

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名：尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 測定は
急性心筋梗塞再灌流療法後の心事故予測因子となる

(Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels increase after
reperfusion in acute myocardial infarction and may predict
subsequent cardiac events)

著者名： 永吉 靖央

Yasuhiro Nagayoshi

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：

2005 年度

目次

1. 要旨	3-5
2. 発表論文リスト	6-8
3. 謝辞	9
4. 略語一覧	10
5. 研究の目的と背景	11-17
6. 研究方法	18-19
7. 研究結果	20-21
8. 考察	22-24
9. 結語	25
10. 表およびその説明	26-28
11. 図およびその説明	29-37
12. 文献	38-46

1. 要旨

【背景】 活性酸素種の産生は急性心筋梗塞（AMI）の病態に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の値は酸化ストレスに対する細胞の反応を示唆している。本研究では急性心筋梗塞患者において、再灌流療法後の尿中 8-OHdG の推移を観察し、さらに臨床経過と尿中 8-OHdG 値の関係を検討した。

【方法】 研究対象は AMI 患者 64 名 (AMI 群) および 48 名の対照患者 (control 群) である。AMI 群は再灌流前、再灌流 4 時間、24 時間、1 週間、2~4 週間後に尿を採取した。control 群は心臓カテーテル検査施行日の早朝、検査 4 時間後、24 時間後に尿を採取した。さらに、AMI 群は入院 2 週間以内の心血管イベントの有無によって 2 群に分けて検討を行った。

【結果】 control 群と AMI 群との間に冠危険因子の差は認められなかった。AMI 群において入院時の尿中 8-OHdG/クレアチニン値 (ng/mg) (以下尿中 8-OHdG レベル) は control 群に比し有意に高値を示した (AMI 群: 25.4 ± 3.8 , control 群: 13.9 ± 0.6 , $p < 0.05$)。入院時の Killip 分類 II~IV 群 (35.0 ± 9.2) は Killip I 群 (19.4 ± 2.7) に比して有意に上昇していた。再灌流療法後 4 時間で尿中 8-OHdG レベルはピークとなり、再灌流前に比べ有意に上昇した (49.3 ± 6.2 , $p < 0.001$)。心血管イベント群 (n=15) は入院時の尿中 8-OHdG レベルが非イベント群 (n=47) に比し高値を示していたが、再灌流療法後 4 時間で両群は同等レベルまで上昇し、その後速やかに低下した。しかし心血管イベント群では再灌流後 24 時間後も高い値を維持していた (心血管イベント群: 21.0 ± 6.0 , 非イベント群: 11.8 ± 0.8 , $p < 0.05$)。

【考察】 AMI 患者において尿中 8-OHdG レベルは再灌流療法後にピーク値を示し、再灌流治療後 24 時間で control 群レベルまで低下する。しかし心血管イベント群では高値を維持しており、酸化ストレスと心血管イベントの関与が示唆される。

【結論】 AMI 患者において尿中 8-OHdG レベルを測定することは心血管イベントのリスクを層別化するのに有用である可能性が示唆された。

Summary

Background– The generation of reactive oxygen species has a critical role in the pathology of acute myocardial infarction (AMI). The levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) are indicative of the cellular responses to oxidative stress. We measured the urinary 8-OHdG levels in patients with AMI, and examined the relationship between the subsequent clinical course and urinary 8-OHdG levels.

Methods– The study subjects consisted of 64 consecutive patients with AMI, and 48 control subjects. In the patients with AMI, urine samples were obtained before reperfusion therapy and then at, 4 hours, 24 hours, 1 week, and 2–4 weeks after reperfusion therapy. In the control subjects, urine samples were obtained before cardiac catheterization and then at 4 hours and 24 hours after cardiac catheterization. The patients with AMI were stratified into 2 groups based on the occurrence of a major cardiac event within 2 weeks of hospital admission.

Results– The urinary 8-OHdG/creatinine (ng/mg) levels on admission in AMI patients (25.4 ± 3.8 , mean \pm SEM) were significantly higher than the levels in control subjects (13.9 ± 0.6 p<0.05). The urinary 8-OHdG/creatinine levels on admission in patients with Killip classification II–IV (35.0 ± 9.2) were higher than those with Killip classification I (19.4 ± 2.7 , p<0.05). The urinary 8-OHdG/creatinine levels peaked at 4-hour after reperfusion therapy (49.3 ± 6.2 , p<0.001). In cardiac event group, the urinary 8-OHdG/creatinine levels on admission were higher than non-cardiac event group. The urinary 8-OHdG/creatinine levels of the 2 groups increased to the same levels 4 hours after reperfusion. The levels decreased immediately in the both groups, while the levels at 24-hour were high in the cardiac event

group (n=15, 19.4 ± 2.7) than in the non-cardiac event group (n=47, 11.6 ± 0.8 , $p < 0.05$).

Conclusions– These results provide additional evidence that oxidative stress increases after reperfusion, and that augmented oxidative stress may play an important role in the cardiac event after the reperfusion therapy. The urinary 8-OHdG/CRE levels may serve as a useful indicator of the risk of cardiac events in AMI patients

2. 発表論文リスト

関連論文

1. Yasuhiro Nagayoshi, Hiroaki Kawano, Jun Hokamaki, Shinzo Miyamoto, Sunao Kojima, Hideki Shimomura, Kenichi Tsujita, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Hisao Ogawa.
Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels increase after reperfusion in acute myocardial infarction and may predict subsequent cardiac events. *Am J Cardiol.* 2005;95:514-517.

その他の論文

1. 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.
2. 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.

3. Yasuhiro Nagayoshi, Kensuke Toyama, Hiroaki Kawano, Ikuo Misumi, Shinzo Miyamoto, Sunao Kojima, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Hisao Ogawa.
Platypnea-orthodeoxia syndrome combined with multiple congenital heart anomalies. *Intern Med.* 2005;44:453-457.
4. Yasuhiro Nagayoshi, Jun Hokamaki, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Sunao Kojima, Hidetomo Maruyoshi, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Hisao Ogawa, Hideki Shimomura, Kenichi Tsujita.
Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels are elevated in relation to severity of heart failure. *Circulation journal.* 2003;67, Suppl. 1:596.
5. Yasuhiro Nagayoshi, Jun Hokamaki, Hisao Ogawa, Kenichi Tsujita, Hideki Shimomura.
Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine to urinary creatinine ratio is correlated with severity of cardiac function in patients with old myocardial infarction. *Circulation.* 2004;110, 17:III-704.
6. Yasuhiro Nagayoshi, Jun Hokamaki, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Hisao Ogawa.
Clinical usefulness of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine to urinary creatinine ratio in the evaluation of myocardial ischemia undergoing revascularization therapy. *Circulation journal.* 2005;69, Suppl. 1:211.
7. Yasuhiro Nagayoshi, Jun Hokamaki, Sunao Kojima, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Hisao Ogawa.
Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine /creatinine in reduced left ventricular function (Comparison of oxidative stress in ischemic heart

disease versus non- ischemic heart disease). *Circulation journal*.
2005:69, Suppl.1:197.

8. Yasuhiro Nagayoshi, Masafumi Nakayama, Jun Hokamaki, Hideki Shimomura, Kenichi Tsujita, Takuya Yamashita, Masaya Fukuda, Yoshinori Nakamura, Hisao Ogawa.

Juvenile hemochromatosis in a Japanese family associated with a novel mutation (Q 312 X) in the HJV gene. *Circulation*. 2005. Suppl (in press).

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をはじめ多くの先生方に深く感謝いたします。

4. 略語一覽

AMI: acute myocardial infarction

ATP: adenosine triphosphate

BMI: body mass index

BNP: B-type natriuretic peptide

CK-MB: creatine kinase MB isozyme

CPK: creatine phosphokinase

CRP: C-reactive protein

dG: deoxyguanine

DNA: deoxy nucleic acid

HDL: high density lipoprotein

LDL: low density lipoprotein

MMP: matrix metalloproteinase

NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NO: nitric oxide

NYHA: New York Heart Association

PCI: percutaneous coronary intervention

ROS: reactive oxygen species

SOD: superoxide dismutase

TBARS: thiobarbituric acid reactive substance

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

地球が誕生した約 46 億年前、大気中の構成比では二酸化炭素がほとんどを占め、酸素はほとんどなかったと考えられている。その環境で最初に誕生した生命は硫化水素等を利用していった。現代の真核生物はミトコンドリアを有し、呼吸に酸素を利用することで硫化水素と比べて飛躍的に高いエネルギーを得ている。ミトコンドリアは細胞の中で酸素を還元しエネルギーである adenosine triphosphate (ATP) を産生する。この一電子還元によって活性化され、活性酸素の一つであるスーパーオキシドが産生される。このスーパーオキシドはそれ自体の反応性は低く、連鎖的な脂質過酸化反応を引き起こす可能性は低いと考えられている。しかし、superoxide dismutase (SOD) によって過酸化水素水に変換された後、レドックス分解（フェントン反応）を介してより反応性が高いヒドロキシラジカルが生じる。このように reactive oxygen species (ROS) は生体のなかで常に産生されており、呼吸で摂取される酸素の数%が活性酸素となるとされている（図 11-1）。

好中球の活性酸素生成障害が慢性肉芽腫症という易感染性疾患の原因となるのに代表されるように、本来 ROS はエネルギー産生、不要な細胞の処理、細胞情報伝達等に必要な物質である。しかし、余剰な活性酸素は反応性の強さから生体の成分（蛋白質、核酸、脂質等）を損傷させてしまうため、好気性生物は進化の過程で何らかの抗酸化システムを獲得してきた。酸化ストレスとは生体内で生成する活性酸素群の酸化的損傷能力と生体内抗酸化システムの差として定義される。この酸化ストレスが発ガン、遺伝子疾患、免疫疾患、生活習慣病、老化に関与していることが明らかになってきた。

5-2. 酸化ストレスと動脈硬化

心臓は年位4000万回以上も拍動を繰り返し、その間400万リットルもの血液を駆出することにより全身の血液循環を維持している反面、酸素需要が多い器官で

あるため、心筋は常にROSに暴露される危険性をはらんでいる。さらに、血流に暴露されている血管内皮細胞はROSによる傷害を最も受けやすい (1)。近年、心血管疾患においても酸化ストレスが動脈硬化の進行、血栓の形成に重要な役割を果たすことが解明されてきた。

粥状動脈硬化性病変の初期には泡沫細胞が認められ、細胞内には大量のエステル化コレステロールを蓄積している。遺伝的にlow density lipoprotein (LDL) 受容体を欠く家族性高脂血症の患者においては動脈硬化が若年から進行していることから血液中のLDLが動脈硬化に影響することが指摘されている (2)。SteinbergらはLDLが内皮下で酸化修飾を受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、動脈硬化を促進するという酸化LDL仮説を提唱した (3)。LDLの酸化はまだ詳細な機序は明らかではないが、好中球のミエオロペルオキシダーゼ(4) やリポキシゲナーゼ由来 (5, 6) のROSが関与している可能性が考えられている。血管においてreduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPHオキシダーゼ)、キサンチンオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼなどを介して産生されるROSはnitric oxide (NO) の生理的活性を抑え、炎症細胞を発現し、細胞増殖、アポトーシス、細胞外マトリックス再構築を促すことで動脈硬化を進行させる (7)。動脈硬化が進行すると、血流の乱流がおこりNADPHオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼが活性化される悪循環もROS産生に寄与している (8)。さらに炎症指標であるC-reactive protein (CRP)はNADPH オキシダーゼの発現を誘導することから炎症と酸化ストレスは相互に増幅するものと思われる (9)。

5-3. 酸化ストレスと急性冠症候群

急性心筋梗塞 (AMI)、不安定狭心症などの急性冠症候群発症のメカニズムには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明らかになってきた (10, 11)。さらに van der Wal と Becker らはAMIの冠動脈責任病変ではプラーク破裂だけではなく、プラークびらんが認められることを報告した (12)。このようなプラークの不安定化をもたらす原因としては内皮の

傷害、炎症、酸化ストレスの関与が考えられている。内皮細胞の機能障害や傷害がおこるとTリンパ球をはじめとする白血球の内皮への接着、内皮下への遊走、浸潤、血小板の接着、凝集などが惹起されてプラークが不安定化する。酸化ストレスはコラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックスを分解する酵素である matrix metalloproteinase (MMP) 遺伝子発現を増加させ、その結果プラーク線維性被膜の脆弱化、不安定化をもたらす破綻の誘因となることが知られている (13, 14)。

近年、ヒト大規模研究で虚血性心疾患の一次予防、二次予防目的で抗酸化剤の投与が試みられてきた。しかし、数々の動物実験では抗酸化剤が動脈硬化に対して有効である結果を示しているのに対して、ヒトではビタミンEをはじめとする抗酸化剤の有効性はまだ確立されていない (15, 16)。今後、抗酸化剤の種類、投与量、対象患者、観察期間について検討すべき課題が残されている。

5-4. 再灌流傷害と酸化ストレス

AMI の治療において早期再灌流の目的は虚血心筋を救済し、梗塞範囲を減少させることである。1977 年に Gruentzig が先端にバルーンを装着した細いカテーテルを用いてヒトの冠状動脈の狭窄部拡張に成功してから、percutaneous coronary intervention (PCI) 手技は虚血性心疾患の最も有力な治療法の一つとなった。さらにステントの登場によって慢性期開存性はさらに向上し、もはや PCI は AMI においても第一選択の治療法である (17)。しかしながら短時間で血流を回復し、組織学的、生化学的には軽度の異常にもかかわらず心筋収縮能のみ著明に低下する現象 (心筋スタニング) (18) や、再灌流直後の不整脈 (19)、冠動脈拡張後も有効な血流が得られない no reflow 現象 (20) などいわゆる虚血-再灌流障害という未だ解決されていない問題が残されている (21, 22)。再灌流障害の原因として、細胞内 Ca^{2+} 過負荷 (23) や心筋細胞内 ATP 減少のほかに、酸化ストレスの産生も重要な要素と考えられている (24)。再灌流において浸潤白血球 (25)、キサンチンオキシダーゼや心筋内ミトコンドリアなどから産生された ROS はイオンチャンネル、イオンポンプを障害し、心筋細胞内の収縮蛋白を障害することが

報告されており、虚血再灌流で生じた心筋収縮不全は SOD で有意に抑制される (26)。Bollini らは再灌流 1 分以内に大量のフリーラジカルが発生し、これが心筋スタニング発症に関係があることを示した (27)。

ビリルビンは ROS のスカベンジャーとして作用した後バイオピリンとして尿中に排泄される。従って尿中バイオピリンの増加は ROS の増加、すなわち酸化ストレスの増加を反映している (28)。現在、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 (29)。我々は AMI 患者例において尿中バイオピリン (バイオピリン/クレアチニン比) を測定した。その結果尿中バイオピリンは再灌流前からすでに上昇しており、再灌流後 4 時間をピークにして徐々に低下した。さらに心血管イベント群と、非イベント群にわけて尿中バイオピリン最大値を比較したところ、心血管イベント群で有意に高値であった。従って AMI 患者のリスクの層別化としてバイオピリン測定の有用性が明らかとなった (30)。

5-5. 心不全と酸化ストレス

心筋梗塞が発生すると、梗塞部位の菲薄化と伸展に続いて、梗塞境界部、非梗塞部において代償性肥大、壁の伸展、内腔拡大が起こる、心筋リモデリングをきたす (31)。アンギオテンシン II はアンギオテンシンタイプ 1 受容体を介して心筋細胞の肥大化、線維芽細胞の増殖を引き起こすことで心筋リモデリングを誘導する (32)。酸化ストレスもまた左室リモデリングに重要な役割を果たすことが報告されている (33-35)。ROS の起源としてはアンギオテンシン II (36)、XO (37) そしてミトコンドリア由来が考えられている。特に梗塞後心筋においてミトコンドリア電子伝達系の機能低下に伴う ROS の産生増加が左室リモデリングの進展に関わっている。ミトコンドリアは活性酸素を産生すると同時に酸化を受ける標的となり、ミトコンドリア DNA 自身が傷害を受けるという悪循環をきたす可能性が指摘されている (38)。

左室リモデリングの進行は、左室全体の収縮性低下を来し、いずれは非代償性心不全におちいる。酸化ストレス、交感神経系、レニン-アンギオテンシン系、tumor necrosis factor alpha (TNF- α)等のサイトカインが誘導され、心筋収縮の低下を引き起こすとともに、心筋リモデリングが進行する。従って、心不全は神経体液性因子、サイトカインだけでなく、酸化ストレスも関連した症候群と考えられるようになってきた。

我々は尿中バイオピリンを用いて、心不全患者における酸化ストレスの影響を検討した。その結果、尿中バイオピリンは対照群に比して心不全群では有意に上昇していることが明らかになった。さらに心不全の New York Heart Association (NYHA) 分類の重症度が進むに従い、尿中バイオピリンは増加した。心不全患者の重要な予後因子の一つである B-type natriuretic peptide (BNP) 濃度とは正相関を認めた (図 11-2)。尿中バイオピリンは肺動脈楔入圧、平均肺動脈圧と正相関し、心係数、および左室駆出率と負の相関を認めた。また尿中バイオピリンは心不全の改善に伴い低下した。以上の結果から、尿中バイオピリン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た (39)。

5-6. 酸化的 DNA 損傷

真核生物において Deoxy Nucleic Acid (DNA) は核とミトコンドリアに存在している。ゲノム DNA やその前駆体のヌクレオチドプールは ROS による損傷を受けることが明らかになっている。数十種類におよぶ DNA 酸化修飾塩基の中で最も研究されている傷害の一つに 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) がある (図 11-3)。1984 年、Kasai らはグアニンのプリン環 8 位炭素が主にヒドロキシラジカルによって酸化され 8-OHdG が産生されることを発見した (40)。8-OHdG は哺乳動物 DNA で生じる修飾塩基の中でも多量に生じ、ヒトにおいては通常の代謝過程で 1 日に細胞あたり約 170 残基の割合で生じている (41)。さらに、DNA 複製においてシトシンとほぼ同じ効率でアデニンと対合して突然変異の原因となる (42)。こうした核酸の酸化損傷に対して生体は防御機構を備えている。酸化ヌクレオチド

は特異的酵素によって分解されることで DNA とりこみが抑制され、DNA 中の酸化塩基は塩基除去修復によって修復される。現在明らかにされている代表的な酵素としては MTH1、OGG1、MUTYH、APEX などが報告されている (43)。DNA の直接酸化により生じた 8-OHdG は OGG1 遺伝子産物の 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼによって除去され、生体内で代謝されることなく最終的に尿中に排泄される。Sakumi らは MTH1、OGG1 の遺伝子欠損マウスを樹立し自然発ガンについての解析を行っているが、これらの修復酵素欠損マウスでは DNA 中の 8-OHdG の蓄積は野生株より数倍の上昇を認めたと報告している (44)。

近年、この酸化的 DNA 損傷である 8-OHdG を測定することで酸化ストレスの定量化が検討されている (45)。当初この 8-OHdG の検出には HPLC 法が一般的に行われてきた。しかし生体で生成する 8-OHdG は微量であり、精度に問題があった。現在は、N45.1 8-OHdG モノクローナル抗体を利用した定量化が検討されている。この抗体の 8-OHdG に対する感度は高く、①8 位の OH 基②リボースが結合していること③リボースの 2' 位が OH 基ではなく H がついていることの 3 カ所を認識しているため特異度が高い。すでに 4 種類の DNA 塩基を含む 21 種類の DNA 塩基類縁物との交差性がないことが確認されている。血液中の 8-OHdG が常温で放置した場合は 1 時間で 2 倍になるなど不安定であるのに対して、尿中の 8-OHdG は比較的安定で、微生物汚染を防止できれば分解しない。ヒト尿の場合クレアチニン濃度で割り返し、補正する方法がとられるが、これより水分摂取量の変化に伴う尿濃度の変化を補正することができる。常温での 24 時間採取も可能であり、 -80°C であれば長期保存も可能である。測定は生体試料と定量的に混合される抗 8-OHdG 抗体の内、試料中の 8-OHdG と結合しない残りの抗体がプレート上にコーティングされた蛋白コンジュゲート 8-OHdG に吸着する。このマウス IgG 抗体を認識する二次抗体に結合している発色試薬の発色の大きさを 8-OHdG を検出する。尿中 8-OHdG は癌 (46)、糖尿病 (47)、喫煙 (48)、基礎代謝亢進 (41) で上昇しており、動脈硬化についても頸動脈プラークで 8-OHdG の産生と DNA 修復酵素の発現亢進が確認されている (49)。Nishikawa らは糖尿病性大血管障害を有する群では 8-OHdG が増加しており、HbA_{1c} 高値群、蛋白尿群、頸動脈内膜肥厚群などで有意に尿中

8-OHdG が高値を示しており、冠動脈疾患のリスクと相関することを示している (50)。

5-7. 本研究の目的

現在までの報告で、酸化ストレスに対する防御指標である、チオレドキシシンや、バイオピリンが AMI で変動することは明らかになっている。しかし、ヒト AMI における DNA 酸化的損傷については評価が難しく、まだ検討がなされていなかった。今回我々は尿中 8-OHdG を用いて、AMI 虚血再灌流療法における DNA 酸化損傷の変動を検討した。さらに ROS と心血管事故との関連について、尿中 8-OHdG レベルが入院中の心血管事故発症予測因子となり得るか否かを検討した。

6. 研究方法

6-1. 対象

連続 64 名（平均年齢 64 ± 1.7 歳、男性 48 名、女性 16 名）の急性心筋梗塞患者 (AMI 群) を登録した。すべての AMI 患者は発症 6 時間以内に来院し、30 分以上持続する胸痛、12 誘導心電図での隣接する 2 誘導以上での 0.2mV 以上の ST 上昇、血清 creatinine kinase MB isozyme (CK-MB) の正常値の 2 倍以上の上昇に基づいて AMI と診断した。理学所見での重症度分類は Killip 分類で行い、血行動態での重症度評価は Forrester 分類にて行った。緊急心臓カテーテル検査を行い、Swan-Ganz カテーテルによる血行動態評価および冠動脈造影を行った。本研究において悪性新生物、肝機能障害および血清クレアチニン値 1.5mg/dl 以上の腎機能障害を有する症例は除外した。

また、48 名（平均年齢 62 ± 1.9 歳、男性 33 名、女性 15 名）の対照患者 (control 群) を登録した。AMI 群と年齢・性別を一致させ、心臓カテーテル検査を含めた循環器諸検査を施行した結果、明らかな心疾患が証明されなかったものを control 群として登録した。本研究の実施あたりは大学倫理委員会からの承諾を受け、全ての患者からインフォームド・コンセントを得た。

6-2. 冠動脈造影および再灌流療法

全ての AMI 群患者は緊急心臓カテーテル検査を施行した。初回造影での心筋梗塞責任血管の血流灌流度は Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) grade にて診断した (51)。2~5mg の硝酸イソソルビドを冠動脈内に注入しても血管末梢まで有効な血流が得られない (grade 0~2) 症例に経カテーテル的に再灌流療法が施行された。冠血流が末梢まで正常に造影される grade 3 を再灌流療法成功と定義した。

6-3. 尿中 8-OHdG レベルの測定

AMI 群において、8-OHdG 測定用の尿検体は再灌流療法前、再灌流 4 時間後、24 時間後、1 週間後、2 週間後（慢性期）に採取した。尿サンプルは速やかに 4°C、2000 回転で遠心分離された後 -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。control 群では心臓カテーテル検査日の早朝、検査 4 時間後、24 時間後に採尿した。尿中 8-OHdG 濃度は anti-8-OHdG monoclonal antibody (45.1) を用いた competitive inhibition ELISA 法 (8-OHdG check, Japan Institute for the Control of Aging, Fukuoroi, Shizuoka) により測定した。その結果は個々の尿中クレアチニン濃度により補正し、解析には尿中 8-OHdG/クレアチニン比（以下、尿中 8-OHdG レベル）を使用した。同一検体での同時再現性 (n=6) は C. V. 値 6%未満、同一検体での日差再現性 (n=6) は C. V. 値 8.0%未満であった。また、同時にもう一つの酸化ストレス指標である尿中バイオピリン濃度を測定し比較検討した。尿中バイオピリンは anti-bilirubin monoclonal antibody (24G7) を用いて inhibition ELISA 法 (Shino-test Co, Tokyo, Japan) により測定した (29, 30)。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）を解析に使用した。同一検体での同時再現性 (n=10) は C. V. 値 3%未満、同一検体での日差再現性 (n=10) は C. V. 値 8.5%未満であった。

6-4. 統計学的解析

尿中 8-OHdG レベルを含めたすべての結果は、平均値±標準誤差 (mean±SEM) にて表記した。尿中 8-OHdG レベルの経時変化の有意差は一元配置分散分析法を用いて評価し、多重比較検定 (Scheffé F test) を行った。AMI 群と control 群の年齢、コレステロール値、中性脂肪値、尿中 8-OHdG レベルの比較は対応のない t 検定で比較した。その他の名義変数に関しては χ^2 テストにて比較した。creatine phosphokinase (CPK) 値、CK-MB 値、左室駆出率と尿中 8-OHdG レベル間の関係は回帰分析を用いて検討した。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

研究対象となった患者の臨床的特徴を表 10-1 に示した。control 群と AMI 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が、血清 HDL コレステロール値のみは AMI 群で有意に低い値を示した。AMI 群では梗塞責任血管の外に多枝冠動脈狭窄を有している症例もあり、それぞれの割合は一枝病変群 33 名、二枝病変群 20 名、三枝病変群 11 名であった。

表 10-2 に AMI 群 64 名の患者背景を示した。64 名は入院時の理学所見によって Killip 分類を用いて分類された。何も症状を認めないクラス I 群と心不全傾向を認めるクラス II-IV 群とに分類し、42 名の患者がクラス I 群、22 名がクラス II-IV 群であった。血行動態正常な Forrester subset I 群とポンプ失調を示す II-IV 群に分類し、34 名の患者が subset I 群、30 名の患者が subset II-IV 群であった。心筋逸脱酵素である CPK のピーク値の平均は 3117 ± 333 (IU/L)、CK-MB 値は 289 ± 45 (IU/L) であった。

AMI 群の 62 名に再灌流療法が施行された。64 名中残る 2 名については、1 名が冠動脈造影施行時には自然再疎通 (TIMI grade 3) が得られており、1 名は梗塞血管が微小であったため保存的加療が選択された。再灌流療法が施行された 62 名では 53 名が経皮的冠動脈形成術、ステント植え込み術が施行されており、9 名には血栓溶解療法が施行された。再灌流が施行患者のうち入院中 2 週間以内に死亡、致死的不整脈、亜急性閉塞、心不全増悪を起こした 15 名を心血管イベント群と定義し、非イベント群と比較を行った。

7-2. 尿中 8-OHdG レベル

AMI 群入院時の尿中 8-OHdG レベルの比較を図 11-4 に示す。Killip 分類クラス II-IV 群 (35.0 ± 9.2 ng/mg) は I 群 (19.4 ± 2.7) に比して尿中 8-OHdG レベルは有意に上昇を認めていた ($p < 0.05$)。Forrester 分類 subset II-IV 群では subset I

群に比して尿中 8-OHdG レベルは高値を示す傾向が認められたが、有意差は認めなかった。

図 11-5 に尿中 8-OHdG レベルの経時変化を示す。入院時の尿中 8-OHdG レベルは、control 群 (13.9 ± 0.6) に比し、AMI 群において有意に上昇していた (25.4 ± 3.8 , $p < 0.05$)。再灌流療法を施行した 62 名については、再灌流療法 4 時間後に尿中 8-OHdG レベルはピーク値 (49.3 ± 6.2) を示し、入院時の値と比べて有意に上昇した ($p < 0.001$)。その中で自然再疎通 (TIMI grade 2) していた 2 名は入院時がピーク値を示した。これらの値は再灌流療法 24 時間後には尿中 8-OHdG レベルは control 群と同じレベルにまで速やかに低下した (図 11-6)。

control 群においては尿中 8-OHdG レベルは造影検査後 4 時間で検査前に比べて有意に上昇したが、その値は AMI 群再灌流 4 時間での値と比較すると有意に低値 (19.3 ± 16 , $p < 0.01$) であった。

2 週間後慢性期に、尿中 8-OHdG レベルは再上昇する傾向にあったが、有意差は認めなかった。再灌流療法 1 ヶ月後の左室駆出率は、CPK 値 ($r = -0.552$, $p < 0.005$) および CK-MB 値 ($r = -0.648$, $p < 0.0001$) と負の相関を認めた。しかし、尿中 8-OHdG レベルは CPK 値、CK-MB 値および左室駆出率とは相関を認めなかった。

表 10-3 に心血管イベント群と非イベント群の尿中 8-OHdG レベル推移の比較を示す。入院時尿中 8-OHdG レベルは非イベント群 (20.5 ± 2.4 , $p < 0.05$) と比較して心血管イベント群 (39.3 ± 13.5 , $p < 0.05$) は有意に高値を示した。再灌流療法 4 時間後での有意差は認められなかったが、非イベント群が 24 時間後には速やかに control 群レベルまで低下するのに対して (11.8 ± 0.8)、心血管イベント群は高値を維持する傾向が認められた (21.0 ± 6.0 , $p < 0.05$)。さらにわれわれは尿中バイオピリンとの比較を行ったところ、尿中 8-OHdG レベル最大値は尿中バイオピリン最大値と正の相関を認めた ($r = 0.342$, $p < 0.01$)。

8. 考察

本研究は AMI 患者における尿中 8-OHdG レベルの変動を解析した最初の報告である。本研究において AMI 患者においては再灌流療法前である入院時から尿中 8-OHdG は高値を示していた。心筋に虚血が生じている間には心筋細胞死などのイベントが生じており、その結果活性酸素種の増加を来すことが知られている (52, 53)。我々は酸化ストレスの指標のひとつであるチオレドキシンでも急性冠症候群と酸化ストレスの関係を検討している。チオレドキシンは SH 基の酸化還元状態を制御する分子量 12000 の蛋白質で、グルタチオン系とともに ROS を消去する抗酸化機構を担っている。AMI 急性期では安定労作性狭心症や胸痛症候群患者に比してチオレドキシンは有意に上昇していた (図 11-6)。また、不安定狭心症でもチオレドキシンは安定労作狭心症、対照患者に比して高値を示していた (54, 55)。以上の結果から抗酸化システムレベルでの上昇が確認されていたが、本研究の結果からは、急性冠症候群初期から DNA 損傷レベルでも上昇があることが明らかになった。

再灌流療法を施行した 62 名の症例の内、60 名の尿中 8-OHdG は再灌流後 4 時間で著しく上昇した。今回の結果は、虚血再灌流療法において脂質過酸化の指標であるチオバルビツール酸反応生成物 (thiobarbituric acid reactive substance: TBARS) や尿中パイピリンの経時的変動の報告と一致するものである (30, 56-58)。

近年、ラットの AMI モデルにおいて、心筋の抗 8-OHdG 免疫組織染色実験が報告されている (60)。その結果、梗塞領域および梗塞周囲での心筋細胞核では、AMI 発症から 24 時間後まで 8-OHdG が増加し、その後徐々に減少することが確認された。この実験では心筋 8-OHdG は心筋ネクロシスと関与している可能性が推察されている。さらに Cordis らのラットを用いた虚血再灌流モデルでは心筋 8-OHdG の上昇を認め、ROS のスカベンジャーである 1, 3dimethyl-2-thiourea によって 8-OHdG 上昇が有意に抑制されたことから、虚血再灌流における ROS の産生と DNA 損傷が確認された (61)。今回のわれわれの研究では再灌流療法後の尿中

8-OHdG レベルは心筋梗塞の大きさを反映する CPK、CK-MB の最大値、慢性期の左室駆出率とは相関を認めなかった。これらの結果は、尿中 8-OHdG レベルの上昇は心筋ネクロシスだけではなく、虚血再灌流による酸化ストレスの増加を反映している可能性が考えられる。非心血管イベント群では再灌流療法後 24 時間までに尿中 8-OHdG レベルは速やかに control 群レベルまで低下した。しかし、心血管イベント群の尿中 8-OHdG レベルは非イベント群に比して高い値を持続していた。これらの結果は、酸化ストレスが AMI 患者の予後と密接な関与がある可能性を示唆している。

そこで次に我々はフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンを AMI 患者に投与し、抗酸化剤の再灌流傷害におよぼす効果について検討した(62)。エダラボン (3-methyl-1-phenyl-2-pyrasolin-5-one) はピアラゾリン骨格を有する化合物でフリーラジカル除去作用を持ち、本邦で開発された世界唯一の脳梗塞再灌流傷害に対して有効性を確立された抗酸化剤である (63, 64)。作用機序としては生体内で電子が付加されたエダラボンアニオンがヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトレートなどに電子を供与することによって無毒化すると考えられており、リポキシゲナーゼによる脂質過酸化を抑制して臓器保護を行うとも考えられている。肝、腎機能障害例を除外した AMI 80 例を対象とし、そのうち 40 例に対して再灌流直前からエダラボン 30mg を静脈投与した。その結果、エダラボン投与群では対照群と比較して最大 CPK 値、最大 CK-MB 値は有意に低下していた。さらにエダラボン投与群では再灌流性不整脈の出現が有意に抑制されていた。対照群では再灌流直後の心機能はエダラボン投与群と比較して有意に低かったが、再灌流 2 週間後の心機能はエダラボン投与群と対照群との間に差はなかった。このことは再灌流障害の一つであるスタニング現象がエダラボン投与群では抑制されていた可能性が考えられる。以上の結果も再灌流療法時の酸化ストレスの上昇が AMI 患者の予後に影響を与える因子の一つであること示唆している。ただし、AMI における酸化ストレスの役割を明らかにする為にはまだ症例数が少なく、さらに研究が必要と考えられる。

我々が尿中バイオピリンを用いて行った検討では尿中バイオピリンはAMIの慢性期に低下傾向を認めていた(30)。しかし、本研究においては興味深いことにAMI慢性期に尿中8-OHdGレベルは再上昇する傾向が認められた。ただし、本研究においてはcontrol群と比べて有意差を持つにはいたらなかった。Miwaらの報告では、AMI発症2~4週間後に梗塞周囲領域および非梗塞領域の心筋の8-OHdGが上昇しており、これは心筋のアポトーシスに関与していると結論づけている(60)。もともと、心筋でのDNA修復遺伝子発現は全身の臓器の中でも高い方ではなく、心筋においては核DNAよりもミトコンドリアDNA由来の8-OHdGが多い(65, 66)。ミトコンドリアからのROSの産生はミトコンドリア自身のDNAにも酸化損傷を与え、機能不全からさらにROSの産生を来す悪循環に導き、左室リモデリング、左心不全の増悪に重要な役割を果たすことが考えられている(67)。我々は、陳旧性心筋梗塞患者において測定した尿中8-OHdGレベルはNYHA分類と密接な関係を示し、冠動脈病変枝数、心不全の指標であるBNPや左室駆出率と相関を示すことを確認している(図11-7)(68)。抗酸化システムとしてのバイオピリンが血行動態をよく反映しているのに対して、DNA損傷の指標である8-OHdGは糖尿病等の冠危険因子の存在や、動脈硬化の存在でも上昇が確認されている。さらに、尿中8-OHdGレベルの生成系としてヌクレオチドプール、ミトコンドリア、核の3つがあり、修復酵素の関与もあるため、厳密には組織8-OHdGとの比較が必要と考えられる。しかし、本研究で認められた尿中8-OHdGレベルの後期の上昇についてはミトコンドリアDNA損傷や心負荷の増加および心筋線維化による酸化ストレスを反映している可能性があり、左室リモデリングの指標になり得るかさらに検討が必要と思われる。

9. 結語

酸化ストレスによる DNA 損傷の指標である尿中 8-OHdG レベルは AMI 発症時には上昇しており、再灌流療法後に一気に増加してくる。この酸化ストレスの上昇は再灌流障害や再灌流療法後の心血管イベントに密接に関係していることが明らかとなった。尿中 8-OHdG レベルの測定は AMI の心血管イベントの層別化に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

	control 群 (n=48)	AMI 群 (n=64)	P-value
年齢 (歳)	62±1.9	64±1.7	NS
性別 (男性)	69% (33)	75% (48)	NS
高血圧 (BP≥140/90 mmHg)	50% (24)	63% (40)	NS
喫煙	37% (18)	53% (34)	NS
糖尿病	23% (11)	33% (21)	NS
脂質代謝異常	50% (24)	62% (36)	NS
肥満 (BMI≥25 Kg/m ²)	36% (9)	38% (21)	NS
総コレステロール (mg/dl)	193±9.7	198±5.8	NS
HDL コレステロール (mg/dl)	53±2.4	47±2.1*	<0.05
中性脂肪 (mg/dl)	136±10	153±15	NS
冠動脈病変枝数			
0 枝	48	0	
1 枝	0	33	
2 枝	0	20	
3 枝	0	11	

結果は平均値±標準誤差 (mean±SEM) にて表記した。

BP = blood pressure, BMI = body mass index, HDL = high density lipoprotein,

10-2. 患者背景-2 (AMI 群)

梗塞責任血管	
左前行枝	29
左回旋枝	11
右冠動脈	22
その他 (対角枝)	2
入院時 Killip 分類	
Class I	44
Class II to IV	20
Forrester 分類	
Subset I	34
Subset II to IV	30
CPK 最大値 (IU/L)	3117±333
CK-MB 最大値 (IU/L)	289±45.2
慢性期左室駆出率 (%)	55±1.4
再灌流療法	
経皮的冠動脈形成術 (ステント植え込み術)	53
血栓溶解療法	9
その他 (保存的加療)	2
入院 2 週間での心血管イベント	
死亡	1
心室頻拍、心室細動	4
完全房室結節ブロック	3
亜急性閉塞	2
心不全の悪化	6

結果は平均値±標準誤差 (mean±SEM) もしくは患者数にて表記した。

CPK = creatine phosphokinase

CK-MB = creatine kinase MB isozyme

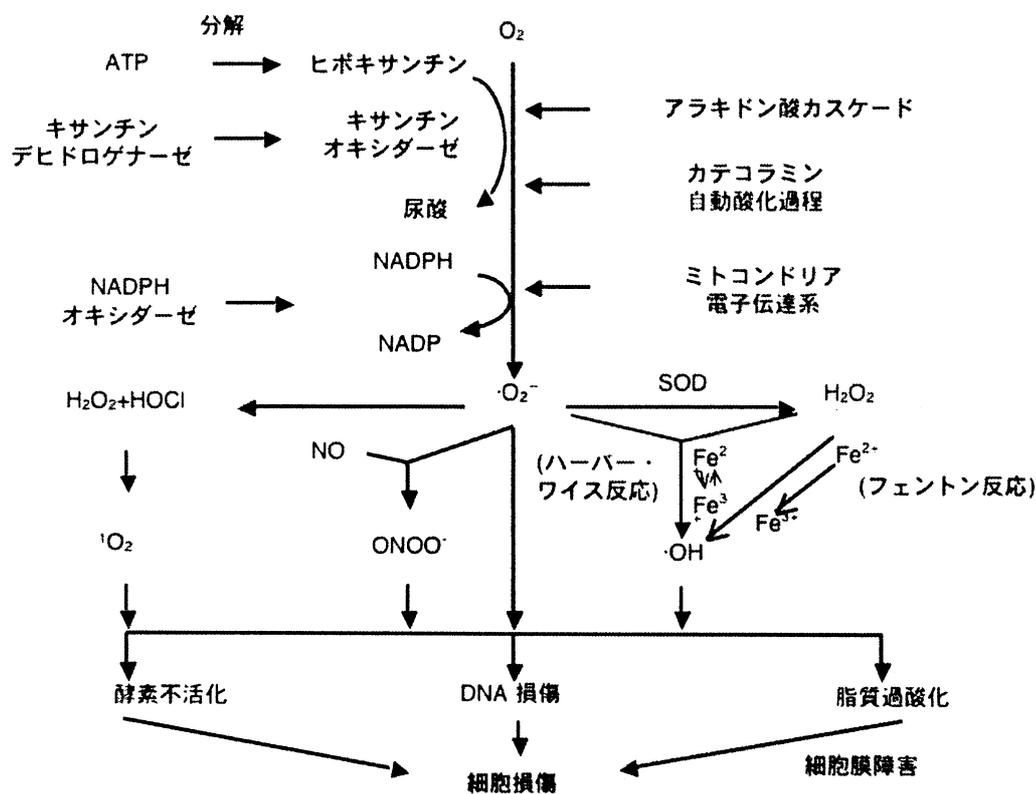
10-3. 尿中 8-OHdG レベルの経時的変化

	尿中 8-OHdG レベル		
	再灌流前	4 時間後	24 時間後
心血管イベント群 (n=15)	39.3±13.5*	57.5±20.0	21.0±6.0*
非イベント群 (n=47)	20.5±2.4	45.5±5.4	11.8±0.8
P values	<0.05	NS	<0.05

結果は平均値±標準誤差 (mean±SEM) にて表記した。

11. 図およびその説明

11-1. 活性酸素産生経路



生体内活性酸素産生経路を示す。血管内皮、好中球、ミトコンドリアなどにおいて、酸素分子が水分子に還元される経路で、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシラジカルが産生される。産生された ROS は DNA 障害等を介して細胞障害をきたすと考えられている。

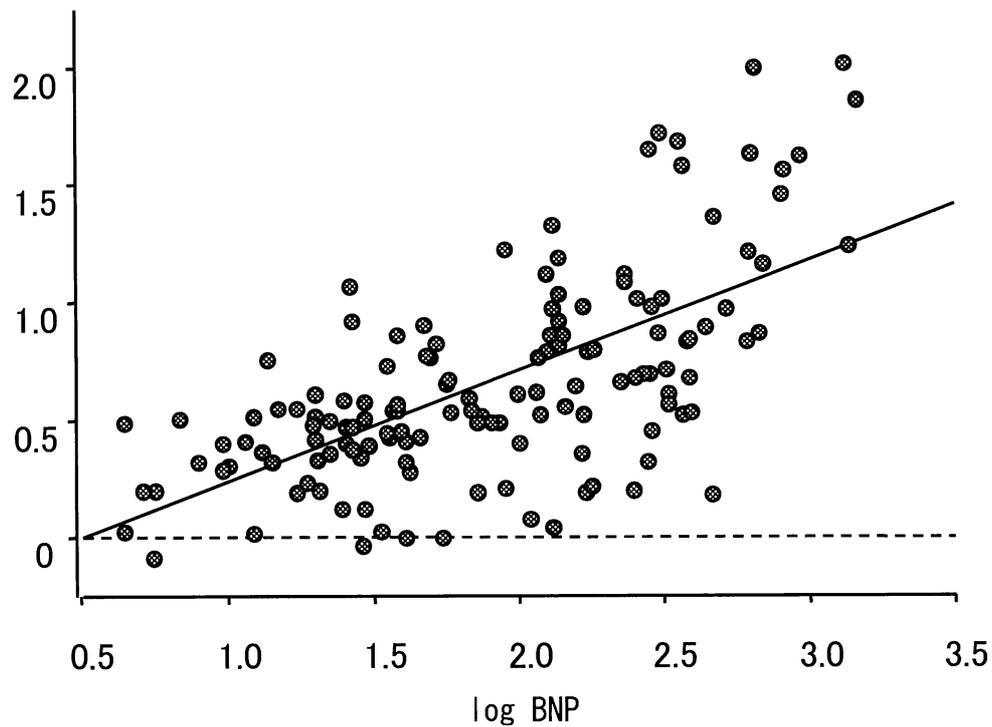
NADP = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

SOD = superoxide dismutase

11-2. バイオピリンレベルと BNP の関係

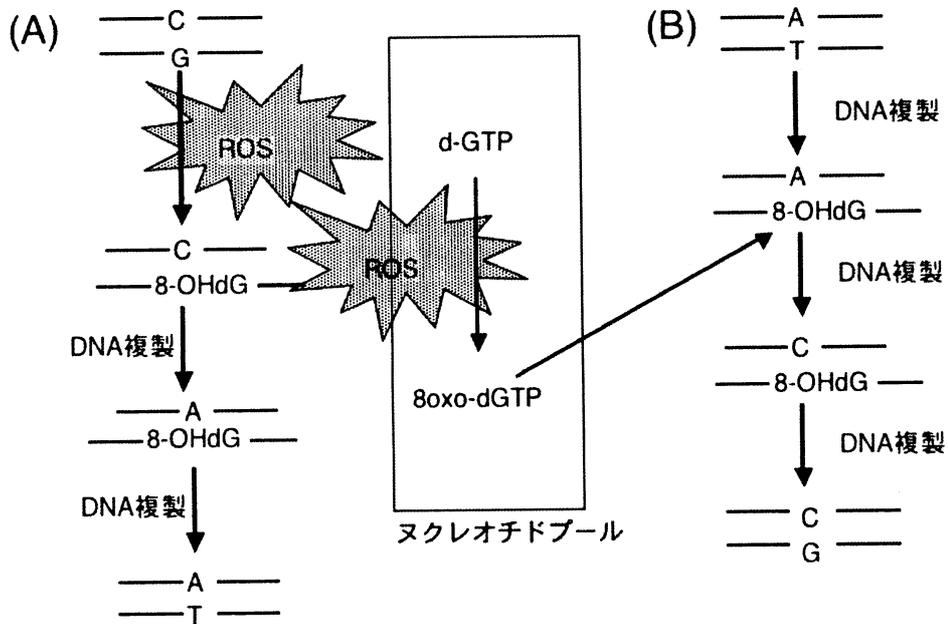
log バイオピリン



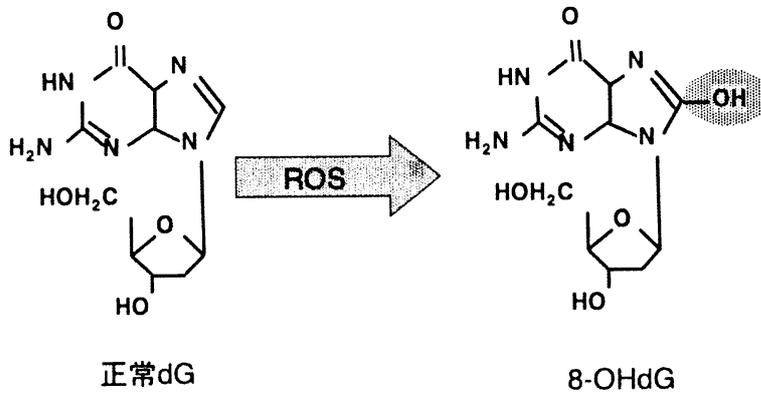
Hokamaki J. et al. J Am Coll Cardiol. 2004;43:1880-1885.

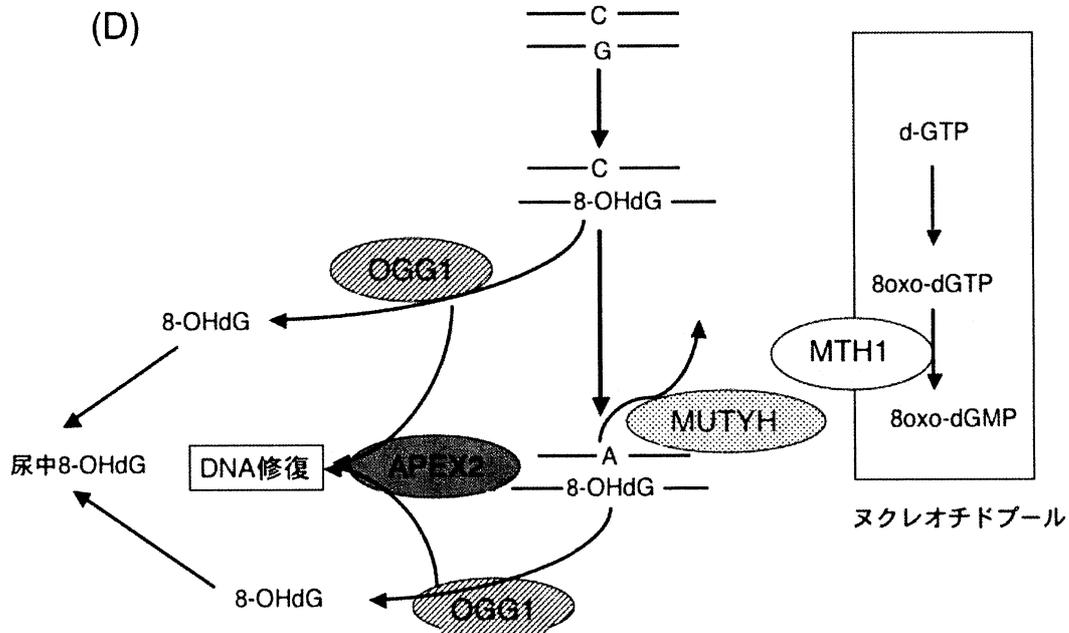
尿中バイオピリンと血漿 BNP の関係を示す。log バイオピリンと log BNP は有意な正相関を認めた ($r=0.650$ 、 $p<0.001$)。

11-3. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の生成



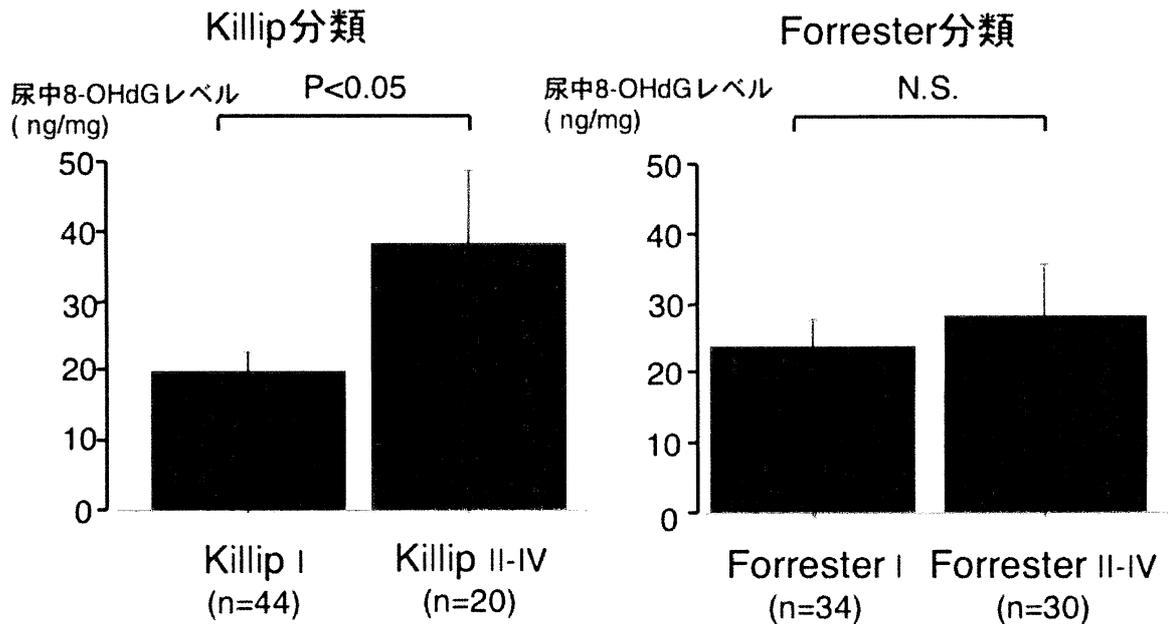
(C)





8-OHdG 生成過程を示す。デオキシグアニン (dG) のプリン環 8 位炭素が主にヒドロキシラジカル等によって直接酸化される系 (A) とヌクレオチドプールからの 8-oxo-dGTP の取り込みによって 8-OHdG が生成される系 (B) がある。8-OHdG の構造式を (C) に示した。ゲノム DNA 中の 8-OHdG は OGG1 遺伝子がコードしている DNA グリコシラーゼによって切り出され、最終的に尿中に排泄される。8-OHdG が切り出された後のゲノム DNA は APEX2 遺伝子がコードしている脱塩基部特異的 DNA エンドヌクレアーゼによってリン酸ジエステル結合が切断され修復が進行する。8-OHdG の誤対合基は MUTYH 遺伝子がコードしている DNA グリコシラーゼによって修復される。8-OHdG の基質である 8-oxo-dGTP は MTH1 遺伝子がコードしている酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素によって分解される (D)。

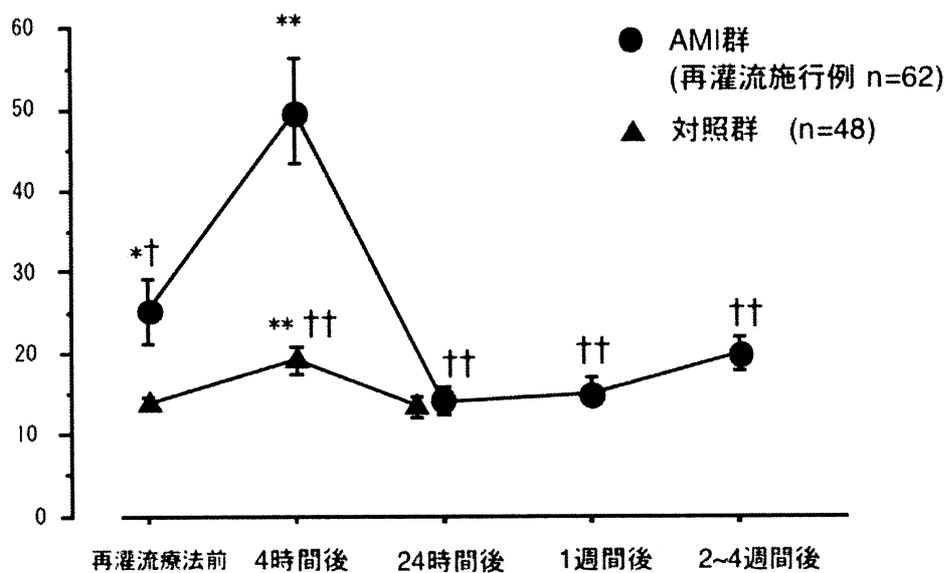
11-4. AMI 群の入院時尿中 8-OHdG レベル比較



登録された AMI 群 64 名の入院時尿中 8-OHdG (ng/mg) を示す。理学所見で心不全傾向を認める Killip 分類クラス II-IV 群 (35.0 ± 9.2) は症状を認めない Killip 分類クラス I 群 (19.4 ± 2.7) に比して尿中 8-OHdG 値は有意に上昇していた。ポンプ失調を示す Forrester 分類 subset II-IV 群は血行動態正常な Forrester subset I 群に比して尿中 8-OHdG レベルは高値を示す傾向があったが、有意差は認めなかった。

11-5. 尿中 8-OHdG レベルの経時的変化

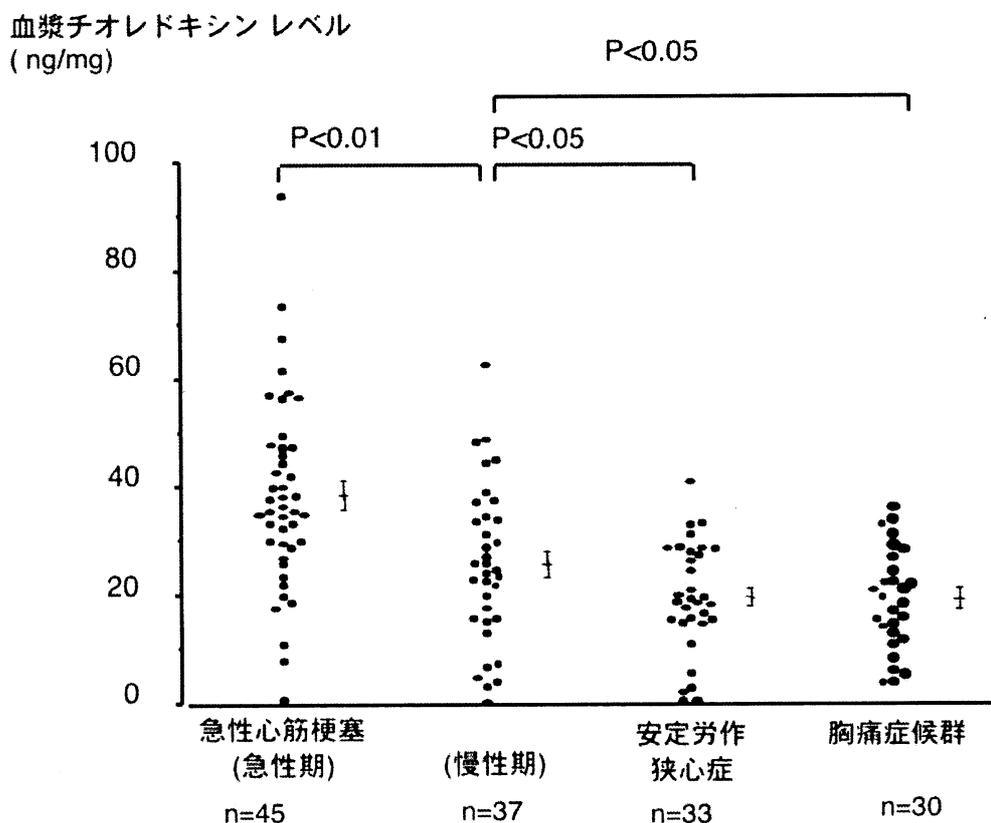
尿中 8OHdG レベル
(ng/mg)



* p<0.05 ; ** p<0.0001 比対照群(心臓カテーテル検査前)
† p<0.001 ; †† p<0.0001 比AMI群再灌流療法4時間後

再灌流療法が施行された AMI 群 62 名の尿中 8-OHdG 経時的変化を示す。control 群は心臓カテーテル検査前後の経過を示した。結果は平均値±標準誤差 (mean±SEM) で表記した。

11-6. 急性冠症候群における血漿チオレドキシシンレベル



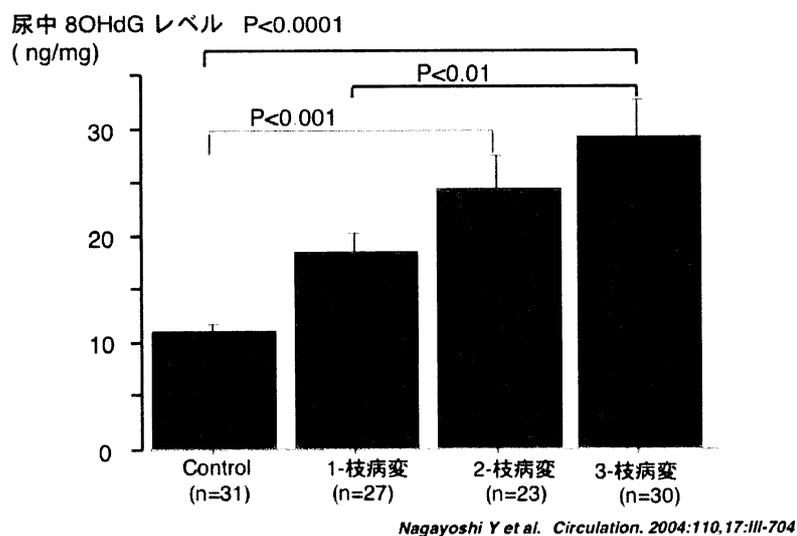
Miyamoto S et al. Am Heart J. 2002; 465-471

安定狭心症、胸痛症候群、急性心筋梗塞（急性期、慢性期）患者の血漿チオレドキシシンレベル（ng/mL）を示す。急性心筋梗塞急性期では血漿チオレドキシシンレベル（ 38.8 ± 2.6 ）は安定狭心症（ 20.0 ± 1.8 ; $P < 0.01$ ）、胸痛症候群（ 18.3 ± 1.7 ; $P < 0.01$ ）に比して有意に上昇していた。

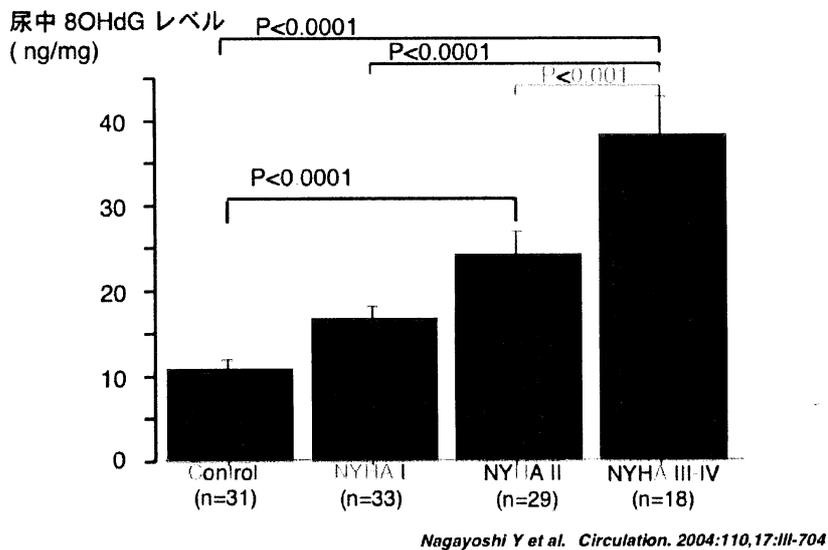
血漿チオレドキシシンレベルは心筋梗塞急性期に比して慢性期（ 26.0 ± 2.3 ; $P < 0.01$ ）には低下する傾向が認められたが、安定狭心症、胸痛症候群に比して高値であった。

11-7. 尿中 8-OHdG レベルと冠動脈病変枝数、NYHA 分類の検討

(A)

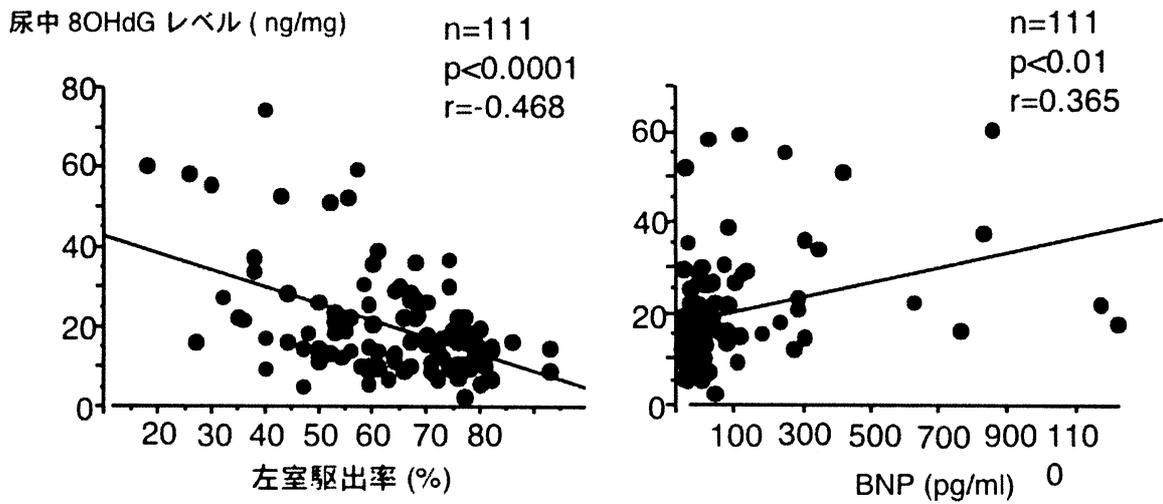


(B)



陳旧性心筋梗塞群の尿中 8-OHdG レベルを示す。尿中 8-OHdG レベルは冠動脈病変枝数 (A) NYHA 分類 (B) の重症度とともに上昇した。control 群は心臓カテーテル検査前後の経過を示した。結果は平均値±標準誤差 (mean±SEM) で表記した。

(C)



Nagayoshi Y et al. 1. *Circulation*. 2004;110,17:III-704

尿中 8-OHdG レベルと左室駆出率、BNP 値との関係を示した。尿中 8-OHdG レベルと左室駆出率、BNP 値の間には良好な相関が認められた。

12. 文献

1. Schilling WP, Elliott SJ. Ca²⁺ signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol.* 1992;262:H1617-1630.
2. Goldstein JL, Kita T, Brown MS. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 1983;309:288-296.
3. Steinberg D Oxidative Modification of LDL and Atherogenesis. *Circulation.* 1997;95:1062-1071
4. Zhang R, Shen Z, Nauseef WM, Hazen SL. Defects in leukocyte-mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma. *Blood.* 2002;99:1802-1810.
5. Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:1046-1050.
6. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999;103:1597-1604.
7. Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003;42:1075-81.
8. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis.* 1985;5:293-302.

9. Kobayashi S, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Matsui K, Mori T, Fujita H, Awano K, Kobayashi K, Azumi H, Ejiri J, Hirata K, Kawashima S, Hayashi Y, Yokozaki H, Itoh H, Yokoyama M. Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1398–1404.
10. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation.* 1990;82:II47–II59.
11. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 1995;91:2844–2850.
12. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994;89:36–44.
13. 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.
14. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 2001;276:41279–41287.
15. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000;342:154–160.
16. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary

- disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS) *Lancet*. 1996;347:781-786.
17. ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction- Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction) *Circulation*, 2004;110:588-636.
 18. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 1982;66:1146-1149.
 19. Miller FC, Krucoff MW, Satler LF, Green CE, Fletcher RD, Del Negro AA, Pearle DL, Kent KM, Rackley CE. Ventricular arrhythmias during reperfusion. *Am Heart J*. 1986;112:928-932.
 20. Rezkalla SH, Kloner RA. No-reflow phenomenon. *Circulation*. 2002;105:656-662
 21. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li RK, Dhillon B, Yau TM. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105:2332-2336.
 22. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol*. 1993;21:537-545.
 23. Gross GJ, Kersten JR, Warltier DC. Mechanisms of postischemic contractile dysfunction. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:1898- 1904.
 24. Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, et al. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:4695- 4699
 25. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1999; 43:860-878.

26. Gross GJ, Farber NE, Hardman HF, Warltier DC. Beneficial actions of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium of dogs. *Am J Physiol.* 1986;250:H372-377.
27. Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res.* 1989;65:607-622.
28. 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.
29. 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.
30. 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 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;90:108-111.
31. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990;81:1161- 1172.
32. Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y, Komuro I. Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation.* 1999;100: 2093- 2099.

33. 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.* 2000;87:392- 398.
34. Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, et al. 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.
35. Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Utsumi H, Takeshita A. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2004;109:544-9.
36. 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-alpha and angiotensin II. *Circulation.* 1998;98:794-799.
37. Engberding N, Spiekermann S, Schaefer A, Heineke A, Wiencke A, Muller M, Fuchs M, Hilfiker-Kleiner D, Hornig B, Drexler H, Landmesser U. Allopurinol attenuates left ventricular remodeling and dysfunction after experimental myocardial infarction: a new action for an old drug? *Circulation.* 2004;110:2175-2179.
38. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res.* 2001;88:529-535.
39. 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.
40. Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res*. 1984;12:2137-2145.
 41. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:9697-9701.
 42. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 1991;349(6308):431-434.
 43. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Ichinoe A, Ohno M, Ide Y, Hirano S, Yoshimura D, Tominaga Y, Furuichi M, Sakumi K. Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1011:101-111.
 44. Sakumi K, Tominaga Y, Furuichi M, Xu P, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Nakabeppu Y. Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res*. 2003;63(5):902-905
 45. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*. 1996;313:17-29.
 46. Tagesson C, Kallberg M, Klintenberg C, Starkhammar H. Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: a powerful technique for assaying in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *Europe J Cancer*. 1995;31A:934-940.

47. Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Laippala P, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Alho H. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Letters*. 1997;417:150–152.
48. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjønneland A, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*. 1992;13:2241–2247.
49. 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.
50. Nishikawa T, Sasahara T, Kiritoshi S, Sonoda K, Senokuchi T, Matsuo T, Kukidome D, Wake N, Matsumura T, Miyamura N, Sakakida M, Kishikawa H, Araki E. Evaluating of urinary 8-Hydroxydeoxyguanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26:1507–1512.
51. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. Phase I findings. TIMI Study Group. *N Engl J Med*. 1985;312:932–936.
52. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med*. 1985;312:159–163.
53. Goldhaber JI, Weiss JN. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities. *Hypertension*. 1992;20:118–127.
54. 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.
55. 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.* 2005;99:225–231.
56. De Scheerder IK, van de Kraay AM, Lamers JM, Koster JF, de Jong JW, Serruys PW. Myocardial malondialdehyde and uric acid release after short-lasting coronary occlusions during coronary angioplasty: potential mechanisms for free radical generation. *Am J Cardiol.* 1991;68:392–395.
57. Ely D, Dunphy G, Dollwet H, Richter H, Sellke F, Azodi M. Maintenance of left ventricular function (90%) after twenty-four-hour heart preservation with deferoxamine. *Free Rad Biol Med.* 1992;12:479–485.
58. 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.
59. Cottin Y, Doise JM, Maupoil V, Tanniere-Zeller M, Dalloz F, Maynadie M, Walker MK, Louis P, Carli PM, Wolf JE, Rochette L. Plasma iron status and lipid peroxidation following thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol.* 1998;12:236–241.
60. Miwa S, Toyokuni S, Nishina T, Nomoto T, Hiroyasu M, Nishimura K, Komeda M. Spatiotemporal alteration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in cardiomyocytes after myocardial infarction in rats. *Free Radical Research.* 2002;36:853–858.
61. Cordis GA, Maulik G, Bagchi D, Riedel W, Das DK. Detection of oxidative DNA damage to ischemic reperfused rat hearts by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30:1939–1944.
62. 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.

63. Watanabe T, Egawa M. Effects of an antistroke agent MCI-186 on cerebral arachidonate cascade. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;271:1624-1629.
64. Edaravone Acute Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis.* 2003;15:222-229.
65. Li YY, Chen D, Watkins SC, Feldman AM. Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor- α -induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation.* 2001;104:2492-2497.
66. Karahalil B, Hogue BA, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair capacity in mitochondria and nuclei: tissue-specific variations. *FASEB J.* 2002;16:1895-1902.
67. Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, Kang D, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. 8-Oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts *Circulation.* 2001;104:2883-2885.
68. Yasuhiro Nagayoshi, Jun Hokamaki, Hisao Ogawa, Kenichi Tsujita. Hideki Shimomura. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine to urinary creatinine ratio is correlated with severity of cardiac function in patients with old myocardial infarction. *Circulation.* 2004;110,17:III-704,