

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590670

研究課題名(和文)

日米の血漿ホモシステイン、関連ビタミンB群および潜在性動脈硬化所見の比較研究

研究課題名(英文)

The impact of plasma homocysteine and B complex vitamins on subclinical atherosclerosis amongst community-dwelling American and Japanese men

研究代表者

岡村 智教 (OKAMURA TOMONORI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00324567

研究成果の概要(和文)：日米2集団(40歳代男性)で計測済みの冠動脈石灰化スコアおよび頸動脈内膜中膜複合体の厚さと、凍結保存検体で測定した血漿ホモシステイン、血清葉酸レベルとの関連を検討した。交絡要因を調整しても血漿ホモシステインは日米両集団で冠動脈石灰化、頸動脈IMTのいずれとも関連を示さなかった。潜在性動脈硬化所見は日本集団のほうが良好であるにもかかわらず、米国集団に比しホモシステインは高く葉酸は低い。したがって両者ともこの年代の日米の潜在性動脈硬化所見の差を説明する要因ではない。

研究成果の概要(英文)：Randomly selected community-based populations of 287 Japanese and 296 US men aged 40-49 were examined for intima-media thickness (IMT) of common carotid artery and coronary calcium in a previous survey. We measured plasma homocysteine and serum folate levels by stored blood sample. Plasma homocysteine levels are much lower in US participants than Japanese participants irrespective of more unfavorable subclinical atherosclerotic findings. Furthermore, we are not able to observe any relationship between plasma homocysteine or serum folate levels and above-mentioned subclinical atherosclerotic findings in both populations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・健康科学

キーワード：ホモシステイン、葉酸、冠動脈石灰化、内膜中膜複合体、日米比較

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患の病型別の死亡率に日米

差があることが従来から指摘されており、日本人では脳卒中が多く、米国では心筋梗塞が

多い。日米の血清コレステロールレベルの差がこの病型の差を説明する主な要因と考えられてきたが、日本のコレステロールの平均レベルはかなり上昇したにも関わらず、依然として日本人の心筋梗塞死亡率は米国に比し低いままである。研究代表者らは、今までに若年日本人男性の血清総コレステロール値は米国と同等であり、血圧や喫煙率が高いにもかかわらず、頸動脈の動脈硬化や冠状動脈の石灰化の程度は米国より良好なことを指摘してきた。したがって日米の病型の差異について古典的な危険因子だけで説明することは困難である。

血漿ホモシステインはメチオニン由来のアミノ酸であり、その血中濃度の上昇は動脈硬化性疾患の危険因子であり、日本でも脳梗塞の発症と関連することが研究代表者らのコホート内症例対照研究で示されている。血中ホモシステイン値は、補酵素である葉酸で規定されており、一般的に血中の葉酸値はホモシステイン値と負の関連を示す。しかしながら日米の血中ホモシステイン、葉酸を直接比較した研究はなく、これらの値と動脈硬化所見との関連に日米差があるのかも明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究の大きな目的は日米の動脈硬化性疾患の病型や死亡率の差を説明できる要因を探索することである。既にこの目的で実施された先行研究（基盤研究A：研究代表者上島弘嗣）で日米の2集団を対象として標準化されたプロトコールにより、電子ビームCTによる冠動脈石灰化の評価、頸動脈超音波検査による内膜中膜複合体（IMT）の計測が実施されていた。さらに古典的危険因子等や生活習慣等の比較も行われてきたが、日米差をすべて説明することはできず更なる原因の探索が必要とされた。そこで先行

研究で採取された日米の凍結血清と血漿を用いて、同一の検査室で日米の血漿ホモシステイン、血清葉酸を測定して比較し、主要な生活習慣要因や頸動脈IMTの厚さとの関連を検討することにした。本研究により日米の動脈硬化性疾患の病型の差について新たな知見を付け加えることができる。

3. 研究の方法

(1)対象

滋賀医科大学に保存されていた40歳代の滋賀県草津市男性 300人、および米国からアレゲーニー県（ペンシルベニア州）の白人男性 300人の凍結検体を日本まで輸送し、同一の検査室で血漿ホモシステインと血清葉酸を測定した。被験者からは保存検体や計測済みデータの関連研究への利用については同意が得られている。

(2)検体の測定

滋賀医科大学ヒューマンサンプル室には先行研究の日本集団の血液検体がマイナス80℃で保管されていた。米国の検体もドライアイスで梱包の上、ここに輸送し測定までここに保管した。

まず血漿ホモシステインの測定手法を検討し、蛍光誘導体化を組み合わせた高速液体クロマトグラフィーとした。なお血漿ホモシステイン値は採血後の血漿を常温で放置すると血球成分による合成が続いて数値が高くなることが報告されている。本研究で用いる血漿は採血後すぐ氷冷されたただちに遠心分離されているためこのような問題はない。また血清葉酸は、化学発光免疫測定法（Chiba-Corning ACS-180）で測定した。日本と米国の検体の測定誤差（日内変動、日差変動）を均等化するため、日米の検体をランダムに混ぜて検査に流した。

最終的に日米の40～49歳男性 583人の検体の測定が可能であった（日本人287人、白人296人）。先行研究ではこれらの被験者の

頸動脈IMTの厚さは同じデバイスで測定され(東芝 140A)、データの日米比較が可能なのが明らかにされている。また冠動脈石灰化についても日米で同一の装置(イマトロンC-150)で測定され、すべて米国でスコア化された。

(3)解析

まず日米のホモシステイン、葉酸の血中レベルを比較する。次にこれらの測定値と画像所見との関連を検討し、個々の集団内および日米集団間の冠動脈石灰化や頸動脈IMTの規定要因としてのホモシステインや葉酸の意義を多変量解析で明らかにする。その際、動脈硬化との関連が強く、かつ日米差が大きい生活習慣である喫煙、飲酒にも焦点をあてた。さらに古典的な危険因子だけでなく、関連がありそうな他のバイオマーカー(コレステロールエステル転送蛋白、酸化LDLコレステロール)についても追加的な検討を加えた。多変量解析は統計量の分布により、多重ロジスティック回帰分析、線形回帰分析、共分散分析を適宜使用した。

(4)連携研究者等の役割

研究代表者の岡村智教は、本研究の先行研究の分担研究者を務めた。その後、飲酒と冠動脈石灰化の関連も論文公表しており、日米比較と潜在性動脈硬化に関する研究の経験を有している。またホモシステインに関しては、本邦で初めてホモシステインと頸動脈硬化との関連を報告し、ビタミンB群とホモシステインの関連についても研究業績がある。滋賀医科大学の上島弘嗣は先行研究の研究代表者で血液検体の保管責任者でもある。本申請課題に際しても連携研究者として全般的な助言・指導を受ける。連携研究者の門脇崇は、先行研究実施時に実務面の責任者を務

め、留学中に米国側の研究者として先行研究に関わり、本研究でも日米間の連絡調整や画像データの管理等の重要な役割を担った。また海外の研究協力者であるピッツバーグ大学の関川暁助教授から米国側の血液検体の提供を受け、データ解析に際して助言を受けた。

4. 研究成果

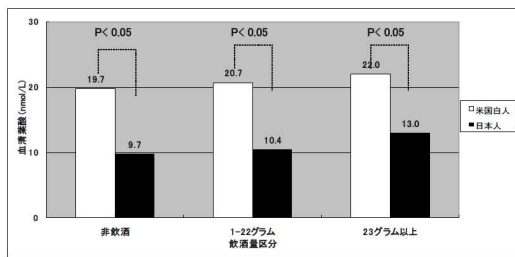
(1) 血漿ホモシステイン、血清葉酸レベル

血漿ホモシステイン値は、米国 8.4 ± 5.1 、日本 13.3 ± 6.6 ($\mu\text{mol/L}$)、血清葉酸値は、米国 21.1 ± 8.7 、日本 11.8 ± 6.4 (nmol/L) でそれぞれ有意差を認めた。一方、ビタミンサプリメントを常用している者は、米国で50.7%、日本で16%と大きな差を認めた。ビタミンサプリメントは葉酸を含んでいるものが多いためその服用者を除いて再度比較したが(米国 146人、日本 241人)、血漿ホモシステイン値は、米国 9.2 ± 7.0 、日本 13.5 ± 6.7 ($\mu\text{mol/L}$)、血清葉酸値は、米国 17.0 ± 6.2 、日本 11.3 ± 5.9 (nmol/L) でやはり有意差を認めた。米国集団ではサプリメント服用者を除くと葉酸値が大きく低下したが日本集団では差を認めなかった。日本人は米国人に比し、血漿ホモシステイン値が高く、血清葉酸値が低いことが明らかになった。線形回帰分析で、年齢、喫煙、ビタミンサプリメント服用、ウエスト周囲径を調整して血清葉酸と血漿ホモシステインの関連を見ると、米国集団では葉酸とホモシステインの間に関連を認めず、日本集団では有意な負の関連 ($r = -0.19$) を示した

(2)生活習慣との関連

本研究では喫煙、飲酒、運動、食生活などの生活習慣と血清葉酸、血漿ホモシステインの関連を検討した。飲酒と葉酸の関連については、共分散分析で年齢、ビタミンサプリメント服用、ウエスト周囲径を調整すると、非

飲酒、1-22、23 グラム以上(いろいろなアルコール飲料からの飲酒量をエタノール換算して求めた1日の平均飲酒量)の各群の血清葉酸値は、米国集団で19.7、20.7、22.0、日本集団で9.7、10.4、13.0(nmol/L)であり、どの飲酒量区分でも米国の葉酸値が有意に高かった(図1)。また日米とも飲酒量が増えるに従って葉酸値が高くなる傾向を認め、日本集団ではトレンド検定で有意差を認めた。



注)年齢、喫煙、ビタミンサプリメントの摂取、ウエスト周囲径を調整。飲酒群間のトレンド検定日本集団では有意差あり(P= 0.001)。

図 1. 飲酒量と血清葉酸値の関連

一方、ホモシステインは、米国集団で8.3、8.5、8.4、日本集団で12.8、13.7、13.2(μmol/L)であり、飲酒量と関連を認めなかった。本研究では飲酒量が増えると葉酸値が上昇する傾向を示したが、日本人集団であってもそれに伴うホモシステインの低下は認めなかった。飲酒者は葉酸の摂取量が多い反面、メチオニンの摂取量が多い、他の補酵素(ビタミンB12やB6)の摂取が少ないなど、何らかのホモシステインの上昇要因を別に持っている可能性が示唆された。その他の生活習慣要因については血清葉酸や血漿ホモシステインと明らかな関連を示さなかった。

(3)潜在性動脈硬化との関連

古典的危険因子を調整した場合

冠動脈石灰化(Agatston scoreで10以上)の頻度は、日本で12.2%、米国で26.8%、IMTの厚さはそれぞれ0.619mm、0.671mmと両者とも有意に米国集団で大きかった。年齢やLDLコレステロール、高血圧、喫煙などの古典的な危険因子を調整すると、葉酸単位

量(1.0 nmol/L)あたりの冠動脈石灰化の有病率オッズ比は、米国集団で0.98(95%信頼区間0.95-1.02)、日本集団で1.03(95%信頼区間0.97-1.09)であり関連を認めなかった。同じく葉酸と総頸動脈IMTとの関連を線形回帰分析で検討したが、米国集団、日本集団とも関連を認めなかった(P=0.39とP=0.29)。同じく血漿ホモシステインも米国集団、日本集団のいずれにおいても冠動脈石灰化、IMTと関連を認めなかった。

新しいバイオマーカーを考慮した場合

古典的な危険因子だけでなく、新しいバイオマーカーとしてコレステロールエステル転送蛋白や酸化LDLコレステロールを調整してホモシステインと動脈硬化との関連を複数の多変量解析モデルで検証した。総頸動脈IMTには、年齢、米国人であること、収縮期血圧、ウエストサイズ、喫煙、酸化LDLコレステロールが関連していたが、このモデルでもホモシステインはIMTと関連を認めなかった。ホモシステインの代わりに葉酸をモデルに投入しても結果は同様であった。またこの結果は冠動脈石灰化を従属変数にしても同様であった。

(4)まとめ

交絡する危険因子や生活習慣を考慮しても、血漿ホモシステインは日米両集団において、冠動脈石灰化、頸動脈IMTのいずれとも関連を示さなかった。しかも潜在性動脈硬化所見の有病率(冠動脈石灰化)、進展度(IMT)のいずれも米国集団のほうが悪く、それにもかかわらず血漿ホモシステイン値は低く血清葉酸値は高かった。結論として血漿ホモシステインおよびその規定要因である葉酸は、この年代の日米の潜在性動脈硬化所見の差を説明する要因ではないと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

岡村智教 . ホモシステイン . 動脈硬化リスクのPro and Con. 循環器内科(科学評論社)、査読なし、70巻、2011(印刷中) .

Okamura T, Sekikawa A, Kadowaki T, Ueshima H (他 19名、4~22番目) .
Cholesteryl ester transfer protein, coronary calcium, and intima-media thickness of the carotid artery in middle-age Japanese men. Am J Cardiol、査読あり、2009、104: 818-822.

岡村智教、門脇 崇、関川 暁、上島弘嗣 .
日米壮年期男性の血清葉酸値、血漿ホモシステイン値と飲酒習慣の関連：Era Jump研究. 日本アルコール薬物医学会雑誌、査読あり、44巻、2009、350-353.

[学会発表](計2件)

Okamura T, Sekikawa A, Kadowaki T, Sutton-Tyrrell K, Kuller LH, Ueshima H .
Smoking, oxidized low density lipoprotein cholesterol and carotid atherosclerosis in middle-aged US and Japanese men. Asia Pacific Conference on Tobacco or Health 2010. シドニー、2010年10月7日.

岡村智教、門脇 崇、関川 暁、上島弘嗣 .
日米壮年期男性の血清葉酸値、血漿ホモシステイン値と飲酒習慣の関連：Era Jump 研究. シンポジウム. 第44回日本アルコール・薬物医学会、横浜、2009年9月8日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡村 智教 (OKAMURA TOMONORI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：00324567

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

上島 弘嗣 (UESHIMA HIROTSUGU)
滋賀医科大学・医学部・特任教授
研究者番号：70144483

門脇 崇 (KADOWAKI TAKASHI)
滋賀医科大学・医学部・客員助教
研究者番号：30324578