

総括研究報告書

(一行分あける)

課題番号：26-18

課題名：成育医療におけるゲノム情報を含む長期追跡データの構築と病因解明に関するコホート研究

(一行分あける)

主任研究者名 (所属施設) 大矢幸弘 (国立成育医療研究センター)
(所属・職名) 生体防御系内科部アレルギー科医長

(一行分あける)

(研究成果の要約) 近年急増したアレルギー疾患を中心とした Common diseases の原因について、出生コホート研究という疫学的手法を用いて因果推論を行うことを目的として、縦断的なデータベースの構築を行ってきた。今年度は10歳、11歳、12歳の子どもを対象とした質問票によるデータ収集を行った。10歳アンケートおよび母親アンケートの回収率は89.2%と高率であり、11歳以降は配布と収集を継続している。収集したデータを解析した結果、生後2年間に児に投与された抗生剤が5歳時のアレルギー疾患の発症と有意な相関があることを見いだした。特にセフェム系は喘息とアレルギー性鼻炎に、マクロライド系はアトピー性皮膚炎との相関が有意であった。また、妊娠中の母親の早産予防に投与されたβ刺激薬リトドリンが児の5歳時点での喘息のリスクファクターとなることを世界で初めて明らかにした。フィラグリン遺伝子解析の結果、機能喪失変異と喘息やアレルギー性鼻炎、喘鳴との関連は認められなかったが、3才以下のアトピー性皮膚炎とフィラグリン機能喪失変異との関連が強く、成長するにしたがって関連は弱くなる傾向が観察された。閉経前女性、閉経後女性、男性のいずれの群においても、HbA1cはMCHと負の相関を示し、FPG < 5.6 mmol/l にも関わらず、MCHの低下に従いHbA1cがprediabetesの診断基準5.7%を上回る者が増加することが示された。9歳における児の体格と肥満度は、妊娠前母体のBMIと出生時の児のBMIと相関し、特に9歳においては妊娠前母体の体格の影響を受けていることが明らかとなった。糖脂質代謝は母児で強い相関があり、遺伝的因子の関与が9歳まで続くことが強く示唆された。9歳児の抗原特異的IgE, IgG1, IgG4, IgAの測定を行い、食物抗原と吸入抗原間でみられるグロブリンクラススイッチパターンに大きな違いがあることが発見された。

1. 研究目的

本研究の目的 近年、軽度発達障害、アレルギー疾患、小児肥満などの Common diseases が増加しているが、その原因はまだ不明であり、出生コホート研究による縦断的な因果推論を行う研究が必要とされている。我々が実施している成育コホート研究では、母子の両方を追跡することによって、それぞれの健康影響に加えて親子の関係性等に関する調査が可能である。成育コホート研究では、平成15年末から2年半に亘って1701名の妊婦をリクルートし、出生した1550人の児と母親について、半年～1年ごとのデータを調査票を用いて収集してきた。さらに平成21年～23年には5歳児とその母親に健診と採血を行った。平成25年～27年にも同様に9歳児とその母親に採血を含む健診並びに遺伝子データの収集を

実施した。平成29年度には継続して11歳、12歳、13歳の参加者に調査票を送付して情報を収集すると同時に、13歳健診を開始し、子どもとその母親のコホート集団を追跡し、各種の病院解明につながる長期的なデータを蓄積している。さらに、これらのデータを用いて、母胎における曝露や遺伝子情報を含む交絡因子を考慮した疾患発症に関する因果推論を展開する。

2. 研究組織

研究者	所属施設
大矢幸弘	国立成育医療研究センター アレルギー科
木戸博	徳島大学先端酵素学研究所
野口恵美子	筑波大学医学医療系遺伝医学
荒田尚子	国立成育医療研究センター

母性内科
堀川玲子 国立成育医療研究センター
内分泌代謝科
成田雅美 国立成育医療研究センター
アレルギー科

3. 研究成果

本年度の研究は、平成 15 年から実施している成育コホート研究について、参加者への質問票調査を継続して施行した。またこれまでに集積したデータを縦断的に結合し、疾患や症状をアウトカムとし、先行暴露との関係について因果推論を行うべく多変量解析するとともに、採取したサンプルから遺伝子情報を得て新たな解析を行った。成育コホート健診に参加した母親についての解析も追加で実施した。

(1) 成育コホート研究

(イ) 質問票送付及び回収

平成 29 年度は 11 歳、12 歳、13 歳の質問票を該当する参加者に送付して郵送で回収した。11 歳質問票は合計で 967 人に送付し 795 人の母親から回答を得(回収率 83.2%)、791 名の子ども本人から解答を得た(回収率 82.7%)

(ロ) 13 歳健診

今年度から 13 歳になった参加者とその母親を対象に健診を開始し、採血を含め医学的データの収集を行った。

(ハ) これまで集積したデータの解析

過去に蓄積した因子とアレルギー疾患発症との関係について解析をおこない、予防因子、危険因子を同定することができた。

(a) 乳幼児期早期における抗生剤のアレルギー疾患への影響

世界的なアレルギー疾患の増加と抗生剤の過剰投与が問題になっており、それらの相関についての解析を行った。生後 2 歳未満の期間に抗生剤の投与を受けた児が 5 歳時点での喘息に罹患している危険性は、家族歴などを補正した修正オッズ比で 1.72(95%信頼区間: 1.10-2.70)、アトピー性皮膚炎は 1.40(95%信頼区間: 1.01-1.94)、アレルギー性鼻炎は 1.65(95%信頼区間: 1.05-2.58)と有意に高かった。また、興味深いことに、抗生剤の種類による違いが見られた。セフェム系は喘息と及びアレルギー性鼻炎との相関が強く(それぞれ aOR 1.97, 95% CI: 1.23-3.16、aOR 1.82, 95% CI: 1.12-2.93)、マクロライド系はアトピー

性皮膚炎との相関が強かった (aOR 1.58, 95% CI: 1.07-2.33)。

Table 3
Participants' Characteristics According to Antibiotic Use

	No antibiotic use, n (%)	Antibiotic use, n (%)	P value
Maternal characteristics			
Maternal history of allergy			
Yes	242 (51.9)	251 (57.6)	.089
No	224 (48.1)	185 (42.4)	
Smoking during pregnancy			
Yes	10 (2.1)	8 (1.8)	.739
No	456 (97.9)	428 (98.2)	
Maternal age at pregnancy (yr)			
<35	275 (59.0)	246 (56.4)	.431
≥35	191 (41.0)	190 (43.6)	
Previous live births			
0	273 (58.6)	257 (58.9)	.912
≥1	193 (41.4)	179 (41.1)	
Type of delivery			
Caesarean	101 (21.7)	107 (24.5)	.307
Vaginal	365 (78.3)	329 (75.5)	
Weeks of gestation, median (IQR)^a			
	39 (38-40)	39 (38-40)	.438
Child's characteristics			
Sex			
Male	238 (51.1)	222 (50.9)	.963
Female	228 (48.9)	214 (49.1)	
Attends daycare			
Yes	76 (16.3)	108 (24.8)	.002
No	390 (83.7)	328 (75.2)	
Bronchitis (fever) at 2 y old			
Yes	47 (10.1)	100 (22.9)	<.001
No	419 (89.9)	336 (77.1)	
Allergy outcomes at 5 y old			
Current wheeze			
Yes	67 (14.4)	81 (18.6)	.089
No	309 (65.6)	335 (75.4)	
Current asthma			
Yes	37 (7.9)	58 (13.3)	.009
No	429 (92.1)	378 (86.7)	
Current atopic dermatitis			
Yes	87 (18.7)	107 (24.5)	.032
No	379 (81.3)	329 (75.5)	
Current allergic rhinitis			
Yes	37 (7.9)	59 (13.5)	.006
No	429 (92.1)	377 (86.5)	

Abbreviation: IQR, Interquartile range (25th to 75th).

^aBy Mann-Whitney test.

(b) 妊婦への早産防止 β 刺激薬

妊娠中に早産予防を目的として β 刺激薬であるリトドリンを使用したケースと使用しなかったケースを抽出し、出生した児の 5 歳児の喘息および喘鳴に関するアウトカムとの関係を調べた。1158 名の児うち 94 名 (8.1%) が母親の母胎で β 刺激薬リトドリンも曝露を受けていた。5 歳時点で、過去 1 年間に喘鳴を経験した児は 191 名 (16.5%)、過去 1 年間に喘息発作を経験した児は 111 名 (9.6%)、生まれてから 5 歳までに喘息に罹患した児は 168 名 (14.5%)であった。母親の年齢、アレルギー歴、学歴、出生週数、出生体重、帝王切開、出生前抗生剤曝露などの交絡因子で補正したあとの β 刺激薬曝露による過去 12 ヶ月間の喘息発作のリスクはオッズ比が 2.04(95%信頼区間: 1.02-4.05)と有意に高かった。また Trend analysis では、胎内での β 刺激薬の累積曝露の影響は曝露期間および曝露量ともに有意な相関を示した(それぞれ p=0.017, 0.015)。

2) 唾液由来ゲノムを使用したアレルギー

関連遺伝子多型解析法の確立と成育コホートサンプルを使用した関連解析(野口恵美子)成育コホートでフォローされている小児でゲノム解析に関する親権者の同意が得られた小児を対象とした。唾液については Oragene を使用してゲノムを抽出し、TaqMan Genotyping 法ならびに TaqMan copy number assay (サーモフィッシャーサイエンティフィック)により遺伝子型を決定した。唾液採取が困難な参加者については静脈血から DNA を抽出した。変異陽性者については全例ダイレクトシーケンス法による確認を行った。1.5~6 歳時における医師の診断と問診によるアレルギー検査結果が得られている参加者を対象として解析を行った。疾患と遺伝子型との関連解析は R (<https://www.r-project.org/>) を使用してロジスティック回帰分析を行った。ゲノム解析研究参加に同意が得られた 738 名のうち、双胎の参加者についてはそのうちの一名をランダムに選抜し、さらに質問紙に全く回答していない 1 名をのぞいた 723 名を解析対象とした。

フィラグリン遺伝子型の分布は、c.3321delA, p.Ser2554X, p.Ser2889X, p.Ser3296X, p.Lys4022X のアレル頻度はそれぞれ、0.69%, 0.62%, 1.53%, 0.21%, 1.8%であった。5歳時のアレルギー性呼吸器疾患とフィラグリン機能喪失変異との関連解析の結果は、フィラグリン機能喪失変異と喘息やアレルギー性鼻炎、喘鳴との関連は認められなかった ($P>0.05$)。各年齢の医師の診断によるアトピー性皮膚炎とフィラグリン機能喪失変異との関連解析の結果は、3歳以下ではフィラグリン機能喪失変異との関連が強く、成長するにしたがって関連は弱くなる傾向が観察された。解析対象とした 723 名の参加者のうち、1.5歳から 6歳まで全てアトピー性皮膚炎の質問に回答している 618 人を対象として、発症年齢(2歳以下または3歳以上)による解析もあわせて行ったところ、2歳以下の発症では強い関連が認められた一方で ($P<0.001$, OR 3.67 [95%CI 1.92-7.0]) 3歳以上発症では関連は認められなかった ($P=0.59$, OR 0.72 [95%CI 0.22-2.36])。父母の喫煙については、2歳の時点では母の喫煙率が 4%、父の喫煙率が 31%であった。父または母が喫煙している場合に、たばこ暴露ありとして喫煙の有無で層別化したところ、たばこ暴露群でのみ、喘鳴と

の関連の傾向が認められた ($P=0.075$, A allele, OR 0.68 [95%CI 0.44-1.04])。GSTM1 の null 変異については、同様にたばこ暴露群でのみ、null アレルを保有することにより喘鳴に対して抵抗性を有していた ($P=0.031$, + allele, OR 1.67 [95%CI 1.05-2.64])。

(3) 閉経前後女性、男性における MCH の HbA1c に及ぼす影響に関する検討(荒田尚子)対象者 1755 例全体および、閉経前女性 656 例、閉経後女性 429 例、男性 670 例の各群の特徴を table 1 に示した。

次に各群それぞれにおいて、HbA1c を目的変数、各赤血球指標 MCH、MCV、RBC count、Hb、Ht を説明変数として単回帰分析を実施し、相関を調べた。その結果、HbA1c と MCH の相関係数は、閉経前女性 ($r=-0.3912$, $p=0.0000$)、閉経後女性 ($r=-0.3416$, $p=0.0000$)、男性 ($r=-0.2359$, $p=0.0000$) となり、いずれの群においても MCH は他の赤血球指標と比較して、最も高い相関係数を示した。

そこで閉経前女性、閉経後女性、男性の各群において MCH 値に従って五分位 (quintile 1~5) に分割し、各群における各五分位間で FPG、HbA1c、GA の比較、検討を行った。

また、各群における MCH と HbA1c の相関図では、閉経前女性が他の 2 群と比較して HbA1c、MCH 共に低い傾向が見られた。

FPG は、閉経前女性全体で 4.6 ± 0.3 mmol/l、閉経後女性全体で 5.0 ± 0.3 mmol/l、男性全体で 5.2 ± 0.3 mmol/l であった。第 1 五分位から第 5 五分位の FPG は、閉経前女性で 4.7 ± 0.3 mmol/l、 4.6 ± 0.3 mmol/l、 4.6 ± 0.3 mmol/l、 4.5 ± 0.3 mmol/l、 4.5 ± 0.3 mmol/l であり、第 1 五分位と第 4 五分位間、第 1 五分位と第 5 五分位間で有意差が認められた ($p < 0.01$)。閉経後女性では 5.1 ± 0.2 mmol/l、 5.0 ± 0.3 mmol/l、 5.0 ± 0.3 mmol/l、 5.0 ± 0.3 mmol/l、 5.0 ± 0.3 mmol/l、男性で 5.2 ± 0.2 mmol/l、 5.2 ± 0.3 mmol/l、 5.2 ± 0.2 mmol/l、 5.2 ± 0.3 mmol/l、 5.1 ± 0.2 mmol/l であり、各五分位間での差は認められなかった。

HbA1c $\geq 5.7\%$ の割合は、閉経前女性全体で 14%、閉経後女性全体で 65%、男性全体で 44% であった (table 1)。第 1 五分位から第 5 五分位での HbA1c $\geq 5.7\%$ の割合は、閉経前女性で 36%、15%、12%、5%、3% ($p=0.0000$)、

閉経後女性で 81%、74%、70%、58%、41% ($p = 0.0000$)、男性で 54%、54%、44%、40%、30% ($p = 0.0002$) であり、いずれの群においても、有意差が認められた。

GA $\geq 15.6\%$ の割合は、閉経前女性全体で 4%、閉経後女性全体で 17%、男性全体で 9%であった。第 1 五分位から第 5 五分位での GA $\geq 15.6\%$ の割合は、閉経前女性で 6%、2%、3%、2%、5%、閉経後女性で 21%、9%、16%、16%、20%、男性で 11%、7%、6%、10%、10%であり、いずれの群においても有意差は認められなかった。

(4) 出生コホートをを用いた小児思春期における成人病基盤の形成に関する研究

成育コホートにおける 9 歳児の糖脂質代謝に影響する因子の検討 (堀川玲子)

母体の分娩時 BMI 24.0 ± 2.6 (平均 \pm SD)、児の出生体重 2954 ± 424 g、出生時 BMI 12.5 ± 1.0 、9 歳検診時の児の BMI 15.9 ± 2.0 、HbA1c $5.16 \pm 0.21\%$ 、GA $12.6 \pm 0.71\%$ 、LDLC 97.5 ± 23.1 mg/dl、HDLc 66.6 ± 12.5 mg/dl、9 歳健診時の母の BMI 21.5 ± 3.2 、HbA1c $5.23 \pm 0.38\%$ 、LDLC 113.3 ± 30.0 mg/dl、HDLc 72.1 ± 16.1 mg/dl であった。重回帰分析の結果児の BMI に有意に影響する因子は、母の妊娠前 BMI ($F=14.7$ 、 $P<0.0001$) と児の出生時 BMI ($F=4.29$ 、 $P=0.03$) であった。脂質代謝では児の LDLC に影響するのは母の LDLC ($F=53.8$ 、 $P<0.0001$) と自身の BMI ($F=13.8$ 、 $P<0.0001$) で健診時の母の BMI ($F=5.89$ 、 $P=0.01$) も弱く認められた。糖代謝では児の GA/HbA1c に影響する因子は、母の GA/HbA1c ($F=44.9$ 、 $P<0.0001$) と自身の腹囲身長比 ($F=4.79$ 、 $P=0.02$) であった。児の GG に影響する因子は同じく母親の GG ($F=57.7$ 、 $P<0.0001$) と胎盤重量 ($F=4.99$ 、 $P=0.025$)、健診時の母親の BMI ($F=10.0$ 、 $P=0.001$) と HOMA-R ($F=4.34$ 、 $P=0.037$) であった。

(5) 抗原特異的免疫グロブリン (IgE, IgG, IgA の測定) (木戸博)

本研究では、少量で好感度にアレルゲン特異的免疫グロブリンの測定が可能な DLC チップを用いて、成育コホートで収集した 9 歳児 729 名の検体の IgE, IgG, IgA の測定を行った。食物抗原では共通して、低値から測定限界に近い高値にまで幅広く分布する IgG1 と IgG4 が、ほとんどが低値を示す IgE、例外なく低値を示す IgA が検出され、これらを特徴とすることが判明した。吸入性抗原の場合は、極端に低値を示す IgG4 と IgG1 が、これとは対照的に

高値を示す IgE が検出され、これらを特徴とすることが判明した。IgA 値は食物抗原も吸入抗原も共通して低値を示した。

(6) 小児アレルギー疾患の発症・予後に関与する因子解明のための疾患コホート (成田雅美)

平成 29 年度は初診患者を 130 名登録した。回収した質問票を検討する過程で、さらに改訂が必要と判断したため、いったんリクルートを中断して新たな質問票の作成を行っている。

4. 研究内容の倫理面への配慮

成育コホート研究及び疾患コホート研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針ガイダンス」に基づき、国立成育医療研究センター倫理審査委員会の承認を得て実施した。また研究参加者の個人情報にはコホート管理室において研究責任者の管理の元に鍵のついた保管場所で厳重に管理し、保護に関しては最大限に配慮する。採血結果などの検査結果の取り扱いにおいては個人の識別不可能な調査番号により匿名化を行い管理した。

・成育医療の長期追跡データの構築に関する研究 (受付番号 52)

・成育医療の長期追跡データの構築と活用に関する研究「成育コホート研究における 5 歳健診での血液検査」(受付番号 341)

・成育医療の長期追跡データの構築と活用に関する研究「成育コホート研究を用いた妊娠中のイベントと女性の生活習慣病リスクに関する研究」(受付番号 342)

・成育医療の長期追跡データの構築と活用に関する研究 (成育コホート研究 7 歳~15 歳) (受付番号 472)

・アレルギー疾患における遺伝要因の探索研究 (受付番号 533)

・成育医療の長期追跡データの構築と活用に関する研究「成育コホート研究における 9 歳健診での血液検査・13 歳健診」(受付番号 614)

・アレルギー疾患の経過・長期予後に関与する因子解明のための患者登録制度の構築 (受付番号 864)

また分担研究者が自施設で実施する研究については、各施設の倫理委員会の承認を得て行った。