

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

胎児期の内分泌かく乱物質への曝露が性分化・性腺機能および第二性徴発来
に及ぼす影響：環境遺伝交互作用の解明
(5-1554)

平成27年度～平成29年度

Effect of Fetal Exposure to Endocrine Disruptor on Sex Differentiation, Gonadal Function and Puberty: Elucidation of
Gene-Environment Interaction on Sexual Development

＜研究代表機関＞

北海道大学

＜研究分担機関＞

北海道大学大学院医学研究院

北海道大学環境健康科学研究教育センター

平成30年5月

目次

I. 成果の概要	 1
1. はじめに(研究背景等)	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 性分化・性腺機能に及ぼす影響の解明	 11
(北海道大学大学院医学研究院)	
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-2 第二次性徴発来に及ぼす影響の解明	 48
(北海道大学 環境健康科学研究教育センター)	
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
III. 英文Abstract	 70

1. 成果の概要

課題名 5-1554 胎児期の内分泌かく乱物質への曝露が性分化・性腺機能および第二性徴発来に及ぼす影響：環境遺伝交互作用の解明

課題代表者名 篠原 信雄（北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室 教授）

研究実施期間 平成27～29年度

累計予算額 109,311千円（うち平成29年度：34,602千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 環境化学物質、胎児期曝露、出生コホート、性分化、第2指第4指比、肛門性器間距離、脳の性分化、性腺機能、第二性徴

研究体制

- (1) 性分化・性腺機能に及ぼす影響の解明（北海道大学大学院医学研究院）
- (2) 第二性徴発来に及ぼす影響の解明（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

1. はじめに（研究背景等）

性腺機能に関連する異常（停留精巣や尿道下裂など）の発生数は欧米で増加傾向にある。これらの原因として、胎児期の環境化学物質曝露や性ステロイド産生などの胎内でのホルモン環境の変化が、出生後の発育や男児での精巣形成不全症候群や女児での遊び方や思春期発来の早期化など、性分化に影響を与えていると考えられている。さらに、その影響には一塩基多型などの遺伝子型による化学物質やステロイドへの感受性差、化学物質曝露によるゲノムへのエピジェネティックな修飾も関連していると考えられている（図1）。このように、妊娠中および胎児期の環境化学物質曝露がこれらの背景に影響していると考えられており、実際に環境化学物質曝露による性ホルモンや性腺

機能への影響については、動物を用いた実験データは数多く報告されている。しかし、現状ではヒトのデータは散見されるのみである。これまでの「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ（以下、北海道スタディ）」の研究成果として、札幌コホートにおいて、フタル酸エステル代謝物（MEHP）、ビスフェノールA（BPA）、有機フッ素化合物（PFOS/PFOA）、およびPCB/Dioxinsの胎児期曝露により、男児で臍帯血中のテストステロン/エストラジオール（T/E2）比、プロゲステロン（P4）、Insulin like factor-3（INSL3）、InhibinB、プロラクチン（PRL）を有意に低下させ、また女児で臍帯血中のT/E2比を増加させる傾向が認められた。以上の結果から、特に男児で環境化学物質と性ホルモン濃度との負の関連がみられ、環境中から日常でさらされる低濃度であっても、胎児期曝露は男児のLeydig細胞・Sertoli細胞の機能を低下、性腺機能への影響が示唆された。しかしながら、その変化が身体的変化や脳の性分化、第二性徴にどのような影響を与えるのかについては未知のまま残されている。

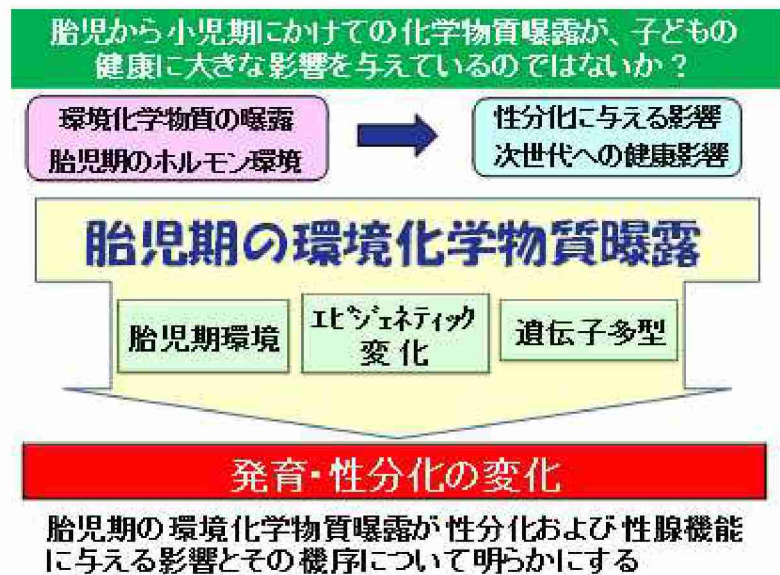


図1 仮説

2. 研究開発目的

本研究では、2001年に開始した出生コホート「北海道スタディ」および2012年に開始した環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」を母体としたエコチル追加調査のコホートを用いて、胎児期の短半減期環境化学物質（ビスフェノール類、フタル酸エステル類）への曝露実態を明らかにし、胎児期曝露が、身体的性分化、脳の性分化、児の性腺機能、特に出生時の性ホルモン濃度と第二次性徴発来時期に与える影響を明らかにすることを目的とする。

サブテーマ1では、エコチル追加調査のコホートを用いて胎児期の環境化学物質曝露（フタル酸エステル類・ビスフェノール類）の身体的性分化（陰茎長・肛門性器間距離（AGD）・第2指第4指比（2D/4D））と脳の性分化（性役割傾向調査：JPSAI）への影響について検討を行うとともに、北海道スタディのコホートを用いて臍帯血の遺伝子多型を検討し、性分化への影響を評価する。サブテーマ2では、札幌コホートで測定済みのフタル酸エステルMEHPとBPAおよび第二次性徴との関連について明らかにする。一方、札幌コホートでは参加人数が限られており、またMEHPの曝露評価は妊娠後期、またBPAは臍帯血中濃度である。そこで、性分化に重要な時期と考えられる妊娠初期の曝露について、北海道大規模コホートで母体血中のBPAおよびフタル酸エステル類濃度を測定し、臍帯血中の、児の性腺機能に関連すると考えられる性ステロイドホルモン（テストステロン（T）、エストラジオール（E2）、プロゲステロン（P4）、卵胞刺激ホルモン（FSH: Follicle Stimulating Hormone）黄体形成ホルモン（LH: Luteinizing Hormone）、Inhibin Bとの関連を分析する。さらに、9-13歳を迎える参加児へ調査票を送付し、Tanner分類による男女それぞれ3つの指標を用いて第二次性徴調査を実施する。曝露による第二次性徴発来時期への影響について解明する。

3. 研究開発の方法

（1）性分化・性腺機能に及ぼす影響の解明

エコチル調査追加調査

・妊娠初期母体尿を用いた胎児期曝露の測定

妊娠初期母体尿として、エコチル調査登録後妊娠22週未満で採取された尿を用いて尿中ビスフェノール類（ビスフェノールA;BPA、ビスフェノールF;BPF およびフタル酸エステル類の測定を行った。尿中ビスフェノール類の分析は、同位体希釈ー液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計（ID-LC-MS/MS）にて行った。検出下限値未満の値にはMethod detection limit(MDLの1/2値を代入し、解析を行った。フタル酸エステル類は、5種類の親化合物Di-n-butyl phthalate (DnBP)、Di-iso-butyl phthalate (DiBP)、Buthyl benzil phthalate (BBzP)、Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)、Diisononylphthalate (DiNP)の代謝物であるMono-n-butyl phthalate (MnBP)、Mono-iso-butyl phthalate (MiBP)、Monobenzyl phthalate (MBzP)、Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)、Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP)、Mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (MEOHP)、mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate (MECPP)、Mono-isononyl phthalate (MiNP)、Mono(4-methyl-hydroxyloctyl)phthalate (OH-MiNP)、Mono(4-methyl-7-carboxyheptyl)phthalate (cx-MiNP)、の合計10種類のフタル酸エステル類代謝物の分析をLC-MS/MSを用いて行った。測定は全て、いであ(株)環境創造研究所で実施した。

・身体的性分化の評価

出生時に肛門性器間距離、第2指、第4指の長さ、男児の陰茎長、精巣体積の測定を行った。また、対象となる児が3歳となる時期に、3歳時調査として第2指、第4指の長さを測定するための両手のコピー・性役割傾向調査（JPSAI）・尿の採取・排泄確立に対するアンケートを依頼した。

北海道スタディ

・遺伝子多型の解析

既に2D/4Dの測定が終了している対象者のうち臍帯血のある1800児を対象に遺伝子多型の評価をおこなった。遺伝子解析には分娩時に採取して-80℃で凍結保存してある臍帯血を用いた。Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)を用いて保存臍帯血からゲノムDNAを抽出した。ESR1遺伝子一塩基多型PvuII(rs2234693)、XbaI(rs9340799)およびrs2077647をTaqMan法で解析した。TaqMan法ではプロトコールに従い、StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)およびTaqMan Minor

Groove Binder probes (AppliedBiosystems)を用いて解析した。各反応系には1.0 μ LのゲノムDNA、0.25 μ LのTaqMan 40 × Assay-on Demand SNP Genotyping Assay Mix (AppliedBiosystems)、5.0 μ L TaqMan GTXpress™ Master Mixと3.75 μ Lの蒸留水を加え全量で10 μ Lとなるように調整した。PCRの温度条件は、95°C20分を1サイクル、95°C3秒+60°C20秒を40サイクルとした。各多型ごとに遺伝子解析に成功した47サンプルをランダムに抽出して追加2回の妥当性検査を施行し、100%の一致を確認した。

(2) 第二性徴発来に及ぼす影響の解明

札幌コホート研究

出生前向きコホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」の2つのコホートのうち、札幌コホートに登録されて調査時点まで継続して調査に参加している小児329人を対象に第二性徴の調査を実施した。第二性徴発来の指標として、1年に1-2回の学校健診記録から身長・体重を転記して9-14歳の男女別発育曲線を作成することにより身長の急伸(スパート)を評価した。またTanner分類を元に、男児は陰毛の発毛および声変わり、女児は乳房の発育、陰毛の発毛、および初経の開始の有無を評価した。

大規模コホート研究

出生前向きコホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」の2つのコホートのうち、「大規模コホート」の参加者のうち2013年までに8歳に達し、臍帯血の検体がある6994名のうち8歳調査(J-PSAIや2D/4D)が実施されており、ベースライン調査票と出生時の医療診断記録がある5563名から、男女各450名を無作為抽出して合計900で臍帯血中性ホルモン濃度を測定済である。男女とも臍帯血から性ステロイドホルモンであるエストラジオール(E2)、総テストステロン(T)、プロゲステロン(P4)をLC-MS/MS法で分析した。加えて男児では、高感度黄体形成ホルモン(LH)および卵巣刺激ホルモン(FSH)を化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法、およびInhibin Bを酵素免疫測定(EIA)法で測定した。測定は全てあすか製薬メディカル(株)で実施した。また、2016年から2018年3月までに9-13歳に到達する児3697名に第二性徴調査を実施した。調査では、第二性徴発来の指標として、小学校6年間の学校健診記録から1年に1-2回の身長・体重を転記して発育曲線を作成することにより身長のスパートを評価した。またTanner分類を元に、男児は陰毛の発毛および声変わり、女児は乳房の発育、陰毛の発毛、および初潮の開始を評価した。

母体血中BPA・フタル酸エステル類の測定

臍帯血中性ホルモンを測定した900名の中から、妊娠初期の検体があり、第二性徴調査のデータが得られた児648名に対し、保管済み妊娠初期母体血を化学物質曝露評価に用いた。血清中BPAの分析は、同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計(ID-LC-MS/MS)にて行った。検出下限値(MDL)は0.045 ng/mlで、検出下限値未満の値にはMDLの1/2値を代入し、解析を行った。フタル酸エステル類は、5種類の親化合物DnBP、DiBP、BBzP、DEHP、DiNPから代謝された1次代謝物MnBP、MiBP、MBzP、MEHP)、2次代謝物MEHHP、MECPP、cx-MiNPの合計7種類のフタル酸エステル類代謝物の分析をLC-MS/MSを用いて行った。測定は全て、いであ(株)環境創造研究所で実施した。

4. 結果及び考察

(1) 性分化・性腺機能に及ぼす影響の解明

1. エコチル追加調査を対象とした妊娠初期母体尿における化学物質濃度と新生児期の身体所見の関係

母体尿中の化学物質の測定と新生児期の身体測定を行っていた対象者は515児であった。男児では化学物質濃度と身体所見(陰茎長・陰茎長/身長・精巣容積・2D/4D・AGD・AGD/身長)の間に有意な関連は見られなかったが、女児においては2D/4D・AGD と化学物質との間に関連は見られなかったものの、MiBPとAGD/身長の間に関連の傾向がみられた($\rho = -0.1528$, $p = 0.0715$)。母体年齢・妊娠前BMI・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・出生時体重・出生週数・学歴で調整すると $B: -0.023(95\%CI: -0.051, 0.0052)$, $p = 0.109$ となった。

2. エコチル追加調査を対象とした妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳時の身体所見(2D/4D)の関係

妊娠初期母体尿における化学物質濃度が測定されており、かつ3歳時の2D/4Dが測定されていたのは381例であった。2D/4Dは右手・左手・平均とも男児で有意に小さい値を示した。妊娠初期母体尿の化学物質濃度との関連では、男児右手2D/4DとOH-MiNP($\rho = 0.2040$, $p = 0.0857$)、女児左手2D/4DとBPS($\rho = -0.1242$, $p = 0.0985$)

で相関の傾向を認めた。母体年齢・妊娠前BMI・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・出生時体重・出生週数・学歴で調整すると前者は $B: 0.0293(95\%CI: 0.0045, 0.0541)$ 、 $p=0.021$ と有意な相関を認めた。

3. エコチル追加調査を対象とした妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳時のJPSAIの関係

妊娠初期母体尿における化学物質濃度が測定されており、かつ3歳時のJPSAIが評価されていたのは408人であった。JPSAIの男性化スコアは男児において、女性化スコアは女児において有意に高く、compositeスコアは男児において有意に高かった。化学物質との関連では、Crudeの解析では、男児ではMEHP濃度とcompositeスコアに正の相関を認めた。女児ではMEOHP濃度・MECPP濃度とcompositeスコアに負の相関を認めた(表(1)–(15))。出産時年齢・妊娠前BMI・初産・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・教育歴・兄あり・姉ありで調整すると、男児ではMEHP濃度とcompositeスコアに正の相関を認めた($B: 4.78(95\%CI: 0.49, 9.07)$ 、 $p=0.030$)。

4. 北海道スタディを対象とした妊娠初期母体血化学物質濃度と学童期2D/4Dとの関係

大規模コホート登録者の中から学童期に2D/4Dを測定し、かつ妊娠初期母体血より化学物質の測定を行っていたのは、553名であった。化学物質濃度と2D/4Dの関連では女児の左手の2D/4DとBPAに負の相関傾向を認め、出産時年齢・喫煙・飲酒・妊娠週数・出生時体重で調整すると $B: -0.2202(-0.4675, 0.0271)$ 、 $p=0.081$ であった。

5. 北海道スタディを対象としたESR1遺伝子一塩基多型と学童期2D/4Dとの関係

規模コホート登録者の中から2003年5月から2006年11月までに出生した児8663人を抽出し最終的に遺伝子解析用臍帯血が保管され、かつ両手コピーのある1800人を解析対象とした。全員における平均2D/4Dにおいて、*XbaI*遺伝子型をAG/GG型とGG型に分けて検討すると(劣性遺伝モデル)、GG型の児はAG/GG型の児と比較して有意に平均2D/4Dが低かった(-0.557% ; $95\%CI: -1.036, -0.078$)。次に左右2D/4Dで比較すると、右2D/4DにおいてGG型の児はAG/GG型の児と比較して有意に低かった(-0.788% ; $95\%CI: -1.334, -0.238$)。さらに右2D/4Dを児の性別で層別すると、特に男児ではAG/GG型と比較してGG型は有意に右2D/4Dの低下を認めた(-0.856% ; $95\%CI: -1.571, -0.141$)。図2に*XbaI*劣性遺伝モデルと右2D/4Dとの関連を示した。女児ではAG/GG型と比較してGG型は右2D/4Dの低い傾向を認めたが、有意な差は得られなかった。*PvuII*および*rs2077647*では2D/4Dとの有意な関連は認めなかった。

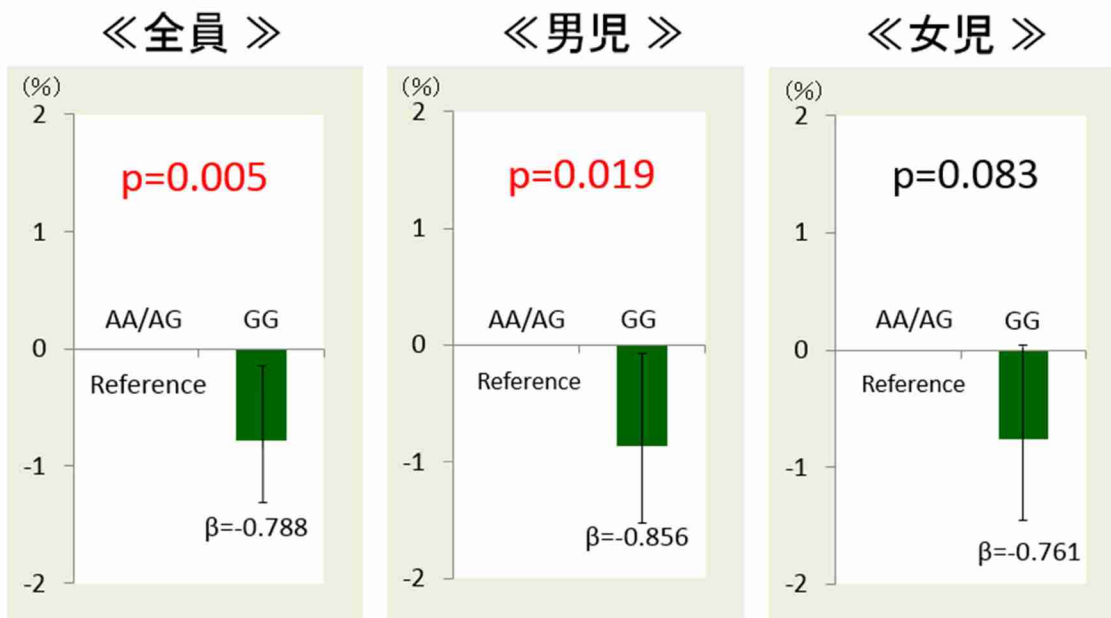


図2 *XbaI*と右2D/4D(劣性遺伝モデル)

(2) 第二性徴発来に及ぼす影響の解明

1. 「札幌コホート」研究

質問票の返送があった150件について、男児が75件、女児が75件であった。第二性徴が開始していると判

断する基準として男児は①身長スパート、②声変わり、③陰毛、女児は①初潮、②胸のふくらみ、③陰毛を指標とした。男女別の上記の指標①②③の中で1つ以上該当する児は第二性徴が開始している(第二性徴開始あり)群に分類して、指標①②③に該当した最も早い月齢を第二性徴開始月齢とした。また、指標①②③の全てに該当しない児を第二性徴開始前の群(第二性徴開始なし)に分類して、調査時の児の月齢を第二性徴開始前の月齢とした。質問票が返送された150件のうち、妊娠中の母体血中MEHP濃度のデータがあり、思春期早発や先天異常のある6件を除いた138組の母児において、胎児期のMEHP曝露が第二性徴開始時期へ与える影響について検討した。

臍帯血中MEHP濃度が2倍になると、男児において第二性徴開始月齢が3.00か月有意に遅く、個別の指標では①身長スパートが4.25か月有意に遅かった(表1)。声変わり、陰毛への影響はみられなかった。一方女児では、臍帯血中MEHP濃度が2倍になると、胸のふくらみ開始が3.09か月有意に遅かった(表2)。初潮、陰毛への影響はみられなかった。男女ともBPA濃度は第二性徴開始月齢への影響はみられなかった。

表1 男児の胎児期化学物質濃度と第二性徴開始月齢への影響

	①～③のいずれかが開始している B (95%CI)	①身長スパート B (95%CI)	②声変わり B (95%CI)	③陰毛 B (95%CI)
BPA ^{a)}	-1.16 (-6.21, 3.89)	-3.29 (-9.67, 3.09)	-1.64 (-9.70, 6.42)	2.62 (-13.70, 8.44)
MEHP ^{b)}	3.00 (0.37, 5.63)*	4.25 (1.36, 7.15)**	0.12 (-03.49, 3.74)	0.98 (-2.14, 4.10)

BPA、MEHPは対数変換(log2)して投入。

^{a)}母親の年齢、小学1年次のBMIと身体測定日月齢で調整。

^{b)}母親の年齢、小学1年次のBMIと身体測定日月齢、採血時期で調整。

*:p<0.05. **:p<0.01.

表2 女児の胎児期化学物質濃度と第二性徴開始月齢への影響

	①～③のいずれかが開始している B (95%CI)	①初潮 B (95%CI)	②胸のふくらみ B (95%CI)	③陰毛 B (95%CI)
BPA ^{a)}	3.22 (-0.76, 7.20)	4.16 (-2.29, 10.60)	3.03 (-1.41, 7.47)	5.71 (-2.98, 14.40)
MEHP ^{b)}	2.04 (-0.67, 4.75)	1.77 (-1.75, 5.29)	3.09 (0.33, 5.85)*	1.98 (-2.62, 6.59)

BPA、MEHPは対数変換(log2)して投入。

^{a)}母親の年齢、小学1年次のBMIと身体測定日月齢で調整。

^{b)}母親の年齢、小学1年次のBMIと身体測定日月齢、採血時期で調整。

*:p<0.05.

2. 「大規模コホート」研究

大規模コホートでは、対象者のうち現在も追跡可能な3679名に、同意書、第二性徴調査への調査協力説明書、第二性徴調査票、および尿採取カップを参加者の自宅に郵送した。調査票を送付した時期に学校健診記録が自宅に保管されておらず身長・体重を記入できない場合は、2016、2017年4月の学校健診記録が自宅に返却される時に転記することを再度依頼した。調査票の未返送者には2016年3月に手紙を郵送して督促した。2018年1月31日時点で、3292名に発送し、調査票1537件(回収率47.0%)を収集した。

すでに臍帯血中性ホルモン濃度のデータがある900件のうち、妊娠初期母体血が保存されている648件についてBPAとフタル酸エステル類代謝物を測定した。

母体血中の化学物質濃度と臍帯血中性ホルモン濃度との関連を検討した重回帰分析では、男児において有意な関連は認められなかった。一方、女児では、調整したモデルで母体血中のMiBP濃度増加により臍帯血中Tが有意に低かった。また、MnBP、MiBP濃度が高いとT/E2比が有意に低かった。

妊娠中の母体血中BPAおよびフタル酸エステル類濃度が児の第二性徴が開始した月齢へ与える影響を重回帰分析で検討した結果を表3、表4に示す。男児においては①～③の指標およびそのいずれかにおいても開始月齢への影響はみられなかった。女児では、MnBP、MiBP、MEHP濃度が2倍になると、②胸のふくらみ開始の

月齢がそれぞれ2.73か月、2.65か月、0.78か月早かった。また①～③いずれかが開始した月齢についても、MnBP、MiBP濃度が2倍になると、それぞれ2.51か月、および2.14か月早かった。

表3 男児の胎児期化学物質濃度と第二性徴開始月齢への影響 (n=110)

	①～③のいずれかが開始 B (95%CI)	①身長スパート B (95%CI)	②声変わり B (95%CI)	③陰毛 B (95%CI)
BPA	-0.46 (-1.39, 0.46)	-0.03 (-0.73, 0.67)	-0.13 (-0.90, 0.64)	-0.60 (-1.66, 0.47)
MnBP	-1.38 (-3.34, 0.58)	-0.97 (-2.47, 0.54)	-0.04 (-2.03, 1.95)	-0.39 (-2.62, 1.83)
MiBP	-1.39 (-3.39, 0.61)	-1.23 (-2.71, 0.26)	-1.35 (-3.62, 0.91)	-1.20 (-3.89, 1.50)
MEHP	0.09 (-0.61, 0.79)	0.06 (-0.48, 0.60)	-0.22 (-0.89, 0.45)	0.11 (-0.61, 0.83)
MECPP	-0.23 (-1.56, 1.10)	0.18 (-0.85, 1.20)	-0.52 (-1.64, 0.59)	-0.18 (-1.46, 1.10)

重回帰分析: 母親の年齢、小学校1年次のBMIと身体測定日の月齢で調整。化学物質は対数変換(log2)して投入。

表4 女児の胎児期化学物質濃度と第二性徴開始月齢への影響 (n=154)

	①～③のいずれかが開始している B (95%CI)	①初潮 B (95%CI)	②胸のふくらみ B (95%CI)	③陰毛 B (95%CI)
BPA	-0.27 (-1.27, 0.72)	-0.09 (-0.93, 0.74)	-0.10 (-1.24, 1.03)	-0.06 (-0.93, 0.82)
MnBP	-2.51 (-4.57, -0.44)*	-1.36 (-3.19, 0.47)	-2.73 (-5.24, -0.21)*	-1.36 (-3.43, 0.72)
MiBP	-2.14 (-4.05, -0.23)*	-1.24 (-2.90, 0.43)	-2.65 (-5.04, -0.25)*	-0.18 (-2.04, 1.69)
MEHP	-0.49 (-1.14, 0.16)	-0.19 (-0.78, 0.40)	-0.78 (-1.53, -0.04)*	0.10 (-0.52, 0.72)
MECPP	-1.01 (-2.31, 0.28)	-0.34 (-1.44, 0.76)	-1.48 (-2.99, 0.04)	0.21 (-1.08, 1.50)

重回帰分析: 母親の年齢、小学校1年次のBMIと身体測定日の月齢で調整。化学物質は対数変換(log2)して投入。*: p<0.05。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

胎児期の環境要因が生後の身体的性分化・脳の性分化について経時的に詳細に分析した研究は国際的にも非常に少ない。本研究では、現時点では最も精度の高いと考えられるLC-MSMSを用いた分析による曝露評価により妊娠中のBPAやフタル酸エステル類など環境化学物質曝露の測定を行うことで、国内の妊婦のビスフェノール類、フタル酸エステル類への曝露実態に関する貴重なデータを提供した。特にフタル酸エステル類は、10種類の代謝物の測定を実施し、曝露実態を明らかにした。フタル酸エステル類は、DEHPが油性食品に接触する器具および包装容器に、また6種類の化合物(DEHP, DBP, BBzP, DINP, DIDP, DNOP)が乳幼児の玩具への使用が規制されている。このような規制はあるが、我が国の妊婦がDnBP、DiBPおよびDEHPに曝露されていることが明らかになった。本研究は日本の妊婦や児のデータに基づく科学的な成果を提供できたものとする。

さらに、妊娠初期のビスフェノール類、フタル酸エステル類曝露が、子どもの身体的および脳の性分化に影響を与えている可能性を示したこと、遺伝子多型も性分化へ影響を与える要素であり、化学物質曝露の影響を修飾する可能性があることを示した。また、胎児器官形成期(12週)までのBPA、フタル酸エステル類曝露が、子どもの性腺機能や第二性徴に影響を与えている可能性を示唆した。今後、さらなる規制が必要か、今後も引き続き検討が必要である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

WHOから出された「State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012」では、組織や臓器の発達を阻害する環境化学物質である内分泌かく乱化学物質(EDCs)についてグローバルな対策が必要とされている。さらに、2012年の第3回国際化学物質管理会議ではEDCsを国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチの新規政策課題に挙げており、特にヒトの疫学データが少ない性分化や性成熟、次世代影響を研究、評価することは緊急の課題であり、今回の検討で明らかになった胎児期の環境化学物質曝露による身体的性分化への影響・脳の性分化への影響・性腺機能への影響・第二性徴への影響はその対策に直結する。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) C. Miyashita, A. Araki, T. Mitsui, S. Itoh, H. Goudarzi, S. SASAKI, J. Kajiwara, T. Hori, K. Cho, K. Moriya, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi. Sex-related differences in the associations between maternal dioxin-like compounds and reproductive and steroid hormones in cord blood: the Hokkaido Study., *Environment International*, in press
- 2) T. Mitsui, A. Araki, H. Goudarzi, C. Miyashita, S. Ito, Sasaki S., T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, N. Shinohara, M. Takeda, K. Nonomura; Relationship between adrenal steroid hormones in cord blood and birth weight: The Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *American Journal of Human Biology*. 2018.
- 3) R. Kishi, A. Araki, M. Minatoya, S. Itoh, H. Goudarzi, C. Miyashita, Birth cohorts in Asia: The importance, advantages, and disadvantages of different-sized cohorts, *Science of the Total Environment*, 615, 1143–1154, 2018
- 4) A. Araki, C. Miyashita, T. Mitsui, H. Goudarzi, F. Mizutani, Y. Chisaki, S. Itoh, S. Sasaki, K. Cho, K. Moriya, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi. Prenatal organochlorine pesticide exposure and the disruption of steroids and reproductive hormones in cord blood: The Hokkaido study. *Environment International*, 110, 1–13, 2018
- 5) M. Minatoya, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, S. Itoh, J. Yamamoto, T. Matsumura, T. Mitsui, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, H. Minakami, N. Shinohara, R. Kishi; Cord blood bisphenol A levels and reproductive and thyroid hormone levels of neonates: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health., *Epidemiology*, 1, S3–S9, 2017
- 6) R. Kishi, A. Araki, M. Minatoya, T. Hanaoka, C. Miyashita, S. Itoh, S. Kobayashi, Y. Ait Bamai, K. Yamazaki, R. Miura, N. Tamura, K. Ito. H. Goudarzi; The Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile – updated 2017, *Environmental Health and Preventive Medicine*, 22–46, 2017
- 7) A. Araki, T. Mitsui, H. Goudarzi, T. Nakajima, C. Miyashita, S. Itoh, S. Sasaki, K. Cho, K. Moriya, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi; Prenatal di(2-ethylhexyl) phthalate exposure and disruption of adrenal androgens and glucocorticoids levels in cord blood: The Hokkaido Study. *Science of the Total Environment*, vol.581–582: 297–304, 2017
- 8) M. Minatoya, A. Araki, C. Miyashita, S. Sasaki, Y. Goto, T. Nakajima, R. Kishi; Prenatal di-2-ethylhexyl phthalate exposure and cord blood adipokine levels and birth size: The Hokkaido study on environment and children's health., *Science of the Total Environment*, 579, 606–611, 2017
- 9) S. Itoh, A. Araki, T. Mitsui, C. Miyashita, H. Goudarzi, S. Sasaki, K. Cho, H. Nakazawa, Y. Iwasaki, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi; Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Environmental International*, 94:51–59, 2016

- 10) H. Goudarzi, A. Araki, S. Itoh, S. Sasaki, C. Miyashita, T. Mitsui, H. Nakazawa, K. Nonomura, R. Kishi; The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study. *Environment Health Perspect*; DOI:10.1289/EHP142, 2016
- 11) T. Mitsui, A. Araki, C. Miyashita, S. Ito, T. Ikeno, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, N. Shinohara, M. Takeda, K. Nonomura; The Relationship between the Second-to-Fourth Digit Ratio and Behavioral Sexual Dimorphism in School-Aged Children. *PLoS One*. 11 (1):e0146849, 2016.
- 12) T. Mitsui, A. Araki, H. Goudarzi, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, N. Shinohara, M. Takeda, K. Nonomura; Effects of adrenal androgens during the prenatal period on the second to fourth digit ratio in school-aged children. *Steroids*. 113 46–51, 2016.
- 13) 荒木敦子、伊藤佐智子、宮下ちひろ、湊屋街子、岸玲子「環境化学物質による次世代の性ホルモンへの影響」*日本衛生学雑誌*、in press
- 14) 岸玲子、荒木敦子、宮下ちひろ、伊藤佐智子、湊屋街子、小林澄貴、山崎圭子、アイツバマイゆふ、三浦りゅう、田村菜穂美「2 万人規模の出生コーホートと、500 人規模の小コーホートからなる北海道スタディが目指してきたもの：環境と子どもの健康—先天異常・発達・アレルギーの 15 年におよぶ経験と成果」、*日本衛生学雑誌*、in press

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

(2)主な口頭発表(学会等)

- 1) K. Morioka, K. Cho, Itaru Hayasaka, Y. Uzuki, Y. Kaneshi, T. Akimoto, A. Moriichi, T. Mitsui, T. Kitta, K. Moriya, A. Imai, S. Sato, N. Shinohara, A. Araki, C. Miyashita, S. Ito, R. Kishi, K. Nonomura, T. Ariga, H. Minakami. “Effect of maternal factors on anogenital distance and penile length of newborn infants: adjunct study of Japan Environment and Children’s Study (JECS).” *Hot Topics in Neonatology 2015*, Washington D.C., USA, 2015
- 2) T. Mitsui, A. Araki, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, N. Shinohara, M. Takeda, K. Nonomura “Effect of adrenal androgens during prenatal periods in the second to fourth digit ratio in school-aged children” 31th EAU, Munich, Germany, 2016
- 3) Araki, A., Kishi R.: Prenatal Di(2-ethylhexyl)phthalate Exposure and Reproductive Hormone in Cord Blood – The Hokkaido Study, ISEE–ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26–29)
- 4) Araki, A., Miyashita, C., Mitui, T., Goudarzi, H., Itoh, S., Mizutani, F., Chisaki, Y., Sasaki, S., Moriya, K., Cho, K., Shinohara, N., Nonomura, K., Kishi, R., Prenatal exposure to prganochlorine pesticides and steroid hormones profiles in fetal blood: The Hokkaido Study, PPTOX V Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu, Japan, (2016.11.13–16)
- 5) Kishi, R., Environmental edocrine–disrupting chemicals and their effects to children: 13 years progress of the Hokkaido Birth Cohort Study, PPTOX V, Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu, Japan, (2016.11.13–16)
- 6) Kishi, R., Araki, A., Miyashita, C., Itoh, S., Goudarzi, H., Maternal exposure to endocrine disrupting chemicals (perfluoro–alkyls, phthalates and PCB/dioxins) and children’s reproductive hormone levels at birth; the Hokkaido Study on Environment and Children’s Health, EPICOH2016, Barcelona, Spain, (2016.9.4–7)
- 7) Itoh, S., A. Araki, C. Miyashita, H. Goudarzi, S. Kato, Y. Iwasaki, H. Nakazawa, N. Shinohara, R. Kishi, Hokkaido Study on Environment and Children’s Health: Endocrine Disruption Effect of Perfluoroalkyl Substances Exposure in Utero, ISEE–ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26–29)

- 8) 荒木敦子, ホウマヌグウダルジ, 三井貴彦, 那須民江, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 佐々木成子, 長和俊, 野々村克也, 岸玲子:「DEHP曝露による胎生期ステロイドホルモンプロファイルへの影響-北海道スタディ」第86回日本衛生学会学術総会, 北海道、旭川, (2016.5.11-13.)
- 9) 森岡圭太、長和俊、早坂格、卯月ゆたか、秋元琢真、兼次洋介、盛一享徳、水上尚典:「母体因子が新生児の性分化に与える影響」第52回日本周産期・新生児医学会、富山、2016年7月16-18日
- 10) 三井貴彦、荒木敦子、伊藤佐智子、宮下ちひろ、橘田岳也、守屋仁彦、長和俊、森岡圭太、篠原信雄、岸玲子、野々村克也 胎児期における男性ホルモンへの曝露が小児期の脳の性分化に与える影響について 第103回日本泌尿器科学会総会 金沢 2015年4月18日—21日
- 11) 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、篠原信雄、野々村克也 胎児期における男性ホルモンへの曝露が学童期の脳の性分化に与える影響について 第24回日本小児泌尿器科学会、東京 2015年7月1日—3日
- 12) 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、武田正之、篠原信雄、野々村克也 胎児期における男性ホルモンへの曝露が学童期の脳の性分化に与える影響について:2D/4Dと性役割行動との関係 第80回日本泌尿器科学会東部総会、東京、2015年 9月25日(金)~27日(日)
- 13) 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、篠原信雄、武田正之、野々村克也 胎児期ホルモン環境が身体的変化に与える影響:第2指:第4指比と性ステロイドホルモンとの関係について 第104回日本泌尿器科学会総会 仙台 2016年4月23日—25日
- 14) 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、篠原信雄、武田正之、野々村克也 胎児期ホルモン環境が出生時体重に与える影響 第105回日本泌尿器科学会総会 鹿児島 2017年4月21日—24日

7. 研究者略歴

研究代表者

篠原信雄

北海道大学大学院医学研究科修了、博士(医学)、
現在、北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室 教授

研究分担者

1)守屋 仁彦

北海道大学大学院医学研究科修了、博士(医学)、
現在、北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室 准教授

2)長 和俊

北海道大学大学院医学研究科修了、博士(医学)、
現在、北海道大学病院周産母子センター 准教授

3)岸 玲子

北海道大学大学院医学研究科修了、博士(医学)
現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招聘教授

4)荒木 敦子

北海道大学大学院医学研究科修了、博士(医学)
現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授

5)宮下 ちひろ

北海道大学大学院医学研究科修了、博士(医学)
現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任准教授

6)伊藤 佐智子

北海道大学大学院歯学研究科修了、博士(歯学)
現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

II. 成果の詳細

II-1 性分化・性腺機能に及ぼす影響の解明

北海道大学大学院医学研究院

腎泌尿器外科学教室	: 篠原 信雄
腎泌尿器外科学教室	: 守屋 仁彦
産科・周産母子センター	: 長 和俊

<研究協力者>

北海道大学大学院医学研究院

腎泌尿器外科学教室	: 西村 陽子
腎泌尿器外科学教室	: 橘田 岳也
腎泌尿器外科学教室	: 中村 美智子
腎泌尿器外科学教室	: 今 雅史
腎泌尿器外科学教室	: 村井 祥代

山梨大学大学院

泌尿器学・泌尿器科	: 三井 貴彦
-----------	---------

社会医療法人 母恋 天使病院

小児科	: 森岡 圭太
-----	---------

平成27～29年度累計予算額：73,571千円（うち平成29年度：24,002千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

内分泌かく乱作用をもつ環境化学物質のうち、フタル酸エステル類やビスフェノールA（BPA）は代謝は速いが恒常的に曝露され続ける問題がある。動物実験でフタル酸エステルは抗アンドロゲン作用による生殖器や発達への有害作用が報告され、ヒトでも胎児期曝露による児の肛門性器間距離への影響や、第二次性徴発来時期の異常等をきたすことが報告されている。これまで我々はヒトでの低濃度曝露であっても胎児期のフタル酸エステル曝露が男児の精巣機能を示すホルモンへの影響があることを既に報告した。一方、BPAについては、胎児期曝露に関する研究や、身体の性分化に与える影響もほとんど報告がない。従ってフタル酸エステル類やフェノール類への胎児期における曝露が、児の身体的性分化や脳の性分化に与える影響やその機序については、研究が遅れているのが現状である。本研究では、妊娠中の環境化学物質、特にフタル酸エステル類やBPAが児の性分化に及ぼす影響と、性ステロイドホルモン受容体などの遺伝子多型がアウトカム発現リスクに与える影響について環境遺伝交互作用の観点から検討を行うことを目的とした。

質問票をベースとした化学物質曝露（喫煙・飲酒・重労働）とエコチル調査追加調査として行われた新生児期の性差に関わる身体所見測定（肛門性器間距離：AGD・第2指第4指比：2D/4D・陰茎長：PL）との関連に関する検討は先天奇形の無い単胎の新生児1046名（男児561名・女児485名）で行った。女児では妊娠22-28週に母体喫煙のあった群でAGDが有意に短い結果となった。男児では妊娠10-16週で母体の重労働があった群でAGDが有意に短い結果となった。またPLは妊娠10-16週に母体喫煙のあった群で有意に長い結果となった。男女ともにAGDが身長と相関していたため、母体因子とAGDを出生時の身長（BL）で補正したAGD/BLでみると、女児では母体の教育年齢が13年以上の群でAGD/BLが有意に長い結果となった。男児では妊娠10-16週で母体の重労働があった群でAGD/BLが有意に短い結果となった。AGD/BL、PLを四分位として検討を行うと、AGDが下四分位である女児では母体の22-28週における母体喫煙の割合が高く、

AGD/BLが下四分位の女児では母体の教育年数が13年以上である割合が低かった。PLが上四分位である男児では母体の妊娠前のBMIが22を以上である割合が高く、妊娠10-16週における母体喫煙の割合が高かった。母体BMI・世帯収入・教育年数・妊娠10-16週の母体喫煙を独立変数、女児のAGD/BL下四分位およびPL上四分位を従属変数として変数増加法でロジスティック回帰解析を行うと、女児のAGD/BLが下四分位に入ることと関連する因子として母体の教育年数が13年以上であることが抽出された(オッズ比 0.60, 95%信頼区間 0.38-0.93, p値 0.023)。また、PLが上四分位に入ることと関連する因子として、妊娠10-16週の母体喫煙が抽出された(オッズ比 1.86, 95%信頼区間 1.16-2.99, p値 0.010)。

エコチル調査追加調査の協力者を対象として妊娠初期(登録時～妊娠22週未満)の母体尿中の化学物質(フタル酸エステル類・ビスフェノール類)と児の身体的性分化・脳の性分化を検討した。化学物質濃度と身体所見との関連では、新生児期の身体所見とは有意な関連は認められなかったものの、3歳時の身体所見では、出産時年齢・妊娠前BMI・喫煙・飲酒・出生時体重・学歴で調整しても男児右手2D/4DとOH-MINP濃度の間に正の相関が認められた($B: 0.0293$ (95%CI: 0.0045, 0.0541), $p=0.021$)。一方、性役割傾向調査(JPSAI)を用いて行った脳の性分化評価と妊娠初期母体尿の化学物質濃度の関連では、出産時年齢・妊娠前BMI・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・教育歴・兄あり・姉ありで調整すると、男児でMEHP濃度とcompositeスコアの間に正の相関を認めた($B: 4.78$ (95%CI: 0.49, 9.07), $p=0.030$)。

北海道スタディ大規模コホートを対象とした妊娠初期母体血中化学物質と学童期2D/4Dの関連では有意な相関は認められなかった。1800名を対象とした学童期の2D/4Dと臍帯血を用いたエストロゲン受容体1(ESR1)遺伝子の1塩基多型の検討では、男児右手における2D/4Dが出生時体重・飲酒・喫煙で調整してもXbaI(rs9340799)のGG型においてAA/AG型よりも2D/4Dが低下していた。

以上の結果から、胎児期の化学物質曝露が身体的および脳の性分化に影響を与える可能性があること、遺伝子多型により表現型が修飾される可能性があることを示した。

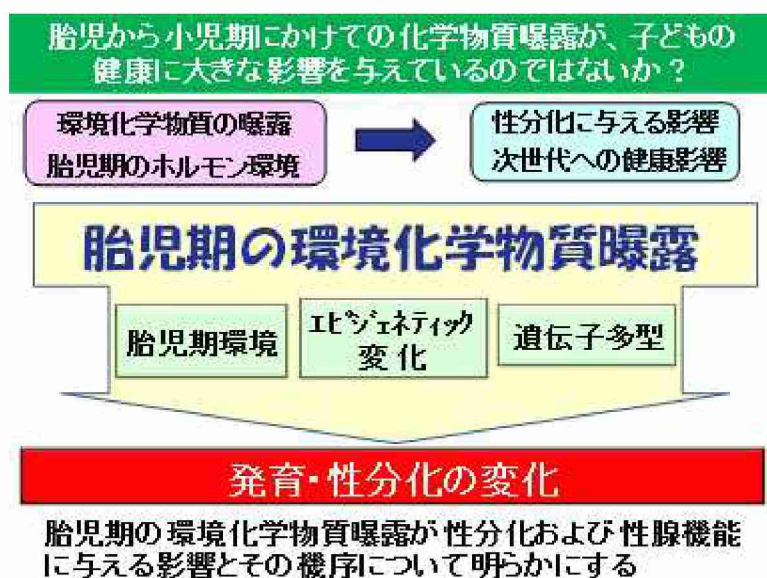
[キーワード]

環境化学物質、胎児期曝露、出生コホート、性分化、第2指第4指比、肛門性器間距離、脳の性分化、

1. はじめに

性腺機能に関連する異常(停留精巣や尿道下裂など)の発生数は欧米で増加傾向にある。これらの原因として、胎児期の環境化学物質曝露や性ステロイド産生などの胎内でのホルモン環境の変化が、出生後の発育や男児での精巣形成不全症候群や女児での遊び方や思春期発来の早期化など、性分化に影響を与えていると考えられている。さらに、その影響には一塩基多型などの遺伝子型による化学物質やステロイドへの感受性差、化学物質曝露によるゲノムへのエピジェネティックな修飾も関連していると考えられている(図(1)-1)。このように、妊娠中および胎児期の環境化学物質曝露がこれら

の背景に影響していると考えられており、実際に環境化学物質曝露による性ホルモンや性腺機能への影響については、動物を用いた実験データは数多く報告されている。しかし、現状ではヒトのデータは散



図(1)-1 仮説

見られるのみである(Cao et al. 2008; Lin et al. 2011)。これまでの「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ（以下、北海道スタディ）」の研究成果として、札幌コホートにおいて、フタル酸エステル代謝物（MEHP）、BPA、有機フッ素化合物（PFOS/PFOA）、およびPCB/Dioxinsの胎児期曝露により、男児で臍帯血中のT/E2比、P4、INSL3、InhibinB、PRLを有意に低下させ、また女児で臍帯血中のT/E2比を増加させる傾向が認められた(Araki et al. 2014)。以上の結果から、特に男児で環境化学物質と性ホルモン濃度との負の関連がみられ、環境中から日常でさらされる低濃度であっても、胎児期曝露は男児のLeydig細胞・Sertoli細胞の機能を低下、性腺機能への影響が示唆された(Araki et al. 2014; Itoh et al. 2016; Minatoya et al. 2016)。しかしながら、その変化が身体的変化や脳の性分化にどのような影響を与えるのかについては未知のまま残されている。

2. 研究開発目的

内分泌かく乱作用をもつ環境化学物質のうち、フタル酸エステル類やBPAの代謝は速いが恒常的に曝露され続ける問題がある。動物実験でフタル酸エステルは抗アンドロゲン作用による生殖器や発達への有害作用が報告され(Dostal et al. 1988; Lin et al. 2011; Phillips and Tanphaichitr 2008)、ヒトでも胎児期曝露による児の肛門性器間距離への影響や(Huang et al. 2009)、第二性徴発来時期の異常等をきたすことが報告されている(Huang et al. 2009)。我々は、妊娠中に曝露したBPAが母の血中濃度とほぼ同じ濃度で胎児へ移行し、ヒトでの低濃度曝露であっても胎児期のフタル酸エステル曝露が男児の精巣機能を示すホルモンへの影響があることを既に報告した(Araki et al. 2014)。一方、BPAについては、横断研究で男性の性腺機能への影響や女児の初潮年齢への影響についての報告があるが(Buttke et al. 2012; Ferguson et al. 2014; McGuinn et al. 2015)、胎児期曝露に関する研究や、身体の性分化に与える影響もほとんど報告がない。従ってフタル酸エステル類やフェノール類への胎児期における曝露が、児のホルモン環境の変化、性分化や第二性徴の発来に与える影響やその機序については、研究が遅れているのが現状である。本研究では、妊娠中の環境化学物質、特にフタル酸エステル類やBPAが児の身体的性分化および脳の性分化に及ぼす影響と、環境遺伝交互作用、特にその機序としてや性ステロイドホルモン受容体などの遺伝子多型がアウトカム発現リスクに与える影響について明らかにすることを目的とする。

北海道大学では全国に先駆け、環境化学物質が次世代に与える影響について明らかにしてきた（北海道スタディ）。また、平成22年より環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」では、北海道全域で8362人の妊婦が参加し、その子どもが13歳になるまで追跡する出生コホート調査を展開している。本研究では、すでに先行している北海道スタディのデータを解析し、その成果をエコチル調査のデータ解析に活用していくことができる。

このように、北海道スタディおよびエコチル調査追加調査で得られた検体および身体所見のデータを用いて、母が曝露した環境化学物質が胎児に与える影響について検討を行う。すなわち、妊娠中および胎児期の環境化学物質が身体的性分化および脳の性分化におよぼす影響と機序について、出生時の身体所見や性役割傾向調査（J-PSAI）に着目しながら検討するとともに、遺伝子多型に着目して遺伝環境交互作用などの影響もふまえて環境化学物質の性分化への影響を科学的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究開発方法

本研究では、北海道スタディ、エコチル調査において、環境化学物質の曝露や環境化学物質濃度と出生時の外性器や精巣の異常、第2指/第4指比（2D/4D）の異常やJ-PSAIに基づく脳の性分化の異常との関連について検討することで化学物質の内分泌かく乱作用を検討し、これまでヒトではほとんど科学的な知見がない性分化および性腺機能における胎児期の環境化学物質曝露のリスクについて明らかにする。また、そのアウトカムにおける遺伝子多型による修飾の影響、環境遺伝子相互作用、についての検討を行う。具体的には、エコチル調査追加調査および北海道スタディ大規模コホートという2つのコホートにおいて、第1に環境化学物質の曝露が男児の陰莖長・精巣体積および男児女児の肛門性器間距離、2D/4D比、脳の性分化に与える影響を明らかにする。第2に遺伝子多型が性分化に与える影響を検討し、化学物質曝

露の影響を修飾する可能性を検討する。最終的には、本研究成果により、妊娠中の環境化学物質が性分化におよぼす影響について明らかにすることができる。

本研究は、北海道大学医学研究科「医の倫理委員会」、および北海道大学環境健康科学研究教育センター倫理委員会の承認を得て実施した。インフォームドコンセントは、全対象者から疫学研究に関する倫理指針およびヘルシンキ宣言に基づき実施した。

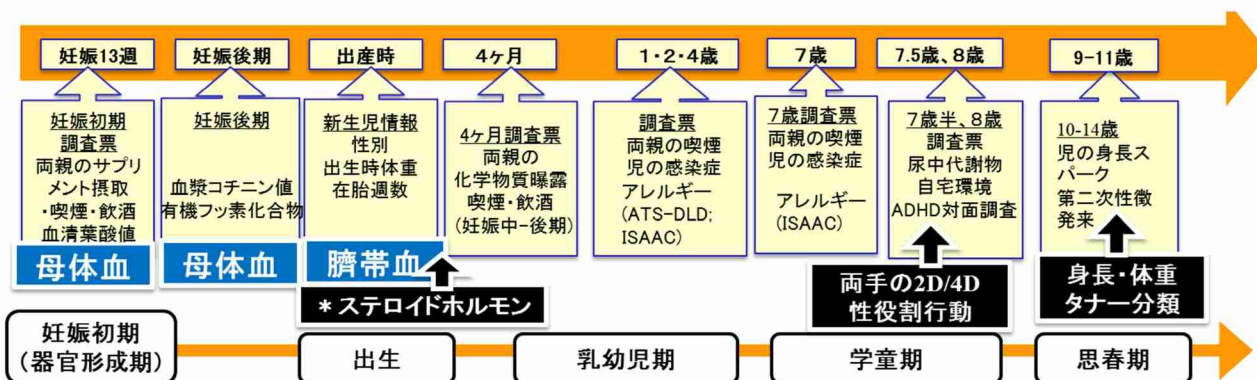
1) エコチル調査追加調査の全体の流れ

北海道大学では、環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」に参加し、コホート研究を行っている。このエコチル調査の本調査に加えて、札幌市内の12施設で本研究は追加調査として行った。エコチル追加調査への参加に同意をいただいた12施設に通院中で札幌市在住のエコチル本調査への参加者に対して、妊娠中期にエコチル追加調査の説明文書を発送した。対面説明の後にエコチル追加調査への同意が得られた妊婦を対象に、出産時に臍帯血の採取（3 ml）、入院中の母体血の採取（3 ml）、さらに出生児の肛門性器間距離、第2指、第4指の長さ、男児の陰茎長、精巣体積の測定を行っている（図（1）-2）。

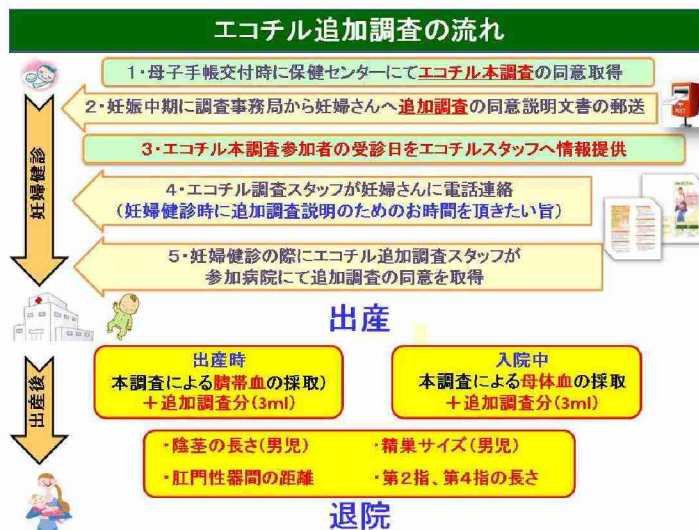
また、対象となる児が2015年10月より順次3歳となるため、3歳時調査として第2指、第4指の長さを測定するための両手のコピー・性役割傾向調査（J-PSAI）・尿の採取・排泄確立に対するアンケートを依頼した（図（1）-3）。

2) 北海道スタディ（大規模コホートの全体の流れ）

出生前向きコホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」の2つのコホートのうち、



図(1)-4 北海道スタディ大規模コホート研究の流れ



図(1)-2 エコチル調査追加調査のリクルートの流れ



図(1)-3 出生時調査と3歳時調査

「大規模コホート」のながれを図(1)-4に示す。「大規模コホート」は、北海道内全域の産科30施設で2003年に開始し、2013年3月までに妊婦20,926人が登録している。妊娠初期のベースライン調査票から、妊娠時の年齢、妊娠前の体格、既往歴、教育歴、妊娠前後の喫煙および飲酒、世帯収入などの情報を得た。出産時の医療機関カルテから在胎週数、児の性別、出生時体重などの情報を得た。妊娠初期と後期の母体血、および分娩時の臍帯血を採取し、 -80°C で保存した。出生後の調査で、7歳半前後に両手のコピーによる2D/4D、8歳時には性役割行動調査(J-PSAI)を実施している(図(1)-4)。

3) 胎児期の環境化学物質への曝露評価

胎児期の環境課が学物質への曝露に対する評価は、質問票および妊娠初期母体尿を用いた化学物質測定にておこなった。

①質問票による評価

エコチル調査に用いられた質問票をもとに分娩時の母体年齢、妊娠前の身長と体重、分娩回数、学歴、世帯収入についての情報を得た。また、妊娠初期(10-16週)および妊娠中期(22-28週)の喫煙、アルコール摂取、重労働の有無についての情報を得た。

②妊娠初期母体尿を用いた評価

妊娠初期母体尿として、エコチル調査登録後妊娠22週未満で採取された尿を用いて尿中ビスフェノール類(ビスフェノールA;BPA、ビスフェノールF;BPF およびフタル酸エステル類の測定を行った。尿中ビスフェノール類の分析は、同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計(ID-LC-MS/MS)にて行った。検出下限値未満の値にはMDLの1/2値を代入し、解析を行った。フタル酸エステル類は、5種類の親化合物Di-n-butyl phthalate (DnBP)、Di-iso-butyl phthalate (DiBP)、Buthyl benzil phthalate (BBzP)、Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)、Diisononylphthalate (DiNP)の代謝物であるMono-n-butyl phthalate (MnBP)、Mono-iso-butyl phthalate (MiBP)、Monobenzyl phthalate (MBzP)、Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)、Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP)、Mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (MEOHP)、mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate (MECPP)、Mono-isononyl phthalate (MiNP)、Mono(4-methyl-hydroxyoctyl)phthalate (OH-MiNP)、Mono(4-methyl-7-carboxyheptyl)phthalate (cx-MiNP)、の合計10種類のフタル酸エステル類代謝物の分析をLC-MS/MSを用いて行った。測定は全て、いであ(株)環境創造研究所で実施した。

4) 遺伝子解析

遺伝子解析には分娩時に採取して -80°C で凍結保存してある臍帯血を用いた。Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)を用いて保存臍帯血からゲノムDNAを抽出した。ESR1遺伝子一塩基多型PvuII(rs2234693)、XbaI(rs9340799)およびrs2077647をTaqMan法で解析した。TaqMan法ではプロトコールに従い、StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)およびTaqMan Minor Groove Binder probes (AppliedBiosystems)を用いて解析した。各反応系には $1.0\mu\text{L}$ のゲノムDNA、 $0.25\mu\text{L}$ のTaqMan 40× Assay-on Demand SNP Genotyping Assay Mix (AppliedBiosystems)、 $5.0\mu\text{L}$ TaqMan GTXpress™ Master Mixと $3.75\mu\text{L}$ の蒸留水を加え全量で $10\mu\text{L}$ となるように調整した。PCRの温度条件は、 95°C 20分を1サイクル、 95°C 3秒+ 60°C 20秒を40サイクルとした。各多型ごとに遺伝子解析に成功した47サンプルをランダムに抽出して追加2回の妥当性検査を施行し、100%の一致を確認した。

5) 統計処理

二群間の平均値の差の検定にはStudentのt検定、カイ二乗検定、およびMann-Whitney U検定を用いた。二変数間の相関分析にはSpearmanの順位相関係数を用いた。重回帰分析においては、ビスフェノール類、フタル酸エステル類濃度はいずれも対数変換して正規分布に近づけた。調整因子は解析ごとに別途示す。統計ソフトJMP12.0を用いて検討し、統計学的有意水準は $p<0.05$ とした。

4. 結果及び考察

1) エコチル調査追加調査回収率

①出生時調査

対面説明を行うことができたのは1622例で、そのうち1601例でエコチル追加調査への参加の同意が得られた（同意率：98.7%）。脱落が51例あり、最終的に1550例で出生児の身体測定（肛門性器間距離、第2指・第4指の長さ、陰茎長、精巣体積のいずれか）が行われた。すべての身体測定が行われていたのは1495名であった。母体血および臍帯血の採取は、それぞれ1505例、431例で行うことができた。

②3歳時調査

出生時にエコチル調査追加調査への参加へ同意した1601例のうち、3歳時時点で1503名が調査への参加を継続しており、そのうち987名から返却が得られた。性役割傾向調査（J-PSAI）・尿の採取・排泄確立に対するアンケートは全例で回収可能であったが、採尿は952名、2D/4Dを測定するための両手のコピーは956名で回収可能であった

2) エコチル調査追加調査における質問票をもとにした胎児期化学物質曝露と出生時身体所見の関係

母体の環境化学物質へ曝露が児の性分化に与える影響として、本研究への参加に同意した妊婦から、北海道大学病院を含む12か所の協力分娩施設で出生した先天奇形のない単胎の新生児1046名（男児 561名、女児 485名）とその母親を解析対象とし、質問票を基にした環境化学物質への曝露と出生児の肛門性器間距離、第2指、第4指の長さ、男児の陰茎長、精巣体積の測定結果との関連を検討した。今回の検討に使用した質問票の項目あるいは児の身体計測に欠測値のある例は除外した。

母体因子および児の身体計測値を男女別に表(1)-1に示す。母体因子には男児と女児の間で大きな違いはなかった。出生時の身長(birth length, BL)および出生体重(birth weight, BW)、AGD、身長で補正したAGD(AGD corrected birth length, AGD/BL)は男児で有意に大きかった。2D/4Dは男女の間で有意な差はなかった。

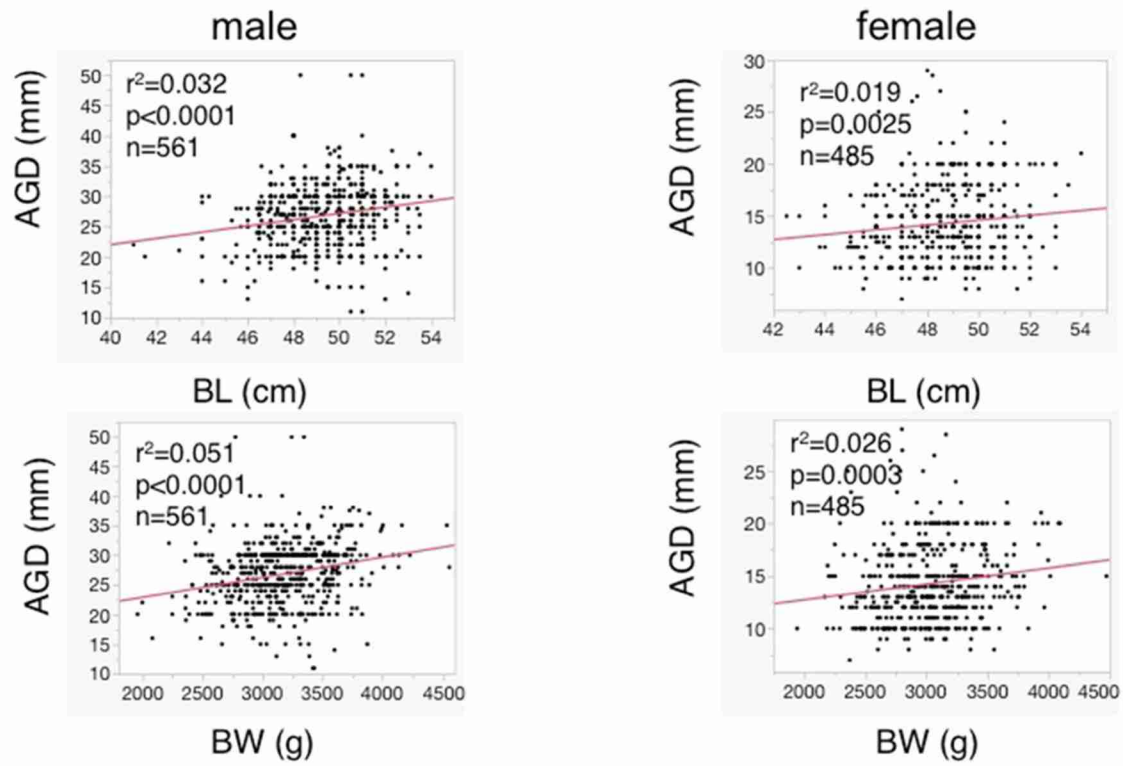
男児と女児でBLおよびBWとAGDの間に正の相関が認められた(図(1)-5)。また、AGD とPLの間にも正の相関が認められた(図(1)-6)。BLあるいはBWで補正したAGDとPLの間に正の相関が認められ(図(1)-7)、これまでの報告と矛盾しない結果であった(Fowler et al. 2011)。

表(1)-1 母体因子および児の身体計測値

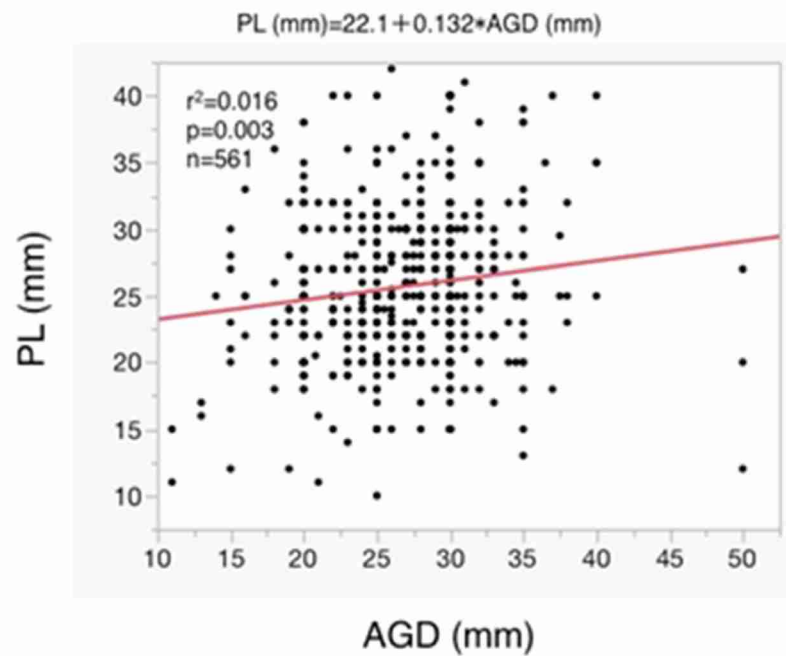
characteristics	Infant gender	
	Male	Female
No. of infant/maternalities	561	485
Maternal age (years)	31.9±5.0	31.8±4.7
Maternal BMI before pregnancy	21.8±5.2	21.9±5.3
Primiparous women	218 (38.9%)	172 (35.5%)
Length of education ≥ 13 years	416 (74.2%)	361 (74.4%)
Annual income < 4.0 million JY	224 (39.9%)	173 (35.5%)
Smoking		
During 10-16 weeks of gestation	91 (16.2%)	78 (16.1%)
During 22-28 weeks of gestation	35 (6.2%)	20 (4.1%)
Alcohol ingestion		
During 10-16 weeks of gestation	57 (10.2%)	45 (9.3%)
During 22-28 weeks of gestation	19 (3.4%)	15 (3.1%)
Hard labor		
During 10-16 weeks of gestation	52 (9.3%)	42 (8.7%)
During 22-28 weeks of gestation	56 (10.0%)	51 (10.5%)
Infant characteristics		
Length of gestation	39±1	39±1
Birth length (cm)	49.3±2.1	48.6±2.1*
Birthweight (g)	3168±16	3032±395*
AGD (mm)	26.8±5.3	14.3±3.7*
AGD/birth length ratio (mm/cm)	0.54±0.11	0.29±0.78*
2D/4D ratio (%), right hand	94.6±6.3	94.7±5.5
2D/4D ratio (%), left hand	93.9±6.0	93.9±6.0
Penile length (mm)	25.7±5.6	
Testicular volume (mL) †		
Non-palpable	7, 5 (1.1%)	
< 0.7	44, 34 (7.0%)	
0.7 - 1.5	431, 452 (79%)	
> 1.5	79, 70 (13%)	

JY, Japanese Yen; *, p < 0.05 vs. male infant,

†, 右および左の精巣 (1122個の精巣における割合)

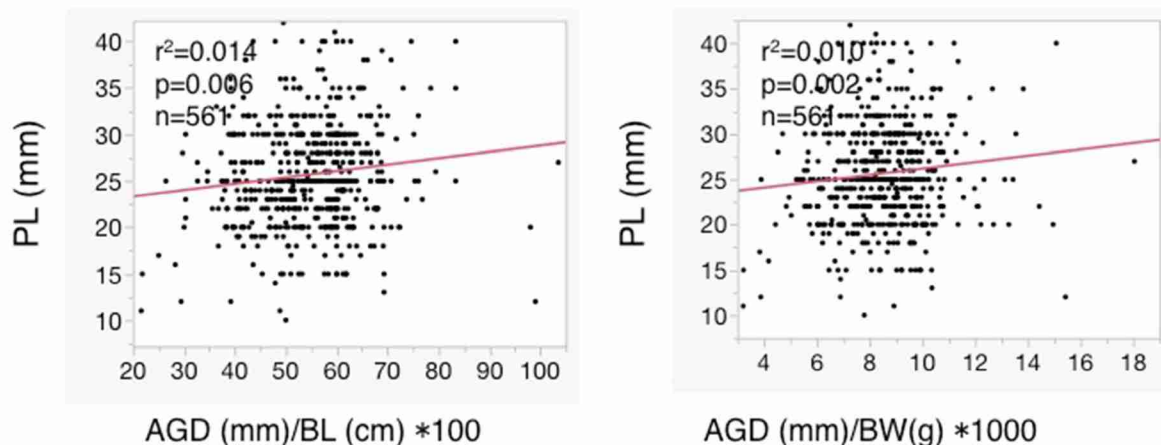


図(1)-5 BLおよびBWとAGDの関係



図(1)-6 PLとAGDの関係

$$PL \text{ (mm)} = 22.3 + 0.062 * AGD \text{ (mm)} / BL \text{ (cm)} * 100 \quad PL \text{ (mm)} = 23.0 + 0.316 * AGD \text{ (mm)} / BW \text{ (g)} * 1000$$



図(1)-7 PLとAGD/BL, AGD/BWの関係

男児と女児とも、左右の2D/4DとAGDの間に相関は認められなかった。男児では左右の2D/4DとPLの間に相関は認められず、BLおよびBWとPLとの間に相関は認められなかった。左右のTVでそれぞれ分けた3群間でAGDの平均値およびPLの平均値を比較したが有意な差は認められなかった。

2D/4Dは性差がなく、男女の2D/4Dと関連する母体因子は抽出されなかった。AGDは男児で長く、女児で短いので、AGDの長短は男性化の指標、あるいは女性化の指標とすることが可能と考えた。また、AGDと相関を認めたPLは男性化の指標とすることが可能と考えられた。そのためAGDおよびPLを性分化の指標として、母体因子の関係を検討した。対象の母体因子とAGDおよびPLとの関係を表(1)-2に示す。女児では妊娠22-28週に母体喫煙のあった群でAGDが有意に短い結果となった。男児では妊娠10-16週で母体の重労働があった群でAGDが有意に短い結果となった。またPLは妊娠10-16週に母体喫煙のあった群で有意に長い結果となった。男女ともにAGDが身長と相関していたため、母体因子とAGDを出生時の身長(BL)で補正したAGD/BLの関係を表(1)-3に示す。女児では母体の教育年齢が13年以上の群でAGD/BLが有意に長い結果となった。男児では妊娠10-16週で母体の重労働があった群でAGD/BLが有意に短い結果となった。

表(1)-2 母体因子とAGDおよびPLとの関係

characteristics	Female		Male		
	AGD (mm)		AGD (mm)		PL (mm)
Maternal age (years)					
< 32	14.1 ± 3.7	n=237	26.7 ± 5.3	n=264	25.6 ± 5.4
≥ 32	14.4 ± 3.7	n=248	26.8 ± 5.4	n=297	25.7 ± 5.8
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)					
< 22	14.3 ± 3.6	n=306	26.7 ± 5.1	n=314	25.3 ± 5.3
≥ 22	14.2 ± 3.9	n=179	26.9 ± 5.6	n=247	26.2 ± 6.0
History of childbirth					
Yes	14.1 ± 3.4	n=313	26.9 ± 5.3	n=343	25.8 ± 5.6
No	14.6 ± 4.2	n=172	26.6 ± 5.5	n=218	25.5 ± 5.6
Length of education ≥ 13 years					
Yes	14.4 ± 3.8	n=361	26.8 ± 5.3	n=416	25.4 ± 5.7
No	13.8 ± 3.5	n=124	26.7 ± 5.4	n=145	26.4 ± 5.2
Annual income ≥ 4.0 million JY					
Yes	14.3 ± 3.7	n=312	26.7 ± 5.2	n=337	25.4 ± 5.7
No	14.3 ± 3.7	n=173	26.8 ± 5.5	n=224	26.1 ± 5.5
Smoking (GW 10-16)					
Yes	13.7 ± 3.3	n=78	26.7 ± 5.0	n=91	26.8 ± 5.7*
No	14.4 ± 3.8	n=407	26.8 ± 5.4	n=470	25.5 ± 5.7*
Smoking (GW 22-28)					
Yes	12.4 ± 2.6*	n=20	25.6 ± 5.2	n=35	27.2 ± 6.1
No	14.3 ± 3.7*	n=465	26.9 ± 5.3	n=526	25.6 ± 5.6
Alcohol ingestion (GW 10-16)					
Yes	14.2 ± 4.0	n=45	27.0 ± 5.3	n=57	24.8 ± 6.2
No	14.3 ± 3.7	n=440	26.8 ± 5.3	n=504	25.8 ± 5.5
Alcohol ingestion (GW 22-28)					
Yes	13.5 ± 3.8	n=15	25.9 ± 4.5	n=19	23.8 ± 3.7
No	14.3 ± 3.7	n=470	26.8 ± 5.3	n=542	25.8 ± 5.6
Hard labor (GW 10-16)					
Yes	14.0 ± 3.7	n=42	25.5 ± 5.2*	n=52	25.0 ± 5.5
No	14.3 ± 3.7	n=434	26.9 ± 5.3*	n=503	25.8 ± 5.6
Hard labor (GW 22-28)					
Yes	13.9 ± 3.7	n=51	26.2 ± 5.3	n=56	25.6 ± 5.9
No	14.3 ± 3.7	n=430	26.8 ± 5.3	n=503	25.7 ± 5.6
JY, Japanese Yen; GW, gestational week; *, p < 0.05 vs. counterpart characteristic					

表(1)-3 母体因子とAGD/BLの関係

	Female		Male	
characteristics	AGD/BL		AGD/BL	
Maternal age (years)				
< 32	29.1±7.8	n=237	54.5±10.5	n=264
≥ 32	29.7±7.7	n=248	54.2±10.7	n=297
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)				
< 22	29.4±7.7	n=306	54.3±10.0	n=314
≥ 22	29.4±8.0	n=179	54.4±11.3	n=247
History of childbirth				
Yes	29.2±7.4	n=313	54.7±10.3	n=343
No	29.9±8.4	n=172	53.8±11.0	n=218
Length of education ≥ 13 years				
Yes	30.0±8.0*	n=361	54.4±10.5	n=416
No	27.9±6.9*	n=124	54.4±10.8	n=145
Annual income ≥ 4.0 million JY				
Yes	29.5±7.9	n=312	54.2±10.3	n=337
No	29.4±7.6	n=173	54.6±11.0	n=224
Smoking (GW 10-16)				
Yes	28.2±8.0	n=78	54.4±9.7	n=91
No	29.7±7.7	n=407	54.4±10.8	n=470
Smoking (GW 22-28)				
Yes	29.5±11.6	n=20	52.7±9.9	n=35
No	29.4±7.6	n=465	54.5±10.6	n=526
Alcohol ingestion (GW 10-16)				
Yes	29.1±8.2	n=45	55.2±10.6	n=57
No	29.5±7.7	n=440	54.3±10.6	n=504
Alcohol ingestion (GW 22-28)				
Yes	26.8±7.2	n=15	53.6±9.4	n=19
No	29.5±7.8	n=470	54.4±10.6	n=542
Hard labor (GW 10-16)				
Yes	29.1±6.9	n=42	51.6±10.4*	n=52
No	29.5±7.9	n=434	54.7±10.6*	n=503
Hard labor (GW 22-28)				
Yes	29.5±7.2	n=51	53.0±10.5	n=56
No	29.4±7.9	n=430	54.5±10.6	n=503
JY, Japanese Yen; GW, gestational week; *, p < 0.05 vs. counterpart characteristic AGD/BLはmm/cmの100倍で表示している。				

母体因子と、女児のAGDが下四分位(cut off値 12mm)・上四分位(cut off値 17mm)、AGD/BLが下四分位(cut off値 24.2)・上四分位(cut off値 34.5)、男児のAGDが下四分位(cut off値 24mm)・上四分位(cut off値 30mm)、男児のAGD/BLが下四分位(cut off値 48.2)・上四分位(cut off値 60.6)、PLが下四分位(cut off値 22mm)・上四分位(cut off値 30mm)であることとの関係を解析した。AGDが下四分位である女児では母体の22-28週における母体喫煙の割合が高かった(表(1)-4)。AGD/BLが下四分位の女児では母体の教

育年数が13年以上である割合が低かった（表(1)-5）。女兒において、AGDがあるいはAGD/BLが上四分位であることと母体因子との間に関連は認められなかった。男児において、AGDあるいはAGD/BLが下四分位であることと母体因子との間に関連は認められなかった。男児において、AGDあるいはAGD/BLが上四分位であることと母体因子との間に関連は認められなかった。PLが下四分位である男児では世帯年収が400万円以上である割合が高かった（表(1)-6）。PLが上四分位である男児では母体の妊娠前のBMIが22を以上である割合が高く、妊娠10-16週における母体喫煙の割合が高かった（表(1)-7）。

表(1)-4 母体因子と女兒のAGDが下四分位であることとの関係

Factors	Yes (n=168)	No (n=317)	p value
Maternal age $\geq$ 32years	85 (50.6)	163 (51.4)	0.924
BMI (kg/m ²) $\geq$ 22	63 (37.5)	116 (36.6)	0.844
History of childbirth	108 (64.3)	205 (64.7)	1
Education $\geq$ 13 years	118 (70.2)	243 (76.7)	0.127
Income $\geq$ 4.0 million JY	107 (63.7)	205 (64.7)	0.843
Smoking (GW 10-16)	33 (19.6)	45 (14.2)	0.122
Smoking (GW 22-28)	12 (7.1)	8 (2.5)	0.028*
Alcohol (GW 10-16)	21 (12.5)	24 (7.6)	0.099
Alcohol (GW 22-28)	8 (4.8)	7 (2.2)	0.166
Hard labor (GW 10-16)	17 (10.4)	25 (8.0)	0.399
Hard labor (GW 22-28)	23 (13.9)	28 (8.9)	0.089

括弧内は割合(%); BMI, body mass index; GW, gestational week; JY, Japanese Yen;
*, p < 0.05

表(1)-5 母体因子と女兒のAGD/BLが下四分位であることとの関係

Factors	Yes (n=123)	No (n=362)	p value
Maternal age $\geq$ 32years	62 (50.4)	186 (56.4)	0.917
BMI (kg/m ²) $\geq$ 22	46 (37.4)	133 (36.7)	0.914
History of childbirth	79 (64.2)	234 (64.6)	1
Education $\geq$ 13 years	82 (66.7)	279 (77.1)	0.031*
Income $\geq$ 4.0 million JY	79 (64.2)	233 (64.4)	1
Smoking (GW 10-16)	24 (19.5)	54 (14.9)	0.256
Smoking (GW 22-28)	7 (5.7)	13 (3.6)	0.303
Alcohol (GW 10-16)	16 (13.0)	29 (8.0)	0.107
Alcohol (GW 22-28)	7 (5.7)	8 (2.2)	0.069
Hard labor (GW 10-16)	11 (9.1)	31 (8.7)	0.855
Hard labor (GW 22-28)	13 (10.7)	38 (10.6)	1

括弧内は割合(%); BMI, body mass index; GW, gestational week; JY, Japanese Yen;
*, p < 0.05

表(1)-6 母体因子と男児のPLが下四分位であることとの関係

Factors	Yes (n=166)	No (n=385)	p value
Maternal age $\geq$ 32years	84 (50.6)	213 (53.9)	0.517
BMI (kg/m ²) $\geq$ 22	67 (40.4)	180 (45.6)	0.265
History of childbirth	97 (58.4)	246 (62.3)	0.395
Education $\geq$ 13 years	131 (78.9)	285 (72.2)	0.112
Income $\geq$ 4.0 million JY	111 (66.9)	226 (57.2)	0.038*
Smoking (GW 10-16)	20 (12.1)	71 (18.0)	0.102
Smoking (GW 22-28)	7 (4.2)	28 (7.1)	0.252
Alcohol (GW 10-16)	22 (13.3)	35 (8.9)	0.127
Alcohol (GW 22-28)	9 (5.4)	10 (2.5)	0.121
Hard labor (GW 10-16)	18 (11.0)	34 (8.7)	0.426
Hard labor (GW 22-28)	18 (11.0)	38 (9.6)	0.645

括弧内は割合(%); BMI, body mass index; GW, gestational week; JY, Japanese Yen;
*, p < 0.05

表(1)-7 母体因子と男児のPLが上四分位であることとの関係

Factors	Yes (n=148)	No (n=413)	p value
Maternal age $\geq$ 32years	75 (50.7)	222 (53.8)	0.565
BMI (kg/m ²) $\geq$ 22	77 (52.0)	170 (41.2)	0.026*
History of childbirth	93 (62.8)	250 (60.5)	0.694
Education $\geq$ 13 years	102 (68.9)	314 (76.0)	0.11
Income $\geq$ 4.0 million JY	84 (56.8)	253 (61.3)	0.378
Smoking (GW 10-16)	34 (23.0)	57 (13.8)	0.013*
Smoking (GW 22-28)	13 (8.8)	22 (5.3)	0.164
Alcohol (GW 10-16)	13 (8.8)	44 (10.7)	0.634
Alcohol (GW 22-28)	2 (1.4)	17 (4.1)	0.182
Hard labor (GW 10-16)	13 (8.8)	39 (9.4)	1
Hard labor (GW 22-28)	14 (9.5)	42 (10.2)	0.874

括弧内は割合(%); BMI, body mass index; GW, gestational week; JY, Japanese Yen;
*, p < 0.05

女児のAGDは妊娠22-28週の喫煙がある群で短かったが、身長で補正したAGD/BLは妊娠22-28週の喫煙群と非喫煙群の間に差が認められなかった。女児のAGD/BLは母体の教育年数が13年以上の群で長く、AGD/BLが下四分位の女児では母体の教育年数が13年以上である割合が低かった。男児のAGDおよびAGD/BLは妊娠10-16週の重労働があると短い、AGDおよびAGD/BLが下四分位であることと関連する母体因子は認められなかった。PLは妊娠10-16週の喫煙がある群で長く、PLが上四分位であることと関連する因子としても妊娠10-16週の母体喫煙が選択された。また、PLが上四分位であることと関連する因子として母体の妊娠前BMIが22以上であることが選択された。PLが下四分位であることと関連する因子としては、世帯収入が400万円以上であることが選択された。これらの結果より母体BMI・世帯収入・教育年数・妊娠10-16週の母体喫煙を独立変数、女児のAGD/BL下四分位およびPL上四分位を従属変数として変数増加法でロジスティック回帰解析を行った。

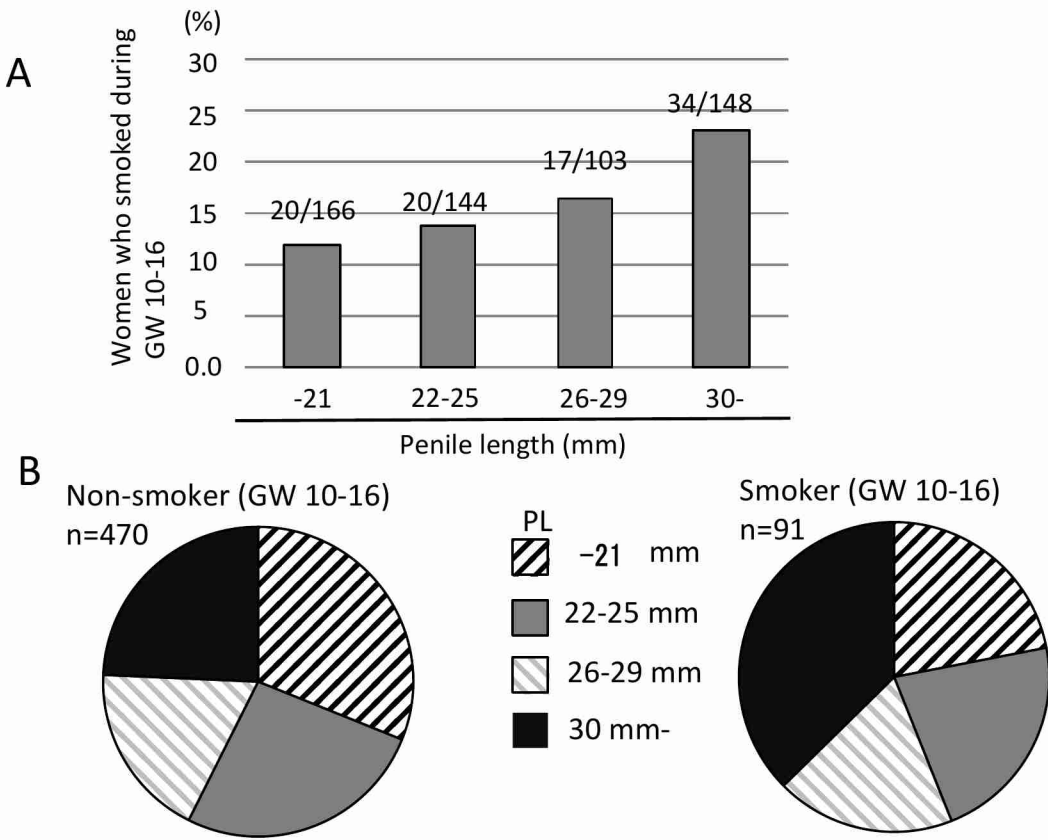
ロジスティック回帰解析の結果、女児のAGD/BLが下四分位に入ることと関連する因子として母体の教育年数が13年以上であることが抽出された(オッズ比 0.60, 95%信頼区間 0.38-0.93, p値 0.023)。

換言すると、女兒のAGD/BLが下四分位に入らないことと関連する因子として母体の教育年数が13年以上であることが抽出された。先行研究では妊娠期間中に精神的ストレス環境にあった母体より出生した女兒のAGDが新生児期に伸長していたことが報告されている(Barrett et al. 2013)。教育年数と精神的ストレスの関連は明らかではないが、母体の教育歴と女兒の性分化についての関係は今後の検討課題である。また、PLが上四分位に入ることと関連する因子として、妊娠10-16週の母体喫煙が抽出された(オッズ比 1.86, 95%信頼区間 1.16-2.99, p値 0.010)。

妊娠10-16週に母体喫煙のあった 91名では喫煙歴のない470名に比してBWは有意に小さかったが(3073±39 対 3186±17 g, p値 0.009)、BL(49.0±0.2 対 49.3±0.1 cm, p値 0.194)およびAGD(26.7±0.6 対 26.8±0.2 mm, p値 0.845)には有意な差はなかった。

561名の男児をPLによって四分位群に分けた。PLの中央値は25.0 mmで、78名の新生児のPLが25.0mmであり第2四分位群へ組み入れた。妊娠10-16週に喫煙していた母体の数は児のPLが長いほど増える傾向にあった(図(1)-8)。母体喫煙のない470名と母体喫煙のある91名の男児で各分画はPLが21mm以下の群で31.1%(146/470)対22.0%(20/91)、PLが22-25mmの群で26.3%(124/470)対22.0%(20/91)、PLが26-29mmの群で18.3%(86/470)対18.7%(17/91)、PLが30mm以上の群で24.3%(114/470)対37.4%(34/91)であった(図(1)-8)。PLが25mm以下の新生児の数は喫煙していない母体で多かった(57%[270/470]対44%[40/91], p値 0.021)。

Fowlerらは妊娠11-20週の第2三半期に選択的に中絶された健常に发育していた胎児の検討で、AGDおよびポンデルル指数で補正したAGDが、喫煙している母体から出生した児で有意に長いことを報告している(図(1)-8)。これは胎児の喫煙への曝露がアンドロゲン曝露の効果を増強させたことを示唆している(Fowler et al. 2011)。本検討では、妊娠10-16週における母体喫煙歴が、PLが30mmをこえることに独立して関連する因子として抽出され、この期間の喫煙が胎児期のアンドロゲン曝露に影響を与えている可能性が示唆された。妊娠10-16週の母体の喫煙がアンドロゲン曝露やPLの发育にどのように影響したかは本研究では明らかにはなっていない。既報では胎児期の喫煙曝露は尿道下裂や停留精巣の頻度を増加させ(Brouwers et al. 2007; Jensen et al. 2007)、妊孕能力に有害な影響をあたえることが報告されている(Jensen et al. 2004)。Fowlerらは妊娠早期のMPWの時期での曝露と、この時期における胎児の感受性をAGD伸長の機序の仮説としている。本研究においてPLが下四分位に入る独立した危険因子として喫煙の有無が抽出されなかったことから、喫煙曝露のみがPLの伸長に影響を及ぼしているのではないと考えられる。またFowlerらの報告では週数を経てAGDの差がなくなっており、喫煙がどの時期においてアンドロゲン作用に影響しているかについては更なる検討の必要がある。本研究における喫煙の有無は質問票の情報のみから判断した。母体喫煙が胎児のAGDやPLに与える影響に関する今後の研究においては、生体試料中のニコチン代謝産物濃度を客観的な曝露指標とすること、臍帯血中性ステロイドホルモン濃度を交絡因子としてアウトカムとの解析を進めていくことなどが望まれる。



図(1)-8 妊娠10-16週における母体喫煙とPLの関連

3) エコチル調査追加調査における妊娠初期母体尿における化学物質測定

妊娠初期母体尿を用いた化学物質の測定は、エコチル調査追加調査に同意した1601名中妊娠初期母体尿のある1041名の中から臍帯血の有無や妊娠中の喫煙や飲酒に関する情報、新生児期の身体所見および、3歳時調査の協力を勘案して518人を対象に行った。

化学物質の測定結果を表(1)-8に示す。化学物質ののうち検出率が80%未満であったMBzP・MiNP・cx-MiNP・ON-MiNP・BPFはその後の検討から除外した。

表(1)-8 化学物質の検出率と濃度分布

	MDL*(ng/mL)	検出率	N	パーセンタイル		
				25%	50%	75%
MnBP	0.9	98.6%	283	4.8	11.0	20.3
MEHP	0.37	97.5%	283	1.5	3.1	6.2
MBzP	0.6	33.7%	283	< MDL	< MDL	1.1
MEHHP	0.16	100.0%	283	2.88	6.1	11.0
MEOHP	0.12	100.0%	283	2.4	4.8	9.0
MiBP	1.2	84.4%	283	1.9	3.7	7.9
MECPP	0.15	100.0%	283	3.8	6.9	14
MiNP	0.54	0.4%	283	< MDL	< MDL	< MDL
cx-MiNP	0.12	16.0%	283	< MDL	< MDL	< MDL
OH-MiNP	0.21	36.2%	283	< MDL	< MDL	0.3
BPA	0.099	91.1%	518	0.18	0.30	0.53
BPF	0.14	14.2%	518	< MDL	< MDL	< MDL
BPS	0.0091	98.6%	518	0.039	0.076	0.141

*:MDL : Method Detection Limit

①妊娠初期母体尿における化学物質濃度と新生児期の身体所見の関係

対象となった515児の背景を表(1)-9に示す。女兒において出生時体重が軽かったものの母体情報や妊娠週数には差は見られなかった(表(1)-10)。男児では化学物質濃度と身体所見(陰茎長・陰茎長/身長・精巣容積・2D/4D・AGD・AGD/身長)の間に有意な関連は見られなかったが、女兒においては2D/4D・AGD と化学物質との間に関連は見られなかったが、MiBPとAGD/身長の間に関連の傾向がみられた ($\rho = -0.1528$, $p = 0.0715$) (表(1)-10)。母体年齢・妊娠前BMI・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・出生時体重・出生週数・学歴で調整するとB: -0.023 (95%CI: -0.051 , 0.0052)、 $p = 0.109$ となった。

表(1)-9 母児の基本属性

	男児 (n=273)	女兒 (n=242)	p
母体情報			
分娩時年齢	32.8±4.5	33.0±4.6	0.5137
出生全前BMI	21.2±2.9	20.6±2.5	0.033
初産	39.8%	32.8%	0.108
妊娠時喫煙	15.1%	13.9%	0.686
妊娠時飲酒	12.6%	11.8%	0.776
学歴13年以上	77.9%	75.9%	0.592
世帯年収600万以上	29.3%	30.0%	0.848
児情報			
出生週数	39.3±1.3	39.3±1.3	0.711
出生時体重	3200±407	3032±368	<0.0001

表(1)-10 男女別の新生児期の身体測定結果

	男児	女兒	p
右手2D/4D (%)	94.9±5.6	94.6±6.0	0.4943
左手2D/4D (%)	93.9±6.2	93.7±5.8	0.7122
平均2D/4D (%)	94.4±4.9	94.2±4.5	0.5151
AGD (mm)	27.3±5.0	14.0±3.6	<0.0001
AGD/身長	0.5546±0.1016	0.2885±0.0745	<0.0001
陰茎長 (mm)	26.5±5.77		
陰茎長/身長	0.5387±0.1183		

表(1)-11 化学物質と新生児の身体所見 (Spearmanの順位相関係数)

	男児				女児	
	陰茎長 ρ (p)	陰茎長/身長 ρ (p)	AGD ρ (p)	AGD/身長 ρ (p)	AGD ρ (p)	AGD/身長 ρ (p)
MnBP	-0.0074 (0.9301)	0.0050 (0.9530)	-0.0843 (0.3185)	-0.0798 (0.3449)	0.0120 (0.8884)	-0.0322 (0.7057)
MEHP	0.0065 (0.9389)	0.0066 (0.9378)	0.0054 (0.9494)	-0.0160 (0.8504)	-0.0425 (0.6178)	-0.0524 (0.5385)
MEHHP	-0.0233 (0.7832)	-0.0098 (0.9079)	0.0513 (0.5441)	0.0422 (0.6178)	-0.0697 (0.4129)	-0.0865 (0.3094)
MEOHP	-0.0333 (0.6943)	-0.0241 (0.7759)	0.0321 (0.7043)	0.0184 (0.8284)	-0.0676 (0.4272)	-0.0821 (0.3349)
MiBP	0.0688 (0.4160)	0.0826 (0.3284)	0.0266 (0.7529)	0.0390 (0.644)	-0.1248 (0.1416)	-0.1528* (0.0715)
MECPP	-0.0223 (0.7922)	-0.0170 (0.8410)	0.0077 (0.9277)	-0.0117 (0.8904)	-0.0408 (0.6326)	-0.0566 (0.5065)
OH-MiNP	0.0066 (0.9383)	0.0337 (0.6902)	-0.0101 (0.9052)	0.0062 (0.9413)	-0.1080 (0.2039)	-0.1156 (0.1738)
BPA	-0.0764 (0.2091)	-0.0590 (0.3327)	-0.0780 (0.1988)	-0.0545 (0.3694)	0.0717 (0.2667)	0.0581 (0.3680)
BPS	-0.0630 (0.3004)	-0.0669 (0.2713)	0.0297 (0.6251)	0.0190 (0.7552)	-0.0264 (0.6824)	-0.0294 (0.6492)

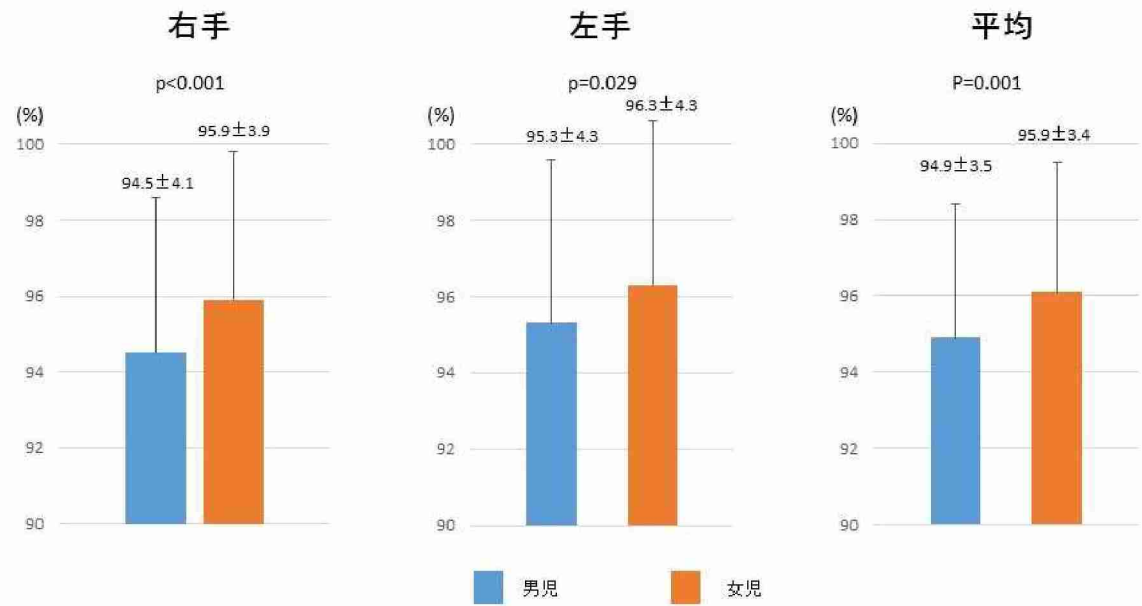
*: $p < 0.1$

②妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳時の身体所見(2D/4D)の関係

妊娠初期母体尿における化学物質濃度が測定されており、かつ3歳時の2D/4Dが測定されていたのは381例であった。381例の基本属性を男女別に表(1)-12に示す。2D/4Dは右手・左手・平均とも男児で有意に小さい値を示した(図(1)-9)。妊娠初期母体尿の化学物質濃度との関連では、男児右手2D/4DとOH-MiNP ($\rho = 0.2040, p = 0.0857$)、女児左手2D/4DとBPS ($\rho = -0.1242, p = 0.0985$)で相関の傾向を認めた(表(1)-12)。母体年齢・妊娠前BMI・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・出生時体重・出生週数・学歴で調整すると前者はB: 0.0293 (95%CI: 0.0045, 0.0541)、 $p = 0.021$ と有意な相関を認めた。

表(1)-12 妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳時の身体所見 (基本属性)

	男児 (n=203)	女児 (n=178)	p
母体情報			
出生時年齢	32.9 ± 4.5	33.8 ± 4.3	0.043
妊娠前BMI	21.1 ± 2.6	20.5 ± 2.6	0.043
初産	38.9%	30.4%	0.091
妊娠時喫煙	12.4%	9.1%	0.312
妊娠時飲酒	13.4%	12.0%	0.691
学歴13年以上	79.7%	80.0%	0.943
世帯年収600万以上	32.2%	31.0%	0.812
児情報			
出生週数	39.3 ± 1.3	39.2 ± 1.3	0.2545
出生時体重	3213 ± 373	3003 ± 362	<0.0001



図(1)-9 3歳時調査における2D/4D

表(1)-13 妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳時の身体所見（Spearmanの順位相関係数）

	男児			女児		
	右手2D/4D	左手2D/4D	平均2D/4D	右手2D/4D	左手2D/4D	平均2D/4D
	ρ (p)	ρ (p)	ρ (p)	ρ (p)	ρ (p)	ρ (p)
MnBP	-0.0526 (0.6609)	-0.0437 (0.7156)	-0.0501 (0.6758)	-0.0816 (0.4896)	-0.1305 (0.2676)	-0.1371 (0.2440)
MEHP	0.0504 (0.6741)	0.0527 (0.6601)	0.0728 (0.5431)	-0.0508 (0.6672)	-0.0775 (0.5117)	-0.0883 (0.4545)
MEHHP	-0.0367 (0.7598)	-0.0191 (0.8738)	-0.0058 (0.9614)	-0.0302 (0.7984)	-0.0777 (0.5106)	-0.0722 (0.5412)
MEOHP	-0.0215 (0.8576)	-0.0523 (0.6623)	-0.0160 (0.8940)	-0.0125 (0.9159)	-0.0788 (0.5046)	-0.0580 (0.6234)
MiBP	-0.0917 (0.4434)	-0.0275 (0.8187)	-0.0712 (0.5520)	-0.0324 (0.7842)	-0.1386 (0.2388)	-0.1077 (0.3609)
MECPP	0.0023 (0.9850)	-0.0504 (0.6741)	-0.0037 (0.9753)	-0.0154 (0.8967)	-0.0933 (0.4291)	-0.0642 (0.587)
OH-MiNP	0.2040* (0.0857)	0.1148 (0.3370)	0.1791 (0.1322)	-0.0116 (0.9218)	-0.1028 (0.3834)	-0.1031 (0.3822)
BPA	0.0801 (0.2558)	-0.0277 (0.6948)	0.0464 (0.5110)	-0.0256 (0.7348)	-0.1015 (0.1776)	-0.0835 (0.2676)
BPS	-0.0908 (0.197)	0.0418 (0.5535)	-0.0148 (0.8340)	-0.0478 (0.5263)	-0.1242* (0.0985)	-0.1095 (0.1456)

*: p < 0.1

これらの検討から、妊娠初期のフタル酸エステル類曝露が児の身体的性差に影響を与えている可能性が示された。動物実験でフタル酸エステルは抗アンドロゲン作用による生殖器や発達への有害作用が報告され(Dostal et al. 1988; Huang et al. 2009; Li et al. 2000)、ヒトでも胎児期曝露による児の肛門性器間距離への影響や(Huang et al. 2009)、第二次性徴発来時期の異常等をきたすことが報告

されている(Chou et al. 2009; Lomenick et al. 2010; Wolff et al. 2010)。本検討結果も過去の報告に矛盾しないものであった。

③妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳時のJPSAIの関係

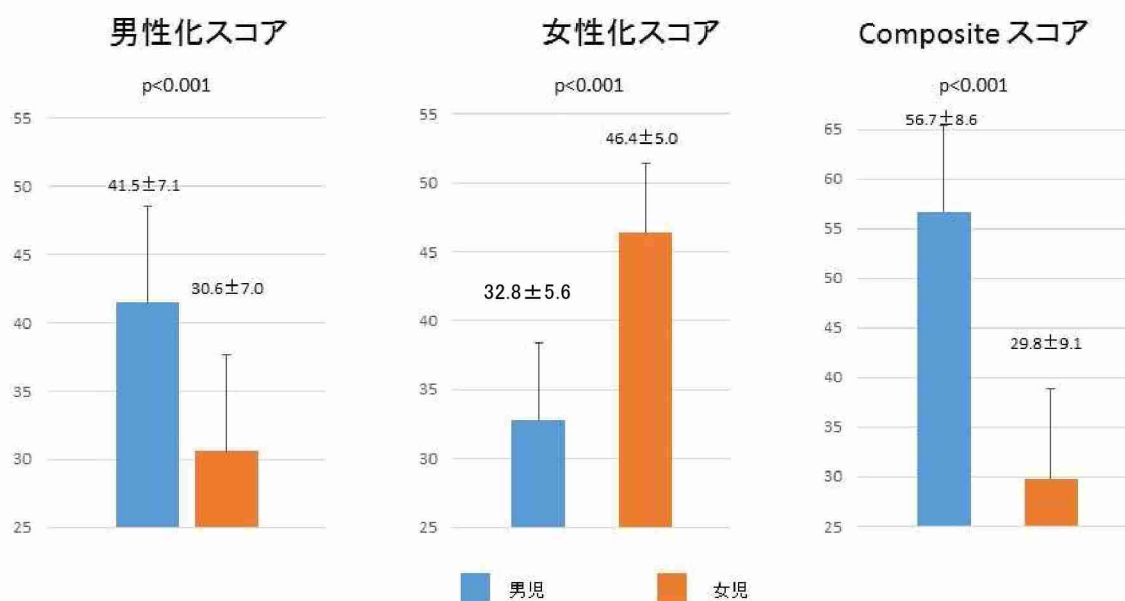
妊娠初期母体尿における化学物質濃度が測定されており、かつ3歳時のJPSAIが評価されていたのは408人であった。408人の基本属性を男女別に表(1)-14に示す。

JPSAIの男性化スコアは男児において、女性化スコアは女児において有意に高く、compositeスコアは男児において有意に高かった(図(1)-10)。

化学物質との関連では、Crudeの解析では、男児ではMEHP濃度とcompositeスコアに正の相関を認めた。女児ではMEHP濃度・MECPP濃度とcompositeスコアに負の相関を認めた(表(1)-15)。出産時年齢・妊娠前BMI・初産・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・教育歴・兄あり・姉ありで調整すると、男児ではMEHP濃度とcompositeスコアに正の相関を認めた (B: 4.78(95%CI:0.49, 9.07)、p=0.030) (表(1)-16、表(1)-17)。

表(1)-14 妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳時のJPSAIの関係 (基本属性)

	男児 (n=221)	女児 (n=187)	p
母体情報			
出生時年齢	32.9±4.5	33.9±4.2	0.032
妊娠前BMI	21.0±2.6	20.5±2.5	0.063
初産	39.2%	31.7%	0.120
妊娠時喫煙	12.3%	9.8%	0.428
妊娠時飲酒	13.6%	11.8%	0.443
学歴13年以上	80.0%	79.9%	0.987
世帯年収600万以上	30.9%	31.7%	0.866
児情報			
出生週数	39.3±1.3	39.2±1.3	0.205
出生時体重	3215±373	3012±366	<0.0001
兄あり	33.0%	38.0%	0.265
姉あり	33.0%	35.8%	0.397



図(1)-10 3歳時調査におけるJPSAI

表(1)-15 妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳時のJPSAIの関係 (Spearmanの順位相関係数)

	男児			女児		
	男性化 スコア ρ (p)	女性化 スコア ρ (p)	Composite スコア ρ (p)	男性化 スコア ρ (p)	女性化 スコア ρ (p)	Composite スコア ρ (p)
MnBP	0.0360 (0.7362)	-0.1056 (0.3221)	0.1033 (0.3327)	-0.1449 (0.1913)	0.0255 (0.8190)	-0.1641 (0.1383)
MEHP	0.1501 (0.1579)	-0.1316 (0.2164)	0.2132** (0.0437)	-0.2027* (0.0661)	0.0366 (0.7428)	-0.2072* (0.0602)
MEHHP	0.0732 (0.4929)	-0.0941 (0.3777)	0.1122 (0.2924)	-0.2125* (0.0538)	0.0019 (0.9866)	-0.2064* (0.0612)
MEOHP	0.0574 (0.5910)	-0.0730 (0.4942)	0.0860 (0.4204)	-0.2129* (0.0533)	0.0281 (0.8011)	-0.2237** (0.0421)
MiBP	0.0376 (0.7251)	0.0179 (0.8667)	-0.0016 (0.9882)	-0.1065 (0.3380)	0.1506 (0.1743)	-0.2007* (0.0689)
MECPP	0.0676 (0.5267)	-0.0557 (0.6018)	0.0790 (0.4591)	-0.2068* (0.0606)	0.0876 (0.4311)	-0.2589** (0.0181)
OH-MiNP	0.0758 (0.4774)	0.0301 (0.7785)	0.0183 (0.8642)	-0.1600 (0.1485)	0.0473 (0.6708)	-0.1883* (0.0882)
BPA	-0.0163 (0.8101)	-0.0095 (0.8878)	0.0053 (0.9377)	-0.1154 (0.1158)	-0.0294 (0.6891)	-0.0737 (0.3165)
BPS	0.0073 (0.9145)	-0.0187 (0.7827)	0.0318 (0.6378)	-0.0740 (0.3142)	-0.1223* (0.0953)	-0.0079 (0.9144)

*: $p < 0.1$ 、**: $p < 0.05$

表(1)-16 妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳男児のJPSAIの関係 (重回帰分析)

	男児		
	男性化スコア β (95%CI)	女性化スコア β (95%CI)	Compositeスコア β (95%CI)
MnBP	1.23 (-2.22, 4.70)	-1.23 (-3.69, 1.24)	2.71 (-1.15, 6.57)
MEHP	2.99 (-0.89, 6.86)	-1.36 (-4.15, 1.43)	4.78** (0.49, 9.07)
MEHHP	1.77 (-2.33, 5.73)	-0.97 (-3.86, 1.91)	2.94 (-1.57, 7.45)
MEOHP	1.72 (-2.38, 5.82)	-0.79 (-3.72, 2.14)	2.77 (-1.83, 7.36)
MiBP	1.79 (-1.57, 5.15)	-0.76 (-1.64, 3.17)	1.13 (-2.67, 4.93)
MECPP	1.98 (-2.58, 6.55)	-0.69 (-3.96, 2.58)	2.95 (-2.17, 8.06)
OH-MiNP	0.29 (-3.59, 4.17)	-0.35 (-3.12, 2.42)	0.70 (-3.66, 5.07)
BPA	-0.11 (-2.36, 2.14)	-0.34 (-2.06, 1.39)	0.25 (-2.40, 2.90)
BPS	0.69 (-1.31, 2.69)	-0.19 (-1.73, 1.34)	0.98 (-1.38, 3.33)

出産時年齢・妊娠前BMI・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・教育歴・妊娠週数・出生時体重・兄あり・姉ありで調整

**: $p < 0.05$

表(1)-17 妊娠初期母体尿における化学物質濃度と3歳女児のJPSAIの関係 (重回帰分析)

	女児		
	男性化スコア β (95%CI)	女性化スコア β (95%CI)	Compositeスコア β (95%CI)
MnBP	-3.32 (-8.23, 1.60)	0.46 (-2.67, 3.59)	-3.32 (-8.23, 1.60)
MEHP	-1.45 (-4.91, 2.02)	-0.84 (-2.02, 3.71)	-2.51 (-7.04, 2.01)
MEHHP	-1.49 (-4.75, 1.83)	0.78 (-1.94, 3.50)	-2.46 (-6.76, 1.83)
MEOHP	-1.37 (-4.78, 4.04)	0.78 (-2.04, 3.60)	-2.37 (-6.82, 2.09)
MiBP	-1.40 (-4.84, 2.04)	1.70 (-1.12, 4.52)	-3.41 (-7.87, 1.04)
MECPP	-1.53 (-5.22, 2.16)	1.58 (-1.45, 4.62)	-3.42 (-8.21, 1.37)
OH-MiNP	-0.97 (-5.76, 3.82)	0.87 (-3.08, 4.82)	-2.03 (-8.29, 4.24)
BPA	-2.59* (-5.50, 0.30)	0.23 (-1.79, 2.26)	-3.11* (-6.82, 0.59)
BPS	-0.75 (-3.39, 1.88)	-0.83 (-2.65, 0.99)	0.08 (-3.28, 3.44)

出産時年齢・妊娠前BMI・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・教育歴・妊娠週数・出生時体重・兄あり・姉ありで調整

*: $p < 0.1$

今回の検討では、男児においてMEHP 濃度とJPSAIのcompositeに正の相関を示した。JPSAIのcompositeスコアは男児において高値を示すことから、脳の性分化は胎児期のアンドロゲン曝露に影響されることが知られており、これまで報告されているフタル酸エステル類の抗アンドロゲン作用を考慮すると(Swan et al. 2010)矛盾のある結果であった。理由は不明であるが、フタル酸エステル類への曝露は注意力に対する問題や多動、社会生活への適応の障害など中枢神経系の発達への影響も指摘されている(Messerlian et al. 2017)。JPSAIは行動の性差のみに着目されて開発された質問票であり、性差とは異なる精神発達の側面への評価が不十分であった可能性は否定できない。また、フタル酸エステル類の中枢神経への作用メカニズムは不明な点があるものの、性ホルモンを介して行われる脳の性分化とは異なるメカニズムを有しているのかもしれない。さらには、中枢神経の発達には妊娠後期も重要な時期であることが知られており、妊娠初期のフタル酸エステル類の曝露は影響が少ない可能性も否定できず、異なる時期の曝露の評価が必要かもしれない。

4) エコチル調査追加調査における出生時身体所見と3歳時の身体所見・JPSAIの関係

①出生時身体所見と3歳時の身体所見の関係

出生時身体所見と3歳時の身体所見813例であった。813例の基本属性を男女別(1)-18に表に示す。

3歳時の2D/4Dと相関を示すのは出生時の2D/4Dのみであった(表(1)-19)。重回帰分析では、男児では右手・左手・両手平均とも有意な相関がみられたが(表(1)-20)、女児では右手・平均のみであった(表(1)-21)。

表(1)-18 出生時身体所見と3歳時の身体所見の関係 (基本属性)

	男児 (n=421)	女児 (n=392)	p
母体情報			
出生時年齢	32.9±4.6	33.1 ±4.6	0.475
妊娠前BMI	21.0±2.7	20.8±2.9	0.373
初産	38.0%	37.0%	0.789
妊娠時喫煙	14.0%	10.0%	0.103
妊娠時飲酒	10.5%	9.2%	0.374
学歴13年以上	71.4%	68.5%	0.409
世帯年収600万以上	27.9%	28.4%	0.350
児情報			
出生週数	39.3±1.3	39.3±1.3	0.985
出生時体重	3172±373	3008±373	<0.0001

表(1)-19 出生時身体所見と3歳時の身体所見の関係 (Spearmanの順位相関係数)

	3歳時					
	男児			女児		
新生児期	右手2D/4D ρ (p)	左手2D/4D ρ (p)	平均2D/4D ρ (p)	右手2D/4D ρ (p)	左手2D/4D ρ (p)	平均2D/4D ρ (p)
右手2D/4D	0.2239* (<0.0001)	0.1929* (<0.0001)	0.2408* (<0.0001)	0.2081* (<0.0001)	0.1222* (0.0159)	0.2008* (<0.0001)
左手2D/4D	0.3042* (<0.0001)	0.2689* (<0.0001)	0.3302* (<0.0001)	0.1868* (0.0002)	0.1112* (0.0286)	0.1764* (0.5385)
平均2D/4D.	0.3186* (<0.0001)	0.2868* (<0.0001)	0.3507* (<0.0001)	0.2448* (<0.0001)	0.1501* (0.0030)	0.2410* (<0.0001)
AGD	0.0061 (0.9011)	0.0017 (0.9718)	-0.0090 (0.8553)	0.0042 (0.9344)	-0.0279 (0.5842)	-0.0171 (0.7383)
AGD/身長	0.0166 (0.7360)	-0.0013 (0.9794)	-0.0009 (0.9846)	0.0114 (0.8224)	-0.0279 (0.5834)	-0.0130 (0.7980)
陰茎長	-0.0031 (0.9498)	-0.0532 (0.2768)	-0.0350 (0.4750)			
陰茎長/身長	0.0103 (0.8339)	-0.0493 (0.3137)	-0.0239 (0.6250)			

*:P<0.05

表(1)-20 出生時身体所見と3歳男児の身体所見の関係 (重回帰分析)

	男児:3歳時調査		
新生児期	右手2D/4D β (95%CI)	左手2D/4D β (95%CI)	平均2D/4D β (95%CI)
右手2D/4D	0.069* (0.021, 0.117)	0.059* (0.012, 0.106)	0.034* (0.025, 0.104)
左手2D/4D	0.100* (0.052, 0.148)	0.09* (0.044, 0.137)	0.095* (0.056, 0.134)
平均2D/4D	0.236* (0.147, 0.325)	0.189* (0.101, 0.277)	0.213* (0.140, 0.286)

出産時年齢・妊娠前BMI・初産・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・教育歴・出生時体重・妊娠週数で調整

*:P<0.05

表(1)-21 出生時身体所見と3歳女児の身体所見の関係 (重回帰分析)

新生児期	女児:3歳時調査		
	右手2D/4D β (95%CI)	左手2D/4D β (95%CI)	平均2D/4D β (95%CI)
右手2D/4D	0.125* (0.040, 0.209)	0.088* (0.007, 0.169)	0.106* (0.038, 0.174)
左手2D/4D	0.06 (-0.026, 0.142)	0.057 (-0.023, 0.138)	0.058 (-0.010, 0.010)
平均2D/4D	0.146* (0.039, 0.254)	0.121* (0.019, 0.223)	0.134* (0.048, 0.220)

出産時年齢・妊娠前BMI・初産・妊娠時喫煙・妊娠時飲酒・教育歴・出生時体重・妊娠週数で調整

*:P<0.05

②出生時身体所見と3歳時のJPSAIの関係

出生時身体所見と3歳時のJPSAIが揃っているのは939例であった。939例の基本属性を男女別に表(1)-22に示す。3歳時のJPSAIと新生児期の身体所見の相関は認められなかった(表(1)-23)。

表(1)-22 出生時身体所見と3歳時のJPSAIの関係 (基本属性)

	男児 (n=501)	女児 (n=438)	p
母体情報			
出生時年齢	32.9±4.5	33.2 ±4.6	0.262
妊娠前BMI	21.0±2.7	20.7±2.7	0.199
初産	38.5%	38.4%	0.969
妊娠時喫煙	14.0%	10.0%	0.103
妊娠時飲酒	10.5%	9.2%	0.374
学歴13年以上	76.3%	77.1%	0.778
世帯年収600万以上	28.7%	33.0%	0.180
児情報			
出生週数	39.3±1.4	39.3±1.2	0.935
出生時体重	3171±380	3008±368	<0.0001
兄あり	33.7%	32.7%	0.768
姉あり	30.0%	28.9%	0.715

表(1)-23 出生時身体所見と3歳時のJPSAIの関係 (Spearmanの順位相関係数)

新生児	3歳時JPSAI					
	男児			女児		
	男性化 スコア ρ (p)	女性化 スコア ρ (p)	Composite スコア ρ (p)	男性化 スコア ρ (p)	女性化 スコア ρ (p)	Composite スコア ρ (p)
右手 2D/4D	0.0393 (0.3809)	-0.0521 (0.2447)	0.0812 (0.0696)	-0.0582 (0.2242)	-0.0164 (0.7329)	-0.0344 (0.4729)
左手 2D/4D	0.0602 (0.1787)	0.0049 (0.9137)	0.0515 (0.2508)	-0.0642 (0.1801)	-0.0721 (0.1317)	-0.0039 (0.9357)
平均 2D/4D	0.0516 (0.2492)	-0.0176 (0.6946)	0.0656 (0.1432)	-0.0723 (0.1307)	-0.0516 (0.2815)	-0.0254 (0.5954)
AGD	-0.0421 (0.3507)	-0.0629 (0.1627)	0.0118 (0.7938)	-0.0198 (0.6825)	0.0617 (0.2018)	-0.0491 (0.3093)
AGD/身長	-0.0398 (0.3778)	-0.0545 (0.2270)	0.0110 (0.8078)	-0.0171 (0.7227)	0.0583 (0.2256)	-0.0426 (0.3758)
陰茎長	0.0836 (0.0624)	0.0085 (0.8495)	0.0547 (0.2234)			
陰茎長/ 身長	0.0846 (0.0592)	0.0140 (0.7550)	0.0550 (0.2204)			

③3歳時の身体所見・JPSAI の関係

3歳時の身体所見・JPSAIが揃っているのは836例であった。836例の基本属性を男女別に表(1)-24に示す。

3歳時のJPSAIは3歳時の2D/4Dとは相関を認めなかった(表(1)-25)。

表(1)-24 3歳時の身体所見・JPSAIの関係 (基本属性)

		男児 (n=433)	女児 (n=403)	p
母体情報				
	出生時年齢	32.9 ± 4.5	33.2 ± 4.7	0.353
	妊娠前BMI	21.0 ± 2.7	20.8 ± 2.8	0.205
	初産	38.7%	36.3%	0.504
	妊娠時喫煙	14.1%	10.0%	0.082
	妊娠時飲酒	12.0%	9.6%	0.291
	学歴13年以上	77.6%	76.4%	0.679
	世帯年収600万以上	30.4%	31.6%	0.710
児情報				
	出生週数	39.3 ± 1.4	39.3 ± 1.3	0.909
	出生時体重	3170 ± 382	3002 ± 381	<0.0001
	兄あり	34.8%	33.7%	0.760
	姉あり	30.1%	30.1%	0.973

表(1)-25 3歳時の身体所見・JPSAIの関係 (Spearmanの順位相関係数)

3歳時 2D/4D	3歳時JPSAI					
	男児			女児		
	男性化 スコア ρ (p)	女性化 スコア ρ (p)	Composite スコア ρ (p)	男性化 スコア ρ (p)	女性化 スコア ρ (p)	Composite スコア ρ (p)
右手2D/4D	0.0596 (0.2164)	0.0364 (0.4501)	0.0289 (0.5498)	0.0218 (0.6628)	-0.0640 (0.1997)	0.0752 (0.1317)
左手2D/4D	-0.0099 (0.8380)	0.0209 (0.6655)	-0.0239 (0.6208)	-0.0548 (0.2722)	-0.0061 (0.9034)	-0.0128 (0.7980)
平均2D/4D	0.0373 (0.4392)	0.0513 (0.2875)	-0.0045 (0.9251)	-0.0103 (0.8374)	-0.0435 (0.3837)	0.0466 (0.3506)

本検討により、2D/4Dは新生児期と3歳時を比較するやや増加するものの相関することが判明した。このような長期的な報告は少なく(Trivers et al. 2006)、特に新生児期からの調査報告は見られておらず貴重な報告であると考えられる。一方で、3歳時のJPSAIの結果は新生児期あるいは3歳時の身体所見と相関しないという結果であった。以前我々が学童期に行った調査では2D/4DとJPSAIの相関は男児においてのみ見られた(Mitsui et al. 2016)。学童期の検討では男児において男性化スコア 34.9 ± 7.0 、女性化スコア 23.4 ± 4.9 、compositeスコア 59.7 ± 8.3 であり、今回の検討での男性化スコア 41.5 ± 7.0 、女性化スコア 32.8 ± 4.9 、compositeスコア 56.7 ± 8.3 とやや異なる値を示している。質問票自体は学童前を主に対象としており、親が児の行動を質問票に沿って回答するにはやや困難があったのかもしれない。

5) 北海道スタディを対象とした妊娠初期母体血化学物質濃度と学童期2D/4Dとの関係

大規模コホート登録者の中から学童期に2D/4Dを測定し、かつ妊娠初期母体血より化学物質の測定を行っていたのは、553名であった。化学物質測定の結果(表(1)-26)と対象者の基本属性(表(1)-27)を示す。化学物質濃度と2D・4Dの関連では女児の左手の2D/4DとBPAに負の相関傾向を認め(表(1)-28)、出産時年齢・喫煙・飲酒・妊娠週数・出生時体重で調整しても $B: -0.2202$ ($-0.4675, 0.0271$), $p=0.081$ であった。

表(1)-26 化学物質の検出率と濃度分布

	MDL*(ng/mL)	検出率	N	パーセンタイル		
				25%	50%	75%
MnBP	0.57	100%	553	30	47	61
MiBP	0.44	99.8%	553	2.0	3.1	4.85
MBzP	0.19	5.6%	553	< MDL	< MDL	< MDL
MEHP	0.31	90.1%	553	0.46	0.95	7.2
MEHHP	0.23	7.4%	553	< MDL	< MDL	< MDL
MECPP	0.11	83.9%	553	0.15	0.24	0.37
cx-MiNP	0.12	0.5%	553	< MDL	< MDL	< MDL
BPA	0.0081	98.6%	553	0.0475	0.086	0.14

*:MDL : Method Detection Limit

表(1)-27 妊娠初期母体血化学物質濃度と学童期2D/4Dの関係（基本属性）

	男児 (n=297)	女児 (n=256)	p
母体情報			
出生時年齢	31.1 ± 4.2	31.0 ± 3.8	0.853
妊娠前体重	52.6 ± 8.0	53.2 ± 8.7	0.430
妊娠時喫煙	27.3%	30.3%	0.409
妊娠時飲酒	12.3%	19.2%	0.027
児情報			
出生週数	39.0 ± 1.2	39.3 ± 1.3	0.003
出生時体重	3128 ± 351	3030 ± 368	0.0015

表(1)-28 妊娠初期母体血化学物質濃度と学童期2D/4Dの関係（Spearmanの順位相関係数）

	男児			女児		
	右手2D/4D	左手2D/4D	平均2D/4D	右手2D/4D	左手2D/4D	平均2D/4D
	ρ (p)	ρ (p)	ρ (p)	ρ (p)	ρ (p)	ρ (p)
MnBP	-0.0331 (0.5699)	-0.0888 (0.1266)	-0.0711 (0.2216)	0.0386 (0.5391)	-0.0143 (0.8197)	0.0160 (0.7987)
MiBP	-0.0283 (0.6273)	-0.1121 (0.0536)	-0.0811 (0.1635)	0.0317 (0.6141)	-0.0572 (0.3617)	-0.0105 (0.8667)
MEHP	-0.0214 (0.7136)	-0.0093 (0.8730)	-0.0307 (0.5981)	0.0658 (0.2943)	0.0804 (0.1999)	0.0721 (0.2506)
MECPP	-0.0653 (0.2623)	-0.0115 (0.8429)	-0.0498 (0.3925)	0.0414 (0.5097)	0.0472 (0.4519)	0.0437 (0.4862)
BPA	-0.0924 (0.1121)	0.0566 (0.3309)	-0.0176 (0.7623)	0.0474 (0.4506)	-0.1050* (0.0936)	-0.0214 (0.7335)

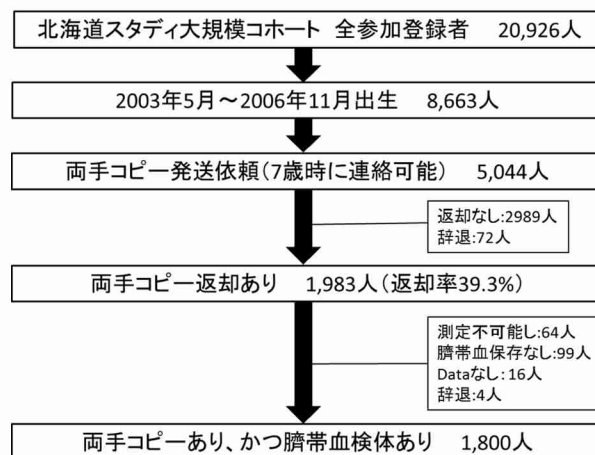
*: p < 0.1

妊娠初期母体尿におけるOH-MiNPと3歳時の男児右手2D/4Dに相関がみられたのに対して、妊娠初期母体血を用いて学童期の2D/4Dと比較した検討では、明らかな相関は認められなかった。新生児期と3歳時の2D/4Dに相関があったことから学童期にも同様に新生児期と3歳時と相関がえられることは想像に難くない。しかしながら妊娠初期母体尿と母体血では2D/4Dに対する影響として異なる結果を示した理由としては、フタル酸エステル類は代謝が早いことから曝露に対する影響を異なる形で示す可能性が考えられる。その相違が3歳時と学童期の差異になった可能性が考えられた。

6) 北海道スタディを対象としたESR1遺伝子一塩基多型と学童期2D/4Dとの関係

大規模コホート登録者の中から2003年5月から2006年11月までに出生した児8663人を抽出し、7歳時に連絡可能な5044人に両手コピーの発送依頼を行い1983人から返却を得た（返却率39.3%）。最終的に遺伝子解析用臍帯血が保管され、かつ両手コピーのある1800人を解析対象とした。（図(1)-11）

妊娠前BMI・出産回数・世帯年収・最終学歴・妊娠初期喫煙および飲酒などの母の情報を妊娠初期の自記式調査票から、出産時年齢・出生週数・出生体重・児の性別などの情報は出産時診療記録から得た。



図(1)-11 対象者の抽出方法

(1) 母児の基本的特徴と平均2D:4D

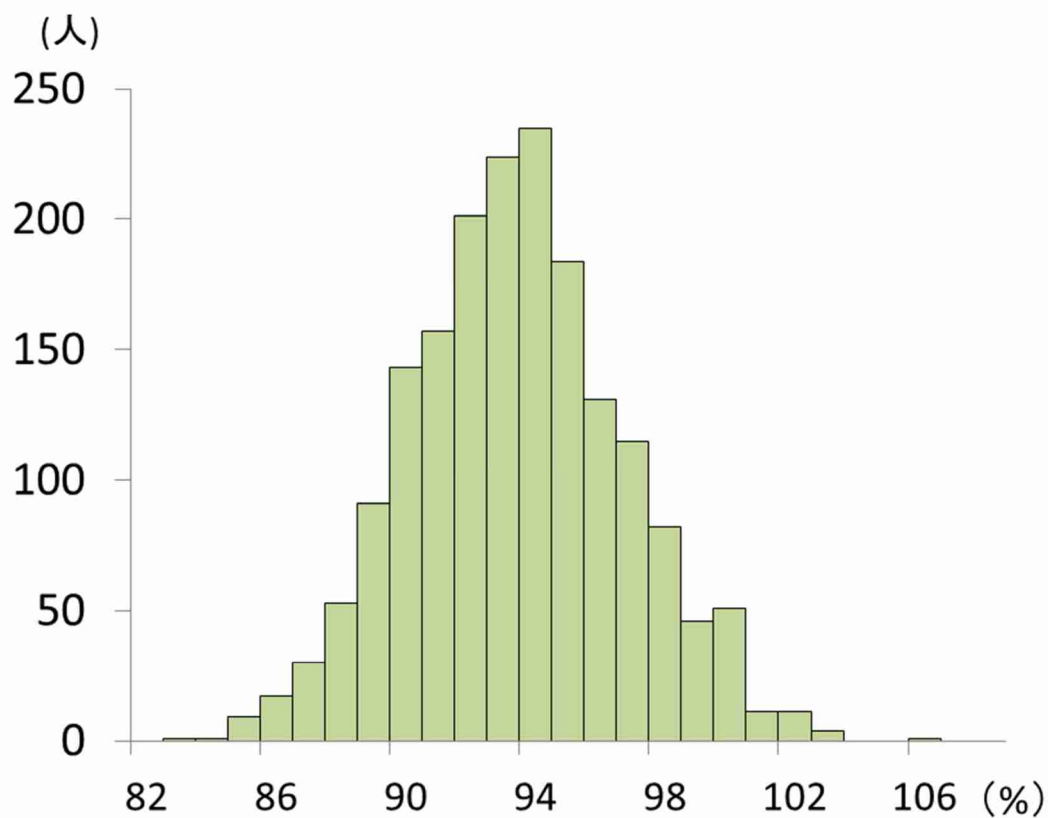
母児の基本的特徴を表(1)-29に示す。男児926人・女児874人で、性分化疾患や尿道下裂・停留精巣症例は含まれていなかった。出生体重のみ男女間に有意差を認めた(3103±363g vs. 2991±370g; $p<0.001$)。

表(1)-29 母児の特徴

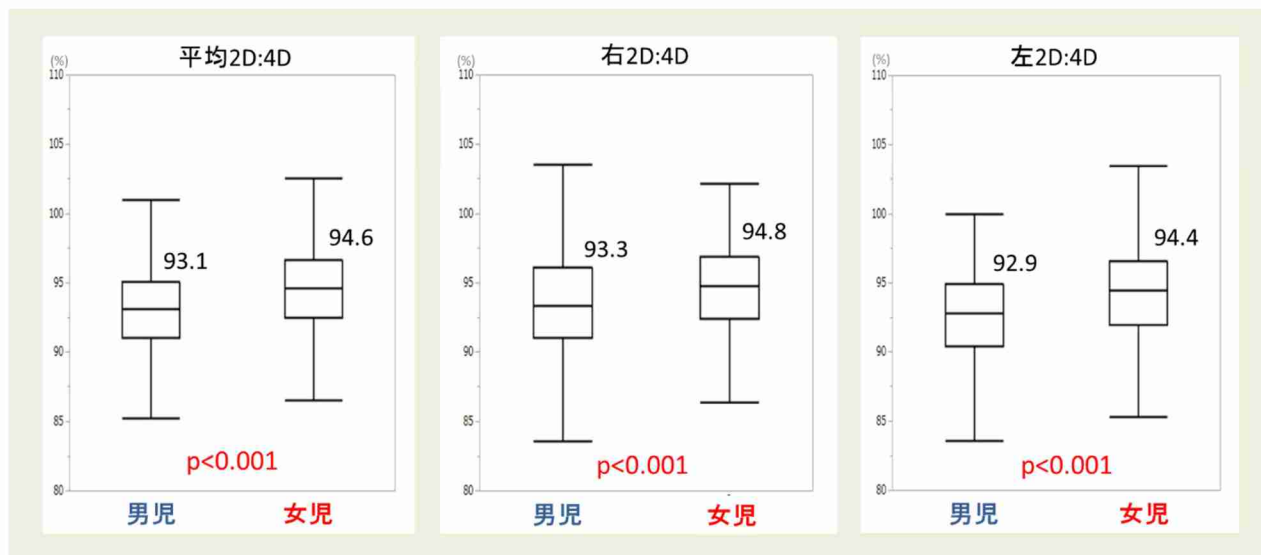
特徴		全員 (1800人) N (%) or 平均±SD	男児 (926人) N (%) or 平均±SD	女児 (874人) N (%) or 平均±SD
母情報				
出産時年齢		31.2±4.3	31.1±4.4	31.2±4.2
妊娠前 BMI (kg/m ²)		21.0±3.0	21.0±2.3	21.0±3.1
出産歴	あり	796 (44.2)	417 (45.0)	379 (43.4)
	なし	936 (52.0)	479 (51.7)	457 (52.3)
	不明	68 (3.8)	30 (3.3)	38 (4.4)
世帯年収	300万円未満	257 (14.3)	137 (14.8)	120 (13.7)
	300～499万円	706 (39.2)	358 (38.7)	348 (39.8)
	500～799万円	426 (23.7)	216 (23.3)	210 (24.0)
	800万円以上	157 (8.7)	87 (9.4)	70 (8.0)
	不明	254 (14.1)	128 (13.8)	126 (14.4)
学歴	中学卒	33 (1.8)	19 (2.1)	14 (1.6)
	高校卒	643 (35.7)	341 (36.7)	302 (34.6)
	短大・専門学校卒	839 (46.6)	419 (45.3)	420 (48.1)
	大学卒(大学院含む)	220 (12.2)	118 (12.7)	102 (11.7)
	その他	2 (0.1)	1 (0.1)	1 (0.1)
	不明	63 (3.5)	28 (3.0)	35 (4.0)
妊娠初期飲酒	あり	988 (54.9)	521 (56.3)	467 (53.4)
	なし	471 (26.2)	234 (25.3)	237 (27.1)
	不明	341 (18.9)	171 (18.5)	170 (19.5)
妊娠初期喫煙	あり	1446 (80.3)	753 (81.3)	693 (79.3)
	なし	278 (15.4)	137 (14.8)	141 (16.1)
	不明	76 (4.2)	36 (3.9)	40 (4.6)
児情報				
性別	男	926 (51.4)		
	女	874 (48.6)		
出生時体重		3049±374	3103±363	2991±370
在胎週数		38.8±1.4	38.8±1.3	38.9±1.4

(2) 2D/4Dの分布

参加者全員の平均2D/4Dは正規分布を示した(図(1)-12)。男女別には平均および左右2D:4Dとも男児が女児より有意に低値(平均: 93.2 vs. 94.6, 右: 93.5 vs. 94.9, 左: 92.9 vs. 94.4, いずれも $p<0.001$)であった(図(1)-13)。



図(1)-12 全員の平均2D/4Dの分布



箱内の水平線：中央値 箱：四分位範囲 ひげ線：最大値および最小値

図(1)-13 2D/4Dの男女間の比較

(3) *ESR1*遺伝子一塩基多型解析結果

*ESR1*遺伝子一塩基多型の遺伝子保有割合の結果を表(1)-30に示す。各*ESR1*遺伝子一塩基多型における遺伝子型の男女間の保有割合に関しては有意な差は認めなかった。

表(1)-30 *ESRI*遺伝子一塩基多型解析結果

特徴	全員 (1800人) N (%)	男児 (926人) N (%)	女児 (874人) N (%)	p 値
<i>PvuII</i> (rs2234693)				
TT	574 (31.9)	282 (30.5)	292 (33.4)	0.298
TC	893 (49.6)	463 (50.0)	430 (49.2)	
CC	333 (18.5)	181 (19.5)	152 (17.4)	
TT/TC	1467 (81.5)	745 (80.5)	722 (82.6)	
TC/CC	1226 (68.1)	644 (69.5)	582 (66.6)	
<i>XbaI</i> (rs9340799)				
AA	1185 (65.8)	617 (66.6)	568 (65.0)	0.412
AG	563 (31.3)	279 (30.1)	284 (32.5)	
GG	52 (2.9)	30 (3.2)	22 (2.5)	
AA/AG	1748 (97.1)	896 (96.8)	852 (97.5)	
AG/GG	615 (34.2)	309 (33.4)	306 (35.0)	
rs2077647				
AA	620 (34.4)	297 (32.1)	323 (37.0)	0.073
AG	889 (49.4)	479 (51.7)	410 (46.9)	
GG	291 (16.2)	150 (16.2)	141 (16.1)	
AA/AG	1509 (83.8)	776 (83.8)	733 (83.9)	
AG/GG	1180 (65.6)	629 (67.9)	551 (63.0)	

(4) *ESRI*遺伝子一塩基多型と2D/4Dとの関連

各*ESRI*遺伝子一塩基多型と2D/4Dとの関連を表(1)-31・32・33に示す。全員における平均2D/4Dにおいて、*XbaI*遺伝子型をAG/GG型とGG型に分けて検討すると(劣性遺伝モデル)、GG型の児はAG/GG型の児と比較して有意に平均2D/4Dが低かった(-0.557%; 95%CI: -1.036, -0.078)。次に左右2D/4Dで比較すると、右2D/4DにおいてGG型の児はAG/GG型の児と比較して有意に低かった(-0.788%; 95%CI: -1.334, -0.238)。さらに右2D/4Dを児の性別で層別すると、特に男児ではAG/GG型と比較してGG型は有意に右2D/4Dの低下を認めた(-0.856%; 95%CI: -1.571, -0.141)。図(1)-14に*XbaI*劣性遺伝モデルと右2D/4Dとの関連を示した。女児ではAG/GG型と比較してGG型は右2D/4Dの低い傾向を認めたが、有意な差は得られなかった。*PvuII*およびrs2077647では2D/4Dとの有意な関連は認めなかった。

表(1)-31 *PvuII*と2D/4Dとの関連

遺伝子型	全員 (1800人) ^a	男児 (926人) ^b	女児 (874人) ^b
	β (95%CI)	β (95%CI)	β (95%CI)
平均2D/4D			
遺伝子型			
TT	Reference	Reference	Reference
TC	0.027 (-0.194, 0.248)	0.164 (-0.135, 0.462)	-0.133 (-0.462, -0.196)
CC	-0.043 (-0.324, 0.238)	-0.300 (-0.669, 0.069)	0.272 (-0.162, 0.0.704)
優性遺伝モデル			
TT	Reference	Reference	Reference
TC/CC	-0.014 (-0.177, 0.168)	-0.054 (-0.294, 0.185)	0.053 (-0.196, 0.302)
劣性遺伝モデル			
TT/TC	Reference	Reference	Reference
CC	-0.033 (-0.243, 0.177)	-0.227 (-0.501, 0.048)	0.203 (-0.120, 0.527)
右2D/4D			
遺伝子型	Reference	Reference	Reference
TT			
TC	0.166 (-0.087, 0.419)	0.300 (-0.041, 0.642)	-0.014 (-0.365, 0.394)
CC	-0.155 (-0.478, 0.168)	-0.368 (-0.790, 0.055)	0.103 (-0.396, 0.602)
優性遺伝モデル			
TT	Reference	Reference	Reference
TC/CC	0.045 (-0.153, 0.243)	0.017 (-0.256, 0.293)	0.077 (-0.210, 0.363)
劣性遺伝モデル			
TT/TC	Reference	Reference	Reference
CC	-0.125 (-0.366, 0.116)	-0.289 (-0.604, 0.026)	0.072 (-0.301, 0.445)
左2D/4D			
遺伝子型			
TT	Reference	Reference	Reference
TC	-0.102 (-0.362, 0.157)	0.035 (-0.323, 0.393)	-0.269 (-0.648, -0.110)
CC	0.063 (-0.267, 0.393)	-0.237 (-0.680, 0.205)	0.435 (-0.063, 0.933)
優性遺伝モデル			
TT	Reference	Reference	Reference
TC/CC	-0.047 (-0.234, 0.140)	-0.124 (-0.410, 0.163)	0.035 (-0.252, 0.3221)
劣性遺伝モデル			
TT/TC	Reference	Reference	Reference
CC	0.152 (-0.071, 0.375)	-0.168 (-0.498, 0.161)	0.330 (-0.042, 0.703)

^a: 児の性別、出生体重、妊娠初期飲酒および喫煙で調整した重回帰分析^b: 出生体重、妊娠初期飲酒および喫煙で調整した重回帰分析 β (95%CI) : referenceグループと比較したときの2D/4Dの変化

表 (1)-32 *XbaI* と 2D/4D との関連

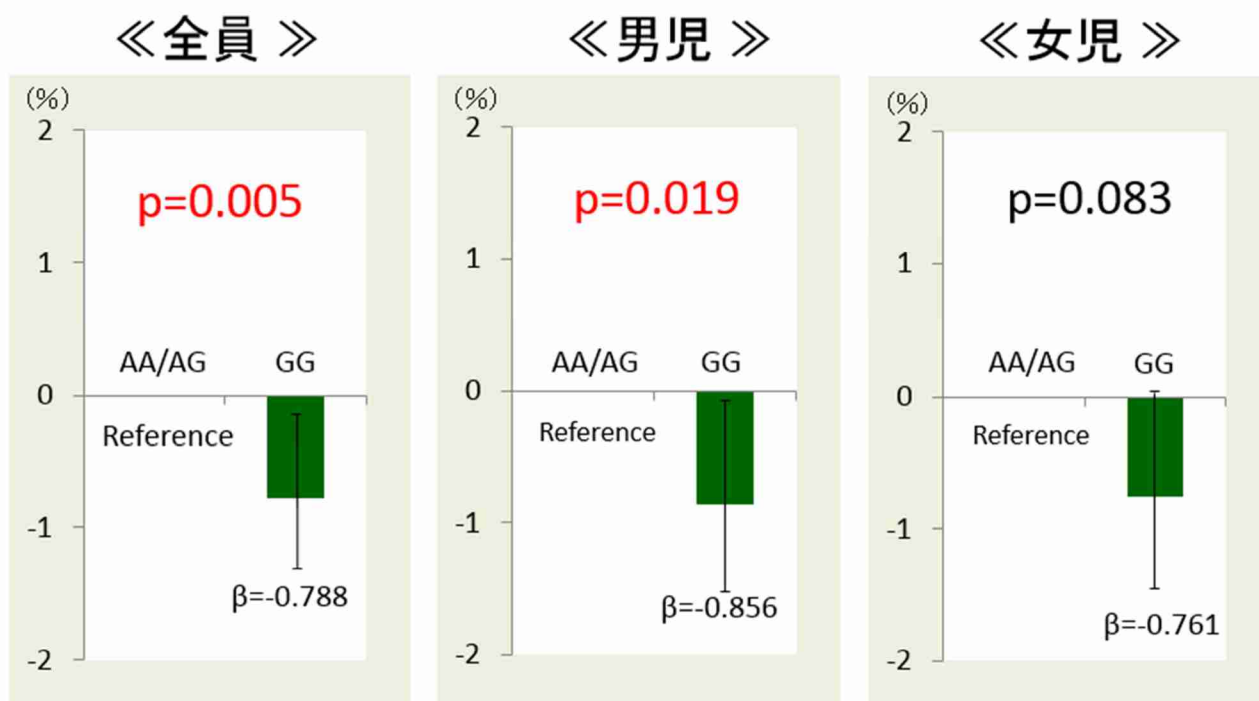
遺伝子型	全員 (1800人) ^a β (95%CI)	男児 (926人) ^b β (95%CI)	女児 (874人) ^b β (95%CI)
平均2D/4D			
遺伝子型			
AA	Reference	Reference	Reference
AG	0.412 (0.035, 0.789)*	0.321 (-0.179, 0.821)	0.559 (-0.017, 1.134)
GG	-0.752 (-1.392, -0.112)*	-0.767 (-1.602, 0.068)	-0.825 (-1.822, 0.172)
優性遺伝モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG/GG	-0.016 (-0.188, 0.156)	-0.117 (-0.353, 0.199)	0.092 (-0.159, 0.344)
劣性遺伝モデル			
AA/AG	Reference	Reference	Reference
GG	-0.557 (-1.036, -0.078)*	-0.588 (-1.212, 0.036)	-0.591 (-1.337, 0.155)
右2D/4D			
遺伝子型			
AA	Reference	Reference	Reference
AG	0.623 (0.199, 1.064)**	0.642 (0.069, 1.215)*	0.662 (-0.001, 1.325)
GG	-1.075 (-1.810, -0.340)**	-1.158 (-2.115, -0.202)*	-1.049 (-2.197, 0.099)
優性遺伝モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG/GG	0.018 (-0.179, 0.216)	-0.027 (-0.298, 0.243)	0.071 (-0.218, 0.360)
劣性遺伝モデル			
AA/AG	Reference	Reference	Reference
GG	-0.788 (-1.334, -0.238)*	-0.856 (-1.571, -0.141)*	-0.761 (-1.62, 0.099)
左2D/4D			
遺伝子型			
AA	Reference	Reference	Reference
AG	0.198 (-0.246, 0.642)	-0.002 (-0.603, 0.598)	0.471 (-0.193, 1.135)
GG	-0.434 (-1.189, 0.32)	-0.380 (-1.382, 0.622)	-0.608 (-1.758, 0.541)
優性遺伝モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG/GG	-0.047 (-0.25, 0.155)	-0.211 (-0.494, 0.072)	0.125 (-0.164, 0.414)
劣性遺伝モデル			
AA/AG	Reference	Reference	Reference
GG	-0.329 (-0.893, 0.235)	-0.324 (-1.073, 0.426)	-0.425 (-1.285, 0.435)

^a: 児の性別、出生体重、妊娠初期飲酒および喫煙で調整した重回帰分析^b: 出生体重、妊娠初期飲酒および喫煙で調整した重回帰分析 β (95%CI) : referenceグループと比較したときの2D/4Dの変化* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

表(1)-33 rs2077647と2D/4Dとの関連

遺伝子型	全員 (1800人) ^a β (95%CI)	男児 (926人) ^b β (95%CI)	女児 (874人) ^b β (95%CI)
平均2D/4D			
遺伝子型			
AA	Reference	Reference	Reference
AG	0.063 (-0.160, 0.287)	0.295 (-0.006, 0.597)	-0.196 (-0.528, 0.136)
GG	-0.054 (-0.346, 0.238)	-0.360 (-0.753, 0.032)	0.291 (-0.145, 0.727)
優性遺伝モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG/GG	0.021 (-0.148, 0.191)	0.032 (-0.204, 0.268)	0.011 (-0.234, 0.255)
劣性遺伝モデル			
AA/AG	Reference	Reference	Reference
GG	-0.044 (-0.262, 0.175)	-0.283 (-0.576, 0.010)	0.221 (-0.106, 0.547)
右2D/4D			
遺伝子型			
AA	Reference	Reference	Reference
AG	0.187 (-0.0691, 0.444)	0.362 (0.016, 0.708)	-0.009 (-0.392, 0.374)
GG	-0.177 (-0.513, 0.158)	-0.414 (-0.864, 0.036)	0.086 (-0.417, 0.589)
優性遺伝モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG/GG	0.053 (-0.142, 0.247)	0.057 (-0.213, 0.328)	0.045 (-0.236, 0.327)
劣性遺伝モデル			
AA/AG	Reference	Reference	Reference
GG	-0.141 (-0.392, 0.110)	-0.327 (-0.663, 0.009)	0.067 (-0.314, 0.439)
左2D/4D			
遺伝子型			
AA	Reference	Reference	Reference
AG	-0.052 (-0.315, 0.211)	0.236 (-0.127, 0.598)	-0.372 (-0.753, 0.010)
GG	0.064 (-0.279, 0.408)	-0.311 (-0.782, 0.160)	0.490 (-0.011, 0.991)
優性遺伝モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG/GG	-0.005 (-0.204, 0.195)	0.011 (-0.272, 0.294)	-0.018 (-0.299, 0.263)
劣性遺伝モデル			
AA/AG	Reference	Reference	Reference
GG	0.050 (-0.207, 0.307)	-0.242 (-0.594, 0.110)	0.374 (-0.015, 0.749)

^a: 児の性別、出生体重、妊娠初期飲酒および喫煙で調整した重回帰分析^b: 出生体重、妊娠初期飲酒および喫煙で調整した重回帰分析 β (95%CI) : referenceグループと比較したときの2D:4Dの変化



棒線 (95%CI) : AA/AG型と比較したときのGG型の右2D/4Dの変化

図(1)-14 *XbaI*と右2D/4D(劣性遺伝モデル)

本研究は*ESR1*遺伝子一塩基多型と子供の2D/4Dとの関連を検討した初めての報告である。2D/4Dとの関連を認めた*ESR1* 遺伝子一塩基多型は*XbaI*(rs9340799)であり、*XbaI*劣性遺伝モデルにおいてGG型男児の右2D/4DがAA/AG型男児と比較して有意に低かった。*XbaI*のAアレルでER α の活性化が報告されており(Maruyama et al. 2000)、Aアレルを保持する児と比較するとGG型の児においてER α 活性が低いため、ER α による指長抑制作用の減弱やARによる伸長作用の相対的な増強により、2D/4Dが低下したと考えられる。また身体の男性化(2D/4Dや精巣サイズ)は右側により強く発現することが報告されており、本研究においても男児右手において遺伝子多型の影響が顕著となった可能性が考えられた。今後環境化学物質曝露の影響を検討するには*ESR1*遺伝子一塩基多型を考慮する必要があると考えられた。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

胎児期の環境要因が生後の身体的性分化・脳の性分化について経時的に詳細に分析した研究は国際的にも非常に少ない。本研究では、現時点では最も精度の高いと考えられるLC-MSMSを用いた分析による曝露評価により妊娠中のBPAやフタル酸エステル類など環境化学物質曝露の測定を行うことで出生時の身体所見や脳の性分化への影響を解明することが可能であった。さらに本検討により児における*ESR1*遺伝子一塩基多型と身体的性分化の指標である2D/4Dとの関連を初めて明らかにした。今後胎児期の環境化学物質曝露による身体的性分化への影響について評価する際、遺伝的素因により層別化したリスク評価が必要であることが示された。今後さらなる検討は必要であるが、本研究の結果からは、母へのビスフェノール類・フタル酸エステル類曝露は胎児の身体的および脳の性分化へ影響を与えること、その影響は遺伝子多型により修飾される可能性があることが示唆された。今後は胎児期の化学物質曝露の身体的性分化や脳の性分化への影響と、遺伝子多型に基づく影響の差異を検討することによりハイリスク群の存在の有無についての検討が必要である。

(2) 環境政策への貢献

本研究で実施したビスフェノール類、フタル酸エステル類の曝露測定結果から、国内の妊婦のビスフェノール類、フタル酸エステル類への曝露実態に関する貴重なデータを提供した。特にフタル酸エステル類は、10種類の代謝物の測定を実施し、曝露実態を明らかにした。即ち、本研究は日本の妊婦や児のデータに基づく科学的な成果を提供できるものと考ええる。フタル酸エステル類は、DEHPが油性食品に接触する器具および包装容器に、また6種類の化合物（DEHP, DBP, BBzP, DINP, DIDP, DNOP）が乳幼児の玩具への使用が規制されている。このような規制はあるが、我が国の妊婦がDnBP、DiBPおよびDEHPに曝露されていることが明らかになった。さらに、妊娠初期のビスフェノール類、フタル酸エステル類曝露が、子どもの身体的および脳の性分化に影響を与えている可能性を示したこと、遺伝子多型も性分化へ影響を与える要素であり、化学物質曝露の影響を修飾する可能性があることを示した。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

WHOから出された「State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012」では、組織や臓器の発達を阻害する環境化学物質である内分泌かく乱化学物質(EDCs)についてグローバルな対策が必要とされている。さらに、2012年の第3回国際化学物質管理会議ではEDCsを国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチの新規政策課題に挙げており、特にヒトの疫学データが少ない性分化や性成熟、次世代影響を研究、評価することは緊急の課題であり、その対策に直結する。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Mitsui T., Araki A., Goudarzi H., Miyashita C., Ito S., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.; Relationship between adrenal steroid hormones in cord blood and birth weight: The Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Children's Health. American Journal of Human Biology. 2018.
- 2) A. Araki, C. Miyashita, T. Mitsui, H. Goudarzi, F. Mizutani, Y. Chisaki, S. Itoh, S. Sasaki, K. Cho, K. Moriya, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi. Prenatal organochlorine pesticide exposure and the disruption of steroids and reproductive hormones in cord blood: The Hokkaido study. Environ Int, 110, 1-13, 2018
- 3) M. Minatoya, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, S. Itoh, J. Yamamoto, T. Matsumura, T. Mitsui, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, H. Minakami, N. Shinohara, R. Kishi; Cord blood bisphenol A levels and reproductive and thyroid hormone levels of neonates: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health., Epidemiology, 1, S3-S9, 2017
- 4) A. Araki, T. Mitsui, H. Goudarzi, T. Nakajima, C. Miyashita, S. Itoh, S. Sasaki, K. Cho, K. Moriya, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi; Prenatal di(2-ethylhexyl) phthalate exposure and disruption of adrenal androgens and glucocorticoids levels in cord blood: The Hokkaido

Study. Science of the Total Environment, vol.581-582: 297-304, 2017

- 5) S. Itoh, A. Araki, T. Mitsui, C. Miyashita, H. Goudarzi, S. Sasaki, K. Cho, H. Nakazawa, Y. Iwasaki, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi; Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Environmental International, 94:51-59, 2016
- 6) H. Goudarzi, A. Araki, S. Itoh, S. Sasaki, C. Miyashita, T. Mitsui, H. Nakazawa, K. Nonomura, R. Kishi; The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study. Environ Health Perspect; DOI:10.1289/EHP142, 2016
- 7) Mitsui T., Araki A., Miyashita C., Ito S., Ikeno T., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.; The Relationship between the Second-to-Fourth Digit Ratio and Behavioral Sexual Dimorphism in School-Aged Children. PLoS One. 11 (1):e0146849, 2016.
- 8) Mitsui T., Araki A., Goudarzi H., Miyashita C., Ito S., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Shinohara N., Takeda M., Nonomura K.; Effects of adrenal androgens during the prenatal period on the second to fourth digit ratio in school-aged children. Steroids. 113 46-51, 2016.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) K. Morioka, K. Cho, Itaru Hayasaka, Y. Uzuki, Y. Kaneshi, T. Akimoto, A. Moriichi, T. Mitsui, T. Kitta, K. Moriya, A. Imai, S. Sato, N. Shinohara, A. Araki, C. Miyashita, S. Ito, R. Kishi, K. Nonomura, T. Ariga, H. Minakami. "Effect of maternal factors on anogenital distance and penile length of newborn infants: adjunct study of Japan Environment and Children's Study (JECS)." Hot Topics in Neonatology 2015, Washington D.C., USA, 2015
- 2) T. Mitsui, A. Araki, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, N. Shinohara, M. Takeda, K. Nonomura "Effect of adrenal androgens during prenatal periods in the second to fourth digit ratio in school-aged children" 31th EAU, Munich, Germany, 2016
- 3) 森岡圭太、長和俊、早坂格、卯月ゆたか、秋元琢真、兼次洋介、盛一享徳、水上尚典：「母体因子が新生児の性分化に与える影響」 第 52 回日本周産期・新生児医学会、富山、2016 年 7 月 16-18 日
- 4) 三井貴彦、荒木敦子、伊藤佐智子、宮下ちひろ、橘田岳也、守屋仁彦、長和俊、森岡圭太、篠原信雄、岸玲子、野々村克也 胎児期における男性ホルモンへの曝露が小児期の脳の性分化に与える影響について 第103回日本泌尿器科学会総会 金沢 2015年4月18日—21日
- 5) 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、篠原信雄、野々村克也 胎児期における男性ホルモンへの曝露が学童期の脳の性分化に与える影響について 第24回日本小児泌尿器科学会、東京 2015年7月1日—3日
- 6) 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、武田正之、篠原信雄、野々村克也 胎児期における男性ホルモンへの曝露が学童期の脳の性分化に与える影響について：2D/4Dと性役割行動との関係 第80回日本

泌尿器科学会東部総会、東京、2015年 9月25日（金）～27日（日）

- 7) 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、篠原信雄、武田正之、野々村克也 胎児期ホルモン環境が身体的変化に与える影響：第2指：第4指比と性ステロイドホルモンとの関係について 第104回日本泌尿器科学会総会 仙台 2016年4月23日～25日
- 8) 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、篠原信雄、武田正之、野々村克也 胎児期ホルモン環境が出生時体重に与える影響 第105回日本泌尿器科学会総会 鹿児島 2017年4月21日～24日

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 市民講演会「北海道の子ども取り巻く環境と健康 ～2万人の調査から～」
（平成30年2月15日、札幌エルプラザ、観客約45名）
- 2) 市民講演会「環境が与えるこどもへの影響～北海道スタディとエコチル調査からわかったこと～」
（平成29年2月23日、札幌市かでの2.7、観客約47名）
- 3) 市民講演会「環境が与えるこどもへの影響～北海道スタディとエコチル調査からわかったこと～」
（平成28年3月14日、札幌エルプラザ、観客約45名）

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Nakajima T, Naito H, Ito S, et al. 2014. Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood: The hokkaido study on environment and children's health. PloS one 9:e109039.
- 2) Barrett ES, Parlett LE, Sathyanarayana S, Liu F, Redmon JB, Wang C, et al. 2013. Prenatal exposure to stressful life events is associated with masculinized anogenital distance (agd) in female infants. Physiology & behavior 114-115:14-20.
- 3) Brouwers MM, Feitz WF, Roelofs LA, Kiemeny LA, de Gier RP, Roeleveld N. 2007. Risk factors for hypospadias. European journal of pediatrics 166:671-678.
- 4) Buttke DE, Sircar K, Martin C. 2012. Exposures to endocrine-disrupting chemicals and age of menarche in adolescent girls in nhanes (2003-2008). Environmental health perspectives 120:1613-1618.
- 5) Cao Y, Winneke G, Wilhelm M, Wittsiepe J, Lemm F, Furst P, et al. 2008. Environmental exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls reduce levels of gonadal hormones in newborns: Results from the duisburg cohort study. Int J Hyg Environ Health 211:30-39.
- 6) Chou YY, Huang PC, Lee CC, Wu MH, Lin SJ. 2009. Phthalate exposure in girls during early puberty. Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM 22:69-77.
- 7) Dostal LA, Chapin RE, Stefanski SA, Harris MW, Schwetz BA. 1988. Testicular toxicity and reduced sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl)phthalate and the recovery of fertility as adults. Toxicology and applied pharmacology 95:104-121.
- 8) Ferguson KK, Peterson KE, Lee JM, Mercado-Garcia A, Blank-Goldenberg C, Tellez-Rojas MM, et

- al. 2014. Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol a in relation to sex hormones and puberty in boys. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY) 47:70–76.
- 9) Fowler PA, Bhattacharya S, Flannigan S, Drake AJ, O'Shaughnessy PJ. 2011. Maternal cigarette smoking and effects on androgen action in male offspring: Unexpected effects on second-trimester anogenital distance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:E1502–1506.
- 10) Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC. 2009. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environment international* 35:14–20.
- 11) Itoh S, Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Goudarzi H, Sasaki S, et al. 2016. Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the hokkaido study on environment and children's health. *Environment international* 94:51–59.
- 12) Jensen MS, Toft G, Thulstrup AM, Bonde JP, Olsen J. 2007. Cryptorchidism according to maternal gestational smoking. *Epidemiology* (Cambridge, Mass) 18:220–225.
- 13) Jensen TK, Jorgensen N, Punab M, Haugen TB, Suominen J, Zilaitiene B, et al. 2004. Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced semen quality and testis size in adulthood: A cross-sectional study of 1,770 young men from the general population in five european countries. *American journal of epidemiology* 159:49–58.
- 14) Li LH, Jester WF, Jr., Laslett AL, Orth JM. 2000. A single dose of di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decreases cyclin d2 expression. *Toxicology and applied pharmacology* 166:222–229.
- 15) Lin LC, Wang SL, Chang YC, Huang PC, Cheng JT, Su PH, et al. 2011. Associations between maternal phthalate exposure and cord sex hormones in human infants. *Chemosphere* 83:1192–1199.
- 16) Lomenick JP, Calafat AM, Melguizo Castro MS, Mier R, Stenger P, Foster MB, et al. 2010. Phthalate exposure and precocious puberty in females. *The Journal of pediatrics* 156:221–225.
- 17) Maruyama H, Toji H, Harrington CR, Sasaki K, Izumi Y, Ohnuma T, et al. 2000. Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with alzheimer disease. *Archives of neurology* 57:236–240.
- 18) McGuinn LA, Ghazarian AA, Joseph Su L, Ellison GL. 2015. Urinary bisphenol a and age at menarche among adolescent girls: Evidence from nhanes 2003–2010. *Environmental research* 136:381–386.
- 19) Messerlian C, Bellinger D, Minguez-Alarcon L, Romano ME, Ford JB, Williams PL, et al. 2017. Paternal and maternal preconception urinary phthalate metabolite concentrations and child behavior. *Environmental research* 158:720–728.
- 20) Minatoya M, Naka Jima S, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Ikeno T, et al. 2016. Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The hokkaido study on environment and children's health. *The Science of the total environment* 565:1037–1043.
- 21) Mitsui T, Araki A, Miyashita C, Ito S, Ikeno T, Sasaki S, et al. 2016. The relationship between the second-to-fourth digit ratio and behavioral sexual dimorphism in school-aged children. *PloS one* 11:e0146849.
- 22) Phillips KP, Tanphaichitr N. 2008. Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews* 11:188–220.
- 23) Swan SH, Liu F, Hines M, Kruse RL, Wang C, Redmon JB, et al. 2010. Prenatal phthalate exposure and reduced masculine play in boys. *International journal of andrology* 33:259–269.
- 24) Trivers R, Manning J, Jacobson A. 2006. A longitudinal study of digit ratio (2d:4d) and other

finger ratios in jamaican children. *Hormones and behavior* 49:150–156.

- 25) Wolff MS, Teitelbaum SL, Pinney SM, Windham G, Liao L, Biro F, et al. 2010. Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environmental health perspectives* 118:1039–1046.

Ⅱ－２ 第二次性徴発来に及ぼす影響の解明

サブテーマ代表

北海道大学 環境健康科学研究教育センター : 岸 玲子

研究分担者

北海道大学 環境健康科学研究教育センター : 荒木 敦子

北海道大学 環境健康科学研究教育センター : 宮下 ちひろ

北海道大学 環境健康科学研究教育センター : 伊藤 佐智子

研究協力者

北海道大学 環境健康科学研究教育センター : 小林 澄貴

平成27～29年度累計予算額：35,740千円（うち平成29年度：10,600千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

近年、合成化学物質の生産量が増加するに伴い、環境からの曝露による生殖機能への影響が注目されている。ビスフェノールA（BPA）やフタル酸エステル類は、生体内での代謝スピードは速いものの、日用品に含まれることから常に恒常的に曝露されると考えられている。これら物質に曝露することによって、生殖機能に与える影響が指摘されているが、ヒトを対象とした疫学研究は少なく、その詳細は明らかになっていない。加えて、これまで用いられてきたフタル酸エステル類に代わり、新たな物質が増加傾向にあるが、それらの影響についても検討されていない。そこで本研究では、胎児期の短半減期環境化学物質（ビスフェノールA（BPA）、フタル酸エステル類）の曝露実態を明らかにし、胎児期曝露が、児の性腺機能、特に出生時の性ホルモン濃度と第二次性徴発来時期に与える影響を明らかにすることを目的とした。

本研究は2001年に開始した出生コホート「北海道スタディ」の2つのコホートを用いて実施した。札幌コホートでは、研究期間内に12-14歳を迎える児329人に調査票を送付してTanner分類に基づき男女それぞれ3つの指標を用いて第二次性徴調査を実施し、150件の回答を得た。すでに測定済のBPAおよびMEHPの胎児期曝露濃度と第二次性徴開始時期に与える影響の検討を行ったところ、臍帯血中MEHP濃度が高くなると、男児において第二次性徴開始月齢が遅く、個別の指標では身長スパークが遅かった。女児では、臍帯血中MEHP濃度が高くなると、胸のふくらみ開始が有意に遅かった。北海道大規模コホートでは、研究期間内に9-13歳を迎える3679名に調査票を送付して札幌コホート同様に男女それぞれ3つの指標を用いて第二次性徴調査を実施し、1560件の回答を得た。また、すでに臍帯血中性ホルモン濃度のデータがある900件のうち、妊娠初期母体血が保存されている648件についてBPAと7種類のフタル酸エステル類代謝物を測定した。その結果、本研究ではDEHPの一次代謝物であるMEHPは1.1ng/mLで先行研究より血中濃度が低い、DnBP、DiBPの一次代謝物であるMnBPが47.0ng/mL、MiBPが3.4ng/mLであり、先行研究より高レベルであった。妊娠初期母体血中BPAと各フタル酸エステル類代謝物が臍帯血中性ホルモン濃度に与える影響の検討を重回帰分析で行った結果、男児でMiBP濃度とインヒビンBに正の相関とが認められた。女児でMnBPとエストラジオールE2に正の相関、MnBPおよびMiBP濃度とテストステロン/エストラジオール比に負の相関が認められた。次にBPAおよびフタル酸エステル類の妊娠初期母体血中濃度と児の第二次性徴開始時期に与える影響の検討を行ったところ、女児では、MnBP、MiBP、MEHP濃度が高くなると、第二次性徴開始時期が早く、個別の指標では胸のふくらみの開始時期が早かった。男児では影響がみられなかった。

これらの結果から、胎児期のBPAおよびフタル酸エステル類曝露は、胎内ホルモン濃度を攪乱すること、第二次性徴開始時期へ影響することが示唆された。加えて両コホートの結果の比較から、曝露時期

および曝露濃度によってその影響が異なる可能性が示唆された。

【キーワード】

環境化学物質、胎児期曝露、出生コホート、第二性徴、性腺機能

1. はじめに

近年増加している合成化学物質には、内分泌かく乱作用が報告されている物質がある (Sifakis et al. 2017)。加えて、生殖器に関連する異常（停留精巣や尿道下裂など）の発生数は欧米で増加傾向にあることから、これらの原因として、胎児期の環境化学物質曝露や性ステロイド産生などの胎内でのホルモン環境の変化による影響が推察されている。加えて、胎児期の環境化学物質曝露が出生後の発育や遊び方や第二性徴発来期の早期化など、性分化に影響を与えていると考えられている。しかし環境化学物質曝露による性ホルモンや性腺機能への影響については、動物を用いた実験データは報告されているが、一方ヒトでの影響に関する報告はほとんどない。

内分泌かく乱作用をもつ環境化学物質のうち、フタル酸エステル類やBPAは代謝が速いものの日用品に多く含まれることから、恒常的に曝露され続ける問題がある (Koch et al. 2004)。動物実験で胎児期のフタル酸エステル類曝露は抗アンドロゲン作用による停留精巣や尿道下裂など雄の生殖器への有害作用、Leydig細胞の異常凝集やSertoli細胞の損傷など、細胞レベルへの影響が報告されている (Dostal et al. 1988)。ヒトでも胎児期曝露による児の肛門性器間距離への影響や (Huang et al. 2009)、第二性徴発来時期への影響をきたすことが報告されている (Mouritsen et al. 2013)。一方、BPAについては、横断研究で男性の性腺機能への影響や女兒の初潮年齢への影響についての報告があるが (Buttke et al. 2012; Ferguson et al. 2014; McGuinn et al. 2015)、胎児期曝露に関する研究や、身体の性分化に与える影響はほとんど報告がない。従ってフタル酸エステル類やフェノール類への胎児期における曝露が与える影響やその機序については、研究が遅れているのが現状である。

これまで我々が実施してきた「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ（以下、北海道スタディ）」の研究成果として、札幌コホートにおいて、フタル酸エステル代謝物 (Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP))、ビスフェノールA (BPA)、有機フッ素化合物 (perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) / perfluorooctanoic acid (PFOA))、およびpoly chlorinated biphenyl (PCB) / Dioxinsの胎児期曝露により、男児で臍帯血中のテストステロン/エストラジオール(T/E2)比、プロゲステロン (P4)、Insulin like factor 3 (INSL3)、InhibinB、プロラクチン (PRL) を有意に低下させ、また女兒で臍帯血中のT/E2比を増加させる傾向が認められた (Araki et al. 2014; Itoh et al. 2016; Minatoya et al. 2016)。以上の結果から、特に男児で環境化学物質と出生時の性ホルモン濃度との関連がみられ、環境中から日常でさらされる低濃度であっても、胎児期曝露は男児のLeydig細胞・Sertoli細胞の機能を低下、性腺機能への影響が示唆された。

しかしながら、胎児期の化学物質曝露が、生後の第二性徴発来期の時期にどのような影響を与えるのかについてはほとんど報告がない。

2. 研究開発目的

本研究では、2001年に開始した出生コホート「北海道スタディ」を用いて、胎児期の短半減期環境化学物質 (BPA、フタル酸エステル類) への曝露実態を明らかにし、胎児期曝露が、児の性腺機能、特に出生時の性ホルモン濃度と第二性徴発来時期に与える影響を明らかにすることを目的とする。まずは札幌コホートで測定済みのフタル酸エステルMEHPとBPAおよび第二性徴との関連について明らかにする。一方、札幌コホートでは参加人数が限られており、またMEHPの曝露評価は妊娠後期、またBPAは臍帯血中濃度である。そこで、性分化に重要な時期と考えられる妊娠初期の曝露について、北海道大規模コホートで母体血中のBPAおよびフタル酸エステル類濃度を測定し、臍帯血中の児の性腺機能に関連すると考えられる性ステロイドホルモン (テストステロン (T)、エストラジオール (E2)、プロゲステロン (P4)、卵胞刺激ホルモン (FSH: Follicle Stimulating Hormone) 黄体形成ホルモン (LH: Luteinizing Hormone)、

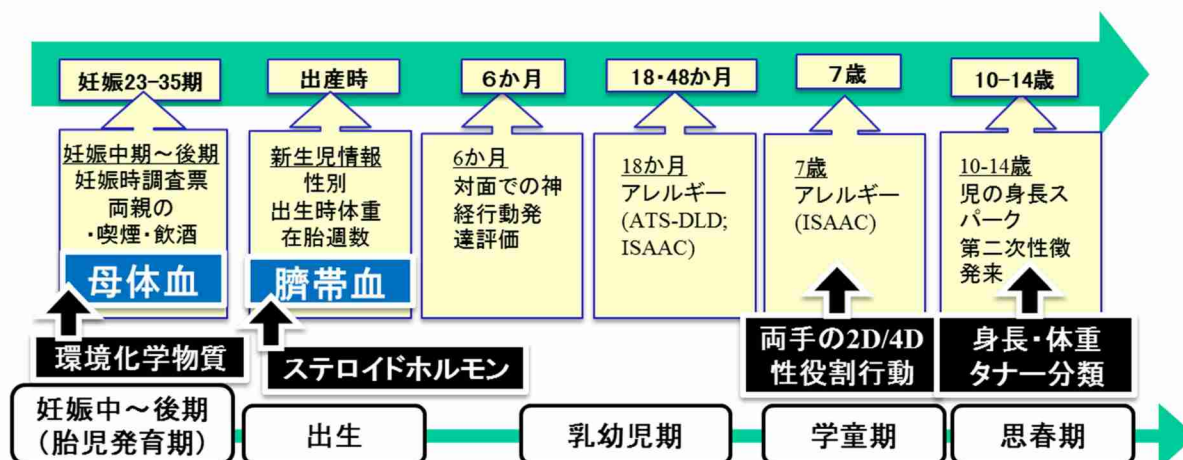
Inhibin Bとの関連を分析する。さらに、9-13歳を迎える参加児へ調査票を送付し、Tanner分類による男女それぞれ3つの指標を用いて第二性徴調査を実施する。曝露による第二性徴発来時期への影響について解明する。加えて将来の子どもの生後の環境化学物質曝露、性ホルモン濃度を調べるために、尿の収集も行う。

3. 研究開発方法

本研究では、北海道スタディにおいて、環境化学物質の曝露実態や、環境化学物質濃度と思春期開始時期の関連、さらに胎生期ホルモン環境との関連について検討する。具体的には、北海道スタディの大小2つの出生前向きコホートをを用いて、研究期間内に9歳以上になる児を対象に、保存済みの妊娠中母体血からフタル酸エステル類・BPA濃度を測定、第二性徴発来時期について、その指標となるTanner分類や身長スパート等について調査を実施する。胎児期のBPAおよびフタル酸エステル類曝露による児の性ホルモン環境、および第二性徴の発来時期に与える影響を解析する。

本研究は、北海道大学医学研究科「医の倫理委員会」、および北海道大学環境健康科学研究教育センター倫理委員会の承認を得て実施した。インフォームドコンセントは、全対象者から疫学研究に関する倫理指針およびヘルシンキ宣言に基づき実施した。

1) 「札幌コホート」研究における第二性徴調査



図(2)-1 札幌コホート研究のながれ

出生前向きコホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」の2つのコホートのうち、「札幌コホート」のながれを図(2)-1に示す。

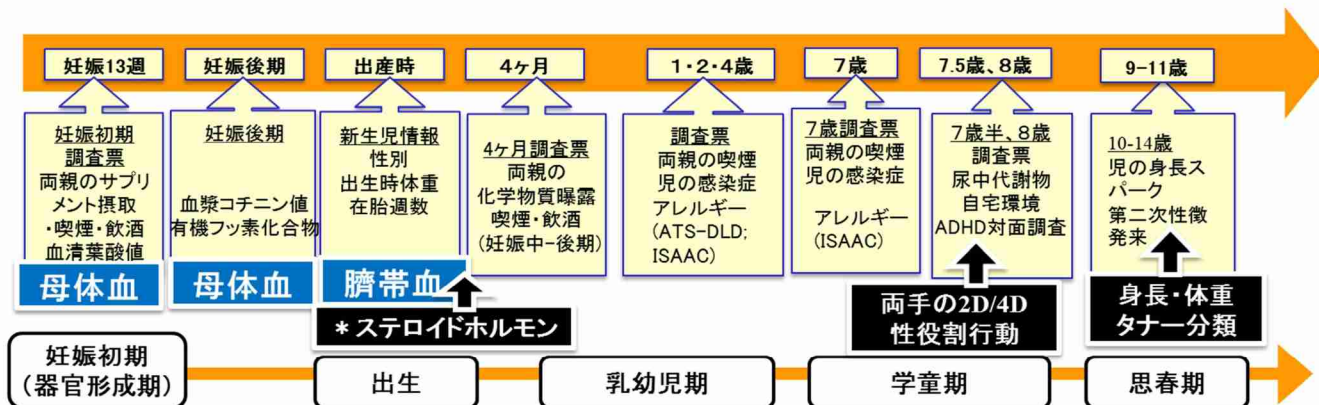
札幌コホートは、北海道札幌市の一産科病院を受診した妊婦とその児を対象にした出生前向きコホート研究である。札幌市およびその周辺に住む日本人で、一産院を2002年7月から2005年9月に受診した妊婦1796名に研究への参加を依頼した。日本臍帯血バンク登録者（22%）と里帰り分娩（3%）（他施設で分娩）予定者は研究対象から除外し、最終的に妊娠23週から35週の妊婦514名（28.6%）が研究参加に同意している。妊娠中期から後期に妊婦と配偶者から、自記式調査票により両親の既往歴、教育歴、世帯収入、妊娠中喫煙状況、妊娠中飲酒状況などの基本的情報を得た。医療診療録から母児の分娩・出生時所見を得た。妊娠中期から後期の母体血および分娩時に臍帯血を採取し、分析まで -80°C で凍結保存してある。

本研究では、札幌コホートに登録されて調査時点まで継続して調査に参加している小児329人を対象に第二性徴の調査を実施した。第二性徴発来の指標として、1年に1-2回の学校健診記録から身長・体重を転記して9-14歳の男女別発育曲線を作成することにより身長の急伸（スパート）を評価した。またTanner分類を元に、男児は陰毛の発毛および声変わり、女児は乳房の発育、陰毛の発毛、および初経

の開始の有無を評価した。児の尿は生後の曝露評価および尿中ステロイドホルモンを将来測定することを念頭に収集した。

2) 「大規模コホート」研究

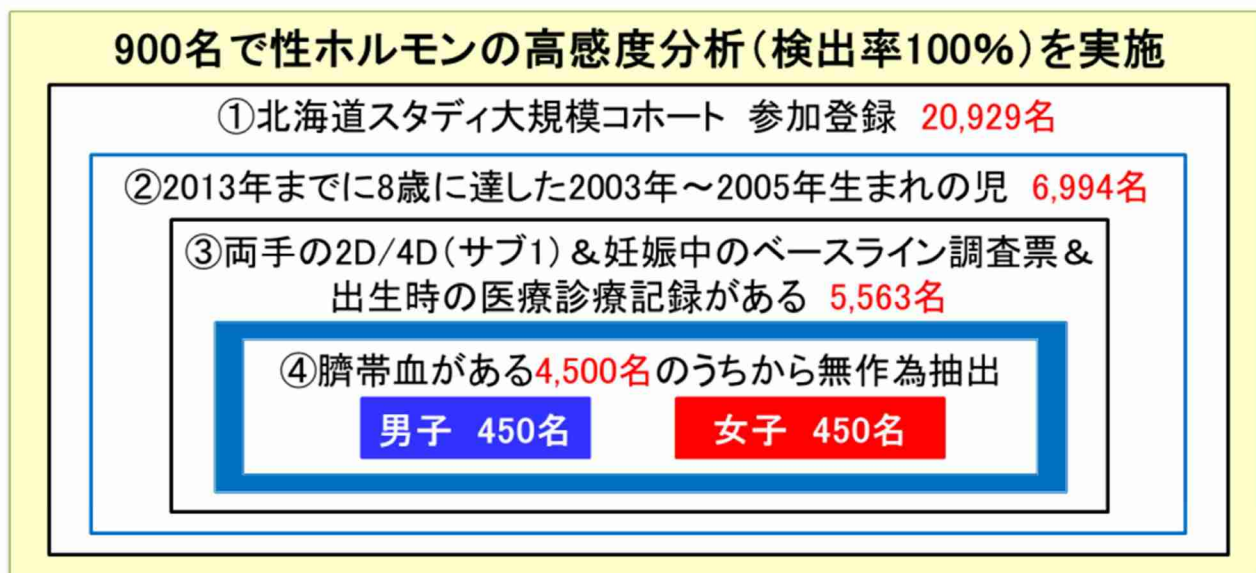
出生前向きコホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」の2つのコホートのうち、「大規模コホート」のながれを図(2)-2に示す。



図(2)-2 北海道大規模コホート研究のながれ

「大規模コホート」は、北海道内全域の産科30施設で2003年に開始し、2013年3月までに妊婦20,926人が登録している。妊娠初期のベースライン調査票から、妊娠時の年齢、妊娠前の体格、既往歴、教育歴、妊娠前後の喫煙および飲酒、世帯収入などの情報を得た。出産時の医療機関カルテから在胎週数、児の性別、出生時体重などの情報を得た。妊娠初期と後期の母体血、および分娩時の臍帯血を採取し、 -80°C で保存した。出生後の調査で、7歳半前後に両手のコピーによる第二指/第四指（2D/4D）比、8歳児には性役割行動調査（J-PSAI）を実施している（図(2)-2）。

また、2013年までに8歳に達し、臍帯血の検体がある6994名のうち8歳調査（J-PSAIや2D/4D）が実施されており、ベースライン調査票と出生時の医療診断記録がある5563名から、男女各450名を無作為抽出して合計900で臍帯血中性ホルモン濃度を測定済である（図(2)-3）。男女とも臍帯血から性ステロイドホルモンであるエストラジオール（E2）、総テストステロン（T）、プロゲステロン（P4）をLC-MS/MS法で分析した。加えて男児では、高感度黄体形成ホルモン（LH）および卵胞刺激ホルモン（FSH）を化学発光



図(2)-3 大規模コホートの性ホルモンを測定した対象者

酵素免疫測定 (CLEIA) 法、および Inhibin B を酵素免疫測定 (EIA) 法で測定した。測定は全てあすか製薬メディカル(株)で実施した。

① 第二性徴調査

大規模コホートでは、2016年から2018年3月までに9-13歳に到達する児3697名に第二性徴調査を実施した。調査では、第二性徴発来 の指標として、小学校6年間の学校健診記録から1年に1-2回の身長・体重を転記して発育曲線を作成することにより身長のスパートを評価した。またTanner分類を元に、男児は陰毛の発毛および声変わり、女児は乳房の発育、陰毛の発毛、および初潮の開始を評価した。児の尿は生後の曝露評価および尿中ステロイドホルモンを将来測定することを念頭に収集した。

② 母体血中BPA、フタル酸エステル類の測定

臍帯血中性ホルモンを測定した900名の中から、妊娠初期の検体があり、②第二性徴調査のデータが得られた児648名に対し、保管済み妊娠初期母体血を化学物質曝露評価に用いた。血清中BPAの分析は、同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (ID-LC-MS/MS) にて行った。検出下限値 (Method detection limit: MDL) は0.045 ng/mlで、検出下限値未満の値にはMDLの1/2値を代入し、解析を行った。フタル酸エステル類は、5種類の親化合物Di-n-butyl phthalate (DnBP)、Di-iso-butyl phthalate (DiBP)、Buthyl benzil phthalate (BBzP)、Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)、Diisononylphthalate (DiNP) から代謝された1次代謝物Mono-n-butyl phthalate (MnBP)、Mono-iso-butyl phthalate (MiBP)、Monobenzyl phthalate (MBzP)、Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)、2次代謝物Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP)、mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate (MECPP)、Mono(carboxy-isononyl)phthalate (cx-MiNP)、の合計7種類のフタル酸エステル類代謝物の分析をLC-MS/MSを用いて行った。測定は全て、いであ(株)環境創造研究所で実施した。

3) 統計解析

二群間の平均値の差の検定にはStudentのt検定、カイ二乗検定、およびMann-Whitney U検定を用いた。二変数間の相関分析にはSpearmanの順位相関係数を用いた。重回帰分析においては、BPA、フタル酸エステル類濃度および性ホルモン濃度はいずれも対数変換 ($\log_2$) して正規分布に近づけた。調整因子は解析ごとに別途示す。

統計ソフトJMP12.0を用いて検討し、統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

4. 結果及び考察

1) 「札幌コホート」研究

a. 調査票および尿検体の収集

札幌コホートでは、対象者のうち現在も追跡可能な329名に、2015年12月から2016年2月までの間に同意書、第二性徴調査への調査協力説明書、第二性徴調査票、および尿採取カップを参加者の自宅に郵送した。調査票を送付した時期に学校健診記録が自宅に保管されておらず身長・体重を記入できない場合は、2016年4月の学校健診記録が自宅に返却される時に転記することを再度依頼した。調査票の未返送者には2016年3月に手紙を郵送して督促した。また2016年4月に電話による督促を実施した。2017年2月28日時点で、質問票150件 (回収率45.6%)、尿検体127件 (回収率38.6%) を収集した。

b. 第二性徴開始の状況

質問票の返送があった150件について、男児が75件、女児が75件であった。第二性徴が開始していると判断する基準として男児は①身長スパート、②声変わり、③陰毛、女児は①初潮、②胸のふくらみ、③陰毛を指標とした。男女別の上記の指標①②③の中で1つ以上該当する児は第二性徴が開始してい

る（第二性徴開始あり）群に分類し、さらに指標①②③に該当した最も早い月齢を第二性徴開始月齢とした。一方、指標①②③の全てに該当しない児を第二性徴開始前の群（第二性徴開始なし）に分類し、調査時の児の月齢を第二性徴開始前の月齢とした。男女別第二性徴開始あり/なしの人数の割合とその月齢の範囲を表(2)-1、表(2)-2に示す。

表(2)-1 第二性徴開始あり/なしの人数の割合

第二性徴開始	男 (n=75) N (%)	女 (n=73) N (%)	p値
なし	25 (33.3)	6 (8.0)	<0.001
あり	50 (66.6)	69 (92.0)	

カイ2乗検定

表(2)-2 第二性徴のあり/なしの月齢の範囲（男女別）

第二性徴開始	月齢 中央値(最小、最大)	p値
男 なし	142 (129, 148)	0.671
男 あり	140 (132, 146)	
女 なし	130 (126, 139)	0.247
女 あり	128 (120, 133)	

Mann-Whitney U検定、第二性徴開始あり：開始の月齢、なし：調査時の月齢

第二性徴開始なしのグループのみで解析すると、男女別の月齢に差はなかったが、第二性徴開始ありのグループのみで解析すると、女兒のほうが男児よりも月齢が早かった。言い換えると、第二性徴開始年齢は女兒で男児よりも早かった。(表(2)-2)。第二性徴開始ありなしの群を比較すると、男児では開始ありのほうが母親の身長が高く、女兒では開始ありのほうが母親の年齢が若かった。その他の母親の妊娠前体重、出産歴、教育歴、世帯年収等と第二性徴開始あり・なしとの関連はなかった。

c. 環境化学物質と第二性徴開始との関連

質問票が返送された150件のうち、妊娠中の母体血中MEHP濃度のデータがあり、思春期早発や先天異常のある6件を除いた138組の母児において、胎児期のMEHP曝露が第二性徴開始時期へ与える影響について検討した。138件の母親の基本的属性を表(2)-3に示す。男児71名、女兒67名であった。

また、質問票が返送された150件のうち、妊娠中の母体血中BPA濃度のデータがあり、思春期早発や先天異常のある3件を除いた89組の母児において、胎児期のBPA曝露が第二性徴開始時期へ与える影響について検討した。89件の母親の基本的属性を表(2)-3に示す。男児35名、女兒51名であった。

表(2)-3 母児の基本的属性

		MEHPデータあり (n=138)		BPAデータあり (n=86)	
		平均値±SD	N (%)	平均値±SD	N (%)
母親					
出産時年齢		31.3±4.4		31.5±4.2	
非妊娠時体重 (kg)		51.8±7.9		51.6±7.8	
身長 (cm)		157.9±5.6		158.0±5.6	
非妊娠時BMI		20.7±2.8		20.9±3.1	
出産歴	なし		71 (51.4)		47 (54.7)
	あり		67 (48.6)		39 (45.3)
世帯年収 (百万)	<5		89 (64.5)		51 (59.3)
	≥5		49 (35.5)		35 (40.7)
教育歴 (年)	≤12		41 (29.7)		28 (32.6)
	≥13		97 (70.3)		58 (67.4)
妊娠中喫煙	あり		10 (7.2)		5 (5.8)
妊娠中飲酒	あり		53 (38.4)		35 (40.7)
児					
性別	男		71 (51.4)		35 (40.7)
	女		67 (48.6)		51 (59.3)
小学校1年生時のBMI		15.4±1.6		15.4±1.5	

臍帯血中BPA濃度および妊娠中母体血中MEHP濃度を表(2)-4に示す。臍帯血中BPAの中央値は9.81 ng/ml、母体血中MEHPの中央値は0.050 ng/mlであった。

表(2)-4 化学物質の濃度

	N	パーセンタイル		
		25%	50%	75%
臍帯血中 BPA ng/ml	86	<MDL	0.050	0.086
母体血中 MEHP ng/ml	138	5.53	9.81	17.1

MDL: method detection limit =0.040 ng/ml

第二性徴開始あり群において、第二性徴開始月齢とBPAおよびMEHP濃度との関連を検討した結果を表(2)-5、(2)-6に示す。臍帯血中MEHP濃度が2倍になると、男児において第二性徴開始月齢が3.00か月有意に遅く、個別の指標では①身長スパートが4.25か月有意に遅かった(表(2)-5)。声変わり、陰毛への影響はみられなかった。一方女児では、臍帯血中MEHP濃度が2倍になると、胸のふくらみ開始が3.09か月有意に遅かった(表(2)-6)。初潮、陰毛への影響はみられなかった。男女ともBPA濃度は第二性徴開始月齢への影響はみられなかった。

表(2)-5 男児の胎児期化学物質濃度と第二性徴開始月齢への影響

	①～③のいずれかが開始している B (95%CI)	①身長スパート B (95%CI)	②声変わり B (95%CI)	③陰毛 B (95%CI)
BPA ^{a)}	-1.16 (-6.21, 3.89)	-3.29 (-9.67, 3.09)	-1.64 (-9.70, 6.42)	2.62 (-13.70, 8.44)
MEHP ^{b)}	3.00 (0.37, 5.63)*	4.25 (1.36, 7.15)**	0.12 (-03.49, 3.74)	0.98 (-2.14, 4.10)

BPA、MEHPは対数変換 (log₂) して投入。

^{a)} 母親の年齢、小学校1年次のBMIと身体測定日月齢で調整。

^{b)} 母親の年齢、小学校1年次のBMIと身体測定日月齢、採血時期で調整。

*: p<0.05. **: p<0.01.

表(2)-6 女児の胎児期化学物質濃度と第二性徴開始月齢への影響

	①～③のいずれかが開始している B (95%CI)	①初潮 B (95%CI)	②胸のふくらみ B (95%CI)	③陰毛 B (95%CI)
BPA ^{a)}	3.22 (-0.76, 7.20)	4.16 (-2.29, 10.60)	3.03 (-1.41, 7.47)	5.71 (-2.98, 14.40)
MEHP ^{b)}	2.04 (-0.67, 4.75)	1.77 (-1.75, 5.29)	3.09 (0.33, 5.85)*	1.98 (-2.62, 6.59)

BPA、MEHPは対数変換 ($\log_2$) して投入。

^{a)} 母親の年齢、小学校1年次のBMIと身体測定日月齢で調整。

^{b)} 母親の年齢、小学校1年次のBMIと身体測定日月齢、採血時期で調整。

*: $p < 0.05$.

2) 「大規模コホート」研究

a. 調査票および尿検体の収集

大規模コホートでは、対象者のうち現在も追跡可能な3679名に、2015年12月から2018年1月までの間に同意書、第二性徴調査への調査協力説明書、第二性徴調査票、および尿採取カップを参加者の自宅に郵送した。調査票を送付した時期に学校健診記録が自宅に保管されておらず身長・体重を記入できない場合は、2016、2017年4月の学校健診記録が自宅に返却される時に転記することを再度依頼した。調査票の未返送者には2016年3月に手紙を郵送して督促した。2018年1月31日時点で、3292名に発送し、調査票1537件（回収率47.0%）、尿検体702件（回収率21.3%）を収集した。

調査票が返送された1560件のうち、すでにデータクリーニングが済んだ1475件を対象とした。母親の基本的属性を表(2)-7に示す。第二性徴調査票記入時の対象児の年齢は中央値11.9歳で、範囲は10歳から13歳まで、男児782名、女児693名であった。

表(2)-7 母親と児の基本的属性 (n=1475)

		平均値±SD	N (%)
母親			
出産時年齢		31.0±4.4	
非妊娠時体重 (kg)		52.8±8.4	
身長 (cm)		158.1±5.2	
Parity	なし		684 (46.4)
	あり		726 (49.2)
世帯年収 (百万)	<5		758 (51.4)
	≥5		477 (32.3)
教育歴 (年)	≤12		573 (38.8)
	≥13		834 (56.5)
児			
性別	男		782 (53.0)
	女		693 (47.0)
出生体重 (g)		3040.7±378.8	
在胎週数		38.8±1.4	
小学校1年生時の体重 (kg)		21.8±3.8	
小学校1年生時の身長 (cm)		117.7±5.4	

第二性徴が開始していると判断する基準として、札幌コホートと同様に男児は①身長スパート、②声変わり、③陰毛、女児は①初潮、②胸のふくらみ、③陰毛を指標とした。男女別の上記の指標①②③

の中で1つ以上該当する児は第二性徴が開始している（第二性徴開始あり）群に分類して、指標①②③に該当した最も早い月齢を第二性徴開始月齢とした。また、指標①②③の全てに該当しない児を第二性徴開始前の群（第二性徴開始なし）に分類して、調査時の児の月齢を第二性徴開始前の月齢とした。

表(2)-8 男女別 第二性徴開始あり/なしの人数の割合（n=1475）

第二性徴開始	なし	あり	p値
	N (%)	N (%)	
男(n=782)	446 (57.0)	336 (43.0)	<0.001
女(n=693)	241 (34.8)	452 (65.2)	

カイ2乗検定

表(2)-9 男女別 第二性徴のあり/なしの月齢の範囲（n=1475）

第二性徴開始		月齢 中央値(最小、最大)	p値
男	なし	145 (139, 146)	0.131
	あり	144 (139, 149)	
女	なし	140 (136, 145)	<0.001
	あり	132 (123, 138)	

Mann-Whitney U検定

第二性徴開始あり：開始の月齢、なし：調査時の月齢

調査票を回収した1475名において、男児に比べ女児の方が第二性徴が開始している割合が高かった（表(2)-8）。第二性徴開始の有無で層別化し、開始ありのグループのみで解析すると、女児のほうが男児よりも開始月齢が有意に早かった（表(2)-9）。第二性徴開始の各指標では、男児では①身長スパートは269人（34.4%）、②声変わりが129人（16.5%）、③陰毛が146人（18.7%）が開始、女児では男児では①初潮は259人（37.4%）、②胸のふくらみが394人（56.9%）、③陰毛が253人（36.5%）で開始していた。第二性徴開始ありなしの群を比較すると、男児では開始ありのほうが母親の身長が高く、女児では開始ありのほうが母親の年齢が若かった。その他の母親の妊娠前体重、出産歴、教育歴、世帯年収等と第二性徴開始あり・なしと関連はなかった。

第二性徴開始のタイミングについて、女児のほうが男児より第二性徴開始の月齢が早く、開始年齢の中央値は132か月（10歳9か月）であった。男児の第二性徴開始年齢の中央値は144か月（11歳8か月）であった。「札幌コホート」研究の結果では、同様に女児のほうが男児より第二性徴開始の月齢が早く、開始年齢の中央値は128か月（10歳6か月）、男児の第二性徴開始年齢の中央値は140か月（11歳6か月）であった。日本の先行研究では第二性徴開始は女児の乳房発育は9.74±1.09歳、男児の精巣重量増加が10.8歳±1.3でみられると報告された（内木ら2012）。本研究では保護者の回答と学校健診記録からの身長スパートをもとに第二性徴の開始を判断していることから、生態学的な第二性徴の開始時期よりタイミングが遅れて第二性徴開始が評価されたと考えられた。

b. 環境化学物質BPAおよび7種類のフタル酸エステル類の測定と、胎内ホルモンとの関連

すでに臍帯血中性ホルモン濃度のデータがある900件のうち、妊娠初期母体血が保存されている648件についてBPAとフタル酸エステル類代謝物を測定した。母児の基本属性を表(2)-10に示す。

表 (2)-10 大規模コホート 母児の基本的属性 (n=648)

属性	N (%)		平均値±SD
母親			
出産時年齢			31.1 ± 4.0
身長			158.3 ± 5.2
非妊娠時体重			53.0 ± 8.4
出産歴	なし	299 (46.1)	
	あり	348 (53.7)	
妊娠初期飲酒	なし	535 (82.6)	
	あり	106 (16.4)	
妊娠初期喫煙	なし	499 (77.0)	
	あり	51 (7.9)	
学歴	中学卒	13 (2.0)	
	高校卒	243 (37.5)	
	短大・専門学校卒	311 (48.0)	
	大学卒（大学院含む）	78 (12.0)	
世帯年収	300万円未満	93 (16.1)	
	300～499万円	265 (40.9)	
	500～799万円	167 (25.8)	
	800万円以上	53 (8.3)	
児			
性別	男	336 (51.9)	
	女	312 (48.1)	
在胎週数			38.9 ± 1.3
出生体重			3074.1 ± 369.1

BPAおよび7種類のフタル酸エステル類の母体血中濃度と検出率を表(2)-11に、児の性別ごとの濃度を表(2)-12に示す。

表 (2)-11 化学物質の検出率 (%) と濃度分布 (ng/mL) (n=648)

化学物質	MDL	N	検出数	検出率 (%)	最小値	25%th	中央値	75%th	最大値
BPA	0.0091	645	637	98.8	<MDL	0.046	0.085	0.14	56.0
MnBP	0.57	648	648	100.0	9.3	31.0	47.0	61.75	150.0
MiBP	0.44	648	601	99.8	<MDL	2.23	3.4	5.5	19.0
MBzP	0.19	648	34	5.2	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	3.8
MEHP	0.31	648	592	91.4	<MDL	0.49	1.1	7.2	100.0
MEHHP	0.23	648	46	7.1	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	1.9
MECPP	0.11	648	555	85.6	<MDL	0.15	0.24	0.37	12.0
cx-MiNP	0.12	648	3	0.5	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	0.18

表(2)-12 男女別の化学物質濃度 (ng/mL)

	男児			女児			p
	n	中央値	(25th-75th)	n	中央値	(25th-75th)	
BPA	337	0.09	(0.04-0.14)	308	0.09	(0.05-0.15)	0.308
MnBP	336	48.00	(31.25-63.75)	312	46.5	(31.00-61.00)	0.355
MiBP	336	3.30	(2.23-5.20)	312	3.50	(2.23-5.88)	0.329
MEHP	323	1.00	(0.47-7.20)	312	1.10	(0.52-7.10)	0.799
MECPP	336	0.24	(0.16-0.37)	312	0.23	(0.14-0.36)	0.227

p value by the Mann-Whitney U test

本研究の妊娠初期血清中BPAは検出率98.8%で中央値0.085ng/mlであった(表(2)-11)。先行研究では、出産可能年齢の女性を対象としたケースコントロール研究で血清中BPA濃度(平均値、ng/ml)を比較した場合、多嚢胞性卵巣症候群1.05 ng/ml (n=13)に対してコントロール群0.71 ng/ml (n=6) (Takeuchi et al. 2004)、また、別の研究で流産歴が3回以上ある症例群で2.6 ng/ml (n=45)に対してコントロール群0.77 ng/ml (n=32)と報告されており (Sugiura-Ogasawara et al. 2005)、どちらの報告でも症例群の方がコントロール群よりBPA濃度が高かった。しかしそれらの研究ではBPAがELISA法で測定されており、バックグラウンドの影響を排除し、より感度の高い測定法での評価が必要であると考えられた。また高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した台湾の妊婦97名で母体血中BPAは幾何平均2.5 ng/mlと報告された (Chou et al. 2011)。そこで本研究ではID-LC-MS/MS法で高感度測定を実施したところ、中央値は0.085 ng/mLであり、本研究対象者の曝露レベルは先行研究より低い可能性が示された。また、日本製缶協会が2008年に制定した「食品缶詰用金属缶に関するビスフェノールA低減缶ガイドライン」等によりBPAの使用規制が進み、曝露濃度が低かった可能性も考えられる。

フタル酸エステル類の検出率はMnBP: 100%、MiBP: 99.8%、MEHP: 91.4%、さらに二次代謝物のMECPP: 85.6%であり、本研究のLC-MS/MS法の検出感度により、日常生活レベルのDnBP、DiBPおよびDEHPの代謝物濃度を検出することができた(表(2)-11)。一方、MBzPの検出率は5.2%、MEHHPの検出率は7.1%、cx-MiNPの検出率は0.5%とほとんど検出されなかった。検出率が70%以上であったBPA、MnBP、MiBP、MEHP、MECPPの5物質のみを後の解析に用いた。

妊娠中の血中フタル酸エステル類濃度を報告した先行研究では、イタリアの妊婦84名の妊娠後期血清中MEHPは $0.52 \pm 0.61 \mu\text{g/mL}$ (平均値 $\pm$ SD)であった (Latini et al. 2003)。オーストラリアの妊婦123名の妊娠初期血清中フタル酸エステル代謝物の中央値(ng/ml)はMiBP: 1.77、MnBP: 2.46、MBzP: 1.26、MEHP: 1.18、MECCP: 1.64、およびMiNP: <LODであった (Hart et al. 2014)。また、上記報告の検出下限値(LOD) (ng/ml)はMiBP: 0.82、MnBP: 0.77、MBzP: 0.40、MEHP: 0.60、MECCP: 0.28、およびMiNP: 0.20であった。本研究ではDEHPの一次代謝物であるMEHPは先行研究より血中濃度が低い、DnBP、DiBPの一次代謝物であるMnBP、MiBPの血中濃度が先行研究より高レベルであった。これは、「油脂、脂肪性食品を含有する食品に接触する器具および容器包装の禁止」(平成14年厚生労働省告示第267号、2002年)や玩具(平成22年厚生労働省告示第336号、2010年)などの使用規制により生体へのDEHP曝露量が減少したが、一方で、DBPは玩具への使用は禁止[23]されているものの、日用品にも広く使用されており、諸外国の先行研究より本研究対象集団は曝露レベルが高い可能性が示された。可塑剤工業会によると2014年の国内可塑剤出荷量の構成比はDEHPが47%、DiNPが26%、およびDBPを含むその他が4%で、本研究の対象集団はDEHPやDBPに加えてDiNPにも曝露されていることが推察されるが、本研究の測定では血清中のDiNP代謝物であるMiNP、cx-MiNPはほとんど検出されなかった。

男女別には母の妊娠初期の5代謝物の濃度差は認められなかった(表(2)-12)。対象者の属性である母親の出産時年齢、身長、非妊娠時体重、出産歴、教育歴、世帯年収、妊娠中の飲酒・喫煙、児の在胎週数、および出生体重と化学物質濃度に有意な関連は認められなかった。

臍帯血中の性ホルモンE2、T、P4、Inhibin Bの検出率は100%であった。男女間の比較では、T、P4、T/Eで濃度が有意に異なった(表(2)-13)。臍帯血中の性ホルモンは男女別に濃度が異なったため、性ホ

ルモンとの解析は全て男女別に行った。LH、FSH、およびInhibin Bは女兒で分析しなかったので男児のみで単変量解析を行った。

表(2)-13 男女別の性ホルモン濃度(n=648)

性ホルモン	男児			女兒			p
	n	中央値	(25th-75th)	n	中央値	(25th-75th)	
E2 (ng/mL)	336	6.83	(4.57-10.77)	312	6.51	(4.34-9.44)	0.142
T (pg/mL)	336	151.7	(104.3-210.8)	312	98.7	(72.3-144.4)	0.000
T/E2	336	19.8	(12.9-32.6)	312	15.6	(11.3-22.3)	0.020
P4 (ng/mL)	336	425.0	(327.3-580.5)	312	367.3	(277.9-483.4)	0.000
LH (mIU/mL)	331	0.74	(0.26-1.70)				
FSH (mIU/mL)	331	0.90	(0.46-1.50)				
Inhibin B (pg/mL)	334	116.5	(94.0-142.3)				

p value by the Mann-Whitney U test

男女別にBPA、MnBP、MiBP、MEHP、およびMECPPの5物質と性ホルモン濃度との順位相関を単変量解析した結果を示す(表(2)-14、(2)-15)。

表(2)-14 男児の化学物質と性ホルモンの相関(n=336)

性ホルモン	BPA	MnBP	MiBP	MEHP	MECPP
	相関係数	相関係数	相関係数	相関係数	相関係数
E2 (ng/mL)	0.054	0.071	0.029	0.017	0.080
T (pg/mL)	0.036	0.068	-0.014	-0.004	-0.001
T/E2	-0.022	-0.022	-0.045	-0.022	-0.087
P4 (ng/mL)	-0.035	0.016	-0.033	-0.006	0.058
LH (mIU/mL)	0.045	0.051	0.092	-0.015	0.045
FSH (mIU/mL)	0.001	0.005	0.038	-0.085	0.051
Inhibin B (pg/mL)	-0.030	0.063	0.112*	0.080	0.107

*; p < 0.05. by the Spearman rank correlation

表(2)-15 女兒の化学物質と性ホルモンの相関(n=312)

性ホルモン	BPA	MnBP	MiBP	MEHP	MECPP
	相関係数	相関係数	相関係数	相関係数	相関係数
E2 (ng/mL)	0.039	0.118*	0.070	0.028	-0.052
T (pg/mL)	0.050	-0.006	-0.061	-0.056	-0.096
T/E2	-0.036	-0.163**	-0.161**	-0.076	-0.011
P4 (ng/mL)	0.045	0.074	0.080	0.055	-0.019

*; p < 0.05. by the Spearman rank correlation

男児でMiBP濃度とInhibin Bに正の相関が認められた(表(2)-14)。女兒でMnBPとE2に正の相関、MnBPおよびMiBP濃度とT/E2比に負の相関が認められた(表(2)-15)。男女ともBPA、MEHP、MECPP濃度と性ホルモン濃度に有意な関連は認められなかった(表(2)-14、(2)-15)。

BPAおよび4種類のフタル酸エステル類の母体血中濃度が、臍帯血中の性ホルモン濃度へ与える影響について、重回帰分析で検討した。結果を表(2)-16、表(2)-17に示す。

表(2)-16 男児の化学物質と性ホルモンの関連（重回帰分析）

	BPA	MnBP	MiBP	MEHP	MECPP
性ホルモン	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)
E2 (ng/mL)	-0.019 (-0.093, 0.055)	0.085 (-0.093, 0.263)	-0.030 (-0.191, 0.132)	-0.010 (-0.073, 0.053)	0.078 (-0.040, 0.197)
T (pg/mL)	-0.038 (-0.105, 0.030)	0.065 (-0.098, 0.228)	-0.064 (-0.212, 0.083)	-0.004 (-0.062, 0.053)	0.003 (-0.105, 0.112)
T/E2	-0.006 (-0.028, 0.016)	-0.020 (-0.191, 0.150)	-0.035 (-0.189, 0.120)	0.006 (-0.054, 0.066)	-0.075 (-0.188, 0.038)
P4 (ng/mL)	-0.008 (-0.049, 0.033)	0.023 (-0.075, 0.120)	-0.025 (-0.113, 0.064)	0.011 (-0.024, 0.045)	0.034 (-0.031, 0.098)
LH (mIU/mL)	0.043 (-0.065, 0.150)	0.140 (-0.102, 0.382)	0.184 (-0.048, 0.416)	0.002 (-0.090, 0.093)	0.054 (-0.012, 0.226)
FSH (mIU/mL)	0.008 (-0.067, 0.083)	0.064 (-0.115, 0.244)	0.089 (-0.072, 0.250)	-0.020 (-0.084, 0.043)	0.022 (-0.097, 0.141)
Inhibin B (pg/mL)	-0.026 (-0.071, 0.018)	-0.003 (-0.110, 0.103)	0.024 (-0.072, 0.120)	-0.009 (-0.047, 0.029)	0.024 (-0.047, 0.095)

BPA、MEHPおよび性ホルモンは対数変換（log2）して投入。母の年齢、妊娠前のBMI、妊娠中の喫煙有無、妊娠中の飲酒有無、児の在胎週数で調整。

表(2)-17 女児の化学物質と性ホルモンの関連（重回帰分析）

	BPA	MnBP	MiBP	MEHP	MECPP
性ホルモン	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)
E2 (ng/mL)	-0.015 (-0.077, 0.048)	0.123 (-0.046, 0.293)	-0.002 (-0.131, 0.126)	0.004 (-0.050, 0.058)	-0.087 (-0.196, 0.022)
T (pg/mL)	-0.037 (-0.090, 0.017)	-0.021 (-0.168, 0.127)	-0.129* (-0.239, -0.019)	-0.023 (-0.070, 0.024)	-0.074 (-0.168, 0.020)
T/E2	-0.007 (-0.021, 0.007)	-0.145* (-0.270, -0.019)	-0.130** (-0.224, -0.035)	-0.029 (-0.069, 0.012)	0.009 (-0.072, 0.091)
P4 (ng/mL)	0.003 (-0.033, 0.039)	0.070 (-0.031, 0.171)	0.053 (-0.023, 0.129)	0.011 (-0.021, 0.044)	-0.032 (-0.097, 0.033)

BPA、MEHPおよび性ホルモンは対数変換（log2）して投入。母の年齢、妊娠前のBMI、妊娠中の喫煙有無、妊娠中の飲酒有無、児の在胎週数で調整。*；p < 0.05。**；p < 0.01。

本研究の男児を対象にした重回帰分析では、母体血中の化学物質濃度と臍帯血中性ホルモンに有意な関連は認められなかった（表(2)-16）。女児を対象にした重回帰分析では、調整したモデルで母体血中のMiBP濃度増加により臍帯血中Tが有意に低かった。また、MnBP、MiBP濃度が高いとT/E2比が有意に低かった（表(2)-17）。

海外の先行研究と比較するとオーストラリアの妊婦123名の妊娠初期血清中濃度（中央値）はMnBP：2.46 ng/mlおよびMiBP：1.77 ng/ml、で、母の性ホルモンとの関連は認められていない（Hart et al. 2014）。本研究ではMnBP：46 ng/mlおよびMiBP：3.2 ng/ml（中央値）で、MnBPで約17倍、MiBPで約1.8倍血中濃度が高く、本研究のDnBPおよびDiBPの曝露レベルでは男児の胎生期性ホルモン環境に対して抗アンドロゲン作用の影響を与える可能性を示唆した。

これまでの我々の研究では、札幌コホートで妊娠後期母体血中MEHPと男児の臍帯血中T/E2比、P4、InhibinB、およびInsulin-like factor3の負の相関を報告した（Araki et al. 2014）。本研究ではMEHPおよびMECPPと性ホルモンについて重回帰分析で関連が認められなかった（表(2)-16、(2)-17）。異なる結果が得られた要因として、以下が挙げられる。

a) 測定に用いた母体血の採取時期の違い：札幌コホートでは、妊娠中～後期のMEHP濃度を測定しているが、大規模コホートでは妊娠初期（器官形成期）の濃度を測定している。フタル酸エステル類は代謝速度が速いことから、曝露評価の時期により分娩時に採取した臍帯血中性ホルモンへの影響が異なる可能性がある。

b) 濃度の違い：MEHPの中央値が、札幌コホートでは9.8ng/mL、大規模コホートでは1.1ng/mLで、札幌コホートよりも大規模コホートのMEHP濃度が低かった。動物実験で、DEHPの低用量曝露ではアロマターゼ活性の抑制、高用量曝露ではアロマターゼ活性の促進といったように、曝露レベルにより性ホルモンに与える影響が報告されていることから（Andrade et al. 2006）、濃度の違いによって異なる影響が見られた可能性がある。

一方、妊娠初期のフタル酸エステル類、特にDnBP曝露により児の胎生期性ホルモン環境をかく乱する可能性が示された。先行研究では、5.9-12.8歳の尿中DBP濃度が高いと副腎アンドロゲン量が少ない、また男児で第二性徴が早いといった報告がある（Mouritsen et al. 2013）。本研究では、児の尿を収集しており、今後は生後の児の曝露濃度や思春期の性ホルモン濃度を測定して、胎児期および生後の環境化学物質曝露が、性ホルモン濃度へ与える影響について、ライフコースアプローチによる検討を行っていく予定である。

c. 胎児期環境化学物質と第二性徴発来時期との関連

大規模コホートにおいて、第二性徴調査への回答があり、妊娠初期血清BPAおよびフタル酸エステル類濃度を測定した476組の母児について検討を行った。BPAおよびフタル酸エステル類濃度を表(2)-18、男女別BPAおよびフタル酸エステル類濃度を表(2)-19に示す。

表(2)-18 化学物質濃度 (ng/mL) と検出率 (n=476)

化学物質	MDL	N	検出数	検出率 (%)	最小値	25%th	中央値	75%th	最大値
BPA	0.0091	473	472	99.8	<MDL	0.045	0.082	0.140	47.000
MnBP	0.57	476	476	100.0	9.3	31.00	46.00	60.00	140.00
MiBP	0.44	476	475	99.8	<MDL	2.10	3.10	4.80	12.00
MBzP	0.19	476	26	5.5	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	3.8
MEHP	0.31	476	430	90.3	<MDL	0.46	0.97	7.17	77.00
MEHHP	0.23	476	37	7.8	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	1.9
MECPP	0.11	476	403	84.7	<MDL	0.15	0.24	0.36	3.1
cx-MiNP	0.12	476	2	0.4	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	0.36

表(2)-19 男女別の化学物質濃度(ng/mL) (n=476)

	男児			女児			p
	n	中央値	(25th-75th)	n	中央値	(25th-75th)	
BPA	246	0.09	(0.04-0.14)	227	0.08	(0.05-0.15)	0.648
MnBP	246	47.00	(30.75-61.00)	230	44.00	(31.00-60.00)	0.385
MiBP	246	3.10	(2.18-4.60)	230	3.20	(2.08-5.20)	0.861
MEHP	246	0.925	(0.46-7.63)	230	0.99	(0.47-6.78)	0.847
MECPP	246	0.24	(0.16-0.36)	230	0.23	(0.14-0.36)	0.268

p value by the Mann-Whitney U test

本研究の妊娠初期血清中BPAは検出率99.8%で中央値0.082ng/mlであった(表(2)-18)。フタル酸エステル類の検出率はMnBP:100%、MiBP:99.8%、MEHP:90.3%、二次代謝物のMECPP:84.7%であった。MBzPの検出率は5.0%と低かった。また、MEHHPの検出率は7.8%、cx-MiNPの検出率は0.4%とほとんど検出されなかった。BPAおよび7種類のフタル酸エステル類は、測定した全648人の結果とほぼ同様であった。

第二性徴開始あり・なしの両群で、母体血中BPAおよびフタル酸エステル類の濃度を比較した結果を表(2)-20、表(2)-21に示す。

表(2)-20 男児の第二性徴開始有無別の化学物質濃度(n=246)

化学物質	第二性徴開始なし			第二性徴開始あり			p
	n	中央値	(25th-75th)	n	中央値	(25th-75th)	
BPA	136	0.085	(0.046-0.145)	110	0.077	(0.037-0.133)	0.302
MnBP	136	48.5	(34.00-61.25)	109	44.00	(25.00-59.00)	0.162
MiBP	136	3.45	(2.30-5.03)	109	3.00	(1.80-4.00)	0.015
MEHP	136	0.91	(0.47-7.20)	109	0.86	(0.43-8.25)	0.872
MECPP	136	0.24	(0.17-0.36)	109	0.24	(0.15-0.36)	0.964

p value by the Mann-Whitney U test

表(2)-21 女児の第二性徴開始有無別の化学物質濃度(n=230)

化学物質	第二性徴開始なし			第二性徴開始あり			p
	n	中央値	(25th-75th)	n	中央値	(25th-75th)	
BPA	75	0.087	(0.051-0.240)	152	0.075	(0.045-0.130)	0.081
MnBP	76	53.00	(38.25-64.00)	154	40.00	(25.75-57.25)	<0.001
MiBP	76	5.40	(3.33-7.20)	154	2.80	(1.78-3.80)	<0.001
MEHP	76	1.25	(0.74-2.95)	154	0.79	(0.39-7.30)	0.202
MECPP	76	0.22	(0.14-0.35)	154	0.24	(0.13-0.37)	0.846

p value by the Mann-Whitney U test

男児では、第二性徴開始ありの群に比べ第二性徴開始あり群でMiBP濃度が有意に高かった(表(2)-20)。女児では、第二性徴開始ありの群に比べ第二性徴開始あり群でMnBP、MiBP濃度が有意に高かった(表(2)-21)。BPA、MEHP、MECPP濃度では男女とも差がみられなかった。

さらに、妊娠中の母体血中BPAおよびフタル酸エステル類濃度が児の第二性徴が開始した月齢へ与える影響を重回帰分析で検討した結果を表(2)-22、表(2)-23に示す。男児においては①～③の指標およびそのいずれかにおいても開始月齢への影響はみられなかった。女児では、MnBP、MiBP、MEHP濃度が2倍になると、②胸のふくらみ開始の月齢がそれぞれ2.73か月、2.65か月、0.78か月早かった。また①～③いずれかが開始した月齢についても、MnBP、MiBP濃度が2倍になると、それぞれ2.51か月、および2.14か月早かった。

表(2)-22 男児の胎児期化学物質濃度と第二性徴開始月齢への影響 (n=110)

	①～③のいずれかが開始	①身長スパート	②声変わり	③陰毛
	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)
BPA	-0.46 (-1.39, 0.46)	-0.03 (-0.73, 0.67)	-0.13 (-0.90, 0.64)	-0.60 (-1.66, 0.47)
MnBP	-1.38 (-3.34, 0.58)	-0.97 (-2.47, 0.54)	-0.04 (-2.03, 1.95)	-0.39 (-2.62, 1.83)
MiBP	-1.39 (-3.39, 0.61)	-1.23 (-2.71, 0.26)	-1.35 (-3.62, 0.91)	-1.20 (-3.89, 1.50)
MEHP	0.09 (-0.61, 0.79)	0.06 (-0.48, 0.60)	-0.22 (-0.89, 0.45)	0.11 (-0.61, 0.83)
MECPP	-0.23 (-1.56, 1.10)	0.18 (-0.85, 1.20)	-0.52 (-1.64, 0.59)	-0.18 (-1.46, 1.10)

重回帰分析：母親の年齢、小1BMI、小1身体測定日の月齢で調整。化学物質は対数変換(log2)して投入。

*:p<0.05. **:p<0.01

表(2)-23 女児の胎児期化学物質濃度と第二性徴開始月齢への影響 (n=154)

	①～③のいずれかが開始している	①初潮	②胸のふくらみ	③陰毛
	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)
BPA	-0.27 (-1.27, 0.72)	-0.09 (-0.93, 0.74)	-0.10 (-1.24, 1.03)	-0.06 (-0.93, 0.82)
MnBP	-2.51 (-4.57, -0.44)*	-1.36 (-3.19, 0.47)	-2.73 (-5.24, -0.21)*	-1.36 (-3.43, 0.72)
MiBP	-2.14 (-4.05, -0.23)*	-1.24 (-2.90, 0.43)	-2.65 (-5.04, -0.25)*	-0.18 (-2.04, 1.69)
MEHP	-0.49 (-1.14, 0.16)	-0.19 (-0.78, 0.40)	-0.78 (-1.53, -0.04)*	0.10 (-0.52, 0.72)
MECPP	-1.01 (-2.31, 0.28)	-0.34 (-1.44, 0.76)	-1.48 (-2.99, 0.04)	0.21 (-1.08, 1.50)

重回帰分析：母親の年齢、小1BMI、小1身体測定日の月齢で調整。化学物質は対数変換(log2)して投入。

*:p<0.05. **:p<0.01

これまで胎児期フタル酸エステル類曝露と児の第二性徴との関連をみた先行研究は2報ある。250名を対象に実施したメキシコの研究では、男児において胎児期のMBzP曝露はPublic hair stageの開始を遅らせ、女児ではMEHPの曝露が胸のふくらみを遅らせる一方、初潮とPublic hair stageの開始を早めるという結果であった (Watkins et al. 2017a, b)。437名を対象に実施した台湾の研究では、妊娠後期のフタル酸エステル類曝露濃度が高いと女児の子宮発育、骨成長を遅くするが、男児には影響がないという報告であった (Su et al. 2015)。本研究と異なる結果である要因として、この二報はいずれも妊娠中の尿からフタル酸エステル類を測定しているため、本研究で用いた母体血とはフタル酸エステル類代謝物の濃度やそのプロファイルが異なる可能性が考えられる。

一方、「札幌コホート」研究では、臍帯血中MEHP濃度が2倍になると、男児において第二性徴開始月齢が3.00か月、①身長スパートが4.25か月有意に遅く (表(2)-5)、女児では、胸のふくらみ開始が3.09か月有意に遅かった (表(2)-6)。初潮、陰毛への影響はみられなかった。男女ともBPA濃度は第二性徴開始月齢への影響はみられなかった。札幌・大規模コホートで異なる結果が得られた要因として、以下が挙げられる。

- a) 測定に用いた母体血の採取時期の違い：札幌コホートでは、妊娠中～後期のMEHP濃度を測定しているが、大規模コホートでは妊娠初期（器官形成期）の濃度を測定している。フタル酸エステル類は代謝速度が速いことから、曝露評価を行った時期の違いにより第二性徴開始時期への影響が異なる可能性がある。

- b) 濃度の違い:MEHPの中央値が、札幌コホートでは9.8ng/mL、大規模コホートの本集団では0.97ng/mLで、札幌コホートよりも大規模コホートのMEHP濃度が低かった。動物実験で、DEHPの低用量曝露ではアロマターゼ活性の抑制、高用量曝露ではアロマターゼ活性の促進といったように、曝露レベルにより性ホルモンに与える影響が報告されていることから(Andrade 2006)、濃度の違いが性ホルモン濃度へ与える影響の違いによって、第二次性徴開始時期への異なる影響が見られた可能性がある。

以上より、男児では、MEHP曝露濃度が高い札幌コホートでは、Inhibin BおよびINSL3およびT/E2の出生時ホルモン濃度を低下させ、第二次性徴開始月齢が遅らせたが、大規模コホートでは影響がみられなかったことから、妊娠後期のMEHP曝露が妊娠初期(器官形成期)の曝露より第二次性徴開始に与える影響が大きい、もしくは曝露濃度が高いほど影響が顕著にみられる可能性が考えられた。

女児では、MEHP曝露濃度が高いと、札幌コホートでは第二次性徴開始指標の一つである胸のふくらみ開始時期が遅れ、一方大規模コホートでは開始時期が早くなることから、曝露時期および曝露濃度によってその影響が異なる可能性が示唆された。MnBP、MiBP曝露濃度が高いと、女児で第二次性徴開始月齢が早くなるメカニズムとして、胎内ホルモンとの関連でみられたMnBP、MiBP曝露によるT濃度およびT/E2比の攪乱が考えられる。今後もコホート参加児の追跡を続け、第二次性徴調査を継続して、サンプルサイズを増やして環境化学物質が第二次性徴開始時期へ与える影響について検討する予定である。加えて、環境化学物質による性ホルモン濃度への影響が、第二次性徴開始時期への影響に介在しているかを媒介分析にて検討していく。

5. 本研究開発により得られた成果

(1) 科学的意義

胎児期の環境要因が生後の性成熟に与える影響について詳細に分析した研究は国際的にも非常に少ない。本研究では、現時点では最も精度の高いと考えられるLC-MSMSを用いた分析による曝露評価により妊娠中のBPAやフタル酸エステル類など環境化学物質曝露の測定を行うことで胎生期のホルモン環境や学童期以降の第二次性徴開始に与える影響を解明することが可能であった。今後さらなる検討は必要であるが、本研究の結果からは、母へのフタル酸エステル類曝露は胎児の内分泌環境へ影響を与え、男女とも思春期の第二次性徴の発来時期に影響を与えている可能性を示唆した。さらに、今回検討した環境化学物質であるフタル酸エステル類、BPA共に半減期が短い。曝露時期によって、また曝露レベルによって胎生期のホルモン環境や第二次性徴の開始時期が異なる可能性を示した。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究で実施したBPA、フタル酸エステル類の曝露測定結果から、国内の妊婦のBPA、フタル酸エステル類への曝露実態に関する貴重なデータを提供した。特にフタル酸エステル類は、7種類の代謝物の測定を実施し、曝露実態を明らかにした。即ち、本研究は日本の妊婦や児のデータに基づく科学的な成果を提供できるものとする。フタル酸エステル類は、DEHPが油性食品に接触する器具および包装容器に、また6種類の化合物(DEHP、DBP、BBzP、DiNP、DiDP、DNOP)が乳幼児の玩具への使用が規制されている。このような規制はあるが、我が国の妊婦がDnBP、DiBPおよびDEHPに曝露されていることが明らかになった。さらに、胎児期のフタル酸エステル類曝露が、子どもの性腺機能や第二次性徴に影響を与えている可能性を示唆したことから、さらなる規制が必要か、今後も引き続き検討が必要である。

また、WHOから出された「State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012」では、組織や臓器の発達を阻害する環境化学物質である内分泌かく乱化学物質(EDCs)についてグローバルな対

策が必要とされている。さらに、2012年の第3回国際化学物質管理会議ではEDCsを国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチの新規政策課題に挙げており、特にヒトの疫学データが少ない性分化や性成熟、次世代影響を研究、評価することは緊急の課題であり、その対策に直結する。

本研究では胎児期のフタル酸エステル類曝露による児の性ホルモンや第二次性徴発来時期への影響を示唆した。「胎児から小児期にかけての化学物質曝露が、子どもの健康に大きな影響を与えているのではないか?」という中心仮説を解明する環境省「子どもの環境と健康に関する全国調査(エコチル調査)」においてもこれら化学物質曝露による内分泌かく乱作用を注意深く検討する必要性を示した。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) C. Miyashita, A. Araki, T. Mitsui, S. Itoh, H. Goudarzi, S. SASAKI, J. Kajiwara, T. Hori, K. Cho, K. Moriya, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi. Sex-related differences in the associations between maternal dioxin-like compounds and reproductive and steroid hormones in cord blood: the Hokkaido Study., *Environment International*, in press
- 2) T. Mitsui, A. Araki, H. Goudarzi, C. Miyashita, S. Ito, Sasaki S., T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, N. Shinohara, M. Takeda, K. Nonomura; Relationship between adrenal steroid hormones in cord blood and birth weight: The Sapporo Cohort, Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *American Journal of Human Biology*. 2018.
- 3) R. Kishi, A. Araki, M. Minatoya, S. Itoh, H. Goudarzi, C. Miyashita, Birth cohorts in Asia: The importance, advantages, and disadvantages of different-sized cohorts, *Science of the Total Environment*, 615, 1143-1154, 2018
- 4) A. Araki, C. Miyashita, T. Mitsui, H. Goudarzi, F. Mizutani, Y. Chisaki, S. Itoh, S. Sasaki, K. Cho, K. Moriya, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi. Prenatal organochlorine pesticide exposure and the disruption of steroids and reproductive hormones in cord blood: The Hokkaido study. *Environment International*, 110, 1-13, 2018
- 5) M. Minatoya, S. Sasaki, A. Araki, C. Miyashita, S. Itoh, J. Yamamoto, T. Matsumura, T. Mitsui, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, H. Minakami, N. Shinohara, R. Kishi; Cord blood bisphenol A levels and reproductive and thyroid hormone levels of neonates: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health., *Epidemiology*, 1, S3-S9, 2017
- 6) R. Kishi, A. Araki, M. Minatoya, T. Hanaoka, C. Miyashita, S. Itoh, S. Kobayashi, Y. Ait Bamai, K. Yamazaki, R. Miura, N. Tamura, K. Ito. H. Goudarzi; The Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile - updated 2017, *Environmental Health and Preventive Medicine*, 22-46, 2017
- 7) A. Araki, T. Mitsui, H. Goudarzi, T. Nakajima, C. Miyashita, S. Itoh, S. Sasaki, K. Cho, K. Moriya, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi; Prenatal di(2-ethylhexyl) phthalate exposure and disruption of adrenal androgens and glucocorticoids levels in cord blood: The Hokkaido Study. *Science of the Total Environment*, vol.581-582: 297-304, 2017
- 8) M. Minatoya, A. Araki, C. Miyashita, S. Sasaki, Y. Goto, T. Nakajima, R. Kishi; Prenatal di-2-ethylhexyl phthalate exposure and cord blood adipokine levels and birth size: The Hokkaido study on environment and children's health., *Science of the Total Environment*, , 579, 606-611, 2017

- 9) S. Itoh, A. Araki, T. Mitsui, C. Miyashita, H. Goudarzi, S. Sasaki, K. Cho, H. Nakazawa, Y. Iwasaki, N. Shinohara, K. Nonomura, R. Kishi; Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Environmental International*, 94:51-59, 2016
- 10) H. Goudarzi, A. Araki, S. Itoh, S. Sasaki, C. Miyashita, T. Mitsui, H. Nakazawa, K. Nonomura, R. Kishi; The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Glucocorticoid and Androgenic Hormones in Cord Blood Samples: The Hokkaido Study. *Environ Health Perspect*; DOI:10.1289/EHP142, 2016
- 11) T. Mitsui, A. Araki, C. Miyashita, S. Ito, T. Ikeno, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, N. Shinohara, M. Takeda, K. Nonomura; The Relationship between the Second-to-Fourth Digit Ratio and Behavioral Sexual Dimorphism in School-Aged Children. *PLoS One*. 11 (1):e0146849, 2016.
- 12) T. Mitsui, A. Araki, H. Goudarzi, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, N. Shinohara, M. Takeda, K. Nonomura; Effects of adrenal androgens during the prenatal period on the second to fourth digit ratio in school-aged children. *Steroids*. 113 46-51, 2016.
- 13) 荒木敦子、伊藤佐智子、宮下ちひろ、湊屋街子、岸玲子「環境化学物質による次世代の性ホルモンへの影響」*衛生学雑誌*、in press
- 14) 岸玲子、荒木敦子、宮下ちひろ、伊藤佐智子、湊屋街子、小林澄貴、山崎圭子、アイツバマイゆふ、三浦りゅう、田村菜穂美「2 万人規模の出生コホートと、500 人規模の小コホートからなる北海道スタディが目指してきたもの：環境と子どもの健康—先天異常・発達・アレルギーの 15 年におよぶ経験と成果」、*日本衛生学雑誌*、in press

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 岸玲子、宮下ちひろ、荒木敦子、環境化学物質の次世代影響に関する出生コホート研究：環境と子どもの健康に関する北海道スタディの成果と課題、*アンチ・エイジング医学*, 12(2), 067-076, 2016.
- 2) 荒木敦子、伊藤佐智子、岸玲子；【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第 13 回環境化学物質曝露による内分泌系への影響（2）性ホルモン. *公衆衛生*. 80(3):221-227, 2016.
- 3) 岸玲子；世界における出生コホート研究の現状. *Endocrine Disrupter News Letter*. 18(1) 1, 2015.
- 4) 荒木敦子、アイツバマイゆふ、岸玲子；【講座 子供を取り巻く環境と健康】短半減期化学物質の曝露実態. *公衆衛生*. 79 485-490, 2015.
- 5) 岸玲子；【講座 子供を取り巻く環境と健康】「奪われし未来」にしない. *公衆衛生*. 79 193-199, 2015.

（2）口頭発表（学会等）

- 1) Araki, A., Kishi R.: Prenatal Di(2-ethylhexyl)phthalate Exposure and Reproductive Hormone in Cord Blood - The Hokkaido Study, *ISEE-ISES AC2016*, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016. 6. 26-29)
- 2) Araki, A., Miyashita, C., Mitsui, T., Goudarzi, H., Itoh, S., Mizutani, F., Chisaki, Y., Sasaki, S., Moriya, K., Cho, K., Shinohara, N., Nonomura, K., Kishi, R., Prenatal exposure to

prganochlorine pesticides and steroid hormones profiles in fetal blood: The Hokkaido Study, PPTOX V Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu, Japan, (2016.11.13-16)

- 3) Kishi, R., Environmental eddocrine-disrupting chemicals and their effects to children: 13 years progress of the Hokkaido Birth Cohort Study, PPTOX V, Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu, Japan, (2016.11.13-16)
- 4) Kishi, R., Araki, A., Miyashita, C., Itoh, S., Goudarzi, H., Maternal exposure to endocrine disrupting chemicals (perfluoro-alkyls, phthalates and PCB/dioxins) and children' s reproductive hormone levels at birth; the Hokkaido Study on Environment and Children' s Health, EPICOH2016, Barcelona, Spain, (2016.9.4-7)
- 5) Itoh, S., A. Araki, C. Miyashita, H. Goudarzi, S. Kato, Y. Iwasaki, H. Nakazawa, N. Shinohara, R. Kishi, Hokkaido Study on Environment and Children' s Health: Endocrine Disruption Effect of Perfluoroalkyl Substances Exposure in Utero, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
- 6) 荒木敦子, ホウマヌグウダルジ, 三井貴彦, 那須民江, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 佐々木成子, 長和俊, 野々村克也, 岸玲子: 「DEHP曝露による胎生期ステロイドホルモンプロファイルへの影響-北海道スタディ」 第86回日本衛生学会学術総会, 北海道、旭川, (2016.5.11-13.)

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 市民講演会「北海道の子ども取り巻く環境と健康 ～2万人の調査から～」
平成30年2月15日、札幌エルプラザ、観客約45名)
- 2) 市民講演会「環境が与えるこどもへの影響～北海道スタディとエコチル調査からわかったこと～」
(平成29年2月23日、札幌市かでる2.7、観客約47名)
- 3) 市民講演会「環境が与えるこどもへの影響～北海道スタディとエコチル調査からわかったこと～」
(平成28年3月14日、札幌エルプラザ、観客約45名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. 2006. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (dehp): Non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. Toxicology 227:185-192.
- 2) Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Nakajima T, Naito H, Ito S, et al. 2014. Association between

maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood: The hokkaido study on environment and children's health. *PloS one* 9:e109039.

- 3) Buttke DE, Sircar K, Martin C. 2012. Exposures to endocrine-disrupting chemicals and age of menarche in adolescent girls in nhanes (2003–2008). *Environmental health perspectives* 120:1613–1618.
- 4) Chou WC, Chen JL, Lin CF, Chen YC, Shih FC, Chuang CY. 2011. Biomonitoring of bisphenol a concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: A birth cohort study in taiwan. *Environmental health : a global access science source* 10:94.
- 5) Dostal LA, Chapin RE, Stefanski SA, Harris MW, Schwetz BA. 1988. Testicular toxicity and reduced sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl)phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicology and applied pharmacology* 95:104–121.
- 6) Ferguson KK, Peterson KE, Lee JM, Mercado-Garcia A, Blank-Goldenberg C, Tellez-Rojas MM, et al. 2014. Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol a in relation to sex hormones and puberty in boys. *Reproductive toxicology* 47:70–76.
- 7) Hart R, Doherty DA, Frederiksen H, Keelan JA, Hickey M, Sloboda D, et al. 2014. The influence of antenatal exposure to phthalates on subsequent female reproductive development in adolescence: A pilot study. *Reproduction (Cambridge, England)* 147:379–390.
- 8) Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC. 2009. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environment international* 35:14–20.
- 9) Itoh S, Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Goudarzi H, Sasaki S, et al. 2016. Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the hokkaido study on environment and children's health. *Environment international* 94:51–59.
- 10) Koch HM, Bolt HM, Angerer J. 2004. Di(2-ethylhexyl)phthalate (dehp) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled dehp. *Archives of toxicology* 78:123–130.
- 11) Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, et al. 2003. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environmental health perspectives* 111:1783–1785.
- 12) McGuinn LA, Ghazarian AA, Joseph Su L, Ellison GL. 2015. Urinary bisphenol a and age at menarche among adolescent girls: Evidence from nhanes 2003–2010. *Environmental research* 136:381–386.
- 13) Minatoya M, Naka Jima S, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Ikeno T, et al. 2016. Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: The hokkaido study on environment and children's health. *Science of the total environment* 565:1037–1043.
- 14) Mouritsen A, Frederiksen H, Sorensen K, Aksglaede L, Hagen C, Skakkebaek NE, et al. 2013. Urinary phthalates from 168 girls and boys measured twice a year during a 5-year period: Associations with adrenal androgen levels and puberty. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98:3755–3764.
- 15) Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. 2017. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: Effects on the male and female reproductive systems. *Environmental toxicology and pharmacology* 51:56–70.
- 16) Su PH, Chang CK, Lin CY, Chen HY, Liao PC, Hsiung CA, et al. 2015. Prenatal exposure to phthalate ester and pubertal development in a birth cohort in central taiwan: A 12-year

follow-up study. Environmental research 136:324-330.

- 17) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K. 2005. Exposure to bisphenol a is associated with recurrent miscarriage. Human reproduction 20:2325-2329.
- 18) Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. 2004. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol a, in normal women and women with ovarian dysfunction. Endocrine journal 51:165-169.
- 19) Watkins DJ, Sanchez BN, Tellez-Rojo MM, Lee JM, Mercado-Garcia A, Blank-Goldenberg C, et al. 2017a. Phthalate and bisphenol a exposure during in utero windows of susceptibility in relation to reproductive hormones and pubertal development in girls. Environmental research 159:143-151.
- 20) Watkins DJ, Sanchez BN, Tellez-Rojo MM, Lee JM, Mercado-Garcia A, Blank-Goldenberg C, et al. 2017b. Impact of phthalate and bpa exposure during in utero windows of susceptibility on reproductive hormones and sexual maturation in peripubertal males. Environmental health : a global access science source 16:69.
- 21) 内木 康博. 思春期の成熟を正しく評価しよう. 小児科診療 75(3), 375-380, 2012-03
- 22) 平成14年厚生労働省告示第267号. 2002年.
- 23) 平成22年厚生労働省告示第336号. 2010年.

III. 英文Abstract

Effect of Fetal Exposure to Endocrine Disruptor on Sex Differentiation, Gonadal Function and Puberty: Elucidation of Gene-Environment Interaction on Sexual Development

Principal Investigator: Nobuo SHINOHARA

Institution: Hokkaido University Graduate School of Medicine
 North-15, West-7, Kita-ku, Sapporo, 060-8638 JAPAN
 Tel: +81-11-706-5966 / Fax: +81-11-706-7853
 E-mail: nobuo-s@med.hokudai.ac.jp

Cooperated by: Hokkaido University Center for Environmental and Health Sciences
 National Institute of Public Health

[Abstract]

Key Words: Environmental chemicals, Prenatal exposure, Birth cohort, Sex differentiation, 2D/4D, anogenital distance, Sexually dimorphic brain development, Gonadal function, Puberty

The use of synthetic chemicals has increased in our life, and many environmental chemicals are now believed to have hormonal activity as endocrine-disrupting hormones (EDCs), which have the adverse effect on key steps during fetal development. In the present study, we aimed to reveal the effect of EDCs on the sex development and puberty.

In Japan environment and children's study (JECS), more than 1500 children were enrolled as an adjunct study. We measured the second and fourth digit length and the Pre-school Activities Inventory (PSAI) at 3 years of age, to investigate sex-typical characteristics and preferred toys which indicates sexually dimorphic brain development and behavior that are also known to be influenced by sex hormones exposure during prenatal periods. Ratio of the second and fourth digit length (2D/4D) at 3 years of age was significantly lower in males than in females. Concentration of phthalate in maternal urine during in early pregnancy was positively associated with 2D/4D in male offspring, which supports previous reports that phthalate exposure in utero has anti-androgenic effects on male offspring.

In the study of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in cord blood in a prospective birth cohort study in Sapporo, Hokkaido Study, SNPs of *XbaI* in *ESR1* gene were significantly associated with 2D/4D in males, which suggests that SNPs would be a significant co-variable when discussing physical phenotype on sexual differentiation.

In Hokkaido study, data regarding beginning of puberty were collected from 2 birth cohort, one named as Sapporo cohort and the other named as Hokkaido cohort. In Sapporo cohort which showed relatively high phthalate concentration in maternal blood evaluated at mid to late pregnancy, age at beginning of puberty was positively associated with concentration of phthalate in both male and female offspring. On the other side, in Hokkaido cohort, which showed relatively low phthalate concentration in maternal blood evaluated at early pregnancy, age at beginning of puberty was negatively associated with concentration of phthalate in female offspring. This finding suggests that phthalate exposure affects the beginning of puberty and

that the effect on puberty differs depending on the timing or dose of exposure.

In conclusion, our study revealed the effect of EDCs and a risk factor to EDCs on the sex development and puberty. Since we had the valuable physical and psychological data at birth and 3 years of age in JECS, we could develop our study to reveal the adverse effect of EDCs.