

心不全における酸化ストレスの関与：基礎的ならびに臨床的検討

— 岡山大学医学賞（結城賞）を受賞して —

中村 一文^{a*}, 草野 研吾^a, 垣下 幹夫^a, 三浦 綾^a, 久松 研一^a
西井 伸洋^a, 伴場 圭一^a, 渡邊 敦之^a, 藤尾 栄起^a
宮地 克維^a, 永瀬 聡^a, 森田 宏^a, 斎藤 博則^a
江森 哲郎^a, 浅沼 幹人^b, 宮崎 正博^c, 中村 陽一^d
松原 広己^e, 伏見 和郎^f, 豊國 伸哉^g, 大江 透^a

^a岡山大学大学院医歯学総合研究科 循環器内科

^b岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学

^c岡山大学大学院医歯学総合研究科 細胞生物学

^d松山市民病院循環器内科

^e国立病院岡山医療センター循環器科

^f北陸先端科学技術大学院大学ナノマテリアルテクノロジーセンター

^g京都大学大学院医学研究科病態生物医学

キーワード；4-Hydroxy-2-nonenal, 酸化ストレス, 心不全, β 遮断薬

要 旨

心不全患者において血中の過酸化脂質の上昇などが報告され、活性酸素による酸化ストレスの関与が示唆されている。そこで、心筋が実際に活性酸素を発生するかどうかを、活性酸素を検出する蛍光プローブを用いてラットの培養心筋細胞において検討した。心不全増悪因子であるアンジオテンシンIIおよび tumor necrosis factor (TNF) -alpha を加えると心筋細胞で濃

度依存性に活性酸素が発生した。さらにヒトの不全心筋においても実際に酸化ストレスの発生が増強しているかを検討した。過酸化脂質の代謝産物で、有害なアルデヒドである4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) によって修飾された蛋白質を免疫染色にて調べたところ、拡張型心筋症患者の心筋において正常心機能者に比べ5倍以上増加していた。さらに β 遮断薬 (Carvedilol) により治療を行ったところ心機能の改善とともに、HNE 修飾蛋白質が40%低下した。以上の一連の研究により、活性酸素による酸化ストレスの発生が不全心筋において増強しており、その抑制が心不全治療のターゲットの一つになりうることを明らかにした。

*論文請求先：〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7351 FAX：086-235-7353
E-mail：ichibun@cc.okayama-u.ac.jp

● プロフィール ●



超高齢化社会を迎えるにあたって心不全患者は今後増えていくものと考えられ、簡単かつ有効な治療法が熱望されております。そのためには心不全の発症・増悪機序をまず検討しようと考え、その過程で着目したのが酸化ストレス研究でした。岡山大学循環器内科の病棟医・大学院生及び大江透教授をはじめとしますスタッフの先生方、細胞生物学・神経情報学をはじめとした共同研究をして頂いている先生方のおかげをもちまして、いくらか世界的にも注目して頂ける研究が出始めました。今後は容易に使える普及型心不全治療（抗酸化ストレス療法など）と高度な技術・知識を要する最先端心不全治療（再生医療など）の両側から、新たな心不全治療法を開発し、岡山発の産学協同研究など進めて行きたいと考えております。（岡山大学医学部 平成5年度卒業）

はじめに

酸素は好氣的エネルギー代謝に必要なだけでなく、活性酸素としても白血球の殺菌作用など多くの生理現象に関与している。しかしながら生体内での処理能力をこえた過剰な活性酸素・フリーラジカルは、酸化ストレスとして組織に害を及ぼし、最終的に疾患をひきおこすことが近年知られるようになった。心血管疾患においても虚血再灌流障害、高血圧、動脈硬化など多くの病態に関与している。

心不全における酸化ストレスの増加

心不全とは原因は何であれあらゆる心疾患の終末像として出現し、“心ポンプ機能の失調と末梢のエネルギー供給不足により易疲労感や運動能力の低下を示す症候群”である。日常臨床でよく診る高血圧・虚血／心筋梗塞・弁膜症などが原因のものや、ウイルスによる感染／心筋炎¹⁾・アルコール多飲²⁾・遺伝子異常などが原因のものなどがある。いずれの病態においても神経体液性因子の上昇が共通の増悪因子と考えられている(図1A)³⁾。何らかの原因にて心筋に過負荷や傷害が加わって心機能が低下すると、交感神経系・レニン-アンジオテンシン系・炎症性のサイトカインなどが活性化し、心肥大・アポトーシス・リモデリングをひきおこしてさらに心不全を悪化させる。サイトカインの中では tumor necrosis factor (TNF)- α の上昇などが認められる(図1B)⁴⁾。

このような心不全増悪因子の一つとして、酸化ストレスの増加も関与するのではないかと近年考えられ始めた。まず心不全患者において、酸化ストレスのマーカーである血液中の過酸化脂質 (thiobarbituric acid reactive substances: TBARS) が高値を呈し、心機能の悪化と相関することが報告された^{5,6)}。そこで、酸化ストレス増加は血液中で亢進しているのみならず、不全心筋そのものでも亢進しているかどうかをみることにした。

まず活性酸素を検出する蛍光プローブを用いてラットの培養心筋細胞 (*in vitro*) において検討した⁷⁾。心不全増悪因子である tumor necrosis factor (TNF)- α およびアンジオテンシン II を加えると心筋細胞で濃度依存性に蛍光の増強がみられた。すなわち TNF- α およびアンジオテンシン II は心筋において濃度依存性に活

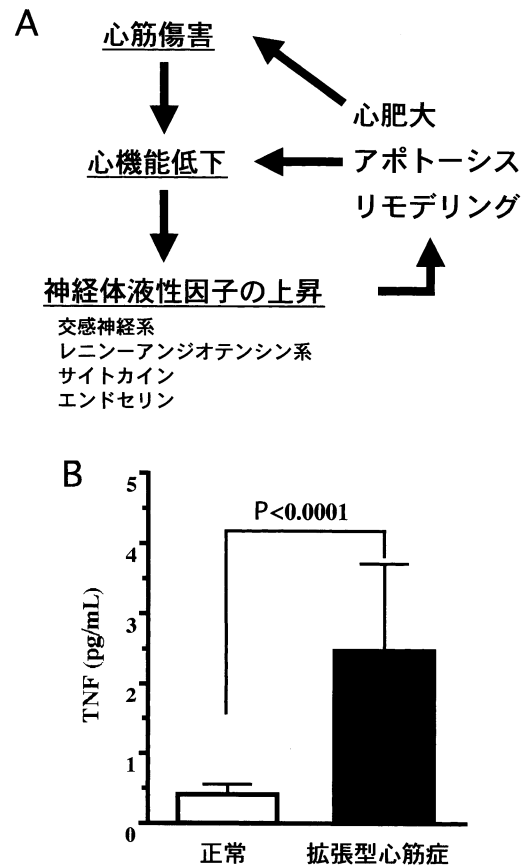


図1 心不全における神経体液性因子の上昇

A: 心不全と神経体液性因子の関係 (文献3より改変引用).
B: 拡張型心筋症患者における血中TNF- α 濃度の上昇. (文献4より改変引用)

性酸素を発生させた (図2)⁷⁾。

In vivo における検討でも、マウスにアンジオテンシン II をオスモティックポンプにて持続投与すると血圧上昇と心肥大を生じるが、その肥大心では hydroxyl radical (\cdot OH) の発生が亢進していた。アンジオテンシン II タイプ I a 受容体の欠損した (angiotensin II type 1a receptor knockout: AT1aKO) マウスではアンジオテンシン II を投与しても hydroxyl radical (\cdot OH) の発生は亢進しない (図3)⁸⁾。

次に実際にヒトの不全心筋においても酸化ストレスの発生が増強しているか確認するため、拡張型心筋症患者の心筋生検組織において検討した⁹⁾。過酸化脂質の分解産物で、有害なアルデヒドである4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) の心筋中での検出を試みた。HNE は蛋白質のヒスチジン・リシン・システイン残基と反応し、特異的な5員環構造を形成し、HNE 修飾蛋白質を

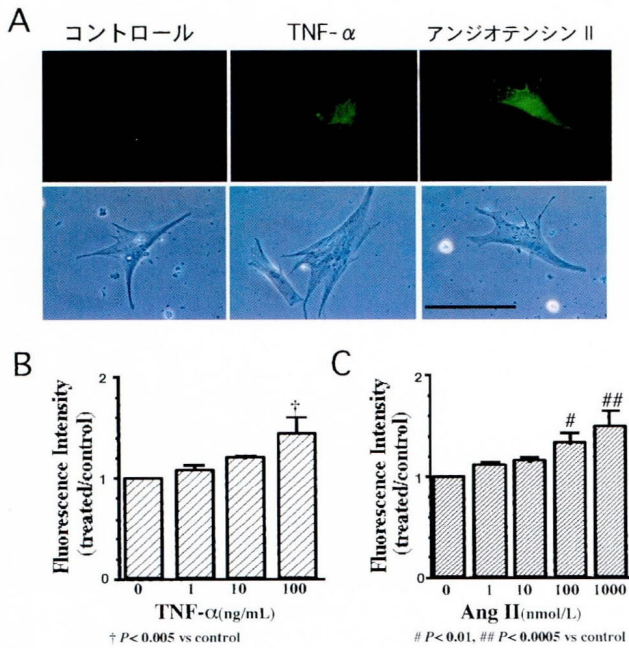


図2 TNF- α 及びアンジオテンシン II による心筋細胞での活性酸素の発生

A: 活性酸素が発生すると蛍光を発するプローブである2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いた。ラット新生児の培養心筋細胞にTNF- α (上段中) 及びアンジオテンシン II (上段右) を投与したところ蛍光を発した。上段蛍光顕微鏡像, 下段は同一細胞の光学顕微鏡像。Bar = 100 μ m。B: TNF- α による濃度依存性の蛍光強度の増加。C: アンジオテンシン II による濃度依存性の蛍光強度の増加。(文献7より改変引用)

形成する。この蛋白質は生体老廃物として組織に沈着しやすく、酸化ストレス病態解析における有用なマーカーと考えられている¹⁰⁻¹³。この HNE 修飾蛋白質を免疫染色にて調べたところ、拡張型心筋症患者の心筋において正常心機能者に比べ5倍以上増加していた(図4 AB及びE)。すなわち拡張型心筋症患者の心筋においては、酸化ストレスが発生しており、脂質過酸化反応の増加が引き起こされていることが判明した。

この HNE は細胞毒性をもつ有害なアルデヒドである¹⁰⁻¹³。HNE は酵素活性抑制作用, DNA・RNA・蛋白質の合成抑制作用, apoptosis を引き起こす作用などがあり、酸化 LDL (low density lipoprotein) による動脈硬化, 鉄による発癌及びアルツハイマー病のニューロン死などと関連づけられている¹⁰⁻¹³。心臓においては虚血時に発生し¹⁴、心筋に投与するとイソプロテレノールによる陽性変力作用を減弱させる作用¹⁵、内向き整流 K チャネル抑制などによる催不整脈作用¹⁶、還元型グルタチオン (GSH) を減少させて酸化ストレスをさらに増悪させる作用¹⁷ および心臓のミトコンドリア

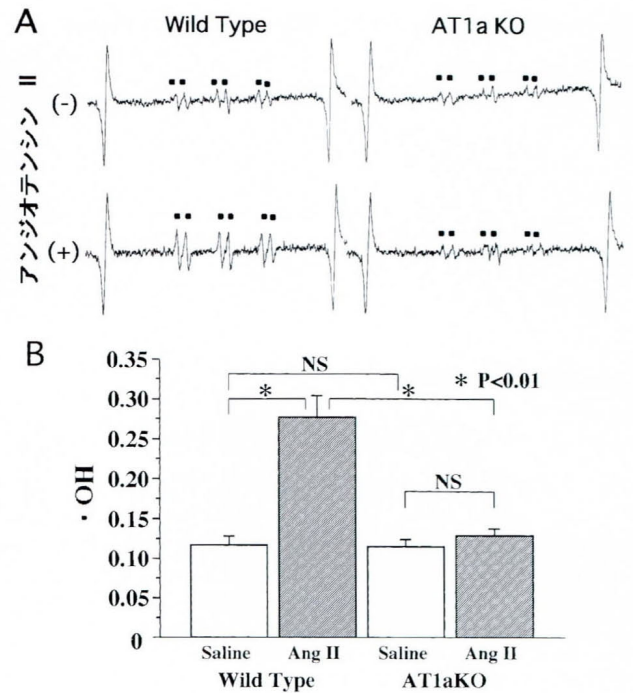


図3 アンジオテンシン II による hydroxyl radical (\cdot OH) の発生
A: 電子スピン共鳴法を用いて、心筋中の alpha-phenyl-N-tert butylnitron (PBN) への hydroxyl radical (\cdot OH) 付加物を測定した。左下図に示すように wild type マウスではアンジオテンシン II 投与により \cdot OH の発生が増強しているが、右下図に示すように angiotensin II type 1a receptor knockout (AT1aKO) マウスでは hydroxyl radical (\cdot OH) の発生は増強していない。B: wild type のアンジオテンシン II (Ang II) 投与マウスの心臓では生理的食塩水 (saline) 投与マウスの心臓より \cdot OH 強度が増強している。(文献8より改変引用)

ア NADP⁺-isocitrate Dehydrogenase を不活化する作用¹⁸ などがあることが知られている。従って拡張型心筋症における HNE の発生は心機能悪化・不整脈発生の両方に悪影響をおよぼしていると考えられる。

このように不全心において酸化ストレスが増加しているが、その要因は前述の TNF- α やアンジオテンシンの他にも多数報告されている(表1)。中でも交感神経活動亢進とカテコールアミンの上昇は重要である。心不全時には交感神経活動亢進・ノルエピネフリン増加がおき、予後を悪化させている^{19, 20}。心臓にカテコールアミンを投与すると hydroxyl radicals や過酸化脂質が発生し酸化ストレスが生じる^{21, 22}。 α 1受容体を介したシグナルは Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) oxidase を活性化し、少量の活性酸素を発生させて心筋細胞の肥大を引き起こし、 β 1受容体を介したシグナルはミトコンドリアにおいて活

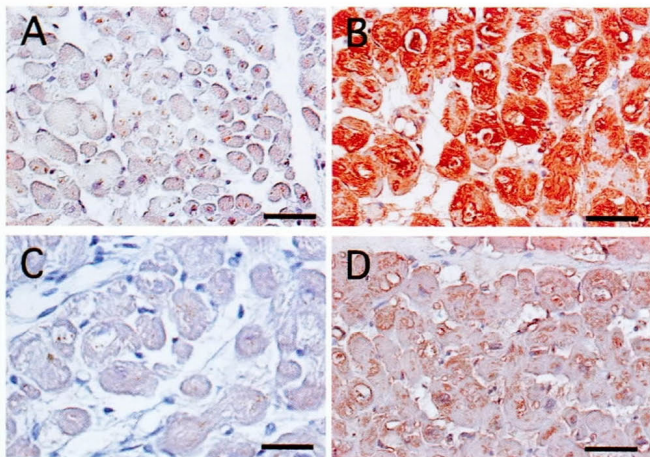


図4 心筋組織における HNE 修飾蛋白質の免疫組織学的検討

A：正常心機能者の心筋，陽染されていない． B：拡張型心筋症患者の心筋，心筋の細胞質が強く陽染されている． C：一次抗体のない陰性コントロール． D：Bと同一患者におけるカルベジロール投与9ヶ月後の心筋，陽染面積が減少している． Bar = 50 μm． E：心筋組織における HNE 修飾蛋白質量の比較，心筋組織中の陽染部の面積を NIH image を使って算出し定量したところ，拡張型心筋症患者において有意に HNE 修飾蛋白質量が増加していた (P<0.001)． (文献9のデータより改変引用)

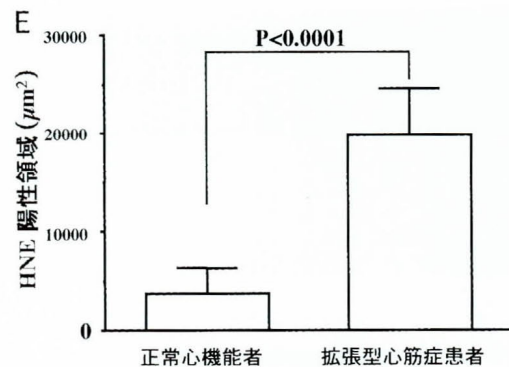


表1 心不全において酸化ストレスを増加させる要因

虚血	過剰な運動
再灌流	睡眠時無呼吸
Tumor necrosis factor-α	Xanthine Oxidase の活性化?
アンジオテンシン II	喫煙
交感神経活動・カテコールアミンの活性化	糖尿病
白血球・マクロファージの浸潤	HIV などの感染
ミトコンドリア機能障害	Adriamycin などの薬剤
NADPH oxidase の活性化	頻拍
伸展刺激	抗酸化酵素作用の低下
endothelin	Myeloperoxidase の活性化

性酸素を発生させ，心筋細胞の apoptosis を引き起こすと考えられている (図5)^{23,26)}。

β遮断薬による酸化ストレス軽減

慢性心不全における β 遮断薬の有効性は，US Carvedilol Heart Failure Study 試験，CIBIS-II 試験，MERIT-HF 試験，COPERNICUS 試験など多くの大規模研究によって裏付けされている²⁷⁻³⁰⁾。このような β 遮断薬治療の有効性の一つの機序として，酸化ストレスの軽減も考えられている。Kukin らは心不全患者にカルベジロール又はメトプロロールを投与したところ，両剤とも左室駆出率の改善と共に血液中の脂質過酸化のマーカーである TBARS を減少させたと報告した³¹⁾。メトプロロールは β1 選択性でカルベジロールは α 遮断作用と抗酸化作用を併せ持つ非選択性の β 遮断薬であるが，本研究では二つの薬剤間に TBARS 減少

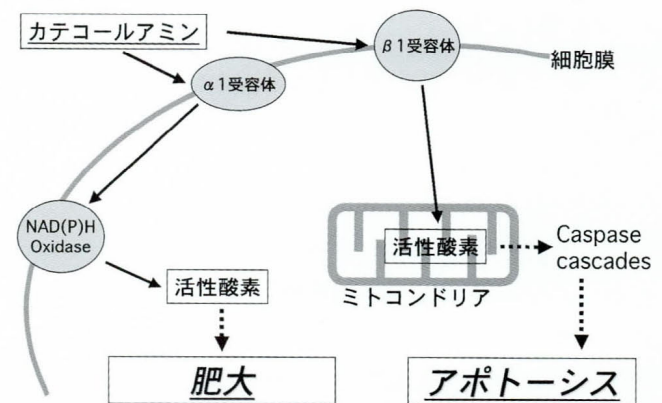


図5 カテコールアミンによる活性酸素発生と心筋のリモデリング (文献23, 26より改変引用)

作用の差はなく，薬剤を問わず β 遮断薬による心不全治療には酸化ストレス軽減作用が関与することが示唆されている。

実際にヒトの不全心筋において β 遮断薬治療が抗酸化作用を及ぼしているかどうかを検討した。11人の拡張型心筋症患者において，カルベジロール投与前後の心筋中での HNE の減少の有無を調べた。平均一日投与量 22 ± 8 mg で平均 9 ± 4 ヶ月投与したところ，心機能の改善 (表2) と共に 40% HNE が減少した (図4 D 及び図6)⁷⁾。すなわちカルベジロール投与による抗酸化作用を不全心筋で認めた。前述の如く HNE は有害な細胞毒性をもつアルデヒドであるので，その減少

表2 カルベジロールによる心機能の改善

	投薬前 (平均値±標準偏差)	投薬後 (平均値±標準偏差)	
収縮期血圧(mmHg)	127±19	123±18	not significant
拡張期血圧(mmHg)	77±13	73±8	not significant
心拍数(/分)	81±13	69±11	P<0.0001
NYHA	2.3±0.8	1.8±0.6	P<0.05
左室拡張末期径(mm)	65±10	61±10	P<0.005
左室収縮末期径(mm)	55±10	50±11	P<0.05
左室駆出率(%)	30±14	38±10	P<0.05
肺動脈楔入圧(mmHg)	7±5	7±4	not significant

(文献9より改変引用)

は心機能の改善に貢献しているものと考えられる。このような心筋での抗酸化作用が、カルベジロールに特異的なのか他の β 遮断薬にも見られるかは今後の検討が必要である。

β 遮断薬による酸化ストレス軽減の機序

β 遮断薬による酸化ストレス軽減作用には下記のような複数の機序が考えられる。

1. β 1受容体を介した活性酸素産生の抑制

前述の如く心筋においてカテコールアミンは β 1受容体を介して活性酸素を発生させるので、その遮断は酸化ストレス軽減に寄与する。

2. レニン・アンジオテンシン系の抑制

ラットにイソプロテレノールを投与し、 β 受容体を刺激すると一過性に傍糸球体細胞でのレニン分泌が増加し、血漿中のレニン活性が上昇する³²⁾。従って β 遮断薬はレニン・アンジオテンシン系を介した活性酸素の発生を二次的に予防していると考えられる。

3. 炎症・免疫・サイトカイン・白血球による活性酸素産生の抑制

拡張型心筋症患者に β 遮断薬(メトプロロール・ベソプロロールまたはカルベジロール)を投与すると血液中のTNF- α 濃度が減少する^{33,34)}。又カルベジロールにて心筋組織中の白血球走化因子 Monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1)の発現が減少する³⁵⁾。このようなサイトカインの減少により活性酸素産生が抑えられ、二次的に酸化ストレスが軽減すると考えられる。さらにカルベジロールには白血球による活性酸素産生を減少させる作用もあり、酸化ストレス軽減に寄与できる³⁶⁾。

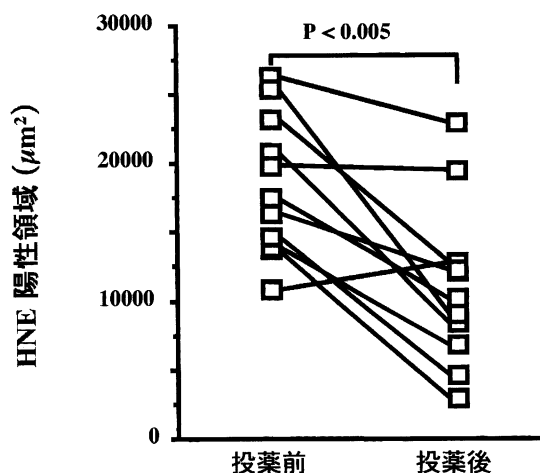


図6 カルベジロール投薬前後の心筋 HNE 量の変化
カルベジロール投与後に40%HNE量が減少した。(文献9より改変引用)

4. 陰性変時作用

Ide, Tsutsui らは頻拍による心不全モデル動物より得られた心筋組織において、ミトコンドリアの電子伝達系の障害によってスーパーオキシド産生が亢進し、さらに hydroxyl radical が生成されて、脂質過酸化反応が生じていることを報告している^{37,38)}。 β 遮断薬による陰性変時作用(心拍数の低下作用)は酸化ストレス軽減につながると考えられる。

5. 抗虚血作用

特に虚血性の心不全においては、 β 遮断薬の抗虚血作用が酸化ストレスの軽減に及ぼす影響は大きいと考えられる。

さらに β 遮断薬の中でも、カルベジロールは α 1遮断作用と直接の強い抗酸化作用を持ち、それらも重なって酸化ストレスを軽減すると考えられる³⁹⁾。前述の如く α 1受容体を介したNADPH oxidaseの活性化は活性酸素を発生させるが、カルベジロールはそれを抑制することが期待できる。又カルベジロールは抗酸化基を持ちフリーラジカルスカベンジジャーとして働くことが知られている。例えば hydroxyl radicals は心筋において sarco-/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)の抑制と共に収縮・弛緩の障害を引き起こすが、カルベジロールはそれを防ぐことも出来る⁴⁰⁾。自己免疫性心筋炎ラットへの投薬にても、心臓の酸化ストレス軽減と心保護作用が認められている。これらの作用はメトプロロールやプロプラノロールには認められていない⁴¹⁾。

おわりに

心不全の増悪因子として酸化ストレスが注目されており，それに関する研究・報告が多いにもかかわらず，現在のところ心不全の治療薬として有効な抗酸化剤は見つかっていない．抗酸化基を持つフリーラジカールカベンジャーはそれ自体がラジカルになる危険性を持つこと，抗酸化酵素は心臓で十分働ける drug delivery システムが確立されていないことなどがその原因として考えられる． β 遮断薬は上述の如く活性酸素産生を抑える作用があり，潜在的な抗酸化剤であると考えられる．さらにカルベジロールは抗酸化基を持ち有効な酸化ストレス減弱作用が期待されている．Carvedilol or Metoprolol European Trial (COMET) 試験では，死亡率の低下においてはカルベジロールがメトプロロールより優位であると報告された⁴²⁾．興味深いことに全死亡+全入院の率については両薬剤に差がなく，カルベジロールは突然死の抑制効果が大きいことが示唆される．この結果の機序に抗酸化基が関与しているか今後の検討が必要である．

謝 辞

本研究内容の一部は，平成14年度岡山大学医学賞第52回結城賞受賞講演，第20回日本心電学会学術諮問委員会提言シンポジウム，第66回日本循環器学会学術集会，74th Scientific Sessions of the American Heart Association にて発表した．本研究の一部はH14年度科学研究費補助金（文部科学省 若手研究(B)，課題番号No.14770314），H13年度科学研究費補助金（文部科学省 基盤研究(C)，課題番号No.13670714），循環器病研究振興財団第11回バイエル循環器病研究助成，及び2003年日本循環器学会第11回CPIS（心臓血管薬物療法国際会議）賞によるものである．

岡山大学神経情報学 小川紀雄先生の御助言と循環器内科補佐員の小林薫さん，大守雅代さん，藤原美由紀さんの御協力にこころより感謝いたします．

文 献

- 1) Nakamura K, Matsumori A, Kusano KF, Banba K, Taniyama M, Nakamura Y, Morita H, Matsubara H, Yamanari H, Ohe T: Hepatitis C virus infection in a patient with dermatomyositis and left ventricular dysfunction. *Jpn Circ J* (2000) 64, 617-618.
- 2) Nakamura K, Kouchi H, Ohe T, Namba M: Increase in beating rate of cultured chick cardiac myocytes by ethanol and inhibition of the increase by antiarrhythmic drugs. *Alcohol Clin Exp Res* (1999) 23, S81-84.
- 3) Braunwald E, Bristow MR: Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* (2000) 102, IV14-23.
- 4) 中村一文, 垣下幹夫, 草野研吾, 伏見和郎, 宮崎正博, 難波正義, 大江 透: TNF- α とアンジオテンシン II による心筋細胞肥大と活性酸素の関与. *フリーラジカールの臨床* (2000) 15, 50-54.
- 5) Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M: Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* (1991) 65, 245-248.
- 6) McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ: Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* (1993) 14, 1493-1498.
- 7) 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.
- 8) Kakishita M, Nakamura K, Asanuma M, Morita H, Saito H, Kusano K, Nakamura Y, Emori T, Matsubara H, Sugaya T, Ogawa N, Ohe T: Direct evidence for increased hydroxyl radicals in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through angiotensin II type 1a receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* (2003) 42, S67-70.
- 9) Nakamura K, Kusano K, Nakamura Y, Kakishita M, Ohta K, Nagase S, Yamamoto M, Miyaji K, Saito H, Morita H, Emori T, Matsubara H, Toyokuni S, Ohe T: Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. *Circulation* (2002) 105, 2867-2871.
- 10) Uchida K, Stadtman ER: Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89, 4544-4548.
- 11) Toyokuni S, Miyake N, Hiai H, Hagiwara M, Kawakishi S, Osawa T, Uchida K: The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct. *FEBS Lett* (1995) 359, 189-191.
- 12) Uchida K: 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* (2003) 42, 318-343.
- 13) Toyokuni S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* (1999) 49, 91-102.
- 14) Eaton P, Li JM, Hearse DJ, Shattock MJ: Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *Am J Physiol* (1999) 276, H935-943.
- 15) Haenen GR, Plug HJ, Vermeulen NP, Timmerman H, Bast A: Contribution of 4-hydroxy-2, 3-trans-nonenal to the

- reduction of beta-adrenoceptor function in the heart by oxidative stress. *Life Sci* (1989) **45**, 71-76.
- 16) Bhatnagar A : Electrophysiological effects of 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, on isolated rat ventricular myocytes. *Circ Res* (1995) **76**, 293-304.
 - 17) Ishikawa T, Esterbauer H, Sies H : Role of cardiac glutathione transferase and of the glutathione S-conjugate export system in biotransformation of 4-hydroxynonenal in the heart. *J Biol Chem* (1986) **261**, 1576-1581.
 - 18) Benderdour M, Charron G, DeBlois D, Comte B, Des Rosiers C : Cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adduct formation : an event that precedes hypertrophy development. *J Biol Chem* (2003) **278**, 45154-45159.
 - 19) Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T : Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* (1984) **311**, 819-823.
 - 20) Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, Kirlin PC, Nicklas J, Liang CS, Kubo SH, Rudin-Toretsky E, 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.
 - 21) Obata T, Yamanaka Y : Cardiac microdialysis of salicylic acid .OH generation on nonenzymatic oxidation by norepinephrine in rat heart. *Biochem Pharmacol* (1997) **53**, 1375-1378.
 - 22) Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS : Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv Exp Med Biol* (1983) **161**, 391-401.
 - 23) Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS : Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* (2002) **34**, 379-388.
 - 24) Xiao L, Pimentel DR, Wang J, Singh K, Colucci WS, Sawyer DB : Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* (2002) **282**, C926-934.
 - 25) Remondino A, Kwon SH, Communal C, Pimentel DR, Sawyer DB, Singh K, Colucci WS : Beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Circ Res* (2003) **92**, 136-138.
 - 26) 中村一文, 垣下幹夫, 草野研吾, 三浦 綾, 久松研一, 永瀬 聡, 森田 宏, 齊藤博則, 江森哲郎, 浅沼幹人, 小川紀雄, 宮崎正博, 中村陽一, 松原広己, 伏見和郎, 豊國伸哉, 大江 透 : β 遮断薬と酸化ストレス. *心電図* (2004) **24**, 15-21.
 - 27) Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH : The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* (1996) **334**, 1349-1355.
 - 28) CIBIS- II Investigators and Committees : The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS II) : a randomised trial. *Lancet* (1999) **353**, 9-13.
 - 29) MERIT-HF Study Group : Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure : Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* (1999) **353**, 2001-2007.
 - 30) Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL ; Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group : Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* (2001) **344**, 1651-1658.
 - 31) Kukin ML, Kalman J, Charney RH, Levy DK, Buchholz-Varley C, Ocampo ON, Eng C : Prospective, randomized comparison of effect of long-term treatment with metoprolol or carvedilol on symptoms, exercise, ejection fraction, and oxidative stress in heart failure. *Circulation* (1999) **99**, 2645-2651.
 - 32) Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, et al. : Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* (1997) **15**, 1471-1479.
 - 33) Ohtsuka T, Hamada M, Hiasa G, Sasaki O, Suzuki M, Hara Y, Shigematsu Y, Hiwada K : Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* (2001) **37**, 412-417.
 - 34) Ohtsuka T, Hamada M, Saeki H, Ogimoto A, Hiasa G, Hara Y, Shigematsu Y, Hiwada K : Comparison of effects of carvedilol versus metoprolol on cytokine levels in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* (2002) **89**, 996-999.
 - 35) Nakamura K, Kakishita M, Kusano K, Nakamura Y, Nagase S, Ohta K, Miyaji K, Morita H, Emori T, Matsubara H, Ohe T : Elevated Levels of 4-Hydroxy-2-nonenal-modified Protein in Myocardium of Patients with Dilated Cardiomyopathy and Amelioration by Carvedilol. *Circulation*

- (2001) 104, II-661.
- 36) Dandona P, Karne R, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Magsino CH Jr : Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids. *Circulation* (2000) 101, 122-124.
- 37) 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.
- 38) Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, Takeshita A : Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* (2000) 86, 152-157.
- 39) Yue TL, Cheng HY, Lysko PG, McKenna PJ, Feuerstein R, Gu JL, Lysko KA, Davis LL, Feuerstein G : Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J Pharmacol Exp Ther* (1992) 263, 92-98.
- 40) Flesch M, Maack C, Cremers B, Baumer AT, Sudkamp M, Bohm M : Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation* (1999) 100, 346-353.
- 41) Yuan Z, Shioji K, Kihara Y, Takenaka H, Onozawa Y, Kishimoto C : Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis: anti-inflammatory effects associated with antioxidant property. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2004) 286, H83-90.
- 42) Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, Lubsen J, Lutiger B, Metra M, Remme WJ, Torp-Pedersen C, Scherhag A, Skene A : Carvedilol Or Metoprolol European Trial Investigators : Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET) : randomised controlled trial. *Lancet* (2003) 362, 7-13.