

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）  
アンジオテンシン変換酵素遺伝子多型と脳・心血管病の関係に関する疫学調査：  
久山町研究

## 分担研究報告

### 久山町の連続剖検例における腎糸球体硬化・動脈硬化の頻度と危険因子

分担研究者 飯田三雄 九州大学大学院医学研究院病態機能内科学・教授  
共同研究者 久保充明 九州大学大学院医学研究院病態機能内科学・研究員

**研究要旨** 1962年-1994年に、福岡県久山町住民の死亡者1,394例を剖検した（剖検率80%）。このうち腎組織が保存され、かつ死亡直近の健診データが存在する839例を本研究の対象とした。糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎細動脈硬化の程度を評価し、その危険因子についてロジスティック回帰モデルを用いて検討した。男性では糸球体硬化は16%、腎細動脈硝子化は16%、腎細動脈硬化は18%に認められ、女性における頻度はそれぞれ27%、15%、24%であった。これら病変の頻度は年齢が高くなるほど上昇した。多変量解析では、年齢と収縮期血圧がいずれも糸球体病変および腎血管病変の独立した有意な危険因子となった。さらに、男性では、耐糖能異常と蛋白尿が糸球体硬化の有意な危険因子となり、総コレステロール高値は腎細動脈硝子化のリスクを有意に上昇させた。心電図異常は男女で、蛋白尿は女性で腎細動脈硬化の独立した有意な危険因子となった。アルコール摂取は、女性で糸球体硬化および腎細動脈硬化に対して保護的に作用する傾向があった。以上より、年齢と収縮期血圧は糸球体・腎血管病変の共通した危険因子であった。さらに、耐糖能異常、総コレステロール、心電図異常、尿蛋白が糸球体・腎血管病変の有意な危険因子となった。

#### A. 研究目的

近年の腎臓病学の進歩や心血管病の劇的な減少にも関わらず、腎の代替医療を受ける患者の数は欧米諸国と同様に日本でも増加している。末期腎不全の主な原因は高血圧や糖尿病であるが、他の心血管病危険因子の腎臓への影響はあまりよく理解されていない。したがって、一般住民における腎臓の組織変化の危険因子を明確にすることは、腎疾患予防について有効な情報をもたらすと考えられる。しかし、この分野の研

究は、動物モデルや特定の患者を対象にしたものに限定されている。われわれは、過去に久山町住民の剖検例270例について、年齢と高血圧が腎硬化症の指標である腎重量の低下と関連することを報告した。しかし、他の心血管病危険因子に関しては評価が行われなかった。そこで本研究では、久山住民の剖検例を用いて種々の心血管病危険因子と糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎細動脈硬化との関係を検討した。

## B. 研究方法

1962年1月から1994年12月までに、1,742名の久山町住民が死亡し、このうち80%に当たる1,394名を剖検した。腎組織が保存されていない者、死亡直前の健診成績が存在しない者を除外した結果、最終的に839名を本研究の対象とした。

剖検例から得られた腎臓の組織を2 $\mu$ mの厚さにスライスし、PAS染色した後、光学顕微鏡で観察した。糸球体硬化の評価にはRaji, AzarとKeaneの方法による半定量的スコアを用いた。各々の切片から100個の糸球体を観察し、糸球体硬化の割合を0から4+にスコア化した。糸球体硬化インデックスは糸球体硬化スコアと糸球体の数から公式を用いて求めた。

腎細動脈硝子化の程度はBaderとMeyerの方法を用いて評価した。各々の切片から50の細動脈を観察し、それぞれ1+から4+まで硝子化の程度をスコア化した。腎細動脈硝子化インデックスを公式により用いて求めた。

Kernohan, Anderson, Keithの方法を用いて血管と内腔の比を腎細動脈硬化の重症度として評価した。各々の切片より、直径が60 $\mu$ m以上の細動脈は全て観察した。血管の外径と内腔の径を測定し、wall-lumen ratioを計算した。

腎疾患、高血圧、糖尿病などを持たない103例の健常人のサブグループを設定し、上記パラメータの95パーセンタイル以上を糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎細動脈硬化ありと定義した。ロジスティック回帰モデルを用いて、糸球体・腎血管病変と心血管病危険因子の関係を検討した。

(倫理面の配慮)

本研究は2省合同の「疫学研究に関する倫理指針」に準拠し、九州大学医学部倫理委員会の承認の元で行われた。各剖検例の家族から書面で研究の承諾を得た。本研究は、健診受診者を対象とした病理疫学調査で、対象者が研究によって不利益を被ることはない。研究者は、対象者の個人情報の漏洩を防ぐうえで細心の注意を払い、その管理に責任を負っている。

## C. 研究結果

男女とも、年齢が高くなるに連れて糸球体硬化度、腎細動脈硝子化度は直線的に上昇し、wall-lumen ratioは直線的に低下した(図1)。

糸球体・腎血管病変に対する心血管病危険因子の年齢調整オッズ比を男女別に求めた(表1, 2)。糸球体硬化に対しては、男女ともに血清クレアチニン、糸球体濾過率、蛋白尿が有意な危険因子となった。収縮期血圧と脈圧は男女で、平均血圧は女性で糸球体硬化のリスクを有意に上昇させた。脈圧は年齢および平均血圧を調整しても、男女で糸球体硬化の有意な危険因子となった。また、耐糖能異常は男性で、心電図異常は女性で糸球体硬化の有意となった。一方、アルコール摂取は女性で糸球体硬化に対し保護的に作用した。

腎細動脈硝子化に対しては、血清クレアチニン高値は男性で、糸球体濾過率の低値は女性で、蛋白尿は男女で有意な危険因子となった。また、脈圧は年齢および平均血圧を調整すると男性で有意な危険因子となったが、女性では有意な因子とならなかった。耐糖能異常、心電図異常、総コレステロールは、男性で腎細動脈硝子化の有意な

危険因子となった。

腎細動脈硬化に対しては、収縮期血圧、平均血圧、脈圧が男女で有意な危険因子となった。脈圧は、男女で年齢と平均血圧を調整しても有意な危険因子となった。心電図異常は男女とも腎細動脈硬化の有意な危険因子となり、反対にアルコール摂取は保護的に作用した。

危険因子の多変量解析の結果を表3に示す。年齢と収縮期血圧は、男女で糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎細動脈硬化すべてに対して有意な危険因子となった。耐糖能異常と蛋白尿は男性で糸球体硬化の有意な危険因子となった。総コレステロール高値は男性で腎細動脈硝子化の有意な危険因子となった。心電図異常は男女で、蛋白尿は女性で腎細動脈硬化の独立した危険因子となった。アルコール摂取は女性で糸球体硬化 ( $p=0.07$ ) および細動脈硬化 ( $p=0.06$ ) に保護的に作用する傾向にあった。

さらに、高血圧と耐糖能異常の有無により対象を4つのグループに分け、糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎細動脈硬化に対する影響を年齢調整して検討した(表4)。高血圧のみのグループでは、すべての腎病変のリスクが有意に上昇したが、耐糖能異常のみのグループではリスクの上昇は認めなかった。しかし、耐糖能異常と高血圧が合併すると、各腎病変に対するオッズ比は男女でさらに上昇したが、この相加効果は細動脈硬化では認められなかった。

#### D. 考 察

糸球体濾過率や腎血流量が年齢とともに低下することは広く知られている。加齢自体が糸球体硬化や腎細動脈硬化の原因であ

ることが示唆される。

血圧の影響は糸球体硬化より腎細動脈硝子化および細動脈硬化に強く認められることから、高血圧がまず血管変化の原因となり、結果として糸球体硬化を生じさせたと考えられる。心電図異常は腎細動脈硬化の危険因子となったが、心電図異常は高血圧の長期的な影響を反映していると考えられる。つまり、腎動脈硬化は冠動脈を含む全身の動脈硬化と密接に関連しているといえよう。

総コレステロールは男性でのみ腎細動脈硝子化の危険因子となった。腎細動脈硬化や糸球体硬化の危険因子とならなかった原因として、わが国の総コレステロール値が欧米諸国に比べ低いことが挙げられる。

本研究の成績は、アルコール摂取が糸球体硬化および腎細動脈硬化に女性で保護的に作用することを示した最初の報告である。女性の飲酒者のほとんどが少量摂取にとどまることから、少量飲酒が糸球体硬化や腎細動脈硬化に保護的に働くことが示唆される。このアルコールの影響は、HDL-コレステロールの上昇を介した作用と考えられる。

#### E. 結 論

一般住民の連続剖検例における検討では、年齢と収縮期血圧は糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎細動脈硬化に共通の危険因子であった。耐糖能異常、総コレステロール高値などの代謝異常や心電図異常も糸球体・腎血管病変を進行させるが、アルコールは保護的に作用していた。

#### F. 健康危険情報

心血管病危険因子は腎糸球体硬化、腎細

動脈硝子化, 腎細動脈硬化を促進させる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kubo M, Kiyohara Y, Kato I, Tanizaki Y, Katafuchi R, Hirakata H, Okuda S, Tsuneyoshi M, Sueishi K, Fujishima M, Iida M: Risk factors for renal glomerular and vascular changes in an autopsy-based population survey: the Hisayama study. *Kidney Int* 63:1508-1515, 2003
2. Arima H, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Tsuchihashi T; Kato I, Kubo M, Tanaka K, Ohkubo K, Nakamura H, Abe I, Fujishima M, Iida M: Validity of the JNC recommendations for the management of hypertension in a general population of Japanese elderly: the Hisayama study. *Arch Intern Med* 163:361-366, 2003
3. Wakisaka Y, Furuta A, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Iida M, Iwaki T: Age-associated prevalence and risk factors of Lewy body pathology in a general population: the Hisayama study. *Acta Neuropath* 106: 374-382, 2003
4. Miyazaki M, Nakamura H, Kubo M, Kiyohara Y, Iida M, Ishibashi T, Nose Y: Prevalence and risk factors for epiretinal membranes in a Japanese population: the Hisayama study. *Arch Clin Exp Ophthalmol* 241:642-646, 2003

### 2. 学会発表

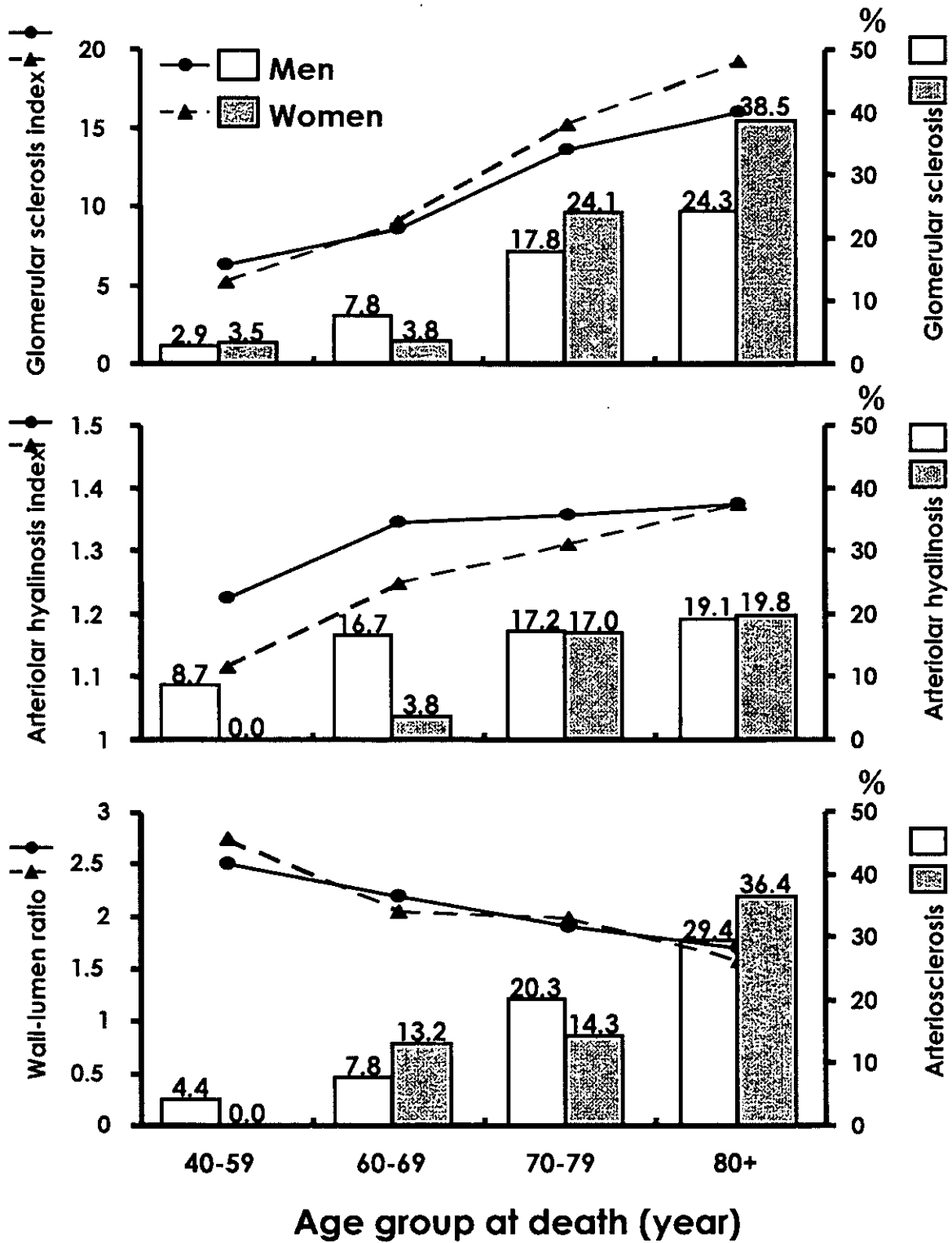
1. 久保充明, 他: 臨床診断と剖検診断のギャップ (久山町研究から)。第 48 回日本透析医学会, 大阪, 2003. 6 月発表
2. 尾石義謙, 他: 地域一般住民における血清ペプシノゲン法と胃癌発症の関係: 久山町研究。第 45 回日本消化器病学会, 大阪, 2003. 10 月発表
3. 田中圭一, 他: 一般住民における CagA 陽性 *Helicobacter pylori* 感染の胃癌発

症に及ぼす影響: 久山町研究。第 45 回日本消化器病学会, 大阪, 2003. 10 月発表

4. 森田友美, 他: 地域一般住民における血清低比重リポ蛋白コレステロールレベルに及ぼす食事性因子の影響。第 14 回日本老年医学会九州地方会, 福岡, 2004. 3 月発表
5. 志方健太郎, 他: TS-1 内服にて長期保存, および良好な QOL をみた 4 型胃癌の 1 例。第 14 回日本老年医学会九州地方会, 福岡, 2004. 3 月発表
6. 湧川佳幸, 他: 一般住民における高感度 CRP 値の脳卒中発症に及ぼす影響: 久山町研究。第 29 回日本脳卒中学会総会, 名古屋市, 2004. 3 月発表
7. 谷崎弓裕, 他: 地域高齢者における脳血管障害による ADL 障害の現状: 久山町研究。第 29 回日本脳卒中学会総会, 名古屋市, 2004. 3 月発表
8. 佐藤 新, 他: リスクプロファイルに基づく脳梗塞発症の予測: 久山町研究。第 29 回日本脳卒中学会総会, 名古屋市, 2004. 3 月発表

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし



Number of subjects				
Men	69	90	163	136
Women	29	53	112	187

Fig1. Age-specific mean values and frequencies of glomerular sclerosis, arteriolar hyalinosis, and arteriosclerosis among the 839 autopsy subjects by gender [men (□)(●) and women (■)(▲)], The Hisayama Study, 1962-1994. Solid and dashed lines indicate age-specific mean values of glomerular sclerosis index, arteriolar hyalinosis index, and wall-lumen ratio in men and women, respectively.

Table 1. Age-adjusted odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) of risk factors for the development of glomerular and vascular changes among 458 male autopsy subjects, the Hisayama Study, 1962 to 1994.

Risk factor	Glomerular sclerosis		Arteriolar hyalinosis		Arteriosclerosis	
	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI
Serum creatinine (10 mmol/l)	1.41 **	1.22 – 1.63	1.12 *	1.01 – 1.25	1.48 **	1.27 – 1.72
Glomerular filtration rate (10 ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	0.58 **	0.47 – 0.73	0.87	0.73 – 1.03	0.54 **	0.43 – 0.68
Proteinuria (yes / no)	4.10 **	2.21 – 7.63	2.52 **	1.35 – 4.72	2.41 **	1.28 – 4.54
Hematuria (yes / no)	0.53	0.11 – 2.44	0.54	0.12 – 2.46	0.66	0.17 – 2.49
Systolic blood pressure (10 mmHg)	1.11 *	1.02 – 1.21	1.25 **	1.15 – 1.37	1.38 **	1.25 – 1.52
Diastolic blood pressure (10 mmHg)	1.03	0.86 – 1.24	1.36 **	1.12 – 1.64	1.49 **	1.23 – 1.82
Mean arterial pressure (10 mmHg)	1.12	0.93 – 1.30	1.41 **	1.21 – 1.64	1.62 **	1.38 – 1.91
Pulse pressure (10 mmHg)	1.17 **	1.05 – 1.30	1.28 **	1.15 – 1.43	1.42 **	1.27 – 1.60
Glucose intolerance (yes / no)	2.43 **	1.41 – 4.18	2.06 **	1.23 – 3.46	1.30	0.75 – 2.25
ECG abnormalities (yes / no)	1.19	0.66 – 2.16	1.82 *	1.07 – 3.12	4.62 **	2.66 – 8.01
Total cholesterol (yes / no)	1.01	0.79 – 1.29	1.50 **	1.19 – 1.88	1.16	0.92 – 1.47
Body mass index (1 kg/m <sup>2</sup> )	0.99	0.90 – 1.09	1.01	0.92 – 1.11	1.04	0.95 – 1.15
Alcohol intake (yes / no)	0.72	0.42 – 1.24	0.66	0.39 – 1.11	0.85	0.51 – 1.41
Smoking habits (yes / no)	0.75	0.44 – 1.28	1.09	0.65 – 1.82	1.08	0.64 – 1.81

Odds ratios were calculated for the increment in parentheses.

Risk of serum creatinine, glomerular filtration rate, and hematuria were estimated in 329 men died after 1974. \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ .

Table 2. Age-adjusted odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) of risk factors for the development of glomerular and vascular changes among 381 female autopsy subjects, the Hisayama Study, 1962 to 1994.

Risk factor	Glomerular sclerosis		Arteriolar hyalinosis		Arteriosclerosis	
	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI
Serum creatinine (10 mmol/l)	1.12 *	1.01 – 1.23	1.03	0.97 – 1.08	1.07	0.98 – 1.16
Glomerular filtration rate (10 ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	0.71 **	0.61 – 0.82	0.85 *	0.73 – 0.99	0.73 **	0.63 – 0.84
Proteinuria (yes / no)	2.53 **	1.35 – 4.74	2.41 *	1.20 – 4.83	3.55 **	1.89 – 6.64
Hematuria (yes / no)	0.43	0.11 – 1.65	NA		0.54	0.14 – 2.04
Systolic blood pressure (10 mmHg)	1.20 **	1.10 – 1.32	1.18 **	1.06 – 1.30	1.16 **	1.06 – 1.26
Diastolic blood pressure (10 mmHg)	1.11	0.93 – 1.33	1.30 *	1.06 – 1.60	1.14	0.95 – 1.37
Mean arterial pressure (10 mmHg)	1.25 **	1.08 – 1.45	1.32 **	1.11 – 1.57	1.22 **	1.05 – 1.42
Pulse pressure (10 mmHg)	1.28 **	1.14 – 1.43	1.17 *	1.03 – 1.32	1.19 **	1.07 – 1.33
Glucose intolerance (yes / no)	1.60	0.87 – 2.94	1.63	0.81 – 3.26	1.05	0.54 – 2.02
ECG abnormalities (yes / no)	1.85 *	1.11 – 3.09	1.52	0.84 – 2.75	3.03 **	1.79 – 5.14
Total cholesterol (yes / no)	1.16	0.95 – 1.42	1.08	0.85 – 1.36	1.08	0.87 – 1.33
Body mass index (1 kg/m <sup>2</sup> )	1.01	0.94 – 1.08	1.04	0.96 – 1.13	0.93	0.86 – 1.00
Alcohol intake (yes / no)	0.21 *	0.05 – 0.92	1.94	0.73 – 5.18	0.11 *	0.01 – 0.87
Smoking habits (yes / no)	0.61	0.29 – 1.31	1.64	0.78 – 3.44	0.45	0.19 – 1.05

NA: Not available. Odds ratios were calculated for the increment in parentheses.

Risk of serum creatinine, glomerular filtration rate, and hematuria were estimated in 270 women died after 1974. \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ .

Table 3. Multivariate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) of risk factors for the development of glomerular and renal vascular changes among the 839 autopsy subjects by sex, the Hisayama Study, 1962 to 1994.

Risk factor	Glomerular sclerosis		Arteriolar hyalineosis		Arteriosclerosis	
	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI
<b>Men (n=458)</b>						
Age at death (10 years)	1.76 **	1.32 – 2.34	1.14	0.88 – 1.46	2.19 **	1.59 – 3.02
Systolic blood pressure (10 mmHg)	1.07	0.97 – 1.17	1.23 **	1.11 – 1.37	1.31 **	1.18 – 1.46
Glucose intolerance (yes / no)	2.29 **	1.28 – 4.09	1.72	0.95 – 3.10		
ECG abnormalities (yes / no)			1.25	0.66 – 2.37	2.78 **	1.51 – 5.13
Total cholesterol (1 mmol/l)			1.57 **	1.21 – 2.03		
Proteinuria (yes / no)	3.45 **	1.80 – 6.59	1.65	0.81 – 3.34	1.69	0.84 – 3.43
<b>Women (n=381)</b>						
Age at death (10 years)	2.11 **	1.55 – 2.88	1.45 *	1.05 – 2.00	2.12 **	1.54 – 2.91
Systolic blood pressure (10 mmHg)	1.16 **	1.04 – 1.30	1.15 *	1.02 – 1.30	1.04	0.93 – 1.17
ECG abnormalities (yes / no)	1.36	0.78 – 2.39			2.41 **	1.36 – 4.25
Alcohol intake (yes / no)	0.24	0.05 – 1.15			0.14	0.02 – 1.13
Proteinuria (yes / no)	1.63	0.80 – 3.30	1.63	0.75 – 3.55	2.81 **	1.39 – 5.69

Age and all significant risk factors available in the age-adjusted analysis were included in the multivariate model.

Odds ratios were calculated for the increment in parentheses. \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ .



Table 4. Age-adjusted odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for the development of glomerular and renal vascular changes according to hypertension (HT) and glucose intolerance (GI) status by sex, the Hisayama Study, 1962 to 1994.

Category	Glomerular sclerosis		Arteriolar hyalinosis		Arteriosclerosis	
	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI
<b>Men (n=458)</b>						
No HT and No GI (n=132)	1.00		1.00		1.00	
GI alone (n=38)	2.50	0.81 – 7.69	2.85	0.92 – 8.80	1.49	0.36 – 6.25
HT alone (n=202)	2.12	0.96 – 4.66	3.29 **	1.47 – 7.36	4.94 **	2.12 – 11.51
HT with GI (n=86)	4.89 **	2.11 – 11.32	5.78 **	2.45 – 13.65	5.83 **	2.30 – 14.75
<b>Women (n=381)</b>						
No HT and No GI (n=98)	1.00		1.00		1.00	
GI alone (n=15)	0.99	0.19 – 5.17	1.65	0.17 – 15.96	1.21	0.23 – 6.37
HT alone (n=220)	2.31 *	1.17 – 4.54	4.66 **	1.61 – 13.51	2.66 **	1.30 – 5.42
HT with GI (n=48)	3.83 **	1.63 – 9.01	7.08 **	2.13 – 23.54	2.55 *	1.02 – 6.40

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

厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)  
分担研究報告

糖尿病症例の冠状動脈動脈硬化の病理組織学的研究:久山町健診例における検討

分担研究者:居石克夫(九州大学大学院医学研究院病理病態学・教授)

研究協力者:中島 豊(同・助教授)

住吉真治(同・大学院生)

研究要旨: 虚血性心疾患の重要な危険因子である糖尿病を持つ症例について、非糖尿病症例との冠状動脈動脈硬化の病理組織学的差異の有無を検討した。1988年の久山町の健診を受けた症例のうち剖検となった例92例(平均75.1歳、男女比47対45)を用いた。冠状動脈の動脈硬化度は内腔の狭窄度を指標とした。また浸潤している炎症細胞について免疫染色を施し、内膜における陽性細胞数を連続切片にて比較した。冠状動脈の狭窄率は各群間で有意差はなかったものの、糖尿病群は平均年齢が65.7歳でその他の群いずれに対しても有意に低かった。内膜における炎症細胞浸潤は、マクロファージ数には各群間で有意差はなかったが、リンパ球数は糖尿病群で他の3群に比して有意に多かった。

【A. 研究目的】

糖尿病患者においては臨床的な冠動脈疾患を発症していない症例でも心疾患による死亡率が高く、冠動脈疾患を発症した非糖尿病症例と同程度と考えられている。主に臨床的な研究から、糖尿病が粥状硬化症を増悪させることは広く認識されているが、病巣の特徴についての検討は十分でない。本研究では久山町健診を受けた剖検例を用い、糖尿病症例の粥状硬化巣の特徴について病理組織学的に検討した。糖尿病は本邦でも増加している疾患であり、その動脈硬化巣の特性の究明は、糖尿病症例の虚血性心疾患の予防・治療につながると考えられる。

【B. 研究方法】

1988年の久山町の健診を受けた症例のうち剖検となった例92例(平均75.1歳、男女比47対45)を用いた。右冠状動脈から2箇所・

左前下降枝2箇所、左回旋枝1箇所から組織学的切片(460箇所)を作製し顕微鏡にて観察した。動脈硬化度は内腔の狭窄度を指標とした。また浸潤している炎症細胞について免疫染色を施し、内膜における陽性細胞数を連続切片にて比較した。

剖検に関する倫理的配慮については、剖検前に遺族からの同意を文書にて得ており問題はない。

【C. 研究結果】

症例は糖尿病例が11例、高血圧群が29例、糖尿病高血圧合併例が11例、どちらもない群が41例であった。冠状動脈の狭窄率は、各群間で有意差はなかったものの、糖尿病群は平均年齢が65.7歳でその他の群いずれに対しても有意に低かった。内膜における炎症細胞浸潤は、マクロファージ数には各群間で有意差はなかったが、リンパ球数は糖尿病群

で他の3群に比して有意に多かった。

#### 【D. 考察】

以上の検討から糖尿病群では冠状動脈動脈硬化の進行が若年のうちから起こっていることが示された。またその内膜の変化としてはリンパ球を主体とした炎症が強いという特徴を持っていることが示唆された。検索症例をさらに追加し、プラークの脆弱性との関連についてもさらに形態学的検討を進めている。

#### 【E. 結論】

糖尿病症例では冠状動脈粥状硬化の進行が早く、内膜における炎症細胞浸潤が強いことも、本症における虚血性心疾患発症に関与している可能性がある。

#### 【F. 健康危険情報】

特になし。

#### 【G. 研究発表】

##### 1. 論文発表

1. Suzuki H, et al: Plaque-stabilizing effect of Pitabastatin in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 10: 109-116, 2003
2. Jiang C et al: In vivo delivery of glial cell-derived neurotrophic factor across blood-brain barrier by gene transfer into the brain capillary endothelial cells. *Human Gene Therapy* 14 : 1181-1192, 2003
3. Shoji T et al: Intramuscular gene transfer of FGF-2 attenuates regenerative endothelial dysfunction and inhibits neointimal hyperplasia of autologous vein grafts in

rabbit poor Runoff Limbs. *American Journal of Physiology* 285: H173-H182, 2003

4. Miyazaki M et al: Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeon's rats. *Gene Therapy* 10: 1503-1511, 2003
5. Okano S et al: Recombinant Sendai virus vector for activated T-lymphocytes. *Gene Therapy* 10:1381-1391, 2003
6. Ikeda Y et al: Simian Immunodeficiency Virus-Based Lentiviral Vector For Retinal Gene Transfer: a preclinical safety study in adult rats. *Gene Therapy* 10: 1161-1169, 2003
7. Jin CH et al: Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hematopoietic stem cells. *Gene Therapy* 10: 272-280, 2003
8. Shoji F et al: Airway-directed gene transfer of interleukin-10 using recombinant Sendai virus effectively prevents post-transplantation bronchiolitis obliterans in mice. *Gene Therapy* 10: 213-218, 2003
9. Morishige K et al: Overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intravascular thrombus formation in porcine coronary arteries in vivo. *Cardiovascular Res.* 57: 572-58, 2003
10. Ameri A et al: Myocardial fibrosis in mice with overexpression of human blood coagulation factor IX. *Blood* 101: 1871-1873, 2003

## 2. 学会発表

日本病理学会、アメリカ遺伝子治療学会他、  
多数。

### 【H. 知的財産権の出願・登録状況】

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

## 分担研究報告

### 久山町住民におけるアンジオテンシン変換酵素遺伝子多型の測定

代表研究者 清原 裕（九州大学病院第二内科・講師）

**研究要旨** 福岡県久山町の住民健診を受けた 2,576 名について ACE 遺伝子多型を行った。その結果、全例測定が可能であった。遺伝子型の内訳は、DD 型 327 例（12.7%）、ID 型 1,188 例（46.1%）、II 型 1,061 例（41.2%）であった。この分布は、Hardy-Weinberg の平衡と矛盾するものではなかった。

#### A. 研究目的

近年、分子生物学の進歩によって遺伝子の多型を比較的簡便に決定できるようになり、特定の遺伝子多型と疾病との関連が検討されるようになった。その中で、アンジオテンシン変換酵素（ACE）遺伝子は、イントロン 16 に 287 塩基対（bp）の挿入/欠失（I/D）多型を有していることが知られている。その中で D 対立遺伝子は、血液および組織の ACE 活性上昇を介して、動脈硬化性疾患などの危険因子となることが示唆されている。しかし、この多型と疾患の関連は、特に日本人において定かではない。本研究では、福岡県久山町の住民の血液サンプルを用いて ACE 多型を測定した。

#### B. 研究方法

血液から DNA を抽出して、遺伝子型を解析した。DNA 抽出には、Lahiri ら（参考文献 1）の方法を用いた。次に、Evans ら（参考文献 2）の報告した PCR 法を実施し、ACE 遺伝子イントロン 16 の一部を増幅した。3 種類のプライマー-ACE1、ACE2、ACE3 を用いて PCR 法を実施すると、挿入（I）および欠失

（D）アレルからそれぞれ 65 および 84bp の PCR 産物が生成される。これらの組合せにより、遺伝子型（II 型、ID 型、DD 型）を判定することができる。得られた PCR 産物を 10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色することにより、遺伝子型を判定した。

#### （倫理面の配慮）

本研究は 3 省合同の「ヒトゲノム/遺伝子解析研究に関する倫理指針」および 2 省合同の「疫学研究に関する倫理指針」に準拠し、九州大学ヒトゲノム・遺伝解析倫理審査専門委員会の承認の元で行われた。本研究は、健診受診者を対象とした疫学調査で、対象者が研究によって不利益を被ることはない。研究者は、対象者の個人情報の漏洩を防ぐうえで細心の注意を払い、その管理に責任を負っている。

#### 参考文献

- 1.Lahiri DK, et al: Rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res 19:5444, 1991
- 2.Evans AE, et al: Polymorphisms of the

angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. Q J Med 87:211-214, 1994

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

#### C. 研究結果

久山町の住民健診を受けた 2,576 名について ACE 遺伝子多型を行った。その結果、全例測定が可能であった。遺伝子型の内訳は、DD 型 327 例 (12.7%)、ID 型 1,188 例 (46.1%)、II 型 1,061 例 (41.2%) であった。この分布は、Hardy-Weinberg の平衡と矛盾するものではなかった。

#### D. 考 察

健診を受けた久山町住民の血液サンプルを用いて ACE 遺伝子多型を測定した。検討した血液サンプルは全例測定が可能であった。遺伝子多型の内訳は、過去に報告されている日本人の報告とよく一致していた。

今後、本研究の成績と久山町の連続剖検例のパラフィン包埋組織を用いて測定した ACE 遺伝子多型の成績を合わせて、心血管病発症に及ぼす ACE 遺伝子多型の影響を、生活習慣・環境要因を合わせて検討する。

#### E. 結 論

久山町住民の血液サンプルを用いて ACE 遺伝子多型を測定した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）  
分担研究報告

パラフィン包埋ブロック組織におけるアンジオテンシン変換酵素遺伝子多型測定法の妥当性の検討

分担研究者 中別府 雄作 九州大学・生体防御医学研究所・教授

**研究要旨** 従来、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック組織からのDNAは分解が激しいために、遺伝子多型の解析には不適當であるとされていた。本研究では久山町研究の一貫として剖検体由来のホルマリン固定パラフィン包埋ブロック組織を材料としてアンジオテンシン変換酵素(ACE)の多型 (I/ deletion[d]) を正確に決定するための方法論を検討し、90%近い効率で正確な遺伝子多型を判定できるシステムを構築した。

**A. 研究目的**

従来、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック組織からのDNAはホルマリンによる組織の固定段階でDNAの損傷により酸化や脱塩基、架橋形成などが高度に引き起こされる結果、DNAが数百塩基長程度の短いDNA断片に分解されるために、遺伝子多型の解析には不適當であるとされていた。久山町研究では、30年に及ぶ剖検体の蓄積が有り、この検体を用いた遺伝子多型の解析が可能になると、膨大な分子疫学的な検討が可能となる。本研究では、久山町研究の一貫として剖検体由来のホルマリン固定パラフィン包埋ブロック組織を材料としてアンジオテンシン変換酵素(ACE)の多型 (I/ deletion[d]) を正確に決定するための方法論の確立を目指した。

**B. 研究方法**

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック組織からのDNA抽出は、SDS-Percoll-Chloroform-GuSCNを用い、KURABOの自動DNA抽出器を用いて行った。遺伝子型はEvansら(1994)の報告した方法に従いNested-PCR法を使用して判定した。判定された遺伝子型の正確さを検証するために、新鮮凍結組織の解析からACEの多型が決定されていた18例についてホルマリン固定パラフィン包埋ブロック組織を用いて検討した。また、パラフィン包埋ブロック組織から抽出したDNAからnested PCRにより増幅されたDNA断片の配列を直接制限酵素による切断部位の存在を比較する事で確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は3省合同の「倫理指針」に準拠し、九州大学医学部倫理委員会の承認の元で行われた。

**C. 研究結果**

パラフィン包埋ブロック組織から抽出したDNAでは、18例中16例で(88.9%)、ACE遺伝子多型が判定でき、その結果は新鮮凍結組織からのDNAで決定したものと同等であった。968例のパラフィン包埋ブロック組織を用いて判定したACE遺伝子多型の頻度は、DD:ID:II=12.4%:47.3%:40.3%であった。この分布は、Hardy-Weinbergの平衡と矛盾するものではなかった( $\chi^2_{2df} = 0.67, p = 0.72$ )。

**D. 考察**

パラフィン包埋ブロックの組織からのDNA抽出、PCRの問題点は、DNAが高度に崇有性を受けているためにPCRで増幅できる領域が短い事である。今回我々は、84bp及び65bpと100bpよりもさらに短い断片を増幅する事で、90%近い標本から再現性よく標的配列を増幅する事が可能となった。さらに、このようなPCRでは実験者自身からの汚染が最も大きなアーティファクトとなる事が判明した。我々は、この問題をクリアするために、切片の切り出し作業をクリーンベンチ内で行い、DNA抽出を自動化する事でクリアする事ができた。

**E. 結論**

30年以上ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックとして保存されていた組織から、90%の精度でACEの遺伝子多型を判定できるシステムを構築した。

**F. 健康危険情報**

特になし

**G. 研究発表**

1.論文発表

現在登投稿中1編

2.学会発表

特になし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

3.その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金・がん予防等健康科学研究事業  
分担研究報告書

ヒト悪性腫瘍の細胞学的特性および悪性度と遺伝子異常に関する検討

分担研究者 恒吉 正澄 九州大学大学院医学研究院形態機能病理学・教授

研究要旨

消化管と骨軟部組織に発生するさまざまな腫瘍において種々の細胞増殖関連因子や遺伝子異常について調べ、それらの因子と腫瘍の発生から発育進展様式や臨床病理学的事項との関連を解析した。

さまざまな悪性腫瘍において遺伝子異常と腫瘍の発育進展との関連が見いだされ、とくに腫瘍の種類により特異的な遺伝子異常が生じていることが示唆された。また、消化管腫瘍では腺癌という同じ組織でも発現形質の違いにより腫瘍発生から発育進展様式が異なり、遺伝子異常の関連も異なる可能性が考えられた。

A. 研究目的

消化管と骨軟部組織に発生するさまざまな腫瘍において種々の細胞増殖関連因子や遺伝子異常を調べ、それらの因子と腫瘍の発生から発育進展様式および臨床病理学的事項との関連について解析し、腫瘍の悪性度評価に応用することを目的とする。

B. 研究方法

消化管の腫瘍は、胃・大腸の腺腫と癌を用い、軟部腫瘍は平滑筋肉腫や線維肉腫、胞巣状軟部肉腫を用いた。消化管腫瘍では、gastric mucin (胃腺窩上皮のマーカ―)、MUC2 (腸杯細胞のマーカ―)、CD10 (小腸刷子縁のマーカ―) による免疫染色を行い、胃型・腸型の形質発現と腫瘍の発育進展様式や悪性度 (リンパ節転移や肝転移)、遺伝子異常 (とくにマイクロサテライト不安定性) との関連を解析した。

軟部腫瘍では、遺伝子異常 (p16、p21、p27、p53、マイクロサテライト不安定性) と腫瘍の発育における意義や悪性度との関連の解析を行った。

なお、マイクロサテライト不安定性の解析には、hMLH1 と hMSH2 に対する抗体を用いた免疫染色とマイクロサテライトマーカ―を用いた PCR 法により行った。p16、p21、p27、p53 の解析はそれぞれに対する抗体を用いた免疫染色に加え、腫瘍からの DNA 抽出後 p16 はそのメチレーションを p53 は遺伝子変異をオートシーケンサーにより検出した。

C. 研究結果

1. 胃癌の発育進展における形質変化。  
粘膜下浸潤胃癌の分化型腺癌の解析で、それらは形質型分類により胃型 26%、不完全腸型 54%、完全腸型 14%、分類不能型 6%に分けられた。粘膜内から粘膜下層へ浸潤しさらにリンパ節へ転移する場合、分化型の形態を保持しながら形質発現は減弱または消失するものがあることが判明した。

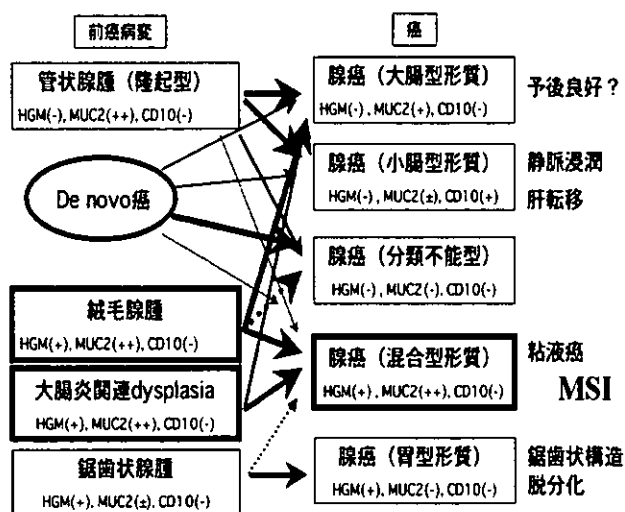
2. 胃腺腫の形質発現と発育進展様式および悪性化の危険性との関連。  
胃腺腫における形質発現の解析では、通常みられる隆起型腺腫は胃型 2%、不



完全腸型 36%、不完全腸型 52%、分類不能型 10%に分類され、分化型腺癌より完全腸型が多い傾向があったが、陥凹型腺腫では胃型 2%、不完全腸型 60%、完全腸型 38%であり、隆起型腺腫より不完全腸型が多い傾向にあった。また、p53 蛋白発現も陥凹型が隆起型より多い傾向があった。

### 3. 大腸上皮性腫瘍の形質発現と発育進展様式の関連

大腸腺腫から発癌に至る経路はいくつか想定されているが、その経路と形質発現の関係は徐々に判明してきた(下図に示す)。その中で、大腸絨毛性腫瘍ではほとんどが胃腸混合型形質に分類され、癌化した場合の形質発現は混合型を維持するか形質発現が減弱・消失するものが主体であり、通常の管状腺腫とそれらから発生した癌とは形質が異なることが示された。また、絨毛性腫瘍では癌化にマイクロサテライト不安定性の関与が示唆された。



### 4. 軟部腫瘍における細胞増殖関連因子、種々の遺伝子異常、マイクロサテライト不安定性の解析。

軟部平滑筋肉腫では p16 蛋白発現減弱例は予後不良であり、遺伝子不活性化のメカニズムとはプロモーター領域のメチル化によるものが主であった。

線維肉腫の中でも粘液線維肉腫では細胞周期関連蛋白のうち p21 蛋白発現が予後不良因子であった。また、皮膚で見られる隆起性皮膚線維肉腫の悪性化に際してマイクロサテライト不安定性は早期に関与し、p53 遺伝子異常は晩期に関与している可能性が示唆された。

胞巣状軟部肉腫において、DNA ミスマッチ修復遺伝子 hMSH2/hMLH1 の不活性化は p53、APC 遺伝子変異の原因と考えられた。

### D. 考察

1. 胃腺腫・腺癌の解析では、発育進展の過程で、形態は保持したまま形質発現の減弱・消失を認めるものは、高悪性度の指標となると考えられた。大腸腺腫・腺癌の解析では、形質発現と腫瘍の発生から発育進展様式の関連があることと、形質の違いと遺伝子異常の関連の可能性が示唆され、形質型分類が腫瘍の分子生物学的解析において重要であると考えられた。

2. 軟部腫瘍の解析では、腫瘍の発生から発育進展においてマイクロサテライト不安定性や p16、p21、p53 などの異常により高悪性化に関連しており、その一部では遺伝子プロモーター領域のメチル化が関与するものもあつてきた。しかしながら、それらは独立したもののから関連したものまでさまざまな形で関与しており、さらに腫瘍の種類により異なることが示唆された。

### E. 結論

さまざまな悪性腫瘍において遺伝子異常と腫瘍の発育進展との関連が見いだされ、とくに腫瘍の種類により特異的な遺伝子異常が生じていることが示唆された。また、消化管腫瘍では腺癌という同じ組織でも発現形質の違いにより腫瘍発生から発育進展様式が異なり、遺伝子異常の関連も異なる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Oya M, Yao T, Nakamura T, Nakanishi K, Tsuneyoshi M. Intestinal phenotypic expression of gastric depressed adenomas and the surrounding mucosa. *Gastric Cancer* 6: 179-184, 2003
  - 2) Takata M, Yao T, Nishiyama K, Nawata H, Tsuneyoshi M. Phenotypic alteration in malignant transformation of colonic villous tumours: with special reference to a comparison with tubular tumours. *Histopathol* 43: 332-339, 2003
  - 3) Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Takahira T, Yamamoto H, Sakamoto A, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Possible Association Between Tumor-Suppressor Gene Mutations and *hMSH2/hMLH1* in Alveolar Soft Part Sarcoma. *Human Pathol* 34: 841-849, 2003
  - 4) Oda Y, Takahira T, Kawaguchi K, Yamamoto H, Tamiya S, Matsuda S, Tanaka K, Kinukawa N, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Altered Expression of Cell Cycle Regulators in Myxofibrosarcoma, With Special Emphasis on Their Prognostic Implications. *Human Pathol* 34: 1035-1042, 2003
  - 5) Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Tamiya S, Takahira T, Miyajima K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Mechanisms of inactivation of the p16<sup>INK4a</sup> gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. *J Pathol* 201: 487-495, 2003
  - 6) Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Takahira T, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Decreased Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$  2 Receptor Is Associated With That of p27KIP1 in Giant Cell Tumor of Bone: A Possible Link Between Transforming Growth Factor- $\beta$  and Cell Cycle-Related Protein. *Human Pathol* 35: 61-68, 2004
  - 7) Takahira T, Oda Y, Tamiya S, Yamamoto H, Kawaguchi K, Kobayashi C, Oda S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Microsatellite Instability and p53 Mutation Associated With Tumor Progression in Dermatofibrosarcoma Protuberans. *Hum Pathol* 35: 240-245, 2004
2. 学会発表
  - 1) 中村俊彦、八尾隆史、西山憲一、恒吉正澄。粘膜内分化型胃癌の肉眼型と形質発現、細胞増殖活性、アポトーシスとの関係。(第75回日本胃癌学会総会、2003.2.7、東京)
  - 2) 高比良知也、小田義直、斎藤剛、山元英崇、川口謙一、小林周、岩本幸英、恒吉正澄。胞巣状軟部肉腫に対する分子生物学的解析。(第36回日本整形外科学会骨・軟部学術集会、2003.7.12、神戸)
  - 3) 高比良知也、小田義直、田宮貞史、山元英崇、川口謙一、小林周、恒吉正澄。隆起性皮膚線維肉腫に対するマイクロサテライト不安定性の解析。(第92回日本病理学会、2003.4.25、福岡)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kubo M, et al	Trends in the incidence, mortality, and survival rate of cardio-vascular disease in a Japanese community: the Hisayama study.	Stroke	34	2349-2354	2003
Kiyohara Y, et al	Dietary factors and development of impaired glucose tolerance and diabetes in a general Japanese population: the Hisayama study.	J Epidemiol	13	251-258	2003
Kiyohara Y, et al	Ten-year prognosis of stroke and risk factors for death in a Japanese community: the Hisayama study.	Stroke	34	2343-2347	2003
Kato I, et al	Insulin-mediated effects of alcohol intake on serum lipid levels in a general population: the Hisayama study.	J Clin Epidemiol	56	196-204	2003
Miyazaki M, et al	Risk factors for age related maculopathy in a Japanese population: the Hisayama study.	Br J Ophthalmol	87	469-472	2003
Tu F, et al	Analysis of hospital charges for ischemic stroke in Fukuoka, Japan.	Health Policy	66	239-246	2003
Kubo M, et al	Risk factors for renal glomerular and vascular changes in an autopsy-based population survey: the Hisayama study.	Kidney Int	63	1508-1515	2003
Arima H, et al	Validity of the JNC recommendations for the management of hypertension in a general population of Japanese elderly: the Hisayama study.	Arch Intern Med	163	361-366	2003
Wakisaka Y, et al	Age-associated prevalence and risk factors of Lewy body pathology in a general population: the Hisayama study.	Acta Neuropath	106	374-382	2003
Miyazaki M, et al	Prevalence and risk factors for epiretinal membranes in a Japanese population : the Hisayama study.	Arch Clin Exp Ophthalmol	241	642-646	2003
Suzuki H, et al	Plaque-stabilizing effect of Pitabastatin in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.	Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	10	109-116	2003
Jiang C, et al	In vivo delivery of glial cell-derived neurotrophic factor across blood-brain barrier by gene transfer into the brain capillary endothelial cells.	Human Gene Therapy	14	1181-1191	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shoji T, et al	Intramuscular gene transfer of FGF-2 attenuates regenerative endothelial dysfunction and inhibits neointimal hyperplasia of autologous vein grafts in rabbit poor Runoff Limbs.	American Journal of Physiology	285	H173-H182	2003
Miyazaki M, et al	Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeon's rats.	Gene Therapy	10	1503-1511	2003
Okano S, et al	Recombinant Sendai virus vector for activated T-lymphocytes.	Gene Therapy	10	1381-1391	2003
Ikeda Y, et al	Simian Immunodeficiency Virus-Based Lentiviral Vector For Retinal Gene Transfer: a preclinical safety study in adult rats.	Gene Therapy	10	1161-1169	2003
Jin CH, et al	Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hematopoietic stem cells.	Gene Therapy	10	272-277	2003
Shoji F, et al	Airway-directed gene transfer of interleukin-10 using recombinant Sendai virus effectively prevents post-transplantation bronchiolitis obliterans in mice.	Gene Therapy	10	213-218	2003
Morishige K, et al	Overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intravascular thrombus formation in porcine coronary arteries in vivo.	Cardiovascular Res	57	572-585	2003
Ameri A, et al	Myocardial fibrosis in mice with overexpression of human blood coagulation factor IX.	Blood	101	1871-1873	2003
Oya M, et al	Intestinal phenotypic expression of gastric depressed adenomas and the surrounding mucosa.	Gastric Cane	6	179-184	2003
Takata M, et al	Phenotypic alteration in malignant transformation of colonic villous tumours: with special reference to a comparison with tubular tumours.	Histopathol	43	332-339	2003
Saito T, et al	Possible Association Between Tumor-Suppressor Gene Mutations and <i>hMSH2/hMLH1</i> in Alveolar Soft Part Sarcoma.	Human Patho	34	841-849	2003