

論 文 要 旨

Effect of Waon therapy on oxidative stress in chronic heart failure

〔 心不全における和温療法の酸化ストレスに及ぼす効果 〕

藤 田 祥 次

【序論および目的】

我々は60℃均等の遠赤外線乾式サウナを用いた和温療法で、慢性心不全患者の心機能及び血管機能が改善することを報告してきた。さらには和温療法により血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現が亢進し、一酸化窒素(NO)産生が増加することで、血管内皮機能が改善するという機序についても報告してきた。

酸化ストレスは心不全で増加し、適正な治療で軽減することが報告されている。我々はすでに冠動脈危険因子を一つ以上有する患者において和温療法が酸化ストレスを減少させることを報告しているが、心不全において和温療法が抗酸化効果を有するかについてはまだ明らかになっていない。そこで本研究の目的は、慢性心不全患者に対する和温療法の酸化ストレスに及ぼす効果を明らかにし、さらには動物実験でそのメカニズムを検討することである。

【材料および方法】

臨床実験では、40名の慢性心不全患者をコントロール群20名と和温療法群20名の2群に分けて4週間後の治療結果を比較検討した。すべての慢性心不全患者は、標準かつ適正な内服加療を受けており、その治療を継続している。和温療法群の患者においては、1日1回、週5回、4週間の和温療法を追加施行した。治療前後で体重(BW)、心拍数、収縮期及び拡張期血圧、心胸郭比(CTR)、左室駆出率(LVEF)、BNP値、尿酸値、酸化ストレスの指標としてヒドロペルオキシド値、一酸化窒素代謝物として硝酸及び亜硝酸イオン値を測定した。

動物実験では、拡張型心筋症モデルである雄性TO-2ハムスターを用いた。雄性TO-2ハムスターは加齢とともに心機能障害が進行し、生後約30週で非代償性心不全を生じる。30週齢の雄性ハムスターを、和温療法群及び和温療法非施行群の2群に分けて4週後の34週齢で比較検討した。和温療法群においては、慢性心不全患者と同様に1日1回、週5回、4週間の和温療法を行った。34週齢でMillarカテーテルを用いてLV+dP/dtを計測し、さらに心エコーで%FSを測定することで心機能を評価した。また酸化ストレスマーカーである4-HNEの心筋での発現を免疫組織化学染色及びELISA法で評価し、さらにWestern blot法で抗酸化酵素であるHSP27、HSP32及びMn-SODの心筋における発現を検討した。

【結 果】

臨床研究では、和温療法施行4週後にヒドロペルオキシド、BNP値、BW及びCTRは有意に減少し(ヒドロペルオキシド: $422 \pm 116 \rightarrow 327 \pm 88$ U.CARR, $P < 0.001$; BNP: $402 \pm 221 \rightarrow 225 \pm 137$ pg/ml, $P < 0.001$; BW: $58.2 \pm 16.5 \rightarrow 57.6 \pm 16.1$ kg, $P < 0.05$; CTR: $56.3 \pm 6.2 \rightarrow 53.0 \pm 5.6\%$, $P < 0.001$)、LVEF及び一酸化窒素代謝物は有意に増加した(LVEF: $31.8 \pm 11.3 \rightarrow 35.8 \pm 13.1\%$, $P < 0.01$; 一酸化窒素代謝物: $71.2 \pm 35.4 \rightarrow 92.0 \pm 40.5$ mmol/l, $P < 0.05$)。一方、コントロール群では、これらの値の変化は認めなかった。

TO-2心筋症ハムスターを用いた動物実験では、和温療法を施行した群は非施行群と比較してLV+dP/dt及び%FSが増加していた(LV+dP/dt: 和温療法群: 5880 ± 1640 vs. 和温療法非施行群:

4180±660 mmHg/s, P<0.01; %FS: 和温療法群: 23.3±4.3 vs. 和温療法非施行群: 16.5±4.2%, P<0.01)。免疫組織化学染色による検討において酸化ストレスマーカーである4HNEの心筋発現は、4週間の和温療法により未施行群と比較し減少しており、ELISA法でも有意に減少していた(和温療法群: 3.57±0.96 vs. 和温療法非施行群: 5.53±1.17 μg/ml, P<0.05)。Western blot法の検討では、抗酸化ストレス酵素であるHSP 27、HSP 32及びMn-SOD発現が、非施行群と比較し4週間の和温療法で有意に増加した(HSP 27: 和温療法群: 1.25±0.30 vs. 和温療法非施行群: 0.27±0.16 arbitrary units, P<0.01; HSP 32: 和温療法群: 0.83±0.18 vs. 和温療法非施行群: 0.54±0.12 arbitrary units, P<0.01; Mn-SOD: 和温療法群: 0.81±0.20 vs. 和温療法非施行群: 0.52±0.16 arbitrary units, P<0.01)。さらにシグナル伝達物質であるp38 MAPKの活性化を示す、リン酸化p38 MAPK (p-p38 MAPK)とp38 MAPKの比 (p-p38 MAPK/p38 MAPK)は、和温療法非施行群に比較して和温療法群で有意に高かった(和温療法群: 0.84±0.18 vs. 和温療法非施行群: 0.53±0.14 arbitrary units, P<0.01)。

【考察】

活性酸素種 (ROS) は不全心筋で発生するが、その活性酸素種は心不全増悪を引き起こすと言われている。増加したROSはeNOS発現低下やeNOSアンカッピングによるNO産生低下により血管内皮機能低下を引き起こし、心不全の増悪を来す。さらに増加した酸化ストレスは、心筋のアポトーシスを誘導し心不全を増悪させる。それゆえ酸化ストレスを減少させることが心不全における心機能及び血管内皮機能を改善させることにつながると考えられる。和温療法施行により酸化ストレスが減少し、LVEF及びCTR改善を認めたことは、和温療法により酸化ストレスが減少し、血管内皮機能及び心機能が改善した結果と考えられた。

一方、代表的な抗酸化酵素であるMn-SODやHSP 27及びHSP 32は、酸化ストレスを減少させることが報告されている。特にHSP 27は、Mn-SODの発現を誘導し抗酸化作用を発揮するのみならず、アポトーシスを抑制することが知られている。またHSP 32を過剰発現させたマウスでは、酸化ストレス減少と、それに伴う細胞障害抑制効果が認められ、一方、HSP 32発現を抑制したマウスでは、酸化ストレス増大と、それに伴う細胞障害の増大が認められたとの報告がなされている。これらをふまえると心不全ハムスターで和温療法によりMn-SOD, HSP 27, HSP 32が増加し、酸化ストレスを減少させ心機能が改善したと考えられる。

温浴で正常ラットのTNF-α及びIL-1β産生によりMn-SODが増加したとの報告がある。TNF-αはNF-κBの転座を活性化し、Mn-SODを増加させる。しかしながら和温療法ではTO2ハムスターにおいて、TNF-αもNF-κBも発現は増加しなかった。心不全で既にTNF-α及びNF-κBは増加しており、Mn-SODが和温療法で増加したのはTNF-α及びNF-κBを介さない別の機序で減少しているものと考えた。その一つとして、P38 MAPKは、ストレス刺激で活性化され、HSP及びMn-SODを増加させる。我々は、和温療法により心不全ハムスターにおいてp-p38 MAPKが増加することを証明した。P38 MAPK活性シグナルであるp-p38 MAPKが、和温療法で増加し、HSP及びMn-SODを誘導したのと考えた。

酸化ストレスは、動脈硬化や心血管病で増加する。これまでに動脈硬化危険因子を有する患者に和温療法を施行し、血管内皮機能が改善したことを報告し、さらに和温療法で酸化ストレスが減少したことを報告している。和温療法は酸化ストレスを減少させ、血管内皮機能を改善させると考えられる。

【結論】

和温療法は、酸化ストレスを減少させる慢性心不全患者に対する革新的非薬物治療である。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 140号	学位申請者	藤田 祥次
審査委員	主査	川平 和美	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	井本 浩	副査 上村 裕一
	副査	竹中 俊宏	副査 新村 英士

Effect of Waon Therapy on Oxidative Stress in Chronic Heart Failure

(慢性心不全における和温療法の酸化ストレスに及ぼす効果)

これまで学位申請者らは、人を和ませる 60℃という温度で遠赤外線により全身を均等に加温する乾式サウナ装置を用いる和温療法が、慢性心不全患者の心機能、神経体液性因子、心室性不整脈及び血管内皮機能を改善させることを報告している。また、和温療法が血管内皮における一酸化窒素 (NO) 及び一酸化窒素合成酵素 (eNOS) を増加させるという、和温療法による血管内皮機能改善の機序についても報告している。一方、心不全と酸化ストレスの関係についての報告は多いが、和温療法が酸化ストレスに及ぼす効果についての検討はない。そこで学位申請者らは心不全における和温療法の酸化ストレスに及ぼす効果について臨床研究及び基礎研究で検討した。臨床研究では、治療前後で BNP、心胸郭比、左室駆出率、酸化ストレス、一酸化窒素代謝物などを測定し、和温療法施行群とコントロール群で比較した。心不全モデル動物では、心筋における酸化ストレス、heat shock protein (HSP)、Mn-SOD、p38MAPK を和温療法施行群と非施行群で比較した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) ヒトにおいて和温療法により酸化ストレスが減少した。
- 2) ヒトにおいて和温療法により左室駆出率の増加、心胸郭比および BNP の低下といった心不全の改善とともに、血管拡張により心不全を改善する一酸化窒素の代謝物が増加した。
- 3) 心不全モデル動物の和温療法群では、非施行群と比し心筋内の酸化ストレスは低く、心機能も良好であった。
- 4) 心不全モデル動物の和温療法群では、非施行群と比し抗酸化作用を有する HSP や Mn-SOD の発現が多かった。
- 5) 心不全モデル動物の和温療法群では、非施行群と比し抗酸化酵素の増加につながる p38MAPK のリン酸化が増加していた。

以上の結果より、心不全において和温療法により酸化ストレスが減少することが明らかとなった。さらに、酸化ストレスの減少に HSP や Mn-SOD の増加が関与していることが示唆された。さらに、抗酸化酵素増加に p38MAPK のリン酸化の増加が関与していることが考えられた。

本研究は、和温療法が心不全患者に及ぼす効果を酸化ストレスの動向から検討し、和温療法により酸化ストレスが減少し心不全が改善すること、酸化ストレスを減少させる効果は p38MAPK のリン酸化により増加した HSP や Mn-SOD による可能性を明らかにした。酸化ストレスへの減少効果を HSP 増加の観点から論じており、非常に興味深い研究内容と考えられた。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 140 号		学位申請者	藤田 祥次
審査委員	主査	川平 和美	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	井本 浩	副査	上村 裕一
	副査	竹中 俊宏	副査	新村 英士

主査および副査の5名は、平成23年8月22日、学位申請者 藤田 祥次 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) ハムスターはヒトより体温が高いはずであるが、ハムスターへの和温療法の温度設定はどのように行ったか。
(回答) ハムスターの体温は約37℃とヒトよりも高い。ヒトに対して和温療法を施行する際に深部体温を約1℃上昇させることで和温療法の効果が得られており、ハムスターにおいても深部体温が約1℃上昇するような温度設定で和温療法を施行した。

質問2) NOの産生の指標としてNO代謝物を測定しているが、eNOS以外の産生の影響はどのように考えるか。
(回答) NO合成酵素(NOS)にはeNOSの他にiNOSやnNOSがあり、eNOSのみによる産生と断定は出来ない。しかし、炎症により増加するiNOSの影響に関しては、4週間の治療期間で炎症反応に変化は認めていないことから影響は少ないものと考えている。また4週間の和温療法により左室駆出率、心胸郭比、BNPなどが改善しており、eNOSによりNOが増加し血管拡張により心不全が改善したと考えられる。また、影響を及ぼす薬剤については、亜硝酸剤が考えられるが、コントロール群及び和温療法群で、その内服状況に有意差はなかった。

質問3) Fig.5でMn-SODとともにCu/Zn-SODを測定しているが、Cu/Zn-SODの測定意義はなにか。
(回答) 酸化ストレスの消去系に作用するSODには主としてミトコンドリアに分布するMn-SOD、細胞質に局在するCu/Zn-SOD、血管内皮細胞に結合するが炎症時に増加するEc-SODの3つのアイソザイムが知られている。和温療法を施行することで酸化ストレスが減少するのに最も関与していると考えたheat shock protein(HSP)は、Mn-SODを増加させるが、Cu/Zn-SODには関与していないとされている。和温療法はMn-SODを増加させるが、Cu/Zn-SODには影響を及ぼさないことを確認するために両者の測定を行った。

質問4) Table 2の体重で和温療法群においては有意差があるのにコントロール群では有意差がない。減少した体重は変わらずに標準偏差はむしろ和温療法群で大きいのに本当に有意差があるのか。
(回答) 対応のあるt検定を行い、和温療法群では有意差があり、コントロール群では有意差はなかった。和温療法群において体重の増加例が1名しかいなかったことが有意差につながったと考えられる。

質問5) 考察でAfに関してふれているが、NOの産生は心房細動の頻度に影響を与えるのか。
(回答) Minaminoらは心房細動患者はNOの産生が低下するとの報告をしており、心房細動の有無によりNO産生に影響される可能性が考えられたので、和温療法群とコントロール群において心房細動の罹患率に有意差がないことを確認している。

質問6) 対象者の中にeNOSやNOに影響を及ぼしうる疾患が経過中にあったのか。
(回答) 対象を比較的安定した慢性心不全患者に設定し、炎症など合併しているような症例については対象外としており他の疾患が原因でNOやeNOSに影響を及ぼす患者は心房細動患者を除いては認めなかった。また、NOに影響を及ぼしうる亜硝酸剤やニコランジルを増量する必要がある不安定な虚血性心筋症は対象に含まれていない。なお、亜硝酸剤及びニコランジルの内服率に関しても和温療法群及びコントロール群において有意差がなかった。

質問7) Table 2において有意差はないが、和温療法群のほうがデータの重症に思える。和温療法群に十分な心不全の標準的加療が行われていたのか。
(回答) Table 1の中に酸化ストレスに影響を及ぼしうる内服薬の状況を記載しているが、そのなかに標準的な心不全加療の中心的薬物であるACE及びARBとβ遮断薬の内服状況を記載している。和温療法群及びコントロール群に有意差は認めていないことと、いずれも90%以上の内服率であることから心不全内服加療は十分にされているものと考えている。

質問8) Fig.3Aで示している4ヒドロキシ2ノネナール(4HNE)の発現は細胞質内で認められるのか。
(回答) 酸化ストレスの増大の主体はミトコンドリアであるとの報告もある。実際、当研究においても4HNEは細胞質内での発現を認めた。

質問9) 心不全のモデルとしてTO2ハムスターを使用しているが、このハムスターを選んだのはなぜか。また他の心不全モデルでは検討していないのか。
(回答) TO2ハムスターは生後30週より心不全を発症しその病態は拡張型心筋症に類似している。慢性心不全患者の約半数が拡張型心筋症の患者であることからTO2ハムスターが心不全モデルとしてふさわしいものと考えた。またIkedaらがTO2ハムスターを用いて和温療法の効果及び和温療法効果の機序について既に報告しており、心不全も改善しているので適切であると考えた。他の心不全モデルでの検討は行っていない。

最終試験の結果の要旨

- 質問 10) 患者の除外診断として酸化ストレスに影響を及ぼす内服薬を変更したものは除くとしているが、どの時点からか。
 (回答) 1 週間の観察期間以降に変更した症例は除外した。
- 質問 11) 4 週間の和温療法により酸化ストレスが低下しているが、さらに継続するとまだ下がるのか。また健常者と同等まで低下するものか。
 (回答) 和温療法を 4 週間以上継続するとさらに低下した症例の経験はある。但し、健常者と同等まで改善した症例は経験がない。心不全のコントロールが良好になったとしても健常者と同等にはならないのではないかと考えている。
- 質問 12) 健常者に対して和温療法を施行すると酸化ストレスは低下するものか。
 (回答) 検討を行っていないのでわからない。但し、酸化ストレスは喫煙などで上昇するとされており、生活習慣が悪い健常者で酸化ストレスが正常高値である場合は低下する可能性があるのと考えている。
- 質問 13) Fig.2 で示している一酸化窒素代謝物の正常値はどの程度か。また心不全患者でも一酸化窒素代謝物が減少していないが、その理由はどう考えるか。
 (回答) 一酸化窒素代謝物の正常範囲は $11\sim 72\mu\text{mol/L}$ である。心不全患者で一酸化窒素代謝物が減少していないことになるが、これは eNOS のアンカップリングが関与しているものと推測される。すなわち eNOS のアンカップリングにより酸化ストレスとして作用する NO が増加している状況と考える。コントロール群では eNOS アンカップリングの改善により一酸化窒素代謝物は減少したものと考える。それに対し、和温療法群はアンカップリングの改善にとどまらず、正常機能の NO が増加しているものとする。心不全が改善し一酸化窒素代謝物が増加していることがその理由である。
- 質問 14) TO_2 ハムスターは 30 週齢で心不全を発症するとのことであるが、30 週齢時点での LV +dp/dt や %FS はどの程度か。
 (回答) 30 週齢での LV +dp/dt は $5000\sim 6000\text{mmHg/s}$ 程度である。また、%FS は 30~40% 程度である。
- 質問 15) 動物実験でミラーカーテルでの拡張能の指標である EDP や LV -dp/dt はどうだったか。
 (回答) 和温療法により LV -dp/dt は有意に改善を認めた。EDP に関しては検討していない。
- 質問 16) Fig.3 や Fig.4 で心筋での評価を行っているが、他の臓器や血中でのデータはどうであったか。
 (回答) 酸化ストレス (4HNE) については、和温療法による血中及び血管内での減少を確認している。また、heat shock protein (HSP) に関しては、血管において増加を認めた。なお、Mn-SOD に関しては、血管内で増加を認めた。HSP 及び Mn-SOD は血中での検討は行っていない。心臓・血管・血中以外の臓器の検討は行っていない。
- 質問 17) 30 週齢時の HSP や 4HNE の検討は行っているのか。
 (回答) 今回はその検討は行っていない。
- 質問 18) 入院で経過をみているが、安定した症例を入院させる必要性についてどう考えるか。
 (回答) 試験開始時点で平均の BNP は 400 を超えており、さらなる心不全コントロールが必要と考えられる症例を対象としており、入院加療が必要であった。
- 質問 19) 心不全患者の利尿剤やカテコラミンは増減していないのか。
 (回答) 観察期間までに調整した症例も含まれているが、カテコラミンの点滴から離脱できない症例は対象に含めていない。利尿剤に関しても調整が必要な症例は除外している。
- 質問 20) 複数の施設で検討されているが、血液検査の測定方法に関して同じといえるのか。
 (回答) 他の施設で採取した検体を当院で測定したが、尿酸などの一部は他施設の測定値を用いた。同じ測定法を用いていたが、精度管理は行っていない。
- 質問 21) 患者背景の中で Others とあるがいかなる疾患であったのか。
 (回答) 心ファブリー、心サルコイドーシス、アルコール性心筋症慢性期、心筋炎後慢性期 2 名が Others に含まれている。
- 質問 22) HSP は局所で発現して局所で働いているのか。
 (回答) HSP は局所で発現し局所では働く物質である。
- 質問 23) 和温療法が心不全に有効であるメカニズムとして酸化ストレス減少による心臓の保護及び NO による血管拡張の効果があるとのことだが、どちらがより心不全改善に寄与しているのか。
 (回答) 和温療法が心不全改善を来すメカニズムとして NO 産生増加による血管拡張による前負荷・後負荷減少、1 回拍出量増加や酸化ストレス減少による心臓自体への効果はいずれも重要で、どちらがより重要かは言えないものと考えている。
- 質問 24) Study limitation としてブラインド化が難しいとあるが、どういうことか。
 (回答) 和温療法自体をブラインド化することは出来ない。和温療法自体が心身をリラックスさせる温度での治療であるため患者に治療に対するブラインド化は不可能と考えられるが、査読者より指摘があったので記載した。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。