

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 26 年度～28 年度 総合研究報告書

研究代表者

北海道大学環境健康科学研究教育センター

岸 玲子

研究分担者

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野

水上 尚典

札幌医科大学医学部産婦人科学講座

遠藤 俊明

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腎泌尿器外科学分野

野々村克也

北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座小児科学分野

有賀 正

福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課

梶原 淳睦

いであ株式会社環境創造研究所

松村 徹

北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門生命有機化学分野

松浦 英幸

北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学教室

石塚真由美

北海道大学環境健康科学研究教育センター

花岡 知之

東京医科歯科大学難治疾患研究所

佐田 文宏

北海道大学環境健康科学研究教育センター

池野多美子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

荒木 敦子

北海道大学大学院医学研究科社会医学講座公衆衛生学分野

佐々木成子

旭川医科大学医学部健康科学講座地域保健疫学分野

吉岡 英治

北海道大学環境健康科学研究教育センター

宮下ちひろ

平成 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 Pollutants) 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リスクが異なり、またメチル化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

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 出生コホートの概要と主要な出生アウトカム

1. 先天異常の発生状況とケースコホートを用いた曝露リスク評価に関する研究
(岸 玲子, 水上 尚典, 遠藤 俊明, 千石 一雄ほか)
2. 先天異常の発生状況とケースコホート研究デザインによる曝露リスク評価に関する研究
(岸 玲子, 水上 尚典, 遠藤 俊明, 千石 一雄, 梶原 淳睦ほか)
3. 大規模コホートにおける出生アウトカムに関する記述統計
(花岡 知之ほか)
4. **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)
5. 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)
6. 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)

- 2 喫煙、社会経済要因および葉酸値との関連する要因

7. **Predictors of folate status among pregnant Japanese women: the Hokkaido Study on
Environment and Children's Health, 2002 -2012**
(岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ, 池野 多美子, 水上 尚典ほか)
8. 児の生下時体重と母親の社会経済要因との関連についての疫学研究
(花岡 知之ほか)
9. 胎児期における喫煙曝露と学童期の注意欠陥/多動性障害 (**ADHD**) 傾向との関連

(岸 玲子, 池野 多美子)

- 3 有機フッ素化合物、PCBs ダイオキシン類、有機塩素農薬等 POPs による曝露影響

10. **Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals and Neurodevelopment in Early Infancy**
(岸 玲子, 池野多美子ほか)
11. **Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children**
(岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ)
12. **Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Risk of Infectious Diseases in Early Life**
(岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ)
13. **The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study**
(岸 玲子, 荒木 敦子, 野々村 克也)
14. **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,)
15. **PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による 42 か月児の認知発達への影響**
(池野多美子, 梶原 淳睦, 佐々木 成子, 岸 玲子, ほか)
16. **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)
17. **有機塩素系農薬の胎児期曝露が生後の免疫に与える影響**
(岸 玲子, 松村 徹, 宮下 ちひろほか)
18. **有機塩素農薬への胎児期曝露が生後 6 か月児の精神運動発達に与える影響**
(岸 玲子, 松村 徹ほか)
19. **胎児期の有機塩素系農薬曝露による児の臍帯血中性ホルモンへの影響**
(岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ, 佐々木 成子, 野々村 克也ほか)
20. **胎児期の有機塩素系農薬(OCP)曝露が母児の甲状腺ホルモンに及ぼす影響**
(岸 玲子, 松村 徹, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ)
21. **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)

- 4 ビスフェノール A、フタル酸エステル類等(短半減期の化学物質)による曝露影響

22. 血液中のビスフェノール A (BPA) フリー体の分析

(松村 徹)

23. **Prenatal exposure to bisphenol A and child neurodevelopment: The Hokkaido Study**

(岸 玲子, 池野多美子, 佐々木成子, 松村 徹ほか)

24. ビスフェノール A の胎児期曝露による免疫機能への影響

臍帯血 IgE および乳幼児期のアレルギー症状, 感染症との関連

(佐々木 成子, 松村 徹, 岸 玲子)

25. **Prenatal MEHP, BPA exposure and cord bold adipokine levels**

(岸 玲子, 松村 徹, 佐々木 成子)

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

(岸 玲子, 池野 多美子)

27. **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 遺伝-環境交互作用：一塩基多型 (SNPs) および DNA メチル化に関する影響

28. 妊婦の異物代謝遺伝子多型がダイオキシン類と児の出生時体格との関連に及ぼす影響

(岸 玲子, 梶原 淳睦ほか)

29. 妊婦の喫煙が母の遺伝子多型を介して児の出生時体格に及ぼす影響

(岸 玲子, 佐田 文宏, 佐々木 成子)

30. 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)

31. 妊婦のカフェイン摂取と **CYP1A2** 遺伝子多型による出生時体格への影響

(佐々木 成子, 岸 玲子ほか)

32. **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)
33. **Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids on Cord Blood IGF2/H19 Methylation and Associations with Birth Size**
(岸 玲子, 佐々木 成子, 石塚 真由美ほか)
34. 胎児期ダイオキシン **PCBs** 曝露が児の臍帯血 **DNA** メチル化に及ぼす影響
(岸 玲子, 石塚 真由美ほか)
35. 胎児期のメチル水銀とフタル酸エステル類曝露が児の **DNA** メチル化に及ぼす影響
(岸 玲子, 石塚 真由美)
36. 胎児期有機フッ素化合物曝露影響の臍帯血網羅的エピゲノム解析
(岸 玲子, 荒木 敦子, 宮下 ちひろ, 佐々木 成子, 石塚 真由美)
- . 研究成果の刊行に関する一覧表

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，および女兒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，回収率を上げて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。しかし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。PFCs11種類(PFHxA,PFHpA,PFOA,PFNA,PFDA,PFUnDA,PFDoA,PFTrDA,PFTeDA,

PFHxS, PFOS) の一斉分析の測定系を確立した。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。

炭素鎖が長いために半減期が長く生体影響が持続すると考えられる PFAAs の代替物質の影響も含めて、胎児期 PFAAs 曝露が出生後の 4 歳のアレルギー症状および感染症発症リスクとの関連を 2003 年～2009 年に登録した母児 1,558 名について検討した。母体血中 PFDoDA, PFTrDA 濃度は高いほど 4 歳児のアレルギー発症リスクが量反的に低下することを示した。性別で層別化して解析したところ男児のみで有意な関連が認められた。さらに、母体血中 PFOS, PFHxS 濃度が高いほど 4 歳の感染症リスクが増加した。長鎖の PFAAs の胎児期曝露は児の免疫アレルギーに対して抑制的に作用し、性別で異なる影響を及ぼす可能性が示唆された。

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、ドリノール類 3 種、クワロルデン類 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。神経行動発達への影響について、生後 6 か月、18 か月時の BSID-II 運動発達スコアとの間に有意な関連は認められず、本研究の曝露レベルでは影響が低い可能性がある。

甲状腺ホルモンへの影響については、濃度が増加するほど母の FT4 が有意に低下し(o,p'-DDE: $= -.03, p < .05$, o,p'-DDT: $= -.06, p < .05$, Dieldrin: $= -.08, p < .05$)、新生児の FT4 は有意に増加したことから(cisNonachlor: $= .04, p < .05$, p,p'-DDT: $= .04, p < .05$, Parlar50: $= .04, p < .05$)、母児で異なった影響を受ける可能性がある。出生時体重については全体では有意でなかったが、男女で層別化した解析で女兒にのみ Parlar26 と負の関連が認められ($= -169, CI: -319 -19, p < 0.05$)、性別による影響の違いが示唆された。男児では、母体血中の農薬濃度が増加するほどテストステロン、インヒピン B、プロラクチンが低下した。一方女兒では DDE および DDT 濃度が高いとエストラジオールが低く、T/E2 比が増加した。これら胎生期の性腺機能への影響が、その後の性役割行動などの性分化や第二性徴発達のタイミングなどの性機能にも影響を与えるのか、ヒトの疫学研究で明らかにすることが必要である。

微量血液試料中 BPA を迅速処理、高精度で測定する生体試料分析法を同位体希釈 LC/MS/MS 法を開発確立した。さらに BPA フリー体の分析方法を開発し、保存中の血液試料からは BPA フリー体は検出されなかったため、試料採取から保存までの操作における試料のコンタミネーションはなかったと考えられた。胎児期の BPA の曝露が、児の甲状腺ホルモンや神経行動発達に与える影響を、甲状腺ホルモン濃度と 6, 18 か月ベイリーテストのスコアを用いて検討した。胎児期の BPA 曝露は児の甲状腺ホルモン濃度(TSH, FT4)や 6, 18 か月での神経行動発達には有意な影響を与えていなかったが、女兒では 6 か月の MDI スコアと、TSH レベルで BPA 濃度と負の関連がみられた。臍帯血 IgE および乳幼児期のアレルギー症状、感染症との関連を検討した。臍帯血中 IgE 濃度との関連は認められなかったが、男児では、臍帯血中 BPA 濃度が約 2.7 倍になると、生後 18 か月までの中耳炎のオッズ比が 6.53 (95% CI: 1.35, 31.57) と有意に上昇した。

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。

環境化学物質に対するハイリスク群を明らかにするため環境-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。妊婦の喫煙状況において, 非喫煙者の児と比較して, 喫煙者の児では, 出生体重が 71g 有意に小さかった (95%CI; -103, -40; P < 0.001)。さらに, 妊婦の遺伝子多型と喫煙状況の組合せにおいて, AHR(G>A, Arg554Lys)-GA/AA 型, CYP1A1-(A>G, Ile462Val)-AA 型でかつ XRCC1(C>T, Arg194Trp)-CC 型をもつ非喫煙者の児と比較して, AHR-GG 型, CYP1A1-AG/GG 型でかつ XRCC1-CT/TT 型をもつ喫煙者の児では, 出生体重が 145g 有意に小さかった (95%CI; -241, -50; P = 0.003)。AHR-GG 型, CYP1A1-AG/GG 型および XRCC1-CT/TT 型をもつ妊婦では, (BPDE) 代謝物や BPDE-DNA 付加体が, それぞれの Reference 群よりも多く生成されると予想される。そして, これらの遺伝子多型と妊娠中の喫煙が組合わさると出生体重の平均が 145g 小さくなる可能性が示唆された。

胎児期のエピゲノム変化が出生時のみならず長じて小児期から成人期へどのような影響を与えるか懸念されている。そこで, 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, 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。胎児期環境化学物質曝露が影響を与えるメチル化部位のさらなる特定のため, HumanMethylation450 を用いた網羅的 DNA メチル化解析を実施している。これまでに, G&G 社にて解析された札幌コーホート臍帯血 DNA での網羅的メチル化データ (N=292) の前処理・バッチ間の補正, および robust linear regression を用いて PFAAs 濃度との関連を解析した。今後は網羅的解析でスクリーニングされた PFAAs 濃度と関連の見られたメチル化変化について, 北海道コーホートで再現性を確認するとともに, 生後のアウトカムとメチル化変化の関連の詳細を検討する。その他, PCBs・ダイオキシン, 水銀等の環境化学物質曝露が影響をおよぼすメチル化部位, その変化に伴う成長発育・アレルギー・神経発達等のアウトカムとの関連を明らかにする。

< 研究分担者 >

水上 尚典

北海道大学大学院医学研究科生殖・
発達医学講座産科・生殖医学分野，
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，市立士別総合病院，日鋼記念病院，
市立札幌病院，幌南病院，市立函館病院，
道立紋別病院，天使病院，函館五稜郭病
院，中村病院，勤医協札幌病院，北見レ
ディースクリニック，遠軽厚生病院，釧
路赤十字病院，名寄市立総合病院，帯広
厚生病院

A．研究目的

ヒトでの科学的な根拠が乏しかった
PCBs・ダイオキシン類や有機フッ素化
合物（PFAAs）などの環境化学物質に
よる先天異常や Small for Gestational
Age (SGA) および低出生体重 (LBW)，
免疫アレルギーや発達への影響につい
て日本の疫学データをもって応えるた
めに，北海道全域の 37 の地域病院の協
力を得て，母体血および臍帯血の採取
保存，化学物質曝露量の測定を行い，
前向きコホート研究を実施する。本
研究に参加同意した妊婦 20,926 名につ
いて追跡する。

環境遺伝(エピゲノム)交互作用を調べ、ハイリスク群を明らかにすると共に、環境化学物質の生体影響の分子生物学的機序を明らかにする。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 NOAEL とされた用量より低い用量の BPA 胎児期曝露で、仔の思春期早発や神経発達への影響などが報告されたが、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。

有機塩素農薬については、高濃度の胎児期曝露による乳幼児期の精神運動発達への悪影響(Jurewicz, Polanska, & Hanke, 2013)、出生後の児の甲状腺ホルモン血中濃度への影響(Kim et al., 2015)、および出生時の児の体重低下(Roberts, Karr, & Council On Environmental, 2012)などが指摘されているが、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、低濃度の OCP 胎児期曝露が甲状腺ホルモン、出生時の体重、アレルギー・感染症、および精神神経発達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。ダイオキシン類についても、PAHs と化学構造が似ており、上記の受容体、代謝酵素が関与する。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関連に影響を及ぼすかをはじめに検討し、次に用量反応関係に影響を及ぼすかを検討した。また、ダイオキシン類についても、AHR, CYP1A1 (T>C, MspI), GSTM1 遺伝子多型の違いによって、妊娠中の母体血中ダイオキシン類濃度と出生時体格との関連に影響を及ぼすかを検討した。

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により変化し、その変化が成長後の表現型に結びつく遺伝子変異を伴わない因子の一

つと考えられている。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. 先天異常の発生状況とケースコホートを用いた曝露リスク評価に関する研究

北海道内の産科 37 施設で妊娠初期から妊婦 20,929 名の協力を得て登録し、平成 25 年 1 月末までに新生児個票の情報が得られた全分娩 (流産・死産を含む) 18,333 名を対象とした。まず分娩後に医療機関で記載された新生児個票から、生死産、流産 (自然・人口) を

集計した。次いで生産児について、性比と単多胎数、在胎週数、出生体重を算出した。妊娠中の疾患について発生状況を調べた。先天異常については、心奇形・尿道下裂・停留精巣等の先天異常(マーカー奇形・異常 55 疾患)、流死産、妊娠中の疾患について発生率を算出した。環境化学物質の曝露評価をケースコホート研究デザインで実施するため、大規模出生コホートからサブコホートを抽出した。先天異常のケースは出生時の新生児個票と生後の質問票から抽出し、コントロールはケースを除いたサブコホート群から出産病院、出産年、母親の出産時年齢、児の在胎週数からマッチングして抽出した。

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

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

産病院、出産年、母親の出産時年齢、児の在胎週数からマッチングして抽出した。

3. 大規模コホートにおける出生アウトカムに関する記述統計

本コホート研究の詳細については研究プロフィールの文献を参照されたい。2003 年 2 月から現在まで北海道内の 37 の病院と診療所に受診した妊娠初期(13 週未満)の妊婦が研究に参加した。これらの病院と診療所は北海道内にほぼ均等に分布していた。

今回の解析に用いたデータは 2013 年末に固定したものであり、研究に参加した妊婦は 20816 名であった。このうち出生アウトカムのデータがないものを追跡不能者とした。出生アウトカムのデータがある者は 18305 名であった。このうち三つ子は 3 名のみであり、妊娠期間が 42 週以降の出生児は 33 名のみであり、これらは今回の統計解析からは除いた。

研究参加時のベースライン質問票と出産時の医療記録のデータを使用した。

各種指標の割合については exact confidence interval を併せて算出した。試験的な検討として、早産、正期産 small-for-gestational age(以下 SGA)、低出生体重児のリスクを母親の出産時年齢(35 歳以上)と研究参加時の BMI(18 以下)について general linear model を使用して算出した。

出生体重に関する指標のうち、small-for-gestational age については日本小児科学会の標準値を使用し、妊娠期間、性別、初産経産別に標準値の 10 パーセントイル未満とした。本検討では、超音波検査で測定された日本人の胎児体重標準値を使用した指標についても検討を行った。娠期間、性別、初産経産別に標準値の 1.5SD 未満(6.7

パーセントイル未満)を small-for-reference-fetal weight (以下 SFW)とした。

4 . Prevalence and Risk of Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study

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.

5 . 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。

6 . 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。

7 . Predictors of folate status among pregnant Japanese women **Study location and population**

Participants of this study were pregnant women recruited during their first trimester (<13 weeks of gestation) from thirty-seven health facilities across Hokkaido Prefecture. They are participants of the ongoing large-scale birth cohort of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Data was generated from these participants by means of baseline questionnaires, biochemical assays, hospital birth records, and four months post-partum health records. Totally, 15266 participants with available baseline questionnaires, folate and cotinine levels were included in this study.

Biochemical assays

Non-fasting whole maternal blood samples were collected from participants and sera were stored promptly at 4°C until folate assay. Folate is quantified by direct chemiluminescent acridinium ester

technology¹³ adopted by World Health Organization's (WHO) classification guidelines¹⁵. In this study, we used plasma cotinine concentrations to quantitatively classify active and passive smoking status as previously reported¹⁶.

Definition of variables

The dependent variable was folate status. Serum folate status was classified as: folate deficiency (<6.80nmol/L); suboptimal status (6.80 -13.59 nmol/L) and optimal folate status (\geq 13.60 nmol/L)¹⁵. We merged folate deficiency and suboptimal category in one group. Active and passive exposure to tobacco smoking statuses were classified based on plasma cotinine cut-off points established in a previous report¹⁶. A non-smoker was defined as having plasma cotinine concentration of less than 1.19 nmol/L. A person exposed to environmental tobacco smoke (ETS) as having 1.19 – 65.21 nmol/L; and active smoker as having greater than 65.21 nmol/L of plasma cotinine concentration. Self-reported active tobacco smoking was categorized based on the number of cigarette sticks smoked per day. Light smokers (<10 cigarette sticks per day); moderate smokers (10-19 cigarette sticks per day); and heavy smokers (\geq 20 cigarette sticks per day). ETS exposure at home and work place was assessed.

Statistical analyses

Skewed serum folate and plasma cotinine concentrations were log-transformed during the

preliminary descriptive analyses, thereafter back-transformed. We used Bayesian logistic regression and fitted the model to the $m = 10$ imputed data set, with dichotomized folate status as the outcome variable, and the followings as potential predictor variables: age, BMI, parity, educational level, income, occupation, region, year of enrollment, season of the year at enrollment, folic acid supplements use, other nutritional supplements use, alcohol intake, active cigarette smoking, and exposure to environmental tobacco smoke (ETS) both at home and work place. We used results of plasma cotinine concentration to quantitatively classify active smoking and passive exposure to tobacco products, and regressed against folate status, with adjustment for all other potential predictors. We reported pooled estimates for the main effects of the predictor variables in the model. P-values for testing for the presence of a linear trend are also reported for predictor variables with more than two categories. Reported effects, confidence intervals and p-values are pooled over the $m = 10$ imputed data sets. Statistical analyses were performed using JMP 11 Pro Statistical Software Package and binary logistic regression model which required multiple imputation of missing data and was performed using R version 3.2.2. An alpha level of significance was set at <0.05.

8. 児の生下時体重と母親の社会経済要因との関連についての疫学研究

『環境と子供の健康に関する北海道研究』の出生コホートに 2002～2012 年の間に登録した母親とその生産した児を対象とした。早産および Small for Gestational Age (SGA) の有無をアウトカムとして、社会経済要因(母親の最終学歴、世帯収入)との関係について Cox ハザード分析を行った(有意水準 $\alpha=0.05$)。調整要因には、早産をアウトカムとしたハザード分析では、児の性別、母親の年齢、母親の BMI、出産歴、生殖補助医療の受診、飲酒習慣を用いた。SGA をアウトカムとしたハザード分析では、母親の年齢、母親の BMI、生殖補助医療の受診、飲酒習慣を用いた。

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

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

al.(2012)の定義に基づき、0.21ng/ml 未満を「非喫煙群」、0.21ng/ml 以上 11.49ng/ml 未満「受動喫煙群」、11.49ng/ml 以上を「能動喫煙群」の 3 段階の曝露レベルでカテゴリライズしてロジスティック回帰分析を行った。

10. Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals and Neurodevelopment in Early Infancy

A self-administered questionnaire survey was completed after the second trimester containing information related to smoking, household income and educational levels, and alcohol and caffeine intake during pregnancy. Medical information including maternal age, maternal body mass index (BMI) before pregnancy, parity, gestational age, pregnancy complications, type of delivery, infant sex, and birth size were obtained from participant medical records (Kishi et al. 2001). A 40-mL blood sample was taken from the maternal peripheral vein after the second trimester of pregnancy and maternal serum PFOS and PFOA levels were assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Nakata et al. 2009). BSIDII (Bayley 1993) were used to assess the infants' neurodevelopment at 6 and 18 months of age. This test includes mental developmental index (MDI) and the psychomotor developmental index (PDI). For data analysis, we used the following eligibility criteria for analysis of subjects: no serious illnesses or complications during pregnancy and delivery, singleton babies born at

term, Apgar score of > 7 at 1 min, infants without congenital anomalies or diseases, and BSID-II completed. We performed multiple-regression analysis to examine the association between and the levels of maternal PFCs and infant's BSID-II scores (MDI, PDI), and confounders were as follows: maternal age, parity, maternal educational levels, alcohol consumption and smoking during pregnancy, caffeine intake during pregnancy, blood sampling period, breast feeding, and total dioxin levels.

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

Mother-infant pairs who enrolled in the Hokkaido large cohort Study on Environment and Children's Health in 2003–2009 were included in this study. 11 PFAAs including PFHxA, PFHpA, PFHxS, PFOS, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA and PFTeDA were measured in maternal plasma taken at 28–32 weeks of gestation using ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. Information on characteristics of participants was obtained from medical birth records, and self-administered questionnaires obtained during pregnancy and after delivery. Allergic diseases including eczema, rhinoconjunctivitis and wheezing were defined using a modified part of the Japanese version of the International Study of Asthma

and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three questionnaire at 4 years of age. Associations of PFAA quartiles with allergic outcomes were examined using logistic models (n=1558).

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

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

of age. Totally 1,558 mother child pairs who had information on infectious diseases and prenatal PFAA measurements were used for analysis. Associations of PFAA quartiles with allergic outcomes were examined using logistic models.

13 . The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples

We conducted a hospital-based birth cohort study between July 2002 and October 2005 in Sapporo, Japan (n=514). In total, 251 mother-infant pairs were included in this study. The prenatal PFOS and PFOA levels were measured in maternal serum samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). Cord blood levels of glucocorticoid (cortisol and cortisone) and androgenic hormones (dehydroepiandrosterone (DHEA) and androstenedione) were also measured by LC-MS-MS.

14 . Association of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances with cord blood adipokines

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.

15 . PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による 42 か月児の認知発達への影響評価

対象者は 2002 年 7 月から 2005 年 9 月に札幌市内 1 産院を受診し、同意を得られた 514 名である。曝露評価は、妊婦 426 名について、妊娠 23 週から 35 週に採血した母体血中ダイオキシン類濃度 PCDDs (7 異性体), PCDFs (10 異性体), ダイオキシン様 PCBs (12 異性体) を、高分解能マススペクトロメーター (HRGC/HRMS 法) で測定した。認知発達は the Kaufman Assessment Battery for Children (以下 K-ABC) で評価した。K-ABC は対面調査で認知能の認知処理過程と習得度をみている。調整因子は、分娩後 5 日以内に採取した母親の毛髪中総水銀濃度 (Hg) を酸化燃焼金アマルガム法 (AAS 法) で測定した。母の認知能は WAIS-R 簡略版を用いた。自記式調査票から、母親の年齢、家族構成、両親の社会経済的要因、飲酒・喫煙、魚類の摂取など生活習慣、分娩時の児の情報、産後の母親抑うつ状態 (エンジンバラ産後うつ)、養育環境を聴取した。分析対象者は、双胎 6 名を除き、K-ABC を実施出来た 151 名である。PCBs・ダイオキシン類は log 変換し重回帰分析で検討した。

16 . 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

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。

17. 有機塩素系農薬の胎児期曝露が乳幼児の免疫に与える影響

2002-5 年に札幌市の一産院で妊婦 514 名を環境と子どもの健康北海道スタディにリクルートした。379 名の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(o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT), ドリン類 3 種(Aldrin, Dieldrin, Endrin), クロルデン類 5 種(cis-Chlordane, trans-Chlordane, oxychlordane, cis-Nonachlor, trans-Nonachlor), ヘプタクロル類 3 種(Heptachlor, trans-Heptachlorepoxide, cis-Heptachlorepoxide), ヘキサクロロシクロヘキサン類 4 種(α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH), マイレックス, トキサフェン 6 種(Parlar-26, 41, 40, 44, 50, 62)およびヘキサクロロベンゼン(HCB))について, ガスクロマトグラフ/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)により一斉分析を行った(いであ(株)環境創造研究所)。母体血中農薬濃度と臍帯血中 IgE, 生後 18 か月児のアレルギー・感染症の発症リスクとの関連を, 母の年齢, 妊娠前 BMI, 教育レベル, 出産歴, 両親アレルギー歴, 児の性別, 児の母乳栄養期間, 児の受動喫煙, 集団保育, 農薬の採血時期, および農薬の測定年で調整した多変量回帰分析で検討した。

18. 有機塩素系農薬への胎児期曝露が生後 6 か月児の精神運動発達に与える影

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 名の母体血中有機塩素系農薬を測定した。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。精神運動発達については, ベイリー乳幼児発達検査-(BSID-)を用いて 274 名を検査した。有機塩素系農薬および BSID- のデータがそろっており, 双胎でない 174 名について検討した。出産時年齢, 妊娠日数, 児性別, 家庭環境得点, 血液採取時期, 出産時年齢, カフェイン摂取量, 妊娠中喫煙で調整した重回帰分析を行った。

19. 胎児期の有機塩素系農薬曝露による児の臍帯血中性ホルモンへの影響

札幌コーホートに登録した母児を対象とした。臍帯血中エストラジオール, 総テストステロン(T), プロゲステロン, 黄体形成ホルモン(LH), 卵胞刺激ホルモン, 性ホルモン結合グロブリン, プロラクチン, インヒビン B, Insulin-like factor3 を測定した。検出率 80%以上の 14 化合物について, 性ホルモンとのデータがそろった男児 106 名, 女児 126 名を解析に用いた。

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

2002 年から 2005 年に札幌市の一産院で妊婦 514 名をリクルートし, 札幌市衛生研究所によるマススクリーニングデータより甲状腺ホルモンの濃度を得た。有機塩素系農薬 29 種類のうち, 検出率が 80%以上であった 15 種類を自然対数に変換した後, 統計解析した。有機塩素系農薬および甲状腺ホルモン

のデータがそろっており，双胎および甲状腺関連疾患を治療中の場合を除いた母 340 名，児 365 名について解析を行った。TSH および FT4 については自然対数に変換した後，母については分娩時年齢，妊娠前 BMI，妊娠中の喫煙，海藻摂取頻度，甲状腺ホルモンおよび OCP 測定における血液採取時期で調整して重回帰分析を行った。同様に，児については在胎週数，性別，出生時体重，甲状腺ホルモン測定のための血液採取時期で調整を行った。

21. 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

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。

22. 血液中のビスフェノール A(BPA) フリー体の分析

これまでに血液中の BPA の測定を行うため同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析法(以降 ID-LC-MS/MS)を開発し，ヒト血液試料(母体血及び臍帯血)に適用した。この方法は，酵素を用いて BPA グルクロン酸抱合体の脱抱合化を行い，血液中の総 BPA を評価する方法であるが，今回は，脱抱合処理を行わず，BPA フリー体を測定する事で，血液試料のコンタミネーションの状況を確認した。

23. Prenatal exposure to bisphenol A

and child neurodevelopment

Cord blood samples collected from the Hokkaido study participants were analyzed for BPA levels. Child neurodevelopment was assessed using mental and psychomotor development indexes (MDI and PDI) from a Bayley Scales of Infant Development II at 6 and 18 months of age (N = 121, 86, respectively). The associations between cord blood BPA levels and child neurodevelopment were estimated using linear regression models adjusted for potential confounders. Data of TSH and FT4 were obtained from mass screening test for endocrine disorders conducted by Sapporo City Institute of Public Health.

24. ビスフェノール A の胎児期曝露による免疫機能への影響 臍帯血 IgE および乳幼児期のアレルギー症状，感染症との関連

札幌市内一産院コーホートに登録した母児 514 名について，自記式質問票で母親と配偶者の妊娠中の喫煙・飲酒状況，食生活や教育歴，世帯収入などを調査し，医療診療録から産科既往歴や分娩時所見などに関する情報を入手した。児の 18 ヶ月時には，母親による自記式質問票で児の健康調査を実施し，18 ヶ月時の体格，アレルギー症状および感染症の既往歴・現病歴，母乳栄養，集団保育歴，児の受動喫煙状況などについて 390 名から回答を得た。臍帯血中の BPA 濃度は，同位体希釈 LC-MS/MS 法(検出下限値 0.048 ng/mL)で測定した。また，臍帯血血清中総 IgE 濃度は，ELISA 法(検出下限値 0.05 IU/mL)で(株)SRLにて測定した。臍帯血中 BPA 濃度と IgE 濃度と

の関連をみるために、両方の測定結果が揃った 152 名を解析対象とした。BPA 濃度と IgE 濃度は自然対数変換し、検出下限値 (LOD) 以下の場合は半値を代入した。最終的に母の年齢、出産経歴、教育歴、妊娠中の喫煙状況、両親のアレルギー疾患既往歴および児の性別で調整した重回帰分析を行った。さらに、BPA 濃度と児の 18 ヶ月までのアレルギー症状および感染症との関連をみるために、両方のデータが得られた 136 名についてロジスティック回帰分析を行った。アレルギー症状は母の教育歴、妊娠中の喫煙状況、両親のアレルギー疾患既往歴、児の性別、母乳栄養期間、18 ヶ月時の家庭内受動喫煙および集団保育歴、感染症は母の教育歴、妊娠中の喫煙状況、児の性別、母乳栄養期間、18 ヶ月時の家庭内受動喫煙および集団保育歴で調整した。

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

Among 514 pregnant women between 23 and 35 weeks of gestation from one hospital in Sapporo, MEHP levels in maternal blood in late pregnancy (N=340) and bisphenol A (BPA) levels in cord blood were measured (N=285). Leptin and total and high molecular weight (HMW) adiponectin measured in cord blood samples as markers of metabolic function. Logistic regression models were used to estimate the association between MEHP and BPA and fetal leptin and adiponectin, adjusting for confounding factors. Total and high molecular weight (HMW) adiponectin and leptin levels in cord blood were measured in 264 and 257 neonates, respectively. Adiponectin analysis

was done by ELISA using Human Adiponectin Assay kit from Sekisui Medical Co. Ltd (Tokyo, Japan). Leptin analysis was done by Radioimmunoassay (RIA) using Human Leptin RIA kit from Linco Research Inc. (St. Charles, MO, USA). Cord blood levels of leptin and total and HMW adiponectin were categorized into the top 90th percentile (high group) and bottom 10th percentile (low group).

26 . Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants

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.

27. The associations between prenatal phthalate exposure and cryptorchidism

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 \pm 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 濃度はいであ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。

28. 妊婦の異物代謝遺伝子多型がダイオキシン類と児の出生時体格との関連に及ぼす影響

札幌市内 1 産院外来を受診し同意を得た妊娠 23~35 週の妊婦 421 名について, 独立変数を母体血中ダイオキシン類毒性等価量 (TEQ), 従属変数を児の出生時体格とし, 妊婦の AHR, CYP1A1, GSTM1 遺伝子多型で組合せ, 交絡因子で調整した後, 重回帰分析を行った。

29. 妊婦の喫煙が母の遺伝子多型を介して児の出生時体格に及ぼす影響

2003 年~2007 年に, 北海道内の 40 産科病院を受診した初期の妊婦で, インフォームドコンセントの得られた母児 1,0731 組のうち, ランダムサンプリ

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

30. 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。

31. 妊婦のカフェイン摂取と CYP1A2 遺伝子多型による出生時体格への影響

札幌市内一産院コーホートに登録した母児 514 名について, 自記式質問票で母親と配偶者の妊娠中の喫煙・飲酒状況, 食生活や教育歴, 世帯収入などを調査し, 医療診療録から産科既往歴や分娩時所見などに関する情報を入手した。妊婦の 1 日当たりのカフェイン摂取量は Nagata ら(1998)による自己申告質問票を用いて算出した。1 日当た

りのカフェイン摂取量は, 各飲料の[カフェイン含有量] \times [摂取回数] \times [1 回の量]の合計で算出し, 100mg 未満, 100-299mg, 300 mg 以上に 3 分類した。カフェイン摂取が 100mg 未満の群を Ref. として解析した。CYP1A2C164A 遺伝子多型[rs762551] はリアルタイム PCR 法で解析した。C アレルは 5'-FAM-TCCTGG GCCCACAGA-MGB-3', A アレルは 5'-VIC-CGTCCTGTG CCCAC-MGB-3'で CC, CA, AA 型に検出できる。CYP1A2 C164A 遺伝子多型の CC/CA 型は代謝が遅く, AA 型は代謝が早い表現型である。対象者 514 名のうち, 10 名は死産, 転居等で脱落した。双胎(7 名), 妊娠高血圧症候群(11 名), 妊娠性糖尿病(1 名), 胎児心疾患(1 名)と血液検体が採取できなかった 8 名を解析から除外して, 最終解析は 476 名で行った。母のカフェイン摂取量および CYP1A2 遺伝子多型(CC/CA, AA) と出生時体格との関連を母の年齢, 妊娠前 BMI, 教育歴, 妊娠中の喫煙状況, 飲酒量, 出産経歴, 新生児性別, 在胎週数で調整した重回帰分析で検討した。さらに, CYP1A2 遺伝子多型の酵素活性を亢進し, 出生時体格と有意に関連するとされる母の喫煙状況との関連も検討した。最後に, カフェイン摂取量と CYP1A2 遺伝子多型を組み合わせ交絡要因で調整した重回帰分析を行い, 母の喫煙状況で層別した解析も行った。

32. 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ケ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。

33 . Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids on Cord Blood IGF2/H19 Methylation and Associations with Birth Size

Two hundred thirty-five mother-child dyads from the Hokkaido Study on Environment and Children's Health were included in this study. Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) levels in the maternal sera were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The *IGF2* differentially methylated region (DMR), *H19* DMR and *LINE1* methylation were quantified in cord blood by pyrosequencing. Multiple linear regressions were performed.

34 . 胎児期ダイオキシン PCBs 曝露が児の臍帯血 DNA メチル化に及ぼす影響

札幌の一産科病院で 2002 年 7 月から 2005 年 10 月までにリクルートし,同意を得た妊婦 514 名のうち,初期調査票・出産時カルテ情報がそろった母児から,臍帯血 DNA,の得られた 238 名を対象とした。臍帯血 400 μ L から Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega 社)を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA を Epiect Plus Bisulfite Kit (Qiagen 社)にてバイサル

ファイト処理を行い, *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 遺伝子領域について, Pyromark Q24 system (Qiagen 社)にて DNA メチル化の定量を行った。

母体血中ダイオキシン・PCBs 濃度は HRGC/HRMS により測定された。曝露影響評価の統計解析には重回帰分析を用い,曝露濃度は log10 変換した値を用い,また濃度が検出下限値以下の場合はその半値を代入した。ダイオキシン総量は毒性等量 (TEQ) に従い算出した (Van den Berg et al. 2005)。 Σ Dioxin-TEQ は PCDDs 7 異性体, PCDFs 10 異性体, Non-ortho PCBs 4 異性体, Mono-ortho PCBs 10 異性体の総量, Σ PCBs は 58 種類の PCB 異性体の総量から計算した。

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

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

母体血中 MEHP 濃度は GC-MS で測定を行った。曝露濃度を \log_{10} 変換し、重回帰分析により統計解析を行った。

36. 胎児期有機フッ素化合物曝露影響の臍帯血網羅的エピゲノム解析

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

倫理面への配慮

疫学調査は北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会および共同研究施設の倫理規定に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、
「人を対象とする医学系研究に関する

倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮し、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科で規定されている「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従い、本研究は倫理面の十分な配慮のうえ行った。

C. 研究結果

1. 先天異常の発生状況とケースコホートをを用いた曝露リスク評価に関する研究

母親の出産時年齢は平均 29.84 ± 4.83 歳であった。生産 18,083 名(98.74%)、死産 102 名(0.56%)、自然流産 92 名(0.50%)、人口流産 37 名(0.20%)であった。出産した児の男児は 9,194 名(50.15%)、単胎は 17,998 名(99.08%)、在胎週数は平均 38.78 ± 1.53 週、出生体重は平均 $3,030.17 \pm 419.42$ g であった。妊娠中の疾患では、切迫早産 1,005 名(5.53%)が最も多く、次いで臍からの出血 489 名(2.69%)、妊娠中毒症 338 名(1.87%)であった。生産、死産、流産を含む全分娩のうち、なんらかの先天異常を有する児の総数は 358 名であり、そのうちマーカー奇形 243 件(1.33%)、その他の先天奇形 137 件(0.75%)であった。また、在胎 22 週以降の分娩 18,142 件中では、先天異常のある児は 316 件(1.74%)であった。発生頻度(出産 1 万対)の最も高い先天異常は心室中隔欠損症 19.1(35 名)であった。次いで停留精巣・非触知精巣 15.2(14 名：男児のみ 9,194 名で算出)、Down 症候群 10.9(20 名)、口唇口蓋裂 10.9(16 名)、水腎症 8.7(16 名)などであった。

2002 年から 2011 年までのリクルート

年毎に無作為抽出された 500 名および、最終 2012 年の全員 369 名から構成される 4869 名のサブコホート集団を抽出した。ケースコホート研究デザインで先天性心疾患 145 名について曝露評価を実施している。PCB・ダイオキシン類は先天性疾患 118 名コントロール 118 名合計 236 名が測定済みである。PFCs は先天性心疾患 145 名コントロール 145 名を測定した。

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

母親の出産時年齢は平均 29.84 ± 4.83 歳であった。生産 18,938 名 (98.2%)、死産 64 名 (0.33%)、自然流産 209 名 (1.1%)、人工流産 56 名 (0.29%) であった。出産した児の男児は 9,552 名 (49.5%)、単胎は 18,582 名 (96.3%)、在胎週数は平均 38.38 ± 3.22 週、出生体重は平均 $3,019.23 \pm 433.02$ g であった。妊娠中の疾患では、切迫早産で入院したものの 1,043 名 (5.4%) が最も多く、次いで臍からの出血 499 名 (2.6%)、妊娠中毒症あるいは妊娠高血圧症候群 359 名 (1.9%) であった。生産、死産、流産を含む全分娩のうち、なんらかの先天異常を有する児の総数は 330 名であり、そのうちマーカー奇形 238 件 (1.2%)、その他の先天奇形 109 件 (0.5%) であった。また、在胎 22 週以降の分娩 18,142 件中では、先天異常のある児は 295 件 (1.5%) であった。発生頻度(出産 1 万対)の最も高い先天異常は心室中隔欠損症 16.8 (33 名) であった。次いで停留精巣・非触知精巣 14.6 (14 名：男児のみ 9,552 名で算出)、Down 症候群 10.3 (20 名)、口唇および口蓋裂 18.1 (35 名)、水腎症 9.3 (18 名) などであった。

2002 年から 2011 年までのリクルー

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

3. 大規模コホートにおける出生アウトカムに関する記述統計

研究参加者のうち追跡不能者は 12% であった。出生アウトカムのデータがある者となない者では母親の出産時年齢と研究参加時の BMI に差はみられなかった。初産の割合は追跡不能者で有意に高かった。

表 1 に単胎と双胎の出生アウトカムを示した。死産(22 週以降)は単胎で 2.6/ 出産 1000、双胎で 12.0/ 出産 1000 であった。単胎では早産(22 週から 37 週)は 4.2%、低出生体重児(以下 LBW)は 7.7% であった。SGA と SFW はそれぞれ 4.3%、4.1% であった。双胎では単胎よりも早産は多く、低体重に関する指標の割合は多かった。

出生体重の平均は 3044.8 で分布は左側に小さな尾をひくガウス分布であった。単胎では超低出生体重児は 37 週以降にはみられず、極低出生体重児は 32 週以降にはみられなかった。双胎では

単胎よりも低体重に関する指標の割合は多かったが、32 週以降でその差は大きくなっていった。双胎では正期産でも体重が小さかった。胎児発達率は、個々の出生児について、報告されている標準値の中央値（または平均値）に対する割合を%で示したものである。平均値はいずれの妊娠期間でもほぼ 100%であったが、超音波検査で測定された日本人の胎児体重標準値を使用した方が若干小さい値となった。試験的に算出した、母親の出産時年齢と研究参加時の BMI についての早産の相対危険度は 1.43(95%信頼区間:1.21, 1.69)と 1.28(95%信頼区間:1.08, 1.54), LBW の相対危険度は 1.39(95%信頼区間:1.23, 1.57)と 1.76(95%信頼区間:1.56, 1.97), 正期産 SGA の相対危険度は 1.15(95%信頼区間:0.95, 1.40)と 1.77(95%信頼区間:1.49, 2.10)であった。

4 . Prevalence and Risk of Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study

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.

5 . 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。

6 . 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 (\geq 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)であったり

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。

7. Predictors of folate status among pregnant Japanese women

Overall, geometric mean (standard deviation) of serum folate concentration was 17.77 (3.58) nmol/L. Prevalence of folate deficiency was 0.52%. Suboptimal folate status constituted 25.65%, while optimal folate status was reported in 73.83% of the population. Initial descriptive analyses using folate as a continuous variable revealed mean serum folate concentrations increased with increasing maternal age, educational status, annual income, FA supplements use, and other nutritional supplements use. Mean serum folate concentrations decreased with increasing number of cigarette sticks smoked per day, ETS exposure at home, and increasing plasma cotinine concentrations. Exposure to ETS at both home and at work was associated with low folate status. Serum folate inversely correlated with plasma cotinine concentration. Significant differences were observed in mean plasma cotinine concentrations among nonusers of FA supplements and users, with geometric mean (SD) of 46.41 (23.23) nmol/L, and 25.27 (15.32) nmol/L respectively. 7.00% of folic acid users started intake more than 3 months before conception. Another 8.00% started 1 month

before conception, while majority (more than 60.00%) started use following confirmation of pregnancy. The average frequency of use per week was 3 times. In the regression model, the value of the McFadden's pseudo-pooled over the imputed data sets was 8.69%. The demographic determinants of low folate status identified were lower maternal age (AOR: 1.48, 95% CI: 1.32, 1.66; lower educational level (AOR: 1.27, 95% CI: 1.17, 1.39; lower annual income (AOR: 1.11, 95% CI: 1.01, 1.22); residing in the south and eastern regions (AOR: 1.25, 95% CI: 1.14, 1.38), and (AOR: 1.15, 95% CI: 1.05, 1.25), respectively. Being enrolled into the study between 2005 and 2007 was associated with an increase in the risk of low folate status (AOR: 1.23, 95% CI: 1.12, 1.35); while recruitment between 2008 and 2010 reduced the likelihood of having low folate status (AOR: 0.81, 95% CI: 0.73, 0.90), respectively. Lower BMI (AOR: 0.84, 95% CI: 0.74, 0.94; and unemployment were associated with risk reduction (AOR: 0.87, 95% CI: 0.80, 0.94).

Lifestyle factors that reduced the odds of low folate status were the use of FA supplements; other nutritional supplements; and weekly alcohol consumption. Lifestyle factors that increased the odds of low folate status were active cigarette smoking and ETS exposure. Smoking <10 cigarette sticks per day was associated with increased odds; while smoking between 10 to 19 cigarette sticks per day was associated with an increased

risk. However, smoking ≥ 20 cigarette sticks per day was not statistically significant, but p-trend <0.001 . Exposure to ETS at home and work increased the odds of low folate status.

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

8. 児の生下時体重と母親の社会経済要因との関連についての疫学研究

生産の児は 18401 名で、平均在胎週数は 38.8 ± 1.53 週、平均出生体重は 3037.1 ± 414.3 g であった。Cox ハザード分析の結果、母親の最終学歴が高校卒である母親に対して、中学卒である母親から生まれた児は、早産のリスクが 1.17 倍有意に高くなった。Cox ハザード分析の結果、母親の最終学歴が高校卒である母親に対して、中学卒である母親から生まれた児は SGA のリスクが 1.16 倍有意に高くなった。世帯年収は、早産および SGA とは有意な関係は認められなかった。

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

母児の基本属性で「ADHD 疑い群」「対照群」に群間差が認められた「出産年齢」「世帯年収」「父親学歴」「出産回数」「在胎週数」「児の性別」「妊娠中葉酸摂取」で調整し、「ADHD 疑い群か否か」を従属変数としたロジスティック回帰分析を実施した。その結果、妊娠初期・中期・後期のいずれにおいても、妊娠中の母親の喫煙は非喫煙に比べオッズ

比が上昇していた(初期 オッズ比(OR) = 1.769, 95% 信頼区間 (CI) : 1.250-2.502 ; 中期 OR = 1.560, 95% CI: 1.105-2.204 ; 後期 OR = 1.557, 95% CI: 1.099-2.265)。母親の妊娠後期コチニン値からカテゴリー分けした非喫煙群は能動喫煙群に対して OR = 1.445, 95% CI: 1.008-2.072 であった。また妊娠中に喫煙を継続していた母親に比べ、妊娠中に禁煙した場合の ADHD 発症への影響は、非喫煙と妊娠初期の禁煙でリスクを低下させた(非喫煙 OR = 0.622, 95% CI: 0.409-0.944, 妊娠初期禁煙 OR = 0.565, 95% CI: 0.354-0.902)。その一方で妊娠中の父親の喫煙状況や出生後の受動喫煙の影響は認められなかった。

10. Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals and Neurodevelopment in Early Infancy

The mean values of maternal PFOS and PFOA levels were 6.2 ng/mL and 1.3 ng/mL, respectively. Average of MDI and PDI scores (\pm SD) of infants at 6 months of age were 90.5 (± 5.7) and 90.2 (± 10.3), respectively. Mean MDI and PDI scores of infants at 18 months of age were 84.2 (± 12.0) and 86.4 (± 10.9), respectively. In 6 months of age, we found a negative significant association between prenatal PFOA and MDI score (not PDI) only in female infants ($\beta = -0.317$, 95% confidence interval: -12.54 to -1.00). We did not find any significant association of PFOS levels with any outcomes. We also divided PFOA levels into quartiles, the quartile analysis showed significant MDI score difference the fourth quartile of PFOA compare to first quartile

among female infants at 6 months of age. In 18 months of age, we did not observe convincing association between PFCs and BSID II (both MDI and PDI), and the association between PFOA and MDI in female infants disappeared.

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

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

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

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

13 . The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples

We found a dose-response relationship of prenatal PFOS exposure, but not PFOA, with glucocorticoid levels after adjusting for potential confounders. Cortisol and cortisone concentrations were -28.70 (95% confidence interval (CI):

-46.10, -11.30; p for trend < 0.001) and -77.93 ng/mL (95% CI: -130.97, -24.89; p for trend <0.001) lower, respectively, in infants with prenatal PFOS in the fourth quartile compared with those in the first quartile. The highest quartile of prenatal PFOS exposure was positively associated with a 0.99 ng/mL higher DHEA level compared with the lowest quartile (95% CI: 0.15, 1.83; p for trend=0.013), whereas PFOA showed a negative association with DHEA levels (quartile 4 vs 1: -0.98 ng/mL, 95% CI: -1.72, -0.23; p for trend=0.011). We observed no significant association between PFCs and androstenedione levels.

14 . Association of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances with cord blood adipokines

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 ($\beta=0.12$, 95% CI:0.01, 0.22), contrary was negatively associated with PI ($\beta=-2.25$, 95% CI: -4.01, -0.50). The association was more significant in boys. PFOA level was negatively associated with birth weight ($\beta=-197$, 95% CI: -391, -3).

15 . PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による 42 か月児の認知発達への影響評価

解析対象の基本属性は、男児 79 名 (49.1%)、第 1 子 76 名 (50.3%)、K-ABC 検査児月齢は平均 35.7 か月 (SD4.7) であった。K-ABC は、認知処理得点は 103.2 (SD=12.8)、習得度得点は 99.9(SD=14.0) であった。K-ABC と関連する要因は、年収が多いほど、母親の WAIS-R 短縮版得点が高いほど、認知処理尺度得点、習得度得点の両方が高かった (年収と認知処理 $p=0.01$, 年収と習得度 $p=0.015$, WAIS-R と認知処理 $p=0.000$, WAIS-R と習得度 $p=0.026$)。ダイオキシン類濃度と年収、教育歴や魚摂取が有意な関連が認められた。年収で層別に K-ABC とダイオキシン類濃度の関連を調べたところダイオキシン類濃度と認知処理得点に関連は認められなかったが、習得度得点は年収の高い群で Total PCDD のみ関連が認められた。

16 . 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))。

17 . 有機塩素系農薬の胎児期曝露が乳幼児の免疫に与える影響

農薬 29 種類のうち、15 種類が検出率 80% であった。このうち 8 種が 10 pg/g-wet 以上の中央値であった (oxychlorane (40 pg/g-wet) : trans-Nonachlor (72 pg/g-wet) : p,p'-DDE(651 pg/g-wet) : p,p'-DDT(23 pg/g-wet) : Dieldrin(16 pg/g-wet) : cis-Heptachlorepoxyde(26 pg/g-wet) : HCB(102 pg/g-wet) : β -HCH(154 pg/g-wet) (中央値))。交絡要因を調

整した重回帰分析で母体血中の農薬により臍帯血 IgE が増加した (B(95%CI) :o,p'-DDT= 0.29 (0.01, 0.56) , Dieldrin= 0.44 (0.02, 0.86))。また, 18 か月の感染症リスクが低下した (OR (95%CI): o,p'-DDE = 0.60 (0.39, 0.93))。しかしアレルギーリスクとの関連は認められなかった。

18. 有機塩素農薬への胎児期曝露が生後 6 か月児の精神運動発達に与える影響

BSID 得点との関連は, MDI では妊娠日数 (r = 0.20, p < .05) , PDI では母の年齢(r = -0.19, p < .05) , 妊娠日数(r = 0.28, p < .05) , および家庭環境得点(r = -0.16, p < .05)について有意であった。有機塩素系農薬について有意な関連性はみられず, 重回帰分析の結果からも, MDI, および PDI との関連性は示されなかった。

19. 胎児期の有機塩素系農薬曝露による児の臍帯血中性ホルモンへの影響

交絡要因を調整した重回帰分析で, 男児では oxychlordan, trans-nonachlor, cis-heptachlorepoxide, HCB, Mirex 濃度濃度が高くなるとテストステロン濃度が低下した。また, DDE および DDT, Dieldrin, β HCH, Mirex, および Parlar-50 濃度が高くなると PRL が低下, c-Heptachlorepoxide, および HCB 濃度が高くなると Inhibin B 濃度が低下した。LH, FSH, SHBG, INSL3 と濃度とに関連はなかった。一方女児では, DDE および DDT 濃度が高いと E2 が低く, p,p'-DDE は T/E2 比が増加した。

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

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

21. 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 < .01) , 出生時身長(r = 0.70, p < .01) , 胸囲(r = 0.81, p < .01) , 頭囲(r = 0.59, p < .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 < .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)。

22. 血液中のビスフェノール A (BPA) フリー体の分析

純水, 又は血液試料を用い BPA フリー体の分析法の確認を行った。純水と血液試料それぞれに 0.5ng/mL となるように BPA を添加し, 回収率の確認を行った。純水に添加した場合は, 回収率 97%, 血液試料に添加した場合は, 回収率 101%であった。操作ブランク値及び分析法の検出下限値 (MDL : Method Detection Limit) を算出するため, 血液試料 20 検体 (母体血 10 検

体及び臍帯血 10 検体)の分析と操作ブランク試験を 5 回実施した。操作ブランクの平均値は 0.036ng/mL であり、操作ブランク試験の結果より計算された MDL は 0.037ng/mL であった。これまでの総 BPA の分析法と同様に、操作ブランク及び MDL は、0.1ng/mL 未満であった。

血液中の BPA フリー体を以前 BPA の分析を行い、濃度の確認の取れている試料を用いて分析した。ヒト血液試料 20 検体(母体血 10 検体及び臍帯血 10 検体)について BPA フリー体の測定分析を行った。血液中の BPA フリー体の濃度は、すべての試料で ND であった。

検体の測定における各試料の回収率(クリーンアップスパイク内標準物質(BPA d-16)/シリンジスパイク内標準物質(BPA d-4))の値を用い、回収率を計算した。結果を表 3 に示す。全試料において回収率は 66~112%の範囲であった。なお、本分析方法は内標準法であるので回収率の数値は結果に影響を与えない。

23 . Prenatal exposure to bisphenol A and child neurodevelopment

Overall, there were no statistical significant associations between cord blood BPA levels and child neurodevelopment at 6 and 18 months of age. Among female, MDI score at 6 month of age and the TSH levels was inversely associated with cord blood BPA levels with borderline significance.

24 . ビスフェノール A の胎児期曝露による免疫機能への影響 臍帯血 IgE および乳幼児期のアレルギー症状、感染症との関連

解析対象者 152 名の母の平均年齢は、 30.2 ± 4.6 歳、短大・大卒以上が 56.6% (86 名) 初産婦は 50.7% (77 名)、妊娠中に喫煙した者(途中禁煙者も含む)は 35.5% (54 名) であった。両親でアレルギー既往がある者は、母が 30.9% (47 名)、父が 16.4% (25 名) であった。また、男児は 45.4% (69 名) であった。生後 18 ヶ月時の質問票に回答した 136 名では、家庭内で受動喫煙がある児が 46.3% (63 名)、集団保育されている児は 18.4% (25 名) であった (Table 1)。

臍帯血中 BPA 濃度は 0.055 ng/mL (中央値)、LOD (0.048 ng/mL) 以下は 40.1% (61 名) であった。臍帯血血清中 IgE 濃度は 0.22 IU/mL (中央値)、LOD (0.05 IU/mL) 以下は 15.1% (23 名) であった (Table 2)。児の出生から 18 ヶ月までのアレルギー症状および感染症の累積罹患率は、湿疹 22.1% (30 名)、食物アレルギー 20.6% (28 名)、喘鳴 9.6% (13 名)、中耳炎 18.4% (25 名) で、男児では中耳炎の罹患が女児の約 2 倍であった (Table 3)。

臍帯血中 BPA 濃度と IgE 濃度との関連を検討したが、交絡因子で調整しても有意な関連は認められなかった。また、臍帯血中 BPA 濃度と 18 ヶ月までの湿疹、食物アレルギー、喘鳴、中耳炎との関連についても調整前後で有意な関連は認められなかった。しかし、性別で層化したところ、男児では、臍帯血中 BPA 濃度が約 2.7 倍になると、中耳炎のオッズ比 (OR) が調整なしで 2.97 (95% CI: 1.05, 8.38) 調整後では 6.53 (95% CI: 1.35, 31.57) と有意に上昇した。

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

Median (IQR) MEHP and BPA

levels (ng/ml) were 10.70 (6.30-17.05) and 0.051 (< LOD-0.075), respectively. Median total and HMW adiponectin and leptin levels were significantly higher in girls than boys. (P = 0.006 for total adiponectin, p = 0.005 for HMW adiponectin, p < 0.001 for leptin, respectively). The median leptin level was significantly correlated to both total and HMW adiponectin levels (data not shown). The median leptin level was significantly higher in mothers with higher BMI (P = 0.006) and the total and HMW adiponectin levels were suggestively higher in mothers with higher BMI (p < 0.1). The geometric mean BPA level was higher in higher total adiponectin group with borderline significance. BPA level was also higher in high HMW adiponectin and high leptin groups with no statistical significance. After adjusting with covariates, MEHP level was positively associated with total and HMW adiponectin levels among boys (p = 0.008 for both). MEHP level was negatively associated with leptin levels with borderline significance over all, and after stratification by child sex, the association was observed only among girls with statistical significance (p = 0.008). BPA level was not associated with any of the adipokine levels.

26 . 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 μ U/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.

27. The associations between prenatal phthalate exposure and cryptorchidism

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。

28. 妊婦の異物代謝遺伝子多型がダイオキシン類と児の出生時体格との関連に及ぼす影響

母体血中 PCDFs の TEQ 値が 10 倍増えると、児の出生時体重が 206g 有意に減少した ($P < 0.05$)。さらに、AHR 遺伝子多型が GA/AA 型、CYP1A1 遺伝子多型が TT/TC 型および GSTM1 遺伝子多型が Absent 型の妊婦では、児の出生時体重が 471g 有意に減少した ($P < 0.01$)。さらにポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン(PCDDs)とポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)の 4 異性体でも同様な結果が認められた。

29. 妊婦の喫煙が母の遺伝子多型を介して児の出生時体格に及ぼす影響

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

30. 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。

31. 妊婦のカフェイン摂取と CYP1A2 遺伝子多型による出生時体格への影響

母の 1 日当たりのカフェイン摂取量、喫煙状況と CYP1A2 遺伝子多型それぞれが出生時体格に及ぼす影響を検討すると、100mg 未満のカフェイン低摂取群と比較すると、300 mg 以上のカフェイン高摂取群でも出生時体格に影響はみられなかった。CYP1A2 遺伝子多型も出生時体格と関連はなかった。喫煙状況では非喫煙妊婦と比較して喫煙妊婦の出生時体重は 87g 減少したが ($p=0.019$)、出生時身長、頭囲に影響はみられなかった。母の CYP1A2 遺伝子多型と 1 日当たりのカフェイン摂取量を組み合わせて検討すると、CYP1A2 遺伝子多型が CC/CA 型で 100 mg 未満のカフェイン低摂取群と比較して、AA 型で 300 mg 以上のカフェイン高摂取

群では、出生時体重および出生時身長に関連は認められなかったが、出生時頭囲は有意に減少した($p=0.023$)。さらに、母の喫煙状況で層別すると非喫煙妊婦で CYP1A2 遺伝子多型が AA 型の 300 mg 以上のカフェイン高摂取群では、出生時体重が 276g($p=0.024$)、出生時頭囲は 1.0cm 減少した ($p=0.027$)。出生時体重では交互作用も有意であった ($p=0.023$)。一方、出生時身長への影響は喫煙状況で層別しても認められなかった。

32 . 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

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($\beta = -0.73$, $p = 0.04$)。また、*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NDERAL 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NDERAL 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。

33 . Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids on Cord Blood *IGF2*/*H19* Methylation and Associations with Birth Size

The median concentrations of PFOS and PFOA were 5.0 and 1.4 ng/mL, respectively. In the fully adjusted model, the *IGF2* methylation fractions significantly decreased with a log₁₀-increase in PFOA concentration [$\beta = -1.53$, 95% confidence interval (CI): -2.93 to -0.12]. We observed a positive correlation between *IGF2* methylation and the ponderal index

(kg/m^3) at birth ($\beta = 0.18$, 95% CI: 0.09 to 0.27).

34 . 胎児期ダイオキシン PCBs 曝露が児の臍帯血 DNA メチル化に及ぼす影響

本研究の対象者、238 組の母児の臍帯血 DNA メチル化レベル(\pm SD)は *IGF2* DMR が 48.7% (± 3.0)、*H19* DMR が 52.4% ($\pm 1.9\%$)、*LINE1* が 75.9% (± 1.1) であった。また、母体血中ダイオキシン・PCBs 濃度の中央値(最小値,最大値)は、ダイオキシン総量(TEQ)が 14.2 pg/g lipid (3.2 to 42.9)、PCBs 総量が 100.8 ng/g lipid (16.0 to 326.8)であった。重回帰分析で交絡因子を調整後、NoCBs、特に 22'33'455'66'-NoCB (PCB-208)と *H19* メチル化との間に正の関連が認められた($\beta = 0.87$, 95%CI: 0.08 to 1.67)。また、男女で層別にして解析を行ったところ、男児において PCDFs と *IGF2* メチル化との間に有意な負の関連が ($\beta = -4.21$, 95%CI: -7.60 to -0.83)、女児において *H19* メチル化と NoCBs ($\beta = 2.60$, 95%CI: 0.82 to 4.38)、DeCB ($\beta = 2.77$, 95%CI: 0.76 to 4.78)と間に有意な正の関連が認められた。

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

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

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

36. 胎児期有機フッ素化合物曝露影響の臍帯血網羅的エピゲノム解析

False-discovery rate <0.05,あるいは、偏回帰係数の絶対値の大きさを基準にし、曝露と関連する CpGs のスクリーニングを行った。抽出された PFOS 曝露関連 368 CpGs, PFOA 曝露関連 316 CpGs のうち、同一遺伝子上に 3 CpGs 以上位置していたものは PFOS で 7 遺伝子 26 CpGs, PFOA で 7 遺伝子 26 CpGs あった。中でも PFOS 曝露では *PTPRN2* の高メチル化が広領域にわたり観察された。PFOA 曝露では *PAX8*, *HDAC4* 等の低メチル化が顕著であった。今後は得られた網羅的解析結果について別集団で再現性を確認し、結果の妥当性について検討する。また、観察された胎児期 PFAAs 曝露によるメチル化変化と、PFAAs 曝露による児の生後の肥満、アレルギー、神経発達等、健康への影響との関連について、出生コホートを追跡し調べる必要がある。

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地域における一般産科クリニックからの報告も多いのでより実態に近いと言える。また、地域ベースの前向きコホート研究という特徴を有している。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本研究はデータを得ることができた。さらに、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意味づけは難しい。

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。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性を 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。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 (ポンドラル指数) 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, PFTrDA, PFTeDA, PFHxS, PFOS) を測定した結果, 2003 年から 2011 年で母体血中 PFOS, PFOA 濃度は有意に減少した一方で, PFNA, PFDA 濃度は有意に上昇した。中央値は PFOS 3.83 ng/mL, PFOA 2.67 ng/mL, PFNA 1.36 ng/mL, PFDA 0.563 ng/mL, PFUnDA 1.50 ng/mL, PFDoA 0.188 ng/mL, PFTrDA 0.347 ng/mL, PFHxS 0.324 ng/mL であった。

母体血中 PFOS, PFOA 濃度が出生時体重に与える影響を検討した結果, PFNA 曝露レベルが高いほど出生時体重と身長が有意に低かった ($p=0.02, p=0.003$)。特に男児に影響が強かった。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。

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であった。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る臍帯血中ホルモン濃度との関連を検討したところ, 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。しかし OCP への胎児期曝露による影響として, 精神運動発達への影響はみとめられなかった。先行研究と比較して非常に低濃度であったことが理由として考えられる (Eskenazi et al.,

2006; Torres-Sanchez et al., 2007)。一方, 甲状腺ホルモンについては, 母児ともに, TSH には変動が観察されず, FT4 のみが増動した。母体血中 o,p'-DDE, o,p'-DDT, Dieldrin の増加による母の FT4 減少, 母体血中 cisNonachlor, p,p'-DDT, Parlar50 の増加による児の FT4 の増加が観察されており, 母児のそれぞれに異なった影響がある可能性が考えられる。出生体重への影響は見られなかった。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, ほぼ一貫して体重の減少がみられていることから (Lenters et al., 2016; Ribas-Fito et al., 2002), この結果は日本と海外の曝露濃度の違いによるものである可能性がある。

妊婦の喫煙が遺伝子型によって児の出生時体格に及ぼす影響については, AHR (G>A, Arg554Lys)-GG 型, CYP1A1 (A>G, Ile462Val)-AG/GG 型および XRCC1 (C>T, Arg194Trp)-CT/TT をもつ妊婦では, BPDE 代謝物や BPDE-DNA 付加体が, それぞれの Reference 群よりも多く生成されると考えられる。そして, そのためにこれらの遺伝子型と妊娠中の喫煙が組み合わせると出生体重の平均が 145g 小さくなる可能性が考えられた

次に, それぞれの遺伝子型の違いによる妊娠中コチニン値と児の出生時体格との量反応関係に及ぼす影響については, 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。

ダイオキシン類の代謝に関与する *AHR* (G>A, Arg554Lys) 遺伝子の GA/AA 型, *CYP1A1* (T>C, MspI) 遺伝子の TT/TC 型, そして *GSTM1* (Present/Absent) 遺伝子の Absent 型では代謝能が低いことが報告されている。*AHR* 遺伝子の GA/AA 型, *CYP1A1* 遺伝

子の TT/TC 型をもった妊婦のダイオキシン類濃度は他の遺伝子型をもった妊婦よりも高濃度であった (Kobayashi et al., 2013)。これら 3 つの遺伝子多型の特定の遺伝子型をもった妊婦ではダイオキシン類に対して最も代謝されにくく, 体内に残留されやすいと考えられる。本研究の結果から, 妊娠中のダイオキシン類曝露と児の出生時体格との関連に遺伝的にハイリスクな妊婦がいる可能性が示唆された。

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の相関を示した。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 PFAAs 曝露のほか, 水銀, MEHP, 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 を用いた遺伝子網羅的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

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-遺伝交互作用を含めた解析を確実に行うことにより、世界的にも初めての実証的なリスク評価のデータを示すことが可能となる。

F . 研究発表

1) 書籍

1. 岸-金堂玲子; 健康・安全で働き甲斐のある職場をつくる-日本学術会議の提言を実効あるものに. 健康・安全で働き甲斐のある職場をつくる-日本学術会議の提言を実効あるものに, 2016. ミネルヴァ書房, 京都

2) 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, 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.
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*, 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.* 1365-2214, 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.
- 3) 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-世界で進む出生コ-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.
13. 小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, チチローラ・セリファト プライモー, 荒木敦子, 宮下ちひろ, ホウマヌ ゴウダルジ, 小林祥子, 岸玲子; 児の出生時体格に妊婦の喫煙とAHR, CYP1A, XRCC1遺伝子型の組合わせが影響する-北海道スタディ. 北海道医師. 91 (2):79, 2016.
14. 岸玲子; ISEE-ISES AC2016 開催報告(国際環境疫学会-国際曝露科学会アジア支部総会). Endocrine Disrupter News Letter. 19 (1):3, 2016.
15. Grandjean P., Kishi R., Kogeninas M., (ISEE) On behalf of the International Society for Environmental Epidemiology; Prevention of developmental neurotoxicity. Epidemiology. 2016.
16. 荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子;【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第10回 乳幼児のアレルギーと胎児期・小児期の可塑剤・難燃剤曝露. 公衆衛生. 79 (12):876-881, 2015.
17. 宮下ちひろ, 岸玲子;【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第9回 乳幼児のアレルギー・感染症へのダイオキシン類、有機フッ素系化学物質曝露による影響. 公衆衛生. 79 (11):805-810, 2015.
18. 湊屋街子, 岸玲子;【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第8回 胎児期の環境化学物質曝露が出生体重と生後発育へ与える影響. 公衆衛生. 79 (10):719-724, 2015.
19. 佐々木成子, 小林澄貴, 岸玲子;【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第7回 喫煙、受動喫煙による児への影響. 公衆衛生. 79 (9):637-643, 2015.
20. 荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子;【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第5回 短半減期化学物質の曝露実態. 公衆衛生. 79 (7):485-490, 2015.
21. 岸玲子;【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第1回 「奪われし未来」

- にしない. 公衆衛生. 79 (3):193-199, 2015.
22. 三井貴彦, 武田正之, 篠原信雄, 野々村克也, 荒木敦子, 岸玲子; 環境化学物質がホルモン環境および身体的変化に与える影響について. Endocrine Disrupter News Letter. 18 (1):6, 2015.
23. 荒木敦子, 宮下ちひろ, 岸玲子; 胎児期の有機フッ素化合物曝露による児の健康への影響. Endocrine Disrupter News Letter. 18 (1):5, 2015.
24. 宮下ちひろ, 岸玲子; 胎児期のPCBsダイオキシン類による出生体重とアレルギー感染症に与える影響. Endocrine Disrupter News Letter. 18 (1):3, 2015.
25. 岸玲子; 世界における出生コホート研究の現状. Endocrine Disrupter News Letter. 18 (1):1, 2015.
26. 小林澄貴, 佐々木成子, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子; 妊婦の受動喫煙が児の出生時体格へ及ぼす影響: 遺伝的なハイリスク群について—環境と子どもの健康に関する北海道スタディー—. 北海道小児保健研究会会誌. 35-39, 2014.
27. 岸玲子; 【公害・環境問題の変貌と新展開】 環境化学物質の次世代影響 出生コホート研究による成果と今後の課題. 公衆衛生. 78 (8):547-552, 2014.
- 4) 学会発表 (海外)
1. Miyashita C., Kishi R., Araki A.; 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)
2. Minatoya M., Tamura N., Itoh S., Suyama S., Miyashita C., Araki A., Saito T., Nakai A., Kishi R.; 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)
3. Minatoya M., Tamura N., Ito S., Miyashita C., Araki A., Kishi R.; 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)
4. Minatoya M., Araki A., Miyashita C., Yamamoto J., Onoda Y., Matsumura T., Kishi R.; Association between prenatal phthalates and BPA exposures and fatal 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)
5. Kobayashi S., Sata F., Sasaki S., Braimoh T. S., Araki A., Miyashita C., Goudarzi H., Kobayashi S., Kishi R.; 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)
6. Kobayashi S., Miura R., Miyashita C., Araki A., Ishizuka M., Nakazawa H., Ito Y. M., Kubota T., Kishi R.; 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)
 7. Kobayashi S., Miura R., Miyashita C., Araki A., Ishizuka M., Nakazawa H., Ito Y., Kubota T., Kishi R.; 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)
 8. Kishi R., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Goudarzi H.; Maternal exposure to endocrine disrupting chemicals (perfluoro-alkyls, phthalates and PCB/dioxins) and children's reproductive hormone levels at birth; the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. EPICOH2016. Barcelona, Spain. (2016.9.4-7)
 9. 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)
 10. Kishi R.; Birth cohorts in Asia: why are new big cohorts functioning in Asia? ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology. Roma, Italy. (2016.9.1-4)
 11. Itoh S., Araki A., Miyashita C., Goudarzi H., Kato S., Iwasaki Y., Nakazawa H., Shinohara N., Kishi R.; 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)
 12. Goudarzi H., Miyashita C., Okada E., Kashino I., Kobayashi S., Chen C.-J., Ito S., Araki A., Matsuura H., Kishi R.; Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic and infectious diseases in early life. ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology. Roma, Italy. (2016.9.1-4)
 13. 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)
 14. Araki A., Miyashita C., Itoh S., Mitsui T., Mizutani F., Chisaki Y., Sasaki S., Cho K., Nonomura K.,

- Kishi R.; 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)
15. Araki A., Kishi R.; 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)
16. Ait Bamai Y., Araki A., Sasaki S., Nakajima T., Miyashita C., Kishi R.; 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)
17. Minatoya M., Sasaki S., Araki A., Miyashita C., Yamamoto J., Matsumura T., Kishi R.; Prenatal BPA exposure and cord blood adipokines, birth weight and child growth: the Hokkaido Study on Environment and Children's health. ISEE 2015. San Paulo, Brazil. (2015.8.30.-9.3.)
18. Kobayashi S., Miyashita C., Sasaki S., Araki A., Sata F., Ban S., Kajiwara J., Todaka T., Kishi R.; Effects of maternal AHR, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and dioxins on infant birth weight: The Hokkaido Study. ISEE 2015. San Paulo, Brazil. (2015.8.30.-9.3.)
19. Goudarzi H., Kishi R., Ikeno T., Kobayashi S., Miyashita C., Ito S., Araki A.; The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of their Offspring: The Hokkaido Study. ISEE 2015. San Paulo, Brazil. (2015.8.30-9.3.)
20. Verner MA., Loccisano AE., Yoon M., Wu H., McDougall R., Maisonet M., Marcus M., Kishi R., Miyashita C., Chen MH., Hsieh W., Andersen M., Clewell III H., Longnecker MP.; The Association Between Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances (PFAS) and Reduced Birth Weight: Is Glomerular Filtration Rate the Underlying Cause? SOT's 53rd Annual Meeting. Phoenix, USA. (2014.3.23-27)
21. Sata F., Eto A., Araki A., Mitsui T., Kanatani Y., Kishi R., Nonomura K.; Associations between fetal genetic polymorphisms and cord blood sex hormone and protein levels. ISEE 2014. Seattle, USA. (2014.8.24-28)
22. Minatoya M., Sasaki S., Nakajima S., Yamamoto J., Araki A., Itoh S., Miyashita C., Matsuura T., Nonomura K., Mitsui T., Cho K., Kishi R.; Prenatal bisphenol A exposure and birth outcomes: The Hokkaido Study. 2014 Conference of International Society for Environmental Epidemiology Asia Chapter. Shanghai, China. (2014.11.29-12.02)
23. Kobayashi S., Azumi K., Sasaki S.,

- Ishizuka M., Nakazawa H., Okada E., Kobayashi S., Goudarzi H., Itoh S., Miyashita C., Ikeno T., Araki A., Kishi R.; The effects of perfluoroalkyl acids (PFAAs) exposure in utero on IGF2/H19 DNA methylation in cord blood. ISEE 2014. Seattle, USA. (2014.8.24-28)
24. Kita T., Nakajima S., Ikeno T., Kishi R.; The Association between Parental Socioeconomic Status and Intellectual Ability in Japanese Infants aged 42 month: The Hokkaido Study. The 20th IEA World Congress Of Epidemiology. Anchorage, USA. (2014.8.17-21)
25. Kishi R., Araki A., Itoh S., Miyashita C., Goudarzi H., Kobayashi S., Sasaki S., Kashino I., Nakazawa H., Nakajima T., Mitsui T., Nonomura K.; Perinatal PFAAs Exposure Cause Various Health Outcomes on Offspring Including Effects on Reproductive and Thyroid Hormones: The Hokkaido Study. PPTOX IV. Boston, USA. (2014.10.26-29.)
26. Kishi R.; Phthalates & Phosphate Flame Retardants (PFRs) in house dust and their associations with asthma and allergies. Summit on Child Health and the Environment 2014 in Hong Kong. Hong Kong, China. (2014.10.11-13)
27. Kishi R.; Twelve years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: malformation, development and allergy. International Symposium of Environmental Medicine Program. 台北、台湾. (2014.10.16-17.)
28. Kishi R.; Twelve Years of Progress in the Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: Focused on Dioxins and PFCs. Summit on Child Health and the Environment 2014. Hong Kong, China. (2014.10.11-13.)
29. Children's Health: Focused on Dioxins and PFCs. Summit on Child Health and the Environment 2014. Hong Kong, China. (2014.10.11-13.)
30. PFCs. Summit on Child Health and the Environment 2014. Hong Kong, China. (2014.10.11-13.)
31. Kishi R.; Exposure levels of perfluoroalkyl acids and their effects on children's health - Hokkaido study. ISEE 2014. Seattle, USA. (2014.8.24-28)
32. Itoh S., Araki A., Miyashita C., Nakazawa H., Mitsui T., Cho K., Sasaki S., Ikeno T., Nonomura K., Kishi R.; Effect of PFOS and PFOA exposure in utero on reproductive hormones levels at birth. ISEE 2014. Seattle, USA. (2014.8.24-28)
33. Goudarzi H., Ikeno T., Kobayashi S., Araki A., Miyashita C., Sasaki S., Nakajima S., Nakazawa H., Kishi R.; Exposure to perfluoroalkyl chemicals and neurodevelopment at 6 months of age. ISEE 2014. Seattle, USA. (2014.8.24-28)
34. Araki A., Mitsui T., Miyashita C., Nakajima T., Nakazawa H., Sasaki S., Ikeno T., Cho K., Itoh S., Nonomura K., Kishi R.; Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and sex hormone levels in fetal blood. ISEE 2014. Seattle, USA. (2014.8.24-28)
35. Araki A, Kishi R; The Hokkaido study on Environment and Children's Health: Cohort profile and brief summary from findings of

PFAAs exposure and various health outcomes. 2014 Conference of International Society for Environmental Epidemiology Asia Chapter. Shanghai, China. (2014.11.29-12.02)

5) 学会発表 (国内)

1. 小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, Titilola BRAIMOH, 荒木敦子, 宮下ちひろ, Houman GOUDARZI, 小林祥子, 岸玲子; 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. 山梨県甲府市. (2017.1.25-27)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, Braimoh T. S., 荒木敦子, 宮下ちひろ, Goudarzi H., 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)
7. 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)
8. 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, 苅木洋一, 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)
9. 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)
10. 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. (2016.5.11-13)
11. アイツバマイゆふ, 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)
12. 湊屋街子, 佐々木成子, 中島そのみ, 那須民江, 後藤裕子, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 小林澄貴, 池野多美子, 岸玲子; 胎児期MEHP曝露による神経行動発達への影響—北海道スタディ—. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山. (2015.3.26-28.)
13. 湊屋街子, 佐々木成子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 山本潤, 松村徹, 岸玲子; 胎児期ビスフェノールA曝露による臍帯血中のアディポカイン、出生体重、子どもの体重への影響: 北海道スタディ. 第67回北海道公衆衛生学会. 旭川. (2015.11.21.)
14. 田村菜穂美, 伊藤久美子, 花岡知之, 喜多歳子, 西原進吉, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 小笠原克彦, 岸玲子; 児の出生体重と母親の社会経済要因との関連についての疫学研究—北海道スタディ. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山. (2015.3.26.-28.)
15. 西原進吉, 池野多美子, 小林澄貴, 佐々木成子, 岸玲子; 胎児期の母と学童期の児の喫煙曝露とADHD-RSとの関連 北海道スタディ. 第74回日本公衆衛生学会大会. 長崎. (2015.11.4-6)
16. 小林澄貴, 宮下ちひろ, 佐々木成子, 荒木敦子, 佐田文宏, 板晋, 梶原淳睦, 戸高尊, 岸玲子; ダイオキシン類曝露と胎児発育との関連: 遺伝的なリスクについて—北海道スタディ—. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山. (2015.3.26.-28.)
17. 小林澄貴, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 池野多美子, 伊藤佐智子, Goudarzi Houman, 花岡知之, 岸玲子; 妊娠初期における就労女性の有害物質の取扱いが児の流・死産に及ぼす影響. 第67回北海道公衆衛生学会. 旭川. (2015.11.22.)
18. 小林澄貴, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 池野多美子, 伊藤佐智子, Goudarzi H., 花岡知之, 岸玲子; 妊娠初期における北海道内女性労働者の記述疫学的考察. 第95回北海道医学大会 (平成27年度日本産業衛生学会北海道地方会). 旭川. (2015.10.17.)
19. 小林祥子, 三浦りゅう, 川口章夫, 宮下ちひろ, 三宅邦夫, 松村徹, 山本潤, 石塚真由美, 荒木敦子, 久保田健夫, 岸玲子; 胎児期ビスフェノールA曝露影響に関する臍帯血DNA網羅的メチル化解析-北海道スタディ. 第4回日本DOHaD研究学術集会. 東京. (2015.8.1-2.)
20. 小林祥子, 安住薫, 佐々木成子, 松村徹, 山本潤, 石塚真由美, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子; 臍帯血血ビスフェノールA濃度と児のIGF2DNAメチル化との関連—北海道スタディ. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山(2015.3.26.-28.)
21. 山崎圭子, 宮下ちひろ, 中島そのみ, 池野多美子, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 小林祥子, 水谷太, 菅木洋一, 岸玲子; 胎児期の有機塩素系農薬曝露が6か月・18か月児の精神運動発達に及ぼす影響-北海道スタディ. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山. (2015.3.26.-28.)
22. 荒木敦子, 宮下ちひろ, 金澤文子, 伊藤佐智子, 三井貴彦, 佐々木成子, 水谷太, 菅木洋一, 野々村克也, 岸玲子; 有機塩素系農薬への胎児期曝露による児の性ホルモン濃度への影響-北海道スタディ-. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山. (2015.3.26-28.)

23. 宮下ちひろ, 金澤文子, 佐々木成子, 池野多美子, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 小林祥子, 水谷太, 苅木洋一, 岸玲子; 有機塩素系農薬が乳幼児の免疫に与える影響—環境と子どもの健康 北海道スタディ-. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山. (2015.3.26-28.)
24. 喜多歳子, 池野多美子, 岸玲子; 親の社会経済状態と18か月児の自閉症スペクトラム疑いリスクとの関連 環境と子どもの健康に関する前向きコホート研究(北海道スタディ). 第74回日本公衆衛生学会大会. 長崎. (2015.11.4-6)
25. 岸玲子; 環境と子どもの健康に関する出生コホート研究の現状: 北海道スタディ13年の経験から. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山. (2015.3.26-28.)
26. Goudarzi H., Kobayashi S., Chen C., Araki A., Miyashita C., Ito S., Kishi R.; Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on risk of allergic diseases at 4 years old children: The Hokkaido Study. 北海道公衆衛生学会. 旭川. (2015.11.21.)
27. 湊屋街子; ビスフェノールAの胎児期曝露による出生時体格、臍帯血中ホルモン濃度、神経行動発達への影響:北海道スタディ. 環境ホルモン学会第17回研究会. 東京. (2014.12.9-10.)
28. 田村菜穂美, 伊藤久美子, 小林澄貴, 岡田恵美子, 喜多歳子, Goudarzi Houman, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 池野多美子, 岸玲子; 児の出生体重と母親の社会経済要因との関連についての疫学研究. 第84回日本衛生学会学術総会. 岡山. (2014.5.25-27)
29. 小林澄貴, 佐々木成子, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子; 胎児期の母の受動喫煙が児の出生時体格に及ぼす影響:遺伝環境交互作用について. 第66回北海道公衆衛生学会. 札幌. (2014.12.2.)
30. 小林澄貴, 佐々木成子, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子; 妊婦の受動喫煙が児の出生時体格へ及ぼす影響: 遺伝的なハイリスク群について - 環境と子どもの健康に関する北海道スタディ -. 北海道小児保健研究会 平成26年度総会. 札幌. (2014.5.24)
31. 小林澄貴, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 池野多美子, 伊藤佐智子, 伊藤久美子, Goudarzi Houman, 田村菜穂美, 岸玲子; 北海道における妊婦の職域における化学物質曝露・受動喫煙および飲酒習慣が児の出生時体格に及ぼす影響. 平成26年度日本産業衛生学会北海道地方会. 札幌. (2014.10.18.)
32. 佐々木成子, 山本潤, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 宮下ちひろ, 三井貴彦, 長和俊, 野々村克也, 松村徹, 岸玲子; 胎児期ビスフェノールA曝露による臍帯血中性ホルモン濃度への影響. 第84回日本衛生学会学術総会. 岡山. (2014.5.25-27)
33. 荒木敦子, 三井貴彦, 宮下ちひろ, 那須民江, 伊藤佐智子, 佐々木成子, 長和俊, 池野多美子, 野々村克也, 岸玲子; DEHPへの胎児期曝露による児の性ホルモン濃度への影響. 第84回日本衛生学会学術総会. 岡山. (2014.5.25-27)
34. 荒木敦子, 岸玲子; フタル酸エステル類の胎児期曝露による次世代影響に関する疫学研究. 第84回日本衛生学会学術総会. 岡山. (2014.5.25-27)
35. 宮下ちひろ, 金澤文子, 池野多美子,

- 荒木敦子, 伊藤佐智子, 小林澄貴,
湊屋街子, Goudarzi Houman, 小林
祥子, 田村菜穂美, 水谷太, 苜木洋
一, 岸玲子; 胎児期の有機塩素系農
薬が小児アレルギー発症に与える影
響 - 環境と子どもの健康北海道スタ
ディ -. 第66回北海道公衆衛生学会.
札幌. (2014.12.02)
36. 喜多歳子, 池野多美子, 小林澄貴;
親の世帯収入と42か月児の問題行動
—北海道スタディの結果から—. 第2
回日本公衆衛生看護学会. 小田原.
(2014.1.13)
37. 岸玲子; 出生コホート研究で明らか
になった人への環境ホルモン様作用
Adverse effects of endocrine
disrupting chemicals on human:
Findings from the birth cohort
38. - the Hokkaido Study on
environment and children's health-
環境ホルモン学会第17回研究会. 東
京. (2014.12.9-10.)
39. 梶原淳睦, 戸高尊, 平川博仙, 宮下
ちひろ, 伊藤佐智子, 佐々木成子,
荒木敦子, 岸玲子; さい帯血と血液
のダイオキシン及びPCB類の組成比
較Comparison of disxins and PCBs
in umbilical cord blood and blood.
環境ホルモン学会第17回研究会. 東
京. (2014.12.9-10.)
40. 伊藤佐智子, 荒木敦子, 宮下ちひろ,
中澤裕之, 三井貴彦, 長和俊, 佐々
木成子, 池野多美子, 野々村克也,
岸玲子; PFOS, PFOAの胎児期曝露
が与える児の出生時性ホルモン濃度
への影響. 第84回 日本衛生学会学
術総会. 岡山. (2014.5.25-27)

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

先天異常の発生状況とケースコホートをを用いた曝露リスク評価に関する研究

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター・特任教授

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

研究分担者 遠藤 俊明 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 准教授

研究分担者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授

研究分担者 吉岡 英治 旭川医科大学医学部健康科学講座 准教授

研究要旨

北海道内の 37 産科医療施設において妊婦健診を受診し、本研究への参加に同意を得られた妊婦 **20,818** 名を対象とした前向きコホート研究の一環として北海道における先天異常発生状況を調査している。今回は **2003** 年から **2014** 年 **1** 月までに、分娩が終了し、出産施設から児の情報が得られた **18,333** 名に対して、先天異常の出産頻度を算出した。先天異常のうち発生要因として環境要因の関与が考えられる異常をマーカー異常とした。なんらかの先天異常を有する児の総数は **381** 名であり、そのうちマーカー奇形が **264** 件、その他の異常が **166** 件であり、先天異常を有する児の出産頻度は **2.08%** であった。日本産婦人科医会の国際先天異常モニタリングセンター (**Japan Association of Obstetricians and Gynaecologists: JAOG**) は、在胎 **22** 週以降の先天異常を報告しているが、本研究参加者の妊娠 **22** 週以降の分娩者 **18,166** 名のうち、先天異常のある児は **340** 名で、出産頻度 **1.87%** であった。わが国の先天異常の発生率は **1997** 年から画像診断による心臓血管形態異常把握開始により、若干の増加を示し約 **1.7~2%** 前後となりその後、大きな変動はみられていないとの報告があるが、本研究においても先天異常を有する児の出産頻度はほぼ同程度であった。**2002** 年から **2011** 年までのリクルート年毎に無作為抽出された **500** 名および、最終 **2012** 年の全員 **369** 名から構成される **4869** 名のサブコホート集団を抽出した。ケースコホート研究デザインで先天性心疾患 **145** 名について曝露評価を実施している。**PCB**・ダイオキシン類は先天性疾患 **118** 名コントロール **118** 名合計 **236** 名が測定済みである。今後も引き続き **PCB**・ダイオキシン類、**PFCs** の曝露評価を継続すると共に、環境化学物質の関与が示唆されるマーカー奇形の尿道下裂・停留精巣 **78** 名をケースとし、妊娠初期（器官形成期）の母体血血清を用いて **BPA**・フタル酸エステル類の曝露評価を行う。

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

(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)

馬場 剛

(札幌医科大学産婦人科学講座)

宮本 敏伸

(旭川医科大学産婦人科学講座)

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

主要な先天異常の発生頻度は**2~5%**と報告されており(ICBDSR, 2014; Dolk H et al., 2003), わが国の**0**歳児の死亡原因の第1位は長年にわたって先天奇形, 変形・染色体異常である。一方, 副耳や多指などといった小奇形はさらに発生頻度が高く, 早急な治療を必要としない疾患が多いが, 主要な奇形を合併していることもあるため出生後の観察は重要である。わが国の先天異常発生モニタリングは, **1972**年より日本産婦人科

医学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**)が実施しており, 主要な先天異常の発生頻度の報告はされているが, 先天異常全体の発生頻度の報告はされていない。他国でも同様に, 地域単位の先天異常全体の発生率や先天異常の種類は少ない

(Correa-villasenor A, et al. 2003; Langlois PH, et al. 2011; Kazim Oztarhan1, et al.2010; Keewan Kim, et al. 2013.)。

先天異常の原因は多彩であるが, 環境要因が関与する多因子遺伝によるものが多い。胎児期 **PCBs**・**ダイオキシン**類による先天異常への影響については, 動物実験においてダイオキシン類の胎児期曝露が心奇形を引き起こすことが報告された(**Kopf et al. 2009**)。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**)。一方, 飲料水が高濃度 **PFOA** に汚染された地域で **Zip codes**により給水領域で分類した居住地域と先天異常発生リスクに関連はなく(**Nolan et al., 2010**), 臍帯血中 **PFOS/PFOA** レベルと児の停留精巣との関連は認められなかった(**Vesterholm Jensen et al., 2013**)。ビスフェノール A およびフタル酸類と先天異常

の関連では、母体血中 **BPA** および妊娠中の尿中フタル酸代謝物レベルは児のコントロール群と比較し尿道下裂群で有意に増加した(Choi et al., 2012)。妊婦の就業形態をサロゲートとしてフタル酸エステル類の職業曝露を推定すると、推定曝露量と共に児の尿道下裂リスクが有意に増加した(Ormond et al., 2009)。一方で、児の停留精巣とコントロール群で臍帯血中 **BPA** 濃度には有意差は認められない(Fenichel et al., 2012)。母乳中フタル酸代謝物濃度と児の停留精巣群とコントロール群に有意な差は認められない(Main et al., 2006)など結果は一致していない。

ヒトを対象にした環境化学物質と先天異常に関する先行研究は、生体試料を用いた胎児期の曝露評価が不十分で異性体レベルで測定した研究もなかった。特に生体影響が **PCBs** より高いと懸念される **OH-PCB** に関する疫学報告は内外でほとんどない。わが国で 2010 年に **PFOS**、**PFOSF** が化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律の第一種特定化学物質（一部用途以外の製造・輸入禁止）に指定された。そこで **PFOS**、**PFOA** 以外の代替品で長鎖の化合物を含めた **PFCs** の妊婦の曝露評価を行う必要がある。ビスフェノール A (**BPA**) は従来の毒性試験で **NOAEL** とされた用量より低い用量の **BPA** 胎児期曝露で、仔の思春期早発や神経発達への影響などが報告されたが、先天異常については停留精巣と尿道下裂の報告が若干あるのみでヒトでのデータは不足している。

本研究は、2002 年から現在進行中の前向きコホート研究によって、北海道全域の産科クリニックから大学病院まで多様な規模の参加施設の協力のもと、先天異常(マーカー奇形・異常 55 疾患)モニタリングを実

施し、地域の病院ベースにおける先天異常発生率を把握する。また、既に得られた妊娠中の母体血を用いて今後曝露評価をケースコホート研究デザインで行うために大規模コホート集団からサブコホート集団を抽出する。

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

B．研究方法

1．対象

2002 年から 2012 年までに、北海道内の 36 産科医療施設で妊婦健診を行い、本調査への参加に同意した妊婦は 20,818 名である。参加登録妊婦が出産した場合、出産施設に「新生児個票」への記載を依頼しており、2014 年 1 月までに受け付けた新生児個票 18,333 件について先天異常発生頻度を集計した。また、1 歳、2 歳に母親へ質問紙を送付して、児の健康状態の情報を得た。

2．方法

参加登録妊婦が出産した場合には、出産施設に新生児の健康状態を 7 日間観察し、

研究班作成の「新生児個票」に記入後、郵送による返送を依頼した。「新生児個票」の質問項目は、出産日、在胎週数、出生時体重、児性別、単・多胎、生・死・流産、妊娠中の疾患、先天異常の有無、先天異常内容などである。先天異常の内容は、先天異常発生に環境要因の関与が考えられる先天性心疾患、口唇口蓋裂、停留精巣などの奇形 55 種をマーカー奇形として設定し、その他の先天奇形については自由記載とした。提出された全新生児個票(流産、死産含む)から先天異常の発生数を算出した。

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

（倫理面への配慮）

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

C．研究結果

1．出産報告の概要

本研究へのお産報告数を地域別で見ると、最も報告数の多い地域は道央圏 38% で、そのほとんどは札幌地区である。次い

で十勝圏 29.1%、道南圏 21.0%と続く(図 1)。施設の規模別では、最も多いのは産科病院 29.8%で、次に産科クリニック 25.0%であった。NICUを持つ地域周産期母子医療センター、総合周産期母子医療センター、道内 3 大学附属病院を合わせると 30.9%であった(図 2)。

母親の出産時年齢は 29.9(14-48)歳、在胎週数 38.5(6-42)週であった。児の性別は男児 9,194 名(50.2%)、女児 9,036 名(49.3%)であった。出産児の数は単胎 17,998 名(98.2%)、複胎 335 名(1.8%)であった(表 1)。

3. 先天異常の発生状況

生産、死産、流産を含む全分娩のうち、何らかの先天異常のある児の総数は 381 件(2.08%)であった。そのうちマーカー奇形 264 件(1.44%)、その他の先天奇形 166 件(0.91%)であった。また、在胎 22 週以降の分娩 18,166 件中では、先天異常のある児は 340 件(1.87%)であった(表 2)。

全分娩において、発生頻度(出産 1 万対)の最も高い先天異常は心室中隔欠損症 19.1(35 名)であった。次いで停留精巣・非触知精巣 15.2(14 名：男児のみ 9,194 名で算出)、多指(趾)13.1(24 名)、Down 症候群 10.9(20 名)、口唇口蓋裂 8.7(16 名)、水腎症 8.7(16 名)、尿道下裂 8.7(8 名：男児のみ 9,194 名で算出)などであった(表 3)。マーカー奇形、先天性心疾患の内訳を表 4 および表 5 に示した。マーカー奇形以外の先天異常は、中枢神経系疾患、マーカー奇形以外の染色体異常、下肢形成不良などの重篤な大奇形から、副耳、臀部母斑などの小奇形まで 90 種の報告があった(表 6)。

1 歳 2 歳に母親に送付した質問紙から、新たな先天異常の報告があった主要な疾

患では、心室中隔欠損症が最も多く1歳時に46件、2歳時に8件の新規の報告があった（表7）。

4. 先天異常の頻度：JAOG との比較

在胎22週以降の分娩に関して先天異常の発生頻度をJAOG報告(ICBDSR Annual Report, 2012)の先天異常発生頻度と比較すると、JAOGの頻度よりも高かった異常は、尿道下裂8.8(JAOG報告4.78)、口蓋裂6.1(5.20)であった(いずれも出生1万対)。一方、発生頻度の低かった異常は、18トリソミー1.1(9.39)、水頭症1.1(7.55)、脊髄髄膜瘤1.1(5.46)、食道閉鎖1.1(4.49)などであった(表4、5)。

5. 2002年から2011年までのリクルート年毎に無作為抽出された500名および、最終2012年の全員369名から構成される4869名のサブコホート集団を抽出した。ケースコホート研究デザインで先天性心疾患145名について曝露評価を実施している。PCB・ダイオキシン類は先天性心疾患118名コントロール118名合計236名が測定済みである。PFCsは先天性心疾患145名コントロール145名を測定した。

D. 考察

2002年から2014年1月までに出生施設から報告があった分娩のうち、在胎22週以降の先天異常発生率は1.87%であり、JAOG報告1.7~2.0%とほぼ同程度であった。しかし、尿道下裂、口蓋裂などはJAOGよりも高かった。また、消化管系閉鎖、脊髄髄膜瘤、水頭症などの発生頻度は低かった。The China-Anhui birth cohort studyでは中国省で2008年~2010年に実施した調査では単胎の生産児13454名を対象にした先天異常の発生頻度は3.9であった(Fang-Biao et

al.,2013)。また、the Born in Bradford studyではイギリスのブラッドフォードで2007年~2011年実施した調査では11396名では先天異常の発生頻度は3.4%と報告している(Eamonn et al.,2013)。北海道スタディの先天異常の発生頻度は、低い結果であった。しかし、それぞれの調査では対象条件が異なる(例えば、全分娩か生産のみか、全奇形か大奇形のみとするかなど)。北海道スタディでは、地域の先天異常発生状況を把握するために全分娩を対象とし、また奇形も小奇形も含めた全奇形としている。今後は、先行研究の対象条件を吟味し、北海道における先天異常の発生特徴を検討していく。また、北海道スタディでは出産時情報だけではなく、母親への1歳、2歳時調査も実施している。そのため、出産時には診断されなかった先天異常がその後の乳児健診などでスクリーニングされることも多い。今後は、これら生後2年までに報告された先天異常をもとに、妊娠初期の生活・環境要因との関連を検討していく。

先天異常との関係では、生産した18,083名を対象に、引き続いてPCBs・ダイオキシン類・OH-PCB, およびPFCs11種類の分析を実施し、最終的にケースコホート研究デザインにおいて、先天性心疾患症例145名と対照例145名で、母の既往歴、妊娠中の薬剤、飲酒など生活習慣、職業歴、血清葉酸値、血中コチニン濃度を調整したうえで、胎児期のPCBs・ダイオキシン類およびOH-PCB, およびPFCsが先天性心疾患リスクに与える影響を明らかにする予定である。今後も引き続きPCB・ダイオキシン類、PFCsの曝露評価を継続すると共に、環境化学物質の関与が示唆されるマーカー奇形の尿道下

裂・停留精巣 78 名をケースとし、妊娠初期（器官形成期）の母体血清を用いて BPA・フタル酸エステル類の曝露評価を行う。

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

E . 結論

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

F . 研究発表

1 . 論文発表

- (1) 湯浅資之、岸玲子、前向き出生コホート研究の現状と課題-「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」を基に、日本衛生学会誌、2009; 64(4):774-781.

2 . 学会発表

- (1) 妊婦葉酸値と先天異常リスクとの関連-環境と子どもの健康に関する北海道スタディ(1)-、伊藤久美子、佐々木成子、Yila TA、馬場俊明、宮下ちひろ、榎野いく子、岡田恵美子、小林澄貴、吉岡英治、岸玲子、第 81 回日本衛生学会学術総会（東京）、2011/3/25-28

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. Choi H, Kim J, Im Y, Lee S, Kim Y. 2012. The association between some endocrine disruptors and hypospadias in biological samples. *J Environ Sci Heal A* 47:2173-2179.
2. 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.
3. Correa-Villasenor A, Cragan J, Kucik J, O'Leary L, Siffel C, Williams L. 2003. The metropolitan atlanta congenital defects program: 35 years of birth defects surveillance at the centers for disease control and prevention. *Birth Defects Res A* 67:617-624.
4. Dolk H, Vrijheid M. 2003. The impact of environmental pollution on congenital anomalies. *Br Med Bull* 68:25-45.
5. Fenichel P, Dechaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, et al. 2012. Unconjugated bisphenol a cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod* 27:983-990.
6. International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. Annual Report 2014. The international center on birth

- defects – ICBDSR Center.
7. Jensen DV, Christensen J, Virtanen HE, Skakkebaek NE, Main KM, Toppari J, et al. 2014. No association between exposure to perfluorinated compounds and congenital cryptorchidism: A nested case-control study among 215 boys from denmark and finland. *Reproduction* 147:411-417.
 8. Kim K, Wang Y, Kirby RS, Druschel CM. 2013. Prevalence and trends of selected congenital malformations in new york state, 1983 to 2007. *Birth Defects Res A* 97:619-627.
 9. Kopf PG, Walker MK. 2009. Overview of developmental heart defects by dioxins, pcbs, and pesticides. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 27:276-285.
 10. Langlois PH, Marengo LK, Canfield MA. 2011. Time trends in the prevalence of birth defects in texas 1999-2007: Real or artifactual? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91:902-917.
 11. Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, et al. 2006. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Persp* 114:270-276.
 12. Nolan LA, Nolan JM, Shofer FS, Rodway NV, Emmett EA. 2010. Congenital anomalies, labor/delivery complications, maternal risk factors and their relationship with perfluorooctanoic acid (pfoa)-contaminated public drinking water. *Reprod Toxicol* 29:147-155.
 13. Ormond G, Nieuwenhuijsen MJ, Nelson P, Toledano MB, Iszatt N, Geneletti S, et al. 2009. Endocrine disruptors in the workplace, hair spray, folate supplementation, and risk of hypospadias: Case-control study. *Environ Health Persp* 117:303-307.
 14. Oztarhan K, Gedikbasi A, Yildirim D, Arslan O, Adal E, Kavuncuoglu S, et al. 2010. Prevalence and distribution of congenital abnormalities in turkey: Differences between the prenatal and postnatal periods. *Congenit Anom (Kyoto)* 50:221-225.
 15. 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.
 16. Stein CR, Savitz DA, Dougan M. 2009. Serum levels of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol* 170:837-846.
 17. 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.**

- 18. 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.**

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

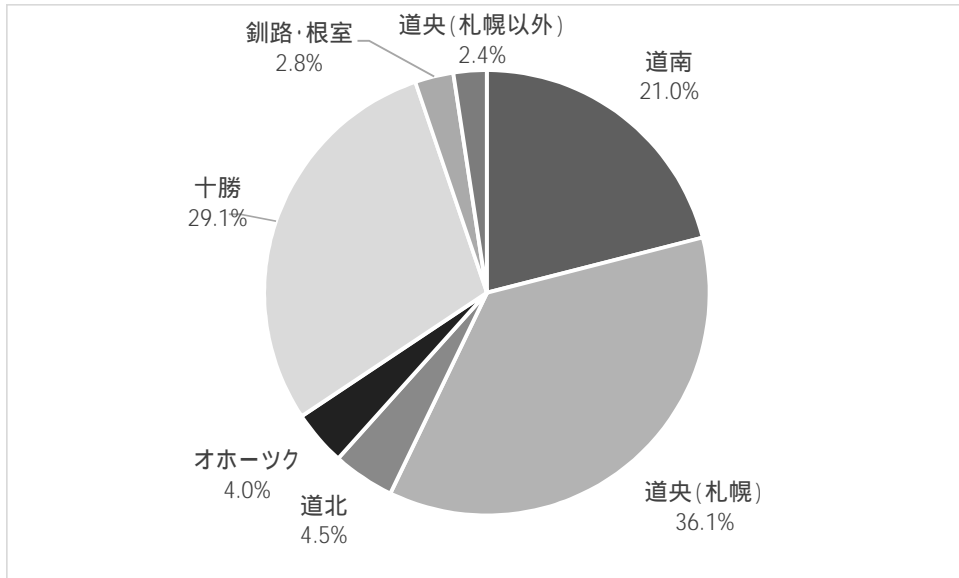


図 1. 地域別出産報告数

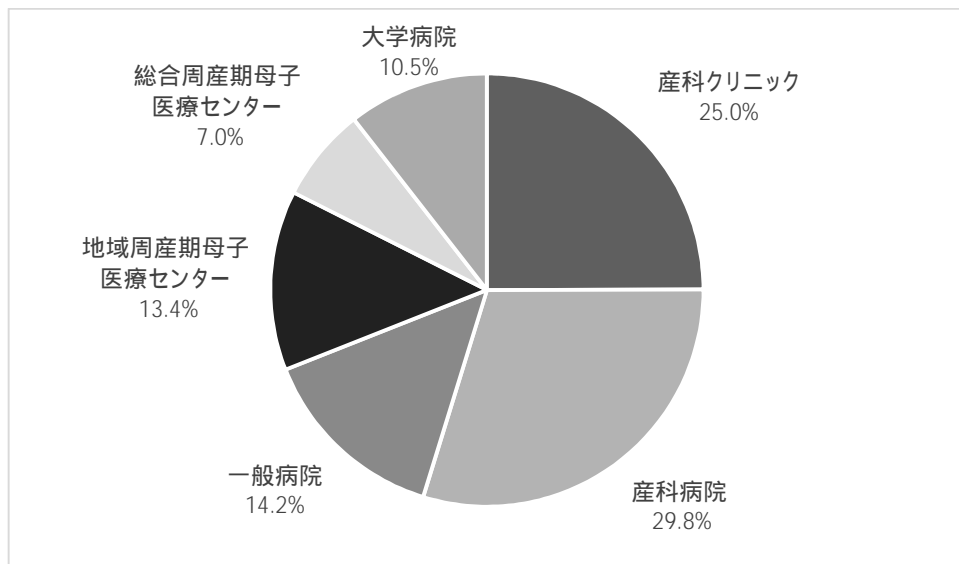


図 2. 出産施設規模別の出産報告数

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 1. 対象母児の属性

	全分娩者 (n18333)		先天異常なし(n17952)		先天異常あり (n381)		P
出産時年齢 (歳)	29.9 ± 4.8 (14 - 48) ^a 歳		29.9 ± 4.8 (14 - 48) ^a 歳		29.9 ± 4.9 (18 - 42) ^a 歳		
<20	264	1.4%	258	1.4%	6	1.6%	0.901
20-24	2346	12.8%	2296	12.8%	50	13.2%	
25-29	5979	32.6%	5863	32.7%	116	30.6%	
30-34	6481	35.4%	6346	35.4%	135	35.5%	
35<	3260	17.8%	3187	17.8%	73	19.2%	
Missing	3						
出産回数 (回)							
0	7065	42.8%	6928	42.8%	137	43.6%	0.404
1	9441	57.2%	9264	57.2%	177	56.4%	
Missing	1827						
分娩帰結							
生産	18102	98.7%	17767	99.0%	335	87.9%	<0.001
死産	102	0.6%	85	0.5%	17	4.5%	
流産	129	0.7%	100	0.6%	29	7.6%	
在胎週数 (週)	38.5 ± 2.9 (6 - 42) ^a 週		38.6 ± 2.7 (6 - 42) ^a 週		36.0 ± 7.0 (10 - 41) ^a 週		
<22	179	1.0%	139	0.8%	40	10.5%	<0.001
22-36	1022	5.6%	995	5.5%	27	7.1%	
37-41	17095	93.3%	16728	93.5%	313	82.4%	
42	33	0.2%	33	0.2%	0	0.0%	
Missing	4						
出産児数							
単胎	17998	98.2%	17624	98.2%	374	98.2%	0.968
複胎	335	1.8%	325	1.8%	7	1.8%	
児の性別							
男児	9194	50.2%	8997	50.4%	197	54.4%	0.07
女児	9036	49.3%	8871	49.6%	165	45.6%	
Missing	103				362		
出生時体重 (g)	3005.6 ± 4908 (10 - 4750) ^a g		3012.0 ± 477.5 (10 - 4750) ^a g		2664.0 ± 894.6 (17 - 4156) ^a g		<0.001
<2500	1761	9.6%	1677	9.4%	84	22.2%	
2500	16536	90.4%	16242	90.6%	294	77.8%	
Missing	36				378		

* a mean (範囲)

表 2. 先天異常件数

	全分娩(n=18,333)		在胎22週以降 (n=18,166)	
	n	%	n	%
先天異常発生数	381	2.08	340	1.87
マーカ-奇形発生数1)	264	1.44	250	1.38
その他の奇形発生数2)	166	0.91	108	0.59

*「疑い」「不明」を含む

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．発生頻度の高い先天異常(2014年1月現在)

JAOG:日本産婦人科医会先天異常モニタリング 2006-2010 年度比較
 (ICBDSR. Annual Report 2012.)

	全分娩 n=18,333		在胎22週以降の分娩 n=18,166		JAOG 2006-2010年 (出産1万対)
	数	北海道スタディ (出産1万対)	数	北海道スタディ (出産1万対)	
心室中隔欠損症	35	19.1	35	19.3	
停留精巣・非触知精巣 * 男児のみ(全9,194人/22週以降9,135人)	14	15.2	14	15.3	
多指(趾)症	24	13.1	24	13.2	6.40
Down症候群	20	10.9	18	9.9	12.02
水腎症	16	8.7	15	8.3	
尿道下裂 * 男児のみ(全9,194人/22週以降9,135人)	8	8.7	8	8.8	4.78
口唇口蓋裂	16	8.7	16	8.8	
口蓋裂	11	6.0	11	6.1	5.20
心房中隔欠損症	10	5.5	10	5.5	

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表4. マーカー奇形の発生頻度 (2014年1月現在)

JAOG:日本産婦人科医会先天異常モニタリング 2006-2010年度比較 (ICBDSR. Annual Report 2012.)

項目			全分娩 n=18,333		在胎22週以降の分娩 n=18,166		JAOG 2006-2010年 (出産1万対)
			数	北海道スタディ (出産1万対)	数	北海道スタディ (出産1万対)	
頭部	A1	無脳症	4	2.2	0	-	0.80
	A2	脳瘤	0	-	0	-	5.46
	A3	小頭症	1	0.5	1	0.6	1.76
	A4	水頭症	2	1.1	2	1.1	7.55
	A5	全前脳胞症	2	1.1	2	1.1	1.20
眼部	B1	眼瞼欠損	0	-	0	-	0.40
	B2	小眼球症・無眼球症	0	-	0	-	0.68
	B3	白内障	0	-	0	-	-
耳部	C1	小耳症	2	1.1	2	1.1	1.83
	C2	外耳道閉鎖	2	1.1	2	1.1	-
	C3	埋没耳	3	1.6	3	1.7	-
	C4	耳介低位	6	3.3	4	2.2	-
口顔部	D1	口唇裂	9	4.9	9	5.0	-
	D2	口蓋裂	11	6.0	11	6.1	5.20
	D3	口唇口蓋裂	16	8.7	16	8.8	-
	D4	顔面裂	0	-	0	-	-
	D5	先天性歯	1	0.5	1	0.6	-
上肢	E1	多指症	15	8.2	15	8.3	-
	E2	合指症	8	4.4	7	3.9	-
	E3	裂手症	0	-	0	-	-
	E4	上肢の減数異常	2	-	2	-	-
	E5	上肢先天性絞扼輪症候群	0	-	0	-	-
	E6	橈骨側の異常	0	-	0	-	-
	E7	尺骨側の異常	0	-	0	-	-
体幹	F1	脊髄髄膜瘤（二分脊椎）	3	1.6	2	1.1	5.46
	F2	膈帯ヘルニア	3	1.6	2	1.1	4.05
	F3	腹壁破裂	0	-	0	-	-
	F4	その他の腹壁異常	10	5.5	10	5.5	-
		横隔膜ヘルニア	6	3.3	6	3.3	6.14
	鼠径ヘルニア	4	2.2	4	2.2	-	
心臓	G1	先天性心疾患(病名不明含む)	95	51.8	95	52.3	-

項目			全分娩 n=18,333		在胎22週以降の分娩 n=18,166		JAOG 2006-2010年 (出産1万対)
			数	北海道スタディ (出産1万対)	数	北海道スタディ (出産1万対)	
消化器	H1	食道閉鎖	2	1.1	2	1.1	4.49
	H2	直腸肛門奇形	5	2.7	5	2.8	-
	H3	小腸閉鎖	5	2.7	5	2.8	7.41
	H4	十二指腸閉鎖	3	1.6	3	1.7	-
泌尿器 ・ 生殖器	I1	水腎症	16	8.7	15	8.3	-
	I2	異形成腎	2	1.1	1	0.6	-
	I3	尿道下裂 * 男児のみ 全9,194人/22週以降9,135人	8	8.7	8	8.8	4.78
	I4	停留精巣・非触知精巣 * 男児のみ 全9,194人/22週以降9,135人	14	15.2	14	15.3	-
	I5	膀胱外反症・ 総排泄腔外反症	1	0.5	1	0.6	0.26
	I6	陰核肥大	0	-	0	-	-
	I7	性別不分明	1	0.5	1	0.6	-
	I8	膈欠損	0	-	0	-	-
下肢	J1	多趾症	9	4.9	9	5.0	-
	J2	合趾症	6	3.3	4	2.2	-
	J3	裂足症	1	0.5	0	-	-
	J4	下肢の減数異常	0	-	0	-	-
	J5	下肢先天性絞扼輪症候群	0	-	0	-	-
皮膚	K1	6個以上または 巨大な色素異常斑	4	2.2	4	2.2	-
	K2	継続する水疱・小水疱 ・びらん形成(先天性表皮水疱 症)	2	1.1	2	1.1	-
症候群 ・ 染色体異 常	L1	Down症候群	20	10.9	18	9.9	12.02
	L2	軟骨無形成症	0	-	0	-	-
	L3	Apert症候群	0	-	0	-	-
	L4	先天性多発性関節拘縮症	0	-	0	-	-
	L5	trisomy 18	3	1.6	2	1.1	9.39
	L6	trisomy 13	1	0.5	1	0.6	2.00
結合双生児	M1	結合双生児	0	-	0	-	-

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表5．先天性心疾患の内訳（2014年1月現在）

JAOG:日本産婦人科医会先天異常モニタリング 2006-2010 年度比較
(ICBDSR. Annual Report 2012.)

	全分娩 n=18,333		在胎22週以降の分娩 n=18,100		JAOG 2006-2010年 (出産1万対)
	数	北海道スタディ (出産1万対)	数	北海道スタディ (出産1万対)	
先天性心疾患全体	95	51.8	95	52.3	
心室中隔欠損症	35	19.1	35	19.3	
心房中隔欠損症	10	5.5	10	5.5	
肺動脈（弁）狭窄症	7	3.8	7	3.9	
ファロー四徴症	5	2.7	5	2.8	6.49
動脈管開存症	7	3.8	7	3.9	
大動脈縮窄症	5	2.7	5	2.8	5.98
肺動脈閉鎖症	2	1.1	2	1.1	
大血管転位症	4	2.2	4	2.2	4.19
単心室	1	0.5	1	0.6	
単心房単心室	2	1.1	2	1.1	
大動脈（弁）狭窄症	1	0.5	1	0.6	4.19
心内膜床欠損症	4	2.2	4	2.2	
左室低形成症	2	1.1	2	1.1	
右室低形成症	1	0.5	1	0.6	
両大血管右室起始	2	1.1	2	1.1	
右胸心	1	0.5	1	0.6	
総肺静脈還流異常症	1	0.5	1	0.6	
動脈管動脈瘤症	1	0.5	1	0.6	
三尖弁逆流症	1	0.5	1	0.6	
心室内結節	1	0.5	1	0.6	
大動脈逆流弁	1	0.5	1	0.6	
不明	29	15.8	29	16.0	

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表6．その他の先天奇形の発生頻度（2014年1月現在）

項目		全出産 n=18,333		項目		全出産 n=18,333		
		数	北海道スタディ (出産1万対)			数	北海道スタディ (出産1万対)	
頭部	1 無頭蓋骨	2	1.1	体幹	44 単一臍帯動脈	3	1.6	
	2 脳室上衣下嚢胞	1	0.5		45 肺低形成	1	0.5	
	3 小脳低形成	1	0.5		46 内臓逆位	1	0.5	
	4 透明中隔欠損、脳梁低形成	1	0.5		47 脊椎側弯	1	0.5	
	5 頭蓋骨形成不全	1	0.5		48 脊髄髄膜瘤に伴う麻痺性の変形	1	0.5	
	6 頭部陥没	1	0.5		49 胎児水腫・胎児腹水	9	4.9	
	7 側脳室拡大(疑い)	1	0.5		消化管	50 消化管穿孔	1	0.5
顔頸部	8 眼球異常(網膜欠損ほか)	1	0.5	51 下部消化管通過障害(疑い)		1	0.5	
	9 耳瘻孔	2	1.1	52 胆のう拡張		1	0.5	
	10 副耳	10	5.5	53 腸管重複症(疑い)		1	0.5	
	11 鯉丘症候群	3	1.6	54 ヒルシュスブルグ病		1	0.5	
	12 声門狭窄	1	0.5	泌尿器・ 生殖器		55 腎のう胞(疑い)	2	1.1
	13 耳介低形成	1	0.5			56 多のう胞腎	1	0.5
	14 耳介水平	1	0.5		57 腎(腎盂)拡張	2	1.1	
	15 耳形状・位置の左右差	1	0.5		58 腎盂拡大	1	0.5	
	16 先天性聴力障害(疑い)	2	1.1		59 腎盂尿管移行部狭窄	1	0.5	
	17 先天性真珠腫	1	0.5		60 精索水腫・陰嚢水腫	4	4.4	
	皮膚	18 先天性頭部皮膚欠損	2		1.1	61 陰茎短小	1	1.1
		19 先天性皮膚欠損症	1		0.5	62 外陰のう胞	1	1.1
		20 無爪症	1		0.5	63 卵巣のう腫(疑い含む)	3	3.3
		21 爪欠損	3		1.6	64 尿管管遺残症	3	1.6
		22 胎児後頸部浮腫	2	1.1	下肢	65 プルーンベリー症候群(疑い)	2	1.1
		23 胸水貯留	1	0.5		66 脊椎側弯	1	0.5
		24 頭頂部に水腫瘍突起物	1	0.5		67 大腿骨短縮	1	0.5
25 手指腫瘍		1	0.5	68 内反足		3	1.6	
26 脂肪腫(背部)		1	0.5	69 外反足		2	1.1	
27 いぼ(側胸部)		1	0.5	70 四肢短縮		7	3.8	
28 仙尾部奇形腫(疑い)		2	1.1	71 先天性骨形成不全		1	0.5	
29 前上腸骨棘付近の腫瘍		1	0.5	72 大腿骨、上腕骨が長い		1	0.5	
30 腹部の腫瘍		1	0.5	73 先天性下肢変形		1	0.5	
31 リンパ管腫(背部)		1	0.5	74 下肢低形成		3	1.6	
32 リンパ管腫(頸部)		1	0.5	75 趾変形	1	0.5		
33 外陰部脂肪腫(外陰腫瘍)		1	0.5	76 屈曲肢異形成症	1	0.5		
34 嚢胞性ヒグローム		3	1.6	染色体	77 染色体異常(46,XX,t(9;18)(q32	1	0.5	
35 先天性魚鱗癬症		1	0.5		78 染色体異常(45X)	1	0.5	
36 血管腫		3	1.6		79 染色体異常(47,XY)	2	1.1	
37 母斑		1	0.5		80 染色体異常(45X/47XXX)	1	0.5	
38 脂性(腺)母斑		1	0.5		81 Campomelic dysplasia	1	0.5	
39 Skene腺のう症		1	0.5		82 ターナー症候群	1	0.5	
40 羊膜素症候群		1	0.5		83 ビエールロバン症候群(疑い)	1	0.5	
手指		41 関節拘縮	1		0.5	84 レックリングハウゼン氏病	1	0.5
		42 手指形態異常	1		0.5	85 筋ジストロフィー(デュシャンヌ型)	1	0.5
		43 拇指屈指症	1		0.5	86 クラインフェルター症候群	1	0.5
					87 クレーン症候群	1	0.5	
				88 胎児常染色体劣性多発性のう胞	1	0.5		
				89 不明(疑い)	1	0.5		
				詳細不明	90	5	2.7	

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表7. 2歳までに新たに報告された先天異常数（主な疾患）

	0歳	1歳	2歳
心室中隔欠損症	35	46	8
心房中隔欠損症	10	17	1
肺動脈(弁)狭窄症	7	16	0
停留精巣・非触知精巣	14	35	13
尿道下裂	8	2	0

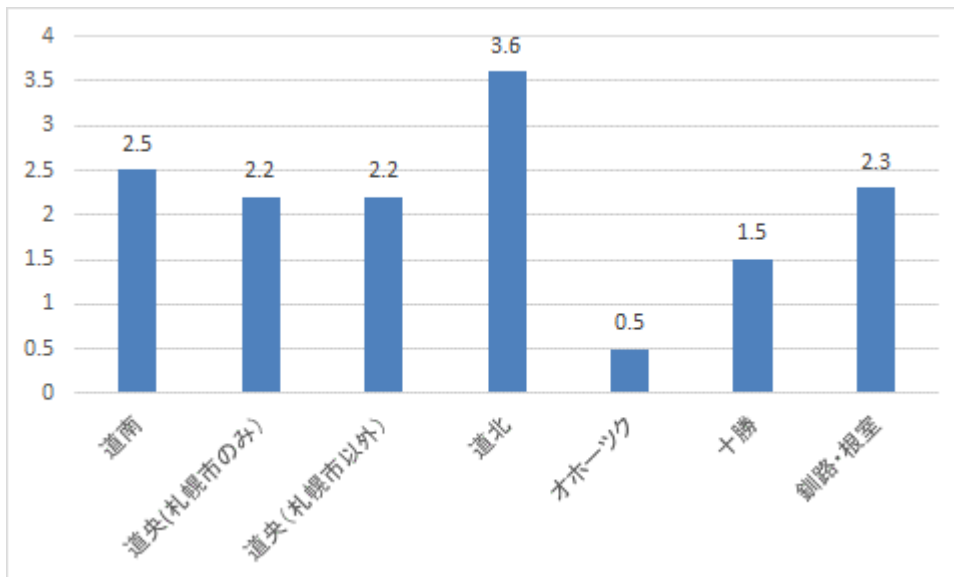


図3. 北海道医療圏別の出生報告件数による先天異常の発生頻度

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

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

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授
研究分担者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科生殖 発達医学講座産科 教授
研究分担者 遠藤 俊明 札幌医科大学医学部産科周産期科 生殖内分泌科 准教授
研究分担者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授
研究分担者 梶原 淳睦 福岡県保健環境研究所保健科学部 部長
研究分担者 花岡 知之 北海道大学環境健康科学研究教育センター 客員教授
研究分担者 荒木 敦子 北海道大学 環境健康科学研究教育センター 准教授
研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学 環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

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

研究協力者

伊藤 久美子

（北海道大学大学院医学研究科 社会医学講座公衆衛生学分野）

小林澄貴

（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

長 和俊

（北海道大学病院周産母子センター）

馬場 剛

（札幌医科大学産婦人科学講座）

宮本 敏伸

（旭川医科大学産婦人科学講座）

A．研究目的

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

（Correa-villasenor A, et al. 2003; EUROCAT., 2005; Langlois PH, et al. 2011; Kazim Oztarhan1, et al.2010; Keewan Kim, et al. 2013.）。

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

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

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

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

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

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

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

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

B．研究方法

1．対象

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

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

2. 方法

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

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

（倫理面への配慮）

本研究は，北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび北海道大学大学院医学研究科・医の倫理委員会の承認を得た。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏洩については，データの管理

保管に適切な保管場所を確保するなどの方法により行うとともに，研究者の道義的責任に基づいて個人データをいかなる形でも本研究の研究者以外の外部の者に触れられないように厳重に保管し，取り扱った。

C. 研究結果

1. 出産報告の概要

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

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

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

3. 先天異常の発生状況

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

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

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

4. 先天異常の頻度：JAOG との比較

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

5. 2 歳までの調査における先天異常の確定状況

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

5. 化学物質濃度の基礎的検討

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

D. 考察

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

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

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

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

先天異常との関係では，生産した **18,083** 名を対象に，引き続いて **PCBs**・**ダイオキシン類**・**OH-PCB**，および **PFCs** **11** 種類の分析を実施した。**263** 名の **PCB**・**ダイオキシン類**濃度は母親の年齢と共に増加，採血した時期（年）が経過すると共に低下，児の出生体重と負の相関を示した。この結果はいずれも先行研究の報告と一致しており，環境からの曝露レベルが経年で減少していること，母親の年齢が高いと体内に蓄積する化学物質の量が増加することに起因すると考えられた。最終的にケースコホート研究デザイン

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

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

E．結論

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

F．研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. **Dolk H, Vrijheid M. 2003. The impact of environmental pollution on congenital anomalies. Br Med Bull 68:25-45.**
2. **Committing to Child Survival: A Promise Renewed Progress Report 2015. Unicef**
3. **Choi H, Kim J, Im Y, Lee S, Kim Y. 2012. The association between some endocrine disruptors and hypospadias in biological samples. J Environ Sci Heal A 47:2173-2179.**
4. **Cordier, S., et al., 2004. Risk of congenital anomalies in the vicinity of municipal solid waste incinerators. Occupational and Environmental Medicine. 61, 8-15.**
5. **Cordier S, Lehebel A, Amar E, Anzivino-Viricel L, Hours M, Monfort C, et al. 2010. Maternal residence near municipal waste incinerators and the risk of urinary tract birth defects. Occup Environ Med 67:493-499.**
6. **Correa-Villasenor A, Cragan J, Kucik J, O'Leary L, Siffel C, Williams L. 2003. The metropolitan atlanta congenital defects program: 35 years of birth defects surveillance at the centers for disease control and prevention. Birth Defects Res A 67:617-624.**

7. **EUROCAT. EUROCAT Statistical Monitoring Report – 2009. (Uploaded to EUROCAT website January 2012). http://ec.europa.eu/health/rare_diseases/docs/eurocat_stat_2009_en.pdf.**
8. **Helen Dolk, Maria Loane, Ester Garne. 2010. The Prevalence of Congenital Anomalies in Europe. Advances in Experimental Medicine and Biology 686; 349-364.**
9. **Fenichel P, Dechaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, et al. 2012. Unconjugated bisphenol a cord blood levels in boys with descended or undescended testes. Hum Reprod 27:983-990.**
10. **International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. Annual Report 2014. The international center on birth defects – ICBDSR Center.**
11. **Jensen DV, Christensen J, Virtanen HE, Skakkebaek NE, Main KM, Toppari J, et al. 2014. No association between exposure to perfluorinated compounds and congenital cryptorchidism: A nested case-control study among 215 boys from denmark and finland. Reproduction 147:411-417.**
12. **Kim K, Wang Y, Kirby RS, Druschel CM. 2013. Prevalence and trends of selected congenital malformations in new york state, 1983 to 2007. Birth Defects Res A**

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

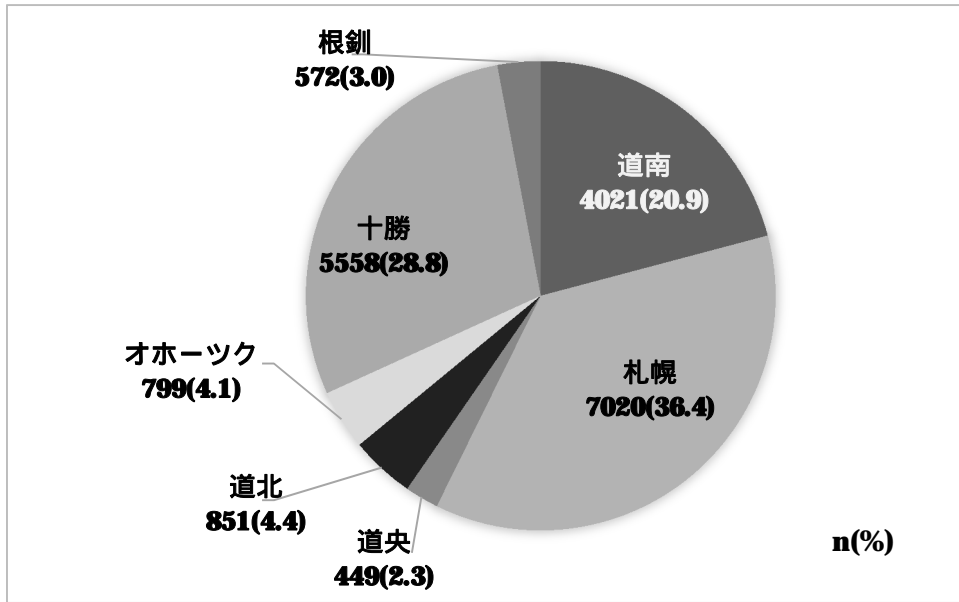


図 1. 地域別の出産報告数

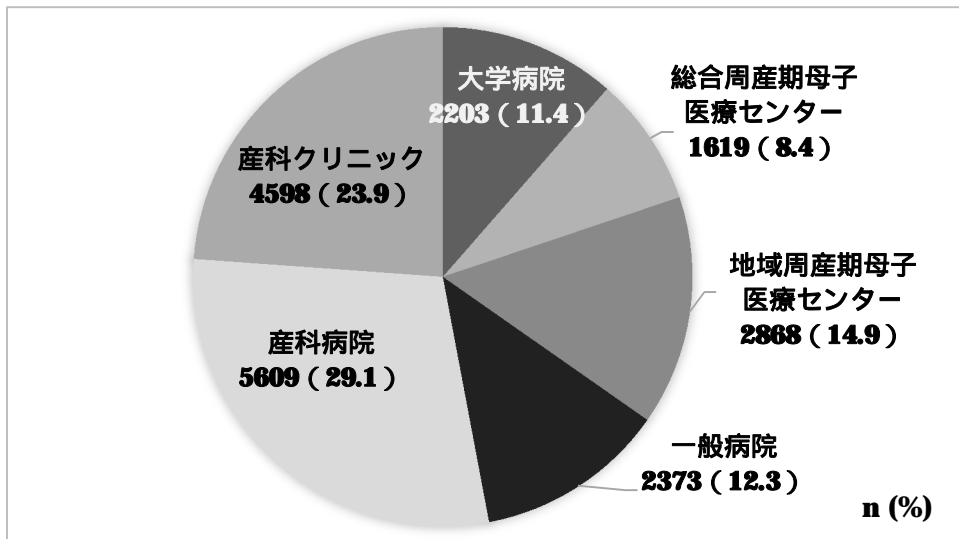


図 2. 出産施設規模別の出産報告数

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1. 対象母児の属性

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

表 2. 先天異常の出産頻度

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表3．出産頻度の高い先天異常(2015年12月現在)

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

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

染色体異常，遺伝子疾患および症候群による場合は含めていない

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表4. マーカー奇形の出産頻度 (2015年12月現在)

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

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

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

染色体異常，遺伝子疾患および症候群による場合は含めていない

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表5．先天性心疾患の内訳（2015年12月現在）

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

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

染色体異常、遺伝子疾患および症候群による場合は含めていない

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表6．その他の先天奇形の出産頻度（2015年12月現在）

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

染色体異常、遺伝子疾患および症候群による場合は含めていない

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

大規模コホートにおける出生アウトカムに関する記述統計

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
北海道療育園美幌療育病院 副院長
研究分担者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・
生殖医学分野 教授
研究分担者 遠藤 俊明 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 准教授
研究分担者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授
研究分担者 吉岡 英治 旭川医科大学医学部健康科学講座 准教授
研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授

研究要旨

小児発達への環境要因の影響を明らかにする疫学研究の基礎検討として「環境と子どもの健康に関する北海道コホート研究」において観察された出生アウトカムの記述を行った。解析に用いたデータは**2013**年末に固定したものであり、研究に参加した妊婦は**20816**名であった。このうち出生アウトカムのデータがないものを追跡不能者とした。出生アウトカムのデータがある者は**18305**名であった。単胎で観察された死産は**2.6**/出産**1000**、早産は**4.2**%であり、いずれも**2012**年の人口動態統計の値より低かった。出生体重の平均は**3044.8**であった。単胎での低出生体重児は**7.7**%であった。早産と低出生体重にはほとんどの場合に原因があるため、出生後に現れる健康影響を調べる場合に原因変数あるいは中間変数として使用するとバイアスを生じる可能性がある。出生児の未熟性に関する指標を今後の関連研究に応用する場合は注意が必要である

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)

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)

馬場 剛
(札幌医科大学産婦人科学講座)

宮本 敏伸
(旭川医科大学産婦人科学講座)

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

「環境と子どもの健康に関する北海道
コホート研究」において観察された出生
アウトカム, 特に妊娠期間と出生体重に
関する記述を行う。また, 出生児の未熟

性に関する指標の将来の関連研究への応用について考察を行う。

B．研究方法

本コホート研究の詳細については研究プロフィールの文献を参照されたい。

2003年2月から現在まで北海道内の37の病院と診療所に受診した妊娠初期（13週未満）の妊婦が研究に参加した。これらの病院と診療所は北海道内にほぼ均等に分布していた。

今回の解析に用いたデータは2013年末に固定したものであり、研究に参加した妊婦は20816名であった。このうち出生アウトカムのデータがないものを追跡不能者とした。出生アウトカムのデータがある者は18305名であった。このうち三つ子は3名のみであり、妊娠期間が42週以降の出生児は33名のみであり、これらは今回の統計解析からは除いた。

研究参加時のベースライン質問票と出産時の医療記録のデータを使用した。

各種指標の割合については **exact confidence interval** を併せて算出した。試験的な検討として、早産、正期産 **small-for-gestational age**（以下 **SGA**）、低出生体重児のリスクを母親の出産時年齢（35歳以上）と研究参加時の **BMI**（18以下）について **general linear model** を使用して算出した。

出生体重に関する指標のうち、**small-for-gestational age** については日本小児科学会の標準値を使用し、妊娠期間、性別、初産経産別に標準値の10パーセント未満とした。本検討では、超音波検査で測定された日本人の胎児体重標準値を使用した指標についても検討を行った。娠期間、性別、初産経産別に標準値の1.5SD未満（6.7パーセント未満）を **small-for-reference-fetal weight**（以下 **SFW**）とした。

（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ている。

C．研究結果

研究参加者のうち追跡不能者は12%であった。出生アウトカムのデータがある者となない者では母親の出産時年齢と研究参加時の **BMI** に差はみられなかった。初産の割合は追跡不能者で有意に高かった。

表1に単胎と双胎の出生アウトカムを示した。死産（22週以降）は単胎で2.6/出産1000、双胎で12.0/出産1000であった。単胎では早産（22週から37週）は4.2%、低出生体重児（以下 **LBW**）は7.7%であった。**SGA** と **SFW** はそれぞれ4.3%、4.1%であった。双胎では単胎よりも早産は多く、低体重に関する指標の割合は多かった。

出生体重の平均は3044.8で分布は左側に小さな尾をひくガウス分布であった。

表2に単胎と双胎の妊娠期間別の低出生体重の割合を示した。単胎では超低出生体重児は37週以降にはみられず、極低出生体重児は32週以降にはみられなかった。双胎では単胎よりも低体重に関する指標の割合は多かったが、32週以降でその差は大きくなっていった。双胎では正期産でも体重が小さかった。

表3に妊娠期間別の胎児発達率（**fetal growth rate**，以下 **FGR**）を示した。胎児発達率は、個々の出生児について、報告されている標準値の中央値（または平均値）に対する割合を%で示したものである。平均値はいずれの妊娠期間でもほぼ100%であったが、超音波検査で測定された日本人の胎児体重標準値を使用した方が若干小さい値となった。

試験的に算出した母親の出産時年齢と

研究参加時の **BMI** についての早産の相対危険度は **1.43**（**95%**信頼区間：**1.21, 1.69**）と **1.28**（**95%**信頼区間：**1.08, 1.54**）、**LBW** の相対危険度は **1.39**（**95%**信頼区間：**1.23, 1.57**）と **1.76**（**95%**信頼区間：**1.56, 1.97**）、期産 **SGA** の相対危険度は **1.15**（**95%**信頼区間：**0.95, 1.40**）と **1.77**（**95%**信頼区間：**1.49, 2.10**）であった。

D．考察

追跡

死産は、**2012** 年の人口動態統計では、北海道では **3.3/出産 1000** で、近の低下傾向を踏まえても本研究では若干低い。これは本研究の参加者が死産を引き起こす原因が少なかった可能性、あるいは健康志向が高かった可能性を示唆している。外国のコホート研究では、ノルウェー **3.0/1000**、オランダ **3.1/1000** と報告されている。死産の原因としては母親の高年齢、低社会経済状態など様々な要因が報告されているが、死産の定義に統一性がなく国際的な検討は制約がある。

早産については、**2012** 年の人口動態統計では **4.8%** で本研究の方が低い。本研究の研究期間が長いことがひとつの原因と考えられる。双胎では本研究では **73.6%**、人口動態統計では **55.4%** であり、本研究の双胎には早産が多い。これは双胎かつ何らかのトラブルを持つ妊婦が本研究の協力機関に受診する傾向があったのかもしれない。外国のコホート研究では、ノルウェー **5.2%**、オランダ **5.1%**、韓国 **3.6%** と報告されている。早産の原因としては、不適切な周産期ケア、喫煙、中毒性薬剤、アルコール、カフェイン、食事、母親の肥満、低社会経済状態など様々な要因が報告されている。

体重に関する指標はいずれも臨床場面や公衆衛生活動においては一般的で基本的なものである。また、低体重と将来の神経発達異常の関係も報告されている。

しかし早産での低体重は必ずしも胎児の異常を示すものではなく、早産における体重は、正常発達、発達遅滞、発達制限が混在していることに注意すべきである。未熟性の指標として超低出生体重児（以下 **VLBW**）は有効かもしれない。また、正期産の **SGA** や **SFW** は有効かもしれない。**FGR** は個々の出生児が持つ値であるという点で有用かもしれない。しかしいずれも標準値の問題があり、標準値のデータベースによって容易に変わってしまう。

Wilcox は疫学研究における「出生児の未熟性」の指標について示唆に富む指摘をしている。早産にはほとんどの場合に原因があるため、出生後の影響、例えば幼児期の発達障害、を調べる場合の原因要因、あるいは中間変数として使用すると衝突変数 (**collider**) となる可能性があり、**Berkson** バイアス様バイアスを生じる危険性がある。低出生体重も同様であり、さらに低出生体重は上記のような曖昧さがある。

本研究で検討した出生児の未熟性に関する指標は疫学研究では慎重に应用すべきである。

E．結論

環境と子どもの健康に関する北海道コホート研究において単胎で観察された死産は **2.6/出産 1000**、早産は **4.2%** であり、いずれも **2012** 年の人口動態統計の値より低かった。

出生児の未熟性に関する指標を今後の関連研究に应用する場合は注意が必要である。

F．研究発表

1. 論文発表
投稿予定
2. 学会発表
なし。

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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) Adams MM, R. AG, Kirby RS, S. WM. **Perinatal Epidemiology for Public Health Practice**. NY: Springer; 2009.
- 2) Buck Louis GM, Platt RW, editors. **Reproductive and Perinatal Epidemiology**. NY: Oxford University Press; 2011.
- 3) Hack M, Taylor HG, Klein N, Eiben R, Schatschneider C, Mercuri-Minich N. **School-age outcomes in children with birth weights under 750 g**. The New England journal of medicine. 1994;331(12):753-9.
- 4) Heitmann K, Nordeng H, Holst L. **Pregnancy outcome after use of cranberry in pregnancy--the Norwegian Mother and Child Cohort Study**. BMC complementary and alternative medicine. 2013;13:345.
- 5) 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(8):1271-93.
- 6) 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**. International journal of epidemiology. 2011;40(3):611-8.
- 7) 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**. Environmental health and preventive medicine. 2013;18(6):429-50.
- 8) Kim BM, Ha M, Park HS, Lee BE, Kim YJ, Hong YC, et al. **The Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) study**. European journal of epidemiology. 2009;24(9):573-83.
- 9) Morgen CS, Bjork C, Andersen PK, Mortensen LH, Nybo Andersen AM. **Socioeconomic position and the risk of preterm birth--a study within the Danish National Birth Cohort**. International journal of epidemiology. 2008;37(5):1109-20.
- 10) Nguyen RH, Wilcox AJ. **Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms**. Journal of epidemiology and community health. 2005;59(12):1019-21.
- 11) Tanabe K, Tamakoshi K, Kikuchi S, Murotsuki J. **Learning disability in 10- to 16-year-old adolescents with very low birth weight in**

**Japan. The Tohoku journal of
experimental medicine.
2014;232(1):27-33.**

**12) Shinozuka N, Masuda H, Kagawa
H, Taketani Y. The standard
values of fetal physique measured
by ultrasonic (in Japanese).
Cyoonpa Igaku. 1996;23:879-88.**

**13) Statistics and Information
Department MsS, Ministry of
Health, Labour and Welfare. Vital
Statistics of Japan 2012. Tokyo:
Health Labour and Welfare
Statistics Association; 2012.**

**14) Wilcox AJ. On the importance--and
the unimportance--of birthweight.
International journal of
epidemiology. 2001;30(6):1233-41.**

**15) Wilcox AJ. Fertility and Pregnancy.
NY: Oxford University Press; 2010.**

**16) Wilcox AJ, Weinberg CR, Basso O.
On the pitfalls of adjusting for
gestational age at birth. American
journal of epidemiology.
2011;174(9):1062-8.**

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 1. Birth outcomes observed in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health.

Index of outcome	Singleton birth		Twin birth	
	n	% [95% CI]	n	% [95% CI]
Still birth	47/17787	0.26 [0.19, 0.35]	4/322	1.2 [0.3, 3.1]
Live birth				
Preterm birth	737/17740	4.2 [3.9, 4.5]	234/318	73.6 [68.4, 78.3]
Moderate preterm birth	684/17740	3.9 [3.6, 4.1]	224/318	70.4 [65.1, 75.4]
Very preterm birth	45/17740	0.25 [0.19, 0.34]	6/318	1.9 [0.7, 4.1]
Extream preterm birth	8/17740	0.05 [0.02, 0.09]	4/318	1.3 [0.3, 3.2]
Low birth weight	1359/17725	7.7 [7.3, 8.1]	250/317	78.9 [74.0, 83.2]
Very low birth weight	49/17725	0.28 [0.20, 0.37]	15/317	4.7 [2.7, 7.7]
Extream low birth weight	13/17725	0.07 [0.04, 0.13]	6/317	1.9 [0.7, 4.1]
Macrosomia	185/17725	1.0 [0.90, 1.2]	0/317	0* [0, 1.2]
Small for gestational age	683/15921	4.3 [4.0, 4.6]	35/286	12.2 [8.7, 16.6]
Term small for gestational age	646/15921	4.1 [3.8, 4.4]	18/286	6.3 [3.8, 9.8]
Small for reference fetal weight	743/15921	4.7 [4.3, 5.0]	63/286	22.0 [17.4, 27.3]

Note. Still birth is the birth of a dead fetus of 22 completed gestational weeks or above. Preterm birth is defined as the birth after 22 and before 37 completed gestational weeks. Preterm birth is subdivided into three degrees of prematurity: moderately preterm (32–36 completed weeks), very preterm (28–31 completed weeks) and extremely preterm (22–27 completed weeks). Low birth weight, very low birth weight and extream low birth weight are the birth weight less than 2500g, 1500 and 1000g, respectively. Macrosomia is the birth weight above 4000g. Small-for-gestational-age is the birth weight less than 10th percentile of the reference birth weight estimated by gestational age, gender and parity. Term small-for-gestational-age is the small-for-gestational-age in the term birth neonates. Small-for-reference-fetal-weight is the birth weight less than 1.5 standard deviation of the reference ultrasonic-based fetal weight estimated by gestational age, gender and parity. CI = confidence interval. *97.5% confidence interval.

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. Proportion of live birth children corresponding to index of birth weight according to gestational age in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health.

Index of birth weight	Gestational age in full weeks at delivery						
	22-31		32-36		37-41		
	n	% [95% CI]	n	% [95% CI]	n	% [95% CI]	
Low birth weight	Singletons	52/53	98.1 [89.9, 100]	315/684	46.1 [42.3, 49.9]	937/16955	5.5 [5.2, 5.9]
	Twins	10/10	100 [69.2, 100]	189/223	84.8 [79.4, 89.2]	51/84	60.7 [49.5, 71.2]
Very low birth weight	Singletons	38/53	71.7 [57.7, 83.2]	11/684	1.6 [0.8, 2.9]	0/16955	0 [0, 0.02]*
	Twins	10/10	100 [69.2, 100]	5/223	2.2 [0.7, 5.2]	0/84	0 [0, 4.3]*
Extream low birth weight	Singletons	13/53	24.5 [13.8, 38.3]	0/684	0 [0, 0.5]*	0/16955	0 [0, 0.02]*
	Twins	6/10	60.0 [26.2, 87.8]	0/223	0 [0, 1.6]*	0/84	0 [0, 4.3]*
Small for gestational age	Singletons	7/46	15.2 [6.3, 28.9]	30/612	4.9 [3.3, 6.9]	646/15263	4.2 [3.1, 6.7]
	Twins	2/10	20.0 [2.5, 55.6]	15/197	7.6 [4.3, 12.2]	18/176	10.2 [6.2, 15.7]
Small for reference fetal weight	Singletons	5/46	10.9 [3.6, 23.6]	51/612	8.3 [6.3, 10.8]	687/15263	4.5 [4.2, 4.8]
	Twins	2/10	20.0 [2.5, 55.6]	36/197	18.3 [13.1, 24.4]	25/176	14.2 [9.4, 20.3]

Note. Low birth weight, very low birth weight and extream low birth weight are the birth weight less than 2500g, 1500 and 1000g, respectively. Small for gestational age is the birth weight less than 10 percentile of reference birth weight estimated by gestational age, gender and parity. Small-for-reference-fetal-weight is the birth weight less than 1.5 standard deviation of reference ultrasonic-based fetal weight estimated by gestational age, gender and parity. CI = confidence interval. * 97.5% confidence interval.

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. Fetal growth ratio of live birth neonates according to gestational age in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health.

		Gestational age in full weeks at delivery					
		22-31		32-36		37-41	
		n	mean [95% CI]	n	mean [95% CI]	n	mean [95% CI]
Fetal growth ratio calculated using reference birth weight (%)							
	Singletons	46	101.4 [92.1, 110.6]	612	105.4 [104.2, 106.6]	15263	103.9 [103.7, 104.1]
	Twins	10	90.4 [75.1, 105.8]	197	96.9 [95.2, 98.7]	79	92.5 [89.9, 95.1]
Fetal growth ratio calculated using reference fetal weight (%)							
	Singletons	46	98.4 [89.3, 107.5]	612	97.8 [96.8, 98.9]	15263	99.3 [99.2, 99.5]
	Twins	10	88.2 [72.8, 103.6]	197	90.1 [88.4, 91.7]	79	86.9 [84.4, 89.3]

Note. 'Fetal-growth-ratio calculated using reference birth weight' is the percent of the median birth weight calculated using the reference birth weight estimated by gestational age, gender and parity. Fetal growth ratio calculated using reference fetal weight is the percent of the median fetal weight using the reference ultrasonic-based fetal weight estimated by gestational age, gender and parity. CI = confidence interval.

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 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

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 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 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 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

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

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 (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

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

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. Observations 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 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

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

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 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}

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

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 different (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 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

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

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.

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

9. Hokkaido prefecture. Hokkaido prefecture Medical Plan (in Japanese). Sapporo, Japan. Hokkaido Prefecture; 2015.
10. Lary JM, Paulozzi LJ. Sex differences in the 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, McConnaughey 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

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

- 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. 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

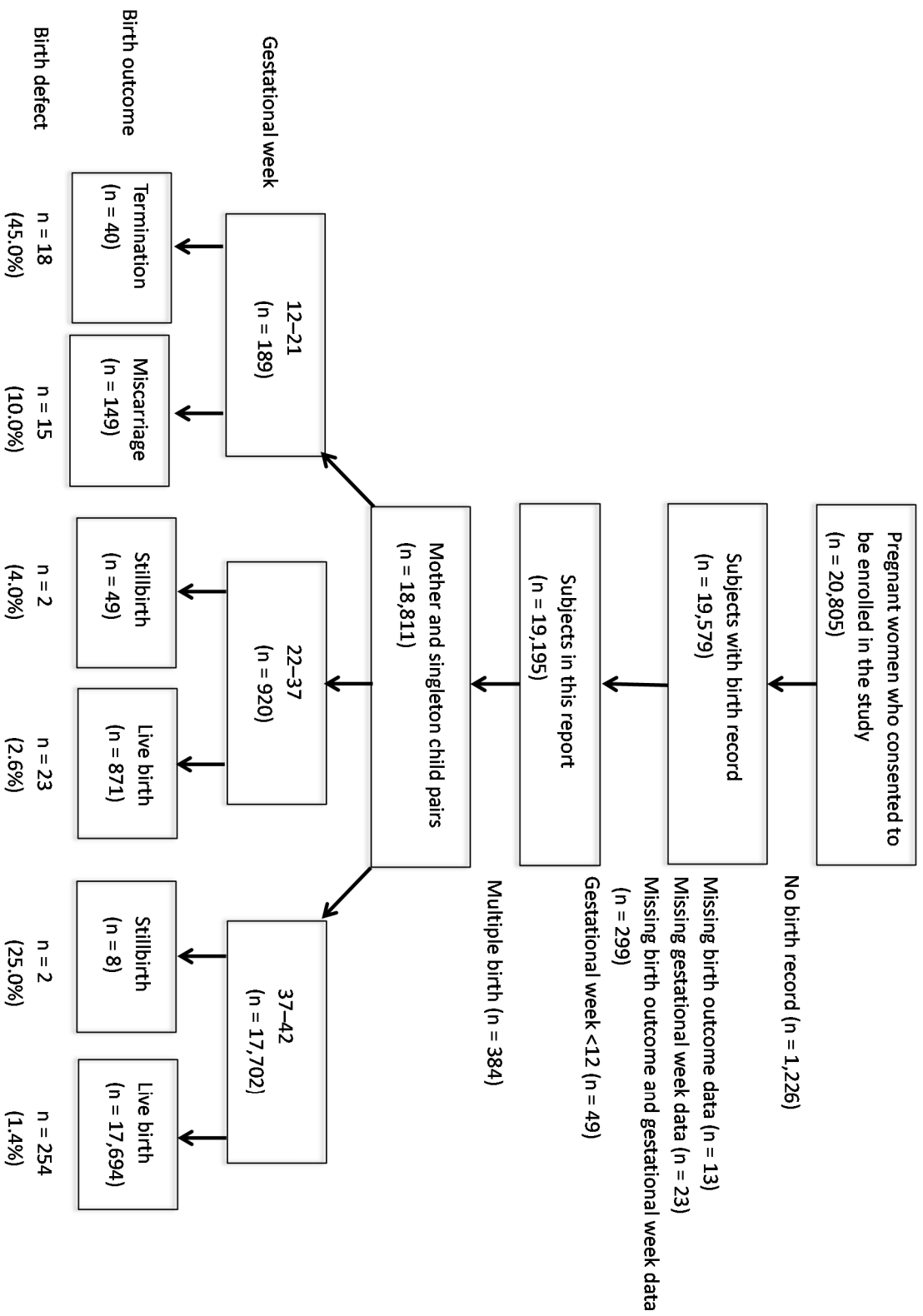


Figure 1. Subjects in this report, and the distribution of birth defects according to the gestational week and pregnancy outcomes.

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)	

ICD, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th revision.

^aEach 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 標 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 週未満）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 週未満の出産は解析から除外した。

(2) Definition and Classification of Birth Defects

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

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

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

(3) Statistical Analysis

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

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

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

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

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

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

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

2. Birth defects と血清葉酸レベル

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

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

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

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

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

D．考察

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

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

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

本研究では, 血清葉酸値が **optimal levels** が大多数であったことが, **birth defects** と妊娠初期の血清葉酸値との関連に有意な結果が得られなかった理由として考えられる。日本人の妊婦 **118** 名を対象とした **2008** 年報告の調査では, **optimal levels (≥6.0 ng/mL; ≥13.5 nmol/L)**²⁹ は **33.0%** で, 本研究の半分程度であった。イランでは小麦への葉酸添加後の出産年齢にある女性の平均血清葉酸値は **18.1 nmol/L** ³⁰ であり, 本研究の結果とほぼ等しかった。本研究期間のほぼ中間にあたる **2007** 年の国民健康・栄養調査では, **20-39** 歳の日本人女性の **1** 日当たりの平均葉酸摂取量は **236-253 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

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

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授
研究分担者 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授
研究分担者 宮下ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 池野多美子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座 教授
研究分担者 遠藤 俊明 札幌医科大学医学部産婦人科学講座 准教授
研究分担者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授
研究分担者 佐々木成子 北海道大学大学院医学研究科 助教
研究分担者 花岡 知之 北海道大学環境健康科学研究教育センター 客員教授

研究要旨

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

研究協力者

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

A. 研究目的

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

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

(ICBDSR), Japan has experienced an increase in the prevalence of spina bifida over the past few decades. While in countries like the United States and England the prevalence of NTDs is about 3 per 10,000 births, Japan has a prevalence of 5.2⁴; ⁵. Efforts have been made to determine folate status of pregnant Japanese women in other regions of Japan but not Hokkaido⁶; ⁷; ⁸; ⁹. However, probable small sample sizes, different folate assay techniques and varied folate status definitions/cut-off levels, might have yielded inconsistent results. For instance, three previous studies have reported a wide range of folate status among pregnant Japanese women. A study from Aichi Prefecture which defined normal versus inadequate folate status as $\geq 6.80\text{nmol/L}$ and $< 6.80\text{nmol/L}$ respectively, reported folate inadequacy in 1.00% of 41 pregnant and 154 non pregnant participants⁶. Another study from Tokyo metropolis among pregnant women in all trimesters reported low folate status in 67.00% of 118 women in their first trimester and 79.30% overall. The study defined normal, low and deficient folate statuses as having $> 13.60\text{nmol/L}$, $6.80 - 13.60\text{nmol/L}$, and $< 6.80\text{nmol/L}$, respectively⁸. The third study from Tokyo metropolis was conducted among 58 young university women. Normal folate status was categorized as having $\geq 13.60\text{nmol/L}$; low status as having $6.80 - 13.59\text{nmol/L}$; while folate deficient group had $< 6.80\text{nmol/L}$ of folate concentration. Results showed 12.10% had folate deficiency, and 58.60% had low status⁹. In Hokkaido Prefecture, such reports are scarce. We recently conducted a genetic study using the first

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

B . 研究方法

Study location and population

Participants of this study were pregnant women recruited during their first trimester (< 13 weeks of gestation) from thirty-seven health facilities across Hokkaido Prefecture. They are participants of the ongoing large-scale birth cohort of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. The study is broadly aimed at observing the health effects of intrauterine exposures to various environmental and genetic factors on fetal development, outcomes of pregnancy, and subsequent childhood health. Details of the study have been described elsewhere¹¹; ¹². Briefly, the ongoing large-scale cohort started in 2002, with a full blown large scale version from February 2003. A total of 20816 women were recruited between 2002 and March 2012. All pregnant Japanese women who presented at any of the participating healthcare facilities for prenatal care during their first trimester, were considered eligible for the study. However, only those who agreed to participate in the study were contacted and recruited. Data was generated from these

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

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

Biochemical assays

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

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

Definition of variables

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

Statistical analyses

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

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

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

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

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

D. 考察

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

had low folate status.

Demographic predictors of folate status

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

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

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

Unfavorable lifestyle predictors of folate status

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

supplements users are more likely to practice healthy lifestyles.

Favorable lifestyle predictors of folate status

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

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

Strengths and limitations

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

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

Implications

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

E . 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

引用文献

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

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

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

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

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

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

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

10. Yila TA, Sasaki S, Miyashita C *et al.* (2012) Effects of maternal 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C Polymorphisms and tobacco smoking on infant birth weight in a Japanese population. *J Epidemiol* **22**, 91-102.

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

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

49.

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

50. Galloway M, Rushworth L (2003)

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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table1 (continued)

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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 2: Estimated effects of demographic characteristics and lifestyle factors on folate status: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health 2002-2012, Japan (N = 15266)

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table2 (continued)

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

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

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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 3: Estimated effects of active and passive cigarette smoking based on plasma cotinine concentrations on folate status: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health 2002-2012, Japan (N = 15266)

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

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

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

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

All percentages are row percentages. Values may not add up to 100% due to missing values. McFadden's pseudo- R^2 = 8.53%.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

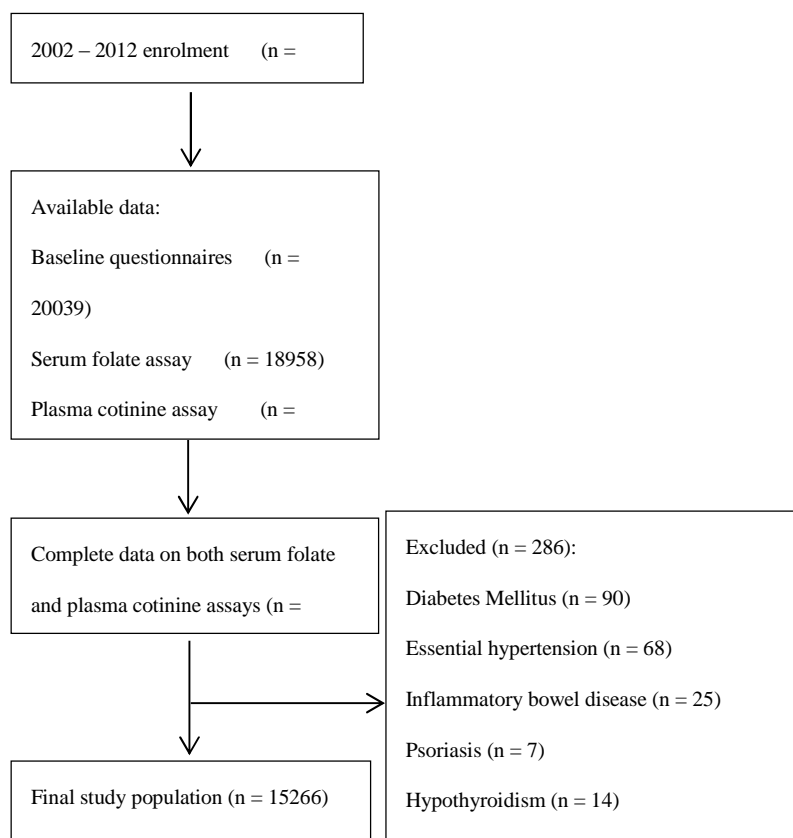


Fig. 1: Study selection chart: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2002 – 2012, Japan.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

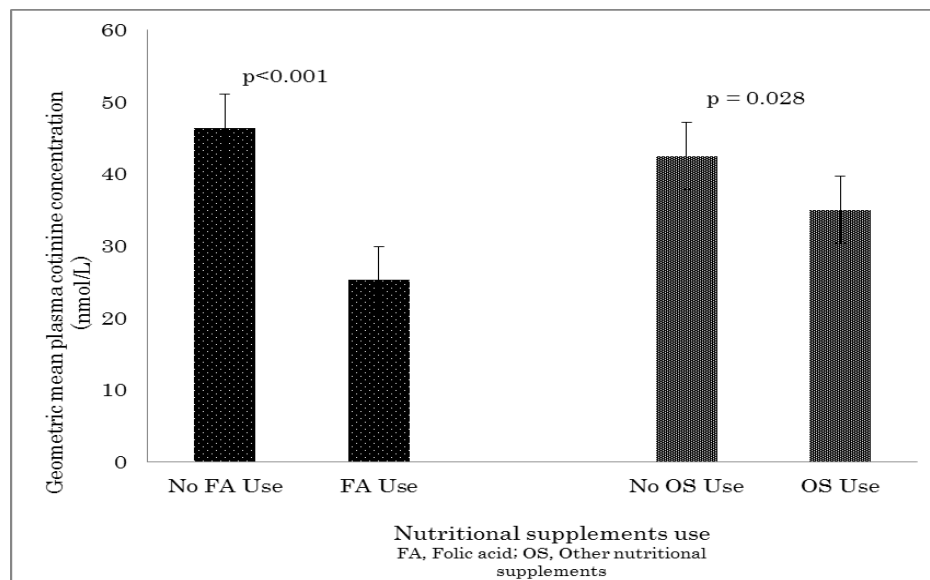


Fig. 2: Mean plasma cotinine concentrations by nutritional supplements use among participants: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2002 – 2012, Japan.

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

児の出生体重と母親の社会経済要因との関連についての疫学研究

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授
研究分担者 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
北海道療育園美幌療育病院 副院長
研究分担者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・
生殖医学分野 教授
研究分担者 遠藤 俊明 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 准教授
研究分担者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授
研究分担者 吉岡 英治 旭川医科大学医学部健康科学講座 准教授

研究要旨 欧米諸国では、母親の社会経済要因において不利であることと児の出生体重が低いことが有意に関係すると報告されている。しかし、日本の児の出生体重と母親の社会経済要因の関係については報告が少ない。そこで、本研究では日本における社会経済要因による出生体重への影響を明らかにすることを目的とした。『環境と子供の健康に関する北海道研究』の出生コーホートに2002～2012年の間に登録した母親とその生産の児を対象とした。早産およびSmall for Gestational Age (SGA)の有無をアウトカムとして、社会経済要因(世帯収入、最終学歴、母親の職業の有無)との関係についてCoxハザード分析を行った(有意水準 $\alpha=0.05$)。調整要因として母親の特徴について出産時年齢、BMI、妊娠歴、生殖医療の受診、ライフスタイル(喫煙、飲酒習慣について)、児の特徴にについて性別、在胎週数を用いた。生産の児は18401名で、平均在胎週数は 38.8 ± 1.53 週、平均出生体重は 3037.1 ± 414.3 gであった。Coxハザード分析の結果、母親の最終学歴が高校卒である母親に対して、中学卒である母親から生まれた児は、早産のリスクが1.17倍有意に高くなった。Coxハザード分析の結果、母親の最終学歴が高校卒である母親に対して、中学卒である母親から生まれた児はSGAのリスクが1.16倍有意に高くなった。世帯年収は、早産およびSGAとは有意な関係は認められなかった。本研究集団においては社会経済要因の中でも、母親の最終学歴と児の出生体重との関連が確認された。

研究協力者

田村 菜穂美
(北海道大学環境健康科学研究
教育センター・保健科学院)
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)
長 和俊, 山田 俊
(北海道大学病院周産母子センター)
馬場 剛
(札幌医科大学産婦人科学講座)

宮本 敏伸

(旭川医科大学産婦人科学講座)

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,

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

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

近年日本における出生体重は減少傾向にあることが厚生労働省より，報告されている。昭和60年に3.17kgとされていた，平均出生体重は，平成21年では3.02kgと150g減少しており，出生体重を2500g未満の低出生体重児発生割合は，4%増加した（厚労省H22年報告）。

出生体重が2500g未満になることは，乳児期，幼児期，成人後の健康に悪影響を及ぼすことが報告されている。幼児期には発達の遅れがみられる（Barker et al.1994），幼児期には早期肥満になりやすい，（Barker et al.1996），成人後では，慢性疾患になりやすく，特に心疾患の発症リスクが高くなることが報告されている（Huxley et al. 2000, Strauss et al. 2000）。

出生体重が減少することには，様々な原因が指摘されているが，その一つとして，欧米諸国では，母親の社会経済要因において不利であることと児の出生体重が低いことが有意に関係すると報告されている（Metcalf et al. 2011, Verropoulou et al. 2013）。日本においても，世帯収入の低い群の出生体重が小さくなる（Teramoto et al. 2006），親の最終学歴が低いほどSmall for Gestational Ageのリスクが高くなる（Fujiwara et al. 2013）ことが報告されているが，児の出生体重に関する研究は少ない。

化学物質リスクの検討にあたって，交絡要因となりえる社会経済要因が，日本でも出生体重に影響を及ぼすことを確認することを目的とした。

B．研究方法

北海道内40か所の参加医療機関の外来を受診した妊娠『環境と子供の健康に関する北海道研究』の出生コーホートに2002～2012年の間に登録した母親とその生産の児を対象とした。登録したもののうち，流産及び死産だったもの，多胎だったものを除き，登録後転院等により追跡不可能だったもの，出生体重，在胎週数の情報に欠損があったものは除いた。

はじめに，在胎週数，早産（在胎週数が37週未満）であったことと，児の出生体重，在胎期間別出生時体格が10%未満（Small for Gestational Age:以下SGA）であったことについて，母児の特徴とMann-WhitneyのU検定，Kruskal-Wallis検定，あるいはカイ二乗検定を行った（有意水準 $\alpha=0.05$ ）。母児の特徴として児の性別（男性，女性），調査登録時の母親の年齢（24歳未満，25-29歳，30-34歳，35歳以上），調査登録時のBMI（18.5未満，18.5から25未満，25以上），出産歴，生殖補助医療の受診の有無，喫煙習慣（喫煙経験なし，妊娠前に禁煙，妊娠初期に喫煙），飲酒習慣（飲酒経験なし，妊娠前に禁酒，妊娠初期に飲酒），専業主婦であること，社会経済要因である最終学歴（中学校卒，高校卒，短大・専門学校卒，大学卒），世帯収入（年収300万円未満，300から500万円，500から800万円，800万円以上）を用いた。

続けて，交絡要因を検討するため社会経済要因と母児の特徴と，あるいはカイ二乗検定を行った。

早産（在胎週数が37週未満）および正期産であった児のうちSGAの有無をアウトカムとして，社会経済要因（世帯収入，最終学歴）との関係についてCoxハザード分析を行った（有意水準 $\alpha=0.05$ ）。調整要因には，早産をアウトカムとしたハザ

ード分析では、児の性別、母親の年齢、母親の BMI、出産歴、生殖補助医療の受診、飲酒習慣を用いた。SGA をアウトカムとしたハザード分析では、母親の年齢、母親の BMI、生殖補助医療の受診、飲酒習慣を用いた。解析には統計解析ソフト JMP Clinical 5 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大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定に従って実施した。インフォームド・コンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行った。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏えいが一切生じないように、研究者によりデータ保管を厳重に行った。

C . 研究結果

北海道内 40 か所の参加医療機関の外来を受診した妊娠『環境と子供の健康に関する北海道研究』の出生コーホートに 2002 ~ 2012 年の間に登録した母親は 20929 人であった。登録したもののうち、流産及び死産だったものは 302 名、多胎だったものは 347 名、登録後転院等により追跡不可能だったものは 1755 名、出生体重、在胎週数の情報に欠損があったものは 30 名であり、最終的な解析には 18401 名の母と児のペアを用いた。（図 1）

平均在胎週数は 38.8 ± 1.53 週、平均出生体重は 3037.1 ± 414.3 g であった。早産（在胎週数 37 週未満で生まれた者は）847 名で全体の 4.6% であり、SGA であった者は 1188 名で、全体の 6.47% であった。

在胎週数と母児の特徴と Mann-Whitney の *U*-検定、Kruskal-Wallis 検定した結果、児の性別、母親の年齢、母親の BMI、出産歴、生殖補助医療の受診、世帯年収との間で、有意な関係が認められた。

早産（在胎週数が 37 週未満）であったことと母児の特徴とをカイ二乗検定した結果、母親の年齢、母親の BMI、生殖補助医療の受診、世帯年収との間に有意な関連を認めた。（表 1.）

児の出生体重と母児の特徴と Mann-Whitney の *U*-検定、Kruskal-Wallis 検定した結果、児の性別、母親の年齢、母親の BMI、出産歴、生殖補助医療の受診、飲酒習慣、母親の最終学歴との間で有意な関係が認められた。

正期産であった児が SGA であったことと母児の特徴とをカイ二乗検定した結果、母親の BMI、出産歴、生殖補助医療の受診、飲酒習慣との間に有意な関連を認めた。（表 2.）

続けて、社会経済要因（母親の最終学歴、世帯収入）と母児の特徴との関連についての結果を表 3、表 4 に示した。母親の最終学歴と母児の特徴とをカイ二乗検定した結果、母親の年齢、母親の BMI、出産歴、生殖補助医療の受診、飲酒習慣、世帯年収との間で、有意な関係が認められた。世帯年収と母児の特徴との関連については、母親の年齢、出産歴、生殖補助医療の受診、飲酒習慣、母親の最終学歴との間で有意な関係が認められた。

早産（在胎週数が 37 週未満）および SGA の有無をアウトカムとして、社会経済要因（世帯収入、最終学歴）との関係について Cox ハザード分析を行った結果、母親の最終学歴が高校である母親に対して、中学校である母親から生まれた児は、早産のリスクが 1.16 倍有意に高くなった。母親の最終学歴が高校である母親に対して、中学校である母親から生まれた児は SGA のリスクが 1.16 倍有意に高くなった。世帯年収は、早産および SGA とは有意な関係は認められなかった。

D . 考察

平均出生体重、平均在胎週数は日本の平

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

均と大きく変わらなかったが、早産（在胎週数 37 週未満で生まれた者）、在胎期間別出生時体格が 10% 未満（Small for Gestational Age）であった者は、日本および、他国の報告よりも少なかった。本研究集団は、リクルートにより、健康な対象者が選択された可能性がある。

児の在胎週数と母親の最終学歴とを Krascal-Wallis 検定した結果では、有意な関連は認められなかった。児の在胎週数と世帯年収とを Krascal-Wallis 検定した結果では、年収が高くなるほど、児の在胎週数が短くなった。これは、社会経済要因が低いことが、児の在胎週数を短くする（Mortensen LH. 2013）という先行研究の結果と矛盾した。

児の出生体重と母親の学歴とを Krascal-Wallis 検定した結果では、学歴が低くなるほど出生体重が有意に低かったことは、日本における先行研究では社会経済要因（父親の学歴が高いこと）が、SGA の発生リスクを有意に下げるとされている（Fujiwara et al. 2013）報告と一致していた。児の出生体重と世帯収入とを Krascal-Wallis 検定した結果では、収入が低くなるほど出生体重が有意に高かったことは、日本における先行研究では社会経済要因（世帯年収が高いこと）が、SGA の発生リスクを有意に下げるとされている（Fujiwara et al. 2013）報告と矛盾していた。

社会経済要因と母児の特徴との関連をカイ二乗検定した結果では、母親の年齢、母親の BMI、出産歴、生殖補助医療の受診、飲酒習慣について有意な関係が認められており、要因間が互いに交絡していることが示された。そのため、早産と社会経済要因（母親の最終学歴、世帯年収）とのハザードリスク分析では、児の在胎週数と社会経済要因との関連が認められた児の性別、母親の年齢、母親の BMI、出産歴、

生殖補助医療の受診、飲酒習慣を調整要因として用いた。SGA と社会経済要因（母親の最終学歴、世帯年収）とのハザードリスク分析では、児の出生体重と社会経済要因と関係があった母親の年齢、母親の BMI、生殖補助医療の受診、飲酒習慣を用いた。児の性別、出産歴は SGA を求める際に調整済みであるため除いた。

早産（在胎週数が 37 週未満）および SGA の有無をアウトカムとして、社会経済要因（世帯収入、最終学歴）との関係について Cox ハザード分析を行った結果では母親の最終学歴が高校卒であることは早産のハザードリスクを 1.16 倍（95CI:1.06 から 1.27）、SGA のハザードリスクを 1.16 倍（95CI:1.07 から 1.26）にした。これは国内外の横断研修やコーホート研究の結果と一致した（Fujiwara et al. 2013, Mortensen LH. 2013）。

世帯年収は早産、SGA との間に有意な関係が認められなかった。Cox ハザード分析では、早産と正期産での SGA の発生について世帯年収との関連は認められず、母親の最終学歴のみに有意な関連が認められたことから、母親の最終学歴の方が早産と正期産での SGA の発生について強く影響していると考えられる。この結果は欧米の先行研究（Mortensen LH et al. 2013）、および日本の先行研究（Fujiwara et al. 2013）報告と一致していた。

しかし、在胎週数、早産（在胎週数が 37 週未満）であったことと、児の出生体重、在胎期間別出生時体格が 10% 未満（Small for Gestational Age: 以下 SGA）であったことについて、母児の特徴と Krascal-Wallis 検定、あるいはカイ二乗検定を行った結果では、世帯年収が高くなるほど在胎週数短く、出生時体重が小さくなっていったが関係が認められなくなった（表 1. 表 2.）。これは、世帯年収が高いことと母親の年齢が高いことが交絡していたと

考えられる（表 3,表 4）。また、世帯年収が最も低い群は 300 万円以下に設定していたが、児の在胎週数や出生体重に影響を与えるほどの経済的困窮は、より低い世帯年収の群であるため、影響が確認できなかった可能性が考えられる。

これらの社会経済要因と母児の特徴は互いに影響し合っていることが考えられる。今後、経済指標を追加し、構造化モデリング分析などを行い、要因間の関連を可視化する必要がある。

E . 結論

日本における社会経済要因による出生体重への影響を明らかにすることを目的とした本研究では、対象集団においても母親の最終学歴が高校卒であることを基準としたとき、中学卒であることは早産のハザードリスクを 1.16 倍（95CI:1.06 から 1.27）、SGA のハザードリスクを 1.16 倍（95CI:1.07 から 1.26）に高くすることが確認された。

F . 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

- (1) 田村菜穂美，伊藤久美子，小林澄貴、岡田恵美子，喜多歳子，Houman Goudarzi，宮下ちひろ，荒木敦子，池野多美子，岸玲子，児の出生体重と母親の社会経済要因およびライフスタイルとの関連についての疫学研究. 第 84 回日本衛生学会学術総会. 岡山市. 2014.5.25.-5.27.
- (2) 田村菜穂美，伊藤久美子，花岡知之，喜多歳子，西原進吉，宮下ちひろ，荒木敦子，小笠原克彦，岸玲子，児の出生体重と母親の社会経済要因との

関連についての疫学研究—北海道スタディ. 第 85 回日本衛生学会学術総会. 和歌山市. 2015.3.26.-3.28.

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) 厚生労働省「出生に関する統計」平成 22 年度.
- (2) Barker. Outcome of low birthweight. *Horm Res.* 1994; 42(4-5):223-30.
- (3) Lackland DT, Bendall HE, Osmond C, Egan BM, Barker DJ. Low birth weights contribute to high rates of early-onset chronic renal failure in the Southeastern United States. *Arch Intern Med.* 2000 May 22; 160(10):1472-6.
- (4) Huxley RR, Shiell AW, Law CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens.* 2000; 18(7): 815-31. Review.
- (5) Strauss RS. Adult functional outcome of those born small for gestational age: twenty-six-year follow-up of the 1970 British Birth Cohort. *JAMA.* 2000 Feb 2; 283(5): 625- 32.
- (6) Metcalfe A1, Lail P, Ghali WA, Sauve RS. The association between neighborhoods and adverse birth outcomes: a systematic review and meta-analysis of multi-level studies. *Paediatr Perinat Epidemiology.* 2011 May;

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

- 25(3):236-45.
- (7) Verropoulou G, Basten S. Very low, low and heavy weight births in Hong Kong SAR: how important is socioeconomic and migrant status? *J Biosoc Sci.* 2014 May; 46(3):316-31.
- (8) Teramoto S, Soeda A, Hayashi Y, Urashima M. Physical and socioeconomic predictors of birthweight in Japan. *Pediatr Int.* 2006 Jun; 48(3):274-7.
- (9) Fujiwara T, Ito J, Kawachi I. Income inequality, parental socioeconomic status, and birth outcomes in Japan. *Am J Epidemiology.* 2013 May 15; 177(10):1042-52.
- (10) Kramer MS. The epidemiology of adverse pregnancy outcomes: an overview. *J Nutr.* 2003. 1592S - 1596S.
- (11) Kesmodel U, Wisborg K, Olsen SF, Henriksen TB, Secher NJ. Moderate alcohol intake during pregnancy and the risk of stillbirth and death in the first year of life. *American Journal of Epidemiology.* 2002; 155(4): 305- 12.
- (12) Mortensen LH. Socioeconomic inequality in birth weight and gestational age in Denmark 1996-2007: using a family-based approach to explore alternative explanations. *Soc Sci Med.* 2013 Jan;76(1):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

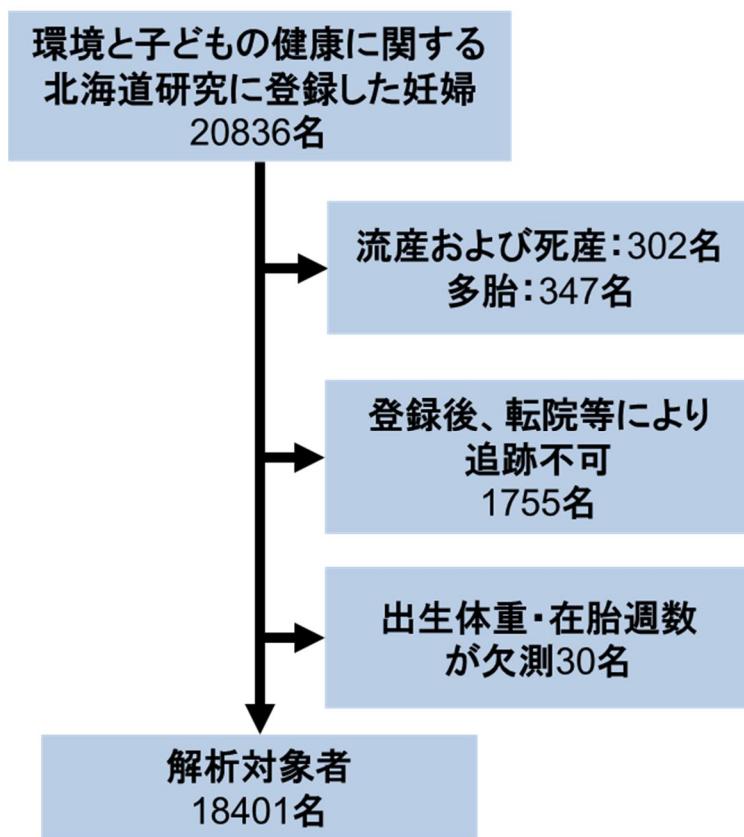


図1. 解析対象者

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1 . 在胎週数、早産（在胎週数が 37 週未満）と母児の特徴との関連

	N	割合 (%)	在胎週数			早産		
			weeks	(SD)	p値	N	%	p値
全体	18401		38.8	(1.53)		847	4.60	
児の性別								
男	9266	50.4	38.7	(0.02)	<0.01 *	446	4.81	0.16
女	9133	49.6	38.9	(0.02)		400	4.38	
母親の年齢								
<24	2259	12.3	39.0	(0.03)	<0.01 *	91	4.03	<0.01 *
25 , <30	7118	38.7	38.9	(0.02)		279	3.92	
30 , <35	5246	28.5	38.8	(0.02)		248	4.73	
35	3770	20.5	38.5	(0.02)		228	6.05	
母親のBMI								
<18.5	3002	17.3	38.7	(0.03)	<0.01 *	164	5.46	<0.01 *
18.5 , <25	12436	71.8	38.8	(0.01)		529	4.25	
25	1888	10.9	38.7	(0.04)		97	5.14	
出産歴								
初産婦	6947	46.9	38.8	(0.01)	<0.01 *	326	4.69	0.77
経産婦	7863	53.1	38.6	(0.03)		361	4.59	
生殖補助治療受診								
未受診	16870	95.8	38.8	(0.01)	<0.01 *	741	4.39	<0.01 *
受診	733	4.2	38.5	(0.06)		61	8.32	
喫煙習慣								
喫煙したことがない	8022	54.5	38.8	(0.02)	0.80	384	4.79	0.85
妊娠前喫煙	4679	31.7	38.8	(0.02)		219	4.68	
妊娠初期に喫煙	2026	13.8	38.8	(0.03)		91	4.49	
飲酒習慣								
飲酒したことがない	6829	39.5	38.7	(0.02)	<0.01 *	334	4.89	0.24
妊娠前に飲酒	10211	59.1	38.9	(0.02)		445	4.36	
妊娠初期に飲酒	233	1.35	38.8	(0.10)		12	5.15	
専業主婦である								
いいえ	10797	58.7	38.8	(0.01)	0.14	516	4.78	0.16
はい	7604	41.3	38.8	(0.02)		330	4.34	
母親の最終学歴								
中学卒	955	5.4	38.7	(0.05)	0.21	45	4.71	0.13
高校卒	7668	43.6	38.8	(0.02)		316	4.12	
短大・専門学校卒	7078	40.2	38.8	(0.02)		349	4.93	
大学卒	1893	10.8	38.8	(0.03)		87	4.60	
世帯年収								
<300万	3458	23.0	38.9	(0.03)	<0.01 *	128	3.70	0.01
300万 , <500万	6713	44.493	38.8	(0.02)		305	4.54	
500万	4923	32.541	38.7	(0.02)		247	5.02	

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．児の出生体重、在胎期間別出生時体格 10%未満（Small for Gestational Age）と母児の特徴との関連

	N	割合 (%)	出生体重			Small for Gestational Age		
			g	(SD)	p値	N	%	p値
全体	18401		3037.1	(414.33)		1188	6.47	
児の性別								
男	9266	50.4	3082.3	(4.27)	<0.01 *	577	6.23	0.20
女	9133	49.6	2991.2	(4.31)		611	6.69	
母親の年齢								
<24	2259	12.3	3048.8	(8.71)	<0.01 *	155	6.86	0.40
25 , <30	7118	38.7	3051.8	(4.91)		448	6.29	
30 , <35	5246	28.5	3034.9	(5.72)		324	6.18	
35	3770	20.5	3005.4	(6.74)		261	6.92	
母親のBMI								
<18.5	3002	17.3	2935.8	(7.48)	<0.01 *	298	9.93	<0.01*
18.5 , <25	12436	71.8	3048.2	(3.68)		733	5.89	
25	1888	10.9	3125.7	(9.44)		81	4.29	
出産歴								
初産婦	6947	46.9	3008.8	(4.96)	<0.01 *	562	8.09	<0.01*
経産婦	7863	53.1	3060.5	(4.66)		341	4.34	
生殖補助治療受診								
未受診	16870	95.8	3041.2	(3.19)	<0.01 *	741	4.39	<0.01*
受診	733	4.2	2960.0	(15.28)		61	8.32	
喫煙習慣								
喫煙したことがない	8022	54.5	3031.2	(4.64)	0.35	537	6.69	0.28
妊娠前喫煙	4679	31.7	3036.6	(6.08)		301	6.43	
妊娠初期に喫煙	2026	13.8	3045.8	(9.24)		116	5.73	
飲酒習慣								
飲酒したことがない	6829	39.5	3043.6	(5.02)	<0.01 *	383	5.61	<0.01*
妊娠前に飲酒	10211	59.1	3037.0	(4.10)		702	6.87	
妊娠初期に飲酒	233	1.35	2951.5	(27.16)		24	10.30	
専業主婦である								
いいえ	10797	58.7	3034.7	(3.99)	0.36	712	6.59	0.37
はい	7604	41.3	3040.4	(4.75)		476	6.26	
母親の最終学歴								
中学卒	955	5.4	3010.3	(13.39)	0.02	72	7.54	0.34
高校卒	7668	43.6	3046.6	(4.72)		478	6.23	
短大・専門学校卒	7078	40.2	3031.4	(4.92)		469	6.63	
大学卒	1893	10.8	3043.5	(9.51)		114	6.02	
世帯年収								
<300万	3458	23.0	3045.7	(7.08)	0.07	242	7.00	0.06
300万 , <500万	6713	44.493	3041.6	(5.08)		400	5.96	
500万	4923	32.541	3030.1	(5.93)		336	6.83	

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

表 3. 母親の最終学歴と母児の特徴との関連

	母親の最終学歴								p値
	中学卒		高校卒		短大・専門学校卒		大学卒		
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
児の性別	955	5.4	7668	43.6	7078	40.2	1893	10.8	
男	479	50.2	3877	50.6	3546	50.1	970	51.2	0.83
女	476	49.8	3791	49.4	3532	49.9	923	48.8	
母親の年齢									
<24	400	41.9	1264	16.5	425	6.0	54	2.9	<0.01*
25 , <30	299	31.3	2983	38.9	2834	40.1	672	35.5	
30 , <35	154	16.1	1983	25.9	2241	31.7	667	35.2	
35	102	10.7	1435	18.7	1577	22.3	500	26.4	
母親のBMI									
<18.5	196	21.5	1259	16.8	1208	17.3	327	17.5	<0.01*
18.5 , <25	582	63.9	5307	70.9	5094	72.9	1407	75.2	
25	133	14.6	920	12.3	690	9.9	138	7.4	
出産歴									
初産婦	335	44.3	2879	44.8	2846	47.54	855	54.5	<0.01*
経産婦	422	55.8	3542	55.2	3141	52.5	715	45.5	
生殖補助治療受診									
未受診	913	98.5	7398	96.8	6708	95.2	1755	93.1	<0.01*
受診	14	1.5	245	3.2	342	4.9	130	6.9	
喫煙習慣									
喫煙したことがない	424	54.2	3347	53.5	3260	56.1	813	52.8	0.10
妊娠前喫煙	252	32.2	2017	32.3	1785	30.7	506	32.9	
妊娠初期に喫煙	107	13.7	889	14.2	764	13.2	221	14.4	
飲酒習慣									
飲酒したことがない	373	40.5	3152	42.1	2675	38.6	595	32.3	<0.01*
妊娠前に飲酒	525	56.9	4232	56.5	4177	60.3	1220	66.2	
妊娠初期に飲酒	24	2.6	110	1.5	70	1.0	28	1.5	
専業主婦であるか									
いいえ	565	59.2	4465	58.2	4041	57.1	1105	58.4	0.39
はい	390	40.8	3203	41.8	3037	42.9	788	41.6	
世帯年収									
<300万	365	48.7	1897	29.3	1025	16.6	169	10.0	<0.01*
300万 , <500万	299	39.9	3108	48.1	2745	44.5	556	32.9	
500万	86	22.6	1463	22.6	2405	39.0	964	57.1	

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 4. 世帯年収と母児の特徴との関連

	世帯年収						p値
	<300万		300万 , <500万		500万		
	No.	%	No.	%	No.	%	
	3458	23.0	6713	44.493	4923	32.541	
児の性別							
男	1757	50.8	3366	50.1	2461	50.0	0.74
女	1701	49.2	3347	49.9	2462	50.0	
母親の年齢							
<24	862	24.9	553	8.2	156	3.2	<0.01*
25 , <30	1475	42.7	2862	42.7	1484	30.2	
30 , <35	687	19.9	2050	30.6	1726	35.1	
35	434	12.6	1246	18.6	1555	31.6	
母親のBMI							
<18.5	587	17.3	1123	17.0	797	16.3	0.17
18.5 , <25	2389	70.5	4755	71.8	3552	72.8	
25	415	12.2	745	11.3	528	10.8	
出産歴							
初産婦	1420	49.5	2445	43.5	1925	46.2	<0.01*
経産婦	1447	50.5	3173	56.5	2244	53.8	
生殖補助治療受診							
未受診	3384	98.2	64440	96.2	4568	93.1	<0.01*
受診	61	1.8	253	3.8	341	7.0	
喫煙習慣							
喫煙したことがない	1533	54.5	3013	54.9	2179	54.0	0.77
妊娠前喫煙	911	32.4	1732	31.6	1291	32.0	
妊娠初期に喫煙	369	13.1	740	13.5	566	14.0	
飲酒習慣							
飲酒したことがない	1433	42.5	2620	39.8	1724	35.9	<0.01*
妊娠前に飲酒	1889	56.0	3878	59.0	3011	62.6	
妊娠初期に飲酒	50	1.5	81	1.2	73	1.5	
専業主婦であるか							
いいえ	2025	58.6	3852	57.4	2864	58.2	0.47
はい	1433	41.4	2861	42.6	2059	51.8	
母親の最終学歴							
中学卒	365	10.6	299	4.5	86	1.8	<0.01*
高校卒	1897	54.9	3108	46.3	1463	29.8	
短大・専門学校卒	1025	29.7	2745	40.9	2405	48.9	
大学卒	169	4.9	556	8.3	964	19.6	

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

表 5 . 早産（在胎週数が 37 週未満）と社会経済要因（世帯収入、最終学歴）との関係についての Cox ハザード分析結果

	割合 (%)	Crude			Adjusted		
		HR	95%CI		HR	95%CI	
母親の最終学歴							
中学卒	5.3	1.17	1.10	1.26	1.16	1.06	1.27
高校卒	43.8	Reference			Reference		
短大・専門学校卒	40.2	1.00	0.97	1.04	1.02	0.98	1.07
大学卒	10.7	1.03	0.98	1.08	1.05	0.99	1.12
世帯年収							
<300万	43.8	1.00	0.96	1.04	1.01	0.96	1.06
300万 , <500万	40.2	Reference			Reference		
500万	10.7	1.02	0.98	1.06	1.01	0.96	1.05

児の性別、母親の年齢、母親の BMI、出産歴、生殖補助医療、飲酒習慣にて調整

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 6 . 正期産であり Small for Gestational Age (SGA) の有無と社会経済要因（世帯収入、最終学歴）との関係についての Cox ハザード分析結果

	割合 (%)	Crude			Adjusted		
		HR	95%CI		HR	95%CI	
母親の最終学歴							
中学卒	5.3	1.16	1.08	1.24	1.16	1.07	1.26
高校卒	43.8	Reference			Reference		
短大・専門学校卒	40.2	1.01	0.97	1.04	1.00	0.96	1.04
大学卒	10.7	1.03	0.98	1.09	1.03	0.97	1.09
世帯年収							
<300万	43.8	1.00	0.96	1.04	0.99	0.94	1.03
300万 , <500万	40.2	Reference			Reference		
500万	10.7	1.02	0.98	1.06	0.99	0.95	1.03

母親の年齢、母親の BMI、生殖補助医療、飲酒習慣にて調整

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授
研究分担者 池野 多美子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

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

研究協力者

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

A . 研究目的

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

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

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

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

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

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

B．研究方法

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

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

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

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

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

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

（倫理面への配慮）

本研究は、北海道大学環境健康科学研究

教育センターおよび大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定に従って実施した。インフォームド・コンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行った。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏えいが一切生じないように、研究者によりデータ保管を厳重に行った。

C. 研究結果

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

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

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

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

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

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

D. 考察

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

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

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

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

る。

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

E . 結論

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

F . 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

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

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を

含む。）

該当なし

参考文献

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

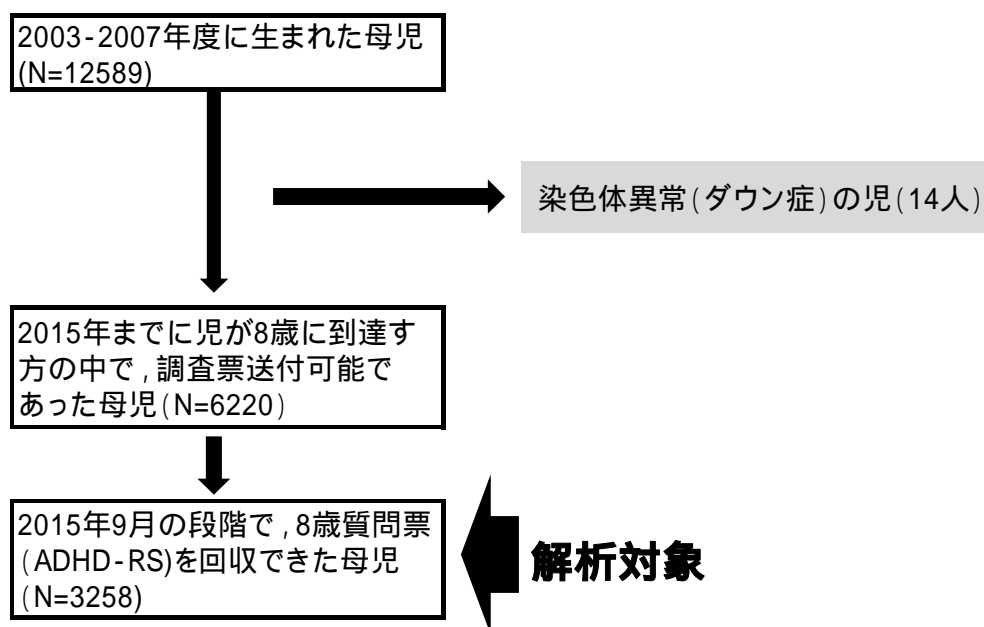


Figure1 . 本研究における解析対象者

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

Table 1 . 健常群および ADHD 傾向群における母児基本属性

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

群間における、頻度の検定には 2乗検定を用いた。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

群間における、頻度の検定には 2乗検定を用いた。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

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

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

群間における、頻度の検定には 2乗検定を用いた。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

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

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

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

Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals and Neurodevelopment in Early Infancy

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授
研究分担者 池野 多美子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 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
生命有機化学分野生物有機化学研究室 准教授

研究要旨

We assessed the effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS)/perfluorooctanoate (PFOA) concentrations, as most well detected PFCs in humans, on neurodevelopment of infants in early infancy. Mother-child pairs were analyzed in this birth cohort between 2002 and 2005 in Japan. The prenatal PFOS and PFOA levels were measured in maternal serum samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Neurodevelopment of infants at 6 and 18 months of age were assessed by Bayley Scales of Infant Development. Associations with log₁₀-transformed PFC concentrations were estimated using linear regression models adjusted for potential confounders. In the fully adjusted model, PFOA, not PFOS, had a negative association with mental developmental index (MDI) among female infants. In addition, we observed negative association between PFOA and MDI/PDI at 18 months of age but it did not meet significant p-value. We observed no association between concentrations of PFOS and neurodevelopmental scores in infants. Our data suggest an inverse association between low-dose PFOA exposure and MDI in early life. In future studies, assessment of the effects of PFCs with longer carbon-chain on neurodevelopment of infants and children with bigger sample size and different battery tests is in need.

研究協力者

中島そのみ（札幌医科大学保健医療学部
作業療法学科）
Houman Goudarzi
（北海道大学環境健康科学研究教育センター）
中澤 裕之、岩崎 雄介
（星薬科大学薬品分析化学教室）

A. 研究目的

Perfluorinated chemicals (PFCs) are ubiquitous and stable chemicals widely detected in humans and environment. The most widely studied and detected PFCs are perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA). They are

slowly eliminated from the human body and are resistant to metabolism with mean half-lives of 5.4 and 3.8 years for PFOS and PFOA, respectively (Olsen et al. 2007). Both of these compounds showed neurodevelopmental toxicity in animal studies; maternal or neonatal exposure to PFOS and PFOA caused neurodevelopmental delay, increased motor activity and reduced habituation that were accompanied by hypothyroxinemia (Lau et al. 2003; Butenhoff et al. 2009). A strong correlation of these compounds has been demonstrated between maternal and cord blood samples in

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

humans, indicating that neonates are exposed to PFCs via the placental passage (Inoue et al. 2004). Exposure of pregnant women and infants to PFCs had raised concerns, and they may have permanent neurodevelopmental toxic effects in humans.

However, the effects of prenatal PFCs exposure on neurodevelopment of next generation, especially in early infancy is not well understood. In the present analyses, we explored the relationship of prenatal PFOS/PFOA exposure with Mental and Psychomotor Developmental Indices (MDI, PDI) at 6 and 18 months of age assessed by Bayley Scales of Infant Development, 2nd edition (BSID II).

B . 研究方法

This study was a part of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health performed between July 2002 and October 2005, and the details have been previously described (Kishi et al. 2011 and 2013). Of 1,796 approached Japanese pregnant women, 514 (28.6%) pregnant women agreed to participate in this study. A self-administered questionnaire survey was completed after the second trimester containing information related to smoking, economic status, educational levels, and alcohol and caffeine intake during pregnancy. Medical information including maternal age, maternal body mass index (BMI) before pregnancy, parity, gestational age, type of delivery, infant sex, and birth size were obtained from participant medical records.

A 40-mL blood sample was taken from the maternal peripheral vein after the second trimester of pregnancy, and PFOS and PFOA levels in maternal serum were measured by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

The PFOS values of all samples were detected, and for samples with PFOA levels below the detection limit (0.50 ng/mL), we used a value of half the detection limit (0.25 ng/mL). BSIDII were used to assess MDI and PDI in infants at 6 and 18 months of age. The environmental conditions of the subjects were assessed by using the questionnaire of home environment devised by Anme et al. (1997).

For the analysis of associations between maternal PFCs and BSID II, the following subjects were excluded: women with pregnancy-induced hypertension (n=11), women with diabetes mellitus (n=1), mother-infant pairs with fetal heart failure (n=1), and twins (n=7). After the exclusion of these subjects, 428 mother-infant pairs had available PFOS and PFOA concentrations. In addition, eligibility criteria for analysis of subjects were: babies born at term (37–42 weeks' gestation), Apgar score of > 7 at 1 min, infants without congenital anomalies or diseases, and BSID-II completed.

We analyzed correlations between PFC concentrations and the characteristics of the mothers and infants (also BSID II scores and characteristics) using the Spearman correlation test, the Mann-Whitney *U*-test, and the Kruskal-Wallis test. We performed multiple-regression analysis to examine the association between BSID-II scores and the levels of PFCs in maternal blood. The levels of PFCs in maternal blood were log₁₀ transformed, and the analysis was adjusted for maternal age (year), parity (0/≥1), maternal educational levels (categorical), alcohol consumption and smoking during pregnancy (yes/no), caffeine intake during pregnancy (milligrams per day), blood sampling period (before and after delivery),

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

breast feeding (less or more than 3 months), Index of Child Care Environment, and total dioxin levels (TEQ, WHO 2005). We performed all of the statistical analyses using JMP pro 10 (SAS Institute Inc., NC, USA). Results were considered significant if $p < 0.05$.

（倫理面への配慮）

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

B. 研究結果

The basic characteristics of the study population are presented in Table 1. The mean scores were 90.5 (SD = 5.7) for MDI and 90.2 (SD = 10.3) for PDI at 6 months of age. Whereas, the mean scores for MDI and PDI were 84.2 (SD = 12.0) and 86.4 (SD = 10.9) at 18 months of age. The mean values of maternal PFOS and PFOA levels were 6.2 ng/mL and 1.3 ng/mL, respectively. In crude and adjusted model, PFOS and PFOA did not show significant association with MDI nor PDI at 6 months of age ($n=174$). After sex stratification, we found a negative significant association between prenatal PFOA and MDI score (but not PDI) only in female infants ($\beta = -0.317$; CI, -12.5 to -0.95; p -value= 0.023) in adjusted model. We did not find any significant association between PFOS levels with BSID II scores before and after sex stratification in adjusted model. Regarding the association between PFCs and neurodevelopment at 18 months ($n=134$), although there was a negative association between PFOA and MDI ($\beta = -0.155$; CI,

-16.5 to 3.8; p -value= 0.219) and PDI ($\beta = -0.135$; CI, -14.2 to 4.3; p -value= 0.295) in adjusted model, but it was not significant. PFOS did not show any significant association with neurodevelopmental outcomes at 18 months of age. Sex stratification was applied to find sex differences of PFCs exposure on neurodevelopment but we did not find any significant association in either sexes at 18 months of age.

D. 考察

To our knowledge, this study is one of few epidemiological reports regarding the association between PFC levels and neurodevelopment, and the first study to examine correlation of PFCs and Bayley's test. We did observe no association between low prenatal PFOS exposure and BSID II scores at 6 and 18 months of age. We found negative correlation between prenatal PFOA exposure and MDI at 6 months of age only among female infants. We observed an inverse association between PFOA and MDI/PDI at 18 months of age but p -value was not significant. It may be due to small sample size in our study at 18 months of age ($n=134$).

There are few reports regarding the association of PFCs and neuro-development in infants and children. Fei et al. (2008) reported no convincing associations between prenatal PFCs (PFOS and PFOA) and developmental milestones at 6 and 18 months of age reported by mothers. In this report, PFOS and PFOA levels were higher than those in our study with a large sample size (6-months, $n=1336$; 18-months, $n=1,255$). In another recent study, there was no association between prenatal PFCs exposure and behavioral/affective disorders

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

such as ADHD in offspring (n=965) at 20 years of age (Strom et al. 2014). In contrast to our result, a Taiwanese report indicated PFOS but not PFOA levels in cord blood plasma were adversely associated with neurodevelopment among 2-year children using a national questionnaire (Chen et al. 2013). In our study, exposure levels of PFCs were lower than all of mentioned studies. Comparison of above results with our results is difficult due to difference of exposure levels, biomedica, societies, age of children and applied battery test. Our results suggest negative association between in utero PFOA exposure and neurodevelopment in early infancy especially among female infants.

E. 結論

Our result suggest in utero PFOA exposure is associated with lower neurodevelopmental indexes in early infancy especially among girls. Previously, our group reported time trends of 11 types of PFCs between 2003 and 2011 in plasma samples of pregnant women in Hokkaido (Okada et al. 2013). The results indicate that PFOS and PFOA concentrations declined, whereas long-chain PFCs (including PFNA and PFDA) levels increased. In future studies, assessment of the effects of newly emergent PFCs (such as PFNA and PFDA) on neurodevelopment of infants and children with bigger sample size and different battery tests is necessary.

F. 研究発表

1. 論文発表

In preparation

2. 学会発表

Houman Goudarzi, Tamiko Ikeno, Sachiko Kobayashi, Atsuko Araki, Chihiro Miyashita, Seiko Sasaki, Sonomi Nakajima, Hiroyuki Nakazawa, Reiko Kishi: Exposure to

perfluoroalkyl chemicals and neurodevelopment at 6 months of age. International Society for Environmental Epidemiology (August 24-28, Seattle, USA, poster presentation)

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) Olsen GW, Burriss JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. 2007. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate perfluoro-hexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. Environ Health Perspect. 115:1298-305.
- 2) Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Rogers JM, Grey BE, Stanton ME, et al. 2003. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation. Toxicol Sci. 74:382-92.
- 3) Butenhoff JL, Ehresman DJ, Chang SC, Parker GA, Stump DG. 2009. Gestational and lactational exposure to potassium perfluorooctanesulfonate (K+PFOS) in rats: developmental neurotoxicity. Reprod Toxicol. 27:319-30.
- 4) Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, et al. 2004. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. Environ Health Perspect.

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

112:1204-7.

5) Kishi R, Sasaki S, Yoshioka E, Yuasa M, Sata F, Saijo Y, et al. 2011. Cohort profile: the Hokkaido study on environment and children's health in Japan. *Int J Epidemiol.* 40:611-8.

6) Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, et al. 2013. Ten years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: cohort profile--updated 2013. *Environ Health Prev Med.* 18:429-50.

7) Anme T, Shimada C, Katayama H. 1997. Evaluation of environmental stimulation for 18 months and the related factors. *Nihon Koshu Eisei Zasshi.* 44:346-52.

8) Fei C, McLaughlin JK, Lipworth L, Olsen J. 2008. Prenatal exposure to perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctanesulfonate (PFOS) and maternally reported developmental milestones in infancy. *Environ Health Perspect.* 116:1391-5.

9) Strøm M, Hansen S, Olsen SF, Haug LS, Rantakokko P, Kiviranta H. et al. 2014. Persistent organic pollutants measured in maternal serum and offspring neurodevelopmental outcomes--a prospective study with long-term follow-up. *Environ Int.* 68:41-8.

10) Chen MH, Ha EH, Liao HF, Jeng SF, Su YN, Wen TW. et al. 2013. Perfluorinated compound levels in cord blood and neurodevelopment at 2 years of age. *Epidemiology.* 24:800-8.

11) Okada E, Kashino I, Matsuura H, Sasaki S, Miyashita C, Yamamoto J. et al. 2013. Temporal trends of perfluoroalkyl acids in plasma samples of pregnant women in Hokkaido, Japan, 2003-2011. *Environ Int.* 60:89-96.

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

Characteristics	At 6 months No. (%)	At 18 month No. (%)
Maternal characteristics		
Age (years) ^a	30.8±4.6	31.1±4.4
Prepregnancy BMI (kg/m ²) ^a	21.2±2.9	21.2±2.9
Parity (times)		
0	83 (48.0)	65 (48.9)
≥1	90 (52.0)	68 (51.1)
Smoking during pregnancy		
Yes	53 (30.5)	39 (29.1)
No	121 (69.5)	95 (70.9)
Alcohol intake during pregnancy		
Yes	51 (29.3)	40 (29.9)
No	123 (70.0)	94 (70.1)
Blood sampling period		
during pregnancy	132 (75.9)	107 (79.8)
after delivery	42 (24.1)	27 (20.1)
Child characteristics		
Sex		
Male	84 (48.3)	67 (50.0)
Female	90 (51.7)	67 (50.0)
Gestational age (days) ^a	276.4±8.3	276.4±8.5
Birth weight (g) ^a	3112.5±357.9	3098.6±323.3
Birth length (cm) ^a	48.2±1.7	48.2±1.6
Breast-feeding (month)		
<3	72 (41.4)	51 (38.0)
≥3	102 (58.6)	83 (62.0)
BSID II mental index score (MDI) ^a	90.5±5.7	84.2±12.0
BSID II psychomotor index score (PDI) ^a	90.2±10.3	86.4±10.9
Index of Child Care Environment ^b	22.2±3.9	28.2±3.5

^amean±SD. ^bperfect score is 30 and 38 points in 6 months and 18 months, respectively.

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.

Concentration of PFOS and PFOA (ng/mL) in maternal blood (n=174) whose infants had Bayley test score

	Mean (SD)	Minimum	Percentile			Maximum
			25th	50th	75th	
PFOS	6.2 (2.7)	1.6	4.4	5.7	7.4	16.2
PFOA ^a	1.3 (0.8)	not detected	0.8	1.2	1.7	4.3

Concentration of PFOS and PFOA (ng/mL) in maternal blood (n=134) whose infants had Bayley test score

	Mean (SD)	Minimum	Percentile			Maximum
			25th	50th	75th	
PFOS	6.2 (2.6)	1.70	4.4	5.8	7.4	16.2
PFOA ^a	1.3 (0.8)	not detected	0.8	1.2	1.8	4.3

^a For subjects with a level below the detection limit, a value equal to half the detection limit were used.

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. BSID II MDI and PDI development scores at 6 months of age for infants in relation to the levels of PFCs in maternal blood (n=174).

	MDI			PDI		
	beta	(95% CI)	p-value	beta	(95% CI)	p-value
PFOS						
crude	0.037	(-3.26 to 5.43)	0.624	-0.016	(-8.62 to 6.96)	0.833
Adjusted a	0.036	(-4.02 to 6.08)	0.688	-0.004	(-0.391 to 0.371)	0.959
PFOA						
crude	0.003	(-2.89 to 3.03)	0.961	-0.030	(-6.38 to 4.21)	0.687
Adjusted a	-0.033	(-4.16 to 2.88)	0.721	0.011	(-5.31 to 6.08)	0.893

adjusted for gestational age, parity, maternal age, smoking and alcohol intake during pregnancy, caffeine during pregnancy, maternal education level, blood sampling period, breast feeding, score, Index of Child care Environment, and total dioxin levels (TEQ, WHO 2005).

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. BSID II MDI and PDI development scores at 6 months of age for infants in relation to the levels of PFCs in maternal blood by sex stratification.

Boys (n=84)	MDI			PDI		
	beta	(95% CI)	p-value	beta	(95% CI)	p-value
PFOS						
crude	-0.080	(-8.58 to 3.96)	0.466	-0.041	(-12.21 to 8.32)	0.707
adjusted ^a	-0.064	(-9.84 to 6.26)	0.659	0.178	(-3.62 to 19.01)	0.179
PFOA						
crude	0.087	(-2.38 to 5.52)	0.431	0.009	(-6.20 to 6.74)	0.934
adjusted ^a	0.139	(-2.09 to 7.72)	0.368	0.063	(-5.87 to 9.33)	0.650
Girls (n=90)						
Girls (n=90)	MDI			PDI		
	beta	(95% CI)	p-value	beta	(95% CI)	p-value
PFOS						
crude	0.136	(-2.11 to 10.03)	0.198	0.002	(-11.63 to 11.90)	0.981
adjusted ^a	0.077	(-5.08 to 9.55)	0.545	0.029	(-11.27 to 14.48)	0.804
PFOA						
crude	-0.094	(-6.56 to 2.48)	0.373	-0.055	(-10.97 to 6.43)	0.605
adjusted ^a	-0.317	(-12.5 to -0.95)	0.023	0.096	(-6.59 to 14.46)	0.458

Adjusted for gestational age, parity, maternal age, smoking and alcohol intake during pregnancy, caffeine during pregnancy, maternal education level, blood sampling period, breast feeding, Index of Child Care Environment, and total dioxin levels (TEQ, WHO 2005).

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

Table 5. BSID II MDI and PDI development scores at 18 months of age for infants in relation to the levels of PFCs in maternal blood (n=134).

	MDI			PDI		
	beta	(95% CI)	p-value	beta	(95% CI)	p-value
PFOS						
crude	0.082	(-5.77 to 16.5)	0.342	-0.033	(-12.08 to 8.15)	0.701
adjusted ^a	-0.002	(-17.8 to 17.4)	0.985	-0.030	(-18.0 to 14.2)	0.815
PFOA						
crude	-0.090	(-10.9 to 3.3)	0.298	-0.065	(-8.9 to 4.0)	0.455
adjusted ^a	-0.155	(-16.5 to 3.8)	0.219	-0.135	(-14.2 to 4.3)	0.295

^a adjusted for gestational age, parity, maternal age, smoking during pregnancy, alcohol during pregnancy, caffeine during pregnancy, maternal education, blood sampling period, breast feeding, caffeine during pregnancy, maternal education, blood sampling period, breast feeding, Index of Child Care Environment, and total dioxin levels (TEQ, WHO 2005).

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授

研究分担者 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授

研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

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

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

研究協力者

Houman Goudarzi (外国人特別研究員)

小林 澄貴 (北海道大学環境健康科学研究教育センター)

檉野 いく子 (国立国際医療研究センター・疫学予防研究部)

岡田 恵美子 (北海道大学大学院医学研究科社会医学講座公衆衛生学分野)

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

A . 研究目的

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

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

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

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

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

B . 研究方法

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

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

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

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

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

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

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

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

(倫理面への配慮)

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

C . 研究結果

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

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

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

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

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

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

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

D . 考察

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

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

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

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

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

E . 結論

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

F . 研究発表

1.論文発表

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

2.学会発表

Houman Goudarzi, Sumitaka Kobayashi,

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

G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

参考文献

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

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

Table 1. Characteristics of study population of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan (n=1558).

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

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

^bETS: environmental tobacco smoke.

Table 2. Concentrations of 11 PFAAs in 1558 maternal plasma samples from the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013.

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

^aMDL: method detection limit.

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

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

^a Chi-square test.

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

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

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

PFNA

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

PFDA

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

PFUnDA

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

PFDODA

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

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

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

^b Adjusted for all the covariates except children gender.

^c OR: odds ratio. ^dCI: confidence interval.

*Indicates number of cases with wheezing.

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

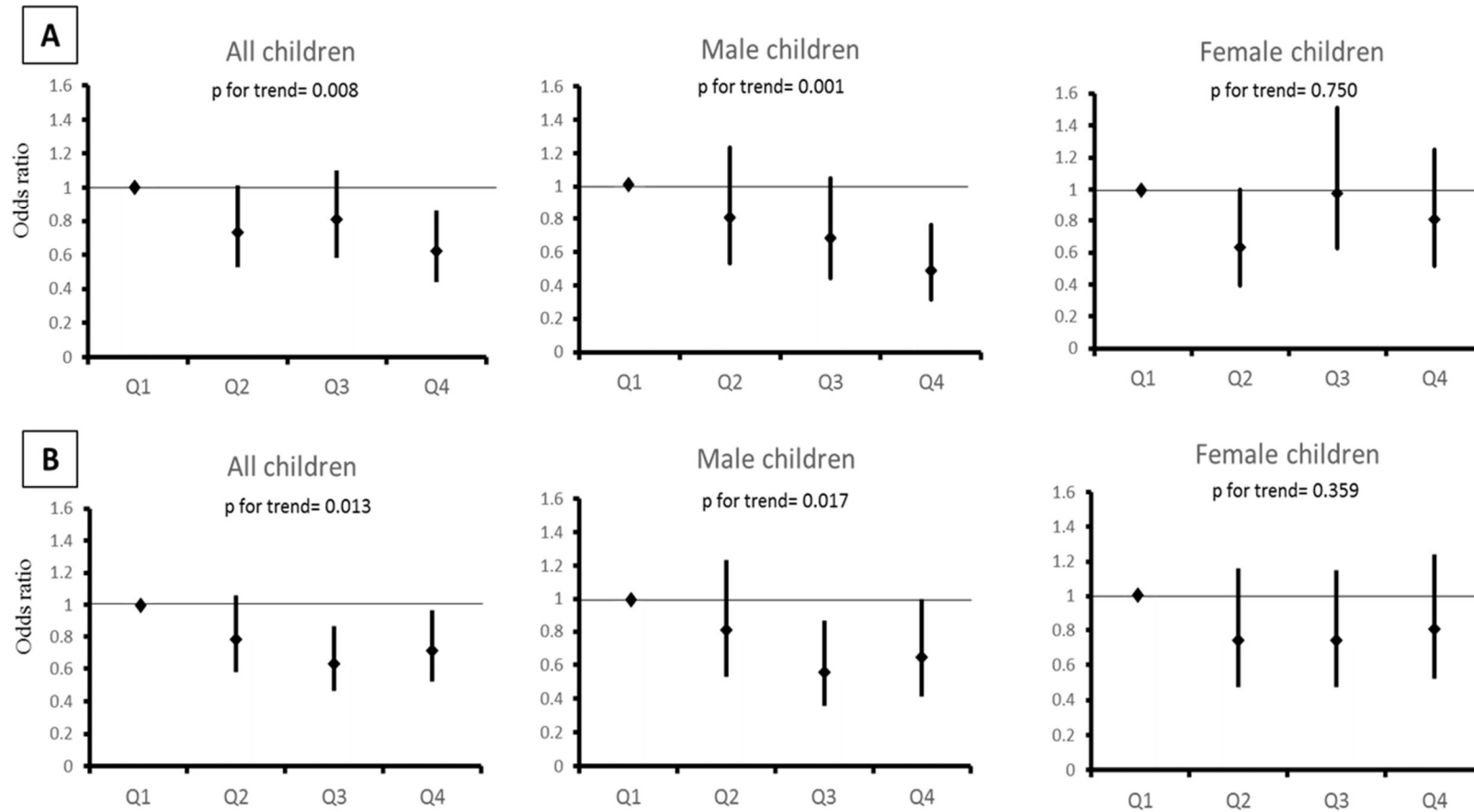
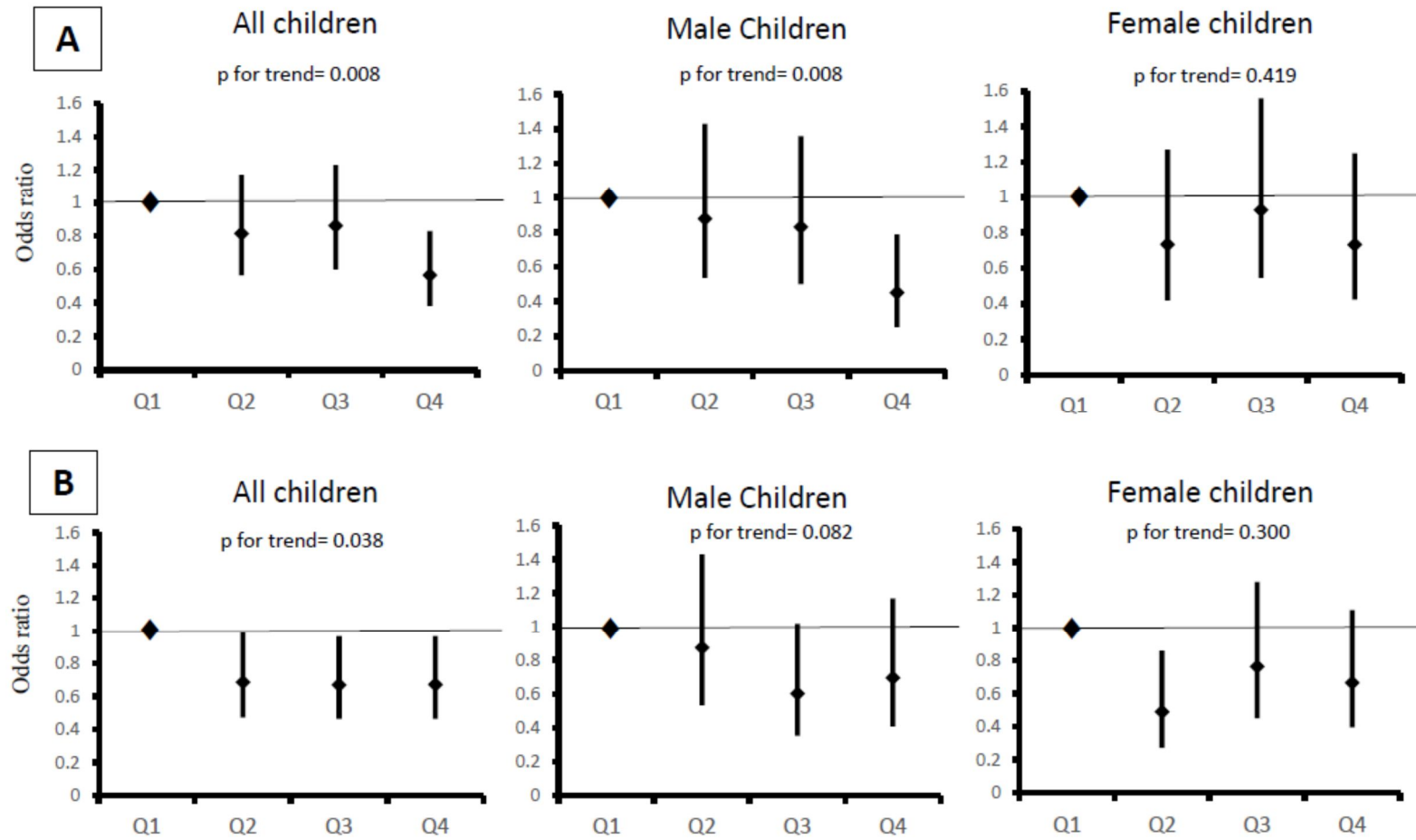


Figure 2. The association between quartiles of PFDoDA (A) and PFTrDA (B) with risk of eczema among 4-year old children. Adjusted for maternal age, maternal educational level, parental allergic history, number of older siblings, children gender, breast feeding, day care attendance and ETS exposure at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



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

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

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授

研究分担者 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授

研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

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

研究協力者

Houman Goudarzi (外国人特別研究員)

A . 研究目的

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

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

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

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

B . 研究方法

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

well.

(倫理面への配慮)

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

C . 研究結果

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

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

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

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

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

D . 考察

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

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

E . 結論

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

F . 研究発表

1.論文発表

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

2.学会発表

なし

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

参考文献

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

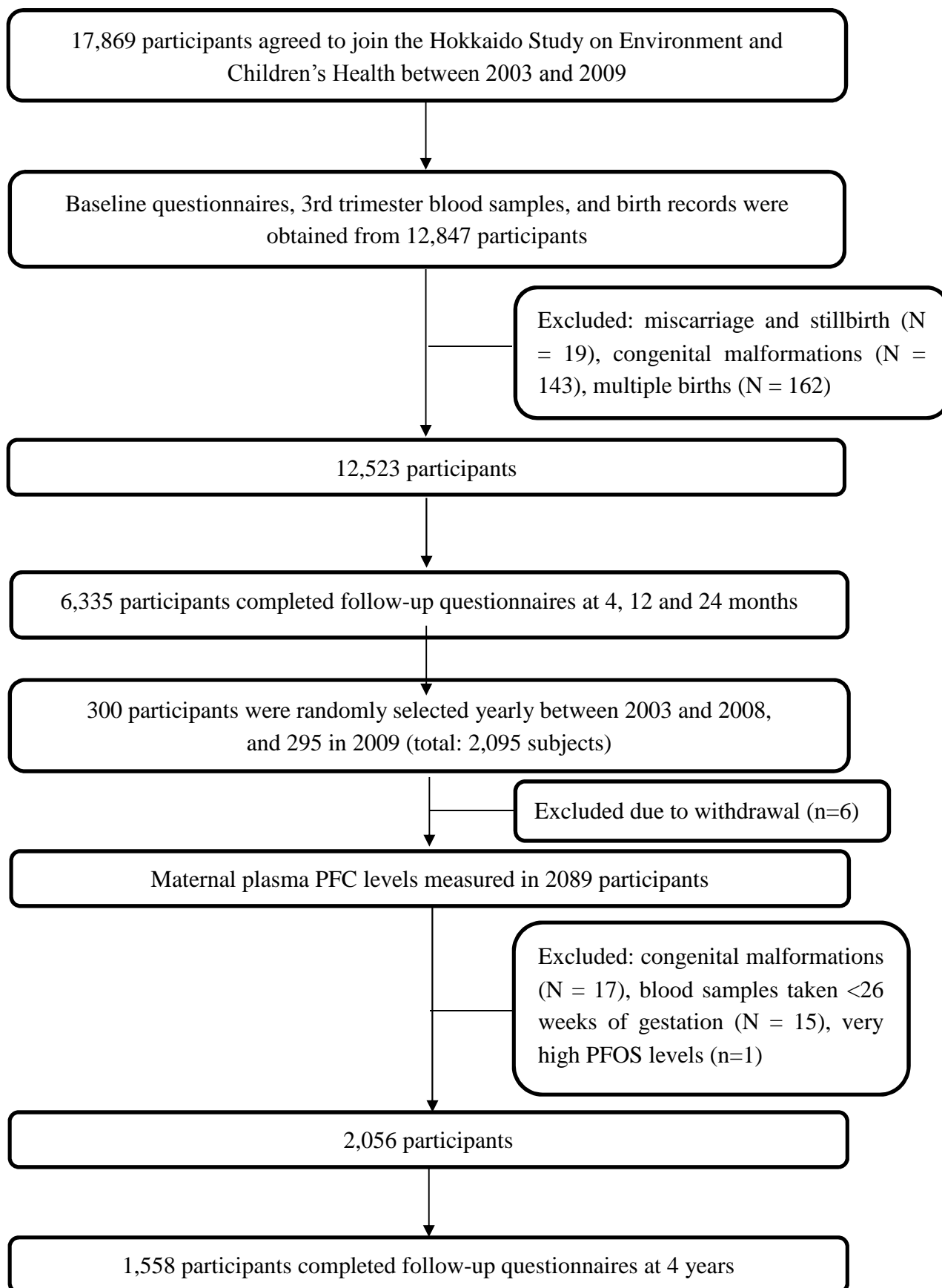
厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Figure S1. Flow chart of study participant selection.



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 1. Characteristics of study population of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013.

Characteristics	Participants	
	(n=1558)	
	No. (%)	
Parental characteristics		
Maternal age (years) (mean ± SD)		31.12±4.48
Prepregnancy BMI		20.96 ±.90
Maternal educational level (years)	≤12	660 (42.36)
	>12	898 (57.64)
Parity (times)	0	702 (45.67)
	≥1	835 (54.32)
	missing	21
Maternal smoking status during pregnancy	Nonsmoker	1465 (94.03)
	Smoker	93 (5.97)
Maternal allergic history	Yes	484 (31.07)
Paternal allergic history	Yes	307 (19.70)
Annual household income (million yen)	<5	880 (56.48)
	≥5	495 (31.77)
	Missing	183 (11.75)
Children characteristics		
Gender	Male	793 (50.9)
	Female	765 (49.1)
Older siblings (numbers)	0	626 (40.18)
	≥1	932 (59.82)
Day care attendance at 4-year-old	Yes	1373 (90.27)
	No	148 (9.73)
	missing	37
ETS ^a exposure at 4-year-old	Yes	724 (48.07)
	No	782 (51.92)
	Missing	52

^a ETS: environmental tobacco exposure

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 2. Concentrations of 11 PFAAs in 1558 maternal plasma samples from the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Japan, 2003–2013.

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

1 ^aMDL: method detection limit

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

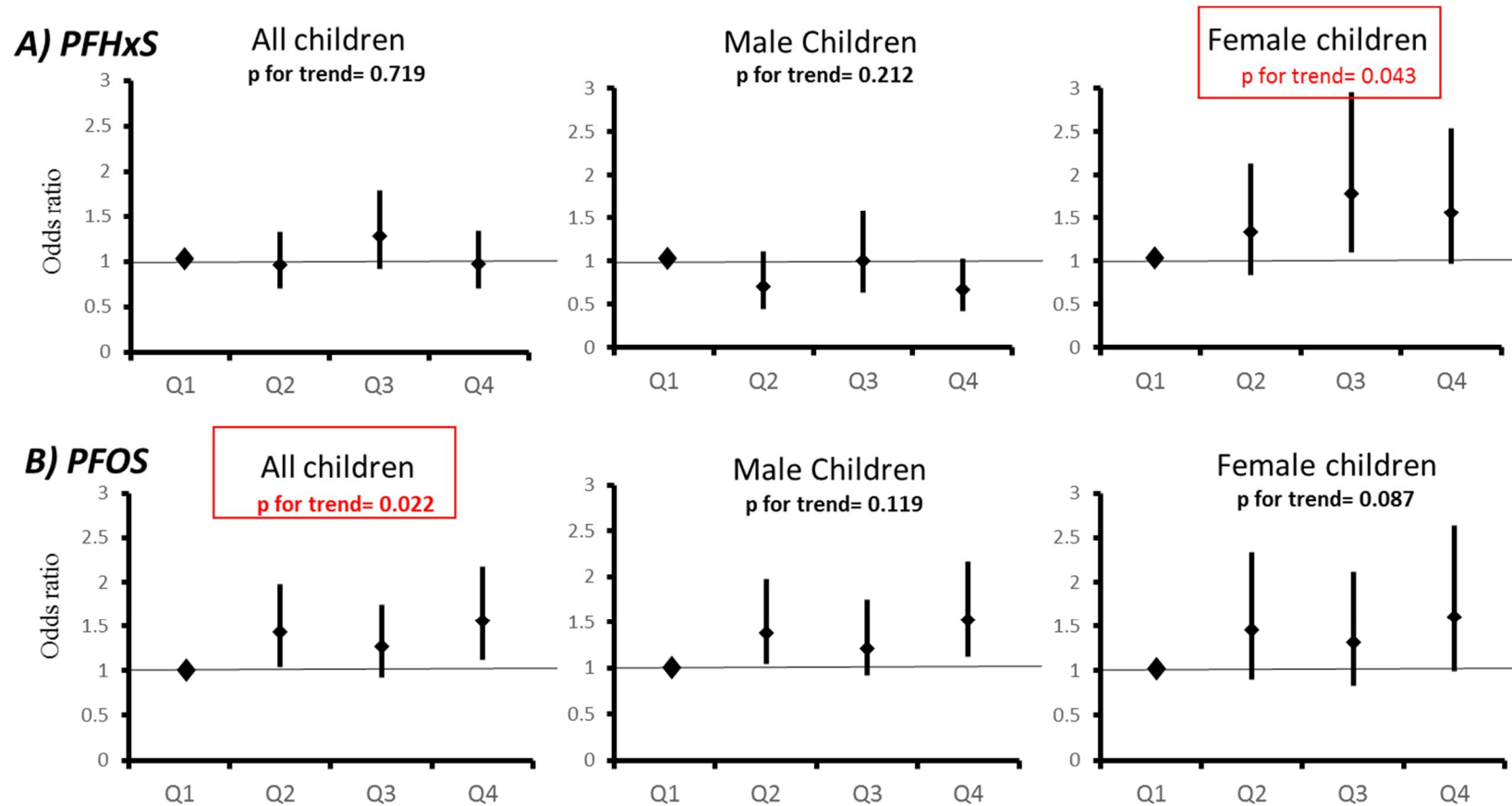
Symptoms	Total		Male children		Female children		p ^a
	(n=1558)		(n=793)		(n=765)		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Infectious diseases ^b	1075	(69)	534	(67.34)	541	(70.72)	0.149
Otitis media	649	(41.66)	340	(42.88)	309	(40.39)	0.320
Pneumonia	287	(18.42)	151	(19.04)	136	(17.78)	0.520
RS virus	197	(12.64)	92	(11.6)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

^aChi-square test.

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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



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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

^b Adjusted for all the covariates except children gender.

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

*Indicates number of cases with infectious diseases.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授
研究分担者 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授
研究分担者 野々村 克也 北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科 名誉教授

研究要旨

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

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

研究協力者

Houman Goudarzi (外国人特別研究員)

A . 研究目的

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

B . 研究方法

This study was part of the Hokkaido Study

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

（倫理面への配慮）

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

C . 研究結果

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

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

D . 考察

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

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

E . 結論

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

F . 研究発表

1.論文発表

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

2.学会発表

Not yet.

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定）

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

を含む。）
該当なし

参考文献

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

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

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

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

syncytiotrophoblasts. Placenta
36:575-580.

- 24) Zhao B, Hu GX, Chu Y, Jin X, Gong
S, Akingbemi BT, et al. 2010.
Inhibition of human and rat
3beta-hydroxysteroid
dehydrogenase and
17beta-hydroxysteroid
dehydrogenase 3 activities by
perfluoroalkylated substances.
Chemico-biological interactions
188:38-43.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 1. Characteristics of the subjects participating in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Sapporo, Japan, 2002-2005 (n = 251).

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 2. Maternal blood PFOS and PFOA levels (ng/mL) in relation to the characteristics of the subjects participating in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, Sapporo, Japan, 2002-2005 (n = 251).

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

P-values calculated by ^a Spearman's correlation (ρ), ^b Mann-Whitney U-test.

^d annual household income (n=2).

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

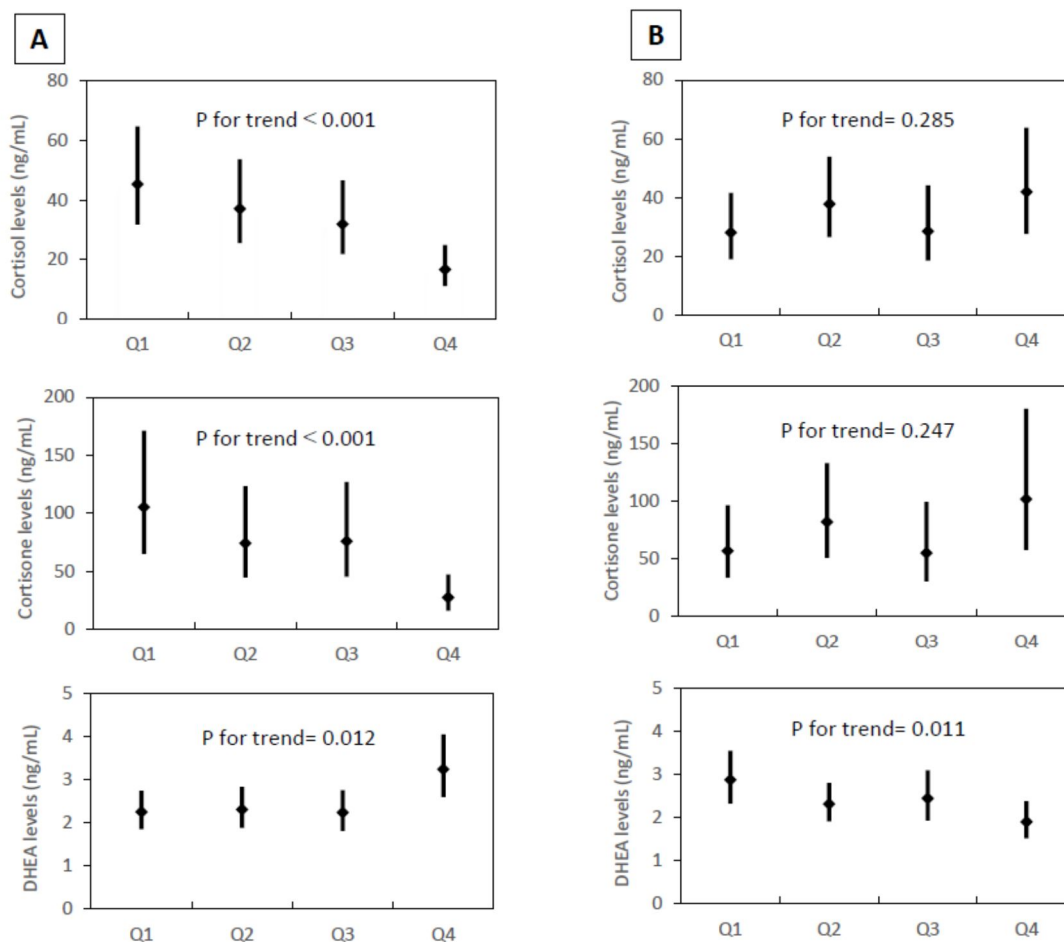
^aAdjusted for maternal age, parity, smoking, and caffeine intake during pregnancy, blood sampling period, and gestational age.

Both exposure and outcome measures were log₁₀ transformed.

Std β : standardized Beta

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Figure 1. The dose-response relationship of prenatal PFOS (A) and PFOA (B) quartiles with glucocorticoid and DHEA levels in cord blood, Sapporo, Japan, 2002-2005 (n=251). The LSMs were adjusted for gestational age, maternal age, smoking, and caffeine intake during pregnancy, parity and the blood sampling period. The LSMs were back transformed from \log_{10} to normal values and the error bars depict the upper and lower 95% CI. Q = quartile.



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

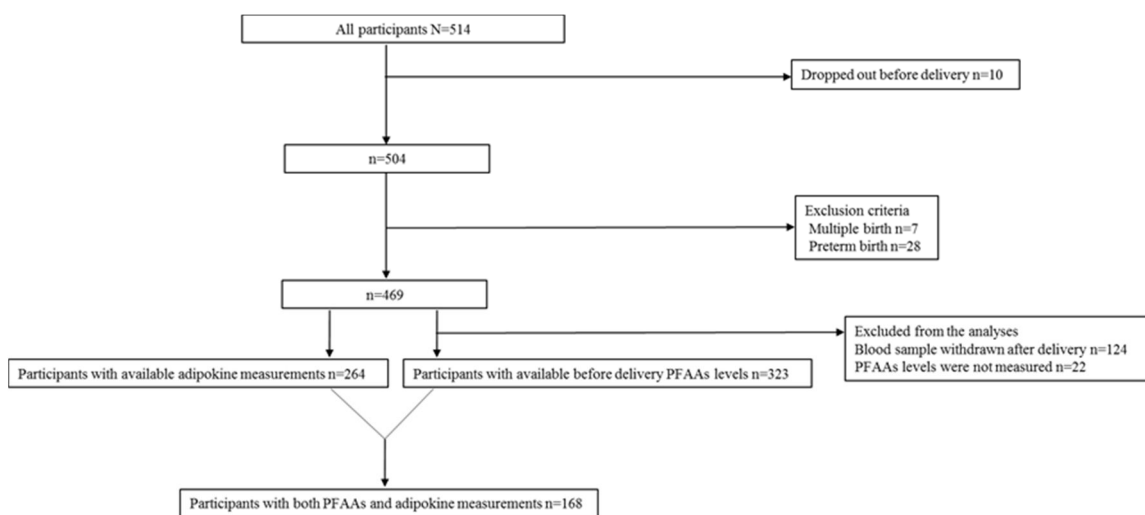
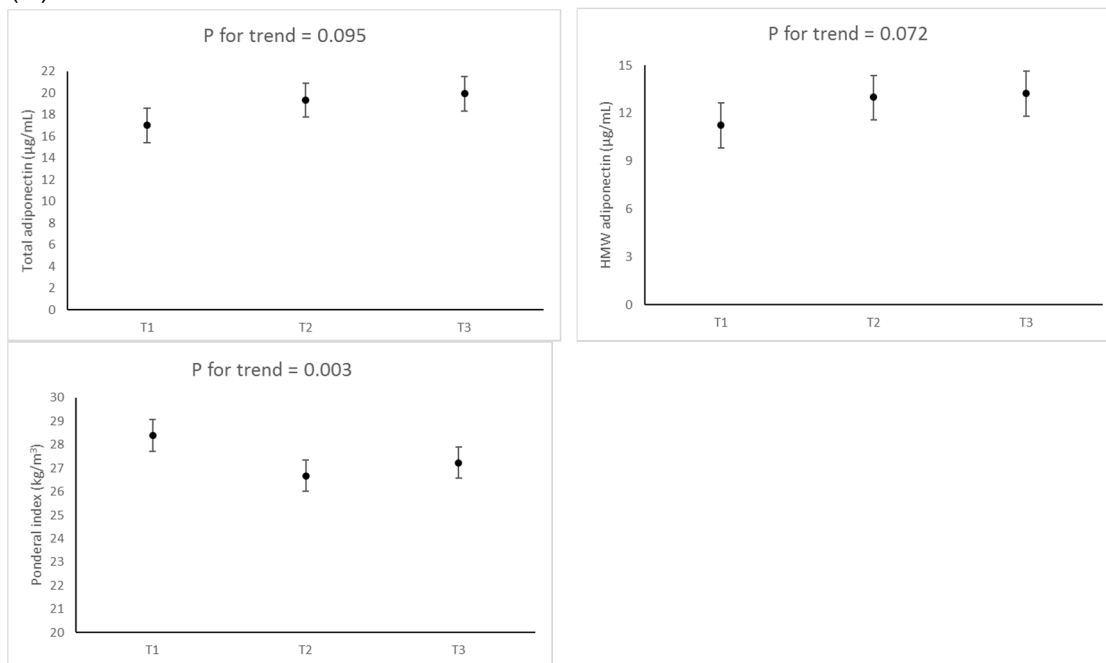


Figure 1. Flowchart of participants' selection.

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

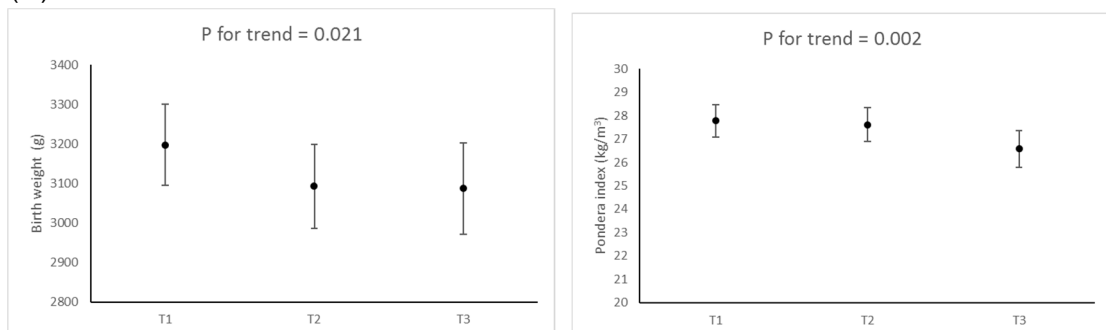


Figure 2. The dose-response relationships of PFOS (A) and PFOA (B) tertiles with adipokine levels and birth size. The LSMs were adjusted for maternal BMI, parity, smoking during pregnancy, blood sampling period, gestational age and infant sex.

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

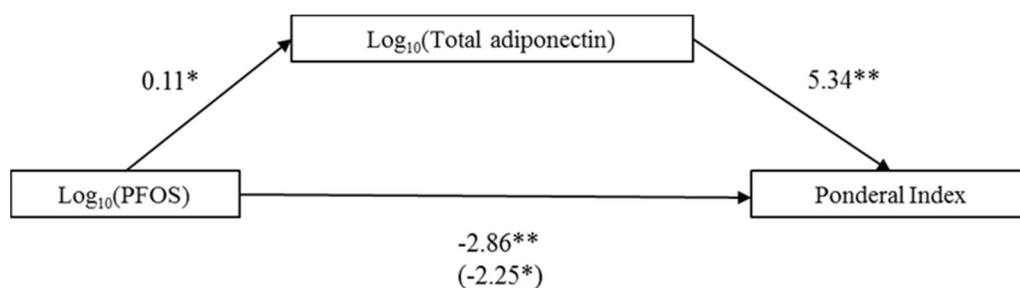


Figure 3. Mediation analysis of the association between PFOS and total adiponectin and between PFOS and PI. Regression coefficients of each path are described alongside with arrows. The total effect of PFOS on PI is described in the parentheses. A significant indirect effect of PFOS on PI through total 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	P _{interaction}
	β (95% CI)	β (95% CI)	
Total adiponectin	0.13 (0.00, 0.26)	0.11 (-0.06, 0.27)	0.563
HMW adiponectin	0.13 (-0.04, 0.30)	0.12 (-0.08, 0.33)	0.598
Leptin	0.01 (-0.28, 0.30)	-0.14 (-0.49, 0.21)	0.008
Birth weight (g)	190 (-162, 543)	-251 (-645, 143)	0.201
Ponderal index (kg/m ³)	-2.46 (-4.74, -0.18)	-2.11 (-4.86, 0.64)	0.658
PFOA			
Total adiponectin	0.06 (-0.13, 0.13)	0.05 (-0.05, 0.16)	0.811
HMW adiponectin	-0.01 (-0.19, 0.16)	0.05 (-0.09, 0.18)	0.885
Leptin	-0.14 (-0.42, 0.15)	0.08 (-0.15, 0.31)	0.591
Birth weight (g)	-276 (-619, 67)	-169 (-419, 81)	0.160
Ponderal index (kg/m ³)	-1.02 (-3.33, 1.29)	-1.39 (-3.13, 0.36)	0.376

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

PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による42か月児の認知発達への影響

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 特任教授
研究分担者 池野多美子 北海道大学区環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 宮下ちひろ 北海道大学区環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

PCBs・ダイオキシン類は生体から検出される化学物質で、胎児期曝露による次世代影響が報告されている。一般環境での低濃度のPCBs・ダイオキシン類による発達への曝露評価は、中島らがPCBs・ダイオキシン類濃度と生後6ヶ月児のBSID-Ⅱについて検討し、曝露濃度が高くなるほど運動発達、特に男児において有意な低下を認めた。本研究では、札幌コーホートにおいて、認知発達評価にK-ABCを用い、42か月時点の認知処理得点と習得度得点にPCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露が影響するか、生後の環境要因を考慮して解析を行った。その結果、習得度得点は種々の交絡要因で調整をしても、全てのダイオキシン類で曝露濃度が高いほど得点が上昇する結果が得られた。しかし胎児期のPCBs・ダイオキシン類曝露は、K-ABCの認知処理得点を上げるとは考えづらいので、最も認知処理得点を上げる方向で関連が強かった年収で層別化し、ダイオキシンの影響を検討したところ、年収500万円未満の群の曝露影響は消失した。しかし年収500万円以上の群で、Total PCDD濃度が高いほど習得度得点が高かった($B=36.1; p=0.029$)。この結果はK-ABCの習得度得点は、子供が生後、環境から獲得した知識や能力を指しており、生後早期（生後6か月のBayleyテスト時点）に認められた胎児期曝露によるダイオキシン類の負の影響が、42か月の調査では収入や養育環境など出生後環境要因の影響により見えづらくなると考えられた。しかし年収の高い群ではむしろダイオキシン類濃度が高いほどKABC得点をあげた原因としては、収入が高いほどダイオキシン類濃度が高く、一方、認知処理得点は、年収が多いほど、母親のWAIS-R短縮版得点が高いほど、養育環境得点が高いほど高い成績を示したので、ダイオキシン類の濃度が高い者ほど、母親の知能が高い、胎児期に神経発達にとって栄養的に有利な条件があったなど幾つかの重要な交絡要因が未だ絡んだまま、交絡が取り切れていない可能性がある。

研究協力者

中島そのみ(札幌医科大学保健医療学部作業療法学科)

A. 研究目的

PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による催奇形や神経行動発達への次世代影響が

報告されたが、Walkowak J (2001) や Vregdenhil HJ(2002)は、乳幼児期の悪影響は、母乳保育や適切な家庭環境による知的な刺激により、学齢期には改善する傾向にあると示唆している。一般環境での低濃度のPCBs・ダイオキシン類による発達への曝露評価は、中島らがPCBs・ダイオキシン

類濃度と生後 6 ヶ月児の BSID- について検討し、母体血中の PCBs・ダイオキシン類の異性体及び Total TEQ の濃度が高くなると PDI (運動尺度得点) が有意に低くなる、特に男児で低下することを報告した(2006)。また龍田らは、CBCL を用いて 31.6±1.7 か月児で評価した結果、PCBs 曝露と出生順が影響していたことを報告した(2012)。本研究では、札幌コーホートにおける 42 か月時点の認知発達について K-ABC を用い、妊娠中の母親の喫煙や飲酒、魚摂取頻度、養育環境などを調整して、ダイオキシン類の胎児期曝露が幼児期にも影響を及ぼすか評価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、前向き出生コーホート研究「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。

曝露評価は、妊婦 426 名について、妊娠 23 週から 35 週に採血した母体血中ダイオキシン類濃度 PCDDs (7 異性体), PCDFs (10 異性体), ダイオキシン様 PCBs (12 異性体) を、高分解能マススペクトロメーター (HRGC/HRMS 法) で測定した。認知発達は the Kaufman Assessment Battery for Children (以下 K-ABC) で評価した。K-ABC は対面調査で認知能の認知処理過程と習得度をみている。

調整因子は、水銀を分娩後 5 日以内に採取した 430 名の母親の毛髪中総水銀濃度 (Hg) を酸化燃焼金アマルガム法 (AAS 法) で測定した。母の認知能は WAIS-R 簡略版を用い 161 名に実施した。自記式調査票から、母親の年齢、家族構成、両親の社会経済的要因、飲酒・喫煙、魚類の摂取など生活習慣、分娩時の児の情報、産後 1 か月の母親抑うつ状態 (エジンバラ産後うつ)、養育環

境 (安梅, 1997) を聴取した。

分析対象者は、双胎 6 名を除き、K-ABC を実施出来た 151 名である。PCBs・ダイオキシン類は正規分布していないため、重回帰分析では log 変換して用いた。年収により層別化して解析を行った。すべてノンパラメトリック法で検定し、有意水準は 5% とした。統計ソフトは SPSS for Windows Ver. 22 を用いた。

C. 研究結果

PCBs・ダイオキシン類の測定結果がそろった 422 名の濃度 (中央値) はそれぞれ Total PCDD=7.25 TEQ pg/g lipid, Total PCDFs=2.55 TEQ pg/g lipid, Total Non Ortho PCB=4.53 TEQ pg/g lipid, Total Mono Ortho PCB=0.37 TEQ pg/g lipid, Total Dioxine=14.70 TEQ pg/g lipid であった (Table 1)。Figure 1 にはそれぞれの濃度分布を示した。

42 か月時点で児の K-ABC を測定完了できた解析対象者は 151 名で、コーホート全体 514 名より少ないため、母児の属性について K-ABC 検査未実施者と比較した (Table 2)。解析対象者は、K-ABC 検査未実施者 (N=355 名) より、母の出産時年齢が高く (p=0.010)、高い年収の割合が多く (p=0.001)、教育歴の長い割合が多かった (p=0.005)。妊娠中の喫煙者は少なく (p=0.003)、母体血清中コチニン値も有意に高かった (p=0.011)。PCBs・ダイオキシン類濃度はいずれも有意に高かった (p=0.000~0.046)。

解析対象の基本属性は、男児 72 名 (47.7%)、第 1 子 76 名 (50.3%) であった。年収によって K-ABC の得点に大きな違いが認められたので、以下の解析は年収 500 万以上と 500 万円未満で層別化して行った。層別化した母児の属性比較を Table 3 に示した。低収入群の方が、母親の年齢が若く (p=0.000)、初産が半数以上を占め (p=0.046)、母親の WAIS-R 短縮版の得点が低く (p=0.024)、喫煙経験者の割合が多か

った ($p=0.041$)。養育環境の要因では低所得群の方が家族人数は少なく ($p=0.001$)、養育環境得点が低かった ($p=0.048$)。妊娠中の魚摂取は、近海魚、遠洋魚とも頻度の差は認められなかった。K-ABC の認知処理得点、習得度得点とも、低所得群の方が有意に低かった ($p=0.014$; $p=0.015$)。PCBs・ダイオキシン類濃度においては、いずれの物質濃度も低所得群は低い結果であった ($p=0.021 \sim 0.055$)。

児のK-ABC各得点と要因の関連をTable 4に示した。解析対象者全体では、認知処理得点は、年収が多いほど、母親のWAIS-R短縮版得点が高いほど、養育環境得点が高いほど高かった(年収と認知処理 $p<0.014$; 母親WAIS-Rと認知処理 $p<0.000$; 養育環境得点と認知処理 $p<0.019$)。習得度得点も年収、母親のWAIS-R短縮版得点、養育環境得点が高いほど得点が高かった(年収と習得度 $p<0.014$; WAIS-Rと習得度 $p<0.026$; 養育環境得点と習得度 $p<0.029$)。過去に喫煙したことがないと習得度得点が高かった ($p=0.046$)。魚摂取頻度によるK-ABCの各得点に差はなかった。化学物質との関連では、すべての物質濃度が習得度得点と強い正相関を認めた ($p=0.000 \sim 0.013$)。

Table5に年収で層別したK-ABC各得点と要因の関連を示した。年収500万円未満の低収入群において、母親の年齢が高いほど認知度得点が低く ($p=0.000$)、母親のWAIS-R短縮版得点と養育環境得点が高いほど、認知処理得点が高かった(WAIS-Rと認知処理 $p<0.004$; 養育環境得点と認知処理 $p<0.048$)。化学物質との関連では習得度得点とTotal Non Ortho PCB以外の物質で濃度が高いほど得点が正相関していた ($0.009 \sim 0.016$)。一方、高収入群は、母児の属性や養育環境と有意な関連は認められなかった。化学物質との関連において、Total PCDDにのみ有意な正相関が認められた

($p=0.046$)。なお、魚摂取とK-ABCの獲得点には低収入群、高収入群とも関連は認めなかった。

Table6にPCBs・ダイオキシン類濃度の影

響についてK-ABCの認知処理得点、習得度得点を従属変数とした重回帰分析の結果を示した。Model 1では、K-ABC得点に影響する要因として母親年齢、児の性別、在胎日数、初産か否か、母親毛髪水銀量、年収(年収別重回帰分析では除外)、母親WAIS-R短縮版得点、産後1か月うつを投入した。Model 2では曝露物質に影響する要因として、出産順(第1子=0)、喫煙状況、採血時期(妊娠中採血=0)、近海魚摂取頻度または遠洋魚摂取頻度(PCDD, PCDF, Dioxineは近海魚, 他は遠洋魚)を投入した。Model 3では母親毛髪水銀で調整した。その結果、認知処理尺度得点では、有意な関連は認められなかったが、習得度得点においてすべての物質で、調整後も物質濃度が高いほど得点を上げる結果となった。年収で層別して解析した結果(Table7)、低収入群では解析対象者全員で認められた有意な影響は認められず、Total PCDFがcrudeで有意であったが、Model 1で関連は消失した。高収入群ではPCDDダイオキシンの濃度が高いほど習得度得点の成績がよかったが、他のダイオキシン類の影響は有意でなくなった ($p=0.029$)。

D. 考察

PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露は、6ヶ月時点の神経行動でPCDFs, PCBs異性体で、特に男児において顕著に表れていたが(Nakajima et al, 2006)、臍帯血PCBs曝露と2歳4歳の認知能には関連しない(Forns et al, 2012)、PCBs低濃度曝露では2歳児の精神運動発達への影響はない

(Lynch, 2012)との報告がある。本研究では、認知能をK-ABCの認知処理得点、習得度得点を用いて検討した結果、認知処理得点には有意な関連は認められず、習得度得点に対して一見、PCBs・ダイオキシン類曝露濃度が高いほど、得点が高いさらに関連を示した。しかし、母親の年齢が高いほど、収入が高く、曝露濃度も高いことから、年

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

収で層別化して解析した結果、K-ABC 得点を有意にあげた要因は、母親の年齢と母親の WAIS-R 短縮版得点、養育環境得点のみであった。すなわち養育環境が良いほど認知処理得点が高く、さらに母親の知能が高いと認知処理得点、習得度得点とも高かった。一方高収入群では、K-ABC の得点との関連は認められなかった。

多変量解析で、K-ABC 得点に関連する交絡要因で調整した結果、crude で認められた関連が消失し、唯一 Total PCDD のみ、高収入群で影響が残ったが、回帰係数は減少した。胎児期の PCBs・ダイオキシン類曝露は、K-ABC の認知処理得点を上げるとは考えづらいので、最も認知処理得点を上げる方向で関連が強かった年収で層別化し、ダイオキシンの影響を検討したところ、年収 500 万円未満の群の曝露影響は消失した。しかし年収 500 万円以上の群で、Total PCDD 濃度が高いほど習得度得点が高かった（ $B=36.1$; $p=0.029$ ）。この結果は K-ABC の習得度得点は、子供が生後、環境から獲得した知識や能力を指しており、生後早期（生後 6 か月の Bayley テスト時点）に認められた胎児期曝露によるダイオキシン類の負の影響が、42 か月の調査では収入や養育環境など出生後環境要因の影響により見えづらくなったと考えられた。しかし年収の高い群ではむしろダイオキシン類濃度が高いほど KABC 得点をあげた原因としては、収入が高いほどダイオキシン類濃度が高く、一方、認知処理得点は、年収が多いほど、母親の WAIS-R 短縮版得点が高いほど、養育環境得点が高いほど高い成績を示したので、ダイオキシン類の濃度が高い者ほど、母親の知能が高い、胎児期に神経発達にとって栄養的に有利な条件があったなど幾つかの重要な交絡要因が未だ絡んだまま、交絡が取り切れていない可能性がある。

K-ABC の習得度は、情報を処理して新しい課題を解決する認知処理能力をもとに、子供が環境から獲得した知識や技能を指す。すなわち、経済社会的要因を背景に、生後の養育環境が、妊娠中の曝露より習得度得点に寄与すると考えられる。Ornoy は、発達問題(障害)のハイリスクを持つ子供は、環境が子ども達の知的能力に強く影響するものの、運動スキルや注意範囲には影響せず、両親の恵まれた社会経済的環境のほうが有利に作用する可能性を示唆している（2003）。PCBs・ダイオキシン類曝露の神経発達への影響については、Sietske らが最近 10 年間の研究を概観した結果、負の影響、正の影響など一致していないと報告されている。その原因として、幅広い神経発達機能の評価指標が評価時期や評価する機能により異なるため、結果の比較が難しいこと、神経発達には化学物質だけでなく社会経済的要因や遺伝的素因も影響していること、性差や研究対象の曝露濃度の違いなどをあげている。

本研究の限界をあげると、解析対象者が、すなわち K-ABC 検査を完了できた集団は、K-ABC 検査未実施者より、PCBs・ダイオキシン類濃度が高く、年収や母親の教育歴が高い傾向があり、非喫煙または禁煙率の高い集団であったため、喫煙群や年収が低い群は、検査をより少ない人数しか受けていない。またより貧困な年収 300 万未満は解析人数が少なく、解析することができなかった。従って今回の結果は、年収が低い群については影響を過小評価する可能性があり、人数を増加して検討する必要がある。今後、いわゆる問題行動（Child Behavior Checklist; CBCL）については、解析対象が 325 人と、今回の解析 151 人の倍になるため、年収が低い階層も含めることができる。サンプルサイズも大きく検討を進める予定

である。

E．結論

胎児期の PCBs・ダイオキシン類の胎児期曝露による 42 か月児の認知発達への影響を、K-ABC を用いて検討した結果、認知処理得点との関連は認められなかった。習得度得点には、曝露濃度が高いほど得点が高まる影響が見られたが、母の年齢や曝露物質と強く関連がある年収で層別化した結果、年収 500 万円未満の群では有意差が消失した。年収 500 万円以上の群でも Total PCDD 以外で関連は消失した。胎児期の PCBs・ダイオキシン類曝露より、認知能の発達には社会経済要因や出生後の環境要因のほうの影響する可能性が示唆された。

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

1. 池野多美子¹、小西香苗²、中島そのみ³、喜多歳子¹、小林澄貴⁴、馬場俊明⁴、岸玲子。胎児期ダイオキシン類曝露が 3 歳半の発達に及ぼす影響 「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」。第 23 回日本疫学会学術総会。大阪府。2013.1.25.-1.26.

参考文献

- 1) Vregdenhil HJ, et al. Effects on perinatal exposure to PCB and dioxin on play behavior in Dutch children school age. *Environ Health Perspect.*;110:A593-A598. 2002.
- 2) Walkowak J ,et al. Environmental

exposure to polychlorinated biphenyls and quality of the home environment: effects on psycho development in early childhood. *Lancet.* 358:1602-1607. 2001.

- 3) Nakajima S, et al. Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at 6 months of age. *Environ Health Perspect.* 114:773-778. 2006.
- 4) Tatsuta N, et al. Prenatal exposures to environmental chemicals and birth order as risk factors for child behavior problems. *Environ Research.* 114:47-52.2012
- 5) Joan Forn, et al. Prenatal exposure to organochlorine compounds and neuropsychological development up to two years of life. *Environment International.* 45:72-77.2012
- 6) Joan Forn, , et al. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and child neuropsychological development in 4-year-olds: An analysis per congener and specific cognitive domain. *Science of the Total Environment.* 432:338-343.2012
- 7) Lynch CD, Jackson LW, Kostyniak PJ, McGuinness BM, Buck Louis GM. 2012. The effect of prenatal and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls and child neurodevelopment at age twenty for months. *Reprod Toxicol.* 34(3):451-456.2012
- 8) Sietske A. Berghuis, Arend F. Bos, Pieter J.J.Sauer, Elise Roze. 2015. Developmental neurotoxicity of persistent organic pollutants: an update on childhood outcome. *Arch Toxicol.* Published on line.
- 9) A.Ornoy. 2003. The impact 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

intrauterine exposure versus
postnatal environment in
neurodevelopmental toxicity:
long-term neurobehavioral studies in

children at risk for developmental
disorders. *Toxicology Letters*.
140-141.

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

	N	Mean	Min	Percentile			Max
				25th	50th	75th	
				Total PCDD-TEQ(05)	422	7.25	
Total PCDF-TEQ(05)	422	2.55	0.64	1.79	2.38	3.04	7.77
Total Non-ortho PCBs-TEQ(05)	422	4.53	0.65	2.62	4.20	5.83	17.37
Total Mono-ortho PCBs-TEQ(05)	422	0.37	0.05	0.23	0.33	0.46	1.09
Total Dioxin-TEQ(05)	422	14.70	3.17	9.90	13.86	18.08	43.35

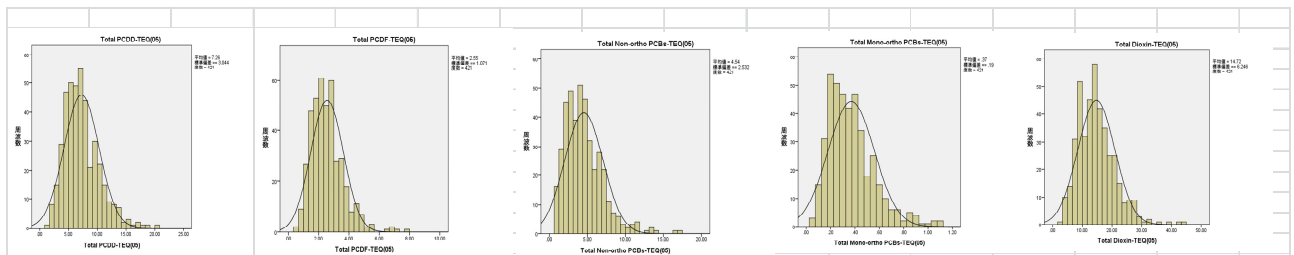


Figure1 解析対象者のPCBs・ダイオキシン類の濃度分布 (N=147)

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 K-ABC検査未実施者と解析対象者の母児属性の比較

	K-ABC検査未実施者 ¹⁾			解析対象者 ²⁾			p3)
	N	Mean± SD / Mean(Min-Max)	n (%)	N	Mean± SD / Mean(Min-Max)	n (%)	
Maternal characteristic							
Age (years)	355	30.4 ± 4.9		151	31.7 ± 4.7		0.01*
Delivery order	355			151			0.242
			first child			76 (50.3)	
			second child over			75 (49.7)	
Annual income	352			151			0.001**
			under 3,000,000			18 (11.9)	
			3,000,000~5,000,000			68 (45.0)	
			5,000,000~70,000,000			38 (25.2)	
			7,000,000 ~ 10,000,000			23 (15.2)	
			7,000,000 over			4 (2.6)	
Educational level	355			151			0.005**
			9 years			1 (0.7)	
			10-12years			51 (33.8)	
			13-16 years			94 (62.3)	
			17 years-			5 (3.3)	
WAIS-R short-version score	22	20.7 ± 3.8		137	21.0 ± 4.1		0.830
Working after delivery	196			147			0.465
			no			87 (57.6)	
			temporary working			6 (4.0)	
			working			54 (35.8)	
Fish intake during pregnancy				151			0.207
Inshore fish	354						
			never			5 (3.3)	
			1~2 times/month			86 (57.0)	
			1~2 times/week			54 (35.8)	
			3~4 times/week			6 (4.0)	
			almost everyday			0 (0.0)	
Deep-sea fish	355			151			0.214
			never			4 (2.6)	
			1~2 times/month			66 (43.7)	
			1~2 times/week			77 (51.0)	
			3~4 times/week			4 (2.6)	
			almost everyday			0 (0.0)	
Caffeine in take during pregnancy (mg/day)	361	152.0 ± 127.1		151	132.6 ± 86.6		0.312
Alcohol intake during pregnancy (mg/day)	361	1.9 ± 11.3		151	1.0 ± 2.5		0.882
Blood cotinin before pregnancy (ng/ml)	334	24.7 ± 65.8		151	10.9 ± 39.6		0.011*
Smoking in during pregnancy	355			151			0.003**
			never			75 (49.7)	
			quit before noticing pregnant			30 (19.9)	
			quit after pregnant			33 (21.9)	
			Smoking			13 (8.6)	
Child Characteristic							
Sex	351			151			0.497
			male			72 (47.7)	
			female			79 (52.3)	
Gestational age (weeks)	351	39.0(31.0-41.0)		151	39.0(31.0-41.0)		0.813
Birthweight (g)	351	3050.0(794.0-4292.0)		151	3088.0(1700.0-4138.0)		0.135
Birthlength (cm)	351	48.0(33.0-53.0)		151	48.2(40.5-52.8)		0.490
Birth chest (cm)	351	31.5(17.5-36.5)		151	31.5(26.5-36.0)		0.395
Hed circumference (cm)	351	33.0(23.5-37.0)		151	33.5(28.0-36.5)		0.258
Nursary Environment							
Family member	354	3.0(1.0-7.0)		151	3.0(2.0-7.0)		0.673
Index of Child Care Environment	196	27.0(17.0-34.0)		147	27.0(18.0-34.0)		0.598
Duration of breastfeeding(mnoths)	126	13.8(0.0-42.0)		100	13.0(0.0-37.0)		0.633
Mother's Depression after 1M of delivery	296	3.0(0.0-23.0)		146	3.0(0.0-26.0)		0.504
Attend to kindergarten at 42 month of age	184			143			0.150
			No			62 (0.4)	
			Yes			81 (0.5)	
K-ABC at 42 month of age							
Mental processing scale	—			151	103.2 ± 12.8		—
Achievement scale	—			151	99.9 ± 14.0		—
The level of PCBs/Dioxines							
Total PCDD-TEQ(05)	274	6.97(1.65-18.48)		147	7.73(1.69-20.81)		0.020*
Total PCDF-TEQ(05)	274	2.42(0.64-7.06)		147	2.76(0.80-7.77)		0.004**
Total Non-ortho PCBs-TEQ(05)	274	4.14(0.65-17.37)		147	5.16(0.65-16.75)		0.000***
Total Mono-ortho PCBs-TEQ(05)	274	0.35(0.05-1.7)		147	0.39(0.05-1.09)		0.046*
Total Dioxin-TEQ(05)	274	13.88(3.17-43.35)		147	16.04(3.35-42.93)		0.001**

1) K-ABCを実施していない、もしくは完了できなかったがPCBs・ダイオキシン類を測定済

2) K-ABC完了かつPCBs・ダイオキシン類濃度を測定

3) ²検定またはMan-Whitney検定

*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

Table3 解析対象者(n=151)を世帯年収で層別化した母児の属性の比較

	Annual income <5,000,000			Annual income 5,000,000			p ¹⁾ p3)
	N	Mean± SD / Mean(Min-Max)	n (%)	N	Mean± SD / Mean(Min-Max)	n (%)	
Maternal characteristic							
Age (years)	86	30.3 ± 4.2		65	33.4 ± 4.7		0.000**
Delivery order	86			65			
first child			49 (57.0)			27 (41.5)	0.043*
second child over			37 (43.0)			38 (58.5)	
Educational level	86			65			
9 years			1 (1.2)			0 (0.0)	0.064
10-12years			35 (40.7)			16 (24.6)	
13-16 years			49 (57.0)			45 (69.2)	
17 years-			1 (1.2)			4 (6.2)	
WAIS-R short-version score	75	20.1 ± 4.0		62	22.1 ± 4.0		0.004**
Working after delivery	86			62			
no			53 (61.6)			34 (54.8)	0.516
tenporary working			4 (4.7)			2 (3.2)	
working			28 (32.6)			26 (41.9)	
Fish intake during pregnancy							
Inshore fish	86			65			
never			3 (3.5)			2 (3.1)	0.426
1~2 times/month			44 (51.2)			42 (64.6)	
1~2 times/week			35 (40.7)			19 (29.2)	
3~4 times/week			4 (4.7)			2 (3.1)	
Deep-sea fish	86			65			
never			4 (4.7)			0 (0.0)	0.247
1~2 times/month			34 (39.5)			32 (49.2)	
1~2 times/week			46 (53.5)			31 (47.7)	
3~4 times/week			2 (2.3)			2 (3.1)	
Caffeine in take during pregnancy (mg)	86	132.2 ± 84.6		65	133.3 ± 89.8		0.952
Alchool intake during pregnancy (mg/d)	86	1.0 ± 2.5		65	0.9 ± 2.5		0.842
Blood cotinin before pregnancy (ng/ml)	86	14.7 ± 49.7		65	5.7 ± 17.0		0.386
Smoking in during pregnancy	86			65			
never			36 (41.9)			39 (60.0)	0.015*
quit before noticing pregnant			15 (17.4)			15 (23.1)	
quit after pregnant			24 (27.9)			9 (13.8)	
Smoking			11 (12.8)			2 (3.1)	
Child Characteristic							
Sex	86			65			
male			40 (46.5)			32 (49.2)	0.745
female			46 (53.5)			33 (50.8)	
Gestational age (weeks)	86	39.0(35.0-41.0)		65	39.0(31.0-41.0)		0.398
Birthweight (g)	86	3095.0(2112.0-4138.0)		65	3078.0(1700.0-3916.0)		0.924
Birthlength (cm)	86	48.2(42.5-52.0)		65	48.2(40.5-52.8)		0.718
Birth chest (cm)	86	31.5(27.0-36.0)		65	31.5(26.5-35.0)		0.659
Hed circumference (cm)	86	33.5(30.5-36.0)		65	33.5(28.0-36.5)		0.434
Nursary Environment							
Family member	86	2.0(2.0-7.0)		65	3.0(2.0-7.0)		0.001**
Index of Child Care Environment	84	26.5(18.0-34.0)		65	28.0(18.0-34.0)		0.048*
Duration of breastfeeding(mnoths)	60	13.0(3.0-37.0)		40	13.0(0.0-30.0)		0.714
Mother's Depression after 1M of deliver	82	3.0(0.0-13.0)		64	2.0(0.0-26.0)		0.134
Attend to kindergarden at 42 month of :	82			61			
No			39 (45.3)			23 (35.4)	0.317
Yes			42 (48.8)			38 (58.5)	
K-ABC at 42 month of age							
Mental processing sacle	86	101.0 ± 13.2		65	106.1 ± 11.6		0.014*
Achievement scale	86	97.1 ± 12.7		65	103.5 ± 15.0		0.015*
The level of PCBs/Dioxines							
Total PCDD-TEQ(05)	83	7.34(3.16-17.32)		64	8.30(1.69-20.81)		0.033*
Total PCDF-TEQ(05)	83	2.61(0.95-7.77)		64	3.00(0.80-6.99)		0.023*
Total Non-ortho PCBs-TEQ(05)	83	4.89(0.65-16.75)		64	5.68(0.65-13.18)		0.053
Total Mono-ortho PCBs-TEQ(05)	83	0.37(0.05-1.09)		64	0.43(0.10-0.92)		0.055
Total Dioxin-TEQ(05)	83	15.20(4.81-42.93)		64	17.42(3.35-39.64)		0.021*

1) 年収2群間の比較は、2検定または、Man-Whitney検定、Kruscal-Wallis検定

*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

Table4 児のK-ABC scoresと関連する要因			(N=151)	
	Mental processing scale		Achievement scale	
	Mean±SD, r ¹⁾	P	Mean±SD, r ¹⁾	P
Maternal characteristic				
Age (years)	r=-0.106	0.196	r=0.155	0.058
Delivery order				
first child	103.1±12.1	0.842	99.8±13.9	0.963
second child over	103.3±13.4		99.9±14.3	
Annual income				
under 5,000,000	101.5±13.6	0.014*	97.1±12.7	0.015*
5,000,000 over	106.1±11.6		103.5±15.0	
Educational level				
~ 12years	103.3±12.4	0.911	98.9±14.9	0.526
13years ~	103.1±13.0		100.4±13.6	
WAIS-R short-version score	r=0.341	0.000***	r=0.190	0.026*
Fish intake during pregnancy				
Inshore fish				
0 ~ 2 times/month	103.8±12.7	0.646	99.7±13.9	0.783
1time over/week	102.3±12.9		100.1±14.3	
Deep-sea fish				
0 ~ 2 times/month	103.3±13.4	0.942	100.5±14.9	0.709
1time over/week	103.1±12.3		99.3±13.4	
Alcohol intake during pregnancy (mg/day)	r=-0.008	0.924	r=0.020	0.809
Blood cotinin before pregnancy (ng/ml)	r=-0.014	0.870	r=-0.104	0.211
Smoking in during pregnancy				
never	102.8±13.1	0.827	102.0±13.7	0.046*
quit or smoking	103.6±12.5		97.7±14.2	
Child Characteristic				
Gestational age (weeks)	r=0.097	0.237	r=0.027	0.740
gender				
male	104.0±12.8	0.656	99.0±14.5	0.357
female	102.4±12.7		100.7±13.7	
Birthweight (g)	r=0.069	0.401	r=0.011	0.891
Birthlength (cm)	r=0.150	0.066	r=0.039	0.635
Birth chest (cm)	r=-0.018	0.83	r=-0.048	0.555
Hed circumference (cm)	r=-0.033	0.689	r=-0.117	0.154
Nursary Environment				
Index of Child Care Environment	r=0.194	0.019*	r=0.186	0.029*
Duration of breastfeeding(months)	r=-0.022	0.831	r=-0.069	0.498
Mother's Depression after 1M of delivery	r=0.067	0.424	r=0.105	0.205
Attend to kindergarden				
No	103.3±11.2	0.294	100.7±15.0	0.402
Yes	103.3±13.6		99.4±13.0	
The level of PCBs/Dioxines				
Total PCDD-TEQ(05)	r=0.014	0.869	r=0.292	0.000***
Total PCDF-TEQ(05)	r=0.032	0.697	r=0.287	0.000***
Total Non-ortho PCBs-TEQ(05)	r=-0.031	0.707	r=0.205	0.013*
Total Mono-ortho PCBs-TEQ(05)	r=-0.012	0.888	r=0.250	0.002**
Total Dioxin-TEQ(05)	r=-0.011	0.891	r=0.273	0.001**
1) r=Spearman Correlation				
2) p: 連続変数はSpearmanの相関係数を、カテゴリー間の検定にはMan-Whitney検定またはKruscal-Wallis検定を用いた				
Mental processing scale: 認知処理得点、Achievement scale: 習得度得点				
*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

Table5 児のK-ABC scoresと関連する要因：年収層別化								
	Mental processing scale				Achievement scale			
	Income <5,000,000 (N=86)		Income 5,000,000> (N=65)		Income <5,000,000 (N=86)		Income 5,000,000> (N=65)	
	Mean±SD, r ¹⁾	P	Mean±SD, r ¹⁾	P	Mean±SD, r ¹⁾	P	Mean±SD, r ¹⁾	P
Maternal characteristic								
Age (years)	r=-0.383	0.000***	r=0.069	0.583	r=0.098	0.432	r=0.140	0.265
Delivery order								
first child	100.8±12.9	0.882	107.1±9.5	0.501	96.1±12.4	0.432	106.6±14.1	0.162
second child over	101.2±13.7		105.3±13.0		98.5±13.2		101.3±15.4	
Annual income								
under 5,000,000								
5,000,000 over								
Educational level								
~ 12years	100.6±12.7	0.661	109.6±9.3	0.113	95.2±13.5	0.192	107.4±14.8	0.187
13years ~	101.3±13.7		104.9±12.1		98.6±12.0		102.2±15.0	
WAIS-R short-version score	r=0.332	0.004**	r=0.241	0.059	r=0.270	0.019*	r=0.001	0.997
Fish intake during pregnancy								
Inshore fish								
0 ~ 2 times/month	101.5±13.2	0.805	106.3±11.8	0.938	97.1±12.4	0.883	102.5±15.1	0.465
1time over/week	100.4±13.4		105.7±11.6		97.2±13.2		105.6±15.0	
Deep-sea fish								
0 ~ 2 times/month	102.0±13.8	0.514	104.8±12.9	0.434	98.1±12.5	0.548	103.5±17.1	0.803
1time over/week	100.2±12.8		107.3±10.3		96.4±13.0		103.5±12.9	
Alcohol intake during pregnancy (mg/day)	r=-0.005	0.966	r=-0.028	0.824	r=-0.013	0.907	r=0.051	0.686
Blood cotinin before pregnancy (ng/ml)	r=-0.015	0.888	r=0.018	0.891	r=-0.075	0.49	r=-0.114	0.378
Smoking in during pregnancy								
never	99.2±14.3	0.393	106.1±11.1	0.909	98.5±11.7	0.281	105.3±14.6	0.210
quit or smoking	102.3±12.3		106.1±12.6		96.2±13.4		100.7±15.4	
Child Characteristic								
Gestational age (weeks)	r=0.164	0.132	r=0.061	0.627	r=-0.096	0.379	r=0.224	0.073
gender								
male	102.9±13.8	0.374	105.5±11.5	0.599	97.4±14.2	0.962	100.9±14.7	0.108
female	99.4±12.6		106.7±11.9		96.9±11.4		106.0±15.0	
Birthweight (g)	r=0.121	0.266	r=0.044	0.728	r=-0.078	0.474	r=0.133	0.289
Birthlength (cm)	r=0.139	0.203	r=0.174	0.165	r=-0.113	0.3	r=0.190	0.129
Birth chest (cm)	r=-0.023	0.835	r=0.014	0.914	r=-0.092	0.398	r=0.004	0.977
Hed circumference (cm)	r=-0.002	0.986	r=-0.027	0.829	r=-0.132	0.225	r=-0.054	0.671
Nursary Environment								
Index of Child Care Environment	r=0.216	0.048*	r=0.034	0.789	r=0.143	0.194	r=0.143	0.265
Duration of breastfeeding(months)	r=-0.069	0.598	r=0.104	0.525	r=-0.184	0.16	r=0.104	0.524
Mother's Depression after 1M of delivery	r=0.171	0.125	r=0.018	0.886	r=0.091	0.417	r=0.175	0.166
Attend to kindergarden								
No	102.9±11.0	0.171	103.9±11.6	0.470	98.3±13.4	0.467	104.7±17.1	0.566
Yes	99.8±14.9		107.0±11.0		97.3±12.4		101.6±13.5	
The level of PCBs/Dioxines								
Total PCDD-TEQ(05)	r=-0.053	0.631	r=0.017	0.893	r=0.286	0.009**	r=0.251	0.046*
Total PCDF-TEQ(05)	r=-0.058	0.604	r=0.056	0.663	r=0.305	0.005**	r=0.194	0.124
Total Non-ortho PCBs-TEQ(05)	r=-0.126	0.258	r=0.050	0.685	r=0.200	0.070	r=0.159	0.210
Total Mono-ortho PCBs-TEQ(05)	r=-0.086	0.442	r=0.016	0.902	r=0.272	0.013*	r=0.163	0.199
Total Dioxin-TEQ(05)	r=-0.118	0.288	r=0.059	0.645	r=0.264	0.016*	r=0.214	0.089
1) r=Spearman Correlation								
2) p: 連続変数はSpearmanの相関係数を、カテゴリー間の検定にはMan-Whitney検定またはKruscal-Wallis検定を用いた								
Mental processing scale: 認知処理得点、Achievement scale: 習得度得点								
*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

Table6 児のK-ABC scoreと母体血中PCBs・ダイオキシン類の関連		(N=109)							
		Mental processing scale				Achievement scale			
		B	95%CI		p	B	95%CI		p
PCDD log	crude	1.771	-11.334	14.876	0.789	24.312	9.964	38.660	0.001***
	Model ¹⁾	3.098	-10.271	16.467	0.647	21.771	6.660	36.881	0.005**
	Model ²⁾	7.049	-8.095	22.193	0.358	26.483	9.263	43.704	0.003**
	Model ³⁾	7.111	-8.137	22.358	0.357	26.033	8.768	43.298	0.004**
PCDF log	crude	1.117	-12.417	14.652	0.870	23.773	8.877	38.669	0.002**
	Model ¹⁾	2.301	-11.972	16.574	0.750	20.824	4.573	37.076	0.013*
	Model ²⁾	6.893	-9.000	22.787	0.391	25.505	7.308	43.703	0.006**
	Model ³⁾	7.067	-9.012	23.147	0.385	24.700	6.342	43.058	0.009**
NPCB log	crude	0.786	-8.297	9.870	0.864	14.915	4.859	24.971	0.004**
	Model ¹⁾	2.374	-7.137	11.886	0.622	12.285	1.373	23.197	0.028*
	Model ²⁾	3.044	-7.697	13.784	0.575	15.822	3.517	28.126	0.012*
	Model ³⁾	3.446	-7.634	14.526	0.538	14.911	2.237	27.584	0.022*
MPCB log	crude	-1.551	-12.119	9.016	0.772	17.221	5.512	28.931	0.004**
	Model ¹⁾	1.959	-9.685	13.604	0.739	15.035	1.685	28.385	0.028*
	Model ²⁾	2.589	-10.124	15.302	0.687	17.746	3.145	32.348	0.018*
	Model ³⁾	2.936	-10.097	15.969	0.656	16.668	1.734	31.602	0.029*
Dioxin log	crude	0.759	-12.088	13.606	0.907	23.776	9.711	37.841	0.001**
	Model ¹⁾	3.127	-10.415	16.670	0.648	21.458	6.118	36.798	0.007**
	Model ²⁾	6.596	-8.844	22.036	0.399	26.552	8.980	44.123	0.003**
	Model ³⁾	6.942	-8.828	22.712	0.384	25.654	7.731	43.577	0.005**
1)Model1:crude+母親出産時年齢、児の性別、年収、HOME、母親WAIS-R短縮版得点、産後鬱1M									
2)Model2:Model1 + 出産順(第1子=0)、喫煙状況、採血時期、近海魚摂取頻度または遠洋魚摂取頻度（PCDD、PCDF、Dioxineは近海魚、他は遠洋海魚）									
3)Model3:Model2+母親毛髪水銀log									
*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

		Table7 児のK-ABC scoreと母体血中PCBs・ダイオキシン類の関連：年収層別化											
		Mental processing scale						Achievement scale					
		Income <5,000,000 (N=60)			Income 5,000,000 > (N=49)			Income <5,000,000 (N=60)			Income 5,000,000 > (N=49)		
	B	95%CI	p	B	95%CI	p	B	95%CI	p	B	95%CI	p	
PCDD log	crude	-8.128	-28.433 ; 12.178	0.426	6.376	-9.869 ; 22.622	0.434	14.419	-4.583 ; 33.422	0.134	28.682	6.865 ; 50.498	0.011*
	Model ¹⁾	-7.196	-26.826 ; 12.434	0.465	11.183	-6.741 ; 29.107	0.215	9.696	-9.973 ; 29.366	0.327	34.444	11.493 ; 57.394	0.004**
	Model ²⁾	-5.373	-26.740 ; 15.995	0.616	12.114	-13.075 ; 37.304	0.336	13.306	-8.366 ; 34.978	0.223	36.818	4.851 ; 68.786	0.025*
	Model ³⁾	-4.806	-26.080 ; 16.468	0.652	11.113	-13.718 ; 35.944	0.370	13.046	-8.811 ; 34.903	0.236	36.143	3.939 ; 68.347	0.029*
PCDF log	crude	-6.914	-27.667 ; 13.839	0.507	2.663	-14.656 ; 19.981	0.758	19.818	0.746 ; 38.890	0.042*	21.280	-2.710 ; 45.270	0.081
	Model ¹⁾	-6.343	-26.634 ; 13.949	0.533	8.751	-11.065 ; 28.567	0.378	15.191	-4.868 ; 35.249	0.135	24.844	-1.807 ; 51.496	0.067
	Model ²⁾	-2.855	-25.251 ; 19.541	0.799	7.933	-17.778 ; 33.645	0.536	22.241	0.123 ; 44.358	0.049*	15.742	-18.505 ; 49.989	0.358
	Model ³⁾	-1.411	-23.810 ; 20.988	0.900	5.819	-19.675 ; 31.313	0.646	21.755	-0.683 ; 44.192	0.057	14.270	-20.419 ; 48.960	0.410
NPCB log	crude	-4.765	-17.182 ; 7.652	0.446	4.347	-9.055 ; 17.749	0.517	10.617	-0.893 ; 22.127	0.070	16.279	-2.369 ; 34.928	0.086
	Model ¹⁾	-4.304	-16.729 ; 8.122	0.490	9.645	-6.483 ; 25.773	0.234	7.224	-5.175 ; 19.623	0.248	14.748	-7.544 ; 37.041	0.189
	Model ²⁾	-2.586	-16.793 ; 11.620	0.716	5.826	-13.788 ; 25.440	0.551	12.529	-1.518 ; 26.576	0.079	15.005	-11.909 ; 41.920	0.266
	Model ³⁾	-0.215	-14.900 ; 14.470	0.977	3.913	-15.706 ; 23.531	0.688	12.083	-2.649 ; 26.816	0.106	13.462	-13.899 ; 40.822	0.325
MPCB log	crude	-6.274	-21.349 ; 8.801	0.408	-1.030	-15.659 ; 13.600	0.888	13.170	-0.799 ; 27.139	0.064	16.883	-3.446 ; 37.211	0.101
	Model ¹⁾	-3.096	-19.483 ; 13.291	0.706	4.028	-13.755 ; 21.811	0.650	10.204	-6.064 ; 26.472	0.214	14.070	-10.272 ; 38.412	0.250
	Model ²⁾	0.263	-17.949 ; 18.475	0.977	-0.661	-20.675 ; 19.354	0.947	16.176	-1.797 ; 34.149	0.077	10.966	-16.590 ; 38.522	0.425
	Model ³⁾	2.529	-15.907 ; 20.965	0.784	-3.533	-23.648 ; 16.581	0.724	15.545	-2.940 ; 34.029	0.097	8.796	-19.464 ; 37.057	0.532
Dioxin log	crude	-9.385	-28.720 ; 9.950	0.335	5.536	-10.996 ; 22.067	0.504	16.097	-1.911 ; 34.105	0.079	25.990	3.495 ; 48.486	0.024*
	Model ¹⁾	-7.984	-27.126 ; 11.158	0.407	11.727	-7.320 ; 30.775	0.221	11.400	-7.729 ; 30.529	0.237	29.196	3.871 ; 54.522	0.025*
	Model ²⁾	-6.030	-27.770 ; 15.710	0.580	11.847	-13.554 ; 37.248	0.351	17.728	-4.089 ; 39.544	0.109	26.328	-7.008 ; 59.664	0.118
	Model ³⁾	-3.408	-25.522 ; 18.707	0.758	9.573	-15.690 ; 34.835	0.447	17.058	-5.436 ; 39.551	0.134	24.889	-8.981 ; 58.759	0.145

1)Model1:crude+母親出産時年齢、児の性別、HOME、母親WAIS-R短縮版得点、産後鬱1 M.
2)Model2:Model1 + 出産順(第1子=0)、喫煙状況、採血時期、近海魚摂取頻度または遠洋魚摂取頻度 (PCDD、PCDF、Dioxineは近海魚、他は遠洋海魚)
3)Model3:Model2+母親毛髪水銀log
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

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。

A．研究目的

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）

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 Engl J Med 355:2226-2235.

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

- 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

有機塩素系農薬の胎児期曝露が生後の免疫に与える影響

研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 池野 多美子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 松村 徹 いであ株式会社環境創造研究所 取締役・環境創造研究所副所長
研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授

研究要旨

有機塩素系農薬は内分泌攪乱作用が懸念され、免疫グロブリンやIgEを増加させると報告された。本研究の目的は有機塩素系農薬の胎児期曝露が生後早期の免疫に与える影響を明らかにすることである。2002-5年に札幌市の一産院で妊婦514名をリクルートした。379名の母体血中の有機塩素系農薬29種類を、ガスクロマトグラフ/負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により一斉分析した（いであ(株)環境創造研究所）。母体血中農薬濃度と臍帯血中IgE、生後18か月児のアレルギー・感染症の発症リスクとの関連を、母の年齢、妊娠前BMI、教育レベル、出産歴、両親アレルギー歴、児の性別、児の母乳栄養期間、児の受動喫煙、集団保育、農薬の採血時期、および農薬の測定年で調整した多変量回帰分析で検討した。農薬29種類のうち、15種類が検出率80%であった。母体血中の農薬により臍帯血IgEが増加した（B(95%CI) : o,p'-DDT = 0.29 (0.01, 0.56), Dieldrin = 0.44 (0.02, 0.86)）。また、18か月の感染症リスクが低下した（OR (95%CI): o,p'-DDE = 0.60 (0.39, 0.93)）。しかしアレルギーリスクとの関連は認められなかった。有機塩素系農薬の胎児期曝露は生後早期の免疫バイオマーカーを変動させる報告および感染症リスクを低下させる報告と一致した。さらに、先行研究は有機塩素系農薬の胎児期曝露が幼児期以降の小児および成人のアレルギーリスクを増加させる可能性を示唆しており、今後、免疫機能が発達しアレルギー症状の診断が明確になる小児以降も追跡調査する。

研究協力者

金澤 文子, 小林 澄貴, 小林 祥子
（北海道大学環境健康科学研究教育センター）
水谷 太, 菅木 洋一
（いであ株式会社環境創造研究所）

A. 研究目的

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）。難分解性の有機塩素系農薬は内分泌攪乱作用による環境や生体への悪影響に対する懸念から、1970年代に日本を含む多くの国での使用が禁止された（Gascon et al., 2014; Mostafalou and Abdollah et al., 2013）。2004年に発効された残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約（Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: POPs条約）の対象物質のうちジクロロジフェニルトリクロロエタン、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、クロルデン、ヘプタクロル、およ

び国内で農薬登録実績はないが海外で殺虫剤として使用されたマイレックス，トキサフェン，工業用に使用されたヘキサクロロシクロヘキサンの9物質については，現在，日本で販売及び使用が禁止されている(Kanazawa et al., 2012; Vijgen et al., 2011)。しかし一方で日本を含む世界各国でヒトの脂肪組織，血液，母乳瞬帯血から有機塩素系農薬は検出されている(El-Shahawi et al., 2010; Miyake et al., 2011)。これまで日本国内で使用実績のない Mirex, Toxaphene が河川土壌等の環境試料中から広範囲に検出され，その土地由来ではない遠距離飛散による汚染の可能性が示唆された(環境省 2006)。有機塩素系農薬の胎児曝露により臍帯血中の免疫グロブリンや IgE を増加させることが報告されているが，小児アレルギー発症リスクへの影響は一致した結果が得られていない(Gascon et al., 2014)。本研究の目的は有機塩素系農薬の胎児期曝露が生後早期の免疫に与える影響を明らかにすることである。

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。分娩時に臍帯血を採取し ELAISA 法で268名の臍帯血血清中総 IgE を測定した(株式会社 SRL)。生後18か月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18か月の食物アレルギー，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379名の母体血を用いて，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-Heptachlorepoxyde, cis-Heptachlorepoxyde)，ヘキサクロロシクロヘキサン(Hexachlorocyclohexane)類4異性体(-HCH, -HCH, -HCH, -HCH)，マイレックス(Mirex)，トキサフェン(Toxaphene)6物質(Parlar-26, 41, 40, 44, 50, 62)およびヘキサクロロベンゼン(Hexachlorobenzene: HCB)の合計29種類の有機塩素系農薬について，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(いであ(株)環境創造研究所)。母体血中農薬濃度(常用対数)と臍帯血中 IgE (常用対数)，生後18か月児のアレルギー・感染症の発症リスクとの関連を，母の年齢，妊娠前 BMI，教育レベル(12年未満，以上)，出産歴(なし，あり)，両親アレルギー歴(なし，あり)，児の性別，児の母乳栄養期間(4カ月未満，以上)，児の受動喫煙(18か月でなし，あり)，集団保育(18か月でなし，あり)，自宅から幹線道路までの距離(100m 未満，以上)，母体血の採血時期(出産前，出産後)，および農薬の測定年で調整した多変量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。母親の出産時年齢は 30.9 ± 4.8 (平均値 \pm SD), 非妊娠時 BMI 21.4 ± 3.3 (平均値 \pm SD), 初産婦 47%, 児の性別の割合は男児 47%, 女児 53%であった。有機塩素系農薬 29 種類の母体血中濃度分布, 検出下限値, 検出率を表2に示す。全ての環境化学物質の濃度は非正規分布を示した。農薬 29 種類のうち検出率 80%であった 15 種類を解析に用いた。農薬と属性との関連を表 3,4 に示す。農薬濃度は母親の年齢と正の相関, 非妊娠時体重と負の相関をした。初産, 教育歴が 12 年以上, 世帯収入が 500 万円以上の群で有意に濃度が高かった。また測定年により濃度に有意差が認められた(表 5)。交絡要因を調整した重回帰分析において, 母体血中 DDT の増加と共に臍帯血 IgE レベルが増加した(B(95%CI):o,p'-DDT= 0.29 (0.01, 0.56), Dieldrin= 0.44 (0.02, 0.86)) (表 6)。また, 母体血中 DDT の増加と共に生後 18 か月の感染症リスク(中耳炎)が低下した(OR (95%CI): o,p'-DDE = 0.60 (0.39, 0.93)) (表 5)。しかしアレルギーリスクとの関連は認められなかった(表 7)。

D. 考察

本研究の母体血中有機塩素系農薬の濃度は中央値で p,p'-DDE 0.635ng/ml, HCB 0.10 ng/ml であった。スペインの先行研究で, DDE の胎児期曝露により 4 歳と 6 歳の持続的な喘鳴リスクの増加が報告されており, 臍帯血血清中の有機塩素系農薬濃度は p,p'-DDE : 1.07 ng/ml, HCB: 0.67 ng/ml であった。また臍帯血中 HCB と 4 歳の IL10 の正相関が認められた(Sunyer et al 2005, 2006)。デンマークの先行研究で, HCB の胎児期曝露により 20 歳の喘息リスクの増加が報告されており, 母体血中の有機塩素系農薬濃度は p,p'-DDE 2.47 ng/ml, HCB 0.54 ng/ml であった(Hansen et al 2014)。スウェーデンの先行研究で母体血 DDE と生後の感染症リスクに関連は認められず, 母体血血清中 p,p'-DDE 88 ng/g lipid であった(Glynn et al 2008)。日本人を対象にした横断研究で, 母乳中有機塩素系農薬と成人のアレルギーリスクとの関連は認められないと報告され, 母乳中の -HCH 28.3 ng/g, HCB 7.0 ng/g, p,p'-DDE 71.6 ng/g であった(Miyake et al 2011)。本研究の有機塩素系農薬濃度は, スペイン, デンマークの先行研究と比較し, 低いレベルにあると考えられた。日本人の母乳中濃度は 2007-2008 年に測定されており, 血中より母乳は高脂質であるため本研究の対象集団より濃度が高いことが考えられた。本研究の結果は有機塩素農薬の胎児期曝露は生後早期の免疫機能に影響を与え, 免疫バイオマーカーを変動させる報告(Sunyer et al 2005), および感染症リスクを低下させる報告(Glynn et al 2008)と一致した。さらに, 有機塩素系農薬の胎児期曝露が幼児期以降の小児(Sunyer 2005, 2006; Gascon 2014)および成人(Hansen 2014)のアレルギーリスクを増加させると報告があり, 今後, 免疫機能が発達し

アレルギー症状の診断が明確になる小児以降も追跡調査する。

E . 結論

有機塩素系農薬，特に DDT の胎児期曝露は生後の免疫バイオマーカーを変動し，18 か月の感染症リスク低下と関連した。有機塩素系農薬は次世代の免疫機能に影響し将来的なアレルギーリスク増加に関連する可能性が示唆された。免疫機能が発達しアレルギー症状の診断が明確になる小児以降も追跡調査し，さらなる検討が必要である。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanazawa A, Miyasita C, Okada E, Kobayashi S, Washino N, Sasaki S, Yoshioka E, Mizutani F, Chisaki Y, Saijo Y, Kishi R. Blood persistent organochlorine pesticides in pregnant women in relation to physical and environmental variables in The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Sci Total Environ* 2012. 426: 73-82.
- 2) Kishi R., Kobayashi S., Ikeno T., Araki A., Miyashita C., Itoh S., Sasaki S., Okada E., Kobayashi S., Kashino I., Itoh K., Nakajima S. The members of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health; Ten Years of Progress in the Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: Cohort Profile - Updated 2013. *Environ Health Prev Med.* (2013.11)

2. 学会発表

- 1) 宮下ちひろ，金澤文子，池野多美

子，荒木敦子，伊藤佐智子，小林澄貴，湊屋街子，Houman Goudarzi，小林祥子，田村菜穂美，水谷太，苮木洋一，岸玲子: 胎児期の有機塩素系農薬が小児アレルギー発症に与える影響 環境と子どもの健康北海道スタディー. 第66回北海道公衆衛生学会. 札幌市. (2014.12.02.)

- 2) 宮下ちひろ，金澤文子，佐々木成子，池野多美子，荒木敦子，伊藤佐智子，小林祥子，水谷太，苮木洋一，岸玲子: 有機塩素系農薬が乳幼児の免疫に与える影響 環境と子どもの健康北海道スタディー. 第85回日本衛生学会学術総会 和歌山. March.26-28, 2015.

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 Engl J Med* 355:2226-2235.
- 3) El-Shahawi MS, Hamza A, Bashammakh AS, Al-Saggaf WT. 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 80:1587-1597.

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

- 4) Gascon M, Sunyer J, Martinez D, Guerra S, Lavi I, Torrent M, et al. 2014. Persistent organic pollutants and children's respiratory health: The role of cytokines and inflammatory biomarkers. *Environ Int* 69:133-140.
- 5) Glynn A, Thuvander A, Aune M, Johannisson A, Darnerud PO, Ronquist G, et al. 2008. Immune cell counts and risks of respiratory infections among infants exposed pre- and postnatally to organochlorine compounds: A prospective study. *Environ Health-Glob* 7.
- 6) Hansen S, Strom M, Olsen SF, Maslova E, Rantakokko P, Kiviranta H, et al. 2014. Maternal concentrations of persistent organochlorine pollutants and the risk of asthma in offspring: Results from a prospective cohort with 20 years of follow-up. *Environ Health Perspect* 122:93-99.
- 7) Miyake Y, Tanaka K, Masuzaki Y, Sato N, Ikeda Y, Chisaki Y, et al. 2011. Organochlorine concentrations in breast milk and prevalence of allergic disorders in Japanese women. *Chemosphere* 85:374-378.
- 8) Mostafalou S, Abdollahi M. 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharm* 268:157-177.
- 9) Sunyer J, Torrent M, Munoz-Ortiz L, Ribas-Fito N, Carrizo D, Grimalt J, et al. 2005. Prenatal dichlorodiphenyldichloroethylene (dde) and asthma in children. *Environ Health Perspect* 113:1787-1790.
- 10) Sunyer J, Torrent M, Garcia-Esteban R, Ribas-Fito N, Carrizo D, Romieu I, et al. 2006. Early exposure to dichlorodiphenyldichloroethylene, breastfeeding and asthma at age six. *Clin Exp Allergy* 36:1236-1241.
- 11) Sunyer J, Garcia-Esteban R, Alvarez M, Guxens M, Goni F, Basterrechea M, et al. 2010. Dde in mothers' blood during pregnancy and lower respiratory tract infections in their infants. *Epidemiology* 21:729-735.
- 12) Vijgen J, Abhilash PC, Li YF, Lal R, Forter M, Torres J, et al. 2011. Hexachlorocyclohexane (hch) as new stockholm convention pops--a global perspective on the management of lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res Int* 18:152-162.

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

Table 1. Characteristics of study subjects (N = 379).

		No. (%)	Mean ± SD
Mother			
Age at delivery (years)		379	30.90 ± 4.76
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		379	21.38 ± 3.34
Parity	0	185 (48.9)	
	≥1	193 (51.1)	
Smoking history	No	178 (47.0)	
	Yes	201 (53.0)	
Tobacco smoking during pregnancy	No	310 (81.8)	
	Yes	69 (18.2)	
Alcohol consumption history	No	106 (28.0)	
	Yes	273 (72.0)	
Alcohol consumption during pregnancy	No	265 (69.9)	
	Yes	114 (30.1)	
Allergic history	No	277 (73.1)	
	Yes	102 (26.9)	
Educational level	≤12 years	161 (42.5)	
	>12 years	218 (57.5)	
Blood sampling period	During pregnancy	246 (64.9)	
	After delivery	133 (35.1)	
Measurement year of POPs	2007	70 (18.5)	
	2008	67 (17.7)	
	2009	37 (9.8)	
	2010	12 (3.2)	
	2011	45 (11.9)	
	2012	56 (14.8)	
	2013	92 (24.3)	
Father			
Allergic history	No	315 (83.1)	
	Yes	64 (16.9)	
Infant			
Gender	Male	178 (47.0)	
	Female	201 (53.0)	
IgE in cord blood (IU/mL)		0.21 (0.08, 0.56) ^a	
Infant at 18 months of age			
Duration of breast-feeding	<4 months	56 (17.2)	
	≥4 months	269 (82.8)	
Day care attendance	No	261 (80.3)	
	Yes	64 (19.7)	
Food allergy	No	269 (82.0)	
	Yes	59 (18.0)	
Eczema	No	268 (81.7)	
	Yes	60 (18.3)	
Asthma	No	286 (87.2)	
	Yes	42 (12.8)	
Infections			
otitis media	No	319 (82.0)	
	Yes	70 (18.0)	
Living environment			
Distance to highway from home during p	<100 m	189 (50.0)	
	≥100 m	189 (50.0)	
Environmental tobacco exposure	No	133 (40.1)	
	Yes	199 (59.9)	
Annual household income	≤5 million yen	257 (68.0)	
	>5 million yen	121 (32.0)	

a; Median (25-75th) 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 persistent organochlorine pesticides in maternal blood (pg/g-wet)(n=379)

Persistent organochlorine pesticides		Detection limit(pg/g-wet)	Detectio n rate (%)	Percentile				
				Minimum	25th	50th	75th	Maximum
	Aldrin	1.00	0	0.50	0.50	0.50	0.50	12.83
Chlordane	<i>cis</i> - Chlordane	0.70	59	0.35	0.35	1.10	2.07	17.53
Chlordane	<i>trans</i> - Chlordane	0.50	45	0.25	0.25	0.25	0.71	3.79
Chlordane	oxychlordane	0.90	100	7.93	27.05	39.67	56.02	250.94
Chlordane	<i>cis</i> - Nonachlor	0.40	100	1.63	6.76	9.97	14.36	38.07
Chlordane	<i>trans</i> - Nonachlor	0.50	100	13.14	49.70	71.52	107.59	513.52
DDT	o,p'-DDD	0.50	12	0.25	0.25	0.25	0.25	1.16
DDT	p,p'-DDD	0.40	90	0.20	0.94	1.48	2.29	9.04
DDT	o,p'-DDE	0.40	85	0.20	0.75	1.27	1.82	6.20
DDT	p,p'-DDE	0.60	100	99.52	401.53	650.99	1011.48	4575.67
DDT	o,p'-DDT	0.60	98	0.30	2.27	3.48	4.86	17.15
DDT	p,p'-DDT	0.40	100	2.38	16.63	23.16	33.99	121.52
	Dieldrin	0.80	100	4.11	12.08	16.42	22.62	71.52
	Endrin	1.00	0	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Heptaclor	Heptachlor	0.80	1	0.40	0.40	0.40	0.40	1.14
Heptaclor	<i>trans</i> - Heptachlorepoide	1.00	0	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Heptaclor	<i>cis</i> - Heptachlorepoide	0.40	100	6.17	18.78	26.44	37.28	200.53
	HCB	0.90	100	34.94	80.24	101.65	130.06	245.48
HCH	-HCH	0.70	69	0.35	0.35	0.90	1.32	3.89
HCH	-HCH	0.60	100	19.95	105.05	154.45	244.76	1667.12
HCH	-HCH	0.90	59	0.45	0.45	1.05	1.63	100.92
HCH	-HCH	0.70	1	0.35	0.35	0.35	0.35	1.11
	Mirex	0.50	100	0.88	4.07	5.95	8.26	34.97
Toxaphene	Parlar-26	1.00	97	0.50	2.87	4.39	6.65	20.82
Toxaphene	Parlar-41	0.70	27	0.35	0.35	0.35	0.72	1.96
Toxaphene	Parlar-40	2.00	1	1.00	1.00	1.00	1.00	2.43
Toxaphene	Parlar-44	2.00	2	1.00	1.00	1.00	1.00	2.84
Toxaphene	Parlar-50	2.00	96	1.00	4.36	6.52	9.68	29.29
Toxaphene	Parlar-62	6.00	0	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 3. Persistent organochlorine pesticides levels in relation to characteristics (N=379).

Characteristics		oxychlorane	cis-Nonachlor	trans-Nonachlor	p,p'-DDD	o,p'-DDE	p,p'-DDE	o,p'-DDT	p,p'-DDT
		r	r	r	r	r	r	r	r
Mother									
Age at delivery (years)		.249**	.193**	.236**	.125*	.016	.228**	-.002	.065
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)		-.107*	.013	-.072	.016	.079	.032	.063	.080
		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
Parity	0	43.3 (8.5, 250.9)*	11.4 (2.0, 38.1)*	82.4 (18.2, 513.5)*	1.5 (0.2, 9.0)	1.3 (0.2, 6.2)*	689.1 (157.1, 4575.7)*	3.5 (0.3, 17.2)	25.3 (6.8, 121.5)
	≥1	35.2 (7.9, 105.2)	8.9 (1.6, 27.8)	65.4 (13.1, 216.7)	1.5 (0.2, 6.3)	1.2 (0.2, 4.6)	606.3 (99.5, 3682.2)	3.5 (0.3, 13.3)	21.8 (2.4, 104.8)
Tobacco smoking during pregnancy	No	39.8 (8.2, 250.9)	10.1 (1.6, 38.1)	72.2 (13.1, 513.5)	1.5 (0.2, 9.0)	1.3 (0.2, 6.2)	659.8 (99.5, 4575.7)	3.6 (0.3, 17.2)	23.7 (2.4, 121.5)
	Yes	38.2 (7.9, 102.6)	8.9 (2.0, 36.4)	68.3 (16.5, 286.8)	1.7 (0.2, 5.7)	1.1 (0.2, 5.6)	619.7 (161.2, 3345.9)	3.0 (0.3, 13.3)	22.0 (8.1, 107.4)
Alcohol consumption during pregnancy	No	39.2 (8.5, 250.9)	9.5 (1.6, 38.1)	69.5 (13.1, 513.5)	1.5 (0.2, 9.0)	1.2 (0.2, 6.2)*	632.2 (99.5, 4575.7)*	3.2 (0.3, 13.3)	22.4 (2.4, 121.5)
	Yes	40.2 (7.9, 119.0)	11.0 (1.9, 33.4)	78.8 (13.4, 317.1)	1.7 (0.2, 6.2)	1.3 (0.2, 5.7)	671.9 (161.2, 3345.9)	3.9 (0.3, 17.2)	24.9 (6.4, 107.4)
Allergic history	No	38.8 (7.9, 199.7)	9.6 (1.7, 38.1)	70.5 (13.1, 513.5)	1.5 (0.2, 9.0)	1.3 (0.2, 6.2)	681.3 (99.5, 4575.7)	3.6 (0.3, 17.2)	23.7 (2.4, 121.5)
	Yes	39.8 (8.2, 250.9)	10.5 (1.6, 34.3)	73.8 (13.4, 487.9)	1.5 (0.2, 5.0)	1.2 (0.2, 3.6)	577.5 (103.3, 3345.9)	3.4 (0.3, 11.1)	21.8 (6.4, 107.4)
Educational level	≤12 years	38.4 (7.9, 107.0)*	9.6 (1.7, 36.4)*	68.6 (13.1, 286.8)	1.4 (0.2, 9.0)	1.2 (0.2, 5.7)	598.2 (104.7, 4575.7)	3.2 (0.3, 17.2)	22.3 (5.6, 121.5)
	>12 years	39.9 (8.5, 250.9)	10.2 (1.6, 38.1)	72.8 (14.5, 513.5)	1.5 (0.2, 7.2)	1.3 (0.2, 6.2)	687.8 (99.5, 3682.2)	3.6 (0.3, 13.3)	24.3 (2.4, 107.4)
Blood sampling period	During pregnancy	38.6 (7.9, 199.7)	9.7 (1.6, 37.6)	68.8 (13.4, 513.5)	1.4 (0.2, 6.3)	1.3 (0.2, 5.7)	649.3 (103.3, 4575.7)	3.6 (0.3, 17.2)	22.5 (5.6, 121.5)
	After delivery	40.7 (9.2, 250.9)	10.3 (1.7, 38.1)	81.7 (13.1, 487.9)	1.8 (0.2, 9.0)	1.3 (0.2, 6.2)	651.0 (99.5, 3682.2)	3.3 (0.3, 13.2)	23.9 (2.4, 107.4)
Measurement year of POPs	2007	39.2 (10.9, 199.7)*	9.9 (4.5, 37.6)*	62.9 (25.2, 513.5)	1.1 (0.2, 4.4)*	1.6 (0.7, 6.2)*	668.6 (192.5, 4575.7)*	4.0 (1.2, 13.2)*	26.5 (10.1, 121.5)*
	2008	45.9 (9.4, 250.9)	11.6 (1.6, 34.3)	82.4 (14.5, 487.9)	1.4 (0.2, 7.2)	1.4 (0.2, 4.4)	637.8 (118.0, 2267.1)	3.7 (0.3, 9.1)	23.9 (7.1, 72.8)
	2009	39.7 (7.9, 88.3)	9.7 (2.0, 27.8)	69.5 (16.5, 216.7)	1.8 (0.2, 9.0)	1.2 (0.2, 3.4)	535.6 (115.5, 2419.2)	3.6 (0.3, 11.0)	19.9 (5.6, 70.5)
	2010	35.0 (18.0, 58.5)	10.1 (3.7, 17.7)	68.2 (33.6, 113.7)	1.8 (0.2, 3.1)	1.0 (0.2, 1.8)	446.9 (229.1, 1170.7)	2.7 (0.3, 5.4)	18.7 (9.7, 29.5)
	2011	46.4 (11.0, 131.0)	10.9 (4.5, 36.4)	75.6 (28.7, 295.0)	1.1 (0.2, 5.2)	1.3 (0.2, 5.6)	782.1 (224.2, 3345.9)	3.8 (1.4, 12.2)	25.8 (8.8, 107.4)
	2012	32.5 (8.5, 103.6)	8.3 (1.7, 25.3)	69.0 (13.1, 231.1)	2.4 (0.2, 6.3)	0.8 (0.2, 3.8)	563.3 (103.3, 2686.2)	2.3 (0.3, 11.1)	20.3 (6.2, 47.8)
	2013	38.1 (8.2, 119.0)	10.0 (1.7, 38.1)	73.2 (13.4, 317.1)	1.7 (0.2, 4.1)	1.2 (0.2, 4.0)	715.5 (99.5, 3682.2)	3.5 (0.3, 17.2)	26.0 (2.4, 90.1)
Father									
Allergic history	No	40.2 (7.9, 199.7)	10.0 (1.6, 38.1)	73.7 (13.1, 513.5)	1.5 (0.2, 9.0)	1.3 (0.2, 6.2)	672.7 (99.5, 4575.7)	3.5 (0.3, 17.2)	24.2 (2.4, 121.5)
	Yes	35.0 (8.2, 250.9)	9.1 (1.7, 34.3)	62.9 (13.4, 487.9)	1.3 (0.2, 6.2)	1.2 (0.2, 3.6)	530.7 (103.3, 2414.5)	3.3 (1.3, 13.3)	19.8 (6.4, 90.1)
Infant									
Gender	Male	40.0 (7.9, 199.7)	9.9 (1.6, 37.6)	75.2 (14.5, 513.5)	1.5 (0.2, 6.0)	1.2 (0.2, 6.2)	663.8 (99.5, 4575.7)	3.4 (0.3, 13.2)	23.8 (2.4, 121.5)
	Female	38.4 (8.2, 250.9)	10.0 (1.7, 38.1)	68.9 (13.1, 487.9)	1.5 (0.2, 9.0)	1.3 (0.2, 4.6)	626.5 (103.3, 3682.2)	3.6 (0.3, 17.2)	22.4 (6.2, 107.4)
Duration of breast-feeding	<4 months	47.0 (11.0, 105.2)	11.3 (3.7, 33.4)	84.1 (28.7, 193.5)	1.3 (0.2, 4.8)	1.1 (0.2, 5.7)	701.5 (200.4, 4575.7)	3.1 (0.7, 12.8)	24.9 (6.8, 121.5)
	≥4 months	39.3 (7.9, 250.9)	9.8 (1.6, 38.1)	69.7 (13.1, 513.5)	1.5 (0.2, 9.0)	1.3 (0.2, 6.2)	669.3 (99.5, 3345.9)	3.5 (0.3, 13.2)	23.4 (2.4, 107.4)
Day care attendance	No	39.7 (7.9, 199.7)	9.9 (1.6, 38.1)	71.5 (13.1, 513.5)	1.5 (0.2, 9.0)	1.3 (0.2, 6.2)	670.4 (103.3, 4575.7)	3.5 (0.3, 13.2)	23.8 (6.1, 121.5)
	Yes	44.6 (14.3, 250.9)	10.9 (1.7, 34.3)	80.8 (14.7, 487.9)	1.4 (0.2, 4.8)	1.3 (0.2, 3.3)	692.0 (99.5, 3682.2)	3.2 (0.3, 12.8)	22.4 (2.4, 72.8)
Living environment									
Environmental tobacco exposure	No	41.1 (8.6, 170.8)	10.7 (1.6, 32.6)	74.8 (13.1, 379.1)	1.4 (0.2, 9.0)	1.2 (0.2, 6.2)	658.2 (104.7, 4575.7)	3.5 (0.3, 13.2)	24.5 (6.1, 121.5)
	Yes	39.0 (7.9, 250.9)	9.3 (1.7, 38.1)	69.5 (13.4, 513.5)	1.5 (0.2, 6.1)	1.3 (0.2, 5.7)	673.5 (99.5, 3345.9)	3.4 (0.3, 12.2)	22.4 (2.4, 107.4)
Annual household income	≤5 million yen	37.8 (7.9, 199.7)*	9.4 (1.6, 38.1)*	68.6 (13.1, 513.5)	1.5 (0.2, 9.0)	1.2 (0.2, 5.7)*	632.2 (99.5, 4575.7)	3.4 (0.3, 13.3)	22.5 (2.4, 121.5)
	>5 million yen	43.6 (10.7, 250.9)	10.9 (3.2, 36.4)	80.0 (21.6, 487.9)	1.5 (0.2, 6.3)	1.4 (0.2, 6.2)	710.2 (103.3, 3345.9)	3.7 (0.3, 17.2)	23.9 (6.8, 107.4)
Distance to highway from home during pregnancy	<100m	40.7 (9.2, 250.9)	10.1 (1.7, 38.1)	72.7 (13.1, 513.5)	1.5 (0.2, 6.2)	1.3 (0.2, 6.2)	670.0 (99.5, 4575.7)	3.5 (0.3, 17.2)	23.7 (2.4, 121.5)
	≥100m	37.8 (7.9, 119.0)	9.4 (1.6, 36.4)	69.7 (13.4, 317.1)	1.6 (0.2, 9.0)	1.2 (0.2, 5.7)	618.8 (115.5, 3345.9)	3.4 (0.3, 13.3)	22.5 (5.6, 107.4)

r: Spearman's rank correlation coefficient; *p<0.05, **p<0.01 by the Spearman's rank correlation test, T test and one-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 4. Persistent organochlorine pesticides levels in relation to characteristics (N=379).

Characteristics	Dieldrin		cis-Heptachlorepoxiid-HCB		-HCH		Mirex		Parlar-26		Parlar-50			
	r		r		r		r		r		r			
Mother														
Age at delivery (years)	.079		.196**		.119*		.378**		.444**		.112*		.113*	
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	.241**		.161**		.049		.128*		-.182**		.187**		.174**	
		Median (min-max)		Median (min-max)		Median (min-max)		Median (min-max)		Median (min-max)		Median (min-max)		Median (min-max)
Parity														
	0	17.6 (5.1, 59.3)		27.8 (7.6, 200.5)		111.0 (46.1, 245.5)*		171.8 (37.8, 1667.1)*		5.9 (1.1, 31.2)		5.2 (0.5, 20.8)		7.5 (1.0, 29.3)
	≥1	15.7 (4.1, 71.5)		25.0 (6.2, 149.1)		92.5 (34.9, 212.3)		140.9 (20.0, 1202.5)		6.0 (0.9, 35.0)		4.0 (0.5, 18.9)		5.8 (1.0, 23.8)
Tobacco smoking during pregnancy	No	16.6 (4.1, 71.5)		26.9 (6.2, 200.5)		101.6 (35.5, 245.5)		157.0 (23.7, 772.6)		6.0 (0.9, 35.0)		4.4 (0.5, 18.9)		6.5 (1.0, 27.2)
	Yes	15.5 (6.8, 53.5)		25.1 (6.5, 93.7)		104.5 (34.9, 221.6)		152.6 (20.0, 1667.1)		5.7 (1.1, 30.1)		4.3 (0.5, 20.8)		6.6 (1.0, 29.3)
Alcohol consumption during pregnancy	No	16.5 (4.1, 71.5)		27.0 (6.2, 200.5)		102.5 (35.5, 245.5)		164.4 (23.7, 1667.1)		5.8 (0.9, 35.0)		4.4 (0.5, 20.8)		6.4 (1.0, 29.3)
	Yes	16.4 (7.3, 47.4)		25.3 (8.4, 149.1)		99.9 (34.9, 212.3)		146.8 (20.0, 558.4)		6.4 (1.9, 30.1)		4.4 (0.5, 18.9)		6.6 (1.0, 27.2)
Allergic history	No	16.2 (4.1, 71.5)		26.1 (6.2, 200.5)		102.9 (34.9, 239.8)		154.5 (20.0, 1667.1)		6.0 (0.9, 35.0)		4.4 (0.5, 20.8)		6.5 (1.0, 29.3)
	Yes	16.9 (7.4, 59.3)		27.7 (7.6, 91.0)		101.4 (36.8, 245.5)		156.3 (23.9, 719.7)		5.7 (1.9, 23.1)		4.3 (0.5, 16.9)		6.6 (1.0, 23.1)
Educational level	≤12 years	15.8 (5.1, 71.5)		26.2 (7.6, 93.7)		100.4 (34.9, 238.2)		149.6 (20.0, 1667.1)		5.9 (1.1, 30.1)		4.6 (0.5, 20.8)		6.6 (1.0, 29.3)
	>12 years	16.8 (4.1, 59.3)		27.0 (6.2, 200.5)		104.3 (36.8, 245.5)		158.6 (23.9, 729.6)		6.0 (0.9, 35.0)		4.3 (0.5, 18.9)		6.4 (1.0, 23.4)
Blood sampling period	During pregnancy	17.0 (5.8, 63.6)		26.6 (6.5, 200.5)		101.9 (34.9, 238.2)		153.6 (20.0, 772.6)		5.8 (1.1, 31.2)		4.5 (0.5, 20.8)		6.8 (1.0, 29.3)
	After delivery	15.6 (4.1, 71.5)		26.4 (6.2, 149.1)		100.4 (39.4, 245.5)		163.2 (23.7, 1667.1)		6.2 (0.9, 35.0)		4.3 (0.5, 16.9)		6.3 (1.0, 23.3)
Measurement year of POPs	2007	18.9 (8.9, 53.5)*		28.3 (9.9, 200.5)*		104.7 (58.1, 238.2)*		166.9 (32.4, 772.6)*		6.1 (2.3, 30.1)*		5.6 (2.3, 18.9)*		8.9 (3.5, 27.2)*
	2008	18.9 (7.8, 37.5)		29.1 (7.1, 72.8)		112.9 (36.8, 245.5)		158.5 (31.8, 642.2)		6.5 (1.9, 27.9)		5.7 (0.5, 13.4)		8.2 (1.0, 22.7)
	2009	14.9 (5.8, 59.3)		23.4 (8.4, 149.1)		90.5 (34.9, 179.5)		127.7 (20.0, 1202.5)		4.9 (2.1, 21.2)		3.9 (1.2, 12.6)		5.3 (1.0, 16.6)
	2010	20.0 (7.5, 22.6)		27.3 (12.4, 58.7)		92.1 (65.6, 145.3)		107.9 (37.0, 209.0)		6.6 (1.9, 11.4)		3.9 (0.5, 7.7)		6.8 (2.1, 9.8)
	2011	17.6 (7.2, 71.5)		32.7 (12.6, 91.0)		115.8 (62.7, 221.3)		183.6 (49.5, 603.7)		6.7 (2.2, 35.0)		4.6 (0.5, 20.8)		7.5 (1.0, 29.3)
	2012	12.9 (5.1, 44.7)		20.6 (6.5, 57.6)		84.2 (38.6, 200.1)		130.4 (23.7, 717.7)		4.7 (1.1, 22.5)		2.9 (0.5, 12.4)		4.7 (1.0, 19.5)
	2013	15.8 (4.1, 63.6)		25.1 (6.2, 93.7)		99.3 (35.5, 239.8)		177.8 (31.1, 1667.1)		5.7 (0.9, 18.6)		4.0 (0.5, 16.9)		5.4 (1.0, 23.3)
Father														
Allergic history	No	16.4 (4.1, 71.5)		26.8 (6.2, 200.5)		104.5 (34.9, 245.5)		163.2 (20.0, 1667.1)		6.0 (0.9, 35.0)		4.4 (0.5, 20.8)		6.4 (1.0, 29.3)
	Yes	16.9 (7.2, 36.1)		25.9 (7.1, 149.1)		99.8 (35.5, 191.9)		133.0 (23.9, 528.1)		5.2 (1.1, 31.2)		4.6 (0.5, 13.9)		6.8 (1.0, 20.5)
Infant														
Gender	Male	15.2 (4.1, 71.5)		26.4 (6.2, 200.5)		99.3 (34.9, 238.2)		156.3 (20.0, 772.6)		6.0 (0.9, 31.2)		4.4 (0.5, 18.9)		6.5 (1.0, 27.2)
	Female	17.3 (6.2, 63.6)		26.8 (6.5, 93.7)		103.9 (35.5, 245.5)		154.5 (23.7, 1667.1)		5.8 (1.1, 35.0)		4.4 (0.5, 20.8)		6.6 (1.0, 29.3)
Duration of breast-feeding	<4 months	19.8 (7.1, 59.3)		27.3 (9.1, 67.7)		107.9 (60.2, 238.2)		181.2 (49.5, 1202.5)		5.8 (1.9, 21.6)		4.8 (1.2, 18.9)		6.6 (2.1, 27.2)
	≥4 months	16.3 (4.1, 71.5)		26.2 (6.2, 200.5)		99.3 (34.9, 245.5)		153.1 (20.0, 1667.1)		6.0 (0.9, 35.0)		4.3 (0.5, 20.8)		6.4 (1.0, 29.3)
Day care attendance	No	16.4 (5.1, 71.5)		26.2 (6.5, 200.5)		100.4 (34.9, 239.8)		151.8 (20.0, 1667.1)		6.1 (1.1, 35.0)		4.1 (0.5, 20.8)		6.2 (1.0, 29.3)
	Yes	16.5 (4.1, 37.5)		26.5 (6.2, 66.3)		104.6 (47.4, 245.5)		178.3 (34.2, 1202.5)		5.8 (0.9, 30.1)		4.9 (0.5, 12.6)		6.6 (1.0, 19.3)
Living environment														
Environmental tobacco exposure	No	17.3 (5.1, 71.5)		27.2 (8.3, 149.1)		101.5 (35.5, 245.5)		165.5 (23.7, 772.6)		6.0 (1.1, 35.0)		4.4 (0.5, 18.9)		6.6 (1.0, 23.8)
	Yes	15.9 (4.1, 59.3)		26.0 (6.2, 200.5)		101.6 (34.9, 239.8)		152.8 (20.0, 1667.1)		6.0 (0.9, 30.1)		4.3 (0.5, 20.8)		6.4 (1.0, 29.3)
Annual household income	≤5 million yen	15.6 (4.1, 71.5)*		25.1 (6.2, 200.5)		100.4 (34.9, 239.8)		150.7 (20.0, 1667.1)		5.5 (0.9, 35.0)*		4.3 (0.5, 18.9)		6.3 (1.0, 27.2)
	>5 million yen	17.8 (7.4, 59.0)		29.8 (7.1, 149.1)		108.4 (39.4, 245.5)		184.1 (23.9, 1202.5)		6.7 (1.9, 30.1)		4.7 (0.5, 20.8)		6.7 (1.0, 29.3)
Distance to highway from home during pregnancy	<100m	16.7 (4.1, 71.5)		27.2 (6.2, 200.5)		103.9 (38.6, 245.5)		169.4 (23.7, 1667.1)		6.0 (0.9, 31.2)		4.5 (0.5, 18.9)		6.6 (1.0, 23.8)
	≥100m	16.2 (5.8, 63.6)		26.2 (7.1, 91.0)		100.4 (34.9, 221.3)		149.6 (20.0, 1202.5)		5.8 (1.1, 35.0)		4.3 (0.5, 20.8)		6.4 (1.0, 29.3)

r: Spearman's rank correlation coefficient; *p<0.05, **p<0.01 by the Spearman's rank correlation test, T test and one-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 5 B (95% CI) between persistent organochlorine pesticides concentrations and IgE in cord blood

Persistent organochlorine pesticides		Crude B (95%CI)	Adjusted B (95%CI)
Chlordane	oxychlordane	-0.03 (-0.39, 0.33)	-0.07 (-0.49, 0.35)
Chlordane	<i>cis</i> -Nonachlor	0.12 (-0.22, 0.46)	0.12 (-0.25, 0.49)
Chlordane	<i>trans</i> -Nonachlor	-0.01 (-0.34, 0.32)	-0.05 (-0.43, 0.32)
DDT	p,p'-DDD	-0.14 (-0.36, 0.08)	-0.11 (-0.33, 0.11)
DDT	o,p'-DDE	0.10 (-0.14, 0.34)	0.09 (-0.15, 0.34)
DDT	p,p'-DDE	0.00 (-0.31, 0.31)	0.11 (-0.22, 0.43)
DDT	o,p'-DDT	0.22 (-0.05, 0.49)	0.29 (0.01, 0.56)*
DDT	p,p'-DDT	0.16 (-0.19, 0.51)	0.19 (-0.16, 0.54)
	Dieldrin	0.37 (-0.04, 0.79)	0.44 (0.02, 0.86)*
Heptaclor	<i>cis</i> -Heptachlorepoide	0.18 (-0.20, 0.57)	0.20 (-0.20, 0.60)
	HCB	0.09 (-0.44, 0.61)	0.11 (-0.45, 0.67)
HCH	-HCH	0.00 (-0.29, 0.29)	0.09 (-0.26, 0.45)
	Mirex	0.05 (-0.30, 0.40)	0.13 (-0.29, 0.56)
Toxaphene	Parlar-26	0.14 (-0.13, 0.42)	0.15 (-0.14, 0.44)
Toxaphene	Parlar-50	0.17 (-0.12, 0.46)	0.17 (-0.14, 0.47)

Adjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, parental allergic history, 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

Table 6 Odds ratio (95% CI) between persistent organochlorine pesticides concentrations and Infection risk during the first 18 months

Persistent organochlorine pesticides		Crude OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)
Infections			
Chlordane	oxychlordane	1.01 (1.00, 1.01)	1.01 (1.00, 1.02)
Chlordane	<i>cis</i> -Nonachlor	1.02 (0.98, 1.06)	1.02 (0.98, 1.07)
Chlordane	<i>trans</i> -Nonachlor	1.00 (1.00, 1.01)	1.00 (1.00, 1.01)
DDT	p,p'-DDD	0.95 (0.79, 1.15)	0.95 (0.76, 1.18)
DDT	o,p'-DDE	0.79 (0.60, 1.03)	0.76 (0.54, 1.07)
DDT	p,p'-DDE	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
DDT	o,p'-DDT	0.89 (0.80, 1.00)*	0.90 (0.79, 1.01)
DDT	p,p'-DDT	1.00 (0.99, 1.01)	1.00 (0.99, 1.02)
	Dieldrin	0.99 (0.96, 1.02)	0.98 (0.95, 1.02)
Heptaclor	<i>cis</i> -Heptachlorepoxyde	1.00 (0.99, 1.01)	1.00 (0.98, 1.01)
	HCB	1.00 (1.00, 1.01)	1.01 (1.00, 1.01)
HCH	-HCH	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
	Mirex	1.04 (0.99, 1.09)	1.05 (0.99, 1.12)
Toxaphene	Parlar-26	1.01 (0.94, 1.08)	1.00 (0.92, 1.09)
Toxaphene	Parlar-50	1.02 (0.97, 1.07)	1.02 (0.96, 1.08)
Otitid media			
Chlordane	oxychlordane	1.00 (0.99, 1.01)	1.00 (0.99, 1.01)
Chlordane	<i>cis</i> -Nonachlor	1.00 (0.96, 1.04)	0.98 (0.93, 1.04)
Chlordane	<i>trans</i> -Nonachlor	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (0.99, 1.00)
DDT	p,p'-DDD	0.94 (0.75, 1.17)	0.94 (0.71, 1.23)
DDT	o,p'-DDE	0.71 (0.50, 1.00)*	0.60 (0.39, 0.93)*
DDT	p,p'-DDE	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
DDT	o,p'-DDT	0.88 (0.77, 1.01)	0.87 (0.75, 1.01)
DDT	p,p'-DDT	0.99 (0.97, 1.01)	0.99 (0.97, 1.01)
	Dieldrin	0.99 (0.96, 1.02)	0.97 (0.93, 1.02)
Heptaclor	<i>cis</i> -Heptachlorepoxyde	1.00 (0.98, 1.01)	0.99 (0.97, 1.01)
	HCB	1.00 (0.99, 1.01)	1.00 (0.99, 1.01)
HCH	-HCH	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
	Mirex	1.03 (0.97, 1.09)	1.03 (0.96, 1.11)
Toxaphene	Parlar-26	0.98 (0.91, 1.07)	0.93 (0.84, 1.04)
Toxaphene	Parlar-50	0.99 (0.94, 1.05)	0.96 (0.89, 1.03)

Adjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, parental allergic history, 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

Table 7 Odds ratio (95% CI) between persistent organochlorine pesticides concentrations and allergic risk during the first 18 months

Persistent organochlorine pesticides		Crude OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)
Food allergy			
Chlordane	oxychlordane	1.00 (0.99, 1.01)	1.00 (0.99, 1.01)
Chlordane	<i>cis</i> -Nonachlor	0.99 (0.95, 1.04)	1.00 (0.95, 1.05)
Chlordane	<i>trans</i> -Nonachlor	1.00 (0.99, 1.00)	1.00 (0.99, 1.00)
DDT	p,p'-DDD	0.95 (0.77, 1.19)	0.98 (0.77, 1.25)
DDT	o,p'-DDE	1.01 (0.76, 1.35)	0.97 (0.69, 1.35)
DDT	p,p'-DDE	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
DDT	o,p'-DDT	1.07 (0.96, 1.19)	1.06 (0.93, 1.20)
DDT	p,p'-DDT	1.00 (0.98, 1.01)	1.00 (0.98, 1.02)
	Dieldrin	1.00 (0.97, 1.03)	1.01 (0.97, 1.04)
Heptaclor	<i>cis</i> -Heptachlorepoide	1.01 (0.99, 1.02)	1.01 (0.99, 1.02)
	HCB	1.00 (0.99, 1.00)	1.00 (0.99, 1.01)
HCH	-HCH	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
	Mirex	0.98 (0.92, 1.05)	0.97 (0.89, 1.05)
Toxaphene	Parlar-26	0.98 (0.90, 1.07)	1.00 (0.90, 1.10)
Toxaphene	Parlar-50	1.00 (0.94, 1.06)	1.01 (0.94, 1.08)
Eczema			
Chlordane	oxychlordane	1.00 (0.99, 1.01)	1.00 (0.99, 1.01)
Chlordane	<i>cis</i> -Nonachlor	0.97 (0.93, 1.02)	0.98 (0.93, 1.03)
Chlordane	<i>trans</i> -Nonachlor	1.00 (0.99, 1.00)	1.00 (0.99, 1.00)
DDT	p,p'-DDD	0.94 (0.75, 1.17)	0.95 (0.74, 1.21)
DDT	o,p'-DDE	0.94 (0.70, 1.27)	0.92 (0.66, 1.28)
DDT	p,p'-DDE	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
DDT	o,p'-DDT	1.00 (0.88, 1.12)	0.98 (0.86, 1.11)
DDT	p,p'-DDT	0.99 (0.97, 1.01)	0.99 (0.97, 1.01)
	Dieldrin	0.98 (0.95, 1.02)	0.99 (0.95, 1.02)
Heptaclor	<i>cis</i> -Heptachlorepoide	1.00 (0.99, 1.02)	1.00 (0.99, 1.02)
	HCB	1.00 (0.99, 1.00)	1.00 (0.99, 1.01)
HCH	-HCH	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
	Mirex	0.96 (0.90, 1.03)	0.95 (0.87, 1.04)
Toxaphene	Parlar-26	0.95 (0.86, 1.04)	0.96 (0.87, 1.07)
Toxaphene	Parlar-50	0.96 (0.91, 1.03)	0.97 (0.90, 1.04)
Asthma			
Chlordane	oxychlordane	1.00 (0.98, 1.01)	1.00 (0.98, 1.01)
Chlordane	<i>cis</i> -Nonachlor	0.99 (0.94, 1.04)	0.98 (0.92, 1.04)
Chlordane	<i>trans</i> -Nonachlor	1.00 (0.99, 1.00)	1.00 (0.99, 1.00)
DDT	p,p'-DDD	0.84 (0.64, 1.12)	0.84 (0.60, 1.18)
DDT	o,p'-DDE	0.88 (0.61, 1.26)	0.80 (0.52, 1.25)
DDT	p,p'-DDE	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
DDT	o,p'-DDT	0.88 (0.75, 1.03)	0.86 (0.72, 1.03)
DDT	p,p'-DDT	1.00 (0.98, 1.02)	1.00 (0.98, 1.02)
	Dieldrin	1.01 (0.97, 1.04)	1.01 (0.97, 1.05)
Heptaclor	<i>cis</i> -Heptachlorepoide	1.00 (0.98, 1.02)	1.00 (0.98, 1.02)
	HCB	1.00 (0.99, 1.01)	1.00 (0.99, 1.01)
HCH	-HCH	1.00 (1.00, 1.00)	1.00 (1.00, 1.00)
	Mirex	0.97 (0.90, 1.05)	0.97 (0.88, 1.07)
Toxaphene	Parlar-26	0.96 (0.86, 1.06)	0.91 (0.80, 1.04)
Toxaphene	Parlar-50	0.99 (0.93, 1.06)	0.97 (0.89, 1.05)

Adjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, parental allergic history, maternal educational level, parity, infant gender, duration of breast-feeding, environmental tobacco exposure, day care attendance, blood sampling

有機塩素農薬への胎児期曝露が生後6か月児の精神運動発達に与える影響

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 特任教授
研究分担者 池野 多美子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 松村 徹 いであ株式会社環境創造研究所 取締役・環境創造研究所副所長

研究要旨

高濃度の有機塩素系（有機塩素系）農薬への胎児期曝露は乳幼児期初期の精神運動発達に悪影響を与えることが指摘されている。本研究では、北海道における低濃度の有機塩素系農薬の胎児期曝露が、6か月児の精神運動発達に及ぼす影響について検討した。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。精神運動発達については、ベイリー乳幼児発達検査-2（BSID2）を用いて274名を測定した。有機塩素系農薬およびBSID2のデータがそろっており、双胎でない174名について検討した。出産時年齢、妊娠日数、児性別、家庭環境得点、血液採取時期、出産時年齢、カフェイン摂取量、妊娠中喫煙、Totalダイオキシンで調整した重回帰分析を行った。重回帰分析の結果、有機塩素系農薬とMDI、およびPDIとの関連性は示されなかった。本研究におけるp,p'DDE濃度は、比較的低濃度であったことから、運動発達が急速に進む6か月児であっても、PDIへの影響が少なかったと考えられる。層別解析を行ったところ、男女間で異なる結果が観察されたことから、有機塩素系農薬の曝露機序は男女で異なる可能性が考えられる。

研究協力者

中島そのみ
（札幌医科大学保健医療学部作業療法学科）
山崎 圭子, 金澤 文子, 小林 祥子
（北海道大学環境健康科学研究教育センター）
水谷 太, 菖木 洋一
（いであ株式会社環境創造研究所）

A. 研究目的

難分解性の有機塩素系農薬は、内分泌攪乱作用を持つことが懸念されている。近年、有機塩素系農薬への胎児期曝露は、乳幼児

期の精神運動発達に悪影響を与えることが、複数の研究により指摘されている（Jurewicz, Polanska, & Hanke, 2013）。特に、母体血清中のp,p'DDT濃度は6か月および12か月児の、また、p,p'DDE濃度は6か月児でのみ、ベイリー乳幼児発達検査（BSID）における運動指標（PDI）と負の関連を持つことが示されている（Eskenazi et al., 2006）。同様に、Torres-Sanchez et al. (2007)は、妊娠の第一トリメスターにおけるDDE濃度が、生後12か月までの児について測定したBSIDのPDI得点の減衰と関

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

連するが、精神発達の指標である MDI とは関連しないことを示した。しかし、同じコホートをを用いた Torres-Sanchez et al. (2009) では、12 か月を過ぎた児については、DDE と PDI、MDI の関連性が示されず、家庭環境による影響が示唆された。彼らは、DDE による運動発達への影響は、可逆的であると結論している。

しかし、これらの結果はいずれも、高濃度の DDE および DDT についての結果であり、低濃度の有機塩素系農薬への曝露が及ぼす影響については、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有機塩素系農薬の胎児期曝露が、6 か月児の精神運動発達に及ぼす影響について検討することを目的とした。

また、本研究と同一コホートでの先行研究として、Nakajima et al. (2006) は、母体血中の PCBs・ダイオキシン類の異性体および Total TEQ の濃度が高くなると、6 か月児の BSID-2 における PDI が低くなることを示した。さらに、Nakajima et al. (in preparation) が解析を進めた結果、男児では同様の結果が観察されたのに対し、女児に関しては有意な効果が観察されなかった。化学物質の胎児期曝露による BSID-2 の得点の変動は、男女間で異なる機序によっておこる可能性がある。したがって、本研究では、男女差にも注目して解析を行うこととした。

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。ダイオキシンの濃度については、妊娠中期から後期に母親から採血し、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メトリー法（HRGC/HRMS 法）で、426 名の母体、中 PCBs、ダイオキシン類濃度を測定した。Total ダイオキシン濃度の TEQ を対数変換した値を分析に用いた。

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-Heptachlorepoxyde, cis-Heptachlorepoxyde), ヘキサクロロシクロヘキサン (Hexachlorocyclohexane) 類 4 異性体 (-HCH, -HCH, -HCH, -HCH), マイレックス (Mirex), トキサフェン (Toxaphene) 6 物質 (Parlar-26, 41, 40, 44, 50, 62) およびヘキサクロロベンゼン (Hexachlorobenzene : HCB) の合計 29 種類について、ガスクロマトグラフィー/負イオン化学イオン化質量分析計 (GC/NCI MS) および高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/HRMS) 法により一斉分析を行った。有機塩素系 29 種類のうち、検出率が 80% 以上であった 15 種類の濃度を自然対数に変換した後、統計解析した。

精神運動発達については、ベイリー乳幼児発達検査-2 (BSID2) を用いて 274 名を測定した (Bayley, 1993)。BSID2 の測定結果から、子どもの認知、言語、対人・社会的側面の発達を評価する指標として Mental development index (MDI) を、運動面での発達を評価する指標として Psychomotor development index (PDI) を算出した。また、育児環境に関しては、Index of child care Environment を用いて測定を行った (Anme et al., 2013)。

妊娠中に重度の病気・合併症がなく、出産時のアプガースコアが 7 を超えた参加者の中から、有機塩素系農薬および BSID2 のデータがそろっており、双胎でない 174 名について検討した。出産時年齢、妊娠日数、児性別、家庭環境得点、血液採取時期、出産時年齢、カフェイン摂取量、妊娠中喫煙、Total ダイオキシン濃度で調整した重回帰分析を行った。

C. 研究結果

対象者の属性を表 1 に示す。母親の年齢は、31.2 ($SD = 4.8$) 歳であった。男児は 84 名 (48.3%)、女児は 90 名 (51.7%) であった。BSID-2 の平均得点は、MDI が 90.1 ($SD = 4.8$)、PDI が 89.9 ($SD = 12.7$) であった。BSID2 得点と参加者の属性の相関を表 2 に示す。MDI は妊娠日数との相関が有意であり ($r = .20, p < .05$)、PDI は母の年齢 ($r = -.19, p < .05$)、妊娠日数 ($r = .28, p < .05$)、家庭環境得点 ($r = -.16, p < .05$) との相関が有意であった。

有機塩素系農薬の濃度を表 3 に示す。中央値 (pg/g-wet) は、それぞれ、oxychlorane (37.8)、cis Nonachlor (9.4)、trans Nonachlor (65.7)、p,p'-DDD (1.3)、p,p'-DDE (1.3)、p,p'-DDE (637.5)、o,p'-DDT (3.5)、p,p'-DDT (24.4)、Dieldrin

(16.7)、cis-Heptachlorepoxide (25.33)、HCB (100.5)、 γ -HCH (153.6)、Mirex (5.93)、Parlar26 (4.8)、Parlar50 (7.2) であった。

有機塩素系農薬と MDI についての重回帰分析の結果を表 4 に、PDI についての結果を表 5 に示す。MDI、PDI のいずれにおいても、有機塩素系農薬との有意な関連性は示されなかった。

男女間での差について検討するため、層別に重回帰分析を行った。結果をそれぞれ、表 5、6 に示す。男児では MDI、PDI のいずれに関しても有意な差が観察されなかったのに対し、女児では、crude のみの Model1 で、PDI と cis Nonachlor ($\beta = -.23, CI: -18.3 -1.04, p < .05$)、Mirex ($\beta = -.25, CI: -20.7 -2.0, p < .05$)、Parlar26 ($\beta = -.22, CI: -15.6 -0.5, p < .05$)、Parlar50 ($\beta = -.22, CI: -17.1 -0.7, p < .05$) の関連性が観察された。また、Mirex に関しては、出産時年齢、妊娠日数、児の性別、育児環境得点、血液採取時期で調整した Model2 においても、関連が有意であった ($\beta = -.23, CI: -20.9 -.03, p < .05$)。しかし、カフェイン摂取量、妊娠中喫煙、Total ダイオキシン TEQ を調整として用いた Model3 では、これらの関連は消失した。

D. 考察

6 か月時点での運動発達においては、妊娠日数、母の年齢のほかに、育児環境得点が影響する可能性が示された。

一方、有機塩素系農薬と BSID 得点は関連しなかった。先行研究における有機塩素系農薬の濃度は、本研究と比較して非常に高く (Eskenazi et al., 2006; Torres-Sanchez et al., 2007)、DDT および DDE とその代謝物に関しては、低濃度曝露が児の精神運動発達に及ぼす影響はわずかである可能性が考

えられる。

他の有機塩素系農薬に関しては，Ribas-Fito et al. (2003)が、臍帯血中の HCB 濃度と 13 か月児の BSID 得点の関連がなかったことを報告している。この結果は、研究での結果と一致する。また、Mirex に関しては、Puertas et al. (2010)が、胎盤中における濃度と、児が 4 歳になったときの知能の関連について報告している。彼らは児の発達指標として、McCarthy Scaled of Children's Abilities (MSCA)を採用し、下位項目の運動能力には Mirex 濃度との関連がなく、ワーキングメモリ及び数量能力には負の関連があることを示した。BSID と有機塩素系農薬、および PCB の関連が示された先行研究(Eskenazi et al., 2006; Nakajima et al., 2006; Torres-Sanchez et al., 2007)は、生後 12 か月、あるいはそれ以前に発達検査を行い、運動指標に悪影響があることを示している。子どもの中樞神経系の発達が、生後の時期に異なった部位で起こり、それに対応して運動や認知機能が発達すると考えられている(Yakovlev PI, 1967)ことを踏まえると、有機塩素系農薬をはじめとした化学物質による運動・認知機能への影響は、神経系の各部位が発達する時期に対応して起こるかもしれない。

さらに、男女の層別解析の結果、女児でのみ、Model1 (crude)では複数の物質と PDI に、model2 では Mirex と PDI に負の関連が観察された。ダイオキシンで調整した model3 では有意差は消失することから、Mirex と PDI の関連性を断定することはできないが、男女間での作用機序は異なる可能性が示唆された。今後は、18 か月以降についても解析することにより、神経系の各部位の発達時期と化学物質曝露の関係を明らかにする必要があるが、男女間での作用機序の違いについても検討する必要がある。

E. 結論

本研究の結果から、有機塩素系農薬と MDI、および PDI との関連性は示されなかった。低濃度の曝露の場合、精神運動発達との関連はわずかであると考えられる。一方、有機塩素系農薬に属する複数の物質と PDI の関連性の違いから、有機塩素系農薬曝露時の機序が男女間で異な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

1. 山崎圭子，宮下ちひろ，中島そのみ，池野多美子，荒木敦子，伊藤佐智子，小林祥子，水谷太，菅木洋一，岸玲子．胎児期の有機塩素系農薬曝露が 6 か月児の精神運動発達に及ぼす影響-北海道スタディ-. 第 85 回日本衛生学会学術総会. 和歌山市. 2015.3.26.-3.28.

参考文献

- 1) Anme, T., Tanaka, E., Watanabe, T., Tomisaki, E., Mochizuki, Y., & Tokutake, K. (2013). Validity and reliability of the Index of Child Care Environment (ICCE). *Public Health Frontier*.
- 2) Bayley, N. (1993). *Manual for the Bayley scales of infant development-II*. San Antonio, TX: The Psychological Corporation.
- 3) Eskenazi, B., Marks, A. R., Bradman, A., Fenster, L., Johnson, C., Barr, D. B.,

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

- & Jewell, N. P. (2006). In utero exposure to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and neurodevelopment among young Mexican American children. *Pediatrics*, 118(1), 233-241.
- 4) Jurewicz, J., Polanska, K., & Hanke, W. (2013). Chemical exposure early in life and the neurodevelopment of children--an overview of current epidemiological evidence. *Ann Agric Environ Med*, 20(3), 465-486.
- 5) Nakajima, S., Saijo, Y., Kato, S., Sasaki, S., Uno, A., Kanagami, N., Kishi, R. (2006). Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at 6 months of age. *Environ Health Perspect*, 114(5), 773-778.
- 6) Puertas, R., Lopez-Espinosa, M. J., Cruz, F., Ramos, R., Freire, C., Perez-Garcia, M, Olea, N. (2010). Prenatal exposure to mirex impairs neurodevelopment at age of 4 years. *Neurotoxicology*, 31(1), 154-160.
- 7) Ribas-Fito, N., Sala, M., Cardo, E., Mazon, C., De Muga, M. E., Verdu, A., Sunyer, J. (2003). Organochlorine compounds and concentrations of thyroid stimulating hormone in newborns. *Occup Environ Med*, 60(4), 301-303.
- 8) Torres-Sanchez, L., Rothenberg, S. J., Schnaas, L., Cebrian, M. E., Osorio, E., Del Carmen Hernandez, M., Lopez-Carrillo, L. (2007). In utero p,p'-DDE exposure and infant neurodevelopment: a perinatal cohort in Mexico. *Environ Health Perspect*, 115(3), 435-439.
- 9) Torres-Sanchez, L., Schnaas, L., Cebrian, M. E., Hernandez Mdel, C., Valencia, E. O., Garcia Hernandez, R. M., & Lopez-Carrillo, L. (2009). Prenatal dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure and neurodevelopment: a follow-up from 12 to 30 months of age. *Neurotoxicology*, 30(6), 1162-1165.
- 10) Yakovlev PI, L. A.-R. (1967). The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. In M. A (Ed.), *Regional development of the brain in early life*. (pp. pp. 3-70.): Blackwell Scientific.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1 Characteristics of mothers and infants (n=174).

Characteristic	No. (%)
Maternal characteristics	
Age (years) ^a	31.2 ±4.8
Education Level (years)	
< 9	4 (2.3)
10-12	63 (36.2)
13-16	103 (59.2)
> 17	4 (2.3)
Economic status:annual income	
< 3,000,000	27 (15.5)
3,000,000-5,000,000	84 (48.3)
5,000,000-7,000,000	39 (22.4)
7,000,000-10,000,000	20 (11.5)
>10,000,000	4 (2.3)
Worked during pregnancy	20 (11.5)
Smoked during pregnancy	23 (13.2)
Caffein intake during pregnancy (mg/day) ^a	135.9 ±94.7
Alcohol intake before pregnancy (g/day) ^a	17.3 ±64.9
Alcohol intake during pregnancy (g/day) ^a	0.9 ±2.6
Blood sampling period	
During pregnancy	117 (67.2)
After delivery	57 (32.8)
Total dioxin TEQ	15.1 ±6.7
Child characteristics	
Sex	
Male	84 (48.3)
Female	90 (51.7)
Gestational age (days) ^a	277.3 ±8.1
Birth weight (g) ^a	3119.6 ±341.7
Length (cm) ^a	48.3 ±1.6
Head circumference (cm) ^a	33.3 ±1.3
First-born	
Duration of breast-feeding, > 3months	
Age at testion (days) ^a	187.1 ±4.5
BSID-II mental index score: MDI ^a	90.1 ±8.9
BSID-II motor index score: PDI ^a	89.9 ±12.7
Index of Child Care Environment ^{a, b}	22.3 ±3.5

^aMean±SD. ^bA perfect score is 30points.

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 BSID-II MDI and PDI scores in relation to mother and infant characteristics (n=174)

Characteristic	No.	MDI		PDI	
		Mean±SD	p-value	Mean±SD	p-value
Maternal characteristics					
Age (years)	174	$r = -0.120$	0.11	$r = -.188^*$	0.01
Education Level (years)					
≤ 12	67	91.4 ±4.4	0.08	92.0 ±11.0	0.09
>13	107	89.3 ±10.8		88.6 ±13.6	
Economic status:annual income					
< 5,000,000	111	90.5 ±5.7	0.46	111.0 ±91.1	0.12
≥5,000,000	63	89.5 ±12.8		63.0 ±87.9	
Worked during pregnancy					
No	20	88.5 ±21.9	0.70	85.6 ±23.5	0.36
Yes	154	90.3 ±5.5		90.5 ±10.6	
Smoked during pregnancy					
Caffein intake during pregnancy (mg/day)	174	$r = 0.053$	0.48	$r = -0.039$	0.61
Alcohol intake before pregnancy (g/day)	174	$r = -0.005$	0.95	$r = -0.064$	0.40
Alcohol intake during pregnancy (g/day)	174	$r = 0.114$	0.14	$r = 0.031$	0.68
Blood sampling period					
During pregnancy	117	90.4 ±5.3	0.63	89.6 ±10.4	0.70
After delivery	57	89.5 ±13.7		90.5 ±16.6	
Total dioxin TEQ	174	$r = 0.060$	0.43	$r = -0.093$	0.22
Child characteristics					
Sex					
Male	84	89.5 ±11.3	0.34	88.4 ±14.2	0.13
Female	90	90.7 ±5.9		91.3 ±11.1	
Gestational age (days)	174	$r = .203^{**}$	0.01	$r = .284^{**}$	0.00
Birth weight (g)	174	$r = 0.018$	0.81	$r = 0.019$	0.81
Length (cm)	174	$r = 0.053$	0.49	$r = 0.084$	0.27
Head circumference (cm)	174	$r = 0.013$	0.87	$r = -0.062$	0.42
First-born					
Yes	91	90.3 ±10.9	0.81	90.0 ±14.6	0.90
No	83	90.0 ±6.2		89.8 ±10.3	
Duration of breast-feeding, > 3months					
Yes	135	89.9 ±9.8	0.62	89.7 ±12.8	
No	39	90.7 ±4.8		90.8 ±12.6	0.63
Age at test (days)	174	$r = 0.120$	0.11	$r = 0.074$	0.33
Index of Child Care Environment	174	$r = 0.006$	0.93	$r = -.155^*$	0.04

Student's t-test, Peason'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 3 Levels of organochlorine pesticides detected over 80 % of participants.

	Detection Limit (pg/g-wet)	Detection Rate	Minimum	Percentile			Maximum
				25th	50th	75th	
oxychlordane	0.90	100	8.19	26.98	37.77	55.74	250.94
cisNonachlor	0.40	100	1.63	6.52	9.44	15.00	38.07
transNonachlor	0.50	100	13.14	46.80	65.72	106.75	513.52
p,p'-DDD	0.40	90	0.20	0.89	1.33	2.26	6.28
o,p'-DDE	0.40	85	0.20	0.77	1.34	1.89	6.20
p,p'-DDE	0.60	100	99.52	409.92	637.53	1021.90	4575.67
o,p'-DDT	0.60	98	0.30	2.26	3.50	4.98	13.27
p,p'-DDT	0.40	100	2.38	16.56	24.39	34.73	121.52
Dieldrin	0.80	100	4.11	12.08	16.68	22.95	53.51
cisHeptachlorepoxyde	0.40	100	6.17	17.31	25.33	35.94	200.53
HCB	0.90	100	36.78	77.91	100.47	129.21	239.84
HCH	0.60	100	23.68	108.66	153.64	221.26	1667.12
Mirex	0.50	100	0.88	3.97	5.93	9.02	30.11
Parlar26	1.00	97	0.50	3.20	4.76	7.13	18.86
Parlar50	2.00	96	1.00	4.90	7.19	10.83	27.23

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 BSID-II mental development scores (MDI) for infants in relation to the organochlorine pesticides.

persistent organochlorine pesticides	MDI											
	Model 1(crude)				Model 2				Model 3			
	95%CI		ρ		95%CI		ρ		95%CI		ρ	
oxychlordane	0.09	-2.28	8.38	0.26	0.08	-2.60	8.12	0.31	0.09	-4.06	10.80	0.37
cisNonachlor	0.09	-2.17	8.00	0.26	0.08	-2.50	7.71	0.31	0.10	-3.78	10.56	0.35
transNonachlor	0.08	-2.36	7.53	0.30	0.07	-2.54	7.39	0.34	0.09	-3.81	9.44	0.40
p,p'-DDD	-0.01	-4.09	3.54	0.89	0.01	-3.55	4.06	0.89	0.02	-3.52	4.40	0.83
o,p'-DDE	0.01	-3.74	4.09	0.93	-0.02	-4.37	3.45	0.82	-0.03	-5.07	3.34	0.69
p,p'-DDE	-0.06	-6.39	2.57	0.40	-0.07	-6.62	2.26	0.33	-0.12	-8.87	1.58	0.17
o,p'-DDT	0.01	-4.12	4.94	0.86	-0.01	-4.77	4.31	0.92	-0.03	-5.83	4.06	0.72
p,p'-DDT	-0.01	-5.41	5.03	0.94	-0.01	-5.50	4.86	0.90	-0.05	-8.20	4.78	0.60
Dieldrin	-0.01	-7.53	6.22	0.85	-0.02	-7.57	6.18	0.84	-0.04	-9.39	5.69	0.63
cisHeptachlorepoide	0.01	-5.47	6.27	0.89	0.01	-5.50	6.16	0.91	0.00	-6.44	6.41	1.00
HCB	0.09	-3.26	13.21	0.23	0.08	-4.00	12.57	0.31	0.09	-6.58	16.46	0.40
HCH	-0.02	-5.07	4.06	0.83	-0.01	-4.87	4.25	0.89	-0.04	-7.23	4.61	0.66
Mirex	0.03	-4.24	6.28	0.70	0.04	-4.04	6.58	0.64	0.06	-5.09	8.94	0.59
Parlar26	0.07	-2.30	6.58	0.34	0.06	-2.71	6.23	0.44	0.06	-3.71	7.04	0.54
Parlar50	0.08	-2.03	7.08	0.27	0.08	-2.28	6.84	0.33	0.08	-3.18	8.00	0.40

Model2: 出産時年齢 妊娠日数 児性別 家庭環境得点 血液採取時期で調整

Model3: Model2 + カフェイン摂取量, 妊娠中喫煙, Todal dioxin TEQで調整

表 5 BSID-II psychomotor development scores (PDI) for infants in relation to the organochlorine pesticides.

persistent organochlorine pesticides	PDI											
	Model 1(crude)				Model 2				Model 3			
	95%CI		ρ		95%CI		ρ		95%CI		ρ	
oxychlordane	-0.01	-8.23	7.05	0.88	-0.01	-7.89	6.87	0.89	0.12	-4.10	16.10	0.24
cisNonachlor	-0.07	-10.55	4.00	0.38	-0.06	-10.14	3.87	0.38	0.02	-8.77	10.81	0.84
transNonachlor	-0.02	-8.21	5.96	0.75	-0.02	-7.92	5.73	0.75	0.08	-5.23	12.81	0.41
p,p'-DDD	-0.02	-6.05	4.84	0.83	0.00	-5.37	5.07	0.95	0.02	-4.52	6.27	0.75
o,p'-DDE	-0.05	-7.48	3.69	0.50	-0.07	-8.10	2.59	0.31	-0.04	-7.20	4.25	0.61
p,p'-DDE	-0.12	-11.63	1.09	0.10	-0.13	-11.45	0.64	0.08	-0.09	-11.08	3.17	0.27
o,p'-DDT	-0.06	-9.25	3.67	0.40	-0.08	-9.45	2.96	0.30	-0.04	-8.65	4.80	0.57
p,p'-DDT	-0.12	-13.33	1.47	0.12	-0.11	-12.73	1.36	0.11	-0.09	-13.31	4.32	0.32
Dieldrin	-0.08	-14.69	4.89	0.32	-0.06	-13.14	5.68	0.44	-0.02	-11.80	8.75	0.77
cisHeptachlorepoide	-0.01	-8.73	8.03	0.93	0.00	-7.75	8.23	0.95	0.06	-5.12	12.34	0.42
HCB	-0.04	-14.88	8.72	0.61	-0.04	-14.22	8.57	0.62	0.07	-10.57	20.84	0.52
HCH	-0.11	-11.29	1.67	0.14	-0.08	-9.89	2.56	0.25	0.00	-8.17	7.95	0.98
Mirex	-0.13	-13.79	1.12	0.10	-0.12	-13.16	1.31	0.11	-0.05	-12.09	7.00	0.60
Parlar26	-0.08	-9.90	2.76	0.27	-0.08	-9.48	2.77	0.28	-0.02	-8.23	6.42	0.81
Parlar50	-0.07	-9.40	3.63	0.38	-0.06	-8.75	3.77	0.43	0.01	-7.05	8.20	0.88

Model2: 出産時年齢 妊娠日数 児性別 家庭環境得点 血液採取時期で調整

Model3: Model2 + カフェイン摂取量, 妊娠中喫煙, Todal dioxin TEQで調整

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 6 BSID-II MDI for male infants in relation to the organochlorine pesticides.

persistent organochlorine pesticides	MDI											
	Model 1(crude)				Model 2				Model 3			
	95%CI		<i>p</i>		95%CI		<i>p</i>		95%CI		<i>p</i>	
oxychlordan	0.09	-5.61	13.76	0.41	0.07	-6.74	13.03	0.53	0.07	-10.99	17.07	0.67
cisNonachlor	0.13	-3.72	15.04	0.23	0.12	-4.37	15.04	0.28	0.17	-6.46	21.50	0.29
transNonachlor	0.09	-5.25	12.68	0.41	0.08	-5.96	12.47	0.48	0.09	-9.13	16.18	0.58
p,p'-DDD	0.01	-7.24	8.11	0.91	0.05	-5.84	9.44	0.64	0.09	-5.46	11.47	0.48
o,p'-DDE	0.04	-5.70	7.87	0.75	-0.01	-6.99	6.59	0.95	-0.01	-7.26	6.95	0.97
p,p'-DDE	-0.09	-11.18	4.73	0.42	-0.09	-11.42	4.59	0.40	-0.12	-13.69	4.61	0.33
o,p'-DDT	0.03	-6.80	8.93	0.79	0.01	-7.47	8.37	0.91	0.01	-8.21	8.72	0.95
p,p'-DDT	0.00	-9.15	9.35	0.98	-0.01	-9.62	8.72	0.92	-0.04	-12.99	9.91	0.79
Dieldrin	-0.05	-15.08	9.37	0.64	-0.04	-14.16	10.29	0.75	-0.06	-16.79	10.39	0.64
cisHeptachlorepoide	0.00	-10.37	10.12	0.98	-0.03	-11.75	8.96	0.79	-0.05	-14.15	9.73	0.71
HCB	0.13	-6.66	25.49	0.25	0.10	-8.59	23.84	0.35	0.14	-13.15	34.51	0.37
HCH	-0.05	-10.24	6.16	0.62	-0.06	-10.77	6.47	0.62	-0.13	-15.57	6.20	0.39
Mirex	0.07	-6.14	12.27	0.51	0.10	-5.75	14.37	0.40	0.09	-8.28	16.08	0.53
Parlar26	0.13	-3.29	13.18	0.24	0.11	-4.19	12.46	0.33	0.12	-5.25	14.54	0.35
Parlar50	0.14	-2.97	12.92	0.22	0.13	-3.35	12.62	0.25	0.15	-4.22	14.84	0.27

Model2: 出産時年齢 妊娠日数 家庭環境得点 血液採取時期で調整

Model3: Model2 + カフェイン摂取量, 妊娠中喫煙, Total dioxin TEQで調整

表 7 BSID-II PDI for male infants in relation to the organochlorine pesticides.

persistent organochlorine pesticides	PDI											
	Model 1(crude)				Model 2				Model 3			
	95%CI		<i>p</i>		95%CI		<i>p</i>		95%CI		<i>p</i>	
oxychlordan	0.08	-7.75	16.67	0.47	0.06	-8.68	15.58	0.57	0.16	-8.41	26.02	0.31
cisNonachlor	0.06	-8.60	15.19	0.58	0.06	-8.59	15.36	0.58	0.16	-8.32	26.20	0.31
transNonachlor	0.08	-7.17	15.45	0.47	0.07	-7.80	14.83	0.54	0.16	-7.27	23.79	0.29
p,p'-DDD	0.01	-9.38	9.96	0.95	0.04	-7.41	11.35	0.68	0.08	-7.02	13.89	0.52
o,p'-DDE	0.01	-8.15	8.96	0.93	-0.02	-9.19	7.46	0.84	-0.01	-9.25	8.30	0.91
p,p'-DDE	-0.15	-16.75	3.14	0.18	-0.12	-15.37	4.20	0.26	-0.13	-17.32	5.23	0.29
o,p'-DDT	-0.07	-12.92	6.87	0.54	-0.06	-12.26	7.14	0.60	-0.05	-12.71	8.17	0.67
p,p'-DDT	-0.09	-16.43	6.78	0.41	-0.09	-15.89	6.51	0.41	-0.10	-19.53	8.63	0.44
Dieldrin	-0.12	-23.73	6.89	0.28	-0.08	-20.26	9.66	0.48	-0.07	-21.97	11.55	0.54
cisHeptachlorepoide	0.01	-12.53	13.28	0.95	0.01	-12.19	13.22	0.94	0.04	-12.62	16.85	0.78
HCB	0.07	-14.27	26.48	0.55	0.07	-13.83	26.10	0.54	0.18	-12.52	46.11	0.26
HCH	-0.10	-15.04	5.53	0.36	-0.06	-13.31	7.84	0.61	-0.06	-16.32	10.65	0.68
Mirex	-0.03	-13.22	10.03	0.79	-0.01	-12.73	12.07	0.96	0.01	-14.62	15.53	0.95
Parlar26	0.01	-10.09	10.83	0.94	0.00	-10.13	10.43	0.98	0.02	-11.12	13.44	0.85
Parlar50	0.04	-8.38	11.81	0.74	0.04	-7.82	11.92	0.68	0.08	-8.04	15.61	0.53

Model2: 出産時年齢 妊娠日数 家庭環境得点 血液採取時期で調整

Model3: Model2 + カフェイン摂取量, 妊娠中喫煙, Total dioxin TEQで調整

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 8 BSID-II MDI for female infants in relation to the organochlorine pesticides.

persistent organochlorine pesticides	MDI											
	Model 1(crude)				Model 2				Model 3			
	95%CI		p		95%CI		p		95%CI		p	
oxychlordane	0.09	-3.00	7.08	0.42	0.10	-3.31	7.90	0.42	0.10	-5.04	10.01	0.51
cisNonachlor	0.01	-4.51	4.99	0.92	0.01	-4.93	5.46	0.92	-0.05	-8.07	5.95	0.76
transNonachlor	0.07	-3.16	6.21	0.52	0.08	-3.48	6.82	0.52	0.06	-5.20	8.00	0.67
p,p'-DDD	-0.04	-3.97	2.67	0.70	-0.04	-3.96	2.77	0.72	-0.05	-4.22	2.72	0.67
o,p'-DDE	-0.07	-5.15	2.67	0.53	-0.07	-5.22	2.75	0.54	-0.13	-6.98	2.34	0.32
p,p'-DDE	-0.03	-5.01	3.67	0.76	-0.05	-5.50	3.35	0.63	-0.12	-8.03	2.99	0.37
o,p'-DDT	-0.03	-5.27	3.78	0.75	-0.05	-5.73	3.45	0.62	-0.11	-7.58	3.08	0.40
p,p'-DDT	-0.02	-5.57	4.56	0.84	-0.04	-6.15	4.25	0.72	-0.11	-9.26	4.06	0.44
Dieldrin	0.03	-5.59	7.79	0.74	0.04	-5.37	8.11	0.69	0.03	-6.61	8.26	0.83
cisHeptachlorepoide	0.03	-5.10	6.52	0.81	0.04	-4.97	6.97	0.74	0.03	-5.60	7.14	0.81
HCB	0.04	-6.14	8.59	0.74	0.03	-6.89	8.65	0.82	-0.01	-10.81	9.96	0.94
HCH	0.05	-3.27	5.45	0.62	0.05	-3.54	5.80	0.63	0.04	-5.01	6.76	0.77
Mirex	-0.05	-6.30	4.04	0.66	-0.06	-7.60	4.61	0.63	-0.15	-11.20	4.03	0.35
Parlar26	-0.04	-4.88	3.40	0.72	-0.03	-4.92	3.77	0.79	-0.09	-7.05	3.69	0.53
Parlar50	-0.03	-5.07	3.94	0.80	-0.01	-5.02	4.43	0.90	-0.07	-7.57	4.50	0.61

Model2: 出産時年齢 妊娠日数 家庭環境得点 血液採取時期で調整

Model3: Model2 + カフェイン摂取量, 妊娠中喫煙, Todal dioxin TEQで調整

表 9 BSID-II PDI for female infants in relation to the organochlorine pesticides.

persistent organochlorine pesticides	PDI											
	Model 1(crude)				Model 2				Model 3			
	95%CI		p		95%CI		p		95%CI		p	
oxychlordane	-0.12	-14.90	3.84	0.24	-0.06	-12.28	7.37	0.62	0.09	-8.97	16.73	0.55
cisNonachlor	-0.23	-18.32	-1.04	0.03 *	-0.18	-16.31	1.56	0.10	-0.15	-17.98	5.80	0.31
transNonachlor	-0.15	-14.85	2.50	0.16	-0.09	-12.71	5.28	0.41	0.00	-11.25	11.31	1.00
p,p'-DDD	-0.03	-7.17	5.24	0.76	-0.03	-6.74	5.04	0.77	-0.02	-6.37	5.49	0.88
o,p'-DDE	-0.16	-12.62	1.83	0.14	-0.14	-11.77	2.04	0.16	-0.09	-11.18	4.77	0.43
p,p'-DDE	-0.10	-12.09	4.06	0.33	-0.12	-12.20	3.16	0.25	-0.04	-10.87	8.04	0.77
o,p'-DDT	-0.08	-11.79	5.06	0.43	-0.10	-12.02	3.97	0.32	-0.05	-10.95	7.31	0.69
p,p'-DDT	-0.16	-16.46	2.22	0.13	-0.15	-15.74	2.22	0.14	-0.09	-15.51	7.24	0.47
Dieldrin	-0.04	-15.04	9.95	0.69	-0.01	-12.13	11.47	0.96	0.06	-9.20	16.15	0.59
cisHeptachlorepoide	-0.04	-12.73	8.97	0.73	0.00	-10.21	10.68	0.96	0.07	-7.29	14.41	0.52
HCB	-0.17	-24.60	2.52	0.11	-0.14	-22.44	4.46	0.19	-0.06	-21.52	13.91	0.67
HCH	-0.12	-12.90	3.29	0.24	-0.09	-11.50	4.79	0.41	0.04	-8.58	11.50	0.77
Mirex	-0.25	-20.72	-2.00	0.02 *	-0.23	-20.93	-0.03	0.049 *	-0.21	-22.49	3.30	0.14
Parlar26	-0.22	-15.59	-0.49	0.04 *	-0.15	-13.13	1.86	0.14	-0.09	-12.33	5.98	0.49
Parlar50	-0.22	-17.11	-0.69	0.03 *	-0.16	-14.39	1.91	0.13	-0.09	-13.94	6.63	0.48

Model2: 出産時年齢 妊娠日数 家庭環境得点 血液採取時期で調整

Model3: Model2 + カフェイン摂取量, 妊娠中喫煙, Todal dioxin TEQで調整

胎児期の有機塩素系農薬曝露による児の臍帯血中性ホルモンへの影響

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

研究要旨

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

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

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

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

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

研究協力者

伊藤佐智子（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

三井 貴彦（山梨大学大学院医学工学総合研究部）

長 和俊（北海道大学病院周産母子センター）

水谷 太，菅木 洋一（いであ株式会社環境創造研究所）

A．研究目的

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

DDT は抗アンドロゲ作用、エストロゲン作用が報告され、乳がんや前立腺が

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

B．研究方法

B-1. 研究対象

北海道札幌市の一産科病院を受診し

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

B-2. 曝露評価

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

B-3. アウトカム評価

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

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

B-4. 共変量

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

B-5. 解析

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

先行研究より、曝露およびアウトカムへの影響が考えられる母親の年齢、経産歴、児の在胎週数を共変量として調整した。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とし、統計解析は JMP Clinical 5 (SAS) を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は、北海道大学大学院医学研究科内に設置された倫理審査委員会の承認を得ている。また、調査票冒頭に本調査の趣旨を明記するとともに、検査データ等の個人情報には厳重な管理をしたで扱われている。

C. 研究結果

1) 対象者の特徴

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

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

2) 母体血中 OCP 濃度分布

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

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

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

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

れも 30%未満だった。

3) 臍帯血中性ホルモン濃度

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

4) OCP 曝露と母児の特徴

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

5) 臍帯血中性ホルモンと母児の特徴

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

6) OCP 曝露と児の性ホルモンとの関連

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

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

合物に由来するのか、他の化合物の影響を排除できないことがあげられる。

E . 結論

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

F . 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

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

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

引用文献

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表1 母児特徴 (N = 232).

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

BMI; body mass index

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表2. 母体血中OCP濃度 (n=232)

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表3 OCP濃度と母児の特徴

Characteristics		n	Oxychlorobene	cis-Nonachlor	trans-Nonachlor	9,p-DDE	9,p-DDE	9,p-DDE	9,p-DDT	9,p-DDT	9,p-DDT							
			Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)							
Mother	Age at delivery (years)																	
	Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	0.350**	0.267**	0.311**	0.030	0.270**	0.009	0.102										
Infant	Birth weight	-0.093	0.089	-0.111	0.119	-0.003	0.062	0.118										
	Gestational Age	0.061	-0.057	-0.057	0.005	-0.002	0.022	0.025										
		0.045	0.025	0.035	0.039	0.117	0.066	0.037										
	Educational level	100	39.83 (27.1, 56.0)	4.19	0.604	72.73 (52.09, 108.20)	0.415	1.62 (0.88, 2.44)	0.479	1.16 (0.70, 1.71)	0.435	5.05 (3.76, 8.1)	9.42 (7.1)	0.323	3.01 (2.09, 4.47)	0.106	21.59 (15.41, 32.84)	0.116
		132	40.22 (28.87, 57.78)			78.85 (51.80, 118.08)		1.69 (1.03, 2.58)		1.33 (0.96, 1.86)		63.47 (42.04, 97.61)		3.54 (2.42, 4.99)		25.32 (16.37, 34.77)		
	Annual Household income	166	39.07 (27.61, 56.0)	0.031	0.023	70.06 (50.04, 111.0)	0.049	1.62 (0.99, 2.53)	0.89	1.26 (0.71, 1.74)	0.309	61.92 (41.26, 94.26)		3.27 (2.22, 4.66)	0.385	22.35 (16.38, 33.65)	0.267	
		66	45.83 (30.02, 66.07)			86.66 (62.34, 110.04)		1.68 (0.98, 2.58)		1.23 (0.77, 2.05)		63.52 (39.24, 130.85)		3.64 (2.41, 5.06)		24.18 (15.54, 38.90)		
	Smoking during pregnancy	190	40.31 (29.25, 57.0)	0.188	0.295	76.63 (54.06, 112.0)	0.388	1.61 (0.98, 2.57)	0.494	1.26 (0.73, 1.77)	0.798	61.75 (40.97, 97.18)		3.46 (2.37, 4.66)	0.52	23.74 (16.38, 33.93)	0.318	
		42	38.64 (23.48, 51.97)			69.19 (48.19, 109.46)		1.79 (1.07, 2.39)		1.17 (0.70, 1.84)		62.95 (40.34, 94.10)		3.03 (1.79, 5.09)		21.08 (14.17, 34.22)		
	Alcohol consumption during pregnancy	154	40.13 (28.81, 56.0)	0.735	0.659	74.14 (51.75, 112.0)	0.86	1.62 (0.99, 2.55)	0.868	1.22 (0.69, 1.72)	0.129	60.54 (41.26, 97.18)		3.10 (2.21, 4.67)	0.021	22.62 (15.54, 33.48)	0.411	
		78	40.04 (28.87, 56.02)			78.85 (52.92, 108.95)		1.67 (0.87, 2.41)		1.27 (0.90, 1.87)		64.85 (40.30, 97.65)		3.86 (2.56, 4.98)		24.14 (17.27, 33.98)		
Mother	Parity	120	42.99 (32.00, 60.0)	0.005	0.034	87.74 (56.35, 117.0)	0.019	1.64 (1.00, 2.52)	0.888	1.35 (0.81, 1.83)	0.009	65.29 (43.78, 100.45)		3.39 (2.38, 4.67)	0.576	24.38 (17.17, 33.92)	0.29	
		112	38.97 (26.35, 54.44)			70.05 (45.60, 97.48)		1.65 (0.91, 2.62)		1.13 (0.69, 1.71)		56.40 (36.51, 93.84)		3.24 (2.22, 4.78)		21.98 (14.92, 34.69)		
	Blood sampling period	159	39.19 (27.65, 56.0)	0.145	0.266	70.38 (51.93, 106.0)	0.086	1.51 (0.99, 2.28)	0.298	1.22 (0.73, 1.83)	0.919	62.60 (42.96, 94.14)		3.42 (2.25, 4.72)	0.709	22.49 (15.57, 33.96)	0.736	
		73	44.66 (29.31, 60.99)			87.82 (51.95, 124.70)		1.76 (0.87, 2.84)		1.35 (0.71, 1.73)		61.45 (39.28, 100.37)		3.36 (2.28, 4.48)		23.77 (19.33, 34.17)		
	Type of delivery	230	39.87 (28.87, 57.0)	0.349	0.155	75.08 (51.89, 110.0)	0.195	1.62 (0.98, 2.53)	0.159	1.25 (0.72, 1.77)	0.783	61.92 (41.04, 96.48)		3.36 (2.27, 4.68)	0.731	22.84 (16.14, 33.93)	0.297	
		2	55.41 (40.2, 70.62)			119.01 (91.04, 146.97)		2.87 (2.23, 3.5)		1.40 (0.91, 1.88)		68.72 (30.45, 107.92)		3.70 (3.03, 4.36)		36.58 (23.77, 49.38)		
	Measurement year of POPs	32	40.78 (28.02, 60.0)	0.264	0.017	66.46 (52.16, 108.0)	0.75	1.16 (0.88, 1.66)	0.001	1.71 (1.18, 2.19)	0.001	71.87 (49.50, 126.30)		4.02 (2.86, 6.21)	0.004	29.49 (18.86, 41.40)	0.002	
		58	44.62 (31.72, 65.59)			83.53 (38.74, 118.82)		1.43 (0.91, 2.39)		1.40 (1.06, 1.88)		65.02 (42.61, 84.49)		3.67 (2.62, 4.42)		24.62 (17.64, 37.90)		
		23	38.79 (19.41, 53.52)			69.50 (45.22, 90.63)		1.73 (0.97, 2.84)		1.11 (0.20, 1.49)		47.42 (29.60, 61.97)		3.15 (2.18, 3.90)		19.66 (14.52, 26.03)		
		9	44.56 (27.94, 50.97)			78.66 (55.40, 105.71)		1.92 (0.88, 3.01)		0.99 (0.20, 1.17)		66.90 (30.11, 91.47)		2.89 (1.63, 3.65)		23.38 (14.52, 28.57)		
		22	44.30 (32.28, 56.66)			74.66 (49.88, 102.90)		1.02 (0.63, 2.11)		1.15 (0.80, 2.44)		79.21 (34.52, 150.93)		3.56 (2.24, 6.76)		25.51 (20.45, 39.58)		
		37	38.04 (26.11, 60.71)			80.26 (49.55, 127.42)		2.58 (1.53, 3.29)		0.71 (0.54, 1.26)		55.92 (31.86, 76.90)		2.25 (1.32, 3.6)		19.21 (11.50, 25.09)		
		51	39.30 (26.30, 53.89)			73.59 (50.83, 122.27)		1.77 (1.17, 2.04)		1.14 (0.69, 1.83)		67.03 (48.66, 116.07)		3.54 (2.41, 5.71)		27.68 (17.40, 35.03)		
Infant	Sex	106	40.22 (29.26, 57.0)	0.623	0.984	75.82 (53.44, 116.0)	0.733	1.70 (1.04, 2.55)	0.799	1.18 (0.72, 1.66)	0.448	64.93 (40.32, 93.47)		3.39 (2.42, 4.42)	0.815	23.90 (16.56, 33.88)	0.759	
		126	39.87 (28.34, 57.15)			74.66 (51.75, 107.06)		1.60 (0.93, 2.66)		1.30 (0.72, 1.87)		61.15 (41.00, 98.41)		3.36 (2.20, 4.97)		21.96 (15.78, 34.45)		

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表3 OCP濃度と母乳の特徴(続き)

Characteristics	n	Dieldrin	cis-HCE	HCB	-HCH	Mirex	Parlar-26	Parlar-50
Mother								
Age at delivery (years)	108	119*	0.254**	0.464**	0.513**	0.176**	0.181**	
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	0.221**	101	0.177**	0.147*	-0.074	0.240**	0.240**	
Birth weight	-0.049	-0.66	-0.101	-0.128	-0.03	-0.024	-0.022	
Gestational Age	-0.035	0.62	-0.082	0.061	0.027	0.024	0.018	
		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)
Educational level	100	16.55 (12.52, 22.0)	26.07 (18.56, 40.28)	101.71 (80.26, 130.0)	154.79 (96.08, 262.0)	5.99 (4.08, 8.34)	4.85 (3.17, 7.55)	7.02 (4.61, 10.28)
	132	16.80 (12.11, 21.59)	26.91 (18.96, 37.13)	106.79 (85.26, 167.25)	154.31 (109.21, 220.69)	6.11 (4.31, 8.59)	4.05 (2.56, 6.68)	6.50 (3.88, 9.48)
Annual Household Income	<5 million yen/year	166	15.93 (12.02, 20.0)	26.07 (18.44, 35.00)	102.17 (80.36, 129.0)	53.64 (100.87, 290.1)	0.001	4.32 (2.89, 6.82)
	5 million yen/year	66	17.89 (12.60, 24.41)	26.55 (19.17, 43.07)	111.51 (85.53, 145.40)	7.44 (4.82, 11.64)	5.22 (3.14, 7.61)	6.48 (4.25, 9.48)
Smoking during pregnancy	No	190	16.86 (12.35, 22.0)	26.79 (19.14, 37.90)	103.82 (83.69, 131.0)	58.46 (103.79, 240.6)	0.203	4.50 (2.84, 6.60)
	Yes	42	15.51 (11.41, 21.31)	24.39 (16.80, 35.42)	104.48 (74.82, 132.31)	50.87 (103.84, 184.91)	4.23 (2.73, 8.24)	5.88 (3.75, 11.43)
Alcohol consumption during pregnancy	No	154	16.80 (12.14, 22.0)	27.18 (18.91, 39.08)	105.46 (81.20, 133.0)	62.80 (104.40, 240.4)	0.597	4.19 (2.82, 6.82)
	Yes	78	16.35 (12.42, 21.66)	24.82 (18.42, 35.69)	99.34 (86.16, 130.72)	146.89 (102.56, 202.87)	4.54 (2.91, 7.58)	7.32 (4.44, 10.56)
Parity	0	120	17.16 (12.52, 21.0)	26.79 (19.16, 36.85)	109.93 (91.03, 131.0)	65.19 (114.52, 270.1)	0.82	5.23 (2.96, 7.20)
	>1	112	16.35 (12.05, 22.66)	25.17 (18.19, 40.63)	95.36 (72.71, 129.15)	143.66 (90.00, 211.57)	4.02 (2.72, 6.68)	5.94 (3.85, 8.66)
Blood sampling period	During pregnancy	159	17.59 (12.39, 22.0)	26.44 (18.91, 38.12)	104.06 (85.45, 130.1)	154.13 (108.06, 210.94)	0.058	4.50 (2.93, 7.08)
	After delivery	73	15.51 (12.06, 21.32)	25.10 (18.90, 36.78)	103.73 (75.77, 138.73)	158.62 (94.33, 254.44)	6.76 (4.54, 10.19)	6.42 (4.45, 10.72)
Type of delivery	Vaginal	230	16.61 (12.16, 22.0)	26.15 (18.76, 37.42)	103.99 (82.85, 131.0)	154.31 (104.40, 240.7)	0.424	4.41 (2.84, 7.09)
	Cesarean section	2	18.66 (16.82, 20.50)	36.20 (28.26, 44.14)	134.17 (85.55, 182.79)	154.45 (68.50, 240.39)	7.67 (5.34, 10.00)	10.15 (7.63, 12.67)
Measurement year of POPs	2007	32	17.66 (12.33, 25.0)	26.30 (18.96, 44.74)	104.75 (88.58, 133.0)	167.85 (124.37, 260.07)	0.047	5.69 (4.41, 9.18)
	2008	58	19.34 (14.29, 23.60)	29.54 (23.84, 41.88)	115.05 (92.00, 137.99)	159.03 (102.13, 273.09)	7.18 (4.98, 10.32)	8.49 (5.49, 12.61)
	2009	23	14.85 (11.80, 16.67)	21.73 (15.67, 31.26)	90.48 (67.89, 135.85)	127.72 (50.51, 180.76)	4.32 (2.71, 6.92)	5.33 (4.32, 6.73)
	2010	9	20.07 (15.95, 20.91)	36.66 (24.19, 41.30)	107.46 (82.55, 145.26)	108.65 (77.16, 171.69)	6.68 (5.62, 8.10)	7.66 (6.09, 9.16)
	2011	22	18.02 (12.72, 28.77)	32.53 (22.23, 39.82)	124.98 (92.86, 144.27)	179.66 (109.99, 279.67)	7.25 (4.88, 10.00)	8.58 (4.04, 12.07)
	2012	37	12.90 (9.01, 19.27)	20.50 (15.27, 34.12)	85.55 (66.94, 107.31)	129.34 (86.86, 192.98)	4.84 (3.72, 4.779)	5.12 (3.46, 6.45)
	2013	51	15.98 (12.17, 20.83)	24.94 (18.48, 32.97)	102.89 (86.36, 134.96)	176.87 (113.61, 247.11)	5.61 (4.08, 7.78)	5.22 (3.84, 8.60)
Infant								
Sex	Male	106	15.92 (12.07, 22.0)	26.39 (19.22, 40.80)	101.76 (85.53, 133.0)	153.65 (107.63, 240.95)	6.04 (4.53, 8.94)	6.64 (4.33, 10.27)
	Female	126	17.07 (12.51, 21.96)	26.15 (18.49, 35.42)	104.60 (78.58, 133.0)	155.04 (102.56, 240.78)	6.04 (4.03, 8.41)	6.50 (4.25, 9.74)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

表4-1. 性ホルモンの母児の特徴(男児)

Characteristics	Boys		P4		SHBG		PRL		T/SHBG		LH		FSH		LHT		InhibinB		ILSN3		
	E2	p-value	T	p-value	SHBG	p-value	PRL	p-value	T/SHBG	p-value	LH	p-value	FSH	p-value	LHT	p-value	InhibinB	p-value	ILSN3	p-value	
Maternal characteristics																					
Age at delivery (years)	-0.213	0.033	0.062	0.529	-0.204	0.037	-0.086	0.330	0.827	0.827	0.150	0.137	0.122	0.221	0.050	0.618	-0.007	0.943	-0.090	0.368	
Pre-pregnancy BMI (m2/kg)	0.071	0.479	0.118	0.232	-0.066	0.385	-0.159	0.106	-0.077	0.439	0.15	0.137	0.122	0.221	0.05	0.618	-0.007	0.943	-0.09	0.368	
Parity	5.72 (3.96-8.39)	0.007	0.411	252.7 (204.3-322.0)	0.01	17.2 (14.6-19.9)	0.019	15.3 (13.3-18.2)	0.308	0.308	0.127	0.987	0.571	0.697	0.697	0.697	0.368	0.368	0.781	0.781	
Annual household income (million yen)	0.249	0.249	0.566	0.566	0.733	0.733	0.335	0.335	0.828	0.828	0.872	0.689	0.689	0.949	0.949	0.401	0.401	0.866	0.866		
Educational level	0.588	0.588	0.797	263.3 (192.4-308.0)	0.101	263.3 (192.4-308.0)	0.657	0.657	0.885	0.885	0.855	0.853	0.853	0.83	0.83	0.81	0.81	0.92	0.92		
Smoking consumption during pregnancy	0.123	0.123	0.464	0.464	0.793	0.793	0.062	0.062	0.137	0.137	0.858	0.858	0.801	0.703	0.703	0.758	0.758	0.105	0.105		
Alcohol consumption during pregnancy	0.926	0.926	0.066	0.066	0.49	0.49	0.555	0.555	0.073	0.073	0.903	0.903	0.834	0.182	0.182	0.83	0.83	0.875	0.875		
Infant characteristics																					
Birth weight (g)	0.092	0.361	-0.061	0.541	0.103	0.295	0.028	0.774	-0.003	0.973	-0.138	0.171	0.097	0.334	-0.138	0.189	-0.079	0.423	-0.02	0.842	
Gestational age (wks)	-0.112	0.266	-0.199	0.043	-0.041	0.675	0.197	0.044	0.094	0.344	-0.103	0.306	-0.031	0.755	0.015	0.879	0.12	0.211	-0.233	0.018	

表4-1. 性ホルモンの母児の特徴(男児)

Characteristics	Boys		P4		SHBG		PRL		T/SHBG		LH		FSH		LHT		InhibinB		ILSN3		
	E2	p-value	T	p-value	SHBG	p-value	PRL	p-value	T/SHBG	p-value	LH	p-value	FSH	p-value	LHT	p-value	InhibinB	p-value	ILSN3	p-value	
Maternal characteristics																					
Age at delivery (years)	-0.111	0.222	0.017	0.856	-0.073	0.422	0.092	0.308	-0.046	0.618	0.192	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	
Pre-pregnancy BMI (m2/kg)	-0.154	0.089	-0.099	0.28	0.098	0.33	0.04	0.653	0.102	0.266	0.11	0.224	0.11	0.224	0.11	0.224	0.11	0.224	0.11	0.224	
Parity	5.17 (3.66-7.55)	0.005	0.710 (52.1-97.8)	0.874	0.006	15.6 (13.9-18.3)	0.146	83.3 (61.5-121.5)	0.764	0.001	13.7 (9.85-18.9)	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	<DL	<DL	<DL	<DL	
Annual household income (million yen)	3.92 (2.89-5.6)	0.099	68.8 (51.9-96.3)	0.387	0.488	15.5 (12.5-18.5)	0.832	86.0 (59.4-119.0)	0.537	0.767	18.2 (12.9-23.9)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	<DL	<DL	<DL	<DL	
Educational level	4.16 (2.96-5.96)	0.099	68.6 (51.2-93.9)	0.387	0.488	15.4 (12.7-19.0)	0.832	87.4 (61.4-122.5)	0.537	0.767	16.2 (12.4-22.2)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	<DL	<DL	<DL	<DL	
Smoking consumption during pregnancy	5.64 (3.96-7.73)	0.007	76.9 (59.2-110.7)	0.387	0.488	15.5 (13.9-17.7)	0.832	81.1 (60.8-115.0)	0.537	0.767	14.4 (11.7-17.7)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	<DL	<DL	<DL	<DL	
Alcohol consumption during pregnancy	4.75 (3.05-6.86)	0.007	78.6 (59.5-110.0)	0.34	0.488	15.8 (13.3-19.0)	0.111	81.4 (56.9-129.0)	0.825	0.512	16.2 (12.8-23.3)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	<DL	<DL	<DL	<DL	
Educational level	4.42 (3.29-6.86)	0.007	65.0 (51.6-90.3)	0.387	0.488	15.3 (12.4-17.3)	0.832	88.6 (64.8-116)	0.537	0.767	15.3 (11.4-20.1)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	<DL	<DL	<DL	<DL	
Smoking consumption during pregnancy	4.51 (3.11-6.39)	0.109	66.7 (50.9-97.0)	0.47	0.488	15.2 (12.5-17.5)	<0.001	85.7 (60.2-116)	0.603	0.201	16.2 (11.7-22.1)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	<DL	<DL	<DL	<DL	
Alcohol consumption during pregnancy	5.24 (3.98-6.96)	0.007	74.8 (56.4-95.5)	0.387	0.488	17.7 (15.4-20.5)	0.832	86.8 (61.5-131.8)	0.537	0.767	14.8 (12.2-20.6)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	<DL	<DL	<DL	<DL	
Educational level	4.67 (3.35-6.48)	0.007	67.3 (51.0-93.8)	0.748	0.488	15.7 (13.4-18.5)	0.818	86.0 (62.5-122.5)	0.689	0.144	15.6 (11.9-22.0)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	<DL	<DL	<DL	<DL	
Alcohol consumption during pregnancy	4.67 (3.00-6.73)	0.007	73.1 (53.2-97.1)	0.387	0.488	15.3 (12.3-18.8)	0.818	86.9 (55.9-111.0)	0.689	0.144	16.2 (11.6-21.0)	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	<DL	<DL	<DL	<DL	
Infant characteristics																					
Birth weight (g)	0.061	0.603	0.102	0.262	-0.003	0.971	-0.127	0.159	0.093	0.913	0.883	0.029	0.159	-0.1212	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	
Gestational age (wks)	-0.05	0.593	-0.031	0.733	-0.144	0.109	0.279	0.002	0.653	0.041	0.653	-0.18	0.049	-0.038	0.6344	0.6344	0.6344	0.6344	0.6344	0.6344	

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク管理事業）
分担研究報告書

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

胎児期の有機塩素系農薬（OCP）曝露が母児の甲状腺ホルモンに及ぼす影響

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

研究要旨

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

研究協力者

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

A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

B. 研究方法

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

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

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

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

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

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

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

有機塩素系農薬の濃度を表 2 に示す。中

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

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

D. 考察

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

本研究では, 有機塩素系農薬による影響として母児ともに FT4 のみ変動し, TSH には変動が観察されなかった。甲状腺ホルモンの通常メカニズムとして, 血中 T4 値が高いと TSH の分泌が抑制され, T4 値

が低いと TSH 分泌が促進される。このようなネガティブフィードバックシステムが働くことにより血中 T4 値が一定であるよう調整されている。本研究では FT4 の変動があったにも関わらず TSH の変動は観察されなかったことから、有機塩素系農薬が上記のネガティブフィードバックシステムを制御する HPT 軸（脳下垂体-甲状腺軸）の作用へ影響している可能性が示された。

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表 なし

2) 学会発表 なし

参考文献

- 1) Boucher, O., Simard, M. N., Muckle, G., Rouget, F., Kadhel, P., Bataille, H., Cordier, S. (2013). Exposure to an organochlorine pesticide (chlordecone) and development of 18-month-old infants. *Neurotoxicology*, 35, 162-168.
- 2) Torres-Sanchez, L., Rothenberg, S. J., Schnaas, L., Cebrian, M. E., Osorio, E., Del Carmen Hernandez, M., Lopez-Carrillo, L. (2007). In utero p,p'-DDE exposure and infant neurodevelopment: a perinatal cohort in Mexico. *Environ Health Perspect*, 115(3), 435-439.
- 3) Eskenazi, B., Marks, A. R., Bradman, A., Fenster, L., Johnson, C., Barr, D. B., & Jewell, N. P. (2006). In utero exposure to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and neurodevelopment among young Mexican American children. *Pediatrics*, 118(1), 233-241.
- 4) Kezios, K. L., Liu, X., Cirillo, P. M., Cohn, B. A., Kalantzi, I., Wang, Y., ... Factor-Litvak, P. (2013). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), DDT metabolites and pregnancy outcomes. *Reprod Toxicol*, 35, 156-164.
- 5) Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Allan, W. C., Williams, J. R., Knight, G. J., Gagnon, J., ... & Faix, J. D. (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1 Characteristics of mothers and infants.

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1 Levels of organochlorine pesticides (pg/g-wet) detected over 80 % of participants.

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

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

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

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

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 Thyroid hormones for infants in relation to the organochlorine pesticides.

	TSH						FT4									
	Crude			Model 1			Crude			Model 1						
	β	95%CI	p	β	95%CI	p	β	95%CI	p	β	95%CI	p				
oxychlordane	-0.02	-0.18	0.14	0.80	-0.06	-0.21	0.10	0.47	0.03	-0.01	0.07	0.15	0.03	-0.01	0.07	0.11
cisNonachlor	0.00	-0.15	0.16	0.96	-0.02	-0.17	0.13	0.79	0.03	0.00	0.07	0.07	0.04	0.00	0.08	0.03
transNonachlor	-0.01	-0.16	0.13	0.86	-0.04	-0.18	0.11	0.60	0.03	-0.01	0.06	0.11	0.03	0.00	0.07	0.06
p,p'-DDD	-0.03	-0.13	0.07	0.57	-0.03	-0.12	0.07	0.59	0.01	-0.01	0.04	0.28	0.01	-0.01	0.03	0.35
o,p'-DDE	0.01	-0.09	0.11	0.86	-0.01	-0.11	0.09	0.79	0.02	0.00	0.04	0.10	0.02	0.00	0.04	0.09
p,p'-DDE	0.01	-0.11	0.14	0.85	-0.01	-0.13	0.12	0.90	0.01	-0.02	0.04	0.36	0.01	-0.02	0.04	0.46
o,p'-DDT	0.06	-0.06	0.19	0.34	0.05	-0.07	0.17	0.44	0.01	-0.02	0.04	0.57	0.01	-0.02	0.04	0.44
p,p'-DDT	-0.02	-0.17	0.13	0.77	-0.04	-0.18	0.11	0.64	0.04	0.00	0.07	0.05	0.04	0.01	0.08	0.02
Dieldrin	0.07	-0.11	0.26	0.45	0.07	-0.12	0.25	0.47	0.04	-0.01	0.08	0.12	0.04	-0.01	0.08	0.08
cisHeptachlorepoxyde	-0.03	-0.19	0.13	0.71	-0.02	-0.18	0.14	0.77	-0.01	-0.05	0.03	0.59	0.00	-0.04	0.04	0.88
HCB	0.01	-0.22	0.24	0.93	-0.05	-0.28	0.18	0.67	0.05	-0.01	0.11	0.09	0.05	0.00	0.11	0.07
β HCH	0.00	-0.12	0.13	0.98	-0.02	-0.14	0.10	0.77	0.01	-0.02	0.04	0.36	0.02	-0.01	0.05	0.23
Mirex	0.03	-0.11	0.18	0.66	0.02	-0.12	0.17	0.74	0.03	-0.01	0.06	0.15	0.03	0.00	0.07	0.05
Parlar26	0.04	-0.08	0.17	0.49	0.03	-0.09	0.16	0.59	0.02	-0.01	0.05	0.31	0.02	-0.01	0.05	0.13
Parlar50	0.01	-0.12	0.14	0.82	0.00	-0.13	0.13	0.98	0.03	0.00	0.06	0.09	0.03	0.00	0.06	0.04

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

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

血液中のビスフェノール A (BPA) フリー体の分析

研究分担者 松村 徹 いであ株式会社環境創造研究所副所長

研究要旨

昨年度までに検討し、開発した血液中のビスフェノール A (BPA) の測定分析方法をもとに BPA のフリー体の分析方法を開発した。この方法を用い保存中の血液試料について BPA フリー体の濃度を確認し、コンタミネーション(汚染)の状況を確認した。分析した試料からは、BPA は検出されなかったため、試料採取から保存までの操作における試料のコンタミネーションはなかったと考えられた。

研究協力者

山本 潤

(いであ株式会社環境創造研究所)

A . 研究目的

ビスフェノール A (以降 BPA) はポリカーボネート製のプラスチックを製造する際、モノマーや、エポキシ樹脂の原料として使用されている化学物質であり、摂取によりエストロゲン受容体が活性化され、エストロゲンに類似した生理作用を表すことが報告されている。低用量仮説の提唱によって注目を受けたが、ヒトに対する健康影響評価に関しては現在も諸説の報告例があり継続して研究が行われているところである。また、近年、BPA については尿道下裂との関連性について幾つか報告がなされているが、血中濃度は極低濃度であり、試料間の有意な濃度差を観測するためには精確な測定値が必要と考えられる。

BPA の体内負荷量を評価するにはヒト血液中における濃度データが必要であるが、存在量は極低く、また、様々な化成品に含まれていることから BPA の分析においてはブランク値や試料採取から保存中におけるコンタミネーション(汚染)の低減、把握する事が必要となる。本研究ではヒト血液中の BPA を議論可能な濃度レベルで精確に測定できていることを確認するため、コンタミネーションの状況

を把握する事を目的とした。

血液中に存在する BPA のほとんどがグルクロン酸と結合し、抱合体の形で存在することに着目し、BPA フリー体の測定方法について開発し、試料採取から保存におけるコンタミネーション状況の確認を行う事とした。

B . 研究方法

これまでに血液中の BPA の測定を行うため同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析法(以降 ID-LC-MS/MS)を開発し、ヒト血液試料(母体血及び臍帯血)に適用した。この方法は、酵素を用いて BPA グルクロン酸抱合体の脱抱合化を行い、血液中の総 BPA を評価する方法であるが、今回は、脱抱合処理を行わず、BPA フリー体を測定する事で、血液試料のコンタミネーションの状況を確認した。

今回の測定に用いた分析フローを図 1 に、LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示す。

C . 研究結果・考察

(1) 分析法の確認

純水、又は血液試料を用い BPA フリー体の分析法の確認を行った。純水と血液試料それぞれに 0.5ng/mL となるように BPA を添加し、回収率の確認を行った。純水に添加した場合は、回収率 97%、血液試料に添加した場合は、回収率 101%で

あった。

(2) 操作ブランク値及び分析法の検出下限値 (MDL : Method Detection Limit)

血液試料 20 検体 (母体血 10 検体及び臍帯血 10 検体) の分析と操作ブランク試験を 5 回実施した。操作ブランク試験の結果及びそれらの結果より計算された MDL を表 2 に示す。操作ブランクの平均値は 0.036ng/mL であり、操作ブランク試験の結果より計算された MDL は 0.037ng/mL であった。これまでの総 BPA の分析法と同様に、操作ブランク及び MDL は、0.1ng/mL 未満であった。

(3) 血液中の BPA フリー体の分析

試料は、以前、BPA の分析を行い、濃度の確認の取れているものを用いた。ヒト血液試料 20 検体 (母体血 10 検体及び臍帯血 10 検体) について BPA フリー体の測定分析を行った。結果を表 3 に示す。血液中の BPA フリー体の濃度は、すべての試料で ND であった。なお、表 3 における BPA 濃度は、操作ブランク値を差し引いた値で、ND は、操作ブランクの 5 回測定より求めた検出下限値 (MDL) 未満であることを示す。

(4) 回収率

検体の測定における各試料の回収率 (クリーンアップスパイク内標準物質 (BPA d-16)/シリンジスパイク内標準物質 (BPA d-4)) の値を用い、回収率を計算した。結果を表 3 に示す。全試料において回収率は 66 ~ 112% の範囲であった。なお、本分析方法は内標準法であるので回収率の数値は結果に影響を与えない。

D . 結論

本研究で開発した分析方法によって血液中の BPA フリー体が評価可能な濃度レベルでデータ取得可能となった。過去の測定で BPA が検出された試料について

BPA フリー体の測定を行い採血から保存中における BPA のコンタミネーションの状況の確認を行ったが、BPA のフリー体は検出されなかった。このため、本研究における BPA のコンタミネーションの影響は軽微であり、これまで報告を行った試料の分析値に与える影響は、ほとんどないものと考えられた。

E . 健康危険情報

該当なし

F . 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

G . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

参考文献

1. Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent Bisphenol A Accumulation in the Human Maternal-Fetal-Placental Unit. Environ. Health Perspectives 2002;110:703-707.
2. Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H. Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent

labeling reagent. J. Pharmaceutical
and Biomedical Anal.
2003;30:1743-1749.

3. Chen M, Chang C, Shen Y, Hung J,
Guo B, Chuang H, Mao I.
Quantification of prenatal exposure
and maternal-fetal transfer of
nonylphenol. Chemosphere
2008;73:239-245.

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

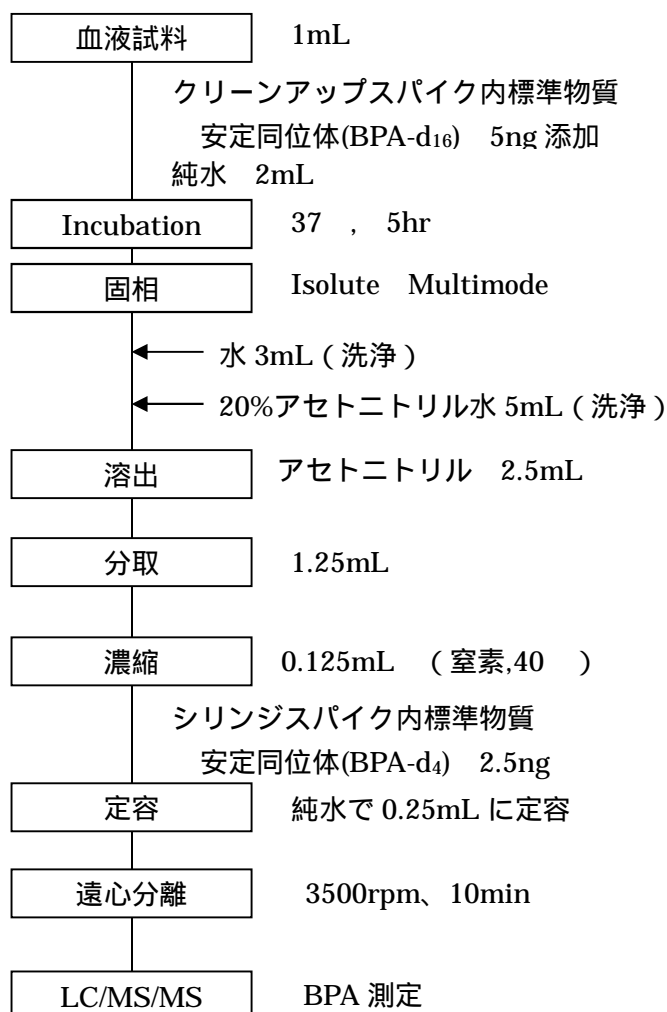


図 1. 血液中の BPA フリー体の分析フロー

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
 分担研究報告書

表 1 . BPA 分析における LC/MS/MS 測定条件

測定装置	LC : Agilent-1100 MS : API-4000 Q Trap
分析カラム	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 2.1×50mm,1.7μm
溶離液	A : 水 B : アセトニトリル
グラジエント(B)	20%(0min)→20%(1min)→60%(7min)→99%(7.1min)→99%(13min) →20%(13.1min)→20%(19min)
注入量	20μL
カラム温度	40
モード	ESI-Negative
m/z	227.0 > 132.9(BPA) 241.0 > 142.0(BPA-d ₁₆) 231.0 > 134.9(BPA-d ₄)

表 2 操作ブランク試験の結果及び MDL .

試料名	BPA 濃度(ng/mL)
Blank 1	0.042
Blank 2	0.040
Blank 3	0.033
Blank 4	0.022
Blank 5	0.042
平均値	0.036
標準偏差	0.00865
t 値(危険率 5%、片側)	2.132
MDL	0.037

【注釈】

MDL= (標準偏差) × t 値 × 2

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
 分担研究報告書

表 3 母体血及び臍帯血中の BPA フリー体の濃度及び各検体における回収率 .

試料名		BPA 濃度 (ng/mL)	回収率 (%)
	SRL		
臍帯血	124	ND	72
	234	ND	106
	241	ND	78
	198	ND	88
	289	ND	88
	252	ND	84
	283	ND	90
	196	ND	95
	227	ND	112
	265	ND	102
母体血	390	ND	85
	395	ND	106
	397	ND	76
	519	ND	66
	520	ND	86
	526	ND	81
	528	ND	87
	85	ND	70
	110	ND	92
	222	ND	86

【注釈】

BPA 濃度は、ブランク値を差し引いた値 .

ブランク試験結果から求めた MDL(0.037ng/mL)未満の試料については、『ND』で表記 .

回収率は、クリーンアップスパイク内標準物質(BPA d-16)の応答/シリンジスパイク内標準物質(BPA d-4)の応答を用い、(試料液)/(標準液の平均) × 100 で算出した値 .

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 bisphenol A and child neurodevelopment: The Hokkaido Study

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授
研究分担者 池野 多美子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師
研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 助教
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 生命有機学分野生物有機化学研究室 准教授
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・環境創造研究所 副所長

研究要旨

Background: Prenatal bisphenol A (BPA) exposure may affect early child thyroid function and neurodevelopment.

Objective: To evaluate the associations between cord blood BPA levels and child mental and psychomotor development at 6 and 18 months of age. Additionally the association with thyroid stimulation hormone (TSH) and free thyroxine (FT4) of newborn were assessed. **Methods:** Cord blood samples collected from the Hokkaido study participants were analyzed for BPA levels. Child neurodevelopment was assessed using mental and psychomotor development indexes (MDI and PDI) from a Bayley Scales of Infant Development II at 6 and 18 months of age (N = 121, 86, respectively). The associations between cord blood BPA levels and child neurodevelopment were estimated using linear regression models adjusted for potential confounders. Data of TSH and FT4 were obtained from mass screening test for endocrine disorders conducted by Sapporo City Institute of Public Health. **Results:** Overall, there were no statistical significant associations between cord blood BPA levels and child neurodevelopment at 6 and 18 months of age. Among female, MDI score at 6 month of age and the TSH levels was inversely associated with cord blood BPA levels with borderline significance.

Conclusion: This study added the evidence that relatively lower levels of prenatal BPA exposure may not affect early child neurodevelopment or levels of thyroid hormones of newborn over all. Further studies of investigating sex specific effects of BPA exposure are needed.

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）

中島そのみ（札幌医科大学保健医療学部作業療法学科）

山本 潤
（いであ株式会社環境創造研究所）

A. 研究目的

Bisphenol A (BPA) is an endocrine-disrupting chemical used in the manufacture of plastics and resins including food and drink containers, and as an additive in thermal paper, dental sealant, medical equipment and flame retardant (Biedermann et al. 2010; Geens et al. 2011). BPA exposure is nearly ubiquitous in developed countries. The predominant source of BPA exposure for general adult population is diet. According to previous study, pregnant women who regularly consume canned food have higher urinary BPA concentrations compared with women without the habit (Braun et al. 2011). BPA has a weak estrogenic properties (Akingbemi et al. 2004; Lee et al. 2003). Experimentally, BPA has shown to interact with estrogen signaling pathways through binding to the estrogen receptors (Naciff et al. 2002; Vandenberg et al. 2009; Wetherill et al. 2007) and also act as a thyroid hormone agonist (Zoeller et al. 2005). In animal studies, the association between prenatal BPA exposure and neurobehavioral effects such as anxiety (Cox et al. 2010; Xu et al. 2011), cognitive deficit (Tian et al. 2010; Viberg and Lee 2012) and social behavior (Wolstenholme et al. 2011) have indicated. Studies also have shown loss of sex differences in animal behavior (Cox et al. 2010; Patisaul et al. 2006; Rubin et al. 2006). There are limited data of BPA exposure effects on neurodevelopment

in humans. Epidemiological studies have investigated the effects of prenatal BPA exposure on child neurobehavior at several different ages using different assessment scales (Braun et al. 2009, 2011, 2014; Perera et al. 2012; Miodovnik et al. 2011; Harley et al. 2013; Yolton et al. 2011). The scales used in these studies were varied such as Behavior Rating Inventory of Executive Function-Preschool (BRIEF), Child Behavior Checklist (CBCL), NICU Network Neurobehavioral Scale (NNS), Behavioral Assessment System for Children (BASC), Conners' ADHD/DSM-IV Scales (CADS) and Social Rating Scale (SRS). Some findings from epidemiological studies may suggest maternal BPA exposure's adverse effects on child neurobehavior, on the other hand, others did not show any evidence of adverse effects of prenatal BPA exposure. Additionally several random clinical trials of dental restorations found that there was a significant reduction in scores on memory tests in children with composite fillings containing BPA at ages 6 and 10 (Bellinger et al. 2007; Bellinger et al. 2008), children with composite fillings reported significantly increased anxiety, depression, social stress, and interpersonal-relation problems at ages 11 and 16 (Maserejian et al. 2012). Among these epidemiological investigations, we did not find any published studies using Bayley Scales of

Infant Development (BSID), which is a standard series of measurements to assess the development of infants. The BSID-II mental scale assesses the age-appropriate children's level of cognitive, language, and personal/social development. The motor scale assesses fine and gross motor development. Our group have reported prenatal exposure to several isomers of dioxins may affect the motor development of 6 month-old infants (Nakajima et al. 2006).

Thyroid hormones play an essential role in pre and postnatal brain development. Several epidemiological studies including prospective cohort and cross-sectional studies have investigated the association between BPA levels and thyroid function of adults and children and showed suggestive inverse associations with TSH and T4 and positive associations with T3 (Bucker-Davis et al. 2011; Chevrier et al. 2013; Wang et al. 2012; Meeker and Ferguson, 2011; Wang et al. 2013), however, there is no human studies on BPA exposure and neonatal thyroid hormone levels along with child neurodevelopmental assessment.

Given very limited research on human thyroid function and neurobehavior in association with prenatal exposure to BPA, the aim of this study was to investigate the association between cord blood BPA levels and newborn thyroid hormone levels and child mental and psychomotor development at two distinct

time points of ages 6 and 18 months.

B . 研究方法

Study population

This prospective birth cohort study was based on the Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Child Health (Kishi et al. 2011; Kishi et al. 2013). 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, home environment, smoking history, alcohol consumption, caffeine intake, family income, educational levels of themselves and partners. The prenatal information of the mothers and their children was collected from their medical records. 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 and Hokkaido University Center for Environment and Health Sciences.

Measurement of Bisphenol A

Cord blood was obtained at delivery. All samples were stored at -80 until analysis. The concentration of BPA in cord blood was measured by using isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-LC/MS/MS) at IDEA Consultants, Inc. (Shizuoka, Japan). 1.0 mL whole blood was spiked with BPA-d16 as an internal standard. After addition of 0.2 M acetate buffer (pH 5.0) and β -glucuronidase, the sample was held in an incubator at 37°C for 5 hours. The diluted sample was applied to a solid-phase extraction column. BPA was extracted using acetonitrile. Then, BPA-d4 was added to the extract as an internal standard. The organic extract was concentrated and the sample was analyzed by ID-LC/MS/MS. The limit of detection (LOD) of BPA was 0.048 ng/ml.

Data from mass screening test

We obtained blood samples data of thyroid stimulating hormone (TSH), free thyroxine (FT4) from Sapporo City Institute of Public Health which conducted the mass screening test for endocrine disorders. A heel-prick blood sample of newborns was obtained as spots on a filter paper for the Guthrie card. The blood samples were obtained from infants between 4 and 7 days age of after birth. Blood samples were applied to 0.3 cm filter disks and TSH and FT4 levels were measured using Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) (TSH:

Enzaplate N-TSH, Bayer Co., Tokyo, Japan; FT4: Enzaplate N-FT4, Bayer Co.). The FT4 values of all samples were detected, and for samples with TSH levels below the detection limit (0.50 μ U/ml), we used a value of half the detection limit.

Developmental measurements

We used BSID-II (Bayley, 1993) to assess the infant mental and psychomotor development at age 6 and 18 months. The BSID-II is an infant developmental test tool used between 0 to 3 years of age. The BSID-II mental scale assesses the age-appropriate children's level of cognitive, language, and personal/social development. The motor scale assesses fine and gross motor development. Mental and motor raw scores were converted to a normalized scale with a mean of 100 and standard deviation of 15. Home Observation for Measurement of the Environment (HOME) was used to investigate the caregiving environmental conditions of children at 6 and 18 months of age (Anme et al. 1997).

Data analysis

We used the following eligibility for criteria for analyses of subjects; no serious illness or complications during pregnancy and delivery, 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 BSID-II completed at ages between 166 and 195 days for 6 months

examination. Among all 514 participants of Sapporo Cohort Study, 286 cord blood samples for BPA measurements were available. For the final analyses, 121 and 86 children at 6 months and at 18 months, respectively, were included.

Since the distributions of cord blood BPA concentrations were right skewed, these variables were transformed by the natural logarithms (ln) to improve their linear relation with MDI and PDI scores. BPA concentrations below the LOD was assigned the value of one-half of the LOD, 0.024 ng/ml. To examine the relation between cord blood BPA levels and child neurodevelopment, linear regression models were used. Then models were stratified by child sex. To select covariates to include in multivariable models, risk factors known or suspected of being associated with the BPA concentrations and/or child neurodevelopment were reviewed in the literatures (Kim et al. 2011; Polanska et al. 2014). The covariates used in this study were maternal education, HOME score, annual income and child sex. Additionally, caffeine intake during pregnancy was used for the analyses of 6 month as the correlation between PDI scores at 6 month was significant. In our previous study (Nakajima et al. 2006), gestational age and maternal smoking status were used as covariates, however, these covariates were not used in this study as the correlations were not

significant. 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. Compared to the Sapporo Cohort full profile data from our previous report (Kishi et al. 2011), no significant differences were observed (data not shown) in maternal age (30.7 ± 4.9 vs. 30.9 ± 4.9 years old), maternal education (55.6% vs. 61.2%, > 12 years), annual income (31.0% vs. 37.2%, 5M), smoking status during pregnancy (18.6% vs. 10.7%, smoker) birth weight (3065 ± 375 vs. 3158 ± 316 g) and gestational age (39.0 ± 1.4 vs. 39.7 ± 1.0 weeks). Duration of breast feeding was used as a covariates in previous reports (Kim et al. 2011; Tellez-Rojo et al. 2013), however, 34.7 % of data were missing in our study, and thus duration of breast feeding was not used as covariate for adjustment. Table 2 shows the characteristics of exposure and outcomes of participants. The median level of cord blood BPA was 0.059 ng/ml. Cord blood BPA level was detected in 73.8% of samples and the range of cord blood BPA levels was from below LOD to 0.217 ng/ml. The median TSH and FT4 levels of newborn were $1.90\mu\text{U/ml}$ and 2.00ng/ml , respectively. Table 3 shows BPA levels and MDI, PDI scores at 6 and 18 months in relation to

participants' characteristics. Maternal caffeine intake during pregnancy was negatively correlated with both MDI and PDI scores at 6 month and statistical significance was found only with PDI score ($p = 0.011$). MDI score at 18 month was higher in the group of annual income was above 5 million yen compared to below 5 million yen (81.2 vs. 86.3, respectively, $p = 0.043$). PDI scores at 18 month was higher in the group of higher paternal education compared to lower (83.8 vs. 89.6, respectively, $p = 0.043$). Both MDI and PDI scores at 18 month were higher in female compared to male with statistical significance (86.4 vs. 79.4, $p = 0.005$ for MDI, 91.1 vs. 84.0, $p = 0.006$ for PDI).

Table 5 and 6 show MDI and PDI scores of BSID-II at 6 and 18 months in relation to natural log transformed cord blood BPA levels. Overall, both MDI and PDI scores at 6 months were negatively associated with cord blood BPA levels. MDI and PDI scores at 18 months were negatively associated with cord blood BPA levels without adjustment, however, after the adjustment, the associations became weakly positive. Since there have been reported that BPA may have sex-specific effects, we performed analyses for male and female separately. After stratification by child sex, MDI scores at 6 months showed opposite associations with cord blood BPA levels between male and female. The scores

were positively associated in male ($\beta = 1.38$, 95% CI: -1.40, 4.16), contrary, negatively associated in female ($\beta = -1.99$, 95% CI: -4.28, 0.31) and the significance was borderline. For PDI scores, the negative association was stronger in male ($\beta = -3.18$, 95% CI: -7.70, 1.35) compared to female ($\beta = -0.91$, 95% CI: -5.52, 3.70). MDI scores at 18 months showed weak negative association with cord blood BPA levels after adjustment in both sexes. PDI scores at 18 months showed opposite association between sexes, positive association in female ($\beta = 2.28$, 95% CI: -3.10, 7.65) and negative association in male ($\beta = -2.05$, 95% CI: -9.11, 5.01). The borderline significance of negative association between female MDI scores at 6 months and cord blood BPA levels was not found at 18 months. Similarly the negative association found in PDI scores at 6 months in male with cord blood BPA levels became weaker at 18 months.

Table 4 shows the associations between cord blood BPA levels and TSH and FT4 of newborn. Overall, TSH levels were negatively associated with cord blood BPA levels. Further analysis after stratification of child sex, female showed borderline significant negative association ($\beta = -0.232$, $p = 0.089$), contrary male showed weak positive association ($\beta = 0.048$, $p = 0.823$). Cord blood BPA level showed weak positive association with FT4 levels with no

statistical significance.

D. 考察

This is the first published study of examining thyroid hormone levels and child neurodevelopment at 6 and 18 months using BSID-II in relation to cord blood BPA levels. There was borderline significant inverse association between cord blood BPA levels and TSH levels in female. Meeker and Ferguson observed suggestive inverse trends for BPA quintiles and TSH (p trend = 0.14) in cross-sectional study of 1367 adults (Meeker and Ferguson. 2011). However, no association was found with FT4 in smaller study of 167 adult men (Meeker et al. 2010). Our observation on TSH and FT4 agreed with their report. Brucker-Davis et al. (2011) reported weak trend for a negative correlation between BPA and TSH in prospective cohort of 164 newborn boys and Chevrier et al. (2013) reported that maternal BPA was negatively associated with neonatal TSH in boys in CHAMACOS study. These studies found negative associations between BPA and THS levels only in male, and our findings did not agree with these previous reports as we observed stronger negative associations in female rather than in male. A study by Kaneko et al. reported that BPA suppresses TSH release from amphibian pituitary in manner independent of both the thyroid hormone feedback mechanism and the estrogenic

activity of BPA (2008) which may explain our observation of negative association between BPA and TSH.

There was no significant association between cord blood BPA levels and child neurodevelopment at 6 and 18 months among all children. The different responses were observed in MDI scores at 6 months; female exhibited decreases in scores and male exhibited increases in scores. PDI scores at 6 months, negative association was stronger in male than in female. At 18 months, the different responses were observed in PDI scores; female exhibited increases in scores and male exhibited decreases in scores. Prenatal BPA exposure may have adverse influences on endocrine or neurotransmitter pathways and cause sexual differentiation of brain and alter behavior in a gender dependent manner (Manson. 2008). Limited observational evidence suggests an association between prenatal BPA exposure and adverse neurobehavioral outcomes in children. Our findings on cord blood BPA levels and child neurodevelopment were compared to the observations from previous human studies. Out of 7 available epidemiological studies regarding BPA exposure and child neurodevelopment, 5 studies suggested prenatal BPA exposure and adverse effects of child neurodevelopment. Braun et al., reported evidences of adverse effect of prenatal BPA exposure predominately in girls using the BASC at 2 years of age

and the BRIEF-P at 3 years of age (Braun et al. 2009, 2011). Perera et al. (2012) used CBCL ages between 3 and 5 years old and suggested that prenatal exposure to BPA may affect child behavior differently among boys and girls. Harley et al. (2013) reported that prenatal urinary BPA concentrations were associated with increased anxiety and depression in boys age at 7 using BASC-2. Contrary, 2 studies, Yolton et al. (2011) and Miodovnik et al. (2011) reported no evidence of an association between prenatal BPA exposure and child neurodevelopment at 5 weeks of age using NNNS and at ages between 7 and 9 years old using SRS, respectively. Those epidemiological results were conflicting and very limited. This could be due to a number of differences between the study designs, and timing and tools of outcome assessment as well as timing of exposure measurements. The assessment tool used in this study, BSID-II assesses developmental domains different from intelligence or executive function. Each unique assessment tool used in different studies had specific purpose; BASC-2 has excellent reliability and validity for assessing adaptive and maladaptive behaviors (Reynolds and Kamphaus 2004), the CBCL measures child behavior problems, the BRIEF-P assess the ability to modulate emotions, the capacity to control behavioral responses, the ability to anticipate and to plan for

future events, the capacity to transition to and from events and the ability to hold information in mind for completing a task, the NNNS assesses 13 dimensions of neurobehavior (Lester and Tronick. 2004), the SRS is a scale for detecting and measuring the severity of autistic behavior, and CADS assesses attention and hyperactivity (Conners. 2001), thus these results simply were not able to be compared on the same table. Also noted that most of the studies used the same cohort. In our study, BPA in cord blood was measured as prenatal exposure whereas maternal urine samples were used in the other epidemiological studies for exposure assessment. This difference made it difficult to compare our observations with previous findings. Even studies used urinary BPA as exposure measurements, intra-individual variability of BPA concentrations were moderately correlated (Braun et al. 2009) and accurately characterizing exposure from a single measurement was difficult. On the other hand, using mean concentration of urinary BPA from several measurements would decrease the ability to identify short time-sensitive window of development (Braun et al. 2011). To improve exposure classification during critical windows of neurodevelopment, the importance of single measurement or summary measurement of BPA concentration should be considered. The cord blood BPA levels in this study was

much lower compared to the previous reports (Aris. 2014; Zhang et al. 2013; Kosarac et al. 2012; Chou et al. 2011; Brucker-Davis et al. 2008 Lee et al. 2008) and this may imply that prenatal BPA exposure levels as low as we observed did not have significant influences on child neurodevelopment.

A recent study suggested that perinatal exposure to low-dose BPA specifically and non-monotonically impairs spatial learning and memory in male offspring rats (Kawahara et al. 2013). Several mechanisms including epigenetic changes in gene expression in various brain regions via BPA action as weak estrogen receptor agonists and an anti-androgen were suggested from animal studies (Wolstenholme et al. 2011); synaptogenesis decrease in hippocampus and prefrontal cortex of monkeys and rats (Leranth et al. 2008; MacLusky et al, 2005), disruption in cortical development in mice (Nakamura et al. 2006, 2007), alternation in sexually dimorphic brain regions in hypothalamus (Patisaul et al. 2006; Rubin et al. 2006) and reduction of corticotropin-released hormone and DA cell number in midbrain (Funabashi et al. 2004; Tando et al. 2007; Tanida et al. 2009). In BPA exposed animals, multiple genes in tissues were differently methylated (Kundakovnic et al. 2013; Tang et al. 2012), BPA exposure may change expression and DNA methylation of nuclear estrogen receptors and/or signaling via glutamate receptor

(Kundakovnic et al. 2013; Xu et al. 2010), these studies suggested that BPA may also lead heritable changes in gene expression.

A couple of issues, especially dose and route of exposure, need to be considered when comparing our result to those of animal studies. Many of dose ranges used in animal studies were not relevant to human study. Route of exposure in animal studies were oral, subcutaneous and direct injection at target organs (Li et al. 2008), whereas oral exposure in human studies were predominate.

The limitations of this study need to be considered. First, there was limited statistical power with our sample size. Additionally, there have been concerns whether single drawing of cord blood sample represent the long-term prenatal BPA exposure due to short half-lives of BPA and there might be a possibility of accidental exposure near blood drawing period. Other limitation is that cord blood samples were taken at delivery, thus, the effect of fetal exposure to BPA during the earlier stages of fetal neurodevelopment have not been assessed in this study. There might be a chance of selection bias in this study as we only included participants with available cord blood samples. However, as described the comparison between original cohort profile and the present study profile did not show significant discrepancy. Another limitation is that we were not able to examine

whether postnatal exposure to BPA was associated with childhood neurodevelopment. The strength of our study was that we measured child neurodevelopment outcome at two different times along with the measurement of newborn thyroid hormone levels. Additionally, in our study we used the BPA levels of cord blood, which accurately indicated the exposure of fetus. However, more studies are necessary to confirm adverse effect BPA exposure on child neurodevelopment.

E. 結論

The findings of this study suggested that relatively lower levels of cord blood BPA levels was not notably associated with thyroid hormone levels or neurodevelopment of children. We have observed suggestive negative associations between BPA levels and TSH levels and MDI at 6 month only in female, thus, additional researches investigating sex specific effects are needed.

F. 研究発表

1. 論文発表

In preparation

2. 学会発表

Minatoya M, Sasaki S, Nakajima S, Yamamoto J, Araki A, Ito S, Miyashita C, Matsumura T, Nonomura K, Mitsui T, Cho K, Kishi R. Effects of prenatal bisphenol A exposure on birth weight, sex hormone levels and mental and motor

development. International Society for Environmental Epidemiology Asia Chapter (ISEE-AC) 2014 Conference. Shanghai. Dec. 2014.

湊屋街子, 佐々木成子, 中島そのみ, 山本潤, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 宮下ちひろ, 松村徹, 野々村克也, 三井貴彦, 長和俊, 岸玲子. ビスフェノールAの胎児期曝露による出生体格、臍帯血中ホルモン濃度、神経発達への影響. 第17回環境ホルモン学会. 東京都. 2014.12.9-10

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. Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP. 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol a is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat leydig cells. *Endocrinology* 145:592-603.
2. Anme T, Shimada C, Katayama H. 1997. Evaluation 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

- stimulation for 18 months and the related factors [in Japanese]. *Jpn J Publ Health* 44:346-352.
3. Aris A. 2014. Estimation of bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada. *Reprod Toxicol* 45:8-13.
 4. Bayley N. 1993. *Manual for the Bayley Scales of Infant Development*. 2nd ed. New York: Psychological Corporation.
 5. Bellinger DC, Trachtenberg F, Daniel D, Zhang A, Tavares MA, McKinlay S. 2007. A dose-effect analysis of children's exposure to dental amalgam and neuropsychological function: The new england children's amalgam trial. *Journal of the American Dental Association* (1939) 138:1210-1216.
 6. Bellinger DC, Trachtenberg F, Zhang A, Tavares M, Daniel D, McKinlay S. 2008. Dental amalgam and psychosocial status: The new england children's amalgam trial. *Journal of dental research* 87:470-474.
 7. Biedermann S, Tschudin P, Grob K. 2010. Transfer of bisphenol a from thermal printer paper to the skin. *Analytical and bioanalytical chemistry* 398:571-576.
 8. Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, Hornung R, Ye X, Calafat AM, et al. 2009. Prenatal bisphenol a exposure and early childhood behavior. *Environmental health perspectives* 117:1945-1952.
 9. Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Bernert JT, Ye X, Silva MJ, et al. 2011. Variability and predictors of urinary bisphenol a concentrations during pregnancy. *Environmental health perspectives* 119:131-137.
 10. Braun JM, Kalkbrenner AE, Just AC, Yolton K, Calafat AM, Sjodin A, et al. 2014. Gestational exposure to endocrine-disrupting chemicals and reciprocal social, repetitive, and stereotypic behaviors in 4- and 5-year-old children: The home study. *Environmental health perspectives* 122:513-520.
 11. Brucker-Davis F, Ferrari P, Boda-Buccino M, Wagner-Mahler K, Pacini P, Gal J, Azuar P, Fenichel P. 2011. Cord blood thyroid tests in boys born with and without cryptorchidism: correlations with birth parameters and in utero xenobiotics exposure. *Thyroid* 21(10):1133-41.
 12. Chevrier J, Gunier RB, Bradman A, Holland NT, Calafat AM, Eskenazi B, Harley KG. 2013. Maternal urinary bisphenol a during pregnancy and maternal and neonatal thyroid function in the CHAMACOS study. *Environ Health Perspect* 121(1):138-44.
 13. Chou WC, Chen JL, Lin CF, Chen YC, Shih FC, Chuang CY. 2011. Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

- umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environ Health* 10:94.
14. Cox KH, Gatewood JD, Howeth C, Rissman EF. 2010. Gestational exposure to bisphenol a and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Hormones and behavior* 58:754-761.
15. Funabashi T, Kawaguchi M, Furuta M, Fukushima A, Kimura F. 2004. Exposure to bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Psychoneuroendocrinology* 29(4):475-85.
16. Geens T, Goeyens L, Covaci A. 2011. Are potential sources for human exposure to bisphenol-a overlooked? *International journal of hygiene and environmental health* 214:339-347.
17. Harley KG, Gunier RB, Kogut K, Johnson C, Bradman A, Calafat AM, et al. 2013. Prenatal and early childhood bisphenol a concentrations and behavior in school-aged children. *Environmental research* 126:43-50.
18. Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC. 2009. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environment international* 35:14-20.
19. Hurst CH, Waxman DJ. 2003. Activation of pparalpha and ppargamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 74:297-308.
20. Ito Y, Yokota H, Wang R, Yamanoshita O, Ichihara G, Wang H, et al. 2005. Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (dehp) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Archives of toxicology* 79:147-154.
21. Jurewicz J, Hanke W. 2011. Exposure to phthalates: Reproductive outcome and children health. A review of epidemiological studies. *International journal of occupational medicine and environmental health* 24:115-141.
22. Kaneko M, Okada R, Yamamoto K, Nakamura M, Mosconi G, Polzonetti-Magni AM, Kikuyama S. 2008. Bisphenol A acts differently from and independently of thyroid hormone in suppressing thyrotropin release from the bullfrog pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 155(3):574-80.
23. Kato K, Silva MJ, Brock JW, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, et al. 2003. Quantitative detection of nine phthalate metabolites in human serum using reversed-phase high-performance liquid

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

- chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology* 27:284-289.
24. Kim BN, Cho SC, Kim Y, Shin MS, Yoo HJ, Kim JW, et al. 2009. Phthalates exposure and attention-deficit/hyperactivity disorder in school-age children. *Biological psychiatry* 66:958-963.
25. 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.
26. 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.
27. Koch HM, Rossbach B, Drexler H, Angerer J. 2003. Internal exposure of the general population to dehp and other phthalates--determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environmental research* 93:177-185.
28. Koch HM, Preuss R, Angerer J. 2006. Di(2-ethylhexyl)phthalate (dehp): Human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *International journal of andrology* 29:155-165; discussion 181-155.
29. Kosarac I, Kubwabo C, Lalonde K, Foster W. 2012. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 898:90-4.
30. Kundakovic M, Gudsruk K, Franks B, Madrid J, Miller RL, Perera FP, Champagne FA. 2013. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(24):9956-61.
31. Kuwahara R, Kawaguchi S, Kohara Y, Cui H, Yamashita K. 2013. Perinatal exposure to low-dose bisphenol a impairs spatial learning and memory in male rats. *Journal of pharmacological sciences* 123:132-139.
32. Lampen A, Zimnik S, Nau H. 2003. Teratogenic phthalate esters and metabolites activate the nuclear receptors ppars and induce differentiation of f9 cells. *Toxicology and applied pharmacology* 188:14-23.
33. Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. 2003.

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

- Antiandrogenic effects of bisphenol a and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 75:40-46.
34. Lee YJ, Ryu HY, Kim HK, Min CS, Lee JH, Kim E, Nam BH, Park JH, Jung JY, Jang DD, Park EY, Lee KH, Ma JY, Won HS, Im MW, Leem JH, Hong YC, Yoon HS. 2008. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 25(4):413-9.
35. Leranath C, Szigeti-Buck K, Maclusky NJ, Hajszan T. 2008. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to testosterone in the brain of adult male rats. *Endocrinology* 149(3):988-94.
36. Lester B, Tronick E. 2004. Using the NNNS TM. NICU Network Neurobehavioral Scale (NNNS) manual. 13.
37. Li AA, Baum MJ, McIntosh LJ, Day M, Liu F, Gray LE, Jr. 2008. Building a scientific framework for studying hormonal effects on behavior and on the development of the sexually dimorphic nervous system. *Neurotoxicology* 29:504-519.
38. Li Y, Zhuang M, Li T, Shi N. 2009. Neurobehavioral toxicity study of dibutyl phthalate on rats following in utero and lactational exposure. *Journal of applied toxicology : JAT* 29:603-611.
39. MacLusky NJ, Hajszan T, Leranath C. 2005. The environmental estrogen bisphenol a inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect*. 2005 113(6):675-9.
40. Manson JE. 2008. Prenatal exposure to sex steroid hormones and behavioral/cognitive outcomes. *Metabolism* 57 (suppl 2), S16-21.
41. Lin S, Ku HY, Su PH, Chen JW, Huang PC, Angerer J, et al. 2011. Phthalate exposure in pregnant women and their children in central taiwan. *Chemosphere* 82:947-955.
42. Maserejian NN, Trachtenberg FL, Hauser R, McKinlay S, Shrader P, Bellinger DC. 2012. Dental composite restorations and neuropsychological development in children: Treatment level analysis from a randomized clinical trial. *Neurotoxicology* 33:1291-1297.
43. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. 2010. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol* 44(4):1458-63.
44. Meeker JD, Ferguson KK. 2011. 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. *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

- health perspectives 119:1396-1402.
45. Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, Ye X, Soorya LV, Silva MJ, et al. 2011. Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology* 32:261-267.
46. Naciff JM, Jump ML, Torontali SM, Carr GJ, Tiesman JP, Overmann GJ, et al. 2002. Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol a, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 68:184-199.
47. Nakajima S, Saijo Y, Kato S, Sasaki S, Uno A, Kanagami N, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Todaka T, Nakamura Y, Yanagiya S, Sengoku Y, Iida T, Sata F, Kishi R.
48. Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at 6 months of age. 2006. *Environ Health Perspect* 114(5):773-8. Nakamura K, Itoh K, Yaoi T, Fujiwara Y, Sugimoto T, Fushiki S. 2006. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol A. *J Neurosci Res* 84(6):1197-205.
49. Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. 2007. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci Lett.* 420(2):100-5.
50. Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK. 2006. Neonatal genistein or bisphenol-a exposure alters sexual differentiation of the avpv. *Neurotoxicology and teratology* 28:111-118.
51. Perera F, Vishnevetsky J, Herbstman JB, Calafat AM, Xiong W, Rauh V, et al. 2012. Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort. *Environmental health perspectives* 120:1190-1194.
52. Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kitraki E. 2010. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol a. *Neuroscience* 167:741-749.
53. Reynolds CR, Kamphaus RW. 2004. *BASC-2: Behavior Assessment System for Children, Second edition Manual* AGS Publishing, Circle Pines, NM.
54. Romero-Franco M, Hernandez-Ramirez RU, Calafat AM, Cebrian ME, Needham LL, Teitelbaum S, et al. 2011. Personal care product use and urinary levels of phthalate metabolites in mexican women. *Environment international* 37:867-871.
55. Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM,

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

- Soto AM. 2006. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol a. *Endocrinology* 147:3681-3691.
56. Suzuki Y, Niwa M, Yoshinaga J, Watanabe C, Mizumoto Y, Serizawa S, et al. 2009. Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary metabolite analysis. *Environmental health and preventive medicine* 14:180-187.
57. Tanaka T. 2005. Reproductive and neurobehavioural effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (dehp) in a cross-mating toxicity study of mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 43:581-589.
58. Tanida T, Warita K, Ishihara K, Fukui S, Mitsunashi T, Sugawara T, Tabuchi Y, Nanmori T, Qi WM, Inamoto T, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N. 2009. Fetal and neonatal exposure to three typical environmental chemicals with different mechanisms of action: mixed exposure to phenol, phthalate, and dioxin cancels the effects of sole exposure on mouse midbrain dopaminergic nuclei. *Toxicol Lett.* 189(1):40-7.
59. Tando S, Itoh K, Yaoi T, Ikeda J, Fujiwara Y, Fushiki S. 2007. Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development. *Brain Dev* 29(6):352-6.
60. Tang WY, Morey LM, Cheung YY, Birch L, Prins GS, Ho SM. 2012. Neonatal exposure to estradiol/bisphenol A alters promoter methylation and expression of *Nsbp1* and *Hpcal1* genes and transcriptional programs of *Dnmt3a/b* and *Mbd2/4* in the rat prostate gland throughout life. *Endocrinology* 153(1):42-55.
61. Tellez-Rojo MM, Cantoral A, Cantonwine DE, Schnaas L, Peterson K, Hu H, et al. 2013. Prenatal urinary phthalate metabolites levels and neurodevelopment in children at two and three years of age. *The Science of the total environment* 461-462:386-390.
62. Tian YH, Baek JH, Lee SY, Jang CG. 2010. Prenatal and postnatal exposure to bisphenol a induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice. *Synapse (New York, NY)* 64:432-439.
63. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. 2009. Bisphenol-a and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine*

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

- reviews 30:75-95.
64. Viberg H, Lee I. 2012. A single exposure to bisphenol a alters the levels of important neuroproteins in adult male and female mice. *Neurotoxicology* 33:1390-1395.
65. Wang F, Hua J, Chen M, Xia Y, Zhang Q, Zhao R, Zhou W, Zhang Z, Wang B. 2012. High urinary bisphenol A concentrations in workers and possible laboratory abnormalities. *Occup Environ Med* 69(9):679-84.
66. Wang T, Lu J, Xu M, Xu Y, Li M, Liu Y, Tian X, Chen Y, Dai M, Wang W, Lai S, Bi Y, Ning G. 2013. Urinary bisphenol a concentration and thyroid function in Chinese adults. *Epidemiology* 24(2):295-302.
67. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al. 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol a action. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)* 24:178-198.
68. Whyatt RM, Liu X, Rauh VA, Calafat AM, Just AC, Hoepner L, et al. 2012. Maternal prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and child mental, psychomotor, and behavioral development at 3 years of age. *Environmental health perspectives* 120:290-295.
69. Wittassek M, Angerer J. 2008. Phthalates: Metabolism and exposure. *International journal of andrology* 31:131-138.
70. Wittassek M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Schafer SD, Klockenbusch W, Dobler L, et al. 2009. Fetal exposure to phthalates--a pilot study. *International journal of hygiene and environmental health* 212:492-498.
71. Wolstenholme JT, Taylor JA, Shetty SR, Edwards M, Connelly JJ, Rissman EF. 2011. Gestational exposure to low dose bisphenol a alters social behavior in juvenile mice. *PLoS one* 6:e25448.
72. 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 analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis* 26:803-824.
73. Xu XH, Zhang J, Wang YM, Ye YP, Luo QQ. 2010. Perinatal exposure to bisphenol-a impairs learning-memory by concomitant down-regulation of n-methyl-d-aspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Hormones and behavior* 58:326-333.
- Xu X, Tian D, Hong X, Chen L, Xie L. 2011. Sex-specific influence of exposure to bisphenol-a between adolescence and young adulthood on mouse behaviors. *Neuropharmacology* 61:565-573.
74. Xu X, Hong X, Xie L, Li T, Yang Y,

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

- Zhang Q, et al. 2012. Gestational and lactational exposure to bisphenol-a affects anxiety- and depression-like behaviors in mice. *Hormones and behavior* 62:480-490.
75. Yolton K, Xu Y, Strauss D, Altaye M, Calafat AM, Khoury J. 2011. Prenatal exposure to bisphenol a and phthalates and infant neurobehavior. *Neurotoxicology and teratology* 33:558-566.
76. Zhang T, Sun H, Kannan K. 2013. Blood and urinary bisphenol A concentrations in children, adults, and pregnant women from china: partitioning between blood and urine and maternal and fetal cord blood. *Environ Sci Technol* 7(9):4686-94.
77. Zoeller RT, Bansal R, Parris C. 2005. Bisphenol-a, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters rc3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146:607-612.

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. Parental and child basic characteristics (N = 121).

Parental characteristics		Mean \pm S.D. or median (IQR) or number (%)
Maternal age (years)		30.9 \pm 4.8
Maternal education	\leq 12 years	47 (38.8)
	> 12 years	74 (61.2)
Paternal age (years)		32.7 \pm 5.9
Paternal education	\leq 12 years	37 (30.6)
	> 12 years	84 (69.4)
Family income	< 5M yen	76 (62.8)
	\geq 5M yen	45 (37.2)
Maternal working during pregnancy	Yes	12 (9.9)
	No	109 (90.1)
Maternal smoking during pregnancy	Yes	13 (10.7)
	No	108 (89.3)
Maternal prepregnancy BMI (kg/m ²)		20.9 \pm 2.6
Parity	0	69 (57.0)
	1	38 (31.4)
	\geq 2	14 (11.6)
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		120.75 (66.75-183.50)
Alcohol consumption during pregnancy	Yes	41 (33.9)
	No	80 (66.1)
Child characteristics		
Sex	Male	53 (43.8)
	Female	68 (56.2)
Birth weight (g)		3158 \pm 316
Birth length (cm)		48.5 \pm 1.5
Gestational age (days)		278.5 \pm 7.1
Duration of breast feeding*	< 3 months	8 (6.6)
	\geq 3 months	71 (58.7)
	Data missing	42 (34.7)

* Duration of breast feeding was obtained from questionnaire at 18 month old.

** Maximum score is 30. *** Maximum score is 38.

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. Characteristics of exposure and outcomes.

Characteristics	Mean \pm S.D. or median (IQR) or number (%)
Cord blood BPA level (ng/ml)	0.050 (LOD-0.076)
BSID-II MDI @ 6 month	90.7 (5.9)
BSID-II PDI @ 6 month	90.4 (11.0)
HOME score @ 6 month**	22.8 (2.6)
BSID-II MDI @ 18 month (N = 86)	83.3 (11.7)
BSID-II PDI @ 18 month (N = 86)	88.0 (12.0)
HOME score @ 18 month*** (N = 89)	28.0 (3.7)
TSH (μ U/ml)	1.90 (1.10-3.20)
FT4 (ng/ml)	2.00 (1.80-2.25)

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. BPA levels and MDI, PDI scores at 6 and 18 months in relation to participants' characteristics.

Parental characteristics		BPA levels		MDI at 6 month		PDI at 6 month		MDI at 18 month		PDI at 18 month	
		mean (S.D)	p-value	mean (S.D)	p-value	mean (S.D)	p-value	mean (S.D)	p-value	mean (S.D)	p-value
Maternal age (years)		$\rho = -0.110$	0.230	$\rho = 0.098$	0.284	$\rho = -0.064$	0.484	$\rho = -0.019$	0.863	$\rho = -0.060$	0.582
Paternal age (years)		$\rho = -0.097$	0.289	$\rho = 0.112$	0.221	$\rho = -0.153$	0.093	$\rho = 0.001$	0.993	$\rho = -0.075$	0.494
Maternal Education	≤ 12 years	0.057 (0.036)	0.578	91.2 (4.4)	0.472	90.9 (10.1)	0.722	83.2 (13.2)	0.978	86.1 (12.3)	0.252
	> 12 years	0.053 (0.036)		90.5 (6.7)		90.2 (11.6)		83.3 (10.8)		89.2 (12.7)	
Paternal Education	≤ 12 years	0.061 (0.043)	0.194	89.7 (5.9)	0.201	90.6 (11.4)	0.908	79.6 (11.4)	0.071	83.8 (11.6)	0.043*
	> 12 years	0.052 (0.033)		91.2 (5.9)		90.4 (10.8)		84.7 (11.6)		89.6 (11.8)	
Family income	< 5 M yen	0.058 (0.040)	0.153	90.6 (6.1)	0.693	90.8 (11.3)	0.632	81.2 (11.3)	0.043*	87.1 (12.6)	0.388
	≥ 5 M yen	0.049 (0.028)		91.0 (5.6)		89.8 (10.4)		86.3 (11.8)		89.3 (11.1)	
Maternal working during pregnancy	Yes	0.042 (0.033)	0.183	90.5 (5.9)	0.218	87.8 (11.5)	0.386	82.5 (10.7)	0.867	90.7 (10.4)	0.573
	No	0.056 (0.036)		92.7 (6.2)		90.7 (10.9)		83.3 (11.8)		87.8 (12.0)	
Maternal smoking during pregnancy	Yes	0.064 (0.031)	0.311	89.0 (7.1)	0.263	87.2 (10.6)	0.265	79.5 (8.9)	0.415	84.0 (10.4)	0.401
	No	0.054 (0.037)		91.0 (5.8)		90.8 (11.0)		83.6 (11.9)		88.3 (12.1)	
Parity	0	0.056 (0.035)	0.831	90.8 (5.8)	0.324	90.4 (11.8)	0.876	81.6 (12.4)	0.124	86.9 (12.1)	0.071
	1	0.056 (0.041)		89.7 (6.5)		90.3 (9.5)		86.9 (10.4)		87.2 (11.8)	
	≥ 2	0.048 (0.029)		93.0 (4.6)		90.8 (11.3)		80.2 (10.1)		96.4 (9.5)	
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)		$\rho = 0.028$	0.759	$\rho = -0.093$	0.310	$\rho = -0.230$	0.011*	$\rho = 0.008$	0.938	$\rho = -0.071$	0.518
Alcohol consumption during pregnancy	Yes	0.053 (0.034)	0.636	90.6 (6.0)	0.885	91.4 (10.6)	0.500	83.9 (9.9)	0.704	89.6 (11.3)	0.352
	No	0.056 (0.037)		90.8 (5.9)		90.0 (11.2)		82.9 (12.7)		87.1 (12.4)	
Child characteristics											
Sex	Male	0.055 (0.030)	0.856	91.4 (5.5)	0.273	90.2 (9.4)	0.815	79.4 (11.3)	0.005	84.0 (10.9)	0.006*
	Female	0.054 (0.041)		90.2 (6.2)		90.6 (12.1)		86.4 (11.2)		91.1 (12.0)	
Birth weight (g)		$\rho = 0.127$	0.164	$\rho = 0.063$	0.491	$\rho = 0.075$	0.415	$\rho = -0.037$	0.737	$\rho = 0.089$	0.417
Birth length (cm)		$\rho = 0.063$	0.492	$\rho = 0.009$	0.918	$\rho = 0.112$	0.220	$\rho = -0.039$	0.720	$\rho = -0.005$	0.966
Gestational age (days)		$\rho = 0.025$	0.787	$\rho = 0.125$	0.170	$\rho = 0.087$	0.345	$\rho = 0.209$	0.053	$\rho = 0.105$	0.334
Duration of breast feeding*	< 3 months	0.042 (0.026)	0.229	90.3 (3.5)	0.879	95.4 (13.8)	0.250	80.0 (3.9)	0.123	88.7 (9.7)	0.760
	≥ 3 months	0.059 (0.039)		90.6 (6.5)		90.8 (10.3)		83.7 (11.8)		87.1 (12.4)	
HOME scale @ 6 month**		$\rho = -0.009$	0.822	$\rho = 0.005$	0.953	$\rho = -0.030$	0.747				
HOME scale @ 18 month***		$\rho = -0.072$	0.502					$\rho = 0.201$	0.072	$\rho = 0.201$	0.072

* Duration of breast feeding was determined from questionnaire at 18 month old.

** Maximum score is 30. *** Maximum score is 38.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 4. Association between natural log transformed TSH, FT4 levels at birth and natural log transformed cord blood BPA concentration (N=121).

	TSH		FT4	
	Adjusted ^a β (95%CI)	p-value	Adjusted ^a β (95%CI)	p-value
All	-0.15 (-0.38, 0.08)	0.206	0.03 (-0.02, 0.08)	0.289
Male	0.05 (-0.38, 0.48)	0.823	0.04 (-0.05, 0.12)	0.409
Female	-0.23 (-0.50, 0.04)	0.089	0.02 (-0.05, 0.09)	0.491

^a Adjusted for child's age (days) at hormone measurement.

Table 5. Association between BSID-II (MDI, PDI) at 6 month and natural log transformed cord blood BPA concentration (N=121).

	Crude		Adjusted ^a	
	β	p-value	β	p-value
All				
MDI @ 6 month	-0.56 (-2.26, 1.15)	0.521	-0.65 (-2.39, 1.05)	0.463
PDI @ 6 month	-1.37 (-4.53, 1.78)	0.390	-1.50 (-4.71, 1.71)	0.357
Male				
MDI @ 6 month	1.52 (-1.15, 4.20)	0.258	1.38 (-1.40, 4.16)	0.323
PDI @ 6 month	-2.19 (-6.72, 2.34)	0.336	-3.18 (-7.70, 1.35)	0.164
Female				
MDI @ 6 month	-1.87 (-4.11, 0.36)	0.099	-1.99 (-4.28, 0.31)	0.088
PDI @ 6 month	-0.87 (-5.32, 3.58)	0.697	-0.91 (-5.52, 3.70)	0.695

^a Adjusted for caffeine intake during pregnancy, HOME at 6 month, maternal education, annual income and child sex for all subjects.

Table 6. Association between BSID-II (MDI, PDI) at 18 month and natural log transformed cord blood BPA concentration (N=86).

	Crude		Adjusted ^a	
	β	p-value	β	p-value
All				
MDI @ 18 month	-0.98 (-4.91, 2.96)	0.623	0.08 (-3.71, 3.87)	0.968
PDI @ 18 month	-0.93 (-4.96, 3.11)	0.648	0.69 (-3.34, 4.72)	0.735
Male				
MDI @ 18 month	-0.91 (-7.40, 5.57)	0.777	-0.09 (-6.51, 6.34)	0.978
PDI @ 18 month	-2.79 (-9.00, 3.43)	0.369	-2.05 (-9.11, 5.01)	0.557
Female				
MDI @ 18 month	-0.39 (-5.21, 4.43)	0.871	-0.96 (-5.88, 3.96)	0.695
PDI @ 18 month	0.75 (-4.40, 5.91)	0.770	2.28 (-3.10, 7.65)	0.398

^a Adjusted for HOME at 18 month, maternal education, annual income and child sex for all subjects.

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

ビスフェノール A の胎児期曝露による免疫機能への影響 臍帯血 IgE および乳幼児期のアレルギー症状，感染症との関連

研究分担者 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
研究分担者 松村 徹 いであ株式会社環境創造研究所副所長
研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター特任教授

研究要旨

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネートプラスチック製品やエポキシ樹脂製品に使用される化学物質で，ヒトへの曝露は主に経口的であるが，経皮的あるいは吸入によっても起こる。ヒト胎児期の BPA 曝露による免疫機能への影響はまだ一致した結果が得られていないことから，臍帯血中 BPA 濃度を測定して，臍帯血 IgE および乳幼児期のアレルギー症状，感染症との関連を検討した。臍帯血中 IgE 濃度との関連は認められなかったが，男児では，臍帯血中 BPA 濃度が約 2.7 倍になると，生後 18 ヶ月までの中耳炎のオッズ比が 6.53 (95% CI: 1.35, 31.57) と有意に上昇した。

研究協力者

山本 潤
(いであ株式会社環境創造研究所)

A．研究目的

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネートプラスチック製品やエポキシ樹脂製品に使用される化学物質である。ヒトへの曝露は主に経口的であるが，経皮的あるいは吸入によっても起こる。BPA は内分泌かく乱化学物質としてエストロゲン類似作用やアンドロゲン阻害作用により正常な細胞機能をかく乱することが示唆されている。

動物実験ではマウス仔で喘息発症と関連があり，また胎仔期の BPA 曝露によりアレルギー感作，気道過反応，気管支好酸球増加性炎症が増強したと報告された。妊婦の母体尿中 BPA 濃度を胎児期曝露の指標としたヒト疫学研究では，BPA 濃度が増加すると生後 6 ヶ月児の喘鳴リスクが上昇したという報告がある一方で，胎児期 BPA 曝露は 5 歳児の喘鳴リスクと負の関連を示し，生後の BPA 曝露で幼児期の喘鳴リスクが上昇したとされるなど，まだ一致した結果は得ら

れていない。

本研究では，微量試料中 BPA 高精度測定法を用いて臍帯血中の BPA 濃度を測定し，胎児期 BPA 曝露による乳幼児期の免疫機能への影響を検討する。

B．研究方法

札幌市内一産院コーホートに登録した母児 514 名について，自記式質問票で母親と配偶者の妊娠中の喫煙・飲酒状況，食生活や教育歴，世帯収入などを調査し，医療診療録から産科既往歴や分娩時所見などに関する情報を入手した。児の 18 ヶ月時には，母親による自記式質問票で児の健康調査を実施し，18 ヶ月時の体格，アレルギー症状および感染症の既往歴・現病歴，母乳栄養，集団保育歴，児の受動喫煙状況などについて 390 名から回答を得た。

臍帯血中の BPA 濃度は，同位体希釈 LC-MS/MS 法 (検出下限値 0.048 ng/mL) で測定した。また，臍帯血血清中総 IgE 濃度は，ELISA 法 (検出下限値 0.05 IU/mL) で (株) SRL にて測定した。

臍帯血中 BPA 濃度と IgE 濃度との関連をみるために，両方の測定結果が揃った

152名を解析対象とした。BPA濃度とIgE濃度は自然対数変換し、検出下限値(LOD)以下の場合には半値を代入した。最終的に母の年齢、出産経歴、教育歴、妊娠中の喫煙状況、両親のアレルギー疾患既往歴および児の性別で調整した重回帰分析を行った。さらに、BPA濃度と児の18ヵ月までのアレルギー症状および感染症との関連をみるために、両方のデータが得られた136名についてロジスティック回帰分析を行った。アレルギー症状は母の教育歴、妊娠中の喫煙状況、両親のアレルギー疾患既往歴、児の性別、母乳栄養期間、18ヵ月時の家庭内受動喫煙および集団保育歴、感染症は母の教育歴、妊娠中の喫煙状況、児の性別、母乳栄養期間、18ヵ月時の家庭内受動喫煙および集団保育歴で調整した。

（倫理面への配慮）

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および研究協力施設の研究倫理委員会に諮り、承認を得たうえで実施した。

C．研究結果

解析対象者152名の母の平均年齢は、 30.2 ± 4.6 歳、短大・大卒以上が56.6%（86名）初産婦は50.7%（77名）、妊娠中に喫煙した者（途中禁煙者も含む）は35.5%（54名）であった。両親でアレルギー既往がある者は、母が30.9%（47名）、父が16.4%（25名）であった。また、男児は45.4%（69名）であった。生後18ヵ月時の質問票に回答した136名では、家庭内で受動喫煙がある児が46.3%（63名）、集団保育されている児は18.4%（25名）であった（Table 1）。

臍帯血中BPA濃度は0.055 ng/mL（中央値）、LOD（0.048 ng/mL）以下は40.1%（61名）であった。臍帯血血清中IgE濃

度は0.22 IU/mL（中央値）、LOD（0.05 IU/mL）以下は15.1%（23名）であった（Table 2）。児の出生から18ヵ月までのアレルギー症状および感染症の累積罹患率は、湿疹22.1%（30名）、食物アレルギー20.6%（28名）、喘鳴9.6%（13名）、中耳炎18.4%（25名）で、男児では中耳炎の罹患が女児の約2倍であった（Table 3）。

臍帯血中BPA濃度とIgE濃度との関連を検討したが、交絡因子で調整しても有意な関連は認められなかった（Table 4）。また、臍帯血中BPA濃度と18ヵ月までの湿疹、食物アレルギー、喘鳴、中耳炎との関連についても調整前後で有意な関連は認められなかった。しかし、性別で層化したところ、男児では、臍帯血中BPA濃度が約2.7倍になると、中耳炎のオッズ比（OR）が調整なしで2.97（95% CI: 1.05, 8.38）、調整後では6.53（95% CI: 1.35, 31.57）と有意に上昇した（Table 5）。

D．考察

母体尿中BPA濃度を曝露指標として胎児期BPA曝露による生後免疫機能の影響を検討したヒト疫学究では、妊娠16週の母体尿中BPA濃度が増加すると、6ヵ月児の喘鳴リスクが上昇したが、3歳までにはその関連が減少し、妊娠26週や出生時のBPA曝露との関連はなかったことから、曝露の影響は妊娠初期の方が強いのではないかという報告がある。また、妊娠16週と26週のBPA曝露は4歳時の呼吸機能低下と関連があったが、生後のBPA曝露については有意な関連は示さなかったという報告がある。一方、妊娠後期の胎児期曝露は5歳児の喘鳴リスクと負の関連があり、生後のBPA曝露により5～7歳の喘鳴リスクが上昇したという報告や、妊娠12～32週のBPA曝露が生後6ヵ月～7歳までの喘鳴や呼吸器感染症、気管支炎と関連があった

という報告など、これら先行研究では曝露評価時期やアウトカム評価時期が一様ではないため、結果の解釈が難しいと考えられる。また、健康アウトカムも喘鳴や喘息などの呼吸器疾患が主となっている。

動物実験では、マウスでBPA曝露によりアレルギー免疫反応が増大することが示唆されている。例えばハツカネズミでは、BPA曝露により制御性T細胞、IFN- γ 、IL-10が減少し、IL-4産生と特異的IgE抗原が増加した。また、卵白アルブミン喘息モデルでは、ハツカネズミで胎児期BPA曝露が生後17日の抗卵白アルブミンIgE増加と気道の活動亢進に参与していた。さらに、マウスでは、胎児期と生後5週のBPA曝露によってアレルギー誘発Th2サイトカイン産生レベルが上昇したと報告されていることから、発達初期のBPA曝露は生後の免疫機能に影響があると考えられるが、そのメカニズムはまだ明らかではない。また、BPAは経口曝露後、ヒトでは代謝されたBPA-グルクロニドが肝臓から全身循環されて速やかに尿中に排泄されるのに対し、マウス、ラットなどのげっ歯類では胆汁中に排泄されて、腸管に存在するグルクロニダーゼによりBPAとグルクロン酸に解離されて再び血液中に吸収されるため、ヒトとげっ歯類では、BPAの体内動態に相違があり感受性が違うと考えられることから、BPA曝露によるヒトへの影響を解明するには、ヒトでのデータをさらに蓄積する必要がある。

本研究では、男児のみで胎児期 BPA 曝露により中耳炎 OR が上昇したが、同じコホート集団で母体血中ダイオキシン類濃度と児の免疫機能を検討した報告では、2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の第 1 四分位に対する第 4 四分位の中耳炎 OR が 2.8 (95%CI: 1.2-6.6) と有意に上昇し、特に男児では、OR が 5.3 (95%CI: 1.5-19.0) とさらに高くなったことから、化学物質への感受性は

女児よりも男児で高い可能性が考えられる。アウトカム評価に関しては、生後 18 ヶ月までのアレルギー症状の確定診断が難しく、正確に結果に反映できなかったことも考えられるため、学童期までのアレルギー疾患・感染症の有病率との関連も評価していく予定である。

E . 結論

臍帯血中の BPA 濃度を測定し、胎児期 BPA 曝露による乳幼児期の免疫機能への影響を検討した。臍帯血中 IgE 濃度との関連は認められなかったが、男児では、臍帯血中 BPA 濃度が約 2.7 倍になると、生後 18 ヶ月までの中耳炎 OR が 6.53 (95% CI: 1.35, 31.57) と有意に上昇した。

先行研究では、成長に伴い免疫機能が変化することが報告されているので、今後は、学童期までの免疫機能への影響について検討していく。

F . 研究発表

- 1) 論文発表
なし
- 2) 学会発表
なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

Donohue KM, Miller RL, Perzanowski MS, Just AC, Hoepner LA, Arunajadai S, et al. Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and asthma development among inner-city children. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:736-742.

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

- Gascon M, Casas M, Morales E, Valvi D, Ballesteros-Gomez A, Luque N, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol*. In press.
- Lee MH, Chung SW, Kang BY, Park J, Lee CH, Hwang SY, et al. Enhanced interleukin-4 production in CD41 T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca²¹. *Immunology*. 2003;109:76-86.
- Midoro-Horiuti T, Tiwari R, Watson CS, Goldblum RM. Maternal bisphenol A exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups. *Environ Health Perspect*. 2010; 118:273-277.
- Miyashita C, Sasaki S, Saijo Y, Washino N, Okada E, Kobayashi S, et al. Effects of prenatal exposure to dioxin-like compounds on allergies and infections during infancy. *Environmental Research*. 2011;111:551-558.
- Ohshima Y, Yamada A, Tokuriki S, Yasutomi M, Omata N, Mayumi M. Transmaternal exposure to bisphenol A modulates the development of oral tolerance. *Pediatr Res*. 2007;62:60-64.
- Sawai C, Anderson K, Walser-Kuntz D. Effect of bisphenol A on murine immune function: modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB X NZW F1 mice. *Environ Health Perspect*. 2003; 111: 1883-1887.
- Spanier AJ, Kahn RS, Kunselman AR, Hornung R, Xu Y, Calafat AM, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and child wheeze from birth to 3 years of age. *Environ Health Perspect*. 2012; 120: 916-920.
- Spanier AJ, Kahn RS, Kunselman AR, Schaefer EW, Hornung R, Xu Y, et al. Bisphenol A Exposure and the Development of Wheeze and Lung Function in Children Through Age 5 Years. *JAMA Pediatr*. 2014; 168(12): 1131-1137.
- Strunk RC, Szeffler SJ, Phillips BR, Zeiger RS, Chinchilli VM, Larsen G, et al. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112: 883-892.
- Tian X, Takamoto M, Sugane K. Bisphenol A promotes IL-4 production by Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;132:240-247.
- Yan H, Takamoto M, Sugane K. Exposure to Bisphenol A prenatally or in adulthood promotes T(H)2 cytokine production associated with reduction of CD4CD25 regulatory T cells. *Environ Health Perspect*. 2008;116:514-519.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table1 Characteristics of subjects (n=152)

Characteristics	n (%)
Parental characteristics	
Maternal age (years) ^a	30.2 (4.6)
Maternal pre pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	20.8 (3.0)
Parity	
0	77 (50.7)
≥1	75 (49.3)
Maternal education level (years)	
≤12	66 (43.4)
≥13	86 (56.6)
Maternal smoking status during pregnancy	
Nonsmoker	98 (64.5)
Smoker	54 (35.5)
Maternal allergic history	
No	105 (69.1)
Yes	47 (30.9)
Paternal allergic history	
No	127 (83.6)
Yes	25 (16.4)
Annual household income (million yen)	
<3	28 (18.4)
3-5	81 (53.3)
≥5	43 (28.3)
Distance from home to highway	
<100 m	72 (47.4)
≥100 m	80 (52.6)
Infant characteristics	
Gender	
Male	69 (45.4)
Female	83 (54.6)
Birth season	
Spring (March-May)	36 (23.7)
Summer (June-August)	44 (28.9)
Autumn (September-November)	34 (22.4)
Winter (December- February)	38 (25.0)
Breast-feeding period (months) (n=134)	
<4	25 (18.7)
≥4	109 (81.3)
Environmental tobacco smoke exposure at 18 months (n=136)	
No	73 (53.7)
Yes	63 (46.3)
Day care attendance at 18 months (n=136)	
No	111 (81.6)
Yes	25 (18.4)

^a Mean (SD)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table2 Concentrations of BPA and concentrations of IgE in cord blood (n=152)

	Detection limit	ND ^a , no. (%)	Mean	Minimum	25th	50th	75th	Maximum	Geometric Mean
Cord blood BPA (ng/mL) ^b	0.048	61 (40.1)	0.058	0.024	0.024	0.055	0.078	0.217	0.048
Cord serum IgE (IU/mL) ^c	0.05	23 (15.1)	0.66	0.03	0.09	0.22	0.55	10.90	0.23

^aND: not determined

^bBPA: bisphenol A

^cIgE: immunoglobulin E

Table 3 Number of infants who developed allergies and infections during the first 18 months of life (n=136)

	Overall n (%)	Male n (%)	Female n (%)
Allergy			
Eczema	30 (22.1)	15 (23.1)	15 (21.1)
Food allergy	28 (20.6)	13 (20.0)	15 (21.1)
Wheezing	13 (9.6)	7 (10.8)	6 (8.5)
Infection			
Otitis media	25 (18.4)	16 (24.6)	9 (12.7)
Chicken pox	10 (7.4)	4 (6.2)	6 (8.5)
RSV disease ^a	3 (2.2)	0 (0)	3 (4.2)
Bronchitis	3 (2.2)	1 (1.5)	2 (2.8)
Pneumonia	2 (1.5)	0 (0)	2 (2.8)
Other viral infections ^b	6 (4.4)	4 (6.2)	2 (2.8)

^aRSV disease: respiratory syncytial virus disease.

^bRotavirus, adenovirus or cytomegalovirus.

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

Table4 Association between BPA^a concentrations (ng/mL) and IgE^b concentrations (IU/mL) in cord blood (n=152)

	Crude		Adjusted ^c	
	β	95% CI	β	95% CI
log _e BPA				
Over all (n=152)	-0.019	(-0.385, 0.346)	-0.051	(-0.416, 0.314)
Male infants (n=69)	0.116	(-0.473, 0.704)	0.189	(-0.399, 0.776)
Female infants (n=83)	-0.146	(-0.614, 0.322)	-0.138	(-0.614, 0.339)

^a BPA: bisphenol A

^b IgE: immunoglobulin E

^c Adjusted models included maternal age, parity, maternal education level, maternal smoking status during pregnancy, parental allergic history, infant gender

Table5 Adjusted odds ratio (95% CI) between BPA concentrations in cord blood and allergies and infectious diseases during the first 18 months of life (n=136)

	Overall (n=152)				Male infants (n=69)				Female infants (n=83)			
	Crude		Adjusted		Crude		Adjusted		Crude		Adjusted	
	OR ^a	95% CI	OR ^a	95% CI	OR ^a	95% CI	OR ^a	95% CI	OR ^a	95% CI	OR ^a	95% CI
log _e BPA ^b												
Eczema ^c	1.14	(0.60, 2.20)	1.08	(0.54, 2.15)	1.39	(0.53, 3.64)	1.40	(0.47, 4.13)	0.96	(0.39, 2.36)	0.75	(0.25, 2.26)
Food allergy ^c	1.14	(0.58, 2.22)	1.21	(0.60, 2.46)	1.93	(0.68, 5.50)	3.05	(0.80, 11.6)	0.76	(0.30, 1.91)	0.62	(0.23, 1.71)
Wheezing ^c	1.16	(0.46, 2.90)	1.06	(0.40, 2.84)	1.20	(0.33, 4.42)	1.10	(0.24, 5.03)	1.10	(0.30, 4.07)	0.51	(0.09, 3.01)
Otitis media ^d	1.73	(0.85, 3.52)	1.78	(0.76, 4.10)	2.97	(1.05, 8.38)	6.53	(1.35, 31.57)	0.86	(0.28, 2.64)	0.82	(0.25, 2.65)

^a OR for a 2.7-fold increase in cord BPA concentrations

^b BPA: bisphenol A

^c Logistic regression model adjusted models for maternal education level, maternal smoking status during pregnancy, parental allergic history, infant gender, breast-feeding period, environmental tobacco exposure, day care attendance at 18 months.

^d Logistic regression model adjusted models for maternal education level, maternal smoking status during pregnancy, infant gender, breast-feeding period, environmental tobacco exposure, day care attendance at 18 months.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

Prenatal MEHP, BPA exposure and cord blood adipokine levels

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授

研究分担者 松村 徹 いであ株式会社環境創造研究所 取締役・環境創造研究副所長

研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科 助教

研究要旨

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

研究協力者

湊屋 街子（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

山本 潤（いであ株式会社環境創造研究所）

那須 民江（中部大学生命健康科学部スポーツ保健医療学科）

A . 研究目的

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

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

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

Phthalates are group of chemicals widely

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

[26].

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

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

B . 研究方法

Study population

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Hokkaido University Center for Environment and Health Sciences.

Measurement of MEHP and BPA

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

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

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

Fetal adipokines

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

Data analysis

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

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

C . 研究結果

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

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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

D . 考察

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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

E . 結論

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

F . 研究発表

1. 学会発表

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

2015, San Paulo, 2015.8.30.-9.3.

湊屋街子, 佐々木成子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 山本潤, 松村徹, 岸玲子.

胎児期ビスフェノールA曝露による臍帯血中のアディポカイン, 出生体重, 子どもの体重への影響: 北海道スタディ. 第67回北海道公衆衛生学会. 旭川市. 2015.11.21

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

参考文献

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

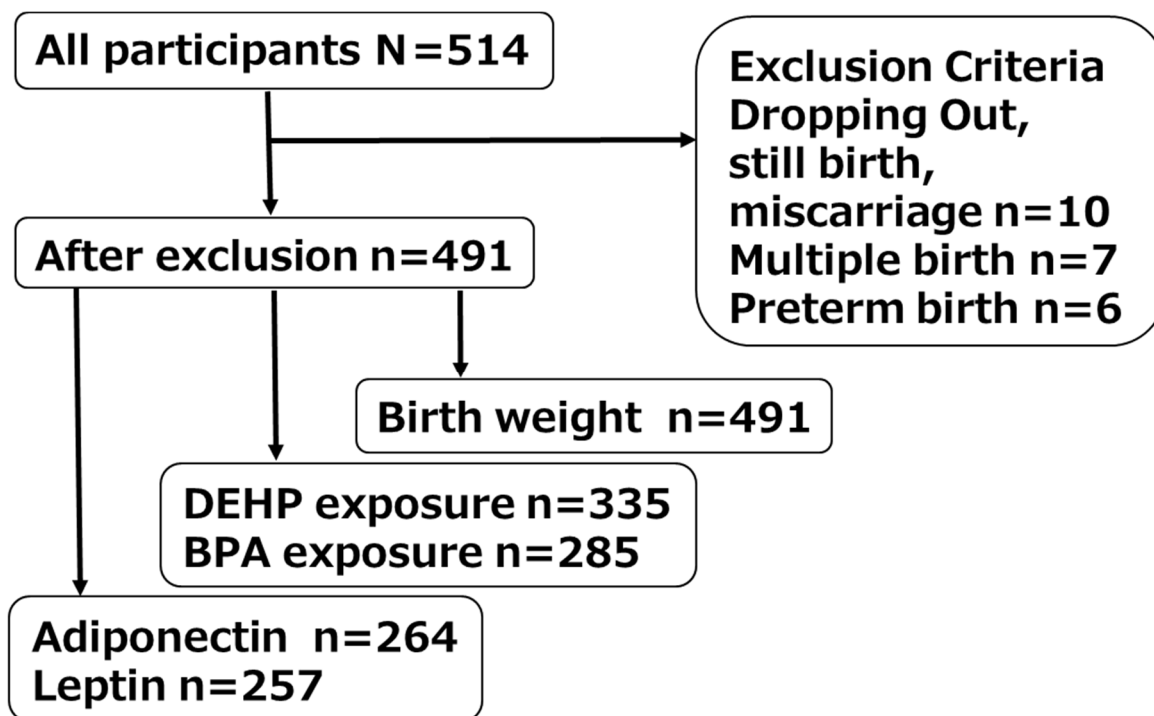


Figure 1. Participants' selection flow in this study.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 1 Characteristics of participants.

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 2 Measurements of MEHP, BAP and adipokines.

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

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

† $p < 0.10$, ** $p < 0.01$

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

^{b)} Adjusted for parental BMI and gestational age.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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

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

* P < 0.05, † p < 0.10

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.

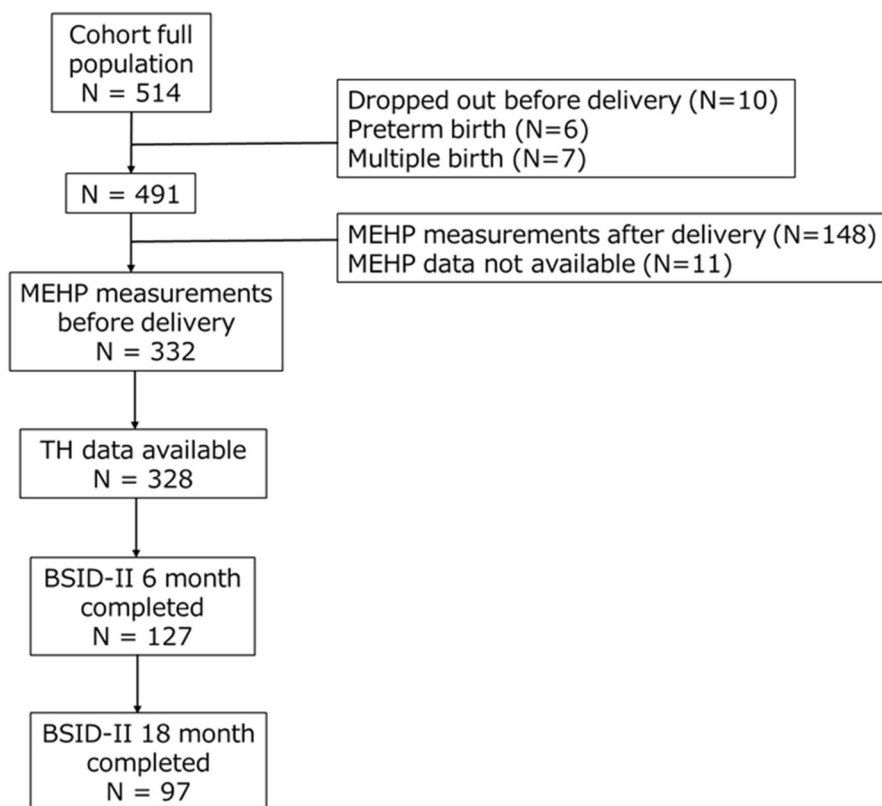
厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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

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, chlozolinate, 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

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

妊婦の異物代謝遺伝子多型がダイオキシン類と児の出生時体格との関連に及ぼす影響

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授

研究分担者 梶原 淳睦 福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課長

研究分担者 佐田 文宏 東京医科歯科大学難治疾患研究所 非常勤講師

研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科社会医学講座公衆衛生学分野助教

研究要旨 ダイオキシン類は生体内への蓄積が懸念されている環境化学物質で、現在までに疫学研究で胎児期曝露による児の出生時体格の減少などが報告されている。細胞内に入ったダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体(AHR)を介し、シトクロム P450 (CYP) 1A1 および GSTM1 などのグルタチオン S-転移酵素によって代謝され体外へ排泄される。胎児期の非喫煙者と比較して、喫煙者は児の出生時体格に対して *AHR* (G>A, Arg554Lys), *CYP1A1* (T>C, *MspI*), *GSTM1* (Present/Absent) 遺伝子多型によって大きな影響を受けると報告されているものの、ダイオキシン類についての報告はまだない。そこで本研究では、妊婦のダイオキシン類代謝に関わる *AHR* (G>A, Arg554Lys), *CYP1A1* (T>C, *MspI*) および *GSTM1* (Present/Absent) 遺伝子多型がダイオキシン類曝露と児の出生時体格との関連に及ぼす影響について検討することとした。札幌市内 1 産科病院外来を受診し同意を得た妊娠 23~35 週の妊婦 421 名について、独立変数を母体血中ダイオキシン類毒性等価量 (TEQ), 従属変数を児の出生時体格とし、妊婦の *AHR*, *CYP1A1*, *GSTM1* 遺伝子多型で組合せ、交絡因子で調整した後、重回帰分析を行った。母体血中 Total dioxins の TEQ 値が 10 倍増えると、児の出生時体重が 204g 有意に減少した ($P < 0.05$)。 *AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型, *CYP1A1* 遺伝子多型が TT/TC 型でかつ *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型の妊婦では、児の出生時体格が 401g 有意に減少した ($P = 0.033$)。児の出生時体重について、PCDF 毒性等価量と *GSTM1* 遺伝子との間の遺伝環境交互作用が認められた ($P_{\text{interaction}} = 0.030$)。さらに、ポリ塩化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン(PCDDs)とポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)の異性体である 2,3,7,8-TetCDD, 1,2,3,7,8-PenCDD, 2,3,7,8-TetCDF, および 2,3,4,7,8-PenCDF でも同様な結果が認められた。児の出生時身長について、2,3,7,8-TetCDD 毒性等価量と *GSTM1* 遺伝子との間の環境遺伝交互作用も認められた ($P_{\text{interaction}} = 0.014$)。本研究の結果から *AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型, *CYP1A1* 遺伝子多型が TC/CC 型でかつ *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型の組合せをもたない妊婦と比較して、これらの組合せをもつ妊婦は、一般環境中の同じダイオキシン類濃度を曝露しても児の出生時体格への影響がより大きく、リスクが高いグループであることがわかった。環境基準を設定するときに予防医学的な個体差への考慮が必要と思われる。

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)

戸高 尊

(九州大学医学部学術研究員)

A. 研究目的

ダイオキシン類は生体内への蓄積が懸念されている環境化学物質で、現在までに疫学研究で胎児期曝露による出生時体格の減少やアレルギー発症などが報告さ

れている。本研究でも、胎児期における低濃度のダイオキシン類曝露が児の出生時体重の減少（Konishi ら，2009），6 か月児の神経発達の遅れ（Nakajima ら，2006），18 か月児の中耳炎のリスク上昇を引き起こしたと報告した（Miyashita ら，2011）。

細胞内に入ったダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体（Aromatic hydrocarbon receptor: AHR）と結合して核内に移行し、AHR 核転写因子（AHR nuclear translocator: ARNT）と結合して異物代謝酵素であるシトクロム P450（Cytochrome P450: CYP）1A1 の発現を誘導し代謝中間体になる。代謝中間体はグルタチオン S-転移酵素（Glutathione S-transferases: GSTs）によって解毒され体外へ排泄される（Vaury ら，1995; Inui ら，2014）。これらの受容体や代謝・解毒酵素は、代謝活性や遺伝子発現に影響を及ぼす遺伝子多型をもっている。本研究で、胎児期の非喫煙者と比較して、喫煙者は児の出生時体格に対して *AHR*（G>A, Arg554Lys），*CYP1A1*（T>C, *MspI*），*GSTM1*（Present/Absent）遺伝子多型によって大きな影響を受けると報告した（Sasaki ら，2006）。しかしながら、ダイオキシン類と児の出生時体格との関連で、ダイオキシン類代謝に関わる遺伝子多型による影響はまだ検討されていない。

そこで本研究では、ダイオキシン類代謝に関わる妊婦の *AHR*、*CYP1A1*、および *GSTM1* 遺伝子多型がダイオキシン類曝露と児の出生時体格との関連に及ぼす影響を検討することを目的とした。

B．研究方法

札幌市内 1 産科病院外来を受診し同意を得た妊娠 23～35 週の妊婦を対象に、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。双胎、妊

娠高血圧症候群、糖尿病および胎児心不全は除外した 421 名を解析対象者とした。

福岡県保健環境研究所で母体血中ダイオキシン類濃度（Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) 7 種，Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) 10 種，Non-*ortho* polychlorinated biphenyls (PCBs) 4 種，Mono-*ortho* PCBs 8 種の合計 29 種)を異性体別に高分解能ガスクロマトグラフ・高分解能マスペクトロメーター（High-resolution gas-chromatography/high-resolution mass spectrometry: HRGC/HRMS）で測定した。この濃度を毒性等価係数（Toxicity equivalency factor: TEF）で毒性等価量（Toxic equivalency quantity: TEQ）に換算した（Van den Berg ら，2006）。

ダイオキシン類の代謝に関与する遺伝子多型として、*AHR*（G>A, Arg554Lys），*CYP1A1*（T>C, *MspI*）、*GSTM1*（Present/Absent）遺伝子多型をそれぞれリアルタイム PCR 法、PCR-RFLP 法、マルチプレックス PCR 法で解析した。

連続変数間 Spearman の相関係数、カテゴリー変数と連続変数間 Mann-Whitney の *U*-検定あるいは Kruskal-Wallis 検定で行った。ダイオキシン類の TEQ（Log₁₀ 変換した連続変数）と出生時体格との関連を *AHR*、*CYP1A1* および *GSTM1* 遺伝子多型で組合せて、母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、妊娠中カフェイン摂取、妊娠中アルコール摂取、妊娠中喫煙状況、教育歴、世帯収入、妊娠中近海魚摂取、妊娠中遠洋魚摂取、血液採取時期、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。ダイオキシン類の TEQ 値（Log₁₀ 変換した連続変数）と *AHR*、*CYP1A1*、あるいは *GSTM1* 遺伝子多型との間の交互作用は交互作用項を加えることで検討した。2 つあるいは 3 つの遺伝子多型の組合せによる交互作用もまた検討した。1～3 つ

の遺伝子多型の組合せによって得られるダイオキシン類の TEQ 値と出生時体格とのモデルで表した。交互作用の P 値は、遺伝子型とダイオキシン類 TEQ 値との 2 つの交互作用項に対する F-検定を組合せたポスト推定（Postestimation）を使って計算した。統計解析には SPSS 22.0J と JMP Pro Ver.11 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

対象者の属性と出生時体格との関連を表 1 に示した。出生時体格と有意な関連が認められたのは、児の性別、在胎週数、母の身長、妊娠前体重であった（ $P < 0.05$ ）。

母体血中ダイオキシン類の TEQ と濃度を表 2 に示した。PCDDs , PCDFs , Non-ortho PCBs , Mono-ortho PCBs および Total dioxins の TEQ の中央値は 6.83 , 2.38 , 4.21 , 0.34 , 13.87 (TEQ pg/g lipid) であり、濃度の中央値は 457.27 , 18.15 , 75.40 , 11302.35 , そして 11876.73(pg/g lipid)であった。

母体血中ダイオキシン類の TEQ 値と児の出生時体格との関連を表 3 で示した。PCDDs の TEQ 値が 10 倍増えると、児の出生時体重が 190 (95%CI; -378, -2)g 有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。さらに異性体別で検討すると、2,3,7,8-TetCDD の

TEQ 値が 10 倍増えると、児の出生時身長が 0.76 (95%CI; -1.51, -0.02)cm 有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。1,2,3,7,8-PenCDD の TEQ 値が 10 倍増えると、児の出生時体重が 213 (95%CI; -374, -51)g 有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。PCDFs の TEQ 値が 10 倍増えると、206 (95%CI; -400, -12)g 有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。さらに異性体別で検討すると、2,3,7,8-TetCDF の TEQ 値が 10 倍増えると、児の出生時頭囲は 0.86 (95%CI; -1.50, -0.21)cm 有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。2,3,4,7,8-PenCDF の TEQ 値が 10 倍増えると、児の出生時体重が 171 (95%CI; -330, -11)g 有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。

妊婦の遺伝子多型と児の出生時体格との関連を表 4 に示した。*GSTM1* 遺伝子多型の Present 型と比較して、Absent 型の児の出生時身長は 0.17 (95%CI; -0.35, -0.00) cm 有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。さらに *AHR* 遺伝子多型が GG 型で *GSTM1* 遺伝子多型が Present 型と比較して、*AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型で *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型の児の出生時身長は 0.29 (-0.57, -0.00) cm 有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。

妊婦の遺伝子多型の組合せによる PCDFs 毒性等価量と出生時体重との関連を表 5 に示した。*CYP1A1* 遺伝子多型が TT/TC 型、*GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型では、PCDFs 毒性等価量が 10 倍増えると、児の出生時体重はそれぞれ 221 (95%CI; -414, -27) g（ $P < 0.05$ ）、430 (95%CI; -691, -168) g 有意に減少した（ $P < 0.001$ ）。児の出生時体重について、PCDF 毒性等価量と *GSTM1* 遺伝子との間の遺伝環境交互作用も認められた（ $P_{\text{interaction}} = 0.030$ ）。遺伝子多型を組合せると、*AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型で *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型、*CYP1A1* 遺伝子多型が TT/TC 型で

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

GSTM1 遺伝子多型が Absent 型, *AHR* 遺伝子多型 GA/AA 型, *CYP1A1* 遺伝子多型が TT/TC 型でかつ *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型では, PCDF の TEQ 値が 10 倍増えると児の出生時体重はそれぞれ 498 (-837, -159) g ($P < 0.01$), 372 (95%CI; -651, -93) g ($P < 0.01$), 471 (95%CI; -820, -121) g ($P < 0.01$) 有意に減少した。PCDDs および Total dioxin TEQ 値でも同様な結果を示した（表なし）。

さらに異性体別で検討した。2,3,7,8-TetCDD 毒性等価量と出生時体格との関連を表 6 に示した。*AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型では, 2,3,7,8-TetCDD の TEQ 値が 10 倍増えると, 児の出生時身長は 1.25 (95%CI; -2.15, -0.35) cm ($P < 0.01$), 出生時頭囲は 0.83 (-1.50, -0.16) cm 有意に減少した ($P < 0.05$)。 *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型では, 2,3,7,8-TetCDD の TEQ 値が 10 倍増えると, 児の出生時体重は 214 (95%CI; -413, -16) g ($P < 0.05$), 出生時身長は 1.74 (95%CI; -2.80, -0.69) cm ($P < 0.01$), 出生時頭囲は 1.06 (95%CI; -1.83, -0.29) cm 有意に減少した ($P < 0.05$)。 児の出生時身長について, 2,3,7,8-TetCDD 毒性等価量と *GSTM1* 遺伝子との環境遺伝相互作用も認められた ($P_{\text{interaction}} = 0.014$)。 *AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型で *CYP1A1* 遺伝子多型が TT/TC 型では, 2,3,7,8-TetCDD の TEQ 値が 10 倍増えると, 児の出生時身長は 1.13 (95%CI; -2.08, -0.17) cm ($P < 0.05$), 出生時頭囲は 0.76 (95%CI; -1.40, -0.03) cm 有意に減少した ($P < 0.05$)。 *AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型で *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型では, 2,3,7,8-TetCDD の TEQ 値が 10 倍増えると, 児の出生時体重は 308 (95%CI; -553, -64) g ($P < 0.05$), 出生時身長は 2.45 (95%CI; -3.74, -1.16) cm 有意に減少した ($P < 0.001$)。

CYP1A1 遺伝子多型が TT/TC 型で *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型では, 2,3,7,8-TetCDD の TEQ 値が 10 倍増えると, 児の出生時身長は 1.64 (95%CI; -2.76, -0.53) cm 有意に減少した ($P < 0.01$)。 *AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型, *CYP1A1* 遺伝子多型が TT/TC 型でかつ *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型では, 2,3,7,8-TetCDD の TEQ 値が 10 倍増えると, 児の出生時体重は 282 (95%CI; -539, -24) g ($P < 0.05$), 出生時身長は 2.31 (95%CI; -3.67, -0.95) cm 有意に減少した ($P < 0.01$)。 さらに 1,2,3,7,8-PenCDD, 2,3,7,8-TetCDF, 2,3,4,7,8-PenCDF でも同様な結果が認められた（表なし）。

D. 考察

PCDDs や PCDFs の TEQ 値が出生時体重の減少に有意な減少を示した。フィンランドの先行研究では, 母乳中の PCDDs や PCDFs 値が増えると出生時体重は減少したと報告されており (Vartiainen ら, 1998), 本研究の結果と一致した。他の健康な日本人妊婦を対象とした研究では, 母乳中の 2,3,7,8-TetCDD と 2,3,4,7,8-PenCDF 値が増えると出生時頭囲が減少し (Nishijo ら, 2008), OECD の TEQ 値が増えると出生時体重が減少した (Tajimi ら, 2005)。本研究の結果との不一致は先行研究よりもサンプルサイズが小さいこと, 交絡因子の違い, 曝露レベルや母体血や母乳といったサンプルの違いが考えられる。出生時体格に対するこれらの結果の不一致はまだ明確になっていないので, 今後の研究で明らかにしていく必要がある。

ダイオキシン類は毒性を引き起こし, *AHR* によって調整される (Van den Berg ら, 2006)。2,3,7,8-TetCDD, 1,2,3,7,8-PenCDD, 2,3,7,8-TetCDF, および 2,3,4,7,8-PenCDF の TEF は 0.0003

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

～0.1 で他の異性体よりも大きい（Van den Berg ら、2006）。また、日本人の血液サンプルから 2,3,7,8-TetCDD , 1,2,3,7,8-PenCDD , 2,3,4,7,8-PenCDF は魚介類摂取の日本人集団で比較的高く検出されている（Tsutsumi ら、2001）。さらに、1,2,3,7,8-PenCDD や 2,3,4,7,8-PenCDF は日本人の女性看護師の胎盤で他のダイオキシン類異性体よりも 10-100 倍高濃度で検出されている（Suzuki ら、2005）。これらのダイオキシン類異性体の代謝に関わる *AHR*（G>A）遺伝子多型の GA/AA 型、*CYP1A1*（T>C）遺伝子多型の TT/TC 型、そして *GSTM1*（Present/Absent）遺伝子多型の Absent 型では、代謝能が低いことや酵素遺伝子の発現が低いことが報告されている（Landi ら、1994; Daly ら、1995; Vaury ら、1995; Wong ら、2001）。それゆえに、*AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型、*CYP1A1* 遺伝子多型が TT/TC 型、*GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型をもった妊婦ではダイオキシン類の代謝能が低い群であると考えられる。我々の過去の本研究でも、*AHR* 遺伝子多型の GA/AA 型、*CYP1A1* 遺伝子多型の TT/TC 型をもった妊婦のダイオキシン類濃度は他の遺伝子型をもった妊婦よりも高濃度であった（Kobayashi ら、2013）。*AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型、*CYP1A1* 遺伝子多型が TT/TC 型でかつ *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型の組合せをもった妊婦はダイオキシン類に対して最も代謝されにくく、そして体内に残留されやすいと考えられる。一般環境中の同じダイオキシン類濃度を曝露しても児の出生時体格への影響がより大きく、高いリスクをもつ妊婦のグループが存在することがわかったので、環境基準を設定するときに予防医学的な個体差への考慮が必要と思われる。

AHR および *CYP1A1* 遺伝子多型で遺

伝環境交互作用は認められなかったものの、*GSTM1* 遺伝子多型ではこの交互作用は認められた。*AHR* および *CYP1A1* 遺伝子多型では Hardy-Weinberg 平衡が満たされたのに対し、*GSTM1* 遺伝子多型ではこの平衡が満たされなかった（表なし）。*AHR*、*CYP1A1*、および *GSTM1* 遺伝子多型での報告はないものの、CHAMACOS 研究では、パラオキシナーゼ 1 型（*PON1*）遺伝子多型と *PON1* 活性の指標であるアシルエステラーゼ（*ARYase*）およびパラオキシナーゼ（*POase*）との間に有意な関連があり、ここで関連を示したほとんどの *PON1* 遺伝子多型では、連鎖不平衡（Linkage disequilibrium）を認めた（Huen ら、2010; Eskenazi ら、2012）。本研究では、*GSTM1* 遺伝子多型の間にはランダムでない相関がみられ、特定のハプロタイプの頻度が有意に高くなる連鎖不平衡（Linkage disequilibrium）が起こり、*PON1* 遺伝子多型と *ARYase* との関連と同じように、*GSTM1* 遺伝子多型とその酵素活性に関連があるために、この遺伝子多型のみで遺伝環境交互作用が認められたと考えられる。

生活習慣病胎児期発症起源説（Developmental Origin of Health and Disease; DOHaD）に基づいたライフコースを通して、妊娠中の環境化学物質曝露や出生時体格の減少が児の神経発達や肥満といった疾患のリスクが上昇した報告がある（Barker ら、1989; Suzuki ら、2009; Hatch ら、2014; Zhu ら、2014）。胎児期のダイオキシン類曝露と生後の児の感染症や神経発達との関連について、遺伝的なハイリスク群が存在するかどうかを今後検討していく予定である。

E . 結論

胎児期のダイオキシン類曝露のうち PCDDs と PCDFs は児の出生時体格に影響

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

響を及ぼし、異性体別でも 2,3,7,8-TetCDD、1,2,3,7,8-PenCDD、2,3,7,8-TetCDF、そして 2,3,4,7,8-PenCDF で影響が認められた。ダイオキシン類代謝に関わる遺伝子多型で関連が認められたのは *AHR* (G>A, Arg554Lys)、*CYP1A1* (T>C, *MspI*)、*GSTM1* (Present/Absent) 遺伝子多型の 3 つであった。*AHR* 遺伝子多型が GA/AA 型、*CYP1A1* 遺伝子多型が TT/CC 型でかつ *GSTM1* 遺伝子多型が Absent 型の組合せをもたない妊婦と比較して、これらの組合せをもつ妊婦は、ダイオキシン類と児の出生時体格との関連でより大きな影響が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

小林澄貴，宮下ちひろ，佐々木成子，荒木敦子，佐田文宏，坂晋，梶原淳睦，戸高尊，岸玲子. ダイオキシン類曝露と胎児発育との関連: 遺伝的なリスクについて—北海道スタディー—. 第 85 回日本衛生学会学術総会. 和歌山市. 2015.3.26.-3.28.

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) Barker DJ, Winter PD, Osmond C et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989; 2: 577-580.
- 2) Daly AK. Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J Mol Med* 1995; 73: 539-553.
- 3) Eskenazi B, Huen K, Marks A et al. PON1 and neurodevelopment in children from the CHAMACOS Study exposed to organophosphate pesticides in utero. *Environ Health Perspect* 2010; 11: 1775-1781.
- 4) Hatch B, Healey DM, Halperin JM et al. Evolution of DOHaD: the impact of environmental health sciences. *J Dev Orig Health Dis* 2014; 4: 1-10.
- 5) Huen K, Harley K, Bradman A et al. Longitudinal changes in PON1 enzymatic activities in Mexican-American mothers and children with different genotypes and haplotypes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 244: 181-189.
- 6) Inui H, Itoh T, Yamamoto K et al. Mammalian cytochrome P450-dependent metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and coplanar polychlorinated biphenyls. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 14044-14057.
- 7) Kobayashi S, Sata F, Sasaki S et al. Genetic association of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1) polymorphisms with dioxin blood concentrations among pregnant Japanese women. *Toxicol Lett* 2013; 219: 269-278.
- 8) Konishi K, Sasaki S, Kato S et al. Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res* 2009; 109: 906-913.
- 9) Landi MT, Bertazzi PA, Shields PG et al. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in human. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 242-246.
- 10) Miyashita C, Sasaki S, Saijo Y et al. Effects of prenatal exposure to di-

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

- oxin-like compounds on allergies and infections during infancy. *Environ Res* 2011; 111: 551-558.
- 11) Nakajima S, Saijo Y, Kato S et al. Effects of 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: 773-778.
- 12) Nishijo M, Tawara K, Nakagawa H et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in maternal breast milk and newborn head circumference. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008; 18: 246-251.
- 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) Suzuki G, Nakano M, Nakano S. Distribution of PCDDs/PCDFs and Co-PCBs in human maternal blood, cord blood, placenta, milk, and adipose tissue: dioxins showing high toxic equivalency factor accumulate in the placenta. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 1836-1847.
- 15) Suzuki K, Ando D, Sato M et al. The association between maternal smoking during pregnancy and childhood obesity persists to the age of 9-10 years. *J Epidemiol* 2009; 19: 1836-1847.
- 16) Tajimi M, Uehara R, Watanabe M et al. Relationship of PCDD/F and Co-PCB concentrations in breast milk with infant birthweights in Tokyo, Japan. *Chemosphere* 2005; 61: 383-388.
- 17) Tsutsumi T, Yanagi T, Nakamura M et al. Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere* 2001; 45: 1129-1137.
- 18) Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006; 93: 223-241.
- 19) Vartiainen T, Jaakkola JJ, Saarikoski S et al. Birth weight and sex of children and the correlation to the body burden of PCDDs/PCDFs and PCBs of the mother. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 61-66.
- 20) Vaury C, Lainé R, Noguez P et al. Human glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription. *Cancer Res* 1995; 55: 5520-5523.
- 21) Wong JMY, 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.
- 22) Zhu JL, Olsen J, Liew Z et al. Parental smoking during pregnancy and ADHD in children: the Danish national cohort. *Pediatrics* 2014; 134: e382-e388.

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. 母児の属性と出生時体格 (N = 421)

属性	N (%)	出生時体重 (g)	出生時身長 (cm)	出生時頭囲 (cm)
	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
児				
性別***				
男	201 (47.7)	3117 ± 393	48.4 ± 2.1	33.7 ± 1.3
女	220 (52.3)	3017 ± 366	47.8 ± 1.7	32.9 ± 1.2
在胎週数 (週)****	38.9 ± 1.4	r = 0.416 ^b	r = 0.393 ^b	r = 0.153 ^b
出生時体重 (g)****	3065 ± 382	-	r = 0.701 ^b	r = 0.502 ^b
出生時身長 (cm)****	48.1 ± 2.0	r = 0.701 ^b	-	r = 0.390 ^b
出生時頭囲 (cm)***	33.3 ± 1.3	r = 0.502 ^b	r = 0.390 ^b	-
妊婦				
年齢 (歳)	30.8 ± 4.7	r = -0.037 ^b	r = -0.058 ^b	r = -0.001 ^b
身長 (cm)****	158 ± 5	r = 0.108 ^b	r = 0.118 ^b	r = 0.124 ^b
妊娠前体重 (kg)****	53 ± 9	r = 0.156 ^b	r = 0.140 ^b	r = 0.105 ^b
出産歴				
初産	204 (48.5)	3045 ± 380	48.1 ± 2.0	33.2 ± 1.3
経産	217 (51.5)	3083 ± 384	48.1 ± 1.9	33.4 ± 1.3
妊娠中喫煙				
なし	349 (82.9)	3070 ± 394	48.1 ± 2.0	33.3 ± 1.4
あり	72 (17.1)	3040 ± 322	47.9 ± 1.9	33.1 ± 1.2
妊娠中アルコール摂取				
なし	293 (69.6)	3047 ± 399	48.0 ± 2.1	33.2 ± 1.4
あり	128 (30.4)	3106 ± 339	48.3 ± 1.7	33.4 ± 1.3
飲酒者のアルコール 摂取量 (g/日)	1.2 (0.3-51.8) ^a	r = -0.003 ^b	r = -0.071 ^b	r = -0.090 ^b
妊娠中カフェイン 摂取量 (mg/日)	117.3 (1.5-646.3) ^a	r = -0.075 ^b	r = -0.053 ^b	r = 0.005 ^b
妊娠中魚摂取				
近海魚				
一度もない	20 (4.8)	3104 ± 417	47.6 ± 2.1	33.3 ± 1.0
1-2 回/月	210 (49.9)	3085 ± 347	48.2 ± 1.7	33.4 ± 1.3
1-2 回/週	167 (39.7)	3028 ± 423	48.0 ± 2.2	33.1 ± 1.4
3-4 回/週	23 (5.5)	3139 ± 329	48.3 ± 1.5	33.5 ± 1.3
ほぼ毎日	1 (0.2)	2604 ± 0	47.1 ± 0	32.5 ± 0
遠洋魚				
一度もない	12 (2.9)	3096 ± 508	47.8 ± 2.5	33.3 ± 0.9
1-2 回/月	182 (43.2)	3066 ± 380	48.0 ± 1.8	33.4 ± 1.3
1-2 回/週	201 (47.7)	3060 ± 393	48.1 ± 2.1	33.2 ± 1.4
3-4 回/週	25 (5.9)	3083 ± 251	48.1 ± 1.6	33.5 ± 1.2
ほぼ毎日	1 (0.2)	3098 ± 0	47.5 ± 0	33.0 ± 0
教育歴				
9 年以下	9 (2.1)	3209 ± 417	48.7 ± 1.8	33.1 ± 1.8
10-12 年	168 (39.9)	3040 ± 390	47.9 ± 1.9	33.2 ± 1.4
13-16 年	235 (23.5)	3073 ± 380	48.1 ± 2.0	33.3 ± 1.3
17 年以上	9 (2.1)	3161 ± 233	49.3 ± 1.3	33.3 ± 0.5
世帯収入				
300 万円以下	68 (16.2)	3071 ± 404	47.9 ± 2.1	33.1 ± 1.4
300-500 万円	209 (49.6)	3083 ± 367	48.1 ± 2.0	33.4 ± 1.3
500-700 万円	93 (22.1)	3008 ± 382	48.1 ± 1.8	33.1 ± 1.3
700-1000 万円	44 (10.5)	3034 ± 385	47.8 ± 2.1	33.4 ± 1.5
1000 万円以上	7 (1.7)	3409 ± 474	49.5 ± 0.9	34.0 ± 0.8
血液採取時期				
妊娠中	293 (69.6)	3072 ± 389	48.2 ± 2.0	33.3 ± 1.3
出産後	128 (30.4)	3049 ± 366	47.9 ± 1.9	33.3 ± 1.4

SD: Standard deviation (標準偏差). a; 中央値 (最小値-最大値). b; Spearman の相関係数.

,*; 出生時体重 (*), 身長 (**), 頭囲 (***) に対して Spearman の相関係数, Mann-Whitney の U-検定あるいは Kruskal-Wallis 検定を使った場合に有意差あり (P < 0.05).

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1. 母児の属性と出生時体格 (N = 421) (続き)

属性	N (%)	出生時体重 (g)	出生時身長 (cm)	出生時頭囲 (cm)
	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
遺伝子多型				
<i>AHR</i> (G>A, Arg554Lys)				
GG	142 (33.7)	3049 ± 414	48.1 ± 1.8	33.3 ± 1.4
GA	195 (46.3)	3078 ± 364	48.1 ± 2.1	33.3 ± 1.3
AA	84 (20.0)	3061 ± 370	48.1 ± 1.9	33.3 ± 1.3
<i>CYP1A1</i> (T>C, <i>MspI</i>)				
TT	176 (41.8)	3086 ± 339	48.2 ± 1.8	33.3 ± 1.3
TC	201 (47.7)	3029 ± 404	47.9 ± 2.1	33.2 ± 1.3
CC	44 (10.5)	3145 ± 430	48.2 ± 1.7	33.3 ± 1.3
<i>GSTM1</i> (Present/Absent)				
Present	209 (49.6)	3062 ± 372	48.1 ± 1.8	33.3 ± 1.4
Absent	212 (50.4)	3068 ± 392	48.0 ± 2.1	33.3 ± 1.3

SD: Standard deviation (標準偏差). a; 中央値 (最小値-最大値). b; Spearman の相関係数.

*, **, ***; 出生時体重 (*), 身長 (**), 頭囲 (***) に対して Spearman の相関係数、Mann-Whitney の *U*-検定あるいは Kruskal-Wallis 検定を使った場合に有意差あり ($P < 0.05$).

表 2. 母体血中ダイオキシン類毒性等価量と濃度 (N = 421)

	平均	パーセンタイル				最大値
		最小値	25th	50th	75th	
毒性等価量 TEQ (TEQ pg/g lipid)						
PCDDs	7.31	1.65	5.01	6.83	9.05	29.32
PCDFs	2.56	0.64	1.79	2.38	3.05	7.77
Non-ortho PCBs	4.57	0.65	2.64	4.21	5.89	23.17
Mono-ortho PCBs	0.37	0.05	0.23	0.34	0.47	1.49
Total dioxins	14.82	3.17	9.89	13.87	18.18	42.93
濃度 (pg/g lipid)						
PCDDs	507.12	92.69	370.94	457.27	611.21	1602.40
PCDFs	20.26	9.50	14.30	18.15	22.66	192.40
Non-ortho PCBs	81.00	20.00	52.62	75.40	99.94	553.62
Mono-ortho PCBs	12472.89	1724.33	7559.09	11302.35	15571.79	49632.02
Total dioxins	13081.28	11876.73	8120.81	11876.73	16247.67	50477.45

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

表 3. 母体血中ダイオキシン類毒性等価量と出生時体格との関連（N = 421）

	出生時体重 (g)	出生時身長 (cm)	出生時頭囲 (cm)
	β (95%CI)	β (95%CI)	β (95%CI)
Log₁₀-transformed TEQ (TEQ pg/g lipid)			
PCDDs	-190 (-378, -2)*	-0.02 (-1.03, 0.99)	-0.27 (-0.99, 0.45)
2,3,7,8-TetCDD	-77 (216, 63)	-0.76 (-1.51, -0.02)*	-0.49 (-1.02, 0.04)
1,2,3,7,8-PenCDD	-213 (-374, -51)*	0.04 (-0.84, 0.91)	-0.26 (-0.88, 0.36)
1,2,3,4,7,8-HexCDD	9 (-154, 171)	0.48 (-0.39, 1.35)	0.16 (-0.46, 0.78)
1,2,3,6,7,8-HexCDD	-102 (-270, 67)	0.25 (-0.66, 1.15)	0.06 (-0.58, 0.70)
1,2,3,7,8,9-HexCDD	-41 (-172, 90)	0.37 (-0.33, 1.08)	0.02 (-0.48, 0.52)
1,2,3,4,6,7,8-HepCDD	-93 (-290, 104)	0.47 (-0.59, 1.53)	0.13 (-0.62, 0.88)
OCDD	-28 (-215, 159)	0.72 (-0.28, 1.72)	0.07 (-0.65, 0.78)
PCDFs	-206 (-400, -12)*	-0.45 (-1.49, 0.60)	-0.29 (-1.03, 0.45)
2,3,7,8-TetCDF	-152 (-323, 19)	-0.74 (-1.66, 0.18)	-0.86 (-1.50, -0.21)*
1,2,3,7,8-PenCDF	—	—	—
2,3,4,7,8-PenCDF	-171 (-330, -11)*	-0.32 (-1.18, 0.54)	-0.10 (-0.71, 0.51)
1,2,3,4,7,8-HexCDF	-70 (-211, 71)	-0.33 (-1.09, 0.43)	-0.18 (-0.72, 0.36)
1,2,3,6,7,8-HexCDF	-100 (-237, 38)	-0.18 (-0.92, 0.56)	-0.22 (-0.74, 0.31)
2,3,4,6,7,8-HexCDF	—	—	—
1,2,3,7,8,9-HexCDF	—	—	—
1,2,3,4,6,7,8-HepCDF	-72 (-178, 33)	-0.14 (-0.71, 0.43)	-0.03 (-0.44, 0.37)
1,2,3,4,7,8,9-HepCDF	—	—	—
OCDF	—	—	—
Non-ortho PCBs	-115 (-250, 20)	-0.20 (-0.92, 0.53)	-0.15 (-0.66, 0.37)
3,4,4',5'-TetCB (#81)	—	—	—
3,3',4,4'-TetCB (#87)	38 (-97, 173)	0.07 (-0.66, 0.79)	-0.28 (-0.79, 0.24)
3,3',4,4',5'-PenCB (#126)	-104 (-228, 21)	-0.17 (-0.84, 0.50)	-0.12 (-0.60, 0.36)
3,3',4,4',5,5'-HexCB (#169)	-84 (-234, 66)	-0.16 (-0.97, 0.65)	-0.25 (-0.82, 0.32)
Mono-ortho PCBs	-114 (-268, 40)	-0.07 (-0.89, 0.76)	-0.33 (-0.92, 0.25)
2',3,4,4',5'-PenCB (#123)	-75 (-183, 33)	-0.04 (-0.62, 0.55)	-0.13 (-0.55, 0.28)
2,3',4,4',5'-PenCB (#118)	-108 (-248, 32)	-0.03 (-0.78, 0.73)	-0.28 (-0.81, 0.26)
2,3,4,4',5'-PenCB (#114)	-64 (-175, 48)	0.12 (-0.48, 0.72)	-0.25 (-0.68, 0.17)
2,3,3',4,4'-PenCB (#105)	-90 (-229, 49)	0.05 (-0.70, 0.80)	-0.24 (-0.77, 0.29)
2,3',4,4',5,5'-HexCB (#167)	-89 (-224, 46)	-0.09 (-0.81, 0.64)	-0.37 (-0.88, 0.15)
2,3,3',4,4',5'-HexCB (#156)	-88 (-258, 82)	-0.21 (-1.12, 0.71)	-0.39 (-1.03, 0.26)
2,3,3',4,4',5'-HexCB (#157)	-53 (-195, 90)	-0.00 (-0.77, 0.76)	-0.21 (-0.75, 0.34)
2,3,3',4,4',5,5'-HepCB (#189)	-26 (-160, 107)	-0.08 (-0.80, 0.63)	-0.32 (-0.83, 0.19)
Total dioxins	-204 (-390, -17)*	-0.20 (-1.20, 0.81)	-0.25 (-0.96, 0.47)

β は母体血中ダイオキシン類毒性等価量（TEQ）が 10 倍増えることの出生時体格の変化量を表す。

母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、妊娠中カフェイン摂取、妊娠中アルコール摂取、妊娠中喫煙状況、教育歴、世帯収入、妊娠中近海魚摂取、妊娠中遠洋魚摂取、血液採取時期、児の性別、在胎週数で調整した重回帰分析。

*; $P < 0.05$.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 4. 妊婦の *AHR* (G>A, Arg554Lys)、*CYP1A1* (T>C, *MspI*)、*GSTM1* (Present/Absent) 遺伝子多型による児の出生時体格への影響

遺伝子多型			N (%)	出生時体重 (g)	出生時身長 (cm)	出生時頭囲 (cm)
<i>AHR</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>GSTM1</i>		(95%CI)	(95%CI)	(95%CI)
GG			142 (33.7)	Referent	Referent	Referent
GA/AA			279 (66.3)	-13 (-47, 22)	0.01 (-0.18, 0.19)	0.01 (-0.13, 0.14)
	CC		44 (10.5)	Referent	Referent	Referent
	TT/TC		377 (89.5)	-29 (-81, 23)	0.01 (-0.27, 0.29)	-0.01 (-0.21, 0.20)
		Present	209 (49.6)	Referent	Referent	Referent
		Absent	212 (50.4)	-20 (-52, 12)	-0.17 (-0.35, -0.00)*	-0.09 (-0.21, 0.04)
GG	CC		14 (3.3)	Referent	Referent	Referent
	TT/TC		128 (30.4)	-36 (-106, 33)	0.06 (-0.31, 0.43)	-0.04 (-0.32, 0.24)
GA/AA	CC		30 (7.1)	52 (-51, 155)	0.10 (-0.45, 0.65)	-0.10 (-0.51, 0.31)
	TT/TC		249 (59.1)	-15 (-79, 48)	0.01 (-0.33, 0.36)	-0.02 (-0.28, 0.23)
GG		Present	66 (15.7)	Referent	Referent	Referent
		Absent	76 (18.1)	-14 (-78, 50)	0.04 (-0.31, 0.38)	0.00 (-0.25, 0.26)
GA/AA		Present	143 (34.0)	40 (-12, 92)	0.27 (-0.01, 0.55)	0.12 (-0.09, 0.32)
		Absent	136 (32.3)	-16 (-69, 37)	-0.29 (-0.57, -0.00)*	-0.14 (-0.35, 0.08)
	CC	Present	21 (5.0)	Referent	Referent	Referent
		Absent	23 (5.5)	28 (-82, 139)	0.03 (-0.56, 0.62)	0.06 (-0.38, 0.50)
	TT/TC	Present	188 (44.7)	-7 (-69, 56)	0.21 (-0.12, 0.54)	0.10 (-0.15, 0.35)
		Absent	189 (44.9)	-51 (-113, 11)	-0.19 (-0.52, 0.14)	-0.11 (-0.35, 0.14)
GG	CC	Present	4 (1.0)	Referent	Referent	Referent
		Absent	10 (2.4)	112 (-81, 304)	0.17 (-0.87, 1.20)	0.38 (-0.39, 1.15)
	TT/TC	Present	62 (14.7)	-0 (-94, 93)	0.12 (-0.38, 0.62)	0.04 (-0.33, 0.42)
		Absent	66 (15.7)	-34 (-127, 59)	0.12 (-0.38, 0.62)	-0.04 (-0.41, 0.33)
GA/AA	CC	Present	17 (4.0)	116 (-36, 267)	0.22 (-0.59, 1.03)	0.01 (-0.60, 0.61)
		Absent	13 (3.1)	5 (-166, 177)	0.05 (-0.86, 0.97)	-0.17 (-0.86, 0.52)
	TT/TC	Present	126 (29.9)	28 (-51, 107)	0.37 (-0.06, 0.79)	0.14 (-0.17, 0.46)
		Absent	123 (29.2)	-21 (-100, 59)	-0.23 (-0.66, 0.19)	-0.12 (-0.44, 0.20)

は出生時体格の変化量を表す。

母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、妊娠中カフェイン摂取、妊娠中アルコール摂取、妊娠中喫煙状況、教育歴、世帯収入、妊娠中近海魚摂取、妊娠中遠洋魚摂取、血液採取時期、児の性別、在胎週数で調整した重回帰分析。

*; $P < 0.05$.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 5. 妊婦の異物代謝遺伝子多型の組合せによる出生体重への影響: PCDFs 毒性等価量

遺伝子多型		出生時体重 (g)	
<i>AHR</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>GSTM1</i>	(95%CI)
GG			-200 (-487, 87)
GA/AA			-215 (-452, 23)
			$P_{\text{interaction}} = 0.932$
	CC		-90 (-419, 239)
	TT/TC		-221 (-414, -27)*
			$P_{\text{interaction}} = 0.992$
		Present	-29 (-280, 223)
		Absent	-430 (-691, -168)***
			$P_{\text{interaction}} = 0.030*$
GG	CC		-759 (-1773, 254)
	TT/TC		-141 (-447, 164)
GA/AA	CC		-33 (-671, 606)
	TT/TC		-238 (-494, 17)
			$P_{\text{interaction}} = 0.761$
GG		Present	-108 (-512, 297)
		Absent	-302 (-699, 95)
GA/AA		Present	-6 (-324, 312)
		Absent	-498 (-837, -159)**
			$P_{\text{interaction}} = 0.118$
	CC	Present	109 (-565, 783)
		Absent	-790 (-1694, 114)
	TT/TC	Present	-68 (-340, 205)
		Absent	-372 (-651, -93)**
			$P_{\text{interaction}} = 0.605$
GG	CC	Present	-16 (-2186, 2153)
		Absent	-774 (-2022, 474)
	TT/TC	Present	-116 (-529, 298)
		Absent	-194 (-636, 247)
GA/AA	CC	Present	80 (-638, 798)
		Absent	-872 (-2414, 670)
	TT/TC	Present	-35 (-391, 320)
		Absent	-471 (-820, -121)**
			$P_{\text{interaction}} = 0.492$

は母体血中ダイオキシン類毒性等価量 (TEQ) が 10 倍増えるごとの出生時体格の変化量を表す。

母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、妊娠中カフェイン摂取、妊娠中アルコール摂取、妊娠中喫煙状況、教育歴、世帯収入、妊娠中近海魚摂取、妊娠中遠洋魚摂取、血液採取時期、児の性別、在胎週数で調整した重回帰分析。

交互作用の P 値は、遺伝子型とダイオキシン類 TEQ 値との 2 つの交互作用項に対する F-検定を組合せたポスト推定 (Postestimation) を使って計算した。

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

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 6. 妊婦の異物代謝遺伝子多型の組合せによる出生時体格への影響: 2,3,7,8-TetCDD 毒性等価量

遺伝子多型			出生時体重 (g)	出生時身長 (cm)	出生時頭圍 (cm)
<i>AHR</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>GSTM1</i>	(95%CI)	(95%CI)	(95%CI)
GG			26 (-216, 268)	0.17 (-1.13, 1.46)	-0.11 (-1.07, 0.86)
GA/AA			-152 (-321, 16)	-1.25 (-2.15, -0.35)**	-0.83 (-1.50, -0.16)*
			$P_{\text{interaction}} = 0.222$	$P_{\text{interaction}} = 0.071$	$P_{\text{interaction}} = 0.211$
	CC		-147 (-557, 262)	-1.10 (-3.29, 1.09)	-1.46 (-3.04, 0.13)
	TT/TC		-62 (-209, 85)	-0.73 (-1.52, 0.06)	-0.40 (-0.97, 0.17)
			$P_{\text{interaction}} = 0.698$	$P_{\text{interaction}} = 0.753$	$P_{\text{interaction}} = 0.215$
		Present	38 (-149, 224)	0.03 (-0.96, 1.02)	-0.07 (-0.79, 0.66)
		Absent	-214 (-413, -16)*	-1.74 (-2.80, -0.69)**	-1.06 (-1.83, -0.29)**
			$P_{\text{interaction}} = 0.063$	$P_{\text{interaction}} = 0.014*$	$P_{\text{interaction}} = 0.058$
GG	CC		26 (-1092, 1143)	0.99 (-4.97, 6.96)	-5.64 (-9.93, -1.35)*
	TT/TC		28 (-220, 275)	0.10 (-1.22, 1.42)	0.19 (-0.77, 1.14)
GA/AA	CC		-204 (-663, 255)	-1.59 (-4.04, 0.86)	-0.60 (-2.36, 1.17)
	TT/TC		-107 (-285, 71)	-1.13 (-2.08, -0.17)*	-0.71 (-1.40, -0.03)*
			$P_{\text{interaction}} = 0.992$	$P_{\text{interaction}} = 0.607$	$P_{\text{interaction}} = 0.070$
GG		Present	40 (-297, 377)	0.44 (-1.34, 2.22)	0.41 (-0.89, 1.71)
		Absent	-24 (-359, 311)	-0.17 (-1.94, 1.60)	-0.67 (-1.97, 0.62)
GA/AA		Present	31 (-188, 251)	-0.17 (-1.33, 0.99)	-0.26 (-1.11, 0.59)
		Absent	-308 (-553, -64)*	-2.45 (-3.74, -1.16)***	-1.21 (-2.15, -0.26)
			$P_{\text{interaction}} = 0.992$	$P_{\text{interaction}} = 0.607$	$P_{\text{interaction}} = 0.069$
	CC	Present	32 (-502, 567)	-0.10 (-2.94, 2.74)	-0.03 (-2.09, 2.03)
		Absent	-392 (-1034, 250)	-2.41 (-5.83, 1.00)	-3.41 (-5.89, -0.94)**
	TT/TC	Present	38 (-161, 238)	0.01 (-1.05, 1.07)	-0.11 (-0.88, 0.66)
		Absent	-186 (-395, 24)	-1.64 (-2.76, -0.53)**	-0.80 (-1.60, 0.01)
			$P_{\text{interaction}} = 0.916$	$P_{\text{interaction}} = 0.781$	$P_{\text{interaction}} = 0.196$
GG	CC	Present	-97 (-1643, 1448)	1.41 (-6.77, 9.59)	-7.52 (-13.4, -1.61)*
		Absent	605 (-1099, 2309)	1.67 (-7.35, 10.7)	-3.60 (-10.1, 2.92)
	TT/TC	Present	34 (-313, 381)	0.34 (-1.49, 2.18)	0.71 (-0.62, 2.03)
		Absent	-1 (-354, 352)	-0.25 (-2.11, 1.62)	-0.44 (-1.79, 0.92)
GA/AA	CC	Present	20 (-555, 596)	-0.30 (-3.35, 2.74)	1.07 (-1.13, 3.27)
		Absent	-588 (-1353, 178)	-3.74 (-7.79, 0.32)	-3.51 (-6.44, -0.58)*
	TT/TC	Present	35 (-203, 274)	-0.15 (-1.42, 1.11)	-0.52 (-1.43, 0.40)
		Absent	-282 (-539, -24)*	-2.31 (-3.67, -0.95)**	-0.95 (-1.94, 0.03)
			$P_{\text{interaction}} = 0.382$	$P_{\text{interaction}} = 0.167$	$P_{\text{interaction}} = 0.099$

は母体血中ダイオキシン類毒性等価量 (TEQ) が 10 倍増えるごとの出生時体格の変化量を表す。

母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、妊娠中カフェイン摂取、妊娠中アルコール摂取、妊娠中喫煙状況、教育歴、世帯収入、妊娠中近海魚摂取、妊娠中遠洋魚摂取、血液採取時期、児の性別、在胎週数で調整した重回帰分析。

交互作用の P 値は、遺伝子型とダイオキシン類 TEQ 値との 2 つの交互作用項に対する F-検定を組合せたポスト推定 (Postestimation) を使って計算した。

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

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
妊婦の喫煙が母の遺伝子多型を介して児の出生時体格に及ぼす影響

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授
研究分担者 佐田 文宏 東京医科歯科大学難治疾患研究所 非常勤講師
研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科 助教

研究要旨

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

研究協力者

小林 澄貴, 宮下 ちひろ
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

A. 研究目的

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

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

細胞内に入った PAHs は芳香族炭化水素受容体 (Aromatic hydrocarbon receptor: AHR) と結合して核内に移行し、AHR 核転写因子 (AHR nuclear translocator: ARNT) と結合して異物代謝酵素であるシトクロム P450 (Cytochrome P450: CYP) 1A1 の発現を誘導し代謝中間体になる。代謝中間体は DNA と付加体を形成する。この PAH-DNA 付加体は DNA を修復する遺伝子 X-ray cross-complementing gene 1 (*XRCC1*) によって、DNA が修復されるので、PAHs に対する *XRCC1* の関与が示唆される。そこで本研究では、*AHR* (G>A, Arg554Lys, rs2066853), *CYP1A1* (A>G,

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

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

B. 研究方法

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

対象者の選択は図 1 に示した。2003 ~ 2007 年に研究参加協力が得られた 10,731 名のうち、出生記録 (N = 10,720)、血漿コチニン値 (N = 9,011)、およびゲノム DNA (N = 9,647) が全てあったのは、8,257 名であり、双胎 (N = 92)、妊娠高血圧 (N = 120)、妊娠性糖尿病 (N = 39) を除外すると 8,015 名だった。妊娠後期の血漿コチニン値のカットオフ値で二分すると 11.48 ng/mL 以下が 6,730 名、11.49 ng/mL 以上が 1,285 名であった。11.48 ng/mL 以下の 6,730 名からランダムサンプリングで 2,010 名に絞り、このうち出生体重、出生身長、および出生頭囲のデータがあった 1,998 名を非喫煙群とした。11.49

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

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

（倫理面への配慮）

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定に従って実施した。インフォームド・コンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行った。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏えいが一切生じないように、研究者によりデータ保管を厳重に行った。採血の方法は日常の一般診療で行われている血液生化学検査の際の採血と同様であり、格段の危険性は伴わなかった。

C. 研究結果

母児の属性を表 1 に示した。非喫煙群

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

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

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

妊婦の遺伝子多型の組合せによる妊娠後期の喫煙状況と出生時体格との関連を表 4 に示した。非喫煙群の児と比較して、喫煙群の児の出生体重は 71 g 小さく (95%信頼区間 (CI); -103, -40), 出生身長は 0.23 cm 小さく (95%CI; -0.41, -0.06), 出生頭囲は 0.28 cm 小さかった (95%CI; -0.41, -0.15)。妊娠後期の喫煙状況と *AHR* 遺伝子多型では、*AHR-GA/AA* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*AHR-GG* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 56 g 小さく (95%CI; -91, -20), 出生身長は 0.35 cm 小さかった (95%CI; -0.55, -0.16)。妊娠後期の喫煙状況と *CYP1A1* 遺伝子多型では、*CYP1A1-AA* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*CYP1A1-AG/GG* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 62 g 小さく (95%CI; -95, -30), 出生身長は 0.27 cm 小さく (95%CI; -0.45, -0.09), 出生頭囲は 0.21 cm 小さかった (95%CI; -0.35, -0.08)。妊娠後期の喫煙状況と *XRCC1* 遺伝子多型では、*XRCC1-CC* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*XRCC1-CT/TT* 型をもつ喫煙群の児

の出生体重は 59 g 小さく (95%CI; -87, -30), 出生頭囲は 0.18 cm 小さかった (95%CI; -0.30, -0.06)。妊娠後期の喫煙状況と *AHR* および *CYP1A1* 遺伝子多型の組合せでは、*AHR-GA/AA* 型で *CYP1A1-AA* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*AHR-GG* 型で *CYP1A1-AG/GG* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 114 g 小さかった (95%CI; -185, -43)。妊娠後期の喫煙状況と *AHR*, *CYP1A1* および *XRCC1* 遺伝子多型の組合せでは、*AHR-GA/AA* 型、*CYP1A1-AA* 型で *XRCC1-CC* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*AHR-GG* 型、*CYP1A1-AG/GG* 型で *XRCC1-CT/TT* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 145 g 小さかった (95%CI; -241, -50)。

D. 考察

本研究では、*AHR-GG* 型、*CYP1A1-AG/GG* 型で *XRCC1-CT/TT* 型をもつ喫煙群の児は出生体重の減少に、より大きな影響を及ぼしていたことが分かった。この結果は先行研究の *AHR-GG* 型や *CYP1A1-AG/GG* 型をもつ喫煙者の児が子宮内での発育により大きな影響を被っていたと報告された先行研究と一致していた (Wang et al., 2002; Sasaki et al., 2006)。また、基準とした遺伝子型と比較して、*AHR-GG* 型や *CYP1A1-AG/GG* 型は代謝活性の亢進や代謝酵素のタンパク発現の亢進と関連しており (Wong et al., 2001; Kisselev et al., 2005), *XRCC1-CT/TT* 型は DNA 修復遺伝子のタンパク発現の低下と関連していた (Hanova et al., 2010)。基準とした遺伝子型の組合せをもつ非喫煙群と比較して、*AHR-GG* 型、*CYP1A1-AG/GG* 型で *XRCC1-CT/TT* 型をもつ喫煙群は PAHs の代謝物がより多く、そして PAH-DNA 付加体がより多く生成されると予想された (Maloue et al., 2005; Nevert et al., 2004; Gao et al., 2014; Hecht et al., 1999; Wang et al., 2003; Shen et al., 2005; Indra et al., 2014; Karttunen et al.,

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

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

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

本研究の限界は、妊娠後期のコチニン値を1回しか測定していないことである。コチニンの生物学的半減期は17.9時間との報告がある(Dempsey et al., 2013)。しかし、表2より、1日当たり1本以上吸ったと自己申告した686名のうち、血漿コチニン値が11.49 ng/mL以上の人は655名であり、95.5%の正確度であった。また、

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

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

E . 結論

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

F . 研究発表

1.論文発表

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

2.学会発表

小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, Titilola Serifat Braimoh, 荒木敦子, 宮下ちひろ, Houman Goudarzi, 小林祥子, 岸玲子. 母の喫煙曝露と胎児発育との

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

関連: 遺伝的なハイリスクについて—
北海道スタディ. 第86回日本衛生学会
学術総会. 北海道旭川市.
2016.5.11.-13.

**G . 知的財産権の出願・登録状況（予定
を含む。）**

該当なし

参考文献

(1) Dempsey DA, Sambol NC, Jacob P 3rd,
et al. CYP2A6 genotype but not age
determines cotinine half-life in infants and
children. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 94:
400-406.

(2) Gao M, Li Y, Xue X, et al. Impact of
AhR, CYP1A1 and GSTM1 genetic
polymorphisms on TP53 R273G mutations
in individuals exposed to polycyclic
aromatic hydrocarbons. *Asian Pac J Cancer
Prev.* 2014; 15: 2699-2705.

(3) Hanova M, Stetina R, Vodickova L, et al.
Modulation of DNA repair capacity and
mRNA expression levels of XRCC1,
hOGG1 and XPG genes in styrene-exposed
workers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;
248: 194-200.

(4) Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens
and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;
91: 1194-1210.

(5) Indra R, Moserova M, Kroftova N, et al.
Modulation of human cytochrome P450
1A1-mediated oxidation of benzo[a]pyrene
by NADPH: cytochrome P450
oxidoreductase and cytochrome b5. *Neuro
Endocrinol Lett.* 2014; 35 Suppl 2: 105-113.

(6) Jhun H, Seo HG, Lee DH, et al.
Self-reported smoking and urinary cotinine
levels among pregnant women in Korea and
factors associated with smoking during
pregnancy. *J Korean Med Sci.* 2010; 25:
752-757.

(7) Karttunen V, Myllynen P, Prochazka G,
et al. Placental transfer and DNA binding of
benzo(a)pyrene in human placental
perfusion. *Toxicol Lett.* 2010; 197: 75-81.

(8) Kisselev P, Schunck WH, Roots I, et al.
Association of CYP1A1 polymorphisms
with differential metabolic activation of
17beta-estradiol and estrone. *Cancer Res.*
2005; 65: 2972-2978.

(9) Klebanoff MA, Levine RJ, Clemens JD,
et al. Serum cotinine concentration and
self-reported smoking during pregnancy. *Am
J Epidemiol.* 1998; 148: 259-262.

(10) Lindqvist R, Lendahls L, Tollbom Ö, et
al. Smoking during pregnancy: comparison
of self-reports and cotinine levels in 496
women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002;
81: 240-244.

(11) Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, et
al. Benzo(a)pyrene diolepoxide
(BPDE)-DNA adducts levels in leukocytes
of smokers in relation to polymorphism of
CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1 and
mEH. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.*
2004; 13: 1342-1348.

(12) Marloue JL, Puga A. Aryl hydrocarbon
receptor, cell cycle regulation, toxicity, and
tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 2005; 96:
1174-1184.

(13) Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, et al.
Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated
induction of the CYP1 enzymes in
environmental toxicity and cancer. *J Biol
Chem.* 2004; 279: 23847-23850.

(14) Sasaki S, Kondo T, Sata F, et al.
Maternal smoking during pregnancy and
genetic polymorphisms in the Ah receptor,
CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size
in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod.*
2006; 12: 77-83.

(15) Sasaki S, Braimoh TS, Yila TA, et al.
Self-reported tobacco smoke exposure and

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

plasma cotinine levels during pregnancy—a validation study in Northern Japan. *Sci Total Environ.* 2011; 412-413: 114-118.

(16) Shen J, Gammon MD, Terry MB, et al. Polymorphisms in XRCC1 modify the association between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, dietary antioxidants, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 336-342.

(17) Walsh RA, Redman S, Adamson L. The accuracy of self-report of smoking status in pregnant women. *Addict Behav.* 1996; 21: 675-679.

(18) Wang X, Zuckerman B, Pearson C, et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA.* 2002; 287: 196-202.

(19) Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, et al. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair.* 2003; 2: 901-908.

(20) Wong JM, Harper PA, Meyer UA, et al. Ethnic variability in the allelic distribution of human aryl hydrocarbon receptor codon 554 and assessment of variant receptor function in vitro. *Pharmacogenesis.* 2001; 11: 85-94.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

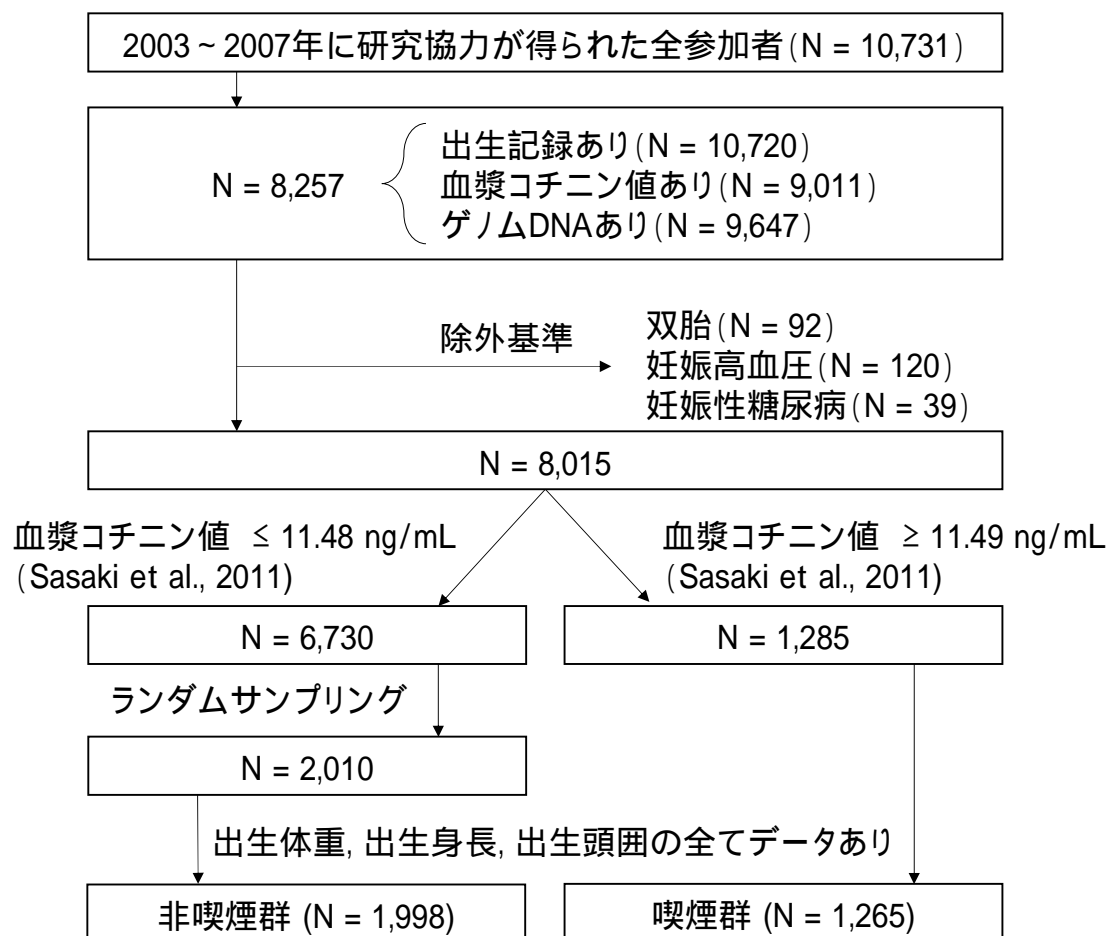


図 1. 対象者の選択フローチャート

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1. 母児の属性 (N = 3,263)

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

カイ二乗検定, Mann-Whitney の U-検定. 不明は除外した.

SD: 標準偏差.

太字: $P < 0.05$.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 2. 妊娠後期の自己申告による喫煙習慣と母体血漿コチニン濃度との関連

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 3. 母児の属性と出生時体格との関連（N = 3,263）

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

カイ二乗検定, Spearman の相関係数. 不明は除外した.

SD; 標準偏差. ^a; Spearman の相関係数.

太字; $P < 0.05$.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表 4. 妊婦の AHR (G>A, rs2066853), CYP1A1 (A>G, rs1048943), XRCC1 (C>T, rs1799782) 遺伝子多型による児の出生時体格への影響

喫煙 状況	遺伝子多型			N	出生体重 (g)	出生身長 (cm)	出生頭囲 (cm)
	AHR	CYP1A1	XRCC1		β (95%CI)	β (95%CI)	β (95%CI)
非喫煙	—	—	—	1,998	Reference	Reference	Reference
喫煙	—	—	—	1,265	-71 (-103, -40)	-0.23 (-0.41, -0.06)	-0.28 (-0.41, -0.15)
非喫煙	GA/AA			1,396	Reference	Reference	Reference
非喫煙	GG			602	57 (30, 83)	0.21 (0.07, 0.36)	0.19 (0.07, 0.30)
喫煙	GA/AA			878	-32 (-52, -6)	0.00 (-0.14, 0.15)	-0.17 (-0.29, -0.06)
喫煙	GG			387	-56 (-91, -20)	-0.35 (-0.55, -0.16)	-0.12 (-0.27, 0.03)
					$P_{int} = 0.130$	$P_{int} = 0.016$	$P_{int} = 0.858$
非喫煙		AA		1,255	Reference	Reference	Reference
非喫煙		AG/GG		743	39 (15, 63)	0.09 (-0.04, 0.22)	0.19 (0.08, 0.29)
喫煙		AA		807	-20 (-47, 7)	-0.01 (-0.16, 0.14)	-0.09 (-0.21, 0.03)
喫煙		AG/GG		458	-62 (-95, -30)	-0.27 (-0.45, -0.09)	-0.21 (-0.35, -0.08)
					$P_{int} = 0.206$	$P_{int} = 0.364$	$P_{int} = 0.154$
非喫煙			CC	937	Reference	Reference	Reference
非喫煙			CT/TT	1,061	38 (17, 60)	0.07 (-0.04, 0.20)	0.16 (0.06, 0.25)
喫煙			CC	615	-19 (-48, 10)	-0.09 (-0.25, 0.08)	-0.10 (-0.23, 0.02)
喫煙			CT/TT	650	-59 (-87, -30)	-0.18 (-0.34, -0.02)	-0.18 (-0.30, -0.06)
					$P_{int} = 0.188$	$P_{int} = 0.886$	$P_{int} = 0.384$
非喫煙	GA/AA	AA		858	Reference	Reference	Reference
非喫煙	GA/AA	AG/GG		538	31 (0, 63)	0.08 (-0.10, 0.25)	0.15 (0.02, 0.29)
非喫煙	GG	AA		397	58 (23, 94)	0.24 (0.04, 0.43)	0.17 (0.02, 0.32)
非喫煙	GG	AG/GG		205	68 (21, 115)	0.24 (-0.02, 0.50)	0.24 (0.04, 0.44)
喫煙	GA/AA	AA		540	-16 (-44, 22)	0.15 (-0.06, 0.36)	-0.13 (-0.29, 0.03)
喫煙	GA/AA	AG/GG		338	-43 (-87, 0)	-0.14 (-0.38, 0.10)	-0.21 (-0.40, -0.03)
喫煙	GG	AA		267	-22 (-72, 27)	-0.23 (-0.51, 0.04)	-0.05 (-0.26, 0.17)
喫煙	GG	AG/GG		120	-114 (-185, -43)	-0.54 (-0.93, -0.15)	-0.26 (-0.56, 0.05)
					$P_{int} = 0.970$	$P_{int} = 0.608$	$P_{int} = 0.732$
非喫煙	GA/AA	AA	CC	144	Reference	Reference	Reference
非喫煙	GA/AA	AA	CT/TT	174	34 (-1, 69)	0.13 (-0.07, 0.32)	0.07 (-0.08, 0.22)
非喫煙	GA/AA	AG/GG	CC	96	19 (-24, 63)	0.04 (-0.20, 0.29)	0.10 (-0.08, 0.29)
非喫煙	GA/AA	AG/GG	CT/TT	100	43 (0, 86)	0.10 (-0.14, 0.34)	0.19 (0.00, 0.37)
非喫煙	GG	AA	CC	72	81 (31, 131)	0.44 (0.16, 0.71)	0.18 (-0.03, 0.40)
非喫煙	GG	AA	CT/TT	74	36 (-14, 86)	0.03 (-0.25, 0.31)	0.14 (-0.08, 0.35)
非喫煙	GG	AG/GG	CC	25	28 (-46, 102)	0.08 (-0.34, 0.49)	0.10 (-0.22, 0.42)
非喫煙	GG	AG/GG	CT/TT	48	97 (32, 162)	0.35 (-0.01, 0.71)	0.33 (0.05, 0.60)
喫煙	GA/AA	AA	CC	250	22 (-32, 76)	0.25 (-0.05, 0.55)	-0.10 (-0.34, 0.13)
喫煙	GA/AA	AA	CT/TT	290	-56 (-111, -2)	0.04 (-0.26, 0.34)	-0.18 (-0.41, 0.05)
喫煙	GA/AA	AG/GG	CC	164	-70 (-136, -4)	-0.21 (-0.57, 0.16)	-0.24 (-0.52, 0.04)
喫煙	GA/AA	AG/GG	CT/TT	178	-22 (-83, 39)	-0.09 (-0.43, 0.25)	-0.21 (-0.47, 0.05)
喫煙	GG	AA	CC	122	0 (-72, 72)	-0.29 (-0.69, 0.11)	-0.10 (-0.40, 0.21)
喫煙	GG	AA	CT/TT	129	-47 (-121, 26)	-0.19 (-0.60, 0.22)	-0.01 (-0.33, 0.31)
喫煙	GG	AG/GG	CC	64	-64 (-186, 58)	-0.28 (-0.96, 0.40)	0.19 (-0.34, 0.71)
喫煙	GG	AG/GG	CT/TT	68	-145 (-241, -50)	-0.70 (-1.24, -0.17)	-0.53 (-0.94, -0.13)
					$P_{int} = 0.199$	$P_{int} = 0.346$	$P_{int} = 0.487$

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

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

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

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

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

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

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 < 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

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の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 al., 2013; Daly, 1995)。しかし、コチニン

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

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: 1843-1850.

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

- (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.* 2007; 28: 657-664.

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

- (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

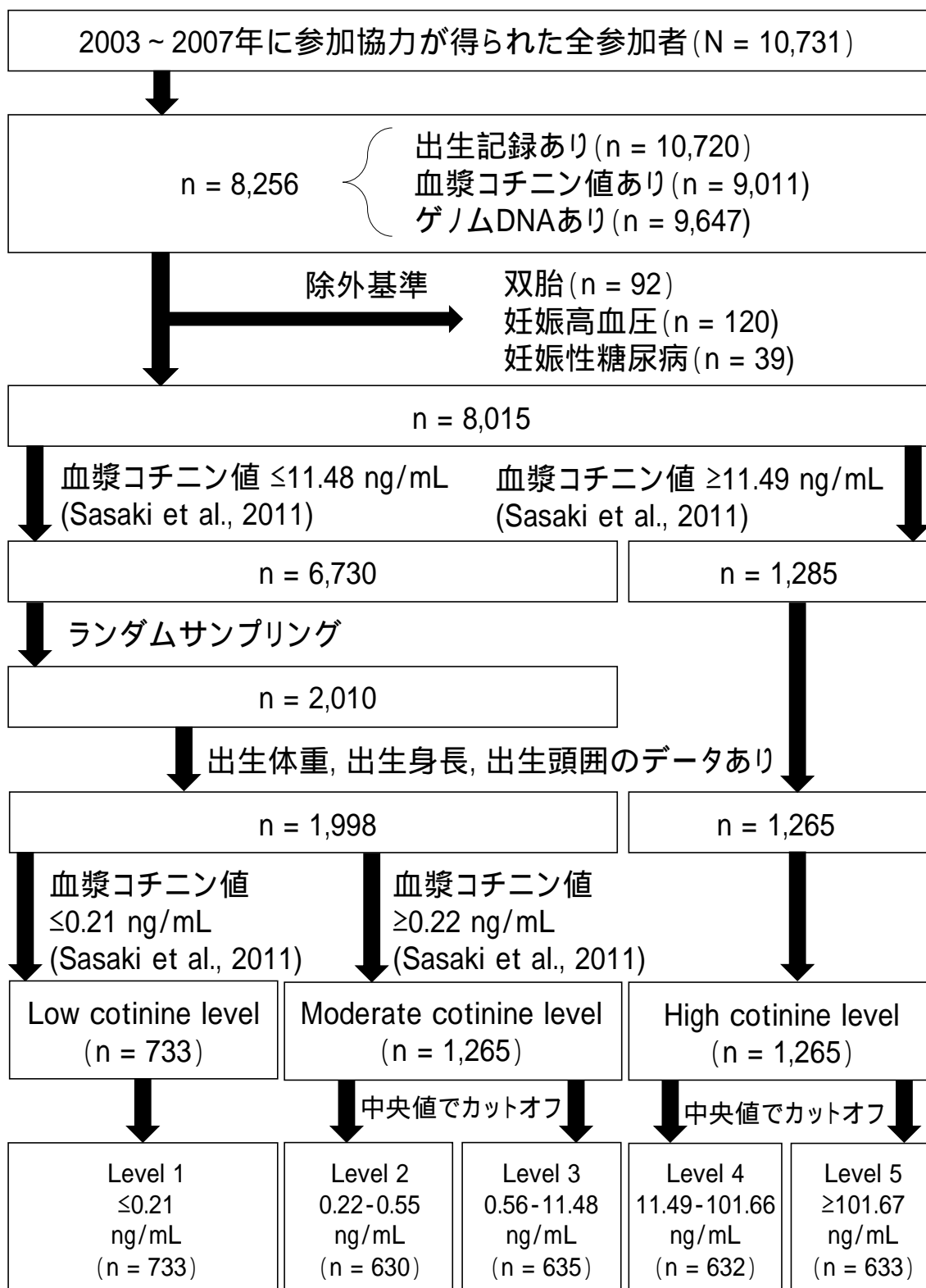


図 1. 対象者の選択フローチャート

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.

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

妊婦のカフェイン摂取とCYP1A2遺伝子多型による出生時体格への影響

研究分担者 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
研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター特任教授

研究要旨

妊婦のカフェイン摂取による流産や出生時体重減少のリスクは結果が一致せず、カフェイン代謝能の個体差が一因として示唆されることから、妊婦のカフェイン摂取とCYP1A2 遺伝子多型が胎児発育に及ぼす影響を検討した。

妊娠中のカフェイン摂取は出生時体格に有意な影響はなかったが、遺伝子多型を考慮すると、CYP1A2 遺伝子多型が CC/CA 型で 100 mg 未満のカフェイン低摂取群と比較して、AA 型で 300 mg 以上のカフェイン高摂取群では、出生時頭囲が有意に減少した。さらに、非喫煙妊婦では出生時体重にも有意な減少があった。日本人妊婦の不育症リスクが高くなった報告では、カフェイン代謝物であるパラキサンチンの関与が示唆されており、母体血や臍帯血中パラキサンチン濃度が増加すると、流産、IUGR、SGA のリスクが上昇することも報告されていることから、胎児に対する影響はカフェインそのものより代謝物であるパラキサンチンの方が大きいことが考えられた。

研究協力者

リンパー マリコ

（北海道大学大学院医学研究科
社会医学講座公衆衛生学分野）

小林 澄貴

（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

佐田 文宏

（国立保健医療科学院健康危機管理研究部・
東京医科歯科大学難治疾患研究所）

A．研究目的

カフェイン(1,3,7トリメチルキサンチン)は、妊娠可能な女性がコーヒー、紅茶、ソーダなどで広く摂取している物質である。妊婦が摂取したカフェインは胎盤を通過し胎児は直接曝露するが、カフェインの主要な代謝酵素であるCYP1A2は胎盤や胎児には存在しない。カフェイン曝露により、神経伝達物質であるカテコールアミン濃度が増加して胎盤の血管収縮と胎児の低酸素症を引き起こし発育に影響を与えることが示唆されているが、その機序はまだよくわかっていない。

先行研究では妊娠中のカフェイン摂取により、流産リスクの上昇や出生時体重が減少する報告もあるが、結果は一致しておらず、カフェイン代謝能の個体差が一因であると考えられる。CYP1A2 はカフェイン代謝の約 95%を担っていて、CYP1A2 C164A 遺伝子多型が特に関与するとされている。先行研究ではカフェイン摂取については詳細に述べているが、カフェイン代謝の個体差も検討した研究は、CYP1A2 C164A 遺伝子多型では死産や不育症についての報告はあるが胎児発育との関連を検討した報告はまだない。

本研究では、前向きコーホートの妊婦を対象として、妊娠中のカフェイン摂取が胎児発育に及ぼす影響を CYP1A2C164A 遺伝子多型による修飾も考慮して検討する。

B．研究方法

（1）札幌市内一産院コーホートに登録した母児514名について、自記式質問票で母親と配偶者の妊娠中の喫煙・飲酒状況、食生活や教育歴、世帯収入などを調査し、医

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

療診療録から産科既往歴や分娩時所見などに関する情報を入手した。妊婦から母体血を採取して-80C°で保存した。

(2)妊婦の1日当たりのカフェイン摂取量はNagataら(1998)による自己申告質問票を用いて算出した。飲料1杯中のカフェイン含有量は、インスタントコーヒー(60mg)、レギュラーコーヒー(50mg)、ノンカフェインコーヒー(0mg)、缶コーヒー(50mg)、紅茶(60mg)、ウーロン茶(30mg)、抹茶(200mg)、玉露(100mg)、他の茶 [煎茶、番茶、玄米茶、ほうじ茶](30mg)、ココア(5mg)、コーラ(60mg)、ドリンク栄養剤(50mg)である。摂取回数は、全く飲まない(0)、月1-2回(0.05)、週1-2回(0.2)、週3-4回(0.5)、ほとんど毎日(1)の5分類に、また、1回の量は1杯以下(1)、2杯(2)、3杯(3)、4杯以上(4)の4つに分類した。1日当たりのカフェイン摂取量は、各飲料の[カフェイン含有量]×[摂取回数]×[1回の量]の合計で算出し、100mg未満、100-299mg、300mg以上に3分類した。カフェイン摂取が全くない妊婦はいなかったため、100mg未満の群をRef.として解析した。

(3)先行研究で妊娠初期に禁煙すると胎児発育に影響はないことが報告されていることから、妊娠中の喫煙状況は、妊娠中に全く喫煙がないか妊娠初期に禁煙した妊婦を非喫煙、妊娠中に喫煙を継続したか妊娠中期以降の禁煙者を喫煙と分類した。

(4)CYP1A2C164A遺伝子多型[rs762551]はリアルタイムPCR法で解析した。Cアレルは5'-FAM-TCCTGGGCCACAGA-MGB-3'、Aアレルは5'-VIC-CGTCCTGTGCCAC-MGB-3'でCC、CA、AA型に検出できる。CYP1A2C164A遺伝子多型のCC/CA型は代謝が遅く、AA型は代謝が早い表現型である。

(5)対象者514名のうち、10名は死産、

転居等で脱落した。双胎(7名)、妊娠高血圧症候群(11名)、妊娠性糖尿病(1名)、胎児心疾患(1名)と血液検体が採取できなかった8名を解析から除外して、最終解析は476名で行った。まず、母のカフェイン摂取量で分類した母児の属性をカテゴリー変数は χ^2 乗検定で、連続変数はANOVAまたはKruskal-Wallis検定で解析した。次に、母児の属性と出生時体格(体重・身長・頭囲)との関連はカテゴリー変数はt検定またはANOVA、連続変数はPearsonまたはSpearmanの相関係数で解析した。母のカフェイン摂取量およびCYP1A2遺伝子多型(CC/CA, AA)と出生時体格との関連を母の年齢、妊娠前BMI、教育歴、妊娠中の喫煙状況、飲酒量、出産経歴、新生児性別、在胎週数で調整した重回帰分析で検討した。さらに、CYP1A2遺伝子多型の酵素活性を亢進し、出生時体格と有意に関与するとされる母の喫煙状況との関連も検討した。

最後に、カフェイン摂取量とCYP1A2遺伝子多型を組み合わせ交絡要因で調整した重回帰分析を行い、母の喫煙状況で層別した解析も行った。

(倫理面への配慮)

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および研究協力施設の研究倫理委員会に諮り、承認を得たうえで実施した。

C. 研究結果

(1)母親の平均年齢は30.7+4.9歳、55.9%が高卒以上であった。妊娠中の喫煙者は21.4%、飲酒者は31.1%であった。1日当たりのカフェイン摂取量は中央値で124.5mg(1.5-1242.5mg)であった。母児の属性と3分類したカフェイン摂取量との関連をみると、母の年齢、妊娠前BMI、教育歴、世帯収入、出産経歴、CYP1A2遺伝子

多型，新生児性別，在胎週数，出生時体格はカフェイン摂取量と有意な差はなかった。喫煙者は1日当たりのカフェイン摂取量が多い傾向にあり，300 mg以上の高摂取群は非喫煙者の5.3%に対して10.8%であった。妊娠中の飲酒の有無とカフェイン摂取量には差がみられたが，飲酒者の飲酒量では差はなかった(Table 1)。

(2) 母の属性と出生時体格との関連を検討すると，喫煙妊婦は非喫煙妊婦より出生時体重が低く(2996 +346g vs.3086 +380g)，300 mg以上のカフェイン高摂取群の出生時体重に近かった(2962 +473g)。母の妊娠前BMIは出生時体重と正の相関があった。CYP1A2遺伝子多型と出生時体格に関連はなく，母の年齢，教育歴，世帯収入，飲酒量，出産経歴とも関連はなかった(Table 2)。

(3) 母の1日当たりのカフェイン摂取量，喫煙状況とCYP1A2遺伝子多型それぞれが出生時体格に及ぼす影響を検討すると，100mg未満のカフェイン低摂取群と比較すると，300 mg以上のカフェイン高摂取群でも出生時体格に影響はみられなかった。カフェイン摂取量を連続変数で解析しても有意な関連はなかった。CYP1A2遺伝子多型も出生時体格と関連はなかった。喫煙状況では非喫煙妊婦と比較して喫煙妊婦の出生時体重は87g減少したが(p=0.019)，出生時身長，頭囲に影響はみられなかった(Table 3)。

(4) 母のCYP1A2遺伝子多型と1日当たりのカフェイン摂取量を組み合わせて検討すると，CYP1A2遺伝子多型がCC/CA型で100 mg未満のカフェイン低摂取群と比較して，AA型で300 mg以上のカフェイン高摂取群では，出生時体重および出生時身長に関連は認められなかったが，出生時頭囲は有意に減少した(p=0.023)。さらに，母の喫煙状況で層別すると非喫煙妊婦でCYP1A2遺伝子多型がAA型の300 mg以上

のカフェイン高摂取群では，出生時体重が276g(p=0.024)，出生時頭囲は1.0cm減少した(p=0.027)。出生時体重では交互作用も有意であった(p=0.023)。一方，出生時身長への影響は喫煙状況で層別しても認められなかった(Table 4,5,6)。

D．考察

本研究では，妊娠中のカフェイン摂取は出生時体格に有意な影響はなかったが，CYP1A2遺伝子多型を考慮した場合は，カフェイン代謝が速いAA型の妊婦では1日当たりのカフェイン摂取量が300mg以上になると出生時頭囲が交絡要因で調整しても有意に減少した。さらに，非喫煙妊婦では出生時体重と頭囲に有意な減少が認められた。CYP1A2G3858A遺伝子多型とSGAとの関連を検討した研究でも，1日当たりのカフェイン摂取量との関連はなかったが，喫煙状況で層別するとAA型でカフェイン高摂取(300 mg以上)の非喫煙妊婦のリスクが高くなった。

CYP1A2C164A遺伝子多型AA型で1日当たりのカフェイン摂取量が300 mg以上の日本人妊婦では不育症のリスクが高くなり，カフェイン代謝物であるパラキサンチンの関与が示唆されている。また，母体血や臍帯血中パラキサンチン濃度が増加すると，流産，IUGR，SGAのリスクが上昇することも報告されていることから，胎児に対する影響はカフェインそのものより代謝物であるパラキサンチンの方が大きいことが考えられるが，そのメカニズムはまだ明らかではない。

たばこ煙中に含まれる多環芳香族炭化水素もCYP1A2遺伝子多型により活性化されるため，喫煙妊婦では喫煙とカフェインの影響を区別することが難しい。さらに，本研究ではCYP1A2遺伝子多型AA型で妊娠中の1日当たりカフェイン摂取量が300 mg以上の群と喫煙群のサンプル数が少なかつ

たことから，喫煙妊婦で有意な影響が認められなかったことが考えられるため，今後はより大きなサンプルでの検証が必要である。また，カフェイン摂取量を血清や尿などのバイオマーカーでの測定をしていないが，先行研究では自己申告と生体試料のカフェイン摂取の相関は強かったので，自己申告によるカフェイン摂取でも評価できたと考える。

合衆国では，1980年代に妊娠中のカフェイン摂取に警告を出しており，近年，1日当たりのカフェイン摂取量を300mg以下か200mgにするように推奨している。これらのガイドラインは先行研究のカフェイン摂取により妊娠出産へのリスクは増加しない，出生時体重が減少した，IUGRリスクが増加したという結果に基づいている。一方，わが国では妊婦のカフェイン摂取についてのガイドラインはない。日本人女性の1日当たりのカフェイン摂取量は256.2mgと報告されている(欧米の成人は173.9-490.0mg)。しかし，1日当たりのカフェイン摂取量400mg以上が11%，31-49歳の56%が200mg以上摂取している。本研究の妊婦は，1日当たりのカフェイン摂取量は22.7%が200mg以上，6.5%は300mg以上であった。また，日本人は約39%がCYP1A2遺伝子多型AA型であることから，今後はより大きな集団で検討してガイドライン策定に繋げることは意義があると考えられる。

E．結論

妊婦のカフェイン摂取と CYP1A2 遺伝子多型が胎児発育に及ぼす影響を検討したところ，妊娠中のカフェイン摂取は出生時体格に有意な影響はなかったが，遺伝子多型を考慮すると出生時頭囲に有意に減少が認められた。さらに，非喫煙妊婦では出生時体重にも有意な減少があった。

今後は生後の発育への影響についても

検討する。

F．研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

佐々木成子, リンパーマリコ, 佐田文宏, 小林澄貴, 岸玲子. 妊婦のカフェイン摂取とCYP1A2遺伝子多型による出生時体格への影響. 第85回日本衛生学会学術総会. 和歌山市. Mar. 26-28, 2015.

G．知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

- Bakker R, Steegers EAP, Obradov A, Raat H, Hofman A, Jaddoe VWV. Maternal caffeine intake from coffee and tea, fetal growth, and the risks of adverse birth outcomes: the Generation R Study. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1691-1698.
- Bech B, Autrup H, Nohr E, Henriksen T, Olsen J. Stillbirth and slow metabolizers of caffeine: comparison by genotypes. *Int J Epidemiol*. 2006;4: 948-953.
- Bracken MB, Triche EW, Belanger K, Leaderer B. Association of maternal caffeine consumption with decrements in fetal growth. *Am J Epidemiol*. 2003;157:456-466.
- Brent RL, Christian MS, Diener RM. Evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2011;92:152-187.
- CARE Study Group. Maternal caffeine

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

- intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study. *BMJ* . 2008;337:a2332.
- Chida M, Yokoi T, Fukui T, Kinoshita M, Yokota J, Kamataki T. Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron 1 of human CYP1A2 in the Japanese population. *Jpn J Cancer Res*. 1999;9:899-902.
- Clausson B, Granath F, Ekblom A, Lundgren S, Nordmark A, Signorello L, Cnattingius S. Effect of caffeine exposure during pregnancy on birth weight and gestational age. *Am J Epidemiol*. 2002;5:429-436.
- David R. Plowchalk & Karen Rowland Yeo. Prediction of drug clearance in a smoking population: modeling the impact of variable cigarette consumption on the induction of CYP1A2. *Eur J Clin Pharmacol* . 2012;68:951-960.
- Greenwood DC, Alwan N, Boylan S, Cade J E, Charvill J, Chipps K C, Cooke M S, Dolby VA, Hay A WM, Kassam S, Kirk S F L, Konje JC, Potdar N, Shires S , Simpson N, Taub N, Thomas J D, Walker J, White KLM, Wild CP. Caffeine intake during pregnancy, late miscarriage and stillbirth. *Eur J Epidemiol* . 2010;25:275-280.
- Grosso LM, Rosenberg KD, Belanger K, Saftlas AF, Leaderer B, Bracken MB. Maternal caffeine intake and intrauterine growth retardation. *Epidemiology*. 2001;12:447-455.
- Grosso L, Triche E, Benowitz N, Bracken M. Prenatal caffeine assessment: fetal and maternal biomarkers or self-reported intake? *Ann Epidemiol*. 2008;3:172-178.
- Hoyt AT , Browne M, Richardson S, Romitti P, Druschel C; The National Birth Defects Prevention Study. Maternal Caffeine Consumption and Small for Gestational Age Births: Results from a Population- Based Case-Control Study. *Matern Child Health J*. In press.
- Infante-Rivard C. Caffeine intake and small-for-gestational-age birth: modifying effects of xenobiotic-metabolising genes and smoking. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2007;21:300-309.
- Jarosz M, Wierzejska R, Siuba M. Maternal caffeine intake and its effect on pregnancy outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biolo* 2012;160 :156-160.
- Kishi R, Sasaki S, Yoshioka E, Yuasa M, Sata F, Saijo Y, Kurahashi N, Tamaki J, Endo T, Sengoku K, Nonomura K, Minakami H. Cohort Profile: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health in Japan. *Int J Epidemiol*. 2011;40(3):611-618.
- Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Sasaki S, Okada E, Kobayashi S, Kashino I, Itoh K, Nakajima S; Members of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. 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):429-450.
- Maslova E, Bhattacharya S, Lin, SW,

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

- Michels KB. Caffeine consumption during pregnancy and risk of preterm birth: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:1120-1132.
- Nagata C, Kabuto M, Shimizu H. Association of coffee, green tea, and caffeine intakes with serum concentrations of estradiol and sex hormone-binding globulin in premenopausal Japanese women. *Nutr Cancer.* 1998;1:21-24.
- Ohmi H, Hirooka K, Mochizuki Y. Fetal growth and the timing of exposure to maternal smoking. *Pediatr Int.* 2002;1:55-59.
- Parazzini F, Chiaffarino F, Chatenoud L, Tozzi L, Cipriani S, Chiantera V, Fedele L. Maternal coffee drinking in pregnancy and risk of small for gestational age birth. *Eur J Clin Nutr.* 2005;59:299-330.
- Peck JD, Leviton A, Cowan LD. A review of the epidemiologic evidence concerning the reproductive health effects of caffeine consumption: A 2000–2009 update. *Food and Chemical Toxicology.* 2010; 48:2549-2576.
- Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Kato E, Morikawa M, Minakami H, Kishi R. Caffeine intake, CYP1A2 polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod.* 2005; 5: 357-360.
- Sengpiel V, Elind E, Bacelis J, Nilsson S, Grove J, Myhre R, Haugen M, Meltzer HM, Alexander J, Jacobsson B, Brantsæter AL. Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with birth weight but not with gestational length: results from a large prospective observational cohort study. *BMC Med.* 2013;11:42.
- Signorello LB, McLaughlin J. Maternal caffeine consumption and spontaneous abortion. A review of epidemiologic evidence. *Epidemiology.* 2004;15:229-239.
- Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, Ito R, Nakata A, Iwasaki Y. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect.* 2009;4: 660-667.
- Xue F, Willett WC, Rosner BA, Forman MR, Michels KB. Parental characteristics as predictors of birthweight. *Hum Reprod.* 2008;23:168-177.
- Yamada M, Sasaki S, Murakami K, Takahashi Y, Okubo H, Hirota N, Notsu A, Todoriki H, Miura A, Fukui A, Date C. Estimation of caffeine intake in Japanese adults using 16 d weighed diet records based on a food composition database newly developed for Japanese populations. *Public Health Nutr.* 2010;13:663-672.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table1 Characteristics of mother -infant pairs in relation to maternal caffeine intake levels during pregnancy, Sapporo, Japan, 2002-2005 (n=476)

Characteristics		Maternal caffeine intake during pregnancy			p-value
		<100mg/day n=180	100-299mg/day n=265	≥300mg/day n=31	
Maternal characteristics					
Maternal age (years)	30.7 (4.9)	30.1 (4.9)	31.2 (4.9)	30.7 (4.9)	0.063
Pre pregnancy BMI (kg/m ²)	21.1 (3.0)	21.3 (3.2)	21.0 (2.8)	21.0 (3.3)	0.692
Education level (years)					
≤12	210	73 (34.8)	122 (58.1)	15 (7.1)	
≥13	266	107 (40.2)	143 (53.8)	16 (6.0)	0.460
Annual household income (million yen)					
<5	324	124 (38.3)	179 (55.2)	21 (6.5)	
≥5	149	55 (36.9)	84 (56.4)	10 (6.7)	0.960
Maternal smoking status during pregnancy					
Nonsmoker	374	160 (42.8)	194 (51.9)	20 (5.3)	
Smoker	102	20 (19.6)	71 (69.6)	11 (10.8)	<0.001
Alcohol intake during pregnancy					
No	328	136 (41.5)	169 (51.5)	23 (7.0)	
Yes	148	44 (29.7)	96 (64.9)	8 (5.4)	0.025
Alcohol intake among drinkers during pregnancy (g/day)	1.4 (0.3-152.0) ^a	1.2 (0.3-14.0) ^a	1.9 (0.4-98.2) ^a	1.6 (0.4-152.0) ^a	0.094
Parity					
0	226	93 (41.2)	120 (53.1)	13 (5.8)	
≥1	250	87 (34.8)	145 (58.0)	18 (7.2)	0.340
CYP1A2 genotype					
CC	64	26 (40.6)	33 (51.6)	5 (7.8)	
CA	225	85 (37.8)	127 (56.4)	13 (5.8)	
AA	187	69 (36.9)	105 (56.1)	13 (7.0)	0.937
CC/CA	289	111 (38.4)	160 (55.4)	18 (6.2)	0.917
Infant characteristics					
Gender					
Male	226	81 (35.8)	129 (57.1)	16 (7.1)	
Female	250	99 (39.6)	136 (54.4)	15 (6.0)	0.667
Gestational age (wks)	39.0 (1.4)	39.1 (1.4)	39.0 (1.4)	38.4 (1.8)	0.080
Birth weight (g)	3067 (374)	3087 (363)	3066 (368)	2962 (473)	0.228
Birth length (cm)	48.1 (1.9)	48.1 (2.1)	48.1 (1.8)	47.5 (1.9)	0.198
Birth head circumference (cm)	33.3 (1.3)	33.3 (1.3)	33.3 (1.3)	33.0 (1.5)	0.383

Mean (SD) / n (%)

^aMedian (minimum-maximum)

the chi-squared test, ANOVA, Kruskal-Wallis test

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table2 Characteristics of mother-infant pairs in relation to mean infant birth size, Sapporo, Japan, 2002-2005 (n=476)

Characteristics	Infant birth weight (g)		Infant birth length (cm)		Infant birth head circumference (cm)	
	Mean (SD)	p-value	Mean (SD)	p-value	Mean (SD)	p-value
Maternal characteristics						
Maternal age (years)	r=-0.026 ^a	0.573	r=-0.029 ^a	0.534	r=0.029 ^a	0.528
Pre pregnancy BMI (kg/m ²)	r=0.100 ^a	0.030	r=0.050 ^a	0.272	r=0.061 ^a	0.182
Education level (years)						
≤12	3049 (377)		48.0 (1.9)		33.2 (1.3)	
≥13	3081 (372)	0.349	48.2 (2.0)	0.258	33.3 (1.3)	0.400
Annual household income (million yen)						
<5	3076 (370)		48.1 (2.0)		33.3 (1.3)	
≥5	3053 (384)	0.526	48.1 (1.8)	0.755	33.3 (1.3)	0.891
Maternal smoking status during pregnancy						
Nonsmoker	3086 (380)		48.1 (2.0)		33.3 (1.3)	
Smoker	2996 (346)	0.032	47.8 (1.6)	0.142	33.1 (1.2)	0.078
Alcohol intake during pregnancy						
No	3056 (389)		48.0 (2.0)		33.3 (1.3)	
Yes	3091 (338)	0.340	48.2 (1.7)	0.242	33.3 (1.3)	0.695
Alcohol intake among drinkers during pregnancy (g)	ρ=0.002 ^b	0.983	ρ=-0.030 ^b	0.719	ρ=-0.114 ^b	0.167
Parity						
0	3048 (376)		48.1 (2.0)		33.2 (1.3)	
≥1	3084 (372)	0.282	48.1 (1.8)	0.930	33.4 (1.3)	0.072
CYP1A2 genotype						
CC	3058 (398)		48.0 (2.0)		33.3 (1.5)	
CA	3062 (359)		48.0 (2.0)		33.3 (1.2)	
AA	3076 (385)	0.911	48.1 (1.8)	0.909	33.2 (1.4)	0.642
CC/CA	3061 (367)	0.671	48.0 (2.0)	0.663	33.3 (1.3)	0.384
Infant characteristics						
Gender						
Male	3110 (381)		48.4 (2.1)		33.6 (1.3)	
Female	3028 (364)	0.017	47.8 (1.7)	0.002	33.0 (1.2)	<0.001
Gestational age (wks)	r=0.472 ^a	<0.001	r=0.406 ^a	<0.001	r=0.208 ^a	<0.001

^aPearson correlation coefficient. ^bSpearman correlation coefficient
the t-test, ANOVA, Pearson, Spearman correlation 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

Table3 Individual associations of maternal caffeine intake during pregnancy, maternal smoking status, and maternal CYP1A2 genotype with infant birth size, Sapporo, Japan, 2002-2005 (n=476)

	n	Infant birth weight						Infant birth length						Infant birth head circumference					
		Crude			Adjusted ^{a,β}			Crude			Adjusted ^{a,β}			Crude			Adjusted ^{a,β}		
		Δbw (g)	95% CI	p-value	Δbw (g)	95% CI	p-value	Δbl (cm)	95% CI	p-value	Δbl (cm)	95% CI	p-value	Δbl (cm)	95% CI	p-value	Δbl (cm)	95% CI	p-value
Caffeine Intake																			
<100mg/day	180	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
100-299mg/day	265	-21	-92, 50	0.558	-3	-63, 62	0.993	0.1	-0.3, 0.5	0.609	0.2	-0.2, 0.5	0.296	-0.002	-0.3, 0.3	0.987	0.02	-0.2, 0.3	0.900
≥300mg/day	31	-125	-268, 18	0.086	-33	-158, 92	0.607	-0.6	-1.3, 0.2	0.134	-0.2	-0.8, 0.5	0.609	-0.3	-0.8, 0.2	0.184	-0.2	-0.7, 0.3	0.379
Smoking Status																			
Non-smoker	374	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Smoker	102	-90	-172, -8	0.032	-87	-160, -15	0.019	-0.3	-0.7, 0.1	0.142	-0.3	-0.7, 0.1	0.173	-0.3	-0.6, 0.03	0.078	-0.2	-0.5, 0.1	0.173
CYP1A2 Genotype																			
CC/CA	289	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
AA	187	15	-54, 84	0.671	24	-35, 84	0.422	0.1	-0.3, 0.4	0.663	0.1	-0.2, 0.4	0.489	-0.1	-0.3, 0.1	0.384	-0.04	-0.3, 0.2	0.714

Δbw (g): mean difference in birth weight (grams) in multiple linear regression model

Δbl (cm): mean difference in birth length or birth head circumference (centimeter) in multiple linear regression model

^aCaffeine intake and CYP1A2 genotype was adjusted for: maternal age, pre-pregnancy BMI, education (≤12, ≥13), maternal smoking status, alcohol intake during pregnancy, parity (0, ≥1), infant gender, gestational age

^βSmoking status was adjusted for: maternal age, pre-pregnancy BMI, education (≤12, ≥13), alcohol intake during pregnancy, parity (0, ≥1), infant gender, gestational age

Table4 Combined association of maternal caffeine intake during pregnancy and maternal CYP1A2 genotype with infant birth weight by maternal smoking status, Sapporo, Japan, 2002-2005

CYP1A2 Genotype	Caffeine Intake	All (n=476)												Non-smokers (n=374)				Smokers (n=102)			
		Crude				Adjusted ^a				Adjusted ^β				Adjusted ^β							
		n	Δbw (g)	95% CI	p-value	Δbw (g)	95% CI	p-value	n	Δbw (g)	95% CI	p-value	n	Δbw (g)	95% CI	p-value					
	<100mg/day	111			Ref.			Ref.				100			Ref.			11			Ref.
CC/CA	100-299mg/day	160	-37	-128, 53	0.416	-23	-102, 56	0.569	115	-24	-113, 65	0.594	45	-15	-214, 185	0.883					
	≥300mg/day	18	25	-161, 210	0.795	54	-108, 217	0.510	12	95	-103, 292	0.346	6	-49	-362, 265	0.759					
	<100mg/day	69	17	-95, 129	0.762	8	-89, 105	0.870	60	-3	-109, 103	0.955	9	113	-166, 392	0.423					
AA	100-299mg/day	105	20	-79, 120	0.689	40	-47, 127	0.363	79	52	-47, 151	0.305	26	10	-205, 225	0.928					
	≥300mg/day	13	-316	-531, -102	0.004	-146	-333, 40	0.124	8	-276	-516, -36	0.024	5	70	-249, 389	0.664					
	Interaction ^γ		-358	-647, -70	0.015	-209	-460, 42	0.103		-367	-684, -51	0.023	6	-454, 465	0.981						

Δbw (g): mean difference in birth weight (grams) in multiple linear regression model

^aAdjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, education (≤12, ≥13), maternal smoking status, alcohol intake during pregnancy, parity (0, ≥1), infant gender, gestational age

^βAdjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, education (≤12, ≥13), alcohol intake during pregnancy, parity (0, ≥1), infant gender, gestational age

^γTest of interaction: tests the null hypothesis that Δbw (g)=0 in the multiple linear regression model for the product term, maternal caffeine intake ≥300mg/day x CYP1A2 AA genotype

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

Table5 Combined association of maternal caffeine intake during pregnancy and maternal CYP1A2 genotype with infant birth length by maternal smoking status, Sapporo, Japan, 2002-2005

		All (n=476)						Non-smokers (n=374)				Smokers (n=102)				
		Crude			Adjusted ^a			Adjusted ^b				Adjusted ^b				
		n	Δbl (cm)	95% CI	p-value	Δbl (cm)	95% CI	p-value	n	Δbl (cm)	95% CI	p-value	n	Δbl (cm)	95% CI	p-value
CYP1A2 Genotype	Caffeine Intake															
	<100mg/day	111		Ref.			Ref.		100		Ref.		11		Ref.	
CC/CA	100-299mg/day	160	0.1	-0.4, 0.5	0.716	0.2	-0.3, 0.6	0.460	115	0.2	-0.3, 0.7	0.410	45	0.1	-0.9, 1.1	0.790
	≥300mg/day	18	0.1	-0.9, 1.0	0.883	0.1	-0.7, 1.0	0.752	12	0.4	-0.7, 1.5	0.456	6	-0.5	-2.1, 1.0	0.507
	<100mg/day	69	0.2	-0.4, 0.7	0.554	0.1	-0.4, 0.7	0.584	60	0.1	-0.5, 0.6	0.821	9	0.8	-0.6, 2.2	0.238
AA	100-299mg/day	105	0.3	-0.2, 0.8	0.290	0.3	-0.1, 0.8	0.153	79	0.3	-0.2, 0.9	0.212	26	0.5	-0.6, 1.6	0.363
	≥300mg/day	13	-1.3	-2.4, -0.2	0.024	-0.5	-1.5, 0.5	0.348	8	-0.7	-2.0, 0.6	0.296	5	-0.1	-1.7, 1.5	0.881
	Interaction ^γ		-1.5	-3.0, -0.03	0.045	-0.8	-2.1, 0.6	0.266		-1.2	-2.9, 0.6	0.184		-0.4	-2.7, 1.9	0.713

Δbl (cm): mean difference in birth length (centimeter) in multiple linear regression model

^aAdjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, education (≤12, ≥13), maternal smoking status, alcohol intake during pregnancy, parity (0, ≥1), infant gender, gestational age

^bAdjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, education (≤12, ≥13), alcohol intake during pregnancy, parity (0, ≥1), infant gender, gestational age

^γTest of interaction: tests the null hypothesis that Δbl (cm)=0 in the multiple linear regression model for the product term, maternal caffeine intake ≥300mg/day x CYP1A2 AA genotype

Table6 Combined association of maternal caffeine intake during pregnancy and maternal CYP1A2 genotype with infant birth head circumference by maternal smoking status, Sapporo, Japan, 2002-2005

		All (n=476)						Non-smokers (n=374)				Smokers (n=102)				
		Crude			Adjusted ^a			Adjusted ^b				Adjusted ^b				
		n	Δbl (cm)	95% CI	p-value	Δbl (cm)	95% CI	p-value	n	Δbl (cm)	95% CI	p-value	n	Δbl (cm)	95% CI	p-value
CYP1A2 Genotype	Caffeine Intake															
	<100mg/day	111		Ref.			Ref.		100		Ref.		11		Ref.	
CC/CA	100-299mg/day	160	-0.1	-0.4, 0.2	0.489	-0.1	-0.4, 0.2	0.654	115	-0.1	-0.4, 0.3	0.615	45	0.02	-0.8, 0.8	0.952
	≥300mg/day	18	0.1	-0.5, 0.8	0.671	0.2	-0.5, 0.8	0.590	12	0.1	-0.7, 0.8	0.862	6	0.5	-0.7, 1.7	0.413
	<100mg/day	69	-0.2	-0.6, 0.2	0.348	-0.1	-0.5, 0.3	0.611	60	-0.1	-0.5, 0.3	0.624	9	0.2	-0.9, 1.3	0.758
AA	100-299mg/day	105	-0.02	-0.4, 0.3	0.925	0.1	-0.3, 0.4	0.792	79	0.02	-0.4, 0.4	0.936	26	0.1	-0.7, 1.0	0.776
	≥300mg/day	13	-1.2	-2.0, -0.4	0.002	-0.8	-1.5, -0.1	0.023	8	-1.0	-1.9, -0.1	0.027	5	-0.4	-1.6, 0.9	0.563
	Interaction ^γ		-1.1	-2.0, -0.1	0.029	-0.9	-1.9, 0.06	0.065		-1.0	-2.2, 0.2	0.105		-1.1	-2.9, 0.8	0.253

Δbl (cm): mean difference in birth head circumference (centimeter) in multiple linear regression model

^aAdjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, education (≤12, ≥13), maternal smoking status, alcohol intake during pregnancy, parity (0, ≥1), infant gender, gestational age

^bAdjusted for maternal age, pre-pregnancy BMI, education (≤12, ≥13), alcohol intake during pregnancy, parity (0, ≥1), infant gender, gestational age

^γTest of interaction: tests the null hypothesis that Δbl (cm)=0 in the multiple linear regression model for the product term, maternal caffeine intake ≥300mg/day x CYP1A2 AA genotype

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クエンス法により、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).

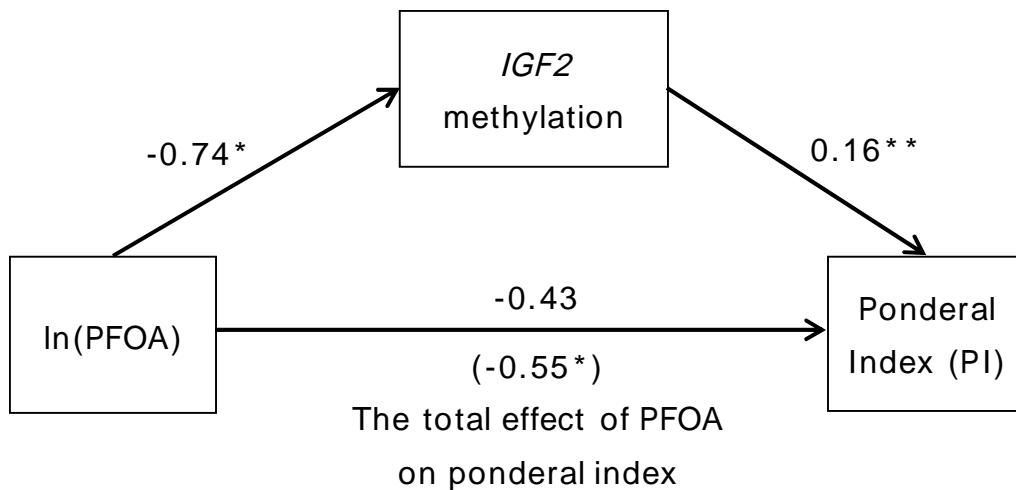


Figure 1. Mediation analysis of the association between PFOA and IGF2 methylation and between PFOA and ponderal index (N =175).

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 ** $P < 0.01$.

Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids on Cord Blood *IGF2/H19* Methylation and Associations with Birth Size

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授

研究分担者 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 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

研究分担者 石塚 真由美 北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学教室 教授

研究要旨

Background: Prenatal exposure to perfluoroalkyl acids (PFAAs) can influence fetal growth and postnatal obesity. However, only one previous study has examined the epigenetic effects of PFAAs *in utero*. Specifically, the effects on gene-specific methylation, including the fetal growth factor insulin-like growth factor 2 (*IGF2*), and the consequences to the offspring are unknown.

Objectives: To evaluate the effects of prenatal PFAA exposure on infants' *IGF2/H19* and *LINE1* DNA methylations and their relations to birth size.

Methods: Two hundred thirty-five mother-child dyads from the Hokkaido Study on Environment and Children's Health were included in this study. Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) levels in the maternal sera were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The *IGF2* differentially methylated region (DMR), *H19* DMR and *LINE1* methylation were quantified in cord blood by pyrosequencing. Multiple linear regressions were performed.

Results: The median concentrations of PFOS and PFOA were 5.0 and 1.4 ng/mL, respectively. In the fully adjusted model, the *IGF2* methylation fractions significantly decreased with a log₁₀-increase in PFOA concentration [$\beta = -1.53$, 95% confidence interval (CI): -2.93 to -0.12]. We observed a positive correlation between *IGF2* methylation and the ponderal index (kg/m³) at birth ($\beta = 0.18$, 95% CI: 0.09 to 0.27).

Conclusion: Our results suggest that prenatal PFOA exposure results in *IGF2* hypomethylation in the offspring, which explains some of the decrease in the ponderal index at birth. Further investigations are necessary to elucidate the effects of *IGF2* hypomethylation on the offspring's postnatal growth and obesity.

研究協力者

小林 祥子、安住 薫、**Houman Goudarzi**、
小林 澄貴
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)
中澤 裕之
(星薬科大学薬品分析化学教室)

A . 研究目的

Perfluoroalkyl acids (PFAAs) are currently widely used synthetic compounds for consumer products and industrial applications and are dispersed all over the environment (Lau et al. 2007). PFAAs have long half-lives of 5.4 years for perfluorooctane sulfonate (PFOS) and 3.8 years for perfluorooctanoic acid (PFOA) in humans (Olsen et al. 2007) and it was reported that PFOS and PFOA are both able to pass through the placental barrier and might exert negative effects on fetuses (Midasch et al. 2007). Previous animal studies have indicated that PFAAs are developmentally toxic and causes neonate mortality and reduced body weight (Kudo and Kawashima 2003). We previously reported that prenatal exposure to PFOS significantly reduces the birth weight of female infants (Washino et al. 2009) and this finding has also been supported by other studies (Olsen et al. 2009). Additionally, in a recent Danish birth cohort study, prenatal PFOA exposure was found to be associated with overweight and obese statuses among 20-year-old females and changes in their obese biomarkers, which suggests that modifications due to

PFOA exposure in utero persist until adulthood (Halldorsson et al. 2012). Recent researches indicated that environmental chemicals in utero may perturb epigenetic machinery and result in persistent phenotypic changes in whole life (Baccarelli and Bollati 2009). We hypothesized prenatal PFAA exposure modifies the DNA methylation patterns of infants and results in reduced birth size.

DNA methylation is an epigenetic process that shapes the cell's characteristics over its entire life and thus has been postulated to be a mediator of the effects of the intrauterine environment on postnatal phenotypes (Drong et al. 2012). DNA methylation occurs via the addition of a methyl group to a cytosine at cytosine-guanine dinucleotides (CpGs) and acts like a "switch" for gene expression. DNA methylation plays fundamental roles during embryonic development and cell differentiation by establishing tissue-specific DNA methylation patterns and subsequent stable gene expression (Hackett and Surani 2013). Additionally, these methylation patterns can be heritable through cell division and are influenced by the external environment (Fraga et al. 2005). Previous epidemiological studies have suggested that prenatal exposure to maternal smoking and environmental chemicals, such as persistent organic pollutants (POPs), bisphenol A and heavy metals, modifies the epigenome of whom exposed (Baccarelli and Bollati 2009).

PFOA has also been reported to have epigenetic effects on cord blood global DNA methylation; however, the study that reported this finding was cross-sectional and had a small sample size (N=30) (Guerrero-Preston et al. 2010). One of the most studied regions in epigenetics is the *insulin-like growth factor 2 (IGF2)/H19* locus. IGF2 is a growth hormone that is essential for fetal growth and is expressed in throughout fetal development. Secreted IGF2 exerts mitogenic and metabolic effects on all tissues, and polymorphisms of this gene are associated with fetal growth (Kaku et al. 2007). Additionally, methylations of *IGF2/H19* in cord blood and placental tissues have been found to be associated with fetal growth in human epidemiological studies. In the Generation R study, children born small-for-gestational age (SGA) were found to exhibit lower *IGF2* methylation levels in cord blood; interestingly, lower *IGF2* methylation was also associated with greater weight gain in the first three months after birth (Bouwland-Both et al. 2013). Other previous study demonstrated that *IGF2/H19* placental methylation and genetic polymorphisms together account for 31% of birth weight variance (St-Pierre et al. 2012), which is suggestive of a major role of the *IGF2* in fetal growth. Moreover, emerging evidence has indicated the role of *IGF2* gene in metabolic risks in humans.

Several reports have shown that polymorphisms of *IGF2* are associated with weight and the obese phenotypes (Cianfarani 2012). Additionally, a recent report suggested that *IGF2/H19* methylation at birth is linked to the development of overweight or obesity in early childhood (Perkins et al. 2012). The expression of this imprinted gene is controlled by DNA methylation at the *IGF2* and *H19* differentially methylated regions (DMRs), which are reciprocally methylated and expressed between the maternal and paternal alleles (Gabory et al. 2010). In addition to their functional importance, these regions have been suggested to be epigenetically labile to environmental perturbations, especially in early life, and have been studied as indicators of epigenetic disruption (Hoyo et al. 2009). Previous epidemiological studies have demonstrated that perturbation in the intrauterine nutritional environment can decrease *IGF2* methylation in the offspring. Heijmans et al. reported that 60 year-old individuals who had experienced severe famine in utero during the Dutch Huger Winter, exhibited 5.2% less *IGF2* methylation in their peripheral blood than their unexposed, sex-matched siblings (Heijmans et al. 2008). Moreover, the children of mothers without periconceptual folic acid supplementation exhibit lower *IGF2* methylation in their cord blood (Haggarty et al. 2013) and peripheral

blood during infancy (Stegers-Theunissen et al. 2009). Other marker of epigenetic disruptions include repetitive sequences, such as the *Long interspersed element 1 (LINE1)*, which is a retrotransposon sequence that is globally distributed and composes approximately 17% of the human genome, and has thus been used as a surrogate for a global methylation (Cortessis et al. 2012).

In this birth cohort study, we prospectively evaluated the effects of prenatal PFOS and PFOA exposures on gene-specific DNA methylation at *IGF2/H19* and global methylation of *LINE1* and the associations of these effects on fetal growth.

B . 研究方法

2.1. Study population. The study participants were enrolled as a part of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, which is an ongoing birth cohort study. Details about the study design have previously been described (Kishi et al. 2011; Kishi et al. 2013). Briefly, pregnant women at 23–35 weeks of gestation were recruited at the Toho Hospital in Sapporo, Japan between 2002 and 2005. Of the 1,796 eligible women, some were excluded because they were registrants of the Japanese cord blood bank (25%) or were planning to deliver at another hospital (3%). Ultimately, 514 expectant mothers agreed to participate in this cohort (29% participation rate). Among the 514

pregnant women who participated at the enrollment, 10 were excluded due to miscarriage or stillbirth (N = 2), relocation (N = 1), and voluntary withdrawal (N = 7) from the study before follow-up. From these mothers, 447 maternal blood samples and 267 cord blood samples were available for PFAA and DNA methylation analyses. Subsequently, 235 mother-infant dyads whose PFAA and DNA methylation data were available were included in this study. All 235 deliveries were singletons.

This study was conducted with the written informed consent of all subjects. The institutional ethical board for human gene and genome studies at Hokkaido University Center for Environmental and Health Science and Hokkaido University Graduate School of Medicine approved the study protocol. **2.2. Data collection.** At enrollment, a self-administered questionnaire was utilized to obtain baseline information that included parental demographic characteristics, anthropometric measurements and lifestyle factors, such as maternal smoking and alcohol consumption (Washino et al. 2009). Information about pregnancy complications, gestational age, infant gender and birth size was obtained from the medical records.

2.3. Specimen collection. A 40-mL maternal blood samples were collected from 177 participants at between 24-41 weeks of gestational age (75.3%) and

from 58 participants within five days of delivery (24.7%). Cord blood samples were taken immediately at birth. All specimens were stored at -80°C until the time of analyses.

2.4. Exposure assessment. Detailed methods for the measurements of PFOS and PFOA have previously been described (Inoue et al. 2004; Nakata A 2009). Serum samples (0.1 mL) were mixed with 0.2 mL internal standard solution containing acetonitrile and centrifuged at $1450 \times g$ for 10 min, and the supernatants were transferred to a polypropylene tube. An aliquot of the filtered sample solution was subjected to column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). PFOS was detected in all of the samples, and the PFOA levels of 15 samples were below the detection limit (0.50 ng/mL). For PFOA concentrations of those samples, we used a value of half the detection limit (0.25 ng/mL).

2.5. Quantification of DNA methylation. Genomic DNA was extracted from umbilical cord blood using a Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). 500 ng of DNA were subjected to a bisulfite conversion using an Epiect Plus Bisulfite Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) to convert the unmethylated cytosines to uracils while leaving the methylated cytosines unchanged. Bisulfite pyrosequencing was performed using previously described methods and primers (Bollati

et al. 2007; Murphy et al. 2012a). We evaluated two *IGF2/H19* regulatory regions, one involved the two CpG sites comprising the intragenic *IGF2* DMR0, and the other involved the four CpG sites within the *H19* DMR, which is within the *IGF2/H19* imprinting control region (ICR). For *LINE1*, three CpG sites in promoter region were quantified. Each locus was amplified using HotStarTaq DNA polymerase in PyroMark PCR Kits (Qiagen). Biotin-labeled single-stranded amplicons were bound to the Streptavidin Sepharose HP (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and purified using the Pyromark Q24 Work Station (Qiagen). Pyrosequencing was performed using a Pyromark Q24 system, and the data were analyzed using Pyro Q-CpG Software (Qiagen). The PCR primers, conditions and sequencing primers are described in Table S1. All of the samples were analyzed in duplicate. For the subsequent analyses, the average methylation level of each CpG site was used.

2.6. Data Analyses. The Spearman correlation test, Mann-Whitney U-test, and Kruskal-Wallis test were applied to determine whether the maternal and offspring characteristics were associated with PFAA exposure. Multiple linear regression analyses were performed to determine the associations between the maternal PFAA concentrations and the infants'

methylation levels at each locus. Due to skewed distributions, we transformed the concentrations of PFOS and PFOA concentrations into log₁₀ scales. The maternal blood sampling periods for the PFAA measurements were categorized into four groups: < seven months, eight months ± four weeks, > nine months of pregnancy, and after delivery. Additionally, the samples were divided into quartiles according to PFOS and PFOA concentrations, and tests for a linear trend were performed by linear contrast. The adjusted least square means of the methylation levels in each quartile were compared with the Hsu-Dunnett method to accommodate for multiple comparisons. Multiple linear regressions were applied to estimate the effects on the infants' birth sizes. The infant ponderal index, an indicator of relative soft tissue mass to bone structure, was calculated as the ratio of birth weight (kg) to cubed birth length (m³) (Miller and Hassanein 1971). One subject was excluded from the analysis of birth length and ponderal index because the birth length of this infant was more than four standard deviations (SDs) from the mean despite having a gestational age and birth weight within the normal ranges. The DNA methylation model was adjusted for maternal age, education, the infant's sex, maternal smoking during pregnancy and the blood sampling period. The birth size model was adjusted for gestational age, maternal

age, pre-pregnancy body mass index (BMI), parity, maternal education, maternal smoking during pregnancy and the infant's sex. All statistical analyses were conducted using JMP pro 11 (SAS Institute Inc., NC, USA). P-values below 0.05 were considered statistically significant.

（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

Among the 235 mother-infant dyads who were included in the study, the mean methylation levels (±SD) for the *IGF2* DMR0, *H19* DMR and *LINE1* were 49.1% (±3.3), 52.1% (±2.0) and 75.7% (±1.2), respectively. The geometric means (GM) (25th to 75th percentiles) of the PFOS and PFOA levels in the maternal blood were 4.8 ng/mL (3.3 to 6.8) and 1.2 ng/mL (0.9 to 1.9), respectively (Table 1). The maternal and infant characteristics and their relations to the PFOS and PFOA concentrations are described in Table 2.

Table 3 shows the results of the multiple linear regression analyses of the effects of the PFAAs on DNA

methylation in the cord blood. After adjusting for potential confounders, our results demonstrated a significant decrease in *IGF2* methylation fraction with a log₁₀-unit increase in PFOA ($\beta = -1.53$, 95% CI: -2.93 to -0.12). Although not statistically significant, the PFOS level exhibited a trend similar to that of PFOA ($\beta = -0.90$, 95% CI: -2.79 to 0.98). The *H19* and *LINE1* methylations did not exhibit any significant association with either PFOS or PFOA concentrations.

Next, we analyzed the effects of PFOS and PFOA stratified by infant gender (Table 4). We did not find significant associations among either the male or female infants. However, after adjusting for potential confounders, a stronger association between PFOS and *IGF2* methylation was observed among the female infants ($\beta = -2.30$, 95% CI: -4.92 to 0.31) compared to the male infants.

Figure 1 shows the changes in the adjusted least square means in *IGF2* methylation across the PFOS and PFOA quartiles. After adjusting for potential confounders, we found that, although only marginally significant, *IGF2* methylation was decreased by 1.31% in the fourth PFOA quartile (> 1.9 ng/mL) compared to the first quartile (≤ 0.9 ng/mL) ($\beta = -1.31$, 95% CI: -2.65 to 0.03, $p = 0.06$). The results also revealed a decrease from the second to fourth quartiles (p for trend = 0.01 in all quartiles). The PFOS quartiles did not

exhibit any significant relation to *IGF2* methylation (p for trend = 0.29; Table S3).

We analyzed whether DNA methylation at *IGF2* was associated with fetal growth (Table 5). After adjusting for gestational age (Model 1) and other potential confounders (Model 2), *IGF2* methylation exhibited a significant correlation with the ponderal index ($\beta = 0.18$, 95% CI: 0.09 to 0.27). *H19* methylation was not significantly related to these fetal growth indices (data not shown).

D . 考察

The prenatal period is a critical time for a fetus to create tissue-specific DNA methylation patterns to develop a functional human body, and perturbation of these canonical processes by external factors such as environmental chemicals might result in persistent epigenetic and phenotypic changes (Barnes and Ozanne 2011). In this study, even at our daily-life exposure levels, we found that prenatal PFOA exposure resulted in a decrease in DNA methylation at the *IGF2* locus in cord blood, which was associated with a lower ponderal index at birth. Interestingly, these effects were more pronounced in the gene-specific methylation than global methylation as measured at *LINE1*. To our knowledge, this is the first epidemiological report to evaluate the effects of prenatal PFAA exposure on gene-specific methylation.

Previous epidemiological studies have demonstrated that intrauterine nutritional perturbations, such as severe famine (Heijmans et al. 2008) and perinatal maternal folic acid deficiencies (Haggarty et al. 2013; Steegers-Theunissen et al. 2009), can decrease the offspring's *IGF2* methylation. According to previous animal and epidemiological studies, prenatal exposure to PFOA can result in poor growth in utero (Olsen et al. 2009). Our results indicated that prenatal PFOA exposure, which is another possible cause of fetal growth restriction, can elicit effects similar to those of malnutrition and folic acid deficiency and resulted in hypomethylation at the *IGF2* locus.

In the current study, we observed that *IGF2* methylation was positively associated with the ponderal index at birth ($\beta = 0.18$, 95% CI: 0.09 to 0.27). Based on our observations, it can be estimated that a ten-fold increase in PFOA concentration resulted in a 1.53% decrease in *IGF2* methylation, which accounted for a reduction in the ponderal index of 0.28 kg/m³. However, because our observations of the association of DNA methylation and ponderal index were cross-sectional, we were unable to determine whether lower ponderal indices resulted in *IGF2* hypomethylation or vice versa. Moreover, it is unknown whether the minor *IGF2* hypomethylation in the cord blood that we observed could represent functional

consequences such as changes in *IGF2* protein levels.

The relationships of *IGF2* methylation with *IGF2* protein levels have not yet been fully clarified. A previous study of placental tissues, which actually secrete *IGF2*, showed that placental *IGF2* DMR0 methylation is positively correlated with *IGF2* protein concentration in the cord blood, which in turn is positively associated with fetal growth indices (St-Pierre et al. 2012). Whereas another cord blood study reported a negative correlation between cord blood *IGF2* DMR0 methylation and *IGF2* protein circulation (Hoyo et al. 2012), which contradicts our observations. Mechanistically, DNA methylation at the *H19* DMR is thought to play a more crucial role in *IGF2* expression; *H19* DMR is located in the *IGF2/H19* ICR and determines the expression of the *H19* gene and the inhibition of *IGF2* expression (Gabory et al. 2010). However, our results showed that methylation at the *IGF2* DMR was associated with the ponderal index, and we do not have a rational explanation for this matter yet.

In contrast, recent epidemiological studies have suggested an association between methylations of imprinted genes and postnatal growth. It has been reported that one year-old infants within >85th percentile in weight for age have higher *H19* methylation levels in the cord blood (Perkins et al. 2012), and *IGF2/H19* ICR methylation in the

peripheral blood was found to be positively correlated with subcutaneous adiposity and skinfold thickness at 17 years of age in cross-sectional study (Huang et al. 2012). It is necessary to further follow up the growth of our population that was exposed to PFOA in utero and exhibited *IGF2* hypomethylation.

Although the exact modes of action of the effects of PFOA on DNA methylation remain to be elucidated, some potential manners in which prenatal PFOA exposure might affect DNA methylation are known. As exogenous ligands, PFAAs might actively change the DNA methylation of specific genes by binding to their target receptors. Previous in vitro reporter assays have demonstrated that PFOA and PFOS can activate the human *peroxisome proliferator - activated receptors (PPARs)* and (Vanden Heuvel et al. 2006), which are important nuclear receptors for lipid homeostasis, adipogenesis and other physiological processes. A previous study suggested that PPAR can induce changes in histone modifications, which represent another epigenetic mechanism that is closely linked to DNA methylation status, and promote adipogenesis (Wakabayashi et al. 2009). These findings might explain the gene-specific methylation due to PFOA exposure that was observed. Moreover, it is possible that other environmental chemicals with the ability to activate PPARs also elicit effects similar to those

of PFOA, and further evaluations are necessary.

In addition to transactivating PPARs, PFOA and PFOS can also exhibit weak estrogenic activity by directly interacting with estrogen receptors (ERs) (Kjeldsen and Bonfeld-Jorgensen 2013), which can lead to changes in *IGF2* methylation (Pathak et al. 2010). This estrogen interaction might explain the sex difference in methylation due to PFOS exposure observed in our study. However, this result was not statistically significant, and further studies with larger samples are needed to clarify the sex differences in the epigenetic effects of PFAAs.

In our study, we observed that only PFOA decreased *IGF2* methylation. A previous in vitro reporter assay indicated that PFOA is a stronger activator of PPARs than PFOS (Takacs and Abbott 2007). Moreover, it has been shown that PFOA has greater transplacental transfer efficiency (Beesoon et al. 2011). These findings might explain our observation that PFOA had a stronger effect on *IGF2* hypomethylation despite the lower exposure level to PFOA than PFOS.

Regarding global methylation, we did not observe a significant association between PFAA concentration and *LINE1* methylation. A previous cross-sectional study (N = 30) demonstrated that PFOA concentrations in cord blood are inversely correlated with the

offspring's global DNA methylation as quantified with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Guerrero-Preston et al. 2010), which is an immunochemical method that can be used to quantify total methylated cytosine to measure global methylation. In contrast, we measured the methylation of the retrotransposon sequence *LINE1* as a surrogate marker of global methylation. Choi et al. reported that *LINE1* methylation is not correlated with total cytosine methylation (Choi et al. 2009). These methodological differences might have caused the discordance of the two results. In contrast, two studies in adult populations indicated that PFOA concentrations are not significantly associated with *LINE1* methylations in peripheral blood or sperm cells (Leter et al. 2014; Watkins et al. 2014). Moreover, two in vitro studies reported no significant effects of PFOA on total cytosine methylation in human cells (Bastos Sales et al. 2013; Tian et al. 2012), and Tian et al. reported a significant increase in methylation at a gene promoter region. The results of these previous studies are concordant with our observations, which suggests that PFOA exposure exerts greater effects on the DNA methylation of specific genes rather than the global methylation.

Our study is a birth cohort study that has followed participants since the prenatal period and can thus minimize

recall bias. However, we acknowledge that this study also has some limitations. First, we measured DNA methylation in cord blood samples, which might not entirely represent the methylation levels of other tissues. Comparisons of the methylation levels across tissues have demonstrated that the *H19* methylation levels are similar across tissues, but lower levels of *IGF2* methylation have been observed in the brain, kidneys and liver compared to other tissues including cord blood and the placenta (Murphy et al. 2012b). Secondly, our study did not have a sufficient sample size to ensure adequate statistical power; thus, it is possible that we were unable to detect all of the effects of PFAA on *IGF2/H19* and *LINE1* methylations. Third, population of this study was entirely from a single hospital in Sapporo city; however, compared to another of our birth cohort studies that covered 37 hospitals in Hokkaido prefecture, the characteristics of the participants were very similar (Kishi et al. 2011; Kishi et al. 2013), which suggests the hospital from which we recruited participants was a typical hospital without special deviations. Therefore, our results can be generalized to a larger context. Additionally, we only used the data from the participants who had cord blood samples for DNA methylation analyses, and this limited our study population to those with vaginal deliveries (99.6%). Another limitation is that the maternal

blood sampling period for the PFAA measurements differed between the subjects. However, PFOS and PFOA have relatively long half-life of 5.4 years and 3.8 years (Olsen et al. 2007), and we adjusted for the blood sampling period to minimize its influence on our results.

In the current study, we found that in utero PFOA exposure can decrease DNA methylation at the *IGF2* locus. In 2009, PFOS was classified as Annex B of the Stockholm Convention on POPs. Since that time, the use of PFOS and PFOA has been declining worldwide (Olsen et al. 2012). Similarly, our group reported that plasma PFOS and PFOA concentrations also decreased in Japan between 2003-2011, whereas the concentrations of perfluorononanoic acid (PFNA) and perfluorodecanoic acid (PFDA) have increased over the years (Okada et al. 2013). Therefore, it is necessary to evaluate the effects of these newly emerged PFAAs on the fetal epigenome. Additionally, it is plausible that PFOA and other PFAAs might exert their epigenetic effects on genomic regions other than *IGF2*. Further epigenome-wide association studies are necessary to fully elucidate the influence of prenatal PFAA exposure on the offspring's epigenome and future risks.

E . 結論

Our study indicated that prenatal exposure to PFOA decreased *IGF2* methylation in infants but did not

significantly affect *H19* or *LINE1* methylation. Moreover, lower *IGF2* methylation levels were associated with lower ponderal indices at birth, which might explain the involvement of DNA methylation in fetal growth restriction that is caused by PFOA exposure. Further long-term observations are necessary to evaluate the health effects of prenatal PFOA exposure and the subsequent *IGF2* hypomethylation on health and disease of the offspring.

F . 研究発表

1 . 論文発表

- (1) Kobayashi S, Azumi K, Itoh S, Goudarzi H, Sasaki S, Ishizuka M et al. Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids on Cord Blood *IGF2/H19* Methylation and Associations with Birth Size: The Hokkaido Study. *Environ Int* (submitted)
- (2) 安住 薫, 小林 祥子, 岸 玲子; 環境化学物質曝露の次世代影響の解明におけるエピジェネティクス研究. 北海道公衆衛生学雑誌. **26(2):29-38, 2012.**

2 . 学会発表

- (1) Kobayashi S., Azumi K., Sasaki S., Ishizuka M., Nakazawa H., Okada E., Kobayashi S., Goudarzi H., Itoh S., Miyashita C., Ikeno T., Araki A., Kishi R.; The effects of perfluoroalkyl acids (PFAAs) exposure in utero on *IGF2/H19* DNA methylation in cord blood. 26th Annual International Society for

**Environmental Epidemiology
Conference. Seattle, USA.
(2014.08.24-28)**

- (2) 小林 祥子, 安住 薫, 宮下 ちひろ, 小林 澄貴, 佐々木 成子, 石塚 真由美, 岸 玲子; 環境化学物質の胎児期曝露が臍帯血 IGF2 DNA メチル化に及ぼす影響. 第 83 回日本衛生学会学術総会. 金沢. (2013.03.24-26)

**G . 知的財産権の出願・登録状況
該当なし**

参考文献

1. Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol Sci* 2007;99(2):366-94.
2. Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. Half-Life of Serum Elimination of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorohexanesulfonate, and Perfluorooctanoate in Retired Fluorochemical Production Workers. *Environ Health Perspect* 2007;115(9):1298-305.
3. Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW, Angerer J. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* 2007;80(7):643-8.
4. Kudo N, Kawashima Y. Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals. *J Toxicol Sci* 2003;28(2):49-57.
5. Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, et al. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect* 2009;117(4):660-7.
6. Olsen GW, Butenhoff JL, Zobel LR. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: an epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reprod Toxicol* 2009;27(3-4):212-30.
7. Halldorsson TI, Rytter D, Haug LS, Bech BH, Danielsen I, Becher G, et al. Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: a prospective cohort study. *Environ Health Perspect* 2012;120(5):668-73.
8. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* 2009;21(2):243-51.
9. Drong AW, Lindgren CM, McCarthy MI. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92(6):707-15.
10. Hackett JA, Surani MA. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013;368(1609):20110328.
11. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- 2005;102(30):10604-9.
12. Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, LeBron C, Witter FR, et al. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics* 2010;5(6):539-46.
13. Kaku K, Osada H, Seki K, Sekiya S. Insulin-like growth factor 2 (IGF2) and IGF2 receptor gene variants are associated with fetal growth. *Acta Paediatr* 2007;96(3):363-7.
14. Bouwland-Both MI, van Mil NH, Stolk L, Eilers PH, Verbiest MM, Heijmans BT, et al. DNA methylation of IGF2DMR and H19 is associated with fetal and infant growth: the generation R study. *PLoS One* 2013;8(12):e81731.
15. St-Pierre J, Hivert MF, Perron P, Poirier P, Guay SP, Brisson D, et al. IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics* 2012;7(10):1125-32.
16. Cianfarani S. Insulin-like growth factor-II: new roles for an old actor. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:118.
17. Perkins E, Murphy SK, Murtha AP, Schildkraut J, Jirtle RL, Demark-Wahnefried W, et al. Insulin-like growth factor 2/H19 methylation at birth and risk of overweight and obesity in children. *J Pediatr* 2012;161(1):31-9.
18. Gabory A, Jammes H, Dandolo L. The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *Bioessays* 2010;32(6):473-80.
19. Hoyo C, Murphy SK, Jirtle RL. Imprint regulatory elements as epigenetic biosensors of exposure in epidemiological studies. *J Epidemiol Community Health* 2009;63(9):683-4.
20. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(44):17046-9.
21. Haggarty P, Hoad G, Campbell DM, Horgan GW, Piyathilake C, McNeill G. Folate in pregnancy and imprinted gene and repeat element methylation in the offspring. *Am J Clin Nutr* 2013;97(1):94-9.
22. Steegers-Theunissen RP, Obermann-Borst SA, Kremer D, Lindemans J, Siebel C, Steegers EA, et al. Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One* 2009;4(11):e7845.
23. Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, et al. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum Genet* 2012;131(10):1565-89.
24. 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(6):429-50.
25. 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(3):611-8.
26. Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, et al. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2004;112(11):1204-7.
27. Nakata A SK, Iwasaki Y, Ito R, Kishi R, Nakazawa H. Determination of Perfluorinated Compounds in Human Milk and Evaluation of Their Transition from Maternal Plasma. *Bunseki Kagaku* 2009;58(8):653-9.
28. Murphy SK, Adigun A, Huang Z, Overcash F, Wang F, Jirtle RL, et al. Gender-specific methylation differences in relation to prenatal exposure to cigarette smoke. *Gene* 2012;494(1):36-43.
29. Bollati V, Baccarelli A, Hou L, Bonzini M, Fustinoni S, Cavallo D, et al. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res* 2007;67(3):876-80.
30. Miller HC, Hassanein K. Diagnosis of impaired fetal growth in newborn infants. *Pediatrics* 1971;48(4):511-22.
31. Barnes SK, Ozanne SE. Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Prog Biophys Mol Biol* 2011;106(1):323-36.
32. Hoyo C, Fortner K, Murtha AP, Schildkraut JM, Soubry A, Demark-Wahnefried W, et al. Association of cord blood methylation fractions at imprinted insulin-like growth factor 2 (IGF2), plasma IGF2, and birth weight. *Cancer Causes Control* 2012;23(4):635-45.
33. Huang RC, Galati JC, Burrows S, Beilin LJ, Li X, Pennell CE, et al. DNA methylation of the IGF2/H19 imprinting control region and adiposity distribution in young adults. *Clin Epigenetics* 2012;4(1):21.
34. Vanden Heuvel JP, Thompson JT, Frame SR, Gillies PJ. Differential activation of nuclear receptors by perfluorinated fatty acid analogs and natural fatty acids: a comparison of human, mouse, and rat peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma, liver X receptor-beta, and retinoid X receptor-alpha. *Toxicol Sci* 2006;92(2):476-89.
35. Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha

- heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. *Mol Cell Biol* 2009;29(13):3544-55.**
- 36. Kjeldsen LS, Bonfeld-Jorgensen EC. Perfluorinated compounds affect the function of sex hormone receptors. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013;20(11):8031-44.**
- 37. Pathak S, D'Souza R, Ankolkar M, Gaonkar R, Balasinor NH. Potential role of estrogen in regulation of the insulin-like growth factor2-H19 locus in the rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 2010;314(1):110-7.**
- 38. Takacs ML, Abbott BD. Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (alpha, beta/delta, gamma) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate. *Toxicol Sci* 2007;95(1):108-17.**
- 39. Beesoon S, Webster GM, Shoeib M, Harner T, Benskin JP, Martin JW. Isomer profiles of perfluorochemicals in matched maternal, cord, and house dust samples: manufacturing sources and transplacental transfer. *Environ Health Perspect* 2011;119(11):1659-64.**
- 40. Choi JY, James SR, Link PA, McCann SE, Hong CC, Davis W, et al. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2009;30(11):1889-97.**
- 41. Watkins DJ, Wellenius GA, Butler RA, Bartell SM, Fletcher T, Kelsey KT. Associations between serum perfluoroalkyl acids and LINE-1 DNA methylation. *Environ Int* 2014;63:71-6.**
- 42. Leter G, Consales C, Eleuteri P, Uccelli R, Specht IO, Toft G, et al. Exposure to Perfluoroalkyl Substances and Sperm DNA Global Methylation in Arctic and European Populations. *Environ Mol Mutagen* 2014.**
- 43. Bastos Sales L, Kamstra JH, Cenijn PH, van Rijt LS, Hamers T, Legler J. Effects of endocrine disrupting chemicals on in vitro global DNA methylation and adipocyte differentiation. *Toxicol In Vitro* 2013;27(6):1634-43.**
- 44. Tian M, Peng S, Martin FL, Zhang J, Liu L, Wang Z, et al. Perfluorooctanoic acid induces gene promoter hypermethylation of glutathione-S-transferase Pi in human liver L02 cells. *Toxicology* 2012;296(1-3):48-55.**
- 45. Murphy SK, Huang Z, Hoyo C. Differentially methylated regions of imprinted genes in prenatal, perinatal and postnatal human tissues. *PLoS One* 2012;7(7):e40924.**
- 46. Olsen GW, Lange CC, Ellefson ME, Mair DC, Church TR, Goldberg CL, et al. Temporal trends of perfluoroalkyl concentrations in American Red Cross adult blood donors, 2000-2010. *Environ Sci Technol* 2012;46(11):6330-8.**

- 47. Okada E, Kashino I, Matsuura H,
Sasaki S, Miyashita C, Yamamoto J,
et al. Temporal trends of
perfluoroalkyl acids in plasma
samples of pregnant women in
Hokkaido, Japan, 2003-2011. Environ
Int 2013;60:89-96.**

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. Concentrations of PFOS and PFOA (ng/mL) in the maternal sera (N = 235).

	Detection	Mean (±SD)	Geometric Mean	Minimum	Percentile				
	limit ^a				ND (%)	25th	50th	75th	Maximum
PFOS	0.5	0 (0.0)	5.5 (±2.7)	4.8	1.4	3.3	5.0	6.8	16.2
PFOA	0.5	14 (4.3)	1.5 (±0.9)	1.2	ND	0.9	1.4	1.9	5.3

ND, nondetectable.

^aFor the subjects levels below the detection limit, we used a value equal to half of the detection limit.

Table 3. Effect of PFAA exposure on DNA methylation in cord blood according to multivariate linear regression models.

	<i>IGF2</i> methylation (%)		<i>H19</i> methylation (%)		<i>LINE1</i> methylation (%)	
	β (95% CI)	<i>p</i>	β (95% CI)	<i>p</i>	β (95% CI)	<i>p</i>
PFOS (log₁₀)						
Crude	-1.69 (-3.45, 0.06)	0.059	0.00 (-1.19, 1.19)	0.996	-0.09 (-0.74, 0.56)	0.787
Adjusted ^a	-0.90 (-2.79, 0.98)	0.346	0.26 (-1.03, 1.54)	0.695	0.01 (-0.64, 0.67)	0.966
PFOA (log₁₀)						
Crude	-1.78 (-3.16, -0.40)	0.012*	-0.59 (-1.53, 0.35)	0.215	-0.03 (-0.54, 0.48)	0.905
Adjusted ^a	-1.53 (-2.93, -0.12)	0.033*	-0.56 (-1.52, 0.40)	0.249	-0.16 (-0.65, 0.33)	0.524

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

**p* < 0.05

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 2. Maternal and infant characteristics and their relationships with PFAA concentrations (N=235).

	Mean ± SD N (%)	PFOS (ng/ml)		PFOA (ng/ml)	
		ρ		ρ	
		Mean (95% CI)	p	Mean (95% CI)	p
Maternal characteristics					
Maternal age (year) ^a	29.9 ± 4.8	ρ = -0.127	0.051	ρ = -0.055	0.405
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	21.0 ± 2.9 [†]	ρ = -0.056	0.395	ρ = -0.109	0.097
Parity ^b					
Primiparous	122 (51.9)	6.14 (5.63, 6.66)	<.001**	1.86 (1.70, 2.02)	<.001**
Multiparous	113 (48.1)	4.74 (4.29, 5.19)		1.11 (0.98, 1.24)	
Educational level (year) ^b					
≤ 12	109 (46.4)	5.41 (4.92, 5.91)	0.913	1.41 (1.24, 1.58)	0.037*
> 12	126 (53.6)	5.51 (5.01, 6.02)		1.57 (1.43, 1.72)	
Smoking during pregnancy ^b					
No	196 (83.4)	5.54 (5.15, 5.93)	0.500	1.54 (1.41, 1.67)	0.093
Yes	39 (16.6)	5.1 (4.28, 5.91)		1.28 (1.05, 1.51)	
Alcohol consumption during pregnancy ^b					
No	159 (67.7)	5.54 (5.10, 5.98)	0.776	1.50 (1.35, 1.64)	0.798
Yes	76 (32.3)	5.32 (4.73, 5.92)		1.50 (1.31, 1.68)	
Blood sampling period ^c					
< 7 months	16 (6.8)	6.71 (5.54, 7.89)	<.001**	1.70 (1.27, 2.13)	0.029*
8 months ± 4 weeks	107 (45.5)	6.15 (5.62, 6.68)		1.65 (1.46, 1.84)	
> 9 months	54 (23.0)	4.67 (4.04, 5.30)		1.31 (1.08, 1.53)	
After delivery	58 (24.7)	4.61 (3.87, 5.34)		1.33 (1.16, 1.51)	
Infant characteristics					
Gestational age (week) ^a	39.4 ± 1.0	ρ = 0.030	0.651	ρ = 0.049	0.458
Sex ^b					
Male	106 (45.1)	5.63 (5.08, 6.17)	0.368	1.58 (1.41, 1.75)	0.11
Female	129 (54.9)	5.34 (4.87, 5.81)		1.43 (1.28, 1.58)	
Birth weight (g)	3122 ± 332	ρ = -0.106	0.107	ρ = -0.105	0.108
Birth length (cm)	48.4 ± 1.6 [‡]	ρ = 0.077	0.237	ρ = -0.004	0.947
Ponderal Index (kg/m ³)	27.5 ± 2.2 [‡]	ρ = -0.233	<.001**	ρ = -0.159	0.015*

[†]Data missing: pre-pregnancy BMI (N=1), fish consumption (N=14)

[‡]Data excluded: birth length (N=1), ponderal Index (N=1)

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

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 4. Gender differences in the effects of PFAAs on DNA methylation according to multivariate linear regression models (N=235).

	N	<i>IGF2</i> methylation (%)		<i>H19</i> methylation (%)		<i>LINE1</i> methylation (%)	
		β (95% CI)	<i>p</i>	β (95% CI)	<i>p</i>	β (95% CI)	<i>p</i>
PFOS (\log_{10})^a							
Male	106	0.68 (-2.19, 3.55)	0.641	-0.99 (-2.93, 0.96)	0.316	0.00 (-0.93, 0.93)	0.997
Female	129	-2.30 (-4.92, 0.31)	0.084	1.08 (-0.68, 2.84)	0.226	-0.05 (-0.97, 0.87)	0.915
PFOA (\log_{10})^a							
Male	106	-1.96 (-4.31, 0.39)	0.101	-1.32 (-2.92, 0.28)	0.106	0.09 (-0.68, 0.86)	0.816
Female	129	-1.45 (-3.29, 0.39)	0.123	-0.29 (-1.53, 0.95)	0.642	-0.23 (-0.87, 0.42)	0.488

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

Table 5. Effects of *IGF2* methylation on fetal growth (N=235).

	<i>IGF2</i> methylation (%)					
	Overall (N = 235)		Male (N = 106)		Female (N = 129)	
	β (95% CI)	<i>p</i>	β (95% CI)	<i>p</i>	β (95% CI)	<i>p</i>
Birth weight (g)						
Model 1	10.5 (-2.9, 23.9)	0.125	16.0 (-2.4, 34.5)	0.088	9.0 (-10.2, 28.2)	0.355
Model 2 [†]	10.2 (-3.1, 23.6)	0.132	16.2 (-3.2, 35.7)	0.1	6.4 (-12.7, 25.6)	0.509
Birth length (cm)[‡]						
Model 1	-0.06 (-0.12, 0.01)	0.074	-0.04 (-0.14, 0.06)	0.383	-0.05 (-0.13, 0.03)	0.241
Model 2 [†]	-0.05 (-0.12, 0.01)	0.118	-0.05 (-0.16, 0.06)	0.368	-0.05 (-0.14, 0.03)	0.199
Ponderal Index (kg/m³)[‡]						
Model 1	0.19 (0.10, 0.28)	<.001**	0.21 (0.09, 0.34)	0.001**	0.17 (0.03, 0.30)	0.014*
Model 2 [†]	0.18 (0.09, 0.27)	<.001**	0.22 (0.10, 0.35)	0.001**	0.15 (0.02, 0.29)	0.027*

[†]Data missing: pre-pregnancy BMI (N=1)

[‡]Data excluded: birth length (N=1), ponderal Index (N=1)

^a Model 1: adjusted for gestational age

^b Model 2: adjusted for gestational age, maternal age, pre-pregnancy BMI, Parity, maternal education, maternal smoking during pregnancy, and the infant's sex

p* < 0.05, *p* < 0.01

Fig 1. Dose-dependent effects of PFOA on *IGF2* methylation (N=235)

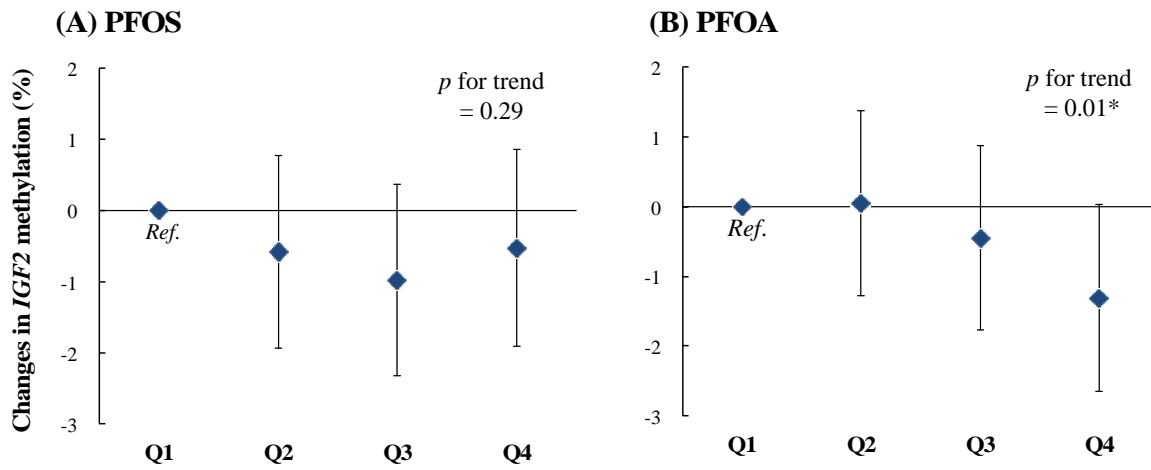


Fig 1. The bold line indicates the effects of PFOS (A) and PFOA (B) based on quartile (Q) splits. The square dots indicate the betas, and the error bars depict the 95% CIs. *IGF2* methylation began to decline in quartile 3. Only PFOA exhibited a significant decrease (p for trend = 0.01).
PFOS: Q1 (≤ 3.3 ng/mL), Q2 (3.3-5.0 ng/mL), Q3 (5.0-6.8 ng/mL), Q4 (> 6.8 ng/mL).
PFOA: Q1 (≤ 0.9 ng/mL), Q2 (0.9-1.4 ng/mL), Q3 (1.4-1.9 ng/mL), Q4 (> 1.9 ng/mL).
Adjusted for maternal age, maternal education, infant's sex, smoking during pregnancy and blood sampling period.

胎児期ダイオキシン PCBs 曝露が児の臍帯血 DNA メチル化に及ぼす影響

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授
研究分担者 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授
研究分担者 梶原 淳睦 福岡県保健環境研究所保健科学部 生活化学課長
研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 助教
研究分担者 石塚 真由美 北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学教室 教授

研究要旨

胎児期のダイオキシン PCBs 曝露は出生体重の減少などといった児の健康への有害な影響が報告されている。また、成人の疫学横断研究により、これらの曝露による DNA メチル化への影響が報告されているが、エピゲノムの面からも脆弱な胎児期の曝露影響を検討した研究はまだない。そこで本研究では、胎児期のダイオキシン PCBs 曝露が、児の臍帯血 *IGF2/H19*、および *LINE1* メチル化への影響の評価を行った。

札幌の一産科病院でリクルートし同意を得た妊婦のうち、初期調査票・出産時カルテ情報・臍帯血・ダイオキシン PCBs 濃度の得られた 238 名を対象とし、パイロシークエンス法を用いて *IGF2/H19* *LINE1* 遺伝子領域の臍帯血 DNA メチル化について定量を行った。胎児期の曝露要因として、母体血中ダイオキシン・PCBs 濃度との関連を重回帰分析で検討を行った。

交絡因子を調整後、NoCBs、特に 22'33'455'66'-NoCB (PCB-208) と *H19* メチル化との間に正の関連が認められた($\beta=0.87$, 95%CI: 0.08 to 1.67)。また、男女で層別にして解析を行ったところ、男児において PCDFs と *IGF2* メチル化との間に有意な負の関連が($\beta=-4.21$, 95%CI: -7.60 to -0.83)、女児において *H19* メチル化と NoCBs ($\beta=2.60$, 95%CI: 0.82 to 4.38)、DeCB ($\beta=2.77$, 95%CI: 0.76 to 4.78) と間に有意な正の関連が認められた。

研究協力者

小林 祥子, 安住 薫, 小林 澄貴
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)
蜂谷 紀之
(環境省国立水俣病総合研究センター)
安武 章
(熊本大学大学院自然科学研究科)
戸高 尊
(九州大学医学部学術研究員)

娠中においてはこれらの物質は胎盤を透過するため、胎児期の曝露が懸念される。現在までに、日常生活レベルの曝露によっても、ダイオキシンの胎児期曝露による出生体重の減少(Konishi et al. 2009)といった、児の健康への有害な影響が報告されている。

さらに成人での疫学横断研究において、これらの曝露とゲノム全体の DNA メチル化との関連が報告されている(Rusiecki et al. 2008; Kim et al. 2010; Lind et al. 2013)。これらの研究では、PCBs を含む POPs 曝露によるレトロトランスポゾン

A . 研究目的

ダイオキシン, PCBs は難分解性, 高蓄積性の性質を持つ化学物質で, 主に生物濃縮により食物を介して曝露される。特に妊

型の *Alu* 配列の低メチル化，ゲノム全体のシトシン部位の高メチル化が報告されているが，対象集団が高濃度曝露のイヌイットのものや，70 才の集団のものなど，結果の一般化が難しいものが多い。さらに，胎児期はエピゲノムへの影響といった点からも外的刺激に脆弱な時期であるにも関わらず，胎児期のダイオキシン PCBs 曝露のエピゲノムへの影響について評価した疫学研究は未だない。DNA メチル化等のエピジェネティックな機構は，ゲノム配列の変化を伴わず遺伝子発現調節を行う機構で，エピゲノムの状態は細胞分裂後も引き継がれていく (Hackett and Surani 2013)。また，DNA メチル化は環境影響からの可塑性をもっており，胎児期の環境と生後の表現型を結ぶ因子だと考えられており (Baccarelli and Bollati 2009)，胎児期のダイオキシン PCBs 曝露が生後の児の健康にどのような影響を及ぼす可能性があるのかを探る，重要な手がかりとなる。

そこで本研究では，胎児期のダイオキシン PCBs 曝露が，児の臍帯血 *IGF2/H19*，および *LINE1* メチル化への影響の評価を行った。

B．研究方法

1．対象

札幌の一産科病院で 2002 年 7 月から 2005 年 10 月までにリクルートし，同意を得た妊婦 514 名のうち，初期調査票・出産時カルテ情報がそろった母児から，臍帯血 DNA の得られた 238 名を対象とした。

2．方法

臍帯血 400 μ L から Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega 社)を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA を

Epitect Plus Bisulfite Kit (Qiagen 社)にてバイサルファイト処理を行い，*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 遺伝子領域について，Pyromark Q24 system (Qiagen 社)にて DNA メチル化の定量を行った。

母体血中ダイオキシン・PCBs 濃度は HRGC/HRMS により測定された。曝露影響評価の統計解析には重回帰分析を用い，曝露濃度は \log_{10} 変換した値を用い，また濃度が検出下限値以下の場合はその半値を代入した。

ダイオキシン総量は毒性等量 (TEQ) に従い算出した (Van den Berg et al. 2005)。Dioxin-TEQ は PCDDs 7 異性体，PCDFs 10 異性体，Non-ortho PCBs 4 異性体，Mono-ortho PCBs 10 異性体の総量，PCBs は 58 種類の PCB 異性体の総量から計算した。

(倫理面への配慮)

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

C．研究結果

本研究の対象者，238 組の母児の臍帯血 DNA メチル化レベル (\pm SD) は *IGF2*

DMR が **48.7% (±3.0)** , **H19 DMR** が **52.4% (±1.9%)** , **LINE1** が **75.9% (±1.1)** であった。また,母体血中ダイオキシン・**PCBs** 濃度の中央値(最小値,最大値)は,ダイオキシン総量(**TEQ**)が **14.2 pg/g lipid (3.2 to 42.9)** , **PCBs** 総量が **100.8 ng/g lipid (16.0 to 326.8)** であった(表1)。母児の属性と曝露との関連を表2に示した。ダイオキシン・**PCB** 総量と関連が見られたものは,母年齢,出産歴,世帯収入であった。

表3にダイオキシン・**PCBs** 曝露と **H19** メチル化との関連を重回帰分析で解析した結果を示した。**Crude** モデルでは **OcCBs**, **NoCBs**, **DeCB** と **H19** メチル化との間に有意な関連が見られたが,世帯収入,母妊娠中喫煙・飲酒,採血時期,児の性別,母年齢で調整をした結果, **total NoCBs** と **H19** メチル化との間に正の関連が認められた($\beta=1.37$, **95%CI: 0.11 to 2.62**)。そのほか,ダイオキシン **PCBs** 曝露と **IGF2**・**LINE1** メチル化との間に有意な関連は認められなかった。

表4に **PCBs** について異性体別で解析を行った結果を示した。**HpCBs**, **OcPBs**, **NoCBs**, **DeCB** の異性体のいくつかで **Crude** モデルで **H19** との間に有意な正の関連が認められたが,世帯収入,母妊娠中喫煙・飲酒,採血時期,児の性別,母年齢で調整をしたモデル2ではそれら異性体での有意な関連は認められなかった。唯一, **22'33'455'66'-NoCB(PCB208)** との間で調整後も有意な関連が認められた($\beta=0.87$, **95%CI: 0.08 to 1.67**)。異性体別の解析でも **IGF2**・**LINE1** メチル化への顕著な影響は認められなかった。

表5にダイオキシン **PCBs** 曝露と **IGF2/H19**・**LINE1** メチル化との関連を男女別に解析した結果を示した。男児におい

て **PCDF** 総量(**TEQ**)と **IGF2** メチル化との間に有意な負の関連が見られ,曝露濃度 **10** 倍ごとに **4.21%** の低下が観察された($\beta=-4.21$, **95%CI: -7.60 to -0.83**)。 **PCDD/PCDF** 総量(**TEQ**)においても **IGF2** メチル化との間に有意な負の関連が認められた($\beta=-3.47$, **-6.75 to -0.18**)。また **H19** メチル化は女児において **NoCB** 総量($\beta=2.60$, **95%CI: 0.82 to 4.38**) , **DeCB**($\beta=2.77$, **95%CI: 0.76 to 4.78**)と有意な正の関連が認められたが,男児ではその傾向は認められなかった。

D. 考察

本研究により,胎児期のダイオキシン **PCBs** 曝露の影響は児のエピゲノムレベルにまで及ぶ可能性が明らかになった。また,その影響には性差が見られ,ダイオキシンである **PCDF** 曝露の影響は男児でより強く, **PCBs** のうち **NoCBs**・**DeCB** の影響は女児でより顕著であった。ダイオキシンの曝露影響には性差があり,本研究と同じ集団で行った小西らの報告によると,ダイオキシン,特に **PCDDs**・**PCDFs** の出生体重への影響は男児でより顕著に見られ, **PCDDs/PCDFs** 総量 (**TEQ**)が **10** 倍ごとに **338.7 g** の出生体重の減少が観察された($p=0.022$) (**Konishi et al. 2009**)。本研究においても, **PCDFs** の影響は男児で顕著に見られ,曝露濃度が **10** 倍となるごとに **IGF2** メチル化の **4.21%** の減少が認められた。**IGF2** は胎児発育に重要なペプチドホルモンであり,この領域のメチル化は出生時の体重との関連が示されている (**St-Pierre et al. 2012**)。また,筆者らの研究でも, **IGF2** メチル化と出生時の体格指数との有意な正の相関が観察されており (**Kobayashi et al. submitted**) , **PCDFs** 曝

露による **IGF2** 低メチル化は出生時の体格指数の減少へつながることが示唆される。

また、**H19**領域は、*in vitro*での報告によると、メチル化されることによりクロマチン構造を大きく変化させ **IGF2** の発現を調節するといわれている(Gabory et al. 2010)。今回観察された **NoCBs**, **DeCB** 曝露による **H19** 高メチル化がどのような表現型につながるか、今後検討していく必要がある。

また、調整後のモデルではその影響はほとんどが有意ではなくなったが、高塩素化 **PCB** 異性体で、**H19** メチル化との間に正の関連が認められた。これら高塩素化 **PCBs** の健康影響についても今後検討を行う必要がある。

本研究の限界として、曝露評価を行った母体血の採血時期が妊娠 24 週目から産後と人によって幅があり、測定値への影響が考えられる点が挙げられる。重回帰分析の際、採血時期を共変量に投入して解析したもののその影響は調整しきれていない可能性は考えられる。また、本研究では臍帯血の **DNA** メチル化を測定しており **IGF2** が実際に発現している肝臓等の組織のメチル化とは異なる可能性も考えられる。さらに、サンプルサイズが小さく十分なパワーが得られていないため、今回の結果には偽陰性のもも含まれていることが考えられるため、今後十分なサンプルサイズでの検討が必要である。

E . 結論

本研究により、胎児期のダイオキシン **PCDFs** 曝露による男児での **IGF2** 低メチル化、および **PCBs** のうち **NoCBs**, **DeCB** 曝露による女児での **H19** 高メチル化が示

された。また、**IGF2** 低メチル化は **PCDFs** の胎児発育への影響を介在している可能性が示されたが、その他のダイオキシン曝露による健康影響についても **DNA** メチル化が介在している可能性が考えられる。今後はそれら他の遺伝子領域のメチル化への影響についても評価していく必要がある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- (1) Kobayashi S, Azumi K, Itoh S, Goudarzi H, Sasaki S, Ishizuka M et al. Effects of Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Acids on Cord Blood IGF2/H19 Methylation and Associations with Birth Size: The Hokkaido Study. Environ Int (submitted)
- (2) 安住薫, 小林祥子, 岸玲子; 環境化学物質曝露の次世代影響の解明におけるエビジェネティクス研究. 北海道公衆衛生学雑誌. 26(2):29-38, 2012.

2 . 学会発表

- (1) Kobayashi S., Azumi K., Sasaki S., Ishizuka M., Nakazawa H., Okada E., Kobayashi S., Goudarzi H., Itoh S., Miyashita C., Ikeno T., Araki A., Kishi R.; The effects of perfluoroalkyl acids (PFAAs) exposure in utero on IGF2/H19 DNA methylation in cord blood. 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference. Seattle, USA. (2014.08.24-28)
- (2) 小林祥子, 安住薫, 宮下ちひろ, 小林

澄貴, 佐々木成子, 石塚真由美, 岸玲子; 環境化学物質の胎児期曝露が臍帯血 IGF2 DNA メチル化に及ぼす影響. 第 83 回日本衛生学会学術総会. 金沢. (2013.03.24-26)

G . 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

1. Baccarelli A, Bollati V. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* 21:243-251.
2. Gabory A, Jammes H, Dandolo L. 2010. The h19 locus: Role of an imprinted non-coding rna in growth and development. *Bioessays* 32:473-480.
3. Hackett JA, Surani MA. 2013. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:20110328.
4. Kim KY, Kim DS, Lee SK, Lee IK, Kang JH, Chang YS, et al. 2010. Association of low-dose exposure to persistent organic pollutants with global DNA hypomethylation in healthy koreans. *Environ Health Perspect* 118:370-374.
5. Konishi K, Sasaki S, Kato S, Ban S, Washino N, Kajiwara J, et al. 2009. Prenatal exposure to pcdds/pcdfs and dioxin-like pcbs in relation to birth weight. *Environ Res* 109:906-913.
6. Lind L, Penell J, Luttrupp K, Nordfors L, Syvanen AC, Axelsson T, et al. 2013. Global DNA hypermethylation is associated with high serum levels of persistent organic pollutants in an elderly population. *Environ Int* 59:456-461.
7. Rusiecki JA, Baccarelli A, Bollati V, Tarantini L, Moore LE, Bonefeld-Jorgensen EC. 2008. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in greenlandic inuit. *Environ Health Perspect* 116:1547-1552.
8. St-Pierre J, Hivert MF, Perron P, Poirier P, Guay SP, Brisson D, et al. 2012. Igf2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics* 7:1125-1132.
9. 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.

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. Dioxins and PCBs concentrations (N=238)

	N	Mean	(±SD)	GM	Min	25th	Median	75th	Max
Dioxins (pg/g lipid)									
total PCDD	238	512.1	(±206.2)	477.8	202.4	374.7	455.5	630.9	1499.9
total PCDF	238	32.2	(±185.3)	19.6	9.5	15.1	19.5	23.0	2877.3
total PCDD/PCDF	238	544.4	(±294.4)	500.9	215.5	390.8	474.7	655.2	3726.3
total Non-ortho PCB	238	84.7	(±49.2)	75.5	20.0	54.0	77.6	102.3	553.6
total Mono-ortho PCB	238	12730.1	(±6461.9)	11242.9	1777.9	8020.2	11563.6	15636.3	36382.2
total Coplanar PCB	238	12814.9	(±6494.6)	11321.9	1797.9	8083.7	11659.3	15716.2	36569.8
total Dioxin	238	13359.2	(±6586)	11897.3	2105.0	8507.5	12097.9	16385.7	37694.5
total PCDD-TEQ(05)	238	7.4	(±2.9)	6.8	1.7	5.2	7.1	9.4	17.3
total PCDF-TEQ(05)	238	2.7	(±1.2)	2.5	0.6	1.9	2.5	3.2	12.1
total PCDD/PCDF-TEQ(05)	238	10.1	(±3.9)	9.4	2.5	7.2	9.7	12.5	25.1
total Non-ortho PCB-TEQ(05)	238	4.7	(±2.8)	4.0	0.7	2.9	4.2	6.1	23.2
total Mono-ortho PCB-TEQ(05)	238	0.4	(±0.2)	0.3	0.1	0.2	0.3	0.5	1.1
total Coplanar PCB-TEQ(05)	238	5.1	(±3.0)	4.4	0.7	3.1	4.6	6.6	23.9
total Dioxin-TEQ(05)	238	15.2	(±6.3)	14.0	3.2	10.5	14.2	18.8	42.9
PCBs (pg/g lipid)									
total TrCBs	238	1552.1	(±1516.1)	1252.2	238.9	874.1	1199.4	1729.1	17655.2
total TeCBs	238	6712.1	(±3130.3)	6121.3	1692.9	4620.6	6238.0	8065.4	24037.5
total PeCBs	238	7341.4	(±3674.9)	6539.8	1424.4	4846.1	6738.6	8835.6	25548.0
total HxCBs	238	49294.0	(±25761.9)	43313.8	6120.2	31105.8	45253.3	60351.0	159214.0
total HpCBs	238	34750.1	(±22071.3)	29393.4	3658.7	19463.9	29663.7	43030.6	167252.0
total OcPBs	238	7194.5	(±3987.3)	6235.1	1108.1	4320.0	6445.8	9202.8	22737.6
total NoCBs	238	1001.7	(±564.6)	868.2	123.8	625.4	892.2	1265.9	3463.2
total DeCBs	238	514.1	(±297.4)	455.8	46.9	335.2	462.0	612.2	3300.5
total PCBs	238	108359.9	(±55810.8)	95836.4	16016.9	67772.8	100822.0	131467.0	326821.0

単位：pg/g lipid

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. Relationships between Maternal/infant characteristics and dioxins/PCBs levels (N=238)

	N	Mean (\pm SD) (%)	total Dioxin-TEQ (pg/g lipid)		total PCBs (pg/g lipid)	
			ρ Median (25th, 75th)	p	ρ Median (25th, 75th)	p
Maternal characteristics						
Maternal age (year) ^a	238	30.4 (\pm 4.8)	0.299	<.0001	0.451	<.0001
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	238	21.0 (\pm 2.9)	0.016	0.812	-0.055	0.401
Parity ^b						
Primiparous	126	(52.9)	15.3 (12.7, 19.7)	0.001	102556.3 (71263.2, 134010.8)	0.063
Multiparous	112	(47.1)	13.3 (9.5, 17.6)		94990.7 (60727.6, 125009.8)	
Annual household income ^c						
< 3	36	(15.1)	12.8 (9.4, 17.9)	0.008	71540.4 (60405.2, 104274.3)	0.002
3-5	124	(52.1)	13.8 (10.1, 17.2)		96317.5 (68847.1, 122004.1)	
5-7	57	(24.0)	15 (11.2, 22.3)		115799.8 (70807.1, 172030)	
> 7	21	(8.8)	17.9 (15.4, 20.7)		115844.6 (83421.5, 175473.3)	
Smoking during pregnancy ^b						
No	207	(87.0)	14.6 (10.6, 19.1)	0.143	101613.2 (68284.5, 130337.4)	0.468
Yes	31	(13.0)	12.7 (9.3, 18)		90673.4 (63458.5, 139706.3)	
Alcohol consumption during pregnancy ^b						
No	158	(66.4)	14.3 (10.3, 18.8)	0.754	96317.5 (64599.7, 123644.4)	0.073
Yes	80	(33.6)	14.2 (11.1, 18.8)		104321.8 (71453.9, 145758.4)	
Blood sampling period ^c						
< 28 weeks	17	(7.1)	14.9 (11, 27.1)	0.41	105574.3 (67391.8, 197835.7)	0.789
28-36 weeks	98	(41.2)	14.6 (11.5, 18.6)		101258.1 (68690.5, 127536.8)	
\geq 36 weeks	55	(23.1)	15.1 (10.1, 18)		101505.4 (67666.9, 139706.3)	
After delivery	68	(28.6)	13.9 (9.8, 18.6)		95401 (64564.7, 127866.8)	
Infant characteristics						
Gestational age (week) ^a	238	39.8 (\pm 1.0)	0.061	0.351	0.089	0.17
Sex ^b						
Male	111	(46.6)	14.1 (10.3, 18.5)	0.712	103157.2 (67808.1, 130251.8)	0.896
Female	127	(53.4)	14.4 (11, 18.9)		100029.6 (67666.9, 133161.1)	
Birth weight (g)	238	3145 (\pm 333)	-0.057	0.38	-0.019	0.771
Birth length (cm)	238	48.5 (\pm 1.9)	0.036	0.577	0.06	0.354
Ponderal Index	238	27.8 (\pm 4.5)	-0.158	0.015	-0.128	0.05

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

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. Relationships between Dioxins/PCBs and *H19* methylation by multiple linear regression model.

(log ₁₀ -transformed)	Crude (N=238)			Model 1 (N=238)			Model 2 (N=238)		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Dioxins									
total PCDD	-0.53	(-2.1, 1.04)	0.509	-0.27	(-1.91, 1.36)	0.743	-0.42	(-2.06, 1.21)	0.612
total PCDF	-0.18	(-1.45, 1.08)	0.775	-0.28	(-1.57, 1.02)	0.673	-0.28	(-1.57, 1)	0.664
total PCDD/PCDF	-0.6	(-2.11, 0.9)	0.432	-0.43	(-1.99, 1.13)	0.585	-0.52	(-2.07, 1.03)	0.511
total Non-ortho PCB	0.74	(-0.48, 1.96)	0.233	1.09	(-0.16, 2.34)	0.088	0.87	(-0.41, 2.15)	0.184
total Mono-ortho PCB	0.7	(-0.42, 1.82)	0.217	0.85	(-0.29, 1.99)	0.143	0.56	(-0.64, 1.77)	0.357
total Coplanar PCB	0.71	(-0.41, 1.83)	0.216	0.85	(-0.29, 2)	0.142	0.57	(-0.64, 1.78)	0.354
total Dioxin	0.7	(-0.47, 1.86)	0.242	0.85	(-0.34, 2.04)	0.159	0.56	(-0.7, 1.81)	0.382
Dioxins (TEQ 2005)									
total PCDD-TEQ	-0.1	(-1.47, 1.27)	0.89	0.07	(-1.33, 1.46)	0.927	-0.37	(-1.84, 1.09)	0.615
total PCDF-TEQ	-0.09	(-1.5, 1.31)	0.894	-0.05	(-1.49, 1.38)	0.94	-0.36	(-1.83, 1.1)	0.626
total PCDD/PCDF-TEQ	-0.16	(-1.58, 1.26)	0.828	-0.04	(-1.48, 1.41)	0.96	-0.45	(-1.95, 1.05)	0.553
total Non-ortho PCB-TEQ	0.5	(-0.48, 1.47)	0.318	0.77	(-0.23, 1.76)	0.131	0.56	(-0.47, 1.59)	0.282
total Mono-ortho PCB-TEQ	0.7	(-0.42, 1.82)	0.217	0.85	(-0.29, 1.99)	0.143	0.56	(-0.64, 1.77)	0.357
total Coplanar PCB-TEQ	0.52	(-0.48, 1.51)	0.305	0.78	(-0.23, 1.8)	0.129	0.58	(-0.47, 1.63)	0.281
total Dioxin-TEQ	0.21	(-1.13, 1.55)	0.758	0.44	(-0.92, 1.81)	0.525	0.08	(-1.34, 1.5)	0.912
PCBs									
total TrCBs	0.02	(-0.93, 0.98)	0.961	-0.09	(-1.08, 0.89)	0.85	-0.06	(-1.04, 0.92)	0.897
total TeCBs	0.47	(-0.87, 1.82)	0.49	0.57	(-0.81, 1.95)	0.417	0.33	(-1.07, 1.74)	0.642
total PeCBs	0.98	(-0.19, 2.14)	0.1	1.07	(-0.12, 2.26)	0.077	0.94	(-0.26, 2.13)	0.125
total HxCBs	0.88	(-0.21, 1.98)	0.114	0.97	(-0.15, 2.1)	0.089	0.69	(-0.5, 1.89)	0.254
total HpCBs	0.97	(-0.01, 1.96)	0.052	1.04	(0.02, 2.06)	0.046*	0.76	(-0.4, 1.92)	0.195
total OcPBs	1.09	(0.04, 2.13)	0.041*	1.23	(0.14, 2.31)	0.027*	0.96	(-0.34, 2.26)	0.147
total NoCBs	1.36	(0.32, 2.4)	0.011*	1.53	(0.45, 2.61)	0.006**	1.37	(0.11, 2.62)	0.033*
total DeCBs	1.37	(0.22, 2.53)	0.020*	1.57	(0.38, 2.77)	0.01*	1.35	(-0.02, 2.72)	0.054
total PCBs	1.05	(-0.09, 2.18)	0.07	1.13	(-0.04, 2.31)	0.058	0.83	(-0.45, 2.11)	0.202

Model 1: adjusted for household income, maternal smoking, alcohol intake, blood sampling period, infant sex

Model 2: adjusted for model 1 + maternal age

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 4. Relationships between selected PCB congeners and *H19* methylation by multiple linear regression model.

(log ₁₀ -transformed)	≤ND (%)	Crude (N=238)			Model 1 (N=238)			Model 2 (N=238)		
		β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
[PCBs]										
HpCBs										
22'33'566'-HpCB(#179)	27 (11.3)	0.54	(0.04, 1.05)	0.036*	0.5	(-0.01, 1.01)	0.052	0.47	(-0.04, 0.98)	0.072
22'33'55'6'-HpCB(#178)	0 (0.0)	0.97	(0.04, 1.9)	0.041*	1.01	(0.05, 1.97)	0.039*	0.77	(-0.31, 1.84)	0.162
22'344'56'-HpCB(#182)	0 (0.0)	1.08	(0.14, 2.01)	0.024*	1.11	(0.14, 2.07)	0.025*	0.88	(-0.18, 1.95)	0.103
22'344'5'6'-HpCB(#183)	0 (0.0)	1.03	(0.06, 2)	0.038*	1.06	(0.07, 2.05)	0.036*	0.84	(-0.22, 1.9)	0.122
22'344'56'-HpCB(#181)	64 (26.9)	0.03	(-0.51, 0.58)	0.906	-0.01	(-0.57, 0.54)	0.96	-0.13	(-0.69, 0.44)	0.652
22'33'4'56'-HpCB(#177)	0 (0.0)	0.96	(0.02, 1.91)	0.046*	1	(0.02, 1.97)	0.045*	0.78	(-0.26, 1.81)	0.142
22'33'455'-HpCB(#172)	1 (0.4)	0.47	(-0.38, 1.31)	0.277	0.48	(-0.39, 1.35)	0.278	0.18	(-0.77, 1.14)	0.705
22'344'55'-HpCB(#180)	0 (0.0)	0.86	(-0.11, 1.82)	0.081	0.95	(-0.07, 1.96)	0.067	0.64	(-0.54, 1.81)	0.286
233'44'5'6'-HpCB(#191)	9 (3.8)	0.41	(-0.24, 1.06)	0.214	0.49	(-0.17, 1.15)	0.145	0.33	(-0.37, 1.03)	0.355
22'33'44'5'-HpCB(#170)	0 (0.0)	0.84	(-0.15, 1.83)	0.098	0.9	(-0.14, 1.93)	0.089	0.57	(-0.61, 1.75)	0.342
OcCBs										
22'33'55'66'-OcCB(#202)	0 (0.0)	0.92	(-0.01, 1.85)	0.051	1.03	(0.07, 1.99)	0.036*	0.78	(-0.31, 1.88)	0.16
22'33'45'66'-OcCB(#200)	15 (6.3)	0.38	(-0.22, 0.97)	0.216	0.42	(-0.18, 1.02)	0.173	0.33	(-0.28, 0.94)	0.286
22'33'45**'-OcCB(#201/198)	0 (0.0)	0.93	(-0.05, 1.91)	0.064	1.04	(0.02, 2.06)	0.045*	0.75	(-0.44, 1.95)	0.216
22'344'55'6'-OcCB(#203)	0 (0.0)	1.13	(0.13, 2.12)	0.026*	1.19	(0.16, 2.23)	0.024*	0.95	(-0.26, 2.17)	0.124
22'33'44'56'-OcCB(#195)	0 (0.0)	1.08	(0.04, 2.12)	0.041*	1.26	(0.19, 2.32)	0.021*	1.02	(-0.19, 2.22)	0.098
22'33'44'55'-OcCB(#194)	0 (0.0)	1.07	(0.01, 2.13)	0.047*	1.28	(0.16, 2.4)	0.025*	1.03	(-0.36, 2.42)	0.146
233'44'55'6'-OcCB(#205)	27 (11.3)	-0.02	(-0.59, 0.55)	0.943	-0.02	(-0.59, 0.55)	0.951	-0.2	(-0.79, 0.4)	0.515
NoCBs										
22'33'455'66'-NoCB(#208)	4 (1.7)	0.93	(0.22, 1.63)	0.010*	1	(0.28, 1.73)	0.007**	0.87	(0.08, 1.67)	0.031*
22'33'44'566'-NoCB(#207)	8 (3.4)	0.71	(0, 1.42)	0.049*	0.7	(-0.02, 1.43)	0.058	0.55	(-0.21, 1.31)	0.156
22'33'44'55'6'-NoCB(#206)	1 (0.4)	0.74	(-0.21, 1.68)	0.125	0.86	(-0.11, 1.83)	0.083	0.58	(-0.5, 1.66)	0.294
DeCB										
22'33'44'55'66'-DeCB(#209)	0 (0.0)	1.37	(0.22, 2.53)	0.020*	1.57	(0.38, 2.77)	0.010*	1.35	(-0.02, 2.72)	0.054

Model 1: adjusted for household income, maternal smoking, alcohol intake, blood sampling period, infant sex

Model 2: adjusted for model 1 + maternal age

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 5. Relationships between Dioxins/PCBs and DNA methylation by sex-stratified multiple linear regression model.

(log ₁₀ -transformed)	<i>IGF2</i> methylation (%)						<i>H19</i> methylation (%)						<i>LINE1</i> methylation (%)					
	Male (N=111)			Female (N=127)			Male (N=111)			Female (N=127)			Male (N=111)			Female (N=127)		
	β	(95% CI)	p-value	β	(95% CI)	p-value	β	(95% CI)	p-value	β	(95% CI)	p-value	β	(95% CI)	p-value	β	(95% CI)	p-value
Dioxins																		
total PCDD	-1.34	(-4.85, 2.17)	0.45	1.23	(-2.47, 4.93)	0.512	-1.53	(-3.87, 0.8)	0.196	0.82	(-1.54, 3.18)	0.495	-0.32	(-1.48, 0.85)	0.589	0.54	(-0.78, 1.85)	0.419
total PCDF	-4.07	(-8.15, 0)	0.05	1.3	(-1.02, 3.61)	0.27	0.69	(-2.09, 3.47)	0.622	-0.67	(-2.15, 0.81)	0.372	-1.13	(-2.49, 0.23)	0.101	0.51	(-0.31, 1.34)	0.217
total PCDD/PCDF	-1.45	(-5.03, 2.12)	0.422	1.79	(-1.46, 5.04)	0.278	-1.49	(-3.87, 0.89)	0.217	0.19	(-1.89, 2.27)	0.856	-0.35	(-1.53, 0.84)	0.563	0.62	(-0.53, 1.78)	0.286
total Non-ortho PCB	-1.3	(-4.23, 1.63)	0.381	0.12	(-2.65, 2.9)	0.931	0.53	(-1.43, 2.5)	0.593	1.29	(-0.46, 3.05)	0.147	-0.24	(-1.22, 0.73)	0.62	0.43	(-0.55, 1.42)	0.384
total Mono-ortho PCB	-1.38	(-4.13, 1.37)	0.322	0.52	(-2.12, 3.16)	0.698	0.1	(-1.75, 1.95)	0.913	1.23	(-0.44, 2.9)	0.147	-0.5	(-1.41, 0.41)	0.283	0.21	(-0.73, 1.14)	0.666
total Coplanar PCB	-1.38	(-4.14, 1.37)	0.321	0.52	(-2.13, 3.16)	0.699	0.11	(-1.75, 1.96)	0.909	1.24	(-0.44, 2.91)	0.146	-0.49	(-1.41, 0.42)	0.284	0.21	(-0.73, 1.15)	0.665
total Dioxin	-1.45	(-4.32, 1.41)	0.317	0.74	(-1.98, 3.47)	0.59	0.09	(-1.84, 2.01)	0.928	1.19	(-0.54, 2.92)	0.175	-0.49	(-1.44, 0.46)	0.304	0.27	(-0.7, 1.24)	0.582
Dioxins (TEQ)																		
total PCDD-TEQ(05)	-3.04	(-6.17, 0.1)	0.057	0.47	(-2.76, 3.69)	0.775	-0.32	(-2.46, 1.82)	0.767	-0.01	(-2.07, 2.04)	0.99	-0.48	(-1.53, 0.57)	0.369	0.1	(-1.05, 1.24)	0.867
total PCDF-TEQ(05)	-4.21	(-7.6, -0.83)	0.015*	1.16	(-1.86, 4.18)	0.449	0.35	(-1.98, 2.69)	0.764	-0.65	(-2.57, 1.28)	0.508	-0.9	(-2.04, 0.25)	0.124	0.66	(-0.41, 1.72)	0.227
total PCDD/PCDF-TEQ(05)	-3.47	(-6.75, -0.18)	0.039*	1	(-2.23, 4.23)	0.542	-0.17	(-2.42, 2.08)	0.879	-0.36	(-2.43, 1.7)	0.728	-0.61	(-1.72, 0.5)	0.277	0.35	(-0.8, 1.5)	0.55
total Non-ortho PCB-TEQ(05)	-1.08	(-3.25, 1.09)	0.328	0.21	(-2.19, 2.6)	0.863	0.46	(-1, 1.91)	0.537	0.92	(-0.6, 2.43)	0.234	-0.19	(-0.91, 0.53)	0.599	0.39	(-0.46, 1.23)	0.369
total Mono-ortho PCB-TEQ(05)	-1.38	(-4.13, 1.37)	0.322	0.52	(-2.12, 3.16)	0.698	0.1	(-1.75, 1.95)	0.913	1.23	(-0.44, 2.9)	0.147	-0.5	(-1.41, 0.41)	0.283	0.21	(-0.73, 1.14)	0.666
total Coplanar PCB-TEQ(05)	-1.13	(-3.36, 1.09)	0.315	0.23	(-2.2, 2.66)	0.85	0.46	(-1.04, 1.95)	0.545	0.95	(-0.59, 2.49)	0.226	-0.21	(-0.95, 0.53)	0.571	0.38	(-0.48, 1.24)	0.381
total Dioxin-TEQ(05)	-2.86	(-5.91, 0.2)	0.067	0.96	(-2.2, 4.12)	0.548	0.3	(-1.77, 2.38)	0.772	0.2	(-1.81, 2.22)	0.842	-0.49	(-1.51, 0.54)	0.35	0.49	(-0.63, 1.61)	0.386
PCBs																		
total TrCBs	0.44	(-1.9, 2.78)	0.709	-0.3	(-2.29, 1.69)	0.767	-0.54	(-2.11, 1.02)	0.492	0.48	(-0.78, 1.75)	0.45	0.02	(-0.75, 0.8)	0.953	0.29	(-0.42, 0.99)	0.424
total TeCBs	-0.59	(-3.6, 2.42)	0.698	-1.44	(-4.59, 1.72)	0.369	0.24	(-1.78, 2.25)	0.817	1.02	(-1, 3.03)	0.319	-0.2	(-1.2, 0.8)	0.693	0.2	(-0.93, 1.32)	0.728
total PeCBs	-0.17	(-2.8, 2.46)	0.899	-0.39	(-3.05, 2.27)	0.771	1.13	(-0.61, 2.88)	0.201	1.23	(-0.46, 2.91)	0.152	-0.28	(-1.15, 0.59)	0.522	0.34	(-0.6, 1.28)	0.477
total HxCBs	-1.67	(-4.47, 1.12)	0.238	1.11	(-1.47, 3.68)	0.396	0.33	(-1.55, 2.22)	0.726	1.21	(-0.42, 2.84)	0.144	-0.5	(-1.43, 0.42)	0.284	0.3	(-0.62, 1.21)	0.521
total HpCBs	-1.68	(-4.55, 1.19)	0.249	1.18	(-1.18, 3.53)	0.324	0.8	(-1.13, 2.73)	0.411	0.92	(-0.58, 2.42)	0.227	-0.48	(-1.43, 0.48)	0.325	0.74	(-0.09, 1.57)	0.081
total OcPBs	-1.92	(-4.87, 1.03)	0.199	1.88	(-0.94, 4.7)	0.19	0.15	(-1.84, 2.14)	0.881	1.63	(-0.16, 3.41)	0.074	-0.65	(-1.63, 0.32)	0.188	0.6	(-0.4, 1.61)	0.235
total NoCBs	-1.37	(-4.08, 1.33)	0.317	0.36	(-2.53, 3.24)	0.806	0.35	(-1.47, 2.17)	0.703	2.6	(0.82, 4.38)	0.004**	-0.7	(-1.59, 0.19)	0.122	0.29	(-0.73, 1.31)	0.576
total DeCBs	-1.82	(-4.69, 1.05)	0.211	1.01	(-2.23, 4.26)	0.538	0.19	(-1.75, 2.13)	0.847	2.77	(0.76, 4.78)	0.007**	-0.67	(-1.62, 0.28)	0.165	0.56	(-0.6, 1.71)	0.341
total PCBs	-1.69	(-4.71, 1.33)	0.269	1.01	(-1.7, 3.72)	0.461	0.57	(-1.46, 2.6)	0.579	1.27	(-0.45, 2.99)	0.146	-0.52	(-1.52, 0.48)	0.306	0.58	(-0.38, 1.54)	0.232

Adjusted for maternal age, annual household income, maternal smoking, alcohol intake, blood sampling period

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

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授
研究分担者 石塚 真由美 北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座 教授

研究要旨

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

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

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

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

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

研究協力者

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

A．研究目的

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

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

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

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

B．研究方法

1．対象

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

2．方法

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

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

（倫理面への配慮）

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

C．研究結果

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

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

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

D．考察

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 1. 母毛髪水銀濃度・母体血中 MEHP 濃度と母児の属性との関連

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

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

*p < 0.05. **p < 0.01

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 2 . 水銀・フタル酸エステルの胎児期曝露による DNA メチル化への影響（重回帰分析）

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

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

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

: partial regression coefficient

*p < 0.05

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

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

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

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

: partial regression coefficient

*p < 0.05, **p < 0.01

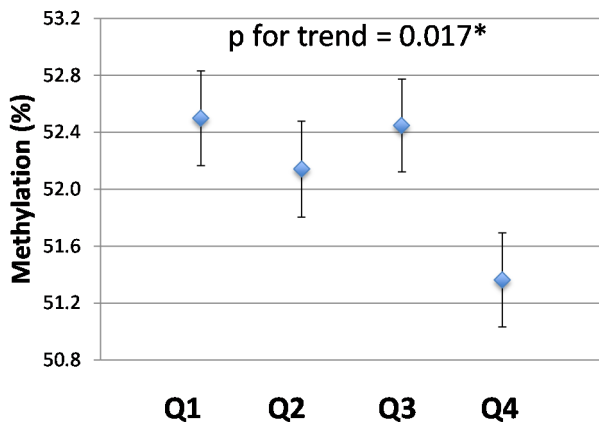


図1. 母体血 MEHP と臍帯血 H19 メチル化変化との関連の濃度依存 (N=187)

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

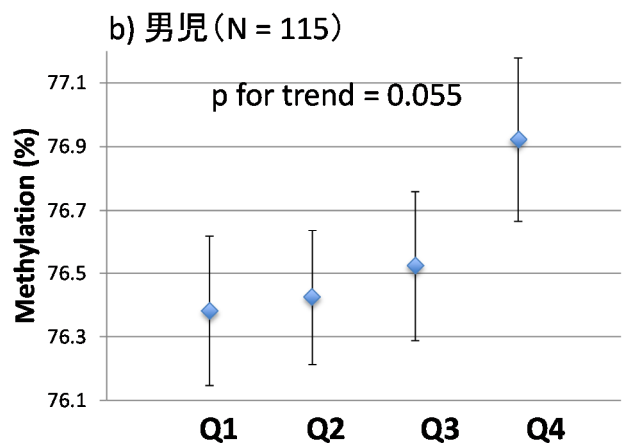
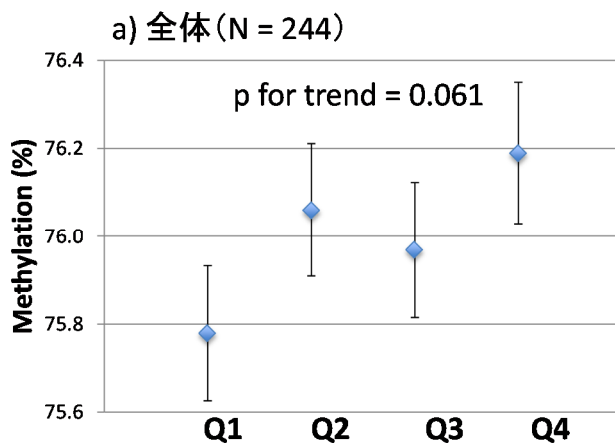


図2. 母毛髪水銀と臍帯血LINE1メチル化変化との関連の濃度依存

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

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

^aAdjusted for gestational age

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

β : partial regression coefficient, *p < 0.05

表4. LINE1およびH19DNAメチル化と出生時体格との相関

胎児期有機フッ素化合物曝露影響の臍帯血網羅的エピゲノム解析

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授

研究分担者 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授

研究分担者 宮下 ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究分担者 佐々木 成子 北海道大学大学院医学研究科 助教

研究分担者 石塚 真由美 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

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

札幌の一産科病院でリクルートし同意を得た妊婦 **514** 名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報・臍帯血・母体血中 **PFAAs** 濃度の得られた **164** 名を対象とし、イルミナ社 **Infinium Human Methylation450 BeadChip** を用いて臍帯血 **DNA** 約 **45** 万 **CpG** 部位の網羅的メチル化解析を行った。データは標準化、バッチ補正を行い、**log₁₀** 変換後の **PFOS**, **PFOA** 濃度との関連を **robust linear regression** で解析した。**False-discovery rate <.05**, 若しくは偏回帰係数の絶対値の大きさを基準にし、曝露と関連する **CpGs** のスクリーニングを行った。

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

研究協力者

小林 祥子, 三浦 りゅう, 安住 薫
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

中澤 裕之

(星薬科大学薬品分析化学教室)

有機フッ素化合物(**perfluoroalkyl acids; PFAAs**)は家庭用品、工業製品に使用されている化合物で、中でも **perfluorooctane sulfonate (PFOS)** は **2009** 年に **POPs** に指定され使用が制限された。しかしながら、難分解性のため未だ

A. 研究目的

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

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

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

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

B．研究方法

1．対象

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

2．方法

母体血中 **PFOS**、**PFOA** 濃度は **LC-MS/MS** により測定を行った。

DNA メチル化解析は、臍帯血 400 μ L から Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega 社)を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA は、**PicoGreen (Molecular Probes, Inc, USA)** による 2 本鎖 DNA 定量と電気泳動法により過度な断片化がない良質な DNA であることを確認した上で、その 500ng を材料に、**Zymo EZ**

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

上記の工程で得られたメチル化データを基に、クオリティーコントロール、**Functional normalization**(Fortin et al. 2014)、**ComBat**法(Leek et al. 2012)によるバッチ補正といった標準化作業によって約45万CpG配列のDNAのメチル化値(ベータ値)を得た。得られたベータ値は母年齢、児性別、母体血採血時期、**surrogate variables** (Leek and Storey 2007)で調整した**Robust linear regression** (Fox and Weisberg 2011)、経験ベイズ法を用いて \log_{10} 変換後のPFOS、PFOA曝露との関連を解析した。CpGsの抽出は先行研究で用いられた手法を参考に(Huang et al. 2015; Khulan et al. 2014)、以下の2点を基準とした(図1)。
i) **False-discovery rate** $q < 0.05$ 、もしくは、
ii) 曝露による影響(偏回帰係数の絶対値の大きさで定義)がPFOS ≥ 0.075 、PFOA ≥ 0.05 かつ $p < 0.05$ 。抽出されたCpGsは位置情報と照らし合わせ、同一遺伝子上で3CpGs以上スクリーニングされた

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

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

本研究の対象者、164組の母児の属性を表1に示した。対象者の母体血中PFOS濃度は中央値4.7 ng/mL (IQR: 3.1-6.7)、

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

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

表2に**(A)PFOS**、**(B)PFOA**の母体血中濃度との関連がみられた **CpGs**のうち、一遺伝子上で **3CpGs**以上抽出されてきたものを示した。**PFOS** 曝露では、**Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, N Polypeptide 2 (PTPRN2)**の **238 kbp**に渡る領域上の **9 CpGs**が **p** 値・偏回帰係数基準の双方で抽出され、その影響の向きも **1 CpG**を除き一致していた。その他、

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

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

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

表4に **Houseman**の手法(Houseman et al. 2012)で行った臍帯血中細胞組成の推定値、およびそれらと **PFOS**、**PFOA**

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

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

D . 考察

本研究で行った網羅的 **DNA** メチル化解析により、胎児期 **PFAAs** 曝露で影響を受ける可能性のあるメチル化部位が示され

た。

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

その他、**gene body** に位置する **3 CpGs** で **PFOS** 曝露による低メチル化が観察された **DNHD1** は、微小管輸送に関わるタンパク質をコードしており、プロモーター領域に **PPAR- α , γ 1, γ 2** の結合部位を持つ (**DECODE, SABiosciences**)。同様に **Gene body** 上の **3 CpGs** の高メチル化が見られた **KLHL35** についてもプロモーター領域に **PPAR- α , γ 1, γ 2** の結合部位を持つが (**DECODE, SABiosciences**)、遺伝子がコードしているタンパク質の機能は不明である。**Gene body** 上の **3 CpGs** で高メチル化が見られた **RPH3AL** がコードするタンパク質は内分泌・外分泌細胞での **Ca²⁺** 依存性エキソサイトーシスを調節しており、膵臓でのインスリン分泌で主要な役割を担っている。動物実験では **DBP** による発現低下が示されている (Gaido et al. 2007;

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

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

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

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

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

今回、臍帯血中の細胞組成の結果への影

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

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

E . 結論

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

F . 研究発表

1 . 論文発表

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

2 . 学会発表

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

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. **Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, et al. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. Genome Biol 2014;15(12):503.**

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 1. 母児の属性と PFAs 濃度との関連

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

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

Figure 1. 網羅的 DNA メチル化解析のフローチャート

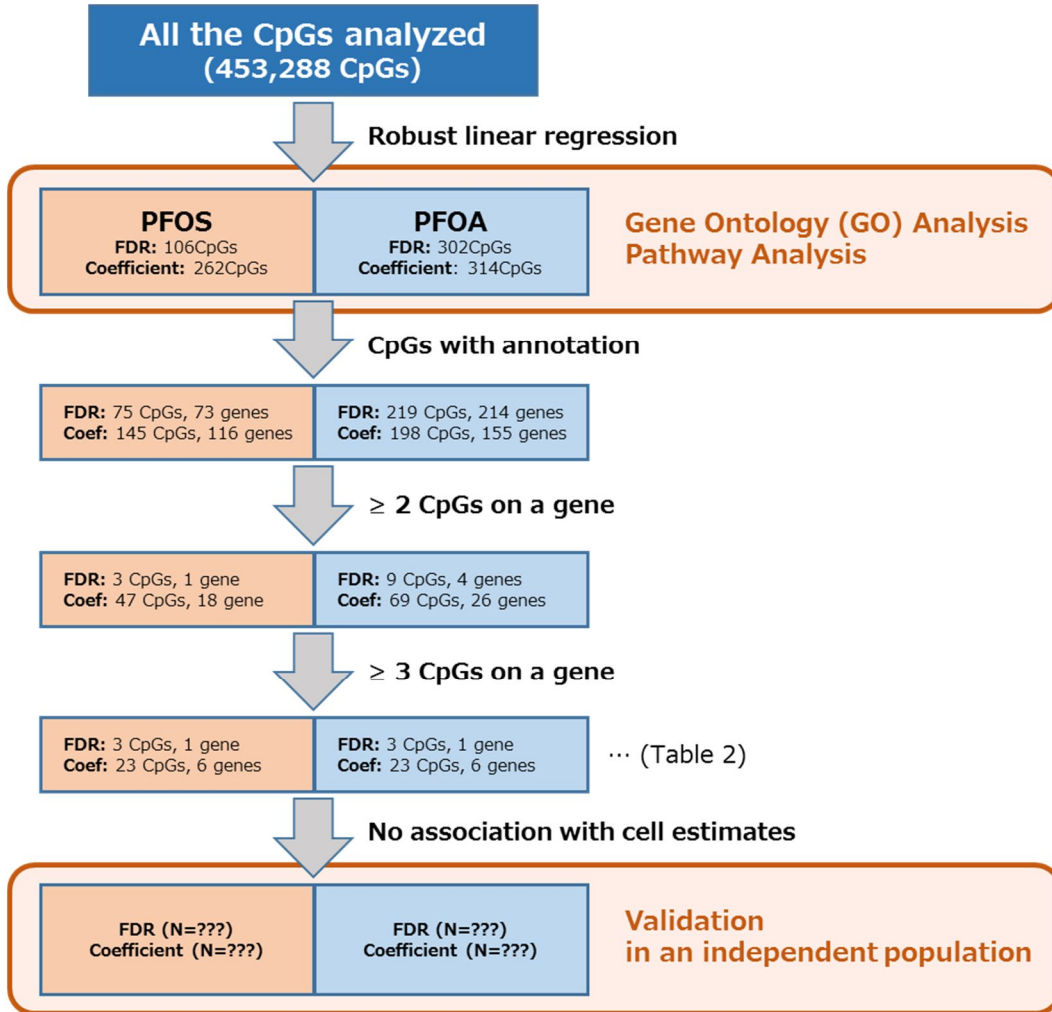
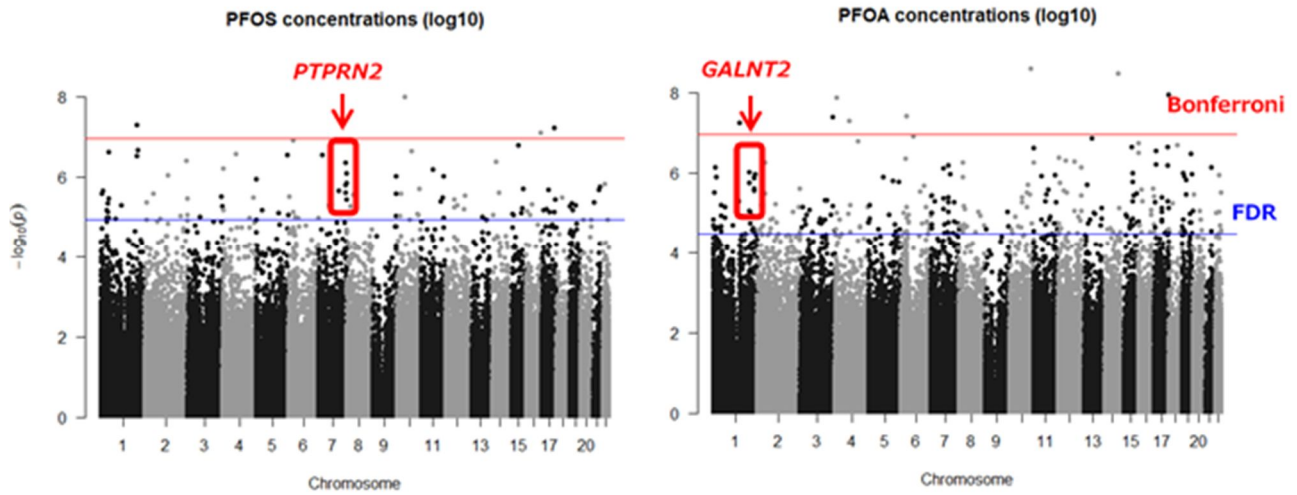


Figure 2. PFAAs 曝露と 45 万 CpGs メチル化との関連

(A) マンハッタン・プロット



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

(B) ボルケーノ・プロット

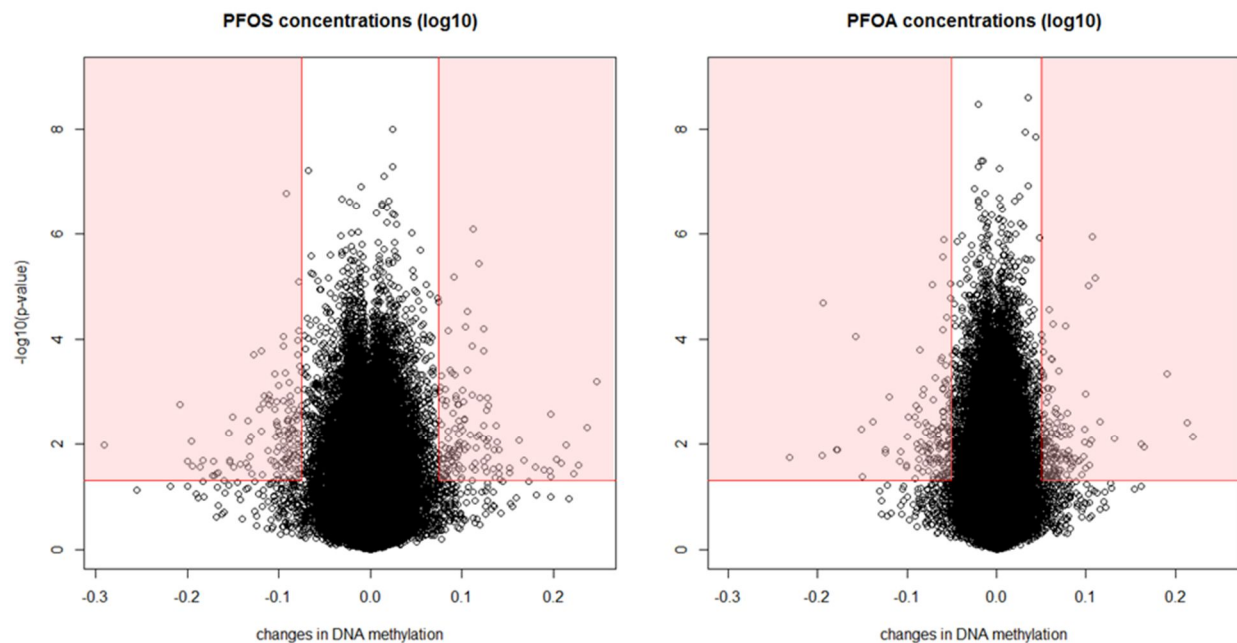


Figure 3. 抽出された CpGs の特徴

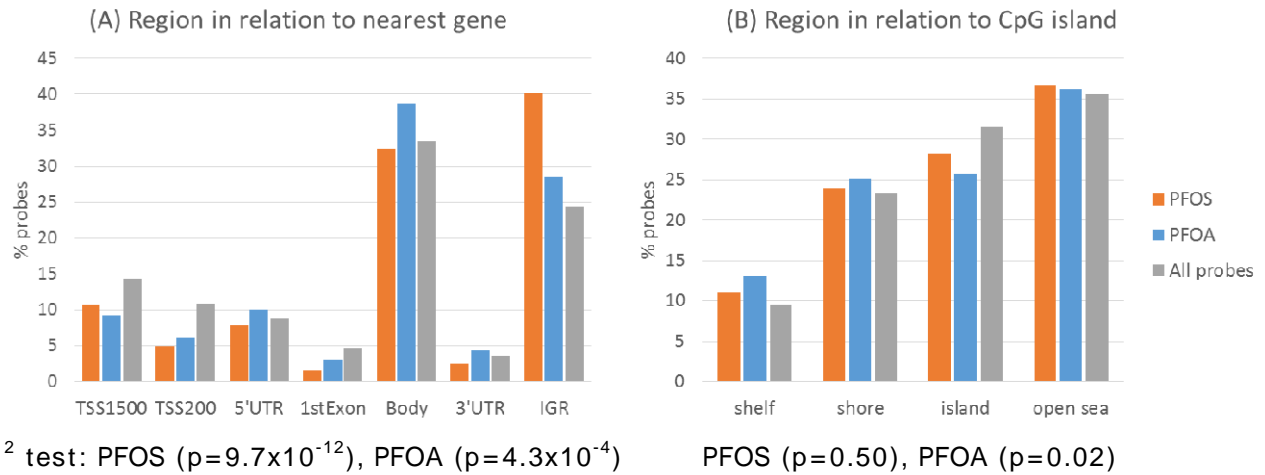


Table 2. Differentially methylated positions associated with PFOS and PFOA concentrations.

(A) PFOS

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

(B) PFOA

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Table 3. Differentially methylated regions indicated by Bumphunting method.

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

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

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

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

ρ: Spearman's correlation coefficient

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

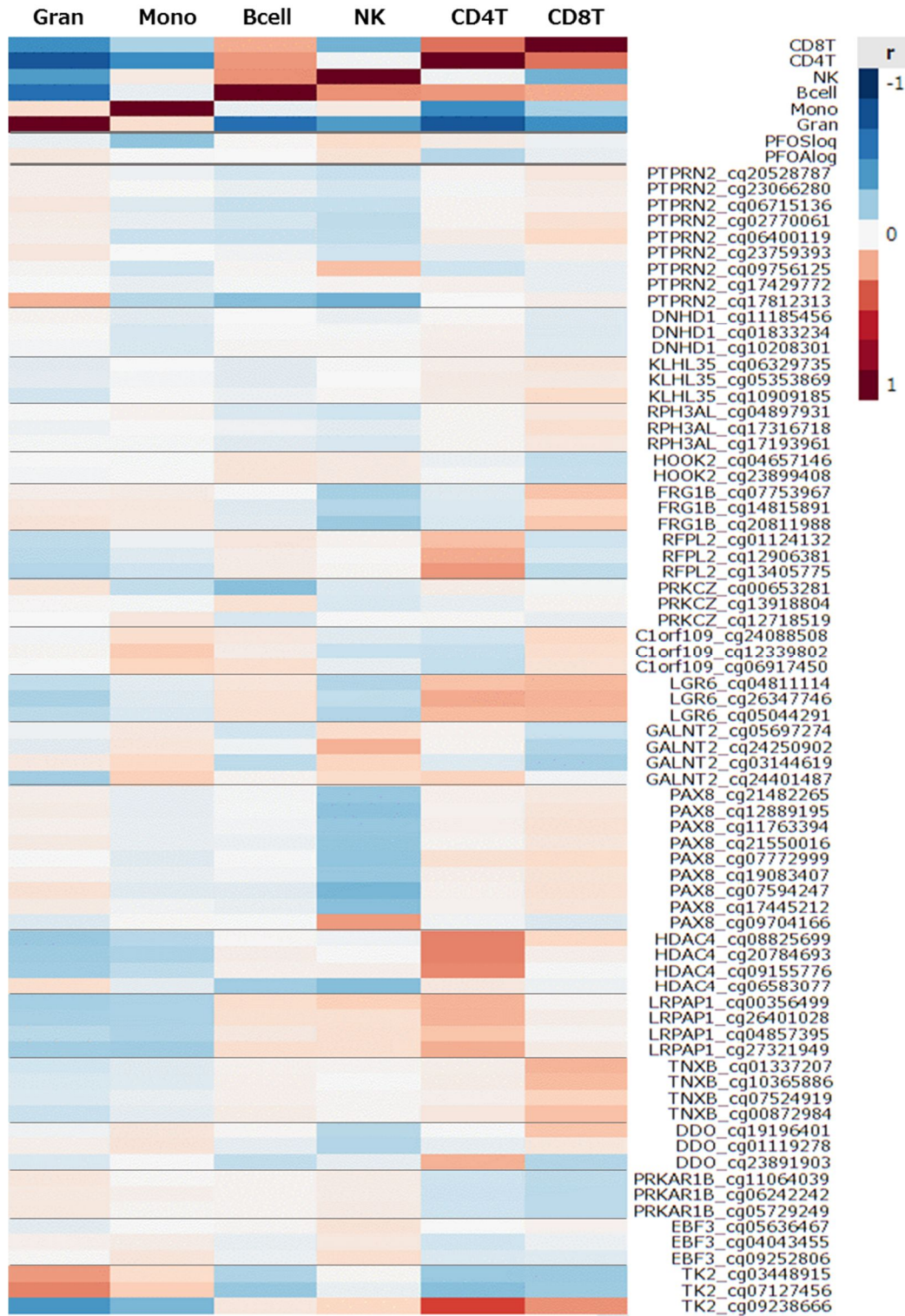
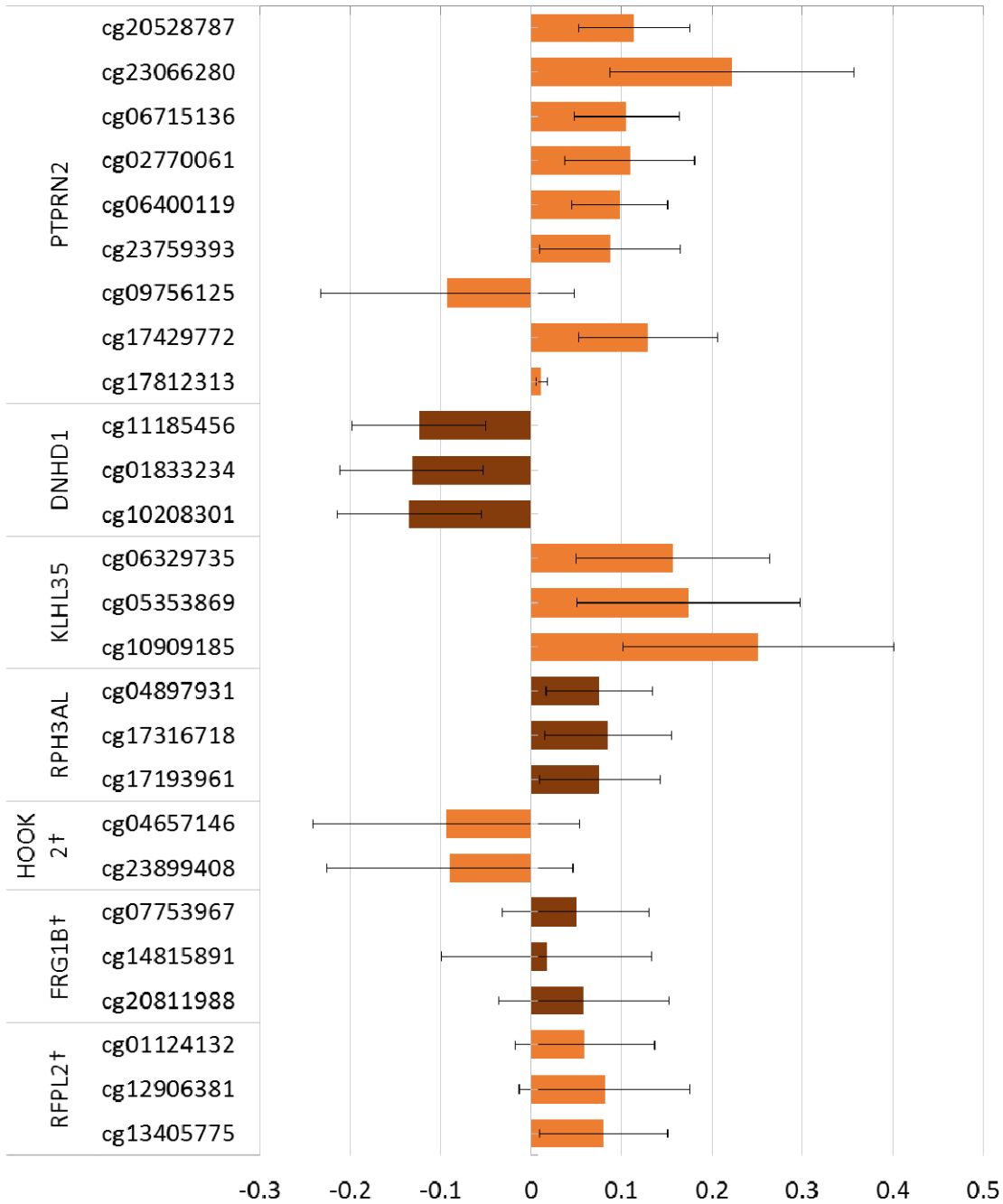


Figure 5. Changes in methylation with log₁₀-unit increase in PFOS and PFOA concentrations with adjustment for estimated cell proportion.

(A) PFOS

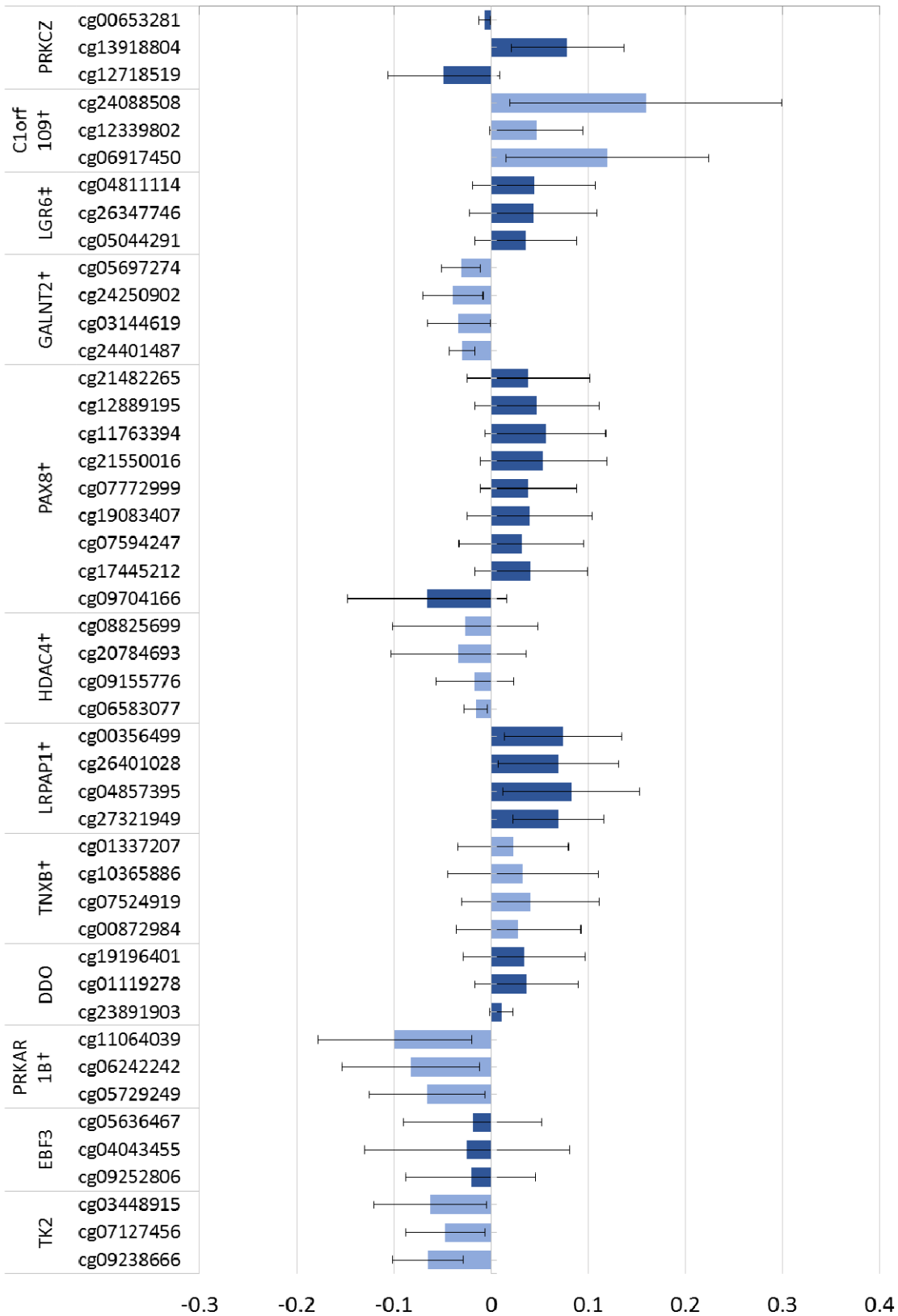


Adjusted for maternal age, infants sex, maternal blood sampling period, (†estimated cell proportion)

Error bars indicates 95% confidence intervals.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

(B) PFOA



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
13	小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, チチローラ・セリファト ブライモー, 荒木敦子, 宮下ちひろ, ホウマヌ ゴウダルジ, 小林祥子, 岸玲子	児の出生時体格に妊婦の喫煙とAHR, CYP1A, XRCC1遺伝子型の組み合わせが影響するー北海道スタディ	北海道医師	91(2)	79	2016
14	岸玲子	ISEE-ISES AC2016 開催報告(国際環境疫学会-国際曝露科学会 アジア支部総会)	Endocrine Disrupter News Letter	19(1)	3	2016
15	Grandjean P., Kishi R., Kogeninas M.	(ISEE) On behalf of the International Society for Environmental Epidemiology; Prevention of developmental neurotoxicity	Epidemiology	-	-	2016

16	荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第10回 乳幼児のアレルギーと胎児期・小児期の可塑剤・難燃剤曝露	公衆衛生	79 (12)	876-881	2015
17	宮下ちひろ, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第9回 乳幼児のアレルギー・感染症へのダイオキシン類、有機フッ素系化学物質曝露による影響	公衆衛生	79 (11)	805-810	2015
18	湊屋街子, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第8回 胎児期の環境化学物質曝露が出生体重と生後発育へ与える影響	公衆衛生	79 (10)	719-724	2015
19	佐々木成子, 小林澄貴, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第7回 喫煙、受動喫煙による児への影響	公衆衛生	79 (9)	637-643	2015
20	荒木敦子, アイツバマイゆふ, 岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第5回 短半減期化学物質の曝露実態	公衆衛生	79 (7)	485-490	2015
21	岸玲子	【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第1回 「奪われし未来」にしない	公衆衛生	79 (3)	193-199	2015

22	三井貴彦, 武田正之, 篠原信雄, 野々村克也, 荒木敦子, 岸玲子	環境化学物質がホルモン環境および身体的変化に与える影響について	Endocrine Disrupter News Letter	18 (1)	3	2015
23	荒木敦子, 宮下ちひろ, 岸玲子	胎児期の有機フッ素化合物曝露による児の健康への影響	Endocrine Disrupter News Letter	18 (1)	5	2015
24	宮下ちひろ, 岸玲子	胎児期のPCBsダイオキシン類による出生体重とアレルギー感染症に与える影響	Endocrine Disrupter News Letter	18 (1)	3	2015
25	岸玲子	世界における出生コホート研究の現状	Endocrine Disrupter News Letter	18 (1)	1	2015
26	小林澄貴, 佐々木成子, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子	妊婦の受動喫煙が児の出生時体格へ及ぼす影響: 遺伝的なハイリスク群について 環境と子どもの健康に関する北海道スタディ	北海道小児保健研究会会誌	-	35-39	2014
27	岸玲子	【公害・環境問題の変貌と新展開】環境化学物質の次世代影響 出生コホート研究による成果と今後の課題	公衆衛生	78 (8)	547-552	2014