

厚生労働科学研究費補助金
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

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清原 裕
平成17（2005）年4月

目 次

I. 総括研究報告書

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 清原 裕（九州大学病院第二内科・講師）	1
--	---

II. 分担研究報告書

1. 久山町の地域住民における胃癌発症率と生命予後	13
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）	
2. 久山町剖検例におけるアンジオテンシン変換酵素遺伝子多型の測定	20
中別府雄作（九州大学生体防御医学研究所個体機能制御学・教授）	
3. 「機能的」脈管リモデリングにおける血管・リンパ管内皮細胞の機能制御機構	23
居石克夫（九州大学大学院医学研究院病理病態学・教授）	
4. 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	25
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）	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	32
-----------------------	----

総括研究報告

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

主任研究者 清原 裕（九州大学病院第二内科・講師）

研究要旨

1. 共同研究：福岡県久山町住民の連続剖検例 817 名について、アンジオテンシン変換酵素（ACE）遺伝子多型が腎糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎動脈硬化に与える影響を検討した。その結果、DD 型に比べ、ID 型および II 型で糸球体硬化の頻度が有意に高かった（DD 型：14.2%、ID 型：23.4%、II 型：23.6%）。ACE 遺伝子多型と細小動脈硝子化の頻度との間には明らかな関連はみられなかった。細動脈硬化の頻度は DD 型に比べ ID 型および II 型で増加する傾向にあったが、有意差は無かった。これらの関係はロジスティック回帰モデルを用いた多変量解析で、死亡時年齢、性、蛋白尿、高血圧、耐糖能異常、心電図異常、心血管病既往の有無、血清コレステロール、飲酒・喫煙を調整しても変わりなかった。
2. 個別研究：福岡県久山町の地域一般住民を対象にした疫学調査の成績をもとに、最近の胃癌発症率と生命予後に関連する要因を検討した。その結果、男性の胃癌発症率は女性より高く、加齢とともに上昇した。また、胃癌の生命予後は病期、発症部位、組織型に関連していた（飯田）。過去 40 年間に剖検した久山町住民のパラフィン包埋組織からの DNA の抽出法および遺伝情報の増幅法を確立した。さらに、1961 年から 32 年間の追跡調査間の久山町剖検例 968 例のパラフィン標本から ACE 遺伝子 I/D 多型を決定し、癌死と ACE 遺伝子多型の関連を解明するためのデータベースを構築した（中別府）。動脈硬化、血栓症などの血管リモデリングに伴う機能的血管・リンパ管新生過程における、各種脈管新生因子の発現動態の解析、ならびにその制御機構における血小板由来増殖因子（PDGF-A、-B）を中心にした病態学的意義について検討した。血管内皮増殖因子群（VEGF、HGF）は間葉系細胞の PDGF-A を介したオートクライン制御により血管新生を促進すること、また内皮由来 PDGF-B が間葉系細胞の VEGF-C を誘導、さらにこの VEGF-C は内皮由来の PDGF-B を誘導し、このパラクライン制御系が毛細血管の成熟性促進とリンパ管形成に密に関与していることが明らかになった（居石）。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および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。その結果、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（恒吉）。

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)

居石 克夫 (九州大学大学院医学研究院病理病態学・教授)

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)

中別府雄作 (九州大学生体防御医学研究所 個体機能制御学・教授)

I. 共同研究：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腎糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎動脈硬化に与える影響

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測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。一方、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、この多型と疾患との関連は、特に日本人において定かではない。そこで本研究では、福岡県久山町の地域住民の剖検検体を用いて、ACE 遺伝子多型の腎糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎動脈硬化に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

対象者：

1962 年 1 月 1 日から 1994 年 12 月 31 日の間に久山町住民の死亡者 1,742 名のうち

1394 名に剖検を行った (剖検率 80.0%)。このうち、1961 年、1967 年、1974 年、1978 年、1983 年、1988 年に行った 6 回の循環器健診のうち少なくとも 1 回を受診していた者は 1,168 名であった (健診受診時の年齢 40 歳以上)。さらにこのうち、ACE 遺伝子多型の測定あるいは腎組織の評価ができなかった 233 名 (ACE 遺伝子多型判定不能 22 名、腎組織保存なし 98 名、他院で剖検 80 名、その他 33 名) と死亡から 7 年以内に健診を受診しなかった 118 名を除いた 817 名 (男 445 名、女 372 名) を本研究の対象者とした。

ACE 遺伝子多型の判定：

DNA は、剖検時に採取されパラフィン固定された主要組織から抽出した。DNA 抽出には、Tukada ら (参考文献 1) の方法を用いた。次に Evans ら (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、I および 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、遺伝子多型 (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、遺伝子多型を判定した。

腎組織の評価：

腎組織はパラフィン固定を行った腎組織を 2 μ m で薄切し、periodic acid-Schiff (PAS) 染色を行った。

糸球体硬化の評価は Raji ら (3) の方法で行った。各組織について 100 個の糸球体をそれぞれ糸球体硬化の程度に応じて 5 段階評価 (0~+4) し、各程度の数を算出後、

糸球体硬化度 (Glemrular sclerosis index ; GSI) を下記の式にて計算した:

$$GSI = (0xN0+1xN1+2xN2+3xN3+4xN4)/4$$

細動脈硝子化の評価は Bader ら (4) の方法で行った。各組織について 50 個の細小動脈を、それぞれ硝子化の程度に応じて 4 段階評価(+1~-+4)し、各程度の数を算出後、細小動脈硝子化度 (hyaline change index ; HCI) を下記の式にて計算した:

$$HCI = (1xN1+2xN2+3xN3+4xN4)/50$$

細動脈硬化の程度は Kernohan ら (5) の方法に基づき、Wall-lumen ratio を計算した。各組織について 60 μ m 以上の全動脈の血管外径と血管内腔径を測定し、下記の式にて Wall-lumen ratio を計算し平均値を求めた:

$$\text{Wall-lumen ratio} = \text{血管内腔径} / ((\text{血管外径} - \text{血管内腔径}) / 2)$$

各変数のカットオフ値は蛋白尿、腎不全、高血圧、耐糖能異常、原発性腎疾患の無い 100 名を選出し、各値の 95 パーセンタイル値より大、または 5 パーセンタイル値より小とした: 糸球体硬化(+); GSI>19.0、細小動脈硝子化(+); HCI>1.62、細動脈硬化(+); Wall-lumen ratio<2.70

危険因子:

血圧 $\geq 140/90$ mmHg または降圧薬内服を高血圧ありと定義した。耐糖能異常は 1961 年、1967 年は尿糖陽性者に糖負荷試験を行って評価した。1974 年、1978 年、1983 年は空腹時、食後血糖にて評価した。1988 年

は 75 g 経口糖負荷試験で評価した。糖尿病の病歴を有する者は耐糖能異常ありとした。心電図異常はミネソタコード 3-1、4-1, 2, 3 を異常と定義した。糸球体濾過量は MDRD 研究の式を用いて評価した (6)。

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。

C. 研究結果

研究対象となった 817 名について ACE 遺伝子の多型解析を行った。その内訳は、DD 型 97 例 (11.9%)、ID 型 386 例 (47.2%)、II 型 334 例 (40.9%) 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。

表 1 に示すように、ACE 遺伝子多型間で死亡時年齢、性、糸球体濾過量、血清クリアチニン値、蛋白尿の有無、収縮期血圧、拡張期血圧、降圧薬服用の有無、高血圧の有無、耐糖能異常の有無、心電図異常の有無、心血管病既往の有無、血清コレステロール値、飲酒・喫煙の有無に有意差を認めなかった。

ACE 遺伝子多型別にみた糸球体硬化、細小動脈硝子化、細動脈硬化の頻度 (年齢・性調整) を図 1 に示した。DD 型に比べ、ID 型と II 型で糸球体硬化の頻度が有意に高

かった (DD 型:14.2%、ID 型:23.4%、II 型:23.6%)。細小動脈硝子化の頻度と ACE 遺伝子多型の間には明らかな関連は見られなかった。細動脈硬化の頻度は、DD 型に比べ ID 型と II 型で増加する傾向にあったが、有意差は無かった。

糸球体硬化、細小動脈硝子化、細動脈硬化に対する ACE 遺伝子多型の odds 比 (OR) を調べた (表 2)。多変量調整はロジスティック回帰モデルを用いた。調整変数として、死亡時年齢、性、蛋白尿の有無、高血圧の有無、耐糖能異常の有無、心電図異常の有無、心血管病既往の有無、血清コレステロール値、飲酒・喫煙の有無を用いた。DD 型に比べ、ID 型および II 型の糸球体硬化に対する odds 比は約 2 倍高かった (ID 型: OR, 2.18; II 型: OR, 2.05; II+ID 型: OR, 2.11)。DD+ID 型に対し II 型は有意なリスクでは無かった。同様の傾向を ACE 遺伝子多型と細動脈硬化との間にも認めたと、統計学的に有意差を認めなかった。ACE 遺伝子多型と細小動脈硝子化に関連は無かった。

D. 考 察

ACE 遺伝子多型と脳卒中や虚血性心疾患などの心血管病の発症との関係を検討した報告は多数みられるが、未だに結論はでていない (7)。ACE D 対立遺伝子が頸動脈の内膜肥厚の有意なリスクであるとしたメタ解析の報告がある (8)。一方、剖検症例による大動脈硬化や冠状動脈硬化と ACE 遺伝子多型との関係をみた報告では、ACE 遺伝子多型は動脈硬化病変の程度と関連は無かった (9)。

本研究では、久山町住民の剖検症例の組織標本を用いて、ACE 遺伝子多型と腎糸球

体硬化、腎細動脈硝子化、腎動脈硬化の程度の関係を検討した。予測に反し、II+ID 型が腎糸球体硬化の有意な危険因子となった。また、腎動脈硬化についても II+ID 型で増加する傾向が見られた。

これまで ACE I 対立遺伝子はアルツハイマー病、高血圧、深部静脈血栓症の発症の危険因子になるという報告がある (10-13)。また、2 型糖尿病患者の尿中アルブミン量や血漿中のプラスミノーゲン値の上昇と有意な関連が見られたという報告も見られる (14)。しかし、ACE 遺伝子 II+ID 型と動脈硬化との関連についての機序は今のところ不明であり、今後の検討課題として残されている。

E. 結 論

久山町住民の剖検症例を用いて、ACE 遺伝子多型の腎糸球体硬化、腎細動脈硝子化、腎動脈硬化症に与える影響を検討した。DD 型に比べ、II+ID 型は腎糸球体硬化の有意な危険因子であった。

F. 健康危険情報

ACE 多型の II+ID 型は、腎糸球体硬化の有意な危険因子となる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka K, Kiyohara Y, Kato I, et al: Incidence and prognosis of gastric cancer in a population-based cohort survey: the Hisayama study. Scand J Gastroenterol 5: 459-463, 2004
2. Miyazaki M, Kubo M, Kiyohara Y, et al: Comparison of diagnostic methods for diabetes mellitus based on prevalence

- of retinopathy in a Japanese population: the Hisayama study. *Diabetologia* 47: 1411-1415, 2004
3. Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, et al: Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke* 35: 2072-2077, 2004
 4. Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo M, et al: Hyperhomocysteinemia and the development of chronic kidney disease in a general population: the Hisayama study. *Am J Kidney Dis* 44: 437-45, 2004
 5. Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, et al: The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: the Hisayama study. *J Dent Res* 83: 485-490, 2004
 6. Shimazaki Y, Saito T, Kiyohara Y, et al: Relationship between electrocardiographic abnormalities and periodontal disease: the Hisayama study. *J Periodntol* 75: 791-797, 2004.
 7. Hata J, Tanizaki Y, Kiyohara Y, et al: Ten year recurrence after first ever stroke in a Japanese community: the Hisayama study. *J Neurol Neurosurg Ps* 76:368- 372, 2005
2. 学会発表
 1. 清原 裕, 大久保 賢: 久山町研究からみた血糖コントロールの指標. <ワークショップ>コントロール基準と日本におけるエビデンス. 第 47 回日本糖尿病学会学術集会, 東京, 2004 年 5 月発表
 2. 清原 裕: 久山町疫学における生活習慣病の過去・現在・未来. 第 13 回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会<特別講演>, 福岡, 2004 年 7 月発表
 3. 清原 裕: 日本人の高血圧と脳卒中-変遷するリスク要因. <脳卒中学会合同シンポジウム>高血圧管理からみた脳卒中の予防と治療. 第 27 回日本高血圧学会総会, 栃木, 2004 年 10 月発表
 4. 清原 裕: 糖尿病の昔と今. 千里ライフ市民公開講座成人病シリーズ第 41 回糖尿病の予防と治療, 大阪, 2004 年 10 月発表
 5. 清原 裕: 糖尿病と動脈硬化: 疫学からの視点. <シンポジウム>糖尿病と動脈硬化 I. 疫学と病態生理, 第 128 回日本医学会シンポジウム, 東京, 2004 年 12 月発表
 6. 清原 裕: 久山町研究. <レクチャー>EBM から見た糖尿病における心血管疾患予防の重要性, 第 39 回糖尿病学の進歩, 仙台, 2005 年 2 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

I. 参考文献

1. Tsukada T, et al.: Rapid and simple method for preparation of DNA by SDS-Percoll-Chloroform-GuSCN. *Rinsho-Kagaku* 24: 65c, 1995 (in Japanese)
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
3. Raij L, et al.: Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 26: 137-143, 1984
 4. Bader H, et al.: The size of the juxtaglomerular apparatus in diabetic glomerulosclerosis and its correlation with arteriolosclerosis and arterial hypertension: a morphometric light microscopic study on human renal biopsies. *Clin Nephrol* 8: 308-311, 1977
 5. Kernohan JW, et al.: The arterioles in cases of hypertension. *Arch Intern Med* 44: 395-423, 1929
 6. Levey AS, et al.: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130: 461-470, 1999
 7. Agerholm-Larsen B, et al.: ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:484-492, 2000
 8. Sayed-Tabatabaei FA, et al.: Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis. *Stroke* 34: 1634-1639, 2003.
 9. Scheer WD, et al.: ACE insert/delete polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 178: 241-247, 2005
 10. Elkins JS, et al.: Alzheimer disease risk and genetic variation in ACE: a meta-analysis. *Neurology* 62: 363-368, 2004
 11. Kolsch H, et al.: ACE I/D polymorphism is a risk factor of Alzheimer's disease but not of vascular dementia. *Neurosci Lett* 377: 37-39, 2005
 12. Ismail M, et al.: Association between the angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and essential hypertension in young Pakistani patients. *J Biochem Mol Biol* 37: 552-555, 2004
 13. Wells PS, et al.: The ACE D/D genotype is protective against the development of idiopathic deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 90: 829-834, 2003
 14. Tkac I, Angiotensin-converting enzyme genotype, albuminuria and plasma fibrinogen in type 2 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr* 115: 835-839, 2003

I. 研究協力者

二宮利治 (九州大学大学院医学研究院病態機能内科学・研究員)

Table 1: Mean values or frequencies of potential risk factors and laboratory variables according to the angiotensin converting enzyme polymorphism among 817 autopsy subjects

Variables	ACE polymorphism			p value for trend
	DD (N = 97)	ID (N = 386)	II (N = 334)	
Age at death, y	74 ± 13	75 ± 12	75 ± 12	ns
Female, %	46.4	43.3	47.9	ns
GFR, ml/min/ 1.73m ²	83.6 ± 24.1	81.2 ± 21.3	79.2 ± 21.7	ns
Serum creatinine, μ mol/L	98.8 ± 89.7	91.8 ± 33.7	92.5 ± 25.4	ns
Proteinuria, %	16.0	14.2	16.0	ns
Systolic blood pressure, mmHg	149 ± 26	152 ± 30	148 ± 28	ns
Diastolic blood pressure, mmHg	81 ± 14	81 ± 15	80 ± 14	ns
Antihypertensive medication, %	19.6	21.0	21.9	ns
Hypertension, %	66.0	68.1	64.1	ns
Diabetes mellitus, %	16.5	24.1	21.0	ns
ECG abnormalities, %	36.2	25.8	26.0	ns
History of cardiovascular disease, %	12.4	12.7	13.8	ns
Total cholesterol, mmol/L	4.45 ± 1.11	4.70 ± 1.15	4.65 ± 1.15	ns
Alcohol intake, %	33.7	32.0	26.6	ns
Smoking habits, %	43.3	39.7	36.1	ns

Abbreviations: ACE, angiotensin converting enzyme; GFR, glomerular filtration rate; ECG, electrocardiogram; ns, not significant.

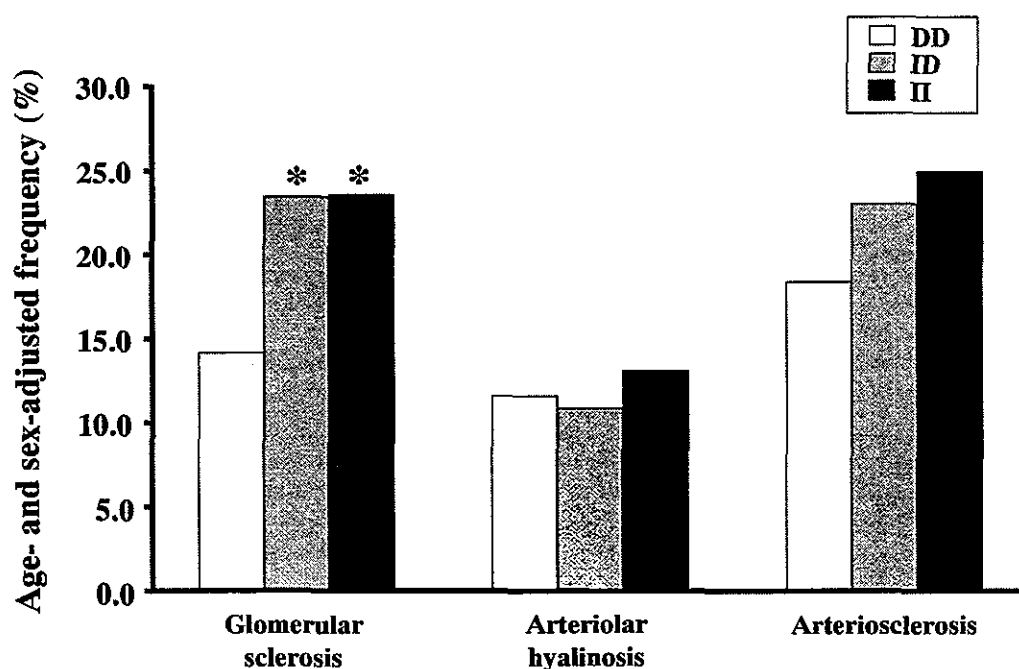


Figure 1. Age- and sex-adjusted frequencies of glomerular sclerosis, arteriolar hyalinosis, and arteriosclerosis according to the angiotensin converting enzyme polymorphism among 817 autopsy subjects. *p<0.05 vs. DD group

Table 2: Age- and sex-adjusted or multivariate-adjusted odds ratios of the angiotensin converting enzyme polymorphism for the glomerular and vascular changes among 817 autopsy subjects.

	Glomerular sclerosis		Arteriolar hyalinosis		Arteriosclerosis	
	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI
Age- and sex-adjusted^{a)}						
II (vs. DD)	2.04	(1.05-3.97)*	1.16	(0.57-2.35)	1.57	(0.86-2.88)
ID (vs. DD)	2.12	(1.10-4.10)*	0.96	(0.47-1.94)	1.42	(0.78-2.59)
II+ID (vs. DD)	2.09	(1.10-3.94)*	1.05	(0.54-2.05)	1.49	(0.84-2.65)
II (vs. DD+ID)	1.09	(0.77-1.55)	1.20	(0.78-1.84)	1.18	(0.84-1.66)
Multivariate-adjusted^{b)}						
II (vs. DD)	2.05	(0.99-4.25)	0.97	(0.45-2.08)	1.95	(0.99-3.85)
ID (vs. DD)	2.18	(1.05-4.52)*	0.93	(0.44-1.97)	1.83	(0.93-3.59)
II+ID (vs. DD)	2.11	(1.12-2.92)*	0.95	(0.47-1.94)	1.89	(0.99-3.60)
II (vs. DD+ID)	1.08	(0.73-1.59)	1.03	(0.64-1.66)	1.20	(0.82-1.77)

Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval

^{a)} Adjusted for age at death and sex.

^{b)} Adjusted for age at death, sex, proteinuria, hypertension, glucose intolerance, electrocardiogram abnormalities, history of cardiovascular disease, total cholesterol, alcohol intake, and smoking habits.

*p<0.05

II. 個別研究：

1. 久山町の地域住民における胃癌発症率と生命予後（飯田）

A. 研究目的

前向き追跡研究で正確に胃癌発症率と生命予後について検討した報告はない。そこで福岡県久山町の地域一般住民を対象にした疫学調査の成績をもとに、最近の胃癌発症率と生命予後に関連する要因を検討した。

B. 研究方法

1988年に久山町の住民検診を受診した満40歳以上の住民2,742名のうち、胃切除歴または胃癌の既往歴がある者を除いた2,605名を対象に、検診・臨床記録、剖検所見をもとに1988年12月から1998年11月まで10年間追跡した。胃癌はすべて手術あるいは剖検で得られた標本の病理組織学的診断により確認した。

（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。

C. 研究結果

追跡期間中に76例の胃癌発症を認めた。年齢調整後の胃癌発症率（対1,000人年）は男性4.9、女性1.2で、男性は女性の4倍有意に高かった。男性の胃癌発症率は加齢とともに上昇したが、女性ではその傾向は認められなかった。胃癌の発生部位別に5年生存率をみると、生命予後は胃中央部1/3のM領域の胃癌が最もよく、次いで幽門側1/3のA領域、噴門側1/3のC領域の順によかった。胃癌の組織型別にみると、高分化型癌の5年生存率が最もよく、中分化型癌および低分化型癌の生存率は高分化型癌に比べ有意に低かった。胃癌の深達度別に予後を検討すると、早期癌の全例が5

年以上生存していたのに対し、進行癌では癌が深部に浸潤するにしたがい生存率が有意に低下した。

D. 考 察

本報告では、欧米の成績に比べ胃癌の5年生存率が高い。これは主に、われわれの胃癌例は早期癌の比率が高いことによると考えられる。わが国で行われた他の観察研究でも同様の報告があり、わが国における胃癌の診断法の進歩や胃癌検診の普及が貢献していると考えられる。また早期胃癌の5年生存率が100%であることから、わが国の治療技術の優秀性がうかがえる。

E. 結 論

久山町の地域住民では、男性の胃癌発症率は女性より高く、加齢とともに上昇した。また、胃癌の生命予後は病期、発症部位、組織型に関連していた。

2. 久山町剖検例におけるアンジオテンシン変換酵素遺伝子多型の測定（中別府）

A. 研究目的

過去40年間に剖検した久山町住民のパラフィン包埋組織からのDNAの抽出法および遺伝情報の増幅法を確立したので、この手法を用いて剖検組織から遺伝子解析を行い、その結果と生活習慣病との関連を検討する目的で臨床データとともにデータベースの構築を目指した。

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

1961年から32年間の追跡調査間の久山町剖検例968例のパラフィン標本において、ACE遺伝子I/D多型を解析した。その結果、98.5%の標本で遺伝子型を決定することができた。940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型12.4%、ID型47.3%、II型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($\chi^2_{2df} = 0.67, p = 0.72$)。

32年間の追跡調査の期間に117名が癌死と診断されていることから、癌死とACE遺伝子多型の関連を明らかにするために性別、年齢、body mass index、耐糖能異常、血清総コレステロール、収縮期血圧、アルコール摂取、喫煙の生活習慣および関連の臨床データとともに、ACE遺伝子I/D多型のデータベースを構築した。

D. 考察

癌死とACE遺伝子多型の関連を性別、年齢、アルコール摂取、body mass index、耐糖能異常、血清総コレステロール、収縮期血圧、喫煙の生活習慣および関連の臨床デ

ータで補正しながら解析中であるが、DDの遺伝子型がIIおよびIDの遺伝子型に比べて喫煙者の癌死の危険因子となる可能性が示唆されており、来年度にかけて最終的な解析結果をまとめる予定で、解析を進めている。

E. 結論

過去40年間に剖検した久山町住民のパラフィン包埋組織からのDNAの抽出法および遺伝情報の増幅法を確立した。1961年から32年間の追跡期間における久山町剖検例968例のパラフィン標本からACE遺伝子I/D多型を決定し、癌死とACE遺伝子多型の関連を解明するためのデータベースを構築した。

3. 「機能的」脈管リモデリングにおける血管・リンパ管内皮細胞の機能制御機構(居石)

A. 研究目的

我々は、FGF-2の機能として内因性血管新生因子群の階層的発現制御を誘導することを明らかにして来た。本研究では、この「階層的血管新生発現制御機構」における血小板由来増殖因子(PDGF)の機能について、これ迄の研究をさらに発展させた。

B. 研究方法

雄性C57BL/6マウスに重症虚血モデルを作成、SeV-FGF2あるいはSeV-luciferaseを筋注した。血流回復効果はレーザードップラー法、各種血管新生因子の発現の経時的変化をreal-time PCR法、ELISA法にて定量化した。各種リガンド、受容体に対する中和活性を持つ特異抗体にて活性を遮断し、遺伝子発現量、治療効果をモニターした。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学組み換え DNA 実験委員会の承認のもと、P2 動物実験室で施行した。動物実験は、九州大学動物実験委員会の審議・許可を得た。

C. 研究結果

1. PDGF-A について:

In vitro, in vivo において、FGF-2 は VEGF、HGF、PDGF-A の発現を誘導し、PDGF-A、p70S6K の活性遮断により VEGF、HGF の発現増強効果は消失した。この PDGF-A/p70S6K 系は悪性腫瘍においても VEGF 発現を支配する、恒常的な系であることが明らかとなった。

2. PDGF-B について:

FGF-2 の遺伝子導入により、内因性の VEGF-C、PDGF-B の発現が増強した。VEGF-C の受容体 VEGFR3/FLT-4 活性中和抗体投与により、FGF-2 の治療効果が消失、PDGF-B の発現も低下し、多数の微小血管瘤が形成されると共に、リンパ管の数が減少した。一方、PDGF-B の発現を特異的活性中和抗体で遮断しても、VEGF-C の発現は低下した。

D. 考察、E. 結論

FGF-2 により、階層的・多段階的に内因性血管新生因子群が誘導され、その制御に PDGF が重要であることが明らかとなった。このシステムの破綻が、血管数と血流の乖離に至ることも示された。

4. 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係する検討 (恒吉)

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、胃癌を用い、軟部腫瘍は平滑筋肉腫や滑膜肉腫、横紋筋肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍などを用いた。消化管腫瘍では、gastric mucin (胃腺窩上皮のマーカー)、MUC2 (腸杯細胞のマーカー)、CD10 (小腸刷子縁のマーカー) 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、細胞増殖との関連や、細胞増殖・アポトーシスや炎症、血管新生と関連する因子である NF- κ B の意義を解析した。

軟部腫瘍では、遺伝子異常 (p53、MDM2、p14、p16、マイクロサテライト不安定性) や細胞増殖関連因子 (MIB-1、E2F-1) の腫瘍の発育における意義や悪性度との関連を解析した。

C. 研究結果

1. 胃癌の発育進展における形質変化と細胞増殖

粘膜下浸潤胃癌の分化型腺癌の解析で、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。さらに、隆起型と陥凹型の胃癌では細胞増殖活性とアポトーシスの程度が異なり、陥凹型胃癌のほうが悪性度が高いことが示唆された。

2. 胃癌における NF- κ B の意義

胃癌において NF- κ B は予後因子の一つであることが多変量解析により示され、さらに NF- κ B の活性化には IL-1 β が重要な

役割を果たしていることも判明した。

3. 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 p53 遺伝子異常を示すものは予後不良であり、頻度は少ないが death-associated protein (DAP) kinase 遺伝子異常を示すものも予後不良であった。

滑膜肉腫では PTEN 遺伝子および p53、APC、E-cadherin などの癌抑制遺伝子の何らかの異常を約半数に認めたが予後との相関はなかった。また、E-cadherin 機能喪失は遺伝子変異もしくは S-nail 発現による E-cadherin 遺伝子抑制による機序が示唆された。

明細胞肉腫では、p53 遺伝子あるいは p16/p14 遺伝子異常は核分裂や腫瘍壊死と相関し、予後に悪影響を与える因子と考えられた。

横紋筋肉腫では、p53 および MDM2 蛋白過剰発現の間に相関を認め、それらの過剰発現群では MIB-1 標識率は高値を示した。E2F-1 標識率は胎児型より胞巣型で高値であった。

種々の軟部肉腫においてマイクロサテライト不安定性は、hMSH2 もしくは hMLH1 蛋白発現減弱と相関し、DNA ミスマッチ修復遺伝子の不活性化がマイクロサテライト不安定性の原因と考えられた。また、YB-1 の核内移行は抗癌剤の多剤耐性に関与する p 糖蛋白発現と相関した。

4. 消化管 GIST と消化管外 GIST の遺伝子異常および細胞増殖動態と悪性度の関連

消化管外 GIST においても消化管 GIST 同様に c-kit あるいは PDGFRA の遺伝子変異を認めることが判明し、消化管 GIST では従来

の悪性度判定因子に加え細胞増殖に関連する cyclin A、cyclin B1 と cdc2 が有用であることを報告した。

D. 考察

胃癌の解析では、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。また、隆起型と陥凹型の胃癌では形質発現には違いが見られなかったが、細胞増殖活性とアポトーシスの違いが発育形態と悪性度を規定していることが想定された。胃癌の形質発現や細胞増殖動態の解析がその生物学的態度を調べる上で重要であると考えられた。

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種々の遺伝子異常が関与し、それらと高悪性度との関連がわかってきた。そして、それらを規定するさまざまな因子の相互関係も少しずつ解明されてきた。今後は、各腫瘍に特異的な異常と共通する異常をもっと明らかにして行く必要がある。

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。

厚生労働科学研究費補助金（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

久山町の地域住民における胃癌発症率と生命予後

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 田中圭一 同・研究員

研究要旨 前向き追跡研究で正確に胃癌発症率と生命予後について検討した報告はない。そこで福岡県久山町の地域一般住民を対象にした疫学調査の成績をもとに、最近の胃癌発症率と生命予後に関連する要因を検討した。1988年に久山町の住民検診を受診した満40歳以上の住民2,742名のうち、胃切除歴または胃癌の既往歴がある者を除いた2,605名を対象に、検診・臨床記録、剖検所見をもとに1988年12月から1998年11月まで10年間追跡した。胃癌はすべて手術あるいは剖検で得られた標本の病理組織学的診断により確認した。追跡期間中に76例の胃癌発症を認めた。年齢調整後の胃癌発症率（対1,000人年）は男性4.9、女性1.2で、男性の方が4倍有意に高かった。男性の胃癌発症率は加齢とともに上昇したが、女性ではその傾向は認められなかった。胃癌の発生部位別に5年生存率をみると、生命予後は胃中央部1/3のM領域の胃癌が最もよく、次いで幽門側1/3のA領域、噴門側1/3のC領域の順によかった。胃癌の組織型別にみると、高分化型癌の5年生存率が最もよく、中分化型癌および低分化型癌の生存率は高分化型癌に比べ有意に低かった。胃癌の深達度別に予後を検討すると、早期癌の全例が5年以上生存していたのに対し、進行癌では癌が深部に浸潤するにしたがい生存率が有意に低下した。

以上より、久山町の地域住民では、男性の胃癌発症率は女性より高く、加齢とともに上昇した。また、胃癌の生命予後は病期、発症部位、組織型に関連していた。

A. 研究目的

胃癌は主要な悪性腫瘍のひとつである。死亡統計によれば、わが国ではこの30年間に年齢調整後の胃癌死亡率は低下傾向にあるが、いまだに世界でもっとも高いレベルにある。この胃癌死亡率の減少には、胃癌検診の普及と癌治療の進歩が貢献したとされている。

わが国における胃癌の発症率と予後についてはいくつかの登録研究より報告されている。しかし、この研究デザインは、剖検を行っていないため潜在癌を見つけることが出来ないことや癌登録率が50%程度との報告もあり、その精度に疑問が残る。また、一般住民を対象とした前向き追跡研究で、その発症率および予後を詳細に検討した研

究報告もほとんどない。

久山町の地域住民を対象にした疫学調査の特筆すべき特長は、徹底した追跡調査とともに死亡者の大多数に剖検を行い、潜在癌を含めた悪性腫瘍の発生と正確な死因を確認していることである。本報告では、この特徴を生かして最近の地域住民における正確な胃癌発症率とその予後について検討した。

B. 研究方法

国勢調査の成績によれば、久山町住民の年齢および職業構成は日本の平均とよく一致している。また、住民の食事習慣も国民栄養調査の成績と類似しており、町住民は偏りの小さい地域集団と考えられる。

1988年に久山町の住民検診を受診した40歳以上の住民2,742名(当該年齢人口の80.1%)のうち、胃切除歴あるいは胃癌の既往歴を有する132名と検診期間中に死亡した5名を除いた2,605名(男性1,071名、平均年齢57歳;女性1,534名、平均年齢59歳)をこの研究の対象とした。この集団を、1988年12月1日から1998年11月30日までの10年間、毎年検診を行って追跡した。対象の約60%が定期的に検診を受診したが、149名(全体の5.7%)は追跡期間中に町外に転出した。定期検診の未受診者や町外転出者に対しては、毎年手紙ないし電話によって健康状態を調査した。また、われわれ研究チーム、地域開業医、久山町健康福祉課の間に設定した追跡システムを通じて、胃癌発症者の情報を収集した。集団内における新たな胃癌発症例を確認するため、久山町内あるいは町周辺の医院や病院における胃透視検査、内視鏡および内視鏡下生検の報告書も調査した。また、毎年行

われる胃癌集団検診の記録もすべて調べた。さらに、潜在胃癌を拾い上げるために、追跡期間中に死亡した393名のうち304名(77.4%)に病理解剖を行った。全ての胃癌例の診断は、生検組織、胃切除術・内視鏡的粘膜切除術・病理解剖により得られた組織の病理学的検索によって確認した。腫瘍の発生部位、組織型、進達度は、胃癌取り扱い規約に基づいて臨床記録と病理組織記録を組み合わせて判定した。

(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。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。

C. 研究結果

追跡期間中に76名(男性54名、女性22名)が胃癌を発症したが、そのうち7名(9.2%)に重複癌が認められたため、83病変となった。病理解剖の際にはじめて発見された潜在癌は3例(3.9%)であった。追跡開始から癌の診断までの期間は、0.5年から9.8年(平均期間5.8年)だった。

胃癌83病変の内訳を表に示す。発症部位別にみると、男女とも胃の噴門側1/3のC領域に比べ中央部1/3のM領域と幽門側1/3のA領域に高率であった。組織型別にみると、高分化型腺癌が過半数を占めていた。深達度別にみると、癌が粘膜下層までにとどまる早期癌の割合は67.5%(男性66.7%、

女性 69.6%)であった。剖検時発見例 3 例を除く 73 例のうち、男性の 88.7%、女性の 85.0%が外科的治療を受けていた。

年齢調整後の胃癌発症率(対 1,000 人年)は男性 4.9、女性 1.2 で、男性の発症率は女性の 4 倍有意に高かった。年齢階級別にみると、男性の胃癌発症率は加齢とともに上昇したが、女性ではその傾向は認められなかった(図 1)。

死因を胃癌関連死のみに限定し、胃癌の生命予後と、それを規定する因子について検討した。胃癌発症例における性・年齢調整後の 5 年生存率は 75.9%であった。胃癌の発生部位別にみた生存曲線を図 2 に示す。M 領域の癌の 5 年生存率は 90.6%で最もよく、次いで A 領域 77.3%、C 領域 55.4%の順に生命予後が低下し、M 領域と C 領域の癌の間に有意差($p < 0.05$)を認めた。各部位の早期癌の割合は、C 領域 50.0%、M 領域 84.6%、A 領域 54.3%であり、高分化型癌の割合は同様に 41.7%、50.0%、57.1%であった。

胃癌の組織型別にみた生存曲線を図 3 に示す。高分化型癌の 5 年生存率は 90.6%で最も生命予後がよく、それに比べて中分化型癌(58.1%)および低分化型癌(60.1%)の生存率は有意に低値であった。中分化型癌と低分化型癌の生存率の間に有意差は認められなかった。

胃癌の深達度別にみた生存曲線を図 4 に示す。早期癌の 5 年生存率は 100%であったが、進行癌では漿膜下組織まで(mp-ss)が 42.1%、漿膜下組織を越えた癌(se-si)は 22.7%で、癌が深部に浸潤するに従って生存率が有意に低下した。

D. 考 察

胃癌発症率に男女差が認められ、男性の発症率は女性よりも 4 倍高かった。動物実験で女性ホルモンに胃癌を予防する効果があることや、ヘリコバクターピロリ菌の感染率が女性の方が低いことが報告されているが、これだけでは男女差を説明することはできない。喫煙や飲酒などの生活習慣の違いも 1 因である可能性があるが、今後この問題についてさらなる研究が必要である。

わが国の胃癌発症率は世界で最も高く、遺伝的要因や環境要因がその原因として考えられている。しかし、日系米国人 2 世の胃癌発症率は 1 世の約半分であることが報告されていることから、胃発癌には遺伝的素因より環境要因の方が重要であり、生活習慣の改善によってその予防が可能であると考えられる。

久山町研究では、ヘリコバクターピロリ感染の胃癌発症に及ぼす危険性について以前に報告した。現在、この菌は胃癌の重要な危険因子の 1 つと認知されているが、それ以外の胃癌の危険因子について、今後さらなる研究が必要である。

本報告では、欧米の成績に比べ胃癌の 5 年生存率が高い。これは主に、われわれの胃癌例は早期癌の比率が高いことによると考えられる。わが国で行われた他の観察研究でも同様の報告があり、わが国における胃癌の診断法の進歩や胃癌検診の普及が貢献していると考えられる。また早期胃癌の 5 年生存率が 100%であることから、わが国の治療技術の優秀性がうかがえる。

病理分類別にみた胃癌の予後の検討でも、早期癌で発見される確率の高かった M 領域の癌の生存率が高く、進達度別にみても早

期癌の予後がよかった。早期癌のレベルで発見し治療することが、胃癌の予後の改善に重要であるといえる。

E. 結 論

久山町の地域住民では、男性の胃癌発症率は女性より高く、加齢とともに上昇した。また、胃癌の生命予後は病期、発症部位、組織型に関連していた。胃癌の予後を改善するには、その危険因子を明らかにするとともに、胃癌の早期発見に努めることが重要である。

F. 健康危険情報

地域住民では、高齢男性の胃癌発症率が高い。早期癌より進行癌の生命予後が、また高分化型癌より中分化型癌および低分化型癌の生命予後が悪い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka K, Kiyohara Y, Kato I, Matsumoto T, Yamagata H, Kubo M, Tanizaki Y, Okubo K, Nakamura H, Iwamoto H, Nakayama K, Iida M: Incidence and prognosis of gastric cancer in a population-based cohort survey: the Hisayama study. *Scand J Gastroenterol* 5: 459-463, 2004
2. Miyazaki M, Kubo M, Kiyohara Y, Okubo K, Nakamura H, Fujisawa K, Hata Y, Tokunaga S, Iida M, Nose Y, Ishibashi T: Comparison of diagnostic methods for diabetes mellitus based on prevalence of retinopathy in a Japanese population: the Hisayama study. *Diabetologia* 47: 1411-1415, 2004
3. Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, Kitazono T, Tanizaki Y, Kubo M, Ueno H, Ibayashi S, Fujishima M, Iida M: Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke* 35: 2072-2077, 2004
4. Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo M, Tanizaki Y, Tanaka K, Okubo K, Nakamura H, Hata J, Oishi Y, Kato I, Hirakata H, Iida M: Hyperhomocysteinemia and the development of chronic kidney disease in a general population: the Hisayama study. *Am J Kidney Dis* 44: 437-45, 2004
5. Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Koga T: The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: the Hisayama study. *J Dent Res* 83: 485-490, 2004
6. Shimazaki Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Koga T: Relationship between electrocardiographic abnormalities and periodontal disease: the Hisayama study. *J Periodntol* 75: 791-797, 2004.
7. Hata J, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Tanaka K, Okubo K, Nakamura H, Oishi Y, Ibayashi S, Iida M: Ten year recurrence after first ever stroke in a Japanese community: the Hisayama study. *J Neurol Neurosurg Ps* 76:368-372, 2005

2. 学会発表

1. 志方健太郎, 他: 地域住民における塩分摂取量の胃癌発症に及ぼす影響: 久山町研究. 第 90 回日本消化器病学会、仙台、2004. 4 月発表
2. 土井康文, 他: 地域住民における CRP レベルと糖尿病発症の関係: 久山町研究. 第 47 回日本糖尿病学会学術集会, 東京, 2004. 5 月発表
3. 大久保 賢, 他: 地域住民の高齢者におけるインスリン抵抗性と虚血性心疾患の関連-久山町研究. 第 47 回日本糖尿病学会学術集会, 東京, 2004. 5 月発表
4. 宮崎美穂, 他: 地域住民における網膜症有病率に基づいた糖尿病診断基準の検討: 久山町研究. 第 47 回日本糖尿病学会学術集会, 東京, 2004. 5 月発表
5. 二宮 利治, 他: 一般住民における慢性腎機能障害と心血管病発症の関係: 久山町研究. 第 47 回日本腎臓学会総会, 栃木, 2004. 5 月発表
6. 湧川佳幸, 他: 一般住民における高感度 CRP 値の虚血性心疾患発症に及ぼす影響: 久山町研究. 第 36 回日本動脈硬化学会総会、福岡、2004. 7 月発表
7. 山縣 元他: 空腹時血糖値と胃癌発症の関係: 久山町研究. 第 9 回 JAPANGAST Study Group
8. 蓼 亜紀子他: リスクプロファイルに基づく高血圧発症の予測: 久山町研究. 第 27 回日本高血圧学会総会、栃木、2004. 10 月発表
9. 湧川佳幸, 他: 久山町の一般住民における高感度 CRP 値と脳卒中発症の関連. 第 15 回日本疫学会学術総会、滋賀、2005. 1

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

Table I. Clinicopathological characteristics of gastric cancer, 1988 to 1998

	Men (<i>n</i> = 60) <i>n</i> (%)	Women (<i>n</i> = 23) <i>n</i> (%)
Location		
Upper third	11 (18.3)	3 (13.0)
Middle third	24 (40.0)	6 (26.1)
Lower third	25 (41.7)	14 (60.9)
Histological type		
Well-differentiated	32 (53.3)	14 (60.9)
Moderately differentiated	13 (21.7)	4 (17.4)
Poorly differentiated	15 (25.0)	5 (21.7)
Depth of invasion		
Limited to the mucosa	29 (48.3)	12 (52.2)
Limited to the submucosa	11 (18.3)	4 (17.4)
Limited to the subserosa	11 (18.3)	4 (17.4)
Beyond the serosa	9 (15.0)	3 (13.0)
Therapy (without unsuspected cancer)		
Operation	36 (67.9)	15 (75.0)
Operation after EMR*	2 (3.8)	0 (0)
EMR	9 (17.0)	2 (10.0)
Observation	6 (11.3)	3 (15.0)

* EMR = endoscopic mucosal resection.

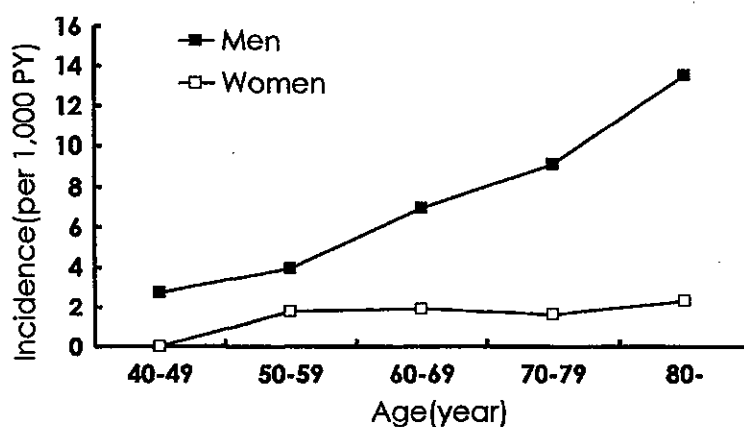


Fig.1: Age-specific incidence of gastric cancer in men (black squares) and in women (open squares) during a 10-year follow-up, the Hisayama study.