

課題名 **5C-1252 妊娠中及び胎児期における内分泌攪乱物質が性分化  
および性腺機能に及ぼす影響について**

課題代表者名 野々村 克也 (北海道大学 名誉教授)

研究実施期間 平成24～26年度

累計予算額 153,990千円 (うち26年度52,200千円) 予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 環境科学物質、胎児期曝露、性分化、性腺機能、性ホルモン、2D/4D、  
性役割行動、一塩基多型(SNP)、ゲノムワイド関連研究(GWAS)、  
遺伝・環境交互作用

#### 研究体制

- (1) 陰茎長・肛門性器間距離・精巣体積および第2指(2D)/第4指(4D)比と環境化学物質の関係  
(北海道大学大学院 医学研究科)
- (2) 環境化学物質が胎内ホルモン環境および性向行動に及ぼす影響  
(北海道大学 環境健康科学研究教育センター)
- (3) 異物・ステロイド代謝酵素やホルモンレセプター等の遺伝子多型によるリスク発現の  
感受性の差とメチル化との交互作用 (国立保健医療科学院)

#### 研究概要

##### 1. はじめに (研究背景等)

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 of 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曝露修飾も関連していると考えられている。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 [1, 2]。

本研究は、母への環境化学物質の濃度を曝露因子とし、化学物質濃度と胎内のホルモン環境、胎児の性分化および性腺機能との関連について検討を行った (図 1)。

##### 2. 研究開発目的

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年度より環境省「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8250人の妊婦を調査対象として子どもが13歳になるまでの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、母が曝露した血液中のPCB・ダイオキシン類や有機フッ素化合物PFOS・PFOA、フタル酸エステルなどの環境化学物質が胎児に与える影響について検討を行い、妊娠中および胎児期の環境化学物質が性分化および性腺機能におよぼす影響と機序について科学的に明らかにすることを目的とする。将来的には、今回の研究をもとに、ライフコース・アプローチで対象となった児を思春期まで長期に経過観察し、外性器の状態および性腺機能における胎生期の環境化学物質の曝露が与える長期間の影響につ

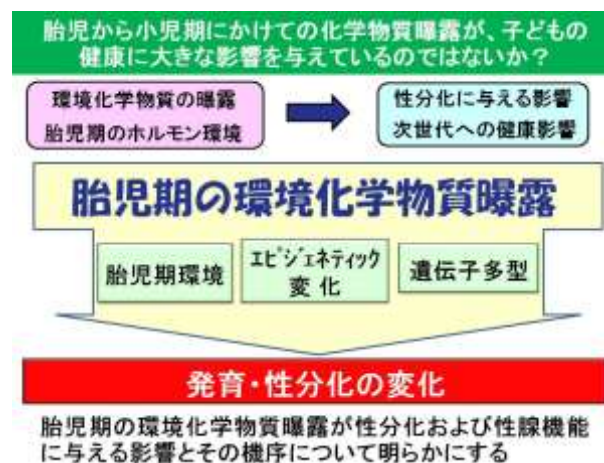


図 1 本研究の流れ

いても知見を得たいと考えている。

### 3. 研究開発の方法

#### (1) 陰茎長・肛門性器間距離・精巣体積および第2指(2D)/第4指(4D)比と環境化学物質の関係

##### 1) エコチル追加調査

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）」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、入院中の母体血の採取（各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た。

##### 2) 北海道スタディ

小規模コホートは、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」を実施した。すでに環境化学物質濃度の測定が終了している小規模コホートに登録されており、追跡可能な349人を対象に2D/4D比の測定を行うことの説明文を郵送して、同意書および両手のコピーの返送を持って研究への参加とした。返送された両手のコピーより2D/4D比の測定を行い、母体血中の環境化学物質の濃度と臍帯血中のホルモン濃度との関連について検討を行った。

環境化学物質は、妊娠後期の母体血で426名のポリ塩化ビフェニル(PCB)・ダイオキシン類を高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マススペクトロメーター(HRGC/HRMS)法(福岡県保健環境研究所)、447名のパーフルオロオクタンスルホン酸・ペルフルオロオクタン酸(PFOS・PFOA)を液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析(LC/MS/MS)法(星薬科大学)、および487名のDEHP代謝物Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) をガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)法(名古屋大学)で測定済みのデータを用いた。

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20,823人が登録した大規模出生コホート「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」である。大規模コホートでは、調査段階で7歳となる5044人を対象に同様に北海道スタディの詳細調査として2D/4D比の測定を行うことの説明文を郵送して、返送された両手のコピーより2D/4D比の測定を行い、臍帯血中性ホルモン濃度および性役割行動(J-PSAI)との関連について検討を行った。

#### (2) 環境化学物質が胎内ホルモン環境および性向行動に及ぼす影響

北海道スタディ小規模コホートでは、514人のうち、保存してあった全臍帯血295検体を用いて、臍帯血中の性ホルモン濃度の測定を行い、母の環境化学物質曝露との関連、について解析した。性ステロイドホルモンであるテストステロン(T)、エストラジオール(E2)、プロゲステロン(P4)、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)、アンドロステネジオン(A-dione)をLC-MS/MS法で、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)、およびプロラクチン(PRL)を免疫放射定量測定(IRMA)法で、InhibinBをELISA法で、insulin-like factor 3 (INSL3)をEIA法で測定した。また、7歳で実施済みのJ-PSAIとの関連についても解析した。

大規模コホートでは、全参加者20,823人の中で2013年までに8歳になった(2003年~2005年生まれ)7632人のうち臍帯血検体を保有、かつ妊娠中のベースライン調査票および出産時の新生児個票がそろった単胎、かつ2D/4Dのデータがそろった男児608人および女児583人を対象とした。このうち、サブコホートとして抽出した男児114人および女児93人の全員、加えて無作為抽出した男児336人および女児357人、最終的に男児女児それぞれ450人を性ホルモン測定対象者とした。保存してあった臍帯血を用いて900名のE2、T、P4を測定した。加えて、男児のみ高感度LH、高感度FSH、Inhibin B、およびINSL3を測定した。測定は全てあすか製薬メディカル(株)で実施した。8歳で実施済みのJ-PSAIとの関連についても解析した。

#### (3) 異物・ステロイド代謝酵素やホルモンレセプター等の遺伝子多型によるリスク発現の感受性の差とメチル化との交互作用

北海道スタディから得られた261名の臍帯血よりQIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen)を用いてゲノムDNAを抽出した。これらのゲノムDNA上の多型を解析するため、まず、異物・ステロイド代謝酵素遺伝子等の一塩基多型(SNP)に着目した。ジェノタイプピングには、BioMark (Fluidigm社)を用い、Fluidigm 48.48 Dynamic Array biochip (Fluidigm社)上で行った。解析する多型は、最近のGWASの結

果等から、T、E2及びSHBGとの関連が報告されたもののうち、日本人における出現頻度等をSNPデータベースで検索、確認の上、選択した46SNPに加え、出生時体重・BMI等の発育・肥満関連46SNPを追加した92SNPを検討した。ジェノタイピングの結果は、Fluidigm SNP Genotyping Analysis ソフトウェアを用いて解析した。ジェノタイピングの結果と、ジェノタイピングの結果と、子宮内胎児発育遅延（SGA：出生時体重<10パーセントイル）、低出生体重（出生時体重<2,500g）及び早産（在胎週数<37週）との関連を、母親の出産時年齢、出産歴、妊娠中の喫煙及び飲酒歴、児の性別で調整した多重ロジスティック回帰分析により解析した。また、出生時体重、身長、頭囲、胸囲、在胎週数、BMI及びPonderal Index（PI）との関連を母親の出産時年齢、出産歴、妊娠中の喫煙及び飲酒歴、児の性別で調整した直線回帰モデルにより解析した。次に、ジェノタイピングの結果と、臍帯血中のT、E2、T・E2比（T/E2）、LH、FSH、P4、SHBG、PRL、Inh-B及び INSL3の濃度との関連を検討した。まず、遺伝子型（Genotype model）とホルモン濃度との関連をKruskal Wallis検定により解析した。Kruskal Wallis検定で有意差がみられたSNPにおいては、各遺伝子型間の濃度差を多重比較（Bonferroni補正Mann-Whitney検定）により検定した。さらに、優性遺伝モデル（dominant model）または劣性遺伝モデル（recessive model）を用いて、ホルモン濃度との関連をMann-Whitney検定により解析した。また、遺伝子型と2D/4D比との関連は、優性遺伝モデルまたは劣性遺伝モデルを用いて、重回帰モデルにより解析した。環境化学物質濃度に関しては、遺伝子型との関連をKruskal Wallis検定により、MEHP濃度に関しては、底10の常用対数変換を行い、重回帰モデルにより解析した。

#### 4. 結果及び考察

##### （1）陰茎長・肛門性器間距離・精巣体積および第2指(2D)/第4指(4D)比と環境化学物質の関係

###### 1) エコチル追加調査

パンフレットを送付および電話連絡を行った後に、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）が行われた。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。

2D/4Dは女児に比べ男児で有意に低い値であった。肛門性器間距離(AGD)は、女児に比べて男児で有意に長かった。陰茎長の平均は25.4 mmであり、多くの男児は20-30 mmの間に分布していた。精巣体積については、約8割で過去の報告通り0.7-1.5 mlの間に分布していた。その一方で、0.7ml未満や精巣が触知できない男児も一部に見られたことから、今後の経過観察が必要であると考えられた。

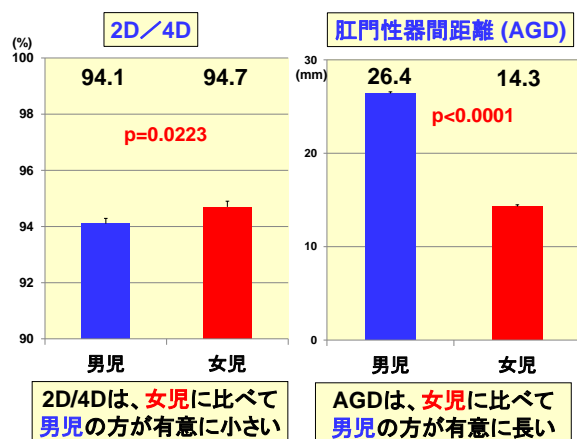


図2 2D/4D, AGD

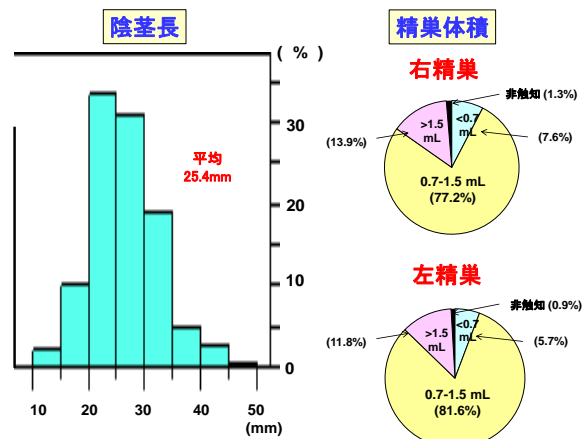


図3 陰茎長、精巣体積

本研究では同意率が高率であり、新生児の身体測定という貴重なデータを得ることができた。この身体測定のデータをもとに、今後エコチル本調査で得られる環境化学物質や生活環境などのデータから、環境因子が身体的変化に与える影響について今後明らかにしていきたい。

###### 2) 北海道スタディ

小規模コホートで得られた結果として、2D/4Dと環境化学物質曝露との関係は、Total PCBs、Total Dioxin、PFOS、PFOA、MEHPなどの環境化学物質について検討したが、2D/4Dの全体、男女別の値と母の環境化学物質曝露との間に有意な相関があるものは認められなかった。母における低濃度の環境化学物質の曝露では、児の身体的変化までは影響を及ぼさないものと考えられた。2D/4Dと胎内ホルモ

ン環境の関係については、臍帯血中のINSL3濃度と2D/4D比有意に関連しており、胎生期のLeydig細胞の機能低下が示唆されるINSL3濃度の低下が診られた症例で、2D/4Dが有意に高く、女兒に近い表現型を示した。また、胎生期の副腎由来のアンドロゲンも関連していることも明らかとなった。

大規模コホートで得られた結果として、2D/4Dと学童期のJ-PSAIについては、Composite scoreでは、女兒では、2D/4DとJ-PSAIの間に有意な相関は認められなかったが、男児では2D/4DとJ-PSAIの間に有意な負の相関を認めた。一方、feminine scoreでは、男児、女兒ともに2D/4Dとの間に有意な相関を認めなかったが、masculine scoreでは、男児、女兒ともに2D/4Dとの間に有意な関連を認めた。一方、兄弟、姉妹の有無についても、学童期のJ-PSAIに影響を与えていた。アンドロゲンへの曝露が強い（2D/4Dが低い）児では、男女ともにmasculine scoreは高くなっていった。また、Composite scoreでも、男児のみではあるがアンドロゲンへの曝露が強い児で、より高い値となっていた（男性化が強い）。このように、胎生期のアンドロゲンへの曝露が、その後の脳の性分化に影響を与えていると考えられた。学童期におけるJ-PSAIと臍帯血中の性ホルモン濃度については、男児では、J-PSAIと臍帯血中の性ホルモン濃度の間に有意な関連を認めることができなかったが、女兒においては、composite scoreではPとの間に負の関連を、feminine scoreでは、エストラジオール(E)、プロゲステロン(P)との間に正の関連を認め、臍帯血中のE、Pが性役割行動における女性化に関連していることが示唆された。胎生期の男性ホルモンへの曝露が、性役割行動における男性化に関与していることが報告されているが、今回の結果は、臍帯血中の男性ホルモン濃度が必ずしも性分化に関わる時期のアンドロゲンへの曝露を反映していないためと考えられた。一方、今回の結果は女性化にE、P関与していることを示唆しており、新たな知見となりうると考えられた。更なる検討が必要である。

## (2) 環境化学物質が胎内ホルモン環境および性向行動に及ぼす影響

### 環境化学物質曝露による性ホルモンへの影響

男児のホルモン濃度は女兒よりもT、LH、FSH、Inhibin B、INSL3、T/E2、およびT/SHBGが有意に高かった。一方、DHEAは女兒の方が有意に濃度が高かった。

**PCB・ダイオキシン類**: 連続数のモデルでは男児でPCB濃度が高いほどT/E2が有意に低かった。また、ダイオキシン類濃度が高いほどDHEA濃度は有意に高く、SHBGおよびPRL濃度が有意に低かった。ダイオキシン類濃度が高いほどT/E2の低下傾向が認められた(p=0.055)。男児の四分位のモデルでは、PCB濃度の第1四分位から第4四分位にかけてT/E2比が低下する傾向が認められた。ダイオキシン類濃度の第1四分位から第4四分位にかけて、T/E2比、SHBG、PRLが有意に低下した(図3)。一方の女兒では、PCB/ダイオキシン類濃度といずれの性ホルモンとの関連も見られなかった。

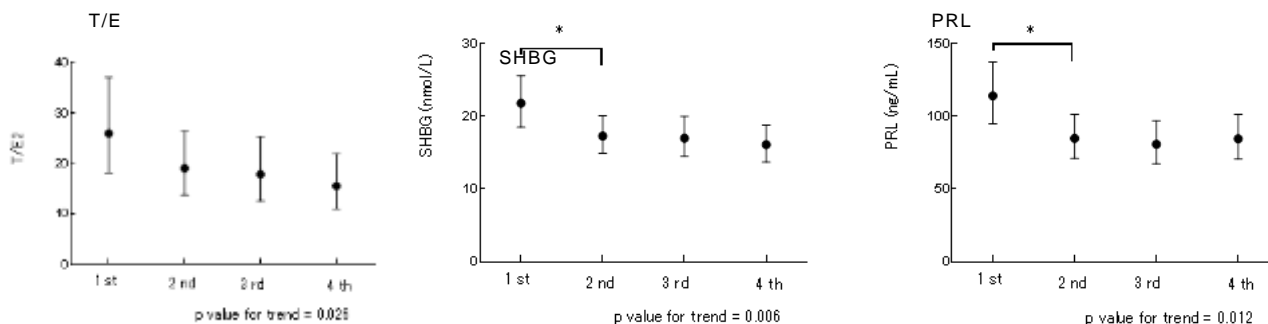


図3 ダイオキシン類 (TEQ) 濃度と性ホルモン(男児)

**有機フッ素化合物**: PFOS濃度が高いと、男児ではT/E2、LH、Inhibin Bは有意に下がり、一方女兒ではP4およびPRL濃度が有意に低下した。PFOA濃度が高いと、男児ではP4およびInhibin Bが高かった

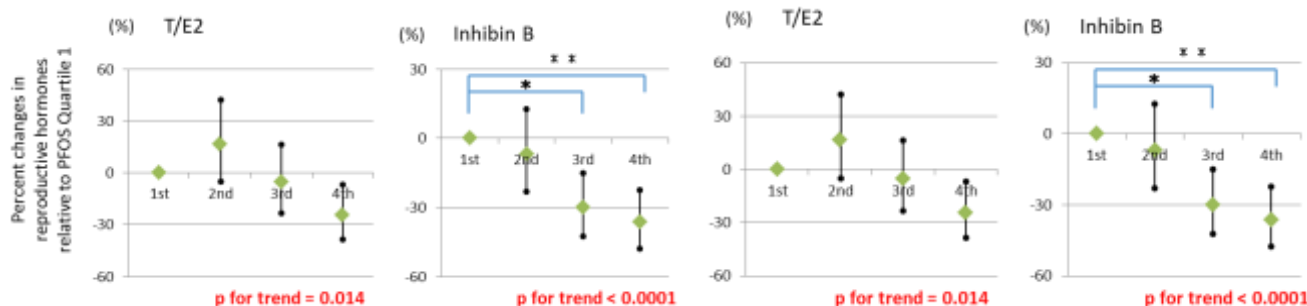


図4 PFOS濃度と性ホルモン(男児)

図5 PFOS濃度と性ホルモン(女兒)



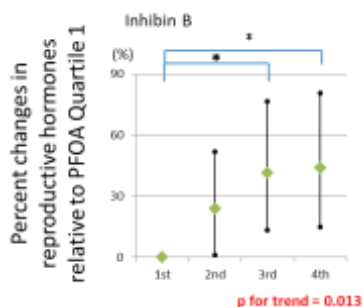


図6 PFOA濃度と性ホルモン(男児)

が、女児では有意な関連はなかった。次いで、PFOS/PFOAを四分位にすると男児では、PFOS濃度が高いほどT/E2比が有意に小さくなった。また、Inhibin Bは第1四分位と比較して第3四分位、第4四分位で有意に低く、p-for trendも有意だった(図4)。女児では、P4、PRLともに第1四分位と比較して第4四分位が有意に低く、p for trendも有意であった(図5)。一方PFOAは、男児で第1四分位と比較して第3および第4四分位のInhibin Bレベルが有意に高く、p-for trendも有意だった(図6)。

**フタル酸エステル:** 全体では、連続数のモデルではMEHP濃度が高いと、T/E2、P4、A-dione、InhibinBは有意に下がり、DEHPは有意に上昇した。MEHPと性に交互作用はなかった。次いで、MEHPを四分位とすると、T/E2は第1四分位と比較して第2四分位は有意に高く、第4四分位は有意に低かった。P-for trendも有意だった。P4は第1四分位と比較して第4四分位が有意に低く、p for trendも有意であった。Inhibin Bは、第1四分位と比較して第3および第4四分位が有意に低く、p-for trendおよび男女交互作用も有意だった。一方、男女別でみると、連続数のモデルでは男児でMEHP濃度が高いとT/E2、P4、Inhibin B、およびINSL3濃度が有意に低く、DHEA濃度は有意に高かった。四分位のモデルでは、MEHP濃度の第1四分位と比較して、P4、InhibinB、INSL3はいずれも第4四分位のホルモン濃度が有意に低く、p-for trendも有意だった(図7)。一方の女児では、MEHP濃度といずれの性ホルモンとの関連も見られなかった。

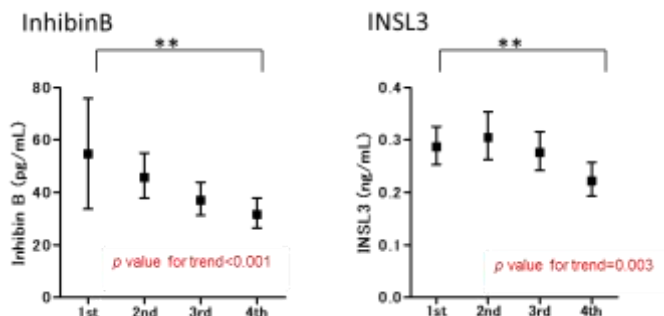


図7 MEHP濃度と性ホルモン(男児)

#### 環境化学物質曝露によるJ-PSAIへの影響

交絡要因を調整した重回帰分析において、男児(n=54)のみで母体血中ダイオキシン類が高いほどJ-PSAI Scaleが低下する、つまり女児傾向が認められた(B (95%CI)=-14(-178, -0.68))。男児傾向と女児傾向の得点別の解析では、母体血中ダイオキシン類濃度が高いほど男児傾向得点が低下する傾向が認められた(B (95%CI)=-13.9 (-28.8, 1.06))が、女児傾向得点への影響は少なく有意ではなかった(B (95%CI)=-0.89 (-11.9, 10.1))。一方、PFOS、PFOA、MEHPは本研究ではJ-PSAIと有意な関連が認められなかった。また、男児傾向得点および女児傾向得点とも有意な関連は認められなかった。

本研究の限界としてサンプル数が男児54人、女児48人と少なかったため、統計学的に有意な結果が得られなかった可能性がある。より大きなサンプルサイズでの検討が必要である。

#### 大規模コホート胎内ホルモン環境と母児の基本的属性との関連

男女別に臍帯血中の性ホルモンと母児の属性との関連を検討したところ、母親の年齢が高いほど男児でE2、P4は低下しT/Eは増加し、女児でE2が低下した。母親の非妊娠時体重が増加するほど女児でP4が低下した。母親が初産では、男児でE2、T、P4が高く、T/E2比が低下し、女児でE2、P4が増加し、T/E2

比が低下した。妊娠初期に飲酒をしていた母親では、女兒のT/E2比が飲酒をしていない母の児よりも低かった。母親の妊娠初期の喫煙とは関連が認められなかった。母親の学歴では、男児と性ホルモンに関連がなく、女兒で学歴とE2、T/E2比の分布に差が見られた。世帯年収では男児でINLS3濃度に分布の差が認められたが、女兒では性ホルモンと関連がなかった。児の在胎週数が増加するほど、男児でP4が増加し、LH,FSHが低下した。出生体重が増加するほど、男児でT,LH、インヒビンBが低下し、女兒でP4が低下した。

### (3) 異物・ステロイド代謝酵素やホルモンレセプター等の遺伝子多型によるリスク発現の感受性の差とメチル化との交互作用

優性遺伝モデル（例えば、rs402675におけるAA+AT型対TT型）により、出生時体格指標と血清性ホルモン濃度と関連のある一塩基多型との関連を検討した。rs402675 (CNTN6遺伝子近傍) 及びrs293428 (UGT2B15遺伝子近傍) において平均出生時体重の低下、rs10454142 (LHCGR遺伝子近傍)、rs2676531 (HSD17B1遺伝子)、rs402675 及びrs1641537 (SHBG遺伝子近傍) において平均BMIの低下、rs10454142、rs2676531 及びrs1641537 において平均PIの低下がみられた。これらのSNPのうち、rs402675では平均出生時胸囲の低下、rs293428では平均出生時頭囲と出生時胸囲の低下も併せてみられた。

環境化学物質とホルモン濃度とともに有意な関連がみられたのが、ZBTB10遺伝子近傍のrs440837である。ZBTB10はzinc finger and BTB domain containing 10という性ホルモンの調節に関与するDNA結合タンパク質で、ZBTB10遺伝子近傍のrs440837を優性遺伝モデルで遺伝子型をAA型とAG/GG型に分けて検討すると、男女ともAG/GG型では、フタル酸エステルの代謝物MEHP濃度が有意に高く、SHBG、PRL及びInh-B濃度は有意に低く、男児でのみE2濃度が有意に高かった。常用対数変換した重回帰分析によっても、ZBTB10遺伝子近傍rs440837 AG/GG遺伝子型では、AA遺伝子型より、男女ともMEHP濃度が有意に高く、男児でInh-Bの分泌が抑制され、E2が上昇することが示唆された。また、AG/GG型の男児では、MEHP濃度は高いほうにシフトし、高濃度群でInhibin Bの分泌が抑制されることが示唆された(図8)。

PFOS濃度、Tdioxin TEQは、全員でZBTB10遺伝子近傍rs440837の遺伝子型と関連がみられ( $p < 0.01$ )、PFOA濃度は、男児でのみATF3遺伝子rs10475、FTO遺伝子 rs1421084の遺伝子型と関連がみられ

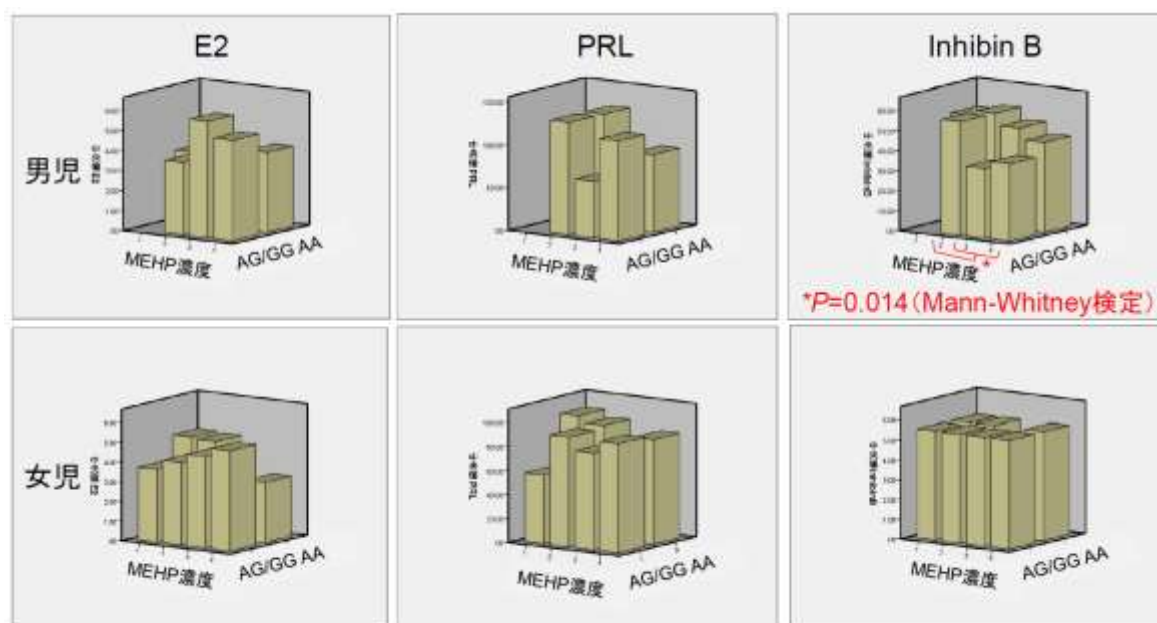


図8 MEHP濃度(4分位)及びZBTB10 rs440837 (AG/GG, AA)で層別化したE2, PRL及びInhibin B濃度

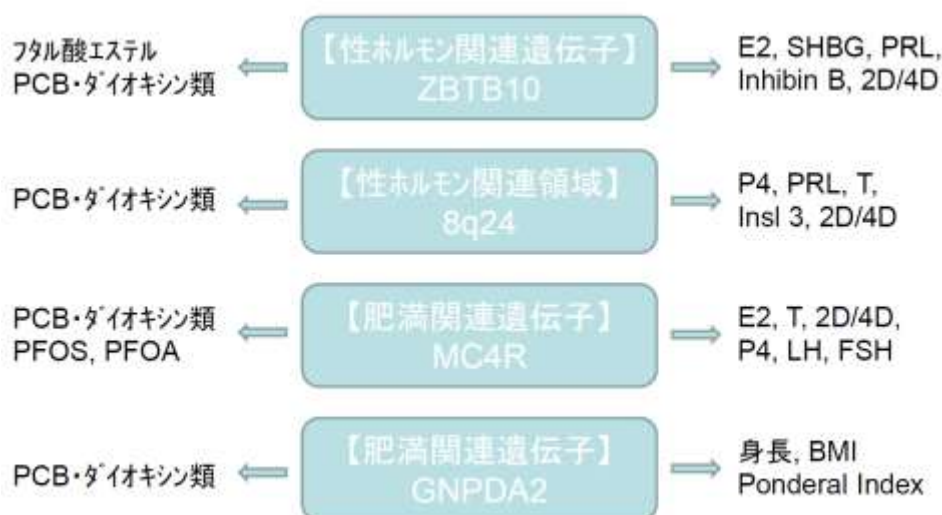


図9 環境化学物質曝露、臍帯血ホルモン濃度及び発育指標と関連のみられる遺伝要因

( $p < 0.01$ )、MEHP濃度は、全員、男児、女児いずれもrs440837の遺伝子型と関連がみられ( $p < 0.001$ )、全員でTDGF3遺伝子近傍rs1573036の遺伝子型と関連がみられ( $p < 0.01$ )、TCPCB(女児)、TNPCB TEG(全員、女児)及びTMPCB TEQ(女児)は、GNPDA2遺伝子近傍rs10938397の遺伝子型と関連がみられ( $p < 0.01$ )、TPCDD TEG、TPCDF TEQ、Tdioxin TEQは、全員で8q24領域rs1456310の遺伝子型と関連がみられた( $p < 0.01$ ) (図9)。

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

胎児期と生後の両方の環境要因を詳細に分析した研究は国際的にも非常に少ない。本研究は世界的に見て最も精度の高い曝露評価により妊娠中や生後のPCB・ダイオキシン類、PFOS/PFOAなどの有機フッ素系化合物、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ので、WHOなどで内分泌かく乱化学物質に対して最も感受性が高く重要なエンドポイントとされている胎内曝露や生後の環境による次世代影響、特に性腺機能についてリスク評価ができる。

PCB・ダイオキシン類曝露による性ホルモンへの影響は、中毒事故や油症患者による高濃度曝露、あるいは工業地域における比較的高濃度曝露の集団における報告はあったが、本研究では比較的曝露濃度が低い一般集団でも、胎児期曝露による出生直後および学童期の影響を示唆した。胎児期曝露による有機フッ素化合物PFC曝露による性ホルモンへの影響に関する報告は本研究が初めてである。胎児期のフタル酸エステルDEHP曝露は、動物実験で精巣のLeydig細胞およびSertoli細胞への生殖毒性を示すことが報告されていたが、ヒトでの胎児期曝露においても動物と同じく児の性腺機能、特に男児の精巣への影響が示唆された。

### (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>

本研究は、環境省が主導しているエコチル調査の基本課題「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？」という中心仮説の解決に大きく貢献するものとする。さらには、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。

また、第1回国際化学物質会議(ICCM, 2006)では「国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ」が策定されたが、第2回ICCM(2009)に新規の課題として追加された「PFCの管理と安全な代替物質への移行」、第3回ICCM(2012)に追加された「内分泌かく乱物質の理解促進」への対策に直結する。

わが国では、既にPCBやダイオキシン類については対策がとられて曝露レベルは低下しているが体内には長期間残存している。有機フッ素化合物のうち、胎児期のPFOS曝露による性腺機能への影響が見られた。PFOSやPFOAの代替物質として多くの有機フッ素化合物が生産されており、日本では

PFNAやPFDAの曝露濃度が増加している。フタル酸エステルDEHPは、油性の食品が接触する包装容器や乳幼児のおもちゃ、医療器具について規制があるが、その他の内装材や生活用品への規制はない。このように、物質によってこれまでの規制の状況、あるいは現在の生産量や使用量は異なるものの、PCBやダイオキシン類、有機フッ素化合物類、フタル酸エステルのいずれとも胎児期曝露が児の性腺機能への影響を示唆したことから、今後はこれらの代替物質も含めてリスク評価を継続し、次世代影響へ対策を検討する必要性がある事を示した。

## 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) R. Kishi, S. Kobayashi, T. Ikeno, A. Araki, C. Miyashita, S. Itoh, S. Sasaki, E. Okada, S. Kobayashi, I. Kashino, K. Itoh, S. Nakajima: The members of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health: Environ Health Prev Med, 18, 6 (vol, issue), 429-450 (2013)  
"Ten Years of Progress in the Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: Cohort Profile – Updated 2013."
- 2) S. Kobayashi, F. Sata, S. Sasaki, S. Ban, C. Miyashita, E. Okada, M. Limpar, E. Yoshioka, J. Kajiwara, T. Todaka, Y. Saijo, R. Kishi: Toxicol Lett, 219, 3 (vol, issue), 269-278 (2013)  
"Genetic association of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1) polymorphisms with dioxin blood concentrations among pregnant Japanese women"
- 3) A. Araki, T. Mitsui, C. Miyashita, T. Nakajima, H. Naito, S. Ito, S. Sasaki, K. Cho, T. Ikeno, K. Nonomura, R. Kishi: PLOS ONE, 9, 10 (vol, issue), e109039 (2014)  
"Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood"
- 4) T. Mitsui, A. Imai, S. Sato, A. Araki, C. Miyashita, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, K. Nonomura: European Urology 13, 1 (vol, issue), e437 (2014)  
"Effect of maternal exposure to endocrine-disrupting chemicals on sex hormone levels in cord blood and ratio of the second and fourth digit length in school children"
- 5) T. Mitsui, A. Araki, A. Imai, S. Sato, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, K. Nonomura: PLOS One, 10, 3 (vol, issue), e0120636 (2015)  
"Effects of prenatal Leydig cell function on the ratio of the second to fourth digit lengths in school-aged children."

#### <査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 佐田文宏：小児保健研究, 73, 6(巻,号) 769-775 (2014)  
「DOHaDの視点に立った生涯にわたるヘルスケア」
- 2) 佐田文宏：日本周産期・新生児医学会雑誌, 印刷中  
「出生ゲノムコホートの現状と展望」
- 3) 佐田文宏：最新医学, 印刷中  
「先制医療実現のための疫学研究：DOHaD学説に基づくライフコース疫学」

### (2) 主な口頭発表（学会等）

- 1) 檜野いく子、岡田恵美子、松浦英幸、山本潤、佐々木成子、宮下ちひろ、松村徹、岸玲子：第21回環境化学討論会（松山, 2012.7.11-13）「妊婦の血中 PFOS/PFOA 及び類縁化合物の定量法の確立」
- 2) 岡田恵美子、檜野いく子、松浦英幸、山本潤、佐々木成子、宮下ちひろ、松村徹、岸玲子：第21回環境化学討論会。（松山, 2012.7.11-13）「北海道における妊婦の血中 PFOS/PFOA および類縁化合物濃度」
- 3) Araki A, Miyashita C, Ikeno T, Sasaki S, Okada E, Ait Bamai Y, Tajima S, Cong S, Ukawa S, Kawai T, Tsuboi T, Kishi R. Birth cohort Consortium of Asia, (Taipei, Taiwan, 2012).  
"Research plan for 7-year old survey of the Hokkaido Study."
- 4) Okada E, Kashino I, Matsuura H, Yamamoto J, Sasaki S, Miyashita C, Matsuura T, Kishi R. Birth cohort Consortium of Asia, (Taipei, Taiwan, 2012). "Levels of perfluorinated chemicals in plasma samples of pregnant women from 2003-2011 in Hokkaido Japan."



- 5) Miyashita C, Sasaki S, Saijo Y, Okada E, Kobayashi S, Baba T, Kajiwara J, Todaka T, Iwasaki H, Nakazawa H, Hachiya N, Yasutake A, Kishi R. International Society of Exposure Science, (Seattle, USA, 2012).“Dioxins, Perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoic acid in the blood, and mercury concentrations in the hair during perinatal period in Japan.”
- 6) 佐田文宏. 第2回DOHaD研究会年会, (東京, 2013.6.7-8). 出生時～幼小児期の体格と成人期のアウトカム.
- 7) 江藤亜紀子, 荒木敦子, 三井貴彦, 岸 玲子, 野々村克也, 金谷泰宏, 佐田文宏. 第2回DOHaD研究会年会, (東京, 2013.6.7-8). 胎児の発育及び新生児の体格に影響を及ぼす胎児の遺伝要因.
- 8) Sata F, Eto A, Kanatani Y, Araki A, Mitsui T, Kishi R, Nonomura Katsuya. (Basel, August 19-23, 2013) Fetal genetic polymorphisms associated with estrogen levels and sex-hormone-binding globulin and fetal growth restriction. Conference of ISEE, ISES and ISIAQ: Environment and Health-Bridging South, North, East and West.
- 9) Eto A, Sata F, Kanatani Y, Araki A, Mitsui T, Kishi R, Nonomura Katsuya. (Basel, August 19-23, 2013)Fetal genetic polymorphisms associated with estrogen levels and sex-hormone-binding globulin and anthropometric parameters in newborns. Conference of ISEE, ISES and ISIAQ: Environment and Health-Bridging South, North, East and West.
- 10) Sata F, Eto A, Kanatani Y, Araki A, Mitsui T, Kishi R, Nonomura Katsuya. (Singapore, November 17-20, 2013)Fetal genetic polymorphisms associated with birth weight and body mass index and intrauterine fetal growth restriction. 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease.
- 11) 佐田文宏, 江藤亜紀子, 荒木敦子, 三井貴彦, 金谷泰宏, 岸 玲子, 野々村克也. (東京, 平成25年12月12, 13日). 胎児のホルモン環境に影響を及ぼす要因の検討: ホルモン関連遺伝子多型と臍帯血ホルモン濃度. 第16回環境ホルモン学会研究発表会.
- 12) Kishi R.; (SingaporeE013.11.17-20)Prenatal Perfluorinated Compounds Exposure and Early childhood Health. DOHaD2013-8th World Congress on DOHaD.
- 13) Araki A., Mitsui T., Miyashita C., Tagawa M., Nakajima T., Sasaki S., Ikeno T., Itoh S., Okada E., Cho K., Nonomura K., Kishi R. ( SingaporeE013.11.17-20) Maternal exposure to DEHP and sex hormone levels in cord blood. DOHaD2013-8th World Congress on DOHaD.
- 14) 荒木敦子, 岸玲子(岡山, 2014.05.25-27) フタル酸エステル類の胎児期曝露による次世代影響に関する疫学研究. 第84回日本衛生学会学術総会.
- 15) 荒木敦子, 三井貴彦, 宮下ちひろ, 那須民江, 伊藤佐智子, 佐々木成子, 長和俊, 池野多美子, 野々村克也, 岸玲子(岡山, 2014.05.25-27) DEHPへの胎児期曝露による児の性ホルモン濃度への影響. 第84回日本衛生学会学術総会.
- 16) 伊藤佐智子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 中澤裕之, 三井貴彦, 長和俊, 佐々木成子, 池野多美子, 野々村克也, 岸玲子(岡山, 2014.05.25-27) PFOS, PFOAの胎児期曝露が与える児の出生時性ホルモン濃度への影響. 第84回日本衛生学会学術総会.
- 17) Kishi R. (Seattle, USA, 2014.08.24-28) Exposure levels of perfluoroalkyl acids and their effects on children's health - Hokkaido study. 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference - From Local to Global: Advancing Science for Policy in Environmental Health.
- 18) Itoh S., Araki A., Miyashita C., Nakazawa H., Mitsui T., Cho K., Sasaki S., Ikeno T., Nonomura K., Kishi R. (Seattle, USA, 2014.08.24-28) Effect of PFOS and PFOA exposure in utero on reproductive hormones levels at birth. 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference - From Local to Global: Advancing Science for Policy in Environmental Health.
- 19) Araki A., Mitsui T., Miyashita C., Nakajima T., Nakazawa H., Sasaki S., Ikeno T., Cho K., Itoh S., Nonomura K., Kishi R. (Seattle, USA, 2014.08.24-28) Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and sex hormone levels in fetal blood. 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference - From Local to Global: Advancing Science for Policy in Environmental Health.
- 20) Reiko Kishi, Atsuko Araki, Sachiko Itoh, Chihiro Miyashita, Houman Goudarzi, Sachiko Kobayashi, Seiko Sasaki, Ikuko Kashino, H Nakazawa, Tamie Nakajima, Takahiko Mitsui,

Katsuya Nonomura(Boston, MA, USA, 2014.10.26-29) Perinatal PFAAs Exposure Cause Various Health Outcomes on Offspring Including Effects on Reproductive and Thyroid Hormones: The Hokkaido Study. PPTOX IV .

- 21) 三井貴彦、荒木敦子、宮下ちひろ、今井紋子、佐藤早基子、橘田岳也、守屋仁彦、長和俊、森岡圭太、伊藤佐智子、岸玲子、野々村克也:第102回日本泌尿器科学会(神戸、2014.4)「母体への環境化学物質曝露と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指比との関連性について」
- 22) Takahiko Mitsui, Ayako Imai, Sakiko Sato, Atsuko Araki, Chihiro Miyashita, Takeya Kitta, Kimihiko Moriya, Kazutoshi Cho, Keita Morioka, Reiko Kishi, Katsuya Nonomura: 62th Annual meeting, Society of Pediatric Urology (Orlando, USA, 2014.5) 「Effect of maternal exposure to endocrine-disrupting chemicals on sex hormone levels in cord blood and ratio of the second and fourth digit length in school-age children」
- 23) 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、篠原信雄、野々村克也:第23回日本小児泌尿器科学会(2014.7)「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指比との関連性について」
- 24) Takahiko Mitsui, Atsuko Araki, Sachiko Ito, Chihiro Miyashita, Takeya Kitta, Kimihiko Moriya, Kazutoshi Cho, Keita Morioka, Nobuo Shinohara, Reiko Kishi, Katsuya Nonomura: 30<sup>th</sup> Annual meeting, European Urological Association (Madrid, 2015.3)「Effect of prenatal androgen exposure on behavioral sexual dimorphism in school-aged children」
- 25) Sata F, Eto A, Kanatani Y, Araki A, Mitsui T, Kishi R, Nonomura K. (Seattle, Washington, USA, August 24-28, 2014) Associations between fetal genetic polymorphisms and cord blood sex hormone and protein levels. 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference.
- 26) 佐田文宏(岡山, 2014年5月25~27日)DOHaDと疫学, 第84回日本衛生学会学術総会.
- 27) 佐田文宏(舞浜, 2014年7月13~15日)出生ゲノムコホートの現状と展望, 第50回日本周産期・新生児医学会学術集会.
- 28) 佐田文宏, 江藤亜紀子, 金谷泰宏, 三井貴彦, 荒木敦子, 岸玲子, 野々村克也(和歌山, 2015年3月26~28日)第2指・第4指比(2D/4D)に影響を及ぼす遺伝要因の検討, 第85回日本衛生学会学術総会.

## 7. 研究者略歴

課題代表者: 野々村 克也

北海道大学医学部卒業、医学博士、現在、北海道大学 名誉教授

研究分担者

- 1) 三井 貴彦  
北海道大学大学院医学研究科修了、博士(医学)、現在、北海道大学病院 助教
- 2) 水上 尚典  
自治医科大学大学院医学研究科修了、博士(医学)、現在、北海道大学医学研究科教授
- 3) 長 和俊  
北海道大学大学院医学研究科修了、博士(医学)、現在、北海道大学病院准教授
- 4) 岸 玲子  
北海道大学大学院医学研究科修了、医学博士  
現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任教授
- 5) 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
- 6) 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 特任講師
- 7) 伊藤 佐智子  
北海道大学大学院歯学研究科修了、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 特任助教
- 8) 佐田 文宏  
京都大学医学部卒業、博士(医学)、現在、国立保健医療科学院生活環境研究部 客員研究員

## 5C-1252 妊娠中及び胎児期における内分泌攪乱物質が性分化および性腺機能に及ぼす影響について

### (1) 陰茎長・肛門性器間距離・精巣体積および第2指(2D)/第4指(4D)比と環境化学物質の関係

北海道大学 医学研究科：

(腎泌尿器外科学) 野々村克也、三井貴彦

(産科学/周産期センター) 水上尚典、長 和俊

(研究協力者) 今井紋子、佐藤早基子、橘田岳也、守屋仁彦、森岡圭太

平成24～26年度累計予算額：94,490千円

(うち、平成26年度予算額：32,030千円)

#### [要旨]

母の環境化学物質への曝露が児の性腺機能、次世代の性分化や第二次性徴の発来などへ影響を与える懸念が、近年世界的に高まっている。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。さらに、次世代の児における身体的変化については、未知な部分がほとんどである。本研究では、エコチル調査において、1500人を超える児の出生時の陰茎長、精巣体積、肛門性器間距離(AGD)、第2指/第4指比(2D/4D)について計測し、出生時のデータを得ることができた。女兒に比べて男児ではAGDは延長し、2D/4Dは低値であった。男児において、陰茎長とAGDの間に正の相関を認め、胎生期のアンドロゲンへの曝露が関与していると考えられた。本研究の結果をもとにエコチル調査で得られる環境的要因が出生時の身体的変化におよぼす影響を明らかにできること、本研究に参加した児の経過を見ることで、胎生期および出生後の環境要因がその後の身体的変化にどのような影響を与えるか、について明らかにすることができる。一方、エコチル調査に先行している北海道スタディでは、学童期となった児を対象に2D/4Dを同様に行ったところ、男児では女兒に比べて低値であった。2D/4Dと妊娠中の母の血液中環境化学物質と出生時の臍帯血中性ホルモン濃度との関連を検討したところ、男児において2D/4DとINSL3およびDEHAとの間に負の相関を認め、2D/4DにはLeydig細胞の機能および副腎由来のアンドロゲンとの関連が示唆された。一方、2D/4Dを性役割行動との関連については、男女ともに男性化スコアの間に関連を示唆された。一方、2D/4Dを性役割行動との関連については、男女ともに男性化スコアの間に関連を示唆された。この結果から、学童期の脳の男性化に胎生期のアンドロゲンへの曝露が関連していることが示唆された。環境化学物質の胎児期曝露が児の性腺機能への影響を示唆したことから(サブ2)、今後はこれらの代替物質も含めてリスク評価を継続し、次世代影響へ対策を検討する必要がある。

#### [キーワード]

環境化学物質、性分化、性腺機能、性ホルモン、2D/4D

## 1. はじめに

性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[1-3]。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。実際に、両親の環境化学物質である内分泌かく乱物質(EDCs: endocrine disrupting chemicals)への曝露によって、児の停留精巣や尿道下裂の発生頻度が増加するという報告も多数みられる[4-10]。

尿道下裂については、妊娠中の両親の職業や食事からのEDCsへの曝露によって、生まれてくる男児の尿道下裂の発生頻度が増加することが報告されている[11]。農薬については、1966年から2008年までの9つの論文のメタアナリシスによると、両親の職業における母の農薬への曝露によって、尿道下裂の発生頻度が1.36倍となり、父の農薬への曝露でも1.19倍になると報告されている[12]。Carboneらは、1998年から2002年の間に生まれた男児において、農薬の使用頻度に応じて尿道下裂の発生頻度が増すことを報告した[4]。Christensenらによると尿道下裂で手術を行った306人の男児と健康な男児を比べた場合、妊娠中に有機栽培の食物を選ばなかった母が、尿道下裂に男児を生む可能性は2.18倍であったことから、尿道下裂の発生に農薬が関係していることを示唆している[5]。一方、その他の化学物質などへの曝露についても、Ormondらのcase-control studyによると、471人の手術記録から、母の職業におけるフタル酸への曝露で3.12倍、ヘヤースプレーへの曝露で2.39倍の尿道下裂の発生頻度が増加していたと報告している。有機塩素剤への曝露については、尿道下裂の発生原因になりうると報告されている[6]。さらに食事に関しては、妊娠中の植物性エストロゲンを多く摂取していると考えられるベジタリアンの母からは、ベジタリアンでない母に比べて尿道下裂の発生が4.99倍増加していたと報告されている。

停留精巣については、農薬への曝露が停留精巣の発生に関与していることが報告されている[7]。また農業に携わる母に停留精巣の発生頻度が高いと報告されており[8, 9]、その背景には農薬への曝露が関与していると考えられている。また、男性ホルモン産生を抑制する作用のあるフタル酸ジブチルへの曝露によって、停留精巣の発生頻度の増加が観察されたと報告されている[10]。

このように、妊娠中および胎児期の環境化学物質曝露が尿道下裂や停留精巣の発生原因のひとつとして影響していると考えられている。一方、母の環境化学物質であるEDCsへの曝露が児の性腺機能、次世代の性分化や第二性徴の発来などへ影響を与える懸念が、近年世界的に高まっている[13, 14]。実際にEDCsの曝露が、ヒトの体内におけるホルモン環境やホルモンが作用する過程に影響を与えていることについて、報告されている[15]。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。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[16, 17]。

このような背景から、胎児期の環境化学物質曝露が、次世代の児の性分化や性腺機能に与える影響についての検討は、現在直面している重要な課題の一つである。

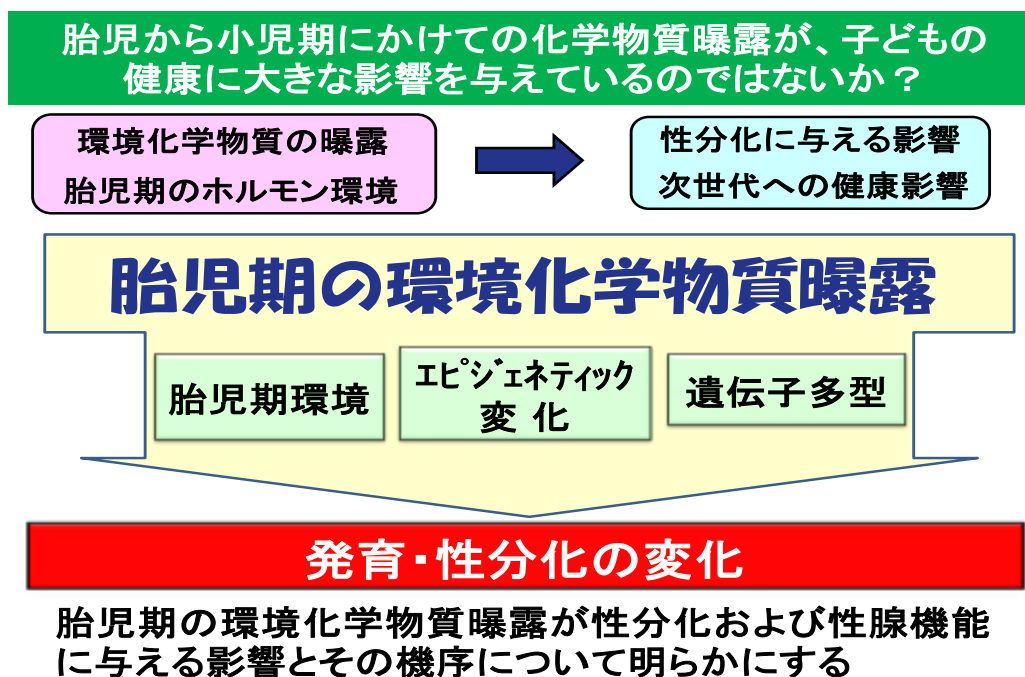


## 2. 研究開発目的

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年度より環境省「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8250人の妊婦を調査対象として子どもが13歳になるまでの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、母が曝露した血液中のPCB・ダイオキシン類や有機フッ素化合物PFOS・PFOA、フタル酸エステルなどの環境化学物質が胎児に与える影響について検討を行い、妊娠中および胎児期の環境化学物質が性分化および性腺機能におよぼす影響と機序について科学的に明らかにすることを目的とする（図(1)-1）。また、エコチル調査では、まず出生時の身体計測を行い、本邦における貴重なデータを得ることを目的とした。

エコチル調査では、北海道スタディで得られた結果をもとに、出生時の身体計測のデータをエコチル調査で得られる環境要因が出生時の身体的変化に与える影響について明らかにしたい。さらに、将来的には今回の研究をもとに、ライフコース・アプローチで対象となった児を思春期まで長期に経過観察し、外性器の状態および性腺機能における胎生期の環境化学物質の曝露が与える長期間の影響についても知見を得たいと考えている。



図(1)-1 本研究の流れ

### 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、環境化学物質濃度と出生時の外性器や精巣の異常、2D/4D比の異常、さらに胎生期ホルモン環境の異常との関連についてそれぞれ検討する。また、性ホルモン受容体遺伝子や異物ステロイド代謝酵素遺伝子等の多型を調べ、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。具体的には、3つのサブグループにおいて、第1に環境化学物質が男児の陰茎長・精巣体積および男児女児の肛門性器間距離、性ホルモンに関連した2D/4D比に与える影響を明らかにする。第2に北海道スタディにおける保存血で児の性腺機能に関連すると考えられるホルモン濃度を測定、8歳時点の性向行動調査を実施し、環境化学物質濃度レベルと性向行動、ホルモン環境の関係を解明する。第3に異物・ステロイド代謝酵素遺伝子多型等の遺伝子型と曝露濃度が胎内ホルモン環境に与える影響、母児の遺伝子型の組み合わせが性分化および性腺機能に及ぼす影響を検討し、同じ曝露濃度でも感受性の高いハイリスク群とその機序を明らかにする。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および性腺機能におよぼす影響について明らかにすることができる（図2）。

本研究は、北海道大学医学研究科「医の倫理委員会」の承認を得て実施した。インフォームド Consent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) エコチル追加調査

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（表(1)-1）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た（図(1)-2）。

表(1)-1 エコチル追加調査 参加施設

#### エコチル追加調査 参加施設(12施設)

医療機関名	
北海道大学病院	札幌医科大学病院
朋佑会札幌産科婦人科	北海道社会保険病院
KKR札幌医療センター	田畑産婦人科
カワカミウィメンズクリニック	月寒グロリアクリニック
エナレディースクリニック	札幌マタニティ・ ウィメンズホスピタル
手稲あけぼの レディースクリニック	清田ウィメンズクリニック



図(1)-2 エコチル調査の流れ

統計学的検討では、数値は平均±標準偏差で表し、男女差については、Student t-testで解析した。身体測定的相关については、スピアマンの順位相関分析で分析した。統計ソフトJMP10を用いて検討し、統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

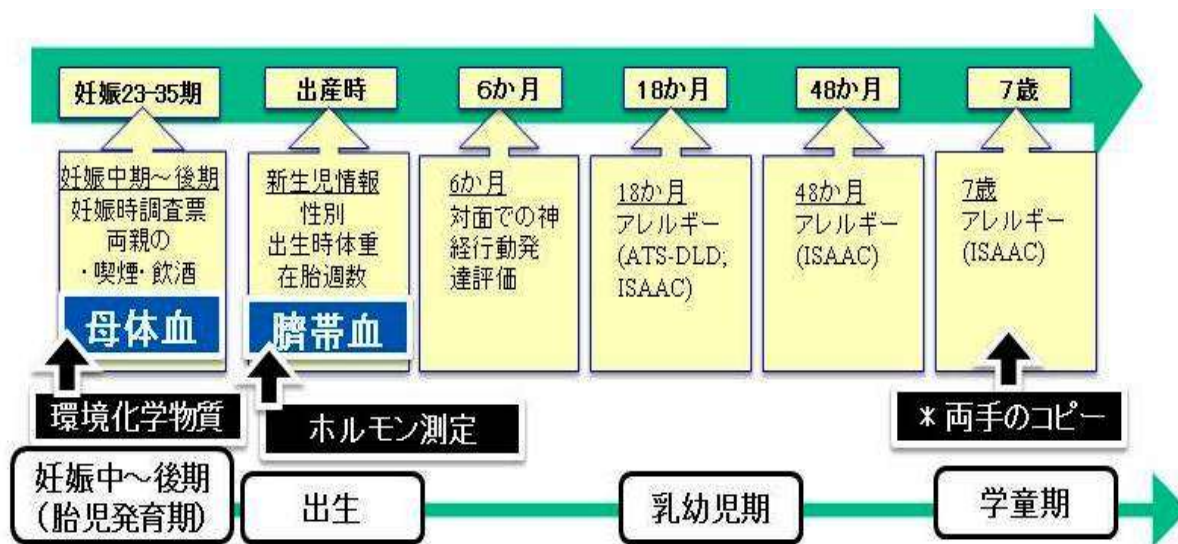
## (2) 北海道スタディ

### 1) 小規模コホート

本研究では、すでに環境化学物質濃度の測定が終了している小規模コホートに登録されており、追跡可能な349人を対象に2D/4D比の測定を行うことの説明文を郵送して、同意書および両手のコピーの返送を持って研究への参加とした。返送された両手のコピーより2D/4D比の測定を行い、母体血中の環境化学物の濃度と臍帯血中のホルモン濃度との関連について検討を行った。

小規模コホートは、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」を実施した。札幌市およびその周辺に住む日本人で、2002年7月から2005年9月に産科を受診した妊婦1796名に研究への参加を依頼した。依頼した妊婦のうち、日本臍帯血バンク登録者(22%)と里帰り分娩(3%) (他施設で分娩)予定者は研究対象から除外した。最終的に妊娠23週から35週の妊婦514名(28.6%)が研究参加に同意した。コホートのながれを図4に示す。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。妊娠中期から後期に妊婦から母体血40ml、および分娩時に臍帯血40mlを採取し、分析まで-80°Cで凍結保存した。(図(1)-3)



図(1)-3 小規模コホートの流れ

#### a 母体血中の環境化学物質の測定

妊娠後期の母体血で426名のポリ塩化ビフェニル (PCB) ・ダイオキシン類を高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マススペクトロメーター (HRGC/HRMS) 法 (福岡県保健環境研究所)、447名のパーフルオロオクタンスルホン酸・ペルフルオロオクタン酸 (PFOS・PFOA) を液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析 (LC/MS/MS) 法 (星薬科大学)、および487名のDEHP代謝物 Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) をガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法 (名古屋大学) で測定済みのデータを用いた。

#### b 臍帯血中のホルモン濃度の測定

臍帯血で295名の性ホルモンであるエストラジオール (E)、総テストステロン (T)、プロゲステロン (P)、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA)、アンドロステネジオン (A-dione) を LC-MS/MS 法、黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、性ホルモン結合グロブリン (SHBG)、およびプロラクチン (PRL) を免疫放射定量測定 (IRMA) 法、Inhibin B を ELISA 法で測定した。また、INSL3 を 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。

統計学的検討では、数値は、平均±標準偏差で表し、2D/4Dの男女差については、Student t-testで解析した。環境化学物質、ホルモン濃度の関連については、調整因子を加えて重回帰分析を行った。統計ソフト JMP10 を用いて検討し、統計学的有意水準は  $p < 0.05$  とした。



## 2) 大規模コホート

大規模コホートでは、調査段階で7歳となる5044人を対象に同様に北海道スタディの詳細調査として2D/4D比の測定を行うことの説明文を郵送して、返送された両手のコピーより2D/4D比の測定を行った。

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20,823人が登録した大規模出生コホート「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」である。コホートのながれを図5に示す。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。出生後の調査で母乳栄養の有無、期間、乳児期以降の食事摂取、感染症り患の有無、気管支喘息 (ISAAC Phase III)、アトピー性皮膚炎、(ISAAC Phase III)、アレルギー性鼻炎、食物アレルギー、および両親のアレルギー既往歴などの情報を得た。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、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。また7歳半の学童期に児の尿とハウスダストを採取、8歳児には軽度発達障害 (ADHD) や性役割行動調査 (J-PSAI) を実施している (図(1)-4)。

本研究では、2D/4D比の測定を行うことの説明文を郵送して、同意書および両手のコピーの返送を持って研究への参加とした。返送された両手のコピーより2D/4D比の測定を行い、臍帯血中性ホルモン濃度およびJ-PSAIとの関連について検討を行った。



図(1)-4 大規模コホートの流れ

### a 血中のホルモン濃度の測定

臍帯血で295名の性ホルモンであるエストラジオール (E)、総テストステロン (T)、プロゲステロン (P) をLC-MS/MS法で測定し、加えて男児では高感度LH、高感度FSH、Inhibin B、INSL3を測定した。測定は全てあすか製薬メディカル(株)で実施した。

統計学的検討では、数値は、平均±標準偏差で表し、2D/4Dの男女差については、Student t-testで解析した。ホルモン濃度、J-PSAIとの関連については、調整因子を加えて重回帰分析を行った。統計ソフトJMP10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) エコチル追加調査

参加施設への説明、倫理委員会への申請・承認など準備を進め、平成24年9月より対象者にパンフレットの送付を行った。平成24年度から平成26年度までの最終結果を表(1)-2に示す。パンフレットを送付および電話連絡を行った後に、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、精巢体積）が行われた。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。

身体測定の結果を図(1)-5に示す。出生児の身長、体重は、女兒にくらべて男児で有意に大きかった（図7）。この結果は、従来報告されているものと矛盾しないものであった。

2D/4Dは右手、左手、左右の平均ともに女兒に比べ男児で有意に低い値であった（左右の平均： $p=0.0223$ ）（図(1)-6）。従来報告の通り、2D/4Dは女兒に比べて男児で有意に低値となること、出生時に同様に観察されたことから、胎生期器官形成期におけるアンドロゲンへの曝露に関連したものであることを確認できた[18-20]。しかし、後で述べる北海道スタディに比べて、男女差は少なく、出生後の影響も少なからず受けている可能性も示唆された。今後、エコチル追加調査に登録された児を経過観察することで、この点については明らかにできると考えられた。

また、肛門性器間距離(AGD)は、女兒に比べて男児で有意に長かった( $p<0.0001$ )（図(1)-6）。この結果は、以前に報告されている結果に矛盾しないものであり、胎児期のアンドロゲンへの曝露によってAGDが長くなると考えられた[20, 21]。

陰茎長の平均は25.4 mmであり、多くの男児は20-30 mmの間に分布していた（図(1)-7）。陰茎長は、他国の報告に比べ短い傾向にあるが、日本人における陰茎長のデータは散見されるのみであり、更なるデータの蓄積が必要である[22]。

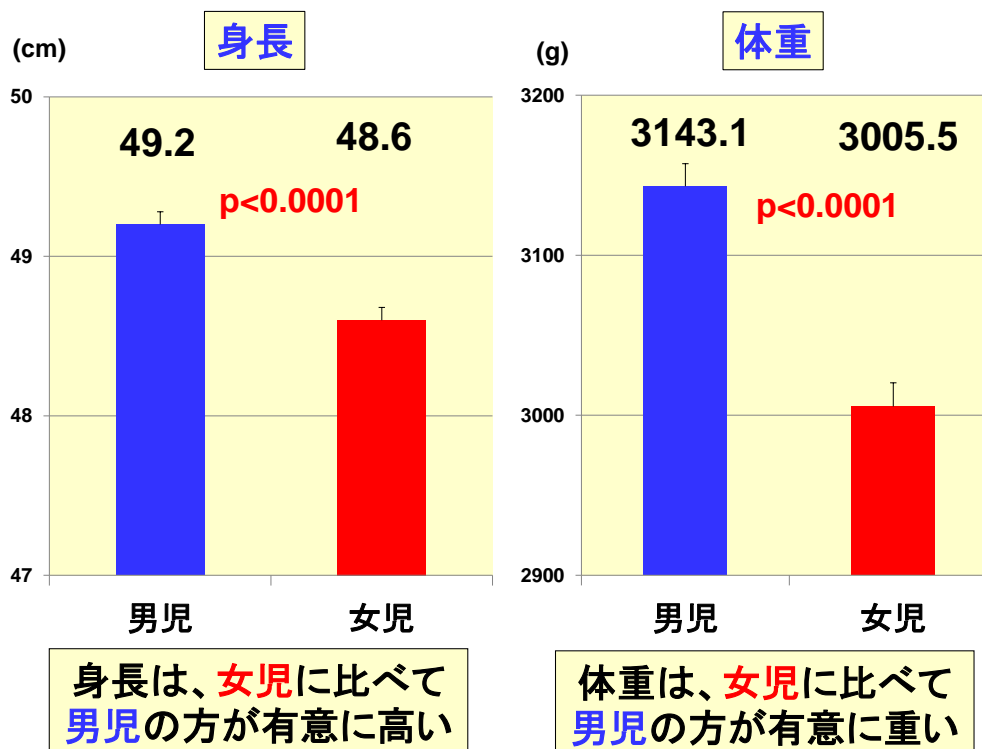
精巢体積については、約8割で過去の報告通り0.7-1.5 mlの間に分布していた。その一方で、0.7ml未満や精巢が触知できない男児も一部に見られたことから、今後の経過観察が必要であると考えられた（図(1)-7）。また、精巢体積が0.7ml未満または非触知であり精巢の異常が示唆される男児( $2996.6\pm 417.7g$ )では、精巢体積が正常であった男児( $3163.8\pm 395.5g$ )に比べて出生時体重が有意に低い結果であった( $p=0.0003$ )。この結果は、従来報告と同様の所見であった[23]。

表(1)-2 エコチル追加調査 登録状況

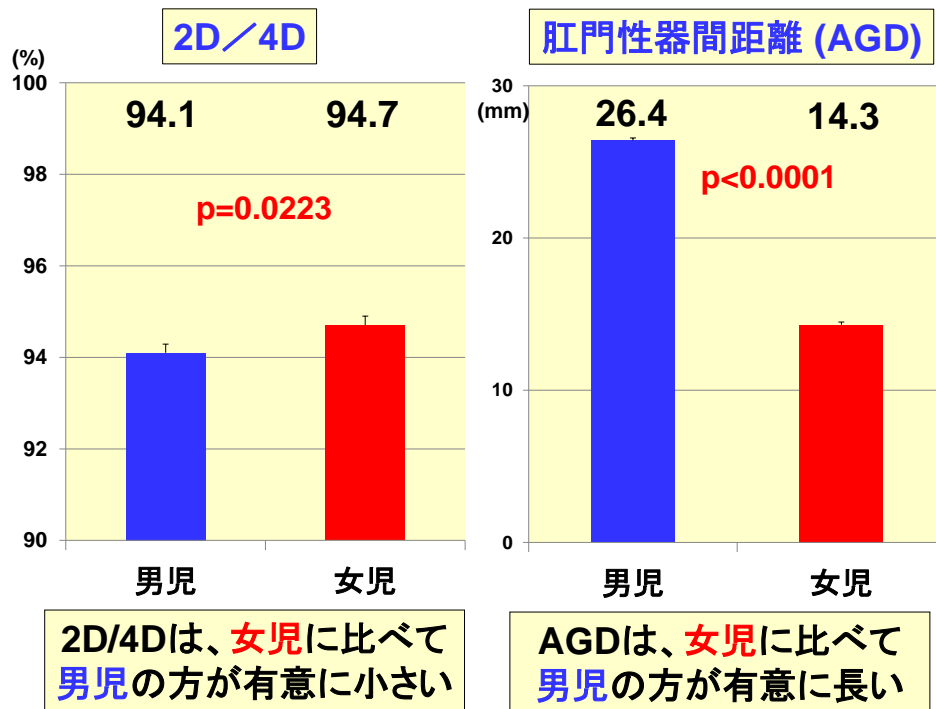
	目標登録者数	登録者数
平成24年度	400人	387人
平成25年度	1000人	904人
平成26年度	500人	310人
合計	1900人	1601人(84.3%)

対面説明者 (人)	同意取得者 (人)	同意率 (%)	脱落(人)
1622	1601	98.7	51 (3%) <small>転院 30 児搬送 7 母体搬送 6 同意撤回 5 児死亡 3</small>

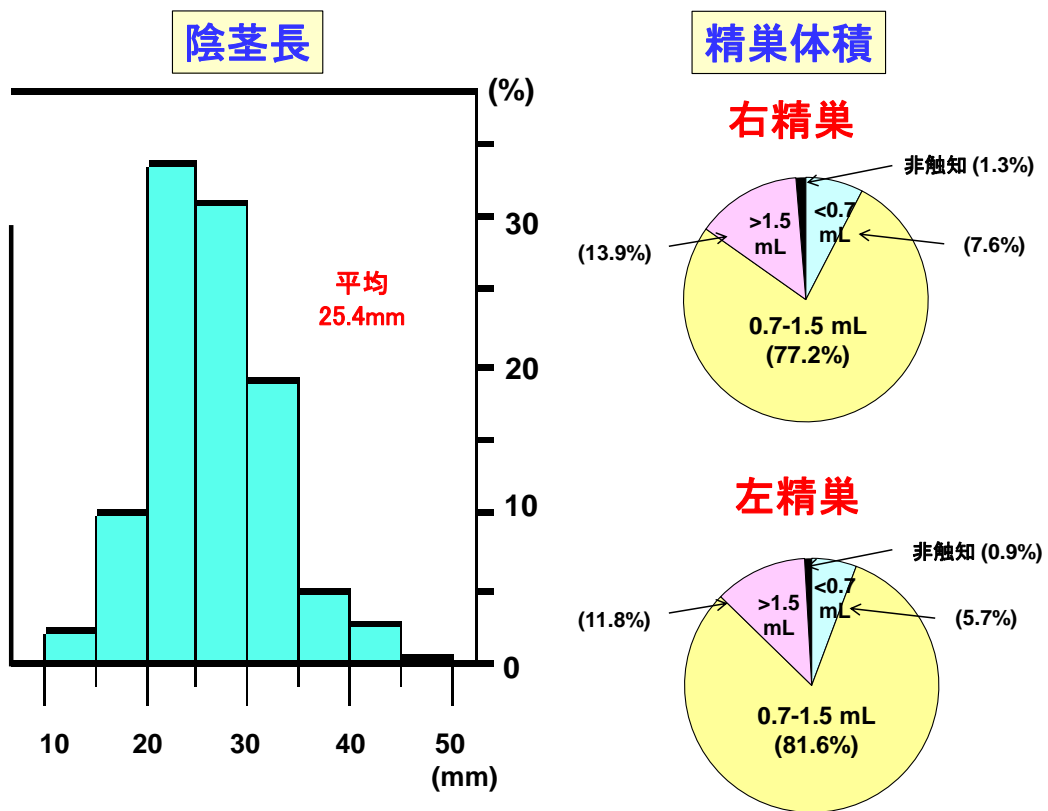
出産・測定(人)	母体血(人)	臍帯血(人)
1550	1505	431



図(1)-5 身体測定：身長、体重



図(1)-6 2D/4D, AGD

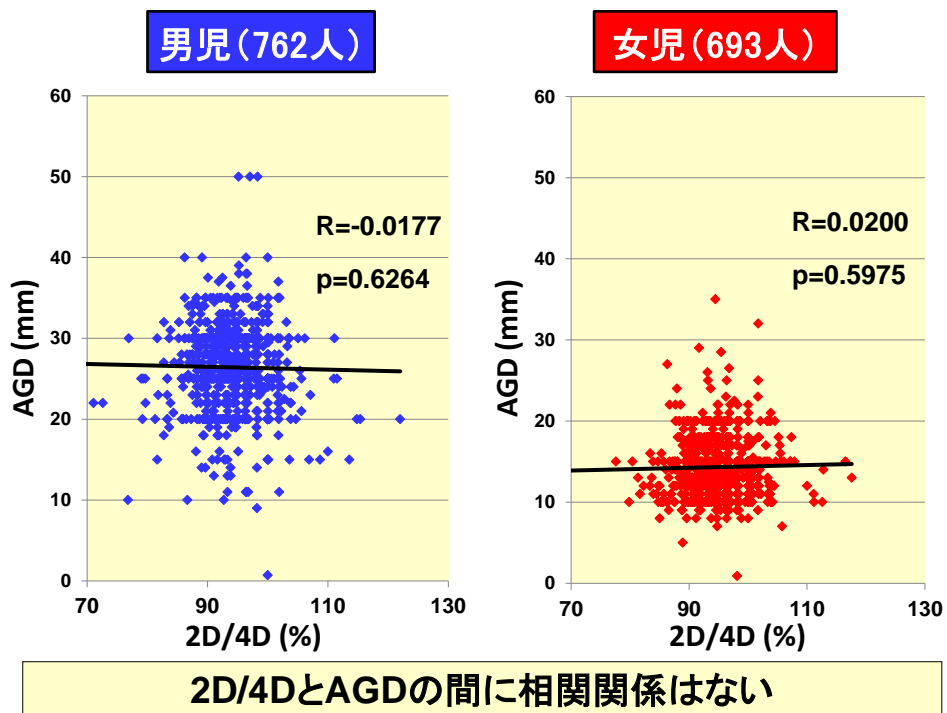


図(1)-7 陰茎長、精巣体積

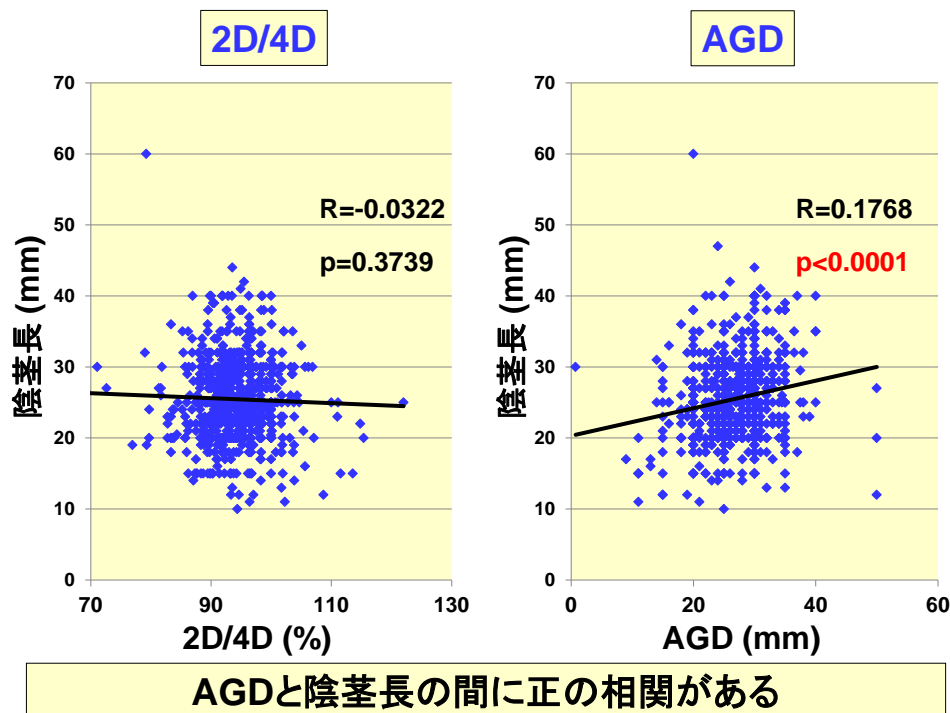


2D/4DとAGDとの関連の検討を行ったが、男児、女児ともに有意な相関を認めなかった(図(1)-8)。また、男児において、2D/4Dと陰茎長との間にも有意な相関を認めなかった(図(1)-9)。2D/4D、AGD、陰茎長はいずれも胎生期のアンドロゲンの曝露を受けるとされているが、2D/4Dとの間に有意な相関を認めなかったことから、2D/4Dについては、男性ホルモンへの曝露以外の因子も関与していることが示唆された。

一方、AGDと陰茎長との間には、有意な相関を認めた( $r=0.1768$ ,  $p<0.0001$ ) (図(1)-9)。これらの結果を踏まえると、AGDおよび陰茎長は胎生期の男性ホルモンへの曝露の影響を直接受けていることが予想される。このことから、胎生期のアンドロゲンの曝露を見るより良い指標としては、AGDおよび陰茎長が良いと考えられた。しかし、幼児期、学童期、思春期と今後経過観察する際は、AGDおよび陰茎長を継時的に測定することは困難であることから、幼児期、学童期に改めて良い指標となる因子を検討する必要があると考えられた。



図(1)-8 2D/4DとAGDとの関連



図(1)-9 陰茎長と2D/4D、AGDとの関連

本研究では同意率が高率であり、新生児の身体測定という貴重なデータを得ることができた。これはエコチル本調査への参加者を対象にしているためであると考えられる。本研究で得られた新生児の身体測定の結果は貴重なデータをもとに、今後エコチル本調査で得られる環境化学物質や生活環境などのデータから、環境因子が身体的変化に与える影響について今後明らかにしていきたい。

## (2) 北海道スタディ

倫理委員会への申請・承認など準備を進め、対象者に北海道スタディの詳細調査として2D/4D比の測定の説明したパンフレットの送付を行った。

### 1) 小規模コホート

小規模コホートでは、対象者のうち現在も追跡可能な349人に送付を行い、平成25年3月上旬現在136例（男児：68例、女児：68例）から同意書および両手のコピーが返送された（同意率：39%）。これをもとに、2D/4D比の測定を行った。

#### a 基本属性

小規模コホート参加者のうち臍帯血中ホルモンの分析を行った295名について、2D/4D比のデータを得ることができた対象者の基本属性について表(1)-3に示す。2D/4D比のデータを得ることができた対象者では、2D/4D比のデータを得ることができなかった対象者に比べて、出産時年齢、年収、学歴、非喫煙率の割合が有意に高かった。

表(1)-3 母児の基本的属性

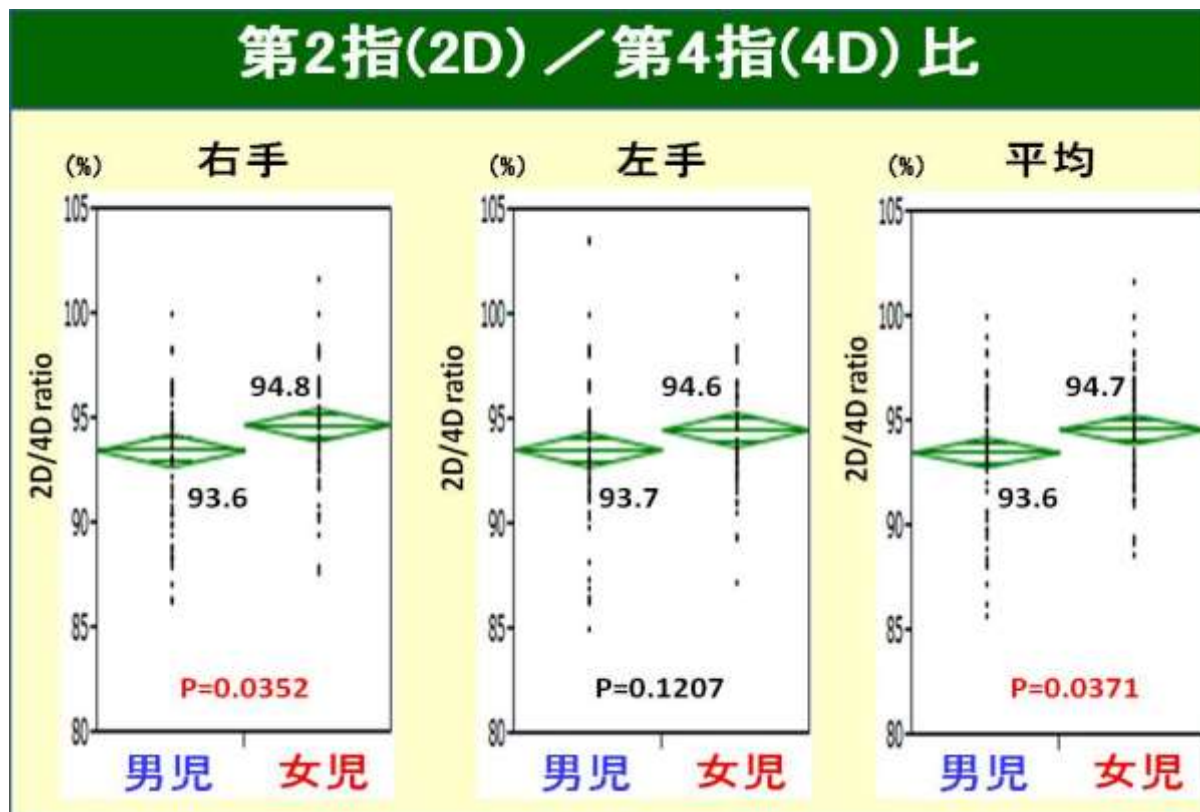
Characteristics	2D/4D比なし		2D/4D比あり		
	N	Mean ±SD	N	Mean ±SD	
<b>Maternal characteristics</b>					
Age at delivery (years)	211	29.6±5.2	84	31.2±4.2	*
Pre-pregnancy BMI (m <sup>2</sup> /kg)	210	20.9±2.9	84	20.9±2.9	
Parity (%)	0	Mean ±SD	46 (54.8)		
	≥1		38 (45.2)		
Annual household income (%)	<5 million yen	106 (50.5)	27 (32.1)		**
	≥5 million yen	104 (49.5)	57 (67.9)		
Educational level (%)	≤12years	159 (76.1)	47 (56.6)		**
	≥13years	50 (23.9)	36 (43.4)		
Smoking during pregnancy (%)	Nonsmoker	161 (76.7)	77 (91.7)		**
	Smoker	49 (23.3)	7 (8.3)		
Alcohol drinking during pregnancy (%)	Nondrinker	138 (65.7)	55 (65.5)		
	Drinker	72 (34.3)	29 (34.5)		
<b>Infant characteristics</b>					
Gender (%)	Boy	98 (46.7)	37 (44.0)		
	Girl	112 (53.3)	47 (56.0)		
Birth weight (g)	210	3129.3 ±347.5	84	3120.5 ±289.8	
Gestational age (wks)	210	39.3 ±1.1	84	39.3 ±1.0	

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 by the t-test, and chi-square test

#### b 2D/4D比について

全体の2D/4D比は、右手94.2±3.3%、左手94.1±3.4%、右手と左手の平均（以下、平均）94.1±3.0%であった。男女間での2D/4Dの比較は、左手では有意差を認めないものの、右手と平均で男女間に有意差を認め、女兒の方が男児に比べて2D/4D比の値は有意に高かった（図(1)-10）。

この結果は、以前に報告されている結果に矛盾しないものであり、胎児期のアンドロゲンへの曝露によって2D/4Dが低下することが予想された[18, 19]。



図(1)-10 2D/4D比の男女間の比較

### c 2D/4D比と環境化学物質曝露との関係について

Paired t検定を行ったところ、右手、左手、平均の間に有意な差を認めなかったため、環境化学物質と2D/4D比との関係についての検討は、平均を2D/4D比の代表値として用いた。環境化学物質の内訳は、Total PCBs、Total Dioxin (TEQ)、Total Coplanar PCB (TEQ)、Total PCDD/PCDF (TEQ)、Total PCDD (TEQ)、Total PCDF (TEQ)、PFOS、PFOA、MEHPについて検討したが、2D/4D比の全体、男女別の値と母の環境化学物質曝露との間に有意な相関があるものは認められなかった(表(1)-4)。

これは、母の環境化学物質の曝露によって、胎生期のホルモン環境に影響を与えるものの(サブ2の結果)、児の身体的変化までは影響を及ぼさないものと考えられた。しかし、今回の検討では、環境化学物質やホルモン受容体の遺伝子多型、エピゲノム解析を行っていないことから、環境化学物質の曝露やホルモン環境の変化に対して脆弱な児に対する影響を検討できなかった。今後の課題であると考えられた。



表(1)-4 2D/4D比と環境化学物質との関係

環境化学物質	全体		男児		女児	
	相関係数	p値	相関係数	p値	相関係数	p値
PCBs (ng/g lipid)	0.0549 (n=128)	0.5379	0.0848 (n=63)	0.5086	-0.04259 (n=65)	0.7362
Dioxins (TEQ pg/g lipid)	0.0110 (n=128)	0.9022	-0.0381 (n=63)	0.7668	0.0490 (n=65)	0.6983
PFOS (ng/mL)	0.0047 (n=119)	0.9596	0.0285 (n=60)	0.8271	0.0006 (n=59)	0.9965
PFOA (ng/mL)	-0.0091 (n=119)	0.9239	-0.0136 (n=63)	0.9198	0.0424 (n=59)	0.7562
MEHP (nmol/mL)	-0.0659 (n=129)	0.4597	-0.0333 (n=66)	0.7925	-0.0954 (n=63)	0.4569

#### d 第2指(2D)/第4指(4D)比と胎内ホルモン環境の関係

サブグループ(1)の2D/4D比の結果とサブグループ(2)の臍帯血中の性ホルモン濃度の結果をもとに2D/4D比と臍帯血中の性ホルモン濃度の両者の測定が可能であった男児45例、女児72例の合計117例について、2D/4D比と臍帯血中の性ホルモン濃度のとの関係についての検討を行った。2D/4D比は、平均を2D/4D比の代表値として用いた。

臍帯血中の性ホルモン濃度については、値が感度以下の場合、感度の半分の値を挿入して検討を行った。Insuline-like factor type 3(INSL3)については、過去の報告で女児では低値になると報告されているが[24]、実際にランダムに抽出した女児20例のINSL3の測定値は、有意に低値であった( $p < 0.0001$ )ことから男児のみで検討を行った。

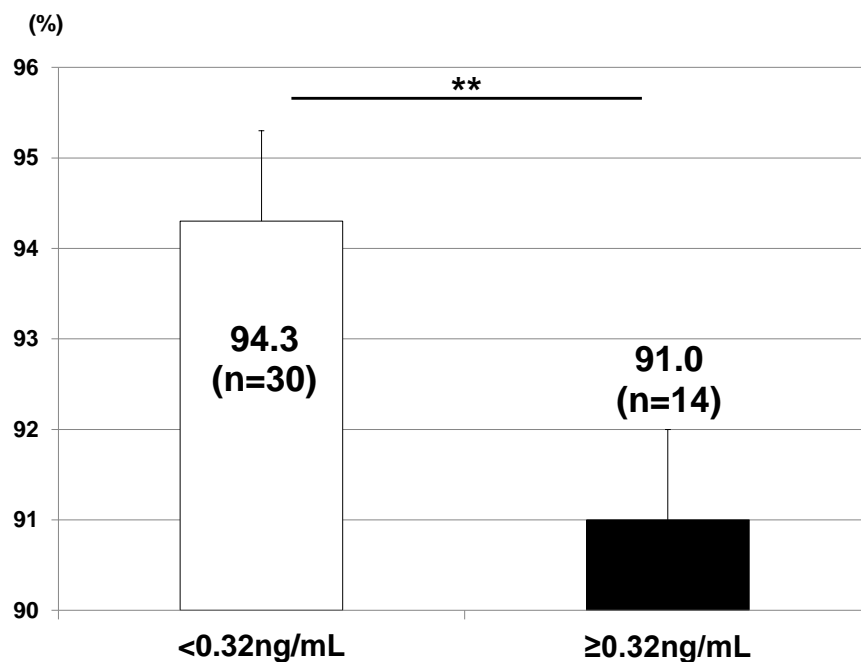
2D/4D比と臍帯血中の各種性ホルモンとの関係については、男女を合わせた全体および女児では2D/4Dと各種ホルモンとの間に有意な関連はなかった。一方、2D/4Dと男児のみで測定を行ったINSL3の間に有意な関連を認めた( $B = -0.377$ 、95% CI:  $-30.17$ ,  $-2.318$ ,  $p < 0.05$ ) (表(1)-5)。実際に、INSL3の高い群(0.32 ng/mL以上)と低い群(0.32 ng/mL未満)の2群で2D/4D比を比較してみるとINSL3の高い群では91.0%であったのに対し、INSL3の低い群では94.3%と有意に高かった( $p < 0.01$ ) (図(1)-11)。また、同じく男児において主に副腎由来と考えられるDHEAと2D/4Dとの間に有意な負の関連を認めた( $B = -0.361$ 、95% CI:  $-8.862$ ,  $-0.697$ ,  $p < 0.05$ ) (表(1)-5)。このことから、2D/4Dは精巣由来のアンドロゲンのみならず副腎由来のアンドロゲンも反映していると考えられた。

胎生期の男性ホルモンへの曝露が関係していると考えられているが[18]、今回の検討で臍帯血中のテストステロンとの間に有意な関連を認められなかった。これは、指の長さの比率は胎生期14週までに確立すると考えられており[25]、臍帯血中のテストステロン濃度が必ずしも胎生期14週までのテストステロン濃度を反映していないためと考えられる[26]。一方、Leydig細胞から産生されるINSL3は、精巣のLeydig細胞の機能を反映していると考えられており、INSL3の低下している例では性腺機能低下が示唆される[24]。今回の検討では、臍帯血中のINSL3濃度と2D/4D比有

意に関連しており、胎生期のLeydig細胞の機能低下が示唆されるINSL3濃度の低下が診られた症例で、2D/4Dが有意に高く、女兒に近い表現型を示した。また、胎生期の副腎由来のアンドロゲンも関連していることも明らかとなった。

表(1)-5 2D/4Dと性ホルモン濃度との関係

Hormone levels	Total			Males			Females		
	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>
<b>T (pg/mL)</b>	114	-0.021 (-2.449, 1.956)	0.113	45	-0.209 (-8.080, 1.754)	0.060	69	0.151 (-0.835, 3.909)	0.214
<b>E (ng/mL)</b>	117	-0.070 (-2.893, 1.257)	0.111	45	-0.051 (-4.956, 3.625)	0.022	72	-0.104 (-3.346, 1.219)	0.180
<b>P (ng/mL)</b>	117	0.036 (-1.323, 1.977)	0.107	45	-0.020 (-4.461, 3.971)	0.020	72	0.078 (-1.114, 3.647)	0.175
<b>T/E</b>	114	0.010 (-2.259, 2.514)	0.113	45	-0.138 (-6.331, 2.650)	0.036	69	0.200 (-0.440, 5.190)	0.228
<b>LH (mIU/mL)</b>	115	0.017 (-2.167, 2.610)	0.104	45	0.207 (-1.335, 5.346)	0.055	70	0.126 (-6.313, 21.64)	0.180
<b>FSH (mIU/mL)</b>	117	-0.038 (-3.696, 2.448)	0.105	45	0.180 (-2.162, 7.177)	0.048		N/A	N/A
<b>INSL3 (ng/mL)</b>		N/A	N/A	44	-0.377* (-30.17, -2.318)	0.145		N/A	N/A
<b>Inhibin B (pg/mL)</b>	116	-0.139 (-2.238, 0.331)	0.124	44	-0.068 (-5.877, 3.891)	0.024	72	-0.082 (-1.387, 2.732)	0.172
<b>A-dione (ng/mL)</b>	113	-0.076 (-2.870, 1.187)	0.112	44	-0.268 (-9.563, 0.840)	0.088	69	-0.028 (-2.302, 1.811)	0.167
<b>DHEA (ng/mL)</b>	113	-0.136 (-3.573, 0.533)	0.125	44	-0.361* (-8.862, -0.697)	0.141	69	-0.074 (-3.036, 1.594)	0.172



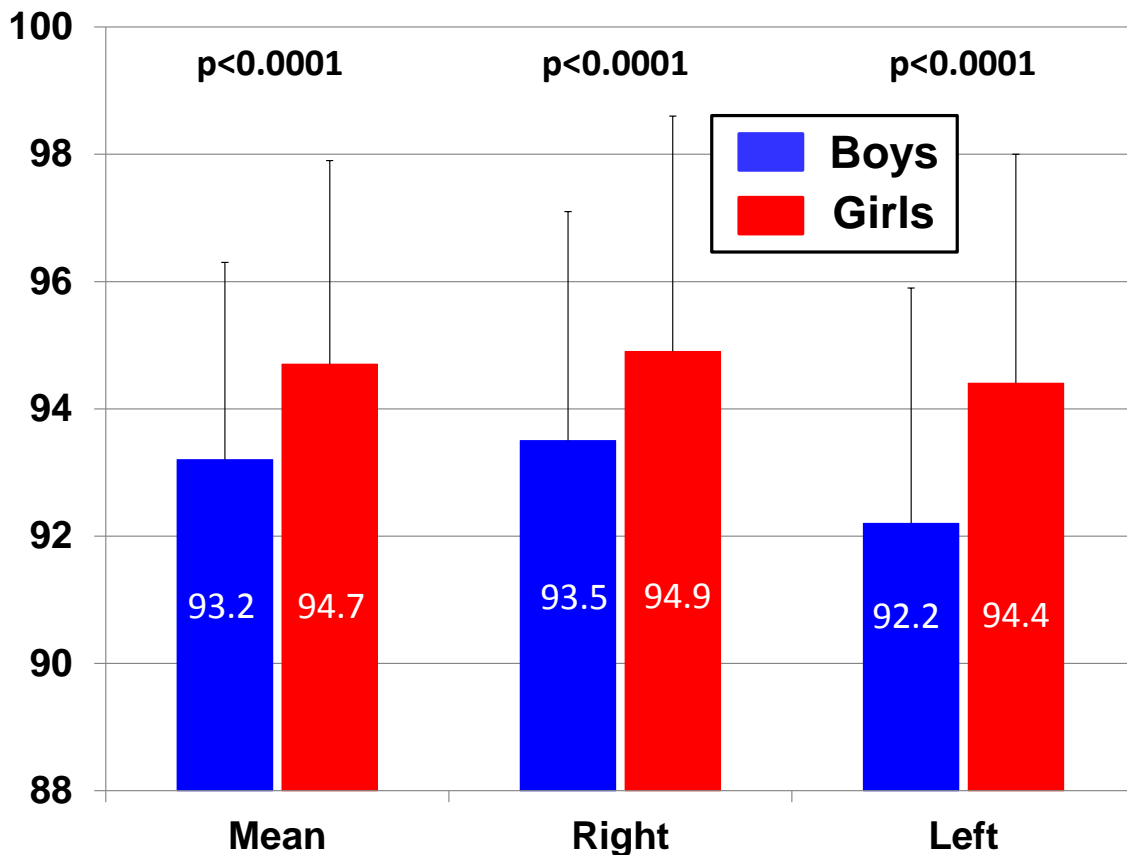
図(1)-11 2D/4DとINSL3との関係

## 2) 大規模コホート

大規模コホートで、倫理委員会の承認のもと、対象者に北海道スタディの詳細調査として2D/4Dの測定の説明したパンフレットの送付を5044人に送付を行い、1903例（男児：982例、女児921例）から同意書および両手のコピーが返送された（同意率：37.7%）。これをもとに、2D/4Dの測定を行った。

全体の2D/4D比は、右手、左手、右手と左手の平均（以下、平均）ともに、女児の方に比べて男児で2D/4Dの値は有意に低かった（図(1)-12）。

この結果は、以前の小規模コホートの結果に矛盾しないものであり、今回はより大きなコホートでも同様な結果が得られており、胎児期のアンドロゲンへの曝露によって2D/4Dが低下することが予想された[18, 19]。



図(1)-12 2D/4D

#### a 2D/4DとJ-PSAIの関係

サブ(1)とサブ(2)の結果からえられた胎生期のホルモン環境が影響を与えると考えられる身体的変化(2D/4D)と学童期のJ-PSAIについて相互間の関係について検討した。Composite scoreでは、女兒では、2D/4D比とJ-PSAIの間に有意な相関は認められなかったが、男児では2D/4DとJ-PSAIの間に有意な負の相関を認めた。一方、feminine scoreでは、男児、女兒ともに2D/4Dとの間に有意な相関を認めなかったが、masculine scoreでは、男児、女兒ともに2D/4Dとの間に有意な相関を認めた(表(1)-6)。一方、兄弟、姉妹の有無についても、学童期のJ-PSAIに影響を与えていた(図(1)-12, 13)。

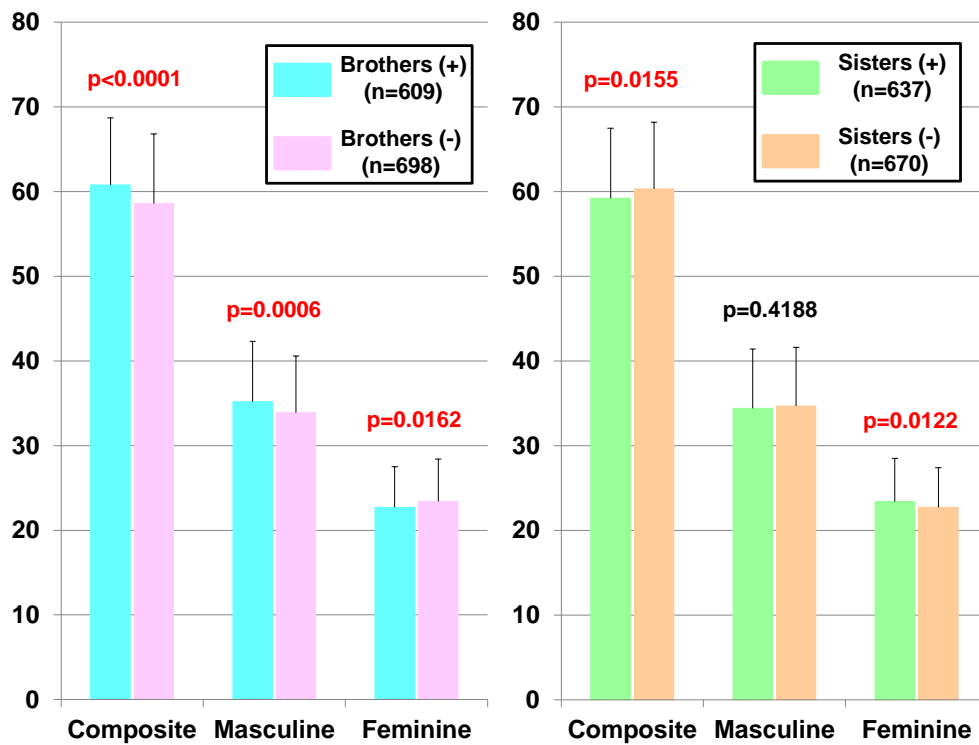
2D/4D)と学童期のJ-PSAIの結果については、兄弟、姉妹を含めた調整因子を加えて多変量解析しても同様の関連を示唆する結果であった(表(1)-7)。これらの結果より、胎生期の男性ホルモンへの曝露に関連していると考えられる2D/4Dで男性化が強い(2D/4Dが小さい)ほど、性役割行動調査でも男性化を認めた(J-PSAIで高い点数)。

胎児期のアンドロゲンへの曝露によって2D/4Dが低下すると考えられているが[18, 19]、性役割行動調査でも男児のみでテストステロン濃度が増加するほど男性に関わる得点が増加する結果が得られ、乳幼児期におけるテストステロンはヒトの性分化的神経行動発達に影響する可能性が示唆されている。今回の我々のデータも、それを裏付けるものとする。実際に、アンドロゲンへ

の曝露が強い（2D/4Dが低い）児では、男女ともにmasculine scoreは高くなっていた。また、Composite scoreでも、男児のみではあるがアンドロゲンへの曝露が強い児で、より高い値となっていた（男性化が強い）。このように、胎生期のアンドロゲンへの曝露が、その後の脳の性分化に影響を与えていると考えられた。

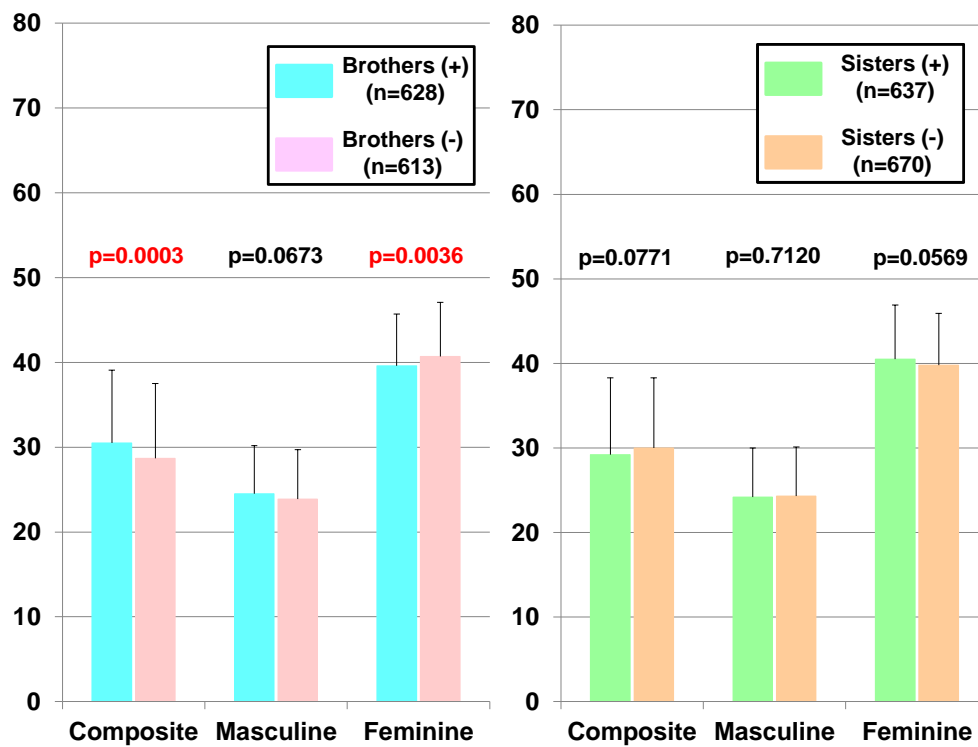
表(1)-6 J-PSAと2D/4Dの関係：Spearman解析

J-PSAI	Male		Female	
	n	R	n	R
Composite	852	<b>-0.1304</b>	779	<b>-0.0639</b>
		<b>p=0.0001</b>		p=0.0748
Masculine	872	<b>-0.1257</b>	779	<b>-0.0951</b>
		<b>p=0.0002</b>		<b>p=0.0079</b>
Feminine	852	<b>0.0242</b>	779	<b>-0.0075</b>
		p=0.4805		p=0.8352



図(1)-12 J-PSA：男児における兄弟、姉妹の有無の影響





図(1)-13 J-PSA：女兒における兄弟、姉妹の有無の影響

表(1)-7 J-PSA と 2D/4D の関係：重回帰解析

J-PSAI	Male			Female		
	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>
Composite	823	<b>-0.122**</b> (-0.492, -0.143)	0.048	738	<b>-0.048</b> (-0.343, 0.069)	0.013
Masculine	823	<b>-0.128**</b> (-0.410, -0.111)	0.024	738	<b>-0.094*</b> (-0.302, -0.040)	0.021
Feminine	823	<b>-0.019</b> (-0.075, 0.131)	0.021	738	<b>-0.024</b> (-0.189, 0.095)	0.017

調整因子：出生時体重、飲酒歴、喫煙歴、兄弟、姉妹

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

#### b J-PSAIと臍帯血中性ホルモン濃度の関係

学童期におけるJ-PSAIと臍帯血中の性ホルモン濃度について相互間の関係について検討した。

今回の検討では、男児では、J-PSAIと臍帯血中の性ホルモン濃度の間に有意な関連を認めることができなかった（表(1)-8）。一方、女児においては、Tとの間に有意な関連を認めなかったが、composite scoreではPとの間に負の関連を、feminine scoreでは、E、Pとの間に正の関連を認め、臍帯血中のE、Pが性役割行動における女性化に関連していることが示唆された。（表(1)-9）

従来の報告では、胎生期の男性ホルモンへの曝露が、性役割行動における男性化に関与していることが報告されているが[27, 28]、本研究では女性ホルモンが性役割行動関連を示した。今回の性ホルモンの濃度は臍帯血中のものであり、出産時のホルモン環境を反映している。しかし、脳性分化に関わるのは妊娠のより初期の段階であると考えられており、そのため今回の結果は、臍帯血中の男性ホルモン濃度が必ずしも性分化に関わる時期のアンドロゲンへの曝露を反映していないためと考えられた。一方、今回の結果は女性化にE、P関与していることを示唆しており、新たな知見となりうると考えられた。更なる検討が必要である。

表(1)-8 J-PSAIと臍帯血中ホルモン濃度の関係（男児）：重回帰解析

Hormone levels	Composite			Masculine			Feminine		
	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>
T (pg/mL)	428	-0.047 <b>a</b> (-3.658, 1.255)	0.025	428	-0.021 <b>a</b> (-2.514, 1.625)	0.014	428	0.043 (-0.782, 2.077)	0.014
E (ng/mL)	428	-0.009 (-2.428, 2.013)	0.023	428	0.034 <b>a</b> (-1.198, 2.539)	0.015	428	0.063 (-0.431, 2.148)	0.016
P (ng/mL)	428	0.012 <b>a</b> (-3.533, 4.534)	0.023	428	0.070 <b>a</b> (-0.913, 5.863)	0.018	428	0.082 <b>b</b> (-0.319, 4.359)	0.019
T/E	428	-0.036 (-3.312, 1.500)	0.024	428	-0.057 <b>a</b> (-3.236, 0.809)	0.017	428	-0.027 (-1.788, 1.011)	0.013
LH (mIU/mL)	422	-0.030 (-2.040, 0.110)	0.024	422	-0.008 <b>a</b> (-1.443, 1.223)	0.014	422	0.037 (-0.577, 1.265)	0.012
FSH (mIU/mL)	422	-0.030 (-3.055, 1.549)	0.024	422	-0.010 <b>a</b> (-2.131, 1.730)	0.014	422	0.035 (-0.846, 1.813)	0.012
INSL3 (ng/mL)	427	0.007 <b>a</b> (-2.771, 3.227)	0.023	427	0.013 <b>a</b> (-2.193, 2.854)	0.014	427	0.007 (-1.622, 1.868)	0.012
Inhibin B (pg/mL)	426	-0.053 (-7.257, 2.111)	0.025	426	-0.081 <b>a</b> (-7.225, 0.653)	0.020	427	-0.034 (-3.665, 1.770)	0.012

調整因子：出生時体重、飲酒歴、喫煙歴、兄弟、姉妹

a: 兄弟が有意な影響、b: 姉妹が有意な影響

表(1)-9 J-PSAIと臍帯血中ホルモン濃度の関係（女児）：重回帰解析

Hormone levels	Composite			Masculine			Feminine		
	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>	n	B (95%CI)	R <sup>2</sup>
T (pg/mL)	444	-0.037 (-3.821, 1.662)	0.011	444	-0.009 (-2.011, 1.648)	0.021	444	0.033 (-1.187, 2.513)	0.038
E (ng/mL)	444	-0.085 (-4.663, 0.222)	0.017	444	-0.006 (-1.732, 1.537)	0.021	444	0.108* (0.273, 3.569)	0.039
P (ng/mL)	444	-0.099* (-9.464, 0.245)	0.019	444	-0.030 (-4.077, 2.098)	0.022	444	0.103* (0.306, 6.540)	0.038
T/E	444	0.081 (-0.550, 6.948)	0.016	444	-0.004 (-2.620, 2.396)	0.021	444	-0.112* (-5.548, -0.492)	0.040

調整因子：出生時体重、飲酒歴、喫煙歴、兄弟、姉妹

\*: p&lt;0.05

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

胎児の環境要因が生後身体と脳の性分化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。

本研究は、まず北海道スタディにおいて、世界的に見ても精度の高い曝露評価により妊娠中のPCB・ダイオキシン類、PFOS/PFOAなどの有機フッ素系化合物、フタル酸エステル類など環境化学物質曝露の測定を行い、胎生期のホルモン環境を含めて、学童期における身体の変化(2D/4D)に与える影響、脳の性分化に与える影響について明らかにした。本研究の結果からは、Leydig細胞機能を反映する胎生期のホルモン環境が学童期の2D/4Dに影響を与えるものの、日常生活の中で曝露されるような低濃度の母への環境化学物質曝露では、2D/4Dには影響を及ぼさないことを明らかにできた。また、胎生期のアンドロゲン曝露を示唆する2D/4Dが、学童期の脳の性分化を評価するJ-PSAIの結果から、特に脳の男性化に関連していることを明らかにすることができた。

一方、エコチル調査では、出生時に身体測定を行い、1500人を超える新生児の陰茎長、精巣体積、肛門性器間距離、2D/4Dの測定を行うことができた。この結果は新生児の身体測定の結果の分布を作成することができた。今後このデータをもとにエコチル調査から得られる胎生期の環境要因の影響について解析することが可能である。また、本研究に参加した児の経過を観察することで、胎生期および出生後の環境的要因が、児の身体および脳の成長に与える影響についても明らかにできる可能性を秘めている。

このように、本研究では、環境要因が生後身体と脳の性分化に与える影響について、貴重なデータを得ることができた。

## (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>

本研究では、Leydig細胞機能を反映する胎生期のホルモン環境が学童期の身体の性分化(2D/4D)に与える影響や胎生期のアンドロゲンへの曝露が脳の性分化(男性化)に影響を与えるものの、日常生活の中で曝露されるような低濃度の母への妊娠中における環境化学物質曝露では、これらの身体や脳の性分化影響を及ぼさないことを明らかにできたことから、本邦における環境化学物質への曝露に関する新たな知見であると考ええる。

また、エコチル調査で得られた出生時に身体測定では、1500人を超える新生児の陰茎長、精巣体積、肛門性器間距離、2D/4Dの測定を行うことができたことから、今後エコチル調査から得られる胎生期の環境要因の影響について解析することが可能であること、本研究に参加した児の経過を観察することで、胎生期および出生後の環境的要因が、児の身体および脳の成長に与える影響についても明らかにできる。この結果も、本邦から世界に発信できる新たなデータであると考ええる。

このように本研究は、環境省が主導しているエコチル調査の基本課題「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？」という中心仮説の解決に大きく貢献するものと考ええる。さらには、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。

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。

## 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) A. Araki, T. Mitsui, C. Miyashita, T. Nakajima, H. Naito, S. Ito, S. Sasaki, K. Cho, T. Ikeno, K. Nonomura, R. Kishi: PLOS ONE, 9, 10 (vol, issue), e109039 (2014)  
 “Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood”
- 2) T. Mitsui, A. Araki, A. Imai, S. Sato, C. Miyashita, S. Ito, S. Sasaki, T. Kitta, K. Moriya, K. Cho, K. Morioka, R. Kishi, K. Nonomura: PLOS One, 10, 3 (vol, issue), e0120636 (2015)  
 “Effects of prenatal Leydig cell function on the ratio of the second to fourth digit lengths in school-aged children.”

#### <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) 長 和俊: Endocrine Disruptor News Lettr, 15, 1 (巻, 号) 5 (2012)  
 「胎児期の環境化学物質が性分化および性腺機能におよぼす影響の解析」
- 2) 三井貴彦、野々村 克也: Endocrine Disruptor News Lettr, 15, 1 (巻, 号) 6 (2012)  
 「胎児期環境化学物質曝露による性殖機能への影響」

### (2) 口頭発表（学会等）

1. 三井貴彦、荒木敦子、宮下ちひろ、今井紋子、佐藤早基子、橘田岳也、守屋仁彦、長和俊、森岡圭太、伊藤佐智子、岸玲子、野々村克也: 第102回日本泌尿器科学会 (2014.4) 「母体への環境化学物質曝露と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指比との関連性について」
2. Takahiko Mitsui, Ayako Imai, Sakiko Sato, Atsuko Araki, Chihiro Miyashita, Takeya Kitta, Kimihiko Moriya, Kazutoshi Cho, Keita Morioka, Reiko Kishi, Katsuya Nonomura: 62th Annual meeting, Society of Pediatric Urology (2014.5) 「Effect of maternal exposure to endocrine-disrupting chemicals on sex hormone levels in cord blood and ratio of the second and fourth digit length in school-age children」
3. 三井貴彦、橘田岳也、守屋仁彦、篠原信雄、野々村克也: 第23回日本小児泌尿器科学会 (2014.7) 「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指比との関連性について」
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: 日本泌尿器科学会北海道地方会 (2015.1) 「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」

5. Takahiko Mitsui, Atsuko Araki, Sachiko Ito, Chihiro Miyashita, Takeya Kitta, Kimihiko Moriya, Kazutoshi Cho, Keita Morioka, Nobuo Shinohara, Reiko Kishi, Katsuya Nonomura: 30<sup>th</sup> Annual meeting, European Urological Association (2015.3) 「Effect of prenatal androgen exposure on behavioral sexual dimorphism in school-aged children」

### (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) 市民公開講座「胎児期における環境ホルモンを考える」（平成27年2月7日、札幌市男女共同参画センター、観客34名

### (5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞（平成27年2月4日、北海道版、朝刊26頁）  
市民公開講座開催について

### (6) その他

特に記載すべき事項はない。

## 8. 引用文献

1. Kallen B, Bertollini R, Castilla E, Czeizel A, Knudsen LB, Martinez-Frias ML *et al.* A joint international study on the epidemiology of hypospadias. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1986, 324:1-52.
2. Czeizel A. Increasing trends in congenital malformations of male external genitalia. *Lancet.* 1985, 1;8426:462-463.
3. Acerini CL, Miles HL, Dunger DB, Ong KK, Hughes IA. The descriptive epidemiology of congenital and acquired cryptorchidism in a UK infant cohort. *Arch Dis Child.* 2009, 94;11:868-872.
4. Carbone P, Giordano F, Nori F, Mantovani A, Taruscio D, Lauria L *et al.* Cryptorchidism and hypospadias in the Sicilian district of Ragusa and the use of pesticides. *Reprod Toxicol.* 2006, 22;1:8-12.
5. Christensen JS, Asklund C, Skakkebaek NE, Jorgensen N, Andersen HR, Jorgensen TM *et al.* Association between organic dietary choice during pregnancy and hypospadias in offspring: a study of mothers of 306 boys operated on for hypospadias. *The Journal of urology.* 2013, 189;3:1077-1082.
6. Rignell-Hydbom A, Lindh CH, Dillner J, Jonsson BA, Rylander L. A nested case-control study of intrauterine exposure to persistent organochlorine pollutants and the risk



- of hypospadias. *PLoS One*. 2012, 7;9:e44767.
7. Damgaard IN, Skakkebaek NE, Toppari J, Virtanen HE, Shen H, Schramm KW *et al*. Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. *Environ Health Perspect*. 2006, 114;7:1133-1138.
  8. Jorgensen KT, Jensen MS, Toft GV, Larsen AD, Bonde JP, Hougaard KS. Risk of cryptorchidism among sons of horticultural workers and farmers in Denmark. *Scand J Work Environ Health*. 2014, 40;3:323-330.
  9. Weidner IS, Moller H, Jensen TK, Skakkebaek NE. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect*. 1998, 106;12:793-796.
  10. Carran M, Shaw IC. New Zealand Malayan war veterans' exposure to dibutylphthalate is associated with an increased incidence of cryptorchidism, hypospadias and breast cancer in their children. *N Z Med J*. 2012, 125;1358:52-63.
  11. Giordano F, Abballe A, De Felip E, di Domenico A, Ferro F, Grammatico P *et al*. Maternal exposures to endocrine disrupting chemicals and hypospadias in offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010, 88;4:241-250.
  12. Rocheleau CM, Romitti PA, Dennis LK. Pesticides and hypospadias: a meta-analysis. *J Pediatr Urol*. 2009, 5;1:17-24.
  13. Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT. Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. *Worlds Health Organization*. 2012.
  14. Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT *et al*. Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci*. 2008, 105;2:235-259.
  15. Sharpe RM, Irvine DS. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *Bmj*. 2004, 328;7437:447-451.
  16. Cao Y, Winneke G, Wilhelm M, Wittsiepe J, Lemm F, Furst P *et al*. 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*. 2008, 211;1-2:30-39.
  17. Lin LC, Wang SL, Chang YC, Huang PC, Cheng JT, Su PH *et al*. Associations between maternal phthalate exposure and cord sex hormones in human infants. *Chemosphere*. 2011, 83;8:1192-1199.
  18. Breedlove SM. Minireview: Organizational hypothesis: instances of the fingerpost. *Endocrinology*. 2010, 151;9:4116-4122.
  19. Manning JT, Scutt D, Wilson J, Lewis-Jones DI. The ratio of 2nd to 4th digit length: a predictor of sperm numbers and concentrations of testosterone, luteinizing hormone and oestrogen. *Hum Reprod*. 1998, 13;11:3000-3004.
  20. Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environ Health Persp*. 2009, 117;11:1786-1790.

21. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM *et al.* Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect.* 2005, 113;8:1056-1061.
22. Ting TH, Wu LL. Penile length of term newborn infants in multiracial Malaysia. *Singapore Med J.* 2009, 50;8:817-821.
23. Jensen MS, Wilcox AJ, Olsen J, Bonde JP, Thulstrup AM, Ramlau-Hansen CH *et al.* Cryptorchidism and hypospadias in a cohort of 934,538 Danish boys: the role of birth weight, gestational age, body dimensions, and fetal growth. *Am J Epidemiol.* 2012, 175;9:917-925.
24. Bay K, Virtanen HE, Hartung S, Ivell R, Main KM, Skakkebaek NE *et al.* Insulin-like factor 3 levels in cord blood and serum from children: effects of age, postnatal hypothalamic-pituitary-gonadal axis activation, and cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92;10:4020-4027.
25. Garn SM, Burdi AR, Babler WJ, Stinson S. Early prenatal attainment of adult metacarpal-phalangeal rankings and proportions. *Am J Phys Anthropol.* 1975, 43;3:327-332.
26. van de Beek C, Thijssen JH, Cohen-Kettenis PT, van Goozen SH, Buitelaar JK. Relationships between sex hormones assessed in amniotic fluid, and maternal and umbilical cord serum: what is the best source of information to investigate the effects of fetal hormonal exposure? *Horm Behav.* 2004, 46;5:663-669.
27. Lombardo MV, Ashwin E, Auyeung B, Chakrabarti B, Taylor K, Hackett G *et al.* Fetal testosterone influences sexually dimorphic gray matter in the human brain. *J Neurosci.* 2012, 32;2:674-680.
28. Yang CF, Shah NM. Representing sex in the brain, one module at a time. *Neuron.* 2014, 82;2:261-278.

## (2) 環境化学物質が胎内ホルモン環境および性向行動に及ぼす影響

北海道大学 環境健康科学研究教育センター 岸 玲子、  
荒木敦子、伊藤佐智子、宮下ちひろ

平成24～26年度累計予算額：49,359千円（うち、平成26年度予算額：16,732千円）

予算額は、間接経費を含む。

### [要旨]

性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り、これらの原因として内分泌かく乱作用がある環境化学物質曝露による胎児期のホルモン環境への影響が懸念されている。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、ヒトのデータは不十分である。そこで本研究では、胎児期の環境化学物質曝露と出生時の外性器、精巣の異常と胎生期ホルモン環境の異常との関連について明らかにすることを目的とした。特にサブテーマ（2）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、胎児期の環境化学物質への胎児期曝露が、児の性腺機能および性役割行動（性向行動）に与える影響を明らかにすることを目的とした。北海道スタディにおいて、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）、デヒドロエピアンドロステロン（DHEA）、アンドロステネジオン（A-dione））、SHBG（Steroid Hormone Binding Globulin）、プロラクチン（PRL）、卵胞刺激ホルモン（Follicle Stimulating Hormone；FSH）黄体形成ホルモン（Luteinizing Hormone；LH）、Inhibin B、Insulin-like Factor 3（ILSN3）の臍帯血中濃度を分析し、環境化学物質として既に測定済みの母体血中Polychlorinated Biphenyls；PCB、ダイオキシン類、有機フッ素化合物（Perfluorinated Compounds；PFC、フタル酸エステルDEHP（di(2-ethylhexyl)phthalate））濃度との関連を検討した。さらに、脳の性分化として7-8歳時点の性向行動調査（性役割行動）への影響を検討した。

胎児期の環境化学物質曝露による胎内の性腺機能に関しては、本研究の母体血中PCB・ダイオキシン類曝露濃度（PCDD/F：9.3 pg/g TEQ）は先行研究と比較して低いが、PCB・ダイオキシン類濃度の増加と共に臍帯血中T/E2比、SHBG、PRL濃度が低下し、DHEA濃度が増加した。従ってPCB・ダイオキシン類の胎児期曝露は抗アンドロゲン作用により児のLeydig細胞の機能低下、およびテストステロンへの合成に関連するアロマターゼの活性に影響する可能性が考えられた。またPFCについては、PFOS/PFOAを四分位にすると男児では、PFOS濃度が高いほどT/E2比が小さく、Inhibin Bが低かった。女児では、P4、PRL値が低かった。一方PFOA濃度が高いほど、男児でInhibin Bが有意に高く、p-for trendも有意だった。胎児期のPFOS曝露は、特に男児においてエストロゲン作用を有する可能性が示唆された。また、本研究からPFOSへの曝露がInhibin Bの産生を低下させる可能性が示唆されたことから、動物同様Inhibin Bを分泌するSertoli細胞変成等の影響があるのではないかと考えられる。女児では明確なエストロゲン作用は認められなかった。一方、PFOAはInhibin Bを増加した。PFOA曝露によるSertoli細胞やInhibin Bへの影響に関する報告は動物実験や細胞実験でも調べた限りはなく、その機序については今後明らかにする必要がある。フタル酸エステルは、男

児でDEHP代謝物であるMEHP (mono(2-ethylhexyl) phthalate) の母体血中濃度が高いとP4、Inhibin B、およびINSL3濃度が有意に低かったが、女兒では、MEHP濃度といずれの性ホルモンとの関連も見られなかった。Inhibin BおよびINSL3は、それぞれ精巣のSertoli細胞、Leydig細胞から分泌されるホルモンである。従って、動物実験で報告されてきた胎児期のDEHP曝露による男児の精巣発達への負の影響が、ヒトへの低濃度曝露でも生じる可能性が示唆された。

胎児期の環境化学物質曝露による脳の性分化に関しては、男児のみで母体血中ダイオキシン類濃度が高いほどJ-PSAI Scaleが低下する、つまり女兒傾向を示す影響が認められた。男児傾向と女兒傾向の得点別の解析では、母体血中ダイオキシン類濃度が高いほど男児傾向得点が低下する傾向が認められたが、女兒傾向得点への影響は少なく有意ではなかった。胎児期のダイオキシン類曝露は、7歳の遊び傾向を女性化させる可能が示された。曝露がLeydig細胞で産生されるテストステロン・エストラジオールに影響し、抗アンドロゲン作用つまり女性化傾向に作用したことが示唆された。PCBs、PFCsおよびフタル酸エステル曝露は、本研究ではJ-PSAIと有意な関連が認められなかった。

胎児期のPCBs・ダイオキシン類、有機フッ素化合物、フタル酸エステル曝露は、胎内の性腺機能および7歳児の脳の性分化に、特に男児に影響する可能性が示唆された。コホートにおいて児の追跡を行うことで、胎児期曝露によるその後の影響についての研究が必要である。

## [キーワード]

環境化学物質、胎児期曝露、出生コホート、性ホルモン、性役割行動

## 1. はじめに

性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り、これらの原因として環境化学物質曝露による胎児期のホルモン環境の影響が懸念されている。エストロゲン作用がある環境化学物質への曝露が増加したために精巣形成不全症候群に至り、また女兒の遊び方や思春期発来 of 早期化等への影響が懸念されている。このことから、World Health Organization (WHO) も2012年に内分泌かく乱物質による潜在的なヒトおよび野生動物への影響についての報告書を作成している[1]。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、ヒトのデータは不十分である。

芳香族炭化水素受容体 (AhR) アゴニストであるPCBs (Polychlorinated Biphenyls)、TCDD (Tetrachlorodibenzodioxin)、PCDFs (polychlorinated dibenzofuran) は、性ステロイドホルモン受容体へ作用することにより視床下部 - 下垂体 - 性腺系 (HPG)、および視床下部 - 脳下垂体 - 甲状腺 (HPT) などのホルモン恒常性を阻害し、内分泌かく乱作用を引き起こすことが示唆されている。また、AhRは発生段階の神経系に存在するため、TCDDの胎児期曝露が正常な脳神経発達を阻害し[2, 3]、出生後の性役割行動に関与する可能性が示唆されているが、詳細なメカニズムは不明である。また、これらは主に動物実験や事故などで高濃度曝露されたヒトの研究からの報告である。ヒトを対象にした思春期および成人の生殖能力（月経周期、睾丸体積、精液質）を評価した研究はいくつか報告されている。Phillips et al. (2008) のまとめによると[4]、不妊患者では精液内のPCB-153、PCB-180が対照群よりも高く、またPCB濃度が高いと精子の運動能が低い、遊離テストステロン値の低下が報告されている一方で、有意な関連はないという報告もある。ドイツ

の工業地域に居住する母児104組を対象にした研究で、母体血中PCDD/Fs濃度が2倍になると臍帯血清中のテストステロンの低下(MR=0.86, 95%CI=0.72-1.03), およびエストラジオールの低下(MR=0.73, 95%CI= 0.61-0.87)が認められた[5]。女性でテストステロンの減少が、男性でエストラジオールの減少がより認められた。胎児期曝露の影響は、PCB(この研究では6種類)と比較してダイオキシン類の方が、より影響が大きい可能性が示された。しかし、この研究では男女別のサブグループ人数は40から58名となり、サンプルサイズが不十分である。また、測定したPCBは6種類のみであり、PCBsの曝露を詳細に評価できたとはいえ難い。母親が油症患者である次世代を対象にした研究で、中毒事故である油症のような高レベルの曝露を胎児期に受けると、男女ともに思春期以降の性ホルモンに影響が認められたが、曝露濃度は測定されていない[5]。

有機フッ素化合物(Perfluorinated compounds; PFCs)については、長期的なPFCs曝露による雄ラットの精巣内におけるステロイド合成能力を阻害[6]、あるいはラット細胞の*in vitro*でPFOA(Perfluorooctanoate)がLeydig細胞のテストステロン放出阻害が報告されている[7]。疫学研究はいずれも横断研究で、成人男性では、血清中PFOS(Perfluorooctane sulfonate)、PFOA濃度とLuteinizing Hormone(LH)との正の相関がある一方、精子の質とは関連がみられなかった報告[8]、成人女性ではPFOS濃度とエストラジオールとの負の相関、およびPFOS、PFOA濃度が高い群で閉経が多いことが報告されている[9]。しかし、胎児期曝露による児の性腺機能に関する報告はない。

フタル酸エステル類については、動物実験では、DEHP(di(2-ethylhexyl) phthalate)曝露が胎児のLeydig細胞、Sertoli細胞の減少あるいは増殖抑制を引き起こし、テストステロン濃度低下などのホルモンバランスを乱すことが報告されている[10, 11]。ヒトでは、成人の横断研究、その多くが不妊外来での患者を対象とした調査で、曝露と精子濃度、テストステロン濃度との負の相関、Follicle Stimulating Hormone(FSH)との正の相関、および精子のDNA障害が多いことが報告されている[12-17]。思春期の女兒においてはケースコントロール研究で、フタル酸エステル曝露による思春期早発、乳房や陰毛の早期成熟などが示唆されている[18-20]。一方、胎児期または乳幼児期の曝露については、曝露濃度が高いと児のテストステロン、SHBG(Steroid Hormone Binding Globulin)と負の相関、肛門性器間距離が短いことが報告されているが[21-23]、このうち胎児期曝露による児の性ホルモンへの影響は1報のみである。また、フタル酸エステル類濃度が高いと遊びの男児スコアが低くなることから、脳の性分化への影響も示唆されている[24]。しかし、ヒトでの科学的エビデンスは十分であるとはいえない。

ところで、性向行動とは、個人が持って生まれた性質(性質や性別)によって、傾向がある行動のことである。特に性別による行動を観察するものとしては青年期における性役割タイプを測定するBSRI(the Bem Sex Role Inventory)[25]、性役割尺度を両方の性にとって望ましい男性・女性に典型的な尺度、およびどちらかの性にとって望ましく典型的な両極で構成された尺度からなるPAQ(Personal Attributes Questionnaire)[26]があり、主に成人に使用される。子どもを対象にしたものだと、幼児期における典型的な性役割行動(Sexual role behavior)の指標として使用されるPSAI(Pre-School Activities Inventory)がある[27]。男児、女児で出生後、または妊娠時母のテストステロン濃度が高いとPSAI得点が増加したことが報告されている[28, 29]。胎児期のPCB・ダイオキシン類、フタル酸エステル類とPSAIについては、5歳から7歳半までの児で、ドイツの報告ではPCB・ダイオキシン類濃度が高いと男児ではPSAI女児得点が高く、女児では低い

[30]、オランダの報告では男児で臍帯血中PCBが高いとPSAI男児得点が低く、男女ともダイオキシン類濃度が高いと女児得点が高い[31]ことが報告されている。また、フタル酸エステル類濃度が高いとPSAIの中の男性得点が低いことが報告されている[24]。しかし、環境化学物質曝露による脳の性分化への影響に関する研究はわずかである。

残留性有機汚染物質（Persistent Organic Pollutants ; POPs）については、国際的に協調して廃絶、削減等を促すための取組として「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約（POPs 条約）」が締結されている。PCBは条約発効時から、有機フッ素化学物質のうちPFOSはストックホルム条約の第4回締約国会議（2009年5月）で制限物質として新たに追加されている。わが国では、PCBやダイオキシン類に対してはダイオキシン類対策特別措置法（平成11年7月12日成立）などにより対策がとられている。しかし、既に欧米ではPFOAについて使用禁止に踏み切った国も多いがわが国では具体的な禁止措置はとられていない。さらに他の有機フッ素化合物についても使用が増えているがリスク評価も十分でないものも多い。フタル酸エステル類は食品の包装容器や乳幼児のおもちゃへの使用については厚生労働省告示による規制があるが、その他の製品への使用規制はない。これら動物実験から内分泌かく乱作用が疑われている物質について日本ではこれまで人の疫学データはほとんどなかったため、日本において性分化や次世代影響を研究、評価する必要がある。

## 2. 研究開発目的

本研究では、北海道スタディ、エコチル調査において、環境化学物質濃度と出生時の外性器、精巣の異常と胎生期ホルモン環境の異常との関連について明らかにすることを目的とする。サブテーマ（2）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、PCBs、ダイオキシン類、有機フッ素化合物、フタル酸エステルDEHP（di(2-ethylhexyl)phthalate）への胎児期曝露が、児の性腺機能および性役割行動（性向行動）に与える影響を明らかにすることを目的とする。具体的には、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）、デヒドロエピアンドロステロン（DHEA）、アンドロステネジオン（A-dione）、SHBG（Steroid Hormone Binding Globulin）、プロラクチン（PRL）、卵胞刺激ホルモン（FSH: Follicle Stimulating Hormone）黄体形成ホルモン（Luteinizing Hormone ; LH）、Inhibin B、Insulin-like Factor 3（ILSN3）、7-8歳時点の性向行動（J-PSAI）への影響を解析し、胎児期の環境化学物質曝露が胎内ホルモン環境および脳の性分化に与える影響について解明する。

## 3. 研究開発方法

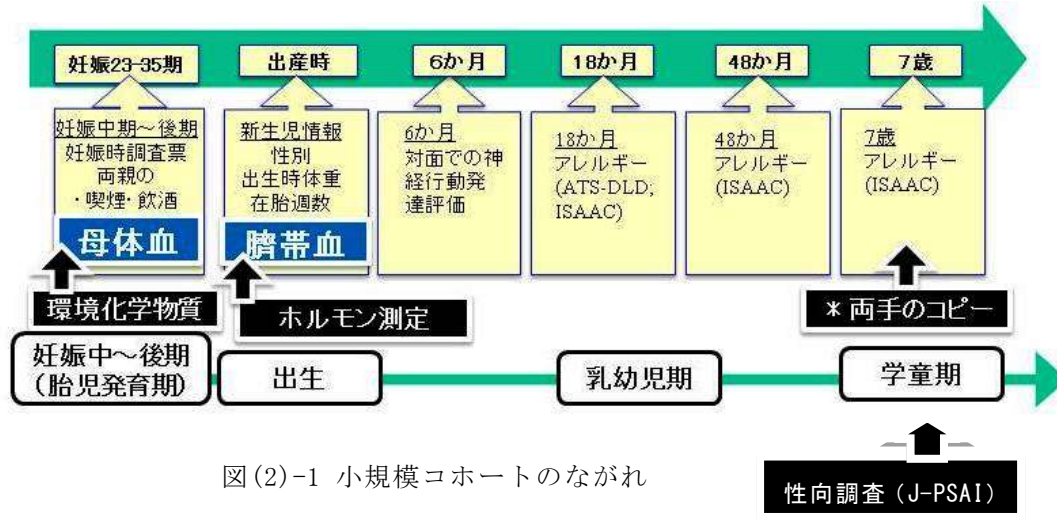
### （1）環境と子どもの健康に関する北海道スタディ（北海道スタディ）

#### 1) 小規模コホート

小規模コホートは、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出生前向きコホート研究である。コホートのながれを図(2)-1に示す。札幌市およびその周辺に住む日本人で、2002年7月から2005年9月に産科を受診した妊婦1,796名に研究への参加を依頼した。依頼した妊婦のうち、日本臍帯血バンク登録者（22%）と里帰り分娩（3%）（他施設で分娩）予定者は研究対象から除外した。最終的に妊娠23週から35週の妊婦514名（28.6%）が研究参加に同意した。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。妊娠中期から後期に妊婦から母体血40 ml、および分娩時に臍帯血40 mlを採取し、分析まで-80℃で凍結保存した。



## 2) 大規模コホート

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20,823人が登録している。コホートのながれを図(2)-2に示す。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。出生後の調査で母乳栄養の有無などの情報を得た。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℃で保存した。8歳児に性向調査(J-PSAI)を実施している。加えて、サブ(1)で7歳から8歳の児を対象に両手のコピーを依頼し、第2指第4指比(2D/4D)を測定した。



## 3) 胎児期の環境化学物質曝露

小規模コホートで、妊娠後期の母体血から426名のPCB・ダイオキシン類を高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マススペクトロメーター(HRGC/HRMS)法(福岡県保健環境研究所)、447名のPFOS・PFOAを液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析(LC/MS/MS)法(星薬科大学)、

および487名のDEHP代謝物Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) をガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法 (名古屋大学) で測定済みのデータを用いた。

#### 4) 臍帯血中ホルモン濃度の測定

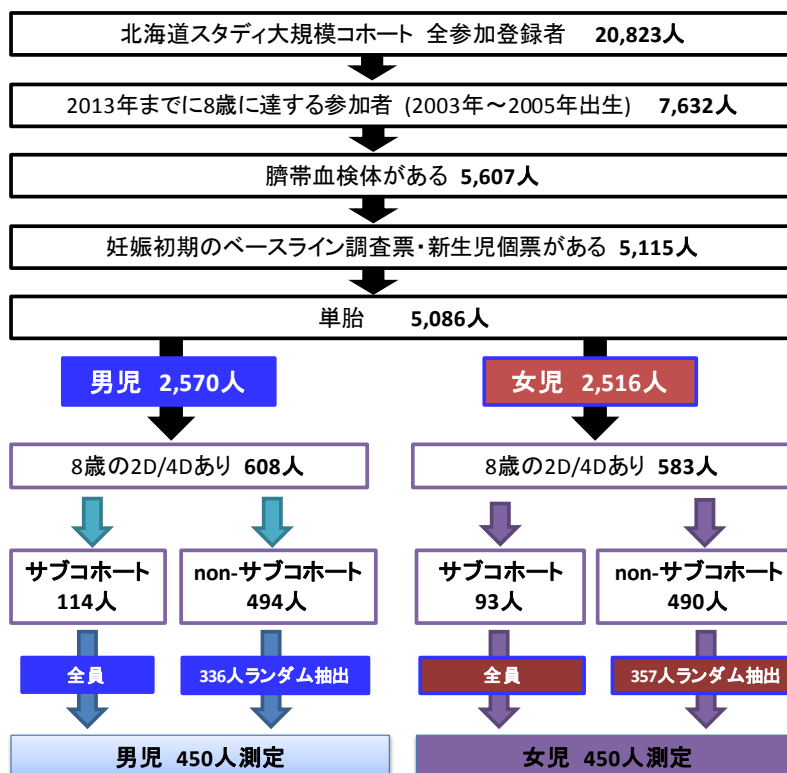
##### a. 小規模コホート

小規模コホートでは、514人のうち、保存してあった全臍帯血295検体を用いて、臍帯血中の性ホルモン濃度の測定をサブ(1)と協力して行った。

性ステロイドホルモンであるテストステロン(T)、エストラジオール(E2)、プロゲステロン(P4)、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)、アンドロステネジオン(A-dione)をLC-MS/MS法で、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)、およびプロラクチン(PRL)を免疫放射定量測定(IRMA)法で、InhibinBをELISA法で、insulin-like factor 3 (INSL3)をEIA法で測定した。性ホルモンの測定は、あすか製薬メディカルにて実施した。

##### b. 大規模コホート

北海道スタディ大規模コホート全参加者20,823人の中で2013年までに8歳になった(2003年～2005年生まれ)7,632人を対象とした。このうち臍帯血検体を保有するのは5607人、かつ妊娠中のベースライン調査票および出産時の新生児個票がそろそろ単胎は5,086人(男児は2,570人および女児は2,516人)だった。このうち男児608人および女児583人が2D/4Dのデータが得られていた。ところで、北海道スタディ大規模コホートでは、あらかじめ無作為に24%をサブコホートとして抽出して



図(2)-3 大規模コホートの性ホルモン測定対象者

いる。そこで、上記の集団で、サブコホートである男児114人および女児93人の全員を性ホルモン測定対象者とし、加えて無作為抽出した男児336人および女児357人、最終的に男児女児それぞれ450人を性ホルモン測定対象者とした(図(2)-3)。保存してあった臍帯血を用いて900名のE2、T、P4をサブ(1)と協力して測定した。加えて、男児のみ高感度LH、高感度FSH、Inhibin B、およびINSL3を測定した。測定は全てあすか製薬メディカル(株)で実施した。

## 5) 典型的性役割行動(性向行動)調査

幼少性役割行動尺度(Japanese version of Pre-School Activities Inventory (J-PSAI))は、佐々木ら(2006)が標準化した日本語版PSAIである[32]。全24項目のうち、男児項目12、女児項目12に分かれており、それぞれの項目について頻度を1-5の5件法で回答し、得点を算出する。

小規模コホートでは、実施済みの小学校入学時J-PSAI質問票得点を用いた(図(2)-1)。佐々木ら(2006)が既に標準化した質問票は男児傾向12項目、女児傾向12項目を含むが、女児傾向の1項目の回答が得られなかったため、女児傾向12項目の平均値(男児2.2、女児3.4)を補完した。J-PSAI scaleは $47.11 + 1.1 \times (\text{男児傾向12項目合計} - \text{女児傾向12項目})$ で算出した[32]。

大規模コホートでは、実施済みの8歳時J-PSAI質問票得点を用いた(図(2)-2)。

## 6) 統計解析

### a. 環境化学物質曝露による性ホルモンへの影響

環境化学物質、ホルモンとも測定値が検出下限値(detection limit; DL)未満の検体には検出下限値の半値を代入して解析した。ダイオキシン類の毒性等価量(toxicity equivalence quantity; TEQ)は、2005年にWHOが発表した毒性等価係数(toxic equivalence factor; TEF)を用いて算出した[33]。環境化学物質および性ホルモン濃度は非正規分布を示したため、常用対数変換してから解析に用いた。性ホルモンの指標としてT/E2、T/SHBG、およびLH/Tを使用した。性ホルモン濃度と母児の特徴との関連をT検定、カイ2乗検定、Mann-Whitney U検定で検討した。児の男女別の性ホルモンの濃度差をMann-Whitney U検定で解析した。環境化学物質と性ホルモンの両方が得られた対象者について化学物質とホルモンの相関をSpearman's rank correlation testで解析した。環境化学物質を連続数として重回帰分析を実施した後、曝露と性ホルモン濃度が有意であった場合は曝露を四分位にして量-影響関係を確認した。調整因子は各環境化学物質ごとに別途示す。

統計学的有意水準は $p < 0.05$ とし、統計解析はThe Statistical Package for Social Science (SPSS) for Windows version 19.0J(日本語版SPSS, Inc., Chicago, USA)、JMP pro 10またはJMP clinical 5(SAS Institute Inc., NC, USA)を用いた。

### b. 環境化学物質曝露によるJ-PSAIへの影響

環境化学物質、J-PSAI scale、男児傾向および女児傾向得点は正規分布でなかったため対数変換した。環境化学物質と男女別のPSAI scale、男児傾向および女児傾向得点の関連を交絡要因で調整した重回帰分析で検討した。調整因子は母親の年齢、妊娠中の喫煙と飲酒、世帯収入、妊娠週数、小学校入学時の児の体重、年長の兄弟有無、採血時期(妊娠週数 $< 28$ wks,  $28- < 36$ wks,  $\geq 36$ wks, 出産後)、児の性別(男女別の解析は除く)を用いた。

統計学的有意水準は $p < 0.05$ とし、統計解析はThe Statistical Package for Social Science (SPSS) for Windows version 19.0J (日本語版SPSS, Inc., Chicago, USA)を用いた。

以上の研究は、すべて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キ宣言に基づき実施した。

#### 4. 結果及び考察

性ホルモンを測定した母児の基本的属性を表(2)-1に示す。母親の出産時年齢は $30.1 \pm 5.0$  (平均値 $\pm$ SD)、男児の性別の割合は45.9%、女児は54.1%、児の在胎週数は $39.3 \pm 1.0$  (平均値 $\pm$ SD)、および出生体重は $3126.8 \pm 331.6$  (平均値 $\pm$ SD)であった。

表(2)-1 母児の基本的属性

		N (%)	Mean $\pm$ SD
<b>Maternal characteristics</b>			
Age at delivery (years)		295	$30.1 \pm 5.0$
Pre-pregnancy BMI ( $m^2/kg$ )		294	$20.9 \pm 2.9$
Parity	0	149 (50.7)	
	$\geq 1$	145 (49.3)	
Annual household income (million yen)	<5	206 (70.5)	
	$\geq 5$	86 (29.5)	
Educational level	$\leq 12$ years	133 (45.2)	
	$\geq 13$ years	161 (54.8)	
Smoking during pregnancy	Nonsmoker	238 (81.0)	
	Smoker	56 (19.0)	
Alcohol drinking during pregnancy	Nondrinker	193 (65.6)	
	Drinker	101 (34.4)	
<b>Infant characteristics</b>			
Gender	Boy	135 (45.9)	
	Girl	159 (54.1)	
Birth weight (g)		294	$3126.8 \pm 331.6$
Gestational age (wks)		294	$39.3 \pm 1.0$

環境化学物質であるMEHP、PCB、ダイオキシン類、PFOS、およびPFOAの母体血中濃度分布を表(2)-2に示す。全ての環境化学物質の濃度は非正規分布を示し、児の性別によって環境化学物質濃度の有意な差は認められなかった。

表(2)-2 母体血中の環境化学物質濃度

	Percentile					
	N	Min	25th	50th	75th	Max
MEHP (nmol/ml)	487	0.007	0.021	0.036	0.059	0.365
PCBs (ng/g lipid)	426	17.8	73.0	107	148	41460
Dioxins (TEQ pg/g lipid)	426	3.17	9.95	13.9	18.2	43.4
PFOS (ng/ml)	447	1.30	3.40	5.20	7.00	16.2
PFOA (ng/ml)	447	0.25	0.80	1.30	1.80	5.30

全体の性ホルモンの検出下限値、検出率、濃度の分布を表(2)-3に示す。検体の量不足により、LHは7件、FSHは8件、PRLは6件、Inhibin Bは5件、性ホルモンの測定が不可能であった。INSL3は男児全員と女児20件のみを測定した。測定できた検体のうち、各性ホルモンの検出率はステロイドホルモン5種類はすべて100%、LHが16.3%、FSHが20.9%、SHBG並びにPRLが99.7%、Inhibin Bが60%、INSL3が100%であった。

表(2)-3 臍帯血中性ホルモンの濃度

	N	DL	Detection rate (%)	Percentile				
				Minimum	25th	50th	75th	Maximum
E2 (ng/mL)	295	0.005	100	0.01	3.29	4.70	7.10	33.5
T (pg/mL)	295	0.005	100	5.45	59.8	83.9	114	1798
P4 (ng/mL)	295	0.010	100	0.43	175	219	279	514
DHEA (ng/mL)	295	0.010	100	0.67	1.77	2.19	2.99	114.16
A-dione (ng/mL)	295	0.010	100	0.10	0.36	0.46	0.58	7.46
LH (mIU/mL)	288	0.5	16.3	<DL	<DL	<DL	<DL	3.37
FSH (mIU/mL)	287	0.5	20.9	<DL	<DL	<DL	<DL	1.89
SHBG (nmol/L)	295	1.1	99.7	<DL	13.3	15.8	19.0	322
PRL (ng/mL)	289	1.0	99.7	<DL	63.1	85.8	116	223
Inhibin B	290	11	60.0	<DL	<DL	23.3	44.7	104
INSL3	153		100	0.07	0.23	0.27	0.32	0.75

N: 検体量不足で測定不可の検体を除く

DL: Detection Limit

INSL3は女児は20名のみ測定

児の性別の性ホルモン濃度を表(2)-4に示す。男児のホルモン濃度は女児よりもT、LH、FSH、Inhibin B、INSL3、T/E2、およびT/SHBGが有意に高かった。一方、DHEAは女児の方が有意に濃度が高かった。本研究において、男児で女児よりも男性ホルモンであるテストステロン濃度、T/E2、およびT/SHBGが高く、男児の特徴として従来の報告と同様であった[34]。性腺刺激ホルモンであるLHおよびFSHに関して男児で濃度が高いのも従来の報告と同様であったが[35]、その検出率は25%未満と低かった。

表(2)-4 児の男女別、臍帯血中性ホルモンの濃度

	男児		女児		p
	N	Median (Min, Max)	N	Median (Min, Max)	
E2 (ng/mL)	135	5.05 (0.01, 33.5)	159	4.70 (1.44, 31.2)	0.227
T (pg/mL)	135	98.8 (5.45, 620)	159	69.9 (6.25, 1798)	<0.001
P4 (ng/mL)	135	203 (0.43, 471)	159	180 (6.25, 514)	0.184
DHEA	135	2.08 (0.67, 2.95)	159	2.32 (0.95, 114)	0.023
A-dione	135	0.47 (0.01, 5.93)	159	0.44 (0.15, 7.46)	0.410
LH (mIU/mL)	132	0.42 (0.25, 3.4)	155	0.25 (0.25, 0.61)	<0.001
FSH (mIU/mL)	132	0.41 (0.25, 1.9)	154	0.25 (0.25, 0.25)	<0.001
SHBG (nmol/L)	135	16.8 (8.10, 322)	159	15.7 (0.55, 306)	0.079
PRL (ng/mL)	132	85.2 (23.2, 219)	156	82.9 (0.50, 223)	0.986
T/E2	135	19.4 (2.05, 21839)	159	15.2 (0.68, 135)	0.002
T/SHBG	135	5.86 (0.51, 44.6)	159	4.55 (0.47, 1760)	<0.001
Inhibin B	135	44.0 (5.5, 104)	159	5.5 (5.5, 76.6)	<0.001
INSL3	132	0.29 (0.07, 0.75)	25	0.18 (0.14, 0.46)	<0.001

表の濃度は、検出下限値未満の検体に下限値の半値を代入して表記、p: Mann-Whitney test

### (1) 胎児期の環境化学物質曝露が臍帯血中性ホルモンへの影響

#### 1) PCB・ダイオキシン類

母体血中PCB・ダイオキシン類濃度と臍帯血中性ホルモン濃度の両方のデータがそろった母児263名を解析対象とした。PCB・ダイオキシン類濃度と性ホルモンの男女別の相関を表(2)-5、表(2)-6に示す。男児ではPCBが増加すると共にFSHが増加した ( $r=0.210$ 、 $p < 0.05$ )。その他に有意に相関は認められなかった。

表(2)-5 母体血中 PCBs と性ホルモン濃度との相関 (男女別)

性ホルモン	男児	女児
	$\rho$	$\rho$
E2 (ng/mL)	-0.043	0.009
T (pg/mL)	-0.047	0.007
T/E2	0.041	0.072
P4 (ng/mL)	-0.028	0.053
DHEA	0.022	-0.027
A-dione	-0.053	-0.080
LH (mIU/mL)	0.121	nd
FSH (mIU/mL)	0.210*	nd
LH/T	0.114	nd
SHBG (nmol/L)	-0.051	0.133
T/SHBG	-0.010	-0.089
PRL (ng/mL)	-0.073	-0.015
Inhibin B (pg/mL)	0.015	nd
INSL3 (ng/mL)	-0.029	nd

Spearman's rank correlation, \* $p < 0.05$ ,  
nd: not determined

表(2)-6 母体血中 Dioxin と性ホルモン濃度との相関 (男女別)

性ホルモン	男児	女児
	$\rho$	$\rho$
E2 (ng/mL)	0.044	0.033
T (pg/mL)	0.035	0.026
T/E2	0.019	0.064
P4 (ng/mL)	-0.024	0.035
DHEA	0.156	0.093
A-dione	-0.072	-0.124
LH (mIU/mL)	-0.036	nd
FSH (mIU/mL)	0.061	nd
LH/T	-0.005	nd
SHBG (nmol/L)	-0.127	0.107
T/SHBG	0.085	-0.052
PRL (ng/mL)	-0.173	-0.095
Inhibin B (pg/mL)	-0.110	nd
INSL3 (ng/mL)	-0.059	nd

Spearman's rank correlation \* $p < 0.05$ ,  
nd: not determined



男女別の多変量解析では、PCB・ダイオキシン類濃度を連続数として重回帰分析を行った後、連続数で有意であった性ホルモンについては、PCB・ダイオキシン類濃度を四分位に分けたモデルを解析した。連続数のモデルでは男児でPCB濃度が高いほどT/E2が有意に低かった(表(2)-7)。また、ダイオキシン類濃度が高いほどDHEA濃度は有意に高く、SHBGおよびPRL濃度が有意に低かった。ダイオキシン類濃度が高いほどT/E2の低下傾向が認められた (p=0.055) (表(2)-8)。

表(2)-7 PCBs 曝露と性ホルモン濃度との関連 (重回帰分析、男女別)

性ホルモン	男児 (n=121)				女児 (n=142)			
	B	(95%CI)		p-value	B	(95%CI)		p-value
E2 (ng/mL)	0.232	-0.145	0.608	0.225	-0.028	-0.251	0.194	0.801
T (pg/mL)	-0.176	-0.447	0.095	0.201	0.096	-0.179	0.371	0.491
T/E2	-0.408	-0.741	-0.074	<b>0.017</b>	0.124	-0.100	0.349	0.276
P4 (ng/mL)	0.195	-0.165	0.555	0.287	0.206	-0.114	0.526	0.204
DHEA	0.075	-0.183	0.332	0.566	-0.210	-0.517	0.098	0.179
A-dione	-0.028	-0.261	0.204	0.811	0.066	-0.162	0.294	0.568
LH (mIU/mL)	0.135	-0.227	0.498	0.461	nd			
FSH (mIU/mL)	0.234	-0.021	0.489	0.072	nd			
LH/T	0.292	-0.188	0.771	0.231	nd			
SHBG (nmol/L)	-0.134	-0.296	0.028	0.105	0.192	-0.007	0.391	0.058
T/SHBG	-0.042	-0.345	0.261	0.782	-0.096	-0.443	0.252	0.587
PRL (ng/mL)	-0.115	-0.302	0.071	0.223	0.139	-0.098	0.377	0.249
Inhibin B (pg/mL)	0.012	-0.212	0.235	0.918	nd			
INSL3 (ng/mL)	-0.052	-0.189	0.085	0.455	nd			

adjusted for maternal age, parity, pre-pregnancy weight, high, smoking during pregnancy, alcohol consumption during pregnancy, gestational age, blood sampling week (<28wks, 28-<36wks, ≥36wks, after delivery), and annual income

nd: not determined

表(2)-8 Dioxin 曝露と性ホルモンとの関連 (重回帰分析、男女別)

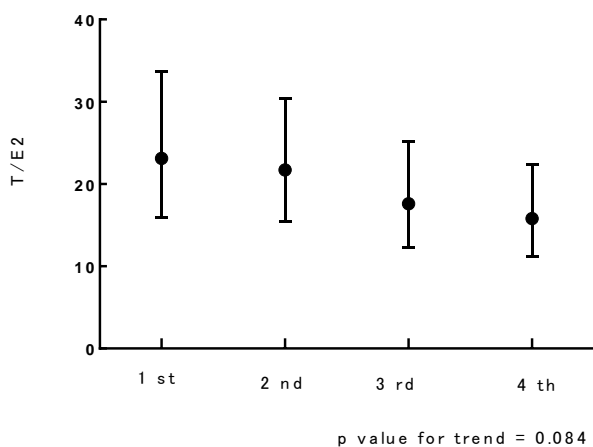
	男児 (n=121)				女児 (n=142)			
性ホルモン	B	(95%CI)		p-value	B	(95%CI)		
E2 (ng/mL)	0.343	-0.078	0.765	0.109	-0.012	-0.267	0.244	0.929
T (pg/mL)	-0.028	-0.335	0.280	0.858	0.166	-0.149	0.482	0.299
T/E2	-0.371	-0.750	0.008	0.055	0.178	-0.080	0.435	0.175
P4 (ng/mL)	0.011	-0.397	0.418	0.959	-0.055	-0.425	0.314	0.767
DHEA	0.323	0.040	0.607	<b>0.026</b>	0.121	-0.233	0.476	0.500
A-dione	-0.027	-0.289	0.234	0.836	0.080	-0.182	0.342	0.546
LH (mIU/mL)	-0.237	-0.643	0.168	0.249	nd			
FSH (mIU/mL)	0.005	-0.285	0.296	0.972	nd			
LH/T	-0.224	-0.764	0.317	0.414	nd			
SHBG (nmol/L)	-0.185	-0.366	-0.003	<b>0.046</b>	0.187	-0.042	0.416	0.109
T/SHBG	0.157	-0.183	0.497	0.363	-0.021	-0.421	0.379	0.918
PRL (ng/mL)	-0.226	-0.433	-0.019	<b>0.032</b>	-0.010	-0.285	0.265	0.943
Inhibin B (pg/mL)	-0.184	-0.433	0.066	0.147	nd			
INSL3 (ng/mL)	-0.098	-0.252	0.055	0.207	nd			

adjusted for maternal age, parity, pre-pregnancy weight, high, smoking during pregnancy, alcohol consumption during pregnancy, gestational age, blood sampling week (<28wks, 28-<36wks, ≥36wks, after delivery), and annual income

nd : not determined

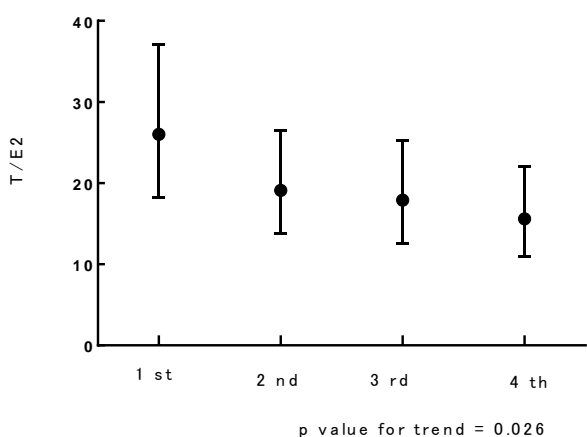
男児の四分位のモデルでは、PCB濃度の第1四分位から第4四分位にかけてT/E2比が低下する傾向が認められた(図(2)-4)。ダイオキシン類濃度の第1四分位から第4四分位にかけて、T/E2比、SHBG、PRLが有意に低下した(図(2)-5)。一方の女児では、PCB/ダイオキシン類濃度といずれの性ホルモンとの関連も見られなかった。

A) Testosterone Estradiol Ratio

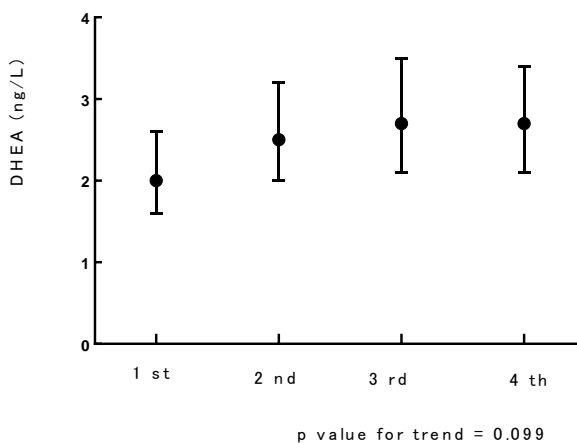


図(2)-4 PCB曝露と児の性ホルモンとの関連 (男児) 濃度を四分位にした時の、ホルモンの最少二乗平均と95信頼区間を示す。

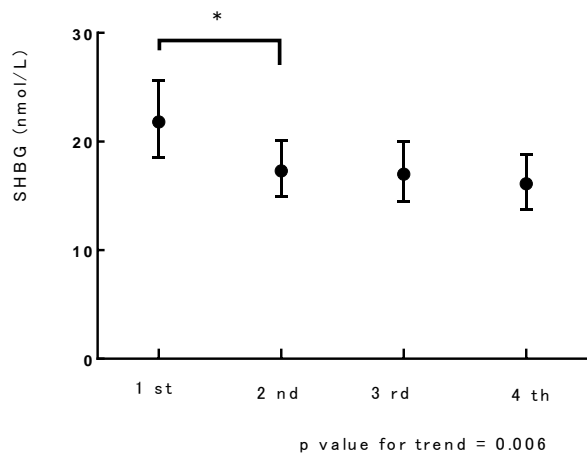
B) Testosterone Estradiol Ratio



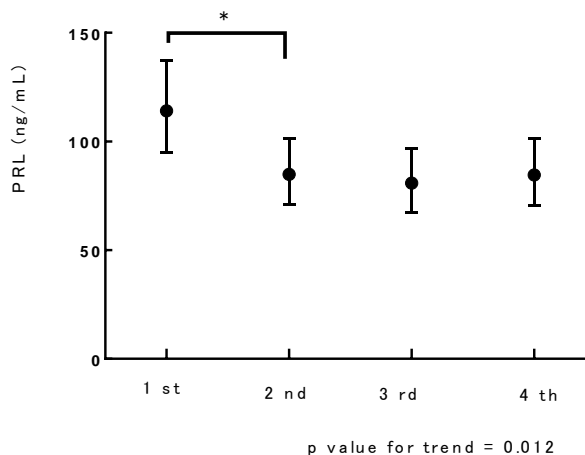
C) DHEA



D) SHBG



E) PRL



図(2)-5 ダイオキシン類曝露と児の性ホルモンとの関連 (男児) 濃度を四分位にした時の、ホルモンの最少二乗平均と95信頼区間を示す。

芳香族炭化水素受容体 (AhR) アゴニストであるPCB・ダイオキシン類は性ホルモン受容体へ作用することにより視床下部 - 下垂体 - 性腺系 (HPG)、および視床下部の脳下垂体の甲状腺 (HPT) などの性ホルモン恒常性を阻害し、内分泌かく乱作用を引き起こすことが示唆されている [2, 3]。ヒトを対象にPCB・ダイオキシン類の胎児期曝露と性ホルモン濃度との関連を検討した研究はこれまで5報ある [5, 36-39]。ドイツの先行研究では母体血中ダイオキシン類が増加するほど臍帯血中TとE2濃度が低下し、特に女兒でテストステロンの減少が、男児でエストラジールの低下が認められた [5]。中毒事故による油症患者の母親から生まれた児の思春期の性ホルモンを検討した研究で、少年でTT/E2およびTT/FSHの減少、およびE2/FSHの増加が [36]、少女ではE2の増加 [39] が認められダイオキシン類曝露による抗アンドロゲン作用が示唆された。ベトナム帰還兵を対象にした横断研究では [4, 40]、PCB・ダイオキシン類曝露は性ステロイドタンパク結合に影響することによりテストステロンを低下させる可能性が示唆された。本研究ではPCB曝露によりT/E2が低下し、ダイオキシン類曝露によりT/E2比とSHBG濃度が低下した。これは先行研究と同様に、PCB・ダイオキシン類の抗アンドロゲン作用による精巣のLeydig細胞の機能低下の可能性が考えられた。本研究ではダイオキシン類曝露により臍帯血中DHEA濃度が増加し、テストステロンへの合成に関連するアロマターゼの活性に影響する可能性が考えられた。出生後の影響については、ドイツの出生コホート研究で母体血と母乳中のダイオキシン類濃度増加と共に思春期前 (6-8歳) の血清中DHEA-S (硫酸抱合体) が低下し、ダイオキシン類曝露により副腎機能の発達を早める可能性が報告された [38]。ベトナムの枯葉剤汚染地区と非汚染地区の母児を対象にした横断研究では、非汚染地区と比較し汚染地区で母乳中のダイオキシン類濃度は3倍以上で、3歳の唾液中DEHA濃度が有意に低く、ダイオキシン類曝露が胎児期の副腎皮質に影響する可能性が報告された [37]。上記2報はDHEAについて本研究結果とは異なる方向への影響を報告しており、引き続いて生後の性ホルモンに与える影響を検討する必要がある。本研究ではダイオキシン類曝露によるPRL濃度が低下し、抗アンドロゲン作用以外の機序が存在する可能性が考えられた。

本研究の曝露濃度は先行研究と比較して低い (PCDD/F: 母体血中15.3 pg/g TEQ (ドイツ) ; 9.3 pg/g TEQ (本研究) [5] が、PCB・ダイオキシン類の胎児期曝露は男児のLeydig細胞・機能を低下、性腺機能への影響する可能性を示した。

### 3) 有機フッ素化合物

有機フッ素化合物PFOS、PFOAと性ホルモンと曝露濃度の両方のデータがそろった257名を解析対象とした。

PFOS/PFOAと性ホルモンの相関を表(2)-9に示す。男児では、PFOSとE2が正の相関、T/E2およびInhibin Bと負の相関を示した。PFOAとT/E2は負の相関を示したが、P4およびInhibin Bとは正の相関を示した。女兒では、PFOSとPRLが負の相関、PFOAとP4は正の相関を示した。

表(2)-9 PFCと性ホルモン濃度の相関

	男児 (N=113)				女児 (N=144)			
	PFOS		PFOA		PFOS		PFOA	
	$\rho$	p-value	$\rho$	p-value	$\rho$	p-value	$\rho$	p-value
E2 (ng/mL)	0.252	<b>0.007</b>	0.161	0.088	0.103	0.22	0.076	0.367
T (pg/mL)	-0.008	0.932	-0.087	0.36	0.009	0.915	0.145	0.863
T/E2	-0.310	<b>&lt;0.001</b>	-0.271	<b>0.003</b>	-0.057	0.501	-0.122	0.145
P4 (ng/mL)	0.048	0.615	0.285	<b>0.002</b>	-0.09	0.281	0.217	<b>0.009</b>
LH (mIU/mL)	-0.15	0.118	-0.104	0.28	-0.122	0.147	-0.053	0.535
FSH (mIU/mL)	0.002	0.987	-0.072	0.456	nd			
SHBG (nmol/L)	-0.047	0.618	0.111	0.241	-0.144	0.086	-0.072	0.392
LH/T	-0.046	0.633	0.027	0.779	nd			
T/SHBG	-0.032	0.973	-0.12	0.208	0.044	0.598	0.038	0.648
PRL (ng/mL)	-0.171	0.074	0.142	0.140	-0.287	<b>&lt;0.001</b>	-0.083	0.327
Inhibin B (pg/mL)	-0.399	<b>&lt;0.001</b>	0.226	<b>0.016</b>	-0.138	0.100	0.151	0.071
INSL3 (ng/mL)	-0.153	0.109	0.052	0.593	nd			

Spearman rank correlation

n.d.: not determined

ついで、重回帰分析を実施した。調整には、登録時の母の年齢、出産歴、母の非妊時BMI、世帯年収、妊娠中の喫煙およびカフェイン摂取、在胎週数、採血時期を用いた。重回帰分析では、PFOS/PFOAを連続数としたモデルを行った後、連続数で有意であった性ホルモンについては、PFOS/PFOA濃度を四分位に分けたモデルを解析した。

まず、PFOS/PFOAを連続数としたモデル(表(2)-10)、および四分位のモデル(図(2)-6、図(2)-7、図(2)-8)の結果を示す。PFOS濃度が高いと、男児ではT/E2、LH、Inhibin Bは有意に下がり、一方女児ではP4およびPRL濃度が有意に低下した。PFOA濃度が高いと、男児ではP4およびInhibin Bが高かったが、女児では有意な関連はなかった。次いで、PFOS/PFOAを四分位にすると男児では、PFOS濃度が高いほどT/E2比が有意に小さくなった。また、Inhibin Bは第1四分位と比較して第3四分位、第4四分位で有意に低く、p-for trendも有意だった。女児では、P4、PRLともに第1四分位と比較して第4四分位が有意に低く、p for trendも有意であった。一方PFOAは、男児で第1四分位と比較して第3および第4四分位のInhibin Bレベルが有意に高く、p-for trendも有意だった。

表(2)-10 胎児期 PFOS 曝露濃度と性ホルモンとの関連

	男児				女児			
	B	(95%CI)		p-value	B	(95%CI)		p-value
E2 (ng/mL)	0.182	-0.072	0.437	0.159	0.018	-0.199	0.236	0.867
T (pg/mL)	-0.050	-0.298	0.197	0.686	-0.027	-0.317	0.263	0.854
T/E2	-0.233	-0.418	-0.047	<b>0.014</b>	-0.046	-0.285	0.194	0.707
P4 (ng/mL)	-0.209	-0.447	0.029	0.084	-0.409	-0.714	-0.103	<b>0.009</b>
LH (mIU/mL)	-0.339	-0.666	-0.012	<b>0.043</b>	nd			
FSH (mIU/mL)	-0.061	-0.296	0.174	0.608	nd			
SHBG (nmol/L)	-0.036	-0.129	0.058	0.452	-0.203	-0.407	0.002	0.052
LH/T	-0.261	-0.697	0.176	0.239				
T/SHBG	-0.015	-0.265	0.235	0.906	0.175	-0.183	0.534	0.334
PRL (ng/mL)	-0.179	-0.358	0	0.050	-0.364	-0.602	0.125	<b>0.003</b>
Inhibin B (pg/mL)	-0.396	-0.565	-0.228	<b>&lt;0.001</b>	nd			
INSL3 (ng/mL)	-0.124	-0.248	0	0.050	nd			

adjusted for maternal factors such as age, parity, BMI before pregnancy, annual income, smoking during pregnancy, caffeine consumption during pregnancy, gestational weeks of blood sampling for PFOS/PFOA measurement, and infant factors such as gestational weeks for birth

nd: not determined

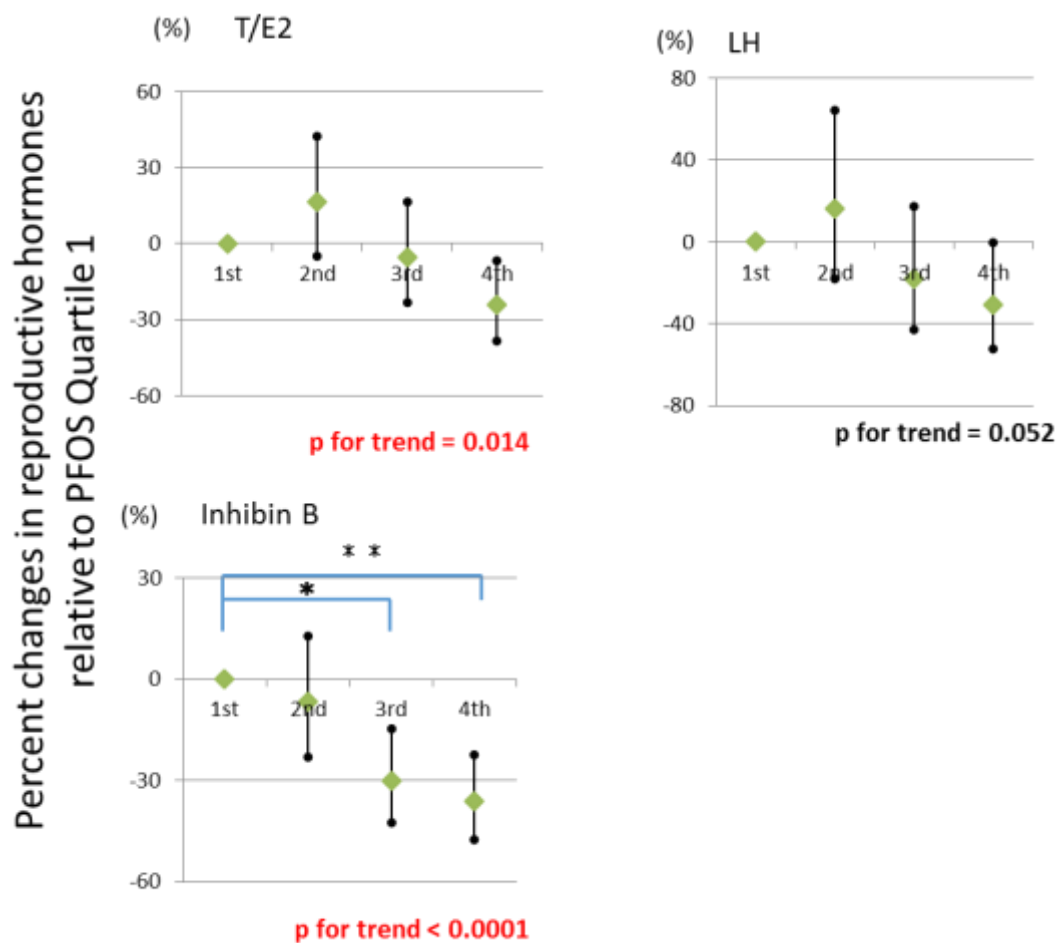
表(2)-11 胎児期 PFOA 曝露による性ホルモンへの影響

	男児				女児			
	B	(95%CI)		p-value	B	(95%CI)		p-value
E2 (ng/mL)	-0.015	-0.258	0.227	0.902	-0.092	-0.243	0.06	0.233
T (pg/mL)	-0.04	-0.273	0.193	0.735	-0.038	-0.241	0.164	0.708
T/E2	-0.025	-0.205	0.155	0.784	0.053	-0.114	0.22	0.529
P4 (ng/mL)	0.229	0.005	0.452	<b>0.045</b>	0.16	-0.058	0.377	0.149
LH (mIU/mL)	-0.023	-0.337	0.291	0.886	nd			
FSH (mIU/mL)	-0.058	-0.279	0.164	0.607	nd			
SHBG (nmol/L)	-0.028	-0.116	0.061	0.535	-0.105	-0.249	0.039	0.152
LH/T	0.004	-0.41	0.417	0.987	nd			
T/SHBG	-0.012	-0.248	0.224	0.918	0.066	-0.185	0.317	0.602
PRL (ng/mL)	0.151	-0.018	0.32	0.079	-0.096	-0.267	0.076	0.271
Inhibin B (pg/mL)	0.217	0.048	0.387	<b>0.013</b>	nd			
INSL3 (ng/mL)	0.051	-0.067	0.169	0.398	nd			

adjusted for maternal factors such as age, parity, BMI before pregnancy, annual income, smoking during pregnancy, caffeine consumption during pregnancy, gestational weeks of blood sampling for PFOS/PFOA measurement, and infant factors such as gestational weeks for birth

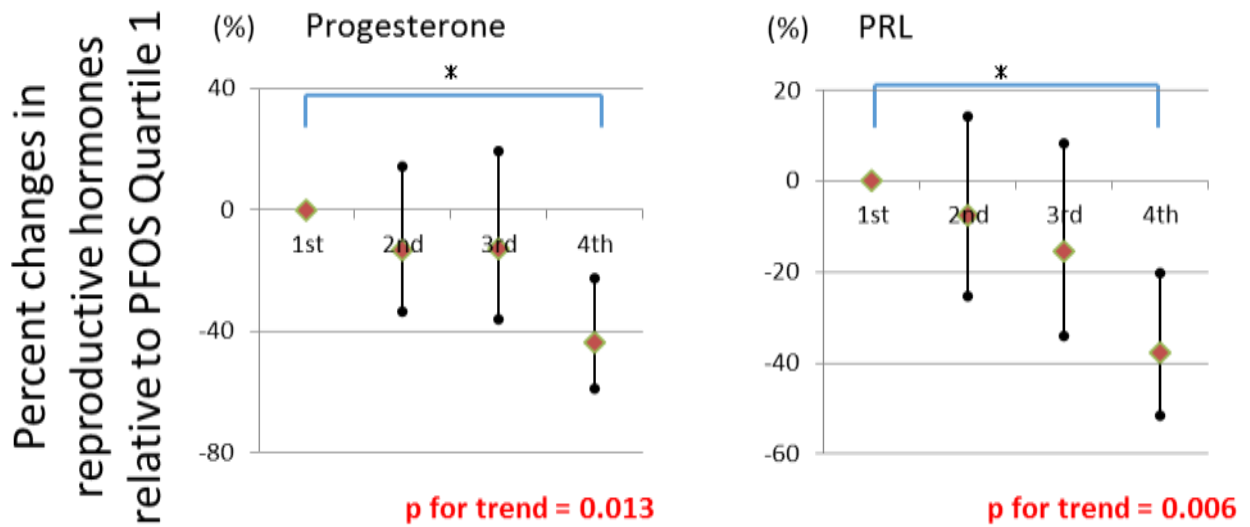
nd: not determined





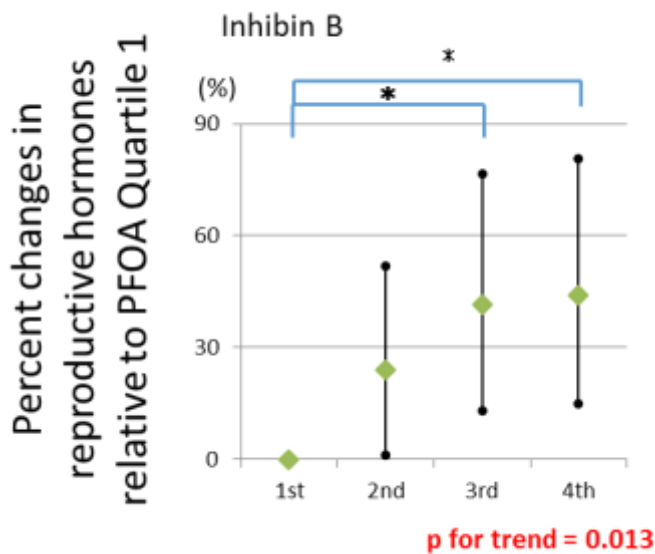
図(2)-6 PFOS曝露と児の性ホルモンとの関連 (男児)

PFOS濃度を四分位にしたとき、第1四分位と比較した時のホルモン濃度変化をパーセント (95%信頼区間) で示す



図(2)-7 PFOS曝露と児の性ホルモンとの関連（女児）

PFC濃度を四分位にしたとき、第1四分位と比較した時のホルモン濃度変化をパーセント（95%信頼区間）で示す



図(2)-8 PFOA曝露と児の性ホルモンとの関連（男児）

PFC濃度を四分位にしたとき、第1四分位と比較した時のホルモン濃度変化をパーセント（95%信頼区間）で示す

PFOS・PFOAの性ホルモンに対する詳細な作用機序は明確になっていないが、PFOSがラットのLeydig細胞に直接作用してテストステロンの合成を阻害する報告や[7] PFOSがコレステロールからテストステロン合成への過程における酵素反応の阻害を行うという報告があり[41]、結果的に

テストステロンを減少させると考えられる。またPFOS・PFOAはヒト生体内で代謝はされず、主に肝臓、腎臓、血中に分布しており[42]、血中ではほとんどがアルブミンと結合することから[43]、血中SHBGへの結合についてテストステロンと競合する可能性が考えられる。PFOSにおいては弱いエストロゲン作用も報告されている[44]ことから、PFOS・PFOAは抗アンドロゲン作用およびエストロゲン作用を有すると考えられる。本研究の男児におけるT/E2低下は、in vitroおよび動物実験におけるこれらの抗アンドロゲン作用およびエストロゲン作用がみられた過去の報告と一致する。

本研究では、PFOS濃度が高いと、男児でT/E2が有意に小さくなった。成人男性の横断研究でも、PFOSとテストステロン濃度、T/E2は負の相関を示しており[45]、本研究により、胎児期曝露でも同様の影響が得られた。一方、別の先行研究2報では成人男性でPFOS・PFOAとLHの正相関[8]、閉経前後の成人女性においてPFOSとE2の逆相関[9]が報告され、本研究の結果と一致しなかった。この理由として先行研究は成人を対象にした横断研究であるが、本研究は胎児期曝露を前向きに検討した研究であり、研究デザインと対象者の違いが結果の不一致の原因であることが考えられた。胎児期のPFOS・PFOA曝露は、成人とは異なり、特に男児において出生時に性ホルモンに対してエストロゲン作用を有する可能性が示唆された。加えて、本研究ではPFOS濃度が高いと女児でP4濃度が有意に減少した。これまでに、PFOS曝露と女性の性腺機能との関連を報告した疫学研究はない。細胞レベルの研究では、PFOSおよびPFOAは弱いエストロゲン様活性があるが、エストロゲンと混合曝露させると抗エストロゲン作用があることが報告されている[46]。女児ではプロゲステロンとプロラクチン低下のみで明確なエストロゲン作用は認められなかった。

本研究では、Inhibin BはPFOS濃度と負の相関、PFOA濃度とは正の相関を示した。動物実験ではPFOS曝露はSertoli細胞の空胞変成を引き起こすことが報告されている[47]。また、PFOS濃度が高いと、動物実験でInhibinのサブユニットinhbaおよびinhbbの発現量が低下することが報告されている[48]。ヒトの胎児期曝露でも、PFOSの曝露がInhibin Bの産生を低下させる可能性が本研究から示唆された。一方、PFOAはInhibin B濃度を増加した。PFOA曝露によるSertoli細胞やInhibin Bへの影響に関する報告は動物実験や細胞実験でも調べた限りはなく、その機序については今後明らかにする必要がある。

さらに、近年PFOSやPFOAの代替物質として炭素鎖が長い物質が生産されており、物質によっては曝露濃度が経年で増加しているものもあり[49]、また胎児期曝露による児の免疫機能かく乱が示唆されている[50]。従って、これらの物質による胎内ホルモン環境への影響についても今後検討する必要がある。

### 3) フタル酸エステル

フタル酸エステルDEHP代謝物MEHPについては、代謝が早いため、妊娠中に得られた母体血データのみを用いた。性ホルモンと曝露濃度の両方のデータがそろった202名を解析対象とした。

MEHPと性ホルモンの相関を表(2)-12に示す。全体ではMEHPが増加すると共にP4, A-dione, PRLおよびInhibin Bが低下した。男女別に分けると、男児では、A-dione, Inhibin B, INLS3が低下、女児ではPRLが低下した。

表(2)-12 母体血中 MEHP と臍帯血中性ホルモン濃度の相関

	全体		男児		女児	
	$\rho$	p-value	$\rho$	p-value	n	p-value
E (ng/mL)	0.015	0.830	0.101	0.334	-0.035	0.716
T (pg/mL)	-0.091	0.198	-0.089	0.398	-0.107	0.269
T/E2	-0.086	0.224	-0.147	0.160	-0.043	0.660
P4 (ng/mL)	-0.202	<b>0.004</b>	-0.218	<b>0.036</b>	-0.184	0.056
LH (mIU/mL)	nd		-0.024	0.822	nd	
DHEA	0.136	0.054	0.054	0.606	0.183	0.057
A-dione	-0.190	<b>0.007</b>	-0.205	<b>0.048</b>	-0.169	0.080
LH/T	nd		0.075	0.478	nd	
FSH (mIU/mL)	nd		0.205	0.052	nd	
SHBG (nmol/L)	-0.047	0.508	-0.037	0.722	-0.050	0.606
T/SHBG	-0.055	0.436	-0.045	0.668	-0.070	0.470
PRL (ng/mL)	-0.229	<b>0.001</b>	-0.119	0.260	-0.301	<b>0.002</b>
Inhibin B (pg/mL)	-0.235	<b>0.001</b>	-0.474	<b>&lt;0.001</b>	nd	
INSL3 (ng/mL)	nd		-0.241	<b>0.022</b>	nd	

Spearman rank correlation

nd: not determined

ついで、重回帰分析を実施した。調整には、登録時の母の年齢、妊娠中の喫煙および飲酒、在胎週数、採血週に加えて、男女合わせた解析では、児の性別とMEHPと性の交互作用項を用いた。重回帰分析では、MEHPを連続数としたモデルを行った後、連続数で有意であった性ホルモンについては、MEHP濃度を四分位に分けたモデルを解析した。

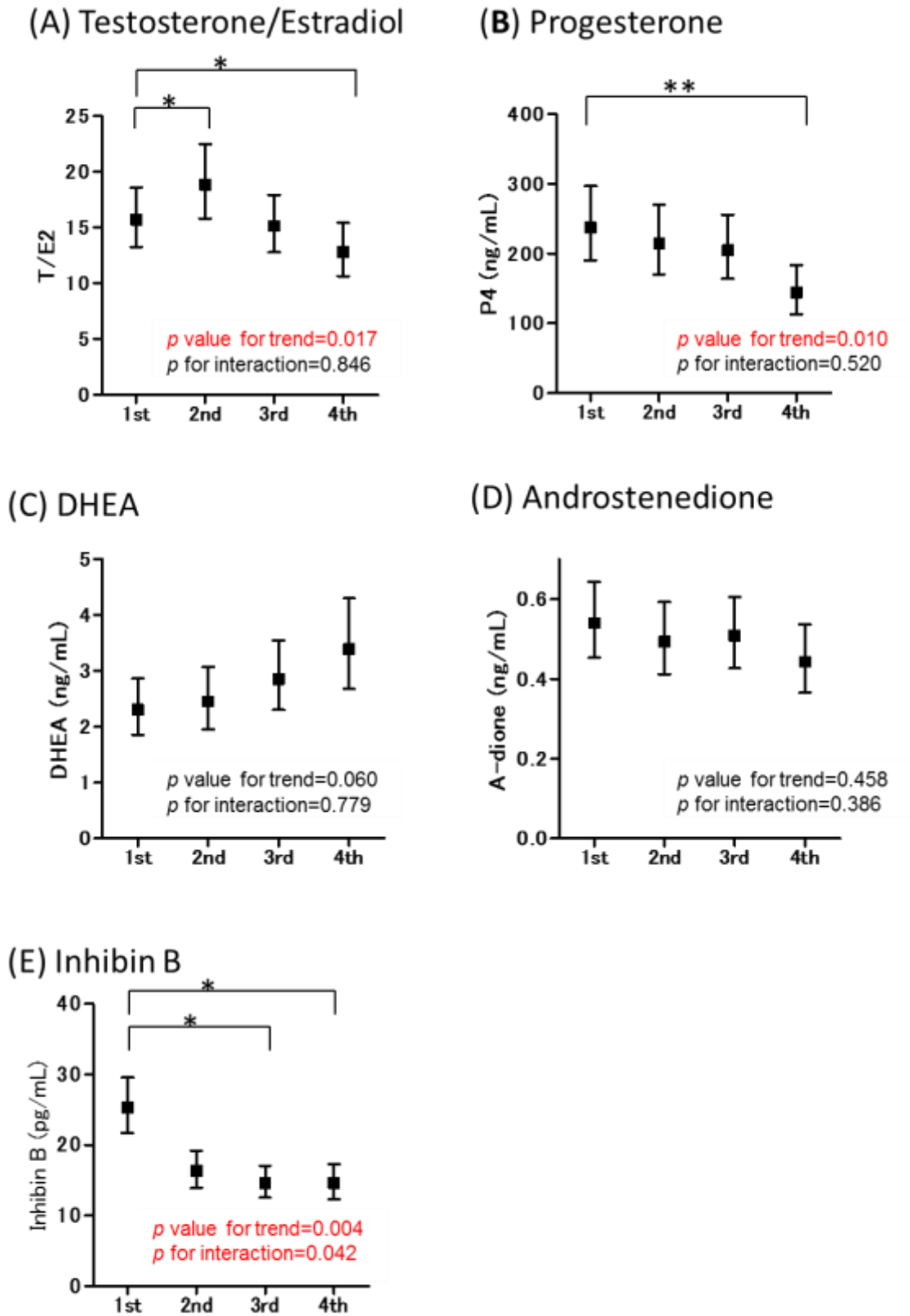
まず、男女合わせた全体について、MEHPを連続数としたモデル（表(2)-13）、および四分位のモデル（図(2)-9）の結果を示す。連続数のモデルではMEHP濃度が高いと、T/E2、P4、A-dione、Inhibin Bは有意に下がり、DHEAは有意に上昇した。MEHPと性に交互作用はなかった。次いで、MEHPを四分位とすると、T/E2は第1四分位と比較して第2四分位は有意に高く、第4四分位は有意に低かった。P-for trendも有意だった。P4は第1四分位と比較して第4四分位が有意に低く、p for trendも有意であった。Inhibin Bは、第1四分位と比較して第3および第4四分位が有意に低く、p-for trendおよび男女交互作用も有意だった。

表(2)-13 MEHP 曝露と性ホルモン濃度との関連 (全体)

	全体 (n=202)			p-value <sup>a</sup>	p for interaction <sup>b</sup>
	B	(95%CI)			
E2 (ng/mL)	0.024	-0.107	0.155	0.718	0.703
T (pg/mL)	-0.147	-0.301	0.006	0.059	0.799
T/E2	-0.171	-0.295	-0.048	<b>0.007</b>	0.473
P4 (ng/mL)	-0.237	-0.401	-0.074	<b>0.005</b>	0.771
DHEA (ng/mL)	0.190	0.045	0.334	<b>0.010</b>	0.532
A-dione (ng/mL)	-0.091	-0.177	-0.005	<b>0.039</b>	0.833
SHBG (nmol/L)	0.013	-0.056	0.082	0.709	0.525
T/SHBG	-0.160	-0.336	0.015	0.073	0.637
PRL (ng/mL)	-0.080	-0.201	0.041	0.194	0.290
Inhibin B (pg/mL)	-0.288	-0.405	-0.170	<b>&lt;0.001</b>	0.970

<sup>a</sup>, adjusted for maternal age, smoking during pregnancy, alcohol consumption during pregnancy, gestational age, blood sampling week, infant sex, and interaction of sex and MEHP

<sup>b</sup>, P for interaction of sex and MEHP



図(2)-9 MEHPレベルと性ホルモン濃度との関連 (全体)

MEHP濃度を四分位にした時の、ホルモンの最少二乗平均と95信頼区間を示す

一方、男女別で見ると、連続数のモデルでは男児でMEHP濃度が高いとT/E2、P4、Inhibin B、およびINSL3濃度が有意に低く、DHEA濃度は有意に高かった。四分位のモデルでは、MEHP濃度の第1四分位と比較して、P4、InhibinB、INSL3はいずれも第4四分位のホルモン濃度が有意に低く、p-for trendも有意だった。一方の女児では、MEHP濃度といずれの性ホルモンとの関連も見られなかった。

表(2)-14 MEHP曝露と性ホルモン濃度との関連(男女別)

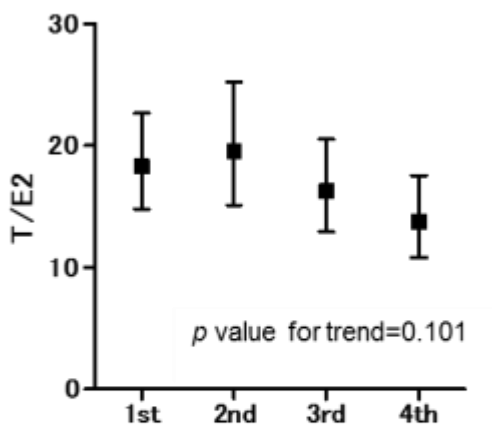
	男児 (n=93)				女児 (n=109)			
	B	(95%CI)		p-value	B	(95%CI)		p-value
E2 (ng/mL)	0.065	-0.151	0.282	0.549	0.001	-0.160	0.161	0.993
T (pg/mL)	-0.130	-0.352	0.093	0.250	-0.133	-0.339	0.073	0.204
T/E2	-0.195	-0.365	-0.025	<b>0.025</b>	-0.134	-0.306	0.038	0.126
P4 (ng/mL)	-0.311	-0.528	-0.095	<b>0.005</b>	-0.200	-0.430	0.029	0.086
DHEA (ng/mL)	0.290	0.075	0.504	<b>0.009</b>	0.134	-0.056	0.321	0.166
A-dione (ng/mL)	-0.087	-0.244	0.070	0.274	-0.093	-0.189	0.002	0.055
LH (mIU/mL)	-0.088	-0.353	0.177	0.510	nd			
LH/T	0.054	-0.324	0.432	0.777	nd			
FSH (mIU/mL)	0.171	-0.020	0.361	0.078	nd			
SHBG (nmol/L)	0.026	-0.058	0.109	0.542	-0.006	-0.106	0.093	0.900
T/SHBG	-0.156	-0.384	0.073	0.179	-0.127	-0.376	0.123	0.317
PRL (ng/mL)	-0.041	-0.181	0.099	0.563	-0.132	-0.312	0.048	0.150
Inhibin B (pg/mL)	-0.276	-0.404	-0.148	<b>&lt;0.001</b>	nd			
INSL3 (ng/mL)	-0.156	-0.258	-0.054	<b>0.003</b>	nd			

adjusted for maternal age, smoking during pregnancy, alcohol consumption during pregnancy, gestational age, blood sampling week  
 nd: not determined

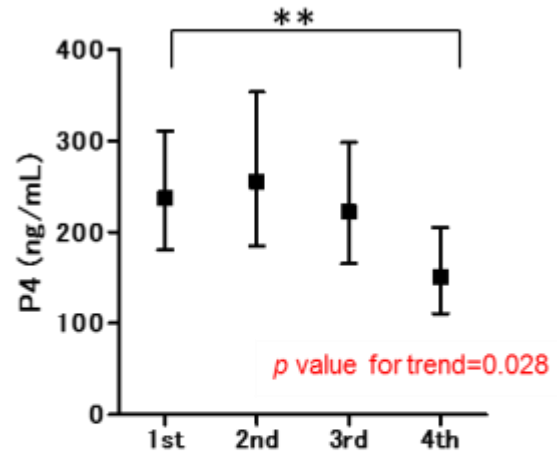
MEHP曝露による性ホルモンへの影響は、女児と比較して男児への影響が明らかであった。INSL3は精巣内のLeydig細胞から分泌される。テストステロンもLeydig細胞から分泌されるホルモンであるが、視床下部-下垂体-性腺間のフィードバックによりその分泌量は制御されており、長期の細胞分化の影響を受ける。一方INSL3はLeydig細胞から継続的に分泌されるため、Leydig細胞分化の状態を表す適切なマーカーである[51]。胎児のフタル酸エステル曝露によるLeydig細胞分化への影響については、細胞や動物を用いた実験でも報告されており[52, 53]、本研究はこれらの結果と一致した。



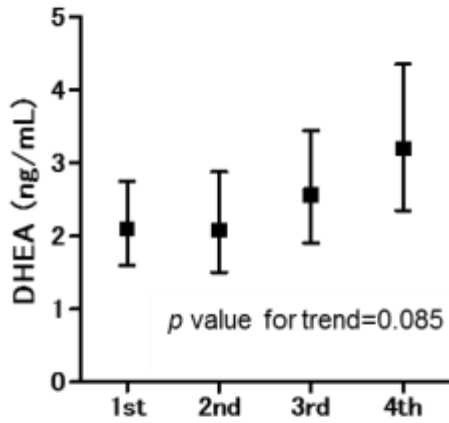
(A) Testosterone/Estradiol



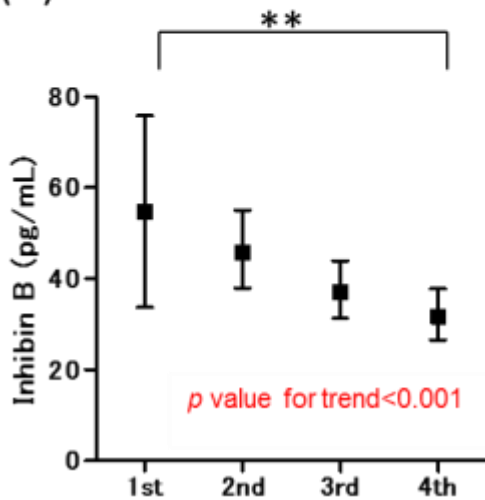
(B) Progesterone



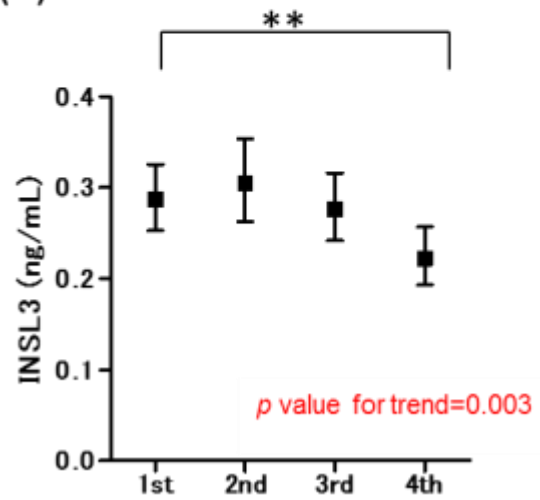
(C) DHEA



(D) Inhibin B



(E) Insulin like factor 3



図(2)-10 MEHPレベルと性ホルモン濃度との関連 (男児)

MEHP濃度を四分位にした時の、ホルモンの最少二乗平均と95信頼区間を示す

MEHP濃度はT/E2比との負の相関を示した。台湾の研究ではLinらが遊離テストステロン (fT) と fT/E2比との負の相関を女兒で示した [54]。デンマーク・フィンランドのコホート研究では、母乳中のフタル酸エステル類代謝物濃度と男児のSHBGとL/fT比の性の相関を報告している [55]。本研究では、男女合わせたモデルでは、MEHPとT/E2比は有意な負の相関を示しているが、層別になると男児でのみ有意だった。MEHPと性の交互作用は有意ではなかったことから、DEHP曝露によるT/E2比への影響は男女ともにあるが、男児においてより顕著であるといえる。興味深いことに、MEHPの四分位のモデルでは第2四分位ではT/E2比が第1四分位と比較して有意に高くJ字型の両反応関係となった。Andrateらは、動物実験でDEHP曝露は濃度が高いとアロマターゼ活性を亢進するが、逆に濃度が低いと活性を抑制することを報告している [56]。しかし、この動物実験のような影響が人への狭い曝露濃度幅の中で生じるかには疑問がある。本研究ではMEHPとP4とに負の相関がみられた。MA-10 Leydig細胞を用いたin vitro実験で、MEHPはステロイド産生を抑制し、P4生産量を下げることが報告されている [57]。MEHPとテストステロン濃度との関連は男女を合わせた全体のモデルではP=0.059で濃度を下げる傾向を示したため、より大きなサンプルサイズで、DEHP曝露によるテストステロン産生への影響を明らかにする必要がある。

DEHPへの胎児期曝露は、精巣のSertoli細胞へも生殖毒性を示すことが知られている [10]。Meinらの研究ではフタル酸エステル類曝露とInhibin Bとの関連は明確ではなかったが [55]、本研究では、男児でMEHPレベルはSertoli細胞から分泌されるホルモンであるInhibin Bとの負の相関を示した。動物実験では、胎児期のDEHP曝露がSertoli細胞の細胞増殖を抑制させることが報告されている [10, 11]。胎児期のSertoli細胞の増加は後の精子産生に必要な意味を持つことから [58]、本研究で得られた胎児期曝露による影響が、児の成長後の精巣機能にどう影響するか、追跡調査が必要である。なお、MEHPとInhibin Bへの影響が男女合わせたモデルでも得られたが、これは女兒のInhibin B検出率は低いために得られた可能性があり、女兒も含めた影響については結果の解釈を注意深く行う必要がある。

本研究における母体血中MEHP濃度は9.94 (5.81-16.3) ng/mLで、先行研究と比較して高い。米国の1999-2000年NHANES (The National Health and Nutrition Examination Survey)、スウェーデンの高齢者の研究、オーストラリアの妊婦の研究における血中MEHP濃度中央値 (25-75%値) は、それぞれ5.4 (3.4-8.9) ng/mL、4.5 (2.0-15.5) ng/mL、1.18 (<ND-3.10) ng/mLだった [54, 59, 60]。日本ではDEHPの食品容器やおもちゃへの使用規制はあるものの、諸外国と比較してその使用量は未だに多い [61]。DEHPの曝露源となる室内ダスト中のDEHP濃度も諸外国と比較すると高いことが [62]、母体血中濃度が諸外国処理も高いことに反映したと考えられる。

本研究の限界として、本研究では妊娠中期から後期の血液中濃度を測定しているため、性腺機能の発生に関係する器官形成期の曝露濃度を示していないことが考えられる。また、DEHPは代謝が早い、MEHP濃度を1回しか測定していないことがあるが、この点についてはいくつかの研究で、1回の測定がある程度の期間の曝露量を反映すると報告されている [15, 63-65]。加えて、本研究ではフタル酸エステル類の曝露評価としてDEHPの代謝物MEHPのみを測定している。最近DEHPの代替物質であるDiNP曝露による男児の肛門性器間距離への影響が報告されており [66]、MEHP以外のフタル酸エステル類曝露による影響を検討する必要がある。

本研究では、DEHPの胎児期曝露が児のP4、Inhibin B、INSL3と負の相関を示し、その影響は女兒と比較して男児で顕著であった。Inhibin BおよびINSL3は、それぞれ精巣のSertoli細胞、Leydig

細胞から分泌されるホルモンであることから、胎児期のDEHP曝露は男児の精巣発達に負の影響を及ぼす可能性がヒトでも示された。コホートにおいて児の追跡を行うことで、胎児期曝露によるその後の影響についての研究が必要である。

## (2) 胎児期の環境化学物質曝露が典型的性役割行動（性向行動）に及ぼす影響

本研究は札幌コホートの環境化学物質濃度とJ-PSAIの両方が揃う102名の母児を解析対象者とした。札幌コホートの非解析対象者と解析対象者の基本的属性を比較すると、解析対象者102名は母親の年齢、年収、教育歴が高く、喫煙率が低く、児の出生体重が重い集団だった（表(2)-15）。また、母体血中PCB・ダイオキシン類レベルは解析対象者の方が非解析対象者よりも有意に高かった（表(2)-16）。解析対象者の母親の出産時年齢は $31.8 \pm 4.3$ （平均値 $\pm$ SD）、性別の割合は男児52.9%、女児47.1%、児の在胎週数は $38.9 \pm 1.5$ （平均値 $\pm$ SD）、および出生体重は $3113.4 \pm 343.0$ （平均値 $\pm$ SD）であった。

J-PSAI scale, 男児傾向および女児傾向得点は児の性別でピークが有意に異なり2峰性を示したので、解析は全員および男女の層別に行った（表(2)-17）。男女別のJ-PSAI scaleと母児の属性の間で有意な関連は認められなかった。交絡要因を調整した重回帰分析において、男児(n=54)のみで母体血中ダイオキシン類が高いほどJ-PSAI Scaleが低下する、つまり女児傾向が認められた（ $B$  (95%CI)=-14(-178, -0.68)）（表(2)-17）。男児傾向と女児傾向の得点別の解析では、母体血中ダイオキシン類濃度が高いほど男児傾向得点が低下する傾向が認められた（ $B$  (95%CI)=-13.9(-28.8, 1.06)）が（表(2)-18）、女児傾向得点への影響は少なく有意ではなかった（ $B$  (95%CI)=-0.89(-11.9, 10.1)）（表(2)-19）。

オランダの7.5歳のPSAIとPCB・ダイオキシン類の関連を検討した研究では、全体(n=158)で母体血中PCBにより有意にPSAI Scaleが低下し( $B$ = -5.5,  $P$ =0.009)、特に男児(n=88)で男児傾向得点の低下が認められた( $B$ = -2.8,  $P$ =0.04) [31]。ドイツでは母乳中PCB・ダイオキシン類により女児傾向得点が男児で増加、女児で低下した[30]。上記2報はいずれもPCB・ダイオキシン類の胎児期曝露によりPSAI Scaleの女児傾向へのシフトを示唆しており本研究の結果と一致した。また、同じ札幌コホートの母児において、男児で母体血中PCBおよびダイオキシン類が10倍になる毎にT/E2比の $\beta$ がそれぞれ-0.408および-0.371有意に低下した（表(2)-7、表(2)-8）。この結果は胎児期PCB・ダイオキシン類曝露による抗アンドロゲン作用は、Leydig細胞に参与するテストステロン・エストラジオールに影響する可能性を示した。したがって、胎児期のPCB・ダイオキシン類曝露は胎児の性ホルモン環境を抗アンドロゲン、つまり女性化傾向に作用し、7歳時の遊び傾向を女性化させる可能が示された。

表(2)-15 札幌コホート 母児の基本的属性

		非解析対象者		解析対象者		
		N (%)	Mean ± SD	N (%)	Mean ± SD	p
<b>Maternal characteristics</b>						
Age at delivery (years)		408	30.0 ± 5.0	102	31.8 ± 4.3	<b>0.001</b>
BMI before pregnancy (kg/m <sup>2</sup> )		404	21.2 ± 3.2	102	21.4 ± 3.4	0.570
Parity	0	194 (48.3)		46 (45.5)		0.354
	≥1	208 (51.7)		55 (54.5)		
Blood sampling period	<28 weeks	15 (4.6)		8 (7.8)		0.166
	28 to <36 weeks	135 (41.7)		51 (50.0)		
	≥36 weeks	68 (21.0)		19 (18.6)		
	After delivery	106 (32.7)		24 (23.5)		
Annual household income (million yen)	<5	285 (70.7)		60 (58.8)		<b>0.015</b>
	≥5	118 (29.3)		42 (41.2)		
Educational level	≤12years	193 (47.5)		32 (31.4)		<b>0.002</b>
	≥13years	213 (52.5)		70 (68.6)		
Tobacco smoking during pregnancy	Nonsmoker	313 (77.1)		92 (90.2)		<b>0.002</b>
	Smoker	93 (22.9)		10 (9.8)		
Alcohol consumption during pregnancy	Nondrinker	279 (68.7)		72 (70.6)		0.407
	Drinker	127 (31.3)		30 (29.4)		
<b>Infant characteristics</b>						
Sex	Boy	188 (46.8)		54 (52.9)		0.158
	Girl	214 (53.2)		48 (47.1)		
Type of delivery	Vaginal birth	321 (79.9)		76 (74.5)		0.149
	Caesarean section	81 (20.1)		26 (25.5)		
Gestational age (wks)		402	38.8 ± 1.5	102	38.9 ± 1.5	0.584
Birth weight (g)		402	3019.7 ± 420.0	102	3113.4 ± 343.0	<b>0.038</b>
Length (cm)		402	47.9 ± 2.1	102	48.3 ± 1.8	0.106
Weight at elementary school of age (kg)		175	20.9 ± 3.1	102	21.5 ± 3.6	0.141
Length at elementary school of age (cm)		175	116.6 ± 5.2	101	117.1 ± 5.4	0.431
Older sibling at elementary school of age	yes	63 (40.9)		47 (46.1)		0.245
	no	91 (59.1)		55 (53.9)		
Maternal tobacco smoking at elementary school of age	yes	145 (81.9)		86 (84.3)		0.368
	no	32 (18.1)		16 (15.7)		
Living with smoker excluding their mothers at elementary school of age	yes	99 (55.9)		55 (53.9)		0.420
	no	78 (44.1)		47 (46.1)		

p value by the t-test, and chi-square test

表(2)-16 札幌コホート 化学物質濃度

化学物質	非解析対象者		解析対象者		p
	N	Median (Min, Max)	N	Median (Min, Max)	
MEHP (nmol/ml)	391	0.034 (0.007, 0.365)	102	0.041 (0.013, 6.32)	0.107
PFOS (ng/ml)	345	5.14 (1.30, 14.7)	102	5.48 (1.80, 16.2)	0.244
PFOA (ng/ml)	345	1.27 (0.25, 5.30)	102	1.31 (0.25, 5.20)	0.923
PCBs (ng/g lipid)	324	91.4 (16.0, 445)	102	107 (36.4, 326)	<b>0.041</b>
Dioxins (TEQ pg/g lipid)	324	13.6 (3.17, 43.4)	102	16.2 (4.90, 42.9)	<b>&lt;0.001</b>

p value by the Mann-Whitney U test

表(2)-17 札幌コホート 化学物質とJ-PSAIスケールの関連 (重回帰分析)

	All (n=102)		Boys <sup>a</sup> (n=54)		Girls <sup>a</sup> (n=48)	
	Crude	Adjusted	Crude	Adjusted	Crude	Adjusted
	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)
MEHP	1.01 (-8.78, 10.8)	1.33 (-3.92, 6.58)	4.19 (-3.25, 11.6)	5.92 (-1.84, 13.7)	0.20 (-6.58, 6.99)	-1.01 (-9.37, 7.35)
PFOS	-3.72 (-18.7, 11.24)	-2.18 (-10.5, 6.10)	-0.88 (-11.0, 9.25)	-3.15 (-13.6, 7.29)	-1.49 (-13.4, 10.4)	-1.60 (-16.2, 13.0)
PFOA	5.92 (-4.08, 15.9)	-1.13 (-6.87, 4.62)	-2.33 (-9.34, 4.68)	-6.82 (-14.8, 1.16)	1.28 (-6.57, 9.14)	3.56 (-6.61, 13.7)
PCBs	-0.83 (-14.8, 13.2)	-0.40 (-8.71, 7.91)	-3.29 (-13.9, 7.32)	-5.97 (-18.7, 6.75)	0.02 (-9.75, 9.78)	0.61 (-12.0, 13.2)
Dioxins	-2.52 (-18.9, 13.9)	-5.88 (-15.0, 3.23)	-7.80 (-19.7, 4.13)	<b>-14.3</b> <b>(-27.9,</b> <b>0.68)*</b>	-2.37 (-14.2, 9.42)	-4.03 (-17.9, 9.82)

調整因子：母親の年齢、妊娠中の喫煙と飲酒、世帯収入、妊娠週数、小学校入学時の児の体重、年長の兄弟有無、採血時期 (<28wks, 28-<36wks, ≥36wks, after delivery)、児の性別 (男女別の解析は除く) \*p<0.05, 環境化学物質はlog<sub>10</sub>変換して投入

表(2)-18 札幌コホート 化学物質とJ-PSAIスケール男児傾向の関連 (重回帰分析)

	All (n=102)		Boys <sup>a</sup> (n=54)		Girls <sup>a</sup> (n=48)	
	Crude	Adjusted	Crude	Adjusted	Crude	Adjusted
	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)
<b>MEHP</b>	1.01 (-8.78, 0.8)	3.19 (-1.17, 7.55)	5.26 (-2.29, 12.8)	7.05 (-1.34, 15.4)	2.26 (-1.61, 6.14)	-0.23 (-4.22, 3.75)
<b>PFOS</b>	-3.72 (-18.7, 1.2)	3.35 (-3.56, 10.3)	2.57 (-7.76, 12.9)	3.12 (-8.23, 14.5)	3.18 (-3.65, 10.0)	1.08 (-5.89, 8.04)
<b>PFOA</b>	5.92 (-4.08, 5.9)	0.66 (-4.17, 5.48)	1.46 (-5.72, 8.63)	-1.00 (-9.94, 7.95)	0.87 (-3.68, 5.42)	0.10 (-4.78, 4.97)
<b>PCBs</b>	-0.83 (-14.8, 3.2)	-2.04 (-9.00, 4.92)	-3.67 (-14.5, 7.16)	-8.93 (-22.6, 4.77)	-1.51 (-7.15, 4.13)	-1.20 (-7.19, 4.78)
<b>Dioxins</b>	-2.52 (-18.9, 3.9)	-4.33 (-12.0, 3.33)	-6.85 (-19.1, 5.38)	-13.9 (-28.8, 1.06)	-0.79 (-7.62, 6.05)	-3.09 (-9.61, 3.44)

調整因子：母親の年齢、妊娠中の喫煙と飲酒、世帯収入、妊娠週数、小学校入学時の児の体重、年長の兄弟有無、採血時期 (<28wks, 28-<36wks, ≥36wks, after delivery)、児の性別 (男女別の解析は除く) 環境化学物質はlog<sub>10</sub>変換して投入

表(2)-19 札幌コホート 化学物質とJ-PSAIスケール女児傾向の関連 (重回帰分析)

	All (n=102)		Boys <sup>a</sup> (n=54)		Girls <sup>a</sup> (n=48)	
	Crude	Adjusted	Crude	Adjusted	Crude	Adjusted
	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)	B (95%CI)
<b>MEHP</b>	2.36 (-3.73, 8.45)	1.98 (-2.08, 0.03)	1.45 (-4.14, 7.03)	1.67 (-4.39, 7.72)	2.08 (-3.14, 7.29)	0.68 (-6.05, 7.41)
<b>PFOS</b>	5.33 (-3.95, 14.6)	5.33 (-1.00, 11.7)	3.37 (-4.12, 10.9)	5.98 (-1.80, 13.8)	4.54 (-4.58, 13.7)	2.53 (-9.21, 14.3)
<b>PFOA</b>	-1.96 (-8.23, 4.30)	1.68 (-2.77, 6.13)	3.57 (-1.57, 8.72)	5.20 (-0.88, 11.3)	-0.30 (-6.39, 5.79)	-3.14 (-11.3, 5.03)
<b>PCBs</b>	-1.53 (-10.3, 7.19)	-1.68 (-8.13, 4.77)	-0.68 (-8.60, 7.24)	-3.50 (-13.37, 6.37)	-1.53 (-9.08, 6.02)	-1.75 (-11.9, 8.37)
<b>Dioxins</b>	-0.62 (-10.9, 9.62)	1.02 (-6.12, 8.15)	0.24 (-8.78, 9.26)	-0.89 (-11.9, 10.1)	1.37 (-7.77, 10.5)	0.58 (-10.6, 11.7)

調整因子：母親の年齢、妊娠中の喫煙と飲酒、世帯収入、妊娠週数、小学校入学時の児の体重、年長の兄弟有無、採血時期 (<28wks, 28-<36wks, ≥36wks, after delivery)、児の性別 (男女別の解析は除く) 環境化学物質はlog<sub>10</sub>変換して投入

PFOS、PFOA、MEHPは本研究ではJ-PSAIと有意な関連が認められなかった（表(2)-17）。また、男児傾向得点（表(2)-18）および女児傾向得点（表(2)-19）とも有意な関連は認められなかった。札幌コホートの母児において、PFOS、PFOA、およびMEHP曝露による児のテストステロン濃度への影響は見られなかった（表(2)-10、表(2)-11、表(2)-14）。従って、PFOS、PFOA、およびMEHPは脳の性分化に影響する抗アンドロゲン作用は少ない可能性がある。一方、先行研究ではMEHP濃度が高いことが男児の男児傾向得点を有意に下げる報告がある[24]。Swanらの集団では男児の男児得点の平均40.8に対し、本集団の平均は34.78と、得点分布が低い。したがって本集団では男児得点の変化が見えにくかった可能性がある。一方、PFOS/PFOAについてはこれまでにPSAIとの関連を検討した報告はない。従って、本研究は初めて一般集団においてPFOS/PFOAの胎児期曝露はと生後の性役割行動に与える影響を検討し、その関連はほとんどない可能性を示唆した。

本研究の限界としてサンプル数が男児54人、女児48人と少なかったため、統計学的に有意な結果が得られなかった可能性がある。より大きなサンプルサイズでの検討が必要である。また、同胞、特に年長の同胞の性別（兄か姉か）が幼児の遊びの行動に関連するという報告があるが[67]、本研究では同胞の性別に関して情報が得られておらず結果に影響したことが考えられた。

男児の胎児期ダイオキシン類曝露によりJ-PSAI Scaleが低下した結果は、サンプルサイズが少なく、95%CI信頼区間が広いが、抗アンドロゲン作用を持つダイオキシン類の胎児期曝露は、特に男児において女児傾向が強くなる可能性を示した結果は重要であるといえる。

### （3）大規模コホート胎内ホルモン環境と母児の基本的属性との関連

性ホルモンを測定した大規模コホートの母児の基本的属性を表(2)-20に示す。母親の出産時年齢は $30.1 \pm 4.1$ （平均値 $\pm$ SD）、児の在胎週数は $38.9 \pm 1.3$ （平均値 $\pm$ SD）、および出生体重は $3060.8 \pm 367.5$ （平均値 $\pm$ SD）であった。臍帯血中の性ホルモンE2、T、P4、LH、FSH、Inhibin Bの検出率は100%であった。INSL3は検出率99.6%だった（検出下限値10pg/ml）。男女でT、P4、T/Eで濃度が有意に異なった（表(2)-21）。

男女別に臍帯血中の性ホルモンと母児の属性との関連を検討したところ、母親の年齢が高いほど男児でE2、P4は低下、T/Eは増加し、女児でE2が低下した（表(2)-22）。母親の非妊娠時体重が増加するほど女児でP4が低下した（表(2)-22）。母親が初産では、男児でE2、T、P4が高く、T/E比が低下し、女児でE2、P4が増加し、T/E比が低下した（表(2)-23）。妊娠初期に飲酒をしていた母親では、女児のT/E2比が飲酒をしていない母の児よりも低かった（表(2)-24）。母親の妊娠初期の喫煙とは関連が認められなかった（表(2)-25）。母親の学歴では、男児と性ホルモンに関連がなく、女児で学歴とE2、T/E比の分布に差が見られた（表(2)-26）。世帯年収では男児でINSL3濃度とに分布の差が認められたが、女児では性ホルモンと関連がなかった（表(2)-27）。児の在胎週数が増加するほど、男児でP4が増加し、LH、FSHが低下した。出生体重が増加するほど、男児でT、LH、Inhibin Bが低下し、女児でP4が低下した（表(2)-28）。

北海道スタディの別の集団である札幌コホートにおいて、既に検討された母児の属性と臍帯血中性ホルモンの関連に関しては、母親の年齢、非妊娠前体重、初産、児の在胎週数および出生体重と関連が認められており本研究の結果と一致した。しかし、母親の妊娠中喫煙は札幌コホートで性ホルモンと関連が認められたが、大規模コホートでは関連が認められなかった。この要因として、大規模コホートは妊娠初期にベースライン調査票を実施し妊娠初期の喫煙状況を得たが、一



方で、札幌コホートは妊娠中後期にベースライン調査票を実施して妊娠後期の喫煙状況を得ている。従って、臍帯血ホルモン濃度への影響は、妊娠初期より妊娠後期の喫煙が大きい可能性が考えられた。

表(2)-20 大規模コホート 母児の基本的属性

属性		N (%)	平均値±SD
<b>母親</b>			
出産時年齢		900	31.0 ± 4.1
身長		897	158.3 ± 5.3
非妊娠時体重		892	53.1 ± 8.3
出産歴	なし	420 (46.9)	
	あり	475 (53.1)	
妊娠初期飲酒	なし	739 (83.7)	
	あり	144 (16.3)	
妊娠初期喫煙	なし	692 (90.5)	
	あり	73 (9.5)	
学歴	中学卒	15 (1.7)	
	高校卒	332 (37.3)	
	短大・専門学校卒	430 (48.3)	
	大学卒 (大学院含む)	114 (12.8)	
世帯年収	300万円未満	132 (16.5)	
	300～499万円	368 (46.1)	
	500～799万円	219 (27.4)	
	800万円以上	80 (10.0)	
<b>児</b>			
性別	男	450 (50.0)	
	女	450 (50.0)	
在胎週数		898	38.9 ± 1.3
出生体重		844	3060.8 ± 367.5

表(2)-21 男女別の性ホルモン濃度

性ホルモン	男児			女児			p
	n	Median	(25th - 75th)	n	Median	(25th - 75th)	
E2 (ng/mL)	450	6.96	(4.78 - 11.1)	450	6.71	(4.41 - 9.77)	0.080
T (pg/mL)	450	155	(107 - 221)	450	99.6	(73.0 - 153)	<0.001
P4 (ng/mL)	450	422	(323 - 578)	450	368	(277 - 485)	<0.001
T/E2	450	19.9	(13.2 - 32.7)	450	15.8	(11.4 - 22.0)	<0.001
LH (mIU/mL)	444	0.71	(0.26 - 1.60)				
FSH (mIU/mL)	444	0.88	(0.45 - 1.40)				
Inhibin B (pg/mL)	448	116	(92.2 - 139)				
INSL3 (ng/mL)	449	0.29	(0.19 - 0.35)				

p value by the Mann-Whitney U test

表(2)-22 母親の出産年齢、身長、体重と性ホルモン濃度の関連

性ホルモン	母親の出産年齢			母親の身長			母親の体重		
	N	相関係数	p	N	相関係数	p	N	相関係数	p
<b>男児</b>									
E2 (ng/mL)	450	-0.188	<0.001	448	-0.022	0.636	445	-0.026	0.590
T (pg/mL)	450	0.028	0.554	448	0.006	0.904	445	0.044	0.359
P4 (ng/mL)	450	-0.128	0.007	448	-0.006	0.903	445	-0.023	0.634
T/E2	450	0.163	0.001	448	0.047	0.321	445	0.058	0.218
LH (mIU/mL)	444	0.079	0.095	442	-0.018	0.702	439	0.058	0.225
FSH (mIU/mL)	444	0.086	0.072	442	0.007	0.878	439	0.065	0.172
Inhibin B (pg/mL)	448	0.051	0.283	446	0.047	0.317	443	0.073	0.126
INSL3 (ng/mL)	449	0.049	0.300	447	0.025	0.593	444	0.092	0.052
<b>女児</b>									
E2 (ng/mL)	450	-0.122	0.010	449	-0.042	0.375	447	-0.020	0.674
T (pg/mL)	450	-0.088	0.062	449	0.014	0.765	447	0.049	0.300
P4 (ng/mL)	450	0.009	0.854	449	-0.081	0.086	447	-0.104	0.028
T/E2	450	0.040	0.394	449	0.037	0.440	447	0.056	0.238

p value by the Spearman rank correlation

表(2)-23 母親の出産歴と性ホルモン濃度の関連

性ホルモン	出産歴 なし		あり		p
	N	Median	N	Median	
<b>男児</b>					
E2 (ng/mL)	221	8.34	227	5.94	<0.001
T (pg/mL)	221	164.60	227	140.30	0.009
P4 (ng/mL)	221	454.74	227	383.95	<0.001
T/E2	221	17.15	227	22.08	0.002
LH (mIU/mL)	219	0.71	223	0.72	0.749
FSH (mIU/mL)	219	0.82	223	0.95	0.186
Inhibin B (pg/mL)	220	121.50	226	112.00	0.109
INSL3 (ng/mL)	220	0.28	227	0.30	0.325
<b>女児</b>					
E2 (ng/mL)	199	7.37	248	5.92	<0.001
T (pg/mL)	199	103.40	248	99.25	0.389
P4 (ng/mL)	199	385.62	248	349.82	0.016
T/E2	199	14.48	248	16.77	<0.001

p value by the Mann-Whitney U test

表(2)-24 母親の妊娠初期飲酒と性ホルモン濃度の関連

	妊娠初期飲酒 なし		あり		p
	N	Median	N	Median	
<b>男児</b>					
E2 (ng/mL)	373	6.91	65	7.04	0.696
T (pg/mL)	373	159.60	65	140.30	0.314
P4 (ng/mL)	373	418.56	65	444.85	0.275
T/E2	373	20.26	65	18.99	0.312
LH (mIU/mL)	368	0.71	64	0.81	0.482
FSH (mIU/mL)	368	0.86	64	1.00	0.193
Inhibin B (pg/mL)	372	114.00	64	118.50	0.605
INSL3 (ng/mL)	373	0.29	64	0.29	0.553
<b>女児</b>					
E2 (ng/mL)	365	6.62	80	6.85	0.253
T (pg/mL)	365	99.60	80	93.95	0.619
P4 (ng/mL)	365	361.36	80	393.13	0.489
T/E2	365	15.90	80	14.38	<b>0.025</b>

p value by the Mann-Whitney U test

表(2)-25 母親の妊娠初期喫煙と性ホルモン濃度の関連

	妊娠初期喫煙 なし		あり		p
	N	Median	N	Median	
<b>男児</b>					
E2 (ng/mL)	344	6.90	33	8.63	0.085
T (pg/mL)	344	151.35	33	177.40	0.145
P4 (ng/mL)	344	421.50	33	402.44	0.637
T/E2	344	20.10	33	19.02	0.443
LH (mIU/mL)	338	0.72	33	0.80	0.373
FSH (mIU/mL)	338	0.91	33	1.00	0.700
Inhibin B (pg/mL)	342	116.00	33	118.00	0.912
INSL3 (ng/mL)	343	0.29	33	0.25	0.057
<b>女児</b>					
E2 (ng/mL)	348	6.63	40	7.06	0.359
T (pg/mL)	348	100.55	40	98.30	0.638
P4 (ng/mL)	348	366.64	40	389.70	0.683
T/E2	348	16.01	40	14.49	0.174

p value by the Mann-Whitney U test

表(2)-26 母親の学歴と性ホルモン濃度の関連

性ホルモン	母親の学歴								p
	中学卒		高校卒		短大・専門学校卒		大学卒		
	N	Median	N	Median	N	Median	N	Median	
<b>男児</b>									
E2 (ng/mL)	7	5.41	172	7.23	212	6.75	56	6.32	0.311
T (pg/mL)	7	137.10	172	166.15	212	140.60	56	148.50	0.079
P4 (ng/mL)	7	351.03	172	435.12	212	417.57	56	416.56	0.469
T/E2	7	21.95	172	19.22	212	19.82	56	21.55	0.445
LH (mIU/mL)	7	0.70	170	0.88	210	0.69	54	0.44	0.216
FSH (mIU/mL)	7	0.71	170	0.95	210	0.86	54	0.92	0.596
Inhibin B (pg/mL)	7	103.00	172	114.50	211	116.00	55	116.00	0.755
INSL3 (ng/mL)	7	0.31	172	0.29	211	0.28	56	0.27	0.985
<b>女兒</b>									
E2 (ng/mL)	8	7.68	160	6.30	221	6.71	58	8.27	<b>0.009</b>
T (pg/mL)	8	105.65	160	97.75	221	99.60	58	113.75	0.436
P4 (ng/mL)	8	343.56	160	358.07	221	372.53	58	402.76	0.162
T/E2	8	14.18	160	16.32	221	15.90	58	13.21	<b>0.049</b>

p value by the Mann-Whitney U test

表(2)-27 世帯年収と性ホルモン濃度の関連

性ホルモン	世帯年収								p
	300万円未満		300～499万円		500～799万円		800万円以上		
	N	Median	N	Median	N	Median	N	Median	
<b>男児</b>									
E2 (ng/mL)	71	6.96	183	6.48	108	7.72	40	6.92	0.902
T (pg/mL)	71	133.00	183	157.80	108	163.20	40	131.05	0.748
P4 (ng/mL)	71	420.97	183	422.77	108	400.69	40	419.99	0.919
T/E2	71	18.26	183	20.74	108	20.64	40	18.35	0.878
LH (mIU/mL)	69	0.72	181	0.71	106	0.81	40	0.67	0.766
FSH (mIU/mL)	69	0.87	181	0.87	106	0.94	40	0.83	0.481
Inhibin B (pg/mL)	71	110.00	182	118.50	107	118.00	40	115.50	0.615
INSL3 (ng/mL)	71	0.22	183	0.30	107	0.29	40	0.27	<b>0.023</b>
<b>女兒</b>									
E2 (ng/mL)	63	7.07	185	6.54	112	6.13	40	7.37	0.526
T (pg/mL)	63	103.80	185	95.20	112	100.40	40	109.60	0.294
P4 (ng/mL)	63	383.32	185	368.72	112	372.49	40	322.77	0.396
T/E2	63	15.49	185	15.56	112	15.61	40	17.15	0.932

p value by the Mann-Whitney U test

表(2)-28 児の在胎週数と出生体重と性ホルモン濃度の関連

性ホルモン	在胎週数			出生体重		
	N	相関係数	p	N	相関係数	p
<b>男児</b>						
E2 (ng/mL)	449	0.066	0.164	415	-0.036	0.467
T (pg/mL)	449	0.030	0.528	415	-0.124	<b>0.011</b>
P4 (ng/mL)	449	0.104	0.027	415	-0.030	0.547
T/E2	449	-0.033	0.488	415	-0.051	0.298
LH (mIU/mL)	443	-0.238	0.000	409	-0.197	<b>&lt;0.001</b>
FSH (mIU/mL)	443	-0.199	0.000	409	-0.074	0.137
Inhibin B (pg/mL)	447	-0.041	0.392	413	-0.135	<b>0.006</b>
INSL3 (ng/mL)	448	-0.029	0.537	414	-0.006	0.900
<b>女児</b>						
E2 (ng/mL)	449	0.012	0.800	429	-0.045	0.354
T (pg/mL)	449	0.016	0.729	429	0.017	0.722
P4 (ng/mL)	449	0.056	0.238	429	-0.096	<b>0.048</b>
T/E2	449	0.007	0.880	429	0.019	0.691

p value by the Spearman rank correlation

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

胎児期の環境化学物質曝露による、児の胎内ホルモン環境、脳の性分化への影響を詳細に分析した研究は国際的にも非常に少ない。本研究は世界的に見て最も精度の高い曝露評価により母体血中PCB・ダイオキシン類、PFOS/PFOAなどの有機フッ素系化合物、フタル酸エステルDEHP代謝物MEHP濃度を用いて、次世代影響、特に性腺機能についてリスク評価を行った。

本研究では男児で、胎児期のPCBおよびダイオキシン類曝露濃度が高いと、テストステロン/エストラジオール比 (T/E2) が有意に低下した。テストステロンの前駆体であるDHEA濃度はむしろ高かったことから、PCB・ダイオキシン類曝露はテストステロンをエストラジオールに変換するアロマターゼ活性に影響した可能性が示唆された。加えて、男児のみで、胎児期のダイオキシン類曝露濃度が高いとJ-PSAI scaleが低下、性役割の男児傾向得点が低下して女児傾向を示した。曝露による影響は児の胎内ホルモン濃度のみならず脳の性分化にも影響を与えている可能性が示された。抗アンドロゲン作用を持つダイオキシン類の胎児期曝露による児の性腺機能や性分化への影響の可能性を示した結果は科学的に意義がある。PCB・ダイオキシン類曝露による性ホルモンへの影響は、中毒事故や油症患者による高濃度曝露、あるいは工業地域における比較的高濃度曝露の集団における報告はあったが、本研究では比較的低濃度曝露が低い一般集団でも、胎児期曝露による影響を示唆したことに意義がある。

有機フッ素化合物PFC曝露による性ホルモンへの影響は、これまで大人の横断研究では報告されていた。しかし、胎児期曝露による胎内ホルモン環境への影響に関する報告は本研究が初めてである。男児では、PFOS濃度が高いとT/E2、LH、Inhibin B濃度が有意に減少した。PFOS曝露によるT/E2低下はin vitroおよび動物実験から報告されてきた、PFOSが抗アンドロゲン作用およびエストロゲン作用があるという報告と一致する。加えて、動物実験で報告されてきたPFOS曝露による

精巣のSertoli細胞の空胞変成が報告されてきたが、本研究でPFOS曝露によりInhibin Bが低下したことから、ヒトでもSertoli細胞の空胞変成が起こっている可能性が示唆された。In vitroや動物実験における曝露量よりも一般集団の曝露量は低いにもかかわらず、実験同様の結果が得られたことに意義がある。また、女兒のPFOS曝露はプロゲステロンとプロラクチン濃度を下げた。PFOSと女性の性腺機能との関連を報告した疫学研究は本研究が初めてである。一方のPFOAについてはこれまでにin vitroや動物実験の報告もほとんどない。本研究ではPFOSとは逆にInhibin Bを増加させるなどの結果が見られたことから、実験においてこのPFOAの作用機序について早急に検討する必要があることを示した。

胎児期のフタル酸エステルDEHP曝露は、動物実験で精巣のLeydig細胞およびSertoli細胞への生殖毒性を示すことが報告されている。本研究では、胎児期DEHP曝露濃度が高いと男児のINSL3およびInhibin Bが有意に下がり、ヒトでの曝露においても動物と同じく児の精巣への影響が示唆された。ヒトの胎児期DEHP曝露が児のINSL3およびInhibin Bの両方に影響する報告は初めてである。また、統計学的には有意ではなかったものの、DEHP曝露が男児でステロイド産生におけるプロゲステロン、テストステロンおよびT/E2の低下、DHEAを増加させる傾向が見られた。これらの傾向はin vitroでの細胞でのDEHP曝露によるステロイド産生同様の結果である。今後より大きなサンプルサイズでDEHP曝露によるステロイド産生経路への影響を明らかにする必要がある事を示した。なお、Sertoli細胞は後の精子産生に重要であることから、コホートを今後も追跡し、第二次性徴あるいは生殖への影響を明らかにする研究が必要である。

## (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>

第1回国際化学物質会議 (ICCM, 2006) では「国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ」が策定されたが、第2回ICCM(2009)に新規の課題として追加された「PFCの管理と安全な代替物質への移行」、第3回ICCM(2012)に追加された「内分泌かく乱物質の理解促進」への対策に直結する。

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、日本の一般集団のPCB・ダイオキシン類曝露において児の性腺機能および脳の性分化への影響、特に男児への影響を明らかにした。わが国では、既にPCBやダイオキシン類については対策がとられて曝露レベルは低下してきているが、引き続き本研究の結果から引き続きPCB・ダイオキシン類曝露による次世代影響、特に性腺機能や脳の性分化への影響を検討する必要がある。

有機フッ素化合物のうちPFOSはストックホルム条約の制限物質となり、わが国の曝露濃度は低下してきている。しかし、PFOAについては具体的な禁止措置はとられていない。胎児期のPFOA曝露による性腺機能への影響については、PFOSより明確ではなかったものの、引き続きリスク評価を継続する必要がある。加えて、PFOSやPFOAの代替物質として多くの有機フッ素化合物が生産されており、日本での曝露濃度が増えている物質もある (Okada et al. 2013)。従って、これら代替物質も含めて、次世代影響について引き続きリスク評価を行う必要がある。

フタル酸エステルDEHPは、油性の食品が接触する包装容器や乳幼児のおもちゃ、医療器具について規制があるが、その他の内装材や生活用品への規制はない。DEHPは世界的に生産量が減っては来ているものの欧米諸国に比べてその減少量は少なく、曝露レベルも高い。一般集団における曝露レベルで男児の精巣への影響が示唆された。加えて、DEHPの代替物質DiNPについて、スウェーデンで男児の外性器への影響が示唆されている。従ってこれら代替物質も含めて、この後も次世代影響に関するリスク評価を継続する必要がある。

## 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) R. KISHI, Sa. KOBAYASHI, T. IKENO, A. ARAKI, C. MIYASHITA, S. ITOH, S. SASAKI, E. OKADA, Su. KOBAYASHI, I. KASHINO, K. ITOH, S. NAKAJIMA, The members of the Hokkaido Study on Environment and Children's Health: Environ. Health Prev. Med, 18, 6 (vol, issue), 429-450 (2013)  
 "Ten Years of Progress in the Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: Cohort Profile - Updated 2013."
- 2) A. ARAKI, T. MITSUI, C. MIYASHITA, T. NAKAJIMA, H. NAITO, S. ITO, S. SASAKI, K. CHO, T. IKENO, K. NONOMURA, R. KISHI: PLOS ONE, 9, 10 (vol, issue), e109039 (2014)  
 "Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood."
- 3) T. MITSUI, A. IMAI, S. SATO, A. ARAKI, C. MIYASHITA, T. KITTA, K. MORIYA, K. CHO, K. MORIOKA, R. KISHI, K. NONOMURA: European Urology 13, 1 (vol, issue), e437 (2014)  
 "Effect of maternal exposure to endocrine-disrupting chemicals on sex hormone levels in cord blood and ratio of the second and fourth digit length in school children"
- 4) T. MITSUI, A. ARAKI, A. IMAI, S. SATO, C. MIYASHITA, S. ITO, S. SASAKI, T. KITTA, K. MORIYA, K. CHO, K. MORIOKA, R. KISHI, K. NONOMURA: PLOS One, 10, 3 (vol, issue), e0120636 (2015)  
 "Effects of prenatal Leydig cell function on the ratio of the second to fourth digit lengths in school-aged children."



### <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：公衆衛生、78, 8（巻, 号）547-552（2014）  
「【公害・環境問題の変貌と新展開】環境化学物質の次世代影響 出生コーホート研究による成果と今後の課題」
- 2) 岸玲子：公衆衛生、79, 3（巻, 号）193-199（2015）  
「【連載[講座]子どもを取り巻く環境と健康－1】「奪われし未来」にしない」
- 3) 荒木敦子、アイツバマイゆふ、岸玲子：公衆衛生（in press）  
「【連載[講座]子どもを取り巻く環境と健康－5】環境化学物質の曝露（4）短半減期化学物質の曝露実態」

### （2）口頭発表（学会等）

- 1) C. MIYASHITA, S. SASAKI, Y. SAIJO, E. OKADA, S. KOBAYASHI, T. BABA, J. KAJIWARA, T. TODAKA, H. IWASAKI, H. NAKAZAWA, N. HACHIYA, A. YASUTAKE, R. KISHI: International Society of Exposure Science, Seattle, USA, 2012.  
“Dioxins, Perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoic acid in the blood, and mercury concentrations in the hair during perinatal period in Japan.”
- 2) R. KISHI; DOHaD2013-8th World Congress on DOHaD. Singapore. (2013.11.17-20)  
“Prenatal Perfluorinated Compounds Exposure and Early childhood Health.”
- 3) A. ARAKI, T. MITSUI, C. MIYASHITA, M. TAGAWA, T. NAKAJIMA, S. SASAKI, T. IKENO, S. ITOH, E. OKADA, K. CHO, K. NONOMURA, R. KISHI: DOHaD2013-8th World Congress on DOHaD. Singapore. (2013.11.17-20)  
“Maternal exposure to dehp and sex hormone levels in cord blood.”
- 4) 荒木敦子, 岸玲子; フタル酸エステル類の胎児期曝露による次世代影響に関する疫学研究. 第84回 日本衛生学会学術総会. 岡山. (2014.05.25-27)
- 5) 荒木敦子, 三井貴彦, 宮下ちひろ, 那須民江, 伊藤佐智子, 佐々木成子, 長和俊, 池野多美子, 野々村克也, 岸玲子; DEHP への胎児期曝露による児の性ホルモン濃度への影響. 第84回 日本衛生学会学術総会. 岡山. (2014.05.25-27)
- 6) 伊藤佐智子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 中澤裕之, 三井貴彦, 長和俊, 佐々木成子, 池野多美子, 野々村克也, 岸玲子; PFOS, PFOA の胎児期曝露が与える児の出生時性ホルモン濃度への影響. 第84回 日本衛生学会学術総会. 岡山. (2014.05.25-27)
- 7) R. KISHI: 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference - From Local to Global: Advancing Science for Policy in Environmental Health. Seattle, USA. (2014.08.24-28)  
“Exposure levels of perfluoroalkyl acids and their effects on children’s health - Hokkaido study.”

- 8) S. ITOH, A. ARAKI, C. MIYASHITA, H. NAKAZAWA, T. MITSUI, K. CHO, S. SASAKI, T. IKENO, K. NONOMURA, R. KISHI: 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference - From Local to Global: Advancing Science for Policy in Environmental Health. Seattle, USA. (2014.08.24-28)  
 “Effect of PFOS and PFOA exposure in utero on reproductive hormones levels at birth.”
- 9) A. ARAKI, T. MITSUI, C. MIYASHITA, T. NAKAJIMA, H. NAITO, S. SASAKI, T. IKENO, K. CHO, S. ITOH, K. NONOMURA, R. KISHI: 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference - From Local to Global: Advancing Science for Policy in Environmental Health. Seattle, USA. (2014.08.24-28)  
 “Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and sex hormone levels in fetal blood.”
- 10) R. KISHI, A. ARAKI, S. ITOH, C. IYASHITA, H. GOUDARZI, S. KOBAYASHI, S. SASAKI, I. KASHINO, H. NAKAZAWA, T. NAKAJIMA, T. MITSUI, K. NONOMURA: PPTOX IV . Boston, MA, USA. (2014.10.26-29)  
 “Perinatal PFAAs Exposure Cause Various Health Outcomes on Offspring Including Effects on Reproductive and Thyroid Hormones: The Hokkaido Study.”

### (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) 北海道大学 国民との対話推進事業「北海道の人々が参加する環境と健康に関する研究」  
 (2014年9月26日、北海道札幌北高等学校、聴衆20人)  
 (2014年12月17日、北海道札幌開成高等学校、聴衆100人)
- 2) 市民公開講座「胎児期における環境ホルモンを考える」(平成27年2月7日、札幌市男女共同参画センター、観客34名、北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野と共催)
- 3) 市民講演会「環境と子どもの健康」(2015年3月5日、札幌エルプラザ、観客50名、主催)
- 4) インターネット上での研究成果の継続的な発信  
 インターネット上で、研究目的、研究内容、研究成果の発信を行っている  
 北海道大学 環境健康科学教育研究センター 研究業績  
<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/research/yearly/>  
 環境と子どもに関する北海道研究・北海道スタディ  
<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/hokkaidostudy/>  
 環境と健康ひろば  
<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/hiroba/>

### (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. WHO, *Endocrine disruptors and child health: Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health*, ed. W.H. Organization 2012, Jeneve.
2. Cooke, P. S., Y. D. Zhao, and L. G. Hansen, *Neonatal polychlorinated biphenyl treatment increases adult testis size and sperm production in the rat*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1996. **136**(1): p. 112-117.
3. Crisp, T. M., et al., *Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis*. *Environmental Health Perspectives*, 1998. **106**: p. 11-56.
4. Phillips, K. P. and N. Tanphaichitr, *Human exposure to endocrine disrupters and semen quality*. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*, 2008. **11**(3-4): p. 188-220.
5. Cao, Y. G., et al., *Environmental exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls reduce levels of gonadal hormones in newborns: Results from the Duisburg cohort study*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2008. **211**(1-2): p. 30-39.
6. Shi, Z., et al., *The effect of perfluorododecanonic acid on endocrine status, sex hormones and expression of steroidogenic genes in pubertal female rats*. *Reprod Toxicol*, 2009. **27**(3-4): p. 352-9.
7. Biegel, L. B., et al., *Effects of Ammonium Perfluorooctanoate on Leydig-Cell Function: In Vitro, in Vivo, and ex Vivo Studies*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995. **134**(1): p. 18-25.
8. Raymer, J. H., et al., *Concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) and their associations with human semen quality measurements*. *Reproductive Toxicology*, 2012. **33**(4): p. 419-427.
9. Knox, S. S., et al., *Implications of Early Menopause in Women Exposed to Perfluorocarbons*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011. **96**(6): p. 1747-1753.
10. Dostal, L. A., et al., *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*, 1988. **95**(1): p. 104-121.
11. Li, L.-H., et al., *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*, 2000. **166**(3): p. 222-229.
12. Duty, S. M., et al., *Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men*. *Human Reproduction*, 2005. **20**(3): p. 604-610.
13. Duty, S. M., et al., *Phthalate exposure and human semen parameters*. *Epidemiology*, 2003.

- 14(3): p. 269-277.
14. Duty, S.M., et al., *The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay*. Environmental Health Perspectives, 2002. **111**(9): p. 1164-1169.
  15. Hauser, R., et al., *Temporal variability of urinary phthalate metabolite levels in men of reproductive age*. Environmental Health Perspectives, 2004. **112**(17): p. 1734-1740.
  16. Hauser, R., et al., *DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites*. Human Reproduction, 2007. **22**(3): p. 688-695.
  17. Wirth, J.J., et al., *A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality*, in *Systems Biology in Reproductive Medicine*2008, Taylor & Francis Ltd. p. 143-154.
  18. Chou, Y.Y., et al., *Phthalate exposure in girls during early puberty*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2009. **22**(1): p. 69-77.
  19. Lomenick, J.P., et al., *Phthalate exposure and precocious puberty in females*. J Pediatr, 2010. **156**(2): p. 221-5.
  20. Wolff, M.S., et al., *Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls*. Environ Health Perspect, 2010. **118**(7): p. 1039-46.
  21. Huang, P.C., et al., *Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns*. Environment International, 2009. **35**(1): p. 14-20.
  22. Lin, L.C., et al., *Associations between maternal phthalate exposure and cord sex hormones in human infants*. Chemosphere, 2011. **83**(8): p. 1192-9.
  23. Swan, S.H., et al., *Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(8): p. 1056-61.
  24. Swan, S.H., et al., *Prenatal phthalate exposure and reduced masculine play in boys*. International journal of andrology, 2010. **33**(2): p. 259-69.
  25. Bem, S.L., *Bern Sex Role Inventory: Professional manual*1981, Palo Alto, CA, USA: Consulting Psychologists Press.
  26. Spence, J.T. and R.L. Helmreich, *Masculinity and femininity: Their psychological dimensions, correlates, and antecedents*1978, Austin, TX, USA: University of Texas Press.
  27. Golombok, S. and J. Rust, *The Pre-School Activities Inventory: A standardized assessment of gender role in children*. . Psychological Assessment, 1993. **5**(2): p. 131-136.
  28. Hines, M., et al., *Testosterone during Pregnancy and Gender Role Behavior of Preschool Children: A Longitudinal, Population Study*. Child Development, 2002. **73**(6): p. 1678-1687.
  29. Lamminmäki, A., et al., *Testosterone measured in infancy predicts subsequent*

- sex-typed behavior in boys and in girls*. *Hormones and Behavior*, 2012. **61**(4): p. 611-616.
30. Winneke, G., et al., *Behavioral sexual dimorphism in school-age children and early developmental exposure to dioxins and PCBs: a follow-up study of the Duisburg Cohort*. *Environmental Health Perspectives*, 2014. **122**(3): p. 292-8.
31. Vreugdenhil, H.J.I., et al., *Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in dutch children at school age*. *Environmental Health Perspectives*, 2002. **110**(10): p. A593-A598.
32. 佐々木 掌子, 日本語版幼少期性役割行動尺度 (J-PSAI) の作成 -Pre-school Activities Inventoryの邦訳-. *社会学研究科紀要*, 2006. **62**: p. 174-176.
33. Van den Berg, M., et al., *The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds*. *Toxicol Sci*, 2006. **93**(2): p. 223-41.
34. Dawood, M.Y. and B.B. Saxena, *Testosterone and Dihydrotestosterone in Maternal and Cord Blood and in Amniotic-Fluid*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1977. **129**(1): p. 37-42.
35. Herruzo, A.J., et al., *Sex differences in serum hormone levels in umbilical vein blood*. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 1993. **41**(1): p. 37-41.
36. Hsu, P.C., et al., *Serum hormones in boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, 2005. **68**(17-18): p. 1447-1456.
37. Kido, T., et al., *High cortisol and cortisone levels are associated with breast milk dioxin concentrations in Vietnamese women*. *European Journal of Endocrinology*, 2014. **170**(1): p. 131-139.
38. Rennert, A., et al., *Prenatal and Early Life Exposure to Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans and Biphenyls May Influence Dehydroepiandrosterone Sulfate Levels at Prepubertal Age: Results from the Duisburg Birth Cohort Study*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2012. **75**(19-20): p. 1232-1240.
39. Yang, C.Y., et al., *The endocrine and reproductive function of the female Yucheng adolescents prenatally exposed to PCBs/PCDFs*. *Chemosphere*, 2005. **61**(3): p. 355-360.
40. Meeker, J.D., A.M. Calafat, and R. Hauser, *Urinary Bisphenol A Concentrations in Relation to Serum Thyroid and Reproductive Hormone Levels in Men from an Infertility Clinic*. *Environmental Science & Technology*, 2010. **44**(4): p. 1458-1463.
41. Zhao, B.H., et al., *Inhibition of human and rat 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 activities by perfluoroalkylated substances*. *Chemico-Biological Interactions*, 2010. **188**(1): p. 38-43.
42. Loccisano, A.E., et al., *Evaluation and prediction of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the monkey and human using a PBPK model*. *Regulatory Toxicology and*

- Pharmacology, 2011. **59**(1): p. 157-175.
43. Han, X., et al., *Binding of perfluorooctanoic acid to rat and human plasma proteins*. Chemical Research in Toxicology, 2003. **16**(6): p. 775-781.
44. Benninghoff, A.D., et al., *Estrogen-Like Activity of Perfluoroalkyl Acids In Vivo and Interaction with Human and Rainbow Trout Estrogen Receptors In Vitro*. Toxicological Sciences, 2011. **120**(1): p. 42-58.
45. Joensen, U.N., et al., *PFOS (perfluorooctanesulfonate) in serum is negatively associated with testosterone levels, but not with semen quality, in healthy men*. Human Reproduction, 2013. **28**(3): p. 599-608.
46. Liu, C., Y. Du, and B. Zhou, *Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in primary cultured tilapia hepatocytes*. Aquatic Toxicology, 2007. **85**(4): p. 267-277.
47. Qiu, L., et al., *Sertoli Cell Is a Potential Target for Perfluorooctane Sulfonate-Induced Reproductive Dysfunction in Male Mice*. Toxicological Sciences, 2013. **135**(1): p. 229-240.
48. Wan, H.T., et al., *Testicular Signaling Is the Potential Target of Perfluorooctanesulfonate-Mediated Subfertility in Male Mice*. Biology of Reproduction, 2011. **84**(5): p. 1016-1023.
49. Okada, E., et al., *Temporal trends of perfluoroalkyl acids in plasma samples of pregnant women in Hokkaido, Japan, 2003-2011*. Environment International, 2013. **60**(0): p. 89-96.
50. Okada, E., et al., *Prenatal exposure to perfluoroalkyl acids and allergic diseases in early childhood*. Environment International, 2014. **65**(0): p. 127-134.
51. Ivell, R., J.D. Wade, and R. Anand-Ivell, *INSL3 as a biomarker of leydig cell functionality*. Biology of Reproduction, 2013. **88**(6): p. 1-8.
52. David, R.M., *Proposed mode of action for in utero effects of some phthalate esters on the developing male reproductive tract*. Toxicologic Pathology, 2006. **34**(3): p. 209-219.
53. Hu, G.X., et al., *Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: leydig cell influence*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(3): p. 139-45.
54. Lind, P.M., et al., *Serum concentrations of phthalate metabolites are related to abdominal fat distribution two years later in elderly women*. Environmental Health, 2012. **11**(1): p. 21.
55. Main, K.M., et al., *Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age*. Environmental Health Perspectives, 2006. **114**(2): p. 270-276.
56. Andrade, A.J.M., et al., *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, 2006. **227**(3): p. 185-192.

57. Zhou, L., et al., *Oxidative stress and phthalate-induced down-regulation of steroidogenesis in MA-10 Leydig cells*. Reproductive Toxicology, 2013. **42**(0): p. 95-101.
58. Orth, J.M. and R. Boehm, *Functional coupling of neonatal rat sertoli cells and gonocytes in coculture*. Endocrinology, 1990. **127**(6): p. 2812-2820.
59. Hart, R., et al., *The influence of antenatal exposure to phthalates on subsequent female reproductive development in adolescence: a pilot study*. Reproduction, 2014. **147**(4): p. 379-390.
60. Silva, M., et al., *Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites*. Archives of Toxicology, 2003. **77**(10): p. 561-567.
61. Bizzari, S.N., M. Blagoev, and A. Kishi, *Plasticizers*. Chemical Economics Handbook 2013.
62. Ait Bamai, Y., et al., *Associations of phthalate concentrations in floor dust and multi-surface dust with the interior materials in Japanese dwellings*. Science of The Total Environment, 2014. **468-469**(0): p. 147-157.
63. Hoppin, J.A., et al., *Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples*. Environmental Health Perspectives, 2002. **110**(5): p. 515-518.
64. Suzuki, Y., et al., *Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary metabolite analysis*. Environmental Health and Preventive Medicine, 2009. **14**(3): p. 180-187.
65. Townsend, M.K., et al., *Within-person reproducibility of urinary bisphenol A and phthalate metabolites over a 1 to 3 year period among women in the Nurses' Health Studies: a prospective cohort study*. Environmental Health, 2013. **12**.
66. Bornehag, C.G., et al., *Prenatal phthalate exposures and anogenital distance in Swedish boys*. Environ Health Perspect, 2015. **123**(1): p. 101-7.
67. Rust, J., et al., *The role of brothers and sisters in the gender development of preschool children*. Journal of experimental child psychology, 2000. **77**(4): p. 292-303.

### (3) 異物・ステロイド代謝酵素やホルモンレセプター等の遺伝子多型によるリスク発現の感受性の差とメチル化との交互作用

国立保健医療科学院

佐田 文宏

国立保健医療科学院 健康危機管理研究部

江藤亜紀子

平成24～26年度累計予算額：10,141千円（うち、平成26年度予算額：3,438千円）

予算額は、間接経費を含む。

#### [要旨]

近年、ゲノムワイド関連研究（GWAS）の普及により、発育・肥満、末梢血性ホルモン濃度等に関連する遺伝子座が次々と明らかになってきた。本研究では、わが国の出生コホート研究の草分けである北海道スタディ参加者（小規模コホート参加者総数514名）を対象に、児の性ホルモン、発育・肥満関連一塩基多型（SNP）約90種と発育、臍帯血ホルモン濃度、第2指・第4指比（2D/4D比）とともに環境化学物質（PCB・ダイオキシン類、有機フッ素系化合物、フタル酸エステル）との関連を調べた。性ホルモン関連遺伝子 *ZBTB10* 近傍及び性ホルモン関連領域8q24のSNPは臍帯血ホルモン濃及び2D/4D比とともにPCB・ダイオキシン類及びフタル酸エステル（*ZBTB10* 遺伝子近傍のみ）との関連がみられた。一方、肥満関連遺伝子 *MC4R* のSNPにおいて臍帯血ホルモン濃及び2D/4D比とともにPCB・ダイオキシン類及び有機フッ素系化合物との関連がみられ、同様に肥満関連遺伝子 *GNPDA2* 近傍のSNPにおいて身長・BMI等とともにPCB・ダイオキシン類との関連がみられた。このように、PCB・ダイオキシン類曝露の感受性と発育及び性分化との関連が示唆されることから、今後、ダイオキシン類の抗エストロゲン作用に関与する遺伝要因等を詳細に検討し、環境化学物質曝露と発育及び性分化との遺伝・環境交互作用を解明し、ハイリスク群の同定と予防対策に繋がりたいと考えている。

#### [キーワード]

一塩基多型（SNP）、ゲノムワイド関連研究（GWAS）、性ホルモン、発育、PCB・ダイオキシン類、遺伝・環境交互作用

#### 1. はじめに

性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。その原因のひとつとして環境化学物質曝露による胎児期のホルモン環境の影響が挙げられる。エストロゲン作用がある環境化学物質への曝露が増加したために精巣形成不全症候群に至り、また女兒の遊び方や思春期発来の早期化等への影響が懸念されている。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。このような背景から、World Health Organization (WHO)も2012年に内分泌かく乱物質による潜在的なヒトおよび野生動物への影響についての報告書を作成している[1]。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、ヒトのデータは不十分である。



従来、ステロイド代謝酵素、受容体及び結合蛋白の遺伝子多型が、性ホルモン濃度と関連があることが報告されていた[2-8]。また、このような遺伝子多型は、新生児の体格と関連があることも報告されていた[9-11]。近年、ゲノムワイド関連研究(GWAS)により、テストステロン(testosterone, T)、エストラジオール(estradiol, E2)及び性ホルモン結合グロブリン(sex hormone binding globulin, SHBG)濃度に影響を及ぼす、これまでに知られていなかった多くの遺伝子座が報告された[12-17]。また、欧州人10,623人のGWASにより、出生時体重と*ADCY5*遺伝子rs9883204 ( $P=7 \times 10^{-15}$ )及び*CCNLI*遺伝子近傍のrs900400 ( $P=2 \times 10^{-35}$ )との間に有意な関連がみられることが初めて報告された[18]。*ADCY5*遺伝子には2型糖尿病の感受性SNPも存在することから、出生時体重と2型糖尿病との間に遺伝的な関連があることが初めて示され、注目を集めた。ただし、このSNPは日本人には存在しないので、日本人の評価には用いることはできない。最近、欧州の主要な出生コホート研究が参画するGWASのメタアナリシスより、これらのSNPと出生時体重との関連が確認された他、*CDKAL1*、*ADRB1*、*HMG2*、*LCORL*、*5q11.2*が出生時体重に関連している遺伝子座であることが報告された[19]。この研究では、*ADCY5*とともに*CDKAL1*は2型糖尿病と、*ADRB1*は成人期の血圧と、*HMG2*、*LCORL*は成人期の身長に関しても遺伝的な関連が存在することが示された。従来、欧州系人種のGWASにより、Body mass index (BMI)と関連する遺伝子座として*FTO*、*MC4R*等が知られていたが[20, 21]、最近、アジア系人種においては、BMIと関連する*GIPR*、*CDKAL1*等の遺伝子座が新たに報告された[22, 23]。また、胎生期のアンドロゲン曝露の指標とされている第2指・第4指比(2D/4D比)に関しても、GWASにより関連する遺伝子座として*LIN28B*が初めて示された[24]。

## 2. 研究開発目的

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)。北海道スタディで得られた母が曝露した血液中のPCB・ダイオキシン類や有機フッ素化合物PFOS・PFOA、フタル酸エステルなどの環境化学物質の曝露濃度、臍帯血中のホルモン濃度、第2指/第4指比(2D/4D)のデータを用いることができる。

本研究では、GWASで報告されたT、E2、SHBG濃度、出生時体重及びBMIに影響を及ぼす遺伝子座が新生児の体格、臍帯血ホルモン濃度及び2D/4Dに及ぼす影響とともに環境化学物質との関連を検討し、遺伝・環境交互作用を明らかにすることを目的に実施する。併せて環境化学物質に対する感受性からハイリスク群を同定し、発育、性分化との関連を検討する。

## 3. 研究開発方法

北海道札幌市で実施されている北海道スタディの小規模コホート研究の参加者514名のうち、臍帯血中で277名のT、E2、黄体化ホルモン(luteinizing hormone, LH)、卵胞刺激ホルモン(follicle stimulating hormone, FSH)、プロゲステロン(progesterone, P4)、SHBG、プロラクチン(prolactin, PRL)、インヒビンB(inhibin B, Inh-B)及び146名のインスリン様ペプチド3(insulin-like factor 3, INSL3)の濃度を測定したサブグループ及び7歳時に右手と左手の2D/4D比を測定した124名のサブグループを対象とした。また、予測因子として、環境化学物質及びその代謝物として、既に測定が行われていた妊娠後期の母体血で124名のポリ塩化ビフェニル(PCB)・ダイオキシン類(高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マススペクトロメーター(HRGC/HRMS)法、福岡県保健

環境研究所)、104名のパーフルオロオクタンスルホン酸・ペルフルオロオクタン酸 (PFOS・PFOA) (液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析 (LC/MS/MS) 法、星薬科大学)、及び117名のDEHP代謝物Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) (ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法、名古屋大学) を用いた。

小規模コホートは、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」を実施した。札幌市およびその周辺に住む日本人で、2002年7月から2005年9月に産科を受診した妊婦1796名に研究への参加を依頼した。依頼した妊婦のうち、日本臍帯血バンク登録者(22%)と里帰り分娩(3%) (他施設で分娩) 予定者は研究対象から除外した。最終的に妊娠23週から35週の妊婦514名(28.6%)が研究参加に同意した。コホートのながれを図4に示す。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。妊娠中期から後期に妊婦から母体血40ml、および分娩時に臍帯血40mlを採取し、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。(図(3)-1)



図(3)-1 小規模コホートのながれ

#### (1) 母体血中の環境化学物質の測定

妊娠後期の母体血で426名のポリ塩化ビフェニル (PCB) ・ダイオキシン類を高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マススペクトロメーター (HRGC/HRMS) 法 (福岡県保健環境研究所)、447名のパーフルオロオクタンスルホン酸・ペルフルオロオクタン酸 (PFOS・PFOA) を液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析 (LC/MS/MS) 法 (星薬科大学)、および487名のDEHP代謝物Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) をガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法 (名古屋大学) で測定した。

#### (2) 臍帯血中のホルモン濃度の測定

臍帯血で295名の性ホルモンであるエストラジオール (E)、総テストステロン (T)、プロゲス

テロン(P)、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)、アンドロステネジオン(A-dione)をLC-MS/MS法、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)、およびプロラクチン(PRL)を免疫放射定量測定(IRMA)法、Inhibin BをELISA法で測定した。また、INSL3を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。

北海道スタディから得られた261名の臍帯血よりQIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen)を用いてゲノムDNAを抽出した。これらのゲノムDNA上の多型を解析するため、まず、異物・ステロイド代謝酵素遺伝子等の一塩基多型(SNP)に着目した。使用するテンプレート量を少なくし、ハイスループットで効率的な解析を行うため、ジェノタイピングには、BioMark (Fluidigm社)を用い、Fluidigm 48.48 Dynamic Array biochip (Fluidigm社)上で行った[25]。BioMark はリアルタイムPCR機の1種であり、集積流体回路とナノバブルで構成されたバイオチップを反応チャンバーとして用いることにより、ナノリットルスケールでの遺伝子解析を可能にするシステムである。解析する多型は、最近のGWASの結果等から、T、E2及びSHBGとの関連が報告されたもののうち、日本人における出現頻度等をSNPデータベースで検索、確認の上、選択した46SNPに加え、出生時体重・BMI等の発育・肥満関連46SNPを追加した92SNPを検討した(表(3)-1)。SNPtypeアッセイ法でタイピングを行うため、着目したSNPに対し、多型を識別するプライマーを合成した。ナノスケールでの解析をより確実にを行うために、ジェノタイピングのためのPCR反応に先立ち、ターゲットとする領域を特異的に増幅するSTA (Specific Target Amplification) 反応を行った。STA反応を行ったゲノムDNAは希釈してジェノタイピングのテンプレートとした。ジェノタイピングの結果は、Fluidigm SNP Genotyping Analysis ソフトウェアを用いて解析した。

ジェノタイピングの結果と、ジェノタイピングの結果と、子宮内胎児発育遅延(IUGR: 出生時体重<10パーセントイル)、低出生体重(出生時体重<2,500g)及び早産(在胎週数<37週)との関連を、母親の出産時年齢、出産歴、妊娠中の喫煙及び飲酒歴、児の性別で調整した多重ロジスティック回帰分析により解析した。また、出生時体重、身長、頭囲、胸囲、在胎週数、BMI及びPonderal Index (PI)との関連を母親の出産時年齢、出産歴、妊娠中の喫煙及び飲酒歴、児の性別で調整した直線回帰モデルにより解析した。次に、ジェノタイピングの結果と、臍帯血中のT、E2、T・E2比(T/E2)、LH、FSH、P4、SHBG、PRL、Inh-B及びINSL3の濃度との関連を検討した。まず、遺伝子型(Genotype model)とホルモン濃度との関連をKruskal Wallis検定により解析した。Kruskal Wallis検定で有意差がみられたSNPにおいては、各遺伝子型間の濃度差を多重比較(Bonferroni補正Mann-Whitney検定)により検定した。さらに、優性遺伝モデル(dominant model)または劣性遺伝モデル(recessive model)を用いて、ホルモン濃度との関連をMann-Whitney検定により解析した。また、遺伝子型と2D/4D比との関連は、優性遺伝モデルまたは劣性遺伝モデルを用いて、重回帰モデルにより解析した。環境化学物質濃度に関しては、遺伝子型(Genotype model)との関連をKruskal Wallis検定により、MEHP濃度に関しては、底10の常用対数変換を行い、重回帰モデルにより解析した。

表(3)-1 解析した一塩基多型 (SNP) と日本人のアレル頻度

一塩基多型 (SNP)	遺伝子	領域	アレル頻度
rs776746	<i>CYP3A5</i>	Splicing defect	A:0.26, G:0.74
rs2257401	<i>CYP3A7</i>	mis	C:0.25, G:0.75
rs10211	<i>CYP3A7</i>	ut3, ese	A:0.75, G:0.25
rs12360	<i>CYP3A7</i>	ut3, ese	C:0.25, T:0.75
rs4545	<i>CYP11B2</i>	misese	A:0.47, G:0.53
rs743572	<i>CP17A1</i>	ut5, ese	A:0.51, G:0.49
rs727479	<i>CYP19A1</i>	intron	G:0.34, T:0.66
rs10046	<i>CYP19A1</i>	ut3, ese	C:0.55, T:0.45
rs700519	<i>CYP19A1</i>	mis, ese	C:0.78, T:0.22
rs1047303	<i>HSD3B1</i>	mis, ese	A:0.62, C:0.38
rs3088283	<i>HSD3B1</i>	mis	C:0.26, T:0.74
rs4659175	<i>HSD3B2</i>	ng5	C:0.78, T:0.22
rs2676531	<i>HSD17B1</i>	ut5, ese	A:0.42, G:0.58
rs4743709	<i>HSD17B3</i>	ng3, tfbs	C:0.26, T:0.74
rs293428	<i>UGT2B15</i>	intergenic	C:0.59, T:0.41
rs314276	<i>LIN28B</i>	intron	A:0.28, C:0.72
rs314277	<i>LIN28B</i>	intron	A:0.05, C:0.95
rs10475	<i>ATF3</i>	ut3, ese	C:0.48, T:0.52
rs135561	<i>PPARA</i>	ng5	C:0.94, T:0.06
rs727428	<i>SHBG</i>	intergenic	A:0.60, G:0.40
rs72829446	<i>SHBG</i>	intergenic	C:0.89, T:0.11
rs6259	<i>SHBG</i>	mis (D356N)	A:0.12, G:0.88
rs1641537	<i>SHBG</i>	intergenic	A:0.41, G:0.59
rs10454142	<i>LHCGR</i>	intergenic	C:0.49, T:0.51
rs4149056	<i>SLC01B1</i>	mis	C:0.18, T:0.82
rs780093	<i>GCKR</i>	intron	A:0.57, G:0.43
rs10488084	<i>PLEKHA8</i>	intron	A:0.92, C:0.08
rs440837	<i>ZBTB10</i>	intergenic	A:0.65, G:0.35
rs17496332	<i>PRMT6</i>	intergenic	A:0.70, G:0.30
rs7910927	<i>JMJD1C</i>	intron	G:0.50, T:0.50
rs10822184	<i>JMJD1C</i>	intron	C:0.48, T:0.52
rs5934505	<i>FAM9B</i>	intergenic	C:0.30, T:0.70
rs2411984	<i>ZNF652</i>	intergenic	A:0.24, G:0.76
rs8023580	<i>NR2F2</i>	intergenic	C:0.36, T:0.64
rs10896449	<i>11q13.2</i>	intergenic	A:0.86, G:0.14
rs597800	<i>EHD3</i>	intron	C:0.21, G:0.79
rs2727261	<i>BEST1</i>	intergenic	A:0.82, G:0.28
rs893226	<i>MMP2</i>	intergenic	G:0.58, T:0.42
rs10993994	<i>MSMB</i>	ng5	C:0.60, T:0.40
rs980171	<i>8q24</i>	intergenic	C:0.20, T:0.80
rs12334903	<i>8q24</i>	intergenic	C:0.19, T:0.81
rs1456310	<i>8q24</i>	intergenic	C:0.52, T:0.48
rs3779195	<i>BAIAP2L1</i>	intron	A:0.69, T:0.31
rs3822356	<i>CD14</i>	intergenic	C:0.27, T:0.73
rs1573036	<i>TDGF3</i>	intergenic	A:0.03, G:0.97
rs402675	<i>CNTN6</i>	intergenic	A:0.06, T:0.94
rs4432842	<i>5q11.2</i>	intergenic	C:0.34, T:0.66

rs9883204	<i>ADCY5</i>	intron	C:0.99, T:0.01
rs900400	<i>CCNL1</i>	intergenic	C:0.40, T:0.60
rs10440833	<i>CDKL1</i>	intron	A:0.40, T:0.60
rs10946398	<i>CDKL1</i>	intron	A:0.59, C:0.41
rs2206734	<i>CDKL1</i>	intron	A:0.39, G:0.61
rs4712523	<i>CDKL1</i>	intron	A:0.59, G:0.41
rs4712524	<i>CDKL1</i>	intron	A:0.54, G:0.46
rs6931514	<i>CDKL1</i>	intron	A:0.55, G:0.45
rs7747752	<i>CDKL1</i>	intron	C:0.41, G:0.59
rs7754840	<i>CDKL1</i>	intron	C:0.41, G:0.59
rs7756992	<i>CDKL1</i>	intron	A:0.54, G:0.46
rs7766070	<i>CDKL1</i>	intron	A:0.42, C:0.58
rs9295474	<i>CDKL1</i>	intron	C:0.61, G:0.39
rs9356744	<i>CDKL1</i>	intron	C:0.42, T:0.58
rs9465871	<i>CDKL1</i>	intron	C:0.45, T:0.55
rs1121980	<i>FTO</i>	intron	C:0.78, T:0.22
rs11642841	<i>FTO</i>	intron	A:0.06, C:0.84
rs12149832	<i>FTO</i>	intron	A:0.17, G:0.83
rs1421084	<i>FTO</i>	intron	A:0.94, G:0.068
rs1421085	<i>FTO</i>	intron	C:0.19, T:0.81
rs1558902	<i>FTO</i>	intron	A:0.16, T:0.84
rs17817449	<i>FTO</i>	intron	G:0.18, T:0.82
rs6499640	<i>FTO</i>	intron	A:0.19, G:0.81
rs7202116	<i>FTO</i>	intron	A:0.82, G:0.18
rs8050136	<i>FTO</i>	intron	A:0.18, C:0.82
rs9922619	<i>FTO</i>	intron	G:0.76, T:0.24
rs9930506	<i>FTO</i>	intron	A:0.77, G:0.23
rs9939609	<i>FTO</i>	intron	A:0.19, T:0.81
rs9940128	<i>FTO</i>	intron	A:0.23, G:0.77
rs9941349	<i>FTO</i>	intron	C:0.78, T:0.22
rs10938397	<i>GNPDA2</i>	intergenic	A:0.63, G:0.37
rs1042757	<i>ST6GAL1</i>	ut3	C:0.62, G:0.38
rs724577	<i>LCORL</i>	intron	A:0.46, C:0.54
rs10871777	<i>MC4R</i>	intergenic	A:0.76, G:0.24
rs12967135	<i>MC4R</i>	intergenic	A:0.19, G:0.81
rs12970134	<i>MC4R</i>	intergenic	A:0.19, G:0.81
rs17773430	<i>MC4R</i>	intergenic	C:0.14, T:0.86
rs17782313	<i>MC4R</i>	intergenic	C:0.22, T:0.78
rs2331841	<i>MC4R</i>	intergenic	A:0.27, G:0.73
rs489693	<i>MC4R</i>	intergenic	A:0.32, C:0.68
rs8192678	<i>PPARGC1A</i>	mis	A:0.53, G:0.47
rs713586	<i>RBJ</i>	intergenic	C:0.48, T:0.52
rs2867125	<i>TMEM18</i>	intergenic	A:0.11, G:0.89
rs6548238	<i>TMEM18</i>	intergenic	C:0.82, T:0.18
rs7561317	<i>TMEM18</i>	intergenic	A:0.12, G:0.88

[注] mis: missense, ut3: 3' -untranslated region, ut5: 5' -untranslated region, ese: exonic splicing enhancers, tfbs: transcription factor binding sites, ng3: 3' -near gene region, ng5: 5' -near gene region

#### 4. 結果及び考察

優性遺伝モデル（例えば、rs402675におけるAA+AT型対TT型）により、出生時体格指標と血清性ホルモン濃度と関連のある一塩基多型との関連を検討した（表(3)-2）。rs402675（*CNTN6*遺伝子近傍）及びrs293428（*UGT2B15*遺伝子近傍）において平均出生時体重の低下、rs10454142（*LHCGR*遺伝子近傍）、rs2676531（*HSD17B1*遺伝子）、rs402675及びrs1641537（*SHBG*遺伝子近傍）において平均BMIの低下、rs10454142、rs2676531及びrs1641537において平均PIの低下がみられた（表(3)-2）。これらのSNPのうち、rs402675では平均出生時胸囲の低下、rs293428では平均出生時頭囲と出生時胸囲の低下も併せてみられた。

表(3)-2 出生時体格指標と血清性ホルモン濃度と関連のある一塩基多型との関連†

rs番号	遺伝子（近傍）	出生時体重（g）		BMI（kg/m <sup>2</sup> ）		PI（kg/m <sup>3</sup> ）	
		B	SE	B	SE	B	SE
rs402675	<i>CNTN6</i>	-151*	58	-0.6*	0.3	-1.2	0.8
rs10454142	<i>LHCGR</i>	-53	42	-0.6**	0.2	-1.7**	0.6
rs1641537	<i>SHBG</i>	-55	49	-0.5*	0.2	-1.5*	0.7
rs293428	<i>UGT2B15</i>	-107*	48	-0.2	0.2	-0.2	0.7
rs4659175	<i>HSD3B2</i>	23	40	-0.02	0.2	-0.3	0.6
rs2676531	<i>HSD17B1</i>	-72	43	-0.5**	0.2	-1.5*	0.6

rs番号	遺伝子（近傍）	出生時身長（cm）		出生時頭囲（cm）		出生時胸囲（cm）	
		B	SE	B	SE	B	SE
rs402675	<i>CNTN6</i>	-0.2	0.3	-0.3	0.2	-0.7**	0.2
rs10454142	<i>LHCGR</i>	0.5*	0.2	-0.1	0.2	-0.2	0.2
rs1641537	<i>SHBG</i>	0.2	0.3	0.1	0.2	-0.2	0.2
rs293428	<i>UGT2B15</i>	-0.3	0.3	-0.5**	0.2	-0.6**	0.2
rs4659175	<i>HSD3B2</i>	0.1	0.2	0.4*	0.2	0.2	0.2
rs2676531	<i>HSD17B1</i>	0.2	0.3	-0.4*	0.2	-0.3	0.2

[注] B：非標準化係数、SE：標準誤差、BMI：Body mass index、PI：Ponderal Index

\*P<0.05, \*\*P<0.01, †母親の出産時年齢、出産歴、妊娠中の喫煙及び飲酒歴、児の性別、在胎週数で調整した重回帰分析

臍帯血ホルモン濃度のうち、T、LH、FSH、INH-B及びINSL3の各濃度に性差がみられた（いずれも $p < 0.001$ ）。男児では、臍帯血E2濃度はrs700519（*CYP19A1*遺伝子）、rs440837（*ZBTB10*遺伝子

近傍)及びrs17773430 (*MC4R*遺伝子近傍)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、臍帯血T濃度はrs2411984 (*ZNF652*遺伝子近傍)、rs727428 (*SHBG*遺伝子近傍)及びrs3828356 (*CD14*遺伝子近傍)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、P4濃度はrs9356744、rs7747752、rs7766070及びrs10440833(いずれも*CDKLI*遺伝子)において(いずれも $p < 0.05$ )、LH濃度はrs2727261 (*BEST1*遺伝子)、rs17782313、rs2331841、rs10871777、rs12967135及びrs489693 (*MC4R*遺伝子近傍)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、FSH濃度はrs314277 (*LIN28B*遺伝子)、rs12970134 (*MC4R*遺伝子近傍)、rs724577 (*LCORL*遺伝子)及びrs700519 (*CYP19A1*遺伝子)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、SHBG濃度はrs7910927及びrs10822184(いずれも*JMJDIC*遺伝子)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、PRL濃度はrs440837 (*ZBTB10*遺伝子近傍)、rs9930506、rs1121980、rs9940128、rs9941349(いずれも*FTO*遺伝子)、rs980171 (*8q24*領域)、rs12360及びrs2257401 (*CYP3A7*遺伝子)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、Inh-B濃度はrs440837の遺伝子型間において( $p=0.001$ )、Ins13濃度はrs4712523 (*CDKLI*遺伝子)及びrs6548238 (*TMEM18*遺伝子近傍)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、有意差がみられた(表(3)-3)。一方、女兒では、E2濃度はrs10488084 (*PLEKHA8*遺伝子)及びrs1573036 (*TDGF3*遺伝子近傍)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、臍帯血T濃度はrs10488084 ( $p < 0.01$ )及びrs1042757 (*HMGA2*遺伝子) ( $p < 0.05$ )の遺伝子型間において、P4濃度はrs314276 (*LIN28B*遺伝子)及びrs1456310 (*8q24*領域)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、SHBG濃度はrs9295474 (*CDKLI*遺伝子)、rs440837 (*ZBTB10*遺伝子近傍)、rs727479 (*CYP19A1*遺伝子)及びrs402675 (*CNTN6*遺伝子近傍)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、PRL濃度はrs440837 ( $p=0.001$ )、rs7747752、rs7756992(いずれも*CDKLI*遺伝子)及びrs135561 (*PPARA*遺伝子)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、Inh-B濃度はrs440837 ( $p < 0.01$ )及びrs893226 (*MMP2*遺伝子近傍)、rs8192678 (*PPARGC1A*遺伝子)、rs10822184 (*JMJDIC*遺伝子)の遺伝子型間において(いずれも $p < 0.05$ )、Ins13濃度はrs4432842 (*5q11.2*領域)の遺伝子型間において( $p < 0.01$ )、有意差がみられた(表(3)-4)。しかしながら、これらの関連は軽微で、多重比較により有意性を維持できないものがほとんどであったが、男児で、Inh-B濃度におけるrs440837 ( $p < 0.001$ )の優性遺伝モデル及び女兒で、PRL濃度におけるrs440837 ( $p=0.001$ )の優性遺伝モデル及びIns13濃度におけるrs4432842 ( $p < 0.001$ )の劣性遺伝モデルは比較的強い関連がみられた(いずれも $p < 0.001$ )。

表(3)-3 臍帯血ホルモン濃度と男児一塩基多型との関連

	rs number	Gene/Locus	$P$ (genotype model †)	$P$ (dominant model#)	$P$ (recessive model#)
E2	rs700519	<i>CYP19A1</i>	0.012	ns	0.016
	rs440837	<i>ZBTB10</i>	0.015	0.012	ns
	rs17773430	<i>MC4R</i>	0.03	<b>0.009</b>	ns
	rs724577	<i>LCORL</i>	ns	ns	0.015
T	rs3822356	<i>CD14</i>	0.015	ns	ns
	rs2411984	<i>ZNF652</i>	0.012	ns	0.029
	rs727428	<i>SHBG</i>	0.022	ns	0.042
	rs980171	<i>8q24</i>	ns	ns	0.016
	rs17773430	<i>MC4R</i>	ns	0.017	ns
T/E2	<b>rs700519</b>	<b><i>CYP19A1</i></b>	<b>0.005</b>	ns	<b>0.002</b>

P4	rs9356744	<i>CDKL1</i>	0.012	<b>0.003</b>	ns
	rs7747752	<i>CDKL1</i>	0.02	0.011	ns
	rs7766070	<i>CDKL1</i>	0.025	<b>0.009</b>	ns
	rs10440833	<i>CDKL1</i>	0.048	0.014	ns
	rs7756992	<i>CDKL1</i>	ns	ns	0.025
LH	rs2727261	<i>BEST1</i>	0.018	<b>0.009</b>	ns
	rs17782313	<i>MC4R</i>	<b>0.009</b>	ns	0.044
	rs2331841	<i>MC4R</i>	0.02	ns	0.019
	rs10871777	<i>MC4R</i>	0.033	ns	ns
	rs12967135	<i>MC4R</i>	0.033	ns	ns
	rs489693	<i>MC4R</i>	0.04	ns	ns
	rs9930506	<i>FTO</i>	ns	ns	0.033
FSH	rs314277	<i>LIN28B</i>	0.029	ns	ns
	rs12970134	<i>MC4R</i>	0.042	ns	0.029
	rs2727261	<i>BEST1</i>	ns	0.033	ns
	rs724577	<i>LCORL</i>	0.038	0.036	ns
	rs700519	<i>CYP19A1</i>	0.039	ns	0.048
SHBG	rs7910927	<i>JMJD1C</i>	0.032	ns	<b>0.009</b>
	rs10822184	<i>JMJD1C</i>	0.033	ns	0.01
	rs440837	<i>ZBTB10</i>	ns	0.035	ns
	rs4432842	<i>5q11.2</i>	ns	ns	0.046
PRL	rs440837	<i>ZBTB10</i>	0.015	<b>0.004</b>	ns
	rs9930506	<i>FTO</i>	0.015	0.017	ns
	rs1121980	<i>FTO</i>	0.03	0.038	ns
	rs9940128	<i>FTO</i>	0.03	0.038	ns
	rs9941349	<i>FTO</i>	ns	0.038	ns
	rs9941349	<i>FTO</i>	0.03	ns	ns
	rs980171	<i>8q24</i>	0.029	ns	ns
	rs1456310	<i>8q24</i>	ns	0.034	ns
	rs12360	<i>CYP3A7</i>	0.044	0.025	ns
	rs2257401	<i>CYP3A7</i>	0.042	0.025	ns
	rs402675	<i>CNTN6</i>	ns	0.043	ns
	rs597800	<i>EHD3</i>	ns	0.049	ns
Inh-B	<b>rs440837</b>	<b><i>ZBTB10</i></b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	ns
	rs135561	<i>PPARA</i>	ns	0.038	ns
	rs727428	<i>SHBG</i>	ns	0.04	ns
Ins13	rs4712523	<i>CDKL1</i>	0.049	ns	0.017
	rs1042757	<i>HMGA2</i>	ns	0.022	ns
	rs980171	<i>8q24</i>	ns	0.024	ns
	rs9295474	<i>CDKL1</i>	ns	0.025	ns
	rs727428	<i>SHBG</i>	ns	ns	0.03
	rs597800	<i>EHD3</i>	ns	0.035	ns
	rs6548238	<i>TMEM18</i>	0.039	0.047	ns

[注] T:testosterone, E2: estradiol, P4: progesterone, LH: luteinizing hormone, FSH: follicle stimulating hormone, SHBG: sex hormone binding globulin, PRL prolactin, Inh-B: inhibin B, INSL3: insulin-like factor 3, ns: non-significant

†Kruskal-Wallis test, #Mann-Whitney test

太字:  $P < 0.01$



表(3)-4 臍帯血ホルモン濃度と女兒一塩基多型との関連

	rs number	Gene/Locus	<i>P</i> (genotype model †)	<i>P</i> (dominant model#)	<i>P</i> (recessive model#)
E2	rs10488084	<i>PLEKHA8</i>	0.015	ns	<b>0.007</b>
	rs1573036	<i>TDGF3</i>	0.016	0.016	ns
T	rs2411984	<i>ZNF652</i>	Ns	0.049	ns
	<b>rs10488084</b>	<b><i>PLEKHA8</i></b>	<b>0.006</b>	ns	<b>0.005</b>
	rs1042757	<i>HMGA2</i>	0.015	0.026	ns
T/E2	<b>rs10896449</b>	<b><i>11q13.2</i></b>	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	ns
	rs10822184	<i>JMJD1C</i>	Ns	0.049	ns
	rs9940128	<i>FTO</i>	0.026	ns	0.035
	rs1121980	<i>FTO</i>	0.031	ns	0.036
	rs9941349	<i>FTO</i>	0.031	ns	0.035
	rs724577	<i>LCORL</i>	0.029	ns	ns
P4	rs1456310	<i>8q24</i>	0.018	ns	0.014
	rs314276	<i>LIN28B</i>	0.013	<b>0.007</b>	ns
	rs12970134	<i>MC4R</i>	Ns	0.042	ns
SHBG	rs9295474	<i>CDKL1</i>	0.016	<b>0.004</b>	ns
	rs4712523	<i>CDKL1</i>	Ns	ns	0.023
	rs440837	<i>ZBTB10</i>	0.018	<b>0.005</b>	ns
	rs727479	<i>CYP19A1</i>	0.017	0.01	ns
	rs700519	<i>CYP19A1</i>	Ns	ns	0.03
	rs402675	<i>CNTN6</i>	0.048	0.017	ns
	rs4432842	<i>5q11.2</i>	Ns	0.03	ns
	rs10822184	<i>JMJD1C</i>	Ns	ns	0.033
	rs727428	<i>SHBG</i>	Ns	ns	0.036
PRL	<b>rs440837</b>	<b><i>ZBTB10</i></b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.013
	rs7747752	<i>CDKL1</i>	0.024	ns	0.01
	rs7756992	<i>CDKL1</i>	0.037	0.023	ns
	rs700519	<i>CYP19A1</i>	Ns	0.015	ns
	rs135561	<i>PPARA</i>	0.033	ns	0.016
	rs12360	<i>CYP3A7</i>	Ns	0.043	ns
	rs2257401	<i>CYP3A7</i>	Ns	0.043	ns
Inh-B	<b>rs440837</b>	<b><i>ZBTB10</i></b>	<b>0.006</b>	<b>0.002</b>	ns
	rs893226	<i>MMP2</i>	0.029	<b>0.008</b>	ns
	rs8192678	<i>PPARGC1A</i>	0.035	0.01	ns
	rs10822184	<i>JMJD1C</i>	0.034	0.027	ns
	rs12970134	<i>MC4R</i>	0.035	ns	ns
	rs4432842	<i>5q11.2</i>	Ns	ns	ns
Ins13	<b>rs4432842</b>	<b><i>5q11.2</i></b>	<b>0.008</b>	ns	<b>&lt;0.001</b>
	rs724577	<i>LCORL</i>	Ns	ns	0.035

[注] T: testosterone, E2: estradiol, P4: progesterone, SHBG: sex hormone binding globulin, PRL prolactin, Inh-B: inhibin B, INSL3: insulin-like factor 3, ns: non-significant  
† Kruskal-Wallis test, #Mann-Whitney test

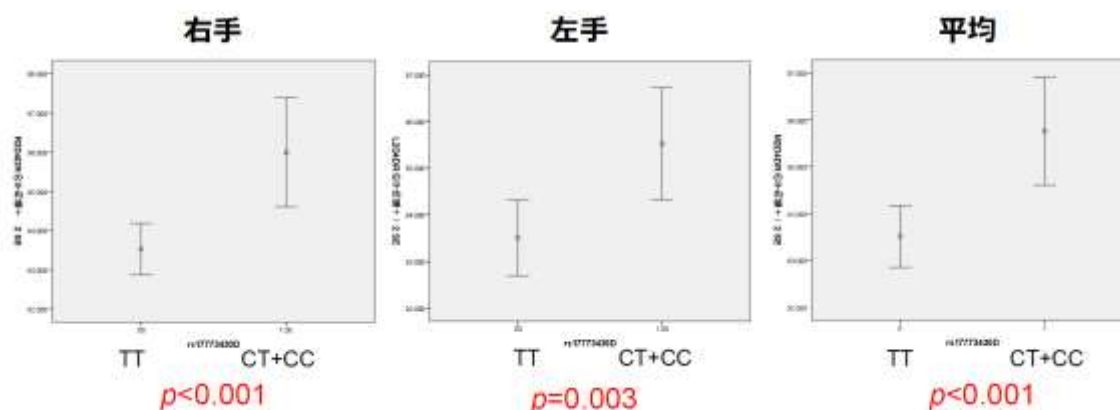
全体の2D/4Dの平均値±標準偏差は、右手94.4±3.4%、左手94.1±3.7%、右手と左手の平均(以下、平均)94.3±3.1%であった。男女間での2D/4Dの比較では、左手、右手及び平均ともに男女

間に有意差を認め、女兒の方が男児に比べて2D/4Dの値は有意に高かった。重回帰分析の結果、右手の2D/4Dは、*MC4R*遺伝子近傍のrs17773430 ( $p < 0.001$ )、8q24のrs980171、rs12334903 (ともに  $p < 0.01$ )、*TMEM18*遺伝子近傍のrs2867125、rs6548238、rs7561317 (いずれも  $p < 0.01$ ) 及び*CNTN6*遺伝子近傍のrs402675 ( $p < 0.05$ ) で有意に増加し、*ZBTB10*遺伝子のrs440837 ( $p < 0.05$ ) で減少した。一方、左手の2D/4Dは、*MC4R*遺伝子近傍のrs17773430 ( $p < 0.01$ ) で有意に増加し、*ZBTB10*遺伝子のrs440837及び*SHBG*遺伝子近傍のrs727428 (ともに  $p < 0.05$ ) で減少した (表(3)-5、図(3)-2)。

表(3)-5 2D/4D比と一塩基多型との関連†

	rs number	Gene/Locus	B	SE	P
右手2D/4D比	rs17773430	<i>MC4R</i>	2.74	0.66	<b>&lt;0.001</b>
	rs980171	<i>8q24</i>	2.01	0.69	<b>0.003</b>
	rs12334903	<i>8q24</i>	1.93	0.71	<b>0.006</b>
	rs2867125	<i>TMEM18</i>	2.08	0.77	<b>0.008</b>
	rs6548238	<i>TMEM18</i>	2.05	0.76	<b>0.008</b>
	rs7561317	<i>TMEM18</i>	2.05	0.76	<b>0.008</b>
	rs402675	<i>CNTN6</i>	2.5	1.53	0.017
左手2D/4D比	rs440837	<i>ZBTB10</i>	-1.62	0.67	0.018
	rs17773430	<i>MC4R</i>	2.2	0.72	<b>0.003</b>
	rs440837	<i>ZBTB10</i>	-1.51	0.71	0.035
平均2D/4D比	rs727428	<i>SHBG</i>	-1.61	0.73	0.03
	rs17773430	<i>MC4R</i>	2.47	0.61	<b>&lt;0.001</b>
	rs980171	<i>8q24</i>	1.66	0.63	<b>0.01</b>
	rs12334903	<i>8q24</i>	1.55	0.66	0.02
	rs440837	<i>ZBTB10</i>	-1.56	0.61	0.012
	rs727428	<i>SHBG</i>	-1.5	0.64	0.02
	rs6548238	<i>TMEM18</i>	1.6	0.69	0.021
	rs7561317	<i>TMEM18</i>	1.6	0.69	0.021
	rs2867125	<i>TMEM18</i>	1.54	0.7	0.029
	rs11642841	<i>FTO</i>	1.76	0.82	0.034

† 母親の出産時年齢、出産歴、妊娠中の喫煙および飲酒歴、児の性別、在胎週数で調整した重回帰分析 (優性遺伝モデル)



\*Mann-Whitney検定

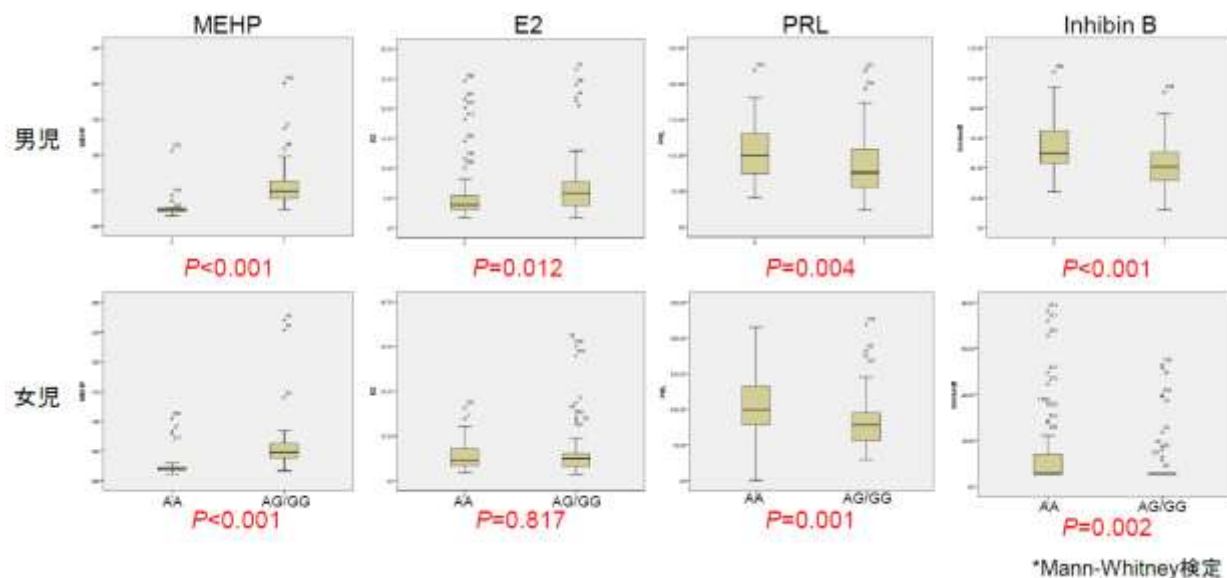
図(3)-2 2D/4D比とMC4R遺伝子近傍rs17773430との関連\*

環境化学物質とホルモン濃度とともに有意な関連がみられたのが、ZBTB10遺伝子近傍のrs440837である。ZBTB10はzinc finger and BTB domain containing 10という性ホルモンの調節に関与するDNA結合タンパク質で、ZBTB10遺伝子近傍のrs440837を優性遺伝モデルで遺伝子型をAA型とAG/GG型に分けて検討すると、男女ともAG/GG型では、フタル酸エステルの代謝物MEHP濃度が有意に高く、SHBG、PRL及びInh-B濃度は有意に低く、男児でのみE2濃度が有意に高かった(表(3)-6、図(3)-3)。常用対数変換した重回帰分析によっても、ZBTB10遺伝子近傍rs440837 AG/GG遺伝子型では、AA遺伝子型より、男女ともMEHP濃度が有意に高く、男児でInh-Bの分泌が抑制され、E2が上昇することが示唆された(表(3)-7)。また、AG/GG型の男児では、MEHP濃度は高いほうにシフトし、高濃度群でInhibin Bの分泌が抑制されることが示唆された(図(3)-4)。

表(3)-6 ZBTB10遺伝子近傍 rs440837 の優性遺伝モデルによるフタル酸エステル、ホルモン濃度

化学物質	ZBTB10	男児		女児	
		Median	25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup>	Median	25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup>
MEHP (ng/mL)	AA	<b>0.023</b>	<b>0.020-0.026</b>	<b>0.020</b>	<b>0.017-0.023</b>
	AG/GG	<b>0.049</b>	<b>0.039-0.076</b>	<b>0.048</b>	<b>0.037-0.063</b>
E2 (ng/mL)	AA	3.62	2.73-4.79	4.71	3.09-7.18
	AG/GG	5.02	3.43-7.21	3.97	2.81-6.48
SHBG (nmol/mL)	AA	16.5	13.1-21.1	15.9	13.7-19.0
	AG/GG	15.6	13.1-19.0	15.3	11.8-16.8
PRL (ng/mL)	AA	90.3	75.8-132.3	97.6	77.8-116.8
	AG/GG	78.3	57.0-122.0	84.5	56.2-96.2
Inhibin B (pg/mL)	AA	54.1	43.2-66.4	5.50	5.50-13.03
	AG/GG	38.5	27.0-51.8	5.50	5.50-5.50

[注] ZBTB10: zinc finger and BTB domain containing 10, MEHP: mono(2-ethylhexyl) phthalate, E2: estradiol, SHBG: sex hormone binding globulin, PRL: prolactin, 赤字:  $P < 0.05$ , 太赤字:  $P < 0.01$  (Mann-Whitney U 検定)



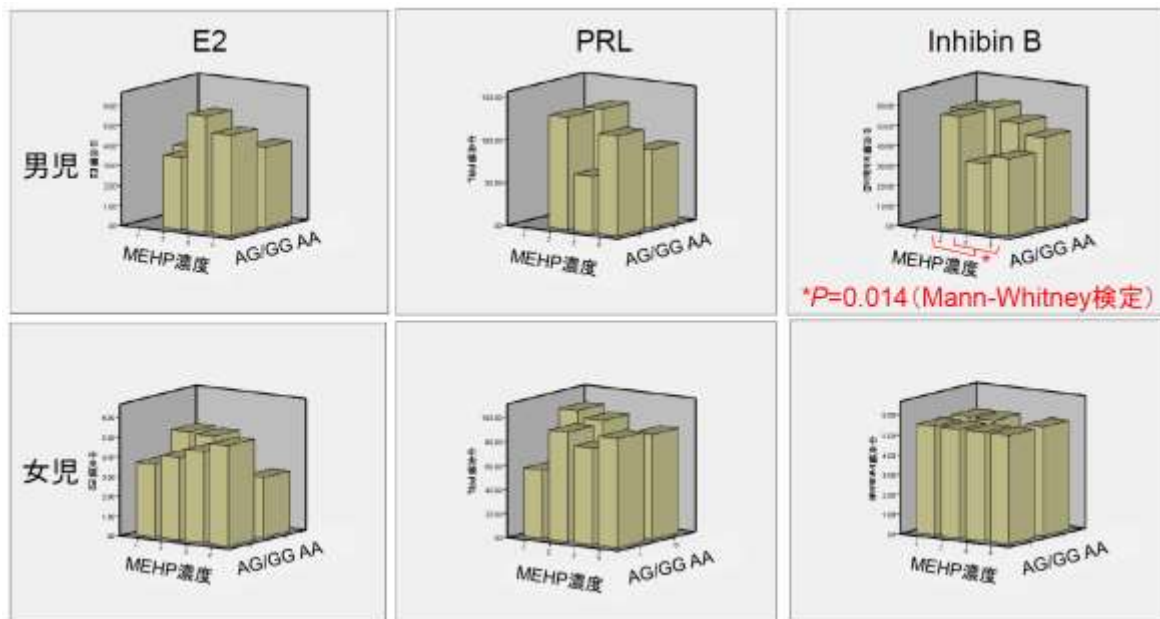
図(3)-3 ZBTB10遺伝子近傍 rs440837 の優性遺伝モデルによるMEHP, E2 PRL及び Inhibin B 濃度\*

表(3)-7 ZBTB10 遺伝子近傍rs440837の 優性遺伝モデルによるMEHP, E2, SHBG, PRL及び Inhibin B 濃度への影響†

	全員			男児			女児		
	B	SE	P	B	SE	P	B	SE	P
MEHP (ng/mL)	<b>0.347</b>	<b>0.049</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.306</b>	<b>0.071</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.349</b>	<b>0.071</b>	<b>&lt;0.001</b>
E2 (ng/mL)	0.046	0.055	0.402	<b>0.162</b>	<b>0.079</b>	<b>0.046</b>	-0.014	0.079	0.859
SHBG (nmol/mL)	0.035	0.050	0.488	-0.021	0.043	0.626	0.089	0.082	0.285
PRL (ng/mL)	-0.057	0.057	0.319	-0.104	0.067	0.131	-0.090	0.035	0.700
Inhibin B (pg/mL)	<b>-0.746</b>	<b>0.054</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>-0.168</b>	<b>0.059</b>	<b>0.007</b>	-0.145	0.082	0.082

[注] ZBTB10: zinc finger and BTB domain containing 10, MEHP: mono(2-ethylhexyl) phthalate, E2: estradiol, SHBG: sex hormone binding globulin, PRL: prolactin, 赤字:  $P < 0.05$ , 太赤字:  $P < 0.01$  (重回帰分析)

↑ 常用対数変換後、母親の年齢、妊娠時の喫煙・飲酒状況、世帯収入及び血液採取時期で調整した重回帰分析



図(3)-4 MEHP濃度(4分位)及びZBTB10 rs440837 (AG/GG, AA)で層別化したE2, PRL及びInhibin B濃度

環境化学物質と関連がみられた遺伝子多型を表6に示す。PFOS濃度、Tdioxin TEQは、全員でZBTB10遺伝子近傍rs440837の遺伝子型と関連がみられ( $p<0.01$ )、PFOA濃度は、男児でのみATF3遺伝子rs10475、FTO遺伝子rs1421084の遺伝子型と関連がみられ( $p<0.01$ )、MEHP濃度は、全員、男児、女児いずれもrs440837の遺伝子型と関連がみられ( $p<0.001$ )、全員でTDGF3遺伝子近傍rs1573036の遺伝子型と関連がみられ( $p<0.01$ )、TCB(女児)、TNPCB TEG(全員、女児)及びTMPCB TEG(女児)は、GNPDA2遺伝子近傍rs10938397の遺伝子型と関連がみられ( $p<0.01$ )、TPCDD TEG、TPCDF TEG、Tdioxin TEQは、全員で8q24領域rs1456310の遺伝子型と関連がみられた( $p<0.01$ ) (表(3)-8、図(3)-5)。

表(3)-8 環境化学物質と関連がみられた遺伝子多型†

	全員	男児	女児
PFOS	<b>ZBTB10 rs440837 0.004</b> FTO rs1421084 0.034 ATF3 rs10475 0.047 SLC01B1 rs4149056 0.049	FTO rs1421084 0.031	ZBTB10 rs440837 0.035
PFOA		<b>ATF3 rs10475 0.003</b> <b>FTO rs1421084 0.009</b> CYP3A5 rs776746 0.041 CYP3A7 rs10211 0.041 CYP3A7 rs12360 0.041 CYP3A7 rs2257401 0.041	
MEHP	<b>ZBTB10 rs440837</b> <b>&lt;0.001</b> <b>TDGF3 rs1573036</b> <b>0.009</b> PLEKH8 rs10488084 0.013 FAM9B rs5934505 0.03 CD14 rs3822356 0.04 CYP3A5 rs776746 0.048 FTO rs12149832 0.044	<b>ZBTB10 rs440837</b> <b>&lt;0.001</b> HSD3B2 rs4659175 0.043	<b>ZBTB10 rs440837</b> <b>&lt;0.001</b> TDGF3 rs1573036 0.012 CYP3A5 rs776746 0.008 SHBG rs1641537 0.03 SHBG rs727428 0.049 CYP3A7 rs10211 0.027 CYP3A7 rs12360 0.027 CYP3A7 rs2257401 0.027
TCB	GNPDA2 rs10938397 0.018 ZBTB10 rs440837 0.018 8q24 rs1456310 0.033	MMP2 rs893226 0.04	<b>GNPDA2 rs10938397 0.007</b>
TPCDD TEQ	<b>8q24 rs1456310 0.006</b> ZBTB10 rs440837 0.012 MC4R rs489693 0.042 SLC01B1 rs4149056 0.045		8q24 rs1456310 0.029
TPCDF TEQ	<b>8q24 rs1456310 0.003</b> ZBTB10 rs440837 0.008 FTO rs9922619 0.016 8q24 rs12334903 0.044 CYP3A5 rs776746 0.048	8q24 rs1456310 0.045 CDKL1 rs4712524 0.021 CDKL1 rs7766070 0.046	8q24 rs1456310 0.04 SLC01B1 rs4149056 0.05 FTO rs9930506 0.043
TPCDD/ PCDF TEQ	<b>8q24 rs1456310 0.004</b> ZBTB10 rs440837 0.011 FTO rs9922619 0.03	MC4R rs2331841 0.049	8q24 rs1456310 0.026

	<i>MC4R</i> rs489693 0.042		
TNPCB TEQ	<b><i>GNPDA2</i> rs10938397 0.009</b> <i>ZBTB10</i> rs440837 0.016 <i>LIN28B</i> rs314276 0.035 <i>HMGA2</i> rs1042757 0.047	<i>CYP3A5</i> rs776746 0.013 <i>CYP3A7</i> rs10211 0.013 <i>CYP3A7</i> rs12360 0.013 <i>CYP3A7</i> rs2257401 0.013 <i>FTO</i> rs1421084 0.015 <i>MC4R</i> rs2331841 0.026	<b><i>GNPDA2</i> rs10938397 0.006</b> <i>MC4R</i> rs2331841 0.035 <i>JMJD1C</i> rs10822184 0.029
TMPCB TEQ	<i>ZBTB10</i> rs440837 0.01 <i>GNPDA2</i> rs10938397 0.012 <i>8q24</i> rs1456310 0.017	<i>ZBTB10</i> rs440837 0.036 <i>HMGA2</i> rs1042757 0.036 <i>MMP2</i> rs893226 0.039	<b><i>GNPDA2</i> rs10938397 0.003</b>
TCPCB TEQ	<i>GNPDA2</i> rs10938397 0.01 <i>ZBTB10</i> rs440837 0.014 <i>LIN28B</i> rs314276 0.037 <i>HMGA2</i> rs1042757 0.044	<i>CYP3A5</i> rs776746 0.016 <i>CYP3A7</i> rs10211 0.016 <i>CYP3A7</i> rs12360 0.016 <i>CYP3A7</i> rs2257401 0.016 <i>FTO</i> rs1421084 0.024 <i>MC4R</i> rs2331841 0.033 <i>5q11.2</i> rs4432842 0.048	<i>MC4R</i> rs2331841 0.037 <i>JMJD1C</i> rs10822184 0.036
Tdioxin TEQ	<b><i>8q24</i> rs1456310 0.006</b> <b><i>ZBTB10</i> rs440837</b> <b>0.008</b> <i>GNPDA2</i> rs10938397 0.023 <i>FTO</i> rs9922619 0.029 <i>8q24</i> rs12334903 0.034 <i>MC4R</i> rs489693 0.036	<i>ZBTB10</i> rs440837 0.049 <i>MC4R</i> rs2331841 0.033	<i>GNPDA2</i> rs10938397 0.023

[注] PFOS: perfluorooctane sulfonate, PFOS: perfluorooctanoate, MEHP: Mono-(2-ethylhexyl) phthalate, PCB: polychlorinated biphenyl, TEQ: Toxicity Equivalency Quantity, PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxin, PCDF: polychlorinated dibenzofuran, TPCB: Total PCBs, TPCDD TEQ: Total PCDD-TEQ, TPCDF TEQ: Total PCDF-TEQ, TPCDD/PCDF TEQ: Total PCDD/PCDF-TEQ, TNPCB TEQ: Total Non-ortho PCBs-TEQ, TMPCB TEQ: Total Mono-ortho PCBs-TEQ, TCPCB TEQ: Total Coplanar PCB-TEQ, Tdioxin TEQ: Total Dioxin-TEQ

† Kruskal Wallis検定



図(3)-5 環境化学物質曝露、臍帯血ホルモン濃度及び発育指標と関連のみられる遺伝要因

*ZBTB10* 遺伝子近傍 rs440837 は、肝機能、脂質代謝、糖代謝、アンドロゲン及びエストロゲン受容体機能、エピジェネティックな影響、乳がんおよび前立腺がんを含むステロイドホルモン応答を含む種々の生物学的経路を包含する遺伝子座の構成要因の一つと考えられており、特に、女性で性分化との関連が強いと報告されている [14]。また、*ZBTB10* 遺伝子座は、マイクロRNAによる調節とアンドロゲン及びエストロゲンの情報伝達との関連が報告されている [26, 27]。rs440837 の環境化学物質や臍帯血ホルモン濃度との関連は、このようなマイクロRNAによる調節とアンドロゲン及びエストロゲンの情報伝達と関連がある可能性が考えられる。また、染色体上の 8q24 領域は、GWAS により、前立腺がん、乳がん、結腸がん及び膀胱がんに関連している領域と同定され、rs1456310 はテストステロンとの関連が報告されている [16]。8q24 領域は、性ホルモン調節領域と考えられている。一方、*MC4R* (melanocortin 4 receptor) 遺伝子は、食物摂取およびエネルギー恒常性の調節に重要な役割を果たしているヒト視床下部メラノコルチン経路の調節を担い、肥満の最も一般的な単一遺伝子の要因である [28, 29]。この遺伝子近傍の rs17773430 は、GWAS により、肥満との関連が報告されている [30]。*GNPDA2* (glucosamine-6-phosphate deaminase 2) 遺伝子によってコードされるタンパク質は、D-グルコサミン-6-リン酸を D-フルクトース-6-リン酸に変換する可逆反応を触媒するアロステリック酵素である [31]。同様に、この遺伝子近傍の rs10938397 は、GWAS により肥満との関連が報告されている [32, 33]。これらが、PCB・ダイオキシン類曝露と関連する機序は不明だが、ダイオキシン類曝露は出生時体重に影響を及ぼすことは一般に知られている [34-36]。今後、ダイオキシン類の抗エストロゲン作用に関与する遺伝要因等を詳細に検討し、環境化学物質曝露と性分化及び発育との遺伝-環境相互作用を解明し、ハイリスク群の同定と予防対策に繋げたいと考えている。



## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

本研究は、最近のGWASを中心にこれまでに知られている末梢血ホルモン濃度、発育・肥満に関連する遺伝要因を網羅的に選別し、環境化学物質曝露等の環境要因と発育、性分化等のアウトカムの両面から関連を検討した点にある。本研究は、世界的に見て最も精度の高い曝露評価により妊娠中や生後のPCB・ダイオキシン類、PFOS/PFOAなどの有機フッ素系化合物、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ので、WHOなどで内分泌かく乱化学物質に対して最も感受性が高く重要なエンドポイントとされている胎内曝露や生後の環境による次世代影響、特に性腺機能について、遺伝的素因により層別化したリスク評価ができる。今後、これまでに知られていなかった化学物質に対する感受性を明らかにし、ハイリスク群を同定したうえで、発育や性分化等のアウトカムとの関連を検討できる。本研究により、環境化学物質、特に、PCB・ダイオキシン類、フタル酸エステル曝露の感受性と発育及び性分化との関連が示唆された。

### (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>

本研究は、環境省が主導しているエコチル調査の基本課題「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？」という中心仮説の解決に大きく貢献するものとする。特に、環境化学物質に対する感受性を考慮したことにより、ハイリスク群に対する曝露の低減、生活習慣指導等のきめ細かな予防対策が実現できる可能性を示唆するものとする。

## 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) S. KOBAYASHI, F. SATA, S. SASAKI, S. BAN, C. MIYASHITA, E. OKADA, M. LIMPAR, E. YOSHIOKA, J. KAJIWARA, T. TODAKA, Y. SAIJO Y and KISHI R: : Toxicol. Lett, 219, 3 (vol, issue), 269-278 (2013)

“Genetic association of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1) polymorphisms with dioxin blood concentrations among pregnant Japanese women”

#### <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) 佐田文宏：小児保健研究，73，6(巻,号) 769-775 (2014)  
「DOHaD の視点に立った生涯にわたるヘルスケア」
- 2) 佐田文宏：日本周産期・新生児医学会雑誌，印刷中  
「出生ゲノムコホートの現状と展望」
- 3) 佐田文宏：最新医学，印刷中  
「先制医療実現のための疫学研究：DOHaD 学説に基づくライフコース疫学」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 佐田文宏. 出生時～幼小児期の体格と成人期のアウトカム. 第2回DOHaD研究会年会，東京，平成25年6月7,8日.
- 2) 江藤亜紀子，荒木敦子，三井貴彦，岸 玲子，野々村克也，金谷泰宏，佐田文宏. 胎児の発育及び新生児の体格に影響を及ぼす胎児の遺伝要因. 第2回DOHaD研究会年会，東京，平成25年6月7,8日.
- 3) Sata F, Eto A, Kanatani Y, Araki A, Mitsui T, Kishi R, Nonomura Katsuya. Fetal genetic polymorphisms associated with estrogen levels and sex-hormone-binding globulin and fetal growth restriction. Conference of ISEE, ISES and ISIAQ: Environment and Health-Bridging South, North, East and West, Basel, August 19-23, 2013
- 4) Eto A, Sata F, Kanatani Y, Araki A, Mitsui T, Kishi R, Nonomura Katsuya. Fetal genetic polymorphisms associated with estrogen levels and sex-hormone-binding globulin and anthropometric parameters in newborns. Conference of ISEE, ISES and ISIAQ: Environment and Health-Bridging South, North, East and West, Basel, August 19-23, 2013
- 5) Sata F, Eto A, Kanatani Y, Araki A, Mitsui T, Kishi R, Nonomura Katsuya. Fetal genetic polymorphisms associated with birth weight and body mass index and intrauterine fetal growth restriction. 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, Singapore, November 17-20, 2013
- 6) 佐田文宏，江藤亜紀子，荒木敦子，三井貴彦，金谷泰宏，岸 玲子，野々村克也. 胎児のホルモン環境に影響を及ぼす要因の検討：ホルモン関連遺伝子多型と臍帯血ホルモン濃度. 第16回環境ホルモン学会研究発表会，東京，平成25年12月12, 13日.
- 7) Sata F, Eto A, Kanatani Y, Araki A, Mitsui T, Kishi R, Nonomura K. Associations between fetal genetic polymorphisms and cord blood sex hormone and protein levels. 26th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference, Seattle, Washington, USA, August 24-28, 2014
- 8) 佐田文宏：DOHaDと疫学，第84回日本衛生学会学術総会，岡山，2014年5月25～27日.
- 9) 佐田文宏：出生ゲノムコホートの現状と展望，第50回日本周産期・新生児医学会学術集会，舞浜，2014年7月13～15日.
- 10) 佐田文宏，江藤亜紀子，金谷泰宏，三井貴彦，荒木敦子，岸 玲子，野々村克也：第2指・第4指比（2D/4D）に影響を及ぼす遺伝要因の検討，第85回日本衛生学会学術総会，和歌山，2015年3月26～28日.

**(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**

特に記載すべき事項はない。

**(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. Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT. Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. *Worlds Health Organization*. 2012.
2. Feigelson HS, Shames LS, Pike MC, Coetzee GA, Stanczyk FZ, Henderson BE. Cytochrome P450c17alpha gene (CYP17) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. *Cancer Res*. 1998, 58;4:585-587.
3. Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE *et al*. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Cancer Res*. 1999, 59;5:1015-1020.
4. Eriksson AL, Lorentzon M, Mellstrom D, Vandenput L, Swanson C, Andersson N *et al*. SHBG gene promoter polymorphisms in men are associated with serum sex hormone-binding globulin, androgen and androgen metabolite levels, and hip bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006, 91;12:5029-5037.
5. Gorai I, Inada M, Morinaga H, Uchiyama Y, Yamauchi H, Hirahara F *et al*. CYP17 and COMT gene polymorphisms can influence bone directly, or indirectly through their effects on endogenous sex steroids, in postmenopausal Japanese women. *Bone*. 2007, 40;1:28-36.
6. Jiang J, Tang NL, Ohlsson C, Eriksson AL, Vandenput L, Chan FW *et al*. Association of genetic variations in aromatase gene with serum estrogen and estrogen/testosterone ratio in Chinese elderly men. *Clin Chim Acta*. 2010, 411;1-2:53-58.
7. Yilmaz MB, Pazarbasi A, Guzel AI, Kocaturk-Sel S, Kasap H, Kasap M *et al*. Association of serum sex steroid levels and bone mineral density with CYP17 and CYP19 gene polymorphisms in postmenopausal women in Turkey. *Genet Mol Res*. 2011, 10;3:1999-2008.
8. Sakka C, Efstathiadou ZA, Polyzos SA, Goutou M, Stakias N, Koukoulis GN. Associations of estrogen receptor alpha and beta gene polymorphisms with sex steroid levels and body fat content in men. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012, 120;3:154-159.
9. Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M *et al*. A polymorphism in

- the CYP17 gene and intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod.* 2004, 10;1:49-53.
10. Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamada T, Minakami H *et al.* Functional maternal catechol-O-methyltransferase polymorphism and fetal growth restriction. *Pharmacogenet Genomics.* 2006, 16;11:775-781.
  11. Kvaloy K, Kulle B, Romundstad P, Holmen TL. Sex-specific effects of weight-affecting gene variants in a life course perspective--The HUNT Study, Norway. *Int J Obes (Lond).* 2013, 37;9:1221-1229.
  12. Prescott J, Thompson DJ, Kraft P, Chanock SJ, Audley T, Brown J *et al.* Genome-wide association study of circulating estradiol, testosterone, and sex hormone-binding globulin in postmenopausal women. *PLoS One.* 2012, 7;6:e37815.
  13. Ohlsson C, Wallaschofski H, Lunetta KL, Stolck L, Perry JR, Koster A *et al.* Genetic determinants of serum testosterone concentrations in men. *PLoS Genet.* 2011, 7;10:e1002313.
  14. Coviello AD, Haring R, Wellons M, Vaidya D, Lehtimaki T, Keildson S *et al.* A genome-wide association meta-analysis of circulating sex hormone-binding globulin reveals multiple Loci implicated in sex steroid hormone regulation. *PLoS Genet.* 2012, 8;7:e1002805.
  15. Jin G, Sun J, Kim ST, Feng J, Wang Z, Tao S *et al.* Genome-wide association study identifies a new locus JMJD1C at 10q21 that may influence serum androgen levels in men. *Hum Mol Genet.* 2012, 21;23:5222-5228.
  16. Chu LW, Meyer TE, Li Q, Menashe I, Yu K, Rosenberg PS *et al.* Association between genetic variants in the 8q24 cancer risk regions and circulating levels of androgens and sex hormone-binding globulin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010, 19;7:1848-1854.
  17. Vandenput L, Ohlsson C. Genome-wide association studies on serum sex steroid levels. *Mol Cell Endocrinol.* 2014, 382;1:758-766.
  18. Freathy RM, Mook-Kanamori DO, Sovio U, Prokopenko I, Timpson NJ, Berry DJ *et al.* Variants in ADCY5 and near CCNL1 are associated with fetal growth and birth weight. *Nat Genet.* 2010, 42;5:430-435.
  19. Horikoshi M, Yaghootkar H, Mook-Kanamori DO, Sovio U, Taal HR, Hennig BJ *et al.* New loci associated with birth weight identify genetic links between intrauterine growth and adult height and metabolism. *Nat Genet.* 2013, 45;1:76-82.
  20. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 2007, 316;5826:889-894.
  21. Loos RJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, Prokopenko I *et al.* Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet.* 2008, 40;6:768-775.
  22. Okada Y, Kubo M, Ohmiya H, Takahashi A, Kumasaka N, Hosono N *et al.* Common variants

- at CDKAL1 and KLF9 are associated with body mass index in east Asian populations. *Nat Genet.* 2012, 44;3:302-306.
23. Wen W, Cho YS, Zheng W, Dorajoo R, Kato N, Qi L *et al.* Meta-analysis identifies common variants associated with body mass index in east Asians. *Nat Genet.* 2012, 44;3:307-311.
  24. Medland SE, Zayats T, Glaser B, Nyholt DR, Gordon SD, Wright MJ *et al.* A variant in LIN28B is associated with 2D:4D finger-length ratio, a putative retrospective biomarker of prenatal testosterone exposure. *Am J Hum Genet.* 2010, 86;4:519-525.
  25. Chan M, Chan MW, Loh TW, Law HY, Yoon CS, Than SS *et al.* Evaluation of nanofluidics technology for high-throughput SNP genotyping in a clinical setting. *J Mol Diagn.* 2011, 13;3:305-312.
  26. Li X, Mertens-Talcott SU, Zhang S, Kim K, Ball J, Safe S. MicroRNA-27a Indirectly Regulates Estrogen Receptor {alpha} Expression and Hormone Responsiveness in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology.* 2010, 151;6:2462-2473.
  27. Pathi SS, Jutooru I, Chadalapaka G, Sreevalsan S, Anand S, Thatcher GR *et al.* GT-094, a NO-NSAID, inhibits colon cancer cell growth by activation of a reactive oxygen species-microRNA-27a: ZBTB10-specificity protein pathway. *Mol Cancer Res.* 2011, 9;2:195-202.
  28. Calton MA, Ersoy BA, Zhang S, Kane JP, Malloy MJ, Pullinger CR *et al.* Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet.* 2009, 18;6:1140-1147.
  29. Hainerova I, Larsen LH, Holst B, Finkova M, Hainer V, Lebl J *et al.* Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response, and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92;9:3689-3696.
  30. Melka MG, Bernard M, Mahboubi A, Abrahamowicz M, Paterson AD, Syme C *et al.* Genome-wide scan for loci of adolescent obesity and their relationship with blood pressure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012, 97;1:E145-150.
  31. Arreola R, Valderrama B, Morante ML, Horjales E. Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study. *FEBS Lett.* 2003, 551;1-3:63-70.
  32. Renstrom F, Payne F, Nordstrom A, Brito EC, Rolandsson O, Hallmans G *et al.* Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet.* 2009, 18;8:1489-1496.
  33. Cheung CY, Tso AW, Cheung BM, Xu A, Ong KL, Fong CH *et al.* Obesity susceptibility genetic variants identified from recent genome-wide association studies: implications in a chinese population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010, 95;3:1395-1403.
  34. Konishi K, Sasaki S, Kato S, Ban S, Washino N, Kajiwara J *et al.* Prenatal exposure

- to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res.* 2009, 109;7:906-913.
35. Lundqvist C, Zuurbier M, Leijds M, Johansson C, Ceccatelli S, Saunders M *et al.* The effects of PCBs and dioxins on child health. *Acta Paediatr Suppl.* 2006, 95;453:55-64.
36. Pan X, Liu X, Li X, Niu N, Yin X, Li N *et al.* Association between Environmental Dioxin-Related Toxicants Exposure and Adverse Pregnancy Outcome: Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Fertil Steril.* 2015, 8;4:351-366.

## Effect of Maternal Exposure to Endocrine-disrupting Chemicals on Sex Development and Gonadal Function

**Principal Investigator:** Katsuya NONOMURA

**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: k-nonno@kushiroh.rofuku.go.jp

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

### [Abstract]

**Key Words:** Environmental chemicals, Prenatal exposure, Sex differentiation, Gonadal function, Sex hormone, 2D/4D, Sex-typical activity, Single nucleotide polymorphisms (SNP), Genome-wide association study (GWAS), Gene-environment interaction

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 gonadal function. A prospective birth cohort study in Sapporo, Hokkaido Study, showed significant associations between maternal polychlorobiphenyls, dioxins, perfluorinated compounds and phthalate concentrations and sex hormone levels in cord blood, suggesting that EDCs exposure *in utero* have adverse effects on both Leydig and Sertoli cell development in male offsprings. Ratio of the second and fourth digit length (2D/4D) in school-aged children, which was significantly lower in males than in females, was affected by prenatal Leydig cell function and adrenogenic androgens, not EDCs. Sexually dimorphic brain development and behavior are also known to be influenced by sex hormones exposure during prenatal periods. To investigate sex-typical characteristics, preferred toys and play activities, we used the Pre-school Activities Inventory (PSAI), which revealed that prenatal exposure of dioxins decreased masculine-score in males. From the study of 2D/4D, prenatal androgen exposure could influence on masculine-typical brain development and behavior in school-aged children. In the study of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in cord blood, SNPs in the sex hormone-associated loci near the *ZBTB10* gene or 8q24 region were associated with not

only cord sex hormone levels and 2D/4D, but also maternal PCBs, dioxins and MEHP concentrations. Particularly, polymorphism of ZBTB10 rs440837 was a risk factor of anti-androgen effect in phthalate.

In Japan environment and children's study (JECS), more than 1500 children were enrolled as an adjunct study, and we measured penile length, testicular volume, anogenital distance (AGD) and the second and fourth digit length at birth. ADG was longer and 2D/4D was smaller in males as previously reported. Combined with data on environmental exposure during the period from pregnancy to early infancy as well as potential confounding sources in JECS, we could be able to investigate the effect of EDCs on physical development *in utero* using these physical data related to the sex development and gonadal function afterward.

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