

原 著

2型糖尿病患者における大血管障害合併と
動脈硬化関連遺伝子多型の検討¹⁾東京女子医科大学 医学部 第三内科学, ²⁾至誠会第二病院 内科, ³⁾さいたま記念病院 内科ム トウ カズ コ ウチ ガタ ヤス コ ホン ダ マサ シ オオ タニ トシ カ イワ モト ヤス ヒコ
武藤 和子¹⁾・内潟 安子¹⁾・本田 正志²⁾・大谷 敏嘉³⁾・岩本 安彦¹⁾

(受付 平成13年2月13日)

Diabetic Macroangiopathy and Genetic Polymorphisms in
Japanese Patients with Type 2 DiabetesKazuko MUTO¹⁾, Yasuko UCHIGATA¹⁾, Masashi HONDA²⁾,
Toshika OTANI³⁾ and Yasuhiko IWAMOTO¹⁾¹⁾Department of Medicine III (Director: Prof. Yasuhiko IWAMOTO),
Diabetes Center, Tokyo Women's Medical University School of Medicine²⁾Department of Medicine, Shiseikai Second Hospital³⁾Department of Medicine, Saitama Memorial Hospital

The main cause of mortality in type 2 diabetic patients is macroangiopathy including coronary heart disease (CHD), cerebrovascular disease (CVD), and obstructive atherosclerosis (ASO). Recent genetic studies showed that these vascular diseases in non-diabetic patients were largely associated with certain genetic polymorphisms. We therefore investigated the relationship between macroangiopathy and the genetic polymorphisms in Japanese patients with type 2 diabetes by a case-control study. A total of 157 patients with type 2 diabetes were divided into 81 with either CHD, CVD or ASO (positive group) and 76 without all (negative group). Two groups were matched with age, duration, HbA1c and lipid metabolism. Healthy individuals who had no abnormality of glucose and lipid metabolisms served as controls. The gene polymorphisms used in this study were as follows; the deletion/insertion allele of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene, 1166A/C allele of angiotensin II type I receptor (AT₁R) gene, PI^{A1}/PI^{A2} allele of platelet glycoprotein IIIa receptor (GPIIIa) gene, TaqIB and Int14G/A allele of cholesteryl ester transfer protein (CETP), 188Gly/Glu allele of lipoprotein lipase (LPL) gene, 4a/b allele of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene, 192Gln/Arg allele of paraoxonase (PON) gene, and 677C/T allele of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. These gene polymorphisms in healthy control were on the way to Hardy-Weinberg equilibrium. The result showed that there was no statistical difference in the polymorphisms between the positive and negative groups. It suggests that the development of macroangiopathy in type 2 diabetes was not associated these gene polymorphisms.

緒 言

虚血性心疾患，脳血管障害，閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化を基盤とする大血管障害は，2型糖尿病の死亡率の約50%を占める重要な合併症である．日本人の2型糖尿病患者に合併する大血管障害を促進する因子として，血糖コントロール状態，罹病期間，喫煙，高血圧，高脂血症などの後天的因子がこれまで報告されてきた¹⁾．その後これらの後天的な促進因子とともに，動脈硬化性病変自体を促進させる遺伝的な因子の関与が強く示唆されるようになってきた²⁾³⁾．

動脈硬化に関連する遺伝的因子の研究のうちで，アンジオテンシン変換酵素(angiotensin I converting enzyme: ACE) 遺伝子多型は心筋梗塞⁴⁾，冠動脈疾患⁵⁾，肥大型心筋症⁶⁾，左室肥大⁷⁾，冠動脈ステント後再狭窄⁸⁾，脳梗塞⁹⁾との関係が報告され，アンジオテンシンIIタイプ1受容体(angiotensin II type 1 receptor: AT₁R) 遺伝子多型は心筋梗塞¹⁰⁾と，血小板膜受容体IIIa (glycoprotein IIIa: GPIIIa) 遺伝子多型は冠動脈血栓¹¹⁾と，コレステリルエステル輸送蛋白(cholesterol ester transfer protein: CETP) 遺伝子多型は心筋梗塞¹²⁾と，リポ蛋白リパーゼ(lipoprotein lipase: LPL Gly¹⁸⁸ Gln) 遺伝子多型は虚血性心疾患¹³⁾と，血管性ニトロオキシド合成酵素(nitric oxide synthase: eNOS) 遺伝子多型は冠動脈疾患¹⁴⁾と，パラオキソナーゼ(paraoxonase: PON) 遺伝子多型は糖尿病患者における冠動脈疾患¹⁵⁾と，メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(methylenetetrahydrofolate reductase: MTHFR) 遺伝子多型は心筋梗塞¹⁶⁾との関連が，非糖尿病患者を対象とした多数の研究から報告された．しかし，日本人非糖尿病患者を対照とした日本人2型糖尿病患者の大血管障害の発症とこれら一連の遺伝子多型との関連性についてはいまだ十分に解明されていない．

我々は，これらの遺伝子多型と日本人2型糖尿病患者の大血管障害合併との関連性を検討するために，臨床背景をマッチさせた大血管障害合併群および非合併群を用いて上記の遺伝子多型を比較検討するとともに，既報のデータについて文献的考察を行った．

対象と方法

1. 対象

東京女子医大糖尿病センター，その関連病院であるさいたま記念病院の糖尿病外来に通院または入院中の2型糖尿病患者を対象とした．

糖尿病の診断は75gブドウ糖負荷試験を行って1982年の日本糖尿病学会判定基準に基づいて診断した．

虚血性心疾患，脳血管障害，閉塞性動脈硬化症の大血管障害をいずれももたない2型糖尿病を大血管障害陰性群，少なくとも一つの大血管障害を有する2型糖尿病患者を大血管障害陽性群と分類し，2群の平均年齢，糖尿病罹病期間，初診時HbA1c，通院期間中全部の平均HbA1c値をマッチさせた(表1)．また，正常血圧で，虚血性心疾患，脳血管障害および閉塞性動脈硬化症の動脈硬化性血管障害を有さない非糖尿病患者75人を至誠会第二病院の人間ドック受診者から選び，正常対照群とした．

全ての対象に調査の十分な説明を行った後，インフォームドコンセントを得，連結不可能匿名化した研究である旨，東京女子医科大学個人識別情

表1 糖尿病患者の大血管障害陰性群と陽性群の患者背景

	大血管障害 (-)	大血管障害 (+)	p
n(男/女)	76(37/39)	81(48/33)	NS
年齢(歳)	64.1±8.4	64.5±8.0	NS
罹病期間(年)	10.3±6.3	11.0±6.8	NS
BMI(kg/m ²)	23.0±3.0	23.7±3.3	NS
喫煙(%)	36.8	44.4	NS
初診時HbA1c(%)	8.3±2.1	8.2±2.1	NS
通院中HbA1c(%)	7.2±1.0	7.4±1.3	NS
T-chol(mg/dl)	202.4±32.9	199.8±40.0	NS
TG(mg/dl)	150.3±85.0	147.4±82.7	NS
HDL-C(mg/dl)	50.5±16.4	52.0±26.1	NS
LDL-C(mg/dl)	122.5±29.0	124.3±33.8	NS
sBP(mmHg)	137.4±15.7	138.5±22.4	NS
dBp(mmHg)	76.2±11.0	78.4±14.8	NS
降圧剤服用(%)	57.9	79.0	p<0.05
retinopathy(N/S/P)	50/12/14	32/12/37	p<0.001
nephropathy(-/+)	64/12	54/27	p<0.05

N/S/P: no retinopathy/simple retinopathy/proliferative retinopathy.

表2 各種遺伝子の primer 配列

Angiotensin I converting enzyme gene
sense 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'
antisense 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'
Angiotensin II type I receptor gene
sense 5'-ATAATGTAAGCTCATCCACC-3'
antisense 5'-GAGATTGCATTTCTGTCTAGT-3'
Glycoprotein IIIa gene
sense 5'-TTCTGATTGCTGGACTTCTCTT-3'
antisense 5'-TCTCTCCCCATGGCAAAGAGT-3'
Cholesteryl ester transfer protein/Taq IB gene
sense 5'-CACTAGCCCAGAGAGAGGAGTGCC-3'
antisense 5'-CTGAGCCCAGCCGACACTAAC-3'
Cholesteryl ester transfer protein/Int14 gene
sense 5'-ATAATGTAAGCTCATCCACC-3'
antisense 5'-GAGATTGCATTTCTGTCTAGT-3'
Lipoprotein lipase gene
sense 5'-GAGCAGTGACATGCGAATGT-3'
antisense 5'-CTCCAAGTCCTCTCTCTGCA-3'
Nitric oxide synthase gene
sense 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCCTTT-3'
antisense 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT-3'
Peroxisome gene
sense 5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3'
antisense 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3'
Methylenetetrahydrofolate reductase gene
sense 5'-CAAAGGCCACCCGAAGC-3'
antisense 5'-AGGACGGTGCAGTGAGAGTG-3'

報管理者の了解を得た。

2. 方法

1) 大血管障害の診断

虚血性心疾患の有無は、トレッドミル運動負荷試験あるいは冠動脈造影で判定し、全く異常のない場合を陰性、狭心症や急性心筋梗塞の既往、または冠動脈造影で少なくとも75%の狭窄が1枝以上に存在する場合を陽性とした。

脳血管障害は神経学的所見に異常があり、かつ頭部CT上、脳梗塞の所見を認める場合を陽性とした。脳出血や脳塞栓が原因と考えられる場合は除外した。

閉塞性動脈硬化症は、足背動脈触知不能あるいは間歇性跛行を認める場合を陽性とした。

2) 臨床検査値の解析

HbA_{1c}は京都第一科学 AUTOA_{1c}-8112によるHPLC法(正常値4.3~5.8%)により測定した。用いたHbA_{1c}値は初診時の値と調査時までの月1

回測定した値の平均値(通院中HbA_{1c}値)である。血圧は安静座位で測定し、調査時前後の外来診察時の3回の値を平均したものをを用いた。調査時採血は早朝空腹時に行い、総コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロールを測定し、LDLコレステロールはそれらの結果より算出して求めた。

3) DNA解析

静脈血の白血球細胞よりDNAを抽出し、各々の遺伝子特異的プライマー(表2)を用いたpolymerase chain reaction (PCR)を行った。解析した遺伝子はACE遺伝子、AT₁R遺伝子、GPIIIa遺伝子、CETP遺伝子、LPL遺伝子、eNOS遺伝子、PON遺伝子、MTHFR遺伝子である。

(1) ACE遺伝子I/D多型診断

Rigatら¹⁷⁾の方法を用いて検出した。PCR産物は5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、490bpのI alleleと190bpのD alleleを同定した。

(2) AT₁R遺伝子1166位A→C多型診断

Takayanagiら¹⁸⁾の方法を用いて検出した。PCR産物は制限酵素Dde Iで切断後、10%アクリルアミドゲル電気泳動し、139bpと211bpを同定した。1166A→C変異がある場合、139bpと211bpに切断される¹⁸⁾。

(3) GPIIIa遺伝子PI^{A1}/PI^{A2}多型診断

Weissら¹¹⁾の方法を用いた。PCR産物は制限酵素Nci IおよびMsp Iで切断後、10%アクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色し、PI^{A1} alleleとPI^{A2} alleleを同定した。Exon 2の1565T→Cの変異により、alleleをPI^{A1}とPI^{A2}が決定される。

(4) CETP遺伝子TaqIB多型診断

Fumeronら¹²⁾の方法を用いた。535bpのPCR産物を制限酵素TthHB8 I (Taq I)で処理し、10%アクリルアミドゲル電気泳動で、361bpと174bpが検出されたものをB1 allele、未切断のものをB2 alleleと同定した。

(5) CETP遺伝子Int14位G→A多型診断

Inazuら¹⁹⁾の方法で行った。PCR産物は制限酵素Nde I処理後、185bpの未切断の正常 alleleと138bpと47bpに切断された変異 alleleを、10%

表3 2型糖尿病患者と対照群における遺伝子多型の頻度

遺伝子		対照群 (n=75) 例(%)	糖尿病群 (n=157) 例(%)	χ^2	p
ACE	DD	14 (19)	19 (12)	2.23	0.38
	ID	31 (41)	63 (40)		
	II	30 (40)	75 (48)		
AT ₁ R	CC	1 (1)	1 (6)	1.31	0.52
	AC	11 (15)	16 (10)		
	AA	63 (84)	140 (89)		
GP _{IIIa}	PI ^{A1} /PI ^{A1}	74 (99)	156 (99)	2.10	0.15
	PI ^{A1} /PI ^{A2} + PI ^{A2} /PI ^{A2}	1 (13)	1 (0.6)		
CETP/Taq IB	B1B1	23 (31)	49 (31)	0.02	0.99
	B1B2	40 (53)	84 (54)		
	B2B2	12 (16)	24 (15)		
CETP/Int14 位	-/-	75 (100)	154 (98)	2.41	0.30
	+/-	0 (0)	3 (2)		
	+/+	0 (0)	0 (0)		
LPL188 位	-/-	75 (100)	157 (100)	0.29	0.87
	+/-	0 (0)	0 (0)		
	+/+	0 (0)	0 (0)		
eNOS	aa	1 (1)	1 (0.6)	5.26	0.07
	ab	11 (15)	23 (15)		
	bb	63 (84)	133 (85)		
PON	AA	5 (7)	24 (15)	0.15	0.93
	AB	40 (53)	63 (40)		
	BB	30 (40)	70 (45)		
MTHFR	CC	28 (37)	63 (40)	0.15	0.93
	CT	34 (45)	68 (43)		
	TT	12 (16)	26 (17)		

アクリルアミドゲル電気泳動で同定した。

(6) LPL 遺伝子 188 位 Gly→Glu 多型診断

Nordestgaard ら¹³⁾の方法で行った。PCR 産物を制限酵素 *Ava* II で切断後、4% アガロースゲルで泳動した。正常 allele (131, 88, 86bp) と変異 allele (219, 131, 88, 86bp) を同定した。

(7) eNOS 遺伝子 4a/b 多型診断

Wang ら¹⁴⁾の方法を用いた。PCR 産物を 4% アガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色で 420bp の eNOS4b allele, 393bp の eNOS4a allele を同定した。

(8) PON 遺伝子 192 位 Glu→Arg 多型診断

Primo ら²⁰⁾の方法で行った。99bp の PCR 産物は制限酵素 *Alw* I 切断後、15% アクリルアミドゲル電気泳動した。エチジウムブロマイド染色後、99bp のみの A allele と 65bp と 34bp に分かれる B allele を同定した。

(9) MTHFR 遺伝子 677 位 C→T 多型診断

Schmitz ら¹⁶⁾の方法で行った。246bp の増幅した PCR 産物は制限酵素 *Hinf* I 切断後、10% アクリルアミドゲルに泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、198bp の未切断 type (C) allele と 175bp (+23bp) の変異 allele を同定した。

4) 統計解析

遺伝子の genotype の分布や allele の頻度の有意差検定には χ^2 検定を用いた。Hardy-Weinberg の平衡は χ^2 検定により確認された。本研究におけるデータはすべて平均値±標準偏差で示し、2群間の比較検討は Student の t 検定もしくは Welch の t 検定で行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 臨床像

表1に糖尿病大血管障害陰性群と大血管障害陽性群の臨床的な特徴を示した。大血管障害陽性群

表4 大血管障害陰性群と陽性群の遺伝子多型と allele 頻度

遺伝子			大血管障害 陰性群 例 (%)	大血管障害 陽性群 例 (%)	χ^2	p
ACE	genotype	DD	9 (12)	10 (12)	1.51	0.47
		ID	27 (36)	36 (44)		
		II	40 (53)	35 (43)		
	allele	D	45 (30)	56 (35)	0.89	0.35
		I	107 (70)	106 (65)		
AT1R	genotype	CC	1 (1)	0 (0)	0.83	0.36*
		AC	9 (12)	7 (9)		
		AA	66 (87)	74 (91)		
	allele	C	11 (7)	7 (4)	1.23	0.27
		A	141 (93)	155 (96)		
GPⅢa	genotype	PIA ¹ /PIA ¹	76 (100)	80 (99)	0.94	0.33**
		PIA ¹ /PIA ²	0 (0)	1 (1.2)		
		PIA ² /PIA ²	0 (0)	0 (0)		
	allele	PIA ¹	153 (100)	166 (99)	0.95	0.33
		PIA ²	0 (0)	1 (0.6)		
CETP/Taq IB						
	genotype	B1B1	20 (26)	29 (36)	1.71	0.43
		B1B2	43 (57)	41 (51)		
		B2B2	13 (17)	11 (14)		
	allele	B1	83 (55)	99 (61)	1.36	0.24
		B2	69 (45)	63 (39)		
CETP/Int14 位						
	genotype	- / -	75 (99)	79 (98)	0.28	0.60***
		- / +	1 (1)	2 (2)		
		+ / +	0 (0)	0 (0)		
	allele	-	151 (99)	160 (99)	0.28	0.60
		+	1 (1)	2 (1)		
eNOS	genotype	aa	0 (0)	1 (1)	2.58	0.11****
		ab	8 (11)	15 (19)		
		bb	68 (89)	65 (80)		
	allele	a	8 (5)	17 (10)	2.93	0.08
		b	144 (95)	45 (90)		
PON	genotype	AA	10 (13)	14 (17)	1.13	0.57
		AB	29 (38)	34 (42)		
		BB	37 (49)	33 (41)		
	allele	A	49 (32)	62 (38)	1.25	0.26
		B	103 (68)	100 (62)		
MTHFR						
	genotype	CC	33 (43)	30 (37)	2.45	0.29
		CT	34 (45)	34 (42)		
		TT	9 (12)	17 (21)		
	allele	C	100 (66)	94 (58)	2.00	0.16
		T	52 (34)	68 (42)		

*CC + AC vs AA, **PIA¹/PIA¹ vs PIA¹/PIA² + PIA²/PIA², ***-/- vs -/+,
 ****aa + ab vs bb.

と大血管障害陰性群は、年齢、罹病期間、初診時 HbA1c 値、通院中 HbA1c 値は予めマッチさせたため、2 群に有意差はない。性別、BMI、血中脂質、

血圧にも有意差はなかったが、降圧剤の服用頻度、網膜症と腎症の合併する頻度は大血管陽性群に有意に多かった。

2. 糖尿病患者における大血管障害関連遺伝子多型の頻度

表3に对照群と糖尿病群における各遺伝子の genotype の頻度を示し、表4に糖尿病大血管障害陽性群および陰性群のそれぞれの遺伝子多型の genotype および allele 頻度を示した。なお、各群での遺伝子型の分布はそれぞれ Hardy-Weinberg の平衡に合致していることを確かめている。

1) ACE 遺伝子と AT₁R 遺伝子の多型

ACE I/D と AT₁R A/C の genotype の分布は对照群と糖尿病群の間に有意差はなかった。なお对照群のこれらの遺伝子の genotype の分布はこれまでの報告と差異はなかった^{21)~23)}。

表4に示したように、ACE I/D genotype の分布は、大血管障害陰性群で DD が9例、ID が27例、II が40例であったのに対し、陽性群では DD が10例、ID が36例、II が35例で、2群間に有意差はなかった。Allele 頻度の比較でも、大血管障害陰性群で D が30%、I が70%であったのに対し、陽性群では D が35%、I が65%であった。後者で D が若干多かったが、有意差はなかった。

AT₁R A/C genotype の分布は、大血管障害陰性群で CC が1例、AC が9例、AA が66例であったのに対し、陽性群では CC が0例、AC が7例、AA が74例で、2群間に有意差はなかった。Allele 頻度においても、大血管障害陰性群で C が7%、A が93%であったのに対し、陽性群では C が4%、A が96%と、有意差はなかった。

また、AT₁R 遺伝子の AA genotype を有する大血管障害陽性群での ACE 遺伝子の genotype の頻度は、DD が9例、ID が34例、II が31例であるのに対し、AC genotype を有する大血管障害陽性群では DD 1例、ID 2例、II 4例であり、ACE 遺伝子と AT₁R 遺伝子 genotype の両方を加味しても大血管障害と相関する特異的な genotype はみつからなかった。

2) GPIIIa 遺伝子の PI^{A1}/A² 多型

对照群 75 例中 1 例のみ、糖尿病群においても大血管障害陽性群で 1 例のみが PI^{A2} (いずれもヘテロ接合体; PI^{A1}/PI^{A2}) を示した。他はすべて PI^{A1}/A¹ であった。

3) CETP 遺伝子の Taq IB 多型

CETP/Taq IB 遺伝子の genotype の分布は对照群と糖尿病群の間に類似しており、有意差はなかった。

大血管障害陰性群および陽性群での CETP/Taq IB 遺伝子の genotype の分布は、大血管障害陰性群で B1B1 が20例、B1B2 が43例、B2B2 が13例であったのに対し、陽性群では B1B1 が29例、B1B2 が41例、B2B2 が11例で、2群間に有意差はなかった。

Allele 頻度は、大血管障害陰性群で B1 が55%、B2 が45%、陽性群では B1 が61%、B2 が39%であった。陰性群で B2 allele の頻度が若干高かったが、有意差はなかった。

4) CETP 遺伝子の Int14 位多型

CETP 遺伝子の変異 allele の分布は、糖尿病群で 157 例中 3 例の変異 allele を認めたのみで、对照群において変異 allele は認めなかった。

大血管障害陰性群および陽性群の CETP 遺伝子の genotype は、大血管障害陰性群で変異 allele を持つものは 76 例中 1 例、陽性群では 81 例中 2 例のみで、いずれもヘテロ接合体であった。この部位の allele 分布においても 2 群間に有意差はなかった。

5) LPL 遺伝子の 188 位多型

LPL 遺伝子多型については、LPL 遺伝子の 188 位 Gly→Gln の置換を調べたが、对照群、糖尿病群いずれにおいても、本多型は認められなかった。

6) eNOS 遺伝子 4a/b 多型

对照群では、aa, ab, bb genotype の分布はそれぞれ 1, 11, 63 例で、糖尿病群では 1, 23, 133 例であり、2群間で有意差はなかった。

大血管障害陰性群と陽性群での eNOS 遺伝子の genotype の分布は、大血管障害陰性群で aa+ab が8例、bb が68例、大血管障害陽性群で aa+ab が16例、bb が65例であり、有意差はなかった。Allele 頻度も、陰性群の a が5%、b が95%、陽性群の a が10%、b が90%で有意差はなかった。

7) PON 遺伝子 192 位多型

对照群では、AA, AB, BB genotype の頻度は

それぞれ5, 40, 30例で、糖尿病群では24, 63, 70例であり、2群間で有意差はなかった。

大血管障害陰性群と陽性群でのPON遺伝子のgenotypeの分布は、大血管障害陰性群はAAが10例、ABが29例、BBが37例で、大血管障害陽性群ではAAが14例、ABが34例、BBが33例であり、2群間に有意差は認めなかった。Allele頻度においても、陰性群がA 32%, B 68%, 陽性群がA 38%, B 62%で、2群間に有意差はなかった。

8) MTHFR 遺伝子 677 位多型

対照群では、CC, CT, TT genotypeの頻度はそれぞれ28, 34, 12例で、糖尿病群では63, 68, 26例であり、2群間に有意差はなかった。

大血管障害陰性群および陽性群のMTHFRのgenotypeの分布は、大血管障害陰性群でCCが33例、CTが34例、TTが9例で、大血管障害陽性群ではCCが30例、CTが34例、TTが17例であり、2群間に有意差は認めなかった。Allele頻度も陰性群がC 66%, T 34%, 陽性群がC 58%, T 42%で、2群間に有意差は認めなかった。

考 察

非糖尿病患者における動脈硬化性大血管障害と動脈硬化発症関連遺伝子との相関を調査したインパクトスコアの高い(4.0以上)報告から9種類の遺伝子を選び、我々は日本人糖尿病患者における動脈硬化性大血管障害の発症がこれらの遺伝子多型と関連しているかどうかを検討した。ACE遺伝子I/D多型、AT₁R遺伝子1166A→C多型、GPIIIa遺伝子PI^{A1}/PI^{A2}多型、CETP遺伝子のTaq IB多型とイントロン14位のG→A多型、LPL遺伝子188位Gly→Gln、eNOS遺伝子4a/b多型、PON遺伝子の多型、MTHFR遺伝子の多型のいずれも、2型糖尿病の発症自体とは関連なく、2型糖尿病における大血管障害の発症との有意な関連性も見出されなかった。

我々のこれらの結果は、非糖尿病患者における動脈硬化性障害がある特定の遺伝子多型と関連があったとするこれまでの報告を支持するものではなかった。両者の相違を以下に考察する。

第一に、大血管障害陰性群の抽出の仕方である。これまでの報告の大血管障害陰性群は、人間ドッ

クあるいは他疾患で来院した際の安静時心電図と既往歴の聴取のみの条件で抽出されており、トレッドミル運動負荷試験後心電図や血管造影などの客観的な評価が行われているものは、一部の報告^{24)~28)}にすぎない。我々は、大血管障害陰性の糖尿病患者群に運動負荷試験もしくは血管造影を行って大血管障害を除外した。よって、大血管障害陰性の糖尿病患者群の選択にはバイアスがかかっていないと考えられる。ちなみに、全例に運動負荷試験または心血管造影を行って確認した大血管障害陰性群について特定の遺伝子多型と肯定的な関連性を報告したのは、GPIIIa遺伝子多型との弱い相関を認めたArdissinoら²⁵⁾の報告と、MTHFR遺伝子多型との関連性についてのInbalら²⁶⁾の報告のみであり、MTHFR遺伝子多型に関するArdissinoら²⁵⁾、Girelliら²⁷⁾、Andersonら²⁸⁾の報告は、我々と同様に否定的な結果であった。

糖尿病患者では無痛性狭心症が多いことは周知の事実である。よって、糖尿病患者を対象とする場合、安静時心電図あるいは臨床症状の有無によって大血管障害陰性と判定しても、大血管障害陰性群を抽出したことにはならない。Ruizら¹⁵⁾をはじめとする糖尿病患者に関する既報文献^{29)~33)}は、大血管障害陰性群を安静時心電図と既往歴の聴取のみの条件で抽出していることから、評価はできないと考えられた。

2番目に、患者の選択におけるバイアスの問題である。我々の研究を含めてであるが、大多数の報告は断面調査であるため心筋梗塞を発症した生存者のみをとってあつまっている。この場合、死亡した心筋梗塞患者は入りにくい。対象患者の選択にバイアスがかかっている可能性は否定できない。Retrospectiveではなく、バイアスのかからない大血管障害合併群の選択によるprospectiveな研究であることが望ましいと考えられる。現在のところprospectiveに研究を行った報告は少ない^{34)~37)}。大規模なprospectiveな調査を行ったLindpaintnerら³⁴⁾の報告によりACE遺伝子のD alleleと虚血性心疾患または心筋梗塞発症との相関が否定され、Ridkerら³⁵⁾の報告によりGPIIIa遺伝子多型と心筋梗塞、脳梗塞、静脈血栓症との

表5 既存の動脈硬化関連遺伝子多型性の報告

遺伝子	報告	対象	対照	結果
ACE	O'Malley ら 1998 ³⁸⁾	家族性高コレステロール血症とMIの既往またはCHDに外科的インターベンションが行われた67例	家族性高コレステロール血症があり、CHDの既往のない146例	DD型はII+DIに比して高頻度 MI: OR=2.57, p=0.018 CHD: OR=2.21, p=0.021
ACE AT1R	Olivieri ら 1999 ³⁹⁾	血管造影によりアテローム性腎動脈狭窄と診断された58例	血管造影により正常冠動脈と診断され、他の動脈硬化性血管障害の既往のない正常血圧者102例	ACEのDアレルが患者で有意に高頻度 OR=1.9, p=0.01 ATR A1166C: NS
ACE MTHFR	Notsu ら 1999 ²¹⁾	MRIにより無症候性脳梗塞(SBI)と診断された147例	MRIにより脳梗塞を否定された214例	ACE, MTHFR: NS
ACE	Argerholm-Larsen ら 1997 ⁴⁰⁾	①50歳以前に虚血性脳血管障害を発症した73例, ②40%以上の頸動脈狭窄があり虚血性脳血管障害を発症した219例, ③虚血性脳血管障害のある160例	①患者と年齢を一致させた一般人口3,191例, ②患者と年齢を一致させた一般人口7,364例, ③虚血性脳血管障害のない7,233例(臨床症状より判断)	2つの case-referent study と横断研究のいずれも NS
ACE	Watanabe ら 1997 ²²⁾	頭部MRI, 頸動脈エコーにて小梗塞あり36例, プラークあり43例	頭部MRI, 頸動脈エコーにて小梗塞なし133例, プラークなし126例	頸動脈プラーク: Dアレルで有意に高頻度に存在 OR=3.27, p=0.016 小梗塞の頻度: NS
ACE	Hibi ら 1997 ²³⁾	冠動脈疾患で入院中の152例	冠動脈疾患の症状のない399例(安静時心電図が正常)	非喫煙者でNS, 喫煙者でDD型で有意 p<0.05
ACE	Catto ら 1996 ⁹⁾	脳卒中と診断された467例(脳梗塞418例, 脳出血49例)	脳卒中でない231例(臨床症状より判断)	NS
ACE	Tarnow ら 1995 ³⁰⁾	冠動脈疾患と糖尿病性腎症を合併したIDDM患者38例	冠動脈疾患はなく糖尿病性腎症を合併したIDDM患者160例(安静時心電図, 臨床症状で診断)	II vs DD+ID: OR=0.27, p<0.05
ACE	Fujisawa ら 1995 ³¹⁾	心筋梗塞の既往のあるNIDDM患者61例	心筋梗塞のないNIDDM患者136例(臨床症状なく, 安静時心電図正常)	DD vs ID+II: OR=2.22, p=0.024
ACE	Ludwig ら 1995 ⁴¹⁾	①冠動脈疾患を有す697例, ②冠動脈疾患を有し心筋梗塞の既往もあり159例	①冠動脈疾患のない335例, ②冠動脈疾患を有すが心筋梗塞の既往はない199例	①冠動脈疾患の頻度: NS ②心筋梗塞の発生はDアレルで多い OR=1.6, p=0.005
ACE	Lindpaintner ら 1995 ³⁴⁾	前向き研究 ①虚血性心疾患を有する1,250例の男性, ②虚血性心疾患を有し心筋梗塞を有する387例	①年齢, 喫煙歴をマッチさせた2,340例(臨床症状より判断), ②虚血性心疾患を有するが心筋梗塞を有しない1,475例	①虚血性心疾患: NS (OR=1.07, p=0.24) ②心筋梗塞: NS (OR=1.05, p=0.56)
ACE	Matts ら 1995 ⁴²⁾	冠動脈疾患404例	冠動脈疾患ない822例(症状と安静時心電図にて)	NS
ACE	Nakai ら 1994 ⁴³⁾	冠動脈疾患178例(狭心症70例と心筋梗塞108例)	冠動脈疾患のない100例	冠動脈疾患でDアレルの頻度が多い(p<0.05), さらに3枝病変は強くDアレルと相関する(p<0.05)
ACE AT1R	Tiret ら 1994 ¹⁰⁾	心筋梗塞既往がある613例	年齢をマッチさせた723例(症状と安静時心電図にて)	ACE DD型のOR: AT1RのAA型1.05, AC型1.52, CC型3.95(p<0.02)低リスク群(apo(B), BMIによる)ではOR=1.64, 7.03, 13.3と更に強い相関を認める
ACE	Cambien ら 1992 ⁴⁾	心筋梗塞既往がある610例	心筋梗塞既往のない733例	患者群でDD型を有する頻度が高い(p<0.007), 特に低リスク群(apo(B), BMIによる)では更に強い相関を認める (OR=3.2, p=0.0001)
GPIIIa	Anderson ら 1999 ²⁴⁾	791例全員に冠血管造影施行 ①心筋梗塞の既往あり225例 ②重度の冠動脈疾患あり549例	791例全員に冠血管造影施行 ①心筋梗塞の既往, 狭心症なし276例 ②正常冠動脈170例	NS ①心筋梗塞とPIA ² : OR=1.47, p=0.062 ②冠動脈疾患とPIA ² : OR=1.20, p=0.38
GPIIIa MTHFR (C677T)	Ardissino ら 1999 ²⁵⁾	45歳前に心筋梗塞を発症し生存した200例	性別, 年齢, 出身地をマッチさせた200例, 臨床症状の既往, 運動負荷試験にて虚血性心疾患を否定	GPIIIa: PIA ² アレル: OR=1.67 MTHFR: NS (Tアレル OR=0.89)

GPIIIa	Ridker ら 1997 ³⁵⁾	健常人 14,916 例の 8.6 年間前向き研究 初めて心筋梗塞を発症 374 例 脳梗塞を発症 209 例 静脈血栓を発症 121 例(合計 704 例)	血栓症を来した報告がなされなかった中で年齢、喫煙をマッチさせた 704 例を抽出	NS (PIA ² アリル：心筋梗塞 OR=0.93, 脳梗塞 OR=0.93, 静脈血栓症 OR=1.07)
GPIIIa	Weiss ら 1996 ¹¹⁾	心筋梗塞または不安定狭心症の 71 例	年齢、人種、性別をマッチさせた狭心症、心筋梗塞の既往のない 68 例 (臨床症状より判断)	PIA ² アリル：OR=2.8, 60 歳未満での OR=6.2
CETP	Zhong ら 1996 ³⁶⁾	ハワイ在住日系人 3,469 例を 3 年間前向き研究 冠動脈疾患を発症した 1,009 例	ハワイ在住日系人 3,469 例を前向き研究 冠動脈疾患発症しない 2,460 例	14G：A 変異または D442G 変異を持つ場合：OR=1.43
CETP	Fumerson ら 1995 ¹²⁾	心筋梗塞既往のある男性 608 例	年齢、出身地をマッチさせた心筋梗塞の既往のない男性 724 例	B2B2 vs B1B2+B1B1：飲酒しない群で OR=1.04 であるが、75g/d 以上飲酒する群では OR=0.34, p=0.02 に減少
LPL	Nordestgaard ら 1997 ¹³⁾	虚血性心疾患 948 例 (冠血管造影で重度の狭窄あり 767 例, 心筋梗塞の既往あり, または運動負荷試験で陽性)	一般人口の 9,259 例	OR=4.9, p=0.04 (75 歳以下で OR=7.5, p=0.03 重度の冠動脈狭窄を持つ群では OR=6.1, p=0.03)
NOS (4a/b)	Hibi ら 1998 ⁴⁴⁾	急性心筋梗塞の 226 例	性別と年齢をマッチさせた 357 例 (臨床症状なく, 安静時心電図が正常)	NS
NOS (4a/b)	Odawara ら 1998 ³²⁾	冠動脈疾患 NIDDM 42 例	冠動脈疾患を伴わない NIDDM 122 例 (安静時心電図にて)	NS (p=0.125)
NOS (4a/b)	Wang ら 1996 ¹⁴⁾	冠動脈疾患 549 例	冠動脈疾患を伴わない 153 例 (臨床症状の有無にて)	p < 0.05, 4a/a vs 4b/b：OR=1.370, 4a/b vs 4b/b：OR=1.288
PON (Glu192 Arg)	Pfole ら 1999 ³³⁾	①冠動脈疾患を伴う NIDDM 170 例 ②心筋梗塞既往 95 例	①冠動脈疾患を伴わない NIDDM 118 例 (82 例は臨床症状と安静時心電図にて) ②心筋梗塞の既往なし 193 例	①冠動脈疾患 AA vs AB + BB OR=1.78, p=0.02 3 枝病変：OR=1.92, p=0.01 ②心筋梗塞の既往：NS (OR=1.20)
PON	Odawara ら 1997 ²⁹⁾	冠動脈疾患合併 NIDDM 42 例	冠動脈疾患を伴わない NIDDM 122 例 (安静時心電図にて)	B アリル：OR=8.82, p=0.037
PON	Antikainen ら 1996 ⁴⁵⁾	冠動脈疾患合併 380 例	冠動脈疾患のない 169 例 (臨床症状の有無にて)	NS (p=0.12)
PON	Ruiz 1995 ¹⁵⁾	冠動脈疾患合併 NIDDM 171 例	冠動脈疾患のない NIDDM 263 例 (狭心症既往なく, 安静時正常心電図)	B アリル：OR=1.94, p=0.03
MTHFR C677T	Inbal ら 1999 ²⁶⁾	52 歳前に急性心筋梗塞を発症した冠動脈疾患を伴う男性 112 例	年齢をマッチさせた冠動脈疾患のない男性 187 例 (冠動脈疾患の既往がなく, 安静時心電図, 運動負荷試験の結果で)	T アリル：OR=2.65
MTHFR	Bova ら 1999 ⁴⁶⁾	無症候性の重度 (> 75%) の頸動脈硬化を有する 48 例	頸動脈硬化を伴わない 26 例 (< 25%)	T アリル：OR=2.4, p=0.02
MTHFR	Girelli ら 1998 ²⁷⁾	重度の 3 枝病変の冠動脈疾患を持つ 278 例	冠動脈疾患を伴わない 137 例 (冠血管造影にて)	NS (p=0.6)
MTHFR	Anderson ら 1997 ²⁸⁾	心筋梗塞と診断された 200 例と重度 (> 60%) の冠動脈疾患を伴う 510 例	心筋梗塞既往のない 554 例 冠動脈疾患を伴わない人 (< 10%) 168 例 (冠血管造影にて)	心筋梗塞：NS (p=0.74, OR=1.09) 冠動脈疾患：NS (p=0.50, OR=0.83)
MTHFR	Schwartz ら 1997 ⁴⁷⁾	45 歳前に心筋梗塞を発症した女性 79 例	年齢を一致させた女性 386 例	NS (TT vs CC：OR=0.90)
MTHFR	Morita ら 1997 ⁴⁸⁾	冠動脈疾患を伴っている 362 例 (心筋梗塞 202 例, 不安定狭心症 20 例, 狭心症 140 例)	冠動脈疾患を伴わない 778 例 (臨床症状, 安静時心電図にて)	TT 型 p=0.0067 ≥ 99% の狭窄を伴う群では p=0.001 3 枝病変 vs 1 枝 or 2 枝病変：p=0.031
MTHFR	Markes ら 1997 ⁴⁹⁾	虚血性脳血管障害 345 例	虚血性脳血管障害を伴わない 161 例	NS (TT 型 p=0.34, T 型 p=0.67)
MTHFR	Ma ら 1996 ³⁷⁾	8 年間経過観察中に心筋梗塞を発症した 293 例 (前向き研究)	8 年間経過観察中に心筋梗塞を発症しなかった 290 例 (6 カ月毎にアンケート調査を施行)	NS (CC vs CT：OR=0.90, CC vs TT：OR=0.8)
MTHFR	Schmitz ら 1996 ¹⁶⁾	心筋梗塞既往のある 190 例	性別、年齢をマッチさせた冠動脈疾患を伴わない 188 例	NS (TT vs CT+CC：OR=1.1, p=0.8)

相関が完全に否定された。

3 番目に、性差、糖尿病、高血圧、脂質、喫煙など、動脈硬化関連遺伝子の多型性を調べる上で影響を与える臨床背景について十分な検討が加えられていないことである。我々は、上記の臨床背景とともに、糖尿病発症年齢、罹病期間、HbA1c もマッチさせた糖尿病性大血管障害陰性群と陽性群について比較した。しかしながら、今回検討した遺伝子多型は糖尿病性大血管障害の発症の有無とは、関連がみられなかった。

4 番目は人種差である。今回検討した遺伝子の中には、GPIIIa 遺伝子のように白人には変異 allele 頻度が 12~18% 存在するが日本人ではほとんど存在しないものもあった。また、LPL 遺伝子のように大血管障害と強い相関が報告されたものの、日本人における変異遺伝子頻度が極端に少なく、大血管障害との相関をはかりかねるものがあった。日本人に頻度が多いとされている CETP 遺伝子の 14G→A 変異 allele は対照群で 0%、糖尿病群で 1.9% しかいなかった (表 3)。LPL 遺伝子および CETP 遺伝子は日本人糖尿病の大血管障害への関与は薄いと考えられるが、さらなる大規模な prospective な検討が必要とされる。

5 番目としてサンプル数の問題がある。しかし、表 5 のこれまでの報告のサンプル数と本研究のサンプル数を比較しても、本研究のサンプル数は小さいとはいえない。

最後に、今回検討しなかった遺伝子のなかに、大血管障害と強く関連する遺伝子があるのかもしれない。本研究は、病態と関連することが考えられる代表的な遺伝子を中心に検討した。

表 5 に今回対象とした遺伝子多型についてこれまで報告された内容をまとめた。最初関連ありと報告されたが、追試検討では関連性が疑問視されているものも多い。しかし、動脈硬化の発症に遺伝的素因を完全に否定する randomized control study (RCT) がなされていないので、本研究の結果からだけで否定的な結論をするつもりはない。

糖尿病発症に関する遺伝子の解明が急速になされている。発症関連遺伝子が明らかにされて、それに見合った治療が究明されることが切望され

る。その一方で、血糖コントロールが自己管理の上に成り立っている現状では、大血管障害をはじめとする糖尿病性合併症の発症予防および進展防止も急務となっている。発症関連遺伝子および防御遺伝子どちらも、その保有分布を把握することにより、合併症の根本的な治療ならびに予防をめざすことができる。

今後さらに大規模な prospective な研究デザインで、新しい候補遺伝子探究を含めて、更に検討していく必要がある。

結 論

我々は動脈硬化性病変との関連を示唆されている ACE 遺伝子、AT1R 遺伝子、GPIIIa 遺伝子、CETP/TaqIB, CETP/Int14G: A 遺伝子、LPL¹⁸⁸ 位 Gly→Gln 遺伝子、eNOS 遺伝子、PON 遺伝子、MTHFR 遺伝子多型が、日本人 2 型糖尿病の大血管障害合併と関連するかを、動脈硬化に関連する臨床背景をマッチさせた合併群と非合併群を対象として検討した。いずれの遺伝子とも明らかな関連が見出されなかった。日本人糖尿病患者における大血管障害の発症進展にはこれらの遺伝子多型の影響は少ないと考えられた。今後大規模な prospective な研究により、更に追試されることが期待される。

本稿を終えるにあたり、研究の緒を導いていただいた東京女子医科大学名誉教授 大森安恵先生、また高田ひとみ先生をはじめ教室の諸先生方に深く感謝の意を表します。

なお、本研究の一部は、第 41 回日本糖尿病学会 (1998 年 5 月、和歌山) で発表した。

文 献

- 1) Ito H, Harano Y, Suzuki M et al: Risk factor analyses for macrovascular complication in non-obese NIDDM patients. *Diabetes* **45** (Suppl 3): S19-S23, 1996
- 2) Sorensen TIA, Nielsen GG, Andersen PK et al: Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* **318**: 727-732, 1988
- 3) Brass LM, Isaacsohn JL, Merikangas KR et al: A study of twins and stroke. *Stroke* **23**: 221-223,

- 1992
- 4) **Cambien F, Poirier O, Lecerf L et al:** Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* **359**: 641–644, 1992
 - 5) **Gardemann A, Fink M, Stricker J et al:** ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals. *Atherosclerosis* **139**: 153–159, 1998
 - 6) **Marian AJ, Yu QT, Workman R et al:** Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* **342**: 1085–1086, 1993
 - 7) **Schunkert H, Hense H-W, Holmer SR et al:** Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* **330**: 1634–1638, 1994
 - 8) **Ribichini F, Steffenino G, Dellavalle A et al:** Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme: A major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis. *Circulation* **97**: 147–154, 1998
 - 9) **Catto A, Carter AM, Barrett JH et al:** Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and cerebrovascular disease. *Stroke* **27**: 435–440, 1996
 - 10) **Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O et al:** Synergic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* **344**: 910–913, 1994
 - 11) **Weiss EJ, Bray PF, Tayback M et al:** A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* **334**: 1090–1094, 1996
 - 12) **Fumeron F, Betoulle D, Luc G et al:** Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest* **96**: 1664–1671, 1995
 - 13) **Nordestgaard BG, Abildgaard S, Wittrup HH et al:** Heterozygous lipoprotein lipase deficiency: frequency in the general population, effect on plasma lipid levels, and risk of ischemic heart disease. *Circulation* **96**: 1737–1744, 1997
 - 14) **Wang XL, Sim AS, Badenhop RF et al:** A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nature Med* **2**: 41–45, 1996
 - 15) **Ruiz J, Blanche H, James RW et al:** Glu-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* **346**: 869–872, 1995
 - 16) **Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P et al:** Genetic polymorphism of methylenetetra-hydrofolate reductase and myocardial infarction: A case-control study. *Circulation* **94**: 1812, 1996
 - 17) **Rigat B, Hubert C, Corvol P et al:** PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* **20**: 1433, 1992
 - 18) **Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y et al:** Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **183**: 910–916, 1992
 - 19) **Inazu A, Koizumi J, Haraki T et al:** Rapid detection and prevalence of cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by intron 14 splicing defect in hyperalphalipoproteinemia. *Hum Genet* **91**: 13–16, 1993
 - 20) **Primo-Paro SL, Sorenson RC, Teiber J et al:** The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON 1) is one member of a multigene family. *Genomics* **33**: 498–507, 1996
 - 21) **Notsu Y, Nabika T, Park HY et al:** Evaluation of genetic risk factors for silent brain infarction. *Stroke* **30**: 1881–1886, 1999
 - 22) **Watanabe Y, Ishigami T, Kawano Y et al:** Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and carotid plaques in Japanese. *Hypertension* **30** (Part 2) : 569–573, 1997
 - 23) **Hibi K, Ishigami T, Kimura K et al:** Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism adds risk for the severity of coronary atherosclerosis in smokers. *Hypertension* **30** (Part 2) : 574–579, 1997
 - 24) **Anderson JL, King GJ, Bair TL et al:** Associations between a polymorphism in the gene encoding glycoprotein IIIa and myocardial infarction or coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **33**: 727–733, 1999
 - 25) **Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA et al:** Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* **94**: 46–51, 1999
 - 26) **Inbal A, Freimark D, Modan B et al:** Synergistic effects of prothrombotic polymorphisms and atherogenic factors on the risk of myocardial infarction in young males. *Blood* **93**: 2186–2190, 1999
 - 27) **Girelli D, Friso S, Trabetti E et al:** Methylenetetrahydrofolate reductase C 677 T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic dis-

- ease: Evidence for an important genetic environmental interaction. *Blood* **91** (11) : 4158–4163, 1998
- 28) **Anderson JL, King GJ, Thomson MJ et al:** A mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with increased risk for coronary artery disease or myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **30**: 1206–1211, 1997
 - 29) **Odawara M, Tachi Y, Yamashita K:** Paraoxonase polymorphism (Gln¹⁹²-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 2257–2260, 1997
 - 30) **Tarnow L, Cambien F, Rossing P et al:** Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I-converting enzyme gene is associated with coronary heart disease in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* **38**: 798–803, 1995
 - 31) **Fujisawa T, Ikegami H, Shen GQ et al:** Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction, but not with retinopathy or nephropathy in NIDDM. *Diabetes Care* **18** (7) : 983–985, 1995
 - 32) **Odawara M, Sasaki K, Tachi Y et al:** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and coronary heart disease in Japanese NIDDM. *Diabetologia* **41**: 365–367, 1998
 - 33) **Pfole M, Koch M, Enderle MD et al:** Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes* **48**: 623–627, 1999
 - 34) **Lindpaintner K, Pfeiffer MA, Kreutz R et al:** A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischaemic heart disease. *N Engl J Med* **332**: 706–711, 1995
 - 35) **Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C et al:** PI^{A1/A2} polymorphism of platelet glykoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet* **349**: 385–388, 1997
 - 36) **Zhong S, Sharp DS, Grove JS et al:** Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* **97**: 2917–2923, 1996
 - 37) **Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH et al:** Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocystein, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* **94**: 2410–2416, 1996
 - 38) **O' Malley JP, Maslen CL, Illingworth DR et al:** Angiotensin-converting enzyme DD genotype and cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* **97**: 1780–1783, 1998
 - 39) **Olivieri O, Trabetti E, Grazioli S et al:** Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and atheromatous renal artery stenosis. *Hypertension* **34**: 1097–1100, 1999
 - 40) **Argerholm-Larsen B, Tybjaerg-Hansen A, Frikke-Schmidt R et al:** ACE gene polymorphism as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease. *Ann Intern Med* **127**: 346–355, 1997
 - 41) **Ludwig E, Corneli PS, Anderson JL et al:** Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis. *Circulation* **91**: 2120–2124, 1995
 - 42) **Matts RK, Needham EWA, Galton DJ et al:** A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly Heart Study. *Circulation* **91**: 270–274, 1995
 - 43) **Nakai K, Itoh C, Miura Y et al:** Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* **90**: 2199–2202, 1994
 - 44) **Hibi K, Ishigami T, Tamura K et al:** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* **32**: 521–526, 1998
 - 45) **Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M et al:** The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUM-PONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* **98**: 883–885, 1996
 - 46) **Bova I, Chapman J, Sylantiev C et al:** The A677V methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid atherosclerosis. *Stroke* **30**: 2180–2182, 1999
 - 47) **Schwartz SM, Siscovick DS, Malinow MR et al:** Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene. *Circulation* **96**: 412–417, 1997
 - 48) **Morita H, Taguchi JT, Kurihara H et al:** Genetic polymorphism of 5, 10-methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* **95**: 2032–2036, 1997
 - 49) **Markes HS, Nadira A, Swaminathan R et al:** A common polymorphism in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene, homocystein, and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* **28**: 1739–1743, 1997