

形成能の評価法は、ISO 23317:2007: Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials として国際標準化された。この評価法では、試験材料を擬似体液に浸漬し、走査型電子顕微鏡及び薄膜 X 線回折法を用いて、経時的に材料表面に形成するアパタイトを観察する。そのため、試験材料の形態に制限があるとともに、アパタイトが形成されるまでに要した時間での評価に留まっている。そこで、試料の形態を選ばず、定量的な解析が可能なフーリエ変換赤外光音響分光法 (FT-IR/PAS) を用いて、チタン合金のアパタイト形成能を評価する方法を検討した。骨系医用材料のアパタイト形成能の定量的評価は、骨結合能に優れた材料の開発に有用であり、骨系医療機器のリスク低減が期待できる。

昨年度は、擬似体液としてハックス平衡塩溶液を用いて、FT-IR/PAS 法によるアパタイト形成能の評価を試みた。そして、Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、ハックス平衡塩溶液浸漬によって、Nb 含量の増加と共にアパタイト形成量が減少することを明らかにした⁶⁾。

現在、チタン合金により高いアパタイ

ト形成能を付与する方法として、アルカリ処理後にカルシウムを導入する方法が検討されている^{7,8)}。そこで、今年度は、現在検討されている塩化カルシウムによるカルシウム導入法^{7,8)}及び我々が考案した水酸化カルシウムによるカルシウム導入法をチタン合金に適用し、これらの表面処理がチタン合金のアパタイト形成能に及ぼす効果を FT-IR/PAS 法を用いて定量的に比較した。

B. 研究方法

1. 試験材料

Ti-Zr 基合金として、Ti と Zr の原子比が 1 : 1 である Ti-Zr 並びに主成分である Ti と Zr の原子比を 1 : 1 に固定し、それに β 相安定化元素のひとつである Nb を添加した Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb 及び Ti-Zr-24Nb を用いた。各 Ti-Zr 基合金の化学組成を表 1 に示した。また、それらの合金を構成している元素の純金属として、Ti、Zr 及び Nb を用いた。さらに、従来から汎用されているチタン合金として、Ti-6Al-4V を用いた。

いずれの試料も直径 14.0 mm、厚さ 1.0 mm の円盤状に加工した後、#400、

表 1 Ti-Zr 基合金の化学組成

Alloy	Chemical composition / mol% (mass%)		
	Nb	Ti	Zr
Ti-Zr	0	50.0 (34.4)	balance
Ti-Zr-4Nb	4.0 (5.3)	48.0 (32.6)	balance
Ti-Zr-8Nb	8.0 (10.4)	46.0 (30.8)	balance
Ti-Zr-16Nb	16.0 (20.3)	42.0 (27.4)	balance
Ti-Zr-24Nb	24.0 (29.7)	38.0 (24.2)	balance

#800 及び #1200 のシリコンカーバイト製耐水研磨紙を用いて、純水中で表面を研磨仕上げした。その後、酢酸エチル、アセトン、エタノール及び超純水の順に超音波洗浄した。

2. 表面処理

試料をポリプロピレン製容器に入れ、5 mol/l 水酸化ナトリウム溶液（和光純薬工業株式会社）17.5 ml を加えて、温度 60.0°C で 24 時間静置した（NaOH 処理）。

NaOH 処理した試料をポリプロピレン製容器に入れ、0.1 mol/l 塩化カルシウム溶液 17.5 ml を加えて、温度 60.0°C で 24 時間静置した（NaOH + CaCl₂ 処理）。

それとは別に、NaOH 処理した試料をポリプロピレン製容器に入れ、0.01 mol/l 水酸化カルシウム溶液 17.5 ml を加えて、温度 60.0°C で 24 時間静置した（NaOH + Ca(OH)₂ 処理）。

3. 擬似体液浸漬

試料をポリプロピレン製容器に入れ、カルシウム及びマグネシウムイオンを含有するハンクス平衡塩溶液（GIBCO #14025、インビトロジェン株式会社）

35 ml を加えた。容器を温度 37.0°C に設定したインキュベータ内に 1 週間静置した。ハンクス平衡塩溶液は一日おきに新鮮なものと交換した。

4. 蛍光 X 線分析 (XRF)

三次元偏光光学系を持つエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 PANalytical Epsilon 5（スペクトリス株式会社）を使用した。試料を厚さ 4 μm のプロレンフィルム（Chemplex Industries, Inc.）に挟んでサンプルカップに固定し、真空雰囲気中で表 2 に示した条件で測定した。ファンダメンタルパラメーター法を用いて定性定量した。

5. デジタル顕微鏡観察

デジタルマイクロスコープ VH-8000C（株式会社キーエンス）を使用し、ズームレンズ VH-Z25（25-175 倍、キーエンス）又は高倍率ズームレンズ VH-Z450（450-3000 倍、キーエンス）を装着して観察した。

6. 走査型電子顕微鏡観察 (SEM)

走査型電子顕微鏡 JSM-5800LV（日本電子株式会社）を使用した。試料を常法に従って金蒸着した後、加速電圧 15

表 2 蛍光 X 線分析測定条件

Secondary target	Excitation voltage / kV	Initial tube current / mA	Measurement time / sec	Measurement element	
				Kα line	La line
Al	35	17	100	Na-Mg	
Ti	40	15	100	Al-Ca	
Ge	75	8	100	Ti-Zn	Hf-Ta
Mo	100	6	100	Ga-Y	W-Bi, Th-U
Al ₂ O ₃	100	6	100	Zr-Yb	

kV で観察した。

7. フーリエ変換赤外光音響分光分析 (FT-IR/PAS)

フーリエ変換赤外分光光度計 JIR-SPX200 (日本電子株式会社) を使用し、光音響検出器 MTEC Model 300 (MTEC Photoacoustics Inc.) を装着した。スキャンスピード 2.0 mm/sec、分解能 8 cm^{-1} 、補間 7 ポイント、アポダイゼーション Happ-Genzel、プリアンプゲイン 10,000×、スキャン回数 1024 回とした。試料を試料セルに導入し、試料セル内の水蒸気を除去するために乾燥空気で十分にパージしてから測定した。また、カーボンブラック薄膜をリファレンス材料として用いた。

C. 研究結果

1. デジタル顕微鏡観察

ハックス平衡塩溶液浸漬後の試料表面をデジタル顕微鏡観察したところ、表面処置していない試料はいずれも析出物が

観察されず、金属表面の研磨痕がはっきりと確認できた。一方、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、いずれの表面処理においても析出物が観察されたが、Ti-Zr-8Nb 及び Zr は、NaOH + Ca(OH)₂ 処理においてのみ析出物が観察された。特に、カルシウム導入のために NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理した Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、試料全面を析出物が覆っていた (図 1)。また、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb 及び Nb は、いずれの表面処理においても析出物が観察されなかった。

2. 走査型電子顕微鏡観察

ハックス平衡塩溶液浸漬後の試料表面を SEM 観察したところ、表面処置していない試料はいずれもアパタイトの形成が確認されなかった。一方、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、いずれの表面処理においても試料全面を覆うアパタイトの形成が観察され、Ti-Zr-8Nb

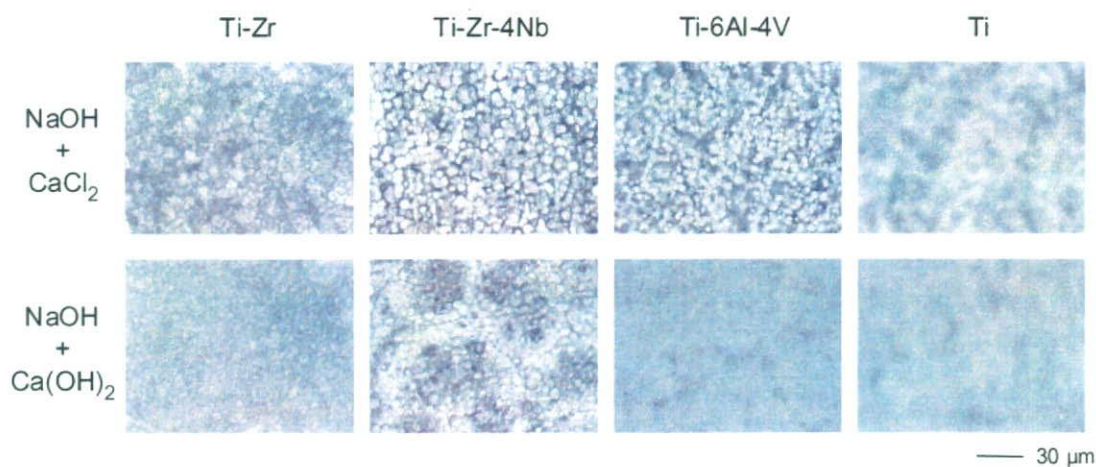


図 1 NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理した Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti のハックス平衡塩溶液浸漬後のデジタル顕微鏡観察像

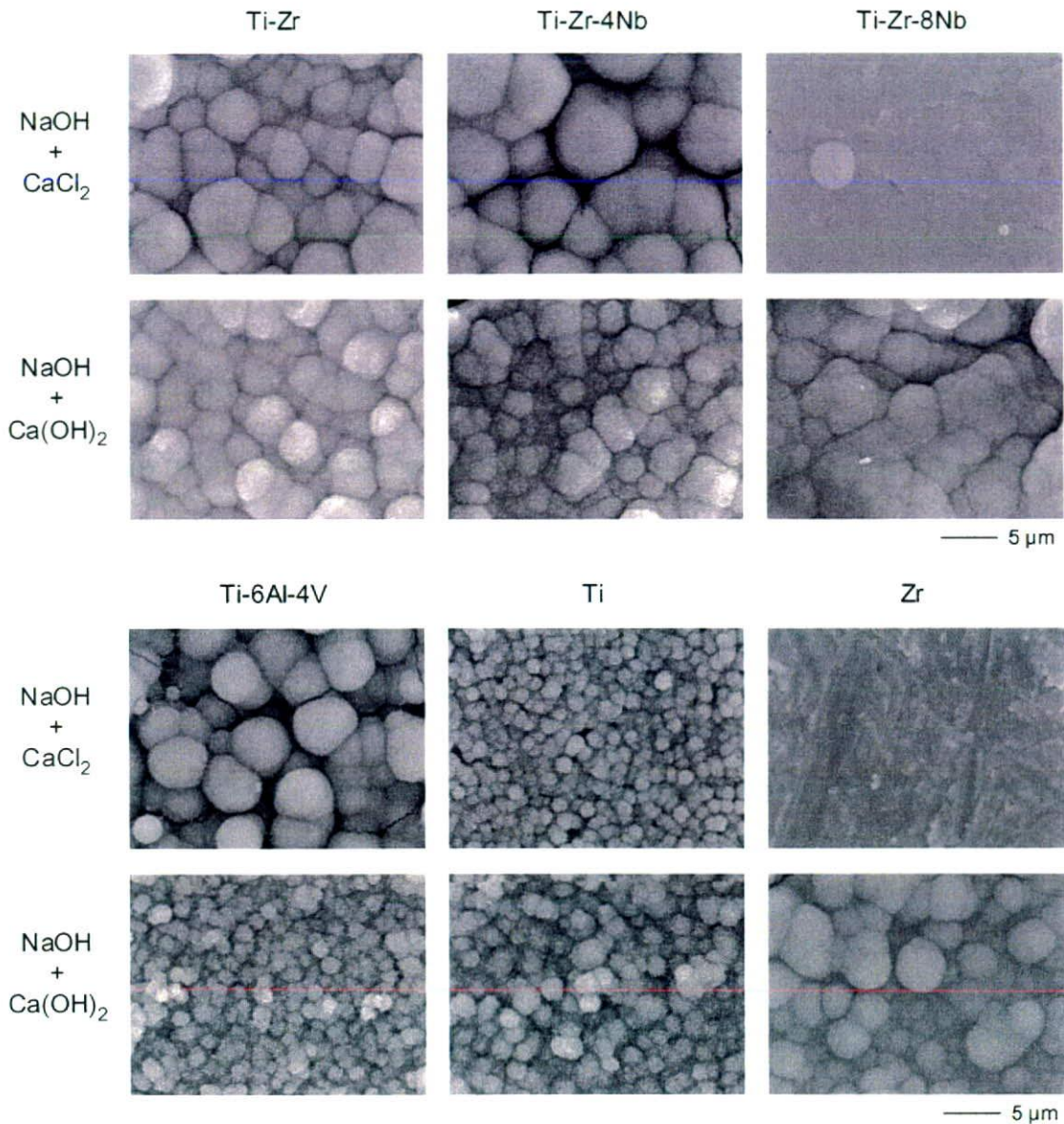


図 2 NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理した Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-6Al-4V、Ti 及び Zr のハンス平衡塩溶液浸漬後の SEM 察像

及び Zr は、NaOH + Ca(OH)₂ 処理においてのみ試料全面を覆うアパタイトの形成が確認された (図 2)。また、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb 及び Nb は、いずれの表面処理においてもアパタイトの形成が確認されなかった。アパタイトが試料全面を覆うほど形成されると、SEM 観察ではアパタイトの形成量を推測することは困難であった。

3. 蛍光 X 線分析

試料表面のカルシウム濃度を XRF 分析で測定したところ、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、どちらのカルシウム導入法においても試料表面にカルシウムを導入できたが、NaOH + CaCl₂ 処理に比べて、NaOH + Ca(OH)₂ 処理の

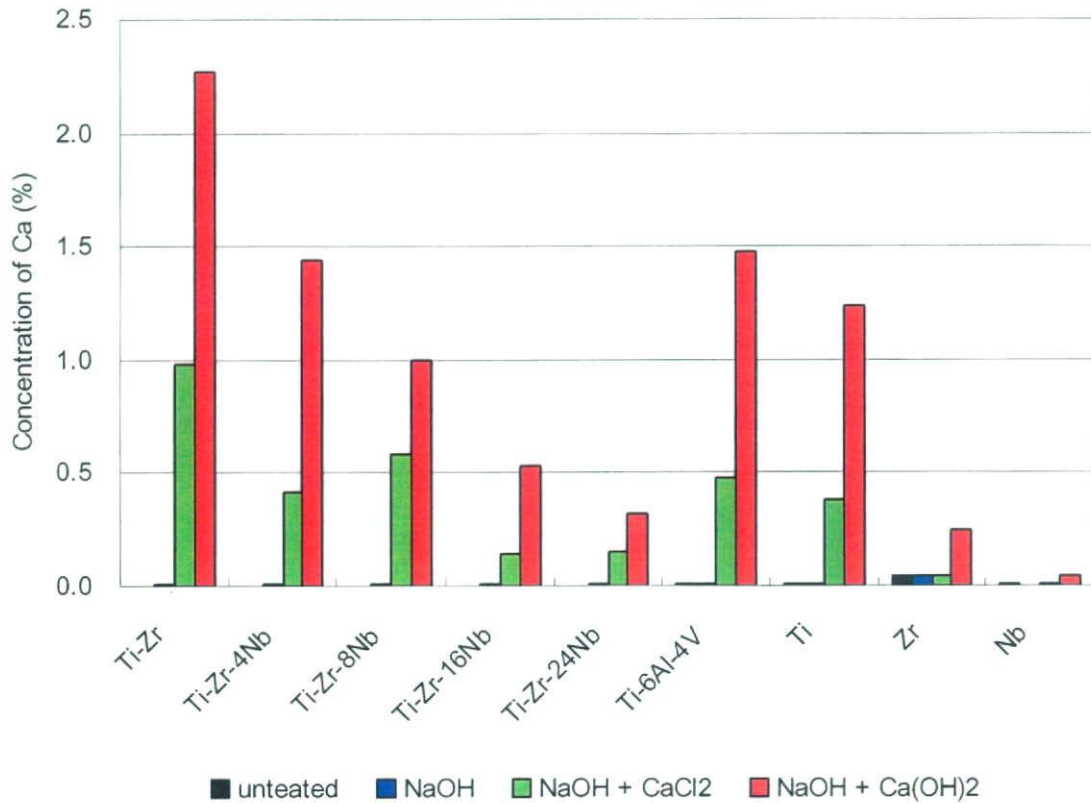


図3 XRF分析による表面処理後の材料表面のカルシウム濃度

方がカルシウム導入量は約2倍高かった(図3)。一方、ZrはNaOH + Ca(OH)₂処理においてのみカルシウムを導入でき、Nbはどちらのカルシウム導入法においてもカルシウムを導入できなかった(図3)。

4. フーリエ変換赤外光音響分光分析

測定条件の検討として、スキャンスピードを0.4、0.8、1.2、1.6、2.0及び2.4 mm/secと変化させて、ハックス平衡塩溶液に浸漬したNaOH処理したTi-6Al-4V表面に形成したアパタイトを測定した。その結果、スキャンスピードが2.0 mm/secの時に最も光音響強度が高く観測されたので、以後の検討はすべてスキャンスピード2.0 mm/secの条件で

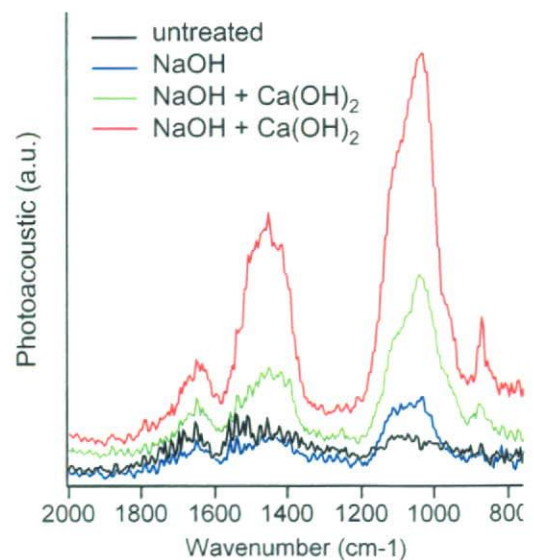


図4 表面処理したTi-6Al-4Vのハックス平衡塩溶液浸漬後のFT-IR/PASスペクトル

測定した。

ハンクス平衡塩溶液に浸漬した Ti-6Al-4V の FT-IR/PAS スペクトルを図 4 に示した。未処理の Ti-6Al-4V はアパタイトに由来するピークが観察されなかったが、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理、NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順に、アパタイトに由来するピークの光音響強度が強くなった。

アパタイトのリン酸基に由来する 1050 cm⁻¹ 付近のピークの光音響強度を用いて、試料表面のアパタイト形成量を評価した (図 5)。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理、NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順にアパタイト形成能が高くなった。また、Ti-Zr-8Nb 及び Zr は、

NaOH + Ca(OH)₂ 処理においてのみアパタイトを形成した。一方、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb 及び Nb は、いずれの表面処理でもアパタイトを形成しなかった。

D. 考察

従来から骨系医療機器に使用されている Ti-6Al-4V は、構成元素のひとつである V に強い細胞毒性があり⁹⁾、安全性が疑問視されている¹⁰⁾。また、我々は、Ti-6Al-4V は V による骨芽細胞の増殖阻害に加え、Al による分化阻害を起こす可能性を明らかにした^{11,12)}。近年、構成元素に V を含まないチタン合金や、V と Al を両方とも含まないチタン合金が数多く開発されている¹³⁾。

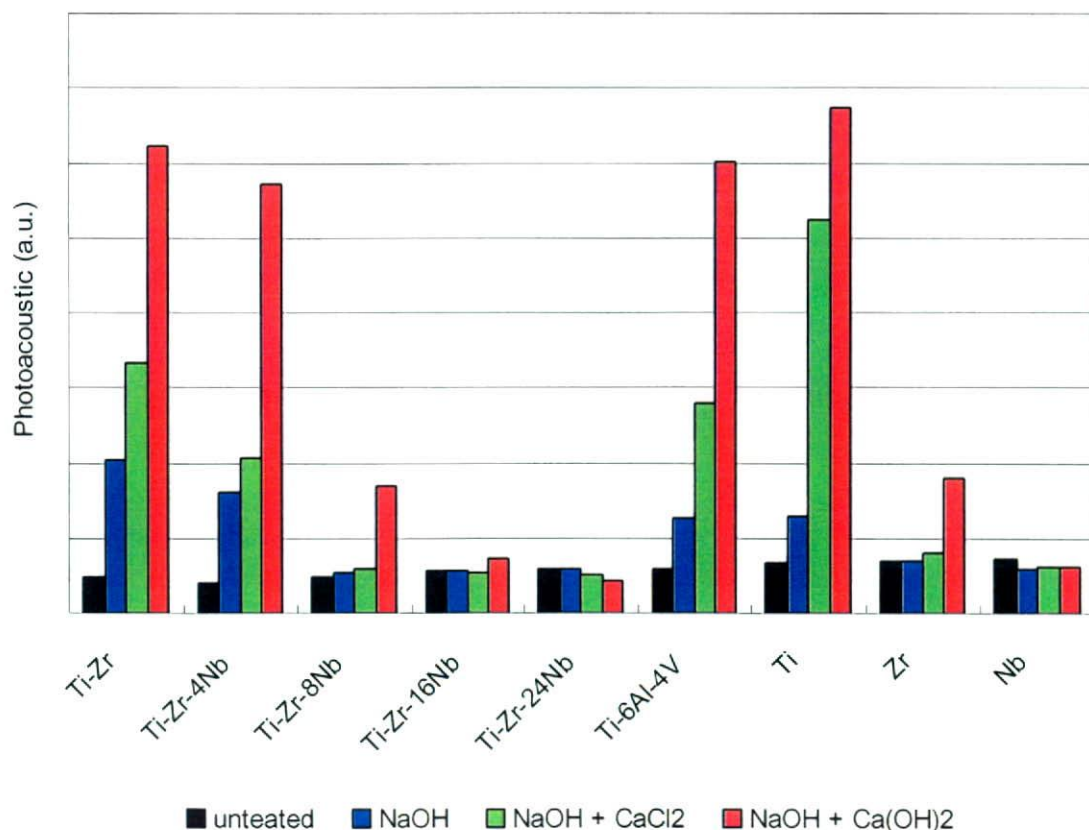


図 5 FT-IR/PAS 法によるハンクス平衡塩溶液浸漬後の材料表面のアパタイト形成量

Ti-Zr 基合金は、1~5 mol% の Nb を添加すると、 α - β 二相組織が得られ、力学的強度が増す¹⁴⁾。また、8 mol% 以上の Nb を添加すると、 β 単相組織が得られ、弾性率が小さくなる¹⁵⁾。このように、Ti-Zr 基合金は、Nb の添加量で力学的性質を制御できるという特徴がある。また、Ti-Zr-Nb 合金の構成元素である Zr 及び Nb には、合金の不動態皮膜中で安定な酸化物となって不動態皮膜をより強固にする働きがあり、耐腐食性が向上する^{1,16)}。さらに、我々は、Nb を添加した Ti-Zr 基合金は細胞毒性が無く、骨芽細胞適合性も高いことを明らかにした¹⁷⁾。また、骨に埋植しても炎症反応を起こさず、骨組織適合性にも問題が無いことを確認した¹⁸⁾。

一般に金属は、セラミックスのように骨組織と直接結合しない。そこで、骨の無機成分に類似したアパタイトコーティングや表面改質などにより、金属に骨と直接結合するような性質を付与する研究が活発に行われている¹⁹⁾。骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成する。擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる^{4,5)}。動物実験によって、擬似体液中でのアパタイト形成能は、生体内での骨結合性をよく再現できることが確認されている²⁰⁾。

擬似体液を用いるアパタイト形成能の評価法は、ISO 23317:2007: *Implants for surgery -- In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials* として国際標準化されている。ISO 23317:2007 で用いる擬似体液は市販されておらず、調製が複雑な上、長期

間保存することもできない。一方、市販のカルシウムイオン及びマグネシウムイオンを含有するハックス平衡塩溶液は、有機成分であるグルコースを含む点で ISO 23317:2007 で用いる擬似体液と大きく異なる。しかし、市販の調製済みのハックス平衡塩溶液は、アパタイト形成能の評価に用いる擬似体液として有用であり⁶⁾、簡便で再現性のある試験が期待できる。

ISO 23317:2007 では、材料表面に形成したアパタイトを、SEM 及び薄膜 X 線回折法を用いて経時的に測定する。SEM では定量的な解析ができず、薄膜 X 線回折法による定量的な解析は平滑な材料表面に限られる。したがって、ISO 23317:2007 では、アパタイトが形成されるまでに要した時間でアパタイト形成能を評価している。

FT-IR/PAS 法は、試料の前処理を必要としない非破壊的表面分析法のひとつで、試料セルに挿入可能な大きさであれば試料の形状にも制限がない。また、干渉計の可動鏡速度や変調周波数を変化させることで、デプスプロファイル解析も可能である²¹⁾。そのため、様々な形状の材料について、体液や擬似体液に浸漬したり、材料の上で骨芽細胞を培養したりした後に、材料表面に形成したアパタイトを分析することができる。さらに、表面に形成したアパタイト量を正確に見積もった材料を、他の評価系の試料として生体内に埋植したりすることも可能である。表面処理したチタン合金を用いた検討において、SEM 観察だけでは材料表面に形成されたアパタイト量を推定することは困難であったが(図 2)、FT-IR/PAS 法ではアパタイト量の定量的解

析が可能であった (図 4)。

チタン合金に骨結合性を付与する表面処置法として、アルカリ加熱処理技術が開発され、人工股関節に応用されている³⁾。最近では、アルカリ処理したチタン合金を塩化カルシウム溶液に浸漬し、表面にカルシウムを導入する方法が検討されている^{7,8)}。チタン合金は、水酸化ナトリウム処理により、チタン酸水素ナトリウムの層が材料表面に形成される²³⁾。その後、塩化カルシウム溶液に浸漬すると、ナトリウムがカルシウムと置換し、チタン酸水素カルシウムに変化して、アパタイト形成能が高くなる^{7,8)}。我々は、アルカリ性条件下でカルシウムへの置換が可能で水酸化カルシウム溶液によるカルシウム導入法について検討した。その結果、材料表面へのカルシウム導入量は、NaOH + CaCl₂ 処理より、NaOH + Ca(OH)₂ 処理の方が多かった (図 3)。さらに、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti のアパタイト形成能は、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理、NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順に高くなった (図 5)。また、Ti-Zr-8Nb 及び Zr は、NaOH + CaCl₂ 処理ではアパタイトを形成しなかったが、NaOH + Ca(OH)₂ 処理ではアパタイトを形成した (図 5)。Zr 及び Nb 並びにこれらを含むチタン合金のアパタイト形成能は低いことが知られているが^{6,19,23)}、NaOH + Ca(OH)₂ 処理は Ti-Zr-8Nb 及び Zr にアパタイト形成能を付与することが可能であった。NaOH + Ca(OH)₂ 処理によるチタン合金への高いアパタイト形成能付与効果は、材料表面への高いカルシウム導入量に起因していると考えられる。

E. 結論

ハンクス平衡塩溶液を用いて、FT-IR/PAS 法により表面処置したチタン合金のアパタイト形成能を評価した。

FT-IR/PAS 法は、材料表面に形成したアパタイト量を定量的に解析することが可能であった。また、アルカリ処理したチタン合金にカルシウムを導入すると、アパタイト形成能が促進することを確認した。さらに、カルシウム導入法として、現在検討されている塩化カルシウム法に比べて、我々が考案した水酸化カルシウム法の方がアパタイト形成能の促進効果が高かった。

アパタイト形成能の定量的評価は、骨系医用材料のリクスアセスメントに有用である。アパタイト形成能が高く、骨結合性を有する材料の開発は、リスクの少ない骨系医療機器への応用が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊佐間和郎、鹿庭正昭、土屋利江：アクセサリ類を除く金属製品に含有する鉛及びカドミウムの分析調査、中毒研究、**21**、393-395 (2008)
- 2) 中島晴信、沢辺善之、伊佐間和郎、土屋利江：高分子材料中のオクチル酸スズ (2-エチルヘキサン酸スズ) の分析、大阪府立公衆衛生研究所研究報告、**46**、97-102 (2008)
- 3) 伊佐間和郎、鹿庭正昭、土屋利江：キャピラリー電気泳動法によるアルカリ性洗浄剤中のナトリウムイオン、カリウムイオン及びモノエタノールアミンの分析、国立医薬品食品衛生研究所報告、**126**、71-75 (2008)
- 4) Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya,

Gamma-ray irradiated poly(L-lactide) for bone repair, Tetsuya Tateishi ed., Biomaterials in Asia, World Scientific Publishing Co., Singapore, pp.254-265 (2008)

2. 学会発表

- 1) 伊佐間和郎、齋島由二、松岡厚子、長谷川千恵、松田良枝、柚場俊康、土屋利江：DEHP を含む PVC の紫外線照射により生成する毒性物質の同定、第 45 回全国衛生化学技術協議会年会 (2008 年 11 月、佐賀)
- 2) 伊佐間和郎、鹿庭正昭、土屋利江：アクセサリ類を除く金属製品に含有する鉛量の調査、第 45 回全国衛生化学技術協議会年会 (2008 年 11 月、佐賀)
- 3) 中島晴信、沢辺善之、伊佐間和郎、土屋利江：高分子材料中のオクチル酸スズ (2-エチルヘキサン酸スズ) の分析、第 45 回全国衛生化学技術協議会年会 (2008 年 11 月、佐賀)
- 4) 伊佐間和郎、齋島由二、松岡厚子、長谷川千恵、松田良枝、柚場俊康、土屋利江：DEHP を含む PVC の紫外線照射により生成する毒性物質の同定、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 (2008 年 11 月、東京)
- 5) 齋島由二、伊佐間和郎、松岡厚子、長谷川千恵、橋本宣子、脇田比呂美、中島敏治、斎藤博久、土屋利江：ヒト細胞に対するスルホン化材料の機能解析に関する研究、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 (2008 年 11 月、東京)
- 6) 齋島由二、伊佐間和郎、松岡厚子、長谷川千恵、浅見仁美、山口 透、土

屋利江：スルホン基含有新規温度応答性細胞培養プレートの開発に関する研究、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 (2008 年 11 月、東京)

- 7) 松岡厚子、松田良枝、中岡竜介、伊佐間和郎、齋島由二、土屋利江：ポリスチレンサイズ標準粒子の細胞毒性および遺伝毒性、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 (2008 年 11 月、東京)
- 8) 松岡厚子、松田良枝、伊佐間和郎、土屋利江：サイズ標準ポリスチレン粒子の細胞毒性および遺伝毒性、日本環境変異原学会第 37 回大会 (2008 年 12 月、沖縄)
- 9) 伊佐間和郎、河上強志、鹿庭正昭、土屋利江：アクセサリ類を除く金属製品に含有する有害金属の分析調査、日本薬学会第 129 年会 (2009 年 3 月、京都)

G. 参考文献

- 1) 岡崎義光：整形外科用金属材料にみる標準化のメリット、バイオマテリアル、22、343-349 (2004)
- 2) 佐藤道夫：金属材料の物理的安全性評価手法の開発、平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2005)
- 3) 松下富春、鈴木順、小林尚博：アルカリ加熱処理技術の実用化研究と人工股関節への適用、バイオマテリアル、27、24-31 (2009)
- 4) T. Kokubo, S. Ito, Z.T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro: Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W, J. Biomed. Mater. Res.,

- 24, 331-343 (1990)
- 5) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro: Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 721-734 (1990)
- 6) 伊佐間和郎：骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2008)
- 7) 山口誠二、木付貴司、高玉博朗、松下富春、中村孝志、小久保正：アルカリ - カルシウム処理による Ti-15Zr-4Ta-4Nb 合金への生体活性の付与、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 予稿集、145 (2008)
- 8) 木付貴司、高玉博朗、松下富春、中村孝志、小久保正：カルシウムを導入したアルカリ処理チタンのアパタイト形成能：オートクレーブの効果、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 予稿集、233 (2008)
- 9) A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita: Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells, *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 331-340 (1998)
- 10) 松村英雄、柳田廣明、米山隆之：チタン合金の歯科補綴への応用、*バイオマテリアル*、**20**、403-407 (2002)
- 11) 伊佐間和郎、土屋利江：遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究：金属製医用材料のヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響評価、*国立衛研報*、**121**、111-112 (2003)
- 12) 伊佐間和郎、土屋利江：金属イオン等と骨分化、医療材料・医療機器の安全性と生体適合性 (土屋利江編集)、シーエムシー出版、東京、230-234 (2003)
- 13) 成島尚之：生体材料としてのチタンおよびチタン合金、*軽金属*、**55**、561-565 (2005)
- 14) E. Kobayashi, S. Matsumoto, H. Doi, T. Yoneyama, H. Hamanaka: Mechanical properties of the binary titanium-zirconium alloys and their potential for biomedical materials, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 943-950 (1995)
- 15) 高橋正史、小林郁夫、土井寿、米山隆之、浜中人士：ニオブを添加した生体用β型チタン-ジルコニウム基合金の相安定性と力学的性質、*日本金属学会誌*、**64**、1120-1126 (2000)
- 16) Y. Okazaki, E. Gotoh: Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro, *Biomaterials*, **26**, 11-21 (2005)
- 17) 伊佐間和郎：金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2006)
- 18) 伊佐間和郎：金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究、平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2007)
- 19) 塙隆夫：医療分野におけるチタンの表面処理、*軽金属*、**55**、553-556 (2005)
- 20) S. Fujibayashi, M. Neo, H.M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura: A comparative study between in vivo

bone ingrowth and in vitro apatite formation on $\text{Na}_2\text{O}\cdot\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ glasses, *Biomaterials*, **24**, 1349-1356 (2003)

- 21) 杉浦英樹 : PAS-FTIR による高分子膜の深さ方向分析、*Ricoh Technical Report*, **24**, 35-42 (1998)
- 22) H-M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Nakamura: Apatite-forming ability of alkali-treated Ti metal in body environment, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **105**, 111-116 (1997)
- 23) X. Tao, M. Niinomi, T. Akahori, H. Ashidate, M. Nakai, H. Tsutsumi: Effect of alloying elements on HAp formability of Ti-Nb-Ta-Zr system alloy through alkali treatment process, *日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 予稿集*, 129 (2008)

4. 人工心臓弁機能不全の
リスクアセスメント手法開発

澤田 留美

分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「医療機器・医用材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究」

分担研究課題名
人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

分担研究者 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所療品部

人工心臓弁を体に埋植した際の機能不全の主な原因と考えられる血栓形成やパルプス形成について、日本人におけるそれらの原因となる遺伝子多型を探索することを目的として人工心臓弁（機械弁）の機能不全の患者および人工弁の不具合が認められない患者の血液を用いて SNP タイピングを行う。

A. 研究目的

心臓弁膜症は、心臓の弁が何らかの原因で働きが損なわれる病気の総称で心臓病の大きな原因の一つとして挙げられる。その主な症状として、狭窄症（血液の通り道が狭くなる）と閉鎖不全症（弁の閉じ方が不完全なため血液の逆流が起こる）の2つが挙げられる。心臓弁膜症の95%以上は、4つある心臓弁のうち大動脈弁と僧帽弁に起こるといわれている。特に大動脈弁狭窄症は心臓弁膜症の中でも病状の進行が早く突然死にいたるリスクも高い難病であったが、人工心臓弁置換手術を行う事により完治することが出来るようになった。現在、臨床的に用いられている人工弁は、大きく分けて機械弁と異種生体弁がある。それぞれの特徴として機械弁は耐久性が高いが抗血栓性に大きな問題があり、生体弁は抗血栓性は高いものの耐久性が低いと一長一短であるが、遠隔成績からは生存率に差はない。機械弁にすべきか生体弁にすべきかについ

てはそれぞれの症例により違ってくるが、世界でインプラントされている弁は約60%が機械弁であるといわれている。一方、わが国における人工弁の利用は一説では約80%が機械弁であるとも言われ米国等に比べて多い。

今日では多くの心臓弁膜症患者が人工弁置換手術により健常人とほぼ同様な日常生活を送れるようになった一方で、置換術後の人工心臓弁（特に機械弁）の機能不全についての報告が存在するのも事実である。機械弁の機能不全の主な原因としては、血栓形成とパルプス（心臓弁の周辺に発育する線維性の自己組織）形成が挙げられている。大動脈弁の置換術後における人工弁機能不全は、患者の生命を危機に曝す重大な問題である。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために置換手術後は生涯にわたり抗血液凝固薬及び抗血小板凝集薬服用が必要となるが、薬の作用の個人差等により血栓が形成された場合には急速な人工心臓

弁機能不全を招く恐れがある。また、パンヌスの形成についてはそのメカニズムは未だ明らかにされていない。一方で、人工心臓弁置換手術技能によって機能不全が起こることも考え得るが、異物に対する生体反応等に個人差がある可能性も否定できない。

そこで本研究では、人工心臓弁（機械弁）を体に埋植した際の血栓やパンヌスの形成の原因となり得る遺伝子多型を探索することを目的とした。特に、血栓形成に対する抗血液凝固療法については、日本人は欧米人と比較すると弱い抗凝固療法でも有効である事がわかっており、わが国のガイドラインは欧米に比べるとやや緩めに設定されているようにその感受性に人種差があると考えられている。抗凝固療法の基本的薬剤であるワーファリンの使用量に関する日本人の遺伝子多型の研究はこれまでも数多くなされているが、心臓弁膜症手術における抗凝固療法に関する遺伝子多型の検討報告はほとんどなされていない。そのため、本研究において日本人の機械弁使用者における機能不全につながる血栓形成の原因となり得る遺伝子多型を検討する事は有意義であろう。また、人工心臓弁機能不全のもう一つの原因と考えられるパンヌス形成に関してはその形成メカニズム自体が不明なため、発生原因につながる遺伝子多型が判明した場合は人工心臓弁の不具合発症予防にも利用できる可能性が期待される。本研究では、人工心臓弁（機械弁）使用者の中で弁の機能不全が認められる患者および不具合が認められない患者の血液を用いて SNP タイピングを行い、両者を比較検討した結果から血栓形成およびパンヌス形成の原因となり得る遺伝子多型の探索を行う。

B. 研究方法

1) 血液採取及び DNA 抽出

久留米大学医学部外科学講座または大阪大学医学系研究科外科学講座心臓血管外科において人工心臓弁置換手術を過去に施された患者から採血し、血液より DNA を抽出する。検体として採取した血液は、久留米大学医学部外科学講座または大阪大学医学系研究科外科学講座心臓血管外科において患者の自由意志に基づくインフォームド・コンセントが得られた患者より定期検診日に提供されたものである。

2) SNP タイピング

血栓形成の原因となり得る遺伝子多型を探索するために行う SNP タイピングのターゲット遺伝子として、まず抗血液凝固薬であるワーファリンの薬効に関連する遺伝子である SERPINE1 [serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1; PAI-1]、CYP2C9 (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9)、プロトロンビン、凝固因子第 7、凝固因子第 9、凝固因子第 10、GGCX (γ -グルタミルカルボキシラーゼ) の 7 遺伝子について着目し、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に計 23SNPs を選定した。さらに炎症反応等に関わる遺伝子として VAMP8 (vesicle-associated membrane protein 8)、TGF β (transforming growth factor- β) 1、TGF β レセプター I (TGF β RI)、TGF β レセプター II (TGF β RII) の 4 遺伝子について計 6SNPs を選択し、総計 29SNPs (表 1) についてタイピングを行う。

さらに上記 29SNPs に加え、ワーファリン使用量の決定因子に関わる遺伝子多型について特に日本人における報告を中心に調査し、新たなターゲットを探る。

C. 研究結果

我々がこれまでにやってきた 29SNPs タイピングで得られている結果を表 2 に示す。これまでに、久留米大学医学部外科学講座において人工心臓弁の機能不全が見られた患者 (2 名) および人工弁使用者で今のところ不具合が認められない患者 (8 名) の血液を用いた検討と、対照データとして健康な日本人の血液由来の DNA を用いて検討した結果を得ている。検体に用いた DNA は、PSC (ファルマ スニップ コンソーシアム) によって樹立された PSC 細胞株から調製された DNA で、100 検体用いて実験を行った。用いた検体の由来は、男性 50 名 (平均年齢 52.3 ± 8.1 才) 女性 50 名 (平均年齢 52.4 ± 8.1 才) である。今年度は、大阪大学医学系研究科外科学講座心臓血管外科より人工心臓弁使用者の血液由来の DNA を用いるために国立医薬品食品衛生研究所及び大阪大学医学部にてそれぞれの倫理審査委員会の承認を得る手続きを行っており、現在までに人工心臓弁使用者の血液由来の DNA を得る事ができていない。また、久留米大学医学部外科学講座からも追加供与がなされていない。サンプル収集が整い次第、解析を再開する予定である。

これまでターゲットとして選定していた 29SNPs に加えて、さらに SNP タイピングの対象とすべき遺伝子多型について検討するために、ワーファリン使用量の決定に関わる多型を調査した。まず、白人 (Caucasian & European) におけるワーファリン使用量に関連する遺伝子多型として報告されているもの^{1,2)}を表 3 にまとめた。しかし、ワーファリンにおける抗血液凝固療法は日本人と欧米人ではその感受性に差があるため、さらに日本人におけるワーファリン使用量に関連する遺伝子多型として

報告されているもの^{3,6)}を調べ表 4 にまとめた。それぞれの調査対象は「ワーファリン使用者」であるが疾患は調査により様々である。その中で、心臓血管外科患者を対象 (31 名中 28 名が人工弁置換された患者) とした検討⁶⁾から、VKORC1 (Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene) の 1173C>T が、ワーファリン使用量と関連する遺伝子多型であることが報告されている。以上の調査結果から、白人でも日本人でもその関連が示唆されており多くの多型が報告されている遺伝子 VKORC1 について、今後本研究でも血栓形成に関する新たな SNP タイピングのターゲットとして加えていくべきであることが示された。また、GGCX も新たに検討すべき SNP の候補がいくつか示された。

D. 考察

心臓弁膜症の治療の一つとして、現在人工弁置換手術が行われているが、人工心臓弁の機能不全は直ちに患者の生命を危機にさらす重大な問題である。機能不全の原因としてこれまでに血栓形成とパンプス形成などが挙げられている。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために、置換手術後は抗血液凝固薬及び抗血小板薬を服用し続けなければならないが、服用していても機能不全につながる血栓が形成されることもある。それは個人の遺伝的背景の違いによって薬に対する感受性の違いが見られる事が原因の一つかもしれない。また、パンプス形成についてはその原因は未だ明らかにされておらず、血栓形成と同様な個人差による可能性も否定できない。

そこで本研究は、人工心臓弁の機能不全を未然に防ぐ方法の確立を目指して、血栓形成やパンプス形成の原因となり得る遺伝

子多型を探索することを目的とした。人工心臓弁を現在使用している患者の血液を用いて、抗血液凝固薬として人工弁置換術後服用するワーファリンの薬効関連遺伝子や、生体における免疫系、創傷治療や発癌など様々な環境下で重要な役割を果たしている TGFβ やそのレセプターなど 11 遺伝子を対象とし、計 29SNPs を選択しタイピングを行うこととした。これまでに対照となる日本人の健常人 (100 名) と人工心臓弁使用者 (10 名) の上記 29SNPs のタイピング結果が得られており、今後も久留米大学または大阪大学より供与される血液サンプルを用いて解析を続けていく。

今年度は、さらにワーファリン使用量の決定に関連する遺伝子多型として報告されているものを調査し、本研究における新たなターゲット SNP の選定の参考とすることにした。ワーファリン等を用いた抗凝固療法は機械弁を使用している限り生涯に渡り必要な治療であるが、これらの遺伝子多型が人工弁の機能不全の直接的な原因につながるかどうかは定かではない。しかし検討する SNP を決定するための 1 つの指標となり得るのではないかと考え、また薬の感受性に人種差があることも明らかであることから、欧米及び日本における最近の報告について調べた。その結果、ワーファリン使用量の決定に関わる遺伝子多型は欧米人と日本人では必ずしも一致しない事がわかった。また、ワーファリンのみならず様々な薬物代謝に大きな役割を果たしている CYP2C9 の多型の一つ CYP2C9*3 は欧米人でも日本人でもワーファリン使用量との関連が示唆されているものの、日本人においてはワーファリン使用量と VKORC1 の多型 (-1639G>A, 1173C>T, 1542G>C) の方

が CYP2C9 の多型よりもその貢献度が高いと報告されている⁴⁾。このため今後は、VKORC1 の日本人における多型について SNP タイピングを行うためにターゲットとなる SNP を選定していく。さらに、人工弁置換術を施されている日本人患者のワーファリン使用量決定に関わる多型 (1173C>T) も示されており⁶⁾注目すべきであろう。一方、パニヌス形成に関わる多型については未だ不明のため網羅的解析も視野に入れていくべきであろう。人工心臓弁の不具合の有無や原因 (血栓形成によるものかパニヌス形成によるものか等) によってアレルの頻度に差が出てくる SNP が特定できれば、血栓形成やパニヌス形成による人工心臓弁機能不全の原因となり得る遺伝的背景を探る手がかりとなるであろう。また、機械弁と生体弁の選択や抗血液凝固療法の程度の決定にも利用できる事が期待される。

E. 結論

人工心臓弁使用者の中で人工心臓弁の機能不全が認められる患者および人工弁の不具合が認められない患者の血液を用いて SNP ジェノタイピングを行い両者を比較することで、人工心臓弁 (機械弁) を体に埋植した際の機能不全の原因となり得る血栓形成やパニヌス形成に関わる遺伝子多型を探索する。

参考文献

1) Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, Bentley D, McGinnis R, Deloukas P, Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism,

- Hum Genet, 121, 23-34 (2007)
- 2) Rieder MJ, Reiner AP, Rettie AE, γ -Glutamyl carboxylase (GGCX) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose, J Thromb Haemost, 5, 2227-2234 (2007)
 - 3) Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Tomoike H, Miyata T, Genotypes of vitamin K epoxide reductase, γ -glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients, Thromb Res, 120(2), 181-186 (2007)
 - 4) Obayashi K, Nakamura K, Kawana J, Ogata H, Hanada K, Kurabayashi M, Kasegawa A, Yamamoto K, Horiuchi R, VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients, Clin Pharmacol Ther, 80, 169-178 (2006)
 - 5) Nakai K, Tsuboi J, Okabayashi H, Fukuhiro Y, Oka T, Habano W, Fukushima N, Nakai K, Obara W, Fujioka T, Suwabe A, Gurwitz D, Ethnic differences in the VKORC1 gene polymorphism and an association with warfarin dosage requirements in cardiovascular surgery patients, Pharmacogenomics, 8(7), 713-719 (2007)
 - 6) Mushiroda T, Ohnishi Y, Saito S, Takahashi A, Kikuchi Y, Saito S, Shimomura H, Wanibuchi Y, Suzuki T, Kamatani N, Nakamura Y, Association of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms with warfarin dose requirements in Japanese patients, J Hum Genet, 51, 249-253 (2006)

表1. ターゲットとしたSNP

Gene	JSNP	dbSNP(rs)	Location
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST005633	rs11178	3'UTR c.1570C>T
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST058119	rs6092	CDS (Ala/Thr) c.43G>A
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST058120	rs6090	CDS (Ile/Val) c.49G>A
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST005631	rs2070682	INTRON c.700+1921C>T
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST005632	rs2070683	INTRON c.1087+859T>A
CYP2C9	IMS-JST052819	rs2298037	INTRON c.1149+147C>T
CYP2C9 *3		rs1057910	CDS (Ile/Leu) c.1075A>C
CYP2C9 *13			CDS (Leu/Pro) c.269T>C
F2 (prothrombin)	IMS-JST005890	rs2070850	INTRON c.240+83T>C
F2 (prothrombin)	IMS-JST005891	rs2070851	INTRON c.316+2125C>T
F2 (prothrombin)	IMS-JST005892	rs2070852	INTRON c.422+90G>C
F2 (prothrombin)	IMS-JST005893	rs5896	CDS (Met/Thr) c.494T>C
F2 (prothrombin)	IMS-JST031911	rs2282686	INTRON c.1472+251C>T
F2 (prothrombin)	IMS-JST031912	rs2282687	INTRON c.1654+290C>T
F7	IMS-JST017150	rs6042	CDS-synonymous c.525C>T
F9	IMS-JST178462	rs3817939	INTRON c.88+75A>G
F10	IMS-JST069694	rs5960	CDS-synonymous c.792T>C
F10	IMS-JST103451	rs3211719	INTRON c.70+270A>G
F10	IMS-JST117973	rs2026160	INTRON c.256+98A>C
F10	IMS-JST119689	rs3211736	INTRON c.231+64C>T
F10	IMS-JST152051	rs3838839	INTRON c.502+2115`2116
F10	IMS-JST190984	rs3829391	INTRON c.502+2531A>G
GGCX	IMS-JST006491	rs2028898	INTRON c.2084+408C>T
VAMP8	IMS-JST041766	rs12888	CDS-synonymous c.201A>G
VAMP8	IMS-JST085287	rs3731828	CDS-synonymous c.138C>T
TGF β1	IMS-JST096736	rs1800470	CDS-synonymous c.29C>T
TGF βRI		rs7861780	CDS-synonymous c.1125A>C
TGF βRII		rs1050833	CDS(Glu/Val) c.946A>T
TGF βRII		rs3209742	CDS(Ala/Val) c.1606T>C

表2. これまでに得られているSNPタイプインゴの結果

Gene	JSNP	dbSNP(rs)	Location	Type	Healthy volunteers (PSC Cell)		Patients													
					Allele1 (frequency)	Allele2 (frequency)	adverse events					no adverse events								
							TT	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	CC			
SERPINE1 (PAI-1)	IMS-JST005633	rs11178	3'UTR	SNP	c.1570C>T	C (0.545)	T (0.455)	TT	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	CC
SERPINE1 (PAI-1)	IMS-JST058119	rs6092	CDS (Ala/Thr)	SNP	c.43G>A	G (0.925)	A (0.075)	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
SERPINE1 (PAI-1)	IMS-JST058120	rs6090	CDS (Ile/Val)	SNP	c.49G>A	G (0.995)	A (0.005)	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
SERPINE1 (PAI-1)	IMS-JST005631	rs2070682	INTRON	SNP	c.700+1921C>T	C (0.545)	T (0.455)	TT	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	CC	TC	CC
SERPINE1 (PAI-1)	IMS-JST005632	rs2070683	INTRON	SNP	c.1087+859T>A	T (0.545)	A (0.455)	AA	AT	TT	AT	TT	AT	TT	AT	TT	AT	TT	AT	TT
CYP2C9	IMS-JST052819	rs2298037	INTRON	SNP	c.1149+147C>T	C (0.705)	T (0.295)	CC	CC	CT	CT	CC	CT	CC	CT	CC	CT	CC	CT	CC
CYP2C9*3		rs1057910	CDS (Ile/Leu)	SNP	c.1075A>C	A (0.990)	C (0.010)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
CYP2C9*13			CDS (Leu/Pro)	SNP	c.269T>C	T (0.990)	C (0.010)	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
F2 (prothrombin)	IMS-JST005890	rs2070850	INTRON	SNP	c.240+83T>G	T (0.560)	C (0.440)	TT	CC	CT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC
F2 (prothrombin)	IMS-JST005891	rs2070851	INTRON	SNP	c.316+2125C>T	C (0.580)	T (0.420)	CC	TT	TC	TC	TC	TC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
F2 (prothrombin)	IMS-JST005892	rs2070852	INTRON	SNP	c.422+90G>C	G (0.635)	C (0.365)	GG	CC	CG	CG	CG	CG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
F2 (prothrombin)	IMS-JST005893	rs5896	CDS (Met/Thr)	SNP	c.494T>C	T (0.580)	C (0.420)	TT	CC	CT	CT	CT	CT	TT	CT	TT	CT	CT	TT	CC
F2 (prothrombin)	IMS-JST031911	rs2282686	INTRON	SNP	c.1472+251C>T	C (0.635)	T (0.365)	CC	TT	TC	TC	TC	TC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
F2 (prothrombin)	IMS-JST031912	rs2282687	INTRON	SNP	c.1654+290C>T	C (0.580)	T (0.420)	CC	TT	CT	CT	CT	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
F7	IMS-JST017150	rs6042	CDS-synonymous	SNP	c.525C>T	C (0.915)	T (0.085)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
F9	IMS-JST178462	rs3817939	INTRON	SNP	c.88+75A>G	A (0.890)	G (0.110)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
F10	IMS-JST069694	rs5960	CDS-synonymous	SNP	c.792T>C	T (0.590)	C (0.410)	TC	CC	TC	CC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC
F10	IMS-JST103451	rs3211719	INTRON	SNP	c.70+270A>G	A (0.675)	G (0.325)	AG	AA	AA	AA	AA	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
F10	IMS-JST117973	rs2026160	INTRON	SNP	c.256+98A>C	A (0.905)	C (0.095)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
F10	IMS-JST119689	rs3211736	INTRON	SNP	c.231+64C>T	C (0.620)	T (0.380)	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
F10	IMS-JST152051	rs3838839	INTRON	INDEL	c.502+2115~2116	- (1.000)	T (0.000)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
F10	IMS-JST190984	rs3829391	INTRON	SNP	c.502+2531A>G	A (1.000)	G (0.000)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
GGCX	IMS-JST006491	rs2028898	INTRON	SNP	c.2084+408C>T	C (0.685)	T (0.315)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
VAMP8	IMS-JST041766	rs12888	CDS-synonymous	SNP	c.201A>G	A (0.605)	G (0.395)	AG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
VAMP8	IMS-JST085287	rs3731828	CDS-synonymous	SNP	c.138C>T	C (0.680)	T (0.320)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
TGFβ1	IMS-JST096736	rs1800470	CDS-synonymous	SNP	c.29C>T	T (0.535)	C (0.465)	CC	CT	CC	CT	CC	CT	CC	CT	CC	CT	CC	CT	CC
TGFβRI		rs7861780	CDS-synonymous	SNP	c.1125A>C	A (1.000)	C (0.000)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
TGFβRII		rs1050833	CDS(Glu/Val)	SNP	c.946A>T	A (1.000)	T (0.000)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
TGFβRII		rs3209742	CDS(Ala/Val)	SNP	c.1606T>C	T (1.000)	C (0.000)	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT

表3. 白人(Caucasian、European)におけるワーファリン使用量に関連する遺伝子多型報告^{1,2)}

VKORC1	rs9923231 rs2359612 rs9934438 rs7294 rs4889490 rs4889537 rs4889599 rs8046978 rs11642603 rs11642466 rs7194347 rs1057910 (*3) rs9332108 rs9325473 rs1057911 rs4917639 rs2860905 rs3814637 rs17882687 (*15)	VKORC1 : Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene
CYP2C9	rs7896133 rs2069919 rs1799809 rs2069901	CYP2C9 : Cytochrome P450 2C9
CYP2C19	rs2069910 rs429358+rs7412	CYP2C19 : Cytochrome P450 2C19
CYP2C18	rs4653436	CYP2C18 : Cytochrome P450 2C18
PROC	rs11653	PROC : Protein C gene
APOE	rs1006023	APOE : Apolipoprotein E
EPHX1	rs2307040	EPHX1 : Epoxide hydrolase 1, microsomal gene
CALU	rs339054	CALU : Calumenin gene
GGCX	rs12714145 rs11676382	GGCX : Gamma-glutamyl carboxylase gene
ORM1-2	rs1687390	ORM1-2 : Orosomucoid 1 gene or Alpha-1-acid glycoprotein 1 gene