



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	出生前のマンガン、カドミウム、鉛、水銀およびセレン曝露が胎児の形態異常発生に及ぼす影響に関する研究
Author(s)	中村, 雄一
Description	配架番号 : 2843
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15909号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15909
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92156
Type	doctoral thesis
File Information	NAKAMURA_Yuichi.pdf



学位論文

出生前のマンガン、カドミウム、鉛、水銀およびセレン曝露が胎児の形態異常発生に及ぼす影響に関する研究

(Studies on the effects of prenatal manganese, cadmium, lead, mercury and selenium exposure on the occurrence of fetal physical abnormalities)

2024 年 3 月

北 海 道 大 学

中 村 雄 一

学位論文

出生前のマンガン、カドミウム、鉛、水銀およびセレン曝露が胎児の形態異常発生に及ぼす影響に関する研究

(Studies on the effects of prenatal manganese, cadmium, lead, mercury and selenium exposure on the occurrence of fetal physical abnormalities)

2024 年 3 月

北 海 道 大 学

中 村 雄 一

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
要旨	2
略語集	5
緒言	6
方法	10
結果	15
考察	34
結論	38
謝辞	39
利益相反	39
引用文献	40

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に発表した。

Yuichi Nakamura, Sumitaka Kobayashi, Kazutoshi Cho, Sachiko Itoh, Chihiro Miyashita, Takeshi Yamaguchi, Hiroyoshi Iwata, Naomi Tamura, Yasuaki Saijo, Yoshiya Ito, Yoshitaka Seto, Ryota Honjo, Akiko Ando, Yuta Furuse, Atsushi Manabe, Reiko Kishi, The Japan Environment and Children's Study (JECS) Group.

Prenatal metal concentrations and physical abnormalities in the Japan Environment and Children's Study.

Pediatric Research. Published: 19 October 2023

要旨

【背景と目的】

先天的形態異常 (congenital anomalies) は、全出生児の 2%~4% に子宮内で発生し、小児期の死亡のみならず、長期的な障害の原因となる構造的・機能的な異常である。先天的形態異常は、遺伝要因に加え、さまざまな環境要因の組み合わせにより生じると考えられており、環境要因には金属類も含まれる。通常、マンガン (Mn)、カドミウム (Cd)、鉛 (Pb)、水銀 (Hg) およびセレン (Se) の体内への取り込みは、食物、水、土壌、粉塵からの経口・吸入摂取および経皮吸収によって起こる。これらの金属は一旦体内に取り込まれると長期間に渡って滞留する。先行研究では、これらの金属への出生前曝露が先天的形態異常発生リスク増加と関連するという報告があるが、報告の多くは症例対照研究であり、出生前の金属曝露と先天的形態異常発生の因果関係には依然として議論がある。特に、低濃度の金属への曝露と胎児の先天的形態異常発生の関係に着目した研究は限られている。出生前の金属曝露と先天的形態異常発生との因果関係を検証するためには、サンプル数の多い前向き出生コホートでの検討が必要である。我々は、出生前の Mn、Cd、Pb、Hg および Se への曝露が、胎児の先天的形態異常発生リスクを増加させるという仮説を立て、出生前の Mn、Cd、Pb、Hg および Se への曝露と児の先天的形態異常との関連性を検討した。

【対象と方法】

環境省が開始した、「子どもの健康と環境に関わる全国調査 (Japan Environment and Children's Study, JECS) : 以下、エコチル調査」において、2011 年 1 月から 2014 年 3 月にかけて、日本の 15 地域で参加者が募集された。本研究では、エコチル調査の総参加者 103,057 人の母親 (104,059 人の児) のうち、データ欠損や人工流産などの除外基準を満たした例を除外した 89,887 人組の母子を解析対象とした。母親の特性に関するデータは、妊娠初期と妊娠中期・後期の 2 回の自記式質問票により入手した。児の性別、分娩予後 (出生、死産、自然流産、人工流産)、身体異常の有無などのデータは、診療録から転記される個票に転記した。エコチル調査で事前に規定された身体異常 (84 項目) のいずれかが観察された場合を、本研究における「身体異常あり」と定義した。出生前の各金属への曝露の指標として、各金属の母体血中濃度を用いた。これらの血中濃度は、妊娠中期または後期の妊婦健診時に母体から採血し、誘導結合プラズマ質量分析により測定した。各金属濃度と児の身体異常との関連は、常用対数変換した各金属の母体血中濃度を独立変数、身体異常の有無を従属変数として、ロジスティック回帰モデルを用いて単変量および多変量解析を行った。共変

量は、母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒および児の性別 (Model 1)、亜鉛・葉酸濃度を加えたもの (Model 2) とした。また、対象の金属類濃度により四分位群に層別し、身体異常との関連についてロジスティック回帰モデルを用いて解析した。混合金属曝露としての検討については、単変量および多変量の quantile g-computation を用いて検討した。quantile g-computation は、R パッケージ "qgcomp" を用いて適用し、個人および全体的な金属効果を推定した。すべての解析は SPSS Statistics version 26 または R v.4.2.2 を用いて行い、統計的有意性は $p < 0.05$ とした。

【結果】

多変量ロジスティック回帰モデル (Model 1) では、全対象者における Mn 濃度 1 単位 (Mn 濃度を常用対数変換した 1) 増加 (Mn 濃度として 10 倍) に対する身体異常のオッズ比 (OR) (95%信頼区間 [CI]) は 1.26 (1.08、1.48) であった。この結果は、Model 2 および染色体異常、死産、自然流産の症例を除外した、生児を対象とした感度分析の結果と同様であった。母体 Mn 四分位濃度と身体異常との濃度依存性を検討したところ、Mn 濃度第 1 四分位値 (≤ 12.5 ng/g) 群に対する Mn 濃度第 4 四分位値 (≥ 18.7 ng/g) 群における身体異常の OR (95%CI) は 1.06 (1.01、1.13)

(傾向に対する p 値 = 0.034) であった。Cd、Pb、Hg、Se についても Mn と同様の解析を行ったが、有意な関連はみられなかった。単変量および多変量 quantile g-computation においても、Mn は正の寄与がみられ、身体異常のリスクとなりうることを示された。

【考察】

本研究では、妊娠中の母体血中 Mn 濃度の上昇は、児の身体異常発生のリスクをわずかに増加させる可能性が示唆された。これは、混合曝露としての解析においても、同様の影響の方向性が確認された。過剰な Mn は酸化ストレスを引き起こし、胎児の細胞成長を阻害する可能性があると考えられている。また催異変性に酸化ストレスが関与しているとする研究報告も複数あり、本研究の結果と矛盾しない。一方で、母体血中の Cd、Pb、Hg、Se 濃度と、児の全体の身体異常の発生リスクとの関連は観察されなかった。個別の臓器の先天的形態異常発生リスクとの関連についてはさらなる研究が必要と考えられる。

本研究の各金属の母体血中濃度については、エコチル調査によるこれまでの研究から、Cd と Hg の母体血中濃度は北米や欧州より高く、Pb と Se の母体血中濃度は他国と同程度、Mn の母体血中濃度は韓国や台湾より低く、カナダやオーストラリアより高いことが報告されている。今後他国でも母体血を検体とした研究を進め、日本と

比較する必要があると思われる。

【結論】

出生前の金属類曝露と胎児の身体異常に関して、大規模前向きコホートをを用いて実施した初の研究である。出生前の **Mn** 曝露は身体異常発生のリスクを増加させる可能性が示唆された。母体血中 **Cd**、**Pb**、**Hg** および **Se** 濃度と身体異常全体の間には有意な関連は見られなかった。これらの知見は、大気汚染物質や食品における **Mn** の安全域についてさらに研究していく必要性を示している。遺伝要因や他の環境要因などのメカニズム解明には、さらなる研究が必要である。

略語集

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。

BMI; Body mass index

Cd; Cadmium

CI; Confidence interval

Hg; Mercury

JECS; The Japan Environment and Children's Study

MDL; Method detection limit

Mn; Manganese

OR; Odds ratio

Pb; Lead

Se; Selenium

緒言

先天的形態異常(congenital anomalies)は、全出生児の 2%~4%に子宮内で発生する構造的・機能的な異常であり、日本での先天的形態異常の発生率は 1.89%と報告されている (Hanaoka et al., 2018)。また、1 万妊娠あたりの主要な形態異常の有病率は 126.7~298.6 であったとする報告もある (Mezawa et al., 2019)。これらの異常は、小児期の死亡のみならず、長期的な障害の原因にもなる重要な問題である (World Health Organization, 2020; Feldkamp et al., 2017; Hanaoka et al., 2018; Mai et al., 2019)。先天的形態異常は、遺伝的要因や環境要因を含む複数の異質な要因の組み合わせにより生じると考えられており (Oliveira and Fett-Conte, 2013)、原因がはっきりしている形態異常は 20.2%に過ぎないという報告がある (Feldkamp et al., 2017)。先天的形態異常発生の環境要因の 1 つとして、金属曝露が考えられる。

通常、マンガン (Mn)、カドミウム (Cd)、鉛 (Pb)、水銀 (Hg) およびセレン (Se) の体内への取り込みは、食物、水、土壌、粉塵からの経口・吸入摂取および経皮吸収によって起こる。これらの金属は一旦体内に取り込まれると長期間に渡って滞留するため軟部組織や骨組織に蓄積し、悪影響を及ぼす可能性がある (Prasher, 2009)。Cd、Pb、Se、Hg が胎盤を通過することは広く知られている (Caserta et al, 2013; Mistry et al, 2012)。Mn は能動輸送によって胎盤を通過する (Krachler et al, 1999)。妊婦がこれらの金属にさらされると、胎盤を通過して発育中の胎児に移行し影響を与える。

Mn は土壌、水、食品に含まれており、経口や吸入摂取によって体内に取り込まれる (United States, Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012; Santamaria and Sulsky, 2010)。Mn は人の必須微量元素で、細胞を酸化ストレスから守る Mn スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) の構成要素の 1 つであり (Pérez and Cederbaum, 2002)、複数の酵素の触媒として働いている。また、Mn はフリーラジカルの形成を抑え、酸化損傷から保護することが報告されている (Bocca et al., 2017)。妊娠中は血中 Mn 濃度が上昇し、その上昇は妊娠後期に顕著になる (Spencer, 1999)。これは、胎児が成長過程にあるために Mn を大量に必要とすることへの適応と考えられている。一方、胎児や新生児は Mn のホメオスタシス機構が十分に発達していないため、高濃度の Mn の毒性の影響を受けるリスクが高いと考えられる (Aschner et al., 2005)。先行研究において、母体血中 Mn 濃度の増加は、発達遅延

や難聴、神経管閉鎖不全や尿道下裂などの先天性形態異常のリスク増加との関連が報告されている (Liu et al., 2013; Langley et al., 2015; White et al., 2019) (表 1)。

表 1. Mn と形態異常の文献レビュー

著者 (年、地域)	研究 デザイン	対 象 者 数	検体	検体中の Mn 濃度	転帰	結果
Liu ら (2013、中国)	症例対照	130	胎盤	Median 131.60 (99.25-166.76), 101.54 (80.14-119.79) (※IQR) ng/g (case vs control)	神経管閉鎖不全	胎盤中の Mn 濃度が高いとリスクが増加
Sanders ら (2014、米国)	前向き コホート	688,532	井戸水	90%ile 以上 139.69 ppm	円錐動脈管異常	Mn 濃度上昇は有病率 上昇と有意に関連 (PR 1.6, 95%CI 1.1-2.5)
Langley ら (2015、米国)	前向き コホート	17,000	井戸水	Median 54.44 (18.70-406.35) (※min-max) μ g/L	発達遅延・難聴	有意かつ正の相関
Yan ら (2017、中国)	症例対照	452	母の 毛髪	Median 0.365 (0.192-0.740), 0.394 (0.223-0.734) ng/mg (case vs control)	神経管閉鎖不全	毛髪中の Mn 濃度との 間に有意差なし
White ら (2019、米国)	症例対照	98,891	大気	5 分位 5.8-6.1, 6.1-7.5, 7.5-9.4, 9.4-12, 12-220 $\times 10^{-4}$ μ g/m ³	尿道下裂	出生前の曝露量が多い と発症リスクが上昇

Cd は土壌から植物への移行率が高いため、ほとんどの食品に含まれている (Satarug et al., 2010)。Cd の重要な曝露源は食事やタバコと考えられている (Adams et al., 2011)。Cd は母体から胎盤を介して妊娠初期の胚に到達すること、胎盤の機能を阻害し二次的な胎児の損傷を引き起こすことが報告されている (Sharma et al., 2014)。過剰な Cd は活性酸素種の産生を増加させ、酸化ストレスを引き起こす可能性があり、この酸化ストレスは形態異常発生の機序となりうる (Ercal et al., 2001; Hansen, 2006)。先行研究において、母体血中 Cd 濃度の増加は、口唇口蓋裂や先天性横隔膜ヘルニア、先天性心疾患、尿道下裂などの先天的形態異常のリスク増加と関連しているという報告がある (Pi et al., 2018; Ni et al., 2018; Jin et al., 2016; Sharna et al., 2014)。

Pb は、粉塵や化学物質を吸い込むことで体内に入る。かつては有鉛ガソリンの使用や工場等からの排気ガスに Pb が含まれており、大気中の Pb 濃度が高くなっていた。現在は、環境中への人為的な Pb の放出は抑制されつつある。また、Pb は飲食、喫煙、化粧品使用時を通して体内に入る可能性がある (Jin et al., 2013)。Pb は母体から胎盤関門を通過し、胎児へ影響することが懸念されている (Caserta et al., 2013)。過剰な Pb は活性酸素種の産生を増加させ、酸化ストレスを引き起こす可能性がある。先行研究において、母体血中 Pb 濃度の増加は、口唇口蓋裂、先天性心疾患、尿道下裂といった先天的形態異常のリスク増加と関連している (Pi et al., 2018; Ou et al., 2017; White et al., 2019)。また、Pb は男性と女性の両方の生殖器官に影響を与えるという報告がある (Sharma et al., 2014)。

Hg は、自然または人為的に発生し、食物連鎖を通じて生体内に蓄積する。魚類の摂取は職業的に曝露されていない集団における Hg の主要な曝露源の 1 つと考えられている (National Research Council., 2000)。メチル水銀 (MeHg) は、人が環境中で曝露される最も一般的な Hg の形態である。MeHg は容易に胎盤を通過し、神経毒性を示すことがある (Myers and Davidson, 1998)。先行研究において、母体血中 Hg 濃度の増加は、神経管閉鎖不全や先天性心疾患などの先天的形態異常のリスク増加と関連しているという報告がある (Jin et al., 2013; Jin et al., 2016; Yalcin et al., 2021)。

Se は、高用量では毒性があるものの、微量濃度の Se は抗酸化酵素活性や正常な胎児の発育に不可欠である (Martin et al., 2004)。食事からの摂取不足により Se 欠乏が起こる (Ou et al., 2017)。飲料水に検出可能な微量の Se が含まれていると、検出可能な Se が含まれていない飲料水にさらされた子供に比べて、先天性心疾患の発生

頻度が低いという報告がある (Zierler et al., 1988)。また、妊娠中の母親の Se 不足が、子供の神経管閉鎖不全の原因になる可能性も指摘されている (Cengiz et al., 2004)。また Se 濃度の減少は口唇口蓋裂や先天性横隔膜ヘルニア、神経管閉鎖不全のリスク増加と関連するという報告がある (Pi et al., 2019; Ni et al., 2019; Yang et al., 2008)。一方、母体血中 Se 濃度の増加は先天性心疾患のリスク増加と関連しているという報告がある (Guo et al., 2019)。

わが国では 2011 年より環境省による「子どもの健康と環境に関わる全国調査 (Japan Environment and Children's Study, JECS) : 以下、エコチル調査」が開始され、全国で約 10 万人の妊婦とその児を調査対象として、児が 13 歳になるまでの出生コホート研究を展開している。エコチル調査はその調査期間が 2022 年に 40 歳までに延長された。胎児期から小児期にかけての化学物質曝露をはじめとする環境因子が、妊娠・生殖、先天異常、精神神経発達、免疫・アレルギー、代謝内分泌に与える影響の解明を目的としている (Kawamoto et al., 2014)。北海道では、約 9,000 組の親子がエコチル調査に参加している。

出生前の金属曝露と先天的形態異常発生の関連について、先行研究の多くは症例対照研究であり、因果関係の証明は困難である。また低濃度の金属への曝露と胎児の先天的形態異常発生の因果関係に着目した研究は限られている。近年は個別の物質だけでなく、混合物としての環境化学物質の曝露を検討することが着目されているが、妊婦の混合金属曝露の影響についての報告はない。

出生前の金属曝露と先天的形態異常発生との因果関係を検証するためには、サンプル数の多い前向き出生コホートでの検討が必要である。そこで、我々はエコチル調査のデータを用いて、出生前の Mn、Cd、Pb、Hg および Se への曝露が胎児の先天的形態異常発生のリスクを増加させるという仮説を立て、出生前の Mn、Cd、Pb、Hg および Se への曝露と児の先天的形態異常との関連性を、複数の統計モデルを用いて検討した。

方法

1. 研究対象者

対象者は、エコチル調査に参加する母児である。2011 年 1 月から 2014 年 3 月にかけて、日本の広い地域にわたる 15 の地域センター（北海道、宮城、福島、千葉、甲信、富山、愛知、京都、大阪、兵庫、鳥取、高知、福岡、南九州・沖縄）の協力医療機関や自治体を通して募集された（図 1）。

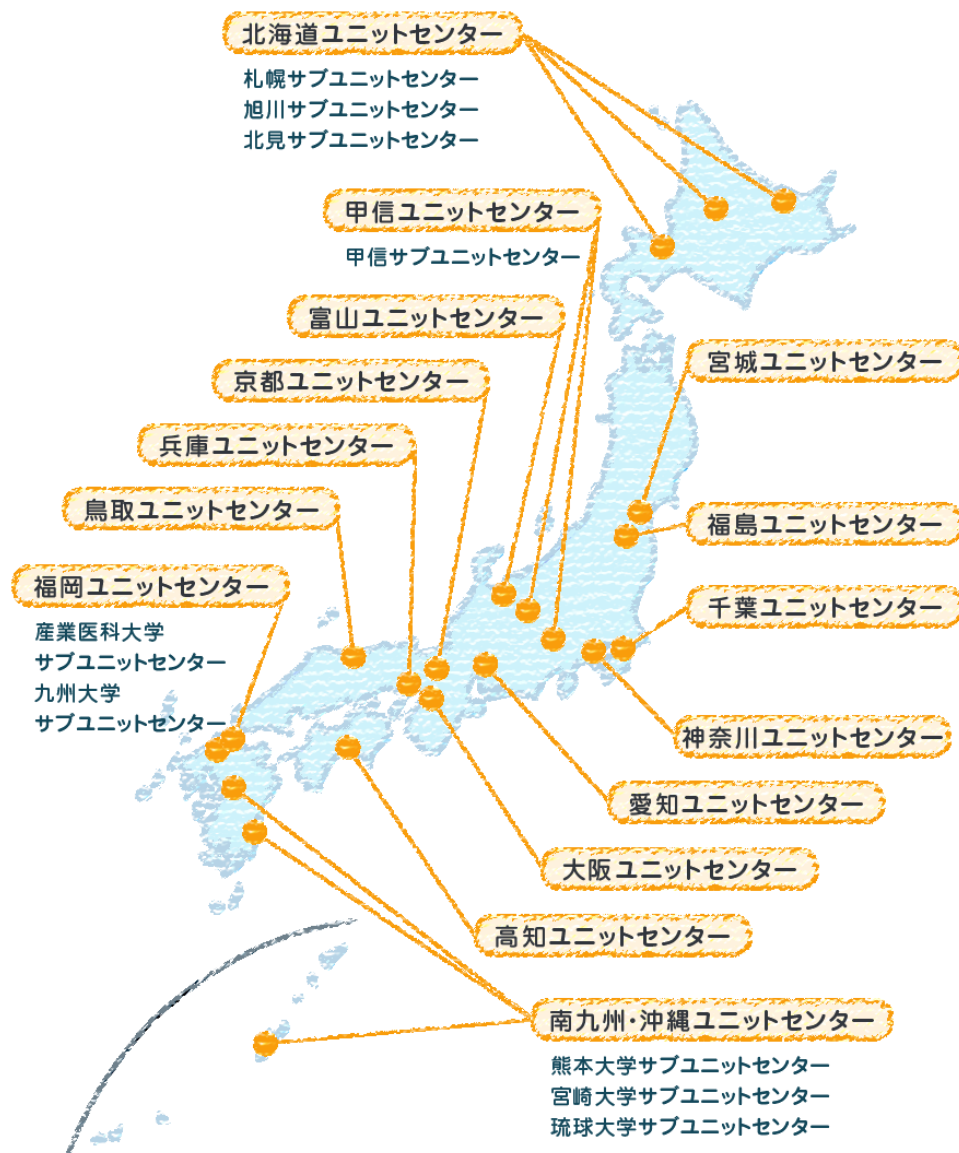


図 1. エコチル調査対象地域（全国の調査対象地域 | エコチル調査とは | エコチル調査 環境省 (env.go.jp)より引用）

エコチル調査では、協力医療機関や自治体を通じて合計 103,057 人の母親 (104,059 人の児) が登録された。本研究における対象は、単体妊娠のみとし、妊娠予後 (生児、死産、自然流産) のデータ欠損 ($n = 2,126$)、人工流産 ($n = 311$)、出生時および出生後 1 か月の診療記録の転記データ欠損 ($n = 1,373$)、母親の血液中の Mn、Cd、Pb、Hg および Se 濃度のデータ欠損 ($n = 3,842$)、調整因子のデータ欠損 ($n = 4,531$) を除外し、89,887 組の母子を解析対象とした (図 2)。

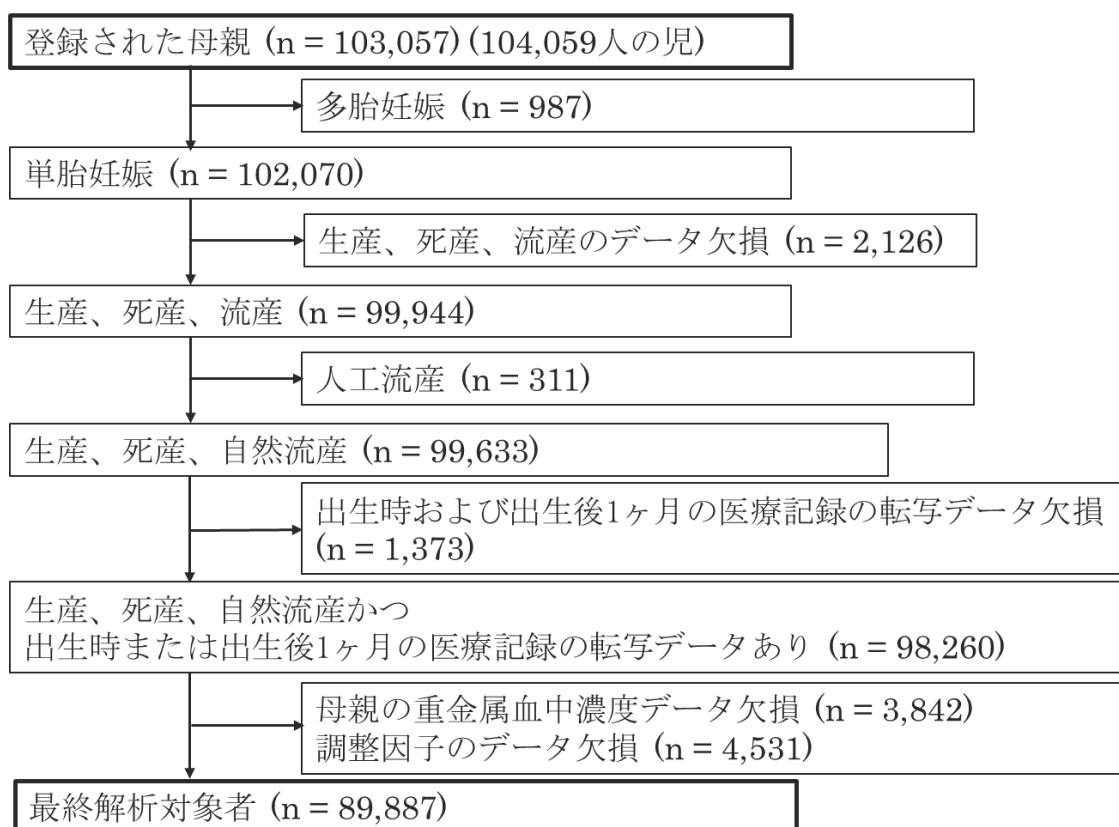


図 2. 対象者抽出のフローチャート

2. 倫理的配慮

エコチル調査への参加について、対象者からそれぞれ書面による同意を得た。エコチル調査のプロトコルは、環境省の疫学研究に関する倫理審査委員会（IRB）および参加全施設の倫理審査委員会の承認を受け実施した。エコチル調査は、ヘルシンキ宣言および人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に準拠して実施した。

3. 質問票調査

母親の年齢、妊娠前の身長、妊娠前の体重、既往分娩回数、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、生殖補助医療の有無などの母親の特性に関するデータは、自記式質問票から入手した。自記式質問票は、妊婦検診の際、または郵送で、妊娠中に2回（妊娠初期および妊娠中期・後期）提供された。妊娠前の体格指数（BMI）（ kg/m^2 ）は、妊娠前の体重（ kg ）/妊娠前の身長（ m ）の2乗と定義した。診療録転記は、妊娠中に1回（妊娠初期）、出生後（出生時および1か月）に2回行った。転記は、医師、助産師、看護師またはリサーチコーディネーターが行った。児の性別、妊娠予後（生児、死産、自然流産、人工流産）、先天的形態異常、妊娠期間、出生時体重、出生時身長のデータは、診療記録から転記した。この研究では、2019年10月に公開された jecs-ta-20190930 と、2021年4月に公開された jecs-qa-20210401 の2つのデータセットを使用した。jecs-ta-20190930 データセットはおもに、母体の妊娠中や出産時と、および子どもが3歳になるまでに収集されたデータで、妊婦や子どもの基本情報や、母親の金属元素などの生体試料の測定データが含まれる。本研究では、基本属性や妊娠情報、金属元素の値を含むほとんどの情報をこのデータセットから抽出した。jecs-qa-20210401 データセットはおもに、子どもが3歳半と4歳のときの情報に加えて、20190930 データセットに記載された情報について修正を要したデータを含む。本研究では、妊娠転帰（生児、死産、流産）に関する情報について、このデータセットを使用した。

4. 本研究における身体異常の定義

「先天異常」とは出生時から存在する異常であり、「先天的形態異常」と先天代謝異常などの内科的異常を合わせた概念である。「先天異常」のうち「先天的形態異常」はICD-10の分類では第17章に相当し、一般的には染色体異常を含む。本研究では、染色体異常を含む先天的形態異常に、母斑などの出生時から存在する外表的な異常を加えて「身体異常」と定義した。

身体異常に関するデータは、診療録の情報を個票に転記することにより収集した。何らかの身体異常が認められた場合には、個票の「身体異常」が「あり」となる。先天性心疾患など、出生時は診断が困難な身体異常が存在することから、出生時の個票

と生後1か月の個票の「身体異常」のいずれかが「あり」であるものを「身体異常あり」とした。また、出生時と1か月の個票には、身体異常の有無とは別に身体異常の詳細記録がある。「身体異常」が「なし」でも、詳細記録に異常の内容が記載されている場合は、「身体異常あり」とした。

5. 金属の濃度測定

各金属の定量プロトコルは以下の通りである。妊娠中期または後期の妊婦健診時に1回、母体の静脈血試料（33 mL）を採取した。化学分析用の全血試料は、EDTA ナトリウムを含む 3 mL チューブに採取し、48 時間以内に中央研究所に移送し、クライオバンキングチューブに分注し、分析まで-80℃で保存した。全血中の金属元素濃度は、Agilent 7700 装置（Agilent Technologies、東京、日本）を用いて誘導結合プラズマ質量分析（inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS）により測定した。反復性は、標準試料とプールされた品質管理（QC）試料を1台の装置で1日に1人のオペレーターが分析することにより決定された。中間精度は、SeronormTM Trace Element Whole Blood L-1（Sero AS, Billingstad, Norway）を順次分析することにより得られた。各元素のメソッド検出限界（MDL）は、Currieの方法を使用して計算された。Mn、Cd、Pb、Hg および Se の MDL はそれぞれ 0.522 ng/g、0.0234 ng/g、0.129 ng/g、0.0490 ng/g および 0.837 ng/g であった。すべての解析対象において、各重金属濃度はMDLを越えていた。同じ方法を用いた過去の研究では、ng/g での濃度は ng/mL での濃度とほぼ等しいと報告されている（Kobayashi et al., 2019）。

6. 統計学的方法

第一に、母体年齢、妊娠前のBMI、既往分娩回数、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、生殖補助医療の有無、児の性別、生産、死産、自然流産、妊娠年齢、出生体重、出生身長、身体異常の頻度などの対象の特性を調べた。これらの変数に関して、児の身体異常あり群となし群とで、分布の違いがあるかどうかをt検定および χ^2 二乗検定で検討した。

第二に、母親の各金属濃度と児の身体異常との関連を調べるために、ロジスティック回帰モデルを使用し解析を行った。独立変数は、常用対数変換（Log10-transformed）した Mn、Cd、Pb、Hg および Se 濃度とした。従属変数は、身体異常の有無とした。共変量は、母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別とした（Model 1）。さらに亜鉛・葉酸濃度を加えたもの（Model 2）を解析した。また感度分析として、染色体異常を伴う症例を除外した解析も実施した。

第三に、全サンプルの Mn、Cd、Pb、Hg および Se 濃度を四分位群に分け、ロジスティック回帰モデルを用いて、母親の血中 Mn、Cd、Pb、Hg および Se 四分位濃度と身体異常の傾向を検討した。さらに有意な関連がみられた金属については、金属濃度十分位での検討を追加した。上記と同様の調整モデルで解析した。

混合金属と身体異常との関連は、単変量および多変量の quantile g-computation を用いた。quantile g-computation は、R パッケージ "qgcomp" を用いて適用し、個人および全体的な金属効果を推定した。多変量 quantile g-computation は、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、および児の性別で調整した。

すべての解析は SPSS Statistics version 26 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) または R v.4.2.2 (R Development Core Team、ウィーン、オーストリア ; <https://www.R-project.org>) を用いて行い、統計的有意性は $p < 0.05$ とした。

結果

表 2 に、対象者の特徴を示す。母体年齢、妊娠前 BMI、妊娠期間、出生体重、出生身長（平均（±標準偏差 [SD]））はそれぞれ 30.8（±5.0）歳、21.3（±3.3）kg/m²、妊娠 38.8（±1.5）週、3,029（±412）g、48.9（±2.2）cmであった。初産婦は 35,963 人（40.0%）、妊娠初期の喫煙は 16,278 人（18.1%）、妊娠初期の飲酒は 8,962 人（10.0%）、生殖補助医療は 5,666 人（6.3%）であった。男児、生児はそれぞれ 46,060 人（51.2%）、89,759 人（99.9%）であった。身体異常のある群では初産が多く、生殖補助医療による妊娠の割合が多かった。また男児が多く、出生時体重が小さかった。

表 3 に、身体異常の頻度を示す。皮膚が最も多く（n=3,324、全体の 3.7%）、胸部が 2 番目に多く（n=1,751、1.9%）、泌尿生殖器系が 3 番目に多かった（n=1,180、1.3%）。

表 2. 対象者の特徴

	全対象者 (n = 89,887)	身体異常あり (n = 11,163)	身体異常なし (n = 78,724)	
母親				
年齢 ^a	30.8 ± 5.0	31.2 ± 5.1	30.7 ± 5.0	*
妊娠前の BMI ^a	21.3 ± 3.3	21.3 ± 3.4	21.2 ± 3.3	
出産回数 ^b				*
初産	35,963 (40.0)	4,569 (40.9)	31,394 (39.9)	
経産	53,924 (60.0)	6,594 (59.1)	47,330 (60.1)	
妊娠初期の喫煙 ^b				
あり	16,278 (18.1)	1,997 (17.9)	14,281 (18.1)	
なし	73,609 (81.9)	9,166 (82.1)	64,443 (81.9)	
妊娠初期の飲酒 ^b				
あり	8,962 (10.0)	1,113 (10.0)	7,849 (10.0)	
なし	80,925 (90.0)	10,050 (90.0)	70,875 (90.0)	
生殖補助医療 ^b				*
あり	5,666 (6.3)	841 (7.5)	4,825 (6.1)	
なし	84,221 (93.7)	10,322 (92.5)	73,899 (93.9)	
採血した週数 ^a	27.2 ± 3.1	27.3 ± 3.1	27.2 ± 3.1	*
亜鉛 (mg) ^c	7.0 (5.6-8.8)	7.0 (5.6-8.9)	7.0 (5.5-8.8)	
葉酸 (μg) ^c	247 (179-339)	248 (179-341)	247 (178-339)	
児				
性別 ^b				*
男児	46,060 (51.2)	6,055 (54.2)	40,005 (50.8)	
女児	43,827 (48.8)	5,108 (45.8)	38,719 (49.2)	
転帰 ^b				
生産	89,759 (99.9)	11,144 (99.8)	78,615 (99.9)	
死産	128 (0.1)	19 (0.2)	109 (0.1)	
自然流産	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
在胎週数 ^a	38.8 ± 1.5	38.6 ± 1.9	38.9 ± 1.5	*
出生時体重 (g) ^a	3,029 ± 412	2,974 ± 479	3,037 ± 400	*
出生時身長 (cm) ^a	48.9 ± 2.2	48.7 ± 2.7	49.0 ± 2.2	*

^a平均 ± 標準偏差 (SD)^bn (%)^c中央値 (四分位範囲; IQR)*身体異常の有無との関連を確認するため、連続値ではt検定、2値ではχ²乗検定を行い、有意差のあった項目

表 3. 対象者における身体異常の頻度

	n	全対象者における 頻度 (%) (n _{Total} = 89,887)	全身体異常群にお ける頻度 (%) (n _{case} = 11,163)
頭部	619	0.7	5.5
無脳症	15	0.0	0.1
脳瘤	17	0.0	0.2
小頭症	31	0.0	0.3
水頭症	68	0.1	0.6
頭蓋瘍	62	0.1	0.6
全前脳胞症	25	0.0	0.2
脳梁欠損	17	0.0	0.2
その他の頭部異常	426	0.5	3.8
眼	330	0.4	3.0
眼瞼欠損	11	0.0	0.1
無眼球症/小眼球症	21	0.0	0.2
白内障	24	0.0	0.2
その他の眼異常	289	0.3	2.6
耳	889	1.0	8.0
聴覚障害	68	0.1	0.6
小耳症	36	0.0	0.3
外耳道閉鎖	36	0.0	0.3
埋没耳	30	0.0	0.3
耳介低位	80	0.1	0.7
その他の耳異常	713	0.8	6.4
口・顔面	569	0.6	5.1
口唇裂	86	0.1	0.8
口蓋裂	62	0.1	0.6
口唇口蓋裂	97	0.1	0.9
顔面裂	6	0.0	0.1
先天性歯	58	0.1	0.5
その他の口顔面異常	329	0.4	2.9
上肢	245	0.3	2.2
多指症	96	0.1	0.9
合指症	41	0.0	0.4
裂手症	4	0.0	0.0
その他の上肢異常	129	0.1	1.2
胸部	1,751	1.9	15.7
先天性横隔膜ヘルニア	34	0.0	0.3
肺分画症	5	0.0	0.0
先天性嚢胞性腺腫様奇形 (CCAM)	13	0.0	0.1
肺低形成	25	0.0	0.2
先天性心疾患	1,024	1.1	9.2
不整脈	95	0.1	0.9
その他の胸部異常	883	1.0	7.9
腹部	956	1.1	8.6
臍帯ヘルニア	36	0.0	0.3
腹壁破裂	9	0.0	0.1
食道閉鎖	18	0.0	0.2
十二指腸閉鎖	18	0.0	0.2
小腸閉鎖	15	0.0	0.1
鎖肛 (直腸肛門奇形)	40	0.0	0.4
鼠径ヘルニア	85	0.1	0.8
その他の腹部異常	776	0.9	7.0
泌尿生殖器	1,180	1.3	10.6

水腎症	185	0.2	1.7
嚢胞性腎奇形	33	0.0	0.3
腎無形成	8	0.0	0.1
尿道下裂	56	0.1	0.5
停留精巣/非触知精巣	277	0.3	2.5
膀胱外反/総排泄腔外反症	3	0.0	0.0
陰核肥大	12	0.0	0.1
膣開口異常	2	0.0	0.0
性別不分明	7	0.0	0.1
その他の泌尿生殖器異常	728	0.8	6.5
下肢	496	0.6	4.4
多趾症	83	0.1	0.7
合趾症	86	0.1	0.8
裂足症	6	0.0	0.1
その他の形態異常	90	0.1	0.8
その他の下肢異常	298	0.3	2.7
皮膚	3,324	3.7	29.8
色素異常斑（茶）	26	0.0	0.2
色素異常斑（黒）	18	0.0	0.2
色素異常斑（赤）	28	0.0	0.2
色素異常斑（白）	3	0.0	0.0
血管腫	647	0.7	5.8
先天性表皮水疱症/色素失調症	15	0.0	0.1
その他の皮膚異常	2,672	3.0	23.9
背部	86	0.1	0.8
脊髄膜瘤/二分脊椎	30	0.0	0.3
その他の背部異常	67	0.1	0.6
染色体異常	197	0.2	1.8
Down 症候群	122	0.1	1.1
18 トリソミー	35	0.0	0.3
13 トリソミー	6	0.0	0.0
Turner 症候群	3	0.0	0.0
その他の染色体異常	43	0.0	0.4
骨格・筋	184	0.2	1.6
致死性骨異形成症	3	0.0	0.0
軟骨無発生症	0	0.0	0.0
軟骨無形成症	7	0.0	0.1
骨形成不全症候群	6	0.0	0.1
股関節の發育不全	10	0.0	0.1
先天性多発性関節拘縮症	7	0.0	0.1
フロッピーインファント	15	0.0	0.1
その他の骨格・筋異常	143	0.2	1.3
結合胎児	2	0.0	0.0
羊膜索症候群	1	0.0	0.0
その他の異常	896	1.0	8.0
未確定の異常	2,287	2.5	20.5

各身体異常は、データ収集パターンごとの症例数、割合を記載した。

聴覚障害は生後 0 か月のみ個票に記載した。

股関節の發育不全は生後 1 か月の個票に記載した。

【Mnに関する解析結果】

表4は、母体血中のMn濃度の結果である。母体血中のMn濃度の平均値は16.0 ng/gであった。母体血中Mn濃度の中央値は15.4ng/gであった。身体異常の有無や、初産・経産で分けても濃度はほとんど変わらなかった。

表4 母体血中のMn濃度 (ng/g)

	平均値	最小値	25 パーセン タイル	中央値	75 パーセンタ イル	最大値
全対象者 (n = 89,887)	16.0	2.84	12.6	15.4	18.7	60.8
身体異常 (n = 11,163)	16.1	2.84	12.6	15.5	18.8	44
身体異常なし (n = 78,724)	16.0	3.06	12.6	15.4	18.6	60.8
初産婦 (n = 35,963)	15.8	3.95	12.4	15.1	18.5	51.8
経産婦 (n = 53,924)	16.1	2.84	12.8	15.5	18.8	60.8

表 5 に、全対象者における母体血中 Mn 濃度 (log10 変換) と身体異常の関連を示す。共変量で調整した後の Mn 濃度 1 単位 (Mn 濃度として 10 倍) 増加に対するオッズ比 (OR) (95%信頼区間 [CI]) は 1.26 (1.08、1.48) であった (Model 1)。さらに栄養状態の影響を検討するため、Model 1 の調整因子に加えて、亜鉛濃度と葉酸濃度で調整した Model 2 において、Model 1 と同等の結果が得られた。

表 5. Mn 濃度の身体異常に対するオッズ比

項目/ Mn (ng/g)	身体異常 (n _{case} = 11,163)					
	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c	
	OR (95% CI) ^d	p 値	OR (95% CI) ^d	p 値	OR (95% CI) ^d	p 値
全対象者 (n = 89,887)	1.23 (1.05–1.43)	0.011	1.26 (1.08–1.48)	0.004	1.26 (1.08–1.48)	0.004

OR: オッズ比; CI: 信頼区間

^a ロジスティック回帰モデル: 調整なし

^b ロジスティック回帰モデル: 母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別で調整した

^c ロジスティック回帰モデル: Model 1 の調整因子に加えて、亜鉛濃度、葉酸濃度で調整した。

^d Mn (ng/g) 濃度は対数変換されているため、OR (95%CI) は、Mn 濃度が 10 倍変化した結果、従属変数に期待されるオッズ比 (95%信頼区間) を表している。

表 6 に、染色体異常、死産、自然流産の症例を除外した、生児を対象とした感度分析の結果を示す。結果は全対象者における解析と同様であった。

表 6. 染色体異常、死産、自然流産の症例を除いた Mn 濃度の身体異常に対するオッズ比

項目/ Mn (ng/g)	身体異常 (n _{case} = 10,951)					
	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c	
	OR (95% CI) ^d	p 値	OR (95% CI) ^d	p 値	OR (95% CI) ^d	p 値
全対象者 (n = 89,566)	1.22 (1.04–1.43)	0.013	1.26 (1.07–1.47)	0.005	1.26 (1.07–1.47)	0.005

OR: オッズ比; CI: 信頼区間.

^a ロジスティック回帰モデル: 調整なし

^b ロジスティック回帰モデル: 母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別で調整した

^c ロジスティック回帰モデル: Model 1 の調整因子に加えて、亜鉛濃度、葉酸濃度で調整した。

^d Mn (ng/g) 濃度は対数変換されているため、OR (95%CI) は、Mn 濃度が 10 倍変化した結果、従属変数に期待されるオッズ比 (95%信頼区間) を表している。

表 7 は、母体血中 Mn 四分位濃度と身体異常との関連を示したものである。Mn 濃度第 1 四分位値 (≤ 12.5 ng/g) 群と比較して、Mn 濃度第 4 四分位値 (≥ 18.7 ng/g) 群における身体異常の OR (95%CI) は 1.06 (1.01、1.13) (傾向に対する p 値=0.034) であった。

表 7. 母体血中 Mn 四分位濃度と身体異常との関連性

	身体異常 ($n_{\text{case}} = 11,163$)					
	Crude ^a OR (95% CI) ^d	p 値	Model 1 ^b OR (95% CI) ^d	p 値	Model 2 ^c OR (95% CI) ^d	p 値
第 1 四分位 (≤ 12.5 ng/g) ($n = 22,639$)	1.00 (Reference)		1.00 (Reference)		1.00 (Reference)	
第 2 四分位 (12.6-15.3 ng/g) ($n = 22,941$)	0.98 (0.92-1.03)	0.384	0.98 (0.93-1.04)	0.516	0.98 (0.93-1.04)	0.516
第 3 四分位 (15.4-18.6 ng/g) ($n = 22,351$)	1.00 (0.95-1.06)	0.891	1.01 (0.96-1.07)	0.643	1.01 (0.96-1.07)	0.642
第 4 四分位 (≥ 18.7 ng/g) ($n = 21,956$)	1.05 (1.00-1.11)	0.070	1.06 (1.01-1.13)	0.031	1.06 (1.01-1.13)	0.031
p for trend		0.056		0.034		0.034

OR: オッズ比; CI: 信頼区間.

^a ロジスティック回帰モデル: 調整なし

^b ロジスティック回帰モデル: 母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別で調整した

^c ロジスティック回帰モデル: Model 1 の調整因子に加えて、亜鉛濃度、葉酸濃度で調整した。

^d OR (95%信頼区間) は、Mn 濃度の第 1 四分位値群と比較した予想オッズ比 (95%信頼区間) を示す。

表 8 は、母体血中 Mn 十分位濃度と身体異常との関連を示したものである。Mn 濃度第 1 十分位値 (≤ 10.5 ng/g) 群と比較して、Mn 濃度第 9 十分位値 (19.7-22.1 ng/g) 群および第 10 十分位値 (≥ 22.2 ng/g) 群における身体異常の OR (95% CI) はそれぞれ 1.13 (1.03、1.23)、1.12 (1.03、1.23) (傾向に対する p 値=0.041) であった。

表 8. 母体血中 Mn 十分位濃度と身体異常との関連性

	身体異常 (n _{case} = 11,163)					
	Crude ^a OR (95% CI) ^d	p 値	Model 1 ^b OR (95% CI) ^d	p 値	Model 2 ^c OR (95% CI) ^d	p 値
第 1 十分位 (≤ 10.5 ng/g) (n = 9,025)	1.00 (Reference)		1.00 (Reference)		1.00 (Reference)	
第 2 十分位 (10.6-12.0 ng/g) (n = 9,196)	1.06 (0.97-1.16)	0.212	1.07 (0.97-1.16)	0.168	1.07 (0.97-1.16)	0.167
第 3 十分位 (12.1-13.2 ng/g) (n = 9,158)	1.07 (0.98-1.17)	0.144	1.08 (0.98-1.18)	0.107	1.08 (0.98-1.18)	0.107
第 4 十分位 (13.3-14.3 ng/g) (n = 9,182)	1.04 (0.95-1.14)	0.352	1.05 (0.96-1.15)	0.257	1.05 (0.96-1.15)	0.256
第 5 十分位 (14.4-15.4 ng/g) (n = 9,019)	0.97 (0.89-1.07)	0.575	0.99 (0.90-1.08)	0.738	0.99 (0.90-1.08)	0.739
第 6 十分位 (15.5-16.6 ng/g) (n = 9,142)	1.09 (0.99-1.19)	0.069	1.10 (1.01-1.20)	0.038	1.10 (1.01-1.20)	0.038
第 7 十分位 (16.7-17.9 ng/g) (n = 8,572)	1.03 (0.94-1.13)	0.554	1.04 (0.95-1.14)	0.380	1.04 (0.95-1.14)	0.379
第 8 十分位 (18.0-19.6 ng/g) (n = 8,936)	1.02 (0.94-1.12)	0.602	1.04 (0.95-1.14)	0.422	1.04 (0.95-1.14)	0.421

第 9 十分位 (19.7-22.1 ng/g) (n = 8,722)	1.11 (1.02-1.21)	0.021	1.13 (1.03-1.23)	0.008	1.13 (1.03-1.24)	0.008
第 10 十分位 (≥22.2 ng/g) (n = 8,935)	1.11 (1.01-1.21)	0.024	1.12 (1.03-1.23)	0.012	1.12 (1.03-1.23)	0.012
<i>p</i> for trend		0.067		0.041		0.041

OR: オッズ比; CI: 信頼区間.

^a ロジスティック回帰モデル : 調整なし

^b ロジスティック回帰モデル : 母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別で調整した

^c ロジスティック回帰モデル : Model 1 の調整因子に加えて、亜鉛濃度、葉酸濃度で調整した。

^d OR (95%信頼区間) は、Mn 濃度の第 1 十分位値群と比較した予想オッズ比 (95%信頼区間) を示す。

【Cd、Pb、Hg、Se に関する結果】

表 9-12 に、母体血中の Cd、Pb、Hg、Se 濃度の結果を示す。身体異常の有無や、初産・経産で分けても各金属濃度の差はなかった。

表 9. 母体血中の Cd 濃度 (ng/g)

	平均	最小値	25 パーセン タイル	中央値	75 パーセン タイル	最大値
全対象者 (n = 89,887)	0.75	0.10	0.50	0.66	0.90	5.33
身体異常 (n = 11,163)	0.76	0.11	0.50	0.67	0.91	5.22
身体異常なし (n = 78,724)	0.75	0.10	0.50	0.66	0.90	5.33
初産婦 (n = 35,963)	0.74	0.11	0.48	0.65	0.90	4.44
経産婦 (n = 53,924)	0.76	0.10	0.50	0.67	0.91	5.33

表 10. 母体血中の Pb 濃度 (ng/g)

	平均	最小値	25 パーセン タイル	中央値	75 パーセン タイル	最大値
全対象者 (n = 89,887)	6.34	1.20	4.70	5.85	7.33	110
身体異常 (n = 11,163)	6.35	1.61	4.72	5.86	7.30	75.5
身体異常なし (n = 78,724)	6.34	1.20	4.70	5.85	7.33	110
初産婦 (n = 35,963)	6.39	1.51	4.76	5.91	7.36	103
経産婦 (n = 53,924)	6.31	1.20	4.67	5.81	7.30	110

表 11. 母体血中の Hg 濃度 (ng/g)

	平均	最小値	25 パーセン タイル	中央値	75 パーセン タイル	最大値
全対象者 (n = 89,887)	4.20	0.18	2.54	3.63	5.19	43.7
身体異常 (n = 11,163)	4.20	0.35	2.54	3.62	5.18	31.1
身体異常なし (n = 78,724)	4.21	0.18	2.55	3.64	5.21	43.7
初産婦 (n = 35,963)	4.07	0.18	2.48	3.53	5.05	35.7
経産婦 (n = 53,924)	4.30	0.32	2.59	3.71	5.31	43.7

表 12. 母体血中の Se 濃度 (ng/g)

	平均	最小値	25 パーセン タイル	中央値	75 パーセン タイル	最大値
全対象者 (n = 89,887)	170	82.8	156	168	182	976
身体異常 (n = 11,163)	170	95.1	157	168	182	371
身体異常なし (n = 78,724)	170	82.8	157	168	182	976
初産婦 (n = 35,963)	167	82.8	154	166	178	425
経産婦 (n = 53,924)	172	83	158	170	184	976

表 13 に、全対象者における母体血中 Cd、Pb、Hg、Se 濃度（log10 変換）と身体異常の関連を示す。各金属濃度と身体異常との関連はなかった。

表 13. Cd、Pb、Hg、Se 濃度の身体異常に対するオッズ比

全対象者 (n = 89,887)	身体異常 (n _{case} = 11,163)					
	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c	
	OR (95% CI) ^d	p 値	OR (95% CI) ^d	p 値	OR (95% CI) ^d	p 値
Cd	1.15 (1.04–1.28)	0.006	1.02 (0.92–1.14)	0.666	1.02 (0.92–1.14)	0.672
Pb	1.02 (0.90–1.17)	0.718	0.95 (0.83–1.08)	0.453	0.95 (0.83–1.08)	0.445
Hg	0.98 (0.90–1.07)	0.671	0.96 (0.89–1.05)	0.394	0.96 (0.88–1.05)	0.374
Se	1.11 (0.75–1.64)	0.611	1.12 (0.76–1.67)	0.571	1.12 (0.76–1.67)	0.565

OR: オッズ比; CI: 信頼区間

^a ロジスティック回帰モデル: 調整なし

^b ロジスティック回帰モデル: 母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別で調整した

^c ロジスティック回帰モデル: Model 1 の調整因子に加えて、亜鉛濃度、葉酸濃度で調整した。

^d Cd、Pb、Hg、Se (ng/g) 濃度は対数変換されているため、OR (95%CI) は Cd、Pb、Hg、Se 濃度が 10 倍変化した結果、従属変数に期待されるオッズ比 (95%信頼区間) を表している。

表 14 に、染色体異常と死産、自然流産の症例を除いた生児を対象とした感度分析の結果を示す。結果は全対象者における解析と同様であった。

表 14. 染色体異常と死産、自然流産の症例を除いた生児の身体異常における Cd、Pb、Hg、Se 濃度のオッズ比

全対象者 (n = 89,566)	身体異常 (n _{case} = 10,951)					
	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c	
	OR (95% CI) ^d	p 値	OR (95% CI) ^d	p 値	OR (95% CI) ^d	p 値
Cd	1.14 (1.03–1.26)	0.014	1.03 (0.92–1.14)	0.651	1.02 (0.92–1.14)	0.659
Pb	1.00 (0.88–1.14)	0.974	0.93 (0.82–1.07)	0.305	0.93 (0.82–1.06)	0.297
Hg	0.98 (0.90–1.06)	0.594	0.96 (0.88–1.05)	0.369	0.96 (0.88–1.05)	0.345
Se	1.10 (0.74–1.63)	0.644	1.13 (0.76–1.68)	0.556	1.13 (0.76–1.69)	0.546

OR: オッズ比; CI: 信頼区間

^a ロジスティック回帰モデル: 調整なし

^b ロジスティック回帰モデル: 母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別で調整した

^c ロジスティック回帰モデル: Model 1 の調整因子に加えて、亜鉛濃度、葉酸濃度で調整した。

^d Cd、Pb、Hg、Se (ng/g) 濃度は対数変換されているため、OR (95%CI) は Cd、Pb、Hg、Se 濃度が 10 倍変化した結果、従属変数に期待されるオッズ比 (95%信頼区間) を表している。

表 15 に、全対象者における母体血中 Cd 濃度 (log10 変換) と身体異常の関連について、各変数を個別に調整した解析結果を示す。Model A から E (それぞれ妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別、生殖補助医療の有無、既往分娩の有無で調整したモデル) では、表 14 とほぼ同等の結果が得られた。一方で、Model F (母体年齢で調整したモデル) では、Cd 濃度と身体異常との関連は有意ではなくなった。

表 15. Cd 濃度の身体異常に対するオッズ比

全対象者 (n = 89,887)	身体異常 (n _{case} = 11,163)					
	Model A ^a		Model B ^b		Model C ^c	
	OR (95% CI) ^g	p 値	OR (95% CI) ^g	p 値	OR (95% CI) ^g	p 値
Cd	1.17 (1.05–1.29)	0.004	1.15 (1.04–1.28)	0.006	1.15 (1.04–1.27)	0.006

全対象者 (n = 89,887)	身体異常 (n _{case} = 11,163)					
	Model D ^d		Model E ^e		Model F ^f	
	OR (95% CI) ^g	p 値	OR (95% CI) ^g	p 値	OR (95% CI) ^g	p 値
Cd	1.14 (1.03–1.27)	0.009	1.16 (1.05–1.28)	0.005	1.04 (0.94–1.15)	0.492

OR: オッズ比; CI: 信頼区間

^a ロジスティック回帰モデル: 妊娠初期の喫煙で調整した

^b ロジスティック回帰モデル: 妊娠初期の飲酒で調整した

^c ロジスティック回帰モデル: 児の性別で調整した

^d ロジスティック回帰モデル: 生殖補助医療の有無で調整した

^e ロジスティック回帰モデル: 既往分娩の有無で調整した

^f ロジスティック回帰モデル: 母体年齢で調整した

^g Cd (ng/g) 濃度は対数変換されているため、OR (95%CI) は Cd 濃度が 10 倍変化した結果、従属変数に期待されるオッズ比 (95%信頼区間) を表している。

表 16 は、母体血中 Cd、Pb、Hg、Se 四分位濃度と身体異常との関連を示したものである。Cd、Pb、Hg、Se 濃度第 1 四分位値群と比較して、Cd、Pb、Hg、Se 濃度第 2-4 四分位値群における身体異常との関連性はなかった。

表 16. 母体血中 Cd、Pb、Hg、Se 四分位濃度と身体異常との関連性

全対象者 (n = 89,887)	身体異常 (n _{case} = 11,163)					
	Crude ^a OR (95% CI) ^d	p 値	Model 1 ^b OR (95% CI) ^d	p 値	Model 2 ^c OR (95% CI) ^d	p 値
母体血中 Cd 四分位値濃度						
第 1 四分位 (≤0.495 ng/g) (n = 22,591)	1.00 (Reference)		1.00 (Reference)		1.00 (Reference)	
第 2 四分位 (0.496-0.662 ng/g) (n = 22,472)	1.05 (1.00–1.11)	0.122	1.02 (0.97–1.08)	0.437	1.02 (0.97–1.08)	0.438
第 3 四分位 (0.663-0.903 ng/g) (n = 22,395)	1.04 (0.99–1.10)	0.138	1.01 (0.95–1.07)	0.849	1.01 (0.95–1.07)	0.854
第 4 四分位 (≥0.904 ng/g) (n = 22,429)	1.07 (1.01–1.13)	0.023	1.00 (0.95–1.06)	0.927	1.00 (0.95–1.06)	0.932
p for trend		0.142		0.862		0.862
母体血中 Pb 四分位値濃度						
第 1 四分位 (≤4.69 ng/g) (n = 22,520)	1.00 (Reference)		1.00 (Reference)		1.00 (Reference)	
第 2 四分位 (4.70-5.84 ng/g) (n = 22,544)	1.02 (0.96–1.08)	0.557	1.01 (0.96–1.07)	0.695	1.01 (0.96–1.07)	0.698
第 3 四分位 (5.85-7.32 ng/g) (n = 22,461)	1.03 (0.98–1.09)	0.282	1.02 (0.96–1.08)	0.511	1.02 (0.96–1.08)	0.515
第 4 四分位 (≥7.33 ng/g) (n = 22,362)	1.00 (0.95–1.06)	0.926	0.97 (0.92–1.03)	0.360	0.97 (0.92–1.03)	0.353
p for trend		0.686		0.414		0.408

全対象者 (n = 89,887)	身体異常 (n _{case} = 11,163)					
	Crude ^a OR (95% CI) ^d	p 値	Model 1 ^b OR (95% CI) ^d	p 値	Model 2 ^c OR (95% CI) ^d	p 値
母体血中 Hg 四分位値濃度						
第 1 四分位 (≤2.54 ng/g) (n = 22,638)	1.00 (Reference)		1.00 (Reference)		1.00 (Reference)	
第 2 四分位 (2.55-3.63 ng/g) (n = 22,394)	0.98 (0.93-1.04)	0.563	0.98 (0.93-1.03)	0.434	0.98 (0.92-1.03)	0.426
第 3 四分位 (3.64-5.19 ng/g) (n = 22,418)	0.99 (0.94-1.05)	0.685	0.98 (0.93-1.04)	0.491	0.98 (0.93-1.04)	0.477
第 4 四分位 (≥5.20 ng/g) (n = 22,437)	0.97 (0.92-1.03)	0.297	0.96 (0.91-1.02)	0.157	0.96 (0.91-1.02)	0.147
p for trend		0.772		0.569		0.549
母体血中 Se 四分位値濃度						
第 1 四分位 (≤156 ng/g) (n = 24,235)	1.00 (Reference)		1.00 (reference)		1.00 (reference)	
第 2 四分位 (157-167 ng/g) (n = 21,083)	1.02 (0.96-1.08)	0.496	1.02 (0.97-1.08)	0.435	1.02 (0.97-1.08)	0.431
第 3 四分位 (168-181 ng/g) (n = 23,122)	1.03 (0.97-1.08)	0.372	1.03 (0.97-1.09)	0.313	1.03 (0.97-1.09)	0.309
第 4 四分位 (≥182 ng/g) (n = 21,447)	1.01 (0.96-1.07)	0.619	1.02 (0.96-1.08)	0.581	1.02 (0.96-1.08)	0.575
p for trend		0.830		0.769		0.765

OR: オッズ比; CI: 信頼区間.

^a ロジスティック回帰モデル: 調整なし

^b ロジスティック回帰モデル: 母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別で調整した

^c ロジスティック回帰モデル: Model 1 の調整因子に加えて、亜鉛濃度、葉酸濃度で調整した。

^dOR (95%信頼区間) は、Cd、Pb、Hg、Se 濃度の第 1 四分位値群と比較した予想オッズ比 (95%信頼区間) を示す。

【混合金属曝露モデルの結果】

すべての金属の複合効果を計算するために、単変量および多変量 quantile g-computation が適用された。単変量および多変量 quantile g-computation は、それぞれ OR 1.41・95%CI (0.92、2.17)、 p 値 0.12、OR 1.47・95%CI (0.95、2.27)、 p 値 0.08 を示した。金属混合物成分の個々の重量を図 3 と図 4 に示す。いずれも、Se、Mn、Cd が正の寄与を示し、Pb と Hg が負の寄与を示した。混合モデルにおいても、Mn が身体異常発生リスクに影響を与えうる金属であると判断した。

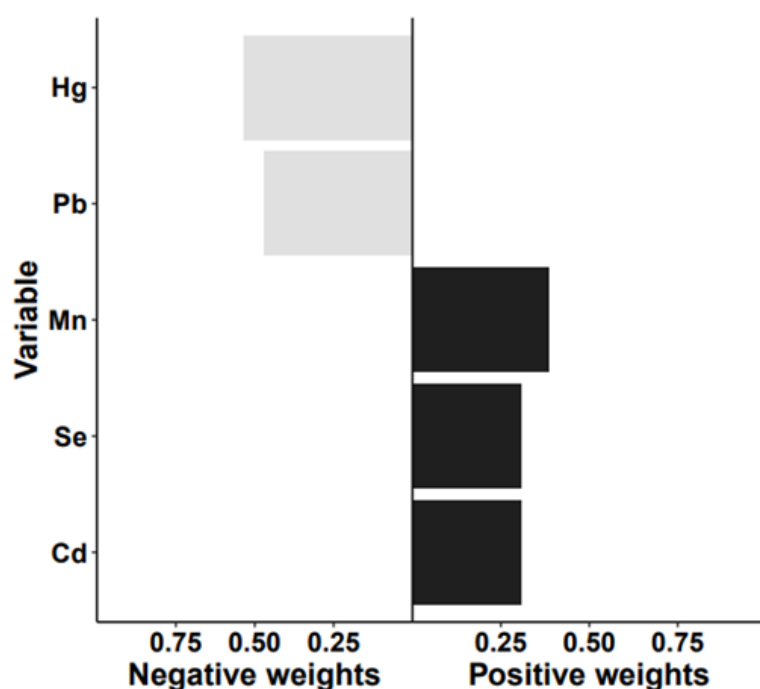


図 3. 身体異常における金属曝露の複合効果。単変量 quantile g-computation による。

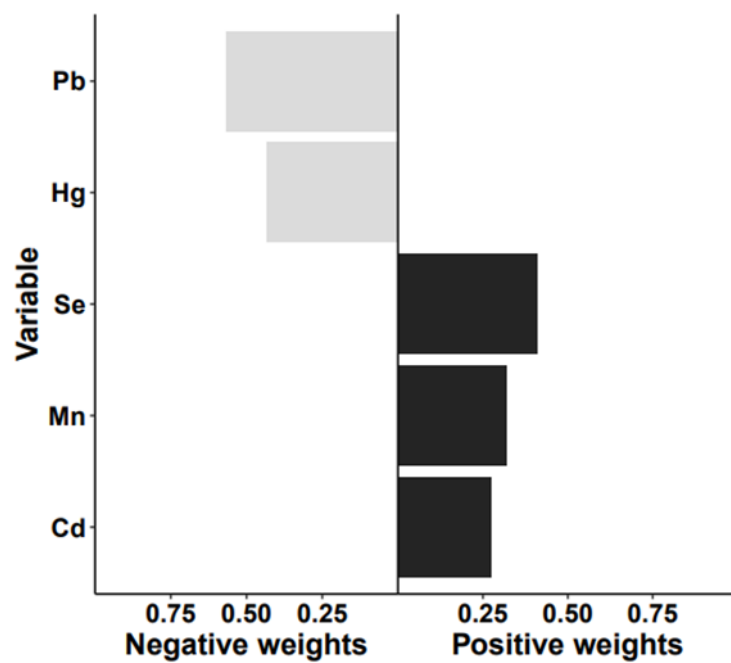


図 4. 身体異常における金属曝露の複合効果。多変量 quantile g-computation による。

考察

本研究では、妊娠中の母体血中 Mn 濃度の上昇は身体異常発生リスクをわずかに増加させる可能性が示唆された。母体血中 Cd、Pb、Hg、Se 濃度と身体異常の関連は有意でなかった。Mn 四分位値濃度の最も高い群 (≥ 18.7 ng/g) は Mn 四分位値濃度の最も低い群 (≤ 12.5 ng/g) に比べて身体異常発生リスクが 1.06 倍高かった。さらに、Mn 十分位値濃度の最も高い群 (≥ 22.2 ng/g) は Mn 十分位値濃度の最も低い群 (≤ 10.5 ng/g) に比べて身体異常発生リスクが 1.12 倍高かった。複合曝露として混合金属曝露モデル等でも検討したが、Mn 濃度の身体異常増加へのわずかな正の関連は一貫した結果が得られた。

エコチル調査によるこれまでの研究では、日本では Cd と Hg の母体血中濃度は北米や欧州より高く、Pb と Se の母体血中濃度は他国と同程度、Mn の母体血中濃度は韓国や台湾より低く、カナダやオーストラリアより高いことが報告されている (Nakayama et al., 2019)。母体血中 Cd 濃度が高い (≥ 0.90 ng/g) と早期早産の頻度が高くなる (Tsuji et al., 2018)。母体血中 Cd 濃度の上昇に伴い出生時体重が減少する (Inadera et al., 2020)。平均出生体重は母体血中 Pb 濃度の上昇に伴い減少する (Goto et al., 2021)。妊娠第 3 期の血中 Mn 濃度が低い (≤ 13.2 ng/g) または高い (≥ 21.0 ng/g) ことは男児の出生体重減少と関連し (Yamamoto et al., 2019)、Se 濃度が低い妊婦群の血中 Hg 濃度が高いと出生時の体重および頭囲が減少する (Kobayashi et al., 2019)。さらに、母親の Cd、Pb、Hg、Se、Mn 濃度と腹部の先天的形態異常の有病率には有意な関連は認められない (Miyashita et al., 2021)、母親の Cd、Pb、Hg、Se、Mn 濃度と口唇口蓋裂の有病率には有意な関連は認められない (Takeuchi et al., 2022)、母親の血中 Mn 濃度が高いほど先天性腎・尿路異常のリスクが低い (Iwaya et al., 2023) といった報告があるが、エコチル調査のデータを用いた出生前の Mn、Cd、Pb、Hg および Se への曝露と新生児の身体異常全体の発生との関連についての報告は本研究が初である。

母体血を採取して児の先天的形態異常との関連を評価した研究は少ないため、先行研究と本研究の結果を直接比較することは困難である。中国の研究では、胎盤の Mn 濃度の上昇が児の神経管閉鎖不全のリスク上昇と関連がみられた (Liu et al., 2013)。米国の研究では、井戸水の Mn 濃度の上昇が児の円錐動脈管異常の高い有病率と有意に関連していた (Sanders et al., 2014)。これらの研究は高濃度の Mn 曝露が先天的形態異常を引き起こしうることを示す。母体血 Mn 濃度の平均は国によって異なる

るため、今後他国でも母体血を検体とした研究を進め、日本と比較する必要があると思われる。

胎児期の Mn 曝露は、脊椎動物の神経細胞や骨格細胞の分化の阻害に関連している (Pinsino et al., 2011)。大脳基底核、白質、皮質構造に影響を与え (Guilarte et al., 2006)、感覚有毛細胞、末梢聴神経線維、神経節ニューロンに大きな損傷を与える (Ding et al., 2011)。Mn はその酸化力のために、ドーパミン (DO) の分解を引き起こし (Oikawa et al., 2006)、ドーパミン作動性ニューロンからシナプス間隙への DO の放出を阻害する。DO はプロラクチンホルモン (PRL) 分泌の抑制を担う神経伝達物質であり (Fitzgerald and Dinan, 2008)、したがって内分泌障害と関連する可能性がある (Dos Santos et al., 2019)。したがって Mn は複数の臓器の先天性形態異常へ関与する可能性がある。過剰な Mn は、酸化ストレスを引き起こし、胎児の細胞成長を阻害する可能性がある (Yamamoto et al., 2019)。酸化ストレスはたんぱく質や DNA を損傷し、胎児の構造異常や死亡を引き起こすことが示唆されている (Wells et al., 2009)。催異常性に酸化ストレスが関与していることはいくつかの研究で実証されており、Mn 曝露による先天性形態異常発生のリスク上昇の可能性が考えられる。

本研究において、単変量の解析では母体血中 Cd 濃度の上昇は身体異常のリスクに有意な影響がみられたが、共変量を母体年齢、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別 (Model 1) として調整したモデルでは有意な影響は認められなかった。これまでの研究で、喫煙者の血中 Cd 濃度は非喫煙者のそれよりもはるかに高いことが示されている (Järup et al., 1998)。また、Cd の生物学的半減期は非常に長いので、ほとんどの組織における Cd 濃度は年齢とともに上昇する (Mijal and Holzman, 2010)。本研究において、Model 1 の各変数を個別に調整因子として解析したところ、母体年齢で調整した際に有意な影響は認められなかったが、既往分娩の有無、生殖補助医療の有無、妊娠初期の喫煙、妊娠初期の飲酒、児の性別に関しては個別に調整しても有意な影響は残っていた。このことから Cd 濃度上昇は母体年齢の影響が大きいものと考えられた。

母親の血液中の Pb、Hg 濃度と身体異常のリスクとの関連は観察されなかった。

母親の血液中の Se 濃度と身体異常のリスクとの関連は観察されなかった。妊娠中の Se レベルは比較的安定しているという報告があり (Mistry et al., 2012)、検体採取のタイミングは結果に影響を及ぼさないと考えられる。Se と有害微量元素との間の複雑な拮抗作用も報告されている。例えば、Se は Pb による炎症因子や熱ショック

タンパク質遺伝子の発現に対して拮抗作用を発揮する可能性があり (Zheng et al., 2016)、Hg の白内障形成作用は Se によって相殺される可能性があり (Lemire et al., 2010)、Se は Cd 誘発毒性に対する潜在的な対策として同定されている (Zwolak and Zaporowska, 2012)。したがって、母体の Se 濃度が高いと先天性形態異常の発生が抑制される可能性がある。

Cd、Pb、Hg、Se 濃度と各臓器の先天性形態異常のリスクとの関連については、今後の研究成果として他の著者によりエコチル調査に報告される予定である。

ヒトは一度に複数の化学物質の混合物に曝露されるため、化学物質の混合物が健康に及ぼす影響をさらに検討することが必要である。そこで、**qgcomp** を用いて身体異常に対する金属の混合物の影響を評価した。**qgcomp** は、重み付き分位点と回帰の推論上の簡便さを組み合わせて、混合物全体の複合効果を評価するものである (Keil et al., 2020)。方向性の均質性を仮定せず、化学物質の効果の非線形性や非加法性を許容する手法である。**qgcomp** の結果から、Mn は身体異常発生に影響を与える金属元素であることが判明した。

本研究の大きな強みは、大規模で前向きな出生コホート研究であることである。また、サブグループ解析により、大規模なサンプルを解析することができ、より正確に因果関係を特定することができた。しかし、本研究にはいくつかの限界もある。まず、サンプル数に対して染色体異常や流産、死産の症例数が少ないため、妊娠中の母体 Mn、Cd、Pb、Hg および Se 濃度と染色体異常や自然流産、死産との関係を明らかにすることができなかったことである。第二に、本研究では身体異常全体の発生について評価を行っていることである。それぞれの身体異常ごとに影響する要因の種類や作用は異なると考えられるため、一部の身体異常の増加がマスクされている可能性がある。第三に、本研究では、各金属の濃度測定の時期が、器官形成期を過ぎた妊娠中期または後期の一回に限られていることである。これについては本研究の身体異常は器官形成期に生じると考えられる先天性形態異常以外の所見も身体異常として評価しているため、暴露による影響が考慮される時期は器官形成期に限定されるものではない。また Cd は生物学的半減期が非常に長く (Mijal and Holzman, 2010)、Pb の半減期は 1 か月 (Jin et al., 2013)、Hg は 18 日 (Bernard, 1995) だが、これらは累積毒性物質であり、長期間非曝露の後に以前の曝露を検出する可能性を持っている (Bernard, 1995)。Se の食事摂取量が少ないと妊娠中の Se 濃度は低下するが、土壌中の Se 含有量が多い地域では血清 Se 濃度に妊娠中の傾向は見られない (Mistry et al., 2012)。Mn は妊娠期間を通して漸増する (Spencer, 1999)。これらの金属は半減期が数十日以上と長く、妊娠中期・後期の採血でも器官形成期の濃度を反映しう

る。

最後に、生後 1 か月以降に初めて先天性形態異常と診断される症例があるため (Bower et al., 2010) これらの症例が本研究の結果に反映されていない可能性がある。

結論

本研究により、出生前の Mn 曝露は身体異常発生のリスクをわずかに増加させる可能性があること、一方で母体血中 Cd、Pb、Hg および Se 濃度と身体異常全体の間には有意な関連は見られないことが示された。

胎児が成長過程において Mn を大量に必要とする一方、Mn の毒性の影響を受ける可能性があるというこれらの知見は、大気汚染物質や食品における Mn の安全域についてさらに研究していく必要性を示している。

今後の展望として、先天性形態異常は臓器や疾患により発生の機序が異なることを考慮し、出生前の金属曝露と先天性形態異常の関連性、個別の臓器や疾患ごとに解析し、Mn と関連性の高い先天性形態異常が存在するのか、あるいは他の金属とも関連性の高い先天性形態異常が存在するのか、といった点を解明していく予定である。

また、染色体異常の症例や自然流産・死産の症例、人工流産を行った母親から生まれた児に対象を広げ解析を行うことや、生後 1 ヶ月以降に先天性形態異常と診断される症例に対しても対象を広げ解析を行うことなどを検討中である。

最後に、前向きコホート研究は結果が成果となるまで時間がかかり、現時点で研究対象の児は 10-12 歳になっているが、データが配布されているのは 4 歳までである。エコチル調査のフォローアップは 13 歳までの予定だったが、40 歳ごろまでの延長が決定している。さらに、長期的な、あるいは次世代への影響を調査することや、現在計画されている遺伝子多型やエピゲノム解析なども計画あるいは実施されている。このようにエコチル調査はこれからますます発展し、成果が期待されている。申請者も小児科医として、今後は実臨床に関連した視点から、母親の金属濃度と早産との関係や、母親の金属濃度と児の発達予後との関係などについて着目し、研究を精力的に継続していくことを考えている。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、ご指導賜りました、北海道大学大学院医学研究院生殖・発達医学分野小児科学教室 真部淳教授、北海道大学病院周産母子センター 長和俊診療教授、古瀬優太助教、北海道大学環境健康科学研究教育センター 岸玲子特別招へい教授、小林澄貴特任准教授、山口健史特任准教授、岩田啓芳特任准教授、田村菜穂美特任講師、伊藤佐智子客員研究員、および宮下ちひろ客員研究員に深く感謝いたします。

本研究にご参加くださり貴重な研究資料をご提供いただきました対象者の皆さま、ご協力いただきました各ユニットセンターおよび医療機関のスタッフの皆さまに厚く御礼申し上げます。

また、様々な面から研究をサポートしてくださいました、北海道大学病院周産母子センター 安藤明子先生、本庄遼太先生、瀬戸康貴先生、武田賢大先生に御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反はありません。

引用文献

Adams, S. V., Newcomb, P. A., Shafer, M. M., Atkinson, C., Bowles, E. J., Newton, K. M., Lampe, J. W. (2011). Sources of cadmium exposure among healthy premenopausal women. *Sci. Total Environ.* *409*, 1632-1637.

Aschner, M, Erikson, K. M., Dorman, D. C. (2005). Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* *35*, 1-32.

Bernard, A. M. (1995). Biokinetics and stability aspects of biomarkers: recommendations for application in population studies. *Toxicology.* *101*, 65-71.

Bocca, B., Ciccarelli, S., Agostino, R., Alimonti, A. (2017). Trace elements, oxidative status and antioxidant capacity as biomarkers in very low birth weight infants. *Environ. Res.* *156*, 705-713.

Bower, C., Rudy, E., Callaghan, A., Quick, J., Nassar, N. (2010). Age at diagnosis of birth defects. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *88*, 251-255.

Caserta, D., Graziano, A., Monte, G. L., Bordi, G., Moscarini, M. (2013). Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur. Rev. Med. Pharmacol Sci.* *17*, 2198-2206.

Cengiz, B., Söylemez, F., Oztürk, E., Cavdar, A. O. (2004). Serum zinc, selenium, copper, and lead levels in women with second-trimester induced abortion resulting from neural tube defects: a preliminary study. *Biol. Trace Elem. Res.* *97*, 225-235.

Ding, D., Roth, J., Salvi, R. (2011). Manganese is toxic to spiral ganglion neurons and hair cells in vitro. *Neurotoxicology.* *32*, 233-241.

Dos Santos, N. R., Rodrigues, J. L. G., Bandeira, M. J., Anjos, A. L. D. S., Araújo, C. F. S., Adan, L. F. F., Menezes-Filho, J. A. (2019). Manganese exposure and association with hormone imbalance in children living near a ferro-manganese alloy plant. *Environ. Res.* *172*, 166-174.

Ercal, N, Gurer-Orhan, H, Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* *1*, 529-539.

Feldkamp, M. L., Carey, J. C., Byrne, J. L. B., Krikov, S., Botto, L. D. (2017). Etiology and clinical presentation of birth defects: population based study. *BMJ.* *357*, j2249.

Fitzgerald, P., Dinan, T. G. (2008). Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J. Psychopharmacol.* *22*, 12-19.

Goto, Y., Mandai, M., Nakayama, T., Yamazaki, S., Nakayama, S. F., Isobe, T., Sato, T., Nitta, H. (2021). Association of prenatal maternal blood lead levels with birth outcomes in the Japan Environment and Children's Study (JECS): a nationwide birth cohort study. *Int. J. Epidemiol.* *50*, 156-164.

Guilarte, T. R., McGlothlan, J. L., Degaonkar, M., Chen, M. K., Barker, P. B., Syversen, T., Schneider, J.S. (2006). Evidence for cortical dysfunction and widespread manganese accumulation in the nonhuman primate brain following chronic manganese exposure: a 1H-MRS and MRI study. *Toxicol. Sci.* *94*, 351-358.

Guo, Y., Yu, P., Zhu, J., Yang, S., Yu, J., Deng, Y., Li, N., Liu, Z. (2019). High maternal selenium levels are associated with increased risk of congenital heart defects in the offspring. *Prenat. Diagn.* *39*, 1107-1114.

Hanaoka, T., Tamura, N., Ito, K., Sasaki, S., Araki, A., Ikeno, T., Miyashita, C., Ito, S., Minakami, H., Cho, K., et al. (2018). Prevalence and Risk of Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *J. Epidemiol.* *28*, 125-132.

Hansen, J. M. (2006). Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today.* *78*, 293-307.

Inadera, H., Takamori, A., Matsumura, K., Tsuchida, A., Cui, Z. G., Hamazaki, K.,

Tanaka, T., Ito, M., Kigawa, M., Origasa, H. et al. (2020). Association of blood cadmium levels in pregnant women with infant birth size and small for gestational age infants: The Japan Environment and Children's study. *Environ. Res.* *191*, 110007.

Iwaya, Y., Sanefuji, M., Nishiyama, K., Sonoda, Y., Hamada, N., Suga, R., Ochiai, M., Shimono, M., Kusuhara, K., Ohga, S., et al. (2023). Prenatal metal levels and congenital anomalies of the kidney and urinary tract: The Japan Environment and Children's Study. *Sci. Total Environ.* *890*, 164356.

Järup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., Vahter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work Environ. Health.* *24*, Suppl 1, 1-51.

Jin, L., Zhang, L., Li, Z., Liu, J. M., Ye, R., Ren, A. (2013). Placental concentrations of mercury, lead, cadmium, and arsenic and the risk of neural tube defects in a Chinese population. *Reprod. Toxicol.* *35*, 25-31.

Jin, L., Liu, M., Zhang, L., Li, Z., Yu, J., Liu, J., Ye, R., Chen, L., Ren, A. (2016). Exposure of methyl mercury in utero and the risk of neural tube defects in a Chinese population. *Reprod Toxicol.* *61*, 131-135.

Jin, X., Tian, X., Liu, Z., Hu, H., Li, X., Deng, Y., Li, N., Zhu, J. (2016). Maternal exposure to arsenic and cadmium and the risk of congenital heart defects in offspring. *Reprod. Toxicol.* *59*, 109-116.

Kawamoto, T., Nitta, H., Murata, K., Toda, E., Tsukamoto, N., Hasegawa, M., Yamagata, Z., Kayama, F., Kishi, R., Ohya, Y., et al. (2014). Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). *BMC Public Health.* *14*, 25.

Keil, A. P., Buckley, J. P., O'Brien, K. M., Ferguson, K. K., Zhao, S., White, A. J. (2020). A Quantile-Based g-Computation Approach to Addressing the Effects of Exposure Mixtures. *Environ. Health Perspect.* *128*, 47004.

Kobayashi, S., Kishi, R., Saijo, Y., Ito, Y., Oba, K., Araki, A., Miyashita, C., Itoh, S., Minatoya, M., Yamazaki, K., et al. (2019). Association of blood mercury levels during pregnancy with infant birth size by blood selenium levels in the Japan Environment and Children's Study: A prospective birth cohort. *Environ. Int.* *125*, 418-429.

Krachler, M., Rossipal, E., Micetic-Turk, D. (1999). Trace element transfer from the mother to the newborn--investigations on triplets of colostrum, maternal and umbilical cord sera. *Eur. J. Clin. Nutr.* *53*, 486-494.

Langley, R. L., Kao, Y., Mort, S. A., Bateman, A., Simpson, B. D., Reich, B. J. (2015). Adverse neurodevelopmental effects and hearing loss in children associated with manganese in well water, North Carolina, USA. *J. Environ. Occup. Sci.* *4*, 62-69.

Lemire, M., Fillion, M., Frenette, B., Mayer, A., Philibert, A., Passos, C. J., Guimarães, J. R., Barbosa, F. J., Mergler, D. (2010). Selenium and mercury in the Brazilian Amazon: opposing influences on age-related cataracts. *Environ. Health. Perspect.* *118*, 1584-1589.

Liu, J., Jin, L., Zhang, L., Li, Z., Wang, L., Ye, R., Zhang, Y., Ren, A. (2013). Placental concentrations of manganese and the risk of fetal neural tube defects. *J. Trace Elem. Med. Biol.* *27*, 322-325.

Mai, C. T., Isenburg, J. L., Canfield, M. A., Meyer, R. E., Correa, A., Alverson, C. J., Lupo, P. J., Riehle-Colarusso, T., Cho, S. J., Aggarwal, D., et al. (2019). National population-based estimates for major birth defects, 2010-2014. *Birth Defects Res.* *111*, 1420-1435.

Martin, I., Gibert, M. J., Pintos, C., Noguera, A., Besalduch, A., Obrador, A. (2004). Oxidative stress in mothers who have conceived fetus with neural tube defects: the role of aminothiols and selenium. *Clin. Nutr.* *23*, 507-514.

Mezawa, H., Tomotaki, A., Yamamoto-Hanada, K., Ishitsuka, K., Ayabe, T., Konishi, M., Saito, M., Yang, L., Suganuma, N., Hirahara, F., et al. (2019). Prevalence of Congenital Anomalies in the Japan Environment and Children's

Study. *J. Epidemiol.* *29*, 247-256.

Mijal, R. S., Holzman, C. B. (2010). Blood cadmium levels in women of childbearing age vary by race/ethnicity. *Environ. Res.* *110*, 505-512.

Mistry, H. D., Broughton Pipkin, F., Redman, C. W., Poston, L. (2012). Selenium in reproductive health. *Am. J. Obstet Gynecol.* *206*, 21-30.

Miyashita, C., Saijo, Y., Ito, Y., Ikeda-Araki, A., Itoh, S., Yamazaki, K., Kobayashi, S., Ait Bamai, Y., Masuda, H., Tamura, N., et al. (2021). Association between the Concentrations of Metallic Elements in Maternal Blood during Pregnancy and Prevalence of Abdominal Congenital Malformations: The Japan Environment and Children's Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* *18*, 10103.

Myers, G. J., Davidson, P. W. (1998). Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental, and behavioral research. *Environ. Health Perspect.* *106*, Suppl 3, 841-7.

Nakayama, S. F., Iwai-Shimada, M., Oguri, T., Isobe, T., Takeuchi, A., Kobayashi, Y., Michikawa, T., Yamazaki, S., Nitta, H., Kawamoto, T., et al. (2019). Blood mercury, lead, cadmium, manganese and selenium levels in pregnant women and their determinants: the Japan Environment and Children's Study (JECS). *J. Expo. Sci. Environ Epidemiol.* *29*, 633-647.

National Research Council. (2000). *Toxicological Effects of Methylmercury*. Washington, DC: The National Academies Press, Washington DC, U.S. pp. 21-25.

Ni, W., Yang, W., Yu, J., Li, Z., Jin, L., Liu, J., Zhang, Y., Wang, L., Ren, A. (2018). Umbilical Cord Concentrations of Selected Heavy Metals and Risk for Orofacial Clefts. *Environ. Sci. Technol.* *52*, 10787-10795.

Ni, W., Yang, W., Yu, J., Li, Z., Jin, L., Liu, J., Zhang, Y., Wang, L., Ren, A. (2019). Association between selected essential trace element concentrations in umbilical cord and risk for cleft lip with or without cleft palate: A case-control study. *Sci. Total Environ.* *661*, 196-202.

Oikawa, S., Hirosawa, I., Tada-Oikawa, S., Furukawa, A., Nishiura, K., Kawanishi, S. (2006). Mechanism for manganese enhancement of dopamine-induced oxidative DNA damage and neuronal cell death. *Free Radic. Biol. Med.* *41*, 748-756.

Oliveira, C. I., Fett-Conte, A. C. (2013). Birth defects: Risk factors and consequences. *J. Pediatr. Genet.* *2*, 85-90.

Ou, Y., Bloom, M. S., Nie, Z., Han, F., Mai, J., Chen, J., Lin, S., Liu, X., Zhuang, J. (2017). Associations between toxic and essential trace elements in maternal blood and fetal congenital heart defects. *Environ. Int.* *106*, 127-134.

Pérez, M. J., Cederbaum, A. I. (2002). Antioxidant and pro-oxidant effects of a manganese porphyrin complex against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* *33*, 111-127.

Pi, X., Qiao, Y., Wei, Y., Jin, L., Li, Z., Liu, J., Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Xie, Q., et al. (2018). Concentrations of selected heavy metals in placental tissues and risk for neonatal orofacial clefts. *Environ. Pollut.* *242*, 1652-1658.

Pi, X., Wei, Y., Li, Z., Jin, L., Liu, J., Zhang, Y., Wang, L., Ren, A. (2019). Higher concentration of selenium in placental tissues is associated with reduced risk for orofacial clefts. *Clin. Nutr.* *38*, 2442-2448.

Pinsino, A., Roccheri, M. C., Costa, C., Matranga, V. (2011). Manganese interferes with calcium, perturbs ERK signaling, and produces embryos with no skeleton. *Toxicol. Sci.* *123*, 217-230.

Prasher, D. (2009). Heavy metals and noise exposure: health effects. *Noise Health.* *11*, 141-144.

Sanders, A. P., Desrosiers, T. A., Warren, J. L., Herring, A. H., Enright, D., Olshan, A. F., Meyer, R. E., Fry, R. C. (2014). Association between arsenic, cadmium, manganese, and lead levels in private wells and birth defects prevalence in North Carolina: a semi-ecologic study. *BMC Public Health.* *14*, 955.

Santamaria, A. B., Sulsky, S. I. (2010). Risk assessment of an essential element: manganese. *J. Toxicol Environ. Health. A.* *73*, 128-155.

Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., Sens, D. A. (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ. Health. Perspect.* *118*, 182-190.

Sharma, T., Banerjee, B. D., Yadav, C. S., Gupta, P., Sharma, S. (2014). Heavy metal levels in adolescent and maternal blood: association with risk of hypospadias. *ISRN Pediatr.* *2014*, 714234.

Spencer, A. (1999). Whole blood manganese levels in pregnancy and the neonate. *Nutrition.* *15*, 731-734.

Takeuchi, M., Yoshida, S., Kawakami, C., Kawakami, K., Ito, S., Japan Environment and Children's Study Group. (2022). Association of maternal heavy metal exposure during pregnancy with isolated cleft lip and palate in offspring: Japan Environment and Children's Study (JECS) cohort study. *PLoS One.* *17*, e0265648.

Tsuji, M., Shibata, E., Morokuma, S., Tanaka, R., Senju, A., Araki, S., Sanefuji, M., Koriyama, C., Yamamoto, M., Ishihara, Y., et al. (2018). The association between whole blood concentrations of heavy metals in pregnant women and premature births: The Japan Environment and Children's Study (JECS). *Environ. Res.* *166*, 562-569.

United States, Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2012). Toxicological Profile for Manganese. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.pdf> (Cited November 29, 2021)

Wells, P. G., McCallum, G. P., Chen, C. S., Henderson, J. T., Lee, C. J., Perstin, J., Preston, T. J., Wiley, M. J., Wong, A. W. (2009). Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol.*

Sci. 108, 4-18.

White, J. T., Kovar, E., Chambers, T. M., Sheth, K.R., Peckham-Gregory, E. C., O'Neill, M., Langlois, P. H., Jorgez, C. J., Lupo, P. J., Seth, A. (2019). Hypospadias Risk from Maternal Residential Exposure to Heavy Metal Hazardous Air Pollutants. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 16, 930.

World Health Organization. Congenital anomalies. (2020). <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies> (Cited November 29, 2021)

Yalçın, S. S., Dönmez, Y., Aypar, E., Yalçın, S. (2021). Element profiles in blood and teeth samples of children with congenital heart diseases in comparison with healthy ones. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 63, 126662.

Yamamoto, M., Sakurai, K., Eguchi, A., Yamazaki, S., Nakayama, S.F., Isobe, T., Takeuchi, A., Sato, T., Hata, A., Mori, C., et al. (2019). Association between blood manganese level during pregnancy and birth size: The Japan environment and children's study (JECS). *Environ. Res.* 172, 117-126.

Yan, L., Wang, B., Li, Z., Liu, Y., Huo, W., Wang, J., Li, Z., Ren, A. (2017). Association of essential trace metals in maternal hair with the risk of neural tube defects in offspring. *Birth Defects Res.* 109, 234-243.

Yang, W., Shaw, G. M., Carmichael, S. L., Rasmussen, S. A., Waller, D. K., Poher, B. R., Anderka, M.; National Birth Defects Prevention Study. (2008). Nutrient intakes in women and congenital diaphragmatic hernia in their offspring. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 82, 131-138.

Zheng, S., Song, H., Gao, H., Liu, C., Zhang, Z., Fu, J. (2016). The Antagonistic Effect of Selenium on Lead-Induced Inflammatory Factors and Heat Shock Protein mRNA Level in Chicken Cartilage Tissue. *Biol. Trace Elem. Res.* 173, 177-184.

Zierler, S., Theodore, M., Cohen, A., Rothman, K. J. (1988). Chemical quality of maternal drinking water and congenital heart disease. *Int. J. Epidemiol.* 17, 589-

594.

Zwolak, I., and Zaporowska, H. (2012). Selenium interactions and toxicity: a review. Selenium interactions and toxicity. *Cell Biol. Toxicol.* 28, 31-46.