

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. **Prevalence and Risk of Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study; the Hokkaido Study on Environment and Children's Health**
(岸 玲子,花岡 知之 水上 尚典,馬場 剛,千石 一雄,有賀 正)
 2. 先天異常の出生時から7歳までの発生状況に関する研究
(岸 玲子,水上 尚典,馬場 剛,千石 一雄,有賀 正)
 3. 妊娠初期の血清葉酸値と **Birth defects** リスクとの関連
(岸 玲子,水上 尚典,馬場 剛,千石 一雄,有賀 正,花岡 知之)
 4. **The associations between prenatal phthalate exposure and cryptorchidism: The Hokkaido Study in Environment and Children's Health**
(岸 玲子,篠原 信雄,松村 徹)
 5. ダイオキシン類の胎児期曝露による3歳半および7歳児のアレルギー・感染症への影響：北海道スタディ
(岸 玲子,梶原 淳睦,荒木 敦子,宮下 ちひろ)
 6. **Association of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances with cord blood adipokines and birth size: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health**
(岸 玲子,松浦 英幸,荒木 敦子,)
 7. 有機塩素系農薬(OCP)への胎児期曝露が出生時体重に与える影響
(岸 玲子,松村 徹,荒木 敦子,宮下 ちひろ)
 8. **Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The Hokkaido Study in Environment and Children's Health**
(岸 玲子,池野 多美子)
 9. 妊娠中の母体血漿コチニン値が児の出生時体格に及ぼす用量依存的な影響は母の **AHR** と **XRCC1** 遺伝子多型によって異なる

(岸 玲子, 佐田 文宏)

10. DNA メチル化を介する有機フッ素化合物胎児期曝露の児への影響

(岸 玲子, 石塚 真由美, 松浦 英幸)

. 研究成果の刊行に関する一覧表

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 28 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

馬場 剛

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生殖・発達医学講座小児科学分野

有賀 正

北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学

篠原 信雄

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

荒木 敦子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

宮下ちひろ

北海道大学環境健康科学研究教育センター

池野多美子

平成 29 (2017) 年 3 月

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、先天異常や疾病との関係について解析を進めています。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 29 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-遺伝交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。出生時から2016年9月までに回収された1歳から7歳までの調査票を集計したところ，先天異常総数は623件(3.2%)で出生時の約2倍であった。頻度の高い順に先天性心疾患186人(うち先天性心室中隔欠損101人)，停留精巣・触知精巣75人，および口唇・口蓋裂41人，染色体異常42人(うちダウン症26人)などであった。

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10,408名のうち喘息(984例)，アトピー性皮膚炎(1439例)，および8歳7,042名からADHD疑い(579例)と化学物質の関連を検討する。12-13歳の児2156名を対象に，身長・体重，および女児では初潮の有無の調査票を郵送した。2016年10月までに644件を回収した(回収率30%)。今後，化学物質の胎児期曝露による第二次性徴発来のタイミングへの影響を検討する。

胎児期のダイオキシン類曝露による児の免疫の影響について3.5歳の323名では母体血中ダイオキシン類濃度とアトピー性皮膚炎・喘息リスクとは関連はなかった。7歳の252名では，母体血中ダイオキシン類濃度が増加するほど喘息リスクが有意に増加した。7歳の小児期は免疫機能が発達しアレルギー症状の診断が明確になる時期であり，3.5歳の幼児期には明確でなかったダイオキシン類による影響が観察されやすくなった可能性が考えられた。

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(代謝関連バイオマーカー)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した。母体血中PFOS，PFOA濃度と，臍帯血中のアディポネクチン，レプチン濃度，出生体格の関連を曝露とアウトカムのそろそろ168名で検討した。PFOS濃度の増加は総アディポネクチン濃度の増加と関連し，逆に体格指数(ボンデラル指数)の低下と関連し，その傾向は男児で特に強く認められた。PFOA濃度の増加は，出生体重の低下と関連し，体格指数の低下傾向もみられたが，アディポネクチン，レプチン濃度とは関連しなかった。胎児期の有機フッ素化合物曝露による，代謝関連バイオマーカーへの影響が示唆された。

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。ケースコホート研究で，尿道下裂・停留精巣をアウトカムに，PCBs・ダイオキシン類はケース61名コントロール122名合計183名で測定した。今後，尿道下裂・停留精巣のケース10名コントロール20名合計30名の測定を計画している。尿道下裂・停留精巣をアウトカムに，有機フッ素化合物(PFAAs)はケース72名コントロール144名合計216名で測定中である。尿道下裂・停留精巣をアウトカムに，妊娠初期(器官形成期)のBPA・フタル酸エステル類はケース79名コントロール158名合計237名で測定した。

さらに、化学物質を測定した尿道下裂・停留精巣のケースコホートの集団において、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を 227 名で測定した。停留精巣のケース 57 名とコントロール 114 名で胎児期フタル酸エステル類曝露と停留精巣との関連を検討したが有意な関連は認められなかった。今後、引き続き曝露評価を継続しサンプルサイズを拡大する予定である。生後の曝露評価は、7 歳の 1,780 名から尿を回収して全件で尿中コチニンを測定しており、フタル酸エステル類の曝露評価を実施中である。

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ることを既に報告した。母体血中の有機塩素農薬 (OCP) 29 種類と出生時体重との間に有意な関連は見られなかったが、男女で層別化して解析を行ったところ、女兒でのみ Parlar26 との間に負の関連が認められ、性別による影響の違いが示唆された。先行研究において、OCP による出生体重への影響についての結果が一貫していないことの原因のひとつである可能性がある。

フタル酸エステル類の DEHP の胎児期曝露と、新生児の甲状腺ホルモン濃度 (FT4, TSH), 6, 18 か月における精神運動発達との関係を 328 名で検討した。甲状腺濃度、精神運動発達ともに胎児期の DEHP 曝露との関連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 社パイロシークエンサーを用いて、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交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。

多環芳香族炭化水素 (PAHs) の代謝に関わる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、および DNA 修復に関わる X-ray cross-complementing gene 1 (XRCC1) 遺伝子多型について、これらの遺伝子型の違いによる妊娠中コチニン値と出生時体格との関連について検討した。母児 3,263 名を対象に、妊娠後期の母体血漿コチニン値を低濃度側から Level 1 から Level 5 に分けた。重回帰分析を使って、母の遺伝子型で層別し、胎児期の母体血漿コチニン値と出生時体格との関連を検討した。その結果、出生体重の減少は妊娠中の母体血漿コチニン値と用量反応関係を示した (P for trend < 0.001)。本研究の結果は、化学物質の代謝や DNA 修復遺伝子がたばこ煙の化合物との反応で、胎児発育の際に大きな役割を果たすことを示唆すると考えられた。

エピゲノム解析は PFAAs の胎児期曝露による児の発達への影響に DNA メチル化変化が関与しているかを検討した。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 DNA、母体血中 PFAAs 濃度のそろった母児ペア (N=177) を対象とした。Insulin-like growth factor 2 (IGF2), H19, および long interspersed element 1 (LINE1) 遺伝子領域の臍帯血メチル化を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 PFAAs の血中濃度との関連を重回帰分析で解析後、媒介分析により、PFAAs 曝露と出生時体格との関連にメチル化が介在しているかを検討した。交絡因子調整後、PFOA 濃度と IGF2 メチル化との間に有意な負の関連が見られた。次に、IGF2 メチル化と出生時体格との関連を検討した結果、IGF2 メチル化とボンデラル指数との間に有意な正の相関が認められ、さらに媒介分析の結果、IGF2 メチル化が PFOA 曝露によるボンデラル指数の減少を仲介しており、その影響の 20%を説明できることが示された。以上の結果は、PFAAs 曝露は、DNA メチル化への影響を介して、胎児の成長に影響を与えていることを示唆すると考えられた。

< 研究分担者 >

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

馬場 剛
札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌器科，講師

千石 一雄
旭川医科大学医学部産婦人科学講座，教授

有賀 正
北海道大学大学院医学研究科・小児科学分野，特任教授

篠原 信雄
北海道大学大学院医学研究科・腎泌尿器外科学，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，常務取締役

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
中央大学保健センター市ヶ谷分室，医療管理者

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

宮下 ちひろ
北海道大学環境健康科学研究教育センター，特任准教授

池野 多美子
北海道大学環境健康科学研究教育センター，客員研究員

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。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，前向きコーホート研究を実施する。本研究に参加同意した妊婦 20,926 名について追跡する。

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。

高濃度の有機塩素系農薬 (OCP) への胎児期曝露は出生時の体重を低下させることが指摘されているが (Roberts, Karr, & Council On Environmental, 2012), 低濃度での曝露の影響については十分に明らかになっていない。本研究では、北海道における低濃度の OCP 胎児期曝露が出生時の体重に及ぼす影響について検討する。

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) はその一種である。PAHs の代謝に芳香族炭化水素受容体 (Aromatic hydrocarbon receptor: AHR), シトクロム P450 (Cytochrome P450: CYP) 1A1, CYP1A2, CYP1B1, グルタチオン S-転移酵素 (GSTs), DNA を修復する遺伝子 X-ray cross-complementing gene 1 (XRCC1) が関与する。AHR, CYP1A1, および XRCC1 遺伝子型の組合せによって妊婦の喫煙と出生体重との関連に影響を及ぼす報告はあるものの (Kobayashi et al., 2016), それぞれの遺伝子型の違いが、量反応関係に影響を及ぼすかはまだ検討されていない。そこで本研究では、AHR (G>A, Arg554Lys, rs2066853), CYP1A1 (A>G, Ile462Val, rs1048943), CYP1A2 (A>C, CYP1A2*1F, rs762551), CYP1B1 (C>G, Leu432Val, rs1056836), GSTM1 (Non-null/null), GSTT1 (Non-null/null) および XRCC1 (C>T, Arg194Trp, rs1799782; G>A, Arg399Gln, rs25487) 遺伝子多型の違いによって、妊娠中の母体血漿コチニン値と出生時体格との用量反応関係に影響を及ぼすかを検討とした。

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っ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. Prevalence and Risk of Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study; the Hokkaido Study on Environment and Children's Health

Subjects in this study comprised 19,244 pregnant women who visited one of 37 associated hospitals in the Hokkaido Prefecture from 2003 to 2012, and completed follow-up. All birth defects after 12 weeks of gestation, including 55 marker anomalies associated with environmental chemical exposures, were recorded. We examined parental risk factors for birth defects, and the association between birth defects and risk of growth retardation.

2. 先天異常の出生時から 7 歳までの発生状況に関する研究

本調査への参加同意が得られた妊婦 20,926 名(2016 年 6 月末現在)【方法】出生時情報は、出産施設の産科医師より出生後 7 日以内の先天異常の有無を含めた birth outcome 情報を得た。また、1 歳、2 歳、4 歳、7 歳の母親への調査票から先天性心疾患、尿道下裂、停留精巣、その他の先天異常情報を得た。先天異常として報告があったもののうち、胎児病、未熟性によるもの、先天異常の有無が不明確なもの、先天性心疾患では、染色体異常や症候群の合併症、不整脈・心雑音のみなどの場合は除外した。先天異常の選択は周産期母子専門医師の助言を受けて行った。先天異常は発生器官別に the International Classification of Disease 10th revision (ICD 10th) コードに基づき分類した。

3. 妊娠初期の血清葉酸値と Birth defects リスクとの関連

北海道スタディ大規模コホートに 2002~2012 年に参加登録した 20,926 人の妊娠初期血清葉酸値を chemiluminescent enzyme immunoassay を使用して測定した。解析対象者は 22 週以降に出産した単胎児のうち、適格基準を満たした母子 14,763 組である。血清葉酸濃度と birth defects リスクとの評価は multivariate logistic regression analysis によって解析した。

4. 胎児期フタル酸エステル類、ビス

フェノール A 曝露による尿道下裂、停留精巣への影響

北海道大規模コホートに参加する児 20,791 名のうち、妊娠初期の母体血があり、尿道下裂および停留精巣の児 69 名と出産病院、出産年±1 年でマッチングしたコントロール 138 名、計 207 名の母児ペアを対象とした。尿道下裂および停留精巣のケースは新生児個票およびその後の質問紙調査により評価した。ケースのうち、停留精巣の自然下降の児および尿道下裂は解析から除外した。妊娠初期の母体血中フタル酸エステル類代謝物濃度 7 化合物 (MnBP, MiBP, MBzP, MEHP, MEHHP, MECPP, MiNP) および BPA 濃度はいで環境総合研究所にて、UPLC-MSMS および ID-LCMSMS を用いて測定した。検出限界値以下の濃度は検出限界値の半値を代入し、検出率 50%以上の化合物を解析対象とした。胎児期のフタル酸エステル代謝物濃度および BPA 濃度と児の尿道下裂、停留精巣との関連は、曝露濃度を自然対数に変換後、出産時の母の年齢、出産回数、在胎週数、母の学歴、母の教育歴、妊娠初期喫煙の有無、妊娠初期飲酒の有無、妊娠前 BMI、児の出生時体重を共変量として Cox 回帰分析にて解析した。有意水準 $P < 0.05$ とし、すべての統計解析は SPSS ver. 22 を用いて行った。本研究は北海道大学環境健康科学研究教育センターの倫理審査委員会の承認を得て実施した。

5. ダイオキシン類の胎児期曝露による児のアレルギーへの影響

2002-5 年に札幌市の一産院で妊婦 514 名をリクルートし、426 名の母体血中のダイオキシン類 (HRGC/HRMS) を測定し (福岡県保健環境研究所)、喘鳴およびアトピー性皮膚炎は ISAAC 調査票で評価した。母体血中ダイオキシン類濃度と生後 3.5 歳、7 歳のアレルギー有訴との関連を、母のアレルギー歴、教育レベル、出産歴、児の性別、児の母乳栄養期間、児の受動喫煙、集団保育、

および採血時期で調整したロジスティック回帰分析で検討した。

6 . Association of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances with cord blood adipokines: The Hokkaido Study on Environment and Children 's Health

In this study, 168 mother-child pairs were included. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in maternal blood were determined by LC-MS/MS. Cord blood adiponectin and leptin levels were measured by ELISA and RIA, respectively. Birth weight and ponderal index (PI) were obtained from birth record.

7 .有機塩素系農薬(OCP)への胎児期曝露が出生時体重に与える影響

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, 379 名の母体血中 OCP を測定した。OCP29 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)。OCP29 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。死産および双胎, 妊娠高血圧症候群, 妊娠性糖尿病, 胎児心疾患を除く 490 名のうち, OCP データがある 374 名を解析の対象とした。出産時年齢, 妊娠日数, 母の BMI, 教育歴, 妊娠中の喫煙, 妊娠中アルコール, 血液採取時期, 児の性別, 出生順で調整した重回帰分析を行った後, 男女で層別化して同様の解析を行った。

8 . Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health.

Maternal blood samples collected between 23 and 41 weeks of gestation was analyzed for mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), metabolite of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) levels. Neonatal FT4 and TSH were obtained from mass screening data. Infant neurodevelopment was assessed by Bayley Scale of Infant Development

second edition at 6 and 18 month of age. For the final analysis, 328 participants were included.

9 . 妊娠中の母体血漿コチニン値が児の出生時体格に影響を及ぼす用量依存的な関係は AHR・XRCC1 遺伝子多型によって異なる

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結果を用いた。2003 ~ 2007 年に研究参加協力が得られ, 出生記録, 血漿コチニン値, およびゲノム DNA が全てあったもののうち, 双胎, 妊娠高血圧, 妊娠性糖尿病を除外した 8015 名について検討した。先行研究(Sasaki et al., 2011)で得られ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全てあったのは 1,998 名だった。このうち先行研究で得られたカットオフ値(Sasaki et al., 2011)を使うと, ≤ 0.21 ng/mL は 733 名(Low cotinine level), 0.22-11.48 ng/mL は 1,265 名(Moderate cotinine level)だった。このうち Moderate cotinine level は, 中央値である 0.55 ng/mL でカットオフし, 2 群に分けた。11.49 ng/mL 以上(High cotinine level)である 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のは, 1,265 名だった。High cotinine level は, 中央値である 101.66 ng/mL でカットオフし, さらに 2 群に分けた。最終的に, 低濃度側から Level 1 (n = 733), Level 2 (n = 630), Level 3 (n = 635), Level 4 (n = 632), Level 5 (n = 633)とした。妊娠後期の喫煙状況と出生時体格との関連は, AHR (G>A, rs2066853), CYP1A1

(A>G, rs1048943), CYP1A2 (A>C, CYP1A2*1F, rs762551), CYP1B1 (C>G, Leu432Val, rs1056836), および XRCC1 (C>T, rs1799782), GSTM1 (Non-null/null) および GSTT1 (Non-null/null) 遺伝子型で層別し, 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。

10. DNA メチル化を介する有機フッ素化合物胎児期曝露の児への影響

対象は, 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 DNA, 母体血中 PFAAs 濃度のそろった母児ペア (N=177) とした。Insulin-like growth factor 2 (IGF2), H19, および long interspersed element 1 (LINE1) 遺伝子領域の臍帯血メチル化を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 PFAAs の血中濃度との関連を重回帰分析で解析し, 媒介分析により, PFAAs 曝露と出生時体格との関連にメチル化が介在しているかを検討した。

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. Prevalence and Risk of Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study; the Hokkaido Study on

Environment and Children's Health
Prevalence of all birth defects was 18.9/1000 births. The proportion of birth defects identified between 12 and 22 weeks gestation was approximately 10% of all birth defects. Among congenital malformation of the nerve system, 39% were observed before 22 weeks of gestation. All anencephaly and encephalocele were identified before 22 weeks of gestation. We observed different patterns of parental risk factors between birth defect cases included in ISBDSR and cases not included. Cases included in ISBDSR were associated with an increased risk of preterm birth. Cases not increased in ISBDSR were associated with an increased risk of being small-for-gestational age at term.

2. 先天異常の出生時から 7 歳までの発生状況に関する研究

先天性異常を持つ児は 7 歳までは 623 名 (3.2%; 分母は新生児個票のある 19,282 名) で出生時の 325 名 (1.7% (在胎週数 22 週以降の児では 292 名 1.5%)) の約 1.9 倍であった。7 歳までで染色体異常の児は 42 名 (うちダウン症 26 名) であった。ICD 10th コードによる先天異常発生器官別で最も多かったのは循環器系 192 名, 次いで筋骨格系 91 名, 生殖器系 89 名であった (重複有り)。出産時集計で最も多い先天異常は心室中隔欠損症 33 名であったが, 7 歳までには 101 名と 3 倍以上に増加していた。外表奇形の口唇口蓋裂は 7 歳まで 41 名で出生時と同数であった。

3. 妊娠初期の血清葉酸値と Birth defects リスクとの関連

妊娠初期血清葉酸値の中央値 (四分位範囲) は 16.5 (13.4-21.5) nmol/L, deficiency (<10.0 nmol/L), possible deficiency (10.0-13.4 nmol/L), optimal levels (≥13.5 nmol/L) はそれぞれ 6.6%, 19.7%, 73.7% であった。optimal levels に対する deficiency levels の any birth defects リスクは, 交絡要因調整後 1.23 (95% confidence interval [CI]: 0.81, 1.87), circulatory system 1.23 (95% CI: 0.81, 1.87), genital organs 1.31 (95% CI: 0.68, 2.55), urinary system 2.36 (95% CI: 0.77, 7.24), そして musculoskeletal system 1.39 (95% CI: 0.49, 3.99), all CHDs 1.39 (95% CI:

0.72, 2.71), septal heart defects 1.30 (95% CI: 0.55, 3.06), ventricular septal defects 1.72 (95% CI: 0.72, 4.11)であったでリスク上昇傾向がみられた。口唇裂の調整後 OR は 0.26 (95% CI: 0.03, 2.03)でリスク低下があった(口唇裂 cases は少数であった)。しかし、いずれも有意な差はみられなかった。

4 . 胎児期フタル酸エステル類, ビスフェノール A 曝露による尿道下裂, 停留精巣への影響

フタル酸エステル類の各代謝物の検出率は MnBP100%, MiBP99.0%, MBzP2.9%, MEHP 98.5%, MEHHP 5.3%, MECPP 86.4%, MiNP 1.0%, BPA 78.6%であった。フタル酸エステル類代謝物の中で最も高濃度に検出されたのは MnBP (中央値 41.0ng/mL)で次いで MiBP(5.3 ng/mL), MEHP (1.2 ng/mL), MECPP (0.26 ng/mL)であった。BPA の中央値濃度は 1.1 ng/mL であった。尿道下裂, 停留精巣の児とコントロールの児で, 出産時の母の年齢, 母の学歴, 妊娠前 BMI, 出産回数, 在胎週数, 妊娠中喫煙, 妊娠初期飲酒, 出生時体重には有意な差はなかった。停留精巣の児とコントロールの児のフタル酸エステル類および BPA 濃度は, コントロールの児で MECPP 濃度が有意に高かった (case vs. control: 0.21 ng/mL vs. 0.28 ng/mL; p=0.011)。交絡要因で調整後, 胎児期の MECPP 濃度が高いことが停留精巣のオッズを 0.60 倍下げる傾向がみられた [OR(95% CI): 0.60 (0.35-1.03); p=0.065]。その他のフタル酸エステル類代謝物および BPA をの間には有意な関連は認められなかった。

5 . ダイオキシン類の胎児期曝露による児のアレルギーへの影響

3.5歳の323名では母体血中ダイオキシン類濃度とアトピー性皮膚炎・喘息リスクとは関連はなかった。7歳の252名では, 母体血中ダイオキシン類濃度が増加するほど喘息リスクが有意に増加した(OR(95&CI)=5.87 (1.18-29.3))。

6 . Association of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances with cord blood adipokines: The Hokkaido Study on Environment and Children ' s Health

The median maternal PFOS and PFOA were 5.1 and 1.4 ng/mL, respectively. The median total adiponectin and leptin levels were 19.4 μg/mL and 6.2 ng/mL, respectively. Adjusted linear regression analyses found that PFOS level was positively associated with total adiponectin levels (β=0.12, 95% CI:0.01, 0.22), contrary was negatively associated with PI (β=-2.25, 95% CI: -4.01, -0.50). The association was more significant in boys. PFOA level was negatively associated with birth weight (β=-197, 95% CI: -391, -3).

7 .有機塩素系農薬(OCP)への胎児期曝露が出生時体重に与える影響

出生時体重は妊娠日数(r = 0.50, p <0.01), 出生時身長(r = 0.70, p <.01), 胸囲(r = 0.81, p <0.01), 頭囲(r = 0.59, p <0.01)と有意に関連した。また, 男児で女児よりも重かった(t = 2.8, p <0.05)。重回帰分析の結果, 全体では OCP と出生時体重との間に有意な関連は見られなかったが, 男女で層別化して解析を行ったところ, 女児でのみ Parlar26 との間に負の関連が認められた(β = -169, CI: -319 -19, p <0.05)。

8 . Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health.

The median levels of maternal MEHP was 10.6ng/ml, neonatal TSH and FT4 was 2.20 μU/ml and 2.03ng/ml, respectively. We did not find any associations between prenatal DEHP exposure and neonatal thyroid levels or infant mental and psychomotor development at 6 and 18month. In this study, prenatal DEHP exposure did not show adverse effects on infant TH levels or mental and psychomotor development in early life stage.

9. 妊娠中の母体血漿コチニン値が児の出生時体格に影響を及ぼす用量依存的な関係は AHR・XRCC1 遺伝子多型によって異なる

対象者全体では、Level 1 と比較して、Level 5 の妊婦から生まれた児の出生体重は 171 g (95% CI: -226, -117) 有意に小さかった (P for trend < 0.001)。

AHR (G>A, Arg554Lys) 遺伝子の GG 型では、Level 1 と比較して、Level 5 の出生体重は 217 g (95% CI: -332, -102) 有意に小さく (P for trend < 0.001) 有意に小さかった (P for trend < 0.01)。XRCC1 (C>T, Arg194Trp) 遺伝子の TT 型では、Level 1 と比較して、Level 5 の出生体重は 387 g (95% CI: -558, -217) 有意に小さかった (P for trend < 0.05)。XRCC1 (G>A, Arg399Gln) 遺伝子の AA 型では、Level 1 と比較して、Level 5 の出生体重は 366 g (95% CI: -554, -177) 有意に小さかった (P for trend < 0.001)。しかし、CYP1A1 (A>G, Ile462Val), CYP1A2 (A>C, CYP1A2*1F), CYP1B1 (C>G, Leu432Val), および GSTM1 (Non-null/null), GSTT1 (Non-null/null) 遺伝子型の違いによる妊娠後期母体血漿コチニン値と出生時体格との関連に違いはなかった。

10. DNA メチル化を介する有機フッ素化合物胎児期曝露の児への影響

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 177 名を対象とし、交絡因子調整後、PFOA 濃度と IGF2 メチル化との間に有意な負の関連が見られた ($\beta = -0.73$, $p = 0.04$)。次に、IGF2 メチル化と出生時体格との関連を検討した結果、IGF2 メチル化とポンドラル指数との間に有意な正の相関が認められた ($\beta = 0.17$, $p = 0.002$)。さらに媒介分析の結果、IGF2 メチル化が PFOA 曝露によるポンドラル指数の減少を仲介しており、その影響の 20% を説明できることが示された。

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。出生時点の調査として日本でこれま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ーホート研究という特徴を有している。妊娠 12 週以降の全ての先天異常を集計することにより ICBDSR で報告されている以外の先天異常について補完することができた。本研究では出生時から 7 歳までの調査票で先天異常を集計して生後に診断される先天異常の件数を加えることでより実際の発生頻度に即したデータとなると考えられる。本研究は一般的な地域集団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。

環境化学物質の関与が示唆されるマーカーク奇形の尿道下裂・停留精巣 79 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った。本研究では胎児期の MECPP 濃度が高いことが停留精巣のリスクを下げる傾向が認められたが、デンマークのコホート内症例対照研究では、270 名の停留精巣および 75 名の尿道下裂と 300 名のコントロールで、羊水中の DEHP, DiNP 代謝物との関連を検討し、DiNP 濃度が高いことが尿道下裂 [1.69 (0.78-3.67)] および停留精巣 [1.28 (0.80-2.01)] のリスクを上げる傾向、また、DEHP 代謝物との間には関連が認められなかったことが報告されている。また、同じコホート内で尿道下裂の児 62 名と健常児 68 名で生後の母乳中 MMP, MEP, MBP, MBzP, MEHP, MiNP 濃度が比較され、母乳中フタル酸濃度と停留精巣との間には関連が認められていない。フランスにおいても停留精巣の児 58 名と健常児 128 名で生後の母乳中 MBP 濃度、臍帯血中 BPA 濃度が比較され、停留精巣の児で母乳中 MBP 濃度および臍帯血中 BPA 濃度が

高い傾向が報告されているが有意な関連は認められていない (MBP: $p=0.09$; BPA: $p=0.1$)。一方で、胎児期のフタル酸エステル類曝露により、胎児の性ホルモン濃度のかく乱や性器 - 肛門距離の減少が報告されているが、フタル酸エステル類, BPA の曝露レベルが低濃度である一般集団では、本研究で検討した尿道下裂, 停留精巣の先天異常アウトカムを引き起こすまでの曝露レベルに達していない可能性が考えられる。本研究も含めいずれの先行研究もサンプルサイズが少なく、統計学的パワーが不十分である可能性もあるため、より大規模な集団での検討が望まれる。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 PFAAs 11 種類の分析を実施し、ケースコホート研究デザインで、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 79 名および先天性心疾患症例 186 名をアウトカムに、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。

胎児期のダイオキシン類曝露による児の免疫の影響について母体血中ダイオキシン類濃度が増加するほど 7 歳の喘息リスクが有意に増加した。7 歳の小児期は免疫機能が発達しアレルギー症状の診断が明確になる時期であり、3.5 歳の幼児期には明確でなかったダイオキシン類による影響が観察されやすくなった可能性が考えられた。今後、3.5 歳, 7 歳の感染症についても検討して免疫機能への影響を明らかにする。

有機フッ素化合物について、母体血中 PFOS 濃度の増加は総アディポネクチン濃度の増加と関連し、逆に体格指数 (ボンデラル指数) の低下と関連し、その傾向は男児で特に強く認められた。PFOA 濃度の増加は、出生体重の低下と関連し、体格指数の低下傾向もみられたが、アディポネクチン, レプチン濃度とは関連しなかった。胎児期の有機フッ素化合物曝露による、代謝関連バイオマーカーへの影響が示唆された。

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。PFAAs 11 種類 (PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoA, PFTTrDA, 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, PFTTrDA 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。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。

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かった。国内で最も使用量が多いとされるフタル酸エステル類の DEHP 代謝物である MEHP の胎児期曝露と、新生児の甲状腺ホルモン濃度 (FT4, TSH), 6, 18 か月における精神運動発達の関係を 328 名で検討した。甲状腺濃度, 精神運動発達ともに胎児期の DEHP 曝露との関連は認められなかった。

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。低濃度 OCP への胎児期曝露による出生体重への影響は参加者全体を対象とした解析では見られなかった。本研究と比較して高濃度の曝露量を示した先行研究では、体重の減少がみられた研究もあることから (Lenters et al., 2016; Ribas-Fito et al., 2002), この結果は濃度の違いによるものである可能性がある。ただし女児では Parlar26 との負の関連性が認められており、性別による影響の違いが示唆された。今後は出生時のみならず、出生後の発育への影響についても男女で層別化して検討していく必要があると考

えられる

AHR (G>A, Arg554Lys)G アレルでは、A アレルよりも、*CYP1A1* が誘導されやすいと報告されており (Wong et al., 2001), より多くの PAH 代謝物 (ベンゾ[a]ピレン ジオールエポキシド; BPDE) や BPDE-DNA 付加体が胎盤内でより多く形成される (Wong et al., 2001; Hodek et al., 2013; Karttunen et al., 2010)。このため、出生時体格の減少を引き起こしているかもしれない。

XRCC1 (C>T, Arg194Trp) T アレルは、C アレルと比較して、染色分体の交換頻度が多く (Au et al., 2003), また、*XRCC1* (G>A, Arg399Gln) A アレルは、G アレルと比較して、非放射線特異的 DNA の修復レベルが低く (Vodicka et al., 2007), DNA 付加体レベルが高いと報告されている (Matullo et al., 2001)。このため、*XRCC1* (C>T, Arg194Trp) T アレルや *XRCC1* (G>A, Arg399Gln) A アレルでは、出生時体格との量依存的な関係が見られたと考えられる。

CYP1A1 (A>G, Ile462Val), *CYP1A2* (A>C, *CYP1A2*1F*), *CYP1B1* (C>G, Leu432Val), および *GSTM1* (Non-null/null), *GSTT1* (Non-null/null) 遺伝子多型では、DNA 発現の違い、代謝活性、そして代謝物と DNA との付加体形成量の違いが既に報告されている (Lodovici et al., 2004; Hanaoka et al., 2002; Wang et al., 2013; Daly, 1995)。しかし、コチニン値と出生時体格との間の用量反応関係は、これらの遺伝子型ではほとんど同じだったので、代謝に関わる遺伝子型による出生時体格への影響は小さいと考えられる。*AHR* (G>A, Arg554Lys) GG 型, *XRCC1* (C>T, Arg194Trp) TT 型, および *XRCC1* (G>A, Arg399Gln) AA 型では、妊娠中コチニン

値と出生体重との量依存的な関係が、より顕著に示すことを明らかにした。

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 PFOA 曝露による *IGF2* の低メチル化が認められた。さらに *IGF2* メチル化とボンデラル指数は正相関し、媒介分析の結果、*IGF2* メチル化が PFOA 曝露によるボンデラル指数の減少を仲介しており、その影響の 20% を説明できることが示された。したがって PFAAs 曝露は、DNA メチル化への影響を介して、胎児の成長に影響を与えていることを示唆している。*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、胎児期曝露が児の 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、出生から 7 歳まで集計した先天異常の児総数は 623 人、先天異常を有する児の出産頻度は 3.2% 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を行うことにより、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. Sasaki S., Limpar M., Sata F., Kobayashi S., Kishi R.; Interaction of maternal caffeine intake during pregnancy and CYP1A2 C164A polymorphism affects infant birth size in the Hokkaido Study. *Pediatric Research*, in press.
2. Minatoya M., Sasaki S., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Yamamoto J., Matsumura T., Mitsui T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Minakam H., Shinohara N., Kishi R.; Cord blood bisphenol A levels and reproductive and thyroid hormone levels of neonates: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health., *Epidemiology*. 2017, in press.
3. Araki A., Mitsui T., Goudarzi H., Nakajima T., Miyashita C., Itoh S., Sasaki S., Cho K., Moriya K., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.; Prenatal di(2-ethylhexyl) phthalate exposure and disruption of adrenal androgens and glucocorticoids levels in cord blood: The Hokkaido Study. *Science of the Total Environment*. 2017, 581-582 : 297-304.
4. Kishi R., Zhang J. J. , Ha E. H., Chen P. C., Tian Y., Xia Y., Tsuchiya K. J., Nakai K., Kim S., Hong S. J., Hong Y. C., Lee J. R., Mohamed H. J. B. J., Parajuli R. P., Adair L. S., Chong Y. S., Guo Y. L., Wang S. L., Nishijo M., Kido T., Tai P. T., Nandasena S.; Birth Cohort Consortium of Asia (BiCCA) - Current and Future Perspectives. *Epidemiology*. In press.
5. Goudarzi H., Miyashita C, Okada E., Kashino I., Chen C.-J., Ito S., Araki A., Kobayashi S., Matsuura H., Kishi R.; Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Prevalence of Infectious Diseases up to 4 Years of Age. *Environment International*, in press.
6. Kobayashi S., Azumi K., Goudarzi H., Araki A., Miyashita C., Kobayashi S., Itoh S., Sasaki S., Ishizuka M., Nakazawa H., Ikeno T., Kishi R.; Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: the Hokkaido study. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, in press.
7. Minatoya M., Itoh S., Araki A., Tamura N., Yamazaki K., Nishihara S., Miyashita C., Kishi R.; Associated factors of behavioural problems in children at preschool age: the Hokkaido study on environment and children's health. *Child Care Health Dev.*, in press.
8. Minatoya M., Araki A., Miyashita C., Sasaki S., Goto Y., Nakajima T., Kishi R.; Prenatal di-2-ethylhexyl phthalate exposure and cord blood adipokine levels and birth size: The Hokkaido study on environment and children's health. *Sci Total Environ*. 579 606-611, 2017.
9. Kobayashi S., Sata F., Miyashita

- C., Sasaki S., Ban S., Araki A., Goudarzi H., Kajiwara J., Todaka T., Kishi R.; Dioxin-metabolizing genes in relation to effects of prenatal dioxin levels and reduced birth size: The Hokkaido Study. *Reprod Toxicol.* 67 111-116, 2017.
10. Goudarzi H., Araki A., Itoh S., Sasaki S., Miyashita C., Mitsui T., Nakazawa H., Nonomura K., Kishi R.; The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study. *Environ Health Perspect.* 125 (1):111-118, 2017.
11. Yila T. A., Araki A., Sasaki S., Miyashita C., Itoh K., Ikeno T., Yoshioka E., Kobayashi S., Goudarzi H., Baba T., Braimoh T., Minakami H., Endo T., Sengoku K., Kishi R.; Predictors of folate status among pregnant Japanese women: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2002-2012. *Br J Nutr.* 115 (12):2227-35, 2016.
12. Yamamoto J., Minatoya M., Sasaki S., Araki A., Miyashita C., Matsumura T., Kishi R.; Quantifying bisphenol A in maternal and cord whole blood using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry and maternal characteristics associated with bisphenol A. *Chemosphere.* 164, 25-31, 2016.
13. Mitsui T., Araki A., Miyashita C., Ito S., Ikeno T., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.; The Relationship between the Second-to-Fourth Digit Ratio and Behavioral Sexual Dimorphism in School-Aged Children. *PLoS One.* 11 (1):e0146849, 2016.
14. Mitsui T., Araki A., Goudarzi H., Miyashita C., Ito S., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.; Effects of adrenal androgens during the prenatal period on the second to fourth digit ratio in school-aged children. *Steroids.* 113 46-51, 2016.
15. Minatoya M., Nakajima S., Sasaki S., Araki A., Miyashita C., Ikeno T., Nakajima T., Goto Y., Kishi R.; Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Sci Total Environ.* 565 1037-43, 2016.
16. Kobayashi S., Sata F., Sasaki S., Braimoh T. S., Araki A., Miyashita C., Goudarzi H., Kobayashi S., Kishi R.; Combined effects of AHR, CYP1A1, and XRCC1 genotypes and prenatal maternal smoking on infant birth size: Biomarker assessment in the Hokkaido Study. *Reprod Toxicol.* 65 295-306, 2016.
17. Kawanishi Y., Saijo Y., Yoshioka E., Nakagi Y., Yoshida T., Miyamoto T., Sengoku K., Ito Y.,

- Miyashita C., Araki A., Kishi R.; The Association between Prenatal Yoga and the Administration of Ritodrine Hydrochloride during Pregnancy: An Adjunct Study of the Japan Environment and Children's Study. PLoS One. 11 (6):e0158155, 2016.
18. Kato S., Itoh S., Yuasa M., Baba T., Miyashita C., Sasaki S., Nakajima S., Uno A., Nakazawa H., Iwasaki Y., Okada E., Kishi R.; Association of perfluorinated chemical exposure in utero with maternal and infant thyroid hormone levels in the Sapporo cohort of Hokkaido Study on the Environment and Children's Health. Environ Health Prev Med. 21, 334-344, 2016.
19. Itoh S., Araki A., Mitsui T., Miyashita C., Goudarzi H., Sasaki S., Cho K., Nakazawa H., Iwasaki Y., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.; Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Environ Int. 94 51-59, 2016.
20. Goudarzi H., Nakajima S., Ikeno T., Sasaki S., Kobayashi S., Miyashita C., Ito S., Araki A., Nakazawa H., Kishi R.; Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and neurodevelopment in early infancy: The Hokkaido Study. Sci Total Environ. 541 1002-10, 2016.
21. Goudarzi H., Miyashita C., Okada E., Kashino I., Kobayashi S., Chen C. J., Ito S., Araki A., Matsuura H., Ito Y. M., Kishi R.; Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on prevalence of allergic diseases among 4-year-old children. Environ Int. 94 124-132, 2016.
22. 小林澄貴, 池野多美子, 荒木敦子, 山崎圭子, 西原進吉, 岸玲子, 環境化学物質の胎児期暴露による児の神経発達への影響に関する疫学文献レビュー: 注意欠如・多動性障害 (AD/HD)・自閉症スペクトラム (ASD)を含めて, 北海道公衆衛生学雑誌, 29(2), 31-40, 2016.
- 2) 論文発表 (解説 査読無)
1. 岸玲子, 湊屋街子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第24回 誰もが健康な人生のスタートを-世界で進むコーホート研究, 公衆衛生, 81(2), 175-183, 2017.
2. 喜多歳子, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第23回 社会経済要因の影響(2) 認知/行動発達, 公衆衛生, 81(1), 79-84, 2017.
3. 花岡知之, 田村菜穂美, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第22回 社会経済要因の影響(1) 死産, 早産, 出生体重, 公衆衛生, 80(12), 943-948, 2016.
4. 宮下ちひろ, ホウマヌグウダルジ, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第21回 環境化学物質曝露による先天異常への影響(2) 先天性疾患、口唇口蓋裂, 公衆衛生, 80(11), 863-867, 2016.
5. 佐田文宏, 佐々木成子, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第19回 妊娠中のカフェイン摂

- 取の母児への影響, 公衆衛生, 80(9), 701-707, 2016.
6. 宮下ちひろ, 伊藤久美子, 荒木敦子, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第18回 葉酸摂取の胎児発育や先天異常、生後アレルギーへの影響, 公衆衛生, 80(8), 615-621, 2016.
 7. 宮下ちひろ, 小林祥子, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第17回 胎児期の化学物質曝露による後天的な遺伝子発現制御への影響, 公衆衛生, 80(7), 531-537, 2016.
 8. 池野多美子, 小林澄貴, 山崎圭子, 西原進吉, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第16回 ADHD(注意欠如・多動性障害)と ASD(自閉スペクトラム症), 公衆衛生, 80(6), 445-450, 2016.
 9. 中島そのみ, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第15回 ダイオキシン類曝露と児の神経発達, 公衆衛生, 80(5), 371-378, 2016.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 岸玲子, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 環境化学物質の次世代影響に関する出生コホート研究: 環境と子どもの健康に関する北海道スタディの成果と課題, アンチ・エイジング医学, 12(2), 067-076, 2016.
1. Araki, A., Miyashita, C., Mitui, T., Goudarzi, H., Itoh, S., Mizutani, F., Chisaki, Y., Sasaki, S., Moriya, K., Cho, K., Shinohara, N., Nonomura, K., Kishi, R., Prenatal exposure to organochlorine pesticides and steroid hormones profiles in fetal blood: The Hokkaido Study, PPTOX V Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu, Japan, (2016.11.13-16)
 2. Kishi, R., Environmental endocrine-disrupting chemicals and their effects to children: 13 years progress of the Hokkaido Birth Cohort Study, PPTOX V, Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu, Japan, (2016.11.13-16)
 3. Minatoya, M., Araki, A., Miyashita, C., Yamamoto, J., Onoda, Y., Matsumura, T., Kishi, R., Association between prenatal phthalates and BPA exposures and fetal adipokines and birth size: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, PPTOX V, Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu, Japan, (2016.11.13-16)
 4. Ait Bamai, Y., A. Araki, S. Sasaki, T. Nakajima, C. Miyashita, R. Kishi, Prenatal exposure to DEHP and childhood wheeze and atopic dermatitis: The Hokkaido Study on the Environment and Children's Health, ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, Roma, Italy, (2016.9.1-4)
 5. Kishi, R., Birth cohorts in Asia:
- 3) 学会発表

- why are new big cohorts functioning in Asia?, ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, Roma, Italy, (2016.9.1-4)
6. Kobayashi, S., R. Miura, C. Miyashita, A. Araki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, Y. Ito, T. Kubota, R. Kishi, Epigenome-wide analyses of prenatal perfluoroalkyl acids exposure on cord blood DNA methylation: the Hokkaido study, ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, (2016.9.1-4)
 7. Minatoya, M., N. Tamura, S. Ito, C. Miyashita, A. Araki, R. Kishi, Associated prenatal factors of behavioral and emotional problems in 5 year-old children: The Hokkaido Study, ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, Roma, Italy, (2016.9.1-4)
 8. Goudarzi, H., C. Miyashita, E. Okada, I. Kashino, S. Kobayashi, C.-J. Chen, S. Ito, A. Araki, H. Matsuura, R. Kishi, Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic and infections diseases in early life, ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, Roma, Italy, (2016.9.1-4)
 9. Araki, A., C. Miyashita, S. Itoh, T. Mitsui, F. Mizutani, Y. Chisaki, S. Sasaki, K. Cho, K. Nonomura, R. Kishi, Prenatal exposure to organochlorine pesticides and reproductive hormones in fetal blood: The Hokkaido Study, ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, Roma, Italy, (2016.9.1-4)
 10. Ait Bamai, Y., A. Araki, R. Kishi, Allergic Disease in Relation to Phthalates and Phosphorus Flame Retardants in House Dust and Urine, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
 11. Araki, A., R. Kishi, Prenatal Di(2-ethylhexyl)phthalate Exposure and Reproductive Hormone in Cord Blood - The Hokkaido Study, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
 12. Itoh, S., A. Araki, C. Miyashita, H. Goudarzi, S. Kato, Y. Iwasaki, H. Nakazawa, N. Shinohara, R. Kishi, Hokkaido Study on Environment and Children's Health: Endocrine Disruption Effect of Perfluoroalkyl Substances Exposure in Utero, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
 13. Kobayashi, S., R. Miura, C. Miyashita, A. Araki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, Y. M. Ito, T. Kubota, R. Kishi, Epigenome-wide Pathway Analyses of Prenatal Perfluoroalkyl Acids Exposure on Cord Blood DNA Methylation: The Hokkaido Study, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
 14. Kobayashi, S., F. Sata, S. Sasaki, T. S. Braimoh, A. Araki, C. Miyashita, H. Goudarzi, S.

- kobayashi, R. Kishi, Combined Effects on AHR, CYP1A1 and XRCC1 Genetic Polymorphisms and Prenatal Maternal Smoking on Infant Birth Size: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
15. Minatoya, M., N. Tamura, S. Itoh, S. Suyama, C. Miyashita, A. Araki, T. Saito, A. Nakai, R. Kishi, Prenatal environment and child behavioral and coordination development at preschool age in the Hokkaido Study, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
16. Miyashita, C., R. Kishi, A. Araki, Hokkaido Study on Environment and Children's Health: Overview, and Findings of PCBs/dioxins Exposure and Birth Size, & Allergies and Infections, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29) Ait Bamai, Y., A. Araki, R. Kishi, Allergic Disease in Relation to Phthalates and Phosphorus Flame Retardants in House Dust and Urine, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
17. 湊屋街子, 小林澄貴, 西原進吉, 池野多美子, 岸玲子, 母の妊娠中喫煙が児の出生体重、生後の発育に与える影響: 北海道スタディ, 第75回日本公衆衛生学会総会, 大阪(グランフロント大阪), (2016.10.26-28)
18. 池野多美子, 母親の精神健康と児の自閉傾向との関連-子供の健康と環境に関する北海道スタディ-, 第75回日本公衆衛生学会総会, 大阪(グ
ランフロント大阪),
(2016.10.26-28)
19. 西原進吉, 小林澄貴, 池野多美子, 湊屋街子, 岸玲子, 家庭内での分煙行動と子どもの尿中コチニン値の関係-北海道スタディ-, 第75回日本公衆衛生学会総会, 大阪(グランフロント大阪), (2016.10.26-28)
20. 小野田優, 梅原美加, 西岡宗一郎, 水谷太, 佐藤修乃, 苅木洋一, 湊屋街子, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 岸玲子, ヒト血清中フタル酸エステル代謝物の分析, 第25回環境化学討論会, 新潟(新潟コンベンションセンター), (2016.6.8-10)
21. 荒木敦子, 西條泰明, ア. ゆふ, 湊屋街子, 吉野博, 東賢一, 河合俊夫, 大和浩, 大澤元毅, 柴田英治, 田中正敏, 増地あゆみ, 岸玲子, 産業衛生の現場で役立つ「シックハウス症候群に関する相談マニュアル改訂新版」の作成, 第96回北海道医学大会産業衛生分科会, 札幌市医師会館(札幌市), (2016.10.22)
22. Ketema, R. M., Y. Ait Bamai, A. Araki, T. Kawai, T. Tuboi, E. Yoshioka, T. Saito, R. Kishi, Association of phthalates in house dust in relation to Sick House Syndrome (SHS) among Sapporo residents, 68th Hokkaido Public Health Society, Sapporo City University School of Nursing, Sapporo, (2016.10.1)
23. 荒木敦子, アイツバマイゆふ, 西條泰明, 湊屋街子, 吉野博, 東賢一, 河合俊夫, 大和浩, 大澤元毅, 柴田英治, 田中正敏, 増地あゆみ, 岸玲子, 「シックハウス症候群に関する相談マニュアル改訂新版」の作成

- 公衆衛生分野での活用に向けて ,
第68回北海道公衆衛生学会, 札幌市
立大学看護学部, 札幌市,
(2016.10.1)
24. 小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, T. S. Braimoh, 荒木敦子, 宮下ちひろ, H. 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)
25. アイツマイゆふ, 荒木敦子, 乃村俊史, 河合俊夫, 坪井樹, 叢石, 宮下ちひろ, 池野多美子, 清水宏, 岸玲子, FLG変異とフタル酸エステル曝露による児のアトピー性皮膚炎への影響: 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, (2016.5.11-13.)
26. 宮下ちひろ, 荒木敦子, 三井貴彦, 伊藤佐智子, 佐々木成子, 戸高尊, 梶原淳睦, 長和俊, 野々村克也, 岸玲子, ダイオキシン類異性体の曝露が胎生期の性ホルモンに与える影響-北海道スタディ (The Hokkaido Study on Environment and Children's Health), 第86回日本衛生学会, 北海道、旭川, (2016.5.13.)
27. 荒木敦子, ホウマヌグウダルジ, 三井貴彦, 那須民江, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 佐々木成子, 長和俊, 野々村克也, 岸玲子, DEHP曝露による胎生期ステロイドホルモンプロファイルへの影響-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, (2016.5.11-13.)
28. 山崎圭子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 荒木敦子, 小林祥子, 水谷太, 苮木洋一, 岸玲子, 胎児期の有機塩素系
- 農薬曝露が母児の甲状腺ホルモンに及ぼす影響-北海道スタディ, 第86回日本衛生学会, 北海道、旭川市, (2016.5.11-13.)
29. 湊屋街子, 佐々木成子, 中島そのみ, 山本潤, 松村徹, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 岸玲子, 臍帯血中ビスフェノールA濃度と子どもの行動発達: 北海道スタディ, 第86回日本衛生学会, 北海道、旭川, (2016.5.11-13.)

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

Prevalence and Risk of Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study;
the Hokkaido Study on Environment and Children's Health

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 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 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科
生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野 特任教授
研究分担者 馬場 剛 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 講師
研究分担者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授
研究分担者 有賀 正 北海道大学大学院医学研究科・小児科学分野 特任教授

研究要旨

Background: Prevalence rates of all anomalies classified into birth defects, including those identified before the 22th gestational week, are limited in published reports, including those from International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research (ICBDSR). In our birth cohort study, we collected the data for all birth defects after 12 weeks of gestation.

Methods: Subjects in this study comprised 19,244 pregnant women who visited one of 37 associated hospitals in the Hokkaido Prefecture from 2003 to 2012, and completed follow-up. All birth defects after 12 weeks of gestation, including 55 marker anomalies associated with environmental chemical exposures, were recorded. We examined parental risk factors for birth defects, and the association between birth defects and risk of growth retardation.

Results: Prevalence of all birth defects was 18.9/1000 births. The proportion of birth defects identified between 12 and 22 weeks gestation was approximately 10% of all birth defects. Among congenital malformation of the nerve system, 39% were observed before 22 weeks of gestation. All anencephaly and encephalocele were identified before 22 weeks of gestation. We observed different patterns of parental risk factors between birth defect cases included in ISBDSR and cases not included. Cases included in ISBDSR were associated with an increased risk of preterm birth. Cases not increased in ISBDSR were associated with an increased risk of being small-for-gestational age at term.

Conclusions: Data from our study complemented the data from ICBDSR. We recommended that birth defects not included in ICBDSR also be analyzed to elucidate the etiology of birth defects.

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)
田村菜穂美
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

A . 研究目的

Birth defects, including malformations, deformations, and chromosomal abnormalities, are major causes of neonatal mortality.^{1,2} Previously, it was believed that

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

most birth defects were idiopathic. However, it is now recognized that there are birth defects known to be caused by hazardous epidemics, such as thalidomide exposure during pregnancy. To investigate and prevent birth defects, surveillance programs affiliated with the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research (ICBDSR) are underway.^{3, 4}

Incidence of birth defects cannot be accurately estimated because fetal death cases before diagnosis of the pregnancy are unknown. The Japan Association of Obstetricians and Gynaecologists (JAOG) reports observed birth defect cases via the nation-wide hospital-based monitoring program to the ICBDSR. However, mortality cases before 22 weeks of gestation have not been reported.³ Data regarding the prevalence of all birth defects, and cases observed before 22 weeks of gestation, could be captured via prospective cohort studies of pregnant women. In this report, we described birth defects observed beginning at 12 weeks of gestation during the pre-natal care of pregnant women in a prefectural-wide hospital-based birth cohort study, the Hokkaido Study on Environmental and Children's Health.^{5, 6} Furthermore, we examined parental risk factors for birth defects, and the association between the birth defects and the risk of growth retardation. We analyzed and presented the differences in these estimations between those birth defect cases included in the ICBDSR and those cases not included.

B . 研究方法

Study cohort

The primary goal of the Hokkaido Study on

Environmental and Children's Health was to examine the effects of perinatal environmental chemical exposures on birth outcomes, including birth defects. The details of this cohort study have been described previously.^{5, 6} We enrolled women in early pregnancy (<13 weeks gestational age), who visited one of the 37 associated hospitals or clinics including 3 university hospitals and their associated clinics in the Hokkaido Prefecture, from February 2003 to March 2012. These hospitals and clinics are evenly distributed throughout the Hokkaido prefecture. We obtained written informed consent from all subjects. The institutional ethical board of the Hokkaido University Center for Environmental and Health Sciences (reference no.14, March 22, 2012), and Hokkaido University Graduate School of Medicine (May 31, 2003) approved the study protocol.

Follow-up

Follow-up with the pregnant women enrolled in the study and their offspring is on-going. In this study, we used the dataset of the fixed cohort as of the end of 2015, which included 20,805 women. The number of study participants with a birth record was 19,579. The follow-up rate at birth was 94.1%. Data from 5.9% of participants were missing because the participants were lost-to-follow-up.

Data collection

The number of subjects in this report who had birth outcome data and gestational week data was 19,244. According to the standardized manual provided by the principal investigator of the Hokkaido University (R.K.), each physician in charge of each woman in the delivery units of the participating hospitals or clinics ascertained and recorded birth defects within 7 days of

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

delivery or at the termination of pregnancy. The physicians selected from a list of 55 disease names to record the birth defect, or if the disease was not on the list, described disease names in the unified sheet. These 55 birth defects listed on the unified sheet are possible effect markers of environmental exposure. We encoded the birth defects according to the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD), 10th revision.⁷ The ICBDSR monitoring list that physicians also complete lists 35 malformations.³

Medical records of the parents and offspring at delivery or termination, including gestational age and birth weight, were also recorded on the same sheet. Preterm birth was defined as birth between 22 and 37 weeks of gestation. Very low birth weight (VLBW) was defined as birth weight <1500 g. Small for gestational age at term (term SGA) was defined as birth weight below the 10th percentile reference point for birth weight, according to gestational age, sex, and parity. We used the database of birth weight published by the Japan Pediatric Society as a reference.⁸

The baseline data regarding information on parental reproductive history and life style factors, including age at the entry of this study, body mass index before the pregnancy, parity, drinking habit in the first trimester, smoking during the pregnancy, and any usage of assisted reproductive technologies, were collected using a self-administered questionnaire.

Statistical analysis

Differences between expected and observed frequencies by gestational week (before week 22 or from week 22 of gestation), sex (males or females), and the number of births (singletons or multiples) for each category

or defect were tested by the Fisher's exact test.

We calculated risk ratios (RRs) for all kinds of birth defects, and birth defects included or not included in the ICBDSR, in singleton fetus or infants, according to maternal and paternal factors, including maternal age at the entry (<35, ≥35 years old), maternal body mass index, parity (0, ≥1), assisted reproductive technology (used, unused), age of the partner at the entry (<35, ≥35 years old), maternal alcohol use in early period of the pregnancy (used, unused), and maternal smoking during pregnancy (smoking, nonsmoking). We estimated RRs of birth defects by preterm birth, VLBW, and term SGA. We calculated RRs using log-binomial regression analysis with and without adjustment for the above maternal and paternal factors. P value <0.05 was considered as statistically significant. Statistical analyses were calculated using Stata 14 (Stata Corp, College Station, TX, USA).

C . 研究結果

We show the distribution of mother and singleton child pairs according to the gestational week and birth outcomes in Figure 1. Women who delivered between 12 and 21 weeks of gestation accounted for 10.0% of all births. The proportion of birth defects among deliveries at 12-21 weeks was 9.7% (32/341) of all birth defect cases observed in this report. Consequently, prevalence of birth defects in this period was approximately ten times as high as the birth defects observed from 22 weeks of gestation. Among study subjects, 40 cases ended in termination and 18 of the 40 cases had a birth defect. Of 149 cases of miscarriage among study subjects, 15 of the cases had 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

birth defect and of 57 stillbirths, 4 had a birth defect. Of the 18,565 cases that were live born, 277 had a birth defect.

The prevalence of birth defects classified by major ICD-10 categories according to gestational week, sex and number of births is shown in Table 1. Each defect was counted separately, even if there were accompanying defects in the same infant. The prevalence of all birth defects observed in this study was 18.9/1,000 births (19.7/1000 pregnant women). The highest prevalence was observed in malformations or deformations of the musculoskeletal system (4.1/1,000 births), followed by malformations of the circulatory system (3.6/1,000 births). The prevalence of the birth defects from 22 weeks of gestation was 17.4/1,000 births. The prevalence before 22 weeks of gestation was 164.2/1,000 births ($P < 0.0001$). Prevalence of malformations of the nervous system, malformations of eye or ear or face or neck, malformations of the urinary system, malformations and deformations of the musculoskeletal system, and Chromosomal abnormalities was higher before 22 weeks of gestation compared to after 22 weeks of gestation. Among the congenital malformation of the nerve system, 39% were observed before 22 weeks of gestation. The total prevalence was not significantly different between males and females; 19.6/1,000 births in males and 17.6/1,000 births in females ($P = 0.48$). Malformations of eye or ear or face or neck, and the circulatory system were found more in females than males, but the differences were not statistically significant ($P = 0.07$ and 0.18 , respectively). Malformations of genital organs and urinary system occurred significantly more in males than females ($P < 0.001$ and $P = 0.003$, respectively). The

total prevalence was not significantly different between singleton (18.9/1,000 births) and multiple birth infants (20.8/1,000) ($P = 0.70$). In multiple births, triplet births occurred only in nine pregnancies. No birth defects were observed in the triplet births. Most birth defect cases were identified before birth. All cases of malformation of the nervous system, digestive system except for oral cavity, and genital organs were identified before birth. Malformations of the respiratory system showed the lowest percentage of identification before birth (50.0%).

There were 32 cases of multiple defects. The most frequent combination of multiple defects was malformations of the circulatory system and chromosomal abnormalities (n, 8), followed by malformations of the circulatory system and other malformations (n, 5), and cleft lip/cleft palate and malformations and deformations of the musculoskeletal system (n, 5).

The prevalence of selective birth defects included in the ICBDSR is shown in Table 2. The prevalence of birth defects included in the ICBDSR was 8.4/1,000 births. Cleft lip with or without cleft palate showed the highest prevalence (1.3/1,000 births), followed by Down syndrome (1.0/1,000 births) and polydactyly (1.0/1,000 births). The prevalence of the birth defects from 22 weeks of gestation was 7.8/1,000 births. The prevalence before 22 weeks of gestation was 64.7/1,000 births. All anencephaly and encephalocele cases were observed before 22 weeks of gestation. Among the spina bifida cases, 33% were observed before 22 weeks of gestation. Most cases were identified before birth. Limb reduction defects showed the lowest percentage of identification before birth

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

(75.0%).

RRs of birth defects in singletons for selective maternal and paternal factors are shown in Table 3. For those birth defects included in the ICBDSR, maternal age \geq 35 significantly increased birth defect risk (adjusted RR, 1.89; 95% CI, 1.23-2.91). For birth defects not included in the ICBDSR, nulliparous and assisted reproductive technology significantly increased birth defect risk (adjusted RR, 1.63; 95% CI, 1.13-2.32, adjusted RR, 1.99; 95% CI, 1.06-1.41, respectively). Body mass index, age of partner, alcohol use, and smoking did not significantly increase birth defect risk.

RRs of growth retardation in singletons with birth defects are shown in Table 4. Presence of a birth defect significantly increased the adjusted RRs of VLBW both for birth defects included and those not included in the ICBDSR. For birth defects included in the ICBDSR, presence of a birth defect significantly increased the adjusted RRs of preterm birth (adjusted RR, 2.20; 95% CI, 1.34-3.60). Among birth defects not included in the ICBDSR, significantly increased RRs of term SGA was observed (adjusted RR, 2.01; 95% CI, 1.11-3.66). Birth defects presented in Table 3 and Table 4 include those observed before 22 weeks of gestation.

D . 考察

The JAOG system is an important nation-wide monitoring system for assessing incidence and prevalence of birth defects, and identifying outbreaks that has been in place for approximately 40 years. However, the system aggregates birth defect cases. It is not a population-based registration system, such as those in Scandinavian countries, but a hospital-based monitoring system. The

primary difference between the nation-wide reporting of birth defect cases by JAOG and the present study is that our study is a prospective birth cohort study, in which various data covering all gestational periods, many parental factors, and other related observations, such as infant development after entry to the cohort were collected, thereby providing additional research and reporting opportunities. In our study, we identified the prevalence of all birth defects after 12 weeks of gestation among the general population of Japanese women in a prefectural-wide prospective cohort study. Our study included 55 birth defects as possible effect markers of environment exposure. We reported that the character of those birth defects not included in the ICBDSR was different from those included in the ICBDSR.

In our study, we were able to examine the above issues because we obtained informed written consent from all women at the time of notification of their pregnancy, or before 13 weeks of gestation. However, we could not include women who miscarried for any reason or cause before the informed consent was obtained. If lethal defects occurred during conception, or before the entry of epidemiological studies or surveillance programs, valid incident cases could not be counted. Because an accurate denominator, i.e. number of fetuses at risk, is unknown, this study omitted observations before 12 weeks of gestation. The ICBDSR surveillance programs omit observations before 22 weeks of gestation. Observation before 22 weeks of gestation are included in this report.

The Japanese data reported in the ICBDSR showed that the prevalence of birth defects (total number of cases among live

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

births, stillbirths, and elective terminations of pregnancy for a fetal anomaly) was 1.6% per year during 2007 - 2011.³ Using the same denominator and numerator, the prevalence of birth defects included in the ICBDSR was found to be 0.8% in our study. The prevalence in our study is lower than that reported in the nation-wide hospital-based monitoring project. One possibility is that the ICBDSR monitoring project consists of core hospitals in each area, such as university hospitals and specified children's hospitals, for example, the Hokkaido Medical Centers for Child Health and Rehabilitation. High-risk pregnant women might tend to visit such hospitals, and severe birth defect cases are usually transferred to such core hospitals before delivery. Moreover, only 10 institutions participated in the monitoring project in the Hokkaido area. Our 37 associated hospitals or clinics including 3 university hospitals, were evenly distributed throughout the Hokkaido prefecture, and accounted for approximately 40 % of the institutes with delivery units in this prefecture.⁹ Therefore, we guess that our study participant represented the population of women in general in the Hokkaido area. Another possibility might be that our participants were relatively healthy pregnant women who had an interest in environment and health in communities.

We found that birth defects observed before 22 weeks of gestation was approximately 10% of all birth defects. However, the proportion of birth defects in this early gestational period was very high. Therefore, this finding confirmed a large proportion of stillbirths and terminations were caused by birth defects. Pregnancies with major structural defects tend to be

terminated. Information on termination of pregnancy is difficult to obtain in general; however, prospective birth cohort studies provide an opportunity to obtain information on termination.

Regarding differences by sex, a population-based study in the US observed that the overall prevalence of major defects in live births was 3.9% among males and 2.8% among females during 1968 to 1995.¹⁰ We did not observe significant differences in prevalence between males and females. Higher prevalence of malformations of genital organs and urinary system in males, and malformations of ear, face, and neck in females were consistent with data in the US. However, we found a difference regarding malformations of the circulatory system; prevalence was higher in females in our study. The mechanisms of a sex-based difference in prevalence are unknown. However, race-based difference in prevalence suggests involvement of differences in susceptibility genes.¹¹

Concerning multiple gestations, the total prevalence of birth defects was not different between singleton and multiple infants in this study. However, there were congenital malformations observed only in twins. Additional etiological factors appeared to be a factor in multiple births.¹² Although the prevalence is low, a study of multiple births would be necessary to elucidate the cause of birth defects.

Our study findings suggest a different pattern of parental risk factors between those birth defects included in the ISBDSR, and those not included. Various risk factors for birth defects have been suggested, including environmental exposures.^{11, 13} However, the causes of most birth defects remain unknown. The

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

increased risk from high maternal age in our study was consistent with previous studies.¹⁴ In previous studies, there was less evidence that high paternal age affected risk.¹⁵ We observed increased risk due to high age of the partner in birth defects included in the ICBDSR, although the RR was not statistically significant. Increased risk due to usage of assisted reproductive technologies of birth defects not included in the ICBDSR was comparable finding to previous studies.¹⁶ The risk of alcohol use and smoking has been reported in previous studies; however, we did not observe the significant risk.^{17, 18} Future studies need to further examine parental and environmental factors, including passive smoking,¹⁹ endocrine disrupting chemicals,²⁰ indoor air pollution,²¹ folate,^{22, 23} supplemental vitamins,²⁴⁻²⁶ and stress.^{27, 28}

It was indicated in a previous study that structural birth defects contributed to a substantial proportion of preterm birth.²⁹ We observed an increased risk of preterm birth in birth defects included in the ICBDSR. In contrast, we observed an increased risk of term SGA in birth defects not included in the ICBDSR. Both preterm birth and term SGA are indicators of fetal growth retardation, however, their etiological factors might be difference (Tamura N., et al., in submission). Therefore, our findings might suggest that there were different etiological factors between birth defects included and those not included in the ICBDSR. Our observation of birth defects not included in the ICBDSR also suggest that the same etiology might be involved in both fetal growth and in birth defects, such as usage of assisted reproductive technologies. Because of future morbidity of children associated with

growth retardation,^{30, 31} our findings emphasize that prospective birth cohort studies play an important role in the prevention of childhood illness.

Birth defects are rare outcomes. In addition, it is often not possible to conduct prospective studies for the investigation of birth defects. Therefore, researchers usually select a case-control study design, which is appropriate for rare disease outcomes, in order to elucidate the relationship between birth defects and parental and environmental factors. However, in case-control studies, an underlying recall bias of exposure is not avoidable.¹¹ Although the rarity of specific anomalies often limits the design of epidemiologic studies, the data from prospective studies are still valuable.

The potential disadvantages of our study data should be considered. The findings concerning the lost-to-follow-up group suggest the existence of 'bias due to withdrawal', although the reason for dropout was speculative. Participants from certain backgrounds might tend to withdraw from this or similar studies. However, the effect of the withdrawal was considered to be small because our follow-up rate was sufficiently high.

Malformations, deformations, and chromosomal abnormalities were previously thought to be idiopathic; therefore, they were frequently termed congenital anomalies. However, more recent research indicates that such abnormalities have been caused in part by parental conditions and environmental factors, such as drug usage and environmental pollution. The term 'congenital anomalies' is no longer used as the general term.¹³ In this study, the term 'birth defects' was used.

Previously, observation of birth

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

defects began at birth. However, timing of ascertainment has begun earlier as technology advance, especially through the use of ultrasound.¹¹ In our study, most birth defects were diagnosed before birth. However, some birth defects, such as malformations of the respiratory system, showed low percentage of ascertainment before birth. We continue to collect data regarding birth defects using a self-administered questionnaire administered at 1, 2, 3, 4, and 7 years after delivery. Because there are birth defects that may not be identified until the later years of follow-up, it is anticipated that the number of birth defect cases will increase over time. Future studies investigating the association of risk factors with birth defects and the long-term impacts of birth defects, using the existing and future data of this cohort study, will provide valuable insights.

In conclusion, we reported the prevalence of birth defects in the general population of Japanese women in our cohort study. Although the monitoring system based on the ICBDSR is an excellent nation-wide monitoring system to survey longitudinal trend, the birth defects not included in the ICBDSR should also be analyzed to elucidate the etiology of birth defects. Prospective studies will contribute the elucidation of the prevalence and etiology of birth defects by using the framework of epidemiology.

F . 研究発表

該当なし

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

1. Mathews TJ, MacDorman MF. Infant mortality statistics from the 2005 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep.* 2008;57:1-32.
2. Statistics and Information Department Ministry of Health Labour and Welfare. *Vital Statistics of Japan, 2012.* Tokyo, Japan. Health Labour and Welfare Statistics Association; 2012.
3. The Centre of the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. *Annual Report 2014.* Roma, Italy. The Centre of the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research; 2014.
4. Orioli IM, Amar E, Bakker MK, Bermejo-Sanchez E, Bianchi F, Canfield MA, et al. Cyclopia: an epidemiologic study in a large dataset from the International Clearinghouse of Birth Defects Surveillance and Research. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011;157C:344-57.
5. Kishi R, Sasaki S, Yoshioka E, Yuasa M, Sata F, Saijo Y, et al. Cohort profile: the Hokkaido study on environment and children's health in Japan. *Int J Epidemiol.* 2011;40:611-8.
6. Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, 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;18:429-50.
7. World Health Organization. *ICD-10: International statistical classification of diseases and health related problems.* Geneva. World Health Organization; 1992.
8. Itabashi K, Fujimura M, Kusuda S, Tamura M, Hayashi T, Takahashi T, et al. The introduction of new standard values of birth weight according to gestational age (in Japanese). *J Jpn Pediatr Soc.* 2010;114:1271-93.
9. Hokkaido prefecture. *Hokkaido prefecture Medical Plan (in Japanese).* Sapporo, Japan. Hokkaido Prefecture; 2015.
10. Lary JM, Paulozzi LJ. Sex differences in the

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

- prevalence of human birth defects: a population-based study. *Teratology*. 2001;64:237-51.
11. Werler M. Birth defects. In: Buck Louis GM, Platt RW, editors. *Reproductive and perinatal epidemiology*. NY: Oxford University Press; 2011. p. 186-203.
12. Christensen K. The 20th century Danish facial cleft population--epidemiological and genetic-epidemiological studies. *Cleft Palate Craniofac J*. 1999;36:96-104.
13. Wilcox AJ. *Fertility and pregnancy*. NY: Oxford University Press; 2010.
14. Hollier LM, Leveno KJ, Kelly MA, DD MC, Cunningham FG. Maternal age and malformations in singleton births. *Obstet Gynecol*. 2000;96:701-6.
15. Kazaura M, Lie RT, Skjaerven R. Paternal age and the risk of birth defects in Norway. *Ann Epidemiol*. 2004;14:566-70.
16. Boulet SL, Kirby RS, Reefhuis J, Zhang Y, Sunderam S, Cohen B, et al. Assisted Reproductive Technology and Birth Defects Among Liveborn Infants in Florida, Massachusetts, and Michigan, 2000-2010. *JAMA Pediatr*. 2016;170:e154934.
17. Gupta KK, Gupta VK, Shirasaka T. An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40:1594-602.
18. Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ*. 2004;82:213-8.
19. Hoyt AT, Canfield MA, Romitti PA, Botto LD, Anderka MT, Krikov SV, et al. Associations between maternal periconceptional exposure to secondhand tobacco smoke and major birth defects. *Am J Obstet Gynecol*. 2016.
20. Winston JJ, Emch M, Meyer RE, Langlois P, Weyer P, Mosley B, et al. Hypospadias and maternal exposure to atrazine via drinking water in the National Birth Defects Prevention study. *Environ Health*. 2016;15:76.
21. Liu Y, Wang B, Li Z, Zhang L, Liu J, Ren A. Indoor air pollution and the risk of orofacial clefts in a rural population in Shanxi province, China. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2016;106:708-15.
22. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *N Engl J Med*. 1999;341:1509-19.
23. Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConaughey DR, Abyholm F, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ*. 2007;334:464.
24. Werler MM, Hayes C, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am J Epidemiol*. 1999;150:675-82.
25. Azais-Braesco V, Pascal G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1325S-33S.
26. Johansen AM, Lie RT, Wilcox AJ, Andersen LF, Drevon CA. Maternal dietary intake of vitamin A and risk of orofacial clefts: a population-based case-control study in Norway. *Am J Epidemiol*. 2008;167:1164-70.
27. Carmichael SL, Shaw GM, Yang W, Abrams B, Lammer EJ. Maternal stressful life events and risks of birth defects. *Epidemiology*. 2007;18:356-61.
28. Hansen D, Lou HC, Olsen J. Serious life events and congenital malformations: a national study with complete follow-up. *Lancet*. 2000;356:875-80.
29. Shaw GM, Savitz DA, Nelson V, Thorp JM, Jr. Role of structural birth defects in preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2001;15:106-9.
30. Hack M, Taylor HG, Klein N, Eiben R, Schatschneider C, Mercuri-Minich N. School-age outcomes in children with birth weights under 750 g. *N Engl J Med*.

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

1994;331:753-9.

31. Tanabe K, Tamakoshi K, Kikuchi S, Murotsuki

J. Learning disability in 10- to 16-year-old
adolescents with very low birth weight in Japan.

Tohoku J Exp Med. 2014;232:27-33.

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

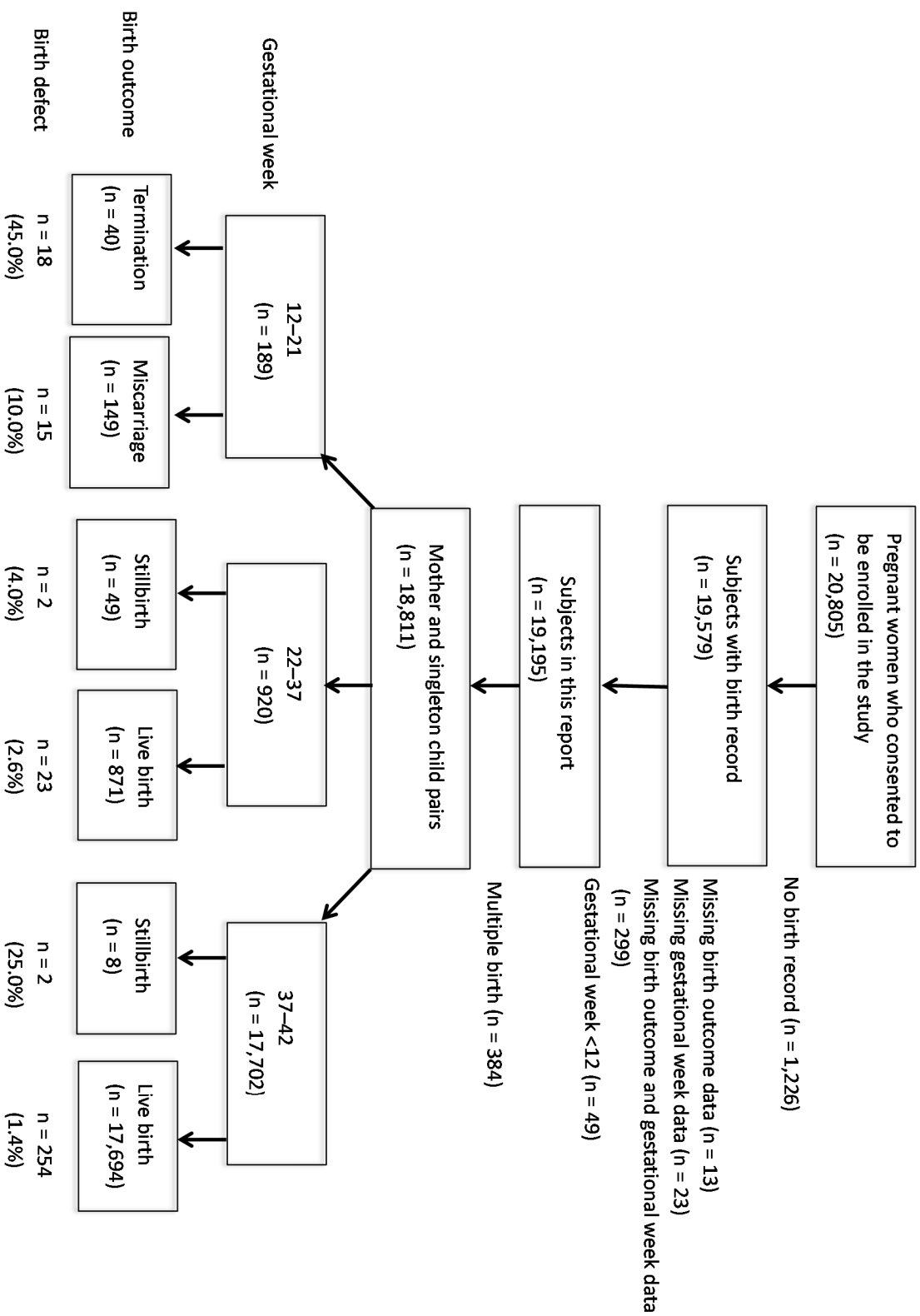


Figure 1. Subjects in this report, and the distribution of birth defects according to the gestational week and pregnancy outcomes.

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. Prevalence of birth defects by major ICD-10 categories according to gestational age, sex, and multiple birth observed after 12th gestational week in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health^a

Classification (ICD-10 code)	Total (n = 19,195) n (/1,000 births)	Gestational week		Sex		Multiple birth		Ascertainment before birth (n = 19,195)
		12 - 21 week (n = 201) n (/1,000 births ≤ 21 week)	22 - 42 week (n = 18,994) n (/1,000 births ≥ 22 week)	males (n = 9,660) n (/1,000 male births)	females (n = 9,437) n (/1,000 female births)	singleton births (n = 18,811) n (/1,000 singleton births)	multiple births (n = 384) n (/1,000 multiple births)	
Congenital malformations of the nervous system (Q00-Q07)	18 (0.9)	7 (34.8)	11 (0.6)	7 (0.7)	8 (0.9)	18 (1.0)	0 (0.0)	100
Congenital malformations of eye, ear, face, and neck (Q10-Q18)	30 (1.6)	3 (14.9)	27 (1.4)	10 (1.0)	20 (2.1)	30 (1.6)	0 (0.0)	73.3
Congenital malformations of the circulatory system (Q20-Q28)	69 (3.6)	0 (0.0)	69 (3.6)	29 (3.0)	40 (4.2)	68 (3.6)	1 (2.6)	85.5
Congenital malformations of the respiratory system (Q30-Q34)	2 (0.1)	0 (0.0)	2 (0.1)	1 (0.1)	1 (0.1)	2 (0.1)	0 (0.0)	50.0
Cleft lip and cleft palate (Q35-Q37)	36 (1.9)	0 (0.0)	36 (1.9)	19 (2.0)	17 (1.8)	35 (1.9)	1 (2.6)	88.9
Other congenital malformations of the digestive system (Q38-Q45)	19 (1.0)	0 (0.0)	19 (1.0)	12 (1.2)	7 (0.7)	18 (1.0)	1 (2.6)	100
Congenital malformations of genital organs (Q50-Q56)	24 (1.3)	0 (0.0)	24 (1.3)	21 (2.2)	3 (0.3)	23 (1.2)	1 (2.6)	100
Congenital malformations of the urinary system (Q60-Q64)	26 (1.4)	2 (10.0)	24 (1.3)	21 (2.2)	5 (0.5)	22 (1.2)	4 (10.4)	96.2
Congenital malformations and deformations of the musculoskeletal system (Q65-Q79)	79 (4.1)	9 (44.8)	70 (3.7)	43 (4.5)	34 (3.6)	79 (4.2)	0 (0.0)	88.6
Other congenital malformations (Q80-Q89)	28 (1.5)	1 (5.0)	27 (1.4)	12 (1.2)	16 (1.7)	28 (1.5)	0 (0.0)	85.7
Chromosomal abnormalities, not elsewhere classified (Q90-Q99)	32 (1.7)	11 (54.7)	21 (1.1)	14 (1.5)	15 (1.6)	32 (1.7)	0 (0.0)	90.6
Total	363 (18.9)	33 (164.2)	330 (17.4)	189 (19.6)	166 (17.6)	355 (18.9)	8 (20.8)	

^aICD, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th revision.
Each defect was counted separately, even if there were accompanying defects in the same infant.

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. Prevalence of selected birth defects included in the ICBDSR surveillance program according to gestational age, observed after 12th gestational age in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health^a

Birth defects	ICD-10 code	Total		Gestational week				Ascertainment before birth (n = 19,195) (%)
		(n = 19,195)		12 - 21 week		22 - 42 week		
		n	(/10,000 births)	n	(/10,000 births<22)	n	(/10,000 births≥22)	
Anencephaly	Q00	4	(2.1)	4	(20.0)	0	(0.0)	100
Spina bifida	Q05	3	(1.6)	1	(49.8)	2	(1.1)	100
Encephalocele	Q01	1	(0.5)	1	(49.8)	0	(0.5)	100
Microcephaly	Q02	1	(0.5)	0	(0.0)	1	(0.5)	100
Holoprosencephaly	Q04.2	2	(1.0)	0	(0.0)	2	(1.1)	100
Hydrocephaly	Q03	2	(1.0)	0	(0.0)	2	(1.1)	100
Anophthalmos/micropthalmos	Q11.0–Q11.2	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	
Anotia/microtia	Q16.0, Q16.1	2	(1.0)	0	(0.0)	2	(1.1)	100
Transposition of great vessels	Q20.1–Q20.3	6	(3.1)	0	(0.0)	6	(3.2)	100
Tetralogy of Fallot	Q21.3	5	(2.6)	0	(0.0)	5	(2.6)	60
Hypoplastic left heart syndrome	Q23.4	2	(1.0)	0	(0.0)	2	(1.1)	100
Coarctation of the aorta	Q25.1	3	(1.6)	0	(0.0)	3	(1.6)	100
Choanal atresia, bilateral	Q30.0	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	
Cleft palate without cleft lip	Q35	11	(5.7)	0	(0.0)	11	(5.8)	81.8
Cleft lip with or without cleft palate	Q36, Q37	25	(13.0)	0	(0.0)	25	(13.2)	92
Oesophageal atresia/stenosis	Q39.0–Q39.4	2	(1.0)	0	(0.0)	2	(1.1)	100
Small intestine atresia/stenosis	Q41	7	(3.6)	0	(0.0)	7	(3.7)	100
Anorectal atresia/stenosis	Q42	6	(3.1)	0	(0.0)	6	(3.2)	100
Undescended testicles	Q53	14	(7.3)	0	(0.0)	14	(7.4)	100
Hypospadias	Q54	8	(4.2)	0	(0.0)	8	(4.2)	100
Indeterminate sex	Q56.4	1	(0.5)	0	(0.0)	1	(0.5)	100
Renal agenesis	Q60	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	
Cystic kidney	Q61.1–Q61.3	2	(1.0)	0	(0.0)	2	(1.1)	100
Epispadias	Q64.0	0	(1.0)	0	(0.0)	0	(1.0)	
Bladder exstrophy	Q64.1	1	(0.5)	0	(0.0)	1	(0.5)	100
Polydactyly, preaxial	Q69	20	(10.4)	1	(49.8)	19	(10.0)	90
Limb reduction defects	Q71, Q72, Q73	4	(2.1)	1	(49.8)	3	(1.6)	75
Diaphragmatic hernia	Q79.0–Q79.1	5	(2.6)	0	(0.0)	5	(2.6)	100
Omphalocele	Q79.2	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	
Gastroschisis	Q79.3	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	
Prune belly sequence	Q79.4	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	
Trisomy 13	Q91.4–Q91.7	1	(0.5)	0	(0.0)	1	(0.5)	100
Trisomy 18	Q91.0–Q91.3	4	(2.1)	1	(49.8)	3	(1.6)	100
Down syndrome	Q90	20	(10.4)	4	(20.0)	16	(8.4)	90
Total		162	(84.4)	13	(646.8)	149	(78.4)	

ICD, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision; WHO, ICBDSR: International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research.

^aEach defect was counted separately, even if there were accompanying defects in the same fetus.

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. Risk ratios of birth defects in singleton infants according to maternal factors, observed in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health

	Risk for all birth defects				Risk for Birth defects included in the ICBDSR program				Risk for birth defects not included in the ICBDSR program			
	without birth defects	with birth defects	Crude RR (95% CI)	Adjusted RR ^a (95% CI)	without birth defects ^b	with birth defects	Crude RR (95% CI)	Adjusted RR ^b (95% CI)	without birth defects ^b	with birth defects	Crude RR (95% CI)	Adjusted RR ^b (95% CI)
Age at the entry												
< 35 years old	15,196	243	1.00		15,195	106	1.00		15,195	138	1.00	
≥ 35 years old	3,301	71	1.34 (1.03, 1.74)	1.61 (1.19, 2.19)	3,301	38	1.64 (1.14, 2.38)	1.89 (1.23, 2.91)	3,301	33	1.10 (0.74, 1.60)	1.40 (0.90, 2.16)
Body mass index												
≥ 18	15,535	239	1.00		15,535	113	1.00		15,535	127	1.00	
< 18	1,905	33	1.12 (0.78, 1.61)	1.21 (0.82, 1.778)	1,905	11	0.80 (0.43, 1.47)	0.83 (0.42, 1.65)	1,905	22	1.41 (0.89, 2.20)	1.52 (0.94, 2.45)
Parity												
≥ 1	11,402	191	1.00		11,401	98	1.00		11,401	94	1.00	
0	7,095	123	1.03 (0.83, 1.29)	1.23 (0.94, 1.60)	7,095	46	0.76 (0.53, 1.07)	0.86 (0.57, 1.30)	7,095	77	1.31 (0.97, 1.77)	1.63 (1.13, 2.32)
Assisted reproductive technologies												
No	16,972	254	1.00		16,971	116	1.00		16,971	139	1.00	
Yes	743	21	1.86 (1.20, 2.89)	1.95 (1.23, 3.10)	743	9	1.76 (0.90, 3.46)	1.96 (0.97, 3.93)	743	12	1.96 (1.09, 3.51)	1.99 (1.06, 3.41)
Age of the partner												
< 35 years old	12,302	192	1.00		12,302	82	1.00		12,302	110	1.00	
≥ 35 years old	6,194	122	1.26 (1.00, 1.57)	1.09 (0.83, 1.43)	6,194	62	1.50 (1.08, 2.08)	1.26 (0.84, 1.87)	6,194	61	1.10 (0.81, 1.50)	0.97 (0.67, 1.39)
Alcohol use in early period of the pregnancy												
No	15,246	228	1.00		15,245	104	1.00		15,245	125	1.00	
Yes	2,141	38	1.18 (0.84, 1.66)	1.14 (0.80, 1.66)	2,141	17	1.16 (0.70, 1.94)	1.14 (0.65, 2.01)	2,141	21	1.19 (0.75, 1.89)	1.15 (0.70, 1.89)
Smoking during pregnancy												
No	12,766	210	1.00		12,766	98	1.00		12,766	112	1.00	
Yes	2,078	30	0.88 (0.60, 1.29)	0.99 (0.67, 1.45)	2,078	10	0.63 (0.33, 1.20)	0.69 (0.36, 1.33)	2,078	20	1.10 (0.68, 1.76)	1.26 (0.80, 2.04)

RR, risk ratio; CI, confidence interval

^aAdjusted for maternal age, parity, maternal body mass index, and assisted reproductive technology.

^bExcluding birth defect cases not listed in the ICBDSR surveillance program.

^cExcluding birth defect cases listed in the ICBDSR surveillance program.

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. Risk ratios of birth outcomes in singleton infants according to birth defects, observed in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health

	Risk of birth defects				Risk of birth defects included in the ICBDSR program				Risk of birth defects not included in the ICBDSR program			
	without birth defects	with birth defects	Crude RR (95% CI)	Adjusted RR ^a (95% CI)	without birth defects ^b	with birth defects	Crude RR (95% CI)	Adjusted RR ^a (95% CI)	without birth defects ^c	with birth defects	Crude RR (95% CI)	Adjusted RR ^a (95% CI)
Preterm birth												
(-)	17,591	289	1.00		17,590	128	1.00		17,590	162	1.00	
(+)	895	25	1.64 (1.12, 2.40)	1.67 (1.13, 2.48)	895	16	2.29 (1.44, 3.66)	2.20 (1.34, 3.60)	895	9	1.09 (0.57, 2.06)	1.21 (0.64, 2.29)
Very low birth weight												
(-)	18,215	277	1.00		18,214	129	1.00		18,214	149	1.00	
(+)	231	33	8.50 (6.01, 12.0)	9.35 (6.57, 13.3)	231	13	7.31 (4.29, 12.5)	8.16 (4.81, 13.8)	231	20	9.45 (6.14, 14.5)	10.20 (6.59, 15.9)
Term small for gestational age												
(-)	15,924	664	1.00		15,919	97	1.00		15,919	117	1.00	
(+)	213	17	1.85 (1.16, 2.93)	1.91 (1.20, 3.03)	664	7	1.68 (0.82, 3.45)	1.75 (0.86, 3.59)	664	10	1.97 (1.08, 3.58)	2.01 (1.11, 3.66)

RR, risk ratio; CI, confidence interval.

^a Adjusted for maternal age, parity, maternal body mass index, and assisted reproductive technology

^b Excluding birth defect cases not listed in the ICBDSR surveillance program

^c Excluding birth defect cases listed in the ICBDSR surveillance program

先天異常の出生時から7歳までの発生状況に関する研究

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・生殖医学分野 特任教授
研究分担者 馬場 剛 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 講師
研究分担者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授
研究分担者 有賀 正 北海道大学大学院医学研究科・小児科学分野 特任教授

研究要旨

【背景】先天異常はわが国の新生児死亡原因の第1位を占める（厚生労働省，人口動態調査，2016）。先天異常の発生原因では，遺伝要因と環境要因の共同作用による多因子遺伝によるものが20～25%を占める。新生児死亡が医療の安全・医療技術の高度化によって大きく改善されているわが国では，環境要因や多因子遺伝による先天異常の発生要因解明は重要な公衆衛生上の課題である。北海道スタディでは，出産施設から出生時情報を得たのちも，母親への質問紙調査により児の健康調査を行っている。今回は，出生時情報があるもののうち，7歳までの調査票に報告された先天異常の集計結果を報告する。

【対象者】本調査への参加同意が得られた妊婦20,926名（2016年6月末現在）。【方法】出生時情報は，出産施設の産科医師より出生後7日以内の先天異常の有無を含めた **birth outcome** 情報を得た。また，1歳，2歳，4歳，7歳の母親への調査票から先天性心疾患，尿道下裂，停留精巣，その他の先天異常情報を得た。先天異常として報告があったもののうち，胎児病，未熟性によるもの，先天異常の有無が不明確なもの，先天性心疾患では，染色体異常や症候群の合併症，不整脈・心雑音のみなどの場合は除外した。先天異常の選択は周産期母子専門医師の助言を受けて行った。先天異常は発生器官別に **the International Classification of Disease 10th revision (ICD 10th)** コードに基づき分類した。【結果】先天性異常を持つ児は7歳までは623名（3.2%；分母は新生児個票のある19,282名）で出生時の325名1.7%（在胎週数22週以降の児では292名1.5%）の約1.9倍であった。7歳までで染色体異常の児は42名（うちダウン症26名）であった。ICD 10th コードによる先天異常発生器官別で最も多かったのは循環器系192名，次いで筋骨格系91名，生殖器系89名であった（重複有り）。出産時集計で最も多い先天異常は心室中隔欠損症33名であったが，7歳までには101名と3倍以上に増加していた。外表奇形の口唇口蓋裂は7歳まで41名で出生時と同数であった。【考察】外表奇形は出生入院中に殆どの異常が発見され，専門機関での診断を得られているが，内部疾患や未熟性によるものかどうかを経過観察する疾患は1歳以降の質問票で報告される件数が増加していた。わが国の乳児健診率は1歳6か月健診，3歳健診ともに90%以上と高く（平成26年度 厚生労働省），乳児健診によって異常の早期発見・治療に繋がっていることが確認された。北海道スタディによる妊娠期の生活・環境要因と出生時の先天異常発生との関連性の検討は，わが国の環境要因や多因子遺伝による先天異常発生予防の方策を検討する基礎的資料となると考える。

研究協力者

伊藤 久美子

(北海道大学大学院医学研究科
社会医学講座公衆衛生学分野)

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

長 和俊, 山田 俊

(北海道大学病院周産母子センター)

宮本 敏伸

(旭川医科大学産婦人科学講座)

研究協力機関

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

A. 研究目的

先天異常は世界の新生児死亡原因において、第1位の早産の合併症**35%**、第2位の分娩に関連する合併症**24%**、第3位の敗血病**15%**に次いで第4位の**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, 変形・染色体異常で、死亡原因の**42.9%**を占める(厚生労働省, 人口動態調査., **2016**)。先天異常の発生原因は多彩であるが、原因の明確な遺伝子変異**7~8%**、染色体異常**6~7%**、環境要因**7~10%**で、先天異常の多くは遺伝要因と環境要因の共同作用によ

って起こる多因子遺伝によるものが**20~25%**を占める。新生児死亡が医療の安全・医療技術の高度化によって大きく改善されているわが国では、環境要因や多因子遺伝による先天異常の要因解明は重要な公衆衛生上の課題である。

環境要因と先天異常に関する疫学研究では、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。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**)。

多因子遺伝により発生すると考えられる神経管閉鎖不全は、世界各地で行われた疫学研究で妊娠前後の葉酸補充により発生頻度が減少することが報告された(**Berry RJ., 1999; MRC Vitamin Study Research Group., 1991; Czeizel AE., 1992**)。さらに、葉酸代謝関連遺伝子の多型と葉酸量との交互作用により神経管閉鎖不全リスクが上昇するとの報告がある(**Etheredge AJ et al., 2012**)。

1990年代以降、世界的に胎児期曝露の影響を明らかにするために出生コホート研究が開始されヨーロッパ、北米を中心に追跡調査の結果が報告されている(岸ら., **2016**)。北海道スタディでも胎児期の化学物質曝露、葉酸摂取、受動喫煙などと先天異常との関連を研究している。先天異常には先天性心疾患や停留精巣などのように

出生時には異常が発見されないが、その後の乳幼児健診などで異常が見つかり、専門機関で診断される場合も多い。北海道スタディでは、生後も母親への質問紙調査によって先天異常の情報収集を行っている。今回は、7歳までの調査票に報告された先天異常に関する集計結果を報告する。

B．研究方法

1．対象

2002年から2012年までに、北海道内の37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娠初期の妊婦20,926名を対象とした(2016年6月末現在)。

2．方法

出生時情報は、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)から先天異常の内容・出産頻度を算出した。また、1歳、2歳、4歳、7歳の母親への調査票では、先天性心疾患、尿道下裂、停留精巣の質問項目の他に、「医師の診断を受け、経過観察・治療・通院している病気」項目の「その他」に記載されている内容からも先天異常情報を抽出した。

先天異常として報告があったもののうち、胎児水腫、陰嚢水腫などの胎児病やソ

径ヘルニア、臍ヘルニアなどの未熟性によるもの、先天異常の有無が不明確なものは除外した。また、先天性心疾患は、『心臓とそれに連動する大血管の構造異常』とした。先天性心疾患の記載があるもののうち、

新生児個票で先天性心疾患疑いのみで、生後調査票に診断名がない、染色体異常の合併症、症候群の合併症、新生児個票に記載がなく、1歳以降の心疾患に記載があるが、診断名がないもの、不整脈、心雑音、期外性収縮など先天異常以外と予測される場合は集計から除外した。先天性と後天性の両方の要因によって発生する疾患に関しては、前後の健康状態を鑑み、総合的に先天異常であるかどうかを判断した。先天異常の選択は周産期母子専門医師の助言を受けて行った。

先天異常は発生器官別に **the International Classification of Disease 10th revision (ICD 10)** に基づき分類した。(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．集計人数

出生時情報が2015年12月までに報告のあった19,282件に関して集計を行った。出生後調査票は2016年6月までに報告のあった、1歳12,392件、2歳10,960件、

4歳 7,552件，7歳 4,363件に関して集計を行った。

2. 出生時から7歳までの先天異常

出生時医療情報から母親への1歳 2歳，4歳，7歳調査票までの先天異常集計では，先天性異常を持つ児は623名（3.2%；分母は新生児個票のある19,282名）で出生時の325名1.7%（在胎週数22週以降の児では292名1.5%）の約1.9倍であった。染色体異常を持つ児は42名（うちダウン症26名）であった。

ICD 10thコードによる先天異常発生器官別では，最も多かった発生器官は循環器系192名，次いで筋骨格系91名，生殖器系89名であった（重複有り）（表1）。

出産時集計で最も多い先天異常は心室中隔欠損症33名であったが，7歳までには101名と3倍以上に増加していた。その他，出生時に報告数の多かった心房中隔欠損症は10名から26名，停留精巣・非触知精巣14名から75名，水腎症18名から35名と増加がみられたが，口唇口蓋裂は41名で同数であった（表2）。

D. 考察

7歳までの母親への質問票による先天異常件数は，出生時の約2倍であった。口唇口蓋裂のような外表奇形は，出生入院中に殆どの異常が発見され，専門機関での診断を得られている。しかし，先天性心疾患のような内部疾患や出生直後では未熟性によるものかどうか経過観察する停留精巣などは1歳以降の質問票で報告される件数が増加していた。わが国の乳児健診率は1歳6か月健診95.5%，3歳健診94.1%と高く（平成26年度厚生労働省），これらの乳児健診によって異常の早期発見・早期治療に繋がっていることが確認された。

先天異常の発生頻度は奇形の種類，人種によって異なる。また，出生前診断の普及，用語の定義により時代とともに変化する。医療的介入を必要とする大奇形の頻度は2~3%でほぼ一定であるが，健康あるいは日常生活に支障がない小奇形は評価の仕方によって大幅に変わる（黒沢，2013）。

本研究の先天異常発生頻度は出生時1.7%、在胎22週以降では1.5%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（Tao FB 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（Sheridan E 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。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）が主要な先天異常の出産頻度の報告を行っている。今回の北海道スタディの出生時での在胎22週以降の先天異常発生頻度は，JAOG報告1.7~2.0%とほぼ同程度であった。世界の先天異常モニタリング結果は，International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research

(ICBDER) が、毎年の世界 36 か国 42 サーベイランスプログラムの先天異常件数を報告している。しかし、集計対象基準(妊娠週数や出生体重の基準)は国によって若干の違いがある (ICBDER Annual Report 2014)。そのため、先天異常児の出産頻度を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。

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を集計している。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 14 年が経過し、この間に約 2 万人以上の母子の協力を得られた。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る。さらに、北海道の妊婦の妊娠期の生活・環境要因と出生時の先天異常発生との関連を検討することで、わが国の多因子遺伝による先天異常発生予防の方策を検討する基礎的資料となると考える。

E . 結論

2002 年から 2012 年までの参加登録妊婦 20,926 名のうち 2015 年 12 月までに出生時報告のあった 19,282 名のうち、母親への 1 歳、2 歳、4 歳、7 歳質問票に記載された先天異常の集計を行った。先天異常のある児の総数は出生時 325 名 1.7% (在胎週数 22 週以降では 292 名 1.5%) で、7 歳まででは 623 名 3.2% と約 2 倍であった。出生時に最も頻度の高かった先天異常は心室中隔欠損も 7 歳までは 101 名となり、

出生時 33 名の約 3 倍以上であった。内部疾患や未熟性が疑われる疾患は 1 歳以降の調査票での報告が増加したが、外表奇形は出生時と 7 歳までの報告ではほぼ同数であった。北海道スタディによる妊娠期の生活・環境要因と出生時の先天異常発生との関連性の検討は、わが国の多因子遺伝による先天異常発生予防の方策を検討する基礎的資料となると考える。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Hanaoka T et al. Prevalence and the risk of birth defects according to selected maternal factors observed in a prospective birth cohort study; the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. (Submitted to the Journal of Epidemiology. 2016.12.26)

2 . 学会発表

該当なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. **Committing to child survival: A Promise Renewed Progress Report 2015. Unicef. https://www.unicef.org/publications/files/APR_2015_9_Sep_15.pdf.**
2. 厚生労働省 指針 増刊 国民衛生の動向.62(9): 79, 2016.
3. 受精卵からヒトになるまで、基礎的発生学と先天異常 原著第 6 版, Moe Persaud, 訳瀬口春道, 小林俊博, Eva Garcia del Saz, 医歯薬出版, 133-158, 2007.
4. 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.**
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. Stein CR , Savitz DA , Dougan M. 2009. Serum levels of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol* 170:837-846.
 7. Berry RJ , Li Z , Erickson JD , et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention [corrected; erratum to be published]. *N Engl J Med*. 1999;341:1485-1490.
 8. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*. 1991;338:131-138.
 9. Czeizel AE , Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*. 1992;327:1832-1835.
 10. Etheredge AJ , Finnell RH , Carmichael SL , et al. Maternal and Infant Gene-Folate Interactions and the Risk of Neural Tube Defects. *Am J Med Genet A*. 2012;158(10):2439-2446.
 11. 岸玲子 , 湊屋街子 , 荒木敦子 , 宮下ちひろ. 子どもが取り巻く環境と健康 誰もが健康な人生のスタートを. 2017. 公衆衛生 81(2): 175-185.
 12. the International Classification of Disease 10th revision (ICD 10)国際疾病分類第 10 版（2003 年改訂）
<http://www.dis.h.u-tokyo.ac.jp/byomei/icd10/>
 13. 平成 26 年度地域保健・健康増進事業報告の概況 , 厚生労働省 ,
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/c-hoken/14/dl/gaikyo.pdf>.
 14. 黒沢健司 , 臨床医が知っておきたい先天異常 , 先天異常の疫学. *小児科臨床*. 2013; 66: 1201-1214.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. Annual Report 2014. The international center on birth defects Center.
<http://www.icbdsr.org/>

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. ICD 10th コードによる先天異常発生器官別件数

ICD 10th cord	件数
Q00-07 神経系	21
Q10-18 眼, 耳, 顔面および頸部	39
Q20-28 循環器系	192
Q30-34 呼吸器系	4
Q35-37 唇裂および口蓋裂	41
Q38-45 消化器系	31
Q50-56 生殖器系	89
Q60-64 腎泌尿器系	50
Q65-79 筋骨格系	91
Q80-89 皮膚, その他	32
Q80-89 先天奇形症候群, その他	19
Q90-99 染色体異常	42

(2016年8月23日時点・重複あり)

表 2. 出生時および7歳までの主な先天異常件数

器官	疾患	出生時	7歳まで
先天性心疾患	全体	57	186
	心室中隔欠損症	33	101
	心房中隔欠損症	10	26
	肺動脈(弁)狭窄症	10	29
唇裂及び口蓋裂	口唇口蓋裂	41	41
泌尿器系	水腎症	18	35
生殖器系	尿道下裂	8	12
	停留精巣・非触知精巣	14	75

(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)

妊娠初期の血清葉酸値と **Birth defects** リスクとの関連

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授
研究分担者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科
生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野 特任教授
研究分担者 馬場 剛 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 講師
研究分担者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授
研究分担者 有賀 正 北海道大学大学院医学研究科・小児科学分野 特任教授
研究分担者 花岡 知之 北海道大学環境健康科学研究教育センター 客員教授

研究要旨

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

研究協力者

伊藤 久美子

(北海道大学大学院医学研究科
社会医学講座公衆衛生学分野)

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

長 和俊, 山田 俊

(北海道大学病院周産母子センター)

宮本 敏伸

(旭川医科大学産婦人科学講座)

研究協力機関

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

A. 研究目的

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

葉酸はメチオニンサイクルに不可欠な一炭素単位転移, および **DNA** メチル化に必要なメチル基ドナーとしても必須の栄養素である。³ 葉酸は多因子遺伝によって引き起こされる神経管閉鎖不全の原因となる遺伝子発現を調節・阻止したり, ある

いは胚の生存を高め, 正常な器官形成を維持するための葉酸輸送障害による悪影響を克服するのに役立つ。⁴ 葉酸欠乏はホモシステイン増加を引き起こし, 高ホモシステインレベルは葉酸の機能を妨げる。その結果, **DNA** メチル化パターンの不規則な発達が器官発生期における胚の致死および発達異常を導く。³

妊娠前の葉酸摂取は神経管閉鎖不全の子どもを出産するリスクを減少させることが **1980~90** 年代の世界各地での大規模疫学研究によって報告された。⁵⁻⁷ そのためアメリカ, カナダ, コスタリカでは **1998** 年から穀物への葉酸添加が義務付けられ, その後 **3-6** 年で **NTDs** の子どもの出生が **19-46%** 減少した。⁸ しかし, 神経管が発生する神経堤細胞から発生する **congenital heart defects (CHDs)**⁹⁻¹² や **orofacial clefts**¹³⁻¹⁶ と葉酸摂取との関連はまだ明確ではない。¹⁷ つまり, 器官形成期の葉酸レベルと **NTDs** 以外の **birth defects** との関連は不明のままである。妊婦の葉酸摂取と **birth defects** との関連評価した研究の殆どは **case-control studies**^{5-15, 18, 20-22} であり, 出産後に妊娠中の葉酸摂取情報を得ている。これには **recall bias** を含む可能性がある。また, 葉酸摂取の評価では体内葉酸量を正確に反映しているとは言い難い。他にも **case-control study** により出産後の血清あるいは赤血球葉酸値を測定し **CHDs** や **orofacial clefts**^{21, 23-30} との関連を評価した研究もある。しかし, 出産後の葉酸濃度測定では, 器官形成期の葉酸濃度との関連を評価できるものではない。**2** つの前向きコホート研究が妊娠期の血清葉酸値と **birth defects** との関連を評価している。一つは妊娠中期 (妊娠第 **15-18** 週) の血清葉酸値と **CHDs** や **cleft lip with/without cleft**

palate (CL ± P)^{14,24} との関連を評価し、いずれも関連はみられないと報告している。もう一つの前向き研究では、妊娠初期の血清葉酸値(中央値)は **birth defects** のある子どもの母親は、**birth defects** のない子どもの母親よりも有意に低かったことを報告している。²⁵ 妊娠期の葉酸値と **birth defects** との関連は議論の余地が大いにある。日本においては、前向き研究により葉酸濃度と **birth defects** との関連を評価した研究はない。そこで、我々は前向き **birth cohort study** により妊娠初期血清葉酸値と **birth defects** との関連を明らかにすることを目的に研究を行った。

B．研究方法

1．対象

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

2．方法

(1) Data collection

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

ているサプリメント(葉酸含有サプリメント)、葉酸含有のマルチビタミン剤に分類した。

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

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

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

(2) Definition and Classification of Birth Defects

Birth defects は **the International Classification of Disease 10th revision (ICD 10)¹⁶** により分類した。また、**CHD** は次の **5 subgroups** に分類した；**1) isolated septal defects** (単独の心室中隔欠損症、単独の心房中隔欠損症)、**2) conotruncal heart defects** (大血管転移症、**Fallot** 四徴症、総動脈幹症、両大血管右室起始症)、**3) left-sided obstructive malformation** (大動脈弁狭窄症、左心室低形成症、大動脈縮窄症、大動脈弓離断症)、**4) right-sided obstructive malformations** (肺動脈弁狭窄、肺動脈閉鎖症、三尖弁閉鎖症、**Ebstein** 奇形)、**5) other CHDs** (重複心奇形、単心室、単独の動脈管開存症)。^{7,8,10} さらに、

folate-related birth defects として神経堤細胞から発生する器官の **birth defects** である **NTDs**,^{5,7} **CHDs**,^{9,8} **orofacial clefts**,^{15,17} **hypospadias**,²⁶ **limb reduction defects**²⁷ を設定した。

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

(3) Statistical Analysis

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

妊娠初期の血清葉酸レベルと **birth defects** リスクとの関連では **any birth defects**, **ICD 10th** による器官別, **folate-related birth defects** とその主要な **phenotype** を解析した。

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

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

1. 母親の属性と妊娠初期血清葉酸レベル
血清葉酸値の中央値（四分位範囲）は **16.5 (13.4 – 21.5) nmol/L**, 血清葉酸レベルの **deficient**, **possible deficient**, **optimal levels** の人数(%)はそれぞれ **981**

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

2. Birth defects と血清葉酸レベル

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

Optimal levels に対する **deficient** と **possible deficiency levels** の調整前後の ORs (95% CI) を示した。Any **birth defects** の調整後 ORs は **deficient** 1.23 (95% CI: 0.81, 1.87) でリスク上昇傾向があった。ICD 10th 分類毎の **optimal levels** に対する **deficiency levels** の調整後 ORs は , **circulatory system** 1.23 (95% CI: 0.81, 1.87) , **genital organs** 1.31 (95% CI: 0.68, 2.55) , **urinary system** 2.36

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

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

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

D．考察

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 1. Baseline characteristics according to serum folate status

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 3. Associations between folate-related birth defects and maternal serum folate status during the first trimester

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

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

CHD, congenital heart defect

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 associations between prenatal phthalate exposure and cryptorchidism: The Hokkaido Study in Environment and Children's Health

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 篠原 信雄 北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科 教授

研究分担者 松村 徹 いであ株式会社 環境創造研究所 常務取締役

研究要旨

Phthalates are chemicals used as plasticizers for polyvinyl chloride, food packaging, cosmetics, personal care products and known endocrine-disrupting effects in rodents. epidemiologic studies of male reproductive disorders such as cryptorchidism and hypospadias using measurements of prenatal or postnatal phthalate levels have been reported, however, in regards to the relationship to prenatal exposure to phthalates is very limited and the results are contradictory. The aim of this study is to investigate potential effects of prenatal phthalate metabolite levels on the occurrence of cryptorchidism in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. This prospective birth cohort study was based on the Hokkaido large-scale cohort, the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. We selected 63 cryptorchidism cases and 126 controls based on the birth records and the questionnaires at aged 1, 2, 4, and 7 years old. Controls were 1 to 2 (1 : 2) matched for delivery year \pm 1 year and their delivery hospitals. Seven phthalate metabolites were measured from first trimester maternal blood using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) instrumentation. Cox logistic regression analyses were performed to evaluate associations between prenatal exposure to phthalates and the risk of cryptorchidism. There were no significant associations were observed between cryptorchidism and phthalates metabolite levels, however, a borderline significance was found in the level of MECPP. Prenatal exposure to phthalates did not show adverse effects on cryptorchidism. This was the first study of investigating prenatal phthalates exposure and cryptorchidism in Japanese population. Previous studies also have been reported negative effects of prenatal phthalates exposure on cryptorchidism, continuous investigation is needed as further studies.

研究協力者

アイツバマイ ゆふ（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

A . 研究目的

Phthalates are chemicals used as plasticizers for polyvinyl chloride, food packaging, cosmetics, personal care products and known endocrine-disrupting effects in rodents [1, 2]. Animal studies suggest that prenatal exposure to di-butyl

phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP, and di-isononyl phthalate (DiNP) induce anti-androgenic effects on the male fetus. They alter Leydig cell differentiation and function and thus diminish fetal testosterone production and reduced anogenital distance [3-7].

Only three epidemiologic studies of male reproductive disorders such as cryptorchidism and hypospadias using measurements of prenatal or postnatal

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

phthalate levels have been reported, however, in regards to the relationship to prenatal exposure to phthalates is very limited and the results are contradictory; In Danish study, mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate (MECPP) and mono(4-methyl-7-carboxyheptyl) phthalate (7cx-MMeHP) in maternal amniotic fluid were measured, however, neither di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) nor di-isononyl phthalate (DiNP) was consistently associated with cryptorchidism and hypospadias [8]. In a prospective Danish-Finnish cohort study, 6 phthalate metabolites from 1–3 months postnatally breast milk sample were measured, however, no association has been reported between phthalate monoester levels and cryptorchidism [9]. In a prospective case – control study of 52 cryptorchidism and 128 control measured monobutyl phthalate (MBP) from breast milk sample 3-5 day after delivery and reported that concentrations were not significantly increased in the cryptorchidism case versus control group although a trend for increased MBP was observed [10].

The aim of this study is to investigate potential effects of prenatal phthalate metabolite levels on the occurrence of cryptorchidism in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health.

B . 研究方法

Study population

This prospective birth cohort study was based on the Hokkaido large-scale cohort, the Hokkaido Study on Environment and Children's Health [11, 12]. Study details regarding the population, data collection, sampling of biological specimens, and

contents of the questionnaire have been described previously [11, 12]. Briefly, native Japanese women living in Hokkaido were recruited in this study at <13 weeks of gestation at 37 hospitals and clinics in Hokkaido between February 2003 and March 2012. From a total of 20,929 pregnant women who were enrolled to The Hokkaido Study of Environment and Children's Health, we selected 19,183 mother-infant pairs who had a baseline questionnaire, birth records, and first trimester maternal blood. From these, we selected 63 cryptorchidism cases and 126 controls based on the birth records and the questionnaires at aged 1, 2, 4, and 7 years old. Controls were 1 to 2 (1 : 2) matched for delivery year \pm 1 year and their delivery hospitals.

Assessments of prenatal exposure to phthalates

Seven phthalate metabolites, mono-n-butyl phthalate (MnBP), mono-iso-butyl phthalate (MiBP), mono-benzyl phthalate (MBzP), mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), mono(2-carboxymethyl-5-oxohexyl) phthalate (MEHHP), mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate (MECPP), Mono (4-methyl-7-carboxyheptyl) phthalate (cx-MiNP) were measured from first trimester maternal blood. Maternal plasma was analyzed using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) instrumentation (Waters, Tokyo, Japan).

Sample preparation

A 40 uL of hydrochloric acid (1M) was added to each maternal plasma sample (0.5 mL). Samples were mixed by vortexing and ultrasonic irradiated for 10 minutes. An internal standard, which consisted of 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

ng/mL of MEHP-d4, MiNP-13C4, MEHHP-13C4, MECPP-13C4, OH-MiNP-d4, cx-MiNP-d4 (100 ng/mL of each), 1100 μ L of ammonium acetate buffer solution (100 mM, pH 9.0), and 10 μ L of β -glucuronidase enzyme were added to each sample to deconjugate glucuronidated phthalate metabolites. The samples were gently mixed and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 90 minutes. After incubation, samples were extracted 300 μ L into tube and added 900 μ L of acetonitrile. The samples were mixed by vortexing to deproteinize. After centrifugation (3,500 rpm for 5 min), 500 μ L of supernatants were transferred into new tubes and dried under nitrogen gas. After drying, 250 μ L of 20 % methanol was added and ultrasonic irradiated for 5 minutes and transferred to a glass sample vial insert.

Instrumental analysis

The reconstituted extract (10 μ L) was injected into an ultra-performance LC (ACQUITY UPLC H-Class) coupled to triple quadrupole tandem MS (Xevo TQ-S) (Waters, Tokyo, Japan). The insoluble particulates were filtered by in-line filters (2.1 \times 5 mm, 1.7 μ m, Vanguard BEH C8, Waters, Tokyo, Japan) preceding the BEH C8 column (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m, Waters, Tokyo, Japan). The retention gap technique was used by installing retention gap columns Atlantis T3 (2.1 \times 50 mm, 3 μ m, Waters, Tokyo, Japan), which improved phthalate metabolites sensitivity by trapping mobile-phase phthalate metabolites (contaminants) in the retention gap column. The column temperature was 40 $^{\circ}$ C. The analytes were quantified using ESI-negative SRM mode with product/precursor ion scans unique for each analyte (Table 1). Analytes were eluted from the column with a linear gradient involving solvent A (2 mM ammonium

acetate in water) and solvent B (2 mM ammonium acetate in 95 % acetonitrile) as follows: 2 % B for the initial 1 min, then a gradient of 2 – 98 % B from 1 min to 16 min. The total UPLC cycle time was 20 min including column re-equilibration. An eluent flowrate of 0.3 mL/min was employed for all analyses.

Data analysis

Because our data did not fall into a normal distribution, phthalate metabolites concentrations were converted to a natural log (Ln) scale. For participants with phthalate metabolites concentrations below the MDL, a value equal to half of the MDL was assigned for statistical analyses. We did not include MBzP, MEHHP, and cx-MiNP in the statistical analysis because these compounds were detected less than 50 %.

For analysis of correlations between the children with and without cryptorchidism and characteristics of mothers and infants, we used the Student's t-test and the Chi-square test. To assess risk factors or protective factors for cryptorchidism, binomial logistic regression analyses were used. Crude and adjusted Cox logistic regression analyses were performed to evaluate associations between prenatal exposure to phthalates and the risk of cryptorchidism. In logistic models, we evaluated odds ratios (ORs) for the risk of cryptorchidism with Ln-transformed maternal phthalate metabolite levels. Multivariate analyses were adjusted for confounding variables that influenced cryptorchidism in univariate analyses, possible risk factors reported in previous studies. The fully adjusted model used logistic regression analysis of cryptorchidism adjusted for maternal age at

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

delivery, gestational week, parity, maternal education, smoking at early pregnancy, alcohol intake at early pregnancy, maternal BMI before pregnancy, and infant birth weight.

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Science (SPSS) for Windows, version 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and JMP Pro 12 Statistical Discovery Software for Windows (S.A.S. Institute Inc., Cary, North Carolina). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Ethics

For this study, all participating women provided written informed consent, and the study protocol was approved by the institutional ethical board for epidemiological studies at the Hokkaido University Center for Environmental and Health Sciences.

C . 研究結果

The characteristics of mother and infant are shown in Table 1. There were no statistical significance relationships between cryptorchidism case and control on maternal age at delivery, gestational week, parity, maternal education, smoking at early pregnancy, alcohol intake at early pregnancy, maternal BMI before pregnancy, and infant birth weight, although the trend ($p < 0.1$) for maternal age at delivery and smoking at early pregnancy; mothers who were older and smokers at early pregnancy had higher prevalence of cryptorchidism.

The distributions of phthalate metabolites were shown in Table 2. MnBP, MiBP, MEHP, and MECPP were detected

more than 70 % of the samples. Most highly detected metabolite was MnBP, followed as MiBP, MEHP, MECPP.

The comparisons of median concentrations of phthalate metabolites were shown in Table 3. The level of MECPP, a second metabolite of DEHP, was lower in cryptorchidism than controls ($p = 0.034$). Other metabolites were not obtained significant differences.

The Cox regression analysis of the associations between prenatal exposure to phthalates on cryptorchidism were shown in Table 4. There were no significant associations were observed between cryptorchidism and phthalates metabolite levels, however, a borderline significance was found in the level of MECPP (OR, 95% CI: 0.60, 0.35 – 1.03; $p = 0.065$).

D . 考察

This was the first study of investigating prenatal phthalates exposure and cryptorchidism in Japanese population. We observed no consistent association between prenatal exposure to phthalates and the risk of cryptorchidism in Japanese populations of large scale birth cohort study. However, a borderline inverse association was found between the level of MECPP and cryptorchidism. Similar findings have been reported from Denmark birth cohort study: higher amniotic fluid levels of MECPP decreased the corresponding OR for cryptorchidism (p for trend = 0.54) [8]. Other two studies have measured postnatal phthalate levels and related it to the occurrence of cryptorchidism or hypospadias.

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

Main et al. (2006) reported that a study of 68 cryptorchidism cases and 62 controls observed no association between cryptorchidism and metabolites of DMP, DEP, DBP, BBzP, DEHP, and DiNP in breast milk, however, no consistent associations between prenatal phthalates exposure and cryptorchidism or hypospadias [9]. Chevalier et al. (2015) reported that concentrations of MBP from breast milk sample 3-5 day after delivery were not significantly increased in the cryptorchidism case versus control group although a trend for increased MBP was observed in a prospective case – control study of 52 cryptorchidism and 128 control [10]. Moreover, a nested in the EDEN and PELAGIE mother–child cohorts study has been reported inverse associations with maternal urinary phthalate metabolites [13]. Important limitations to these inconsistent interpretations are variations in the case definition, the analytical matrices, and the timing of exposure assessment. Jensen et al. (2015) measured phthalate levels in amniotic fluid from pregnant women who aged more than 35 years old or having high risk of pregnancy [8]. Therefore, study population in this previous study might differ from our population. Main et al. (2006) and Chevalier et al. (2015) measured phthalate levels from breast milk after their delivery [9, 10]. Considering the important time window of fetal masculinization, exposure assessments should be during the

first half of pregnancy. The findings from previous studies are still unclear, therefore, continuous investigations are needed.

Animal studies supported that prenatal phthalates exposure alter Leydig cell differentiation and function and thus diminish fetal testosterone production and showed cryptorchidism and reduced anogenital distance [3-7]. The exogenous administration of oestrogens during pregnancy results in increased incidence of cryptorchidism were supported by animal studies (Toppari et al., 1996). In this study, we did not investigate the associations between prenatal exposure to phthalates and hormone levels. We could not confirm the inverse relation between prenatal phthalates exposure and cryptorchidism. In contrast, we observed an unexpected decrease in the risk of cryptorchidism with increased concentrations of maternal phthalate metabolites, for which we have no clear explanation. Therefore, for further study, the associations with hormones such as testosterone, androstendione, and insulin-like factor-3 which is produced by fetal Leydig cells and acts on the gubernaculum of the testis which plays a key role in guiding the testis during its phase of transabdominal descent should be investigated in this study.

The limitations of this study need to be considered. In this study, we used serum for measurements of phthalate metabolites instead of urine. The disadvantage of using blood sample instead of urine, such as conversion from diester to monoester after blood sampling, have been considered [14, 15]. To avoid this conversion, we stored blood samples at -80 immediately and added acid to inhibit enzyme activity after defrosting samples. The use of a single

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

measure to classify exposure levels of phthalate exposure assessments is also one of our limitations. Since phthalates are known as short half-life compounds, exposure levels of phthalates might be varied during pregnancy. Repeated measurements are much appropriate. However, we collected blood samples from first trimester of pregnancy, therefore, our time window of exposure assessment is suitable. The definition of cryptorchidism was based on birth records and the self-reported (mother) questionnaires, therefore some misclassifications might be happened. However, we collected most of cryptorchidism cases from birth records, which are diagnosed by medical doctors. Therefore, we think the misclassifications are held to a minimum. Moreover, cryptorchidism cases appeared in this study might have been not enough to fill the statistical power to analyze the risk of prenatal exposure to phthalates on cryptorchidism, although we selected all cryptorchidism cases from large birth cohort, the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Small sample size could be a possible reason for not observing association between prenatal phthalates exposure and cryptorchidism.

E . 結論

In conclusion, prenatal exposure to phthalates did not show adverse effects on cryptorchidism. This was the first study of investigating prenatal phthalates exposure and cryptorchidism in Japanese population. Previous studies also have been reported negative effects of prenatal phthalates exposure on cryptorchidism, continuous investigation is needed as further studies.

F . 研究発表

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

該当なし

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

1. Gray, T.J., et al., *Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters*. Toxicol Lett, 1982. **11**(1-2): p. 141-7.
2. Martino-Andrade, A.J. and I. Chahoud, *Reproductive toxicity of phthalate esters*. Molecular Nutrition & Food Research, 2010. **54**(1): p. 148-157.
3. Gray, L.E., et al., *Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat*. Toxicology and Industrial Health, 1999. **15**(1-2): p. 94-118.
4. Gray, L.E., et al., *Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat*. Toxicological Sciences, 2000. **58**(2): p. 350-365.
5. Mylchreest, E., R.C. Cattley, and P.M.D. Foster, *Male reproductive tract malformations in rats following*

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 and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: An antiandrogenic mechanism?* Toxicological Sciences, 1998. **43**(1): p. 47-60.
6. Mylchreest, E., et al., *Disruption of androgen-regulated male reproductive development by Di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1999. **156**(2): p. 81-95.
 7. Kurahashi, N., et al., *The effects of subacute inhalation of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the testes of prepubertal Wistar rats*. Journal of Occupational Health, 2005. **47**(5): p. 437-444.
 8. Jensen, M.S., et al., *Amniotic fluid phthalate levels and male fetal gonad function*. Epidemiology, 2015. **26**(1): p. 91-9.
 9. Main, K.M., et al., *Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age*. Environmental Health Perspectives, 2006. **114**(2): p. 270-6.
 10. Chevalier, N., et al., *A negative correlation between insulin-like peptide 3 and bisphenol A in human cord blood suggests an effect of endocrine disruptors on testicular descent during fetal development*. Hum Reprod, 2015. **30**(2): p. 447-53.
 11. Kishi, R., 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**(6): p. 429-50.
 12. Kishi, R., et al., *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**(10): p. 1038-45.
 13. Chevrier, C., et al., *Maternal urinary phthalates and phenols and male genital anomalies*. Epidemiology, 2012. **23**(2): p. 353-6.
 14. Kato, K., et al., *Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate*. Environmental Health Perspectives, 2004. **112**(3): p. 327-30.
 15. Silva, M.J., et al., *Urinary and serum metabolites of di-n-pentyl phthalate in rats*. Chemosphere, 2011. **82**(3): p. 431-6.

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 mothers and infants

		total		case		control		p value
		n	%	n	%	n	%	
Maternal education	≤12 yr	90	44.1	30	44.1	60	44.1	1.000
	>12yr	114	55.9	38	55.9	76	55.9	
Household income (million yen/year)	< 4	120	67.0	36	62.1	84	69.4	0.330
	≥ 5	59	33.0	22	37.9	37	30.6	
Alcohol intake during early pregnancy		27	13.0	9	13.0	18	13.0	1.000
Smoking during early pregnancy		22	10.6	10	14.5	12	8.7	0.202
Prity	< 1	95	45.9	32	46.4	63	45.7	0.921
	≥ 2	112	54.1	37	53.6	75	54.3	
Maternal age at deliver	Mean±SD	30.8	4.9	31.6	4.3	30.5	5.1	0.129
Gestational week	Mean±SD	38.6	1.6	38.4	1.8	38.6	1.6	0.277
BMI before pregnancy	Mean±SD	21.2	3.6	21.8	4.3	21.2	3.2	0.282
Birth weight (g)	Mean±SD	3075	443.4	3006.7	452.5	3108.7	436.5	0.121
X2 test or t-test								

Table 2. Distributions of phthalate metabolites

	MDL	<MDL (%)	Min	25%	Median	75%	Max
MnBP	0.57	100	2.7	19.75	41	67.25	150
MiBP	0.44	99	0.22	3.4	5.3	8.13	19
MBzP	0.19	2.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.7
MEHP	0.23	98.5	<LOD	0.7	1.2	6.75	72
MEHHP	0.23	5.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.9
MECPP	0.11	86.4	<LOD	0.16	0.26	0.37	1.4
cx-MiNP	0.12	0.97	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.13
BPA			0.012	0.14	1.1	4.9	30

MDL: method of detection limits

Table 3. Comparisons of phthalate metabolites

		median	(25th - 75th)	p value
MnBP	Case	39.00	(20 - 56.0)	0.363
	Control	41.00	(18.5 - 7.00)	
MiBP	Case	5.30	(3.0 - 8.2)	0.581
	Control	5.30	(3.65 - 8.15)	
MEHP	Case	1.30	(0.68 - 9.1)	0.566
	Control	1.20	(0.7 - 6.4)	
MECPP	Case	0.21	(0.13 - 0.33)	0.011
	Control	0.28	(0.19 - 0.42)	
BPA	Case	0.99	(0.14 - 4.75)	0.637
	Control	1.20	(0.14 - 4.9)	

Mann-Whitney U-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. The Cox regression analysis of the associations between prenatal exposure to phthalates on cryptorchidism

		OR	95% CI		p value
MnBP	Crude	0.64	0.37	1.10	0.106
MnBP	Adjusted	0.64	0.34	1.20	0.164
MiBP	Crude	0.64	0.37	1.10	0.104
MiBP	Adjusted	0.63	0.34	1.15	0.133
MEHP	Crude	1.13	0.77	1.67	0.540
MEHP	Adjusted	1.18	0.78	1.79	0.435
MECPP	Crude	0.64	0.40	1.03	0.068
MECPP	Adjusted	0.60	0.35	1.03	0.065
BPA	Crude	0.85	0.60	1.19	0.338
BPA	Adjusted	0.87	0.60	1.26	0.459

All phthalate metabolites were Ln-transformed.

Adjusted for birth weight, maternal age at delivery, parity, gestational week, maternal education, smoking during early pregnancy, alcohol intake during early pregnancy, and maternal BMI before pregnancy

ダイオキシン類の胎児期曝露による3歳半および7歳児のアレルギー・感染症 への影響：北海道スタディ

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 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 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 特任准教授

研究要旨

ダイオキシン類は難分解で蓄積性があり，ダイオキシン類の胎児期曝露により海外の疫学研究では免疫機能への抑制作用が報告された。しかし，幼児期以降のアレルギー・感染症に与える影響について研究はわずかである。本研究は胎児期のダイオキシン類曝露が生後の免疫機能に与える影響を検討することを目的に，母体血中ダイオキシン類濃度と生後3.5歳，7歳のアレルギー・感染症との関連を検討した。【方法】2002-5年に札幌市の一産院で妊婦514名をリクルートし，426名の母体血中のダイオキシン類（HRGC/HRMS）を測定し（福岡県保健環境研究所），喘鳴およびアトピー性皮膚炎はISAAC調査票で評価した。母体血中ダイオキシン類濃度と生後3.5歳，7歳のアレルギー有訴との関連を交絡要因で調整したロジスティック回帰分析で検討した。【結果】3.5歳の323名では母体血中ダイオキシン類濃度とアトピー性皮膚炎・喘息リスクとは関連はなかった。7歳の252名では，母体血中ダイオキシン類濃度が増加するほど喘息リスクが有意に増加した（OR (95CI) = 5.87 (1.18-29.3)）。【考察】7歳の小児期は免疫機能が発達しアレルギー症状の診断が明確になる時期であり，3.5歳の幼児期には明確でなかったダイオキシン類による影響が観察されやすくなった可能性が考えられた。

研究協力者

小林 澄貴

（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

A．研究目的

日本ならびに諸外国で，アレルギー疾患は有病率が増加すると共に発症の低年齢化が進んでおり，その要因として遺伝的要因の他に環境要因の急激な変化が関与している可能性が示唆されている（Eder et al., 2006; 学校保健統計調査）。

動物実験や高濃度に曝露される中毒事故などの研究で，PCBs・ダイオキシン類は胸腺萎縮や細胞性および体液性免

疫異常，およびウイルス感染に対する宿主抵抗性や抗体産生能の抑制することが示されている（Smialowicz et al., 2008）。PCBs・ダイオキシン類を含む内分泌かく乱物質への胎児期から出生後早期の曝露は，免疫応答に關与するTh1系細胞の抑制およびTh2系細胞を刺激し，免疫機能を炎症サイトカインや特異的IgE抗体を産生するTh2バランスに傾けることにより成長後のアレルギー疾患リスクを増加させる可能性が示唆されている（Diamanti-Kandarakis et al., 2009）。しかし，PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露が出生後の児のアレルギー・感染症発症リスクに与える影響は明

確になっていない。

本研究は胎児期のダイオキシン類曝露が生後の免疫機能に与える影響を検討することを目的に、母体血中ダイオキシン類濃度と生後 3.5 歳、7 歳のアレルギー・感染症との関連を検討した。

B．研究方法

2002-2005 年に札幌市の一産院を受診した妊婦 514 名とその児を対象とした。出産時情報として医療記録から母親の年齢、非妊娠時体重、身長、出産歴、児の出生体重・身長についての情報を得た。生後 3 歳半および 7 歳の追跡調査票から受動喫煙、母乳期間、感染症発症などの情報を収集した。さらに国際的に使用され、先行研究と調査結果が比較可能である ISSAC 質問票（The International Study of Asthma and Allergies in Childhood）を用いて生後 3 歳半および 7 歳の食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、喘息の発症リスクを検討した。曝露評価は妊娠中期から後期に採血した母体血を用いて、426 名の PCBs・ダイオキシン類濃度を高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マススペクトロメトリー法(HRGC/HRMS)により一斉分析を行った(福岡県保健環境研究所)(Todaka et al. 2003)。

母体血中ダイオキシン類濃度（常用対数）と生後 3 歳半および 7 歳のアレルギー・感染症の発症リスクとの関連を、母のアレルギー歴（なし、あり）、教育レベル（12 年未満、以上）、出産歴、児の性別（なし、あり）、児の母乳栄養期間（4 カ月未満、以上）、児の受動喫煙（なし、あり）、集団保育（なし、あり: 3.5 歳のみ）、および採血時期で調整したロジスティック回帰分析で検討した。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とし、統計解析は The Statistical Package for Social Science（SPSS）for Windows version

19.0J（日本語版 SPSS, Inc., Chicago, USA）を用いた。

（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

本研究の対象者の属性を表 1 に示す。3.5 歳の解析対象集団において母親の出産時年齢は 31.0 ± 4.4 （平均値 \pm SD）、非妊娠時 BMI 21.2 ± 3.2 （平均値 \pm SD）、経産婦 49.7%、児の性別の割合は男児 51.1%であった。7 歳の解析対象集団において母親の出産時年齢は 31.3 ± 4.4 （平均値 \pm SD）、非妊娠時 BMI 21.1 ± 3.3 （平均値 \pm SD）、経産婦 51.0%、児の性別の割合は男児 49.2%であった。交絡要因を調整したロジスティック回帰分析において、3.5 歳の 323 名では母体血中ダイオキシン類濃度とアトピー性皮膚炎・喘息リスクとは関連はなかった。7 歳の 252 名では、母体血中ダイオキシン類濃度が増加するほど喘息リスク (OR(95CI)=5.87 (1.18-29.3))、および水痘リスク (OR(95CI)= 4.69 (1.13, 19.51)) が有意に増加した。男女別に分けるとダイオキシン類の胎児期曝露により男児で喘息リスク増加の傾向 (OR(95CI)=8.98 (0.90, 89.54))、女児で有意な水痘リスクの増加 (OR(95CI)= 18.88 (2.04, 174.85)) が認められた。

D．考察

本研究の母体血中ダイオキシン類の

濃度は中央値で 15 pg/g lipid であった。3.5 歳の 323 名では母体血中ダイオキシン類濃度とアトピー性皮膚炎・喘息リスクとは関連はなかった。7 歳の 252 名では、母体血中ダイオキシン類濃度が増加するほど喘息リスクが有意に増加した。

先行研究で、オランダの 207 名 3.5 歳の小児において、非ダイオキシン類 PCB の胎児期曝露は喘息様症状のリスク低下、出生後の曝露は再発性中耳炎および水痘リスクの増加およびアレルギー反応低下と関連した(Weisglas-Kuperus et al. 2000)。さらに 167 名就学前の追跡調査では胎児期の PCB 曝露はアレルギー症状頻度の低下と関連した(Weisglas-Kuperus et al. 2004)。別のオランダの研究で 8 歳 27 名について、出生前後の PCDDs/PCDFs はアレルギーリスク低下と関連した(ten Tusscher et al. 2003)。日本の 17-76 歳 2264 名を対象にした横断研究では血中ダイオキシン類濃度はアトピー性皮膚炎の既往歴リスク低下と有意に関連した(Nakamoto et al. 2013)。本研究と同じ北海道スタディの対象者においては、ダイオキシン類の胎児期曝露により生後 18 か月の感染症リスクを増加させることを報告しており(Miyashita et al. 2011)、胎児期の PCB ダイオキシン類曝露は Th1/Th2 バランスに影響し、感染症リスクを高めて免疫応答が Th1 バランスへシフトすることによりアレルギーリスク低下が認められる可能性が報告されている。しかし、出生後の乳幼児期にみられた影響が継続するかこれまでの先行研究では一貫した結果は得られていなかった。

本研究では 7 歳で喘息リスクの増加が認められ、18 か月で報告した感染症への影響は明確でなかった。7 歳の小児期は免疫機能が発達しアレルギー症状の診断が明確になる時期であり、3.5 歳の幼児期には明確でなかったダイオキシン

類による影響が観察されやすくなった可能性が考えられた。

ダイオキシン類の胎児期曝露が 20 歳の呼吸機能に影響すると報告があり(Hansen et al. 2016)、今後も追跡調査する必要がある。

E . 結論

ダイオキシン類の胎児期曝露は生後 7 歳の喘息リスク増加と関連した。成人期のアレルギー症状に移行する可能性が高くなる学童期以降も追跡調査し、さらなる検討が必要である。

F . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 宮下 ちひろ、荒木 敦子、伊藤佐智子、湊屋街子、小林澄貴、アイツバマイ ゆふ、梶原淳睦 戸高尊、岸 玲子: ダイオキシン類の胎児期曝露による児のアレルギーへの影響: 北海道スタディ. 第 87 回日本衛生学会. 宮崎市. (2017.3. 27.)

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

参考文献

- 1) 環境省.平成 16 年度モニタリング調査結果.平成 17 年度(2005 年度)化学物質と環境 2006.
- 2) Eder W, Ege MJ, von Mutius E. 2006. The asthma epidemic. N

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

- Engl J Med 355:2226-2235.
- 3) Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocr Rev* 30:293-342.
 - 4) Hansen S, Strom M, Olsen SF, Dahl R, Hoffmann HJ, Granstrom C, et al. 2016. Prenatal exposure to persistent organic pollutants and offspring allergic sensitization and lung function at 20 years of age. *Clin Exp Allergy* 46:329-336.
 - 5) Miyashita C, Sasaki S, Saijo Y, Washino N, Okada E, Kobayashi S, et al. 2011. Effects of prenatal exposure to dioxin-like compounds on allergies and infections during infancy. *Environmental research* 111:551-558.
 - 6) Nakamoto M, Arisawa K, Uemura H, Katsuura S, Takami H, Sawachika F, et al. 2013. Association between blood levels of pcdds/pcdfs/dioxin-like pcbs and history of allergic and other diseases in the japanese population. *Int Arch Occ Env Hea* 86:849-859.
 - 7) Smialowicz RJ, DeVito MJ, Williams WC, Birnbaum LS. 2008. Relative potency based on hepatic enzyme induction predicts immunosuppressive effects of a mixture of pcdds/pcdfs and pcbs. *Toxicol Appl Pharmacol* 227:477-484.
 - 8) ten Tusscher GW, Steerenberg PA, van Loveren H, Vos JG, von dem Borne AE, Westra M, et al. 2003. Persistent hematologic and immunologic disturbances in 8-year-old dutch children associated with perinatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect* 111:1519-1523.
 - 9) Todaka T, Hirakawa H, Tobiihi K, Iida T. 2003. New protocol of dioxins analysis in human blood. *Fukuoka Igaku Zasshi* 94:148-157.
 - 10) Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, et al. 2006. The 2005 world health organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 93:223-241.
 - 11) Weisglas-Kuperus N, Patandin S, Berbers GA, Sas TC, Mulder PG, Sauer PJ, et al. 2000. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in dutch preschool children. *Environ Health Perspect* 108:1203-1207.
 - 12) Weisglas-Kuperus N, Vreugdenhil HJ, Mulder PG. 2004. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in dutch school children. *Toxicol Lett* 149:281-285.

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 subjects

		3.5 years of age		7 years of age	
		No. (%)	Mean \pm SD	No. (%)	Mean \pm SD
Mother					
Age at delivery (years)		327	31.0 \pm 4.4	264	31.3 \pm 4.4
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		327	21.2 \pm 3.2	264	21.1 \pm 3.0
Parity	≥ 1	162 (49.7)		134 (51.0)	
Educational level	>12 years	200 (61.2)		173 (65.5)	
Tobacco smoking during pregnancy	Yes	38 (11.6)		28 (10.6)	
Alcohol consumption during pregnancy	Yes	99 (30.3)		84 (31.8)	
Allergic history	Yes	93 (28.4)		80 (30.3)	
Blood sampling period	<28 weeks	20 (6.1)		17 (6.4)	
	28 to <36 weeks	146 (44.6)		119 (45.1)	
	≥ 36 weeks	67 (20.5)		52 (19.7)	
	After delivery	94 (28.7)		76 (28.8)	
Father					
Allergic history	Yes	61 (18.7)		49 (18.6)	
Living environment					
Environmental tobacco exposure	Yes	189 (57.8)		131 (49.6)	
Keeping pets	Yes	52 (15.9)		44 (16.7)	
Distance to highway from home	≥ 100 m			144 (54.8)	
Annual household income during pregnancy	>5 million yen	115 (35.2)		103 (39.0)	
Child					
Gender	Male	167 (51.1)		130 (49.2)	
Duration of breast-feeding	≥ 4 months	272 (84.0)		213 (84.2)	
Day care attendance	Yes	174 (53.2)			
Outcomes of child					
Allergy	Yes	136 (41.6)		148 (56.1)	
Food allergy	Yes	72 (22.0)		58 (22.0)	
Eczema	Yes	69 (21.1)		81 (30.7)	
Asthma	Yes	42 (12.8)		89 (33.7)	
Infections	Yes	219 (67.0)		204 (77.3)	
Otitis media	Yes	136 (41.6)		115 (43.6)	
Respiratory infection	Yes	66 (20.2)		48 (18.2)	
RSV infection	Yes	10 (3.1)		8 (3.0)	
Chicken pox	Yes	98 (30.0)		147 (55.7)	

BMI; body mass index

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 total 29 dioxin like- compounds in maternal blood (TEQ pg/g lipid)

	3.5 years of age (n=327)	7 years of age (n=264)
	Median (Min, Max)	Median (Min, Max)
All	14.2 (3.35, 43.4)	15.0 (4.19, 42.9)
Boy	14.2 (4.19, 42.9)	14.5 (4.19, 42.9)
Girl	14.2 (3.35, 43.4)	15.2 (4.28, 36.6)

TEQs were calculated using toxic equivalency factor values (Van den Berg et al. 2006). TEQ, toxic equivalent

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 Odds ratio (95% CI) between dioxins concentrations and allergy risk

	All		Boy		Girl	
	Adjusted		Adjusted		Adjusted	
	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
3.5 years of age						
allergy	0.66 (0.18, 2.36)	0.520	0.72 (0.11, 4.51)	0.725	0.58 (0.09, 3.77)	0.570
food allergy	1.29 (0.29, 5.80)	0.743	2.83 (0.33, 24.38)	0.343	0.42 (0.04, 4.05)	0.457
eczema	0.83 (0.18, 3.76)	0.807	0.32 (0.03, 3.03)	0.319	2.62 (0.28, 24.52)	0.400
asthma	0.69 (0.10, 4.58)	0.698	0.10 (0.01, 1.89)	0.124	3.80 (0.20, 71.35)	0.372
7 years of age						
allergy	1.98 (0.48, 8.20)	0.348	2.67 (0.35, 20.24)	0.343	1.05 (0.13, 8.64)	0.965
food allergy	1.53 (0.28, 8.25)	0.620	3.28 (0.32, 33.97)	0.319	0.39 (0.03, 5.24)	0.477
eczema	1.19 (0.26, 5.38)	0.819	0.41 (0.05, 3.58)	0.419	5.14 (0.48, 54.86)	0.175
asthma	5.87 (1.18, 29.27)	0.031	8.98 (0.90, 89.54)	0.061	3.34 (0.29, 38.76)	0.334

Adjusted for maternal allergic history, educational level, parity, infant gender, duration of breast-feeding, environmental tobacco exposure, blood sampling

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 Odds ratio (95% CI) between dioxins concentrations and Infection risk

	All		Boy		Girl	
	Adjusted OR (95%CI)	p	Adjusted OR (95%CI)	p	Adjusted OR (95%CI)	p
3.5 years of age						
Infections	0.96 (0.25, 3.71)	0.958	1.70 (0.25, 11.38)	0.585	0.45 (0.06, 3.53)	0.447
Otitid media	0.51 (0.14, 1.84)	0.301	0.61 (0.09, 4.11)	0.612	0.48 (0.07, 3.07)	0.435
Respiratory infection	0.92 (0.19, 4.43)	0.916	2.81 (0.19, 41.23)	0.452	0.90 (0.11, 7.08)	0.918
RSV	1.94 (0.04, 96.78)	0.739	1.30 (0.00, 602.88)	0.932	0.88 (0.01, 108.01)	0.959
Chickenpox	1.15 (0.28, 4.81)	0.845	1.28 (0.16, 10.60)	0.816	1.19 (0.14, 9.93)	0.870
7 years of age						
Infections	4.29 (0.86, 21.47)	0.077	4.14 (0.46, 37.57)	0.206	6.12 (0.54, 69.27)	0.143
Otitid media	0.96 (0.23, 3.97)	0.953	0.98 (0.14, 6.93)	0.984	1.19 (0.13, 10.55)	0.877
Respiratory infection	0.47 (0.08, 2.70)	0.396	1.20 (0.09, 16.55)	0.890	0.17 (0.01, 2.10)	0.166
RSV	3.59 (0.06, 219.94)	0.542	0.30 (0.00, 150.78)	0.707	5.17 (0.01, 2221.97)	0.595
Chickenpox	4.69 (1.13, 19.51)	0.034	1.93 (0.28, 13.41)	0.507	18.88 (2.04, 174.85)	0.010

Adjusted for maternal educational level, parity, infant gender, duration of breast-feeding, environmental tobacco exposure, day care attendance, blood sampling

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

Association of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances with cord blood adipokines and birth size: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health

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

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

研究要旨

Perfluoroalkyl substances (PFASs) are synthetic chemicals that persist in the environment and in humans. There is a possible association between prenatal PFASs exposure and both neonate adipokines and birth size, yet epidemiological studies are very limited. The objective of this study was to examine associations of prenatal exposure to PFASs with cord blood adipokines and birth size. We conducted birth cohort study, the Hokkaido Study. In this study, 168 mother-child pairs were included. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in maternal blood were determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Cord blood adiponectin and leptin levels were measured by ELISA and RIA, respectively. Birth weight and ponderal index (PI) were obtained from birth record. The median maternal PFOS and PFOA were 5.1 and 1.4 ng/mL, respectively. The median total adiponectin and leptin levels were 19.4 μ g/mL and 6.2 ng/mL, respectively. Adjusted linear regression analyses found that PFOS level was positively associated with total adiponectin levels ($\beta=0.12$, 95% CI:0.01, 0.22), contrary was negatively associated with PI ($\beta=-2.25$, 95% CI: -4.01, -0.50). PFOA level was negatively associated with birth weight ($\beta=-197$, 95% CI: -391, -3). Leptin levels were not associated with PFASs levels. PFOS and adiponectin levels showed marginal dose-response relationship and both PFOS and PFOA and birth size showed significant dose-response relationships. Mediation analysis suggested that cord blood adiponectin was a mediator that could account for association between PFOS levels and PI. Results from this study suggested that prenatal PFASs exposure may alter cord blood adiponectin levels and may decrease birth size.

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）

A . 研究目的

Perfluoroalkyl substances (PFASs) are widely used in the industry including textile

impregnation, furnishings, non-stick housewares, and food packaging (Lau et al. 2007) and found in the environment, animals, and humans. The main exposure pathway to PFASs in human occurs orally via intake of contaminated food and water. (Fromme et al. 2009). Even though the use

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 PFOS has been diminishing globally since they were included in Annex B of the Stockholm Convention on persistent organic pollutants in 2009 (UNEP 2007), due to their bioaccumulation and presence in older products, PFOS and PFOA are still detectable in human and environmental samples (Olsen et al. 2012; Okada et al. 2013). Since PFASs can cross the placental barrier and can be transferred from mother to fetus (Inoue et al. 2004; Midasch et al. 2007), studies in prenatal exposure to PFASs and its adverse health effects on fetus are warranted.

Adiponectin and leptin are hormones produced by adipocyte and have been used as biomarkers of metabolic function. The known roles of these hormones are metabolic homeostasis and regulation (Farooqi and O'Rahilly 2014; Fiaschi et al. 2014). Child adiponectin levels at birth and birth weight have been examined in the previous studies however, were inconsistent. Volberg et al. reported no relations (Volberg et al. 2013), while the others reported positive association between cord blood adiponectin levels with birth weight (Mantzoros et al. 2009) and the association between lower adiponectin and small for gestational age (SGA) and preterm birth (Palcevaska-Kocevska et al. 2012; Yeung et al. 2015). A progressively significant negative association between adiponectin and BMI at 2, 5, and 9 years of age has been reported (Volberg et al. 2013). In adults, low adiponectin levels are the implication of obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes (DM2) (Mather and Goldberg 2014). Studies have suggested that both too high and too low leptin in fetus result in non-optimal fetal growth phenotypes that subsequently increase long term obesity risk

(Ornoy 2011). High cord blood leptin levels have been known to positively associated with birth weight (Karakosta et al., 2011), while low cord blood leptin levels have been associated with SGA (Ren and Shen 2010).

Importance of investigating adipokine levels at birth have been suggested from the studies that found cord blood leptin levels may modify child growth trajectory (Parker et al. 2011; Kaar et al. 2014; Karakosta et al. 2016). There have been reported that cord blood adiponectin levels were negatively correlated with body weight at one year, weight gain after one year and with BMI at one year (Mazaki-Tovi et al. 2011) and that cord serum adiponectin levels were significant predictors of BMI Z-score gain from birth to 3 years of age (Nakano et al. 2012). Thus alternation of cord blood adiponectin levels may cause adverse effects on early childhood growth.

Previous epidemiological studies including our group have found that reduction of birth weight in association with prenatal exposure to PFASs (Olsen et al. 2009; Washino et al. 2009; Verner et al. 2015). In addition to birth weight, our group has reported that prenatal exposure to PFASs could results in disrupting various hormones balance including reproductive, thyroid and steroid hormone of neonates. PFOS were inversely associated with testosterone/estradiol, progesterone (P4) and inhibin B among boys and with P4 and prolactin among girls (Itoh et al. 2016). PFOS, but not PFOA were inversely correlated with maternal TSH and positively associated with infant serum TSH (Kato et al. 2016). Similarly, PFOS, but not PFOA was negatively associated with glucocorticoids in cord blood (Goudarzi et al. 2017).

Animal studies have suggested that

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

developmental exposure to PFOS may contribute to lipid metabolic disorder in adulthood in rats (Lv et al. 2013). There was only one study in human that found inverse association between PFOS exposure and polyunsaturated fatty acid levels in pregnant women (Kishi et al. 2015). Developmental exposure to lower levels of PFOA induced elevated serum leptin and overweight in mid-life in female mice through increasing of fatty acid metabolism by activation of proliferator-activated receptors (PPAR)-alpha (Hines et al. 2009). However, findings from animal data may not be applicable to humans. To our knowledge, there has been only a few prospective cohort studies that examined associations between early life exposure to PFASs and metabolic function such as adipokine levels (Halldorsson et al. 2012; Fleisch et al. 2016; Ashley-Martin et al. 2017). One study found no evidence of an adverse effect of PFASs exposure on metabolic function in mid-childhood (Fleisch et al. 2016) and contrary, the other study suggested that prenatal PFOA exposure significantly associated with leptin and adiponectin levels in female at age of 20 years (Halldorsson et al. 2012). These studies only investigated postnatal adipokine levels at childhood and early adulthood, but not examined adipokine levels at birth. The recent study in Canada (MIREC Study) is the only one to examine associations between maternal PFAS concentrations and birth weight and cord blood concentrations of leptin and adiponectin (Ashley-Martin et al. 2017), which found null associations.

The fetal time period is critical window of adipocyte development and thus, exposures to PFASs during fetal period may change postnatal growth trajectory and increase the

risk of obesity and metabolic disorders later in life (Grun and Blumberg 2009; Hatch et al. 2010). Though prenatal exposure to PFASs and birth outcomes such as birth size have been studied, adipokines at birth, the metabolic related biomarkers have not been well investigated and understood.

The objectives of this study was to examine the association between prenatal exposure to PFASs and neonatal adipokines including adiponectin and leptin levels in cord blood along with birth size.

B . 研究方法

Study population and questionnaire

This prospective birth cohort study was based on the Sapporo Cohort, the Hokkaido Study on Environment and Children's Health (Kishi et al. 2011; Kishi et al. 2013). The Sapporo Cohort is an ongoing cohort study that began in 2002. Briefly, pregnant women at 23–35 weeks of gestation were recruited between July 2002 and October 2005 from the Sapporo Toho Hospital in Hokkaido, Japan. 514 women agreed to participate in the cohort study. All participants were residents in Sapporo City or surrounding areas.

The participants completed the self-administered questionnaire including baseline information such as 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. Maternal anthropometric measurement data and medical history were obtained from medical record and birth weight and length were collected from birth records. We used the following criteria to include the participants into the analyses; singleton baby born at term (37–42 weeks of gestation). Participants with no PFASs

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

measurement (n=22) or those with blood collected after delivery (n=124) were excluded since PFOS and PFOA concentrations were significantly lower in post-delivery blood samples (Goudarzi et al. 2016; Itoh et al. 2016). Finally, 168 mother-child pairs who had both PFASs and adipokine measurements were included into the statistical analyses (Fig 1). 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 Hokkaido University Center for Environment and Health Sciences. This study was conducted with the informed consent of all participants in written forms.

Maternal serum PFASs measurements

PFOS and PFOA concentrations in maternal serum were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Detailed methods for the PFOS and PFOA measurements can be found in our previous reports (Nakata et al. 2009; Kishi et al. 2015). The limit of detection (LOD) of PFOS and PFOA was 0.50 ng/mL. PFOS was detected in all samples, and for samples with PFOA below LOD, we used a value of half the LOD (0.25 ng/mL). Nine samples were below LOD for PFOA measurement.

Cord blood adipokine measurements

Total and high molecular weight (HMW) adiponectin and leptin levels in cord blood were measured. Adiponectin levels were determined by Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) using Human Adiponectin Assay kit from Sekisui Medical Co. Ltd (Tokyo, Japan). Leptin levels were determined 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. Analyses were repeated for all samples with coefficient of variation (CV) greater than 15 %. The LODs of adiponectin was 0.39 μ 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.

Statistical analyses

PFOS and PFOA levels in relation to maternal and infant characteristics were examined by Spearman's correlation test and Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test. Similarly, cord blood adipokine levels in relation to maternal and infant characteristics were examined by Spearman's correlation test and Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test. Associations of maternal PFOS and PFOA levels with cord blood adipokines and birth size were analyzed by multiple linear regression analyses. Maternal PFOS and PFOA levels did not distribute normally, thus these levels were log₁₀ transformed for linear regression analyses. Total and HMW adiponectin, leptin levels were also log₁₀ transformed. PI which was calculated as follows; $PI (kg/m^3) = \text{Birth weight (kg)} / (\text{Birth length (m)})^3$. To assess dose-response relationships, PFAS levels were categorized into tertiles and the least square means (LSMs) and lower and upper 95 % CI were calculated. P for trend was obtained from dose-response analysis.

Potential confounding variables were

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

considered based on the previous literatures (Itoh et al. 2016; Kato et al. 2016; Goudarzi et al. 2017). Medical record and questionnaires were used for obtaining data. The final linear regression model was adjusted for maternal body mass index (BMI), maternal smoking status during pregnancy, parity, maternal blood sampling period (gestational weeks in categories, 23-31, 32-34 and 35-41), infant sex, and gestational age (days).

All the analyses were conducted for boys and girls combined as well as boys and girls separately. Results were considered significant at $p < 0.05$. All analyses were conducted using SPSS Version 22.0 J (Chicago, IL, USA). Additionally, mediation analysis was performed by SPSS PROCESS, a macro implemented in SPSS (Hayes 2013) to examine indirect effect of prenatal exposure to PFASs on birth size through cord blood adipokines. The indirect effect and the bias-corrected and accelerated confidence intervals of the indirect effect were determined by bootstrapping with 5000 iterations. The effect size was determined by using percent mediation (PM) method (Preacher and Hayes 2008).

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 Hokkaido University Center for Environment and Health Sciences.

C . 研究結果

The characteristics of both mothers and infants is shown in Table 1. Among 168 participants included in this study, the median concentrations of maternal PFOS and PFOA were 5.1 ng/mL (interquartile range [IQR]:3.7-6.7 ng/mL) and 1.4 ng/mL (IQR: 0.9-2.2 ng/mL), respectively. PFOS and PFOA levels were modestly correlated (Spearman's $\rho=0.287$). Table 2 shows maternal PFOS and PFOA levels in relation to characteristics of mothers and infants. PFOS and PFOA levels were significantly higher among primiparous women. PFOS and PFOA levels were significantly lower among smokers. Caffeine intake during pregnancy was negatively correlated with PFOA levels. PFOS and PFOA levels were negatively correlated with blood sampling period (gestational weeks). The mean PFOA level was higher among boys compared to girls. PFOS level was negatively correlated with PI and PFOA level was negatively correlated with both birth weight and PI.

Concentrations of cord blood adiponectin

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 leptin are shown in Table 3. The detection rate of both adiponectin and leptin was 100%.

Table 4 shows cord blood adipokine levels in relation to characteristics of mothers and infants. None of the maternal characteristics were significantly associated with either adiponectin or leptin levels. Adiponectin and leptin levels were significantly higher in girls than in boys. Total adiponectin level was negatively correlated with gestational age, contrary positively correlated with PI. Leptin level was positively correlated with birth weight, length and PI.

Associations of maternal PFOS and PFOA levels with cord blood adiponectin and leptin levels, birth weight and PI are shown in Table 5. PFOS level was positively associated with total adiponectin level ($\beta = 0.12$; 95% confidence interval [CI]: 0.01, 0.22). Contrary, PFOS level was negatively associated with PI ($\beta = -2.25$; 95% CI: -4.01, -0.50). PFOA levels were negatively associated with birth weight ($\beta = -197$; 95% CI: -391, -3) and marginally negatively associated with PI ($\beta = -1.32$; 95% CI: -2.66, 0.02). Stratification by infant sex found that positive association between PFOS and adiponectin and negative association between PFOS and PI were more significant in boys (Table S1). PFASs and sex interaction was examined and found to be not significantly associated except PFOS and sex interaction on leptin levels ($p=0.008$) (Table S1).

We also PFASs levels into tertiles and examined the dose-response relationships between PFASs and cord blood adipokines (Figure 2 and Tables S2 and S3). The tertile analysis with adjustment showed that the highest tertile of PFOS was associated with 2.91 $\mu\text{g/mL}$ increase in

total adiponectin compared to the lowest tertile and p for trend was 0.095. Similarly, the highest tertile of PFOS was associated with 1.99 $\mu\text{g/mL}$ increase in HMW adiponectin compared to the lowest tertile and p for trend was 0.072. The highest tertile of PFOS was associated with 1.16 kg/m^3 decrease in PI compared to the lowest tertile and p for trend was significant ($P_{\text{trend}} = 0.003$). The PFOA level was associated with decreased birth weight and PI with clear dose-response relationships. P for trend for birth weight was 0.021 and for PI was 0.002, respectively.

D . 考察

We have previously reported that decreased birth weight among girls in association with in utero exposure to PFOS with significance in this population (Washino et al. 2009). Similarly, our previous report of both PFOS and PFOA levels and PI were inversely associated (Kobayashi et al. 2016). Our results provided a new evidence of association between relatively lower levels of prenatal PFASs exposure and neonatal birth size and cord adipokines. In addition to our previous findings of inverse association between PFOS exposure and polyunsaturated fatty acids levels of mothers (Kishi et al. 2015), this study suggested PFOS exposure may associate with disruption of fetal metabolic function.

Median concentrations of maternal PFOS and PFOA in this study were 5.1 and 1.4 ng/mL , respectively, which were comparable to the recent report from Canada (PFOS: 4.6, PFOA: 1.7 ng/mL) (Ashley-Martin et al. 2017), however, lower than previous reports from Korea (PFOS: 9.3, PFOA: 2.6 ng/mL) (Lee et al. 2013)., the United States (PFOS: 8.2, PFOA: 2.9 ng/mL) (Stein et al. 2012), Denmark (PFOS: 21.5, PFOA: 3.7 ng/mL)

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

(Halldorsson et al. 2012), Norway (PFOS: 13, PFOA: 2.2 ng/mL) (Starling et al. 2014). Adiponectin and leptin levels in this study were comparable to those from Japanese study (Nakano et al. 2012) and other studies in Asian countries (Chou et al. 2011; Kim et al. 2016). Contrary, cord blood adiponectin in our study showed lower level compared to the previous studies from North America and Europe (Brynhildsen et al. 2013; Lagiou et al. 2013; Luo et al. 2013; Ashley-Martin et al. 2017). Similarly, compared to Canadian study, leptin level in our study was lower. (Ashley-Martin et al. 2014; Ashley-Martin et al. 2017). Relatively lower levels of adiponectin and leptin in our study was consistent with previously reported observations that showed differences in these adipokine levels among ethnicities (Mente et al. 2010; West et al. 2014).

Two of the previous birth cohort studies (Halldorsson et al. 2012; Fleisch et al. 2016) only examined associations between maternal levels of PFASs and adipokine levels of mid-childhood and early adulthood, however, there were lacking information at birth. Besides exposure levels were relatively high in those two studies whereas our study could assess relatively lower level exposures to PFASs on metabolic related outcomes. The recent Canadian birth cohort study found overall null associations between maternal PFAS levels and cord blood adiponectin and leptin and birth weight z score (Ashley-Martin et al. 2017). The maternal PFAS levels in their study were similar to ours and our findings partially agreed to their results. Regression coefficients in our study were also comparable to their results and both of the studies found no association between maternal PFOS and PFOA levels and cord

blood leptin levels.

The mediation analysis found a significant indirect effect of maternal PFOS levels on PI through cord blood total adiponectin levels (Figure 3). The results showed that cord blood adiponectin as a mediator could account for ~27% of the total effect (PM=0.27). Cross-sectional studies reported a negative association between cord blood PFOS levels and PI (Apelberg et al. 2007) and an inverse relationship between neonatal adiponectin levels and PI (Mantzoros et al. 2004). Our study added the evidence that prenatal exposure to PFOS were associated with both increased cord blood adiponectin levels and reduced PI. Result from the mediation analysis suggested that mediatory effect of cord blood adiponectin may partially be responsible for the observed relationship between prenatal exposure to PFOS and PI. However, the result should be cautiously interpreted. There are possibilities that other unmeasured factors including other types of adipokines and hormones that are responsible for fetal growth can account for our result. Observed null association between maternal PFOA and cord blood adipokine levels indicated that prenatal PFOA exposure's adverse effects on birth size was not likely to occur through adiposity-related pathways.

The mechanisms behind observed association between prenatal PFOS exposures and cord blood adiponectin levels are not fully understood. Mutual adjustment to see whether PFOS and PFOA have additive effects on outcomes was performed, however, the regression coefficient did not change. The possible pathway could be interaction of PFASs with PPAR-alpha, which were involved in lipid metabolism in adipocytes (Takacs and Abbott 2007; Hines

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. 2009). Yet, why only PFOS showed inverse association with adiponectin levels remain unclear. PFOA can pass placenta more efficient than PFOS (Gutzkow et al. 2012) may explain our observed association between PFOA and reduced birth weight and PI.

Accumulating evidences from epidemiological studies indicated that reduced birth size was a risk factor for a range of metabolic problems including high adult BMI, insulin resistance, increased visceral adiposity, and impaired glucose tolerance (Calkins and Devaskar 2011). Thus our finding of reduced birth size in association with prenatal exposure to PFASs may also be responsible for adverse metabolic outcomes in later life. Continuous follow-up of cohort participants is required to determine whether altered adipokine levels at birth persist and reduced birth size relates to metabolic dysfunction.

The limitations of this study should be considered. The participants included into the statistical analyses were limited to those who with available prenatal PFASs exposure and cord blood adipokines measurements (n=168), which may have led to potential selection bias. We should note that cord blood samples for adipokine measurements were available only from those who had vaginal delivery. Compared to the whole population, participants included in this study showed higher prevalence of primipara, higher rate of smoking during pregnancy, lower family income (< 5million yen/year) and longer gestational age (Table S4). However, maternal age, pre-pregnancy BMI, alcohol intake during pregnancy and maternal education of participants in this study are similar to those in the whole population. In the statistical analysis,

variables differed between this study population and the whole population were adjusted, thus potential influence of these variables were considered to be null. Although the number of participants were limited, we included only those who had blood samples during pregnancy for PFASs exposure measurements, which enabled accurate reflection of prenatal exposures. There might be a possibility of the influence of unmeasured co-exposures and confounders.

Recently, our group has reported that maternal MEHP levels were associated with alternation of adiponectin and leptin levels in cord blood in sex-specific manner (Minatoya et al. 2017). Cord blood adipokine levels can be investigated in association with these environmental chemical exposures in our future work. As a strength of prospective birth cohort study, we have longitudinal follow-up data including childhood anthropometric measurements and metabolic related health outcomes at different ages. The follow-up data together with exposure assessment and cord blood adipokines and birth size can be used for further investigation of associations between prenatal exposures and metabolic related outcomes in later life.

E . 結論

Our findings provided some evidences of possible adverse effects of prenatal exposure to PFASs on metabolic function at birth and birth size. PFOS and adiponectin levels showed marginal dose-response relationship and both PFOS and PFOA and birth size showed significant dose-response relationships. Additionally, our result suggested mediatory effect of adiponectin on relationship between PFOS exposure and PI. Further investigation is required to

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

determine whether prenatal exposure to PFASs continue to associate with growth and metabolic related outcomes such as obesity and DM2 in later life. Additionally, potential sex-specific influence of exposure to PFASs on metabolic related outcomes should be further investigated for better understanding of mechanism behind observed findings. Future follow-up study in the Hokkaido Study will enable to explore associations between prenatal exposures and childhood growth.

F . 研究発表

1.論文発表

Machiko Minatoya, Sachiko Itoh, Chihiro Miyashita, Atsuko Araki, Seiko Sasaki, Ryu Miura, Houman Goudarzi, Yusuke Iwasaki, Reiko Kishi. Association of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances with cord blood adipokines and birth size: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Environ Res submitted.

2.学会発表

Machiko Minatoya, Sachiko Itoh, Chihiro Miyashita, Atsuko Araki, Seiko Sasaki, Yusuke Iwasaki, Reiko Kishi. Association of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances with cord blood adipokines: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. 第 87 回日本衛生学会学術総会.宮崎.2017.3.27

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

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. Environmental health perspectives 115:1670-1676.

Ashley-Martin J, Dodds L, Arbuckle TE, Ettinger AS, Shapiro GD, Fisher M, et al. 2014. A birth cohort study to investigate the association between prenatal phthalate and bisphenol a exposures and fetal markers of metabolic dysfunction. Environmental health : a global access science source 13:84.

Ashley-Martin J, Dodds L, Arbuckle TE, Bouchard MF, Fisher M, Morriset AS, et al. 2017. Maternal concentrations of perfluoroalkyl substances and fetal markers of metabolic function and birth weight: The maternal-infant research on environmental chemicals (mirec) study. American journal of epidemiology.

Brynhildsen J, Sydsjo G, Blomberg M, Claesson IM, Theodorsson E, Nystrom F, et al. 2013. Leptin and adiponectin in cord blood from children of normal weight, overweight and obese mothers. Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992) 102:620-624.

Calkins K, Devaskar SU. 2011. Fetal origins of adult disease. Current problems in pediatric and adolescent health care 41:158-176.

Chou WC, Chen JL, Lin CF, Chen YC, Shih FC, Chuang CY. 2011. 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. Environmental health : a global access science source 10:94.

Farooqi IS, O'Rahilly S. 2014. 20 years of leptin: Human disorders of leptin action. The Journal of endocrinology 223:T63-70.

Fiaschi T, Magherini F, Gamberi T, Modesti PA, Modesti A. 2014. Adiponectin as 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

- tissue regenerating hormone: More than a metabolic function. Cellular and molecular life sciences : CMLS 71:1917-1925.
- Fleisch AF, Rifas-Shiman SL, Mora AM, Calafat AM, Ye X, Luttmann-Gibson H, et al. 2016. Early life exposure to perfluoroalkyl substances and childhood metabolic function. Environmental health perspectives.
- Fromme H, Tittlemier SA, Volkel W, Wilhelm M, Twardella D. 2009. Perfluorinated compounds--exposure assessment for the general population in western countries. International journal of hygiene and environmental health 212:239-270.
- Goudarzi H, Nakajima S, Ikeno T, Sasaki S, Kobayashi S, Miyashita C, et al. 2016. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and neurodevelopment in early infancy: The hokkaido study. The Science of the total environment 541:1002-1010.
- Goudarzi H, Araki A, Itoh S, Sasaki S, Miyashita C, Mitsui T, et al. 2017. The association of prenatal exposure to perfluorinated chemicals with glucocorticoid and androgenic hormones in cord blood samples: The hokkaido study. Environmental health perspectives 125:111-118.
- Gutzkow KB, Haug LS, Thomsen C, Sabaredzovic A, Becher G, Brunborg G. 2012. Placental transfer of perfluorinated compounds is selective--a norwegian mother and child sub-cohort study. International journal of hygiene and environmental health 215:216-219.
- 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. Environmental health perspectives 120:668-673.
- Hayes AF. 2013. Introduction to mediation, moderation, and conditional process analysis: A regression-based approach. New York, NY, USA:Guilford Press.
- Hines EP, White SS, Stanko JP, Gibbs-Flournoy EA, Lau C, Fenton SE. 2009. Phenotypic dichotomy following developmental exposure to perfluorooctanoic acid (pfoa) in female cd-1 mice: Low doses induce elevated serum leptin and insulin, and overweight in mid-life. Molecular and cellular endocrinology 304:97-105.
- 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.
- Itoh S, Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Goudarzi H, Sasaki S, et al. 2016. Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the hokkaido study on environment and children's health. Environment international 94:51-59.
- Kaar JL, Brinton JT, Crume T, Hamman RF, Glueck DH, Dabelea D. 2014. Leptin levels at birth and infant growth: The epoch study. Journal of developmental origins of health and disease 5:214-218.
- Karakosta P, Roumeliotaki T, Chalkiadaki G, Sarri K, Vassilaki M, Venihaki M, et al. 2016. Cord blood leptin levels in relation to child growth trajectories. Metabolism: clinical and experimental 65:874-882.

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

- Kato S, Itoh S, Yuasa M, Baba T, Miyashita C, Sasaki S, et al. 2016. Association of perfluorinated chemical exposure in utero with maternal and infant thyroid hormone levels in the sapporo cohort of hokkaido study on the environment and children's health. *Environmental health and preventive medicine*.
- Kim JH, Park H, Lee J, Cho G, Choi S, Choi G, et al. 2016. Association of diethylhexyl phthalate with obesity-related markers and body mass change from birth to 3 months of age. *Journal of epidemiology and community health* 70:466-472.
- 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. *International journal of epidemiology* 40:611-618.
- 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. *Environmental health and preventive medicine* 18:429-450.
- 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. *Environmental health perspectives* 123:1038-1045.
- Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, et al. 2016. Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood igf2/h19 methylation and ponderal index: The hokkaido study. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*.
- Lagiou P, Hsieh CC, Samoli E, Lagiou A, Xu B, Yu GP, et al. 2013. Associations of placental weight with maternal and cord blood hormones. *Annals of epidemiology* 23:669-673.
- Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. 2007. Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 99:366-394.
- 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.
- Luo ZC, Nuyt AM, Delvin E, Fraser WD, Julien P, Audibert F, et al. 2013. Maternal and fetal leptin, adiponectin levels and associations with fetal insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring, Md)* 21:210-216.
- Lv Z, Li G, Li Y, Ying C, Chen J, Chen T, et al. 2013. Glucose and lipid homeostasis in adult rat is impaired by early-life exposure to perfluorooctane sulfonate. *Environmental toxicology* 28:532-542.
- Mantzoros C, Petridou E, Alexe DM, Skalkidou A, Dessypris N, Papatoma E, et al. 2004. Serum adiponectin concentrations in relation to maternal and perinatal characteristics in newborns. *European journal of endocrinology* 151:741-746.
- Mantzoros CS, Rifas-Shiman SL, Williams CJ, Fagnoli JL, Kelesidis T, Gillman MW. 2009. Cord blood leptin and adiponectin as predictors of adiposity in children at 3 years of age: A prospective cohort study. *Pediatrics* 123:682-689.
- Mather KJ, Goldberg RB. 2014. Clinical use of adiponectin as a marker of metabolic

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

- dysregulation. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism 28:107-117.
- Mazaki-Tovi S, Kanety H, Pariente C, Hemi R, Kuint J, Yinon Y, et al. 2011. Cord blood adiponectin and infant growth at one year. Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM 24:411-418.
- Mente A, Razak F, Blankenberg S, Vuksan V, Davis AD, Miller R, et al. 2010. Ethnic variation in adiponectin and leptin levels and their association with adiposity and insulin resistance. Diabetes care 33:1629-1634.
- Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW, Angerer J. 2007. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: A pilot study. International archives of occupational and environmental health 80:643-648.
- Minatoya M, Araki A, Miyashita C, Sasaki S, Goto Y, Nakajima T, et al. 2017. Prenatal di-2-ethylhexyl phthalate exposure and cord blood adipokine levels and birth size: The hokkaido study on environment and children's health. The Science of the total environment 579:606-611.
- Nakano Y, Itabashi K, Nagahara K, Sakurai M, Aizawa M, Dobashi K, et al. 2012. Cord serum adiponectin is positively related to postnatal body mass index gain. Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society 54:76-80.
- Nakata ASK, Iwasaki Y, Ito R, Kishi R, Nakazawa H. 2009. Determination of perfluorinated compounds in human milk and evaluation of their transition from maternal plasma. Bunseki Kagaku 58:653-659.
- 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. Environment international 60:89-96.
- Olsen GW, Butenhoff JL, Zobel LR. 2009. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: An epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. Reproductive toxicology (Elmsford, NY) 27:212-230.
- Olsen GW, Lange CC, Ellefson ME, Mair DC, Church TR, Goldberg CL, et al. 2012. Temporal trends of perfluoroalkyl concentrations in american red cross adult blood donors, 2000-2010. Environmental science & technology 46:6330-6338.
- Ornoy A. 2011. Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. Reproductive toxicology (Elmsford, NY) 32:205-212.
- Palcevaska-Kocevska S, Aluloska N, Krstevska M, Shukarova-Angelovska E, Kojik L, Zisovska E, et al. 2012. Correlation of serum adiponectin and leptin concentrations with anthropometric parameters in newborns. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo 140:595-599.
- Parker M, Rifas-Shiman SL, Belfort MB, Taveras EM, Oken E, Mantzoros C, et al. 2011. Gestational glucose tolerance and cord blood leptin levels predict slower weight gain in early infancy. The Journal of pediatrics 158:227-233.
- Preacher KJ, Hayes AF. 2008. Asymptotic and resampling strategies for assessing and comparing indirect effects in multiple mediator models. Behavior research methods 40:879-891.

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

- Ren RX, Shen Y. 2010. A meta-analysis of relationship between birth weight and cord blood leptin levels in newborns. *World journal of pediatrics* : WJP 6:311-316.
- 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.
- 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. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY) 34:312-316.
- Takacs ML, Abbott BD. 2007. Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (alpha, beta/delta, gamma) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 95:108-117.
- UNEP. 2007. Report of the persistent organic pollutants review committee on the work of its third meeting. Available: <http://chm.pops.int/TheConvention/POPsReviewCommittee/Meetings/POPRC3/POPRC3documents/tabid/77/ctl/Download/mid/11118/Default.aspx?id=162&ObjID=5393> [accessed Jan 17 2017].
- Verner MA, Loccisano AE, Morken NH, Yoon M, Wu H, McDougall R, et al. 2015. Associations of perfluoroalkyl substances (pfas) with lower birth weight: An evaluation of potential confounding by glomerular filtration rate using a physiologically based pharmacokinetic model (pbpk). *Environmental health perspectives* 123:1317-1324.
- Volberg V, Heggeseth B, Harley K, Huen K, Yousefi P, Dave V, et al. 2013. Adiponectin and leptin trajectories in mexican-american children from birth to 9 years of age. *PloS one* 8:e77964.
- 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.
- West J, Wright J, Fairley L, Sattar N, Whincup P, Lawlor DA. 2014. Do ethnic differences in cord blood leptin levels differ by birthweight category? Findings from the born in bradford cohort study. *International journal of epidemiology* 43:249-254.
- Yeung EH, McLain AC, Anderson N, Lawrence D, Boghossian NS, Druschel C, et al. 2015. Newborn adipokines and birth outcomes. *Paediatric and perinatal epidemiology* 29:317-325.

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

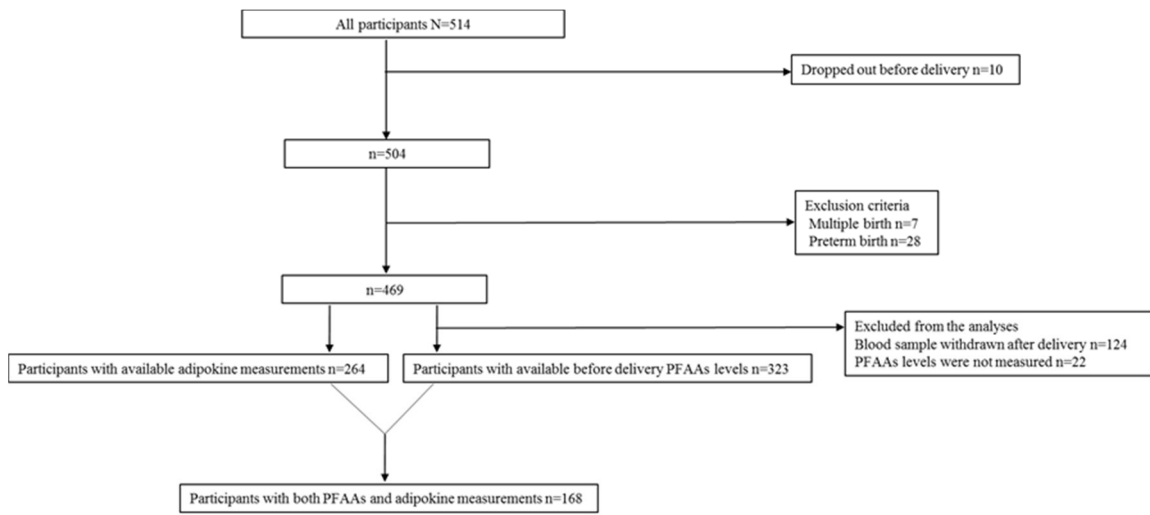
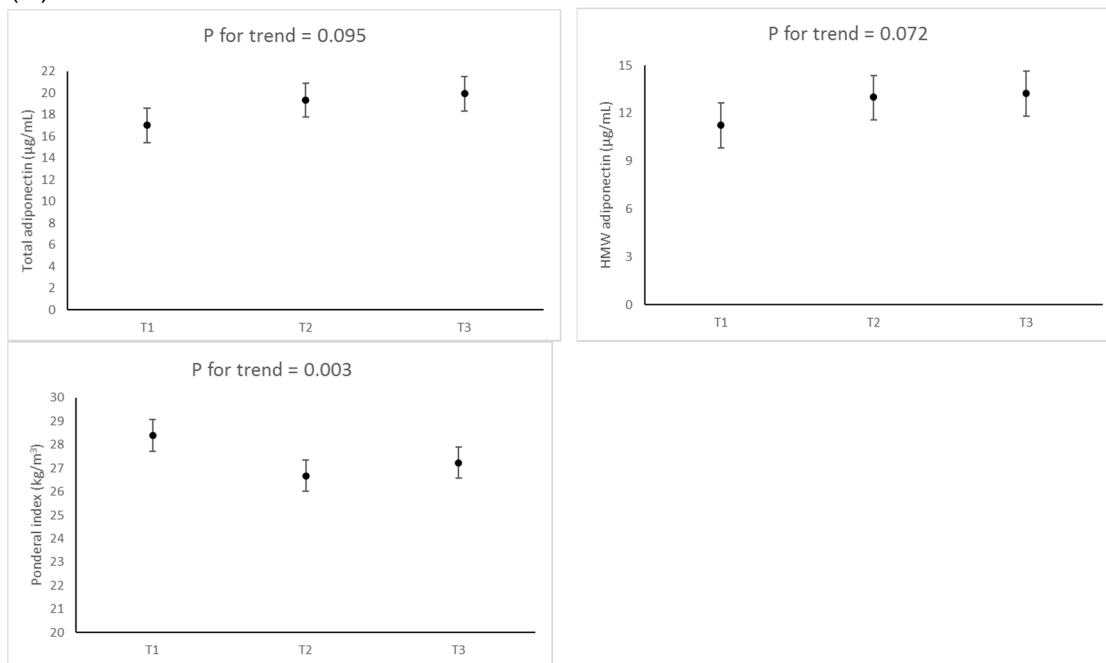


Figure 1. Flowchart of participants' selection.

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

(A) PFOS



(B) PFOA

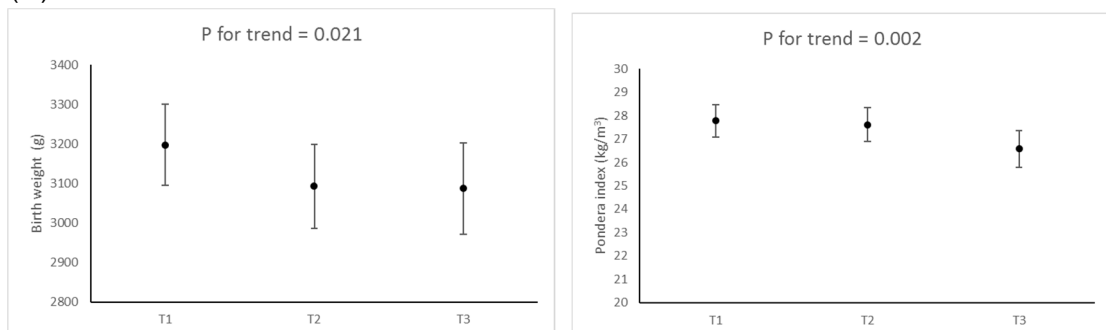


Figure 2. The dose-response relationships of PFOS (A) and PFOA (B) tertiles with adipokine levels and birth size. The LSMs were adjusted for maternal BMI, parity, smoking during pregnancy, blood sampling period, gestational age and infant sex.

PFOS; T1:1.5-4.0 ng/mL, T2: 4.1-6.2 ng/mL, T3: 6.3-14.7 ng/mL.

PFOA; T1:<LOD-1.10 ng/mL, T2: 1.20-1.80 ng/mL, T3: 1.90-5.30 ng/mL.

The error bars show the lower and upper 95% confidence intervals.

LSM: least square mean, LOD: limit of detection.

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

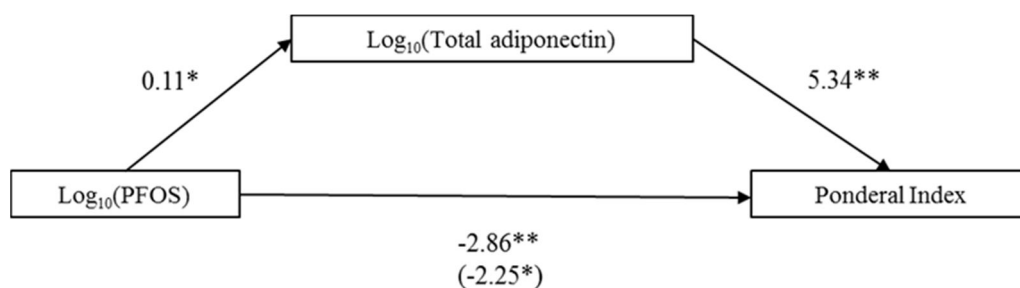


Figure 3. Mediation analysis of the association between PFOS and total adiponectin and between PFOS and PI. Regression coefficients of each path are described alongside with arrows. The total effect of PFOS on PI is described in the parentheses. A significant indirect effect of PFOS on PI through total adiponectin was observed (indirect effect=0.61; bias-corrected and accelerated confidence interval: 0.04, 1.50). The total adiponectin as a mediator can account for roughly 30% of total effect (percent mediation=0.27). Adjusted for maternal BMI, parity, smoking during pregnancy, blood sampling period, gestational age and infant sex. * $p < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

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 1 Characteristics of participants (n=168).

Characteristics		N (%) or mean \pm S.D.
Mother		
Age (years)		30.0 \pm 4.6
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		21.2 \pm 3.3
Parity	0	90 (53.6)
	1	78 (46.4)
Educational level (years)	12	76 (45.2)
	13	92 (54.8)
Family income (million yen)	5	121 (72.0)
	> 5	47 (28.0)
Smoking during pregnancy	Yes	31 (18.5)
	No	137 (81.5)
Alcohol intake during pregnancy	Yes	56 (33.3)
	No	112 (66.7)
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		139.5 \pm 127.9
Blood sampling period	23-31 weeks	64 (38.1)
	32-34 weeks	39 (23.2)
	34-41 weeks	65 (38.7)
Infant		
Sex	Boy	78 (46.4)
	Girl	90 (53.6)
Gestational age (days)		279.0 \pm 6.6
Birth weight (g)		3150 \pm 330
Birth length (cm)		48.6 \pm 1.6
Ponderal index (kg/m ³)		27.5 \pm 2.2

Table 2 Maternal PFOS and PFOA levels in relation to characteristics of participants.

Characteristics		PFOS mean \pm S.D. or correlation	p-value	PFOA mean \pm S.D. or correlation	p-value
Mother					
Age (year)		ρ =-0.048	0.534	ρ =-0.021	0.789
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		ρ =-0.105	0.177	ρ =-0.060	0.439
Parity	0	5.86 \pm 2.56	0.009	1.95 \pm 0.99	< 0.001
	1	4.90 \pm 2.34		1.24 \pm 0.79	
Educational level (years)	12	5.27 \pm 2.10	0.846	1.58 \pm 1.02	0.295
	13	5.54 \pm 2.80		1.66 \pm 0.93	
Family income (million yen)	5	5.30 \pm 2.47	0.350	1.63 \pm 1.03	0.674
	>5	5.71 \pm 2.59		1.60 \pm 0.81	
Smoking during pregnancy	Yes	4.57 \pm 2.23	0.047	1.29 \pm 0.80	0.023
	No	5.61 \pm 2.53		1.69 \pm 0.99	
Alcohol intake during pregnancy	Yes	5.37 \pm 2.43	0.968	1.62 \pm 0.85	0.819
	No	5.44 \pm 2.55		1.62 \pm 1.02	
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		ρ =-0.144	0.141	ρ =-0.183	0.018
Blood sampling period (weeks)	23-31	6.06 \pm 2.18	< 0.001	1.82 \pm 0.90	0.007
	32-34	5.85 \pm 3.08		1.61 \pm 1.14	
	35-41	4.53 \pm 2.16		1.43 \pm 0.90	
Infant					
Sex	Boys	5.85 \pm 2.63	0.054	1.77 \pm 0.90	0.013
	Girl	5.04 \pm 2.33		1.49 \pm 1.01	
Gestational age (days)		ρ =0.055	0.483	ρ =0.093	0.233
Birth weight (g)		ρ =-0.048	0.539	ρ =-0.156	0.044
Birth length (cm)		ρ =0.131	0.091	ρ =0.071	0.364
Ponderal index (kg/m ³)		ρ =-0.232	0.003	ρ =-0.259	0.001

Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test. Spearman's rho.

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 Concentration of cord blood adipokines.

		N	Median (IQR)
Total adiponectin (µg/ml)	All	168	19.4 (15.7-22.6)
	Boy	78	18.7 (14.8-21.1)
	Girl	90	20.4 (16.8-23.7)
HWM adiponectin (µg/ml)	All	168	12.9 (9.9-15.6)
	Boy	78	11.6 (9.7-14.6)
	Girl	90	13.6 (10.3-16.7)
Leptin (ng/ml)	All	165	6.2 (3.9-10.1)
	Boy	78	5.0 (3.4-6.8)
	Girl	87	8.2 (4.8-13.0)

Detection rate was 100% for all the adipokines.

Table 4 Cord blood adipokines in relation to characteristics of participants.

Characteristics		Total adiponectin mean ± S.D. or correlation	p-value	HWM adiponectin mean ± S.D. or correlation	p-value	Leptin mean ± S.D. or correlation	p-value
Mother							
Age (year)		ρ=0.005	0.954	ρ=-0.018	0.821	ρ=-0.046	0.554
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		ρ=0.119	0.125	ρ=0.113	0.143	ρ=0.153	0.050
Parity	0	20.0 ± 5.7	0.445	13.3 ± 4.6	0.642	8.3 ± 5.9	0.398
	1	19.0 ± 5.4		12.8 ± 4.6		7.2 ± 5.1	
Educational level (years)	12	20.2 ± 5.6	0.108	13.8 ± 4.8	0.052	8.6 ± 6.2	0.071
	13	19.0 ± 5.5		12.4 ± 4.3		7.1 ± 4.9	
Family income (million yen)	5	19.9 ± 5.9	0.239	13.4 ± 4.9	0.175	8.1 ± 5.7	0.246
	>5	18.5 ± 4.4		12.1 ± 3.6		7.0 ± 5.1	
Smoking during pregnancy	Yes	19.6 ± 7.0	0.920	13.3 ± 5.6	0.781	7.9 ± 6.1	0.869
	No	19.5 ± 5.2		13.0 ± 4.3		7.7 ± 5.5	
Alcohol intake during pregnancy	Yes	19.5 ± 5.5	0.946	12.9 ± 4.5	0.874	7.7 ± 5.7	0.757
	No	19.6 ± 5.6		13.1 ± 4.6		7.8 ± 5.5	
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		ρ=-0.036	0.645	ρ=-0.002	0.978	ρ=-0.037	0.638
Infant							
Sex	Boys	18.4 ± 4.5	0.017	12.1 ± 3.6	0.015	6.0 ± 4.5	<0.001
	Girl	20.5 ± 6.2		13.9 ± 5.1		9.4 ± 6.0	
Gestational age (days)		ρ=-0.157	0.042	ρ=-0.138	0.075	ρ=0.139	0.076
Birth weight (g)		ρ=0.131	0.090	ρ=0.116	0.133	ρ=0.366	<0.001
Birth length (cm)		ρ=-0.060	0.442	ρ=-0.073	0.348	ρ=0.155	0.048
Ponderal index (kg/m ³)		ρ=0.259	0.001	ρ=0.264	0.001	ρ=0.294	<0.001

Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test. Spearman's rho.

Table 5 Association of maternal PFASs levels with cord blood adipokines and birth size.

	PFOS		PFOA	
	β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value
Total adiponectin	0.12 (0.01, 0.22)	0.028	0.04 (-0.04, 0.11)	0.377
HWM adiponectin	0.12 (-0.01, 0.25)	0.075	0.03 (-0.07, 0.13)	0.575
Leptin	-0.05 (-0.27, 0.18)	0.691	0.02 (-0.15, 0.19)	0.830
Birth weight (g)	-29 (-289, 232)	0.828	-197 (-391, -3)	0.047
Ponderal index (kg/m ³)	-2.25 (-4.01, -0.50)	0.012	-1.32 (-2.66, 0.02)	0.054

Both PFASs levels and adipokine levels were log₁₀ transformed.

Adjusted for maternal BMI, parity, smoking during pregnancy, blood sampling period, gestational age and infant sex.

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 Association of maternal PFASs levels with cord blood adipokines and birth size stratified by child sex and interaction between PFASs and child sex.

PFOS	Boys		Girls	
	β (95% CI)		β (95% CI)	
Total adiponectin	0.13 (0.00, 0.26)		0.11 (-0.06, 0.27)	
HMW adiponectin	0.13 (-0.04, 0.30)		0.12 (-0.08, 0.33)	
Leptin	0.01 (-0.28, 0.30)		-0.14 (-0.49, 0.21)	
Birth weight (g)	190 (-162, 543)		-251 (-645, 143)	
Ponderal index (kg/m ³)	-2.46 (-4.74, -0.18)		-2.11 (-4.86, 0.64)	
PFOA				
Total adiponectin	0.06 (-0.13, 0.13)		0.05 (-0.05, 0.16)	
HMW adiponectin	-0.01 (-0.19, 0.16)		0.05 (-0.09, 0.18)	
Leptin	-0.14 (-0.42, 0.15)		0.08 (-0.15, 0.31)	
Birth weight (g)	-276 (-619, 67)		-169 (-419, 81)	
Ponderal index (kg/m ³)	-1.02 (-3.33, 1.29)		-1.39 (-3.13, 0.36)	

Adjusted for maternal BMI, parity, smoking during pregnancy, blood sampling period and gestational age. $P_{interaction}$ for PFOS or PFOA and child sex interaction.

Table S2 Adjusted least square means (LSM) for cord blood adipokines. and birth size by tertiles of PFASs.

PFOS	Total adiponectin			HMW adiponectin			Leptin		
	LSM	LCI	UCI	LSM	LCI	UCI	LSM	LCI	UCI
T1	17.02	15.41	18.63	11.23	9.81	12.65	7.44	5.58	9.31
T2	19.36	17.77	20.94	12.97	11.58	14.36	8.11	6.28	9.95
T3	19.93	18.34	21.53	13.22	11.81	14.62	7.09	5.22	8.97
P_{trend}	0.095			0.072			0.906		
PFOA									
T1	17.78	16.19	19.37	11.72	10.34	13.09	7.45	5.78	9.13
T2	21.24	19.60	22.89	14.67	13.24	16.09	7.89	6.15	9.63
T3	19.86	18.08	21.65	13.14	11.59	14.69	7.23	5.35	9.11
P_{trend}	0.644			0.796			0.789		

PFOS; T1:1.5-4.0 ng/mL, T2: 4.1-6.2 ng/mL, T3: 6.3-14.7 ng/mL.

PFOA; T1:<LOD-1.10 ng/mL, T2: 1.20-1.80 bg/mL, T3: 1.90-5.30 ng/mL.

Adjusted for maternal BMI, parity, smoking during pregnancy, blood sampling period, gestational age and infant sex.

LSM: least square mean, LCI: lower 95% confidence interval, UCI: upper 95% confidence interval, T: tertile, LOD: limit of detection.

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 S3 Adjusted least square means (LSM) for birth size by tertiles of PFASs.

PFOS	Birth weight			Ponderal index		
	LSM	LCI	UCI	LSM	LCI	UCI
T1	3196	3095	3298	28.39	27.71	29.06
T2	3076	2976	3176	26.68	26.02	27.34
T3	3158	3057	3258	27.23	26.57	27.90
P _{trend}	0.424			0.003		
PFOA						
T1	3197	3095	3300	27.78	27.08	28.48
T2	3092	2986	3199	27.61	26.89	28.34
T3	3087	2972	3203	26.58	25.79	27.37
P _{trend}	0.021			0.002		

PFOS; T1:1.5-4.0 ng/mL, T2: 4.1-6.2 ng/mL, T3: 6.3-14.7 ng/mL.

PFOA; T1:<LOD-1.10 ng/mL, T2: 1.20-1.80 ng/mL, T3: 1.90-5.30 ng/mL.

Adjusted for maternal BMI, parity, smoking during pregnancy, blood sampling period, gestational age and infant sex.

LOD: limit of detection.

Table S4 Comparison of basic characteristics between whole population (n=469) and participants included in this study (n=168).

Characteristics		Whole population (n=469)	Participants included in this study (n=168)
Mother		% or mean (SD)	
Age at delivery (years)		30.7 (4.9)	30.0 (4.6)
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		21.1 (3.1)	21.2 (3.3)
Parity	0	48.0%	53.6%
	1	51.8%	46.4%
Smoking during pregnancy	No	83.3%	81.5%
	Yes	16.6%	18.5%
Alcohol intake during pregnancy	No	68.0%	66.7%
	Yes	32.0%	33.3%
Education (years)	12	45.0%	45.2%
	13	55.0%	54.8%
Family income (yen)	< 5M	68.9%	72.0%
	5M	31.1%	28.0%
Infant			
Sex	Boy	46.9%	46.4%
	Girl	53.1%	53.6%
Gestational age (days)		276.7 ± 7.8	279.0 ± 6.6

有機塩素系農薬(OCP)への胎児期曝露が出生時体重に与える影響

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 特任准教授

研究要旨

高濃度の有機塩素系農薬(OCP)への胎児期曝露は出生時の体重を低下させることが指摘されている。本研究では低濃度の OCP 胎児期曝露が出生時の体重に及ぼす影響について検討する。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。死産および双胎、妊娠高血圧症候群、妊娠性糖尿病、胎児心疾患を除く 490 名のうち、OCP データがある 374 名を解析の対象とした。OCP 濃度については自然対数に変換した後、出産時年齢、妊娠日数、母の BMI、教育歴、妊娠中の喫煙、妊娠中アルコール、血液採取時期、児の性別、出生順で調整した重回帰分析を行った。また、男女で層別化して同様の解析を行った。出生時体重は妊娠日数($r = 0.50, p < 0.01$)、出生時身長($r = 0.70, p < 0.01$)、胸囲($r = 0.81, p < 0.01$)、頭囲($r = 0.59, p < 0.01$)と有意に関連した。また、男児で女児よりも重かった($t = 2.8, p < 0.05$)。重回帰分析の結果、全体では OCP と出生時体重との間に有意な関連は見られなかったが、男女で層別化して解析を行ったところ、女児でのみ Parlar26 胎児期曝露濃度との間に負の関連が認められた($\beta = -169, CI: -319 -19, p < 0.05$)。低濃度 OCP への胎児期曝露による出生体重への影響は、性別により異なる可能性が示唆された。

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, 苅木 洋一(いであ株式会社環境創造研究所)

A. 研究目的

高濃度の有機塩素系農薬(OCP)への胎児期曝露は出生時の体重を低下させることが指摘されている(Roberts, Karr, & Council

On Environmental, 2012)。特に DDE への胎児期曝露が出生体重の減少と関連したと報告した研究(Lenters et al., 2016; Lopez-Espinosa et al., 2011; Weisskopf et al., 2005)と関連がなかったとした研究は混在しており(Fenster et al., 2006; Govarts et al., 2012; Ribas-Fito et al., 2002; Sagiv, Tolbert, Altshul, & Korrnick, 2007)、結果は一貫していない。本研究に置ける有機塩素系農薬への曝露濃度は、本研

究と同一コホートの結果である Kanazawa et al. (2012)の結果から比較的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出生時体重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), ドリン(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-Heptachlorepoxide, cis-Heptachlorepoxide), 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。有機塩素系農薬については自然対数に変換した後、統計解析した。

死産および双胎、妊娠高血圧症候群、妊娠性糖尿病、胎児心疾患を除く490名のうち、OCPデータがある374名を解析の対象とした。出産時年齢、妊娠日数、母のBMI、教育歴、妊娠中の喫煙、妊娠中アルコール、血液採取時期、児の性別、出生順で調整した重回帰分析を行った後、男女で層別化して同様の解析を行った。

(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。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

母児の属性と出生体重との関連を表1に示す。出生時体重は妊娠日数($r = 0.50, p < 0.01$), 出生時身長($r = 0.70, p < 0.01$), 胸囲($r = 0.81, p < 0.01$), 頭囲($r = 0.59, p < 0.01$)と有意に関連した。また、男児で女児よりも重かった($t = 2.8, p < 0.05$)。

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 (39.5), cisNonachlor (10.0), transNonachlor (71.6), p,p'-DDD (1.5),

o,p'-DDE (1.3), p,p'-DDE (653.5), o,p'-DDT (3.5), p,p'-DDT (23.3), Dieldrin (16.5), cis-Heptachlorepoxide (26.6), HCB (101.9), γ -HCH (154.3), Mirex (6.0), Parlar26 (4.4), Parlar50 (6.5)であった。

有機塩素系農薬と出生時体重についての重回帰分析の結果を表3に示す。Crudeとmodelのいずれにおいても、有機塩素系農薬との関連性は観察されなかった。男女で層別化して同様の解析を行った結果を表4に示す。男児では有意な関連性は観察されなかったが、女児ではParlar26濃度が高い場合には有意に体重が減少していた(=)。

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用いた先行研究と一致して(Kanazawa et al., 2012), p,p'-DDEの濃度が最も高かった。この濃度はアメリカのFenster et al. (2006)の値(Median 1003.7 ng/g lipid)と比較すると低く、Govarts et al. (2012)がヨーロッパの15集団を統合した値(Median 527.9 ng/L)と比較するとほぼ同程度であった。

男女をともに解析した場合、OCPによる出生時体重への影響は観察されなかった。しかし男女で層別化した解析の結果、男児ではOCPによる有意な影響が見られなかったが、女児ではParlar26濃度が高い場合に体重の減少が見られることが示された。OCP胎児期曝露による出生体重への影響は、男女で異なっている可能性が考えられる。先行研究において、OCPによる出生体重への影響についての結果が一貫していないことの原因のひとつである可能性がある。しかしながら、男女の特徴を比較すると女児で男児よりも妊娠中の喫煙率が高かった。重回帰分析では妊娠中の喫煙による調整も行っているが、このことが影響した可能性

も考えられる。さらに本研究の限界として、解析の実施数が多いことから、女児でのParlar26による影響は偶然に有意になった可能性がある。また、OCPの濃度は互いに高い相関を示すため、他の物質の影響を排除できていない。今後は構造化方程式モデルなどの手法を用いてさらなる解析を行う必要がある。

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は女児でのみ体重を減少させる可能性が示された。

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) Fenster, L., Eskenazi, B., Anderson, M., Bradman, A., Harley, K., Hernandez, H., . . . Barr, D. B. (2006). Association of in utero organochlorine pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. *Environ Health Perspect*, 114(4), 597-602.
- 2) Govarts, E., Nieuwenhuijsen, M., Schoeters, G., Ballester, F., Bloemen, K., de Boer, M., . . . Enrieco. (2012). Birth weight and prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE): a meta-analysis within 12

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

- European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect*, 120(2), 162-170.
- 3) 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. *Sci Total Environ*, 426, 73-82.
- 4) Lenters, V., Portengen, L., Rignell-Hydbom, A., Jonsson, B. A., Lindh, C. H., Piersma, A. H., . . . Vermeulen, R. (2016). Prenatal Phthalate, Perfluoroalkyl Acid, and Organochlorine Exposures and Term Birth Weight in Three Birth Cohorts: Multi-Pollutant Models Based on Elastic Net Regression. *Environ Health Perspect*, 124(3), 365-372.
- 5) Lopez-Espinosa, M. J., Murcia, M., Iniguez, C., Vizcaino, E., Llop, S., Vioque, J., . . . Ballester, F. (2011). Prenatal exposure to organochlorine compounds and birth size. *Pediatrics*, 128(1), e127-134. doi:10.1542/peds.2010-1951
- 6) Ribas-Fito, N., Sala, M., Cardo, E., Mazon, C., De Muga, M. E., Verdu, A., . . . Sunyer, J. (2002). Association of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds with anthropometric measures at birth. *Pediatr Res*, 52(2), 163-167.
- 7) Roberts, J. R., Karr, C. J., & Council On Environmental, H. (2012). Pesticide exposure in children. *Pediatrics*, 130(6), e1765-1788.
- 8) Sagiv, S. K., Tolbert, P. E., Altshul, L. M., & Korrick, S. A. (2007). Organochlorine exposures during pregnancy and infant size at birth. *Epidemiology*, 18(1), 120-129.
- 9) Weisskopf, M. G., Anderson, H. A., Hanrahan, L. P., Kanarek, M. S., Falk, C. M., Steenport, D. M., . . . Great Lakes, C. (2005). Maternal exposure to Great Lakes sport-caught fish and dichlorodiphenyl dichloroethylene, but not polychlorinated biphenyls, is associated with reduced birth weight. *Environ Res*, 97(2), 149-162.

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 Birth weight in relation to mother and infant characteristics (n=374)

Characteristic	No.	Birth weight	
		Mean±SD	p-value
Maternal			
Age (years)	374	$r = -0.061$	0.24
Education Level (years)			
≤ 12	159	3046 ±391	0.42
> 13	215	3078 ±372	
Economic status:annual income			
< 5,000,000	255	3091 ±366	0.06
≥5,000,000	118	3010 ±404	
Worked during pregnancy			
No	333	3052 ±380	0.09
Yes	41	3160 ±370	
Smoked during pregnancy			
No	318	3064 ±392	0.98
Yes	56	3065 ±307	
BMI	372	$r = 0.076$	0.14
Alcohol intake during pregnancy			
No	260	3056 ±395	0.56
Yes	114	3082 ±344	
Blood sampling period			
During pregnancy	243	3075 ±379	0.44
After delivery	131	3044 ±382	
Infants			
Sex			
Male	174	3122 ±392	0.01
Female	200	3013 ±363	
Gestational age (days)	374	$r = .506^{**}$	0.00
Length (cm)	374	$r = .704^{**}$	0.00
Chest circumference (cm)	374	$r = .810^{**}$	0.00
Head circumference (cm)	374	$r = .591^{**}$	0.00
First-born			
Yes	192	3075 ±392	0.55
No	182	3052 ±367	

Student's t-test, Pearson's correlation coefficient 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 Levels of organochlorine pesticides (pg/g-wet) detected over 80 % of participants

	Detection Limit	Detection Rate	Percentile				Mean	SD	
			Min	25th	50th	75th			Max
oxychlordane	0.9	100	8.0	27.1	39.5	56.0	251.0	44.6	26.3
cisNonachlor	0.4	100	2.0	6.8	10.0	14.4	38.0	11.3	6.3
transNonachlor	0.5	100	13.0	49.7	71.6	108.0	514.0	85.4	57.3
p,p'-DDD	0.4	90	0.0	0.9	1.5	2.3	9.0	1.8	1.3
o,p'-DDE	0.4	85	0.0	0.8	1.3	1.8	6.0	1.4	1.0
p,p'-DDE	0.6	100	100.0	406.3	653.5	1011.6	4576.0	798.6	586.9
o,p'-DDT	0.6	98	0.0	2.3	3.5	4.9	17.0	4.0	2.5
p,p'-DDT	0.4	100	2.0	16.6	23.3	34.0	122.0	27.8	16.8
Dieldrin	0.8	100	4.0	12.1	16.5	22.6	72.0	18.7	9.7
cisHeptachlorepoxyde	0.4	100	6.0	18.9	26.6	37.3	201.0	30.7	18.9
HCB	0.9	100	35.0	80.2	101.9	130.1	245.0	107.8	38.3
HCH	0.6	100	20.0	106.2	154.3	244.2	1667.0	198.6	160.8
Mirex	0.5	100	1.0	4.1	6.0	8.3	35.0	7.0	4.6
Parlar26	1.0	97	1.0	2.9	4.4	6.7	21.0	5.3	3.4
Parlar50	2.0	96	1.0	4.4	6.5	9.7	29.0	7.6	4.8

(pg/g-wet)

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 Birth weight in relation to the organochlorine pesticides

	ALL							
	Crude				Model			
	95%CI		<i>p</i>		95%CI		<i>p</i>	
oxychlordane	-25.1	-190.9	140.7	0.77	-115.4	-261.2	30.4	0.12
cisNonachlor	-57.3	-216.4	101.8	0.48	-119.0	-256.4	18.4	0.09
transNonachlor	-35.1	-189.5	119.3	0.66	-103.8	-237.9	30.4	0.13
p,p'-DDD	17.7	-86.0	121.3	0.74	10.1	-78.1	98.3	0.82
o,p'-DDE	58.0	-48.6	164.5	0.29	0.6	-90.5	91.8	0.99
p,p'-DDE	103.8	-29.0	236.6	0.13	33.7	-82.0	149.4	0.57
o,p'-DDT	27.8	-105.5	161.2	0.68	10.3	-104.9	125.6	0.86
p,p'-DDT	22.6	-134.8	180.1	0.78	-17.9	-151.9	116.0	0.79
Dieldrin	52.3	-141.8	246.4	0.60	21.0	-153.0	195.1	0.81
cisHeptachlorepoxyde	-24.4	-194.5	145.8	0.78	-48.8	-199.4	101.8	0.52
HCB	3.7	-243.0	250.4	0.98	-156.9	-367.6	53.7	0.14
HCH	-6.0	-136.2	124.2	0.93	-78.8	-198.0	40.3	0.19
Mirex	-63.4	-220.2	93.4	0.43	-94.4	-247.9	59.2	0.23
Parlar26	-27.6	-158.1	102.9	0.68	-65.8	-178.7	47.2	0.25
Parlar50	-2.1	-139.0	134.8	0.98	-62.6	-180.4	55.3	0.30

Model: Adjusted for maternal age, annual income, working and smoking during pregnancy, maternal BMI, blood sampling period, gestational days

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 Birth weight for male and female infants in relation to the organochlorine pesticides

	Male								Female							
	Crude				Model				Crude				Model			
	95%CI		p		95%CI		p		95%CI		p		95%CI		p	
oxychlordane	-81.6	-331.9	168.7	0.52	-166.8	-385.9	52.2	0.13	9.6	-209.0	228.2	0.93	-61.8	-260.1	136.5	0.54
cisNonachlor	-68.5	-304.9	167.9	0.57	-81.1	-286.7	124.5	0.44	-47.7	-260.6	165.3	0.66	-131.1	-320.4	58.2	0.17
transNonachlor	-96.2	-327.6	135.1	0.41	-139.9	-339.9	60.1	0.17	4.8	-200.2	209.8	0.96	-59.5	-242.8	123.8	0.52
p,p'-DDD	140.2	-21.5	302.0	0.09	89.0	-48.6	226.6	0.20	-77.4	-209.1	54.3	0.25	-40.3	-156.4	75.7	0.49
o,p'-DDE	59.9	-96.0	215.8	0.45	41.5	-91.0	174.0	0.54	68.5	-76.4	213.4	0.35	-17.4	-145.9	111.0	0.79
p,p'-DDE	37.5	-171.8	246.9	0.72	57.5	-124.6	239.6	0.53	155.0	-13.5	323.5	0.07	48.7	-103.2	200.7	0.53
o,p'-DDT	32.0	-161.8	225.9	0.74	109.0	-57.3	275.2	0.20	36.9	-145.6	219.3	0.69	-35.5	-202.0	131.0	0.67
p,p'-DDT	121.0	-113.1	355.1	0.31	121.4	-79.5	322.3	0.23	-63.2	-273.1	146.7	0.55	-103.6	-287.6	80.4	0.27
Dieldrin	151.8	-130.7	434.3	0.29	169.7	-86.1	425.5	0.19	-9.4	-275.2	256.3	0.94	-123.9	-365.4	117.6	0.31
cisHeptachlorepoide	-81.0	-331.1	169.1	0.52	-92.9	-324.6	138.8	0.43	22.9	-207.1	252.8	0.84	-0.7	-206.0	204.5	0.99
HCB	-36.2	-428.7	356.2	0.86	-84.4	-421.0	252.3	0.62	30.2	-281.6	341.9	0.85	-180.0	-455.9	95.9	0.20
HCH	-77.4	-281.2	126.3	0.45	-121.6	-310.2	67.0	0.20	52.2	-114.0	218.5	0.54	-31.1	-186.6	124.4	0.69
Mirex	-0.7	-234.6	233.2	1.00	18.2	-205.2	241.6	0.87	-158.2	-367.8	51.4	0.14	-172.7	-390.8	45.4	0.12
Parlar26	61.2	-135.4	257.9	0.54	86.6	-88.1	261.3	0.33	-97.6	-269.4	74.1	0.26	-168.9	-318.9	-19.0	0.03
Parlar50	36.6	-160.2	233.4	0.71	33.1	-139.3	205.6	0.71	-37.6	-226.9	151.7	0.70	-136.7	-302.9	29.5	0.11

Model: Adjusted for maternal age, annual income, working and smoking during pregnancy, maternal BMI, blood sampling period, gestational days

Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The Hokkaido Study in Environment and Children's Health

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，客員研究員

研究要旨

Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is commonly used phthalates and concerns of adverse effects of prenatal DEHP exposure on neonatal thyroid hormone (TH) and neurodevelopment are increasing. However, there is no report regarding association between prenatal DEHP exposure and infant neurodevelopment including TH levels in Japanese population. Thus the aim of present study was to evaluate the associations between prenatal DEHP exposure and mental and psychomotor development of infants 6 and 18 months along with investigating influence on neonatal free thyroxine (FT4) and thyroid stimulating hormone (TSH) levels in the prospective birth cohort study. Maternal blood samples collected between 23-41 weeks of gestation was analyzed for mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), metabolite of DEHP levels. Neonatal FT4 and TSH were obtained from mass screening data. Infant neurodevelopment was assessed by Bayley Scale of Infant Development second edition at 6 and 18 month of age. For the final analysis, 328 participants were included.

The median levels of maternal MEHP was 10.6 ng/ml, neonatal TSH and FT4 was 2.20 μ U/ml and 2.03 ng/ml, respectively. We did not find any associations between prenatal DEHP exposure and neonatal TH levels or infant mental and psychomotor development at 6 and 18 months.

In this study, prenatal DEHP exposure did not show adverse effects on infant TH levels or mental and psychomotor development in early life stage. However, our previous study revealed negative effects of prenatal DEHP exposure on sex hormone levels, continuous investigation on neurodevelopment in later life in association with prenatal DEHP exposure is necessary.

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）

A . 研究目的

Phthalates are a group of chemicals widely used in consumer products including personal care products as well as in industry for primary plasticizers¹. Phthalate can be

inhaled through contaminated air or dust, ingested through food and dermally absorbed through care products² and detectable levels of phthalates have been reported worldwide³⁻⁵. In particular, Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) represents one of the most important plasticizers used in industry¹. DEHP is primarily metabolized to monoester,

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

Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) then further metabolized to the secondary metabolites. Adverse health effects of phthalate exposure has been a growing issue, especially in populations such as pregnant women and infants⁶ as maternal-fetal transmission to offspring have been reported^{7, 8} and as detoxifying enzymes are not fully developed in fetus.

In animal studies, prenatal DEHP exposure were associated with adverse effects on neurodevelopment and behavior in their offspring⁹. In human, certain phthalate metabolites, especially metabolites of DEHP measured in maternal urine during pregnancy have been associated with adverse infant neurodevelopment¹⁰⁻¹³. Cross-sectional studies have reported that DEHP metabolites including MEHP were significantly associated with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) symptom among school age children¹⁴, reduced intelligence quotient (IQ) in school age children in Korea¹⁵ and attention deficit disorder (ADD) symptom among children aged 6-15 years¹⁶. Some of these adverse effects on child neurodevelopment observed in previous studies were sex-specific and limited. Thus understanding impact of prenatal exposure to phthalates, especially most commonly used DEHP, is urgent.

Subtle changes in circulating levels of thyroid hormone (TH) may have permanent effect on child development¹⁷. TH is very important for fetal growth during pregnancy. Exposure to environmental chemicals including phthalates have been reported to cause thyroid disruption in experimental animals¹⁸. Several studies have indicated that phthalates may alter thyroid functions in human¹⁹⁻²¹. Especially, MEHP was inversely associated with serum free thyroxine (FT4)

and total triiodothyronine (T3) levels in a cross-sectional study of 408 men attending a U.S. infertility clinic²⁰. The same group reported significant inverse relationships between urinary DEHP metabolites including MEHP, MEHHP (Mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl phthalate), MEOHP (Mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate) and MECPP (Mono-2-ethyl-5-carboxypentyl phthalate) and total thyroxine (T4), FT4, T3, and positive relationships with thyroid-stimulating hormone (TSH) among 1346 adult population in U.S. (NHANES)¹⁹. Urinary DEHP metabolites were also inversely related to total and FT3 levels in a Danish cross-sectional study of 845 children²². Contrary, two of the previous studies observed no association between maternal DEHP exposure and thyroid function in their offspring^{23, 24}.

To our knowledge, there are no available data of investigating association between prenatal DEHP exposure and TH levels of neonates and effects of later infant neurodevelopment together. Thus the aim of this study was to investigate the association between prenatal DEHP exposure and infant mental and psychomotor development at two distinct time points of ages 6 and 18 month along with examining the influence of prenatal DEHP exposure on infant TH levels.

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^{25, 26}. 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.

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

All subjects were residents in Sapporo City or surrounding areas. The participants completed the self-administered questionnaire after the second trimester during their pregnancy. The questionnaire contained baseline information including their dietary habits, exposure to tobacco smoking history, alcohol consumption, caffeine intake, family income, educational levels of themselves and partners. The perinatal information of the mothers and their infants was collected from their medical records. We used the following eligibility for criteria for analyses of subjects; no serious illness or complications during pregnancy and delivery, no thyroid function diseases, singleton babies born at term (37 to 42 weeks of gestation), Apgar score of > 6 at 1 minute, babies without congenital anomalies or diseases, and Bayley Scale of Infant Development second edition (BSID-II)²⁹ completed. Among all 514 participants of Sapporo Cohort Study, 493 available maternal blood samples for MEHP measurements. Maternal blood samples collected after delivery were excluded from analysis due to the relatively short biological half-life of DEHP. Eventually 332 maternal blood levels of MEHP were available in this study. Of 332, 328 participants had available TH levels, among them, only 127 and 97 participants had available BSID-II scores at 6 month and at 18 month, respectively. This study was conducted with the informed consent of all participants in written forms. The protocol used in this study was approved by the Institutional Ethical Board for epidemiological studies at the Hokkaido University Graduate School of Medicine, Hokkaido University Center for Environmental and Health Sciences and

Ethics Review Committee of Nagoya University Graduate School of Medicine.

MEHP measurement

Approximately 40 mL of maternal blood samples were collected from each woman after the second trimester of their pregnancy. All samples were stored in uniform way at -80 until the analysis to avoid hydrolysis by enzyme activity. The concentrations of MEHP in maternal blood were measured by using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) at Nagoya University under the analytical conditions mentioned previously²⁷. 30 μ l of blood samples were mixed with 120 μ l of 1N HCl to deactivate the serum enzymes, 350 μ l of saturated saline solution and 50 μ l of 10 μ M MEHP-d as an internal standard. Then MEHP was extracted two times with 500 μ l of ethyl acetate after shaking for 15 minutes. There was no incubation process until extraction. The ethyl acetate layer was evaporated then the residue was dissolved into 40 μ l of ethyl acetate. After addition of 20 μ l 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 MEHP²⁸. The limit of detection (LOD) was 0.278 ng/ml (1 pmol/ml). For each sample, duplicate analysis was performed. 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

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

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 concentration²⁷.

Thyroid hormone measurement

We obtained blood samples data of TSH and FT4 from Sapporo City Institute of Public Health which conducted the mass screening test for congenital diseases routinely. A heel-prick blood sample of newborns was obtained as spots on a filter paper for the Guthrie test. The blood samples were obtained from infants between 3 and 7 days after birth. Blood samples were applied to 0.3 cm filter disks and TSH and FT4 levels were measured using ELISA (TSH: Enzaplate N-TSH, Bayer Co., Tokyo, Japan; FT4: Enzaplate N-FT4, Bayer Co.). The FT4 levels were detected from all the samples. For samples with TSH levels below the detection limit (0.50 μ U/mL), we used a value of half the detection limit (0.25 μ U/mL).

Developmental assessment

We used BSID-II²⁹ to assess the infant mental (mental development index; MDI) and psychomotor (psychomotor development index; PDI) development at age 6 and 18 month. The BSID-II is considered most useful infant developmental test tool used between 0 to 3 years of age. The BSID-II mental scale assesses children's cognitive, language, and personal/social development and the psychomotor scale assesses fine and gross motor development. The developmental evaluation was performed by three occupational therapists who have clinical experience in the field of developmental disabilities³⁰. The examiner was unaware of maternal MEHP levels. Additionally, the

Index of Child Care Environment (ICCE) was used to investigate the child care environment of infants at 6 and 18 month of age³⁰.

Data analysis

Since the distributions of MEHP concentrations and TH levels were right skewed, these variables were transformed by the natural logarithms (ln) to improve their linear relation with MDI and PDI. To examine the relation between prenatal DEHP exposure and infant TH levels and infant neurodevelopment, mediation analyses were conducted by using bootstrapping confidence intervals. To select covariates to include in models, risk factors known or suspected of being associated with the phthalates concentrations and/or infant neurodevelopment were reviewed in the literatures^{10, 11}. The covariates used in this study were maternal age at delivery, maternal education, caffeine intake during pregnancy, family income, parity, blood sampling period, gestational age and infant sex. The covariates were included into the final model if their p-values were below 0.1. Results were considered significant at $p < 0.05$. All analyses were conducted using SPSS (Version 22.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

C . 研究結果

Table 1 shows basic characteristics of participants. There were no significant difference in maternal characteristics between infant sexes. 18% of mother smoked during pregnancy and 33% of mothers had alcohol consumption during pregnancy. Birth length was significantly longer in boys compared to girls ($p = 0.005$). The median concentration of MEHP was 10.6 ng/ml (Inter Quartile range (IQR); 6.3-17.1 ng/ml) and was detected in 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

of the samples. The median concentration of TSH was 2.20 μ U/ml (IQR; 1.40-4.00) and FT4 was 2.03 ng/ml (IQR; 1.79-2.29), respectively. The mean \pm SD of MDI and PDI at 6 month were 90.2 \pm 5.4 and 88.6 \pm 10.4, respectively. The mean \pm SD of MDI and PDI at 18 month were 84.6 \pm 12.4 and 87.0 \pm 11.5, respectively.

Table 2 shows maternal MEHP levels in relation to participants' characteristics. All the characteristics except blood sampling period were not associated with MEHP levels. MEHP levels were significantly higher among samples taken between 32-34 weeks of gestation. Maternal MEHP levels were not associated with infant characteristics.

Comparison between participants who completed BSID-II (N=127) and who did not (N=201) was shown in the Supplemental Table 1. Maternal and paternal education levels, family income, paternal age and MEHP level were significantly higher among those who included in final the analysis compared to those who were not included. Comparison between those who had two times of neurodevelopment assessments (both at 6 and 18 months, N=97) and those who had one assessment (only at 6 month, N=30), both maternal and paternal ages were significantly higher among those who had both assessments. Additionally, the percentage of maternal smoking during pregnancy was significantly lower among those who had both assessments. Furthermore PDI at 6 month was significantly higher among those who both assessments (Supplemental Table 2).

Table 3 shows association between infant TH levels and maternal MEHP levels. Both TSH and FT4 levels were not associated with maternal MEHP levels.

Table 4 shows association between BSID-II score and 6, 18 month and maternal MEHP levels. Overall there was no significant association between BSID-II scores and maternal MEHP levels at both tested ages. Models included environmental chemicals; PCBs, dioxins and perfluorinated chemical (PFCs) that showed negative association with BSID-II in the same cohort^{30,31} did not change the results (data not shown).

D . 考察

Maternal MEHP level was higher compared to previously reported values of pregnant women³². In our study, we found that maternal MEHP level was not associated with infant TH level nor infant neurodevelopment at ages 6 and 18 months. Our findings added evidence to the previous prospective study²³, which found no association between DEHP exposure and cord blood TH levels.

In several epidemiological studies, adverse health effects of DEHP exposure determined by urine metabolites on TH levels were reported^{19, 21}. In Taiwanese study, high exposure to DEHP from foodstuffs were associated with decreased TSH levels in children, however, in their study, DEHP exposure assessment was only based on interview, thus misclassification might exist²¹. Experimental evidence suggested that thyroid homeostasis disruption, peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) activation, and changing lipid metabolism maybe responsible for prenatal phthalate in association with fetal neurodevelopment³³. Although these studies suggest DEHP metabolites may disrupt TH homeostasis among adults and children, how and which particular TH by which phthalate metabolite is still inconsistent. Additionally, adults and children may have different

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

influence on thyroid functions. Contrary a prospective birth cohort study in Taiwan showed no significant association between DEHP exposure and TH levels in cord blood²³. Our finding was consistent with the Taiwanese prospective study, however, given the fact that T4 and TSH levels in this study were within the normal ranges and the sample size was relatively small, thus possible significant relationships could easily have been missed.

In this study, we did not find any significant association between maternal MEHP levels and infant MDI and PDI at both 6 and 18 month. As described in previous publications from our group^{30, 31}, maternal caffeine intake, birth weight, birth length and gestational age for 6 month, family income and infant sex for 18 month were found to be correlated to BSID-II scores in this study population (Supplemental Table 2) and thus even the study population was smaller compared to our original cohort, subpopulation in this study considered to have null bias. Our result was supported by previous report that socioeconomic status was associated with neurological functions such as language, memory, cognition and social development³⁴. In this study, BSID-II score at 6 month were similar between boys and girls, however, girls showed higher BSID-II scores at 18 month. Previous study showed higher MDI and PDI among girls after first year of life but not earlier age³⁵ and our result was consistent with the previous report.

Kim et al.¹⁰ found an inverse association between prenatal levels of MEHHP and MEOHP, metabolites of DEHP and MDI and PDI only in male. Tellez-Rojo et al.¹² evaluated the effects of maternal urinary concentrations of phthalate metabolites on

MDI and PDI in children 24-36 months and found no significant association among all children, however, negative association between DEHP metabolites and MDI was observed only in girls. Polanska et al.¹¹ found that child motor development was inversely associated with sum of DEHP metabolites in maternal urine samples. A study examined infant neurodevelopment at 5 weeks newborn intensive care unit (NICU) Network Neurobehavioral Scale (NNS) found that prenatal exposure to DEHP determined from maternal urine levels at 26 weeks of gestation was associated with non-optimal reflexes in male infants³⁶. The recent study in Taiwan³⁷ suggested that positive associations between maternal DEHP exposure and externalizing domain behavior problems in 8-year-old children by using Child Behavior Checklist (CBCL).

Although various epidemiological studies have been conducted on prenatal DEHP exposure and child neural and behavioral development, demographic of study population, timing of exposure and outcome measurements, assessment of outcome, and other factors have varied among studies and therefore, no clear conclusion have been found. The median concentration of MEHP was 10.6 ng/ml in this study. Compared to the study of serum MEHP measurements of pregnant women³², the level was higher. However, the production and use of DEHP varied among countries, which could have caused differences in observed MEHP levels in blood. More than 50% of phthalate use in Japan is DEHP³⁸, and DEHP intake in Japanese population was higher than that of most other studies³⁹. Additionally, the levels of DEHP in house dust in Japan were higher compared to the studies from other countries⁴⁰. Previous report from our cohort

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

population showed that prenatal DEHP exposure was not associated with infant birth size²⁷ suggested that MEHP levels we observed were not high enough to cause developmental adverse effects on infant health.

No differences were found between boys and girls in relation to MEHP levels and infant neurodevelopment in this study. In several epidemiological studies, sex specific effects of prenatal phthalate exposure on child neurodevelopment were found^{10, 12, 36, 41}, yet results from these previous studies were inconsistent. Also the reason that we did not find significant association could be due to relatively smaller sample size of this study. Decreased PDI at 18 month among girls even it did not reach the significance may suggest there might be sex specific effect. Continuous neurodevelopmental evaluation and larger sample sizes were required to find out sex specific effects.

Maternal smoking and alcohol consumption during pregnancy, breast feeding were known important factors of infant neurodevelopment. Breast feeding also could possibly be an exposure source of DEHP. In this study, we examined the model including these factors, however, the results of analysis with and without these covariates did not show much change, and thus, those factors were excluded from the final model. We also investigated the association between maternal MEHP levels and TH of neonate and BSID-II with controlling other environmental chemical exposures including PCBs, dioxins and PFCs as they were found to be negatively associated with neonatal TH levels and infant development^{30, 31, 42}. However, the result remained unchanged and we did not find adverse effects of prenatal DEHP exposure on TH levels and

BSID-II.

BSID-II mean scores in both 6 and 18 months were lower than standardized scores in this study. Since there are cultural and language differences between Japan and the United States, the BSID-II should be used with caution in Japan. Although we observed relatively lower mean BSID-II scores among our study population, Oka et al. reported high correlation between BSID-II and the Kyoto Developmental Test that was standardized in Japan⁴³. Thus, BSID-II scores of our study population were considered to be validated and reasonable for using analyses.

The strength of our study was that we measured child neurodevelopment outcome by well-trained examiners and twice at different time points which allowed us to investigate the association of prenatal DEHP exposure and child neurodevelopment across the time. The limitations of this study need to be considered. In our study population, serum was used for measurements of phthalates instead of urine. Recently, some disadvantages of using serum instead of urine have had much attention⁴⁴. It is known that hydrolytic enzymes are present in blood samples and may be responsible for diester to monoester conversion after the blood sample is drawn⁴⁵. Thus, levels of monoester phthalates may seem to be falsely elevated due to *ex-vivo* conversion of contamination. To reduce the influence of enzyme, blood samples were immediately stored at -80 and acid was added to samples immediately after thawing to inhibit enzyme activity. We cannot exclude the possibility of conversion of diesters from sample contamination happened between drawing of blood and analysis. In this study, all blood samples were collected at one hospital in the same

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

way, and analyzed at the same laboratory, therefore, it is expected to be the same level of potential environmental contamination if any. Additionally findings from previous studies suggested that urinary DEHP metabolites in pregnant women were lower, particularly at the later stages of pregnancy than those in non-pregnant women, thus using urinary DEHP metabolites as exposure biomarkers needs to be cautiously implemented⁴⁶. Other limitations were the follows. There have been concerns whether single drawing of maternal blood sample represent the long-term prenatal phthalate exposure due to short half-life of DEHP and there might be a possibility of accidental exposure near blood drawing period. Blood concentrations might change rapidly and therefore, repeated measurements would be desirable. Using secondary metabolites of phthalates was recommended due to hydrolytic enzyme activity in blood samples and several recent studies^{47, 48} successfully determined secondary metabolites of DEHP in blood samples though level of secondary metabolites in serum sample was lower than in urine sample⁴⁹. Measurement of MEHP may be more relevant in studies investigating associations between DEHP exposure and adverse health effects as MEHP is known to be responsible for biological activities attributed to DEHP exposure⁵⁰. Maternal blood samples were taken during the third trimester, thus, the effect of fetal exposure to DEHP during the earlier stages of fetal neurodevelopment have not been assessed in this study. Previously, influence on infant neurobehavior by phthalate was evident only with exposure measured at 26 weeks but not at 16 weeks of gestation³⁶, thus exposure assessment at late pregnancy might be more

reasonable when comes to assessing neurodevelopment. Fetal growth is rapid during the third trimester. Biologically, little synapse formation occurs before the beginning of the third trimester, when it accelerates to approximately 40,000 synapses per minute⁵¹ indicating that it was a relevant exposure period. There might be a chance of selection bias in this study as we only included participants with available maternal blood samples and BSID-II scores into the final analysis (N=127). Participants included in our final analysis showed higher percentage of college graduate level of education of parents, higher income level (5 million yen/year), compared to the participants who excluded. Small sample size could be a possible reason for not observing association between prenatal DEHP exposure and neurodevelopment.

E . 結論

In conclusion, prenatal exposure to DEHP did not show adverse effects on neonate TH levels and infant MDI and PDI in early life stage, although prenatal PCBs, dioxins and PFCs exposure showed negative impact in the same cohort participants^{30, 31, 42}. This was the first study of investigating prenatal DEHP exposure and TH levels of newborns and infant MDI and PDI at early stage of life. However, our previous study revealed negative effects of prenatal DEHP exposure on maternal fatty acids including omega 3²⁷ and sex hormone levels²⁸, continuous investigation on neurodevelopment in later life, especially peripuberty, in association with prenatal DEHP exposure is necessary.

F . 研究発表

1.論文発表

Minatoya M, Naka Jima S, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Ikeno T, Nakajima T, Goto Y, Kishi R. Effects of prenatal phthalate

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

exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Sci Total Environ.* 2016; 565:1037-43.

2.学会発表

Machiko Minatoya, Seiko sasaki, Sonomi Nakajima, Tamie Nakajima, Yuko Goot, Chihiro Miyashita, Sumitaka Kobayashi, Tamiko Ikeno, Astuko Araki, Reiko Kishi. Prenatal MEHP exposure and infant neurodevelopment: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health.第 86 回 日本衛生学科学術総会.和歌山.2015.3.27

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. Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbuehler K. 2006. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in europeans? *Risk Anal.* 2006; 26, 803-824.
2. Hernandez-Diaz S, Mitchell AA, Kelley KE, Calafat AM, Hauser R. Medications as a potential source of exposure to phthalates in the U.S. Population. *Environ Health perspect.* 2009; 117, 185-189.
3. Casas L, Fernandez MF, Llop S, et al. Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of spanish pregnant women and children. *Environ Int.* 2011; 37, 858-866.
4. Romero-Franco M, Hernandez-Ramirez RU, Calafat AM, et al. 2011. Personal care product use and urinary levels of phthalate metabolites in mexican women. *Environ Int.* 2011; 37, 867-871.
5. Suzuki Y, Niwa M, Yoshinaga J, et al. Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary

- metabolite analysis. *Environ Health Prev Med.* 2009; 14, 180-187.
6. Jurewicz J, Hanke W. Exposure to phthalates: Reproductive outcome and children health. A review of epidemiological studies. *Int J Occup Med Environ Health.* 2011; 24, 115-141.
7. Huang PC, Kuo PL, Guo YL, Liao PC, Lee CC. Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Human Reprod.* 2007; 22, 2715-2722.
8. Wittassek M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, et al. Fetal exposure to phthalates- a pilot study. *Int J Hyg Environ Health.* 2009; 212, 492-498.
9. Tanaka T. Reproductive and neurobehavioural effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (dehp) in a cross-mating toxicity study of mice. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43, 581-589.
10. Kim Y, Ha EH, Kim EJ, et al. Prenatal exposure to phthalates and infant development at 6 months: prospective Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) study. *Environ Health Perspect.* 2011; 119(10), 1495-500.
11. Polanska K, Ligocka D, Sobala W, Hanke W. Phthalate exposure and child development: the Polish Mother and Child Cohort Study. *Early Hum Dev.* 2014; 90(9), 477-85.
12. Tellez-Rojo MM, Cantoral A, Cantonwine DE, et al. Prenatal urinary phthalate metabolites levels and neurodevelopment in children at two and three years of age. *Sci Total Environ.* 2013; 461-462, 386-390.
13. Whyatt RM, Liu X, Rauh VA, et al. Maternal prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and child mental, psychomotor, and behavioral development at 3 years of age. *Environ Health Perspect.* 2012; 120, 290-295.

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

14. Kim BN, Cho SC, Kim Y, et al. 2009. Phthalates exposure and attention-deficit/hyperactivity disorder in school-age children. *Biol Psychiatry*. 2009; 66, 958-963.
15. Cho SC, Bhang SY, Hong YC, et al. Relationship between environmental phthalate exposure and the intelligence of school-age children. *Environ Health Perspect*. 2010; 118, 1027-1032.
16. Chopra V, Harley K, Lahiff M, Eskenazi B. Association between phthalates and attention deficit disorder and learning disability in U.S. Children, 6-15 years. *Environ Res*. 2014; 128, 64-69.
17. Zoeller TR, Dowling AL, Herzig CT, et al. Thyroid hormone, brain development, and the environment. *Environ Health Perspect*. 2002; 110 Suppl 3, 355-61.
18. Brucker-Davis F, Ferrari P, Boda-Buccino M, et al. Cord blood thyroid tests in boys born with and without cryptorchidism: correlations with birth parameters and in utero xenobiotics exposure. *Thyroid*. 2011; 21(10), 1133-41.
19. Meeker JD, Ferguson KK. Relationship between urinary phthalate and bisphenol a concentrations and serum thyroid measures in U.S. Adults and adolescents from the national health and nutrition examination survey (NHANES) 2007-2008. *Environ Health Perspect*. 2011; 119, 1396-1402.
20. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men. *Environ Health Perspect*. 2007 115:1029-1034.
21. Wu MT, Wu CF, Chen BH, et al. Intake of phthalate-tainted foods alters thyroid functions in Taiwanese children. *PLoS One*. 2013; 8(1), e55005.
22. Boas M, Frederiksen H, Feldt-Rasmussen U, et al. Childhood exposure to phthalates: Associations with thyroid function, insulin-like growth factor I, and growth. *Environ Health Perspect*. 2010; 118, 1458-1464.
23. Kuo FC, Su SW, Wu CF, et al. Relationship of urinary phthalate metabolites with serum thyroid hormones in pregnant women and their newborns: a prospective birth cohort in Taiwan. *PLoS One*. 2015; 10(6), e0123884.
24. de Cock M, de Boer MR, Lamoree M, Legler J, van de Bor M. Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals in relation to thyroid hormone levels in infants - a Dutch prospective cohort study. *Environ Health*. 2014; 13, 106.
25. Kishi R, Sasaki S, Yoshioka E, et al. Cohort profile: The hokkaido study on environment and children's health in japan. *Int J Epidemiol*. 2011; 40, 611-618.
26. Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, 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.
27. Jia X, Harada Y, Tagawa M, 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(3), 168-78.
28. Araki A, Mitsui T, Miyashita C, 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), e109039.
29. Bayley N. Manual for the Bayley Scales of Infant Development. 2nd ed. 1993. Psychological Corporation, New York.
30. Nakajima S, Saijo Y, Kato S, et al. Effects of

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 polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at 6 months of age. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(5), 773-8.
31. Goudarzi H, Nakajima S, Ikeno T, et al. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and neurodevelopment in early infancy: The Hokkaido Study. *Sci Total Environ.* 2016; 541: 1002-1010.
32. Hart R, Doherty DA, Frederiksen H, et al. The influence of antenatal exposure to phthalates on subsequent female reproductive development in adolescence: a pilot study. *Reproduction.* 2014; 147(4), 379-90.
33. Miodovnik A, Edwards A, Bellinger DC, Hauser R. Developmental neurotoxicity of ortho-phthalate diesters: Review of human and experimental evidence. *Neurotoxicol.* 2014; 41, 112-122.
34. Hackman DA, Farah MJ. Socioeconomic status and the developing brain *Trends Cogn. Sci.* 2009; 13, 65-73.
35. Lung FW, Shu BC, Chiang TL, Chen PF, Lin LL. Predictive validity of Bayley scale in language development of children at 6-36 months. *Pediatr Int.* 2009; 51, 666-669.
36. Yolton K, Xu Y, Strauss D, et al. Prenatal exposure to bisphenol a and phthalates and infant neurobehavior. *Neurotoxicol Teratol.* 2011; 33, 558-566.
37. Lien YJ, Ku HY, Su PH, et al. Prenatal exposure to phthalate esters and behavioral syndromes in children at 8 years of age: Taiwan Maternal and Infant Cohort Study. *Environ Health Perspect.* 2015; 123(1), 95-100.
38. Japan Plasticizer Industry Association and Ministry of Economy Trade and Industry (2012) Information of Japan plasticizer industries.
39. Ait Bamai Y, Araki A, Kawai T, et al. Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families. *Int J Hyg Environ Health.* 2015; 218(5), 461-70.
40. Ait Bamai Y, Araki A, Kawai T, 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, 147-57.
41. Engel SM, Zhu C, Berkowitz GS, et al. Prenatal phthalate exposure and performance on the neonatal behavioral assessment scale in a multiethnic birth cohort. *Neurotoxicol.* 2009; 30, 522-528.
42. Kato S, Itoh S, Yuasa M, et al. Association of perfluorinated chemical exposure in utero with maternal and infant thyroid hormone levels in the Sapporo cohort of Hokkaido Study on the Environment and Children's Health. *Environ Health and Prev Med.* [accepted] doi: 10.1007/s12199-016-0534-2
43. Oka T, Suzuki K, Nakai K, Hosokawa T, Satoh H. A trial to apply Bayley Scales of Infant Development second edition to Japanese children [in Japanese] *J Clin Exp Med.* 2005; 212, 259-263.
44. Calafat AM, Koch HM, Swan SH, et al. Misuse of blood serum to assess exposure to bisphenol A and phthalates. *Breast Cancer Res.* 2013; 15(5), 403.
45. Kato K, Silva MJ, Brock JW, et al. Quantitative detection of nine phthalate metabolites in human serum using reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2003; 27, 284-289.
46. Nakajima T, Hayashi Y, Ito Y. Prenatal Exposure to Di(2-ethylhexyl) phthalate and Subsequent Infant and Child Health Effects. *Food Safety.* 2015; 3(3), 70-83.

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

47. Specht OI, Bonde JP, Toft G, et al. Serum Phthalate Levels and Time to Pregnancy in Couples from Greenland, Poland and Ukraine. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0120070.
48. Smit LA, Lenters V, Høyer BB, et al. Prenatal exposure to environmental chemical contaminants and asthma and eczema in school-age children. *Allergy*. 2015; 70(6): 653-60.
49. Frederiksen H, Jorgensen N, Andersson AM. 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.
50. Heindel JJ, Powell CJ. Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992; 115(1): 116-123.
51. Levitt P. Structural and functional maturation of the developing primate brain. *J Pediatr*. 2003; 143(4 Suppl): S35-45.

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.

Parental characteristics		Mean \pm SD or number (%) or Median (IQR)			p-value ^b
		All (N=328)	Boys (N=158)	Girls (N=170)	
Maternal age (years)		30.2 \pm 4.7	30.5 \pm 4.9	30.0 \pm 4.6	0.524
Maternal education (years)	12	147 (44.8)	70 (44.3)	77 (45.3)	0.857
	> 12	181 (55.2)	88 (55.7)	93 (54.7)	
Parity	0	167 (51.1)	86 (54.8)	81 (47.6)	0.198
	1	160 (48.9)	71 (45.2)	89 (52.4)	
Maternal smoking during pregnancy	Yes	59 (18.0)	23 (14.6)	36 (21.2)	0.119
	No	269 (82.0)	135 (85.4)	134 (78.8)	
Alcohol consumption during pregnancy	Yes	108 (32.9)	105 (66.5)	53 (33.5)	0.819
	No	220 (67.1)	115 (67.6)	55 (32.4)	
Maternal work during pregnancy	Yes	31 (9.5)	15 (9.5)	16 (9.4)	0.980
	No	297 (90.5)	143 (90.5)	154 (90.6)	
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		143.0 \pm 120.8	145.1 \pm 101.2	141.1 \pm 136.7	0.215
MEHP (ng/ml)		10.6 (6.3-17.1)	10.1 (6.5-15.6)	11.3 (5.9-17.8)	0.361
Maternal pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		21.3 \pm 3.3	20.9 \pm 3.2	21.6 \pm 3.4	0.030
Family income (million yen)	< 5	225 (68.8)	110 (69.6)	115 (68.0)	0.759
	5	102 (31.2)	48 (30.4)	54 (32.0)	
Paternal age (years)		31.9 \pm 5.6	32.0 \pm 5.5	31.7 \pm 5.6	0.729
Paternal education (years)	12	146 (44.6)	67 (42.7)	79 (46.5)	0.491
	> 12	181 (55.4)	90 (57.3)	91 (53.5)	
Paternal smoke during pregnancy	Yes	237 (72.5)	111 (70.7)	123 (74.1)	0.490
	No	90 (27.5)	46 (29.3)	44 (25.9)	
Infant characteristics					
Birth weight (g)		3096 \pm 366	3108 \pm 381	3085 \pm 352	0.614
Birth length (cm)		48.2 \pm 1.9	48.4 \pm 2.2	48.0 \pm 1.5	0.005
Gestational age (days)		277.1 \pm 8.9	276.2 \pm 9.4	278.0 \pm 8.4	0.115
Mode of delivery	Vaginal	278 (84.8)	130 (82.3)	148 (87.1)	0.229
	C-section	50 (15.2)	28 (17.7)	22 (12.9)	
TSH (μ U/ml)		2.20 (1.40-4.00)	2.21 (1.38-4.00)	2.30 (1.38-3.93)	0.790
FT4 (ng/ml)		2.03 (1.79-2.29)	2.02 (1.81-2.22)	2.03 (1.79-2.34)	0.437
MDI at 6 month	N=127	90.2 \pm 5.4	90.3 \pm 5.4	90.1 \pm 5.4	0.898
PDI at 6 month	N=127	88.6 \pm 10.4	87.3 \pm 9.4	90.0 \pm 11.3	0.132
MDI at 18 month	N=97	84.6 \pm 12.4	82.2 \pm 11.5	87.1 \pm 12.9	0.053
PDI at 18 month	N=97	87.0 \pm 11.5	84.4 \pm 11.4	89.5 \pm 11.1	0.029

p value obtained from Mann-Whitney U-test between boys and girls.

MEHP; Mono-2-ethylhexyl phthalate, TSH; Thyroid Stimulating Hormone, FT4; Free Thyroxine, MDI; Mental Development Index, PDI; Psychomotor Development index

Table 2 Maternal MEHP levels in relation to participants' characteristics (N=328).

Maternal characteristics		MEHP levels (ng/ml)	
		mean \pm SD	p-value
Maternal age (years)		$\rho = -0.015$	0.790
Maternal education (years)	12	14.3 \pm 13.4	0.474
	> 12	13.4 \pm 10.3	
Parity	0	13.6 \pm 12.2	0.753
	1	14.0 \pm 11.4	
Maternal smoking during pregnancy	Yes	15.4 \pm 17.8	0.416
	No	13.4 \pm 10.0	
Alcohol consumption during pregnancy	Yes	14.0 \pm 12.2	0.818
	No	13.7 \pm 11.6	
Maternal working during pregnancy	Yes	14.9 \pm 9.4	0.585
	No	13.7 \pm 12.0	
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		$\rho = 0.080$	0.148
Maternal pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		$\rho = -0.005$	0.929
Family income (million yen)	< 5	13.9 \pm 13.1	0.797
	5	13.6 \pm 8.4	
Blood sampling period (weeks)	23-31	13.6 \pm 10.1	0.002
	32-34	16.2 \pm 15.0	
	35-41	12.0 \pm 10.5	
Infant characteristics			
Sex	Boy	12.9 \pm 11.0	0.181
	Girl	14.6 \pm 12.5	
Birth weight (g)		$\rho = -0.036$	0.513
Birth length (cm)		$\rho = -0.001$	0.982
Mode of delivery	Vaginal	13.8 \pm 12.1	0.971
	C-section	13.7 \pm 9.8	
Gestational age (days)		$\rho = -0.007$	0.906
TSH (μ U/ml)		$\rho = 0.041$	0.464
FT4 (ng/ml)		$\rho = 0.018$	0.752

MEHP; Mono-2-ethylhexyl phthalate, TSH; Thyroid Stimulating Hormone, FT4; Free Thyroxine, Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test and Spearman's coefficients.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 3. Association between infant thyroid hormone levels and maternal MEHP levels stratified by infant sex.

Thyroid hormone		N	β (95% CI)	p-value
TSH (μ U/ml)	All	328	0.04 (-0.16, 0.23) ^a	0.719
	Boy	158	0.04 (-0.18, 0.26) ^b	0.732
	Girl	170	0.08 (-0.09, 0.25) ^b	0.381
FT4 (ng/ml)	All	328	-0.02 (-0.08, 0.03) ^a	0.361
	Boy	158	0.03 (-0.02, 0.07) ^b	0.277
	Girl	170	-0.01 (-0.05, 0.04) ^b	0.781

^a Adjusted for infant sex, infant age (days) at hormone measurement and blood sampling period for MEHP measurement.

^b Adjusted for infant age (days) at hormone measurement and blood sampling period for MEHP measurement.
TSH; Thyroid Stimulating Hormone, FT4; Free Thyroxine

Table 4. Association between MDI and PDI at 6 and 18 months and maternal MEHP levels stratified by infant sex.

BSID 6 month		N	β (95% CI)	p-value
MDI	All	127	0.64 (-0.75, 2.03) ^a	0.365
	Boy	64	-0.09 (-2.17, 1.98) ^b	0.929
	Girl	63	1.17 (-0.83, 3.17) ^b	0.247
PDI	All	127	-1.63 (-4.14, 0.88) ^a	0.202
	Boy	64	-1.99 (-5.44, 1.47) ^b	0.254
	Girl	63	-1.42 (-5.37, 2.53) ^b	0.474
BSID 18 month			β (95% CI) ^b	p-value
MDI	All	97	0.49 (-3.19, 4.17) ^c	0.791
	Boy	50	1.18 (-4.42, 6.78) ^d	0.674
	Girl	47	0.28 (-5.80, 5.25) ^d	0.920
PDI	All	97	-1.19 (-4.55, 2.17) ^c	0.483
	Boy	50	0.31 (-5.23, 5.86) ^d	0.810
	Girl	47	-2.86 (-7.54, 1.83) ^d	0.225

^a Adjusted for infant sex, gestational age, mother's age at delivery, maternal education, blood sampling period for MEHP measurement, caffeine intake during pregnancy (only for PDI).

^b Adjusted for gestational age, mother's age at delivery, maternal education, blood sampling period for MEHP measurement, caffeine intake during pregnancy (only for PDI).

^c Adjusted for gestational age, mother's age at delivery, maternal education, blood sampling period for MEHP measurement, family income (only for PDI), parity (only for PDI).

^d Adjusted for infant sex gestational age, mother's age at delivery, maternal education, blood sampling period for MEHP measurement, family income (only for PDI), parity (only for PDI).

BSID; Bayler Scale of Infant Development, MDI; Mental Development Index, PDI; Psychomotor Development index

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

Supplemental Table 1. Difference in characteristics between included participants (N=127) and excluded participants (N=201).

Parental characteristics		Mean \pm SD or number (%)		p-value
		Included (N=127)	Excluded (N=201)	
Maternal age (years)		30.6 \pm 4.7	30.0 \pm 4.8	0.252
Maternal education (years)	12	45 (35.4)	102 (50.7)	0.007
	> 12	82 (64.6)	99 (49.3)	
Parity	0	68 (54.0)	99 (49.3)	0.407
	1	58 (46.0)	102 (50.7)	
Maternal smoking during pregnancy	Yes	17 (13.4)	42 (20.9)	0.085
Alcohol consumption during pregnancy	Yes	42 (33.1)	66 (32.8)	0.965
Maternal work during pregnancy	Yes	15 (7.5)	16 (12.6)	0.121
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		136.8 \pm 93.3	146.9 \pm 135.3	0.463
Maternal pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		21.4 \pm 2.7	21.7 \pm 3.6	0.507
Family income (million yen)	< 5	78 (61.4)	147 (73.5)	0.022
	5	49 (38.6)	53 (26.5)	
MEHP (ng/ml)		15.6 \pm 13.3	12.6 \pm 10.6	0.022
Paternal age (years)		32.7 \pm 5.3	31.3 \pm 5.7	0.030
Paternal education (years)	12	45 (35.4)	101 (50.5)	0.008
	> 12	82 (64.6)	99 (49.5)	
Paternal smoke during pregnancy	Yes	93 (73.2)	144 (72.0)	0.808
Infant characteristics				
Birth weight (g)		3147 \pm 329	3064 \pm 385	0.044
Birth length (cm)		48.5 \pm 1.6	48.1 \pm 2.0	0.078
Gestational age (days)		278.2 \pm 8.3	276.5 \pm 9.2	0.099
Sex	Boy	64 (50.4)	94 (46.8)	0.522
	Girl	63 (49.6)	107 (53.2)	
TSH (μ U/ml)		2.54 \pm 1.86	3.09 \pm 2.67	0.043
FT4 (ng/ml)		2.03 \pm 0.39	2.07 \pm 0.38	0.404

Student's t test or chi-square test.

Supplemental Table 2. Difference in characteristics of participants with 2 times neurodevelopmental assessments (6 and 18 months) and with only one (6 month) assessment.

Parental characteristics		Mean \pm SD or number (%)		p-value
		Both assessment (N=97)	Only 6 month assessment (N=30)	
Maternal age (years)		31.1 \pm 4.6	28.9 \pm 4.7	0.021
Maternal education (years)	12	33 (34.0)	12 (40.0)	0.550
	> 12	64 (66.0)	18 (60.0)	
Parity	0	50 (51.5)	19 (63.3)	0.257
	1	47 (48.5)	11 (36.7)	
Maternal smoking during pregnancy	Yes	9 (9.3)	8 (26.7)	0.015
Alcohol consumption during pregnancy	Yes	33 (34.0)	9 (30.0)	0.682
Maternal work during pregnancy	Yes	10 (10.3)	6 (20.0)	0.162
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		131.7 \pm 89.6	153.4 \pm 104.3	0.268
Maternal pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		21.4 \pm 2.6	21.4 \pm 3.2	0.918
Family income (million yen)	< 5	50 (59.8)	20 (66.7)	0.499
	5	39 (40.2)	10 (33.3)	
MEHP (ng/ml)		14.9 \pm 11.7	17.5 \pm 17.7	0.357
Paternal age (years)		33.3 \pm 5.3	30.8 \pm 5.0	0.022
Paternal education (years)	12	34 (35.1)	11 (36.7)	0.872
	> 12	63 (64.9)	19 (63.3)	
Paternal smoke during pregnancy	Yes	72 (74.2)	21 (70.0)	0.648
Infant characteristics				
Birth weight (g)		3123 \pm 302	3226 \pm 398	0.133
Birth length (cm)		48.4 \pm 1.6	48.5 \pm 1.7	0.958
Gestational age (days)		278.2 \pm 8.3	278.0 \pm 8.3	0.907
Sex	Boy	50 (51.5)	14 (46.7)	0.640
	Girl	47 (48.5)	16 (53.3)	
TSH (μ U/ml)		2.53 \pm 1.77	2.43 \pm 1.95	0.786
FT4 (ng/ml)		2.00 \pm 0.38	2.10 \pm 0.44	0.223
ICCE at 6 month ^a		23.0 \pm 2.5	22.2 \pm 4.8	0.252
MDI at 6 month		90.3 \pm 5.0	90.0 \pm 6.5	0.783
PDI at 6 month		89.7 \pm 10.0	85.2 \pm 11.4	0.038

^a Maximum score is 30.

MEHP; Mono-2-ethylhexyl phthalate, MDI; Mental Development Index, PDI; Psychomotor Development index, ICCE; Index of Child Care Environment, TSH; Thyroid Stimulating Hormone, FT4; Free Thyroxine
Student's t test or chi-square test.

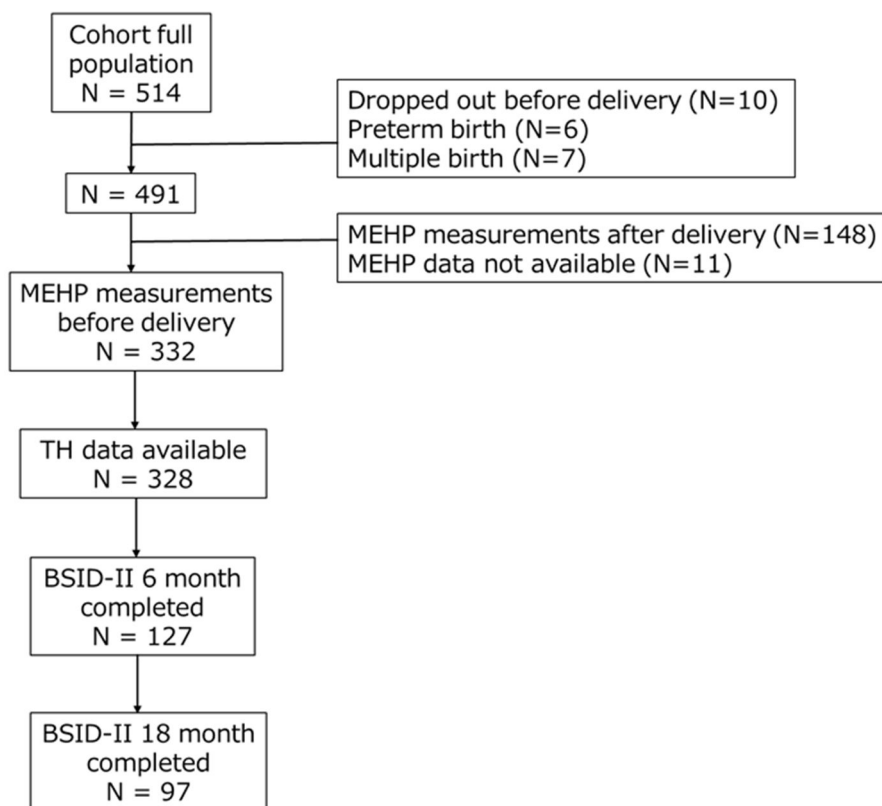
厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Supplemental Table 3. Characteristics of participants in relation to BSID-II at 6 and 18 months.

	MDI at 6 month		PDI at 6 month		MDI at 18 month		PDI at 18 month		
	mean (SD)	p-value	mean (SD)	p-value	mean (SD)	p-value	mean (SD)	p-value	
Parental characteristics									
Maternal age (years)	$\rho = 0.044$	0.620	$\rho = 0.021$	0.811	$\rho = -0.010$	0.926	$\rho = -0.065$	0.527	
Maternal education (years)	12	90.7 (4.3)	0.476	89.0 (11.0)	0.787	84.2 (12.2)	0.827	86.3 (12.4)	0.675
	> 12	90.0 (5.9)		88.5 (10.2)		84.8 (12.6)		87.3 (10.9)	
Paternal age (years)		$\rho = 0.019$	0.835	$\rho = -0.076$	0.395	$\rho = -0.135$	0.189	$\rho = -0.104$	0.310
Paternal education	12	90.1 (5.1)	0.885	87.5 (9.7)	0.379	82.9 (11.9)	0.311	85.3 (11.7)	0.233
	> 12	90.3 (5.5)		89.2 (10.8)		85.7 (12.6)		87.9 (11.3)	
Family income (million yen)	< 5	90.2 (5.3)	0.999	88.4 (10.4)	0.785	83.3 (13.0)	0.200	85.1 (11.7)	0.045
	5	90.2 (5.6)		89.0 (10.6)		86.6 (11.1)		89.9 (10.6)	
Maternal working during pregnancy	Yes	91.6 (6.1)	0.282	85.9 (7.6)	0.270	93.0 (12.5)	0.022	85.1 (13.1)	0.603
Maternal smoking during pregnancy	Yes	89.5 (6.3)	0.548	85.8 (9.8)	0.234	86.7 (12.3)	0.567	84.9 (11.3)	0.564
Parity	0	90.6 (5.4)	0.394	89.2 (10.4)	0.476	84.0 (13.9)	0.564	84.7 (11.6)	0.053
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		$\rho = -0.026$	0.773	$\rho = -0.278$	0.002	$\rho = 0.020$	0.847	$\rho = -0.062$	0.547
Alcohol intake during pregnancy	Yes	90.2 (5.6)	0.983	88.6 (11.5)	0.997	83.8 (9.4)	0.603	86.9 (11.6)	0.965
	1	89.8 (5.3)		87.9 (10.5)		85.3 (10.6)		89.2 (11.0)	
Maternal pre-pregnancy BMI (kg/m²)		$\rho = 0.006$	0.947	$\rho = 0.038$	0.670	$\rho = -0.097$	0.342	$\rho = -0.186$	0.068
Paternal smoke during pregnancy	Yes	90.6 (5.3)	0.148	89.1 (10.5)	0.448	85.2 (12.2)	0.399	87.7 (10.7)	0.239
Infant characteristics									
Sex	Boy	90.3 (5.4)	0.898	87.3 (9.4)	0.132	82.2 (11.5)	0.053	84.4 (11.4)	0.029
	Girl	90.1 (5.4)		90.0 (11.3)		87.1 (12.9)		89.5 (11.1)	
Birth weight (g)		$\rho = 0.184$	0.038	$\rho = 0.152$	0.089	$\rho = 0.140$	0.171	$\rho = 0.053$	0.540
Birth length (cm)		$\rho = 0.122$	0.173	$\rho = 0.225$	0.011	$\rho = 0.028$	0.783	$\rho = 0.058$	0.576
Mode of delivery	Vaginal	90.4 (5.4)	0.176	88.8 (10.4)	0.571	85.3 (12.4)	0.177	86.5 (11.6)	0.461
	C-section	88.5 (5.2)		87.3 (10.9)		80.4 (11.6)		89.0 (10.6)	
Gestational age (days)		$\rho = 0.201$	0.023	$\rho = 0.352$	< 0.001	$\rho = 0.184$	0.071	$\rho = 0.087$	0.395
ICCE at 6 month		$\rho = -0.068$	0.450	$\rho = -0.132$	0.139				
ICCE at 18 month						$\rho = 0.102$	0.333	$\rho = 0.070$	0.509
TSH (μU/ml)		$\rho = 0.062$	0.491	$\rho = 0.137$	0.125	$\rho = -0.038$	0.713	$\rho = 0.031$	0.766
FT4 (ng/ml)		$\rho = 0.056$	0.535	$\rho = -0.010$	0.907	$\rho = 0.009$	0.932	$\rho = -0.103$	0.315

Mann-Whitney test and Spearman's coefficients.

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



Supplemental Figure 1. Participants' selection flowchart.

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

妊娠中の母体血漿コチニン値が児の出生時体格に及ぼす

用量依存的な影響は母の *AHR* と *XRCC1* 遺伝子多型によって異なる

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 中央大学保健センター市ヶ谷分室 医療管理者

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、妊婦の喫煙のバイオマーカーであるたばこ煙中に含まれるニコチンの代謝物であるコチニンと出生時体格との間に用量反応関係がある。またこれらの関連には多環芳香族炭化水素（PAHs）の代謝に関わる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、DNA 修復に関わる X-ray cross-complementing gene 1（*XRCC1*）が関与することも分かっている。しかし、これらの遺伝子多型の違いによる用量反応関係に線形があるかについて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), *CYP1A2* (A>C, *CYP1A2*1F*; rs762551), *CYP1B1* (C>G, Leu432Val; rs1056836), *GSTM1* (Non-null/null), *GSTT1* (Non-null/null), および *XRCC1* (C>T, Arg194Trp, rs1799782; A>G, Arg399Gln, rs25487) 遺伝子多型について、これらの遺伝子型の違いによる妊娠中コチニン値と出生時体格との関連について検討することを目的とした。2003～2007年に前向きコ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 = 0.21, 0.55, 11.48, 101.66 ng/mL）、低濃度側から Level 1 から Level 5 に分けた。重回帰分析を使って、母の遺伝子型で層別し、胎児期の母体血漿コチニン値と出生時体格との関連を検討した。その結果、出生体重の減少は妊娠中の母体血漿コチニン値と用量反応関係を示した（*P* for trend < 0.001）。遺伝子型を考慮しない場合、Level 1 の母から生まれた児と比較して、Level 5 から生まれた児の出生体重は 171 g（95% 信頼区間（CI）: -226, -117）有意に小さかった。さらに特定の *AHR* (G>A, Arg554Lys, rs2066853) と *XRCC1* (C>T, Arg194Trp, rs1799782; A>G, Arg399Gln, rs25487) 遺伝子型を考慮した場合でも、これらの用量反応関係は認められた。

研究協力者

小林 澄貴

（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

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）

A. 研究目的

近年、欧米だけでなくわが国でも低出生体重児の増加が報告されている。胎児期の母の喫煙は低出生体重児のリスクファクターの一つであり、ライフスタイルを変えると止められる要因であることが

ら、本研究では喫煙に着目した。妊娠中の能動喫煙が出生体重に及ぼす影響はありと見解が一致しているものの、受動喫煙が出生体重に及ぼす影響は一致した見解がまだ得られていない。そして、受動喫煙から能動喫煙までのたばこ煙の曝露量と出生時体格との間に線形の用量反応関係があるかはまだよくわかっていない。

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, CYP1A2, CYP1B1 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。また代謝中間体はグルタチオン S-転移酵素 (GSTs)によって抱合反応を受けた後、体外に排泄される。すでに、*AHR*, *CYP1A1*, および *XRCC1* 遺伝子型の組合せによって妊婦の喫煙と出生体重との関連に影響を及ぼす報告はあるものの(Kobayashi et al., 2016), それぞれの遺伝子型の違いが、線形の用量反応関係に影響を及ぼすかはまだ検討されていない。

そこで本研究では、はじめに妊娠中の母体血漿コチニン値と出生時体格との用量反応関係があるかを検討した。次に、*AHR* (G>A, Arg554Lys, rs2066853), *CYP1A1* (A>G, Ile462Val, rs1048943), *CYP1A2* (A>C, *CYP1A2*1F*, rs762551), *CYP1B1* (C>G, Leu432Val, rs1056836), *GSTM1* (Non-null/null), *GSTT1* (Non-null/null) および *XRCC1* (C>T, Arg194Trp, rs1799782; G>A, Arg399Gln, rs25487) 遺伝子多型について、これらの遺伝子型の違いによって、妊娠中の母体血漿コチニン値と出生時体格との用量反応関係に影響を及ぼすかを検討することを本研究の目的とした。

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、出生前向きコー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、たばこ煙に曝露された非喫煙群、および喫煙群のカットオフ値を算出した（カットオフ値 = 0.21 および 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 修復に関与する遺伝子多型として、*AHR* (G>A, rs2066853), *CYP1A1* (A>G, rs1048943), *CYP1A2* (A>C, *CYP1A2*1F*, rs762551), *CYP1B1* (C>G, Leu432Val, rs1056836), 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、*GSTM1* (Non-null/null) および *GSTT1* (Non-null/null) 遺伝子多型はマルチプレックス 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 に示す。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、8,256 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全てあったのは 1,998 名だった。このうち < 0.21 ng/mL は Low cotinine level と定義し 733 名、0.22-11.48 ng/mL は Moderate cotinine level と定義し 1,265 名だった。このうち Moderate cotinine level については、

中央値である 0.55 ng/mL でカットオフし、2 群に分けた。11.49 ng/mL 以上は High cotinine level と定義し、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のは、1,265 名だった。High cotinine level は、中央値である 101.66 ng/mL でカットオフし、さらに 2 群に分けた。最終的に、低濃度側から Level 1 (≤ 0.21 ng/mL; $n = 733$), Level 2 (0.22-0.55 ng/mL; $n = 630$), Level 3 (0.56-11.48 ng/mL; $n = 635$), Level 4 (11.49-101.66 ng/mL; $n = 632$), Level 5 (≥ 101.67 ng/mL; $n = 633$)とした。

統計解析では、カテゴリ変数と連続変数間には Kruskal-Wallis 検定、カテゴリ変数間にはカイ二乗検定で行った。妊娠後期の喫煙状況と出生時体格との関連は、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。さらに各遺伝子型で層別し、上記と同じ交絡因子で調整した重回帰分析で検討した。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。Level 1 から Level 5 の群間で有意差が認められた

のは、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 $P < 0.05$ ）。

AHR (G>A, Arg554Lys)・*XRCCI* (C>T, Arg194Trp; G>A, Arg399Gln) 遺伝子型による妊娠後期母体血漿コチニン値が出生時体格に及ぼす影響を表 2 に示す。

遺伝子型を考慮しない場合、Level 1 の妊婦から生まれた児と比較して、Level 5 の妊婦から生まれた児の出生体重は 171 g (95% CI: -226, -117) 有意に小さく、出生身長は 0.63 cm (95% CI: -0.93, -0.03) 有意に小さく、出生頭囲は 0.53 cm (95% CI: -0.77, -0.07) 有意に小さかった（いずれも P for trend < 0.001 ）。

AHR (G>A, Arg554Lys) 遺伝子型を考慮した場合、GG 型では、Level 1 の妊婦から生まれた児と比較して、Level 5 の妊婦から生まれた児の出生体重は 217 g (95% CI: -332, -102) 有意に小さく (P for trend < 0.001)、出生身長は 0.97 cm (95% CI: -1.54, -0.40) 有意に小さく (P for trend < 0.01)、出生頭囲は 0.57 cm (95% CI: -1.01, -0.13) 有意に小さかった (P for trend < 0.01)。一方、AA 型では、Level 1 の妊婦から生まれた児と比較して、Level 5 の妊婦から生まれた児の出生体重、出生身長、および出生頭囲で有意な減少を示さなかった。

XRCCI (C>T, Arg194Trp) 遺伝子型を考慮した場合、TT 型では、Level 1 の妊婦から生まれた児と比較して、Level 5 の妊婦から生まれた児の出生体重は 387 g (95% CI: -558, -217) 有意に小さく (P for trend < 0.01) 出生頭囲は 1.63 cm (95% CI: -2.91, -0.35) 有意に小さかった (P for trend < 0.05)。一方、CC 型では、Level 1 の妊婦から生まれた児と比較して、Level 5 から生まれた児の出生体重は 133 g (95% CI: -213, -53) 有意に小さく (P for trend < 0.01)、出生頭囲は 0.38 cm (95% CI: -0.72, -0.04) 有意に小さかった (P for trend $<$

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

0.01)。

XRCCI (G>A, Arg399Gln) 遺伝子型を考慮した場合、AA 型では、Level 1 から生まれた児と比較して、Level 5 から生まれた児の出生体重は 366 g (95% CI: -554, -177) 有意に小さく (P for trend < 0.001), 出生身長は 2.10 cm (95% CI: -3.18, -1.03) 有意に小さかった (P for trend < 0.001)。一方、GG 型では、Level 1 から生まれた児と比較して、Level 5 から生まれた児の出生体重は 169 g (95% CI: -243, -95) 有意に小さく (P for trend < 0.001), 出生身長は 0.57 cm (95% CI: -1.01, -0.13) 有意に小さかった (P for trend < 0.05)。

CYP1A1 (A>G, Ile462Val), *CYP1A2* (A>C, *CYP1A2*1F*), *CYP1B1* (C>G, Leu432Val), および *GSTM1* (Non-null/null), *GSTT1* (Non-null/null) 遺伝子型を考慮した場合、遺伝子型による妊娠後期母体血漿コチニン値と出生時体格との関連に違いはなかった (表なし)。

D. 考察

本研究と同じ対象者を用いた先行研究で、Level 1 から Level 3 まで (Low cotinine levels と Moderate cotinine levels) の妊婦の 91.1% は自記式調査票で非喫煙と回答していた (Kobayashi et al., 2016)。Low cotinine levels と Moderate cotinine levels を受動喫煙者、High cotinine levels を能動喫煙者とみなした場合、Moderate cotinine levels の妊婦から生まれた児の出生体重の減少量と受動喫煙者から生まれた児の出生体重の減少量は類似していた (30 g から 101 g の減少) (Kharrazi et al., 2004; Salmasi et al., 2010)。一方、High cotinine levels の妊婦から生まれた児の出生体重の減少量と能動喫煙者から生まれた児の出生体重の減少量も類似していた (281 g までの減少) (Sasaki et al., 2006; Salmasi et al., 2010; Suzuki et al., 2016)。それゆえに、受動喫煙者から生まれた児は出生体重を減少させる傾向にあり、能動喫煙者から

生まれた児はより大きく出生体重を減少させる傾向があった。本研究から、主流煙と比較して副流煙によるヒトへの影響は小さいという先行研究と結果は一致していた (Behera et al., 2014)。しかし、児の出生体重の減少を予防するために、できるだけ妊婦は受動喫煙を避けるべきだと考える。

AHR (G>A, Arg554Lys) G アレルでは、A アレルよりも *CYP1A1* の誘導がより大きいことが報告されている (Wong et al., 2001)。G アレルをもつ Moderate cotinine levels や High cotinine level の妊婦は、A アレルよりもより多くの PAH 代謝物 (ベンゾ[a]ピレン ジオールエポキシド; BPDE) や BPDE-DNA 付加体が胎盤内でより多く形成されると予想される (Wong et al., 2001; Hodek et al., 2013; Karttunen et al., 2010)。これらの増加は胎児に影響を与え、出生時体格の減少を引き起こしているかもしれない。

XRCCI (C>T, Arg194Trp) T アレルは、C アレルと比較して、染色分体の交換が多く頻度で起こっていることが報告されている (Au et al., 2003)。*XRCCI* (G>A, Arg399Gln) A アレルは、G アレルと比較して、非放射線特異的 DNA の修復レベルが低く (Vodicka et al., 2007), DNA 付加体レベルが高いことが報告されている (Matullo et al., 2001)。このために、*XRCCI* (C>T, Arg194Trp) T アレルや *XRCCI* (G>A, Arg399Gln) A アレルの妊婦では、出生時体格の減少が大きくなったと考えられる。

CYP1A1 (A>G, Ile462Val), *CYP1A2* (A>C, *CYP1A2*1F*), *CYP1B1* (C>G, Leu432Val), および *GSTM1* (Non-null/null), *GSTT1* (Non-null/null) 遺伝子多型では、DNA 発現の違い、代謝活性、そして代謝物と DNA との付加体形成量の違いが既に報告されている (Lodovici et al., 2004; Hanaoka et al., 2002; Wang et

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

al., 2013; Daly, 1995)。しかし、コチニン値と出生時体格との間の用量反応関係は、これらの遺伝子型ではほとんど同じだった。それゆえに、これらの代謝に関わる遺伝子型による出生時体格への影響は、コチニン値による出生時体格への影響よりも小さいと考えられる。

本研究の結果から、妊娠中の母体血漿コチニン値と出生時体格との関連は線形の用量反応関係にあることがわかった。そして、*AHR*（G>A, Arg554Lys）GG型、*XRCC1*（C>T, Arg194Trp）TT型、および*XRCC1*（G>A, Arg399Gln）AA型では、これらの関係が、より顕著に示すことを明らかにした。本研究の結果は、化学物質の代謝やDNA修復遺伝子がたばこ煙の化合物との反応で、胎児発育の際に大きな役割を果たすことを示唆するものである。

先行研究では、ニトロソアミン類代謝酵素の遺伝子多型によって、母の喫煙と児の出生時体格との関連に影響を及ぼすことが明らかになっている（Sasaki et al., 2008）。今後は、妊婦の受動喫煙と出生時体格との関係に、ニトロソアミン類代謝酵素の遺伝子多型によって影響が異なるかについてさらに検討していく予定である。

E．結論

妊娠中の母体血漿コチニン値と出生時体格との関連は線形の用量反応関係にあった。そして、*AHR*（G>A, Arg554Lys）GG型、*XRCC1*（C>T, Arg194Trp）TT型、および*XRCC1*（G>A, Arg399Gln）AA型では、これらの関係が、より顕著に示した。

F．研究発表

1.論文発表

(1) Kobayashi S, Sata F, Sasaki S, et al. Combined effects of *AHR*, *CYP1A1*, and *XRCC1* genotypes and prenatal tobacco

smoking on infant birth size: Biomarker assessment in the Hokkaido Study. *Reprod Toxicol.* 2016; 65: 295-306.

(2) Kobayashi S, Sata F, Sasaki S, et al. Modification of adverse health effects of maternal active and passive smoking by genetic susceptibility: dose-dependent association of plasma cotinine with infant birth size among Japanese women—The Hokkaido Study. *Int J Epidemiol.* (submitted).

2.学会発表

(1) Kobayashi S, Sata F, Sasaki S, et al. Combined effects of *AHR*, *CYP1A1* and *XRCC1* genetic polymorphisms and prenatal maternal smoking on infant birth size: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Conference of International Society for Environmental Epidemiology and International Society of Exposure Science – Asia Chapter 2016 (ISEE-ISES 2016AC). Sapporo, Japan. June 26-29, 2016.

(2) 小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, 他. 妊婦のコチニン値と出生体重との濃度依存的な関係に影響を及ぼす *AHR* と *XRCC1* 遺伝子: 北海道スタディ. 第27回日本疫学会学術総会. 甲府市. 2017.1.25-27.

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) Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect.* 2003; 111:

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

- 1843-1850.
- (2) Behera SN, Xian H, Balasubramanian R. Human health risk associated with exposure to toxic elements in mainstream and sidestream cigarette smoke. *Sci Total Environ.* 2014; 472: 947-956.
- (3) Daly AK. Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J Mol Med.* 1995; 73: 539-553.
- (4) 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.
- (5) Hanaoka T, Yamano Y, Pan G, et al. Cytochrome P450 1B1 mRNA levels in perinatal blood cells and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Chinese coke oven workers. *Sci Total Environ.* 2002; 296: 27-33.
- (6) Hodek P, Koblihoová J, Kizek R, et al. The relationship between DNA adduct formation by benzo[a]pyrene and expression of its activation enzyme cytochrome P450 1A1 in rat. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; 36: 989-996.
- (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) Kharrazi M, DeLorenze GN, Kaufman FL, et al. Environmental tobacco smoke and pregnancy outcome. *Epidemiology.* 2004; 15: 660-670.
- (9) 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.
- (10) Kobayashi S, Sata F, Sasaki S, et al. Combined effects of *AHR*, *CYP1A1*, and *XRCC1* genotypes and prenatal tobacco smoking on infant birth size: Biomarker assessment in the Hokkaido Study. *Reprod Toxicol.* 2016; 65: 295-306.
- (11) Matullo G, Palli D, Peluso M, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and ³²P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis.* 2001; 22: 1437-1445.
- (12) Salmasi G, Grady R, Jones J, et al. Environmental tobacco smoke exposure and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analyses. *Acta Obstet Gynecol.* 2010; 89: 423-441.
- (13) 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.
- (14) Sasaki S, Sata F, Katoh S, et al. Adverse birth outcomes associated with maternal smoking and polymorphisms in the N-nitrosamine-metabolizing enzyme genes NQO1 and CYP2E1. *Am J Epidemiol.* 2008; 167: 719-726.
- (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) Suzuki K, Shinohara R, Sato M, et al. Association between maternal smoking during pregnancy and birth weight: an appropriately adjusted model from the Japan Environment and Children's study. *J Epidemiol.* 2016; 26: 371-377.
- (17) Vodicka P, Stetina R, Polakova V, et al. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis.*

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

2007; 28: 657-664.

(18) Wang L, Hu Z, Deng X, et al.

Association between common CYP1A2 polymorphisms and theophylline metabolism in non-smoking healthy volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2013; 112: 257-263.

(19) 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. *Pharmacogenetics.* 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

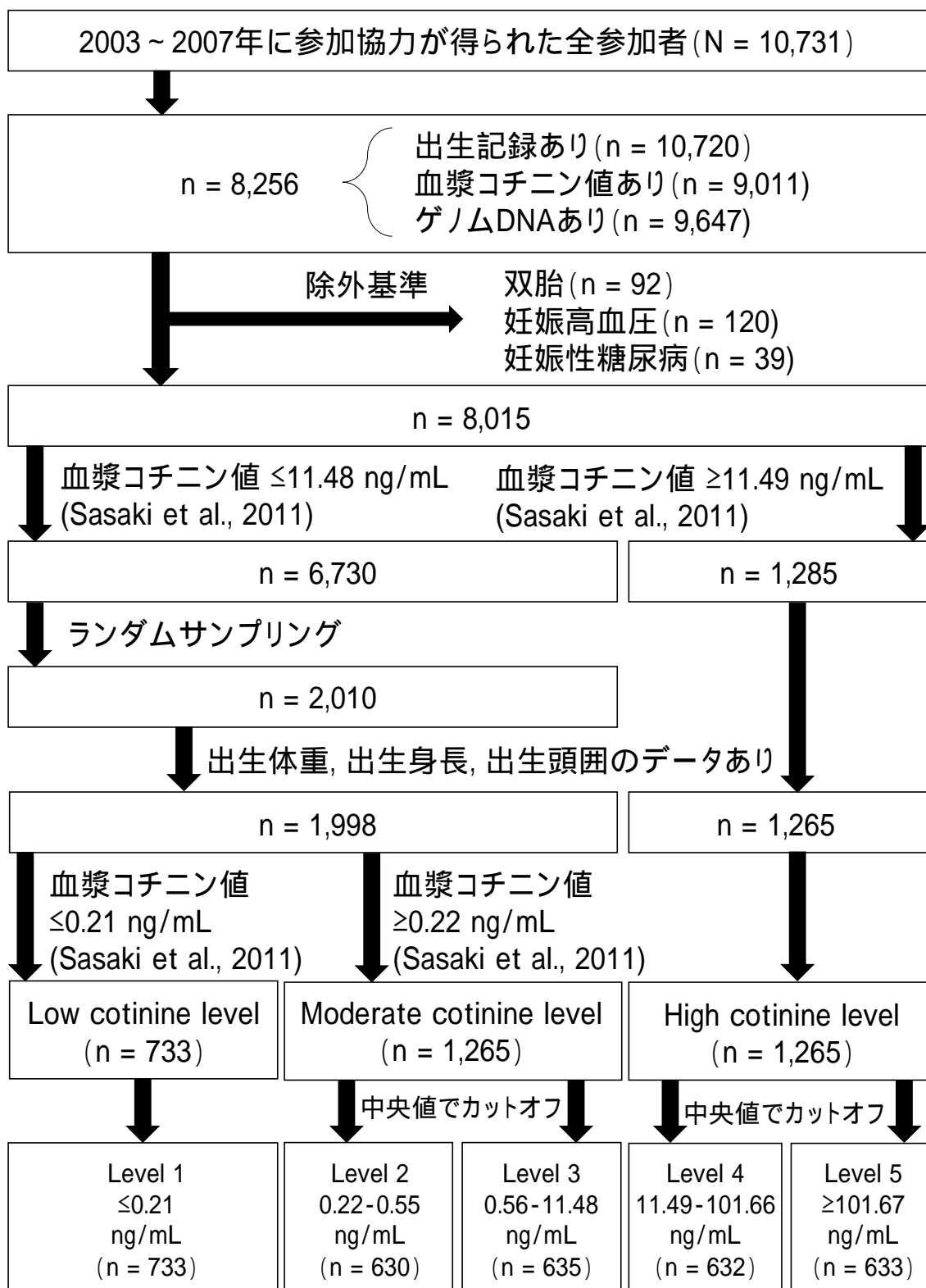


図 1. 対象者の選択フローチャート

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)

	母体血漿コチニン値					P value
	Low	Moderate		High		
	Level 1 (n = 733)	Level 2 (n = 630)	Level 3 (n = 635)	Level 4 (n = 632)	Level 5 (n = 633)	
児						
性別 ^a						
男	358 (48.8)	314 (49.8)	287 (45.2)	317 (50.2)	335 (52.9)	0.089
女	375 (51.2)	316 (50.2)	348 (54.8)	315 (49.8)	297 (46.9)	
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	
出生体重 (g) ^b	3,093 (394)	3,081 (384)	3,065 (373)	3,055 (374)	2,948 (378)	<0.001***
出生身長 (cm) ^b	49.2 (2.1)	49.1 (2.1)	49.0 (2.0)	49.1 (2.0)	48.5 (3.1)	<0.001***
出生頭囲 (cm) ^b	33.4 (1.7)	33.3 (1.4)	33.1 (1.4)	33.1 (1.3)	33.0 (1.7)	<0.001***
在胎週数 (週) ^b	38.8 (1.3)	39.1 (1.3)	39.1 (1.2)	39.0 (1.2)	38.8 (1.3)	<0.001***
妊婦						
年齢 (歳) ^b	31.4 (4.2)	30.2 (4.5)	29.3 (4.5)	29.0 (4.8)	28.9 (4.6)	<0.001***
身長 (cm) ^b	158.0 (5.2)	158.1 (5.2)	158.1 (5.0)	158.6 (5.5)	157.9 (6.0)	0.224
妊娠前体重 (kg) ^b	53.0 (8.5)	52.9 (8.3)	52.5 (8.1)	53.8 (11.3)	53.1 (10.0)	0.179
出産歴 ^a						
初産	296 (40.4)	283 (44.9)	316 (49.8)	259 (41.0)	187 (29.5)	<0.001***
経産	437 (59.6)	347 (55.1)	319 (50.2)	350 (55.4)	434 (68.6)	
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	23 (3.6)	12 (1.9)	
妊娠中飲酒 ^a						
なし	313 (42.7)	245 (38.9)	249 (39.2)	208 (32.9)	223 (35.2)	0.089
あり	420 (57.3)	385 (61.1)	386 (60.8)	413 (65.3)	399 (63.0)	
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (1.7)	10 (1.6)	
教育歴 ^a						
中学卒業	10 (1.4)	14 (2.2)	25 (3.9)	80 (12.7)	96 (15.2)	<0.001***
高校卒業	280 (38.2)	244 (38.7)	309 (48.7)	357 (56.0)	372 (58.8)	
短大卒業	336 (45.8)	291 (46.2)	253 (39.8)	175 (27.7)	141 (22.3)	
大学卒業	107 (14.6)	80 (12.7)	48 (7.6)	14 (2.2)	9 (1.4)	
不明	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)	9 (1.4)	15 (2.4)	
世帯収入 (万円) ^a						
<300	111 (15.1)	119 (18.9)	189 (29.8)	148 (23.4)	162 (25.6)	<0.001***
300-<500	346 (47.2)	291 (46.2)	263 (41.4)	248 (39.2)	251 (39.7)	
500-<800	216 (29.5)	168 (26.7)	143 (22.5)	96 (15.2)	90 (14.2)	
≥800	60 (8.2)	52 (8.3)	40 (6.3)	27 (4.3)	30 (4.7)	
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	113 (17.9)	100 (15.8)	

カイ二乗検定, Kruskal-Wallis 検定. 不明は除外した.

母体血漿コチニン値: Level 1 (0.12-0.21 ng/mL), Level 2 (0.22-0.55 ng/mL), Level 3 (0.56-11.48 ng/mL), Level 4 (11.49-101.66 ng/mL), Level 5 (101.67-635.25 ng/mL).

^a; N (%).

^b; Mean (SD)..

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

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

表 2.妊娠後期母体血漿コチニン値が出生時体格との関連（*AHR*（G>A, rs2066853）・*XRCC1*（C>T, rs1799782; G>A, rs25487）遺伝子型別）

遺伝子型	コチニン値	n	出生体重 (g)	出生身長 (cm)	出生頭囲 (cm)
			β (95% CI)	β (95% CI)	β (95% CI)
All					
(-)	Level 1	733	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
(-)	Level 2	630	-57 (-104, -10)*	-0.36 (-0.62, -0.09)**	-0.26 (-0.47, -0.05)*
(-)	Level 3	635	-55 (-103, -8)*	-0.31 (-0.58, -0.05)*	-0.27 (-0.49, -0.06)*
(-)	Level 4	632	-93 (-147, -39)**	-0.34 (-0.64, -0.03)*	-0.40 (-0.64, -0.16)**
(-)	Level 5	633	-171 (-226, -117)***	-0.63 (-0.93, -0.03)***	-0.53 (-0.77, -0.07)***
			<i>P</i> for trend < 0.001***	<i>P</i> for trend < 0.001***	<i>P</i> for trend < 0.001***
<i>AHR</i> (G>A, Arg554Lys; rs2066853)					
GG					
	Level 1	219	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
	Level 2	183	-76 (-175, 23)	-0.35 (-0.84, 0.15)	-0.24 (-0.62, 0.14)
	Level 3	200	-63 (-163, 37)	-0.28 (-0.78, 0.22)	-0.26 (-0.65, 0.13)
	Level 4	193	-182 (-297, -67)**	-0.74 (-1.31, -0.16)*	-0.63 (-1.07, -0.18)**
	Level 5	194	-217 (-332, -102)***	-0.97 (-1.54, -0.40)**	-0.57 (-1.01, -0.13)*
			<i>P</i> for trend < 0.001***	<i>P</i> for trend < 0.01**	<i>P</i> for trend < 0.01**
GA					
	Level 1	364	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
	Level 2	317	-72 (-134, -10)*	-0.37 (-0.71, -0.02)*	-0.42 (-0.71, -0.12)**
	Level 3	290	-82 (-146, -18)*	-0.44 (-0.80, -0.08)*	-0.34 (-0.64, -0.03)*
	Level 4	300	-90 (-164, -16)*	-0.22 (-0.64, 0.19)	-0.42 (-0.77, -0.07)*
	Level 5	315	-177 (-249, -104)***	-0.46 (-0.86, -0.05)*	-0.58 (-0.93, -0.24)**
			<i>P</i> for trend < 0.001***	<i>P</i> for trend > 0.05	<i>P</i> for trend < 0.01**
AA					
	Level 1	150	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
	Level 2	130	8 (-98, 114)	-0.35 (-1.04, 0.33)	0.06 (-0.43, 0.55)
	Level 3	145	-7 (-112, 97)	-0.18 (-0.86, 0.49)	-0.26 (-0.74, 0.22)
	Level 4	139	9 (-103, 122)	-0.09 (-0.82, 0.63)	-0.19 (-0.70, 0.33)
	Level 5	124	-102 (-224, 21)	-0.53 (-1.32, 0.26)	-0.52 (-1.08, 0.05)
			<i>P</i> for trend > 0.05	<i>P</i> for trend > 0.05	<i>P</i> for trend > 0.05
<i>XRCC1</i> (C>T, Arg194Trp; rs1799782)					
CC					
	Level 1	337	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
	Level 2	297	-56 (-125, 13)	-0.38 (-0.76, 0.00)*	-0.35 (-0.65, -0.06)*
	Level 3	303	-65 (-136, 6)	-0.32 (-0.71, 0.07)	-0.40 (-0.70, -0.09)*
	Level 4	298	-96 (-175, -17)*	-0.36 (-0.80, 0.07)	-0.53 (-0.86, -0.19)**
	Level 5	317	-133 (-213, -53)**	-0.57 (-1.01, -0.13)*	-0.38 (-0.72, -0.04)*
			<i>P</i> for trend < 0.01**	<i>P</i> for trend < 0.05*	<i>P</i> for trend < 0.01**
CT					
	Level 1	320	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
	Level 2	273	-52 (-126, 23)	-0.37 (-0.78, 0.05)	-0.10 (-0.39, 0.18)
	Level 3	264	-19 (-95, 57)	-0.23 (-0.65, 0.19)	-0.04 (-0.33, 0.24)
	Level 4	276	-100 (-185, -15)*	-0.29 (-0.77, 0.18)	-0.14 (-0.47, 0.18)
	Level 5	265	-172 (-258, -87)***	-0.59 (-1.07, -0.12)*	-0.45 (-0.77, -0.12)**
			<i>P</i> for trend < 0.001***	<i>P</i> for trend < 0.05*	<i>P</i> for trend < 0.05*
TT					
	Level 1	76	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
	Level 2	60	-61 (-196, 74)	-0.20 (-1.10, 0.69)	-0.48 (-1.49, 0.53)
	Level 3	68	-139 (-264, -14)*	-0.52 (-1.35, 0.31)	-0.49 (-1.43, 0.45)
	Level 4	58	-5 (-167, 157)	-0.31 (-1.39, 0.76)	-0.89 (-2.11, 0.32)
	Level 5	51	-387 (-558, -217)***	-0.88 (-2.02, 0.25)	-1.63 (-2.91, -0.35)*
			<i>P</i> for trend < 0.01**	<i>P</i> for trend > 0.05	<i>P</i> for trend < 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（続き）

遺伝子型	コチニン値	n	出生体重 (g)	出生身長 (cm)	出生頭圍 (cm)
			β (95% CI)	β (95% CI)	β (95% CI)
<i>XRCC1</i> (G>A, Arg399Gln; rs25487)					
GG	Level 1	413	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
	Level 2	346	-60 (-123, 3)	-0.30 (-0.68, 0.07)	-0.31 (-0.61, -0.02)*
	Level 3	363	-50 (-114, 14)	-0.17 (-0.55, 0.21)	-0.41 (-0.71, -0.11)**
	Level 4	348	-55 (-129, 18)	-0.15 (-0.58, 0.29)	-0.48 (-0.83, -0.13)**
	Level 5	348	-169 (-243, -95)***	-0.57 (-1.01, -0.13)*	-0.76 (-1.11, -0.41)***
			<i>P</i> for trend < 0.001***	<i>P</i> for trend > 0.05	<i>P</i> for trend < 0.001***
GA	Level 1	265	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
	Level 2	232	-37 (-117, 44)	-0.41 (-0.81, -0.01)*	-0.17 (-0.48, 0.15)
	Level 3	237	-53 (-133, 28)	-0.51 (-0.91, -0.10)*	-0.11 (-0.42, 0.21)
	Level 4	245	-111 (-200, -21)*	-0.47 (-0.91, -0.02)*	-0.23 (-0.58, 0.12)
	Level 5	237	-126 (-218, -34)**	-0.39 (-0.85, 0.07)	-0.15 (-0.51, 0.21)
			<i>P</i> for trend < 0.01**	<i>P</i> for trend > 0.05	<i>P</i> for trend > 0.05
AA	Level 1	55	0 (Reference)	0.00 (Reference)	0.00 (Reference)
	Level 2	52	-112 (-269, 44)	-0.67 (-1.56, 0.23)	-0.36 (-1.03, 0.31)
	Level 3	35	-31 (-218, 156)	-0.59 (-1.66, 0.48)	0.32 (-0.47, 1.12)
	Level 4	39	-278 (-498, -59)*	-1.18 (-2.43, 0.08)	-0.68 (-1.62, 0.26)
	Level 5	48	-366 (-554, -177)***	-2.10 (-3.18, -1.03)***	-0.85 (-1.62, 0.26)
			<i>P</i> for trend < 0.001***	<i>P</i> for trend < 0.001***	<i>P</i> for trend > 0.05

95% CI, 95%信頼区間.

母体血漿コチニン値: Level 1 (0.12-0.21 ng/mL), Level 2 (0.22-0.55 ng/mL), Level 3 (0.56-11.48 ng/mL), Level 4 (11.49-101.66 ng/mL), Level 5 (101.67-635.25 ng/mL).

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.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

DNA メチル化を介する有機フッ素化合物胎児期曝露の児への影響

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 石塚 真由美 北海道大学大学院獣医学研究科 教授
研究分担者 松浦 英幸 北海道大学農学研究院生命有機化学 准教授

研究要旨

背景：有機フッ素化合物（**Perfluoroalkyl acids; PFAAs**）の胎児期曝露は児の健康に影響を及ぼすことが報告されている。その作用機序の1つとして、**DNA** メチル化への影響が介在していると考えられているが、疫学研究で検討した報告はない。

目的：本研究は、**PFAAs** 曝露による胎児発達への影響に **DNA** メチル化変化が関与しているかを明らかにすることを目的とした。

方法：対象は、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 **DNA**、母体血中 **PFAAs** 濃度のそろそろ母児ペア(N=177)とした。**Insulin-like growth factor 2 (IGF2)**, **H19**, および **long interspersed element 1 (LINE1)** 遺伝子領域の臍帯血メチル化をパイロシークエンス法を用いて定量した。得られた **DNA** メチル化率と **PFAAs** の血中濃度との関連を重回帰分析で解析し、媒介分析により、**PFAAs** 曝露と出生時体格との関連にメチル化が介在しているかを検討した。

結果：交絡因子調整後、**PFOA**濃度と**IGF2**メチル化との間に有意な負の関連が見られた($\beta = -0.73$, $p = 0.04$)。次に、**IGF2**メチル化と出生時体格との関連を検討した結果、**IGF2**メチル化とポンドラル指数との間に有意な正の相関が認められた($\beta = 0.17$, $p = 0.002$)。さらに媒介分析の結果、**IGF2**メチル化が**PFOA**曝露によるポンドラル指数の減少を仲介しており、その影響の20%を説明できることが示された。

考察：以上の結果は、**PFAAs** 曝露は、**DNA** メチル化への影響を介して、胎児発達に影響を与えていることを示唆している。

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)

A . 研究目的

有機フッ素化合物 **perfluoroalkyl acids (PFAAs)** は身近な日用品、工業製品の成分として広く使用されている化合物である。**PFAAs** の中で、**perfluorooctane sulfonate (PFOS)** および **perfluorooctanoic acid (PFOA)** が最も使用されていたが、近年その高い毒性・残留性から、世界各国で使用

制限が実施されるようになってきた。しかし、**PFOS**, **PFOA** は難分解性のため未だ環境中に多く残存し、また、人での半減期は **PFOS** で 5.4 年、**PFOA** で 3.8 年と長い(Olsen et al., 2007)。さらに、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。曝露による出生時体格の低下は各国で報告があり、我々も **PFOS** 胎児期曝露による女児での出生体重低下 (Washino et al., 2009)を報告している。また、我々は、**PFAAs** 胎児期曝露が生後のアレルギー症状と関連していることを見出した

（Goudarzi et al., 2016）。このように、胎児期曝露が長期にわたり児の健康に影響を及ぼす作用機序の1つとして、DNAメチル化を含むエピジェネティクス変化の影響が介在していると考えられている（Baccarelli and Bollati, 2009）。しかし、PFAAs 胎児期曝露による児 DNA メチル化への影響を検討した疫学研究は、臍帯血 PFOA 濃度と臍帯血中のゲノム全体のメチル化低下を報告した横断研究のみである（Guerrero-Preston et al. 2010）。

本研究では、PFAAs の胎児期曝露による児の健康への影響に DNA メチル化変化が関与しているかを明らかにすることを目的とし、胎児期の PFAAs 曝露と long interspersed element-1（LINE1）、Insulin-like growth factor 2(IGF2)/H19 領域の臍帯血 DNA メチル化変化、および児の出生体格との関連について出生コホートを用いて検討した（Kobayashi et al., 2016）。

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、PFOS、PFOA の出産前母体血中濃度のそろった母児ペア(N=177)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 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ケンス法により、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。母体血中 PFOS、PFOA 濃度は LC/MS-MS で測定した。得られた曝露濃度を log 変換し、重回帰分析により統計解析を行った。また、媒介分析 (Hayes, 2013) により、DNA メチル化の介在性について検討した。

（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 48.5% (\pm 3.0)、H19 が 52.3% (\pm 2.0)、LINE1 が 75.8% (\pm 1.1)であった。出産前母体血中 PFOS 濃度の中央値は 5.2 ng/ml (最小値-最大値: 3.9-7.2)、PFOA 濃度の中央値は 1.3 ng/ml (最小値-最大値: 0.9-2.1)であった。Table 1 に解析に用いた集団の母児の属性、および、PFOS、PFOA 濃度との関連を示した。PFOS、PFOA 濃度ともに出産歴および採血時期との有意な相関が認められた。また、PFOA 濃度については、母の教育歴および児の性別との相

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（**Table 2**）、母年齢・学歴・妊娠中喫煙・児性別・母体血採血時期で調整後、**PFOA**濃度と **IGF2** メチル化との間に有意な負の関連がみられた（ $\beta = -0.73$, $p = 0.04$ ）が、**H19**, **LIN1**との関連は認められなかった。**PFOS**濃度については、いずれのメチル化とも有意な関連は認められなかった。

次に、メチル化と出生時体格との関連を調べた結果（**Table 3**）、**IGF2**の低メチル化によるポンデラル指数の低下が認められた（ $\beta = 0.17$, $p < 0.01$ ）。

さらに、媒介分析の結果（**Figure 1**）**IGF2**メチル化が **PFOA**曝露によるポンデラル指数の減少を仲介しており（ $ab = -0.11$; **BCaCI: -0.30 to -0.02**）その影響の 21%（ $P_M = 0.21$; **Preacher and Hayes, 2008**）を説明出来ることが示された。

D．考察

本研究により、**PFOA**曝露による出生時体格低下への影響において、**IGF2**メチル化が仲介していることが示された。

疫学および動物実験による先行研究で **PFAAs**曝露による出生体格の低下が報告されている（**Olsen et al., 2009; Washino et al., 2009; Verner et al. 2015**）。しかしながら、その作用機序については明らかにされていない。我々の結果は、**PFAAs**胎児期曝露による胎児発達への作用機序の1つとして、曝露による児のメチル化変化、その結果として起こる遺伝子発現への影響が関与していることを示唆するものである。

IGF2は胎児発育に重要なインスリン様

成長因子をコードしており、そのメチル化は出生体重や体格のみならず、生後の肥満状態とも相関が示されている（**Perkins et al., 2012**）。デンマークの出生コホート研究では、胎児期 **PFOA**曝露により女児の 20年後の肥満傾向の上昇、レプチン濃度の低下、アディポネクチン濃度の上昇といった影響を与えることが示されている（**Halldorsson et al., 2012**）。ポンデラル指数は脂肪組織などの軟組織に対する骨構造の割合を示し、児の肥満度を表す。その減少、つまり胎児発達の遅れは、将来の肥満のみならず、2型糖尿病、心疾患などの疾病リスクを上昇させる可能性がある（**Barker, 2010**）。**PFAAs**の胎児曝露による長期的な影響を考えると、曝露によるメチル化変化の影響が児の将来の健康とどうかかわるのか、出生コホートを追跡し解明することが必要である。

E．結論

胎児期 **PFOA**曝露による **IGF2**の低メチル化、さらに低メチル化による出生時ポンデラル指数低下が認められた。媒介分析により、**IGF2**メチル化が **PFOA**曝露によるポンデラル指数減少を仲介しており、その影響の 20%を説明できることが示された。

F．研究発表

1．論文発表

(1) **Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, Itoh S, Sasaki S, Ishizuka M, Nakazawa H, Ikeno T, Kishi R. 2016. Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: The**

**Hokkaido Study. J Expo Sci Environ
Epidemiol. 2016 Aug 24.**

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. Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR. 2007. Half-life of serum elimination of perfluoro-octanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. Environ Health Perspect. 115:1298-305.**
- 2. Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW, Angerer J. 2007. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. Int Arch Occup Environ Health. 80:643-8.**
- 3. Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, Ito R, Nakata A, Iwasaki Y, Saito K, Nakazawa H, Kishi R. 2009. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. Environ Health Perspect. 117:660-7.**
- 4. Goudarzi H, Miyashita C, Okada E, Kashino I, Kobayashi S, Chen CJ, Ito S, Araki A, Matsuura H, Ito YM, Kishi R. 2016. Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on prevalence of allergic diseases among 4-year-old children. Environ Int. 94:124-32.**
- 5. Baccarelli A and Bollati V. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. Curr Opin Pediatr. 21:243-251.**
- 6. Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, Lebron C, Witter FR, Apelberg BJ, Hernández-Roystacher M, Jaffe A, Halden RU, Sidransky D. 2010. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. Epigenetics. 5:539-46.**
- 7. Hayes AF. 2013. Introduction to Mediation, Moderation, and Conditional Process Analysis. In *A Regression-Based Approach*. New York, NY, USA: Guilford Press.**
- 8. Preacher KJ, Hayes AF. 2008. Asymptotic and resampling strategies for assessing and comparing indirect effects in multiple mediator models. *Behav Res Methods*, 40: 879-891.**
- 9. Olsen GW, Butenhoff JL, Zobel LR. 2009. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: an epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reprod Toxicol*. 27:212-30.**
- 10. Verner MA, Luccisano AE, Morken NH, Yoon M, Wu H, McDougall R, Maisonet M, Marcus M, Kishi R, Miyashita C, Chen MH, Hsieh WS, Andersen ME, Clewell HJ 3rd,**

- Longnecker MP. 2015. Associations of Perfluoroalkyl Substances (PFAS) with Lower Birth Weight: An Evaluation of Potential Confounding by Glomerular Filtration Rate Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK). Environ Health Perspect. 123:1317-24.**
- 11. Perkins E, Murphy SK, Murtha AP, Schildkraut J, Jirtle RL, Demark-Wahnefried W, Forman MR, Kurtzberg J, Overcash F, Huang Z, Hoyo C. 2012. Insulin-like growth factor 2/H19 methylation at birth and risk of overweight and obesity in children. The Journal of pediatrics. 161:31-9.**
- 12. Halldorsson TI, Rytter D, Haug LS, Bech BH, Danielsen I, Becher G, Henriksen TB, Olsen SF. 2012. Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: a prospective cohort study. Environmental health perspectives. 120:668-73.**
- 13. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. 2006. Clin Obstet Gynecol. 49:270-83.**

Table 1. Maternal and infant characteristics and their relationships with maternal serum PFAAs concentrations (N=177).

	Mean ±SD N (%)	PFOS (ng/ml)		PFOA (ng/ml)	
		Median (25th-75th)	p-value	Median (25th-75th)	p-value
Maternal characteristics					
Maternal age (year) ^a	29.8 ± 4.8	= -0.105	0.165	= -0.067	0.376
Pre-pregnancy BMI (kg/m)	21.2 ± 3.1 ^b	= -0.019	0.799	= -0.08	0.292
Parity ^c					
0	98 (55.4)	6.0 (4.2, 8.0)	0.008**	1.6 (1.2, 2.4)	<0.001**
1	59 (33.3)	4.8 (3.1, 6.2)		1.1 (0.8, 1.4)	
≥ 2	20 (11.3)	4.6 (3.3, 6.6)		0.8 (0.5, 1.1)	
Educational level (year) ^c					
≤ 12	83 (46.9)	5.2 (4.0, 7.0)	0.846	1.2 (0.8, 1.8)	0.030*
> 12	94 (53.1)	5.5 (3.7, 7.5)		1.5 (1.0, 2.3)	
Smoking during pregnancy ^c					
No	144 (81.4)	5.3 (4.0, 7.2)	0.308	1.4 (0.9, 2.2)	0.133
Yes	33 (18.6)	4.8 (2.8, 7.3)		1.2 (0.8, 1.7)	
Alcohol consumption during pregnancy ^c					
No	120 (67.8)	5.2 (3.9, 7.3)	0.891	1.4 (0.9, 2.1)	0.907
Yes	57 (32.2)	5.5 (3.7, 7.2)		1.4 (0.9, 2.2)	
Blood sampling period ^d					
23–31 weeks	67 (37.9)	6.0 (4.8, 7.6)	<0.001**	1.6 (1.0, 2.3)	0.015*
32-34 weeks	45 (25.4)	6.2 (3.9, 8.6)		1.4 (0.8, 1.9)	
35-41 weeks	65 (36.7)	4.6 (2.9, 5.9)		1.1 (0.8, 1.8)	
Infant characteristics					
Gestational age (week) ^a	39.8 ± 1.0	= 0.042	0.575	= 0.063	0.403
Sex ^c					
Male	79 (44.6)	5.4 (4.2, 7.5)	0.158	1.6 (1.0, 2.2)	0.040*
Female	98 (55.4)	5.2 (3.3, 7.0)		1.3 (0.8, 1.9)	
Birth weight (g) ^a	3125 ± 330	= -0.126	0.096	= -0.116	0.124
Birth length (cm) ^a	48.5 ± 1.5 ^e	= 0.091	0.232	= 0.071	0.346
Ponderal Index (kg/m ³) ^a	27.4 ± 2.2 ^e	= -0.264	<0.001**	= -0.226	0.003**

Abbreviations: BMI, body mass index; PFAA, perfluoroalkyl acid; PFOA, perfluorooctanoic acid; PFOS, perfluorooctane sulfonate. ^aSpearman's correlation coefficient (ρ). ^bData missing: prepregnancy BMI (N = 1). ^cMann–Whitney U-test. ^dKruskal–Wallis test. ^eData excluded: birth length (N=1) and ponderal index (N= 1). *P<0.05; **P<0.01.

Table 2. Association between maternal PFAA concentrations and cord blood DNA methylation in multiple linear regression analyses (N=177).

	IGF2 methylation (%)		H19 methylation (%)		LINE1 methylation (%)	
	(95% CI)	p	(95% CI)	p	(95% CI)	p
log (PFOS)						
Crude	-0.60 (-1.53, 0.33)	0.203	-0.16 (-0.79, 0.46)	0.605	0.18 (-0.17, 0.53)	0.321
Adjusted	-0.56 (-1.56, 0.44)	0.274	-0.09 (-0.77, 0.59)	0.798	0.05 (-0.31, 0.42)	0.764
	R ² =0.056		R ² = 0.018		R ² =0.134	
log (PFOA)						
Crude	-0.82 (-1.50, -0.14)	0.019*	-0.10 (-0.56, 0.36)	0.673	-0.02 (-0.28, 0.24)	0.863
Adjusted	-0.73 (-1.44, -0.02)	0.043*	-0.08 (-0.57, 0.40)	0.736	-0.15 (-0.41, 0.10)	0.244
	R ² =0.072		R ² = 0.018		R ² =0.140	

Abbreviations: β , partial regression coefficient and indicates methylation changes with log-unit increase in concentration; CI, confidence interval; *IGF2*, insulin growth factor 2; *LINE1*, long interspersed element 1; PFAA, perfluoroalkyl acid; PFOA, perfluorooctanoic acid; PFOS, perfluorooctane sulfonate; R², squared multiple correlation coefficient in adjusted model. Adjusted for maternal age, maternal education, maternal smoking during pregnancy, infant sex, and maternal blood sampling period. *P<0.05.

Table 3. Association between DNA methylation and birth size in multiple linear regression analyses.

	Birth weight (g) (N=177)		Birth length (cm) (N=176)		Ponderal index (kg/m ³) (N=176)	
	(95% CI)	P-value	(95% CI)	P-value	(95% CI)	P-value
IGF2 methylation (%)						
Adjusted for gestational age	11.5 (-3.8, 26.9)	0.140	-0.05 (-0.12, 0.02)	0.190	0.19 (0.08, 0.29)	0.001**
Full adjustment ^a	13.2 (-2.5, 28.8)	0.099	-0.03 (-0.10, 0.05)	0.443	0.17 (0.06, 0.27)	0.002**
H19 methylation (%)						
Adjusted for gestational age	-0.2 (-23.3, 23.0)	0.987	0.03 (-0.08, 0.14)	0.545	-0.06 (-0.22, 0.10)	0.470
Full adjustment ^a	7.9 (-16.1, 31.9)	0.515	0.05 (-0.06, 0.16)	0.362	-0.02 (-0.18, 0.15)	0.839
LINE1 methylation (%)						
Adjusted for gestational age	10.0 (-31.3, 51.3)	0.634	0.15 (-0.05, 0.34)	0.142	-0.15 (-0.44, 0.14)	0.306
Full adjustment ^a	-3.1 (-47.1, 40.9)	0.889	0.01 (-0.20, 0.21)	0.940	-0.04 (-0.34, 0.27)	0.807

Abbreviations: β , partial regression coefficient and indicates methylation changes with log-unit increase in concentration; BMI, body mass index; CI, confidence interval; IGF, insulin growth factor; LINE1, long interspersed element 1. Full adjustment: Adjusted for maternal age, prepregnancy BMI, parity, maternal education, maternal smoking during pregnancy, gestational age, and infant sex. **P<0.01. ^aData missing: prepregnancy BMI (N=1).

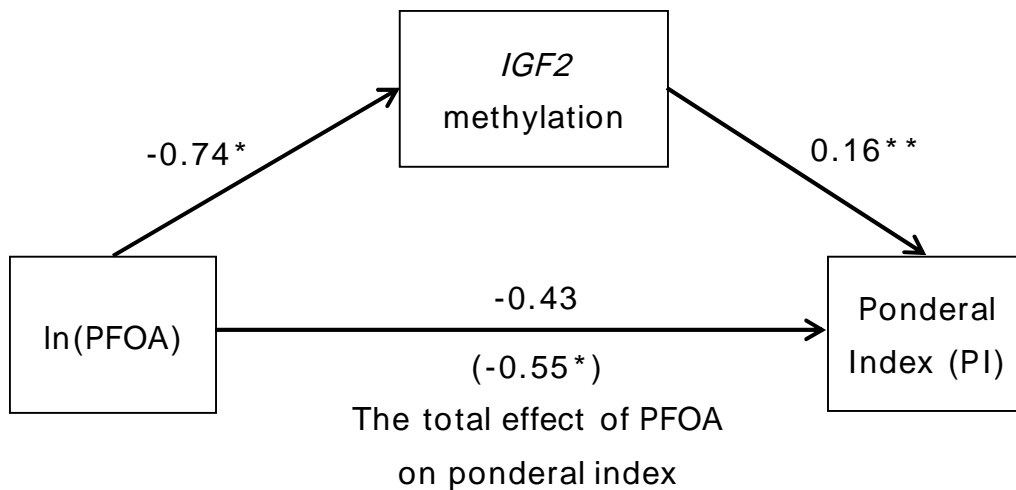


Figure 1. Mediation analysis of the association between PFOA and IGF2 methylation and between PFOA and ponderal index (N =175).

Regression coefficients of each path are described alongside with arrows. The total effect of PFOA on ponderal index is described within parentheses. A significant indirect effect of PFOA on ponderal index through IGF2 hypomethylation was observed ($ab = -0.11$; BCaCI: -0.30 to -0.02 ; Hayes, 2013). The IGF2 methylation as a mediator can account for ~20% of the total effect (PM=0.20; Preacher and Hayes, 2008). Maternal age, prepregnancy body mass index (BMI), parity, maternal education, maternal smoking during pregnancy, gestational age, infant sex, and maternal blood sampling period were adjusted. *ab*, indirect effect; BCa CI: bias-corrected and accelerated confidence interval; PM, percent mediation. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

	著者氏名	編著者	書籍名	出版社	出版地	執筆担当章	ページ	出版年
1.	岸-金堂玲子	岸-金堂玲子 森岡孝二	健康・安全で働き甲斐のある職場をつくる-日本学会議の提言を実効あるものに	株式会社ミネルヴァ書房	京都府	序章 労働雇用問題がなぜ現代日本で最重要課題なのか？過去100年の歴史を遡り考える 第 部 労働と関係する病気の予防と働く人の健康増進 第1章 労働関連疾患としての循環器疾患、糖尿病、不眠症などの実態、予防対策 第5章 女性労働者の健康と安全 終章 日本学会議提言が実効あるものになるために-生活に根ざした改革のグランドデザインを	1-10 102-110 134-142 269-278	2016年3月

論文発表（原著・総説 査読有）

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Sasaki S., Limpar M., Sata F., Kobayashi S., Kishi R.	Interaction of maternal caffeine intake during pregnancy and CYP1A2 C164A polymorphism affects infant birth size in the Hokkaido Study	Pediatric Research	-	-	In press
2	Minatoya M, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Yamamoto J, Matsumura T, Mitsui T, Moriya K, Cho K, Morioka K, Minakam H, Shinohara N, Kishi R.	Cord blood bisphenol A levels and reproductive and thyroid hormone levels of neonates: The Hokkaido Study on Environment and Children 's Health	Epidemiology	-	-	In press
3	Araki A., Mitsui T., Goudarzi H., Nakajima T., Miyashita C., Itoh S., Sasaki S., Cho K., Moriya K., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.	Prenatal di(2-ethylhexyl) phthalate exposure and disruption of adrenal androgens and glucocorticoids levels in cord blood: The Hokkaido Study	Science of the Total Environment	581-582	297-304	2017
4	Kishi R., Zhang J. J. , Ha E. H., Chen P. C., Tian Y., Xia Y., Tsuchiya K. J., Nakai K., Kim S., Hong S. J., Hong Y. C., Lee J. R., Mohamed H. J. B. J., Parajuli R. P., Adair L. S., Chong Y. S., Guo Y. L., Wang S. L., Nishiyo M., Kido T., Tai P. T., Nandasena S.	Birth Cohort Consortium of Asia (BiCCA) - Current and Future Perspectives	Epidemiology	-	-	In press

5	Goudarzi H., Miyashita C, Okada E., Kashino I., Chen C.-J., Ito S., Araki A., Kobayashi S., Matsuura H., Kishi R.	Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Prevalence of Infectious Diseases up to 4 Years of Age	Environment International	-	-	In press
6	Kobayashi S., Azumi K., Goudarzi H., Araki A., Miyashita C., Kobayashi S., Itoh S., Sasaki S., Ishizuka M., Nakazawa H., Ikeno T., Kishi R.	Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: the Hokkaido study	Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology	-	-	In press
7	Minatoya M., Itoh S., Araki A., Tamura N., Yamazaki K., Nishihara S., Miyashita C., Kishi R.	Associated factors of behavioural problems in children at preschool age: the Hokkaido study on environment and children's health	Child Care Health Dev.	-	-	In press
8	Minatoya M., Araki A., Miyashita C., Sasaki S., Goto Y., Nakajima T., Kishi R.	Prenatal di-2-ethylhexyl phthalate exposure and cord blood adipokine levels and birth size: The Hokkaido study on environment and children's health	Sci Total Environ.	579	606-611	2017
9	Kobayashi S., Sata F., Miyashita C., Sasaki S., Ban S., Araki A., Goudarzi H., Kajiwara J., Todaka T., Kishi R.	Dioxin-metabolizing genes in relation to effects of prenatal dioxin levels and reduced birth size: The Hokkaido Study	Reprod Toxicol.	67	111-116	2017

10	Goudarzi H., Araki A., Itoh S., Sasaki S., Miyashita C., Mitsui T., Nakazawa H., Nonomura K., Kishi R.	The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study	Environ Health Perspect	125 (1)	111-118	2017
11	Yila T. A., Araki A., Sasaki S., Miyashita C., Itoh K., Ikeno T., Yoshioka E., Kobayashi S., Goudarzi H., Baba T., Braimoh T., Minakami H., Endo T., Sengoku K., Kishi R.	Predictors of folate status among pregnant Japanese women: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2002-2012	Br J Nutr.	115 (12)	2227-35	2016
12	Yamamoto J., Minatoya M., Sasaki S., Araki A., Miyashita C., Matsumura T., Kishi R.	Quantifying bisphenol A in maternal and cord whole blood using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry and maternal characteristics associated with bisphenol A	Chemosphere	164	25-31	2016
13	Mitsui T., Araki A., Miyashita C., Ito S., Ikeno T., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.	The Relationship between the Second-to-Fourth Digit Ratio and Behavioral Sexual Dimorphism in School-Aged Children	PLoS One	11 (1)	e0146849	2016

14	Mitsui T., Araki A., Goudarzi H., Miyashita C., Ito S., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.	Effects of adrenal androgens during the prenatal period on the second to fourth digit ratio in school-aged children	Steroids	113	46-51	2016
15	Minatoya M., Nakajima S., Sasaki S., Araki A., Miyashita C., Ikeno T., Nakajima T., Goto Y., Kishi R.	Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health	Sci Total Environ.	565	1037-43	2016
16	Kobayashi S., Sata F., Sasaki S., Braimoh T. S., Araki A., Miyashita C., Goudarzi H., Kobayashi S., Kishi R.	Combined effects of AHR, CYP1A1, and XRCC1 genotypes and prenatal maternal smoking on infant birth size: Biomarker assessment in the Hokkaido Study	Reprod Toxicol	65	295-306	2016
17	Kawanishi Y., Saijo Y., Yoshioka E., Nakagi Y., Yoshida T., Miyamoto T., Sengoku K., Ito Y., Miyashita C., Araki A., Kishi R.	The Association between Prenatal Yoga and the Administration of Ritodrine Hydrochloride during Pregnancy: An Adjunct Study of the Japan Environment and Children's Study	PLoS One	11 (6)	e0158155	2016

18	Kato S., Itoh S., Yuasa M., Baba T., Miyashita C., Sasaki S., Nakajima S., Uno A., Nakazawa H., Iwasaki Y., Okada E., Kishi R.	Association of perfluorinated chemical exposure in utero with maternal and infant thyroid hormone levels in the Sapporo cohort of Hokkaido Study on the Environment and Children's Health	Environ Health Prev Med	21	334-344	2016
19	Itoh S., Araki A., Mitsui T., Miyashita C., Goudarzi H., Sasaki S., Cho K., Nakazawa H., Iwasaki Y., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.	Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health	Environ Int.	94	51-59	2016
20	Goudarzi H., Nakajima S., Ikeno T., Sasaki S., Kobayashi S., Miyashita C., Ito S., Araki A., Nakazawa H., Kishi R.	Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and neurodevelopment in early infancy: The Hokkaido Study	Sci Total Environ.	541	1002-10	2016
21	Goudarzi H., Miyashita C., Okada E., Kashino I., Kobayashi S., Chen C. J., Ito S., Araki A., Matsuura H., Ito Y. M., Kishi R.	Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on prevalence of allergic diseases among 4-year-old children	Environ Int.	94	124-132	2016

22	Verner M. A., Loccisano A. E., Morken N. H., Yoon M., Wu H., McDougall R., Maisonet M., Marcus M., Kishi R., Miyashita C., Chen M. H., Hsieh W. S., Andersen M. E., Clewell H. J., Longnecker M. P.	Associations of Perfluoroalkyl Substances (PFAS) with Lower Birth Weight: An Evaluation of Potential Confounding by Glomerular Filtration Rate Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK)	Environ Health Perspect	123(12)	1317-24	2015
23	Miyashita C., Sasaki S., Saijo Y., Okada E., Kobayashi S., Baba T., Kajiwara J., Todaka T., Iwasaki Y., Nakazawa H., Hachiya N., Yasutake A., Murata K., Kishi R.	Demographic, behavioral, dietary, and socioeconomic characteristics related to persistent organic pollutants and mercury levels in pregnant women in Japan	Chemosphere	133	13-21	2015
24	Miyashita C., Sasaki S., Ikeno T., Araki A., Ito S., Kajiwara J., Todaka T., Hachiya N., Yasutake A., Murata K., Nakajima T., Kishi R.	Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and polyunsaturated fatty acids on birth size	Sci Total Environ	533	256-265	2015
25	Mitsui T., Araki A., Imai A., Sato S., Miyashita C., Ito S., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Nonomura K.	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

26	Kishi R., Nakajima T., Goudarzi H., Kobayashi S., Sasaki S., Okada E., Miyashita C., Itoh S., Araki A., Ikeno T., Iwasaki Y., Nakazawa H.	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	2015
27	Jia X., Tagawa T., Yatsuya H., Naito H., Hayashi Y., Husna Y., Sasaki S., Araki A., Miyashita C., Ikeno T., Kishi R., Nakajima T.	Association of maternal whole blood fatty acid status during the prenatal period with term birth dimensions: a cross-sectional study	J Perinat Med	43(5)	565-75	2015
28	Jia X., Harada Y., Tagawa M., Naito H., Hayashi Y., Yetti H., Kato M., Sasaki S., Araki A., Miyashita C., Ikeno T., Kishi R., Nakajima T.	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	20(3)	168-78	2015
29	Hanley S. J., Yoshioka E., Ito Y., Kishi R.	HPV vaccination crisis in Japan	Lancet	385(9987)	2571	2015

30	Otake Y., Nakajima S., Uno A., Kato S., Sasaki S., Yoshioka E., Ikeno T., Kishi R.	Association between maternal antenatal depression and infant development: a hospital-based prospective cohort study	Environ Health Prev Med	19(1)	30-45	2014
31	Okada E., Sasaki S., Kashino I., Matsuura H., Miyashita C., Kobayashi S., Itoh K., Ikeno T., Tamakoshi A., Kishi R.	Prenatal exposure to perfluoroalkyl acids and allergic diseases in early childhood	Environ Int	65	127-134	2014
32	Hanley S. J., Yoshioka E., Ito Y., Konno R., Sasaki Y., Kishi R., Sakuragi N.	An exploratory study of Japanese fathers' knowledge of and attitudes towards HPV and HPV vaccination: does marital status matter?	Asian Pac J Cancer Prev	15(4)	1837-1843	2014
33	Araki A., Mitsui T., Miyashita C., Nakajima T., Naito H., Ito S., Sasaki S., Cho K., Ikeno T., Nonomura K., Kishi R.	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	9(10)	e109039	2014

34	小林澄貴, 池野多美子, 荒木敦子, 山崎圭子, 西原進吉, 岸玲子	環境化学物質の胎児期暴露による児の神経発達への影響に関する疫学文献レビュー: 注意欠如・多動性障害(AD/HD)・自閉症スペクトラム(ASD)を含めて	北海道公衆衛生学雑誌	29(2)	31-40	2016
35	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

論文発表(解説 査読無)

1	岸玲子, 湊屋街子, 荒木敦子, 宮下ちひろ	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第24回 誰もが健康な人生のスタートを-世界で進むコーホート研究	公衆衛生	81(2)	175-183	2017
2	喜多歳子, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第23回 社会経済要因の影響(2)認知/行動発達	公衆衛生	81(1)	79-84	2017
3	花岡知之, 田村菜穂美, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第22回 社会経済要因の影響(1)死産, 早産, 出生体重	公衆衛生	80(12)	943-948	2016

4	宮下ちひろ, ホウマヌグウダルジ, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第21回 環境化学物質曝露による先天異常への影響(2) 先天性疾患、口唇口蓋裂	公衆衛生	80(11)	863-867	2016
5	佐田文宏, 佐々木成子, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第19回 妊娠中のカフェイン摂取の母児への影響	公衆衛生	80(9)	701-707	2016
6	宮下ちひろ, 伊藤久美子, 荒木敦子, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第18回 葉酸摂取の胎児発育や先天異常、生後アレルギーへの影響	公衆衛生	80(8)	615-621	2016
7	宮下ちひろ, 小林祥子, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第17回 胎児期の化学物質曝露による後天的な遺伝子発現制御への影響	公衆衛生	80(7)	531-537	2016
8	池野多美子, 小林澄貴, 山崎圭子, 西原進吉, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第16回 ADHD(注意欠如・多動性障害)とASD(自閉スペクトラム症)	公衆衛生	80(6)	445-450	2016
9	中島そのみ, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第15回 ダイオキシン類曝露と児の神経発達	公衆衛生	80(5)	371-378	2016

10	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
11	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
12	岸玲子, 宮下ちひろ, 荒木敦子	環境化学物質の次世代影響に関する出生コホート研究: 環境と子どもの健康に関する北海道スタディの成果と課題	アンチ・エイジング医学	12(2)	067-076	2016