

Review

A Review on Metaanalysis of Biomarkers : Promises and Pitfalls

Sarah Lewington^{1,*}, Fiona Bragg¹ and Robert Clarke¹

+ Author Affiliations

¹Clinical Trial Service Unit and Epidemiological Studies Unit (CTSUS), University of Oxford, Oxford UK.

* Address correspondence to this author at : Clinical Trial Service Unit and Epidemiological Studies Unit (CTSUS), Richard Doll Bldg., Old Road Campus, University of Oxford, Oxford OX3 7LF, UK. Fax +44-1865-743985 ; e-mail sarah.lewington@ctsus.ox.ac.uk.

Clinical Chemistry 2012 ; 58 : 1192-1204

バイオマーカーに関するメタ分析：利点と落とし穴

概要

背景： 過去 30 年間メタ分析の報告数は、指数関数的な増加を示している。複数の研究の成果を組み合わせることによって、メタ分析は特定の論点に関するエビデンスの全体像、且つ偶然誤差の影響を低減するのに必要となる統計的検出力を提供し、且つそれ程効果量 (effect size) の大きく無いデータを組み合わせることによって、精度の高い結論を導き出すことの出来る有効な手段である。心血管疾患に関する新規バイオマーカーの研究などの様に、同じ様な課題を取り扱う多数の小規模な研究の成果を総括する場合に、メタ分析は特に有用な手法となっている。しかしながら信頼出来るエビデンスを得る為には、種々の点に留意しながら注意深くメタ分析を実施する必要がある。

内容：この総説では分析の対象とする個々の試験のデザイン、選定基準、曝露 (exposure; バイオマーカーの濃度) と、結果 (outcomes; 疾病) の評価、およびバイアスと交絡 (confounding) のコントロールといった、メタ分析のデザイン及び実施にあたって考慮する必要のある主な留意点について論説する。メタ分析に関する潜在的な問題点及び落とし穴について言及し、それらの影響について考察を加えることを目的としている。また、ホモシステイン及び中性脂肪を例に取り、如何に観察研究のメタ分析が我々の理解の深耕に貢献してきたか、あるいは妨げとなったか、更にその様な知見を基にその後どのような仕事がなされてきたか論じていく。

要約：観察研究のメタ分析、特に個々の被験者データを使うメタ分析は、疾病に関する新規バイオマーカーを評価する上で有効な手段である。しかしながら、疾病との因果関係の裏付け等におけるそれらの観察研究の限界について、十分な理解を持つ必要があり、ランダム化比較試験及び遺伝学的研究から得られる付加的なエビデンスが、心血管疾患のリスクと新しいバイオマーカーの関連性を完全に解明する上で、必要であるということを理解しなければならない。

心血管疾患は、世界的に主要な死因の 1 つとなっている(1)。フラミンガム研究は喫煙、高血圧、コレステロール及び糖尿病が、心血管疾患の重要なリスクファクターであることを明らかにしてきた

(2, 3)。また、それらのリスクファクターのレベルから、この先 10 年間に於ける発症のリスクを評価するスコアリングシステムも確立されている (2, 3)。しかしながら、これまでに明らかにされているリスクファクターは、冠性心疾患発症の約 50%しか説明できないことが示唆されており (4-6)、そのような知見を背景にバイオマーカーを含む新規のリスクファクターを探索する研究努力が続けられている(7, 8)。

ケースコントロール試験や前向きコホート研究のような疫学的な観察研究は、バイオマーカーと疾病の関連性について有用な知見を提供するが、一つの独立した試験のみによって明確な関連性を示すことは難しく、確固たるエビデンスを示す為にはより多くの症例数が必要となる (9)。メタ分析はその様な制約を克服する上で、有用なツールとなる。しかしながら個々の観察研究と同様に、メタ分析にも制約があり、信頼できるエビデンスを得る為には適切な方法論が必要である。また、バイアスを回避する手立ても必要となる。本総説では心血管疾患のリスクの予測に関するバイオマーカーについての研究を例に取り、メタ分析における主要な留意点を論じていく。

メタ分析数の増加

エビデンスに基づいた医療に対するニーズの高まり、電子出版による文献へのアクセスの改善およびソフトウェアの普及によって、メタ分析の報告数は飛躍的に増加してきている。Medline でサーチした結果を図 1 に示すが、1980 年から 2010 年の間にメタ分析の報告数が、1,000 倍に増加している。

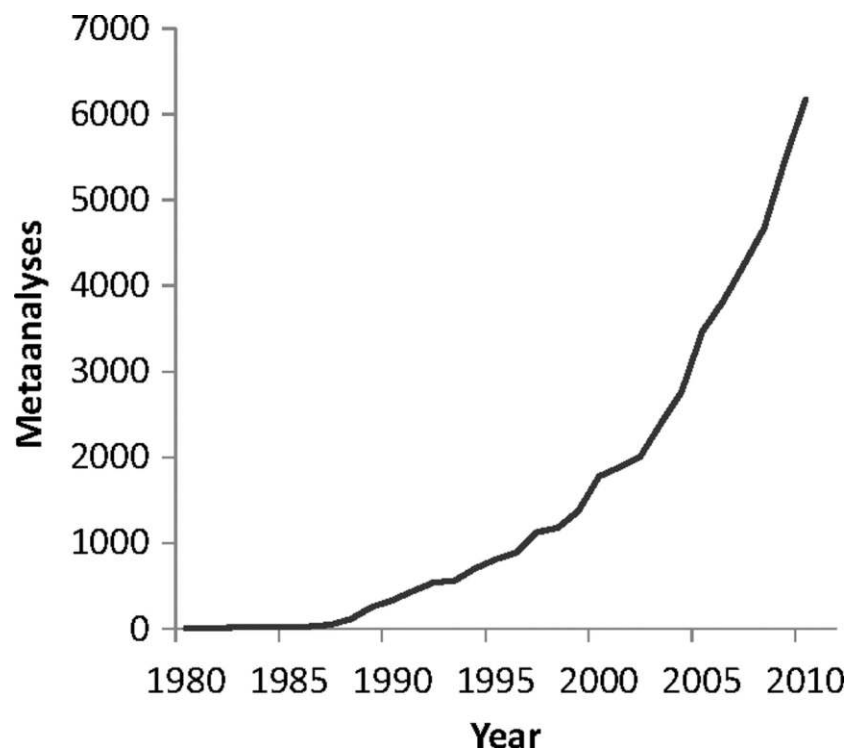


図 1 メタ分析の報告数 (1980 年–2010 年)

Medline を使ったメタ分析の報告数の調査結果

メタ分析の有用性

特定の疾病に関する相対リスクが2以下で示される様な、比較的大きく無い関連性はそれ程重要には捕らえられないかもしれないが、実際には実質的なインパクトを持つ(9)。殆どの試験では被験者数が少ないこと、あるいはその試験で用いられた方法論によって偶然バイアスおよび交絡の影響を受けやすくなり、バイオマーカーと心血管疾患の関連性に関して有意な結果が得られない場合がある(10)。メタ分析の主要なアドバンテージは、同様な目的で実施された複数の小規模な試験の結果を統合することによって統計的検出力 (statistical power) を高め、偶発誤差を低減し、より信頼性の高いエビデンスを得ることが出来るという点である。バイアス及び交絡はコントロールすることが難しく、折りにしてメタ分析において誤った結論が導き出されてしまうことがある(11, 12)。しかしながら、適切な手法に基づいて実施し、且つバイアス及び交絡の効果を十分考慮して分析をデザインし、実施することによって、メタ分析は心血管疾患リスクとバイオマーカーの関連性について、信頼出来るエビデンスを提供することが出来る手段となる。

試験のデザイン

観察研究のデザインおよび分析方法は、それらの試験における知見の信頼性に大きな影響を与える。本報では個々の観察研究の強みと限界に関する包括的なレビューは行わないが、いくつかの重要な留意点については述べておきたい。まず、「逆の因果関係 (reverse causality)」と呼ばれる疾患の発症が、バイオマーカーの濃度に影響を与えるということ避けるという意味で、疾患を発症する前に血液検体が採取される前向き試験の方が、疾患の発症後に血液検体が採取される懐古的なケースコントロール試験よりも好ましい。それに加えて、前向き試験では同じ母集団の中でコントロール群を設定することができ、それによって被験者の選定基準におけるバイアスを低減することが出来る。また、前向き試験では曝露、つまりリスクファクターの濃度と疾患との因果関係に関して、経時的な知見も得ることが出来る。メタ分析にケースコントロール試験の結果を含める場合には、コントロール群の選定にバイアスが掛からない様に十分留意する必要がある。

データのソース

公表されたデータのメタ分析

メタ分析は規模と複雑さにおいて多様である。公表された文献から抽出されたデータを使うメタ分析は、比較的迅速に行うことができ、シンプルでコストもそれ程掛からない。公表されたデータのメタ分析は最も一般的なアプローチで、単にオリジナルの報告書(それらの多くはオンラインに無料で閲覧することが可能である)にアクセスするだけで良く、個々の研究に関して各研究者から事前に

合意を取り付ける必要も無い(12)。しかしながら、比較的簡単に仮説に基づく結論を導き出すことが出来るものの、一方で柔軟性に掛ける面があり、間違った結論を導き出してしまう危険性もある。

サマリーデータに基づくメタ分析

公表されているかどうかに関わらず、試験を実施した研究者から個別に試験結果のサマリーを入手して、メタ分析に組み込むことも可能である。その様な一覧表データあるいはサマリーデータに基づくメタ分析は、公表された文献のみを使うメタ分析とは異なり、各試験のデータを統一した様式あるいは共通の条件でサブ解析した形で、データを提供してもらうことが出来るという意味で自由度が高い。公表された文献を使用するメタ分析よりも時間及びコストが掛かり、他の研究者の協力を得ることが出来るかどうか左右されるという不確定さもあるものの、協力を得ることが出来れば付加的なデータの入手も可能であり、且つ比較的限定された専門知識でもメタ分析を実施することが可能となる。

個々の被験者データに基づくメタ分析

より複雑なアプローチではあるものの、個々の被験者のデータを基にメタ分析を実施するケースが増えて来ている。公表された文献のみ、あるいはサマリーデータに基づくメタ分析における種々のデメリットを克服出来るアプローチであり、複数の観察研究の結果を統合する際の懸念を低減できる手法である(12)。この手法の主なアドバンテージは、各被験者の生データにアクセスすることによって分析の自由度が上がり、選定基準あるいは除外基準における一貫性を保つことが出来るという点である。また、曝露（バイオマーカーの濃度）と結果（疾患の発症）の定義においても一貫性を保つことができ、複数の試験間での補正の標準化が可能で、学会誌等の編集者が統計学的に有意な結果の得られていないものはリジェクトすることによる「出版バイアス（publication bias）」も低減することができる（詳細は以下を参照）(12, 13)。その様なアドバンテージによって個々の被験者データに基づくメタ分析は、ゴールドスタンダード的なアプローチとして認識されているが(13)、限界と課題も存在する。時間とコストが掛かり、各試験の研究者とコンタクトし、コミュニケーションを図る上でかなりの人的リソースを必要とする。また、各試験の生データを収集して再解析する上でも、人手と時間を要する(13)。倫理関係、契約関係、あるいは守秘情報の関係で、データへのアクセスが制限される可能性もある。古い試験のデータについては、生データが残っていないというケースも考えられる(13)。アクセスが試験の主要なデータのみ限定される場合には、バイアスが掛かってしまう危険性にも留意しなければならない(13)。

出版バイアス

公表された文献のみに基づいたメタ分析は、その分析に用いる文献の内容に依存することになる。より有意性の高い研究成果が編集者によってアクセプトされ、有意性の低い研究成果はリジェクト

されるという傾向があり、メタ分析において公表された研究成果を過大に評価してしまうという出版バイアスが生じる危険性が存在する(12)。従ってメタ分析では出版バイアスに関する評価も含めることが妥当であり、その目的において Funnel Plot という手法が有効である(14, 15)。また、文献検索における方針及び各文献の発表年を明らかにし、文献の取捨に関する基準も明らかにすることによって出版バイアスを低減する努力も必要となる(12)。公表された文献のみに基づいたメタ分析よりは、個々の被験者のデータを基に行うメタ分析の方が出版バイアスを避けるという意味だけでなく、未発表のデータにもアクセスし、且つ付加的或いはより最新のデータも分析に盛り込むことが出来るという意味で推奨される(10, 12, 13)。

曝露の測定

曝露のカットオフ、つまり研究の対象となるバイオマーカーのカットオフ濃度あるいは曝露の分類に関して、異なる試験間で一貫性が無いケースがある。その様な試験結果を纏めてメタ分析するにあたっては苦勞を伴うが、統計学的手法を応用することが可能である(16)。一番やっかいなのが疾患との関連性において、より有意な結果を得る為に様々なカットオフが用いられることである。公表された文献のみを使用するメタ分析においては、その様なカットオフの操作が行われた事が分かり難く、また再分析する際にも補正がやりにくいという意味で、特に深刻な問題となっている。個々の被験者のデータにアクセスすることによって、対象となる全ての試験結果に対して統一した分類方法を適用することができ、また研究の対象となるバイオマーカーの濃度と疾患の発症率に関してドースレスポンスを分析することも可能となる(12)。また個々の試験者のデータにアクセスすることによって、バイオマーカーに関する各試験の結果を再分析することが可能で、例えば個人内変動によるデータの過小評価なども補正することが可能となる(17)。

サブグループ解析

サブグループ解析を行うことによって、疾患とバイオマーカーとの関連性についてより深い知見を得ることが出来る。サブグループ解析は個々の被験者のデータを入手することによって、実施することが可能である(12, 13)。個々の試験において、データをサブグループに分けて解析することは統計的検出力を落とすことにもなり得るが(10)、多数の被験者のデータを取り扱うメタ分析においては、その様なリスクは低いと言える。サブグループ解析においては、バイアスを回避することを目的に、結果に基づくグループ化は極力避け、事前にサブグループ分けの基準を決めておくことが重要である(10)。

結果の測定

心血管疾患は複合的な疾患の発症、あるいは冠動脈疾患、脳卒中といった心血管疾患に分類される、個別の疾患の発症をもっても定義することが出来る。複合的な疾患として捉える場合には、個々の

疾患との関連性が希釈されてしまうことになり、一方後者の場合には、公表された文献に基づくメタ分析などにおいて分析の対象とするべき試験を除外してしまうリスクがある。個々の被験者のデータにアクセスすることによって、結果の定義についても統一的な見解をもってメタ分析を実施することが可能となる。

交絡

バイオマーカーと疾患の関連性を調査する際には、すべての潜在的な交絡因子（confounding factorsもしくは confounders）をコントロールする必要がある。観察研究では交絡因子を適切にコントロールしないことによって、あるいは完全にコントロール出来ないことによって、しばしば影響を受けてしまい、結果的にそれらの試験結果を基に実施されるメタ分析もネガティブな影響を受けることになる。公表された文献を用いるメタ分析において、効果量（effect size）を補正するかどうか明確なコンセンサスは無いが(12)、交絡因子に対する補正が不適切な場合には、バイオマーカーと疾患の関連性が実態以上に強調されてしまうことになる(18)。個々の試験において交絡因子が正しく同定され、測定されていれば、個々の被験者のデータを用いるメタ分析では、一貫性のある手法でもって交絡因子に関する補正を掛けることができ、バイオマーカーと疾患の関連性についてより正確な評価を下すことが出来る。

心血管疾患に関する新しいバイオマーカーの探索において、メタ分析は有効な手法であるものの、潜在的な落とし穴があることに十分留意しなければならない。ホモシステインと冠動脈疾患、および中性脂肪と冠動脈疾患・脳卒中との関連性に関する研究成果をレビューすることによって、如何にして観察研究のメタ分析が利用されてきたか、更にその様な知見を基に、その後どの様な仕事になされてきたか論じたい。以下、オッズ比やハザード比といった効果量を表現するにあたっては、説明をシンプルにする事を目的に相対リスクという表現を統一的に使用する。

ホモシステイン

血中ホモシステイン濃度と冠動脈疾患発症のリスクの関係性について、過去 30 年間に渡って高い関心が持たれて来ている。ホモシスチン尿症（homocystinuria）とは、先天的な遺伝子の異常によって過剰産生したホモシスチンが、尿中に大量排泄される疾病で、血漿中のホモシステイン濃度は >13.5 mg/L (>100 μ mol/L) という高値を示す疾患であるが、ホモシスチン尿症を煩う子供達の心血管疾患の発症によって“ホモシステイン仮説”、つまりホモシステインの血中濃度が高いと心血管疾患を発症しやすくなるという考え方が広まった(19)。この仮説を支持する初期の疫学的なエビデンスは、ケースコントロール試験で得られたものであるが、その試験では冠動脈疾患患者の血中ホモシステイン濃度（以下、ホモシステイン）が、年齢をマッチさせたコントロール群よりも $0.4-0.7$ mg/L ($3-5$ μ mol/L) 高いと報告されていた(20, 21)。その後いくつかの前向き研究が実施され、ホモシステインと冠動脈疾患の関連性は、初期のケースコントロール試験で報告されたレベルよりも、有意性は低いと報告された。複数の観察研究の結果をメタ分析したレポートが、過去 15 年間に複数発表され

ている (18, 22 - 27) (表 1)。その内の 3 報 (1995 年の Boushey らによる報告 (22)、1998 年の Danesh 及び Lewington による報告(18)、および 2002 年に発表された Homocysteine Studies Collaboration (28)) について、その後に得られている遺伝学的な知見及びランダム化比較試験で得られたエビデンスに照らして、それらのメタ分析における報告内容について以下で論じていきたい。

表 1 ホモシステインと冠動脈疾患の関連性に関するメタ分析

Metaanalysis	Year	Patient population	No. of studies	No. of studies and design	No. of cases	Data source (Pub, IPD) ^a	Adjustments	Effects (fixed or random)	Correction for RDB?	Effect size (per 0.7-mg/L higher baseline or 0.4 mg/L usual) ^b
Boushey et al. (22)	1995	CAD, stroke, PVD	17	2 Prospective 3 Population-based case-control 7 Other case-control 5 Cross-sectional	2297	Pub	None	Fixed	No	1.6 (1.4-1.7) (Male) 1.8 (1.3-1.9) (Female)
Danesh and Lewington (18)	1998	General population (prospective) and vascular disease (case-control)	22	5 Prospective 10 Population-based case-control 7 Other case-control	3740 Prospective, 1041 Population case-control, 1859 Other case-control, 840	Pub	Varying	Fixed	No	Prospective: 1.3 (1.1-1.5) Population case-control: 1.6 (1.4-1.7) Other case-control: 1.9 (1.6-2.3)
HSC (28)	2002	General population (prospective) and vascular disease (case-control)	30	12 Prospective 13 Population-based case-control 5 other case-control	CHD, 5073	IPD	Age, sex, smoking, total cholesterol, SBP	fixed	Yes	Prospective: 1.2 (1.1-1.3) Population case-control: 1.5 (1.4-1.6) Other case-control: 1.4 (1.2-1.6)
Wald et al. (23)	2002	General population (prospective) and vascular disease (case-control)	92	72 case-control studies reporting prevalence of MTHFR 20 Prospective	MTHFR studies, 12 193 prospective studies, 3144	Pub	Age, sex, smoking, total cholesterol, SBP	Random	Yes	Genetic studies: 1.42 (1.11-1.84) Prospective: 1.32 (1.19-1.45)
Humphrey et al. (26)	2008	Healthy population	20 (16 with CHD/CVD explicitly excluded)	Prospective	Not given	Pub	Various "Framingham risk factors"	Random	No	All: 1.2 (1.1-1.3) Excluding prior disease: 1.21 (1.10-1.32) Exclusions not described: 1.09 (1.01-1.18)
Kieck et al. (33)	2002	CHD cases	40	5 Prospective 35 Retrospective	12 000	IPD	Study	Fixed	N/A	1.16 (1.05-1.28)

Continued on page 1197

Metaanalysis	Year	Patient population	No. of studies	No. of studies and design	No. of cases	Data source (Pub, IPD) ^a	Adjustments	Effects (fixed or random)	Correction for RDB?	Effect size (per 0.7-mg/L higher baseline or 0.4 mg/L usual) ^b
Wald et al. (27)	2011	CHD cases	92	75 Case-control studies reporting prevalence of MTHFR, 14 RCTs	Genetic studies, 22 068; RCTs, 3233	Pub	Age, sex, smoking, total cholesterol, SBP	Random	N/A	Genetic studies: 1.26 (1.07–1.50) RCTs ^d : 1.00 (0.93–1.08)
Clarke et al. (35)	2012	CHD cases	Published, 06 Unpublished, 19	Case-control	20 617 48 175	Pub IPD	Year of publication Country	Fixed Fixed	N/A N/A	Published: 1.15 (1.09–1.21) Unpublished: 1.02 (0.98–1.07)

^a Pub, results from published reports; IPD, results from analyses of individual-participant data; RDB, regression dilution bias; CAD, coronary artery disease; PVD, peripheral vascular disease; SBP, systolic blood pressure; N/A, not applicable.

^b Baseline of 0.7 mg/L is approximately equivalent to 0.4 mg/L usual (i.e., after correction for regression dilution bias). Effect size (RR) data are presented with the 95% CI in parentheses. Conventional units for homocysteine are converted to SI units as follows: 1 mg/L = 7.397 μmol/L.

^c Reported as 25% higher usual homocysteine concentration, which is approximately equivalent to 0.4 mg/L usual or 0.7 mg/L baseline.

^d A subgroup analysis suggested (nonsignificant) benefit among patients not taking aspirin (RR, 0.93; 95% CI, 0.84–1.05).

1995年に Boushey らは 17 報の公表された文献を使ってメタ分析を行い、結果を報告した (22)。クオリティが高いと考えられる 3 件の前向き研究及び 6 件のケースコントロール試験、クオリティが低いと考えられる 13 件のケースコントロール試験（入院患者もしくは疾患発症群とは異なる母集団から選ばれた被験者をコントロール群として使用）の結果を基にメタ分析を行った。17 件の試験における総被験者数は 2,297 人であり、その内の 14 件の試験結果はホモシステインと冠動脈疾患の有意な関連性を示すものであった。メタ分析の結果、ホモシステインが 0.7-mg/L (5-μmol/L) 高くなると冠動脈疾患のリスクが 60% 高くなり（相対リスク 1.6; 95% 信頼区間 1.5–1.8）、性差は無いと報告された (図 2)。報告者らが“クオリティが高い”、“クオリティが低い”と定義した個々の試験結果を見ると、“クオリティが高い”と定義された試験における有意性の方が低いという状況であったが、そのメタ分析ではホモシステインの濃度が高くなると、動脈硬化性の血管疾患のリスクが高くなるという明らかなエビデンスが得られたと報告された。ホモシステイン濃度は葉酸 (800 μg) で容易に下げることができ、また比較的安価に投与出来るものであることから、当時その結果は非常に関心を集め、冠動脈疾患及び脳卒中のリスクの低減における葉酸の効果を検証する事を目的に、いくつかの大規模なランダム化比較試験が実施された (30)。

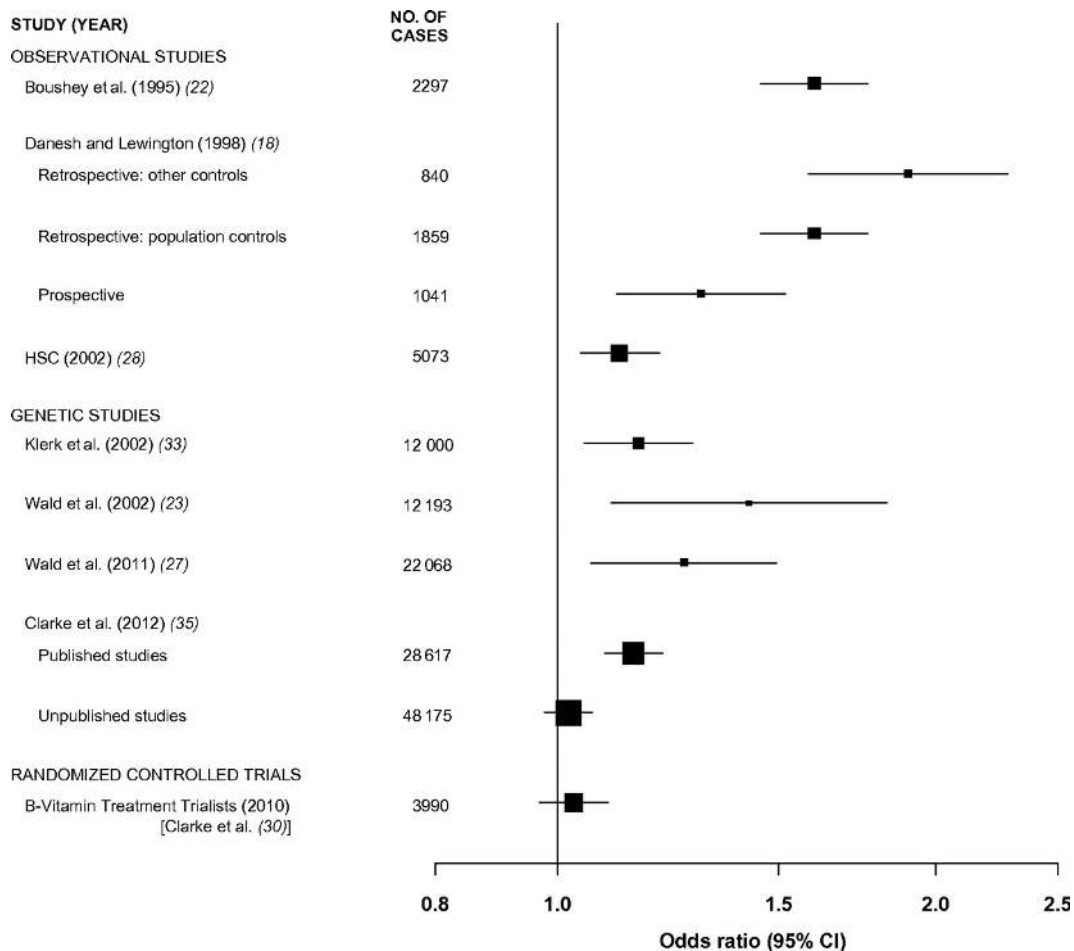


図2 ホモシステインと冠動脈疾患の関連性に関するメタ解析の結果

通常ホモシステイン濃度から 0.4 mg/L (3- μ mol/L)上昇する際のオッズ比。■各試験におけるオッズ比で、サイズは症例数を反映

その後いくつかの前向き観察研究が実施され、1998年に Danesh と Lewington が、ホモシステインと冠動脈疾患のリスクに関して公表された文献を基にメタ分析を行い、結果を発表した。彼らは 3,740 の冠動脈疾患症例を含む 22 件の試験結果を基にメタ分析を実施し(18)、その結果、追加検討の必要性があるいくつかの課題が明らかとなった。ホモシステイン濃度は、年齢、性別、肥満、血圧などといった、既に確立されている種々のリスクファクターと強く相関することから、それらの交絡因子を考慮しないと冠動脈疾患との関連性に関して間違った結論を導き出してしまうことになる (31)。交絡因子に関する補正を実施したとしても、血圧などランダムな変動を含む交絡因子が正しく測定及び評価されていない場合には、やはり疾患との関連性が過大に評価されてしまうことになる。それに加えて、過去に実施された試験の殆どが小規模であるが、その様な小規模の試験を多数寄せ集

めてメタ分析する場合には、出版バイアスを含んでしまう可能性も高くなる。異なる試験間での異なるカットオフ値の使用は、各試験を実施した研究者が疾患の発症と、最も有意な結果が得られる濃度を意図的にカットオフとして設定したことを示唆するものでもある。入院患者もしくは疾患発症群とは異なる母集団から選ばれた被験者を、コントロール群として使用した殆どの試験において、非常に強い相関性を報告しているが（ホモシステインが 0.7-mg/L (5- μ mol/L)高くなるとリスクが 90% (95%信頼区間 60%–130%)増加する）、その様な試験の全てにおいて、年齢、性別他の交絡因子に関する補正が行われていない。正しくコントロール群を設定し、且つ交絡因子を適正にコントロールした後ろ向き試験では、概ね低目の相関性が報告されている（ホモシステインが 0.7-mg/L (5- μ mol/L)高くなるとリスクが 60% (95% 信頼区間 40%–70%) 増加する）。1,041 人の冠動脈疾患患者を含む 5 件のコホート内ケースコントロール試験では、試験間のバラツキは大きいもののホモシステインが 0.7-mg/L (5- μ mol/L)高い場合のリスクの増加は、僅かに 30%(95%信頼区間 10%–50%)増加するのみであると報告されている。いずれの試験も 100 例以上の冠動脈疾患患者を含み、且つ年齢、性別、喫煙及び他のリスクファクターに関する補正を実施していることから、このメタ分析における出版バイアス及び交絡は最小化されているものと考えられる。また、前向き研究と後ろ向き研究における結果が異なることから、冠動脈疾患の発症そのものが血中のホモシステイン濃度を高めている可能性も示唆された。初期の知見よりも関連性は弱いことが分かったものの、冠動脈疾患に対してホモシステインが何らかの関わりを持つことは明らかであり、更なる研究を促すこととなった。以上の知見及び大規模ランダム化比較試験の必要性から、Homocysteine Studies Collaboration が実施された (24)。

個々の被験者のデータを全ての関連した観察研究から集め、確立済みの心血管疾患のリスクファクターによる交絡を補正し、且つ相関希釈バイアス (regression dilution bias) に関する補正も実施した上で、ホモシステインと冠動脈疾患・脳卒中との関連性について信頼出来る評価を下すことを目的に Homocysteine Studies Collaboration が実施された(17)。このメタ分析は 30 件の試験を基に行われ、患者の総数は 5,073 人で、その内の約半分が前向き研究における発症例であった。Danesh と Lewington のメタ分析 (18)で報告されたのと同様に、前向き研究では全般的に後ろ向き研究よりも弱い関連性が示された。相関希釈バイアスおよび年齢、性別、喫煙、血圧、総コレステロールに関する補正を掛けた際、ホモシステイン濃度が 25%上昇するとリスクが 12% (95%信頼区間 4%–20%)高くなるという結論が導き出された。全ての試験の分析方法を標準化すると、前向き試験間でのデータの齟齬はほぼ消失し、ホモシステインの測定と冠動脈疾患発症の間のラグタイムが長くなるほど、相対リスクが低減するという傾向が見られるのみであった。個々の被験者のデータにアクセスすることによって、交絡因子に関する段階的な補正も実施することが可能となり、各種のリスクファクターで補正を掛けた際に、ホモシステインの有意性の指標となる χ^2 値は 24 から 9 に減少し、過去の試験で報告された有意性の高い関連性の主な部分はホモシステインでは無く、他のリスクファクターによる交絡であった事が示された。それらのリスクファクターの測定において誤差が含まれている可能性が十分あることから、ホモシステインの冠動脈疾患との関連性において依然交絡因子の影響が残っている可能性も十分考えられる。また、これまで考慮されていない他の交絡因子の存在、例えば腎機能等が関与していることも十分考えられる。いずれにしても、少なくともホモシステイン濃度を低減させることが、リスクを低減する上でメリットがあることは確かであるという結論となった。

上記 3 つのメタ分析で示された通り、メタ分析の基となる個別の試験のクオリティの改善に伴って、ホモシステインと冠動脈疾患の関連性は当初の知見よりも弱いものであることが徐々に明らかとなり、ホモシステインが本当に冠動脈疾患の原因因子であるかどうかについて疑問が投げかけられることとなった(図 2)。観察研究によるエビデンスに加えて、遺伝学的な研究(メンデル無作為化試験)及びランダム化比較試験に基づくメタ分析が、ホモシステインと冠動脈疾患の関連性を更に解明する手段として検討されることとなった。

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素をコードする MTHFR3 遺伝子 [methylentetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)遺伝子]に関して、共通の多型性が存在することが知られている。MTHFR 遺伝子の 677 番目の塩基が C (シトシン) から T (チミン) に置換されており、ビタミン B 群の補充を受けていない人では野生型である CC 型に比べて、血中ホモシステイン値が約 25%高くなるという報告がある。被験者をランダムに抽出する限りにおいては、遺伝学的な研究は観察研究で見られる交絡因子の影響を受けにくい。12,000 人の冠動脈疾患発症者を含む 40 件の遺伝学的試験を基にしたメタ分析を行ったところ、TT 型では野生型の CC 型に比べてホモシステイン値が 25%高くなり、それに伴って冠動脈疾患のリスクが 16% (95% 信頼区間 5%–28%)高くなることが分かり、ホモシステインが冠動脈疾患の原因因子であることが示された(33)。しかしながら個々の試験結果を見ると、試験間でのバラツキが大きく、そのバラツキは主に葉酸レベルの違いによって説明されることが示唆された。MTHFR 遺伝子の TT 型変異は、アジア系及びヨーロッパ系の人種では冠動脈疾患のリスクを高めるが、葉酸を添加した小麦粉が日常的に食される北米においてはその様な傾向は認められない。この知見は TT 型による冠動脈疾患リスクは、葉酸値が低い場合にのみ葉酸の補充によって低減が可能であるという知見と一貫している。

葉酸を用いてホモシステイン値を下げるという大規模なランダム化比較試験によって、冠動脈疾患発症におけるホモシステインの役割について、明確なエビデンスを得る事が出来る。大規模な(被験者数が 1,000 人以上で、治療期間 1 年以上)ランダム化比較試験に関して、個々の被験者のデータを基にメタ分析を行うことを目的に、B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration (30, 34)が計画された(血管疾患発症者数 9,326 人、冠動脈疾患発症者数 3,990 人)。結果として、平均 5 年間の葉酸の投与によってホモシステイン値は平均で 25%低下するものの、冠動脈疾患のリスクに関しては有意な影響が無いということが分かった(相対リスク 1.03; 95%信頼区間 0.97–1.10)。平均 5 年間という葉酸補充の介入に関する 52,000 人を対象とした試験によって、ホモシステイン値を低減しても血管疾患のリスクを低減する効果は得られないということが実証された。公表された文献を基にして行われた最近のメタ分析によれば、アスピリンとホモシステインの相互作用によるものであることが示唆されている。つまり、葉酸と付随して投与されたアスピリンが、冠動脈疾患のリスクの低減におけるホモシステインの効果を相殺してしまったのではないかと考えられている(27)。この仮説は B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration の 2 次評価の中で検証されることになっている。

これまで実施された介入試験が、5 年間という比較的短期間におけるホモシステイン値の変動の効果を見たものであり、主に心血管疾患の 2 次予防に主眼を置いたものであったことから、冠動脈疾患及び脳卒中のリスクに関する定常的なホモシステイン値の効果を正しく評価するには、遺伝子の変異に関するメンデル無作為化試験が必要である。過去 5 年間において遺伝子チップを使った遺伝子変異に関する大規模な試験結果が報告されており、その中で MTHFR 遺伝子の関連性についても

分析されている。未発表のデータを用いた MTHFR 遺伝子の C677T 多型と、冠動脈疾患リスクの関連性についてのメタ分析の結果が、その多型性に関する公表された文献に基づくメタ分析の結果と比較された(35)。19 件の未発表の試験結果を用いたメタ分析(冠動脈疾患患者数 48,000 人、コントロール 68,000 人)によって、CC 型から TT 型への変異による冠動脈疾患の相対リスクは 1.02(95%信頼区間 0.98–1.07; P = 0.28)であること、および葉酸の補充を受けていない低葉酸群での相対リスクは 1.01(95%信頼区間 0.95–1.07)であることが報告された。一方、86 報の公表された文献(発症例 29,000 人、コントロール 42,000 人)を基にしたメタ分析では、試験間にバラツキはあったものの(14 件の大規模試験での相対リスクが 1.12、72 件の小規模な試験での相対リスクが 1.18)全体の相対リスクは 1.15 (95%信頼区間 1.09–1.21)と報告されており、前者のメタ分析とは異なる結果であった。未発表のデータ(MTHFR 多型性の冠動脈疾患に関する相対リスクが計算されておらず、従って出版バイアス或いは方法論におけるミスによって影響を受けていないと思われるデータ)と公表された文献における知見の食い違いは、出版バイアスの危険性を浮き彫りにするものである。真の関連性を歪めてしまう危険性があることから、出版バイアスの重要性を認識することは、特に公表された遺伝学的な文献に基づいてメタ分析を行う場合に大切である。出版バイアスを十分に考慮すれば、MTHFR 多型性の冠動脈疾患との関連性に関するメタ分析の結果と、大規模ランダム化比較試験のメタ分析の結果には、ホモシステインと冠動脈疾患リスクとの間に関連性がないということを実証している点において一貫性がある。

心血管疾患に対するホモシステインの関連性についてのエビデンスの蓄積によって、小規模な後ろ向き試験によって示唆された仮説を臨床現場に応用する前に、更に厳密にデザインされた評価で検証する必要性が示されている。ここまで述べてきた通り、観察研究及びその様な試験を基にしたメタ分析の限界は明らかで、正しい見解を得る為には大規模ランダム化比較試験及び遺伝学的な試験が重要であるということが理解出来るものと思われる。また、メタ分析を注意深くデザインすることの重要性についても、認識出来るものと思われる。

中性脂肪

過去 50 年余りに渡って、冠動脈疾患及び脳卒中のリスクファクターとして血清中の中性脂肪について非常に多くの観察研究が行われてきた。残念ながら、それらの試験結果には一貫性は無く、心血管疾患に関して、中性脂肪が独立した危険因子なのかどうかについて疑念が生み出されている。ホモシステインと同じ様に、いくつかのメタ分析においてその様な疑念が示されており、一方で試験のデザイン及び方法論の改善が、冠動脈疾患及び脳卒中発症のリスクの予知における中性脂肪の役割に関する我々の理解をより明確なものにしてきている(表 2 及び図 3)。

表 2 血管疾患のリスクと中性脂肪の関連性に関するメタ分析

Metaanalysis	Year	Population	No. of studies	Study design	No. of cases	Data source (Pub, IPD, Tab) ^a	Adjustments	Correction for RDB? ^b	Effect size (per 88-mg/dL baseline TG or 1 SD log TG higher) ^{b,c}		
									Unadjusted	Adjusted	
Hokanson and Austin (36)	1996	General population	Total, 17	Prospective	Men, 2445	Pub	All studies: HDL-C	No	CVD	1.14 (1.05–1.28) (Male)	
			Men, 16		Women, 439		Some studies: age, TC, LDL-C, smoking, BMI, BP		1.32 (1.26–1.39)	1.37 (1.13–1.66) (Female)	
			Women, 5						1.76 (1.50–2.07)		
Abdel-Maksoud and Hokanson (37)	2002	General population	Total, 21	Prospective	Men, 3670	Pub	All studies: HDL-C	No	CVD	1.12 (1.06–1.19) (Male)	
			Men, 20		Women, 446		Some studies: BMI, BP, age, smoking, LDL-C, TC, DM, family history of MI		1.30 (1.25–1.35)	1.37 (1.13–1.66) (Female)	
			Women, 5						1.69 (1.45–1.97)		
APSCC (Patel et al. (38))	2004	General population	Total, 26	Prospective	CHD	IPD	Study: age, sex, SBP, smoking status, TC:HDL-C ratio	Yes	CHD	1.33 (1.09–1.62) (Fatal)	
			CHD		Fatal, 670				N/A	1.56 (1.20–2.03)	
			Fatal, 24		Fatal or nonfatal, 368				N/A	1.35 (1.00–1.83)	
			Fatal or nonfatal, 8		IS				IS		
			IS		Fatal or nonfatal, 273				N/A		
Sarwar et al. (39)	2007	General population	29	Prospective	10 158	Pub	All studies but one: age, sex, smoking, lipid concentration	Yes	CHD	1.28 (1.23–1.34)	
							Most studies: BP		N/A		
ERFC (40)	2009	General population	CHD, 68	Prospective	CHD, 12 785	IPD	Age, sex, SBP, smoking status, DM, BMI, non-HDL-C, HDL-C	Yes	CHD	0.99 (0.94–1.05)	
			IS, 32		IS, 2534					1.51 (1.44–1.59) ^d	1.02 (0.94–1.11)
										IS	1.26 (1.18–1.34) ^d
TCGDC and ERFC (41)	2010	CHD cases	38	Case-control	20 842	Tab, 37	Study	N/A	CHD	N/A	
						Pub, 1				1.96 (1.25–3.06)	

^a Pub, results from published reports; IPD, results from analyses of IPD; Tab, results from analyses of tabular data; RDB, regression dilution bias; TG, triglycerides; TC, total cholesterol; BMI, body mass index; BP, blood pressure; DM, diabetes mellitus; MI, myocardial infarction; APSCC, Asia-Pacific Cohort Studies Collaboration; SBP, systolic blood pressure; N/A, not applicable; IS, ischemic stroke; ERFC, Emerging Risk Factors Collaboration; TCGDC, Triglyceride Coronary Disease Genetics Consortium.

^b Results are for fatal and nonfatal events combined, unless otherwise stated. Effect size (RR) data are presented with 95% CIs in parentheses. Conventional units for TG are converted to SI units as follows: 1 mg/dL = 0.0113 mmol/L.

^c 1 SD is approximately equivalent to 88 mg/dL baseline or 58 mg/dL usual TG.

^d Age and sex adjusted.

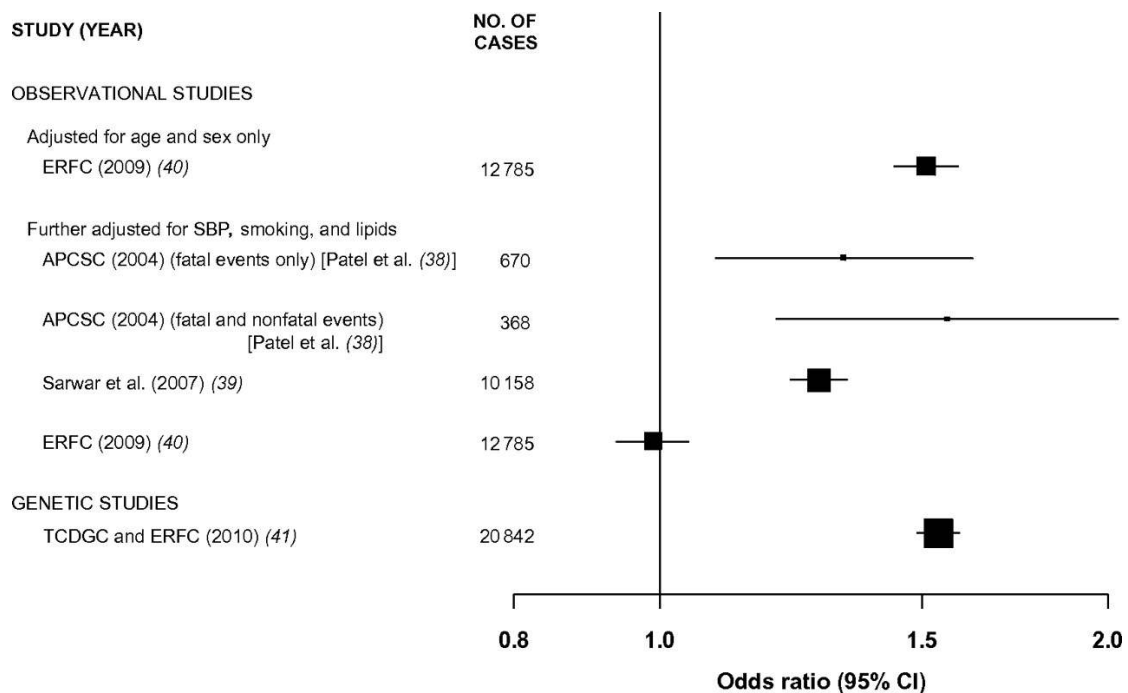


図3 冠動脈疾患と血清中性脂肪の関連性に関するメタ分析

中性脂肪が 58-mg/dL (0.65-mmol/L)上昇する際のオッズ比。■各試験におけるオッズ比で、サイズは症例数を反映。ERFC, Emerging Risk Factors Collaboration; APCSC, Asia-Pacific Cohort Studies Collaboration; TCDGC, Triglyceride Coronary Disease Genetics Consortium

2,884 例の心血管疾患症例を含む 17 報の公表された文献を基に、Hokanson と Austin がメタ分析を実施し、単変量解析における中性脂肪 88-mg/dL (1-mmol/L)あたりの心血管疾患の相対リスクは男性で 1.32 (95% 信頼区間 1.26–1.39)、女性で 1.76 (95%信頼区間 1.50–2.07)であると 1996 年に報告した (36)。HDL コレステロール及び他の交絡因子による補正によって有意性は低くなるものの、相対リスクは補正後も有意に高いと報告された (男性 1.14 (95%信頼区間 1.05–1.28)、女性 1.37 (95%信頼区間 1.13–1.66))。一方、多変量解析は少なくとも HDL コレステロールで補正を掛けた試験のみを対象に行われたが、解析の対象者数及びイベント数が少なくなってしまう、検出力が低くなってしまった。また、他の潜在的な交絡因子の補正によって、心血管疾患に関して中性脂肪が独立したリスクファクターであるか否かについて、統一的な見解が得られていないのは交絡因子の影響である可能性が示唆された。このメタ分析は 2002 年にアップデートされているが、その結論は初期の分析と同等の内容であった (37)。

Asia-Pacific Cohort Studies Collaboration によるメタ分析の様に、個々の被験者のデータを使ってメタ分析を行うことによって、潜在的な交絡因子に関して一貫性のある補正を掛けることができる (38)。Asia-Pacific Cohort Studies Collaboration によるメタ分析は 96,224 人の被験者を含む 26 の独立したコホート試験の結果を使って実施され、致命的な冠動脈疾患 (670 例)、その他の冠動脈疾患 (368 例) 及び虚血性脳卒中 (670 例) との、中性脂肪の関連性が評価された。個々の被験者のデ

ータを使ってメタ分析を行う事によって、総コレステロール及び HDL コレステロールに対する補正をより一貫性のある方法で実施することができ、また後日集められた一部の被験者のデータから稀釈バイアスに対する補正も掛けることが出来た。後者の補正は個人内変動が大きい中性脂肪に関しては、特に重要である (39)。メタ分析の結果、中性脂肪濃度は致命的な冠動脈疾患、総冠動脈疾患及び総虚血性脳卒中の発症に関して正の相関性を持ち、有意に独立した危険因子であることが示された。相対リスクはそれぞれ 1.33 (95%信頼区間 1.09–1.62)、1.56 (95%信頼区間 1.20–2.03) 及び 1.97 (95%信頼区間 1.52–2.55) であった。感度分析 (sensitivity analyses) において、他の脂質項目で補正を掛けた際に、中性脂肪と致死性冠動脈疾患の関連性において明らかな減衰が示された。最低四分位と最大四分位群間の相対リスクは、年齢、性別、血圧及び喫煙に関する補正を掛けることによって、1.97 (95%信頼区間 1.72–2.25) から 1.77 (95%信頼区間 1.54–2.03) に減少し、更に総コレステロールと HDL コレステロールで補正を掛けることによって、1.72 (95%信頼区間 1.48–2.01) まで減少した。全ての関連した交絡因子、特に空腹時血糖に関する補正は実施することが出来ず、また分析は比較的少数のイベント数を対象に実施されたものであるが、この個々の被験者データを使ったメタ分析によって、中性脂肪が冠動脈疾患と虚血性脳卒中に関する独立したリスクファクターであることが示された。

2007年に Sarwar らが 6,000 の症例を含む、8 件の公表された前向き研究の結果を使ってメタ分析を行い、結果を報告している (39)。この大規模なメタ分析では、稀釈バイアスの補正を行っているが、中性脂肪濃度と冠動脈疾患リスクの間で有意な正の関連性が示された。最小四分位と最大四分位群の比較における補正後の相対リスクは、1.72 (95%信頼区間 1.56–1.90) であった。1 件の例外を除いてメタ分析の対象となった全ての試験では、年齢、性別、喫煙および脂質項目に関して補正が掛けられており、また殆どの試験では血圧に関する補正も行われていた。しかしながら、これらの公表された個々の試験における交絡因子補正の正確性は、余り明確にはなっていない。

その後の公表済み及び未発表の試験における個々の被験者データを使用したメタ分析によって、より明らかな知見が得られている (40)。脂質項目以外に関して補正を掛けた際、中性脂肪濃度と冠動脈疾患発症の間に非常に強い関連性が示されたが (相対リスク 1.37; 95%信頼区間 1.31–1.42)、HDL コレステロール及び non-HDL コレステロールによる補正によって有意性が消失した (相対リスク 0.99; 95%信頼区間 0.94–1.05)。虚血性脳卒中に関しても同様で、コレステロールによる補正によって相対リスクが 1.26 (95%信頼区間 1.18–1.34) から 1.02 (95%信頼区間 0.94–1.11) に減少した。この Emerging Risk Factors Collaboration によるメタ分析における優れた検出力、交絡因子及び希釈バイアスに関する詳細な補正によって、過去のメタ分析による結論が覆され、中性脂肪は他の確立されたリスクファクターによって補正を掛けると、心血管疾患に関しては独立したリスクファクターとはなり得ないことが示唆された。

これらの知見を単純に解釈すれば、心血管疾患に関して中性脂肪は臨床的な意義を持たないということになるかもしれない。しかしながら、各種脂質間の複合的な相互関係を考慮すると、中性脂肪に関しては更に調査の必要性があるものと思われる。例えば、仮にリポ蛋白中のコレステロールの濃度が中性脂肪濃度を左右すると想定するならば、コレステロールによる補正は過剰補正ということになる。しかしながら、逆にその様な因果関係が存在しないのであれば、補正を掛けずにデータを評価することによって、中性脂肪と心血管疾患リスクの間に独立した関連性があるということが

誤って示唆されてしまうことになる (41)。したがって、各種脂質成分の個々の役割を解明することは、恐らく観察研究あるいはそれらのデータを使ったメタ分析では難しいのかもしれない。

ランダム化比較試験は、バイアス及び交絡の影響をコントロールすることが出来ることから、一般的に観察研究よりも信頼性の高いエビデンスを与えるが、選択的に中性脂肪のみを低下させる治療薬が存在しないことから、心血管疾患に関する中性脂肪の真の役割を解明することはランダム化比較試験でも容易ではない。フィブラート及びナイアシンは中性脂肪濃度を低下させるが、同時に HDL コレステロールを増加させ、LDL コレステロールを低下させる (42, 43)。心血管疾患の一次予防及び二次予防におけるフィブラートの効果を検証したメタ分析において、致命的で無い冠動脈疾患のみであるもののフィブラートは有意に発症のリスクを低減すると報告された(13%; 95% 信頼区間 7%–19%)。また、フィブラートはベースラインの中性脂肪濃度が高い群において、特に有効であったとも報告されている (42)。ナイアシンに関しては、中性脂肪濃度低減の効果は明らかにされていないものの、ランダム化比較試験の公表された文献を使ったメタ分析において、冠動脈疾患及び脳卒中の発症を有意に低減させるものであったと報告されている (43)。

遺伝学的研究が初期の観察研究およびその結果に関するメタ分析による知見を補足するデータを提供している。メンデル無作為化研究に関する最近のメタ分析では、中性脂肪濃度に関連した遺伝子変異の影響を評価している(41)。先に述べた様に、このアプローチは生涯における中性脂肪濃度の違いの効果を調べることが可能で、交絡及び逆の因果関係の影響を受けにくいという利点がある。血中の中性脂肪濃度を左右する主要な遺伝子である APOA5 (apolipoprotein A-V) 遺伝子のプロモーター領域における多型性 (-1131T が C に変異) と、冠動脈疾患及び脳卒中との関連性についての報告がある。C 型の変異を持つ被験者における中性脂肪濃度は T 型に比べて 16% 高く (95% 信頼区間 12.9%–18.7%)、冠動脈疾患のリスクは 18% 高くなる(相対リスク 1.18; 95% 信頼区間 1.11–1.26)と報告されている。また、同遺伝子における変異は脂質以外のリスクファクターとは関連性が無いということも報告されている。重要な点としては、Emerging Risk Factors Collaboration によるメタ分析で、中性脂肪濃度が 16% 増加する場合の年齢、性別を補正した冠動脈疾患に対する相対リスクが 1.10 (95% 信頼区間 1.08–1.12)であったと報告されている内容と良く一致していることが挙げられる(40)。したがって、食事とライフスタイルの影響による高中性脂肪血症と、遺伝的変異による高中性脂肪血症は、いずれも同じレベルで冠動脈疾患発症のリスクと関連しているということが示唆される。これらのデータから冠動脈疾患における中性脂肪の直接的な役割を推論することは出来ないが、中性脂肪が冠動脈疾患の発症に関して何らかの形で関与していることは明らかであると云える。従って、過去に実施された観察研究のメタ分析で得られた、中性脂肪は独立した関係性が無いという知見は、因果関係の欠如のエビデンスとしては考慮するべきでは無いと考えられる。

心血管疾患のリスクファクターとして中性脂肪の役割を調べたこれらの研究は、交絡因子に対する適切な補正の重要性を強調し、メタ分析の限界を浮き彫りにするものである。高いクオリティの大規模ランダム化比較試験における個々の被験者のデータを使ったメタ分析であっても、心血管疾患のリスクと中性脂肪の関連性に関して、信頼出来る結果を提供することが出来ておらず (40)、遺伝学的な試験によって我々の中性脂肪に関する理解は高まったものの、冠動脈疾患及び脳卒中のリスクと中性脂肪の関連性を完全に解明するにはまだ至っていない。

本総説では、心血管疾患に関する新しいバイオマーカーの役割を評価する手法としての、メタ分析の利点と落とし穴について事例を交えて解説した。両方の事例において、個々の観察研究および初期のメタ分析は仮説を立てるという意味において重要な役割を果たしたが、初期の段階においてはバイアス及び交絡によって誤解を与える知見が生み出されてしまった。方法論の改善、特に個々の被験者のデータを使ったメタ分析の使用によって、より信頼性の高い知見が得られ、その様な新しい知見は心血管疾患におけるホモシステインと中性脂肪の役割に関する我々の理解を深めるにあたって、非常に重要な役割を果たした。本総説では遺伝学的研究およびランダム化比較試験及びそのメタ分析が、観察研究のメタ分析に対して如何に重要で補完的な役割を果たすか、また、如何に新規バイオマーカーに関する包括的な理解を与えるものであるかを論証した。

(訳者：目黒 洋介)

脚注

²Nonstandard abbreviations:

CVD, cardiovascular disease; CHD, coronary heart disease; RR, relative risk; IPD, individual-participant data; HSC, Homocysteine Studies Collaboration; RCT, randomized controlled trial; HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol

³Human genes:

MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H);

APOA5, apolipoprotein A-V

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: None declared.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: Medical Research Council and British Heart Foundation.

Expert Testimony: None declared.

Received for publication February 10, 2012.

Accepted for publication June 4, 2012.

© 2012 The American Association for Clinical Chemistry

References

1. World Health Organization. The global burden of disease 2004 update. Geneva: World Health Organization; 2008.
2. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97: 1837–47.
3. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003; 24: 987–1003.
4. Corday E, Corday SR. Prevention of heart disease by control of risk factors: The time has come to face the facts. *Am J Cardiol* 1975; 35: 330–3.
5. Lefkowitz RJ, Willerson JT. Prospects for cardiovascular research. *JAMA* 2001; 285: 581–7.
6. Melander O, Newton-Cheh C, Almgren P, Hedblad B, Berglund G, Engstrom G, et al. Novel and conventional biomarkers for prediction of incident cardiovascular events in the community. *JAMA* 2009; 302: 49–57.
7. Magnus P, Beaglehole R. The real contribution of the major risk factors to the coronary epidemics: time to end the “only-50%” myth. *Arch Intern Med* 2001; 161: 2657–60.
8. Beaglehole R, Magnus P. The search for new risk factors for coronary heart disease: occupational therapy for epidemiologists? *Int J Epidemiol* 2002; 31: 1117–22.
9. Doll R. Weak associations in epidemiology: importance, detection, and interpretation. *J Epidemiol* 1996; 6: S11–20.
10. Warrell DA, Cox TM, Firth JD Baigent C, Peto R, Gray R, Parish S, Collins R. Large-scale randomized evidence: trials and meta-analyses of trials. In: Warrell DA, Cox TM, Firth JD , eds. *Oxford textbook of medicine*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2010. Chapter 2.3.3, p 31–45.
11. Egger M, Schneider M, Davey Smith G. Spurious precision? Meta-analysis of observational studies. *BMJ* 1998; 316: 140–4.
12. Blettner M, Sauerbrei W, Schlehofer B, Scheuchenpflug T, Friedenreich C. Traditional reviews, meta-analyses and pooled analyses in epidemiology. *Int J Epidemiol* 1999; 28: 1–9.

13. Riley RD, Lambert PC, Abo-Zaid G. Meta-analysis of individual participant data: rationale, conduct, and reporting. *BMJ* 2010; 340: c221.
14. Begg CB, Mazumdar M. Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics* 1994; 50: 1088–101.
15. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997; 315: 629–34.
16. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease. *JAMA* 1998; 279: 1477–82.
17. Clarke R, Shipley M, Lewington S, Youngman L, Collins R, Marmot M, Peto R. Underestimation of risk associations due to regression dilution in long-term follow-up of prospective studies. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 341–53.
18. Danesh J, Lewington S. Plasma homocysteine and coronary heart disease: systematic review of published epidemiological studies. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5: 229–32.
19. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111–28.
20. Wilcken DEL, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079–82.
21. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149–55.
22. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049–57.
23. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; 325: 1202.
24. Clarke R, Lewington S. Homocysteine and coronary heart disease. *Semin Vasc Med* 2002; 2: 391–400.
25. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 292–9.
26. Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M, Helfand M. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 1203–12.
27. Wald DS, Morris JK, Wald NJ. Reconciling the evidence on serum homocysteine and ischaemic heart disease: a meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6: e16473.
28. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke. *JAMA* 2002; 288: 2015–22.

29. Homocysteine Lowering Trialists Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 806–12.
30. Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. *Arch Intern Med* 2010; 170: 1622–31.
31. Phillips AN, Smith GD. How independent are “independent” effects? Relative risk estimation when correlated exposures are measured imprecisely. *J Clin Epidemiol* 1991; 44: 1223–31.
32. Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; 360: 1903–13.
33. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG, MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease. *JAMA* 2002; 288: 2023–31.
34. B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration. Homocysteine-lowering trials for prevention of cardiovascular events: a review of the design and power of the large randomized trials. *Am Heart J* 2006; 151: 282–7.
35. Clarke R, Bennett DA, Parish S, Verhoef P, Dötsch-Klerk M, Lathrop M, et al. Homocysteine and coronary heart disease: meta-analysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. *PLoS Med* 2012; 9: e1001177.
36. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996; 3: 213–9.
37. Abdel-Maksoud MF, Hokanson JE. The complex role of triglycerides in cardiovascular disease. *Semin Vasc Med* 2002; 2: 325–33.
38. Patel A, Barzi F, Jamrozik K, Lam TH, Ueshima H, Whitlock G, et al. Serum triglycerides as a risk factor for cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Circulation* 2004; 110: 2678–86.
39. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007; 115: 450–8.
40. Emerging Risk Factors Collaboration. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009; 302: 1993–2000.
41. Triglyceride Coronary Disease Genetics Consortium, Emerging Risk Factors Collaboration. Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet* 2010; 375: 1634–9.
42. Jun M, Foote C, Lv J, Neal B, Patel A, Nicholls SJ, et al. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010; 375: 1875–84.
43. Bruckert E, Labreuche J, Amarenco P. Meta-analysis of the effect of nicotinic acid alone or in combination on cardiovascular events and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010; 210: 353–61.