

Materials and Methods

Genotyping

Founders were genotyped with DNA extracted from tail pieces. The presence of the target allele in DNA was detected by PCR amplification using primer SRBI F55 5'-ACACCTTGCTGCTGAGGGAGT-3' in combination with either primer SRBI intron R06 5'-ACTTCCCTATGGAAGGTAAACCGA-3' or primer SRBI R177 5'-TCTTGAGCACCTGCTGCTTGAT-3' to define homozygous knockout for *SR-BI*.

Combination with primer mouse apoAI+548R 5'-GAGGATTCAAACCTGGGACACATAGTC-3' either with mouse apoAI neoF738 5'-TTCCTCGTGCTTACGGTATCG-3' or mouse apoAI+283F 5'-CTGGTCTTCCTGACAGGTAGG-3' were used for determination of intrinsic *apoA-I* gene deletion. Genotyping for transgenics was determined by PCR with specific 2 primer sets for *CLA-1* transgenics; CLA-1 5'endF322 5' GTCAGAATGCAAGGACGCAA-3' and 5'endR652 5' CCCTCTCCTCCTCTATCGGGA-3', CLA-1 F2142 5' TTACACAGGCCTCGGAAAAC-3' and R2409 5'-CTCAGCCTGGGCACCTATAA-3'; 2 primer sets for human *PDZK1* transgenics; human PDZK1 5'end F2 5'-CAGAGACAGAATTCCTGAGTGAACG-3' and 5'end

R2 5'-AAGGCTTTTTCTGAGGTCGGTTA-3', F1748 5'-
TATCATTGTCTTACAGGCGGCTATT-3' and R2040 5'-
CGGGTTCATGGTATTTATTCTAGCAAC-3'; 1 primer set for human *apoA-I*
transgenics; human apoAI341F 5'-TCCTCTGCCAACACAATGGAC-3' and 72R 5'-
CAAGGCCTGAACCTTGAGCTG-3', respectively.

RNA isolation and analysis

Animals were deep-anesthetized with 2.5% avertin and sacrificed by cervical dislocation. Total RNAs from different tissues were isolated utilizing Sepazol RNA I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). RNase protection assays were performed with 10 µg of total RNA using RPA II kit (Ambion, Austin, TX) and ³²P-UTP-labeled probes transcribed with MAXIscript-T7 kit (Ambion, Austin, TX) as manufacturer's protocols. Human *PDZK1* and mouse *PDZK1* mRNA expression were confirmed by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) employing One Step RT-PCR Kit (QAIGEN, Chatsworth, CA): 0.5 µg of total RNA was digested with DNase I, reverse-transcribed, and amplified with inter-exonic primer sets species specific for cDNA according to the instruction.

CLA-1 expression in peritoneal macrophage

Macrophages were collected from wild type, *SR-BI^{-/-}*, *SR-BI^{-/-}/CLA-1* mice 3days after

intraperitoneal injection of thioglycollate (2.9%, 1.0 ml). Cells were plated onto dishes in DMEM containing 10% FCS. Four hours after plating cells were washed and collected to extract total mRNA by RNeasy kit (QIAGEN, Chatsworth, CA). Macrophage mRNA were reverse transcribed and RT-PCR was performed using the gene-specific primers for SR-BI, CLA-1 and mouse β -actin.

Protein isolation and Western blotting

Liver was homogenized in ice-cold PBS containing 1% Triton X-100 and a protease inhibitor cocktail (Nakarai, Kyoto, Japan). Lysates were centrifuged at 30,000 g for 15 min at 4°C and protein content determined in the supernatant. Fifteen micrograms of protein were electrophoresed on pre-cast SDS/ polyacrylamide gels (4-20% acryl amide; Invitrogen, Carlsbad, CA), and electrically transferred onto nitrocellulose membrane (Protran, Whatman, Brentford, Middlesex). Nonspecific binding sites of the membrane were blocked using defatted milk followed by the addition of mouse monoclonal antibodies against the C-terminus region of rat PDZK1, spanning amino acids 485-504 recognize both mouse and human PDZK1 (kindly provided by Hiroyuki Arai, the University of Tokyo). Immunoblot analysis of SR-BI was performed by rabbit polyclonal antibody against mouse SR-BI (NB400-104, Novus Biologicals, Littleton, CO), which reacts with both mouse SR-BI and CLA-1. The relative amount of primary

antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) followed by ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biotech, Sunnyvale, CA). The bands were quantificated by imaging densitometer, Science Lab 99 Image Gauge (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SD. The statistical significance of the differences of the mean between groups was evaluated by the one way ANOVA followed by the *post hoc* analysis (Scheffe test) for comparison of two groups. All analyses were performed using SPSS (SPSS Japan, Tokyo, Japan). P values <0.05 are considered to be statistically significant.

日本人の血清脂質

荒井秀典*

はじめに

高い喫煙率と高血圧の頻度にもかかわらず、これまで日本人における虚血性心疾患発症率が欧米に比べ低かったのは、日本人のLDLコレステロール値の低さに負うところが大きかったと考えられる。1960年より10年ごとに日本人の血清コレステロール値に関する調査が行われてきたが、調査が開始された1960年頃の日本人の血清総コレステロールの平均値は約180 mg/dlであり、ほぼ同時期に行われたアメリカ人の平均値と比べると約40 mg/dl低い値を示している。しかしながら、アメリカ人の総コレステロール値が年々減少しているのとは対照的に日本人の総コレステロール値は過去40年間上昇傾向を示している。そして西暦2000年の調査においては日本人の総コレステロール値の平均は200 mg/dlを越えており、ほぼアメリカと肩を並べるまでに達している。日本人の血清コレステロールが欧米並みとなり、肥満、糖尿病などが増加することにより、今後日本人においても狭心症、心筋梗塞などの動脈硬化性疾患の発症率がますます高くなるのが危惧される。本稿においては西暦2000年に行われた日本人の血清脂質調査の結果をもとに日本人における血清脂質の特徴と分子疫学について考えてみた

い。

① 西暦2000年における日本人の血清脂質データ

「日本人の血清脂質調査」は、一般集団における血清脂質の動向を知るために1960年から10年ごとに行われている全国調査で、2000年に行われた調査が5回目となる。今回の調査においては血清脂質のみならず、血糖、HbA1c、尿酸などとともに脂質代謝に関わる遺伝子変異に関する解析も行われた。2000年の調査における総コレステロール値は全体の平均が201 mg/dlであり、男性202 mg/dL、女性200 mg/dLとほぼ男女差はなかった¹⁾。これは10年前の1990年と比べて、全体平均で5 mg/dLの上昇となっている。全体の5%は脂質低下薬を服用しており、それを除くと全体平均は205 mg/dLとなった。男性においては30歳代に上昇した後にはほぼ変化がないのに対し、女性においては40歳代から上昇し始め、閉経後である50歳代には30歳代と比べ、40 mg/dL近く上昇する(図1)。直接法によるLDL-Cの測定は今回初めて実施されたため、過去のデータとの比較はできないが、平均は118 mg/dLとなり、男性121 mg/dL、女性115 mg/dLで、男性のほうがやや高い傾向がみられた。年齢ごとの変化は総コレステロールとほぼ同様である(図2)。

今回の調査で最も大きな変化が認められたのはトリグリセリド値である。全体の平均118 mg/

* 京都大学大学院医学研究科加齢医学
Hidenori Arai: Serum lipid levels in Japanese.
Department of Geriatric Medicine, Kyoto University
Graduate School of Medicine.

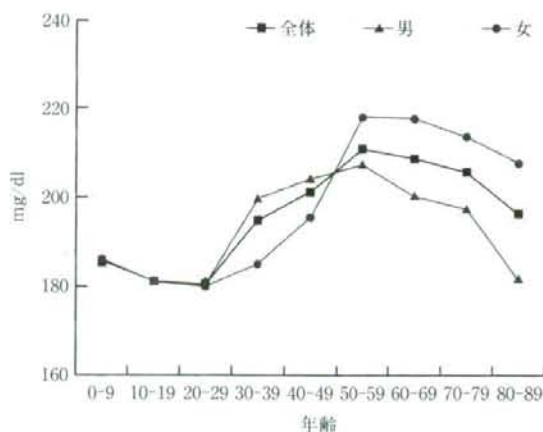


図1 西暦2000年日本人の血清脂質調査における年齢別、男女別総コレステロール値の推移（文献1より改変）

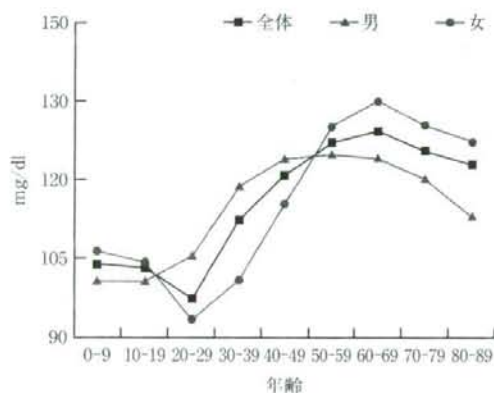


図2 西暦2000年日本人の血清脂質調査における年齢別、男女別LDLコレステロール値の推移（文献1より改変）

dLであり、男性136 mg/dL、女性92 mg/dLと男性で高値を示し、10年前と比べて全体平均で13 mg/dL上昇した。女性ではほぼ横這いであったが、図3に示すように男性では40~59歳で約30 mg/dL、20~39歳でも約20 mg/dLと著しい上昇が認められた。この傾向は、近年の国民栄養調査での結果とほぼ一致している。この変化は1990年から2000年にかけての10年間における血清脂質の変化でもっとも目立った変化であり、今後の対策が必要と考えられる。また、この男性

におけるトリグリセリド値の変化はBMIの変化と一致している。すなわち、男性におけるBMIは10年前と比べ、トリグリセリド値と同様30歳代から50歳代にかけて増加傾向を示している。

HDLコレステロール値については平均59 mg/dL、男性55 mg/dL、女性65 mg/dLとなり、10年前と比べて特に女性で約10 mg/dL、男性でも約5 mg/dLの上昇がみられた。図4に示すように10歳代までは男女差を認めないが、男性においては20歳以降減少し、30歳以降ではほぼプラ

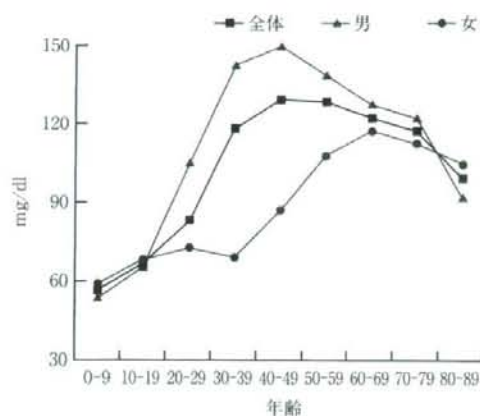


図3 西暦2000年日本人の血清脂質調査における年齢別、男女別トリグリセリド値の推移（文献1より改変）

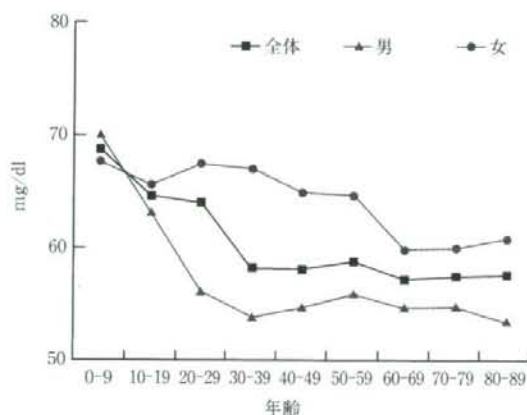


図4 西暦2000年日本人の血清脂質調査における年齢別、男女別HDLコレステロール値の推移（文献1より改変）

トーに達する、女性においては60歳代以降に減少する傾向がある。前回と今回の検査では測定法が沈殿法と直接法という違いもあったため、その影響も否定できないが、HDLコレステロールと食事内容との関係も知られており、日本人が摂取する食事内容の変化も関係している可能性がある。このHDLコレステロール値については欧米に比べ、高い傾向があり、日本人における虚血性心疾患の罹患率が低い一つの要因になっているのではないかと考えられる。また、日本人の虚血性

心疾患の発症は男性のほうが約10から15年早いといわれているが、今回示したように男性においてLDLコレステロールが早期に上昇し、HDLコレステロールが早期に下降することが、男女における虚血性心疾患の発症率の差を説明する要因の一つではないかと考えられる。

さらに日本人においてこのようにHDLコレステロールが高い値を示すのはCETP（コレステリルエステル転送蛋白）、LIPC（肝性トリグリセリドリパーゼ）などHDL代謝に関与する遺伝子に

においてHDLコレステロールが高くなる多型の頻度が多いことも関係していることが今回の遺伝子解析の調査で明らかになった²⁾。これについては後述する。

② 日本人における脂質異常症の頻度

今回の調査で高トリグリセリド血症(150 mg/dl以上)を満たすのは22%であった。低HDLコレステロール血症(40 mg/dl未満)については8%であり、他の調査と比べて少ない傾向にあった。日本人の血清脂質値については図1から4に示したような加齢変化をみせるが、2007年の日本動脈硬化学会の脂質異常症の診断基準を満たす人の年齢ごとの頻度をみても、同様な傾向が伺える。すなわち図5に示すように男性においては30歳代から高LDLコレステロール血症が増加するが、女性においては閉経後から高LDLコレステロール血症が増加し、その頻度は40%を越えている。また高トリグリセリド血症に関しては図6に示すように女性においてはコレステロール同様に閉経後に増加するが、男性においては20歳代から増加し始め、40歳代でピークを迎える。ピーク時の頻度は約35%である。このように現在の日本人においては中年男性における高トリグリセリド血症の増加(主としてⅣ型脂質異常症)と閉経後女性における高LDLコレステロール血症(主としてⅡa型脂質異常症)の増加が特徴である。Ⅱb型脂質異常症は家族性複合型高脂血症、糖尿病、メタボリックシンドロームなどのハイリスク群において多く認められるタイプの脂質異常症であり、LDLコレステロール、トリグリセリドいずれもが増加するタイプ(LDL+VLDL)である。今回の調査におけるⅡb型の頻度は男性8.8%、女性5.2%であった。また脂質異常症に対する薬物治療を受けているのは4.7%であり、男性4.2%、女性5.6%と女性に多い傾向が認められた。この脂質低下薬剤服用者の頻度については、米国では男性のほうが服薬者の頻度が高くなっている。この事実は米国ではよりリスクの高い

男性を中心に治療が行われているのに対し、日本においては高コレステロール血症の頻度と同様な傾向を示しており、両国における脂質異常症治療に対する傾向の差が出ており、興味深い。これらのデータを元に日本人の脂質管理を考え、心血管イベントの抑制に向けて生かす必要がある。

③ 日本人における血清脂質を制御する遺伝子異常

血清LDLコレステロールを制御する遺伝子異常に関しては次項において詳細に記載されると思われるので、本稿においてはトリグリセリドとHDLコレステロールに影響を及ぼす遺伝子異常とその頻度を中心に述べたい。

西暦2000年の調査では遺伝子多型に関して、2,267人を対象に解析を行った。本集団における総コレステロール、トリグリセリド、HDLコレステロール、LDLコレステロールいずれも全体の平均値との差はなく、日本の代表的な集団で解析を行えたと考えられる。HDLコレステロール、トリグリセリドの代謝に関係するCETP、リポ蛋白リパーゼ(LPL)、LIPC、アポリポ蛋白C3(APOC3)の4遺伝子について、それぞれD442G・Int14+1G→A・TaqIB(これらはCETP)、S447X(LPL)、514CT(LIPC)、SstI(APOC3)という6つの一塩基多型(SNPs)の解析を行った。HDL代謝に関係するCETPのD442G、Int14+1G→A、TaqIBの変異型は、いずれも有意にHDL-C高値との相関を示し、CETPの遺伝子多型はHDLコレステロールとよく相関することが確認された。これまでの研究からは、D442GとInt14+1G→Aの変異型ではCETP活性が低下するためにHDL-Cを上昇させるといわれているが、TaqIBの変異型は逆にCETP活性を高めるとされており、TaqIB変異型におけるHDLコレステロール上昇の機序については不明である。なお、Int14+1G→Aの変異はCETP欠損症に関係し、日本人で重要であるが、欧米ではほとんど見つかっていない。今回の調査ではヘテロの頻度が0.6%で

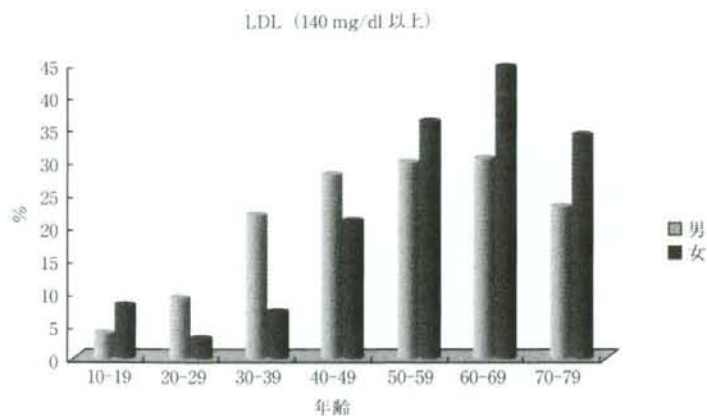


図5 各年代別，男女別の高LDL コレステロール血症の頻度

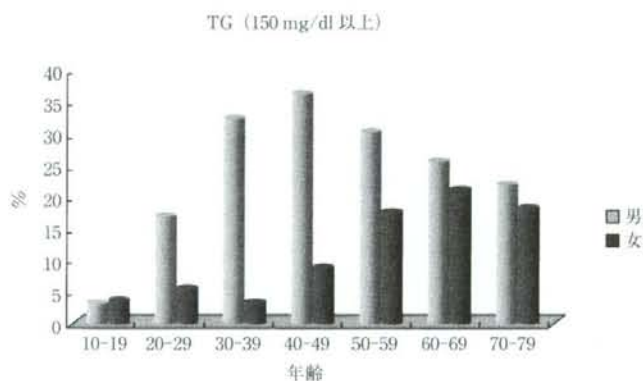


図6 各年代別，男女別の高トリグリセリド血症の頻度

あり，この変異型については日本人でもかなり少ないことが明らかになった²⁾。

トリグリセリド代謝に関係する LPL の S447X の変異型では，有意にトリグリセリド低値，HDL-C 高値を示した，LIPC もトリグリセリド代謝に関係するはずであるが，その 514CT の変異はトリグリセリドとは相関せず，むしろ変異型では HDL コレステロールが有意に上昇していた，APOC3 の SstI 変異型においては，トリグリセリドが有意に高かったが，HDL コレステロールとは相関がなかった。このように CETP，LPL，

LIPC，APOC3 の遺伝子多型はトリグリセリドや HDL コレステロールと関係が深いことが今回の大規模な研究でも確認され，日本人における HDL コレステロールの高値が CETP，LPL の遺伝子多型と関わっていることが示唆された，詳細に関しては文献 2 をご参照いただきたい。

また，アポリポ蛋白 E (アポ E) 多型と血清脂質との関係についても解析した，E2/E2 は次々項にあるようにⅢ型高脂血症の原因となることが知られている，アポ E 多型の頻度は表に示すように E2/E2 が 0.4%，E2/E3 が 6.8%，E3/E3 が 72.9

表 アポE遺伝子多型と血清脂質との関係

	$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$	total	P value
	平均±SEM	平均±SEM	平均±SEM	平均±SEM	平均±SEM	平均±SEM	平均±SEM	
男性 (%)	71.4	50.0	42.2	42.9	61.5	25.0	43.1	0.179
年齢	52.8±10.1	49.5±2.11	50.8±5.32	46.7±0.69	47.4±1.30	43.2±4.61	47.1±0.58	0.659
T-cho	165.0±23.8	189.7±3.00	202.9±12.6	201.8±0.92	206.8±1.95	223.3±9.18	202.1±0.81	<0.0001
TG	171.4±52.8	118.8±8.55	189.0±53.3	117.0±2.41	128.0±5.16	127.9±18.9	119.8±2.13	0.023
HDL-c	51.2±9.51	63.6±1.92	53.0±3.07	59.8±0.41	58.0±0.82	61.9±3.48	59.7±0.36	0.007
LDL-c	70.5±5.63	101.9±2.75	117.2±8.07	118.5±0.91	120.5±1.93	131.5±7.97	117.7±0.79	<0.0001
RLP-c	22.9±1.15	4.4±0.37	12.5±7.59	4.7±0.17	5.2±0.33	4.1±0.58	4.8±0.15	<0.0001
血糖	121.3±19.5	104.7±3.27	110.6±9.37	103.9±0.94	103.3±2.17	88.6±2.54	103.9±0.83	0.461

%, E3/E4 が 10.7%, E2/E4 が 0.8%, E4/E4 が 1.1% であった。ANOVA による解析により E2/E2, E2/E3, E3/E3, E3/E4, E2/E4, E4/E4 間で総コレステロール, トリグリセリド, HDL コレステロール, LDL コレステロール, RLP コレステロールいずれも p 値は 0.05 未満であった。また、同時に測定した血糖値, インスリン値においても p 値は 0.05 未満であった。このように日本人の血清脂質とアポE多型との関連が明らかになった³⁾。

おわりに

2000 年に行われた日本人の血清脂質調査の結果をもとに日本人における血清脂質の特徴について述べた。これまで日本人においては虚血性心疾患の発症率が欧米に比べ低かったが、その理由は

魚や大豆製品を多く摂取する食生活に加え、LDL コレステロールが欧米人に比べ低く、HDL コレステロールが高いことに起因するものではないかと考えられる。しかしながら、今回の調査結果を見る限り、LDL コレステロールについてはほぼ欧米と同じレベルにまで増加しており、男性を中心にメタボリックシンドロームが増加しつつあることを考えると若年から生活習慣の改善に関する取り組みを進める必要がある。

文 献

- 1) Arai, H. et al.: J. Atheroscler. Thromb., 12: 98, 2005.
- 2) Arai, H. et al.: J. Atheroscler. Thromb., 12: 240, 2005.
- 3) Arai, H. et al.: J. Arterioscl. Thromb., 14: 167, 2007.

フィブラートの効果—VA-HITを中心に

荒井秀典*

要旨

- ・低 HDL コレステロール血症は脳卒中の発症と関係する。
- ・フィブラートは低 HDL コレステロール血症を改善し、高トリグリセリド血症を改善する。
- ・VA-HIT 試験は冠動脈疾患の既往のある低 HDL コレステロール血症を持つ男性を対象にゲムフィプロジルを用いて行われた大規模臨床試験である。
- ・本試験において低 HDL コレステロール血症、高トリグリセリド血症の改善とともに虚血性脳梗塞の発症抑制が認められた。
- ・フィブラート系薬剤は二次予防で低 HDL コレステロール血症を伴うハイリスク患者の脳卒中リスクを減少させることが期待される。

はじめに

脳卒中の一次、二次予防に関する脂質低下療法によるエビデンスは、ほとんどがスタチンを用いたものであり、フィブラートを用いたものは少ないが、今回はフィブラートの一種であるゲムフィプロジルを用いた VA-HIT 試験における脳血管障害に対するイベント抑制効果について概説する。

HDL コレステロールと脳血管障害

低 HDL コレステロール血症が冠動脈疾患のリスクファクターであることは確立している¹⁾。LDL コレステロールと脳梗塞の関係については、その関係を示すエビデンスは少ないが、いくつかのコホート研究で低 HDL コレステロール血症が脳血管障害のリスクであることは明らかとなっている^{2~4)}。

VA-HIT 試験は低 HDL コレステロール血症を持つ冠動脈疾患患者を対象として、HDL コレステロールを上げ、トリグリセリドを下げることにより脳心血管イベントの減少が得られるかどうかを初めて検証した大規模臨床試験である⁵⁾。本試験における一次エンドポイントは冠動脈疾患死と非致死性の心筋梗塞であり、脳血管障害は二次エンドポイントになっている。本稿においては、VA-HIT 試験におけるゲムフィプロジルの脳血管障害への影響について解説する。

VA-HIT 試験の概略

VA-HIT 試験はアメリカ合衆国における 20 のベテラン病院で、心筋梗塞既往があるか、血行再建術を受けたことがあるか、虚血所見の明らかな狭心症を持っているか、冠動脈造影で主要冠動脈に有意狭窄がある患者の中で、HDL コレステロールが 40 mg/dl 以下、LDL コレステロールが 140 mg/dl 以下、トリグリセリドが 300 mg/dl 以

*ARAI Hidenori 京都大学医学部附属病院老年内科 [〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54]

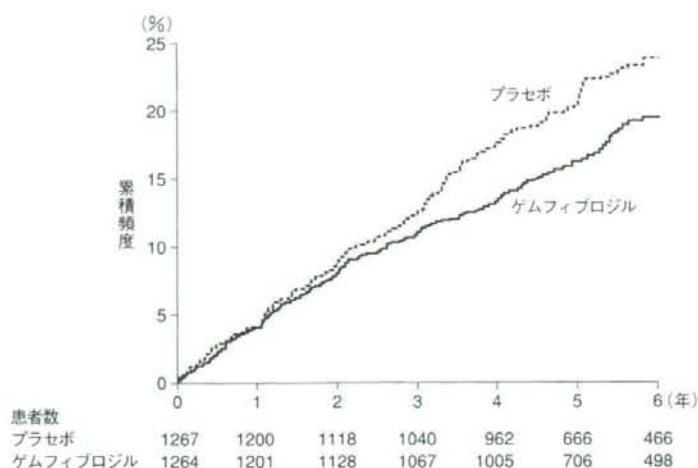


図1 VA-HIT試験における一次エンドポイントの結果：プラセボ群およびゲムフィプロジル群における冠動脈疾患死および非致死性心筋梗塞の発症頻度

表1 治療群、非治療群における脳血管イベントのタイプ

	プラセボ	ゲムフィプロジル	全体
虚血性			
血栓性	16 (21)	3 (5)	19 (14)
ラクナ	13 (17)	14 (24)	27 (20)
塞栓性	23 (30)	24 (41)	47 (35)
不明*	17 (22)	11 (20)	28 (21)
虚血性全体	69 (91)	52 (90)	121 (90)
出血性	5 (7)	6 (10)	11 (8)
不詳†	2 (2)	0	2 (2)
全体	76 (100)	58 (100)	134 (100)
致死性	9	3	

値はイベント数 (%)

*：ここに分類されたイベントは虚血性と判定されたが、どの分類に入るかについては決められず。

†：ここに分類されたイベントは急性の脳血管障害と診断されたが、その診断根拠となるイメージが示されなかった。

(文献⁶⁾より引用し改変)

下を満たす74歳未満の男性患者2,531名をプラセボ群とゲムフィプロジル1,200mgに無作為に割り付けし、平均5.1年フォローしたものである。

エントリーした患者の平均LDLコレステロールは111mg/dl、総コレステロール175mg/dl、

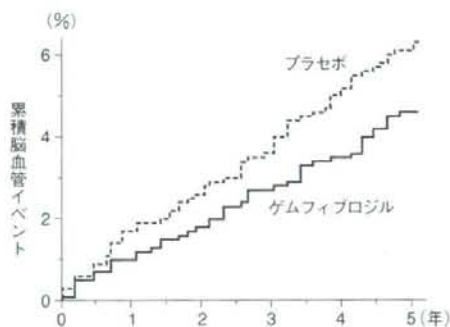


図2 VA-HIT試験におけるプラセボ群およびゲムフィプロジル群別の脳血管イベントの発症頻度

HDLコレステロール32mg/dl、トリグリセリド161mg/dlであった。1年後の血清脂質値の変化であるが、ゲムフィプロジル群でHDLコレステロールが6%増加し、トリグリセリドは31%低下し、総コレステロールは4%低下した。LDLコレステロール値に変化はなかった。一次エンドポイントである冠動脈疾患死および非致死性心筋梗塞は、ゲムフィプロジル群でプラセボ群に比べ22%減少した(図1)。

あった。全脳血管イベントのうち 38 イベントは心血管イベントのあとに起こっていた。図 2 に示すようにゲムフィブロジルによるイベント抑制効果は治療開始後 6~12 カ月の間にすでに現れている。

表 2 はゲムフィブロジルの効果がどういった患者背景に基づくものであるかを明らかにするためのサブ解析の結果である。すべての項目に関して Heterogeneity 検定は有意ではなく、治療効果は治療前の患者背景に左右されるものではないことが明らかになった。ただ、ベースラインの HDL コレステロールに関しては p 値が 0.05 とボーダーラインであり、HDL コレステロールがより低い方(31.5 mg/dl 未満)が、ゲムフィブロジルによる治療によりベネフィットを受けた可能性がある。

このように低 HDL コレステロール血症を持つ二次予防患者において、ゲムフィブロジルは脳血管イベントの発症を 31%減少させることが明らかとなった。また、このゲムフィブロジルの効果はスタチンがそうであるように、主として虚血性、特に血栓性の脳梗塞を減少させる効果のあることがこの VA-HIT 試験により実証された。ゲムフィブロジルは、また致死性の脳血管イベントを減少させることも示された。

VA-HIT における対象は、低 HDL コレステロール血症を持つ二次予防の患者であり、いわゆるハイリスクな患者群である。それに対して一次予防試験として同じゲムフィブロジルを用いて行われた Helsinki Heart Study は、脳血管イベントに関してリスクが低い集団を対象とした試験と考えられるが、この試験においてゲムフィブロジルは有意に脳血管イベントのリスクを減少させなかった⁷⁾。また、2 型糖尿病患者を対象にフェノフィブラートを用いて行われた FIELD 試験においても、フェノフィブラート群で脳血管イベントは 10%減少したが、統計学的には有意ではなかった⁸⁾。

フィブラートがどのようなメカニズムで脳血管イベントの発症を抑制するかについては十分に研究されているわけではないが、フィブラートには HDL コレステロールを上昇させ、トリグリセリ

ドを減少させるとともに内皮細胞機能を改善し、抗炎症作用があることから動脈硬化の安定化に寄与するのではないかと考えられている⁹⁾。フィブラートはまた第 7 因子、トロンビン、フィブリノーゲン、血小板機能を減少させると考えられており、これらの抗血栓作用も脳梗塞の発症予防に効果があるのではないかと考えられる^{10,11)}。

おわりに

VA-HIT 試験の結果を中心にフィブラート系薬剤による脳卒中発症抑制効果について概説した。ゲムフィブロジルは、残念ながら日本では発売されていないが、日本で発売されているフィブラート系薬剤であるフェノフィブラートやベザフィブラートにも同様な効果のあることが期待される。

文 献

- 1) Kitamura A, Iso H, Naito Y, et al: High-density lipoprotein cholesterol and premature coronary heart disease in urban Japanese men. *Circulation* 89: 2533-2539, 1994
- 2) Tanne D, Yaari S, Goldbourt U: High-density lipoprotein cholesterol and risk of ischemic stroke mortality. A 21-year follow-up of 8586 men from the Israeli Ischemic Heart Disease Study. *Stroke* 28: 83-87, 1997
- 3) Lindstrom E, Boysen G, Nyboe J: Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City Heart Study. *BMJ* 309: 11-15, 1994
- 4) Wannamethee SG, Shaper AG, Ebrahim S: HDL-Cholesterol, total cholesterol, and the risk of stroke in middle-aged British men. *Stroke* 31: 1882-1888, 2000
- 5) Rubins HB, Robins SJ, Collins D, et al: Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 341: 410-418, 1999
- 6) Bloomfield Rubins H, Davenport J, Babikian V, et al: Reduction in stroke with gemfibrozil in men with coronary heart disease and low HDL cholesterol: The Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation* 103: 2828-2833, 2001
- 7) Frick MH, Elo O, Haapa K, et al: Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil

- in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* **317**: 1237-1245, 1987
- 8) Keech A, Simes RJ, Barter P, et al: Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* **366**: 1849-1861, 2005
- 9) Staels B, Koenig W, Habib A, et al: Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* **393**: 790-793, 1998
- 10) Fujii S, Sobel BE: Direct effects of gemfibrozil on the fibrinolytic system. Diminution of synthesis of plasminogen activator inhibitor type I. *Circulation* **85**: 1888-1893, 1992
- 11) Schonfeld G: The effects of fibrates on lipoprotein and hemostatic coronary risk factors. *Atherosclerosis* **111**: 161-174, 1994

「成人病と生活習慣病」バックナンバー

37 卷 (2007 年) 第 2 号 (2 月)	特集	実地医家のための造血器腫瘍の診療 —minimum-requirementとtopics—	(2,650 円)
第 3 号 (3 月)	特集	薬剤性肺障害のすべて	(2,650 円)
第 4 号 (4 月)	特集	注目されるべき脳卒中後肺炎と脳卒中後うつ病	(2,650 円)
第 5 号 (5 月)	特集	産業界のための生活習慣病の予防と治療	(2,650 円)
第 6 号 (6 月)	特集	消化器癌の化学(放射線)療法はここまできた —日本の現状は?	(2,650 円)
第 7 号 (7 月)	特集	心不全診療の最前線	(2,650 円)
第 8 号 (8 月)	特集	利尿薬の最新知識と使い方	(2,650 円)
第 9 号 (9 月)	特集	“COPD up to date”	(2,650 円)
第 10 号 (10 月)	特集	40 歳からの生活習慣病健診 —平成 20 年の開始に備えて	(2,650 円)
第 11 号 (11 月)	特集	がん罹患ハイリスク群の臨床	(2,650 円)
第 12 号 (12 月)	特集	移植と人工臓器の哲学 —医療従事者へのメッセージ	(2,650 円)
38 卷 (2008 年) 第 1 号 (1 月)	特集	最新の循環器画像診断	(2,680 円)

*発行 1 年以内のバックナンバーのご注文ならびに在庫照会には下記までご連絡下さい。価格は定価です。

東京医学社販売部

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町 2-20-13 Y's コーラルビル
TEL 03-3265-3551 FAX 03-3265-2750

Original Article

Long-Term Probucol Treatment Prevents Secondary Cardiovascular Events: a Cohort Study of Patients with Heterozygous Familial Hypercholesterolemia in Japan

Shizuya Yamashita¹, Hideaki Bujo², Hidenori Arai³, Mariko Harada-Shiba⁴, Shigeyuki Matsui⁵, Masanori Fukushima⁶, Yasushi Saito⁷, Toru Kita⁸, and Yuji Matsuzawa⁹

¹Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

²Department of Genome Research and Clinical Application, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

³Department of Geriatric Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

⁴Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

⁵Department of Pharmacoepidemiology, School of Public Health, Kyoto University, Kyoto, Japan

⁶Translational Research Center, Kyoto University Hospital, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

⁷Department of Clinical Cell Biology, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

⁸Department of Cardiovascular Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

⁹Department of Internal Medicine, Sumitomo Hospital, Osaka, Japan

Aim: The POSITIVE study assessed whether long-term treatment with probucol, a potent anti-oxidant and cholesteryl ester transfer protein (CETP) activator, is associated with a lowered risk of cardiovascular events in a very high-risk population: familial hypercholesterolemia (FH).

Methods: The study cohort included 410 patients with heterozygous FH, diagnosed between 1984 and 1999 by cardiovascular and metabolic experts at fifteen centers. Traceable patients were screened using predefined eligibility criteria. The primary outcome measure for comparison between probucol exposure and non-exposure was the time to the first cardiovascular event involving hospitalization.

Results: Analysis revealed significant differences in baseline characteristics and follow-up treatment between exposure and non-exposure. An observed indication bias was the use of probucol in more severe FH at diagnosis, both for primary and secondary prevention. When the multivariate Cox regression procedure was used after adjustment for possible confounding factors, probucol lowered the risk (hazard ratio [HR], 0.13; 95% confidence interval [CI], 0.05–0.34) in secondary prevention ($n=74$) and was statistically significant ($p<0.001$), although not significant (HR, 1.5; 95% CI, 0.48–4.67; $p=0.49$) in primary prevention ($n=233$). Safety assessment found no specific difference between exposure and non-exposure.

Conclusion: Long-term probucol treatment may prevent secondary attack in a higher cardiovascular risk population of heterozygous FH.

J Atheroscler Thromb, 2008; 15:292-303.

Key words; Atherosclerosis, Antioxidants, CETP activator, Dyslipidemia

Introduction

Cardiovascular (CV) diseases, including coronary

Address for correspondence: Shizuya Yamashita, Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
E-mail: shizu@imed2.med.osaka-u.ac.jp

Received: July 17, 2008

Accepted for publication: September 19, 2008

heart disease and stroke, are the leading cause of death in Japan. Prevention of fatal CV events is therefore the final goal as well as the rationale of cholesterol-lowering therapy.

Probucol, a conventional cholesterol-lowering drug, originated with the report by Barnhart in 1970¹⁾. The drug has been used clinically in Japan since 1985. Nearly 60,000 Japanese patients still take probucol; western countries discontinued probucol use after

the original manufacturer's withdrawal notice to the United States FDA in 1995 after 18 year's use of the drug. Probucol's cholesterol-lowering mechanism has not yet been clearly established, but it is thought to increase catabolic excretion of cholesterol into bile². Later studies³⁻⁵ have described new mechanisms of probucol, including anti-atherogenic and anti-oxidant actions. Another controversial and anti-atherogenic feature of probucol is its paradoxical effect of lowering high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). This action reflects, most likely, its molecular mechanisms: promoting cholesterol efflux, and enhancing reverse cholesterol transport by activation of cholesteryl ester transfer protein (CETP)⁶⁻⁸ and class B type 1 scavenger receptor^{9,10}. Matsuzawa and his colleagues reported an observed close correlation between the extent of regression in Achilles' tendon xanthoma and probucol-induced decrease in HDL-C levels in patients with familial hypercholesterolemia (FH)¹¹.

No large-scale, randomized, double blind comparative study has been conducted to justify the use of probucol in the prevention of CV events or diseases. However, clinical studies as well as pre-clinical data have been accumulating evidence of the clinical worth of probucol in arteriosclerotic diseases. Numerous clinical results, including a reduction in Achilles' tendon xanthoma thickness after long-term treatment for FH^{12,13}, reduced rates of restenosis after angioplasty¹⁴⁻¹⁶, and a decrease in carotid artery intima-media thickness^{17,18} support the therapeutic and preventative effects of probucol on arteriosclerotic lesions and plaque. To evaluate the risk and benefit of long-term probucol treatment, we conducted a cohort study to determine whether probucol treatment is associated with the risk reduction of CV events in patients with heterozygous FH, a very high-risk population.

Methods

Study Cohort

We registered patients with FH who received treatment between January 1, 1984 and December 31, 1999 at 15 centers specializing in CV and metabolic diseases, including FH, nationwide. Patients were traceable by medical record and met the diagnostic criteria for heterozygous FH under the Japan Atherosclerosis Society Guidelines (2002) for the Diagnosis and Treatment of Atherosclerotic CV Diseases¹⁹. Definite heterozygous FH was defined as having at least two of the major features: total cholesterol (TC) of 260 mg/dL and above; tendon xanthoma or xanthoma tuberosum; reduced or abnormal receptor activity noted by LDL receptor analysis. Probable heterozy-

gous FH was defined as having at least one each of the major (as above) and minor features: palpebral xanthoma; arcus juvenilis (<50 years); juvenile (<50 years) ischemic heart disease. For other eligibility criteria, we excluded patients with possible homozygous FH or with severe ventricular arrhythmias (polymorphic premature ventricular contractions). Possible homozygous FH was defined as having any one of the clinical features: defect of homozygous or hetero-polymeric LDL receptors confirmed by gene analysis; no LDLR activity observed by receptor analysis; severe elevation of plasma TC higher than 500 mg/dL; xanthoma or atherosclerotic vascular lesions including symptoms of juvenile ischemic heart disease; hypercholesterolemia confirmed in both parents; history of ischemic heart disease confirmed in both parents; or poor response to any 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase inhibitor (statin).

During the study period between June, 2004 and September, 2005, we collected anonymous case report forms with the patients' baseline data, including medical history, findings at clinical examination, medication data, and laboratory data. The investigators transcribed the data on to case report forms (identified by a code) from the stored medical charts of the patients. The observation period was the period for which each patient's clinical course could be traced. The longest observation period exceeded 20 years for patients on stable doses of probucol.

We required a sample size of 200 in both the probucol exposure and non-exposure groups, supposing a difference of 10% in the incidence of CV events for 5 years (15% in exposure and 25% in non-exposure). A least 400 subjects were needed to detect the difference with 80% power and a type I error of 5% at the 5% significance level with two-sided log-rank test based on normal approximation. The study protocol was approved through the process of ethics committee or institutional review board at each center.

Definitions and Endpoints

The primary outcome measure was the time to the first CV event, defined as acute myocardial infarction (MI), angina pectoris (AP), heart failure (HF), stroke, transient ischemic attack (TIA) or arteriosclerotic peripheral artery diseases (PAD) leading to hospitalization or death as well as sudden death within 24 hours of an observed intrinsic event. The obtained baseline data at the first visit of each patient included demographic characteristics: sex, date of diagnosis at the participant medical center, age, height, weight, and habits of smoking and drinking. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided

by the square of height in meters. The other collected characteristic factors at diagnosis were the presence of xanthoma and its location, prior CV event, onset date if any prior CV event, treatment for the event, and other possible risk factors for CV events, including the presence of hypertension, diabetes, ventricular arrhythmia, and PAD. We collected data on cholesterol-lowering therapy (with or without probucol) and other concomitant therapy with anti-platelet, antihypertensive or diabetic drugs. Dates of drug initiation, discontinuation, re-administration, and termination were entered as elemental information. Treatment period was defined as the length from initiation until medication termination, or until the occurrence of the defined CV event, whichever came first. A lipid profile of TC, triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and HDL-C, blood pressure, level of fasting blood sugar (FBS), hemoglobinA_{1c} (HbA_{1c}), and thickness of tendon xanthoma in both feet were variables of interest, seen as potential predictors of CV events. We obtained measurements of those variables on a yearly basis after each patient was diagnosed. LDL-C levels were calculated from TC and HDL-C measurements with the Friedewald formula in TG < 400 mg/dL. For TG of 400 mg/dL and more than 400 mg/dL, the expression of $0.16 \times TG$ was applied in stead of $0.2 \times TG$ ²⁰. Most patients had fasted compliantly at periodic checkups of their lipid levels. We set a follow-up period of 10 years for the measurements.

Statistical Analyses

The primary objective of analysis was a comparison between probucol exposure and non-exposure to evaluate whether treatment with probucol (500 mg to 1,000 mg daily) for FH provided CV benefits. The analysis was based on intent-to-treat principles. The secondary objective was to assess whether changes in the lipid profile after probucol treatment predicted CV events in the cohort. Event-free survival, defined as the time from diagnosis to the first CV event, was determined as a response variable. Statistical analysis was performed to evaluate clinical outcomes separately for secondary and primary prevention groups; that is, patients with or without a history of CV events at diagnosis.

Baseline characteristics of each group were explored to detect risk factors for CV events because potential confounders, including indication bias, were anticipated. For baseline comparison, Wilcoxon's rank sum test and Fisher's exact test were used for continuous variables and categorical variables respectively. For detection of risk factors, univariate Cox proportional

hazards regression with a baseline variable as covariate was used as a screening step to determine the relationship with CV events. Variables that achieved significance at the level of 20% in univariate analysis were subsequently included in a multivariate Cox proportional hazards regression using backward variable selection. Variables proving significant at the 10% significance level were selected as risk factors to be adjusted. Consequently, probucol treatment effect was evaluated using the multivariate Cox model with adjustment for the selected baseline variables. Finally, the other observed treatment factors: cholesterol-lowering drugs other than probucol, LDL-apheresis, anti-platelet drugs, anti-hypertensive drugs, and diabetic drugs were entered into that model to assess their effects.

For the association between changes in lipid profile after probucol treatment and the risk of CV events, pre-treatment values of TG, LDL-C, HDL-C as well as TC, and each lipid reduction ratio after treatment were used as covariates. Multivariate analyses of time from probucol start to the first CV event used multivariate Cox's proportional hazards models. Statistical analysis was performed with SAS version 8.2.

Results

Patient Characteristics

We collected data from the medical records of 541 patients, and excluded the data of 131 patients that did not meet eligibility predefined in the protocol.

The flow diagram (Fig. 1) gives reasons for the exclusion. A substantial fraction of probucol-exposed patients, 80.0% and 93.2%, took probucol within two years after diagnosis for in primary and secondary prevention groups, respectively. Baseline characteristics at diagnosis are given for each group (Table 1, 2). The secondary prevention group (Table 2) had prior diseases of AP, MI, stroke, HF, and TIA. This group was found to have significant higher proportions of men (60.2%, $p < 0.01$), smokers (50.0%, $p < 0.01$), hypertension (40.9%, $p < 0.001$) diabetes (15.9%, $p = 0.02$), and older median age (52 years, $p = 0.01$) than the primary prevention group. Moreover, the group tended to have hypo-HDL cholesterolemia of median 42 (20-90) mg/dL, and to receive combined treatments with anti-platelet drugs (56.8%), anti-hypertensive drugs (53.4%), and LDL-apheresis (14.8%).

Comparison between probucol-exposed and non-exposed groups revealed significant differences in some baseline characteristics and treatments, which showed a confounding indication that patients with more severe FH took probucol. For baseline characteristics, the exposed group for primary prevention had more

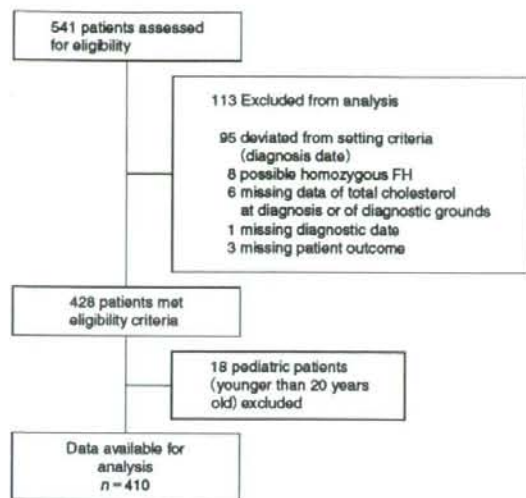


Fig. 1. Patient Flowchart.

We collected data from the medical records of 541 patients, and excluded the data of 131 patients who did not meet the eligibility predefined in the protocol. The flow diagram gives reasons for the exclusion.

palpebral xanthoma (13.4%, $p=0.05$), thicker median measurement of tendon xanthoma (12.5 mm, $p<0.01$), higher median HbA_{1c} (5.8%, $p=0.03$), and more use of antihypertensive drugs (25.3%, $p<0.01$). Their lipid profile was more severe with a higher median baseline TC (325 mg/dL, $p=0.001$), a higher median LDL-C level (253 mg/dL, $p<0.001$), and a lower HDL-C level (47 mg/dL, $p<0.001$) than the unexposed group. The exposed group for secondary prevention had a higher prevalence of post-MI (44.6%, $p<0.01$) than the unexposed group. Observed medications were also significantly different between the exposed and unexposed groups. The exposed group used anti-hypertensive drugs concomitantly at a higher rate (25.3% vs. 11.2%, $p<0.01$) for primary prevention.

Descriptive analysis of baseline characteristics and treatments during observation implies that in both primary and secondary prevention, the exposed groups tended to include patients with more severe FH at diagnosis. Arguably, patients considered more severe at diagnosis would receive more intensive treatment, including probucol.

Outcomes

We present the absolute number of CV events requiring hospitalization by prevention group with

details of the events (Table 3). The incidence of CV events without consideration of confounding factors was 11.6% in the exposed group and 4.5% in the unexposed group for primary prevention. For secondary prevention, the incidence was 27.0% in the exposed group and 64.3% in the unexposed group. The event-free survival curve of the secondary prevention group is given (Fig. 2).

To identify risk factors for CV events, we determined the relationship between the incidence and every baseline variable using univariate Cox regression at a significant level of 20%. Variables proving significant at the 10% significance level in multivariate Cox regression were selected as risk factors to be adjusted. We estimated the effect of treatment after adjusting the selected risk factors. We calculated hazard ratios (HRs) with 95% confidence interval (CI) for binary variables, BMI ≥ 25 vs BMI < 25 , drinking vs no drinking, for example, and the indicated HRs corresponded to a 1 standard deviation increase for continuous variables, including TC. Estimated results are given (Table 4).

In the primary prevention group, significant variables were BMI ≥ 25 (HR 1.86, 95% CI 0.87–3.98; $p=0.11$), drinking (HR 2.17, 95% CI 1.02–4.63; $p=0.05$), tendon xanthoma (HR 2.17, 95% CI 0.76–6.23; $p=0.15$), prior diseases other than CV events (HR 1.87, 95% CI 0.87–3.99; $p=0.11$), PAD (HR 5.23, 95% CI 0.70–39.2; $p=0.11$), diabetes (HR 2.27, 95% CI 0.79–6.50; $p=0.13$), TC (HR 1.37, 95% CI 0.99–1.89; $p=0.06$), HDL-C (HR 0.75, 95% CI 0.50–1.12, $p=0.16$), SBP (HR 1.48, 95% CI 1.00–2.18; $p=0.05$), and the thickness of tendon xanthoma (HR 1.50, 95% CI 1.06–2.14; $p=0.02$). Three of these variables, drinking, TC, and PAD were selected for adjustment at the 10% significance level as a result of a multivariate Cox regression with backward variable selection. After adjustment for these three baseline variables, we found no significant effect by probucol at the 5% significant level. The estimated hazard ratio of probucol use for CV events was 1.50 (95% CI 0.48–4.67; $p=0.49$).

In the secondary prevention group, significance variables were drinking (HR 1.74, 95% CI 0.80–3.79; $p=0.17$), presence of palpebral xanthoma (HR 5.34, 95% CI 2.26–12.61, $p<0.001$), TIA (HR 4.16, 95% CI 0.54–32.21; $p=0.17$), history of coronary artery bypass graft (HR 0.31, 95% CI 0.11–0.90; $p=0.03$), hypertension (HR 0.58, 95% CI 0.26–1.28; $p=0.18$), diabetes (HR 2.89, 95% CI 1.30–6.42; $p<0.01$), and fasting blood sugar (HR 1.31, 95% CI 0.91–1.89; $p=0.15$). Two of these variables, palpebral xanthoma and diabetes, were selected for adjustment at the 10% sig-

Table 1. Baseline characteristics of patients in primary prevention group[†]

Characteristics	All n=322	Primary prevention No. (%) of patients		P
		Exposed n=233 (72.4)	Unexposed n=89 (27.6)	
Age, mean (range)	49 (27-74)	50 (20-74)	47 (20-72)	0.18
Men, No. (%)	134 (41.6%)	96 (41.2%)	38 (42.7%)	0.90
BMI \geq 25	71 (22.5%)	49 (21.4%)	22 (25.6%)	0.45
Smoker	99 (33.2%)	74 (34.1%)	25 (30.9%)	0.68
Drinker	124 (42.2%)	93 (43.7%)	31 (38.3%)	0.43
Xanthoma	259 (80.7%)	190 (81.9%)	69 (77.5%)	0.43
Tendon xanthoma	245 (76.3%)	181 (78.0%)	64 (71.9%)	0.30
Nodular xanthoma	28 (8.7%)	22 (9.5%)	6 (6.7%)	0.51
Palpebral xanthoma	36 (11.2%)	31 (13.4%)	5 (5.6%)	0.05
PAD	4 (1.2%)	1 (0.4%)	3 (3.4%)	0.07
Hypertension	54 (16.8%)	40 (17.2%)	14 (15.7%)	0.87
Diabetes	22 (6.9%)	17 (7.3%)	5 (5.6%)	0.81
Lipid profile, mg/dL				
TC [‡]	320 (188-493)	325 (188-493)	307 (194-464)	0.001
TG [‡]	120 (28-1289)	121 (34-1068)	120 (28-1289)	0.96
HDL-C [‡]	49 (20-108)	47 (20-90)	52 (27-108)	<0.001
LDL-C [‡]	244 (45-425)	253 (98-425)	223 (45-403)	<0.001
Blood Pressure, mmHg				
SBP [§]	129 (82-190)	128 (82-190)	131 (90-190)	0.57
DBP [§]	0 (48-120)	80 (48-120)	80 (56-120)	0.91
FBS (mg/dL) [§]	95 (63-276)	94 (63-140)	95 (81-276)	0.41
HbA _{1c} (%) [§]	5.7 (4.1-12.4)	5.8 (4.1-9.7)	5.3 (4.3-12.4)	0.03
Tendon xanthoma thickness (mm) [§]	12.1 (7.5-49.0)	12.5 (7.5-49.0)	10.5 (8.0-20.0)	<0.01
Treatment				
Cholesterol-lowering drugs (non-probucol)	302 (93.8%)	219 (94.0%)	83 (93.3%)	0.80
LDL-apheresis	7 (2.2%)	6 (2.6%)	1 (1.1%)	0.68
Anti-platelet drugs	49 (15.2%)	41 (17.6%)	8 (9.0%)	0.06
Anti-hypertensive drugs	69 (21.4%)	59 (25.3%)	10 (11.2%)	<0.01
Diabetic drugs	15 (4.7%)	12 (5.2%)	3 (3.4%)	0.37

[†]Continuous variables compared by Wilcoxon's rank sum test, distribution of categorical variables by Fisher's exact test. [‡]Data are median (range). All data are number (%) unless otherwise indicated. Each percentage shown is related to the total number with measurement data. BMI, body mass index; PAD, peripheral artery disease; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; FBS, fasting blood sugar; HbA_{1c}, hemoglobin A_{1c}. LDL-C was calculated with the Friedewald formula.

nificance level as a result of multivariate Cox regression analysis using a backward variable selection. After adjustment for these two baseline variables, the hazard ratio of probucol use for CV events was estimated to be 0.13 (95% CI 0.05-0.34) and significant ($p < 0.001$). In sensitivity analyses, we also obtained similar estimation results on probucol for various sets of baseline covariates for adjustment.

The lipid levels of TC, LDL-C and HDL-C were lowered after probucol treatment both in primary and secondary prevention. In the primary prevention

group, the median (range) levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C closest to before treatment were respectively 305 (165-493), 119 (35-1068), 228 (107-425) and 48 (25-96) mg/dL, and those at 10-year treatment were, respectively, 222 (141-371), 94 (43-335), 157 (91-311) and 39 (17-81) mg/dL. In the secondary prevention, the median levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C closest to before treatment were, respectively, 320 (191-469), 129 (37-636), 240 (117-381) and 44 (24-90) mg/dL, and those at 10-year treatment were, respectively, 211 (135-305), 71 (48-475),