

山千寿子、仲森隆子

第 42 回日本糖尿病学会年次学術集会、1999 年 5 月、横浜

一般住民における肥満、高インスリン血症に対する遺伝子多型 (ACE,  $\beta$ 3-AR, AGT, FABP2, LPL-PvuII, LPL-HindIII) の関与について

中野里美、丸山太郎、村田 満、丸山千寿子、春日 明、広瀬 寛、池田康夫、都島基夫、猿田享男

第 31 回日本動脈硬化学会総会、1999 年 6 月、宮崎

三重県紀勢町における動脈硬化の疫学的研究 (第 4 報) -頸動脈波速度と頸動脈エコーの対比-

中野里美、都島基夫、京谷晋吾、丸山太郎、丸山千寿子、仲森隆子、猿田享男

第 31 回日本動脈硬化学会総会、1999 年 6 月、宮崎

炎症反応と動脈硬化に関する臨床的研究 (第 2 報) -健常住民と患者におけるクラミジア抗体の比較-

都島基夫、大原せつ、京谷晋吾、洪秀樹、鈴木正昭、西大條靖子、小松良哉、原納優、丸山太郎、中野里美、丸山千寿子、仲森隆子

第 31 回日本動脈硬化学会総会、1999 年 6 月、宮崎

一般住民における血中ホモシスチン濃度と栄養摂取量について

丸山千寿子、都島基夫、中野里美、京谷晋吾、仲森隆子、丸山太郎

17th Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis, Aug, 1999, Washington, D.C., USA

Association between paraoxonase 192Gln/Arg genotype and the mortality rate by coronary artery disease in Japanese general population.

Nakano S, Maruyama T, Murata M, Kyotani S, Kasuga A, Hirose H, Ikeda Y, Tsushima M, Saruta T

第 6 回日本未病システム学会、2000 年 1 月、広島

冠動脈疾患と cholesteryl ester transferase protein(CETP)の遺伝子多型について

本橋佳子、丸山太郎、村田 満、中野里美、丸山千寿子、京谷晋吾、都島基夫、池田康夫、猿田享男

表1 対象住民の背景

n	224
Age	55.6±9.3
BMI	22.9±3.2
SBP	128.4±17.0
DBP	81.2±11.4
TC	227.8±39.5
TG	101.4±56.4
HDL-C	63.0±16.2
LDL-C	144.5±37.1
TC/HDL	3.8±1.1
HDL-C/Apo A- I	0.3±0.05
Apo A- I	181.4±34.8
FPG	102.6±21.2
IRI	6.9±4.8
HOMA-R	1.8±1.3
%Post-menopause	63.4
%Smoker	3.7
%Drinker	6.3
%using of anti-hyperlipidemia	7.7
frequency of exercise	
none~1-2 times/Wk	76
>3-4 times/Wk	24

表 2 CETP遺伝子TaqI B多型と生化学的因子、環境因子の関係

	B1B1	B1B2	B2B2	P
age	56.4±8.9	55.2±9.4	55.6±9.7	NS
BMI	23.5±3.3	22.6±3.3	23.1±2.9	NS
TC	224.3±34.2	231.0±40.7	224.8±43.7	NS
TG	117.6±71.2†	100.5±51.0	79.8±34.7	0.0024
HDL-C	59.2±14.5†	62.4±16.4*	70.3±15.9	0.0016
LDL-C	141.5±33.1	148.5±37.6	138.5±40.7	NS
TC/HDL	4.1±1.0*	4.0±1.2*	3.3±0.8	0.0115
HDL-C/Apo A-1	0.32±0.04†	0.33±0.05*	0.37±0.05	0.009
Apo A-1	179.4±29.7	179.5±36.3	189.7±31.9	NS
FPG	102.7±18.7	104.0±28.8	105.1±17.7	NS
IRI	6.8±3.3	6.9±4.2	6.6±4.0	NS
HOMA-R	1.7±0.9	1.8±1.1	1.8±2.0	NS
% smoker	4.9	2.4	2.3	NS
% drinker	6.5	7.1	4.1	NS
% post-menopausal	64.6	61.7	64.8	NS
frequency of exercise				
none~1-2 times/WK	72.1	77.7	70.4	NS
>3-4 times/WK	27.9	22.3	29.6	
%using of anti-hyperlipidemia	9.5	6.7	7.6	NS

\* P<0.05 vs B2B2

† P<0.001 vs B2B2

表 3 ApoA-1 遺伝子多型 (M1) と生化学的因子、環境因子の関係

	M1+(M1+/+)	M1-(M1+/-,-/-)	P
age	55.3±9.5	56.4±8.9	NS
BMI	23.1±3.4	22.6±2.9	NS
TC	225.2±40.0	233.6±38.1	NS
TG	106.1±61.1	90.9±42.6	NS
HDL-C	60.7±15.5	68.1±16.6	0.0014
LDL-C	143.3±37.0	147.3±37.4	NS
TC/HDL	3.9±1.1	3.6±1.1	NS
HDL-C/Apo A-1	0.35±0.05	0.34±0.05	0.0449
Apo A-1	177.4±34.9	189.1±33.6	0.0303
FPG	103.2±22.6	101.3±17.8	NS
IRI	7.1±5.2	6.4±3.3	NS
HOMA-R	1.8±1.4	1.6±0.9	NS
% smoker	3.8	0	NS
% drinker	7.3	4.4	NS
% post-menopause	62.5	65.2	NS
frequency of exercise			
none~1-2 times/Wk	78.6	65.6	NS
>3-4 times/Wk	21.4		
%using of anti-hyperlipidemia	7.5	8.1	NS

表4 ApoA-1遺伝子多型 (M2) と生化学的因子、環境因子の関係

	M2+(M2+/+)	M2-(M2+/-,-/-)	P
age	55.3±9.5	56.4±8.9	NS
BMI	23.0±3.2	21.7±2.7	NS
TC	228.3±39.6	219.6±37.9	NS
TG	102.1±56.6	90.9±53.4	NS
HDL-C	62.8±16.3	65.7±14.3	NS
LDL-C	145.0±37.2	135.8±35.3	NS
TC/HDL	3.8±1.1	3.5±1.0	NS
HDL-C/Apo A-1	0.34±0.05	0.37±0.06	NS
Apo A-1	180.7±35.2	191.4.1±26.8	NS
FPG	102.5±21.7	103.0±11.3	NS
IRI	6.9±4.8	6.7±2.6	NS
HOMA-R	1.7±1.3	1.7±0.7	NS

表5 CETP遺伝子多型の影響に対する中性脂肪レベルの関与

TG<150

	B1B1	B1B2	B2B2	P
n	51	98	42	
BMI	23.2±3.5	22.3±3.3	23.1±2.9	NS
TC	221.2±33.1	227.9±38.4	221.5±40.4	NS
TG	88.6±30.3	83.6±30.1	75.1±27.5	NS
HDL-C	62.3±14.2*	64.2±15.6*	71.2±15.6	0.0133
LDL-C	141.2±32.9	147.0±35.7	135.2±37.2	NS
TC/HDL	3.9±0.9	3.7±1.0	3.3±0.8	NS
HDL-C/Apo A- I	0.33±0.04*	3.34±0.05	0.37±0.05	0.0057

\*P<0.05 vs B2B2

†P<0.001 vs B2B2

TG≥150

	B1B1	B1B2	B2B2	P
n	14	17	2	
BMI	24.4±2.5	24.2±3.2	24.1±1.9	NS
TC	235.6±36.9	248.7±49.7	294.5±68.6	NS
TG	223.3±77.9	198.0±34.1	178.5±20.5	NS
HDL-C	48.1±9.5	51.8±17.4	50.0±0.0	NS
LDL-C	142.8±34.9	157.3±47.2	208.8±64.5	NS
TC/HDL	3.9±0.9	3.7±1.0	3.3±0.8	NS

表6 CETP遺伝子多型の影響に対する閉経の関与

閉経前	B1B1	B1B2	B2B2	P
n	18	40	14	
BMI	23.2±2.3	21.7±2.9	23.0±2.9	NS
TC	221.2±39.8	217.5±32.4	202.1±44.9	NS
TG	101.8±47.7	89.9±49.5	66.9±30.7	NS
HDL-C	58.6±15.5	62.6±15.5	67.3±13.4	NS
LDL-C	136.2±40.3	136.9±33.5	121.4±42.8	NS
TC/HDL	4.4±1.3	3.8±1.2	3.2±1.0	NS
HDL-C/Apo A- I	0.31±0.04	0.34±0.05	0.35±0.03	NS
Apo A- I	174.0±31.1	183.6±34.4	187.7±23.3	NS
FPG	103.2±10.7	108.3±44.9	106.0±26.2	NS
IRI	8.8±3.2	6.6±3.6	8.5±5.2	NS
HOMA-R	2.3±1.0	1.8±1.3	2.4±1.7	NS

\* P<0.05 vs B2B2

† P<0.001 vs B2B2

閉経後	B1B1	B1B2	B2B2	P
n	42	71	29	
BMI	23.6±3.8	22.8±3.3	23.2±3.0	NS
TC	227.1±32.9	237.8±43.6	238.3±36.6	NS
TG	124.4±79.1*	104.9±50.2	87.2±35.2	0.0292
HDL-C	59.0±13.8*	62.5±17.2*	71.7±17.2	0.0057
LDL-C	143.3±30.9	154.3±38.9	149.2±35.4	NS
TC/HDL	4.0±1.0	4.1±1.1*	3.4±0.7	0.0375
HDL-C/Apo A- I	0.32±0.04 †	0.33±0.05*	0.37±0.05	0.0032
Apo A- I	179.1±30.2	181.0±44.6	198.6±36.0	NS
FPG	100.7±22.3	102.7±17.4	104.7±13.7	NS
IRI	6.2±3.1	7.2±4.7	5.7±3.2	NS
HOMA-R	1.5±0.8	1.8±1.1	1.5±0.8	NS

\* P<0.05 vs B2B2

† P<0.001 vs B2B2

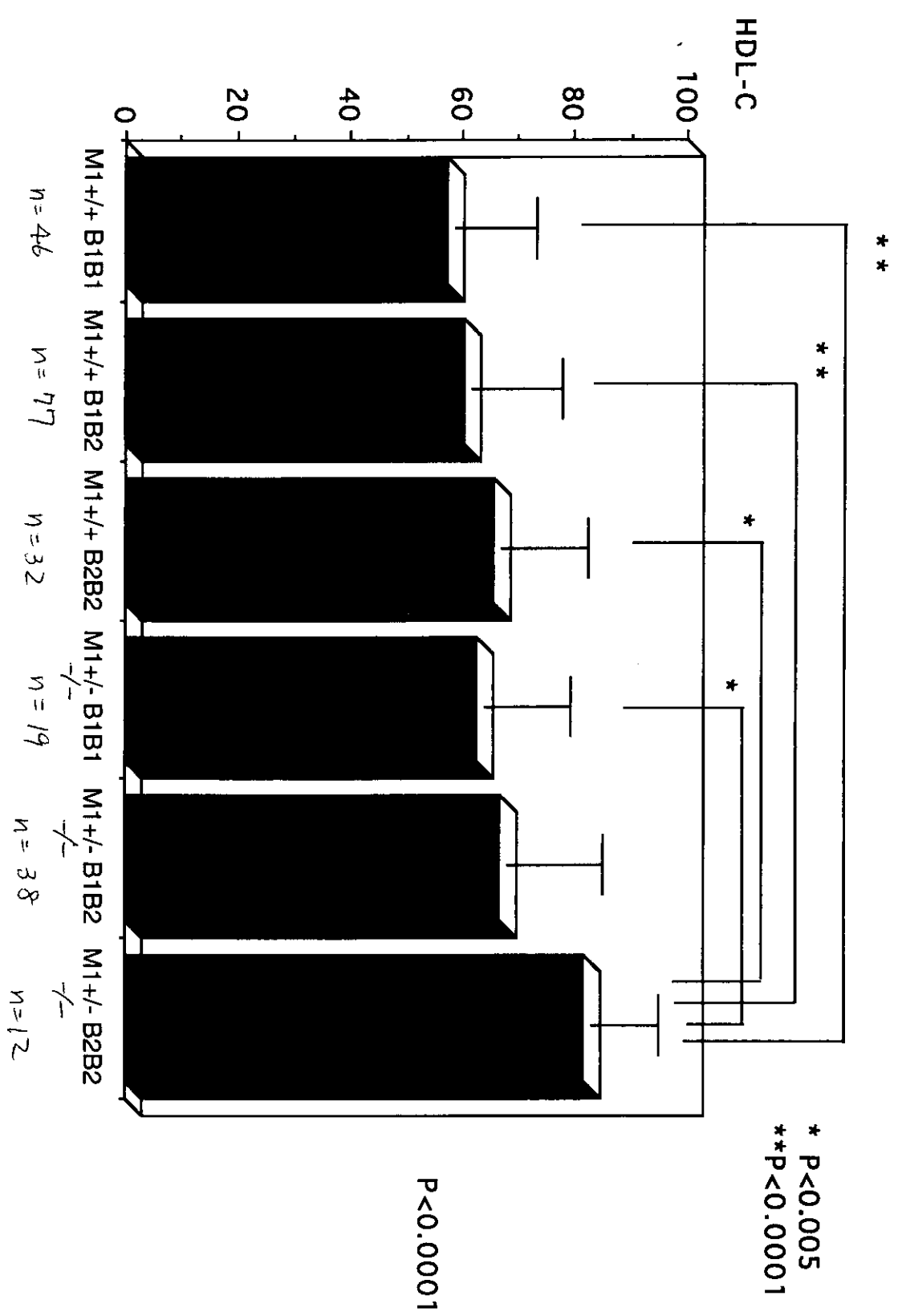


図1 CETP 遺伝子多型と ApoA-1 遺伝子多型の組み合わせと血中 HDL コレステロール濃度の関係



分担研究報告書

循環器未病対策における遺伝子多型の意義

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部内科講師

研究要旨：脳血管障害との関連が示唆されている15種類の因子の遺伝子多型を系統的に解析し、リスクファクターとなる遺伝的危険因子を同定し、さらに危険因子の重複が及ぼす疾患への影響を検討した。解析したなかで、対照群と比較して有意に多型頻度の違いを認められたのは、GPIIb $\alpha$  (Thr145Met) とNADPH oxidase p22 phox (His72Tyr) の2つであった。これは喫煙、糖尿病、高脂血症、高血圧等で補正しても有意であった。凝固XII因子については患者群で46Cが多い傾向にあった。年齢 < 60 yに限定して解析すると、GPIIb $\alpha$  (Thr145Met) とNADPH oxidase p22 phox (His72Tyr)の両方が危険型である頻度は、患者群で10.6% であるのに対し、対照群では 2.9% であった ( $p < 0.05$ )。患者群だけで解析すると、脳血管障害の発症年齢は、リスク遺伝子を2つもつ患者では  $53.3 \pm 5.5$  yと、それ以外の患者の  $58.6 \pm 7.7$  に比べ、約5歳若年であった ( $p < 0.05$ )。これは遺伝的危険因子が、より早期の脳梗塞発症をもたらす可能性を示している。今後さらに症例を重ねて検討するとともに、前向き研究が必要と考えられる。

A. 研究目的

脳血管障害は多因子病である。すなわち、複数の遺伝的要因と後天的要因が複雑に絡み合って発症する。その病態は、粥状硬化が原因であるアテローム血栓性梗塞やTIA、穿通枝の細動脈硬化に起因するラクナ梗塞、心疾患が原因である心原性塞栓症など、それぞれの病型により異なると考えられるが、一般には動脈硬化が基盤に存在する。従って脳梗塞の危険因子としては、高血圧や従来から知られている動脈硬化の進展を早める因子、糖尿病や高脂血症に加え、血栓形成を助長させる血液凝固能や血小板機能の亢進を考慮せねばならない。この両者は互いに関係しあっている。例えば動脈硬化の危険因子は易血栓性（凝固能や血小板機能の亢進）を招来し、逆に血栓が動脈硬化を進展させることも知られている。脳梗塞の遺伝的リスクの評価には、動脈硬化に関する遺伝的危険因子と血栓性素因に関係する遺伝的危険因子の両面からのアプローチが必要である。遺伝

子のなかには、環境とのinteractionを認めるもの、すなわち、特定の遺伝子タイプを有する個体にだけ環境因子が悪影響を引き起こす場合が知られている。個体の遺伝的リスクを評価することは、より効果的に、より経済的に疾患を予防することにつながり、未病という観点から重要である。本研究は、循環器病予防に向けた遺伝子多型の体系的スクリーニングを行うための基礎的データを集めることを目的としている。今年度は、特に脳梗塞と関連が示唆されている各種因子の遺伝子多型を系統的に解析し、リスクファクターの重複によるphenotypeの違い等を検討した。

B. 研究方法

健常人281人 ( $59.0 \pm 4.1$  y)、虚血性脳血管障害患者200人 (atherothrombotic stroke (n=52), lacunar infarction (n=126), and transient ischemic attack (TIA, n=22); mean age  $58.3 \pm 7.6$  y) から遺伝子解

析に関する文書による同意を得た後、以下の15種類の遺伝子多型のタイピングを、PCRまたはPCR-RFLP法にて行った。methylenetetrahydrofolate reductase (C677T), paraoxonase (Gln192Arg), apolipoprotein E ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4), cholesteryl ester transfer protein (Taq I genotype of intron 1), angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion), nitric-oxide synthase (4 repeat/5 repeat), serotonin receptor 5HT2A (T102C), platelet glycoprotein (GP) Iba (Thr145Met), fibrinogen ( $\beta$ -chain, G-455A), coagulation factor XII (C46T), PAI-1 (promoter 4G/5G), NADPH oxidase p22 phox (His72Tyr), mitochondrial DNA (C5178A), monocyte CD14 antigen (promoter C-260T), and atrial natriuretic peptide (G664A)。

### C. 研究結果

解析したなかで、対照群と比較して有意な多型頻度の違いを認めたものは、GPIba (Thr145Met) と NADPH oxidase p22 phox (His72Tyr) の2つであった。これは喫煙、糖尿病、高脂血症、高血圧等で補正しても有意であった。凝固XII因子については患者群で46Cが多い傾向にあった。表1、表2、表3に NADPH oxidase p22 phox (His72Tyr) の結果を示す。病型によらず、患者でT-alleleをもつ頻度が高いことがわかる。また表には示さないが年齢 < 60 y に限って解析すると、GPIba (Thr145Met) と NADPH oxidase p22 phox (His72Tyr) の両方が危険型である頻度は、患者群で10.6% であるのに対し、対照群では2.9% であった ( $p < 0.05$ )。患者群だけで解析すると、脳血管障害の発症年齢は、リスク遺伝子を2つもつ患者では  $53.3 \pm 5.5$  y と、それ以外の患者の  $58.6 \pm 7.7$  に比べ、約5歳若年であった ( $p < 0.05$ )。

### D. 考察

他の生活習慣病と同様、1990年代中盤から脳血管障害についても多くの研究者が疾患感受性遺伝子の同定に鎬を削っている。上述のように多数の遺伝子変異や多型が報告されているが、未だに遺伝子診断

TABLE 1. Clinical Characteristics of CVD Patients and Control Subjects

	Controls (n=301)	CVD Patients (n=226)	P*
Male, %	76.6	77.4	NS
Age (mean $\pm$ SD), y	59 $\pm$ 4	58 $\pm$ 8	NS
Hypertension, %	25.5	56.1	<0.001
Hypercholesterolemia, %	32.6	39.4	0.11
Diabetes mellitus, %	6.6	24.4	<0.001
Smoking, %	38.2	53.2	0.001

\* $\chi^2$  tests were used to compare the values for CVD patients and controls for all parameters except age, which was compared with the use of the Student t test.

TABLE 2. Allele Frequencies of p22 PHOX Genotypes in CVD Patients and Control Subjects

	T Allele Frequency	CC, n (%)	TC+TT, n (%)	P*
Controls (n=301)	0.07	261 (86.7)	38+2 (13.3)	
All CVD patients (n=226)	0.12	177 (78.3)	46+3 (21.7)	0.011
Atherothrombotic (n=63)	0.13	47 (74.6)	16+0 (25.3)	0.015
Lacunar (n=140)	0.11	111 (79.3)	26+3 (20.7)	0.046
TIA (n=23)	0.09	19 (82.6)	4+0 (17.4)	0.306

\* $\chi^2$  tests were used to compare genotype frequencies between controls and all CVD patients, or between controls and each group of CVD patients.

TABLE 3. Odds Ratios for the C242T Polymorphism in p22 PHOX

Subtype	OR	95% CI
All CVD patients	1.81	1.15-2.86
Atherothrombotic	2.22	1.11-2.78
Lacunar	1.71	1.01-2.88
TIA	1.37	0.45-3.05

として日常臨床に直接影響するほど確立されたものはない。今回我々15種類の候補遺伝子多型について症例—対照研究を行なったが、危険因子として明らかであったものは上述の因子のなかでGPIIb $\alpha$  145Thr/MetとNADPH oxidaseのp22phoxの2つのみであった。GPIIb $\alpha$  145Thr/Metについては、昨年の報告書で詳述したので省略する。NADPH oxidaseは、元来好中球に存在するoxidaseとして同定され、ファゴサイトーシス時の殺菌機構を担うと考えられているが、近年、ノックアウトマウスを用いた検討により、NADPH oxidaseは、脳虚血時の活性酸素産生の中心的な酵素系である事が判明している。我々はNADPH oxidaseのp22phoxのheme binding domainに存在し、His/Tyrアミノ酸変異を伴う多型が、虚血性脳血管障害、特にアテローム血栓性脳梗塞と関連することを見出した。この多型はNADPH oxidaseの酵素活性そのものに影響することが示唆されており、その病態形成への関与が興味深い。

この2つの遺伝子多型が共に「危険型」である患者は、他の遺伝子型の患者に比べ発症年齢が約5年若いことが判明した。これは遺伝的危険因子が、より早期の脳梗塞発症をもたらす可能性を示している。しかし遺伝子多型の診断には（1）疾患との関連の有無が報告により異なること、（2）遺伝的リスクが後天的リスクに比較してどの程度の相対的な重みをもつかが必ずしも明確でないこと、また、ひとつの変異が疾患全体に占める関与の大きさが不明確であること、（3）複数の遺伝的危険因子が互いにどのように関連しあうか不明であること、（4）遺伝子変異と当該因子の機能変化が実験的に証明されていない場合があること、など問題点も多い。今後さらに症例を重ねて検討するとともに、前向き研究が必要と考えられる。

## F. 文献

Ito D, Murata M, Watanabe K, Yoshida T, Saito I, Tanahashi N, Fukuuchi Y. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22 phox gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. *Stroke* 31: 936-939, 2000

Ito D, Murata M, Tanahashi N, Sato H, Sonoda A, Saito I, Watanabe K, Fukuuchi Y. Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 31(11):2661-2664, 2000.

Oguchi S, Ito D, Murata M, Yoshida T, Tanahashi N, Fukuuchi Y, Ikeda Y, Watanabe K: Genotype distribution of the 46C/T polymorphism of coagulation factor XII in the Japanese population: absence of its association with ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Haemost* 83: 178-179, 2000

石井啓子、小口修司、竹下栄子、村田 満、伊東大介、棚橋紀夫、福内靖男、斉藤郁夫、池田康夫、渡邊清明：虚血性脳血管障害と関係する遺伝子多型解析。第23回日本血栓止血学会総会 2000年11月、名古屋

Murata M. Genetic polymorphisms associated with thrombotic disorders in the Japanese population. *Fibrinolysis and Proteolysis* (invited review article) 14: 155-164, 2000

## 長寿科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

### 分担研究報告書

高齢化社会における循環器未病対策と医療経済に関する疫学的基礎的研究

血漿ホモシステイン濃度に影響する血中葉酸濃度と栄養摂取量との関係について

分担研究者 丸山千寿子 日本女子大学家政学部食物学科助教授

#### 研究要旨

三重県度会郡紀勢町において一般住民を対象に健康診断を実施し、30歳から69歳の男性87名、女性163名、計250名を対象として、血漿 Hcy 濃度と食事性因子の関係について検討した。血漿 Hcy 濃度に対して、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子多型 AA 群では血清尿酸濃度、VV 群では血清葉酸濃度が独立した規定因子であった。血清尿酸濃度はアルコール、豆類摂取頻度が正、果物摂取頻度が負の係数を有していた。VV 群の血中葉酸濃度は乳類、油脂類の摂取に影響されることが示された。AA、AV 群では血中葉酸濃度に緑黄色野菜、魚類、果物の摂取頻度が影響していた。血漿 Hcy 濃度は MTHFR 遺伝子変異により規定因子が異なり、MTHFR 遺伝子変異のそれぞれに対応した血漿 Hcy 濃度および血中葉酸濃度を維持するための食品の組合せを考慮する必要がある

#### A.研究目的

血漿ホモシステイン (Hcy) 濃度の高値が心筋梗塞、脳梗塞など、動脈硬化、血栓塞栓性疾患の独立した危険因子であることが明らかとされており<sup>1)</sup>、血漿 Hcy 濃度の研究は動脈硬化の治療及び予防の観点からも重要であると考えられる。

我々は初年度の検討で、一般住民を対象として血漿 Hcy 濃度と栄養摂取状況との関係を検討し、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子多型により血漿 Hcy 濃度が上昇すること、血漿 Hcy 濃度の上昇を抑えるためには血清葉酸濃度を上げることが有効である可能性を報告した<sup>2)</sup>。しかし日常的な栄養摂取状態が動脈硬化性疾患の発症及び血漿 Hcy 濃度に及ぼす影響については明確な結果は得られなかった。そこで今回さらに対象の数を増やし、一般住民における血漿 Hcy 濃度と食事性因子の関係に

ついて検討した。

#### B.研究対象および方法

##### 2.対象および方法

1997年、1998年、1999年12月に三重県度会郡紀勢町において一般住民749名(97年:223名、98年:299名、99年:227名)を対象に健康診断を実施し、以下の項目を測定した。本研究報告では、健康診断受診者のうち全てのデータが得られ、かつ血漿 Hcy 濃度に影響を及ぼす薬剤を服用していない30歳から69歳の男性87名、女性163名、計250名を対象とした。

##### (1) 身体検査

身長、体重、ウエスト、血圧を測定し、Body Mass Index (BMI) = {体重 (kg) / 身長 (m<sup>2</sup>)} を求めた。

##### 2) MTHFR 遺伝子多型測定

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)法を用いて塩基番号677番目のシトシンのチミンへの変異を調べ、野生型であるAA、変異アレルのAV、VVに分類した。

### (3) 血液生化学検査

血清につき総蛋白(TP)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cr)、尿酸(UA)、総コレステロール(TC)、HDLコレステロール(HDL-C)、トリグリセリド(TG)、リン脂質(PL)、遊離脂肪酸(FFA)、空腹時血糖値(FPG)を酵素法で測定し、LDLコレステロール(LDL-C)はFriedewaldの計算式で求めた。また、GOT、GTP、 $\gamma$ -GTPはJSCC標準化対応法、血漿Hcy濃度はHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC)法、血清葉酸濃度はChemiluminescent Immuno Assay (CLIA)法で測定した。

### (4) 血液学的検査

赤血球(RBC)、血小板数(Plt)はシーソーフロー電気抵抗方式、白血球(WBC)は電気抵抗検出方式、ヘモグロビン量(Hb)はSLSヘモグロビン法による比色定量、ヘマトクリット値(Ht)は赤血球パルス波高値検出方式、フィブリノーゲンはトロンビン時間法で測定した。また、MCV、MCH、MCHCは計算により求めた。

### (5) プラーク、内中膜肥厚度

汎用超音波画像診断装置 LOGIQ500PRO Series (GE 横河メディカルシステム)により、左右両側総頸動脈分岐部の1cm上流の肥厚度を測定し、可視範囲内のプラークの有無を調べた。

### (6) 食事調査、食生活習慣調査

食事調査と基礎調査を留置法にて行い、健康診断時に面接し、内容を確認後回収した。食事記録は原則として健康診断前2日間の食事を秤量法で記録してもらった。この2日間の食事記録について栄養摂取量を

栄養価計算ソフトウェアエクセル97/98栄養君PLUS Ver.2.1(吉村幸雄/高橋啓子 建帛社)を用いて一日平均を算出し、葉酸、ビタミンB6、ビタミンB12については昨年と同様に推定摂取量を算出した。食習慣調査に関しては「ほとんど食べない」を1、「月1~2回」を2、「週1~2回」を3、「週3~4回」を4、「週5~6回」を5、「毎日」を6とカテゴリー化した。

### (7) 統計処理

統計処理は統計ソフトウェア Stat view 5.0 (Abacus Concepts, Inc. Berkeley, CA)を用い、Mann-Whitney's U-test および変数選択重回帰分析を行った。2×2分割表の独立性の検定は、統計ソフトウェア DA Statsにより $\chi^2$ 検定を行った。

## C. 研究結果

### (1) 年齢、体格、血圧 (Table 1)

男性、女性の各群間において、年齢、身長、BMI、収縮期血圧(SBP)、拡張期血圧(DBP)には、差がみられなかった。体重は、男性でAA群とVV群で有意差が認められたが( $p < 0.05$ )、女性では差がみられなかった。

### (2) 生化学検査成績 (Table 2)

血漿Hcy濃度は、男性でAA群、AV群に比してVV群が有意に高値だった(AA vs VV:  $p < 0.01$ , AV vs VV:  $p < 0.05$ )。女性でもAA群、AV群に比してVV群が有意に高値だった(AA vs VV:  $p < 0.01$ , AV vs VV:  $p < 0.01$ )。血清葉酸濃度は、AA群に比してAV群、VV群で低値傾向にあり、特に女性で有意に低値を示した(AA vs AV:  $p < 0.05$ , AA vs VV:  $p < 0.01$ )。TPは、男性でAV群に対しVV群で有意に高値だったが( $p < 0.05$ )、女性では差がみられなかった。TG、FFAは、男性でAA群に比してAV群で有意に低値だったが(AA vs AV:  $p < 0.01$ , AA vs AV:  $p < 0.05$ )、VV

群との間には差が認められず、女性でも差はみられなかった。その他の項目は、男女ともに AA、AV、VV 群間に差がみられなかった。

### (3) 血液学的検査 (Table3)

男性では、MCHC が AA 群、AV 群に比して VV 群で有意に低値だった (AA vs VV:  $p < 0.01$ 、AV vs VV:  $p < 0.05$ )。女性は全ての検査項目に関して遺伝子群間で差はみられなかった。

### (4) プラーク、内中膜肥厚度 (Table4)

プラーク出現率は男女ともに 3 群間で有意な差はみられなかったが、女性では、AA 群、AV 群、VV 群の順に高値傾向を示した。頸動脈肥厚度は男性の左側で AA 群に比して AV 群が高値を示したが ( $p < 0.05$ )、男性の右側と、女性では差がみられなかった。

### (5) 栄養素摂取量 (Table5)

カルシウム、リン、カリウム摂取量は、男性の AA 群に比して AV 群で有意に少なかったが (カルシウム:  $p < 0.05$ 、リン:  $p < 0.05$ 、カリウム:  $p < 0.01$ )、女性で差はみられなかった。レチノール摂取量は男性で差はみられなかったが、女性で AA 群、AV 群に比して VV 群で有意に高値であった (AA vs VV:  $p < 0.01$ 、AV vs VV:  $p < 0.01$ )。その他は男女ともに各群間で差はみられなかった。

男性では、葉酸推定摂取量が AA 群に比して AV 群で有意に低値であり ( $p < 0.05$ )、VB12 推定摂取量が AV 群に比して VV 群で有意に低値であった ( $p < 0.05$ )。女性は全ての項目において各群間で有意な差はみられなかった。

アミノ酸摂取量は各群間で差は認められなかった。

### (6) 変数選択重回帰分析

血漿 Hcy 濃度に影響を与える因子を明らかにするために、血漿 Hcy 濃度を目的変数、年齢、性別、血液生化学検査成績を説明変

数として変数選択重回帰分析を行った。血漿 Hcy 濃度は対数に変換することで正規分布がみられたため本検定の血漿 Hcy 濃度は対数を用いた。血漿 Hcy 濃度に対して AA 群で男性、女性ともに血清尿酸濃度が有意な正の係数を有していた ( $R^2: 0.334$ 、 $R^2: 0.416$ )。AV 群では、男性で総コレステロールと収縮期血圧が負の相関を示し、女性では空腹時血糖が正の係数を有していた ( $R^2: 0.566$ 、 $R^2: 0.275$ )。VV 群では、男性で有意な説明因子が得られなかったが、女性で血清葉酸濃度が負の係数を有し、対象全体でも同様の結果が得られた ( $R^2: 0.785$ 、 $R^2: 0.435$ )。すなわち、AA 群では血清尿酸濃度、VV 群では血清葉酸濃度が血漿 Hcy 濃度の値を規定することが示された (Table 6)。

そこで、これらに対する食事との関係を見るために、血清尿酸濃度を目的変数、食品摂取頻度を説明変数として変数選択重回帰分析を行った。血清尿酸濃度は AA 群の男性、対象全体でアルコール、豆類摂取頻度が正の係数、果物摂取頻度が負の係数を有していた ( $R^2: 0.692$ 、 $R^2: 0.449$ )。AV 群では、対象全体でアルコール摂取頻度が正の係数を有していた ( $R^2: 0.331$ )。VV 群では、男性で肉加工品、女性で乳、乳製品摂取頻度が正の係数を有していた ( $R^2: 0.796$ 、 $R^2: 0.498$ ) (Table 7)。

同様に血清葉酸濃度を目的変数、食品摂取頻度を説明変数として変数選択重回帰分析を行った。血清葉酸濃度は、AA 群の男性と対象全体 ( $R^2: 0.303$ 、 $R^2: 0.394$ )、AV 群の女性と対象全体 ( $R^2: 0.437$ 、 $R^2: 0.452$ ) において緑黄色野菜摂取頻度が正の係数を有していた。VV 群では男性で有効な説明因子が得られなかったが、女性、対象全体において、乳、乳製品摂取頻度が正の係数を有し、油脂類摂取頻度が負の係数を有していた ( $R^2: 0.933$ 、 $R^2: 0.533$ ) (Table 8)。

#### D. 考察

MTHFR 遺伝子多型変異の VV 型と、血中ビタミンB6、ビタミンB12、葉酸濃度は、空腹時 Hcy 濃度の決定因子とみなされており、男性、閉経、加齢も Hcy 濃度に影響を与えるとされている。今回の解析においても、Hcy 濃度は男女とも MTHFR 遺伝子多型変異の VV 型は AA、AV 群に比べて高く、男性は女性に比して高値であった。

これまでに報告されている Hcy 濃度低下を目的としたビタミン投与の介入試験では、ビタミンB12 および葉酸投与の有効性が示されている。特に葉酸については 4~6 週間の試験期間で、1日 650~10,000  $\mu\text{g}$  の投与で検討され、いずれも Hcy 濃度低下効果をもとめている。また、十分な葉酸が投与されている場合にはマイナーな遺伝子変異では臨床的に差を認めないとされ、冠動脈疾患や頸動脈壁肥厚のリスクを低減させるために葉酸摂取の有効性が強調されている。

今回の検討で MTHFR 遺伝子多型別に変数選択重回帰分析を行った結果、VV 型でのみ、血清葉酸濃度が血漿 Hcy 濃度の値を規定することが示された。VV 群の葉酸摂取量は AA、AV 群と差がないことから、MTHFR の活性低下によるものと思われた。AA、AV 群の平均葉酸推定摂取量は、AA 群男性 349  $\mu\text{g}$ 、女性 290  $\mu\text{g}$ 、AV 群の男性で 281  $\mu\text{g}$ 、女性で 318  $\mu\text{g}$  であった。AA、AV 群では血中葉酸濃度が血漿 Hcy 濃度の決定因子ではないが、AA 群、AV 群とも対象全体では血清葉酸濃度に対して緑黄色野菜摂取頻度が正の規定因子となっており、AA、AV 群の Hcy を再メチル化するために必要な 5-メチルテトラヒドロ葉酸は今回の対象の摂取レベルで確保される可能性が推測された。本対象年齢の日本人の葉酸所要量は血清葉酸濃度を 7 nmol/l 以上を保つために必要な量として 200  $\mu\text{g}$  とされている<sup>3)</sup>。本対象の AA、AV 群の摂取量は、男女とも

これより多く、血清葉酸濃度は男性で平均 18 nmol/l、女性で平均 21 nmol/l であり、これまで報告されている介入試験などの対象と比べて高いことから、血漿 Hcy 濃度の上昇を防ぐには充分量の葉酸を集団全体として摂取していたものと考えられ、AA、AV 群で適正な緑黄色野菜摂取は有効と考えられた。また、Broekmans らによると、果物や野菜の摂取で血清葉酸濃度が上昇するとの報告がなされているが<sup>4)</sup>、本対象の AV 群女性と対象全体でも果物摂取頻度が血清葉酸濃度の正の規定因子となっており、これを支持する結果であった。さらに、AA、AV 群の対象全体で魚類、魚加工品摂取頻度が血清葉酸濃度の負の規定因子となっていたが、魚類、魚加工品はメチオニン含有量が多いため、メチオニン代謝に葉酸が要求される可能性が推測された。これらのことから、AA、AV 群では血中葉酸濃度を維持するためには、緑黄色野菜のみならず他の食品との組合せも考慮する必要があることが示唆された。

VV 群では、血漿 Hcy 濃度に血清葉酸濃度が独立して影響することが示された。しかし、葉酸供給源である緑黄色野菜摂取が血清葉酸濃度の規定因子にはならなかった。これは、VV 群では MTHFR の活性低下のため食事から摂取した葉酸のテトラヒドロ葉酸への変換量が少ないためと推測される。血清葉酸濃度に対して VV 群では、女性で乳・乳製品摂取頻度が正、油脂類摂取頻度が負の規定因子であった。Hustad らにより MTHFR 遺伝子変異をもった対象に特異的に血漿リポフラビン濃度が低く血漿 Hcy 濃度が高値を示したとの報告がある<sup>5)</sup>。乳・乳製品はリポフラビンの供給源であり、脂質はリポフラビンを消費することから、活性が低下している MTHFR の還元剤としての FADH の競合がおこることが推測された。しかし、今回の解析では VV 群の男性で明

確な説明因子が得られなかったため、今後さらに対象を増やして検討する必要がある。

#### E. 結論

今回の検討では、血漿 Hcy 濃度に対して血中葉酸濃度が独立した規定因子であったのは VV 群のみであった。VV 群の血中葉酸濃度は乳類、油脂類の摂取に影響されることが示された。AA、AV 群では血中葉酸濃度に緑黄色野菜、魚類、果物の摂取頻度が影響していた。

血漿 Hcy 濃度は MTHFR 遺伝子変異により規定因子が異なり、MTHFR 遺伝子変異のそれぞれに対応した血中葉酸濃度を維持するための食品の組合せを考慮する必要がある。

#### 引用文献

- 1) Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH : A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. JAMA 1992 Aug 19 ; 268(7):877-81 ,
- 2) 丸山千寿子：頸動脈硬化の危険因子としての血漿ホモシステイン濃度と栄養摂取量との関係について 平成 11 年度厚生科学研究費補助金長寿科学総合研究事業 高齢化社会における循環器未病対策と医療経済に関する疫学的基礎的研究分担研究報告書、26-35
- 3) 第六次改定 日本人の栄養所要量 食事摂取基準 1999 健康・栄養情報研究会 第一出版
- 4) Broekmans WM, Klopping - Ketelaars IA, Schuurman CR, Verhagen FI, van den Berg II, Kok FJ, van Poppel G : Fruits and vegetables increase plasma carotenoids

and vitamins and decrease homocysteine in humans. J Nutr 2000 Jun ; 130(6) : 1578-83

- 5) Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J : Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine:effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism . Clin.Chem 2000 Aug. ; 46 (8Pt1) : 1065-71

#### 研究発表

第32回日本動脈硬化学会総会 2000,6/1、2 千葉；一般住民における動脈硬化に及ぼす血中ホモシステイン (Hcy)濃度と食事性因子の検討。丸山千寿子、都島基夫、小野友紀子、金森敦子、中野里美、本橋佳子、京谷晋吾、仲森隆子、丸山太郎



Table 1 Characteristics of subjects by MTHFR genotype group

	Male			Female		
	AA	AV	VV	AA	AV	VV
Number	43	33	11	78	69	16
Frequency	49	38	13	48	42	10
In appearance (%)						
Age	55.9 ± 11.0	56.3 ± 10.1	57.1 ± 10.4	55.6 ± 10.1	55.7 ± 8.5	56.9 ± 9.8
Height (cm)	165.7 ± 6.5	166.8 ± 6.2	162.8 ± 5.6	151.9 ± 6.0	152.8 ± 5.3	153.0 ± 4.8
Weight (kg)	65.9 ± 11.6 a	63.5 ± 10.0	58.2 ± 7.2 b	54.1 ± 7.8	53.8 ± 7.4	56.4 ± 6.8
Body Mass Index	24.0 ± 3.5 a	22.5 ± 3.1 b	22.1 ± 3.0	23.5 ± 2.9	23.1 ± 3.1	24.1 ± 2.5
SBP (mmHg)	130 ± 20	125 ± 14	135 ± 18	129 ± 19	130 ± 19	132 ± 19
DBP (mmHg)	84 ± 12	82 ± 10	86 ± 11	83 ± 14	84 ± 12	84 ± 10
Mean ± SD	a>b: p<0.05					

Table 2 Clinical characteristics of subjects by MTHFR genotype group

	Male			Female		
	AA	AV	VV	AA	AV	VV
Hey( $\mu$ mol/l)	10.3 $\pm$ 2.3 c	10.3 $\pm$ 2.1 b	12.0 $\pm$ 3.3 a	8.6 $\pm$ 1.9 c	8.5 $\pm$ 1.9 c	10.8 $\pm$ 3.1 a
Folic acid(ng/ml)	8.2 $\pm$ 3.3	7.8 $\pm$ 3.0	7.5 $\pm$ 2.6	10.3 $\pm$ 3.3 a	9.1 $\pm$ 3.1 b	7.9 $\pm$ 1.8 c
T-P( $\mu$ g/dl)	7.5 $\pm$ 0.4	7.3 $\pm$ 0.4 b	7.6 $\pm$ 0.5 a	7.5 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 0.4
BU(N(ng/dl)	16.7 $\pm$ 2.9	16.9 $\pm$ 2.7	16.8 $\pm$ 5.4	15.8 $\pm$ 3.3	16.2 $\pm$ 3.8	14.6 $\pm$ 2.6
Cr(mg/dl)	1.02 $\pm$ 0.12	1.04 $\pm$ 0.14	1.02 $\pm$ 0.10	0.79 $\pm$ 0.11	0.81 $\pm$ 0.12	0.81 $\pm$ 0.12
UA(mg/dl)	5.9 $\pm$ 1.5	6.0 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 1.8	4.6 $\pm$ 0.9	4.7 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 1.0
AST(U/l)	28 $\pm$ 13	28 $\pm$ 12	33 $\pm$ 21	24 $\pm$ 14	23 $\pm$ 8	25 $\pm$ 9
ALT(U/l)	30 $\pm$ 21	28 $\pm$ 13	34 $\pm$ 27	24 $\pm$ 19	22 $\pm$ 11	24 $\pm$ 10
$\gamma$ -GTP(U/l)	49 $\pm$ 72	37 $\pm$ 39	61 $\pm$ 99	24 $\pm$ 36	20 $\pm$ 18	23 $\pm$ 14
TC(mg/dl)	220 $\pm$ 35	211 $\pm$ 27	220 $\pm$ 44	223 $\pm$ 33	223 $\pm$ 35	226 $\pm$ 44
HDL-C(mg/dl)	59 $\pm$ 15	59 $\pm$ 15	58 $\pm$ 12	61 $\pm$ 15	62 $\pm$ 15	58 $\pm$ 11
LDL-C(mg/dl)	134 $\pm$ 33	134 $\pm$ 28	141 $\pm$ 47	142 $\pm$ 30	142 $\pm$ 32	148 $\pm$ 40
TG(mg/dl)	130 $\pm$ 98 a	90 $\pm$ 37 c	107 $\pm$ 47	100 $\pm$ 43	93 $\pm$ 47	105 $\pm$ 52
PL(mg/dl)	243 $\pm$ 35	232 $\pm$ 29	236 $\pm$ 31	239 $\pm$ 30	237 $\pm$ 29	238 $\pm$ 30
FPA(mEq/l)	0.57 $\pm$ 0.24 a	0.46 $\pm$ 0.17 c	0.56 $\pm$ 0.21	0.56 $\pm$ 0.21	0.54 $\pm$ 0.22	0.59 $\pm$ 0.33
FPG(mg/dl)	108 $\pm$ 31	106 $\pm$ 20	112 $\pm$ 42	102 $\pm$ 26	99 $\pm$ 13	96 $\pm$ 8

Mean  $\pm$  SD

a>b: p<0.05, a>c: p<0.01

Table 3 Blood characteristics of subjects by MTHFR genotype group

	Male				Female			
	AA	AV	VV		AA	AV	VV	
Red blood cell( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	499 $\pm$ 52	494 $\pm$ 35	503 $\pm$ 31		450 $\pm$ 32	452 $\pm$ 35	446 $\pm$ 29	
White blood cell( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	61 $\pm$ 14	58 $\pm$ 18	51 $\pm$ 13		54 $\pm$ 15	55 $\pm$ 15	58 $\pm$ 15	
Hemoglobin(g/dl)	15.5 $\pm$ 1.2	15.4 $\pm$ 0.6	15.5 $\pm$ 0.9		13.5 $\pm$ 1.2	13.7 $\pm$ 0.9	13.7 $\pm$ 0.8	
Hematocrit(%)	46.8 $\pm$ 3.6	47.0 $\pm$ 2.9	47.6 $\pm$ 2.1		41.5 $\pm$ 3.2	42.1 $\pm$ 2.8	42.1 $\pm$ 2.5	
MCV(fl)	94.0 $\pm$ 5.0	94.8 $\pm$ 4.0	95.4 $\pm$ 3.8		92.4 $\pm$ 5.4	93.2 $\pm$ 4.3	94.3 $\pm$ 2.8	
MCH(pg)	31.1 $\pm$ 1.7	31.5 $\pm$ 1.4	30.7 $\pm$ 1.3		30.0 $\pm$ 2.2	30.2 $\pm$ 1.6	30.6 $\pm$ 0.7	
MCHC(%)	33.1 $\pm$ 0.8 c	33.0 $\pm$ 0.8 b	32.4 $\pm$ 0.7 a		32.4 $\pm$ 1.1	32.5 $\pm$ 0.9	32.5 $\pm$ 0.8	
Platelet( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	26.6 $\pm$ 5.9	24.4 $\pm$ 4.5	23.4 $\pm$ 4.4		26.8 $\pm$ 6.3	26.1 $\pm$ 6.0	27.7 $\pm$ 5.5	
Fibrinogen(mg/dl)	299 $\pm$ 55	279 $\pm$ 77	262 $\pm$ 55		294 $\pm$ 55	302 $\pm$ 50	293 $\pm$ 71	

Mean  $\pm$  SD, a<b: p<0.05, a<c: p<0.01

Table 4 Plaque appearance and intima-media thickness (IMT)

	Male				Female		
	AA	AV	VV		AA	AV	VV
Plaque appearance (Number/All subjects) (%)	7/43 16	4/33 12	1/11 9		10/78 13	10/69 15	5/16 31
RT-IMT(mm)	0.73±0.16	0.77±0.20	0.72±0.16		0.68±0.13	0.71±0.14	0.66±0.11
LT-IMT(mm)	0.71±0.15 a	0.79±0.20 b	0.73±0.19		0.69±0.13	0.72±0.14	0.70±0.14

a<b : p<0.05, Mean±S.D.