

量の調節を行なうことが推奨されている。実際、良好な PT-INR のコントロールは、血栓塞栓症のイベントならびに出血の副作用を抑制することが、大規模研究の結果として報告されている。しかしながら、ワルファリンの至適投与量には、個人差があり、また、同一患者においても投与量の調整の必要性がしばしば発生するため、そのコントロールを困難としている。また、このことがワルファリン治療の普及、徹底を阻害している主因であると考えられている。

近年、ワルファリン必要量の個人差と遺伝子多型の関連性について、ワルファリンの主な代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) 2C9 の遺伝子多型が発見され、野生型とのクリアランスの違いが明らかになった。また、ワルファリンの標的分子であるビタミン K エポキシド還元酵素 (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1:VKORC1) の遺伝子多型が報告された。最近の報告では、CYP2C9、VKORC1 の遺伝子多型、年齢、性別、体表面積、体重等の要因でワルファリンの 1 日投与量の個人差の約 55% が説明可能とされる。しかし、残る 45% は説明のつかない部分として残されている。

実際の臨床現場においては、経験的に食事等がワルファリンの必要投与量の変動に、なんらかの影響を及ぼしていると推測されている。しかしながら、今までのところ、食事の影響を加味して検討した研究結果の報告はほとんどない。そこで、本研究では、CYP2C9 ならびに VKORC1 の遺伝子多型とその他の生理学的要因に加えて、食事調査票の導入によってビタ

ミン K を主とした栄養摂取状況などの因子がワルファリンの投与量に与える影響について検討し、患者個人に適した抗凝固療法（個別化医療）の確立を目指す。

B. 研究方法

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (The Study on the Contribution of Genetic Factors or Dietary Vitamin K Intake to Individual Warfarin Dosage [Godward Study]: 前向き横断研究)

非弁膜性心房細動等の塞栓源となる心疾患もしくは血栓塞栓症を有し、少なくとも屋内自立の状態であり経口で普通食を摂取している患者群で、ワルファリンによる抗凝固療法を受けている外来患者を対象とし、前向き横断研究を実施した。患者本人の文書同意取得後、年齢、性別、体表面積 (BSA)、リスク因子 (高血圧、糖尿病、脂質異常症、喫煙、飲酒、血栓塞栓症の既往、併用薬) 等の背景情報を調査するとともに VKORC1 および CYP2C9 の遺伝子多型検査を実施した。食事調査票を用いてビタミン K を含む各種栄養摂取量を推定するとともに、3 ヶ月間のワルファリン投与量と PT-INR の推移等について調査した。

(倫理面への配慮)

本研究は、下記に配慮し、倫理委員会の承認を受けた上で実施した。

(1) 医学研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

説明を十分に行い、同意を得た患者のみを対象とする。また、匿名化を行うので遺伝情報が外部に漏れない。個人を特

定できる情報は連結可能匿名化を用いて管理する。

(2) 医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

対象となる患者は、すでにワルファリンを服用しているため、本研究への参加により治療方針が変わることはない。食事調査に御参加いただくことで、普段の食事内容の分析結果を提供することが可能であり利益となる可能性がある。

季節変動を考慮したワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (Godward-Multi Study) : 多施設共同前向き研究)

参加各施設に通院している患者で、非弁膜性心房細動等の塞栓源となる心疾患もしくは血栓塞栓症を有し、少なくとも屋内自立の状態であり経口で普通食を摂取している患者群で、ワルファリン療法を受けている患者を対象とし、多施設共同研究を実施している。患者本人の同意取得後、体重等の背景情報を調査するとともに VKORC1 および CYP2C9 の遺伝子多型検査を実施する。食事調査票記載時期の PT-INR 検査値を含む血液検査データを収集する。食事調査票を用いたビタミン K を含む各種栄養摂取量の推定に関しては、季節変動を調査するため、患者 1 名につき、原則として、春 (3-5 月)、夏 (6-8 月)、秋 (9-11 月)、冬 (12-2 月) の 4 回食事調査を実施する。加えて、ビタミン K 血中濃度の測定も行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、上記した点に配慮し、倫理委員会の承認を受けた上で実施している。

C. 研究結果

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (Godward Study: 前向き横断研究)

登録され、解析可能となった 176 名について検討を行なっている。CYP2C9, VKORC1 の遺伝子多型を検討した結果、

CYP2C9*1/*1 を保有しかつ VKORC1 ホモ変異型を保有する遺伝子型を持つ患者は、約 80% 存在することが判明し、過去の日本人における検討とほぼ同様の結果であった。ワルファリン維持投与量の平均 (±SD) は 3.3 ± 1.2 mg/day であった。方法に記載した因子に加えて、AST

(aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), BUN (blood urea nitrogen) や糸球体濾過量の推定値 (eGFR) の肝腎機能検査データ、ビタミン K 摂取量、遺伝子多型を含めた多変量解析等により、これらの因子が、ワルファリン維持投与量にどの様に影響を与えているか詳細な解析を実施しているところである。

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (Godward-Multi Study) : 多施設共同前向き研究)

国立循環器病センターでは 2009 年 1 月 14 日より症例登録が開始され、参加各施設においても順次登録が開始されている。症例登録期間は当初 2009 年 11 月末としていたが、目標登録症例数に満たないことから 2010 年 2 月末まで延長した。遺伝子検体も順調に集積され、当院の新規登録患者ならびに他施設分も合わせて現時点で 184 症例分が遺伝子抽出されている。現在解析を実施しているところである。

D. 考案

近年、ファーマコゲノミクスが注目され、個別化医療という言葉も現実味を帯びてきている。その最先端をいくのがワルファリンと遺伝子多型の研究である。ワルファリン投与患者では、その効果をPT-INR等でモニタリングしながら投与量を調節し、治療を行っている。しかしながら、その投与量は、各個人によってかなりのばらつきがある。以前から、ワルファリンの代謝酵素CYP2C9の遺伝子多型がワルファリン反応性の個人差を説明するものとして報告されていたが、CYP2C9だけではうまく説明できなかった。2004年に、VKORC1がクローニングされ、多型解析から、本酵素の多型が極めて強くワルファリン必要量と関連することが明らかとなった。その後の多くの報告により、ワルファリンの個人差の約30%がVKORC1多型、約10%がCYP2C9多型、約15%が年齢、性別、併用薬などで説明されるとされる。しかし、残りの45%程度は、これら因子では説明できていない。日本人における抗凝固作用は白人に比べ少量のワルファリンで維持される傾向にある。この一因として、白人のVKORC1遺伝子では、酵素活性の高いアレルの頻度が日本人に比べて高いので、VKORC1蛋白質が多く発現し、その活性を阻害するためには、多くのワルファリンが必要であると考えられる。また、日本人のVKORC1とCYP2C9の遺伝子多型頻度を解析した結果では、日本人の約78%は同一の遺伝子型を保有していることより、日本人のワルファリン維持量の個人差は比較的少な

いと推定される。本研究でもほぼ同様の結果を得ている。しかし、頻度は低いながらも、大量のワルファリンを必要とすると考えられる日本人や、少ないワルファリン量で維持できると考えられる遺伝子多型の組み合わせを持つ個人が存在することも判明した。また、上述したように、遺伝子多型のみでワルファリンの投与量が規定できるわけではなく、残る45%は未だ説明のつかない部分として残されている。その一因として、食事の影響（ビタミンK摂取量）が示唆されるが、それを詳細に検討した報告は少ない。今回、季節変動や、食事調査票を用いたビタミンK摂取量の推定、ビタミンK血中濃度の測定による詳細な検討、また、それ以外のさまざまな因子について、遺伝子多型情報と合わせて解析を行なうことは、ワルファリンの至適投与量の推定に重要な情報をもたらすものと期待できる。今後さらに、患者登録を進め、詳細な検討を行うことにより、患者個人に最適なワルファリン投与量を事前に推測し、より有効な抗凝固効果を示し、出血の副作用の最小化を可能とするワルファリン療法の個別化医療の確立を目指す。

E. 結論

CYP2C9、VKORC1の遺伝子多型、食事調査票によるビタミンK摂取量や、年齢、性別、体表面積（BSA）やリスク因子（高血圧、糖尿病、脂質異常症など）を含めた患者背景情報や、肝腎機能検査値などがワルファリン必要投与量に与える影響について詳細に検討を行っている。これら研究結果の解析により、患者個人に最

適なワルファリン投与量を事前に推測し、より有効な抗凝固効果を示し、出血の副作用の最小化を可能とするワルファリン療法の個別化医療の確立を目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 関連する研究発表

- 1) 山本晴子、長束一行、嘉田晃子、浦敏郎、太田直孝、宮田茂樹、宮田敏行、峰松一夫、成富博章：ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討. 第50回日本神経学会総会、仙台、5月22日、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 神出 計 大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学 講師

研究要旨:ヒトの老化は高血圧や動脈硬化などと密接に関連性があり、老化関連遺伝子は高血圧など生活習慣病の病態に深く関与している可能性が高い。そのため老化関連遺伝子は高血圧、降圧薬の感受性遺伝子の新たなターゲットと言える。本研究では我が国で発見された老化関連遺伝子である Klotho 遺伝子の遺伝子多型と動脈硬化の関連性につき検討を行った。

対象は高血圧外来患者 853 人と 1783 人の検診受診一般住民で、頸動脈 B モードエコーにて総頸動脈内中膜肥厚を計測した。Klotho 遺伝子のハプロタイプブロックから一塩基多型 (SNP) を 4 個選出し、TaqMan 法にて遺伝子型を決定した。種々の交絡因子を補正して行った多変量解析でイントロン 4 に存在する rs650439 が高血圧患者群において有意に動脈硬化と相関した。しかしながら一般住民の解析ではこの関連性は認められなかった。高血圧患者群は一般住民検診群よりも動脈硬化の危険因子が高度であった。本研究結果より Klotho 遺伝子遺伝素因は高血圧患者のみで動脈硬化形成に関与する。おそらく動脈硬化危険因子の動脈硬化形成を促進することに関与している SNP である可能性が示唆された。

A. 研究目的

老化と心血管疾患には密接な関連性を認める。血圧も加齢に伴って上昇するため、高血圧は老化の一表現型と考えられる。老化関連遺伝子 klotho は我が国で同定された遺伝子で、このノックアウトマウスは動脈硬化、骨粗鬆症、不妊、肺気腫近年、肥満、糖尿病など老化の表現型を示し、Klotho は老化抑制に関わる蛋白と考えられている。したがって Klotho はヒトにおいても高血圧や降圧薬の効果に関わる可能性を有している。ヒト Klotho 遺伝子はマウスと 86% の相同性を持ち、これまでにヒト Klotho 遺伝子の遺伝素因、特

に一塩基多型 (SNP) と各疾患との関連が検討されているが、対象疾患や人種によって報告された SNP の部位は様々である。また動脈硬化性疾患に関しては冠動脈疾患との関連が報告されているが、動脈硬化の指標とされる頸動脈内中膜肥厚 (IMT) との関連は不明のままである。本研究では日本人における Klotho 遺伝子の SNP を明らかにし、ヒト動脈硬化との関連性について頸動脈 IMT を用いて検討することを目的とした。

B. 研究方法

書面による遺伝子解析のインフォーム

ドコンセントが得られた国立循環器病センター受診中の高血圧患者 853 人、および吹田地区一般住民検診受診者 1783 人を対象に解析を行った。これらの研究対象者に対して B-mode 頸動脈エコーにて総頸動脈 IMT を計測し、頸動脈硬化を $IMT \geq 1.1\text{mm}$ 以上と定義した。Klotho 遺伝子の SNP を同定するため、96 人の高血圧患者に対しプロモーター、全コーディング領域ならびに近傍イントロン領域に対してダイレクトシーケンスを行った。同定された SNP から連鎖不平衡 ($r^2 > 0.5$) を考慮しハプロタイプブロックを求め、その中でマイナー・アレル頻度 5% 以上を示した 4SNP (rs7323281; intron1, rs5644481; exon4, rs3752472; exon3 Pro→Ser, rs650439; intron4) を Tag SNP とし、全研究対象者に対して TaqMan PCR 法にて遺伝子型の決定を行った。

C. 研究結果

高血圧患者群および一般住民集団の背景を比較したところ、一般住民集団にくらべて高血圧患者群において、BMI、血圧、糖尿病、高脂血症、慢性腎臓病などの動脈硬化リスクを持つ割合が高かった。頸動脈硬化を有する患者は、高血圧患者群で 184 人 (21.6%)、一般住民集団で 70 人 (3.9%) であった。高血圧患者において、各アレル間の頸動脈硬化の頻度を χ^2 乗検定で検討したところ rs3752472 (CC+TC vs. TT: $P=0.036$) および、rs650439 (TT vs. TA vs. AA: $p=0.024$, TT+TA vs. AA: $p=0.012$) に有意な関連を認めた。動脈硬化リスクを交絡因子とした多重ロジスティック解析を行ったところ rs650439 のみ

で頸動脈硬化との有意な関連を認め、AA アレルに比べて TA+TT アレルで頸動脈硬化のリスクが高かった (TT+TA vs. AA: オッズ比=1.71 $p=0.0034$)。各アレルと IMT 実測値との関連を検討するため、交絡因子を考慮した共分散分析を施行したところ、rs650439 で多型間の IMT 値に有意差を認めた (TT+TA=0.851mm, AA=0.827mm: $P=0.045$)。

一般住民検診者においても高血圧患者と同様の解析を施行したが、Tag SNP と頸動脈硬化および IMT 値との間に有意な相関は認めなかった。

D. 考察

Klotho 遺伝子の SNP である rs650439 は日本人において高血圧患者の頸動脈硬化および頸動脈 IMT 値と相関することが示唆された。一般住民で同 SNP が総頸動脈 IMT と有意な関連性を示さなかったことは高血圧患者群で明らかに動脈硬化危険因子の程度が強い患者が多く、Klotho rs650439 は動脈硬化促進を促す遺伝素因である可能性が強く示唆された。本 Klotho 遺伝子の SNP は高血圧や降圧薬の効果にも関連している可能性が考えられる。

E. 結論

Klotho 遺伝子の SNP である rs650439 は日本人において高血圧患者の頸動脈硬化および頸動脈 IMT 値と相関することが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

Hypertens (in press)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, Shimaoka I, Congrains A, Horio T, Hanada H, Ohishi M, Katsuya T, Okamura T, Miyata T, Kawano Y, Rakugi H. Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of the klotho gene in patients with hypertension. Geriatr Gerontol Int (in press)
- 2) Shimaoka I, Kamide K, Ohishi M, Katsuya T, Akasaka H, Saitoh S, Sugimoto K, Oguro R, Congrains A, Shimamoto K, Ogihara T, Rakugi H. Association of gene polymorphism of the fat-mass and obesity-associated gene with insulin resistance in Japanese. Hypertens Res 2010;33:214-218.
- 3) Miwa Y, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Horio T, Tanaka C, Banno M, Miyata T, Kawano Y. Association of PLA2G7 polymorphisms with carotid atherosclerosis in hypertensive Japanese. Hypertens Res 2009;32:1112-1118.
- 4) Horio T, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Miwa Y, Matayoshi T, Yoshihara F, Nakamura S, Tokudome T, Miyata T, Kawano Y. Association of insulin-like growth factor-1 receptor gene polymorphisms with left ventricular mass and geometry in essential hypertension. J Hum

2. 学会発表

- 1) 神出計、小久保喜弘、堀尾武史、岡村智教、楽木宏実、河野雄平、宮田敏行 日本人高血圧患者における dopamine D3 受容体遺伝子ミスセンス多型の関与
第16回日本遺伝子診療学会大会
2009年8月 札幌
- 2) Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, Shimaoka I, Congrains A, Ohishi M, Okamura T, Miyata, Kawano Y, Rakugi H. Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of klotho gene in patients with hypertension and in the general population.
82nd American Heart Association 2009 Scientific Sessions. 2009:Nov.18
Orland, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 鎌倉史郎 国立循環器病センター心臓血管内科 部長

研究要旨：先行研究で得られたワルファリンの投与量と遺伝子多型、ビタミンK摂取量に関する解析を行いながら、ビタミンK摂取量における季節の影響についての研究を進めている。国立循環器病センターでは2008年10月25日、倫理委員会において研究プロトコルが承認され、2009年1月14日より症例登録が開始された。症例登録期間は当初2009年11月末としていたが、目標登録症例数に満たないことから2010年2月末まで延長した。国立循環器病センター心臓内科では2010年1月19日までに29例が登録され、食事調査票の回収、ビタミンK採血などプロトコル通りに研究が進行している。

A. 研究目的

ワルファリンは至適投与量に大きな個人差があり遺伝子多型との関連が確認されている。しかしそれ以外に、食事（ビタミンK摂取量）との関連等の関与が推測される。本研究では遺伝子多型やビタミンK摂取量などワルファリン投与量に影響する因子を明確にするとともに、それらを含んだ予測値を基に個人の至適投与量を推定する方法を開発し、ワルファリン治療による有害事象の減少を目的とする。

B. 研究方法

血栓症の予防目的でワルファリンを服用している外来通院患者を対象に、ワルファリンの作用に大きな影響を与えるCYP2C9とVKORC1の遺伝子多型の決定と四季のビタミンK摂取量の変動を食事調査票で調査する。それぞれの季節の調査

期間は1ヶ月で、最初の季節は同時にビタミンKの血中濃度を測定する。背景因子としてはこれまで関連が認められている、身長、体重、性別、肝機能、腎機能、併用薬の調査を行う。

（倫理面への配慮）

（1） 医学研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

説明を十分に行い、同意を得た患者のみを対象とする。また、匿名化を行うので遺伝情報が外部に漏れない。個人を特定できる情報は連結可能匿名化を用いて管理する。

（2） 医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

対象となる患者は、すでにワルファリンを服用しているので、本研究への参加により治療方針が変わることはない。食事調査に御参加いただくことで、普段の食事内容の分析結果を提供することが可

能であり利益となる可能性がある。前向き介入試験についてはワルファリン服用が必要な症例が対象であるので、治療方針は変わらない。入院期間の短縮につながれば利益となる。初期投与量が高容量となる場合には、慎重に止血検査を繰り返し、過剰投与にならないように注意を払う。

C. 研究成果

国立循環器病センターでは2008年10月25日、倫理委員会において研究プロトコルが承認され、2009年1月14日より症例登録が開始された。先行研究で一度食事調査を実施している症例から登録を開始しているために、初期の登録は順調であったが、新規患者の登録が進まなかったため登録期間を2010年2月末まで延長し、2010年1月29日までに心臓内科では29例が登録され、全員が新規症例であった。食事調査票の回収とビタミンKの採血も進んでおり、食事調査票の結果を患者さんに順次説明を加えながら変革している。

D. 考察

先行研究からの登録症例は多施設共同研究への移行も継続も順調であるが、新規登録症例は同意を得られない症例も見られ、途中で脱落する例も見られた。目標登録症例数との隔たりが大きかったため、登録期間を3ヶ月延長し心臓内科のみで29例の新規症例を増やすことができた。新規症例は少なくとも2シーズン経過するとその後脱落が減るのでCRCからののはげますが、継続のポイントと考え

られた。また初期の症例には食事調査の結果を順次返却しており、データの早急なフィードバックが脱落を防ぐためにも重要かもしれない。

E. 結論

症例登録は完了し、心臓内科だけで29例と多くの症例を登録することが出来、研究は予定通りに進行している。今後脱落を少しでも減らすための対策を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamakura S, Ohe T, Nakazawa K, Aizawa Y, Shimizu A, Horie M, Ogawa S, Okumura K, Tsuchihashi K, Sugi K, Makita N, Hagiwara N, Inoue H, Atarashi H, Aihara N, Shimizu W, Kurita T, Suyama K, Noda T, Satomi K, Okamura H, Tomoike H. Long-Term Prognosis of Proband With Brugada-Pattern ST-Elevation in Leads V1-V3. *Circulation: Arrhythm Electrophysiol* 2009;2:495-503.
- 2) Shimizu W, Moss AJ, Wilde AA, Towbin JA, Ackerman MJ, January CT, Tester DJ, Zareba W, Robinson JL, Qi M, Vincent GM, Kaufman ES, Hofman N, Noda T, Kamakura S, Miyamoto Y, Shah S, Amin V, Goldenberg I, Andrews ML, McNitt S. McNitt S. Genotype-Phenotype Aspects of Type 2

Long QT Syndrome. J Am Coll Cardiol
2009;54:2052-2062.

3) Ohno S, Toyoda F, Zankov DP, Yoshida
H, Makiyama T, Tsuji K, Honda T,
Obayashi K, Ueyama H, Shimizu W,
Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H,
Kita T, Horie M. KCNE3 mutation
reduces repolarizing potassium
current and associated with long QT
syndrome. Hum Mutat
2009;30:557-563.

4) Yokokawa M, Okamura H, Noda T, Satomi
K, Suyama K, Kurita T, Aihara N,
Kamakura S, Shimizu W. Neurally
Mediated Syncope as a Cause of
Syncope in Patients with Brugada
Elect. rocardiogram. J Cardiovasc
Electrophysiol 2010;21:186-192.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 山本晴子 国立循環器病センター臨床研究開発部 室長

研究要旨：ワルファリンの投与量と遺伝子多型、さらにビタミンK摂取量における季節の影響についての研究を進めている。先行研究において、主として食事調査票の記載と回収に様々な問題が生じることが確認されたため、本研究ではこれらの点を改善するため、臨床研究開発部の支援を受けて臨床研究コーディネーターを2名配置し、食事調査票の回収の手順確認など、円滑な研究実施のための整備を行った。研究開始後は、研究者とCRC、データマネージャーが定期的にミーティングを行い、進捗状況や問題点の確認を行い、早期解決を図るよう努めた。また、他の参加施設を積極的に訪問し、研究の目的や具体的方法等について意見交換を行い、被験者登録の促進とデータの質の向上を図った。

A. 研究目的

ワルファリンは至適投与量に大きな個人差があり遺伝子多型との関連が確認されている。しかしそれ以外に、食事（ビタミンK摂取量）との関連等の関与が推測される。本研究では遺伝子多型やビタミンK摂取量などワルファリン投与量に影響する因子を明確にするとともに、それらを含んだ予測値を基に個人の至適投与量を推定する方法を開発し、ワルファリン治療による有害事象の減少を目的とする。

B. 研究方法

血栓症の予防目的でワルファリンを服用している外来通院患者を対象に、ワルファリンの作用に大きな影響を与えるCYP2C9とVKORC1の遺伝子多型の決定と四季のビタミンK摂取量の変動を食事調

査票で調査する。先行研究として、3ヶ月間のPT-INR及びワルファリン服用量の推移と、その期間の食事調査を1回だけ行う研究を単施設で実施した。その結果、高齢患者では食事調査票の記載に不備が多く、また持参するのを忘れるなど、回収にも非常に手間取ることが判明した。本研究では、3ヶ月毎に食事調査票を記載するため、調査票への記載の完成度を高めることと、迅速に回収することが必須となる。そのため、昨年度から当院臨床研究開発部の支援により、CRCによる患者対応やスケジュール管理支援、データマネージャーによるデータベース作成とデータマネジメント業務が実施されている。また、他の参加施設を積極的に訪問し、研究の意義の確認、研究方法の正しい理解、研究実施への動機付け等を行った。

(倫理面への配慮)

(1) 医学研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

説明を十分に行い、同意を得た患者のみを対象とする。また、匿名化を行うので遺伝情報が外部に漏れない。個人を特定できる情報は連結可能匿名化を用いて管理する。

(2) 医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

対象となる患者は、すでにワルファリンを服用しているので、本研究への参加により治療方針が変わることはない。食事調査に御参加いただくことで、普段の食事内容の分析結果を提供することが可能であり利益となる可能性がある。

C. 研究成果

当院臨床研究開発部より研究支援を受けることとなり、2名の臨床研究コーディネーターが配置された。また、データマネージャーによる electric data capture 方式の症例報告書及びデータベースの作成支援とデータマネジメント業務が開始された。これら研究支援者と研究者、中央事務局を担当する事務員が定期的にミーティングを行い、患者の登録状況、患者対応の中でみられる問題点、他施設における進捗状況、他施設との連絡状況などをその都度確認し、問題がある場合にはその早期解決を図った。その結果、最新の患者登録状況が把握でき、進捗状況に応じて患者登録期間を変更するなどの対応が的確に実施できた。

また、他の参加施設の準備状況がまちまちであったため、主任研究者が施設訪

問を行い、各施設の参加医師に対して研究計画の説明会を現地開催した。遠方の施設もあったが、主任研究者が訪問することで、各施設に研究完遂への熱意が伝わり、また各施設の研究実施体制やキーパーソンがわかることで、その後の連絡が円滑に行えるという効果もあり、非常に有意義であった。

D. 考察

多施設共同研究の実施には、中央事務局の活動性、参加施設全体の熱意、実施体制の整備、施設と中央事務局との密な連絡体制等、様々な体制整備が必要である。また、多様な施設と研究者が関与することで、ともすればデータの品質低下が起こりやすいため、その防止策も必要である。本研究では、登録しやすい症例報告書の作成、データマネジメントの徹底、各施設への一律な説明による研究方法の標準化等の活動を通じて、質の高いデータを収集することができている。

E. 結論

多施設共同研究の実施には、十分な準備と体制整備、複数の施設の複数の研究者の熱意を保ちつつ中央事務局との良好な意思の疎通を図ることなど、様々な体制整備が必要である。それらの活動のひとつひとつを確実に実行することが、多施設共同研究の成功を導くと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 山本晴子、長束一行、嘉田晃子、浦敏郎、太田直孝、宮田茂樹、宮田敏行、峰松一夫、成富博章：ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討. 第50回日本神経学会総会、仙台、5月22日、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

SmartAmp 法によるワルファリン関連遺伝子タイピングに関する研究

研究分担者 レジャバ・アレキサンダー 理化学研究所 上級研究員

研究協力者 片山敦子 理化学研究所 研究員

研究要旨：昨年度の本調査研究において、SmartAmp 法による、ワルファリン投与量に関連する遺伝子である VKORC1 及び CYP2C9*3 の SNP タイピングシステムの開発を行い、40 分以内に SNP を検出することができることを示した。さらに実際の血液を用いてシステムのバリデーションを行い、従来法（シーケンス法）による結果と矛盾のないことを示した。この結果は Clinical Chemistry 誌に発表した。

SmartAmp 法は従来法に比べてきわめて簡便かつ迅速な方法であるが、医療現場においてワルファリンを投与する際の事前検査として導入するため、よりいっそうユーザーフレンドリーなシステムの開発を行うことが求められる。

そこで、理化学研究所岡本独立主幹ユニットにおいて開発された新規蛍光物質であるエキシトンドイを、増幅の検出試薬として、従来のインターカレーターである SYBRGreenI のかわりに導入することを試みた。この蛍光物質で標識したプライマーを用いると、S/N 比の高いシグナルが得られ、結果、増幅の有無をリアルタイム PCR を使わずに目視で判定できるシステムが開発された。

A. 研究目的

実際の医療現場において、ワルファリン投与前に適量がある程度判定できるようなシステムの実用化に向けて、より簡単な検査が行えるよう、目視による SNP 診断系の開発を目指す。

B. 研究方法

既に、SYBRGreenI を検出試薬とした VKORC1 及び CYP2C9*3 のタイピングシステムが開発されているが、プライマーセットのうち BP をエキシトンドイで標識し、SmartAmp 法に導入する。まずはこれまでと同じようにリアルタイム PCR を用いて

特異的な増幅が起こることを確認し、最終的に目視で増幅を判定できるような条件を、バッファー条件・プライマー比率等について検討を行う。さらに、1 チューブ内で複数の変異を同時に判定することができるようなシステムについても開発を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は遺伝子多型同定法の開発に関する研究なので倫理面の問題がない。

C. 研究結果

ワルファリン関連遺伝子である VKORC1 及び CYP2C9*3 を用いて、SmartAmp 法の増

幅検出試薬としてエキシトンプライマーを導入することに成功した。SYBRGreenIを用いた時と同様、検体としてゲノム及び血液を用いて、約45分でタイピングを行うことができた。またこの条件下において、増幅の有無を目視で判定することが可能であった。さらにリアルタイムPCRを用いて、1チューブ内で複数の遺伝子を同時に増幅するマルチプレックスシステムの開発も、引き続き行っている。結果は、Human Mutation誌に発表した。

D. 考察

C (研究結果) において述べたように、エキシトンプライマーをSmartAmp法に導入することに成功した。まずは一種類の蛍光物質を用いて、野生型・変異型プライマーをそれぞれ別のチューブに加えて増幅反応を行ったものであるが、これは上記の通り、検体が血液であっても増幅が目視で確認することができた。続いて、波長の異なる複数の蛍光物質を用いて、1チューブ内で複数の遺伝子を同時に増幅することのできる、マルチプレックスシステムの開発を行ったが、これに関してはVKORC1を除き、鋳型をヘテロとした時の増幅に若干不安定性が残るため、今後検討の余地を残した。また残念ながら、CYP2C9*2及びCYP2C9*3に関しては、ヘテロ型及び野生型の血液が非常に稀少であり、鋳型を血液とした時の検討が困難であるため、今後は医療機関の協力を得て検体の入手に努めることとしたい。

E. 結論

ワルファリン投与量に関わる遺伝子の

迅速かつ簡易遺伝子増幅において、S/N比の高いエキシトンプライマーを用いた、目視可能なSNP検出システムを開発した。今後はヘテロ型増幅の安定性の改良と、血液検体を用いた検討等を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lezhava A, Victor S, Hayashizaki Y, Haberstroh K, Faulstich K. Rapid Genetic Testing for Warfarin Dosing on an ESE-Quant TS Reader. International LABMATE, 2009:34(7):30-31.
- 2) Lezhava A, Ishidao T, Ishizu Y, Naito K, Hanami T, Kogo Y, Katayama A, Soma T, Ikeda S, Murakami K, Nogawa C, Itoh M, Mitani Y, Harbers M, Okamoto A, Hayashizaki Y. Exciton-Primer Mediated SNP Detection in SmartAmp2 Reactions. Human Mutation 2009:31(2):208-217.

2. 学会発表

- 1) Lezhava A. (Invited speaker) Portable handheld devices for rapid mutation detection with the isothermal Smart Amplification Process. 10th International Symposium on Mutations in the Genome 2009: 28th May - 1st June, Paphos, Cyprus

2) Ishidao T, Ishizu Y, Naito K, Hanami T, Katayama A, Kogo Y, Soma T, Ikeda S, Murakami K, Nogawa C, Itoh M, Mitani Y, Harbers M, Okamoto A, Hayashizaki Y and Lezhava A. Exciton Primer-mediated Multiplex assays for SNP detection in SmartAmp2 reaction. 17th international Molecular Medicine tri-conference. 2010 February 3-5, Moscone North Convention Center, San Francisco, CA, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業） 分担研究報告書

抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 古賀政利 国立循環器病センター内科脳血管部門 医師

研究要旨：先行研究で得られたワルファリンの投与量と遺伝子多型、ビタミンK摂取量に関する解析を行いながら、ビタミンK摂取量における季節の影響についての研究を進めている。国立循環器病センターでは2008年10月25日、倫理委員会において研究プロトコルが承認され、2009年1月14日より症例登録が開始された。症例登録期間は当初2009年11月末としていたが、目標登録症例数に満たないことから2010年2月末まで延長した。国立循環器病センター脳内科では2010年1月19日までに152例が登録され、食事調査票の回収、ビタミンK採血などプロトコル通りに研究が進行している。

A. 研究目的

ワルファリンは至適投与量に大きな個人差があり遺伝子多型との関連が確認されている。しかしそれ以外に、食事（ビタミンK摂取量）との関連等の関与が推測される。本研究では遺伝子多型やビタミンK摂取量などワルファリン投与量に影響する因子を明確にするとともに、それらを含んだ予測値を基に個人の至適投与量を推定する方法を開発し、ワルファリン治療による有害事象の減少を目的とする。

B. 研究方法

血栓症の予防目的でワルファリンを服用している外来通院患者を対象に、ワルファリンの作用に大きな影響を与えるCYP2C9とVKORC1の遺伝子多型の決定と四季のビタミンK摂取量の変動を食事調査票で調査する。それぞれの季節の調査期間は1ヶ月で、最初の季節は同時にビ

タミンKの血中濃度を測定する。背景因子としてはこれまで関連が認められている、身長、体重、性別、肝機能、腎機能、併用薬の調査を行う。

（倫理面への配慮）

（1）医学研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

説明を十分に行い、同意を得た患者のみを対象とする。また、匿名化を行うので遺伝情報が外部に漏れない。個人を特定できる情報は連結可能匿名化を用いて管理する。

（2）医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

対象となる患者は、すでにワルファリンを服用しているので、本研究への参加により治療方針が変わることはない。食事調査に御参加いただくことで、普段の食事内容の分析結果を提供することが可能であり利益となる可能性がある。前向き介入試験についてはワルファリン服用

が必要な症例が対象であるので、治療方針は変わらない。入院期間の短縮につながれば利益となる。初期投与量が高容量となる場合には、慎重に止血検査を繰り返し、過剰投与にならないように注意を払う。

C. 研究成果

国立循環器病センターでは2008年10月25日、倫理委員会において研究プロトコルが承認され、2009年1月14日より症例登録が開始された。先行研究で一度食事調査を実施している症例から登録を開始しているため、初期の登録は順調であったが、新規患者の登録が進まなかったため登録期間を2010年2月末まで延長した。2010年1月29日までに脳内科では152例が登録された。食事調査票の回収とビタミンKの採血も進んでおり、食事調査票の結果を患者さんに順次説明を加えながら変革している。

D. 考察

先行研究からの登録症例は多施設共同研究への移行も継続も順調であるが、新規登録症例は同意を得られない症例も見られ、途中で脱落する例も見られた。目標登録症例数との隔たりが大きかったため、登録期間を3ヶ月延長し脳血管内科のみで152例（新規症例を38例）に増やすことができた。新規症例は少なくとも2シーズン経過するとその後脱落が減るのでCRCからの励ましが、継続のポイントと考えられた。また初期の症例には食事調査の結果を順次返却しており、データの早急なフィードバックが脱落を防

ぐためにも重要かもしれない。

E. 結論

症例登録は完了し、脳血管内科だけで152例と多くの症例を登録することが出来、研究は予定通りに進行している。今後脱落を少しでも減らすための対策を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimura S, Koga M, Toyoda K, Mukai T, Hyun BH, Naganuma M, Nagatsuka K, Minematsu K. Frontal bone window improves the ability of transcranial color-coded sonography to visualize the anterior cerebral artery of Asian patients with stroke. *Am J Neuroradiol* 2009;30:1268-9.
- 2) Koga M, Toyoda K, Nakashima T, Hyun B-H, Uehara T, Yokota C, Nagatsuka K, Naritomi H, Minematsu K. Carotid duplex ultrasonography can predict outcome of intravenous alteplase therapy for hyperacute stroke. *J Stroke and Cerebrovasc Diseases* 2010, in press
- 3) Koga M, Uehara T, Yasui N, Hasegawa Y, Nagatsuka K, Okada Y, Minematsu K. Influencing factors of cooperation among healthcare providers in a community-based stroke care system in Japan. *J Stroke and Cerebrovasc*

Diseases. 2010, in press

2. 学会発表

- 1) 古賀政利、峰松一夫. 急性期脳梗塞の経頭蓋超音波検査(血栓溶解含む). 日本超音波医学会第82回学術集会、東京、2009年5月
- 2) 古賀政利、上原敏志、安井信之、長谷川泰弘、長束一行、岡田靖、峰松一夫. 脳卒中地域医療における医療・介護提供者の連携状況の決定要因. 第34回日本脳卒中学会総会、島根、2009年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響に関する研究

研究分担者 矢坂正弘 国立病院機構九州医療センター 脳血管内科 科長

研究要旨： ワルファリン用量への遺伝子多型（CYP2C9 と VKORC1）と食事の影響を明らかにする目的で、ワルファリン療法中の症例を対象に、遺伝子検査と食事内容の詳細を調べ、それらの個々の症例におけるワルファリン至適用量との関連性を明らかにする。

A. 研究目的

ワルファリン用量の個人差が大きいことから、ワルファリン用量への遺伝子多型（CYP2C9 と VKORC1）と食事の影響を明らかにする。ワルファリン療法の対象である発作性非弁膜性心房細動（PAF）における脳梗塞の重症度を急性脳梗塞連続例を対象にして明らかにする。

B. 研究方法

ワルファリン療法中の症例を対象に、遺伝子検査と食事内容の詳細を調べ、それらの個々の症例におけるワルファリン至適用量との関連性を明らかにする。ワルファリンの脳出血への影響を調べる。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守する。

C. 研究結果

当院倫理委員会通過後、調査用紙の印刷や遺伝子研究用の採血検査態勢が整い、

登録研究を開始した。すでに30名を登録し遺伝子検査とビタミンK採血を行った。食事調査を各季節毎に行っている。ワルファリン療法中の脳出血は血腫が大きく、予後不良。

D. 考察および結論

研究は順調に進んでおり、プロトコールに従って、研究を進める。ワルファリン療法の脳内血腫増大作用を報告した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuwashiro T, Yasaka M, et al:
Enlargement of Acute Intracerebral Hematomas in Patients on Long-Term Warfarin Treatment

2. 学会発表

矢坂正弘：心房細動における抗凝固療法のリスク・ベネフィット 血栓止血学会
21年6月5日、小倉