研究所によるマススクリーニングデータより甲状腺ホルモンの濃度を得た。379名の母体血中有機塩素系農薬について, ガスクロマトグラフィー/陰イオン化学イオン化質量分析計および高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法により一斉分析を行った(いであ(株)環境創造研究所)。有機塩素系農薬 29 種類のうち, 検出率が 80%以上であった 15 種類を自然対数に変換した後, 統計解析した。有機塩素系農薬および甲状腺ホルモンのデータがそろっており, 双胎および甲状腺関連疾患を治療中の場合を除いた母 340 名, 児 365 名について解析を行った。TSH および FT4 については自然対数に変換した後, 母については分娩時年齢, 妊娠前 BMI, 妊娠中の喫煙, 海藻摂取頻度, 甲状腺ホルモンおよび OCP 測定における血液採取時期で調整して重回帰分析を行った。同様に, 児については在胎週数, 性別, 出生時体重, 甲状腺ホルモン測定のための血液採取時期で調整を行った。

8 . Prenatal MEHP, BPA exposure and cord blood adipokine levels

Among 514 pregnant women between 23 and 35 weeks of gestation from one hospital in Sapporo, MEHP levels in maternal blood in late pregnancy (N=340) and bisphenol A (BPA) levels in cord blood were measured (N=285). Leptin and total and high molecular weight (HMW) adiponectin measured in cord blood samples as markers of metabolic function. Logistic regression models were used to estimate the association between MEHP and BPA and fetal leptin and adiponectin, adjusting for confounding factors. Total and high molecular weight (HMW) adiponectin and leptin levels in cord blood were measured in 264 and 257 neonates, respectively. Adiponectin analysis was done by ELISA using Human Adiponectin Assay kit from Sekisui Medical Co. Ltd (Tokyo, Japan). Leptin analysis was done by Radioimmunoassay (RIA) using Human Leptin RIA kit from Linco Research Inc. (St. Charles, MO, USA). Cord blood levels of leptin and total and HMW adiponectin were categorized into the top 90th percentile (high group) and bottom 10th percentile (low group).

9. 胎児期における喫煙曝露と学童期の注意欠陥/多動性障害(ADHD)傾向との関連

北海道スタディ大規模コーホートにおいて、調査票を回収できた 8 歳時 3,258 名について検討した。ADHD の評価は、ADHD-RS (ADHD-Rating Scale; 田中ら, 2008)と医師による ADHD 確定診断情報に基づき、ADHD-RS の得点から、DuPaul et al.(1998)の分類を用いて ADHD と判定される児、および 8 歳調査票において、ADHD の確定診断が明らかになっている児のいずれかに当てはまる合計 501 名(全体の 15.5%)を「ADHD 疑い群」として定義した。喫煙曝露評価は、胎児期の喫煙曝露を妊娠初期・中期・後期の喫煙状況と妊娠後期に採血した母体血のコチニン値、出生後の受動喫煙曝露は 1 歳 2 歳 4 歳、7 歳時の調査票による両親の喫煙状況により評価した。母体血中コチニン値は ELISA 法で分析した。解析は、調査票による喫煙状況を「非喫煙群」「喫煙群」の 2 群で、母体血中コチニン値は Sasaki et al.(2012)の定義に基づき、0.21ng/ml 未満を「非喫煙群」、

0.21ng/ml 以上 11.49ng/ml 未満「受動喫煙群」、11.49ng/ml 以上を「能動喫煙群」の 3 段階の曝露レベルでカテゴリー化してロジスティック回帰分析を行った。

10. 妊婦の喫煙が母の遺伝子多型を介して児の出生時体格に及ぼす影響

2003 年~2007 年に、北海道内の 40 産科病院を受診した初期の妊婦で、インフォームドコンセントの得られた母児 1,0731 組のうち、ランダムサンプリングした 3,263 組が研究対象である。妊婦とその配偶者に対して、妊娠初期に既往歴、社会経済要因、生活環境などに関する質問紙調査を行った。妊娠後期に血液を採取し、母体血漿コチニン値を ELISA 法で解析し、Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を用いて喫煙者と非喫煙者に分類した(カットオフ値=11.48 ng/mL)。出産時に母体血を採取し、DNA を抽出した後、芳香族炭化水素受容体(AHR)、シトクロム P450(CYP) 1A1 および DNA 修復遺伝子である X-ray repair cross-complementing gene 1 (XRCC1) の遺伝子多型をリアルタイム PCR 法で解析した。産後 4 か月時に母子健康手帳からの出生時体格情報の転記を依頼した。妊婦の喫煙、遺伝子多型と児の出生時体格との関連には重回帰分析を SPSS Ver. 22 を用いて行った。

11. 胎児期有機フッ素化合物曝露影響の臍帯血網羅的エピゲノム解析

札幌の一産科病院で 2002 年 7 月から 2005 年 10 月までにリクルートした北海道スタディ札幌コーホート参加者のうち、初期調査票・出産時カルテ情報・母体血中 PFAAs 濃度・臍帯血がそろった母児を対象とし、臍帯血 DNA を用いて Infinium HumanMethylation450 BeadChip 網羅的メチル化解析を行い、163 名分の 45 万 CpGs のメチル化値を得た。母体血中 PFAAs 濃度は LC-MS/MS にて測定した。メチル化値は標準化・バッチ間補正後、robust linear regression を用いて log10 変換後の PFAAs 濃度との関連を解析した。False-discovery rate (FDR) で $q < 0.05$ 、もしくは偏回帰係数の絶対値が PFOS で 0.075、PFOA で 0.05 以上であり p 値が 0.05 未満であった CpGs の抽出を行い、うち同一遺伝子上で 3CpGs 以上抽出されたものみに絞り込んだ。臍帯血中細胞組成は Houseman の手法にメチル化値から推定した。データ処理・統計解析は R(ver.3.1.3) を用いて行った。

Bioconductor(ver.3.0)の minfi, sva, limma package, JMP(ver.11)を用いて行った。

12. 胎児期のメチル水銀とフタル酸エステル類曝露が児の DNA メチル化に及ぼす影響

2002年から2005年に札幌市の一産院で妊婦をリクルートした北海道スタディ札幌コホート参加者 514 名のうち、出産時カルテ情報、臍帯血 DNA、母毛髪水銀(N=244)もしくは母体血中 MEHP 濃度(N=187)のそろった母子ペアを対象とした。臍帯血全血 400 μ L から Maxwell[®] 16 DNA Purification Kit (Promega 社)にて抽出を行った臍帯血 DNA を Epiect Plus Bisulfite Kit (Qiagen 社)にてバイサルファイト処理後、Pyromark Q24 system (Qiagen 社)を用いたパイロシークエンス法により IGF2, H19, LINE1 の 3 領域について DNA メチル化解析を行った。母毛髪水銀は酸化燃焼金アマルガム法(AAS法)、母体血中 MEHP 濃度は GC-MS で測定を行った。曝露濃度を log₁₀ 変換し、重回帰分析により統計解析を行った。

倫理面への配慮

疫学調査は北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会および共同研究施設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「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮し、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科で規定されている「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従い、本研究は倫理面の十分な配慮のうえ行った。

C. 研究結果

1. 先天異常の発生状況とケースコホート研究デザインによる曝露リスク評価に関する研究

母親の出産時年齢は平均 29.84 \pm 4.83 歳であった。生産 18,938 名(98.2%)、死産 64 名(0.33%)、自然流産 209 名(1.1%)、人工流産 56 名(0.29%)であった。出産した児の男児は 9,552 名(49.5%)、単胎は 18,582 名(96.3%)、

在胎週数は平均 38.38 \pm 3.22 週、出生体重は平均 3,019.23 \pm 433.02g であった。妊娠中の疾患では、切迫早産で入院したものの 1,043 名(5.4%)が最も多く、次いで臍からの出血 499 名(2.6%)、妊娠中毒症あるいは妊娠高血圧症候群 359 名(1.9%)であった。生産、死産、流産を含む全分娩のうち、なんらかの先天異常を有する児の総数は 330 名であり、そのうちマーカー奇形 238 件(1.2%)、その他の先天奇形 109 件(0.5%)であった。また、在胎 22 週以降の分娩 18,142 件中では、先天異常のある児は 295 件(1.5%)であった。発生頻度(出産 1 万対)の最も高い先天異常は心室中隔欠損症 16.8(33 名)であった。次いで停留精巣・非触知精巣 14.6(14 名：男児のみ 9,552 名で算出)、Down 症候群 10.3(20 名)、口唇および口蓋裂 18.1(35 名)、水腎症 9.3(18 名)などであった。

2002 年から 2011 年までのリクルート年毎に無作為抽出された 500 名および、最終 2012 年の全員 369 名から構成される 4,869 名のサブコホート集団を抽出した。ケースコホート研究デザインで PCBs・ダイオキシン類は先天性疾患 182 名、コントロール 182 名、合計 364 名が測定済みである。PFAAs は先天性心疾患 145 名、コントロール 290 名、合計 435 名が測定済みである。尿道下裂・停留精巣のケースコントロール 210 件について、妊娠初期(器官形成期)の BPA およびフタル酸エステル類および、胎児期の性腺機能の指標となる臍帯血中の性ステロイドホルモン 108 件について測定した。母親の年齢や出産年でマッチングしたコントロールと解析し、化学物質が内分泌かく乱作用を介して先天異常リスクに与える影響を明らかにする。

2. Predictors of folate status among pregnant Japanese women: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2002 -2012

Overall, geometric mean (standard deviation) of serum folate concentration was 17.77 (3.58) nmol/L. Prevalence of folate deficiency was 0.52%. Suboptimal folate status constituted 25.65%, while optimal folate status was reported in 73.83% of the population. Initial descriptive analyses using folate as a continuous variable revealed mean serum folate concentrations increased with

increasing maternal age, educational status, annual income, FA supplements use, and other nutritional supplements use. Mean serum folate concentrations decreased with increasing number of cigarette sticks smoked per day, ETS exposure at home, and increasing plasma cotinine concentrations. Exposure to ETS at both home and at work was associated with low folate status. Serum folate inversely correlated with plasma cotinine concentration. Significant differences were observed in mean plasma cotinine concentrations among nonusers of FA supplements and users, with geometric mean (SD) of 46.41 (23.23) nmol/L, and 25.27 (15.32) nmol/L respectively. 7.00% of folic acid users started intake more than 3 months before conception. Another 8.00% started 1 month before conception, while majority (more than 60.00%) started use following confirmation of pregnancy. The average frequency of use per week was 3 times. In the regression model, the value of the McFadden's pseudo-pooled over the imputed data sets was 8.69%. The demographic determinants of low folate status identified were lower maternal age (AOR: 1.48, 95% CI: 1.32, 1.66; lower educational level (AOR: 1.27, 95% CI: 1.17, 1.39; lower annual income (AOR: 1.11, 95% CI: 1.01, 1.22); residing in the south and eastern regions (AOR: 1.25, 95% CI: 1.14, 1.38), and (AOR: 1.15, 95% CI: 1.05, 1.25), respectively. Being enrolled into the study between 2005 and 2007 was associated with an increase in the risk of low folate status (AOR: 1.23, 95% CI: 1.12, 1.35); while recruitment between 2008 and 2010 reduced the likelihood of having low folate status (AOR: 0.81, 95% CI: 0.73, 0.90), respectively. Lower BMI (AOR: 0.84, 95% CI: 0.74, 0.94; and unemployment were associated with risk reduction (AOR: 0.87, 95% CI: 0.80, 0.94).

Lifestyle factors that reduced the odds of low folate status were the use of FA supplements; other nutritional supplements; and weekly alcohol consumption. Lifestyle factors

that increased the odds of low folate status were active cigarette smoking and ETS exposure. Smoking <10 cigarette sticks per day was associated with increased odds; while smoking between 10 to 19 cigarette sticks per day was associated with an increased risk. However, smoking \geq 20 cigarette sticks per day was not statistically significant, but p-trend <0.001. Exposure to ETS at home and work increased the odds of low folate status.

Participants with plasma cotinine levels between 1.19 - 65.21 nmol/L were 1.20 times more likely to have low folate status (AOR: 1.20, 95% CI: 1.10, 1.31); while those with levels > 65.21 nmol/L had a twofold increase in risk (AOR: 1.91, 95% CI: 1.70, 2.14).

3 . Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children

Mother-child pairs who had information on allergy at 4 years and PFAA measurements were included in data analysis (n=1558). The number of children who developed allergic disorders at 4 years of age were as follows: wheezing, 291 (18.6%); rhinoconjunctivitis 84 (5.4%); eczema 296 (19.0%); and total allergic disease 536 (34.4%). Adjusted odds ratios (ORs) in the 4th quartile vs 1st quartile (Q4 vs Q1) for total allergic diseases (including at least one of allergic outcomes) were significantly decreased for PFDoDA (Q4 vs Q1 OR: 0.621; 95% CI: 0.454, 0.847) and PFTrDA (Q4 vs Q1 OR: 0.712; 95% CI: 0.524, 0.966) in all children. We found the same results between PFAAs and eczema. The adjusted OR (Q4 vs Q1) for wheezing in association with higher maternal PFHxS levels was 0.728 (95% CI: 0.497, 1.06) in all children. Although adjusted OR for allergic outcomes in 2nd to 4th of examined PFAA quartiles reduced compare to first quartile in both sexes, the associations were statistically significant only in boys after sex stratification.

4 . Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Risk of Infectious Diseases in Early Life

The number of children who developed infectious disorders until 4 years of age were as follows: otitis media, 649 (41.4%); pneumonia, 287 (18.4%); RSV, 197 (12.6%); varicella 589 (37.8%), and febrile seizure, 121 (7.7%), and total infectious disease 1075 (69.0%). There was no significant difference between incidence of infectious diseases among boys and girls. PFOS levels in the highest quartile (Q) were associated with increased odds ratio of infectious diseases compare with the lowest quartile (Q4 vs Q1 OR: 1.56; 95% CI: 1.12, 2.17; p for trend= 0.022) in all children. In addition, PFHxS was associated with higher risk of total infectious diseases only among girls across quartiles (Q4 vs Q1 OR: 1.56, 95% CI: 0.963, 2.54; p for trend= 0.022). However, PFDA was associated with reduced risk of otitis media among girls (Q4 vs Q1 OR: 0.700; 95% CI: 0.452, 1.08, p for trend= 0.042).

5 . The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study

We found a dose-response relationship of prenatal PFOS exposure, but not PFOA, with glucocorticoid levels after adjusting for potential confounders. Cortisol and cortisone concentrations were -28.70 (95% confidence interval (CI): -46.10, -11.30; p for trend < 0.001) and -77.93 ng/mL (95% CI: -130.97, -24.89; p for trend <0.001) lower, respectively, in infants with prenatal PFOS in the fourth quartile compared with those in the first quartile. The highest quartile of prenatal PFOS exposure was positively associated with a 0.99 ng/mL higher DHEA level compared with the lowest quartile (95% CI: 0.15, 1.83; p for trend=0.013), whereas

PFOA showed a negative association with DHEA levels (quartile 4 vs 1: -0.98 ng/mL, 95% CI: -1.72, -0.23; p for trend=0.011). We observed no significant association between PFCs and androstenedione levels.

6 . 胎児期の有機塩素系農薬曝露による児の臍帯血中性ホルモンへの影響

最も高濃度検出されたのは p,p'-DDE(中央値 619.3 pg/g-wet), ついで -HCH(154.3), HCB(104.0)だった。交絡要因を調整した重回帰分析で, 男児では oxychlordan, trans-nonachlor, cis-heptachlorepoxide, HCB, Mirex 濃度濃度が高くなるとテストステロン濃度が低下した。また, DDE および DDT, Dieldrin, HCH, Mirex, および Parlar-50 濃度が高くなると PRL が低下, c-Heptachlorepoxide, および HCB 濃度が高くなると Inhibin B 濃度が低下した。LH, FSH, SHBG, INSL3 と濃度とに関連はなかった。一方女児では, DDE および DDT 濃度が高いと E2 が低く p-p'-DDE は T/E2 比が増加した。

7 . 胎児期の有機塩素系農薬 (OCP) 曝露が母児の甲状腺ホルモンに及ぼす影響

交絡要因を調整した重回帰分析の結果, 母では OCP による TSH への影響は観察されなかったが, 一方で, 母体血中 o,p'-DDE, o,p'-DDT および Dieldrin が増加するほど FT4 が有意に低下した (o,p'-DDE: =-.03, p<.05, o,p'-DDT: =-.06, p<.05, Dieldrin: =-.08, p<.05)。児については TSH への影響は観察されなかったが, 一方, 母体血中 cicNonachlor, p,p'-DDT, および Parlar50 が増加するほど新生児の FT4 が有意に増加した (cicNonachlor: =.04, p<.05, p,p'-DDT: =.04, p<.05, Parlar50: =.04, p<.05)。

8 . Prenatal MEHP, BPA exposure and cord blood adipokine levels

Median (IQR) MEHP and BPA levels (ng/ml) were 10.70 (6.30-17.05) and 0.051 (< LOD-0.075), respectively. Median total and HMW adiponectin and leptin levels were significantly higher in girls than boys. (P = 0.006 for total adiponectin, p = 0.005 for HMW adiponectin, p < 0.001 for leptin, respectively). The median leptin level was significantly correlated to both total and HMW adiponectin levels (data not shown). The median

leptin level was significantly higher in mothers with higher BMI ($P = 0.006$) and the total and HMW adiponectin levels were suggestively higher in mothers with higher BMI ($p < 0.1$). The geometric mean BPA level was higher in higher total adiponectin group with borderline significance. BPA level was also higher in high HMW adiponectin and high leptin groups with no statistical significance. After adjusting with covariates, MEHP level was positively associated with total and HMW adiponectin levels among boys ($p = 0.008$ for both). MEHP level was negatively associated with leptin levels with borderline significance over all, and after stratification by child sex, the association was observed only among girls with statistical significance ($p = 0.008$). BPA level was not associated with any of the adipokine levels.

9. 胎児期における喫煙曝露と学童期の注意欠陥/多動性障害(ADHD)傾向との関連

母児の基本属性で「ADHD 疑い群」「対照群」に群間差が認められた「出産年齢」「世帯年収」「父親学歴」「出産回数」「在胎週数」「児の性別」「妊娠中葉酸摂取」で調整し、「ADHD 疑い群か否か」を従属変数としたロジスティック回帰分析を実施した。その結果、妊娠初期・中期・後期のいずれにおいても、妊娠中の母親の喫煙は非喫煙に比べオッズ比が上昇していた(初期 オッズ比(OR)=1.769, 95% 信頼区間(CI):1.250-2.502; 中期 OR=1.560, 95%CI:1.105-2.204; 後期 OR=1.557, 95%CI:1.099-2.265)。母親の妊娠後期コチニン値からカテゴリー分けした非喫煙群は能動喫煙群に対して OR=1.445, 95%CI:1.008-2.072 であった。また妊娠中に喫煙を継続していた母親に比べ、妊娠中に禁煙した場合の ADHD 発症への影響は、非喫煙と妊娠初期の禁煙でリスクを低下させた(非喫煙 OR=0.622, 95%CI:0.409-0.944, 妊娠初期禁煙 OR=0.565, 95%CI:0.354-0.902)。その一方で妊娠中の父親の喫煙状況や出生後の受動喫煙の影響は認められなかった。

10. 妊婦の喫煙が母の遺伝子多型を介して児の出生時体格に及ぼす影響

妊婦の遺伝子多型の違いによって、児の出生時体格との関連に有意な差は認められなかった。妊婦の喫煙状況において、非喫煙者の児と比較して、喫煙者の児では出生体重が 71g 有意に小さかった(95%CI; -103, -40; $P < 0.001$)。さらに妊婦の遺伝子多型と喫煙状況の組合せにおいて、AHR(G>A, Arg554Lys)-GA/AA 型, CYP1A1-(A>G, Ile462Val)-AA 型でかつ XRCC1(C>T, Arg194Trp)-CC 型をもつ非喫煙者の児と比較して、AHR-GG 型, CYP1A1-AG/GG 型でかつ XRCC1-CT/TT 型をもつ喫煙者の児では、出生体重が 145g 有意に小さかった(95%CI; -241, -50; $P = 0.003$)。

11. 胎児期有機フッ素化合物曝露影響の臍帯血網羅的エピゲノム解析

札幌の一産科病院で 2002 年 7 月から 2005 年 10 月までにリクルートした北海道スタディ札幌コホート参加者のうち、初期調査票・出産時カルテ情報・母体血中 PFAAs 濃度・臍帯血がそろった母児を対象とし、臍帯血 DNA を用いて Infinium HumanMethylation450 BeadChip 網羅的メチル化解析を行い、163 名分の 45 万 CpGs のメチル化値を得た。母体血中 PFAAs 濃度は LC-MS/MS にて測定した。メチル化値は標準化・バッチ間補正後、robust linear regression を用いて log10 変換後の PFAAs 濃度との関連を解析した。False-discovery rate (FDR) で $q < 0.05$ 、もしくは偏回帰係数の絶対値が PFOS で 0.075、PFOA で 0.05 以上であり p 値が 0.05 未満であった CpGs の抽出を行い、うち同一遺伝子上で 3CpGs 以上抽出されたものみに絞り込んだ。臍帯血中細胞組成は Houseman の手法にメチル化値から推定した。データ処理・統計解析は R(ver.3.1.3)、Bioconductor(ver.3.0)の minfi, sva, limma package, JMP(ver.11)を用いて行った。

12. 胎児期のメチル水銀とフタル酸エステル類曝露が児の DNA メチル化に及ぼす影響

母毛髪中水銀量の中央値は 1.42 μ g/g (最小値-最大値: 0.30-7.55)、出産前に採血を行った 187 名の母体血中 MEHP 濃度の中央値は 10.4 ng/ml (最小値-最大値: 3.4-64.0)であった。母毛髪水銀量との関連については、母年齢・世帯年収・妊娠中喫煙・魚摂取量・パームの有無・児性別で調整後、LINE1 メチル化との間に有意な正の関連がみられた($\beta = 0.7$, $p = 0.04$)。フタル酸エス

テル代謝物 (MEHP) 濃度については、母年齢・学歴・妊娠中喫煙・児性別・母体血採血時期で調整後、H19 メチル化との間に有意な負の関連がみられた ($r = -1.3$, $p = 0.02$)。性別での層別解析を行なったところ、母毛髪水銀量と LINE1 メチル化、MEHP 濃度と H19 メチル化、どちらも男児のみで有意な関連がみられた。また、それぞれの曝露濃度を 4 分位に分けて解析を行なった結果、MEHP 濃度と H19 メチル化との関連で有意な濃度依存性が見られた (p for trend = 0.02)。水銀と LINE1 メチル化との関連では有意ではないが濃度依存傾向がみられ、特に、男児でその傾向が強かった。

D. 考察

本研究で示した先天異常発生状況のデータは、わが国における初めての大規模な地域病院ベースの情報である。日本で唯一の全国規模調査である「日本産婦人科医会先天異常モニタリング (JAOG ICBDSR Annual report 2013)」の 2007-2011 年報告と北海道スタディ 2003-2014 年報告の形態異常頻度を比較すると、脊髄髄膜瘤、水頭症、口唇裂、横隔膜ヘルニア、小腸閉鎖、尿道下裂、ダウン症などのほとんどが JAOG よりも発生率が低かったが、多指・趾症は若干高かった。先天異常の発生率は殆どが JAOG 報告よりも下回っているが、これは調査対象施設の規模による違いが大きい。JAOG は地域の中心的な医療を担う病院が対象であるが、本研究では周産期医療の中心的な施設だけでなく産科クリニックからの報告も多く、地域ベースの前向きコホート研究という特徴を有している。本研究は一般的な地域の有病率を把握する上で、わが国で他に例のない非常に重要なデータと考えられる。

環境化学物質と先天異常の関係については、全出産児 19,267 名を対象に、引き続き PCBs・ダイオキシン類・OH-PCB、および PFAAs11 種類の分析を実施し、最終的にケースコホート研究デザインにおいて、先天性心疾患症例 182 名と対照例 182 名で、母の既往歴、妊娠中の薬剤、飲酒など生活習慣、職業歴、血清葉酸値、血中コチニン濃度を調整したうえで、胎児期の PCBs・ダイオキシン類および OH-PCB、および PFAAs が先天性心疾患リスクに与える影響を明らかにする予定である。今後も、引き続き PCBs・ダイオキシン類、PFAAs の曝露評価を継続すると共に、環

境化学物質の関与が示唆されるマーカ-奇形の尿道下裂・停留精巣 78 名をケースとして、妊娠初期 (器官形成期) の母体血血清を用いて BPA・フタル酸エステル類の曝露評価を行う。

これまでの研究で北海道 (大規模) コホートをを用いて 2003 年~2011 年の経年変化を PFAAs の一斉分析の測定系を確立し、曝露濃度の変化を検討した。PFAAs11 種類 (PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxS, PFOS) を測定した結果、2003 年から 2011 年で母体血中 PFOS, PFOA 濃度は有意に減少した一方で、PFNA, PFDA 濃度は有意に上昇した。中央値は PFOS 3.83 ng/mL, PFOA 2.67 ng/mL, PFNA 1.36 ng/mL, PFDA 0.563 ng/mL, PFUnDA 1.50 ng/mL, PFDoA 0.188 ng/mL, PFTrDA 0.347 ng/mL, PFHxS 0.324 ng/mL であった。母体血中 PFOS, PFOA 濃度が出生時体重に与える影響を検討した結果、PFNA 曝露レベルが高いほど出生時体重と身長が有意に低かった ($p = 0.02$, $p = 0.003$)。特に男児に影響が強かった。アレルギー症状との関連では、2 歳時では、女児のみにおいて母体血中 PFUnDA, PFTrDA 濃度が高いほど、2 歳児のアトピー性湿疹の発症リスクが量反応的に低下した。同じ集団を継続してフォローアップし 4 歳のアレルギーとの関連を検討したところ、母体血中 PFDoDA, PFTrDA 濃度は高いほど 4 歳児のアレルギー発症リスクが量反応的に低下することを示した。性別で層別化して解析したところ男児のみで有意な関連が認められた。さらに母体血中 PFOS, PFHxS 濃度が高いほど 4 歳の感染症リスクが増加した。長鎖の PFAAs の胎児期曝露は児の免疫アレルギーに対して抑制的に作用し、性特異的な影響を及ぼす可能性が示唆された。しかし、炭素鎖の長い PFAAs が生体に及ぼす影響に関しては、世界的にデータが乏しく、性差のメカニズムは不明であることから、一般集団を対象に長鎖の PFAAs 曝露の影響を詳細に検討し、免疫毒性および性差について明らかにする必要がある。さらに、平成 26 年 12 月までに調査が終了した 2,807 名のうち 1,066 名については、近年アトピー性皮膚炎の要因として知られる皮膚のバリア機能に關与するフィラグリン遺伝子 (*FLG*) 変異についてシークエンスを行っている。2 歳、4 歳時のアトピー性皮膚炎は *FLG* 遺伝子変異があるとオッズ比がそれぞれ 1.55 (95%CI: 1.08 - 2.22), 1.47 (95%CI: 1.03 - 2.09) だったことから、アトピー性皮膚炎については今

後 FLG 遺伝子変異の有無も考慮して曝露の影響を検討する必要がある。

胎児期の PFOS・PFOA 曝露による臍帯血中グルココルチコイドと性ホルモンとの関連を検討したところ、PFOS がコルチゾールとコルチゾンとを低下させ、DHEA を増加させた。これまでの研究で同じ集団で PFOS 曝露による性ステロイドホルモンへの抗アンドロゲン作用やエストロゲン作用、およびステロイドホルモン合成の基質となるトリグリセリドや脂肪酸(パルミチン酸等)の低下を報告した。本研究で認められた、グルココルチコイドや DEHA への影響は、性腺機能のみならず視床下部-脳下垂体-副腎皮質系(HPA)軸の制御をかく乱させ、妊娠維持および胎児発育に重要な体内電解質や血圧などの制御に影響する可能性を示した重要な報告である。

難分解性の有機塩素系農薬については、本研究の DDT 類、HCB の濃度は 2002-2003 年に調査が実施された千葉市・山梨市(Fukata et al., 2005)およびドイツ(Wittsiepe et al., 2008)の報告と近似し、スペイン(Jimenez Torre et al., 2006)、USA(Chevier et al., 2008)の農業地域より低値と推測された。日本では Mirex は未使用にもかかわらず、全母体血から検出された。これまでに、同じ集団で胎児期の環境化学物質曝露により、胎内でのホルモン環境が変化する内分泌かく乱作用がみられた。母への環境化学物質の濃度を曝露因子とし、化学物質濃度と胎内のホルモン環境との関連について検討を行った。胎児期の PFOS 曝露により臍帯血中のコルチゾール・コルチゾンが低下し、エストラジオール(E2)、DHEA が増加した。テストステロン(T)/E2 比は低下したことから、アロマターゼ活性亢進の可能性が示唆された。また、Inhibin B は低下し、動物実験同様にセルトリ細胞への負の影響が見られた。女兒でもプロゲステロンとプロラクチンが低下し、内分泌かく乱作用が見られた。DEHP の一次代謝物(MEHP)の濃度が高いほど男児で Inhibin B および insulin like factor-3(INSL3)が有意に低下したことから、生活レベルの曝露でも動物実験同様に DEHP 曝露は精巣のセルトリ細胞・ライディヒ細胞の増殖抑制や減少を促す可能性が示された。BPA はテストステロンやプロゲステロン等のステロイドホルモン値を上げる結果が得られていることから、PFC やフタル酸とは異なる作用機序で内分泌かく乱作用を引き起こしているといえる。

加えて OCP の胎児期曝露による児の性ホルモンへの影響が示唆された。特に男児でテストステロン、女児でエストラジオール値の低下が見られた。男児でテストステロンを下げる結果は、成人男性の結果と一致した。胎児期曝露は E2 を低下させる結果を示し、アロマターゼ活性阻害による可能性を示唆した。思春期あるいは成人で報告されている DDT 曝露によるエストロゲン様作用が胎児期にも影響を及ぼすのか、さらなる検討が必要である。加えて、これら胎生期の性腺機能への影響が、その後の性役割行動や第二性徴発来のタイミングなどの性分化にも影響を与えるのか、ヒトの疫学研究で明らかにする必要がある。

甲状腺ホルモンへの影響については、母体血中の有機塩素系農薬が増加するほどに母の FT4 が低下し、新生児の FT4 が増加した。有機塩素系農薬の中で DDT, Dieldrin, dicNonachlor, および Parlar50 はより母児の甲状腺機能に影響する可能性が示唆された。これらの影響が児の発達に与える影響については今後検討していく必要がある。

本研究での母体血中 MEHP 濃度は、妊婦での先行研究と比較すると高く、臍帯血中 BPA 濃度は先行研究と比較すると低かった。本研究のレプチン、アディポネクチン濃度は、日本や台湾の先行研究と同レベルであったが、欧米諸国の報告値よりは低い値であった。本研究では、レプチン、高分子量・総アディポネクチンは女児で男児よりも高かった。本研究では、男女ともに BPA 濃度とレプチン、アディポネクチン濃度の関連はみられなかったが、MEHP 濃度とアディポネクチン濃度で正の関連がみられた。女児では、MEHP 濃度とレプチン濃度と負の相関がみられた。これまでに臍帯血中 BPA 濃度とアディポサイトカインを検討した研究は 2 報で、Chou らは、特に男児で胎児期 BPA 曝露は新生児のアディポネクチンの低下、レプチンの増加のリスクを上げるとし、Ashley-Martin らは男児で BPA 濃度とアディポネクチン濃度に逆相関があると報告している。胎児期フタル酸エステル類曝露とアディポサイトカインの先行研究は Ashley-Martin らの 1 報のみで、妊婦の尿中 MCPP 濃度の上昇で男児のレプチン濃度が増加することを示唆した。本研究は、胎児期 MEHP 曝露が児のアディポネクチン、レプチン濃度に影響を与えること、そして影響には性差があることを示し、先行研究に科学的な根拠を追加した。

胎児期から学童期までの喫煙曝露による 8 歳児の ADHD 傾向の関連では、妊娠初期・中期・後期のすべての時点で妊娠中の母親の喫煙が出生後の ADHD 傾向に影響を与える可能性が示唆された。さらに、禁煙行動の時期別に影響を検討したところ、非喫煙および妊娠初期の禁煙行動のみが ADHD 傾向のリスクを低下させることが確認された。妊娠後期の母体血中コチニン濃度による曝露評価においては、非喫煙レベルに比べ能動喫煙レベルで ADHD 傾向が有意に上昇する量反応関係が確認された。妊娠中の母親の喫煙が児の ADHD 傾向に影響を及ぼす可能性はこれまで複数報告がある(Han et al., 2015; Obel et al., 2009)が、妊娠中の曝露時期による影響を厳密に検討した研究は見当たらない。本研究では妊娠時期別の喫煙状況に加え、妊娠後期の喫煙曝露をコチニンで直接的に評価した点で先行研究に例をみないものである。児の健全な発達のため、妊娠の可能性がある年齢層への禁煙教育の重要性を裏付ける点で貴重な結果である。

妊婦の喫煙が遺伝子多型を介して児の出生時体格に及ぼす影響については、AHR-GG 型、CYP1A1-AG/GG 型およびXRCC1-CT/TT 型をもつ妊婦では、(BPDE)代謝物や BPDE-DNA 付加体が、それぞれの Reference 群よりも多く生成されると予想される。そして、これらの遺伝子多型と妊娠中の喫煙が組合わさると出生体重の平均が 145g 小さくなる可能性が考えられた。しかし、本研究の結果から胎児期の母の喫煙と児の出生時体格との量反応関係およびこれらの関係における母の遺伝的な影響の関与についてはまだわからない。引き続き、母の遺伝的な影響の関与について検討する予定である。

胎児期の内分泌かく乱物質曝露による児の DNA メチル化への影響については、胎児期の水銀曝露による LINE1 高メチル化、MEHP 曝露による H19 低メチル化が示唆された。LINE1 はゲノムのおよそ 17%を占める反復配列で、レトロトランスポゾンコードしており、ゲノム全体のメチル化の指標として用いられる。出産後の母の爪の水銀レベルとの関連では、CpG アイランド上流に位置する CpG サイトの高メチル化が報告されており(Cardenas et al., 2015)、我々の結果と同様の傾向を示した。一方、H19 はノンコーディング RNA をコードしており、IGF2 の発現を抑制する。今回の結果では H19 メチル化と出生時体格との間に有意な関連は認められなかつ

た。IGF2 は脳内でも発現しており、胎児の発育のみならず、脳の発達にも重要なホルモンである。今後は神経行動発達への影響等についても調べる必要がある。また、我々はこれまでに水銀、MEHP 曝露のほか、PFAAs、ダイオキシン・PCBs 等の環境化学物質の胎児期曝露による IGF2/H19、LINE1 メチル化への影響を示した。これは、曝露が時間・組織特異的 DNA メチル化機構を攪乱し、胎児の発達に影響を与えることを示唆している。さらに、環境化学物質曝露が影響を与えるメチル化部位を特定するため、現在 Illumina 社 HumanMethylation450 BeadChip を用いた網羅解析を進行中である。今後は、さらにメチル化とその変化に伴う成長発育・アレルギー・神経発達等のアウトカムとの関連を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

本コーホート参加妊婦で平成 27 年 12 月末までに新生児個票が確認された 19,280 人のうち、先天異常の児総数は 330 人、先天異常を有する児の出産頻度は 1.7%であった。今後は、PCBs・ダイオキシン類、PFOS 等の有機フッ素化合物(PFAAs)、ビスフェノール A およびフタル酸エステル類曝露の影響について先天異常、SGA、免疫アレルギー、神経行動発達等についてケースコホート研究デザインでリスク評価を継続する。さらに、重要な交絡要因となる母体血中葉酸濃度や葉酸サプリメント摂取、母の能動および受動喫煙の有無、代謝酵素遺伝子多型を考慮して、思春期前期の成長発育、免疫アレルギー、神経行動発達など環境化学物質による次世代影響について微量分析と環境-遺伝相互作用を含めた解析を確実に行うことにより、世界的にも初めての実証的なデータを示すことが可能となる。

F. 研究発表

1) 論文発表 (原著・総説 査読有)

1. H. Goudarzi, S. Nakajima, T. Ikeno, S. Sasaki, S. Kobayashi, C. Miyashita, S. Ito, A. Araki, H. Nakazawa and R. Kishi, Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and neurodevelopment in early infancy: The Hokkaido Study, *Sci Total Environ*, 2016, 541:

- 1002-10.
2. M. A. Verner, A. E. Luccisano, N. H. Morken, M. Yoon, H. Wu, R. McDougall, M. Maisonet, M. Marcus, R. Kishi, C. Miyashita, M. H. Chen, W. S. Hsieh, M. E. Andersen, H. J. Clewell, 3rd and M. P. Longnecker, Associations of Perfluoroalkyl Substances (PFASs) with Lower Birth Weight: An Evaluation of Potential Confounding by Glomerular Filtration Rate Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK), *Environ Health Perspect*, 2015.
 3. C. Miyashita, S. Sasaki, Y. Saijo, E. Okada, S. Kobayashi, T. Baba, J. Kajiwara, T. Todaka, Y. Iwasaki, H. Nakazawa, N. Hachiya, A. Yasutake, K. Murata and R. Kishi, Demographic, behavioral, dietary, and socioeconomic characteristics related to persistent organic pollutants and mercury levels in pregnant women in Japan, *Chemosphere*, 2015, 133: 13-21.
 4. C. Miyashita, S. Sasaki, T. Ikeno, A. Araki, S. Ito, J. Kajiwara, T. Todaka, N. Hachiya, A. Yasutake, K. Murata, T. Nakajima and R. Kishi, Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and polyunsaturated fatty acids on birth size, *Sci Total Environ*, 2015, 533: 256-265.
 5. T. Mitsui, A. Araki, A. Imai, S. Sato, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi and K. Nonomura, Effects of prenatal leydig cell function on the ratio of the second to fourth digit lengths in school-aged children, *PLoS One*, 2015, 10: e0120636.
 6. R. Kishi, T. Nakajima, H. Goudarzi, S. Kobayashi, S. Sasaki, E. Okada, C. Miyashita, S. Itoh, A. Araki, T. Ikeno, Y. Iwasaki and H. Nakazawa, The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Essential and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of Their Offspring: The Hokkaido Study, *Environ Health Perspect*, 2015, 123: 1038-45.
 7. R. Kishi, T. Nakajima, H. Goudarzi, S. Kobayashi, S. Sasaki, E. Okada, C. Miyashita, S. Itoh, A. Araki, T. Ikeno, Y. Iwasaki and H. Nakazawa, The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Essential and Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of their Offspring: The Hokkaido Study, *Environ Health Perspect*, 2015, 124.
 8. S. J. Hanley, E. Yoshioka, Y. Ito and R. Kishi, HPV vaccination crisis in Japan, *Lancet*, 2015, 385: 2571.
 9. Y. Ait Bamai, A. Araki, T. Kawai, T. Tsuboi, E. Yoshioka, A. Kanazawa, S. Cong and R. Kishi, Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families, *Int J Hyg Environ Health*, 2015, 218: 461-70.
 10. 小林澄貴, 荒木敦子, 佐々木成子, 池野多美子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子,

- 岸玲子, 胎児期の母の受動喫煙と児の出生体重に関する最近の研究動向, 北海道公衆衛生学雑誌, 28, 37-48. 2015
11. X. Jia, T. Tagawa, H. Yatsuya, H. Naito, Y. Hayashi, Y. Husna, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, T. Ikeno, R. Kishi and T. Nakajima, Association of maternal whole blood fatty acid status during the prenatal period with term birth dimensions: a cross-sectional study, *J Perinat Med*, 2015, 43(5) : 565-575.
 12. X. Jia, Y. Harada, M. Tagawa, H. Naito, Y. Hayashi, H. Yetti, M. Kato, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, T. Ikeno, R. Kishi and T. Nakajima, Prenatal maternal blood triglyceride and fatty acid levels in relation to exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: a cross-sectional study, *Environ Health Prev Med*, 2015, 20(3) : 168-178, DOI : 10.1007/s12199-014-0440-4.
 13. 小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, 坂晋, 宮下ちひろ, 岡田恵美子, Limpar Mariko, 吉岡英治, 梶原淳睦, 戸高尊, 西條泰明, 岸玲子, 妊婦のダイオキシン類代謝酵素遺伝子多型と母体血中ダイオキシン類濃度との関連, *北海道医学雑誌* 2013 88 (4-5):145.
- 2) 論文発表 (解説 査読無)
1. 岸玲子, 【講座 子供を取り巻く環境と健康】第1回「奪われし未来」にしない, *公衆衛生*, vol. 79, pp.193-199. 2015.
 2. 梶原淳睦, 【講座 子供を取り巻く環境と健康】第3回 POPs(ダイオキシン・PCB類)の曝露実態, *公衆衛生*, vol. 79, pp.347-352. 2015.
 3. 荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子, 【講座 子供を取り巻く環境と健康】第5回 短半減期化学物質の曝露実態, *公衆衛生*, vol. 79, 485-490. 2015.
 4. 佐々木成子, 小林澄貴, 岸玲子, 【講座 子供を取り巻く環境と健康】第7回 喫煙, 受動喫煙による児への影響, *公衆衛生*, vol. 79, pp.637-643. 2015.
 5. 湊屋街子, 岸玲子, 【講座 子供を取り巻く環境と健康】第8回 胎児期の環境化学物質曝露が出生体重と生後発育へ与える影響, *公衆衛生*, vol. 79, pp.719-724. 2015.
 6. 宮下ちひろ, 岸玲子, 【講座 子供を取り巻く環境と健康】第9回 乳幼児のアレルギー・感染症へのダイオキシン類, 有機フッ素系化学物質曝露による影響, *公衆衛生*, vol. 79, pp.805-810., 2015.
 7. 荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第10回 乳幼児のアレルギーと胎児期・小児期の可塑剤・難燃剤曝露, *公衆衛生*, vol. 79, pp.876-881. 2015.
 8. 岸玲子, 世界における出生コホート研究の現状, *Endocrine Disrupter News Letter* vol.18.p.1.2015
 9. 宮下ちひろ, 岸玲子, 胎児期のPCBsダイオキシン類による出生体重とアレルギー感染症に与える影響, *Endocrine Disrupter News Letter* vol.18.p.3.2015.
 10. 荒木敦子, 宮下ちひろ, 岸玲子, 胎児期の有機フッ素化合物曝露による児の健康への影響, *Endocrine Disrupter News Letter* vol.18.p.5. 2015.

11. 三井貴彦, 武田正之, 篠原信雄, 野々村克也, 荒木敦子, 岸玲子, 環境化学物質がホルモン環境および身体的変化に与える影響について, *Endocrine Disrupter News Letter* vol.18.p.6. 2015.
 12. 伊藤佐智子, 岸玲子; 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第 12 回 環境化学物質曝露による内分泌系への影響(1) 甲状腺機能. *公衆衛生*. 80 (2):137-144, 2016.
 13. 荒木敦子, 伊藤佐智子, 岸玲子; 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第 13 回 環境化学物質曝露による内分泌系への影響(2) 性ホルモン. *公衆衛生*. 80 (3):221-227, 2016.
- 3) 学会発表
1. S. Kobayashi, C. Miyashita, S. Sasaki, A. Araki, F. Sata, S. Ban, J. Kajiwara, T. Todaka and R. Kishi, Effects of maternal AHR, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and dioxins on infant birth weight: The Hokkaido Study, ISEE 2015, San Paulo, 2015.8.30.-9.3.
 2. M. Minatoya, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, J. Yamamoto, T. Matsumura and R. Kishi, Prenatal BPA exposure and cord blood adipokines, birth weight and child growth: the Hokkaido Study of Environment and Children's health, ISEE 2015, San Paulo, 2015.8.30.-9.3.
 3. A. Araki, Y. Ait Bamai and R. Kishi, Allergic disease in relation to phthalates in house dust and urine, ISEE 2015, San Paulo, 2015.8.30.-9.3.
 4. H. Goudarzi, The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of their Offspring: The Hokkaido Study, ISEE 2015, São Paulo, 2015.8.30-9.3.
 5. H. Goudarzi, S. Kobayashi, C. Chen, A. Araki, C. Miyashita, S. Ito and R. Kishi, Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children: The Hokkaido Study, 第67回北海道公衆衛生学会, 旭川, 2015.11.21.
 6. 湊屋街子, 佐々木成子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 山本潤, 松村徹, 岸玲子. 胎児期ビスフェノール A 曝露による臍帯血中のアディポカイン, 出生体重, 子どもの体重への影響: 北海道スタディ. 第 67 回北海道公衆衛生学会. 旭川市. 2015.11.21.
 7. 宮下ちひろ, 荒木敦子, 三井貴彦, 伊藤佐知子, 佐々木成子, 戸高尊, 梶原淳睦, 長和俊, 野々村克也, 岸玲子. 胎児期ダイオキシン類曝露による臍帯血中性ホルモンへの影響: 環境と子供の健康北海道スタディ. 第 67 回北海道公衆衛生学会. 旭川市. 2015.11.21.
 8. 喜多歳子, 池野多美子, 岸玲子. 親の社会経済状態と 18 か月児の自閉症スペクトラム疑いリスクとの関連 環境とこどもの健康に関する前向きコホート研究(北海道スタディ). 第 74 回日本公衆衛生学会大会. 長崎. 2015.11.4-6.
 9. 西原進吉, 池野多美子, 小林澄貴, 佐々木成子, 岸玲子. 胎児期の母と学童期の児の喫煙曝露と ADHD-RS

- との関連 北海道スタディ . 第 74 回日本公衆衛生学会大会. 長崎. 2015.11.4-6.
10. 小林澄貴, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 池野多美子, 伊藤佐智子, H. Goudarzi, 花岡知之, 岸玲子, 妊娠初期における北海道内女性労働者の記述疫学的考察, 第95回北海道医学大会(平成27年度日本産業衛生学会北海道地方会), 旭川市, 2015.10.17.
 11. 小林祥子, 三浦りゅう, 川口章夫, 宮下ちひろ, 三宅邦夫, 松村徹, 山本潤, 石塚真由美, 荒木敦子, 久保田健夫, 岸玲子, 胎児期ビスフェノールA曝露影響に関する臍帯血DNA網羅的メチル化解析-北海道スタディ, 第4回日本DOHaD研究学術集会, 東京, 2015.8.1-2.
 12. 田村菜穂美, 伊藤久美子, 花岡知之, 喜多歳子, 西原進吉, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 小笠原克彦, 岸玲子, 児の出生体重と母親の社会経済要因との関連についての疫学研究 北海道スタディ, 第85回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26.-28.
 13. 山崎圭子, 宮下ちひろ, 中島そのみ, 池野多美子, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 小林祥子, 水谷太, 菅木洋一, 岸玲子, 胎児期の有機塩素系農薬曝露が6か月・18か月児の精神運動発達に及ぼす影響-北海道スタディ, 第85回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26.-28.
 14. 小林澄貴, 宮下ちひろ, 佐々木成子, 荒木敦子, 佐田文宏, 板晋, 梶原淳睦, 戸高尊, 岸玲子, ダイオキシン類曝露と胎児発育との関連: 遺伝的なリスクについて 北海道スタディ, 第85回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26.-28.
 15. 湊屋街子, 佐々木成子, 中島そのみ, 那須民江, 後藤裕子, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 小林澄貴, 池野多美子, 岸玲子, 胎児期MEHP曝露による神経行動発達への影響-北海道スタディ, 第85回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26-28.
 16. 荒木敦子, 宮下ちひろ, 金澤文子, 伊藤佐智子, 三井貴彦, 佐々木成子, 水谷太, 菅木洋一, 野々村克也, 岸玲子, 有機塩素系農薬への胎児期曝露による児の性ホルモン濃度への影響-北海道スタディ-, 第85回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26-28.
 17. 岸玲子, 環境とこどもの健康に関する出生コホート研究の現状: 北海道スタディ13年の経験から, 第85回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26-28.
 18. 宮下ちひろ, 金澤文子, 佐々木成子, 池野多美子, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 小林祥子, 水谷太, 菅木洋一, 岸玲子, 有機塩素系農薬が乳幼児の免疫に与える影響 環境とこどもの健康北海道スタディ-, 第85回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26-2.
 19. 小林祥子, 安住薫, 佐々木成子, 松村徹, 山本潤, 石塚真由美, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子, 臍帯血ビスフェノールA 濃度と児のIGF2 DNA メチル化との関連-北海道スタディ, 第85回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26-28.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

先天異常の発生状況とケースコホート研究デザインによる曝露リスク評価に関する研究

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 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 梶原 淳睦 福岡県保健環境研究所保健科学部 部長
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
研究分担者 荒木 敦子 北海道大学 環境健康科学研究教育センター 准教授
研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学 環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

北海道内の 37 産科医療施設において妊婦健診を受診し、本研究への参加に同意を得られた妊婦 20,926 名を対象とした前向きコホート研究の一環として北海道における先天異常発生状況を調査している。今回は 2003 年から 2015 年 12 月までに、分娩が終了し、出産施設から児の情報が得られた 18,333 名に対して、先天異常の出産頻度を算出した。先天異常のうち発生要因として環境要因の関与が考えられる異常をマーカー異常とした。なんらかの先天異常を有する児の総数は 330 名であり、そのうちマーカー奇形が 238 件、その他の異常が 109 件であり、先天異常を有する児の出産頻度は 1.7%であった。日本産婦人科医会の国際先天異常モニタリングセンター (Japan Association of Obstetricians and Gynaecologists: JAOG) は、在胎 22 週以降の先天異常を報告しているが、本研究参加者の妊娠 22 週以降の分娩者 19,005 名のうち、先天異常のある児は 295 名で、出産頻度 1.6%であった。わが国の先天異常の発生率は約 1.7~2%前後との報告があるが、本研究においても先天異常を有する児の出産頻度はほぼ同程度であった。2002 年から 2011 年までのリクルート年毎に無作為抽出された 500 名および、最終 2012 年の全員 369 名から構成される 4869 名のサブコホート集団を抽出した。ケースコホート研究デザインで先天性心疾患 145 名について曝露評価を実施している。平成 24,25,26 年度に PCB・ダイオキシン類は先天性疾患 118 名コントロール 118 名合計 236 名が測定し、PCB58 異性体の中央値は 31.1 ng/g lipid, ダイオキシン類 29 異性体の中央値は 5.2 TEQ pg/g lipid であった。化学物質濃度と母児の各変数との関連を単変量解析で検討したところ、PCBs・ダイオキシン類濃度は母親の出産年、出産病院、出産時年齢、児の出生体重と有意に関連した。今後、多変量解析を用いて PCB・ダイオキシン類、PFCs の曝露評価を継続すると共に、環境化学物質の関与が示唆されるマーカー奇形の尿道下裂・停留精巣 78 名をケースとし、妊娠初期（器官形成期）の母体血血清を用いて BPA・フタル酸エステル類の曝露評価を行う。

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）

小林澄貴

（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

長 和俊

（北海道大学病院周産母子センター）

馬場 剛

（札幌医科大学産婦人科学講座）

宮本 敏伸

（旭川医科大学産婦人科学講座）

A．研究目的

先天異常は世界の新生児死亡原因の11%を占める（UNICEF, 2015）。わが国でも新生児死亡原因の第1位は長年にわたって先天奇形・染色体異常で、死亡原因の40.3%を占める（厚生労働省，人口動態調査, 2014）。主要な先天異常の出産頻度は2～5%と報告されており（Dolk H et al., 2003），わが国では約2.5%と報告されている。わが国の先天異常発生モニタリングは，1972年より日本産婦人科医会による全国規模の大学や基幹病院を主体とした先天異常モニタリングが実施され，その後，国際先天異常モニタリングセンター（Japan Association of Obstetricians and Gynaecologists: JAOG）として実施され，主要な先天異常の出産頻度の報告を行っている。しかし，地域単位での先天異常児の出産頻度や先天異常の種類は少ない（Correa-villasenor A, et al. 2003; EUROCAT., 2005; Langlois PH, et al. 2011; Kazim Oztarhan1, et al.2010; Keewan Kim, et al. 2013.）。

先天異常の原因は多彩であるが，環境要因が関与する多因子遺伝によるものが 20～

25%を占める。胎児期 PCBs・ダイオキシン類による先天異常への影響については，動物実験においてダイオキシン類の胎児期曝露が心奇形を引き起こすことが報告された（Kopf et al. 2009）。PCB やダイオキシン類とヒトの先天性心疾患に関する先行研究では廃棄物処理場の距離からダイオキシン類の曝露レベルを推定したところ関連は認められなかった（Cordier et al., 2004）。アメリカ（ボルチモア）で左心低形成症候群（hypoplastic left heart syndrome (HLH)）の発生頻度が高く，大気中のPCBやダイオキシン類濃度と関連することが示唆された（Kuehl and Loffredo, 2006）。イタリアでは焼却炉の位置と大気中のダイオキシン類濃度により対象者の曝露程度を推定し，心室中隔欠損1名を含む4名の先天異常児との関連を検討した。先天異常リスクは増加したが（RR: 2.26）統計的な信頼性が乏しかった（95%CI:0.57-6.14）（Vinceti et al., 2008）。日本で焼却炉からの距離と先天異常の発生リスクを検討したが関連は認められなかった（Tango et al., 2004）。妊娠初期のPCBs とダイオキシン類濃度と先天性心疾患について化学物質の体内曝露量を大気濃度や焼却場の距離で間接的に推定しており，血液などを用いた曝露評価のデータが乏しい。フランスでは妊娠初期のダイオキシン濃度が高い群で，停留精巣リスクが増加（Cordier et al. 2010），デンマーク・フィンランド研究でも尿道下裂・停留精巣発症群の曝露濃度が対照群より高い傾向を認めた。非職業性の低濃度なダイオキシン類レベルについて，器官形成期の生体試料を用いて曝露評価を実施して，先天異常リスクに与える影響を検討した研究が不足している。

胎児期 PFAAs 曝露による児の先天異常への影響については，妊婦の血清中 PFOA

が中央値(21.2 ng/mL)以上で新生児の先天異常リスクが中央値以下の群と比較し有意に増加した(Stein et al., 2009)。一方、飲料水が高濃度 PFOA に汚染された地域で Zip codes により給水領域で分類した居住地域と先天異常発生リスクに関連はなく(Nolan et al., 2010)、臍帯血中 PFOS/PFOA レベルと児の停留精巣との関連は認められなかった(Vesterholm Jensen et al., 2013)。ビスフェノール A およびフタル酸類と先天異常の関連では、母体血中 BPA および妊娠中の尿中フタル酸代謝物レベルは児のコントロール群と比較し尿道下裂群で有意に増加した(Choi et al., 2012)。妊婦の就業形態をサロゲートとしてフタル酸エステル類の職業曝露を推定すると、推定曝露量と共に児の尿道下裂リスクが有意に増加した(Ormond et al., 2009)。一方で、児の停留精巣とコントロール群で臍帯血中 BPA 濃度には有意差は認められない(Fenichel et al., 2012)、母乳中フタル酸代謝物濃度と児の停留精巣群とコントロール群に有意な差は認められない(Main et al., 2006)など結果は一致していない。

ヒトを対象にした環境化学物質と先天異常に関する先行研究は、生体試料を用いた胎児期の曝露評価が不十分で異性体レベルで測定した研究もなかった。特に生体影響が PCBs より高いと懸念される OH-PCB に関する疫学報告は内外でほとんどない。わが国で 2010 年に PFOS、PFOSF が化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律の第一種特定化学物質(一部用途以外の製造・輸入禁止)に指定された。そこで PFOS、PFOA 以外の代替品で長鎖の化合物を含めた PFCs の妊婦の曝露評価を行う必要がある。ビスフェノール A (BPA) は従来の毒性試験で NOAEL とされた用量より低い用

量の BPA 胎児期曝露で、仔の思春期早発や神経発達への影響などが報告されたが、先天異常については停留精巣と尿道下裂の報告が若干あるのみでヒトでのデータは不足している。

本研究は、2002 年から現在進行中の前向きコホート研究によって、北海道全域の産科クリニックから大学病院まで多様な規模の参加施設の協力のもと、先天異常(マーカー奇形 55 疾患とその他の先天異常)モニタリングを実施し、地域の病院ベースにおける先天異常児の出産頻度を把握する。また、既に得られた妊娠中の母体血を用いて今後曝露評価をケースコホート研究デザインで行うために大規模コホート集団からサブコホート集団を抽出する。

先行研究は、生後の母乳中化学物質濃度や就業形態を胎児期化学物質曝露の指標に用いており、曝露評価が不十分であると考えられた。また停留精巣と尿道下裂の報告のみで他の先天異常について検討がまだない。そこで本研究は、出生前向きコホート「環境と子どもの健康 北海道スタディ」において、先天異常の発生に強く関与する器官形成期の母体血を用いてフタル酸エステル類および BPA について微量測定を行う。また既に参加登録した母児 2 万人の出生時情報を用いて、胎児期フタル酸エステル類と BPA が先天異常(停留精巣、尿道下裂など)、出産異常(死産、早産)に与える影響をケースコホート研究で明らかにする予定である。

B. 研究方法

1. 対象

2002 年から 2012 年までに、北海道内の 36 産科医療施設で妊婦健診を行い、本調査への参加に同意した妊婦は 20,929 名

である。参加登録妊婦が出産した場合，出産施設に「新生児個票」への記載を依頼しており，2015年12月までに受け付けた新生児個票19,280件について先天異常児の出産頻度を集計した。また，1歳，2歳に母親へ質問紙を送付して，児の健康状態の情報を得た。

2. 方法

参加登録妊婦が出産した場合には，出産施設に新生児の健康状態を7日間観察し，研究班作成の「新生児個票」に記入後，郵送による返送を依頼した。「新生児個票」の質問項目は，出産日，在胎週数，出生時体重，児性別，単・多胎，生・死・流産，妊娠中の疾患，先天異常の有無，先天異常内容などである。先天異常の内容は，先天異常発生に環境要因の関与が考えられる先天性心疾患，口唇口蓋裂，停留精巣などの奇形55種をマーカー奇形として設定し，その他の先天奇形については自由記載とした。提出された全新生児個票(流産，死産含む)から先天異常児の出産頻度を算出した。

環境化学物質の曝露評価をケースコホート研究デザインで実施するため，大規模出生コホートからサブコホートを抽出した。先天異常のケースは出生時の新生児個票と生後の質問票から抽出し，コントロールはケースを除いたサブコホート群から出産病院，出産年，母親の出産時年齢，児の在胎週数からマッチングして抽出した。

(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. 出産報告の概要

出産年2002年から2013年についての出産者の概要および先天異常を報告する。

本研究へのお産報告数を地域別で見ると，最も報告数の多い地域は道央圏38.7%で，そのほとんどは札幌地区である。次いで十勝圏28.8%，道南圏20.9%と続く(図1)。施設の規模別では，最も多いのは産科病院29.1%で，次に産科クリニック23.9%であった。NICUを持つ地域周産期母子医療センター，総合周産期母子医療センター，道内3大学附属病院を合わせると34.7%であった(図2)。

母親の出産時年齢は 30.4 ± 4.9 歳，在胎週数 38.4 ± 3.2 週であった。児の性別では男児9,668名(50.1%)，女児9,444名(49.0%)であった。出産児の数は単胎18,894名(98.0%)，多胎386名(2.0%)であった(表1)。

3. 先天異常の発生状況

生産，死産，流産を含む全分娩のうち，何らかの先天異常のある児の総数は330件(1.7%)であった。そのうちマーカー奇形238件(1.2%)，その他の先天奇形109件(0.6%)であった。また，在胎22週以降の分娩19,005件中では，先天異常のある児は295件(1.6%)であった(表2)。

全分娩において，出産頻度(出産1万対)の最も高い先天異常は心室中隔欠損症16.8(33名)であった。次いで停留精巣・

非触知精巢 14.5（14名：男児のみ 9,668名で算出），多指（趾）13.1（24名），Down症候群 10.3（20名），口唇および口蓋裂 18.1（35名），水腎症 9.3（18名）などであった（いずれも染色体異常，遺伝子疾患によるものは除外，表 3）。マーカー奇形，先天性心疾患の内訳を表 4 および表 5 に示した。マーカー奇形以外の先天異常は，中枢神経系疾患，マーカー奇形以外の染色体異常，下肢形成不良などの重篤な大奇形から，副耳，臀部母斑などの小奇形まで多種多様の報告があった（表 6）。

4. 先天異常の頻度：JAOG との比較

在胎 22 週以降の分娩に関して先天異常の発生頻度を JAOG 報告 (ICBDSR Annual Report, 2013) の先天異常発生頻度と比較すると，JAOG の頻度よりも高かった異常は，多指（趾）症 13.2（JAOG 報告 6.7），尿道下裂 8.3（5.2）であった（いずれも出生 1 万対）。一方，発生頻度の低かった異常は水頭症 1.1（7.8），脊髄髄膜瘤 1.1（5.6），Down 症 8.9（13.2）などであった（表 4，5）。

5. 2 歳までの調査における先天異常の確定状況

母親への出産 1 年後および 2 年後の自記調査で出生時情報では報告されなかった先天異常の報告がある。出生時情報のあるもので，出産 2 年後調査で先天異常が報告されたのは 592 件であった。最も多く報告された先天異常は先天性心疾患で中でも心室中隔欠損 96 件，心房中隔欠損 30 件が多かった。その他の先天異常では停留精巢 65 件，先天性股関節脱臼 19 件などであった。

5. 化学物質濃度の基礎的検討

2002 年から 2011 年までのリクルート年毎に無作為抽出された 500 名および，最終 2012 年の全員 369 名から構成される 4869 名のサブコホート集団を抽出した。ケースコホート研究デザインで先天性心疾患 145 名について曝露評価を実施している。平成 24,25,26 年度に PCB・ダイオキシン類を先天性疾患 118 名コントロール 118 名合計 236 名が測定し，PCB58 異性体の中央値は 31.1 ng/g lipid，ダイオキシン類 29 異性体の中央値は 5.2 TEQ pg/g lipid であった。化学物質濃度と母児の各変数との関連を単変量解析で確認した。PCBs・ダイオキシン類濃度は母親の出産年，出産病院，出産時年齢，児の出生体重と有意に関連した。一方で化学物質を測定した年度，児の性別，在胎週数，ケース/コントロールでは関連は認められなかった。PFCs は先天性心疾患 145 名コントロール 145 名を測定した。

D. 考察

2002 年から 2015 年 12 月までに出産施設から報告があった分娩のうち，在胎 22 週以降の先天異常児の出産頻度は 1.6% であった。中国アンホイ省で 2008 年～2010 年に実施した The China-Anhui birth cohort study では，単胎の生産児 13,454 名を対象にした先天異常の出産頻度は 3.9 であった (Fang-Biao et al.,2013)。また，イギリスのブラッドフォードで 2007 年～2011 年実施した the Born in Bradford study では対象者 11,396 名のうち先天異常児の出産頻度は 3.4% と報告している (Eamonn et al.,2013)。また，European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT) の 2003～2007 年の報告では主要な先天異常の出産頻度を 23.9（出産

1,000人当たり）と報告している。北海道スタディの先天異常児の出産頻度はこれらの報告よりも低い、JAOG 報告 1.7～2.0%とほぼ同程度であった。先天異常の集計は報告により妊娠週数や出生体重の基準が異なるため、一概に比較はできないが JAOG および北海道スタディにおける先天異常児の出産頻度は他国に比べても高くはないことが推測される。

疾患別にみると、多指（趾）症，尿道下裂などは JAOG よりも出産頻度が高かった。また，水頭症，脊髄髄膜瘤，Down 症などの出産頻度は低かった。また，心室中隔欠損症や口唇裂（口蓋裂合併も含む）の出産頻度が高かったことは JAOG 報告と同様であった。

北海道スタディでは，地域の先天異常児の出産状況を把握するために全分娩を対象とし，また小奇形も含めた全奇形としている。今後は，先行研究の対象条件を吟味し，北海道における先天異常を発生器官別や心室中隔欠損症，停留精巣，口唇裂，多指症などの出産頻度の高い異常別に妊娠初期の生活・環境要因との関連を検討していく。

先天異常との関係では，生産した 18,083 名を対象に，引き続いて PCBs・ダイオキシン類・OH-PCB，および PFCs11 種類の分析を実施した。263 名の PCB・ダイオキシン類濃度は母親の年齢と共に増加，採血した時期（年）が経過すると共に低下，児の出生体重と負の相関を示した。この結果はいずれも先行研究の報告と一致しており，環境からの曝露レベルが経年で減少していること，母親の年齢が高いと体内に蓄積する化学物質の量が増加することに起因すると考えられた。最終的にケースコホート研究デザイン

において，先天性心疾患症例 145 名と対照例 145 名で，母の既往歴，妊娠中の薬剤，飲酒など生活習慣，職業歴，血清葉酸値，血中コチニン濃度を調整したうえで，胎児期の PCBs・ダイオキシン類および OH-PCB，および PFCs が先天性心疾患リスクに与える影響を明らかにする。今後も引き続き PCB・ダイオキシン類，PFCs の曝露評価を継続すると共に，環境化学物質の関与が示唆されるマーカー奇形の尿道下裂・停留精巣 78 名をケースとし，妊娠初期（器官形成期）の母体血血清を用いて BPA・フタル酸エステル類の曝露評価を行う。

本研究の研究協力施設は，北海道全域を網羅しており，分娩施設の規模も産科クリニックから大学病院まで様々である。研究を開始して 10 年以上が経過し，この間に約 2 万人以上の女性の協力を得られた。地域ベースによる長期間の先天異常モニタリングは，北海道における先天異常発生動向を把握する上では極めて重要であり，今後は先天異常発生への関連要因解明に向けて検討を進めて行く。

E．結論

2003 年から 2014 年 1 月までに新生児個票が提出された 18,333 名に対して先天異常の集計を行った。先天異常のある児の総数は 381 名，そのうちマーカー奇形発生数は 264 件，その他の先天異常発生数は 166 件であった。先天異常の発生頻度は 2.08%であった。

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. Dolk H, Vrijheid M. 2003. The impact of environmental pollution on congenital anomalies. *Br Med Bull* 68:25-45.
2. Committing to Child Survival: A Promise Renewed Progress Report 2015. Unicef
3. Choi H, Kim J, Im Y, Lee S, Kim Y. 2012. The association between some endocrine disruptors and hypospadias in biological samples. *J Environ Sci Heal A* 47:2173-2179.
4. Cordier, S., et al., 2004. Risk of congenital anomalies in the vicinity of municipal solid waste incinerators. *Occupational and Environmental Medicine*. 61, 8-15.
5. Cordier S, Lehebel A, Amar E, Anzivino-Viricel L, Hours M, Monfort C, et al. 2010. Maternal residence near municipal waste incinerators and the risk of urinary tract birth defects. *Occup Environ Med* 67:493-499.
6. Correa-Villasenor A, Cragan J, Kucik J, O'Leary L, Siffel C, Williams L. 2003. The metropolitan atlanta congenital defects program: 35 years of birth defects surveillance at the centers for disease control and prevention. *Birth Defects Res A* 67:617-624.
7. EUROCAT. EUROCAT Statistical Monitoring Report – 2009. (Uploaded to EUROCAT website January 2012). http://ec.europa.eu/health/rare_diseases/docs/eurocat_stat_2009_en.pdf.
8. Helen Dolk, Maria Loane, Ester Garne. 2010. The Prevalence of Congenital Anomalies in Europe. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 686; 349-364.
9. Fenichel P, Dechaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, et al. 2012. Unconjugated bisphenol a cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod* 27:983-990.
10. International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. Annual Report 2014. The international center on birth defects – ICBDSR Center.
11. Jensen DV, Christensen J, Virtanen HE, Skakkebaek NE, Main KM, Toppari J, et al. 2014. No association between exposure to perfluorinated compounds and congenital cryptorchidism: A nested case-control study among 215 boys from denmark and finland. *Reproduction* 147:411-417.
12. Kim K, Wang Y, Kirby RS, Druschel CM. 2013. Prevalence and trends of selected congenital malformations in new york state, 1983 to 2007. *Birth Defects Res A*

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

- 97:619-627.
13. Kopf PG, Walker MK. 2009. Overview of developmental heart defects by dioxins, pcbs, and pesticides. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 27:276-285.
 14. Kuehl, K. S., Loffredo, C. A., 2006. A cluster of hypoplastic left heart malformation in Baltimore, Maryland. *Pediatric Cardiology*. 27, 25-31.
 15. Langlois PH, Marengo LK, Canfield MA. 2011. Time trends in the prevalence of birth defects in texas 1999-2007: Real or artifactual? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91:902-917.
 16. Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, et al. 2006. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Persp* 114:270-276.
 17. Nolan LA, Nolan JM, Shofer FS, Rodway NV, Emmett EA. 2010. Congenital anomalies, labor/delivery complications, maternal risk factors and their relationship with perfluorooctanoic acid (pfoa)-contaminated public drinking water. *Reprod Toxicol* 29:147-155.
 18. Ormond G, Nieuwenhuijsen MJ, Nelson P, Toledano MB, Iszatt N, Geneletti S, et al. 2009. Endocrine disruptors in the workplace, hair spray, folate supplementation, and risk of hypospadias: Case-control study. *Environ Health Persp* 117:303-307.
 19. Oztarhan K, Gedikbasi A, Yildirim D, Arslan O, Adal E, Kavuncuoglu S, et al. 2010. Prevalence and distribution of congenital abnormalities in turkey: Differences between the prenatal and postnatal periods. *Congenit Anom (Kyoto)* 50:221-225.
 20. Sheridan E, Wright J, Small N, Corry PC, Oddie S, Whibley C, et al. 2013. Risk factors for congenital anomaly in a multiethnic birth cohort: An analysis of the born in bradford study. *Lancet* 382:1350-1359.
 21. Stein CR, Savitz DA, Dougan M. 2009. Serum levels of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol* 170:837-846.
 22. Tango T, Fujita T, Tanihata T, Minowa M, Doi Y, Kato N, et al. 2004. Risk of adverse reproductive outcomes associated with proximity to municipal solid waste incinerators with high dioxin emission levels in japan. *J Epidemiol* 14:83-93.
 23. Tao FB, Hao JH, Huang K, Su PY, Cheng DJ, Xing XY, et al. 2013. Cohort profile: The china-anhui birth cohort study. *Int J Epidemiol* 42:709-721.
 24. Virtanen, H. E., et al., 2012. Associations between congenital cryptorchidism in newborn boys

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

and levels of dioxins and PCBs in
placenta. International journal of
andrology. 35, 283-93.

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

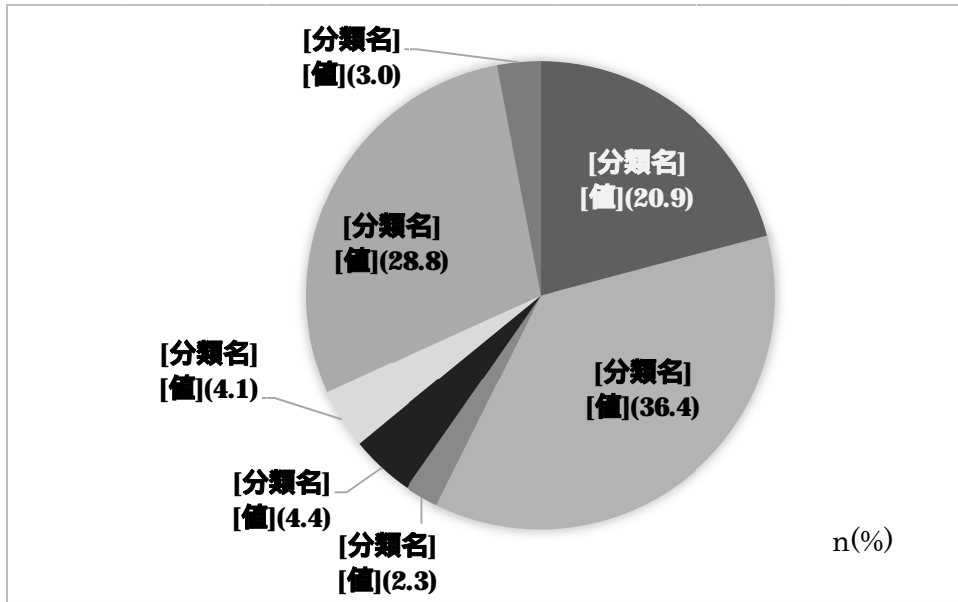


図 1. 地域別の出産報告数

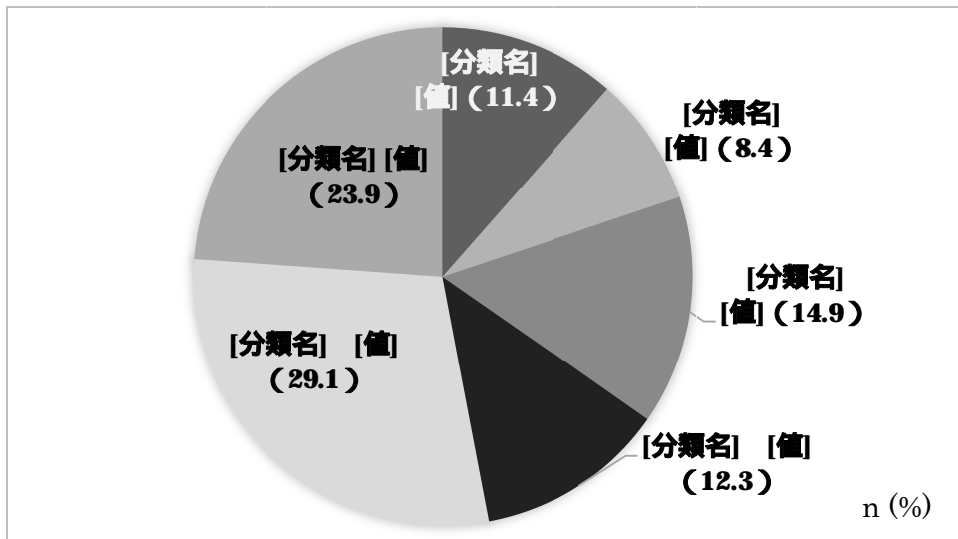


図 2. 出産施設規模別の出産報告数

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 1. 対象母児の属性

	Mean ± SD (range) N (%)
出産時年齢 (歳)	30.4 ± 4.9 (15-48)
<20	164 (0.01)
20-24	2,159 (0.11)
25-29	5,887 (0.31)
30-34	7,027 (0.37)
35	4,016 (0.21)
Missing	27
出産回数 (回)	
0	8,321 (0.5)
1	10,030 (0.5)
Missing	929
分娩帰結	
生産	18,941 (98.3)
死産	64 (0.3)
流産	265 (1.1)
Missing	10
在胎週数 (週)	38.4 ± 3.2 (6-42)
< 22	251 (1.3)
22-36	1,197 (6.2)
37-41	17,774 (92.3)
42	34 (0.2)
Missing	24
出産児数	
単胎	18,894 (98.0)
多胎	386 (2.0)
児の性別	
男児	9,668 (50.1)
女児	9,444 (49.0)
Missing	103
出生時体重 (g)	2990.3 ± 513.3 (10-4750)
< 2500	2,003 (10.5)
2500	17,153 (89.5)
Missing	124

表 2. 先天異常の出産頻度

	全分娩(n=19,280) n (%)	在胎 22 週以降 (n=19,005) n (%)
先天異常の出産数	330 (1.7)	295 (1.6)
マーカー奇形の出産数	238 (1.2)	221 (1.2)
その他の奇形の出産数	109 (0.6)	93 (0.5)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表3．出産頻度の高い先天異常(2015年12月現在)

JAOG:日本産婦人科医会先天異常モニタリング 2007-2011 年度比較
(ICBDSR. Annual Report 2013.)

	全分娩 n=19,280		在胎22週以降の分娩 n=19,005		JAOG 2007-2011年 (出産1万対)
	数	北海道 (出産1万対)	数	北海道 (出産1万対)	
心室中隔欠損症	33	17.1	37	17.4	-
停留精巣・非触知精巣 * 男児のみ 全9,668人/22週以降9,586人	14	14.5	14	14.6	-
口唇裂(口蓋裂合併含む)	24	12.4	24	12.6	21.67
多指症(多趾症含む)	25	13.0	25	13.2	6.74
水腎症	18	9.3	17	8.9	-
Down症候群	20	10.4	17	8.9	13.19
尿道下裂 * 男児のみ 全9,668人/22週以降9,586人	8	8.3	8	8.3	5.19
口蓋裂	11	5.7	11	5.8	5.05
心房中隔欠損症	10	5.2	10	5.3	-
肺動脈(弁)狭窄/閉鎖症	10	5.2	10	5.3	-

染色体異常, 遺伝子疾患および症候群による場合は含めていない

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. マーカー奇形の出産頻度（2015年12月現在）

JAOG:日本産婦人科医会先天異常モニタリング 2007-2011年度比較（ICBDSR. Annual Report 2013.）

項目	全分焼 n=19,280		在胎22週以降の分焼 n=19,005		JAOG 2007-2011年 (出産1万対)	
	数	北海道 (出産1万対)	数	北海道 (出産1万対)		
頭部	A1 無脳症	4	2.1	0	-	0.74
	A2 脳瘤	1	0.5	0	-	-
	A3 小頭症	1	0.5	1	0.5	1.56
	A4 水頭症	2	1.0	2	1.1	7.82
	A5 全前脳胞症	2	1.0	2	1.1	1.17
眼部	B1 眼瞼欠損	0	-	0	-	-
	B2 小眼球症・無眼球症	0	-	0	-	0.68/0.27
	B3 白内障	0	-	0	-	-
耳部	C1 小耳症	2	1.0	2	1.1	2.12
	C2 外耳道閉鎖	2	1.0	2	1.1	-
	C3 埋没耳	3	1.6	3	1.6	-
	C4 耳介低位	6	3.1	4	2.1	-
口顔部	D1 口唇裂(口蓋裂合併含む)	24	12.4	24	12.6	21.67
	D2 口蓋裂	11	5.7	11	5.8	5.05
	D3 口唇口蓋裂	16	8.3	16	8.4	-
	D4 顔面裂	0	-	0	-	-
	D5 先天性歯	1	0.5	1	0.5	-
上肢	E1 多指症(多趾症含む)	25	13.0	25	13.2	6.74
	E2 合指症	10	5.2	9	4.7	-
	E3 裂手症	0	-	0	-	-
	E4 上肢の減数異常	0	-	0	-	-
	E5 上肢先天性絞扼輪症候群	0	-	0	-	-
	E6 橈骨側の異常	0	-	0	-	-
	E7 尺骨側の異常	0	-	0	-	-
体幹	F1 脊髄髄膜瘤(二分脊椎)	3	1.6	2	1.1	5.59
	F2 臍帯ヘルニア	4	2.1	3	1.6	3.73
	F3 腹壁破裂	0	-	0	-	-
	F4 横隔膜ヘルニア	6	3.1	6	3.2	6.67
心臓	G1 先天性心疾患	67	34.8	67	35.3	-

項目	全分焼 n=19,280		在胎22週以降の分焼 n=19,005		JAOG 2007-2011年 (出産1万対)	
	数	北海道 (出産1万対)	数	北海道 (出産1万対)		
消化器	H1 食道閉鎖	2	1.0	2	1.1	-
	H2 直腸肛門奇形	6	3.1	6	3.2	-
	H3 小腸閉鎖	5	2.6	5	2.6	7.82
	H4 十二指腸閉鎖	3	1.6	2	1.1	-
泌尿器・生殖器	I1 水腎症	18	9.3	17	8.9	-
	I2 異形成腎	2	1.0	1	0.5	-
	I3 尿道下裂 *男児のみ 全9,668人/22週以降9,586人	8	8.3	8	8.3	5.19
	I4 停留精巣・非触知精巣 *男児のみ 全9,668人/22週以降9,586人	14	14.5	14	14.6	-
	I5 膀胱外反症・ 総排泄腔外反症	1	0.5	1	0.5	0.23
	I6 陰核肥大	0	-	0	-	-
	I7 性別不明	1	0.5	1	0.5	-
	I8 膈欠損	0	-	0	-	-
下肢	J1 多趾症	9	4.7	9	4.7	-
	J2 合趾症	6	3.1	4	2.1	-
	J3 裂足症	1	0.5	1	0.5	-
	J4 下肢の減数異常	0	-	0	-	-
	J5 下肢先天性絞扼輪症候群	0	-	0	-	-
皮膚	K1 6個以上または 巨大な色素異常斑	4	2.1	4	2.1	-
	K2 継続する水疱・小水疱 ・びらん形成(先天性表皮水疱症)	2	1.0	2	1.1	-
症候群・染色体異常	L1 Down症候群	20	10.4	17	8.9	13.19
	L2 軟骨無形成症	0	-	0	-	-
	L3 Apert症候群	0	-	0	-	-
	L4 先天性多発性関節拘縮症	0	-	0	-	-
	L5 trisomy 18	4	2.1	3	1.6	9.9
	L6 trisomy 13	1	0.5	1	0.5	2.03
結合双生児	M1 結合双生児	0	-	0	-	-

染色体異常，遺伝子疾患および症候群による場合は含めていない

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表5．先天性心疾患の内訳（2015年12月現在）

JAOG:日本産婦人科医会先天異常モニタリング 2007-2011 年度比較
 (ICBDSR. Annual Report 2013.)

	全分娩 n=19,280		在胎22週以降の分娩 n=19,005		JAOG 2007-2011年 (出産1万対)
	数	北海道 (出産1万対)	数	北海道 (出産1万対)	
先天性心疾患全体	64	33.2	64	33.7	-
心室中隔欠損症	33	17.1	33	17.4	-
心房中隔欠損症	10	5.2	10	5.3	-
肺動脈（弁）狭窄/閉鎖症	10	5.2	10	5.3	-
動脈管開存症	7	3.6	7	3.7	-
大動脈縮窄症	6	3.1	6	3.2	6.65
ファロー四徴症	5	2.6	5	2.6	7.03
大血管転位症	4	2.1	4	2.1	4.69
心内膜床欠損症	4	2.1	4	2.1	-
単心房	3	1.6	3	1.6	-
左室低形成	2	1.0	2	1.1	4.53
兩大血管右室起始	2	1.0	2	1.1	-
その他	12	6.2	12	6.3	-

染色体異常、遺伝子疾患および症候群による場合は含めていない

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．その他の先天奇形の出産頻度（2015年12月現在）

項目		全出産 n=19,280		項目		全出産 n=19,280				
		数	北海道 (出産1万対)			数	北海道 (出産1万対)			
Q00-07 神経系	1	脳室拡大	1	0.5	Q65-79 筋骨格系	32	手指欠損	2	1.0	
	2	透明中隔欠損	1	0.5		33	手指形態異常	1	0.5	
	3	脳梁低形成	2	1.0		34	内反足	3	1.6	
	4	小脳低形成	2	1.0		35	外反足	4	2.1	
	5	脳動脈奇形	1	0.5		36	爪欠損（手/趾）	3	1.6	
	6	キアリ奇形第2奇形	1	0.5		37	軟骨低形成症	1	0.5	
Q10-18眼、耳、顔 面及び頸部	7	眼球異常（網膜欠損ほか）	1	0.5		38	無頭蓋骨	2	1.0	
	8	副耳	10	5.2		39	頭蓋骨形成不全	2	1.0	
	9	耳形状左右差、位置のアンバランス	1	0.5		40	クルーゾン症候群	1	0.5	
	10	耳瘻孔	2	1.0		41	下趾の変形	1	0.5	
	11	耳介水平	1	0.5		42	下肢低形成	1	0.5	
	12	小顎	1	0.5		43	骨形成不全	1	0.5	
	13	鰓弓症候群	2	1.0		44	脊椎側弯	1	0.5	
	14	鰓弓遺残（左頸部）	1	0.5		45	屈曲肢異形成症	1	0.5	
	15	先天性歯	1	0.5		46	関節拘縮	2	1.0	
	16	先天性真珠腫	1	0.5		47	四肢長の異常	2	1.0	
	17	oral-facial-digital syndrom	1	0.5		48	四肢短縮（軟骨無形成症、骨形成不全症を除く）	2	1.0	
Q30-34 呼吸器系	18	声門狭窄	1	0.5		Q80-89 その他：皮膚	49	先天性魚鱗癬症	1	0.5
	19	肺低形成	1	0.5			50	血管腫（顔面、頸部）	2	1.0
Q38-45 消化器系	20	消化管穿孔	1	0.5			51	母斑	1	0.5
	21	胆のう拡張	1	0.5			52	脂腺母斑	2	1.0
Q50-56 生殖器系	22	ヒルシュブルング病	1	0.5			53	イボ	1	0.5
	23	陰茎低形成（男児9,668人）	2	2.1			54	痣（顔面）	1	0.5
Q60-64 腎泌尿器系	24	外陰のう胞（女児9,444人）	2	2.1			55	リンパ管腫	5	2.6
	25	腎盂拡張	1	0.5			56	皮下水腫	1	0.5
	26	腎盂尿管移行部狭窄	1	0.5			57	頭部腫瘍（頭頂部に水腫瘍突起物）	1	0.5
	27	腎拡張	1	0.5			58	先天性皮膚欠損症	3	1.6
	28	腎のう胞	1	0.5		Q80-89 その他：先天奇形 症候群、その他	59	内臓逆位	1	0.5
	29	尿管遺残症	3	1.6	60		詳細不明の奇形	3	1.6	
	30	巨大膀胱小結腸管紙せんどう症候群	1	0.5	Q90-99 染色体異常	61	筋ジストロフィー（デュシャンヌ型）	1	0.5	
	31	Prune belly syndrom	2	1.0		62	染色体異常症	8	4.1	

染色体異常、遺伝子疾患および症候群による場合は含めていない

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

**Predictors of folate status among pregnant Japanese women: the Hokkaido Study
on Environment and Children's Health, 2002 -2012**

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 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授
研究分担者 宮下ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 池野多美子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
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 教授
研究分担者 遠藤 俊明 札幌医科大学医学部産婦人科学講座 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 佐々木成子 北海道大学大学院医学研究科 助教
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

The International Clearinghouse for Birth Defects, Surveillance and Research (ICBDSR) reports a rise in the prevalence rate of spina bifida in Japan. We determined first trimester folate status of Hokkaido women and identified potential predictors. Participants were 15266 pregnant women of The Hokkaido Study on Environment and Children's Health Cohort. Data was extracted from self-reported questionnaires and biochemical assay results. Demographic determinants of low folate status were younger maternal age (Adjusted odds ratio [AOR]: 1.48, 95% CI: 1.32, 1.66); lower educational level (AOR: 1.27, 95% CI: 1.17, 1.39); and lower annual income (AOR: 1.11, 95% CI: 1.01, 1.22). Plasma cotinine concentrations of 1.19 – 65.21nmol/L increased the risk of low folate status (AOR: 1.20, 95% CI: 1.10, 1.31); and concentration > 65.21nmol/L further increased the risk (AOR: 1.91, 95% CI: 1.70, 2.14). Most favorable predictor was folic acid (FA) supplements use (AOR: 0.19, 95% CI: 0.17, 0.22). Certain socio-demographic factors influence folate status among pregnant Japanese women. Modifiable negative and positive predictors are active and passive tobacco smoking, and folic acid supplements use. Avoiding both active and passive tobacco smoking, and using folic acid supplements could improve folate status of Japanese women.

研究協力者

Yila Thamar Ayo、伊藤久美子、小林澄貴、馬場俊明、Braithmoh Tiilola
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)
Houman Goudaruzi (外国人特別研究員)

A. 研究目的

Folate as a cofactor in one-carbon metabolism is very essential in all cellular processes, especially in conditions of

rapid cell replications and tissue growth like pregnancy. The role of synthetic folic acid (FA) supplements in the prevention of neural tube defects (NTDs) has been well documented^{1,2}. Several countries with policies of FA food fortification, do report a 30.00% to 70.00% reduction in the incidence of NTDs³. As reported by the International Clearinghouse for Birth Defects, Surveillance and Research

(ICBDSR), Japan has experienced an increase in the prevalence of spina bifida over the past few decades. While in countries like the United States and England the prevalence of NTDs is about 3 per 10,000 births, Japan has a prevalence of 5.2^{4, 5}. Efforts have been made to determine folate status of pregnant Japanese women in other regions of Japan but not Hokkaido^{6, 7, 8, 9}. However, probable small sample sizes, different folate assay techniques and varied folate status definitions/cut-off levels, might have yielded inconsistent results. For instance, three previous studies have reported a wide range of folate status among pregnant Japanese women. A study from Aichi Prefecture which defined normal versus inadequate folate status as ≥ 6.80 nmol/L and < 6.80 nmol/L respectively, reported folate inadequacy in 1.00% of 41 pregnant and 154 non pregnant participants⁶. Another study from Tokyo metropolis among pregnant women in all trimesters reported low folate status in 67.00% of 118 women in their first trimester and 79.30% overall. The study defined normal, low and deficient folate statuses as having > 13.60 nmol/L, 6.80 - 13.60nmol/L, and < 6.80 nmol/L, respectively⁸. The third study from Tokyo metropolis was conducted among 58 young university women. Normal folate status was categorized as having ≥ 13.60 nmol/L; low status as having 6.80 - 13.59nmol/L; while folate deficient group had < 6.80 nmol/L of folate concentration. Results showed 12.10% had folate deficiency, and 58.60% had low status⁹. In Hokkaido Prefecture, such reports are scarce. We recently conducted a genetic study using the first

part of this cohort's data. Low folate status was reported among 28.70% of the study population (N = 1784), but the scope of the study excluded a detailed exploration of the demographic and lifestyle predictors of folate status¹⁰. In contrast to previous smaller studies in Japan, this study uses data from a large cohort to explore the various demographic and lifestyle factors that may influence first trimester folate status of Japanese women in Hokkaido.

B. 研究方法

Study location and population

Participants of this study were pregnant women recruited during their first trimester (< 13 weeks of gestation) from thirty-seven health facilities across Hokkaido Prefecture. They are participants of the ongoing large-scale birth cohort of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. The study is broadly aimed at observing the health effects of intrauterine exposures to various environmental and genetic factors on fetal development, outcomes of pregnancy, and subsequent childhood health. Details of the study have been described elsewhere^{11, 12}. Briefly, the ongoing large-scale cohort started in 2002, with a full blown large scale version from February 2003. A total of 20816 women were recruited between 2002 and March 2012. All pregnant Japanese women who presented at any of the participating healthcare facilities for prenatal care during their first trimester, were considered eligible for the study. However, only those who agreed to participate in the study were contacted and recruited. Data was generated from these

participants by means of baseline questionnaires, biochemical assays, hospital birth records, and four months post-partum health records. We finally used a total of 15266 participants, details of selection is shown in the flow chart (**Fig. 1**).

Certain repeated self-reported information obtained from birth records and postpartum questionnaires were used to compare with the baseline questionnaires in order to improve quality and missing information in the whole data. Otherwise, these data were not used in the analysis of this report.

Biochemical assays

Non-fasting whole blood samples were collected from participants, pre-treated and sera obtained. Sera were stored promptly at 4°C until they were transported on ice to a commercial laboratory (SRL Corporation Inc, Tokyo, Japan), for folate assay. The ADVIA Centaur Folate Assay Protocol is one of the automated Competitive Protein Binding (CPB) Immunoassay Technology. Folate is quantified by direct chemiluminescent acridinium ester technology¹³. This technique has an acceptable imprecision of less than 10.00%, with an advanced Quality Control (QC) package. It has an analytical sensitivity of 0.91nmol/L. It can detect from small volumes of as low as 10uL of biological specimen, thus, making it a method of choice in large epidemiological studies¹⁴. Specimen preparations, shipping, and assays, were done in batches, depending on new recruitments. All laboratory analysts were blinded to participants' information. Because there is no standard classification of folate status

from automated immunoassay techniques, we adopted the World Health Organization's (WHO) classification guidelines¹⁵. Nicotine is the toxic chemical in tobacco products and its predominant metabolite is cotinine. Cotinine can be detected in biological specimens as biomarker of exposure to tobacco. In this study, we used plasma cotinine concentrations to quantitatively classify active and passive smoking status. The details of measurements of plasma cotinine are described in our previous report¹⁶.

Definition of variables

The dependent variable was folate status. Folate status was classified as: folate deficiency, defined as (<6.80nmol/L) of serum folate; suboptimal status (6.80 -13.59nmol/L) and optimal folate status (\geq 13.60nmol/L)¹⁵. Folate deficiency was reported in 0.52% of the study population. To improve study power, and because non fasting serum was used for folate assay, we merged this group with the suboptimal category. Active and passive exposure to tobacco smoking statuses were classified based on plasma cotinine cut-off points established in a previous report¹⁶. A non-smoker was defined as having plasma cotinine concentration of less than 1.19nmol/L. A person exposed to environmental tobacco smoke (ETS) as having 1.19 – 65.21nmol/L; and active smoker as having greater than 65.21nmol/L of plasma cotinine concentration. Prenatal folic acid (FA) supplement use was defined as “a report on the use of FA supplements before or after conception”. Other nutritional

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

supplements use was defined as “any report on intake of nutritional supplements other than FA, before or after conception”. Ingestion of alcoholic beverages was categorized based on frequency of intake: “monthly, weekly or daily”. Self-reported active tobacco smoking was categorized based on the number of cigarette sticks smoked per day. Light smokers (<10 cigarette sticks per day); moderate smokers (10-19 cigarette sticks per day); and heavy smokers (≥ 20 cigarette sticks per day). ETS exposure at home was defined as “living with one or more active smokers”. ETS at work place referred to “working with one or more active smokers at work place”. In this study, lifestyle habits considered were alcoholic beverage consumption, nutritional supplements use, and tobacco use. Potential predictors of folate status were identified based on previous reports. In this study, year of enrolment, maternal age, parity, BMI, educational level, household income, occupation, use of nutritional supplements, active and passive cigarette smoking, alcohol intake, season of the year, and geographical location, were identified as putative predictors.

Statistical analyses

Statistical tests of associations included Pearson's chi squared tests, and Fischer's exact tests for categorical variables. Skewed serum folate and plasma cotinine concentrations were log-transformed during the preliminary descriptive analyses, thereafter back-transformed. Differences in mean folate levels were explored using ANOVA with post-hoc analyses to correct for multiple

comparisons. However, the main regression analyses were performed using qualitative folate status. We imputed the missing values present in the data via Multivariate Imputation by Chained Equations (MICE), as implemented in the R package *mice*, obtaining $m = 10$ imputed data sets. MICE is a Markov Chain Monte Carlo method that uses the correlation structure of the data and imputes missing data values for each incomplete variable m times by regression of incomplete variables on the other available variables iteratively. We used Bayesian logistic regression and fitted the model to the $m = 10$ imputed data set, with dichotomized folate status as the outcome variable, and the followings as potential predictor variables: age, BMI, parity, educational level, income, occupation, region, year of enrollment, season of the year at enrollment, folic acid supplements use, other nutritional supplements use, alcohol intake, active cigarette smoking, and exposure to environmental tobacco smoke (ETS) both at home and work place. We used results of plasma cotinine concentration to quantitatively classify active smoking and passive exposure to tobacco products, and regressed against folate status, with adjustment for all other potential predictors. We reported pooled estimates for the main effects of the predictor variables in the model. P-values for testing for the presence of a linear trend are also reported for predictor variables with more than two categories. Reported effects, confidence intervals and p-values are pooled over the $m = 10$ imputed data sets. Additionally, we reported the value of the McFadden's

pseudo- R^2 pooled over these data sets. All statistical analyses were performed using JMP 11 Pro Statistical Software Package (SAS, Cary, NC, USA), except for the binary logistic regression model which required multiple imputation of missing data and was performed using R version 3.2.2 (Vienna, Austria). An alpha level of significance was set at <0.05 .

（倫理面への配慮）

The Institutional Ethical Board for Human Gene and Genome studies at Hokkaido University Graduate School of Medicine approved the study protocol.

C. 研究結果

Overall, geometric mean (standard deviation) of serum folate concentration was 17.77 (3.58)nmol/L. Among women with optimal folate status, the geometric mean (standard deviation) was 20.67 (3.26) nmol/l, and 10.83 (2.65) nmol/l among participants with suboptimal folate status. One sided lower limit tolerance interval at 95% of the population was 8.47nmol/L. Prevalence of folate deficiency was 0.52%. Suboptimal folate status constituted 25.65%, while optimal folate status was reported in 73.83% of the population (**Table 1**). Initial descriptive analyses using folate as a continuous variable revealed mean serum folate concentrations increased with increasing maternal age ($p<0.001$), educational status ($p<0.001$), annual income ($p<0.001$), FA supplements use ($p<0.001$), and other nutritional supplements use ($p<0.001$). Mean serum folate concentrations decreased with increasing number of cigarette sticks smoked per day ($p<0.001$), ETS exposure at home ($p<0.001$), and increasing plasma

cotinine concentrations ($p<0.001$). Exposure to ETS at both home and at work was associated with low folate status, $p <0.001$. About 60.00% of those with folate deficiency were exposed to both ETS at home and at work place. Other associations were geographical region, year of enrolment into the study, and season of the year (data not shown). Serum folate inversely correlated with plasma cotinine concentration ($r = -0.2000$, $p <0.001$, data not shown). Significant differences were observed in mean plasma cotinine concentrations among nonusers of FA supplements and users, with geometric mean (SD) of 46.41 (23.23)nmol/L, and 25.27 (15.32)nmol/L, $p <0.001$, respectively. Also, geometric mean (SD) between nonusers and users of other nutritional supplements was 42.49 (21.91)nmol/L, and 34.99 (20.17)nmol/L, $p = 0.028$, respectively (**Fig. 2**). Users of FA supplements were likely to be those with chronic inter-current medical conditions, those who had fertility treatments, and those who were also users of other nutritional supplements. 7.00% of folic acid users started intake more than 3months before conception. Another 8.00% started 1 month before conception, while majority (more than 60.00%) started use following confirmation of pregnancy. The average frequency of use per week was 3 times. Multivitamins reported were found to contain various doses of folic acid in the range of 100 μ g to 200 μ g per tablet (data not shown).

In the regression model, the value of the McFadden's pseudo- R^2 pooled over the $m = 10$ imputed data sets was -8.69% . The demographic determinants of low

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

folate status identified were lower maternal age (AOR: 1.48, 95% CI: 1.32, 1.66, $p < 0.001$); lower educational level (AOR: 1.27, 95% CI: 1.17, 1.39, $p < 0.001$); lower annual income (AOR: 1.11, 95% CI: 1.01, 1.22, $p = 0.024$); residing in the south and eastern regions (AOR: 1.25, 95% CI: 1.14, 1.38, $p < 0.001$), and (AOR: 1.15, 95% CI: 1.05, 1.25, $p = 0.003$), respectively. Being enrolled into the study between 2005 and 2007 was associated with an increase in the risk of low folate status (AOR: 1.23, 95% CI: 1.12, 1.35, $p < 0.001$); while recruitment between 2008 and 2010 reduced the likelihood of having low folate status (AOR: 0.81, 95% CI: 0.73, 0.90, $p < 0.001$), respectively. Being enrolled during summer, autumn, and winter were associated with higher likelihood of low folate status (AOR: 1.12, 95% CI: 1.02, 1.24, $p = 0.023$); (AOR: 1.13, 95% CI: 1.02, 1.25, $p = 0.015$), and (AOR: 1.13, 95% CI: 1.01, 1.27, $p = 0.037$), respectively. Lower BMI (AOR: 0.84, 95% CI: 0.74, 0.94, $p = 0.006$); and unemployment were associated with risk reduction (AOR: 0.87, 95% CI: 0.80, 0.94, $p = 0.001$), (**Table 2**).

Lifestyle factors that reduced the odds of low folate status were the use of FA supplements (AOR: 0.19, 95% CI: 0.17, 0.22, $p < 0.001$); other nutritional supplements (AOR: 0.55, 95% CI: 0.48, 0.64, $p < 0.001$); and weekly alcohol consumption (AOR: 0.75, 95% CI: 0.62, 0.90, $p = 0.003$), respectively. Lifestyle factors that increased the odds of low folate status were active cigarette smoking and ETS exposure. Smoking < 10 cigarette sticks per day was associated with increased odds (AOR: 1.42, 95% CI:

1.23, 1.64, $p < 0.001$); while smoking between 10 to 19 cigarette sticks per day was associated with an increased risk (AOR: 2.28, 95% CI: 1.92, 2.71, $p < 0.001$). However, smoking ≥ 20 cigarette sticks per day was not statistically significant, but $p_{\text{trend}} < 0.001$. Exposure to ETS at home increased the odds of low folate status (AOR: 1.23, 95% CI: 1.13, 1.34, $p < 0.001$), and exposure to ETS at workplace also increased the odds of low folate status (AOR: 1.16, 95% CI: 1.02, 1.31, $p = 0.02565$), (**Tables 2**).

Using plasma cotinine concentrations to classify active and passive exposure to tobacco products, **Tables 3** shows that participants with plasma cotinine levels between 1.19 – 65.21nmol/L were 1.20 times more likely to have low folate status (AOR: 1.20, 95% CI: 1.10, 1.31, $p < 0.001$); while those with levels > 65.21 nmol/L had a twofold increase in risk (AOR: 1.91, 95% CI: 1.70, 2.14, $p < 0.001$); $p_{\text{trend}} < 0.001$.

D. 考察

To our knowledge, this report presents robust information on demographic and lifestyle predictors of folate status in a relatively large cohort of pregnant Japanese women. Majority (73.83%) of participants had optimal first trimester folate status. Only 0.52% had serum folate concentrations below 6.80nmol/L, a level clinically considered a negative folate balance, while 25.65% of the population had marginal folate status. Lower tolerance limit of 8.47nmol/L implies a negative folate balance for this population. Our findings contrast those from Tokyo where more than 50.00% of the study population of pregnant women

had low folate status.

Demographic predictors of folate status

Low folate status was associated with younger maternal age, higher BMI, educational level and annual income. Cigarette smoking rate is on the increase among young Japanese women, and a quest to achieve a lower BMI via dieting is in vogue among women of reproductive age. These factors may invariably compromise nutritional status including folate among younger women^{4; 17}. Micronutrients deficiencies including folate in overweight/obese people have been reported by some previous studies¹⁸. Possible mechanisms postulated have been: decrease dietary intake, current cigarette smoking, and possible low serum/plasma concentrations as a result of increased intravascular volume¹⁹. Consistent with our findings, socio-economic status has been reported to influence folate intake among Japanese workers²⁰. Also, educational attainment was reported in Belgium²¹, and Australia²². In USA, older maternal age, higher education, and higher income status, have been reported to predict the use of FA supplements²³. In this study, these factors might have favored higher folate status. Other demographic factors associated with suboptimal folate status have been reported from other countries, and these include household size²⁴, season of the year²⁵, rural residence²⁶, and region²⁷. We observed that residing in the southern and eastern regions; and seasons of the year were associated with the risk of low folate status.

Traditionally, most Japanese women are full-time house wives. This may explain

why the unemployed had lower risk. Working women are likely to skip their meals and may prefer fast foods as reported among children of working women²⁸. Of note here is that employment status was broadly classified. Further exploration based on job types may shade more insight on this observation.

Unfavorable lifestyle predictors of folate status

We report self-reported active cigarette smoking and ETS exposure as the major modifiable unfavorable predictors of folate status. Although we could not demonstrate a dose-response pattern in the odds, especially among heavy smokers during pregnancy; this may probably be related to a small subgroup size. Using plasma cotinine biomarker, the risk of low folate status increased in a dose-response pattern. Contrary to this result, another study in Tokyo found no lifestyle habits as risk factors for suboptimal folate status⁸. However, our result is consistent with reports from other developed countries, where lifestyle factors are commonly observed as predictors of folate status. Folate depleting effects of active smoking and ETS exposure have been reported^{29; 30; 31; 32; 33; 34; 35}. Possible biologic mechanisms of folate depletion in active and passive smokers include decreased intake^{29; 33}, inactivating effects of organic nitrites, cyanates, and nitrous oxide on circulating folates^{34; 36}, and direct effects of oxidative stress or increased folate turnover^{31; 37}. We observed lower mean plasma cotinine concentrations among nutritional supplements users. Nutritional

supplements users are more likely to practice healthy lifestyles.

Favorable lifestyle predictors of folate status

FA supplements use is the major modifiable predictor of optimal folate status. This report further confirms the well documented role of FA supplements in improving folate status. Other nutritional supplements used also correlated positively with folate status, probably because most multivitamins also contain FA. Other nutritional supplements used included multivitamins, trace elements, herbs, proteins, ginseng and energy drinks. Over-the-counter (OTC) multivitamins used contained various doses of folic acid in the range of 100 μ g to 200 μ g per tablet according to the brand names reported by study participants, majority of whom were recruited between 2002 and 2010. However, lately, folic acid content seems to have been increased by drug makers (up to 480 μ g/tablet). This may reflect in our findings of increase in mean folate concentrations of participants enrolled from 2010 and beyond, and a reduction in the risk of having low folate status. In this study, majority of folic acid supplements users did not use it because of pregnancy. Those who used it for prenatal purpose started only after confirming they were pregnant. This information may impact on the crucial periconceptional period for prevention of NTDs. Within Japan, some smaller studies outside Hokkaido did report that using FA supplements increased blood folate concentrations more than using dietary sources of folate only. They also observed that Japanese women in their

reproductive age do not meet the daily Recommended Dietary Allowance (RDA) of 440 μ g for folate^{5; 7; 8; 38; 39}. Although the Japanese Government has recommended that women of reproductive age or those who plan to become pregnant should take 400 μ g/day of FA supplements, scholars have reported that the level of awareness and compliance with the recommendations are still low^{5; 40}. Furthermore, across the Asian sub-region, prenatal FA supplements use is not a routine prenatal care practice⁴¹. Our findings are similar to other reports emerging from China, Malaysia and Indonesia. Of these three, mandatory fortification is legislated only in Indonesia^{42; 43; 44}. Internationally, studies from other developed countries without food fortification policies are reporting increasing incidence of suboptimal folate concentrations^{21; 45; 46}. Our result on the role of alcoholic beverage consumption on folate is consistent with a previous study in Czech Republic, where moderate beer consumption correlated with higher plasma folate⁴⁷. Conversely, chronic heavy alcohol consumption is associated with folate deficiency via numerous mechanisms⁴⁸. We stand with the universal recommendation that pregnant women should abstain from consuming alcoholic beverages, because of adverse fetal effects⁴⁹.

Strengths and limitations

This study is the first to utilize a large population of pregnant Japanese women who were recruited early enough within the stage of embryonic neurulation and organogenesis. Epidemiologically, the study identified demographic and lifestyle

determinants of folate status at this critical stage of neural tube formation. Identifying modifiable lifestyle factors as favourable and unfavourable determinants can lay a sound foundation for Public Health intervention policies. All information about the type or brand name of nutritional supplements used, the timing and duration of use were self-reported, hence the risk of bias. However, nutritional supplements use and smoking status were validated by biomarkers to avoid misclassification bias. For instance, the difference observed in folate biomarker concentrations among FA users and non-users was an indication of valid self-reported use. Also, comparable results were obtained with plasma cotinine and self-reported cigarette smoking or ETS exposure. Serum folate was used as an indicator of folate status. Erythrocyte folate signifies tissue folate reserves and is not subject to dietary fluctuations exhibited by serum/plasma folate concentrations, thus making it a more reliable choice. However, because erythrocyte folate assay is more complex, serum folate assay was preferred to conduct this large epidemiological study. Two previous studies have justified its use in epidemiologic studies^{50;51}. This study involved only women who presented at the designated health facilities and consented to participate, therefore may not be representative of the general population. Finally, our findings are more of statistical correlations and not in any way signifying causality. Future randomized controlled trials employing erythrocyte folate and known dosages of folic acid supplements may be more informative.

Implications

The implication of active and passive tobacco smoking in the determination of folate status is of public health importance because an increasing prevalence of tobacco smoking among younger Japanese women is being reported⁵². Optimal first trimester folate status is central in this subpopulation. It may be helpful to consider policies that could improve folate status in this group. Mandatory food fortification with FA might be a great precautionary measure. Although, there are emerging controversies about prenatal FA exposure and epigenetic effects⁵³, however, the folate depleting effects of tobacco smoke may constitute a huge public health challenge in the prevention of NTDs and other birth defects in Japan. Although this Hokkaido cohort data recorded only eight (0.04%) cases of isolated NTDs, the national rate is the second highest in developed countries after Germany.

E. 結論

In conclusion, demographic and lifestyle factors likely predict folate status of Hokkaido women. Active cigarette smoking and ETS exposure are the major modifiable unfavourable predictors of folate status; while the use of FA supplement and FA containing multivitamins are the major favourable predictors. FA supplementation may correct the folate deficits associated with tobacco smoking.

F. 研究発表

1. 論文発表

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

Under minor review with British Journal of Nutrition (BJN).

2. 学会発表

I.Manokhina, T.A. Yila, W.P. Robinson. Towards Accurate Quantification of miRNAs for Clinical Use: Evaluation of Technical and Biological Confounders. 4th Annual Canadian Human and Statistical Genetics Meeting, 18 – 21 April, 2015 Vancouver, BC, Canada.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

引用文献

1. (1991) Vitamins to prevent neural tube defects. *Lancet* **338**, 894-895.
2. Cragan JD, Roberts HE, Edmonds LD *et al.* (1995) Surveillance for anencephaly and spina bifida and the impact of prenatal diagnosis--United States, 1985-1994. *MMWR CDC Surveill Summ* **44**, 1-13.
3. Initiative FF Fifteen Years of Fortifying With FA Reduces Birth Defects; Averts Healthcare Expenses. Flour Fortification Initiative. http://www.ffinetwork.org/about/stay_informed/publications/documents/FolicAcidBackground.pdf (accessed April 6 2015)
4. Takimoto H, Tamura T (2006) Increasing trend of spina bifida and decreasing birth weight in relation to declining body-mass index of young

women in Japan. *Med Hypotheses* **67**, 1023-1026.

5. Kondo A, Kamihira O, Ozawa H (2009) Neural tube defects: prevalence, etiology and prevention. *Int J Urol* **16**, 49-57.

6. Kondo A, Kamihira O, Shimosuka Y *et al.* (2005) Awareness of the role of folic acid, dietary folate intake and plasma folate concentration in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* **31**, 172-177.

7. Mito N, Takimoto H, Umegaki K *et al.* (2007) Folate intakes and folate biomarker profiles of pregnant Japanese women in the first trimester. *Eur J Clin Nutr* **61**, 83-90.

8. Matsuzaki M, Haruna M, Ota E *et al.* (2008) Dietary folate intake, use of folate supplements, lifestyle factors, and serum folate levels among pregnant women in Tokyo, Japan. *J Obstet Gynaecol Res* **34**, 971-979.

9. Ihara H, Watanabe T, Aoki Y, *et al.* (2009) Dietary folate intake and serum folate status in Japanese women of childbearing age. *J Anal Bio-Sci* **32**, 5.

10. Yila TA, Sasaki S, Miyashita C *et al.* (2012) 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.

11. Kishi R, Sasaki S, Yoshioka E *et al.* (2011) Cohort profile: the Hokkaido study on environment and children's health in Japan. *Int J Epidemiol* **40**, 611-618.

12. Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T *et al.* (2013) Ten years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: cohort profile--updated 2013. *Environ Health*

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

- Prev Med* **18**, 429-450.
13. Diagnostics B Package insert: ADVIA Centaur assay manual. Bayer Diagnostics, Revision AT.
14. Sujaku K, Ogiwara T, Y K (2006) Determination of vitamin B12 and folate by ADVIA Centaur. *J Anal Bio-Sci*. 2006; **29**:235-42. *J Anal Bio-Sci* **29**, 235-242.
15. Sauberlich HE (July 27, 1999) Folate (FA, pteroylmonoglutamic acid, folacin). In *Laboratory Tests for the Assessment of Nutritional Status*, Second Edition ed., pp. Pages 103-134. Washington D.C: CRC Press
16. Sasaki S, Braimoh TS, Yila TA *et al.* (2011) Self-reported tobacco smoke exposure and plasma cotinine levels during pregnancy--a validation study in Northern Japan. *Sci Total Environ* **412-413**, 114-118.
17. Takimoto H, Yoshiike N, Kaneda F *et al.* (2004) Thinness among young Japanese women. *Am J Public Health* **94**, 1592-1595.
18. Damms-Machado A, Weser G, Bischoff SC (2012) Micronutrient deficiency in obese subjects undergoing low calorie diet. *Nutr J* **11**, 34.
19. Aasheim ET, Hofso D, Hjelmestaeth J *et al.* (2008) Vitamin status in morbidly obese patients: a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr* **87**, 362-369.
20. Miyaki K, Song Y, Taneichi S *et al.* (2013) Socioeconomic status is significantly associated with the dietary intakes of folate and depression scales in Japanese workers (J-HOPE Study). *Nutrients* **5**, 565-578.
21. Vandevijvere S, Amsalkhir S, Van Oyen H *et al.* (2012) Determinants of folate status in pregnant women: results from a national cross-sectional survey in Belgium. *Eur J Clin Nutr* **66**, 1172-1177.
22. Gall S, Seal J, Taylor R *et al.* (2012) Folate status and socio-demographic predictors of folate status, among a national cohort of women aged 26-36 in Australia, 2004-2006. *Aust N Z J Public Health* **36**, 421-426.
23. Branum AM, Bailey R, Singer BJ (2013) Dietary supplement use and folate status during pregnancy in the United States. *J Nutr* **143**, 486-492.
24. Thoradeniya T, Wickremasinghe R, Ramanayake R *et al.* (2006) Low folic acid status and its association with anaemia in urban adolescent girls and women of childbearing age in Sri Lanka. *Br J Nutr* **95**, 511-516.
25. Hao L, Ma J, Stampfer MJ *et al.* (2003) Geographical, seasonal and gender differences in folate status among Chinese adults. *J Nutr* **133**, 3630-3635.
26. Garcia-Casal MN, Osorio C, Landaeta M *et al.* (2005) High prevalence of folic acid and vitamin B12 deficiencies in infants, children, adolescents and pregnant women in Venezuela. *Eur J Clin Nutr* **59**, 1064-1070.
27. Zhao Y, Hao L, Zhang L *et al.* (2009) Plasma folate status and dietary folate intake among Chinese women of childbearing age. *Matern Child Nutr* **5**, 104-116.
28. Gaina A, Sekine M, Chandola T *et al.* (2009) Mother employment status and nutritional patterns in Japanese junior high schoolchildren. *Int J Obes (Lond)* **33**, 753-757.
29. Mathews F, Yudkin P, Smith RF *et al.* (2000) Nutrient intakes during pregnancy: the influence of smoking status and age. *J Epidemiol Community Health* **54**, 17-23.
30. Trobs M, Renner T, Scherer G *et al.*

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

- (2002) Nutrition, antioxidants, and risk factor profile of nonsmokers, passive smokers and smokers of the Prevention Education Program (PEP) in Nuremberg, Germany. *Prev Med* **34**, 600-607.
31. Ulvik A, Ebbing M, Hustad S *et al.* (2010) Long- and short-term effects of tobacco smoking on circulating concentrations of B vitamins. *Clin Chem* **56**, 755-763.
32. Mannino DM, Mulinare J, Ford ES *et al.* (2003) Tobacco smoke exposure and decreased serum and red blood cell folate levels: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Nicotine Tob Res* **5**, 357-362.
33. Ortega RM, Requejo AM, Lopez-Sobaler AM *et al.* (2004) Smoking and passive smoking as conditioners of folate status in young women. *J Am Coll Nutr* **23**, 365-371.
34. Erdemir EO, Bergstrom J (2007) Effect of smoking on folic acid and vitamin B12 after nonsurgical periodontal intervention. *J Clin Periodontol* **34**, 1074-1081.
35. Vardavas CI, Linardakis MK, Hatzis CM *et al.* (2008) Smoking status in relation to serum folate and dietary vitamin intake. *Tob Induc Dis* **4**, 8.
36. Ozerol E, Ozerol I, Gokdeniz R *et al.* (2004) Effect of smoking on serum concentrations of total homocysteine, folate, vitamin B12, and nitric oxide in pregnancy: a preliminary study. *Fetal Diagn Ther* **19**, 145-148.
37. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC *et al.* (2007) Systemic effects of smoking. *Chest* **131**, 1557-1566.
38. Kondo A, Shimosuga Y, Oguchi H *et al.* (2008) [Folic acid reduces the risk of neural tube defects: awareness and folate intake among pregnant women in 2006]. *Hinyokika Kyo* **54**, 537-542.
39. Kondo A, Asada Y, Shibata K *et al.* (2011) Dietary folate intakes and effects of folic acid supplementation on folate concentrations among Japanese pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res* **37**, 331-336.
40. Japan MoH (Dec 28, 2000) Ministry of Health: Department of Maternal and Child Health, Bureau of Children and Families, Tokyo: Information on promoting intake of FA in order to reduce children afflicted with neural tube defects among young women who are capable of becoming pregnant [BoCaF Department of Maternal and Child Health, editor]. Tokyo.
41. Oi S (2003) Current status of prenatal management of fetal spina bifida in the world: worldwide cooperative survey on the medico-ethical issue. *Childs Nerv Syst* **19**, 596-599.
42. Ren A, Zhang L, Li Z *et al.* (2006) Awareness and use of folic acid, and blood folate concentrations among pregnant women in northern China--an area with a high prevalence of neural tube defects. *Reprod Toxicol* **22**, 431-436.
43. Khor GL, Duraisamy G, Loh SP *et al.* (2006) Dietary and blood folate status of Malaysian women of childbearing age. *Asia Pac J Clin Nutr* **15**, 341-349.
44. Green TJ, Skeaff CM, Venn BJ *et al.* (2007) Red cell folate and predicted neural tube defect rate in three Asian cities. *Asia Pac J Clin Nutr* **16**, 269-273.
45. Brough L, Rees GA, Crawford MA *et al.* (2009) Social and ethnic differences in folic acid use preconception and during early pregnancy in the UK: effect on

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

maternal folate status. *J Hum Nutr Diet* **22**, 100-107.

46. McNulty B, Pentieva K, Marshall B *et al.* (2011) Women's compliance with current folic acid recommendations and achievement of optimal vitamin status for preventing neural tube defects. *Hum Reprod* **26**, 1530-1536.

47. Mayer O, Jr., Simon J, Rosolova H (2001) A population study of the influence of beer consumption on folate and homocysteine concentrations. *Eur J Clin Nutr* **55**, 605-609.

48. Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM *et al.* (2002) Metabolic interactions of alcohol and folate. *J Nutr* **132**, 2367S-2372S.

49.

<http://www.icap.org/PolicyTools/ICAPBlueBook/BlueBookModules/10DrinkingandPregnancy/tabid/171/Default.aspx> ICAP Blue Book 10. Drinking and Pregnancy

50. Galloway M, Rushworth L (2003)

Red cell or serum folate? Results from the National Pathology Alliance benchmarking review. *J Clin Pathol* **56**, 924-926.

51. Drogan D, Klipstein-Grobusch K, Wans S *et al.* (2004) Plasma folate as marker of folate status in epidemiological studies: the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Br J Nutr* **92**, 489-496.

52. Takimoto H, Yokoyama T, Yoshiike N *et al.* (2005) Increase in low-birth-weight infants in Japan and associated risk factors, 1980-2000. *J Obstet Gynaecol Res* **31**, 314-322.

53. Dolinoy DC (2007) Epigenetic gene regulation: early environmental exposures. *Pharmacogenomics* **8**, 5-10.

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

Table1: Distributions of maternal characteristics by folate status: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health 2002-2012, Japan (N = 15266).

Variables	Categories	n	Folate status (nmol/L)					
			Deficient (<6.80)		Suboptimal (6.80 – 13.59)		Optimal (≥13.60)	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)
			79	(0.52)	3916	(25.65)	11271	(73.83)
Age (years)	<20	110	2	(1.82)	53	(48.18)	55	(50.00)
	20-24	1685	16	(0.95)	614	(36.44)	1055	(62.61)
	25-29	4564	25	(0.55)	1249	(27.37)	3290	(72.09)
	30-34	5393	24	(0.45)	1258	(23.33)	4111	(76.23)
	≥35	2827	9	(0.32)	572	(20.23)	2246	(79.45)***
Parity	Nulliparous	5983	27	(0.45)	1549	(25.89)	4407	(73.66)
	Parous	8035	38	(0.47)	2125	(26.45)	5872	(73.08)
BMI (Kg/m ²)	<18.50	2532	8	(0.32)	660	(26.07)	1864	(73.62)
	18.50 -24.99	10576	45	(0.43)	2649	(25.05)	7882	(74.53)
	25.00 -29.00	1225	17	(1.39)	347	(28.33)	861	(70.29)
	≥30.00	313	4	(1.28)	92	(29.39)	217	(69.33)***
Educational level	Junior high school	768	4	(0.52)	283	(36.85)	481	(62.63)
	High school	6573	49	(0.75)	1946	(29.61)	4578	(69.65)
	College	5948	17	(0.29)	1301	(21.87)	4630	(77.84)
	University	1580	7	(0.44)	283	(17.91)	1290	(81.65)***
Annual income (million JPY)	<3	2914	21	(0.72)	915	(31.40)	1978	(67.88)
	3-4,999	5709	23	(0.40)	1462	(25.61)	4224	(73.99)
	5-7,999	3215	13	(0.40)	716	(22.27)	2486	(77.33)
	≥8	889	4	(0.45)	164	(18.45)	721	(81.10)***
Occupation	Unemployed	6464	31	(0.48)	1568	(24.26)	4865	(75.26)
	Employed	8802	48	(0.55)	2348	(26.68)	6406	(72.78)**
Tobacco smoking (cigarette sticks/day)	No	13599	59	(0.44)	3249	(23.96)	10251	(75.60)
	<10	975	8	(0.82)	343	(35.18)	624	(64.00)
	10-19	630	11	(1.75)	290	(46.03)	329	(52.22)
	≥20	102	1	(0.98)	34	(33.33)	67	(65.69)***
°ETS at home	No	5763	25	(0.43)	1178	(20.44)	4560	(79.13)
	Yes	9503	54	(0.57)	2738	(28.81)	6711	(70.62)***
°ETS at work place	No	1530	11	(0.72)	383	(25.03)	1136	(74.25)
	Yes	13736	68	(0.50)	3533	(25.72)	10135	(73.78)
Combined ETS exposure at home and work place	None	724	4	(0.55)	149	(20.58)	571	(78.87)
	Work place	5039	21	(0.42)	1029	(20.42)	3989	(79.16)
	Home only	806	7	(0.87)	234	(29.03)	565	(70.10)
	Home and work place	8697	47	(0.54)	2504	(28.79)	6146	(70.67)***
Plasma cotinine status (nmol/L)	<1.19	5874	22	(0.37)	1142	(19.44)	4710	(80.18)
	1.19-65.21	7113	35	(0.49)	1905	(26.78)	5173	(72.73)
	>65.21	2279	22	(0.97)	869	(38.13)	1388	(60.90)***

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

Table1 (continued)

Variables	Categories	n	Folate status (nmol/L)					
			Deficient (<6.80)		Suboptimal (6.80 – 13.59)		Optimal (≥13.60)	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)
			79	(0.52)	3916	(25.65)	11271	(73.83)
Alcohol intake (frequency)	No	8084	37	(0.46)	1965	(24.31)	6082	(75.24)
	Monthly	5590	34	(0.61)	1586	(28.37)	3970	(71.02)
	Weekly	723	3	(0.41)	160	(22.13)	560	(77.46)
	Daily	869	5	(0.58)	205	(23.59)	659	(75.83)***
Folic Acid supplements use	No	13559	74	(0.62)	3672	(30.68)	8224	(68.71)
	Yes	1707	5	(0.15)	244	(7.40)	3047	(92.45)***
Other nutritional supplements use	No	13956	74	(0.53)	3660	(26.23)	10222	(73.24)
	Yes	1310	5	(0.38)	256	(19.54)	1049	(80.08)***
Region	Central	6718	27	(0.40)	1522	(22.66)	5169	(76.94)
	South	3589	18	(0.50)	1076	(29.98)	2495	(69.52)
	East	4765	33	(0.69)	1271	(26.67)	3461	(72.63)
	Other regions	194	1	(0.52)	47	(24.23)	146	(75.26)***
	Year of enrolment	2002 -2004	4623	15	(0.32)	1290	(27.90)	3318
	2005 - 2007	5651	35	(0.62)	1675	(29.64)	3941	(69.74)
	2008 -2010	4063	22	(0.54)	782	(19.25)	3259	(80.21)
	2011-2012	929	7	(0.75)	169	(18.19)	735	(81.05)***
Season of the year at enrolment	Spring	3850	31	(0.81)	1010	(26.23)	2809	(72.96)
	Summer	3720	17	(0.46)	987	(26.53)	2716	(73.01)
	Autum	2424	13	(0.54)	629	(25.95)	1782	(73.51)
	Winter	5272	18	(0.34)	1290	(24.47)	3964	(75.19)*

SD, Standard deviation ; n, number of participants; BMI, Body mass index; JPY, Japanese Yen; ETS, Environmental Tobacco smoke.

P values were derived from Pearson's chi squared tests and Fisher's exact tests. Means and standard deviations generated from Students t-tests and ANOVA with post-hoc analysis. All percentages are row percentages.

Values may not add up to 100% due to missing values. Levels of significance: *p <0.050; **p<0.010; ***p<0.001.

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: Estimated effects of demographic characteristics and lifestyle factors on folate status: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health 2002-2012, Japan (N = 15266)

Variables	Categories	n	Folate status (nmol/L)					
			Deficient (<6.80)		Suboptimal (6.80 – 13.59)		Optimal (≥13.60)	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)
			79	(0.52)	3916	(25.65)	11271	(73.83)
Age (years)	<20	110	2	(1.82)	53	(48.18)	55	(50.00)
	20-24	1685	16	(0.95)	614	(36.44)	1055	(62.61)
	25-29	4564	25	(0.55)	1249	(27.37)	3290	(72.09)
	30-34	5393	24	(0.45)	1258	(23.33)	4111	(76.23)
	≥35	2827	9	(0.32)	572	(20.23)	2246	(79.45)***
Parity	Nulliparous	5983	27	(0.45)	1549	(25.89)	4407	(73.66)
	Parous	8035	38	(0.47)	2125	(26.45)	5872	(73.08)
BMI (Kg/m ²)	<18.50	2532	8	(0.32)	660	(26.07)	1864	(73.62)
	18.50 -24.99	10576	45	(0.43)	2649	(25.05)	7882	(74.53)
	25.00 -29.00	1225	17	(1.39)	347	(28.33)	861	(70.29)
	≥30.00	313	4	(1.28)	92	(29.39)	217	(69.33)***
Educational level	Junior high school	768	4	(0.52)	283	(36.85)	481	(62.63)
	High school	6573	49	(0.75)	1946	(29.61)	4578	(69.65)
	College	5948	17	(0.29)	1301	(21.87)	4630	(77.84)
	University	1580	7	(0.44)	283	(17.91)	1290	(81.65)***
Annual income (million JPY)	<3	2914	21	(0.72)	915	(31.40)	1978	(67.88)
	3-4,999	5709	23	(0.40)	1462	(25.61)	4224	(73.99)
	5-7,999	3215	13	(0.40)	716	(22.27)	2486	(77.33)
	≥8	889	4	(0.45)	164	(18.45)	721	(81.10)***
Occupation	Unemployed	6464	31	(0.48)	1568	(24.26)	4865	(75.26)
	Employed	8802	48	(0.55)	2348	(26.68)	6406	(72.78)**
Tobacco smoking (cigarette sticks/day)	No	13599	59	(0.44)	3249	(23.96)	10251	(75.60)
	<10	975	8	(0.82)	343	(35.18)	624	(64.00)
	10-19	630	11	(1.75)	290	(46.03)	329	(52.22)
	≥20	102	1	(0.98)	34	(33.33)	67	(65.69)***
°ETS at home	No	5763	25	(0.43)	1178	(20.44)	4560	(79.13)
	Yes	9503	54	(0.57)	2738	(28.81)	6711	(70.62)***
°ETS at work place	No	1530	11	(0.72)	383	(25.03)	1136	(74.25)
	Yes	13736	68	(0.50)	3533	(25.72)	10135	(73.78)
Combined ETS exposure at home and work place	None	724	4	(0.55)	149	(20.58)	571	(78.87)
	Work place	5039	21	(0.42)	1029	(20.42)	3989	(79.16)
	Home only	806	7	(0.87)	234	(29.03)	565	(70.10)
	Home and work place	8697	47	(0.54)	2504	(28.79)	6146	(70.67)***
Plasma cotinine status (nmol/L)	<1.19	5874	22	(0.37)	1142	(19.44)	4710	(80.18)
	1.19-65.21	7113	35	(0.49)	1905	(26.78)	5173	(72.73)
	>65.21	2279	22	(0.97)	869	(38.13)	1388	(60.90)***

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

Table2 (continued)

Variables	Categories	n	Folate status (nmol/L)					
			Deficient (<6.80)		Suboptimal (6.80 – 13.59)		Optimal (≥13.60)	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)
			79	(0.52)	3916	(25.65)	11271	(73.83)
Alcohol intake (frequency)	No	8084	37	(0.46)	1965	(24.31)	6082	(75.24)
	Monthly	5590	34	(0.61)	1586	(28.37)	3970	(71.02)
	Weekly	723	3	(0.41)	160	(22.13)	560	(77.46)
	Daily	869	5	(0.58)	205	(23.59)	659	(75.83)***
Folic Acid supplements use	No	13559	74	(0.62)	3672	(30.68)	8224	(68.71)
	Yes	1707	5	(0.15)	244	(7.40)	3047	(92.45)***
Other nutritional supplements use	No	13956	74	(0.53)	3660	(26.23)	10222	(73.24)
	Yes	1310	5	(0.38)	256	(19.54)	1049	(80.08)***
Region	Central	6718	27	(0.40)	1522	(22.66)	5169	(76.94)
	South	3589	18	(0.50)	1076	(29.98)	2495	(69.52)
	East	4765	33	(0.69)	1271	(26.67)	3461	(72.63)
	Other regions	194	1	(0.52)	47	(24.23)	146	(75.26)***
	Year of enrolment	2002 -2004	4623	15	(0.32)	1290	(27.90)	3318
	2005 - 2007	5651	35	(0.62)	1675	(29.64)	3941	(69.74)
	2008 -2010	4063	22	(0.54)	782	(19.25)	3259	(80.21)
	2011-2012	929	7	(0.75)	169	(18.19)	735	(81.05)***
Season of the year at enrolment	Spring	3850	31	(0.81)	1010	(26.23)	2809	(72.96)
	Summer	3720	17	(0.46)	987	(26.53)	2716	(73.01)
	Autum	2424	13	(0.54)	629	(25.95)	1782	(73.51)
	Winter	5272	18	(0.34)	1290	(24.47)	3964	(75.19)*

n, number of participants; BMI, Body mass index; JPY, Japanese Yen; ETS, Environmental Tobacco smoke. AOR, Adjusted odds ratio; CI, Confidence interval.

Regression model adjusted for maternal age, parity, BMI, educational level, annual income, occupation, geographical region, year of enrolment into the study, season of the year at enrolment, nutritional supplements use, alcohol intake, and active and passive smoking.

Levels of significance: *p <0.050; **p<0.010; ***p<0.001. McFadden's pseudo- R^2 = 8.69%.

All percentages are row percentages. Values may not add up to 100% due to missing values. NS, not significant.

†Other nutritional supplements used included multivitamins, trace elements, herbs, proteins, ginseng and energy drinks.

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: Estimated effects of active and passive cigarette smoking based on plasma cotinine concentrations on folate status: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health 2002-2012, Japan (N = 15266)

Smoking status	Plasma cotinine levels (nmol/L)	Folate status (nmol/L)		AOR	95%CI	P _{trend}
		Suboptimal (<13.60)	Optimal (≥13.60)			
		n	(%)	n	(%)	
		3995	(26.17)	11271	(73.83)	
Non smoker	<1.19	1164	(19.82)	4710	(80.18)	1.00 Reference <0.001
ETS exposed	1.19 – 65.21	1940	(27.27)	5173	(72.73)	1.20 (1.10, 1.31)**
Active smoker	>65.21	891	(39.10)	1388	(60.90)	1.91 (1.70, 2.14)***

n, number of participants; BMI, Body mass index; JPY, Japanese Yen; ETS, Environmental Tobacco smoke. AOR, Adjusted odds ratio; CI, Confidence interval.

Regression model adjusted for maternal age, parity, BMI, educational level, annual income, occupation, geographical region, year of enrolment into the study, season of the year at enrolment, nutritional supplements use, alcohol intake, and active and passive smoking.

Levels of significance: *p <0.050; **p<0.010; ***p<0.001.

All percentages are row percentages. Values may not add up to 100% due to missing values. McFadden's pseudo-R² = 8.53%.

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

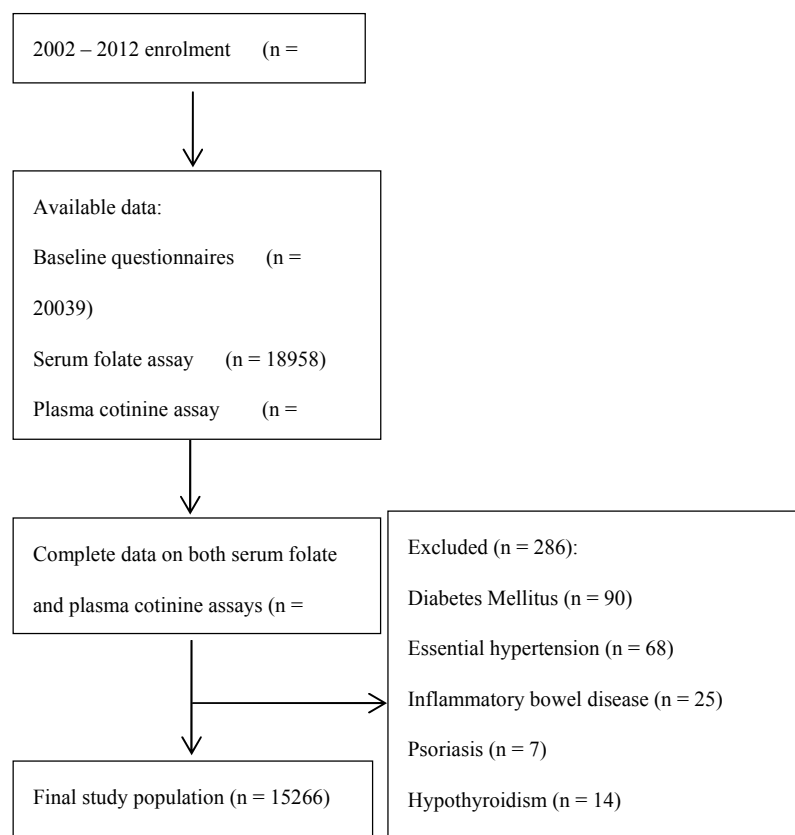


Fig. 1: Study selection chart: The Hokkaido Study on Environment and Children’s Health, 2002 – 2012, Japan.

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

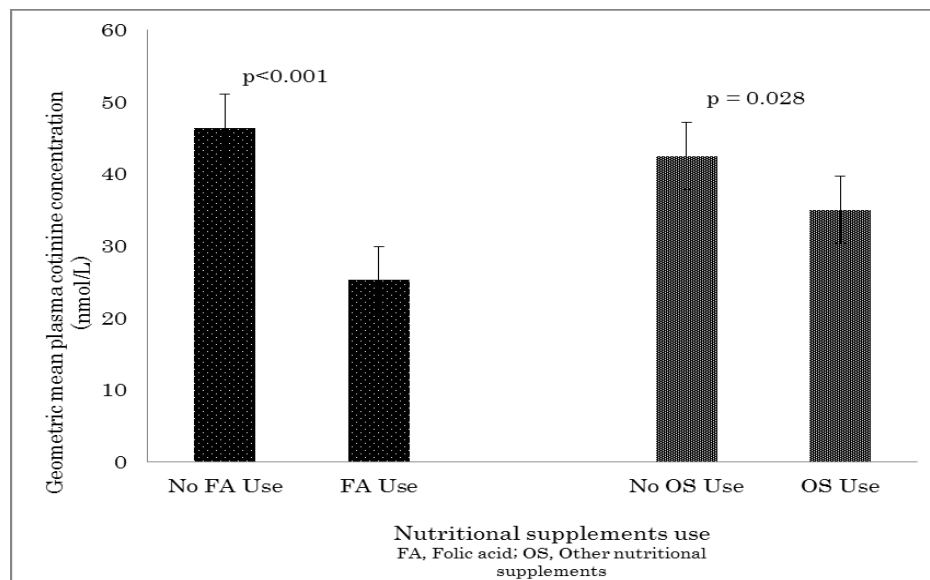


Fig. 2: Mean plasma cotinine concentrations by nutritional supplements use among participants: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2002 – 2012, Japan.

Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children

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 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授

研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

Perfluoroalkyl acids (PFAAs) as emerged chemicals are extremely resistant chemicals widespread in environment and frequently detected in human blood samples. Animal studies showed exposure to PFAAs cause immunotoxicity. However, the association between PFAAs including long chain PFAAs and allergy in humans are not well understood. We examined whether prenatal exposure to PFAAs is associated with allergic symptoms in 4-year old children in a large-scale prospective birth cohort, Hokkaido, Japan. 1558 mother-child pairs were analyzed in this study and prenatal levels of 11 PFAAs were measured in maternal plasma samples obtained between 28 and 32 weeks of pregnancy by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Information of participants' characteristics were obtained from self-administered pre-, postnatal questionnaires and medical birth records. Infant allergies including eczema, wheezing, and allergic rhinoconjunctivitis were assessed by Japanese version of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three questionnaire obtained at 4 years post-delivery. Associations of PFAA quartiles with allergic outcomes were examined using logistic models. Adjusted odds ratios (ORs) in the 4th quartile vs 1st quartile (Q4 vs Q1) for total allergic diseases (including at least one of allergic outcomes) were significantly decreased for PFDoDA (Q4 vs Q1 OR: 0.621; 95% CI: 0.454, 0.847) and PFTrDA (Q4 vs Q1 OR: 0.712; 95% CI: 0.524, 0.966) in all children. We found the same results between PFAAs and eczema. The adjusted OR (Q4 vs Q1) for wheezing in association with higher maternal PFHxS levels was 0.728 (95% CI: 0.497, 1.06) in all children.

Although adjusted OR for allergic outcomes in 2nd to 4th of examined PFAA quartiles reduced compare to first quartile in both sexes, the associations were statistically significant only in boys after sex stratification (p for trend <0.05). In conclusion, prenatal exposure to PFAAs, especially long chain ones, may have immunosuppressive effects on allergic diseases in 4 year old children especially among boys.

研究協力者

Houman Goudarzi (外国人特別研究員)

小林 澄貴 (北海道大学環境健康科学研究教育センター)

檉野 いく子 (国立国際医療研究センター・疫学予防研究部)

岡田 恵美子 (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)

Perfluoroalkyl acids (PFAAs) are ubiquitous chemicals with widespread contamination in environment, animals and humans. Main route of exposure to PFAAs are contaminated food and water, and house dust (Kato et al., 2009). The most used PFAAs are perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA). While PFOS and PFOA are being voluntarily phased out by several industries,

A . 研究目的

they are still present in older products. PFAAs are resistant to metabolism with long elimination half-lives for example 3.8, 5.4 and 8.5 years for PFOA, PFOS perfluorohexane sulfonate (PFHxS) in humans, respectively (Olsen et al., 2007). The stability and long half-lives of PFAAs result in continued presence in environment and human exposure.

Exposure to PFOS and PFOA in animals decreased lymphoid organ weights, reduced number of lymphoid cells and antibody production (Yang et al. 2001; Peden-Adams et al., 2007). In animals, PFOS and PFOA inhibit T-cell-dependent Immunoglobulin M (IgM) antibody response (TDAR) which is one of essential and predictor of immune system function.

PFAAs can pass placenta during pregnancy (Inoue et al., 2004); therefore, fetuses and children are continuously exposed to PFAAs. Exposure to PFAAs during these critical window of susceptibility may affect several aspects of health in later life including immune function. Previous epidemiological studies propose immunomodulatory effects of PFAAs indicating that prenatal exposure to PFOS and PFOA were associated with IgE levels of cord blood in different directions (Okada et al., 2012; Wang et al., 2011). Also pre- and post-natal exposure to PFOS and PFOA are associated with reduced antibody levels of tetanus, and diphtheria (Grandjean et al., 2012), and rubella (Granum et al., 2013) in children.

We previously reported declining trend for PFOS and PFOA, however we observed increasing trend for perfluorononanoic acid (PFNA, C9) and perfluorodecanoic acid (PFDA, C10) levels among pregnant women between 2003 and 2011, Hokkaido, Japan (Okada et al. 2013); worthy to note that PFAAs with longer carbon chains including perfluoroundecanoic acid (PFUnDA, C11),

perfluorododecanoic acid (PFDoDa, C12), and perfluorotridecanoic acid (PFTrDA, C13) were detectable in more than 90% of maternal plasma samples obtained at 3rd trimester of pregnancy in our cohort. Our group assessed association of prenatal exposure to 11 types of PFAAs and allergic symptoms at 12 to 24 months of age, reported negative association between prenatal exposure to PFTrDA and eczema among female infants (Okada et al., 2014). Although some animal experiments suggest prenatal PFC exposures modified postnatal immune response throughout the period of early childhood (Keil et al. 2008); to this date, effects of PFAAs including long-chain PFAAs on allergic diseases in childhood long observations especially in prospective birth cohorts are not well understood. Therefore, in this study, we followed mother-child pairs in the same cohort of report of Okada et al. (2014) and assessed the association of prenatal PFAAs with allergic disease at 4 year-old children.

B . 研究方法

The current work is a part Hokkaido Study on Environment and Children's health, prospective ongoing birth cohort. The details of this study have previously described (Kishi et al. 2011 and 2013). Briefly, pregnant women who had antenatal health care in early pregnancy (>13 weeks of gestational age) at any 37 participating hospitals and clinics in Hokkaido prefecture in this study were eligible. Health care personnel approached pregnant women and introduced the study. Between 2003 and 2009, 17,869 agreed to participate in large-scale Hokkaido cohort. Of these, we selected 12,847 who had submitted a baseline questionnaire and from whom we had obtained a third trimester blood sample and hospital birth records. After exclusion of cases with miscarriage and stillbirth (n = 19),

congenital malformation (n = 143), and multiple births (n = 162), we extracted 6335 participants who had completed all three postnatal questionnaires at 4, 12, and 24 months after birth for long-term follow-up. From these, we randomly extracted 300 participants per year from 2003 to 2008 and 295 participants in 2009 (n=2095) for the PFAA measurement in maternal plasma samples (Okada et al., 2014). Finally, a total of 1,558 mother-child pairs sent us 4-year old questionnaires and were included in the current study.

During the first trimester of pregnancy, participants completed a self-administered baseline questionnaire which included parental information related to age, prepregnancy BMI, previous medical history, educational level, annual household income, parity, alcohol consumption and smoking during pregnancy, and medication. Medical birth records from hospitals included the gestational age, infant gender, and birth weight, as well as miscarriage, stillbirth, multiple births, and congenital anomalies. We collected a self-administered questionnaire at 4 months after delivery reported by mothers, including information about birth size, maternal complications during pregnancy, and maternal smoking status in the third trimester. At 4 years post-delivery, participants completed another self-administered questionnaire including information related to breast feeding, infant size, smoking status of parents, parental history of allergic diseases, environmental tobacco smoke (ETS) exposure and day care attendance. In addition, mothers reported previous or current medical history of infant allergic diseases including eczema, wheezing, and allergic rhinoconjunctivitis symptoms.

Detailed sample preparation and PFAAs measurement methods have been previously described (Okada et al., 2013). We used

maternal plasma for exposure assessment using ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry instrumentation (UPLC-MS/MS). We measured concentrations of 11 PFAAs: PFASs (perfluoroalkane sulfonates) including PFHxS, PFOS; and PFCAs (perfluorinated carboxylic acids) including perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA) in maternal plasma samples obtained at third trimester of pregnancy.

Infant allergies were assessed based on the mothers' self-administered questionnaires obtained 4 years post-delivery. Allergic diseases were defined using a modified part of the Japanese version of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three questionnaire (Asher et al., 2006). Eczema was defined based on positive answers to all three following questions: "Have your child had this itchy rash at any time in the past 12 months?", "Have your child ever had a skin rash which was coming and going for at least 6 months?", and "Has this itchy rash at any time affected any of the following places: the folds of the elbows; behind the knees; in front of the ankles; under the buttocks; or around the neck, ears, or eyes?". Wheezing was defined based on a positive answer to the question: "Have your child had wheezing or whistling in the chest in the past 12 months?". Current allergic rhinoconjunctivitis symptoms were assessed based on all positive answers to both of following questions: "In the past 12 months, has your child had a problem with sneezing or a runny or blocked nose when you (he/she) did not have a cold or the flu?" and if the answer is positive, "In the past 12 months, has this nose problem been

accompanied by itchy watery eyes?” (Asher et al., 2006). We also defined total allergic diseases as cases with at least one of symptoms of eczema, wheezing, and allergic rhinoconjunctivitis.

Correlations between PFAA concentrations were analyzed using the Spearman's rank correlation coefficient (ρ). We divided participants to 4 groups according to quartiles (Q) of prenatal PFAA levels. In crude and adjusted logistic regression analyses we examined associations between maternal PFAA concentrations and the risk of allergic diseases. In logistic models, odds ratios (ORs) for the risk of allergic diseases were evaluated with PFAA concentrations in the second through fourth quartiles and compared to those in the lowest quartiles. We examined the effects on total allergic diseases and also each allergic symptoms, separately. Potential confounding variables considered in the analysis were: maternal age (continuous), number of older siblings (0, ≥ 1), maternal education (≤ 12 , > 12 years), parental allergic history (yes/no), infant gender, breast-feeding period (< 6 , ≥ 6 months), day care attendance (yes/no), and environmental tobacco smoke (ETS) exposure at 4 years old children (yes/no). The number of older siblings was obtained from parity information.

(倫理面への配慮)

This study was conducted with all of the participants' written informed consent during pregnancy up to two years old and also another informed consent was obtained at four years old. The institutional ethical board for epidemiological studies at Hokkaido University Center for Environmental and Health Sciences and Hokkaido University Graduate School of Medicine approved the study protocol.

C . 研究結果

We assessed the association of prenatal exposure to PFAAs and allergic diseases in 4-year old children in totally 1,558 mother-child pairs. The average of maternal age (SD) was 31.1 (4.4), and prepregnancy BMI (SD) was 20.9 (2.9). 45.7 % of mothers were nulliparous and 5.7% were smoking during pregnancy. 50.9% of infants were male (Table 1).

Because of low detection rate, we excluded PFHxA, PFHpA and PFTeDA before data analysis. Among left 8 PFAAs, PFHxS and PFDoDA had detection rate of 82.6 and 90.6%, respectively (Table 2). Other PFAAs had detection rate were more than 97%. PFOS had the highest median exposure levels (4.92 ng/mL) followed by PFOA (2.01 ng/mL), PFUnDA (1.43 ng/mL), and PFNA (1.18 ng/mL).

Table 3 shows the incidence of allergic symptoms among children at 4 years in our study population. The number and percentage of children who developed allergic diseases in the preceding 12 months were: wheezing, 291 (18.7%); eczema, 296 (19.0%), and rhinoconjunctivitis 84 (5.4%). Totally, 536 (34.4%) had at least one of allergic symptoms. Incidence of allergic symptoms were a little bit higher among boys than girls but it was not statistically significant.

We analyzed the association of PFAAs with total allergic diseases (Figure 1), eczema (Figure 2), wheezing (Table 4) using logistic regression models. Adjusted ORs in the highest quartile vs lowest quartile for total allergic diseases were significantly decreased for PFDoDA (Q4 vs Q1 OR: 0.621; 95% CI: 0.454, 0.847; p for trend= 0.008) and PFTrDA (Q4 vs Q1 OR: 0.712; 95% CI: 0.524, 0.966; p for trend= 0.013). After sex stratification, we observed significant association of PFDoDA and PFTrDA with total allergic diseases among boys not girls (Figure 1).

Figure 2 shows the association of PFAAs with risk of eczema. Adjusted ORs for eczema and PFOA decreased significantly for the three highest quartiles compared with lowest quartile as reference only among boys (Q4 vs Q1 OR: 0.592; 95% CI: 0.319, 1.08, p for trend= 0.022). Adjusted ORs for the highest vs lowest quartile were 0.566 (95% CI: 0.383, 0.831) for PFDoDA, and 0.672 (95% CI: 0.465, 0.968) for PFTrDA in all children. Effects of these long PFAAs were prominent among boys, for examples adjusted ORs of eczema in boys across second to fourth quartile compared with lowest quartile of PFDoDA were 0.877 (95% CI: 0.536, 1.43), 0.828 (95% CI: 0.500, 1.36), and 0.451 (95% CI: 0.253, 0.785) with a dose-response relationship (p for trend= 0.008).

Among PFAAs, PFHxS were significantly associated with risk of wheezing (Table 4); the adjusted OR of PFHxS in the fourth quartile vs first quartile was 0.728 (95% CI: 0.497, 1.06, p for trend= 0.038) in all children. After sex stratification, this association was prominent among boys (Q4 vs Q1 OR: 0.650; 95% CI: 0.391, 1.07; p for trend= 0.063).

We also assess the association between PFAAs and rhinoconjunctivitis (data not shown). PFNA showed significant association with monotonic reduced risk of (Q4 vs Q1 OR: 0.409; 95% CI: 0.192, 0.825; p for trend= 0.019), after sex stratification we observed reduced OR of quartile fourth vs first quartile of PFNA in both sexes but p for trend did not meet significance statistically. In addition, adjusted ORs for rhinoconjunctivitis were decreased for the three highest quartiles of PFUnDA (Q4 vs Q1 OR: 0.285; 95% CI: 0.099, 0.714; p for trend= 0.030) and PFDoDA (Q4 vs Q1 OR: 0.430; 95% CI: 0.176, 0.985; p for trend= 0.045) compared with the lowest quartile only among boys.

D . 考察

In the current study, we focused on the effects of prenatal exposure to 11 PFAAs, including long-chain ones, on allergic diseases of next generation at 4 years in a prospective birth cohort. We found that prenatal exposure to long chain PFAAs including PFDoDA and PFTrDA were associated with reduced risk of total allergic diseases in 4 year-old children. We observed that PFDoDA and PFTrDA were associated with a decline in the risk of eczema, also PFHxS showed association with reduced risk of wheezing. Although, almost all adjusted OR of allergic diseases across 2nd to 4th quartiles of PFAAs were less than one compared with first quartile as reference among girls, we observed the associations of PFAAs with allergic diseases at 4 year-old children were statistically significant only in boys.

Several previous animal studies suggest that PFAAs have immunotoxic effects including suppression of cytokine production such as TNF- α , IL4 and IFN- γ (Qazi et al., 2010), and reduced IgM production and humoral immunity (Dewitt et al., 2009; Peden-Adams et al., 2007). Epidemiological studies also have reported suppression of antibody production in individuals exposed to higher PFAA levels. Prenatal exposure to PFAAs were negatively associated with anti-rubella antibody among 3-year old children (Granum et al., 2013). In Granum's study, only 4 types of PFAAs were examined and strength of inverse association between PFAAs with reduced antibody were as follows: PFNA>PFOA>PFHxS>PFOS, indicating that PFCAs have stronger impact on antibody production compared with PFSAs. We also observed stronger association of PFCAs with longer carbon chain on allergic outcomes compared with PFSAs. In another

study, higher pre- and postnatal exposure to PFOS and PFOA were inversely associated with tetanus and diphtheria antibody concentrations at 5 and 7 years old children (Grandjean et al., 2012); Results of these birth cohort are consistent with our results suggesting association of PFAAs with reduced immune response.

Our group previously analyzed the association of prenatal exposure to PFOS and PFOA with cord blood IgE and allergic diseases at 18 months of age in another birth cohort of Hokkaido Study with small sample size (Okada et al., 2012). We did not find any association of PFOS and PFOA with allergic diseases; however, PFOA levels were negatively associated with cord blood IgE among female infants suggesting immunomodulatory effects of this chemical. In addition, we reported the association of PFAAs with infant allergic diseases at 12 and 24 months of age using ISAAC questionnaires (Okada et al., 2014), showing association of prenatal exposure to PFTrDA and reduced risk of eczema (n=2,062). After sex stratification, higher PFTrDA and PFUnDA were negatively associated with risk of eczema only among female infants. In the current study, we followed those infants to 4 years including 1558 mother-child pairs and found that not only PFTrDA but also other long chain PFAAs including PFNA, PFUnDA, PFDoDA are negatively associated with reduced risk of allergic outcomes. However, impact of PFAAs on male infants were prominent in this current study. We conducted further examination and comparison to clarify difference of populations in Okada et al. (2014) (n=2,062) and current analyses (n=1558), we looked at characteristics and exposure levels between two studies (data not shown). PFAA exposure levels of participants in these two studies were similar in range. Demographic characteristics including maternal age, parity,

child gender and parental allergy history were similar. However, maternal smoking rate during pregnancy was lower in the current analysis compare to report of Okada et al. (5.7% vs 7.3%). Also, we looked at the characteristics of population with loss of between 2 vs 4 years (n=498); 10.6% of mothers were smoker during pregnancy and mothers had lower educational levels in loss of follow up group. Day care attendance in current analysis was significantly higher compare with that of Okada et al. (90.3% vs 28.3%), suggesting that high percentage of children at 4 year old have day care attendance. Taken together, although we observed some few differences in characteristic between these Okada et al. study and current study, these two reports suggest consistent immunosuppressive effects of prenatal exposure to PFAAs in infancy and early childhood.

E . 結論

This study suggest inverse association between prenatal exposures to long chain PFCAs with risk of allergic diseases in early childhood with sex differences. It may provide new evidence in humans that PFAAs have immunosuppressive effects consistent with animal studies. However, more studies with longer observations need to be conducted in prospective studies.

F . 研究発表

1.論文発表

Houman Goudarzi, Chihiro Miyashita, Emiko Okada, Ikuko Kashino, Sumitaka Kobayashi, Chi-Jen Chen, Sachiko Ito , Atsuko Araki , Hideyuki Matsuura, Yoichi M. Ito, Reiko Kishi. Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children. In preparation.

2.学会発表

Houman Goudarzi, Sumitaka Kobayashi,

Chi-Jen Chen, Atsuko Araki, Chihiro Miyashita, Sachiko Ito, Reiko Kishi. Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children: The Hokkaido Study. 第 67 回北海道公衆衛生学会,旭川。平成 27 年 11 月 21 日。

G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

参考文献

- 1) Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK. 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 368:733–43.
- 2) DeWitt JC, Shnyra A, Badr MZ, Loveless SE, Hoban D, Frame SR, et al. 2009. Immunotoxicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and the role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Crit Rev Toxicol* 39:76–94.
- 3) Grandjean P, Andersen EW, Budtz-Jørgensen E, Nielsen F, Mølbak K, Weihe P, et al. 2012. Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *JAMA* 307:391–7.
- 4) Granum B, Haug LS, Namork E, Stølevik SB, Thomsen C, Aaberge IS, et al. 2013. Pre-natal exposure to perfluoroalkyl substances may be associated with altered vaccine antibody levels and immune-related health outcomes in early childhood. *J Immunotoxicol* 10(4):373-9.
- 5) Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S et al. 2004. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect* 112:1204-1207.
- 6) Kato K, Calafat AM, Needham LL. 2009. Polyfluoroalkyl chemicals in house dust. *Environ Res.* 109:518-523.
- 7) Keil D. E., Mehlmann T., Butterworth L., and Peden-Adams M. M. 2008. Gestational exposure to perfluorooctane sulfonate suppresses immune function in B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* 103, 77–85.
- 8) Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, et al. 2013. Ten years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: cohort profile--updated 2013. *Environ Health Prev Med.* 18:429–50.
- 9) Kishi R, Nakajima T, Goudarzi H, Kobayashi S, Sasaki S, Okada E, et al. 2015. The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Essential and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of Their Offspring: The Hokkaido Study. *Environ Health Perspect.* 123(10):1038-45.
- 10) Okada E, Sasaki S, Saijo Y, Washino N, Miyashita C, Kobayashi S, et al. 2012. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and relationship with allergies and infectious diseases in infants. *Environ Res.* 112:118–25.
- 11) Okada E, Kashino I, Matsuura H, Sasaki S, Miyashita C, Yamamoto J, et al. 2013. Temporal trends of perfluoroalkyl acids in plasma samples of pregnant women in Hokkaido, Japan, 2003-2011. *Environ Int* 60:89-96.
- 12) Okada E, Sasaki S, Kashino I, Matsuura

- H, Miyashita C, Kobayashi S, Itoh K, Ikeno T, Tamakoshi A, Kishi R. 2014. Prenatal exposure to perfluoroalkyl acids and allergic diseases in early childhood. *Environ Int.* 65:127-34.
- 13) Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. 2007. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* 115:1298-1305.
- 14) Peden-Adams M. M., EuDaly J. G., Dabra S., EuDaly A., Heesemann L., Smythe, J., et al. 2007. Suppression of humoral immunity following exposure to the perfluorinated insecticide sulfluramid. *J Toxicol Environ Health A* 70: 1130–141.
- 15) Qazi MR, Abedi MR, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M. 2010. Dietary exposure to perfluorooctanoate or perfluorooctane sulfonate induces hypertrophy in centrilobular hepatocytes and alters the hepatic immune status in mice. *Int Immunopharmacol.* 10(11):1420-7.
- 16) Wang IJ, Hsieh WS, Chen CY, Fletcher T, Lien GW, Chiang HL, et al. 2011. The effect of prenatal perfluorinated chemicals exposures on pediatric atopy. *Environ Res.* 111: 785–91.
- 17) Yang Q, Xie, Y, Eriksson A. M., Nelson B. D., and DePierre J. W. 2001. Further evidence for the involvement of inhibition of cell proliferation and development in thymic and splenic atrophy induced by the peroxisome proliferator perfluorooctanoic acid in mice. *Biochem Pharmacol* 62: 1133–40.

Table 1. Characteristics of study population of the Hokkaido Study on Environment and Children's

Health, Japan (n=1558).

Characteristics		4-year postpartum assessment (n=1558), mean±SD or No. (%)
Parental characteristics		
Maternal age (years) (mean ± SD)		31.1±4.4
Prepregnancy BMI		20.9 ±2.9
Maternal educational level (years)	≤12	660 (42.4)
	>12	898 (57.6)
Parity (times) ^a	0	702 (45.7)
	≥1	835 (54.3)
Maternal smoking status during pregnancy	Nonsmoker	1468 (94.3)
	Smoker	90 (5.7)
Maternal allergic history	Yes	484 (31.0)
Paternal allergic history	Yes	307 (19.7)
Annual household income (million yen) ^a	<5	880 (64.0)
	≥5	495 (36.0)
Children characteristics		
Gender	Male	793 (50.9)
	Female	765 (49.1)
Breast feeding (months)	<6	289 (18.6)
	≥6	1269 (81.4)
Older siblings (numbers)	0	702 (45.7)
	≥1	835 (54.3)
Day care attendance at 4-year-old ^a	Yes	1373 (90.3)
	No	148 (9.7)
ETS exposure at 4-year-old ^{a, b}	Yes	724 (48.0)
	No	782 (52.0)

^aMissing data: parity (n=21), annual household income (n=183), day care attendance (N=37), and ETS exposure (n=52).

^bETS: environmental tobacco smoke.

Table 2. Concentrations of 11 PFAAs in 1558 maternal plasma samples from the Hokkaido Study on

Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013.

Compound	Detection			Concentration (ng/mL)						
	MDL ^a	No.	%	Geometric mean	Mean	Minimum	25th	50th	75th	Maximum
PFHxS (C6)	0.2	1287	82.6	0.275	0.322	<0.2	0.221	0.296	0.395	3.386
PFHxA (C6)	0.1	721	46.2	0.085	0.103	<0.1	<0.1	<0.1	0.145	0.694
PFHpA (C7)	0.1	549	35.2	0.076	0.095	<0.1	<0.1	<0.1	0.125	0.757
PFOS (C8)	0.3	1558	100	4.932	5.456	1.003	3.667	4.925	6.654	30.283
PFOA (C8)	0.2	1557	99.9	2.105	2.713	<0.2	1.314	2.013	3.346	24.88
PFNA (C9)	0.3	1556	99.8	1.23	1.402	<0.3	0.908	1.183	1.589	13.189
PFDA (C10)	0.1	1551	99.5	0.514	0.575	<0.1	0.393	0.522	0.694	2.434
PFUnDA (C11)	0.1	1555	99.8	1.368	1.534	<0.1	1.037	1.431	1.895	5.89
PFDoDA (C12)	0.1	1413	90.6	0.172	0.191	<0.1	0.14	0.186	0.233	0.729
PFTTrDA (C13)	0.1	1524	97.8	0.316	0.35	<0.1	0.247	0.332	0.424	1.325
PFTeDA (C14)	0.1	238	15.2	0.057	0.061	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.303

^aMDL: method detection limit.

Table 3. Number and proportion of children who developed allergic diseases during the 4-year-old in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013 (n = 1558).

Symptoms	Total		Male children		Female children		p ^a
	(n=1558)		(n=793)		(n=765)		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Total allergic diseases ^b	536	(34.4)	285	(35.9)	251	(32.8)	0.194
Wheezing	291	(18.7)	162	(20.4)	129	(16.8)	0.071
Eczema	296	(19.0)	153	(19.2)	143	(18.6)	0.762
Allergic rhinoconjunctivitis symptoms	84	(5.4)	46	(5.8)	38	(4.9)	0.467

^aChi-square test.

^b“Total allergic diseases” indicates cases with at least one of the listed symptoms.

Table 4. Prenatal PFAA concentrations and risk of wheezing at 4 years old in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013 (n= 1558).

Compound	Total (n = 1558)				Male children (n = 793)				Female children (n = 765)						
	n*	Crude		Adjusted ^a		n*	Crude		Adjusted ^b		n*	Crude		Adjusted ^b	
		OR ^c	(95% CI) ^d	OR ^c	(95% CI) ^d		OR ^c	(95% CI) ^d	OR ^c	(95% CI) ^d		OR ^c	(95% CI) ^d	OR ^c	(95% CI) ^d
PFHxS															
Quartile 1	80	1		1		49	1		1		31	1		1	
Quartile 2	83	1.00	(0.711, 1.41)	0.895	(0.624, 1.28)	42	0.829	(0.519, 1.32)	0.705	(0.430, 1.15)	41	1.28	(0.764, 2.14)	1.21	(0.706, 2.10)
Quartile 3	61	0.702	(0.486, 1.01)	0.652	(0.443, 0.954)	33	0.612	(0.374, 1.00)	0.582	(0.346, 0.966)	28	0.842	(0.483, 1.47)	0.811	(0.448, 1.46)
Quartile 4	67	0.778	(0.543, 1.11)	0.728	(0.497, 1.06)	38	0.722	(0.448, 1.16)	0.650	(0.391, 1.07)	29	0.867	(0.499, 1.50)	0.889	(0.494, 1.59)
p for trend		0.056		0.038			0.097		0.063			0.320		0.398	
PFOS															
Quartile 1	78	1		1		43	1		1		35	1		1	
Quartile 2	67	0.822	(0.572, 1.18)	0.753	(0.514, 1.09)	33	0.758	(0.458, 1.25)	0.751	(0.439, 1.27)	34	0.899	(0.533, 1.51)	0.753	(0.433, 1.30)
Quartile 3	79	1.01	(0.714, 1.43)	0.980	(0.680, 1.41)	47	1.21	(0.758, 1.94)	1.18	(0.718, 1.94)	32	0.826	(0.487, 1.40)	0.809	(0.467, 1.39)
Quartile 4	67	0.824	(0.574, 1.18)	0.770	(0.526, 1.12)	39	0.901	(0.555, 1.46)	0.889	(0.530, 1.48)	28	0.740	(0.429, 1.27)	0.676	(0.379, 1.19)
p for trend		0.527		0.398			0.855		0.921			0.259		0.238	
PFOA															
Quartile 1	66	1		1		32	1		1		34	1		1	
Quartile 2	74	1.13	(0.79, 1.64)	1.09	(0.743, 1.60)	44	1.33	(0.805, 2.20)	1.22	(0.722, 2.09)	30	0.94	(0.549, 1.61)	0.982	(0.557, 1.72)
Quartile 3	76	1.18	(0.823, 1.70)	1.10	(0.749, 1.62)	44	1.40	(0.845, 2.32)	1.29	(0.762, 2.22)	32	0.977	(0.575, 1.66)	0.969	(0.544, 1.72)
Quartile 4	75	1.16	(0.806, 1.67)	1.09	(0.729, 1.65)	42	1.37	(0.824, 2.28)	1.25	(0.711, 2.22)	33	0.971	(0.574, 1.64)	1.00	(0.555, 1.82)
p for trend		0.411		0.699			0.235		0.427			0.948		0.992	

PFNA

Quartile 1	70	1		1	36	1		1		34	1		1		
Quartile 2	78	1.14	(0.801, 1.64)	1.16	(0.803, 1.67)	47	1.43	(0.883, 2.34)	1.49	(0.908, 2.49)	31	0.878	(0.514, 1.49)	0.860	(0.493, 1.49)
Quartile 3	67	0.945	(0.654, 1.36)	0.910	(0.617, 1.33)	34	0.987	(0.588, 1.65)	0.911	(0.526, 1.57)	33	0.906	(0.535, 1.53)	0.918	(0.528, 1.59)
Quartile 4	76	1.10	(0.767, 1.57)	1.11	(0.760, 1.63)	45	1.27	(0.781, 2.07)	1.23	(0.732, 2.09)	31	0.918	(0.537, 1.56)	1.04	(0.587, 1.85)
p for trend		0.872		0.875			0.658		0.852		0.788		0.820		

PFDA

Quartile 1	76	1		1	40	1		1		36	1		1		
Quartile 2	65	0.816	(0.566, 1.17)	0.785	(0.537, 1.14)	36	0.873	(0.529, 1.43)	0.794	(0.468, 1.34)	29	0.755	(0.441, 1.29)	0.785	(0.451, 1.35)
Quartile 3	82	1.09	(0.768, 1.54)	1.08	(0.756, 1.56)	52	1.45	(0.909, 2.32)	1.53	(0.943, 2.51)	30	0.762	(0.447, 1.29)	0.728	(0.415, 1.26)
Quartile 4	68	0.853	(0.594, 1.22)	0.879	(0.602, 1.28)	34	0.834	(0.503, 1.38)	0.859	(0.503, 1.45)	34	0.874	(0.521, 1.46)	0.918	(0.532, 1.58)
p for trend		0.755		0.917			0.966		0.743		0.637		0.702		

PFUnDA

Quartile 1	72	1		1	37	1		1		35	1		1		
Quartile 2	70	0.96	(0.667, 1.38)	0.994	(0.682, 1.44)	45	1.13	(0.695, 1.83)	1.20	(0.725, 2.01)	25	0.753	(0.43, 1.31)	0.793	(0.444, 1.40)
Quartile 3	77	1.06	(0.748, 1.52)	1.10	(0.762, 1.60)	41	1.216	(0.739, 2.00)	1.32	(0.783, 2.25)	36	0.944	(0.565, 1.57)	0.918	(0.541, 1.56)
Quartile 4	72	0.991	(0.69, 1.42)	1.04	(0.714, 1.51)	39	1.047	(0.635, 1.72)	1.19	(0.709, 2.03)	33	0.931	(0.551, 1.57)	0.906	(0.522, 1.56)
p for trend		0.889		0.706			0.803		0.462		0.980		0.843		

PFDODA

Quartile 1	71	1		1	34	1		1		37	1		1		
Quartile 2	71	0.972	(0.675, 1.39)	0.962	(0.659, 1.40)	50	1.42	(0.874, 2.32)	1.41	(0.851, 2.36)	21	0.553	(0.31, 0.987)	0.556	(0.303, 1.00)
Quartile 3	79	1.109	(0.776, 1.58)	1.12	(0.778, 1.63)	41	1.21	(0.731, 2.01)	1.22	(0.728, 2.08)	38	1.01	(0.613, 1.67)	1.02	(0.604, 1.73)
Quartile 4	70	0.946	(0.657, 1.36)	0.999	(0.684, 1.45)	37	1.04	(0.622, 1.74)	1.14	(0.668, 1.95)	33	0.859	(0.512, 1.44)	0.864	(0.502, 1.48)
p for trend		0.960		0.794			0.903		0.781		0.950		0.533		

PFTTrDA														
Quartile 1	78	1			1	44	1		1		34	1		1
Quartile 2	73	0.918	(0.643, 1.31)	0.966	(0.669, 1.39)	38	0.737	(0.452, 1.199)	0.810	(0.487, 1.34)	35	1.16	(0.691, 1.96)	1.19 (0.696, 2.04)
Quartile 3	65	0.800	(0.556, 1.15)	0.805	(0.550, 1.17)	39	0.788	(0.485, 1.281)	0.813	(0.486, 1.35)	26	0.789	(0.453, 1.37)	0.801 (0.449, 1.41)
Quartile 4	75	0.926	(0.650, 1.31)	0.944	(0.653, 1.36)	41	0.883	(0.545, 1.43)	0.978	(0.590, 1.61)	34	0.976	(0.579, 1.64)	0.919 (0.531, 1.58)
p for trend		0.526		0.565			0.694		0.931			0.614		0.474

^a Adjusted for maternal age, maternal educational level, parental allergic history, number of older siblings, children gender, breast feeding, day care attendance and ETS exposure at 4-years old.

^b Adjusted for all the covariates except children gender.

^c OR: odds ratio. ^d CI: confidence interval.

*Indicates number of cases with wheezing.

Figure 1. The association between quartiles of PFD_oDA (A), PFT_rDA (B) with risk of total allergic diseases among 4-year old children. Total allergic diseases were defined as cases with at least one of the following symptoms: eczema, wheezing, allergic rhinoconjunctivitis symptoms. Adjusted for maternal age, maternal educational level, parental allergic history, number of older siblings, children gender, breast feeding, day care attendance and ETS exposure at 4-years old. Q: quartile.

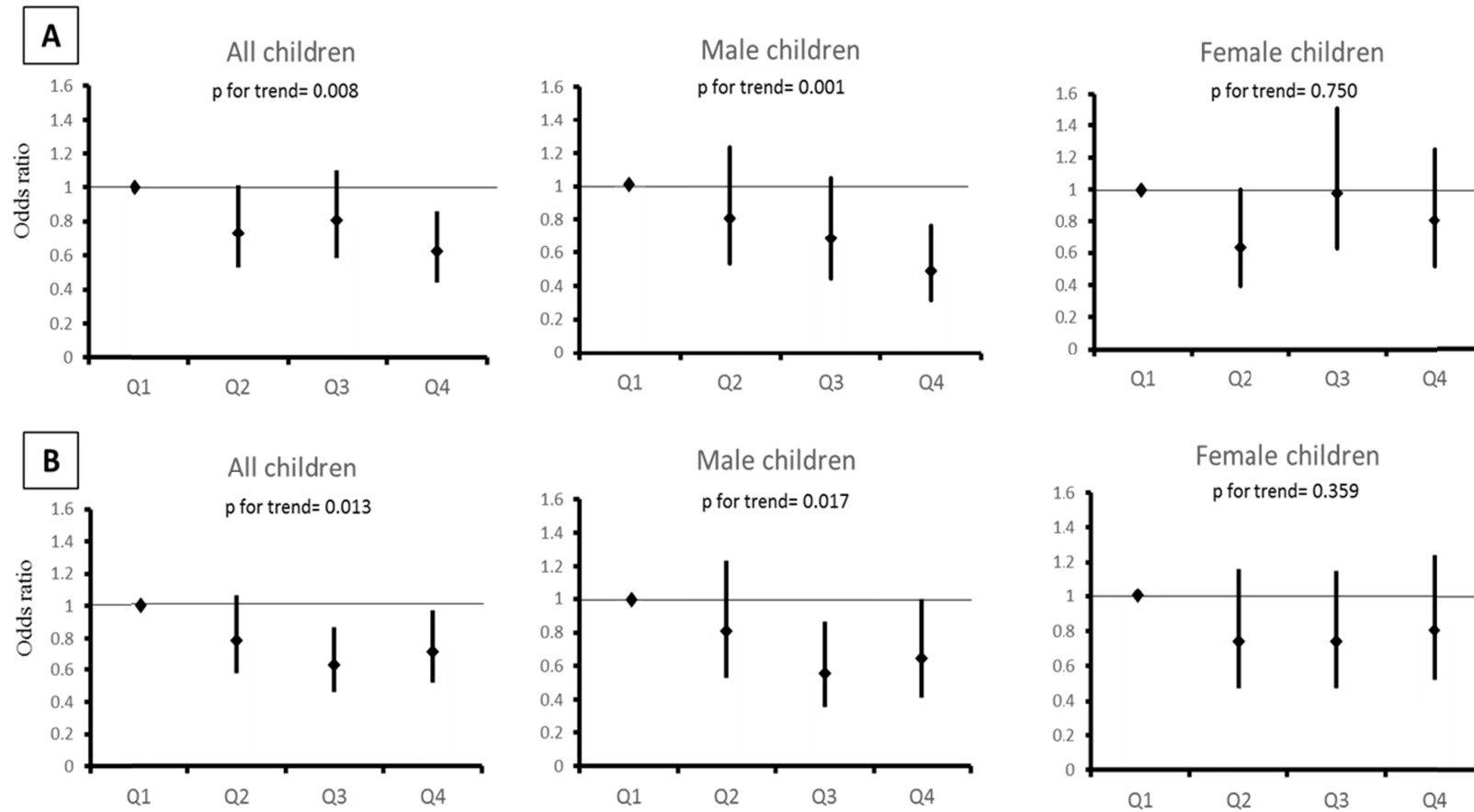
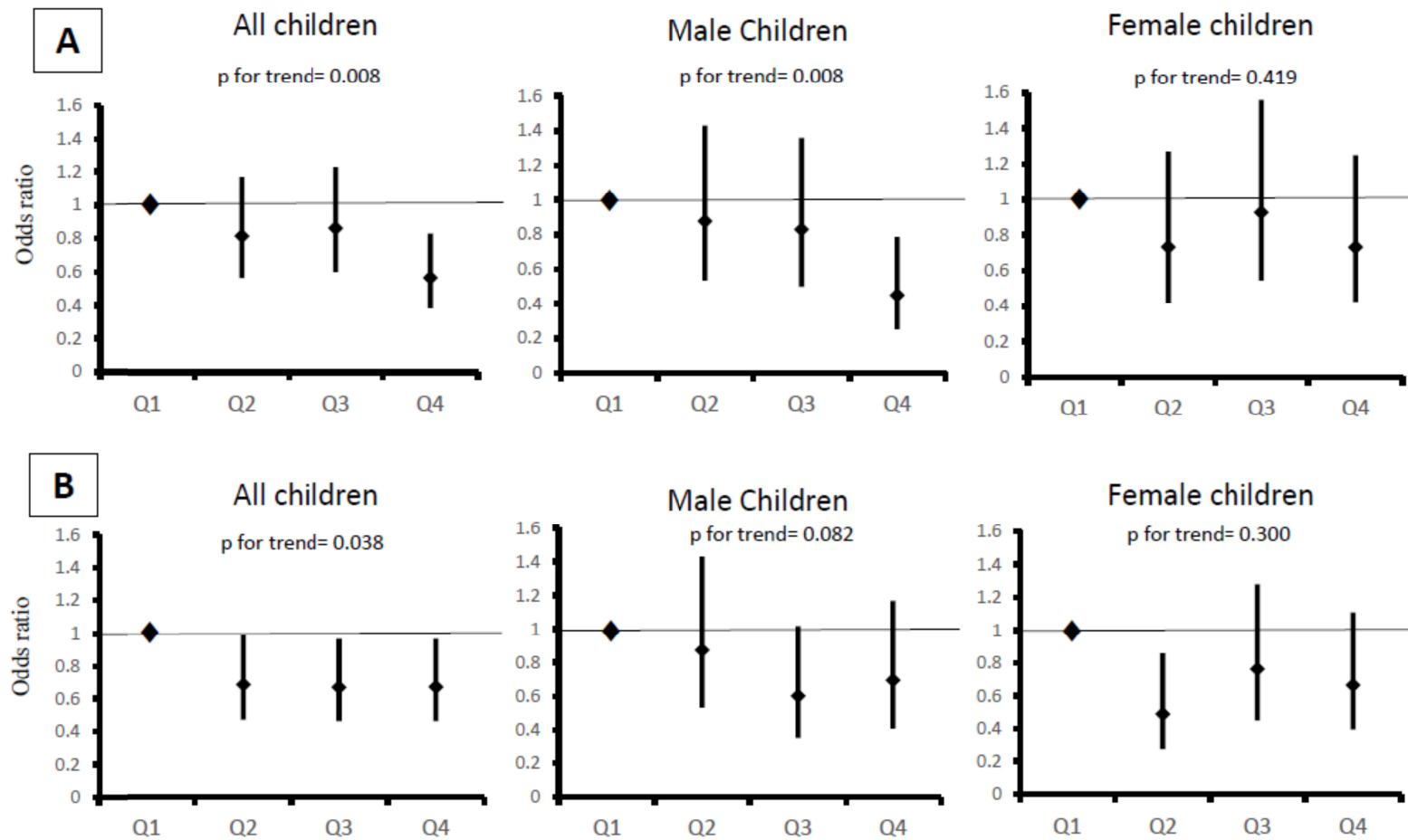


Figure 2. The association between quartiles of PFDoDA (A) and PFTrDA (B) with risk of eczema among 4-year old children. Adjusted for maternal age, maternal educational level, parental allergic history, number of older siblings, children gender, breast feeding, day care attendance and ETS exposure at 4-years old. Q: quartile.



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

Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Risk of Infectious Diseases in Early Life

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 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授

研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

Animal studies have shown that perfluoroalkyl acids (PFAAs) have immunotoxic effects. However, epidemiological studies investigating the effects of PFAAs on infectious diseases, are scarce. We examined the relation between prenatal exposure to PFAAs and risk of infectious diseases at 4 years of age. Mother-infant pairs who enrolled in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health in 2003–2009 were included in this study. Eleven PFAAs including PFHxA, PFHpA, PFHxS, PFOS, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA and PFTeDA were measured in maternal plasma taken at third trimester of gestation using ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS). Information on characteristics of participants was obtained from medical birth records, and self-administered questionnaires obtained during pregnancy and after delivery. Infectious diseases including otitis media, pneumonia, respiratory syncytial virus (RSV), varicella, and febrile seizure were defined using a mother-reported questionnaire at 4 years of age. For those who have information on allergy at 4 years and PFAA measurements were used for analysis (n=1558). The number of children who developed infectious disorders at 4 years of age were as follows: otitis media, 649 (41.4%); pneumonia, 287 (18.4%); RSV, 197 (12.6%); varicella 589 (37.8%), and febrile seizure, 121 (7.7%), and total infectious disease 1075 (69.0%). PFOS levels in the highest quartile were associated with increased odds ratio of infectious diseases (Q4 vs Q1 OR: 1.56; 95% CI: 1.12, 2.17; p for trend= 0.022) in all children. In addition, PFHxS was associated with higher risk of total infectious diseases only among girls (Q4 vs Q1 OR: 1.56, 95% CI: 0.963, 2.54; p for trend= 0.043). Our findings suggest that prenatal exposure to PFOS and PFHxS may increase risk of infectious diseases at 4 years of age. In addition, we previously reported immunosuppressive effects of PFAAs on allergic symptoms at 2 and 4 years old children. These suggest that prenatal exposure to PFAAs may suppress immune system in next generation.

研究協力者

Houman Goudarzi (外国人特別研究員)

A . 研究目的

There is a globally contamination of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in environment, wild life, and humans. Food is

expected to be the main source of human exposure to PFAAs; however people are also exposed to these chemicals through contaminated water, dust and air and various consumer products (ATSDR 2015). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) are the most

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

commonly used PFAAs. PFAAs are resistant to metabolism; elimination half-life for PFOS and PFOA is 5.4 and 3.8 years, respectively (Olsen et al. 2007). Recently, PFOS and PFOA are being voluntarily phased out by several industries, however they are still present in older products. However, humans are constantly exposed to PFAAs with long-half-lives resulting in bioaccumulation into human tissues overtime which raises human health concerns.

Globally, infectious diseases account for more than one-half of all deaths among children aged less than 5 years, and it also has high burden for health care systems (Elliot and Beason, 2008). Previous laboratory studies showed that exposure to PFAAs have immunotoxic and immunosuppressive effects such as atrophy and reduced cell number of immune organs such as spleen and thymus, lower IgM production, decreases of natural killer-cell activity and change of pro-inflammatory cytokine production (Dewitt 2008, Peden-Adams 2008, Brieger et al. 2011; Qazi et al. 2012).

PFAAs can pass placenta during pregnancy, therefore fetuses are exposed to these chemicals. Pre- and postnatal PFOS/PFOA concentrations are associated with reduced humoral immune response to diphtheria and tetanus in children aged 5 and 7 years (Grandjean et al. 2012). Also, another report showed inverse association between prenatal exposure to PFOS, PFOA, PFNA and PFHxS and the level of anti-rubella antibodies in the children and the concentrations of the four PFAAs. Furthermore, they found a positive association between the maternal concentrations of PFOA and PFNA and the

number of episodes of common cold for the children, and between PFOA and PFHxS and the number of episodes of gastroenteritis (Granum et al. 2013). However, Fei et al. (2010) reported no association between prenatal exposure to PFOS and PFOA with and risk of infectious diseases leading to hospitalization in early childhood.

Previously, in a small cohort, we reported negative association of prenatal exposure to PFOA and cord blood IgE levels among female infant; however we did not observe any association between PFOS and PFOA with risk of allergic diseases at 18 months of age (Okada et al. 2012). We also examined the association of in utero exposure to PFAAs with allergic diseases in early infancy in a large scale cohort and found that PFTrDA levels is inversely associated with risk of eczema among female infants (Okada et al. 2014).

To this date, effects of PFAAs on risk of infectious diseases is not well investigated especially impact of exposure to these chemicals during pregnancy on developing immune system and functions. In this study, we assessed association between prenatal exposure to eleven PFAAs and risk of infectious diseases in early childhood, in a prospective birth cohort.

B . 研究方法

The current work is a part Hokkaido Study on Environment and Children's health, prospective ongoing birth cohort (Kishi et al. 2011 and 2013). This study started in February 2003 and the participants were all native Japanese mother-child pairs. Briefly, pregnant women who had antenatal health care in early pregnancy (>13 weeks of gestational age) at any 37 participating hospitals and clinics in Hokkaido prefecture

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

in this study were eligible. Health care personnel approached pregnant women and introduced the study. Flowchart of study is shown in Figure. 1.

During the first trimester of pregnancy, participants completed a self-administered baseline questionnaire which included parental information related to age, prepregnancy BMI, previous medical history, educational level, annual household income, parity, alcohol consumption and smoking during pregnancy. Medical birth records from hospitals included the gestational age, infant gender, and birth weight, as well as miscarriage, stillbirth, multiple births, and congenital anomalies. We collected a self-administered questionnaire at 4 months after delivery reported by mothers, including information about maternal smoking status in the third trimester. At 4 years post-delivery, participants completed another self-administered questionnaire including information related to breast feeding, smoking status of parents, parental history of allergic diseases, pets in the home, and environmental tobacco smoke (ETS) exposure and day care attendance. In addition, mothers reported previous or current medical history of infant infectious diseases including pneumonia, otitis media, varicella, respiratory syncytial virus (RSV), and febrile seizure.

Detailed sample preparation and PFAAs measurement methods have been previously described (Okada et al. 2013). Maternal peripheral vein samples were collected and stored at -80°C until exposure analysis. We used maternal plasma for exposure assessment using ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry instrumentation (UPLC-MS/MS) (Waters,

USA). We measured concentrations of 11 PFAAs: PFASs (perfluoroalkane sulfonates) including PFHxS, PFOS; and PFCAs (perfluorinated carboxylic acids) including perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDODA, PFTrDA, perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA) in maternal plasma samples obtained at 3rd trimester of pregnancy.

We performed all of the statistical analyses using JMP pro 10 (SAS Institute Inc., NC, USA). The results were considered statistically significant if $p < 0.05$. For participants with PFAA levels less than MDL, a value equal to half of the MDL was substituted. We divided participants to 4 groups according to quartiles (Q) of prenatal PFAA levels. In crude and adjusted logistic regression analyses we examined associations between maternal PFAA concentrations and the risk of infectious diseases. In logistic models, odds ratios (ORs) for the risk of infectious diseases were evaluated with PFAA concentrations in the second through fourth quartiles and compared to those in the lowest quartiles. We selected confounders in analysis according to a review of the literature. Potential confounding variables considered in the analysis were: maternal age (continuous), number of older siblings (0, ≥ 1), maternal education (≤ 12 , > 12 years), parental allergic history (yes/no), infant gender, breast-feeding period (< 6 , ≥ 6 months), day care attendance (yes/no), and environmental tobacco smoke (ETS) exposure at 4 years old children (yes/no). The number of older siblings was obtained from parity information. Because of potential sex differences of PFAA health effects, we stratified the results by sex, as

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

well.

(倫理面への配慮)

This study was conducted with all of the participants' written informed consent during pregnancy up to two years old and also another informed consent was obtained at four years old. The institutional ethical board for epidemiological studies at Hokkaido University Center for Environmental and Health Sciences and Hokkaido University Graduate School of Medicine approved the study protocol.

C . 研究結果

The average of maternal age at birth (SD) was 31.1 (4.4) and 50.9% of infants were male. 54.3 % of mothers were multiparous and 5.9% were smoking during pregnancy (Table 1).

Because of low detection rate, PFHxA, PFHpA and PFTeDA levels were excluded before data analysis. Median of PFAAs were as follows: PFHxS (0.296 ng/mL); PFOS (4.92 ng/mL); PFOA (2.01 ng/mL); PFNA (1.18 ng/mL); PFDA (0.522 ng/mL); PFUnDA (1.43); PFDoDA (0.186 ng/mL); PFTrDA (0.332 ng/mL) (Table 2).

Incidence of infectious diseases symptoms among children at 4 years in our study population is shown in Table 3. The number and percentage of children who developed infectious diseases at 4 years old were: otitis media, 649 (41.6%); pneumonia, 287 (18.4%); RSV, 197 (12.6%); varicella, 589 (37.8%) and febrile seizure, 121 (7.7%). In total, 1075 (69.0%) of children had at least one of infectious diseases. Incidence of infectious diseases was not significantly different among boys than girls.

We assessed the association of PFAAs with total infectious diseases using logistic regression models (Figure 2, Supplementary

Table S1). We observed a positive association with total infectious diseases across PFHxS quartiles (Q4 vs Q1 adjusted OR: 1.56, 95% CI: 0.963, 2.54; p for trend= 0.043) in female but not male children. In addition, adjusted ORs in the highest quartile vs lowest quartile for total infectious diseases were significantly increased for PFOS (Q4 vs Q1 OR: 1.56; 95% CI: 1.12, 2.17; p for trend= 0.022) in all children.

D . 考察

This study is one of few studies which focuses on prenatal exposure to PFAAs and risk of infectious diseases. We measured eleven types of PFAAs including long-chain PFAAs during pregnancy and followed up children until 4 years in a large-scale birth cohort. We observed that prenatal exposure to PFHxS and PFOS were associated with higher risk of infectious diseases in 4 year-old children. However, we did not any significant association of PFCAs including PFOA, PFNA and PFDA with infectious diseases.

Median values of PFAAs with C6-C8 including PFHxS, PFOS and PFOA in this study were low compare to those in the US (Stein et al., 2012), Denmark (Halldorsson et al., 2012), Korea (Lee et al., 2013) and China (Jiang et al., 2014) during pregnancy. However, longer chain PFAA levels ($C \geq 9$) were higher than western countries such as Spain, Denmark, Sweden and USA (Harada et al. 2011).

Animal studies showed endocrine disruption, neuro- and immunotoxic properties of PFOS and PFOA (Lau et al. 2003; Seacat 2003; Leubker 2005). Exposure to PFOS and PFOA in animals decreased lymphoid organ weights, reduced number of lymphoid cells and antibody

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

production (Yang 2001; Peden-Adams 2007). Pre- and post-natal exposure to PFOS and PFOA were associated with reduced antibody levels of tetanus, diphtheria (Grandjean et al. 2012), and rubella (Granum et al. 2013) in children. In adults, elevated PFOA serum concentrations are associated with reduced antibody titer rise, particularly to A/H3N2 influenza virus, and an increased risk of not attaining the antibody threshold considered to offer long-term protection (Looker et al. 2014). These animal and human studies suggest immunosuppressive effects of PFAAs.

There are few conducted studies about the effects of PFAAs, especially in prospective studies, on risk of infectious diseases. A Danish study examined the association of prenatal exposure to PFOS and PFOA with risk of hospitalization for infectious diseases in early childhood, and did not find any association between these PFAAs and risk of infectious diseases leading to hospitalization (Fei et al. 2010). However, Granum et al. (2013) reported a positive association between the prenatal PFOA and PFNA levels and the number of episodes of common cold for the children and between PFOA and PFHxS and the number of episodes of gastroenteritis at 3 years of age. In this study PFAA exposure levels were similar to those we found, and their results are consistent with our result indicating that prenatal exposure to PFAAs are associated with increased risk of infectious diseases in next generation.

Previously we studied association of eleven PFAAs and risk of allergic diseases at 12-24 months of age and found inverse association of prenatal exposure to PFTrDA and risk of eczema among female infants (Okada et al. 2014). Recently, we examined

the effects of prenatal PFAAs on risk of allergic diseases at 4 years of age in the same cohort and follow up of the same participants. The result showed that there is an inverse association of prenatal exposure to PFDoDA and PFTrDA with risk of eczema; and inverse association between PFHxS and wheezing (Goudarzi et al. in preparation). Taken together, PFAAs may suppress immune system in humans resulting in higher risk of infectious diseases and reduced allergic reactions.

E . 結論

This study suggests inverse association between prenatal exposures to PFOS and PFHxS and risk of infectious diseases in early childhood. It may provide new evidence that PFAAs have immunomodulatory effects on human immune system. However, more studies are necessary to observe long effects of in utero exposure to PFAAs on immune system in later life.

F . 研究発表

1. 論文発表

Houman Goudarzi, Chihiro Miyashita, Emiko Okada, Ikuko Kashino, Chi-Jen Chen, Sachiko Ito, Atsuko Araki, Hideyuki Matsuura, Reiko Kishi. Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Risk of Infectious diseases in early life.

2. 学会発表

なし

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

参考文献

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

- 1) ATSDR, 2015. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Draft Toxicological Profile for Perfluoroalkyls. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- 2) Brieger A, Bienefeld N, Hasan R, Goerlich R, Haase H. 2011. Impact of perfluoro- octanesulfonate and perfluorooctanoic acid on human peripheral leukocytes. *Toxicol In Vitro*. 25(4):960-8.
- 3) DeWitt, J.C., Copeland, C.B., Strynar, M.J., Luebke, R.W., 2008. Perfluorooctanoic acid induced immunomodulation in adult C57BL/6J or C57BL/6N female mice. *Environ. Health Perspect*. 116, 644–650.
- 4) Elliott S.R., Beeson, J.G. 2008. Estimating the burden of global mortality in children aged 5 years by pathogen-specific causes. *Clin. Infect. Dis*. 46(11),1794–1795.
- 5) Fei C, McLaughlin JK, Lipworth L, Olsen J. 2010. Prenatal exposure to PFOA and PFOS and risk of hospitalization for infectious diseases in early childhood. *Environ Res*. 110(8):773-7.
- 6) Grandjean P, Andersen EW, Budtz-Jørgensen E, Nielsen F, Mølbak K, Weihe P, et al. 2012. Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *JAMA* 307:391–7.
- 7) Granum B, Haug LS, Namork E, Stølevik SB, Thomsen C, Aaberge IS, et al. 2013. Pre-natal exposure to perfluoroalkyl substances may be associated with altered vaccine antibody levels and immune-related health outcomes in early childhood. *J Immunotoxicol* 10(4):373-9.
- 8) Houman Goudarzi, Chihiro Miyashita, Emiko Okada, Ikuko Kashino, Sumitaka Kobayashi, Chi-Jen Chen, et al. 2015. Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children. Submitted to *Environment International*
- 9) Halldorsson TI, Rytter D, Haug LS, Bech BH, Danielsen I, Becher G et al. 2012. Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: a prospective cohort study. *Environ Health Perspect* 120:668-673.
- 10) Harada KH, Hitomi T, Niisoe T, Takanaka K, Kamiyama S, Watanabe T, et al. 2011. Odd-numbered perfluorocarboxylates predominate over perfluorooctanoic acid in serum samples from Japan, Korea and Vietnam. *Environ Int*. 37:1183–9.
- 11) Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S et al. 2004. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect* 112:1204-1207.
- 12) Jiang W, Zhang Y, Zhu L, Deng J. 2014. Serum levels of perfluoroalkyl acids (PFAAs) with isomer analysis and their associations with medical parameters in Chinese pregnant women. *Environ Int* 64:40-47.
- 13) Kannan K, Perrotta E, Thomas NJ. 2006. Association between perfluorinated compounds and pathological conditions in southern sea otters. *Environ Sci Technol*. 15;40(16):4943-8.
- 14) Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A,

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

- Miyashita C, Itoh S, et al. 2013. Ten years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: cohort profile--updated 2013. *Environ Health Prev Med.* 18:429–50.
- 15) Kishi R, Nakajima T, Goudarzi H, Kobayashi S, Sasaki S, Okada E, et al. 2015. The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Essential and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of Their Offspring: The Hokkaido Study. *Environ Health Perspect.* 123(10):1038-45.
- 16) Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Rogers JM, Grey BE, Stanton ME, et al. 2003. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: Postnatal evaluation. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 74:382-392.
- 17) Lee YJ, Kim MK, Bae J, Yang JH. 2013. Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in Korea. *Chemosphere* 90:1603-1609.
- 18) Looker C, Luster MI, Calafat AM, Johnson VJ, Burleson GR, Burleson FG, et al. 2014. Influenza vaccine response in adults exposed to perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate. *Toxicol Sci.* 138(1):76-88.
- 19) Luebker DJ, York RG, Hansen KJ, Moore JA, Butenhoff JL. 2005. Neonatal mortality from in utero exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters. *Toxicology* 215:149-169.
- 20) Okada E, Sasaki S, Saijo Y, Washino N, Miyashita C, Kobayashi S, et al. 2012. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and relationship with allergies and infectious diseases in infants. *Environ Res.* 112:118–25.
- 21) Okada E, Kashino I, Matsuura H, Sasaki S, Miyashita C, Yamamoto J, et al. 2013. Temporal trends of perfluoroalkyl acids in plasma samples of pregnant women in Hokkaido, Japan, 2003-2011. *Environ Int* 60:89-96.
- 22) Okada E, Sasaki S, Kashino I, Matsuura H, Miyashita C, Kobayashi S, Itoh K, Ikeno T, Tamakoshi A, Kishi R. 2014. Prenatal exposure to perfluoroalkyl acids and allergic diseases in early childhood. *Environ Int.* 65:127-34.
- 23) Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. 2007. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* 115:1298-1305.
- 24) Peden-Adams M. M., EuDaly J. G., Dabra S., EuDaly A., Heesemann L., Smythe, J., et al. 2007. Suppression of humoral immunity following exposure to the perfluorinated insecticide sulfluramid. *J Toxicol Environ Health A* 70: 1130–141.
- 25) Peden-Adams M.M., Keller J.M., Eudaly J.G., Berger J., Gilkeson G.S., Keil D.E. 2008. Suppression of humoral immunity in mice following exposure to perfluorooctane sulfonate. *Toxicol. Sci.* 104, 144–154.
- 26) Qazi MR, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M. 2012. High-dose dietary exposure of mice to perfluorooctanoate or perfluorooctane

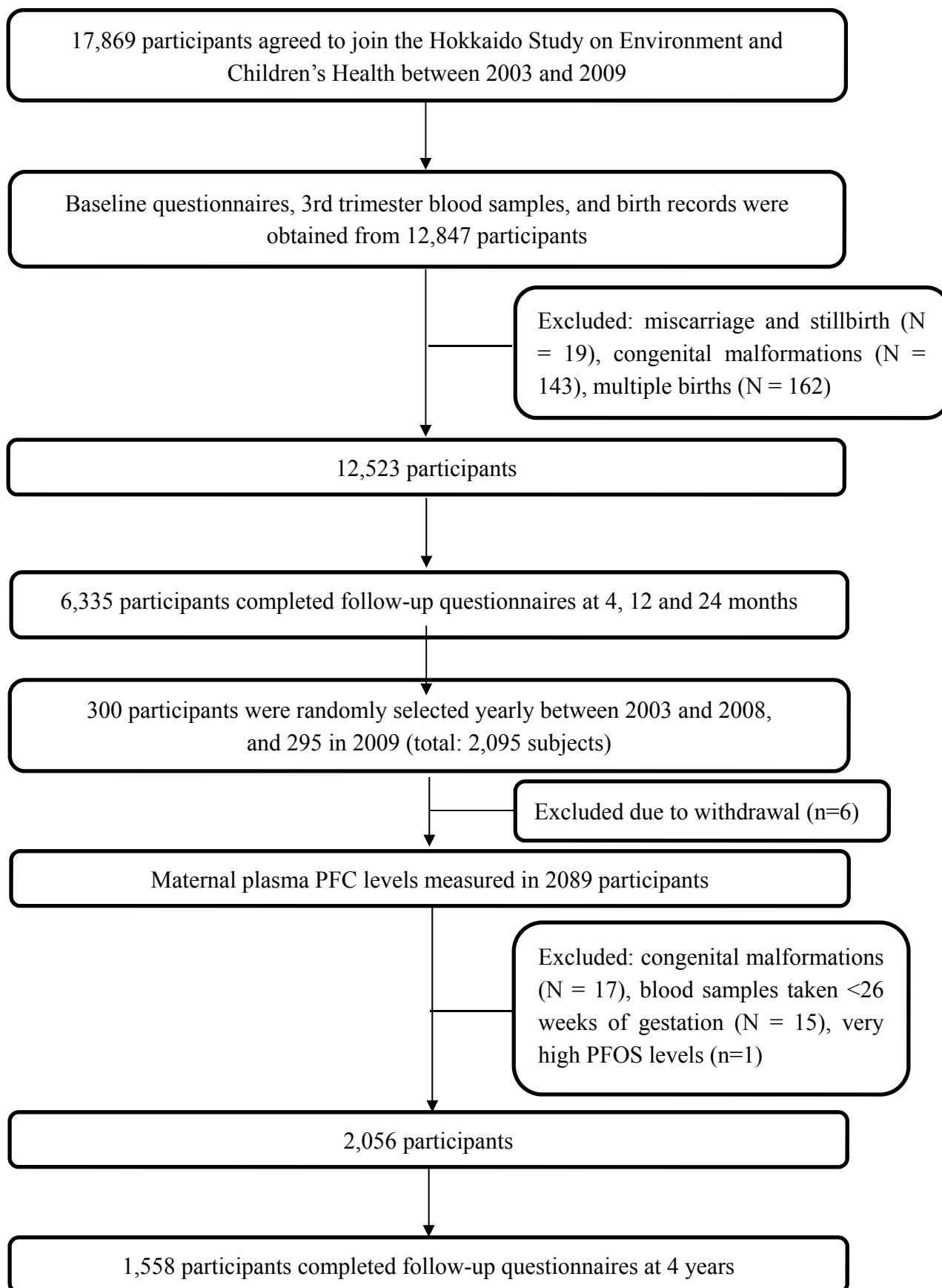
厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

sulfonate exerts toxic effects on myeloid and B-lymphoid cells in the bone marrow and these effects are partially dependent on reduced food consumption. *Food Chem Toxicol.* 50(9):2955-63.

- 27) Seacat AM, Thomford PJ, Hansen KJ, Clemen LA, Eldridge SR, Elcombe CR, et al. 2003. Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctanesulfonate in rats. *Toxicology* 183:117-131.
- 28) Stein CR, Wolff MS, Calafat AM, Kato K, Engel SM. 2012. Comparison of polyfluoroalkyl compound concentrations in maternal serum and amniotic fluid: a pilot study. *Reprod Toxicol* 34:312-316.
- 29) Yang Q, Xie, Y, Eriksson A. M., Nelson B. D., and DePierre J. W. 2001. Further evidence for the involvement of inhibition of cell proliferation and development in thymic and splenic atrophy induced by the peroxisome proliferator perfluorooctanoic acid in mice. *Biochem Pharmacol* 62: 1133–40.

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 S1. Flow chart of study participant selection.



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 study population of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013.

Characteristics	Participants (n=1558) No. (%)
Parental characteristics	
Maternal age (years) (mean ± SD)	31.12±4.48
Prepregnancy BMI	20.96 ± 9.90
Maternal educational level (years)	
≤12	660 (42.36)
>12	898 (57.64)
Parity (times)	
0	702 (45.67)
≥1	835 (54.32)
missing	21
Maternal smoking status during pregnancy	
Nonsmoker	1465 (94.03)
Smoker	93 (5.97)
Maternal allergic history	Yes 484 (31.07)
Paternal allergic history	Yes 307 (19.70)
Annual household income (million yen)	
<5	880 (56.48)
≥5	495 (31.77)
Missing	183 (11.75)
Children characteristics	
Gender	
Male	793 (50.9)
Female	765 (49.1)
Older siblings (numbers)	
0	626 (40.18)
≥1	932 (59.82)
Day care attendance at 4-year-old	
Yes	1373 (90.27)
No	148 (9.73)
missing	37
ETS ^a exposure at 4-year-old	
Yes	724 (48.07)
No	782 (51.92)
Missing	52

^a ETS: environmental tobacco exposure

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. Concentrations of 11 PFAAs in 1558 maternal plasma samples from the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013.

Compound	MDL ^a	%	Mean	Minimum	25th	50th	75th	Maximum
PFHxS	0.2	82.61	0.322	<0.2	0.221	0.296	0.395	3.386
PFHxA	0.1	46.28	0.103	<0.1	<0.1	<0.1	0.145	0.694
PFHpA	0.1	35.24	0.095	<0.1	<0.1	<0.1	0.125	0.757
PFOS	0.3	100	5.456	1.003	3.667	4.925	6.654	30.283
PFOA	0.2	99.94	2.713	<0.2	1.314	2.013	3.346	24.88
PFNA	0.3	99.87	1.402	<0.3	0.908	1.183	1.589	13.189
PFDA	0.1	99.55	0.575	<0.1	0.393	0.522	0.694	2.434
PFUnDA	0.1	99.81	1.534	<0.1	1.037	1.431	1.895	5.89
PFDoDA	0.1	90.69	0.191	<0.1	0.14	0.186	0.233	0.729
PFTTrDA	0.1	97.82	0.35	<0.1	0.247	0.332	0.424	1.325
PFTeDA	0.1	15.28	0.061	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.303

1 ^aMDL: method detection limit

Table 3. Number and proportion of children who developed allergic and infectious diseases during the 4-year-old in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013 (n = 1558).

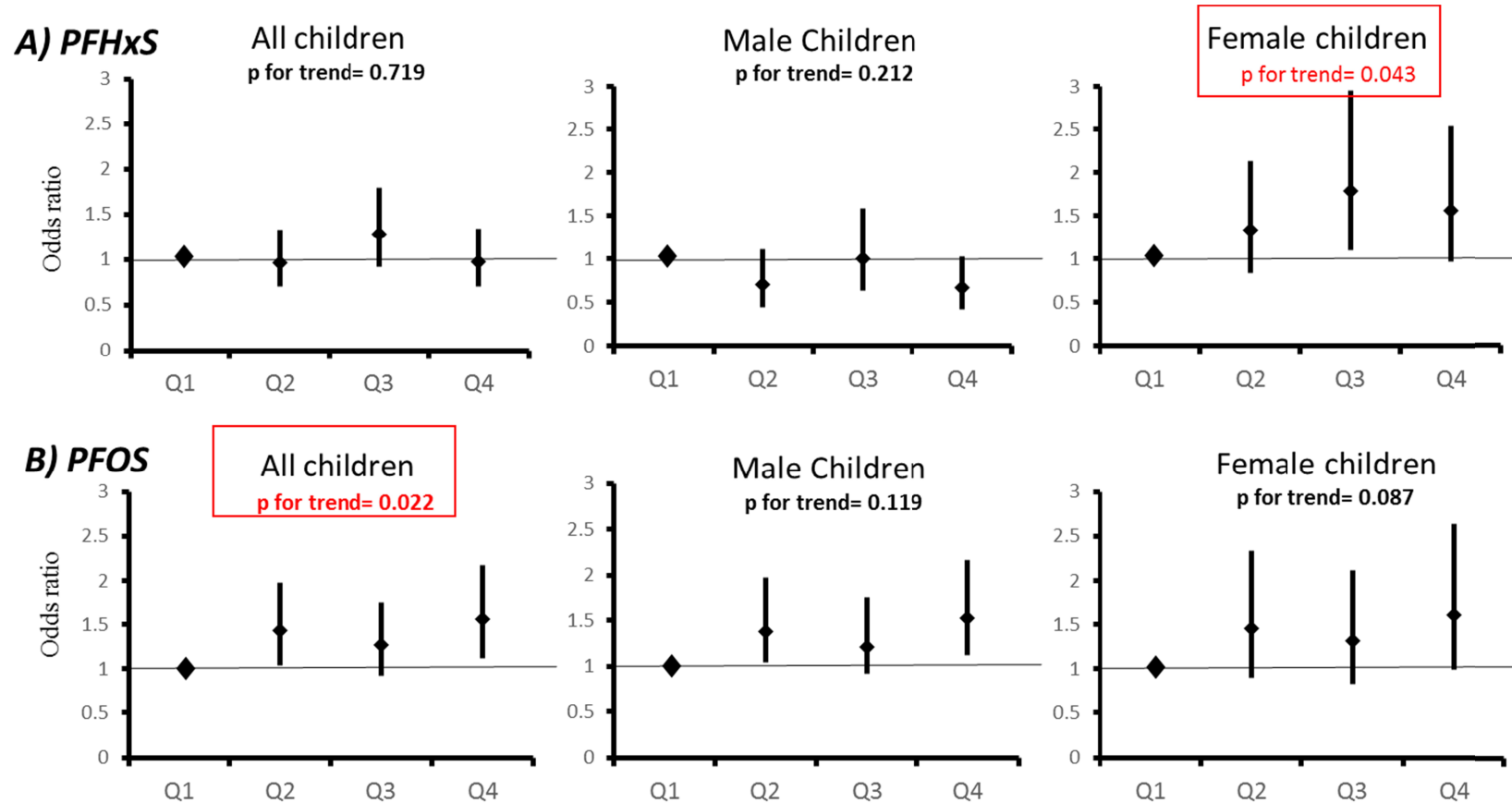
Symptoms	Total		Male children		Female children		p ^a
	(n=1558)		(n=793)		(n=765)		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Infectious diseases ^b	1075	(69)	534	(67.34)	541	(70.72)	0.149
Otitis media	649	(41.66)	340	(42.88)	309	(40.39)	0.320
Pneumonia	287	(18.42)	151	(19.04)	136	(17.78)	0.520
RS virus	197	(12.64)	92	(11.6)	105	(13.73)	0.207
Febrile seizure	121	(7.77)	59	(7.44)	62	(8.1)	0.624
Varicella	589	(37.8)	284	(35.81)	305	(39.87)	0.099

^a Chi-square test.

^b “Infectious diseases” indicates cases with at least one of the listed symptoms.

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 2. The association between quartiles of PFHxS (A) and PFOS (B) with risk of total allergic diseases among 4-year old children.



Adjusted ORs in the highest quartile vs lowest quartile for infectious diseases were significantly decreased for PFHxS and PFOS. Q: quartile. Infectious diseases includes otitis media, pneumonia, respiratory syncytial virus (RSV), varicella, febrile seizure and were collected using a mother-reported questionnaire at 4 years of age. Logistic models were adjusted for maternal age, maternal educational level, parental allergic history, parity, children gender, day care attendance and ETS exposure in at 4-year-old, and breast feeding.

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

Supplementary Table S1. Odds ratio (95% CI) between PFAA concentrations in maternal plasma and total infectious diseases during the 4 year-old in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013 (n= 1558).

Compound	Total (n = 1558)					Male children (n = 793)					Female children (n = 765)				
	n*	Crude		Adjusted ^a		n*	Crude		Adjusted ^b		n*	Crude		Adjusted ^b	
		OR ^c	(95% CI) ^d	OR ^c	(95% CI) ^d		OR ^c	(95% CI) ^d	OR ^c	(95% CI) ^d		OR ^c	(95% CI) ^d	OR ^c	(95% CI) ^d
PFHxS															
Quartile 1	267	1		1		143	1		1		124	1		1	
Quartile 2	267	0.898	(0.663, 1.21)	0.963	(0.697, 1.33)	127	0.710	(0.465, 1.08)	0.705	(0.446, 1.11)	140	1.14	(0.743, 1.77)	1.33	(0.835, 2.13)
Quartile 3	280	1.10	(0.811, 1.51)	1.28	(0.919, 1.79)	140	0.945	(0.612, 1.46)	1.00	(0.630, 1.59)	140	1.30	(0.836, 2.04)	1.79	(1.10, 2.95)
Quartile 4	261	0.858	(0.634, 1.16)	0.974	(0.703, 1.34)	124	0.647	(0.425, 0.987)	0.663	(0.421, 1.03)	137	1.16	(0.750, 1.80)	1.56	(0.963, 2.54)
p for trend		0.596		0.719			0.131		0.212		0.416		0.043		
PFOS															
Quartile 1	251	1		1		130	1		1		121	1		1	
Quartile 2	276	1.31	(0.969, 1.77)	1.43	(1.04, 1.98)	134	1.23	(0.813, 1.86)	1.38	(0.883, 2.17)	142	1.39	(0.900, 2.16)	1.45	(0.903, 2.33)
Quartile 3	264	1.15	(0.856, 1.55)	1.27	(0.921, 1.75)	127	1.11	(0.736, 1.68)	1.21	(0.775, 1.90)	137	1.18	(0.773, 1.82)	1.32	(0.834, 2.11)
Quartile 4	284	1.46	(1.07, 1.98)	1.56	(1.12, 2.17)	143	1.40	(0.924, 2.13)	1.52	(0.968, 2.41)	141	1.52	(0.978, 2.39)	1.61	(0.995, 2.63)
p for trend		0.039		0.022			0.171		0.119		0.123		0.087		
PFOA															
Quartile 1	266	1		1		129	1		1		137	1		1	
Quartile 2	272	1.04	(0.774, 1.42)	1.13	(0.814, 1.57)	137	0.927	(0.611, 1.40)	0.934	(0.593, 1.46)	135	1.232	(0.787, 1.92)	1.42	(0.875, 2.32)

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

Quartile 3	277	1.13	(0.835, 1.54)	1.18	(0.850, 1.66)	144	1.23	(0.802, 1.90)	1.22	(0.765, 1.95)	133	1.04	(0.673, 1.60)	1.16	(0.717, 1.89)
Quartile 4	260	0.917	(0.679, 1.23)	1.16	(0.826, 1.65)	124	0.851	(0.559, 1.29)	0.986	(0.606, 1.60)	136	0.993	(0.646, 1.52)	1.38	(0.838, 2.31)
p for trend		0.699		0.363			0.766		0.743			0.802		0.346	
PFNA															
Quartile 1	273	1		1		140	1		1		133	1		1	
Quartile 2	271	0.984	(0.723, 1.33)	1.17	(0.849, 1.62)	134	0.926	(0.605, 1.41)	1.14	(0.725, 1.80)	137	1.04	(0.674, 1.63)	1.23	(0.775, 1.97)
Quartile 3	276	1.01	(0.743, 1.37)	1.20	(0.869, 1.67)	125	0.812	(0.531, 1.24)	0.971	(0.616, 1.52)	151	1.32	(0.844, 2.07)	1.53	(0.952, 2.50)
Quartile 4	255	0.808	(0.597, 1.09)	0.987	(0.711, 1.37)	135	0.815	(0.537, 1.23)	0.973	(0.617, 1.53)	120	0.777	(0.503, 1.20)	1.02	(0.634, 1.66)
p for trend		0.204		0.983			0.272		0.745			0.441		0.704	
PFDA															
Quartile 1	277	1		1		142	1		1		135	1		1	
Quartile 2	275	0.941	(0.69, 1.28)	0.989	(0.712, 1.37)	133	0.799	(0.524, 1.21)	0.799	(0.508, 1.25)	142	1.14	(0.720, 1.81)	1.28	(0.787, 2.08)
Quartile 3	266	0.851	(0.625, 1.15)	0.893	(0.645, 1.23)	130	0.817	(0.533, 1.25)	0.791	(0.501, 1.24)	136	0.886	(0.568, 1.38)	1.00	(0.625, 1.60)
Quartile 4	257	0.744	(0.549, 1.00)	0.851	(0.614, 1.17)	129	0.775	(0.507, 1.18)	0.865	(0.545, 1.36)	128	0.711	(0.460, 1.10)	0.865	(0.541, 1.38)
p for trend		0.042		0.266			0.280		0.547			0.066		0.365	
PFUnDA															
Quartile 1	262	1		1		131	1		1		131	1		1	
Quartile 2	270	1.08	(0.799, 1.46)	1.11	(0.804, 1.53)	146	1.03	(0.683, 1.56)	1.04	(0.672, 1.63)	124	1.15	(0.738, 1.80)	1.16	(0.722, 1.89)
Quartile 3	271	1.06	(0.790, 1.44)	1.08	(0.788, 1.49)	122	0.94	(0.618, 1.44)	0.984	(0.621, 1.56)	149	1.19	(0.779, 1.83)	1.19	(0.756, 1.88)
Quartile 4	272	1.10	(0.812, 1.49)	1.07	(0.779, 1.48)	135	1.04	(0.686, 1.59)	1.07	(0.682, 1.68)	137	1.16	(0.750, 1.79)	1.04	(0.660, 1.66)
p for trend		0.577		0.703			0.942		0.836			0.485		0.801	
PFDoDA															
Quartile 1	264	1		1		127	1		1		137	1		1	

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

Quartile 2	262	0.908 (0.671, 1.22)	0.957 (0.694, 1.32)	145	1.089 (0.714, 1.66)	1.16 (0.747, 1.83)	117	0.747 (0.484, 1.15)	0.718 (0.448, 1.14)
Quartile 3	275	1.06 (0.780, 1.44)	1.01 (0.736, 1.40)	130	0.976 (0.638, 1.49)	1.03 (0.657, 1.61)	145	1.16 (0.744, 1.81)	0.956 (0.592, 1.54)
Quartile 4	274	1.02 (0.752, 1.38)	1.10 (0.801, 1.53)	132	0.962 (0.630, 1.46)	1.13 (0.724, 1.78)	142	1.09 (0.703, 1.70)	1.05 (0.653, 1.69)
p for trend		0.655	0.473		0.730	0.719		0.320	0.548
PFTTrDA									
Quartile 1	261	1	1	121	1	1	140	1	1
Quartile 2	270	1.10 (0.816, 1.49)	1.10 (0.801, 1.52)	150	1.45 (0.951, 2.22)	1.64 (1.04, 2.59)	120	0.829 (0.536, 1.28)	0.710 (0.444, 1.13)
Quartile 3	272	1.14 (0.842, 1.54)	1.16 (0.841, 1.61)	137	1.18 (0.779, 1.80)	1.30 (0.834, 2.04)	135	1.11 (0.716, 1.74)	0.992 (0.614, 1.60)
Quartile 4	272	1.05 (0.784, 1.43)	1.08 (0.789, 1.49)	126	1.04 (0.685, 1.58)	1.23 (0.789, 1.93)	146	1.08 (0.700, 1.66)	0.922 (0.577, 1.47)
p for trend		0.676	0.563		0.889	0.567		0.464	0.907

^a Adjusted for maternal age, maternal educational level, parental allergic history, parity, children gender, breast-feeding period, day care attendance at 4-year-old, and ETS exposure in children at 4-year-old.

^b Adjusted for all the covariates except children gender.

^c OR: odds ratio. ^d CI: confidence interval.

*Indicates number of cases with infectious diseases.

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

The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study

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 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授

研究分担者 野々村 克也 北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科 名誉教授

研究要旨

Perfluorinated chemicals (PFCs) disrupt homeostasis of cholesterol, which is a substrate of steroid hormones. Steroid hormones such as glucocorticoids and androgenic hormones mediate several vital physiologic functions; however, the in utero effects of PFCs exposure on the homeostasis of these steroid hormones are not well understood in humans. We examined the relationship between prenatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS)/perfluorooctanoate (PFOA) and cord blood levels of glucocorticoid and androgenic hormones.

Methods. We conducted a hospital-based birth cohort study between July 2002 and October 2005 in Sapporo, Japan (n=514). In total, 251 mother-infant pairs were included in this study. The prenatal PFOS and PFOA levels were measured in maternal serum samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). Cord blood levels of glucocorticoid (cortisol and cortisone) and androgenic hormones (dehydroepiandrosterone (DHEA) and androstenedione) were also measured by LC-MS-MS. We found a dose-response relationship of prenatal PFOS exposure, but not PFOA, with glucocorticoid levels after adjusting for potential confounders. Cortisol and cortisone concentrations were -28.70 (95% confidence interval (CI): -46.10, -11.30; p for trend <0.001) and -77.93 ng/mL (95% CI: -130.97, -24.89; p for trend <0.001) lower, respectively, in infants with prenatal PFOS in the fourth quartile compared with those in the first quartile. The highest quartile of prenatal PFOS exposure was positively associated with a 0.99 ng/mL higher DHEA level compared with the lowest quartile (95% CI: 0.15, 1.83; p for trend=0.013), whereas PFOA showed a negative association with DHEA levels (quartile 4 vs 1: -0.98 ng/mL, 95% CI: -1.72, -0.23; p for trend=0.011). We observed no significant association between PFCs and androstenedione levels. Our results indicated that prenatal exposure to PFC levels were significantly associated with glucocorticoid and DHEA levels in cord blood.

研究協力者

Houman Goudarzi (外国人特別研究員)

A. 研究目的

Perfluorinated chemicals (PFCs) are persistent and ubiquitous chemicals that have been widely used in different industries. PFCs have long elimination half-lives;

serum elimination of PFOS and PFOA in human sera is estimated to take 5.4 and 3.8 years, respectively (Olsen et al. 2007). These result in the bioaccumulation of PFCs in the human body.

Fetuses are exposed to PFCs because of maternofetal passage during organ development (Inoue et al. 2004). Some

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

epidemiological studies in the general population suggest that these compounds are associated with poor birth outcomes such as reduced birth size (Apelberg et al. 2007; Washino et al. 2009). Cholesterol is a substrate of all steroid hormones. Previous human studies have reported that PFCs may change the cholesterol profile in pregnant (Starling et al. 2014) and non-pregnant people (Frisbee et al. 2010; Winquist et al. 2014). Joensen et al. (2013) reported an inverse association between PFOS and testosterone levels in serum samples of adult men. Previously, our group has reported a negative association between prenatal PFOS and progesterone hormone levels of cord blood samples in male and female infants. In addition, PFOS was negatively associated with testosterone/estradiol in male infants, whereas prenatal PFOA was positively associated with progesterone levels in cord blood samples of both sexes (Itoh et al. 2014). However, the effects of PFCs on glucocorticoid hormones and androgenic hormones (the main substrates of testosterone and estrogen) are not well understood in humans.

We investigated whether prenatal exposure to PFOS and PFOA was associated with cortisol and cortisone levels in cord blood samples in a birth cohort using a prospective design. In addition to glucocorticoids, to gain a better understanding of the effects of PFCs on steroidogenesis, we assessed the association of PFCs with DHEA and androstenedione as androgenic hormones in cord blood and assessed the balance of glucocorticoids and androgenic hormones in infants.

B . 研究方法

This study was part of the Hokkaido Study

on the Environment and Children's Health that was conducted between July 2002 and October 2005 (n=514). The details of this study have been described previously (Kishi et al. 2011 and 2013). A self-administered questionnaire survey was completed after the second trimester of pregnancy that contained information related to previous medical history, socioeconomic status, and habits during pregnancy. Medical information, including maternal age, maternal body mass index (BMI) before pregnancy, parity, gestational age, pregnancy complications, type of delivery, infant's sex, and birth size, was obtained from participant medical records.

A 40-mL blood sample was taken from the maternal peripheral vein after the second trimester of pregnancy to measure PFOS and PFOA levels. PFOS and PFOA levels were measured in maternal serum samples using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) (Nakata et al. 2009). A blood sample (10–30 mL) was collected from the umbilical cord at delivery. Concentrations of cortisol, cortisone, DHEA, and androstenedione were measured in cord blood samples using LC-MS/MS (Yamashita et al. 2007a, 2007b).

The following subjects were excluded from the analysis of associations between maternal PFCs and glucocorticoids: women with pregnancy-induced hypertension (n=11), women with diabetes mellitus (n=1), mother-infant pairs with fetal heart failure (n=1), and twins (n=7). After the exclusion of the mentioned subjects, 428 mother-infant pairs had available PFOS and PFOA concentrations. Of those, 251 mother-infant pairs had available cord blood samples and included in current analysis. Because of the skewed distributions, we treated the levels

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

of PFCs, glucocorticoid and androgenic hormones as a continuous variable on a log₁₀ scale.

We analyzed correlations between PFOS and PFOA concentrations and the characteristics of the mothers and infants using the Spearman correlation test, the Mann-Whitney U-test. The same statistical analyses were performed to find associations between steroid hormone levels and participants' characteristics. We performed multiple-regression analysis to examine the association between glucocorticoid and androgenic hormones and the levels of PFCs in maternal serum samples. Potential confounders that affected exposure and/or outcome levels including maternal age (year), parity (0/≥1), gestational age (continuous), caffeine intake (continuous), smoking during pregnancy (yes/no), and blood sampling period (before and after delivery). To assess a dose-response relationship, we divided PFC levels into four quartiles and least square means (LSMs) and 95% confidence intervals (CI) were calculated. To calculate a p value for the trend, we used linear contrast coefficients of -3, -1, +1, and +3 assigned to quartiles 1, 2, 3, and 4, respectively. We performed all of the statistical analyses using JMP clinical 5 (SAS Institute Inc., NC, USA) and results were considered significant when $p < 0.05$.

（倫理面への配慮）

All participants provided written informed consent and the study protocol was approved by the institutional ethical board for epidemiological studies at the Graduate School of Medicine and the Center for Environmental and Health Sciences, Hokkaido University.

C . 研究結果

The average age of the mothers at birth was 29.9 years (standard deviation (SD) 4.8); 49.9 % of mothers were nulliparous (Table 1). Among pregnant women, 15.5 % smoked and 33.1 % consumed alcohol during pregnancy. The mean (\pm SD) of birth weight was 3119.2 g (\pm 332.7), and 44.2% of newborns were boys. PFOS levels were detected in all of the samples, however PFOA levels were not detected in 16 maternal serum samples (6.3% of participants). The median (25-75 percentile) values of PFOS and PFOA were 5.0 ng/mL (3.2 to 6.8 ng/mL) and 1.4 ng/mL (0.9 to 1.9 ng/mL), respectively (Table 2). We observed statistically significant differences in mean PFOS concentrations by parity and blood sampling period. Additionally, there were significant differences in mean PFOA concentrations by parity, blood sampling period, and smoking and caffeine intake during pregnancy. Median (25-75 percentile) values of cortisol, cortisone, DHEA and androstenedione in cord blood samples were 37.9 (22.3-63.0), 93.5 (68.9-123.3), 2.2 (1.7-3.0), and 0.46 (0.36-0.59) ng/mL, respectively (Table 3). Cortisol and cortisone were detected in 97.2 % and 94.4 % of samples, respectively. The detection rates of DHEA and androstenedione were both 100%.

Cortisol and cortisone levels in cord blood showed a negative association with maternal age. Glucocorticoid levels in cord blood of infants with multiparous mothers were significantly lower compared with those in infants with nulliparous mothers. Gestational age had a significant positive correlation with cortisol levels and a non-significant positive correlation with cortisone levels. DHEA and androstenedione

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

levels did not show any association with maternal or infant characteristics (data not shown).

As shown in Table 4, after controlling for potential confounders, prenatal PFOS concentration was inversely associated with cortisol levels ($\beta = -0.284$; 95% CI: -1.05, -0.397; p -value < 0.001). Similarly, we observed a significant negative association between PFOS and cortisone levels ($\beta = -0.268$; 95% CI: -1.37, -0.471; p value < 0.001). In addition, prenatal PFOS concentrations were positively associated with DHEA levels ($\beta = 0.181$; 95% CI: 0.067, 0.436; p -value = 0.007). We found a non-significant positive association between PFOA and cortisol ($\beta = 0.117$; 95% CI: -0.053, 0.525; p -value = 0.109) and cortisone levels ($\beta = 0.136$; 95% CI: -0.024, 0.761; p -value=0.066). Prenatal exposure to PFOA was negatively associated with DHEA levels ($\beta = -0.219$; 95% CI: -0.396, -0.085; p value = 0.002). In addition, we assessed the association of PFCs with the cortisol to DHEA ratio and the glucocorticoid to androgenic hormones ratio. PFOS was significantly negatively associated with the ratios of cortisol/DHEA and glucocorticoid/androgenic hormones. However, PFOA showed a positive and significant association with these ratios.

For further assessment, we also divided maternal PFC levels into quartiles and examined the dose-response relationship between PFCs and steroid hormones (Figure 1). The quartile analysis after full adjustment showed that the highest quartile of PFOS was associated with a -28.70 ng/mL (95% CI: -46.10, -11.30; p for trend < 0.001) in cortisol and -77.93 ng/mL (95% CI: -130.97, -24.89; p for trend < 0.001) in cortisone levels compared with the lowest quartile.

PFOA did not show any significant trend for glucocorticoid levels. In addition, we found significant increases in DHEA levels across PFOS quartiles (quartile 4 vs 1 difference: 0.99 ng/mL, 95% CI: 0.15, 1.83; p for trend = 0.012), but significant decreases in DHEA levels among PFOA quartiles (quartile 4 vs 1 difference = -0.98 ng/mL, 95% CI: -1.72, -0.23; p for trend = 0.011). We did not observe a dose-response relationship between PFCs and androstenedione levels.

D . 考察

To the best of our knowledge, this study is the first to address the association of PFCs with cord blood glucocorticoid and androgenic hormone levels in a prospective birth cohort. In this study, we found a significant negative association of prenatal PFOS levels with cortisol and cortisone levels in cord blood samples. In addition, we found a non-significant association of prenatal PFOA with cortisol and cortisone levels. We observed a positive association between PFOS and DHEA levels, whereas PFOA was inversely associated with DHEA levels. Our results provide new evidence regarding the association of exposure to low levels of PFCs in utero with the concentration of glucocorticoid and androgenic hormones in the next generation.

The values we obtained for glucocorticoids in cord blood samples in our study are comparable with those in cord blood samples both in and outside of Japan (Hasegawa et al. 2010; Anderson et al. 2010). There is a physiologic hypercortisolism during pregnancy, and glucocorticoids are essential for regulating and/or modulating normal physiologic functions in metabolism, growth, neurodevelopment, the immune system, blood pressure maintenance, and fluid and electrolyte homeostasis (Reynolds

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

2010; Braun et al. 2013). Moreover, glucocorticoids have a crucial role in late gestational lung and heart maturation, and insufficient or excess amounts of these hormones have lifelong adverse effects on the cardiovascular system (Rog-Zielinska et al. 2014; Ishimoto and Jaffe 2011). In addition, cord blood cortisol is lower in infants with intrauterine growth retardation compared with infants with appropriate growth for their gestational age (Strinic et al. 2007). Our findings suggest that dyshomeostasis of glucocorticoids and DHEA at birth are associated with in utero PFCs exposure, and this may have adverse effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and steroid hormone homeostasis later in life. Therefore, in utero PFC exposure may be a public health concern and longer observations of these effects are warranted.

The fetal adrenal uses large amounts of progesterone supplied by the placenta for cortisol synthesis (Mastorakos and Ilias 2003). PFOS can inhibit the secretion of progesterone in a concentration-dependent manner in human placental syncytiotrophoblasts (Zhang et al. 2015). In addition, we reported that prenatal exposure to PFOS was inversely associated with progesterone levels in cord blood of male and female infants in the same cohort. In contrast, prenatal PFOA levels were positively associated with cord blood progesterone levels in male and female infants (Itoh et al. 2014). Therefore, this may partly explain the negative association of PFOS but not PFOA with glucocorticoids in the current study.

We found that PFOS is associated with a decrease in the cortisol/DHEA ratio and glucocorticoid/androgenic hormone ratio,

indicating that PFOS may shift steroidogenesis to androgenic hormones. Additionally, PFCs, especially PFOS, inhibit the activity of several enzymes in the pathway of steroidogenesis in human cells, such as 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B), that convert pregnenolone to progesterone and DHEA to androstenedione (Zhao et al. 2010). Therefore, these modified enzyme activities may disrupt the balance of C19-steroids (androgenic hormones) and C21-steroids (glucocorticoids). In contrast, PFOA increased these ratios. In this study, we found that the direction of PFOS and PFOA effects on steroids are different. Further studies are necessary to replicate these findings and clarify the mechanistic effects of these PFCs on steroidogenesis.

E . 結論

Our results indicated that prenatal exposure to PFC levels were significantly associated with glucocorticoid and DHEA levels in cord blood.

F . 研究発表

1.論文発表

Houman Goudarzi, Atsuko Araki, Sachiko Itoh, Seiko Sasaki, Chihiro Miyashita, Takahiko Mitsui, Hiroyuki Nakazawa, Katsuya Nonomura, Reiko Kishi. The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study. Under review in Environ Health Perspect., 2015.

2.学会発表

Not yet.

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定

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

を含む。）

該当なし

参考文献

- 1) Anderson H, Fogel N, Grebe SK, Singh RJ, Taylor RL, Dunaif A. 2010. Infants of women with polycystic ovary syndrome have lower cord blood androstenedione and estradiol levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95:2180-2186.
- 2) Apelberg BJ, Witter FR, Herbstman JB, Calafat AM, Halden RU, Needham LL et al. 2007. Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Perspect* 115:1670-1676.
- 3) Braun T. 2013. Early-life glucocorticoid exposure: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and long-term disease risk. *Endocr Rev.* 34(6):885-916.
- 4) Frisbee SJ, Shankar A, Knox SS, Steenland K, Savitz DA, Fletcher T, et al. 2010. Perfluorooctanoic acid, perfluorooctanesulfonate, and serum lipids in children and adolescents: results from the C8 Health Project. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 164:860-869.
- 5) Hasegawa T, Kubo H, Shinozaki K, Nowatari M, Ishii M. 2010. Micro determination of cortisol and cortisone in umbilical cord blood by chemiluminescent high-performance liquid chromatography. *Biomedical chromatography: BMC* 24:613-619.
- 6) Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, et al. 2004. Perfluorooctane sulfonate (pfos) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: Assessment of pfos exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environmental health perspectives* 112:1204-1207.
- 7) Ishimoto H, Jaffe RB. 2011. Development and function of the human fetal adrenal cortex: A key component in the fetoplacental unit. *Endocrine reviews* 32:317-355.
- 8) Itoh S, Araki A, Miyashita C, Nakazawa H, Mitsui T, Cho K, et al. 2014. Effect of PFOS and PFOA Exposure in Utero on Reproductive Hormones Levels at Birth. 26th International society for Environmental Epidemiology, Seattle, USA. Abstract Number: 2403, ID: O-049. <http://ehp.niehs.nih.gov/isee/o-049/>
- 9) Joensen UN, Veyrand B, Antignac JP, Blomberg Jensen M, Petersen JH, Marchand P, et al. 2013. Pfos (perfluorooctanesulfonate) in serum is negatively associated with testosterone levels, but not with semen quality, in healthy men. *Human reproduction* 28:599-608.
- 10) Kishi R, Sasaki S, Yoshioka E, Yuasa M, Sata F, Saijo Y, et al. 2011. Cohort profile: The Hokkaido study on environment and children's health in Japan. *Int J Epidemiol* 40:611-618.
- 11) Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, et al. 2013. Ten years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: cohort profile--updated 2013. *Environ Health Prev Med.*
- 12) Mastorakos G, Ilias I. 2003. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 997:136-149.
- 13) Nakata A, Saito K, Iwasaki Y, Ito R, Kishi R, Nakazawa H. 2009. Determination of Perfluorinated

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

- Compounds in Human Milk and Evaluation of Their Transition from Maternal Plasma. *Bunseki Kagaku* 58:653.
- 14) Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. 2007. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environmental health perspectives* 115:1298-1305.
- 15) Reynolds RM. 2010. Corticosteroid-mediated programming and the pathogenesis of obesity and diabetes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 122:3-9.
- 16) Rog-Zielinska EA, Richardson RV, Denvir MA, Chapman KE. 2014. Glucocorticoids and foetal heart maturation; implications for prematurity and foetal programming. *Journal of molecular endocrinology* 52:R125-135.
- 17) Starling AP, Engel SM, Whitworth KW, Richardson DB, Stuebe AM, Daniels JL, et al. 2014. Perfluoroalkyl substances and lipid concentrations in plasma during pregnancy among women in the norwegian mother and child cohort study. *Environment international* 62:104-112.
- 18) Strinic T, Roje D, Marusic J, Capkun V. 2007. Cord blood cortisol level is lower in growth-restricted newborns. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 33:144-150.
- 19) Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, et al. 2009. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environmental health perspectives* 117:660-667.
- 20) Winquist A, Steenland K. 2014. Modeled PFOA exposure and coronary artery disease, hypertension, and high cholesterol in community and worker cohorts. *Environ Health Perspect* 122:1299-1305.
- 21) Yamashita K, Okuyama M, Watanabe Y, Honma S, Kobayashi S, Numazawa M. 2007a. Highly sensitive determination of estrone and estradiol in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Steroids* 72:819-827.
- 22) Yamashita K, Takahashi M, Tsukamoto S, Numazawa M, Okuyama M, Honma S. 2007b. Use of novel picolinoyl derivatization for simultaneous quantification of six corticosteroids by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1173:120-128.
- 23) Zhang N, Wang WS, Li WJ, Liu C, Wang Y, Sun K. 2015. Reduction of progesterone, estradiol and hcg secretion by perfluorooctane sulfonate via induction of apoptosis in human placental syncytiotrophoblasts. *Placenta* 36:575-580.
- 24) Zhao B, Hu GX, Chu Y, Jin X, Gong S, Akingbemi BT, et al. 2010. Inhibition of human and rat 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 activities by perfluoroalkylated substances.

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

Chemico-biological interactions

188:38-43.

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 the subjects participating in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Sapporo, Japan, 2002-2005 (n = 251).

Characteristics	N (%) or mean \pm SD
Maternal characteristics	
Age (years)	29.9 \pm 4.8
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	20.8 \pm 2.7
Parity (times) ^a	
0	125 (49.9)
≥ 1	126 (50.1)
Educational level (years)	
≤ 12	118 (47.0)
≥ 13	133 (53.0)
Annual household income (million yen) ^a	
less than 5	180 (72.2)
more than 5	69 (27.8)
Smoking during pregnancy	
Yes	39 (15.5)
No	212 (84.5)
Alcohol intake during pregnancy	
Yes	83 (33.1)
No	168 (66.9)
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)	149.6 \pm 123.6
Blood sampling period	
during pregnancy	185 (73.7)
after delivery	66 (26.3)
Gestational age (days)	278.0 \pm 7.0
Infant characteristics	
Sex	
Male	111 (44.2)
Female	140 (55.8)

^aMissing data: annual household income (n=2).

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. Maternal blood PFOS and PFOA levels (ng/mL) in relation to the characteristics of the subjects participating in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Sapporo, Japan, 2002-2005 (n = 251).

Characteristics	N (%)	PFOS mean \pm SD, median (25–75 percentile), or correlationa (p-value)	p-Value	PFOA mean \pm SD, median (25–75 percentile), or correlationa (p-value)	p-Value
Mean (\pm SD)	251 (100)	5.4 (2.7)		1.5 (0.8)	
Median (25-75 percentile)	251 (100)	5.0 (3.2-6.8)		1.4 (0.9-1.9)	
Maternal characteristics					
Age (years) ^a		$\rho = -0.093$	0.138	$\rho = -0.055$	0.377
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a		$\rho = -0.033$	0.594	$\rho = -0.060$	0.338
Parity (times) ^b					
0	125	6.08 \pm 0.24	<0.001	1.89 \pm 0.07	<0.001
≥ 1	126	4.73 \pm 0.24		1.12 \pm 0.07	
Educational level (years) ^b					
≤ 12	118	5.27 \pm 0.25	0.480	1.44 \pm 0.08	0.254
≥ 13	133	5.52 \pm 0.24		1.56 \pm 0.07	
Annual household income (million yen) ^{b, d}					
less than 5	180	5.36 \pm 0.20	0.866	1.49 \pm 0.06	0.630
more than 5	69	5.43 \pm 0.33		1.55 \pm 0.10	
Smoking during pregnancy ^b					
Yes	39	4.68 \pm 0.44	0.078	1.23 \pm 0.14	0.034
No	212	5.53 \pm 0.19		1.55 \pm 0.06	
Alcohol intake during pregnancy ^b					
Yes	83	5.28 \pm 0.30	0.625	1.51 \pm 0.09	0.985
No	168	5.46 \pm 0.21		1.50 \pm 0.06	
Caffeine intake during pregnancy (mg/day) ^a		$\rho = -0.102$	0.104	$\rho = -0.190$	0.010
Blood sampling period ^b					
during pregnancy	185	5.78 \pm 0.20	<0.001	1.60 \pm 0.06	0.003
after delivery	66	4.34 \pm 0.33		1.23 \pm 0.10	

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

Gestational age (days) ^a		$\rho = 0.073$	0.246	$\rho = 0.100$	0.111
Infant characteristics					
Sex ^b					
Male	111	5.74 \pm 0.26	0.088	1.59 \pm 0.08	0.161
Female	140	5.13 \pm 0.23		1.43 \pm 0.07	

P-values calculated by ^a Spearman's correlation (ρ), ^b Mann-Whitney U-test.
^d annual household income (n=2).

Table 3. Concentrations (ng/mL) of steroid hormones in cord blood samples (n=251).

	n	mean	SD	Med	(25th-75th)	>LOD (%)
Cortisol	251	46.5	35.6	37.9	(22.3-63.0)	97.2
Cortisone	251	96.0	41.4	93.5	(68.9-123.3)	94.4
DHEA	251	4.1	9.2	2.2	(1.7-3.0)	100
Androstenedione	251	0.60	0.73	0.46	(0.36-0.59)	100

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 4. Association of prenatal PFC levels with cord blood glucocorticoids and androgenic hormones (n=251).

	PFOS			PFOA		
	Std β	(95% CI)	p-value	Std β	(95% CI)	p-value
Cortisol						
Crude	-0.225	(-0.888, -0.266)	<0.001	0.145	(0.043, 0.540)	0.021
Adjusted ^a	-0.284	(-1.05, -0.397)	<0.001	0.117	(-0.053, 0.525)	0.109
Cortisone						
Crude	-0.248	(-1.26, -0.437)	<0.001	0.102	(-0.057, 0.613)	0.104
Adjusted ^a	-0.268	(-1.37, -0.471)	<0.001	0.136	(-0.024, 0.761)	0.066
DHEA						
Crude	0.204	(0.115, 0.455)	0.001	-0.128	(-0.276, -0.005)	0.041
Adjusted ^a	0.181	(0.067, 0.436)	0.007	-0.219	(-0.396, -0.085)	0.002
Androstenedione						
Crude	-0.010	(-0.140, 0.119)	0.868	-0.080	(-0.167, 0.035)	0.203
Adjusted ^a	-0.020	(-0.163, 0.119)	0.762	-0.111	(-0.211, 0.027)	0.130
Cortisol/DHEA ratio						
Crude	-0.235	(-1.30, -0.419)	<0.001	0.150	(0.077, 0.787)	0.017
Adjusted ^a	-0.267	(-1.45, -0.502)	<0.001	0.165	(0.062, 0.891)	0.024
Glucocorticoid/androgenic hormones ratio						
Crude	-0.247	(-1.44, -0.496)	<0.001	0.131	(0.024, 0.786)	0.037
Adjusted ^a	-0.265	(-1.55, -0.526)	<0.001	0.171	(0.082, 0.972)	0.020

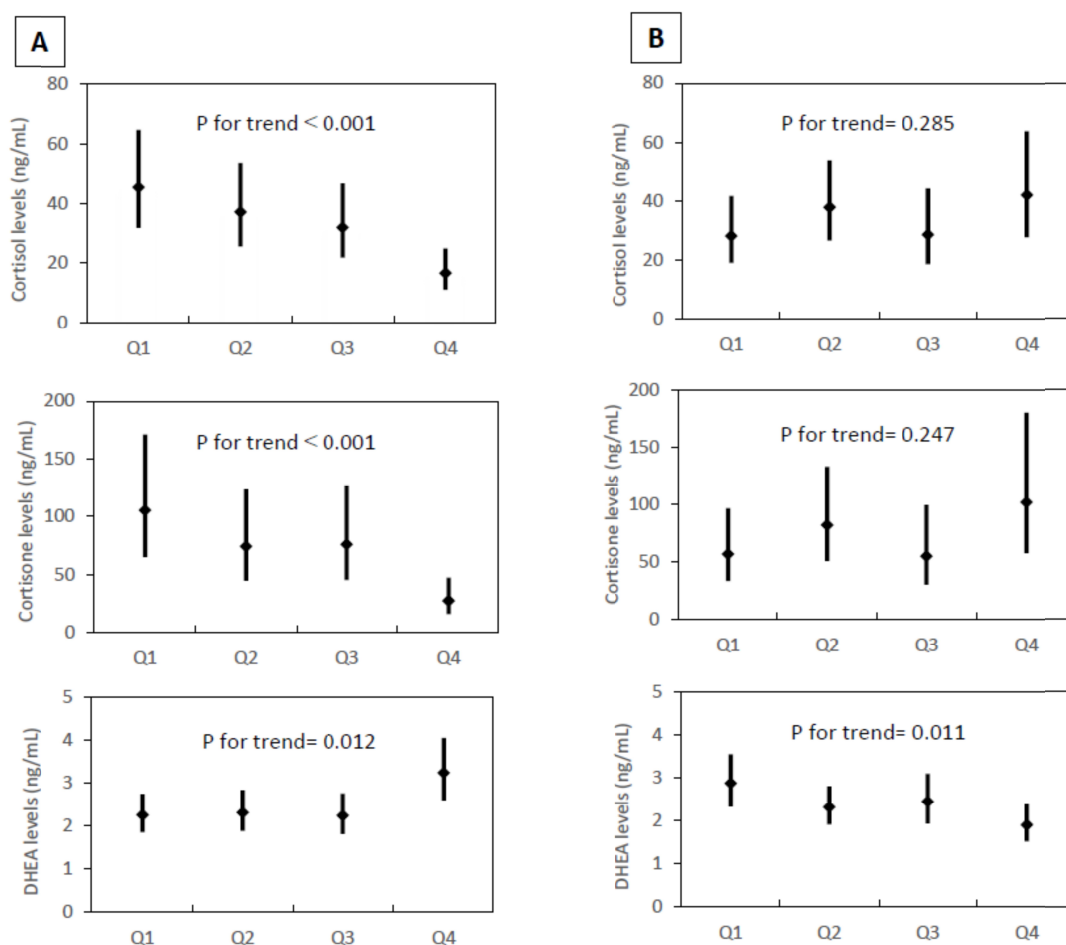
^aAdjusted for maternal age, parity, smoking, and caffeine intake during pregnancy, blood sampling period, and gestational age.

Both exposure and outcome measures were log₁₀ transformed.

Std β : standardized Beta

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. The dose-response relationship of prenatal PFOS (A) and PFOA (B) quartiles with glucocorticoid and DHEA levels in cord blood, Sapporo, Japan, 2002-2005 (n=251). The LSMs were adjusted for gestational age, maternal age, smoking, and caffeine intake during pregnancy, parity and the blood sampling period. The LSMs were back transformed from \log_{10} to normal values and the error bars depict the upper and lower 95% CI. Q = quartile.



胎児期の有機塩素系農薬曝露による児の臍帯血中性ホルモンへの影響

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 荒木 敦子 北海道大学・環境健康科学研究教育センター 准教授
研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学・環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科 助教
研究分担者 野々村 克也 北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科 名誉教授
研究分担者 松村 徹 いであ株式会社環境創造研究所 取締役・環境創造研究副所長

研究要旨

有機塩素系農薬(organochlorine pesticide; OCP)は内分泌攪乱作用が懸念されている。既にその長期残留性により 1970 年には生産中止となっているものの、2002 年から 2005 年に札幌の妊婦から採取した血液中からは、DDT をはじめと OCP が検出されている。OCP は成人では性ホルモンとの関連が報告されているが、胎児期曝露による報告はほとんどない。そこで、本研究は胎児期 OCP 曝露が児の性ホルモンに与える影響を明らかにすることを目的とした。

『環境と子どもの健康に関する北海道研究』札幌コーホートに登録した母児を対象とした。379 名の母体血中 DDT 類 6 物質、Drin 類 3 物質、Chlordane 類 5 物質、Heptachlor 類 3 物質、Hexachlorocyclohexane (HCH)類 4 異性体、Toxaphene 6 物質、および Mirex、Hexachlorobenzene (HCB)の合計 29 化合物を、GC/NCI MS および GC/HRMS で分析した。臍帯血中エストラジオール、総テストステロン(T)、プロゲステロン、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン、性ホルモン結合グロブリン、プロラクチン、インヒビン B、Insulin-like factor3 を測定した。検出率 80% 以上の 15 化合物について、性ホルモンとのデータがそろった男児 106 名、女児 126 名を解析に用いた。

最も高濃度検出されたのは p,p'-DDE(中央値 619.3 pg/g-wet)、ついで HCH(154.3 pg/g-wet)、HCB (104.0 pg/g-wet)だった。交絡要因を調整した重回帰分析で、男児では oxychlordan, trans-nonachlor, cis-heptachlorepoxyde (HCE), HCB, Mirex 濃度が高いとテストステロン濃度は低かった。また、Mirex は P4 と、Parlar-26 は T/E2 比と負の相関がみられた。p,p'-DDE、o,p'-DDE、p'-DDT、o,p'-DDT, Dieldrin, beta-HCH, Mirex, Parlar-50 濃度が高いとプロラクチン濃度は低かった。cis-Heptachlorepoxyde, HCB 濃度戦いと Inhibin B が低かった。一方女児では、o,p'-DDE、p,p'-DDE、o,p'-DDT 濃度が高いと E2 濃度が低く、p,p'-DDE は T/E2 とは正の相関が得られた。

日本では Mirex は未使用にもかかわらず、全母体血から検出された。OCP の胎児期曝露は、男児ではテストステロン濃度とプロラクチン量、Inhibin B を下げ、女児では E2 を下げる結果が得られた。男児で OCP が T を低下させることは成人男性の結果と一致していた。DDE は in vitro ではアロマターゼ活性を阻害し、E2 を下げる報告があり、女児の結果とは一致していた。しかし DDE は女児の思春期早発や初潮年齢を早める報告もあり、胎生期の E2 の低下がその後の発育への影響については、

追跡が必要である。統計的に多種類の化合物で繰り返し解析を行ったため、偶然有意の関連が出現した可能性がある。また、多くの化合物は互いに相関しており、有意差が見られた化合物についても、他の化合物の影響を排除できないことは限界である。

研究協力者

伊藤佐智子（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

三井 貴彦（山梨大学大学院医学工学総合研究部）

長 和俊（北海道大学病院周産母子センター）

水谷 太，菅木 洋一（いであ株式会社環境創造研究所）

A．研究目的

有機塩素系農薬 (Organochlorine Pesticides: OCPs) は DDT に代表される数種の殺虫剤であり [1]、第二次世界大戦後にわが国にも導入され、あるいは国内で開発されて広く使用されてきた。しかし、毒性や残留性が問題となり、残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants: POPs) としてストックホルム条約において規制されている。現在は 8 物質 (アルドリン、クロルデン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、ヘキサクロロベンゼン (HCB)、マイレックス、トキサフェン) が付属書 A に該当する廃絶物質で、製造・輸入が原則禁止されている。また、DDT は付属書 B による制限物質としてマラリア予防の必要な国でのみ一部の製造使用が認められている。日本ではマイレックス、トキサフェン、ヘキサクロロベンゼンが農薬登録されたことはなく、その他の物質も 1970 年代には登録が失効しておりその後は販売も使用も禁止されている。

DDT は抗アンドロゲ作用、エストロゲン作用が報告され、乳がんや前立腺が

んのリスクが報告されてきた [1]。しかし、OCP と性ホルモンとの関係についての報告は少ない。OCP は成人の横断研究では男性でテストステロン濃度との負の相関 [2, 3]、女性で LH や FSH との負の相関 [3]、生理周期の短縮が報告されている [4]。一方で、精子の質や性ホルモンとの関係はみられなかった報告もある [5-7]。前向き出生コホート研究では、最近のフランスの研究で、Endosulfan, heptachlorepoxide (HCE) が臍帯血中の SHBG とエストラジオール (E2) をあげ、テストステロン (T) を下げたことが報告された [8]。しかし、20 歳児の男性の精子の質や性ホルモンと DDE に関連はなかったと報告されている [9]。男児の停留精巣や尿道下裂などの先天奇形の影響も米国と一致した結果は得られていない [10, 11]。札幌出生コホート研究に登録する妊婦の血液中塩素系農薬を測定したところ、日本での DDT 使用中止からすでに 30 年を経ているにも関わらず妊婦の血液から検出され、その他未使用の OCP も含めて複数の OCP が検出された [12]。従って、曝露濃度は低いものの日本でも未だに OCP への胎児期曝露があることから、児への有害な影響の有無について明らかにする必要がある。本研究は胎児期 OCP 曝露が児の性ホルモンに与える影響を明らかにすることを目的とした。

B．研究方法

B-1. 研究対象

北海道札幌市の一産科病院を受診し

た妊婦とその児を対象に出生前向きコホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」札幌コホートを対象とした[13, 14]。札幌市およびその周辺に住む日本人で、2002年7月から2005年9月に産科を受診した妊婦1796名に研究への参加を依頼した。依頼した妊婦のうち、日本臍帯血バンク登録者（22%）と里帰りなど他施設での分娩（3%）予定者は研究対象から除外した。最終的に妊娠23週から35週の妊婦514名（28.6%）が研究に同意した。

B-2. 曝露評価

妊娠中期から後期に妊婦から母体血40mlを採取し、分析まで-80°Cで凍結保存した。分析したOCP29化合物は、*o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *cis*-chlordane, *trans*-chlordane, *cis*-nonachlor, *trans*-nonachlor, oxychlordane, aldrin, dieldrin, endrin, heptachlor, *cis*-HCE, *trans*-HCE, hexachlorobenzene (HCB), alpha-hexachlorocyclohexane (HCH), beta-HCH, gamma-HCH, delta-HCH, mirex, parlar-26, parlear-40, parlar-41, parlar-44, parlar-50, parlar-62である。内部標準物質としては、¹³C-ラベル体またはd-体を用いた（Cambridge Isotope Laboratory, Inc. Andover, MA, USA）。有機溶媒は、ダイオキシン測定グレードを用いた（関東化学株式会社、東京；和光純薬株式会社、大阪）。OCPの分析はいであ株式会社にてGC/NCI MSおよびGC/HRMSをもちいて実施した[12]。

B-3. アウトカム評価

分娩時に295名の臍帯血40mlが採取され、分析まで-80°Cで凍結保存した。臍帯血からエストラジオール(E2)、

総テストステロン(T)、プロゲステロン(P4)、をLC-MS/MS法、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)、およびプロラクチン(PRL)を免疫放射定量測定(IRMA)法、インヒピンBをELISA法、Insulin-like factor3 (INSL3)をEIA法で測定した。INSL3は男児全員と、女児は25名のみ測定した。性ホルモンの測定は全てあすか製薬メディカル(株)で実施した[15]。

B-4. 共変量

妊娠中期から後期に妊婦から自記式調査票により母の年齢、教育歴、世帯収入、妊娠中喫煙状況、妊娠中飲酒状況などの基本的情報を得た。児の在胎週数および出生時体重は、医療診療録より得た。

B-5. 解析

OCP及び性ホルモンデータがそろった男児106、女児126を解析に用いた。統計解析において、環境化学物質、ホルモンとも測定値が検出下限値(detection limit; DL)未満の検体には検出下限値の半値を代入して解析した。性ホルモンは、±3SDよりも大きい値は外れ値として除外した。個々の濃度に加えて、T/E2、T/SHBG、およびLH/Tを使用した。児の男女の性ホルモン濃度の差はMann-Whitney testで解析した。OCPと性ホルモンの両方が得られた対象者についてOCPとホルモンの相関をSpearman's rank correlation testで解析した。その後、 $p < 0.05$ の物質について、曝露を各化学物質、アウトカムを各性ホルモンとして、男女に層別化して重回帰分析を行った。重回帰分析においては、環境化学物質および性ホルモン濃度とも非正規分布を示したため、常用対数変換した値を用いた。

先行研究より、曝露およびアウトカムへの影響が考えられる母親の年齢、経産歴、児の在胎週数を共変量として調整した。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とし、統計解析は JMP Clinical 5 (SAS) 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内に設置された倫理審査委員会の承認を得ている。また、調査票冒頭に本調査の趣旨を明記するとともに、検査データ等の個人情報には厳重な管理をしたで扱われている。

C. 研究結果

1) 対象者の特徴

OCP および性ホルモンのデータがそろった 232 名の特徴を表 1 に示す。母の年齢は平均 ± 標準偏差が 30.45 ± 4.81 歳、妊娠前 BMI は 21.03 ± 2.92 だった。教育歴は 56.9%が高卒以上で、世帯年収は 500 万円未満が 71.6%。妊娠中も喫煙および飲酒を継続していたのはそれぞれ 18.1%、33.6%だった。初産が 51.7%、経膣分娩が 99.1%だった。これらの特徴はコホート全体の分布とほぼ同様だったが、帝王切開のみ 2 名と少なかった。これは、帝王切開による分娩時は臍帯血を採取することが困難だったことによる。母体血は妊娠中期から後期に実施したが、妊娠中に貧血であった 31.5%の妊婦からは分娩後に採取した。

児は男児が 45%で、出生時体重は 3130 ± 332.5 g、在胎週数は 39.32 ± 1.05 週であった。

2) 母体血中 OCP 濃度分布

表 2 に母体血中 OCP 濃度分布を示す。最も高濃度かつ高頻度で検出された化合物は、DDT の主要代謝物である

p,p'-DDE で中央値(25-75%値)は 619.26 (409-79-968.05) pg/mL で検出率は 100%だった。DDT 化合物としては、p,p'-DDT が 23.17 (16.22-33.94) pg/mL で 100% 検出、o,p'-DDT が 3.36(2.28-4.67)pg/mL で検出率は 96%だった。この他の DDT 代謝物は、濃度が低く o,p'-DDE が 1.25(0.72-1.78)pg/mL で検出率 86.6%、p,p'-DDD が 1.65(0.98-2.54) pg/mL で検出率 88.8%、o,p'-DDD は検出率が 14.2%だった。

このほかの化合物は、クロリダンの代謝物は、trans-nonachlor が 75.60 (52.09-110.54) pg/mL、oxychlordane が 40.04 (28.87-57.32) pg/mL、cis-Nonachlor が 10.37 (7.07-15.07) pg/mL でいずれも検出率 100%だった。ヘプタクロルとそのエポキシドは cis-HCE が 26.25 (18.81-37.45) pg/mL で検出率 100%だったが、heptachlor および trans-HCE はそれぞれ 0.9%、0%とほとんど検出されなかった。ディルドリンは 16.68 (12.16-22.21) pg/mL で 100%検出されたが、エンドリンは未検出だった。ベンゼンヘキサクロリド (HCH) は、-HCH が 154.31 (104.25-238.45) pg/mL で 100 検出されたが、このほかの異性体では、HCH が 68.5% (中央値 0.91 pg/mL)、-HCH が 57.3% (中央値 1.09 pg/mL)、-HCH が 1.3%と濃度・検出率とも低かった。

一方、日本では未使用の OCP も検出された。HCB は 103.99 (83.04-131.61) pg/mL、マイレックスは 6.04 (4.11-8.53) pg/mL でいずれも検出率は 100%だった。トキサフェンの中でも Parlar-26 と Parlar-50 は検出率がそれぞれ 97.0%、96.1%で、血中濃度も 4.46 (2.84-7.13) pg/mL、6.56 (4.30-9.86) pg/mL だった。Parlar-41, Parlar-40, Parlar-44, Parlar-62 は検出率ははず

れも 30%未満だった。

3) 臍帯血中性ホルモン濃度

臍帯血中性ホルモン濃度は、テストステロン、Inhibin B、INSL3 は男児の方が女児よりも有意に高かった。また、LH、FSH は女児ではほとんど検出されなかった。男女で明らかな性ホルモン濃度差があるため、OCP 曝露による影響は男女を層化して行った。

4) OCP 曝露と母児の特徴

表 3 に OCP と母児の特徴を示す。対象とした 15 化合物の OCP のうち、濃度は、母児の年齢と正の相関を示した。経産婦は初産婦よりも濃度が低かった。また、いくつかの OCP は母の妊娠前 BMI と正の相関を示し、また、教育歴が長いほう (>12 年以上) が短いよりも (<12 年)、年収が多いほうが (>500 万) 少ないよりも (<500 万)、非喫煙者が妊娠中の喫煙継続者よりも、妊娠中の飲酒者が非飲酒者よりも OCP 濃度が高かった。OCP と児の性別、出生体重、在胎週数と有意な関連はなかった。

5) 臍帯血中性ホルモンと母児の特徴

表 4 に性ホルモン値と母児の特徴を示す。幾つかの性ホルモンは母の年齢、妊娠歴との関連が見られた。

6) OCP 曝露と児の性ホルモンとの関連

表 5 に OCP と児の性ホルモンとの相関、表 6 に母の妊娠時の年齢、出産歴、および児の在胎週数で調整した重回帰分析の結果を示す。男児では oxychlordan, trans-nonachlor, cis-HCE, HCB, Mirex 濃度が高いと T が低かった。また、Mirex は P4 と、Parlar-26 は T/E2 比と負の相関がみられた。p,p'-DDE、o,p'-DDE、p'-DDT、o,p'-DDT, Dieldrin, beta-HCH, Mirex,

Parlar-50 濃度が高いとプロラクチン濃度は低かった。cis-HCE, HCB 濃度が高いと Inhibin B が低かった。一方女児では、o,p'-DDE、p,p'-DDE、o,p'-DDT 濃度が高いと E2 濃度が低く、p,p'-DDE は T/E2 とは正の相関が得られた。

D. 考察

本研究では、2002-2005 年に札幌市で妊娠した母の血液中 OCP を分析している。多くの OCP は既に 1970 年代には生産中止となり、その後 30 年以上経過しているにもかかわらず、DDT を始め多くの OCP が妊婦血液中から検出された。さらに、日本では Mirex、Parlar-26、Parlar-50 は未使用にもかかわらず、濃度そのものは中央値でそれぞれ 6.04 pg/mL, 4.46 pg/mL, 6.56 pg/mL と低いものの、95%以上の母体血から検出された。長期残留する特性から、輸入食材あるいは環境移送による曝露が懸念される[12]。

OCP の胎児期曝露は、男児ではテストステロン濃度とプロラクチン量、Inhibin B を下げ、女児では E2 を下げる結果が得られた。これまでに OCP と性ホルモンについては、胎児期曝露と臍帯血中性ホルモンについてはフランスの出生コホート研究からの報告が 1 報のみである。この研究では、臍帯血中の HCE と E2、SHBG との正の相関、HCB とテストステロン、T/E2 比との負の相関がみられた。HCB とテストステロンの負の相関については、本研究と同じ結果であった。本研究とフランスの研究の OCP 濃度を比較すると、DDE は本研究 619 pg/mL vs 185 pg/mL, HCB 105 pg/mL vs 33 pg/mL, HCE 26.3 pg/mL vs 10 pg/mL であった。母体血と臍帯血中濃度なので単純には比較できないが、ENRIECO のメタアナリシスで用いた DDE の母児移行換算式である、臍帯血中濃度=0.36 母

体全血中濃度とすると[16]、本研究とフランスの研究の OCP 曝露レベルはほぼ同程度と言えるのではないかと。また、OCP 成人の横断研究で、男性で Heptachlor と o,p'-DDT とテストステロンの負の相関[3]、DDE とでヒドロテストステロン、LH との負の相関[17]、および HCB とテストステロン、SHBG との負の相関が報告されている[2]。男児で OCP が T を低下させることは成人男性の結果とも一致していた。しかし、日本の妊婦の OCP 曝露濃度は、成人男性の研究が行われた 1989 年の妊婦やブラジルの成人の OCP 曝露と比較して 10 分の 1 以下である。本研究における曝露レベルで胎児の性ホルモンのかく乱が見られたことは驚くべきことであろう。

Inhibin B に関しては、ヨーロッパのコホート研究で DDE が Inhibin B と負の相関を示す報告がある[18]。また、プロラクチンについては、野生の白カモメの雄で塩素系化合物の濃度が高いとプロラクチンの分泌量が下がるという報告がある[19]。ヒトの胎児期曝露でも同様の影響が本当にあるのか、データの積み重ねが必要であろう。

DDE は in vitro ではアロマターゼ活性を阻害し、E2 を下げる報告があり、女兒の結果とは一致していた。しかし DDE はエストロゲン様作用が報告されており、女兒の思春期早発や初潮年齢を早める報告がある[20, 21]。胎生期の E2 の低下がその後の発育への影響については、追跡が必要である。

本研究の限界としては、15 の OCP 化合物について 9 つの性ホルモンとの解析を繰り返し実施しているために、統計学的に 10 回に 1 回は偶然 $p < 0.05$ となる可能性がある。第二に、多くの塩素系化合物は互いに相関している。従って、有意差が見られた化合物の性ホルモン値かく乱作用が、本当にその化

合物に由来するのか、他の化合物の影響を排除できないことがあげられる。

E . 結論

既に 30 年以上前に生産を中止している有機塩素系農薬 OCP に、2002-2005 年に妊娠した札幌市の女性が曝露していた。OCP への胎児期曝露レベルが高いと、出生時の男児のテストステロン、プロラクチン、Inhibin B を、女兒のエストラジオール値が有意に低かった。OCP は精子や初潮のタイミングなど、第二次性徴後の生殖機能への影響が既に報告されており、胎児期曝露による胎内ホルモン環境への影響がその後も継続するか、児の追跡が必要である。

F . 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

荒木敦子、宮下ちひろ、金澤文子、伊藤佐智子、三井貴彦、佐々木成子、水谷太、菅木洋一、野々村克也、岸玲子 . 「有機塩素系農薬への胎児期曝露による児の性ホルモン濃度への影響 - 北海道スタディ - 」第 85 回日本衛生学会学術総会 . 平成 27 年 3 月 26 - 28 日 . 和歌山市

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

引用文献

1. Beard, J., *DDT and human health*. Science of The Total Environment, 2006. **355**(1-3): p. 78-89.
2. Ferguson, K.K., et al., *Serum*

- concentrations of *p, p'*-DDE, HCB, PCBs and reproductive hormones among men of reproductive age. *Reproductive Toxicology*, 2012. **34**(3): p. 429-435.
3. Freire, C., et al., *Association between serum levels of organochlorine pesticides and sex hormones in adults living in a heavily contaminated area in Brazil*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2014. **217**(2-3): p. 370-378.
 4. Windham, G.C., et al., *Exposure to Organochlorine Compounds and Effects on Ovarian Function*. *Epidemiology*, 2005. **16**(2): p. 182-190
10.1097/01.ede.0000152527.24339.17.
 5. Haugen, T.B., et al., *Differences in serum levels of CB-153 and *p,p'*-DDE, and reproductive parameters between men living south and north in Norway*. *Reproductive Toxicology*, 2011. **32**(3): p. 261-267.
 6. Rignell-Hydbom, A., et al., *Exposure to CB-153 and *p,p'*-DDE and male reproductive function*. *Hum Reprod*, 2004. **19**(9): p. 2066-75.
 7. Stronati, A., et al., *Relationships between sperm DNA fragmentation, sperm apoptotic markers and serum levels of CB-153 and *p,p'*-DDE in European and Inuit populations*. *Reproduction*, 2006. **132**(6): p. 949-958.
 8. Warembourg, C., et al., *Exposure of pregnant women to persistent organic pollutants and cord sex hormone levels*. *Human Reproduction*, 2016. **31**(1): p. 190-198.
 9. Vested, A., et al., *In utero exposure to persistent organochlorine pollutants and reproductive health in the human male*. *Reproduction*, 2014. **148**(6): p. 635-46.
 10. Fernandez, M.F., et al., *Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study*. *Environ Health Perspect*, 2007. **115 Suppl 1**: p. 8-14.
 11. Pierik, F.H., et al., *Maternal pregnancy serum level of heptachlor epoxide, hexachlorobenzene, and β -hexachlorocyclohexane and risk of cryptorchidism in offspring*. *Environmental Research*, 2007. **105**(3): p. 364-369.
 12. Kanazawa, A., et al., *Blood persistent organochlorine pesticides in pregnant women in relation to physical and environmental variables in The Hokkaido Study on Environment and Children's Health*. *Sci Total Environ*, 2012. **426**: p. 73-82.
 13. Kishi, R., et al., *Ten years of progress in the Hokkaido birth*

- cohort study on environment and children's health: cohort profile—updated* 2013. Environmental Health and Preventive Medicine, 2013. **18**(6): p. 429-450.
14. Kishi, R., et al., *Cohort profile: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health in Japan*. International Journal of Epidemiology, 2011. **40**(3): p. 611-618.
15. Araki, A., et al., *Association between Maternal Exposure to di(2-ethylhexyl) Phthalate and Reproductive Hormone Levels in Fetal Blood: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health*. PLoS ONE, 2014. **9**(10): p. e109039.
16. Govarts, E., et al., *Birth Weight and Prenatal Exposure to Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE): A Meta-analysis within 12 European Birth Cohorts*. Environmental Health Perspectives, 2012. **120**(2): p. 162-170.
17. Emeville, E., et al., *Persistent Organochlorine Pollutants with Endocrine Activity and Blood Steroid Hormone Levels in Middle-Aged Men*. PLoS ONE, 2013. **8**(6): p. e66460.
18. Giwercman, A., et al., *Reproductive hormone levels in men exposed to persistent organohalogen pollutants: A study of Inuit and three European cohorts*. Environmental Health Perspectives, 2006. **114**(9): p. 1348-1353.
19. Verreault, J., et al., *Changes in prolactin in a highly organohalogen contaminated Arctic top predator seabird, the glaucous gull*. General and Comparative Endocrinology, 2008. **156**(3): p. 569-576.
20. Krstevska-Konstantinova, M., et al., *Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: evidence of previous exposure to organochlorine pesticides*. Human Reproduction, 2001. **16**(5): p. 1020-1026.
21. Vasiliu, O., J. Muttineni, and W. Karmaus, *In utero exposure to organochlorines and age at menarche*. Human Reproduction, 2004. **19**(7): p. 1506-1512.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表1 母児特徴 (N = 232).

		No.	Mean ± SD	%
Mother				
Age at delivery (years)		232	30.45 ± 4.81	
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		232	21.03 ± 2.92	
Educational level	≤12 years	100		43.1
	>12 years	132		56.9
Annual Household income	<5 million yen per year	166		71.6
	5 million yen per year	66		28.4
Smoking during pregnancy	No	190		81.9
	Yes	42		18.1
Alcohol consumption during preg	No	154		66.4
	Yes	78		33.6
Parity	0	120		51.7
	≥1	112		48.3
Type of delivery	Vaginal	230		99.1
	Caesarian section	2		0.9
Blood sampling period	During pregnancy	159		68.5
	After delivery	73		31.5
Measurement year of POPs	2007	32		13.8
	2008	58		25.0
	2009	23		9.9
	2010	9		3.9
	2011	22		9.5
	2012	37		15.9
	2013	51		22.0
Infant				
Sex	Male	106		45.7
	Female	126		54.3
Birth weight			3130.5 ± 332.5	
Gastational Age			39.32 ± 1.05	

BMI; body mass index

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表2. 母体血中OCP濃度 (n=232)

Persistent organochlorine pesticides	Detection limit (pg/g-wet)	Detection rate (%)	Percentile					
			Minimum	25th	50th	75th	Maximum	
	Aldrin	1.00	0.4	0.50	0.50	0.50	0.50	12.83
Chlordane	<i>cis</i> -Chlordane	0.70	62.1	0.35	0.35	1.15	2.29	17.53
Chlordane	<i>trans</i> -Chlordane	0.50	49.6	0.25	0.25	0.25	0.84	3.79
Chlordane	oxychlordane	0.90	100.0	7.93	28.87	40.04	57.32	250.94
Chlordane	<i>cis</i> -Nonachlor	0.40	100.0	1.63	7.07	10.37	15.07	37.58
Chlordane	<i>trans</i> -Nonachlor	0.50	100.0	13.45	52.09	75.60	110.54	513.52
DDT	o,p'-DDD	0.50	14.2	0.25	0.25	0.25	0.25	1.16
DDT	p,p'-DDD	0.40	88.8	0.20	0.98	1.65	2.54	9.04
DDT	o,p'-DDE	0.40	86.6	0.20	0.72	1.25	1.78	4.60
DDT	p,p'-DDE	0.60	100.0	99.52	409.79	619.26	968.05	2686.23
DDT	o,p'-DDT	0.60	96.6	0.30	2.28	3.36	4.67	17.15
DDT	p,p'-DDT	0.40	100.0	2.38	16.22	23.17	33.94	104.76
	Dieldrin	0.80	100.0	4.11	12.16	16.68	22.21	71.52
	Endrin	1.00	0.0	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Heptaclor	Heptachlor	0.80	0.9	0.40	0.40	0.40	0.40	1.14
Heptaclor	<i>trans</i> -HCE	1.00	0.0	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Heptaclor	<i>cis</i> -HCE	0.40	100.0	6.17	18.81	26.25	37.45	200.53
	HCB	0.90	100.0	34.94	83.04	103.99	131.61	245.48
HCH	-HCH	0.70	68.5	0.35	0.35	0.91	1.31	3.10
HCH	-HCH	0.60	100.0	19.95	104.25	154.31	238.45	717.67
HCH	-HCH	0.90	57.3	0.45	0.45	1.09	1.73	100.92
HCH	-HCH	0.70	1.3	0.35	0.35	0.35	0.35	1.11
	Mirex	0.50	100.0	0.88	4.11	6.04	8.53	30.11
Toxaphene	Parlar-26	1.00	97.0	0.50	2.84	4.46	7.13	20.82
Toxaphene	Parlar-41	0.70	28.4	0.35	0.35	0.35	0.73	1.96
Toxaphene	Parlar-40	2.00	0.9	1.00	1.00	1.00	1.00	2.43
Toxaphene	Parlar-44	2.00	2.2	1.00	1.00	1.00	1.00	2.77
Toxaphene	Parlar-50	2.00	96.1	1.00	4.30	6.56	9.86	29.29
Toxaphene	Parlar-62	6.00	0.0	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表3 OCP濃度と母児の特徴

Characteristics		n	oxychlorodane	cis-Nonachlor	trans-Nonachlor	9p-DDD	9p-DDE	9p-DDE	9p-DDE	9p-DDT	9p-DDT	9p-DDT
			Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
Mother	Age at delivery (years)		0.350**	0.267**	0.311**	0.137*	0.30	0.30	0.270**	0.09	0.102	
	Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		-0.093	0.89	-0.11	0.82	0.119	0.119	0.03	0.62	0.118	
Infant	Birth weight		-0.061	-0.87	-0.87	-0.87	0.05	0.05	0.02	0.22	0.25	
	Gestational Age		0.045	0.25	0.35	-0.13	0.39	0.39	0.17	0.66	0.37	
	Educational level		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
	<12 years	100	39.83 (27.1, 56.0)	9.88 (7.22, 14.64)	0.804	1.62 (0.88, 2.44)	0.479	1.16 (0.70, 1.71)	0.435	3.01 (2.09, 4.47)	0.106	21.59 (15.41, 32.84)
	>12 years	132	40.22 (28.87, 57.78)	10.78 (6.85, 15.13)	0.804	1.69 (1.03, 2.58)	0.479	1.33 (0.86, 1.86)	0.435	3.54 (2.42, 4.99)	0.106	25.32 (16.37, 34.77)
	Annual Household Income <5 million yen/year	166	39.07 (27.61, 56.0)	9.93 (6.71, 14.35)	0.023	1.62 (0.99, 2.53)	0.89	1.26 (0.71, 1.74)	0.309	3.27 (2.22, 4.66)	0.365	22.35 (16.38, 33.65)
	5 million yen/year	66	45.83 (30.02, 66.07)	11.91 (8.21, 15.98)	0.804	1.68 (0.98, 2.58)	0.89	1.23 (0.77, 2.05)	0.309	3.64 (2.41, 5.06)	0.365	24.18 (15.54, 38.90)
	Smoking during pregnancy		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
	No	190	40.31 (29.25, 57.0)	10.70 (7.17, 15.02)	0.295	1.61 (0.88, 2.57)	0.494	1.26 (0.73, 1.77)	0.798	3.46 (2.37, 4.66)	0.52	23.74 (16.38, 33.93)
	Yes	42	38.64 (23.48, 51.97)	8.94 (6.01, 15.10)	0.804	1.79 (1.07, 2.39)	0.494	1.17 (0.70, 1.84)	0.798	3.03 (1.79, 5.03)	0.52	21.09 (14.17, 34.22)
	Alcohol consumption during pregnancy		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
	No	154	40.13 (28.81, 58.0)	10.14 (6.90, 14.76)	0.658	1.62 (0.99, 2.55)	0.868	1.22 (0.69, 1.72)	0.129	3.10 (2.21, 4.67)	0.021	22.62 (15.54, 33.44)
	Yes	78	40.04 (28.87, 56.02)	11.04 (7.29, 15.25)	0.804	1.67 (0.87, 2.41)	0.868	1.27 (0.90, 1.87)	0.129	3.86 (2.56, 4.98)	0.021	24.14 (17.27, 33.98)
Mother	Parity		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
	0	120	42.99 (32.00, 60.0)	11.52 (7.50, 15.13)	0.034	1.64 (1.00, 2.52)	0.888	1.35 (0.81, 1.83)	0.09	3.39 (2.38, 4.67)	0.576	24.38 (17.17, 33.92)
	≥1	112	38.97 (26.35, 54.44)	9.5 (6.37, 14.06)	0.804	1.65 (0.91, 2.62)	0.888	1.13 (0.69, 1.71)	0.09	3.24 (2.22, 4.78)	0.576	21.98 (14.92, 34.69)
	Blood sampling period		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
	During pregnancy	159	39.19 (27.65, 55.0)	10.01 (7.06, 14.87)	0.266	1.51 (0.99, 2.28)	0.298	1.22 (0.73, 1.83)	0.919	3.42 (2.25, 4.72)	0.709	22.49 (15.57, 33.95)
	After delivery	73	44.66 (29.31, 60.98)	11.15 (6.88, 16.79)	0.804	1.76 (0.97, 2.84)	0.298	1.35 (0.71, 1.73)	0.919	3.36 (2.28, 4.48)	0.709	23.77 (19.33, 34.17)
	Type of delivery		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
	Vaginal	230	39.87 (28.87, 57.0)	10.33 (7.03, 15.04)	0.155	1.62 (0.98, 2.53)	0.159	1.25 (0.72, 1.77)	0.783	3.36 (2.27, 4.68)	0.731	22.84 (16.14, 33.93)
	Caesarian section	2	55.41 (40.2, 70.62)	18.84 (12.12, 25.55)	0.804	2.87 (2.23, 3.5)	0.159	1.40 (0.91, 1.88)	0.783	3.70 (3.03, 4.36)	0.731	36.58 (23.77, 49.38)
	Measurement year of POPs		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
	2007	32	40.78 (28.02, 60.0)	10.52 (7.14, 15.20)	0.017	1.16 (0.88, 1.66)	0.001	1.71 (1.18, 2.19)	<0.001	4.02 (2.86, 6.21)	0.004	29.49 (18.86, 41.40)
	2008	58	44.62 (31.72, 65.58)	12.04 (8.23, 18.11)	0.804	1.43 (0.81, 2.39)	0.001	1.40 (1.06, 1.88)	0.804	3.67 (2.62, 4.42)	0.004	24.62 (17.64, 37.90)
	2009	23	38.79 (19.41, 53.52)	9.74 (5.63, 11.47)	0.804	1.73 (0.97, 2.84)	0.804	1.11 (0.20, 1.49)	0.804	3.15 (2.18, 3.90)	0.004	19.66 (14.52, 26.03)
	2010	9	44.56 (27.94, 50.97)	11.48 (9.52, 15.95)	0.804	1.92 (0.88, 3.01)	0.804	0.99 (0.20, 1.17)	0.804	2.89 (1.63, 3.65)	0.004	23.38 (14.52, 28.57)
	2011	22	44.30 (32.28, 56.66)	11.12 (7.16, 19.25)	0.804	1.02 (0.63, 2.11)	0.804	1.15 (0.80, 2.44)	0.804	3.56 (2.24, 6.76)	0.004	25.51 (20.45, 39.58)
	2012	37	38.04 (26.11, 60.71)	8.74 (5.67, 12.48)	0.804	2.58 (1.53, 3.29)	0.804	0.71 (0.54, 1.26)	0.804	2.25 (1.32, 3.6)	0.004	19.21 (11.50, 25.09)
	2013	51	39.30 (26.30, 53.89)	10.20 (6.93, 14.96)	0.804	1.77 (1.17, 2.04)	0.804	1.14 (0.69, 1.83)	0.804	3.54 (2.41, 5.71)	0.004	27.88 (17.40, 35.03)
Infant	Sex		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
	Male	106	40.22 (29.26, 57.0)	10.29 (7.11, 15.11)	0.984	1.70 (1.04, 2.35)	0.799	1.18 (0.72, 1.66)	0.448	3.39 (2.42, 4.42)	0.815	23.90 (16.56, 33.88)
	Female	126	39.87 (28.34, 57.15)	10.42 (6.80, 15.04)	0.804	1.60 (0.93, 2.66)	0.799	1.30 (0.72, 1.87)	0.448	3.36 (2.20, 4.97)	0.815	21.96 (15.78, 34.45)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表3 OCP濃度と母児の特徴(続き)

Characteristics	n	Dieldrin	cis-HCH	HCB	-HCH	Mirex	Parlar-26	Parlar-50
Mother								
Age at delivery (years)		108	0.254**	119	0.464**	0.513**	0.176**	0.181**
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		0.221**	0.177**	101	0.147*	-0.074	0.240**	0.240**
Birth weight		-0.049	-0.101	-0.066	-0.128	-0.03	-0.024	-0.022
Gestational Age		-0.035	-0.082	0.052	0.061	0.027	0.024	-0.018
		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
Educational level		100 16.55 (12.52, 22.0)	26.07 (18.56, 40.28)	101.71 (80.26, 136.0)	154.79 (96.08, 262.0)	5.99 (4.08, 8.34)	4.85 (3.17, 7.55)	7.02 (4.61, 10.28)
	>12 years	132 16.80 (12.11, 21.59)	26.91 (18.96, 37.13)	106.79 (86.26, 167.25)	154.31 (109.21, 220.69)	6.11 (4.31, 8.59)	4.05 (2.56, 6.68)	6.50 (3.88, 9.48)
Annual Household Income	<5 million yen/year	166 15.93 (12.02, 20.9)	26.07 (18.44, 35.00)	102.17 (80.36, 125.0)	153.64 (100.87, 290.1)	5.76 (3.88, 7.79)	4.32 (2.89, 6.82)	6.48 (4.25, 9.48)
	5 million yen/year	66 17.89 (12.60, 24.41)	26.55 (19.17, 43.07)	111.51 (85.53, 145.40)	165.66 (113.97, 279.53)	7.44 (4.82, 11.64)	5.22 (3.14, 7.61)	7.69 (4.33, 11.64)
Smoking during pregnancy	No	190 16.86 (12.35, 22.0)	26.79 (19.14, 37.90)	103.82 (83.69, 131.0)	158.46 (103.79, 240.6)	6.16 (4.51, 8.61)	4.50 (2.84, 6.60)	6.82 (4.32, 9.74)
	Yes	42 15.51 (11.41, 21.31)	24.39 (16.80, 35.42)	104.48 (74.82, 132.31)	150.87 (103.84, 184.91)	5.69 (3.73, 7.82)	4.23 (2.73, 8.24)	5.88 (3.75, 11.43)
Alcohol consumption during pregnancy	No	154 16.80 (12.14, 22.0)	27.18 (18.91, 39.08)	105.46 (81.20, 133.0)	162.80 (104.40, 240.4)	6.04 (4.11, 8.38)	4.19 (2.82, 6.82)	6.40 (4.28, 9.58)
	Yes	78 16.35 (12.42, 21.66)	24.82 (18.42, 35.69)	99.34 (86.16, 130.72)	146.89 (102.56, 202.87)	6.09 (4.11, 8.61)	4.54 (2.91, 7.58)	7.32 (4.44, 10.56)
Parity	0	120 17.16 (12.52, 21.0)	26.79 (19.16, 36.85)	109.93 (91.03, 131.0)	165.19 (114.52, 270.0)	5.98 (4.14, 8.81)	5.23 (2.96, 7.20)	7.54 (4.54, 9.99)
	>1	112 16.35 (12.05, 22.66)	25.17 (18.19, 40.63)	95.36 (72.71, 129.15)	143.66 (90.00, 211.57)	6.19 (4.11, 8.47)	4.02 (2.72, 6.68)	5.94 (3.85, 9.66)
Blood sampling period	During pregnancy	159 17.59 (12.39, 22.0)	26.44 (18.91, 38.12)	104.06 (85.45, 131.0)	154.13 (108.08, 210.9)	5.88 (4.07, 7.86)	4.50 (2.93, 7.08)	7.16 (4.25, 9.72)
	After delivery	73 15.51 (12.06, 21.32)	25.10 (18.50, 36.78)	103.73 (75.77, 138.73)	158.62 (94.33, 254.44)	6.76 (4.54, 10.19)	4.33 (2.56, 7.49)	6.42 (4.45, 10.72)
Type of delivery	Vaginal	230 16.61 (12.16, 22.0)	26.15 (18.76, 37.42)	103.99 (82.85, 131.0)	154.31 (104.40, 240.7)	6.04 (4.11, 8.51)	4.41 (2.84, 7.09)	6.55 (4.28, 9.79)
	Cesarean section	2 18.66 (16.82, 20.60)	36.20 (28.96, 44.14)	134.17 (85.55, 182.79)	154.45 (69.50, 240.39)	13.99 (4.84, 23.14)	7.67 (5.34, 10.00)	10.15 (7.63, 12.67)
Measurement year of POPs	2007	32 17.66 (12.33, 25.0)	26.30 (18.96, 44.74)	104.75 (85.58, 133.0)	167.85 (124.37, 260.0)	6.29 (4.10, 9.48)	5.69 (4.41, 9.18)	8.76 (6.26, 13.91)
	2008	58 19.34 (14.29, 23.60)	29.54 (23.84, 41.88)	115.05 (92.00, 137.99)	159.03 (102.13, 273.0)	7.18 (4.98, 10.32)	5.79 (3.47, 8.10)	8.49 (5.49, 12.61)
	2009	23 14.85 (11.80, 16.67)	21.73 (15.67, 31.26)	90.48 (67.89, 135.85)	127.72 (50.51, 180.76)	4.32 (2.71, 6.92)	3.67 (3.16, 4.43)	5.33 (4.32, 6.73)
	2010	9 20.07 (15.95, 20.91)	36.66 (24.19, 41.30)	107.46 (82.55, 145.26)	108.65 (77.16, 171.69)	6.8 (5.62, 8.10)	5.63 (2.90, 6.78)	7.66 (6.09, 9.16)
	2011	22 18.02 (12.72, 28.77)	32.53 (22.23, 39.82)	124.98 (92.86, 144.27)	179.66 (109.89, 279.67)	7.25 (4.88, 10.00)	4.91 (2.31, 7.88)	8.58 (4.04, 12.07)
	2012	37 12.80 (9.01, 19.27)	20.50 (15.27, 34.12)	85.55 (66.94, 107.31)	129.34 (86.86, 192.98)	4.84 (3.72, 47.79)	2.87 (2.10, 4.27)	5.12 (3.46, 6.45)
	2013	51 15.98 (12.17, 20.83)	24.94 (18.48, 32.97)	102.89 (86.36, 134.96)	176.97 (113.61, 247.11)	5.81 (4.08, 7.78)	3.60 (2.84, 6.78)	5.22 (3.84, 8.60)
Infant								
Sex	Male	106 15.92 (12.07, 22.0)	26.39 (19.22, 40.80)	101.76 (85.53, 131.0)	153.65 (107.63, 240.9)	6.04 (4.53, 8.94)	4.50 (2.91, 6.96)	6.64 (4.33, 10.27)
	Female	126 17.07 (12.51, 21.98)	26.15 (18.49, 35.42)	104.60 (78.58, 133.0)	155.04 (102.56, 240.78)	6.04 (4.03, 8.41)	4.24 (2.73, 7.36)	6.50 (4.25, 9.74)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表4-1. 性別ホルモンと母児の特徴(男児)

Characteristics	Boys		T	P4	SHBG	PRL	T/SHBG	LH	FSH	LHT	InhibinB	p-value
	E2	p-value										
Maternal characteristics												
Age at delivery (years)	-0.213	0.033	0.062	-0.204	0.037	-0.086	0.330	0.827	0.122	0.050	0.618	0.943
Pre-pregnancy BM (m2/kg)	0.071	0.479	0.118	-0.066	0.385	-0.159	0.106	0.439	0.122	0.05	0.618	-0.090
Parity	5.72 (3.99-8.39)	0.007	0.007	252.7 (204.3-322.0)	0.01	17.2 (14.6-19.9)	0.019	0.308	0.127	0.571	0.697	-0.09
	4.21 (2.86-6.06)			208.1 (167.8-264.6)		15.3 (13.3-16.2)			0.987			0.368
Annual household income (million yen)	0.249	0.249	0.566		0.733	0.335	0.828	0.828	0.636	0.689	0.949	0.401
												0.866
Educational level		0.586	0.797	263.3 (192.4-308.0)	0.101	0.657	0.885	0.885	0.532	0.83	0.83	0.81
				219.3 (178.5-259.5)								0.932
Smoking consumption during pregnancy		0.123	0.464		0.793	15.9 (13.3-18.7)	0.062	0.137	0.801	0.073	0.758	0.105
						19.0 (15.6-20.2)						
Alcohol consumption during pregnancy		0.926	0.066		0.49	0.555	0.073	0.073	0.834	0.182	0.83	0.875
Infant characteristics												
Birth weight (g)	0.092	0.361	-0.061	0.103	0.295	0.028	0.774	-0.003	0.973	-0.138	0.169	0.423
Gestational age (wks)	-0.112	0.266	-0.199	-0.041	0.675	0.197	0.044	0.094	0.344	-0.103	0.015	-0.233
									-0.077	0.445	0.879	0.018

表4-1. 性別ホルモンと母児の特徴(男児)

Characteristics	Boys		T	P4	SHBG	PRL	T/SHBG	LH	FSH	LHT	InhibinB	p-value
	E2	p-value										
Maternal characteristics												
Age at delivery (years)	-0.111	0.222	0.017	-0.073	0.422	-0.046	0.618	0.192	0.034	-0.165	0.1422	0.7652
Pre-pregnancy BM (m2/kg)	-0.154	0.089	-0.089	0.012	0.698	0.04	0.663	0.102	0.266	-0.111	0.224	0.888
Parity	5.17 (3.66-7.65)	0.005	0.005	245.6 (192.5-305.0)	0.006	16.6 (13.9-18.3)	0.016	0.001	0.888	0.462	0.743	0.368
	3.32 (2.89-5.76)			195.4 (162.6-246.2)		15.5 (12.5-16.6)				0.438	0.26	0.781
Annual household income (million yen)	0.098	0.098	0.686	68.6 (51.2-93.9)	0.387	0.537	0.767	0.767	0.437	0.367	0.89	0.89
				207.5 (170.6-275.8)	0.534	12.2 (9.0-15.4)			4.37	12.8	0.89	0.89
Educational level		0.693	0.34		0.111	81.1 (60.8-115.0)	0.025	0.512	0.512	0.481	0.481	0.481
						15.5 (13.9-17.7)			4.51	11.4	0.481	0.481
Smoking consumption during pregnancy		0.109	0.47		0.468	86.0 (64.8-116)	0.069	0.201	0.661	0.797	0.512	0.512
						15.3 (12.4-17.3)			6.43	13.4	0.512	0.512
Alcohol consumption during pregnancy		0.338	0.748		0.918	86.7 (60.2-116)	0.003	0.144	4.40	0.406	0.512	0.512
						15.2 (12.5-17.5)			4.40	0.406	0.512	0.512
Educational level		0.338	0.748		0.918	86.7 (60.2-116)	0.003	0.144	4.40	0.406	0.512	0.512
						15.2 (12.5-17.5)			4.40	0.406	0.512	0.512
Smoking consumption during pregnancy		0.338	0.748		0.918	86.7 (60.2-116)	0.003	0.144	4.40	0.406	0.512	0.512
						15.2 (12.5-17.5)			4.40	0.406	0.512	0.512
Alcohol consumption during pregnancy		0.338	0.748		0.918	86.7 (60.2-116)	0.003	0.144	4.40	0.406	0.512	0.512
						15.2 (12.5-17.5)			4.40	0.406	0.512	0.512
Infant characteristics												
Birth weight (g)	0.081	0.503	0.102	-0.003	0.971	0.036	0.697	0.013	0.883	-0.1212	0.128	0.128
Gestational age (wks)	-0.05	0.583	-0.031	-0.144	0.109	0.002	0.767	0.041	0.653	-0.18	0.049	0.6344

表4-1. 性別ホルモンと母児の特徴(男児)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表5 OCPと性ホルモンの相関		oxychlorodane		cis-Nonachlor		trans-Nonachlor		pp'-DDD		op'-DDE		pp'-DDE		op'-DDT		pp'-DDT		
		p-value		p-value		p-value		p-value		p-value		p-value		p-value		p-value		
Male																		
Estradiol (ng/mL)	-0.1262	0.1976	-0.1156	0.238	-0.135	0.1677	-0.0884	0.3673	0.0373	0.704	0.0585	0.5512	0.0502	0.6094	-0.0409	0.6775		
Testosterone (pg/mL)	-0.0683	0.4867	-0.0259	0.792	-0.0638	0.5158	-0.0546	0.5785	-0.0372	0.7046	-0.0255	0.7949	-0.0041	0.9669	-0.0145	0.8825		
T/E2	0.1296	0.1855	0.0978	0.3187	0.097	0.3228	0.0764	0.4361	-0.0884	0.3673	0.0173	0.8599	-0.0562	0.5673	0.041	0.6767		
Progesterone (ng/mL)	0.0655	0.505	-0.034	0.729	0.0355	0.718	-0.0534	0.5863	-0.0199	0.8399	-0.1138	0.2455	-0.1023	0.2966	-0.0278	0.7773		
LH (mIU/mL)	0.0974	0.3275	0.0999	0.3154	0.1113	0.2629	-0.0128	0.898	0.0422	0.6724	0.1143	0.2503	0.081	0.4159	0.0143	0.8861		
LH/T	0.132	0.1837	0.1164	0.2417	0.1402	0.1579	0.0149	0.8814	0.0727	0.4653	0.1167	0.2403	0.081	0.4161	0.0483	0.6278		
FSH (mIU/mL)	0.1135	0.2537	0.2097	0.0335	0.13	0.1907	0.0766	0.4421	0.0657	0.5094	0.1938	0.0498	0.106	0.2865	0.1684	0.089		
SHBG (nmol/L)	0.006	0.951	-0.0778	0.4279	0.0087	0.9296	0.1069	0.2755	-0.0919	0.3489	-0.0343	0.7274	-0.1177	0.2297	-0.046	0.6398		
T/SHBG	-0.0958	0.3287	-0.022	0.8227	-0.1047	0.2854	-0.1399	0.1525	0.0031	0.9749	0.0049	0.96	0.037	0.7065	-0.0092	0.9257		
PRL (ng/mL)	0.0285	0.7754	-0.0976	0.3268	0.0037	0.9706	0.0826	0.4069	-0.1887	0.0562	-0.2541	0.0096	-0.2958	0.0024	-0.126	0.2049		
Inhibin B (pg/mL)	0.0141	0.8856	-0.0998	0.3086	-0.0258	0.7929	-0.0638	0.5159	-0.1575	0.107	-0.184	0.059	-0.1786	0.067	-0.1508	0.1228		
INSL3 (ng/mL)	-0.003	0.9759	0.0672	0.5003	0.0117	0.9064	-0.1111	0.2639	0.0008	0.9935	-0.1387	0.1623	-0.0343	0.7308	0.0595	0.5508		
Female																		
Estradiol (ng/mL)	0.0596	0.5072	0.0505	0.5741	0.056	0.5331	-0.123	0.17	-0.1487	0.0965	-0.1466	0.1014	-0.1837	0.0394	-0.0928	0.3012		
Testosterone (pg/mL)	-0.0301	0.7383	-0.0168	0.8516	-0.0255	0.7766	-0.0809	0.3677	-0.1289	0.1503	-0.0303	0.7364	-0.1069	0.2336	-0.0073	0.9353		
T/E2	-0.0487	0.588	-0.0457	0.6113	-0.043	0.6324	0.0347	0.6998	0.0654	0.4668	0.1106	0.2175	0.1226	0.1715	0.1137	0.2049		
Progesterone (ng/mL)	0.115	0.1998	0.2077	0.0196	0.1515	0.0905	0.2023	0.8212	-0.034	0.7053	-0.0791	0.3788	-0.0894	0.3192	0.0333	0.7115		
SHBG (nmol/L)	0.0288	0.7488	0.0255	0.7772	0.0203	0.8212	0.0375	0.6769	-0.0533	0.5532	0.0223	0.8045	-0.0657	0.4648	-0.0473	0.5989		
T/SHBG	-0.0424	0.6375	-0.0547	0.5433	-0.0528	0.5568	-0.0942	0.2943	-0.1053	0.2405	-0.0624	0.4878	-0.0763	0.396	-0.0056	0.9508		
PRL (ng/mL)	0.0163	0.858	0.0349	0.7017	0.0165	0.8566	0.0717	0.4308	-0.0696	0.4441	0.0265	0.7715	-0.0561	0.5376	-0.0378	0.678		
Male																		
Estradiol (ng/mL)	0.0342	0.7277	-0.0621	0.5271	-0.0229	0.8159	-0.0729	0.4578	-0.237	0.0144	0.0342	0.7275	-0.0189	0.8475				
Testosterone (pg/mL)	0.0411	0.6754	-0.014	0.8867	-0.103	0.2933	-0.0518	0.598	-0.1394	0.1541	0.0658	0.5026	0.0274	0.78				
T/E2	-0.0403	0.6819	0.1033	0.2919	-0.0101	0.9181	0.1364	0.1632	0.164	0.0931	0.0002	0.9982	0.0353	0.7191				
Progesterone (ng/mL)	-0.0908	0.3547	-0.0086	0.9299	0.0743	0.4489	-0.0604	0.5384	-0.116	0.2362	-0.0735	0.4542	-0.0539	0.5831				
LH (mIU/mL)	-0.0118	0.9061	-0.0173	0.8621	-0.0318	0.7502	0.1006	0.3118	0.1506	0.1289	0.08	0.4219	0.0414	0.6782				
LH/T	-0.0009	0.9928	0.0147	0.8831	0.0718	0.4712	0.1259	0.205	0.2097	0.0335	0.0255	0.7979	0.0294	0.7684				
FSH (mIU/mL)	0.0487	0.625	0.0944	0.343	0.1347	0.1751	0.2257	0.0219	0.2506	0.0107	0.1739	0.0789	0.2039	0.0388				
SHBG (nmol/L)	-0.1125	0.251	-0.027	0.7838	-0.0862	0.3795	-0.0261	0.7902	-0.0916	0.3502	-0.0859	0.3812	-0.1323	0.1764				
T/SHBG	0.0688	0.4836	-0.0314	0.7493	-0.0453	0.645	-0.0202	0.8369	-0.0983	0.3163	0.0645	0.5111	0.0647	0.5102				
PRL (ng/mL)	-0.1649	0.096	-0.0621	0.5335	-0.1244	0.2105	-0.1061	0.2863	-0.0929	0.3508	-0.1035	0.298	-0.1272	0.2003				
Inhibin B (pg/mL)	-0.2002	0.0396	-0.1406	0.1505	-0.1975	0.0424	-0.1363	0.1636	-0.0929	0.8914	-0.2482	0.0103	-0.2291	0.0182				
INSL3 (ng/mL)	-0.0112	0.9104	0.0035	0.9723	-0.0068	0.9458	-0.0578	0.5617	0.0065	0.948	-0.0648	0.5157	0.0107	0.9146				
Female																		
Estradiol (ng/mL)	0.0429	0.6336	0.0954	0.2878	-0.01	0.9114	-0.0431	0.6316	0.0254	0.7775	0.0008	0.9928	0.001	0.9914				
Testosterone (pg/mL)	-0.0212	0.814	0.072	0.4233	-0.007	0.9383	0.001	0.9912	-0.0741	0.4096	-0.0364	0.686	-0.0327	0.7159				
T/E2	-0.0279	0.7565	-0.0191	0.8322	-0.0012	0.9898	0.0738	0.4113	-0.0764	0.3952	-0.0186	0.8362	-0.0068	0.9395				
Progesterone (ng/mL)	0.1737	0.0517	0.1936	0.0299	0.1464	0.1018	0.0226	0.8016	0.1387	0.1213	0.1613	0.0711	0.1718	0.0544				
SHBG (nmol/L)	0.0017	0.9849	0.0554	0.5377	0.0353	0.6951	0.1137	0.205	0.0796	0.3758	0.0603	0.5027	0.0453	0.6146				
T/SHBG	-0.0696	0.4389	-0.0134	0.882	-0.0282	0.7535	-0.061	0.4976	-0.0802	0.3717	-0.0894	0.3194	-0.07	0.436				
PRL (ng/mL)	-0.1265	0.1633	-0.0168	0.8541	-0.0004	0.9965	-0.0443	0.6266	0.0449	0.6216	-0.024	0.7922	-0.0056	0.9507				
Spearman's																		
n.d.: not determined																		

胎児期の有機塩素系農薬（OCP）曝露が母児の甲状腺ホルモンに及ぼす影響

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 松村 徹 いであ株式会社環境創造研究所 取締役・環境創造研究副所長
研究分担者 荒木 敦子 北海道大学・環境健康科学研究教育センター 准教授
研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学・環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

胎児期には甲状腺ホルモンが身体や脳の発育を調整する。一方、高濃度の有機塩素系農薬への胎児期曝露は児の発達に悪影響を与えることも指摘されている。そこで本研究では、有機塩素系農薬の胎児期曝露が母児の甲状腺ホルモンの濃度に影響を与えるかどうかについて検討する。札幌市の一産院でリクルートした妊婦 514 名のうち、379 名の母体血中有機塩素系農薬を測定した。有機塩素系農薬 29 種類について、ガスクロマトグラフィー/陰イオン化学イオン化質量分析計および高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計法により一斉分析を行った（いであ(株)環境創造研究所）。有機塩素系農薬 29 種類のうち、検出率が 80%以上であった 15 種類を自然対数に変換した後、統計解析した。有機塩素系農薬および甲状腺ホルモンのデータがそろっており、双胎および甲状腺関連疾患を治療中の場合を除いた母 340 名、児 365 名について解析を行った。TSH および FT4 については自然対数に変換した後、母については分娩時年齢、妊娠前 BMI、妊娠中の喫煙、海藻摂取頻度、甲状腺ホルモンおよび OCP 測定における血液採取時期で調整して重回帰分析を行った。同様に、児については在胎週数、性別、出生時体重、甲状腺ホルモン測定のための血液採取時期で調整を行った。交絡要因を調整した重回帰分析の結果、母児ともに TSH への影響は認められなかった。一方で、母体血中の o,p'-DDE、o,p'-DDT および Dieldrin の増加に伴って母の FT4 が減少し、cisNonachlor、p,p'-DDT、および Parlar50 の増加に伴って新生児の FT4 が増加した。有機塩素系農薬への曝露が母児の甲状腺機能に影響する可能性が示された。

研究協力者

山崎 圭子（北海道大学環境健康科学研究教育センター）
水谷 太、 菅木 洋一（いであ株式会社環境創造研究所）

A. 研究目的

難分解性の有機塩素系農薬は、内分泌攪乱作用を持つことが懸念されている。近年、

有機塩素系農薬への胎児期曝露は、乳幼児期の精神運動発達を遅延させることや（Boucher et al., 2013, Torres-Sanchez et al., 2007, Eskenazi et al., 2006）、出生時体重を減少させること（Keizos et al., 2013）などが示されており、児の成長・発達に悪影響を与えることが指摘されている。そのような悪影響を介するメカニズムの一つとして、母児の甲状腺ホルモンの変動が考え

られている。例えば、胎児期に母の甲状腺ホルモンの異常がある場合には、児の神経発達への悪影響が発生する（Haddow, 1999）。

有機塩素系農薬への曝露による甲状腺ホルモンの変動を調べた先行研究では、妊婦の血液中濃度への影響（Lopez-Espinosa et al., 2009）、臍帯血中濃度への影響（Asawasinsopon et al., 2006）、出生後の児の血中濃度への影響（Kim et al., 2015）などが報告されている。しかし一方で、胎児期の曝露では児の甲状腺ホルモンへの影響は観察されなかったという報告もあり（Keizos et al., 2013）、一貫しない。

このことの原因の一つとして、農薬への曝露濃度の違いがあるかもしれない。たとえば、母体血中の p,p'-DDE の中央値を比較した場合、Kim ら（2015）では 55.2ng/g lipid であるが、Keizos ら（2013）では 38.7ng/mL であるが、本研究と同一コホートの結果である Kanazawa ら（2012）では 0.61 ng/g wet であった。表示単位が違うために単純比較は難しいが、本コホートでは有機塩素系農薬への曝露濃度は海外と比較して低濃度であることが想定される。

そこで本研究は、低濃度の有機塩素系農薬の胎児期曝露が、母児の甲状腺ホルモンレベルに及ぼす影響について検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象者は 2002 年 7 月から 2005 年 10 月の期間に札幌市の一産科医療機関を受診した妊娠 23 週から 35 週の妊婦で、インフォームドコンセントが得られ、前向き出生コホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」に参加登録した母児 514 組であった。自記式調査票により、妊婦とその配偶者から、既往歴、教育歴、世

帯収入、ライフスタイルなどを、医療診療録から母児の分娩情報、児の出生時所見、出生時体格（体重、身長、頭囲）や在胎日数などを得た。

有機塩素系農薬の濃度は、妊娠中期から後期の、379 名の母体血を用いて行った。ジクロロジフェニルトリクロロエタン (DDT) 類 6 物質 (o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT)、ドリノ (Drin) 類 3 物質 (Aldrin, Dieldrin, Endrin)、クロルデン (Chlordane) 類 5 物質 (cis-Chlordane, trans-Chlordane, oxychlordane, cis-Nonachlor, trans-Nonachlor)、ヘプタクロル (Heptachlor) 類 3 物質 (Heptachlor, trans-Heptachlorepoxyde, cis-Heptachlorepoxyde)、ヘキサクロロシクロヘキサン (Hexachlorocyclohexane) 類 4 異性体 (-HCH, -HCH, -HCH, -HCH)、マイレックス (Mirex)、トキサフェン (Toxaphene) 6 物質 (Parlar-26, 41, 40, 44, 50, 62) およびヘキサクロロベンゼン (Hexachlorobenzene : HCB) の合計 29 種類について、ガスクロマトグラフィー/負イオン化学イオン化質量分析計 (GC/NCI MS) および高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/HRMS) 法により一斉分析を行った。有機塩素系 29 種類のうち、検出率が 80% 以上であった 15 種類について以降の解析を行った。母児甲状腺ホルモン値 (TSH, FT4) は、札幌市が実施しているマススクリーニングの結果を用いた。有機塩素系農薬および甲状腺ホルモンについては自然対数に変換した後、統計解析した。

有機塩素系農薬および甲状腺ホルモンのデータがそろっており、双胎および甲状腺関連疾患を治療中の場合を除いた母 340 名、児 365 名について解析を行った。母につい

ては分娩時年齢、妊娠前 BMI、妊娠中の喫煙、海藻摂取頻度、甲状腺ホルモンおよび OCP 測定における血液採取時期で調整して重回帰分析を行った。同様に、児については在胎週数、性別、出生時体重、甲状腺ホルモン測定のための血液採取時期で調整した。

（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。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

属性および甲状腺ホルモン値を表 1 に示す。母親の平均年齢は、31.3 ($SD = 4.7$) 歳であった。また妊娠中の平均 BMI が 21.2 ($SD = 3.2$) で TSH との正の相関が有意であった ($r = .13, p < .05$)。甲状腺ホルモン測定時期は平均日数 79.6 ($SD = 15.6$) であり、TSH ($r = .20, p < .01$) および FT4 ($r = -0.24, p < .01$) との相関が有意であった。男児は 170 名 (46.6%)、女児は 195 名 (53.4%) であり、男女間での甲状腺ホルモン値に違いはなかった。妊娠日数の平均値は 275.4 ($SD = 10.1$) であり、TSH ($r = 0.14, p < .05$) および FT4 ($r = 0.16, p < .01$) と相関が有意であった。出生体重については、平均が 3063g ($SD = 382.6$) であり、FT4 の値とのみ正の相関が有意であった ($r = 0.21, p < .01$)。児の甲状腺ホルモンの測定時期についても平均が出生後 4.4 日 ($SD = 0.9$) であり、FT4 の値とのみ正の相関が有意であった ($r = -0.17, p < .01$)。

有機塩素系農薬の濃度を表 2 に示す。中

央値 (pg/g-wet) は、それぞれ、oxychlordane (39.2), cisNonachlor (9.8), transNonachlor (70.5), p,p'-DDD (1.5), o,p'-DDE (1.3), p,p'-DDE (637.8), o,p'-DDT (3.5), p,p'-DDT (22.7), Dieldrin (16.3), cis-Heptachlorepoxide (26.1), HCB (101.1), -HCH (153.1), Mirex (5.9), Parlar26 (4.3), Parlar50 (6.4) であった。

有機塩素系農薬と母の甲状腺ホルモンについての重回帰分析の結果を表 3 に示す。TSH については、いずれの有機塩素系農薬との関連性も観察されなかった。FT4 については、調整後の Model1 で o,p'-DDE ($\beta = -0.03, CI: -0.06 \text{ } 0.00, p < .05$)、o,p'-DDT ($\beta = -0.06, CI: -0.10 \text{ } -0.02, p < .01$)、Dieldrin ($\beta = -0.08, CI: -0.15 \text{ } -0.02, p < .05$) について関連性が有意であった。同様に、児の甲状腺ホルモンについての結果を表 4 に示す。TSH については、いずれの有機塩素系農薬との関連性も観察されなかった。FT4 については、調整後の Model1 では o,p'-DDE ($\beta = -0.03, CI: -0.06 \text{ } 0.00, p < .05$)、o,p'-DDT ($\beta = -0.06, CI: -0.10 \text{ } -0.02, p < .01$)、Dieldrin ($\beta = -0.08, CI: -0.15 \text{ } -0.02, p < .05$) について負の関連性が有意であった。TSH については有意な関連性は認められなかった。FT4 については、調整後の Model1 で cisNonachlor ($\beta = 0.04, CI: 0.00 \text{ } 0.08, p < .05$)、p,p'-DDT ($\beta = 0.04, CI: 0.01 \text{ } 0.08, p < .05$)、Parlar50 ($\beta = 0.03, CI: 0.00 \text{ } 0.06, p < .05$) について正の関連性が有意であった。

D. 考察

本研究で検出された有機塩素系農薬は、同一コホートをを用いた先行研究と一致し (Kanazawa et al., 2012)、p,p'-DDE の濃度が最も高かったが、スペイン (Eskenazi et al., 2006) やメキシコ (Gascon et al., 2013) などの地域での DDT 類濃度と比較

すると低濃度であった。

本研究では、有機塩素系農薬による影響として母児ともに FT4 のみが増加し、TSH には変動が観察されなかった。甲状腺ホルモンの通常メカニズムとして、血中 T4 値が高いと TSH の分泌が抑制され、T4 値が低いと TSH 分泌が促進される。このようなネガティブフィードバックシステムが働くことにより血中 T4 値が一定であるよう調整されている。本研究では FT4 の変動があったにもかかわらず TSH の変動は観察されなかったことから、有機塩素系農薬が上記のネガティブフィードバックシステムを制御する HPT 軸（脳下垂体-甲状腺軸）の作用へ影響している可能性が示された。

母の FT4 が減少した一方、児では逆に FT4 の増加が観察されたことについては、Dallaire ら(2008)の結果と類似している。母の T4 が胎盤を通過して児に移行したことにより、結果としてこのような変動が観察された可能性がある。しかし、FT4 の変動は、母では o,p'-DDE、o,p'-DDT、Dieldrin による減少、児では cisNonachlor、p,p'-DDT、Parlar50 による増加として観察されており、原因となっている物質が異なっている。母児のそれぞれに異なった影響がある可能性も考えられる。

胎生期の甲状腺ホルモンの変動は、児の脳神経系の発達に影響し、出生後の発達を阻害する可能性がある。今後はこのような変動が出生後の児の神経発達にどのように影響するかについても検討する必要がある。

E. 結論

本研究における有機塩素系農薬への曝露は海外と比較して低濃度であった。低レベルの農薬への曝露が母児の甲状腺ホルモン FT4 に影響を及ぼす可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表 なし

2) 学会発表 なし

参考文献

- 1) Boucher, O., Simard, M. N., Muckle, G., Rouget, F., Kadhel, P., Bataille, H., Cordier, S. (2013). Exposure to an organochlorine pesticide (chlordecone) and development of 18-month-old infants. *Neurotoxicology*, 35, 162-168.
- 2) Torres-Sanchez, L., Rothenberg, S. J., Schnaas, L., Cebrian, M. E., Osorio, E., Del Carmen Hernandez, M., Lopez-Carrillo, L. (2007). In utero p,p'-DDE exposure and infant neurodevelopment: a perinatal cohort in Mexico. *Environ Health Perspect*, 115(3), 435-439.
- 3) Eskenazi, B., Marks, A. R., Bradman, A., Fenster, L., Johnson, C., Barr, D. B., & Jewell, N. P. (2006). In utero exposure to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and neurodevelopment among young Mexican American children. *Pediatrics*, 118(1), 233-241.
- 4) Kezios, K. L., Liu, X., Cirillo, P. M., Cohn, B. A., Kalantzi, I., Wang, Y., . . . Factor-Litvak, P. (2013). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), DDT metabolites and pregnancy outcomes. *Reprod Toxicol*,

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

- 35, 156-164.
- 5) Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Allan, W. C., Williams, J. R., Knight, G. J., Gagnon, J., ... & Faix, J. D. (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *New England Journal of Medicine*, 341(8), 549-555.
- 6) Lopez-Espinosa, M. J., Vizcaino, E., Murcia, M., Llop, S., Espada, M., Seco, V., . . . Ballester, F. (2009). Association between thyroid hormone levels and 4,4'-DDE concentrations in pregnant women (Valencia, Spain). *Environ Res*, 109(4), 479-485.
- 7) Asawasinsopon, R., Prapamontol, T., Prakobvitayakit, O., Vaneesorn, Y., Mangklabruks, A., & Hock, B. (2006). The association between organochlorine and thyroid hormone levels in cord serum: a study from northern Thailand. *Environ Int*, 32(4), 554-559.
- 8) Kim, S., Park, J., Kim, H. J., Lee, J. J., Choi, G., Choi, S., Choi, K. (2015). Association between Several Persistent Organic Pollutants and Thyroid Hormone Levels in Cord Blood Serum and Bloodspot of the Newborn Infants of Korea. *PLoS One*, 10(5), e0125213.
- 9) Kanazawa, A., Miyasita, C., Okada, E., Kobayashi, S., Washino, N., Sasaki, S., & Kishi, R. (2012). Blood persistent organochlorine pesticides in pregnant women in relation to physical and environmental variables in The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Science of the Total Environment*, 426, 73-82.
- 10) Dallaire, R., Dewailly, E., Ayotte, P., Muckle, G., Laliberte, C., & Bruneau, S. (2008). Effects of prenatal exposure to organochlorines on thyroid hormone status in newborns from two remote coastal regions in Quebec, Canada. *Environ Res*, 108(3), 387-392.

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 Characteristics of mothers and infants.

Characteristic	Mean±SD No.(%)	TSH		FT4		
		Mean±SD	p-value	Mean±SD	p-value	
<i>Maternal characteristics</i>						
Age at delivery (years)	342	31.3 ±4.7	<i>r</i> = 0.06	0.28	<i>r</i> = -0.07	0.22
BMI before pregnancy	340	21.2 ±3.2	<i>r</i> = 0.13	0.01	<i>r</i> = -0.08	0.12
Parity	1	162 (47.4)	1.27 0.99	0.80	1.01 0.24	0.17
	>1	179 (52.4)	1.24 1.11		1.05 0.32	
Education Level (years)	<13	147 (43.0)	1.29 1.01	0.66	1.01 0.30	0.20
	≥13	195 (57.0)	1.24 1.08		1.05 0.27	
Economic status:annual income (yen)	<300	60 (17.5)	1.31 1.30	0.72	0.99 0.20	0.15
	≥300	282 (82.5)	1.25 0.99		1.04 0.30	
Smoked during pregnancy	No	292 (85.4)	1.23 1.03	0.20	1.04 0.29	0.06
	Yes	50 (14.6)	1.45 1.15		0.97 0.20	
Alcohol intake during pregnancy	No	239 (69.9)	1.30 1.07	0.32	1.04 0.30	0.33
	Yes	103 (30.1)	1.18 1.00		1.01 0.23	
Povidone iodine gargling(week)	No	322 (94.2)	1.27 1.07	0.45	1.03 0.29	0.69
	Yes	19 (5.6)	1.12 0.79		1.05 0.20	
seaweed (week)	No	100 (29.2)	1.48 1.15	0.06	1.00 0.31	0.45
	Yes	184 (53.8)	1.22 1.02		1.02 0.27	
iodine include supplements/eggs (month)	No	240 (70.2)	1.31 1.07	0.80	1.01 0.29	0.43
	Yes	44 (12.9)	1.36 1.13		1.04 0.23	
Blood sampling period POPs	Before delivery	223 (65.2)	1.26 1.03	0.97	1.02 0.23	0.67
	After delivery	119 (34.8)	1.26 1.09		1.04 0.36	
Blood sampling period TH	341	79.6 ±15.6	<i>r</i> = 0.20	0.00	<i>r</i> = -0.24	0.00
<i>Infant characteristics</i>						
Gender	Male	170 (46.6)	2.84 2.89	0.67	2.03 0.39	0.68
	Female	195 (53.4)	2.73 1.84		2.05 0.41	
Gestational days	365	275.4 ±10.1	<i>r</i> = 0.14	0.01	<i>r</i> = 0.16	0.00
Birth weight (g)	365	3063.0 ±382.6	<i>r</i> = -0.01	0.90	<i>r</i> = 0.21	0.00
Blood sampling (day after birth) of THs	365	4.4 ±0.9	<i>r</i> = 0.00	0.98	<i>r</i> = -0.17	0.00

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 Levels of organochlorine pesticides (pg/g-wet) detected over 80 % of participants.

	Detection		Percentile					Mean	SD
	Limit	Rate	Minimum	25th	50th	75th	Maximum		
oxychlordane	0.9	100.0	7.9	27.0	39.2	55.7	250.9	44.3	26.3
cisNonachlor	0.4	100.0	1.6	6.7	9.8	14.1	38.1	11.2	6.3
transNonachlor	0.5	100.0	13.1	49.7	70.5	104.7	513.5	84.4	57.4
p,p'-DDD	0.4	89.7	0.2	0.9	1.5	2.3	9.0	1.8	1.3
o,p'-DDE	0.4	85.0	0.2	0.7	1.3	1.8	6.2	1.4	1.0
p,p'-DDE	0.6	100.0	99.5	399.7	637.8	1011.6	4575.7	795.7	592.7
o,p'-DDT	0.6	97.6	0.3	2.3	3.5	4.8	17.1	4.0	2.5
p,p'-DDT	0.4	100.0	2.4	16.6	22.7	33.9	121.5	27.6	16.9
Dieldrin	0.8	100.0	4.1	12.1	16.3	22.4	71.5	18.5	9.6
cisHeptachlorepoide	0.4	100.0	6.2	18.5	26.1	36.7	200.5	30.3	18.7
HCB	0.9	100.0	34.9	79.9	101.1	129.3	245.5	107.0	38.3
HCH	0.6	100.0	19.9	104.8	153.1	239.6	1667.1	196.6	160.1
Mirex	0.5	100.0	0.9	4.1	5.9	8.2	35.0	6.9	4.6
Parlar26	1.0	97.1	0.5	2.9	4.3	6.5	20.8	5.1	3.4
Parlar50	2.0	96.0	1.0	4.3	6.4	9.5	29.3	7.5	4.7

表 3 Thyroid hormones for mothers in relation to the organochlorine pesticides.

	TSH						FT4								
	Crude			Model 1			Crude			Model 1					
	β	95%CI	p	β	95%CI	p	β	95%CI	p	β	95%CI	p			
oxychlordane	-0.04	-0.21	0.13	0.67	-0.01	0.18	0.94	-0.04	-0.21	0.13	0.67	0.00	-0.05	0.06	0.86
cisNonachlor	0.00	-0.17	0.16	0.97	0.02	-0.16	0.82	0.00	-0.17	0.16	0.97	-0.02	-0.07	0.03	0.46
transNonachlor	-0.01	-0.16	0.15	0.94	0.00	-0.17	1.00	-0.01	-0.16	0.15	0.94	0.00	-0.05	0.04	0.88
p,p'-DDD	0.07	-0.04	0.18	0.19	0.03	-0.08	0.61	0.07	-0.04	0.18	0.19	0.00	-0.03	0.03	0.98
o,p'-DDE	0.02	-0.09	0.12	0.77	0.06	-0.05	0.28	0.02	-0.09	0.12	0.77	-0.03	-0.06	0.00	0.048
p,p'-DDE	-0.01	-0.14	0.13	0.93	0.00	-0.15	0.97	-0.01	-0.14	0.13	0.93	-0.03	-0.07	0.02	0.22
o,p'-DDT	0.03	-0.11	0.16	0.68	0.06	-0.08	0.40	0.03	-0.11	0.16	0.68	-0.06	-0.10	-0.02	0.00
p,p'-DDT	-0.02	-0.18	0.15	0.85	0.04	-0.13	0.62	-0.02	-0.18	0.15	0.85	-0.04	-0.09	0.01	0.12
Dieldrin	-0.01	-0.21	0.20	0.94	0.05	-0.17	0.65	-0.01	-0.21	0.20	0.94	-0.08	-0.15	-0.02	0.01
cisHeptachlorepoxyde	0.00	-0.18	0.17	0.99	-0.01	-0.20	0.95	0.00	-0.18	0.17	0.99	-0.04	-0.09	0.02	0.19
HCB	-0.07	-0.32	0.18	0.59	-0.01	-0.28	0.91	-0.07	-0.32	0.18	0.59	-0.03	-0.10	0.05	0.49
β HCH	0.02	-0.12	0.15	0.82	0.00	-0.15	0.98	0.02	-0.12	0.15	0.82	-0.01	-0.06	0.03	0.52
Mirex	0.00	-0.16	0.16	0.96	0.05	-0.15	0.62	0.00	-0.16	0.16	0.96	0.00	-0.06	0.05	0.95
Parlar26	0.01	-0.12	0.14	0.86	0.05	-0.09	0.52	0.01	-0.12	0.14	0.86	-0.03	-0.07	0.01	0.16
Parlar50	-0.05	-0.19	0.09	0.48	0.00	-0.15	0.99	-0.05	-0.19	0.09	0.48	-0.03	-0.07	0.01	0.12

Model 1: Adjusted for maternal age, maternal BMI, smoking, during pregnancy, intake of seaweed, blood sampling period of TH and OCP

表 4 Thyroid hormones for infants in relation to the organochlorine pesticides.

	TSH					FT4				
	Crude			Model 1		Crude			Model 1	
	β	95%CI	p	β	p	β	95%CI	p	β	p
oxychlordane	-0.02	-0.18	0.14	0.80	0.47	0.03	-0.01	0.07	0.15	0.11
cisNonachlor	0.00	-0.15	0.16	0.96	0.79	0.03	0.00	0.07	0.07	0.03
transNonachlor	-0.01	-0.16	0.13	0.86	0.60	0.03	-0.01	0.06	0.11	0.06
p,p'-DDD	-0.03	-0.13	0.07	0.57	0.59	0.01	-0.01	0.04	0.28	0.35
o,p'-DDE	0.01	-0.09	0.11	0.86	0.79	0.02	0.00	0.04	0.10	0.09
p,p'-DDE	0.01	-0.11	0.14	0.85	0.90	0.01	-0.02	0.04	0.36	0.46
o,p'-DDT	0.06	-0.06	0.19	0.34	0.44	0.01	-0.02	0.04	0.57	0.44
p,p'-DDT	-0.02	-0.17	0.13	0.77	0.64	0.04	0.00	0.07	0.05	0.02
Dieldrin	0.07	-0.11	0.26	0.45	0.47	0.04	-0.01	0.08	0.12	0.08
cisHeptachlorepoide	-0.03	-0.19	0.13	0.71	0.77	-0.01	-0.05	0.03	0.59	0.88
HCB	0.01	-0.22	0.24	0.93	0.67	0.05	-0.01	0.11	0.09	0.07
β HCH	0.00	-0.12	0.13	0.98	0.77	0.01	-0.02	0.04	0.36	0.23
Mirex	0.03	-0.11	0.18	0.66	0.74	0.03	-0.01	0.06	0.15	0.05
Parlar26	0.04	-0.08	0.17	0.49	0.59	0.02	-0.01	0.05	0.31	0.13
Parlar50	0.01	-0.12	0.14	0.82	0.98	0.03	0.00	0.06	0.09	0.04

Model 1: Adjusted for gender, Gestational days, birth weight, blood sampling (day after birth) of THs

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

Prenatal MEHP, BPA exposure and cord blood adipokine levels

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 松村 徹 いであ株式会社環境創造研究所 取締役・環境創造研究副所長

研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科 助教

研究要旨

There is a growing interest in the possibility of endocrine disrupting chemicals (EDCs) such as bisphenol A (BPA) and phthalates may contribute to obesity. However, there has been insufficient research addressing the obesogenic potential of prenatal exposure to EDCs in epidemiological studies. Thus, our objective was to investigate fetal adipokine levels, birth weight in association with prenatal exposure to DEHP and BPA in prospective birth cohort study. MEHP levels in maternal blood in late pregnancy and BPA levels in cord blood were measured. Leptin and adiponectin levels in cord blood were measured as markers of metabolic function. Association between MEHP and BPA levels and fetal leptin and adiponectin levels, birth weight, were examined. Leptin and adiponectin levels were significantly higher among girls than boys. HEHP level was positively associated with adiponectin levels among boys and was negatively associated with leptin level among girls. This study suggested that prenatal DEHP exposure may have adverse influence on fetal adipokine levels but not on birth weight and the influence may potentially be sex-specific.

研究協力者

湊屋 街子（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

山本 潤（いであ株式会社環境創造研究所）

那須 民江（中部大学生命健康科学部スポーツ保健医療学科）

A . 研究目的

Obesity is known to closely link to physical activity and diet, however, recent research suggests that other factors can contribute to obesity etiology [1]. In 2006, the term “obesogen” was coined by Grün and Blumberg [2] and defined as “molecules that inappropriately regulate lipid metabolism and adipogenesis to promote obesity”. From growing number of in vivo and in vitro studies, endocrine disrupting chemicals

(EDCs) have been considered as obesogens [3, 4]. EDCs including bisphenol A (BPA) and phthalates are ubiquitous in the environment and have been detected in majority of population [5-8]. Experimental data have shown that phthalate and BPA exposure alters lipid metabolism and adipogenesis (Grun, 2009 #109).

BPA is used in the manufacture of plastics and resins including food and drink containers, and as an additive in thermal paper, dental sealant, medical equipment and flame retardant [9, 10]. The predominant source of BPA exposure for general adult population is diet [11]. The effects of BPA on metabolic function by inhibiting adiponectin release from human adipose tissue have been reported [12].

Phthalates are group of chemicals widely

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

used in consumer products including personal care products as well as in industry for plasticizers [13]. In particular, the metabolite of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), one of the most commonly used plasticizer, mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), were widely detected in human urine and blood samples [14]. Phthalate exposure may potentially promote weight gain by binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ), which regulates fatty acid storage and glucose metabolism [15].

Although adult exposure to EDCs is important, developmental fetal exposure to EDCs is of particular concern [16-18] as the fetal time period is particularly crucial window for adipocyte development [19].

Adipocyte-produced hormones including adiponectin and leptin have been used as biomarkers of fetal metabolic function. The roles of these hormones in metabolic homeostasis and regulation, recently have been recognized [20, 21]. For fetus, leptin signals that existing fat depots are sufficient [22]. Studies have suggested that both too much and too little leptin in fetus results in non-optimal fetal growth phenotypes that subsequently increase long term obesity risk [23]. Chemical exposures during fetal period may change growth and weight gain trajectory and may influence on the risk of obesity in later life or may cause long lasting metabolic disorders because it is known that fetal period is a critical window of development of adipocyte [18]. It has known that high cord blood leptin levels have been positively associated with birth weight [24] whereas low levels of cord blood leptin have been associated with small for gestational age [25]. Cord blood adiponectin levels were positively associated with birth weight

[26].

There are only a few studies regarding prenatal BPA and phthalates exposure and cord blood adipokines [27-29]. Thus investigation of health effects of fetal BPA and phthalates exposure on metabolic function is warrant.

Thus, the objective of this study was to assess the association between maternal MEHP and cord blood BPA levels and fetal adipokines levels and birth weight.

B . 研究方法

Study population

This prospective birth cohort study was based on the Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Children's Health [30, 31]. Briefly we recruited pregnant women at 23-35 weeks of gestation between July 2002 and October 2005 from the Sapporo Toho Hospital in Hokkaido, Japan. All subjects were resident in Sapporo City or surrounding areas. The participants completed the self-administered questionnaire survey after the second trimester during their pregnancy. The questionnaire contained baseline information including their dietary habits, exposure to chemical compounds in their daily life, smoking history, alcohol consumption, caffeine intake, family income, educational levels of themselves and partners. The prenatal information of the mothers and their neonates was collected from their medical records. This study was conducted with the informed consent of all participants in written forms. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol used in this study was approved by the Institutional ethical board for epidemiological studies at the Hokkaido University Graduate School of Medicine and

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

Hokkaido University Center for
Environment and Health Sciences.

Measurement of MEHP and BPA

The concentrations of MEHP were measured in maternal serum samples collected after the second trimester of their pregnancy. Approximately 40 mL of maternal blood samples were collected from each woman and samples were stored at -80 until the analysis. The measurement was carried out by using chromatography-mass spectrometry (GC/MS) at Nagoya University under the analytical conditions mentioned previously [32]. 30 µl of blood samples were mixed with 120 µl of 1N HCl to deactivate the serum enzymes, 350 µl of saturated saline solution and 50 µl of 10 µM MEHP-d as an internal standard. Then MEHP was extracted two times with 500 µl of ethyl acetate after shaking for 15 minutes. No incubation process until extraction. The ethyl acetate layer was evaporated then the residue was dissolved into 40 µl of ethyl acetate. After addition of 20 µl of N-methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl) trifluoroacetamide (GL Sciences, Tokyo, Japan), the reaction was left for 60 minutes at room temperature. The concentration of MEHP tertbutyldimethylsilyl derivative was measured by GC/MS (6890N, 5973N; Agilent Technologies, CA, USA). Two ions, m/z 227 as quantification ion and 339 for confirmation ion, were used to detect MEHP [33]. The limit of detection (LOD) was 0.278 ng/ml (1 pmol/ml). For each sample, duplicate analysis was performed. Ultimately, MEHP level was available from 493 samples. To determine background levels, MEHP levels in a tube containing the same medium as the reaction vial were measured. All glass wares were heated at 200 for 2 hours to exclude the possibility

of environmental contamination. Coefficient of variation (CV) of MEHP measurements within a day was 2.0-7.8 % for 6 days, and CV of day to day for 6 days was 6.2 % at 5 pmol/ml of concentration [34].

The concentration of BPA in cord blood was measured by using isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-LC/MS/MS) at IDEA Consultants, Inc. Briefly cord blood was obtained at delivery and stored at -80 until analysis. 1.0 mL whole blood was spiked with Bisphenol A-d16 as an internal standard. After addition of 0.2 M acetate buffer (pH 5.0) and β-glucuronidase, the sample was held in an incubator at 37°C for 5 hours. The diluted sample was applied to a solid-phase extraction column (ISOLUTE multimode (500 mg/3 mL) cartridges) from Biotage (Biotage Japan, Tokyo, Japan). BPA was extracted using acetonitrile. Then, BPA-d4 was added to the extract as an internal standard. The organic extract was concentrated and the sample was analyzed by ID-LC/MS/MS (Agilent 1100 liquid chromatograph, API 4000 Q Trap mass spectrometer). Ultimately 285 cord blood samples for BPA measurements were available and the LOD was 0.048ng/ml.

Fetal adipokines

Total and high molecular weight (HMW) adiponectin and leptin levels in cord blood were measured in 264 and 257 neonates, respectively. Adiponectin analysis was done by ELISA using Human Adiponectin Assay kit from Sekisui Medical Co. Ltd (Tokyo, Japan). Leptin analysis was done by Radioimmunoassay (RIA) using Human Leptin RIA kit from Linco Research Inc. (St. Charles, MO, USA). All the analyses were conducted at LSI Medience (Tokyo, Japan) according to the operation manual. Analysis

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

was repeated for all samples with coefficients of variation (CV) greater than 15 %. The LODs of adiponectin was 0.39 $\mu\text{g/ml}$ and of leptin was 0.5 ng/ml . All samples were in the range of detection. Intra- and inter-assay CVs for total adiponectin were $< 9.1\%$ and $< 10.1\%$, for HMW adiponectin were $< 9.2\%$ and $< 11.6\%$ and for leptin were $< 5.3\%$ and $< 8.1\%$, respectively.

Data analysis

To consider potential confounding variables, we used data from medical record at birth. We examined the following variables as potential cofounders based on previous literatures; child sex, parental BMIs, gestational age.

BMI were calculated from body weight and height obtained from questionnaire. As distribution of BPA and MEHP were skewed, concentrations were \log_{10} transformed for statistical analysis. For MEHP levels, 493 samples were obtained, however, we excluded blood samples withdrawn after delivery as there might be MEHP exposure from medical devices during delivery, and for the final analysis, 335 samples were included. For BPA levels, we had 285 available data. Cord blood levels of adipokine were also \log_{10} transformed for statistical analysis. Given evidences of sex differences in the relationship between BPA and dipokines [27], all the analyses were conducted for boys and girls combined as well as boys and girls separately. Concentrations below LOD were assigned the value of one-half of the LOD. Results were considered significant at $p < 0.05$. All analyses were conducted using SPSS (Version 22.0J; SPSS, Chicago, IL, USA).

C . 研究結果

Initially the prospective birth cohort was consisted of 514 mothers. We excluded total 23 participants for dropping out before delivery ($n=10$), multiple birth ($n=7$) and pre-term birth ($n=6$). For the final analysis of this study, 491 subjects were included (Figure 1). Birth weight was significantly heavier among boys compared to girls, however, ponderal index (PI), which is calculated as weight divided by height raised to the power of 3 did not differ between boys and girls.

Median (IQR) MEHP and BPA levels (ng/ml) were 10.70 (6.30-17.05) and 0.051 (LOD-0.076), with the detection rate of 100% and 83.2%, respectively.

Median total and HMW adiponectin and leptin levels were significantly higher in girls than in boys ($p = 0.006$ for total adiponectin, $p = 0.005$ for HMW adiponectin, $p < 0.001$ for leptin, respectively, Table 2). The median leptin level was significantly higher in mothers with higher BMI ($p = 0.006$) and the total and HMW adiponectin levels were suggestively higher in mothers with higher BMI ($p < 0.10$). Birth weight was significantly heavier among neonates with higher maternal BMI. Although there was not statistically significant, neonates born from smokers had lower birth weight compared to nonsmokers. (Table S1).

Maternal MEHP and cord blood BPA levels according to maternal characteristics were shown in Table 3. Geometric mean (GM) of either MEHP or BPA levels did not differ among mothers of different ages, BMIs, educational levels, family income and smoking habit.

The association between maternal MEHP and cord blood BPA levels and adipokine levels were shown in Table 4. After

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

adjusting with covariates, MEHP level was positively associated with total and HMW adiponectin levels among boys ($p = 0.009$, $p = 0.012$, respectively). MEHP level was negatively associated with leptin levels with borderline significance over all ($p = 0.063$), and after stratification by child sex, the association was observed only among girls with statistical significance ($p = 0.004$). The association between maternal MEHP levels and cord blood adipokines were different between boys and girls. BPA level was not associated with any of the adipokine levels. The association between maternal MEHP and cord blood BPA levels and birth weight and ponderal index were shown in Table 5. Overall, maternal MEHP levels were not significantly associated with birth weight. The β s for birth weight in association with maternal MEHP levels showed opposite directions between boys and girls. Positive associations among boys, whereas negative associations among girls were observed. This indicated that prenatal DEHP exposure may influence on fetal adipokine levels and birth weight in sex specific manner. Cord blood BPA levels were not significantly associated with birth weight.

D . 考察

In this prospective birth cohort study of Japanese women, we investigated the relationship between MEHP level in maternal blood and BPA level in cord blood and fetal adipokine levels, birth weight. The median concentration of MEHP levels was 10.70 ng/ml in this study. Compared to the study of serum MEHP measurements of pregnant women [35], the level was slightly higher. However, blood sampling periods were different between our study and previous study, which could explain the difference of maternal MEHP levels. When

compared to 2 other studies of adult serum MEHP measurements from European countries [36, 37], MEHP levels in our study was higher, however, the production and use of DEHP varied among countries where studies were taken place, which could have caused differences in observed MEHP levels in blood. In fact, the levels of DEHP in house dust in Japan [38] were higher compared to studies from European countries [39-43], Asian countries [44, 45], and the USA [45, 46].

The cord blood BPA levels in this study was much lower compared to the previous reports [47-51].

We observed higher levels of leptin and total and HMW adiponectin levels in girls than in boys. Compared to previous studies, the leptin and adiponectin levels in this study is similar levels to those from Japanese study [52], however, they observed that male had higher adiponectin levels compared to female (18.8 $\mu\text{g/ml}$ vs. 16.4 $\mu\text{g/ml}$). Also our observed levels of adipokines were close range to the reported levels in Taiwan [27]. Leptin levels in our study was lower compared to the recently reported levels from Canadian study [28] which showed higher leptin levels in female than in male (16.0 and 8.7 ng/ml, respectively). Several studies from western countries showed much higher levels of adiponectin [53] and leptin [54] compared to our results. Contrary, report from USA and China [55] showed relatively lower adiponectin levels compared to our results. As previously reported [56, 57], leptin and adiponectin levels vary among ethnicities and in adult study, Asian population showed lower adiponectin levels compared to those of European people [58]. To our knowledge, there have been two previous reports on prenatal BPA exposure

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

and cord blood adipokine levels and birth outcome [27, 28] Chou et al. showed that elevated prenatal BPA exposure increased the risk of adverse actions of adipokines, low adiponectin and high leptin in neonates, especially in male infants. In addition, they reported negative correlation between maternal serum BPA levels and birth weight ($\rho = -0.24$) and prenatal BPA exposure increased the risk of LBW and SGA. In their study, geometric mean (GM) concentration of cord blood BPA was 0.5 ng/ml, which was over 10 times higher than our result (GM = 0.045 ng/ml), thus the difference in exposure levels could be one of the reasons that we did not observe association between BPA levels and either adiponectin and leptin levels or birth weight. Ashley-Martin et al. observed an inverse, non-linear relationship between maternal urine BPA level and adiponectin level among males. The association between maternal urine BPA levels and birth size was not examined in their study. In our study, we found no association between BPA and adiponectin levels. In their study, maternal urinary samples were used for exposure assessment while we used cord blood samples, which made it difficult in comparison of the study results. Further, their study population was mainly Caucasian living in Canada whereas our population was Japanese, thus, genetic differences in metabolism among ethnic groups may explain the various finding. Associations between prenatal BPA exposure and birth size have been reported from several birth cohort studies [27, 51, 59-61], yet the results from those epidemiological studies were inconsistent. One study estimated prenatal BPA exposure only based on questionnaires with no bio monitoring data, thus comparison of results

was difficult [61]. 2 birth cohort studies Korea, they reported that prenatal BPA exposure was associated with increased birth weight [51, 59]. However, cord blood levels of BPA was higher in Korean study [51], and this could be a reason that we did not find the same result. Experimental studies suggested that BPA increased gene expression of adipogenic transcription factors in 3T3-L1 preadipocytes [62] and perinatal BPA exposure was associated with the over-expression of adipocyte hypertrophy and of lipogenic genes in rats [63]. Although these studies provided some evidences that BPA exposure may alter adipokine secretion, we should consider that results from higher exposure levels in experimental setting may not be applicable to human exposure levels and thus examinations in lower exposure level in epidemiological studies still need to be conducted.

There have been one previous study regarding prenatal phthalate exposure and adipokine levels in cord blood [28]. They found that maternal urinary Mono-(3-carboxypropyl) phthalate (MCP), metabolite of Di-n-octyl phthalate (DOP), level was associated with increased odds of high leptin among males (OR = 3.5, 95% CI: 1.1-11.6). They also have investigated other phthalate metabolites including MEHP, however, did not find any associations between these metabolites and fetal adipokine levels. In our study, we did not conduct exposure assessment of DOP, thus we were unable to compare our results with the previous study results, however, we found positive association between MEHP and adiponectin in boys and negative association between MEHP and leptin in girls. In the previous study [28], they only

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

have investigated the association between maternal urinary phthalate levels and fetal adipokines, but no birth outcomes such as birth weight were examined. Our study is the first study to investigate the association between prenatal phthalate exposure and fetal adipokines and birth outcome together. The results from our study could be interpreted that prenatal phthalate exposure may cause changes in fetal adipokine levels, but not adverse influence on birth size. Other previous studies have shown no significant association between prenatal phthalate exposure and birth size [64, 65]. Our result added an evidence that prenatal DEHP exposure did not have significant influence on birth weight. Yet influence of other phthalate exposure on fetus adipokines and birth size need to be investigated in the future work.

E . 結論

This was the first study of investigating prenatal DEHP and BPA exposure on fetal adipokine levels along with investigating birth weight. This study suggested that prenatal BPA and DEHP exposure may have adverse influence on fetal metabolic function but not on birth size. Also these influences appeared to be potentially sex-specific. In the future, evaluation of postnatal exposure to these chemicals and examination of biomarkers of children is necessary to assess the association between EDCs exposure and childhood growth.

F . 研究発表

1. 学会発表

M. Minatoya, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, J. Yamamoto, T. Matsumura and R. Kishi, Prenatal BPA exposure and cord blood adipokines, birth weight and child growth: the Hokkaido Study of Environment and Children's health, ISEE

2015, San Paulo, 2015.8.30.-9.3.

湊屋街子, 佐々木成子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 山本潤, 松村徹, 岸玲子.
胎児期ビスフェノールA曝露による臍帯血中のアディポカイン, 出生体重, 子どもの体重への影響: 北海道スタディ. 第67回北海道公衆衛生学会. 旭川市. 2015.11.21

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

参考文献

1. Keith, S.W.; Redden, D.T.; Katzmarzyk, P.T.; Boggiano, M.M.; Hanlon, E.C.; Benca, R.M.; Ruden, D.; Pietrobelli, A.; Barger, J.L.; Fontaine, K.R., et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: Exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond)* 2006, 30, 1585-1594.
2. Grun, F.; Blumberg, B. Environmental obesogens: Organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 2006, 147, S50-55.
3. Grun, F.; Blumberg, B. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* 2009, 304, 19-29.
4. de Cock, M.; van de Bor, M. Obesogenic effects of endocrine disruptors, what do we know from animal and human studies? *Environ Int* 2014, 70, 15-24.
5. Woodruff, T.J.; Zota, A.R.; Schwartz, J.M. Environmental chemicals in pregnant women in the united states: Nhanes 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2011, 119, 878-885.
6. Suzuki, Y.; Niwa, M.; Yoshinaga, J.; Watanabe, C.; Mizumoto, Y.; Serizawa, S.; Shiraishi, H. Exposure assessment of phthalate esters in japanese pregnant women by using urinary metabolite

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

- analysis. *Environ Health Prev Med* 2009, 14, 180-187.
7. Casas, M.; Valvi, D.; Luque, N.; Ballesteros-Gomez, A.; Carsin, A.E.; Fernandez, M.F.; Koch, H.M.; Mendez, M.A.; Sunyer, J.; Rubio, S., et al. Dietary and sociodemographic determinants of bisphenol a urine concentrations in pregnant women and children. *Environ Int* 2013, 56, 10-18.
 8. Romero-Franco, M.; Hernandez-Ramirez, R.U.; Calafat, A.M.; Cebrian, M.E.; Needham, L.L.; Teitelbaum, S.; Wolff, M.S.; Lopez-Carrillo, L. Personal care product use and urinary levels of phthalate metabolites in mexican women. *Environ Int* 2011, 37, 867-871.
 9. Biedermann, S.; Tschudin, P.; Grob, K. Transfer of bisphenol a from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem* 2010, 398, 571-576.
 10. Geens, T.; Goeyens, L.; Covaci, A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-a overlooked? *Int J Hyg Environ Health* 2011, 214, 339-347.
 11. Kang, J.H.; Kondo, F.; Katayama, Y. Human exposure to bisphenol a. *Toxicology* 2006, 226, 79-89.
 12. Hugo, E.R.; Brandebourg, T.D.; Woo, J.G.; Loftus, J.; Alexander, J.W.; Ben-Jonathan, N. Bisphenol a at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 2008, 116, 1642-1647.
 13. Wormuth, M.; Scheringer, M.; Vollenweider, M.; Hungerbuhler, K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in europeans? *Risk Anal* 2006, 26, 803-824.
 14. Meeker, J.D.; Sathyanarayana, S.; Swan, S.H. Phthalates and other additives in plastics: Human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009, 364, 2097-2113.
 15. Desvergne, B.; Feige, J.N.; Casals-Casas, C. Ppar-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Mol Cell Endocrinol* 2009, 304, 43-48.
 16. Newbold, R.R. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones (Athens)* 2010, 9, 206-217.
 17. Heindel, J.J. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. *Reprod Toxicol* 2007, 23, 257-259.
 18. Hatch, E.E.; Nelson, J.W.; Stahlhut, R.W.; Webster, T.F. Association of endocrine disruptors and obesity: Perspectives from epidemiological studies. *Int J Androl* 2010, 33, 324-332.
 19. McMillen, I.C.; Robinson, J.S. Developmental origins of the metabolic syndrome: Prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005, 85, 571-633.
 20. Fiaschi, T.; Magherini, F.; Gamberi, T.; Modesti, P.A.; Modesti, A. Adiponectin as a tissue regenerating hormone: More than a metabolic function. *Cell Mol Life Sci* 2014, 71, 1917-1925.
 21. Farooqi, I.S.; O'Rahilly, S. 20 years of leptin: Human disorders of leptin action. *J Endocrinol* 2014, 223, T63-70.
 22. Shroff, M.R.; Holzman, C.; Tian, Y.; Evans, R.W.; Sikorskii, A. Mid-pregnancy maternal leptin levels, birthweight for gestational age and preterm delivery. *Clinical endocrinology* 2013, 78, 607-613.
 23. Ornoy, A. Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical

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

- effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reprod Toxicol* 2011, 32, 205-212.
24. Karakosta, P.; Chatzi, L.; Plana, E.; Margioris, A.; Castanas, E.; Kogevinas, M. Leptin levels in cord blood and anthropometric measures at birth: A systematic review and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011, 25, 150-163.
25. Romano, M.E.; Savitz, D.A.; Braun, J.M. Challenges and future directions to evaluating the association between prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals and childhood obesity. *Curr Epidemiol Rep* 2014, 1, 57-66.
26. Mantzoros, C.S.; Rifas-Shiman, S.L.; Williams, C.J.; Fargnoli, J.L.; Kelesidis, T.; Gillman, M.W. Cord blood leptin and adiponectin as predictors of adiposity in children at 3 years of age: A prospective cohort study. *Pediatrics* 2009, 123, 682-689.
27. Chou, W.C.; Chen, J.L.; Lin, C.F.; Chen, Y.C.; Shih, F.C.; Chuang, C.Y. Biomonitoring of bisphenol a concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: A birth cohort study in taiwan. *Environ Health* 2011, 10, 94.
28. Ashley-Martin, J.; Dodds, L.; Arbuckle, T.E.; Ettinger, A.S.; Shapiro, G.D.; Fisher, M.; Morisset, A.S.; Taback, S.; Bouchard, M.F.; Monnier, P., et al. A birth cohort study to investigate the association between prenatal phthalate and bisphenol a exposures and fetal markers of metabolic dysfunction. *Environ Health* 2014, 13, 84.
29. Volberg, V.; Harley, K.; Calafat, A.M.; Dave, V.; McFadden, J.; Eskenazi, B.; Holland, N. Maternal bisphenol a exposure during pregnancy and its association with adipokines in mexican-american children. *Environ Mol Mutagen* 2013, 54, 621-628.
30. Kishi, R.; Kobayashi, S.; Ikeno, T.; Araki, A.; Miyashita, C.; Itoh, S.; Sasaki, S.; Okada, E.; Kobayashi, S.; Kashino, I., et al. Ten years of progress in the hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile--updated 2013. *Environ Health Prev Med* 2013, 18, 429-450.
31. Kishi, R.; Sasaki, S.; Yoshioka, E.; Yuasa, M.; Sata, F.; Saijo, Y.; Kurahashi, N.; Tamaki, J.; Endo, T.; Sengoku, K., et al. Cohort profile: The hokkaido study on environment and children's health in japan. *Int J Epidemiol* 2011, 40, 611-618.
32. Ito, Y.; Yokota, H.; Wang, R.; Yamanoshita, O.; Ichihara, G.; Wang, H.; Kurata, Y.; Takagi, K.; Nakajima, T. Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (dehp) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch Toxicol* 2005, 79, 147-154.
33. Hayashi, Y.; Ito, Y.; Yanagiba, Y.; Kamijima, M.; Naito, H.; Nakajima, T. Differences in metabolite burden of di(2-ethylhexyl)phthalate in pregnant and postpartum dams and their offspring in relation to drug-metabolizing enzymes in mice. *Arch Toxicol* 2012, 86, 563-569.
34. Jia, X.; Harada, Y.; Tagawa, M.; Naito, H.; Hayashi, Y.; Yetti, H.; Kato, M.; Sasaki, S.; Araki, A.; Miyashita, C., et al. Prenatal maternal blood triglyceride and fatty acid levels in relation to exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: A cross-sectional study. *Environ Health Prev Med* 2015, 20, 168-178.
35. Hart, R.; Doherty, D.A.; Frederiksen, H.; Keelan, J.A.; Hickey, M.; Sloboda, D.;

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

- Pennell, C.E.; Newnham, J.P.; Skakkebaek, N.E.; Main, K.M. The influence of antenatal exposure to phthalates on subsequent female reproductive development in adolescence: A pilot study. *Reproduction* 2014, 147, 379-390.
36. Frederiksen, H.; Jorgensen, N.; Andersson, A.M. Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2010, 34, 400-410.
37. Olsen, L.; Lampa, E.; Birkholz, D.A.; Lind, L.; Lind, P.M. Circulating levels of bisphenol a (bpa) and phthalates in an elderly population in sweden, based on the prospective investigation of the vasculature in uppsala seniors (pivus). *Ecotoxicol Environ Saf* 2012, 75, 242-248.
38. Ait Bamai, Y.; Araki, A.; Kawai, T.; Tsuboi, T.; Saito, I.; Yoshioka, E.; Kanazawa, A.; Tajima, S.; Shi, C.; Tamakoshi, A., et al. Associations of phthalate concentrations in floor dust and multi-surface dust with the interior materials in japanese dwellings. *Sci Total Environ* 2014, 468-469, 147-157.
39. Bornehag, C.G.; Lundgren, B.; Weschler, C.J.; Sigsgaard, T.; Hagerhed-Engman, L.; Sundell, J. Phthalates in indoor dust and their association with building characteristics. *Environ Health Perspect* 2005, 113, 1399-1404.
40. Kolarik, B.; Naydenov, K.; Larsson, M.; Bornehag, C.G.; Sundell, J. The association between phthalates in dust and allergic diseases among bulgarian children. *Environ Health Perspect* 2008, 116, 98-103.
41. Abb, M.; Heinrich, T.; Sorkau, E.; Lorenz, W. Phthalates in house dust. *Environ Int* 2009, 35, 965-970.
42. Fromme, H.; Lahrz, T.; Piloty, M.; Gebhart, H.; Oddoy, A.; Ruden, H. Occurrence of phthalates and musk fragrances in indoor air and dust from apartments and kindergartens in berlin (germany). *Indoor Air* 2004, 14, 188-195.
43. Clausen, P.A.; Lindeberg Bille, R.L.; Nilsson, T.; Hansen, V.; Svensmark, B.; Bowadt, S. Simultaneous extraction of di(2-ethylhexyl) phthalate and nonionic surfactants from house dust. Concentrations in floor dust from 15 danish schools. *J Chromatogr A* 2003, 986, 179-190.
44. Hsu, N.Y.; Lee, C.C.; Wang, J.Y.; Li, Y.C.; Chang, H.W.; Chen, C.Y.; Bornehag, C.G.; Wu, P.C.; Sundell, J.; Su, H.J. Predicted risk of childhood allergy, asthma, and reported symptoms using measured phthalate exposure in dust and urine. *Indoor Air* 2012, 22, 186-199.
45. Guo, Y.; Kannan, K. Comparative assessment of human exposure to phthalate esters from house dust in china and the united states. *Environ Sci Technol* 2011, 45, 3788-3794.
46. Rudel, R.A.; Camann, D.E.; Spengler, J.D.; Korn, L.R.; Brody, J.G. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol* 2003, 37, 4543-4553.
47. Aris, A. Estimation of bisphenol a (bpa) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in eastern townships of canada. *Reprod Toxicol* 2014, 45, 8-13.

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

48. Zhang, T.; Sun, H.; Kannan, K. Blood and urinary bisphenol a concentrations in children, adults, and pregnant women from china: Partitioning between blood and urine and maternal and fetal cord blood. *Environ Sci Technol* 2013, 47, 4686-4694.
49. Kosarac, I.; Kubwabo, C.; Lalonde, K.; Foster, W. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol a in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012, 898, 90-94.
50. Brucker-Davis, F.; Ferrari, P.; Boda-Buccino, M.; Wagner-Mahler, K.; Pacini, P.; Gal, J.; Azuar, P.; Fenichel, P. Cord blood thyroid tests in boys born with and without cryptorchidism: Correlations with birth parameters and in utero xenobiotics exposure. *Thyroid* 2011, 21, 1133-1141.
51. Lee, Y.J.; Ryu, H.Y.; Kim, H.K.; Min, C.S.; Lee, J.H.; Kim, E.; Nam, B.H.; Park, J.H.; Jung, J.Y.; Jang, D.D., et al. Maternal and fetal exposure to bisphenol a in korea. *Reprod Toxicol* 2008, 25, 413-419.
52. Nakano, Y.; Itabashi, K.; Nagahara, K.; Sakurai, M.; Aizawa, M.; Dobashi, K.; Mizuno, K.; Tanaka, D. Cord serum adiponectin is positively related to postnatal body mass index gain. *Pediatr Int* 2012, 54, 76-80.
53. Brynhildsen, J.; Sydsjo, G.; Blomberg, M.; Claesson, I.M.; Theodorsson, E.; Nystrom, F.; Sydsjo, A.; Josefsson, A. Leptin and adiponectin in cord blood from children of normal weight, overweight and obese mothers. *Acta Paediatr* 2013, 102, 620-624.
54. Luo, Z.C.; Nuyt, A.M.; Delvin, E.; Fraser, W.D.; Julien, P.; Audibert, F.; Girard, I.; Shatenstein, B.; Deal, C.; Grenier, E., et al. Maternal and fetal leptin, adiponectin levels and associations with fetal insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring)* 2013, 21, 210-216.
55. Lagiou, P.; Hsieh, C.C.; Samoli, E.; Lagiou, A.; Xu, B.; Yu, G.P.; Onoyama, S.; Chie, L.; Vatten, L.J.; Adami, H.O., et al. Associations of placental weight with maternal and cord blood hormones. *Ann Epidemiol* 2013, 23, 669-673.
56. West, J.; Wright, J.; Fairley, L.; Sattar, N.; Whincup, P.; Lawlor, D.A. Do ethnic differences in cord blood leptin levels differ by birthweight category? Findings from the born in bradford cohort study. *Int J Epidemiol* 2014, 43, 249-254.
57. Gardener, H.; Crisby, M.; Sjoberg, C.; Hudson, B.; Goldberg, R.; Mendez, A.J.; Wright, C.B.; Rundek, T.; Elkind, M.S.; Sacco, R.L. Serum adiponectin in relation to race-ethnicity and vascular risk factors in the northern manhattan study. *Metab Syndr Relat Disord* 2013, 11, 46-55.
58. Mente, A.; Razak, F.; Blankenberg, S.; Vuksan, V.; Davis, A.D.; Miller, R.; Teo, K.; Gerstein, H.; Sharma, A.M.; Yusuf, S., et al. Ethnic variation in adiponectin and leptin levels and their association with adiposity and insulin resistance. *Diabetes Care* 2010, 33, 1629-1634.
59. Lee, B.E.; Park, H.; Hong, Y.C.; Ha, M.; Kim, Y.; Chang, N.; Kim, B.N.; Kim, Y.J.; Yu, S.D.; Ha, E.H. Prenatal bisphenol a and birth outcomes: Moceh (mothers and children's environmental health) study. *Int J Hyg Environ Health* 2014, 217, 328-334.

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

60. Snijder, C.A.; Heederik, D.; Pierik, F.H.; Hofman, A.; Jaddoe, V.W.; Koch, H.M.; Longnecker, M.P.; Burdorf, A. Fetal growth and prenatal exposure to bisphenol a: The generation r study. *Environ Health Perspect* 2013, 121, 393-398.
61. Miao, M.; Yuan, W.; Zhu, G.; He, X.; Li, D.K. In utero exposure to bisphenol-a and its effect on birth weight of offspring. *Reprod Toxicol* 2011, 32, 64-68.
62. Phrakonkham, P.; Viengchareun, S.; Belloir, C.; Lombes, M.; Artur, Y.; Canivenc-Lavier, M.C. Dietary xenoestrogens differentially impair 3t3-11 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, 110, 95-103.
63. Somm, E.; Schwitzgebel, V.M.; Toulotte, A.; Cederroth, C.R.; Combescure, C.; Nef, S.; Aubert, M.L.; Huppi, P.S. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 2009, 117, 1549-1555.
64. Wolff, M.S.; Engel, S.M.; Berkowitz, G.S.; Ye, X.; Silva, M.J.; Zhu, C.; Wetmur, J.; Calafat, A.M. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect* 2008, 116, 1092-1097.
65. Philippat, C.; Mortamais, M.; Chevrier, C.; Petit, C.; Calafat, A.M.; Ye, X.; Silva, M.J.; Brambilla, C.; Pin, I.; Charles, M.A., et al. Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environ Health Perspect* 2012, 120, 464-470.

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

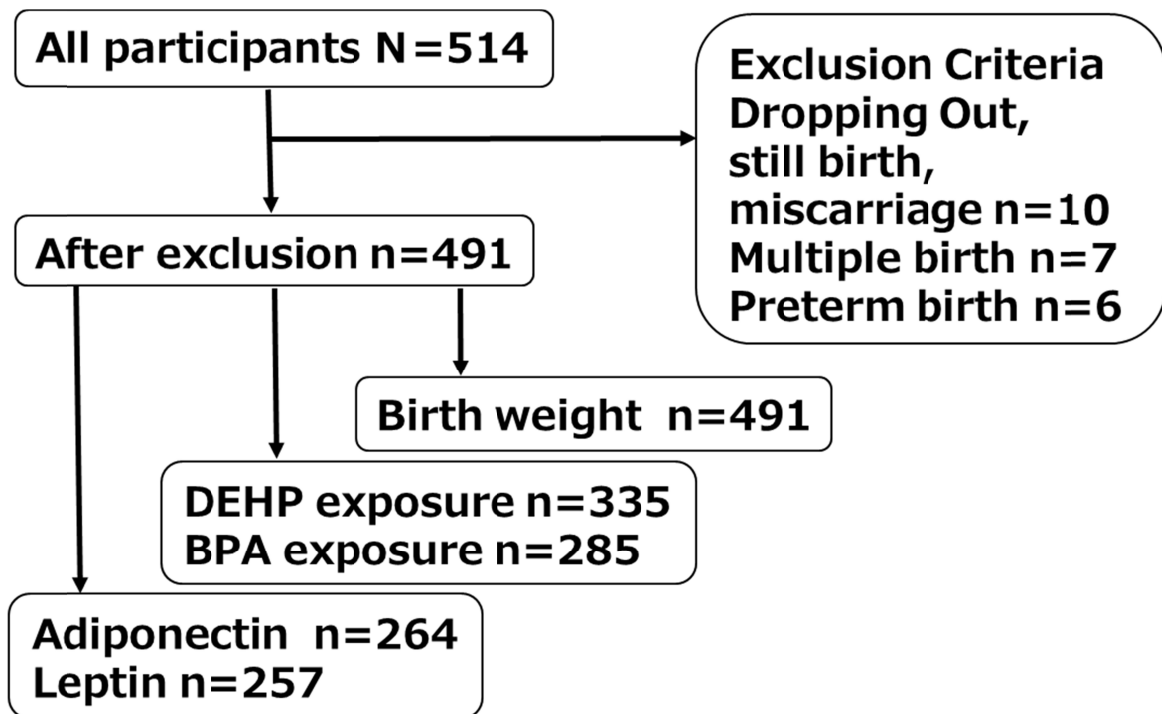


Figure 1. Participants' selection flow in this study.

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.

Characteristics	All % or mean (SD)	Boys % or mean (SD)	Girls % or mean (SD)
Maternal characteristics	N = 491		
Age at delivery (years)	30.7 (4.9)		
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	21.2 (3.2)		
Parity-nulliparous	47.8%		
Smoking Never/quit before pregnancy	59.7%		
Quit after finding pregnancy	23.4%		
Current smoker	16.9%		
Education (years) 12	44.6%		
13	55.4%		
Family income (yen) < 5M	68.2%		
5M	31.2%		
Paternal characteristics	N = 491		
Age (years)	32.3 (5.7)		
BMI (kg/m ²)	23.2 (3.4)		
Education (years) 12	43.8%		
13	56.2%		
Child characteristics	N = 491	N=233	N=258
Gestational age (days)	275.6 (9.6)	275.0 (9.4)	276.0 (9.7)
Birth weight (g)	3064 (374)	3113 (378)	3020 (365)
Ponderal Index (kg/m ³)	27.6 (3.6)	27.6 (4.5)	27.6 (2.4)

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 Measurements of MEHP, BAP and adipokines.

Biomarkers	All		Boys		Girls	
	N	Median (IQR)	N	Median (IQR)	N	Median (IQR)
MEHP (ng/ml)	335	10.70 (6.30-17.05)				
BPA (ng/ml)	285	0.051 (LOD-0.076)				
Total adiponectin (μ g/ml)	264	19.1 (15.0-22.8)	127	18.3 (14.1-21.2)	137	19.7 (16.0-23.8)
HMW adiponectin (μ g/ml)	264	12.7 (9.5-15.5)	127	11.4 (8.9-14.8)	137	13.1 (10.2-16.7)
Leptin (ng/ml)	257	5.9 (3.8-9.3)	125	5.0 (3.4-6.6)	132	7.4 (4.4-11.8)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 3 Distribution of maternal MEHP and cord blood BPA levels by maternal characteristics.

		MEHP (ng/ml) N=335		BPA (ng/ml) N=285	
Characteristics		GM	p value	GM	p value
Age (years)	24	11.21	0.823	0.051	0.714
	25-29	11.20		0.047	
	30-34	10.52		0.046	
	35	10.84		0.046	
BMI (kg/m ²) < 18.5		11.44	0.819	0.048	0.123
	18.5-24.9	10.88		0.046	
	25.0-29.9	9.70		0.063	
	30	10.76		0.063	
Parity 0		10.68	0.444	0.047	0.684
	1	11.17		0.047	
Education (years)	12	10.94	0.885	0.046	0.967
	13	10.84		0.048	
Family income (yen) < 5M		10.62	0.190	0.048	0.586
	5M	11.42		0.046	
Smoking never/quit before pregnancy		10.94	0.802	0.046	0.794
	quit after finding pregnancy	10.80		0.048	
	current smoker	10.81		0.048	

p values were obtained from Mann-Whitney's U test or Kruskal-Wallis test.

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 4 Association between maternal MEHP and cord blood BPA levels and fetal adipokines.

	All			Boys			Girls		
	N	β	95% CI	N	β	95% CI	N	β	95 % CI
MEHP									
Total adiponectin ($\mu\text{g/ml}$)^{a)}	187	0.02	-0.04, 0.09	91	0.12	0.03, 0.21**	96	-0.04	-0.13, 0.06
HMW adiponectin ($\mu\text{g/ml}$)^{a)}	187	0.04	-0.05, 0.12	91	0.15	0.03, 0.27**	96	-0.03	-0.15, 0.09
Leptin (ng/ml)^{b)}	181	-0.13	-0.27, 0.01†	89	0.08	-0.12, 0.28	92	-0.29	-0.49, -0.10**
BPA									
Total adiponectin ($\mu\text{g/ml}$)^{a)}	251	0.03	-0.03, 0.09	118	0.04	-0.05, 0.13	133	0.03	-0.05, 0.10
HMW adiponectin ($\mu\text{g/ml}$)^{a)}	251	0.04	-0.04, 0.11	118	0.04	-0.08, 0.16	133	0.04	-0.06, 0.13
Leptin (ng/ml)^{b)}	245	0.07	-0.05, 0.19	117	0.05	-0.12, 0.21	128	0.09	-0.09, 0.27

^{a)} Adjusted for child sex and maternal BMI

^{b)} Adjusted for child sex, maternal BMI and gestational age

† p < 0.10, ** p < 0.01

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 5 Association between maternal MEHP levels, cord blood BPA levels and birth weight.

	All			Boys			Girls		
	N	β^a	95%CI	N	β^b	95%CI	N	β^b	95%CI
MEHP	335			161			174		
Weight (g)		-36.5	-162.4, 89.4		33.5	-169.5, 236.5		-81.2	-243.0, 80.5
Ponderal Index (kg/m³)		-0.57	-2.10, 0.96		-0.08	-3.21, 3.06		-0.85	-2.03, 0.33
BPA	285			127			158		
Weight (g)		54.1	-69.5, 177.7		63.4	-116.4, 243.2		46.8	-126.5, 220.2
Ponderal Index (kg/m³)		0.44	-0.47, 1.36		1.10	-0.26, 2.45		-0.04	-1.29, 1.21

^{a)} Adjusted for child sex, parental BMIs and gestational age.

^{b)} Adjusted for parental BMI 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

Table S1 Distribution of adipokines and birth weight by maternal characteristics.

	Total adiponectin (μg/ml)	HMW adiponectin (μg/ml)	Leptin (ng/ml)	Birth weight (g)
Maternal characteristics	median	median	median	mean (SD)
Age (years) 24	18.7	12.2	8.2	3068 (367)
25-29	18.8	12.6	5.5	3077 (375)
30-34	20.3	13.4	6.3	3068 (376)
35	16.9	11.0	5.4	3039 (375)
BMI (kg/m ²) < 18.5	18.2†	11.4†	4.3*	2951 (371)*
18.5-24.9	18.8	12.6	6.0	3083 (371)
25.0-29.9	20.4	12.4	7.0	3059 (435)
30	22.9	16.1	8.6	3163 (160)
Education (years) 12	19.7	12.8	6.1	3044 (376)
13	18.6	12.4	5.7	3079 (372)
Family income (yen) < 5M	19.5	12.8	5.8	3076 (368)
5M	18.3	11.9	6.0	3042 (386)
Smoking never/quit before pregnancy	19.0	12.7	5.8	3062 (378)
quit after finding pregnancy	18.4	12.0	5.9	3097 (392)
current smoker	19.7	12.8	6.0	3022 (331)

p values were obtained from Mann-Whitney's U test or Kruskal-Wallis test.

* P < 0.05, †p < 0.10

胎児期における喫煙曝露と学童期の注意欠陥/多動性障害(ADHD)傾向との関連

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 池野 多美子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

本研究は、胎児期における喫煙曝露と学童期における児の ADHD 傾向の関連を検討したものである。本研究では、母親、および、父親の喫煙に由来する胎児の喫煙曝露を、妊娠初期、妊娠中期、妊娠後期という複数の曝露時期別に評価することで、各時期における喫煙曝露が 8 歳時の児の ADHD 傾向に与える影響を検討した。加えて、母親の禁煙行動と児の ADHD 傾向との関連も検討した。ADHD 傾向群であるか否かを従属変数としたロジスティック回帰分析の結果、妊娠前の母親の喫煙は、喫煙しない場合と比較して ADHD 傾向に有意な影響を与えなかった。一方で、妊娠初期(OR=1.769, 95%CI: 1.25-2.502)、妊娠中期(OR=1.56, 95%CI: 1.105-2.204)、妊娠後期 (OR=1.577, 95%CI:1.099-2.265)における喫煙は、喫煙しない場合と比較して有意にリスクを上昇させた。また、妊婦の禁煙行動と児の ADHD 傾向との関連について、妊娠初期で禁煙を行った母親は、有意に ADHD のリスクを下げる事が示唆された(OR=0.565, 95%CI:0.354-0.902)。一方で、父親の喫煙の影響は、どの曝露時期においても観察されなかった。

研究協力者

西原 進吉, 山崎圭子, 宮下ちひろ
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

A. 研究目的

注意欠如多動性障害 (attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD) は、年齢あるいは発達に不釣り合いな注意力、及び/又は衝動性、多動性を特徴とする行動の障害で、社会的な活動や学業の機能に支障をきたすものと定義されている。発症機序は依然として不明であるが、近年、発症に関わる原因の一つとして、胎児期における喫煙曝露が挙げられている。

胎児期における喫煙曝露と ADHD の関連については、比較的多くの研究が行われており、およそ、胎児期曝露によるリスクの上昇を示している (Braun, Kahn,

Froehlich, Auinger, & Lanphear, 2006; D'Onofrio et al., 2008; Gatzke-Kopp & Beauchaine, 2007; Han et al., 2015; Keyes, Davey Smith, & Susser, 2014; Kotimaa et al., 2003; Obel et al., 2009; Rodriguez & Bohlin, 2005; Zhu et al., 2014)。しかし、これらの先行研究では、妊娠期間中のどの時期での喫煙曝露が ADHD リスクに影響を与えるのかという問題がほとんど検討されておらず、明らかではない。

精神発達に関わる中枢神経系の形成は、妊娠 5 週頃から開始されることが知られており、喫煙曝露と ADHD の関係をより詳細に明らかにするためには、喫煙曝露に対し感受性の高い時期を特定することが重要である。喫煙曝露に対して感受性の高い時期を特定することは、その時期までに禁煙を行うことが、ADHD の予防におい

て有効であるということを示すこととなり、禁煙行動の奨励につながるはずである。このような知見の存在は厚生労働行政において重要であろうと思われるが、少なくとも ADHD との関連を検討した先行研究でこのような研究は存在しない。

そこで、本研究では、妊娠前と、妊娠中の複数の時期（妊娠初期、妊娠中期、妊娠後期）での喫煙曝露評価を行い、各時期における喫煙曝露が学童期の子ども（8歳時）の ADHD 傾向と関連するか否かを検討する。加えて、禁煙行動の奨励につながるような知見を提供するために、妊婦が禁煙行動を行った時期と学童期子どもの ADHD 傾向との関連も検討する。

B．研究方法

本研究には、「環境と子どもの健康に関する北海道研究（北海道スタディ）」における大規模コーホートのデータが用いられた。北海道スタディ大規模コーホートは、2003 年から始まり、現在も進行中の出生前向きコーホートである。北海道スタディ大規模コーホートは、妊娠初期（13 週まで）に参加登録が行われ、20926 名の妊婦が参加している。

本研究のデータは、2003 年 4 月から 2007 年 3 月までに生まれ、2015 年 4 月の段階で 8 歳を迎えた児で、ダウン症である児 14 名を除外し、8 歳まで追跡可能であった母児 6220 名のうち、8 歳質問票が回収可能であった母児 3258 名が調査対象となった(Figure 1)。

ADHD に関する評価は、児が 8 歳になった段階で送付される質問票内の情報に基づいて実施された。送付された質問票は、児の保護者が回答するものであり、その中で、ADHD-RS 得点によるカットオフ（DuPaul et al., 1998）、および、医師による ADHD 診断の有無に関する情報を組み合わせて用いられた。具体的には、

ADHD-RS 得点から、ADHD に分類される児、もしくは、ADHD に関する診断がある児を、ADHD 傾向群、そうでない児を健常群と定義した。

本研究において、喫煙曝露の評価が、複数の時点において実施された。「妊娠前」と「妊娠初期」の喫煙曝露評価に関しては、妊娠 13 週目までに回収された調査票から、「父母の喫煙有無」、「父母の一日あたり喫煙本数」、および、「母親の禁煙週」の情報が用いられた。また、産後 4 ヶ月のタイミングで送付される質問票においても、妊娠中の父母の喫煙ステータス情報を収集しており、その中に収録されている、「妊娠中に禁煙をした週」の情報から、「妊娠中期」、「妊娠後期」の喫煙状況を後ろ向きに推定することで曝露評価を行った。加えて、北海道スタディ大規模コーホートでは、妊娠後期に母体血を採取しており、本研究では、母体血中のコチニン濃度を測定し、Sasaki ら(2012)の分類に基づいて、非喫煙(0.21ng/ml 未満)、受動喫煙(0.21ng/ml 以上、11.49ng/ml 未満)、能動喫煙(11.49ng/ml 以上)の3つの曝露レベルを定義した。

統計的解析として、ADHD 傾向群と健常群間の基本属性に差が観察されるか否かについて、カイ二乗検定を用いて検討された。次いで、8歳の段階で ADHD 傾向群であるか否かを従属変数としたロジスティック回帰分析を実施した。共変量に関しては、ADHD 傾向群と健常群間で有意な差が観察された項目を用いて調整が行われ、「妊娠前」、「妊娠初期」、「妊娠中期」、「妊娠後期」における喫煙曝露が 8 歳時の ADHD 傾向のオッズ比を上昇させるか、また、妊娠期間中の母親の禁煙行動が ADHD 傾向のオッズ比を低下させるか検討した。

（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た。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えいが一切生じないように、研究者によりデータ保管を厳重に行った。

C . 研究結果

ADHD 傾向群の選定には、ADHD-RS のカットオフ判定を用いて 403 名が、ADHD の診断情報を用いて 18 名が ADHD 傾向群に分類された。両者いずれかに分類された児を ADHD 傾向群と定義し、計 501 名が ADHD 傾向群とされた。ADHD 傾向率は 15.3%であった。

健常群と ADHD 傾向群に分類された児の、基本属性は Table1 の通りである。カイ二乗検定を実施して、群間に有意な差が観察された項目は、児の性別、出産年齢、出産回数、世帯年収、父学歴、在胎週数、葉酸摂取有無であった。また、健常群と ADHD 傾向群に分類された児の母親 (Table2) と父親 (Table3) の喫煙行動の違いに関して、父親の喫煙行動に関してはどの時期においても群間で有意な差は観察されなかったものの、母親の喫煙行動は、妊娠初期、妊娠中期、妊娠後期において群間で有意な差が見られた。

ADHD 傾向群であるか否かを従属変数としたロジスティック回帰分析の結果は Table 4 から Table 9 に示した通りである。出産前の母親の喫煙の有無に関して (Table 4)、妊娠前の喫煙は、喫煙しない場合と比較して ADHD 傾向に有意な影響を与えなかった。一方で、妊娠初期 (OR=1.769, 95%CI: 1.25-2.502)、妊娠中期 (OR=1.56, 95%CI: 1.105-2.204)、妊娠後期 (OR=1.577, 95%CI: 1.099-2.265) における喫煙は、喫煙しない場合と比較して有意にオッズ比を上昇させた。また、妊娠

前と妊娠初期における喫煙本数についても (Table 5)、妊娠前の喫煙本数は ADHD 傾向に影響を与えなかったものの、妊娠初期の喫煙本数は、児の ADHD 傾向に有意な影響を与えることが示されており、非喫煙の母親に比べて、特に、一日に 10 本から 19 本喫煙する母親は、ADHD のリスクが 2.3 倍に上昇した (OR=2.319, 95%CI: 1.353-3.975)。加えて、妊娠後期の母体血中のコチニン濃度に依拠した喫煙曝露評価においても (Table 4)、非喫煙レベルを基準とした場合、能動喫煙レベルにおいてのみ有意にオッズ比を上昇させた (OR=1.445, 95%CI: 1.008-2.072)。

一方、父親からの喫煙曝露の影響 (Table 5, Table 6) に関しては、どの曝露期間においても、喫煙の有無、喫煙本数共に、オッズ比の有意な上昇は認められなかった。

最後に、妊娠中の母の禁煙行動が、ADHD のリスクに関連するか否かの検討を行ったところ、妊娠中に継続して喫煙をし続けた母親を基準とした場合、非喫煙の母親 (OR=0.662, 95%CI: 0.409-0.944) と、妊娠初期で禁煙を行った母親 (OR=0.565, 95%CI: 0.354-0.902) において、有意に ADHD のリスクを下げることが示唆された (Table 8)。一方で、妊娠中期と後期の禁煙は ADHD のリスクを低下させないようである。

D . 考察

本研究は、母親と父親の喫煙行動、禁煙行動を追跡することにより、胎児期における喫煙曝露が、8 歳時の ADHD 傾向と関連するか否かを検討した。

出産前の喫煙曝露と ADHD の関連について検討した過去のコーホート研究では、多くの研究で胎児期曝露の影響が観察されている (e.g., Braun, Kahn, Froehlich, Auinger, & Lanphear, 2006; D'Onofrio et al., 2008; Gatzke-Kopp & Beauchaine, 2007; Han et al., 2015; Keyes, Davey

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

Smith, & Susser, 2014; Kotimaa et al., 2003; Obel et al., 2009; Rodriguez & Bohlin, 2005; Zhu et al., 2014)。これらの研究の中で、近年、検討が必要と考えられている問題がいくつか存在する。それは、(1)妊娠中における感受性の高い曝露時期を特定する、(2)父親からの喫煙曝露の影響を評価する、(3)妊娠中の禁煙行動の効果を明らかにするというものである。加えて、これらすべての先行研究においては、質問票やインタビューのみを用いた喫煙曝露の評価が行われているため、(4)生体試料に基づいた評価を行うことも極めて重要なことと思われる。本研究の結果は、出産前の喫煙曝露と児の ADHD の関係における、これらの問題について示唆を与えるデータを提供したといえる。

まず、喫煙曝露時期に関して、多くの先行研究では、妊娠中のどの時期に喫煙曝露がなされたかということは明らかではないが、一部の研究においては、妊娠初期に収集された母親の喫煙情報を用いて、喫煙曝露の影響を示しているものの(Kotimaa et al., 2003; Zhu et al., 2014)、妊娠初期以外の曝露の影響は不明である。また、妊娠後半のみに焦点を当てて曝露評価を行った研究(Gatzke-Kopp & Beauchaine, 2007)も存在するが、こちらは、初期の影響が不明である。さらに、妊娠時期を前期と後期に分けて解析を行った研究では(Rodriguez & Bohlin, 2005)、母親の妊娠前半の喫煙の影響が示されているが、用いたサンプル数が少なく(N=290)、多くのサンプル用いた詳細な検討が必要とされている。

本研究では、出産前の喫煙曝露を、妊娠前、妊娠初期、妊娠中期、妊娠後期に分けて曝露評価を行い、それぞれの時点での喫煙曝露の影響を検討した。その結果、Table 4 および Table 5 で示した通り、妊娠前の喫煙有無や、喫煙量は、学童期の児の

ADHD 傾向と関連しないこと。また、妊娠初期、中期、後期における母親の喫煙有無や喫煙量が、学童期の児の ADHD 傾向と関連することが明らかになった。この結果は、一見、すべての妊娠期の喫煙が、児の ADHD と関連すると解釈することができるかもしれない。しかし、妊娠初期に喫煙をした母親のほとんどが中期(83.4%)、後期(76.8%)と、喫煙を継続していることから、この結果は、妊娠初期の喫煙曝露が ADHD に対して重要である可能性を示唆するものと思われる。

次いで、父親からの喫煙曝露の影響に関しては、影響が認められる研究(Han et al., 2015; Langley, Heron, Smith, & Thapar, 2012)や、認められない研究(Keyes et al., 2014)が散見され、結果が一貫していない。本研究では、妊娠前、妊娠初期、妊娠中期、妊娠後期という、複数の時点での喫煙曝露評価を行ったが、いずれも、児の ADHD 傾向との有意な関連は認められなかった。

母親の禁煙行動に関して、先行研究では、一部検討した研究は存在するものの(Kotimaa et al., 2003; Obel et al., 2009; Zhu et al., 2014)、研究数が非常に少ない。加えて、これらの研究では、非喫煙者を基準に禁煙者や喫煙者で ADHD のリスクが上昇するというデータを示しており、禁煙の有効性は必ずしも認められていない。本研究は、妊娠中に喫煙をし続けた母を基準とし、非喫煙者、妊娠初期禁煙者、妊娠中期禁煙者、妊娠後期禁煙者で有意に ADHD のリスクを低下させるか否かを検討した。その結果、Table 8 で示した通り、非喫煙者と妊娠初期喫煙者は、喫煙継続者に比べて ADHD のリスクを約 6 割程度に低下させることが示された。この結果は、喫煙者であっても妊娠が発覚した段階での禁煙が ADHD の予防に有効であるということを意味し、予防医学的観点に立脚した場合、非常に重要な知見であると思われる。

る。

最後に、胎児期の喫煙曝露について検討した過去のコーホート研究では、生体試料に基づいた曝露評価がなされておらず、この点は、多くの研究で Limitation として明記されている。本研究では、妊娠後期の母体血から測定されたコチニン濃度に基づいた曝露評価の結果、能動喫煙レベルの濃度の母親から生まれた子どもにおいて ADHD のリスクが有意に上昇するという結果が得られており、これはニコチンに対する曝露の影響を直接的に示した過去にない重要な結果と考えることができる。

E . 結論

本研究の結果から、妊娠前の父母の喫煙は、8歳の児の ADHD 傾向に影響を与えないが、妊娠中の母親の喫煙は、ADHD 傾向のリスクを上昇させることが明らかになり、特に妊娠初期における喫煙の重要性が示唆された。また、妊娠中の母親の禁煙行動に関して、妊娠初期における禁煙行動が、ADHD のリスクを低下させることが明らかになった。この知見は、妊娠が発覚した段階での禁煙行動が、子どもの ADHD の予防に有効であることを示している。

F . 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

- (1) 西原進吉,池野多美子,小林澄貴,佐々木倫子,岸玲子,胎児期の母と学童期の児の喫煙曝露と ADHD-RS との関連—北海道スタディー—. 第 74 回日本公衆衛生学会総会. 長崎市. 2015.11.4.-11.6.

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を

含む。）

該当なし

参考文献

- (1) Bandiera, F. C., Richardson, A. K., Lee, D. J., He, J. P., & Merikangas, K. R. (2011). Secondhand smoke exposure and mental health among children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 165(4), 332-338.
- (2) Braun, J. M., Kahn, R. S., Froehlich, T., Auinger, P., & Lanphear, B. P. (2006). Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environ Health Perspect*, 114(12), 1904-1909.
- (3) Cho, S. C., Kim, B. N., Hong, Y. C., Shin, M. S., Yoo, H. J., Kim, J. W., . . . Kim, H. W. (2010). Effect of environmental exposure to lead and tobacco smoke on inattentive and hyperactive symptoms and neurocognitive performance in children. *J Child Psychol Psychiatry*, 51(9), 1050-1057.
- (4) D'Onofrio, B. M., Van Hulle, C. A., Waldman, I. D., Rodgers, J. L., Harden, K. P., Rathouz, P. J., & Lahey, B. B. (2008). Smoking during pregnancy and offspring externalizing problems: an exploration of genetic and environmental confounds. *Dev Psychopathol*, 20(1), 139-164.
- (5) Gatzke-Kopp, L. M., & Beauchaine, T. P. (2007). Direct and passive prenatal nicotine exposure and the development of externalizing psychopathology. *Child Psychiatry*

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

- Hum Dev*, 38(4), 255-269.
- (6) Han, J. Y., Kwon, H. J., Ha, M., Paik, K. C., Lim, M. H., Gyu Lee, S., Kim, E. J. (2015). The effects of prenatal exposure to alcohol and environmental tobacco smoke on risk for ADHD: a large population-based study. *Psychiatry Res*, 225(1-2), 164-168.
- (7) Kabir, Z., Connolly, G. N., & Alpert, H. R. (2011). Secondhand smoke exposure and neurobehavioral disorders among children in the United States. *Pediatrics*, 128(2), 263-270.
- (8) Keyes, K. M., Davey Smith, G., & Susser, E. (2014). Associations of prenatal maternal smoking with offspring hyperactivity: causal or confounded? *Psychol Med*, 44(4), 857-867.
- (9) Kollins, S. H., Garrett, M. E., McClernon, F. J., Lachiewicz, A. M., Morrissey-Kane, E., FitzGerald, D., Ashley-Koch, A. E. (2009). Effects of postnatal parental smoking on parent and teacher ratings of ADHD and oppositional symptoms. *J Nerv Ment Dis*, 197(6), 442-449.
- (10) Kotimaa, A. J., Moilanen, I., Taanila, A., Ebeling, H., Smalley, S. L., McGough, J. J., Jarvelin, M. R. (2003). Maternal smoking and hyperactivity in 8-year-old children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 42(7), 826-833.
- (11) Langley, K., Heron, J., Smith, G. D., & Thapar, A. (2012). Maternal and paternal smoking during pregnancy and risk of ADHD symptoms in offspring: testing for intrauterine effects. *Am J Epidemiol*, 176(3), 261-268.
- (12) Max, W., Sung, H. Y., & Shi, Y. (2013). Attention deficit hyperactivity disorder among children exposed to secondhand smoke: a logistic regression analysis of secondary data. *Int J Nurs Stud*, 50(6), 797-806.
- (13) Obel, C., Linnet, K. M., Henriksen, T. B., Rodriguez, A., Jarvelin, M. R., Kotimaa, A., Olsen, J. (2009). Smoking during pregnancy and hyperactivity-inattention in the offspring--comparing results from three Nordic cohorts. *Int J Epidemiol*, 38(3), 698-705.
- (14) Rodriguez, A., & Bohlin, G. (2005). Are maternal smoking and stress during pregnancy related to ADHD symptoms in children? *J Child Psychol Psychiatry*, 46(3), 246-254.
- (15) Xu, X., Cook, R. L., Ilacqua, V. A., Kan, H., & Talbott, E. O. (2010). Racial differences in the effects of postnatal environmental tobacco smoke on neurodevelopment. *Pediatrics*, 126(4), 705-711.
- (16) Zhu, J. L., Olsen, J., Liew, Z., Li, J., Niclasen, J., & Obel, C. (2014). Parental smoking during pregnancy and ADHD in children: the Danish National birth cohort. *Pediatrics*, 134(2), e382-388.

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

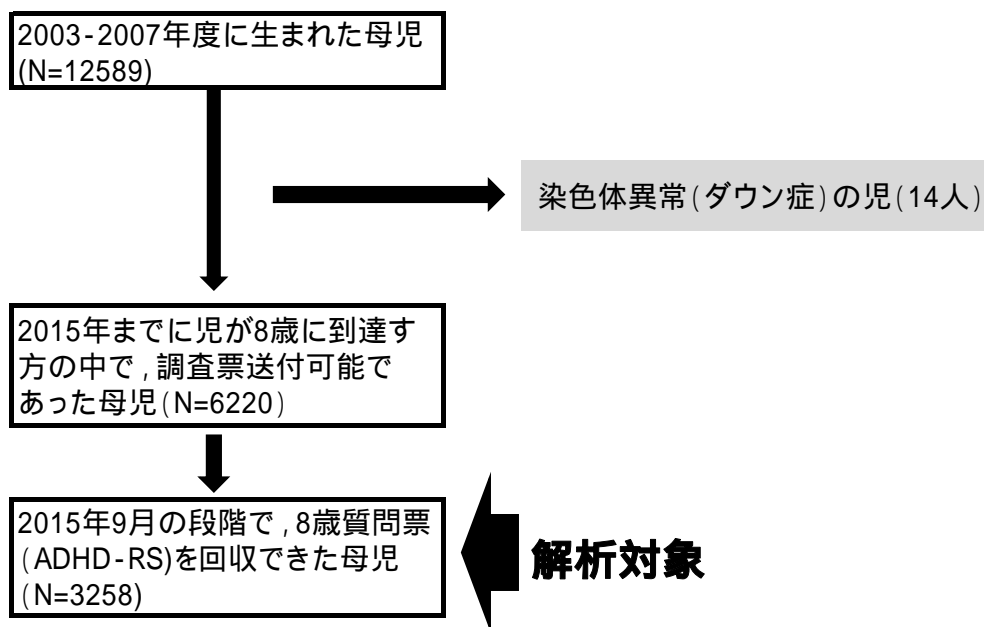


Figure1 . 本研究における解析対象者

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. 健常群および ADHD 傾向群における母児基本属性

	Normal (N=2757)			ADHD suspected (N=50)			P-value
	N	Number	%SD	N	Number	%SD	
Mother's Characteristic							
出産年齢	2757			501			0.003 *
24歳以下		189	6.9%		57	11.4%	
25歳-29歳		832	30.2%		145	28.9%	
30歳-34歳		1141	41.4%		186	37.1%	
35歳以上		595	21.6%		113	22.6%	
Missing		0	0.0%		0	0.0%	
BMI	2682			494			0.694
18.5未満		433	16.1%		72	14.6%	
18.5以上25未満		1965	73.3%		368	74.5%	
25以上		253	9.4%		46	9.3%	
Missing		31	1.2%		8	1.6%	
母学歴	2682			494			0.088
中学卒		58	2.2%		20	4.0%	
高校卒		1064	39.7%		184	37.2%	
短大・専門学校卒		1225	45.7%		236	47.8%	
大学卒		319	11.9%		52	10.5%	
その他		2	0.1%		0	0.0%	
Missing		14	0.5%		2	0.4%	
父学歴	2682			494			0.026 *
中学卒		133	5.0%		23	4.7%	
高校卒		1018	38.0%		211	42.7%	
短大・専門学校卒		618	23.0%		126	25.5%	
大学卒		854	31.8%		127	25.7%	
その他		13	0.5%		0	0.0%	
Missing		46	1.7%		7	1.4%	
世帯年収	2682			494			0.046 *
300万未満		418	15.6%		96	19.4%	
300万 499万		1035	38.6%		199	40.3%	
500万 799万		663	24.7%		106	21.5%	
800万以上		234	8.7%		33	6.7%	
Missing		332	12.4%		60	12.1%	
出産回数	2682			494			0.013 *
1回		1186	44.2%		259	52.4%	
2回		1053	39.3%		165	33.4%	
3回		377	14.1%		56	11.3%	
4回		27	1.0%		6	1.2%	
5回		14	0.5%		1	0.2%	
6回		6	0.2%		0	0.0%	
Missing		19	0.7%		7	1.4%	
妊娠初期飲酒	2682			491			0.691
なし		2280	85.0%		416	84.7%	
あり		384	14.3%		74	15.1%	
Missing		18	0.7%		4	0.8%	
妊娠初期葉酸摂取	2682			494			0.033 *
なし		2269	84.6%		396	80.2%	
あり		392	14.6%		90	18.2%	
Missing		21	0.8%		8	1.6%	
Child Characteristic							
性別	2757			501			0.005 *
男		1357	49.2%		281	56.1%	
女		1400	50.8%		220	43.9%	
Missing		0	0.0%		0	0.0%	
出生体重	2753			501			0.174
1500g未満		2	0.1%		57	11.4%	
1500g以上2500g未満		185	6.7%		145	28.9%	
2500g以上4000g未満		2537	92.2%		186	37.1%	
4000g以上		28	1.0%		113	22.6%	
Missing		1	0.0%		0.00	0.0%	
在胎週数	2733			494			0.044
<24 week		0	0.0%		0	0.0%	
25-29		1	0.0%		2	0.4%	
30-36		128	4.7%		21	4.3%	
37=<		2599	95.1%		471	95.3%	
Missing		5	0.2%		0	0.0%	

群間における、頻度の検定には 2乗検定を用いた。

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

Table 2 . 健常群および ADHD 傾向群における母親の喫煙関連行動

	Normal (N=2757)			DHD suspected (N=501)			P-value
	N	Number	%、SD	N	Number	%、SD	
Mother's Smoking							
妊娠前喫煙	2682			494			0.294
なし		1866	69.6%		332	67.2%	
あり		795	29.6%		158	32.0%	
Missing		21	0.8%		4	0.8%	
妊娠前喫煙本数	2682			494			0.843
0本		1863	69.5%		331	67.0%	
1本-9本		196	7.3%		33	6.7%	
10本-19本		395	14.7%		75	15.2%	
20本以上		202	7.5%		49	9.9%	
Missing		26	1.0%		6	1.2%	
妊娠初期喫煙	2682			494			0.001 *
なし		2394	89.3%		420	85.0%	
あり		191	7.1%		56	11.3%	
Missing		97	3.6%		18	3.6%	
妊娠初期喫煙本数	2682			494			0.005 *
0本		2394	89.3%		421	85.2%	
1本-9本		123	4.6%		29	5.9%	
10本-19本		57	2.1%		22	4.5%	
20本以上		11	0.4%		4	0.8%	
Missing		97	3.6%		18	3.6%	
妊娠中期喫煙(生後4か月調査票)	2543			471			0.043 *
なし		2238	88.0%		401	85.1%	
あり		213	8.4%		53	11.3%	
Missing		92	3.6%		17	3.6%	
妊娠後期喫煙(4か月調査票)	2543			471			0.035 *
なし		2264	89.0%		406	86.2%	
あり		187	7.4%		48	10.2%	
Missing		92	3.6%		17	3.6%	
妊娠後期喫煙(母体血コチニン値)	2417			433			0.052
非喫煙		2009	83.1%		346	79.9%	
受動喫煙		210	8.7%		36	8.3%	
能動喫煙		198	8.2%		51	11.8%	
Missing		0	0.0%		0	0.0%	
妊娠中禁煙行動	2641			481			0.157
非喫煙		1470	55.7%		256	53.2%	
妊娠初期禁煙		440	16.7%		76	15.8%	
妊娠中期禁煙		13	0.5%		3	0.6%	
妊娠後期禁煙		10	0.4%		1	0.2%	
喫煙		136	5.1%		38	7.9%	
Missing		572	21.7%		107	22.2%	

群間における、頻度の検定には 2乗検定を用いた。

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

Table 3 . 健常群および ADHD 傾向群における父親の喫煙関連行動

	Normal (N=2757)			ADHD suspected (N=501)			P-value
	N	Number	M,SD	N	Number	%,SD	
Father's smoking status							
妊娠前喫煙	2682			494			0.732
なし		952	35.5%		176	35.6%	
あり		1631	60.8%		291	58.9%	
Missing		99	3.7%		27	5.5%	
妊娠前喫煙本数	2682			494			0.672
0本		952	35.5%		176	35.6%	
1本-9本		146	5.4%		30	6.1%	
10本-19本		531	19.8%		89	18.0%	
20本以上		929	34.6%		168	34.0%	
Missing		124	4.6%		31	6.3%	
妊娠初期喫煙	2682			494			0.76
なし		1091	40.7%		202	40.9%	
あり		1504	56.1%		270	54.7%	
Missing		87	3.2%		22	4.5%	
妊娠初期喫煙本数	2682			494			0.942
0本		1092	40.7%		202	40.9%	
1本-9本		199	7.4%		39	7.9%	
10本-19本		542	20.2%		95	19.2%	
20本以上		741	27.6%		132	26.7%	
Missing		108	4.0%		26	5.3%	
妊娠中期喫煙	2543			471			0.373
なし		1056	41.5%		206	43.7%	
あり		1393	54.8%		248	52.7%	
Missing		94	3.7%		17	3.6%	
妊娠後期喫煙	2543			471			0.344
なし		1074	42.2%		210	44.6%	
あり		1375	54.1%		244	51.8%	
Missing		94	3.7%		17	3.6%	

群間における、頻度の検定には 2乗検定を用いた。

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

Table 4 . 妊娠前および妊娠中における母の喫煙行動と児の ADHD 傾向の関連（ロジスティック回帰分析結果：喫煙有無）

		Crude			Model		
		オッズ比	95%CI	p値	オッズ比	95%CI	p値
母妊娠前喫煙	非喫煙	ref			ref		
	喫煙	1.117	(0.908 - 1.374)	0.294	1.06	(0.84 - 1.337)	0.626
母妊娠初期喫煙	非喫煙	ref			ref		
	喫煙	1.671	(1.219 - 2.291)	0.001 *	1.769	(1.25 - 2.502)	0.001 *
母妊娠中期喫煙	非喫煙	ref			ref		
	喫煙	1.389	(1.009 - 1.911)	0.044 *	1.56	(1.105 - 2.204)	0.012 *
母妊娠後期喫煙	非喫煙	ref			ref		
	喫煙	1.431	(1.025 - 1.999)	0.035 *	1.577	(1.099 - 2.265)	0.014 *
母妊娠後期喫煙(コチニン)	非喫煙	ref			ref		
	受動喫煙	0.995	(0.687 - 1.443)	0.98	0.859	(0.563 - 1.311)	0.482
	能動喫煙	1.496	(1.077 - 2.077)	0.016 *	1.445	(1.008 - 2.072)	0.045 *

model：性別，出産年齢，在胎週数，世帯収入，父学歴，出産回数，葉酸摂取有無で調整

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 5 . 妊娠前および妊娠中における母の喫煙行動と児の ADHD 傾向の関連（ロジスティック回帰分析結果：喫煙本数）

		Crude			Model		
		オッズ比	95%CI	p値	オッズ比	95%CI	p値
母妊娠前喫煙本数	0本/日	ref			ref		
	1-9本/日	0.948	(0.644 - 1.395)	0.785	0.838	(0.542 - 1.295)	0.425
	10-19本/日	1.069	(0.813 - 1.404)	0.634	1.035	(0.768 - 1.395)	0.822
	20本以上/日	1.365	(0.978 - 1.905)	0.067	1.31	(0.908 - 1.891)	0.149
母妊娠初期喫煙本数	0本/日	ref			ref		
	1-9本/日	1.341	(0.883 - 2.036)	0.169	1.337	(0.843 - 2.122)	0.218
	10-19本/日	2.195	(1.328 - 3.628)	0.002 *	2.319	(1.353 - 3.975)	0.002 *
	20本以上/日	2.068	(0.655 - 6.524)	0.215	3.419	(0.976 - 11.972)	0.055

Model：性別，出産年齢，在胎週数，世帯収入，父学歴，出産回数，葉酸摂取有無で調整

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 6．妊娠前および妊娠中における父の喫煙行動と児の ADHD 傾向の関連（ロジスティック回帰分析結果：喫煙有無）

		Crude			Model		
		オッズ比	95%CI	p値	オッズ比	95%CI	p値
父妊娠前喫煙	非喫煙	ref			ref		
	喫煙	0.965	(0.787 - 1.183)	0.732	0.949	(0.75 - 1.202)	0.666
父妊娠初期喫煙	非喫煙	ref			ref		
	喫煙	0.97	(0.795 - 1.182)	0.76	0.957	(0.762 - 1.202)	0.706
父妊娠中期喫煙	非喫煙	ref			ref		
	喫煙	0.913	(0.746 - 1.116)	0.373	0.897	(0.713 - 1.129)	0.356
父妊娠後期喫煙	非喫煙	ref			ref		
	喫煙	0.908	(0.742 - 1.11)	0.344	0.292	(0.703 - 1.112)	0.292

model：性別，出産年齢，在胎週数，世帯収入，父学歴，出産回数，葉酸摂取有無で調整

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 7. 妊娠前および妊娠中における父の喫煙行動と児の ADHD 傾向の関連（ロジスティック回帰分析結果：喫煙本数）

		Crude			Model		
		オッズ比	95%CI	p値	オッズ比	95%CI	p値
父妊娠前喫煙本数	0本/日	ref			ref		
	1-9本/日	1.111	(0.727 - 1.699)	0.626	1.269	(0.794 - 2.028)	0.32
	10-19本/日	0.907	(0.688 - 1.195)	0.487	0.805	(0.586 - 1.105)	0.18
	20本以上/日	0.978	(0.777 - 1.231)	0.851	0.987	(0.759 - 1.283)	0.922
父妊娠初期喫煙本数	0本/日	ref			ref		
	1-9本/日	1.059	(0.728 - 1.541)	0.763	1.094	(0.724 - 1.653)	0.67
	10-19本/日	0.948	(0.727 - 1.235)	0.69	0.863	(0.639 - 1.166)	0.337
	20本以上/日	0.963	(0.759 - 1.222)	0.757	0.985	(0.753 - 1.289)	0.911

model：性別，出産年齢，在胎週数，世帯収入，父学歴，出産回数，葉酸摂取有無で調整

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 8 . 妊娠中の母の禁煙行動と児の ADHD 傾向の関連（ロジスティック回帰分析結果：喫煙継続群を referent とする）

		Crude			Model		
		オッズ比	95%CI	p値	オッズ比	95%CI	p値
禁煙時期	非喫煙	0.623	(0.425 - 0.914)	0.016 *	0.622	(0.409 - 0.944)	0.026 *
	妊娠初期禁煙	0.618	(0.4 - 0.954)	0.03 *	0.565	(0.354 - 0.902)	0.017 *
	妊娠中期禁煙	0.826	(0.224 - 3.048)	0.774	1.034	(0.267 - 4.012)	0.961
	妊娠後期禁煙	0.358	(0.044 - 2.884)	0.335	0.598	(0.069 - 5.138)	0.639
	喫煙継続	ref			ref		

model：性別，出産年齢，在胎週数，世帯収入，父学歴，出産回数，葉酸摂取有無で調整

妊婦の喫煙が母の遺伝子多型を介して児の出生時体格に及ぼす影響

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 佐田 文宏 東京医科歯科大学難治疾患研究所 非常勤講師

研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科 助教

研究要旨

胎児期の母の喫煙と児の出生時体格の減少との関連の報告があり、これらの関連には芳香族炭化水素受容体 (AHR) やシトクロム P450 (CYP) 1A1 遺伝子多型が関与することも分かっている。しかし、DNA 修復遺伝子である X-ray cross-complementing gene 1 (XRCC1) の関与はまだわかっていない。そこで本研究では、AHR (G>A, Arg554Lys, rs2066853), CYP1A1 (A>G, Ile462Val, rs1048943) および XRCC1 (C>T, Arg194Trp, rs1799782) 遺伝子多型について、母の喫煙曝露によるこれらの遺伝子型の違いが出生時体格に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。2003 ~ 2007 年に前向きコーホート研究に参加登録した 3,263 名が対象者で、妊娠後期の母体血漿コチニン値でカットオフし (カットオフ値 = 11.48 ng/mL)、非喫煙群 (1,998 名) と喫煙群 (1,265 名) に分けた。重回帰分析を使って、胎児期の母の喫煙と児の出生時体格との関連を遺伝要因も含めて検討した。その結果、非喫煙群の児と比較して、喫煙群の児の出生体重は 71 g 有意に小さかった (95% 信頼区間 (CI); -103, -40)。遺伝要因を含めると、AHR-GA/AA 型、CYP1A1-AA 型で、XRCC1-CC 型をもつ非喫煙群の児と比較して、AHR-GG 型、CYP1A1-AG/GG 型で、XRCC1-CT/TT 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 145 g 有意に小さかった (95% CI; -241, -50)。これらの結果から、AHR-GG 型、CYP1A1-AG/GG 型で XRCC1-CT/TT 型の組合せをもつ喫煙群の児は、出生時体格の減少により大きな影響が認められた。

研究協力者

小林 澄貴, 宮下ちひろ
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

A . 研究目的

近年、わが国では低出生体重児の増加が報告されている。妊娠中の栄養状況、妊娠合併症、薬物、喫煙や飲酒といった生活習慣、胎児の性別、出生順位、社会経済要因などが低出生体重に及ぼす要因としてあげられる。特に胎児期の母の喫煙はライフスタイルを変えると止められる要因であることから、本研究では喫煙に着目した。たばこ煙中には約 4,000 種類の化学物質が含まれ、多環芳香族炭化

水素 (Polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs) は発がん性が既に認められている。

細胞内に入った PAHs は芳香族炭化水素受容体 (Aromatic hydrocarbon receptor: AHR) と結合して核内に移行し、AHR 核転写因子 (AHR nuclear translocator: ARNT) と結合して異物代謝酵素であるシトクロム P450 (Cytochrome P450: CYP) 1A1 の発現を誘導し代謝中間体になる。代謝中間体は DNA と付加体を形成する。この PAH-DNA 付加体は DNA を修復する遺伝子 X-ray cross-complementing gene 1 (XRCC1) によって、DNA が修復されるので、PAHs に対する XRCC1 の関与が示唆される。そこ

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

で本研究では、*AHR* (G>A, Arg554Lys, rs2066853), *CYP1A1* (A>G, Ile462Val, rs1048943) および *XRCC1* (C>T, Arg194Trp, rs1799782) 遺伝子多型について、母の喫煙曝露によるこれらの遺伝子型の違いが出生時体格に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

北海道内 40 産科病院外来を受診し同意を得た妊娠初期の妊婦を対象に、出生前向きコホート研究を実施した。対象者の基本的属性は自記式調査票、出生時所見は病院記録から得た。妊娠後期に母体血漿を採取し、Enzyme-linked Immunosolvent Assay (ELISA)法でコチニン値を求めた。そして Receiver Operating Characteristic (ROC)曲線を用いてコチニン値による非喫煙群と喫煙群のカットオフ値を算出した（カットオフ値 = 11.48 ng/mL）（Sasaki et al., 2011）。出産時の血液から DNA を抽出し、PAHs の受容体、代謝や DNA 修復に關与する遺伝子多型として、*AHR* (G>A, rs2066853), *CYP1A1* (A>G, rs1048943) および *XRCC1* (C>T, rs1799782) 遺伝子多型はリアルタイム PCR 法で解析した。生後 4 か月時に母から児の出生時体格情報について母子健康手帳からの転記を依頼した。

対象者の選択は図 1 に示した。2003 ~ 2007 年に研究参加協力が得られた 10,731 名のうち、出生記録 (N = 10,720), 血漿コチニン値 (N = 9,011), およびゲノム DNA (N = 9,647) が全てあったのは、8,257 名であり、双胎 (N = 92), 妊娠高血圧 (N = 120), 妊娠性糖尿病 (N = 39) を除外すると 8,015 名だった。妊娠後期の血漿コチニン値のカットオフ値で二分すると 11.48 ng/mL 以下が 6,730 名、11.49 ng/mL 以上が 1,285 名であった。11.48 ng/mL 以下の 6,730 名からランダムサンプリングで 2,010 名に絞り、このうち出生体重、出

生身長、および出生頭囲のデータがあった 1,998 名を非喫煙群とした。11.49 ng/mL 以上では、人数が限られていたので、ランダムサンプリングを行わなかった。1,285 名のうち、出生体重、出生身長、および出生頭囲のデータがそろった 1,265 名を喫煙群とした。

統計解析では、連続変数間 Spearman の相関係数、カテゴリー変数と連続変数間 Mann-Whitney の *U*-検定で行った。妊娠後期の喫煙状況と出生時体格との関連は *AHR*, *CYP1A1* および *XRCC1* 遺伝子多型で組合せて、母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、妊娠中アルコール摂取、妊娠中喫煙状況、教育歴、世帯収入、児の性別および在胎週数で調整し重回帰分析で検討した。妊娠後期の喫煙状況と *AHR*, *CYP1A1*, あるいは *XRCC1* 遺伝子多型との間の交互作用は交互作用項を加えることで検討した。2 つあるいは 3 つの遺伝子型の組合せによる交互作用もまた検討した。交互作用の *P* 値は、妊娠後期の喫煙状況と遺伝子型との 2 つの交互作用項に対する *F*-検定を組合せたポスト推定 (Postestimation) を使って計算した。多重比較の場合は、Bonferroni 法で *P* 値を補正した。統計解析には SPSS 22.0J 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た。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えいが一切生じないように、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同様であり、格段の危険性は伴わなかった。

C . 研究結果

母児の属性を表 1 に示した。非喫煙群と喫煙群との間で有意差が認められたのは、児の性別、在胎週数、出生時体格、母の年齢、出産歴、飲酒歴、教育歴、および世帯収入であった(いずれも $P < 0.05$)。

妊娠後期の自己申告による喫煙習慣と母体血漿コチニン濃度との関連を表 2 に示した。自己申告で非喫煙と答えた 1,759 名のうち、母体血漿コチニン値が 11.49 ng/mL 以上だったのは 157 名 (8.9%) だった。また自己申告で喫煙していたと答えた 692 名のうち、母体血漿コチニン値が 11.48 ng/mL 以下だったのは 37 名 (5.3%) だった。

母児の属性と出生時体格との関連を表 3 に示した。出生時体格と有意な関連が認められたのは、児の性別、在胎週数、母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、教育歴および世帯収入であった (いずれも $P < 0.05$)。

妊婦の遺伝子多型の組合せによる妊娠後期の喫煙状況と出生時体格との関連を表 4 に示した。非喫煙群の児と比較して、喫煙群の児の出生体重は 71 g 小さく (95%信頼区間 (CI); -103, -40), 出生身長は 0.23 cm 小さく (95%CI; -0.41, -0.06), 出生頭囲は 0.28 cm 小さかった (95%CI; -0.41, -0.15)。妊娠後期の喫煙状況と *AHR* 遺伝子多型では、*AHR-GA/AA* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*AHR-GG* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 56 g 小さく (95%CI; -91, -20), 出生身長は 0.35 cm 小さかった (95%CI; -0.55, -0.16)。妊娠後期の喫煙状況と *CYP1A1* 遺伝子多型では、*CYP1A1-AA* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*CYP1A1-AG/GG* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 62 g 小さく (95%CI; -95, -30), 出生身長は 0.27 cm 小さく (95%CI; -0.45, -0.09), 出生頭囲は 0.21 cm 小さかった (95%CI; -0.35, -0.08)。妊娠後期の喫煙状況と *XRCCI* 遺伝子多型では、

XRCCI-CC 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*XRCCI-CT/TT* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 59 g 小さく (95%CI; -87, -30), 出生頭囲は 0.18 cm 小さかった (95%CI; -0.30, -0.06)。妊娠後期の喫煙状況と *AHR* および *CYP1A1* 遺伝子多型の組合せでは、*AHR-GA/AA* 型で *CYP1A1-AA* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*AHR-GG* 型で *CYP1A1-AG/GG* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 114 g 小さかった (95%CI; -185, -43)。妊娠後期の喫煙状況と *AHR*, *CYP1A1* および *XRCCI* 遺伝子多型の組合せでは、*AHR-GA/AA* 型、*CYP1A1-AA* 型で *XRCCI-CC* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*AHR-GG* 型、*CYP1A1-AG/GG* 型で *XRCCI-CT/TT* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 145 g 小さかった (95%CI; -241, -50)。

D . 考察

本研究では、*AHR-GG* 型、*CYP1A1-AG/GG* 型で *XRCCI-CT/TT* 型をもつ喫煙群の児は出生体重の減少に、より大きな影響を及ぼしていたことが分かった。この結果は先行研究の *AHR-GG* 型や *CYP1A1-AG/GG* 型をもつ喫煙者の児が子宮内での発育により大きな影響を被っていたと報告された先行研究と一致していた (Wang et al., 2002; Sasaki et al., 2006)。また、基準とした遺伝子型と比較して、*AHR-GG* 型や *CYP1A1-AG/GG* 型は代謝活性の亢進や代謝酵素のタンパク発現の亢進と関連しており (Wong et al., 2001; Kisselev et al., 2005), *XRCCI-CT/TT* 型は DNA 修復遺伝子のタンパク発現の低下と関連していた (Hanova et al., 2010)。基準とした遺伝子型の組合せをもつ非喫煙群と比較して、*AHR-GG* 型、*CYP1A1-AG/GG* 型で *XRCCI-CT/TT* 型をもつ喫煙群は PAHs の代謝物がより多く、そして PAH-DNA 付加体がより多く生成されると予想された (Maloue et al., 2005; Nevert et al., 2004; Gao et al., 2014; Hecht

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

et al., 1999; Wang et al., 2003; Shen et al., 2005; Indra et al., 2014; Karttunen et al., 2010; Lodovici et al., 2004)。AHR-GG型、CYP1A1-AG/GG型でXRCCI-CT/TT型をもつ喫煙群の児が145g小さかった理由はわからないものの、PAHsの代謝物やPAH-DNA付加体の濃度の増加が児の出生体重の減少に関連している可能性が考えられた。

本研究の対象者で、自己申告で非喫煙と答えた1,759名のうち、157名は母体血漿コチニン値が11.49 ng/mL以上であった。この157名は母体血漿コチニン値が11.49 ng/mL以上である1,265名全体の12.4%を占めていた。血漿コチニン値が11.49 ng/mL以上であっても非喫煙と申告した母は、先行研究から正直に申告していない(Walsh et al., 1996; Lindqvist et al., 2002)、あるいはパートナーや同居喫煙者あるいは職場喫煙者からのたばこ煙に強く曝されている可能性が考えられた。

また、自己申告で喫煙していたと答えた692名のうち、37名は母体血漿コチニン値が11.48 ng/mL以下であった。この37名は、母体血漿コチニン値が11.48 ng/mL以下の1,998名全体の1.9%を占めていた。喫煙していると申告した母であっても血漿コチニン値が11.48 ng/mL以下であった理由は、機会的喫煙であると考えられた。機会的喫煙は、コチニン値を用いると過小評価されることは既に言われている(Jhun et al., 2010; Klebanoff et al., 1998)。これらからコチニン濃度による喫煙状況の分類は、自記式調査票による喫煙状況の分類よりも正確度が高いと考えられた。

本研究の限界は、妊娠後期のコチニン値を1回しか測定していないことである。コチニンの生物学的半減期は17.9時間との報告がある(Dempsey et al., 2013)。しかし、表2より、1日当たり1本以上吸ったと自己申告した686名のうち、血漿コ

チニン値が11.49 ng/mL以上の人は655名であり、95.5%の正確度であった。また、非喫煙と申告した1,759名のうち、血漿コチニン値が11.48 ng/mL以下の人は1,602名であり、91.1%の正確度であった。これらから、この結果の信頼度は高いと考えられた。

本研究の結果から、胎児期の母の喫煙と児の出生時体格の減少との関連が明らかになったものの、これらの量反応関係についてはわからない。今後は、受動喫煙も含めた胎児期の母の喫煙と出生時体格との量反応関係を明らかにした上で、これらの関係に対する遺伝要因の関与についてもさらに検討していく予定である。

E. 結論

胎児期の母の喫煙は児の出生時体格に影響を及ぼし、たばこ煙中のPAHs代謝およびDNA修復に関わる遺伝子多型で有意な関連が認められたのはAHR(G>A, rs2066853)、CYP1A1(A>G, rs1048943)およびXRCCI(C>T, rs1799782)遺伝子多型の3つであった。AHR-GG型、CYP1A1-AG/GG型でXRCCI-CT/TT型をもつ喫煙群の児は、出生時体格の減少により大きな影響が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sumitaka Kobayashi, Fumihiro Sata, Seiko Sasaki, Titilola Serifat Bramoh, Atsuko Araki, Chihiro Miyashita, Houman Goudarzi, Sachiko Kobayashi, Reiko Kishi. Combined effects of AHR, CYP1A1, and XRCC1 genotypes and prenatal tobacco smoking on infant birth size: Biomarker assessment in the Hokkaido Study. Nicotine & Tobacco Research (Submitted)

2. 学会発表

小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, Titilola Serifat Braimoh, 荒木敦子, 宮

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

下ちひろ, Houman Goudarzi, 小林祥子, 岸玲子. 母の喫煙曝露と胎児発育との関連: 遺伝的なハイリスクについて—北海道スタディ. 第86回日本衛生学会学術総会. 北海道旭川市. 2016.5.11.-13.

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

参考文献

- (1) Dempsey DA, Sambol NC, Jacob P 3rd, et al. CYP2A6 genotype but not age determines cotinine half-life in infants and children. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 94: 400-406.
- (2) Gao M, Li Y, Xue X, et al. Impact of AhR, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms on TP53 R273G mutations in individuals exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15: 2699-2705.
- (3) Hanova M, Stetina R, Vodickova L, et al. Modulation of DNA repair capacity and mRNA expression levels of XRCC1, hOGG1 and XPG genes in styrene-exposed workers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 248: 194-200.
- (4) Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 1194-1210.
- (5) Indra R, Moserova M, Kroftova N, et al. Modulation of human cytochrome P450 1A1-mediated oxidation of benzo[a]pyrene by NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome b5. *Neuro Endocrinol Lett.* 2014; 35 Suppl 2: 105-113.
- (6) Jhun H, Seo HG, Lee DH, et al. Self-reported smoking and urinary cotinine levels among pregnant women in Korea and factors associated with smoking during pregnancy. *J Korean Med Sci.* 2010; 25: 752-757.
- (7) Karttunen V, Myllynen P, Prochazka G, et al. Placental transfer and DNA binding of benzo(a)pyrene in human placental perfusion. *Toxicol Lett.* 2010; 197: 75-81.
- (8) Kisselev P, Schunck WH, Roots I, et al. Association of CYP1A1 polymorphisms with differential metabolic activation of 17beta-estradiol and estrone. *Cancer Res.* 2005; 65: 2972-2978.
- (9) Klebanoff MA, Levine RJ, Clemens JD, et al. Serum cotinine concentration and self-reported smoking during pregnancy. *Am J Epidemiol.* 1998; 148: 259-262.
- (10) Lindqvist R, Lendahls L, Tollbom Ö, et al. Smoking during pregnancy: comparison of self-reports and cotinine levels in 496 women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002; 81: 240-244.
- (11) Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, et al. Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adducts levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1 and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* 2004; 13: 1342-1348.
- (12) Marloue JL, Puga A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 2005; 96: 1174-1184.
- (13) Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, et al. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem.* 2004; 279: 23847-23850.
- (14) Sasaki S, Kondo T, Sata F, 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.* 2006; 12: 77-83.

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

- (15) Sasaki S, Braimoh TS, Yila TA, et al. Self-reported tobacco smoke exposure and plasma cotinine levels during pregnancy—a validation study in Northern Japan. *Sci Total Environ.* 2011; 412-413: 114-118.
- (16) Shen J, Gammon MD, Terry MB, et al. Polymorphisms in XRCC1 modify the association between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, dietary antioxidants, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 336-342.
- (17) Walsh RA, Redman S, Adamson L. The accuracy of self-report of smoking status in pregnant women. *Addict Behav.* 1996; 21: 675-679.
- (18) Wang X, Zuckerman B, Pearson C, et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA.* 2002; 287: 196-202.
- (19) Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, et al. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair.* 2003; 2: 901-908.
- (20) Wong JM, Harper PA, Meyer UA, et al. Ethnic variability in the allelic distribution of human aryl hydrocarbon receptor codon 554 and assessment of variant receptor function in vitro. *Pharmacogenesis.* 2001; 11: 85-94.

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

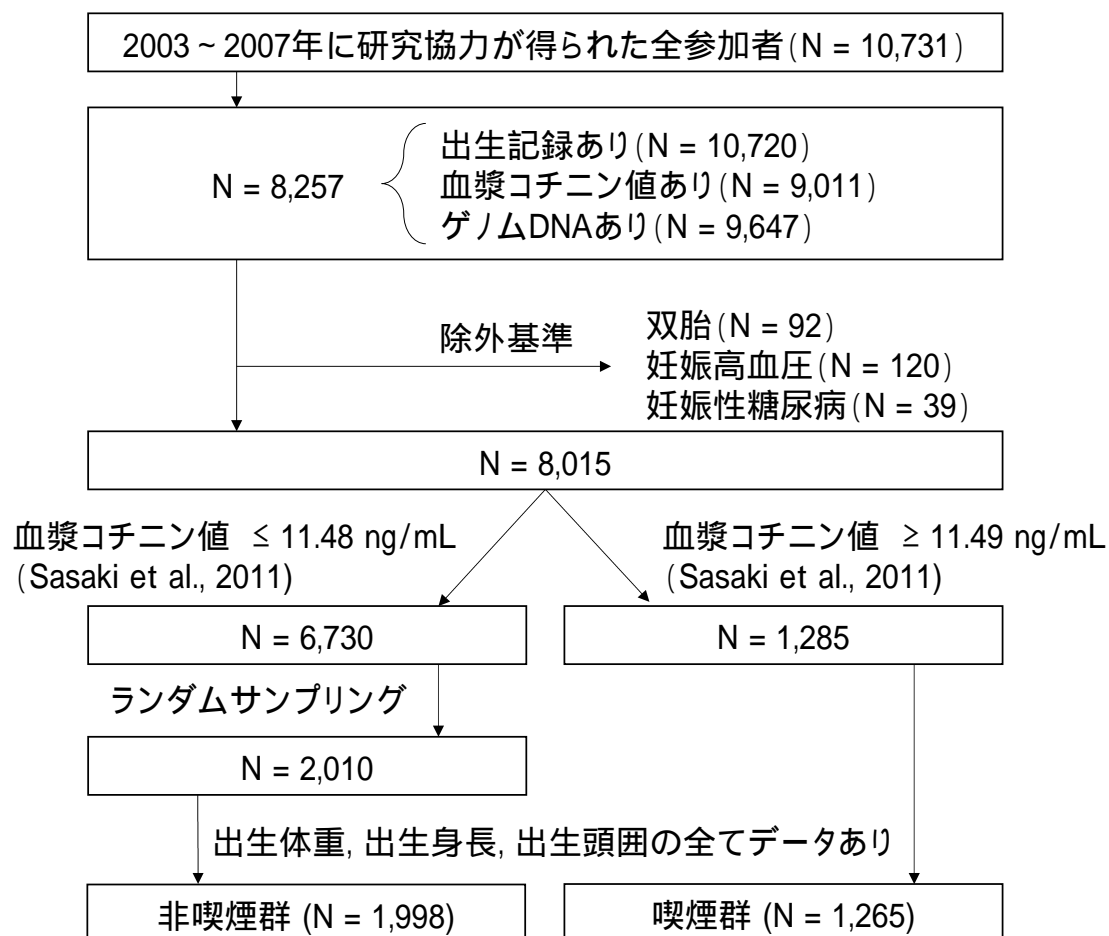


図 1. 対象者の選択フローチャート

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. 母児の属性 (N = 3,263)

属性	非喫煙群 (N = 1,998)	喫煙群 (N = 1,265)
	N (%) 平均 ± SD	N (%) 平均 ± SD
児		
性別		
男	959 (48.0)	652 (51.5)
女	1,039 (52.0)	613 (48.5)
不明	0 (0.0)	1 (0.1)
在胎週数 (週)	39.0 ± 1.3	38.9 ± 1.3
出生体重 (kg)	3,081 ± 384	3,002 ± 379
出生身長 (cm)	49.1 ± 2.1	48.8 ± 2.6
出生頭囲 (cm)	33.3 ± 1.5	33.0 ± 1.5
母		
年齢 (歳)	30.3 ± 4.5	29.4 ± 4.7
身長 (cm)	158 ± 5	158 ± 6
妊娠前体重 (kg)	53 ± 8	53 ± 11
出産歴		
初産	895 (44.8)	431 (34.1)
経産	1,103 (59.6)	784 (62.0)
不明	0 (0.0)	50 (4.0)
妊娠初期の飲酒歴		
なし	807 (40.4)	431 (34.1)
あり	1,191 (59.6)	812 (64.2)
不明	0 (0.0)	22 (1.7)
教育歴 (卒業)		
中学	49 (2.5)	176 (13.9)
高校	833 (41.7)	726 (57.4)
短大・専門学校	880 (44.0)	316 (25.0)
大学	235 (11.8)	23 (1.8)
不明	1 (0.1)	24 (1.9)
世帯収入 (万円)		
300 未満	419 (21.0)	310 (24.5)
300-500	900 (45.0)	499 (39.4)
500-800	527 (26.4)	186 (14.7)
800 以上	152 (7.6)	57 (4.5)
不明	0 (0.0)	213 (16.8)
妊娠後期の 1 日当たりの喫煙本数 (本)		
0-4	15 (0.8)	97 (7.7)
5-9	14 (0.7)	196 (15.5)
10-14	5 (0.3)	247 (19.5)
15-19	3 (0.2)	51 (4.0)
20 以上	0 (0.0)	58 (4.6)
不明	—	616 (48.7)

カイ二乗検定, Mann-Whitney の U-検定. 不明は除外した.

SD; 標準偏差.

太字: $P < 0.05$.

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. 妊娠後期の自己申告による喫煙習慣と母体血漿コチニン濃度との関連

妊娠後期	自己申告による喫煙習慣 (4か月時調査票の回答)		妊娠後期母体血漿コチニン値 (ng/mL)		
	N (%)	中央値(25%-75%)	N (%)		
			≤0.21	0.22-11.48	≥11.49
非喫煙	1,759 (53.9)	0.34 (0.15-0.91)	607 (34.5)	995 (56.6)	157 (8.9)
喫煙 (本/日)					
1-4	112 (3.4)	55.1 (26.6-95.4)	0 (0.0)	15 (13.4)	97 (86.6)
5-9	210 (6.4)	88.9 (52.4-128.9)	2 (1.0)	12 (5.7)	196 (93.3)
10-14	252 (7.7)	117.3 (79.5-155.9)	0 (0.0)	5 (2.0)	247 (98.0)
15-19	54 (1.7)	140.0 (104.2-190.9)	0 (0.0)	3 (5.6)	51 (94.4)
20以上	58 (1.8)	128.5 (101.6-175.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	58 (100.0)
不明	6 (1.4)	76.0 (58.0-92.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100.0)
4か月時に脱落	812 (24.9)	62.5 (0.41-111.0)	124 (15.3)	235 (28.9)	453 (55.8)
全員	3,263 (100.0)	1.01 (0.25-79.2)	733 (22.5)	1,265 (38.8)	1,265 (38.8)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 3. 母児の属性と出生時体格との関連（N = 3,263）

属性	平均 ± SD	出生体重(g)	出生身長 (cm)	出生頭囲 (cm)
	N (%)	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
児				
性別				
男	1,611 (49.4)	3,111 ± 386	49.3 ± 2.5	33.4 ± 1.7
女	1,651 (50.6)	3,002 ± 376	48.7 ± 2.0	33.0 ± 1.3
不明	1 (0.0)			
在胎週数 (週)	39.0 ± 1.3	$\rho = 0.421^a$	$\rho = 0.421^a$	$\rho = 0.202^a$
出生体重 (kg)	3,055 ± 384		$\rho = 0.759^a$	$\rho = 0.568^a$
出生身長 (cm)	49.0 ± 2.3	$\rho = 0.759^a$		$\rho = 0.384^a$
出生頭囲 (cm)	33.2 ± 1.5	$\rho = 0.568^a$	$\rho = 0.384^a$	
母				
年齢 (歳)	30.0 ± 4.6	$\rho = 0.005^a$	$\rho = -0.035^a$	$\rho = 0.104^a$
身長 (cm)	158.1 ± 5.4	$\rho = 0.186^a$	$\rho = 0.214^a$	$\rho = 0.139^a$
妊娠前体重 (kg)	53.0 ± 9.3	$\rho = 0.249^a$	$\rho = 0.196^a$	$\rho = 0.176^a$
出産歴				
初産	1,341 (4.6)	3,044 ± 365	49.1 ± 2.5	33.0 ± 1.4
経産	1,887 (57.8)	3,064 ± 400	48.9 ± 2.1	33.3 ± 1.5
不明	35 (1.1)			
妊娠初期の飲酒歴				
なし	1,238 (37.9)	3,056 ± 389	49.0 ± 2.1	33.2 ± 1.6
あり	2,003 (61.4)	3,056 ± 382	49.0 ± 2.4	33.2 ± 1.5
不明	22 (0.7)			
教育歴 (卒業)				
中学	225 (6.9)	3,042 ± 381	49.0 ± 2.0	33.1 ± 1.4
高校	1,559 (47.8)	3,036 ± 385	49.0 ± 2.2	33.1 ± 1.4
短大・専門学校	1,196 (36.7)	3,066 ± 388	49.0 ± 2.0	33.3 ± 1.6
大学	258 (7.9)	3,127 ± 361	49.4 ± 1.8	33.5 ± 1.5
不明	25 (0.8)			
世帯収入 (万円)				
300 未満	729 (22.3)	3,050 ± 378	49.1 ± 1.8	33.1 ± 1.4
300-500	1,399 (42.9)	3,050 ± 391	49.0 ± 2.1	33.1 ± 1.5
500-800	713 (21.9)	3,091 ± 388	49.1 ± 2.2	33.4 ± 1.5
800 以上	209 (6.4)	2,999 ± 361	48.6 ± 1.9	33.3 ± 1.3
不明	213 (6.5)			

カイ二乗検定, Spearman の相関係数. 不明は除外した.

SD; 標準偏差. ^a; Spearman の相関係数.

太字; $P < 0.05$.

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. 妊婦の AHR (G>A, rs2066853), CYP1A1 (A>G, rs1048943), XRCC1 (C>T, rs1799782) 遺伝子多型による児の出生時体格への影響

喫煙 状況	遺伝子多型			N	出生体重 (g)	出生身長 (cm)	出生頭囲 (cm)
	AHR	CYP1A1	XRCC1		β (95%CI)	β (95%CI)	β (95%CI)
非喫煙	—	—	—	1,998	Reference	Reference	Reference
喫煙	—	—	—	1,265	-71 (-103, -40)	-0.23 (-0.41, -0.06)	-0.28 (-0.41, -0.15)
非喫煙	GA/AA			1,396	Reference	Reference	Reference
非喫煙	GG			602	57 (30, 83)	0.21 (0.07, 0.36)	0.19 (0.07, 0.30)
喫煙	GA/AA			878	-32 (-52, -6)	0.00 (-0.14, 0.15)	-0.17 (-0.29, -0.06)
喫煙	GG			387	-56 (-91, -20)	-0.35 (-0.55, -0.16)	-0.12 (-0.27, 0.03)
					$P_{int} = 0.130$	$P_{int} = 0.016$	$P_{int} = 0.858$
非喫煙		AA		1,255	Reference	Reference	Reference
非喫煙		AG/GG		743	39 (15, 63)	0.09 (-0.04, 0.22)	0.19 (0.08, 0.29)
喫煙		AA		807	-20 (-47, 7)	-0.01 (-0.16, 0.14)	-0.09 (-0.21, 0.03)
喫煙		AG/GG		458	-62 (-95, -30)	-0.27 (-0.45, -0.09)	-0.21 (-0.35, -0.08)
					$P_{int} = 0.206$	$P_{int} = 0.364$	$P_{int} = 0.154$
非喫煙			CC	937	Reference	Reference	Reference
非喫煙			CT/TT	1,061	38 (17, 60)	0.07 (-0.04, 0.20)	0.16 (0.06, 0.25)
喫煙			CC	615	-19 (-48, 10)	-0.09 (-0.25, 0.08)	-0.10 (-0.23, 0.02)
喫煙			CT/TT	650	-59 (-87, -30)	-0.18 (-0.34, -0.02)	-0.18 (-0.30, -0.06)
					$P_{int} = 0.188$	$P_{int} = 0.886$	$P_{int} = 0.384$
非喫煙	GA/AA	AA		858	Reference	Reference	Reference
非喫煙	GA/AA	AG/GG		538	31 (0, 63)	0.08 (-0.10, 0.25)	0.15 (0.02, 0.29)
非喫煙	GG	AA		397	58 (23, 94)	0.24 (0.04, 0.43)	0.17 (0.02, 0.32)
非喫煙	GG	AG/GG		205	68 (21, 115)	0.24 (-0.02, 0.50)	0.24 (0.04, 0.44)
喫煙	GA/AA	AA		540	-16 (-54, 22)	0.15 (-0.06, 0.36)	-0.13 (-0.29, 0.03)
喫煙	GA/AA	AG/GG		338	-43 (-87, 0)	-0.14 (-0.38, 0.10)	-0.21 (-0.40, -0.03)
喫煙	GG	AA		267	-22 (-72, 27)	-0.23 (-0.51, 0.04)	-0.05 (-0.26, 0.17)
喫煙	GG	AG/GG		120	-114 (-185, -43)	-0.54 (-0.93, -0.15)	-0.26 (-0.56, 0.05)
					$P_{int} = 0.970$	$P_{int} = 0.608$	$P_{int} = 0.732$
非喫煙	GA/AA	AA	CC	144	Reference	Reference	Reference
非喫煙	GA/AA	AA	CT/TT	174	34 (-1, 69)	0.13 (-0.07, 0.32)	0.07 (-0.08, 0.22)
非喫煙	GA/AA	AG/GG	CC	96	19 (-24, 63)	0.04 (-0.20, 0.29)	0.10 (-0.08, 0.29)
非喫煙	GA/AA	AG/GG	CT/TT	100	43 (0, 86)	0.10 (-0.14, 0.34)	0.19 (0.00, 0.37)
非喫煙	GG	AA	CC	72	81 (31, 131)	0.44 (0.16, 0.71)	0.18 (-0.03, 0.40)
非喫煙	GG	AA	CT/TT	74	36 (-14, 86)	0.03 (-0.25, 0.31)	0.14 (-0.08, 0.35)
非喫煙	GG	AG/GG	CC	25	28 (-46, 102)	0.08 (-0.34, 0.49)	0.10 (-0.22, 0.42)
非喫煙	GG	AG/GG	CT/TT	48	97 (32, 162)	0.35 (-0.01, 0.71)	0.33 (0.05, 0.60)
喫煙	GA/AA	AA	CC	250	22 (-32, 76)	0.25 (-0.05, 0.55)	-0.10 (-0.34, 0.13)
喫煙	GA/AA	AA	CT/TT	290	-56 (-111, -2)	0.04 (-0.26, 0.34)	-0.18 (-0.41, 0.05)
喫煙	GA/AA	AG/GG	CC	164	-70 (-136, -4)	-0.21 (-0.57, 0.16)	-0.24 (-0.52, 0.04)
喫煙	GA/AA	AG/GG	CT/TT	178	-22 (-83, 39)	-0.09 (-0.43, 0.25)	-0.21 (-0.47, 0.05)
喫煙	GG	AA	CC	122	0 (-72, 72)	-0.29 (-0.69, 0.11)	-0.10 (-0.40, 0.21)
喫煙	GG	AA	CT/TT	129	-47 (-121, 26)	-0.19 (-0.60, 0.22)	-0.01 (-0.33, 0.31)
喫煙	GG	AG/GG	CC	64	-64 (-186, 58)	-0.28 (-0.96, 0.40)	0.19 (-0.34, 0.71)
喫煙	GG	AG/GG	CT/TT	68	-145 (-241, -50)	-0.70 (-1.24, -0.17)	-0.53 (-0.94, -0.13)
					$P_{int} = 0.199$	$P_{int} = 0.346$	$P_{int} = 0.487$

母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 出産歴, 妊娠中アルコール摂取, 教育歴, 世帯収入, 在胎週数, 児の性別で調整した重回帰分析.

β は Reference と比較したときの出生時体格の変化量 (g あるいは cm) を表す.

交互作用の P 値 (P_{int}) は, 遺伝子型と喫煙状況との 2 つの交互作用項に対する F 検定を組合せたポスト推定 (Postestimation) を使って計算した (例, AHR-GG 型×喫煙; AHR-GG 型×CYP1A1-AG/GG 型×喫煙).

太字; Bonferroni の補正後有意が認められたところ (1 つの遺伝子型の場合, $P < 0.013$ (0.05/4); 2 つの遺伝子型の組合せの場合, $P < 0.006$ (0.05/8); 3 つの遺伝子型の組合せの場合, $P < 0.003$ (0.05/16)).

胎児期有機フッ素化合物曝露影響の臍帯血網羅的エピゲノム解析

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 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授

研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科 助教

研究分担者 石塚 真由美 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

胎児期有機フッ素化合物(perfluoroalkyl acids; PFAAs)曝露による出生体重の減少などといった児の健康への有害な影響が報告されている。その影響の一端は曝露によるエピゲノムへの影響が関与していると考えられるが、疫学研究で検討した報告はほとんどない。我々はこれまでに胎児期 PFOA 曝露による *Insulin-like growth factor 2 (IGF2)* 遺伝子の DNA メチル化低下、それに伴う出生時ポンデラル指数減少を報告した。しかしながら、胎児期 PFAAs 曝露がその他の遺伝子領域のメチル化に与える影響については不明であり、網羅的に解析することにより胎児期 PFAAs 曝露による健康影響の一端が明らかになることが期待される。

札幌の一産科病院でリクルートし同意を得た妊婦 514 名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報・臍帯血・母体血中 PFAAs 濃度の得られた 164 名を対象とし、イルミナ社 Infinium Human Methylation450 BeadChip を用いて臍帯血 DNA 約 45 万 CpG 部位の網羅的メチル化解析を行った。データは標準化、バッチ補正を行い、 \log_{10} 変換後の PFOS, PFOA 濃度との関連を robust linear regression で解析した。False-discovery rate $<.05$ 、若しくは偏回帰係数の絶対値の大きさを基準にし、曝露と関連する CpGs のスクリーニングを行った。

抽出された PFOS 曝露関連 368 CpGs, PFOA 曝露関連 316 CpGs のうち、同一遺伝子上に 3 CpGs 以上位置していたものは PFOS で 7 遺伝子 26 CpGs, PFOA で 7 遺伝子 26 CpGs あった。中でも PFOS 曝露では *PTPRN2* の高メチル化が広領域にわたり観察された。PFOA 曝露では *PAX8*, *HDAC4* 等の低メチル化が顕著であった。今後は得られた網羅的解析結果について別集団で再現性を確認し、結果の妥当性について検討する。また、観察された胎児期 PFAAs 曝露によるメチル化変化と PFAAs 曝露による児の生後の肥満、アレルギー、神経発達等、健康への影響との関連について、出生コーホートを追跡し調べる必要がある。

研究協力者

小林 祥子, 三浦りゅう, 安住 薫
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)
中澤 裕之
(星薬科大学薬品分析化学教室)

A. 研究目的

有機フッ素化合物(perfluoroalkyl acids; PFAAs)は家庭用品、工業製品に使用されている化合物で、中でも perfluorooctane sulfonate (PFOS)は 2009 年に POPs に指定され使用が制限さ

れた。しかしながら、難分解性のため未だ環境中に多く残存している。生体内では難代謝性を示し、人での半減期はPFOSで5.4年、perfluorooctanoic acid (PFOA)で3.8年と長い(Olsen et al., 2007)。また胎盤透過性を示し(Midasch et al., 2007)、妊娠中の母を介した胎児への曝露影響が懸念される。曝露による出生体重・サイズの低下は各国で報告があり、我々の出生コホートでもPFOS胎児期曝露による女児での出生体重低下を報告している(Washino et al., 2009)。さらには、生後20歳時の肥満との関連も報告されており(Halldorsson et al., 2012)、その生体影響の少なくとも一部は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)や、estrogen receptor (ER)等の核内受容体を介し作用していると考えられている(Takacs and Abbott 2007)。近年、我々は出生コホート研究で胎児期PFOA曝露による*Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2)*遺伝子の低メチル化、さらに低メチル化による出生時ボンデラル指数の低下を報告し、PFOA曝露と出生体格低下への影響においてIGF2のメチル化による仲介が示唆された(Kobayashi et al., *in preparation*)。しかしながら、胎児期PFAAs曝露の児DNAメチル化への影響は疫学研究ではほとんど調べられておらず、我々の報告以外では、臍帯血PFOA濃度と臍帯血清中のゲノム全体のメチル化低下を報告した横断研究が一報のみである(Guerrero-Preston et al. 2010)。

DNAメチル化等のエピジェネティックな機構は、ゲノム配列の変化を伴わず遺伝子発現調節を行うことができ、エピゲノムの状態は細胞分裂後も引き継がれていく。また、DNAメチル化は環境影響による可

塑性をもっており、胎児期の環境と生後の表現型を結ぶ因子だと考えられている(Baccarelli and Bollati 2009)。そのため、胎児期PFAAs曝露が児のどのような遺伝子のDNAメチル化へ作用するか詳細を調べることにより、PFAAsの曝露影響について、胎児期のPFAAs曝露が生後の児の健康にどのような影響を及ぼす可能性があるのかを探る、重要な手がかりとなる。

そこで本研究では、胎児期のPFAAs曝露が、児のどのような遺伝子のメチル化に影響するのか、出生コホートの臍帯血を用いて、網羅的メチル化解析ツール、イルミナ社 Infinium HumanMethylation450 BeadChip にて検討を行った。

B．研究方法

1．対象

札幌の一産科病院で2002年7月から2005年10月までにリクルートし、同意を得た妊婦514名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報がそろった母児から、臍帯血の得られた292名のDNAを用い、網羅的DNAメチル化解析を行った。うち96名分のサンプルは、現在再解析を実施しており今回の解析からは除外した。今回は、うち母体血があり、PFAAs濃度を測定した164名について統計解析を行った。

2．方法

母体血中PFOS、PFOA濃度はLC-MS/MSにより測定を行った。

DNAメチル化解析は、臍帯血400 μ LからMaxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega社)を用いてDNA抽出を行った。抽出したDNAは、PicoGreen (Molecular Probes, Inc, USA)による2本鎖DNA定量と電気泳動法により過度な断片化がない良質なDNAであることを確認した

上で、その 500ng を材料に、Zymo EZ DNA Methylation Kit(Zymo Research, Irvine, CA, USA)を用いて亜硝酸ナトリウムによる化学処理を行い、HumanMethylation450 DNA Analysis Kit (Illumina, SanDiego, CA, USA)により、(1) 全ゲノム増幅、(2) 断片化処理(300～600bp 程度)、(3) HumanMethylation 450 BeadChip(ヒト全遺伝子の調節領域(プロモーター領域内およびその上流・下流の近傍領域)に存在する 485,577 カ所の CpG 配列が搭載)上へのハイブリダイゼーション、(4) 一塩基伸長反応、(5) 蛍光標識、(6) スキャナーによる読み取り(イルミナ社製スキャナー iScan を使用)の各工程を、G&G サイエンス株式会社(福島県松川町)で実施した。

上記の工程で得られたメチル化データを基に、クオリティーコントロール、Functional normalization(Fortin et al. 2014)、ComBat 法(Leek et al. 2012)によるバッチ補正といった標準化作業によって約 45 万 CpG 配列の DNA のメチル化値(ベータ値)を得た。得られたベータ値は母年齢、児性別、母体血採血時期、surrogate variables (Leek and Storey 2007)で調整した Robust linear regression (Fox and Weisberg 2011)、経験ベイズ法を用いて \log_{10} 変換後の PFOS、PFOA 曝露との関連を解析した。CpGs の抽出は先行研究で用いられた手法を参考に(Huang et al. 2015; Khulan et al. 2014)、以下の 2 点を基準とした(図 1)。
i) False-discovery rate $q < 0.05$ 、もしくは、
ii) 曝露による影響(偏回帰係数の絶対値の大きさで定義)が $PFOS \geq 0.075$ 、 $PFOA \geq 0.05$ かつ $p < 0.05$ 。抽出された CpGs は位置情報と照らし合わせ、同一遺伝子上

で 3 CpGs 以上スクリーニングされた CpGs のみに絞り込んだ。メチル化値は細胞の種類によって異なり、臍帯血中の細胞組成が結果への交絡となる可能性があるため、細胞組成の違いによる解析結果への影響について確認した。CD8⁺T 細胞・CD4⁺T 細胞・ナチュラルキラー細胞・B 細胞・単球・顆粒細胞の全 6 種類の細胞組成の推定は、大人末梢血 DNA 網羅的メチル化データを参照にした Houseman の手法で行った(Houseman et al. 2012)。細胞組成推定値と抽出された CpGs との相関についてスピアマンの順位相関係数で確認した。同一領域上で一貫して相関係数が $\geq \pm 0.1$ より大きかった箇所について、相関の見られた細胞推定値を個別に共変量としてモデルに加え、曝露とメチル化との関連を別途解析した。以上のデータ処理・統計解析は、R (ver.3.1.3)、Bioconductor (ver.3.0)の minfi, sva, limma package、JMP (ver.11)を用いて行った。

遺伝子名、機能についてはデータベース GeneCards を参考に記載した。

(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

本研究の対象者、164 組の母児の属性を表 1 に示した。対象者の母体血中 PFOS

濃度は中央値 4.7 ng/mL (IQR: 3.1-6.7) , PFOA 濃度は 1.4 ng/mL (IQR: 0.8-1.8) だった。母の年齢の平均値は 30.0 才 (± 4.7) , 初産婦が 52.4% , 妊娠中喫煙者は 15.9% を占めた。児の在胎週数は 39.7 週 (± 1.1) , 出生体重は 3108 g (± 318) だった。PFOS , PFOA 濃度と有意な関連がみられたものは , 出産歴 , 母体血採血時期があった。また PFOA 濃度と児の性別の間に有意な関連が認められた。

図 2 に robust linear regression により PFOS , PFOA 曝露と解析を行った結果を示した。解析を行った 453,288 CpGs のうち , i) False-discovery rate < 0.05 ((A)マンハッタン・プロット下線より上部) , もしくは , ii) 曝露による影響(偏回帰係数の絶対値の大きさで定義)が $PFOS \geq 0.075$, $PFOA \geq 0.05$ でかつ $p < 0.05$ ((B)ボルケーノプロット薄枠部分)の基準で抽出されてきた CpGs は全部で PFOS 曝露が 368 , PFOA 曝露が 616 あった。抽出された CpGs の特徴について , (A)近傍の遺伝子との位置関係 , (B) CpGs アイランドからの位置関係の違いについて , X^2 検定で確認した(図 3)。結果 , 抽出された CpGs は PFOS , PFOA 曝露ともに元の 45 万 CpGs とは構成が異なり , transcription start site (TSS)近傍に位置する CpGs が少ない一方 , intragenic region (IGR)の割合が大きかった。

表 2 に(A)PFOS , (B)PFOA の母体血中濃度との関連がみられた CpGs のうち , 一遺伝子上で 3CpGs 以上抽出されてきたものを示した。PFOS 曝露では , *Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, N Polypeptide 2 (PTPRN2)* の 238 kbp に渡る領域上の 9 CpGs が p 値・偏回帰係数基準の双方で抽出され , その影響の向きも

1 CpG を除き一致していた。その他 , *Dynein Heavy Chain Domain 1 (DNHD1)* , *Kelch-Like Family Member 35 (KLHL35)* , *Rabphilin 3A-Like (RPH3AL)*等の遺伝子上の CpG が複数個抽出され , いずれも影響の向きは各遺伝子内で一致していた。

PFOA 曝露については , Paired Box 8 (PAX8)の 39 kbp に及ぶ領域上の 9 CpGs が抽出され , うち 8 CpGs で一貫した高メチル化が見られた。また , *Histone Deacetylase 4 (HDAC4)* , *D-Aspartate Oxidase (DDO)*上の CpGs が p 値・偏回帰係数基準の双方で抽出されたほか , *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Associated Protein 1 (LRPAP1)* , *Protein Kinase, CAMP-Dependent, Regulatory, Type I, Beta (PRKAR1B)* , *Thymidine Kinase 2, Mitochondrial (TK2)*等の遺伝子上の CpGs が複数個抽出されたが , 一遺伝子を除き , 影響の向きはいずれも各遺伝子内で一致していた。

表 3 に近隣の CpGs の連続した変化領域を特定する Bumphunting 法(Jaffe et al. 2012) で PFOS 曝露について解析した結果を示した。PFOS を \log_{10} 変換した値 , もしくは第一四分位に対して第四四分位での影響を解析したところ , *Hook Microtubule-Tethering Protein 2 (HOOK2)* の gene body に位置する 4 CpGs で低メチル化が観察され , うち 2 CpGs については robust linear regression で抽出されたものと一致していた。PFOA 曝露に関してはこの手法では有意なメチル化変化をしている領域は見られなかった。

表 4 に Houseman の手法(Houseman et al. 2012)で行った臍帯血中細胞組成の

推定値，およびそれらと PFOS，PFOA との関連について示した。組成は顆粒細胞が全体のおよそ 60.3%を占めており，次いで CD4⁺T 細胞 11.6%，単球 10.9%，B 細胞 10.1%が多かった。PFOS，PFOA との関連をスピアマンの順位相関係数で確認したところ，PFOS と単球の推定値との間に有意な負の相関が見られたが ($\rho = -0.214$, $p = 0.006$)，その他細胞組成との間には有意な相関はなかった。図 4 に各細胞の推定値と抽出された CpGs のメチル化値との相関を調べた結果を示した。各遺伝子内で一貫して相関係数 ± 0.1 以上の強い相関が見られた箇所について，表 2 右側の「cell」の列に示した。

抽出された各 CpGs について，母年齢，児性別，母体血採血時機，および細胞組成と相関が見られたものについては細胞組成の値で調整した重回帰分析を行った(図 5)。PAX8 等，一部曝露との関連が有意でなくなった CpGs もあったが，その影響の程度・方向については robust linear regression での網羅的解析結果と同様の傾向を示した。また，PFOA との関連が確認された *Leucine-Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 6 (LGR6)* については CD8⁺T 細胞・CD4⁺T 細胞・ナチュラルキラー細胞・B 細胞・顆粒細胞と相関が見られ，これらを共変量として重回帰分析を行ったところ，顆粒細胞が VIF 15.6 と多重共線性を示したため，PFOA 濃度との相関も小さい顆粒細胞をモデルから除いて解析を行ったが，いずれも結果に大きな変化は見られなかった。

D．考察

本研究で行った網羅的 DNA メチル化解析により，胎児期 PFAAs 曝露で影響を受

ける可能性のあるメチル化部位が示された。

PFOS 曝露では *PTPRN2* の gene body 上 238 kbp の広範囲に位置する 8 CpGs で高メチル化が示された。*PTPRN2* は受容体様タンパク質チロシンホスファターゼと類似した配列をコードしているが，実験的には示されていない。ラットの相同遺伝子はホスファチジルイノシトール脱リン酸化酵素をコードしていることが示唆され，インスリンの分泌に関わっている可能性がある。神経系や膵臓の内分泌細胞の発生への関与も示唆されており，インスリン依存性糖尿病の自己抗原となる。PFAAs 曝露との関係について報告はないが，動物実験では PFAAs と同様 PPARs を介して生体影響を及ぼすと考えられるフタル酸ジブチル(DBP)や，エストロゲン様作用を示すビスフェノール A(BPA)曝露による mRNA 遺伝子発現変化の報告がある(Ali et al. 2014; Johnson et al. 2011)。

その他，gene body に位置する 3 CpGs で PFOS 曝露による低メチル化が観察された *DNHD1* は，微小管輸送に関わるタンパク質をコードしており，プロモーター領域に PPAR- α , $\gamma 1$, $\gamma 2$ の結合部位を持つ(ENCODE, SABiosciences)。同様に Gene body 上の 3 CpGs の高メチル化が見られた *KLHL35* についてもプロモーター領域に PPAR- α , $\gamma 1$, $\gamma 2$ の結合部位を持つが(ENCODE, SABiosciences)，遺伝子がコードしているタンパク質の機能は不明である。Gene body 上の 3 CpGs で高メチル化が見られた *RPH3AL* がコードするタンパク質は内分泌・外分泌細胞での Ca²⁺依存性エキソサイトーシスを調節しており，膵臓でのインスリン分泌で主要な役割を担っている。動物実験では DBP による発

現低下が示されている(Gaido et al. 2007; Johnson et al. 2011)。また, Bumphunter を含めた複数の方法で低メチル化が観察された *Hook Microtubule-Tethering Protein 2 (HOOK2)* ではプロモーター領域に PPAR- γ 1, γ 2 のほか, ER- α の結合部位を持ち(DECODER, SABiosciences), 動物実験で DBP 曝露による遺伝子発現上昇(Ren et al. 2010), BPA 曝露による発現低下(Ali et al. 2014)が示されている。

胎児期 PFOA 曝露については, *PAX8* 遺伝子上の 8 CpGs で曝露による高メチル化が観察された。*PAX8* は転写因子をコードしており, 甲状腺濾胞細胞の分化, 甲状腺特異的遺伝子の発現に関わる。プロモーター領域に PPAR- α , γ 1, γ 2 の結合部位を持ち(DECODER, SABiosciences), ラット細胞での *in vitro*, ゼブラフィッシュでの実験により, PFOS, PFOA 曝露による *PAX8* mRNA の発現変化が示されている(Du et al. 2013; Naile et al. 2012)。しかし今回の結果では, 臍帯血細胞組成調整後, 高メチル化傾向は見られたものの有意な結果は得られなかったため, 今後別集団にて再現性を確認する必要がある。

Polypeptide N-Acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GALNT2) の 3'-非翻訳領域に位置する 4 CpGs は PFOA 曝露による低メチル化を示した。*GALNT2* は糖転移酵素をコードしており, 中性脂肪レベル, 2 型糖尿病との関連が示唆されている。PPAR- α , γ 1, γ 2 の結合部位を持ち(DECODER, SABiosciences), ヒト細胞での *in vitro* 実験により, PFOA 曝露による発現上昇が示されている(Peng et al. 2013)。4 CpGs での低メチル化が見られた *HDAC4* はヒストン脱アセチル化酵素をコードしており, 遺伝子のプロモーター

部位に結合することで発現を抑制する。プロモーター領域に PPAR- α , γ 1, γ 2 の結合部位を持ち(DECODER, SABiosciences), PFAAs 曝露についての報告はないが, フタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (DEHP) 曝露による *HDAC4* の発現上昇, ヒストンアセチル化の減少が示されている(Guida N, et al. Toxicol Appl Pharmacol. 2014)。また, 5'-非翻訳領域での 3 CpGs の低メチル化が見られた *PRKAR1B* は cAMP 依存性プロテインキナーゼ A を構成するサブユニットをコードしており, 脂質や糖代謝を調節している。4 CpGs で高メチル化が見られた *LRPAP1* は, 発生初期に重要で脂質恒常性の維持に携わる *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1)* の折りたたみを助けるタンパク質をコードしている。

今回, スクリーニングされてきた CpGs が位置する遺伝子には PPAR の結合部位を持ち, インスリン分泌, 甲状腺機能, 脂質・糖代謝等の機能に関わるものがあつた。胎児期の PFAAs 曝露は, 甲状腺ホルモン攪乱(Wang et al. 2014)や将来の肥満への影響(Halldorsson et al. 2012)が疫学研究で示されており, 今回得られた結果には整合性がある。しかしながら, 例えばプロモーターに PPARs の結合部位を持つ遺伝子, インスリン経路や脂質代謝等の特定の経路に関わる遺伝子等のメチル化が選択的に変化する傾向にあるのかは, 今後, Gene Ontology (GO)解析, パスウェイ解析で明らかにする必要がある。また, 今回 PFAAs 曝露によりメチル化変化が観察された一部の CpGs の影響のみ示しており, 今後は同遺伝子上の近隣 CpGs についても曝露により一貫してメチル化変化が生じているか, 詳細に検討する必要がある。

今回、臍帯血中の細胞組成の結果への影響を極力小さくするため、Houseman の手法を用い細胞組成の推定を行ったが、この手法は大人末梢血を参照に推定を行っているため、臍帯血の推定には適していない。そのため、臍帯血細胞組成の違いによる結果への交絡の可能性については完全には否定できない点も注意が必要である。

最後に、DNA メチル化は様々な環境因子、および SNPs を含めた個人の遺伝的背景の影響を受けており、今回観察された結果にそれら未測定因子が強く影響している可能性は否定できない。今後、別集団である北海道コーホートでも DNA メチル化と曝露との関連を解析し、再現性を確認することによって、これら曝露以外の因子による影響の可能性は低くなり、より強固な結果が得られる。また、今回観察された胎児期 PFAAs 曝露によるメチル化変化が、肥満・糖尿病・甲状腺機能を含め、生後の児にどのような健康影響を及ぼすかについて、出生コーホートの集団を追跡し明らかにしていく必要がある。

E . 結論

本研究により、胎児期の PFAAs 曝露により、児臍帯血で PFOS では *PTPRN2* 遺伝子、PFOA では *PAX8* 遺伝子等のメチル化が変化する可能性が示され、インスリン分泌、甲状腺機能、脂質・糖代謝等の機能への影響が懸念される。しかしながら、網羅的解析の特性上、今回の観察結果に近隣の SNPs 等、未測定因子の他の要因の影響がある可能性は否定できず、今後、別集団である北海道コーホートでの再現性の確認が必要になる。また、PFAAs 曝露によるメチル化変化が、児の生後の健康とどのように関わっているか、追跡し調べる必要が

ある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- (1) Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, et al. Effects of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals Exposure on Cord Blood IGF2/H19 Methylation and Ponderal Index: The Hokkaido Study. (*in preparation*)

2 . 学会発表

- (1) 小林祥子, 三浦りゅう, 川口章夫, 宮下ちひろ, 三宅邦夫, 松村徹, 山本潤, 石塚真由美, 荒木敦子, 久保田健夫, 岸玲子, 胎児期ビスフェノール A 曝露影響に関する臍帯血 DNA 網羅的メチル化解析 北海道スタディ, 第 4 回日本 DOHaD 研究学術集会, 東京, 2015.8.1-2.
- (2) 小林祥子, 安住薫, 佐々木成子, 松村徹, 山本潤, 石塚真由美, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子, 臍帯血ビスフェノール A 濃度と児の IGF2 DNA メチル化との関連 - 北海道スタディ, 第 85 回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26-28.

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, et al. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies.

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

- Genome Biol 2014;15(12):503.
2. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 2012;28(6):882-3.
 3. Leek JT, Storey JD. Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS Genet* 2007;3(9):1724-35.
 4. Fox, J. and S. Weisberg, Robust regression in R, in *An R Companion to Applied Regression*. 2011, Sage: Thousand Oaks, CA.
 5. Smyth, G.K., Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004. 3: p. Article3.
 6. Olsen GW, Burriss JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. Half-Life of Serum Elimination of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorohexanesulfonate, and Perfluorooctanoate in Retired Fluorochemical Production Workers. *Environ Health Perspect* 2007;115(9):1298-305.
 7. Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW, Angerer J. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* 2007;80(7):643-8.
 8. Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, et al. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect* 2009;117(4):660-7.
 9. Halldorsson TI, Rytter D, Haug LS, Bech BH, Danielsen I, Becher G, et al. Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: a prospective cohort study. *Environ Health Perspect* 2012;120(5):668-73.
 10. Takacs ML, Abbott BD. Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (alpha, beta/delta, gamma) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate. *Toxicol Sci* 2007;95(1):108-17.
 11. Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, LeBron C, Witter FR, et al. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics* 2010;5(6):539-46.
 12. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* 2009;21(2):243-51.
 13. Khulan B, Manning JR, Dunbar DR, Seckl JR, Raikkonen K, Eriksson JG, et al. Epigenomic profiling of men exposed to early-life stress reveals DNA methylation differences in association with current mental state. *Transl Psychiatry* 2014;4:e448.
 14. Huang RC, Garratt ES, Pan H, Wu Y,

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

- Davis EA, Barton SJ, et al. Genome-wide methylation analysis identifies differentially methylated CpG loci associated with severe obesity in childhood. *Epigenetics* 2015;10(11):995-1005.
15. Houseman EA, Accomando WP, Koestler DC, Christensen BC, Marsit CJ, Nelson HH, et al. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics* 2012;13.
16. Jaffe AE, Murakami P, Lee H, Leek JT, Fallin MD, Feinberg AP, et al. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *Int J Epidemiol* 2012;41(1):200-9.
17. Johnson KJ, McDowell EN, Viereck MP, Xia JQ. Species-specific dibutyl phthalate fetal testis endocrine disruption correlates with inhibition of SREBP2-dependent gene expression pathways. *Toxicol Sci* 2011;120(2):460-74.
18. Ali S, Steinmetz G, Montillet G, Perrard MH, Loundou A, Durand P, et al. Exposure to low-dose bisphenol A impairs meiosis in the rat seminiferous tubule culture model: a physiotoxicogenomic approach. *PLoS One* 2014;9(9):e106245.
19. Gaido KW, Hensley JB, Liu D, Wallace DG, Borghoff S, Johnson KJ, et al. Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 2007;97(2):491-503.
20. Ren H, Aleksunes LM, Wood C, Vallanat B, George MH, Klaassen CD, et al. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha--independent effects of PPARalpha activators in the rodent liver: di-(2-ethylhexyl) phthalate also activates the constitutive-activated receptor. *Toxicol Sci* 2010;113(1):45-59.
21. Du G, Huang H, Hu J, Qin Y, Wu D, Song L, et al. Endocrine-related effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) in zebrafish, H295R steroidogenesis and receptor reporter gene assays. *Chemosphere* 2013;91(8):1099-106.
22. Naile JE, Wiseman S, Bachtold K, Jones PD, Giesy JP. Transcriptional effects of perfluorinated compounds in rat hepatoma cells. *Chemosphere* 2012;86(3):270-7.
23. Peng S, Yan L, Zhang J, Wang Z, Tian M, Shen H. An integrated metabolomics and transcriptomics approach to understanding metabolic pathway disturbance induced by perfluorooctanoic acid. *J Pharm Biomed Anal* 2013;86:56-64.
24. Wang Y, Rogan WJ, Chen PC, Lien GW, Chen HY, Tseng YC, et al. Association between Maternal Serum Perfluoroalkyl Substances during Pregnancy and Maternal and Cord Thyroid Hormones: Taiwan Maternal and Infant Cohort Study. *Environ Health Perspect* 2014;122(5):529-34.

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. 母児の属性と PFASs 濃度との関連

	N	Mean (\pm SD) (%)	PFOS (ng/mL)		PFOA (ng/mL)	
			Median (25th, 75th)	p	Median (25th, 75th)	p
Concentration in maternal blood	164		4.7 (3.1, 6.7)		1.4 (0.8, 1.8)	
<i>Maternal characteristics</i>						
Maternal age (year) ^a	164	30.0 (\pm 4.7)	$\rho = -0.102$	0.195	$\rho = -0.114$	0.145
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	164	20.9 (\pm 2.9)	$\rho = 0.016$	0.841	$\rho = -0.015$	0.852
Parity ^b						
Primiparous	86	52.4	5.4 (3.8, 7.6)	0.002**	1.5 (1.2, 2.1)	< .001**
Multiparous	78	47.6	4.2 (2.8, 5.3)		0.9 (0.6, 1.4)	
Maternal education ^b						
≤ 12 years	78	47.6	4.8 (3.3, 6.0)	0.931	1.2 (0.8, 1.7)	0.208
> 12 years	86	52.4	4.7 (3.0, 7.2)		1.4 (0.9, 1.8)	
Smoking during pregnancy ^b						
No	138	84.1	4.8 (3.2, 7.0)	0.178	1.4 (0.9, 1.8)	0.071
Yes	26	15.9	4.2 (2.5, 6.7)		1.2 (0.7, 1.6)	
Alcohol consumption during pregnancy ^b						
No	119	72.6	4.8 (3.2, 6.5)	0.536	1.3 (0.8, 1.7)	0.514
Yes	45	27.4	4.2 (3.1, 6.9)		1.4 (0.9, 2)	
Blood sampling period ^c						
< 28 weeks	9	5.5	6.7 (5.5, 7.8)	< .001**	1.6 (1.1, 2.7)	0.040*
28-36 weeks	73	44.5	5.2 (4.2, 7.5)		1.5 (0.9, 2.1)	
≥ 36 weeks	37	22.6	3.1 (2.4, 5.3)		1.1 (0.8, 1.4)	
After delivery	45	27.4	3.6 (2.7, 5.4)		1.3 (0.8, 1.7)	
<i>Infant characteristics</i>						
Gestational age (week) ^a	164	39.7 (\pm 1.1)	$\rho = 0.112$	0.155	$\rho = 0.123$	0.116
Sex ^b						
Male	63	38.4	5.0 (3.7, 7.5)	0.127	1.5 (1.1, 1.9)	0.019*
Female	101	61.6	4.6 (3.1, 6.2)		1.3 (0.8, 1.7)	
Birth weight (g) ^a	164	3108 (\pm 318)	$\rho = -0.102$	0.195	$\rho = -0.019$	0.813

^a Spearman's correlation, ^b Mann-Whitney U-test, ^c Kruskal-Wallis

Figure 1. 網羅的 DNA メチル化解析のフローチャート

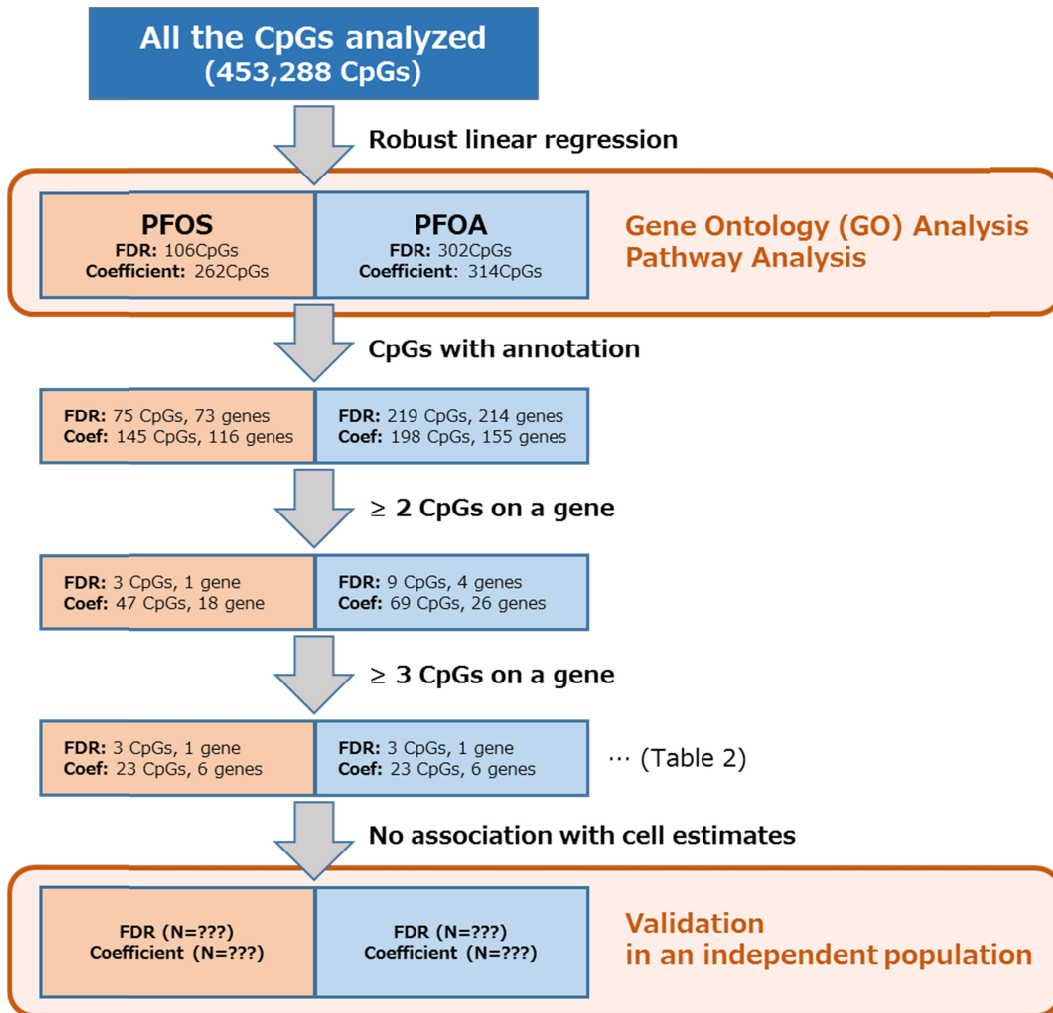
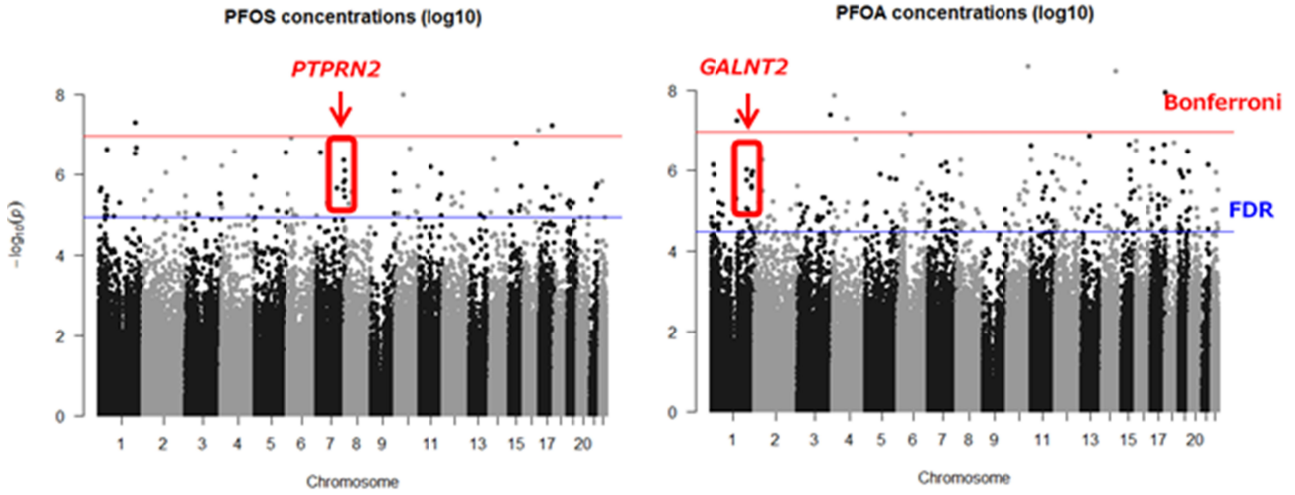


Figure 2. PFAAs 曝露と 45 万 CpGs メチル化との関連

(A) マンハッタン・プロット



横線(上) ボンフェローニ法での有意基準 ($p < 1.1 \times 10^{-7}$)
横線(下) False-discovery rate での有意基準

(B) ボルケーノ・プロット

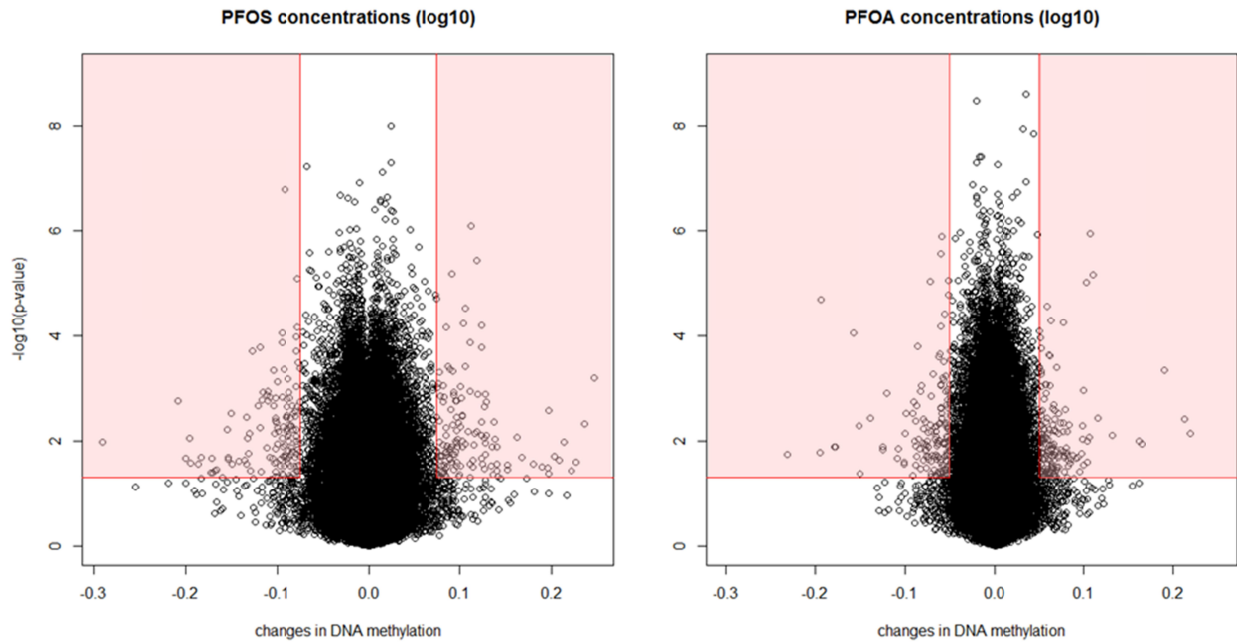


Figure 3. 抽出された CpGs の特徴

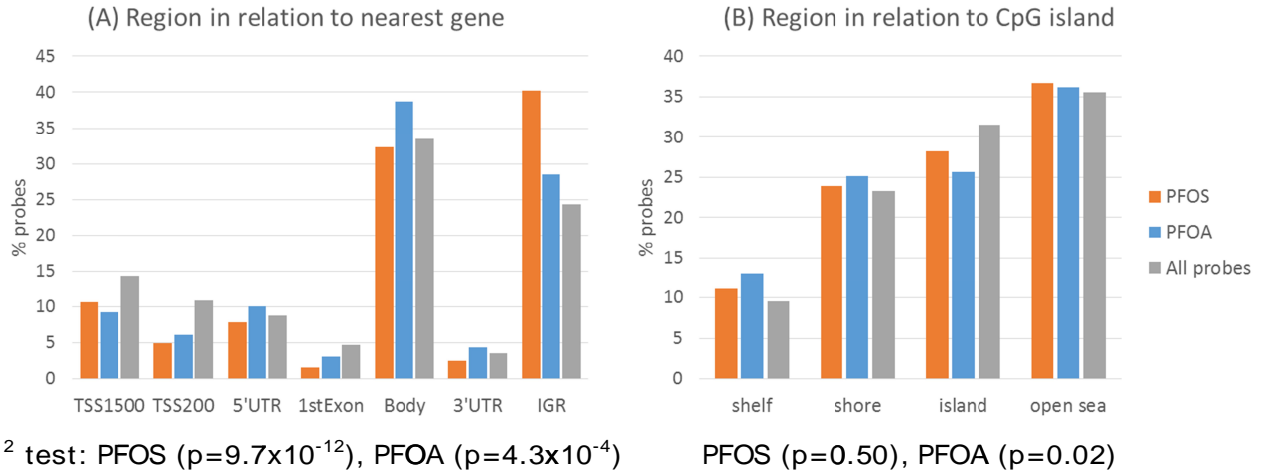


Table 2. Differentially methylated positions associated with PFOS and PFOA concentrations.

(A) PFOS

Gene name	Probe ID	CHR	MAPINFO	Coef	P	feature	CpGI	method ¹⁾	cell ²⁾
PTPRN2	cg20528787	7	158032352	0.12	6.3E-05	Body	open sea	c	
	cg23066280	7	158032496	0.25	6.3E-04	Body	open sea	c	
	cg06715136	7	158046025	0.12	3.7E-06	Body	open sea	p	
	cg02770061	7	158046166	0.12	1.3E-03	Body	open sea	c	
	cg06400119	7	158046222	0.11	8.1E-07	Body	open sea	p	
	cg23759393	7	158110405	0.13	1.3E-03	Body	shore	c	
	cg09756125	7	158250978	-0.15	2.7E-02	Body	shore	c	
	cg17429772	7	158269409	0.13	2.2E-03	Body	open sea	c	
	cg17812313	7	158270995	0.01	1.5E-06	Body	open sea	p	
DNHD1	cg11185456	11	6592066	-0.10	7.4E-04	Body	island	c	
	cg01833234	11	6592585	-0.10	3.8E-03	Body	island	c	
	cg10208301	11	6592745	-0.09	3.6E-03	Body	island	c	
KLHL35	cg06329735	11	75139390	0.13	1.8E-02	Body	shore	c	
	cg05353869	11	75139544	0.15	2.8E-02	Body	island	c	
	cg10909185	11	75139736	0.21	1.0E-02	Body	island	c	
RPH3AL	cg04897931	17	152089	0.08	1.9E-02	Body	shore	c	
	cg17316718	17	152308	0.09	3.1E-02	Body	island	c	
	cg17193961	17	152350	0.09	1.2E-02	Body	island	c	
HOOK2*	cg04657146	19	12876947	-0.17	4.1E-02	Body	island	c, b	CD8T, Bcell
	cg23899408	19	12877188	-0.17	3.7E-02	Body	shore	c, b	
FRG1B	cg07753967	20	29611652	0.08	2.5E-02	TSS1500	island	c	CD8T, NK
	cg14815891	20	29611903	0.14	4.4E-03	Body	island	c	
	cg20811988	20	29611924	0.12	6.8E-03	Body	island	c	
RFPL2	cg01124132	22	32599511	0.10	1.1E-02	TSS200	open sea	c	CD4T, Gran
	cg12906381	22	32599516	0.12	4.3E-03	TSS200	open sea	c	
	cg13405775	22	32599648	0.10	9.4E-04	TSS200	open sea	c	

¹⁾ method: c (coefficient based), p (p-value based), b (Bumphunter)

²⁾ cell: cell proportion that was associated with methylation levels (Spearman's correlaton $> \pm 0.1$)

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

(B) PFOA

Gene name	Probe ID	CHR	MAPINFO	Beta	P	feature	CpGI	method ¹⁾	cell ²⁾
PRKCZ	cg00653281	1	1991051	-0.01	2.0E-05	Body	island	p	
	cg13918804	1	2043761	0.10	1.1E-03	5'UTR	shelf	c	
	cg12718519	1	2058417	-0.07	2.3E-02	5'UTR	open sea	c	
C1orf109	cg24088508	1	38156462	0.22	7.3E-03	TSS1500	shore	c	CD8T
	cg12339802	1	38156545	0.07	4.5E-03	TSS1500	shore	c	
	cg06917450	1	38156652	0.17	1.1E-02	TSS1500	shore	c	
LGR6	cg04811114	1	202172778	0.08	1.6E-02	TSS200	open sea	c	
	cg26347746	1	202172848	0.07	3.1E-02	TSS200	open sea	c	CD8T, CD4T, NK, Bcell, Gran
	cg05044291	1	202172867	0.06	4.9E-02	TSS200	open sea	c	
GALNT2	cg05697274	1	230415377	-0.04	1.4E-06	3'UTR	island	p	CD8T, NK, Mono
	cg24250902	1	230415547	-0.06	1.3E-06	3'UTR	island	p	
	cg03144619	1	230415668	-0.05	1.2E-03	3'UTR	island	c	
	cg24401487	1	230416880	-0.03	2.5E-06	3'UTR	shore	p	
PAX8	cg21482265	2	113992762	0.07	4.3E-02	Body	shore	c	CD8T, NK
	cg12889195	2	113992843	0.07	3.1E-02	Body	shore	c	
	cg11763394	2	113992921	0.07	1.8E-02	Body	shore	c	
	cg21550016	2	113992930	0.06	2.3E-02	Body	shore	c	
	cg07772999	2	113993052	0.05	2.7E-02	Body	shore	c	
	cg19083407	2	113993142	0.07	3.4E-02	Body	shore	c	
	cg07594247	2	113993304	0.06	3.2E-02	Body	island	c	
	cg17445212	2	113993313	0.06	3.8E-02	Body	island	c	
	cg09704166	2	114031854	-0.10	2.8E-02	Body	shore	c	
HDAC4	cg08825699	2	239983929	-0.09	1.0E-02	Body	open sea	c	CD4T, Gran
	cg20784693	2	239984030	-0.10	2.9E-03	Body	open sea	c	
	cg09155776	2	239984105	-0.05	8.2E-03	Body	open sea	c	
	cg06583077	2	240090977	-0.02	2.9E-05	Body	open sea	p	
LRPAP1	cg00356499	4	3516065	0.06	1.9E-02	Body	shore	c	CD4T, Bcell, Mono, Gran
	cg26401028	4	3516534	0.06	4.4E-02	Body	island	c	
	cg04857395	4	3516637	0.08	1.7E-02	Body	island	c	
	cg27321949	4	3516692	0.06	1.9E-02	Body	island	c	
TNXB	cg01337207	6	32063835	0.05	1.2E-02	Body	island	c	CD8T, CD4T
	cg10365886	6	32063874	0.06	4.7E-02	Body	island	c	
	cg07524919	6	32063901	0.05	3.7E-02	Body	island	c	
	cg00872984	6	32063991	0.05	2.1E-02	Body	island	c	
DDO	cg19196401	6	110721138	0.07	2.0E-02	Body	island	c	
	cg01119278	6	110721349	0.06	4.5E-02	Body	island	c	
	cg23891903	6	110725439	0.01	2.9E-06	Body	shelf	p	
PRKAR1B	cg11064039	7	766100	-0.11	1.4E-02	5'UTR	island	c	CD8T, CD4T
	cg06242242	7	766104	-0.09	2.9E-02	5'UTR	island	c	
	cg05729249	7	766119	-0.07	4.2E-02	5'UTR	island	c	
EBF3	cg05636467	10	131669406	-0.08	1.1E-02	Body	shelf	c	
	cg04043455	10	131669461	-0.12	1.3E-02	Body	shelf	c	
	cg09252806	10	131669630	-0.09	2.1E-03	Body	shelf	c	
TK2	cg03448915	16	66583078	-0.08	4.3E-03	Body	shore	c	
	cg07127456	16	66583081	-0.06	2.4E-03	Body	shore	c	
	cg09238666	16	66584358	-0.05	8.6E-04	TSS200	shore	c	

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. Differentially methylated regions indicated by Bumphunting method.

CHR	Start (Mb)	Gene	CpGs	Probes	Features	CGI	Area	p-value (area)	FDR (area)
PFOS log ₁₀ -transformed									
19	12.9	HOOK2	3	cg04657146* cg06417478 cg11738485 cg23899408*	Body	island/shore	0.83	0.0001	0.112
PFOS (1st vs. 4th Quartiles)									
19	12.9	HOOK2	3	cg04657146* cg06417478 cg11738485	Body	island/shore	0.38	0.0056	0.037
22	24.3	GSTTP1	3	cg11141652 cg15242686 cg22666875	TSS1500	open sea	0.33	0.0108	0.072

*cg0457146, cg23899408 は robust linear regression でもスクリーニングされた CpGs

Table 4. Estimated cell proportion in cord blood and their relation to PFAAs concentration (N=164).

	Proportion		PFOS		PFOA	
	Median	(25th, 75th)		p-value		p-value
Lymphocytes						
CD8 ⁺ T	0.064	(0.049, 0.083)	-0.043	0.585	-0.068	0.384
CD4 ⁺ T	0.116	(0.0912, 0.142)	0.057	0.468	-0.037	0.638
NK cells	0.024	(0.000, 0.053)	0.103	0.188	0.128	0.101
B cells	0.101	(0.0874, 0.120)	0.020	0.800	0.035	0.656
Myeloid cells						
Monocytes	0.109	(0.097, 0.120)	-0.214	0.006*	-0.053	0.505
Granulocytes	0.603	(0.566, 0.649)	-0.022	0.784	0.054	0.494

ρ: Spearman's correlation coefficient

Figure 4. Spearman's correlation between cell proportion estimates and DNA methylation at selected CpGs.

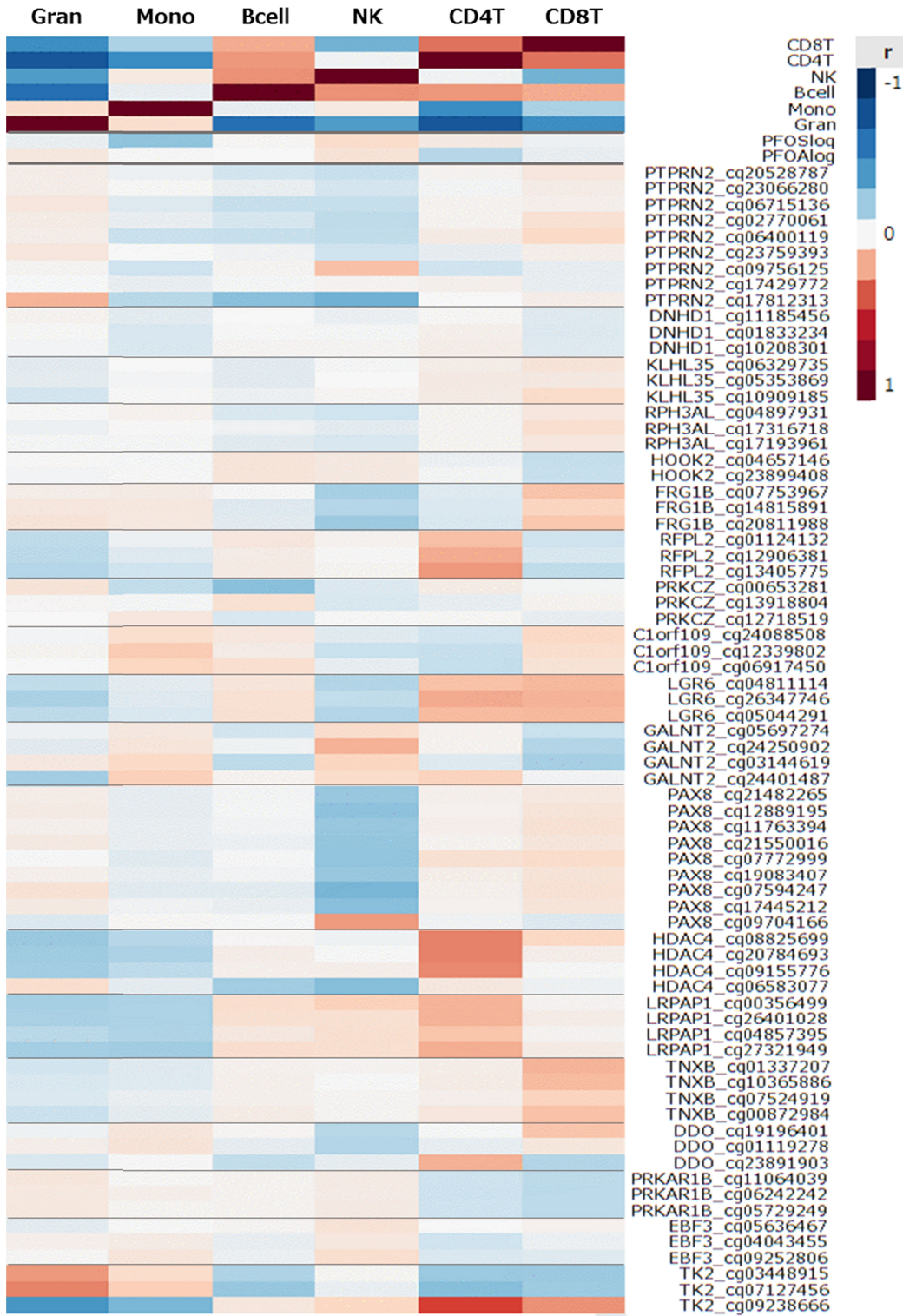
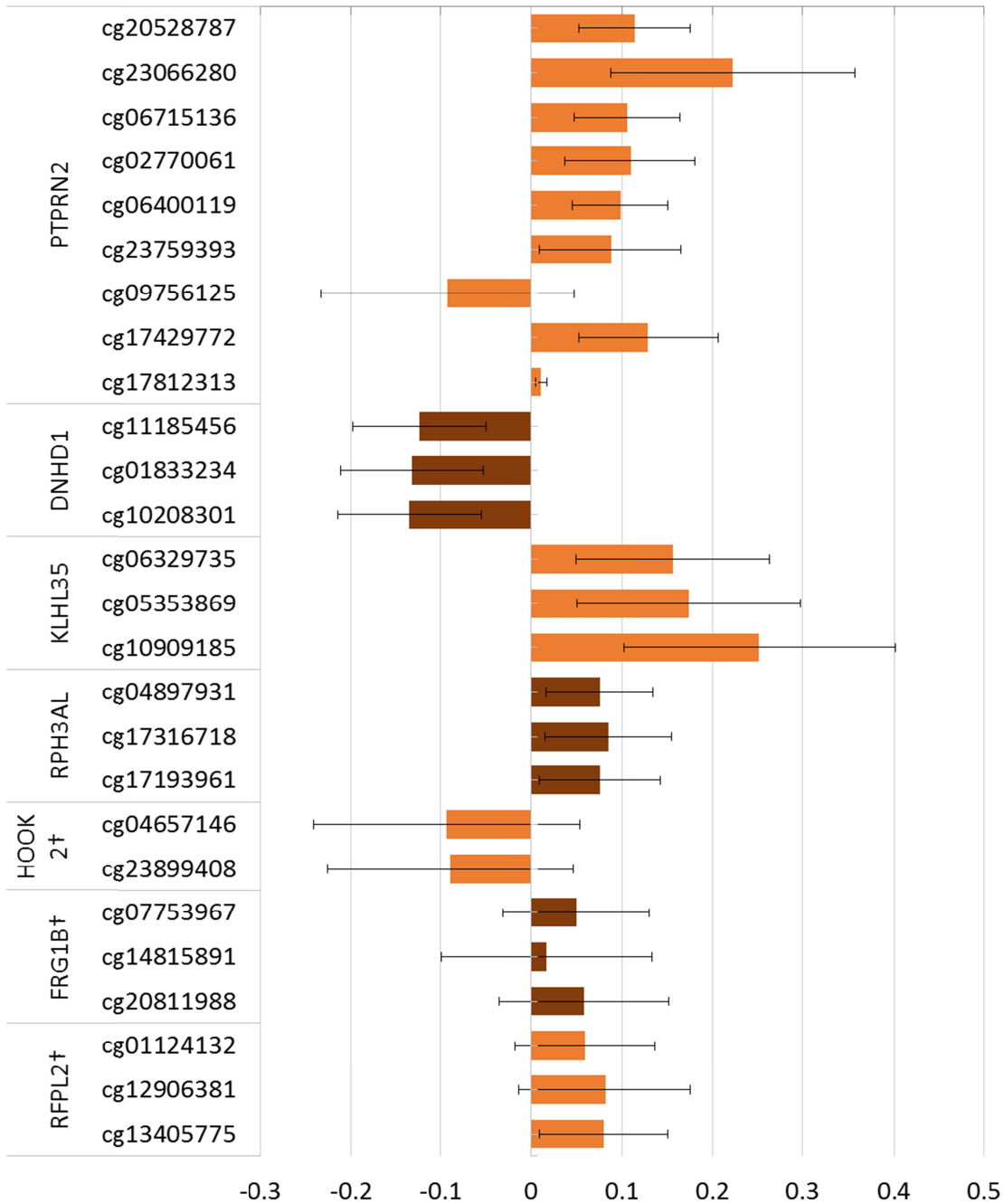


Figure 5. Changes in methylation with log₁₀-unit increase in PFOS and PFOA concentrations with adjustment for estimated cell proportion.

(A) PFOS

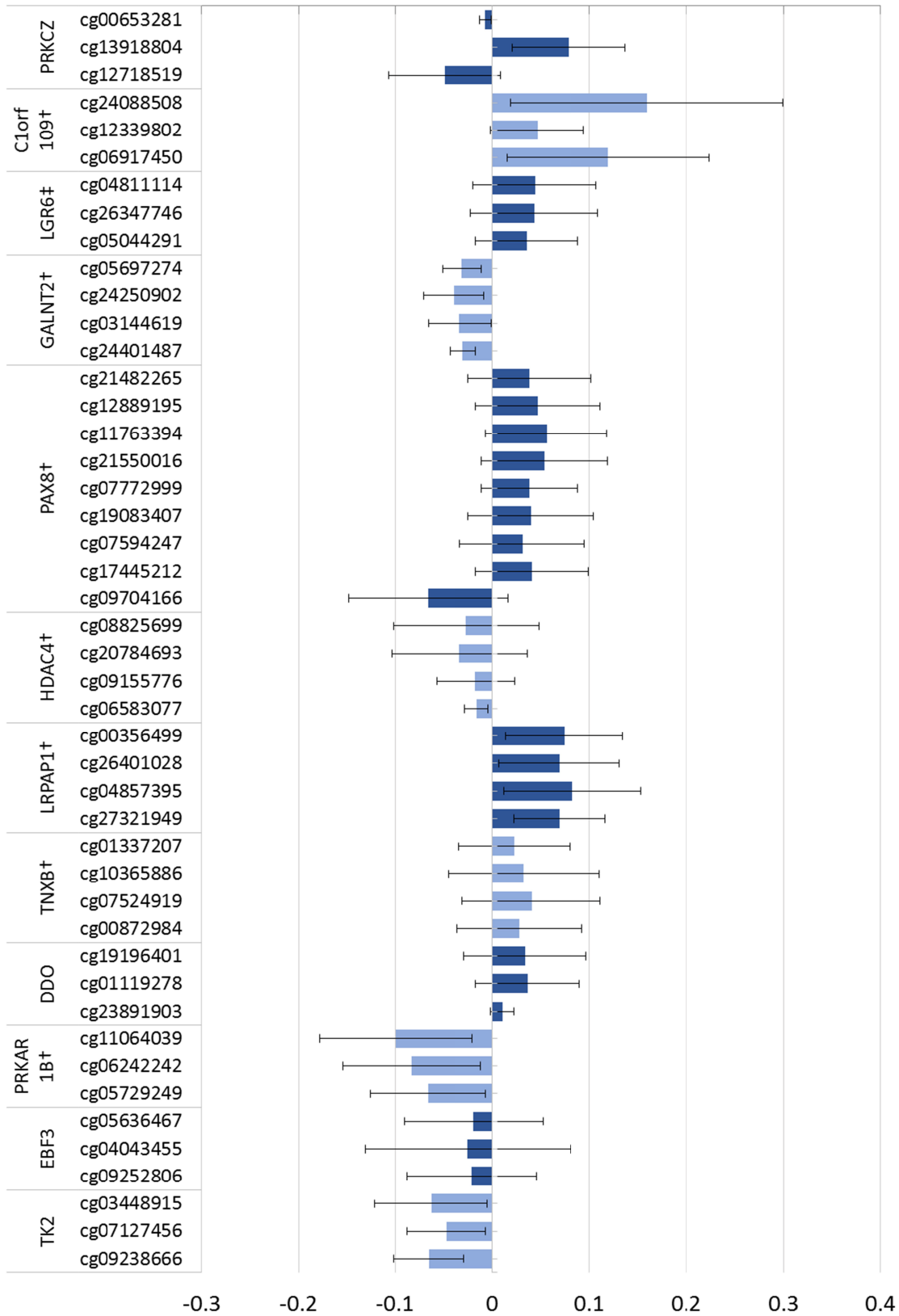


Adjusted for maternal age, infants sex, maternal blood sampling period, (†estimated cell proportion)

Error bars indicates 95% confidence intervals.

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

(B) PFOA



胎児期のメチル水銀とフタル酸エステル類曝露が児の DNA メチル化に及ぼす影響

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 石塚 真由美 北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座 教授

研究要旨

背景：胎児期環境要因の影響は、その持続性からエピジェネティックな変化をもたらしていると考えられてきている。しかし、胎児期環境要因としての化学物質曝露については、動物実験において DNA メチル化などのエピジェネティクス機構への影響が示されているが、現在のところ疫学研究での報告、特に胎児期曝露の影響を評価した報告は少ない。

目的：本研究では、環境化学物質の胎児期曝露が DNA メチル化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、曝露要因として水銀・フタル酸エステル曝露とゲノム全体のメチル化指標である LINE1 遺伝子、および、胎生環境と DNA メチル化との関連性を示すマーカー遺伝子座 IGF2/H19 のメチル化変化との関連を検討した。

方法：札幌の一産科病院で 2002 年から 2005 年にリクルートし、同意を得た妊婦 514 名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報、臍帯血 DNA、母毛髪水銀(N=244)もしくはフタル酸エステル代謝物である MEHP の母体血中濃度(N=187)のそろう母児ペアを対象とした。IGF2/H19、LINE1 遺伝子領域の臍帯血メチル化はパイロシークエンス法を用いて定量し、得られた DNA メチル化率と母の毛髪水銀濃度および MEHP の血中濃度との関連を重回帰分析で検討した。

結果：交絡因子調整後、母毛髪水銀量と LINE1 メチル化との間に有意な正の関連がみられた($r=0.7$, $p=0.04$)。MEHP 濃度については、H19 メチル化との間に有意な負の関連がみられた($r=-1.3$, $p=0.02$)。男女別解析では、母毛髪水銀量と LINE1 メチル化、MEHP 濃度と H19 メチル化、どちらも男児のみで有意な関連がみられた。また、それぞれの曝露濃度を 4 分位に分けて解析を行なった結果、MEHP 濃度と H19 メチル化との関連で有意な濃度依存性が見られた(p for trend = 0.02)。水銀と LINE1 メチル化との関連では有意ではないが濃度依存傾向がみられ、特に、男児でその傾向が強かった。

結論：水銀、フタル酸エステルの胎児期曝露による LINE1、H19 のメチル化への影響が認められ、環境化学物質の胎児期曝露により、児の DNA メチル化が影響を受けることが示唆された。

研究協力者

三浦 りゅう，小林祥子，小林澄貴
（北海道大学環境健康科学研究教育センター）
中澤 裕之
（星薬科大学薬品分析化学教室）
那須 民江（中央大学生命健康科学部）
蜂谷 紀之
（環境省国立水俣病総合研究センター）
安武 章
（熊本大学大学院自然科学研究科）

A．研究目的

エピジェネティクスは環境影響による可塑性を示し，胎児期環境と生後の表現型を結ぶ重要な因子であると考えられている（Baccarelli and Bollati, 2009）。一方，環境に蔓延している化学物質の胎児期曝露は児の健康へのリスクファクターとなっている。その影響は成長後まで持続することから，児の DNA メチル化を始めとするエピジェネティクス機構への影響が考えられ，動物実験による報告が急増している。しかし，現在のところ疫学研究での報告，特に胎児期曝露によるエピジェネティクスへの影響を評価した報告は少ない。

DNA メチル化は最も研究が進んでいるエピジェネティクス機構の一つであり，ゲノムのおよそ 17%を占める反復配列の LINE1 遺伝子がゲノム全体のメチル化指標として用いられている（Ruiz-Hernandez et al. 2015）。Insulin-like growth factor 2（IGF2）と，IGF2 の発現制御に関わっている H19 は，胎児発達や細胞分化に重要な役割を果たしており，2 つの遺伝子が並んだ IGF2/H19 遺伝子座は，胎生環境と DNA メチル化との関連性を示すマーカーとなるインプリンティング遺伝子座である（Cui et al. 2002; Hoyo et al. 2012）。

一方，環境化学物質については，魚介類摂取が主な曝露源となるメチル水銀は胎盤を通過し，児の神経系などへの影響が懸念されている（Bukulski et al. 2015）。フタル酸エステルはプラスチックの可塑剤として使用されている化学物質であり，様々な製品に汎用されているため，恒常的かつ長期的な曝露による健康影響が懸念されている（Zhao et al. 2015）。

そこで本研究では，環境化学物質の胎児期曝露が DNA メチル化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に，水銀およびフタル酸エステルの胎児期曝露と臍帯血の LINE1，IGF2/H19 領域の DNA メチル化変化との関連について出生コホートを用いて検討した。

B．研究方法

1．対象

札幌の一産科病院で 2002 年 7 月から 2005 年 10 月までにリクルートし，同意を得た妊婦 514 名のうち，初期調査票・出産時カルテ情報，臍帯血 DNA，母毛髪水銀（N=244）もしくはフタル酸エステル代謝物である MEHP の出産前母体血中濃度（N=187）のそろった母児ペアを対象とした。

2．方法

臍帯血全血 400 μ L から Maxwell® 16 DNA Purification Kit（Promega 社）を用いて DNA 抽出を行った。得られた臍帯血 DNA を EpiTect Plus Bisulfite Kit（Qiagen 社）にてバイサルファイト処理後，PyroMark Q24 system（Qiagen 社）を用いたパイロシーケンシング法により，IGF2 DMR0（chr11p15.5, site 1: 2,109,519; site 2: 2,109,516; NCBI Human Genome Build 37.1），H19 DMR（chr11p15.5, site 1: 1,964,261; site 2: 1,964,259; site 3: 1,964,257; site 4: 1,964,254），LINE1 の 3 領域について DNA メチル化解析を行った。母の毛髪

を出産後5日以内に採取し、メチル化水銀の曝露指標として毛髪中の総水銀濃度を酸化燃焼金アマルガム法（AAS法）で測定した。母体血中MEHP濃度はGC-MSで測定を行った。曝露濃度を \log_{10} 変換し、重回帰分析により統計解析を行った。

（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

本研究に用いた集団の臍帯血DNAメチル化率の平均値（ \pm SD）は、IGF2が48.7%（ \pm 2.9）、H19が52.3%（ \pm 2.0）、LINE1が75.8%（ \pm 1.1）であった。母毛髪中水銀量の中央値は1.42 μ g/g（最小値-最大値：0.30-7.55）、出産前に採血を行った187名の母体血中MEHP濃度の中央値は10.4 ng/ml（最小値-最大値：3.4-64.0）であった。表1に解析に用いた集団の母児の属性、および、母毛髪中水銀濃度・母体血中MEHP濃度との関連を示した。母毛髪中水銀濃度と魚摂取量、母体血中MEHP濃度と採血時期および児のポンドラル指数との有意な相関が認められた。

それぞれの曝露によるDNAメチル化への影響を重回帰分析で検討した結果（表2）、母毛髪水銀量との関連については、母年齢・世帯年収・妊娠中喫煙・魚摂取量・

パーマの有無・児性別で調整後、LINE1メチル化との間に有意な正の関連がみられた（ $\beta=0.7$, $p=0.04$ ）。MEHP濃度については、母年齢・学歴・妊娠中喫煙・児性別・母体血採血時期で調整後、H19メチル化との間に有意な負の関連がみられた（ $\beta=-1.3$, $p=0.02$ ）。性別での層別解析を行なったところ、母毛髪水銀量とLINE1メチル化、MEHP濃度とH19メチル化、どちらも男児のみで有意な関連がみられた（表3）。また、濃度依存性を見るために、それぞれの曝露濃度を4分位に分けて解析を行った。図1に示すように、MEHP濃度とH19メチル化との関連で有意な濃度依存性が見られた（ p for trend = 0.02）。一方、水銀とLINE1メチル化との関連では有意な濃度依存は見られなかったが（図2-a）、男児において水銀濃度が増加するにつれて、メチル化率が高くなっていた（図2-b）。しかし、表4に示すように、LINE1、および、H19のメチル化率共に、児の出生時体格との相関は見られなかった。

D．考察

胎児期水銀曝露によるゲノム全体のメチル化指標であるLINE1の高メチル化、フタル酸エステル曝露による胎生環境とメチル化との関連指標であるH19の低メチル化、およびそれらの影響の性差が示された。

本研究において、90%以上の対象者の毛髪水銀濃度は、次世代影響が認められる可能性がある下限値：2.75 μ g/g未満であるにも関わらず、ゲノム全体へのDNAメチル化への影響が示された。これは、出産後の母の爪の水銀レベルと臍帯血DNAのメチル化との関連において、CpGアイランド上流に位置するCpGサイトの高メチル化

が認められた結果 (Cardenas et al. 2015)と一致するものである。しかし、LINE1 メチル化と児の出生時体格との関連は見られなかったことから、一般環境レベルである水銀曝露と関連する DNA メチル化変化は出生時体格に影響を及ぼすレベルではない可能性がある。あるいは、出生時体格以外のアウトカムに影響を及ぼす可能性も考えられ、検討が必要である。

フタル酸エステル曝露の影響については、妊娠中の曝露が胎盤の LINE1 (Zhao et al. 2015)、IGF2/H19 (LaRocca et al. 2014) のメチル化に影響するという報告があるが、胎児の DNA メチル化に関する疫学研究での報告はない。本研究では、ゲノム全体のメチル化の指標として用いた LINE1 には有意な影響は見られず、遺伝子特異的に H19 の低メチル化が認められ、その影響に性差および濃度依存性が見られた。H19 は IGF2 の発現制御に関わっているが、H19 メチル化と出生時体格との間に有意な関連は認められなかった。しかし、IGF2 の役割は胎児の発育のみに限られたものではなく、また、H19 は細胞分化において重要な役割を果たしており、出生時体格以外の表現型に影響している可能性がある。水銀曝露と同様に、フタル酸エステル曝露で観察されたメチル化変化と関連する児のアウトカムを検討していく必要がある。

我々はこれまでにフタル酸エステル曝露のほか、PFCs、ダイオキシン・PCBs の胎児期曝露による IGF2/H19 メチル化への影響を明らかにした (Kobayashi et al. submitted)。これは、胎児期環境としての化学物質曝露が DNA メチル化変化と関連することを示している。DNA メチル化変化は時間・組織特異的に制御されていることから (Bale TL. 2015)、環境化学物質曝

露の影響を受ける特異的メチル化部位の存在が考えられる。現在、その特異的メチル化部位を特定するため、HumanMethylation450 BeadChip (Illumina社)を用いた網羅解析を行っている。今後、特異的メチル化部位とその変化に伴う成長発育・アレルギー・神経発達等のアウトカムとの関連を明らかにしていく。

E. 結論

本研究で、水銀の胎児期曝露によるゲノム全体のメチル化の亢進、および、フタル酸エステル曝露による H19 のメチル化への負の影響が認められ、胎児期の環境化学物質曝露が胎児に与える影響に DNA メチル化変化が関与している可能性が示唆された。

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. Baccarelli A and Bollati V. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 21:243-251.
2. Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. 2002. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res.* 15;62(22):6442-6.

3. Hoyo C, Fortner K, Murtha AP, Schildkraut JM, Soubry A, Demark-Wahnefried W, Jirtle RL, Kurtzberg J, Forman MR, Overcash F, Huang Z, Murphy SK. 2012. Association of cord blood methylation fractions at imprinted insulin-like growth factor 2 (IGF2), plasma IGF2, and birth weight. *Cancer Causes Control*. 23(4):635-45.
4. Ruiz-Hernandez A, Kuo CC, Rentero-Garrido P, Tang WY, Redon J, Ordovas JM, Navas-Acien A, Tellez-Plaza M. 2015. Environmental chemicals and DNA methylation in adults: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Clin Epigenetics*. 29;7(1):55.
5. Bakulski KM, Lee H, Feinberg JI, Wells EM, Brown S, Herbstman JB, Witter FR, Halden RU, Caldwell K, Mortensen ME, Jaffe AE, Moye J Jr, Caulfield LE, Pan Y, Goldman LR, Feinberg AP, Fallin MD. 2015. Prenatal mercury concentration is associated with changes in DNA methylation at TCEANC2 in newborns. *Int J Epidemiol*. 44(4):1249-62
6. Zhao Y, Shi HJ, Xie CM, Chen J, Laue H, Zhang YH. 2015. Prenatal phthalate exposure, infant growth, and global DNA methylation of human placenta. *Environ Mol Mutagen*. 56(3):286-92.
7. Cardenas A, Koestler DC, Houseman EA, Jackson BP, Kile ML, Karagas MR, Marsit CJ. 2015. Differential DNA methylation in umbilical cord blood of infants exposed to mercury and arsenic in utero. *Epigenetics*. 10(6):508-15
8. LaRocca J, Binder AM, McElrath TF, Michels KB. 2014. The impact of first trimester phthalate and phenol exposure on IGF2/H19 genomic imprinting and birth outcomes. *Environ Res*. 2014 Aug;133:396-406.
9. Kobayashi S, Azumi K, Itoh S, Goudarzi H, Sasaki S, Ishizuka M, Nakazawa H, Kobayashi S, Miyashita C, Ikeno T, Araki A, Kishi R. Effects of Prenatal Perfluorinated Chemicals Exposure on Cord Blood *IGF2/H19* Methylation and Ponderal Index: The Hokkaido Study. Submitted.
10. Bale TL. 2015. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*. 16(6):332-44.

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. 母毛髪水銀濃度・母体血中 MEHP 濃度と母児の属性との関連

	N=244		Total Hg (µg/g)				N=187		MEHP (ng/ml)			
	Mean ± SD	N (%)	Median	25th	75th	p	Mean ± SD	N (%)	Median	25th	75th	p
Maternal Characteristic												
Maternal age (year) ^a	30.0 ± 4.8		= 0.032			0.619	29.9 ± 4.9		= 0.042			0.565
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	20.9 ± 2.9		= -0.033			0.606	21.1 ± 2.9		= 0.059			0.425
Parity ^b												
0	132 (54.1)		1.42	0.99	1.89	0.945	103 (55.1)		10.15	5.68	15.06	0.465
1	112 (45.9)		1.44	0.95	2.02		84 (44.9)		10.46	6.28	15.47	
Educational level (year) ^b												
12	107 (43.9)		1.47	0.95	1.89	0.691	85 (45.5)		10.37	5.99	14.34	0.886
> 12	137 (56.1)		1.42	1.01	1.97		102 (54.5)		10.49	5.69	15.42	
Annual household income ^b												
5,000,000	169 (69.3)		1.48	0.97	1.89	0.592						
> 5,000,000	75 (30.7)		1.42	1.01	2.08							
Smoking during pregnancy ^b												
No	205 (84.0)		1.44	0.99	1.93	0.209	156 (83.4)		10.44	5.99	15.36	0.273
Yes	39 (16.0)		1.30	0.96	1.61		31 (16.6)		9.96	5.12	14.38	
Alcohol consumption during pregnancy ^b												
No	165 (67.6)		1.42	0.96	1.92	0.666	121 (64.7)		10.48	5.96	15.33	0.854
Yes	79 (32.4)		1.44	1.03	1.89		66 (35.3)		10.35	5.63	15.09	
Caffein in take during pregnancy (mg/day) ^b	149.9 ± 125.0		= -0.026			0.686	145.9 ± 127.3		= 0.043			0.562
Blood sampling period ^c												
< 28 weeks							17 (9.1)		14.18	8.84	17.35	0.013*
28-36 weeks							109 (58.3)		10.87	6.45	15.38	
36 weeks							61 (32.6)		7.13	5.24	13.96	
Fish consumption (g/day) ^a												
Inshore fish	47.1 ± 32.3		= 0.244			0.0001**						
Deep-sea fish	36.8 ± 27.6		= 0.257			<.0001**						
Hair permanemt ^b												
No	172 (70.5)		1.44	0.96	1.93	0.579						
Yes	72 (29.5)		1.40	0.99	1.70							
Infant Characteristic												
Geatation age (week) ^a	39.8 ± 1.0		= 0.004			0.954	39.8 ± 1.0		= 0.0002			0.998
Sex ^b												
Male	115 (47.1)		1.48	0.97	1.97	0.484	88 (47.1)		10.48	5.68	16.27	0.528
Female	129 (52.9)		1.36	0.97	1.87		99 (52.9)		9.86	6.37	14.26	
Birth weight (g) ^a	3129.2 ± 333.4		= 0.007			0.909	3130.7 ± 335.4		= -0.091			0.217
Birth length (cm) ^a	48.4 ± 1.6		= -0.080			0.214	48.5 ± 1.6		= 0.071			0.338
Ponderal Index (kg/m ³) ^a	27.5 ± 2.3		= 0.100			0.121	27.4 ± 2.2		= -0.166			0.023*

^aSpearman's correlation, ^bMann-Whitney U-test, ^cKruskal-Wallis test

*p < 0.05. **p < 0.01

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 . 水銀・フタル酸エステルの胎児期曝露による DNA メチル化への影響（重回帰分析）

	IGF2 methylation (%)			H19 methylation (%)			LINE1 methylation (%)		
		(95% CI)	p		(95% CI)	p		(95% CI)	p
Total Hg (log ₁₀)									
Crude	0.034	(-1.783, 1.851)	0.971	0.707	(-0.509, 1.922)	0.253	0.649	(-0.026, 1.324)	0.060
adjusted ^a	0.041	(-1.829, 1.911)	0.965	0.364	(-0.880, 1.608)	0.565	0.704	(0.047, 1.361)	0.035*
MEHP (log ₁₀)									
Crude	0.548	(-1.014, 2.109)	0.490	-1.341	(-2.385, -0.297)	0.012*	-0.199	(-0.798, 0.400)	0.513
adjusted ^b	0.524	(-1.072, 2.120)	0.518	-1.309	(-2.355, -0.22)	0.015*	-0.097	(-0.665, 0.472)	0.738

^aAdjusted for maternal age, annual house income, smoking during pregnancy, fish consumption, hair permanemt, infant's sex

^bAdjusted for maternal age, maternal education, smoking during pregnancy, blood sampling period, infant's sex

: partial regression coefficient

*p < 0.05

表 3 . 水銀曝露の LINE1 メチル化およびフタル酸エステル曝露の H19 メチル化に及ぼす影響の性差

	N	LINE1 methylation (%)				N	H19 methylation (%)		
			(95% CI)	p				(95% CI)	p
Total Hg (log ₁₀) ^a					MEHP (log ₁₀) ^b				
Male	115	1.019	(0.060, 1.978)	0.038*	Male	88	-2.817	(-4.335, -1.298)	<0.001**
Female	129	0.379	(-0.576, 1.334)	0.434	Female	99	-0.707	(-2.163, 0.750)	0.338

^aAdjusted for maternal age, annual house income, smoking during pregnancy, fish consumption, hair permanemt

^bAdjusted for maternal age, maternal education, smoking during pregnancy, blood sampling period

: partial regression coefficient

*p < 0.05, **p < 0.01

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

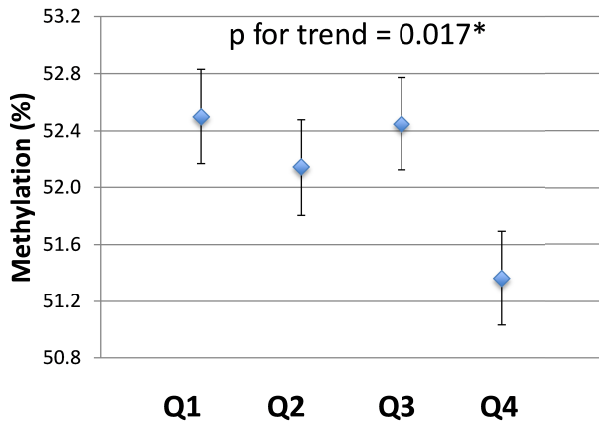


図1. 母体血 MEHP と臍帯血 H19 メチル化変化との関連の濃度依存 (N=187)

Q1: < 5.9 ng/ml
Q2: 5.9 - 10.4 ng/ml
Q3: 10.4 - 15.2 ng/ml
Q4: > 15.2 ng/ml

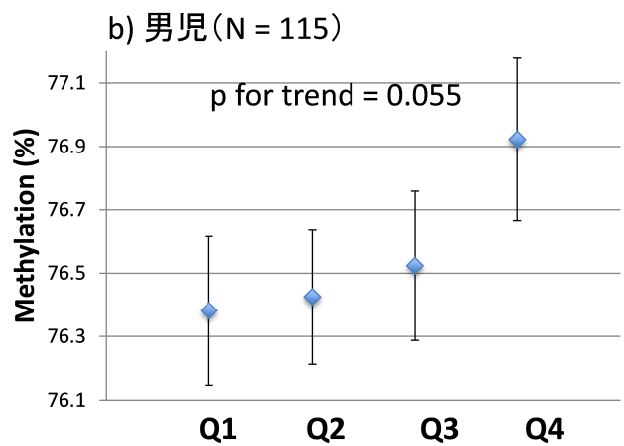
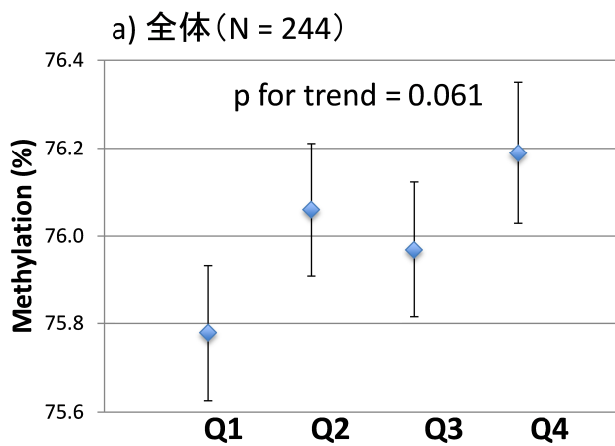


図2. 母毛髪水銀と臍帯血LINE1メチル化変化との関連の濃度依存

Q1: < 0.97 $\mu\text{g/g}$, Q2: 0.97 - 1.42 $\mu\text{g/g}$, Q3: 1.42 - 1.91 $\mu\text{g/g}$, Q4: > 1.91 $\mu\text{g/g}$

	LINE1 methylation (%), N=244			H19 methylation (%), N=187		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Birth weight (g)						
adjusted ^a	7.943	(-28.01, 43.90)	0.664	2.673	(-20.72, 26.06)	0.822
adjusted ^b	-8.061	(-45.14, 29.01)	0.669	4.554	(-19.15, 28.25)	0.705
Birth length (cm)						
adjusted ^a	-0.003	(-0.179, 0.172)	0.970	0.041	(-0.071, 0.152)	0.472
adjusted ^b	-0.114	(-0.296, 0.069)	0.221	0.043	(-0.067, 0.154)	0.440
Ponderal index (kg/m ³)						
adjusted ^a	0.109	(-0.151, 0.369)	0.408	-0.044	(-0.203, 0.116)	0.587
adjusted ^b	0.150	(-0.125, 0.425)	0.284	-0.032	(-0.192, 0.129)	0.699

^aAdjusted for gestational age

^bAdjusted for gestational age, maternal age, parity, maternal education, pre-pregnancy BMI, smoking during pregnancy, infant's sex

β : partial regression coefficient, *p < 0.05

表4. LINE1およびH19DNAメチル化と出生時体格との相関

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Goudarzi, S. Nakajima, T. Ikeno, S. Sasaki, S. Kobayashi, C. Miyashita, S. Ito, A. Araki, H. Nakazawa and R. Kishi	Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and neurodevelopment in early infancy: The Hokkaido Study	The Science of the total environment	541	1002-1010	2016
M. A. Verner, A. E. Loccisano, N. H. Morken, M. Yoon, H. Wu, R. McDougall, M. Maisonet, M. Marcus, R. Kishi, C. Miyashita, M. H. Chen, W. S. Hsieh, M. E. Andersen, H. J. Clewell, 3rd and M. P. Longnecker	Associations of Perfluoroalkyl Substances (PFASs) with Lower Birth Weight: An Evaluation of Potential Confounding by Glomerular Filtration Rate Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK)	Environmental health perspectives	doi: 10.1289/ehp. 1408837		2015
C. Miyashita, S. Sasaki, Y. Saijo, E. Okada, S. Kobayashi, T. Baba, J. Kajiwara, T. Todaka, Y. Iwasaki, H. Nakazawa, N. Hachiya, A. Yasutake, K. Murata and R. Kishi	Demographic, behavioral, dietary, and socioeconomic characteristics related to persistent organic pollutants and mercury levels in pregnant women in Japan	Chemosphere	133	13-21	2015
C. Miyashita, S. Sasaki, T. Ikeno, A. Araki, S. Ito, J. Kajiwara, T. Todaka, N. Hachiya, A. Yasutake, K. Murata, T. Nakajima and R. Kishi	Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and polyunsaturated fatty acids on birth size	The Science of the total environment	533	256-265	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Mitsui, A. Araki, A. Imai, S. Sato, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi and K. Nonomura	Effects of prenatal leydig cell function on the ratio of the second to fourth digit lengths in school-aged children	PloS one	10 (3)	e0120636	2015
R. Kishi, T. Nakajima, H. Goudarzi, S. Kobayashi, S. Sasaki, E. Okada, C. Miyashita, S. Itoh, A. Araki, T. Ikeno, Y. Iwasaki and H. Nakazawa	The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Essential and Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of their Offspring: The Hokkaido Study	Environmental Health Preventives	123 (10)	1038-1045	2015
S. J. Hanley, E. Yoshioka, Y. Ito and R. Kishi	HPV vaccination crisis in Japan	Lancet (London, England)	385 (9987)	2571	2015
Y. Ait Bamai, A. Araki, T. Kawai, T. Tsuboi, E. Yoshioka, A. Kanazawa, S. Cong and R. Kishi	Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families	International journal of hygiene and environmental health	218 (5)	461-470	2015
X. Jia, T. Tagawa, H. Yatsuya, H. Naito, Y. Hayashi, Y. Husna, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, T. Ikeno, R. Kishi and T. Nakajima	Association of maternal whole blood fatty acid status during the prenatal period with term birth dimensions: a cross-sectional study	Journal of Perinatal Medicine	43 (5)	565-575	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
X. Jia, Y. Harada, M. Tagawa, H. Naito, Y. Hayashi, H. Yetti, M. Kato, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, T. Ikeno, R. Kishi and T. Nakajima	Prenatal maternal blood triglyceride and fatty acid levels in relation to exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: a cross-sectional study	Environmental health and preventive medicine	20 (3)	168-78	2015
小林澄貴, 荒木敦子, 佐々木成子, 池野多美子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 岸玲子	胎児期の母の受動喫煙と児の出生体重に関する最近の研究動向	北海道公衆衛生学雑誌	28 (2)	37-48	2015
岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】第1回「奪われし未来」にしない	公衆衛生	79	193-199	2015
梶原淳睦	【講座 子供を取り巻く環境と健康】第3回 POPs (ダイオキシン・PCB類)の曝露実態	公衆衛生	79	347-352	2015
荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】第5回 短半減期化学物質の曝露実態	公衆衛生	79	485-490	2015
佐々木成子, 小林澄貴, 岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】第7回 喫煙,受動喫煙による児への影響	公衆衛生	79	637-643	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
湊屋街子, 岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】 第8回 胎児期の環境化学物質曝露が 出生体重と生後発育へ与える影響	公衆衛生	79	719-724	2015
宮下ちひろ, 岸玲子	【講座 子供を取り巻く環境と健康】 第9回 乳幼児のアレルギー・感染症への ダイオキシン類, 有機フッ素系化学 物質曝露による影響	公衆衛生	79	805-810	2015
荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】 第10回 乳幼児のアレルギーと胎 児期・小児期の可塑剤・難燃剤曝露	公衆衛生	79	876-881	2015
岸玲子	世界における出生コホート研究の現 状	Endocrine Disrupter News Letter	18	1	2015
宮下ちひろ, 岸玲子	胎児期のPCBsダイオキシン類による出 生体重とアレルギー感染症に与える影 響	Endocrine Disrupter News Letter	18	2	2015
荒木敦子, 宮下ちひろ, 岸玲子,	胎児期の有機フッ素化合物曝露による 児の健康への影響	Endocrine Disrupter News Letter	18	5	2015
三井貴彦, 武田正之, 篠原信雄, 野々村克也, 荒木敦子, 岸玲子	環境化学物質がホルモン環境および身 体的変化に与える影響について	Endocrine Disrupter News Letter	18	6	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
伊藤佐智子, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第12回 環境化学物質曝露による内分泌系への影響(1)甲状腺機能	公衆衛生	80	137-144	2016
荒木敦子, 伊藤佐智子, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第13回 環境化学物質曝露による内分泌系への影響(2)性ホルモン	公衆衛生	80	221-227	2016