

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: CAPP 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 bendrofluzide, 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.

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).

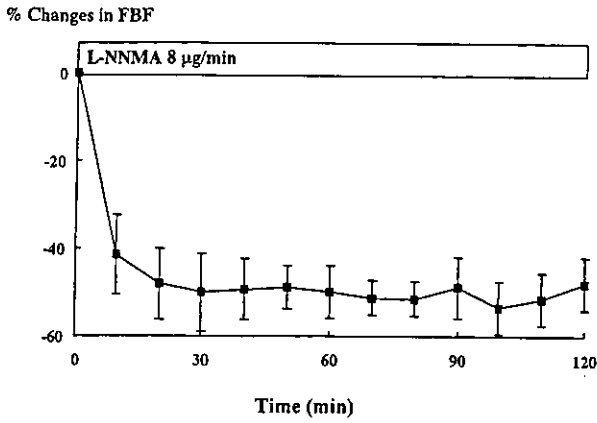


Fig. 1. Time course of the percent reduction of forearm blood flow ratios during the continuous intra-arterial infusion of L-NMMA at 8 µg/min (n=6).

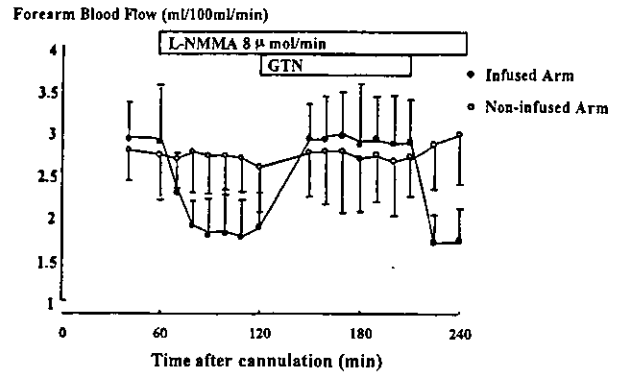


Fig. 2. Time course of the forearm blood flow (absolute value) of the non-infused arm (open circle) and the infused arm (filled circle) during the intra-arterial infusion of L-NMMA at 8 µg/min with co-infusion of GTN (NO clamp technique, 120 min to 210 min).

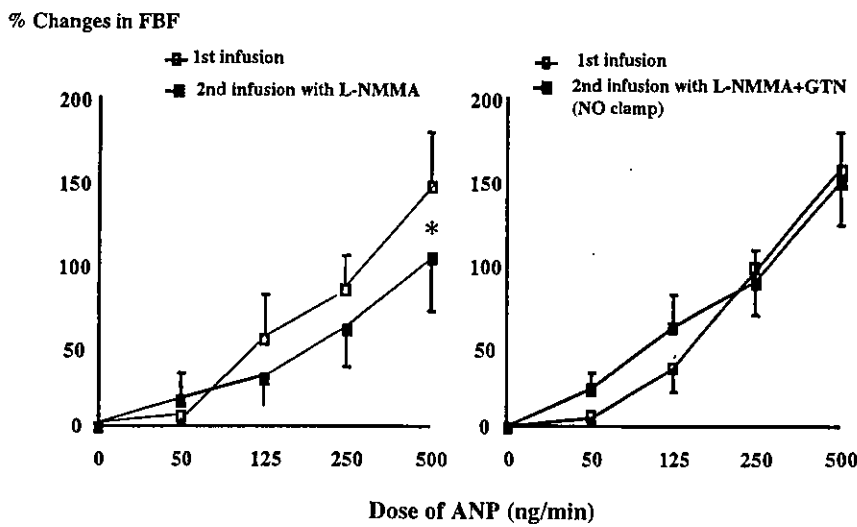


Fig. 3. Dose-response curves of ANP alone (open squares) and ANP with L-NMMA (filled squares). L-NMMA was infused alone (left panel) or with GTN (the NO clamp technique, right panel). P values represent the statistical differences by repeated measures of ANOVA over the full dose-response curves. * p=0.001.

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.

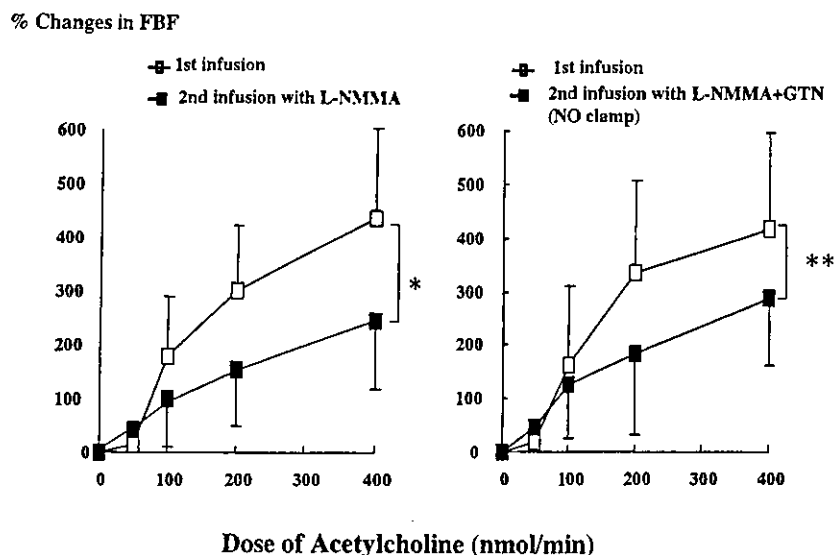


Fig. 4. Dose-response curves of acetylcholine alone (open squares) and acetylcholine with L-NMMA (open squares). L-NMMA was infused alone (left panel) or with GTN (the NO clamp technique, right panel). P values represent the statistical differences by repeated measures of ANOVA over the full dose-response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

- basal flow and conduit vessel length. *Clin Sci* 1994; **87**: 45-51.
23. Coats P, Johnston F, MacDonald J, McMurray JJV, Hillier C: Endothelium-derived hyperpolarizing factor: identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation* 2001; **103**: 1702-1708.
 24. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A: Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2793-2799.
 25. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, et al: Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999; **40**: 493-497.
 26. Tagawa T, Hirooka Y, Shimokawa H, et al: Long-term treatment with eicosapentaenoic acid improves exercise-induced vasodilatation in patients with coronary artery disease. *Hypertens Res* 2002; **25**: 823-829.
 27. Hirooka Y, Eshima K, Setoguchi S, Kishi T, Egashira K, Takeshita A: Vitamin C improves attenuated angiotensin II-induced endothelium-dependent vasodilation in human forearm vessels. *Hypertens Res* 2003; **26**: 953-959.
 28. Chowienczyk PJ, Watts GF, Cockcroft JJR, Ritter JM: Impaired endothelium dependent vasodilatation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemia. *Lancet* 1992; **340**: 1430-1432.
 29. Honing ML, Smits P, Morrison PJ, Rabelink TJ: Bradykinin-induced vasodilatation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. *Hypertension* 2000; **35**: 1314-1318.
 30. O'Kane KP, Webb DJ, Collier JG, Vallance PJ: Local L-N^G monomethyl-arginine attenuates the vasodilator action of bradykinin in the human forearm. *Br J Clin Pharmacol* 1994; **38**: 311-315.
 31. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, Ritter JM: Effect of N^G-monomethyl-L-arginine on kinin-induced vasodilation in the human forearm. *Br J Clin Pharmacol* 1994; **38**: 307-310.

RAS

Renin-Angiotensin System

特集◇血管とRAS

II. 血管におけるRASの臨床応用

血管内皮機能とRAS

植田真一郎

琉球大学大学院医学研究科薬物作用制御学

アンジオテンシンIIさらにアルドステロンは基礎的な実験のみならずヒト *in vivo* 実験からも酸化ストレス亢進などを介した血管内皮機能低下を引き起こす可能性が示唆されている。本態性高血圧患者においては慢性レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system: RAS) 抑制による特異的な血管内皮機能改善は明らかではないが、2型糖尿病においてはアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin-converting enzyme: ACE) 阻害薬、AT₁受容体拮抗薬 (AT₁ receptor blocker: ARB) とともに血管内皮機能を改善することが報告されている。冠動脈疾患患者でも伝導血管において同様の結果が得られている。糖尿病や冠動脈疾患の患者においてはRAS抑制が血管内皮機能を改善し、予後を改善する可能性があるが、機序に関して不明な点や方法論・研究デザイン上の問題も多く、今後標準化された方法で検討されるべきである。

Key words

アセチルコリン, アンジオテンシン変換酵素阻害薬, アンジオテンシンII受容体拮抗薬, FMD, プレチスモグラフ

はじめに

血管内皮細胞はさまざまな機能を有するが、多くの臨床研究ではヒト血管における薬理的あるいは生理的刺激による内皮依存性血管拡張反応をその指標として評価している。この総説ではレニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system: RAS) 抑制はさまざまな疾患をもつ患者の血管内皮機能を改善させるか? 改善するならばどのようなメカニズムが介在するか? という問いに焦点をあて、文献をレビューし、考察を加えた。

ヒトにおける血管内皮機能評価とRAS活性の影響を検討する際の問題点

ヒトRASと血管内皮機能について述べる前に、ヒトにおける血管内皮機能評価法について簡単に紹介する。評価法の特徴、とくに交絡因子について知ることは提示

されたデータの解釈に必須である。ヒト血管内皮機能は、橈骨動脈にアセチルコリンを注入しアゴニスト刺激による前腕抵抗血管の内皮依存性拡張を、プレチスモグラフを用いた前腕血流量の測定により評価する方法と、阻血解除後の血流増加による血管拡張を、超音波を用いて血管径の変化として評価する方法により評価される。前者は薬理的刺激による抵抗血管の、後者は生理的刺激による伝導血管の内皮機能をそれぞれ評価していることになる。

1) アセチルコリン動注による前腕抵抗血管における評価法について

前腕血流量は、静脈閉塞による還流の抑制をおこなった状態で、流入する血流量を前腕体積の増大率としてプレチスモグラフを用いて計測する。アセチルコリン動注による血管拡張反応は血管内皮機能の指標となるが、

NO依存性の拡張は全体の40~50%程度とされる⁷⁾。この実験系におけるアセチルコリン血管拡張作用は前腕血流基礎値²⁾および血圧³⁾に影響されると報告されている。問題はこれらはアンジオテンシン変換酵素(angiotensin-converting enzyme: ACE)阻害薬またはAT₁受容体拮抗薬(AT₁ receptor blocker: ARB)の投与により変化しうることである。したがって、RAS抑制の影響を検討するには対照として同程度の血圧降下をきたす介入をおこなうか、血圧や前腕血流が変化しない対象者(例:塩分摂取正常の正常血圧者)で研究をおこなう必要がある。アセチルコリン血管拡張反応の再現性は、臨床研究プロトコル作成において症例数の決定に重要であるが、AUCによる検討でも%CVは15~25%であり^{4,5)}、個人差も大きい。

2) FMDによる伝導血管における検討

frow-mediated vasodilation (FMD)による評価は侵襲がアセチルコリン法よりも少なく、小児にも用いることが可能などの利点はあるが、現在おこなわれている方法では、RAS抑制の効果を詳細に検討するような臨床研究に使用するには再現性が低すぎる⁶⁾。この点は、たとえばリアルタイムトラッキングシステムの導入やプローブの安定性などの点を今後改善していく必要がある。Ghiadoniらはリアルタイムトラッキング法を用いて、FMDのピーク値や反応のAUCを算出し、その半年後の再測定による再現性を報告しているが、CV 15%と以前の報告よりも良好である⁷⁾。

データの解釈に関しては、FMDは④阻血解除後の血管内皮刺激としての血流増加、⑤血流増加によるNOなどの血管内皮細胞からの遊離、⑥NOへのcGMPの反応(平滑筋機能)の3因子が影響することを念頭に置くべきである。FMDの改善が血管内皮機能の改善として評価されるには、このうち④と⑥は変化しないことが前提である。しかしここでもまたACE阻害薬やARBは⑤のみならず④、⑥にも影響することに留意すべきである。④はそもそも測定されること自体が少ない。⑥は通常ニトログリセリン投与後の血管拡張反応として評価され、多くの研究では介入の前後で差がない。ゆえにFMDの改善は内皮機能の改善である、と解釈されている。しかし

1用量での検討であり、反応もFMDの2倍程度と、対照実験としての妥当性が確立しているとはいえない。この点も今後検討・改善すべきであろう。先述したGhiadoniらは低用量のニトログリセリンを投与して、FMDとほぼ同程度の血管拡張を得ることに成功している⁷⁾。またアセチルコリンテストと同様に血圧が影響することも報告されているため⁸⁾、ACE阻害薬やARBの介入による影響を評価する際に血圧の変動は問題になる。以上のようなこの2つの評価法の限界を知ったうえで、得られたデータの解釈をおこなうべきである。

アンジオテンシンIIは血管内皮機能障害を引き起こすか?

HarrisonらのグループはアンジオテンシンII慢性投与により高血圧を発症する動物モデルを作製した。このラットではアンジオテンシンIIによる膜結合型NAD(P)Hオキシダーゼの活性化または発現増加を介した活性酸素産生増加が血管内皮機能低下、血圧上昇に貢献している可能性が強い。また注目すべきことは同時にNOドナーに対する血管拡張反応も低下していることで、NOの活性酸素による不活性化が介在していることを示している⁹⁾。腎血管性高血圧患者はRAS活性が亢進しているが、Higashiらはこの疾患の患者において酸化ストレスのマーカーが高値であり、血管内皮機能が低下していること、ビタミンC投与および腎血管形成術によりそれらが改善することから、ヒトにおいてもアンジオテンシンIIへの暴露が酸化ストレスを亢進させ、ヒトの血管内皮機能を障害することを明らかにした¹⁰⁾。しかしHigashiらの研究では、NOドナーとして用いたイソソルピドに対する血管拡張反応の血管形成術後の変化については明らかではない。この点はRASと内皮機能の関連を考察するうえで重要である。

Hirookaらは健常者においてアンジオテンシンIIを動注し、アセチルコリンによる血管拡張反応への影響を検討した。アンジオテンシンIIはアセチルコリンの血管拡張作用を減弱させ、この作用はビタミンCの同時投与により消失した¹¹⁾。またわれわれの研究室ではNOドナーの血管拡張作用に及ぼすアンジオテンシンIIの影響を検討した。アンジオテンシンIIはNOドナーのニトロ

グリセリンの血管拡張作用を減弱させ、これはビタミンCおよびARBの投与により消失した¹²⁾。上記の2つの実験で使用されたアンジオテンシンIIの投与量により得られる前腕のアンジオテンシンII濃度は *in vitro* でNAD(P)Hオキシダーゼを活性化すると報告されているものであることから、ヒト抵抗血管において比較的短期間のアンジオテンシンIIへの暴露により、AT₁受容体を介して活性酸素の産生増加によるNOの不活性化、血管内皮機能低下が生じる可能性がある。

アルドステロンは血管内皮機能を低下させるか？

1999年に発表されたRALES研究は、抗アルドステロン薬であるスピロラクトンを、ACE阻害薬を含む心不全の標準治療に加えることが約30%の死亡率の低下を伴うことを明らかにした¹³⁾。これまでアンジオテンシンIIこそがRAS最終産物としてさまざまな心血管イベントに関連すると考えられてきたが、この試験の結果は心不全においてアルドステロンも生命予後に関与する危険因子として認識されるべきであることを強く示唆する。また、さまざまな基礎研究から、アルドステロンは心血管組織でも産生され、受容体も存在することが明らかになった。血管においてはNOの遊離を抑制することが示されたほか、ACE活性の増強などを介して、RAS活性を亢進させる可能性がある。Farquharsonらは心不全患者に対するスピロラクトンの標準治療への追加が、アセチルコリンテストで評価した血管内皮機能および基礎的なNO産生(L-NMMAの血管収縮作用で評価される)を改善することを、プラセボを使用したクロスオーバー法で明らかにした¹⁴⁾。この厳格な研究デザインの使用は、この結果の信頼性をきわめて高いものにしてている。またFarquharsonらは健常者においてアルドステロンの全身投与が血管内皮機能を低下させることをやはり二重盲検クロスオーバー法により明らかにした¹⁵⁾。詳細な機序は現時点では不明であるが、アルドステロンは直接内皮細胞に作用し、NO産生または遊離の抑制により血管内皮機能を低下させると考えられる。

高血圧患者における血管内皮機能とRAS抑制

高血圧患者において血管内皮機能が低下しているこ

と、NOドナーへの反応は保持されていることを示唆する報告は多い。しかしすべての報告が一致しているわけではなく、内皮機能は保持されているとの報告、NOドナーへの反応も低下しているとする報告も存在する。年齢や存在する代謝異常などが影響すると考えられる。血管内皮機能低下が存在する場合、降圧薬による治療は血管内皮機能を改善させるか否かについて多くの研究がおこなわれた。

1) アセチルコリンを用いた前腕抵抗血管における検討—本態性高血圧—

HirookaらはACE阻害薬カプトプリルが血管内皮機能を改善すること、ニフェジピンは改善しないことを、それぞれ単回投与後であるが、はじめて報告した¹⁶⁾。ACE阻害薬はアンジオテンシンII産生抑制、ブラジキニンの不活性化抑制を介して血管内皮機能を改善する可能性はあるが、その後の研究では、一致した見解は得られていない(表①)。慢性投与の場合、ACE阻害薬では改善しないとする報告もみられ¹⁷⁾¹⁸⁾、逆にCa拮抗薬でも改善するとする報告¹⁹⁾もある。ARBは、L-NMMAの血管収縮作用で評価する基礎的NO産生を改善し、アセチルコリンに対する血管拡張反応も改善するが、同時にニトロプルシドへの反応も改善しており、内皮機能の改善とは結論づけられないとしている²⁰⁾。同様の結果はACE阻害薬についても報告されている²¹⁾。このように相容れない結果となってしまう理由については、前述したようにアセチルコリンが血圧の影響を受けること、長期にわたる再現性は確認されていないことなどがあげられる。現在のところクロスオーバーデザインや十分な検出力をもつランダム化平行群間比較試験デザインを用いた研究は少なく、ほとんどバイアスのかかりやすい前後比較であることも理由の1つであろう。結局、現時点では本態性高血圧患者においてRAS抑制がアセチルコリンへの血管拡張反応で評価した血管内皮機能を改善するという明確な証拠は得られていない。したがって逆にRAS活性亢進が本態性高血圧の血管内皮機能低下を引き起こしていることを裏づける証拠はないことになる。L-NMMAの血管収縮作用で基礎的NO産生を評価する方法も用いられている。高血圧患者で基礎的NO産生は

表① RAS抑制と血管内皮機能—本態性高血圧—

前腕抵抗血管 (アセチルコリンテスト)			
Hirooka	カプトプリル 25 mg 単回投与	オープン試験, 前後比較 (n=7)	改善あり
Creager	カプトプリル 150 mg 7~8 週間	前後比較 (n=12)	変化なし
	エナラプリル 30 mg 7~8 週間	無作為割り付け	変化なし
Viridis	カプトプリル 100 mg 52 週間	オープン試験, 前後比較	改善あり (サブグループ解析にかぎり)
Kiowski	シラザプリル 10 mg 21 週間	オープン試験, 前後比較 (n=22)	変化なし
Taddei	リシノプリル 10 mg 単回投与	オープン試験, 前後比較 (n=10)	変化なし
	4 週間 1 年間		変化なし 改善あり (SNP への反応も増加)
Ghiodoni	カンデサルタン 8~16 mg 8 週間 6 カ月間	オープン試験, 前後比較 (n=10)	変化なし 改善あり (SNP への反応も増加)
伝導血管 (FMD)			
Ghiodoni	ベリンドプリル 2~4 mg 6 カ月間	前後比較 (n=28)	改善あり
	テルミサルタン 80~160 mg 6 カ月間	前後比較 (n=29) 無作為割り付け	変化なし

(筆者作成)

低下していることが知られているが、この方法では現在のところ、先述した ARB に加えて ACE 阻害薬、Ca 拮抗薬ともに高血圧患者では改善することが報告されている²²⁾。したがって現時点では本態性高血圧患者において血圧降下そのものではなく RAS 活性抑制が特異的に血管内皮 NO 産生を増加させるか否かは不明である。

2) 腎血管性高血圧における検討

先に腎血管性高血圧患者ではアンジオテンシン II 産生増加により酸化ストレス亢進による血管内皮機能低下が生じるとする報告があることを述べた。興味深いことに動脈硬化性の腎血管性高血圧患者においては ARB や α_1 遮断薬では血圧低下するものの内皮機能 (この研究では 100%NO 依存性の血管拡張を起こすセロトニンを使用) は改善せず、ACE 阻害薬投与時のみ改善が認められたとする報告がある²³⁾。もし腎血管性高血圧の内皮機能低下が AT₁ 受容体を介した酸化ストレス亢進あるいは血圧上昇そのものにあるのなら、この結果は矛盾することになる。

3) FMD による検討—本態性高血圧—

FMD は先述したように臨床研究に用いるには多くの

問題があるが、最近、先に述べたように再現性を改善した方法による RAS 抑制の内皮機能への影響をみた研究が報告された。1 群約 180 名の患者を無作為に ACE 阻害薬、ARB、2 種類の Ca 拮抗薬、2 種類の β 遮断薬に割り付けて FMD を半年の治療前後で計測したものである。血圧は各群ともほぼ同程度 (<140/<90 mmHg) にコントロールされたが、ACE 阻害薬群でのみ内皮機能 (FMD) の改善が認められた⁷⁾。ARB ではこの作用は認められず、RAS 抑制 (アンジオテンシン II の作用抑制) よりもブラジキニン不活性化による内皮機能改善の可能性が示唆される。事実、健常者における検討でも、ACE 阻害薬は急性に FMD を改善したが、ブラジキニン B₂ 受容体拮抗薬と同時に投与するとその作用は消失している。ただし、この仮説には抵抗血管での研究結果を考慮すると矛盾する点がある。

4) まとめ

本態性高血圧患者においては、前腕抵抗血管での慢性的な RAS 抑制による内皮機能の改善は明らかではなく、むしろ降圧そのものが基礎的 NO 産生を改善する可能性がある。一方、伝導血管では ACE 阻害薬による FMD の特異的な改善が報告されており、ARB では改善

表② RAS抑制と血管内皮機能—糖尿病—

1型糖尿病			
前腕抵抗血管 (アセチルコリンテスト)			
O'Driscoll	エナラプリル 20mg 4週間	オープン試験, 前後比較 (n=9)	改善あり
伝導血管 (FMD)			
MacFarlane	ベリンドプリル 2~4mg 12週間	二重盲検クロスオーバー (n=20)	変化なし
Schalkwijk	キナプリル 10mg 5週間	二重盲検クロスオーバー (n=24)	変化なし
Mullen	エナラプリル 20mg 24週間	二重盲検ランダム化 (n=45)	変化なし
2型糖尿病			
前腕抵抗血管 (アセチルコリンテスト)			
Bijlstra	ベリンドプリル 4~8mg 24週間	オープン試験, 前後比較 (n=10)	変化なし
O'Driscoll	エナラプリル 20mg 4週間	二重盲検クロスオーバー (n=10)	改善あり
Cheetham	ロサルタン 50mg 4週間	二重盲検クロスオーバー (n=9)	改善あり
伝導血管 (FMD)			
Cheetham	ロサルタン 50mg 4週間	二重盲検クロスオーバー (n=12)	改善あり

(筆者作成)

しなかったこと、健常者でもACE阻害薬はFMDを増大させ、その作用はB₂受容体拮抗薬により消失することなどから、RAS抑制よりもむしろブラジキニン不活性化が機序として考えられる²⁴⁾。しかし抵抗血管では、健常者でもACE阻害薬によるブラジキニン不活性化を介した血管拡張反応増強は認められるが、アセチルコリンの血管拡張作用は増強しない。つまりブラジキニン増加は抵抗血管のアセチルコリン刺激後の内皮依存性血管拡張に影響していないことになる。これは血管床による違いなのか、アセチルコリンテストはACE阻害薬(ブラジキニン不活性化)の内皮機能への影響を評価するには妥当でないのかは明らかではない。アセチルコリンの作用のうちNOに依存する部分はFMDでのそれにくらべ少ないことが理由となるかもしれない。実際ほぼ100%NOに依存するセロトニンの血管拡張作用を指標にした腎血管性高血圧患者における研究では、先述したようにACE阻害薬が抵抗血管の血管内皮機能を改善したと報告されている。ただこの結果は、よりRAS活性が亢進した状態(腎血管性高血圧)ではブラジキニン不活性化が内皮機能を改善するとも解釈できる。

糖尿病患者における血管内皮機能とRAS抑制 (表②)

1型糖尿病においては以前から血管内皮機能および

NOドナーへの血管拡張反応が低下していることが報告されている。RAS抑制の介入をおこなった研究はいくつか報告されているが、研究間の結果の不一致が認められる。O'Driscollらはエナラプリラートの動注およびエナラプリルの1ヵ月間投与が正常血圧の1型糖尿病患者の血管内皮機能(アセチルコリンテストにより評価した)を改善すると報告している²⁵⁾。Arcaroらは大腿動脈のFMDが1週間のカプトプリルまたはエナラプリル投与により改善することを示した²⁶⁾。しかしMcFarlaneらの研究ではより厳格な研究デザイン(二重盲検クロスオーバー法)において12週間のACE阻害薬の投与はFMDで評価した血管内皮機能に影響せず²⁷⁾、さらにMullenらは半年間のACE阻害薬投与がやはりFMDを改善しなかったと報告している²⁸⁾。ただし後者は従来のFMDの評価法を用いて、二重盲検ながらプラセボとの平行群間比較をおこなっており、検出力は十分でなかった可能性は残る。また重要なポイントとしてプラセボ群においても半年後のFMDは改善しており、この種の研究における、プラセボを用いない前後比較による過大評価の危険性を示唆している。長期RAS抑制のアセチルコリンを用いた評価は報告されていないが、総じて急性の抑制では改善するものの、慢性的RAS抑制が1型糖尿病の血管内皮機能を改善する明らかな証拠はまだ得られていない。

2型糖尿病においても血管内皮機能, 平滑筋機能の低下が報告されている。1995年にBijlstraらは10名の高血圧を合併した2型糖尿病患者において, 半年間のACE阻害薬投与はメタコリン動注により評価した血管内皮機能を改善しなかったと報告している²⁹⁾。この研究は少人数での前後比較であるが, O'Driscollらは正常血圧の2型糖尿病において二重盲検クロスオーバー法によりACE阻害薬4週間投与とプラセボを比較し, ACE阻害薬投与はアセチルコリンテストで評価した血管内皮機能およびL-NMMAの血管収縮反応で評価した基礎的NO産生を改善したと報告している³⁰⁾。同じ研究グループはさらに同じく正常血圧の2型糖尿病において, ARBロサルタン4週間投与がプラセボと比較してFMDで評価した伝導血管およびアセチルコリンテストで評価した前腕抵抗血管の血管内皮機能を改善することを二重盲検クロスオーバー法により明らかにした³¹⁾³²⁾。したがって, より長期の十分な検出力と客観性をもった研究はおこなわれていないが, 4週間のRAS抑制は正常血圧の2型糖尿病患者の血管内皮機能を改善させることが示唆された。ARBでもACE阻害薬でも2型糖尿病の血管内皮機能が改善することは, アンジオテンシンIIの産生・作用の抑制を介したメカニズムが介在する可能性が強いことを示唆する。しかしARBと異なり, ACE阻害薬では基礎的NO産生の改善も認められている³⁰⁾。これはブラジキニン不活性化を介したものである可能性がある。

冠動脈疾患患者における血管内皮機能とRAS抑制

TREND研究は正常血圧の冠動脈疾患患者を無作為にACE阻害薬キナプリルとプラセボに割り付け, 半年間の治療後の冠動脈血管内皮機能を評価したものである。キナプリルは有意に冠動脈血管内皮機能を改善した³³⁾。BANFF研究は8週間のエナラプリル, キナプリル, ロサルタン, アムロジピン投与のFMDで評価した血管内皮機能へ及ぼす影響をクロスオーバー法により検討したものであるが, キナプリル投与後のみ血管内皮機能の改善が認められた³⁴⁾。しかしこの研究で用いたFMD測定法は高血圧の項で紹介した最近の報告と異なり再現性が低く, 十分な検出力を有していたかは疑問である。

有意ではないものの, 少なくともロサルタン, アムロジピンでも改善する傾向はあった。Hornigらは同様の臨床的背景を有する患者においてACE阻害薬とARBを比較したが, 両者とも同程度にFMDで評価された内皮機能を改善している³⁵⁾。L-NMMAやビタミンCを使用した実験から, 両者ともNOの生体内有効利用を増加させ, 酸化ストレスを減少させることが機序として考えられる。ただしプラセボによる評価はなく, 先に引用した論文が示唆するように, 両者の効果を過大評価している可能性もある。Prasadらはやはり冠動脈疾患患者において8週間のARBロサルタン投与がFMDを改善したと報告しているが, この研究ではプラセボなしの前後比較による過大評価とロサルタンにより血圧が低下していることが結果に影響したことも否定できない³⁶⁾。

要約すると, 冠動脈疾患患者ではRAS抑制が内皮機能を改善する可能性がいくつかの研究から示唆される。このことは冠動脈疾患患者では血管のRAS活性亢進により酸化ストレス亢進, NOの生体内有効利用の低下などが起こり, 血管内皮機能を低下させていることも示唆する。ARBとACE阻害薬に差がないことは, RAS抑制(アンジオテンシンIIの産生・作用の抑制)そのものが内皮機能改善に貢献していると考えられる。動物実験では血管(例:ラット冠動脈)にAT₂受容体が存在し, AT₁受容体の遮断によりAT₂受容体を刺激し, AT₁受容体刺激時とは逆の血管拡張, 抗動脈硬化(抗酸化, 抗炎症)作用を呈するとされる³⁷⁾。これまでヒト血管においてはAT₂受容体の存在や機能について明らかではなかった。しかし最近Danserらのグループは, AT₂受容体刺激によりB₂受容体およびNOを介してヒト冠微小動脈が拡張することを報告した³⁸⁾。興味深いことにAT₂受容体を介した作用の割合は年齢とともに増加することが示唆されている。このことは冠動脈疾患を有する比較的高齢者においてはARB投与によりAT₂受容体が刺激され, NO産生亢進などを介して内皮機能が改善する可能性があることを示唆する。おそらくARBの内皮機能への影響は血管におけるAT₂受容体の発現に依存しており, たとえば若年の高血圧患者では, その点でARBによる内皮機能の改善は認められない可能性もある。RASと血管内皮機能の理解のためには, 今後この領域の臨床研究を

進める必要がある。

おわりに

基礎的実験で得られた結果にくらべ、ヒトではRASと血管内皮機能に関して相反する結果も報告されており、明らかでない部分も多い。一部は方法論や研究デザインにも問題がある。また心血管イベントという本来のRAS抑制の目標を考慮すると、いうまでもなく短期間の研究で結論は出せない。しかし、代替エンドポイントとしての血管内皮機能の妥当性はさまざまな研究により明らかになりつつあり、より正当性がある方法論を用いた厳格なデザインで、いかなる病態においてどのようなメカニズムでRAS抑制が内皮機能を改善するのか、今後ヒトにおいて明らかにすべきである。

文 献

- 1) Ueda S *et al* : Validity and feasibility of NO clamp technique for human NO research. *Hypertens Res* : 2004 (in press)
- 2) Chowienzyk PJ *et al* : Blood flow responses to intra-arterial acetylcholine in man: effect of basal flow and conduit vessel length. *Clin Sci* 87 : 45-51, 1994
- 3) Millgard J *et al* : Acute hypertension impairs endothelium-dependent vasodilatation. *Clin Sci* 94 : 601-607, 1998
- 4) Walker HA *et al* : Assessment of forearm vasodilator responses to acetylcholine and albuterol by strain gauge plethysmography: reproducibility and influence of strain gauge placement. *Br J Clin Pharmacol* 51 : 225-229, 2001
- 5) Ueda S *et al* : Unpublished observation
- 6) Hijmering ML *et al* : Variability of flow mediated dilation: consequences for clinical application. *Atherosclerosis* 157 : 369-373, 2001
- 7) Ghiadoni L *et al* : Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension* 41 : 1281-1286, 2003
- 8) Olsen MH *et al* : Vasodilatory capacity and vascular structure in long-standing hypertension: a LIFE sub-study. *Am J Hypertens* 15 : 398-404, 2002
- 9) Laursen JB *et al* : Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95 : 588-593, 1997
- 10) Higashi Y *et al* : Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 346 : 1954-1962, 2002
- 11) Hirooka Y *et al* : Vitamin C improves attenuated angiotensin II-induced endothelium-dependent vasodilation in human forearm vessels. *Hypertens Res* 26 : 953-959, 2003
- 12) Wada A *et al* : Angiotensin II attenuates the vasodilating effect of a nitric oxide donor, glyceryl trinitrate: roles of superoxide and angiotensin II type 1 receptor. *Clin Pharmacol Ther* 71 : 440-447, 2002
- 13) Pitt B *et al* : The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 341 : 709-717, 1999
- 14) Farquharson CA *et al* : Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation* 101 : 594-597, 2000
- 15) Farquharson CA *et al* : Aldosterone induces acute endothelial dysfunction *in vivo* in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. *Clin Sci (Lond)* 103 : 425-431, 2002
- 16) Hirooka Y *et al* : Captopril improved impaired endothelium dependent vasodilatation in hypertensive patients. *Hypertension* 20 : 175-180, 1992
- 17) Creager MA *et al* : Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. *Hypertension* 24 : 499-505, 1994
- 18) Kiowski W *et al* : Effect of cilazapril on vascular structure and function in essential hypertension. *Hypertension* 27 : 371-376, 1996
- 19) Taddei S *et al* : Effect of lisinopril on endothelial function. *J Hypertens* 16 : 447-456, 1998
- 20) Ghiadoni L *et al* : Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension* 35 : 501-506, 2000
- 21) Taddei S *et al* : Restoration of nitric oxide availability after Ca-antagonist in essential hypertensive patients. *Hypertension* 37 : 943-948, 2001
- 22) Lyons D *et al* : The effect of antihypertensive therapy on responsiveness to local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 12 : 1047-1052, 1994
- 23) van Ampting JM *et al* : Vascular effects of ACE inhibi-

- tion independent of the renin-angiotensin system in hypertensive renovascular disease: a randomized, double-blind, crossover trial. *Hypertension* 37 : 40-45, 2001
- 24) Hornig B *et al* : Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation* 95 : 1115-1118, 1997
 - 25) O'Driscoll G *et al* : Improvement in endothelial function by angiotensin converting enzyme inhibition in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 100 : 678-684, 1997
 - 26) Arcaro G *et al* : ACE inhibitors improve endothelial function in type I diabetic patients with normal arterial pressure and microalbuminuria. *Diabetes Care* 22 : 1536-1542, 1999
 - 27) McFarlane R *et al* : Angiotensin converting enzyme inhibition and arterial endothelial function in adults with type I diabetes mellitus. *Diabet Med* 16 : 62-66, 1999
 - 28) Mullen MJ *et al* : Effect of enalapril on endothelial function in young insulin-dependent diabetic patients: a randomized, double-blind study. *J Am Coll Cardiol* 31 : 1330-1335, 1998
 - 29) Bijlstra PJ *et al* : Effect of long-term angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function in patients with the insulin-resistance syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol* 25 : 658-664, 1995
 - 30) O'Driscoll G *et al* : Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 33 : 1506-1511, 1999
 - 31) Cheetham C *et al* : Losartan, an angiotensin type I receptor antagonist, improves conduit vessel endothelial function in type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 100 : 13-17, 2001
 - 32) Cheetham C *et al* : Losartan, an angiotensin type I receptor antagonist, improves endothelial function in non-insulin-dependent diabetes. *J Am Coll Cardiol* 36 : 1461-1466, 2000
 - 33) Mancini GB *et al* : Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease: the TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) study. *Circulation* 94 : 258-265, 1996
 - 34) Anderson TJ *et al* : Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease. *J Am Coll Cardiol* 35 : 60-66, 2000
 - 35) Hornig B *et al* : Comparative effect of ace inhibition and angiotensin II type I receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase. *Circulation* 103 : 799-805, 2001
 - 36) Prasad A *et al* : Angiotensin type I receptor antagonism reverses abnormal coronary vasomotion in atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 38 : 1089-1095, 2001
 - 37) Tsutsumi Y *et al* : Angiotensin II type 2 receptor over-expression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest* 104 : 925-935, 1999
 - 38) Batenburg WW *et al* : Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation* 109 : 2296-2301, 2004