



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	母体因子が児の性分化に与える影響 [全文の要約]
Author(s)	森岡, 圭太
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2236 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12132号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61942
Type	doctoral thesis
File Information	Keita_Morioka_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

母体因子が児の性分化に与える影響

(Effect of maternal factors on sex differentiation in
newborn infants)

2016年3月

北 海 道 大 学

森 岡 圭 太

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Keita Morioka, Kazutoshi Cho, Itaru Hayasaka, Yutaka Uzuki, Yosuke Kaneshi, Takuma Akimoto, Akinori Moriichi, Takahiko Mitsui, Takeya Kitta, Kimihiko Moriya, Ayako Imai, Sakiko Sato, Nobuo Shinohara, Atsuko Araki, Chihiro Miyashita, Sachiko Ito, Reiko Kishi, Katsuya Nonomura, Tadashi Ariga, Hisanori Minakami

Effect of maternal factors on anogenital distance and penile length of newborn infants: adjunct study of Japan Environment and Children's Study(JECS).

Pediatric Research (投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Keita Morioka, Kazutoshi Cho, Itaru Hayasaka, Yutaka Uzuki, Yosuke Kaneshi, Takuma Akimoto, Akinori Moriichi, Takahiko Mitsui, Takeya Kitta, Kimihiko Moriya, Ayako Imai, Sakiko Sato, Nobuo Shinohara, Atsuko Araki, Chihiro Miyashita, Sachiko Ito, Reiko Kishi, Katsuya Nonomura, Tadashi Ariga, Hisanori Minakami

Effect of maternal factors on anogenital distance and penile length of newborn infants: adjunct study of Japan Environment and Children's Study(JECS).

Hot Topics in Neonatology 2015, Dec 6-9, 2015, Washington D.C., USA

緒言

胎児の器官形成および発育・発達には遺伝要因と環境要因がそれぞれ関与しているが、それらの間には相互の関係(gene-environment interaction)が存在する。環境要因の作用には遺伝的感受性が影響し、環境要因により遺伝子がエピジェネティック変異を受ける(図1)。エピジェネティック変異によって、ゲノムに書かれた遺伝情報は変更されることなく、個体発生や細胞分化の過程において遺伝子発現が制御される。また、胎児の環境要因に対する感受性は妊娠週数に依存しており、影響を受ける組織と環境要因の組み合わせごとに臨界期が存在する。胎児に影響する環境要因には、母体因子、環境化学物質や放射線に対する曝露、感染症などがある。母体因子としては、喫煙・飲酒などの生活習慣や、食習慣、職業を介した影響、母体を受けるストレスなどが知られている。これらの母体因子はある程度個別に制御可能であるが、環境化学物質への曝露を個別に制御することは困難である。

妊娠中の母体の喫煙により、母体では流産、前期破水、常位胎盤早期剥離、前置胎盤などの妊娠合併症の発症率が高まり、胎児では早産、低出生体重、周産期死亡などの発症率が高くなる^{1,4}。たばこの煙には400種以上の化学物質が含まれているが、中でもニコチンはその薬理作用により臍帯および胎児の血管収縮を介して胎児・胎盤系への酸素と栄養の供給低下をもたらす。妊娠後期まで喫煙した場合は非喫煙妊婦に比べて、在胎週数に比して出生体重が小さくなるリスクが2倍になることが報告されている¹。また喫煙本数が増えると新生児の体重および身長が減少する傾向があることも報告されている⁵。たばこの煙にはベンツピレンなどの多環芳香族炭化水素やニトロソアミン類などの遺伝毒性や発癌性をもつ物質が含まれている。このような物質はDNA内に付加体を形成することが知られており、喫煙妊婦の白血球中DNA付加体量は非喫煙妊婦に比べると有意に多くなる。母体白血球のDNA付加体量と児の出生時体重、身長および頭囲が反比例することが報告されている⁶。

胎児性アルコール症候群は妊娠中の母体のアルコール大量摂取による胎児の先天異常で、主症状として子宮内胎児発育遅延ならびに生後の成長障害、精神発達遅延や多動症などの中枢神経障害、顔面正中の形成不全を主体とした特異顔貌および小頭症などの頭蓋顔面奇形、心奇形や関節異常などの種々の形態異常を合併する。欧米では1973年に初めて報告され、出生1000あたりに0.3から1.9と頻度の高い先天異常として注目されてきた。エタノールおよびその代謝産物であるアセトアルデヒドが胎盤を通過し、胎児細胞の増殖や発達を障害すると考えられている。アルコール曝露の時期と胎児異常の関係については、妊娠全期間を通じて影響があると考えられており⁷⁻⁹、妊娠初期の器官形成期の曝露では特異顔貌や種々の奇形が生じ、妊娠中期から後期の

曝露では胎児発育遅延や中枢神経障害が生ずると考えられている。喫煙やアルコールへの曝露による胎児における異常の発生は予防可能であることから、これまでも多くの啓発活動がなされてきたが、いまだ解決にはいたっていない。

妊婦は個々の生活様式により様々な環境化学物質にさらされている可能性がある。庭師の女性から出生した男児において尿道下裂の頻度が高かったことは、母体の職業性化学物質曝露が胎児の性分化に影響を与えることを示唆している¹⁰。このように、特定の母体因子が胎児の環境化学物質曝露に関連し、児に有害な影響をもたらすことには重大な関心が寄せられている。

喫煙やアルコール摂取をしていなくとも、あるいは特定の職業に就いていなくとも、現代の妊婦は様々な固定発生源から環境中に放出されている数多くの環境化学物質に曝露されている¹¹。食品包装・容器や農薬、食品添加物などに使用されている環境化学物質の一部は内分泌攪乱物質としての性質を持っている。内分泌攪乱物質とは、これまでの臨床報告や動物実験、疫学研究の結果から、生体内ホルモンの合成、分泌、輸送、結合、作用あるいは分解を妨害することにより恒常性の維持、生殖、発生または行動に影響を与える外来物質と定義されている。内分泌攪乱物質の作用機序は多様で、受容体を介した作用以外にも多くの作用機序が考えられているがその全容はまだ未解明である。

内分泌活性を持つ化学物質が個体およびその次世代に悪影響を及ぼした例にジェチルスチルベストールがある。ジェチルスチルベストールはエストロゲン受容体にエストラジールと同等の親和性で結合しエストロゲン作用を示すことから、流産の予防目的に1950年から1970年頃まで使用されていた医薬品である。200万人以上の女性がこの薬品を服用したが、その後に次世代の女性で生殖機能異常や陰透明細胞腺癌¹²、男性で停留精巣、短小陰茎、副睾丸嚢腫が発生し^{13,14}、エストロゲン作用物質がヒトの生殖・発生に対して有害な影響をあたえることが初めて明らかになった。これらの予期できなかった作用は、その後の動物実験で証明された。雌マウスの生後1～5日の間にジェチルスチルベストールを投与した結果、1年後に子宮腺癌が半数に発生した¹⁴。また、雄ハムスターの出生直後のジェチルベストールの投与では90日後に精巣および副生殖器の萎縮と無精子症が発症した¹⁵。これらの検証により内分泌攪乱作用に関して実験動物とヒトとの間に類似性があり、十分な動物実験を行うことの必要性が示された。

環境化学物質への胎児期曝露が性腺機能および生殖行動へ影響を与えることが、いくつかの *in vivo* および *in vitro* 実験で示唆されている。フタル酸エステル類は胎児のライディッヒ細胞やセルトリ細胞の減少あるいは増殖抑制を引き起こし、血中テストステロン濃度の低下を招く¹⁶⁻¹⁹。有機フッ素化合物は性ステロイドホルモン受容体の転写活性に影響を与えることで抗アンドロゲン作用を発揮し、精巣内でのステロイド

合成能力やライディッシュ細胞からのホルモン放出を直接的に阻害する^{20,21}。ポリ塩化ビフェニルやダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体アゴニストであるため、性ステロイドホルモン受容体に作用することで、視床下部-下垂体-性腺の恒常性を阻害する。さらにこれらの物質は発達段階の神経系に作用し、正常な脳神経発達を阻害して出生後の性ホルモンや生殖行動に関与する^{22,23}。

男児では、妊娠第1三半期の後半に子宮内でおこる masculinization programming window (MPW)の時期におこるアンドロゲン曝露の後に陰茎が分化・発育し、精巣が腹腔内から鼠径を経て陰嚢内へ移動する²⁴。動物実験では、肛門性器間距離(anogenital distance, AGD)がMPWにおけるアンドロゲン曝露によって伸長することから、AGDが性分化の指標となることが示されており、雄のラットのAGDは雌のおよそ2倍になる²⁵。MPWにおける適切なアンドロゲン曝露がなければ、その後の生殖器の正常な分化に支障をきたすことも報告されている²⁵⁻²⁷。精巣および前立腺、精嚢、陰茎の低形成や尿道下裂および停留精巣の発症頻度の増加、テストステロン濃度や造精能の低下が認められ、これらはAGDの短縮に相関していた²⁵⁻²⁸。ヒトにおいてもAGDには性差があり男児で女児より長く、男児のAGDは2歳~2歳半で女児のおよそ2倍となり²⁹⁻³²、その差は体格の成長に伴い縮小するものの成人期でも性差が存在する³³。胎児期のAGDの性差は妊娠11~13週で明らかになり、妊娠17~20週ですでに2倍近い差があることが報告されている³⁴。MPWは妊娠11~13週より前にあり、この時期のアンドロゲン曝露により男児でAGDが女児より伸長すると考えられている。マウスでの実験ではアンドロゲン不感受性の雄ではAGDの伸長が認められなかった³⁵。しかし、Kallmann症候群や5- α 還元酵素欠損等の低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の男性におけるAGDの計測値についてはこれまで報告がない。新生児期の生殖器疾患とAGDとの関連については、健常新生児42名と尿道下裂を有する新生児77名の比較において、健常児に比して尿道下裂児でAGDが短縮していた³⁶。停留精巣のある男児では健常児に比してAGDが短縮しているとの報告がある^{31,37}。しかし、これらの疾患の病因のすべてをアンドロゲン曝露の程度で説明できる訳ではない³⁰。AGDと精子数および生殖能力との関連についての検討では、青年男子の精子の数および質とAGDとは強く相関しており³⁸⁻⁴⁰、AGDは精巣容積(testicular volume, TV)とも相関していた⁴¹。成人男性においてAGDが造精能の強い予測因子であることが示されたことは、MPWにおけるアンドロゲン曝露が生後の生殖能力の決定に重要な役割を果たしていることを示唆している。また、andrology clinicに通院する成人男性116名においてAGDとテストステロン濃度との間に強い相関が認められており³⁹、動物実験でも同様の結果が得られている²⁸。出生時の伸展陰茎長(stretched penile length, PL)はAGDと強く相関しており^{30,31,42}、成人においても同様の結果が報告されている^{33,39,41}。動物においてはヒトよりもAGDとPLに強

い相関が報告されている^{27,28,43}。ヒトでは正確に AGD と PL を計測することが困難であることを反映している可能性があり、更なる情報の蓄積が望まれている。

ヒトの第2指と第4指の比(ratio of second to fourth digit length, 2D/4D)は男児で女児より低下することが知られている⁴⁴。胎児の軟骨組織にはアンドロゲン受容体が存在し、2D/4D の性差は MPW におけるアンドロゲン曝露と、抗ミューラー管ホルモンなどの性腺由来のホルモンによって形成される胎児期のホルモン環境に起因していると考えられている^{45,46}。この仮説は副腎皮質過形成の女児で 2D/4D が小さく⁴⁷、アンドロゲン不感受性症候群の児で 2D/4D が大きいこととも矛盾していない⁴⁸。しかし、健康成人 360 名を対象とした検討では 2D/4D と TV および造精能との間に関連はなく、テストステロン濃度との間にも同様に関連は認められなかった⁴⁹。一方、泌尿器外科手術を施行された 144 名の成人男子を対象とした検討では 2D/4D と PL との間に強い相関が認められた⁵⁰。294 名の就学児童において出生時の臍帯血中の INSL3 濃度が高い群では 2D/4D が有意に小さく、2D/4D は胎児期のライディッヒ細胞の機能を反映している可能性が示唆された⁵¹。動物実験においては、2D/4D は妊娠早期でのアンドロゲン曝露のみでは小さくならず⁵²、出生時の 2D/4D と AGD には相関が認められなかった^{53,54}。

母体因子や化学物質曝露が胎児の性分化に影響を与えている可能性がある。妊娠 11～16 週の人工妊娠中絶胎児の AGD が、母体が喫煙していない例に比べて、母体が喫煙している例の方が長かったことは、母体の喫煙がアンドロゲン曝露に類似した効果を胎児にもたらす可能性を示唆している³⁴。妊娠期間中にストレス環境にあった母体より出生した女児の AGD が新生児期に伸長していたことも、母体に対するストレスが胎児に対してアンドロゲン曝露に類似した作用をもたらす可能性を示唆している⁵⁵。また、子宮内でフタル酸エステル類に曝露があった男児において就学前の AGD が短縮していたことは、胎児期のフタル酸エステル類曝露がアンドロゲン曝露に拮抗する可能性を示唆している³¹。

近年、母体因子や胎児期の化学物質曝露が胎児の発育、発達および性分化に与える影響について研究が進められているが、この影響はいまだ十分に解明されていない。北海道大学では全国に先駆けて「環境と子どもの健康に関する北海道研究」を 2002 年より開始し環境化学物質による次世代影響について(1)泌尿器生殖系の先天異常、(2)神経行動発達、(3)甲状腺機能への影響、(4)免疫・アレルギー性疾患等に焦点を当てて前向きコホート研究を実施してきた⁵⁶。2011 年より環境省による「子どもの健康と環境に関わる全国調査：エコチル調査」が開始され、全国で 10 万人の妊婦とその子どもを調査対象として、子どもが 13 歳になるまでの出生コホート研究を展開している⁵⁷。胎児期から小児期にかけての化学物質曝露をはじめとする環境因子が、妊娠・生殖、先天異常、精神神経発達、免疫・アレルギー、代謝内分泌に与える影響の解明を

目的としている。北海道では、9000 組の親子がエコチル調査に参加している。さらに、2012 年よりエコチルの本調査に参加している妊婦を対象に、各地域のユニットセンターごとでエコチル追加調査が開始され、北海道ユニットでは、本研究を含むエコチル追加調査「環境化学物質と性腺機能に関する研究」が 2012 年より開始された。先行研究の結果から AGD は胎児期のアンドロゲン曝露の影響を反映して性差が認められることから、胎児期の性分化の指標となる身体計測値であると考えられる。また PL、TV、2D/4D も胎児期のアンドロゲン曝露の影響を受けると考えられているため、これらの身体計測値をアウトカムとすることで、特定の母体因子や化学物質曝露が胎児の性分化にもたらす影響を評価することが可能である。

本研究では母体因子と身体計測値(AGD、PL、TV、2D/4D)との関連を解析し、母体因子が胎児の性分化に与える影響を解明することを目的とした。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AGD	anogenital distance
AGD/BL	AGD corrected by birth length
BL	birth length
BW	birth weight
GW	gestational weeks
INSL3	insulin-like 3
MPW	masculinization programming window
PL	stretched penile length
TV	testicular volume
2D/4D	ratio of second to fourth digit length

研究方法

本研究は、北海道大学医学部および環境健康科学研究教育センターにおいて実施される疫学研究として「北海道大学大学院医学研究科・医学部医学科医の倫理委員会」の承認を得て実施した。また本研究に協力可能な分娩施設を 12 施設選定し、各施設の倫理委員会の承認を得た。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、全対象者に対して対面説明を行い書面で同意を得た。

1. 対象と方法

本研究の対象は、2012 年 9 月から 2014 年 4 月の間に、札幌サブユニットにおいて「子どもの健康と環境に関わる全国調査：エコチル調査」への参加に同意した妊婦のうち、本研究(追加調査)への参加に追加で同意した妊婦と出生した新生児である。本研究への参加に同意した 1817 名の妊婦から、北海道大学病院を含む 12 か所の協力分娩施設で出生した先天奇形のない単胎の新生児 1046 名(男児 561 名、女児 485 名)とその母親を解析対象とした。今回の検討に使用した質問票の項目あるいは児の身体計測に欠測値のある例は除外した。

質問票より分娩時の母体年齢、妊娠前の身長と体重、分娩回数、学歴、世帯収入についての情報を得た。また、妊娠初期(10-16 週)および妊娠中期(22-28 週)の喫煙、アルコール摂取、重労働の有無についての情報を得た。

・ 学歴

- | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| ☐ 中学 | ☐ 高校 | ☐ 高等専門学校 | ☐ 専門学校 |
| ☐ 短期大学 | ☐ 大学 | ☐ 大学院(修士・博士) | |

上記の選択肢より、教育年数を 12 年以下(高校卒業まで)か、13 年以上(高等専門学校卒業以上)の 2 群に分けた。

・ 世帯収入

- | | |
|--|--|
| ☐ 200 万円未満 | ☐ 200 万円以上～400 万円未満 |
| ☐ 400 万円以上～600 万円未満 | ☐ 600 万円以上～800 万円未満 |
| ☐ 800 万円以上～1,000 万円未満 | ☐ 1,000 万円以上～1,200 万円未満 |
| ☐ 1,200 万円以上～1,500 万円未満 | ☐ 1,500 万円以上～2,000 万円未満 |
| ☐ 2,000 万円以上 | |

上記の選択肢より、世帯年収を 400 万円未満か、400 万円以上の 2 群に分けた。

・ 喫煙

- ☐ 喫煙したことはない。
- ☐ 以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づく前から止めていた。
吸い始めた年齢は？ □□歳
吸うのを止めた年齢は？ □□歳
平均して毎日何本くらい吸っていましたか？ □□本
- ☐ 以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づいて止めた。
吸い始めた年齢は？ □□歳
最後に吸ったのはいつですか？ □□歳
平均して毎日何本くらい吸っていましたか？ □□本
- ☐ 喫煙を続けている。
吸い始めた年齢は？ □□歳
平均して毎日何本くらい吸っていますか？ □□本

上記の選択肢より、妊娠初期では「以前は吸っていたが、今回の妊娠に気づいて止めた。」と「喫煙を続けている。」に回答した妊婦を喫煙群とした。妊娠中期では「喫煙を続けている。」に回答した妊婦のみを喫煙群とした。

・ 飲酒

- ☐ もともと飲まない。
- ☐ 以前は飲んでいましたが、今回の妊娠に気づく前から止めていた。
- ☐ 以前は飲んでいましたが、今回の妊娠に気づいて止めた。
- ☐ 現在も飲んでいる。

上記の選択肢より、妊娠初期では「以前は飲んでいましたが、今回の妊娠に気づいて止めた。」と「現在も飲んでいる。」に回答した妊婦を飲酒群とした。妊娠中期では「現在も飲んでいる。」に回答した妊婦のみを飲酒群とした。

- ・ 重労働

- ☐ 約 20 キロ以上の物をもつ。

- ☐ 有機溶剤(シンナーや接着剤など)を使う。

- (物質名：)

- ☐ 騒音が激しい。

- (騒音の内容：)

- ☐ 振動工具を扱う。

- (振動工具の内容：)

- ☐ 冷蔵庫や冷凍庫に出入りする。

- ☐ 激しく汗をかくような暑い所で作業をする。

- (内容：)

- ☐ 粉じんを扱う。

- (粉じんの種類・内容：)

妊娠初期および中期で上記のいずれかの労働環境に従事していたと回答した妊婦を重労働群とした。

出生時に児の身長、体重、頭囲の計測を行い、日齢 6 以内に AGD、PL、TV および 2D/4D を計測した。計測は本研究が開始される以前に測定方法に関する講習を受けた医療者が行った。計測には、本研究のために準備した清潔な使い捨ての定規と精巣容積見本を使用した。

- ・ AGD は仰臥位で両側の股関節および膝関節を伸展させ、脚を腹側に軽く押した状態で男児は肛門前縁から陰嚢基部まで、女児では肛門前縁から陰唇小帯後部までの距離を計測した。

- ・ PL は仰臥位で陰茎を手動的に伸展させ恥骨結合から亀頭先端へ定規を押し当て陰茎背面の長さを測定した。陰茎基部の皮下組織が厚い場合は同部を圧迫し、陰茎基部(恥骨結合付近)を十分に露出させた上で測定した。

- ・ TV は本研究で独自に作成した 1.5ml および 0.7ml の容積の球体を用いて行った。触知した精巣と精巣容積見本を比較して、精巣容量を 0.7ml 未満、0.7ml・1.5ml、1.5ml より大きい、非触知の 4 群に分けて判定した。

- ・ 両手の第2指と第4指の指基部のしわから先端までの長さを定規で計測した。第2指の長さ:aを第4指の長さ:bで除し 2D/4D を得た。

2. 統計学的方法

計測結果は平均値±標準偏差で表記した。統計解析には JMP10© statistical software package (SAS, Cary, NC)および IBM SPSS Statistics 18.0 software(SPSS Inc, Chicago, IL)を使用した。平均値の差の検定には Student の t 検定および一元分散分析と Tukey の HSD(honestly significant difference)検定を用いた。カテゴリーデータの比較には Fisher の正確検定を用いた。二変数間の相関分析には Spearman の順位相関係数を用いた。ロジスティック回帰解析により性分化の指標に独立して関連する母体因子の選択を行った。すべての解析の有意水準は 5%未満とした。

研究結果

1. 母体因子と身体計測値の性差

母体因子には男児と女児の間に大きな違いはなかった。出生時の身長(birth length, BL)および出生体重(birth weight, BW)、AGD、身長で補正した AGD(AGD corrected birth length, AGD/BL)は男児で有意に大きかった。2D/4D は男女の間に有意な差はなかった。

2. BL および BW と AGD の関係

男児と女児で BL および BW と AGD の間に正の相関が認められた。

3. PL の分布および AGD と PL の関係

PL の平均値は 25.7 ± 5.6 mm であった。AGD と PL の間に正の相関が認められた。

4. BL および BW で補正した AGD と PL の関係

AGD は BL と BW との間に正の相関が認められた。BL で補正した AGD と PL の間に正の相関が認められた。BW で補正した AGD と PL の間にも正の相関が認められた。

5. 2D/4D と AGD の関係

男児と女児で左右の 2D/4D と AGD の間に相関は認められなかった。

6. 2D/4D と PL の関係

男児で左右の 2D/4D と PL の間に相関は認められなかった。

7. BL および BW と PL の関係

BL および BW と PL との間に相関は認められなかった。

8. TV と AGD の関係

左右の TV でそれぞれ分けた 3 群間で AGD の平均値を比較したが有意な差は認められなかった。

9. TV と PL の関係

左右の TV でそれぞれ分けた 3 群間で PL の平均値を比較したが有意な差は認められなかった。

1 0. 母体因子と AGD および PL との関係

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

1 1. 母体因子と AGD、AGD/BL および PL が下四分位・上四分位であることとの関係

母体因子と、女児の AGD が下四分位(cut off 値 12mm)・上四分位(cut off 値 17mm)、AGD/BL が下四分位(cut off 値 24.2)・上四分位(cut off 値 34.5)、男児の AGD が下四分位(cut off 値 24mm)・上四分位(cut off 値 30mm)、男児の AGD/BL が下四分位(cut off 値 48.2)・上四分位(cut off 値 60.6)、PL が下四分位(cut off 値 22mm)・上四分位(cut off 値 30mm)であることとの関係を解析した。AGD が下四分位である女児では母体の 22-28 週における母体喫煙の割合が高かった。AGD/BL が下四分位の女児では母体の教育年数が 13 年以上である割合が低かった。PL が下四分位である男児では世帯年収が 400 万円以上である割合が高かった。PL が上四分位である男児では母体の妊娠前の BMI が 22 を以上である割合が高く、妊娠 10-16 週における母体喫煙の割合が高かった。

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

る因子として母体の教育年数が13年以上であることが抽出された(オッズ比 0.60, 95%信頼区間 0.38-0.93, p 値 0.023)。換言すると、女兒の AGD/BL が下四分位に入らないことと関連する因子として母体の教育年数が13年以上であることが抽出された。また、PL が上四分位に入ることと関連する因子として、妊娠 10-16 週の母体喫煙が抽出された(オッズ比 1.86, 95%信頼区間 1.16-2.99, p 値 0.010)。

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

1 2. 妊娠 10-16 週における母体喫煙と PL との関係

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

考察

本研究の対象である健康新生児における解析から以下のことが明らかとなった。

- AGD は男児で女児よりも有意に長く、男女それぞれで BL および BW と有意に相関していた。
- PL は AGD と有意に相関し、身長および体重で補正した AGD とも同様の結果であった。BL および BW と PL との間に相関は認められなかった。
- 2D/4D は男児と女児の間に差が認められなかった。
- 2D/4D と AGD および PL との間に相関は認められなかった。
- 左右それぞれで TV によって分けた 3 群間で AGD および PL の平均値に差は認められなかった。
- 女児の AGD/BL が下四分位に入らないことと関連する独立した因子として教育年数が 13 年以上であることが抽出された。
- PL が上四分位に入ることと関連する独立した因子として妊娠 10-16 週における母体喫煙が抽出された。

本研究において AGD は男児の方が女児より長く性差は明らかであった。AGD は胎児期の MPW におけるアンドロゲン曝露により伸長し、妊娠 11-13 週で性差が明らかになり、妊娠 17-20 週でその差は最大になり男児で女児の 2 倍になることが報告されている³⁴。本研究における男児の AGD の平均値は 26.8 ± 5.3 mm (BW の平均値は 3168 ± 16 g, BL の平均値は 49.3 ± 2.1 cm)、女児の AGD の平均値は 14.3 ± 3.7 mm (BW の平均値は 3032 ± 395 g, BL の平均値は 48.6 ± 2.1 cm) であり既報と矛盾しない差が認められた。出生後の AGD には 24-30 か月齢まで男女で 2 倍近い差があり³⁰、成人ではその差は縮小するが性差は維持される³³。本研究における男女の AGD はそれぞれ身長および体重と相関しており、これは既報とも一致していた³⁴。Thankamony らの新生児に関する報告では、英国で出生した 285 名の男児の AGD の平均値は 19.8 ± 6.1 mm (BW の平均値は 3590 ± 460 g, BL の平均値は 51.6 ± 2.0 cm)、279 名の女児の AGD の平均値は 9.1 ± 2.8 mm (BW の平均値は 3470 ± 430 g, BL の平均値は 48.7 ± 2.2 cm) であった³⁰。Salazar-Martinez らの報告ではメキシコで出生した 45 名の男児の新生児で AGD の平均値は 21.0 ± 3.0 mm (BW の平均値は 3060 ± 440 g, BL の平均値は 51.6 ± 2.0 cm)、42 名の女児の新生児で AGD の平均値は 11.0 ± 2.0 mm (BW の平均値は 3070 ± 408 g, BL の平均値は 48.6 ± 1.4 cm) であった²⁹。AGD は体格の影響を受け人種差があると考えられている。

本研究で得られた PL の平均値は 25.7 ± 5.6 mm であった。本邦の Fujieda らの報告

では日齢 5 に計測された 25 名の PL の平均値は 29.0 ± 5.0 mm⁵⁸、Matsuo らの報告では 547 名の健康新生児において日齢 1 から 7 に計測された PL の平均値は $30.6 \text{ mm} \pm 2.6$ mm であった⁵⁹。本研究の計測値が本邦の既報より短い結果となっている理由の一つとして、日本人の新生児期の PL が経年的に短くなっている可能性が考えられる。Matsuo らは対象のうち 63 名で生後 12 時間以内と日齢 1 から 7 での計測値を検証し 3.0 mm (95%信頼区間: 2.2-3.4) の差があったことを確認している。生後 12 時間以内の新生児では浮腫の影響があり、PL の計測に影響を及ぼすと考えられている⁵⁹。本研究における身体計測は出生時から日齢 6 までの間に行われており、生後早期の浮腫により PL が短く計測された可能性が考えられる。また、Matuso らは対象となった健康新生児 547 名のうち 3.7% の児で浮腫の影響がなくとも、恥骨結合表面の皮下組織が厚く陰茎が埋没しているため計測が困難であったことを報告している⁵⁹。このような埋没陰茎は健康新生児に一定の頻度で存在すると考えられている⁵⁹。陰茎長の計測方法には伸展陰茎長と弛緩陰茎長の二つがあり、伸展陰茎長は勃起時の陰茎長に強く相関するとされているが、伸展陰茎長と弛緩陰茎長との間で計測結果は差が少なかったことも報告されている⁶⁰。Feldman らの米国で出生した新生児の PL の平均値は 35.0 ± 4.0 mm⁶¹、Boas らの北欧白人の新生児の弛緩陰茎長の平均値は 34.9 ± 4.0 mm であった⁶⁰。Chen らの報告では中国系カナダ人新生児の PL の平均値は 31.0 ± 3.0 mm、白人系カナダ人新生児の PL の平均値は 34.0 ± 3.0 mm で人種差が認められた⁶²。本研究では身長および体重と PL に相関は認められなかった。Matsuo らは身長で PL を補正後に日本人と中国人系カナダ人、白人系カナダ人、デンマーク人、フィンランド人、イスラエル人新生児との間で比較を行ったが日本人および中国系カナダ人で有意に短かった。以上より出生時の体格で補正しても PL の人種差があることが考えられた。本研究では AGD は PL と強く相関しており、これは既報と一致した結果であった^{30,31,42}。また身長および体格で補正した AGD にも既報と同じく PL と相関が認められた³⁴。

本研究では 2D/4D に関しては性差が認められなかった。Manning らは 2 歳をこえた男児では 2D/4D 比の平均は 0.98 となり第 2 指に比して第 4 指が長くなる傾向があり、2 歳をこえた女児では 2D/4D 比の平均は 1.00 となり第 2 指と第 4 指が等しくなる傾向があることを報告している。2D/4D は男性では精液中の精子数と血中のテストステロン濃度とは負の相関があり、男女で性差・年齢・身長・体重で調整した後の解析でも血中の黄体化ホルモンおよびエストロゲン濃度と正の相関があった⁴⁴。子宮内で性が決定した後に胎児精巣より Insulin-like 3 (INSL3) が産生されるようになる⁶³。就学児童において臍帯血中の INSL3 濃度が高い群では 2D/4D が有意に小さかった⁵¹。2D/4D の性差は MPW におけるアンドロゲン曝露と、抗ミューラー管ホルモンなどの性

腺由来のホルモンによって形成される胎児期のホルモン環境に起因していると考えられているが^{45,46}。しかし、動物実験において妊娠早期でのアンドロゲン曝露のみでは 2D/4D は小さくならず⁵²、また出生時の 2D/4D と AGD には相関が認められなかった^{53,54}。新生児期の 2D/4D の性差がまだ小さいために、本研究では有意な差が認められなかった可能性がある。

本研究では左右それぞれで TV によって分けた 3 群間で AGD および PL の平均値に差が認められなかった。Fujieda らの報告では TV は生後 3 か月までの間に発育し、以降は 1 歳から 11 歳までは緩徐に発育し 11 歳以降にまた急速に成長を遂げていた⁶⁴。Matsuo らの報告では新生児の TV の 90%tile に相当するのは 2.0ml であった。9.5 歳の TV の平均値 2ml に対して 10.5 歳の平均値 2.8ml、11.5 歳の平均値 4.6ml と急速に発育し、これはスイス人男児の TV の発育より約 1 年早かった⁶⁵。本研究では 0.7ml 未満、0.7-1.5ml、1.5ml< の 3 群に分けて計測を行ったがそれぞれの群の間で AGD および PL の平均値に差はなかった。成人では AGD は TV と相関する報告ことが報告されているが⁴¹、前述の TV の発育年齢を考慮すると^{64 65}、新生児期にはまだ TV と AGD や PL との相関が小さい可能性が考えられた。

本研究では女児の AGD/BL が下四分位に入らないことと関連する独立した因子として教育年数が 13 年以上であることが抽出された。先行研究では妊娠期間中に精神的ストレス環境にあった母体より出生した女児の AGD が新生児期に伸長していたことが報告されている⁵⁵。教育年数と精神的ストレスの関連は明らかではないが、母体の教育歴と女児の性分化についての関係は今後の検討課題である。また、成人女性で AGD が伸張していることと、多嚢胞性卵巣症候群との関連が報告されている⁵⁵。胎児期のアンドロゲン曝露の女児の生殖能力に対する影響については更なる検討が必要である。

Fowler らは妊娠 11-20 週の第 2 三半期に選択的に中絶された健常な発育していた胎児の検討で、AGD およびボンデラル指数で補正した AGD が、喫煙している母体から出生した児で有意に長いことを報告しているおり、これは胎児の喫煙への曝露がアンドロゲン曝露の効果を増強させたことを示唆している³⁴。しかし、妊娠 17-20 週に中絶された男児の AGD には母体喫煙の有無で差が認められなかった。本研究では胎児期の母体喫煙の有無で AGD/BL の差は認められなかった(表 2)。

本研究においては妊娠 10-16 週で母体喫煙があった児は有意に PL が長かった(表 2)。また、PL が 30mm をこえる(561 名の男児の PL 上四分位に相当)男児では母体が妊娠 10-16 週で喫煙していた割合が高かった(図 14-A)。さらに、561 名の男児におい

て第2四分位に相当する PL 25mm 未満に該当する児の数は妊娠 10-16 週に喫煙していた母体で明らかに少なかった(図 14-B)。最終的に、11 の母体因子のうち妊娠 10-16 週における母体喫煙歴が、PL が 30mm をこえることに独立して関連する因子として抽出され、この期間の喫煙が胎児期のアンドロゲン曝露に影響を与えている可能性が示唆された。妊娠 10-16 週の母体の喫煙がアンドロゲン曝露や PL の発育にどのように影響したかは本研究では明らかにはなっていない。既報では胎児期の喫煙曝露は尿道下裂や停留精巣の頻度を増加させ^{66 67}、妊孕能力に有害な影響あたえることが報告されている⁶⁸。Fowler らは妊娠早期の MPW の時期での曝露と、この時期における胎児の感受性を AGD 伸長の機序の仮説としている。本研究において PL が下四分位に入る独立した危険因子として喫煙の有無が抽出されなかったことから、喫煙曝露のみが PL の伸長に影響を及ぼしているのではないと考えられる。また Fowler らの報告では週数を経て AGD の差がなくなっており、喫煙がどの時期においてアンドロゲン作用に影響しているかについては更なる検討の必要がある。本研究における喫煙の有無は質問票の情報のみから判断した。母体喫煙が胎児の AGD や PL に与える影響に関する今後の研究においては、生体試料中のニコチン代謝産物濃度を客観的な曝露指標とすること、臍帯血中性ステロイドホルモン濃度を交絡因子としてアウトカムとの解析を進めていくことなどが望まれる。

総括および結論

本研究で対象となった健康新生児から以下のことが明らかとなった。

- AGD は男児で女児よりも有意に長く、男女それぞれで BL および BW と有意に相関していた。
- PL は AGD と有意に相関し、身長および体重で補正した AGD とも同様の結果であった。BL および BW と PL の間には相関は認められなかった。
- 2D/4D は男児と女児で差がみられなかった。2D/4D と AGD および PL との間に相関は認められなかった。
- 左右それぞれの TV で分けた 3 群の間で、AGD および PL の平均値に差は認められなかった。
- 女児の AGD/BL が下四分位に入らないことと関連する独立した因子として教育年数が 13 年以上であることが抽出された。
- PL が上四分位に入ることと関連する独立した因子として妊娠 10-16 週における母体喫煙が抽出された。

本研究において AGD は男児のほうが女児より長く性差は明らかであった。本研究では男女の AGD は身長および体重に相関しており、これは既報とも一致していた。

本研究で得られた PL の平均値は 25.7mm であった。本研究における PL の計測値が本邦における既報より短い結果であった理由の一つとして、日本人の新生児期の PL が経年的に短くなっている可能性が考えられる。また、本研究における身体計測は出生時から日齢 6 までの間に行われており生後早期の浮腫のために PL がより短く計測された可能性がある。

本研究では PL と AGD は有意に相関しており、これは既報と一致した結果であった。また身長および体格で補正しても既報と同じく相関が認められた。

本研究では 2D/4D に関しては性差が認められなかった。新生児期の 2D/4D の性差がまだ小さいために、検出されなかった可能性が考えられた。

本研究では左右それぞれの TV で分けた 3 群の間で、AGD および PL の平均値に差は認められなかった。新生児期にはまだ AGD や PL との相関が小さい可能性が考えられた。

本研究では 11 項目の母体因子を用いた解析から、女児の AGD/BL が下四分位に入らないことに関連する独立した因子として教育年数が 13 年以上であることが抽出された。母体の教育歴と女児の性分化についての関係は今後の検討課題である。また、PL が上四分位に入ることに関連する独立した因子として妊娠 10-16 週における母体喫煙が抽出され、妊娠 10-16 週の母体喫煙が胎児期のアンドロゲン曝露に影響を与える可能性が示唆された。妊娠 10-16 週における母体喫煙がアンドロゲン曝露や PL の

発育にどのように影響したかは本研究では明らかにはなっていない。PLが下四分位に入る独立した因子として喫煙の有無が抽出されなかったことから、喫煙曝露のみがPLの伸長に影響を及ぼしているのではないことが示唆された。また、喫煙がどの時期においてアンドロゲン作用に影響しているかについては更なる検討の必要がある。母体喫煙が胎児のAGDやPLに与える影響に関する今後の研究においては、生体試料中のニコチン代謝産物濃度を客観的な曝露指標とすること、臍帯血中性ステロイドホルモン濃度を交絡因子としてアウトカムとの解析を進めていくことなどが望まれる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究にご協力をいただきましたすべてのお母様とそのお子様に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて下さり、ご指導賜りました、北海道大学大学院医学研究科産科・生殖医学分野教授 水上尚典先生、北海道大学病院周産母子センター診療教授 長和俊先生に深く感謝致します。また直接様々なご指導を下さりました、北海道大学大学院医学研究科小児科学分野教授 有賀正先生、北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野名誉教授 野々村克也先生、同教授 篠原信雄先生、北海道大学環境健康科学研究教育センター特別招聘教授 岸玲子先生に深く感謝致します。また本研究のエコチル追加調査につきましてご指導をくださりました北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野 三井貴彦先生、守屋仁彦先生、橘田岳也先生、佐藤早基子様、今井紋子様、北海道大学環境健康科学研究教育センター 荒木敦子先生、宮下ちひろ先生、伊藤佐智子先生に深く感謝致します。また様々な面から研究をサポートしてくださいました盛一享徳先生、秋元琢真先生、兼次洋介先生、卯月ゆたか先生、早坂格先生にお礼申し上げます。

本研究は環境省の子どもの健康と環境に関する全国調査に係る環境研究総合推進費【5c-1252,5-1554】の一部助成を受けて行われました。本論文に示された見解は著者自らのものであり環境省の見解ではありません。

引用文献

- 1 Lieberman, E., Gremy, I., Lang, J. M. & Cohen, A. P. Low birthweight at term and the timing of fetal exposure to maternal smoking. *Am. J. Public. Health* **84**, 1127-1131 (1994).
- 2 England, L. J. *et al.* Effects of smoking reduction during pregnancy on the birth weight of term infants. *American journal of epidemiology* **154**, 694-701 (2001).
- 3 Cnattingius, S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* **6 Suppl 2**, S125-140 (2004).
- 4 Bernstein, I. M. *et al.* Maternal smoking and its association with birth weight. *Obstetrics and gynecology* **106**, 986-991 (2005).
- 5 厚生労働省雇用均等・児童家庭局. 平成 12 年乳幼児身体発育調査報告書. (2001) .
- 6 Perera, F. P., Jedrychowski, W., Rauh, V. & Whyatt, R. M. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environmental health perspectives* **107 Suppl 3**, 451-460 (1999).
- 7 May, P. A. *et al.* Prevalence and characteristics of fetal alcohol spectrum disorders. *Pediatrics* **134**, 855-866 (2014).
- 8 Jones, K. L. & Smith, D. W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet (London, England)* **302**, 999-1001 (1973).
- 9 Abel, E. Paternal contribution to fetal alcohol syndrome. *Addiction biology* **9**, 127-133; discussion 135-126 (2004).
- 10 Weidner, I. S., Moller, H., Jensen, T. K. & Skakkebaek, N. E. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environmental health perspectives* **106**, 793-796 (1998).
- 11 Maqbool, F., Mostafalou, S., Bahadar, H. & Abdollahi, M. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life. Sci* 2015.10.022 (2015).
- 12 Herbst, A. L., Ulfelder, H. & Poskanzer, D. C. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *The New England journal of medicine* **284**, 878-881 (1971).

- 13 Wilcox, A. J., Baird, D. D., Weinberg, C. R., Hornsby, P. P. & Herbst, A. L. Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *The New England journal of medicine* **332**, 1411-1416 (1995).
- 14 Newbold, R. R., Bullock, B. C. & McLachlan, J. A. Uterine adenocarcinoma in mice following developmental treatment with estrogens: a model for hormonal carcinogenesis. *Cancer research* **50**, 7677-7681 (1990).
- 15 Khan, S. A., Ball, R. B. & Hendry, W. J., 3rd. Effects of neonatal administration of diethylstilbestrol in male hamsters: disruption of reproductive function in adults after apparently normal pubertal development. *Biology of reproduction* **58**, 137-142 (1998).
- 16 Akingbemi, B. T., Ge, R., Klinefelter, G. R., Zirkin, B. R. & Hardy, M. P. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 775-780 (2004).
- 17 Dostal, L. A., Chapin, R. E., Stefanski, S. A., Harris, M. W. & Schwetz, B. A. Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl)phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicology and applied pharmacology* **95**, 104-121 (1988).
- 18 Li, L. H., Jester, W. F., Jr., Laslett, A. L. & Orth, J. M. A single dose of Di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decreases cyclin D2 expression. *Toxicology and applied pharmacology* **166**, 222-229 (2000).
- 19 Lin, H. *et al.* Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7218-7222 (2008).
- 20 Kjeldsen, L. S., Ghisari, M. & Bonefeld-Jorgensen, E. C. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and applied pharmacology* **272**, 453-464 (2013).
- 21 Biegel, L. B., Liu, R. C., Hurtt, M. E. & Cook, J. C. Effects of ammonium perfluorooctanoate on Leydig cell function: in vitro, in vivo, and ex vivo studies. *Toxicology and applied pharmacology* **134**, 18-25 (1995).
- 22 Cooke, P. S., Zhao, Y. D. & Hansen, L. G. Neonatal polychlorinated biphenyl treatment increases adult testis size and sperm production in the rat.

- Toxicology and applied pharmacology* **136**, 112-117 (1996).
- 23 Crisp, T. M. *et al.* Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental health perspectives* **106 Suppl 1**, 11-56 (1998).
 - 24 Dean, A. & Sharpe, R. M. Clinical review: Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: relationship to male reproductive development and its disorders. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **98**, 2230-2238 (2013).
 - 25 Welsh, M. *et al.* Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *The Journal of clinical investigation* **118**, 1479-1490 (2008).
 - 26 Macleod, D. J. *et al.* Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *International journal of andrology* **33**, 279-287 (2010).
 - 27 van den Driesche, S. *et al.* Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. *International journal of andrology* **34**, e578-586 (2011).
 - 28 Drake, A. J. *et al.* Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology* **150**, 5055-5064 (2009).
 - 29 Salazar-Martinez, E., Romano-Riquer, P., Yanez-Marquez, E., Longnecker, M. P. & Hernandez-Avila, M. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environmental health : a global access science source* **3**, 8 (2004).
 - 30 Thankamony, A., Ong, K. K., Dunger, D. B., Acerini, C. L. & Hughes, I. A. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environmental health perspectives* **117**, 1786-1790 (2009).
 - 31 Swan, S. H. *et al.* Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental health perspectives* **113**, 1056-1061 (2005).
 - 32 Papadopoulou, E. *et al.* Anogenital distances in newborns and children from Spain and Greece: predictors, tracking and reliability. *Paediatric and perinatal epidemiology* **27**, 89-99 (2013).

- 33 Eisenberg, M. L., Hsieh, T. C. & Lipshultz, L. I. The relationship between anogenital distance and age. *Andrology* **1**, 90-93 (2013).
- 34 Fowler, P. A., Bhattacharya, S., Flannigan, S., Drake, A. J. & O'Shaughnessy, P. J. Maternal cigarette smoking and effects on androgen action in male offspring: unexpected effects on second-trimester anogenital distance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **96**, E1502-1506 (2011).
- 35 Yeh, S. *et al.* Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13498-13503 (2002).
- 36 Hsieh, M. H. *et al.* Caucasian male infants and boys with hypospadias exhibit reduced anogenital distance. *Human reproduction (Oxford, England)* **27**, 1577-1580 (2012).
- 37 Hsieh, M. H., Breyer, B. N., Eisenberg, M. L. & Baskin, L. S. Associations among hypospadias, cryptorchidism, anogenital distance, and endocrine disruption. *Current urology reports* **9**, 137-142 (2008).
- 38 Mendiola, J., Stahlhut, R. W., Jorgensen, N., Liu, F. & Swan, S. H. Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in Rochester, New York. *Environmental health perspectives* **119**, 958-963 (2011).
- 39 Eisenberg, M. L., Jensen, T. K., Walters, R. C., Skakkebaek, N. E. & Lipshultz, L. I. The relationship between anogenital distance and reproductive hormone levels in adult men. *The Journal of urology* **187**, 594-598 (2012).
- 40 Eisenberg, M. L., Hsieh, M. H., Walters, R. C., Krasnow, R. & Lipshultz, L. I. The relationship between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men. *PloS one* **6**, e18973 (2011).
- 41 Eisenberg, M. L., Shy, M., Walters, R. C. & Lipshultz, L. I. The relationship between anogenital distance and azoospermia in adult men. *International journal of andrology* **35**, 726-730 (2012).
- 42 Alaei, E., Gharib, M. J. & Fouladinejad, M. Penile length and anogenital distance in male newborns from different Iranian ethnicities in golestan province. *Iran Red Crescent Med J* **16**, e16729 (2014).
- 43 Welsh, M., MacLeod, D. J., Walker, M., Smith, L. B. & Sharpe, R. M.

- Critical androgen-sensitive periods of rat penis and clitoris development. *International journal of andrology* **33**, e144-152 (2010).
- 44 Manning, J. T., Scutt, D., Wilson, J. & Lewis-Jones, D. I. The ratio of 2nd to 4th digit length: a predictor of sperm numbers and concentrations of testosterone, luteinizing hormone and oestrogen. *Human reproduction (Oxford, England)* **13**, 3000-3004 (1998).
- 45 Breedlove, S. M. Minireview: Organizational hypothesis: instances of the fingerpost. *Endocrinology* **151**, 4116-4122 (2010).
- 46 Ben-Hur, H. *et al.* Estrogen, progesterone and testosterone receptors in human fetal cartilaginous tissue: immunohistochemical studies. *Calcified tissue international* **60**, 520-526 (1997).
- 47 Okten, A., Kalyoncu, M. & Yaris, N. The ratio of second- and fourth-digit lengths and congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Early human development* **70**, 47-54 (2002).
- 48 Berenbaum, S. A., Bryk, K. K., Nowak, N., Quigley, C. A. & Moffat, S. Fingers as a marker of prenatal androgen exposure. *Endocrinology* **150**, 5119-5124 (2009).
- 49 Bang, A. K. *et al.* A study of finger lengths, semen quality and sex hormones in 360 young men from the general Danish population. *Human reproduction (Oxford, England)* **20**, 3109-3113 (2005).
- 50 Choi, I. H. *et al.* Second to fourth digit ratio: a predictor of adult penile length. *Asian journal of andrology* **13**, 710-714 (2011).
- 51 Mitsui, T. *et al.* Effects of prenatal Leydig cell function on the ratio of the second to fourth digit lengths in school-aged children. *PloS one* **10**, e0120636 (2015).
- 52 Abbott, A. D., Colman, R. J., Tiefenthaler, R., Dumesic, D. A. & Abbott, D. H. Early-to-mid gestation fetal testosterone increases right hand 2D:4D finger length ratio in polycystic ovary syndrome-like monkeys. *PloS one* **7**, e42372 (2012).
- 53 Hurd, P. L. *et al.* Intrauterine position effects on anogenital distance and digit ratio in male and female mice. *Archives of sexual behavior* **37**, 9-18 (2008).
- 54 Manno, F. A., 3rd. Measurement of the digit lengths and the anogenital distance in mice. *Physiology & behavior* **93**, 364-368 (2008).
- 55 Barrett, E. S. *et al.* Prenatal exposure to stressful life events is associated

- with masculinized anogenital distance (AGD) in female infants. *Physiology & behavior* **114-115**, 14-20 (2013).
- 56 Kishi, R. *et al.* Exploiting gene-environment interaction to detect adverse health effects of environmental chemicals on the next generation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **102**, 191-203 (2008).
- 57 Kawamoto, T. *et al.* Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). *BMC public health* **14**, 25 (2014).
- 58 Fujieda, K. & Matsuura, N. Growth and maturation in the male genitalia from birth to adolescence. II. Change of penile length. *Acta paediatrica Japonica; Overseas edition* **29**, 220-223 (1987).
- 59 Matsuo, N., Ishii, T., Takayama, J. I., Miwa, M. & Hasegawa, T. Reference standard of penile size and prevalence of buried penis in Japanese newborn male infants. *Endocrine journal* **61**, 849-853 (2014).
- 60 Boas, M. *et al.* Postnatal penile length and growth rate correlate to serum testosterone levels: a longitudinal study of 1962 normal boys. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **154**, 125-129 (2006).
- 61 Feldman, K. W. & Smith, D. W. Fetal phallic growth and penile standards for newborn male infants. *The Journal of pediatrics* **86**, 395-398 (1975).
- 62 Cheng, P. K. & Chanoine, J. P. Should the definition of micropenis vary according to ethnicity? *Hormone research* **55**, 278-281 (2001).
- 63 Anand-Ivell, R., Ivell, R., Driscoll, D. & Manson, J. Insulin-like factor 3 levels in amniotic fluid of human male fetuses. *Human reproduction (Oxford, England)* **23**, 1180-1186 (2008).
- 64 Fujieda, K. & Matsuura, N. Growth and maturation in the male genitalia from birth to adolescence. I. Change of testicular volume. *Acta paediatrica Japonica; Overseas edition* **29**, 214-219 (1987).
- 65 Matsuo, N., Anzo, M., Sato, S., Ogata, T. & Kamimaki, T. Testicular volume in Japanese boys up to the age of 15 years. *European journal of pediatrics* **159**, 843-845 (2000).
- 66 Brouwers, M. M. *et al.* Risk factors for hypospadias. *European journal of pediatrics* **166**, 671-678 (2007).
- 67 Jensen, M. S., Toft, G., Thulstrup, A. M., Bonde, J. P. & Olsen, J. Cryptorchidism according to maternal gestational smoking. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* **18**, 220-225 (2007).

- 68 Jensen, T. K. *et al.* Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced semen quality and testis size in adulthood: a cross-sectional study of 1,770 young men from the general population in five European countries. *American journal of epidemiology* **159**, 49-58 (2004).