



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	胎児期における内分泌かく乱化学物質曝露が性分化へ与える影響に関する研究
Author(s)	小串, 陽子
Description	配架番号 : 2512
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14049号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14049
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77887
Type	doctoral thesis
File Information	Yoko_Ogushi.pdf



学位論文

胎児期における内分泌かく乱化学物質曝露が性分化へ与える影響に関する研究

(Studies on effects of prenatal exposure to endocrine-disrupting
chemicals on the sex differentiation)

2020 年 3 月

北海道大学

小串 陽子

学位論文

胎児期における内分泌かく乱化学物質曝露が性分化へ与える影響に関する研究
(Studies on effects of prenatal exposure to endocrine-disrupting
chemicals on the sex differentiation)

2020 年 3 月
北海道大学
小串 陽子

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
第 I 章	
緒言	10 頁
方法	13 頁
結果	17 頁
考察	24 頁
第 II 章	
緒言	26 頁
方法	28 頁
結果	31 頁
考察	39 頁
結論	42 頁
謝辞	44 頁
利益相反	45 頁
引用文献	46 頁

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。

1. Yoko Nishimura, Kimihiko Moriya, Sumitaka Kobayashi, Atsuko Araki, Fumihiro Sata, Takahiko Mitsui, Sachiko Itoh, Chihiro Miyashita, Kazutoshi Cho, Masafumi Kon, Michiko Nakamura, Takeya Kitta, Sachiyo Murai, Reiko Kishi, Nobuo Shinohara. Association between *ESR1* polymorphisms and second to fourth digit ratio in school-aged children in the Hokkaido Study. *Steroids* **141**:55-62 (2019).
2. Yoko Nishimura, Kimihiko Moriya, Sumitaka Kobayashi, Atsuko Araki, Fumihiro Sata, Takahiko Mitsui, Sachiko Itoh, Chihiro Miyashita, Kazutoshi Cho, Masafumi Kon, Michiko Nakamura, Takeya Kitta, Sachiyo Murai, Reiko Kishi, Nobuo Shinohara. The association between prenatal phthalate esters and bisphenol A exposure and polymorphisms in the *ESR1* gene on second to fourth digit ratio in school-aged children: data from the Hokkaido Study. *Steroids* (投稿中) .

要旨

【背景と目的】近年、男児の外陰異常である停留精巣や尿道下裂の増加や思春期発来の早期化など性腺機能の異常の増加が報告され、その原因のひとつとして内分泌かく乱化学物質（EDCs：endocrine disrupting chemicals）の胎児期曝露の影響が懸念されている。EDCsの一部にはエストロゲン受容体（ER：estrogen receptor）アゴニスト作用を有する化学物質が存在するけれどもヒトの性腺機能への影響は未だ不明な点が多い。EDCsによる影響は一塩基多型（single nucleotide polymorphism、以下SNP）などの遺伝的な個体差も関連すると考えられている。胎児期性ホルモン曝露の指標として用いられるのがヒト第2指と第4指の比（以下、2D:4D）であり、通常女性よりも男性で低値となる。1998年にManningらは2-25歳の800人分の2D:4Dの評価を行い、2D:4Dが胎児期アンドロゲンと負の相関を・胎児期エストロゲン濃度と正の相関を示すことを報告した。動物実験ではアンドロゲン受容体（AR：androgen receptor）が2D:4Dを低下させ、ERが2D:4Dを上昇させることが報告されている。2D:4Dは胎児期アンドロゲン曝露指標として主に使用されたためAR遺伝子多型との関連は評価されてきたが、ER遺伝子SNPとの関連を評価した報告や胎児期EDCs曝露・ER遺伝子SNPと2D:4Dとの関連を評価した報告はほとんどない。体内で主要な活性を持つER α をコードする*ESR1*遺伝子SNPにはrs2234693（T>C）、rs9340799（A>G）およびrs2077647（A>G）があり、尿道下裂や前立腺癌・乳癌など性ホルモン疾患との関連が指摘されている。本研究は、研究（Ⅰ）において*ESR1*遺伝子SNPによる2D:4Dへの影響を検討し、次に研究（Ⅱ）においてERアゴニスト作用を持つEDCsであるフタル酸エステル類およびビスフェノールA（BPA：bisphenol A）の胎児期曝露が2D:4Dに与える影響、および胎児期曝露と*ESR1*遺伝子SNPが2D:4Dに与える影響を評価することを目的とした。

【対象と方法】本研究は2002-2012年に北海道内37産科医療機関を受診した20926人の妊婦が登録された前向き出生コホート「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」を用いた。2003年5月-2006年11月までに出生した児8663人を対象とした。7歳時に連絡可能な5044人に両手コピーの発送依頼を行い1983人から返却を得た（返却率39.3%）。研究（Ⅰ）では臍帯血が保管されかつ両手コピーのある1800人の児を、研究（Ⅱ）では研究（Ⅰ）の対象者のうち母親の妊娠初期血液中フタル酸エステル類およびBPA濃度を測定していた623人の児を対象とした。妊娠前BMI・出産回数・世帯年収・最終学歴・妊娠初期喫煙お

よび飲酒などの母の情報を妊娠初期の自記式調査票から、出産時年齢・出生週数・出生体重・児の性別などの情報は出産時診療記録から得た。2D:4D測定は2人の測定者により測定した。左右の2D:4Dを測定後、両者の平均値を平均2D:4Dとして算出した。保存臍帯血からDNAを抽出し、3つの*ESR1*遺伝子SNPはTaqMan法で解析した。胎児期曝露、遺伝子多型および2D:4Dとの関連を重回帰分析で検討し、調整因子は研究（Ⅰ）では児の性別・出生体重・母の妊娠初期喫煙および飲酒、さらに研究（Ⅱ）では（Ⅰ）の調整因子に母の出産時年齢を加えた。フタル酸エステル類代謝産物とBPA濃度を中央値で高曝露群・低曝露群の2群に分けて統計解析を行った。統計学的有意水準は p 値 <0.05 とし、多重比較の場合はボンフェローニ補正を用いて統計学的有意を判断した。

【結果】研究（Ⅰ）；男児 926 人・女児 874 人で平均および左右 2D:4D とも男児が女児より有意に低値(平均：93.2% vs. 94.6%、右：93.5% vs. 94.9% 左：92.9% vs. 94.4%、いずれも $p < 0.001$)であった。rs9340799 (AG/GG vs. GG) において、GG 型の児は AA/AG 型の児と比較して平均 2D:4D が 0.63%低下した (95%CI:-1.12、-0.14)。特に男児では AG/GG 型と比較して GG 型は平均 2D:4D が 0.78%低下した (95%CI:-1.41、-0.15)。次に右 2D:4D では、GG 型の児は AA/AG 型の児と比較して 0.82%低下 (95%CI:-1.38、-0.26)、男児でも同様の傾向を認めた (0.96%低下、95%CI:-1.68、-0.24)。研究（Ⅱ）；フタル酸エステル類代謝産物および BPA 濃度と 2D:4D との間に関連は認めなかった。rs2077647 (AA vs. AG/GG) において、mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) 高曝露群かつ AG/GG 型を持つ男児が、MEHP 低曝露群かつ AA 型を持つ男児と比較して平均 2D:4D が 1.51%上昇した (95% CI: 0.40、2.63)。同様の傾向が Σ di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) 高曝露群かつ rs2077647 の AG/GG 型を持つ男児と、 Σ DEHP 低曝露群かつ rs2077647 の AA 型を持つ男児との比較においても認められた (1.37%上昇、95% CI: 0.25、2.49)。しかし、MEHP および Σ DEHP と *ESR1* 遺伝子 SNP との間に明らかな遺伝環境交互作用は認めなかった。女児では *ESR1* 遺伝子 SNP と 2D:4D との間に関連を認めず、また胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露・*ESR1* 遺伝子 SNP・2D:4D との間にも有意な関連を認めなかった。

【考察】本研究は胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露、*ESR1* 遺伝子 SNP、2D:4D との関連を検討した初めての報告である。先行研究において rs9340799A アレルと rs2077647G アレルで $ER\alpha$ 活性化が報告されている。また DEHP の $ER\alpha$ アゴニスト作用も報告されている。研究（Ⅰ）において rs9340799 の GG 型男児の 2D:4D が有意に低下した理由としては、A アレルを保持する児と比較すると GG

型の児において ER α 活性が低いため、ER α による指長抑制作用の減弱や AR による伸長作用の相対的な増強により 2D:4D が低下したと考えられた。研究（Ⅱ）の rs2077647G アレルを持ち DEHP 高曝露の男児 2D:4D が高値を示した理由としては、rs2077647G アレルにおける ER α 活性化と DEHP による ER α へのアゴニスト作用の 2 つの機序が推測された。

【結論】 rs9340799 は 2D:4D 決定に影響を及ぼしていた。胎児期 DEHP 曝露が rs2077647G アレル持つ男児 2D:4D に影響を認めた。本研究は胎児期 EDCs 曝露による性分化への影響を受ける可能性のある母児に対する曝露低減や生活習慣指導などの今後の予防対策に寄与する可能性があると考えられた。

略語表

AR: androgen receptor

BPA: bisphenol A

cx-MiNP: mono-(4-methyl-7-carboxyheptyl) phthalate

DEHP: di(2-ethylhexyl) phthalate

EDCs: endocrine disrupting chemicals

ER: estrogen receptor

ESR1: estrogen receptor 1

MDL: method detection limits

MBzP: mono-benzyl phthalate

MECPP: mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate

MEHP: mono-(2-ethylhexyl) phthalate

MEHHP: mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate

MiBP: mono-isobutyl phthalate

MnBP: mono-n-butyl phthalate

SNP: single nucleotide polymorphism

2D:4D: ratio of the lengths of the second and fourth digits

緒言

近年、男児の外陰異常である停留精巣や尿道下裂の増加や思春期発来の早期化など性腺機能の異常の増加が報告されている(Acerini et al., 2009; Arch Dis Child, 2009, Källén et al., 1986; Acta Paediatr Scand Suppl, 1986)。その原因のひとつとして胎児期における内分泌かく乱化学物質(EDCs: endocrine disrupting chemicals)の胎児期曝露が児の性腺機能や性分化などへ影響を与えているのではないかと懸念されている(Hotchkiss et al., 2008; Toxicol Sci, 2008, Rignell-Hydbom et al., 2012; PLoS One, 2012)。EDCsの一部にはエストロゲン様作用を有するものや、性腺機能への影響を及ぼす化学物質が存在することが知られている。また EDCs による人体への影響の一部は、一塩基多型(single nucleotide polymorphism、以下 SNP)などの遺伝的感受性に依存することが明らかになっている(Xie et al., 2015; Environ Res, 2015)。World Health Organization (WHO)は2012年にEDCsによる潜在的なヒトおよび野生動物への影響について報告した(Bergman Å et al., 2012; World's Health Organization, 2012)。しかしながら、動物実験ではEDCsによる性腺機能への影響が数多く報告されているが、ヒトへの影響は未だ不明な点が多い。上記のような背景から、胎児期におけるEDCs曝露が次世代の児の性分化に与える影響の検討は重要な課題の一つであると考えられる。

EDCsによる次世代の健康への負の影響を解明するために2002年に開始されたのが「子どもの健康に関する北海道スタディ」である。2002-2012年に北海道内37産科医療機関を受診した20926人の妊婦が登録された前向き出生コホートで、妊娠初期に同意を得た妊婦の母体血および臍帯血の採取保存、化学物質曝露量やホルモン濃度などの測定を行い、児の先天性疾患や成長・発達、アレルギー、第二性徴評価など思春期まで追跡調査を行い将来的な小児疾患予防を目的としたコホートで現在も進行中である。これまで北海道スタディは胎児期EDCs曝露が児の健康に負の影響を及ぼす様々な知見を明らかにしてきた(Kishi et al., 2011; Int J Epidemiol, 2011, Kishi et al., 2013; Environ Health Prev Med, 2013, Kishi et al., 2017; Environ Health Prev Med, 2017)。

ヒトでは妊娠8-14週が性分化におけるcritical windowと考えられている(Welsh et al., 2008; J Clin Invest, 2008)。北海道スタディでは胎児期曝露による性分化への影響を評価するため、妊娠初期母体血中のフタル酸エステル類代謝産物およびビスフェノールA(BPA: bisphenol A)濃度を測定している。フ

フタル酸エステル類とBPAはエストロゲン様作用を持つ代表的なEDCsであり、フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤として、BPAは合成樹脂の原料として使用される(Vandenberg et al., 2007; *Reprod. Toxicol*, 2007, Araki et al., 2014; *PLoS One*, 2014)。フタル酸エステル類およびBPAの半減期は6時間程度と短いですが日常的な低濃度曝露により常に体内に存在していると考えられる(Hoppin et al., 2002; ; *Environ. Health Perspect*, 2002, Völkel et al., 2002; *Chem. Res. Toxicol*, 2002)。フタル酸エステル類およびBPAへの胎児期曝露は性分化に対する生殖毒性作用が報告されている(Chang et al., 2015; ; *Hum. Reprod*, 2015, Fernández et al., 2016; *Reprod. Toxicol*, 2016, Jensen et al., 2015; *Epidemiology*, 2015)。

身体の性分化の指標として使用されるのがヒト第2指と第4指の比(以下、2D:4D)である。2D:4Dの性差は19世紀から指摘されており、通常男性で女性よりも低値となる。1998年にManningらは2-25歳の800人分の2D:4Dの評価を行い、2D:4Dが胎児期アンドロゲンと負の相関を・胎児期エストロゲン濃度と正の相関を示すことを報告した(Manning et al., 1998; *Hum. Reprod*, 1998)。胎児期の直接的なホルモン濃度測定は不可能のため簡便に測定できる2D:4Dが胎児期性ホルモン曝露の指標として使用されたが、近年は主に胎児期アンドロゲン曝露の指標として心理学・行動科学・神経科学など幅広い分野で汎用されてきた(Voracek and Loibl, 2009; *Psychol Rep*, 2009)。しかしながら、2011年マウスの実験において2D:4D決定における胎児期エストロゲンの重要性が改めて示された(Zheng and Cohn, 2011; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011)。この実験によりアンドロゲン受容体(AR: androgen receptor)が2D:4Dを低下させ、エストロゲン受容体(ER: estrogen receptor)が2D:4Dを上昇させる作用を持つことが明らかにされた。

組織へのエストロゲン曝露とエストロゲンの生物学的活性はERを介して調節される。ERには α と β 型の2種類あり、主要な活性を持つER α は生殖器以外に骨などの非生殖器にも発現が確認されている(Arnal et al., 2017; *Physiol. Rev*, 2017, Kan et al., 2014; *Bull. Exp. Biol. Med*, 2014, Safarinejad et al., 2012; *Mol. Carcinog*, 2012)。ER α をコードする遺伝子はestrogen receptor 1 (*ESR1*) 遺伝子である。*ESR1* 遺伝子には多くのSNPが報告されており、その中でrs2234693 (T>C)、rs9340799 (A>G)、およびrs2077647 (A>G)が初経/閉経、乳癌/前立腺癌、および男児の尿道下裂などの性ホルモン疾患と強い関連を示すことが報告されている(Ban et al., 2008; *Hum Reprod*, 2008, Johansson

et al., 2016; Breast Cancer Res, 2016, Safarinejad et al., 2012; Mol Carcinog, 2012, Stavrou et al., 2002; Hum. Reprod, 2002)。また、rs2234693T アレル・rs9340799A アレル・rs2077647G アレルにおいて ER α 活性が高いことが報告されている (Maruyama et al., 2000; ; Arch. Neurol, 2000, Sathyanarayana et al., 2012; Asian J. Androl, 2012, Stavrou et al., 2002; Hum. Reprod, 2002)。これまで 2D:4D は胎児期アンドロゲン曝露の指標であるという認識のもとに AR 感受性に影響すると推測されている AR 遺伝子 CAG リピート数と 2D:4D との関連が主に評価されてきたが、*ESR1* 遺伝子 SNP と 2D:4D との関連に関してはほとんど報告がない (表 1)。

フタル酸エステル類および BPA の作用機序の一つとして ER α へのアゴニスト作用が指摘されている (Rubin, 2011; J. Steroid Biochem. Mol. Biol, 2011, Takeuchi et al., 2005; Toxicology, 2005)。*ESR1* 遺伝子 SNP は 2D:4D 決定だけでなく、胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露が 2D:4D 決定に与える影響にも関与している可能性がある。これまでヒトを対象とした疫学研究では、胎児期フタル酸エステル類曝露ともう一つの性分化指標である肛門性器間距離 (anogenital distance; AGD) との関連を評価した報告はあるが (Barrett et al., 2017; ; Environ. Health Perspect, 2017, Swan et al., 2015; Hum Reprod, 2015)、胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露と 2D:4D との関連、胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露・*ESR1* 遺伝子 SNP・2D:4D との関連を評価した報告はない。

以上より、本研究では胎児期 EDCs 曝露が児の性分化に与える影響を解明することを目的として、第 I 章でまず *ESR1* 遺伝子 SNP による児の 2D:4D への影響を評価し、次に第 II 章において妊娠初期におけるフタル酸エステル類および BPA 曝露が 2D:4D に与える影響、胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露と *ESR1* 遺伝子 SNP の組み合わせが児の 2D:4D に与える影響を検討した。

表 1. AR および ER 遺伝子多型と 2D:4D との関連

出版年	著者	(国名)	対象者数	遺伝子多型	研究デザイン	結果
<AR 遺伝子 2D:4D と関連あり>						
2016	Durdiaková et al.	(スロバキア)	51 人 (10-18 歳女兒)	CAG リピート数	横断研究	CAG リピート数と左 2D:4D は負の相関あり
2012	Butovskaya et al.	(タンザニア)	142 人 (成人男性)	CAG リピート数	横断研究	CAG リピート数は左 2D:4D と弱い正の相関あり
2003	Manning et al.	(英国)	50 人 (成人男性)	CAG リピート数	横断研究	CAG リピート数と右 2D:4D は正の相関あり
<AR 遺伝子 2D:4D と関連なし>						
2011	Knickmeyer et al.	(米国)	364 人 (0-2 歳)	CAG リピート数	出生コホート	CAG リピート数と 2D:4D は関連なし
2014	Kubranská et al.	(スロバキア)	75 人 (成人男性)	CAG リピート数	横断研究	CAG リピート数と 2D:4D は関連なし
2013	Zhang et al.	(中国)	685 人 (成人)	CAG リピート数	横断研究	CAG および GGN リピート数と 2D:4D は関連なし
2012	Folland et al.	(英国)	77 人 (成人男性)	CAG リピート数	横断研究	CAG リピート数と 2D:4D は関連なし
<ER 遺伝子>						
2012	Vaillantcourt et al.	(カナダ)	188 人 (成人男性)	TA リピート数	横断研究	TA リピート数は左 2D:4D と正の相関あり

第 I 章

ESR1 遺伝子一塩基多型が 2D:4D に与える影響

1. 緒言

ヒト 2D:4D の性差は 19 世紀から指摘されており、通常男性で女性よりも低値となる(Manning et al., 1998; Hum. Reprod, 1998)。2D:4D は妊娠 14 週頃に決定し、以降の妊娠週数や思春期のホルモン変化に影響を受けないとされる(Galis et al., 2010; Arch. Sex. Behav, 2010, Malas et al., 2006; Early Hum. Dev, 2006, Manning et al., 1998; Hum. Reprod, 1998)。1998 年に Manning ら(Manning et al., 1998; Hum. Reprod, 1998)はヒト 2D:4D は胎児期アンドロゲン濃度と負の相関を、胎児期エストロゲン濃度と正の相関を示すことを報告した。妊娠初期の胎児性ホルモン濃度の測定は技術的・倫理的に困難であることから、簡便に測定可能な 2D:4D が胎児期アンドロゲン・エストロゲン曝露の指標として使用された。しかしながら、Manning らに続く諸研究において 2D:4D は胎児期アンドロゲン曝露の指標とされ(Voracek and Loibl, 2009; Psychol Rep, 2009)、胎児期エストロゲンによる影響に関してはほとんど検討されてこなかった。

一方、近年になり 2D:4D の決定には胎児期エストロゲンも重要であることが動物実験により改めて示された。2011 年に Zheng ら(Zheng and Cohn, 2011; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011)はマウスモデルにおいて、2D:4D は胎生 12.5-17 日のごく限られた期間に胎児期テストステロンと胎児期エストロゲンのバランスにより決定されることを初めて示した。彼らは、(1)第 4 指では第 2 指と比較して、オスでは AR が、メスでは ER が有意に多く発現していること、(2)AR は軟骨細胞の分裂に促進的に作用し ER は抑制的に作用するため、オスでは第 2 指と比較して第 4 指が伸長して低 2D:4D に、メスでは第 4 指の伸長が鈍化するため高 2D:4D となる機序を明らかにした。ヒトでは妊娠 10 週で AR および ER とも胎児軟骨組織に発現していることは確認されているが(Ben-Hur et al., 1997; Calcif. Tissue Int, 1997)、2D:4D 決定における胎児期アンドロゲンおよびエストロゲンとの関連に関しては未だにわかっていない。

組織へのエストロゲン曝露とエストロゲンの生物学的活性は ER を介して調節される。ER には α と β 型の 2 種類あり、主要な活性を持つ ER α は生殖器だけでなく骨などの非生殖器でも発現が確認されている(Arnal et al., 2017; Physiol. Rev, 2017, Kan et al., 2014; Bull. Exp. Biol. Med, 2014,

Safarinejad et al., 2012; Mol. Carcinog, 2012)。ER α は第6染色体上に位置する *ESR1* 遺伝子によりコードされ(Menasce et al., 1993; Genomics, 1993, Ponglikitmongkol et al., 1988; EMBO J, 1988)、*ESR1* 遺伝子 SNP には、イントロン 1 に存在する 2 つの有名な多型 rs2234693(T>C) と rs9340799(A>G) (Johansson et al., 2016; ; Breast Cancer Res, 2016, Langdahl et al., 2000; J. Bone Miner. Res, 2000, Roodi et al., 1995; J. Natl. Cancer Inst, 1995, Yaich et al., 1992, Cancer Res, 1992)、さらにエクソン 1 に存在する rs2077647 (A>G)がある(Anghel et al., 2010; Pathol. Oncol. Res, 2010)。HapMap プロジェクトでは、日本人における上記 3SNP の低頻度ホモ接合体は、CC 型(rs2234693)、GG 型 (rs9340799)、GG 型 (rs2077647) はそれぞれ 12.8%、4.4%、11.6%であることが報告されている。これらの SNP が *ESR1* 遺伝子機能に直接与える影響や機序は不明であるが、rs2234693 の T アレルと rs9340799 の A アレル (いずれも優性アレル) は ER α 活性を増強することが示唆されている(Maruyama et al., 2000; ; Arch. Neurol, 2000, Stavrou et al., 2002; Hum. Reprod, 2002)。また rs2077647 の G アレルは、2D:4D 以外の性分化の指標である AGD を女性化することが報告されている(Sathyanarayana et al., 2012; Asian J. Androl, 2012)。

2D:4D と遺伝型に関する研究では、その遺伝的寄与は表現型の約 60%に及ぶことが報告されている。(Paul et al., 2006; Hum. Genet , 2006, Voracek and Dressler, 2009; Am. J. Phys. Anthropol , 2009)。これまで 2D:4D は胎児期アンドロゲン曝露の指標であるという認識に従い、アンドロゲン感受性に関わるとされる AR 遺伝子 CAG リピート数との関連が主に評価されてきた。(Knickmeyer et al., 2011; Horm. Behav , 2011, Manning et al., 2003; Manning et al., 2003, Warrington et al., 2018; Hum. Mol. Genet , 2018)。対照的に ER に関しては、*ESR1* 遺伝子プロモーターである TA リピート数と成人男性の 2D:4D との関連を評価した報告が 1 編あるが(Vaillancourt et al., 2012; Am. J. Hum. Biol, 2012)、*ESR1* 遺伝子 SNP と 2D:4D との関連を評価した報告はない。

北海道スタディでは、学童期 2D:4D が臍帯血中のデヒドロエピアンドロステロンおよび インスリン様成長因子 3 濃度と負の相関を示すがエストラジオールまたはテストステロン濃度とは相関を示さなかったことを報告している(Mitsui et al., 2015; ; PLoS One, 2015, Mitsui et al., 2016; Steroids, 2016)。しかしながら、2D:4D は妊娠初期に決定されるため出産時の臍帯血中ホルモン濃度と 2D:4D との関連自体が弱かった可能性がある。妊娠初期における 2D:4D 決定に対する胎児期エストロゲンの影響を評価するために、我々は ER α 活性を高

める可能性のある *ESR1* 遺伝子 SNP (rs2234693、rs9340799、および rs2077647) が 2D : 4D 決定に影響を与えているのではないかという仮定を立てた。この仮説を検証するために、前向きコホート研究である北海道スタディに登録された 7 歳の 1,800 人の児の 2D:4D とこれら 3 つの *ESR1* 遺伝子 SNP との関連を評価した。

2. 研究方法

(1) 研究対象者

本研究は 2002-2012 年に北海道内 37 産科医療機関を受診した 20926 人の妊婦が登録された前向き出生コホート「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」を用いた。2003 年 5 月-2006 年 11 月までに出生した児 8663 人を対象とした。7 歳時に連絡可能な 5044 人に両手コピーの発送依頼を行い 1983 人から返却を得た(返却率 39.3%)。最終的に臍帯血が保管され、かつ両手コピーのある 1800 人を研究対象とした(図 1)。

(2) 質問票によるベースライン調査

妊娠初期の研究参加登録時に妊婦はベースライン調査票に回答した。この自記式調査票から母の妊娠前 BMI・出産回数・世帯年収・最終学歴・妊娠初期喫煙および飲酒などの基本情報を収集した。出産時年齢・出生週数・出生体重・児の性別、先天性疾患の有無などの情報は出産時診療記録から得た。妊娠 16 週まで喫煙または飲酒を継続していた場合を妊娠初期喫煙または妊娠初期飲酒ありと定義した。

(3) 2D:4D 測定

両方の手のひらの腹側のコピーにおいて、指の根本のしわから指先端までの長さを Vernier calipers を用いて 0.5mm 単位で測定した。2D:4D は、第 2 指の長さを第 4 指の長さで除算して計算した。2D および 4D 測定は最初の測定者によって行われた後 2 番目の測定者が結果を確認した。1,800 人すべての参加者の 2D:4D は参加者情報を知らない同じ 2 人の測定者によって同方法で double-check された。左右の 2D:4D を測定後、両者の平均値を平均 2D:4D として算出した。結果はすべて%で表示した。

(4) 児の *ESR1* 遺伝子解析

分娩時に採取・保管されていた臍帯血 400 μ g を分取してから Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いて DNA 抽出を行った。rs2234693、rs9340799 および rs2077647 遺伝子多型については TaqMan 法で解析した。

TaqMan 法ではプロトコールに従い、StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)および TaqMan Minor Groove Binder probes (AppliedBiosystems)を用いて解析した。各反応系には 1.0 μ L のゲノム DNA、0.25 μ L の TaqMan 40 $\times$ Assay-on Demand SNP Genotyping Assay Mix (AppliedBiosystems)、5.0 μ L TaqMan GTXpress™ Master Mix と 3.75 μ L の蒸留水を加え全量で 10 μ L となるように調整した。PCR の温度条件は、95°C で 20 分、その次に 95°C で 3 秒間と 60°C で 20 秒間を 1 サイクルとして 40 サイクル繰り返した。各 SNP において遺伝子解析に成功した 47 サンプルをランダムに抽出して追加 2 回の妥当性検査を施行し、100%の一致を確認した。

(5) 統計解析

一塩基多型は 2 つの対立遺伝子の一对からなる 3 つの遺伝型、集団の中で高頻度のホモ接合体・ヘテロ接合体・低頻度のホモ接合体として同定される。3 つの遺伝型をそれぞれ 1 カテゴリーとして比較する遺伝型モデル (genotype model)、高頻度ホモ接合体とヘテロ接合体を 1 カテゴリーとみなして低頻度のホモ接合体と比較する優性遺伝モデル (dominant model)、低頻度ホモ接合体とヘテロ接合体を 1 カテゴリーとみなして高頻度のホモ接合体と比較する劣性遺伝モデル (recessive model) の 3 つのタイプに分けられる。本研究において用いた *ESR1* 遺伝型では、優性遺伝モデルは TT vs. TC/CC (rs2234693)、AA vs. AG/GG (rs9340799)、AA vs. AG/GG (rs2077647)、劣性遺伝モデルは TT/TC vs. CC (rs2234693)、AA/AG vs. GG (rs9340799)、AA/AG vs. GG (rs2077647) と定義される (Ban et al., 2008; Hum Reprod, 2008, Jurečková et al., 2015; J. Cancer Res. Clin. Oncol, 2015)。遺伝子頻度の最も低い rs9340799 の GG 型の児が 52 人 (男児 30 人・女児 22 人) であったため、本研究では上記 3 つのすべてのモデルを用いて検討した。

児と母親の属性を平均値または%で表示して、男女間の比較を t 検定または χ^2 検定によって検討した。一元配置分散分析を用いて男女の遺伝型モデルの頻度を比較した。*ESR1* 遺伝子 SNP と 2D : 4D との関連を児の性別、出生体重、母の妊娠初期喫煙および飲酒で調整した重回帰分析で検討した。また喫煙による影響を評価するため、妊娠初期喫煙による重回帰分析の層別化を行い比較検討した。統計学的有意水準は p 値 < 0.05 とし、多重比較の場合はボンフェローニ補正を用いて統計学的有意を判断した。統計解析には JMP Pro 13 (SAS Institute, NC, USA) を用いた。

(6) 倫理的配慮

本研究は北海道大学大学院医学研究院および北海道大学環境健康科学研究教育センターの倫理委員会の承認を得て実施した。遺伝子解析に関してはわが国の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき実施した。インフォームド・コンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」、「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いて行った。研究への参加は自由意志により自発的に中止しても不利益を被らないように配慮した。対象者のプライバシー保持には細心の注意を払い、個人データの漏洩防止のためデータ保管を厳重に行った。

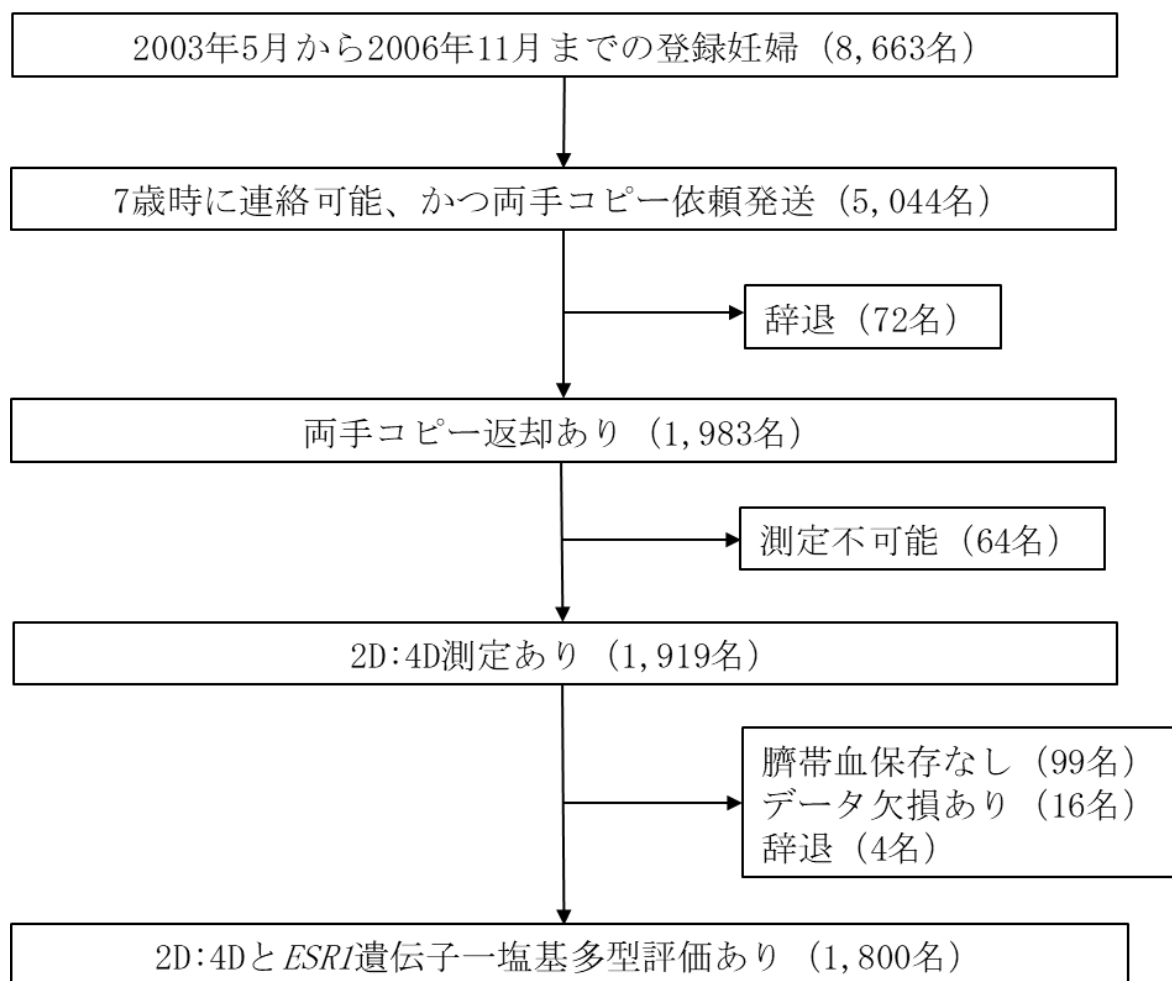


図 1. 解析対象者の選出方法

3. 研究結果

(1) 母児の属性と 2D:4D、遺伝型頻度

男児 926 人・女児 874 人で、性分化疾患や尿道下裂・停留精巣症例は含まれていなかった。出生体重のみ男女間に有意差を認めた ($3103 \pm 363\text{g}$ vs. $2991 \pm 370\text{g}$; $p < 0.001$) (表 2)。平均および左右 2D:4D とともに男児が女児より有意に低値 (平均: 93.2% vs. 94.6% 、右: 93.5% vs. 94.9% 、左: 92.9% vs. 94.4% 、いずれも $p < 0.001$) であった。rs2234693 (T > C)、rs9340799 (A > G)、および rs2077647 (A > G) のマイナーのホモ接合体の頻度は、 18.5% 、 2.9% 、 16.2% であった。男女間で遺伝型頻度に有意差は認めなかった (表 3)。

(2) ESR1 遺伝子 SNP と 2D:4D との関連

表 4 と図 2 に rs9340799 と 2D:4D との関連の結果を示した。遺伝型モデルにおける評価では、rs9340799 の GG 型の児は AA 型の児と比較して平均 2D:4D が 0.85% 低下した ($95\% \text{CI}$: -1.5 , -0.20)。ただし、この関連は児の性別で層別すると女児において消失した。右 2D:4D における評価では、AA 型の児と比較して、AG 型の児は 0.66% 上昇したが ($95\% \text{CI}$: 0.22 , 1.10) GG 型の児は 1.12% 低下した ($95\% \text{CI}$: -1.87 , -0.37)。性別で層別化すると、GG 型の男児では AA 型の児と比較して 1.29% 低下したが ($95\% \text{CI}$: -2.26 , -0.32)、AG 型の男児では AA 型の児と比較して有意差は認めなかった。劣性遺伝モデルにおける評価では、rs9340799 の GG 型の児は AA/AG 型の児と比較して平均 2D:4D が 0.63% 低下した ($95\% \text{CI}$: -1.12 , -0.14)。さらに児の性別で層別すると、特に男児では AG/GG 型と比較して GG 型は平均 2D:4D が 0.78% 低下した ($95\% \text{CI}$: -1.41 , -0.15)。次に右 2D:4D における評価では、GG 型の児は AA/AG 型の児と比較して 0.82% 低下し ($95\% \text{CI}$: -1.38 , -0.26)、男児でも同様の傾向を認めた (0.96% 低下、 $95\% \text{CI}$: -1.68 , -0.24)。左 2D:4D と rs9340799 との間に有意な関連は認めなかった。女児では遺伝モデルまたは左右に関係なく、rs9340799 との関連を認めなかった (表なし)。また rs2234693 および rs2077647 では男女とも 2D:4D との関連は認めなかった (表なし)。

(3) 喫煙による影響

rs9340799 と右 2D:4D との関連に対する妊娠初期喫煙の影響を表 5 に示した。非喫煙群における遺伝型モデルでは、AA 型の児と比較して、AG 型の児で 0.70% 上昇し ($95\% \text{CI}$: 0.17 , 1.23) GG 型の児で 1.26% 低下した ($95\% \text{CI}$: -2.16 , -0.36)。

児の性別で層別すると、GG 型の男児で 1.47%の低下を認めた (95%CI:-2.56、-0.38)。非喫煙群における劣性遺伝モデルでは、GG 型の児は AA/AG 型の児と比較して平均 2D:4D が 0.93%低下した (95%CI:-1.60、-0.26)。次に児の性別で層別すると、男児では AG/GG 型と比較して GG 型は右 2D:4D の 1.10%の低下を認めた (95%CI:-1.91、-0.28)。これらの関連は喫煙群では認めなかった。女兒の右 2D : 4D は喫煙の有無にかかわらず rs9340799 との関連を認めなかった。平均および左 2D:4D も喫煙の有無にかかわらず rs9340799 との関連を認めなかった (表なし)。また rs2234693 と rs2077647 も喫煙の有無にかかわらず 2D : 4D との間に関連を認めなかった (表なし)。

表 2. 母児の属性

	全児 (n = 1,800)	男児 (n = 926)	女児 (n = 874)	p 値 ^a
児の属性				
性別 男児	926 (51.4)	(-)	(-)	
女児	874 (48.6)	(-)	(-)	
出生体重 (g)	3,049 ± 374	3,103 ± 363	2,991 ± 370	< 0.001
在胎週数 (週)	38.8 ± 1.4	38.8 ± 1.3	38.9 ± 1.4	0.066
母の属性				
出産時年齢 (歳)	31.2 ± 4.3	31.1 ± 4.4	31.2 ± 4.2	0.618
妊娠前 BMI (kg/m ²)	21.0 ± 3.0	21.0 ± 2.9	21.0 ± 3.1	0.742
出産歴				
初産	796 (44.2)	417 (45.0)	379 (43.4)	0.630
経産	936 (52.0)	479 (51.7)	457 (52.3)	
データなし	68 (3.8)	30 (3.3)	38 (4.3)	
世帯年収(万円)				
<300	257 (14.3)	137 (14.8)	120 (13.7)	0.666
300-499	706 (39.2)	358 (38.7)	348 (39.8)	
500-799	426 (23.7)	216 (23.3)	210 (24.0)	
≥800	157 (8.7)	87 (9.4)	70 (8.0)	
データなし	254 (14.1)	128 (13.8)	126 (14.4)	
教育歴				
中卒	33 (1.8)	19 (2.1)	14 (1.6)	0.673
高卒	643 (35.7)	341 (36.8)	302 (34.6)	
短大卒	839 (46.6)	419 (45.2)	420 (48.1)	
大卒	220 (12.2)	118 (12.7)	102 (11.7)	
データなし	65 (3.6)	29 (3.1)	36 (4.1)	
妊娠初期喫煙				
なし	976 (54.2)	516 (55.7)	460 (52.6)	0.419
あり	400 (22.2)	198 (21.4)	202 (23.1)	
データなし	424 (23.6)	212 (22.9)	212 (24.3)	
妊娠初期飲酒				
なし	1,446 (80.3)	753 (81.3)	693 (79.3)	0.395
あり	278 (15.4)	137 (14.8)	141 (16.1)	
データなし	76 (4.2)	36 (3.9)	40 (4.6)	

カテゴリー変数は n (%)、連続変数は平均 ± 標準偏差

^a独立 t 検定あるいは χ^2 検定

表 3. 児の *ESRI* 遺伝子一塩基多型

遺伝型	全児 (N = 1,800)	男児 (N = 926)	女児 (N = 874)	<i>p</i> 値
rs2234693				
TT	573 (31.8)	282 (30.5)	291 (33.3)	0.317 ^a
TC	894 (49.7)	463 (50.0)	431 (49.3)	
CC	333 (18.5)	181 (19.5)	152 (17.4)	
TT/TC	1,467 (81.5)	745 (80.5)	722 (82.6)	
TC/CC	1,227 (68.2)	644 (69.5)	583 (66.7)	
rs9340799				
AA	1,184 (65.8)	617 (66.6)	567 (64.9)	0.385 ^b
AG	564 (31.3)	279 (30.1)	285 (32.6)	
GG	52 (2.9)	30 (3.2)	22 (2.5)	
AA/AG	1,748 (97.1)	896 (96.8)	852 (97.5)	
AG/GG	616 (34.2)	309 (33.4)	307 (35.1)	
rs2077647				
AA	619 (34.4)	297 (32.1)	322 (36.8)	0.083 ^c
AG	890 (49.4)	479 (51.7)	411 (47.0)	
GG	291 (16.2)	150 (16.2)	141 (16.1)	
AA/AG	1,509 (83.8)	776 (83.8)	733 (83.9)	
AG/GG	1,181 (65.6)	629 (67.9)	552 (63.2)	

n (%)

^a一元配置分散分析 (TT vs. TC vs. CC)

^b一元配置分散分析 (AA vs. AG vs. GG)

^c一元配置分散分析 (AA vs. AG vs. GG)

表 4. 2D:4D と rs9340799 との関連

遺伝型	全児 ^a	男児 ^b	女児 ^b
	β (95% CI)	β (95% CI)	β (95% CI)
平均 2D:4D			
遺伝型モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG	0.46 (0.08, 0.85)	0.44 (-0.07, 0.95)	0.52 (-0.07, 1.12)
GG	-0.85 (-1.50, -0.20)*	-1.02 (-1.86, -0.18)	-0.72 (-1.75, 0.30)
優性遺伝モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG/GG	-0.02 (-0.20, 0.16)	-0.15 (-0.39, 0.10)	0.11 (-0.15, 0.37)
劣性遺伝モデル			
AA/AG	Reference	Reference	Reference
GG	-0.63 (-1.12, -0.14)**	-0.78 (-1.41, -0.15)**	-0.51 (-1.28, 0.26)
右 2D:4D			
遺伝型モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG	0.66 (0.22, 1.10)*	0.69 (0.10, 1.27)	0.67 (-0.01, 1.35)
GG	-1.12 (-1.87, -0.37)*	-1.29 (-2.26, -0.32)*	-0.99 (-2.16, 0.19)
優性遺伝モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG/GG	0.02 (-0.18, 0.22)	-0.06 (-0.34, 0.22)	0.11 (-0.18, 0.41)
劣性遺伝モデル			
AA/AG	Reference	Reference	Reference
GG	-0.82 (-1.38, -0.26)**	-0.96 (-1.68, -0.24)**	-0.71 (-1.58, 0.17)
左 2D:4D			
遺伝型モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG	0.27 (-0.19, 0.73)	0.19 (-0.42, 0.80)	0.39 (-0.30, 1.08)
GG	-0.58 (-1.36, 0.19)	-0.75 (-1.77, 0.27)	-0.46 (-1.65, 0.73)
優性遺伝モデル			
AA	Reference	Reference	Reference
AG/GG	-0.06 (-0.27, 0.15)	-0.23 (-0.52, 0.06)	0.12 (-0.18, 0.42)
劣性遺伝モデル			
AA/AG	Reference	Reference	Reference
GG	-0.44 (-1.02, 0.14)	-0.60 (-1.36, 0.16)	-0.32 (-1.21, 0.57)

^a 児性別、出生体重、妊娠初期飲酒および妊娠初期喫煙で調整した重回帰分析

^b 出生体重、妊娠初期飲酒および妊娠初期喫煙で調整した重回帰分析

β (95% CI)は調整した後の reference 群とそれぞれの群との間の 2D:4D 変化(%)

* $p < 0.017$ (0.05/3); ** $p < 0.025$ (0.05/2) ; ボンフェローニ補正後有意

表 5. 妊娠初期喫煙の有無による右 2D:4D と rs9340799 との関連

妊娠初期喫煙	遺伝型	全児 ^a	男児 ^b	女児 ^b
		β (95% CI)	β (95% CI)	β (95% CI)
非喫煙者	遺伝型モデル			
	AA	Reference	Reference	Reference
	AG	0.70 (0.17, 1.23)**	0.77 (0.11, 1.44)	0.57 (-0.32, 1.47)
	GG	-1.26 (-2.16, -0.36)**	-1.47 (-2.56, -0.38)*	-0.86 (-2.46, 0.73)
	優性遺伝モデル			
	AA	Reference	Reference	Reference
	AG/GG	-0.02 (-0.26, 0.23)	-0.09 (-0.42, 0.24)	0.10 (-0.26, 0.45)
	劣性遺伝モデル			
	AA/AG	Reference	Reference	Reference
	GG	-0.93 (-1.60, -0.26)**	-1.10 (-1.91, -0.28)**	-0.62 (-1.82, 0.57)
喫煙者	遺伝型モデル			
	AA	Reference	Reference	Reference
	AG	0.63 (-0.18, 1.44)	0.28 (-1.00, 1.56)	0.86 (-0.23, 1.95)
	GG	-0.88 (-2.23, 0.48)	-0.46 (-2.70, 1.79)	-1.10 (-2.86, 0.66)
	優性遺伝モデル			
	AA	Reference	Reference	Reference
	AG/GG	0.12 (-0.26, 0.49)	0.03 (-0.49, 0.55)	0.20 (-0.35, 0.74)
	劣性遺伝モデル			
	AA/AG	Reference	Reference	Reference
	GG	-0.62 (-1.63, 0.40)	-0.33 (-2.00, 1.34)	-0.76 (-2.08, 0.56)

^a 児性別、出生体重、妊娠初期飲酒で調整した重回帰分析^b 出生体重、妊娠初期飲酒で調整した重回帰分析 β (95% CI)は調整した後の reference 群とそれぞれの群との間の右 2D:4D 変化(%)* $p < 0.017$ (0.05/3); ** $p < 0.025$ (0.05/2) ; ボンフェローニ補正後有意

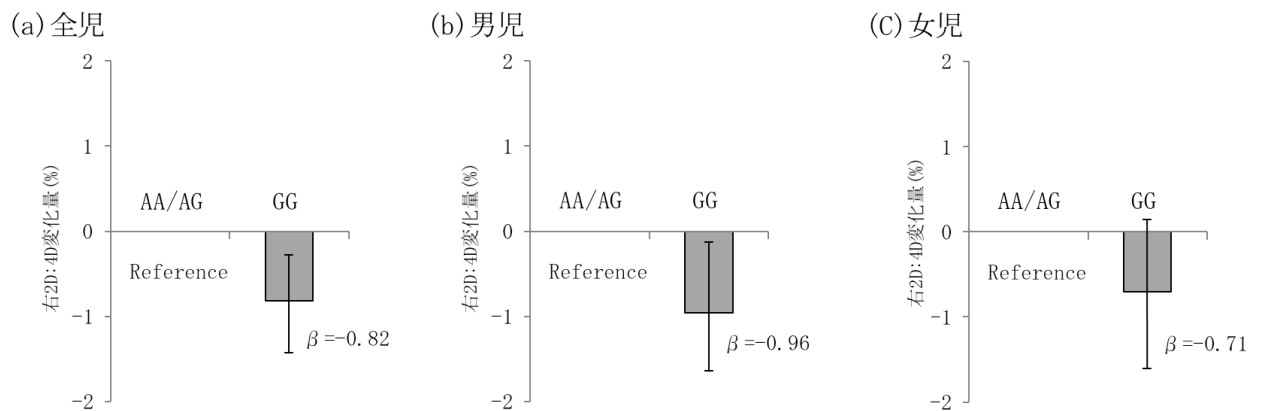


図 2. rs9340799 多型の劣性遺伝モデルにおける AA/AG の児と比較した GG 型の児の右 2D:4D 変化量(%) (全児 1,800 名、男児 926 名、女児 874 名)

(a) 重回帰分析は児性別、出生体重、妊娠初期飲酒および妊娠初期喫煙で調整

(b) と (c) 重回帰分析は出生体重、妊娠初期飲酒および妊娠初期喫煙で調整

Bar は調整平均と 95%信頼区間

4. 考察

本研究は *ESR1* 遺伝子 SNP と児の 2D:4D との関連を検討した初めての報告である。

(1) *ESR1* 遺伝子 SNP が 2D:4D に与える影響

2D:4D との関連を認めた *ESR1* 遺伝子 SNP は rs9340799 であり、rs9340799 の劣性遺伝モデルにおいて GG 型男児の右 2D:4D が A アレル保持の児と比較して低下を認めた。rs9340799 の GG 型では ER α 活性が低いことが報告されている (Stavrou et al., 2002 ; Hum. Reprod, 2002)。このため、GG 型の児において ER α による指長抑制作用の減弱や AR による指長伸長作用の相対的な増強につながり 2D:4D が低下したと推察される。一方、遺伝型モデルでは AG 型の児が AA 型の児よりも右 2D:4D の上昇を示した。その理由の一つとしては A アレルによる 2D:4D の上昇作用や、rs9340799 が *ESR1* 遺伝子活性に影響を及ぼす他の遺伝子と連鎖している可能性などが考えられた。

(2) *ESR1* 遺伝子 SNP が 2D:4D に与える影響の性差のメカニズム

本研究においては、男児 2D:4D にのみ *ESR1* 遺伝子 SNP の影響が認められた。この原因としては胎盤アロマターゼによる影響が推測された。胎児テストステロンの産生は胎児精巣において妊娠 8 週からはじまり、妊娠 12~20 週で男児が女児の 3~8 倍となるが (Scott et al., 2009; Endocr. Rev, 2009)、胎児エストロゲン濃度は妊娠 20 週間までは非常に低いことが報告されている (Touchstone et al., 1972; Clin. Chem, 1972)。胎盤アロマターゼはテストステロンをエストラジオールに変換する作用をもつが、ヒトでは妊娠 7 週までに胎盤に発現することが確認されている (Li et al., 2005; Placenta, 2005)。このため、男児では胎児テストステロンの一部がアロマターゼによってエストロゲンに変換され女児よりも多くのエストロゲンが供給されたため、2D:4D に対する *ESR1* 遺伝子 SNP の影響が男児にのみ認められたと推察された。

(3) 喫煙の影響

本研究において *ESR1* 遺伝子 SNP による 2D:4D への影響は非喫煙者の児においてのみ認められた。この原因としては妊娠中の喫煙による子宮内ホルモン環境の変化が考えられる。妊娠中のニコチン摂取は胎児テストステロン濃度を上昇させることが動物実験で報告されている (Smith et al., 2003; Nicotine Tob.

Res, 2003)。一方ヒトでは、妊娠中の喫煙が胎児テストステロン濃度を低下させ、停留精巣リスクの増加や胎児精巣の胚細胞数を減少させることが報告されている(Jensen et al., 2007; Epidemiology, 2007, Mamsen et al., 2010; Hum Reprod, 2010))。また、妊娠中の喫煙による卵巣毒性や初経の早期発来とも関連することが報告されている(Lutterodt et al., 2009; Hum Reprod, 2009, D'Aloisio et al., 2013; Epidemiology, 2013))。本研究においては、妊娠初期の喫煙が胎児期ホルモン環境に影響を及ぼし、*ESR1* 遺伝子 SNP の影響をマスクしたと推測された。

(4) 研究の限界

本研究の限界の一つとして、*ESR1* 遺伝子 SNP による ER α 機能への影響の程度が解明されていないことが挙げられる。また *ESR1* 遺伝子 SNP と 2D:4D との間に認めた関連は、エストロゲンが 2D:4D と関連しているという直接的な証拠ではないことに注意する必要がある。

第Ⅱ章

胎児期フタル酸エステル類およびビスフェノール A 曝露と *ESR1* 遺伝子一塩基多型が 2D:4D に与える影響

1. 緒言

EDCs は内分泌代謝に悪影響を及ぼし、ホルモン機能の低下を引き起こすことが指摘されている (Rehman et al., 2018; Trans. Androl. Urol, 2018)。特に胎児期 EDCs 曝露は、胎児の性ホルモン環境を変化させることが報告されている (Araki et al., 2014; PLoS One, 2014, Araki et al., 2017; Sci. Total Environ, 2017)。フタル酸エステル類と BPA は代表的なエストロゲン様作用を持つ EDCs である (Harris et al., 1997; Environ. Health Perspect, 1997, Rehman et al., 2018; Trans. Androl. Urol, 2018)。フタル酸エステル類は玩具、屋内材料、化粧品、医療機器などのさまざまなプラスチック化合物の可塑剤として汎用されている (Araki et al., 2014; PLoS One, 2014)。BPA は金属缶や飲料容器などのコーティングとして使用されるポリカーボネート樹脂およびエポキシ樹脂の合成に使用される (Vandenberg et al., 2007; Reprod. Toxicol, 2007)。これら 2 つの化学物質の半減期は 6-12 時間程度と短い、日常的な低濃度曝露により常に体内に存在していると考えられている (Hoppin et al., 2002; Environ. Health Perspect, 2002, Völkel et al., 2002; Chem. Res. Toxicol, 2002)。また胎盤移行性を持つため (Jensen et al., 2012; Environ. Health Perspect, 2012, Yamada et al., 2002; Yamada et al., 2002)、フタル酸エステル類および BPA への胎児期曝露は性分化に対して生殖毒性作用を及ぼす可能性がある (Chang et al., 2015; Hum. Reprod, 2015, Fernández et al., 2016; Reprod. Toxicol, 2016, Jensen et al., 2015; Epidemiology, 2015)。

胎児期性ホルモン曝露の指標として用いられるのがヒト 2D:4D である。これまでヒトを対象とした疫学研究では、胎児期 EDCs 曝露による性分化への影響の評価としてもう一つの胎児期性ホルモン曝露の指標である AGD が主に使用されており、妊娠初期におけるフタル酸エステル類曝露と男児 AGD の女性化との関連が報告されている (Barrett et al., 2017; Environ. Health Perspect, 2017, Swan et al., 2015; Hum Reprod, 2015)。しかしながら動物実験では、一般的な環境曝露濃度に近い EDCs 低濃度曝露における評価では、2D:4D は女性化を認めず AGD では変化が認められなかったことから AGD よりも 2D:4D の方が有用である可能性が報告されている (Auger et al., 2013; Proc. Biol. Sci, 2013)。

さらに、2D:4D は胎児期の性ホルモンおよび化学物質の曝露のみで決定されるが、AGD は胎児期だけではなく生後の曝露にも影響を受けることが示されている (Auger et al., 2013; Proc. Biol. Sci., 2013, Zheng and Cohn, 2011; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2011)。これらの動物実験は性分化に対する胎児期 EDCs 曝露の影響評価には ADG よりも 2D:4D が優れている可能性があることを示唆しているが、現在までヒトを対象とした胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露と 2D:4D との関連を検討した報告はない。

フタル酸エステル類および BPA の作用機序の一つとして $ER\alpha$ へのアゴニスト作用が指摘されている (Rubin, 2011; J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2011, Takeuchi et al., 2005; Toxicology, 2005)。 $ER\alpha$ は *ESR1* 遺伝子によってコードされており (Ponglikitmongkol et al., 1988 ; EMBO J., 1988)、*ESR1* 遺伝子 SNP が 2D:4D 決定に影響を及ぼす可能性があることを研究 (I) で明らかにした。さらに遺伝子多型は EDCs に対する個々の感受性に影響を与えることが指摘されており (Xie et al., 2015 ; Environ Res., 2015)、*ESR1* 遺伝子 SNP は 2D:4D のみならず胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露による 2D:4D への影響も修飾している可能性がある。本研究では、胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露がヒト性分化に与える影響を明らかにするため、胎児期フタル酸および BPA 曝露と 2D:4D との関連を検討した。また *ESR1* 遺伝子 SNP が胎児期フタル酸および BPA 曝露と 2D:4D との関連に与える影響についても検討した。

2. 研究方法

(1) 研究対象者

本稿第 I 章 研究方法に記載した研究対象者 1800 人のうち、母親の妊娠初期母体血中のフタル酸エステル類代謝産物および BPA 濃度が測定されていた 623 人の児を対象とした。

(2) 質問票によるベースライン調査

本稿第 I 章 研究方法に記載した。

(3) フタル酸エステル類代謝産物および BPA 濃度測定

妊娠初期の母体血清を採取して -80° C で保存した。血清サンプルを用いて BPA および 7 種のフタル酸代謝物、mono-n-butyl phthalate (MnBP)、mono-isobutyl phthalate (MiBP)、mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)、mono-benzyl phthalate (MBzP)、mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP)、mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate (MECPP) および mono-(4-methyl-7-carboxyheptyl) phthalate (cxMiNP) を測定した。BPA 測定には isotope-diluted liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用い、フタル酸代謝物測定には ultra-performance LC-MS/MS を用いた。すべての測定はいであ株式会社 (Shizuoka, Japan) で実施した。MnBP、MiBP、MBzP、MEHP、MEHHP、MECPP、cx-MiNP および BPA の検出下限値 (method detection limits ;MDLs) は、それぞれ 0.57、0.44、0.19、0.31、0.23、0.11、0.12、0.011 ng/mL であった。また、di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の 3 つの代謝物のモル合計を Σ DEHP として以下の式で算出した： Σ DEHP (nmol/ L) = ([qMEHP/278] + [qMEHHP/ 294] + [qMECPP/308]) × 1000。なお q は濃度 (ng/mL) を、278、294、および 308 はそれぞれの DEHP 代謝物の分子量 (ng / nmol) を表す。

(4) 2D:4D 測定

本稿第 I 章 研究方法に記載した。

(5) 遺伝子解析

本稿第 I 章 研究方法に記載した。なお、本研究では rs9340799 (A> G) における低頻度ホモ接合体である GG 型の頻度が 3.2% (20 人) とサンプルサイズが限られ統計学的パワーが足りないため、劣性遺伝モデルを用いた評価は行わな

かった。

(6) 統計解析

母児の属性は平均値または%で表示した。研究 I の対象者 1800 人との各属性における比較を 1 標本 t 検定により行った。各遺伝型におけるフタル酸エステル類代謝物と BPA 濃度の中央値を Mann-Whitney U 検定を用いて比較した。フタル酸エステル類代謝物の濃度が MDL 未満の場合は、MDL の半値に置き換えて解析した。BPA の MDL はバッチ毎に異なっていたため（最大 MDL ; 0.048 ng / mL、最小 MDL ; 0.0081 ng / mL）、BPA 濃度が MDL 未満の場合は各バッチの MDL の半値に置き換えて解析した。3 つのフタル酸代謝物（MBzP、MEHHP、および cx-MiNP）は検出率が低いため（MBzP ; 5.3%、MEHHP ; 6.7%、cx-MiNP ; 0.48%）重回帰分析を行わなかった。フタル酸エステル類代謝物と BPA 濃度を低濃度群（<50 パーセンタイル、Low 群）および高濃度群（≥50 パーセンタイル、High 群）に分類し、重回帰分析を用いて両群の平均 2D : 4D を比較した。フタル酸エステル類代謝物および BPA 濃度と平均 2D : 4D の関連を、児の性別・出生体重・出産時年齢・妊娠初期喫煙および飲酒で調整した重回帰分析を用いて検討した。また、平均 2D : 4D、フタル酸エステル類代謝物および BPA 濃度、*ESR1* 遺伝子 SNP との関連について重回帰分析を用いて検討した。 P_{int} は遺伝環境交互作用の P 値を表し、フタル酸エステル類代謝産物および BPA の濃度と *ESR1* 遺伝子 SNP の組み合わせで作られた独立変数に対する積項として以下のごとく定義した；フタル酸エステル類代謝産物および BPA の濃度（低濃度群=0 および高濃度群=1）×*ESR1* 遺伝子 SNP（rs2234693:TT=0 および TC/CC=1、rs9340799:AA=0 および AG/GG=1、rs2077647:AA=0 および AG/GG=1）。統計学的有意水準は両側 p 値<0.05 とし、多重比較の場合はボンフェローニ補正を用いて統計学的有意を判断した。統計解析には JMP Pro 13 (SAS Institute, NC, USA)を用いた。

(7) 倫理的配慮

本稿第 I 章 研究方法に記載した。

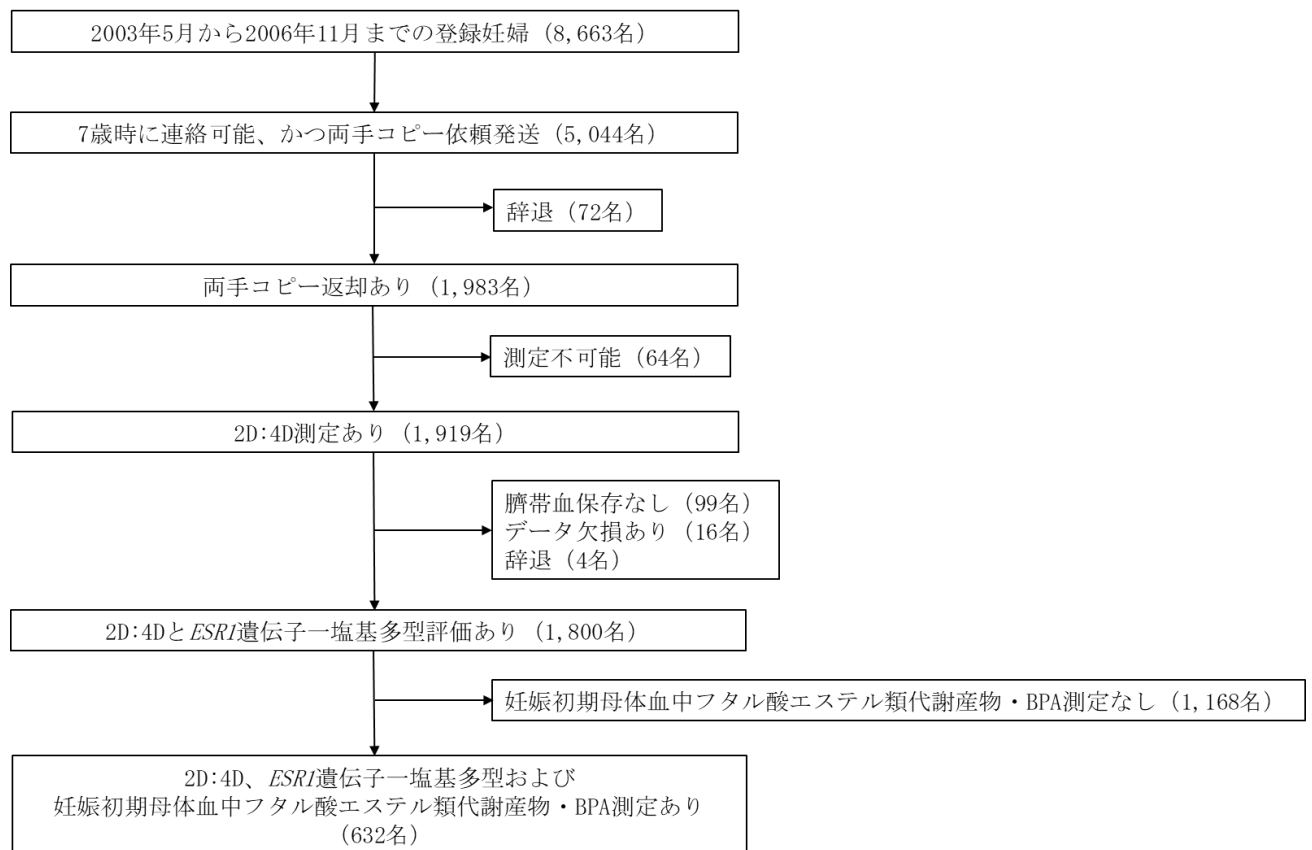


図 3. 解析対象者の選出方法

3. 研究結果

(1) 母児の属性

表 6 および表 7 に母児の属性を示した。男児 51.4%であり女児 48.6%であった。出産時年齢は 31.1 ± 4.0 歳であった。低頻度ホモ接合体の割合は rs2234693 (T>C) ; 18.9%、rs9340799 (A>G) ; 3.2%、rs2077647 (A>G) 17.5%であった。平均 2D:4D は男児が女児よりも有意に低かった(男児 ; 93.3%、女児 ; 94.5%、 $p < 0.001$)。本研究には先天性疾患を持つ児は含まれていなかった。研究 I の対象者 1800 人と比較して、研究 II の対象者は出生体重が高かった(研究 I ; 3,049g 研究 II ; 3,081g、 $p = 0.027$)。また出産歴・世帯年収・教育歴・妊娠初期飲酒の有無においても有意差を認めた。

(2) 児の *ESR1* 遺伝子 SNP で層別した妊娠初期母体血中フタル酸エステル類代謝産物および BPA 濃度

表 8 にフタル酸エステル類代謝産物と BPA 濃度を示した。各化学物質の検出率は以下の通りであった。MnBP は 100%、MiBP は 99.7%、MBzP は 5.3%、MEHP は 91.1%、MEHHP は 6.8%、MECPP は 84.8%、cx-MiNP は 0.48%、そして BPA は 92.6%であった。男女間で MEHP および Σ DEHP 濃度に有意差を認めなかった。(MEHP 中央値; 男児 1.2 ng/mL・女児 1.3 ng/mL $p = 0.150$ 、 Σ DEHP 中央値; 男児 5.2 nmol/L・女児 5.4 nmol/L $p = 0.718$)。MEHP と Σ DEHP との間に高い相関を認めた($r = 0.999$ 、 $p < 0.001$)。表 8 に *ESR1* 遺伝子 SNP で層別したフタル酸エステル類代謝産物および BPA 濃度を示した。rs2234693 において BPA 濃度に有意差を認めた。

(3) フタル酸エステル類代謝産物および BPA 濃度と 2D:4D との関連 (全児)

表 10 にフタル酸エステル類代謝産物および BPA 濃度と 2D:4D との関連を示した。曝露濃度と 2D:4D との間に関連は認めなかった。

(4) MEHP および Σ DEHP 濃度、*ESR1* 遺伝子 SNP、平均 2D:4D との関連

表 11 に MEHP および Σ DEHP 濃度、*ESR1* 遺伝子 SNP、平均 2D:4D との関連を示した。623 人全員における評価では、MEHP および Σ DEHP と *ESR1* 遺伝子 SNP は平均 2D:4D に影響を与えなかった。一方男女で層別すると、MEHP 高曝露群かつ rs2077647 の AG/GG 型を持つ男児が、MEHP 低曝露群かつ rs2077647 の AA 型を持つ男児と比較して平均 2D:4D が 1.51%上昇した(95% CI: 0.4、2.63)。同様の傾

向が Σ DEHP 高曝露群かつ rs2077647 の AG/GG 型を持つ男児と、 Σ DEHP 低曝露群かつ rs2077647 の AA 型を持つ男児との比較においても認められた (1.37% 上昇, 95% CI: 0.25、2.49)。女児では MEHP および Σ DEHP 濃度、*ESR1* 遺伝子 SNP、平均 2D:4D との間に関連を認めなかった。MEHP および Σ DEHP と *ESR1* 遺伝子 SNP との間に明らかな遺伝環境交互作用は認めなかった。また、MnBP、MiBP、MECPP および BPA は、*ESR1* 遺伝子 SNP、平均 2D:4D と間に関連を認めなかった (表なし)。

表 6. 母の属性

	研究Ⅱ (N = 623)	研究Ⅰ (N = 1,800)	p 値 ^a
出産時年齢 (歳)	31.1 ± 4.0	31.2 ± 4.3	0.502
妊娠前 BMI (kg/m ²)	21.0 ± 3.5	21.0 ± 3.0	0.206
出産歴			
初産	282 (45.3)	796 (44.2)	< 0.001
経産	340 (54.6)	936 (52.0)	
データなし	1 (0.1)	68 (3.8)	
世帯年収 (万円)			
<500	345 (55.4)	963 (53.5)	0.021
≥500	213 (34.2)	583 (31.4)	
データなし	65 (10.4)	254 (14.1)	
教育歴(年)			
<12	242 (38.8)	676 (37.5)	0.000
≥13	377 (60.5)	1,959 (58.8)	
データなし	4 (0.6)	65 (3.6)	
妊娠初期喫煙			
なし	351 (56.3)	976 (54.2)	0.071
あり	149 (23.9)	400 (22.2)	
データなし	123 (19.7)	424 (23.6)	
妊娠初期飲酒			
なし	518 (83.1)	1,446 (80.3)	< 0.000
あり	101 (16.2)	278 (15.4)	
データなし	4 (0.6)	76 (4.2)	

カテゴリー変数は n (%), 連続変数は平均 ± 標準偏差

^a1 標本 t 検定

表 7. 児の属性

	研究 II (N = 623)	研究 I (N = 1,800)	<i>p</i> 値 ^a
性別			
男	320 (51.4)	926 (51.4)	0.986
女	303 (48.6)	874 (48.6)	
出生体重 (g)	3,081 ± 360	3,049 ± 374	0.027
在胎週数 (週)	38.9 ± 1.3	38.8 ± 1.4	0.139
rs2234693 (T>C)			
TT	187 (30.0)	573 (31.8)	0.633
TC	318 (51.0)	894 (49.7)	
CC	118 (18.9)	333 (18.5)	
TC/CC	436 (70.0)	1,227 (68.2)	
rs9340799 (A>G)			
AA	404 (64.8)	1,184 (65.8)	0.829
AG	199 (31.9)	564 (31.3)	
GG	20 (3.2)	52 (2.9)	
AG/GG	219 (35.2)	616 (34.2)	
rs2077647 (A>G)			
AA	198 (31.8)	619 (34.4)	0.349
AG	316 (50.7)	890 (49.4)	
GG	109 (17.5)	291 (16.2)	
AG/GG	425 (68.2)	1,181 (65.6)	

カテゴリー変数は n (%), 連続変数は平均 ± 標準偏差

^a1 標本 t 検定

表 8. 妊娠初期母体血中フタル酸エステル類代謝産物および BPA 濃度

	n	検出率 (%)	中央値	IQR (25th-75th)
MnBP (ng/ml)	619	100	47.0	31.0-61.0
MiBP (ng/ml)	619	99.7	3.30	2.20-5.50
MBzP (ng/ml)	619	5.3	< MDL	< MDL - < MDL
MEHP (ng/ml)	619	91.1	1.00	0.49-7.20
MEHHP (ng/ml)	619	6.8	< MDL	< MDL - < MDL
MECPP (ng/ml)	619	84.8	0.24	0.15-0.36
Σ DEHP (nmol/L)	619	-	5.25	2.83-26.68
cx-MiNP (ng/ml)	619	0.48	< MDL	< MDL - < MDL
BPA (ng/ml)	623	92.6	0.085	0.047-0.140

MDL: Method detection limit

IQR: Interquartile range

表 9. 児の *ESR1* 遺伝子一塩基多型で層別した妊娠初期母体血中フタル酸および BPA 濃度

	rs2234693 (T>C)				rs9340799 (A>G)				rs2077647 (A>G)			
	遺伝型	n	中央値 (IQR) (ng/mL)	<i>p</i> 値	遺伝型	n	中央値 (IQR) (ng/mL)	<i>p</i> 値	遺伝型	n	中央値 (IQR) (ng/mL)	<i>p</i> 値
MnBP	TT	185	47.0 (33.0-62.5)	0.774	AA	400	47.0 (32.0-61.0)	0.933	AA	196	47.0 (29.5-61.0)	0.708
	TC/CC	434	46.0 (30.8-61.0)		AG/GG	219	47.0 (30.0-62.0)		AG/GG	423	47.0 (31.0-61.0)	
MiBP	TT	184	3.20 (2.30-5.35)	0.698	AA	398	3.30 (2.30-5.50)	0.881	AA	195	3.50 (2.20-5.60)	0.096
	TC/CC	433	3.30 (2.10-5.50)		AG/GG	219	3.30 (2.10-5.50)		AG/GG	422	3.10 (2.10-5.08)	
MEHP	TT	167	1.10 (0.48-8.50)	0.398	AA	367	1.00 (0.49-7.28)	0.673	AA	178	1.00 (0.46-8.13)	0.614
	TC/CC	397	0.99 (0.49-6.38)		AG/GG	197	1.00 (0.49-4.60)		AG/GG	386	1.00 (0.49-6.60)	
MECPP	TT	153	0.25 (0.14-0.38)	0.977	AA	337	0.24 (0.14-0.37)	0.498	AA	163	0.24 (0.14-0.37)	0.597
	TC/CC	372	0.23 (0.15-0.35)		AG/GG	188	0.24 (0.16-0.36)		AG/GG	362	0.24 (0.15-0.36)	
Σ DEHP (nmol/L)	TT	185	5.26 (2.76-32.0)	0.415	AA	400	5.28 (2.82-27.5)	0.797	AA	196	5.09 (2.72-30.8)	0.728
	TC/CC	434	5.26 (2.84-24.7)		AG/GG	219	5.16 (2.83-17.5)		AG/GG	423	5.31 (2.87-24.9)	
BPA	TT	177	0.10 (0.05-0.17)	0.021	AA	374	0.09 (0.05-0.15)	0.623	AA	192	0.10 (0.05-0.16)	0.054
	TC/CC	400	0.08 (0.04-0.14)		AG/GG	203	0.08 (0.05-0.14)		AG/GG	385	0.08 (0.04-0.14)	

IQR; interquartile range

Mann-Whitney U 検定

表 10. 妊娠初期母体血中フタル酸および BPA と 2D:4D（全児）との関連

	高 or 低濃度	n	平均 2D:4D	右 2D:4D	左 2D:4D
			β (95% CI)	β (95% CI)	β (95% CI)
MnBP	Low	304	Reference	Reference	Reference
	High	315	-0.19 (-0.47, 0.09)	-0.20 (-0.53, 0.13)	-0.17 (-0.49, 0.15)
MiBP	Low	298	Reference	Reference	Reference
	High	321	-0.12 (-0.39, 0.16)	-0.06 (-0.39, 0.26)	-0.16 (-0.48, 0.16)
MEHP	Low	307	Reference	Reference	Reference
	High	312	0.13 (-0.15, 0.40)	-0.02 (-0.35, 0.30)	0.28 (-0.04, 0.60)
MECPP	Low	305	Reference	Reference	Reference
	High	314	-0.07 (-0.35, 0.21)	-0.22 (-0.55, 0.10)	0.07 (-0.25, 0.39)
Σ DEHP	Low	308	Reference	Reference	Reference
	High	311	0.10 (-0.18, 0.38)	-0.01 (-0.34, 0.31)	0.22 (-0.10, 0.54)
BPA	Low	311	Reference	Reference	Reference
	High	312	-0.01 (-0.29, 0.27)	-0.06 (-0.38, 0.27)	0.04 (-0.28, 0.36)

児性別、出生体重、出産時年齢、妊娠初期飲酒および妊娠初期喫煙で調整した重回帰分析
 β (95% CI)は調整した後の reference 群 (Low 群) と High 群との間の 2D:4D 変化(%)

表 11. MEHP もしくは Σ DEHP 濃度と *ESR1* 遺伝子一塩基多型と平均 2D:4D との関連

曝露-遺伝型			全児 ^a			男児 ^b			女児 ^b		
			n	β (95% CI)	<i>Pint</i>	n	β (95% CI)	<i>Pint</i>	n	β (95% CI)	<i>Pint</i>
MEHP	rs2234693	Low-TT	89	Reference	0.479	44	Reference	0.828	45	Reference	0.649
		Low-TC/CC	218	0.07 (-0.81, 0.95)		117	0.40 (-0.79, 1.6)		101	-0.07 (-1.36, 1.21)	
		High-TT	96	-0.05 (-1.06, 0.96)		43	0.56 (-0.89, 2.01)		53	-0.41 (-1.85, 1.03)	
		High-TC/CC	216	0.46 (-0.41, 1.33)		113	1.15 (-0.05, 2.35)		103	-0.08 (-1.36, 1.21)	
	rs9340799	Low-AA	199	Reference	0.283	105	Reference	0.372	94	Reference	0.038
		Low-AG/GG	108	-0.43 (-1.26, 0.41)		56	0.28 (-0.85, 1.41)		52	-1.06 (-2.3, 0.19)	
		High-AA	201	0.03 (-0.66, 1.64)		105	0.95 (0.02, 1.89)		96	-0.79 (-1.82, 0.23)	
		High-AG/GG	111	0.25 (-0.57, 1.07)		51	0.49 (-0.64, 1.62)		60	-0.02 (-1.21, 1.17)	
	rs2077647	Low-AA	98	Reference	0.676	51	Reference	0.416	47	Reference	0.206
		Low-AG/GG	209	0.12 (-0.73, 0.97)		110	1.05 (-0.07, 2.17)		99	-0.83 (-2.11, 0.46)	
		High-AA	98	0.07 (-0.92, 1.07)		45	1.14 (-0.23, 2.51)		53	-0.93 (-2.39, 0.53)	
		High-AG/GG	214	0.45 (-0.40, 1.30)		111	1.51 (0.40, 2.63) *		103	-0.61 (-1.90, 0.68)	
Σ DEHP	rs2234693	Low-TT	91	Reference	0.902	44	Reference	0.921	47	Reference	0.996
		Low-TC/CC	217	0.26 (-0.61, 1.12)		117	0.55 (-0.65, 1.75)		100	0.15 (-1.12, 1.41)	
		High-TT	94	0.15 (-0.86, 1.16)		43	0.55 (-0.90, 2.01)		51	-0.03 (-1.46, 1.41)	
		High-TC/CC	217	0.48 (-0.38, 1.34)		113	1.02 (-0.19, 2.22)		104	0.13 (-1.13, 1.39)	
	rs9340799	Low-AA	198	Reference	0.622	104	Reference	0.381	94	Reference	0.181
		Low-AG/GG	110	-0.24 (-1.07, 0.59)		57	0.27 (-0.84, 1.39)		53	-0.72 (-1.97, 0.53)	
		High-AA	202	0.10 (-0.59, 0.79)		106	0.73 (-0.20, 1.66)		96	-0.44 (-1.48, 0.59)	
		High-AG/GG	109	0.15 (-0.68, 0.98)		50	0.28 (-0.88, 1.44)		59	0.02 (-1.18, 1.22)	
	rs2077647	Low-AA	100	Reference	0.867	51	Reference	0.253	49	Reference	0.436
		Low-AG/GG	208	0.30 (-0.54, 1.14)		110	1.20 (0.16, 2.23)		98	-0.58 (-1.85, 0.69)	
		High-AA	96	0.27 (-0.73, 1.26)		45	1.13 (-0.24, 2.50)		51	-0.50 (-1.96, 0.96)	
		High-AG/GG	215	0.46 (-0.38, 1.30)		111	1.37 (0.25, 2.49)*		104	-0.38 (-1.64, 0.89)	

^a 児性別、出生体重、出産時年齢、妊娠初期飲酒および妊娠初期喫煙で調整した重回帰分析^b 出生体重、出産時年齢、妊娠初期飲酒および妊娠初期喫煙で調整した重回帰分析 β (95% CI)は調整後の reference 群 (MEHP/ Σ DEHP 低曝露群かつ rs2234693TT 型、rs9340799AA 型、rs2077647AA 型) とそれぞれの群との間の平均 2D:4D の変化(%)* $p < 0.017$ (0.05/3) ; ボンフェローニ補正後有意

4. 考察

本研究は胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露、*ESR1* 遺伝子 SNP、児の 2D:4D との関連を検討した初めての報告である。

(1) MEHP と DEHP

本研究においては MEHP および Σ DEHP の高曝露群において rs2077647 の AG/GG 型を持つ男児が、rs2077647 の AA 型を持つ男児と比較して平均 2D:4D の上昇を認めた。MEHP は DEHP の第一次代謝産物かつ主要代謝産物である。DEHP は日本において使用されるフタル酸エステル類の 50%以上を占めており曝露機会が多い。本研究における MEHP と Σ DEHP との間には極めて高い相関を認めたことから、MEHP は DEHP 曝露量を反映していると考えられ、MEHP 高濃度群は DEHP 高曝露群と同義として以下を考察する。

(2) rs2077647 と MEHP および Σ DEHP 曝露が 2D:4D の上昇を引き起こす作用機序について

rs2077647 の G アレルを持つ DEHP 高曝露の児の 2D:4D が上昇した理由としては、rs2077647 の G アレルにおける ER α 活性の増強と DEHP による ER α へのアゴニスト活性の 2 つが機序として推測される。rs2077647 多型による *ESR1* 遺伝子機能への影響は未解明であるが、過去の報告では rs2077647 の G アレルが、健康な男児における AGD の女性化や (Sathyanarayana et al., 2012; Asian J. Androl, 2012)、エストロゲン依存性乳癌のリスク増加 (Son et al., 2015; J. Cancer Res. Clin. Oncol, 2015) と関連することが報告されている。これらの報告は rs2077647G アレル保持者の ER α 活性が高いことを示唆している。また DEHP に関しては ER α を活性化することが報告されている (Takeuchi et al., 2005; Toxicology, 2005)。このため rs2077647 の AG/GG 型を持ち DEHP 高曝露を受けた児の ER α 活性が高いため、第 4 指の伸長が抑制され 2D:4D が上昇したと考えられた。なお、胎児期 DEHP 曝露と rs2077647 との間に明らかな遺伝環境交互作用は認めなかったが、今後サンプルサイズの増加により統計学的パワーが大きくなれば有意な遺伝環境交互作用が得られる可能性が示唆されたと考えられた。女兒において MEHP と rs9340799 との間に弱い遺伝環境交互作用を認めたが、いずれの遺伝型における検討でも関連は認めなかったことから偶然に検出されたと考えられた。

(3) DEHP 高曝露群の男児においてのみ影響が認められた理由

本研究において MEHP および Σ DEHP 曝露、*ESR1* 遺伝子 SNP と 2D:4D との関連は男児においてのみ認められた。DEHP による男児 2D:4D の女性化への作用機序は不明であるが、DEHP 曝露に伴う胎盤アロマターゼ作用の活性化が機序の一つとして推察される。マウスの実験では雄ラットでは DEHP 高濃度でアロマターゼの活性化を認めるが、雌ラットでは濃度変化に伴う活性変化は生じなかったことが報告されている (Andrade et al., 2006; Toxicology, 2006)。さらに、母体への DEHP 高曝露は胎児 (男児) におけるテストステロン/エストロゲン比の低下につながることを報告されている (Araki et al., 2014; PLoS One, 2009)。研究 I の考察で記述したように、元々男児では胎盤アロマターゼにより女児よりも多くの胎児期エストロゲンが妊娠初期に供給されている可能性がある。このため DEHP 高曝露群の男児では低曝露群の男児と比較して、DEHP による胎盤アロマターゼ活性化による胎児エストロゲン量が増加したため 2D:4D が上昇したと考えられた。

(4) BPA と *ESR1* 遺伝子 SNP について

本研究では rs2234693 において BPA 濃度に有意差が見られたが、BPA と *ESR1* 遺伝子 SNP と 2D:4D との間には有意な関連は認めなかった。本コホートにおける BPA 濃度は過去の報告と比較してもかなり低濃度であることから (Aris, 2014; Reprod Toxicol, 2014)、遺伝型における濃度の違いが 2D:4D に有意な影響を及ぼすには至らなかったと推察された。

(5) 本研究の強みと限界

本研究における強みの一つは、母体曝露評価時期が児の性分化決定時期および 2D:4D 決定時期と一致している点である。さらに、胎児は胎盤を介した母体血により EDCs 曝露を受けることから、本研究における母体血中のフタル酸エステル類代謝産物と BPA 濃度は胎児への子宮内曝露を反映していると考えられる。一方、血中に存在する加水分解酵素により一部のフタル酸エステル類がジエステルからモノエステルに変換されている可能性があるため、フタル酸エステル類代謝産物濃度評価に尿検体を推奨する報告が存在する (Kato et al., 2003; J. Anal. Toxicol, 2003, Koch et al., 2005; Arch. Toxicol, 2005)。しかしながら、DEHP によるジエステルからモノエステルへの変換速度は極めて

遅いことが報告されている (Kato et al., 2003; J. Anal. Toxicol, 2003)。また、37℃における 1 時間の保温後でもジエステルの加水分解は認めなかったことが報告されている (Kessler et al., 2012; Toxicol. Appl.

Pharmacol, 2012)。北海道スタディでは尿検体は採取していないが、血液検体は検体採取後すぐに 4℃で冷所保管してその後-80℃の冷凍保存をしているため、加水分解酵素による影響は極めて低いと考えられる。実際、本研究における母体 MEHP 血中濃度は、オーストラリアにおける妊娠女性を対象としたコホート (the Western Australian Pregnancy Cohort (Raine) Study) (Hart et al., 2014; Reproduction, 2014) とほぼ同レベルであった (MEHP 濃度中央値:

1.18 ng/mL)。このため我々は、加水分解酵素による影響の可能性は否定できないが、本研究におけるフタル酸エステル類代謝産物の血中濃度は検体採取時の胎児期曝露濃度を反映していると考えている。また尿検体中の化学物質濃度に関しては、曝露以外の要因 (尿希釈、腎機能、妊娠中代謝機能変化など) にも影響を受けている可能性があるため、間接的な曝露評価であることに注意する必要があると考えている (Hart et al., 2014; Reproduction, 2014, Olsén et al., 2012; Ecotoxicol. Environ. Saf, 2002)。

本研究における限界としては、フタル酸エステル類と BPA は半減期が短いことから単回測定では 2D:4D への影響を評価するには不十分である可能性がある。しかしながら、単回測定でもある程度の期間の曝露量を反映することがいくつかの研究で報告されている (Hart et al., 2014; Reproduction, 2014, Hoppin et al., 2002; Hoppin et al., 2002)。また、研究 I の対象者と比較して選択バイアスが存在している可能性がある。出産歴・世帯年収・教育歴・妊娠初期飲酒の有無に関しては研究 I の対象者におけるデータ欠損群の割合が研究 II の対象者と比較して高かったことによる影響が考えられた。出生体重に関しては、研究 II の対象者は研究 I の対象者と比較して高い出生体重を示した。先行研究において高出生体重の児は低 2D:4D を示すことが報告されている (Klimek et al., 2014; Ann Hum Biol, 2014)。胎児期 DEHP 曝露と *ESR1* 遺伝子 SNP による 2D:4D への影響は研究 II の対象者の方がより検出が困難になる可能性があることから、仮に選択バイアスが存在しても研究 II において認めた胎児期 DEHP 曝露と rs2077647 による男児 2D:4D の上昇という結果に及ぼす影響は低いと考えられた。

結論

本研究では、胎児期 EDCs 曝露が児の性分化に与える影響を遺伝的感受性も考慮して検討した。

① 本研究における新知見と意義

研究Ⅰ：*ESR1* 遺伝子 SNP が 2D:4D に与える影響

本研究では北海道スタディに登録された妊婦とその児のうち 1800 人を対象として解析を施行した。rs9340799 において、GG 型の児は AA/AG 型の児と比較して右 2D:4D が 0.82%低下した (95%CI:-1.38、-0.26)。児の性別で層別すると、男児にのみ影響を認めた (0.96%低下、95%CI:-1.68、-0.24)。さらに妊娠初期喫煙の有無で層別したところ、非喫煙群の男児では AG/GG 型と比較して GG 型は右 2D:4D が 1.10%の低下を認めたが (95%CI:-1.91、-0.28)、喫煙群では *ESR1* 遺伝子 SNP の影響を認めなかった。女児では *ESR1* 遺伝子 SNP と 2D:4D との関連を認めなかった。

本研究では以下のことが明らかになった。

- (1) *ESR1* 遺伝子 SNP (rs9340799) は 2D:4D に影響を及ぼす。
- (2) 妊娠中の喫煙は *ESR1* 遺伝子 SNP (rs9340799) と 2D:4D に影響を及ぼす。
- (3) (1)(2) の影響は男児で認められた。

研究Ⅱ：胎児期フタル酸エステル類および BPA 曝露と *ESR1* 遺伝子 SNP が 2D:4D に与える影響

本研究では第Ⅰ章で対象となった 1800 人のうち、妊娠初期母体血中のフタル酸エステル類代謝産物および BPA を測定した 623 人を解析した。胎児期曝露と 2D:4D では明らかな関連を認めなかったが、児の *ESR1* 遺伝子 SNP で層別すると DEHP 高曝露群かつ rs2077647 の AG/GG 型を持つ男児が、DEHP 低曝露群かつ rs2077647 の AA 型を持つ男児と比較して平均 2D:4D が上昇した (MEHP;1.51%上昇、95% CI:0.4-2.63、 Σ DEHP ; 1.37%上昇、95% CI: 0.25-2.49)。女児では胎児期曝露、*ESR1* 遺伝子 SNP、2D:4D との間に関連を認めなかった。

本研究では以下のことが明らかになった。

- (1) 胎児期 DEHP 曝露と *ESR1* 遺伝子 SNP(rs2077647) が 2D:4D に影響を及ぼしていた。
- (2) (1) の影響は男児で認められ、男児 2D:4D が高値を示した。

結論

ESR1 遺伝子 SNP (rs9340799) は 2D:4D に影響を及ぼしていた。妊娠中の胎児期 DEHP 曝露と *ESR1* 遺伝子 SNP (rs2077647) が児の 2D:4D を上昇させ、特に男児において影響を認めた。

② 今後の展開と課題

本研究は、胎児期 EDCs 曝露による性分化への影響を受ける可能性のある母児に対する曝露低減や生活習慣指導など、今後の予防対策・環境政策に寄与する可能性があると考えられた。また胎児期 EDCs 曝露を受けた児における思春期以降の性腺機能障害の有無などを長期的に追跡評価していくことが必要であると考えられた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導とご助言を賜りました北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室 篠原信雄教授、北海道大学環境科学研究教育センター 岸玲子特別招へい教授、北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室元准教授であり現市立札幌病院泌尿器科 守屋仁彦副部長、北海道大学環境科学研究教育センター 荒木敦子特任准教授ならびに小林澄貴特任講師、中央大学保健センター市ヶ谷分室 佐田文宏医療管理者でかつ北海道大学環境科学研究教育センター客員教授、山梨大学大学院医学工学総合研究部泌尿器科学・泌尿器科 三井貴彦准教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究は北海道大学環境科学研究教育センター 「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」研究グループで数々の貴重なご助言とご協力を賜りました宮下ちひろ特任准教授、伊藤佐智子特任講師、ならびに統計数理研究所 伊藤陽一教授、田村 菜穂美特任助教に深く感謝申し上げます。また、研究の遂行とご支援を頂きました研究支援員、北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室および北海道大学環境科学研究教育センター教員および研究員の皆様にも多大なるご協力を賜り感謝致します。

最後に、本研究にご参加下さり貴重な研究資料をご提供頂きました対象者の皆様、ご協力頂きました札幌東豊病院、青葉産婦人科クリニック、秋山記念病院、旭川医科大学付属病院、旭川赤十字病院、岩見沢こども・産婦人科クリニック、遠軽厚生病院、えんどう桔梗マタニティクリニック、王子総合病院、帯広協会病院、帯広厚生病院、北見赤十字病院、北見レディースクリニック、勤医協札幌病院、釧路赤十字病院、釧路労災病院、慶愛病院、KKR 札幌医療センター、公立芽室病院、五輪橋産科婦人科小児科病院、札幌医科大学付属病院、札幌厚生病院、札幌徳洲会病院、市立札幌病院、市立土別総合病院、市立函館病院、市立稚内病院、白石産婦人科病院、新日鐵室蘭総合病院、手稲溪仁会病院、天使病院、北海道立紋別病院、町立中標津病院、中村病院、名寄市立総合病院、日鋼記念病院、函館五稜郭病院、函館中央病院、はしもとクリニック、朋佑会札幌産科婦人科病院、北海道社会保険病院（現 JCHO 北海道病院）および北海道大学病院の関係者の皆様に心からお礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

参考文献

- Acerini, C.L., Miles, H.L., Dunger, D.B., Ong, K.K., and Hughes, I.A. (2009). The descriptive epidemiology of congenital and acquired cryptorchidism in a UK infant cohort. *Arch Dis Child* *94*, 868-872.
- Andrade, A.J., Grande, S.W., Talsness, C.E., Grote, K., and Chahoud, I. (2006). A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* *227*, 185-192.
- Anghel, A., Narita, D., Seclaman, E., Popovici, E., Anghel, M., and Tamas, L. (2010). Estrogen receptor alpha polymorphisms and the risk of malignancies. *Pathol Oncol Res* *16*, 485-496.
- Araki, A., Mitsui, T., Goudarzi, H., Nakajima, T., Miyashita, C., Itoh, S., Sasaki, S., Cho, K., Moriya, K., Shinohara, N., *et al.* (2017). Prenatal di(2-ethylhexyl) phthalate exposure and disruption of adrenal androgens and glucocorticoids levels in cord blood: The Hokkaido Study. *Sci Total Environ* *581-582*, 297-304.
- Araki, A., Mitsui, T., Miyashita, C., Nakajima, T., Naito, H., Ito, S., Sasaki, S., Cho, K., Ikeno, T., Nonomura, K., *et al.* (2014). Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood: the Hokkaido study on environment and children's health. *PLoS One* *9*, e109039.
- Aris, A. (2014). Estimation of bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada. *Reprod Toxicol* *45*, 8-13.
- Arnal, J.F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., *et al.* (2017). Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol Rev* *97*, 1045-1087.
- Auger, J., Le Denmat, D., Berges, R., Doridot, L., Salmon, B., Canivenc-Lavier, M.C., and Eustache, F. (2013). Environmental levels of oestrogenic and antiandrogenic compounds feminize digit ratios in male rats and their unexposed male progeny. *Proc Biol Sci* *280*, 20131532.
- Ban, S., Sata, F., Kurahashi, N., Kasai, S., Moriya, K., Kakizaki, H., Nonomura, K., and Kishi, R. (2008). Genetic polymorphisms of ESR1 and ESR2 that may influence estrogen activity and the risk of hypospadias. *Hum Reprod* *23*, 1466-1471.
- Barrett, E.S., Sathyanarayana, S., Mbowe, O., Thurston, S.W., Redmon, J.B., Nguyen, R.H.N., and Swan, S.H. (2017). First-Trimester Urinary Bisphenol A Concentration in Relation to Anogenital Distance, an Androgen-Sensitive Measure of Reproductive Development, in Infant Girls. *Environ Health Perspect* *125*, 077008.
- Ben-Hur, H., Thole, H.H., Mashiah, A., Insler, V., Berman, V., Shezen, E., Elias, D., Zuckerman, A., and Ornoy, A. (1997). Estrogen, progesterone and testosterone receptors

in human fetal cartilaginous tissue: immunohistochemical studies. *Calcif Tissue Int* *60*, 520–526.

Bergman Å., Heindel JJ., Jobling S., Kidd KA., and Zoeller RT. (2012). *Endocrine Disrupting Chemicals-2012*. World Health Organization, 2012.

Chang, W.H., Li, S.S., Wu, M.H., Pan, H.A., and Lee, C.C. (2015). Phthalates might interfere with testicular function by reducing testosterone and insulin-like factor 3 levels. *Hum Reprod* *30*, 2658–2670.

D'Aloisio, A.A., DeRoo, L.A., Baird, D.D., Weinberg, C.R., Sandler, D.P. (2013). Prenatal and infant exposures and age at menarche, *Epidemiology* *24*, 277–284.

Fernández, M.F., Arrebola, J.P., Jiménez-Díaz, I., Sáenz, J.M., Molina-Molina, J.M., Ballesteros, O., Kortenkamp, A., and Olea, N. (2016). Bisphenol A and other phenols in human placenta from children with cryptorchidism or hypospadias. *Reprod Toxicol* *59*, 89–95.

Galis, F., Ten Broek, C.M., Van Dongen, S., and Wijnaendts, L.C. (2010). Sexual dimorphism in the prenatal digit ratio (2D:4D). *Arch Sex Behav* *39*, 57–62.

Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G., and Sumpter, J.P. (1997). The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* *105*, 802–811.

Hart, R., Doherty, D.A., Frederiksen, H., Keelan, J.A., Hickey, M., Sloboda, D., Pennell, C.E., Newnham, J.P., Skakkebaek, N.E., and Main, K.M. (2014). The influence of antenatal exposure to phthalates on subsequent female reproductive development in adolescence: a pilot study. *Reproduction* *147*, 379–390.

Hoppin, J.A., Brock, J.W., Davis, B.J., and Baird, D.D. (2002). Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ Health Perspect* *110*, 515–518.

Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L., and Gray, L.E. (2008). Fifteen years after “Wingspread”—environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci* *105*, 235–259.

Jensen, M.S., Toft, G., Thulstrup, A.M., Bonde, J.P., Olsen, J. (2010). Cryptorchidism according to maternal gestational smoking. *Epidemiology* *18*, 220–25.

Jensen, M.S., Anand-Ivell, R., Nørgaard-Pedersen, B., Jönsson, B.A., Bonde, J.P., Hougaard, D.M., Cohen, A., Lindh, C.H., Ivell, R., and Toft, G. (2015). Amniotic fluid phthalate levels and male fetal gonad function. *Epidemiology* *26*, 91–99.

Jensen, M.S., Nørgaard-Pedersen, B., Toft, G., Hougaard, D.M., Bonde, J.P., Cohen, A., Thulstrup, A.M., Ivell, R., Anand-Ivell, R., Lindh, C.H., *et al.* (2012). Phthalates and perfluorooctanesulfonic acid in human amniotic fluid: temporal trends and timing of amniocentesis in pregnancy. *Environ Health Perspect* *120*, 897–903.

Johansson, H., Gray, K.P., Pagani, O., Regan, M.M., Viale, G., Aristarco, V., Macis, D., Puccio, A., Roux, S., Maibach, R., *et al.* (2016). Impact of CYP19A1 and ESR1 variants on early-onset side effects during combined endocrine therapy in the TEXT trial. *Breast Cancer Res* 18, 110.

Jurečková, J., Babušíková, E., Kmet'ová, M., Kliment, J., and Dobrota, D. (2015). Estrogen receptor alpha polymorphisms and the risk of prostate cancer development. *J Cancer Res Clin Oncol* 141, 1963–1971.

Kan, N.E., Tyutyunnik, V.L., Donnikov, A.E., Sannikova, M.V., and Sukhikh, G.T. (2014). Association of ESR1 gene polymorphism with preterm rupture of fetal membranes. *Bull Exp Biol Med* 156, 841–844.

Kato, K., Silva, M.J., Brock, J.W., Reidy, J.A., Malek, N.A., Hodge, C.C., Nakazawa, H., Needham, L.L., and Barr, D.B. (2003). Quantitative detection of nine phthalate metabolites in human serum using reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 27, 284–289.

Kessler, W., Numtip, W., Völkel, W., Seckin, E., Csanády, G.A., Pütz, C., Klein, D., Fromme, H., and Filser, J.G. (2012). Kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in blood and of DEHP metabolites in urine of male volunteers after single ingestion of ring-deuterated DEHP. *Toxicol Appl Pharmacol* 264, 284–291.

Kishi, R., Araki, A., Minatoya, M., Hanaoka, T., Miyashita, C., Itoh, S., Kobayashi, S., Ait Bamai, Y., Yamazaki, K., Miura, R., *et al.* (2017). The Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: cohort profile—updated 2017. *Environ Health Prev Med* 22, 46.

Kishi, R., Kobayashi, S., Ikeno, T., Araki, A., Miyashita, C., Itoh, S., Sasaki, S., Okada, E., Kashino, I., Itoh, K., *et al.* (2013). Ten years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: cohort profile—updated 2013. *Environ Health Prev Med* 18, 429–450.

Kishi, R., Sasaki, S., Yoshioka, E., Yuasa, M., Sata, F., Saijo, Y., Kurahashi, N., Tamaki, J., Endo, T., Sengoku, K., *et al.* (2011). Cohort profile: the Hokkaido study on environment and children's health in Japan. *Int J Epidemiol* 40, 611–618.

Klimek, M., Galbarczyk, A., Nenko, I., Alvarado, L.C., and Jasienska, G. (2014). Digit ratio (2D:4D) as an indicator of body size, testosterone concentration and number of children in human males. *Ann Hum Biol* 41, 518–523.

Knickmeyer, R.C., Woolson, S., Hamer, R.M., Konneker, T., and Gilmore, J.H. (2011). 2D:4D ratios in the first 2 years of life: Stability and relation to testosterone exposure and sensitivity. *Horm Behav* 60, 256–263.

Koch, H.M., Bolt, H.M., Preuss, R., and Angerer, J. (2005). New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 79, 367–376.

Källén, B., Bertollini, R., Castilla, E., Czeizel, A., Knudsen, L.B., Martinez-Frias, M.L., Mastroiacovo, P., and Mutchinick, O. (1986). A joint international study on the epidemiology of hypospadias. *Acta Paediatr Scand Suppl* 324, 1-52.

Langdahl, B.L., Løkke, E., Carstens, M., Stenkjaer, L.L., and Eriksen, E.F. (2000). A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. *J Bone Miner Res* 15, 2222-2230.

Li, Y., Isomaa, V., Pulkka, A., Herva, R., Peltoketo, H., and Vihko, P. (2005). Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas. *Placenta* 26, 387-392.

Lutterodt, M.C., Sørensen, K.P., Larsen, K.B., Skouby, S.O., Andersen, C.Y., Byskov, A.G. (2009). The number of oogonia and somatic cells in the human female embryo and fetus in relation to whether or not exposed to maternal cigarette smoking, *Hum. Reprod.* 24, 2558-2566.

Malas, M.A., Dogan, S., Evcil, E.H., and Desdicioglu, K. (2006). Fetal development of the hand, digits and digit ratio (2D:4D). *Early Hum Dev* 82, 469-475.

Mamsen, L.S., Lutterodt, M.C., Andersen, E.W., Skouby, S.O., SørK.P., ensen, Andersen, C.Y. et al. (2010). Cigarette smoking during early pregnancy reduces the number of embryonic germ and somatic cells, *Hum. Reprod.* 25 (2010) 2755-2761.

Manning, J., Bundred, P., Newton, D., and Flanagan, B. (2003). The second to fourth digit ratio and variation in the androgen receptor gene. *Evolution and Human Behavior* 24, 399-405.

Manning, J.T., Scutt, D., Wilson, J., and Lewis-Jones, D.I. (1998). The ratio of 2nd to 4th digit length: a predictor of sperm numbers and concentrations of testosterone, luteinizing hormone and oestrogen. *Hum Reprod* 13, 3000-3004.

Maruyama, H., Toji, H., Harrington, C.R., Sasaki, K., Izumi, Y., Ohnuma, T., Arai, H., Yasuda, M., Tanaka, C., Emson, P.C., et al. (2000). Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 57, 236-240.

Menasce, L.P., White, G.R., Harrison, C.J., and Boyle, J.M. (1993). Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics* 17, 263-265.

Mitsui, T., Araki, A., Goudarzi, H., Miyashita, C., Ito, S., Sasaki, S., Kittu, T., Moriya, K., Cho, K., Morioka, K., et al. (2016). Effects of adrenal androgens during the prenatal period on the second to fourth digit ratio in school-aged children. *Steroids* 113, 46-51.

Mitsui, T., Araki, A., Imai, A., Sato, S., Miyashita, C., Ito, S., Sasaki, S., Kittu, T., Moriya, K., Cho, K., et al. (2015). Effects of prenatal Leydig cell function on

the ratio of the second to fourth digit lengths in school-aged children. *PLoS One* *10*, e0120636.

Olsén, L., Lampa, E., Birkholz, D.A., Lind, L., and Lind, P.M. (2012). Circulating levels of bisphenol A (BPA) and phthalates in an elderly population in Sweden, based on the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS). *Ecotoxicol Environ Saf* *75*, 242–248.

Paul, S.N., Kato, B.S., Cherkas, L.F., Andrew, T., and Spector, T.D. (2006). Heritability of the second to fourth digit ratio (2d:4d): A twin study. *Twin Res Hum Genet* *9*, 215–219.

Ponglikitmongkol, M., Green, S., and Chambon, P. (1988). Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J* *7*, 3385–3388.

Rehman, S., Usman, Z., Aldraihem, M., Rehman, N., Rehman, I., and Ahmad, G. (2018). Endocrine disrupting chemicals and impact on male reproductive health. *Transl Androl Urol* *7*, 490–503.

Rignell-Hydbom, A., Lindh, C.H., Dillner, J., Jönsson, B.A., and Rylander, L. (2012). A nested case-control study of intrauterine exposure to persistent organochlorine pollutants and the risk of hypospadias. *PLoS One* *7*, e44767.

Roodi, N., Bailey, L.R., Kao, W.Y., Verrier, C.S., Yee, C.J., Dupont, W.D., and Parl, F.F. (1995). Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* *87*, 446–451.

Rubin, B.S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* *127*, 27–34.

Safarinejad, M.R., Safarinejad, S., and Shafiei, N. (2012). Estrogen receptors alpha (rs2234693 and rs9340799), and beta (rs4986938 and rs1256049) genes polymorphism in prostate cancer: evidence for association with risk and histopathological tumor characteristics in Iranian men. *Mol Carcinog* *51 Suppl 1*, E104–117.

Sathyanarayana, S., Swan, S.H., Farin, F.M., Wilkerson, H.W., Bamshad, M., Grady, R., Zhou, C., and Schwartz, S.M. (2012). A pilot study of the association between genetic polymorphisms involved in estrogen signaling and infant male genital phenotypes. *Asian J Androl* *14*, 766–772.

Scott, H.M., Mason, J.I., and Sharpe, R.M. (2009). Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev* *30*, 883–925.

Smith, L.M., Cloak, C.C., Poland, R.E., Tarday, J., Ross, M.G. (2003) Prenatal nicotine increases testosterone levels in the fetus and female offspring, *Nicotine Tob. Res.* *5* (2003) 369–374.

Son, B.H., Kim, M.K., Yun, Y.M., Kim, H.J., Yu, J.H., Ko, B.S., Kim, H., and Ahn, S.H. (2015). Genetic polymorphism of ESR1 rs2881766 increases breast cancer risk in Korean women. *J Cancer Res Clin Oncol* *141*, 633–645.

- Stavrou, I., Zois, C., Ioannidis, J.P., and Tsatsoulis, A. (2002). Association of polymorphisms of the oestrogen receptor alpha gene with the age of menarche. *Hum Reprod* *17*, 1101–1105.
- Swan, S.H., Sathyanarayana, S., Barrett, E.S., Janssen, S., Liu, F., Nguyen, R.H., Redmon, J.B., and Team, T.S. (2015). First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Hum Reprod* *30*, 963–972.
- Takeuchi, S., Iida, M., Kobayashi, S., Jin, K., Matsuda, T., and Kojima, H. (2005). Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. *Toxicology* *210*, 223–233.
- Touchstone, J.C., Murawec, T., and Bolognese, R.J. (1972). Gas-chromatographic determination of total estriol in amniotic fluid. *Clin Chem* *18*, 129–130.
- Vaillancourt, K.L., Dinsdale, N.L., and Hurd, P.L. (2012). Estrogen receptor 1 promoter polymorphism and digit ratio in men. *Am J Hum Biol* *24*, 682–689.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., and Welshons, W.V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* *24*, 139–177.
- Voracek, M., and Dressler, S.G. (2009). Brief communication: Familial resemblance in digit ratio (2D:4D). *Am J Phys Anthropol* *140*, 376–380.
- Voracek, M., and Loibl, L.M. (2009). Scientometric analysis and bibliography of digit ratio (2D:4D) research, 1998–2008. *Psychol Rep* *104*, 922–956.
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., and Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* *15*, 1281–1287.
- Warrington, N.M., Shevroja, E., Hemani, G., Hysi, P.G., Jiang, Y., Auton, A., Boer, C.G., Mangino, M., Wang, C.A., Kemp, J.P., *et al.* (2018). Genome-wide association study identifies nine novel loci for 2D:4D finger ratio, a putative retrospective biomarker of testosterone exposure in utero. *Hum Mol Genet* *27*, 2025–2038.
- Welsh, M., Saunders, P.T., Fiskens, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Smith, L.B., and Sharpe, R.M. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* *118*, 1479–1490.
- Xie, C., Jin, R., Zhao, Y., Lin, L., Li, L., Chen, J., and Zhang, Y. (2015). Paraoxonase 2 gene polymorphisms and prenatal phthalates' exposure in Chinese newborns. *Environ Res* *140*, 354–359.
- Yaich, L., Dupont, W.D., Cavener, D.R., and Parl, F.F. (1992). Analysis of the PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res* *52*, 77–83.
- Yamada, H., Furuta, I., Kato, E.H., Kataoka, S., Usuki, Y., Kobashi, G., Sata, F.,

Kishi, R., and Fujimoto, S. (2002). Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* *16*, 735-739.

Zheng, Z., and Cohn, M.J. (2011). Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 16289-16294.