

動脈全血グルタチオンのレドックス状態と急性心筋梗塞後の左室機能との関連

Relationship Between Redox State of Whole Arterial Blood Glutathione and Left Ventricular Function After Acute Myocardial Infarction

大澤 幸
都留 利恵
北條 行弘
水野 修
深澤 浩
三橋 武司
勝木 孝明
島田 和幸

Miyuki OHSAWA, MD
Rie TSURU, MD
Yukihiro HOJO, MD
Osamu MIZUNO, MD
Hiroshi FUKAZAWA, MD
Takeshi MITSUHASHI, MD
Takaaki KATSUKI, MD
Kazuyuki SHIMADA, MD,

Abstract

Objectives. To investigate the role of oxidative stress in left ventricular function after acute myocardial infarction.

Methods. We studied 41 patients with acute myocardial infarction (30 men and 11 women, mean age 61.7 ± 11.6 years) with Thrombolysis in Myocardial Infarction grade 3 recanalization of occluded coronary arteries within 12 hr after onset. Cardiac catheterization was performed at the time of admission and before discharge. Three markers for oxidative stress were measured: plasma lipid hydroperoxide, plasma creatol and whole arterial blood glutathione at the time of admission.

Results. Mean time from onset to recanalization was 5.2 ± 0.6 hr. The patients were divided into two groups according to the changes in left ventricular wall motion (LVWM); patients who showed improvement in LVWM and those without improvement. There were no significant differences in age, sex, coronary risk factors, severity of coronary artery disease, time from onset to recanalization or ejection fraction between two groups. Maximum creatine kinase and C-reactive protein levels in patients without LVWM improvement were significantly higher than in patients with improvement. Plasma levels of lipid hydroperoxide and creatol did not differ significantly between two groups. On the other hand, reduced glutathione/oxidized glutathione ratio in arterial blood in patients without LVWM improvement was significantly lower than in patients with LVWM improvement (69.8 ± 3.4 vs 85.5 ± 2.9 , $p < 0.05$).

Conclusions. Our results suggest that whole arterial blood glutathione is more oxidized in acute myocardial infarction patients without LVWM improvement than in patients with improvement. Redox state of arterial blood can be a predicting factor for left ventricular function after acute myocardial infarction.

J Cardiol 2004 Oct; 44(4): 141 - 146

Key Words

■ Myocardial infarction, pathophysiology
■ Ventricular function

■ Infarct size

■ Ischemia

自治医科大学 循環器内科: 〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1

Department of Cardiology, Jichi Medical School, Tochigi

Address for correspondence: HOJO Y, MD, Department of Cardiology, Jichi Medical School, Yakushiji 3311-1, Minamikawachi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498

Manuscript received April 16, 2004; revised July 22, 2004; accepted July 23, 2004

はじめに

生体は内因性および外因性に生じる活性酸素種 (reactive oxygen species) を分解するシステムを有している。しかしながら、生体の防御機構に何らかの破綻が生じると、酸化ストレスの亢進状態となる。酸化ストレスは加齢、発癌のほか、動脈硬化、高血圧、心不全などの心血管系疾患に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた¹⁻⁶⁾。

生体の活性酸素種生成状態の指標は数多く知られている。血清中の過酸化脂質は古典的な指標で脂質の過酸化状態を反映し動脈硬化の進展に関与するといわれている⁷⁾。クレアトールはクレアチニンと活性酸素種の中でも反応性の強いヒドロキシラジカルが反応して生成される物質で、生体内活性酸素種の生成の指標となる。従来、健康人の血清クレアトール濃度は低く測定が困難であったが、測定法の発達でより低い濃度での測定が可能となり、生体内酸化ストレスの鋭敏な指標の一つとなった^{8,9)}。さらに、酸化ストレスの防御機構として細胞には抗酸化物質グルタチオンが mM レベルの高濃度で存在し、細胞外の活性酸素種の消去や細胞内シグナル伝達分子の活性を制御している¹⁰⁻¹²⁾。グルタチオンはグルタミン、システイン、グリシンが結合したペプチドであり、細胞内の主要な SH 化合物である。酸化型グルタチオン (oxidized glutathione: GSSG) はグルタチオン還元酵素により還元型グルタチオン (reduced glutathione: GSH) となる。還元型・酸化型グルタチオンの量は細胞内で平衡状態を保っており、その比 (GSH/GSSG 比) は生体の酸化還元 (レドックス) 状態を反映する (Fig. 1)。しかしながら、組織における酸化型グルタチオン濃度は還元型の 1/100 と低くかつ不安定で、また還元型グルタチオンを十分に除去することができず、測定は困難であった。近年、新たな還元型グルタチオンスカベンジャーが開発され、より正確な酸化型グルタチオンの測定が可能になった。

今回我々は、これら酸化ストレスの指標と急性心筋梗塞患者の梗塞後の左室心筋傷害の関係を検討した。

対象と方法

1. 対象

発症 12 時間以内の急性心筋梗塞患者を対象とした。

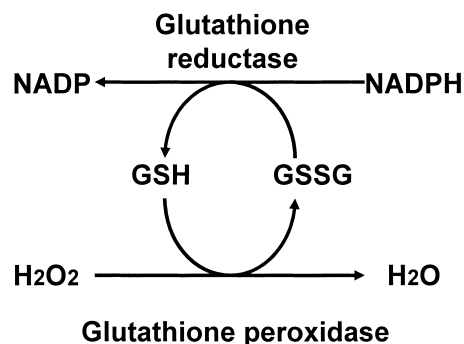


Fig. 1 Glutathione system

Glutathione, a tripeptide (γ-glutamylcysteinylglycine) is a major cellular antioxidant. Reduced glutathione (GSH) provides protons for glutathione peroxidase which catalyzes hydrogen peroxide to water. During this process, GSH becomes oxidized glutathione (GSSG). GSSG is reduced by glutathione reductase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). When cells are exposed to oxidative stress, the ratio of GSH/GSSG decreases as a consequence of GSSG accumulation.

すべての患者からインフォームド・コンセントをとり、入院直後および退院前に冠動脈造影および左室造影を施行した。局所麻酔下に大腿動静脈を穿刺しシースを挿入後、造影検査を行った。入院直後の冠動脈造影で再灌流が Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 分類 3 度未満の場合は経皮的冠動脈インターベンションを行い、全例で発症 12 時間以内に TIMI 分類 3 度の再灌流が得られた。対象から心臓カテーテル検査禁忌症例、悪性腫瘍合併患者および慢性腎不全患者は除外した。

2. 方法

患者来院直後に末梢動脈血を Na-EDTA により抗凝固採血した。血清中過酸化脂質はチオバルビツール酸反応法⁷⁾で、血清クレアトールは高速液体クロマトグラフィー法^{8,9)}で測定した。全血 GSH/GSSG 比は GSH/GSSG 測定キット (Oxis Research) のプロトコルに従い、酵素リサイクリング法を用いて測定した。左室造影の解析は面積・長さ法 (QLV-CMS, MEDIS) に基づき行った。

3. 統計解析

2 群間の平均値の差は対応のない Student の *t* 検定により、分布の差は ² 検定を用いて行った。 *p* < 0.05 を

Table 1 Clinical parameters in patients with acute myocardial infarction

	Improvement group (n = 22)	No improvement group (n = 19)
Age(yr)	62.3 ± 11.5	60.9 ± 11.9
Sex(male/female)	16/6	14/5
Coronary risk factors		
Hypertension	12(55)	11(58)
Diabetes mellitus	11(50)	10(53)
Hyperlipidemia	11(50)	10(53)
Smoking	15(68)	12(63)
Family history of coronary artery disease	5(23)	6(32)
Infarction site		
Anterior/inferior/lateral	9/9/4	13/5/1
Number of diseased vessels		
0/1/2/3	2/14/4/2	0/5/11/3
Time until recanalization(hr)	5.0 ± 0.85	5.5 ± 1.0
Left ventricular ejection fraction(%)	56.2 ± 4.0	50.1 ± 3.0
Maximum creatine kinase(IU/l)	1,174 ± 187	2,948 ± 792*
Maximum C-reactive protein(mg/dl)	7.5 ± 1.1	13.7 ± 1.5*

Continuous values are mean ± SEM.() %. * $p < 0.05$.

有意差の判定とした。

結 果

対象となった急性心筋梗塞患者は合計41例で、男性30例、女性11例、年齢範囲は38 - 84歳、平均年齢61.7 ± 11.6歳であった。発症から再灌流が得られるまでの平均時間は5.2 ± 0.6時間、最大クレアチンキナーゼ値は1,975 ± 399 IU/lであった。梗塞部位は前壁中隔梗塞22例、下壁梗塞14例、側壁梗塞5例で、0枝病変2例、1枝病変19例、2枝病変15例、3枝病変5例であった。左室駆出率は30.0 - 80.0%、平均左室駆出率は51.0 ± 2.6%であった。入院時の冠動脈造影上で22例には自然再灌流がみられた。3例は冠動脈造影のみ、1例は大動脈内バルーンパンピングのみを行った。残りのTIMI分類3度未満の症例には経皮的冠動脈インターベンションを行い(バルーン形成術のみ8例、方向性アテレクトミー2例、ステント留置27例)、全例にTIMI分類3度の再灌流が得られた。

入院直後および退院前の左室造影右前斜位像の壁運動解析を面積 - 長さ法で行った。左室を合計100分節に分割し、急性心筋梗塞責任部位の壁運動消失および壁運動低下を示す分節の合計数が経過中50%以上減少した患者を左室壁運動改善群と定義した。その結果、

対象は壁運動改善群(改善群, 22例)、壁運動非改善群(非改善群, 19例)の2群に分けられた。入院直後から退院前の左室造影までの時間は14.6 ± 3.0日であった。Table 1に示すように2群間で、年齢、性別、冠危険因子、梗塞部位、罹患冠動脈病枝数、発症から再灌流までの時間および左室駆出率に有意差はなかった。非改善群の最大クレアチンキナーゼ値は改善群に比べ有意に高値を示した(2,948 ± 792 vs 1,174 ± 187 IU/l, $p < 0.05$)。さらに非改善群の経過中の最大C反応性蛋白値は改善群に比べ有意に高値を示した(13.7 ± 1.5 vs 7.5 ± 1.1 mg/dl, $p < 0.05$)。2群間の血清過酸化脂質レベルとクレアトール値に有意差はなかった。全血グルタチオン測定の結果、全血総グルタチオンレベル、酸化型グルタチオンレベルは2群間で差が認められなかった。非改善群のGSH/GSSG比は改善群に比べ有意に低値を示し(69.8 ± 3.4 vs 85.5 ± 2.9, $p < 0.05$)、非改善群の全血は改善群と比べて、より酸化されていることが明らかとなった(Table 2)。

考 察

今回我々は血清中の酸化ストレス指標と急性心筋梗塞後の心筋傷害、左室機能との関係を検討した。血清過酸化脂質およびクレアトールのレベルは左室壁運動

Table 2 Markers for oxidative stress in patients with acute myocardial infarction

	Improvement group	No improvement group
Serum lipid peroxide(nmol/l)	2.60 ± 0.16	2.82 ± 0.11
Serum creatol(μg/dl)	1.20 ± 0.21	1.37 ± 0.30
Total glutathione(μmol/g protein)	5.39 ± 0.23	4.77 ± 0.21
GSH(μmol/g protein)	5.34 ± 0.23	4.72 ± 0.23
GSSG(μmol/g protein)	0.062 ± 0.003	0.070 ± 0.007
GSH/GSSG ratio	85.5 ± 2.9	69.8 ± 3.4*

Values are mean ± SEM. * $p < 0.05$.

Abbreviations as in Fig. 1.

改善群，非改善群間で差がなかった．一方，非改善群のGSH/GSSG比は改善群と比べ有意に低値を示し，この群の動脈血はより酸化されていることが示された．

細胞の主要な抗酸化ペプチドであるグルタチオンのレドックス状態は組織のレドックスを反映すると考えられている．今回の研究でレドックス状態の指標として古典的に確立され，簡便な方法であるため全血におけるグルタチオンの測定を行ったが，今後は異なる組織間でレドックス状態の違いがあるかどうかを検討する必要があると思われる．血清中グルタチオンは細胞内に比べ1/1,000低いμMオーダーで存在するため，今回の測定指標からその影響を無視してよいと思われたが，赤血球，白血球，血小板など細胞種間のレドックス状態は異なる可能性がある．我々の予備実験では全血のGSH/GSSG比はほぼ赤血球，単核球，多核白血球のGSH/GSSG比と一致することが示された(全血127 ± 6.7，赤血球123 ± 7.3，単核球127 ± 7.0，多核白血球124 ± 7.2)．人間において心筋のレドックス状態を測定することは困難であるが，動物実験で動脈全血のレドックス状態と心筋のレドックス状態が一致するか否かを確認する必要がある．

全血グルタチオンのレドックス状態が個体の組織のそれを反映するとすれば，左室壁運動非改善群の組織はより酸化されていることになる．細胞内にはさまざまなレドックス感受性のシグナル伝達分子が存在することが報告されている．その代表にはプロテインキナーゼCやSrcなどがある^{12,13})．一般にこれらキナーゼは還元されるとその活性は減弱し，酸化されると増強する．したがって，心筋のレドックス状態が酸化側に傾いていれば，細胞内のシグナル伝達レベルで心筋

梗塞後の組織傷害反応，炎症反応はより増強すると考えられる．今回の我々の結果はこの仮説を支持すると考えられる．蛋白分子の一部にはグルタチオン自身が結合することにより活性が変化することが報告されているものもある¹⁴)．改善群と非改善群間で還元型および酸化型グルタチオンの絶対量に差はなく，細胞内レドックスの指標である還元型と酸化型の比のみに有意差が認められた．組織傷害の反応には傷害発生時のレドックス状態が重要で，シグナル伝達分子が酸化・還元型グルタチオンの平衡状態で活性が制御されている可能性が示唆された．

今回の研究で血清過酸化脂質やクレアトールのレベルと急性心筋梗塞後の心筋傷害の間に明らかな関連はなかった．血中過酸化脂質やクレアトールが反映する酸化ストレスは従来動脈硬化の進行と関連すると考えられているが，慢性に進行する血管内皮の傷害や単球の活性化に主要な役割を果たし，急性心筋梗塞発症時の心筋傷害にはこれら細胞外の酸化ストレスよりもそのときの組織のレドックス状態が重要な役割を持つと思われた．

動物実験では細胞内蛋白のS=S結合を還元しSHにする作用を有するN-アセチルシステインが，急性心筋梗塞後の再灌流障害や左室機能を改善することが報告されている^{15,16})．臨床においてArstallら¹⁷)は急性心筋梗塞発症後，N-アセチルシステインを静脈内投与することで急性心筋梗塞の予後が改善することを報告している．N-アセチルシステインが臨床効果を得るためにはmMオーダーの血中濃度が必要であるといわれているが，このことは細胞内グルタチオンがその機序に関連することを示唆する．我々のデータと併せて考えると急性心筋梗塞発症時の組織グルタチオンの酸化・

還元状態が左室心筋傷害を規定する可能性がある。将来的にN-アセチルシステインや -リポ酸などのように組織のレドックス調節をターゲットとした治療薬品が開発される可能性もある。今後、心筋梗塞動物モデルで細胞内レドックスを変化させる薬剤投与による心筋傷害の変化を検討する必要があると思われた。

今回の研究では我々は入院時の採血と約2週間後の左室収縮能との関連を調べた。一部症例において発症10日後の全血GSH/GSSG比と左室心筋傷害の関連を同様に検討したが、有意な結果は得られず、発症直後のレドックス状態のみが左室心筋傷害を規定していると考えられたが、今後さらに症例を増やし確認する必要がある。また、本研究の限界として早期再灌流を行った症例のため最大クレアチンキナーゼ値が必ずし

も左室心筋傷害の程度を反映しているとは限らず、左室造影以外の他の画像診断による心筋傷害評価も組み合わせる必要があると思われた。今後はこれら酸化ストレス指標と急性心筋梗塞後の左室リモデリングの進行、再狭窄、不整脈の出現および心不全の発症など長期予後との関係を検討する必要があると考えられた。

結 論

急性心筋梗塞の責任冠動脈早期再灌流後において壁運動改善がみられない症例の動脈全血は、改善がみられた症例と比べより酸化されており、全血レドックス状態と急性心筋梗塞後の心筋傷害および左室機能との関連が示唆された。

要 約

目 的: 今回我々は急性心筋梗塞患者において酸化ストレスと梗塞後の心筋傷害、左室機能との関係を検討した。

方 法: 急性心筋梗塞患者41例(男性30例,女性11例,平均年齢 61.7 ± 11.6 歳)を対象とした。発症直後に冠動脈造影を行い、必要症例には冠動脈形成術を施行し、全例で発症12時間以内にThrombolysis in Myocardial Infarction分類3度の再灌流を得たことを確認した。

結 果: 発症から再灌流が得られるまでの時間は 5.2 ± 0.6 時間であった。対象を入院後および退院前の左室造影所見により壁運動改善群と非改善群に分けた。2群間で年齢、性別、冠危険因子、冠動脈罹患枝数、再灌流が得られるまでの時間および左室駆出率に差はなかった。非改善群は改善群と比べ最大クレアチンキナーゼ値と最大C反応性蛋白値は有意に高値を示し、より強い心筋傷害があることが示唆された。改善群と非改善群の血清過酸化脂質、血清クレアチンレベルには差はみられなかった。一方、酸化還元(レドックス)状態を示す全血還元型グルタチオン/酸化型グルタチオン比において、非改善群は改善群と比べ有意に低値を示し(69.8 ± 3.4 vs 85.5 ± 2.9 , $p < 0.05$)、動脈全血はより酸化されていることが示された。

結 論: 急性心筋梗塞の責任冠動脈早期再灌流後において壁運動改善がみられない症例の動脈全血は、改善がみられた症例と比べより酸化されており、全血レドックス状態と急性心筋梗塞後の心筋傷害および左室機能との関連が示唆された。

J Cardiol 2004 Oct; 44(4): 141 - 146

文 献

- 1) Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY, Ma YS: Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci* 1998; **854**: 155 - 170
- 2) Loft S, Poulsen HE: Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 1996; **74**: 297 - 312
- 3) Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T: Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000; **18**: 655 - 673
- 4) Kojda G, Harrison D: Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; **43**: 562 - 571
- 5) Hoeschen RJ: Oxidative stress and cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 1997; **13**: 1021 - 1025
- 6) Berk BC: Redox signals that regulate the vascular response to injury. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 810 - 817
- 7) Stringer MD, Gorog PG, Freeman A, Kakkar VV: Lipid peroxides and atherosclerosis. *BMJ* 1989; **298**: 281 - 284
- 8) Nakamura K, Ienaga K, Nakano K, Nakai M, Nakamura Y,

- Hasegawa G, Sawada M, Kondo M, Mori H, Kanatsuna T: Diabetic renal failure and serum accumulation of the creatinine oxidative metabolites creatol and methylguanidine. *Nephron* 1996; **73**: 520 - 525
- 9) Aoyagi K, Nagase S, Koyama A, Narita M, Tojo S: Products of creatinine with hydroxyl radical as a useful marker of oxidative stress in vivo. *Methods Mol Biol* 1998; **108**: 157 - 164
- 10) Schafer FQ, Buettner GR: Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; **30**: 1191 - 1212
- 11) Burdon RH: Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995; **18**: 775 - 794
- 12) Gopalakrishna R, Jaken S: Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**: 1349 - 1361
- 13) Akhand AA, Pu M, Senga T, Kato M, Suzuki H, Miyata T, Hamaguchi M, Nakashima I: Nitric oxide controls Src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25821 - 25826
- 14) Klatt P, Lamas S: Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 4928 - 4944
- 15) Tang LD, Sun JZ, Wu K, Sun CP, Tang ZM: Beneficial effects of N-acetylcysteine and cysteine in stunned myocardium in perfused rat heart. *Br J Pharmacol* 1991; **102**: 601 - 606
- 16) Forman MB, Puett DW, Cates CU, McCroskey DE, Beckman JK, Greene HL, Virmani R: Glutathione redox pathway and reperfusion injury: Effect of N-acetylcysteine on infarct size and ventricular function. *Circulation* 1988; **78**: 202 - 213
- 17) Arstall MA, Yang J, Stafford I, Betts WH, Horowitz JD: N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction: Safety and biochemical effects. *Circulation* 1995; **92**: 2855 - 2862