
Technical Report Series

A Longitudinal Study of the Association between ABO Blood Phenotype and Total Serum Cholesterol Level in the Adult Health Study, 1958–86

**F. Lennie Wong, Kazunori Kodama, Hideo Sasaki,
Michiko Yamada, Howard B. Hamilton**



Radiation Effects Research Foundation

A Cooperative Japan–United States Research Organization

RERF Technical Report Series

Technical reports are the basic medium for reporting of original research carried out at the Radiation Effects Research Foundation. Reports in this series receive both internal and external peer review and may serve, in part or in toto, as the basis for publication in the open scientific literature. Although they may be quoted and cited, these reports are considered to be internal publications of the Foundation. Copies are available upon request from Publication and Documentation Center, RERF, 5-2 Hijiyama Park, Minami-ku, Hiroshima, 732 Japan.

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.

業績報告書シリーズ

成人健康調査集団におけるABO式血液型表現型と
総血清コレステロール値との関係に関する経時的調査、
広島・長崎、1958-86年[§]

A Longitudinal Study of the Association between ABO
Blood Phenotype and Total Serum Cholesterol Level in
the Adult Health Study, 1958-86

F. Lennie Wong^a 児玉和紀^b 佐々木英夫^b 山田美智子^b
Howard B. Hamilton^c

要約

この調査は、日本人集団におけるABO式血液型表現型と総血清コレステロール値との関係を調べ、多くの西欧人集団で一貫して認められているようなコレステロール値の増加と表現型Aとの関連が、日本人にもあてはまるか否かを検討したものである。非白人集団におけるこの種の調査は極めて少ないが、入手できた報告は一般的にこのような関係を示しておらず、ABO式血液型表現型と血清コレステロール値の関係は人種間で異なることが示唆される。種々の人種についての横断的データでは、新生児から成人までの年齢群によって様々な結果が示され、ABO式血液型とコレステロールとの関係が有意でないというデータもある。このような不一致は、年齢の影響ではないかという疑問が起こった。また、脂肪摂取量または総コレステロール平均値が低い集団では、ABO式血液型とコレステロールとの関係が明らかでないという示唆もある。本調査では、広島・長崎の被爆者で、1958年から1986年までABCC-放影研の成人健康調査プログラムに参加した人から連続的に入手した総血清コレステロール値に関する長期データを調べることによって、上記の仮説を検証した。継続的な測定値を解析する縦断的統計手法である成長曲線解析法を用いて、各被検者のコレステロール値の年齢依存性変化をモデル化し、ABO式血液型の多型性が成長曲線を修飾する影響に

[§]本報告書は研究計画書RP4-89に基づく。本報告の日本語版は別に発行する。承認1991年10月4日。印刷1993年4月。

放影研^a統計部および^b臨床研究部、^c元放影研臨床検査部。

ついて調べた。その結果、日本人の表現型 A では、非表現型 A と比較して総血清コレステロール値が平均で約 4 mg/dL 高く ($p = .027$)、また、この関係が成人初期から後期まで持続することが分かった。これによって、A 型の人は、心臓血管疾患の主なリスクファクターの一つである血清コレステロール値の上昇により、心臓血管疾患に罹患しやすいと考えられるかもしれない。本調査は、日本人における ABO 式血液型とコレステロールとの関係に関する初めての調査であり、かつ長期的に入手された総血清コレステロールのデータが得られた集団についての最初の調査である。

A Longitudinal Study of the Association between ABO Blood Phenotype and Total Serum Cholesterol Level in the Adult Health Study, 1958–86[§]

F. Lennie Wong,^a Kazunori Kodama,^b Hideo Sasaki,^b
Michiko Yamada,^b Howard B. Hamilton^c

Summary

This study examined the relationship between ABO blood phenotype and total serum cholesterol level in a Japanese population to determine whether an elevated cholesterol level is associated with phenotype A, as has been demonstrated consistently in many West-European populations. Studies of this nature in nonwhite populations are scarce; available findings have generally failed to demonstrate the relationship, suggesting racial heterogeneity. Cross-sectional data of various racial groups with age categories ranging from neonates to adults exhibit varying results, including nonsignificant ABO-cholesterol associations and raise the question of an age effect as a possible explanation for the discrepancies. It has also been suggested that the ABO-cholesterol association may not be apparent in populations with low fat intake or low mean cholesterol level. We addressed these hypotheses by examining long-term data on total serum cholesterol level collected serially from survivors of the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki who were participants of the Adult Health Study program at the Atomic Bomb Casualty Commission–Radiation Effects Research Foundation between 1958 and 1986. A longitudinal statistical method of growth-curve analysis for serially measured response was used to model age-dependent changes in cholesterol levels within individuals. The effects of the ABO polymorphism in modifying the resultant growth curve were examined. We demonstrated that total serum cholesterol levels were elevated on average by about 4 mg/dL in phenotype A compared to non-A phenotypes in the Japanese ($p = .027$) and that this relationship is maintained from early to late adulthood.

[§]This technical report is based on Research Protocol 4-89. The full Japanese text will be available separately; approved 4 October 1991; printed April 1993.

Departments of ^aStatistics and ^bClinical Studies, RERF; ^cformerly, Department of Clinical Laboratories, RERF.

Thus, phenotype-A individuals may be predisposed to cardiovascular disease through one of its major risk factors. This is the first study of the ABO-cholesterol association in the Japanese and the first based on a cohort with longitudinally collected total serum cholesterol data.

Introduction

The ABO blood system has long been recognized as a marker for diseases such as peptic ulcer, gastric cancer, and coronary vascular disease.¹ In particular, an excess of Type-A individuals and a deficit of Type O among subjects with cardiovascular disease (CVD) have been observed in various retrospective studies. This suggests that phenotype-A individuals may be more susceptible to myocardial infarction, atherosclerotic peripheral vascular occlusive disease, and other forms of CVD than non-A individuals.²⁻¹⁰ There are also numerous reports on the association of ABO phenotypes with total serum cholesterol¹¹⁻²⁶ and systolic blood pressure,^{25,27} two of the recognized major risk factors of CVD. Phenotype A has been linked to higher mean levels of cholesterol, whereas the ABO-systolic-blood-pressure association is not as conclusive due to inconsistent findings from the limited number of studies. Consequently, considerable interest has been generated in the role of the ABO locus as a factor influencing CVD susceptibility, either directly or indirectly through its effects on CVD risk factors.

Reports of an association between ABO phenotype and total serum cholesterol level have so far been limited to populations of West-European origin. The few studies done on East-Indian adults,^{12,13} Chinese newborns,¹⁸ and Afro-American school children¹¹ failed to demonstrate such a relationship, raising racial heterogeneity and age influence as possible explanations for the discrepancies. A study of both black and white adult Brazilian males, whose socioeconomic levels resembled those of the East Indians, also failed to show the association. This further supported the hypothesis that the relationship may be apparent only in populations with higher mean cholesterol levels.²³ A recent study of black and white adolescents in the Bogalusa Heart Study²⁴ demonstrated an ABO-cholesterol association in both races, although the highest mean level of the age-, height-, and weight-adjusted total cholesterol occurred in phenotype B for blacks, whereas the highest mean level occurred in phenotype A for white adolescents. The study also showed that much of the association in both racial groups could be accounted for by the disproportionate increase in the proportion of A and AB individuals (or B and AB in blacks) in the upper cholesterol distribution. The disproportionate increase was even greater in the β -lipoprotein fraction distribution. This suggested that phenotypic variations at the ABO locus are primarily related to high β -lipoprotein levels and that the associations with other lipids are the result of their interrelationship with the β -lipoprotein fraction. An analysis of a pedigree with about 200 members containing a high frequency of heart disease cases²⁶ showed the A allele to be associated with increased levels of total serum cholesterol and low-density lipoprotein, confirming the results of the Bogalusa Heart Study.²⁴

Although much evidence exists to support the ABO-total-serum-cholesterol association in white populations, the questions of racial heterogeneity, age influence, and minimal population level of cholesterol necessary to detect the association remain unanswered. Racial differences are presently not a tenable

explanation, because of the paucity of data on nonwhites. Published data to date consist of cross sections of individuals from various age groups: adults,^{7,14,17,19,20} young adults,^{16,20,21} adolescents,^{24,25} school children,¹¹ and neonates,¹⁸ generally tending toward elevated cholesterol levels among phenotype-A individuals. However, due to the cross-sectional nature of these data, even in white populations from which most evidence for the association has been derived, one can only indirectly postulate lack of age dependence, or more interestingly, the possibility that the relationship is maintained over the lifetime regardless of age. To address these questions properly, additional studies of nonwhites (as well as long-term serial data) are required.

We examined these questions using the biennially collected total serum cholesterol data from a cohort of Japanese survivors of the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki. This study of a population consisting of various birth cohorts with almost 30 years of follow-up enables us not only to examine the ABO-cholesterol association in a population with a relatively low cholesterol level and low fat intake but also to provide additional clues about racial heterogeneity, age influence, and lifetime persistence of the ABO-cholesterol association.

Materials and Methods

Data

The subjects are members of the Radiation Effects Research Foundation (RERF) Adult Health Study (AHS) cohort.²⁸ The AHS was begun in 1958 by RERF's predecessor, the Atomic Bomb Casualty Commission (ABCC), as a follow-up study to search for long-term medical and biological effects of exposure to atomic bomb radiation among the survivors in Hiroshima and Nagasaki. Twenty thousand persons were invited to participate in biennial health examinations conducted by the ABCC-RERF clinical staff. These examinations consisted of clinical evaluations and routine laboratory determinations that included total serum cholesterol and blood pressure levels and various anthropometric measurements such as height and weight.

The current study sample was derived from 16,505 AHS subjects who took part in at least one clinical examination between 1958 and 1986 and whose ABO blood type was determined. Excluded from the study were 3301 subjects who were not in either city (NIC) at the time of the bombings, 2402 lacking Dosimetry System 1986 (DS86) dose estimates, 762 exposed in utero, and 202 completely lacking either height or weight data. The NIC subjects were excluded due to discontinuation of their follow-up after 1974. Due to the impracticality of checking each subject's height and weight against the medical records, height measurements after age 20 (to allow for growth) that deviated by 5 cm, and weights by more than 25% from the subject's mean values after age 20 were recoded as missing: 102 individuals were subsequently excluded for lack of complete data on height, weight, and cholesterol in all attended exams. To avoid confounding with possible radiation effects, which is the subject of a separate report in preparation,²⁹ the analysis was restricted to 4162 subjects in the zero-dose group. We also excluded those who were diagnosed with certain medical conditions that could adversely affect their total serum cholesterol levels: 4 cases with nephrotic syndrome, 40 with diseases of the gallbladder and biliary ducts, 10 with disorders of the

adrenal glands, 26 with acute hepatitis, and 3 with nutritional marasmus. These conditions were ascertained through the three-digit International Classification of Disease (ICD) codes assigned to medical conditions diagnosed at any of the AHS examinations. Familial hypercholesterolemic cases were not excluded because their ascertainment using only the ICD codes was considered unreliable; such cases are expected to constitute only a small fraction of the data. The remaining 4079 were the subjects of our analyses.

Laboratory determinations

Blood groups were determined by the standard red-cell agglutination and plasma agglutinin tests. The subtypes A₁ and A₂, though determined, were not considered in this report due to the small number of A₂ subjects. Nonfasting total serum cholesterol levels were determined by the Kendall-Abell method during 1958–65 (AHS Cycles 1–4), followed by three types of automated methods using a Technicon autoanalyzer: the N24 method during 1965–66 (AHS Cycle 4), the N37A method during 1966–67 (AHS Cycles 4 and 5), and the N24A method during 1967–86 (AHS Cycles 5–14). They have since been replaced by a Hitachi model 7050 autoanalyzer beginning with AHS Cycle 15. Because autoanalyzers were not available in Nagasaki, frozen blood specimens were sent to Hiroshima for analysis. Standardization, to ensure comparability of the various cholesterol determination methods, was achieved by obtaining cholesterol measurements from the five systems using the same blood samples and estimating those equations relating measurements from the four earlier methods to those of the model 7050 autoanalyzer. The equations took the form: $Y_{adj} = c \times y_{orig}$, where Y_{orig} is a cholesterol measurement obtained by one of the four earlier methods and Y_{adj} is the adjusted value standardized to the 7050 autoanalyzer using the correction factor $c = .9513, .7991, .8842, \text{ and } .9468$, respectively, for the Kendall-Abell, N24, N37A, and N24A methods.

Statistical analysis

The basic analytical method used was the growth-curve technique for serially measured data. Modeling and estimation were carried out using the mixed-effects model of Laird and Ware,³⁰ which includes growth curves as a special case. A detailed description of the statistical methods is provided in the Appendix; a simplified description follows.

The growth-curve method is similar to the traditional regression approach in that a regressionlike function relating (the natural log of) cholesterol level to a linear-quadratic function of age is obtained. However, unlike the regression approach in which there is only one dependent variable per subject, the unit of observation is the set of multiple cholesterol measurements for each individual. For each subject, the regressionlike function is used to model the age-dependent change in cholesterol levels as a subject-specific "growth curve." The assumption made regarding the distribution of cholesterol accounts for correlations among repeated observations within each person. Individual growth curves can be considered as random observations from a population with a mean growth curve, with individual growth curves varying randomly around this population curve. The objective of the current analysis is to estimate this population growth

function using information from the individual curves. Factors such as sex and ABO phenotypes may affect the shape of the population growth curve, and another objective is to identify these factors. The resultant population growth curve with the relevant factors, or covariates, incorporated resembles a regression function.

The primary covariate in this analysis was the ABO phenotype, although certain demographic factors known from cross-sectional studies to affect cholesterol levels, such as sex and birth cohort status, have also been incorporated. The covariates included *CITY* and *SEX*, coded as 0:1 binary factors, respectively, for Hiroshima/Nagasaki, and male/female; *AGE*; *AGE*²; ABO blood phenotype, using three indicator variables (I_A , I_B , I_{AB}) to distinguish phenotypes A (1,0,0), B (0,1,0), AB (0,0,1), and O (0,0,0); year of birth minus 1945 (*YOB* - 45) to differentiate birth cohorts; and body mass index (*BMI*, the ratio of weight in kilograms to the square of height in centimeters \times 100), which is available concurrently with each cholesterol measurement.

The analysis began with a model for the cholesterol growth function that contained all covariates and interactions of interest. The coefficients in the model were estimated using the program REML.³¹ To obtain a parsimonious model, a backward stepping algorithm was employed to eliminate nonsignificant terms starting with the least significant. Tests were based on asymptotic normality of the estimates using a Type-I error of .05 at each step. A detailed description of the model-selection procedure is given in the Appendix.

Results

The number of cholesterol determinations per subject ranged from 1 to 13 (median = 7). The distributions of age in 1945, or birth cohort status, were comparable among the ABO phenotypes and between the sexes in both cities (Table 1). The age range with available cholesterol measurements in the males was 20 to 92 yr (birth years 1887 to 1945), and in the females, 19 to 86 yr (birth years 1894 to 1944). The maximum likelihood estimates of the allele and phenotype frequencies, given in Table 2, were obtained using the program MENDEL.³² No departure from Hardy-Weinberg equilibrium was detected ($\chi^2 = 2.28$, $df = 1$), indicating random mating among the various ABO genotypes and no change in

Table 1. Mean age in 1945 \pm SD (*n*)

City	Sex	ABO phenotype			
		A	B	O	AB
Hiroshima	Male	27.8 \pm 15.1 (386)	27.6 \pm 15.4 (175)	27.4 \pm 15.3 (274)	24.9 \pm 14.5 (108)
	Female	28.1 \pm 14.1 (675)	26.4 \pm 14.8 (371)	27.2 \pm 13.3 (489)	27.0 \pm 13.9 (177)
Nagasaki	Male	22.7 \pm 13.8 (234)	21.4 \pm 13.5 (137)	25.1 \pm 15.3 (175)	22.4 \pm 13.7 (82)
	Female	20.84 \pm 12.9 (338)	21.7 \pm 10.7 (170)	21.5 \pm 12.1 (203)	21.5 \pm 13.1 (85)

genotypic frequencies from generation to generation. The estimates were comparable between the cities (data not shown) and similar to those obtained from various regions in Japan, which range from .243 to .309 for allele A, .082 to .229 for allele B, and .492 to .675 for allele O.³³

The full model considered for the cholesterol growth curve is

$$\begin{aligned}
 E[\ln(y_{ij})] = & \alpha_0 + \alpha_1(c_i) + \alpha_2(s_i) + \alpha_3(I_{Ai}) + \alpha_4(I_{Bi}) + \alpha_5(I_{ABi}) + \alpha_6(z_i) + \alpha_7(b_{ij}) + \alpha_8(s_i \times b_{ij}) \\
 & + \alpha_9(z_i \times b_{ij}) + \alpha_{10}(s_i \times z_i) + \alpha_{11}(a_{ij}) + \alpha_{12}(c_i \times a_{ij}) + \alpha_{13}(s_i \times a_{ij}) + \alpha_{14}(I_{Ai} \times a_{ij}) \\
 & + \alpha_{15}(I_{Bi} \times a_{ij}) + \alpha_{16}(I_{ABi} \times a_{ij}) + \alpha_{17}(z_i \times a_{ij}) + \alpha_{18}(b_{ij} \times a_{ij}) + \alpha_{19}(s_i \times b_{ij} \times a_{ij}) \\
 & + \alpha_{20}(z_i \times b_{ij} \times a_{ij}) + \alpha_{21}(s_i \times z_i \times a_{ij}) + \alpha_{22}(a_{ij}^2) + \alpha_{23}(c_i \times a_{ij}^2) \\
 & + \alpha_{24}(s_i \times a_{ij}^2) + \alpha_{25}(I_{Ai} \times a_{ij}^2) + \alpha_{26}(I_{Bi} \times a_{ij}^2) + \alpha_{27}(I_{ABi} \times a_{ij}^2) + \alpha_{28}(z_i \times a_{ij}^2) \\
 & + \alpha_{29}(b_{ij} \times a_{ij}^2) + \alpha_{30}(s_i \times b_{ij} \times a_{ij}^2) + \alpha_{31}(z_i \times b_{ij} \times a_{ij}^2) + \alpha_{32}(s_i \times z_i \times a_{ij}^2), \quad (1)
 \end{aligned}$$

where y_{ij} = total serum cholesterol level, a_{ij} = age, b_{ij} = BMI, c_i = city, s_i = sex, and z_i = YOB - 1945 at the j th age for the i th person. The final model included 20 significant parameters, whose estimates are given in Table 3.

ABO effects on growth curves

Although the shapes of the growth functions were allowed to vary by ABO phenotypes, the phenotype indicators I_B , I_{AB} and their interactions with AGE and AGE^2 were eliminated in the initial step. The significance levels for 3- df χ^2 tests of zero I_B and I_{AB} effects; that is, $H_0: \alpha_4 = \alpha_{15} = \alpha_{26} = 0$ and $H_0: \alpha_5 = \alpha_{16} = \alpha_{27} = 0$, were .77 and .62, respectively. However, a similar test of the I_A effect ($H_0: \alpha_3 = \alpha_{14} = \alpha_{25} = 0$) was highly significant ($p < .00001$). After step-by-step elimination of nonsignificant terms, only the coefficient for I_A at the baseline level (α_3) remained in the final model ($p = .027$), indicating that the population growth curve of phenotype A is distinct from that of non-A and that no significant differences exist in the growth functions among groups AB, B, and O.

Phenotype-A effect on the shape of growth curves

Interactions of I_A with AGE and AGE^2 (α_{14} and α_{25}) were not significant, indicating that in the age range considered the general shape of the expected cholesterol growth curve in phenotype A appears not to differ from that of non-A except for a proportional shift upward. Although cholesterol values were available between the ages of 20 and 90 yr, there may not be adequate data for

Table 2. Maximum likelihood estimates (MLE) of the ABO allele and phenotype frequencies in Hiroshima and Nagasaki, males and females

Allele	MLE \pm SD	Phenotype	MLE	n
A	0.3001 \pm 0.0056	A	0.4010	1633
B	0.1749 \pm 0.0044	B	0.2162	853
O	0.5250 \pm 0.0061	O	0.2787	1141
		AB	0.1041	452

Table 3. Estimates of the statistically significant coefficients in the growth curve of total serum cholesterol level

Variable	α	SD	z
Intercept	3.68	0.079	46.44
CITY	0.084	0.039	2.16
SEX	0.37	0.064	5.84
I_A	0.025	0.0052	4.89
YOB - 45	-0.022	0.0016	-13.36
BMI	3.60	0.30	12.11
SEX \times BMI	-0.63	0.11	-5.53
SEX \times (YOB - 45)	-0.017	0.0028	-5.97
AGE	0.040	0.0024	16.50
CITY \times AGE	-0.0050	0.0015	-3.39
SEX \times AGE	-0.014	0.0027	-5.31
BMI \times AGE	-0.039	0.0065	-6.02
(YOB - 45) \times BMI \times AGE	0.0010	0.00020	4.87
SEX \times (YOB - 45) \times AGE	0.00074	8.75×10^{-5}	8.40
AGE ²	-0.00031	2.45×10^{-5}	-12.82
CITY \times AGE ²	4.56×10^{-5}	1.36×10^{-5}	3.34
SEX \times AGE ²	0.00021	3.16×10^{-5}	6.77
(YOB - 45) \times AGE ²	3.31×10^{-6}	4.09×10^{-7}	8.10
BMI \times AGE ²	-1.0×10^{-5}	2.82×10^{-6}	-3.54
SEX \times (YOB - 45) \times AGE ²	-7.81×10^{-6}	7.74×10^{-7}	-10.09

detecting interactions of age with I_A past age 80, because there were fewer than 30 subjects with cholesterol data beyond this age. However, more than 450 persons with an average of six cholesterol determinations, spanning 12 yr beginning in their 20s, were available, suggesting that data size is not a problem at this end of the age range. Hence, cholesterol levels on the average tend to be higher in phenotype A than in types AB, B, and O combined, and this trend is maintained as nonintersecting curves from early adulthood to old age, or from 20 to about 80 yr. The estimated population growth curves are shown in Figure 1 for four female birth cohorts, assuming a constant BMI of 0.203 (eg, weight = 50 kg, height = 1.57 m). The mean cholesterol level in phenotype A is estimated to be elevated by about $2.5 \pm 0.005\%$ or generally 4 mg/dL above that of the non-A phenotypes throughout most of their lives. For comparison against the growth-curve result, Figure 2 shows the mean cholesterol levels by attained age in a cohort of 454 females born between 1905 and 1914. Mean cholesterol values in phenotype A are shown to be higher in general, by approximately 5 mg/dL, than those of non-A.

Sex, birth-cohort, and BMI effects on the shape of growth curves

To determine whether the shape of the growth curves in phenotypes A and non-A vary by *SEX*, *YOB* - 45, and change in *BMI*, their interactions with I_A , $I_A \times AGE$, and $I_A \times AGE^2$ were included in the final model, and the significance of each set of terms was tested simultaneously by a 3-*df* χ^2 test. None were statistically significant ($p = .32, .16$, and $.37$ for sex, *YOB* - 45, and *BMI* effects, respectively). Thus, cholesterol levels in phenotype A on the average are higher than in non-A at any age regardless of sex, *BMI*, or the year of birth. Except for the actual shape of the cholesterol growth function, which is sex dependent, the relative difference between phenotypes A and non-A in males would be similar to those shown in Figure 1 for females.

Comparison with results from conventional analyses

The results of the growth-curve analysis were compared with those of the more conventional approach. Table 4 shows the mean cholesterol levels, adjusted for mean age, at each of the 14 AHS examination cycles for the four ABO phenotypes. Significance levels comparing the equality of the means were based on analysis of covariance. Mean cholesterol levels are shown to differ among the four ABO phenotypes in 9 out of 14 exam cycles, with the highest level generally occurring in A but with uncertain ranking in the remaining groups.

To identify the phenotypes that actually differ from one another, $\ln(\text{cholesterol})$ at each exam cycle was regressed against *AGE*, AGE^2 , *SEX*, and the phenotype indicators I_A , I_B , and I_{AB} . Table 5 shows the significance levels of each phenotype indicator. ABO heterogeneity is indicated by the significant I_A terms in 9 out of 14 regression analyses, showing that phenotype A differs from B, O,

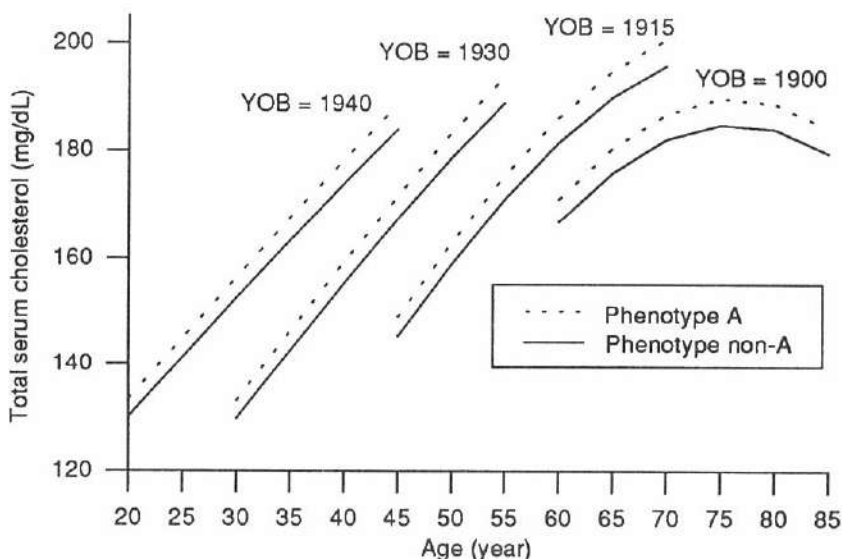


Figure 1. Total serum cholesterol growth curves in phenotype-A and non-A females (weight = 50 kg, height = 1.57 m; YOB = year of birth).

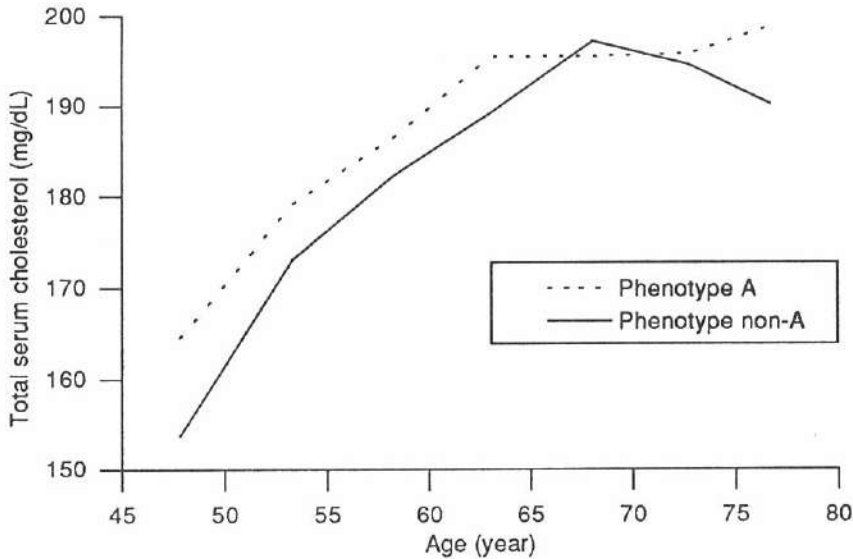


Figure 2. Mean total serum cholesterol in a cohort of 454 females born between 1905 and 1914.

and AB combined. Almost none of the coefficients for I_B and I_{AB} showed statistical significance, indicating that the differences are indistinguishable among the latter three blood types. The estimates of I_A coefficients also suggest that cholesterol levels in phenotype A are elevated on average by about 3%.

The results of the conventional analyses are generally in agreement with those of the growth-curve approach. However, it is apparent that they are inefficient for direct assessments of the longitudinal effect of the ABO polymorphism on the age-dependent pattern of change in cholesterol levels and are unsuitable for elucidating more-intricate relationships of ABO phenotype, or any other covariates, to an individual's cholesterol profile.

Discussion

The purpose of this report was to investigate whether an association between ABO blood phenotype and total serum cholesterol levels exists in the Japanese and to investigate whether an age influence could explain the discordant results observed in some of the earlier studies on this association. We analyzed longitudinally collected cholesterol data from a cohort of atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki. We demonstrated an ABO-cholesterol association in this Japanese population, in particular an elevated cholesterol level among phenotype-A individuals, and demonstrated that this relationship prevails from early to late adulthood. The cholesterol growth curves for A and non-A phenotypes appeared to be nonintersecting between ages 20 and 80 yr. These results did not appear to depend on sex, birth cohort status, or changes in *BMI*.

A search of the published literature reveals that this study was the first to analyze data on the relationship between the ABO blood group system and total serum cholesterol, one of the recognized risk factors of CVD, using statistical

Table 4. Mean total serum cholesterol levels (mg/dL) adjusted by mean age^a ± SD (n), Hiroshima and Nagasaki, males and females

Exam no.	<i>p</i> value ^b	ABO phenotype				Mean age (yr)
		A	B	AB	O	
1	.07	152.3 ^c ± 33.2 (562)	149.2 ± 32.4 (289)	149.8 ± 32.6 (144)	146.8 ± 32.9 (411)	47.9
2	.67	149.6 ± 33.0 (407)	148.1 ± 32.7 (230)	149.8 ± 33.0 (119)	146.8 ± 32.4 (291)	43.3
3	<.01	160.9 ± 37.4 (353)	151.1 ± 35.2 (165)	151.7 ± 35.3 (79)	151.5 ± 35.3 (198)	44.5
4	.01	155.4 ± 32.2 (881)	150.0 ± 31.1 (449)	151.4 ± 31.4 (227)	151.3 ± 31.3 (575)	47.6
5	.04	164.2 ± 34.6 (1198)	160.4 ± 33.8 (595)	160.3 ± 33.8 (317)	160.7 ± 33.9 (825)	48.9
6	.03	167.9 ± 31.7 (1088)	166.4 ± 31.4 (553)	165.8 ± 31.3 (290)	163.4 ± 30.9 (768)	50.9
7	.02	177.1 ± 34.0 (507)	172.4 ± 33.1 (259)	168.4 ± 32.3 (125)	172.4 ± 33.1 (328)	58.8
8	.16	188.1 ± 35.7 (619)	183.9 ± 34.9 (302)	182.2 ± 34.6 (150)	185.7 ± 35.2 (427)	60.4
9	.14	181.4 ± 33.7 (985)	177.8 ± 33.1 (502)	177.5 ± 33.0 (252)	178.9 ± 33.3 (684)	55.0
10	.15	182.0 ± 33.4 (997)	179.1 ± 32.9 (508)	177.7 ± 32.6 (275)	179.6 ± 33.0 (695)	56.2
11	<.01	184.8 ± 34.6 (1098)	179.5 ± 33.6 (590)	180.1 ± 33.8 (314)	180.0 ± 33.7 (773)	57.0
12	.01	183.8 ± 34.3 (1086)	179.4 ± 32.5 (575)	181.0 ± 33.8 (320)	178.6 ± 33.4 (766)	58.4
13	.04	187.8 ± 35.4 (570)	183.0 ± 34.6 (570)	185.8 ± 35.1 (303)	184.4 ± 34.9 (721)	59.8
14	<.01	189.1 ± 35.0 (1026)	182.3 ± 33.7 (539)	186.6 ± 34.6 (308)	183.0 ± 33.9 (698)	61.4

^a Adjusted mean cholesterol level in phenotype *k*:

$\mu_k = \ln(\text{chol})_k - \beta_1(\overline{AGE}_k - \overline{AGE}) - \beta_2(\overline{AGE}_k^2 - \overline{AGE}^2)$, where \overline{AGE} and \overline{AGE}^2 are overall means.

^b Significance levels for the equality of adjusted means.

^c Natural log transformation was used in the analyses. The means have been transformed back to the original scale. Standard deviations are approximations based on the following: $\{\exp(\mu_k) \times [\exp(SD_k)] - \exp(\mu_k) / [\exp(SD_k)]\} / 2$, where SD_k is SD in the natural log scale.

methods for serially measured data. The availability of serial cholesterol data allowed characterization of the age-dependent pattern of change in cholesterol levels and the long-term effects of ABO phenotype on the expected growth function using the growth-curve methods. Parameter estimation and hypothesis tests were carried out using the mixed-effects model of Laird and Ware,³⁰ which includes the growth-curve technique as a special case. This approach accounts for correlations among repeated observations within individuals and is appropriate for analyzing time-dependent serially measured data. The statistical technique is also appropriate for the analysis of other normally distributed serially measured data available in the AHS subjects and should be useful for studying the effects of radiation exposure on the long-term characteristic patterns of these measurements.

The mixed-effects model enables unified assessment of the effects of covariates on serially measured data, which is not possible with conventional, less appropriate, techniques such as the analysis of covariance and regression analyses applied to nonindependent data collected periodically. Analysis of the cholesterol data with these methods at each exam cycle revealed ABO heterogeneity in 9 out of 14 tests, with the remaining 5 showing no differences. Due to irregular

Table 5. Significance levels of the ABO phenotype indicators in the linear regression of ln (cholesterol) on AGE, AGE², SEX, I_A, I_B, I_{AB}, Hiroshima and Nagasaki combined

Exam cycle	<i>p</i> values for indicators ^a			Estimates of I _A coefficients ± SE
	I _A	I _B	I _{AB}	
1	0.01	0.38	0.31	0.037 ± 0.014
2	0.20	0.63	0.27	0.021 ± 0.016
3	<0.01	0.96	0.91	0.060 ± 0.020
4	0.03	0.39	0.96	0.024 ± 0.011
5	0.03	0.83	0.99	0.021 ± 0.009
6	<0.01	0.12	0.20	0.026 ± 0.009
7	0.10	0.72	0.30	0.022 ± 0.013
8	0.28	0.38	0.38	0.012 ± 0.012
9	0.16	0.48	0.72	0.013 ± 0.009
10	0.08	0.94	0.93	0.016 ± 0.009
11	<0.01	0.71	0.68	0.026 ± 0.008
12	<0.01	0.78	0.14	0.027 ± 0.008
13	0.03	0.53	0.31	0.019 ± 0.009
14	<0.01	0.81	0.04	0.033 ± 0.009

^aSignificance levels for the coefficients of ABO phenotype indicators. Type A corresponds to (I_A, I_B, I_{AB}) = (1,0,0), type B to (0,1,0), type AB to (0,0,1), and type O to (0,0,0).

attendance patterns of the AHS subjects to clinical examinations, sample composition and, consequently, the analytical results varied by exam period. If the only data available were those from the five AHS examinations showing no ABO heterogeneity, our study of this Japanese population would not have demonstrated an ABO-cholesterol association but would have given more support to the racial heterogeneity hypothesis. Seven studies of nonwhites have appeared to date: two of East-Indian adults,^{12,13} one of Chinese newborns,¹⁸ one of Brazilian blacks and whites,²³ one of Afro-American school children,¹¹ one of a Thai population,³⁴ and another of Afro-American adolescents.²⁴ In the first four studies, phenotype A was not associated with significantly higher levels of total cholesterol, although Banerjee and Saha,¹³ in their East-Indian adult sample, reported that the highest mean occurred in Type-A individuals (A = 173.9, O = 163.7, B = 161.9, and AB = 158.3). ABO heterogeneity was indicated in Afro-American school children and adolescents, albeit types O and B were associated with the highest mean level in those data. Although the Thai diet is considered to be low fat, which is reflected in low Thai cholesterol levels, the relationship with phenotype A was apparent. However, among Brazilian blacks, whose cholesterol levels are also low, the relationship was absent. As seen in Table 4, cholesterol levels in this Japanese cohort are also low compared to a mean of 248 mg/dL for the male and female Framingham subjects⁷ in 1960 at mean age 58. The difference is especially striking considering that in the 14th exam cycle, 26 years after the Framingham results, the mean level in the AHS cohort with an average age of 61 was only 186 mg/dL. Thus even in the Japanese, who have a relatively low fat intake and low cholesterol levels, the ABO-cholesterol association was evident, in particular the elevated level for phenotype A that has been demonstrated consistently in white-population data. Finding the association in one Japanese cohort admittedly does not establish the relationship, nor does it preclude its absence in other nonwhite populations. Nevertheless, the size and the nature of our data suggest that sampling variation associated with cross-sectional data is a more likely explanation for the lack of association seen in some of the earlier studies, rather than racial heterogeneity or a low population level of total serum cholesterol.

Previous cross-sectional studies suggested that the cholesterol differential prevailed between A and O, non-O and O, or A and non-A groups. George et al²⁶ showed allele A to have an increasing, and allele B to have a decreasing, effect on total cholesterol level, which is consistent with our finding that showed group A to have higher levels than AB, with no discernable differences among AB, B, and O. The lack of interaction between phenotype A and sex, year of birth, or changes in *BMI* indicates, respectively, that the effect is not manifested differentially between males and females, or through varying environmental factors such as dietary habits associated with various birth cohorts, or through changes in individual body/fat ratio. The last indication does not imply a lack of ABO effect on the anthropometric variable but indicates that the ABO effect on cholesterol levels is not manifested through this factor. Whether the ABO phenotype affects changes in *BMI* must be assessed by examining the relationship between ABO and *BMI* growth curves.

A major strength of our longitudinal cholesterol data is that they allow us to model the long-term interrelationship between the factors of interest and the

serially measured response. Lifetime maintenance of elevated cholesterol level in phenotype A, which was demonstrated in our study, can be described by the phenomenon of "tracking." Although the specific definition differs among investigators, tracking is based on the idea that an individual's measured response level at one time remains within the respective percentile of the population distribution at a later time.³⁵ This would occur if the expected cholesterol profiles in groups of individuals are parallel or nonintersecting.³⁶ In this analysis, tracking of total serum cholesterol was shown to occur as nonintersecting growth curves, with the expected cholesterol levels in phenotype A elevated proportionally by about 2.5% relative to non-A in the age range of 20 to 80 yr.

Tracking of total serum cholesterol, and of systolic blood pressure, from youth to maturity was suggested by Fox et al,²⁷ who found both of these CVD risk factors to be elevated in phenotype A of their Bogalusa adolescent sample. Although adolescents are not represented, our results on tracking apply as early as age 20. Garrison et al⁷ considered the cholesterol factor to be of secondary importance in explaining the excess coronary heart disease (CHD) cases observed in phenotype A; the cholesterol differential between A and non-A is too small to account for even a 10% excess (A:O relative incidence 1.3–2.0 among West-European populations showing excess CHD cases in type A³³). They concluded that the influence of blood group A must be independent of the cholesterol risk factor. Indeed, our estimate of the average increase was only about 4 mg/dL. However, cholesterol levels in most CHD cases were shown to be increased by only a modest amount compared to the normal non-CHD distribution.³⁷ Furthermore, as noted by Fox et al,²⁷ the Framingham Heart Study³⁷ showed not only that the risk for coronary artery disease rises with cholesterol level but also that the effect is synergistic in combination with additional risk factors such as elevated systolic blood pressure. Tracking of systolic blood pressure would extend the Bogalusa adolescent results to maturity, predicting the level of another CVD risk factor to be elevated in phenotype A at a later age when CVD risk is increased. As further indicated by the evidence of elevated levels of low-density lipoprotein cholesterol, which is considered the primary atherogenic lipoprotein³⁹ in phenotype A,^{7,24,26,38} blood-type-A individuals could potentially possess an even greater liability toward CVD than suggested by the observed A:non-A mean differences in the individual risk factors. Lipoprotein fraction data are also available for 127 male and 104 female AHS subjects from exam cycle 8 who were serologically typed for ABO. Regression analysis of the β -lipoprotein fraction level by age, sex, and A:non-A blood type indicated that the level in phenotype A increased by about 6% ($p = .052$, data not shown), providing further evidence for an increased level of this risk factor in another racial group. Tracking of the risk factors further indicates that phenotype-A individuals are more predisposed (than non-phenotype-A individuals) to CVD at an age when the risk for the disease is still small. Since a substantial rise in CVD risk occurs when total cholesterol and systolic blood pressure have attained the adult levels, it might be hypothesized that the increased liability (represented in part by the levels of cholesterol and systolic blood pressure) in phenotype A is not manifested as disease until the liability, augmented by additional risk factors such as cigarette smoking and left ventricular hypertrophy, rises to a clinically significant level.

Evidence for elevated systolic blood pressure levels in phenotype A is sparse, so that tracking can only be speculative. A more-definitive answer awaits further studies, such as that using the serial systolic blood pressure data in the AHS cohort. Whether CHD risk in phenotype A is increased in the Japanese is unknown. However, total serum cholesterol and systolic blood pressure are risk factors in this population as well,⁴⁰⁻⁴² so that a CVD incidence study in the AHS incorporating the ABO locus with other risk factors would be informative for delineating its role in CVD development.

The association between ABO polymorphism and total serum cholesterol levels implies genetic involvement in the control of this quantitative trait; either the ABO locus itself or other closely linked loci must be responsible for the variability. Reports of associations with other independent loci such as Gm, haptoglobin, and secretor status²² indicate that ABO is but one locus responsible for the variability in total serum cholesterol levels and that the trait is polygenic. Further study of these markers may help identify a phenotype based on combinations of such markers associated with elevated levels of the CVD risk factors. Because ABO and other blood types are constant and easily determinable, associations with blood types and tracking of the risk factors may provide early identification of a subgroup of individuals with elevated susceptibility to CVD, potentially useful for disease prevention.

References

1. Morton NE: Genetic markers in atherosclerosis: A review. *J Med Genet* 13:81-90, 1976
2. Hall R, Bunch GA, Humphrey CS: The frequencies of ABO blood groups and of secretors of ABH group substances in peripheral arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 14:241-6, 1971
3. Kingsbury KJ: Relation of ABO blood groups to atherosclerosis. *Lancet* 1:199-203, 1971
4. Weiss NS: ABO blood type and arteriosclerosis obliterans. *Am J Hum Genet* 24:65-70, 1972
5. Allan TM: ABO blood-groups and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 18:347-51, 1973
6. Morris T, Bouhoutsos J: ABO blood groups in occlusive and ectatic arterial disease. *Br J Surg* 60:892-3, 1973
7. Garrison RJ, Havlik RJ, Harris RB, Feinleib M, Kannel WB, Padgett SJ: ABO blood group and cardiovascular disease—the Framingham study. *Atherosclerosis* 25:311-8, 1976
8. Cronenwett JL, Davis JT, Garrett HE: ABO blood group and serum lipids in female atherosclerosis. *J Cardiovasc Surg* 24:658-61, 1983
9. Platt D, Muhlberg W, Kiehl L, Schmitt-Ruth R: ABO blood groups system, age, sex, risk factors and cardiac infarction. *Arch Gerontol Geriatr* 4:241-9, 1985
10. Hrby J, Gyrtrup HJ, Grande P, Vestergaard A: Relation of serum lipoproteins and lipids to the ABO blood groups in patients with intermittent claudication. *J Cardiovasc Surg* 30:533-7, 1989

11. Hames CG, Greenberg BG: A comparative study of serum cholesterol levels in school children and their possible relation to atherogenesis. *Am J Public Health* 51:374-85, 1961
12. Srivastava BK, Sinha AS: Observations on serum cholesterol and lipid phosphorus levels in relation to ABO blood groups. *J Indian Med Assoc* 47:261-2, 1966
13. Banerjee B, Saha N: Blood groups and serum cholesterol. *Lancet* 2:961, 1969
14. Oliver MF, Cumming RA, Geizerova H, Heady JA: Serum cholesterol and ABO and Rhesus blood-groups. *Lancet* 2:605-7, 1969
15. Langman MJS, Elwood PC, Foote J, Ryrie DR: ABO and Lewis blood-groups and serum-cholesterol. *Lancet* 2:607-9, 1969
16. Beckman L, Olivecrona T, Hernell O: Serum lipids and their relation to blood groups and serum alkaline phosphatase isozymes. *Hum Hered* 20:569-79, 1970
17. Medalie JH, Levine C, Neufeld H, Riss E, Dreyfus F, Papier C, Goldbourt U, Kahn H, Oron D: Blood-groups, cholesterol, and myocardial infarction. *Lancet* 2:723, 1970
18. Saha N, Banerjee B: Blood groups and serum cholesterol. *Lancet* 1:969, 1971
19. Hagerup L, Hansen PF, Skov F: Serum-cholesterol, serum-triglyceride and ABO blood groups in a population of 50-year-old Danish men and women. *Am J Epidemiol* 95:99-103, 1972
20. Wakely EJ, Langman MJS, Elwood PC: Blood group A sub-groups and serum cholesterol. *Cardiovasc Res* 7:679-83, 1973
21. Fraser GR, Volkers WS, Bernini LF, De Greve WB, Van Loghem E, Meera Khan P, Nijenhuis LE, Veltkamp JJ, Vogel GP, Went LN: A search for associations between genetical polymorphic systems and physical, biochemical and haematological variables. *Hum Hered* 24:424-34, 1974
22. Sing CF, Orr JD: Analysis of genetic and environmental sources of variation in serum cholesterol in Tecumseh, Michigan. III. Identification of genetic effects using 12 polymorphic genetic blood marker systems. *Am J Hum Genet* 28:453-64, 1976
23. Colonia VJ, Roisenberg I: Investigation of association between ABO blood groups and coagulation, fibrinolysis, total lipids, cholesterol and triglycerides. *Hum Genet* 48:221-30, 1979
24. Fox MH, Webber LS, Srinivasan SR, Thurmon TF, Berenson GS: ABO blood group association with cardiovascular risk factor variables. I. Serum lipids and lipoproteins—The Bogalusa Heart Study. *Hum Biol* 53:411-37, 1981
25. Borecki IB, Elston RC, Rosenbaum PA, Srinivasan SR, Berenson GS: ABO associations with blood pressure, serum lipids and lipoproteins, and anthropometric measures. *Hum Hered* 35:161-70, 1985
26. George VT, Elston RC, Amos CI, Ward LJ, Berenson GS: Association between polymorphic blood markers and risk factors for cardiovascular disease in a large pedigree. *Genet Epidemiol* 4:267-75, 1987
27. Fox MH, Webber LS, Thurmon TF, Berenson GS: ABO blood group association with cardiovascular risk factor variables II. Blood pressure, obesity, and their anthropometric covariables—The Bogalusa Heart Study. *Hum Biol* 58:549-84, 1986

28. Hollingsworth JW, Beebe GW: ABCC-JNIH Adult Health Study: Provisional research plan. ABCC TR 9-60
29. Yamada M, Wong FL, Sasaki H, Kodama K: Radiation effects on the growth curve of the total serum cholesterol levels in the Adult Health Study, 1956-86. RERF TR in preparation
30. Laird NM, Ware JH: Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics* 38:963-74, 1982
31. Cook N: A FORTRAN program for random-effects models. Technical report. Cambridge, Mass, Harvard School of Public Health, Dept. of Biostatistics, 1982
32. Lange K, Boehnke M, Weeks D: Program for Pedigree Analysis (MENDEL). Department of Biomathematics, University of California at Los Angeles School of Medicine, and Dept. of Biostatistics, University of Michigan School of Public Health, Ann Arbor, 1986
33. Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K: *Blood Groups and Disease*. Oxford, Oxford University Press, 1976
34. Flatz G: Serum-Cholesterin, ABO-Blutgruppen und Hamoglobintyp. Beitrag zur Frage der genetischen Beeinflussung der Serum-Cholesterinkonzentration. *Humangenetik* 10:318-28, 1970
35. Ware JH, Wu MC: Tracking: Prediction of future values from serial measurements. *Biometrics* 37:427-37, 1981
36. Crowder MJ, Hand DJ: *Analysis of Repeated Measures*. New York, Chapman and Hall, 1990. p. 141
37. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T: Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann Intern Med* 90:85-91, 1979
38. Polychronopoulou A, Miras CJ, Trichopoulos D: Lipoprotein types, serum cholesterol, and ABO blood groups. *Br J Prev Soc Med* 28:60-2, 1974
39. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB: The prediction of coronary heart disease by high-density and other lipoproteins: An historical perspective. In *Hyperlipidemia: Diagnosis and Therapy*. Ed by Rifkind BM, Levy RI. New York, Grune and Stratton, 1977. pp. 71-8
40. Prentice RL, Shimizu Y, Lin C, Peterson AV, Kato H, Mason MW, Szatrowski TP: Serial blood pressure measurements and cardiovascular disease in a Japanese cohort. *Am J Epidemiol* 116:1-28, 1982 (RERF TR 22-81)
41. Szatrowski TP, Peterson AV, Shimizu Y, Prentice RL, Mason MW, Fukunaga Y, Kato H: Serum cholesterol, other risk factors, and cardiovascular disease in a Japanese cohort. *J Chronic Dis* 33:569-84, 1984 (RERF TR 3-82)
42. Barlow WE, Kodama K, Kato H: Risk factors for myocardial infarction and angina pectoris in a Japanese cohort, 1958-78. RERF TR 8-84
43. Paterson L, Roab G: REML in medical surveys: The Edinburg Lead Study. *Biometric Bull* 6(3):5-6, 1989

Appendix

The mixed-effects model of Laird and Ware³⁰ may be presented from the perspective of growth-curve analysis. This approach in describing the method is more appropriate for the current problem since the basic technique for analyzing serially measured response data, whose goal includes characterization of the time-dependent trend, involves the growth-curve method. The mixed-effects model may be regarded as a generalization of this method. Since the current analyses were conducted using a computer program written for parameter estimation in the mixed-effects model setting, a general description of the relationship between this model and the growth-curve approach would provide the motivation and justification for their implementation. Specific application to the current cholesterol problem is described as an example. The description given below should serve as a reference for future studies of this kind involving other serially measured AHS data.

The mixed-effects model of Laird and Ware

For the i th person, let \mathbf{y}_i denote the $n_i \times 1$ vector of measured responses. Assume the following growth model to relate \mathbf{y}_i to time-varying covariates from the n_i occasions:

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{Z}_i \boldsymbol{\beta}_i + \mathbf{e}_i, \quad i = 1, \dots, m,$$

where \mathbf{Z}_i is $n_i \times q$ known design matrix of time-dependent covariates, $\boldsymbol{\beta}_i$ is a $q \times 1$ vector of growth parameters, and \mathbf{e}_i is an $n_i \times 1$ vector of errors. A common growth model is assumed for all individuals. However, the values of $\boldsymbol{\beta}_i$ are considered unique to each subject, with $\mathbf{Z}_i \boldsymbol{\beta}_i$ defining the i th subject's growth curve; $\boldsymbol{\beta}_i$ and \mathbf{e}_i are assumed to be independently, randomly distributed according to $N(\mathbf{A}_i \boldsymbol{\alpha}, \mathbf{D})$ and $N(\mathbf{0}, \sigma^2 \mathbf{I}_i)$, respectively. \mathbf{A}_i is a $q \times p$ known design matrix of time-independent covariates relating $\boldsymbol{\beta}_i$ linearly to $\boldsymbol{\alpha}$, $\boldsymbol{\alpha}$ is a $p \times 1$ vector of fixed parameters, \mathbf{D} is a $q \times q$ covariance matrix of unknown parameters, and \mathbf{I}_i is an $n_i \times n_i$ identity matrix. Note that independence is assumed for the within-subject errors.

This means that $\boldsymbol{\beta}_i = \mathbf{A}_i \boldsymbol{\alpha} + \mathbf{b}_i$, where \mathbf{b}_i is the vector of deviation of the i th subject's growth parameters from the overall mean and is distributed as $N(\mathbf{0}, \mathbf{D})$. It follows that

$$\begin{aligned} \mathbf{y}_i &= \mathbf{Z}_i \boldsymbol{\beta}_i + \mathbf{e}_i \\ &= \mathbf{Z}_i (\mathbf{A}_i \boldsymbol{\alpha} + \mathbf{b}_i) + \mathbf{e}_i \\ &= \mathbf{Z}_i \mathbf{A}_i \boldsymbol{\alpha} + \mathbf{Z}_i \mathbf{b}_i + \mathbf{e}_i \end{aligned} \tag{A.1}$$

$$= \mathbf{X}_i \boldsymbol{\alpha} + \mathbf{Z}_i \mathbf{b}_i + \mathbf{e}_i, \quad i = 1, \dots, m, \tag{A.2}$$

where \mathbf{X}_i is an $n_i \times p$ known design matrix. Since $\mathbf{b}_i = \beta_i - \mathbf{A}_i\alpha$, $\mathbf{Z}_i\mathbf{b}_i$ models the deviation of the i th subject's growth function from the overall mean. It also follows that

$$E(\mathbf{y}_i) = \mathbf{X}_i\alpha,$$

$$\text{Var}(\mathbf{y}_i) = \sigma^2\mathbf{I}_i + \mathbf{Z}_i\mathbf{D}\mathbf{Z}_i' .$$

Errors in an individual consist of the between-subject and within-subject components, $\mathbf{Z}_i\mathbf{b}_i$ and \mathbf{e}_i , respectively. The error structure in $\text{Var}(\mathbf{y}_i)$ allows for correlations among repeated observations within an individual.

Expression (A.2) is the mixed-effects model of Laird and Ware, with α and \mathbf{b}_i as vectors of the fixed- and random-effects parameters, respectively. It is more general than the growth-curve formulation of (A.1) in that the special structure of $\mathbf{X}_i = \mathbf{Z}_i\mathbf{A}_i$ is not imposed on \mathbf{X}_i , which is specified simply as an $n_i \times p$ known design matrix. Fixed effects are associated with parameters that are considered to be constant across individuals. Random effects are associated with parameters that vary from person to person. From the growth-curve perspective, $\mathbf{Z}_i\mathbf{A}_i\alpha$ and $\mathbf{X}_i\alpha$ model the mean growth function, which is constant for individuals in the same population, whereas $\mathbf{Z}_i\mathbf{b}_i$ models the deviation of an individual's growth function from the population mean and varies randomly among individuals. Effects may consist of one or both components depending on model specification.

The estimates of the unknown variance components, that is, σ^2 and the unique elements of \mathbf{D} , together with the estimates of the fixed and random-effects parameters and their standard errors, can be obtained with the program REML.³¹ The required input includes \mathbf{y}_i , \mathbf{X}_i , and \mathbf{Z}_i for each subject. The variance component estimates are restricted maximum likelihood (REML) estimates,⁴³ which are preferable to ordinary maximum likelihood estimates as the latter are biased for simultaneous estimation of fixed and random effects. The estimates of the random effects are empirical Bayes estimators. Inference is based on asymptotic normality.

Application to the current problem

Let \mathbf{y}_i denote the series of the natural log of total-serum-cholesterol measurements for person i obtained from n_i AHS examinations, $n_i = 1, \dots, 13$, and $i = 1, \dots, 4079$. The natural log was used since cholesterol distribution was shown to be reasonably normalized by this transformation in cross-sectional analyses. Following the growth-curve modeling approach, we assume that \mathbf{y}_i for an individual can be adequately described by the following growth function:

$$\begin{aligned} y_{ij} = & \beta_{0i} + \beta_{1i}(AGE_{ij}) + \beta_{2i}(AGE_{ij}^2) + \beta_{3i}(BMI_{ij}) \\ & + \beta_{4i}(BMI_{ij} \times AGE_{ij}) + \beta_{5i}(BMI_{ij} \times AGE_{ij}^2), \end{aligned} \quad (\text{A.3})$$

where $j = 1, \dots, n_i$. Thus, $q = 6$, \mathbf{D} is a 6×6 matrix, and \mathbf{Z}_i is an $n_i \times 6$ matrix made up of ones in the first column, AGE in the second, AGE^2 in the third, and so on.

We assume the following linear relationships for the parameters in β_i with respect to $CITY$, SEX , I_A , I_B , I_{AB} , $YOB - 45$, and $SEX \times YOB - 45$ interaction:

$$\begin{aligned}
 \beta_{0i} &= \alpha_0 + \alpha_1(CITY_i) + \alpha_2(SEX_i) + \alpha_3(I_{Ai}) + \alpha_4(I_{Bi}) + \alpha_5(I_{ABi}) + \alpha_6(YOB - 45_i) + \alpha_7(SEX \times YOB - 45_i) + b_{0i} \\
 \beta_{1i} &= \alpha_8 + \alpha_9(CITY_i) + \alpha_{10}(SEX_i) + \alpha_{11}(I_{Ai}) + \alpha_{12}(I_{Bi}) + \alpha_{13}(I_{ABi}) + \alpha_{14}(YOB - 45_i) + \alpha_{15}(SEX \times YOB - 45_i) + b_{1i} \\
 \beta_{2i} &= \alpha_{16} + \alpha_{17}(CITY_i) + \alpha_{18}(SEX_i) + \alpha_{19}(I_{Ai}) + \alpha_{20}(I_{Bi}) + \alpha_{21}(I_{ABi}) + \alpha_{22}(YOB - 45_i) + \alpha_{23}(SEX \times YOB - 45_i) + b_{2i} \\
 \beta_{3i} &= \alpha_{24} + \alpha_{25}(SEX_i) + \alpha_{26}(YOB - 45_i) + b_{3i} \\
 \beta_{4i} &= \alpha_{27} + \alpha_{28}(SEX_i) + \alpha_{29}(YOB - 45_i) + b_{4i} \\
 \beta_{5i} &= \alpha_{30} + \alpha_{31}(SEX_i) + \alpha_{32}(YOB - 45_i) + b_{5i}
 \end{aligned}
 \tag{A.4}$$

The dimension of α is 33×1 , A_i is 6×33 , and $X_i = Z_i A_i$ is an $n_i \times 33$ matrix. In addition, $\beta_i \sim N(A_i \alpha, D)$ and $b_i \sim N(0, D)$. Although the growth parameters β_{0i} , β_{1i} , and β_{2i} corresponding to the intercept, AGE , and AGE^2 in (A.3) are allowed to be modified by all seven time-independent covariates, those corresponding to BMI , $BMI \times AGE$, and $BMI \times AGE^2$ are assumed to be invariant to $CITY$, ABO phenotype, and interaction between sex and cohort status in order to minimize the number of parameters to be estimated initially. This particular model was selected to reflect our primary interest, which is to examine the effects of ABO phenotype on changes in cholesterol levels with chronological aging, rather than with changes in BMI associated with the aging process. The effects of ABO on BMI , $BMI \times AGE$, and $BMI \times AGE^2$ were tested after a simpler model containing only the I_A effect was obtained, by incorporating $I_A \times BMI$, $I_A \times BMI \times AGE$, and $I_A \times BMI \times AGE^2$ terms in the model. $CITY$ and $SEX \times (YOB - 45)$ effects may be tested similarly, but this was not done in this report.

A preliminary analysis that included only AGE , AGE^2 , and BMI in the growth function gave an estimate of the coefficient of variation of the BMI effect; that is, the square root of the estimated between-subject variance of the growth parameter corresponding to BMI divided by the estimate of the expectation of the parameter as .0003, in contrast to .8 of the age effects. This indicated the between-subject variability in individuals' BMI growth parameter, relative to the size of its effect, to be negligible in comparison to those of age, and that setting its variance to zero may not be unreasonable. Thus, BMI was assumed to consist of only the fixed effect. We assumed this to be true for the last two terms in (A.3) as well. Thus, the diagonal and off-diagonal elements in D corresponding to BMI , $BMI \times AGE$, and $BMI \times AGE^2$ were set to zero. The covariance matrix of β_i then has the following structure:

$$D = \begin{bmatrix} \sigma_{00}^2 & \sigma_{01}^2 & \sigma_{02}^2 & 0 & 0 & 0 \\ \sigma_{10}^2 & \sigma_{11}^2 & \sigma_{12}^2 & 0 & 0 & 0 \\ \sigma_{20}^2 & \sigma_{21}^2 & \sigma_{22}^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}.$$

In addition, $[b_{0i}, b_{1i}, b_{2i}] \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{D}^*)$, where \mathbf{D}^* is the 3×3 upper left submatrix of \mathbf{D} consisting of the nonzero elements. The variables b_{3i} , b_{4i} , and b_{5i} are identically equal to zero. When the expressions in (A.4) are incorporated into (A.3), the subject-specific growth function takes the following form in terms of b_i :

$$y_{ij} = b_{0i} + b_{1i}(\text{AGE}_{ij}) + b_{2i}(\text{AGE}_{ij}^2).$$

The overall growth model for y_i expressed as a mixed-effects model consists of the $n_i \times 33$ fixed-effects design matrix \mathbf{X}_i , and the 33×1 vector of the fixed-effects parameters α , both of which are defined earlier. It also includes \mathbf{Z}_i , which is now an $n_i \times 3$ design matrix of the random effects made up of ones in the first column, age in the second, and the square of age in the third and also b_i , which is a 3×1 vector of the random effects. Model (1) given in the Results section is the expectation of y_i . Expressed in the mixed-effects model formulation, the estimation of the parameters and their standard errors may proceed using the program REML by supplying y_i , \mathbf{X}_i , and \mathbf{Z}_i for each individual.

Selection of an appropriate model for the mean function $\mathbf{X}_i\alpha$ may proceed in ways analogous to model selection in regression analyses. These include (1) specification of a model of interest and test for the significance of the included terms, (2) a forward-stepping procedure in which significant effects are added to an initially simpler model, and (3) a backward-stepping procedure in which nonsignificant terms are eliminated from a larger model. We applied a backward-stepping procedure to model (1) to obtain a parsimonious model for the mean cholesterol growth function. Assuming asymptotic normality of the parameter estimates, multivariate tests of zero simultaneous effect of the fixed effects in (A.4) were carried out initially, using χ^2 tests with degrees of freedom equal to the number of fixed effects tested as zero. For example, the significance of an overall ABO effect on β_{0i} , β_{1i} , and β_{2i} in (A.4); that is,

$$H_0: \alpha_3 = \alpha_4 = \alpha_5 = \alpha_{11} = \alpha_{12} = \alpha_{13} = \alpha_{19} = \alpha_{20} = \alpha_{21} = 0,$$

was tested by comparing the value of the Wald test statistics computed in REML against the χ^2 distribution with nine degrees of freedom. A similar procedure was carried out to test the simultaneous significance of each ABO indicator variable, I_A , I_B , and I_{AB} on β_{0i} , β_{1i} , and β_{2i} . The simultaneous tests were followed by one-at-a-time significance tests of each remaining term in the model. Elimination of terms proceeded in a stepwise fashion beginning with the least significant, followed by re-estimation of the parameters and their standard errors. This procedure continued until no more terms could be eliminated from the model.

業績報告書シリーズ
Technical Report Series

成人健康調査集団における ABO 式血液型表現型と
総血清コレステロール値との関係に関する
経時的調査, 広島・長崎, 1958-86 年

A Longitudinal Study of the Association between
ABO Blood Phenotype and Total Serum Cholesterol
Level in the Adult Health Study, 1958-86

F Lennie Wong 児玉和紀 佐々木英夫 山田美智子 Howard B Hamilton

放影研業績報告書シリーズ RERF Technical Report Series

業績報告書は、放射線影響研究所で行われたオリジナルな研究を報告するためのものである。このシリーズに含まれる報告書は、研究所内外の専門家による検討を受けたものであり、その一部または全文は学術雑誌への投稿原稿としても用いられる。本報告書を引用したり参考文献として言及しても差し支えないが、本報告書自体は当研究所の内部出版物である。報告書は放影研出版・資料センター、〒732 広島市南区比治山公園5-2で入手できる。

放射線影響研究所(元 ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足した。その経費は日米両国政府の平等分担とし、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって充てる。

業績報告書シリーズ

**成人健康調査集団における ABO 式血液型表現型と
総血清コレステロール値との関係に関する経時的調査,
広島・長崎, 1958-86 年[§]****A Longitudinal Study of the Association between
ABO Blood Phenotype and Total Serum Cholesterol
Level in the Adult Health Study, 1958-86**F Lennie Wong^a 児玉和紀^b 佐々木英夫^b 山田美智子^b Howard B Hamilton^c**要 約**

この調査は、日本人集団における ABO 式血液型表現型と総血清コレステロール値との関係を調べ、多くの西欧人集団で一貫して認められているようなコレステロール値の増加と表現型 A との関連が、日本人にもあてはまるか否かを検討したものである。非白人集団におけるこの種の調査は極めて少ないが、入手できた報告は一般的にこのような関係を示しておらず、ABO 式血液型表現型と血清コレステロール値の関係は人種間で異なることが示唆される。種々の人種についての横断的データでは、新生児から成人までの年齢群によって様々な結果が示され、ABO 式血液型とコレステロールとの関係が有意でないというデータもある。このような不一致は、年齢の影響ではないかという疑問が起こった。また、脂肪摂取量または総コレステロール平均値が低い集団では、ABO 式血液型とコレステロールとの関係が明らかでないという示唆もある。本調査では、広島・長崎の被爆者で、1958 年から 1986 年まで ABCC-放影研の成人健康調査プログラムに参加した人から連続的に入手した総血清コレステロール値に関する長期データを調べることによって、上記の仮説を検証した。継続的な測定値を解析する縦断的統計手法である成長曲線解析法を用いて、各被検者のコレステロール値の年齢依存性変化をモデル化し、ABO 式血液型の多型性が成長曲線を修飾する影響について調べた。その結果、日本人の表現型 A では、非表現型 A と比較して総血清コレステロー

[§]本業績報告書は研究計画書 RP 4-89 に基づく。本報告の英語版は別に発行した。承認 1991 年 10 月 4 日。印刷 1993 年 8 月。

放影研 ^a統計部および ^b臨床研究部 ^c元 放影研臨床検査部。

ル値が平均で約4 mg/dL 高く ($p = .027$), また, この関係が成人初期から後期まで持続することが分かった。これによって, A型の人は, 心臓血管疾患の主なリスクファクターの一つである血清コレステロール値の上昇により, 心臓血管疾患に罹患しやすいと考えられるかもしれない。本調査は, 日本人におけるABO式血液型とコレステロールとの関係に関する初めての調査であり, かつ長期的に入手された総血清コレステロールのデータが得られた集団についての最初の調査である。

緒言

ABO式血液型は, 消化性潰瘍, 胃癌および冠状動脈性血管疾患などの疾患の指標として長年認められてきた。¹ 様々な遡及的調査において, 特に心臓血管疾患(CVD)患者にはA型が多く, O型が少ないことが分かっている。このことは, A型は他の血液型に比べて心筋梗塞, アテローム性末梢血管閉塞性疾患, およびその他のCVD性疾患に罹患しやすいことを示唆している。²⁻¹⁰ また, ABO式血液型とCVDの二つの主要リスク因子である総血清コレステロール¹¹⁻²⁶ および収縮期血圧^{25,27} との関連性についても多くの報告がある。表現型Aとコレステロール平均値の増加との関係は明確になっているが, ABO式血液型と収縮期血圧との関係は, 調査件数が少なく, しかも得られた所見に一貫性がないことから,それほど確実なものではない。このため, ABO遺伝子座位がCVDリスク因子を通じてCVD罹病性に直接的あるいは間接的に影響を及ぼす因子として, その役割に多大な関心が払われてきた。

ABO式血液型表現型と総血清コレステロール値との関連性についての報告は, これまでのところ西欧人集団に限定されている。東インド諸島の成人,^{12,13} 中国の新生児,¹⁸ およびアメリカ黒人児童¹¹ に対して実施された少数の調査では, このような関連性は認められなかった。この不一致は, 人種間の差異や年齢の影響によるものではないかと考えられている。社会経済的レベルが東インド人に類似しているブラジルの黒人および白人成人男性に関する調査でも, 上記の関連性は認められなかった。このことから, 更に, コレステロール平均値の高い集団にのみ, これらの関連性が認められるのではないかという仮説が生まれた。²³ Bogalusa心臓調査²⁴ における黒人および白人青年に関する最近の調査では, 両人種ともに ABO式血液型とコレステロールとの関連性が認められた。年齢, 身長および体重を調整した総コレステロール平均値が最も高かったのは黒人では表現型Bだったが, 白人青年では表現型Aに認められた。また, 両人種群に見られた血液型とコレステロールとの関連性は, 高コレステロール区分におけるA型およびAB型(黒人においてはB型およびAB型)の割合が不均衡に増加することによってほぼ説明できることが分かった。この不均衡な増加は, β リポ蛋白分画の分布で一層大きかった。このことは, ABO遺伝子座位における表現型の変動は β リポ蛋白値の増加と主に関連していること, また, その他の脂質との関連性は β リポ蛋白との相互関

係に起因することを示唆している。心臓疾患の頻度が高い約200人から成る家系についての解析²⁶によれば、対立遺伝子Aは総血清コレステロールの増加および低比重リポ蛋白濃度の低下と関連している。これによりBogalusa心臓調査²⁴の結果が確認された。

白人集団におけるABO式血液型と総血清コレステロールとの関連性を示唆する証拠は多くみられるが、血液型とコレステロールとの関連性の確認に必要な人種間の差異、年齢の影響および集団のコレステロール値が低い場合といった問題は未解決のままである。人種間の差異は、白人以外のデータが不足しているため、現在のところ批判に耐え得る説明とは言えない。これまで発表されたデータは、成人^{7,14,17,19,20}、若年成人^{16,20,21}、青年^{24,25}、児童¹¹、新生児¹⁸などの様々な年齢群に関する横断的データであり、全般的に表現型Aのコレステロール値が高い傾向にあった。しかし、これらのデータは横断的であるため、血液型とコレステロールとの関連性を示す証拠が多く得られている白人集団においてさえも、年齢依存性が欠如しているとか、あるいはより興味深い点として、両者の関係が年齢とは無関係に一生維持されるのではないかと間接的に推測することしかできない。これらの問題に適切に答えるためには、白人以外の調査データとともに長期間収集された連続的なデータが必要である。

我々は、広島・長崎の日本人原爆被爆者集団から2年に1度収集される総血清コレステロール・データを用いてこれらの問題を検討した。この集団は約30年間追跡された様々な出生集団から成り、これを調査することによって、コレステロール値が比較的lowく、脂肪摂取率が低い集団におけるABO式血液型とコレステロール値との関係を検討できるだけでなく、人種間差、年齢の影響および生涯にわたるこの関係の継続性について更に手掛かりが得られる。

対象および方法

データ

調査対象者は放影研成人健康調査(AHS)集団構成員²⁸である。成人健康調査は、広島・長崎の被爆者における原爆放射線被曝の長期的な医学的および生物学的影響を追跡調査するために、放影研の前身である原爆傷害調査委員会(ABCC)により1958年に開始された。ABCC-放影研臨床スタッフによる2年に1度の検診には20,000人に参加を呼びかけた。この調査では、総血清コレステロール値、血圧、身長および体重などの様々な身体計測を含めた臨床的評価および通常の臨床検査が実施された。

今回の調査集団は、1958年から1986年までに少なくとも1度は成人健康調査の検診を受けたことがあり、ABO式血液型が決定された16,505人から抽出した。被爆時に広島・長崎いずれの都市にもいなかった3,301人(NIC)、1986年線量推定体系(DS86)に基づく線量

推定値が計算されていない2,402人、胎内被爆者762人、ならびに身長と体重のいずれかのデータがない202人は本調査から除外した。市内不在者は、1974年以降、追跡調査が中止されたので除外した。各対象者の身長および体重を診療録に照らしてチェックすることはできないので、20歳以後の(成長を考慮して)当人の平均を、身長では±5 cm、体重では25%以上逸脱している測定値は不明と記録した。その結果、すべての検診で身長、体重およびコレステロールに関する完全なデータが欠けている102人を除外した。放射線の影響は、別途作成中の報告書²⁹のテーマであるので、これとの混同を避けるために、本解析は0線量群の4,162人に限定した。総血清コレステロール値に悪影響を及ぼす可能性のある特定の疾患に罹患している患者も除外した。すなわち、ネフローゼ症候群4例、胆嚢および胆管疾患40例、副腎疾患10例、急性肝炎26例、ならびに栄養性消耗症3例である。これらの疾患は、成人健康調査のいずれかの検診で診断された疾患に与えられた国際疾病分類(ICD)の3桁コードにより確認した。家族性高コレステロール血症は、ICDコードのみの確認は信頼できないと思われたので、除外しなかったが、この症例がデータ全体に占める割合はわずかである。残りの4,079人を本解析の対象者とした。

臨床測定

標準的な赤血球凝集反応および血漿凝集素検査によって血液型を決定した。亜型A₁およびA₂についても決定したが、A₂の例数が少ないため本報では考慮しなかった。非絶食時総血清コレステロール値は1958-65年の期間(成人健康調査第1-第4検診周期)にKendall-Abell法により決定され、その後Technicon自動分析機を用いた3種類の手法、すなわち、1965-66年(第4周期)のN24法、1966-67年(第4および第5周期)のN37A法、ならびに1967-86年(第5-第14周期)のN24A法により追跡測定が行われた。第15周期以後、これらの自動分析機の代わりに日立7050モデルを使用した。長崎では自動分析機がなかったので、凍結血液標本を広島に送り、分析を行った。異なるコレステロール測定法を比較可能なものにするため標準化を行った。このために、同一血液標本を用いて五つの測定系でコレステロール値を測定し、以前の四つの方法で得られた測定値と自動分析機7050で得られた測定値との関係を示す式を推定した。得られた式は $Y_{\text{adj}} = c \times y_{\text{orig}}$ である。ここで、 Y_{orig} は以前の四つの方法の内の一つで得られたコレステロール測定値であり、 Y_{adj} は、Kendall-Abell、N24、N37AおよびN24A法に対する補正係数 $c = .9513, .7991, .8842$ および $.9468$ をそれぞれ用いて、自動分析機7050の値を基準にした調整値である。

統計的解析

使用した基本的解析法は、連続測定データ用の成長曲線法である。成長曲線を特別のケースとして含むLairdおよびWare³⁰の混合モデルを使用してモデル化および推定を行った。統計的方法の詳細な説明は付録に示したが、以下に簡単に説明する。

コレステロール値(の自然対数)と年齢の線形-二次関数を関連させる回帰様関数を得るという点で、成長曲線法は従来の回帰法と類似している。しかし、対象者1人当たり従属変数が一つだけの回帰法とは異なり、観察単位は、各対象者における一群の複数のコレステロール測定値である。各対象者について、コレステロール値と年齢との関係を示す回帰様関数(反復測定値間の相関関係を考慮)を用いて、対象者別「成長曲線」としてコレステロール値変化の年齢依存性パターンをモデル化した。個人別成長曲線は、平均成長曲線を持つ集団の任意観察値とみなすことができ、集団曲線の付近で任意に変化する。本解析の目的は、個人別成長曲線の情報を用いてこの集団成長関数を推定することである。性別およびABO表現型などの因子は集団成長曲線の形状に影響を及ぼすと考えられるので、これらの因子についても検討した。この結果得られた適切な因子、すなわち共変数を組み込んだ集団成長曲線は、回帰関数に類似している。

本解析の主要共変数はABO表現型であるが、横断的調査によってコレステロール値に影響を及ぼすことが判明している性別および出生コホートなどの特定の人口統計学的因子についても検討した。共変数には、CITYおよびSEX(広島・長崎、男性・女性)のそれぞれについて0:1の二値変数としてコード; AGE(年齢); AGE^2 ; ABO式血液型表現型A(1, 0, 0), B(0, 1, 0), AB(0, 0, 1)およびO(0, 0, 0)を区別する三つの指標変数(I_A, I_B, I_{AB}); YOB-45(出生コホートを区別する出生年マイナス1945); 各コレステロール測定値と同時に得られる身体質量指数BMI, すなわち体重(kg)/身長²(cm) × 100, などが含まれる。

検討対象となるすべての共変数ならびに相互作用を含むコレステロール成長関数モデルを用いて解析を開始した。モデル中の係数はREMLプログラム³¹を用いて推定した。簡潔なモデルにするため、後退段階アルゴリズムを用いて最も有意性の低い項から順に非有意項を除外した。各段階で第一種の誤差.05を用いて推定値の漸近的正規性に基づくテストを行った。モデルの選択手順についての詳細を付録に示した。

結 果

対象者1人当たりのコレステロール測定回数は1-13回であった(中央値 = 7)。1945年における年齢すなわち出生コホートの分布は、ABO式血液型表現型および広島・長崎両市の男女間で比較が可能であった(表1)。男性について得られたコレステロール測定値の年齢範囲は20-92歳(出生年1887-1945年)であり、女性では19-86歳(出生年1894-1944年)であった。表2に示した対立遺伝子および表現型頻度の最大尤度推定値は、MENDELプログラム³²を用いて得た。Hardy-Weinberg平衡からの逸脱は認められず($\chi^2 = 2.28, df = 1$)、種々のABO遺伝子型が無作為に組み合わせられていること、また、世代間で遺伝子型頻

表1. 1945年における平均年齢±SD (n)

都 市	性 別	ABO表現型			
		A	B	O	AB
広 島	男 性	27.8 ± 15.1 (386)	27.6 ± 15.4 (175)	27.4 ± 15.3 (274)	24.9 ± 14.5 (108)
	女 性	28.1 ± 14.1 (675)	26.4 ± 14.8 (371)	27.2 ± 13.3 (489)	27.0 ± 13.9 (177)
長 崎	男 性	22.7 ± 13.8 (234)	21.4 ± 13.5 (137)	25.1 ± 15.3 (175)	22.4 ± 13.7 (82)
	女 性	20.84 ± 12.9 (338)	21.7 ± 10.7 (170)	21.5 ± 12.1 (203)	21.5 ± 13.1 (85)

表2. 広島・長崎の男女におけるABO式血液型対立遺伝子および表現型頻度の最大尤度推定値(MLE)

対立遺伝子	MLE ± SD	表現型	MLE	n
A	0.3001 ± 0.0056	A	0.4010	1633
B	0.1749 ± 0.0044	B	0.2162	853
O	0.5250 ± 0.0061	O	0.2787	1141
		AB	0.1041	452

度に変化はないことが示唆された。推定頻度は両市間で比較可能であり(データ示さず), 日本各地から得られた値(対立遺伝子Aは .243-.309, Bは .082-.229, Oは .492-.675)³³と類似している。

コレステロール成長曲線について考慮した完全なモデルは以下のとおりである。

$$\begin{aligned}
 E[\ln(y_{ij})] = & \alpha_0 + \alpha_1(c_i) + \alpha_2(s_i) + \alpha_3(I_{Ai}) + \alpha_4(I_{Bi}) + \alpha_5(I_{ABi}) + \alpha_6(z_i) + \alpha_7(b_{ij}) + \alpha_8(s_i \times b_{ij}) \\
 & + \alpha_9(z_i \times b_{ij}) + \alpha_{10}(s_i \times z_i) + \alpha_{11}(a_{ij}) + \alpha_{12}(c_i \times a_{ij}) + \alpha_{13}(s_i \times a_{ij}) + \alpha_{14}(I_{Ai} \times a_{ij}) \\
 & + \alpha_{15}(I_{Bi} \times a_{ij}) + \alpha_{16}(I_{ABi} \times a_{ij}) + \alpha_{17}(z_i \times a_{ij}) + \alpha_{18}(b_{ij} \times a_{ij}) + \alpha_{19}(s_i \times b_{ij} \times a_{ij}) \\
 & + \alpha_{20}(z_i \times b_{ij} \times a_{ij}) + \alpha_{21}(s_i \times z_i \times a_{ij}) + \alpha_{22}(a_{ij}^2) + \alpha_{23}(c_i \times a_{ij}^2) \\
 & + \alpha_{24}(s_i \times a_{ij}^2) + \alpha_{25}(I_{Ai} \times a_{ij}^2) + \alpha_{26}(I_{Bi} \times a_{ij}^2) + \alpha_{27}(I_{ABi} \times a_{ij}^2) + \alpha_{28}(z_i \times a_{ij}^2) \\
 & + \alpha_{29}(b_{ij} \times a_{ij}^2) + \alpha_{30}(s_i \times b_{ij} \times a_{ij}^2) + \alpha_{31}(z_i \times b_{ij} \times a_{ij}^2) + \alpha_{32}(s_i \times z_i \times a_{ij}^2), \quad (1)
 \end{aligned}$$

ここで、各項は、 i 番目の対象者の年齢 j における、 y_{ij} = 総血清コレステロール値, a_{ij} = AGE, b_{ij} = BMI, c_i = CITY, s_i = SEX, z_i = YOB - 1945 をそれぞれ示している。最終モデルは20個の有意なパラメータを含む。その推定値を表3に示した。

成長曲線に対するABOの影響 成長関数の形状はABO表現型とともに変化するようにしたが、表現型指標 I_B , I_{AB} , ならびにこれらと AGE および AGE^2 との相互作用は最初の段階で除外された。 I_B および I_{AB} の影響がゼロの場合、すなわち $H_0: \alpha_4 = \alpha_{15} = \alpha_{26} = 0$ ならびに $H_0: \alpha_5 = \alpha_{16} = \alpha_{27} = 0$ のときの自由度3の χ^2 検定の有意水準は、それぞれ.77および.62であった。他方、 I_A の影響($H_0: \alpha_3 = \alpha_{14} = \alpha_{25} = 0$)についての同様な検定は極めて高い有意性を示した($p < .00001$)。有意でない項を順次除外していくと、基準レベル(α_3)での I_A の係数のみが最終モデルに残った($p = .027$)。これは、表現型Aの集団成長曲線がA以外のものと異なっていること、また、AB, BおよびOでは、成長関数に有意な差はないことを示唆している。

表3. 総血清コレステロール値成長曲線における統計学的に有意な係数の推定値

変数	α	SD	z
Intercept	3.68	0.079	46.44
CITY	0.084	0.039	2.16
SEX	0.37	0.064	5.84
I_A	0.025	0.0052	4.89
YOB-45	-0.022	0.0016	-13.36
BMI	3.60	0.30	12.11
SEX \times BMI	-0.63	0.11	-5.53
SEX \times (YOB - 45)	-0.017	0.0028	-5.97
AGE	0.040	0.0024	16.50
CITY \times AGE	-0.0050	0.0015	-3.39
SEX \times AGE	-0.014	0.0027	-5.31
BMI \times AGE	-0.039	0.0065	-6.02
(YOB - 45) \times BMI \times AGE	0.0010	0.00020	4.87
SEX \times (YOB - 45) \times AGE	0.00074	8.75×10^{-5}	8.40
AGE ²	-0.00031	2.45×10^{-5}	-12.82
CITY \times AGE ²	4.56×10^{-5}	1.36×10^{-5}	3.34
SEX \times AGE ²	0.00021	3.16×10^{-5}	6.77
(YOB - 45) \times AGE ²	3.31×10^{-6}	4.09×10^{-7}	8.10
BMI \times AGE ²	-1.0×10^{-5}	2.82×10^{-6}	-3.54
SEX \times (YOB - 45) \times AGE ²	-7.81×10^{-6}	7.74×10^{-7}	-10.09

成長曲線に対する表現型 A の影響 I_A と AGE および AGE^2 との相互作用 (α_{14} および α_{25}) は有意ではなく、検討した年齢範囲においては、表現型 A の期待されるコレステロール成長曲線の一般的形状は、比例して上方に移動していることを除いて、A 以外の場合の形状と差異がないことが示唆された。20 歳から 90 歳までの年齢範囲についてコレステロール値が得られたが、80 歳以上では、コレステロール・データのある例は 30 例以下なので、年齢と 80 歳以上の I_A との相互作用を確認するための適切なデータではないかもしれない。他方、20 代から 12 年間にわたってコレステロール測定を平均 6 回受けた者が 450 人以上いるので、年齢が低い方についてはデータの規模には問題ないと思われる。したがって、コレステロール値は表現型 AB, B および O 型を併合したのものよりも A 型の方が平均して高い傾向にあり、また、この傾向は成人初期から高齢に至るまで、すなわち、20 歳から約 80 歳まで、それぞれの曲線は交差することなく維持される。女性の四つの出生コホートについて、BMI の定数を 0.203 と仮定した場合(例えば、体重 50 kg, 身長 1.57 m)の推定集団成長曲線を図 1 に示した。表現型 A の平均コレステロール値は、生涯の大部分を通して、それ以外の表現型よりも約 $2.5 \pm 0.005\%$ すなわち一般的に 4 mg/dL ほど高いと推定される。成長曲線解析の結果と比較するために、1905 年から 1914 年までに生まれた女性 454 人について、到達年齢別平均コレステロール値を図 2 に示した。表現型 A の平均コレステロール値は、それ以外の表現型よりも、全体的に約 5 mg/dL ほど高い。

性別、出生コホートおよび BMI の成長曲線の形状に対する影響 表現型 A およびそれ以外の表現型における成長曲線の形状が、SEX, YOB - 45 および BMI の変化によって変化するかどうかを検討するために、それらと I_A , $I_A \times AGE$ および $I_A \times AGE^2$ の相互作用を最終モデルに含め、自由度 3 の χ^2 検定によって各項の有意性を同時に検証した。いずれの項も統計的に有意ではなかった(性別, YOB - 45, BMI に起因する影響のそれぞれについて、 $p = .32, .16, .37$)。このように、表現型 A における平均コレステロール値は、性別, BMI および出生年に関係なく、どの年齢においても A 型以外の表現型よりも高い。性別に依存するコレステロール成長関数の実際の形状を除いて、男性における表現型 A とそれ以外の表現型の間の相対的差異は、図 1 に示した女性の場合と類似していると考えられる。

従来の解析結果との比較 成長曲線解析の結果を従来の方法の場合と比較した。ABO 式血液型の四つの表現型について、成人健康調査の 14 周期のそれぞれにおける、平均年齢について調整した平均コレステロール値を表 4 に示した。平均値の均等性を比較する有意水準は共変数解析に基づいて決定した。14 の検診周期中、9 周期において、四つの ABO 表現型で平均コレステロール値に差異があり、最高値はだいたい A 型に認められたが、その他の血液型では順位は一定でなかった。

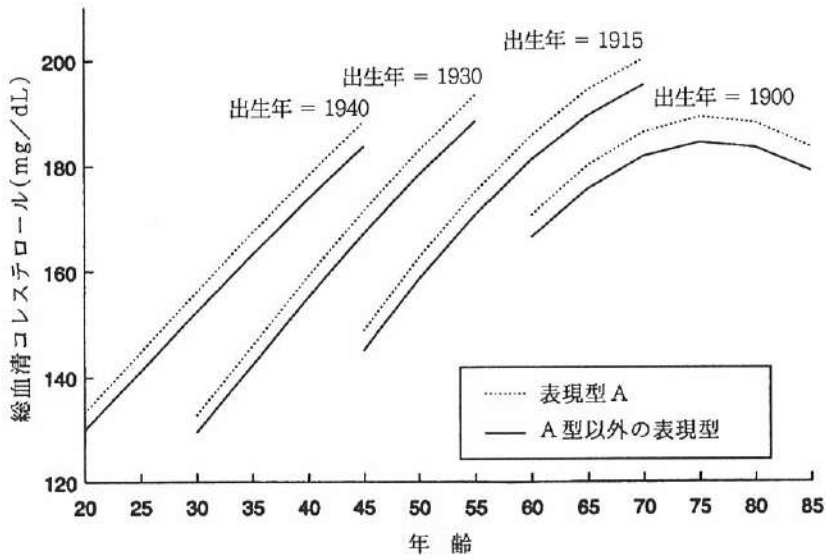


図1. 表現型Aおよびそれ以外の表現型の女性における総血清コレステロール成長曲線, 体重 50 kg, 身長 1.57 m

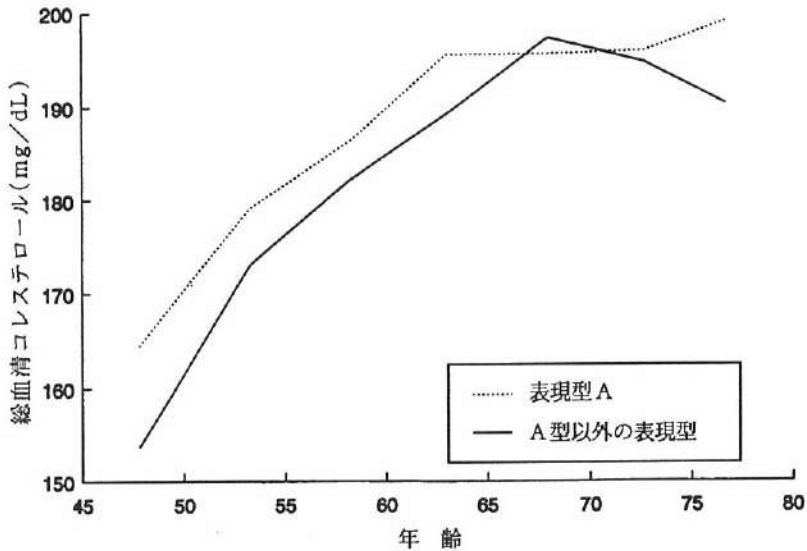


図2. 1905年から1914年に生まれた女性454人における平均総血清コレステロール

実際に差異を示す表現型を突き止めるために, AGE , AGE^2 , SEX および表現型の指標である I_A , I_B および I_{AB} に対して各検診周期における $\ln(\text{コレステロール})$ を回帰推定した。各表現型指標の有意水準を表5に示した。14回の回帰分析中9回, 有意な I_A 項が認められたことから, ABO式血液型の各表現型に差異があることが示唆され, 表現型Aは, その他の表現型,

表4. 平均年齢により調整した平均総血清コレステロール値^a ± SD (n),
広島・長崎, 男性・女性

ABO表現型						
検診周期	p値 ^b	A	B	AB	O	平均年齢
1	.07	152.3 ^c ± 33.2 (562)	149.2 ± 32.4 (289)	149.8 ± 32.6 (144)	146.8 ± 32.9 (411)	47.9
2	.67	149.6 ± 33.0 (407)	148.1 ± 32.7 (230)	149.8 ± 33.0 (119)	146.8 ± 32.4 (291)	43.3
3	<.01	160.9 ± 37.4 (353)	151.1 ± 35.2 (165)	151.7 ± 35.3 (79)	151.5 ± 35.3 (198)	44.5
4	.01	155.4 ± 32.2 (881)	150.0 ± 31.1 (449)	151.4 ± 31.4 (227)	151.3 ± 31.3 (575)	47.6
5	.04	164.2 ± 34.6 (1198)	160.4 ± 33.8 (595)	160.3 ± 33.8 (317)	160.7 ± 33.9 (825)	48.9
6	.03	167.9 ± 31.7 (1088)	166.4 ± 31.4 (553)	165.8 ± 31.3 (290)	163.4 ± 30.9 (768)	50.9
7	.02	177.1 ± 34.0 (507)	172.4 ± 33.1 (259)	168.4 ± 32.3 (125)	172.4 ± 33.1 (328)	58.8
8	.16	188.1 ± 35.7 (619)	183.9 ± 34.9 (302)	182.2 ± 34.6 (150)	185.7 ± 35.2 (427)	60.4
9	.14	181.4 ± 33.7 (985)	177.8 ± 33.1 (502)	177.5 ± 33.0 (252)	178.9 ± 33.3 (684)	55.0
10	.15	182.0 ± 33.4 (997)	179.1 ± 32.9 (508)	177.7 ± 32.6 (275)	179.6 ± 33.0 (695)	56.2
11	<.01	184.8 ± 34.6 (1098)	179.5 ± 33.6 (590)	180.1 ± 33.8 (314)	180.0 ± 33.7 (773)	57.0
12	.01	183.8 ± 34.3 (1086)	179.4 ± 32.5 (575)	181.0 ± 33.8 (320)	178.6 ± 33.4 (766)	58.4
13	.04	187.8 ± 35.4 (570)	183.0 ± 34.6 (570)	185.8 ± 35.1 (303)	184.4 ± 34.9 (721)	59.8
14	<.01	189.1 ± 35.0 (1026)	182.3 ± 33.7 (539)	186.6 ± 34.6 (308)	183.0 ± 33.9 (698)	61.4

^a表現型 k における調整平均コレステロール値 $\mu_k = \ln(\overline{chol}_k) - \beta_1(\overline{AGE}_k - \overline{AGE}) - \beta_2(\overline{AGE}_k^2 - \overline{AGE}^2)$
ここで, \overline{AGE} および \overline{AGE}^2 は全体平均である。

^b調整平均値の相等性の有意水準。

^c自然対数変換を解析に用いた。平均値は元の尺度に変換し直した。標準誤差は, 次の式に基づく近似値である。 $\{\exp(\mu_k) \times [\exp(SD_k)] - \exp(\mu_k) / [\exp(SD_k)]\} / 2$, ここで, SD_k は自然対数尺の SD である。

B, O および AB を併合したものと異なることが分かった。実際, I_B および I_{AB} の係数はいずれも統計的に有意ではなく, A を除く三つの血液型では差異は明瞭ではないことを示唆した。また, I_A の係数推定値は, 表現型 A のコレステロール値が平均約 3% 増加していることを示

峻した。

従来の解析の結果は、成長曲線解析法と全般的に一致している。しかし、従来の方法では、年齢とともに変化するコレステロール値のパターンにABO式血液型の多形性が与える経時的な影響を直接的に評価することはできないし、また、ABO式血液型の表現型、あるいは他の共変数と個々のコレステロール値の動向とのより複雑な関連性を究明するには、不適切であることは明瞭である。

考 察

本報の目的は、ABO式血液型の表現型と総血清コレステロール値との関連性における人種間差について検討し、この関係についていくつかの初期の調査で認められた結果の不一致が、

表 5. AGE, AGE², SEX, I_A, I_B, I_{AB} に対する ln(コレステロール)の線形回帰における ABO表現型指標の有意水準、広島・長崎合計

検診周期	各指標のp値 ^a			I _A の係数推定値 ± SE
	I _A	I _B	I _{AB}	
1	0.01	0.38	0.31	0.037 ± 0.014
2	0.20	0.63	0.27	0.021 ± 0.016
3	< 0.01	0.96	0.91	0.060 ± 0.020
4	0.03	0.39	0.96	0.024 ± 0.011
5	0.03	0.83	0.99	0.021 ± 0.009
6	< 0.01	0.12	0.20	0.026 ± 0.009
7	0.10	0.72	0.30	0.022 ± 0.013
8	0.28	0.38	0.38	0.012 ± 0.012
9	0.16	0.48	0.72	0.013 ± 0.009
10	0.08	0.94	0.93	0.016 ± 0.009
11	< 0.01	0.71	0.68	0.026 ± 0.008
12	< 0.01	0.78	0.14	0.027 ± 0.008
13	0.03	0.53	0.31	0.019 ± 0.009
14	< 0.01	0.81	0.04	0.033 ± 0.009

^aABO表現型指標係数の有意水準。A型は(I_A, I_B, I_{AB}) = (1, 0, 0), B型は(0, 1, 0), AB型は(0, 0, 1), O型は(0, 0, 0)に相当する。

年齢の影響で説明できるか否かを調べることである。このために、広島・長崎の原爆被爆者集団から長期間にわたり収集されたコレステロール・データの解析を行った。その結果、調査した日本人集団において、ABO式血液型とコレステロールとの関係を認め、特に、表現型Aにコレステロール値の上昇を認めた。また、この関係は成人初期から後期まで持続することも分かった。表現型Aとそれ以外の表現型のコレステロール成長曲線は20歳から80歳までの間、交差しない。これらの結果は、性別、出生コホートまたはBMIの変化に依存しないと考えられる。

発表された文献を検討した結果、ABO式血液型と心臓血管疾患のリスク因子として認められている総血清コレステロールとの関係を、連続測定データ用の統計的方法を用いて解析したのは、本調査が最初であることが分かった。コレステロールの連続的測定データが利用できたので、成長曲線法を用いてコレステロール値における年齢依存性変化ならびにABO式血液型表現型の期待成長関数に対する長期的影響の特徴を示すことができた。成長曲線法を特例として含むLairdおよびWare³⁰の混合モデルを用いて、パラメータ推定ならびに仮説検定を行った。この方法は、各対象者の反復測定値の相関関係を考慮するので、時間依存性連続測定データの解析に適している。この統計的技法は、また、成人健康調査対象者から得られるその他の正規分布連続測定データの解析にも適しており、長期間にわたって得られたこのような測定値の特徴的パターンに対する放射線被曝の影響を究明する上で有用である。

混合モデルによって、連続測定データに及ぼす共変数の影響を一樣に評価することができる。これは、異なる時期に収集された非独立データに適用される共変数解析や回帰分析などのような、従来のあまり適切でない技法では不可能である。これらの方法によって各検診周期のコレステロール・データを解析した結果、14検定中9検定でABO式血液型に差異が認められ、残りの5検定では差異は認められなかった。成人健康調査対象者の来診状況が一定していないために、標本の構成、ひいては、解析結果が検診期間によって異なった。ABO式血液型に差異が認められなかった5回の検診のデータだけなら、この日本人集団についての我々の調査は、ABO式血液型とコレステロールとの関連性を示さず、人種間差異の仮説をより強く支持するものとなったであろう。これまでに白人以外の人種の調査が7回行われている。そのうち、東インド諸島の成人に関する調査が2回、^{12,13} 中国の新生児に関するものが1回、¹⁸ ブラジルの黒人および白人に関するものが1回、²³ アフリカ系アメリカ人児童に関するものが1回、¹¹ タイでの調査が1回、³⁴ アフリカ系アメリカ人青年の調査が1回²⁴である。最初の4回の調査では、表現型Aと総コレステロールの有意な増加との関連性は認められなかった。ただし、BanerjeeおよびSaha¹³は、東インド諸島の成人集団において、表現型Aにコレステロールの最高平均値を認めた(A = 173.9, O = 163.7, B = 161.9, AB = 158.3)。アフリカ系アメリカ人児童および青年にABO表現型の差異が示唆されたが、最高平均値は

O型およびB型に認められた。タイの食生活では脂肪の摂取が少なく、これが低コレステロール値に反映されているが、表現型Aとの関係は明瞭であった。一方、ブラジルの黒人もコレステロール値は低い、表現型Aとの関係は認められなかった。また、表4に示したように、1960年のFramingham調査⁷で平均年齢58歳の男女から得られた平均コレステロール値248 mg/dLよりも、今回調査した日本人集団のコレステロール値のほうが低い。Framingham調査の26年後の成人健康調査第14検診周期において、平均年齢61歳の対象者の平均コレステロール値が186 mg/dLにすぎないことを考慮すれば、両集団間の差は特に顕著である。このように、脂肪の摂取量が比較的少なく、コレステロール値の低い日本人集団においても、ABO式血液型とコレステロールとの関連性は明瞭であり、特に白人集団データで一貫して認められた表現型Aにおけるコレステロール値の増加も確認された。しかし一つの日本人集団で血液型とコレステロールとの関係が確認されたことで、この関係の存在を確実に示す証拠が得られたわけではないし、その他の非白人集団にこれが存在しない可能性がなくなるわけでもない。我々のデータの大きさと性格からして、初期の調査で血液型とコレステロールとの関係が認められなかったのは、人種間の差異や集団の総血清コレステロール値の低さではなく、横断的データに伴う標本抽出の変動が原因ではないかと考えられる。

以前の横断的調査は、コレステロール値の差異はA型とO型、O型以外とO型、A型とA型以外で顕著であることを示唆した。Georgeら²⁶は、対立遺伝子Aはコレステロール値を増加させ、Bは減少させると報告したが、これは、A型のコレステロール値はAB型よりも高く、AB、BおよびO型で明確な差異はないことを確認した我々の調査と同様の結果である。表現型Aと性別、出生年およびBMIの変化との間に相互作用が認められないことは、それぞれ男性と女性、また食習慣などの異なる出生コホートと関連する環境因子、あるいは身体の脂肪の割合の変化などによって、影響に差が現れることはないことを示唆している。BMIの変化は、ABO式血液型の表現型が身体計測変数に影響を及ぼさないことを意味せず、コレステロール値に対するABO表現型の影響がこの因子を通しては現われないことを示している。ABO表現型がBMIの変化に影響するか否かについては、ABO表現型とBMI成長曲線との関係を検討することにより評価すべきである。

我々の長期的なコレステロール・データの大きな長所は、検討対象である因子と連続測定値との長期的な相互関係をモデル化できることである。本調査で示されたように、表現型Aにおいて高コレステロール値が生涯維持されるという点は、「tracking」という現象で説明できる。研究者間でその定義は異なるが、trackingというのは、ある時期の特定個人の測定値は、その後もその測定値の集団分布上における百分位数の範囲内にとどまるという考え方に基づいている。³⁵ 集団内におけるコレステロールの期待動向が並行、すなわち、交差しない場合にtrackingは生ずる。³⁶ 本解析においては、総血清コレステロールのtrackingは、非

交差成長曲線を示し、表現型 A の期待コレステロール値は、20 歳から 80 歳までの年齢範囲において、それ以外の表現型に対して約 2.5 % の増加を示した。

青年期から成人期にかけての総血清コレステロールおよび収縮期血圧の tracking は Fox ら²⁷により提唱されたもので、彼らはこれらの CVD リスク因子がいずれも Bogalusa の青年集団の表現型 A で高値を示していることを発見した。tracking に関する我々の調査結果は、青年期を含まないが、早くも 20 歳ころから適用される。Garrison ら⁷は、表現型 A で認められる冠状動脈性心疾患 (CHD) の過剰を説明する上で、コレステロール因子は二次的な重要性しか持たないと考えた。すなわち、A 型とそれ以外の表現型とのコレステロールの差は極めて小さく、10 % の過剰をも説明できない (A 型 CHD の過剰が認められる西欧人集団の A 型対 O 型の相対発生率 1.3 - 2.0³³)。Garrison らは、A 型の影響はコレステロール・リスク因子とは独立して現れると結論付けている。実際、平均増加推定値は約 4 mg/dL にすぎなかった。しかし、ほとんどの CHD 例におけるコレステロール値の増加は、正常な非 CHD 分布と比べて、わずかなものにすぎない。³⁷ 更に、Fox ら²⁷が指摘したように、Framingham 心臓調査³⁷では、冠状動脈性疾患リスクがコレステロール値に伴って増加することだけでなく、収縮期血圧の増加など、その他のリスク因子が重なってリスクの増加を促進することが認められた。収縮期血圧の tracking は、Bogalusa 調査での青年に関する調査結果を成人にまで拡大することになり、CVD リスクが増加する成人期において表現型 A で高くなるもう一つの CVD リスク因子の増加を示している。主なアテローム誘発性リポ蛋白質³⁹である低濃度リポ蛋白コレステロールが表現型 A で増加していることから、^{7,24,26,38} A 型は、A 型とそれ以外の表現型についてこれまでに認められたリスク因子の平均値の差から示唆されるよりも、更に高い CVD 罹患性を有していると考えられる。また、成人健康調査第 8 周期で ABO 式血液型を血清学的に決定した男性 127 人および女性 104 人についてリポ蛋白質分画データを得ている。β リポ蛋白質分画の年齢、性、および A 型対非 A 型別の回帰分析は、表現型 A の β リポ蛋白値が約 6 % 増加 ($p = .052$, データ示さず) したことを示し、日本人集団においても、このリスク因子が上昇することを示す証拠をもう一つ提供した。これらリスク因子の tracking のために、更に、表現型 A の人は (表現型 A 以外の人よりも)、CVD のリスクがまだ低い年齢においてこの疾患に罹患しやすいことも分かった。総コレステロールと収縮期血圧が成人レベルに達したときに CVD リスクが著しく増加するので、表現型 A の罹患性の増加 (その一部は、コレステロール値および収縮期血圧値で示される) は、それが喫煙や左心室肥大により促進され、臨床的に有意なレベルに達するまでは現れないとの仮説を立てることができよう。

表現型 A における収縮期血圧上昇について現在得られている証拠は乏しいので、tracking は推論の域を出ない。より確実な答えを得るには、成人健康調査集団の収縮期血圧の連続デー

タを用いた解析など、更に検討を重ねる必要がある。日本人における表現型AのCHDリスクが増加しているかどうかは、現在のところ不明である。しかし、総血清コレステロールおよび収縮期血圧は成人健康調査集団でもリスク因子であるので、⁴⁰⁻⁴² この集団について、ABO式血液型遺伝子座位とその他のリスク因子との関係に関するCVD発生率調査を実施することは、CVD発生における同座位の役割を究明する上で有用であろう。

ABO表現型の多型性と総血清コレステロール値との関連性は、この定量的特性のコントロールに遺伝的関与があることを示唆する。ABO式血液型遺伝子座位自身、または、その他の密接に関連した座位がこの変動性の原因と考えられる。Gm, ハプトグロビン, 分泌型など、その他の独立した遺伝子座位との関連性についての報告²²では、ABO式血液型遺伝子座位が、総血清コレステロール値の変動性に関係する一つの座位にすぎないこと、また、この特性が多遺伝子性であることが示唆されている。これらのマーカーを更に検討することによって、CVDリスク因子の増加に関連するマーカーの組み合わせに基づいた表現型を同定できるかもしれない。ABO式およびその他の血液型は一定しており、容易に決定できるので、血液型との関連性とリスク因子trackingによって、CVDに対する罹患性が高い集団を早期に発見できると考えられ、疾患予防の有用な手段となり得る。

参考文献

1. Morton NE: Genetic markers in atherosclerosis: A review. *J Med Genet* 13:81-90, 1976
2. Hall R, Bunch GA, Humphrey CS: The frequencies of ABO blood groups and of secretors of ABH group substances in peripheral arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 14:241-6, 1971
3. Kingsbury KJ: Relation of ABO blood groups to atherosclerosis. *Lancet* 1:199-203, 1971
4. Weiss NS: ABO blood type and arteriosclerosis obliterans. *Am J Hum Genet* 24:65-70, 1972
5. Allan TM: ABO blood-groups and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 18:347-51, 1973
6. Morris T, Bouhoutsos J: ABO blood groups in occlusive and ectatic arterial disease. *Br J Surg* 60:892-3, 1973
7. Garrison RJ, Havlik RJ, Harris RB, Feinleib M, Kannel WB, Padgett SJ: ABO blood group and cardiovascular disease - the Framingham study. *Atherosclerosis* 25:311-8, 1976
8. Cronenwett JL, Davis JT, Garrett HE: ABO blood group and serum lipids in female atherosclerosis. *J Cardiovasc Surg* 24:658-61, 1983
9. Platt D, Muhlberg W, Kiehl L, Schmitt-Ruth R: ABO blood groups system, age, sex, risk factors and cardiac infarction. *Arch Gerontol Geriatr* 4:241-9, 1985
10. Hrby J, Gyrtup HJ, Grande P, Vestergaard A: Relation of serum lipoproteins and lipids to the ABO blood groups in patients with intermittent claudication. *J Cardiovasc Surg* 30:533-7, 1989
11. Hames CG, Greenberg BG: A comparative study of serum cholesterol levels in school children and their possible relation to atherogenesis. *Am J Public Health* 51:374-85, 1961

12. Srivastava BK, Sinha AS: Observations on serum cholesterol and lipid phosphorus levels in relation to ABO blood groups. *J Indian Med Assoc* 47:261-2, 1966
13. Banerjee B, Saha N: Blood groups and serum cholesterol. *Lancet* 2:961, 1969
14. Oliver MF, Cumming RA, Geizerova H, Heady JA: Serum cholesterol and ABO and Rhesus blood-groups. *Lancet* 2:605-7, 1969
15. Langman MJS, Elwood PC, Foote J, Rylie DR: ABO and Lewis blood-groups and serum-cholesterol. *Lancet* 2:607-9, 1969
16. Beckman L, Olivecrona T, Hernell O: Serum lipids and their relation to blood groups and serum alkaline phosphatase isozymes. *Hum Hered* 20:569-79, 1970
17. Medalie JH, Levine C, Neufeld H, Riss E, Dreyfus F, Papier C, Goldbourt U, Kahn H, Oron D: Blood-groups, cholesterol, and myocardial infarction. *Lancet* 2:723, 1970
18. Saha N, Banerjee B: Blood groups and serum cholesterol. *Lancet* 1:969, 1971
19. Hagerup L, Hansen PF, Skov F: Serum-cholesterol, serum-triglyceride and ABO blood groups in a population of 50-year-old Danish men and women. *Am J Epidemiol* 95:99-103, 1972
20. Wakely EJ, Langman MJS, Elwood PC: Blood group A sub-groups and serum cholesterol. *Cardiovasc Res* 7:679-83, 1973
21. Fraser GR, Volkers WS, Bernini LF, De Greve WB, Van Loghem E, Meera Khan P, Nijenhuis LE, Veltkamp JJ, Vogel GP, Went LN: A search for associations between genetical polymorphic systems and physical, biochemical and haematological variables. *Hum Hered* 24:424-34, 1974
22. Sing CF, Orr JD: Analysis of genetic and environmental sources of variation in serum cholesterol in Tecumseh, Michigan. III. Identification of genetic effects using 12 polymorphic genetic blood marker systems. *Am J Hum Genet* 28:453-64, 1976
23. Colonia VJ, Roisenberg I: Investigation of association between ABO blood groups and coagulation, fibrinolysis, total lipids, cholesterol and triglycerides. *Hum Genet* 48:221-30, 1979
24. Fox MH, Webber LS, Srinivasan SR, Thurmon TF, Berenson GS: ABO blood group association with cardiovascular risk factor variables. I. Serum lipids and lipoproteins-The Bogalusa Heart Study. *Hum Biol* 53:411-37, 1981
25. Borecki IB, Elston RC, Rosenbaum PA, Srinivasan SR, Berenson GS: ABO associations with blood pressure, serum lipids and lipoproteins, and anthropometric measures. *Hum Hered* 35:161-70, 1985
26. George VT, Elston RC, Amos CI, Ward LJ, Berenson GS: Association between polymorphic blood markers and risk factors for cardiovascular disease in a large pedigree. *Genet Epidemiol* 4:267-75, 1987
27. Fox MH, Webber LS, Thurmon TF, Berenson GS: ABO blood group association with cardiovascular risk factor variables II. Blood pressure, obesity, and their anthropometric covariables-The Bogalusa Heart Study. *Hum Biol* 58:549-84, 1986
28. Hollingsworth JW, Beebe GW: ABCC-JNIH Adult Health Study: Provisional research plan. ABCC TR 9-60
29. Yamada M, Wong FL, Sasaki H, Kodama K: Radiation effects on the growth curve of the total serum cholesterol levels in the Adult Health Study, 1956-86. RERF TR in preparation
30. Laird NM, Ware JH: Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics* 38:963-74, 1982

31. Cook N: A FORTRAN program for random-effects models. Technical report. Cambridge, Mass, Harvard School of Public Health, Dept. of Biostatistics, 1982
32. Lange K, Boehnke M, Weeks D: Program for Pedigree Analysis (MENDEL). Department of Biomathematics, University of California at Los Angeles School of Medicine, and Dept. of Biostatistics, University of Michigan School of Public Health, Ann Arbor, 1986
33. Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K: *Blood Groups and Disease*. Oxford, Oxford University Press, 1976
34. Platz G: Serum-Cholesterin, ABO-Blutgruppen und Hamoglobintyp. Beitrag zur Frage der genetischen Beeinflussung der Serum-Cholesterinkonzentration. *Humangenetik* 10:318-28, 1970
35. Ware JH, Wu MC: Tracking: Prediction of future values from serial measurements. *Biometrics* 37:427-37, 1981
36. Crowder MJ, Hand DJ: *Analysis of Repeated Measures*. New York, Chapman and Hall, 1990. p. 141
37. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T: Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann Intern Med* 90:85-91, 1979
38. Polychronopoulou A, Miras CJ, Trichopoulos D: Lipoprotein types, serum cholesterol, and ABO blood groups. *Br J Prev Soc Med* 28:60-2, 1974
39. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB: The prediction of coronary heart disease by high-density and other lipoproteins: An historical perspective. In *Hyperlipidemia: Diagnosis and Therapy*. Ed by Rifkind BM, Levy RI. New York, Grune and Stratton, 1977. pp. 71-8
40. Prentice RL, Shimizu Y, Lin C, Peterson AV, Kato H, Mason MW, Szatrowski TP: Serial blood pressure measurements and cardiovascular disease in a Japanese cohort. *Am J Epidemiol* 116:1-28, 1982 (RERF TR 22-81)
41. Szatrowski TP, Peterson AV, Shimizu Y, Prentice RL, Mason MW, Fukunaga Y, Kato H: Serum cholesterol, other risk factors, and cardiovascular disease in a Japanese cohort. *J Chronic Dis* 33:569-84, 1984 (RERF TR 3-82)
42. Barlow WE, Kodama K, Kato H: Risk factors for myocardial infarction and angina pectoris in a Japanese cohort, 1958-78. RERF TR 8-84
43. Paterson L, Roab G: REML in medical surveys: The Edinburg Lead Study. *Biometric Bull* 6(3):5-6, 1989

付 録

LairdおよびWare³⁰の混合モデルは、成長曲線解析の観点から説明できる。この方法の方が我々の目的に適している。というのは、連続測定データ解析の基本的方法が、時間依存性変量の特徴づけを目的とし、成長曲線法を用いるからである。混合モデルは成長曲線法を一般化したものと考えることができる。今回の解析は、混合モデルにおけるパラメータ推定のために作成されたコンピュータ・プログラムを用いて行ったので、このモデルと成長曲線法との関係の概略を説明することによって、これらを使用した動機と理由を示すことができる。今回の解析対象であるコレステロール・データへの応用を例として挙げる。成人健康調査のその他の連続測定データについて将来同じような調査をする場合、以下の説明が参考となるであろう。

LairdおよびWareの混合モデル

i 番目の対象者について、 y_i は測定値の $n_i \times 1$ ベクトルを示す。次の成長モデルによって、 y_i は、 n_i 回の検診での時間依存共変量と関係づけられているものと仮定する。

$$y_i = Z_i \beta_i + e_i, \quad i = 1, \dots, m$$

ここで、 Z_i は時間依存共変量の既知の $n_i \times q$ 計画行列であり、 β_i は成長パラメータの $q \times 1$ ベクトル、 e_i は誤差の $n_i \times 1$ ベクトルである。対象者全員について共通の成長モデルを仮定する。しかし、 β_i の値は各対象者ごとに独特のものとし、 $Z_i \beta_i$ が i 番目の対象者の成長曲線を決定する。 β_i および e_i は互いに独立に、それぞれ $N(A_i \alpha, D)$ と $N(0, \sigma^2 I_i)$ に従ってランダムに分布すると仮定する。 A_i は β_i と α との線形関係を示す時間に依存しない共変量の既知の $q \times p$ 計画行列、 α は固定パラメータの $p \times 1$ ベクトル、 D は未知のパラメータの $q \times q$ 分散行列、 I_i は $n_i \times n_i$ 恒等行列である。対象者内誤差がそれぞれ独立していると仮定していることに注意する。

その結果、 $\beta_i = A_i \alpha + b_i$ となり、ここで b_i は i 番目の対象者における成長パラメータの全体平均からの逸脱のベクトルで、 $N(0, D)$ として分布する。したがって、以下のようなになる。

$$\begin{aligned} y_i &= Z_i \beta_i + e_i \\ &= Z_i (A_i \alpha + b_i) + e_i \\ &= Z_i A_i \alpha + Z_i b_i + e_i \end{aligned} \quad (\text{A.1})$$

$$= X_i \alpha + Z_i b_i + e_i, \quad i = 1, \dots, m \quad (\text{A.2})$$

ここで、 X_i は既知の $n_i \times p$ 計画行列である。 $b_i = \beta_i - A_i\alpha$ であるから、 $Z_i b_i$ は i 番目の対象者における成長曲線の全体平均からの逸脱をモデル化したものである。また、次のようになる。

$$E(y_i) = X_i\alpha,$$

$$\text{Var}(y_i) = \sigma^2 I_i + Z_i D Z_i'$$

特定対象者における誤差は、対象者間誤差 $Z_i b_i$ と対象者内誤差 e_i から成る。 $\text{Var}(y_i)$ の誤差構造は、特定対象者における繰り返し測定値間の相関を考慮したものである。

式(A.2)は、LairdおよびWareの混合モデルであり、 α と b_i はそれぞれ固定効果パラメータとランダム効果パラメータのベクトルである。これは(A.1)の成長曲線式よりも一般的である。なぜなら、 $X_i = Z_i A_i$ という特別な構造が X_i に与えられず、 X_i は単に既知の $n_i \times p$ 計画行列として明示されるからである。対象者間で一定と考えられるものを固定効果パラメータとし、対象者ごとに変化するものをランダム効果パラメータとする。成長曲線の観点からすれば、 $Z_i A_i \alpha$ および $X_i \alpha$ は同一集団において一定の平均成長関数をモデル化し、 $Z_i b_i$ は特定対象者の母集団成長関数からの逸脱をモデル化したもので、対象者間でランダムに変化する。モデルを明示することによって、効果はこれらの固定またはランダムのいずれか一つまたは両方により構成される。

未知の分散成分、すなわち、 σ^2 および独特な構成要素Dの推定値を、固定およびランダム効果パラメータとその標準誤差の推定値とともに、REMLプログラム³¹を用いて算出できる。各対象者について、 y_i 、 X_i および Z_i を入力する。分散成分推定値は制限最大尤度(REML)推定⁴³であり、これは、固定およびランダム効果の同時推定の際には偏りを生ずる通常の最大尤度推定よりも優れている。ランダム効果の推定値は経験的Bayes推定量である。推定は漸近的正規性に基づく。

本解析への応用

n_i ($n_i = 1, \dots, 13$, $i = 1, \dots, 4079$)回の成人健康調査から得た対象者 i の一連の総血清コレステロール測定値の自然対数を y_i で表す。自然対数を用いたのは、横断的解析におけるこの変換によりコレステロール分布が適切に正規化されたためである。成長曲線モデルを用いれば、特定対象者の y_i を、以下の成長関数によって適切に記述できると仮定する。

$$y_{ij} = \beta_{0i} + \beta_{1i}(AGE_{ij}) + \beta_{2i}(AGE_{ij}^2) + \beta_{3i}(BMI_{ij})$$

$$+ \beta_{4i}(BMI_{ij} \times AGE_{ij}) + \beta_{5i}(BMI_{ij} \times AGE_{ij}^2) \quad (A.3)$$

ここで、 $j = 1, \dots, n_i$ である。したがって、 $q = 6$ 、 D は 6×6 の行列であり、また、 Z_i は $n_i \times 6$ の行列で第一列が1、第二列が AGE 、第三列が AGE^2 、というようになる。 β_i のパラメータと $CITY$ 、 SEX 、 I_A 、 I_B 、 I_{AB} 、 $YOB - 45$ 、および $SEX \times YOB - 45$ の相互作用との関係について以下のような線形関係を仮定する。

$$\begin{aligned}
 \beta_{0i} &= \alpha_0 + \alpha_1(CITY_i) + \alpha_2(SEX_i) + \alpha_3(I_{Ai}) + \alpha_4(I_{Bi}) + \alpha_5(I_{ABi}) + \alpha_6(YOB - 45_i) + \alpha_7(SEX \times YOB - 45)_i + b_{0i} \\
 \beta_{1i} &= \alpha_8 + \alpha_9(CITY_i) + \alpha_{10}(SEX_i) + \alpha_{11}(I_{Ai}) + \alpha_{12}(I_{Bi}) + \alpha_{13}(I_{ABi}) + \alpha_{14}(YOB - 45_i) + \alpha_{15}(SEX \times YOB - 45)_i + b_{1i} \\
 \beta_{2i} &= \alpha_{16} + \alpha_{17}(CITY_i) + \alpha_{18}(SEX_i) + \alpha_{19}(I_{Ai}) + \alpha_{20}(I_{Bi}) + \alpha_{21}(I_{ABi}) + \alpha_{22}(YOB - 45_i) + \alpha_{23}(SEX \times YOB - 45)_i + b_{2i} \\
 \beta_{3i} &= \alpha_{24} + \alpha_{25}(SEX_i) + \alpha_{26}(YOB - 45_i) + b_{3i} \\
 \beta_{4i} &= \alpha_{27} + \alpha_{28}(SEX_i) + \alpha_{29}(YOB - 45_i) + b_{4i} \\
 \beta_{5i} &= \alpha_{30} + \alpha_{31}(SEX_i) + \alpha_{32}(YOB - 45_i) + b_{5i} \quad (A.4)
 \end{aligned}$$

α の大きさは 33×1 であり、 A_i は 6×33 、 $X_i = Z_i A_i$ は $n_i \times 33$ の行列である。更に、 $\beta_i \sim N(A_i \alpha, D)$ 、 $b_i \sim N(0, D)$ である。(A.3)の切片、 AGE および AGE^2 に対応する成長パラメータ β_{0i} 、 β_{1i} および β_{2i} は、時間に依存しない七つの共変数すべてにより修飾されるが、最初に推定するパラメータ数を最小限にするために、 BMI 、 $BMI \times AGE$ および $BMI \times AGE^2$ に対応するパラメータは、 $CITY$ 、 ABO 表現型ならびに性別とコホート状態の相互作用に対して不変であると仮定した。加齢過程に伴う BMI の変化よりも、経時的加齢に伴うコレステロール・レベルの変化に対する ABO 式血液型表現型の影響を調べるのが今回の主な目的であるので、これを反映した上記のモデルを特に選んだ。 I_A のみを含む単純なモデルを得た後、 $I_A \times BMI$ 、 $I_A \times BMI \times AGE$ および $I_A \times BMI \times AGE^2$ の各項をモデルに組み込み、 BMI 、 $BMI \times AGE$ および $BMI \times AGE^2$ に対する ABO の影響を検証した。 $CITY$ および $SEX \times (YOB - 45)$ の影響も同様に検証できるが、本報では行っていない。

成長関数に AGE 、 AGE^2 および BMI のみを含む予備解析では、 BMI の推定変動係数(BMI に対応する成長パラメータの推定対象者間分散の平方根を同パラメータの期待値の推定値で割ったもの)は.0003であるが、これに対して、年齢の場合には.8であった。このため、個人別 BMI 成長パラメータの対象者間変動が、その影響の大きさに比べて、年齢の場合よりも小さく、これをゼロとするのも不合理とは言えない。したがって、 BMI は固定効果のみから成ると仮定した。これは(A.3)の最後の2項にもあてはまるものと仮定し、 BMI 、 $BMI \times AGE$ および $BMI \times AGE^2$ に対応する D の対角および非対角成分はゼロとした。したがって、 β_i の共分散行列は次の構造を持つ。

$$D = \begin{bmatrix} \sigma_{00}^2 & \sigma_{01}^2 & \sigma_{02}^2 & 0 & 0 & 0 \\ \sigma_{10}^2 & \sigma_{11}^2 & \sigma_{12}^2 & 0 & 0 & 0 \\ \sigma_{20}^2 & \sigma_{21}^2 & \sigma_{22}^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

更に, $[b_{0i}, b_{1i}, b_{2i}] \sim N(0, D^*)$ であり, D^* はゼロ以外の成分から成る $D3 \times 3$ の左上部分行列である。 b_{3i}, b_{4i} および b_{5i} は同様にゼロに等しい。(A.4)の式を(A.3)に組み込むと, 対象者別成長関数は b_i について以下の式になる。

$$y_{ij} = b_{0i} + b_{1i}(AGE_{ij}) + b_{2i}(AGE_{ij}^2)$$

混合効果モデルとして表現される y_i の全体的成長モデルは, $n_i \times 33$ の固定効果計画行列 X_i および固定効果パラメータ α の 33×1 ベクトルから成る。これらについては既に定義済みである。これにはまた, 第一列に1, 第二列に年齢, 第三列に年齢の二乗を含むランダム効果の $n_i \times 3$ 計画行列である Z_i , ならびに, ランダム効果の 3×1 ベクトルである b_i を含む。「結果」に示したモデル(1)は y_i の期待値である。混合効果モデル式で表したパラメータおよびその標準誤差の推定は, 各対象者に y_i, X_i および Z_i をあてはめて, REMLプログラムを用いて行う。

平均関数 $X_i\alpha$ のための適切なモデルの選択は, 回帰分析におけるモデル選択と類似した方法で行う。すなわち, 1)モデルの指定および含まれる項の有意性の検定, 2)初期の単純なモデルに有意な影響を加えた前進法, 3)大きなモデルから非有意項を除いた後退法, である。モデル(1)に後退法をあてはめて, 平均コレステロール成長関数のための簡潔なモデルを得た。パラメータ推定値について漸近的な正規性を仮定し, 効果がないとしてテストした固定効果の数に等しい自由度の χ^2 検定を用いて, (A.4)における固定効果の効果がないという帰無仮説について多変量検定を行った。例えば, (A.4)における β_{0i}, β_{1i} および β_{2i} に対する ABOの全体的影響の有意性, すなわち,

$$H_0: \alpha_3 = \alpha_4 = \alpha_5 = \alpha_{11} = \alpha_{12} = \alpha_{13} = \alpha_{19} = \alpha_{20} = \alpha_{21} = 0$$

を, REMLで算定したWaldテスト統計量の値を自由度9の χ^2 分布と比較して検証した。 β_{0i}, β_{1i} および β_{2i} に対する ABO式血液型標識変数の I_A, I_B および I_{AB} の同時有意性の検定にも同様の方法を用いた。同時検定の次に, モデル中の残りの各項について一度に一項ずつ有意性検定を行った。最も有意性の低い項から順次除去し, 次にパラメータとその標準誤差を再び推定した。モデルから除去すべき項がなくなるまで上記の手順を繰り返した。