

第 45 回日本心臓病学会学術集会
Young Investigator's Award 受賞論文

最優秀賞

Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental vitamin E on Attenuation of the Development of nitrate tolerance

渡邊 秀樹(きぬ医師会病院循環器内科)

優秀賞

Radioimmunoimaging of aortic dissection and acute bowel infarction with radioiodinated murine antismooth muscle myosin antibody

岩崎 俊弥(群馬大学医学部第二内科)

Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model

尾野 亘(京都大学医学研究科循環病態学)

Upregulation of angiotensin-converting enzyme during the healing process after injury at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty in humans

大石 充(大阪大学医学部第四内科)

In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rat

鈴木 憲(大阪大学医学部第一外科)

硝酸薬耐性予防におけるビタミンE 摂取に関する二重盲検試験

Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Supplemental Vitamin E on Attenuation of the Development of Nitrate Tolerance

渡邊 秀樹
垣花 昌明*1
大塚 定徳*2
杉下 靖郎*2

Hideki WATANABE, MD
Masaaki KAKIHANA, MD*1
Sadanori OHTSUKA, MD*2
Yasuro SUGISHITA, MD, FJCC*2

Abstract

The attenuation of intracellular production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) has been known as a mechanism of nitrate tolerance. A recent *in vitro* study have shown an increase in superoxide levels and a reduced activation of guanylate cyclase in tolerant vessels. We investigated the preventive effect of an antioxidant, vitamin E, on the development of nitrate tolerance.

In this double-blind, placebo-controlled study, 24 normal volunteers and 24 patients with ischemic heart disease (IHD patients) were randomized to receive either vitamin E (200 mg t. i. d.; vitamin E group) or placebo (placebo group). Vasodilator response to nitroglycerin was assessed with forearm plethysmography by measuring the change in the forearm blood flow before and 5 min after sublingual administration of 0.3 mg nitroglycerin, and at the same time, blood samples were taken from veins to measure the platelet cGMP level. Measurements of the forearm blood flow and blood sampling were obtained serially at baseline (day 0), 3 days after taking vitamin E or placebo alone (day 3), and 3 days after application of a 10 mg/24 hr nitroglycerin tape concomitantly with oral vitamin E or placebo (day 6).

The response of forearm blood flow (%FBF) and cGMP (%cGMP) after sublingual nitroglycerin on day 0 (%FBF: normal volunteers 32±12% vs 31±11%, IHD patients 35±15% vs 34±15%; %cGMP: normal volunteers 38±10% vs 35±11%, IHD patients 37±11% vs 38±12%; vitamin E group vs placebo group) and day 3 (%FBF: normal volunteers 33±9% vs 32±12%, IHD patients 35±12% vs 33±13%, %cGMP: normal volunteers 38±10% vs 37±11%, IHD patients 36±14% vs 37±10%, vitamin E group vs placebo group) were not different between the two groups. On day 6, %FBF and %cGMP in the placebo group were significantly lower compared with day 0, and there were significant differences in them between the two groups (%FBF: normal volunteers 30±12% vs 17±9%, *p*<0.01; IHD patients 28±14% vs 17±8%, *p*<0.01; %cGMP: normal volunteers 35±11% vs 8±5%, *p*<0.01; IHD patients 38±10% vs 12±4%, *p*<0.01, vitamin E group vs placebo group).

In conclusion, the combination therapy with vitamin E is potentially a useful method to prevent the development of nitrate tolerance.

—J Cardiol 1998; 31 (3): 173-181

Key Words

Antioxidants, Nitroglycerin, Platelets, Drug interactions

Reproduced with permission from Circulation 1997; 96: 2545-2550

Copyright © 1997 American Heart Association

きぬ医師会病院 循環器内科: 〒303-0016 茨城県水海道市新井木町13-3; *茨城県立医療大学 内科, 茨城; **筑波大学臨床医学系内科/循環器内科, 茨城

Department of Cardiology, Kinu Medical Association Hospital, Ibaraki; *Internal Medicine, Ibaraki Prefectural University of Health Sciences, Ibaraki; **Cardiovascular Division, Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki

Address for reprints: WATANABE H, MD, Department of Cardiology, Kinu Medical Association Hospital, Araigi-cho 13-3, Mitsukaido, Ibaraki 303-0016

Received for publication December 2, 1997

はじめに

硝酸薬は循環器領域で広く使われている薬剤である。しかし、その持続投与による耐性の出現が報告されている¹⁻³⁾。硝酸薬耐性の機序は、多くの因子が関与していると考えられ⁴⁾、神経体液性因子の活性⁵⁾、体液貯留⁶⁾、guanylate cyclase の脱感作⁷⁾、nitroglycerin の変換異常⁸⁾なども考えられている。最近、硝酸薬耐性と superoxide 産生の増加との関係も示された⁹⁾。この superoxide が nitroglycerin から一酸化窒素への変化を障害し、cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 産生を低下させることで耐性を生じると考えられている。更に endothelin による血管収縮反応の増大も示されている¹⁰⁾。ビタミン E は脂溶性の抗酸化剤であり、その摂取により低比重リポ蛋白 (low-density lipoprotein: LDL) の酸化予防が示されている¹¹⁾。そこで本研究では、抗酸化剤ビタミン E による硝酸薬耐性の予防効果を健康成人と虚血性心疾患患者において検討した。

方法

1. 対象

健康成人 24 例 (男性 18 例, 女性 6 例), 年齢 19-38 歳と虚血性心疾患 (ischemic heart disease) 患者 24 例 (男性 19 例, 女性 5 例), 年齢 45-74 歳を対象とした。健康成人には心疾患、腎疾患の既往はなく、硝酸薬および心血管薬の使用はない。虚血性心疾患患者では、18 例が長時間作用の isosorbide dinitrate (ISDN; ニトロール-R, 20 mg, 1 日 2 回) を、16 例が Ca 拮抗薬を服用していた。長時間作用の ISDN は、研究の 72 時間前より中止した。他の薬剤は持続した。患者背景は Table

Selected abbreviations and acronyms

cGMP=cyclic guanosine monophosphate

1 にまとめた。

2. 研究のプロトコル

研究は次の 3 相からなり、それぞれの相で nitroglycerin 舌下前後での前腕血流と血小板 cGMP の反応を検討した。3 相は、1) baseline (0 日目), 2) ビタミン E 200 mg を 1 日 3 回 (ユベラ, ビタミン E 群, 12 例) またはプラセボ (プラセボ群, 12 例) を単独で服用 3 日後 (3 日目), 3) nitroglycerin テープ 10 mg/day (ミリスロールテープ) とビタミン E またはプラセボの併用 3 日後 (6 日目) から構成されている。

0 日目では、nitroglycerin 0.3 mg の舌下前および 5 分後で前腕血流量と血小板 cGMP の測定後、健康成人および虚血性心疾患患者それぞれランダムにビタミン E またはプラセボを服用する群に割り付けを行った。3 日後 (3 日目), ふたたび nitroglycerin 0.3 mg の舌下前および 5 分後で前腕血流量と血小板 cGMP の測定を

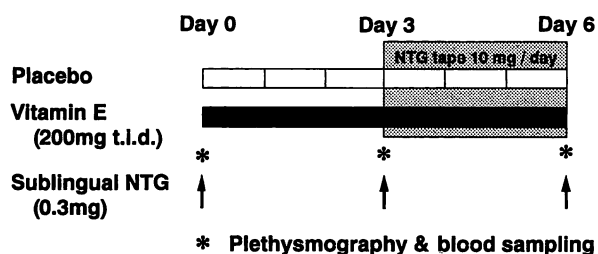


Fig. 1 Study protocol
NTG=nitroglycerin.

Table 1 Clinical characteristics of the subjects

	Normal volunteers		Patients with ischemic heart disease	
	Placebo group (n=12)	Vitamin E group (n=12)	Placebo group (n=12)	Vitamin E group (n=12)
Age (yr)	36±8	32±6	61±9	60±8
Sex (M/F)	9/3	9/3	10/2	9/3
Number of smokers (%)	5 (42)	4 (33)	8 (67)	9 (75)
Mean blood pressure (mmHg)	110±15	114±16	131±14	134±18
Pulse rate (beat/min)	72±4	68±4	78±6	72±8
Total cholesterol (mg/dl)	184±16	183±15	206±12	208±16

Data are number of subjects or mean ± SD.

M= male; F=female.

行った。更に nitroglycerin テープとビタミン E または プラセボを併用した 3 日後(6 日目)に、同様の測定を行った。Fig. 1 にプロトコルを示した。このプロトコルは、きぬ医師会病院、筑波大学の承認を受け、全ての対象者から書類によるインフォームドコンセントを得た。

3. Nitroglycerin による血管拡張反応の評価

Nitroglycerin による血管拡張反応を評価するために、プレチスモグラフィを用いて前腕血流量(ml/min/100 ml, 前腕)を測定した。ストレインゲージは前腕の肘から 5 cm に置き、静脈灌流はカフにより 40 mmHg で遮断した。手への循環を遮断するため、手関節部において、収縮期圧以上でカフによる圧迫を行った。前腕血流量は 3 回測定し、その平均とした。

4. 血小板 cGMP 測定の準備

採血は 5 mmol/l の ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) と cGMP phosphodiesterase 阻害薬 (10^{-3} mol/l 2-O-propoxyphenyl-8-azapurin-6-one dissolved in 1% triethanolamine) を含んだ注射器で行い、ただちに、200 g で 20 分間の遠心分離により乏血小板血漿と多血小板血漿に分離した。多血小板血漿は更に 2,500 g で 10 分間の遠心分離による洗浄を繰り返し、上層は廃棄した。沈殿物は modified Tyrode 液に浮遊させ、

-70°C で凍結保存した¹²⁾。

5. 血小板 cGMP 測定

洗浄血小板検体 1 ml 当たり 0.5 ml の trichloroacetic acid (TCA) を加え、2,500 g で 20 分間の遠心分離を行い、TCA はエーテルで抽出した。放射免疫測定法 (radioimmunoassay) キット [Yamasa Shoyu 製(東京)] を用いて、cGMP の測定を行った¹³⁾。結果は pmol/ 10^6 血小板数で示した。この測定の intra-assay error と interassay error はそれぞれ 3.4% および 11.9% であった。

6. 統計解析

前腕血流量は平均±標準偏差で示し、血小板 cGMP レベルは平均±標準誤差で示した。各測定日間での比較は ANOVA 検定および Bonferroni 検定で検討し、nitroglycerin 舌下前後および健常成人と虚血性心疾患患者間の比較は Student の *t* 検定で行った。p<0.05 をもって有意差の判定とした。

結 果

1. 前腕血流量

Nitroglycerin 舌下前後の前腕血流量の変化を Fig. 2 に示す。

Nitroglycerin 舌下後の前腕血流量は、健常成人と虚

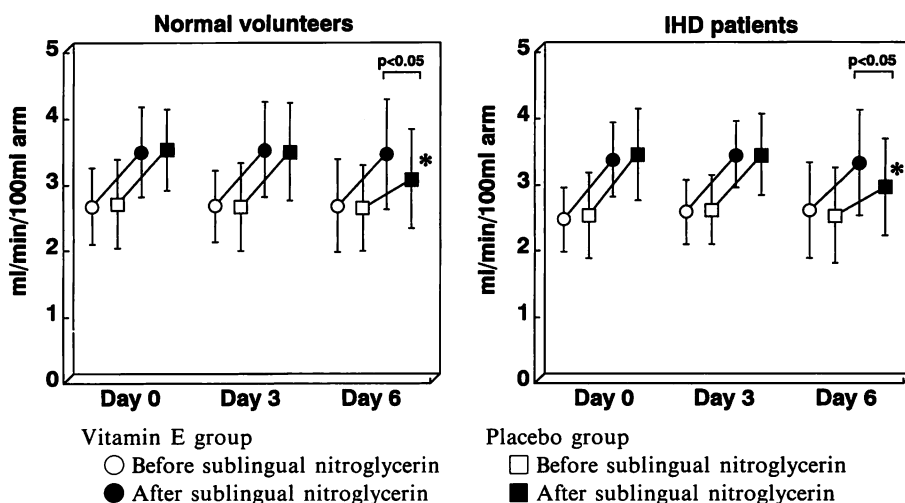


Fig. 2 Forearm blood flow before and after sublingual nitroglycerin
Data are mean±SD. *p<0.05 vs day 0 and day 3.
IHD=ischemic heart disease.

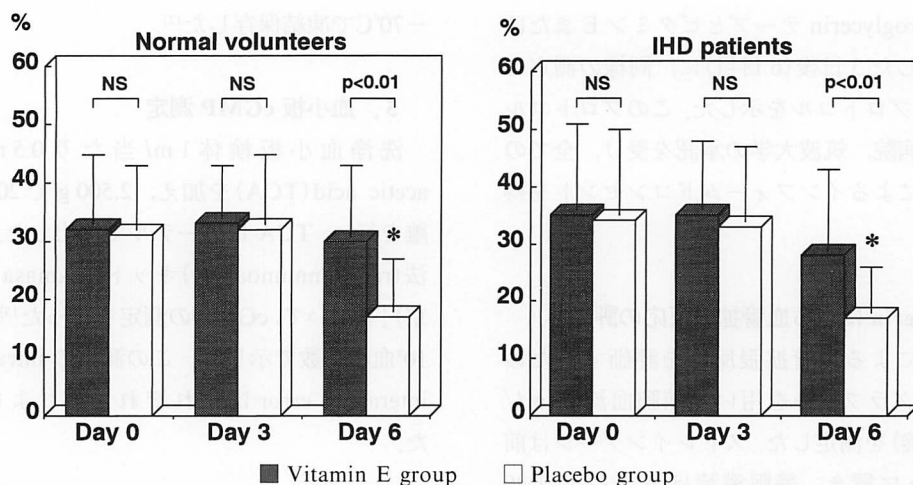


Fig. 3 Percent increase of the forearm blood flow after sublingual nitroglycerin

Data are mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs day 0 and day 3.

Abbreviation as in Fig. 2.

虚血性心疾患患者のいずれも、0日目(ビタミンE群における健常成人 $2.60 \pm 0.58 \rightarrow 3.43 \pm 0.68$ ml/min, 虚血性心疾患患者 $2.40 \pm 0.48 \rightarrow 3.24 \pm 0.56$ ml/min; プラセボ群における健常成人 $2.64 \pm 0.67 \rightarrow 3.46 \pm 0.62$ ml/min; 虚血性心疾患患者 $2.46 \pm 0.64 \rightarrow 3.29 \pm 0.69$ ml/min)および3日目(ビタミンE群における健常成人 $2.61 \pm 0.54 \rightarrow 3.47 \pm 0.72$ ml/min; 虚血性心疾患患者 $2.51 \pm 0.48 \rightarrow 3.38 \pm 0.51$ ml/min; プラセボ群における健常成人 $2.60 \pm 0.66 \rightarrow 3.43 \pm 0.74$ ml/min, 虚血性心疾患患者 $2.54 \pm 0.52 \rightarrow 3.38 \pm 0.61$ ml/min)とも有意に増加した。

6日目における nitroglycerin 舌下後の血流量は、0日目および3日目と比較して、プラセボ群で有意に低下しており(健常成人 $2.58 \pm 0.64 \rightarrow 3.02 \pm 0.75$ ml/min, 虚血性心疾患患者 $2.46 \pm 0.72 \rightarrow 2.89 \pm 0.73$ ml/min, $p < 0.05$), ビタミンE群では、0日目および3日目と有意差を認めなかった(健常成人 $2.61 \pm 0.70 \rightarrow 3.39 \pm 0.84$ ml/min, 虚血性心疾患患者 $2.54 \pm 0.72 \rightarrow 3.26 \pm 0.79$ ml/min)。また、nitroglycerin 舌下後の血流量は、ビタミンE群がプラセボ群より有意に大であった($p < 0.05$)。

Nitroglycerin 舌下後の前腕血流量の増加率を Fig. 3 に示す。

健常成人および虚血性心疾患患者いずれも、0日目と3日目ではビタミンE群とプラセボ群での増加率に有意差を認めなかった(0日目: ビタミンE群における健常成人 $32 \pm 12\%$, 虚血性心疾患患者 $35 \pm 15\%$;

プラセボ群における健常成人 $31 \pm 11\%$, 虚血性心疾患患者 $34 \pm 15\%$, 3日目: ビタミンE群における健常成人 $33 \pm 9\%$, 虚血性心疾患患者 $35 \pm 12\%$, プラセボ群における健常成人 $32 \pm 12\%$, 虚血性心疾患患者 $33 \pm 13\%$)。

6日目における増加率は、0日目および3日目と比べプラセボ群で有意に低下し(健常成人 $17 \pm 9\%$; 虚血性心疾患患者 $17 \pm 8\%$, $p < 0.05$), ビタミンE群では低下しなかった(健常成人 $30 \pm 12\%$, 虚血性心疾患患者 $28 \pm 14\%$)。そしてビタミンE群の増加率がプラセボ群より有意に大であった($p < 0.01$)。

2. 血小板 cGMP レベル

Nitroglycerin 舌下前後の血小板 cGMP レベルの変化を Fig. 4 に示す。

血小板 cGMP レベルは、健常成人(0日目: ビタミンE群 $0.58 \pm 0.04 \rightarrow 0.80 \pm 0.05$; プラセボ群 $0.63 \pm 0.05 \rightarrow 0.85 \pm 0.06$ pmol/ 10^9 PLT; 3日目: ビタミンE群 $0.59 \pm 0.05 \rightarrow 0.81 \pm 0.06$ pmol/ 10^9 PLT; プラセボ群 $0.61 \pm 0.04 \rightarrow 0.84 \pm 0.06$ pmol/ 10^9 PLT)と虚血性心疾患患者(0日目: ビタミンE群 $0.35 \pm 0.03 \rightarrow 0.48 \pm 0.04$ pmol/ 10^9 PLT; プラセボ群 $0.39 \pm 0.05 \rightarrow 0.54 \pm 0.04$ pmol/ 10^9 PLT; 3日目: ビタミンE群 $0.38 \pm 0.06 \rightarrow 0.52 \pm 0.04$ pmol/ 10^9 PLT; プラセボ群 $0.38 \pm 0.05 \rightarrow 0.52 \pm 0.06$ pmol/ 10^9 PLT)のいずれも0日目および3日目で有意差なく、nitroglycerin 舌下後に増加した。またプラセボ群とビタミンE群間では有意差を認め

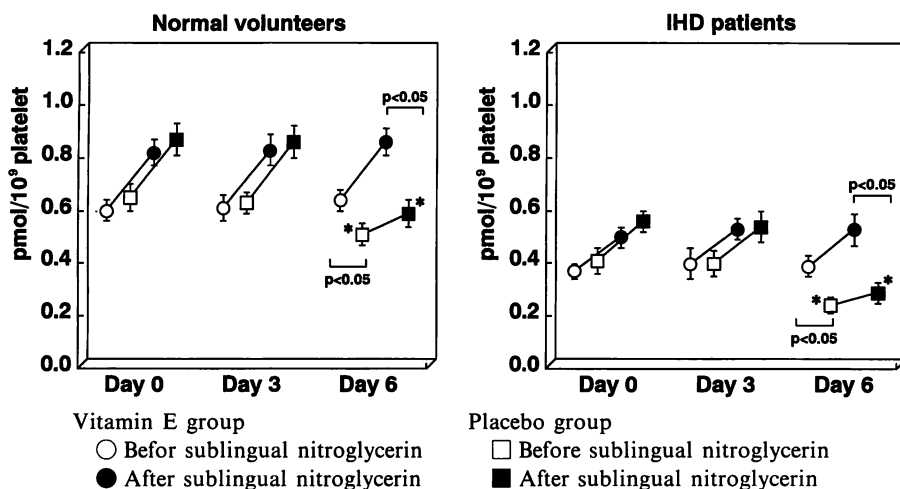


Fig. 4 Platelet cGMP level before and after sublingual nitroglycerin

Data are mean ± SEM. **p* < 0.05 vs day 0 and day 3.

Abbreviation as in Fig. 2.

なかった。

6日目で血小板cGMPレベルは、健常成人と虚血性心疾患患者いずれも、プラセボ群では、0日目および3日目と比べて、nitroglycerin舌下前(健常成人0.49 ± 0.04 pmol/10⁹PLT, *p* < 0.05; 虚血性心疾患患者0.22 ± 0.03 pmol/10⁹PLT, *p* < 0.05), および舌下後(健常成人0.53 ± 0.05 pmol/10⁹PLT, *p* < 0.05; 虚血性心疾患患者0.25 ± 0.04 pmol/10⁹PLT, *p* < 0.05)で有意に低値であった。また、ビタミンE群よりも有意に低下していた(*p* < 0.05)。一方でビタミンE群では(健常成人0.62 ± 0.04 → 0.84 ± 0.05 pmol/10⁹PLT; 虚血性心疾患患者0.37 ± 0.04 → 0.51 ± 0.06 pmol/10⁹PLT), 0日目および3日目と有意差はなく、血小板cGMPは維持されていた。

今回の結果では、虚血性心疾患患者の血小板cGMPレベルは、全ての測定日で健常成人の値より低値であった(*p* < 0.05)。

Nitroglycerin舌下後の血小板cGMPの増加率をFig. 5に示す。

健常成人および虚血性心疾患患者いずれも、0日目と3日目ではビタミンE群とプラセボ群での増加率に差を認めなかった(0日目: ビタミンE群における健常成人38 ± 10%, 虚血性心疾患患者37 ± 11%; プラセボ群における健常成人35 ± 11%, 虚血性心疾患患者38 ± 12%, 3日目: ビタミンE群における健常成人38 ± 10%, 虚血性心疾患患者36 ± 14%; プラセボ群に

おける健常成人37 ± 11%, 虚血性心疾患患者37 ± 10%)。

6日目における増加率は、0日目および3日目と比べプラセボ群で有意に低下し(健常成人8 ± 5%, 虚血性心疾患患者12 ± 4%, *p* < 0.05), ビタミンE群では低下しなかった(健常成人35 ± 11%, 虚血性心疾患患者38 ± 10%)。そしてビタミンE群の増加率がプラセボ群より有意に大であった(*p* < 0.01)。

考 察

本研究では、nitroglycerinの経皮投与を行っている期間中のnitroglycerin舌下による前腕血流量と血小板cGMP産生の変化を検討し、プラセボ群ではその増加が低下しているのに対し、ビタミンE群では維持されていたことを示した。この結果は、抗酸化剤であるビタミンEは硝酸薬耐性を予防可能であることを示唆している。

1. 硝酸薬耐性の機序

硝酸薬耐性の現象は今世紀初頭に報告されたが¹⁴⁾, 臨床医たちはこの現象を意味のあることとはとらえてなかったようである¹⁵⁾。しかし、この10年来、硝酸薬耐性の重要性が指摘され、この現象により、虚血性心疾患や心不全治療のnitroglycerinによる治療効果の限界となることが明らかになってきた¹⁶⁻¹⁸⁾。硝酸薬耐性の機序は多くの因子が関与していると考えられてい

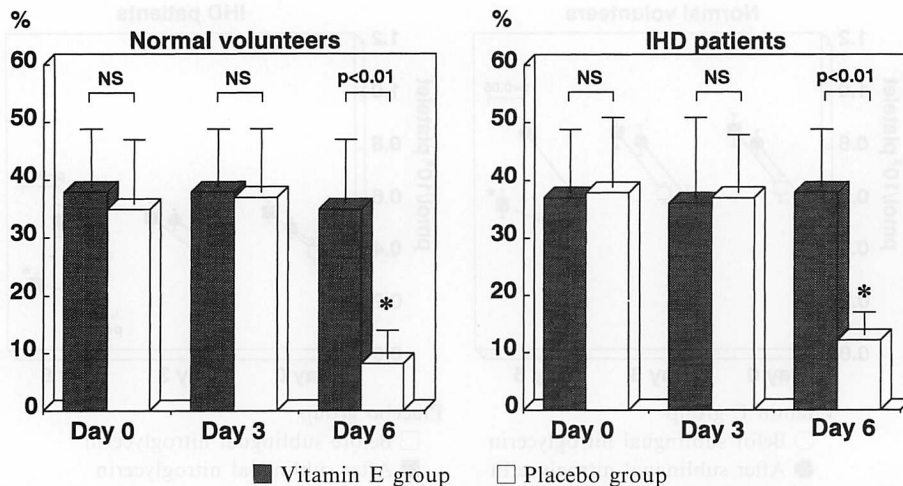


Fig. 5 Percent increase of platelet cGMP level after sublingual nitroglycerin
Data are mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs day 0 and day 3.
Abbreviation as in Fig. 2.

る^{4,17,19}。そして硝酸薬耐性は nitroglycerin に対する血管反応性の低下によるものと考えられている²⁰。硝酸薬耐性の機序として、1) guanylate cyclase の脱感作²¹、2) phosphodiesterase 活性の亢進²¹、3) 細胞内 sulfhydryl 基の枯渇²²、4) nitroglycerin の変換の異常²³の4つが提唱されており、Münzel ら¹⁸)はそこに superoxide による血管拡張反応の低下を提唱している。最近彼らは、アンジオテンシン(angiotensin)IIの活性化による superoxide の産生亢進を報告し、それが nitroglycerin 由来の一酸化窒素による血管拡張反応を阻害していることを示した⁹。この superoxide は、nitroglycerin から一酸化窒素を放出する過程に作用し、cGMP 産生を低下させ、硝酸薬耐性を引き起こすものと考えられる。我々の研究では、抗酸化剤であるビタミンEが nitroglycerin による cGMP 産生の低下を予防し、血管拡張反応を維持した。つまり、この結果から、硝酸薬の長期投与により superoxide の増加が硝酸薬耐性に関与していることが推測される。

2. 硝酸薬耐性におけるビタミンEの効果

ビタミンEは、重要な内因性の脂溶性抗酸化剤である¹¹。最近、ビタミンEが冠動脈疾患の二次予防効果を持つことが、Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)で報告された²⁴。Miwa ら²⁵)は、血管攣縮性狭心症患者で有意に血漿ビタミンEが低下していることを報告している。更に、ビタミンEは虚血により

誘発されるフリーラジカルによる心筋細胞傷害を保護し²⁶、血小板の凝集抑制作用を持つことも報告されている²⁷。我々の知る限りでは、臨床的に硝酸薬耐性の予防効果がビタミンEで示されたのは、この研究が最初である。本研究は、ビタミンEの摂取は冠動脈疾患の二次予防に有用であるだけでなく、硝酸薬による治療を受けている冠動脈疾患患者での硝酸薬耐性の予防にも有用であることを示している。

3. 硝酸薬耐性予防に関するこれまでの研究

硝酸薬耐性は硝酸薬の治療効果の限界となるため、その予防に関しては最近多くの研究がなされてきた。アンジオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme: ACE)阻害薬が硝酸薬耐性の予防効果を有することが報告され²⁸⁻³¹、その一方で、ACE阻害薬による効果がなかったとの報告もある^{32,33}。硝酸薬耐性予防におけるこれらの報告による違いを説明することは困難であるが、アンジオテンシンII産生を抑制するために、比較的大量のACE阻害薬を必要とするのかもかもしれない。最近の報告によれば、高用量のenalaprilが硝酸薬耐性の予防を可能にすることが示された³⁴。また、硝酸薬を服用している患者では、循環血漿量の増加が認められ、そのことが血行動態の減弱の原因であるとの報告がある^{5,6,33}。しかし、利尿薬の併用が、硝酸薬耐性を予防出来なかった報告がある³⁵⁻³⁷。重要なことは、これまでの報告では、細胞内のcGMP産生を検

討しているものがないことである。したがって、硝酸薬耐性の予防における ACE 阻害薬や利尿薬の有用性を検討するために、更に情報を必要とするであろう。

4. 研究の限界

第1に我々は、硝酸薬耐性のビタミンEによる予防効果を健常成人と虚血性心疾患患者で検討した。血小板 cGMP レベルが健常成人と比べ、虚血性心疾患患者では有意に低値であった。しかし、この機序については、両群間での患者背景が異なるために、今回の研究では検討しなかった。

第2に、我々は、細胞内 cGMP 産生を血小板 cGMP で検討した。平滑筋細胞における cGMP 産生を *in vivo* で検討することは、生検以外に方法はない。Nitroglycerin は血小板の可溶性 guanylate cyclase を活性化し、血小板凝集の抑制効果を持つことは知られている^{38,39)}。血小板は可溶性 guanylate cyclase が有意に含有していることも知られている^{40,41)}。そのため、血小板

は臨床的に cGMP を検討するのに有用であると考えた。我々は、以前に血小板 cGMP が硝酸薬耐性の評価の指標として有用であることを報告した¹²⁾。

第3に、我々は、血管や血小板での superoxide やビタミンE レベルを測定出来なかった。しかし、Münzelらの報告⁹⁾をもとに考えると、ビタミンEによる superoxide の抑制効果が、その主要な効果であったと考えられる。

第4に、本研究では、cross-tolerance や他の抗酸化剤の効果については検討されなかった。これらについては更なる研究が必要であろう。

結 論

我々は、抗酸化剤ビタミンEの摂取が硝酸薬耐性の予防に有用であることを示した。硝酸薬耐性予防における抗酸化剤の有用性を明らかにする更なる研究が必要である。

要 約

細胞内 cyclic guanosine monophosphate (cGMP) の産生の低下が硝酸薬耐性の機序の一つであることは知られている。最近、*in vitro* での研究において耐性血管における superoxide の増加による guanylate cyclase 活性の低下が示された。そこで、我々は抗酸化剤であるビタミンEの硝酸薬耐性の予防効果につき検討した。

二重盲検・プラセボコントロール試験で、健常成人24例と虚血性心疾患患者24例を対象に、無作為にビタミンE (200 mg を3回/day、ビタミンE群) またはプラセボ (プラセボ群) を服用させた。Nitroglycerin に対する血管拡張反応は、nitroglycerin 0.3 mg 舌下前と5分後で、プレチスモグラフィによる前腕血流量の変化で評価し、同時に血小板内 cGMP レベルを測定した。前腕血流量の測定と採血は baseline (0日目)、ビタミンEあるいはプラセボ単独投与3日後 (3日目)、nitroglycerin テープ 10 mg/day の持続貼付にビタミンEまたはプラセボを併用投与3日後 (6日目) で行った。前腕血流増加率 (%FBF) と cGMP 増加率 (%cGMP) は、ビタミンE群とプラセボ群の比較において0日目 (%FBF: 健常成人では $32 \pm 12\%$ vs $31 \pm 11\%$, 虚血性心疾患患者では $35 \pm 15\%$ vs $34 \pm 15\%$; %cGMP: 健常成人では $38 \pm 10\%$ vs $35 \pm 11\%$, 虚血性心疾患患者では $37 \pm 11\%$ vs $38 \pm 12\%$) および3日目 (%FBF: 健常成人では $33 \pm 9\%$ vs $32 \pm 12\%$, 虚血性心疾患患者では $35 \pm 12\%$ vs $33 \pm 13\%$; %cGMP: 健常成人では $38 \pm 10\%$ vs $37 \pm 11\%$, 虚血性心疾患患者では $36 \pm 14\%$ vs $37 \pm 10\%$) で2群間に有意差を認めなかった。6日目での %FBF と %cGMP は、プラセボ群で有意に低下しており、ビタミンE群では維持されていた (%FBF: 健常成人では $30 \pm 12\%$ vs $17 \pm 9\%$, $p < 0.01$; 虚血性心疾患患者では $28 \pm 14\%$ vs $17 \pm 8\%$, $p < 0.01$; %cGMP: 健常成人では 35 ± 11 vs 8 ± 5 , $p < 0.01$; 虚血性心疾患患者では 38 ± 10 vs 12 ± 4 , $p < 0.01$)。

ビタミンEの摂取は、硝酸薬耐性の予防に有用であることが示された。

J Cardiol 1998; 31 (3): 173-181

文 献

- 1) Abram J: Tolerance to organic nitrates. *Circulation* 1986; **74**: 1181-1185
- 2) Packer M, Lee WH, Kessler PD, Gottlieb SS, Medina N, Yushak M: Prevention and reversal of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med* 1987; **317**: 799-804
- 3) Zimrin D, Reichel N, Bogin KT, Aurigemma G, Douglas P, Berko B, Fung H-L: Antianginal effects of intravenous nitroglycerin over 24 hours. *Circulation* 1988; **77**: 1376-1384
- 4) Fung H-L: Solving the mystery of nitrate tolerance: A new scent on the trail? *Circulation* 1993; **88**: 322-324
- 5) Parker JD, Farrell B, Fenton T, Cohan M, Parker JO: Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. *Circulation* 1991; **84**: 2336-2345
- 6) Dupuis J, Lalonde G, Lemieux R, Rouleau JL: Tolerance to intravenous nitroglycerin in patients with congestive heart failure: Role of increased intravascular volume, neurohumoral activation and lack of prevention with N-acetylcysteine. *J Am Coll Cardiol* 1990; **16**: 923-931
- 7) Waldman SA, Rapoport RM, Ginsburg R, Murad F: Desensitization to nitroglycerin in vascular smooth muscle from rat and human. *Biochem Pharmacol* 1986; **35**: 3525-3531
- 8) Schröder H, Leitman DC, Bennett BM, Waldman SA, Murad F: Glyceryl trinitrate-induced desensitization of guanylate cyclase in cultured rat lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; **245**: 413-418
- 9) Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG: Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance: A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 1995; **95**: 187-194
- 10) Münzel T, Giaid A, Kurz S, Stewart D, Harrison D: Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitrate tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5244-5248
- 11) Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G: Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 1991; **53** (Suppl): 314S-321S
- 12) Watanabe H, Kakihana M, Ohtsuka S, Enomoto T, Yasui K, Sugishita Y: Platelet cyclic GMP: A potentially useful indicator to evaluate the effects of nitroglycerin and nitrate tolerance. *Circulation* 1993; **88**: 29-36
- 13) Honma M, Satoh T, Takezawa J, Ui M: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small volume samples from blood and tissue. *Biochem Med* 1977; **18**: 257-273
- 14) Crandall LA, Leake CD, Loevenhart AS, Muehlberger CW: Acquired tolerance to and cross-tolerance between the nitrous and nitric acid esters and sodium nitrite in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1931; **41**: 103-119
- 15) Elkayam U, Aronow WS: Glyceryl trinitrate(nitroglycerin) ointment and isosorbide dinitrate: A review of their pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 1982; **23**: 165-194
- 16) Elkayam U: Tolerance to organic nitrates: Evidence, mechanisms, clinical relevance, and strategies for prevention. *Ann Intern Med* 1991; **114**: 667-677
- 17) Mangione NJ, Glasser SP: Phenomenon of nitrate tolerance. *Am Heart J* 1994; **128**: 137-146
- 18) Münzel T, Kurz S, Heitzer T, Harrison DG: New insights into mechanisms underlying nitrate tolerance. *Am J Cardiol* 1996; **77**: 24C-30C
- 19) Packer M: What causes tolerance to nitroglycerin?: The 100 year old mystery continues. *J Am Coll Cardiol* 1990; **16**: 932-935 (editorial comment)
- 20) Slack CJ, McLaughlin BE, Brien JF, Marks GS, Nakatsu K: Biotransformation of glyceryl trinitrate and isosorbide dinitrate in vascular smooth muscle made tolerant to organic nitrates. *Can J Physiol Pharmacol* 1989; **67**: 1381-1385
- 21) Axelsson KL, Andersson RGG: Tolerance towards nitroglycerin, induced in vivo, is correlated to a reduced cGMP response and an alteration in cGMP turnover. *Eur J Pharmacol* 1983; **88**: 71-79
- 22) Needleman P, Johnson EM: Mechanism of tolerance development to organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; **184**: 709-715
- 23) Feelisch M, Noack EA: Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* 1987; **139**: 19-30
- 24) Stephens NG, Parsons AJ, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ, Brown M: Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart AntiOxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; **347**: 781-786
- 25) Miwa K, Miyagi Y, Igawa A, Nakagawa K, Inoue H: Vitamin E deficiency in variant angina. *Circulation* 1996; **94**: 14-18
- 26) Klein HH, Pich S, Lindert S, Nebendahl K, Niedmann P, Kreuzer H: Combined treatment with vitamins E and C in experimental myocardial infarction in pigs. *Am Heart J* 1989; **118**: 667-673
- 27) Steiner M: Influence of vitamin E on platelet function in humans. *J Am Coll Nutr* 1991; **10**: 466-473
- 28) Katz RJ, Levy WS, Buff L, Wasserman AG: Prevention of nitrate tolerance with angiotensin converting enzyme inhibitors. *Circulation* 1991; **83**: 1271-1277
- 29) Muiesan ML, Boni E, Castellano M, Beschi M, Cefis G, Cerri B, Verdecchia P, Porcellati C, Pollavini G, Agabiti-Rosei E: Effects of transdermal nitroglycerin in combination with an ACE-inhibitor in patients with chronic stable angina pectoris. *Eur Heart J* 1993; **14**: 1701-1708
- 30) Pizzulli L, Hagendorff A, Zirbes M, Fehske W, Ewig S, Jung W, Lüderitz B: Influence of captopril on nitroglycerin-mediated vasodilation and development of nitrate tolerance in arterial and venous circulation. *Am Heart J* 1996; **131**: 342-349
- 31) Lawson DL, Nichols WW, Mehta P, Mehta JL: Captopril-induced reversal of nitroglycerin tolerance: Role of sulfhydryl group vs. ACE-inhibitory activity. *J*

- Cardiovasc Pharmacol 1991; **17**: 411-418
- 32) Dakak N, Makhoul N, Flugelman MY, Merdler A, Shehadeh H, Schneeweiss A, Halon DA, Lewis BS: Failure of captopril to prevent nitrate tolerance in congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990; **66**: 608-613
 - 33) Parker JD, Parker JO: Effect of therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor on hemodynamic and counterregulatory responses during continuous therapy with nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol* 1993; **21**: 1445-1453
 - 34) Münzel T, Bassenge E: Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with high-dose enalapril retards nitrate tolerance in large epicardial arteries and prevents rebound coronary vasoconstriction in vivo. *Circulation* 1996; **93**: 2052-2058
 - 35) Parker JD, Farrell BO, Fenton T, Parker J: Effects of diuretic therapy on the development of tolerance during continuous therapy with nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol* 1992; **20**: 616-622
 - 36) Elkayam U, Kulick D, McIntosh N, Roth A, Hseuh W, Rahimtoola SH: Incidence of early tolerance to hemodynamic effects of continuous infusion of nitroglycerin in patients with coronary artery disease and heart failure. *Circulation* 1987; **76**: 577-584
 - 37) Parker JD, Parker AB, Farrell B, Parker JO: Effects of diuretic therapy on the development of tolerance to nitroglycerin and exercise capacity in patients with chronic stable angina. *Circulation* 1996; **93**: 691-696
 - 38) Bowen R, Haslam RJ: Effects of nitrovasodilators on platelet cyclic nucleotide levels in rabbit blood: Role for cyclic AMP in synergistic inhibition of platelet function by SIN-1 and prostaglandin E1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; **17**: 424-433
 - 39) Pohl U, Busse R: EDRF increases cyclic GMP in platelets during passage through the coronary vascular bed. *Circ Res* 1989; **65**: 1798-1803
 - 40) Rapoport RM, Murad F: Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: Role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 1983; **9**: 281-296
 - 41) Glass DB, Frey W II, Carr DW, Goldberg ND: Stimulation of human platelet guanylate cyclase by fatty acids. *J Biol Chem* 1977; **252**: 1279-1285

抗平滑筋ミオシンモノクローナル抗体による実験的大動脈解離および腸梗塞の免疫シンチグラフィの開発

岩崎 俊弥
岩崎 勉
織内 昇*1
遠藤 啓吾*1
鈴木 亨*2
加藤 裕久*3
永井 良三*2

Radioimmunoimaging of Aortic Dissection and Acute Bowel Infarction With Radioiodinated Murine Anti-smooth Muscle Myosin Antibody

Toshiya IWASAKI, MD
Tsutomu IWASAKI, MD
Noboru ORIUCHI, MD*1
Keigo ENDOU, MD*1
Tohru SUZUKI, MD*2
Hirohisa KATOH, MD*3
Ryozo NAGAI, MD, FJCC*2

目 的

動脈硬化を基盤として発症する解離性大動脈瘤や腸間膜動脈血栓症は平滑筋組織の障害を特徴とする特異的な病像を呈する。これら平滑筋組織の疾病は急激で重篤な臨床経過をとり、迅速で正確な部位診断が適切な治療に不可欠であるが、現在まで平滑筋障害性疾患に特異的な検査法はなく、早期診断や部位診断に苦慮することが多い。我々は今までに、平滑筋ミオシンに対する特異的のモノクローナル抗体を用いたイムノアッセイ法を開発し、解離性大動脈瘤の新しい血清学的診断法として報告した。しかし、解離部の画像診断は依然困難で、新しい特異的画像診断法の開発が望まれている。今回我々は、放射線同位元素で標識した抗平滑筋ミオシン抗体を、実験的に大動脈解離あるいは腸梗塞を作製したラットに投与して、免疫シンチグラフィによる平滑筋障害部のイメージングを行い、平滑筋壊死に対する新しい画像診断法の開発を試みた。

対象と方法

1. 大動脈解離の画像化

体重 300 g の Wistar ラット(雄)に麻酔をかけ、コイル状のガイドワイヤーを大腿動脈より腹部大動脈まで挿入すると同時に開腹し、腹部大動脈を内腔のワイ

ヤーごと鉗子で圧迫しながらワイヤーを操作して、腹部大動脈血管壁に解離を作製した。創部を縫合後、ただちに大腿静脈より technetium-99m (^{99m}Tc) で標識した抗平滑筋ミオシン抗体あるいは非特異的抗体 74 Mbq を静注し、1 時間後および 6 時間後に、低エネルギー用高分解能コリメーターまたはピンホールコリメーターを装着した東芝製(東京)デジタルガンマカメラ GCA-901A により、正面 planar 像および single photon emission computed tomography (SPECT) 像を収集した。次いでラットを屠殺し、各臓器 1 g 当たりの ^{99m}Tc のカウントを測定して生体内分布を解析した。

2. 腸梗塞の画像化

ラットに麻酔をかけ開腹後、腸間膜動脈を剝離結紮し、2 時間後に同様に標識した抗体 74 Mbq を静注し、1 時間後および 6 時間後に、免疫シンチグラフィのイメージングと生体内分布の解析を行った。

結 果

生体内分布では、大動脈解離部および腸管梗塞部において、抗平滑筋抗体の特異的な集積が、6 時間後により顕著に認められた。免疫シンチグラフィでは planar 像、SPECT 像ともに 6 時間後で、大動脈解離部、腸管梗塞部が明瞭に描出された (Fig. 1-矢印)。

投稿中

群馬大学医学部 第二内科, *1核医学科: 〒371-0068 群馬県前橋市昭和町 3-39-22; *2東京大学医学部 第三内科, 東京; *3ヤマサ醤油診断薬部免疫研究室, 千葉

Address for correspondence: IWASAKI T, MD, The Second Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine, Showa-machi 3-39-22, Maebashi, Gunma 371-0068

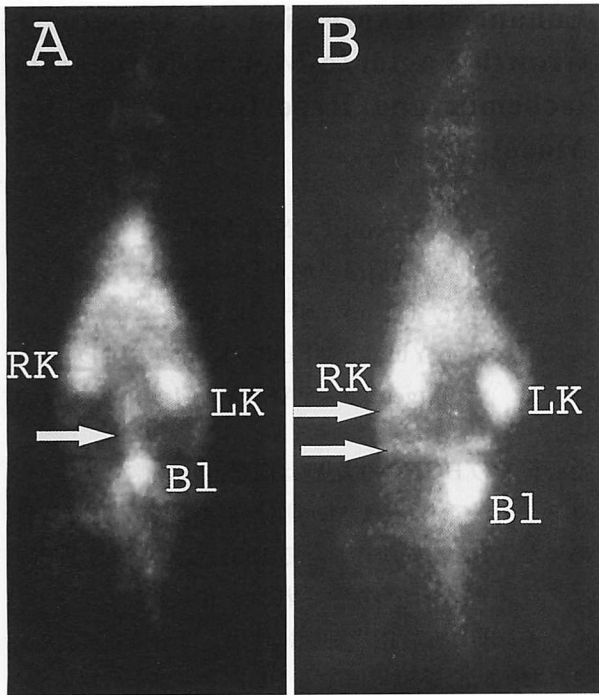


Fig. 1 Immunoscintigram with technetium-99m (^{99m}Tc)-SM-MAb at 6 hours postinjection of the tracer showing anterior whole-body images of rats with abdominal aortic dissection (A) or intestinal infarction (B)

Selective accumulation of ^{99m}Tc-anti-SM-MAb is clearly observed in the region of the aortic dissection (arrow in A) or infarcted intestine (arrows in B).

RK=right kidney; LK=left kidney; Bl=bladder.

結 論

抗平滑筋ミオシン抗体による免疫シンチグラフィにより、実験の大動脈解離および腸梗塞の特異的部位

診断が可能であった。抗平滑筋ミオシン抗体を用いた血管あるいは消化管壊死の免疫シンチグラフィは循環器疾患の新しい画像診断法として臨床応用出来ると考えられた。

* * *

Address for correspondence: MATSUI MORI A, MD, Department of Endovascular Medicine, Kyoto University, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan. Tel: 81-75-753-2222. Fax: 81-75-753-2222. E-mail: mori@med.kyoto-u.ac.jp

ラット心筋虚血再灌流モデルにおける肝細胞増殖因子およびその受容体 c-Met の発現の検討

尾野 亘
松森 昭
塩井 哲雄
古川 裕
篠山 重威

Enhanced Expression of Hepatocyte Growth Factor/c-Met by Myocardial Ischemia and Reperfusion in a Rat Model

Koh ONO, MD
Akira MATSUMORI, MD
Tetsuo SHIOI, MD
Yutaka FURUKAWA, MD
Shigetake SASAYAMA, MD, FJCC

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) は、培養肝細胞の増殖を促す因子として同定され、部分肝切除のラット血漿中より単離された。その後、この因子は組織再生・修復・血管新生作用を持つことが示された。心筋梗塞後の急性期において、循環血液中の HGF が上昇していることが当教室において明らかにされたが、その病態生理学的意義に関しては不明であった。そこでこの HGF の心筋梗塞における役割を検討するために、ラット心筋虚血再灌流モデルを用いて HGF とその受容体である c-Met の発現を検討した。

血漿中の HGF は再灌流後 1 時間より上昇し、3 時間後に最高値 $3.4 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$ を示した。8 μg の poly (A) + RNA を用いた Northern blot 法による心臓での HGF mRNA 発現は、虚血域において 24・48 時間後に約 3 倍と上昇し、120 時間後においても持続高値を示した。一方 c-met mRNA も HGF と平行して上昇を示した。HGF は肝切除モデルにおいて、肝以外の組織においてもその発現が上昇することが知られている。そこでこのモデルでも腎・肝・肺・脾臓での HGF mRNA 発現を検討した。すると、これらの遠隔臓器においても再灌流後 12 時間で HGF mRNA 発現が最高値となったが、c-met mRNA 発現に変化は認められなかった。このことから、HGF の上昇は生体の障害に対して反応性に上昇しているのではなく、虚血による障害部局所での働きを持つことが示唆された。更に酵素抗体法による免疫染色により、虚血再灌流刺激を行っ

た心臓での HGF 産生細胞は血管内皮細胞と浸潤マクロファージであり、c-Met 陽性細胞は血管内皮細胞であった。そこで局所における HGF は、血管内皮細胞、マクロファージから産生され、オートクライン・パラクライン的に血管内皮細胞に作用している可能性が示された。また、遠隔臓器でも HGF 産生が上昇することより、これがエンドクライン的にも作用しうるものと考えられた。

HGF 発現上昇が心臓内で虚血再灌流部にのみ認められたことは、この部位のみで働く産生刺激の存在を示唆する。HGF の 5' 上流域には IL-6 response element と nuclear factor-IL-6 の結合域があり、HGF 発現に対する炎症性サイトカインの関与が考えられる。実際にこれまでの報告ならびに当教室での検討によって虚血再灌流の際には虚血部において炎症性サイトカインの発現が著明に上昇することが確認されている。

一方、部分肝切除のモデルにおいて、切除後の残存肝から分泌され、遠隔臓器において HGF 産生を促す因子として injurin と呼ばれる 10-20 kDa の熱・酸に安定な蛋白が単離されている。このモデルにおいては injurin の存在について検討を行ってはいないが、この因子の存在が HGF と c-met の発現様式に差異を生じている可能性が考えられる。

リコンビナントヒト HGF が生体内で血管新生作用を持つことが示されており、我々の結果から、心筋梗塞の際には HGF が側副血行路を形成するための役割を担っていることが示唆される。更にヘパリンがヒト

掲載誌: Circulation 1997; 95: 2552-2558

京都大学大学院医学研究科 循環病態学: 〒 606-8397 京都市左京区聖護院川原町 54

Address for correspondence: MATSUMORI A, MD, Department of Cardiovascular Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kawara-cho 54, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8397

や動物モデルにおいて血管新生を促進することが知られているが、HGF はヘパリン結合性物質であるため

にこのヘパリン投与の際にも血管新生の役割を果たしていることが考えられる。

* * *

ヒト経皮的冠動脈形成術後傷害修復過程におけるアンジオテンシン変換酵素の発現亢進

Upregulation of Angiotensin-Converting Enzyme During the Healing Process After Injury at the Site of Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty in Humans

大石 充
上田真喜子*¹
楽木 宏実
岡村 篤徳
成子 隆彦*²
Anton E. Becker*²
日和田邦男*³
神谷 敦
神出 計
檜垣 実男
荻原 俊男

Mitsuru OHISHI, MD
Makiko UEDA, MD*¹
Hiromi RAKUGI, MD
Atsunori OKAMURA, MD
Takahiko NARUKO, MD*²
Anton E. BECKER, MD*²
Kunio HIWADA, MD*³
Atsushi KAMITANI, MD
Kei KAMIDE, MD
Jitsuo HIGAKI, MD
Toshio OGIHARA, MD

目 的

血管壁レニン・アンジオテンシン系は血管平滑筋の遊走・増殖を中心として、動脈硬化の進展に関与していることが *in vitro* や動物実験系で確認されている。しかし、ヒト冠動脈の動脈硬化進展における血管壁レニン・アンジオテンシン系の関与は明らかではない。そこで今回我々は、ヒト冠動脈の新生内膜・再生内皮形成におけるレニン・アンジオテンシン系の役割を明らかにするために、ヒト経皮的冠動脈形成術(percutaneous transluminal coronary angioplasty: PTCA)

後の反応性増殖内膜にみられるアンジオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme: ACE)の発現について、免疫組織化学的に検討した。

方 法

ヒト PTCA 後傷害部位 37 部位(28 剖検例)の冠動脈について検討した。PTCA 施行より死亡まで 5 日-19 ヶ月であり、全例において死亡より 5 日以内の ACE 阻害薬の服用はなかった。ACE 発現は LSAB 法により、抗ヒト ACE 抗体(ポリクローナル)を用いた。更に同一冠動脈および腎皮質において、他の抗 ACE

掲載誌: Circulation 1997; 96: 3328-3337

大阪大学医学部 老年病医学: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2; *¹大阪市立大学医学部 第一病理, 大阪: *²アムステルダム大学医学部 病理学, アムステルダム; *³愛媛大学医学部 第二内科, 愛媛

Address for correspondence: OHISHI M, MD, Department of Geriatric Medicine, Osaka University Faculty of Medicine, Yamadaoka 2-2, Suita, Osaka 565-0871

抗体(モノクローナル: 9B9)との比較, および ACE 活性の測定と PT-PCR による mRNA の検出を行い, この抗体の有効性を証明した.

構成細胞成分は抗平滑筋抗体(1A4), 抗 α -actin 抗体(HHF35, CGA7), 抗マクロファージ抗体(HAM56, EBM11), 抗内皮細胞抗体(von Willebrand factor)を用い同定し, 新生内膜の活動性の指標として, HLA-DR の免疫染色を行った. また ACE 陽性細胞の細胞構成成分の決定のために, ACE/1A4, ACE/EBM11, 1A4/EBM11 の免疫二重染色も併せて行った. ヒト動脈硬化巣の構成が一樣でないことより, 対象を傷害深達度と既存の動脈硬化巣により, 線維硬化性プラーク限局群(6例; 1-5ヵ月), 粥腫性プラーク限局群(15例; 5日-19ヵ月), 中膜傷害群(16例; 5日-17ヵ月)の3群に分類した.

更に線維硬化性プラーク群と中膜傷害群について, 新生内膜内の平滑筋細胞における ACE 陽性細胞の割合(抗 ACE 抗体陽性面積/抗平滑筋細胞抗体陽性面積)を MacSCOPE Ver 2.2 を用い解析した.

成 績

1. 線維硬化性プラーク限局群

PTCA 後 2ヵ月以内の症例では, 新生内膜は主に平滑筋細胞で構成されており, 新生内膜内の平滑筋細胞に ACE の発現が認められた. しかしながら, PTCA 後 5ヵ月の症例では, 新生内膜内に ACE の発現は認められなかった (Fig. 1).

2. 粥腫性プラーク限局群

PTCA 後 2ヵ月以内の症例では, 新生内膜部に集積した HAL-DR 陽性の活動性の高いマクロファージに一致して, ACE の高度発現が認められた. 新生内膜内に平滑筋細胞が認められる症例では, これらの平滑筋細胞に ACE が発現していた.

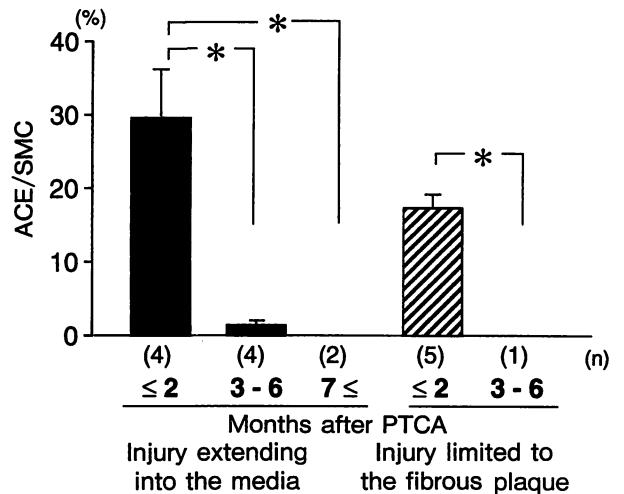


Fig. 1 Morphometric analysis of ACE expression in the neointima

ACE/SMC, ACE positive cell area expressed as a percentage of 1A4 positive SMC area.

* $p < 0.05$.

(n) = number of analyzed sample; SMC = smooth muscle cell.

3. 中膜傷害群

PTCA 後 2ヵ月以内の症例では, 新生内膜内の主たる構成成分である平滑筋細胞は HLA-DR 陽性を示し, ACE の高度発現が認められた. しかしながら, PTCA 後 3-6ヵ月の症例においては, 平滑筋細胞主体で構成された新生内膜の内腔側には再生内皮を認めた. このような時期では, 新生内膜内に ACE の発現は殆ど認められず, 再生内皮に ACE の発現が認められた (Fig. 1).

結 論

組織修復が盛んに行われている早期に ACE の高度発現が認められ, 修復が終了している晩期に認められないことは, ACE がアンジオテンシン II の平滑筋細胞遊走・増殖作用を介して, ヒト PTCA 後新生内膜形成において重要な役割を担っていることを示唆する.

*

*

*

遺伝子導入による心筋虚血耐性の向上に関する研究：熱性ショック蛋白 70 高度発現による心筋保護効果

鈴木 憲
澤 芳樹
金田 安史
市川 肇
白倉 良太
松田 暉

In Vivo Gene Transfection With Heat Shock Protein 70 Enhances Myocardial Tolerance to Ischemia-Reperfusion Injury in Rat

Ken SUZUKI, MD
Yoshiki SAWA, MD
Yasufumi KANEDA, MD
Hajime ICHIHARA, MD
Ryota SHIRAKURA, MD
Hikaru MATSUDA, MD, FJCC

背景と目的

近年心筋障害における内因性保護因子の関与が注目され、その心筋保護法への応用が期待されている。これらのうち、熱性ショック蛋白 70 (heat shock protein 70: HSP70) が虚血再灌流障害に対する保護効果を示すことは、数多くの報告で明らかにされてきたが、その誘導方法として、従来の熱性ショックや虚血性プレコンディショニングなどでは、発現の時期・量・期間や副作用などの点で、臨床応用に際し問題があった。またこれら従来の HSP70 誘導方法では、誘導時に HSP70 以外の内因性保護因子も同時に誘導されるため、HSP70 自身の保護効果の証明には不相当であった。一方、我々はこれまで困難であった心臓に対する *in vivo* 遺伝子導入法を開発し、その有効性を報告してきた。今回、我々は *in vivo* 遺伝子導入法を応用し、HSP70 の高度発現が心筋虚血耐性を向上しうるかを検討した。

方法と結果

心筋保護液にて心停止後摘出した成熟ラット心の冠動脈に、ヒト HSP70 の complementary DNA (cDNA) を含む 1 ml の hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome 液を注入し、同種同系ラットの腹部に移植した (H 群)。遺伝子を含まない HVJ-liposome 液を同様に注入した C 群、全く無処置の N 群、直腸温 42°C、20

分の熱性ストレスを与えた S 群の計 4 群 (各群とも 13 例) を作製した。H 群、S 群は移植後 4 日目に、S 群は熱性ショック 24 時間後に心を摘出し、以下の測定に供した。

HSP70 の発現を評価するため、2 種類のモノクローナル抗体を用いた Western blot と免疫組織染色を行った (各群 5 例)。ヒトの HSP70 にのみ反応するモノクローナル抗体を用いた Western blot では、H 群にのみ、HSP70 の明らかな高度発現が観察された。ヒトとラットの両方の HSP70 に反応するモノクローナル抗体を用いた Western blot では、N 群、C 群に比し S 群で高度の HSP70 の発現をみたが、H 群では S 群よりも更に高度の発現が確認された。免疫組織染色では、H 群の心筋細胞に広く HSP70 が高度発現していることが確認された。

Langendorff 灌流装置を用い、虚血 (37°C, 30 分)、再灌流 (37°C, 60 分) 障害に対する耐性を経時的に評価した (各群 8 例)。虚血再灌流後の left ventricular developed pressure, maximum dP/dt, minimum dP/dt 回復率は、S 群では C 群、N 群に比し有意に良好であったが、H 群では S 群よりも再灌流早期から更に良好な回復を示した。

冠血流回復率は H 群、S 群では C 群、N 群よりも良好で、creatine phosphokinase 漏出量も H 群、S 群では C 群、N 群よりも少なかった。

掲載誌: J Clin Invest 1997; 99: 1645-1650

大阪大学医学部 第一外科: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

Address for correspondence: SUZUKI K, MD, The First Department of Surgery, Osaka University Faculty of Medicine, Yamadaoka 2-2, Suita, Osaka 565-0871

ま と め

1) HVJ-liposome の冠動脈注入法を用いた *in vivo* 遺伝子導入により, ラット心全体に HSP70 が高度発現した.

2) HSP70 の高度発現した心筋では, 虚血再灌流障

害に対する耐性が向上した.

3) 以上の結果は, 高度に発現した HSP70 の心筋保護効果を証明するとともに, HSP70 の遺伝子導入を応用した心筋保護法の可能性を示唆するものであると考えられた.