

DNA検体収集法

各協力病院にてEDTA採血(5mL)



採血後、室温にて国立佐倉病院に送付



3,500rpm、10分間遠心し、
buffy coatを15mL試験管に採取



-30°Cにて凍結保存



解凍し、DNA抽出に

図 1

DNA抽出法

凍結検体を解凍し、溶血試薬添加、
3,500rpmで10分間遠心、上清除去



ペレットをほぐし、TNE溶液0.5mL,
プロテナーゼK液(10mg/mL),0.25mL
10%SDS添加



56°Cにて2時間消化



2.7mLの2M、酢酸ナトリウムpH4.0を
添加、混合、マイクロチューブに分注、
4°Cにて10分間放置



1,000rpmにて10分間遠心、上清を採取



2倍量の100%エタノールにて沈殿、
70%エタノールにて2回洗浄、溶解

Angiotensin Converting Enzyme(ACE)

遺伝子イントロン16多型性の検出法

PCR法

primer F: 24mer

5'CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT3'

primer R: 25mer

5'GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT3'

Mixture:

template DNA(100ng)	2 μ L
primer mixture(F+R) 10 μ M	1 μ L
dNTPs 5mM	0.8 μ L
10xPCR buffer	2 μ L
Taq DNA polymerase 5u	0.06 μ L
D.W.	14.14 μ L

☒ 3-1

Program on PE9600

denaturation: 94°C 1min

annealing: 58°C 1min x35repeats

extension: 72°C 2min

Assay: (ethidium bromide stained)

2% agarose gel

0.5x TBE buffer

5V/cm,20min

Amplification band

I type: 479bp

D type: 191bp

☒ 3-2

分担研究報告書

「全国規模ネットワークシステムでの患者登録による糖尿病性腎症の
疾病構造の解析と腎症進展阻止指針作成の為の体制整備に関する研究」

糖尿病性腎症の疾病構造の解析方法に関する疫学・統計学的研究

分担研究者 星山 佳治 昭和大学医学部 講師
分担研究者 川口 毅 昭和大学医学部 教授

研究要旨 糖尿病性腎症の疾病構造を解析するために、どのような疫学・統計学的手法を用いることが妥当であるかを、既存のデータを用いて検討した。

その結果、各期間の群間比較は Mann-Whitney を用いる。同一 group の異なる観察期との比較は Wilcoxon を用いる。腎症進展までの期間を規定する要因の解析には、その期間を生存時間に読み替えて解析を行なう。これには proportional hazard model を用いる。生存関数の推定には、検査の間隔が全体の追跡期間と比べ短ければ Kaplan-Meier 法によって推定し、区間ごとにまとめられたデータを処理する場合は、life table method を用いる必要がある。

以上、解析の基本方針を明らかにした。

研究協力者：国立病院治療共同研究

島田 典生 国立千葉病院

「糖尿病性腎症データベースによる糖尿病
性腎症予防と進展阻止に関する研究」班

井上 薫 国立病院九州医療
センター

山田 研一 国立佐倉病院

大石 まり子 国立京都病院

能登 裕 国立金沢病院

東 輝一朗 国立熊本病院

西村 元伸 国立佐倉病院

若杉 英之 国立病院九州がん
センター

佐々木隆幸 国立霞ヶ浦病院

加藤 泰久 国立名古屋病院

A. 研究目的

糖尿病性腎症の疾病構造を解析するために、どのような疫学・統計学的手法を用いることが妥当であるかを、既存のデータを用いて検討した。

B. 研究方法

本研究と同様に糖尿病性腎症を対象

にして平成6年度より国立病院治療共同研究として行われている「糖尿病性腎症データベースによる糖尿病性腎症発症予防と進展阻止に関する研究(班長 山田研一)」のデータを用いて疫学・統計学的手法について検討した。その際、統計パッケージについても検討した。

検討項目は、群間比較、群内比較、生存時間解析、および欠損値の取り扱い方法である。統計パッケージは、SAS, Halwin を用いた。

今回モデルとして用いた「糖尿病性腎症データベースによる糖尿病性腎症発症予防と進展阻止に関する研究」は正常アルブミン尿、微量アルブミン尿を呈する糖尿病患者を対象にアンギオテンシン変換酵素阻害剤(ACE-I)と抗酸化作用をもつプロブコールの糖尿病性腎症進展阻止効果を検討した研究である。この研究では種々の検査を行ったが、代表として早期腎症の評価に最も頻繁に使用される尿中アルブミン排泄率の24ヶ月目までの生データを表1から表3に示す。

C. 結果と考察

1. 群間比較

各期間の群間比較は Mann-Whitney のU検定を用いる。一般に医学領域で扱うデータはパラメトリックでないことが多い。図1に本研究でも扱う臨床検査項目である尿中アルブミン排泄率と尿中IV型コラーゲン排泄率の観察期データ(全エントリー患者163人)の分布を示すが、明らかに正規分布からはずれてい

る。したがって解析にはノンパラメトリックな手法を用いることが妥当である。但し、パラメトリックなデータに対してノンパラメトリックの検定を行なうと検出力が弱くなるので、有意水準に近いP値が得られたときは、データの分布を見直すことにしておく。例えば図2にHbA1cとクレアチニンクリアランスの観察期データを示すがこれらは正規分布に近いと考えられる。

2. 群内比較

同一groupの異なる観察期との比較は Wilcoxon を用いる。この場合も同様に、ノンパラメトリックなデータであるとして解析するべきであり、有意水準に近いP値が得られたときは、これもデータの分布を見直すことにしておく。

図3から図10に今回モデルとして用いた「糖尿病性腎症データベースによる糖尿病性腎症発症予防と進展阻止に関する研究」のデータを Mann-Whitney のU検定、Wilcoxon を用いて解析した結果を示す。

3. 生存時間解析

腎症進展までの期間を規定する要因の解析には、その期間を生存時間に読み替えて解析を行なう。これには proportional hazard model を用いるべきである。その理由として、予後因子の評価を正しく行なうためには、背景因子の影響を取り除くあるいは調整する必要があるためである。この目的には proportional hazard model が最適であると考えられる。

生存関数の推定には、検査の間隔が全体の追跡期間と比べ短ければ Kaplan-Meier 法によって推定し、区間ごとにまとめられたデータ（しか得られない）を処理する場合は、life table method を用いる必要がある。

4. 欠損値の取り扱い方法

通常、本研究のような疾病の場合、その追跡には、一定間隔毎の検査を病院等で受けてもらうことになるが、検査値によって、event 発生を定義するために、検査を連続して受けない場合には問題が残る。今回モデルとして用いた「糖尿病性腎症データベースによる糖尿病性腎症発症予防と進展阻止に関する研究」でも、表 1 から表 3 で示すようなデータの欠損があり、対象患者数の多い多施設共同研究ではある程度のデータの欠損は避け得ないことである。例えば、2 回続けて検査を受けなかった症例が 3 回目の検査で初めて event 発生が確認された場合、前回、前々回に event 発生が無かった保証はえられない。したがって、この症例がどの時点 event 発生したかを決定することは、操作的な問題となる。また、今回の検査で event 発生した症例が次回の検査値では event 発生にならない場合の処理は、event 発生を検査値によって定義している以上、これも操作的な問題となる。こうしたデータの取り扱い方法に定説はなく、疾病の性質等を総合して定義するよりないと考えられる。

なお、ドロップアウトした症例については、観察し得た期間の情報を用いれば

よいが、ある特定条件の症例のみドロップアウトしたかどうか、また、施設間に差はないか調査しておく必要がある。

「糖尿病性腎症データベースによる糖尿病性腎症発症予防と進展阻止に関する研究」の解析では各対象患者の観察期の尿中アルブミン排泄率により event を定義した。例えば観察期尿中アルブミン排泄率が $10\mu\text{g}/\text{min}$ 以上 $70\mu\text{g}/\text{min}$ 未満の症例は $70\mu\text{g}/\text{min}$ を越えた場合を event と定義した。この際、欠損値の有無にかかわらず初めて event が確認された時点を event 発生時期と定義した。また、尿中アルブミン排泄率は癌の生存期間の解析などと異なり reversibility がある event である。従って、1 回でも event が確認されたときを event 発生時期とするのと、2 回の続けて event が確認された時のみ event 発生とする 2 種の定義を用いて解析を試みた。参考のためこの解析結果を図 11 と図 12 に示す。この解析では前者の定義でのみアンギオテンシン変換酵素の有用性が認められた。従って、本研究でも event 発生の定義に関してはデータの性質を考慮した上で決めるべきものと考えられた。

なお、本研究では欠損値をできるだけ減らすために、主治医への検査時期の連絡などといった工夫をすべきと考えられた。

D. 結 論

糖尿病性腎症の疾病構造を解析するために、どのような疫学・統計学的手法を用

いることが妥当であるかを、既存のデータを用いて検討した。

その結果、各期間の群間比較は Mann-Whitney の U 検定、同一 group の異なる観察期との比較は Wilcoxon の検定を用いるのが妥当であると考えられた。腎症進展までの期間を規定する要因の解析には、コックスの proportional hazard model を用い、生存関数の推定には、検査の間隔が全体の追跡期間と比べ短ければ Kaplan-Meier 法によって推定し、区間ごとにまとめられたデータを処理する場合は、life table method を用いる必要がある等、解析の基本方針を明らかにした。

E. 謝 辞

本研究の統計解析の基本方針を明らかにするにあたり、基礎データの提供をいただいた、国立病院治療共同研究「糖尿病性腎症データベースによる糖尿病性腎症発症予防と進展阻止に関する研究（班長 山田研一）」（大石まり子・能登裕・東 輝一朗・西村 元伸・若杉 英之・佐々木隆幸・加藤 泰久・島田 典生・井上 薫）の班員諸先生に深謝致します。

表1-1: コントロール群の尿中アルブミン排泄率 ($\mu\text{g}/\text{min}$)の変化-1

患者番号	観察期	6ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月
1	18.1	22.1	73.1	0	23
2	99.4	48.5	76.7	202.1	126.6
3	3.2	5.92	6.66	21.4	3.6
4	21.3	18.8	15.8		10.3
5	42.7	51	100.3	41.2	24.4
6	13.5	17.2	17.2	28.8	22.9
7	96.1	113.4	20.7		20
8	6.555	8.62	7.69	9.66	14.8
9	5.91	8.498	5.77		5.986
10	6	3.5	5.2	7.7	
11	44.25	132.7	190	440	978.5
12	138.4	79.6	109.5	104.4	108.4
13	1.67	3.21	2.5		1.43
14	51.4	55.71			95.83
15	104.1	58.6	11	2.2	
16	20.3	10.6	8.16	9.52	13.11
17	8.3	9.6	3.6	2.7	4
18	7.1	3.6	4.8		20.8
19	21.1	13.6		6.25	
20	22.8	24.3	19.4	6.65	6.2
21	11	10.64	9.5	70	
22	19.864	2.78	15.25	0.691	
23	11.45	7	5.6	12.3	
24	4.68	8.3		7.05	4.7
25	13.5	1.26	12.67		8.52
26	12.8	9.4	5.6		15.2
27	8.15	0	52.9	3.29	
28	2.26	3	3.85	3.95	11.3
29	5.75	7.3	5.6	61	6
30	9.1	5.3	5.3		6.9
31	62.6	92.8	32.7		36.3
32	13.1	8.58	12.5	25.7	9.74
33	7.8	12.3	13.1		
34	106.2	33.5	50.2		59.3
35	3.9	5.3	11.6	1.8	3.1
36	36.9	39.3	35.8	27.2	37.35
37	3.2	17.5	3.14	0	3.9
38	7.8		10.96	1.2	10.1
39	49.15	83.3	85.45		
40	10	28	9		
41	21.2	16.36	115.5		
42	26.2	20.3		67.2	57.1
43	20.7	33.5	19.5	32	
44	7.13	8.4	5.1	5	7.4
45	5.7	8.5	10.3	0	9.7

表1-2：コントロール群の尿中アルブミン排泄率 (μg/min)の変化-2

患者番号	観察期	6ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月
46	2.1	4.1	6.1	5.45	2.4
47	4.05	11.7	10.6	0	3.6
48	142	41	70		
49	0.62	5.1	4.2	1.5	1.53
50	73.25	63		61.3	
51	5.38	5.49	2.89	4.14	6.33
52	9	5.6	8.8	0.3	0.33
53	8.67		7.7		
54	4	4.11	12	0	4.5
55	12.3	20	3.265	12.8	12.4
56	5.85	3.7	1.48	4.6	3.04
57	11.25	37.4	128		
58	5.6	5.7	3.63	3.1	0
59	4.2	7.99	5.64		10.3
60	117.25	117.3	184.8	103	188.1
61	22.37	21.4	19.8		
62	50	56.7	66.3		164.15
63	58.05	33	53.8	15.2	36.3
64	1.9	5.03	3.3	6.9	4.65
65	14.8	9.2	12.4	23.4	29.3
66	153.8	1697			428.6
67	162.55	66.5	53.2	85.8	
68	17.25	10.2	7.9	9.96	5.65
69	8.63	4.46	3.07	8.83	
70	5.85	4.8	5.25	0	4.28
71	2.85		8.3	14.85	
72	0	9.9	6.2	10.3	13.3
73	33.55	53.5	62.5	72.7	79.7
74	12.6	4.2	8.6		
75	78.1	73.4	97.1	47.8	118
76	44.42	54.31			63.08
77	64.8		69		
78	10.42	4.78		7.44	
79	4.2	8	3.2	0	0
80	7.555	8.5	4.22	0	0
81	2.35	0	9.5	2.1	
82	8.85	1.6	3	3.15	1.96
83	11.55	7.95	6.3	28.6	16.6
84	18.73	23.6	18	18.5	140.3
85	43.75	4.2	56.3	72.4	62
86	39.13	9.74	19.3	60.6	
87	2.55	6.2	7.5	9.8	7.8

表2：アンギオテンシン変換酵素阻害剤(ACE-I)群の
尿中アルブミン排泄率 (μg/min)の変化

患者番号	観察期	6ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月
101	33.1	46.3	5.9	9.5	6.3
102	34.2	36.3	8.7	24.5	25.8
103	21	35.3	47.4	44.3	15.9
104	86.7	248.5	805.5		
105	25.75	12.3	16.2	15.4	10.4
106	42	39.8	25.5	18.8	25.9
107	81.95			90	158.5
108	14.85	12.54		13.3	
109	11.4	12.5	16.3	6.72	8.6
110	9.44				
111	15.7	10	4.68	3.9	4.51
112	28.5	7.7	19.3	115.9	52.6
113	6.7	15.4	7.35	3.48	6.52
114	183.15		161.1	32.5	
115	3.1	5.9	4.8	3.76	0
116	81.5	91.5	88.3	90	156
117	5.77	13	8.32	4.16	6.53
118	66.2		53.7	63	
119	7.15	7.6	9.3		32.4
120	12.35	15.2	8.5	3.1	5.2
121	7.1	5.1	23.7	20.3	1.56
122	6.78	3.27	4.88		4.265
123	4.8	8.75	5.4	3.93	3.7
124	41.5	48.7	28.5	32.9	26
125	74.15	50	69.9	11.2	25.5
126	98.81	74.798	154.8		
127	16.4	6	4.8		
128	1.165	5	4.57	0.7	4.26
129	4.25	5.9	4.8	7.09	6.71
130	54.65	26	21.4	21.9	14.7
131	67.7	58.2	52	42.5	48.4
132	40	17.7	14.9	18.4	12.3
133	27.6	24.8	17.8	12.8	14.4
134	11	46.75	39		
135	10.8	28.9	52.1	21	
136	8.4	2.8	1.23		3.9
137	8.35	11	7.62	5.3	0
138	2.083	4.69	8.94	46.4	0.784
139	3.82	6.24	5.9	7.1	0
140	92.5	55			95.3
141	7.16	5	4.58	4.3	3.7
142	82.7	19	29	17	
143	89.57	7.8	5.1	11.6	67.5
144	32.3	13.3	10.5		

表3：プロブコール群の尿中アルブミン排泄率 (μg/min)の変化

患者番号	観察期	6ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月
201	8.75	10.8	13.1	13.4	11.2
202	2.6	3.2	8.8		
203	65.5	84	107	254.3	
204	179	275.3	225.9	168.9	276
205	5.55	4.2	0	1.5	
206	44.4	30.6	29.2		42.9
207	23.98	5.672		12.7	
208	53.55	85.1	57.2	377.6	
209	12.8	8.9	8.4	7.9	5.5
210	90.6	129.1	177.2		166
211	13.1	6.4	28		
212	3.62	3.57		2.19	2.06
213	134	105.4	86.7	120	270.8
214	4.67	3.2	1.5	3.5	3.2
215	10.8	6.1	11.1	1.95	7.2
216	25.2	18.5	8.68	13	7.95
217	5.9	4.8	5.8	5.75	4.55
218	28.37	63.1	70.2	89.4	124.3
219	11.67	4.9	4.3	4.3	4.4
220	43.35	50.3	37.6	33.6	73.5
221	55.5	81.6	29.8	58.3	37.2
222	11	10	5.46	7.56	9.12
223	4.55	10.7	11.6	0	0
224	6.9	4.9	4.9	6.6	
225	10.4	7.5	15.1	6	7.2
226	8.9	11.7	8.95	10	10.3
227	147.2	130	183.3	406	105.2
228	8.35	8.8	19.7		5.31
229	2.55	2.5	4	9.4	5.5
230	20.9	21	67.8	19.8	
231	24.005	11.8	8.4	10.7	6
232	2.78	3.72	1.188	1.33	4.012
233	8.23	10.2	6.2	4.2	

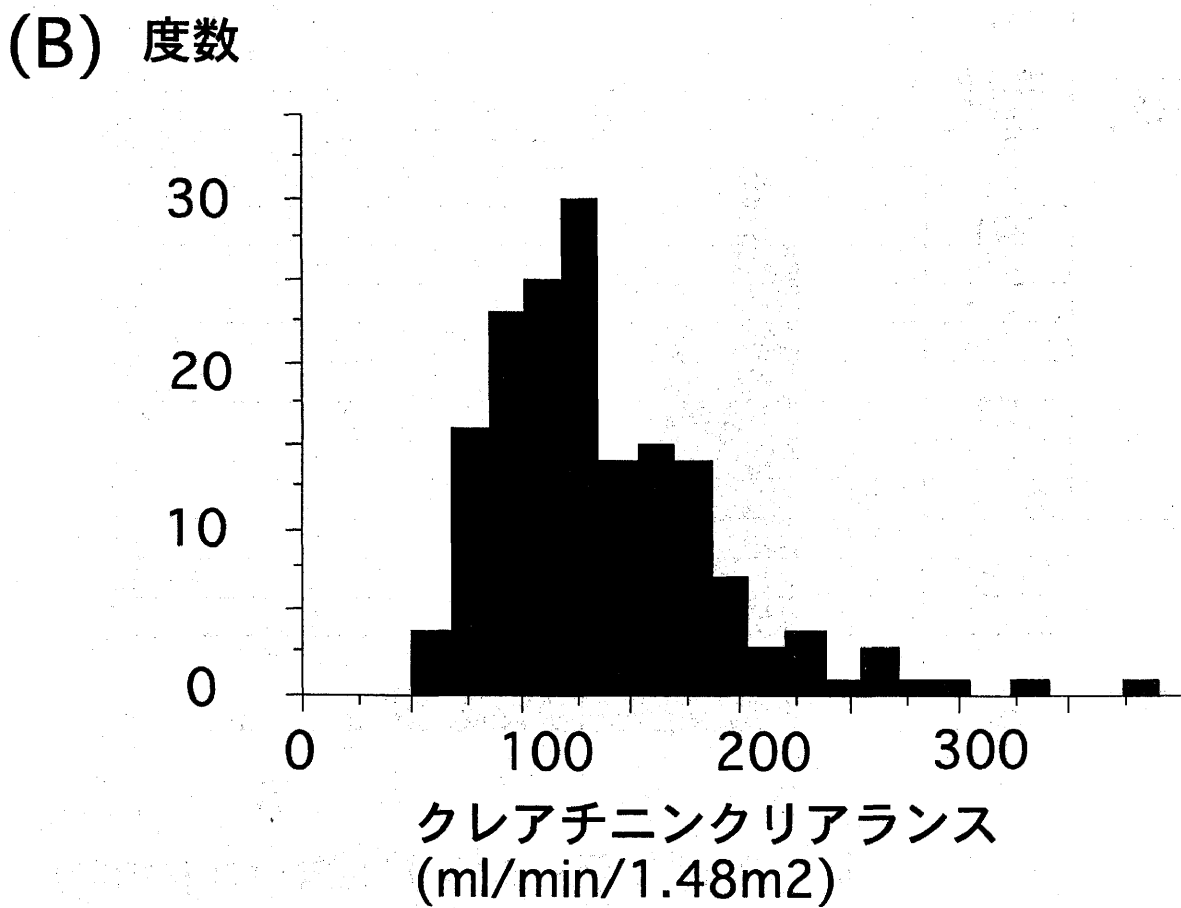
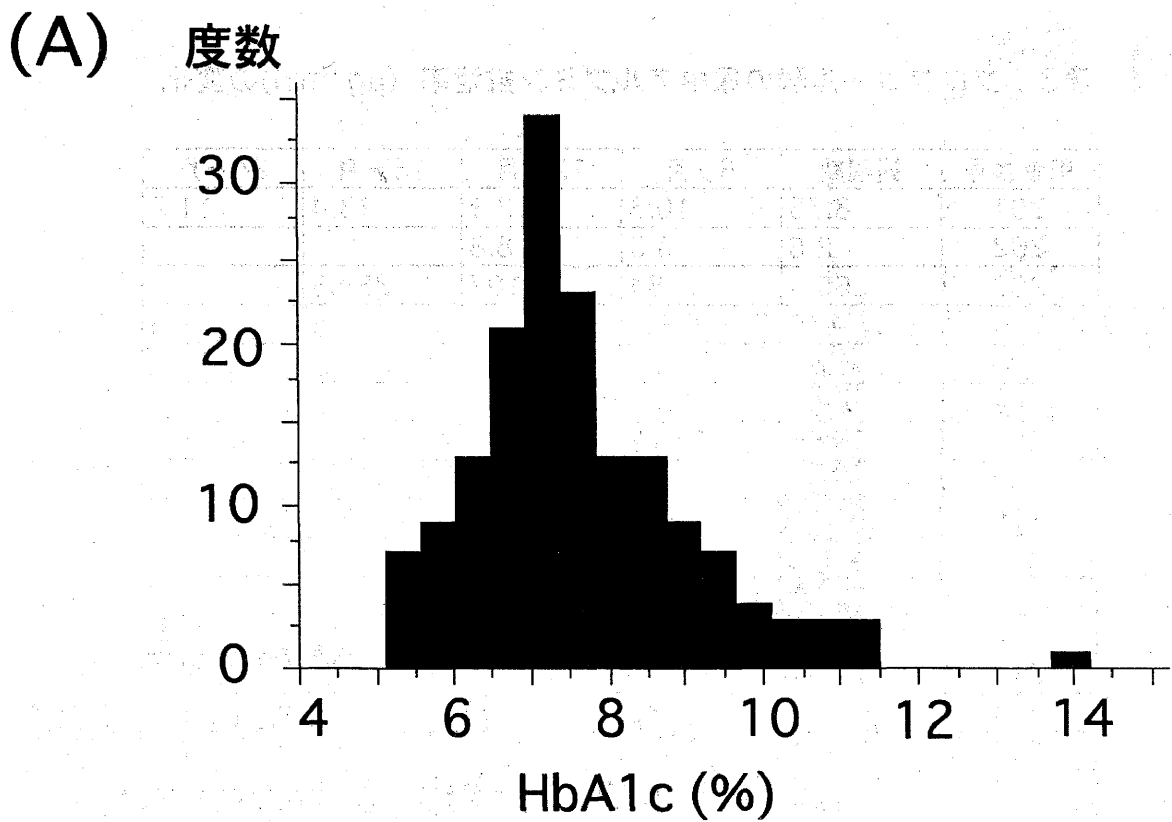


図2
全エントリー患者 (163人) の観察期のデータの分布
(A)HbA1c、
(B)クレアチンクリアランス

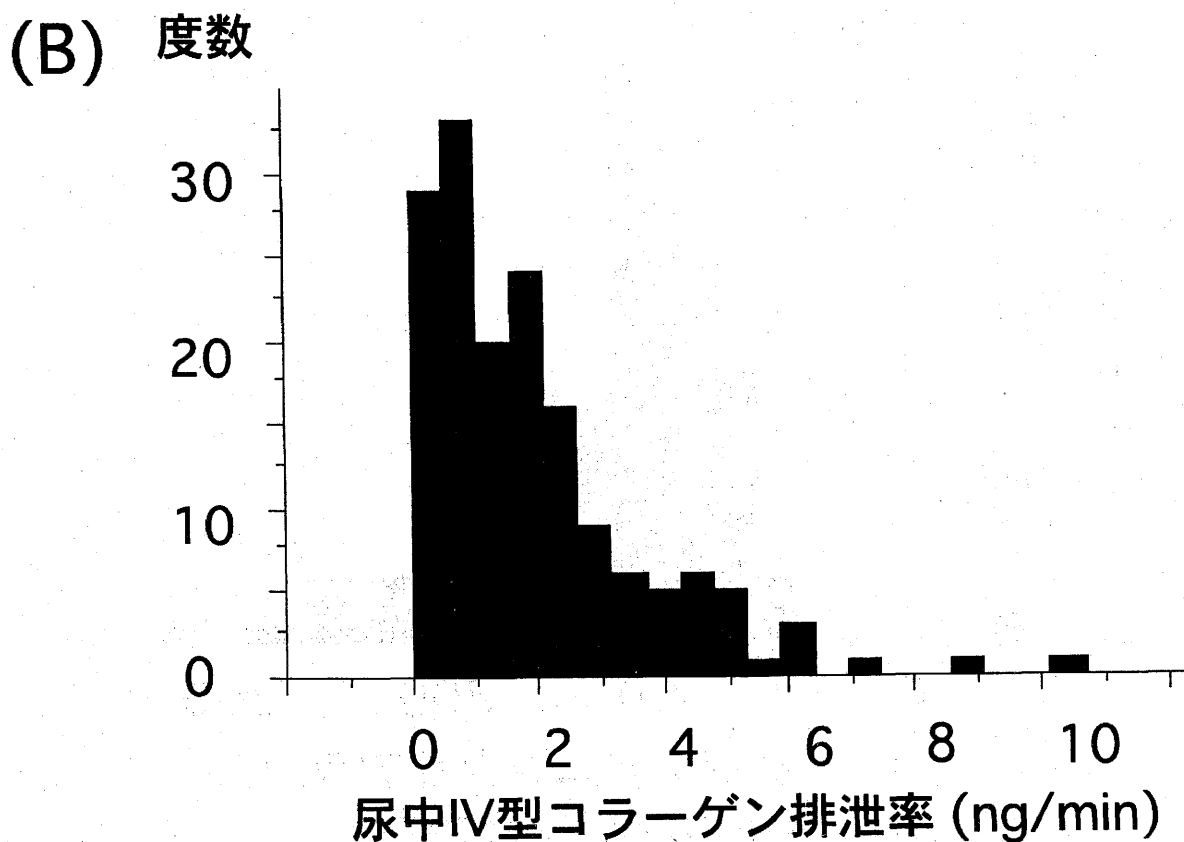
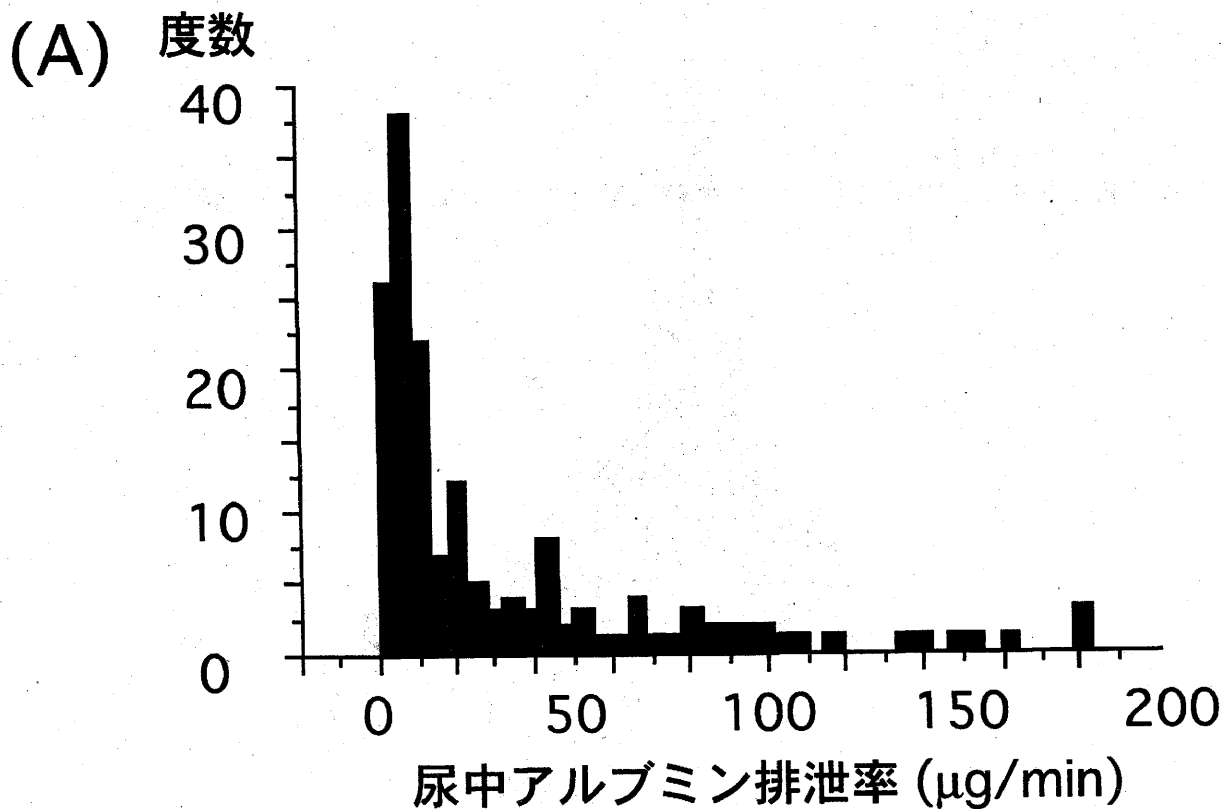


図1
 全エントリー患者（163人）の観察期のデータの分布
 (A)尿中アルブミン排泄率、
 (B)尿中IV型コラーゲン排泄率

図3 AER (尿中アルブミン排泄率)

群間比較：全て有意差なし

群内比較：ACE-I 24カ月で $P < 0.01$ vs 観察期。18カ月は $p = 0.051$ vs 観察期

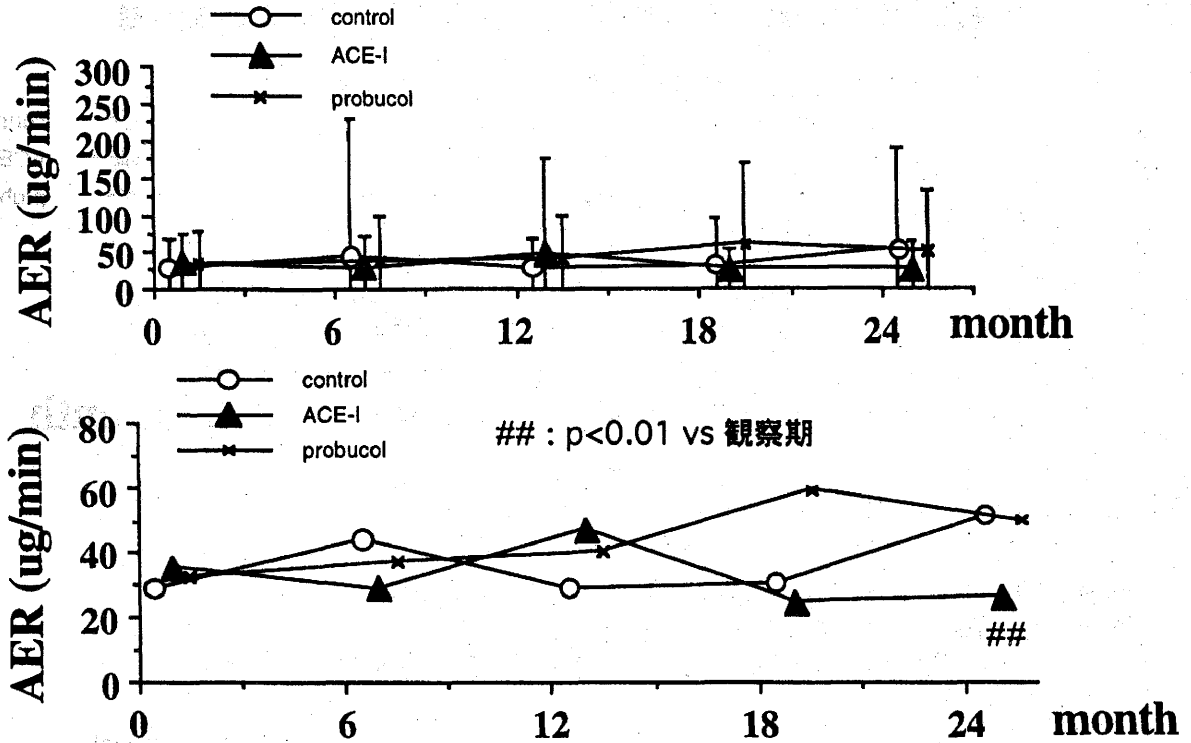


図4 尿中IV型コラーゲン

群間比較：probu群 $p < 0.01$ vs cont at 6M, ACE群 $p < 0.05$ at 24M

群内比較：cont群 $p < 0.05$ at 12M, $p < 0.01$ at 18, 24M vs 観察期 (有意に増加)

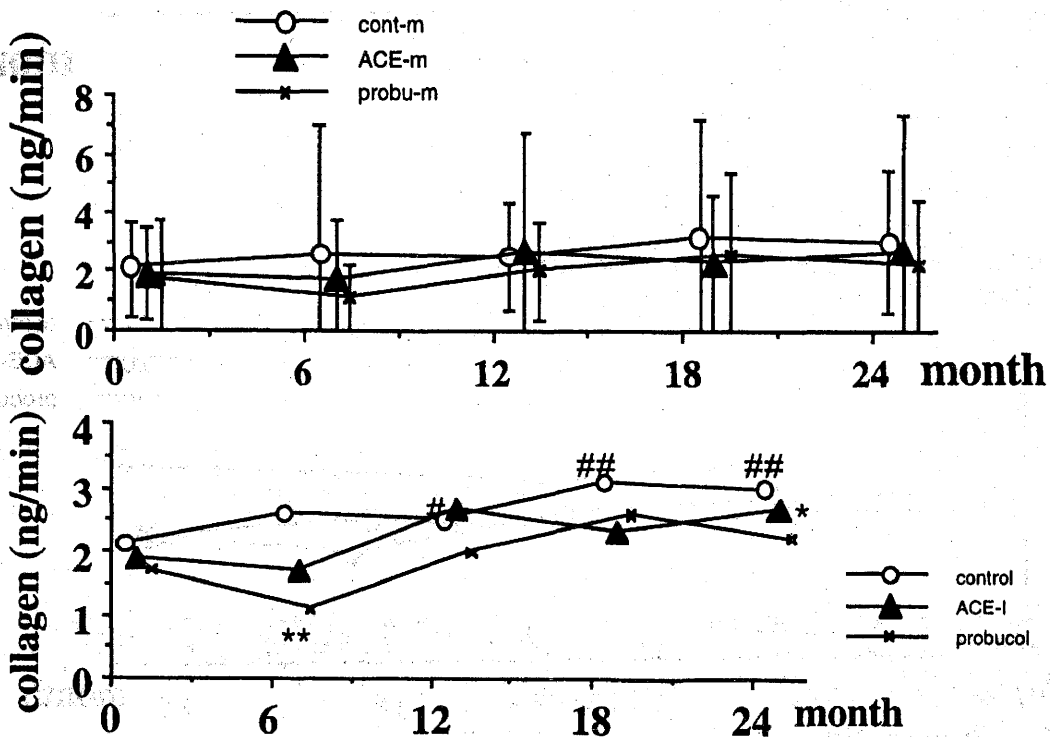


図5 Ccr (クレアチニンクリアランス)

群間比較：有意差なし

群内比較：ACE群 6-24Mにて $p < 0.01$ vs 観察期、P群 18Mにて $p < 0.05$ vs 観察期
 cont群 6Mにて $p < 0.05$ vs 観察期、18, 24Mにて $p < 0.01$ vs 観察期

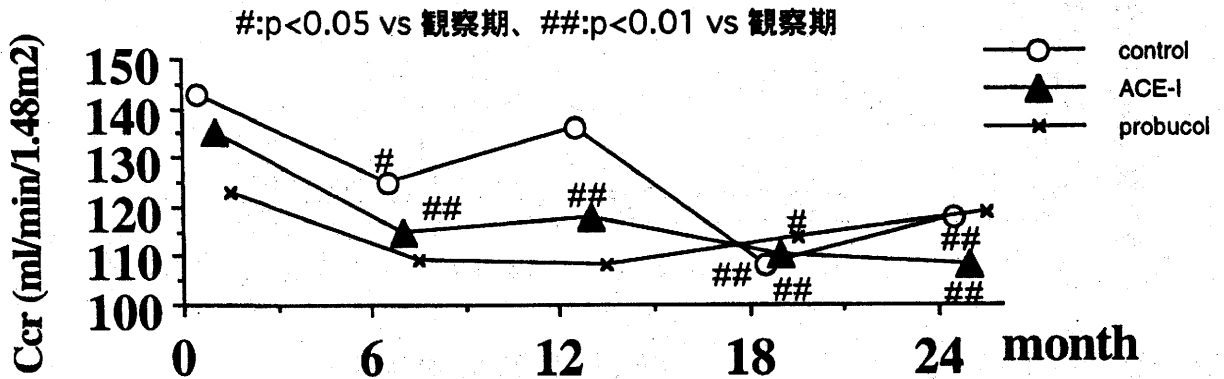


図6 T-cho (総コレステロール)

群間比較：6Mで $p < 0.01$ vs cont, 12Mで $p < 0.05$ vs cont

群内比較：P群 各期間で $p < 0.01$ vs 観察期、
 C群 18Mで $p < 0.01$ 、24Mで $p < 0.05$ vs 観察期

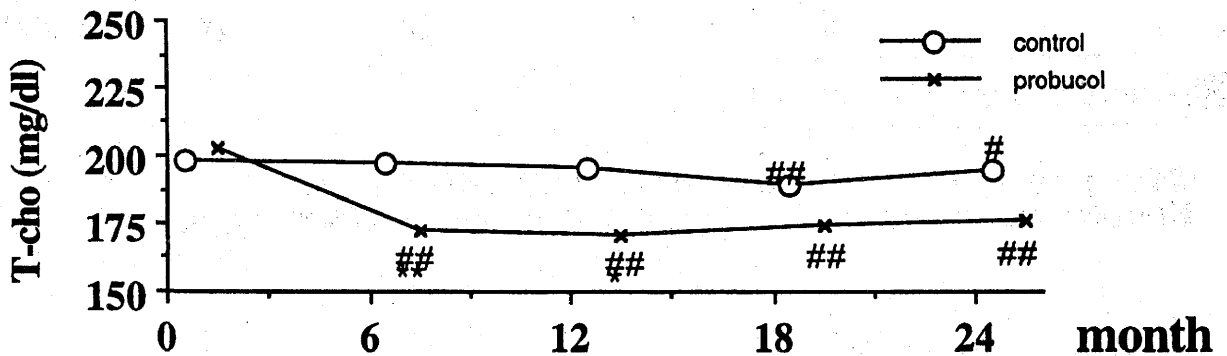


図7 HbA1c

群間比較：観察期と24Mで $p < 0.05$ vs cont

群内比較：有意差なし

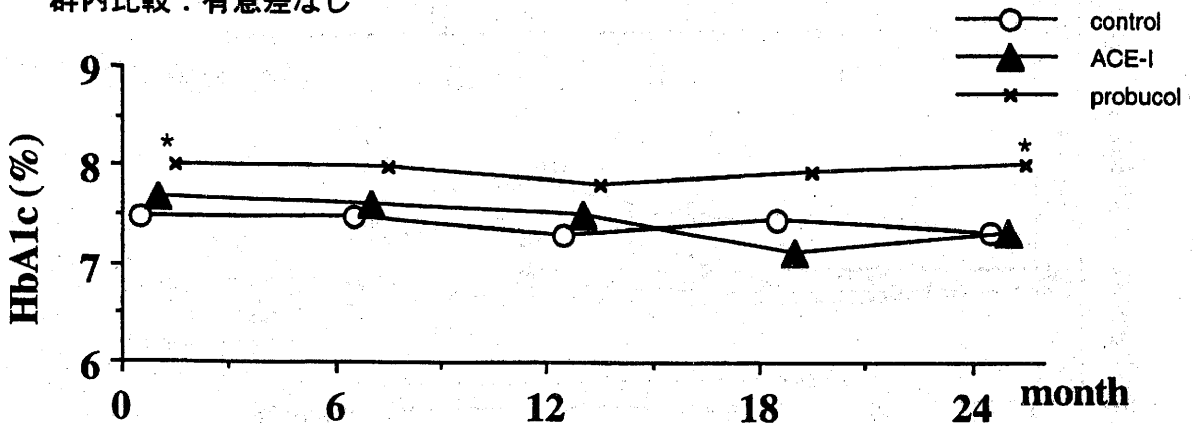


図8

LPO (過酸化脂質)

群間比較：有意差無し

群内比較：C群6Mで $p < 0.05$ vs 観察期、P群12Mで有意に上昇。 $p < 0.05$ vs 観察期

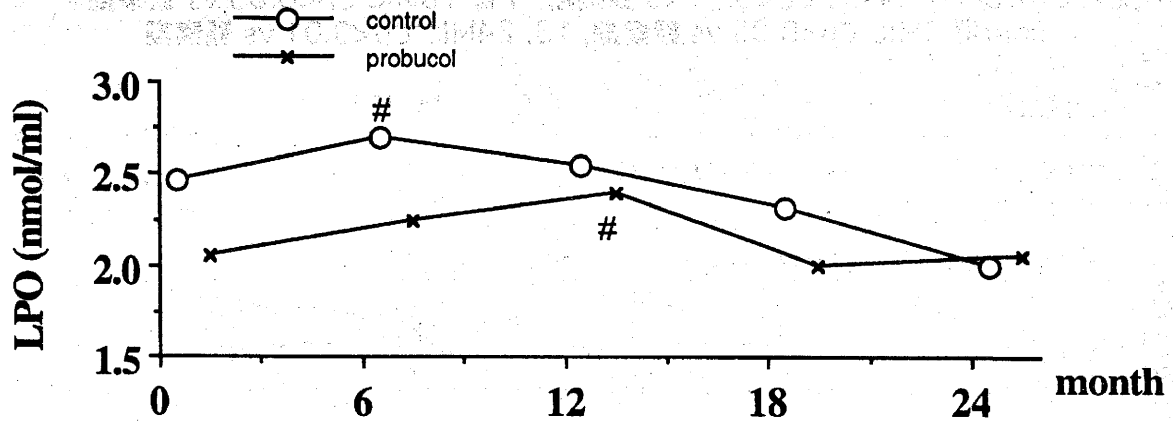


図9

LF (ラクトフェリン)

群間比較：P群 観察期、6、12Mで $p < 0.05$ vs cont

群内比較：P群 6、18Mで $p < 0.05$ vs 観察期、12、24Mで $p < 0.01$ vs 観察期

C群 6Mで $p < 0.05$ vs 観察期、12Mで $p < 0.01$ vs 観察期

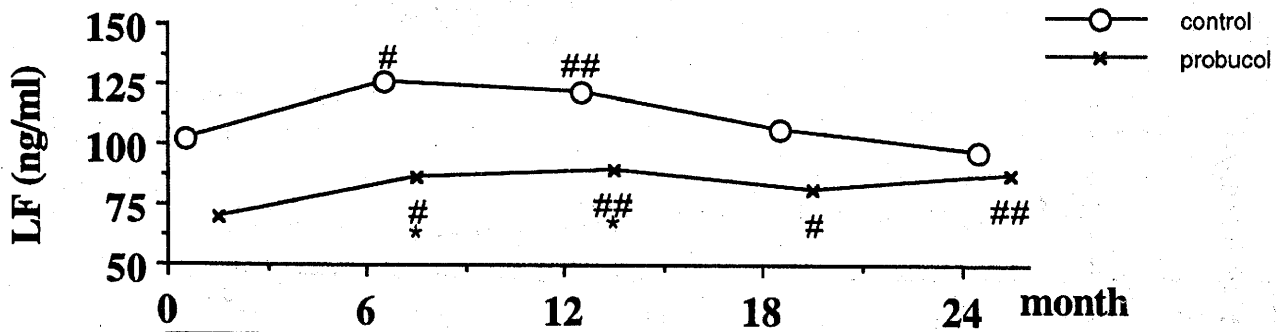


図10

BP (血圧)

*: $p < 0.05$ vs cont, **: $p < 0.01$ vs cont

ACE-I群：群内では観察期に対し有意差なし

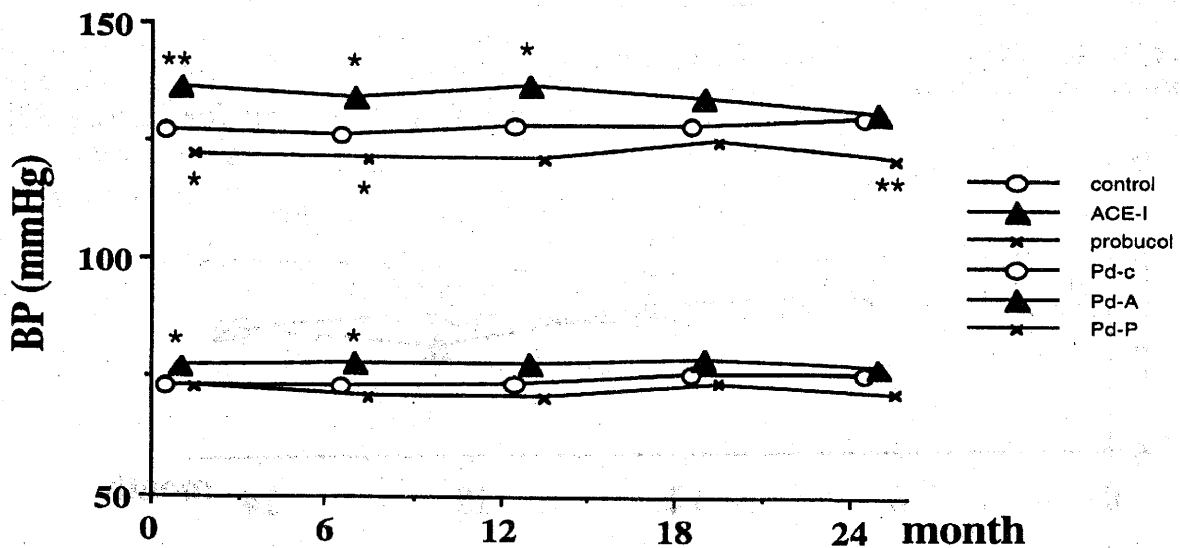


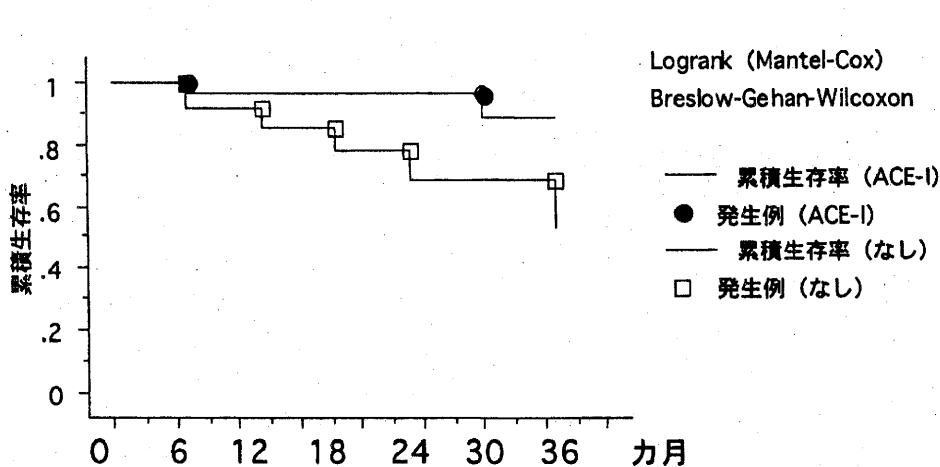
図11：生存時間解析の例-1

観察期 10 ≤ AER < 70 ug/min の患者で
 1回でも AER ≥ 70 になったのを event 発生と定義した場合
 注) AER : 尿中アルブミン排泄率

control vs ACE-I

有意差あり

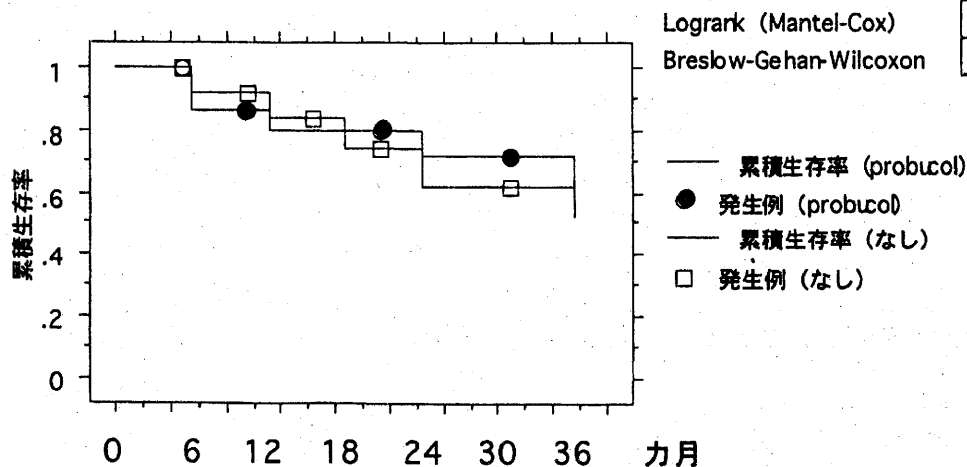
	観察数	発生数	打ち切り数	% 打ち切り	欠測値数	無効数
ACE-I	28	2	26	92.857	0	0
なし	49	15	34	69.388	0	0
合計	77	17	60	77.922	0	0



カイ2乗	自由度	p値	
Logrank (Mantel-Cox)	5.388	1	.0203
Breslow-Gehan-Wilcoxon	5.181	1	.0228

control vs probucol

	観察数	発生数	打ち切り数	% 打ち切り	欠測値数	無効数
probucol	15	5	10	66.667	0	0
なし	38	13	25	65.789	0	0
合計	53	18	35	66.038	0	0



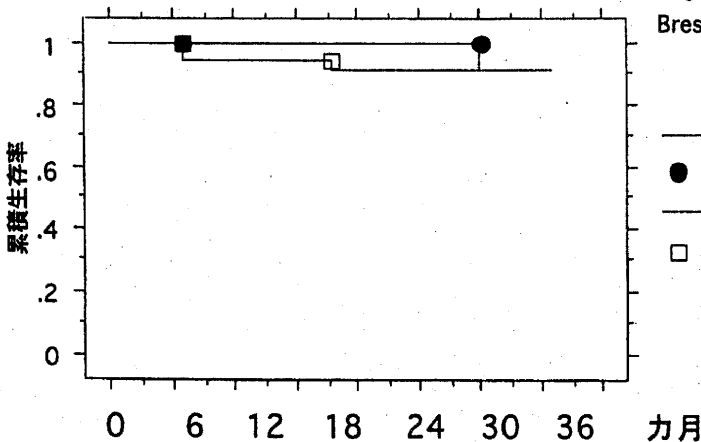
カイ2乗	自由度	p値	
Logrank (Mantel-Cox)	.059	1	.8086
Breslow-Gehan-Wilcoxon	.042	1	.8379

図12：生存時間解析の例-2

観察期 $10 \leq \text{AER} < 70 \text{ug/min} \geq$ の患者で
2回続けて $\text{AER} \geq 70$ になったのを event 発生と定義した場合

control vs ACE-I

	観察数	発生数	打ち切り数	% 打ち切り	欠測値数	無効数
ACE-I	19	1	18	94.737	0	0
なし	37	3	34	91.892	1	0
合計	56	4	52	92.857	1	0



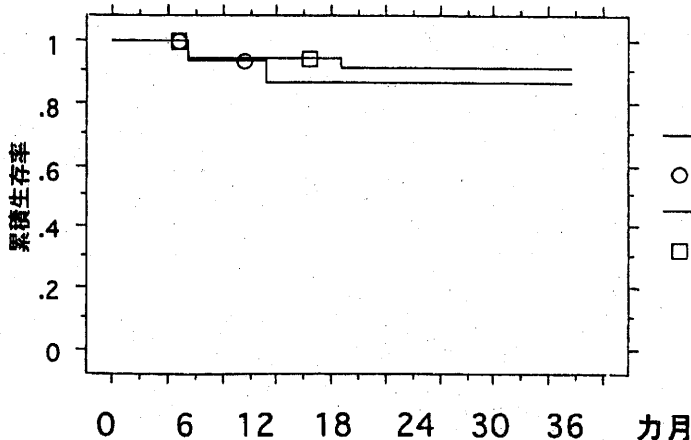
Logrank (Mantel-Cox)
Breslow-Gehan-Wilcoxon

カイ2乗	自由度	p値
.162	1	.6878
.538	1	.4632

— 累積生存率 (ACE-I)
● 発生例 (ACE-I)
— 累積生存率 (なし)
□ 発生例 (なし)

control vs probucol

	観察数	発生数	打ち切り数	% 打ち切り	欠測値数	無効数
probucol	15	2	13	86.667	0	0
なし	37	3	34	91.892	1	0
合計	52	5	47	90.385	1	0



Logrank (Mantel-Cox)
Breslow-Gehan-Wilcoxon

カイ2乗	自由度	p値
.321	1	.5709
.334	1	.5634

— 累積生存率 (probucol)
○ 発生例 (probucol)
— 累積生存率 (なし)
□ 発生例 (なし)

