

学 位 論 文

Doctor's Thesis

尿中バイオピリンレベルは心不全重症度の進行に従い上昇する

(Urinary biopyrrins levels are elevated in relation to severity of
heart failure)

外牧 潤

Jun Hokamaki

指導教官

熊本大学大学院医学研究科博士課程循環器内科学

小川 久雄 教授

2004 年度

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名：尿中バイオピリンレベルは心不全重症度の進行に
従い上昇する

(Urinary biopyrrins levels are elevated in relation to severity of
heart failure)

著者名： 外牧 潤

Jun Hokamaki

指導教官：熊本大学大学院医学研究科博士課程循環器内科学
小川 久雄 教授

審査委員名：生体機能薬理学担当教授： 光山 勝慶 教授
代謝内科学担当教授： 荒木 栄一 教授
腎臓内科学担当教授： 富田 公夫 教授
心臓血管外科学担当教授： 川筋 道雄 教授

2004 年度

目次

1. 要旨	3-5
2. 発表論文リスト	6-10
3. 謝辞	11
4. 略語一覧	12
5. 研究の目的と背景	13-20
6. 研究方法	21-23
7. 研究結果	24-25
8. 考察	26-28
9. 結語	28
10. 表およびその説明	29-30
11. 図およびその説明	31-33
12. 文献	34-43

1. 要旨

【背景】心疾患発症に酸化ストレスが関与していることが知られている。近年、酸化ストレスの上昇が心機能の低下を引き起こし、心不全を増悪させることが報告されている。ビリルビンの酸化代謝産物であるバイオピリンが見いだされ、酸化ストレスの有望な指標の一つとして注目されている。本研究では尿中バイオピリンレベルと心不全重症度との関係について検討した。

【方法】尿中バイオピリンレベルと血漿 B-type natriuretic peptide (BNP) レベルを、94 名の心不全患者（心不全群）（男性 59 名、女性 35 名、平均年齢 65 ± 1 歳）及び、性、年齢を一致させた 47 名の対照患者（対照群）（男性 30 名、女性 17 名、平均年齢 65 ± 2 歳）において測定した。心不全の原因は特発性拡張型心筋症 18 名、肥大型心筋症 9 名、陳旧性心筋梗塞 37 名、高血圧性心臓病 12 名、心臓弁膜症 16 名、先天性心疾患 2 名であった。尿と血液は入院時に採取するとともに、心不全群の 40 名においては治療後に再び採尿を行い、治療前後における変化を検討した。

【結果】対照群と心不全群間に冠危険因子において差は認められなかった。尿中バイオピリンレベル ($\mu\text{mol/g creatinine}$) は New York Heart Association (NYHA) I 度の心不全群 ($n=35$, $3.46 [2.60-5.42]$)、NYHA II 度の心不全群 ($n=33$, $5.39 [3.37-9.36]$)、NYHA III/IV 度の心不全群 ($n=26$, $17.05 [7.85-42.91]$) は対照群 ($2.38 [1.57-3.15]$) と比較して有意に高値を示した。心不全の重症度が進むに従い、尿中バイオピリンレベルは有意に増加した。また、心不全の治療によって、心不全重症度は NYHA 2.5 ± 0.1 から 1.7 ± 0.1 へと低下するとともに、尿中バイオピリンレベルも $7.43 [3.84-17.05]$ から $3.07 [2.21-5.71]$ へと低下した。さらに \log バイオピリンレベルは \log BNP レベルと正相関 ($r=0.650$, $p<0.001$) を示した。

【考察】尿中バイオピリンは心不全が悪化するに従い増加する。NYHA 分類のみならず、心不全重症度の客観的指標の一つである血漿 BNP レベルとも強い相関が

認められた。一方、治療により心不全が軽快した場合、尿中バイオピリンレベルも低下することが判明した。

【結論】尿中バイオピリンレベルの測定は、心不全の重症度ならびにその治療効果を反映する有用な指標の一つと考えられる。

Summary

Background Oxidative stress is evident in heart disease and contributes to the development of ventricular dysfunction in patients with heart failure. Biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, have been discovered as potential markers of oxidative stress.

Objectives We investigated the relationship between the urinary levels of biopyrrins and the severity of heart failure.

Methods We measured the levels of urinary biopyrrins and plasma B-type natriuretic peptide (BNP) in 94 patients with heart failure (59 men, 35 women; mean age 65 ± 1) and 47 controls (30 men, 17 women; mean age 65 ± 2). Urine and blood samples were taken immediately after admission in every subject. Further urine samples were obtained from 40 patients following the treatment of heart failure.

Results The urinary biopyrrins/creatinine levels ($\mu\text{mol/g creatinine}$) in patients with New York Heart Association (NYHA) class I ($n=35$, 3.46 [2.60 – 5.42]) and II ($n=33$, 5.39 [3.37 – 9.36]) were significantly higher than those in controls (2.38 [1.57 – 3.15]). The urinary biopyrrins/creatinine levels were the highest in patients with NYHA classes III/IV ($n=26$, 17.05 [7.85 – 42.91]) among the heart failure groups. The treatment of heart failure significantly decreased both urinary biopyrrins/creatinine levels (from 7.43 [3.84 – 17.05] to 3.07 [2.21 – 5.71]) and NYHA classification (from 2.5 ± 0.1 to 1.7 ± 0.1). Log biopyrrins/creatinine levels were positively correlated with log BNP levels ($r=0.650$, $p<0.001$).

Conclusion These results indicate that the urinary biopyrrins levels are increased in patients with heart failure and are elevated in proportion to its severity.

2. 発表論文リスト

関連論文

1. Jun Hokamaki, Hiroaki Kawano, Michihiro Yoshimura, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Sunao Kojima, Tomohiro Sakamoto, Seigo Sugiyama, Nobutaka Hirai, Hideki Shimomura, Yasuhiro Nagayoshi, Kenichi Tsujita, Izuru Shioji, Shinya Sasaki, Hisao Ogawa.
Urinary biopyrrins levels are elevated in relation to severity of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1880-1885.

その他の論文

1. Jun Hokamaki, Hiroaki Kawano, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Sunao Kojima, Tomohiro Sakamoto, Seigo Sugiyama, Michihiro Yoshimura, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Hisao Ogawa.
Plasma thioredoxin levels in patients with unstable angina. *Int J Cardiol.* 2004 in press.
2. Kenichi Tsujita, Hideki Shimomura, Hiroaki Kawano, Jun Hokamaki, Masaya Fukuda, Takuro Yamashita, Satoru Hida, Yoshinori Nakamura, Yasuhiro Nagayoshi, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Hidekazu Arai, Hisao Ogawa.
Effects of edaravone on reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004;94:481-484.
3. Shinzo Miyamoto, Hiroaki Kawano, Keiji Takazoe, Hirofumi Soejima, Tomohiro Sakamoto, Jun Hokamaki, Michihiro Yoshimura, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Hisao Ogawa.

Vitamin E improves fibrinolytic activity in patients with coronary spastic angina. *Thromb Res.* 2004;113:345–351.

4. Hidetomo Maruyoshi, Sunao Kojima, Tohru Funahashi, Shinzo Miyamoto, Jun Hokamaki, Hirofumi Soejima, Tomohiro Sakamoto, Hiroaki Kawano, Michihiro Yoshimura, Akira Kitagawa, Yuji Matsuzawa, Hisao Ogawa.
Adiponectin is inversely related to plasminogen activator inhibitor type 1 in patients with stable exertional angina. *Thromb Haemost.* 2004;91:1026–1030.
5. Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Tomoko Tanaka, Hiroaki Kawano, Seigo Sugiyama, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Hideki Kishikawa, Hisao Ogawa.
Coronary spastic angina in patients with connective tissue disease. *Circ J.* 2004;68:367–370.
6. Shinzo Miyamoto, Hiroaki Kawano, Tomohiro Sakamoto, Hirofumi Soejima, Ichiro Kajiwara, Jun Hokamaki, Nobutaka Hirai, Seigo Sugiyama, Michihiro Yoshimura, Hirofumi Yasue, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Hisao Ogawa.
Increased plasma levels of thioredoxin in patients with coronary spastic angina. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6:75–80.
7. Hirofumi Soejima, Hisakazu Suefuji, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Hisao Ogawa.
Increased plasma thioredoxin in patients with acute myocardial infarction. *Clin Cardiol.* 2003;26:583–587.

8. Shinzo Miyamoto, Tomohiro Sakamoto, Hirofumi Soejima, Hideki Shimomura, Ichiro Kajiwara, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Seigo Sugiyama, Michihiro Yoshimura, Yukio Ozaki, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Hisao Ogawa.
Plasma thioredoxin levels and platelet aggregability in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2003;146:465–471.
9. Hiroaki Kawano, Hirofumi Yasue, Nobutaka Hirai, Toshiaki Yoshida, Hironobu Fukushima, Shinzo Miyamoto, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Hisao Ogawa.
Effects of transdermal and oral estrogen supplementation on endothelial function, inflammation and cellular redox state. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003;41:346–353.
10. Sunao Kojima, Tohru Funahashi, Tomohiro Sakamoto, Shinzo Miyamoto, Hirofumi Soejima, Jun Hokamaki, Ichiro Kajiwara, Seigo Sugiyama, Michihiro Yoshimura, Kazuteru Fujimoto, Yuji Miyao, Hisakazu Suefuji, Akira Kitagawa, Noriyuki Ouchi, Shinji Kihara, Yuji Matsuzawa, Hisao Ogawa.
The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction. *Heart.* 2003;89:667.
11. Hirofumi Soejima, Atsushi Irie, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Tomohiro Sakamoto, Tomoko Tanaka, Michihiro Yoshimura, Yasuharu Nishimura, Hisao Ogawa.
Preference toward a T-helper type 1 response in patients with coronary spastic angina. *Circulation.* 2003;107:2196–2200.

12. Shinzo Miyamoto, Hiroaki Kawano, Tomohiro Sakamoto, Hirofumi Soejima, Ichiro Kajiwara, Hideki Shimomura, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Seigo Sugiyama, Nobutaka Hirai, Michihiro Yoshimura, Yukio Ozaki, Hisao Ogawa. Formation of platelet microaggregates correlates with adverse clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2003;89:681-686.

13. Hirofumi Soejima, Hisao Ogawa, Tomohiro Sakamoto, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Seigo Sugiyama, Michihiro Yoshimura, Hisakazu Suefuji, Yuji Miyao, Kazuteru Fujimoto, Hiroo Miyagi, Hideki Kishikawa. Increased serum matrix metalloproteinase-1 concentration predicts advanced left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Circ J.* 2003;67:301-304.

14. Hideki Shimomura, Hisao Ogawa, Keiji Takazoe, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Tomohiro Sakamoto, Hiroaki Kawano, Hisakazu Suefuji, Hiroaki Nishikawa, Hidekazu Arai, Jun Hokamaki, Ichiro Kajiwara, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Michihiro Yoshimura. Comparison of urinary biopyrrin levels in acute myocardial infarction (after reperfusion therapy) versus stable angina pectoris and their usefulness in predicting subsequent cardiac events. *Am J Cardiol.* 2002;15:108-111.

15. Makoto Uchino, Eiichi Uyama, Hiroaki Kawano, Jun Hokamaki, Kiyotaka Kugiyama, Yoichiro Murakami, Hirofumi Yasue, Masayuki Ando.

A histochemical and electron microscopic study of skeletal and cardiac muscle from a Fabry disease patient and carrier. *Acta Neuropathol.* 1995;90:334-338.

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御支援下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部循環器病態学 小川久雄教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究において直接御指導をいただきました熊本大学大学院医学研究科集中治療部講座、河野宏明講師、熊本大学大学院医学薬学研究部循環器病態学 吉村道博助教授、熊本大学大学院医学薬学研究部循環器病態学 坂本知浩講師をはじめ多くの先生方に深く感謝いたします。

4. 略語一覧

ACE: angiotensin-converting enzyme

ANP: A-type natriuretic peptide

ARB: angiotensin II type 1 receptor blockers

BMI: body mass index

BNP: B-type natriuretic peptide

CNP: C-type natriuretic peptide

HDL: high density lipoprotein

LDL: low density lipoprotein

LVEF: left ventricular ejection fraction

NADPH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NO: nitric oxide

NYHA: New York Heart Association

ROS: reactive oxygen species

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

5. 研究の背景と目的

5-1. 酸化ストレス

酸化ストレスとは、生体における酸化と抗酸化のバランスが破綻し、酸化に傾いた状態と定義される。成人が安静時に消費する酸素は1日最低500リットルであり、酸素は体内に入って、主にエネルギーをつくるために使われている。その過程で、体内に摂取した酸素の数%は活性酸素へ変わり、生体を障害し得る状態となる。活性酸素はエネルギーを産生するのに使われた酸素が、最終的に水に消費されていくのに必要な反応の過程でできるものであるから必ず存在する。しかし、多くの組織では、正常な状態においては抗酸化機序によって速やかに除去される。つまり、体内には酸化と抗酸化という機序があり、正常では両者が非常に微妙なバランスをとって働いているのであるが、そのバランスが崩れて酸化に傾くのが酸化ストレスと考えられている。多くの研究者の報告から、酸化ストレスは個体の発生から死に至るまでの、さまざまな生命機構や病態に関与していることが明らかになってきている。

5-2. 酸化ストレスと循環器疾患

心筋は常に拍動を繰り返しているため、酸素需要が多い器官の一つである。従って、抗酸化機構が発達しているのであるが、常に酸化ストレスに暴露される危険性をはらんでいる。代表的な心筋への酸化ストレスの影響の一つとして、虚血再灌流時の心筋stunningや不整脈の発生が挙げられる(1)。その他、動脈硬化、虚血性心疾患、心不全、心肥大などの循環器疾患の病態形成にも酸化ストレスは関与している(2)。

急性心筋梗塞、不安定狭心症など急性冠症候群発症のメカニズムに、脆弱な脂質プラークの破綻とそれに引き続く血栓形成が関与していることが、ヒト冠動脈組織を用いた病理学的検討やモデル動物を用いた研究によって次第に明らかとなってきた(3,4)。また、Rossらの傷害反応説をはじめとする数多くの研究により、動脈硬化の進展に血管内皮を含む血管内膜の炎症性変化が深く関与してい

ることが報告されている(5)。粥状動脈硬化の初期病変では、内皮障害が発生すると接着因子の発現を介して内皮下に単球・マクロファージの浸潤を引き起こし、その結果として泡沫細胞の集積を認めるようになる。さらに動脈硬化が進行してくると、中膜血管平滑筋細胞の分化・増殖および内膜への遊走・浸潤を来す。Tリンパ球をはじめとする白血球の内皮下への遊走・浸潤、血小板の接着・凝集などが惹起されると、病変が不安定化していくと考えられている。この一連の反応の中で酸化ストレスは血管内皮や各種の炎症細胞を活性化し、動脈硬化の進展、プラーク被膜の脆弱化やプラーク破綻にも関与している(6)。我々は酸化ストレスの指標の一つであるthioredoxinの推移を観察することにより、急性冠症候群と酸化ストレスの関係を検討した。その結果、急性心筋梗塞急性期において、安定狭心症や対照患者に比してthioredoxinは上昇していた。急性心筋梗塞慢性期において、thioredoxinは急性期に比し有意に低下するものの、安定狭心症や対照患者に比し、高い値を維持していた。急性心筋梗塞患者において、入院時にthioredoxinが高い群では、低い群に比し、慢性期の左室駆出率が有意に低下していた(7)。急性冠症候群の一つである不安定狭心症でもthioredoxinは、安定狭心症、対照患者に比し高値を示していた。特に、入院前48時間以内に安静時狭心症発作を有するBraunwald's IIIb群は、48時間以上安静時狭心症発作がなかったBraunwald's IIb群より、thioredoxinが高い値を示していた。治療にもかかわらず安静時の狭心症発作を生じた心血管イベント発生群は、経過中に安静時狭心症発作を生じなかった非発生群に比し、慢性期のthioredoxinは高値であった(8)。以上のことから、急性心筋梗塞や不安定狭心症等の急性冠症候群では虚血発作の程度と酸化ストレスとの間に密接な関係があり、発症早期より酸化ストレスが亢進した状態であると考えられる。

また、1989年にSteinbergらが、low density lipoprotein (LDL) が内皮下にて酸化修飾をうけた後にマクロファージに取り込まれ、泡沫細胞および脂肪線条を形成し、動脈硬化を進展するという酸化LDL仮説を唱えて以来、酸化ストレスが動脈硬化の発症進展機構に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきている。我々も尿中の酸化ストレスの指標である8-hydroxy-2'-

deoxyguanosine (8-OHdG) を用いた検討にて、代表的な動脈硬化性疾患の一つである器質性狭心症では対照患者に比し、8-OHdGは高値を示し、冠動脈病変枝数や炎症反応とも関係していることを見いだしている。

動脈硬化発症・進展過程において、内皮由来の一酸化窒素 (NO) の生物学的活性低下が関与していることが報告されている。動脈硬化における NO 活性の低下は血管壁で惹起された酸化ストレスに関係することが明らかにされて来ている。冠攣縮は急性冠症候群を含む虚血性心疾患全般の発症に重要な役割を果たしていることが知られているが、この冠攣縮の発症にも NO の生物学的活性低下が関与している。我々の冠攣縮性狭心症における検討でも、冠攣縮性狭心症は対照患者に比し、thioredoxin は高値を示していた。さらに一週間に 3 回以上の心電図変化を伴う自然発作を認めたものを high activity 群、それ以外を low activity 群とした場合、high activity 群は low activity 群に比し高い値を示した。やはり冠攣縮性狭心症においても虚血発作の程度と酸化ストレスとの間に密接な関係があり、disease activity が高い患者では酸化ストレスは上昇しているものと思われる (9)

5-3. ビリルビンと酸化ストレス

生体への酸化ストレスに対する防御機構としてビタミン C や E、グルタチオン、尿酸など活性酸素を消去する内因性抗酸化物質の存在が明らかにされている。最近、新たにビリルビンの内因性抗酸化物質としての働きが注目されている。ヘムからビリルビンへの中間代謝産物であるビリベルジンは水溶性であり細胞毒性もなく、鳥類ではそのまま排泄されるが、哺乳類では酵素反応によって脂溶性のビリルビンに代謝される。ビリルビンの詳細な生理的役割については未だ不明である。以前は核黄疸に代表されるように血清レベルの著しい上昇は神経障害を引き起こすことから、生体にとって有害無益な物質と考えられてきた。しかし、ビリルビンの抗酸化作用が報告されて以来、ビリルビンは *in vivo* において reactive oxygen species (ROS) の重要な scavenger の一つと考えられるようになってきている (10-12)。実際、 $8.5 \mu\text{mol/L}$ の生理的濃度のビリルビンは、 $1-3\text{mmHg}$

の生理的細胞内酸素濃度下では、 α -トコフェノールを凌ぐ抗酸化作用を有することが報告されている(13)。

5-4. バイオピリン

ビリルビンは自らが抗酸化剤になることにより活性酸素を消去し、ビリルビン自身は、酸化代謝産物に変化し、尿中に排泄される。ビリルビンの酸化代謝産物であるバイオピリンは anti-bilirubin monoclonal antibody を用いて、ヒトの尿および血漿サンプルから測定可能である(14)。従って、近年ではバイオピリンは酸化ストレスを示す一つの指標として考えられるようになっている(15)。実際に、ラット肝の虚血再灌流モデルにおいて、再灌流後に大量のバイオピリンが排泄されることが報告されている(16)。その他、ヒトにおいても、心筋虚血の誘発によって尿中バイオピリンが上昇することが報告されている(17)。

ヘムは律速酵素であるヘムオキシゲナーゼにより、ビリベルジンに変化し、reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) の存在下にビリベルジンリダクターゼによってビリルビンが生成される。何らかのストレスで、活性酸素種が産生されると、誘導型のヘムオキシゲナーゼが強く誘導され、ヘムを分解し、ビリルビンの産生を増加させる。産生されたビリルビンは活性酸素種の scavenger として働き、その結果バイオピリンが生成され、尿中に排泄される。従って、バイオピリンの定量は活性酸素種の増加、つまり酸化ストレスの増加を反映する。尚、ビリルビンが抗酸化作用を示す活性酸素種は、スーパーオキシド、一重項酸素、過酸化水素、一酸化窒素、ペルオキシ亜硝酸イオンなどが報告されている。また、重金属、臭化ベンゼンやジエチルマレート等の有機化合物、紫外線照射、熱ショック、エンドトキシンなどが生体に作用することで活性酸素の増加による酸化ストレスを引き起こし、その結果、誘導型のヘムオキシゲナーゼが強く誘導されることが判明している(18)。

バイオピリンは anti-bilirubin monoclonal antibody (24G7) によって検出することが可能であり、inhibition ELISA法にて簡便に測定可能となっている

(14, 19)。我々は、急性心筋梗塞における酸化ストレスの経時的变化についてバイオピリンを用いて検討した。急性心筋梗塞に対して血栓溶解療法や血管形成術による血行再建が早期再灌流療法として普及したことにより、急性期および慢性期の心機能や予後は大きく改善した。しかし、再灌流療法は心筋壊死救済効果としては完全ではなく、一部には、早期再灌流施行にもかかわらず心機能および予後の改善がみられない例や、逆に悪化する例も存在する。また、再灌流直後には心室性期外収縮、心室頻拍・心室細動などのいわゆる再灌流性不整脈が出現することが知られている。再灌流障害を引き起こす原因としては様々なものが議論されているが、その一つとして酸化ストレスが考えられている。すなわち、虚血心筋に急激な再灌流を行い、心筋細胞、冠動脈内皮細胞を再酸素化すると、これらの細胞で活性酸素種が産生され、心筋に対して障害を引き起こすと考えられている。このような背景から、急性心筋梗塞に対する再灌流療法が盛んに行われている現在において、再灌流前後での酸化ストレスを評価することは重要であると思われる。バイオピリンは急性心筋梗塞症例において、再灌流前、すなわち、虚血時に既に安定狭心症および対照患者に比し、有意に上昇を示していた。しかも再灌流後には、さらに上昇し、4時間後をピークにして徐々に低下することを発見した。再灌流療法を実施した患者において、入院中の心血管イベント発生群と非発生群に分けて尿中バイオピリンレベルの最大値を比較したところ、心血管イベント発生群の方が、有意に高値を示しており、リスクの層別化としてのバイオピリン測定の有用性を明らかにした(19)。さらに、我々はfree radical scavengerであるedaravoneを、急性心筋梗塞患者に再灌流療法前に投与した場合、さらなる梗塞範囲縮小および入院中の心血管イベント抑制に効果があることを発見した(20)。これらのことから、早期再灌流療法時の酸化ストレスの上昇は急性心筋梗塞患者の予後に影響を与える大きな因子の一つであると考えられる。

5-5. 心不全

心不全とは、全身の酸素需要量に見合うだけの血液量を、絶対的あるいは相対的に全身に拍出できない状態と定義される。労作時呼吸困難、息切れ、尿量

低下、四肢の浮腫、肝腫大などの症状の出現により生活の質的低下が生じ、日常生活が障害される。臨床的には、血行動態的諸指標や肺体うっ血の有無により診断されている。また、致死的不整脈の出現も高頻度にみられ、突然死の危険性も高い。すべての心疾患の終末的な病態であり、その生命予後は極めて悪い。欧米先進国では、心不全の罹患率が増加しており、米国では既に約500万人の患者が心不全に罹患し、毎年50万人が新たに心不全を発症している。心不全を直接、あるいは間接的原因として死亡している患者は毎年30万人を超えており、死亡者数は年々増加しているのが現状である。残念ながら、我が国では心不全の正確な疫学資料はほとんどない。しかし、厚生労働省大臣官房統計部資料によると、年齢調節死亡率において心不全死亡は増加傾向にある。心不全は高齢者病であり、高齢化社会の到来、食生活の欧米化も重なり、今後、心不全に対する多くの問題が顕在化してくることが予想される。

心不全状態では、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系の亢進、交感神経系、エンドセリンなどの心筋毒性作用を有すると考えられる神経体液性因子が心不全の悪化に関与している。一方、これらの因子に拮抗し、心筋保護に作用するナトリウム利尿ペプチド系、アドレノメジュリンも亢進していることが報告されている。従って、最近では心不全は種々な神経体液性因子が複雑にからみ合った一つの症候群と考えられるようになってきている (21, 22)。

5-6. 心不全と B-type natriuretic peptide (BNP)

不全心の心筋細胞において、心臓由来のナトリウム利尿ペプチドの発現、アクチンやミオシンのアイソフォーム変化、サイトカイン(tumor necrosis factor alpha (TNF- α)、エンドセリンなど)の増加、デスミンなどの中間径フィラメントの増加など、多彩な分子生物学的変化が報告されている (23-26)。我が国の松尾らは三種類のナトリウム利尿ペプチドを発見した。1983年にヒトおよびラット心房から単離同定された A 型 (ANP) (27)、1988年にブタ脳から単離された B 型 (BNP) (28)、さらに 1990年に同じくブタ脳より発見された C 型 (GNP)

(29) である。神経体液性因子の中で BNP は、強力なナトリウム利尿作用、血管拡張作用、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系と交感神経系の抑制などの幅広い生理作用を持った心臓ホルモンである (30)。BNP は正常心において、主に心室で生合成・分泌されているが、心不全になると心室からの生合成・分泌が著しく増加する (31)。心室にて合成された BNP は constitutive pathway により常に血中に放出されている。すなわち、遺伝子の転写の増減がそのまま BNP の分泌量に反映される。負荷が生じると、心室筋の伸展により BNP の mRNA の発現量は増加して蛋白合成も増える (32)。末梢血レベルでの BNP 濃度は心不全の重症度とともに増加し、各種血行動態の指標と相関することから (22, 33-35)、心不全の重症度を示す確立した客観的な指標である。臨床的には、入院、外来診療を問わず日常診療において多用されている (34, 36)。現在、左室収縮機能低下患者のスクリーニング、心不全診断および重症度の評価、心不全治療効果判定などに血漿 BNP 濃度測定の有用性が報告されている。

5-7. 心不全と酸化ストレス

循環器領域において、酸化ストレスは虚血・再灌流障害や動脈硬化のみならず、心不全にも関与することが明らかにされつつある。従って、心不全は種々な神経体液性因子、サイトカインに加え、新たに酸化ストレスもその病態に関連した症候群と考えられるようになってきている (37-45)。実際、急性および慢性心不全の両者は酸化ストレスの増加、抗酸化物質の減少が病態と関係していること (46, 47)、ROS が心不全の発症および進行に関与しているとも報告されている (48-51)。しかしながら、ヒトにおいて ROS は非常に反応性に富むため、これらを捕捉し、定量することは容易ではないのが現状である。

ROS の特殊な定量法として、心筋組織で産生されるスーパーオキシドアニオンを、電子スピン法を用いて検出する方法がある。心筋においては心筋細胞のミトコンドリア電子伝達系、血管内皮のキサンチンオキシダーゼ系、NADPH オキシダーゼ系、好中球の NADPH オキシダーゼ系などで ROS が産生されることが考えられている。現在、電子スピン法を用いた検討で、不全心筋でミトコンドリアのス

一パーオキシドアニオン産生が亢進することが明らかにされている (52)。また、心筋細胞において活性酸素がミトコンドリアの透過性を変えて、ミトコンドリアからの活性酸素種の放出を誘発するとの報告もある (53)。さらに培養心筋細胞において ROS を亢進させると心筋細胞肥大やアポトーシスが誘導されるとも報告されている (54)。その他、TNF- α やカテコールアミンも ROS 産生を亢進させる。しかしながら、これらの刺激が、どのように作用して ROS 産生を増加させるかについては未だ不明であり、心不全と酸化ストレスに関しては解明できていない点が多く存在しているのが実情である。

ヒトにおいて、現在考えられている酸化ストレスの心不全に対する関与として、心筋細胞肥大 (54) やアポトーシスの誘導 (55)、細胞外マトリックスの修飾、間質線維化等 (56) が誘導され、心筋リモデリングを形成することなどが挙げられる。従って、酸化ストレスは、心不全の進展に大きな影響を与えると考えられる。

5-8. 本研究の目的

我々は酸化ストレスの指標の一つである尿中バイオピリンが心不全重症度の指標として有用であると推測した。本研究において、心不全の重症度と酸化ストレスの関係を検討するために、尿中バイオピリンを測定し、New York Heart Association (NYHA) 分類および客観的な心不全の指標である血漿 BNP との関係を検討した。

6. 研究方法

6-1. 対象

本研究において連続 94 名（平均年齢 65±1 歳、男性 59 名、女性 35 名）の心疾患患者（心不全群）を登録した。心疾患の診断は病歴、身体所見、心電図、胸部 X 線写真、心エコー、左室造影、および冠動脈造影に基づいて診断した。NYHA クラス I の心不全群については、心疾患はあるが身体活動の制限に至らない患者、通常身体活動では、さほどの疲労、動悸、呼吸困難、または狭心痛を引き起こさないものと定義した。NYHA クラス II~IV の心不全群は心不全による何らかの症状を有していた。特に NYHA クラス III/IV の心不全群は浮腫、Ⅲ音、肺うっ血等の明らかな心不全症状を有していた。心不全の原因は特発性拡張型心筋症 18 名、肥大型心筋症 9 名、陳旧性心筋梗塞 37 名、高血圧性心臓病 12 名、心臓弁膜症 16 名、先天性心疾患 2 名であった。悪性疾患、重症の肺疾患、重度の腎不全、高度の肝疾患は除外した。NYHA クラス分類は入院時に評価した。左室駆出率（LVEF）は経胸壁心エコーを用いて Simpson 法で測定した。

また、我々は本研究において 47 名（平均年齢 65±2 歳、男性 30 名、女性 17 名）の対照患者（対照群）を登録した。対照群は心不全群と年齢・性別を一致させた。すべての対照群は多数の冠危険因子もしくは心電図異常を有し、胸痛の既往があるために心臓カテーテル検査を含めた循環器諸検査を行っている。その結果、明らかな心疾患が証明されなかったものを対照群として登録した。本研究の実施にあたってはすべての患者からインフォームド・コンセントを得た。

6-2. 尿中バイオピリンの測定

すべての患者において、バイオピリン測定用の尿検体は入院後直ちに採取した。心不全群の 59 名（NYHA クラス II 群、及び、NYHA クラス III/IV 群の患者の合計数）中 40 名において、退院時に再度尿サンプルを採取し、NYHA クラス分類を再評価した。残りの 19 名は経皮的冠動脈形成術や手術の施行、肺、脳梗塞、腎機能増悪等の合併症のため除外された。40 名すべての患者がアンジオテ

ンシン変換酵素（ACE）阻害剤もしくはアンギオテンシン II タイプ1 受容体遮断剤（ARB）（76%）、利尿剤（80%）、 β 遮断剤（40%）、ジギタリス（20%）、血管拡張剤（50%）といった薬剤を組み合わせ心不全の治療を行った。すべての尿サンプルは速やかに -80°C で凍結し、測定されるまで遮光した状態で凍結保存した。

尿中バイオピリン濃度は anti-bilirubin monoclonal antibody (24G7) を用いた inhibition ELISA 法 (Shino-test Co., Tokyo, Japan) により 2 重測定した (14, 19)。その結果は Accuras Auto CRE (Shino-test Co.) にて測定した個々の尿中クレアチニン濃度により補正した (19)。尿中バイオピリン/クレアチニン比（以下、尿中バイオピリンレベル）を以後の解析に使用した。同一検体での同時再現性 (n=10) は 3 重測定にて 3.4%、同一検体での日差再現性 (n=10) は 3 重試験にて 8.5%であった。

6-3. 血漿 BNP の測定

すべての患者において血漿 BNP 測定のための血液サンプルを肘静脈より、入院後速やかに採取した。血漿 BNP 用の血液サンプルとバイオピリン用の尿サンプルは同一日に採取した。血漿 BNP 濃度を specific RIA for human BNP にて測定した (22)。

6-4. 統計学的解析

血漿 BNP レベルと尿中バイオピリンレベル以外のすべての結果は、平均値±標準誤差 (mean±SEM) にて表記した。正規分布している多群間での連続変数の比較には一元配置分散分析法に引き続く多重比較検定 (Scheffé F test) を統計解析に用いた。名義変数に関しては χ^2 テストにて比較した。血漿 BNP レベルと尿中バイオピリンレベルは正規分布していなかった。従って、血漿 BNP レベルと尿中バイオピリンレベルは中央値 (50th percentile 値) に加えて 25th-75th percentile 値を表記するとともに、心不全重症度との関係についてはノンパラメトリック解析を用いて解析した。Mann-Whitney U 検定は 2 群間での尿中バイ

オピリンレベルの検定に使用した。多群間での血漿 BNP、尿中バイオピリンレベルの比較検討には Kruskal-Wallis と Mann-Whitney U 検定にて解析した。log BNP と log バイオピリンレベルは 2 つの変数間に関係があるかを検討する回帰分析の際に使用した。心不全治療前後の NYHA 分類変化は、対応のある t 検定にて検討した。治療前後の尿中バイオピリンレベルの変化は Wilcoxon 符号付順位和検定にて検討した。P 値 0.05 未満を有意と判定した。

7. 研究結果

7-1. 患者背景

94名の心不全群をNYHA分類に基づき3群に分類した。35名の患者がNYHAクラスI群、33名の患者がNYHAクラスII群、26名がNYHAクラスIII/IV群に分類された。研究対象となった患者の臨床的特徴を表10-1に示した。対照群と心不全群間に年齢、性別、冠危険因子において有意差は認められなかった。

表10-2に、各NYHA分類における血行動態諸指標を示した。心拍数はNYHAクラスIII/IV群において最も高値を示した。血圧は、収縮期血圧、拡張期血圧共に、各群間において有意差は認められなかった。LVEFは対照群に比し、NYHAクラスII群、NYHAクラスIII/IV群は有意に低値を示した(NYHAクラスII群 vs. 対照群 $p < 0.001$, NYHAクラスIII/IV群 vs. 対照群 $p < 0.001$)。また、NYHAクラスIII/IV群のLVEFは、NYHAクラスI群、及びNYHAクラスII群と比較して低値を示していた(NYHAクラスIII/IV群 vs. NYHAクラスI群 $p < 0.001$, NYHAクラスIII/IV群 vs. NYHAクラスII群 $p < 0.05$)。しかし、対照群とNYHAクラスI群との間には差は認められなかった。血漿BNPレベルはNYHAクラスIII/IV群において最も高値を示した。また、血漿BNPレベルは対照群に比し、NYHAクラスI群、NYHAクラスII群において有意に高値であった(NYHAクラスII群 vs. 対照群 $p < 0.001$, NYHAクラスI群 vs. 対照群 $p < 0.001$)。血漿BNPレベルは各群間において有意差が認められた。

7-2. 尿中バイオピリンレベル

尿中バイオピリンレベル ($\mu\text{mol/g creatinine}$) は、対照群に比し、心不全群において有意に上昇していた(表10-1, $p < 0.001$)。図11-1に各群における尿中バイオピリンレベルを示した。その結果、NYHAクラスI群(3.46 [2.60-5.42])、NYHAクラスII群(5.39 [3.37-9.36])、NYHAクラスIII/IV群(17.05 [7.85-42.91])の尿中バイオピリンレベルは、対照群(2.38 [1.57-

3.15]) と比較して有意に高値を示した。心不全の重症度が進むに従い、尿中バイオピリンレベルは増加し、各群間において有意差を持っていた (図 11-1)。

図 11-2 に尿中バイオピリンレベルと血漿 BNP との関係を示した。log バイオピリンレベルは log BNP レベルと有意な正相関を認めた ($r=0.650$, $p<0.001$)。

その他、log バイオピリンレベルは肺動脈楔入圧 ($r=0.327$, $p<0.001$)、平均肺動脈圧 ($r=0.389$, $p<0.001$) と正相関、心係数 ($r=-0.338$, $p<0.001$) および LVEF ($r=-0.415$, $p<0.001$) と負の相関を認めた。しかしながら、右房圧とは相関関係を認めなかった。

図 11-3 に心不全治療前後での NYHA 分類と尿中バイオピリンレベルを示した。心不全治療は NYHA クラス分類 (2.5 ± 0.1 から 1.7 ± 0.1 へ, $p<0.001$) と尿中バイオピリンレベル (7.43 [$3.84-17.05$] から 3.07 [$2.21-5.71$] , $p<0.001$) を両者とも有意に低下させた。

8. 考察

本研究は心不全患者における尿中バイオピリンレベルを解析した最初の報告である。尿中バイオピリンレベルがNYHA分類による心不全重症度と血漿BNPレベルの両方に関係して変動しているという臨床的事実を明らかにした。

近年、心不全患者において酸化ストレスの生化学的指標の上昇のみならず(47, 57)、心室機能障害と酸化ストレスとの間に明確な関連が存在することも報告されている(46, 49)。心室リモデリングあるいは心不全終末像へと導く進行性の心室拡張には、ROSが関与している(46, 49)。従って、ROSは心不全の病因のみならず、心不全の活動的な進行にも関与している可能性があると考えられている(48-51)。一方、生体内では、酵素依存性および非依存性の酸化防止合成物質が存在する。実際、Stockerらは生体においてビリルビンの強力な抗酸化作用を実証している(10, 58)。本研究では、酸化ストレスの指標としてビリルビンの代謝産物であるバイオピリンを測定した。その結果、対照群と比較して心不全群において尿中バイオピリンレベルが有意に増加していることを明らかにした。この結果は、心不全の進行が酸化ストレス増大と関係していることを示しており、これまでの報告に矛盾しない結果である(47, 59, 60)。尿中バイオピリンレベルは心不全が重症化するに従い上昇し、心不全の積極的な治療により減少する。尿中バイオピリンの増加は、ビリルビンがROSに対してscavengerとして作用した結果であると考えられ、バイオピリンは制御できない心不全に関連して生じるROSによって発生した過剰な酸化ストレスを間接的に反映していると推察できる。また、心不全治療によるバイオピリンの減少は心不全改善に伴うROSの減少を示していると思われる。

酸化ストレスは心室リモデリングに関与し、心不全を悪化させることから、心不全が重症化するに従い、尿中バイオピリンレベルも上昇するものと考えられる。一方、心不全は、各種サイトカイン、酸化ストレス、交感神経系およびレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系の慢性かつ持続的な活性化によって特徴づけられた、いわゆる一つの症候群である(21, 61)。交感神経の活性化

は心不全において心拍出量を維持する初期のメカニズムである。従って、ノルエピネフリンは心不全患者において上昇している (21, 63)。ノルエピネフリンは ROS を生成させ、心筋のアポトーシスを促進することから (62-64)、過剰なノルエピネフリンの上昇は、アポトーシスによる心筋細胞の減少を引き起こし、心室リモデリングを進行させることにもなる (62)。心筋アポトーシスおよび ROS の産生には、神経伝達物質 (ノルエピネフリン等) に加えてサイトカイン (例えばアンジオテンシン II 等) や機械的な力も引き金と成り得ると考えられる (62)。しかしながら、増加した酸化ストレスのはっきりとした原因については、本研究においては明らかにできていない。今後の更なる研究が必要である。

血漿 BNP レベルは左室機能、心筋障害の程度を反映するだけでなく、心不全患者の重要な予後予測因子の一つでもある (30, 65-67)。本研究では、尿中バイオピリンレベルと血漿 BNP との関係についても明らかにした。log バイオピリンレベルは log BNP レベルと密接な正相関を示した。ナトリウム利尿ペプチドは心内容量や心内圧の上昇に反応し放出される (68)。一方、心筋の過伸展は ROS の生成亢進に結びつくことが示されている (69)。アンジオテンシン II 自体も心不全を悪化させると考えられており、ラットにおいてアンジオテンシン II の注入は、BNP を含む様々な遺伝子発現を引き起こすことが見いだされている (70)。また、Suo らはアンジオテンシン II によって誘導された実験用高血圧モデルにおいて、左室 BNP の mRNA と免疫反応性 BNP レベルが、BNP プロモーター活性によって明確に制御されているということを証明している (32)。アンジオテンシン II の刺激そのものでも、心筋内の ROS 生成は増加する (71)。これら神経体液性因子やサイトカインに加えて、うっ血性心不全における心筋虚血、圧もしくは容量過負荷によっても ROS 生成を惹起することになり、その結果として心筋収縮性が障害されることとなる (72, 73)。これらのことが、尿中バイオピリンレベルと BNP が密接な相関性と有する一つの理由なのかもしれない。

本研究では、従来の報告と比較して、各群の心不全患者の左室駆出率が比較的高値を示している。近年、心筋収縮性は比較的保たれているにもかかわらず、心筋拡張性の低下により心不全症状が出現する、いわゆる “diastolic heart

failure” の概念が生まれてきている。血漿 BNP は拡張機能障害を有する患者においても増加する (74)。本研究では収縮機能障害のみならず拡張機能障害の心不全症例も含んでいた。さらに、可逆性心筋虚血発作によって心不全の増悪を繰り返す症例が心不全群に 6%含まれていた。これらの理由から、心不全各群における左室駆出率が従来の報告に比較して高値を示したものと思われる。

本研究において、抗酸化剤であるビタミン E またはカルベジロールを使用している症例も含んでいたが、バイオピリンレベルに対して有意な影響を認めなかった。その原因としては、観察期間、抗酸化剤治療グループの患者数、抗酸化物質の種類や投与量が影響している可能性がある。さらに、我々は、腎不全患者および肝臓機能障害患者を本研究において除外した。従って、今後、バイオピリンレベルに対する抗酸化剤、肝臓および腎臓疾患の影響を明確にする研究を進める必要がある。

バイオピリンの半減期は本研究の結果およびその解釈に影響を与える情報であるが、残念ながら、我々は詳細なデータを持ち合わせていない。しかしながら、急性心筋梗塞患者においては、数時間内にバイオピリンが劇的に変動すること (19)、冠攣縮性狭心症患者においても、冠攣縮による一過性の急性冠閉塞後 24 時間以内にバイオピリンレベルは劇的に変動することなど、我々を含めたいくつかの研究グループからのヒトにおける報告がある (17)。これらの報告は、ヒトにおいてバイオピリン濃度が短時間内に変動するというを示していると考えられる。

9. 結語

酸化ストレスの指標である尿中バイオピリンレベルは心不全の NYHA 分類と血漿 BNP レベルの両者と密接な関係がある。尿中バイオピリンの測定は非侵襲的な検査であり、臨床的に有用な検査である可能性がある。尿中バイオピリンレベルは心不全重症度を示す指標として有用である可能性が示唆された。

10. 表およびその説明

10-1. 患者背景-1

	対照群 (n=47)	心不全群 (n=94)
年齢 (歳)	65±2	65±1
性別 (男性/女性)	30/17	59/35
高血圧	22 (47%)	46 (49%)
喫煙	9 (19%)	23 (24%)
糖尿病	7 (15%)	18 (19%)
肥満 (BMI≥25)	12 (26%)	25 (27%)
総コレステロール (mg/dl)	192±6	187±3
HDL コレステロール (mg/dl)	51±2	53±2
LDL コレステロール (mg/dl)	121±5	115±3
中性脂肪 (mg/dl)	133±10	116±8
尿中バイオピリン (μmol/g creatinine)	2.38 (1.57-3.15)	5.91 (3.33-10.45)*

尿中バイオピリンレベル以外の結果は平均値±標準誤差 (mean±SEM) にて表記した。尿中バイオピリンレベルは中央値 (50th percentile 値)、および括弧内に 25th-75th percentile 値で表記した。

BMI = body mass index, HDL = high density lipoprotein, LDL = low density lipoprotein.

* p<0.001 vs. 対照群.

10-2. 患者背景-2

	対照群 (n=47)	NYHA I (n=35)	NYHA II (n=33)	NYHA III/IV (n=26)
心拍数 (bpm)	65±2 ^{**†}	70±2 ^{**}	77±4 ^{**}	98±4
血圧 (mmHg)	132±2/78±1	128±4/75±2	130±6/72±3	128±7/81±5
LVEF (%)	61.7±1.4 ^{****}	54.8±2.7 ^{**}	46.7±2.7 [*]	36.3±3.6
BNP (pg/ml)	24.9 ^{****##} (13.3-38.3)	80.2 ^{****} (29.3-153.0)	232.0 ^{**} (109.1-294.0)	404.5 (280.0-686.0)

BNP 以外の結果は平均値±標準誤差 (mean±SEM) にて表記した。BNP レベルは中央値 (50th percentile 値)、および括弧内に 25th-75th percentile 値で表記した。

BNP = B-type natriuretic peptide, LVEF = left ventricular ejection fraction,
NYHA = New York Heart Association.

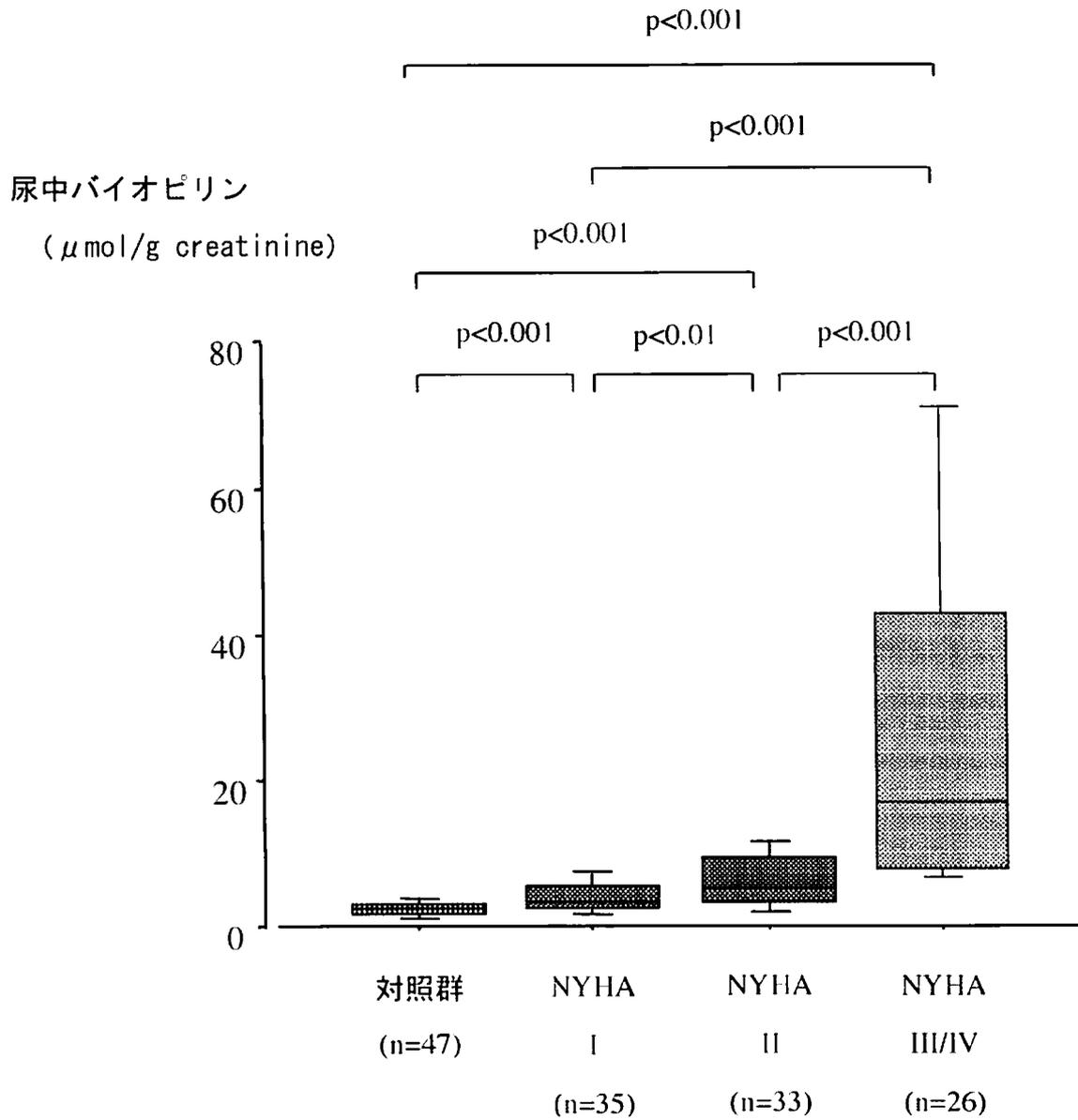
^{**} p<0.001 vs. NYHA III/IV. ^{*} p<0.05 vs. NYHA III/IV.

^{**} p<0.001 vs. NYHA II. [†] p<0.05 vs. NYHA II.

^{##} p<0.001 vs. NYHA I.

11. 図およびその説明

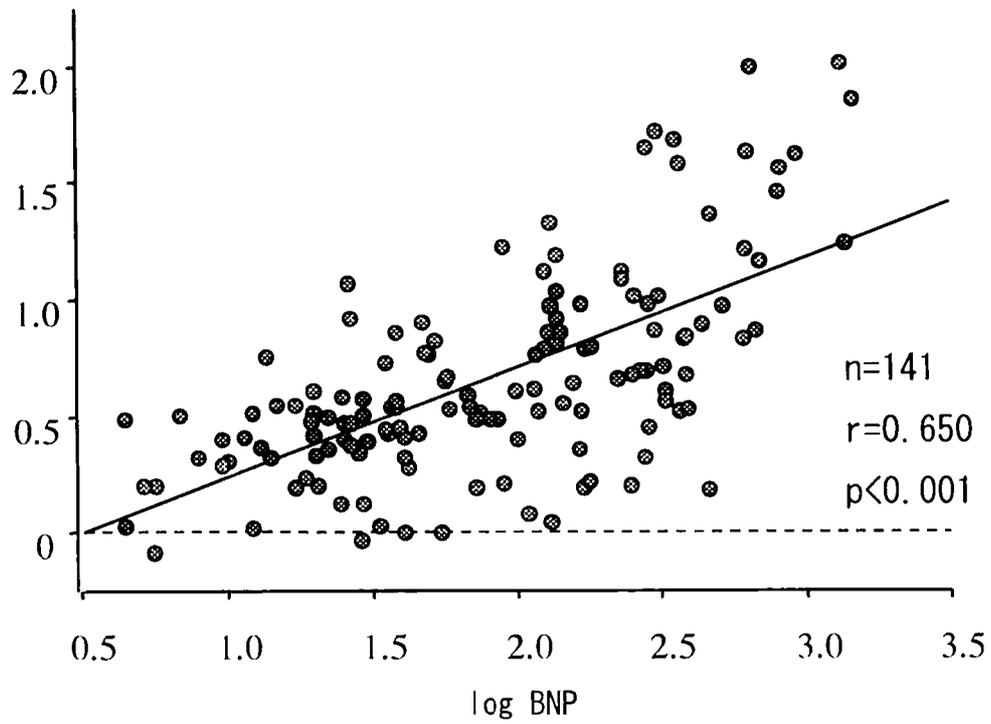
11-1. バイオピリンレベルと NYHA 分類



尿中バイオピリンレベルは対照群に比し、心不全群において有意に上昇しており、また、重症になるにしたがい、尿中バイオピリンレベルも高値を示した。結果は箱ヒゲ図で表示しており、中央値(50th percentile 値)、25th、75th、10th、90th percentile を示した。

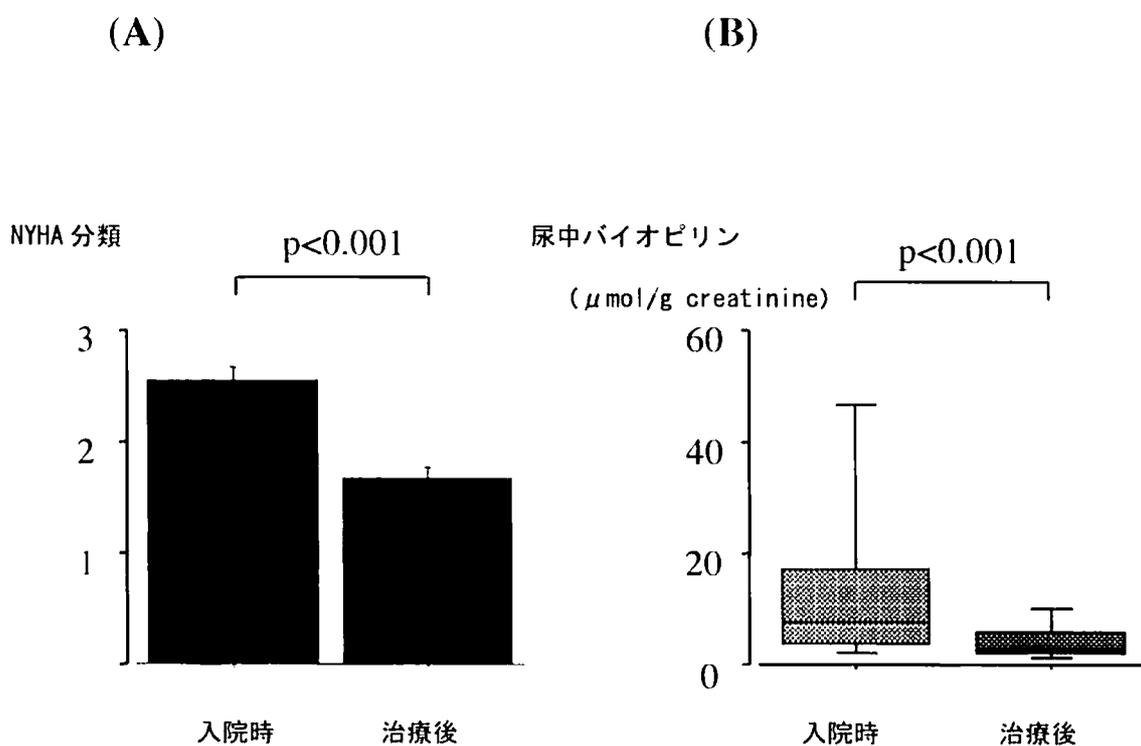
11-2. バイオピリンレベルと BNP の関係

log バイオピリン



log バイオピリンレベルは log BNP レベルと、 $r=0.650$ 、 $p<0.001$ と有意な正相関を示した。

11-3. 心不全治療前後での NYHA 分類と尿中バイオピリンレベル



心不全治療によって、心不全重症度は NYHA 2.5 ± 0.1 から 1.7 ± 0.1 へと低下すると共に、尿中バイオピリンレベルも $7.43 [3.84-17.05]$ から $3.07 [2.21-5.71]$ へと低下した。結果は (A) については平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で表記した。(B) は箱ヒゲ図で表示しており、中央値 (50th percentile 値)、25th、75th、10th、90th percentile を示した。

12. 文献

1. Young IS, Purvis JA, Lightbody JH, Adgey AA, Trimble ER. Lipid peroxidation and antioxidant status following thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 1993;14:1027-1033.
2. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2002;106:927-932.
3. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation*. 1990;82:1147-1159.
4. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995;91:2844-2850.
5. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
6. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*. 1996;98:2572-2579.
7. Miyamoto S, Sakamoto T, Soejima H, Shimomura H, Kajiwara I, Kojima S, Hokamaki J, Sugiyama S, Yoshimura M, Ozaki Y, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H. Plasma thioredoxin levels and platelet aggregability in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2003;146:465-471.
8. Hokamaki J, Kawano H, Soejima H, Miyamoto S, Kajiwara I, Kojima S, Sakamoto T, Sugiyama S, Yoshimura M, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H. Plasma Thioredoxin levels in patients with unstable angina. *Int J Cardiol*. 2004 in press.

9. Miyamoto S, Kawano H, Sakamoto T, Soejima H, Kajiwara I, Hokamaki J, Hirai N, Sugiyama S, Yoshimura M, Yasue H, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H. Increased plasma levels of thioredoxin in patients with coronary spastic angina. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6:75-80.
10. Stocker R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun*. 1990;9:101-112.
11. Dennerly PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rodgers PA, Stevenson DK. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med*. 1995;19:395-404.
12. Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vincent GM, Williams RR. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:250-255.
13. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987;235:1043-1046.
14. Izumi Y, Yamazaki M, Shimizu S, Shimizu K, Yamaguchi T, Nakajima H. Anti-bilirubin monoclonal antibody. II. Enzyme-linked immunosorbent assay for bilirubin fractions by combination of two monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*. 1988;967:261-266.
15. Yamaguchi T, Shioji I, Sugimoto A, Komoda Y, Nakajima H. Chemical structure of a new family of bile pigments from human urine. *J Biochem*. 1994;116:298-303.
16. Yamaguchi T, Terakado M, Horio F, Aoki K, Tanaka M, Nakajima H. Role of bilirubin as an antioxidant in an ischemia-reperfusion of rat liver and induction of heme oxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;223:129-135.

17. Morita Y, Takahashi H, Kamihata H, Yamamoto Y, Hara K, Iwasaka T. Urinary excretion of biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, increases after spasm provocation tests in patients with coronary spastic angina. *Int J Cardiol.* 2001;80:243–250.
18. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:99–103.
19. Shimomura H, Ogawa H, Takazoe K, Soejima H, Miyamoto S, Sakamoto T, Kawano H, Suefuji H, Nishikawa H, Arai H, Hokamaki J, Kajiwara I, Kugiyama K, Yoshimura M. Comparison of urinary biopyrrins levels in acute myocardial infarction (after reperfusion therapy) versus stable angina pectoris and their usefulness in predicting subsequent cardiac events. *Am J Cardiol.* 2002;90:108–111.
20. Tsujita K, Shimomura H, Kawano H, Hokamaki J, Fukuda M, Yamashita T, Hida S, Nakamura Y, Nagayoshi Y, Sakamoto T, Yoshimura M, Arai H, Ogawa H. Effects of edaravone on reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004;94:481–484.
21. Mehra MR, Uber PA, Francis GS. Heart failure therapy at a crossroad: are there limits to the neurohormonal model? *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1606–1610.
22. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation.* 1994;90:195–203.
23. Takemura G, Fujiwara H, Horike K, Mukoyama M, Saito Y, Nakao K, Matsuda M, Kawamura A, Ishida M, Kida M, et al. Ventricular expression of atrial natriuretic polypeptide and its relations with hemodynamics and

- histology in dilated human hearts. Immunohistochemical study of the endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 1989;80:1137-1147.
24. Yamazaki T, Komuro I, Shiojima I, Yazaki Y. The molecular mechanism of cardiac hypertrophy and failure. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;874:38-48.
 25. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol*. 1998;274:R577-R595.
 26. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1991;83:504-514.
 27. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;118:131-139.
 28. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*. 1988;332:78-81.
 29. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168:863-870.
 30. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med*. 1998;339:321-328.
 31. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest*. 1991;87:1402-1412.
 32. Suo M, Hautala N, Foldes G, Szokodi I, Toth M, Leskinen H, Uusimaa P, Vuolteenaho O, Nemer M, Ruskoaho H. Post-transcriptional control of BNP gene expression in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2002;39:803-808.

33. Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, Nakao K, Imura H. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1993;87:464-469.
34. Grantham JA, Burnett JC Jr. BNP: increasing importance in the pathophysiology and diagnosis of congestive heart failure. *Circulation*. 1997;96:388-390.
35. Cowie MR, Struthers AD, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Sutton GC. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet*. 1997;350:1349-1353.
36. Yoshimura M, Yasue H, Morita E, Sakaino N, Jougasaki M, Kurose M, Mukoyama M, Saito Y, Nakao K, Imura H. Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1991;84:1581-1588.
37. Studer R, Reinecke H, Muller B, Holtz J, Just H, and Drexler H. Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in the failing human heart. Quantification by competitive RNA polymerase chain reaction. *J Clin Invest*. 1994;94:301-310.
38. Zisman LS, Abraham WT, Meixell GE, Vamvakias BN, Quaife RA, Lowes BD, Roden RL, Peacock SJ, Groves BM, Reynolds MV, Bristow MR, Perryman MB. Angiotensin II formation in the intact human heart. Predominance of the angiotensin-converting enzyme pathway. *J Clin Invest*. 1995;96:1490-1498.
39. Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, and Korner PI. Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*. 1986;73:615-621.

40. Kurose M, Okumura K, Ogawa H, Yoshimura M, Morita E, and Yasue H. Reduced cardiac extraction of norepinephrine and epinephrine in patients with heart failure—correlation with left ventricular function. *Int J Cardiol.* 1994;47:21–29.
41. Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, Kirlin PC, Nicklas J, Liang CS, Kubo SH, Rudin-Toretzky E, and Yusuf S. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation.* 1990;82:1724–1729.
42. Goldsmith SR. Control of arginine vasopressin and congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1993;71:629–630.
43. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, and Burnett JC Jr. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation.* 1994;89:1580–1586.
44. Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F, Compagnon P, Mace B, Comoy E, Letac B, Thuillez C. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation.* 1997;96:1976–1982.
45. Li X, Moody MR, Engel D, Walker S, Clubb FJ Jr, Sivasubramanian N, Mann DL, Reid MB. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation.* 2000;102:1690–1696.
46. Ghatak A, Brar MJ, Agarwal A, Goel N, Rastogi AK, Vaish AK, Sircar AR, Chandra M. Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *Int J Cardiol.* 1996;57:119–127.

47. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, Jeejeebhoy KN. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1352-1356.
48. Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*. 2000;101:33-39.
49. Werns SW, Shea MJ, Lucchesi BR. Free radicals and myocardial injury: pharmacologic implications. *Circulation*. 1986;74:1-5.
50. Ball AM, Sole MJ. Oxidative stress and the pathogenesis of heart failure. *Cardiol Clin*. 1998;16:665-675.
51. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res*. 1998;40:426-432.
52. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*. 1999;85:357-363.
53. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*. 2000;192:1001-1014.
54. Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, Chang DL, Pagano PJ, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res*. 1999;85:147-153.
55. Kang PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res*. 2000;86:1107-1113.

56. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C53-C60.
57. Singal PK, Khaper N, Farahmand F, Bello-Klein A. Oxidative stress in congestive heart failure. *Curr Cardiol Rep*. 2000;2:206-211.
58. Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1994;269:16712-16719.
59. Yucel D, Aydogdu S, Cehreli S, Saydam G, Canatan H, Senes M, Cigdem Topkaya B, Nebioglu S. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem*. 1998;44:148-154.
60. Mallat Z, Philip I, Le Bret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation*. 1998;97:1536-1539.
61. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med*. 2001;110:37S-46S.
62. Fortuno MA, Ravassa S, Fortuno A, Zalba G, Diez J. Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension: mechanisms and potential management. *Hypertension*. 2001;38:1406-1412.
63. Benedict CR, Francis GS, Shelton B, Johnstone DE, Kubo SH, Kirilin P, Nicklas J, Liang CS, Konstam MA, Greenberg B, Yusuf S. Effect of long-term enalapril therapy on neurohormones in patients with left ventricular dysfunction. SOLVD Investigators. *Am J Cardiol*. 1995;75:1151-1157.
64. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation*. 1998;98:1329-1334.

65. Koglin J, Pehlivanli S, Schwaiblmair M, Vogeser M, Gremer P, vonScheidt W. Role of brain natriuretic peptide in risk stratification of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1934–1941.
66. Omland T, Aakvaag A, Bonarjee VV, Caidahl K, Lie RT, Nilsen DW, Sundsfjord JA, Dickstein K. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. *Circulation*. 1996;93:1963–1969.
67. Cowie MR, Mendez GF. BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002;44:293–321.
68. Struthers AD. Prospects for using a blood sample in the diagnosis of heart failure. *QJM*. 1995;88:303–306.
69. Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest*. 1995;96:2247–2259.
70. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000;52:11–34.
71. Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, Namba M. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II. *Circulation*. 1998;98:794–799.
72. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985;312:159–163.
73. Katz AM. Cellular mechanisms in congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1988;62:3A–8A.

74. Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, Gardetto N, Wanner E, Maisel AS. Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation*. 2002;105:595-601.