

<一般論文>

心臓血管外科手術施行後のワルファリン初期投与計画における *CYP2C9*及び *VKORC1*の遺伝子多型情報の臨床上の意義

The clinical significance of genotype of *CYP2C9* and *VKORC1* on warfarin dosage regimen for initial anticoagulation after cardiovascular surgery

川名純一¹⁾、小柳俊哉²⁾、中村克徳³⁾、大林恭子⁴⁾、山本康次郎⁴⁾、越前宏俊⁵⁾、住吉徹哉⁶⁾、緒方宏泰⁷⁾
Junichi Kawana¹⁾, Toshiya Koyanagi²⁾, Katsunori Nakamura³⁾, Kyoko Obayashi⁴⁾,
Koujiro Yamamoto⁴⁾, Hirotochi Echizen⁵⁾, Tetsuya Sumiyoshi⁶⁾, Hiroyasu Ogata⁷⁾

1) *明治薬科大学公衆衛生・疫学、2) 杏嶺会一宮西病院心臓血管外科、
3) 名古屋市立大学臨床薬学教育研修センター、4) 群馬大学医学部附属病院薬剤部、
5) 明治薬科大学薬物治療学、6) 日本心臓血圧研究振興会附属榊原記念病院循環器内科、7) 明治薬科大学

*明治薬科大学公衆衛生・疫学
〒204-8588 東京都清瀬市野塩2-522-1

Summary

We previously proposed dosage regimens for the initiation of warfarin treatment after cardiovascular surgery based on the PK/PD theory, which allowed successful anticoagulation to be achieved within 10 days after coronary artery bypass grafting in 75% of the patients. We studied the relationship between the success rate within 10 days after introduction of warfarin treatment and the background factors involving *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms. Although only the number of *VKORC1* (*1173 C>T*) *T* alleles was significantly related to the success of anticoagulation after introduction of warfarin treatment, the coefficient of determination was small. Furthermore, the majority of Japanese patients showed the *CYP2C9**1/*1 and *VKORC1* (*1173 C>T*) *T/T* patterns. From those data, we concluded that the clinical significance of genetic testing was small and limited, and that the method proposed by us for determination of the warfarin dosage regimen for effective initial anticoagulation in individuals during the first 10 days after cardiovascular surgery was preferable.

Keywords : Warfarin, dosage regimen for initial anticoagulation, genotype, *CYP2C9*, *VKORC1*, ワルファリン, 導入法, 遺伝子多型

(Received: January 9, 2013, accepted: February 15, 2013)

(Corresponding author: jun-jun@brown.plala.or.jp)

1. 緒言

抗凝固薬のワルファリン(以下、WF)は、血栓塞栓症の予防効果を有する一方、治療域が狭く頭蓋内出血などを引き起こすリスクがあり^{1), 2)}、また維持投与量の個人差が大きい³⁾ため、トロンボテスト(以下、TT)やプロトロンビン時間国際標準化比(以下、PT-INR)等の血液凝固能検査による投与量調整が必須である。市販のワルファリン錠は二つの光学異性体(S-WF と R-WF)を含有し、両者は異なる Pharmacokinetics(以下、PK)と Pharmacodynamics(以下、PD)の特性を有している。S-WF の抗凝固効果は R-WF より約 3-5 倍強⁴⁾、S-WF の主代謝酵素 cytochrome p-450(以下、CYP)2C9 には遺伝子多型があり、日本人では野生型より低代謝活性の *CYP2C9*3* アレルの保有者が 5%前後存在する⁵⁾。さらに S-WF の標的分子は Vitamin K epoxide reductase complex(VKORC)であるが、*VKORC1* にも遺伝子多型が存在し、WF 投与量の個人差に影響すると報告されている⁶⁾。一方、WF の PK/PD の特性から、WF 導入直後より日々測定した血液凝固能検査値にあわせて投与量調節を行うと、投与量の増減を繰り返し、各患者の最適な維持投与量を確定するまでに長期間を要することがわかっている⁷⁾。先に、我々は血液凝固能の最適な測定時期とその測定値に基づく投与量の選択を示すモノグラムの作成を試みた。確立した WF 導入法(CABG-Warfarin-Regimen(以下、CWR 法)及び Valve surgery-Warfarin-Regimen(以下、VWR 法))は、約 75%の心臓血管外科手術後患者で投与開始 10 日以内に個別化 WF 投与量を設定できることを示した^{7), 8)}。一方、WF の抗凝固効果は PK/PD 関連遺伝子である *CYP2C9* 及び *VKORC1* の遺伝子多型の影響を受けることが明らかなことから^{5), 6)}、遺伝子多型情報を WF 導入法(CWR 法及び VWR 法)に組み込むことの臨床上の意義について検討を行った。

2. 方法

2-1. 対象

本試験の対象患者は、日本心臓血管研究振興会附属榊原記念病院において、2004 年 3 月から 2004 年 12 月までの期間に心臓血管外科手術後に WF 導入

予定の 18 歳以上の日本人患者 200 例とした。

2-2. 試験方法

対象患者を連続的に登録し、以下の臨床試験を行った。なお、本研究計画は、日本心臓血管研究振興会附属榊原記念病院倫理委員会にて承認を受け、試験内容を医師から被験者に説明され、文書による同意を取得した後に実施した。

2-3. WF 導入法(初期投与計画)

心臓血管外科手術後の WF 導入は、TT 値の治療目標域(至適凝固能)を 10~20%に設定し、冠動脈バイパス術(以下 CABG)後患者では 1 日目のみ 5 mg/day を投与し、2 日目以降の投与量を 3 mg/day に原則として固定し、投与開始 5 日目に TT 値及び投与量の確認を行い、さらに投与開始 7 日目の TT 値により事前に設定された指針に従って投与量を調節する方法(CWR 法)を、弁膜症、先天性心疾患などの心臓血管外科手術後患者では 1 日目及び 2 日目のみ 5 mg/day を投与し、3 日目以降の投与量を 3 mg/day に原則として固定し、投与開始 5 日目に TT 値及び投与量の確認を行い、さらに投与開始 7 日目の TT 値により事前に設定された指針に従って投与量を調節(VWR 法)した(Fig.1)⁸⁾。

2-4. 調査項目

調査項目は、性別、年齢、身長、体重、現病歴、術式、併用薬、WF の投与状況(最終的に確定した WF 維持投与量を含む)、TT 値、臨床検査値、遺伝子多型(*CYP2C9* 及び *VKORC1*)、出血及び血栓塞栓症の有無とした。

2-5. *CYP2C9* 及び *VKORC1* の遺伝子解析

WF 投与開始前に末梢静脈より 10mL の採血を行った。検体は連結可能匿名化を行った後⁹⁾、ゲノム DNA 抽出及び解析を群馬大学医学部薬効動態制御学教室において Obayashi らの方法¹⁰⁾に従い実施した。*CYP2C9* は、日本人において臨床的意義が明らかにされているのは *CYP2C9*3* (*1075A>C*、*Ile359Leu*)のみであることから、*CYP2C9*3* を対象に

PCR-RFLP 法により解析を行った。VKORC1 のコーディング領域及びエクソン-イントロン接合部は、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析した。

VKORC1 はハプロタイプ解析の結果、intron1 の変異 (1173C>T) を含む 5 つのほぼ完全にリンクする SNPs が WF 投与量の決定因子であることが示されていることから、1173 変異を VKORC1 変異として解析を行った。CYP2C9 及び VKORC1 の各変異について出現頻度を算出した。

2-6. 評価項目

主要評価項目は、CYP2C9 及び VKORC1 の遺伝子変異組み合わせ別の WF 導入法による投与開始 9 日目の至適凝固能到達率 (初期導入成功率) とした。なお、至適凝固能は TT 値として 10~20% に設定した。また、副次的に、CYP2C9 及び VKORC1 の遺伝子変異組み合わせ別の患者群で最終的に確定した維持投与量の分布についても評価した。なお、WF 導入が当初の初期投与計画で成功しなかった患者については、その後の外来診療で最終的に設定された投与量を平均値の算出に用いた。

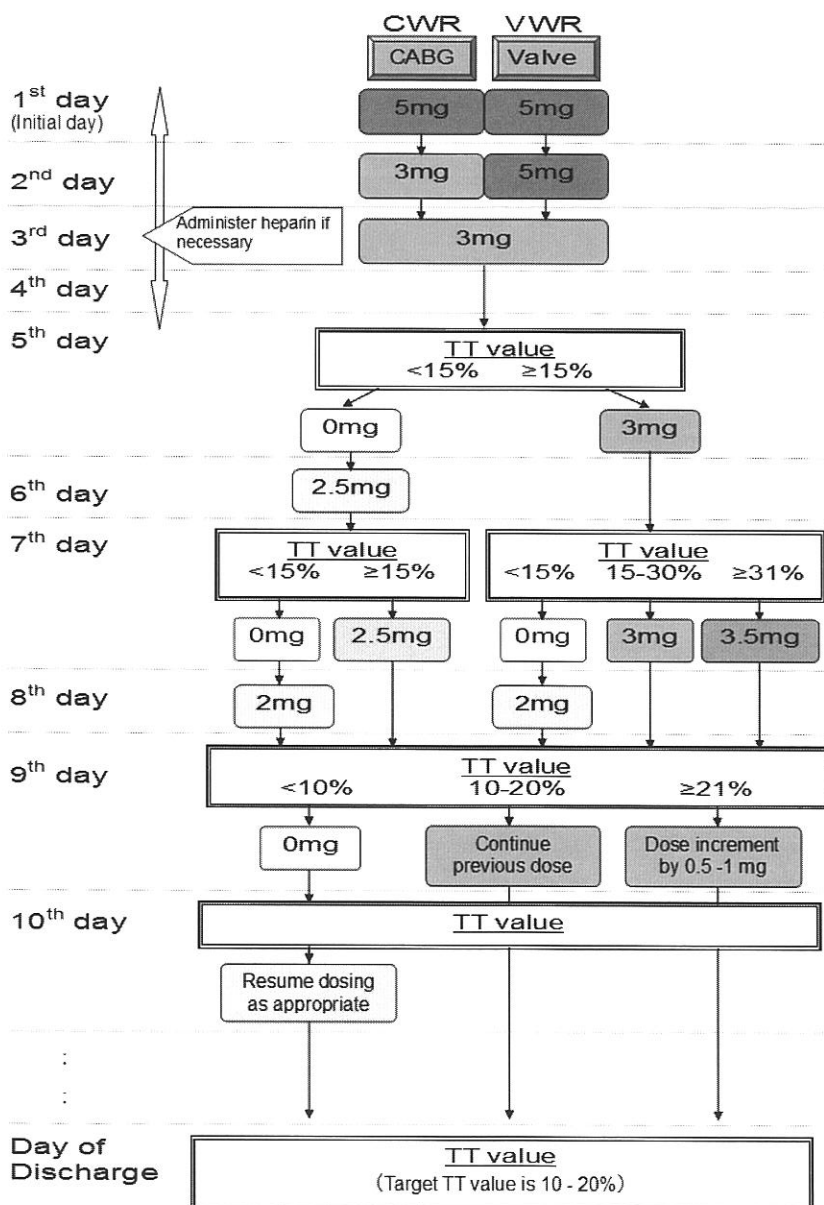


Fig.1 Dosage regimens for introduction of warfarin treatment after cardiovascular surgery (CWR and VWR)

2-7. 統計解析

患者背景に関する2群の統計比較は対応のないt検定、カイ二乗検定で行った。*CYP2C9* 及び *VKORC1* の遺伝子変異については、ハーディ・ワインバーグ則からの発現率の偏りを把握するために、有意水準を $p < 0.05$ として検討を行った。導入成否に係る各遺伝子多型の寄与(導入成功率)は重回帰分析を用い、有意水準を $p < 0.05$ として検討を行った。遺伝子多型別の各患者が最終的に確定した維持投与量の比較には G 検定を行った。統計解析には SPSS statistical software(version 11.0; SPSS, Inc., Chicago, Ill)を用いた。すべてのデータは平均±標準偏差(SD)で表した。

3. 結果

3-1. 患者背景

本試験への参加の同意は 200 名の患者から取得した。WF 未投与例及び心臓血管外科手術未施行例を除く 179 例が初期投与計画(CWR 法もしくはは

VWR 法)に基づき WF の導入を行った。当該 179 例(男/女:117/66 例)を本試験の解析対象とし、その患者背景を Table 1 に示した。

3-2. 導入状況

WF 導入は CABG 後患者(n=53)では CWR 法を用い、弁膜症手術後患者(n=115)及び先天性心疾患パッチ閉鎖術後患者(n=11)(以下、弁膜症等手術後患者、n=126)では VWR 法を用いた(Table 1)。なお、CWR 法を適用した患者群は虚血性心疾患患者であったため、VWR 法を適用した患者群に比べ男性患者が多く、年齢及び体重が大きかったが、臨床検査値等に差は認められなかった。

その結果、CWR 法による投与開始 9 日目の至適凝固能到達率(初期導入成功率)は 70%(n=37)、VWR 法による初期導入成功率は 73%(n=92)であり、両群間に差は認められず、両 WF 導入法を統合した初期導入成功率は 72%(n=129)であった。

Table 1 Baseline Patient Characteristics and Allelic Variant Frequencies

Characteristic	CWR group	VWR group	Combined group
N	53	126	179
Age, y, mean±SD (range)	66±8 (50–80)	61±12 (20–83)*	62±11 (20–83)
Male sex, %	79.2	56.3*	63.1
Height, cm, mean±SD (range)	161±8 (140–175)	162±8 (145–184)	161±8 (140–184)
Weight, kg, mean±SD (range)	61.9±8.5 (47.5–82.1)	58.2±11.0 (35.8–85.6)*	59.3±10.4 (35.8–85.6)
Angina pectoris, %	73.6	7.1	26.8
Myocardial infarction, %	47.1	1.6	15.1
Valvular disease, %	-	91.2	65.9
Congenital heart disease, %	-	8.7	6.1
Total protein, mg/dL, mean±SD (range)	6.3±0.6 (5.0–7.8)	6.4±0.5 (5.1–7.8)	6.4±0.5 (5.0–7.8)
AST, IU/L, mean±SD (range)	26±19 (11–147)	25±11 (12–72)	26±14 (11–147)
ALT, IU/L, mean±SD (range)	39±37 (11–257)	42±35 (5–262)	41±36 (5–262)
Creatinine, mg/dL, mean±SD (range)	1.01±1.28 (0.45–9.99)	0.81±0.72 (0.38–8.07)	0.87±0.92 (0.38–9.99)
BUN, mg/dL, mean±SD (range)	17±8 (7–58)	18±7 (8–53)	18±7 (7–58)
<i>CYP2C9</i> (1075A>C)			
*1/*1 (A/A), %	94.3	95.2	95.0
*1/*3 (A/C), %	5.7	4.8	5.0
<i>VKORC1</i> 1173C>T			
C/C, %	1.9	1.6	1.7
C/T, %	15.1	10.3	11.7
T/T, %	83.0	88.1	86.6

* $p < 0.05$ between CWR and VWR groups.

3-3. 遺伝子解析結果

本 WF 導入法 (CWR 法もしくは VWR 法) に基づき WF 導入を行った 179 名の遺伝子解析の結果は、野生型である *CYP2C9**1 ホモ接合体保有者 (*1075A>C A/A*) が 170 例 (95%) であり、*CYP2C9**3 変異 (*1075A>C*) をヘテロで有する患者 (*A/C*) は 9 例 (5%) であった。*CYP2C9**3 (*1075A>C*) 変異をホモで有する患者 (*C/C*) はいなかった。また、*VKORC1* の intron1 の変異 (*1173C>T*) を T/T で有する患者は 155 例 (87%) であり、*C/T* で有する患者は 21 例 (11%)、*VKORC1* の intron1 の変異 (*1173C>T*) を保有しない患者は 3 例 (2%) であった。なお、*CYP2C9* 及び *VKORC1* の遺伝子多型の出現頻度は、CWR 法または VWR 法の対象となった患者群間で差は認められなかったため、両導入法の結果を併合して集計することとした。*CYP2C9* 及び *VKORC1* の遺伝子多型の組み合わせ別の出現頻度を Table 2 に示した。*CYP2C9**1 をホモ接合体 (*1075A>C A/A*) かつ *VKORC1* (*1173C>T*) T/T を有する患者が 83% を占め、その頻度は他の日本人での報告とほぼ同様の結果であった。

3-4. WF 導入法による至適凝固能到達の成否に及ぼす遺伝子多型の影響

遺伝子多型別の出現頻度の最も高かった *CYP2C9**1 をホモ接合体 (*1075A>C A/A*) かつ、*VKORC1* の intron1 の変異 (*1173C>T*) を T/T で有する患者 (n = 148) において、WF 導入法 (CWR 法または VWR 法) による投与開始 9 日目の至適凝固能到達率 (初期導入成功率) は 80% であったのに対し、*VKORC1* の intron1 の変異 (*1173C>T*) を C/C 及び C/T で有する患者における WF 導入法による初期導入成功率はそれぞれ、0% 及び 21% であった (Table 3)。さらに投与開始 9 日目の至適凝固能到達の成否、すなわち初期導入成功率について *CYP2C9**3 (*1075A>C*) アレル数及び *VKORC1* T アレル数をそれぞれ独立した変数として (ヘテロ変異を 1、ホモ変異を 2 とした)、重回帰分析した結果を下式に示した。統計解析上、*CYP2C9**3 (*1075A>C*) アレルの影響は有意ではなかったため、*VKORC1*

(*1173C>T*) T アレル数のみが本 WF 導入法の成否に有意に関係する因子として検出された。

初期導入成功率(%)=

$$47.1 \times VKORC1 \text{ T アレル数} - 15.6 \\ (R^2=0.157, p<0.001)$$

Table 2 Allelic frequencies of *CYP2C9* and *VKORC1* variants in Japanese patients

		<i>VKORC1</i> 1173 C>T		
		C/C	C/T	T/T
<i>CYP2C9</i>	*1/*1	2% (n=3)	10% (n=19)	83% (n=148)
	*1/*3	0% (n=0)	1% (n=2)	4% (n=7)

Table 3 Percentage of success in introduction of warfarin treatment by the dosage regimen (CWR and VWR) according to genotype of *CYP2C9* and *VKORC1*

		<i>VKORC1</i> 1173 C>T		
		C/C (n=3)	C/T (n=21)	T/T (n=155)
<i>CYP2C9</i>	*1/*1 (n=170)	0% (0/3)	21% (4/19)	80% (118/148)
	*1/*3 (n=9)	- (0/0)	100% (2/2)	71% (5/7)

3-5. 遺伝子多型別の WF 維持投与量の分布

本試験の対象となった 179 名における遺伝子多型別の最終的に確定した WF 維持投与量の平均は、*CYP2C9**1 ホモ接合体保有者 (*1075A>C A/A*) で 3.4 ± 1.1 mg、*CYP2C9**3 ヘテロ接合体患者 (*A/C*) で 3.1 ± 1.0 mg と有意差は認められなかった。それぞれの WF 維持投与量の最頻値は *CYP2C9**1 ホモ接合体保有者 (*A/A*) が 3.0 mg であるのに対し、*CYP2C9**3 ヘテロ接合体患者 (*A/C*) では 2.5 mg と低用量であったが、両者の WF 維持投与量の分布は完全に重なっていた (Fig. 2)。一方、*VKORC1* では、各遺伝子多型の平均 WF 維持投与量は、C/C で 6.2 ± 1.4 mg、C/T で 4.5 ± 1.7 mg、T/T で 3.2 ± 0.9 mg と有意に異なった ($p<0.001$) もの、それらの WF 維

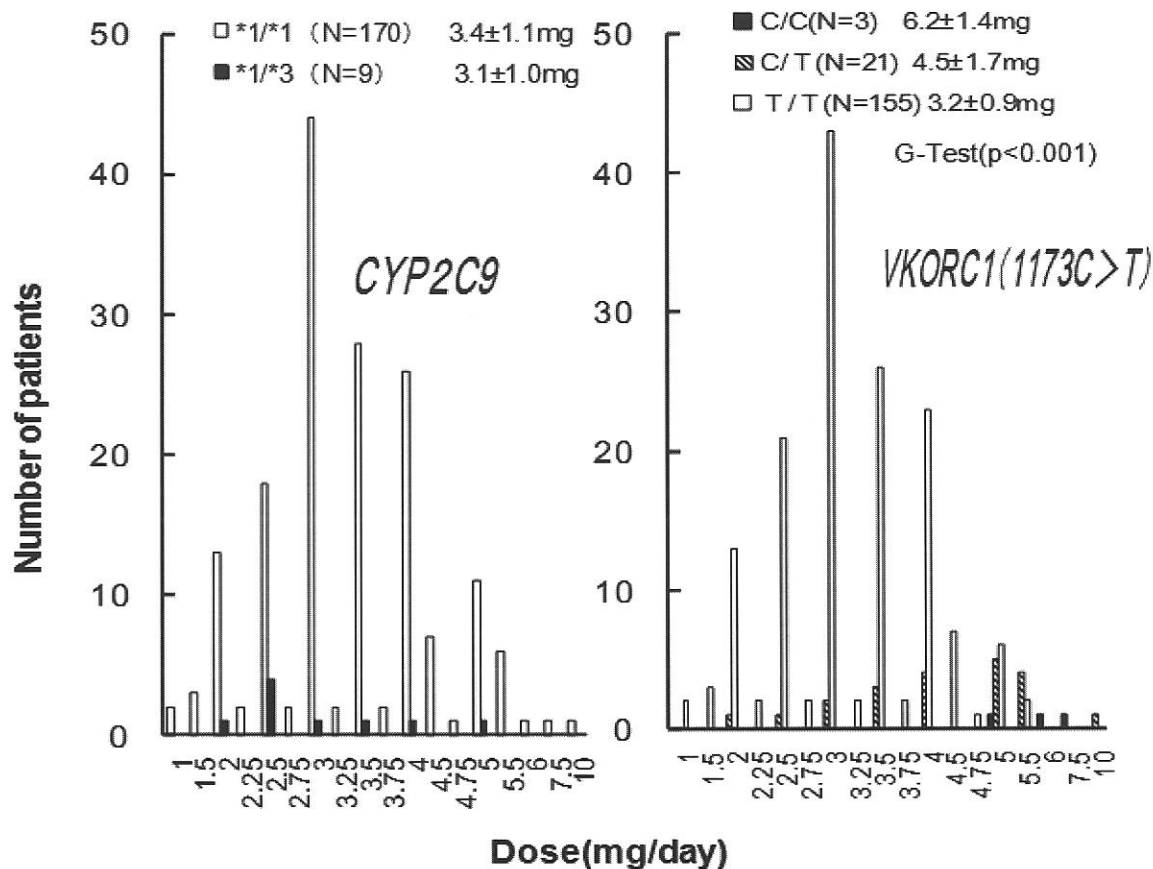


Fig.2 Histograms of warfarin doses in patients with distinct combinations of *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes

持投与量の分布には大きな重なりが認められた (Fig. 2)。

3-6. 安全性

本 WF 導入法 (CWR 法もしくは VWR 法) に基づき WF 導入を行った 179 名において、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼ上昇、総ビリルビン値上昇、貧血及び血性胸水、十二指腸潰瘍が各 1 例認められたが、いずれも軽度であった。それ以外に、重大な出血または血栓症の発症は観察されなかった。

4. 考察

WF の維持投与量の個人間変動に対する遺伝要因の関与について以下の事実が明らかになっている。PK の変動因子である *CYP2C9**3 (1075A>C) 変異

型アレルと臨床効果との関連性は、維持投与量について検討されてきた。*CYP2C9**3 変異を有する日本人の患者では、S-WF の肝代謝活性の低下及び WF の平均維持投与量の低下が認められた¹¹⁾。Higashiらは主に白人患者を対象に、*CYP2C9**3 変異保有患者における投与開始 3 ヶ月間の出血イベント発生のハザード比が 3.94 (95% C.I.: 1.29-12.06) と報告している¹²⁾。また、WF の PD の変動因子である *VKORC1* の変異型アレルと臨床効果との関連性についても多くの研究がされている。Takahashiらは白人及び日本人患者データを対象に多変量解析を行い、年齢、体重あるいは体表面積、*CYP2C9* ならびに *VKORC1* の遺伝子型により維持投与量の個人差の約 60% が説明でき、*VKORC1* の関与は *CYP2C9* のそれと比較して大きいものであることを報告している¹³⁾。Obayashiらは日本人患者を対象とした解析の結

果、維持投与量への寄与は *CYP2C9* 変異が 13.4%、*VKORC1* 変異が 16.5%と報告している¹⁰⁾。米国 FDA は 2007 年、WF 維持投与量の影響因子として *CYP2C9* 及び *VKORC1* 遺伝子変異の両者の情報を添付文書に追加した¹⁴⁾。

一方、WF の初期導入時の効果と副作用の個人差に関する遺伝要因の関与についても検討がされている。Schwarz らは主に白人患者を対象として、投与開始 2 週以降の WF 投与量に *CYP2C9* の遺伝子型及び *VKORC1* のハプロタイプが有意な影響を及ぼしたものの、至適凝固能到達時間には *VKORC1* のハプロタイプのみが有意な予測因子であることを示し¹⁵⁾、WF 初期導入時では、WF 血中濃度は効果の代替評価指標には成り難く、血液凝固能のモニターが重要であると報告している。Aomori らは日本人患者において、WF 維持投与量の決定までにかかる時間は *CYP2C9* 及び *VKORC1* の遺伝子型に依存することを報告している¹⁶⁾。また、Anderson らは白人患者を対象として、WF 投与開始前に検査した *CYP2C9* と *VKORC1* の変異情報及び臨床情報を組み込んだ維持投与量予測式に基づき推定した投与量にて開始し、4 日目以降血液凝固能検査に基づく投与量調整アルゴリズムに従う方法と、標準的な経験的アルゴリズムを用いた方法との非無作為化比較試験の結果を報告している^{17), 18)}。治療開始後 1 ヶ月 / 3 ヶ月での血液凝固能検査の治療域からの逸脱率及び 3 ヶ月での血液凝固能検査治療域内時間率は、いずれも WF 導入前の遺伝子情報に基づく推定投与量にて開始する方法が有意に良好な結果を示した。当該研究対象の白人集団のように *VKORC1* の変異アレル出現頻度が 60%程度であり、遺伝子変異情報を迅速かつ安価に入手できる場合には有用だが、日本人集団のように *VKORC1* の変異アレル出現頻度が 90%以上と極めて高く、かつ *CYP2C9**3 (*1075A>C*) の発現頻度が 5%程度と低い場合には、遺伝子型の均一性が高いため遺伝子検査は有用とは言い難い。さらに、投与開始 2 週間程度の入院期間内に血液凝固能検査値を治療域に調整する必要のある心臓血管外科手術施行患者に適用可能か不明である。

本試験においては、先に我々が確立した心臓血管手術施行後の WF 投与開始 10 日以内に至適凝固能域に到達することができる WF 導入法^{7, 8)}を用い、投与開始 9 日目の至適凝固能到達率(初期導入成功率)と遺伝子変異の関連性を検討した。その結果、CWR 法もしくは VWR 法による投与開始 9 日目において至適凝固能(TT 値:10-20%)に到達した患者数は 129 名(初期導入成功率:72%)であった。また、日本人を対象としたため、*CYP2C9**1 をホモ接合体 (*1075A>C A/A*)かつ *VKORC1* (*1173 C>T*) *T/T* を有する患者が 83%を占めているが、そのグループの初期導入成功率は 80%と全患者の平均値の 72%に比べて高かった。さらに本 WF 導入法による初期導入の成否を両遺伝子のアレル数を変数として重回帰分析した結果、*CYP2C9**3 (*1075A>C*)アレルの影響は認められず、*VKORC1* (*1173 C>T*) *T* アレルのみが WF 導入の成否に有意に関係することが示されたものの、決定係数(R^2)が小さく、WF 導入法による初期導入成功率をこの因子のみで把握することは難しいと考えられる。最終的に確定した平均維持投与量が *VKORC1* (*1173 C>T*) *T/T* を有する患者 (3.2mg) に比べ、より高用量である *VKORC1* (*1173 C>T*) *C/C* 及び *C/T* を有する患者では、本 WF 導入法による初期導入が成功する確率は小さいため、本 WF 導入法を適用せず、より高用量から開始するなどの新たな導入アルゴリズムを適用する選択肢も考えられる。しかし、同一アレル保有患者内での WF 維持投与量の個人間変動は大きく、他アレル保有患者の WF 維持投与量の分布と大きな重なりが認められることから、日本人を対象として、*VKORC1* (*1173 C>T*) を WF 開始前に確認したとしても、その情報によって個々の患者の最終的な維持投与量を決定できるものではなく、血液凝固能検査による投与量調整を行うことが必須であると考えられる。

以上の考察から、現時点で心臓血管外科手術を施行した日本人に対し PK/PD 関連の遺伝子検査は実施しなくても、我々が確立した本 WF 導入法 (CWR 法及び VWR 法) による投与量調節が、安全かつ本邦における WF の治療実態に適した方法であると結論づけられる。なお、本研究の対象は、心臓血

管外科的治療が適応となる患者であったため、年齢、体重、生理機能等が限定されていたため、他の患者集団に本WF導入法(CWR及びVWR法)を適用する場合には検証する必要がある。また、今回のWF導入法の評価は入院患者を対象とし、投与開始後2週間程度によるものであるため、退院後の外来診療もしくは長期投与時におけるWF投与方法についても、今後、検討が必要である。さらに安全性の評価も、WFの応答性に関係する遺伝子多型変異の保有者を含んでいたが、より多数の対象者で検討が必要と考える。

5. 結論

CYP2C9*1をホモ接合体(1075A>C A/A)かつ、VKORC1のintron1の変異(1173C>T)をT/Tで有する患者が80%以上を占める日本人患者では、我々が確立した心臓血管外科手術施行後のWF導入法による投与量調節を行う場合、PK/PD関連遺伝子検査をWF投与開始前に全患者において実施する意義は低いと考えられる。

【参考文献】

- 1) Hylek E. M., Skates S. J., Sheehan M. A., Singer D. E., An analysis of the lowest effective intensity of prophylactic anticoagulation for patients with nonrheumatic atrial fibrillation, *N. Engl. J. Med.* 1996; 335: 540-546.
- 2) Hylek E. M., Singer D. E., Risk factors for intracranial hemorrhage in outpatients taking warfarin, *Ann. Intern. Med.* 1994; 120: 897-902.
- 3) Rettie A. E., Tai G., The pharmacogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine. *Mol Interv.* 2006; 6: 223-227.
- 4) Ansell J., Hirsh J., Hylek E., Jacobson A., Crowther M., Palareti G., The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2008; 133: 160S-198S.
- 5) Takahashi H., Echizen H., Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 2001; 40: 587-603.
- 6) Rieder M. J., Reiner A. P., Gage B. F., Nickerson D. A., Eby C. S., McLeod H. L., Blough D. K., Thummel K. E., Veenstra D. L., Rettie A. E., Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 2285-2293.
- 7) Kawana J., Koyanagi T., Sumiyoshi T., Hanada K., Ohno T., Ogata H., Efficient dosage regimen for introduction of warfarin treatment after coronary artery bypass grafting in Japanese patients. *J. Jpn. Coron. Assoc.* 2009; 15: 98-103.
- 8) Kawana J., Koyanagi T., Sumiyoshi T., Hanada K., Ohno T., Ogata H., Efficient dosage regimen for introduction of warfarin treatment after cardiovascular surgery in Japanese patients: comparisons between coronary artery bypass grafting and surgery for valvular heart disease. *J. Jpn. Coron. Assoc.* 2009; 15: 104-108.
- 9) Kawana J., Preparation of a Standard Operating Procedure for Use in Genetic Research at Medium or Small-Scale Clinical Research Institutions to Render Samples Anonymous. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2006; 37: 145-148.
- 10) Obayashi K., Nakamura K., Kawana J., Ogata H., Hanada K., Kurabayashi M., Hasegawa A., Yamamoto K., Horiuchi R., VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006; 80: 169-178.
- 11) 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. 2006; 51: 249–253.

12) Higashi M. K., Veenstra D. L., Kondo L. M., Wittkowsky A. K., Srinouanprachanh S. L., Farin F. M., Rettie A. E., Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA*.2002; 287: 1690-1698.

13) Takahashi H., Wilkinson G. R., Nutescu E. A., Morita T., Ritchie M. D. Scordo M. G., Pengo V., Barban M., Padrini R., Ieiri I., Otsubo K., Kashima T., Kimura S., Kijima S., Echizen H., Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenet. Genomics*.2006; 16: 101–110.

14) FDA, FDA Approves Updated Warfarin (Coumadin) Prescribing Information New Genetic Information May Help Providers Improve Initial Dosing Estimates of the Anticoagulant for Individual Patients. U S Food and Drug Administration Home Page, 16 August, 2007.

<<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108967.htm> >,

15) Schwarz U. I., Ritchie M. D., Bradford Y., Li C., Dudek S. M., Frye-Anderson A., Kim R. B., Roden D. M., Stein C. M., Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N. Engl. J. Med.*.2008; 358: 999-1008.

16) Aomori A., Obayashi K., Fujita Y., Araki T., Nakamura K. Nakamura T., Kurabayashi M., Yamamoto K., Influence of CYP2C9 and vitamin k oxide reductase complex (VKORC)1 polymorphisms on time to determine the warfarin maintenance dose., Caucasians and African-Americans. *Pharmazie*.2011; 66: 222–225

17) Anderson J. L., Horne B. D., Stevens S. M., Grove A. S., Barton S., Nicholas Z. P., Kahn S. F., May H. T., Samuelson K. M., Muhlestein J. B., Carlquist J. F., Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 2007; 116: 2563–2570.

18) Anderson J. L., Horne B. D., Stevens S. M., Scott C. W., Kent M. S., Mansfield J. M., Robinson M., Barton S., Kim B., Mower C. P., Huntinghouse J. A., Rollo J. S., Siler D., Bair T. L., Knight S., Muhlestein J. B., Carlquist J. F., A randomized and clinical effectiveness trial comparing two pharmacogenetic algorithms and standard care for individualizing warfarin dosing (CoumaGen-II). *Circulation* 2012; 125: 1997–2005.