

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 2 月 26 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590845

研究課題名（和文）新規心筋虚血マーカーである血清デオキシリボ核酸分解酵素 I による不安定狭心症診断

研究課題名（英文）Diagnosis of unstable angina pectoris by serum deoxyribonuclease I as a new diagnostic maker of myocardial ischemia

研究代表者

河合 康幸 (KAWAI YASUYUKI)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40324157

研究成果の概要（和文）：本研究において血清デオキシリボ核酸分解酵素 I (DNase I) は、これまで診断に用いられてきた、トロポニン T やクレアチンキナーゼ MB 分画 (CK-MB) などの心筋壊死マーカーが上昇していない不安定狭心症/非 ST 上昇型心筋梗塞患者 (UAP/NSTEMI) においても発症早期に高い診断効率を示した。したがって UAP/NSTEMI 患者において、血清 DNase I は心筋障害に左右されない胸痛発症後早期の有用な診断マーカーであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, a high diagnostic efficacy of serum deoxyribonuclease I (DNase I) activity levels could be observed in the early phase, even in unstable angina/non ST segment elevation myocardial infarction (UAP/NSTEMI) patients who did not show elevated levels of conventional cardiac markers, such as troponin T or creatine kinase-MB. The serum DNase I can be a useful marker for the early diagnosis of UAP/NSTEMI after the onset of chest pain, irrespective of the evidence of myocardial injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

DNase I は二本鎖 DNA を分解し、最近ではアポトーシスに関与している酵素と考えられているが、疾患との関連は未だ十分に明らかになっていない。これまで我々は、血清 DNase I 活性が急性心筋梗塞 (AMI) 急性期の有用な心筋マーカーであること (Circulation, 2004;109:2398-2400) を報告した。さらに血清 DNase I が冠動脈インターベンション後や冠攣縮誘発試験後に上昇す

ること (Eur Heart J 2005;26:2375-2380、Eur Heart J 2007;28:2992-2997) を見出し、心筋壊死マーカーよりはむしろ一過性心筋虚血のマーカーとして有用であることを報告した。

AMI と UAP/NSTEMI はいずれも急性冠症候群に包括され、より重篤な AMI に移行あるいは突然死する症例があることから早期診断・治療が重要である。しかしながら一過性心筋虚血や軽微な心筋壊死を呈する

UAP/NSTEMI は来院時に胸痛の自覚および心電図変化に乏しいこと、既存の心筋壊死マーカーであるトロポニン T や CK-MB が陰性である患者が多いことが、早期診断を困難にしている。したがって、UAP/NSTEMI の早期診断マーカーが望まれているのが現状である。

以上のことから血清 DNase I は AMI のみならず、UAP/NSTEMI においてもその早期診断に有用である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、通常の検査では診断し得ない UAP/NSTEMI の早期診断に血清 DNase I 活性が有用かどうかを検証し、その実用化を図ることである。具体的には以下のことを目的とした。

- (1) 血清 DNase I 活性の迅速診断法の開発
- (2) 血清 DNase I 活性の変化率による UAP/NSTEMI 診断の有用性を検証すること
- (3) 大規模臨床研究により血清 DNase I 活性の有用性を検討し、血清 DNase I 検査法の標準化を行うこと

3. 研究の方法

(1) 血清 DNase I 活性は single radial enzyme diffusion (SRED) 法で測定した。SRED 法では活性測定に約 20 時間必要とする。すでに血清 DNase I 活性を十分以内に定量できる方法が考案されており、その結果 (Clin Chem. 2004;50:446-448) をもとに迅速活性測定キットを開発する。また活性測定キット化が困難な場合は血清 DNase I 濃度による測定法を検討する。

(2) 胸痛発症 24 時間以内に来院した UAP/NSTEMI が疑われた患者 (52 例) を対象とした。緊急冠動脈造影で器質的有意狭窄を認めた患者 (31 例) および冠攣縮が証明された患者 (2 例) を UAP/NSTEMI 群 (33 例) とし、有意狭窄を認めず、冠攣縮も誘発されなかった患者を胸痛症候群、CPS 群 (10 例) とし、血清 DNase I 活性およびその変化を検討した。さらに UAP/NSTEMI 群と CPS 群を胸痛発症後の時間経過からさらに 3 群に分け、血清 DNase I 活性を比較した。グループ 1 は胸痛発作後 3 時間以内に入院した患者群、グループ 2 は胸痛発作後 3 時間から 6 時間以内に入院した患者群、グループ 3 は胸痛発作後 6 時間以上経過して入院した患者群とした。

各群の患者から来院直後、来院 3、6、12、24 時間後に採血を行い、血清 DNase I 活性、トロポニン T および CK-MB 濃度を測定した。これまでの報告から血清 DNase I 活性の正常上限を 17.9 U/L とし、この基準を越えたものを DNase I 活性の上昇が陽性と定義した。さらに診断効率を上げるために来院時から来院 3 時間後の血清 DNase I 活性の変化率を

算出し、既存の心筋壊死マーカーであるトロポニン T および CK-MB との診断効率の比較を行った。これまでの報告からこの変化率の絶対値の正常上限を 12.4% とし、この基準を越えたものを DNase I 活性の変化が陽性と定義した。CK-MB とトロポニン T の基準値をそれぞれ 25 U/L、0.01 μ g/L とした。

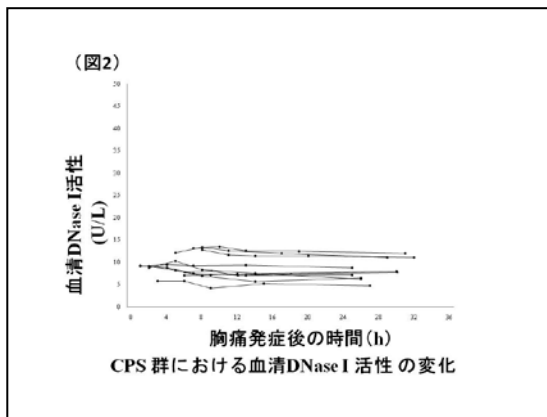
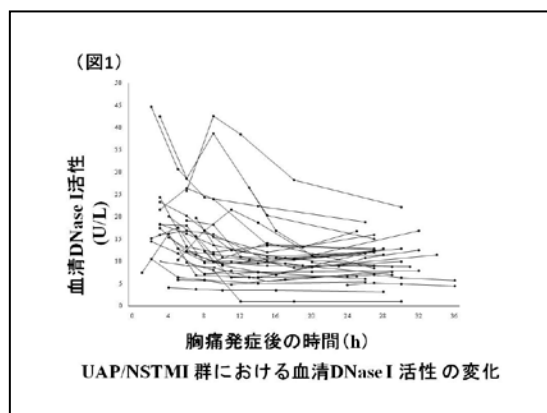
(3) (1) で開発した迅速診断キットを用いて他施設共同でその有用性を検証する。

4. 研究成果

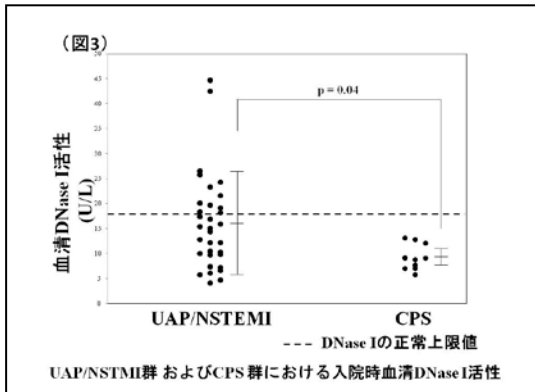
(1) 活性測定キット化が困難であったため、DNase I 濃度測定法の開発を行った。共同研究者により抗 DNase I 抗体を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて SRED 法より簡便な血清 DNase I 濃度測定法が開発された。AMI 患者において血清 DNase I 濃度は血清 DNase I 活性と $r=0.839$ の良好な相関が認められた。

未だ迅速測定キットの開発は成功していないが、濃度測定法の確立により、濃度測定による迅速測定キット開発の可能性が開かれた。今後はさらに救急室などで測定可能なキットの開発を進めていく予定である。

(2) UAP/NSTEMI 群において血清 DNase I は、胸痛発症後、少なくとも 6 時間以内にピークを迎え、以後漸減し 24 時間以内に正常レベルに戻り、AMI 患者の動態と同様の結果を示した (図 1)。一方、CPS 群の血清 DNase I 活性は経過中変化しなかった (図 2)。

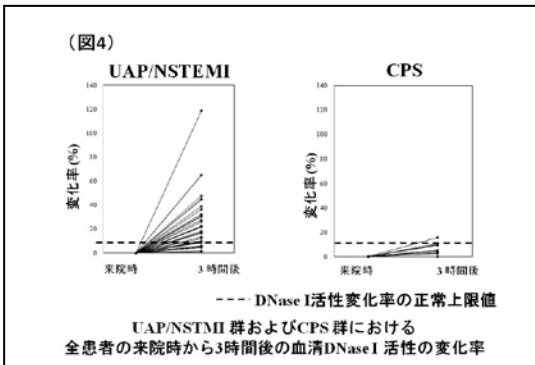


UAP/NSTEMI 群において入院時の血清 DNase I 活性の平均値は 16.0 ± 9.5 U/L で CPS 群の 9.5 ± 2.5 U/L と比較して有意に高値であった ($P=0.04$) (図 3)。



さらに胸痛発作後からの時間経過で 3 群に分け血清 DNase I 活性を検討したところ、胸痛発症後 3 時間以内に入院したグループ 1 において UAP/NSTEMI 群の血清 DNase I 活性の平均値は 19.3 ± 11.2 U/L で CPS 群の 8.4 ± 1.5 U/L より有意に高値であった ($P=0.047$)。しかしながら、グループ 2 とグループ 3 においては両群とも血清 DNase I 活性に有意差を認めなかった。UAP/NSTEMI 群においてグループ 1 の 47%、グループ 2 の 30%、グループ 3 の 25% で血清 DNase I 活性の上昇が陽性であった。一方、CPS 群では血清 DNase I 活性の上昇が陽性となった患者は認められなかった。

入院時と入院 3 時間後の血清 DNase I 活性の変化率の絶対値を両群で比較すると UAP/NSTEMI 群では 61% の患者が陽性で、その中間値は 18.1% と CPS 群の 5.4% に比べ有意に高値であった ($P=0.02$)。CPS 群ではわずか 1 例のみが陽性にすぎなかった (図 4) 表 1)。



(表 1)

	患者数 n	来院時から3時間後 の変化率 %	DNase I 変化率陽性 患者、n.(%)
UAP/NSTEMI	33	18.1* (9.7, 36)	20 (61)
CPS	10	5.4 (2.9, 9.4)	1 (10)

(25th and 75th percentile values)
* vs CPS, $P=0.02$

UAP/NSTEMI 群およびCPS 群における血清DNase I 活性の変化率

UAP/NSTEMI 群においてグループ 1 の 67%、グループ 2 の 60%、グループ 3 の 50% で血清 DNase I 活性の変化が陽性となった。しかしながら、CPS 群では血清 DNase I 活性の変化が陽性であったものは 1 例のみであった。血清 DNase I 活性の上昇あるいは変化のどちらかが陽性であったものを血清 DNase I 活性陽性と定義すると、UAP/NSTEMI 群のうち、グループ 1 は 80%、グループ 2 は 70%、グループ 3 は 50% の患者が血清 DNase I 活性陽性で AMI 同様、胸痛発症後早期の診断マーカーとして有用であることが明らかになった。

血清 DNase I 活性の陽性率が比較的高かった胸痛発症後 6 時間以内の患者群における UAP/NSTEMI の診断効率を既存のマーカーであるトロポニン T および CK-MB と比較した。DNase I、トロポニン T、CK-MB の感度はそれぞれ 80%、45%、20%、特異度は 80%、100%、100%、陽性的中率は 92%、100%、100%、陰性的中率は 67%、38%、29% であり、特に DNase I は感度と陰性的中率が他のマーカーより優れていた。さらに発症 6 時間以内に来院した UAP/NSTEMI 患者のうち、経過を通じてトロポニン T、CK-MB が陰性であった患者群 (9 例) において血清 DNase I 活性の診断効率を検討すると、感度 89%、特異度 88%、陽性的中率 89%、陰性的中率 88% と既存の診断マーカーでは診断し得ない患者においても高い診断効率を示した。(表 2)

(表 2)

	DNase I
感度、%	89
特異度、%	88
陽性的中率、%	89
陰性的中率、%	88

発症6時間以内に来院したUAP/NSTEMI患者のうち
心筋壊死マーカー陰性患者におけるDNase Iの診断効率

これらの結果から血清 DNase I は、心筋障害に左右されない、胸痛発作後早期の有用な UAP/NSTEMI の診断マーカーであると考えられた。この診断マーカーは、救急室に代表される臨床現場において活用されることで UAP/NSTEMI 患者の早期診断のみならず、疾患のリスク層別化および早期治療を容易にし、患者の予後改善に貢献すること、さらに確定診断に必要とされる冠動脈造影検査などを行わず、非侵襲的に CPS 患者を特定することを可能にすることで、患者や医療経済上の負担の軽減が期待される。

(3) 迅速診断キットが未完成のため、他施設で DNase I の UAP/NSTEMI 診断における有用性を検討することができなかった。今後は迅速診断キットの開発を進め、それを用いて

の他施設共同で研究を行うことが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Fujibayashi K, Kawai Y, Yasuda T, et al. Serum deoxyribonuclease I activity can be a useful diagnostic marker for the early diagnosis of unstable angina pectoris or non-ST-segment elevation myocardial infarction. Journal of Cardiology, 査読有り, 2012, in press.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Kawai Y, et al. Doxyribonuclease I as a useful diagnostic marker of unstable angina or non-ST-segment elevation myocardial infarction. The 73rd annual scientific meeting of the Japanese Circulation Society, March 22, 2009, Osaka

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 康幸 (KAWAI YASUYUKI)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40324157

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

安田 年博 (YASUDA TOSHIHIRO)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：80175645