

Bisfenol A i urin från män och kvinnor i Norr- och Västerbotten

Christian Lindh¹, Bo Jönsson¹, Maya Berggren², Anna Beronius³, Bo Carlberg⁴, Anneli Sundkvist², Ingvar Bergdahl²

¹ Institutionen för Laboratoriemedicin, Avd. Arbets och miljömedicin, Lunds Universitet

² Institutionen för Folkhälsa och klinisk medicin, Yrkes- och miljömedicin, Umeå universitet

³ Institutet för miljömedicin, Karolinska Institutet

⁴ Institutionen för Folkhälsa och klinisk medicin, Medicin, Umeå Universitet

Programområde: Hälsorelaterad miljöövervakning
Delprogram: Miljögiftssamordning Screening
Undersökning: Retrospektiva studier, Bisfenol A analys
Avtalsnummer:2190902

Inledning

Bisfenol A (BPA) är ett ämne som används i mycket stora mängder för att producera främst epoxipolymerer och polykarbonat. Det tolerabla dagliga intaget (TDI) för BPA har fastställts till 50 µg per kg kroppsvikt och dag baserat på ett NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) av 5 mg per kg kroppsvikt och dag (EFSA, 2006). European Food Safety Authority (EFSA) har uppskattat att exponeringsnivåerna i den Europeiska befolkningen ligger mellan 0,2 och 13 µg per kg kroppsvikt och dag (EFSA, 2006). Det nuvarande TDI-värdet är dock omdiskuterat då en stor mängd djurstudier som gjorts de senaste tio åren har rapporterat effekter av BPA vid doser under 5 mg per kg kroppsvikt och dag. Främst är det störd utveckling och funktion av reproduktionsorgan (t ex Nagel *et al.*, 1997; vom Saal *et al.*, 1998; Gupta, 2000; Markey *et al.*, 2005) samt nervsystem och beteende (t ex Negishi *et al.*, 2004; Ryan and Vandenberg, 2006; Nakagami *et al.*, 2009) som observerats i dessa studier, ibland vid doser på bara några µg per kg kroppsvikt och dag.

Under de senaste tio åren har ett tiotal riskbedömningar av BPA gjorts av olika myndigheter och expertgrupper i Europa, USA, Canada och Japan. De olika riskbedömningarna har dock kommit till olika slutsatser vad gäller riskerna för människors hälsa. Främst beror olikheterna på hur man har värderat och tolkat de studier som rapporterar effekter av BPA vid låga doser, under 5 mg per kg kroppsvikt och dag (Beronius *et al.*, 2009).

Det finns även två epidemiologiska studier som tyder på samband mellan hjärt- kärlsjuklighet och möjligen också diabetes, och koncentrationen av Bisfenol A i urin (Lang *et al.*, 2008; Metzger *et al.*, 2010).

Spädbarn beräknas ha den högsta exponeringen av BPA (EFSA, 2006). Detta grundas på ett högt intag av t ex välling och modersmjölkersättning från polykarbonatflaskor och mat från förpackningar (t ex konserverburkar) som på insidan är lackade med epoxi. Spädbarn har dessutom ett högt intag av mat i relation till kroppsvikt jämfört med vuxna. Den viktigaste källan till exponering hos vuxna verkar vara epoxilacken som finns på insidan av konserverburkar, men det råder viss oklarhet om andra förpackningar bidrar, t.ex. plastförpackningar för kakor och frukostflingor (von Goetz *et al.*, 2010). Det har visats att urinhaltarna av BPA ökar vid konsumtion av dryck från polykarbonatflaskor (Carwile *et al.* 2009).

Utsöndringen av bisfenol A i urin antas vara snabb, med en halveringstid på ca 6 timmar (ex EFSA, 2006). Det finns dock rapporter om att de exponeringsnivåer som beräknats för den allmänna populationen inte kan förklara de halter av BPA som faktiskt uppmätts i blod och urin från människor (Vandenberg *et al.*, 2007; Stahlhut *et al.*, 2009). Detta förklaras med att det kan finnas ytterligare (okända) exponeringskällor för BPA eller att kunskap saknas vad gäller kinetiken för BPA och att metabolismen av ämnet hos människor inte är så effektiv som man tidigare trott.

Det är oklart om analys av ett enstaka urinprov ger ett bra mått på exponeringen. I en studie anses ett prov ge ett prediktionsvärde på långtidsexponering (Mahalingaiah *et al.*, 2008), medan andra studier visar på enbart svaga korrelationer mellan urinprover tagna vid två tillfällen på samma individ (Meeker *et al.*, 2010).

Ingen svensk studie har rapporterats där bisfenol A i urin har kvantifierats. Däremot har bisfenol A bestämts i urinprover tagna i andra länder. Flera studier har bl.a. utförts i USA (Calafat et al., 2008, Meeker et al., 2010), Norge (Ye et al., 2009), Holland (Ye et al., 2008), samt Tyskland (Becker et al., 2009)

Syftet med den här studien var att undersöka vilka koncentrationer som finns i urin från vuxna boende i Norrbotten och Västerbotten.

Metod

Undersökta personer och provsamling

Provtagning skedde inom ramen för MONICA-projektet, som genomfört populationsbaserade undersökningar i Norr- och Västerbotten (Stegmayr et al., 2003). En ny undersökningsomgång skedde 2009. Sexhundra av de personer som bjöds in till MONICA-undersökningen 2009 bjöds också in att delta i en miljödel, med bl.a. urinprovtagning. Av dessa 600 lämnade 329 (55%) urinprov i vilka BPA bestämdes.

Urinprov samlades i en pappersmugg och överfördes till ett syrasköljt provrör. Pappersmugg och provrör skickades med post, och morgonurin samlades i hemmet.

Kemiska analysmetoder

Analyser av BPA genomfördes med vätskekromatografi-tandem masspektrometri (LC/MS/MS) efter en glukuronidhydrolys följt av upprening med fast-faskolonner enligt en modifierad metod (Kuklennyik, et al. 2003; Völkel 2005). Isotopiskt märkt D₁₆-BPA användes som intern standard. Alla prover har analyserats minst två gånger. Detektionsgränsen ligger på 0.5 ng/mL. Standardkurvor var baserade på två invägningar. En standardkurva samt två kontrollprover var inkluderade i alla analysserier. Interlaboratoriekontroller fanns ej tillgängliga.

I urinproven bestämdes även densitet med en handrefraktometer och kreatinin med en enzymatisk metod (Mazzachi et al., 2000). Data har bearbetats för BPA-koncentration i urin, men också för densitetsjusterad koncentration (justerad mot 1.016 g/mL) och för BPA normerat till kreatinin.

Statistiska analyser

Statistiska analyser har utförts i programmet SPSS version 18 (PASW Statistics 18.0) 2009. Halterna var inte normalfördelade för någon grupp eller totalt för män eller kvinnor. För jämförelse av grupper har oparametriska tvåsidiga test använts (Mann-Whitney).

Resultat

Totalt 323 personer ingår i de statistiska analyserna, 4 st var under detektionsgränsen 0,5 µg/L (ojusterat).

Tabell 1. Antal män och kvinnor i olika åldersgrupper. Yngre = 25-29 år, äldre = 50-59 år

	Åldersgrupp	Antal	Procent
Män	yngre	65	44,5
	äldre	81	55,50
	total	146	100
Kvinnor	yngre	89	50,3
	äldre	88	49,7
	totalt	177	100

Tabell 2. Halt BPA i urin i µg/L. Ojusterade prov. Yngre = 25-29 år, äldre = 50-59 år

		Åldersgr	Antal	medel	Std.dev	min	max	median	geo.med	percentil	
										25	75
Män	yngre	66	4,1	3,5	0,3	18	2,9	3,1		2,0	5,1
	äldre	81	3,4	3,4	0,4	23	2,5	2,3		1,1	3,9
	total	146	3,7	3,5	0,3	23	2,7	2,6		1,6	4,6
Kvinnor	yngre	89	4,9	7,4	0,6	52	3,0	3,0		1,7	4,6
	äldre	88	4,1	10	0,4	86	1,7	1,9		0,9	3,4
	totalt	177	4,5	9,0	0,4	86	2,3	2,4		1,2	4,2
Samtliga	yngre	154	4,5	6,0	0,3	52	2,9	3,1		1,8	4,9
	äldre	169	3,7	7,9	0,4	86	1,9	2,1		1,0	3,7
	totalt	323	4,1	7,1	0,3	86	2,5	2,5		1,3	4,4

Tabell 3. Halt BPA i urin i µmol/mol kreatinin. Kreatininjusterade prov. Yngre = 25-29 år, äldre = 50-59 år

		Åldersgr	Antal	medel	Std.dev	min	max	median	geo.med	percentil	
										25	75
Män	yngre	66	1,0	0,7	0,2	3,6	0,8	0,8		0,5	1,2
	äldre	81	1,0	0,9	0,1	5,4	0,7	0,8		0,5	1,2
	total	146	1,0	0,8	0,1	5,4	0,8	0,8		0,5	1,2
Kvinnor	yngre	89	1,5	1,7	0,2	13	1,0	1,1		0,7	1,6
	äldre	88	1,7	3,0	0,1	23	0,9	1,0		0,6	1,7
	totalt	177	1,6	2,4	0,1	23	1,0	1,0		0,6	1,7
Samtliga	yngre	154	1,3	1,4	0,2	13	0,9	0,9		0,6	1,4
	äldre	169	1,4	2,3	0,1	23	0,80	0,9		0,5	1,4
	totalt	323	1,3	1,9	0,1	23	0,9	0,9		0,6	1,4

Tabell 4. Halt BPA i urin i µg/L. Densitetsjusterade prov (1.016g/mL) . Yngre = 25-29 år, äldre = 50-59 år

		Åldersgr	Antal	medel	Std.dev	min	max	median	geo.med	percentil	
										25	75
Män	yngre	66	3,4	2,5	0,4	14	2,7	2,8		2,0	4,1
	äldre	81	3,1	2,7	0,4	15	2,3	2,3		1,4	4,2
	total	146	3,3	2,6	0,4	15	2,5	2,5		1,6	4,1
Kvinnor	yngre	89	4,8	5,8	0,7	42	3,0	3,3		2,0	4,8
	äldre	88	4,2	8,3	0,5	66	2,1	2,4		1,3	4,0
	totalt	177	4,5	7,2	0,5	66	2,7	2,8		1,5	4,6
Samtliga	yngre	154	4,2	4,8	0,4	42	2,9	3,1		2,0	4,6
	äldre	169	3,7	6,3	0,4	66	2,2	2,4		1,3	4,1
	totalt	323	3,9	5,6	0,4	66	2,6	2,7		1,5	4,2

Skillnader mellan grupper

Det var ingen signifikant skillnad i BPA-halter mellan män och kvinnor i densitetsjusterade prov, $p=0,456$ (Tabell 5). I kreatininjusterade prov var däremot skillnaden signifikant mellan män och kvinnor, $p=0,002$ (Tabell 6).

Tabell 5. Test^a män – kvinnor densjust. halt

	µgBPAL
Mann-Whitney U	12298,000
Wilcoxon W	23029,000
Z	-,746
Asymp. Sig. (2-tailed)	,456

a. Grouping Variable: Kön

Tabell 6. Test^a män – kvinnor kreatininjust. halt

	µmolBPA
Mann-Whitney U	10280,000
Wilcoxon W	21011,000
Z	-3,162
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002

a. Grouping Variable: Kön

I densitetsjusterade prov var det nästan signifikant skillnad i BPA-halt mellan yngre och äldre män, $P=0,072$ och signifikanta skillnader mellan yngre och äldre kvinnor; $P=0,007$ (Tabell 7). I kreatininjusterade prov var det däremot ingen signifikant skillnad mellan yngre och äldre, $p=0,605$ för män och $p=0,675$ för kvinnor (Tabell 8).

Tabell 7. Test^a yngre – äldre densjust. halt

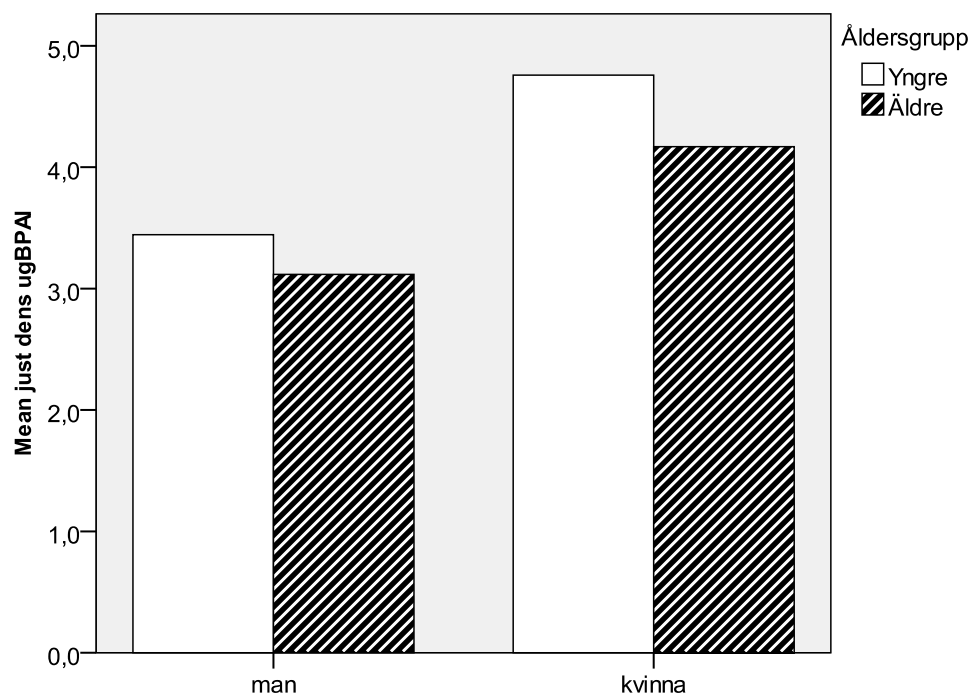
Kön		µgBPAL
man	Mann-Whitney U	2175,000
	Wilcoxon W	5496,000
	Z	-1,801
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,072
kvinna	Mann-Whitney U	3002,000
	Wilcoxon W	6918,000
	Z	-2,682
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,007

a. Grouping Variable: Åldersgrupp

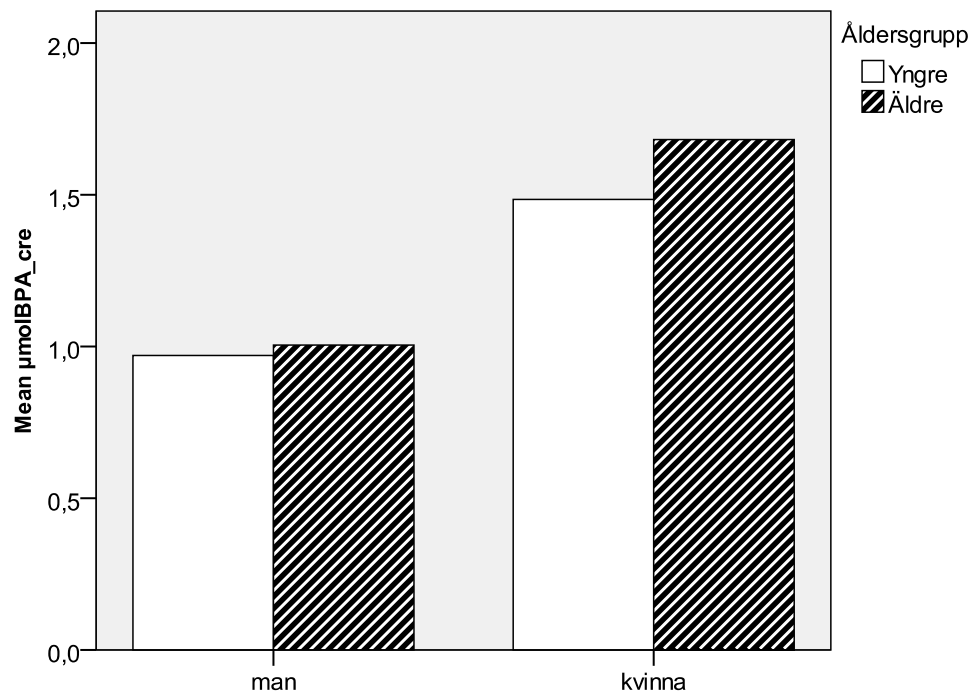
Tabell 8. Test Yngre – äldre^a kreatininjust. halt

Kön		µmolBPA
man	Mann-Whitney U	2501,000
	Wilcoxon W	5822,000
	Z	-,518
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,605
kvinna	Mann-Whitney U	3773,000
	Wilcoxon W	7689,000
	Z	-,420
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,675

a. Grouping Variable: Åldersgrupp



Figur 1. Medelhalten BPA ($\mu\text{g/L}$) i densitetsjusterade prov i män och kvinnor uppdelat i åldersgrupperna yngre (25-29 år) samt äldre (50-59 år). Där var ingen signifikant skillnad mellan BPA-halt mellan kvinnor och män ($p=0,456$) men en signifikant skillnad mellan yngre och äldre kvinnor ($p=0,007$).



Figur 2. Medelhalten BPA ($\mu\text{mol/g}$ kreatinin) i kreatininjusterade prov hos män och kvinnor uppdelat i åldersgrupperna yngre (25-29 år) samt äldre (50-59 år). Där var en signifikant skillnad i BPA-halt mellan män och kvinnor ($p=0,002$).

Diskussion

BPA-koncentrationen i urin från vuxna norr- och västerbottningar har ett medelvärde om 3,9 µg/L i densitetsjusterade prov. Skillnaderna mellan kön och åldersgrupper är små, men det finns en tendens till skillnader mellan yngre och äldre individer. Vi finner BPA-koncentrationer i urin som är något högre än i studier gjorda i USA (Calafat et al., 2008; Meeker et al., 2010) samt i Holland (Ye et al., 2008), men i nivå med dem man sett i Norge (Ye et al., 2009) och hos barn i Tyskland (Becker et al., 2009). Orsakerna till skillnaderna är okända.

Styrkor, svagheter och nyhetsvärde i studien

Studien är baserad på ett populationsbaserat urval i Norr- och Västerbotten, vilket betyder att nivåerna representerar normalbefolkningen. Eftersom det här är den första studien vi känner till i svensk normalbefolkning så vet vi inte om det finns regionala skillnader som kan göra att Norr- och Västerbottningar har andra nivåer än boende i andra delar av Sverige. Dock tyder samstämmigheten med flera andra europeiska studier på att regionala skillnader är små eller måttliga.

Urin är den matris som anses lämpligast för att mäta BPA. Urinproven togs i hemmet som första morgonurin. Det betyder att det är urin som producerats under natten (i de fall personen varit uppe och kissat under natten representerar provet urin som producerats under senare delen av natten). Detta kan behöva beaktas när resultaten jämförs med andra data, eftersom BPA antas ha en relativt kort halveringstid (se Intro).

Vanligtvis måste man justera urinprov för dess varierande utspädning. En vanlig metod är att man justerar mot urinens kreatininhalt. Det har dock visats att kreatinhalten påverkas av en rad faktorer som kön, ålder, muskelmassa, och kost. En alternativ metod är att justera mot urinens densitet. Även densiteten kan påverkas av samma faktorer men nyligen publicerade studier av kadmium och arsenik halter justerade med både kreatinin och densitet har man observerat att densitetsjustering var att föredra (Suwazono et al. 2005; Nermell et al. 2008). Då denna studie baseras på en är blandad population av män och kvinnor samt i olika åldrar är densitetsjustering att föredra.

Kvalitetskontrollen i de kemiska analyserna har varit god, med dubbla invägningar för kalibreringskurvor, isotopmärkta interna standarder, dubbelprover, etc. Dock finns inga resultat av interlaboratoriejämförelser. För många andra kemiska föroreningar, t.ex. bly i blod och persistenta klororganiska föroreningar i plasma och bröstmjolk, finns system uppsatta för jämförelser mellan laboratorier, men för BPA saknas ännu sådana system. Detta innebär en osäkerhet i jämförelser mellan data från olika studier.

Jämförelse med övrig litteratur

Bisfenol A i urin har bestämts i en rad internationella studier. I NHANES, som är en studie av normalbefolkning i USA, fann man medelvärden på 2.7 ng/mL (n=2517; Calafat et al., 2008). I en studie av 167 män från en infertilitetsklinik i USA kunde man detektera BPA i 89% av proven (LOD=0.4ng/mL) man redovisar ett GM på 1.3 ng/mL, samt ett P90 på 5.0 ng/mL, och P95 på 5.8 ng/mL (Meeker et al., 2010). I en holländsk studie har man analyserat urin från 100 gravida kvinnor (Generation R). Man fann ett medianvärde på 1.2 ng/mL (Ye et al., 2008). I en tysk studie analyserades BPA i 600 morgonurinprov från barn (3-14år). BPA detekterades i 99% av proven (LOD=0.1ng/mL) med ett GM på 2.7 ng/mL (P90 = 9.5 ng/mL,

samt P95 = 14 ng/mL). (Becker *et al.*, 2009). I en norsk studie av 110 gravida kvinnor (MoBa) analyserades BPA i 10 poolade prover. Hos dessa kvinnor fann man medelvärden på 4.5 ng/mL (Ye *et al.*, 2009). I ovan nämnda studier är urinproverna insamlade som spot prover i alla studier utom hos de tyska barnen där morgon urin insamlades (Becker *et al.*, 2009).

Framtida möjligheter i ytterligare databearbetning

Eftersom provinsamlingen gjorts inom ramen för MONICA-undersökningen finns data om bl.a. kostvanor och riskfaktorer för hjärt- och kärlsjukdom. Detta innebär att dessa data skulle kunna användas för att undersöka betydelsen av kostvanor och andra livsstilsmonster. Med tanke på att två studier har visat en koppling mellan BPA i urin och hjärt-kärlsjuklighet kan man också tänka sig att undersöka samband med riskfaktorer för hjärt-kärlsjuklighet i MONICA-data. Med sin begränsade storlek (drygt 300 urinprover) kommer förmodligen resultaten av sådana studier vara relativt osäkra, men kan ändå ha ett värde.

Slutsatser

BPA-koncentrationen i urin från vuxna norr- och västerbottningar, och sannolikt även andra svenskar, har ett medianvärde om 2,1-3,0 µg/L, samt ett medelvärde om 3,1-4,8 µg/L, med ett interkvartilintervall (25:e och 75:e percentilen) som är 1.3-4.8 µg/L i densitetsjusterade prov. Skillnaderna mellan kön och åldersgrupper är små, men det finns en tendens till skillnader mellan yngre och äldre individer.

Tack

Studien har genomförts med stöd från Naturvårdsverket, Svenska Vetenskapsrådet samt landstingen i Västerbotten och Norrbotten . Tack till Gunvor Johannesson för utmärkt analytiskt arbete.

Referenser

Becker K, Göen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fuss H, Müller J, Wittassek M, Schulz C, Kolossa-Gehring M. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health*. 2009;212(6):685-92.

Beronius A, Rudén C, Håkansson H, Hanberg A. Risk to all or none? A comparative analysis of controversies in the health risk assessment of Bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2009, doi: 10.1016/j.reprotox.2009.11.007

Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*. 2008;116(1):39-44.

Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang JY, Ye X, Calafat AM, Michels KB. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect*. 2009;117(9):1368-72.

European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A). 2006. Tillgänglig via EFSA:s hemsida: www.efsa.europa.eu

Gupta C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *PSEBM* 2000;224:61-68.

Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 2008;300:1303-10.

Mahalingaiah S, Meeker JD, Pearson KR, Calafat AM, Ye X, Petrozza J, Hauser R. Temporal variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations in men and women. *Environ Health Perspectives* 2008;116:173-178.

Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod* 2005;72:1344-1351.

Mazzachi BC, Peake MJ, Ehrhardt V. *Clin Lab*. 2000; 46(1-2): 53

Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol*. 2010;44(4):1458-63.

Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. Association of urinary bisphenol A concentration with heart disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS ONE* 2010;5:8673

Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MD, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 1997;105:70-6.

Nakagami A, Negishi T, Kawasaki K, Imai N, Nishida Y, Ihara T, et al. Alterations in male infant behaviors towards its mother by prenatal exposure to bisphenol A in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) during early suckling period. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:1189-97.

Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, et al. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ Health Perspect* 2004;112:1159-64.

Nermell B., A-L Lindberg, M Rahman, M Berglund, LA Persson, S Arifeen, M Vahter, Urinary arsenic concentration adjustment factors and malnutrition *Environmental Research* 106 (2008) 212–218

Ryan BC, Vandenberg JG. Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm Behav* 2006;50:85-93.

Stahlhut RW, Welshons WV, Swan SH. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspectives* 2009;117:784-789.

Stegmayr B, Lundberg V, Asplund K. The events registration and survey procedures in the Northern Sweden MONICA project. *Scand J Public Health*. 2003;31(Suppl. 61):9-17.

Suwazono Y, Akesson A, Alfvén T, Järup L, Vahter M. *Biomarkers* 2005; 10: 117.

Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007;24:139-77.

Von Goetz N, Wormuth M, Schering M, Hungerbühler K. Bisphenol A: How the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk analysis* 2010, e-published DOI: 10.1111/j.1539-6924.2009.01.345.x

Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998;14:239-60.

Ye X, Pierik FH, Hauser R, Duty S, Angerer J, Park MM, Burdorf A, Hofman A, Jaddoe VW, Mackenbach JP, Steegers EA, Tiemeier H, Longnecker MP. Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study. *Environ Res*. 2008;108(2):260-7.

Ye X, Pierik FH, Angerer J, Meltzer HM, Jaddoe VW, Tiemeier H, Hoppin JA, Longnecker MP. Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in

pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int J Hyg Environ Health*. 2009;212(5):481-91.