

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593373

研究課題名(和文)葉酸代謝関連遺伝子多型、ライフスタイル因子との相互作用による先天異常発生への影響

研究課題名(英文) Relationship between Maternal Folate-Related Gene Polymorphisms, Gene-environment Interaction and Birth defects

研究代表者

伊藤 久美子 (KUMIKO, ITO)

札幌医科大学・保健医療学部・講師

研究者番号：20292039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：「環境と子どもの健康に関するモニタリング調査：北海道スタディ」の2003 - 13年までの参加者20,929名のうち、妊娠初期の生活情報及び血清葉酸値、出生児情報がある在胎22週以降の単胎児とその母親のうち、児の染色体異常及、単一遺伝子疾患及び先天奇形不明を除いた15,037組の母児について、妊娠初期の生活環境要因、血清葉酸値と先天奇形との関連を検討した。分析した全先天奇形は426名であった。妊娠初期血清葉酸値と先天奇形の関連を母親の年齢、出産回数、妊娠初期の喫煙で調整して検討したが、全先天奇形、疾患別、先天奇形の器官別のいずれも関連はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship serum folate levels and birth defects in 15,037 mother child pairs, where information on lifestyle factors and maternal folate uptake in the first trimester of pregnancy was available, and where children were singleton births born after 22 gestational weeks. Participants were selected from the 20,929 mother-child pairs enrolled in the Hokkaido Study of Environment and Children's Health. Logistic regression analyses, both crude and adjusted (After adjusting for mother's age, parity, social factors, alcohol consumption and smoking status during the first trimester), indicated no associations between serum folate levels were and any birth defects. This results may be due to the small sample size. Further studies will include investigations on relationship between maternal folate-related gene polymorphisms, folate intake during the first trimester of pregnancy and birth defects.

研究分野：助産学

キーワード：先天異常 妊娠初期血清葉酸値

1. 研究開始当初の背景

先天異常はわが国の新生児死亡原因の第1位であり、全新生児死亡の38.8%を占めている(H21年度人口動態統計、厚生労働省)。国際先天異常モニタリングセンター報告によると、わが国の先天異常の発生率は1997年から画像診断による心臓血管形態異常把握開始により、若干の増加を示し約1.7~2%前後となりその後、大きな変動はみられない(平原史樹、日産婦誌59(9), 2007.)。子どもに先天異常がある場合、両親、家族の悲嘆は大きく、先天異常を持つ子どもの親に対して、長期的視野に基づいた適切な健康管理、発生原因、妊娠中の生活との関連、再発率や再発予防などを解明することは母子保健上、重要な意義がある。先天異常は染色体異常や多因子遺伝によるものが大部分を占める。多因子遺伝は環境要因と遺伝子要因との相互作用により発生するが、そのメカニズムはまだ解明されていないものが多い。先天異常の一つである神経管欠損症は、妊娠前の血中葉酸濃度低値との関連が大規模コホート研究で報告され、アメリカやカナダ等は食品への葉酸添加を義務付けた結果、有病率低下が報告された。妊娠前の葉酸サプリメント摂取は、このほかに口唇裂(Krapels et al. 2006)、先天性心疾患(Czeizel et al. 2004)、ダウン症(Takamura et al. 2004)などの発症リスクを低下させるという報告があるが、その結果は一様ではない(Cochrane review 2010.)。近年、葉酸代謝関連遺伝子多型と先天異常との関連に関する研究が報告されている。葉酸代謝関連酵素活性やそれによる代謝サイクルの微妙なバランス変化が、器官形成期に核酸合成やDNAメチル化に対する影響が酵素活性に軽微な変化をおこし、疾患発生を生じると考えられている。葉酸代謝酵素関連遺伝子多型と先天異常との関連では、口唇裂・口蓋裂、神経管欠損症、先天性心疾患等の報告があり、MTHFR多型やMTHFR変異が非症候性口唇裂・口蓋裂リスク増加させる(Bufoalino A et al, 2010; Zhu J et al, 2010)という報告の一方、MTHFRやCBSは口唇裂リスク減少させるという報告もある(Little J et al, 2008; Boyles AL et al, 2008)。また神経管欠損症では、母親MTHFRと父親GCP II多型はNTDsリスクを増加させる(Naushad SM et al, 2010)、あるいは遺伝子多型の関与は低い(Candito M et al, 2008)との報告がある。さらに、先天性心疾患発症リスク増加とMTHFR多型との関連報告がある(Hobbs CA et al, 2010; Kuehl K, 2010; van Beynum IM et al, 2008.)が、葉酸代謝酵素関連遺伝子多型と先天異常との関連結果は一様ではない。遺伝子多型頻度は人種、地域による差がみられる。葉酸代謝酵素関連遺伝子多型と先天異常報告の多くは欧米であり、アジア系は中国での非症候性口唇裂、神経管欠損症の報告、インドの神経管欠損症の報告がある。日本では、MTHFRとダウン症との関連報告は少数あるが(Takamura et al, 2004; 大橋ら, 2003)他の先天異常の報告はない。また、環境要因を合わせた報告

はまだ少ない。

2. 研究の目的

前向きコホート研究「環境と子どもの健康に関するモニタリング調査(北海道スタディ)」により、妊娠初期血清葉酸、妊娠初期のライフスタイル、葉酸代謝関連遺伝子多型と先天異常発生との相互作用を明らかにし、先天異常を有する児の出産既往の女性および既往のない女性に対しても先天異常リスクが低減する生活指導や不安軽減に役立てる。

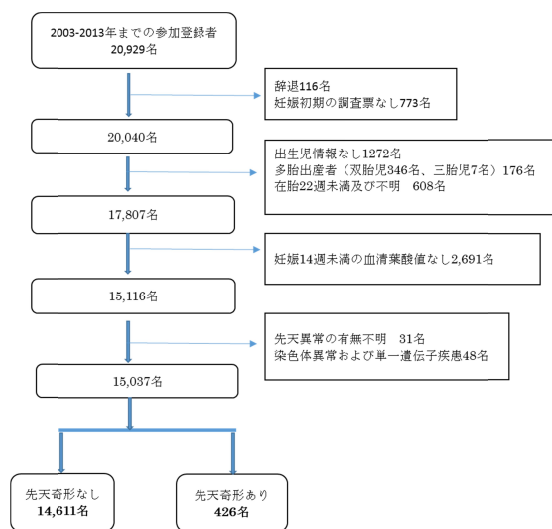


図1. 分析対象者のフローチャート

3. 研究の方法

2003年から2013年までに、北海道内の37産科施設の協力の下、妊娠初期の生活環境や化学物質曝露との出生児の健康に関する前向きコホート研究「環境と子どもの健康に関するモニタリング調査(北海道スタディ)」に参加登録した女性に対して、妊娠初期に質問紙調査を行い、妊娠初期の生活環境に関する情報を得た。また、出生児の情報は出産施設から生後7日までに確認された先天異常及び1、2歳時の母親への質問紙に記載されたものを統合した。妊娠初期の血清葉酸値と葉酸代謝関連遺伝子多型を分析するために、協力産科施設において妊娠初期と出産後の採血を依頼した。

血清葉酸値は、採血後に血液を-80以下で冷凍保存し、SRL(株)に依頼し、全自動化学発光免疫測定装置(ADVIA Centaur)による化学発光免疫測定法(CLIA法)にて測定した。

北海道スタディの全登録者20,929名のうち、辞退者、妊娠初期の生活環境情報、児の先天異常や出生時情報、妊娠初期の血清葉酸値のないものを除外した。また、在胎22週以降の全出産のうち、染色体異常、単一遺伝子異常、先天異常の有無不明を除外した15,037組の母児に関して分析を行った(図1)。

血清葉酸値は正規分布していないためlog変換してから分析した。また、血清葉酸値は2010年初頭までは15.0ng/dLや24.0ng/dLを超えるものは、それぞれ15.0ng/dL<、24.0ng/dL<と報告されていたため、今回の分析対象者の

うち、154名は数値データ分析からは除外し、WHO葉酸基準値による分析を行う場合には分析に含めた。

先天異常は、先天異常全体、ICD10による先天異常の器官別および発生頻度の多い上位5疾患の血清葉酸値の分布をもとめた。さらに、本研究で症例数の多かった器官および疾患に関しては、血清葉酸値との関連を分析した。

血清葉酸値と母親の妊娠初期の生活環境因子および出生児との関連は²検定あるいはMann-Whitney U検定を行った。また、血清葉酸値と先天異常との関連はロジスティック回帰分析を行い、ORsと95%信頼区間を算出した。調整因子は先行文献から母親の年齢、出産回数、妊娠初期の喫煙、性別とした。統計的分析にはIBM社の統計分析ソフトSPSS Statistics Regression 22を使用した。

本研究は北海道大学環境健康科学研究教育センター及び北海道大学大学院医学研究科・医の倫理委員会の承認を得た。

表1 母親と出生児の背景 (N=15,037)

	n	%
母親		
出産時年齢(歳)		
<20	116	0.8
20-24	1,658	11.0
25-29	4,686	31.2
30-34	5,507	36.6
>=35	3,065	20.4
教育年数(年)		
<9	758	5.0
10-1	6,568	43.7
13-15	6,048	40.2
16	1,545	10.3
世帯収入(円)		
<300	2,903	22.6
300-499	5,712	44.5
500-799	3,293	25.6
800	942	7.3
出産歴		
初産	6,074	42.9
経産	8,078	57.1
葉酸サプリメント使用 (妊娠12週までの摂取)		
なし	11,020	79.4
あり	2,867	20.6
飲酒 (妊娠初期の飲酒)		
なし	12,919	88.1
あり	1,741	11.9
喫煙 (妊娠初期の喫煙)		
なし	9,060	62.2
あり	5,506	37.8
出生児		
性別		
男児	7,588	50.5
女児	7,444	49.5
出生時体重		
2,500g <	1,190	7.9
2,500 <=	13,839	92.1
分娩帰結		
生産	14,985	99.7
死産	47	0.3

* 不明は除外

4. 研究成果

(1) 対象母親の背景と先天異常

分析対象の母親の出産時年齢は20-34歳が全体の78.0%を占め、35歳以上は20.4%であった。初産婦よりも経産婦が14.2ポイント多かった。妊娠12週までの葉酸サプリメント摂取者

は79.4%であり、妊娠初期に喫煙のあったものは62.2%であった。児の性別は男児女児がほぼ同率であり、ほとんどが生産児であった(表1)。母親の背景と妊娠初期の血清葉酸値では、母親の出産時年齢区分(p<0.001)、教育年数(p<0.001)、世帯収入(p<0.001)、出産歴(p<0.016)、妊娠12週までの葉酸サプリメント摂取(p<0.001)、妊娠初期の喫煙(p<0.001)に有意な差がみとめられた(表2)。

表2 母児の背景と妊娠初期の血清葉酸値 (N=14,882)

	n	%	Concentration (ng/mL)					p
			Geometric Mean	Median	Minimum	25th	75th	
母親								
出産時年齢(歳)								
<20	116	0.8	5.88	6.0	2.2	4.8	7.4	18.6
20-24	1,654	11.1	6.73	6.6	2.3	5.3	8.2	51.0
25-29	4,649	31.2	7.51	7.1	1.7	5.8	9.3	410.0
30-34	5,443	36.6	7.97	7.6	1.4	6.0	10.0	835.0
>=35	3,015	20.3	8.48	8.0	2.5	6.3	10.8	505.0
教育年数(年)								
中学(<9)	755	5.1	6.82	6.6	2.8	5.2	8.2	430.0
高校(10-12)	6,518	44.1	7.38	7.1	1.4	5.7	9.1	164.0
短大・専門学校(13-15)	5,975	40.5	8.04	7.6	1.7	6.1	10.0	835.0
大学・大学院(16)	1,516	10.3	8.83	8.5	2.8	6.5	11.5	530.0
世帯収入(円)								
<300	2,878	22.6	7.16	7.0	1.4	5.5	8.8	430.0
300-499	5,654	44.5	7.80	7.3	1.8	5.9	9.7	835.0
500-799	3,248	25.6	8.20	7.8	2.4	6.1	10.3	505.0
>=800	929	7.3	8.59	8.1	2.2	6.4	11.0	151.0
出産歴								
初産	5,999	42.8	7.81	7.3	1.8	5.9	9.8	835.0
経産	8,006	57.2	7.59	7.3	1.4	5.9	9.3	505.0
葉酸サプリメント使用 (妊娠12週までの摂取)								
なし	10,988	80.0	6.99	6.9	1.4	5.6	8.5	530.0
あり	2,746	20.0	11.76	11.6	2.0	8.5	15.7	835.0
飲酒 (妊娠初期の飲酒)								
なし	12,782	88.1	7.77	7.3	1.4	5.9	9.7	835.0
あり	1,725	11.9	7.73	7.4	1.9	6.1	9.3	505.0
喫煙 (妊娠初期の喫煙)								
なし	8,961	62.2	8.21	7.7	1.8	6.2	10.3	835.0
あり	5,455	37.8	7.10	6.9	1.4	5.5	8.7	430.0
出生児								
性別								
男児	7,508	50.5	7.75	7.3	1.4	5.9	9.7	530.0
女児	7,369	49.5	7.77	7.4	1.7	5.9	9.7	835.0
出生時体重								
2,500g <	1,171	7.9	7.53	7.4	1.4	5.9	9.8	430.0
2,500 <=	13,703	92.1	7.75	7.3	1.7	5.9	9.7	835.0
分娩帰結								
生産	14,831	99.7	7.76	7.3	1.4	5.9	9.7	835.0
死産	47	0.3	8.07	7.7	4.5	6.5	9.8	19.3

* Mann-Whitney U test
* 不明は除外

先天異常がある児は426名(2.8%)であった。ICD10コードによる器官別では循環器系が130名(2.8%)と最も多く、次いで生殖器系(男児)56名(0.7%)、筋骨格系85名(0.6%)であった。また、最も頻度が高かった疾患は停留精巣44名(0.6%)、次いで心室中隔欠損症72名(0.5%)、心房中核欠損症21名(0.1%)、水腎症と口唇口蓋裂が18名(0.1%)であった。また、今回の分析対象には神経管閉鎖不全はみられなかった(表3)。

表3. 先天異常の器官と発生頻度上位5疾患

ICD 10 コード	n	%
全先天異常*	426	2.8
Q00-07 神経系	8	0.1
Q10-18 眼、耳、顔面及び頸部	37	0.2
Q20-28 循環器系	130	0.9
Q30-34 呼吸器系	4	0.0
Q35-37 唇裂及び口蓋裂	29	0.2
Q38-45 消化器系	23	0.2
Q50-56 生殖器	56	0.7
	3	0.0
Q60-64 腎尿路系	32	0.2
Q65-79 筋骨格系	85	0.6
Q80-85 その他(皮膚)	28	0.2
Q86-89 その他(皮膚以外)	10	0.1

発生頻度上位5疾患

停留精巣(男児のみ)	44	0.6
心室中隔欠損	72	0.5
心房中隔欠損	21	0.1
水腎症	18	0.1
口唇口蓋裂	18	0.1

* 全先天異常: 染色体異常、単一遺伝子疾患などを除く

* 重複あり

(2)妊娠初期の血清葉酸値と先天異常との関連
 全対象者の血清葉酸値は7.3(1.4-835.0)ng/mLであり、先天異常の対照群と症例群に有意な差は認められなかった(p=0.116)。また、先天異常の対照群と器官別及び発生頻度上位5疾患の血清葉酸値の分布を比較しても有意な差は認められなかった(表4)。
 次に全先天異常、主な器官別及び本研究における発生頻度上位5疾患と血清葉酸値(Log変換)との関連を母親の出産時年齢、出産回数、妊娠初期の喫煙を調整因子として検討した。いずれの器官、疾患においても血清葉酸値との関連はみられなかった。

表4. 先天異常の器官と発生頻度上位5疾患の血清葉酸値

	n	%	Concentration (ng/mL)							p
			Geometric Mean	Median	Minimum	25th	50th	75th	Maximum	
全体	14,882	100.0	7.8	7.3	1.4	5.9	7.3	9.7	835	
先天異常なし	14,459	97.1	7.7	7.3	1.4	5.9	7.3	9.7	530	0.116
先天異常あり	423	2.9	8.1	7.5	2.8	6.0	7.5	10.3	835	
ICD 10 コードによる器官										
Q00-07 神経系	8	0.1	8.9	9.6	4.5	6.7	9.6	12.7	13.9	0.226
Q10-18 顔、耳、顔面及び頸部	37	0.2	8.3	7.9	3.2	6.8	7.9	9.3	47.0	0.256
Q20-29 循環器系	130	0.9	8.0	3.6	3.6	5.9	7.3	10.0	835.0	0.858
Q30-34 呼吸器系	4	0.0	9.8	11.7	4.8	4.9	11.7	19.9	21.2	0.796
Q35-37 唇裂及び口蓋裂	29	0.2	8.7	8.4	2.8	7.0	8.4	10.0	29.0	0.070
Q38-45 消化器系	23	0.2	8.9	7.1	3.3	5.8	7.1	9.5	18.7	0.077
Q50-56 生殖器 男性	56	0.8	7.8	7.3	3.3	5.9	7.3	9.8	32.0	0.933
Q50-56 生殖器 女性	3	0.0	9.1	7.4	6.0	6.7	7.4	12.2	17.0	0.653
Q60-64 眼耳鼻	32	0.2	8.3	7.4	3.6	5.9	7.3	9.7	38.0	0.694
Q65-79 筋骨格系	85	0.6	7.9	7.8	3.6	5.9	7.8	11.1	21.3	0.511
Q80-85 その他(皮膚)	28	0.2	8.1	7.4	3.6	6.5	7.4	10.0	29.0	0.599
Q86-89 その他(皮膚以外)	10	0.1	7.0	6.0	3.7	4.5	6.0	8.3	29.0	0.197
発生頻度上位5疾患										
停留精巣	44	0.6	7.5	7.1	3.3	5.8	7.1	9.5	18.7	0.804
心室中隔欠損	72	0.5	7.6	8.4	7.3	5.7	7.3	9.2	40.5	0.556
心房中隔欠損	21	0.1	8.5	6.8	4.2	5.9	6.8	12.6	17.6	0.411
水腎症	18	0.1	9.0	8.1	3.6	5.8	8.1	13.0	38.0	0.411
口唇口蓋裂	18	0.1	9.1	8.1	4.5	7.0	8.1	9.9	29.0	0.145

*全先天異常: 染色体異常、単一遺伝子疾患などを除く

*Mn-Whitney U test

(3)考察

本研究の目的は2つあり、第1は妊娠初期の血清葉酸値と先天異常発生との関連を妊娠初期の生活環境要因を調整して明らかにすること、第2は葉酸代謝関連遺伝子多型と妊娠初期の生活環境要因および先天異常発生との関連を明らかにするものであった。

妊娠初期の血清葉酸値は全対象者で中央値7.3(1.4-835)ng/mLであった。中島らの妊娠初期の妊婦81名の血清葉酸値11.16±3.40ng/mLや水戸らの妊娠初期の妊婦70名の血清葉酸値10.3 ng/mLよりも低値であったが、ADVIA Centaur 使用したCLIA法の基準値は3.6~12.9ng/mLであり、WHOでは血清葉酸値が6~20 ng/mLをnormal rangeとしており、今回の対象者はいずれの基準も満たしている。

先天異常の対照群と症例群の血清葉酸値は、それぞれ中央値(範囲)が7.3(1.4-530.0)ng/mL、7.5(835.0)ng/mLであり差はみられなかった。オランダの408名を対象としたケースコントロール研究では先天性心疾患に関して、産後の血清葉酸値を比較し、ケース群15.0 nom/L(6.0ng/dL)、コントロール群14.6 nom/L(5.8ng/dL)で、両群に差はみられなかったと報告している(Anna et al.)。今回の分析でも、先天性心疾患群に血清葉酸値の差はみられなかったが、測定値にカットオフポイントを設定しなかったこともあり、今後は基準値をはるかに上回る測定値をどのように扱うかについても検討していく必要がある。また、アメリカ・ユタ州の816名を対象としたケースコントロール研究による出産後の血清葉酸値と口唇口蓋裂に関する研究では、単独の口唇裂(口蓋裂合併も含

む)では血清葉酸値を四分位により分析し、第1四分位に対して四分位が高くなるにつれて口唇裂リスクが低下すると報告している(Ronald et al.)。今回の結果では、先天異常全体、器官別および主な疾患のいずれにも妊娠初期の血清葉酸値との関連はみられなかった。

今回の分析対象の先天異常は多様な疾患であり、症例数の多い疾患でも停留精巣44名、心室中隔欠損72名であり、症例数の少なさが結果に影響したことも考えられる。しかし、本研究は先天異常個々の症例数は少ないが、妊娠初期からの前向きコホート研究で、妊娠初期に生活環境要因や血清葉酸値を得ているため、体内の葉酸レベルを直接評価でき、器官形成期の生活環境要因や葉酸の役割を検討するうえで、結果へのバイアスが少ないことが強みである。今回の研究期間では、第2の研究目的である葉酸代謝関連遺伝子多型を分析するまでには至らなかったが、対象ケースのDNA抽出は終了した。現在は、ケース・コホート研究法による解析準備を進めており、今後は、葉酸代謝関連遺伝子多型と生活環境要因、葉酸値との相互作用を検討し、器官形成期における生活環境要因や葉酸の役割について検討していく予定である。

<引用文献>

- 平原史樹. 先天異常モニタリング: わが国と世界の取り組み 2007; 59(9): 246-250.
- Ingrid P. Krapels, Christl Vermeij-Keers, et al. Steegers-Theunissen Nutrition and Genes in the Development of Orofacial Clefting 2006; 64: 280-288.
- Czeizel AE. The primary prevention of birth defects: Multivitamins or folic acid? International Journal of Medical Sciences 2004; 1(1): 50-61.
- Takamura N, Kondoh T, Ohgi S, et al. Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down. Eur J Nutr 2004; 43(5): 285-287.
- Bufalino A et al. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology 2010; 88(11):980-986.
- Little J, Gilmour M, Mossey PA, et al.. Folate and clefts of the lip and palate-a U.K.-based case-control study: Part 1: Diet and Supplemental Folate. Cleft Palate Craniofac J 2008; 45:420-427.
- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, et al. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. Am J Med Genet A. 2008; 146A(4):440-9.
- Shaik Mohammad Naushad, Akella Radha Rama Devi. Role of parental folate pathway single nucleotide polymorphisms in altering the susceptibility to neural tube defects in South India. Journal of Perinatal Medicine 2010; 38(1): 63-69.

WHO Technical Report Series
No.405,1968; 22-23..

Ann C. Verkleij-Hagoot, Jeanne H.M. de
Vries, Nicolette T.C.Ursem, et al. Dietary
intake of B-vitamins in mothers born a
child with a congenital heart defect. Eur
J Nutr 2006; 45: 478-486.

Ronald G. Munger, Tsunenobu Tamura,
Kelley E. Johnston, et al.Oral Clefts and
Maternal Biomarkers of
Folate-Dependent One-Carbon
Metabolism in Utah. Birth Defects
Research 2011; 91: 153-161.

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 久美子 (Kumiko, Ito)
札幌医科大学・保健医療学部・講師
研究者番号：20292039

(2)研究分担者

佐々木 成子 (Seiko, Sasaki)
北海道大学・医学研究科・助教
研究者番号：30448831

(3)連携研究者

岸 玲子 (Reiko, KIshi)
北海道大学・環境健康科学研究教育センタ
ー・特任教授
研究者番号：80112449

(4)連携研究者

吉岡 英治 (Eiji Yoshioka)
旭川医科大学・健康科学講座地域保健疫学分
野・准教授
研究者番号：70435957