



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 妊娠初期の血清葉酸濃度と先天異常リスクに関する研究：前向き出生コホート：環境と子どもの健康に関する北海道スタディによる検討                                   |
| Author(s)           | 伊藤, 久美子                                                                                         |
| Description         | 配架番号：2430                                                                                       |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第13374号                                                                                        |
| Issue Date          | 2018-12-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k13374">https://doi.org/10.14943/doctoral.k13374</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/72396">https://hdl.handle.net/2115/72396</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Kumiko_Ito.pdf                                                                                  |



# 学 位 論 文

妊娠初期の血清葉酸濃度と先天異常リスクに関する研究－前向き出生コホート：環境と子どもの健康に関する北海道スタディによる検討－

(Maternal serum folate concentrations in the first trimester and the risk of birth defects: the Hokkaido Study of Environment and Children's Health)

2018 年 12 月

北 海 道 大 学

伊 藤 久 美 子

## 目 次

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| 発表論文目録および学会発表目録                            | 1  |
| 要旨                                         | 2  |
| 略語表                                        | 5  |
| I. 緒言                                      | 7  |
| 1. わが国の乳児死亡・先天異常の動向                        | 7  |
| 2. 神経管閉鎖不全と葉酸との関連                          | 9  |
| 3. 葉酸の代謝と体内役割                              | 10 |
| 4. わが国の出産年齢にある女性の食事性葉酸および葉酸サプリメント<br>使用状況  | 12 |
| 5. わが国の神経管閉鎖不全の発症状況                        | 14 |
| 6. 葉酸と NTDs 以外の神経堤細胞から分化する先天異常に関する<br>先行研究 | 15 |
| 7. 本研究の目的                                  | 28 |
| II. 本論                                     | 28 |
| 1. 研究方法                                    | 28 |
| 1) 研究対象者                                   | 28 |
| 2) 倫理的配慮                                   | 31 |
| 3) 調査項目と測定方法                               | 31 |
| 4) 先天異常の定義と分類                              | 31 |
| 5) 統計解析                                    | 32 |
| 2. 結果                                      | 33 |
| 1) 対象者の属性                                  | 33 |
| 2) 妊娠初期の血清葉酸濃度                             | 35 |
| 3) 出生児の属性、妊娠初期の血清葉酸濃度と先天異常との関連             | 35 |
| 3. 考察                                      | 43 |
| 1) 妊娠初期の血清葉酸レベルと出生児の先天異常リスクとの関連            | 43 |
| 2) 器官形成における葉酸摂取の影響                         | 44 |
| 3) 母親の妊娠期の葉酸摂取と児の健康影響の検討                   | 45 |
| 4) 本研究の強みと弱み                               | 50 |
| 4. 結論                                      | 51 |
| 謝辞                                         | 52 |
| 利益相反                                       | 52 |
| 引用文献                                       | 53 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文・雑誌に発表した。

1. Kumiko Ito, Tomoyuki Hanaoka, Naomi Tamura, Seiko Sasaki, Chihiro Miyashita, Atsuko Araki, Sachiko Ito, Hisanori Minakami, Kazutoshi Cho, Toshiaki Endo, Tsuyoshi Baba, Toshinobu Miyamoto, Kazuo Sengoku, Akiko Tamakoshi, and Reiko Kishi  
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  
Journal of Epidemiology, vol. 29(4) (online 10.13, 2018)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 伊藤久美子, 佐々木成子, Yila T. A., 馬場俊明, 宮下ちひろ, 檜野いく子, 岡田恵美子, 小林澄貴, 吉岡英治, 岸玲子  
環境と子どもの健康に関する北海道スタディ (1) 妊婦葉酸値と先天異常リスクとの関連.  
第 81 回日本衛生学会学術総会, 平成 23 年 3 月 25-28 日 (東日本), 東京

## 要旨

【背景と目的】先天異常は乳幼児死亡の主要死因であり、その病因は環境要因が3割程度を占める。1980～90年代の世界的な大規模疫学研究により、妊娠前の葉酸摂取に神経管閉鎖不全の予防効果が報告された。1998年にはアメリカ、カナダ、コスタリカで穀物への葉酸添加が義務付けられ、3～6年後には神経管閉鎖不全を有する子どもの出生は19～46%減少した。神経管は神経堤細胞由来の器官で、同じ細胞由来の先天性心疾患や口唇口蓋裂も葉酸摂取との関連が研究されている。しかし、先行研究の殆どはケースコントロール研究により妊娠前後の葉酸摂取と先天異常との関連を評価しており、結果へのバイアス影響は否めない。また、出産後の血中葉酸濃度と先天性心疾患や口唇口蓋裂との関連を評価した研究もあるが、出産後の母親の血中葉酸濃度は、器官形成期の葉酸濃度と同じではない。前向きコホート研究により、妊娠期初・中期の母親の血中葉酸濃度と先天性心疾患や口唇口蓋裂等との関連を検討した研究が2編あるが結果は一致しておらず、妊娠期の葉酸濃度と神経管閉鎖不全以外の先天異常との関連は明確ではない。また、先行研究の多くは欧米、中国の研究で、日本において葉酸と先天異常との関連を評価した前向き研究はない。そこで、本研究は、北海道における前向きコホート研究により妊娠初期（妊娠14週未満）の母体の血清葉酸濃度と出生児の先天異常との関連を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】(1) 対象者：2003年2月から2013年3月までに北海道の37産科施設を受診し、研究参加に同意した妊婦20,940名。(2) データ収集方法：自記式質問調査票によって母親の年齢、身長、妊娠前体重、既往歴、産科歴、教育年数、先天異常の家族歴、生殖補助医療利用、妊娠前の喫煙、飲酒、妊娠初期の常用薬剤使用、葉酸サプリメント使用などの情報を得た。また、妊娠初期の血清葉酸濃度を測定。出生児の先天異常情報は、出生7日以内に出生施設に、環境要因の関与が考えられる先天異常55疾患からの選択とそれ以外の先天異常は疾患名の記載を依頼。さらに、産後1年、2年の母親への自記式質問調査票からも先天異常情報を得た。先天異常内容は、新生児医師の確認を得た。先天異常は、発生器官別および神経堤細胞由来器官の先天異常（先天性心疾患、口唇裂・口蓋裂、尿道下裂、四肢欠損）に分類した。本研究では、多胎、妊娠第12週未満の出産、複数器官の先天異常のある場合は解析から除外し、最終的な解析対象者は14,896名であった。(3) 統計解析：母親の属性と血清葉酸濃度との

関連はウィルコクソン符号順位検定、クラスカル・ウォリス検定、母体の血清葉酸濃度（自然対数変換値）と出生児の先天異常との関連はロジスティック回帰分析を用いて検討した。（4）倫理的配慮：北海道大学大学院医学研究科および北海道大学環境健康科学教育センターの倫理委員会の承認を得た。また、研究参加者には書面および口頭で研究目的、内容、個人情報保護、参加の自由意思尊重などを説明し、同意を得た。

【結果】（1）対象者の属性：母親の年齢は 29.8 歳、妊娠前 BMI は標準（18.5～24.9 kg/m<sup>2</sup>）群 71.6%、初産婦 42.5%、妊娠前の飲酒習慣 13.2%、喫煙者 39.3%、生殖補助医療の利用 4.0%、先天異常の家族歴あり 2.2%であった。妊娠初期の常用薬使用 37.7%、葉酸サプリメント使用 22.6%であった。（2）妊娠初期の血清葉酸濃度：血液採取時期は妊娠 10.8 週、血清葉酸濃度の中央値 16.5nmol/L、血清葉酸濃度の低値（6.8nmol/L 未満）は 0.7%であった。血清葉酸濃度が高かったのは、母親の年齢が高く、妊娠前 BMI が標準群、教育年数 12 年より長く、初産婦、非喫煙者、生殖補助医療利用者、先天異常の家族歴あり、そして妊娠初期の葉酸サプリメント使用者であった。先天異常を有する児の母親および先天異常のない児の母親の血清葉酸濃度の中央値はいずれも 16.5nmol/L であった。

（3）出生児の属性、妊娠初期の血清葉酸濃度と先天異常との関連：児の在胎週数は 38.6 週、出生児に先天異常がみられたのは 2.4%（358 名）であった。先天異常で最多は心室中隔欠損症 61 児であった。神経堤細胞由来器官の先天異常は 161 児で、そのうち神経管閉鎖不全 6 児、先天性心疾患 125 児、顔面裂 21 児であった。血清葉酸濃度（自然対数変換値）との関連では、神経系および口唇口蓋裂リスクに対数変換した血清葉酸濃度が 1 単位上昇する毎の調整後オッズ比の上昇傾向がみられた（それぞれ、オッズ比[95%信頼区間]；1.35 [0.28-6.48], 1.94 [0.66-5.80]）。一方、尿路系、筋骨格系の対数変換した血清葉酸濃度が 1 単位上昇する毎の調整後オッズ比は減少傾向がみられた（それぞれ、オッズ比[95%信頼区間]；0.47 [0.15-1.45], 0.61 [0.30-1.24]）。神経堤細胞由来器官の先天異常では、心房中隔欠損症や口唇裂の対数変換した血清葉酸濃度が 1 単位上昇する毎の調整後オッズ比上昇傾向がみられた（それぞれ、オッズ比[95%信頼区間]；2.72 [0.49-10.53], 4.10 [0.96-17.58]）が、先天性心疾患、心室中隔欠損症の対数変換した血清葉酸濃度が 1 単位上昇する毎の調整後オッズ比は減少傾向がみられた（それぞれ、オッズ比[95%信頼区間]；0.83 [0.50-1.37], 0.63 [0.30-1.33]）。しかし、いずれの関連も統計学的に有意ではなかった。また、血清葉酸濃度を四分位によって評価したが、器官別の先天異

常、神経堤細胞由来の先天異常のいずれにも関連はみられなかった。

【考察】妊娠初・中期の葉酸濃度と児の先天性心疾患や口唇口蓋裂との関連を検討した先行研究 2 編のうち、Hammouda SA ら（2013）は、先天異常を有する児の母親の妊娠初期の血清葉酸レベルは平均 40.85 nmol/L、先天異常のない児の母親は平均 50.50 nmol/L で両者間に有意な差があった

( $P<0.001$ )。しかし、彼らの研究は対象者が 1,180 名と少なく、社会経済要因、妊娠前 BMI、喫煙習慣などの交絡影響が考慮されていない。Shaw ら（2009; 2014.）は、アメリカ・カルフォルニア州の妊婦の妊娠 15～18 週時の血清葉酸濃度を測定し、円錐動脈幹異常や口唇裂を有する児の出生とは、本研究と同様に関連はなかったことを報告。その理由として、既にカルフォルニア州では穀物の葉酸添加が行われ、日常的な葉酸摂取ができていることを挙げている。本研究でも、血清葉酸濃度低値者が 0.7%であり、葉酸濃度が十分である対象であったことが関連がみられなかった要因の一つであると考え。本研究の強みは前向きコホート研究によって、客観的指標である血清葉酸濃度と先天異常との関連を評価したことである。一方で、先天異常情報の一部を母親から得たことによる誤分類や葉酸濃度評価に食事内容の影響を受ける血清葉酸値を使用したことによる過大あるいは過少評価の可能性、サンプルサイズ、そして、本研究では測定しなかった要因などが結果に影響した可能性もある。

【結論】母親の妊娠初期の血清葉酸濃度と出生児の先天異常に有意な関連は認められなかった。しかし、前向きコホート研究により妊娠初期の葉酸濃度を測定し、器官形成期の葉酸と先天異常発生リスクとの関連を検討した基礎的研究としての意義がある。今後も大規模コホート研究によって妊娠初期の血清葉酸濃度、葉酸代謝遺伝子多型、環境要因と先天異常との関連を検討し、環境要因による先天異常発症予防に向けたエビデンスを提示していく必要がある。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ASD: atrial septal defect; 心房中隔欠損症

BMI: body mass index; 体格指数

CBS: cystathionine- $\beta$ -synthase; シスタチオニン合成酵素

CC(H): hospital based case-control study

； 病院ベースケースコントロール研究

CC(P): population based case-control study

； 集団ベースケースコントロール研究

CC: case-control study; ケースコントロール研究

CHDs: congenital heart defects; 先天性心疾患

CI: confidence interval; 信頼区間

Cohort (P): prospective cohort study; 前向きコホート研究

Cohort (R): retrospective cohort study; 後ろ向きコホート研究

DNA: deoxyribonucleic acid; デオキシリボ核酸

EUROCAT: European surveillance of congenital anomalies

； 欧州先天奇形サーベイランス

HAVEN study: Heart Defects, Vascular Status, Genetic Factors and  
Nutrition study

ICBDMS: International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring  
Systems; 国際先天異常監視機構

ICBDSR: International Clearinghouse for Birth Defects, Surveillance  
and Research; 国際先天異常調査研究機構

ICD 10th: International Classification of Diseases, tenth Revision 10<sup>th</sup>  
； 疾病及び関連保健問題の国際統計分類（国際疾病分類 2013 年版）

IQR: Interquartile Range; 四分位範囲

JAOG: Japan Association of Obstetricians and Gynecologists  
； 日本産婦人科医会

MS: methionine synthase; メチオニン合成酵素

MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase  
； メチレンテロラヒドロ葉酸還元酵素

MTRR: methionine synthase reductase; メチオニン合成酵素還元酵素

NCCs: neural crest cells; 神経堤細胞

NTDs: neural tube defects; 神経管閉鎖不全

ORs: odds ratios; オッズ比

OFC: orofacial cleft; 口腔顔面裂

OTDs: outflow tract defect; 流出路障害

SD: standard deviation; 標準偏差

VSD: ventricular septal defect; 心室中隔欠損症

WHO: world health organization; 世界保健機構

## I. 緒言

### 1. わが国の乳児死亡・先天異常の動向

わが国の 2016 年の乳児死亡率は 2.0（出生 1,000 対）であり、アメリカ合衆国 5.9（2015 年）、ドイツ 3.3（2015 年）、イギリス 3.9（2015 年）など欧米諸国と比較しても非常に低率である。乳児死亡の原因の第 1 位は長年にわたり「先天奇形、変形および染色体の異常（以後、先天異常等とする）」（国際疾病分類 2013 年版：International Classification of Diseases, tenth Revision; ICD 10<sup>th</sup>; Q00-Q99）であり、全乳児死亡の 34.4%を占める（わが国の人口動態，政府統計，<https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/81-1a2.pdf>。）（図 1）。

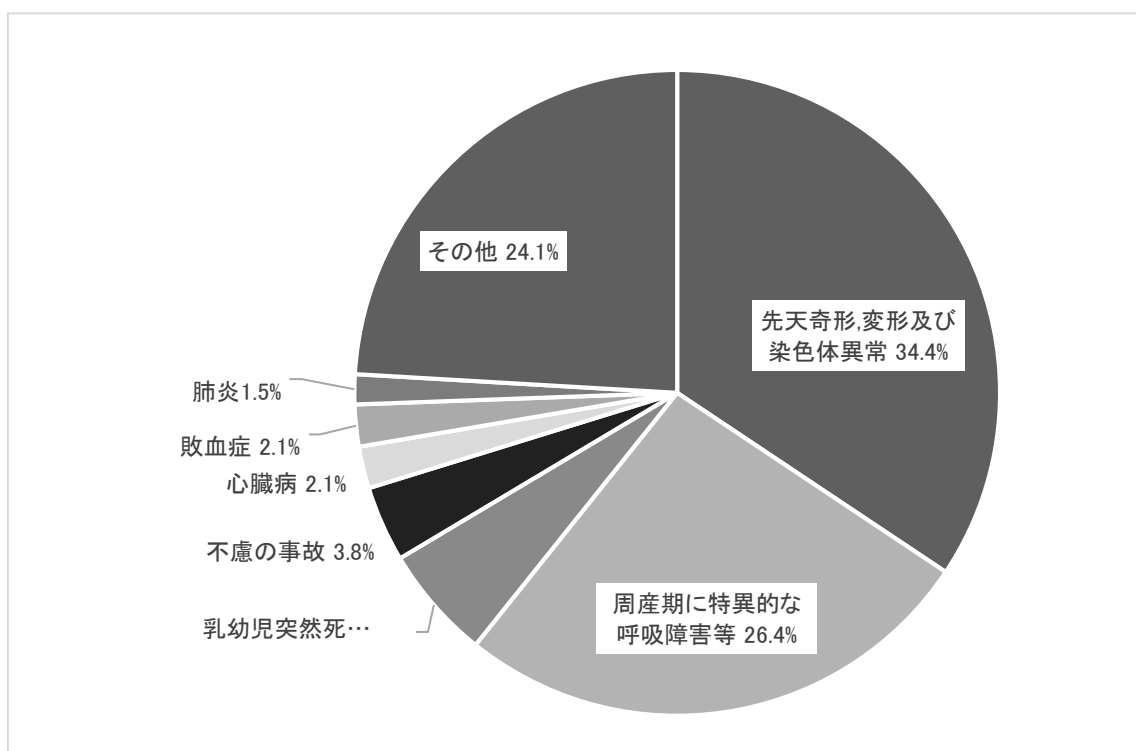


図 1. 乳児死亡数の死因別割合

（わが国の人口動態、政府統計、<https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/81-1a2.pdf>。

2018 年 8 月 11 日アクセス。より作成）

先天異常の成因は、「原因不明」50～60%、複数の遺伝子要因と複数の環境要因が複合して先天異常の発生に関与する「多因子遺伝」20～25%、21 trisomy やクラインフェルター症候群などの「染色体異常」6～7%、「突然変異」7～8%、薬剤・化学物質・感染などの催奇形性のある「環境要因」7

～10%である（図 2）。（瀬口ら訳, Moore et al., 著, 2007） つまり、先天異常の原因のうち少なくとも 3 割以上に環境要因が関与していることになる。

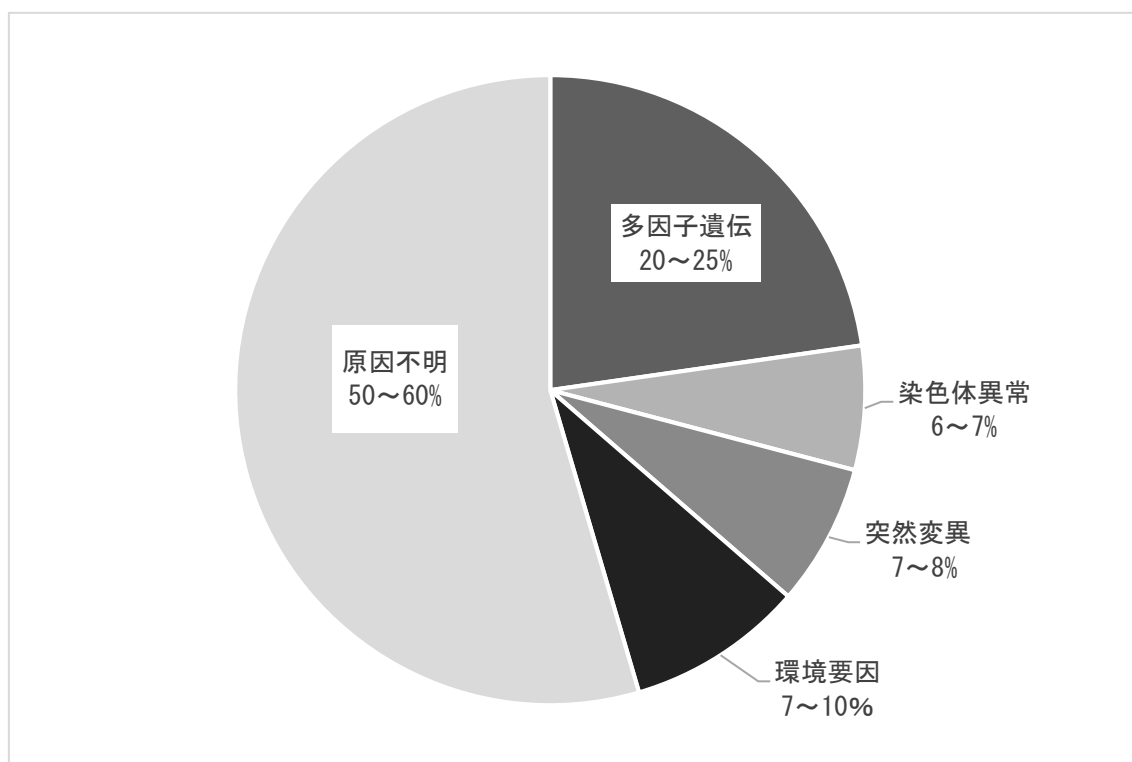


図 2. 先天異常の成因

（瀬口ら訳, Moore ら著, Before we are born Essentials of Embryology and Birth Defects, 受精卵からヒトになるまで, 原著第 6 版基礎的発生学と先天異常, (2007). 東京, 医歯薬出版, より作成）

ヒトの受精卵は細胞分裂を繰り返し、胎齢 2 週目の初めには内胚葉、外胚葉の 2 層性杯盤を形成し、胎齢 3 週の初めには外胚葉と内胚葉の中間に中胚葉が形成され 3 層杯盤が形成される。これ以後の組織・器官はこの 3 胚葉から形成され、その変化は各胚葉において同時に平行して、相互に複雑に影響を及ぼしながら進行していき、胎齢 8 週末までには多くの器官が形成される。この胎齢 8 週末までを胚子（胚）、この期間を胚子期といい、器官形成の時期にあたる（図 3）。催奇形因子が胎齢 2 週までに作用すると胚子を死亡させるが、その一方でほんの僅かの細胞を障害した場合は、初期胚子の強力な調整能力により異常が修復され、先天異常を起こすことなく胚子を発生させる。胚子の器官形成期（胎齢 3～8 週）に催奇形因子の影響を受けると主要な先天異常を誘発する。また胎齢 9 週以降の胎児期に影響を受け

ると外耳の小さな形態異常や精神発達障害などの機能障害を起こしやすい。胎子期の器官や組織発生には、その発生に障害を受けやすい臨界期がある（瀬口ら訳, Moore et al 著, 2007; 藤本十四秋ら, 2010.）。

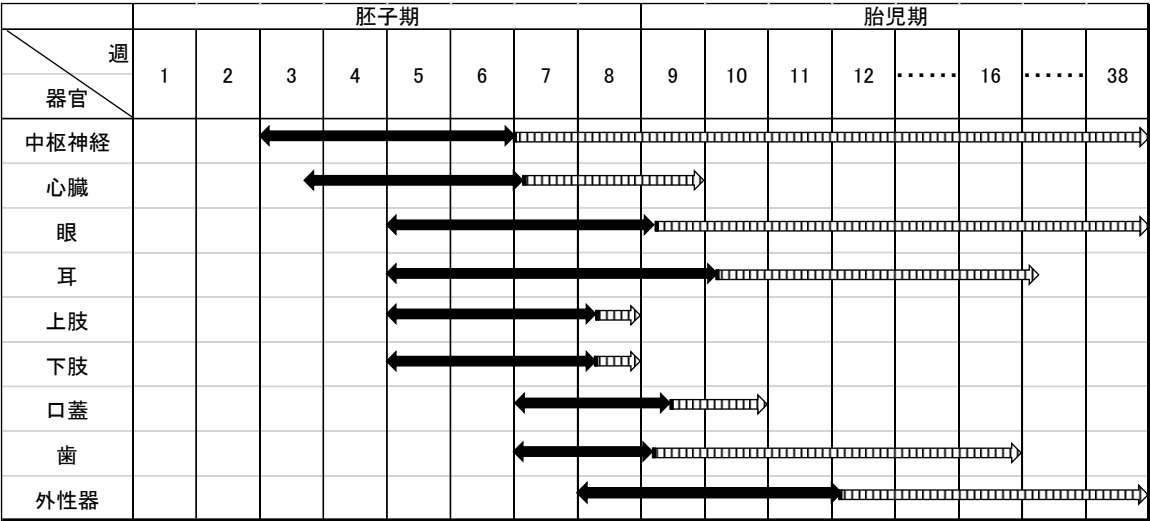


図 3. 器官別臨界期

（実線：著しい形態異常を生じやすい時期  
破線：軽度の異常や機能障害を起こしやすい）

（訳 瀬口春道, 小林俊博, Eva Garcia del Saz. 著 Moore, Persaud. Before we are born Essentials of Embryology and Birth Defects, 受精卵からヒトになるまで, 原著第 6 版基礎的発生学と先天異常. (2007). 東京, 医歯薬出版; 藤本十四秋, 受島敦美, 医学要点双書発生学第 6 版. (2010). 京都, 金芳堂.より一部加筆作成）

衛生環境や栄養状況の向上、医療の安全・医療技術の高度化によって新生児・乳児死亡が大きく改善されているわが国では、環境要因と先天異常発生要因を解明することは重要な公衆衛生上の課題である。

## 2. 神経管閉鎖不全と葉酸との関連

先天異常の約 2 割を占める多因子遺伝には、神経管閉鎖不全（neural tube defects; NTDs）、先天性心疾患（congenital heart defects; CHDs）、口唇・口蓋裂、先天性股関節脱臼のような単一の主要な先天異常が多く含まれる。多因子遺伝による先天異常の中でも NTDs は、胎齢 4 週までに起こる神経管の閉鎖不全で、一次脳瘤、無脳症、脊髄髄膜瘤、二分脊椎が含まれる。神経管閉鎖不全のうち、二分脊椎の 1970 年代後半の発生頻度は出生

1,000 に対して、アメリカ（アトランタ州）6.58、ハンガリー8.42、メキシコ 12.9、オーストラリア 8.37、ニュージーランド 11.67 であった（Annual Report 2014, International Clearinghouse for Birth Defects, Surveillance and Research; ICBDSR; 国際先天異常調査研究機構, <http://www.icbdsr.org/resources/annual-report/>。）。現在良く知られている NTDs と妊娠前の葉酸摂取との関連については、1976 年にイギリスで NTDs を持つ母親の妊娠初期の赤血球葉酸濃度が有意に低値であることが報告されたのが最初である（Smithells et al., 1976）。1980～90 年代には世界各地で大規模な介入研究が行われ、妊娠前の葉酸摂取に神経管閉鎖不全の予防効果があることが確認された（Smithells et al., 1981; Berry RJ et al., 1999; MRC Vitamin Study Research Group, 1991; Czeizel AE et al., 1992）。それを受けて 1990 年代後半にはアメリカ、カナダ、コスタリカで小麦粉への葉酸添加が義務付けられ、現在では 87 か国で穀物への葉酸添加が義務付けられるに至った（Countries with industrially milled flour and/or rice fortification legislation, Food Fortification Initiative June 2018, [http://www.ffinetwork.org/global\\_progress/index.php](http://www.ffinetwork.org/global_progress/index.php)。）。また、アメリカ、カナダ、コスタリカでは、穀物への葉酸添加が義務化して 3～6 年後の NTDs 児の出生頻度が 19～46%減少したことが報告されている（Crider KS et al., 2011）。

### 3. 葉酸の代謝と体内役割

葉酸は緑黄色野菜、大豆、レバーなどに多く含まれるビタミン B 群の水溶性ビタミンである。化学名はプテロイルグルタミン酸で、プテリジン基、パラアミノ安息香酸、L- グルタミン酸からなる（図 4；葉酸構造式）。哺乳類は体内でプテリジン基を合成することはできるが、安息香酸は合成できないため体外からの葉酸摂取が必要である。

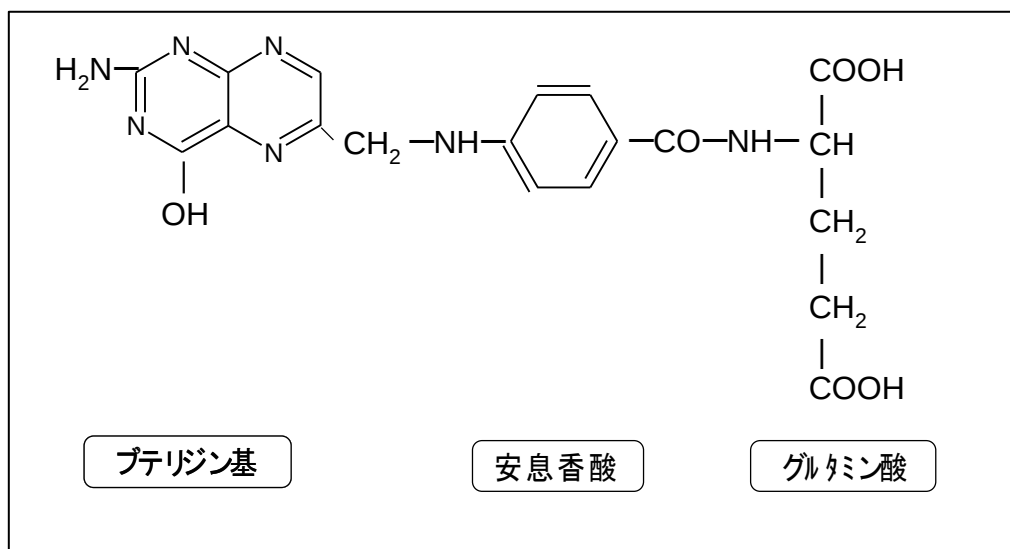


図 4. 葉酸構造式

体内に吸収された葉酸は、体内でジヒドロ葉酸からテトラヒドロ葉酸となる。このテトラヒドロ葉酸から葉酸代謝回路を経て産生されるテトラヒドロ葉酸誘導体は、核酸合成に必須のプリン塩基合成、DNA (deoxyribonucleic acid; デオキシリボ核酸) 合成に必須のチミジル酸合成、アミノ酸代謝にとって重要な役割を果す。この葉酸代謝サイクルの主要な働きを担う補酵素が MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase; メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) であり、MTHFR 活性に大きく影響する補酵素として MS (methionine synthase; メチオニン合成酵素)、MTRR (methionine synthase reductase; メチオニン合成酵素還元酵素)、CBS (cystathionine-β-synthase; シスタチオニン合成酵素) がある。また、蛋白合成過程であるメチオニン回路では、ホモシステインが葉酸代謝回路で生成されるメチル基を受け取る一炭素単位の転移反応によりメチオニンへ転換される。その結果、葉酸回路では DNA の合成・修復、メチオニン回路では DNA やヒストンのメチル化が起こる (住吉, 2004; 佐久間監訳, Agamemnon Despopoulos et al., 2007; 日本ビタミン学会監修, 香川靖雄ら編集, 2008; 平原, 2009) (図 5)。葉酸は妊娠初期の神経堤細胞の増殖・維持に関与する遺伝子発現に寄与する。そのため、この時期に細胞内葉酸が欠乏することで神経管の閉鎖に支障をきたすと考えられている (Boshnjaku V et al, 2012; Ichi et al, 2010; 2013)。

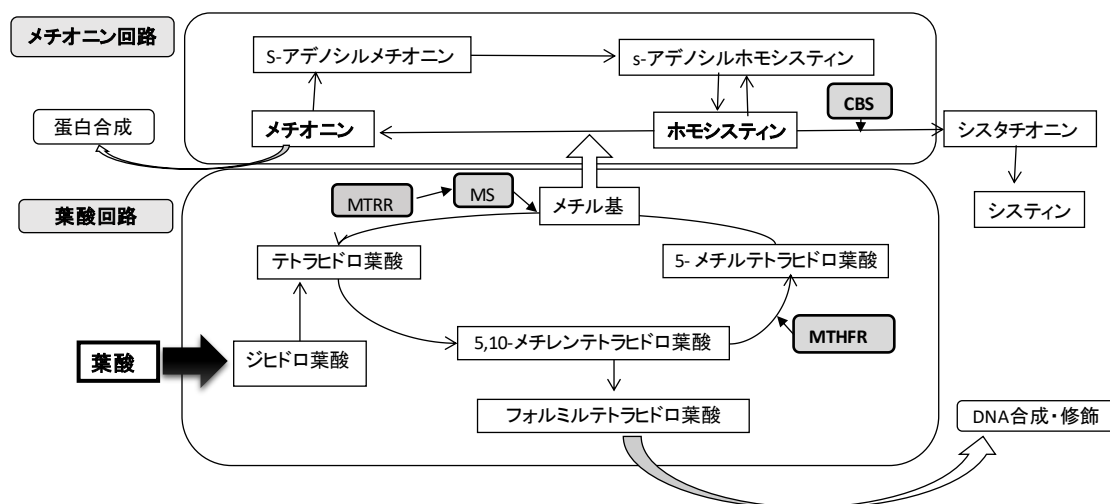


図 5 葉酸代謝

MTHFR: メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素

MS: メチオニン合成酵素

MTRR: メチオニン合成酵素還元酵素

CBS: シスタチオニン合成酵素

一瀬沙織ら. 医療・生命-P3095 簡便で高感度な血中の動脈硬化性疾患の危険因子の分析ヒト血漿中の葉酸関連化合物の LC-MS 分析 [www.jsac.or.jp/tenbou/TT57/P14.html](http://www.jsac.or.jp/tenbou/TT57/P14.html). Accessed 28.04.16. より一部加筆.

#### 4. わが国の出産年齢にある女性の食事性葉酸および葉酸サプリメント使用状況

わが国では穀物への葉酸添加は義務化されていないが、厚生省（現・厚生労働省）は 2000 年 12 月 28 日に「神経管閉鎖障害の発症リスクの低減に関する報告書」に基づき都道府県、政令市、特別区、および保健医療関係者へ「神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について」により「妊娠を計画する女性は、栄養バランスに留意した食事を摂り、妊娠 1 か月以上前から妊娠後 3 か月まで食品からの葉酸摂取量に加えて葉酸サプリメントを 1 日 400 $\mu$ g 内服することで神経管閉鎖障害のリスクが低減される」旨の情報提供の必要性を通知した。また、18～49 歳女性の 1 日あたりの食事性葉酸の摂取推奨量を 240 $\mu$ g/日とし、妊娠を計画している女性はさらに 400 $\mu$ g/日の葉酸サプリメントの摂取を勧めている（神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について，厚生労働省，[https://www.mhlw.go.jp/www1/houdou/1212/h1228-1\\_18.html](https://www.mhlw.go.jp/www1/houdou/1212/h1228-1_18.html)）。葉酸補充の勧告が出された以降の妊婦の葉酸サプリメント利用状況は、近藤らが 2002～

2011 年に全国の産婦人科医 250 人の協力により 11,861 名の妊婦を対象として調査した結果、葉酸摂取による神経管閉鎖障害リスク低減の認知率は 15.3%から 43.7%へ上昇し、また、葉酸サプリメント使用率も 9.1%から 61.5%へ上昇したことを報告している（近藤ら, 2013）。しかし、2011 年に東北地方で 127 名の妊婦を対象にした調査の葉酸摂取による神経管閉鎖障害リスク低減の認知率は 32.0%であった（小林ら, 2013）。また、2012 年に行われた全国インターネット調査は、20 代から 40 代女性の 71%が妊娠 3 か月までに葉酸強化食品、サプリメント、市販薬（医薬品）のいずれかから葉酸を摂取し、中部以北で摂取者が多かったことが報告されている（佐藤ら, 2014）。したがって、妊娠初期の妊婦のサプリメント摂取は地域や調査対象により大きく結果が異なっている現状にある。また、国民健康・栄養調査によると、20～29 歳、30～39 歳女性の 1 日食事性葉酸摂取量平均はそれぞれ 2001 年 263 $\mu$ g、262 $\mu$ g から 2016 年 229 $\mu$ g、240 $\mu$ g といずれも減少しているのみならず、18～49 歳女性の摂取推奨量 240 $\mu$ g/日を 20 歳代はわずかながら下回っている（平成 28 年国民健康・栄養調査報告, 2001 年～2016 年調査結果, 厚生労働省, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/dl/h28-houkoku-04.pdf>。）（図 6）。2000 年に厚生労省から神経管閉鎖障害リスク低減のための葉酸摂取勧告が出されたにもかかわらず、食事性葉酸摂取量は増加どころか減少傾向にあるのがわが国の現状である。

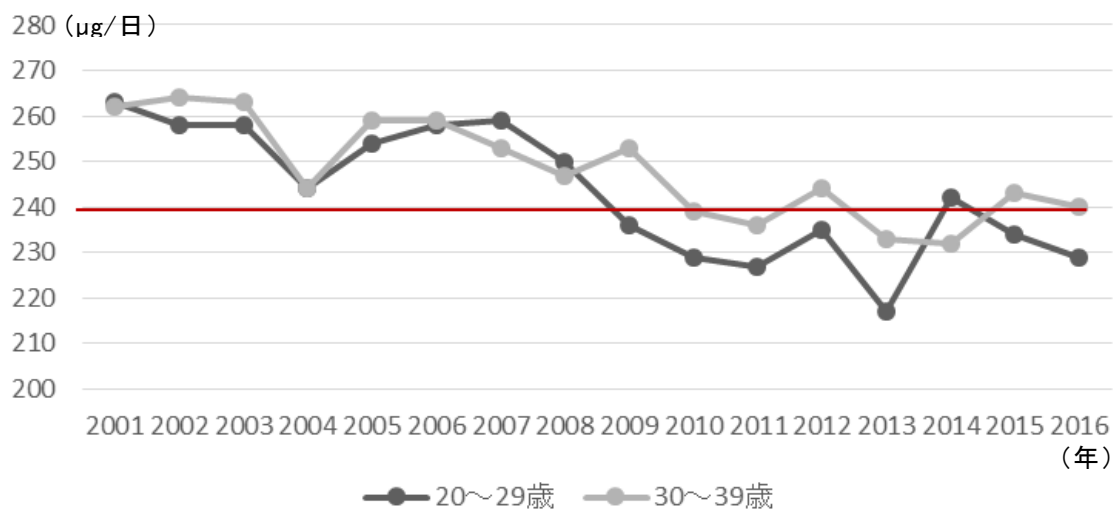


図 6. 女性の 1 人 1 日あたりの葉酸摂取量の推移

平成 28 年 国民健康・栄養調査報告，厚生労働省．  
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/dl/h28-houkoku-04.pdf>. Accessed 13.6.18. より作成

## 5. わが国の神経管閉鎖不全の発症状況

わが国では、1972 年より日本母性保護医協会（現日本産婦人科医会）が全国規模の病院ベースの先天異常モニタリングを開始した。その後、横浜市立大学国際先天異常モニタリングセンター（現、クリアリングハウス国際モニタリングセンター日本支部）（Japan Association of Obstetricians and Gynaecologists: JAOG）において解析・検討が行われるとともに、国際先天異常監視研究機構（International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems: ICBDMs）に参画し、国際的な情報交換を行っている。JAOG は全国 270 登録出産施設（発足当時の登録出産施設は 331 施設）から妊娠 22 週以降、生後 7 日以内に診断された先天形態異常のモニタリングを行い、主要な先天異常の発生状況を解析しており、これは日本の全出産児の約 10%を占めている。その結果をみると、日本人では心血管形態形成異常、口唇口蓋裂、四肢形態異常、ダウン症などの発生頻度が高い（平原, 2011）。

わが国の二分脊椎の発生頻度は、1970 年代後半は 2.09（出生 10,000 対）と同時代の欧米やオセアニアよりも低かった。その後は増加傾向にあり、2009 年にはピークの 6.18 を示した後、その後は若干の減少を示し 2012 年は 5.18（いずれも出生 10,000 対）であった（図 7）。二分脊椎の発生には、年代差、地域差、そして人種差があり、この理由として食事による日常的な葉酸摂取量の差があることや葉酸代謝に関与する遺伝子多型の頻度の差異

によるものと言われている（住吉, 2004）。

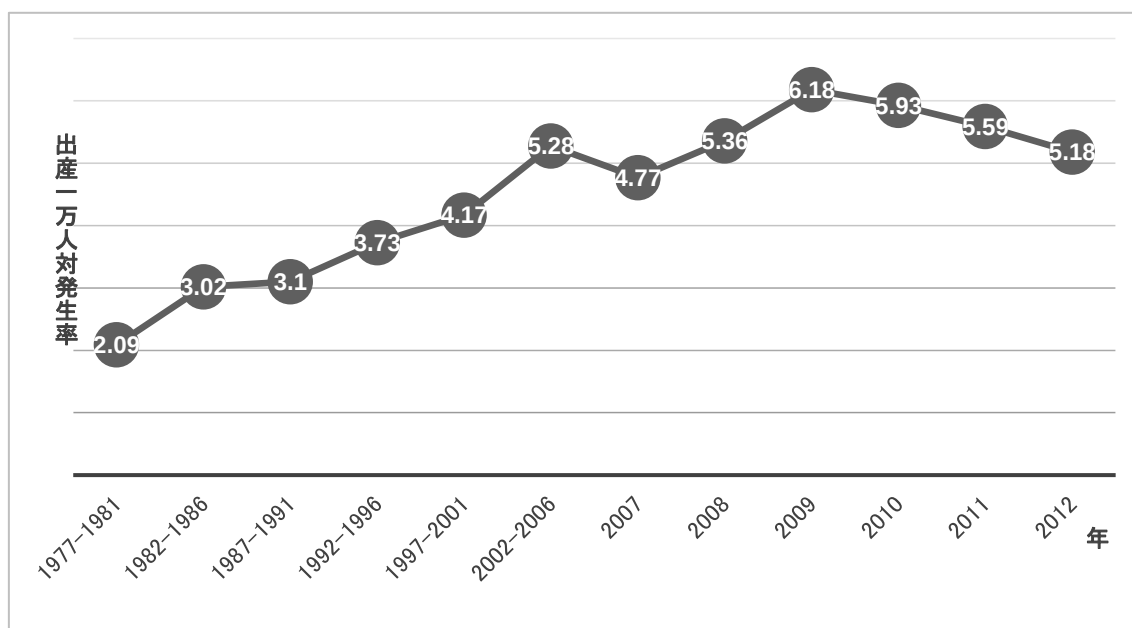


図 7. わが国の二分脊椎の発生状況(出産 10,000 対)

International clearinghouse for birth defects surveillance and research, Annual Report 2009-2014, <http://www.icbdsr.org/resources/annual-report/> Accessed 13.6.18.より作成

JAOG 調査は先天異常の全数調査ではなく、また 22 週以降の児を対象としているため、先天異常により自然流産する症例や先天異常を理由に人工妊娠中絶される症例は含まれない。そのため、NTDs に限らず先天異常発生頻度としては過少評価となることが指摘されている（篠崎ら, 2010; 倉橋ら, 2005）。

6. 葉酸と NTDs 以外の神経堤細胞から分化する先天異常に関する先行研究  
神経管が発生する神経堤細胞は遊走性に優れ、多分化能を有する。この神経堤細胞は、交感・副交感神経細胞、感覚神経細胞、グリア細胞、平滑筋、骨・軟骨（頭部、顔面）、結合組織、そして心臓神経堤細胞などに分化する（Hall BK, 2008; 森田ら, 2012）ことから、この神経堤細胞から発生する器官の形態異常（先天性心疾患、口唇・口蓋裂、四肢欠損など）についても NTDs 同様に葉酸との関連が研究されている。妊娠前および初期の食事性葉酸摂取量や葉酸サプリメント使用と CHDs との関連（表 1）では、スウェーデンの医療情報を使用した前向きコホート研究（Källén B, 2007）では摂取

量増加に伴い、CHDs リスクが上昇したことを、またオランダのケースコントロール研究の HAVENstudy (Heart Defects, Vascular Status, Genetic Factors and Nutrition study) (Smedts HP et al., 2008) では関連が認められなかったことを報告している。一方で、EUROCAT (European surveillance of congenital anomalies; 欧州先天奇形サーベイランス) データベースによる北オランダの研究 (van Beynum Imet et al., 2010) や中国の研究 (Li X et al., 2013)、ハンガリーの国家的な集団ベース・ケースコントロール研究 (Czeizel AE et al., 2015)、では、妊娠前や器官形成期の葉酸サプリメント使用により CHDs のリスクが減少したことを報告している。また、カナダの生態学的研究ではカナダでの穀物への葉酸添加政策後の CHDs 児の出生数の低下を報告している (Liu SL et al., 2016)。

表 1. 妊娠期の葉酸摂取と子どもの CHDs との関連

| First author, year                    | Study design | No. of sample or cases/controls | Exposure                                  | OR/RR (95% CI)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------|--------------|---------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Czeizel AE, et al.<br>2015<br>Hungary | CC(P)        | 3,567/ 5,395                    | folic acid supplement<br>•Period<br>•Dose | <p>1. Period</p> <p>1) Any time during pregnancy<br/>VSD: <b>0.83 (0.66–0.97)</b><br/>ASD: 0.90 (0.75–1.36)<br/><b>d-Transposition of great arteries: 0.71 (0.52–0.97)</b><br/>other Conotruncal heart defects: no association<br/>Left-sided obstructive: no association<br/>Right-sided obstructive: no association</p> <p>2) Critical period<br/>VSD: <b>0.76 (0.63–0.91)</b><br/>ASD: <b>0.70 (0.41–0.96)</b><br/>Conotruncal heart defects: no association<br/>Left-sided obstructive: no association<br/>Right-sided obstructive: no association</p> <p>2. Dose of folic acid</p> <p>1) One FA tablet<br/>VSD: <b>0.62 (0.43–0.87)</b><br/>ASD: 0.90 (0.46–1.74)<br/>Conotruncal heart defects: <b>0.54 (0.28–0.98)</b></p> <p>2) Two FA tablets<br/>VSD: <b>0.62 (0.48–0.75)</b><br/>ASD: <b>0.57 (0.37–0.86)</b><br/>Conotruncal heart defects: <b>0.52 (0.35–0.76)</b></p> <p>3) Three FA tablets<br/>VSD: no association<br/>ASD: no association<br/>Conotruncal heart defects: no association</p> |

| First author, year            | Study design | No. of sample or cases/controls | Exposure                                             | OR/RR (95% CI)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------|--------------|---------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Li X, et al.<br>2013<br>China | CC(H)        | 358/ 422                        | folic acid supplement<br>• Use<br>• Period<br>• Type | <p>1. Users<br/> Total CHDs: 0.47 (0.32–0.70)<br/> Isolated CHDs: 0.52 (0.34–0.78)<br/> Septal heart defect: 0.39 (0.25–0.61)<br/> Conotruncal heart defects: 0.55 (0.33–0.89)<br/> Left-sided obstructive: 0.59 (0.33–1.12)<br/> Right-sided obstructive: 0.42 (0.22–0.79)<br/> Anomalous pulmonary venous return: 0.36 (0.17–0.77)</p> <p>2. Period<br/> 1) &lt;1 month before conception: no association<br/> 2) 1–3 month before conception<br/> Total CHDs: 0.37 (0.18–0.76)<br/> Isolated CHDs: 0.45 (0.22–0.94)<br/> Septal heart defect: 0.28 (0.11–0.71)<br/> Conotruncal heart defects: 0.35 (0.13–0.97)<br/> Left-sided obstructive: 0.54 (0.16–1.87)<br/> Right-sided obstructive: 0.53 (0.17–1.70)<br/> Anomalous pulmonary venous return: 0.19 (0.03–1.11)<br/> 3) ≥ 3 months before conception<br/> Total CHDs: 0.28 (0.17–0.48)<br/> Isolated CHDs: 0.31 (0.18–0.54)<br/> Septal heart defect: 0.20 (0.10–0.39)<br/> Conotruncal heart defects: 0.37 (0.19–0.73)<br/> Left-sided obstructive: 0.39 (0.16–0.96)<br/> Right-sided obstructive: 0.18 (0.07–0.51)<br/> Anomalous pulmonary venous return: 0.11 (0.34–0.81)<br/> 4) &lt;1 month after conception: no association<br/> 5) ≥ 1 months after conception<br/> Total CHDs: 0.53 (0.38–0.93)</p> |

| First author, year                           | Study design | No. of sample or cases/controls                                                        | Exposure                                                                                                                                                                                                                                          | OR/RR (95% CI)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                              |              |                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                   | Isolated CHDs: <b>0.59 (0.26–0.70)</b><br>Septal heart defect: 0.43 (0.36–1.04)<br>Conotruncal heart defects: 0.61 (0.32–1.29)<br>Left-sided obstructive: <b>0.64 (0.22–0.90)</b><br>Right-sided obstructive: 0.44 (0.21–1.04)<br>Anomalous pulmonary venous return: 0.46 (0.21–1.04)<br>3. Types<br>1) folic acid alone users<br>Total CHDs: <b>0.45 (0.30–0.67)</b><br>Isolated CHDs: <b>0.52 (0.34–0.78)</b><br>2) folic acid-containing multivitamin users<br>Total CHDs: <b>0.57 (0.34–0.97)</b><br>Isolated CHDs: <b>0.56 (0.32–0.98)</b> |
| van Beynum IM, et al.<br>2010<br>Netherlands | CC(P)        | 596/2359                                                                               | single supplement or multivitamin containing folic acid (400 mg daily) at least prior to conception and continued for the first 2 months of pregnancy, or those who started after conception and took folic acid regularly in the advised period. | <b>Any congenital heart defect: 0.82 (0.68–0.98)</b><br><b>Isolated septal heart defects: 0.62 (0.47–0.82)</b><br><b>Isolated VSD: 0.69 (0.50–0.96)</b><br><b>Isolated ASDII: 0.54 (0.31–0.94)</b><br>Conotruncal heart defects: 0.77 (0.52–1.15)<br>Left ventricle outflow obstruction: 1.23 (0.82–1.85)<br>Right ventricle outflow obstruction: 1.07 (0.69–1.65)<br>Pulmonary valve stenosis: 0.89 (0.50–1.61)                                                                                                                                |
| Smedts HP, et al.<br>2008<br>Netherlands     | CC(P)        | 276 cases (190 outflow tract defects and 86 non-outflow tract defects)<br>324 controls | the dietary folate intake by the FFQ at 16 months after the index-pregnancy                                                                                                                                                                       | Total case: 1.3 (0.9–1.9)<br>OTDs: 1.5 (0.97–2.2)<br>Non-OTDs: 1.0 (0.6–1.8)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

| First author, year         | Study design | No. of sample or cases/controls | Exposure                                                | OR/RR (95% CI)                                                  |
|----------------------------|--------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Källén B<br>2007<br>Sweden | Cohort (P)   | 20,891 women                    | folic acid supplement (0.4 or 0.5mg)<br>early pregnancy | any CHDs: 1.19 (1.05–1.35)<br>only VSD or ASD: 1.06 (0.88–1.27) |

CI, confidence interval; OR, odds ratio; RR, relative risk.

CC: case-control study; CC(P): population based case-control study; CC(H): hospital based case-control study; Cohort (P): prospective cohort study; Cohort (R): retrospective cohort study.

VSD: ventricular septal defect ASD: atrial septal defect; CHDs: congenital heart defects; OTDs: outflow tract defect

口唇口蓋裂との関連（表 2）について、ノルウェーの国家的な集団ベース・ケースコントロール研究（Wilcox AJ et al., 2007）では妊娠初期の葉酸サプリメント摂取で、中国の前向きコホート研究（Li S et al., 2012）では最終月経前からの葉酸サプリメント摂取で、いずれも口唇裂のリスクの低下があることが観察された。その一方で、北オランダの集団ベース・ケースコントロール研究は妊娠してから妊娠 12 週までの摂取により口唇裂のリスクが上昇したことを報告している（Rozendaal AM et al., 2013）。また、オランダの前向きコホート研究（Bille C et al., 2007）では妊娠初期の葉酸サプリメント摂取と、イギリスの集団ベース・ケースコントロール研究（Little J et al., 2008）では、妊娠前の食事性葉酸やサプリメント摂取と口唇口蓋裂リスクとの関連はみられなかった。

表 2. 妊娠期の葉酸摂取と子どもの口唇口蓋裂との関連

| First author, year, Region                 | Study design | No. of sample or cases/controls                                  | Exposure                                                                             | OR/RR (95% CI)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rozendaal AM, et al<br>2013<br>Netherlands | CC(P)        | 367/924chromosomal/syndrome or 2,021non-folate related anomalies | Folic acid supplement<br>•Type<br>•Period                                            | 1. Consistent use during weeks 0–12 postconception<br>1) Any folic acid supplementc<br>Any oral cleft: 1.72 (1.19–2.49)<br>Cleft lip/alveolus only: 3.16 (1.69–5.91)<br>Cleft palate: no association<br>2)Folic acid alone<br>Any oral cleft: 1.65 (1.10–2.47)<br>Cleft lip/alveolus only: 3.11 (1.57–6.14)<br>Cleft palate: no association<br>3) Multivitamins: no association<br>2. Consistent and partial use during weeks 0 – 12 postconception: no association |
| Li S, et al<br>2012<br>China               | Cohort (P)   | 240,244<br>southern (n=209,105)<br>northern (n=31,139)           | Folic acid supplement<br>•folic acid 400 $\mu$ g (without other vitamins)<br>•Period | 1)Any use<br>Cleft lip: 0.73 (0.59–0.90)<br>Cleft palate: no association<br>2) Preconception use<br>Cleft lip: 0.71 (0.55–0.91)<br>Cleft palate: no association<br>3) Late use<br>Cleft lip: no association<br>Cleft palate: no association<br>4)Early discontinuation<br>Cleft lip: 0.63 (0.41–0.98)<br>Cleft palate: no association                                                                                                                               |

| First author, year, Region               | Study design | No. of sample or cases/controls                           | Exposure                                                                                                                                                                                       | OR/RR (95% CI)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Little J, et al<br>2008<br>U.K           | CC (P)       | 112 Cleft lip , 78 Cleft palate cases<br>248 controls     | periconceptional dietary intake by FFQ(during the 3-month period before pregnancy and the first 3 months of pregnancy)<br>periconceptional folic acid supplement use of the type, period, dose | 1. Total folate intake(quartile)<br>Any cleft lip or palate: no association<br>2. Supplement type<br>Any cleft lip or palate: no association                                                                                                                                                                                                                              |
| Wilcox AJ , et al.<br>2007<br>Norway     | CC(P)        | case<br>377 cleft lip<br>196 cleft palate<br>763 controls | folic acid supplement dietary folate (<400 µg/day, ≥400 µg/day)<br>early pregnancy                                                                                                             | 1) In the dichotomous analysis of folic acid (<400 µg/day vs ≥400 µg/day)<br>isolated cleft lip with or without cleft palate: <b>0.61 (0.39-0.96)</b><br>2) ≥400 µg folic acid plus multivitamins and healthy diet<br>cleft lip with or without cleft palate: <b>0.36 (0.17-0.77)</b>                                                                                     |
| Bille C, , et al.<br>2007<br>Netherlands | Cohort (P)   | 220/880                                                   | folic acid supplement first trimester (from conception until enrolment)<br>user<br>dose<br>0-5200 mcg/daily<br><400, ≥400 mcg folic acid daily                                                 | 1. User<br>All oral clefts: no association<br>Cleft lip: no association<br>Cleft palate: no association<br>2. Dose<br>1) Continuous<br>All oral clefts: no association<br>Cleft lip: no association<br>Cleft palate: no association<br>2) <400, ≥400 mcg folic acid daily<br>All oral clefts: no association<br>Cleft lip: no association<br>Cleft palate: no association |

CI, confidence interval; OR, odds ratio; RR, relative risk.

CC: case-control study; CC(P): population based case-control study; CC(H): hospital based case-control study; Cohort (P): prospective cohort study; Cohort (R): retrospective cohort study

概観すると妊娠前あるいは妊娠初期の葉酸摂取は、CHDs に関しては予防効果が示唆されているものが多いが、口唇口蓋裂に関する予防効果はまだ結果が混在している。この要因として、疾患診断や疾患タイプの差異、葉酸サプリメントの摂取量、摂取時期の差異などが考えられる (Feng Y et al., 2015; Wehby GL et al., 2010)。また、体内葉酸レベルは葉酸代謝に關与する複数の遺伝子多型やその組み合わせにより影響を受ける (Bueno O et al., 2016)。そのため、葉酸摂取状況を用いる評価では、体内の葉酸量やその働きを十分評価できるとはいえない。そこで、いくつかの研究では葉酸濃度を測定し、CHDs や口唇口蓋裂との関連を評価している。アメリカ・アーカンソー州での 2 つのケースコントロール研究とオランダの the Dutch HAVEN study の 2 つのケースコントロール研究は出産後の母親の血清・血漿あるいは赤血球葉酸濃度を測定して子どもの CHDs リスクとの関連を検討し、いずれも CHDs を有する子どもの母親と先天異常のない子どもの母親の出産後の葉酸濃度には差はみられなかった (Hobbs CA et al., 2005, 2006; Verkleij-Hagoort AC et al., 2006a, 2006b) (表 3)。また、児の口唇口蓋裂と母親の葉酸濃度との関連 (表 4) では、オランダのケースコントロール研究では出産後の赤血球葉酸濃度との関連はみられなかったことを報告している (van Rooij IA et al., 2003)。しかし、イギリスのケースコントロール研究では、出産後の赤血球および血清葉酸濃度が高いと口唇裂リスクは低下するが、口蓋裂リスクは増加すると報告している (Little J et al., 2008)。また、アメリカ・ユタ州のケースコントロール研究では産後の母親の血漿および赤血球葉酸濃度が低いことと単独の口唇裂および口蓋裂リスクの増加に關連があつたことを報告している (Munger RG et al., 2011)。このようにケースコントロール研究により出産後の母親の血中葉酸濃度と出生児の口唇口蓋裂との関連を検討した結果は一様ではない。しかし、心臓、口唇、口蓋が著しい形態異常を生じやすい時期はそれぞれ胎生第 3~6 週 (軽度異常の場合は 7~8 週) まで、第 5~6 週 (軽度異常の場合は第 7~8 週)、第 7~9 週 (軽度異常の場合は 9~10 週) であり (瀬口ら訳, Moore P 著 2007; 藤本, 2010)、出産後の葉酸濃度によって器官形成期の葉酸の役割を評価するのは適當ではない。

表 3. 葉酸濃度と子どものCHDsとの関連

| First author, year, Region                         | Study design | No. of sample or cases/controls | Exposure                                                       | OR/RR (95% CI)                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------|--------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Verkleij-Hagoort AC, et al<br>2006a<br>Netherlands | CC           | 149 /183                        | serum and RBC folate at 11-18 months after the index-pregnancy | 1. Serum folate (nmol/L) Median (min, max)<br>cases: 15.0 (6.2-27.8)<br>controls: 14.1 (6.4-40.3)<br>$p \geq 0.05$ 1.3 (0.5-3.1)<br>2. RBC folate (nmol/L) Median (min, max)<br>cases: 646 (299-1343)<br>controls: 630 (163-1549)<br>$p \geq 0.05$ 1.1 (0.4-2.6) |
| Verkleij-Hagoort AC, et al<br>2006b<br>Netherlands | CC           | 192/216                         | serum and RBC folate at 11-18 months after the index-pregnancy | 1. Serum folate (nmol/L) Median (interquartile range)<br>cases: 15.0 (12.3-18.6)<br>controls: 14.6 (12.1-19.4)<br>$p \geq 0.05$<br>2. RBC folate (nmol/L) Median (interquartile range)<br>cases: 666 (535-793)<br>controls: 674 (537-855)<br>$p \geq 0.05$       |
| Hobbs CA , et al.<br>2006<br>U.S.A                 | CC           | 331/125                         | Plasma concentrations of folate after the index-pregnancy      | 1. Plasma folate ( $\mu\text{g/L}$ ) Median (min, max)<br>cases: 9.67 (1.86-30.23)<br>controls: 10.12 (3.55-34.92)<br>$p=0.1042$                                                                                                                                 |
| Hobbs CA , et al.<br>2005a<br>U.S.A                | CC           | 224/90                          | Plasma concentrations of folate at 6 week after delivery       | 1. Plasma folate concentration (log transformed)(mg/L)<br>Median (min, max)<br>case: 9.60 (1.86, 30.23)<br>controls: 10.66 (3.55, 40.12)<br>$p=0.168$ 0.89 (0.41-1.96)                                                                                           |

CI, confidence interval; OR, odds ratio; RR, relative risk.

CC: case-control study; CC(P): population based case-control study; CC(H): hospital based case-control study

Cohort (P): prospective cohort study; Cohort (R): retrospective cohort study  
RBC folate: red blood cell folate

表 4. 葉酸濃度と子どもの口唇口蓋裂との関連

| First author, year, Region        | Study design | No. of sample or cases/controls | Exposure                                                                                         | OR/RR (95% CI)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Munger RG, et al<br>2011<br>U.S.A | CC(P)        | 347/469                         | Red blood cell and serum folate concentration<br>12 months after the end of their last pregnancy | <p>1. Serum Folate (nmol/L)(Quartile)<br/>Cleft Lip: Q2: 0.86 (0.54–1.36)<br/>Q3: 0.66 (0.42–1.05)<br/>Q4: 0.34 (0.21–0.56)<br/>p-trend p&lt;0.001</p> <p>Cleft palate: Q2: 0.67 (0.35–1.27)<br/>Q3: 0.54 (0.28–1.03)<br/>Q4: 0.35 (0.18–0.68)<br/>p=0.002</p> <p>2. RBC Folate (nmol/L)(Quartile)<br/>Cleft Lip: Q2: 0.83 (0.52–1.33)<br/>Q3: 0.65 (0.41–1.04)<br/>Q4: 0.78 (0.48–1.25)<br/>p-trend p=0.20</p> <p>Cleft palate: Q2: 0.78 (0.42–1.46)<br/>Q3: 0.46 (0.23–0.90)<br/>Q4: 0.49 (0.24–0.97)<br/>p=0.01</p> |

| First author, year, Region                 | Study design | No. of sample or cases/controls | Exposure                                                                            | OR/RR (95% CI)                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------|--------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Little J, et al<br>2008<br>U.K             | CC (P)       | 112 CL<br>78 CP<br>248 controls | Red blood cell folate concentration<br>12 month postpartum                          | 1. RBC Folate (nmol/L)(Quartile)<br>Cleft Lip: Q2: 0.2 (0.08–0.56)<br>Q3: 0.5 (0.21–1.31)<br>Q4: 0.5 (0.18–1.18)<br>Cleft palate: Q2: 1.6 (0.56–4.38)<br>Q3: 0.9 (0.32–2.67)<br>Q4: 3.22 (1.14–9.10)<br>OFC: Q2: 0.4 (0.20–0.93)<br>Q3: 0.8 (0.36–1.72)<br>Q4: 1.1 (0.52–2.51) |
| van Rooij IA, et al<br>2003<br>Netherlands | CC           | 96/88                           | RBC and serum folate concentration<br>around 14 months after the index<br>pregnancy | 1.RBC Folate (nmol/L)<br>Median(10percentile, 90 percentile)<br>cases: 631 (573–694)<br>controls: 635 (575–700)<br>p=0.93<br>2. Serum Folate (nmol/L)<br>Median(10percentile, 90 percentile)<br>cases: 12.9 (11.7–14.4)<br>controls: 13.3 (12.0–14.9)<br>p=0.70                |

CI, confidence interval; OR, odds ratio; RR, relative risk.

CC:case-control study; CC(P): population based case-control study; CC(H): hospital based case-control study

Cohort (P): prospective cohort study; Cohort (R): retrospective cohort study; RBC folate: red blood cell folate

OFC: orofacial cleft

前向きコホート研究により妊娠初期あるいは中期の葉酸濃度と先天異常の関連を検討した 2 グループの研究は、子どもに何等かの先天異常がある母親の妊娠初期の血清葉酸濃度が低かった (Hammouda SA et al., 2013)、あるいは CHDs や口唇裂との関連はみられなかった (Shaw GM et al., 2009; 2014) と報告している。

以上から、CHDs や口唇口蓋裂と葉酸との関連を評価した先行研究の多くはケースコントロール研究によるものであるため、研究デザインとして対象者の選択バイアス、曝露指標である葉酸摂取や交絡因子情報の思い出しバイアスが結果に影響を及ぼしたことは否めない。また、先行研究は欧米、中国の女性を対象としたものが多く、日本において葉酸と先天異常との関連を評価した前向き研究はない。

## 7. 本研究の目的

「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)」は北海道において出産施設ベースの出生コホート研究を 2002 年から開始し、妊娠期の母親の環境曝露が出生児の健康に及ぼす研究を行っている。これまでに先天異常頻度 (Hanaoka et al., 2018)、妊婦の葉酸摂取状況 (Yila T et al., 2016)、そして血清葉酸と妊娠初期の喫煙が出生体重に及ぼす影響 (Yila T et al., 2012) などを報告している。本研究は、妊娠初期の血清葉酸濃度と先天異常リスクとの関連を明らかにすることを目的にした。

## II. 本論

### 1. 研究方法

#### 1) 研究対象者

北海道スタディは妊娠期間中の環境化学物質曝露が出生児の健康(分娩機転、出生体重、先天異常発生、発育・発達、アレルギーなど)に及ぼす影響を検討する前向きコホート研究である。北海道の 37 出産施設(大学病院 3 施設、自治体病院 8 施設、その他の病院 21 施設、クリニック 5 施設)で 2002 年以降に妊娠を診断された妊娠 13 週未満の女性が研究協力の登録を行っている。2012 年で登録を終了し、計 20,962 名が登録された (Kishi R et al., 2011; 2013; 2017)。ベースライン時には自記式質問調査票によって年齢、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・体重などの基本的属性や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、そして先天異常家族歴についての情報を得た。また、血清葉酸濃度を測定するための採血を行った。

分娩終了後には分娩施設から出産情報を得た他、産後 1 年と 2 年には参加者に自記式質問調査票を送付して児の健康情報を得た（図 8）。

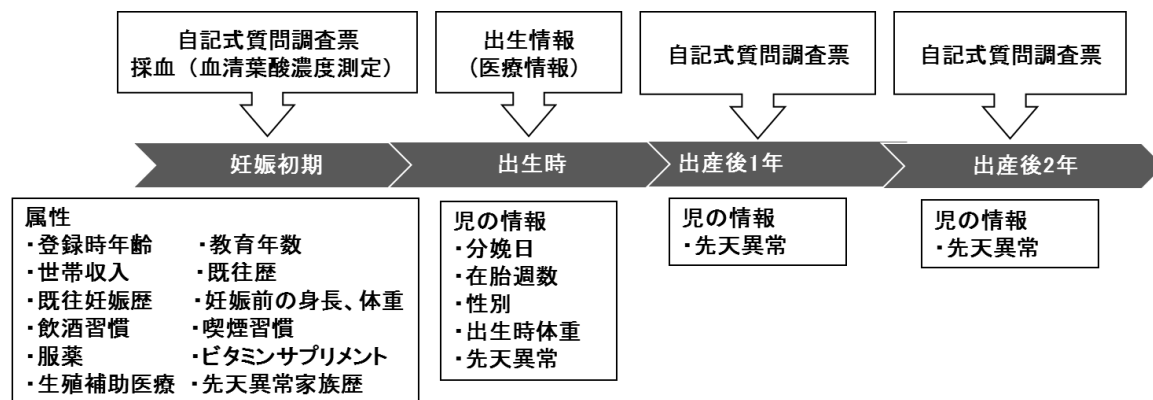


図 8. 北海道スタディのデータ収集内容と収集時期

本研究では、ベースライン時情報があり、妊娠初期（妊娠 14 週未満）の血清葉酸が測定された単胎児を妊娠 12 週以降に出産した参加者の中から、児の先天異常の有無が不明、児の先天異常が染色体異常、遺伝子疾患である場合は除外した。また、副耳や耳漏孔などの生活に支障をきたさない小奇形のみを有する子どもを持つ参加者も除外した。さらに、妊娠初期の葉酸の特定器官への影響を検討するために複数の器官に先天異常がある児をもつ参加者も解析から除外した。最終的な解析対象は 14,896 組の母子である（図 9）。

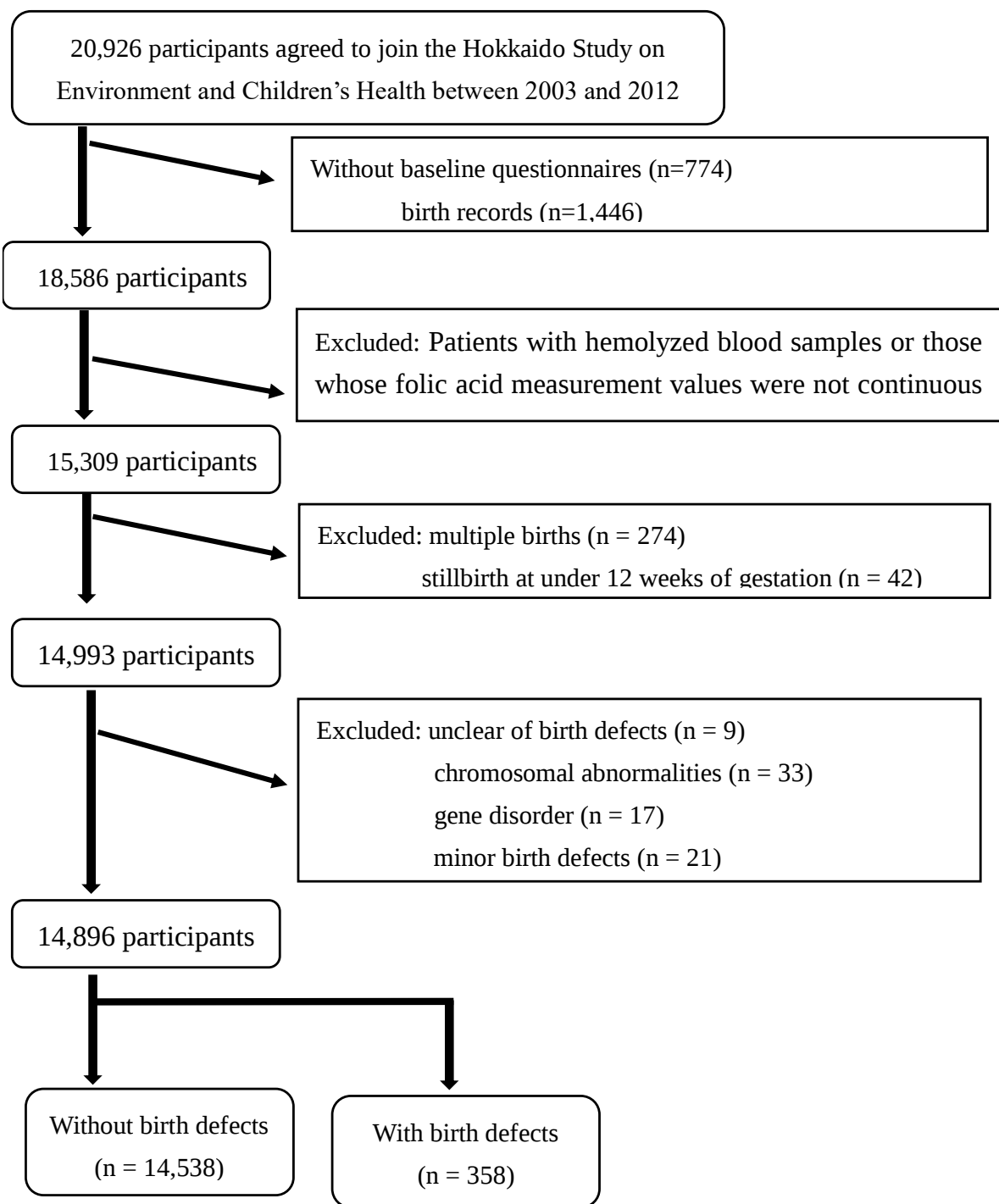


図 9. 対象者フローチャート

## 2) 倫理的配慮

本研究は北海道大学大学院医学研究科（2003 年 3 月 31 日）および北海道大学環境健康科学教育センター（2012 年 3 月 22 日）の倫理委員会の承認を得て行った。また、研究参加者には書面および口頭にて研究の目的、内容、個人情報保護、参加者に費用負担はないこと、いつでも研究参加を辞めることができること、調査結果の開示を行うことを説明し、同意書を取得した。

## 3) 調査項目と測定方法

分析に使用したデータは、ベースライン時の自記式質問調査票、妊娠初期時に採血した血液による血清葉酸濃度、出産施設からの出生児情報、1 歳および 2 歳時点の母親への自記式質問調査票である。

ベースライン時の自記式質問調査票では、母親の年齢、身長、妊娠前の体重、既往歴、産科歴、教育年数、先天異常の家族歴、今回の妊娠の生殖補助医療利用、妊娠 12 週までの喫煙、飲酒、常用薬剤（処方薬剤および市販薬）使用、葉酸サプリメント使用などの情報を得た。今回の研究では、葉酸単独のサプリメントおよび葉酸含有マルチビタミン剤の使用者を葉酸サプリメント使用者と定義した。

参加登録した母親が妊娠 12 週以降に分娩した場合は、出産施設から出産後 7 日までに分娩帰結（流産、死産、生産）、在胎週数、出生時体重、性別、先天異常、妊娠異常などについての出産情報を得た。

さらに、出産後 1 年および 2 年時点に送付回収した母親への自記式質問調査票により、先天異常を含めた児の成長発達・健康状態の情報を得た。

血清葉酸濃度を測定するための採血は妊婦健診受診施設へ依頼した。採血にあたり、空腹時採血などの指定はしていない。血清葉酸濃度は業者（株式会社 SRL 北海道ラボラトリー）に委嘱し、the ADVIA Centaur technique による競合性蛋白結合・化学発酵酵素免疫測定法（competitive protein binding chemiluminescent enzyme immunoassay）（sensitivity, 0.91 nmol/L; coefficient of variation, 4.0–4.3%; imprecision, <10.0%）によって測定した（Yila T et al., 2012; 2016）。

## 4) 先天異常の定義と分類

本研究では、出生児の先天異常情報は、医療機関からの出生時情報の他に、出生直後には診断が得られない CHDs や尿道下裂などの先天異常情報を得るために、母親への出産後 1 年および 2 年時点の自記式質問調査票も使用

した。医療機関からの先天異常情報は、その発生に環境要因の関与が考えられる先天異常 55 疾患を列記した中からの選択とし、それ以外の先天異常の場合は疾患名の記載を依頼した (Hanaoka et al., 2018)。医療機関及び母親から報告された先天異常内容の分類にあたっては、新生児医師の確認を得た。まず、先天異常は発生器官別に ICD-10 に基づき分類した。さらに、神経堤細胞 (neural crest cells : NCCs) 由来器官の先天異常を NCCs 由来先天異常と定義し、NTDs (Berry RJ et al., 1999; MRC, 1991; Czeizel et al., 1992)、CHDs (Smedts HP et al., 2008; Li X et al., 2013)、口唇裂・口蓋裂 (Li S et al., 2012; Rozendaal AM et al., 2013)、尿道下裂 (Ormond G et al., 2009)、四肢欠損 (Yang Q et al., 1997) をこれに含めた。CHDs は 5 つのサブグループ ; ① 単発の心室中隔欠損 (ventricular septal defect: VSD)、心房中隔欠損 (atrial septal defect: ASD)、② 円錐動脈幹異常 (大動脈騎乗、Fallot 四徴候、大動脈瘤、両大動脈右室起始症)、③ 左流路系異常 (大動脈弁狭窄、左室低形成症候群、僧帽弁閉鎖不全、大動脈縮窄)、④ 右流路系異常 (肺動脈狭窄、肺動脈閉鎖、三尖弁閉鎖、Ebstein 奇形)、⑤ その他の CHDs (重複心奇形、単心室、単発の動脈管開存など) に分類した (van Beyunm IM et al., 2006; Li X et al., 2013; Czeizel AE et al., 2015)。

## 5) 統計解析

血清葉酸濃度は非正規分布を呈していたため、中央値 (Interquartile Range: IQR; 四分位範囲) を示した。母親の登録時年齢、身長と妊娠前の体重から算出した妊娠前 BMI は平均 (standard deviation: SD; 標準偏差) を算出し、カテゴリカルデータは個数 (%) を算出した。また、先天異常のない子どもの母親と先天異常のある子どもの母親との血清葉酸濃度の比較には、ウィルコクソン符号順位検定、クラスカル・ウォリス検定を行った。血清葉酸濃度と先天異常発生との関連に関しては、血清葉酸濃度を自然対数で log 変換したのち、ロジスティック回帰分析を使用して、対数変換後の血清葉酸濃度と先天異常発生に関するオッズ比 (odds ratios; ORs) と 95% 信頼区間 (confidence interval; CIs) を算出した。また、血清葉酸濃度の分布により対象者を 4 群に分け、最も低い群 (第 1 四分位) をリファレンス 1.0 とした時の先天異常発生の ORs と 95% 信頼区間も算出した。交絡因子は先行研究などからベースライン時の母親の年齢 (連続量)、既往出産歴 (0 回,  $\geq 1$  回)、教育年数 ( $\leq 12$  年,  $> 12$  年)、妊娠前 BMI (body mass index; 体格指数) (連続量)、生殖補助医療の利用 (有, 無)、妊娠前の飲酒習慣 (有, 無)、喫煙習慣 (有, 無)、妊娠 12 週までの市販薬を含む服薬 (有, 無) とした。

有意水準は両側 0.05 未満とした。統計分析には SPSS for Windows, version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) を使用した。

## 2. 結果

### 1) 対象者の属性

データ解析対象者（以下、対象者とする）のベースライン時の属性を表 5 に示す。母親の年齢は平均 29.8 (SD, 4.8) 歳であった。妊娠前 BMI は標準 (18.5~24.9 kg/m<sup>2</sup>) が最も多く 71.6%で、痩せ (18.5 kg/m<sup>2</sup> 未満) は 17.3%であった。教育年数は 12 年 (高校卒業) 以下と 12 年より長いがほぼ同じ割合であった。初産婦は 42.5%で経産婦の方が多かった。妊娠前までの飲酒習慣があるものは 13.2%、喫煙者は 39.3%であった。また、生殖補助医療を受けたものは 4.0%と少なく、糖尿病罹患率は 0.5%、先天異常の家族歴があるものは 2.2%であった。妊娠初期に何らかの常用薬のあるもの 37.7%、葉酸サプリメント使用者は 22.6%であった。

表 5. ベースライン時の属性と妊娠初期の血清葉酸濃度 (n=14,896)

| Characteristics                                          | n (%)         | Serum Folate<br>concentration<br>(nmol/L) | p-value                       |
|----------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Maternal age at delivery (years)</b>                  |               |                                           |                               |
| mean(SD)                                                 | 29.8 (4.8)    |                                           |                               |
| <20                                                      | 177 (1.2)     | 13.8 (10.9, 17.0)                         | <b>p&lt;0.001<sup>a</sup></b> |
| 20-24                                                    | 1,944 (13.1)  | 14.9 (12.0, 18.6)                         |                               |
| 25-29                                                    | 4,969 (33.4)  | 16.3 (13.1, 20.8)                         |                               |
| 30-34                                                    | 5,209 (35.0)  | 17.2 (13.6, 22.4)                         |                               |
| ≥35                                                      | 2,596 (17.4)  | 17.9 (14.0, 24.0)                         |                               |
| Unknown                                                  | 1             |                                           |                               |
| <b>Body Mass Index at Prepregnancy (kg/m2)</b>           |               |                                           |                               |
| mean(SD)                                                 | 21.2 (3.4)    |                                           |                               |
| ≤18.5                                                    | 2,525 (17.3)  | 16.3 (13.1, 21.1)                         | <b>p&lt;0.001<sup>a</sup></b> |
| 18.5-24.9                                                | 10,420 (71.6) | 16.8 (13.4, 22.0)                         |                               |
| ≥25.0                                                    | 1,615 (11.1)  | 16.1 (12.9, 20.8)                         |                               |
| Unknown                                                  | 336           |                                           |                               |
| <b>Educational level (years)</b>                         |               |                                           |                               |
| ≤12                                                      | 7,302 (49.4)  | 15.9 (12.7, 20.4)                         | <b>p&lt;0.001<sup>a</sup></b> |
| >12                                                      | 7,480 (50.6)  | 17.4 (13.8, 22.9)                         |                               |
| Unknown                                                  | 114           |                                           |                               |
| <b>Parity (times)</b>                                    |               |                                           |                               |
| 0                                                        | 5,963 (42.5)  | 16.5 (13.1, 22.0)                         | <b>0.028<sup>a</sup></b>      |
| ≥1                                                       | 8,066 (57.5)  | 16.3 (13.4, 20.8)                         |                               |
| Unknown                                                  | 867           |                                           |                               |
| <b>Drinking at early pergnancy</b>                       |               |                                           |                               |
| Yes                                                      | 1,951 (13.2)  | 16.5 (13.6, 21.1)                         | 0.818 <sup>a</sup>            |
| No                                                       | 12,793 (86.9) | 16.5 (13.1, 21.7)                         |                               |
| Unknown                                                  | 152           |                                           |                               |
| <b>Smoking at early pergnancy</b>                        |               |                                           |                               |
| Yes                                                      | 5,793 (39.3)  | 15.6 (12.5, 19.7)                         | <b>p&lt;0.001<sup>a</sup></b> |
| No                                                       | 8,929 (60.7)  | 17.4 (13.8, 22.9)                         |                               |
| Unknown                                                  | 174           |                                           |                               |
| <b>Assisted reproductive technology</b>                  |               |                                           |                               |
| Yes                                                      | 592 (4.0)     | 19.0 (14.7, 29.4)                         | <b>p&lt;0.001<sup>a</sup></b> |
| No                                                       | 14,206 (95.4) | 16.5 (13.1, 21.5)                         |                               |
| Unknown                                                  | 98            |                                           |                               |
| <b>Diabetes mellitus</b>                                 |               |                                           |                               |
| Yes                                                      | 66 (0.5)      | 18.0 (14.4, 23.3)                         | 0.169 <sup>a</sup>            |
| No                                                       | 14,037 (99.5) | 16.5 (13.4, 21.7)                         |                               |
| Unknown                                                  | 793           |                                           |                               |
| <b>Family history of birth dects</b>                     |               |                                           |                               |
| Yes                                                      | 322 (2.2)     | 18.1 (13.8, 22.9)                         | <b>0.003<sup>a</sup></b>      |
| No                                                       | 14,457 (97.8) | 16.5 (13.4, 21.5)                         |                               |
| Unknown                                                  | 117           |                                           |                               |
| <b>Medication at early pergnancy</b>                     |               |                                           |                               |
| Yes                                                      | 5,577 (37.7)  | 16.8 (13.1, 21.7)                         | 0.248 <sup>a</sup>            |
| No                                                       | 9,201 (62.3)  | 16.5 (13.4, 21.5)                         |                               |
| Unknown                                                  | 118           |                                           |                               |
| <b>Any folic acid supplements use at early pergnancy</b> |               |                                           |                               |
| Yes                                                      | 3,315 (22.6)  | 24.5 (17.9, 32.6)                         | <b>p&lt;0.001<sup>a</sup></b> |
| No                                                       | 11,321 (77.4) | 15.4 (12.7, 19.0)                         |                               |
| Unknown                                                  | 260           |                                           |                               |

## 2) 妊娠初期の血清葉酸濃度

血清葉酸測定用の血液の採取時期は平均妊娠 10.8 (SD, 1.7) 週であった。血清葉酸濃度の中央値は 16.5 (IQR, 13.4-21.5) nmol/L であり、血清葉酸濃度の低値 (6.8nmol/L 未満; WHO 基準による) はわずか 0.7% であった (図 10. 血清葉酸濃度の分布)。単変量解析の結果、母親の登録時の属性と血清葉酸濃度が高かったのは、母親の年齢が高く、妊娠前 BMI の標準 (18.5 ~ 24.9kg/m<sup>2</sup>) 群、教育年数 12 年より長く、初産婦、妊娠前の非喫煙者、生殖補助医療利用者、先天異常の家族歴のあるもの、そして妊娠初期の葉酸サプリメント使用者であった (表 5)。

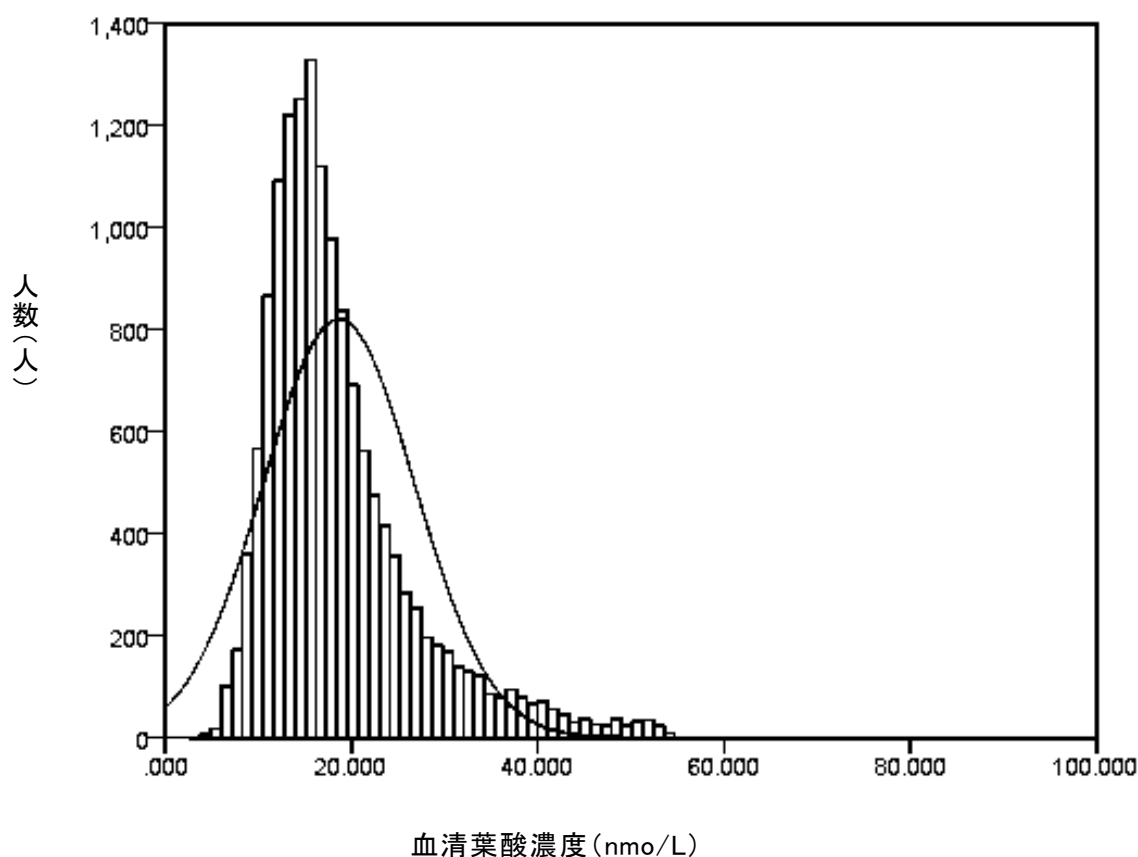


図 10. 妊娠初期の母体の血清葉酸濃度の分布 (n=14,896)

## 3) 出生児の属性、妊娠初期血清葉酸濃度と先天異常との関連

児の出産状態は流産 (妊娠 22 週未満の人工流産含む) 0.9%、死産 0.3%、生産 98.8% であった。在胎週数は平均 38.6 (SD, 2.7) 週、出生時体重は平均 3035.2 (SD, 599.3) g であった。児の性別は男児 50.4% で女児とほぼ同じ割合であった。

対象者のうち出生児に何らかの先天異常がみられたのは 2.4% (358 名) であった。出生児の先天異常で最も多かった器官は循環器系 130 児、次いで生殖器系 63 児であった。また、疾患別では VSD が 61 児で最も多く、次に肺動脈弁狭窄の 17 児であった。NCCs 由来器官の先天異常は 161 児で、内訳は NTDs 6 児、CHDs 125 児、顔面裂 21 児、尿道下裂 4 児、四肢減数 2 児であった。CHDs のサブグループでは、中隔欠損が 80 児と最も多かった。

先天異常を有さない児の母親および先天異常を有する児の母親の血清葉酸濃度の中央値はいずれも 16.5nmol/L であった。妊娠初期の母親の対数変換した血清葉酸濃度と器官別の先天異常出現のリスク評価 (表 6) では、泌尿器系 (Q60-64) と筋骨格系 (Q65-79) で対数変換した血清葉酸濃度が 1 単位上昇する毎に調整後 ORs の低下傾向がみられたが、統計学的有意差はみられなかった (それぞれ、ORs [95% CIs]; 0.47 [0.15–1.45], 0.61 [0.30–1.24])。一方、神経系 (Q00-07) と口唇裂及び口蓋裂 (Q35-37) では、対数変換した血清葉酸濃度が 1 単位上昇する毎に調整後 ORs の上昇傾向がみられたが、統計学的有意差はみられなかった (それぞれ、ORs [95% CIs]; 1.35 [0.28–6.48], 1.94 [0.66–5.80])。

表 6. 妊娠初期の母親の血清葉酸濃度(自然対数変換値)と全先天異常 および器官別の先天異常との関連(先天異常を有しない児の母親との比較)

|                                                                            | No. of infants<br>with birth<br>defects | Maternal<br>serum folate<br>(nmol/L) | Crude<br>ORs (95% CIs) | Adjusted<br>ORs (95% CIs) |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Any birth defect                                                           | 358                                     | 16.5<br>(13.4, 22.0)                 | 1.04 (0.79–1.36)       | 0.99 (0.74–1.32)          |
| ICD-10 code birth defects                                                  |                                         |                                      |                        |                           |
| Nervous system (Q00-07)                                                    | 12                                      | 16.9<br>(14.9, 25.8)                 | 1.68 (0.42–6.78)       | 1.35 (0.28–6.48)          |
| Eye, ear, face, and neck (Q10-18)                                          | 12                                      | 16.0<br>(14.3, 20.3)                 | 0.87 (0.20–3.77)       | 1.33 (0.29–6.10)          |
| Circulatory system (Q20-28)                                                | 130                                     | 16.5<br>(13.4, 22.2)                 | 1.09 (0.70–1.69)       | 0.99 (0.61–1.61)          |
| Respiratory system (Q30-34)                                                | 1                                       | 16.5<br>(-)                          | 0.04 (0.00–5.69)       | 0.03 (0.00–3.58)          |
| Cleft lip and cleft palate (Q35-37)                                        | 24                                      | 18.3<br>(15.3, 21.9)                 | 1.56 (0.58–4.21)       | 1.94 (0.66–5.80)          |
| Digestive system (Q38-45)                                                  | 18                                      | 18.1<br>(13.4, 21.5)                 | 2.18 (0.71–6.68)       | 3.03 (0.90–10.21)         |
| Genital organs (Q50-56)                                                    | 63                                      | 16.3<br>(12.9, 21.7)                 | 0.97 (0.52–1.83)       | 0.91 (0.45–1.83)          |
| Urinary system (Q60-64)                                                    | 25                                      | 15.9<br>(13.6, 18.8)                 | 0.55 (0.19–1.56)       | 0.47 (0.15–1.45)          |
| Musculoskeletal system (Q65-79)                                            | 61                                      | 16.3<br>(12.5, 20.4)                 | 0.77 (0.40–1.48)       | 0.61 (0.30–1.24)          |
| Other Skin (Q80-85)<br>(except for syndromes, not elsewhere<br>classified) | 12                                      | 19.3<br>(12.5, 28.1)                 | 1.57 (0.39–6.38)       | 2.18 (0.50–9.52)          |

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Serum folate, median (IQR). Serum folate level of women who had infants without birth defects was 16.5 (13.4, 21.5) nmol/L.

ORs (with 95% CI) per log-transformed folate concentration in maternal serum folate level.

Adjusted for maternal age (continuous variable), parity, educational level (years), assisted reproductive technology, smoking, alcohol, body mass index (continuous variable), and medication use.

血清葉酸濃度の四分位による分析では、第 1 四分位と比較して、第 2、第 3、第 4 四分位のいずれにも ORs 低下傾向がみられた器官の先天異常はなく、第 1 四分位と比較して、第 2、第 3、第 4 四分位のいずれにも ORs 上昇傾向がみられたものは神経系 (Q00-07) と消化器系 (Q38-45) であったが、いずれも統計学的有意差はみられなかった (表 7)。

表 7 . 妊娠初期の母親の血清葉酸濃度(四分位)と全先天異常および器官別の先天異常との関連

|                                                                         | No. Birth defects | Quartile 1 |      | Quartile 2 |                        | Quartile 3 |                        | Quartile 4 |                        | P for trend |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------|------|------------|------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|-------------|
|                                                                         |                   | No.        | ORs  | No.        | ORs (95% CI)           | No.        | ORs (95% CI)           | No.        | ORs (95% CI)           |             |
| Any birth defect                                                        | 358               | 94         | 1.00 | 87         | 0.99<br>(0.73 – 1.35)  | 84         | 0.90<br>(0.65 – 1.23)  | 93         | 1.00<br>(0.73 – 1.37)  | 0.864       |
| Nervous system (Q00-07)                                                 | 12                | 2          | 1.00 | 3          | 1.12<br>(0.16 – 8.02)  | 2          | 1.19<br>(0.16 – 8.55)  | 5          | 2.29<br>(0.40 – 13.07) | 0.337       |
| Eye, ear, face, and neck (Q10-18)                                       | 12                | 2          | 1.00 | 5          | 3.09<br>(0.59 – 16.08) | 3          | 2.05<br>(0.34 – 12.48) | 2          | 1.60<br>(0.22 – 11.74) | 0.753       |
| Circulatory system (Q20-28)                                             | 130               | 33         | 1.00 | 35         | 1.06<br>(0.64 – 1.73)  | 29         | 0.70<br>(0.40 – 1.21)  | 33         | 0.95<br>(0.57 – 1.59)  | 0.531       |
| Respiratory system (Q30-34)                                             | 1                 | 1          | 1.00 | 0          | -                      | 0          | -                      | 0          | -                      | -           |
| Cleft lip and cleft palate (Q35-37)                                     | 24                | 4          | 1.00 | 5          | 1.50<br>(0.40 – 5.62)  | 9          | 2.51<br>(0.74 – 8.46)  | 6          | 1.75<br>(0.45 – 6.71)  | 0.276       |
| Digestive system (Q38-45)                                               | 18                | 2          | 1.00 | 4          | 4.45<br>(0.49 – 40.00) | 6          | 5.79<br>(0.67 – 50.06) | 6          | 6.84<br>(0.80 – 58.46) | 0.064       |
| Genital organs (Q50-56)                                                 | 63                | 21         | 1.00 | 12         | 0.63<br>(0.30 – 1.34)  | 14         | 0.78<br>(0.39 – 1.57)  | 16         | 0.73<br>(0.35 – 1.51)  | 0.469       |
| Urinary system (Q60-64)                                                 | 25                | 6          | 1.00 | 9          | 1.47<br>(0.51 – 4.26)  | 5          | 0.95<br>(0.29 – 3.14)  | 5          | 0.75<br>(0.21 – 2.74)  | 0.543       |
| Musculoskeletal system (Q65-79)                                         | 61                | 20         | 1.00 | 12         | 0.61<br>(0.29 – 1.30)  | 15         | 0.70<br>(0.34 – 1.45)  | 14         | 0.62<br>(0.30 – 1.30)  | 0.258       |
| Other_Skin (Q80-85)<br>(except for syndromes, not elsewhere classified) | 12                | 3          | 1.00 | 2          | 1.17<br>(0.16 – 8.33)  | 1          | 0.58<br>(0.05 – 6.47)  | 6          | 3.46<br>(0.67 – 18.05) | 0.128       |

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Adjusted for maternal age (continuous variable), parity, educational level (years), assisted reproductive technology, smoking, alcohol, body mass index (continuous variable), medication use.

次に、妊娠初期の母親の対数変換した血清葉酸濃度と NCCs 由来の先天異常との関連を検討した（表 8）。CHDs と VSD に対数変換した血清葉酸濃度が 1 単位上昇する毎に調整後 ORs の減少傾向がみられたが、統計学的有意差はみられなかった（それぞれ、ORs [95% CIs]; 0.83 [0.50–1.37], 0.63 [0.30–1.33]）。一方、ASD と口唇裂には、対数変換した血清葉酸濃度が 1 単位上昇する毎に調整後 ORs の上昇傾向がみとめられたが、統計学的有意差はみられなかった（それぞれ、ORs [95% CIs]; 2.72 [0.49–10.53], 4.10 [0.96–17.58]）。

表 8. 妊娠初期の母親の血清葉酸濃度（自然対数変換値）と NCCs 由来器官の先天異常との関連（先天異常を有しない児の母親との比較）

|                                        | No. of infants<br>with birth<br>defects | Maternal serum<br>folate (nmol/L) | Crude<br>ORs (95% CIs) | Adjusted<br>ORs (95% CIs) |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|---------------------------|
| All birth NCC defects                  | 161                                     | 16.5 (13.5, 21.7)                 | 1.09 (0.73–1.62)       | 1.02 (0.65–1.58)          |
| NTDs                                   | 6                                       | 19.9 (14.9, 26.5)                 | 2.52 (0.37–17.25)      | 2.01 (0.21–19.05)         |
| CHDs                                   | 125                                     | 16.5 (13.4, 20.6)                 | 0.94 (0.60–1.48)       | 0.83 (0.50–1.37)          |
| CHDs classifications                   |                                         |                                   |                        |                           |
| Septal heart defects                   | 80                                      | 16.4 (13.3, 21.0)                 | 1.04 (0.59–1.82)       | 0.91 (0.49–1.70)          |
| Conotruncal heart defects              | 5                                       | 16.5 (15.9, 20.6)                 | 1.01 (0.11–9.49)       | 0.74 (0.08–7.19)          |
| Left ventricle outflow obstruction     | 9                                       | 14.9 (12.9, 16.5)                 | 0.30 (0.05–1.76)       | 0.23 (0.03–1.68)          |
| Right ventricle outflow obstruction    | 17                                      | 16.1 (13.8, 26.3)                 | 1.11 (0.33–3.71)       | 0.91 (0.25–3.27)          |
| CHDs phenotype                         |                                         |                                   |                        |                           |
| Ventricular septal defects             | 61                                      | 16.3 (12.7, 19.9)                 | 0.73 (0.38–1.40)       | 0.63 (0.30–1.33)          |
| Atrial septal defects                  | 12                                      | 22.2 (13.7, 30.5)                 | 3.30 (0.86–12.62)      | 2.27 (0.49–10.53)         |
| Pulmonary valve stenosis               | 17                                      | 16.1 (13.8, 26.3)                 | 1.19 (0.36–3.95)       | 0.93 (0.26–3.31)          |
| Orofacial cleft phenotype              |                                         |                                   |                        |                           |
| Cleft lip with or without cleft palate | 13                                      | 19.0 (15.9, 21.3)                 | 2.25 (0.60–8.38)       | 4.10 (0.96–17.58)         |
| Cleft palate (alone)                   | 8                                       | 18.9 (13.9, 22.7)                 | 0.81 (0.13–4.87)       | 0.47 (0.06–3.62)          |
| Hypospadias                            | 4                                       | 21.6 (12.1, 35.1)                 | 2.86 (0.28–29.65)      | 1.86 (0.10–34.66)         |
| Limb reduction                         | 2                                       | 16.8 (15.9, 17.7)                 | 0.83 (0.02–30.19)      | 2.92 (0.05–157.08)        |

CHDs, congenital heart defects; CI, confidence interval; NCCs, neural crest cells; NTDs, neural tube defects; OR, odds ratio.

Serum folate, median (IQR). Serum folate level of women who had infants without birth defects was 16.5 nmol/L.

ORs (with 95% CI) per log-transformed folate concentration in maternal serum

folate level.

Adjusted for maternal age (continuous variable), parity, educational level (years), assisted reproductive technology, smoking, alcohol, body mass index (continuous variable), and medication use.

CHDs were classified by a previous study (van Beyunm IM et al., 2006; Li X et al., 2013; Czeizel AE et al., 2015).

血清葉酸濃度の四分位での分析（表 9）でも、第 1 四分位と比較して上位になるほど ORs 低下傾向がみられたものは、VSD であったが、統計学的有意差はみられなかった。先行研究で妊娠前の葉酸摂取により疾患発生の予防効果が認められている NTDs は本対象者中 6 児、その母親の妊娠初期の平均血清葉酸濃度は 19.9 nmol/L であった。対数変換した血清葉酸濃度が 1 単位上昇する毎の調整後 ORs[95%CI] は 2.01[0.21–19.05]であった。また、四分位での検討でも葉酸濃度が上位になるほど ORs は上昇傾向を示したが、いずれも統計学的有意差はみられなかった。

表 9 . 妊娠初期の母親の血清葉酸濃度(四分位)と NCCs 由来器官の先天異常との関連

|                                                  | No. Birth defects | Quartile 1 |      | Quartile 2 |                        | Quartile 3 |                        | Quartile 4 |                        | P for trend |
|--------------------------------------------------|-------------------|------------|------|------------|------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|-------------|
|                                                  |                   | No.        | ORs  | No.        | ORs (95% CI)           | No.        | ORs (95% CI)           | No.        | ORs (95% CI)           |             |
| All birth defects from neural crest cell defects | 161               | 40         | 1.00 | 41         | 1.05<br>(0.67 – 1.65)  | 40         | 0.88<br>(0.55 – 1.41)  | 40         | 0.97<br>(0.60 – 1.55)  | 0.712       |
| NTDs                                             | 6                 | 1          | 1.00 | 1          | 1.21<br>(0.07 – 19.80) | 1          | 1.33<br>(0.08 – 21.80) | 3          | 3.23<br>(0.27 – 38.52) | 0.350       |
| CHDs                                             | 125               | 33         | 1.00 | 34         | 1.02<br>(0.62 – 1.68)  | 29         | 0.70<br>(0.40 – 1.21)  | 29         | 0.83<br>(0.49 – 1.40)  | 0.271       |
| CHD classification                               |                   |            |      |            |                        |            |                        |            |                        |             |
| Septal heart defects                             | 80                | 21         | 1.00 | 21         | 0.91<br>(0.48 – 1.72)  | 19         | 0.64<br>(0.32 – 1.30)  | 19         | 0.85<br>(0.44 – 1.63)  | 0.444       |
| Conotruncal heart defects                        | 5                 | 1          | 1.00 | 2          | 2.20<br>(0.19 – 24.89) | 1          | 0.98<br>(0.06 – 16.16) | 1          | 0.80<br>(0.05 – 13.62) | 0.698       |
| Left ventricle outflow obstruction               | 9                 | 3          | 1.00 | 4          | 1.62<br>(0.35 – 7.42)  | 1          | 0.38<br>(0.04 – 3.78)  | 1          | -                      | 0.116       |
| Right ventricle outflow obstruction              | 17                | 4          | 1.00 | 6          | 1.45<br>(0.41 – 5.16)  | 1          | 0.23<br>(0.03 – 2.08)  | 6          | 1.29<br>(0.35 – 4.74)  | 0.901       |
| Other CHDs                                       | 14                | 4          | 1.00 | 1          | 0.35<br>(0.04 – 3.41)  | 7          | 2.07<br>(0.51 – 8.47)  | 2          | 0.75<br>(0.12 – 4.69)  | 0.699       |
| CHD phenotype                                    |                   |            |      |            |                        |            |                        |            |                        |             |
| Ventricular septal defects                       | 61                | 17         | 1.00 | 17         | 0.95<br>(0.47 – 1.91)  | 17         | 0.68<br>(0.32 – 1.46)  | 10         | 0.61<br>(0.27 – 1.36)  | 0.159       |
| Atrial septal defects                            | 12                | 3          | 1.00 | 2          | 0.31<br>(0.03 – 3.04)  | 1          | 0.30<br>(0.03 – 2.97)  | 6          | 1.19<br>(0.26 – 5.35)  | 0.672       |
| Pulmonary valve stenosis                         | 17                | 4          | 1.00 | 6          | 1.44<br>(0.40 – 5.13)  | 1          | 0.23<br>(0.03 – 2.05)  | 6          | 1.23<br>(0.34 – 4.51)  | 0.842       |

|                                        | No. Birth defects | Quartile 1 |      | Quartile 2 |                        | Quartile 3 |                        | Quartile 4 |                        | P for trend |
|----------------------------------------|-------------------|------------|------|------------|------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|-------------|
|                                        |                   | No.        | ORs  | No.        | ORs                    | No.        | ORs                    | No.        | ORs                    |             |
| Orofacial cleft phenotype              |                   |            |      |            |                        |            |                        |            |                        |             |
| Cleft lip with or without cleft palate | 13                | 1          | 1.00 | 4          | 5.48<br>(0.60 – 50.17) | 5          | 5.85<br>(0.64 – 53.63) | 3          | 5.38<br>(0.54 – 54.13) | 0.162       |
| Cleft palate (alone)                   | 8                 | 2          | 1.00 | 1          | 0.52<br>(0.05 – 5.75)  | 3          | 1.50<br>(0.24 – 9.18)  | 2          | 0.46<br>(0.04 – 5.26)  | 0.805       |
| Hypospadias                            | 4                 | 2          | 1.00 | 0          | -                      | 0          | -                      | 2          | 0.67<br>(0.06 – 7.87)  | 0.560       |
| Lim reduction                          | 2                 | 0          |      | 1          | -                      | 1          | -                      | 0          | -                      | 0.582       |

CHDs, congenital heart defects; CI, confidence interval; NCCs, neural crest cells; NTDs, neural tube defects; OR, odds ratio.

Adjusted for maternal age (continuous variable), parity, educational level (years), assisted reproductive technology, smoking, alcohol, body mass index (continuous variable), medication use.

### 3. 考察

本研究は前向きコホート研究を用いて母体の妊娠初期の血清葉酸濃度と児の先天異常との関連を検討した。血清葉酸濃度（自然対数変換値）の上昇により、神経系先天異常および口唇口蓋裂リスクの調整後 ORs 上昇傾向がみられた一方で、尿路系、筋骨格系先天異常の調整後 ORs は減少傾向がみられた。NCCs 由来器官の先天異常では、ASD や口唇裂の調整後 ORs 上昇傾向がみられたが、VSD の調整後 ORs は減少傾向がみられた。しかし、いずれの関連も統計学的に有意ではなかった。先行研究で妊娠前から妊娠初期の葉酸摂取により発生抑制効果が確認されている NTDs では、血清葉酸濃度上昇による調整後 ORs の増加傾向があったが、NTDs の児が 6 例と少数であったことに注意する必要がある。

#### 1) 妊娠初期の血清葉酸レベルと出生児の先天異常リスクとの関連

本研究では、先天異常を持つ児と持たない児の母親両群の妊娠初期の血清葉酸濃度に差はみられなかった。これまでに本研究と同様に妊娠初期～中期の母体血の葉酸濃度を測定し、児の CHDs や口唇口蓋裂との関連を検討した研究は 2 つある。サウジアラビアにおける葉酸レベルと CHDs, 口唇裂などを含めた先天異常リスクとの関連を研究した前向きコホート研究 (Hammouda SA et al., 2013) は、先天異常のある児をもつ母親の妊娠初期の血清葉酸レベルは平均 40.85 nmol/L、先天異常のない児をもつ母親の血清葉酸レベルは平均 50.50 nmol/L で両者間には有意な差がみられている ( $P<0.001$ )。しかし、彼らの研究では対象者は 1,180 名と少なく、社会経済要因、妊娠前 BMI、喫煙習慣などの交絡の影響が考慮されていない。アメリカ・カルフォルニア州において、円錐動脈幹異常や口唇裂を有する子どもの母親と先天異常のない子どもの母親の妊娠第 15~18 週時の血清葉酸レベルを検討した (Shaw et al., 2009; 2014)。彼らは本研究と同様に出生児の円錐動脈幹異常または口唇裂発生との関連は認められなかったことを報告しているが、その理由として、研究開始時は既にカルフォルニア州で穀物への葉酸添加が行われていたことから、日常的に食事から葉酸が摂取できていたことを挙げている。アメリカでは NTDs 予防のために 1998 年から穀物への葉酸添加が定められた。それによって 1999~2006 年では出産時期にある女性の血清葉酸濃度の低レベル (3.0 ng/mL あるいは 6.8 nmol/L 未満) は約 0.8% と極めて少なくなった (McDowell MA et al., 2008)。Shaw らは対象集団の血清葉酸濃度が高かったことが関連性をみいだせなかった理由の一つであると考察している。

わが国の妊娠初期の妊婦の葉酸濃度を滝本 (Takimoto H et al., 2007.) と松崎 (Matsuzaki M et al., 2008.) が報告している。滝本の報告によると、東京都在住の妊婦 51 人の平均血清葉酸濃度は 23.2 nmol/L であった。また、松崎は東京都在住の妊娠初期の妊婦 118 人の血清葉酸濃度の中央値は 4.8 ng/mL (著者換算 10.9 nmol/L) であったと報告している。本研究の対象者の血清葉酸濃度 (中央値) は 16.5 nmol/L で、松崎の対象者よりも血清葉酸濃度は高かった。また、6.8nmol/L 未満の低レベル群は 0.7% であり、アメリカの葉酸の穀物添加政策実施後に McDowell ら (McDowell MA et al., 2008) が報告した血清葉酸値低レベル群 0.8% とほぼ同様であった。これらは、本研究で妊娠初期の血清葉酸レベルと児の先天異常発生との間に正や負の関連がありそうだったが、統計学的に有意ではなかった理由の一つであると考ええる。

## 2) 器官形成における葉酸摂取の影響

葉酸は、DNA および S-アデノシルメチオニンの合成のためのピリミジンおよびプリンを産生する 1 炭素代謝に不可欠な栄養素であるため、細胞の増殖および細胞生存自体にも必須である (Copp AJ et al., 2010)。また、NCCs は、交感・副交感神経細胞、感覚神経細胞、グリア細胞、平滑筋、骨・軟骨 (頭部、顔面)、結合組織、そして心臓神経堤細胞などに分化するが (Hall BK, 2008)、葉酸は細胞膜上に存在する葉酸受容体タンパク葉酸受容体  $\alpha$  と結合し、細胞内へ輸送され、細胞核内に到着し、NCCs の増殖・維持に関わる遺伝子 *Hes1* と結合し、転写遺伝子として働く (Boshnjaku V et al, 2012)。この NCCs の増殖・分化を調整する遺伝子発現にはヒストン修飾の有無が影響するが、葉酸はメチオニン回路で DNA/ヒストンなどのメチル化に必要なメチル基の供給に働くため、神経幹細胞の増殖・分化には葉酸の働きが重要である (Ichi S et al., 2013)。一方で、稲垣は NTDs の子どもの母親の妊娠初期の血清や赤血球葉酸レベルが必ずしも低いわけではないことから、母親や胎児の葉酸代謝過程に何らかの障害があるためにメチオニン回路におけるメチル化が遅くなり、メチオニンからホモシステインへの代謝が促進され、メチオニン不足とホモシステイン過剰が引き起される可能性を指摘している。したがって、葉酸の十分な補充はこの過程を補完し、結果的に正常のメチオニン、ホモシステイン濃度を維持すること、その結果として葉酸は NTDs のうち、開放性二分脊椎の一部に予防効果があると述べている (稲垣, 2011)。体内における葉酸の働きは、経口摂取する葉酸量だけではなく、葉酸代謝に関与する多様な遺伝子が複合的に関与する (Bueno O et al., 2016)。

また、葉酸代謝関連遺伝子と妊娠前の葉酸補充による環境要因と遺伝子の相互作用が CHDs と口唇裂に認められたという報告がある (van Beynum IM et al., 2006; Tang X et al., 2015; Ibarra-Lopez JJ et al., 2013)。このことは、葉酸欠乏状態は直接的に先天異常のリスクに影響を及ぼすというよりも、DNA メチル化反応またはヌクレオチド合成のためのメチル基の生体内利用率に影響を及ぼすことによって、先天異常発生に関与することを示唆している。われわれは器官形成期における葉酸の先天異常への影響を検討するために、妊娠 10.8 (SD, 1.7) 週に葉酸濃度測定を行なった。しかし、最も疾患数の多い心臓に著しい形態異常をきたす時期は胎齢 3~6 週であり、本研究の採血時期はこの時期を過ぎていた。このことも、本研究において血清葉酸濃度と先天異常発生リスクとの関連が認められなかった一因であることが考えられる。胎齢 3~6 週 (妊娠 5~8 週) は、女性自身が妊娠の可能性を考え、受診する時期にあたる。われわれが葉酸濃度測定のために参加者から血液採取するまでの間、妊娠の可能性を考慮して非妊娠時よりも葉酸を多く摂取した可能性や、悪阻により食事内容に変化が生じた可能性もある。しかし、胎齢 3~6 週 (妊娠 5~8 週) 以前に対象者を登録することは困難である。器官形成の感受性の高い時期を若干すぎた時期の葉酸濃度測定ではあるが、これまで妊娠初期の葉酸濃度と先天異常との関連を検討した研究は少なく、葉酸と先天異常との関連を検討する上での基礎的研究であると考えられる。

NCCs 由来器官の先天異常、特に CHDs や口唇裂と葉酸関与のメカニズムやリスクはまだ未解明なことが多いため、今後も *in vitro study* や前向きコホート研究による集団ベースによる研究を重ねる必要がある。

### 3) 母親の妊娠期の葉酸摂取と児の健康影響の検討

妊娠期の葉酸摂取の負の影響の可能性として、国際的に政策としての穀物への葉酸添加が進む中、2000 年代から妊娠前あるいは初期の葉酸補充と出生児の健康影響として小児アレルギー疾患増加との関連が研究されている。Hollingsworth (2008) はマウスの実験により、葉酸は体内でメチル基供与体として、遺伝子プロモーター領域の後天的修飾・DNA メチル化を促進させるが、葉酸摂取が過剰な場合は、遺伝子発現を不活性化させるために、胎児の免疫系発達を阻害することで出生後の免疫アレルギー疾患リスクを増加させることを示唆している。近年の研究では、妊娠中の葉酸摂取が小児アレルギー疾患を増加させる (Veeranki SP et al., 2015; Zetstra-van der Woude PA et al., 2014; Whitrow M et al., 2009)、あるいは関連が認められない (Yang L et al., 2015; Martinussen MP et al., 2012; Roy A et al., 2018;

Magdelijns FJ et al., 2011; Vereen S et al., 2018) と、結果は一樣ではない (表 11)。この理由として、宮下らは各研究が血中の葉酸濃度を測定せずに葉酸摂取量を使用している曝露評価の問題の他、対象者間の葉酸代謝酵素遺伝子多型による酵素活性の差異、酵素活性に影響を及ぼす喫煙曝露との相互作用、喘息発症リスクに対する出生後の環境要因の検討の不十分さなどを挙げている (宮下ら, 2016)。妊娠前および初期の母親への葉酸摂取の推進をさらに推奨するためには、その先天異常に対する予防効果のみならず、胎児・出生児への副作用を検証するさらなる研究と慎重な検討が必要である。

表 11. 妊娠期の葉酸摂取、葉酸濃度と子どもの健康影響

喘息・喘鳴

| First author, year, Region                              | Design     | No. of sample or cases/controls | Exposure                                                                                                                                                                               | Results                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------|------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Veeranki SP, et al.<br>2015<br>USA                      | Cohort (R) | 104,428                         | filling folic acid-containing prescriptions during pregnancy<br>no folic acid prescription (reference)<br>first trimester only<br>after first trimester<br>first trimester and beyond. | Asthma diagnosis in children at age 4.5–6 years<br>Adjusted OR (95%CI)<br>first trimester only: 1.2 (1.1–1.3)<br>after first trimester: 1.0 (1.0–1.1)<br>in first trimester and beyond: 1.2 (1.2–1.3) |
| Yang L, et al.<br>2015<br>China                         | CC (H)     | 150 cases /212 controls         | folic acid supplementation for mother during pregnancy                                                                                                                                 | Asthma<br>All: 0.72 (0.37–1.39)<br>high-dose supplementation (>72,000 µg/day)<br>3.16 (1.15–8.71)<br>low-dose supplementation (<36,000 µg·d; OR = 0.36, 95% CI = 0.17–0.77).                          |
| Zetstra-van der Woude PA, et al.<br>2014<br>Netherlands | Cohort     | 913                             | high-dose folic acid (5mg) during pregnancy (compared with children who were not exposed to this high dose)                                                                            | Asthma<br>1.14 (95%CI: 1.04–1.30)                                                                                                                                                                     |
| Martinussen MP, et al<br>2012<br>U.S.A                  | Cohort (P) | 1499                            | folic acid supplementation in pregnancy                                                                                                                                                | Asthma at 6 years<br>month before conception 0.95 (0.68–1.32)<br>first trimester 1.23 (0.73–2.07)                                                                                                     |

| First author, year, Region             | Design     | No. of sample or cases/controls | Exposure                                                                                                                                             | Results                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------|------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Whitrow M, et al<br>2009<br>Australian | Cohort (P) | 557                             | Maternal folate intake from diet and supplements was assessed by food frequency questionnaire in early (<16 weeks) and late (30–34 weeks) pregnancy. | Asthma at 3.5 Years<br>Prepregnancy<br>supplement: 1.22 (0.70–2.15)<br>Early pregnancy<br>Diet (100 µg /day): 1.09 (0.78–1.51)<br>Supplement, mg/day: 0.92 (0.79–1.08)<br>Late pregnancy<br>Diet (100 µg /day): 1.03 (0.66–1.60)<br><b>Supplement, mg/day: 1.26 (1.09–1.47)</b> |
| Roy A, et al.<br>2018<br>USA           | Cohort (P) | 875                             | maternal 2nd trimester plasma folate levels (ng/ml)                                                                                                  | maternal 2nd trimester plasma folate levels (ng/ml) as a continuous measure; expressed as 10 ng/ml increment<br>Adjusted OR (95%CI)<br>Current wheeze in the 3rd year of life<br>0.97 (0.84–1.12)                                                                               |
| Magdelijns FJ, et al<br>2011<br>Dutch  | Cohort     | 2834                            | folic acid supplementation and higher intracellular folic acid (ICF) levels during pregnancy.                                                        | at age 6 to 7 years in a dose-dependent manner<br>P for trend=0.05)                                                                                                                                                                                                             |

#### 気管支炎

| First author, year, Region      | Design     | No. of sample or cases/controls | Exposure                                    | Results                                                                                                                                                       |
|---------------------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vereen S, et al.<br>2018<br>USA | Cohort (R) | 676                             | maternal 2nd trimester plasma folate levels | maternal 2nd trimester plasma folate levels (ng/ml) (Quartile)<br>Adjusted OR (95%CI)<br>Q2: 1.17 (0.68–2.00)<br>Q3: 0.74 (0.42–1.31)<br>Q4: 0.73 (0.40–1.31) |

アトピー性皮膚炎

| First author, year,<br>Region | Design     | No. of sample<br>or<br>cases/controls | Exposure                                                  | Results                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------|------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Roy A, et al.<br>2018<br>USA  | Cohort (P) | 875                                   | maternal 2nd<br>trimester plasma<br>folate levels (ng/ml) | maternal 2nd trimester plasma folate levels (ng/ml) as a<br>continuous measure; expressed as 10 ng/ml increment<br>Adjusted OR (95%CI)<br>Atopic dermatitis at age 3 years<br>1.04 (0.92–1.19) |

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Cohort (P), prospective cohort study; Cohort (R): retrospective cohort study; CC (H) , hospital based case-control study

#### 4) 本研究の強みと弱み

本研究の強みは、第 1 に出生コホート研究によって妊婦の妊娠初期の葉酸濃度を評価したことである。先行研究の多くは妊娠期の葉酸状況の評価に葉酸サプリメント摂取を使用しているが、本研究では、器官形成期の葉酸の影響を評価するために血清葉酸濃度を測定した。さらに、妊娠初期からの前向きコホート研究であるために、先天異常と妊娠初期の葉酸濃度との関連を評価する上で交絡因子となりうる妊娠初期の喫煙、飲酒、服薬などの生活環境要因に関するリコールバイアスを除外することができている。第 2 に本研究には、北海道内のクリニック、産婦人科病院、自治体病院、大学病院などの様々な医療規模の出産施設に受診している妊婦が参加したことである。そのため北海道の一般的な妊婦の生活環境と先天異常との関連を評価することが可能となった (Hanaoka T et al., 2018)。

一方で、本研究には 4 つの弱みがある。第 1 に出生児の先天異常情報は、出産施設からの医療情報だけでなく、出産後 1 年と 2 年の母親への自記式質問調査票から出産施設の退院以降に判明した先天異常についての情報を得た。そのため、退院後に判明した先天異常情報は、医療記録による医学的診断を確認できていないことから、先天異常の有無やその表現型に誤分類が生じた可能性がある。しかし、先天異常としては最も一般的な CHDs は出生後数日では診断されないことが多いため、このような対応を行った。第 2 に本研究では、採血前の食事摂取条件を指定せずに得られた検体を用いて血清葉酸濃度を測定したことである。体内葉酸レベルを評価する指標には血清葉酸濃度と赤血球葉酸濃度がある。一般的に赤血球葉酸濃度は長期間の体内葉酸濃度を表す指標である一方、血清葉酸濃度は短期間の体内葉酸濃度の指標とされ、測定前の食物摂取の影響を受ける。しかし、赤血球葉酸濃度測定は血清葉酸濃度測定と比較して測定が複雑であり、日本の保健医療機関の通常検査では血清葉酸濃度を測定する。また、大規模の疫学調査では利便性の観点から血清葉酸濃度が使用されることが多く、本研究でも体内葉酸状況の評価として血清葉酸濃度を使用した。さらに、本研究では血液採取は、参加者の妊婦健診施設に依頼したが、本研究のために食事条件を指定するのは困難であった。Prinz-Langenohl R ら (1999) は葉酸摂取後の血漿葉酸濃度の推移を研究し、葉酸を摂取後の数時間で濃度はピークとなり、約 8 時間前後で摂取前の濃度に戻ることを報告している。しかし、妊娠初期の採血は出生児の先天異常情報を得るよりも前に行っており、集団全体でみれば採血方法が結果に影響を及ぼすことはなかったと考える。第 3 の研究の弱みとして、本研究は約 2 万人の妊婦を対象とした大規模のコホート研究である

が、先天異常数や血清葉酸濃度の低レベル者が少なかったことである。妊娠前の葉酸摂取に発生の予防効果がある二分脊椎の北海道スタディにおける頻度は 1.6（出生 10,000 対）（Hanaoka T et al., 2018）であり、二分脊椎を有する児 10 名以上確保するには 62,500 名以上の集団が必要である。しかし、本研究では在胎 12 週以降に出生した児を対象としていることで、在胎 22 週以降の出生を対象としたクリアリングハウス国際モニタリングセンター日本支部の先天異常報告や他の出生コホート研究と合わせて検討することで、わが国の先天異常発生状況をより多角的に検討することができると考える。また、低葉酸濃度と先天異常との関連を検討するには、本研究の対象者における血清葉酸濃度の低レベルは 0.7% と少数であった。しかし、血液葉酸濃度は通常健康診査や妊婦の健康診査の検査項目には該当しないため、わが国の健康な生殖期女性や妊婦の葉酸濃度の分布に関する報告は少ない。そのため、約 2 万人の妊婦の妊娠初期の葉酸濃度分布を提示した本研究は、今後の葉酸摂取促進に向けた支援をする上でも重要な基礎的資料である。

研究の弱みの最後として、本研究では測定しなかった要因、例えば妊娠初期の放射線や化学物質への曝露、大気汚染、そして妊娠初期の感染症罹患などの影響が先天異常発生に関与していた可能性もある。

#### 4. 結論

本研究では母親の妊娠初期の血清葉酸濃度と出生児の先天異常出現との間に有意な関連は認められなかった。しかし、わが国において大規模コホート研究により妊娠初期の葉酸レベルを測定し、器官形成期の葉酸と先天異常発生リスクとの関連を検討した基礎的研究として意義があると考えられる。

わが国は未だに妊娠可能性世代女性の葉酸サプリメント摂取率が低く、妊娠可能年齢の女性の食事からの葉酸摂取量も推奨量前後であること、さらに諸外国と比較して NTDs の大幅な減少にいたっていない。NTDs 予防のための葉酸摂取を促進するためにも、NTDs 以外の先天異常と葉酸摂取に関する大規模コホート研究を利用したネステッドケースコントロール研究やケースコホート研究などによって妊娠初期血清葉酸濃度、葉酸代謝遺伝子多型、環境要因と先天異常との関連を検討し、環境要因による先天異常発症予防に向けたエビデンスを提示していく必要がある。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、「環境と子どもの健康に関する北海道研究」に参加登録していただいた皆様に心より感謝申し上げます。また、研究を進めるにあたり細やかなご指導ご助言をいただきました北海道大学環境健康科学研究教育センター花岡知之招聘教員、荒木敦子准教授、宮下ちひろ特任准教授、伊藤佐智子特任講師、小林澄貴特任講師、田村菜穂美氏、「環境と子どもの健康に関する北海道研究」のスタッフの皆様、先天異常情報の分析に貴重なお指導ご助言をいただきました北海道大学病院周産期センター長和俊准教授、基礎論文作成にご指導ご助言をいただきました北海道大学水上尚典名誉教授、札幌医科大学産婦人科遠藤俊明前准教授、札幌医科大学産婦人科馬場剛講師、旭川医科大学産婦人科千石一雄教授、旭川医科大学医学部産婦人科学講座宮本敏伸講師、講義・ゼミ、論文作成においてご指導ご助言をいただきました北海道大学大学院医学研究院社会医学分野公衆衛生学教室中村幸志准教授、佐々木成子助教、趙文静助教、研究生活を支えてくれました公衆衛生学教室の教室員の皆様、事務職員の皆様、大阪市立大学の鶴川重和准教授、医薬基盤・健康・栄養研究所の岡田恵美子主任研究員に深く感謝申し上げます。

長きに渡りご指導ご助言いただきました北海道大学環境健康科学研究教育センター岸玲子特別招聘教授(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 名誉教授)、そして北海道大学大学院医学研究院社会医学分野公衆衛生学教室玉腰暁子教授に心より深く御礼申し上げます。

最後に研究生活を支えてくれた家族に感謝いたします。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金 H26-科学一般 002、文部科学省科学研究費基盤 A 16H02645、文部科学省科学研究費基盤 C 24593373 の助成を受けたものである。

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はありません。

## 引用文献

Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J, Hong SX, Correa A. (1999). Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 341:1485-1490.

Bille C, Olsen J, Vach W, Knudsen VK, Olsen SF, Rasmussen K, Murray JC, Andersen AM, Christensen K. (2007). Oral clefts and life style factors--a case-cohort study based on prospective Danish data. *Eur J Epidemiol* 22:173-181.

Boshnjaku V, Shim KW, Tsurubuchi T, Ichi S, Szany EV, Xi G, Mania-Farnell B, McLone DG, Tomita T, Mayanil CS. (2012). Nuclear localization of folate receptor alpha: a new role as a transcription factor.

Bueno O, Molloy AM, Fernandez-Ballart JD, Garcia-Minguillan C, Ceruelo S, Rios L, Ueland P, Meyer K, Murphy M. (2016). Common polymorphisms affecting folate transport to metabolism modify the effect of the MTHFR 677C>T polymorphism on folate status. *J Nutr* 146:1-8.

Copp AJ, Greene ND. (2010). Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol* 220, 217-230.

Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. (2011). Folic acid food fortification--its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients* 3, 370-384.

Czeizel AE, Dudás I. (1992). Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327:1832-1835.

Czeizel AE, Vereczkey A, Szabó I. (2015). 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* 193:34-39.

De-Regil LM, Peña-Rosas JP, Fernández-Gaxiola AC, Rayco-Solon P. (2015). Effects and safety of periconceptional oral folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev.* (12):CD007950.

Feng Y, Wang S, Chen R, Tong X, Wu Z, Mo X. (2015). Maternal folic acid supplementation and the risk of congenital heart defects in offspring: a meta-analysis of epidemiological observational studies. *Sci Rep* 5:8506.

Hall BK. (2008). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci.*33: 781-793.

Hammouda SA, Abd Al-Halim OA, Mohamadin AM. (2013). Serum levels of some micronutrients and congenital malformations: prospective cohort study in healthy Saudi-Arabian first trimester pregnant women. *Int J Vitam Nutr Res* 83, 346-354.

Hanaoka T, Tamura N, Ito K, Sasaki S, Araki A, Ikeno T, Miyashita C, Ito Sachiko, Minakami H, Cho K, et al. (2018). Prevalence and the risk of birth defects observed in a prospective birth cohort study. *J Epidemiology* 28, 125-132.

Hobbs CA, Cleves MA, Melnyk S, Zhao W, James SJ. (2005). Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. *Am J Clin Nutr* 81:147-153.

Hobbs CA, Cleves MA, Zhao W, Melnyk S, James SJ. (2006). Congenital heart defects and maternal biomarkers of oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 82:598-604.

Hollingsworth JW, Maruoka S, Boon K, Garantziotis S, Li Z, Tomfohr J, Bailey N, Potts EN, Whitehead G, Brass DM, Schwartz DA. (2008) . In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest* 118:3462-9.

Ibarra-Lopez JJ, Duarte P, Antonio-Vejar V, Calderon-Aranda ES, Huerta-Beristain G, Flores-Alfaro E, Moreno-Godinez ME. (2013). Maternal C677T MTHFR polymorphism and environmental factors are associated with cleft lip and palate in a Mexican population. *J Investig Med* 61, 1030-1035.

Ichi S, Costa FF, Bischof JM, Nakazaki H, Shen YW, Boshnjaku V, Sharma S, Mania-Farnell B, McLone DG, Tomita T, Soares MB, Mayanil CS. (2010). Folic acid remodels chromatin on *Hes1* and *Neurog2* promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem* 285, 36922-36932.

Ichi S, Mayanil C, Tomita T. (2013). Multifactorial causation of spina bifida and its prevention: The role of maternal folic acid intake involves epigenetic component. *Jpn J Neurosurg.* 22: 256-268

İscan B, Tuzun F, Eroglu Filibeli B, Cilekar Micili S, Ergur BU, Duman N, Ozkan H, Kumral A. (2018). Effects of maternal folic acid supplementation on airway remodeling and allergic airway disease development. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 27:1-9.

Källén B. (2007). Congenital malformations in infants whose mothers reported the use of folic acid in early pregnancy in Sweden. A prospective population study. *Congenit Anom* 47:119-24.

Kishi R, Sasaki S, Yoshioka E, Yuasa M, Sata F, Saijo Y, Kurahashi N, Tamaki J, Endo T, Sengoku K, et al. (2011). The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Cohort profile: the Hokkaido study on environment and children's health in Japan. *Int J Epidemiol* 40:611-618.

Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Sasaki S, Okada E, Kobayashi S, Kashino I, 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* 18:429-450.

Kishi R, Araki A, Minatoya M, Hanaoka T, Miyashita C, Itoh S, Kobayashi S, Ait Bamai Y, Yamazaki K, Miura R, et al. (2017). The Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: cohort profile—updated 2017. *Environ Health Prev Med*. 22;46.

Li S, Chao A, Li Z, Moore CA, Liu Y, Zhu J, Erickson JD, Hao L, Berry RJ, et al. (2012). Folic acid use and nonsyndromic orofacial clefts in China: a prospective cohort study. *Epidemiology* 23:423-432.

Li X, Li S, Mu D, Liu Z, Li Y, Lin Y, Chen X, You F, Li N, Deng K, et al. (2013). The association between periconceptional folic acid supplementation and congenital heart defects: a case-control study in China. *Prev Med* 56:385-389.

Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D, Cardy A, Clayton-Smith J, Fryer AE; ITS MAGIC collaboration. (2008). Folate and clefts of the lip and palate—a U.K.-based case-control study: Part I: Dietary and supplemental folate. *Cleft Palate Craniofac J* 45:420-427.

Little J, Gilmour M, Mossey PA, FitzPatrick D, Cardy A, Clayton-Smith J, Hill A, Duthie S, Fryer A, Molloy A, Scott J, ITS MAGIC Collaboration. (2008). 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* 45:428-438.

Liu S, Joseph KS, Luo W, León JA, Lisonkova S, Van den Hof M, Evans J, Lim K, Little J, Sauve R, Kramer MS, et al. (2016). Effect of Folic Acid Food Fortification in Canada on Congenital Heart Disease Subtypes. *Circulation* 134: 647-55.

Magdelijns FJ, Mommers M, Penders J, Smits L, Thijs C. (2011). Folic acid use in pregnancy and the development of atopy, asthma, and lung function in childhood. *Pediatrics* 128:e135-44.

Martinussen MP, Risnes KR, Jacobsen GW, Bracken MB. (2011). Folic acid supplementation in early pregnancy and asthma in children aged 6 years. *Am J Obstet Gynecol.* 206:72.e1-7.

Matsuzaki M, Haruna M, Ota E, Sasaki S, Nagai Y, Murashima S. (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.

McDowell MA, Lacher DA, Pfeiffer CM, Mulinare J, Picciano MF, Rader JI, Yetley EA, Kennedy-Stephenson J, Johnson CL. (2008). Blood folate levels: the latest NHANES results. *NCHS Data Brief* 6:1-8.

MRC Vitamin Study Research Group. (1991). Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338:131-137.

Munger RG, Tamura T, Johnston KE, Feldkamp ML, Pfister R, Cutler Richard, Murtaugh MA, Carey JC. (2011). Oral clefts and maternal biomarkers of folate-dependent one-carbon metabolism in Utah. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol* 91:153-161.

Ormond G, Nieuwenhuijsen MJ, Nelson P, Toledano MB, Iszatt N, Geneletti S, Elliott P. (2009). Endocrine disruptors in the workplace, hair spray, folate supplementation, and risk of hypospadias: case-control study. *Environ Health Perspect* 117:303-307.

Prinz-Langenohl R, Brönstrup A, Thorand B, Hages M, Pietrzik K. (1999). Availability of food folate in humans. *J Nutr* 129:913-916.

Rozendaal AM, van Essen AJ, te Meerman GJ, Bakker MK, van der Biezen JJ, Goorhuis-Brouwer SM, Vermeij-Keers C, de Walle HE, et al. (2013). 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* 28:875-887.

Roy A, Kocak M, Hartman TJ, Vereen S, Adgent M, Piyathilake C, Tylavsky FA, Carroll KN. (2018). Association of prenatal folate status with early childhood wheeze and atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 29:144-150.

Shaw GM, Vollset SE, Carmichael SL, Yang W, Finnell RH, Blom H, Ueland PM. (2009). Nested case-control study of one-carbon metabolites in mid-pregnancy and risks of cleft lip with and without cleft palate. *Pediatr Res* 66, 501-506.

Shaw GM, Yang W, Carmichael SL, Vollset SE, Hobbs CA, Lammer EJ, Ueland PM. (2014). One-carbon metabolite levels in mid-pregnancy and risks of conotruncal heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100,107-115.

Smedts HP, Rakhshandehroo M, Verkleij-Hagoort AC, de Vries JH, Ottenkamp J, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. (2008). Maternal intake of fat, riboflavin and nicotinamide and the risk of having offspring with congenital heart defects. *Eur J Nutr.* 47:357-365.

Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller M J, Nevin N C, Harris R, Read A P, Fielding D W. (1981). Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Arch Dis Child* 56:911-918.

Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. (1976). Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 51.

Takimoto H, Mito N, Umegaki K, Ishiwaki A, Kusama K, Abe S, Yamawaki M, Fukuoka H, Ohta C, Yoshiike N. (2007). Relationship between dietary folate intakes, maternal plasma total homocysteine and B-vitamins during pregnancy and fetal growth in Japan. *Eur J Nutr* 46:300-306.

Tang X, Cleves MA, Nick TG, Li M, MacLeod SL, Erickson SW, Li J, Shaw GM, Mosley BS, Hobbs CA; National Birth Defects Prevention Study. (2015). Obstructive heart defects associated with candidate genes, maternal obesity, and folic acid supplementation. *Am J Med Genet Part A* 167, 1231-1242.

van Beynum IM, Kapusta L, Bakker MK, den Heijer M, Blom HJ, de Walle HE. (2010). 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* 31:464-471.

van Beynum IM, Kapusta L, Den Heijer M, Vermeulen SH, Kouwenberg M, Danieëls O, Blom HJ.(2006). Maternal MTHFR 677C>T is a risk factor for congenital heart defects: Effect modification by periconceptional folate supplementation. *Eur Heart J* 27, 981-987.

van Rooij IA, Swinkels DW, Blom HJ, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. (2003). Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol* 189:1155-1160.

Veeranki SP, Gebretsadik T, Mitchel EF, Tylavsky FA, Hartert TV, Cooper WO, Dupont WD, Dorris SL, Hartman TJ, Carroll KN. (2015). Maternal Folic Acid Supplementation During Pregnancy and Early Childhood Asthma. *Epidemiology* 26:934-41.

Vereen S, Gebretsadik T, Johnson N5, Hartman TJ, Veeranki SP, Piyathilake C, Mitchel EF, Kocak M, Cooper WO, Dupont WD, Tylavsky F, Carroll KN. (2018). Association Between Maternal 2nd Trimester Plasma Folate Levels and Infant Bronchiolitis. *Matern Child Health* Jul 19. doi: 10.1007/s10995-018-2610-2.

Verkleij-Hagoort AC, Verlinde M, Ursem NT, de Jonge R, Hop WC, Steegers-Theunissen RP. (2006a). Maternal hyperhomocysteinaemia is a risk factor for congenital heart disease. *BJOG* 113:1412-1418.

Verkleij-Hagoort, A.C, Vries JH, Ursem NT, de Jonge R, Hop WC, Steegers-Theunissen RP.(2006b). Dietary intake of B-vitamins in mothers born a child with a congenital heart defect. *European Journal of Nutrition* 45:478-486.

Wang T, Zhang HP, Zhang X, Liang ZA, Ji YL, Wang G.(2015). Is Folate Status a Risk Factor for Asthma or Other Allergic Diseases? *Allergy Asthma Immunol Res.* 7:538-46.

Wehby GL, Murray JC. (2010). Folic Acid and Orofacial Clefts: A Review of the Evidence. *Oral Dis* 16:11-19.

Whitrow MJ, Moore VM, Rumbold AR, Davies MJ. (2009). Effect of supplemental folic acid in pregnancy on childhood asthma: a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol* 170:1486-93.

Whitrow MJ, Moore VM, Rumbold AR, Davies MJ.(2009). Effect of supplemental folic acid in pregnancy on childhood asthma: a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol* 170:1486-93.

Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConnaughey DR, Abyholm F, Vindenes H, Vollset SE, Drevon CA.(2007). Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ* 334(7591):464.

Yang L, Jiang L, Bi M, Jia X, Wang Y, He C, Yao Y, Wang J, Wang Z. (2015). High dose of maternal folic acid supplementation is associated to infant asthma. *Food Chem Toxicol* 75:88-93.

Yang Q, Khoury MJ, Olney RS, Mulinare J. (1997). Does periconceptional multivitamin use reduce the risk for limb deficiency in offspring? *Epidemiology* 8:157-161.

Yila T, 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. (2016). Predictors of folate status among pregnant

Japanese women: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health 2002–2012. *British Journal of Nutrition* 115, 2227-2235.

Yila T, Sasaki S, Miyashita C, Braimoh T, Kashino I, Kobayashi S, Okada E, Baba T, Yoshioka E, Minakami H, Endo T, Sengoku K, Kishi R. (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.

Zetstra-van der Woude PA, De Walle HE, Hoek A, Bos HJ, Boezen HM, Koppelman GH, de Jong-van den Berg LT, Scholtens S. (2014). Maternal high-dose folic acid during pregnancy and asthma medication in the offspring. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 23:1059-1065.

稲垣隆介. (2011). 特集 小児脳神経外科における諸問題 神経発生からみた二分脊椎、その発生と予防について. *脳神経外科ジャーナル*. 20: 782-789.

梅垣敬三. (2014). 葉酸. *調剤と情報* 20, 85-88

倉橋典絵, 笠井世津子, 西條泰明, 佐田文宏, 岸玲子. (2005). 内分泌攪乱物質曝露に関する疫学研究の実際と課題－特に尿道下裂と停留精巣について. *日本公衆衛生誌* 60, 15-22

小林由香, 小原 拓, 目時弘二, 岩崎雅弘, 佐藤 博, 村井ユリ子, 眞野成康, 鈴木雅洲, 今井 潤, BOSHI 研究グループ. (2013). 妊婦における葉酸サプリメント摂取の評価: BOSHI 研究. *医薬品相互作用研究* 37, 37-43

近藤 厚生, 岩垣 重秋, 紀平 正道, 中西 義人, 下須賀洋一, 岡井いくよ, 篠崎 圭子. (2013). 妊婦ライフスタイルの変遷と二分脊椎の発生リスク. *Jpn. J. Urol* 104, 598-604

佐久間康夫監訳, Agamemnon Despopoulos, Stefan Silbernagl 著. (2007). *Color Atlas of Physiology 5th edition, completely revised and expanded カラー図解よくわかる生理学の基礎*. (東京: メディカルサイエンスインターナショナル)

佐藤陽子, 中西朋子, 千葉剛, 梅垣敬三. (2014). 妊婦における神経管閉鎖障害リスク低減のための folic acid 摂取行動に関する全国インターネット調査. 日本公衆衛生雑誌 61, 321-332

篠崎圭子, 田中敏博, 伊藤真也. (2010). 葉酸による神経管閉鎖障害の一次予防. 日本小児科学会雑誌 114, 447-453

住吉好雄. (2004). 臨床におけるサプリメント 私はこのように指導する 6. 葉酸. Progress in Medicine 24, 61-69

瀬口春道, 小林俊博, Eva Garcia del Saz 訳, Moore, Persaud 著. Before we are born Essentials of Embryology and Birth Defects 受精卵からヒトになるまで 原著第6版 基礎的発生学と先天異常. (2007). 東京, 医歯薬出版.

日本ビタミン学会監修, ゲノムビタミン学ー遺伝子対応栄養教育の基礎ー. (2008). (東京: 健泉社)

平原史樹. (2009). 妊婦への葉酸摂取推進ー先天異常リスクの低減化ー. ビタミン 83, 259-263

平原史樹. (2011). 特集妊娠と薬物療法 ヒト生殖におけるベースラインリスクーヒト先天異常の発生状況と発生リスク要因ー. 月刊薬事 53, 25-30

藤本十四秋, 受島敦美, 医学要点双書 発生学第6版. (2010). 京都, 金芳堂.

宮下ちひろ, 伊藤久美子, 荒木敦子, 岸玲子. (2016). 講座子どもを取り巻く環境と健康・18-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, 615-621.

森田唯加, 小柴和子, 竹内 純. (2012).連載 発生学・再生学シリーズ 心臓発生とその分子メカニズム. 血管医学 13, 291-307.

Countries with industrially milled flour and/or rice fortification legislation, Food Fortification Initiative June 2018, [http://www.ffinetwork.org/global\\_progress/index.php/](http://www.ffinetwork.org/global_progress/index.php/). Accessed 29.8.18

World Health Organization. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO\\_NMH\\_NHD\\_EP\\_G\\_12.1\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO_NMH_NHD_EP_G_12.1_eng.pdf). Accessed 12.2.18.

World Health Organization. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision. <http://www.mhlw.go.jp/toukei/sippe/>. Accessed 10.09.16.

一瀬沙織, 高井伸彦, 池田理恵, 和田光弘, 大庭義史, 中島憲一郎. 医療・生命－P3095 簡便で高感度な血中の動脈硬化性疾患の危険因子の分析ヒト血漿中の葉酸関連化合物の LC-MS 分析 [www.jsac.or.jp/tenbou/TT57/P14.html](http://www.jsac.or.jp/tenbou/TT57/P14.html). Accessed 28.04.16.

神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について, 厚生労働省, [https://www.mhlw.go.jp/www1/houdou/1212/h1228-1\\_18.html](https://www.mhlw.go.jp/www1/houdou/1212/h1228-1_18.html). Accessed 11.8.18

平成 28 年国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyoudl/h28-houkoku-04.pdf>. Accessed 13.6.18