

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究
周産期試料に関する分析

主任研究者 牧野 恒久 （東海大学医学部専門診療学系産婦人科）
研究協力者 和泉俊一郎 （東海大学医学部専門診療学系産婦人科）

報告要旨

生体試料採取にあたっては、周産期試料を対象とした。周産期試料としては母子関係を重視し、母体側試料と、その母体より出生した新生児側試料を関連づけて採取した。母体側からは、母体血、母乳を、新生児側からは臍帯血を基準試料とし、我々の班で策定したガイドラインの測定法を用いた。さらに生体試料提供協力者の身体的、社会的、環境的背景を記録し、疫学的分析の資料とした。各物質とも母乳からの検出はなかった。また最も高頻度に検出されたのは、尿中の NP であった。また DEHP は決して検出率は高くないが、検出されたサンプルでは母体血、さい帯血で最も高い濃度を示した。また今回検出された検体では危険値を超える濃度を示したものは認められなかった。

A. 研究目的

次世代への内分泌かく乱化学物質の影響を考える場合、母児間の移行の実態の理解は必須である。

まず内分泌かく乱物質の妊婦および胎児・新生児への影響は、単独試料による分析だけでは不十分であり、母子の一連の試料のもとに、母体側暴露状態と、妊娠中の胎児への移行を分析する必要がある。そこで、本研究に使用する試料の採取にあたっては、十分なインフォームドコンセントの上で同意を得て母体側試料と、その母体より出生した新生児の試料を採取し、母子両者の分析結果比較が可能になるよう条件を設けた。

次に、母体側環境、例えば妊娠経過、その間の食生活、嗜好、また、住居付近の生活環境等にも配慮し、疫学的分析の資料とした。

B. 試料

東海大学医学部付属病院産婦人科外来において、研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた患者より、全例同意書を得た。

周産期試料としては、分娩時、母体血 20ml、臍帯血全量を採取し、すぐに遠沈し、血清をマイナス 4℃で保存した。採取にあたっては、採取器具からのコンタミネーションを防止するために、本研究開始時の基礎実験の結果に基づ

いて施行した。母乳採取は分娩 4 日目と 5 日目に可能な限りの量を採取し、マイナス 4℃にて保存した。また、分析対象の補充を試みるべく、各研究機関からの依頼を受けて、必要に応じて母体毛髪、臍帯、胎脂等の採取を行った。

検査法については牧野班で策定したガイドラインにしたがい、主要 3 物質（フタル酸エステル類、ビスフェノール A、ノニルフェノール）を検討対象とした。

C. 測定方法

①フタル酸エステル類

1.1 試薬および標準溶液

ヘキサン、アセトニトリル、アセトン、硫酸ナトリウムは関東化学製フタル酸エステル測定用を用いた。フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジイソオクチル (DiOP)、フタル酸ジイソノニル (DiNP) は、関東化学製環境分析用を用いた。また、内部標準物質として用いた DBP-d4、BBP-d4、DEHP-d4、DiOP-d4、DiNP-d4 は、林純薬工業製環境分析用を用いた。フロリジル及びボンデシル PSA は、それぞれ和光純薬工業及びバリアン社製を使用した。フタル酸エステル類の標準溶液は、DBP、BBP、DEHP の濃度が 4 μ g/mL、DiOP、DiNP の濃度が 20 μ g/mL になるようにヘキサンで希釈した。内部標準溶液は、それぞれの濃度が 4

μg/mL になるようにヘキサンで希釈した。

1.2 器具・試薬の前処理

ホールピペット、メスフラスコ以外の器具は、200℃で2時間加熱し、使用直前にヘキサンで洗浄した。塩化ナトリウム、フロリジル、硫酸ナトリウムは、200℃で2時間加熱した。

1.3 フロリジル-PSA カラムの調製

内径 15 mm、長さ 110 mm のガラス製カラムの底に、ガラス繊維濾紙を敷き、フロリジル 1 g、PSA 0.5 g、無水硫酸ナトリウム 2 g を積層した。使用直前にアセトン 10 mL、ヘキサン 10 mL で洗浄した。

1.4 試験溶液の調製法

試験溶液の調製法の概要を、スキーム 1 に示した。血清 1 g を共栓付遠心管 (10 mL、ガラス製) にとり、アセトニトリル 5 mL、塩化ナトリウム 0.5 g、ヘキサン 1 mL 及び内部標準溶液 (あるいは標準溶液) 25 μL を加えた後、3 分間混和した。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層を分取し、減圧留去した。残渣を蒸留水 2 mL、ヘキサン 5 mL に溶解後、ヘキサン層を分取した。残った水層に再度ヘキサン 3 mL を加えて混和後、ヘキサン層を分取した。分取したヘキサン層をフロリジル-PSA カラムに負荷し、ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を減圧留去後、ヘキサン 1 mL に溶解して試験溶液とした。

1.5 GC/MS 条件

装置: Agilent 6890N GC/5973N MSD

イオン源: EI

カラム: HP-5MS SV (30 m x 0.25 mm ID、膜厚 0.5 μm)

カラム温度: 80℃ (3 分) → 20℃/分 → 240℃ → 10℃/分 → 300℃ (5 分)

キャリアガス: He (カラム流量 1.2 mL/分)

注入口温度: 250℃

試料注入法: パルスドスプリットレス

四重極温度: 150℃

イオン源温度: 230℃

検出法: 選択イオン検出 (SIM)

1.6 定量法

試料液を GC/MS に注入し、各フタル酸エステル類のピーク面積を内部標準のピーク面積で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。DiOP は主要な 2 本のピークを、DiNP は主要な 5 本のピーク面積をそれぞれ合計して定量対象とした。

②ビスフェノール A

1. 試料

標準品: ビスフェノール A (BPA) 及びビスフェノール A-d₁₆ (BPA-d₁₆) は関東化学(株)製の環境分析用試薬を、¹³C-BPA はケンブリッジアイトープ製を用いた。標準溶液は、各標準品 20mg を精秤し、メタノール 100mL に溶解して標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液とした。

Daidzein, Genistein, Glycitein 及びイソフラボン配糖体、Malonyl 体、Acetyl 体は和光純薬工業(株)あるいはナカライ化学(株)製の生化学用試薬を用いた。標準溶液は、各標準品 10mg を精秤し、メタノール 100mL に溶解して標準原液を調製し、適宜 80%メタノールに溶解して標準溶液とした。

β-グルクロニダーゼ: シグマ社製又は、和光純薬工業(株)製、生化学用 (いずれも 100,000 units/mL 以上) を用いた。

精製用カートリッジ: Isolute Multimode カートリッジ (500 mg): International Sorbent Technology Ltd. 製、又は、スペルコ製、スペルクリン ENVI-18 (0.5g) を用いた。カートリッジは予めメタノール 10mL、水 5mL の順で洗浄した後使用した。

アルミナ-A カートリッジ: Waters 社製、Sep-Pak アルミナ-A カートリッジ (1.7g) を用いた。カートリッジは予めアセトン 5mL、精製水 5mL、アセトン 5mL の順で洗浄して使用した。BSTFA: ジーエルサイエンス(株)製を使用した。

その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を用いた。

2. 装置及び測定条件

2.1. 高速液体クロマトグラフィー質量分析計: Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。測定条件は表 1 のとおりとした。

2.2. ガスクロマトグラフィー質量分析計: 日本電子(株)製 GC-mate を用いた。測定条件は次のとおりとした。

GC: HP-5890 シリーズ II

カラム: DB-5MS 0.32mm x 30m x 0.25 μm

カラム温度: 70℃ (2min) → 20℃/min → 150℃ → 10℃/min → 300℃ (5min)

注入口温度: 250℃

キャリアーガス: He, 1mL/min

注入方法: スプリットレス パージオフ 1min

MS: Jeol GC-mate

イオン源温度: 230℃

イオン化電圧：70V

モニターイオン (m/z)：BPA (357, 372), BPA- d_{16} (368, 386), ^{13}C -BPA (369)

3. 検量線の作成

3.1 LC/MS 測定

安定同位体標識内部標準物質 BPA- d_{16} を 10 ng 含んだ BPA の 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 100ng/mL の溶液を調製し、その 10 μL を LC/MS に注入する。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM)法を採用し、それぞれモニターイオン m/z 227, m/z 241 により得られた SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め、BPA と BPA- d_{16} の面積比により検量線を作成した。

3.2. GC/MS 測定

試験管に BPA を 10~200ng の範囲で段階的に採り、これに安定同位体標識内部標準物質として ^{13}C -BPA を 100ng 添加し、BSTFA 200 μL を加え、アセトンで 1mL に定容した。これを一夜放置し、GC/MS-SIM で測定し、 ^{13}C -BPA との面積比で検量線を作成した。

4. 試験溶液の調製

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品・化学物質安全総合研究事業)「試料分析の信頼性確保と生体曝露量のモニタリングに関する研究」報告書に準拠して次のとおり調製した。

4.1. LC/MS 測定用試験溶液の調製

○遊離体 BPA 測定用試験溶液

血清は 1mL を、尿は 2mL を採り、内部標準物質である BPA- d_{16} を 5~10 ng 加えた後 Isolute Multimode カートリッジに負荷した。水 3mL 及び 20%メタノール 3mL で洗浄した後メタノール 3mL で溶出し、減圧乾固後 10%メタノール 1mL に溶解して試験溶液とした。

○総 BPA 測定用試験溶液

血清は 1mL を、尿は 2mL を採り、0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) 1mL、 β -グルクロニダーゼ 6,500units/mL (試薬 β -グルクロニダーゼを 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) で 10 倍希釈) を 50 μL 加えた後、37℃で 1 時間インキューベートした。その後の操作は遊離体 BPA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

4.2. GC/MS 測定用試験溶液の調製

○遊離体 BPA 測定用試験溶液

尿試料 100 mL を共栓付き三角フラスコに採り、 ^{13}C -BPA 0.1 μg を加え、これに (1+1) リン酸 1mL を加え、pH 3 以下にした。これを、予

めメタノール 5mL、精製水 10mL で活性化した C18 カートリッジに負荷し BPA を抽出した。カートリッジを 10%メタノール 10mL で洗浄後、3mL のメタノールで BPA を溶出させ、100mL のナス型フラスコに受け、酢酸エチル 20mL を加え、ロータリーエバポレータで濃縮乾固した。フラスコに BSTFA 200 μL とアセトン 2mL を加え一夜放置し TMS 化し、ロータリーエバポレータでアセトンを留去した。これに n -ヘキサン 2mL を加え、超音波洗浄機で溶解させ、予め n -ヘキサン 5mL で洗浄したフロリジルカートリッジに負荷し、流出液を試験管に採取した。更に、 n -ヘキサン 2mL ずつでフラスコを 2 回洗浄し、カートリッジに負荷し、先の流出液と合わせた。流出液に窒素ガスを吹き付け、1mL に濃縮し、これを GC/MS-SIM で定量した。

○総 BPA 測定用試験溶液

尿試料 100mL を共栓付き三角フラスコに採り、 β -グルクロニダーゼ溶液 100 μL と ^{13}C -BPA 0.1 μg を加え、37℃で 90 分間酵素処理した。その後の操作は遊離体 BPA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

③ノニルフェノール

1. 試薬・装置

【試薬】ノニルフェノール (NP) は、環境分析用試薬 (関東化学社製) を使用した。内標準物質として用いた 4-(1-メチル)オクチルフェノール- d_5 (NP- d_5) は、環境分析用試薬 (林純薬社製) を用いた。それぞれの構造式を図 1 に示す。

【溶媒】LC/MS の移動相に使用したアセトニトリルは和光純薬社製 HPLC 用を、酢酸アンモニウムは和光純薬社製特級を選択した。また、前処理に利用した溶媒は、全て和光純薬社製残留農薬用を使用した。精製水は日本ミリポア社製 Milli-Q (EDS ポリッシャー付き) で精製した水を使用した。

【実験用器具】ガラス製の実験器具は、すべて 200℃以上で加熱後使用した。

【LC/MS 装置及び測定条件】

LC/MS 装置 (機種：Agilent 1100 LC/MSD-SL)
LC 条件

・分析用カラム：関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2.1 x 100 mm, 5 μm)

・ガードカラム：関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2 x 5 mm, 5 μm)

・前処理用カラム：TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5 μm)

・移動相：アセトニトリル+0.02%酢酸ア

- ンモニウム/ 0.02 %酢酸アンモニウム溶液
(70 : 30 (8 min)→95 : 5 (10 min) (V/V))
・流速: 0.2 ml/min (分析カラム)、0.5 ml/min
(前処理カラム)
・カラム温度: 40 °C
・注入量: 30 µl

MS 条件

- ・イオン化法: Electrospray (ESI) ,
Negative
・Nebulizer gas: N₂ (35 psi)
・Drying gas: N₂ (12 l/min, 350 °C)
・フラグメンター電圧: 130 V (NP, NP-d₅)
・モニタリングイオン (*m/z*): 219 (NP), 224
(NP-d₅)

2. オンライン前処理-LC/MS 法の測定概要

血清試料に同量のアセトニトリルを加え、遠心分離を行った。その後、上清を取り、暫定濃度になるように内標準物質を添加し、測定用試料とした。抽出精製・濃縮は、オンライン前処理固相カラムを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質を分離部及び検出部 (LC/MS) に導入する。検出には、ESI-MS による SIM モードネガティブで測定を実施した。

測定試料の調製法

測定対象とした血清は神奈川県食肉衛生検査所にてした屠殺した血液を用い、神奈川県衛生研究所で遠心分離 (3000rpm、10 分間) を行い、使用に供するまで - 80°C にて凍結保存した。測定時には室温解凍し、転倒混和を行った後に、ピペッターで正確に 1 ml を量り取り、試験管に移した。この試験管は、あらかじめ洗浄後に精製水、アセトンを通液したものを使用した。血清が入った試験管に標準溶液を血清中 50 µg/ml となるように添加した。次に、血清と同量のアセトニトリルを加え混和後、遠心分離 (3000rpm、30min、4°C) を行った。その後、上清 1 ml をバイアル瓶に正確に量り取り、暫定濃度になるように内標準物質である、NP-d₅ を加え、測定に供した。

標準試料の調製法

各標準品を化学天秤で 100 ml 用メスフラスコに 100 mg 量り取り、標準原液としてアセトニトリルで 1.0 mg/ml とする。その後、0.2~100 µg/ml の濃度範囲になるようにアセトニトリル/水=1/1 (V/V) 溶液を加え調製する。又、内標

準物質を暫定濃度になるよう希釈する。

その後、LC/MS-SIM 法により標準試料溶液を測定し、内標準法を用いて各濃度範囲内における検量線を作成し、定量分析を行った。

D. 結果

サンプルの提供者の平均年齢は 31.9 才であった。各種サンプル数を図 1 に、地域分布を図 2 に示した。

各サンプルについて、前述の方法で各物質の濃度を測定し、それぞれ 0.5 ng/ml をカットオフ値とした。サンプルごとの各物質の検出頻度を図 3~6 に示す。BA は母体血で 86 例中 1 例 (1.2%)、尿中で 16 例中 1 例 (6.3%)、DEHP は母体血で 79 例中 4 例 (5.1%)、さい帯血で 46 例中 1 例 (2.1%)、また NP は母体血で 78 例中 6 例 (7.7%)、さい帯血で 48 例中 4 例 (8.3%)、尿で 16 例中 12 例 (75%) の検出率であった。最も高頻度に検出されたのは、尿中の NP (75%) であった。また検出濃度を図 6 に示す。DEHP が母体血、およびさい帯血で最も高値を示した。

E. 考察

各物質とも母乳からの検出はなかった。また最も高頻度に検出されたのは、尿中の NP であった。また DEHP は決して検出率は高くないが、検出されたサンプルでは母体血、さい帯血で最も高い濃度を示した。また DEHP は血液中では比較的高濃度で検出されているが、尿中からの検出はなく、BA や NP とは異なり、モノ体の測定も必要であることが示唆される。このため DEHP については今後、脂肪組織など他の検体における濃度についても検討の必要があると思われる。また今回検出された検体では危険値を超える濃度を示したものは認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

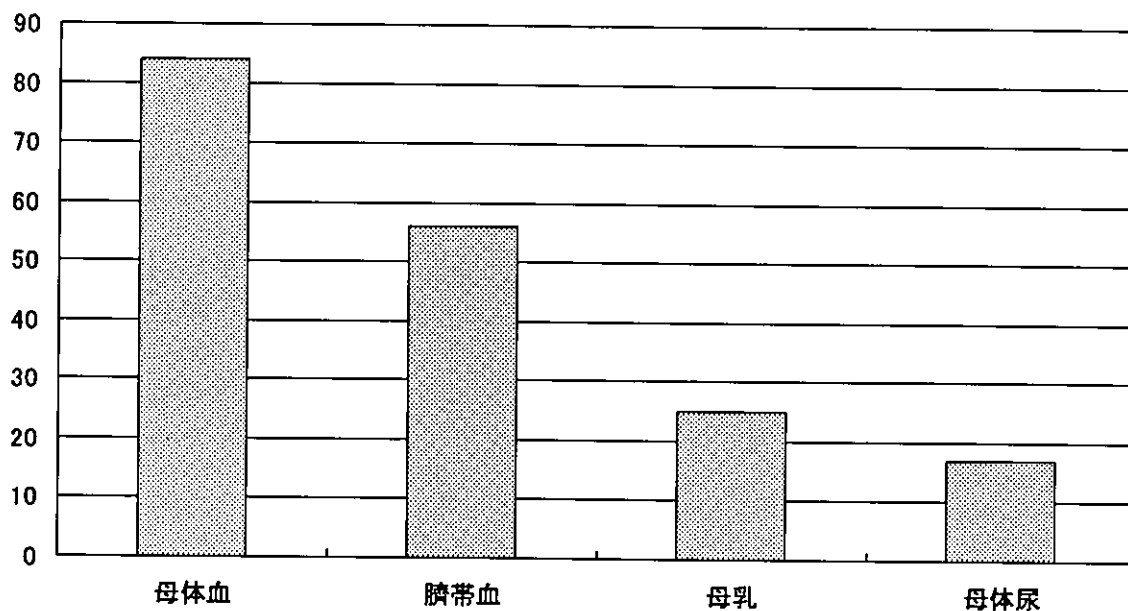
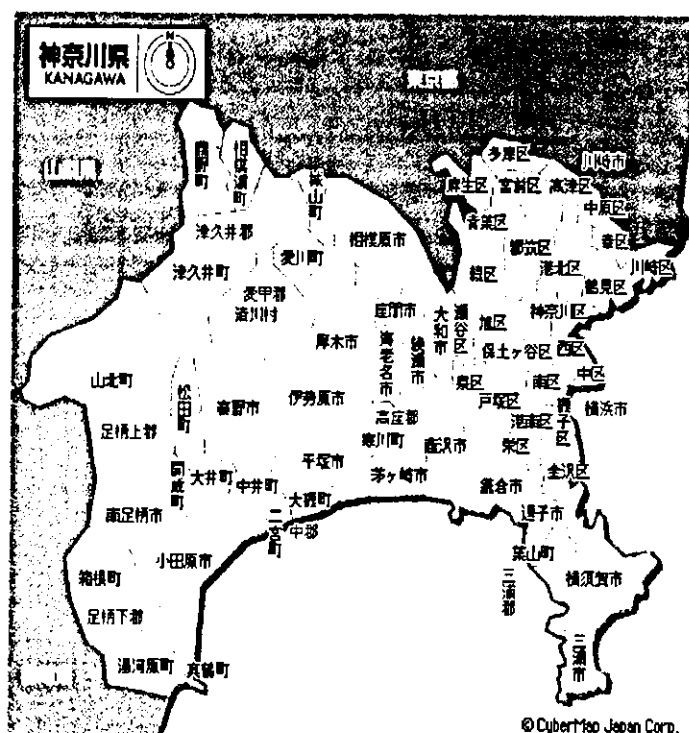


図1 周産期サンプル群



伊勢原市	20	静岡県	8
横浜市	6	東京都	4
平塚市	6	埼玉県	1
秦野市	11	富山県	1
座間市	3	宮崎県	1
小田原市	3	茨城県	1
厚木市	10		
大磯町	2		
茅ヶ崎市	3		
海老名市	1		
大和市	1		
綾瀬市	1		
相模原市	1		
横須賀市	1		
藤沢市	2		
足柄下郡	1		

図2 周産期サンプリング群・地域 (n=84)

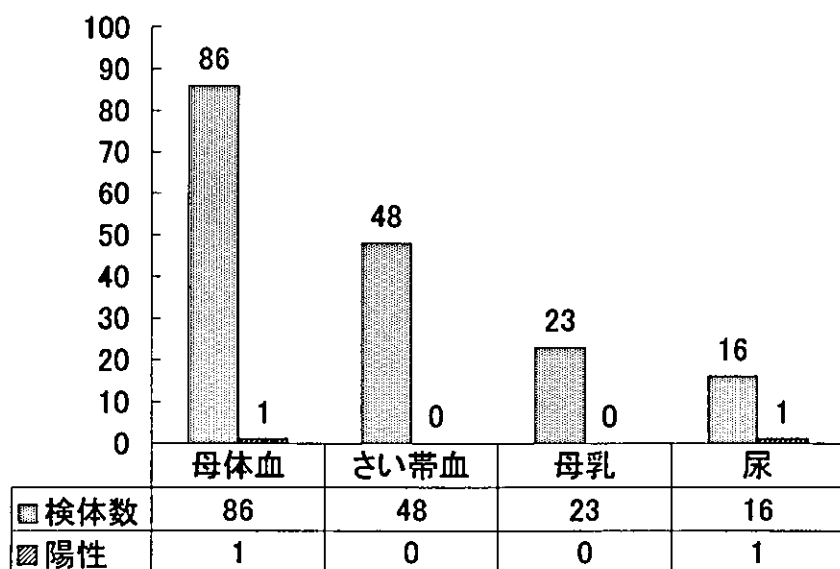


図3 検出頻度 (BA)

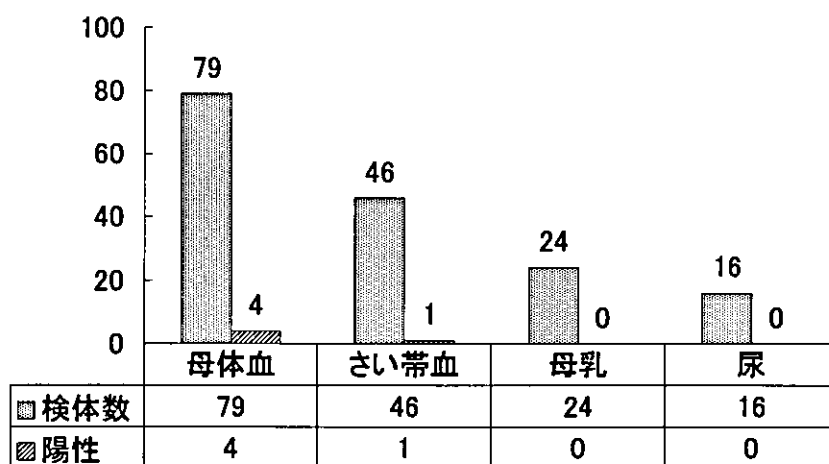


図4 検出頻度 (DEHP)

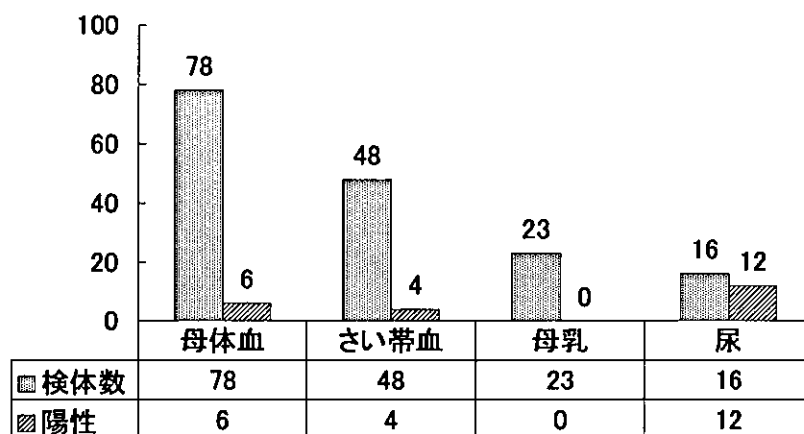


図5 検出頻度 (NP)

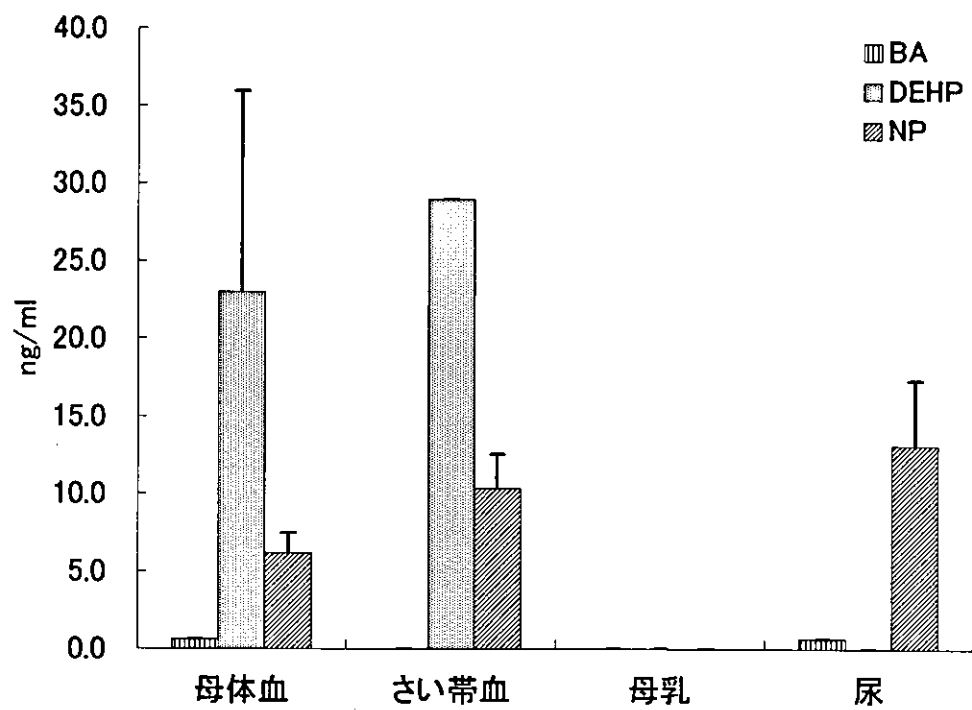


図 6 検出濃度

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究
環境中の内分泌かく乱物質の胎盤機能と胎児発生における影響

主任研究者：牧野 恒久 東海大学医学部教授
分担研究者：塩田 邦郎 東京大学
研究協力者：横田 博 酪農学園大学

研究要旨

妊娠期における内分泌かく乱物質の作用を知る目的で、母体・胎盤・胎児における化学物質の代謝解毒反応、および、胎盤細胞に対する影響を解析した。その結果、子宮環境が化学物質に対するバリアー機能を果たす一方、胎盤はビスフェノール A を通過させることが示された。また、フタル酸エステルが胎盤細胞のゲノム DNA メチル化状態を乱すことが分かり、エピジェネティック異常といった側面からの内分泌かく乱作用の研究が必要であることが明らかになった。

A. 研究目的

胎児期の内分泌かく乱化学物質の作用を評価するにあたって、母体における化学物質の代謝解毒反応、胎盤を介した母体から胎児への移行、および、細胞に対する化学物質の作用機序に関する知見が必要とされる。本研究は妊娠母体における解毒・代謝機能、および、内分泌かく乱物質による胎盤形成への影響を明らかにする事を目的とし、ラット、マウスおよびモルモットの臓器、細胞を用いた研究を行った。

B. 研究方法

B-1 ラット臓器灌流システム

これまでの研究で確立したラット腸管、胃、子宮の灌流システムに加え、モルモットの胎盤灌流システムを確立し用いた。臓器にビスフェノール A を暴露し、経時的に灌流液中の代謝物を HPLC で分析した。

B-2 MEHP の DNA メチル化への作用の解析

1 μ M の Mono-2-dihylhexyl phthalate (MEHP) 存在下でマウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を未分化条件および分化条件で培養し、ゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA のメチル化状態は Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法により解析した。

B-3 倫理面への配慮

本研究に用いられたマウス（東京大学）およびラット、モルモット（酪農学園大学）の飼育・と殺は、各大学の動物実験実施規則を遵守して行われた。

C. 結果

C-1 ラット胃での代謝解毒酵素活性の解析

昨年度から継続して行った胃灌流実験により、胃ではビスフェノール A が素早く吸収され、その大半がグルクロン酸抱合されて粘膜側に戻されることが分かった。

C-2 ラット子宮におけるビスフェノール A の代謝動態の解析

ラット子宮での灌流実験系を用いてビスフェノール A の代謝を調べたところ、ビスフェノール A のグルクロン酸抱合体が生成され、漿膜側に排泄されることが分かった。今回は、妊娠ラット子宮から間質細胞を単離培養し、酵素活性を測定する系を構築した。その結果、妊娠ラット子宮間質細胞に低い値ながらビスフェノール A のグルクロン酸抱合能が存在していることを確認できた。この結果は、免疫組織染色によるグルクロン酸抱合酵素の局在の結果と一致した。

C-3 モルモット胎盤におけるビスフェノール A の代謝動態の解析

モルモットの胎盤灌流実験系を確立し、1-ナフトールの胎盤での代謝を解析すると、その多くがグルクロン酸抱合され母体側に戻っていた。次にビスフェノール A を灌流したところ、1-ナフトールと異なり、その多くが胎盤を通過した。さらに、移行したビスフェノール A は胎児の様々な臓器にグルクロン酸抱合されていない Free 体のまま蓄積して

いた。

C-4 MEHP の TS 細胞ゲノム DNA メチル化への影響の解析

未分化維持条件下、および、分化誘導条件下のどちらにおいても、MEHP 添加による細胞形態の明瞭な変化は観察されなかった。しかし、RLGS によるゲノム DNA のメチル化解析では、未分化維持条件下では 20 ヲ所のメチル化の変化が（亢進 12／阻害 8）、分化誘導条件下では 22 ヲ所のメチル化の変化が（亢進 16／阻害 6）認められた。また、これらのうち、メチル化の亢進した 2 ヲ所は両条件で共通していた（図 1）。

D. 考察および結論

ビスフェノール A は、非妊娠期には子宮上皮細胞に存在する UGT によって、また、妊娠期にもやはり胎児を取り巻く母体の間質細胞によってグルクロン酸抱合（解毒）される事がわかった、これらは、母体子宮環境が薬物のバリエーションとして機能していることを示している。しかし、妊娠後期のモルモット胎盤はそのまま通過することが分かった。妊娠後期のビスフェノール A の胎児への移行は、胎盤にグルクロン酸抱合酵素が発現していないことに起因すると考えられる。

MEHP 添加によりゲノム DNA のメチル化異常が検出されたことの意義は大きい。DNA メチル化は細胞分裂後も維持されるので、MEHP の前駆体である DEHP への一過的な暴露が、DNA メチル化の異常を介して慢性的な遺伝子発現異常を引き起こす可能性がある。これは、内分泌かく乱作用の研究に“エピジェネティック毒性”という新たなパラダイムを提示するものである。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Narukawa, J., Inoue, H., Kato, S. and Yokota, H.
Glucuronidation of 1-naphthol and excretion into the vein in perfused rat kidney
Drug Metab. Dispos. 32:758-761, 2004.
- 2) Kibe, R., Sakamoto, M., Hayashi, H., Yokota, H. and Benno, Y.
Maturation of the murine cecal microbiota

as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism and 16S rRNA gene clone libraries.

FEMS Microbiology Letters 235:139-146, 2004.

- 3) Ito, H., Yokota, H., Wang, R., Yamanoshita, O., Ichihara, G., Wang, H., Kurata, Y., Takagi, K. and Nakajima, T.
Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets
Archives of Toxicology 1432-0738 (Online), 2004.

2. 学会発表

- 1) 五島朋子・富川順子・服部中・田中智・塩田邦郎
フタル酸エステルによるゲノムワイドな DNA メチル化状態への影響
第 138 回日本獣医学会学術集会
(2004 年 9 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該 当 な し

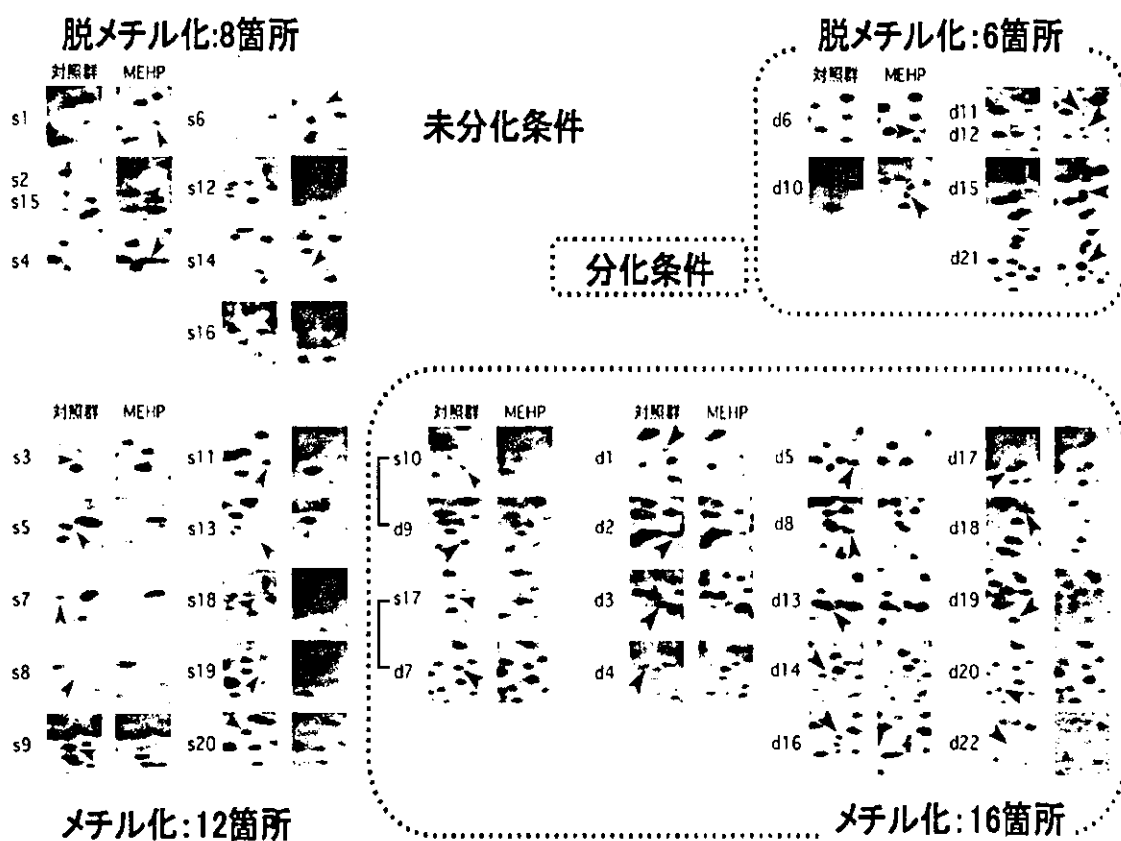


図1 MEHP の DNA メチル化に対する影響

1 μ M の MEHP 存在下、非存在下で培養した TS 細胞における、DNA メチル化状態を解析した結果、MEHP 添加により脱メチル化される領域（上段）および、メチル化される領域（下段）の両方が検出された。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書
「試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究」

研究分担項目「内分泌かく乱化学物質に対する感受性に関与する遺伝子の解明」

分担研究者	木村 穰	（東海大学医学部基礎医学系）
分担研究者	松坂 恭成	（東海大学医学部基礎医学系）
研究協力者	牧野 恒久	（東海大学医学部専門診療系）
研究協力者	和泉 俊一郎	（東海大学医学部専門診療系）

研究要旨

本研究では、内分泌かく乱化学物質の生体への影響として子宮内膜症を取り上げているが、この疾患については内分泌かく乱化学物質が環境要因として深く関与していることが状況証拠として集積しつつあることは周知の事実となってきた。しかしながら、それでも同一の環境におかれてもやはり本疾患のなりやすさ（疾患感受性）は個人で異なっていると考えられる。

本疾患の発症には、代謝酵素調節を含む種々の細胞表面および細胞内分子が重要であると考え、内分泌かく乱物質の毒性発現に関与する細胞内シグナル伝達経路の構成分子に対する遺伝子を本疾患の候補遺伝子として選定した。特に、エスロゲン受容体、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素、アリルヒドロカーボン受容体の各遺伝子については、昨年度までに遺伝子多型を明らかにし、その解析方法を確立した。さらに遺伝的多型マーカーとして有用な高度な多型性を示す遺伝マーカーを設定した。

本年度は、有用性の検討が行われた遺伝的多型マーカーを用いて子宮内膜症患者 43 名、一般健常者 59 名の日本人試料における、各一塩基多型（SNP）の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度について遺伝的相関解析を行った。

A. 研究目的

一般にヒト疾患は遺伝要因と環境要因の組み合わせによって規定されと考えられる。現在までに進められてきた疾患の遺伝要因の解析の多くは、単純なメンデル遺伝を示す単一遺伝子の支配によるものに限定されていた。しかしながら、複数の遺伝的要因が関与する複合性遺伝疾患あるいは、人類集団中において高頻度で見出される通常疾患の原因遺伝子についても、高密度な遺伝的多型マーカーを用いた遺伝的相関解析を行うことによって、その疾患感受性遺伝子を同定できる可能性が示された。子宮内膜症についても、複数の遺伝的効果が複雑に作用している複合性遺伝疾患であると考えられ、高密度な遺伝的多型マーカーを用いた相関解析によってその遺伝要因を明らかにすることができると考えられる。この子宮内膜症は、内因性のエストロゲンとの関係が以前から報告されており、内分泌かく乱化学物質が子宮内膜症の発症および病態に何らかの影響を与えることも予想される。

以上より、本研究では子宮内膜症発症と内分泌かく乱物質の関係において、その遺伝的な背景を明らかにし、発症機構の解明と治療法の開発に役立てることを最終的な目的とした。遺伝的相関解析には、全ゲノム領域を対象として位置的情報のみを手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法と、現在までにその遺伝子の機能が解明されており疾患との関連性を考慮して候補遺伝子を選定する、すなわち機能的情報を手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法があるが、本研究では後者の方法によって子宮内膜症の遺伝的要因に関する情報を蓄積することを目指した。

疾患候補遺伝子として、内分泌かく乱物質の毒性発現に関与する細胞内シグナル伝達経路の構成分子に対応する遺伝子を選定した。今回、対象とした子宮内膜症候補遺伝子は、エスロゲン受容体、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素、アリルヒドロカーボン受容体の各遺伝子である。昨年度はこれらの候補遺伝子領域を遺伝的多型の連鎖不平衡によって網羅的に解析す

るために、遺伝マーカーの設定およびその遺伝的多型の解析法を確立した。今年度は、内子宮内膜症患者集団および健常者集団を用いて、各遺伝マーカーの対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度について、遺伝的相関解析によって子宮内膜症感受性対立遺伝子を同定することを目指とした。

B. 研究方法

1. DNA の抽出

インフォームドコンセントの得られたボランティアより末梢血の採取を行った。採血管はヘパリンがその後の酵素反応に影響を与えるためクエン酸主体のものを使用し、約 10ml を採血した。このうち 0.4ml を用いて、カートリッジ(キアゲン社)による DNA の抽出を行った。得られたゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動によりゲノム DNA の定性的判断を行った。さらに、吸光度を測定して DNA 濃度を算出した。

2. DNA 配列情報および一塩基置換 (SNP) の検索

上記 3 遺伝子 (*ESR1*, *CYP11A1*, *AHR*) のゲノム領域内において SNPs の検出を行うためには、これらの遺伝子領域を含むゲノム DNA の配列情報が必要となる。ヒトゲノム配列は、GenBankDNA database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) より入手した。得られたゲノム配列について、上記 3 遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーター領域を明らかにした。SNP のなかには、調節領域に存在する rSNP (regulatory SNP) やコーディング領域に存在する cSNP (coding SNP), イントロン領域に存在する iSNP (intron SNP), 遺伝子間の介在領域に存在する gSNP (genomic SNP) がある。これらのうち、直接的に表現型に影響を与える SNPs は、rSNP、cSNP、iSNP であり、予めこれらの情報を整理しておくことは、疾患感受性遺伝子のマッピングするうえで大変重要である。

現在までにヒトゲノム上で見い出された SNP についてはデータベースに登録されており、上記 3 遺伝子領域に存在する SNP についてもこのデータベースを検索することによって SNP の位置を明らかにした (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)。

3. プライマーの設計

PCR プライマーの設計は、PCR に適した条件を考慮するソフトウェアである「Primer

Express」を用いて、SNP を挟み込むようにフォワードプライマーとリバースプライマーの 2 種類のプライマーを各 SNP の箇所ごとに設計した。このソフトウェアは PCR に適した条件の必要事項である Tm 値、GC 含量、プライマー配列の 2 次構造等を考慮してプライマー配列を選定できるが、反復領域やゲノム上に類似した配列がある場合、あるいはプライマー配列内に多型がある場合には PCR 増幅が阻害されるため、できる限り配列情報の検索を行っておくことが重要であり、この点は精査した。

4 PCR 増幅

ゲノム DNA 10ng を鋳型としてサーマルサイクラー 9700 (ABI 社) を用いて PCR 反応を行い、SNP を含むゲノム領域の増幅を行った。増幅断片を 2.0% アガロースゲル電気泳動等によって確認した。このとき、予想されるサイズの DNA 断片が検出されなかったり、非特異的 DNA 断片が検出された場合は、PCR 増幅サイクルのうち、アニーリング温度あるいは伸長反応の時間を変化させることによって特異的な DNA 増幅を検討した。最終段階の塩基配列の決定において偽陽性あるいは偽陰性が検出される場合があるため、SNP 検出においては、PCR 増幅条件を十分に検討することが重要である。

5 塩基配列の決定

増幅 DNA 断片をエクソヌクレアーゼ I および Shrimp アルカリホスファターゼによって精製後、PCR 増幅に用いたプライマーを用いてシーケンシングサイクルを行う。反応後、シーケンシング産物を精製して ABI3100 シーケンサーによって塩基配列の決定を行った。明確な波形データが得られない場合は、入れ子 (nested) プライマーを用いて再度シーケンシングサイクルを行った。

6. 統計解析

対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度は、各対立遺伝子および遺伝子型を直接カウントすることによって算出した。患者および健常者集団の間で対立遺伝子の分布に関する偏りは、Fisher の P 検定によって調べた。このとき、 $P < 0.05$ を統計学的有意差とした。オッズ比および 95% 信頼区間は全てのマーカーで解析された。各集団において、遺伝子型頻度がハーディ・ワインベルグの平衡状態にあることも解析した。

なお、本研究は遺伝子解析を含むため、3 省庁

の指針に従い、東海大学医学部の医の倫理委員会での承認を得ると共に、試料提供者には十分な説明を行い、試料提供の同意書を得るように十分配慮した。採取する試料は、血液、毛髪、尿、患者腹水（検査に必須のもの）であることから、試料提供者に直接の不利益はほぼ皆無である。

当初、血液だけを暴露量測定材料と考えた「子宮内膜症に関する遺伝要因の解明」と題する申請については伊医倫 02-037 号の承認を 2002 年 10 月 17 日に得たが、その後、本研究班の班会議において、人体の暴露量測定には尿や毛髪、または子宮内膜症の検査に必須の腹水も有効な試料となる可能性が示されたことから、再度変更申請を行い、伊医倫 02-053 号の承認を 2002 年 11 月 27 日に得ている。

一方この研究について、本大学医学部では情報管理、遺伝カウンセリングの体制も十分備えて万全を期している。

C. 研究成果

1. 遺伝的多型箇所検索

子宮内膜症候補遺伝子である *ESR1* 遺伝子、*CYP11A1* 遺伝子、*AHR* 遺伝子の各遺伝子について、遺伝的多型箇所をデータベースおよび文献検索によって調べた。*ESR1* 遺伝子については、280Kb の比較的広大なゲノム領域にわたり、現在までのところ 340 個の SNP と 8 個のマイクロサテライトが存在する。また、*CYP11A1* 遺伝子および *AHR* 遺伝子については、それぞれ約 6kb と 49.5kb のゲノム領域にともに 24 個の SNP が存在する。また、*AHR* 遺伝子については 4 個のマイクロサテライトが存在していたが、*CYP11A1* 遺伝子については存在していなかった。SNP に関しては、その対立遺伝子頻度の情報が全ての SNP について明らかにされていないため、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency の高い遺伝マーカーを実際実験的に調べる必要がある。そこで、上記の検索によって検出された SNP についてランダムにいくつかの SNP について対立遺伝子頻度を求めることとした。

2. PCR プライマーおよび PCR 条件の設定

遺伝的多型の解析方法を確立するために、a) DNA 抽出方法、b) PCR プライマーの設定と PCR 条件の決定、c) PCR 産物の抽出方法、d) Sequencing 方法の決定を行った。DNA の抽出方法については、0.4ml の末梢血試料をカート

リッジ（キアゲン社）を使用して DNA の調製を行った。このようにして抽出されたゲノム DNA は下記の PCR 反応条件に適当な DNA 濃度および品質を保っていた。PCR プライマーは、SNP 箇所を挟み込む形で設定して、その増幅 DNA 断片が 1.5kb 以下になるように設計した。PCR 反応条件は、94° C 30sec、56~60° C 40sec、72° C 1min のサイクルを 30 回繰り返すことで標的 DNA 断片の増幅を確認できた（表 1）。また、近接する SNP 箇所については 1 つの PCR 断片の中に複数の SNP が含まれるように PCR プライマーを設定し、多型解析の効率化を図った。PCR 増幅断片を含む PCR 産物には、PCR プライマーおよび dNTPs（デオキシヌクレオチド三リン酸）が含まれているため、これらを Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase によって除去し、1/100 量を Sequencing 反応に使用した。

3. DNA 多型解析

DNA 多型の解析方法が確立された SNP について、その対立遺伝子頻度を求め遺伝的多型マーカーとしての有用性を検討した。患者群 5 名、対照群 11 名について、子宮内膜症候補遺伝子内に検出された遺伝的多型箇所のうちランダムに SNP を選択して、塩基配列の決定を行った。その結果、*ESR1* 遺伝子については SNP43 箇所中 31 箇所において多型性が確認された。さらに、多型が確認されたこれらの SNP について Minor allele frequency を算出したところ、多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が 0.2 以上の SNP を 26 箇所確認した（表 2）。同様に、*CYP11A1* 遺伝子については SNP32 箇所中 8 箇所において多型性が確認され、Minor allele frequency が 0.2 以上の SNP は 4 箇所存在していた（表 2）。また、*AHR* 遺伝子については SNP11 箇所中 5 箇所において多型性が確認され、この SNP はすべて Minor allele frequency が 0.2 以上を満たしていた（表 2）。

4. 遺伝的相関解析

子宮内膜症患者集団において特異的な対立遺伝子が存在するかを調べるために、上記のようにして設定された SNP マーカーを用いて、日本人対象者集団 59 人と子宮内膜症患者 43 人における相関解析を子宮内膜症候補遺伝子である *ESR1* 遺伝子、*CYP11A1* 遺伝子、*AHR* 遺伝子の各遺伝子について行った。*ESR1* 遺伝子については、17 個の SNPs マーカー（プロモーター領

域 1 個、翻訳領域 2 個、非翻訳領域 2 個、イントロン領域 12 個)を用いた。その結果、統計学的な有意差を示す対立遺伝子は見い出されなかった。

しかしながら、遺伝子型頻度については 1 個の SNPs マーカーにおいて統計学的な有意差を示した (rs2228480, $P=0.031$, Odds Ratio=8.06, $\chi^2=4.67$) (表 3, 4)。CYP1A1 遺伝子については、4 個の SNPs マーカー (プロモーター領域 1 個、翻訳領域 1 個、イントロン領域 1 個、3' flanking 領域 1 個)を用いた。その結果、プロモーター領域における SNP マーカーにおいて統計学的な有意差を示す対立遺伝子が見い出された (rs3826041, $P=0.007$, Odds Ratio=2.16, $\chi^2=7.34$) (表 3)。AHR 遺伝子については、5 個の SNPs マーカー (翻訳領域 1 個、イントロン領域 4 個)を用いた。その結果、統計学的な有意差を示す対立遺伝子が 1 個の SNP マーカーにおいて見い出された (rs2106728, $P=0.038$, Odds Ratio=2.16, $\chi^2=4.32$) (表 3)。さらに、遺伝子型頻度についても上記の SNPs マーカーにおいて統計学的な有意差を示した。AHR-intron 10 T/T (rs2106728) $P=0.020$ (Odds Ratio=2.71, $\chi^2=5.40$) (表 4)。

5. マイクロサテライトマーカー解析

さらに、ESR1 遺伝子のイントロン 5 に存在するマイクロサテライト繰り返し配列のタイピングを行った。このマイクロサテライトは、塩基配列 (AAAT) の繰り返し配列であり、日本人対象者集団 42 人と子宮内膜症患者 32 人におけるタイピングの結果、5 個の対立遺伝子が存在していた。このうち 1 個の対立遺伝子において統計学的な有意差を示した。ESR1-intron 5 MS-aaat (262) $P=0.015$ (Odds Ratio=5.86, $\chi^2=5.90$) (表 5)。

D. 考察

現在までのところ、内分泌かく乱化学物質が関与する疾患の遺伝的要因については不明な部分が多く、各疾患の発症および病態を捕らえるまでには至っていない。本研究は、このような疾患に関与する遺伝子を科学的根拠に基づき選定し、その遺伝的関与を詳細に解析するという点で独創的な研究であると考えられる。現在までに行われてきた疾患感受性遺伝子の解析は、その遺伝子の翻訳領域を中心とした解析が中心であった。これはそれまで、ヒトのゲ

ノム情報の不完全さが原因であり、そのため大変低い対立遺伝子頻度を対象とした解析により実際にはその疾患に重要な遺伝子多型を見逃してしまう可能性があった。

しかしながら、現在ではヒトのゲノム情報を簡単迅速に入手することが可能となり、疾患感受性遺伝子の遺伝的解析においてもその遺伝子領域全体を高密度な遺伝的多型マーカーを用いて網羅的に解析することが可能となった。このようなことから、高度な多型性を示す遺伝マーカーを高密度に設定し、疾患との感受性を解析することにより、より信頼性の高い解析結果と評価が可能であると予想される。本研究において、見出された高度な多型性を示す遺伝マーカーは本疾患との関係を詳細に解析するだけでなく、今後の疾患感受性遺伝子の遺伝的解析においても重要な知見をもたらすことは間違いないと期待される。

また、相関解析において統計学的有意差を示した各対立遺伝子については、その対立遺伝子自身あるいはその近傍に存在する多型が子宮内膜症になんらかの影響を与えている可能性が高いと考えられる。

今回、相関解析に用いた患者集団および対象者集団はそれぞれ 43 名、58 名であり、昨年度に比べてその人数を増やしているが、さらに検体数を増加させることにより、比較的弱い遺伝的効果を検出できる可能性がある。

E. 結論

今年度の主な成果は下記の通りである。

1. 昨年度までに見い出された遺伝的多型箇所に加えて、さらに高密度な多型マーカーを候補遺伝子領域に設定するために、多型情報の検索を行い、子宮内膜症候補遺伝子領域に新たに多型箇所を見出し、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency > 0.2 以上の SNP マーカーを ESR1 遺伝子については 26 個、AHR 遺伝子については 5 個、CYP1A1 遺伝子については 4 個設定し得た。
2. 上記のように設定された SNPs マーカーのうち、ESR1 遺伝子については 17 個、AHR 遺伝子については 5 個、CYP1A1 遺伝子については 4 個の SNPs マーカーを用いて、一般対象者集団 59 名、子宮内膜症患者集団 43 名について、タイピングを行い、対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度についての

遺伝学的相関解析を行った。*ESR1* 遺伝子については、1つの遺伝子型 (rs2228480, A/A) において統計学的有意差を示した ($P=0.031$)。*AHR* 遺伝子については1つの遺伝マーカー (rs2106728) において、統計学的有意差を示した ($P=0.038$)。*CYP1A1* 遺伝子についても1つの遺伝マーカー (rs3826041) において、統計学的有意差を示した ($P=0.007$)。

3. *ESR1* 遺伝子のイントロン 5 に存在するマイクロサテライト繰り返し配列について、タイピングを行ったところ、5 個の対立遺伝子を同定した。日本人対象者集団 42 人と子宮内膜症患者 32 人におけるタイピングの結果、1つの対立遺伝子 (*ESR1*-intron 5 MS-aaat-262) において統計学的有意差を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

2. 学会発表

直接的に関与する発表はないので省略する。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

表 1. PCRおよびSequencing用プライマーの配列

GENE	Location	Forward sequences (5' to 3')	Reverse sequences (5' to 3')	sequencing primer (5' to 3')	product (bp)	annealing temperature (°C)
AHR	intron 1	CCGGAATCCTAACTTCAGCG	AAATTGGCCTGGGCATAGTG	TTGTTTATTTCTCCATCCTCCAC	1161	58
	intron 2	TGTTCTTAAATTGGAGAGCCAGAG	CCTCACCAAGCAAGCTATCAC		1251	58
	intron 2	TCGTTACCTCTGTCTTGATTGTC	TTAGTTCACCTAGAGTCACTGGC		1212	58
	exon 10	GTACTTCAAGTACTGCAC	AGCCAAGGACTGTTGCTGTT	GATAATACTGCACCCGATGG	741	56
	intron 10	GTTGCCATTCAATTGAAGATACAGG	GGTTTGCTTTGACCAGGTTTG		576	58
	promoter	ACATTGGATTCTTGACTCCACACTCCTGC	TTGATTGGCAGAGCACAGAAATCCGG		1045	56
	intron 1	TTATTCTCTGCTCTCTGTTAACCTG	AATGAGGCTCAGAGAAGGTAAGTAAC		833	56
	exon 7	AGCAAAACTGCAGCCAGATCA	TCAGAGATGCAGAGGAAAGGC		601	56
	3' flanking region	AAAAAATTAGCCGGGTGTGGT	CTGTGTTGGGTTTACTGTAGGGA	GGGAGGAAGAAGAGAGGTAGC	801	56
	promoter	CATTATCCAGCGCTGTGCAGTAG	CCTGCTAGGATACAGACACTAGCCAG		339	56
ESR1	intron 1	GCTCCTGAAG GATAATTGCC AC	ATAACCTGGT AAGCCAGGCT GC		557	60
	intron 1	CTGCCACCTATCTGTATCTTTTCTCTATTCTCC	TCTTTCTCTGCCACCCCTGGCGTCGATTATCTGA	GCTGGGCTCAAACTACAG	1374	56
	exon 4	TTCCACCTGTGTTTTCAGGGA	AGCTGCGCTTCGCATTCTTAC		375	56
	intron 4	GGAACCTCTA AGGTTGCAGG AC	CGGAGAGGAG TTCTATGCAT CTG		592	60
	intron 4	AAGCATGTGA AGGAGCAACA GTAG	AGCAACCACT TCTGCCATTG		512	60
	intron 6	GAATGTGAAC CCTTTCATGT CTTG	TGGAGCCTGGAAATTGGTCAC		600	60
	intron 6	GCTCACATTGGGTATCAGCG	TCATTCTGTAATTCAGTCTCTGCC		551	58
	intron 6	TCATGAGACCAATGACCAAGTG	CATCCTTCTCTCCGAGC		595	56
	intron 6	TTGCAGTGAATGGGCTTGG	CAGCCTGCTTAATAGCCTGC		600	58
	intron 6	GGCATGTGGTTGGTTATGTAGTC	CCTAATGCCAATACTGCCACAC		579	56
CYP1A1	intron 6	GGTGCTCCTCGTGGCTTCAC	GCAGATGCTTCTCTAGTTGTGC		553	59
	exon 8-3'UTR	GCTCTACTTCATCGCATTCCTTGC	GGCCAAATTGTAGGAACACAGCTGTC		1371	58
	3' UTR	GGCTTCTCTTGGTATGCTCTTG	GTTCCTTCTTCTCTAGAACTGAAG	TTGTTAAAAAGCAAAATTAGCTGCC TCCAGAACAGAAATTACTACATTG	1257	56
	3' UTR	TTGATCACATTAAAGGTGTTCTCACCTTG	ATTGTTACAGGTGCTCGAGCATC	GCTGCTCTATTATGGCACTTC	1020	56

表 2. SNPs マーカーの対立遺伝子頻度

No.	dbDBSNP ID	Major allele	Minor allele	Minor Allele Frequency	Gene	Location	Amino acid position
1	rs2071454	T	g	0.20	ESR1	Promoter	
2	rs3778609	C	t	0.25	ESR1	intron 1	
3	rs2234693	T	c	0.30	ESR1	intron 1	
4	NEW1	A	g	0.15	ESR1	intron 1	
5	rs4134644	T	c	0.00	ESR1	intron 1	
6	rs1801132	C	g	0.40	ESR1	exon 4	P325P
7	rs3798759	A	c	0.25	ESR1	intron 4	
8	rs932477	G	a	0.20	ESR1	intron 4	
9	NEW2	A	aa	0.10	ESR1	intron 6	
10	rs273206	G	t	0.20	ESR1	intron 6	
11	rs2273207	A	g	0.20	ESR1	intron 6	
12	rs2207396	G	a	0.25	ESR1	intron 6	
13	rs974276	A	g	0.20	ESR1	intron 6	
14	rs3798565	C	t	0.40	ESR1	intron 6	
15	rs3839390	A	aa	0.05	ESR1	intron 6	
16	rs3798566	T	c	0.25	ESR1	intron 6	
17	rs3798567	G	a	0.20	ESR1	intron 6	
18	rs3798568	G	a	0.20	ESR1	intron 6	
19	rs3778080	A	c	0.20	ESR1	intron 6	
20	NEW3	T	c	0.10	ESR1	intron 6	
21	rs3798575	A	g	0.25	ESR1	intron 6	
22	rs3798576	T	c	0.25	ESR1	intron 6	
23	NEW 4	C	t	0.20	ESR1	intron 6	
24	rs750686	G	a	0.45	ESR1	intron 6	
25	rs3778092	A	g	0.20	ESR1	intron 6	
26	rs3020381	T	a	0.45	ESR1	intron 6	
27	rs2228480	G	a	0.25	ESR1	exon 8	I592T
28	rs3020385	G	a	0.00	ESR1	3' UTR	
29	rs3798577	T	c	0.40	ESR1	3' UTR	
30	rs2982901	C	a	0.00	ESR1	3' UTR	
31	rs3798758	C	a	0.15	ESR1	3' UTR	
32	NEW4	A	DEL	0.50	ESR1	3' UTR	
33	rs3020386	T	c	0.00	ESR1	3' UTR	
34	NEW 5	T	DEL	0.50	ESR1	3' UTR	
35	rs2747648	T	c	0.00	ESR1	3' UTR	
36	rs3020387	G	a	0.00	ESR1	3' UTR	
37	rs722029	G	c	0.00	ESR1	3' UTR	
38	rs3020388	G	a	0.00	ESR1	3' UTR	
39	rs3020389	G	a	0.00	ESR1	3' UTR	
40	rs1062577	T	a	0.25	ESR1	3' UTR	
41	NEW 6	G	a	0.00	ESR1	3' UTR	
42	NEW 7	A	g	0.00	ESR1	3' UTR	
43	NEW 8	C	a	0.00	ESR1	3' UTR	

太字がMinor allele frequency>0.2