

難治性心不全に対する PDE5 阻害剤の効果を検証する無作為化比較試験の計画に関する研究  
分担研究者 井手 友美（九州大学病院 冠動脈疾患治療部）

## 研究要旨

ホスホジエステラーゼ 5 阻害剤であるシルデナフィルは、既存の治療法では十分な効果が得られない、重症心不全患者における血管内皮機能、および運動耐容能を改善することが示唆される。

### A. 研究目的

- (ア) ホスホジエステラーゼ 5 阻害剤であるシルデナフィルが、心不全患者の内皮機能および運動耐容能改善効果を有するか。
- (イ) 心不全モデルマウスにおいて、その血行動態および予後の改善効果について直接的な心臓保護効果を有するか。

以上の 2 点について、検討を行うことを目的とした。

### B. 研究方法

- ① 心不全患者 4 名にシルデナフィル内服開始後、1 ヶ月、3 ヶ月後に、超音波診断装置を用いて血管内皮機能を測定した。具体的には、下腕部を 5 分間駆血した後に駆血を解除し、血流依存性血管拡張反応を発生させ、最大血管系を測定した。運動耐容能は、心肺運動負荷テストにて行い、評価項目として最高酸素摂取量、 $VE/VCO_2$  スロープ、 $O_2$  パルスを用いた。
- ② 心不全モデルマウスは、CD-1 マウスの左冠動脈を結紮し、4 週間飼育し、作成した。手術直後より、シルデナフィル (100mg/kg/day) を混餌した群と通常餌群とにわけ、4 週間経過した時点での生存率、血行動態、心エコーによる心機能、臓器重量について sham 手術群とあわせた 3 群で検討した。

(倫理面への配慮)

九州大学倫理委員会においてプロトコールを審議し、承認された。試験実施に当たっては、省令 GCP「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成九年三月二十七日)(厚生省令第二十八号)」を参考とし、「臨床研究に関する倫理指針(平成 15 年厚生労働省告示第 255 号)」を遵守した。本学では臨床試験に参画する医師に資格試験による認定制度を課している。医療機能評価機構により九州大学病院は H19 年度

に認定された。

### C. 研究結果

① 心不全患者の血管内皮機能は低下していることが報告されており、血流依存性血管拡張反応は、非侵襲的に血管内皮機能を測定することが可能

である。心不全患者は 4 名と少数ではあったが、血流依存性血管拡張反応は全例で 12 週の経過の中で改善を示した。

(右図)

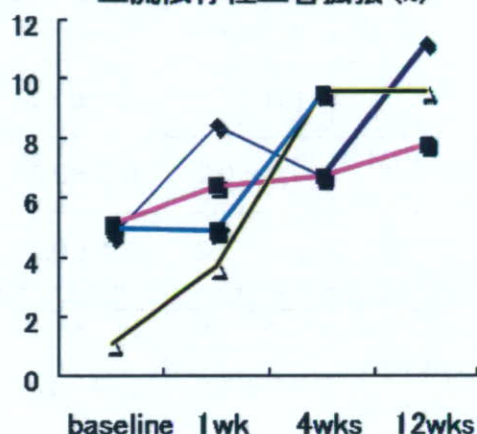
また、一般に心不全患者の運動耐容能は、健常成人と比して低下している。シルデナフィル投与開始前の最高酸素摂取量で推定する運動耐容能は 4 名とも低下を示していた。

シルデナフィル投与によって 4 名中 3 名が改善を示し、1 名は不変であった。(右図)

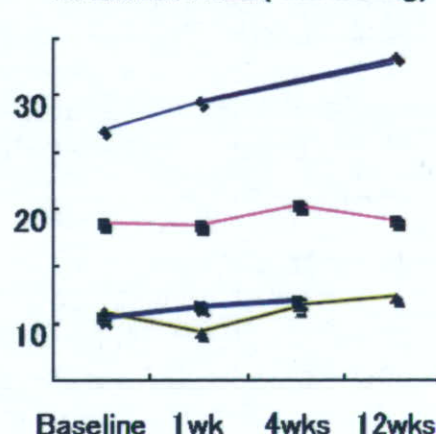
② 心不全モ

デルマウスに、心筋梗塞作成直後より、シルデナフィルを混餌投与した。28 日目での生存率は、vehicle 群およびシルデナフィル投与群でも

血流依存性血管拡張 (%)



最高酸素摂取量 (mL/min/kg)



に 61%の生存率を示し、有意差を認めなかった。さらに、血行動態、心エコーでの心不全評価においても、両者に差は認められなかった。

\*p<0.05 vs sham group

BW: body weight

HW: heart weight

LVDd: left ventricular dimension at end-diastole

FS: Fractional Shortening

LVEDP: left ventricular end-diastolic pressure

HR: heart rate

#### D. 考察

4名という少数ではあるものの、きわめて治療に難渋している重症心不全患者に対するシルデナフィル投与は、血管内皮機能を改善し、

	Sham (n=7)	MI-Vehicle (n=21)	MI-sildenafil (n=22)
BW (g)	40.8 ± 0.4	39.4 ± 0.5	40.4 ± 0.5
HW (mg)	181 ± 7.3	220 ± 7.3*	225 ± 6.0*
LVDd (mm)	4.0 ± 0.2	6.0 ± 0.2*	6.5 ± 0.2*
LVDs (mm)	2.3 ± 0.2	5.4 ± 0.2*	6.1 ± 0.2*
FS (%)	37.6 ± 1.6	10.9 ± 1.1*	6.6 ± 1.0*
LVEDP (mmHg)	1.0 ± 1.0	13.4 ± 2.4*	15.0 ± 1.9*
HR (/min)	480 ± 22	459 ± 12	458 ± 8

運動耐容能を向上させることが示唆される。また一方で、マウスにおける心筋梗塞後リモデリングを示す心不全モデルにおいては、心筋の重量、心機能に影響を及ぼさなかった。シルデナフィルが有する心不全治療効果は、心筋肥大やリモデリングといったシグナリングに関与するのではなく、別の作用機序の存在が示唆される。

#### E. 結論

シルデナフィルの長期投与によって、重症心不全患者の血管内皮機能が改善し、運動耐容能の向上が認められた。シルデナフィルによるPDE-5阻害は新たな心不全治療薬として有用である可能性が示唆された。

特になし

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

学会発表

1. 福岡循環器フォーラム 2007.10.18  
慢性心不全における心臓リハビリテーションの役割  
井手友美、他
2. 第13回心臓リハビリテーション学会  
2007.7.13-14 東京 都市センターホテル  
心不全患者に対する短期心臓リハビリテーション施行による効果の検討  
藤吉 大輔、井手 友美、他
3. 心臓リハビリテーションに参加した心不全患者における筋力は低下している  
河野 一郎、井手 友美、他

H. 知的財産権の出願・取得状況（予定を含む。）  
該当なし。

難治性心不全に対する PDE5 阻害剤の効果を検証する無作為化比較試験の計画に関する研究

分担研究者 砂川 賢二（九州大学大学院医学研究院）

## 研究要旨

重症心不全に対する最終的治療法である心移植の実施率が本邦では極めて低い。そのために亡くなる症例が多数存在し、より有効な薬物療法開発が急務である。PDE5 阻害剤のシルデナフィルは肺高血圧合併の重症心不全において有効と報告されている。本研究ではパイロット試験を実施し、わが国においてシルデナフィルの重症心不全に対する有効性および安全性を確認する無作為化比較試験の準備を行った。又、臨床試験の基盤整備を行った。

標準治療によっても十分な治療効果の上がない重症心不全患者に対しシルデナフィルの①単回投与試験、②反復投与試験、③長期投与試験の順に行った。①50mg 単回投与では過度の血圧低下や肺動脈楔入圧の上昇を含め有害事象は認められなかった。②反復投与試験：一ヶ月後の peak VO<sub>2</sub>、血流依存性血管拡張能、BNP に改善を認めた。本薬は心移植が適応となるような最重症の心不全症例にも安全に使用でき、上記の如く有効性が認められた。基盤的側面としては専任の CRC を雇用し、臨床試験医とともに育成、平成 20 年度にかけて高度先端医療センターと共同で基盤を整備している。

## A. 研究目的

本邦では心移植適応症例の発生に比し同実施率が極めて低く左室補助装置が植込まれた最重症例でも平均 735 日の待機期間がある。適応がありながら亡くなる症例が多数存在し、より有効な薬物療法開発が急務である。PDE5 阻害剤のシルデナフィルは肺動脈性肺高血圧症に欧米で承認され、肺高血圧合併の重症心不全においても有効と報告されている。本研究では、わが国においてシルデナフィルの重症心不全に対する有効性および安全性を確認する無作為化比較試験を実施するために、パイロット試験の実施および基盤整備を行った。検出力、代理エンドポイント、症例数、用量設定などの比較試験の統計設計に必要な情報の収集、及び基本的な安全性の確認を行う。同時に大規模心不全臨床試験実施の体制整備を行う。

## B. 研究方法

### 【パイロット試験】

① 単回投与試験。認容性の確認を主目的とする。ACEI・ARB、β遮断剤など標準的な治療が最適化されているにも拘らずコントロール不良である難治性心不全患者を対象とする。本試験に同意が得られた症例について、CCU 病棟に入院の上、スワングアンツカテーテルを留置しベースラインの血行動態指標を測定。血圧、心拍数などの監視の下、本薬 25mg 及び 50mg を単回経口投与して、血行動態指標を 1、2、4 時間後に測定する。同時に過度の血圧低下などの問題となる副作用がないかを

確認する。

② 反復投与試験。①で特に問題が無かった症例に対し、75mg 3x を 12 週間投与する反復投与試験に移行する。投与前と 12 週後に右心カテーテル検査、心肺運動負荷試験、6 分間歩行、SAS、QOL スコア、心エコー検査、血流依存性血管拡張能 (FMD) 測定、BNP 測定、酸化ストレス指標の採血などを行う。

③ 長期投与試験。②の終了時において有効であるか、その可能性が高い患者で安全性に問題が無い症例では 6 ヶ月間の長期投与試験に移行する。3 ヶ月後、6 ヶ月後に上記 12 週後の検査項目を実施する。

（倫理面への配慮）

九州大学倫理委員会においてプロトコールを審議し、承認された。試験実施に当たっては、省令 GCP「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成九年三月二十七日)(厚生省令第二十八号)」を参考とし、「臨床研究に関する倫理指針(平成 15 年厚生労働省告示第 255 号)」を遵守した。本学では臨床試験に参画する医師に資格試験による認定制度を課している。医療機能評価機構により九州大学病院は H19 年度に認定された。

## C. 研究結果

【パイロット試験】報告書提出時点で 4 例をエントリーしている。左室駆出率 25±8%。①右心カテ観察下の 50mg 単回投与では収縮期血圧は 86.8±5.9 から Tmax である一時間後に 86.8

±7.4 mmHg と殆ど変化を認めなかった。作用機序から懸念された肺動脈楔入圧の上昇を含め有害事象は認められなかった。②全例反復投与に移行した。一ヶ月後の血流依存性血管拡張能 (FMD,  $3.6 \pm 2.2 \rightarrow 7.7 \pm 1.7\%$ )、最高酸素摂取量 (peak  $\text{VO}_2$ ,  $17 \pm 8 \rightarrow 19 \pm 10 \text{ ml/min/kg}$ )、BNP ( $876 \pm 849 \rightarrow 532 \pm 387 \text{ pg/ml}$ ) に改善を認めている。腎機能の指標である Cystatin C はばらつきが大きいものの低下傾向を示している。1 例で服薬当初に頭痛を認めたがその他には副作用を認めていない。頭痛を訴えた症例も継続可能であった。本薬は心移植が適応となるような最重症の心不全症例にも安全に使用でき、上記の如く有効性も認められている。

#### 【基盤整備】

専任の CRC と心エコー技師を雇用した。又九州大学高度先端医療センターと共同で新規に雇用した CRC、データマネージャーと共に教育を行っている。症例登録センターとして九州臨床試験支援センターを選定した。

#### D. 考察

Pilot 試験の症例数が現状ではやや少ない。まず、本邦で初めて心不全に対する投与となるため非常に慎重に症例を選定した。1 年間に十数例が候補に上がったが既存治療を最適化することでコントロールが付いてしまったり、逆に最重症で何とか病態を安定化させエントリーしようと努力したものの増悪して左室補助装置が装着されたり、ホスピスケアに移行した症

例などが多く、結果的に 4 例の登録に留まった。当初の数ヶ月間は症例の選定において慎重になり過ぎたきらいがあるので安全性について確信が得られた今後は登録が加速するものと考ええる。

本邦においては心不全への応用は初の試みである。血管拡張能、運動耐容能の改善などは欧米でも報告されている通りではあるが、その結果として静注薬依存であった症例などにおいて QOL が改善し退院するなどの効果は、心移植が一般的な医療である欧米においては報告されていない。腎臓における Na 利尿ホルモンとの相互作用によると思われる腎機能の改善作用も欧米においてはまだ報告されていない。

#### E. 結論

今年度のパイロット試験によって来年度以降の無作為化試験実施の準備が整った。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

該当なし。

#### H. 知的財産権の出願・取得状況（予定を含む。）

該当なし。

無作為化比較試験による難治性心不全に対する PDE5 阻害剤の効果を検証する研究  
試験デザインの統計学的研究

分担研究者 岸本 淳司(九州大学)

要旨

難治性心不全に対する PDE5 阻害剤の効果を検証する試験を実施するにあたり、その試験計画と評価法として通常行われない方法を提案する。試験計画としては、ランダムに 2 群に分けるが、実薬群以外的一方をプラセボ群とせず、遅れて実薬治療を始める群とする。主要評価項目は FMD, VO2, BNP, Ccr を判別関数の方法で合成し、Hotelling の  $T^2$  統計量で検定を行う。

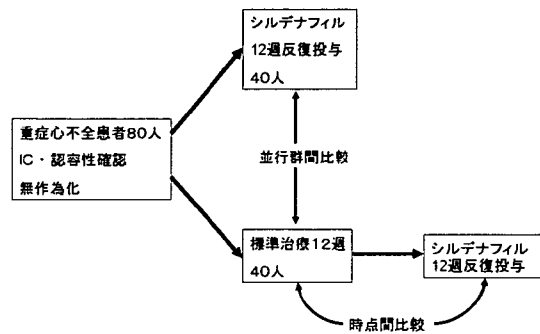
はじめに

難治性心不全に対するシルデナフィルの効果を検証する臨床研究を計画するにあたり、試験デザインと主要評価項目に関してやや特殊な方法を採用した。本稿ではその統計学的な事項について考察する。

遅延開始二群比較

「検証」を目的とする臨床試験の標準的方法はランダム割付を伴う並行群間比較である。より情報の少ない「探索」段階ではシングルアームのデータを用いて処置前後の時点比較を行うことが多い。並行群間比較に対する時点比較の最大の利点は、個人差を調整することができるため処置の効果を鋭敏に検出できる点にある。しかし、ナチュラルコースとしての変化と処置の効果とを分離できない点が難点となる。並行群間比較ではこの難点がない代わりに、多くの症例数を必要とする。効果が短期で評価できてしかも持ち越し効果がないと仮定できる場合にはクロスオーバー計画もよく用いられる。本試験の対象である重症心不全の場合、薬剤を投与して治療効果が出ているのが明らかな場合でも第二期に移ると投薬を中止しなければならないことは倫理的に問題があると思われる。

遅延開始二群比較は、検証と探索の中間的段階に適した方法である。クロスオーバー法に類似しているが、一方のアームで処置の変更を行わない。今回の試験では、80 人の症例数を目標として集め、これを 2 群にランダム化する。一方の群ではシルデナフィンを 12 週反復投与し、一方の群では標準治療を行う。標準治療を行った群では、12 週後シルデナフィンを 12 週反復投与に移行する。



このデザインで、最初の 12 週は普通の並行群間試験として扱うことができる。また、当初標準治療を行った群には時点間比較を行うこともできる。さらに長期予後の観察のためには症例全体を用いることができる。

このデザインが有効に働くためには、当初の並行群間比較の時期に有効性が現れる必要がある。本試験のパイロットスタディ(4 例)では 4 週で効果が現れているので、この基準は満たしていると思われる。長期安全性の比較評価ができないことも欠点であるが、シルデナフィンは勃起不全や肺高血圧症により使用経験が確立しているので、問題にならない。

遅延開始二群比較法ではすべての患者に投薬治療が行われるので、インフォームドコンセントがとりやすいと思われる。また、一度投薬を始めて効果が現れた患者に対し投薬を中止する必要がないので倫理的に問題が少ない。ランダム化比較試験としての厳密さとシングルアーム観察研究としての簡便さ・効率を併せ持つ本法は今回の研究課題に適していると判断される。

判別関数法と Hotelling の  $T^2$  統計量

本試験のエンドポイントとして FMD, VO2, BNP, Ccr 等が候補となる。シルデナフィンは心不全治療薬としての経験が少ないので、事前に主要評価項目を定める根拠がない。そこで

Fisher (1936) の判別関数法を利用して最適な合成変数を事後的に作成する。判別関数では  $y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4$  という形式で合成変数を作り、二群の分離を最大にするという基準で定数  $\beta_1 \sim \beta_4$  を定める。

多変量で測定された二群の平均ベクトルの差の検定には Hotelling (1931) の  $T^2$  統計量を用いる。これは、単変量の場合の  $t$  検定を多変量に拡張したものである。これをさらに多群の場合に拡張すると多変量分散分析 (MANOVA) となり、Wilks の  $\lambda$  (ラムダ) 統計量などの検定方法が知られている。

Hotelling の  $T^2$  検定では、単変量解析の繰り返しでは検出できなかった差を検出できる可能性を持つという意味で優れた方法である。しかし、最も分離がよくなる合成変数の定数を事後的に定めるという点から、純粋に「検証」的な研究には適さない。本試験は経験の少ない分野に挑戦するものなので許容できるものと考えている。

主要評価項目の作り方が研究中は不明であるという点から、Hotelling の  $T^2$  統計量での評価は実質的に PROBE (Prospective, Randomized, Open, Blinded-Endpoint) 試験になっている。しかも、通常の PROBE 試験ではエンドポイントの評価のみがブラインドになっているのに対し、Hotelling の  $T^2$  統計量なら試験に参加している医師・患者に対してもオープン試験のままですべて主要評価項目を秘匿することができる。

### 症例数設計

本試験の症例予定数は、集積能力を勘案して両群合計 80 人とされた。Hotelling の  $T^2$  統計量を前提として検出力解析するためには変数間の相関の情報が必要であるが、パイロットスタディの 4 例では相関係数の安定した推定が不可能である。そこで FMD, VO2, BNP, Ccr の変数ごとに別々に検出力解析を行った。

パイロットスタディで得られた平均・標準偏差をそのまま真の値として検出力解析 ( $\alpha = 0.05, 1 - \beta = 0.8$ ) を行った結果を示す。

### 平行群間比較について

指標	検出力0.8を達成する例数	各群20例のときの検出力
FMD	8	> .999
VO2	410	.137
BNP	268	.185
Ccr	130	.335

### 時点間比較について

指標	検出力0.8を達成する例数	20例のときの検出力
FMD	6	> .999
VO2	12	.966
BNP	24	.734
Ccr	49	.416

すなわち、定められた症例数で試験を行うと、並行群間比較については FMD のみが有望な指標で、時点間比較については Ccr 以外は有望である。いずれも、Hotelling の  $T^2$  統計量で評価するならば問題ない。

### おわりに

本試験で採用された遅延開始二群比較・Hotelling の  $T^2$  統計量は、情報の少ない状況でランダム化対照試験の厳密さを保ちつつ、IC 取得・PROBE 試験の実施を容易にする。本試験の結果が有益なエビデンスの創出につながることを期待する。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
井手 友美 砂川 賢二	ミトコンドリアと 老化	Angiotensin Research	In press		2008
井手 友美	In vivo 心臓における 活性酸素の動態 酸化 ストレスと循環器疾 患	CARDIAC PRACTICE	18(4)	p333-336	2007

トピックス

## *In vivo*心臓における 活性酸素の動態

九州大学大学院医学研究院循環器内科

井手 友美  
Ide, Tomomi

*In vivo* redox assessment in the heart

KEY WORDS 酸化ストレス 活性酸素 心筋細胞

活性酸素/isoprostane/*in vivo* ESR/  
心筋梗塞/リモデリング

生物が陸上で生活し始めてからの歴史は、酸素を取り込み、ATP (adenosine triphosphate)を産生できることに始まった。生体内は常に酸素に暴露され、その副産物としていわゆる活性酸素が産生される。近年、活性酸素が加齢や種々の病態に深くかかわっていることが明らかとなり、その抗酸化の重要性が認識されている。しかし、生体内は常に酸化還元が生じる場であり、酸化還元そのものが細胞内シグナリングを誘導し、種々の遺伝子発現にかかわっていることを考慮すると、生体内のレドックス反応は、活性酸素=悪玉という簡単な図式ではなく、常に生体内で生じている酸化・還元反応を介した生体制御を意味する。したがって、その評価は生体の状態に大きく影響され、*in vivo*でのレドックス反応を推し

量することは、きわめて重要である。

以前より、活性酸素と慢性疾患については、多くその病態形成に活性酸素が重要な役割を果たしていることが取り上げられてきた。循環器領域でも、特に虚血再環流や、動脈硬化では、活性酸素の産生メカニズムやその役割が多くの動物実験や臨床研究で明らかにされてきた。心筋細胞も種々の刺激によって、自ら活性酸素を産生していることが知られており、動物実験では、抗酸化ストレス療法が心筋リモデリングを抑制することは、今や広く受け入れられている。しかしながら、一方で、大規模な抗酸化薬による臨床研究からは、抗酸化薬の投与が心不全を含む心血管病の予防に役立つという結論はいまだ得られておらず、むしろ有害であるという報告さえ存在する。本項では、



*in vivo*における活性酸素の動態について考察する。

### *In vivo*における 活性酸素の測定

#### 1. 全身での活性酸素の測定

*in vivo*における活性酸素の測定の中で、最もよく用いられている方法は、生体試料つまり血液、尿に含まれる活性酸素反応物の定量である。特に、isoprostaneは、細胞膜やリポ蛋白に含まれるリン脂質がフリーラジカルにより酸化されて形成されるプロスタグランジン様の化合物で、喫煙、糖尿病、動脈硬化との関連性が報告されている。なかでも、 $iPF_2\alpha-III$  (8-isoprostane  $F_2\alpha$ )は、尿中でさらなる代謝を受けずにきわめて安定に存在する。GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry)によって測定するisoprostaneは、その全身性酸化ストレスの評価に関して1990年にMorrowらが報告して以降、“ゴールドスタンダード”としての位置づけとなった<sup>1)</sup>。しかしながら、広く測定されているELISA (enzyme linked immunosorbent assay)法による $iPF_2\alpha-III$ の測定は簡便ではあるが、その前処置によって結果が大きく左右され、internal controlがおけないことから測定間にばらつきがみられ、信頼性が低いことが問題点として挙げられる。また、 $iPF_2\alpha-III$ は、isoprostaneの中でも、特にメジャーなものではな

く、8, 12- $iPF_2\alpha-IV$ などの、さらに重要なisoprostaneを測定すべきであるとの意見もあるが、これらが測定できる施設は世界でも一部に限られているのが現状である。

では、このisoprostaneを用いて評価した、心不全患者における全身性酸化ストレスはいかがであろうか。Liらの複数のisoprostaneを測定した報告によると、家族性高脂血症患者の尿中isoprostaneは、健常群と比較して優位に高値を示したが、心不全においては、限られたピークでのみ上昇していることが示され、心不全患者の尿中酸化ストレスマーカーの上昇が少なくとも顕著ではないことが示された<sup>2)</sup>。

#### 2. 心臓における活性酸素産生の測定

一方、心嚢液中の $iPF_2\alpha-III$ は、

NYHA (New York Heart Association)の重症度に従って増加すること、種々の動物実験から、心筋リモデリングを有する不全心筋においては、脂質過酸化が増大していること、抗酸化薬の投与や、抗酸化酵素の過剰発現によって、心筋リモデリングが抑制されること<sup>3,4)</sup>から、不全心において活性酸素産生が増大し、その病態形成に重要な役割を果たしていることは事実である。では、心筋局所における活性酸素産生は、末梢でのマーカーにどの程度反映されるのであろうか。心筋リモデリングの研究を行うにあたって、マウスの心筋梗塞後心不全モデルは、ヒトの虚血性心筋症へのプロセスによく類似したモデルとして知られている。冠動脈を完全結紮すると、その支配領域は虚血になり、数時間～ほぼ1日のうちに壊死に

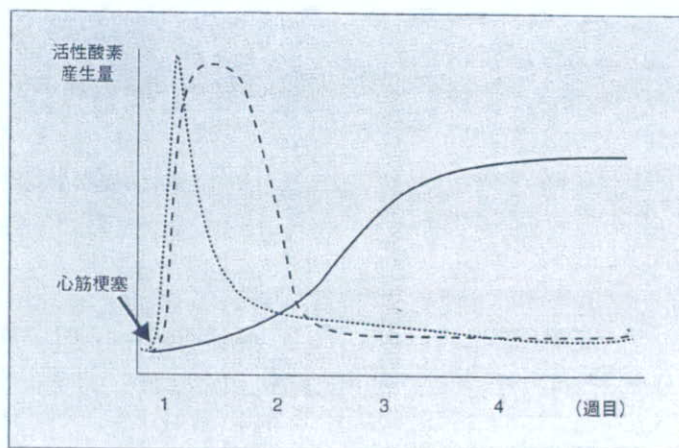


図1 心筋梗塞後の血中および組織における活性酸素産生推移  
---: 全身性酸化ストレス(血液中), .....: 梗塞部, —: 非梗塞部

■ イソプロスタンは広く用いられる酸化ストレスマーカーであるが、局所における評価は困難である。

陥る。壊死した心筋組織は、線維成分に置き換わり、瘢痕 (scar) となる (early remodeling)。次第に、左室の非虚血部分にも、圧負荷およびサイトカインの増大、レニンアンジオテンシン系をはじめとする神経液生因子が活性化することで、心筋細胞肥大、MMP (matrix metalloproteinase) の活性化、アポトーシスの増加などに特徴づけられる、いわゆるlate remodeling (あるいはglobal remodeling) と呼ばれる病態を呈する。

実際に、心筋梗塞後慢性期に至るまで、梗塞部および非梗塞部における脂質過酸化は、全く相反するパターンを示し、梗塞初期には、梗塞部で活性酸素の産生が増加し、慢性期には非梗塞部での産生が増加する (図1)。

また、梗塞部の活性酸素の増加は各種サイトカインを動員し、交感神経を活性化し、おそらくはその結果として、血球および血管床での活性酸素産生を惹起し、血清中の脂質過酸化のマーカーの急激な増大を伴っている。これらの全身性酸化ストレスマーカーは、マウスの心筋梗塞モデルでは、梗塞後1週間以内に見事なほどには必ずすべてが正常化する。しかしながら、その一方で、心筋梗塞後後期リモデリングに入り、徐々に非梗塞部の酸化ストレスが上昇している時期でもあり、全身性酸化ストレスマーカーから心臓リモデリングの程度を予測することは困難であると考えられる。

### 3. *in vivo* ESRによる活性酸素の測定

そこで、*in vivo*で、心臓局所における酸化ストレスの程度を推測する手段として、*in vivo* 電子スピン共鳴分光法 (electron spin resonance : ESR) が有

用となる。ESRは電磁波を照射し、フリーラジカルにより共鳴する現象を検出する手段である (図2)。その測定は主に、フリーラジカルを直接トラップするスピントラップ法と、安定なニト

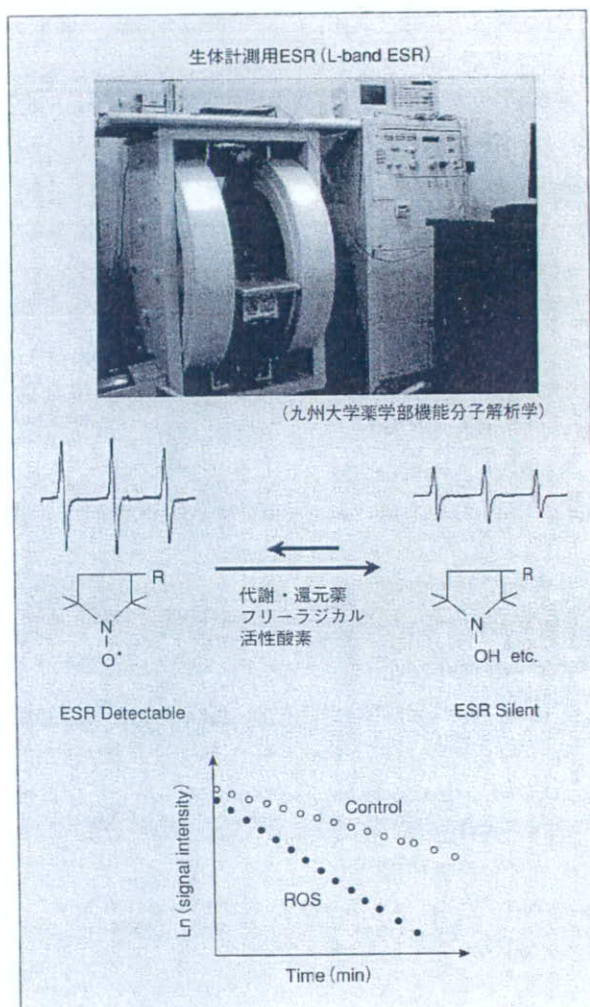


図2 生体計測用ESR  
ニトロキシルプローブの消失速度から生体内レドックスを評価できる。

■ *in vivo* ESRは、リアルタイムで酸化還元反応の評価が可能である。

ロキシルラジカルの生体内シグナル減衰速度を計測するスピンプローブ法に分けられる。生体内で生成するフリーラジカルは、トラップされてもアダクトそのものの体内寿命が極端に短いことから、測定は困難であるため、スピンプローブを用いて評価される。スピンプローブとして用いられるニトロキシルラジカルは、フリーラジカル以外にも、アスコルビン酸、チトクロームP450m、ミトコンドリア電子伝達系によってヒドロキシルアミンに還元され、常磁性を失う。また、排泄などのスピンプローブ動態そのものの影響も受けるため、それぞれの活性種に特異的なラジカル消去薬の併用によって、産生されるラジカルの評価が可能となる。*in vivo* ESRの最大のメリットは、何と云っても、生体を生きたままレドックス状態を評価できる、という点である。この方法によって、梗塞後心筋梗塞のリモデリング過程を評価すると、不全心筋において脂質過酸化が徐々に増加したのと同じパターンで、心臓での活性酸素の増加を確認することができる。

## 今後の課題

*in vivo* ESRは、生体におけるレドックス評価には有用であるが、現時点ではやはり詳細で正確な解析には、組織における生化学とを総合した判断が必要である。そして、生体におけるラジカル・レドックスのさらなる詳細な部位解析には、生体内ラジカル・レドックスの画像化(ESRI)が必要である<sup>5)</sup>。最近では、MRI画像を組み合わせた装置開発によって、レドックス代謝と生体内での酸化ストレス、解剖学的情報を合わせて評価することが可能となり、また、核・電子間のオーバーハウザー効果を利用したプロトン・電子二重共鳴画像化装置(proton-electron double resonance imaging: PEDRI)の開発によって、さらに高感度の計測が可能となりつつある<sup>6)</sup>。今後はより高解像度の酸化ストレス・レドックス代謝解析が可能となり、レドックス・フリーラジカルと心不全の病態形成に関する研究が発展していくことが期待される。

### ●文献

- 1) Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ 2nd: Noncyclooxygenase oxidative

formation of a series of novel prostanoids; analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 184: 1-10, 1990

- 2) Li H, Lawson JA, Reilly M, et al: Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F(2)-isoprostanes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13381-13386, 1999
- 3) Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, et al: Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice; role of oxidative stress. *Circ Res* 87: 392-398, 2000
- 4) Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, et al: Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2237-H2245, 2006
- 5) Takeshita K, Utsumi H, Hamada A: ESR measurement of radical clearance in lung of whole mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 874-880, 1991
- 6) Utsumi H, Yamada K, Ichikawa K, et al: Simultaneous molecular imaging of redox reactions monitored by Overhauser-enhanced MRI with <sup>14</sup>N- and <sup>15</sup>N-labeled nitroxyl radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1463-1468, 2006