

特集

わが国の降圧薬介入試験：関係者による解説，評価と展望

日本人本態性高血圧患者 における降圧利尿薬の安全性， 降圧効果，費用対効果に関する ランダム化臨床試験*—新規 糖尿病発症に焦点をあてて—

植田真一郎**

Key Words : diuretics, type 2 diabetes, cost effectiveness, essential hypertension, RCT

研究の背景

1. 降圧利尿薬の第一選択薬としてのエビデンス

降圧利尿薬はこれまでの数々の臨床試験により，高血圧患者の心血管リスクを減少させることが証明されている。MRC研究¹⁾などの比較的若年の低リスク高血圧患者を対象とした，またSHEP研究²⁾などの高齢者を対象とした試験において，プラセボとの比較において心血管リスク（若年者では脳卒中のみ）を減少させることが明らかになった。その後，新たに登場したカルシウム拮抗薬やACE阻害薬との比較試験も行われたが，心血管リスク減少という点ではこれらの降圧薬との差は明らかではなかった^{3)~5)}。これまで降圧利尿薬は単独か，主にβ遮断薬と併用されていたが，薬理作用からはおそらくACE阻害薬やアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬との併用が有効であると考えられる⁶⁾。PROGRESS研究ではACE阻害薬と併用することによって脳卒中再発のリスクを減少させた⁷⁾。LIFE研究は本来アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬ロサルタンとβ遮断薬アテノロールとの比較であるが，ロサルタ

ン単独では100mgまで増量しても血圧の降下は十分ではなく，結果的に両群とも9割で降圧利尿薬ハイドロクロチアジドの併用が必要であった⁸⁾。このような臨床試験の結果から，主に併用薬として降圧利尿薬の使用は血圧の降下，ひいては心血管リスクの減少に貢献すると考えられる。ALLHAT研究⁹⁾ではカルシウム拮抗薬やACE阻害薬と比べても心筋梗塞発生リスクに関して差がなく，降圧利尿薬見直しの機運が高まった。事実，その後発表されたJNCⅦでは降圧利尿薬を第一選択薬としている。しかし，ALLHATの二次薬は明らかに適切ではなく，心機能に関する患者の適合基準や心不全の診断基準など問題が多い。したがって，この結果で利尿薬を見直すというのは適切ではなく，むしろMRC研究からLIFE研究，PROGRESS研究までのエビデンスを考慮すると明らかに第一選択薬のひとつとして位置づけられると考える方が正しい。

2. わが国における利尿薬使用の減少

これだけの臨床試験の結果からのエビデンスの蓄積にもかかわらず，降圧利尿薬の日本での使用は荻原らの示す通り減少している¹⁰⁾。その理由は副作用，とくに糖尿病の発生やカリウム低下，尿酸の上昇などに対する懸念であろう。少量投与ではこれらの副作用の発生は少ないことがいくつかの臨床研究で示されているものの，

* Randomised clinical trial for the evaluation of safety, blood pressure lowering effect, and cost-effectiveness of diuretics in Japanese patients with essential hypertension : focus on new onset of type 2 diabetes.

** Shinichiro UEDA, M.D.: 琉球大学大学院医学研究科薬物作用制御学講座(〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原207) ; Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa 903-0215, JAPAN

日本人でのデータはない。また、新たな降圧薬が市場に登場し、薬価の高騰と相まって宣伝も増える一方で、安価な利尿薬はまったく媒体による宣伝がないことも理由のひとつであろう。

3. 降圧利尿薬と糖尿病の発生

降圧利尿薬の副作用の中でもっとも臨床的な重要性をもつものは糖尿病の発生であろう。これは心血管リスクを著しく増大させ、降圧で得られるリスク減少を帳消しにする。最近、降圧薬治療中の血糖の上昇は心筋梗塞のリスク増大に関与すると報告されている。このことでおそらく臨床家は降圧利尿薬を敬遠する傾向にあったと思われる。実際、過去の臨床試験においても、降圧利尿薬または降圧利尿薬とβ遮断薬の組み合わせはやや他剤にくらべ糖尿病の発生は多い傾向にある。ALLHATでも降圧利尿薬群ではほかの治療群に比べ糖尿病の発生は多かった。しかし、必要であればACE阻害薬やアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬との併用において(ALLHATはβ遮断薬の併用)、また、糖代謝への影響は明らかに用量依存性であるため低用量(ハイドロクロロチアジドで12.5mg以下)を厳守して比較されるべきである。いくつかの1万人規模の疫学調査では高血圧そのものが糖尿病発生の危険因子であり、β遮断薬はリスクを高める可能性があるものの降圧利尿薬は低用量であれば否定的と報告されている¹¹⁾¹²⁾。

4. 降圧利尿薬とほかの副作用

ほかの副作用としては低カリウム血症がある。これも用量依存性であり、低用量では生じにくいと考えられる。しかし、SHEP研究の結果は、3.5mmol/l以下の低カリウム血症は心血管リスクの減少を相殺してしまうことを示唆しており、とくに投与開始1年以内は注意が必要である。したがって、本研究でも治療抵抗性の低カリウム血症は二次エンドポイントとした。SHEP研究やALLHAT研究と異なり本研究において、また、実際の臨床の現場でもACE阻害薬やアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬、カリウム保持性利尿薬の併用が可能であり、しかも低用量を厳守することで低カリウム血症の頻度は抑制できる可能性がある。尿酸値の上昇も降圧利尿薬投与に伴って認められる。実際高用量の利尿薬が使用され

たMRC研究では、痛風の発生が男性高血圧患者のうち12.8%に認められた。しかし、尿酸に関しても用量依存性であり、Gurwitzらは約1万人を対象としたコホート研究から、ヒドロクロロサイアジド25mg以上の服用は新たな抗痛風治療開始にリスクになるが、12.5mg以下ではリスクにならないと報告した¹³⁾。低用量の厳守と必要に応じて尿酸排泄作用をあわせもつロサルタンの併用などでこれも発生を抑制できる可能性がある。

5. 日本人でこの研究がなぜ必要か？

日本人は欧米人に比べ遺伝的にインスリン分泌能が低いため、インスリン抵抗性や肥満の存在が比較的容易に2型糖尿病の発症につながりやすい。さらに最近の研究で、日本人はβ3遺伝子多型やPPAR γ 遺伝子多型など、いわゆるthrifty geneを保有する率が高く、糖尿病の易発症性に関与している可能性がある。降圧利尿薬は、欧米では、低用量では糖尿病発症のリスクは低いと考えられているが、日本人ではこのような糖尿病の易発症性により、必ずしもそういえない可能性がある。したがって、日本人において低用量降圧利尿薬投与下の糖尿病の発生を検討することは大きな臨床的意義があると考えられる。

日本人は塩分摂取量が多いため多く、平成8年度の調査でも1日13gと報告されている¹⁴⁾。理想的にはまず軽度の塩分制限を試みるべきであるが、降圧利尿薬(併用)によるナトリウム排泄はとくに日本人高血圧患者において血压コントロールおよび合併症の予防に有益である可能性がある。

前述したように、欧米人高血圧患者における降圧利尿薬のデータは多いが、環境因子、遺伝的因子の異なる日本人にあてはまらない可能性がある。日本人で行われた臨床試験はいくつかあるものの、現在の臨床現場を反映したような方法(降圧利尿薬は少量併用)でかつ、より多い患者における無作為化された研究によるデータが必要である。

現在日本の医療経済は危機に瀕しており、安全で効果的な医療を安価に提供することが必要とされている。また、高血圧患者は30歳以上で3000万人にも達するとされ、薬剤経済学的なインパクトは大きい。降圧利尿薬は安価であり、現在危機に瀕している本邦の医療経済を考慮す

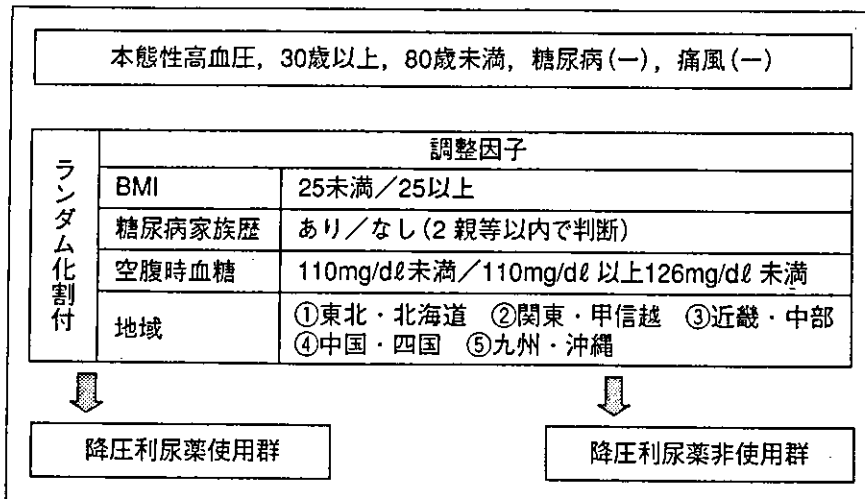


図1 研究デザイン

ると積極的に使用すべきである。しかし、薬剤経済学的分析は薬剤コストのみでは評価できない。基本的には、薬剤以外の直接コストや有害事象発生に伴う費用、労働生産性損失などを含めて算出されるべきである。

以上のような観点から、われわれは日本人高血圧患者における降圧利尿薬の安全性、降圧効果、費用対効果に関するランダム化臨床試験を行う。

研究計画

1. 研究仮説

低用量の降圧利尿薬を用いた降圧治療と用いない降圧治療は新規糖尿病の発生および降圧効果に関して同等であり、しかも安価である。

2. 目的

糖尿病を合併していない日本人の本態性高血圧患者を対象に、少量降圧利尿薬を使用した降圧療法と使用しない降圧療法を比較すると新たな糖尿病の発生が同等であることを検証する。また、副次的に下記secondary endpointとして設定したイベントの発生、臨床評価における比較と費用対効果の検討も行う。

(1) Primary endpoint

新たな糖尿病の発生。

(2) Secondary endpoint

1) 下記イベントの発生

痛風、治療抵抗性の低カリウム血症、心血管系イベント、全死亡。

2) 下記の臨床評価

降圧効果、耐糖能、脂質代謝、インスリン感受性(HOMA指数)、脈波伝導速度(PWV)。

3) 費用対効果の評価

3. 研究デザイン(図1)

降圧利尿薬使用群、降圧利尿薬非使用群の非盲検無作為化群間比較試験。ランダム化は行うがプラセボは用いず、イベントの判定は割付治療をマスクして独立した委員会が行う(PROBE法)。割り付けは、BMI、糖尿病家族歴、空腹時血糖値および地域を層とした層化割付とする。

4. 対象患者

選択基準を満たし、除外基準に抵触しない30歳以上80歳未満の通院中の本態性高血圧患者。

選択基準として、未治療の場合、登録票記載時から4週以内の2回の診察時のいずれにおいても坐位の収縮期血圧150mmHg以上または拡張期血圧90mmHg以上。降圧薬服用中の場合、登録票記載時から4週以内の2回の診察時のいずれにおいても坐位の収縮期血圧140mmHg以上または拡張期血圧90mmHg以上で、治療期間、使用降圧薬などが明らかな患者。

除外基準として、坐位の収縮期血圧200mmHg以上または拡張期血圧120mmHg以上、降圧薬服用中で治療期間、使用降圧薬などが不明瞭、降圧利尿薬服用中、糖尿病、痛風、高尿酸血症、低カリウム血症、勃起障害、肝、腎機能障害の合併、降圧利尿薬の重篤な副作用歴、同意日前6か月以内の脳卒中、心筋梗塞、冠動脈インター

ベンションやCABG,心不全または左室駆出率40%以下,利尿薬の投与が必須,同意日前5年以内の悪性腫瘍の既往またはその疑い,妊娠中または妊娠の可能性,授乳中,担当医師が不適切と判断した場合である。

5. 登録と割り付け

担当医師は対象患者が選択基準に該当し,除外基準に抵触しないことを確認し,「症例登録票」に必要事項をすべて記入の上,京都大学医学部附属病院総合診療科クリニカルリサーチサポートユニット(CRSU)にファックスにより登録する。CRSUでは適格性を確認し,適格症例については割付調整因子に基づき層化割付法を用いていずれかの治療法に割り付ける。治療群への割付結果は担当医師に連絡される。

6. プロトコル治療(介入内容)

未治療やその時点で降圧薬の治療を中断しているものは登録前4週以内に少なくとも2回測定した血圧が選択基準を満たし,その他の検査や診察の結果において除外基準にあてはまらない場合,患者登録およびプロトコル治療の割り付けを行い下記の治療のいずれかを開始する。

すでに降圧薬による治療歴があり,とくに利尿薬が投与されている患者を本研究に組み入れる場合,長期間にわたる休薬期間が必要であり実際的ではない。よって利尿薬をすでに投与されている場合は除外する。他剤による治療を受けている場合に関しても適切な休薬期間を設定することは困難である。したがって,すでに降圧薬の投与を受け,休薬を行わない患者は現在の坐位血圧が収縮期血圧140mmHg以上,または拡張期血圧90mmHg以上であり,治療期間などの病歴,使用薬剤が明瞭な場合に適格とする。現在の坐位血圧が収縮期血圧140mmHg未満,または拡張期血圧90mmHg未満にコントロールされている場合,この臨床試験に入ることで血圧のコントロールが悪化する,または過度の降圧をきたす可能性があり,倫理的に問題があると考えられる。

降圧利尿薬使用群ではトリクロルメサイアザイドまたはインダパミドで1mg/日相当量から開始するが,選択は担当医師に一任される。降圧薬の選択は担当医師に一任される。また,過

度の降圧や有害反応出現時などに降圧利尿薬減量も可とする。途中,クレアチニンが2.0mg/dl以上になった場合はループ利尿薬を使用する。

降圧利尿薬非使用群では降圧利尿薬以外のどの降圧薬も使用できる。効果不十分であれば降圧利尿薬以外の降圧薬の増量,併用を担当医師の判断において行う。

降圧目標は年齢にかかわらず,収縮期血圧140mmHg未満かつ拡張期血圧90mmHg未満とする。

7. 経済評価

経済評価としては,降圧利尿薬使用群と降圧利尿薬非使用群とを比較する費用効果分析(cost-effectiveness analysis)を行う。立場は原則として社会の立場とする。費用は薬物費用を主とし,医療にかかる直接費用を患者負担を含めて算出する。Primary endpoint, secondary endpointとして設定された,糖尿病やその他の有害事象にかかる費用も含まれる。

本研究では2群の糖尿病発症率が同等であることが立証された後,費用最小化分析(cost minimization analysis : CMA)を行う。経済評価でのコストデータ収集には,①解析に算入されるコストデータの同定,②単価(unit price)の算定,③資源消費量の算定という3つのプロセスが必要になる。わが国の場合,薬剤費や種々の検査料の単価は診療報酬点数表から容易に得られる。しかし,資源消費量の算定,とくに有害事象の治療コストを算定する際には,実際の診療データへのアクセスが不可欠である。

しかし,本研究に登録されたすべての患者のレセプトを入手することは困難であり,現実的でない。よって,基本的に調査票に記載された情報を基にコストデータを算出する。一方,協力の得られる参加施設からはイベント発生の有無にかかわらずレセプトのコピーを入手し,経済評価小委員会で診療モデルを作成し解析に用いる。レセプト収集率は約20%を目標とし,全症例2,200例を考慮して500症例の回収を目指すとともに,イベント発生症例に関しては全例収集を図る。現在イベントの発生率は約10%と見込まれているため,症例数は2,400例 \times 0.1=約240症例となる。この240症例に関しては発生前およ

び発生後それぞれのレセプト(発生当月を含めて最低3か月, 可能なかぎり外来および入院両方)を収集する。これに加えてイベント非発症例に関しても500-240=約260症例に関してレセプトを収集する。レセプト収集の承認が得られない医療機関に関しては, イベント発症例のカルテへのアクセスも考慮する。よって, インフォームドコンセントと各施設のIRBにおいてレセプトの使用についての承認を得る。降圧利尿薬使用群と降圧利尿薬非使用群の糖尿病発症率が同等であるという仮説が棄却された場合にはCMAを実施せず, 費用効果分析(cost-effectiveness analysis: CEA)によって増分費用効果比(incremental cost-effectiveness ratio: ICER)の算出を行う。

8. 予定症例数設定とその根拠

これまでに報告されている種々の降圧利尿薬の研究において, 新規糖尿病の発症率は糖尿病の判定基準の違いや観察期間の長さなどの試験デザインによって異なっている。本研究では比較的デザインの類似している研究結果を参考に, 糖尿病の発症率を降圧利尿薬使用群において4年間で7%, 降圧利尿薬非使用群において4年間で4%と見積った。両治療群間の糖尿病発症率の差が4年間で3%以内(平均5.5%)であれば同等であると考え, 両側 $\alpha=5\%$, $\beta=10\%$, $\Delta=3\%$ として計算した結果, 解析に必要な症例数は1群955例となる。利尿薬使用群のハザード率を λ_i , 非利尿薬使用群のハザード率 λ_c とする。また, 利尿薬使用群のファンクションを ϕ_i , 非利尿薬使用群のファンクションを ϕ_c とすると, サンプルサイズNは以下の式より計算される¹⁵⁾。

$$2N = \frac{2(Z_\alpha + Z_\beta)^2 [\phi(\lambda_c) + \phi(\lambda_i)]}{(\lambda_i - \lambda_c)^2}$$

$$\lambda_i = 0.018$$

$$\lambda_c = 0.01$$

本研究の観察期間T=5年間であるから

$$\phi(\lambda_i) = \lambda_i^2 / \{1 - \exp(-1 \times \lambda_i \times T)\} = 3.7644 \times 10^{-3}$$

$$\phi(\lambda_c) = \lambda_c^2 / \{1 - \exp(-1 \times \lambda_c \times T)\} = 2.0504 \times 10^{-3}$$

$$\text{両側 } \alpha = 5\% \text{ より } Z_\alpha = 1.96$$

$$\text{検出力 } (1 - \beta) = 90\% \text{ より } Z_\beta = 1.282$$

1群のサンプルサイズNは

$$N = \{[(1.96 + 1.282)^2] \times [2.0504 \times 10^{-3} + 3.7644 \times 10^{-3}]\} / (0.018 - 0.01)^2 = 955$$

20%の脱落を考慮してsimple inflation methodを適用すると1群で1,194例が必要になる。

文 献

- 1) Medical Research Council working party. MRC trial of treatment of mild hypertension : the principle results. *BMJ* 1985 ; 291 : 1146-51.
- 2) Prevention of stroke by antihypertensive treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program. *JAMA* 1991 ; 265 : 3255-64.
- 3) Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension : CAPPP randomized trial. *Lancet* 1999 ; 353 : 611-6.
- 4) Hansson L, Lindholm LH, Ekblom T, et al. Randomized trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients : cardiovascular mortality and morbidity STOP-2 study. *Lancet* 1999 ; 354 : 1751-6.
- 5) Brown MJ, Palmer CR, Castaigne A, et al. Morbidity and mortality in patients randomized to double-blind treatment with a long-acting calcium channel blocker or diuretic in the International Nifedipine GITS study : Intervention as a goal in hypertension treatment (INSIGHT). *Lancet* 2000 ; 356 : 366-72.
- 6) 伊藤貞嘉. AII受容体拮抗薬と利尿薬はなぜベストカップルなのか? *Hypertension Frontier* 2004 ; 7 : 108-15.
- 7) PROGRESS collaborative groups. Randomised trial of a perindapril based blood pressure lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke and or transient ischaemic attack. *Lancet* 2001 : 358 : 1033-7.
- 8) Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For End-points reduction (LIFE) in hypertension study. A randomized trial against atenolol. *Lancet* 2002 ; 359 : 995-1003.
- 9) The ALLHAT collaborative research group. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to ACE inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic. *JAMA* 2002 ; 288 : 2981-97.

- 10) 萩原俊男, 森本茂人, 中橋 毅, ほか. 本邦における高齢者高血圧に対する治療方針に関する検討. 日本老年病学会誌 1994 ; 31 : 396-403.
- 11) Gurwitz JH, Bohn RL, Glynn RJ, et al. Antihypertensive drug therapy and the initiation of treatment for diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1993 ; 118 : 273-78.
- 12) Gress TW, Nieto FJ, Shahar E, et al. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000 ; 342 : 905-12.
- 13) Gurwitz JH, Kalish SC, Bohn RL, et al. Thiazide diuretics and the initiation of anti-gout therapy. *J Clin Epidemiol* 1997 ; 50 : 953-9.
- 14) 厚生省保健医療局地域保健健康増進栄養課生活習慣病対策室. 平成10年版国民栄養の現状. 東京 : 第一出版 ; 1998.
- 15) Lachin JM. Introduction to sample size determination and power analysis for clinical trials. *Control Clin Trials* 1981 ; 2 : 93-113.

* * *

一般診療における降圧利尿薬の有効性：エビデンスの検証

植田真一郎

要 旨

降圧利尿薬はプラセボとの比較試験により比較的若年の軽症高血圧患者における脳卒中リスクの軽減、高齢者高血圧における冠動脈疾患および脳卒中リスクの軽減についてのエビデンスを有する。さらにACE阻害薬やカルシウム拮抗薬など比較しても特に利尿薬の使用が不利であるというエビデンスは無い。またACE阻害薬との併用は脳卒中二次予防に有効である。このように降圧薬として心血管イベント減少に関するエビデンスは蓄積されているにも関わらず、副作用への懸念からか使用は少ない。しかし勃起障害以外の主に代謝面での副作用は用量依存性であり、低用量では軽微であることが示唆されている。降圧利尿薬の適正使用は日本人高血圧患者の心血管リスク減少に貢献すると考えられるが、残念ながら欧米でのエビデンスしかなく、今後安全性や効果に関する臨床試験が必要である。

〔日内会誌 93：780～786, 2004〕

Key words：降圧利尿薬，高血圧，臨床試験，糖尿病発生

はじめに

1967年に発表されたVA studyは拡張期血圧115～129 mmHgの高血圧患者において薬物療法による降圧が心血管合併症を減少させることを初めて示した¹⁾。この研究以降、より軽症の高血圧での降圧の妥当性、降圧薬による予後の差異、高齢者における降圧の妥当性、適切な降圧の程度などに関する試験が行われ、その結果は今日さまざまなガイドラインに反映されている。降圧利尿薬はそのほとんどの試験で用いられ、心血管合併症を減少させることからいずれのガイドラインにおいても他剤と共に第一選択薬として推奨されている。

1. 降圧利尿薬の心血管イベント減少効果に関するエビデンス

1) 比較的若年の低リスク軽症高血圧におけるエビデンス

MRC軽症高血圧研究では拡張期血圧が90～109 mmHgの35歳から65歳までの軽症高血圧患者において降圧利尿薬群(ベンドロフルアザイド)ではプラセボ群に比べ、有意に脳卒中が減少した(18/4,500 vs 106/9,000, 約60%の減少)²⁾。しかし、冠動脈イベントは減少せず、総死亡率も差はなかった。この結果を論文の著者らはimportant but infrequent benefitとし、イギリス高血圧学会のガイドライン(1993)には「このレベルの高血圧において治療のメリットは少なく、全ての軽症高血圧を治療すべきとは考えられない」とコメントされている。ただしMRC研究は参加した患者が糖尿病患者の除外などにより比較的低リスクであり、心血管イベントの総数が少な

うえだ しんいちろう：琉球大学大学院医学研究科薬物作用制御学講座

いため、短期間では治療による予防効果を検討するには不適切であった可能性が強い。実際血圧は同程度であるが比較的心血管リスクの高い患者を対象としたHypertension detection and follow up program (HDFP)では利尿薬を基礎薬とした「段階的治療」によりMRC研究よりも効率の良いリスク低下が得られている³⁾。降圧利尿薬をこのような低リスク患者におけるプラセボを対照とした臨床試験はこの後行われておらず、ほとんどの臨床試験はよりリスクの高い患者で行われるようになった。

しかし少なくともこの試験から、脳卒中のリスクを減少させようという点で、比較的lowリスクの高血圧患者における降圧利尿薬による降圧の妥当性を支持するエビデンスが得られたと考えられる。一方この試験で心筋梗塞が減少しなかった理由として、高用量の降圧利尿薬による血糖値やカリウム、尿酸代謝への悪影響が、降圧効果による心血管リスク軽減を相殺するという仮説が生まれた。このことが現在も降圧利尿薬の使用が減少している原因のひとつとなっている。

2) 高齢者高血圧におけるエビデンス

一方高齢者ではリスクが高く、総イベント発生が多いためより明瞭な結果が得られている。老年者収縮期性高血圧を対象としたSHEP研究では現在のような低用量降圧利尿薬が用いられプラセボと比較して脳卒中は37%減少し、総心血管イベントも減少した⁴⁾。MRC高齢者高血圧試験においてもやはり糖尿病を除外した比較的lowリスク患者が対象であったがSHEP研究と同様の結果が得られている。総じて降圧利尿薬はプラセボとの比較において脳卒中の予防効果は明らかであり、疫学研究から期待される成績には達しないものの、高齢者では低用量で冠動脈疾患の減少も認められている。SHEP研究のサブ解析では糖尿病を伴う高血圧患者においてすら低用量では予後を改善する可能性が示唆されている⁵⁾。

3) 降圧利尿薬と他剤の比較

結論を先に述べればこれまでの試験からは心血管イベントの抑制に関して降圧利尿薬が他剤と比較して不利または有利とする十分な根拠は得られていない。併用による降圧治療が原則とされるならば単独の薬剤間の比較は臨床的にさほど大きな意義はないと考えられる。

降圧利尿薬そのものを比較した試験はカルシウム拮抗薬nifedipineと比較したINSIGHT研究⁶⁾、nicardipineと比較したNICS-EH研究⁷⁾ (日本) およびACE阻害薬と比較したANBP2研究⁸⁾が報告されている。全2者は治療群間にエンドポイント発生の差はなかったが、単剤比較を重視したため両治療薬の用量が多く、特に降圧利尿薬に関しては両試験とも比較的高用量であるため現在の診療への応用は難しい。ANBP2研究ではACE阻害薬群で心血管イベントは少なかったが割り付けられた治療をおこなっているものが両群とも約50%であることから解釈は簡単ではなく、また本来併用すべき2剤を比較したことから臨床的意義は少ない。

CAPPP研究⁹⁾やSTOP2研究¹⁰⁾は降圧利尿薬単独ではなく、β遮断薬とともに「従来の降圧薬」として前者ではACE阻害薬と後者ではカルシウム拮抗薬、ACE阻害薬の比較を行ったものである。両研究ともACE阻害薬に降圧利尿薬の併用が可能であり、ある程度現実の診療を反映している。しかし前者は基礎血圧や達成された血圧にそもそも差が生じており、結果の解釈は困難である。後者は治療群間で一次エンドポイント発生(心血管死)の差は認めなかった。

直接比較ではないものの、同様の患者背景をもつSyst-Eur研究¹¹⁾(カルシウム拮抗薬とプラセボの比較)とSHEP研究⁴⁾(利尿薬とプラセボの比較)の結果を比較しても心血管リスクの軽減において降圧利尿薬とカルシウム拮抗薬の間には差がなかった。

4) ALLHAT研究の結果は降圧利尿薬の積極的使用を支持するものか？

ALLHAT研究は降圧利尿薬、カルシウム拮抗薬、ACE阻害薬、 α 遮断薬の比較である¹²⁾。このうち α 遮断薬群は決して妥当とはいえない理由で中止された。対象は超高リスクともいえる肥満高血圧患者であり、高血圧臨床試験でありながら心不全の発生が脳卒中より多く、死亡率も治療群でありながら約28/1,000患者・年と他の臨床試験と比較しても予後が悪い。この点からもこの研究の結果を一般の高血圧診療へ応用することが困難であることが伺える。一次エンドポイントである冠動脈疾患による死亡および非致死性心筋梗塞は3群間に差はなかった¹⁵⁾。先頃発表されたアメリカのガイドライン、JNCVIIの治療指針はALLHAT研究の結果から降圧利尿薬を基本とし、多剤を適宜併用するべきであるという内容である。しかしこの研究には試験薬、二次薬の選択、患者の適合、除外基準などに関して様々な問題がある。まず二次薬が β 遮断薬やクロニジンなどと限られており、現在の臨床の現場を反映するものではない。ANBP2研究⁹⁾でも同様の問題があるが組み合わせとして臨床的には最も頻回に使用される降圧利尿薬とACE阻害薬が併用できない。これらはこの研究の目的のためにはやむを得ないが、結果の臨床への適用は困難である。既に降圧利尿薬を服用して血圧がある程度コントロールされていた患者が多く、母集団としてすでにバイアスがかかっているし、心機能の面から（心駆出率35%で適合）、降圧利尿薬を中止して他剤に割り付けたことは倫理的に問題があるといえる。（心不全発生に関してきわめて危険な患者群であるにも関わらず、心不全の診断基準はきわめて曖昧である。）事実ランダム化直後の α 遮断薬群での心不全の発生増加（他の治療群でも同様の傾向は認められる）はおそらく降圧利尿薬退中止によるものである。これまでの欧米での試験に比べ黒人の参加者が多いことも降圧利尿薬を使用しない群には明らか

に不利である。この研究の結果をきっかけに降圧利尿薬見直しの機運があるが、これは誤りで降圧利尿薬の意義はもともとMRC研究以来PROGRESS研究¹³⁾までの多くのエビデンスに支持されているもので、決してALLHAT研究により明らかになったわけではない。実際この研究の結果はヨーロッパ高血圧学会のガイドラインでは評価されていない。

5) 併用薬としての降圧利尿薬の妥当性を支持するエビデンス

PROGRESS研究¹³⁾は降圧利尿薬併用の脳卒中二次予防における有効性をはじめて明らかにした。脳卒中のリスク低下はACE阻害薬単独群でわずか5%（95%CI：0.77, 1.19）であったが、利尿薬併用群では47%（CI：0.46, 0.70）に達した。血圧低下はACE阻害薬単独群で5/3 mmHg、利尿薬併用群で12/5 mmHgと利尿薬併用による降圧効果の増強が脳卒中の二次予防に有効であった可能性がある。

2. 降圧利尿薬の副作用に関するエビデンスの検証

前項で述べたように降圧利尿薬は第一選択薬の一つとして多くのエビデンスを持つにもかかわらず、我が国の荻原らの調査¹⁴⁾でも米国の調査¹⁵⁾でも使用は減少している。宣伝がされていないこともあるが、MRC軽症高血圧研究²⁾などで高用量の降圧利尿薬が代謝系の副作用をひきおこすことが報告されていることも大きな理由であろう。現在低用量の使用が主流になっても副作用への危惧が投与をためらわせていると考えられる。

1) 降圧利尿薬使用は糖尿病発生のリスクファクターか？

高用量の利尿降圧薬では糖尿病の発生をはじめ種々の代謝面の副作用が報告されている。しかし低用量ではかならずしもそうではない。SHEP研究によると高齢者の収縮期性高血圧において

表. 降圧利尿薬臨床試験における新規糖尿病の発症

研究名	観察期間 (年)	糖尿病発症 (%)		
		利尿薬またはβ遮断薬	プラセボまたはACEI, CA	
SHEP	3	140/1,631 (8.6)	118/1,578 (7.5)	(diuretics vs placebo)
CAPPP	5	380/5,493 (6.9)	337/5,492 (6.1)	("conventional" vs ACEI)
NORDIL	5	251/5,471 (4.6)	216/5,410 (4.0)	("conventional" vs CA)
STOP-2	6	252/2,213 (11.4)	467/4,404 (10.6)	("conventional" vs CA/ACEI)
INSIGHT	4	137/3,164 (4.3)	96/3,147 (3.0)	(diuretics vs nifedipine)
NICS-EH	5	4/ 210 (0.2)	0/ 204 (0)	(diuretics vs nicardipine)
ALLHAT	4	302/2,606 (11.6)	154/1,567 (9.8)	(diuretics vs amlodipine)
			119/1,464 (8.1)	vs lisinopril)

ACEI : ACE 阻害薬, CA : カルシウム拮抗薬

糖尿病は3年間の観察期間中に利尿薬群で1,631名中140例(8.6%), プラセボ群でも1,578名中118名(7.5%)に発症し有意差はなかった¹⁶⁾. 11,855名の血糖降下療法を開始した患者においても降圧薬服用は有意な危険因子であったが, 降圧薬間でのリスクの差は認めなかった¹⁷⁾. 12,550名の高血圧患者における前向き研究では, 高血圧自体が新たな糖尿病発症のリスクになるが, 利尿降圧薬そのものはリスクとならないと報告された¹⁸⁾.

CAPPP研究⁹⁾ではカプトプリルとβ遮断薬, 利尿薬などいわゆるconventional therapyを比較したが, 糖尿病の発生は前者でやや少なかった(relative riskのCIは境界域(0.74~0.99)). INSIGHT研究ではカルシウム拮抗薬と降圧利尿薬を比較し, 糖尿病の発生は降圧利尿薬群が多かったが, この研究のプロトコールは基本的に降圧利尿薬とカルシウム拮抗薬の単独治療を比較したもので, ハイドロクロロチアジドは25mgで開始され, 効果不十分であれば増量し, その後基本的にβ遮断薬を併用している⁹⁾. ハイドロクロロチアジドは25mg以上から代謝系副作用は増えるが, 降圧効果は12.5mgと変わらないとされるため¹⁹⁾, この使用法は現在では適切ではないと考えられる. 従ってより少量の併用療法ではこのような糖尿病発症の差は生じない可能性がある. ALLHAT研究では降圧利尿薬群で糖尿病の発生が多いが,

平均BMI30という肥満高血圧患者を対象にした試験であることも考慮すべきである¹²⁾.

日本においてはトリクロルメチジドとカルシウム拮抗薬ニカルジピンとの比較試験が行われたが⁷⁾, この試験も厳密な単独治療の比較であり, トリクロルメチアジドが4mgまで40%の患者において増量されている. 結果として新たな糖尿病は利尿薬群で210名中4名に発生し, ニカルジピン群では発生がなかったが, できればより多い対象者において, 降圧利尿薬は少量併用の形で比較すべきであると考えられる. 表に降圧利尿薬を用いた臨床試験における糖尿病の発生についてまとめた. いずれも降圧利尿薬を含む治療群で糖尿病の発生が多い傾向にあるが, 今後低用量かつより適切な併用薬の使用のもとに評価すべきである.

2) 降圧利尿薬と痛風の発生

降圧利尿薬は用量依存性に血清尿酸値を上昇させる. しかし臨床的な観点からはこの上昇が1) 痛風の発生に関与するか? 2) 心血管リスクを増強するか? の2点から考察する必要がある. MRC研究では高用量の利尿薬群で約5%の痛風の発生(プラセボ群約0.4%)があり, 離脱の2番目に多い原因となった³⁾. 25mgまたは50mgのハイドロクロロチアジドを使用したINSIGHT研究では利尿薬群で2.1%, カルシウム拮抗薬群で1.3%とMRC研究よりは少ない発生

となっている⁶⁾。Gurwitzらは約1万人を対象としたコホート研究からハイドロクロロサイアザイド25mg以上の服用は新たな抗痛風治療開始にリスクになるが、12.5mg以下ではリスクにならないと報告した²⁰⁾。この結果はMRC研究やINSIGHT研究の結果や降圧利尿薬による血清尿酸値上昇の用量依存性に矛盾しない。他の研究でも痛風発生の危険因子として低用量であれば利尿薬よりもむしろ男性の高血圧患者、アルコール摂取、BMI高値、低下した腎機能などが示唆されている。2)に関しては、高尿酸血症は様々な心血管危険因子と同時に認められることが多く、単独での危険因子としての評価は難しい。26年間の経過を追ったフラミンガム研究でも高尿酸血症は単独では心血管危険因子とはならないと報告されている²¹⁾。

3) 降圧利尿薬と血清カリウム値

降圧利尿薬によるカリウム値の低下もやはり用量依存性である²²⁾。例えばハイドロクロロサイアザイド12.5mgの4週間から12週間の投与では血清カリウム値はプラセボ群またはベースラインと有意差なく、25mg以上では有意なカリウムの低下(0.2~0.7 mmol/L)を認めた。しかし、低用量の降圧利尿薬の投与によっても重篤な低カリウム血症を発症することはあり得る。SHEP研究では血清カリウム値が3.5mmol/L以下の群では心血管リスクの軽減が見られなかったとされるため注意が必要である²³⁾。ALLHAT研究でも利尿薬群と他の治療群とのカリウム値の差は0.2~3mmol/L程度であるが、カリウム値3.5mmol/L以下の割合は2年目には12.8%に達した¹²⁾。ただしカリウム代謝は利尿薬投与開始後約2~4週間で平衡状態に達するとされ、事実SHEP研究でも重篤な(<3.5 mmol/L)低カリウム血症はほぼ1年以内に発生している。結論として低用量の降圧利尿薬によるカリウムの低下は平均すれば軽微であるが、重篤なものも生じる可能性はあり、投与初期の注意深い観察が必要である。

4) 降圧利尿薬と勃起障害

TOMHS研究では低用量のクロルサリドンでも勃起障害の出現頻度は他剤にくらべると2年後の時点で有意に多く(17.1%に発生、プラセボ群では8.1%)、4年後は他剤との間に統計学的には差がないものの(18%、プラセボ群は16%に増加)多い傾向にある²⁴⁾。高用量の同薬を用いたMRC研究では1年に1,000人あたり12.6人に出現したと報告されている²⁾。性的機能への影響が一次エンドポイントであるTAIM研究ではやはり低用量のクロルサリドンで勃起障害の悪化が28%(プラセボ群で3%、アテノロール群で11%)で出現している²⁵⁾。これらの研究から勃起障害に関しては用量依存性ではなく、低用量でも高用量と同程度に出現の可能性はある。

5) 降圧利尿薬と高脂血症

脂質代謝に対する降圧利尿薬の影響も用量依存性である可能性が強い。

高用量では総コレステロールを12mg/dl、中性脂肪を約26mg/dl上昇させると報告されている²⁶⁾。しかし、少人数、短期間の観察ではあるが、少量投与では少なくとも臨床的に有意な上昇は認められていない²⁷⁾。SHEP研究の解析では低用量の降圧利尿薬はプラセボと比較して投与開始後1年で総コレステロールを約5mg/dl上昇させるがそれ以降はむしろ投与前の値にまで低下する¹⁶⁾。すなわち前述したような他の代謝系への影響と似た経過を辿る。HDLコレステロールへの影響についてはプラセボとの間に差はなかった。中性脂肪に関しては、SHEP研究においても高用量利尿薬とほぼ同程度に約20mg/dlの上昇が1年目で認められたが¹⁶⁾、その後の持続的な上昇はない。また降圧薬開始後の中性脂肪上昇は冠動脈疾患の罹患率に影響しないと報告されている²⁸⁾。

文 献

おわりに 日本人における降圧利尿薬に関するエビデンスの必要性

塩分摂取量の多い日本人においては欧米人よりもむしろ降圧利尿薬が有効である可能性がある。レニンアンジオテンシン系抑制薬にとっても塩分摂取量を考慮するとほぼ必須の併用薬であろう。しかし副作用、特に糖代謝への影響については、その悪化が心血管リスクを増大させることから慎重に評価されるべきである。事実2003年の厚生労働省の「糖尿病実態調査」によると2002年の我が国の糖尿病患者は740万人、可能性の否定できない人を含めると1,620万人にのぼるとされている。日本人は欧米人に比べ遺伝的にインシュリン分泌能が低いため、インシュリン抵抗性や肥満の存在が比較的容易に2型糖尿病の発症につながりやすいと考えられる。さらに最近の研究で、日本人は $\beta 3$ 遺伝子多型やPPAR γ 遺伝子多型などいわゆるthrifty geneを保有する率が高く、糖尿病の易発症性に関与している可能性がある。降圧利尿薬は欧米では低用量では糖尿病発症のリスクは低いと考えられているが、日本人ではこのような糖尿病の易発症性により、必ずしもそう言えない可能性がある。従って、日本人において低用量降圧利尿薬投与下の糖尿病の発生を検討することは大きな臨床的意義があると考えられる。欧米人高血圧患者における降圧利尿薬のデータは多いが、環境因子(塩分摂取量、食事内容など)遺伝的因子(易糖尿病発症性、食塩感受性、レニンアンジオテンシン系活性など)の異なる日本人にあてはまらない可能性がある。また従来の研究は β 遮断薬等と組み合わせ、いわゆる従来型治療として新しい降圧薬との比較がなされたが、臨床の現場ではむしろACE阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬と併用されることが多く、このような形での評価が必要である。

- 1) VA Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents: Effects of treatment on morbidity in hypertensive patients with diastolic pressure averaging 115 through 129 mmHg. *JAMA* 202: 1028-1034, 1967.
- 2) Medical Research Council working party: MRC trial of treatment of mild hypertension: the principle results. *BMJ* 291: 1146-1151, 1985.
- 3) Hypertension Detection and Follow up Program Cooperative Group: Five-year findings of the Hypertension Detection and Follow up Program. 1. Reduction in Mortality of persons with high blood pressure including mild hypertension. *JAMA* 242: 2562-2571, 1979.
- 4) Prevention of stroke by antihypertensive treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program. *JAMA* 265: 3255-3264, 1991.
- 5) Curb JD, et al: Effect of diuretic-based antihypertensive treatment on cardiovascular disease risk in older diabetic patients with isolated systolic hypertension. *JAMA* 276: 1886-1892, 1996.
- 6) Brown MJ, et al: Morbidity and mortality in patients randomized to double-blind treatment with a long-acting calcium channel blocker or diuretic in the International Nifedipine GITS study: Intervention as a goal in hypertension treatment (INSIGHT). *Lancet* 356: 366-372, 2000.
- 7) NICS-EH study group: Randomised double-blind comparison of a calcium antagonist and a diuretic in elderly hypertensives. *Hypertension* 34: 1129-1133, 1999.
- 8) Wing LMH, et al: A comparison of outcomes with angiotensin converting enzyme inhibitors and diuretics for hypertension in the elderly. *N Engl J Med* 348: 583-592, 2003.
- 9) Hansson L, et al: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: CAPPP randomized trial. *Lancet* 353: 611-616, 1999.
- 10) Hansson L, et al: Randomized trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity STOP-2 study. *Lancet* 354: 1751-1756, 1999.
- 11) Staessen JA, et al: Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. *Lancet* 350: 757-764, 1997.
- 12) The ALLHAT collaborative research group: Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to ACE inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic. *JAMA* 288: 2981-2997, 2002.
- 13) PROGRESS collaborative groups: Randomised trial of a perindril based blood pressure lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke and or transient ischaemic attack. *Lancet* 358: 1033-1037, 2001.

- 14) 荻原俊男, 他: 本邦における老年者高血圧に対する治療方針に関する検討. 日本老年病学会誌 31:396-403, 1994.
- 15) Knight EL, et al: Failure of evidence-based medicine in the treatment of hypertension in older patients. *J Gen Intern Med* 15: 702-709, 2000.
- 16) Savage PJ, et al: Influence of long-term low-dose, diuretic-based, antihypertensive therapy on glucose, lipid, uric acid, and potassium levels in older men and women with isolated systolic hypertension. *Arch Int Med* 158: 741-751, 1998.
- 17) Gurwitz JH, et al: Antihypertensive drug therapy and the initiation of treatment for diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 118: 273-278, 1992.
- 18) Gress TW, et al: Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 342: 905-912, 2000.
- 19) Flack JM, Cushman WC: Evidence for the efficacy of low dose diuretic monotherapy. *Am J Med* 101: 53S-60S, 1996.
- 20) Gurwitz JH, et al: Thiazide diuretics and the initiation of anti-gout therapy. *J Clin Epidemiol* 50: 953-959, 1997.
- 21) Brand FN, et al: Hyperuricemia as a risk factor of coronary heart disease: Framingham Study. *Am J Epidemiol* 121: 11-18, 1985.
- 22) Carlsen JE, et al: Relation between dose of bendroflumazide, antihypertensive effect, and adverse biochemical effects. *BMJ* 300: 975, 1990.
- 23) Franse LV, et al: Hypokalemia associated with diuretic use and cardiovascular events in the systolic hypertension in the elderly program. *Hypertension* 35: 1025-1030, 2000.
- 24) Grimm RH, et al: Long term effects on sexual function of five antihypertensive drugs and nutritional hygienic treatment in hypertensive men and women. *Hypertension* 29: 8-14, 1997.
- 25) Wassertheil-Smoller S, et al: Effect of antihypertensives on sexual function and quality of life: The TAIM study. *Ann Intern Med* 114: 613-620, 1991.
- 26) Ames RP, et al: Increase in serum lipids during treatment of hypertension with chlorthalidone. *Lancet* I: 721-723, 1976.
- 27) McKenny JM, et al: The effect of low-dose hydrochlorthiazide on blood pressure, serum potassium and lipoproteins. *Pharmacotherapy* 6: 179-184, 1986.
- 28) Samuelson O, et al: Diabetes mellitus and raised serum triglyceride concentration in treated hypertension. Are they of prognostic importance? Observational study. *BMJ* 313: 660-663, 1996.

Original Article

Methodological Validity and Feasibility of the Nitric Oxide Clamp Technique for Nitric Oxide Research in Human Resistant Vessels

Shinichiro UEDA^{*,**}, Atsushi WADA^{**}, and Satoshi UMEMURA^{**}

N^G-methyl-L-arginine (L-NMMA) has been widely used for nitric oxide (NO) research, particularly for the assessment of NO-dependent vasodilatation evoked by agonists. However, such experiments may not be straightforward because L-NMMA causes vasoconstriction, which itself must non-specifically affect responses to any vasoactive agents. Therefore, in order to more accurately estimate the roles of NO in human vessels *in vivo*, we developed an NO clamp technique that uses co-infusion of an NO donor with L-NMMA. To assess the validity and feasibility of this technique, we compared the effects of intra-arterial infusion of L-NMMA on the forearm blood flow responses to vasodilators with and without the NO clamp technique in healthy males. All drugs were intra-arterially infused and changes in forearm blood flow (FBF) were measured by strain-gauge plethysmography. Vasodilatation evoked by atrial natriuretic peptide was significantly attenuated by L-NMMA alone ($p=0.001$) but not by the NO clamp technique. L-NMMA significantly attenuated the responses to acetylcholine either with or without the NO clamp technique. However, the ratio of the area under the curve (AUC) of acetylcholine with L-NMMA to that without L-NMMA was significantly higher when the NO clamp technique was not used (AUC ratio: 0.62 ± 0.13 vs. 0.48 ± 0.14 , respectively; $p=0.031$). The contribution of NO to the FBF responses to vasodilators may be more properly assessed by the co-infusion of L-NMMA with the NO clamp technique than by L-NMMA alone. Our NO clamp technique thus appears to be valid and feasible for human NO research. (*Hypertens Res* 2004; 27: 351–357)

Key Words: *N*^G-methyl-L-arginine, nitric oxide, atrial natriuretic peptide, acetylcholine, nitric oxide clamp

Introduction

The roles of nitric oxide (NO) in the regulation of human vascular tone have been extensively investigated using forearm blood flow (FBF) measurement with the intra-arterial infusion of agonists that simulate NO production and of *N*^G-methyl-L-arginine (L-NMMA), which inhibits NO synthase activity (1). The basal vascular NO production can be indirectly represented by the reduction of FBF during the infusion of L-NMMA (2–5). The stimulated NO production of

human vessels as a pivotal part of vascular endothelial function can be assessed by the vasodilator response to acetylcholine with L-NMMA (6, 7). The contribution of NO to vasodilatation evoked by any agonist can also be assessed by the co-infusion of vasodilators and L-NMMA (8–10). The results from these experiments, however, should be carefully interpreted, since L-NMMA causes robust vasoconstriction (1) and differences in basal FBF may non-specifically affect responses to vasodilators (11). Stroes *et al.* first described the NO clamp technique, which pharmacologically restores the reduced FBF induced by L-NMMA in order to avoid the

From the *Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, University of the Ryukyus School of Medicine, Okinawa, Japan, and **Department of Medicine, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan.

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (No. 13670734 to S.Ueda).

Address for Reprints: Shinichiro Ueda, M.D., Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, University of the Ryukyus School of Medicine, 207 Uehara, Nishihara-cho, Okinawa 903–0215, Japan. E-mail: suedano9@dream.com

Received July 11, 2003; Accepted in revised form February 23, 2004.

non-specific effects of L-NMMA and to assess the contribution of NO as accurately as possible (12). We have also used a modified version of this technique for human NO research (13). In the present study we estimated the methodological validity of this technique and then tested our hypothesis that a reduction in FBF by L-NMMA may non-specifically attenuate the effects of NO-independent vasodilators (e.g., atrial natriuretic peptide (ANP)) and overestimate the NO-dependent part of vasodilatation by acetylcholine if not for NO clamp technique.

Methods

Subjects

Six (protocol 1 and 2), 8 (protocol 3), and 8 (protocol 4) normotensive healthy men between 20 and 24 years of age (mean: 22 years) were studied. All subjects had normal results of routine physical and laboratory examinations. Written informed consent was obtained from each subject after a full explanation of the study. The Yokohama City University Hospital Ethics Committee approved all study protocols.

FBF Measurement

All experiments were performed in a quiet, temperature-controlled room. The subjects fasted overnight and abstained from smoking cigarettes and drinking beverages containing alcohol or caffeine for at least 12 h before the study. FBF was measured by bilateral venous occlusion strain gauge plethysmography. The details of the method and the reproducibility of the results are described elsewhere (14, 15). All drugs were infused into a catheter inserted into the brachial artery of the non-dominant arm.

Baseline FBF was measured at least 30 min after cannulation, after confirming that this variable was stable on 3 consecutive occasions. The drug infusion rate was maintained at 1 ml/min throughout the study.

Study Protocol

Protocol 1: Changes in FBF during L-NMMA Infusion

L-NMMA (Clinalfa, Laufelfingen, Switzerland) was infused intra-arterially at 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ for 120 min in each subject. Blood pressure and FBF were measured every 10 min.

Protocol 2-a: Co-Infusion of Glyceryl Trinitrate with L-NMMA

L-NMMA at 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was infused intra-arterially for 150 to 180 min (L-NMMA alone for 60 min, with glyceryl trinitrate [GTN; Nihon Kayaku, Tokyo, Japan] for 70 to 90 min, and L-NMMA alone again for 30 min). The concomitant infusion of GTN was started 60 min after starting L-NMMA infusion to restore reduced FBF. The dose of GTN was titrated every 10 min from 50 ng/min until FBF returned to the baseline value (NO clamp) (12, 13). The duration of each

dose of GTN in this protocol was valid because steady-state FBF during GTN infusion was obtained within 5 min. Once the individual dose was determined, GTN was infused for another 60 min. FBF was measured every 10 min until 30 min after the termination of GTN to confirm the stable, sustained inhibition of NO production.

Protocol 2-b: Repeated NO Clamp with the Individually Determined Doses of GTN

In the 4 subjects participating in protocol 2-a, L-NMMA was intra-arterially infused at 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and GTN at the titrated doses in protocol 2-a was co-infused 20 min after starting L-NMMA. FBF was measured every 10 min.

Protocol 3: Effects of L-NMMA Alone and L-NMMA with GTN on the Vasodilator Response to ANP in Normal Volunteers

This protocol involved 2 study days. ANP (Daiichi Seiyaku, Tokyo, Japan) was infused intra-arterially at 50, 125, and 250 ng/min (10 min per dose), on two occasions on Day 1. After the first infusion of ANP and a 30-min washout period, the infusion of L-NMMA at 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was started. The second ANP infusion was commenced at least 30 min after starting the L-NMMA infusion. On Day 2, after the first infusion of ANP at the same doses and a 30-min washout period, the infusion of L-NMMA at 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was started, followed by co-infusion of GTN in order to restore reduced FBF (NO clamp). The second ANP infusion was commenced at least 10 min after starting the GTN infusion.

Protocol 4: Effects of L-NMMA Alone and L-NMMA with GTN on the Vasodilator Response to Acetylcholine in Normal Volunteers

This protocol also involved 2 study days. Acetylcholine (Dai-ichi Seiyaku, Tokyo, Japan) was infused intra-arterially at 50, 100, 200, and 400 nmol/min (10 min per dose), on two occasions on Day 1. After the first infusion of acetylcholine and a 30-min washout period, the infusion of L-NMMA at 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was started. The second acetylcholine infusion was commenced at least 30 min after starting the L-NMMA infusion. On Day 2, after the first infusion of acetylcholine at the same doses and a 30-min washout period, the infusion of L-NMMA at 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was started followed by co-infusion of GTN in order to restore reduced FBF (NO clamp). The second acetylcholine infusion was commenced at least 10 min after starting the GTN infusion.

Analysis of FBF Data

All FBF data were obtained via a Mac Lab 4 chart recorder (AD Instruments; Hamstead, London, UK). The percentage change in the ratio of FBF from the baseline value was calculated as $[F(i)_D/F(ni)_D - F(i)_B/F(ni)_B] \times 100\%$, where $F(i)$ and $F(ni)$ represent forearm blood flow in the infused arm and non-infused arm, respectively, during baseline measurement (B) and drug infusion (D).

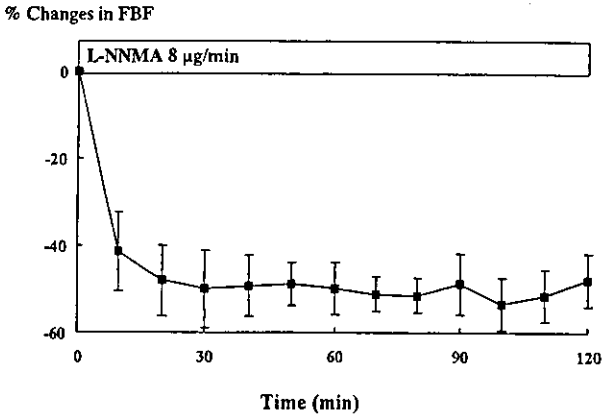


Fig. 1. Time course of the percent reduction of forearm blood flow ratios during the continuous intra-arterial infusion of L-NMMA at 8 µg/min (n=6).

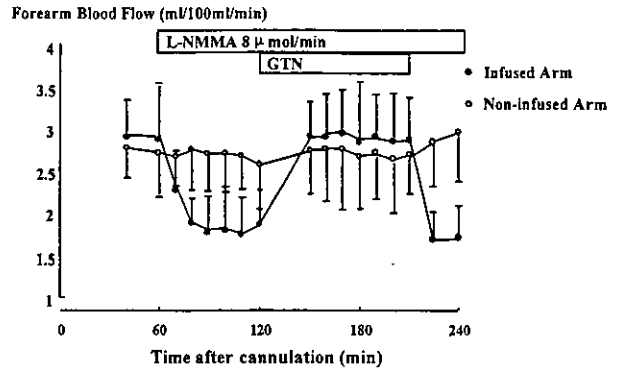


Fig. 2. Time course of the forearm blood flow (absolute value) of the non-infused arm (open circle) and the infused arm (filled circle) during the intra-arterial infusion of L-NMMA at 8 µg/min with co-infusion of GTN (NO clamp technique, 120 min to 210 min).

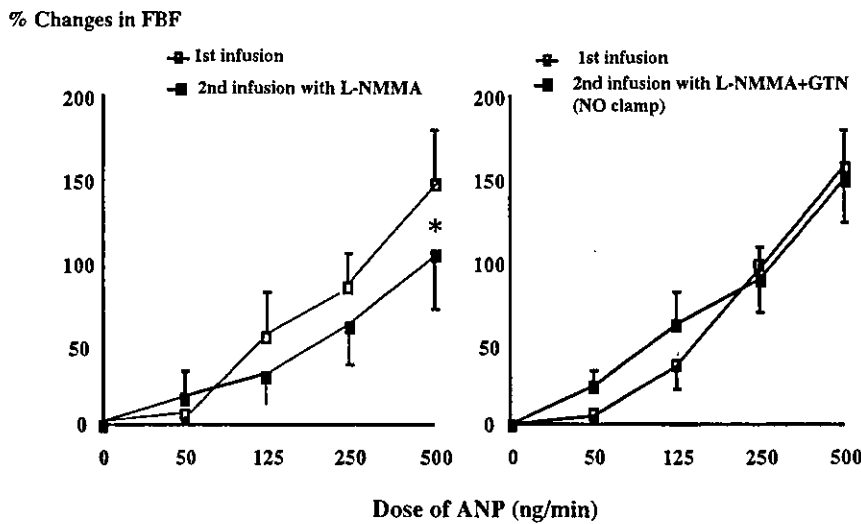


Fig. 3. Dose-response curves of ANP alone (open squares) and ANP with L-NMMA (filled squares). L-NMMA was infused alone (left panel) or with GTN (the NO clamp technique, right panel). P values represent the statistical differences by repeated measures of ANOVA over the full dose-response curves. * p=0.001.

Statistical Analysis

Data are shown as the means ± SD unless otherwise indicated. The dose-response curves of acetylcholine and ANP during co-infusion of L-NMMA with or without the NO clamp technique were compared with those during infusion of saline by repeated measures of analysis of variance (ANOVA). Areas under the dose-response curve (AUC) of acetylcholine alone and acetylcholine with L-NMMA were calculated individually. The ratio of the AUC with L-NMMA to that without the NO clamp technique was compared by paired t-test.

Results

Protocol 1: Effect of L-NMMA on FBF

L-NMMA infusion significantly reduced FBF, and a steady state was achieved approximately 20 min after starting the infusion (Fig. 1). There was no significant change in blood pressure or heart rate during the infusion of L-NMMA. FBF during the L-NMMA infusion remained constant for at least 90 min.

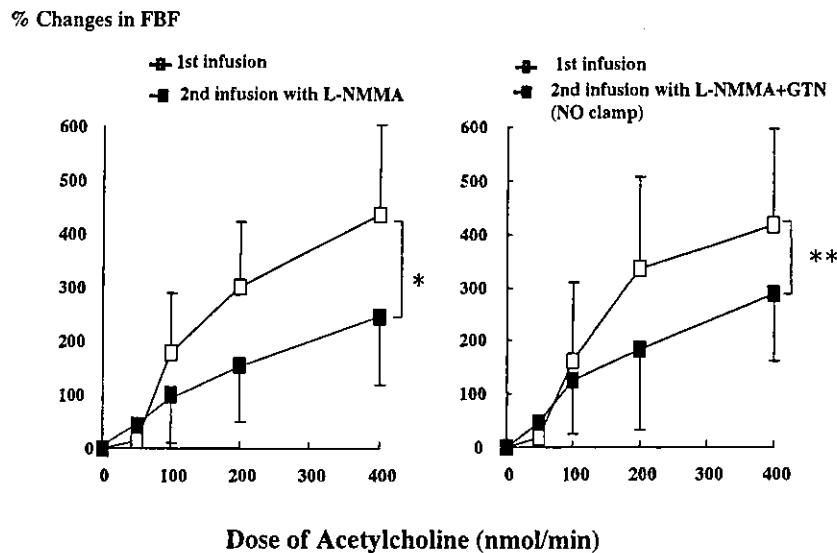


Fig. 4. Dose-response curves of acetylcholine alone (open squares) and acetylcholine with L-NMMA (open squares). L-NMMA was infused alone (left panel) or with GTN (the NO clamp technique, right panel). P values represent the statistical differences by repeated measures of ANOVA over the full dose-response curves. * $p < 0.0001$; ** $p = 0.0014$.

Protocol 2-a: Effect of Concomitant Infusion of GTN (NO Clamp Technique)

Figure 2 shows the changes in FBF during L-NMMA and GTN infusion. L-NMMA significantly decreased blood flow and GTN restored blood flow to the baseline value. Individually titrated doses of GTN for clamp ranged from 50 ng/min to 250 ng/min. FBF during the infusions of L-NMMA and GTN remained constant for 60 min and returned to the value during the infusion of L-NMMA alone after the withdrawal of GTN.

Protocol 2-b: Repeated NO Clamp with the Individually Determined Doses of GTN

GTN at the individually determined doses in protocol 2-a successfully restored FBF during L-NMMA infusion in the same subjects (3.26 ± 0.78 ml/min/dl before L-NMMA, 1.73 ± 0.41 after L-NMMA, 3.21 ± 0.63 after GTN).

Protocol 3: Effects of L-NMMA Alone and L-NMMA with GTN (NO Clamp Technique) on the Vasodilator Response to ANP in Normal Volunteers

Figure 3 shows the effects of L-NMMA alone (Day 1) and L-NMMA with the NO clamp technique (Day 2) on the vasodilator responses to ANP. Although the FBF before the second infusion of ANP was significantly lower than that before the first infusion on Day 1 (L-NMMA only) (1.57 ± 0.44 vs. 3.15 ± 1.00 ml/min/dl, $p < 0.0001$), the FBF before each infusion of ANP was comparable on Day 2 (L-NMMA with the NO clamp technique) (3.13 ± 0.67 vs. 3.00 ± 0.70 ml/min/dl). Although co-infusion of L-NMMA significantly at-

tenuated the response to ANP on Day 1 ($p = 0.001$), there was no significant effect of L-NMMA on the response to ANP with the NO clamp technique.

Protocol 4: Effects of L-NMMA Alone and L-NMMA with GTN on the Vasodilator Response to Acetylcholine in Normal Volunteers

Figure 4 shows the effects of L-NMMA alone (Day 1) and L-NMMA with the NO clamp technique (Day 2) on the vasodilator response to acetylcholine. Although the FBF before the second infusion of acetylcholine was significantly lower than that before the first infusion on Day 1 (L-NMMA only) (2.06 ± 0.60 vs. 3.70 ± 1.14 ml/min/dl, $p = 0.0005$), the FBF before each infusion of acetylcholine was comparable on Day 2 (L-NMMA with the NO clamp technique) (3.59 ± 1.05 vs. 3.43 ± 0.87 ml/min/dl). Although co-infusion of L-NMMA significantly attenuated the response to acetylcholine on both study days ($p < 0.0001$ on Day 1, $p = 0.0014$ on Day 2) the attenuation of the response to acetylcholine by L-NMMA was significantly smaller with the NO clamp technique than that without the NO clamp technique (AUC ratio: 0.62 ± 0.13 vs. 0.48 ± 0.14 , $p = 0.031$).

Discussion

Validity of the NO Clamp Technique

We showed that the intra-arterial infusion of L-NMMA significantly reduced FBF by approximately 50%, and the co-infusion of GTN successfully restored FBF to the baseline values. Although Stroes *et al.* (12) introduced the NO clamp technique, we here validated this technique with respect to

several methodological points for the first time. First, reduced FBF during the infusion of L-NMMA was achieved 20 min after starting the infusion, suggesting that infused L-NMMA may maximally inhibit NO production of forearm vessels at this point. This time-dependent effect of infused L-NMMA on FBF was first shown by Duffy *et al.* (16) and reproduced by our present study. This result suggests that the infusion of GTN to restore reduced FBF should be started approximately 20 min after starting L-NMMA infusion, and thus that Stroes *et al.* (12) started sodium nitroprusside (5 min after L-NMMA infusion) too quickly. Second, we also showed that reduced FBF by L-NMMA was successfully restored by GTN and that FBF during the co-infusion of L-NMMA and GTN at individually titrated doses was kept constant for 60 min. Although the doses of GTN ranged from 50 to 250 ng/min, the titration period was not time-consuming, since the steady-state response to GTN could be achieved within 5 min. Third, FBF after the withdrawal of GTN was comparable with that before GTN, suggesting constant inhibition of NO production during the NO clamp technique. Finally, we showed that the individually determined dose could be used for another experiment in the same subjects. All these findings support the validity of our NO clamp technique.

One would question, however, if using an NO donor (GTN) could be justified for NO clamp. We chose GTN for several reasons. First, GTN acts directly through vascular smooth muscle cells and does not affect endothelial function. Second, supplying exogenous NO with L-NMMA infusion to restore FBF inhibits stimulated NO production but leaves the amount of basal NO unchanged, which may be suitable for the assessment of the contribution of NO to the vasodilating effect of agonists. Finally, no other appropriate vasodilators are available. For example, a steady-state response to hydralazine is achieved more than 1 h after the start of infusion (Ueda S and Wada A, unpublished data).

Feasibility of the NO Clamp Technique

We demonstrated that the intra-arterial infusion of L-NMMA alone significantly attenuated changes in FBF during the infusions of ANP as previously shown by Sugamori *et al.* (17), which seems to suggest an NO-dependent vasodilating effect of ANP. Costa *et al.* also demonstrated an NO-dependent effect of ANP (18). They showed that the hypotensive effect of ANP was abolished by the infusion of L-NMMA in rats. However, we also demonstrated that the infusion of L-NMMA with the NO clamp technique had no significant effect on the FBF responses to ANP, which suggests that the vasodilating effect of ANP is not NO dependent in human forearm resistant vessels and the attenuated response to ANP during the infusion of L-NMMA alone may be due to the reduction of basal FBF. Although the NO-dependency of ANP may differ among species or among different types of vascular beds, the hypothesis that ANP elicits vasorelaxation through NO production in human forearm resistant vessels

was adequately rejected. This result is consistent with the reports by Winquist *et al.*, which showed endothelium-independent vasorelaxation by ANP (19), and Honing *et al.*, which showed hyperpolarization-dependent, NO-independent vasorelaxation by a C-type natriuretic peptide (20) that shares natriuretic peptide receptor-B with ANP (21).

The vasodilatation evoked by acetylcholine is, albeit not in all vascular beds, deemed NO-dependent because co-infusion of L-NMMA significantly attenuated acetylcholine-induced vasodilatation in healthy volunteers (6, 8). However, we demonstrated that co-infusion of L-NMMA resulted in significantly less inhibition of the acetylcholine response when the NO clamp technique was used than did L-NMMA alone, which may be due to differences in basal FBF, because Chowienzyk *et al.* showed that vasodilator responses to acetylcholine were significantly dependent on resting FBF (22). Therefore, the contribution of NO to vasodilatation by acetylcholine may have been overestimated without the NO clamp technique and may be less than we previously thought. In fact, Coats *et al.* recently showed that NO accounted for only 20% of the maximum relaxation response to acetylcholine in human subcutaneous resistance-size arteries (23). Urakami-Harasawa also similarly showed that endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine was significantly inhibited by L-NMMA and indomethacin in large arteries but not in microvessels (24). Our study suggests that the "true" L-NMMA-sensitive, NO-dependent component may have been approximately 40% of the maximum response to acetylcholine in the forearm-resistant vessels of our subjects. However, it should be noted that the compensatory activation of other endogenous vasoactive systems (*e.g.*, endothelium-derived hyperpolarizing factor [EDHF] (25)) was not taken into account in our experiment.

Our study also showed that non-specific effect of L-NMMA on vasodilator response to acetylcholine was smaller than that to ANP and to bradykinin (BK) particularly at higher doses because of NO dependency. Therefore comparison of NO dependent part of vasodilatation of acetylcholine before and after treatment may be possible without NO clamp, albeit not so accurate as with NO clamp, as long as FBF after L-NMMA is comparable.

Vascular endothelial function in humans has been frequently assessed by the response to acetylcholine of the forearm resistant vessels (5–7, 26, 27). Blunted responses to acetylcholine have been considered to indicate endothelial dysfunction in patients with several diseases, including hypertension (6), hyperlipidaemia (28), and diabetes mellitus (7). However, our results together with the report by Chowienzyk *et al.* (22) caution that any reduction in basal blood flow could non-specifically blunt the responses to acetylcholine, which cannot be regarded as endothelial dysfunction.

It has also been shown that NO mediates the vasodilating effects of several other vasoactive agents, including BK and serotonin. While the vasodilating effect of serotonin was

completely abolished by L-NMMA even with the NO clamp technique (29), the vasodilating effect of BK, like that of ANP in the present study, was attenuated by L-NMMA alone (30, 31) but not by L-NMMA with the NO clamp technique (13, 29) in human forearm resistant vessels. These results suggest that the vascular action of serotonin depends purely on NO, while that of BK depends on other factors, for example EDHF (29).

Advantage and Disadvantage of the NO Clamp Technique

As discussed above, FBF reduction during the infusion of L-NMMA non-specifically affects the activities of vasodilators, which can be avoided by using the NO clamp technique. Therefore, the effects of inhibition of stimulated NO production on the vascular actions of drugs or peptides may be more accurately evaluated with an NO clamp, which is the apparent advantage of this experimental technique. Although this also can be a disadvantage, because the effect of reduced basal NO cannot be evaluated with an NO clamp, our results suggest that substantial changes in basal FBF may lead to less accurate results.

In conclusion, the contribution of NO to the FBF responses to vasodilators may be more correctly assessed by the co-infusion of L-NMMA with the NO clamp technique than by infusion of L-NMMA alone, which may overestimate the role of NO in agonist-induced vasodilatation. Our results also suggest that adequate comparison of the vasodilator properties of any agonist, as for example between patients and controls, can be made only when the baseline flow of the vascular beds is comparable.

References

- Vallance P, Collier J, Moncada S: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; **2**: 997-1000.
- Calver A, Collier J, Moncada S, et al: Effect of local intra-arterial N^G-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens* 1992; **10**: 1025-1031.
- Calver A, Collier J, Vallance P: Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 1992; **90**: 2548-2554.
- Petrie JR, Ueda S, Webb D, et al: Insulin sensitivity and endothelial function: a physiological relationships with implications for pathophysiology of cardiovascular disease. *Circulation* 1996; **93**: 1331-1333.
- O'Driscoll G, Green D, Taylor RR: Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improve endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997; **95**: 1126-1131.
- Panza JA, Casion PR, Kilcoyne CM, et al: Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of with essential hypertension. *Circulation* 1993; **87**: 1468-1474.
- Makimattila S, Liu ML, Vakkilainen J, et al: Impaired endothelium-dependent vasodilatation in type 2 diabetes: relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants. *Diabetes Care* 1992; **22**: 973-981.
- Newby DE, Boon NA, Webb DJ: Comparison of forearm vasodilatation to substance P and acetylcholine: contribution of nitric oxide. *Clin Sci* 1997; **92**: 133-138.
- Nakamura M, Yoshida H, Makita S, Arakawa N, Ninuma H, Hiramori K: Potent and long lasting vasodilatory effects of adrenomedullin in humans. *Circulation* 1997; **95**: 1214-1221.
- Nakagawa K, Higashi Y, Sasaki S, Oshima T, Matsuura H, Chayama S: Leptin causes vasodilatation in humans. *Hypertens Res* 2002; **25**: 161-165.
- Robinson BF: Assessment of responses to drugs in forearm resistance vessels and hand veins of man: techniques and problem, in Kuhlmann J, Wingender W (eds): Dose-Response Relationships of Drugs. Munich, Zuckshwerdt Verlag, 1990, pp 40-43.
- Stroes ES, Luscher TF, de Groot FG, Koomans HA, Rabelink TJ: Cyclosporine A increases nitric oxide activity *in vivo*. *Hypertension* 1997; **29**: 570-575.
- Ueda S, Masumori-Maemoto S, Wada A, Ishii M, Brosnihan KB, Umemura S: Angiotensin-(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man. *J Hypertens* 2001; **19**: 2001-2009.
- Benjamin N, Calver A, Collier J, Robinson BF, Vallance P, Webb DJ: Measuring forearm blood flow and interpreting the responses to drugs and mediators. *Hypertension* 1995; **25**: 918-923.
- Petrie JR, Ueda S, Morris AD, et al: How reproducible is bilateral forearm venous occlusion plethysmography in man? *Br J Clin Pharmacol* 1998; **45**: 131-139.
- Duffy SJ, New G, Tran BT, et al: Relative contribution of vasodilator prostanoids and NO to metabolic vasodilation in the human forearm. *Am J Physiol* 1999; **276**: H633-H670.
- Sugamori T, Ishibashi Y, Shimada T, et al: Nitric oxide-mediated vasodilatory effect of atrial natriuretic peptide in forearm vessels of healthy humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; **29**: 92-97.
- Costa MA, Gonzalez Bosc LV, Majowicz MP, Vidal NA, Balaszczuk AM, Arranz CT: Atrial natriuretic peptide modifies arterial blood pressure through nitric oxide pathway in rats. *Hypertension* 2002; **35**: 1119-1123.
- Winquist RJ, Faison EP, Waldman SA, Sxhwartz K, Murad F, Rapoport RM: Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activate particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc Nat Acad Sci USA* 1984; **81**: 7661-7664.
- Honing MLH, Smits P, Morrison PJ, Burnett CJ Jr, Rabelink TJ: C-type natriuretic peptide-induced vasodilatation is dependent on hyperpolarization in human forearm resistance vessels. *Hypertension* 2001; **37**: 1179-1183.
- Suga S, Nakao K, Hosoda K, et al: Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 1992; **130**: 229-239.
- Chowienzyk PJ, Cockcroft JR, Ritter JM: Blood flow responses to intra-arterial acetylcholine in man: effect of