

代替エンドポイントとして用いるときに重要である。なぜならばtype 2 errorを避けるための必要症例数は再現性と期待できる治療効果で決定されるからである。

本法のconfounding factorとして最も重要なものは前腕血流量の基礎値である。Chowienczykらはアセチルコリンの反応はベースラインの血流量に影響されることを報告している⁴⁾。したがってある疾患の患者と対照者の内皮機能の比較を行うとき、基礎前腕血流量は同等であることが前提となる。しかし現実には統計学的な有意差はないものの、同等とはいえない場合が多く、%changeで表す方法などが使用されるが根本的な解決方法にはならない。基礎血流量が大きな問題になるのはアセチルコリンによる血管拡張作用の、NO依存性の部分を評価するときである。この場合L-NMMAを用いてNO産生を阻害した状態でアセチルコリンを投与するが、L-NMMAは血管収縮作用を有し、約50%の血流量低下が生じる。この血管収縮自体が血管拡張反応の測定に非特異的に影響することを筆者らは明らかにし、さらにこの影響を除外するため、後述するようなNOクランプ法を用いている⁵⁾。ほかに、Chowienczykらが指摘するような前腕の長さやコリンエステラーゼ活性などがconfounding factorになりうる可能性もあるが、これらは薬効評価など同一個体内での比較に際しては問題にならない。降圧薬の血管内皮機能への影響がいくつか報告されているが、血圧そのものも血管内皮機能またはアセチルコリンへの反応に影響する可能性が示唆されている⁶⁾。Millgardらはノルアドレナリンの静注による急性の血圧上昇が前腕でのアセチルコリンへの血管拡張反応を減弱させたことを報告している。降圧薬の内皮機能への影響を比較検討するならば、少なくとも同等の降圧を達成することが前提条件となるであろう。

□ アセチルコリンのNO依存性血管拡張の評価法

アセチルコリンによる血管拡張反応のNO依存性は、NO合成酵素阻害薬であるL-NMMA投与により血管拡張がどの程度減弱するかで評価される。前述したようにL-NMMAによる血管収縮は非特異的にアセチルコリンの血管拡張作用に影響するため、筆者らはNOクランプ法を用いている⁵⁾。これはまずアセチルコリンの動注を行い、用量反応曲線を得た後、L-NMMAを $8\mu\text{mol}/\text{min}$ で持続動注する。このL-NMMA動注により減少した前腕血流量をニトロプルシドまたはニトログリセリンを同時に動注することでL-NMMA投与前の基礎値に戻す。その状態で再びアセチルコリンの動注を開始する。この方法により血管収縮による非特異的な影響を排除して、NO合成酵素阻害によるアセチルコリンの血管拡張作用減弱、すなわちNO依存性をAUC比などで評価できる。

L-NMMAの投与量であるが、多くの施設で4または $8\mu\text{mol}/\text{min}$ の持続投与が行われている。この量ではNO合成酵素の阻害に不十分であり $16\sim 64\mu\text{mol}/\text{min}$ を投与すべきとする報告もあるが、筆者らの検討では8と $16\mu\text{mol}/\text{min}$ との間に差はなく、 $16\mu\text{mol}/\text{min}$ では血圧の上昇をきたすなど全身の血行動態に影響するため、 $8\mu\text{mol}/\text{min}$ が適切であると考えられる(植田, 和田, 梅村, 未発表データ)。また $4\sim 8\mu\text{mol}/\text{min}$ で、*in vitro*でNO合成酵素を阻害できる濃度が計算上達成できる。

□ 臨床的妥当性—抗動脈硬化治療の代替エンドポイントとなりえるか?

これまでに高血圧、糖尿病、高コレステロール血症の患者や喫煙者などでアセチル

ルコリン血管拡張反応の低下が報告され、これらの疾患における内皮機能の低下が示唆されている。しかし本法で測定された血管内皮機能が臨床的な妥当性を有するには、疾患の予後（心血管イベントの発生）との関連が認められること、内皮機能を改善する介入が予後をも改善することを証明する必要がある。前者に関しては冠動脈のアセチルコリンへの反応と予後の関連を示唆する報告があり、また高血圧患者においてプレシモグラフで測定したアセチルコリンの血管拡張反応と心血管イベントの間に関連が認められたとする報告がある。ただし本法は比較的侵襲が多い検査法であり、1万人前後の症例数を必要とする（治療による15%のエンドポイントの差を検出力80~90%で検出するために必要な症例数）高血圧などの大規模臨床試験に用いることは不可能である。その意味では厳密に疾患の予後との関連を検討することは困難である。後者に関しては、スタチンが冠動脈疾患患者の予後を改善し、同時にアセチルコリンへの血管拡張反応で評価した内皮機能を改善することが報告されている。

これらの知見を統合すると、本法により測定された内皮機能は臨床的妥当性を有すると考えられ、抗動脈硬化治療の代替エンドポイントとなりえる。しかし大規模臨床試験での使用は不可能であり、比較的小規模な臨床研究での詳細な抗動脈硬化薬効評価（の予測）に適切である。

NOドナーの血管拡張作用を検討することの重要性

アセチルコリンへの血管拡張反応の低下が内皮機能の低下によるものと結論するには血管内皮非依存性の血管拡張反応およびNOへの反応が正常であることが前提条件となる。このために、アセチルコリン動注を行う際、ニトロプルシドやニトログリセリンなどのNOドナーの血管拡張作用を検討する。この検討は糖尿病患者においては特に重要である。2型および1型糖尿病患者では内皮機能の低下とともにニトロプルシドやニトログリセリンへの反応が低下していることが報告されている^{7,8)}。さらに最近筆者らは、すでに確立した2型糖尿病患者のみならず耐糖能障害を有する患者においても内皮機能低下とともにNOへの反応も低下していることを報告した⁹⁾。また冠動脈のNOドナーへの反応も予後規定因子の1つであることも判明している。つまり血管不全の病態によっては内皮機能を改善させる治療のみでは不十分であり、NOへの平滑筋の反応をも改善させようような治療を開発する必要がある。

L-NMMAによる血管収縮反応のプレシモグラフによる測定

NO合成酵素阻害薬であるL-NMMAは動注により前腕血流の低下が生じる。このことは前腕抵抗血管では基礎的なNO産生があり、血管トーンスの維持に貢献していることを示唆している。したがってL-NMMA動注時の血管収縮反応を測定することによって間接的に基礎的なNO産生を評価することが可能である。筆者らはL-NMMAを8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ で持続動注し、steady stateに達した時点の前腕血流量の減少を基礎的なNO産生量の指標としている。

本法の問題点は科学的な妥当性に曖昧さが残ることである。NO合成酵素はNOのみを産生するわけではなく（例：スーパーオキシド）またNO合成酵素を介さないNO産生系も存在する。さらにそもそも基礎的なNO産生抑制による血管収縮はどの血

管収縮経路がunmaskされることにより生じるのか不明である。この点は今後解明される必要がある。また筆者らはインスリン感受性との相関を報告したが¹⁰⁾ 動脈硬化性疾患の予後との関連は明らかではない。

プレシモグラフィによる反応性充血(reactive hyperemia)の測定

本法は上腕の阻血を解除した際に反応性充血による前腕血流量の増加をプレシモグラフィで測定するものである。

本法はアセチルコリンへの反応に比べ生理的血管拡張であり、侵襲がなく、良好な再現性(CV5%)が報告されており、ある程度の規模の臨床試験には使用可能である。Higashiらはアセチルコリンへの血管拡張反応と相関することを報告しており¹¹⁾、代替法となる可能性はある。しかし問題点として血管拡張反応のピークはL-*NMMA*により抑制されず、アセチルコリンへの反応との合致性(NO依存に関して)に問題があり、得られた結果のメカニズムに関する解釈は単純ではないこと、血管の最大拡張を評価する方法であり血管内皮機能よりもむしろ血管構造を評価している可能性もあること、冠動脈疾患の予後との関連をみた研究や介入試験のデータが少なく、臨床的妥当性が確立していないことなどがあげられる。しかし再現性のよさと侵襲のなさを考慮すると今後検討を加え、予後との関連が明らかになれば抗動脈硬化治療の代替エンドポイントとなりえる可能性がある。

血流依存性血管拡張反応検査(flow mediated dilatation ; FMD)

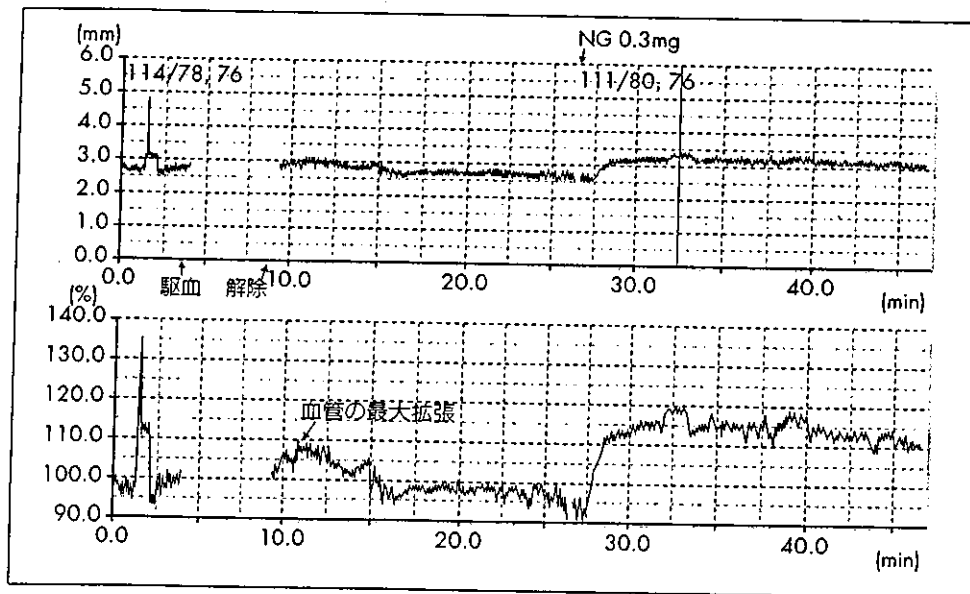
FMDは非侵襲的内皮機能診断法として広く用いられている。この方法はその利点を生かして小児にも使用可能である¹²⁾。カフによる圧迫、解除で得られた反応性充血に伴う血流増加刺激による内皮依存の、主として産生遊離されたNOを介した血管拡張を血管径の変化として測定する。血管内皮非依存の血管拡張はニトログリセリンの舌下(400 μ g)またはスプレーによる投与後に測定される。本法は非侵襲的、生理的であり、プレシモグラフィでは評価できない伝導血管の内皮機能を測定できる利点がある。しかし多くの問題を有する。

第一の問題は測定の再現性である。最近の報告では群としてのなんらかのリスクファクターによる影響の検出(例:喫煙群での低下)には使用できるが、臨床試験に使用するには再現性が十分ではないとされる¹²⁾。この報告をみるかぎり、抗動脈硬化治療の評価に使用するのは困難なようである。再現性を改善するために筆者の共同研究者である大屋らや久留米大学の松岡らはまずプローブの位置を固定できる装置を開発し、さらにリアルタイムトラッキングシステム(α 同期させた持続的自動測定)を使用している【3】。このデータからピーク値やTmax, AUCなどが得られ、再現性に関しても例えば阻血解除後60秒などのワンポイント測定に比べ良好である。

第二の問題は科学的な妥当性であり、得られた結果の解釈である。本法で阻血解除後の血管径増加が減弱していることが「内皮機能低下」と判断されるには、血管拡張刺激(血流の増加)および平滑筋のNOへの反応が不変であることが前提である。例えば降圧薬などの内皮機能への影響をFMDで検討した報告があるが、一部

を除き（久留米大学 松岡ら）血流への影響は考慮されないまま解析されている。後者は通常測定されているが，用量反応曲線を構築したものではなく，血管径の増加もFMDの倍以上であり，対照実験としては問題が多い。これらの問題の解決には血流量の測定と解析での補正，ニトログリセリンの用量の再検討などが必要である。

抗動脈硬化治療の代替エンドポイントとしてはまず前述したように再現性の改善が前提であるが，非侵襲であることと，伝導血管の内皮機能を評価できることにより抵抗血管を評価するプレシモグラフ+動注法と相補的であるなどの利点がある。今後方法論的な再検討のうえで介入試験や小児の臨床研究，予後との関連をみる縦断的研究が行われるべきである。



[3] リアルタイムトラッキングによるFMD測定

(琉球大学医学部循環器系総合内科 大屋祐輔氏提供)

◆文献◆

- 1) Hewlett AW, van Zwaluwenburg JG: The rate of blood flow in the arm. Heart 1: 87-97, 1909.
- 2) Petrie JR, Ueda S, Morris AD, et al: How reproducible is bilateral forearm plethysmography? Br J Clin Pharmacol 45: 131-139, 1998.
- 3) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the regulation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288: 373-376, 1980.
- 4) Chowiecnyk PJ, Cockcroft JR, Ritter JM: Blood flow responses to intra-arterial acetylcholine in man: effects of basal flow and conduit vessel length. Clin Sci 87: 45-51, 1994.
- 5) Ueda S, Wada A, Umemura S: Methodological validity and feasibility of NO clamp technique. Hypertens Res (in press).
- 6) Millgard J, Lind L: Acute hypertension impairs endothelium-dependent vasodilatation. Clin Sci 94: 601-607, 1998.
- 7) Chan NN, Vallance P, Colhoun HM: Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23: 1048-1054, 2003.
- 8) McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, et al: Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 35: 771-776, 1992.
- 9) 鳥袋充生, 比嘉南夫, 植田真一郎, ほか: 第67回日本循環器学会. 2003, 福岡.
- 10) Petrie JR, Ueda S, Webb DJ, et al: Direct association between insulin sensitivity and basal nitric oxide production in man. Circulation 93: 1331-1333, 1996.
- 11) Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, et al: A noninvasive measurement of reactive hyperemia that can be used to assess resistance artery endothelial function in humans. Am J Cardiol 87: 121-125, 2001.
- 12) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet 340: 1111-1115, 1992.
- 13) Hijmering ML, Stroes ES, Pasterkamp G, et al: Variability of flow mediated dilation: consequences for clinical application. Atherosclerosis 157: 369-373, 2001.

Hypoadiponectinemia Is Closely Linked to Endothelial Dysfunction in Man

MICHIO SHIMABUKURO, NAMIO HIGA, TOMOHIRO ASAHI, YOSHITO OSHIRO, NOBUYUKI TAKASU, TATSUYA TAGAWA, SHINICHIRO UEDA, IICHIRO SHIMOMURA, TOHRU FUNAHASHI, AND YUJI MATSUZAWA

Second Department of Internal Medicine (M.S., N.H., T.A., Y.O., N.T.) and Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine (T.T., S.U.), University of the Ryukyus, 903-0215 Okinawa, Japan; and Departments of Medicine and Pathophysiology (I.S.) and Internal Medicine and Molecular Science (T.F., Y.M.), Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

Vascular endothelial dysfunction has been demonstrated in overweight or obese patients, but the molecular basis for this link has not been clarified. We asked what the relationship was between adiponectin, an adipose-specific molecule, and endothelial function. Forearm blood flow (FBF) was measured during reactive hyperemia by using strain-gauge plethysmography in 76 Japanese subjects without a history of cardiovascular or cerebrovascular disease, diabetes mellitus, hepatic, or renal disease. The peak FBF and total reactive hyperemic flow [flow debt repayment (FDR)] during reactive hyperemia were correlated with waist circumference ($r = -0.418$ and -0.414 , respectively) and body mass index ($r = -0.597$ and -0.626 , respectively). After correcting for age, gender, and body mass index, the peak FBF was correlated with sys-

tolic blood pressure ($r = -0.294$; $P = 0.010$), free fatty acid (FFA) ($r = -0.331$; $P = 0.004$), and adiponectin in log 10 ($r = 0.492$; $P < 0.001$), and FDR was correlated with adiponectin in log 10 ($r = 0.462$; $P = 0.001$). In stepwise multiple regression analyses, predictive variables for peak FBF were adiponectin in log 10 ($r = 0.468$) and FFA ($r = -0.292$; $r^2 = 0.487$; $P < 0.0001$); and predictive variables for FDR were adiponectin in log 10 ($r = 0.474$) and FFA ($r = -0.275$; $r^2 = 0.346$, $P < 0.0001$). Endothelial function was impaired in proportion to the severity of obesity, and the level of severity was closely related to plasma adiponectin levels. Adiponectin may play a protective role against the atherosclerotic vascular change, and loss of effects enhances endothelial dysfunction, as in obese people. (*J Clin Endocrinol Metab* 88: 3236–3240, 2003)

OBESITY IS ASSOCIATED with increased cardiovascular morbidity and mortality (1, 2). The American Heart Association determined that obesity is a major, modifiable risk factor for coronary heart disease, based on emerging data about the link between adiposity and coronary heart disease (3). Vascular endothelial dysfunction plays a pivotal role in the pathogenesis of atherosclerosis and enhances the risk of future cardiovascular events (4, 5). The presence of vascular endothelial dysfunction has been demonstrated in overweight or obese patients with insulin resistance (6, 7) and visceral obesity (8). However, the molecular basis for the link between obesity and vascular endothelial dysfunction has not been clarified. A newly discovered adipose-specific molecule, adiponectin, was shown to be decreased in obese people (hypoadiponectinemia) (9), as in patients with coronary artery disease (10). Because adiponectin may protect the endothelium from early atherosclerotic events such as the expression of adhesion molecules (10) or the attachment of monocyte cells (11), hypoadiponectinemia could be linked to endothelial damage. The present study questioned the relationship between plasma adiponectin levels and endothelial function in humans.

Abbreviations: BMI, Body mass index; FBF, Forearm blood flow; FDR, flow debt repayment; FFA, free fatty acid; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; NO, nitric oxide; NTG, nitroglycerin; RH, reactive hyperemia.

Subjects and Methods

Subjects

This study consisted of 76 Japanese subjects without a history of cardiovascular or cerebrovascular disease, diabetes mellitus, hepatic, or renal disease. The study protocol complied with the Guidelines of the Ethical Committee of the University of the Ryukyus. Informed consent was obtained from all subjects.

Endothelial function

Forearm blood flow (FBF) was measured using a mercury-filled SILASTIC strain-gauge plethysmograph (EC-5R, D. E. Hokanson, Inc., Issaquah, WA), as previously described (12, 13). The strain gauge was attached to the upper arm, held above the right atrium, and connected to a plethysmographic device. A wrist cuff was inflated to a pressure of 200 mm Hg to exclude the hand circulation from the measurements 1 min before each measurement and throughout the measurement of FBF. The upper arm cuff was inflated to 40 mm Hg for 7 sec in each 15-sec cycle to occlude venous outflow from the arm, using a rapid cuff inflator (EC-20, D. E. Hokanson, Inc.). The FBF output signal was transmitted to a recorder (U-228, Advance Co., Nagoya, Japan). FBF was expressed as milliliters per minute per 100 ml of forearm tissue. The FBF was then calculated by two independent observers who had no knowledge of the subjects' profiles; the interobserver coefficient of variation was $3.0 \pm 1.3\%$.

Study protocol

The study began at 0900 h, after the subjects fasted for at least 12 h. The subjects were kept in a supine position, in a quiet, dark, air-conditioned room (constant temperature of 25 C) throughout the study. After 30 min in the supine position, the basal FBF was measured. Then the effect of reactive hyperemia (RH) and sublingual nitroglycerin (NTG) on FBF was measured, as described, with modifications (14, 15).

To induce RH, FBF was occluded by inflating the cuff on the right upper arm to a pressure of 200 mm Hg for 5 min. After releasing the cuff, FBF was measured for 180 sec. Subjects were then given 0.3 mg of NTG sublingually, and FBF was measured for 5 min. The end of the response to RH or sublingual NTG was followed by a 15-min recovery period. Baseline blood samples were obtained after 30 min at rest. The peak FBF response (12) and total reactive hyperemic flow [flow debt repayment (FDR)] (16) during RH were used to assess the resistance of vessel endothelial function. FDR was defined as the curve under the area flow vs. time during RH above baseline flow (16). Because FDR, but not peak FBF, was significantly decreased by intraarterial infusion of N^G -monomethyl-L-arginine ($4 \mu\text{mol}/\text{min}$), a blocker of nitric oxide (NO) synthesis, we used FDR as a relatively NO-dependent marker (16). In the preliminary study, we confirmed the reproducibility of RH and sublingual NTG-induced vasodilation on two separate occasions in 28 healthy male subjects (mean age, 27 ± 5 yr). The coefficients of variation were 4.3% and 2.8%, respectively.

Biochemical measurements

Venous blood samples were obtained in tubes containing EDTA-sodium ($1 \text{ mg}/\text{ml}$) and polystyrene tubes without an anticoagulant. The EDTA-containing tubes were promptly chilled. Plasma was immediately separated by centrifugation at 3000 rpm at 4°C for 10 min, and serum was separated by centrifugation at 1000 rpm at room temperature for 10 min. Samples were stored at -80°C until assayed. Routine chemical methods were used to determine the serum concentrations of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, creatinine, glucose, and electrolytes. The serum concentration of low-density lipoprotein was estimated using Friedewald's method (17). The plasma adiponectin concentration was measured by sandwich ELISA, as previously described (9). Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), an insulin resistance index, was calculated as described (18).

Statistical analysis

Values are expressed as the mean \pm SD. Comparisons of time-course curves of FBF during RH were analyzed by two-way ANOVA for repeated measures on one factor, followed by Fisher's protected least significant difference for multiple-paired comparisons. The repeated factor was time of RH, and the nonrepeated factor was one group vs. the other group. Multigroup comparisons of variables were made by one-way ANOVA followed by Fisher's protected least significant difference for multiple-paired comparisons. Probabilities less than 0.05 were considered to be significant. The data were processed using StatView J-5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

The mean values (range) of basal FBF, peak FBF, and the maximal flow after NTG administration (in milliliters per minute per 100 ml) were 3.27 ± 1.43 (1.37–6.19), 18.45 ± 6.76 (4.05–35.3), and 4.26 ± 1.64 (2.35–6.88) in all 76 subjects. Single correlation analyses showed that the peak FBF was negatively correlated with waist circumference, body mass index (BMI), systolic blood pressure, free fatty acid (FFA), and leptin, and was positively correlated with adiponectin (Fig. 1 and Table 1). FDR correlated negatively with waist circumference, BMI, HOMA-IR, FFA, and leptin, and positively with adiponectin. The maximal flow after NTG did not correlate with any metabolic and anthropometric variables. After correcting for age, gender, and BMI, the peak FBF was correlated only with systolic blood pressure, FFA, and adiponectin, and FDR was correlated with adiponectin. In stepwise multiple regression analyses, predictive variables for peak FBF were adiponectin in log 10 ($r = 0.468$) and FFA ($r =$

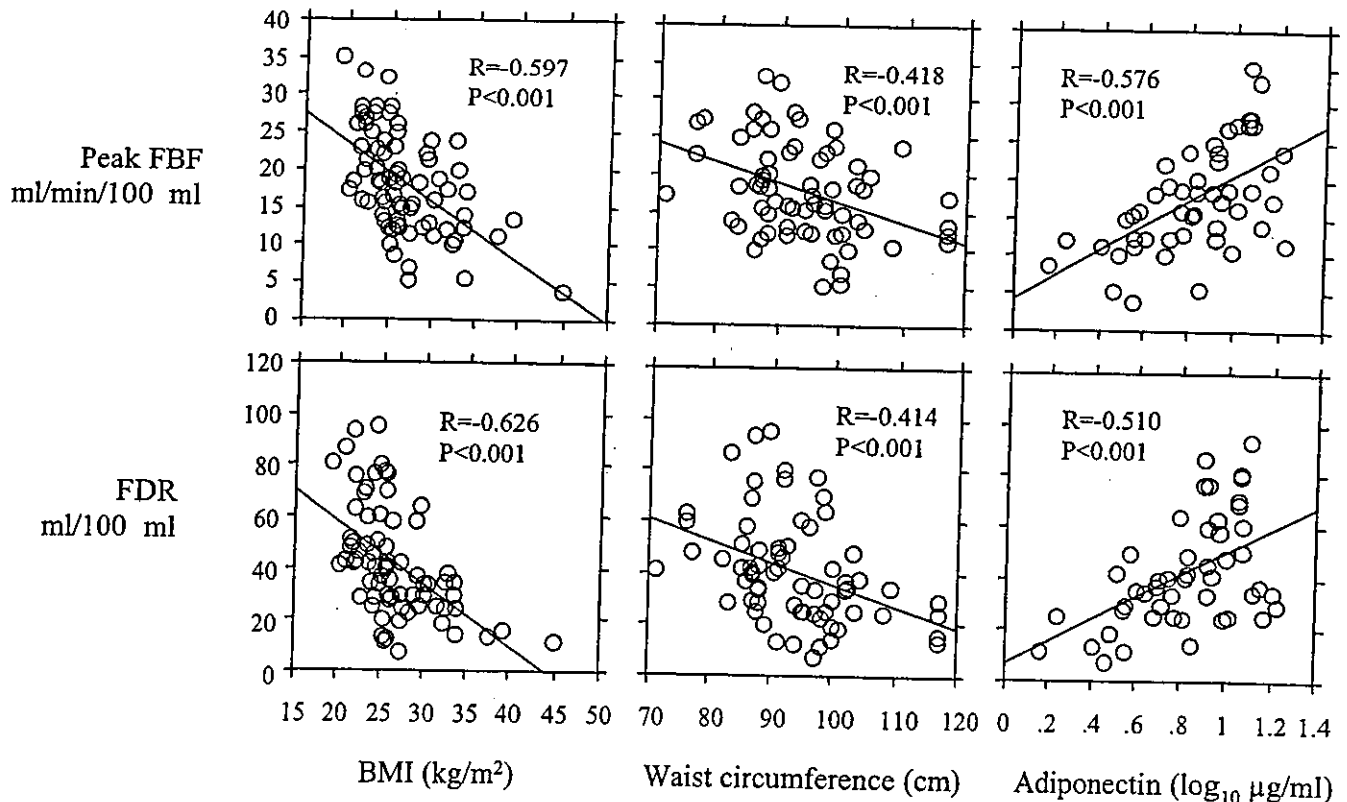


FIG. 1. Correlation between peak FBF (upper panels) and FDR (lower panels) during RH, BMI, waist circumference, and serum adiponectin levels in all 76 subjects. Pearson's correlation coefficients are shown.

TABLE 1. Peak FBF, FDR, and variables

	Peak FBF				FDR			
	Simple correlation		Partial correlation		Simple correlation		Partial correlation	
	r ^a	P	r ^b	P	r ^a	P	r ^b	P
Age (yr)	-0.075	0.609			-0.177	0.215		
Waist circumference (cm)	-0.418	0.000	0.088	0.469	-0.414	0.000	0.090	0.455
BMI (kg/m ²)	-0.597	<0.0001			-0.626	<0.0001		
Systolic blood pressure (mm Hg)	-0.304	0.008	-0.294	0.010	-0.201	0.082	-0.118	0.310
Hemoglobin A1c	-0.156	0.194	0.047	0.697	-0.230	0.052	-0.023	0.848
HOMA-IR	-0.206	0.090	-0.021	0.864	-0.269	0.024	-0.052	0.669
Triglyceride (mg/100 ml)	-0.033	0.780	-0.081	0.493	-0.046	0.696	-0.016	0.892
LDL cholesterol (mg/100 ml)	-0.082	0.494	-0.124	0.296	-0.034	0.775	-0.129	0.273
FFA (mmol/liter)	-0.386	0.001	-0.331	0.004	-0.336	0.003	-0.210	0.073
Leptin (log ₁₀ ng/ml)	-0.453	0.000	-0.008	0.950	-0.349	0.004	0.019	0.880
Adiponectin (log ₁₀ μg/ml)	0.576	<0.0001	0.492	0.000	0.510	<0.0001	0.462	0.001

LDL, Low-density lipoprotein.

^ar, Pearson's correlation coefficient.^br, Variables corrected by age, gender, and BMI.

TABLE 2. Stepwise multiple regression models predicting peak FBF and FDR

	Peak FBF				FDR			
	Model 1		Model 2		Model 1		Model 2	
	β	F	β	F	β	F	β	F
Adiponectin (log ₁₀ μg/ml)	0.468	16.473	0.439	16.907	0.474	14.354	0.388	12.58
Age (yr)	0.084	0.287	-0.122	0.621	-0.125	0.662	-0.281	3.59
Gender	0.258	2.857			0.012	0.006	-0.016	0.01
BMI (kg/m ²)			-0.498	21.765			-0.516	22.25
HOMA-IR	-0.186	1.439	0.06	0.148	-0.063	0.170	0.225	2.24
LDL cholesterol (mg/100 ml)	0.044	0.077	-0.093	0.358	-0.069	0.202	-0.144	0.88
FFA (mmol/liter)	-0.292	6.609	-0.274	3.317	-0.275	4.817	-0.208	1.90
Systolic blood pressure (mm Hg)	-0.273	5.75	-0.286	3.664	-0.192	1.599	-0.101	0.44
Hemoglobin A1c	-0.268	3.096	-0.149	0.93	-0.236	2.482	-0.184	1.47
r		0.698		0.745		0.588		0.721
r ²		0.487		0.555		0.346		0.520
F		12.976		26.151		11.353		23.33
P		<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001

The F value to enter was 4.0 at each step. β, Parameter estimate; LDL, low-density lipoprotein.

-0.292; r² = 0.487; P < 0.0001), and predictive variables for FDR were adiponectin in log 10 (r = 0.474) and FFA (r = -0.275; r² = 0.346; P < 0.0001) (Table 2, model 1). When BMI was included in the model (Table 2, model 2), predictive variables for peak FBF and FDR were adiponectin in log 10 (r = 0.439 and 0.388, respectively) and BMI (r = -0.498 and -0.516, respectively). Serum adiponectin in log 10 (micrograms per milliliter) was negatively correlated with waist circumference (r = -0.334; P = 0.020), BMI (r = -0.365; P = 0.007), HOMA-IR (r = -0.302; P = 0.034), and FFA (r = -0.271; P = 0.052).

Discussion

The major findings of the present study were: 1) the peak FBF response and FDR to RH, indices of the function of vessel endothelial resistance, were impaired in proportion to the severity of obesity; and 2) the impairment in the FBF response and FDR was correlated with low levels of serum adiponectin. This is the first study that shows the effects of adiponectin on endothelial function in human subjects and that low levels of adiponectin were closely correlated with resistance vessel endothelial dysfunction.

Serum adiponectin and endothelial function

Measurements of FBF during intraarterial infusion of acetylcholine are used to investigate endothelium-dependent vasodilatation (12, 13). However, this technique is invasive and time consuming and cannot be used routinely. We measured FBF during RH using strain-gauge plethysmography. With this noninvasive method, resistant vessel endothelial function can be assessed physiologically with a high reproducibility (14, 15). Higashi *et al.* (15) reported that peak FBF during RH was well correlated with FBF to maximal acetylcholine dose (30 μg/min; r = 0.91; P < 0.001), indicating that this noninvasive method is a useful alternative for assessing resistance vessel endothelial function. Because the contribution of NO may be different at the RH phase, we used peak FBF as a combination marker of shear stress and local metabolic factors at an early phase of RH, and FDR as a relatively NO-dependent marker at the mid-to-late phase of RH (16).

The peak FBF and FDR were correlated negatively with waist circumference, BMI, FFA, systolic blood pressure (peak FBF), HOMA-IR (FDR), and leptin, and correlated positively with adiponectin. After correcting for age, gender, and BMI, the endothelial function indices were correlated positively

with adiponectin and negatively with FFA. NTG-induced FBF changes were not correlated with any metabolic and anthropometric variables, indicating that endothelium-dependent function was predominantly affected by hypoadiponectinemia. It is suggested that, in humans, the plasma level of adiponectin may be directly linked to endothelial function.

Mechanisms for a link between hypoadiponectinemia and endothelial dysfunction

Two possible mechanisms by which hypoadiponectinemia decreases endothelial function are postulated.

First, adiponectin level can be linked to whole-body insulin sensitivity, and hypoadiponectinemia can cause endothelial dysfunction by decreasing insulin sensitivity. Because the plasma adiponectin level was decreased in the prediabetic insulin-resistant phase in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), hypoadiponectinemia might play a causative role in the development of insulin resistance (19). We confirmed this concept by showing that experimental ablation of the adiponectin gene in mice reduces insulin sensitivity, and adenovirus-mediated supplementation of plasma adiponectin can recover the sensitivity (20). There is a close correlation between whole-body insulin sensitivity and endothelium-dependent vasodilatation (6, 7). We previously reported that endothelial NO production (21) and vasodilatation induced by local intraarterial infusion of insulin/glucose (22) were both closely linked to whole-body insulin sensitivity (21). In the current study, FDR was negatively correlated with HOMA-IR (Table 1), indicating a link between FDR and insulin sensitivity. But this correlation was abolished after correcting for age, gender, and BMI, probably by a strong confounding effect of BMI on insulin sensitivity. In multiple regression analysis, endothelial function was negatively correlated with FFA and positively correlated with adiponectin (Table 2, model 1). When BMI was included in the model as an independent variable, the power of FFA, but not of adiponectin, was abolished (Table 2, model 2). HOMA-IR, a casual marker for insulin resistance (18), was not selected as a predictor for endothelial function. Serum adiponectin levels were reported to be closely linked to insulin sensitivity in human subjects (19, 23), and the current study showed that adiponectin levels were correlated negatively with waist circumference, BMI, and HOMA-IR, indicating a close link between hypoadiponectinemia and insulin resistance. Adiponectin might eliminate the predictive power of HOMA-IR, which is a relatively weaker predictor for insulin sensitivity than other markers, such as an M-value by the hyperinsulinemic euglycemic clamp (23). It was also reported that FFA can directly impair endothelial function in humans by decreasing insulin sensitivity (6, 7). Adiponectin (19, 29, 23) and FFA (6, 7), which are both secreted from adipocytes, may independently and bidirectionally regulate endothelial function through modulation of insulin sensitivity in the whole body and vascular beds.

Second, hypoadiponectinemia may be directly linked to early atherosclerotic vascular damage and a subsequent endothelial dysfunction. Experimentally, Ouchi *et al.* (10) showed that adiponectin inhibited TNF- α -induced expres-

sion of endothelial adhesion molecules in endothelial cells and that adiponectin reduced atherogenic transformation of macrophage to foam cells by suppressing scavenger receptor expression (11). It was also evident that plasma adiponectin levels were decreased in patients with atherosclerotic risk factors such as obesity, impaired glucose tolerance, diabetes mellitus, or previous coronary heart disease (10). Loss of plasma adiponectin may accelerate early atherosclerotic vascular damage and reduce various physiological roles of endothelial cells, including NO synthesis and supply, which may be linked to decreases in the peak FBF and FDR, in the current study.

Study limitation

The current study cannot determine which of the following is plausible: 1) hypoadiponectinemia impairs endothelial function by impairment of insulin sensitivity in the whole body and vascular beds; 2) hypoadiponectinemia first accelerates vascular damage and then impairs NO supply from endothelium; or 3) hypoadiponectinemia first impairs NO synthesis and supply and then accelerates vascular damage (3). Direct actions of adiponectin on vascular function should be observed in future studies.

Conclusions

The current study showed that endothelial function was impaired in proportion to the severity of obesity and that endothelial function was closely related to plasma adiponectin levels. Adiponectin may play a protective role directly against the atherosclerotic vascular change and/or indirectly through improving insulin sensitivity. The loss of adiponectin effects enhances endothelial dysfunction and may be associated with future cardiovascular events.

Acknowledgments

Received November 30, 2002. Accepted March 14, 2003.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Michio Shimabukuro, Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan. E-mail: mshimabukuro-ur@umin.ac.jp or me447945@members.interq.or.jp.

This work was supported by grants from the Takeda Science Foundation and from the Japanese Society for the Promotion of Science (11770645).

References

1. Stevens J, Cai J, Pamuk ER, Williamson DF, Thun MJ, Wood JL 1998 The effect of age on the association between body mass index and mortality. *N Engl J Med* 338:1–8
2. 2000 Overweight, obesity, and health risk. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity. *Arch Intern Med* 160:898–904
3. Eckel RH, Krauss RM 1998 American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *Circulation* 97:2099–2100
4. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes Jr DR, Lerman A 2000 Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101:948–954
5. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM 2000 Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101:1899–1906
6. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD 1996 Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 97:2601–2610
7. Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A,

- Bayazeed B, Baron AD 1997 Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest* 100:1230-1239
8. Arcaro G, Zamboni M, Rossi L, Turcato E, Covi G, Armellini F, Bosello O, Lechi A 1999 Body fat distribution predicts the degree of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity. *Int J Obes* 23:936-942
 9. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y 1999 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83
 10. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y 1999 Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein, adiponectin. *Circulation* 100:2473-2476
 11. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y 2001 Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103:1057-1063
 12. Linder L, Kiowski W, Bühler FR, Lüscher TF 1990 Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo: blunted response in essential hypertension. *Circulation* 81:1762-1777
 13. Panza JA, Quyyumi AA, Brush Jr JE, Epstein SE 1990 Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323:22-27
 14. Takeshita A, Imaizumi T, Ashihara T, Yamamoto K, Hoka S, Nakamura M 1982 Limited maximal vasodilator capacity of forearm resistance vessels in normotensive young men with a familial predisposition to hypertension. *Circ Res* 50:671-677
 15. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T 2001 A noninvasive measurement of reactive hyperemia that can be used to assess resistance artery endothelial function in humans. *Am J Cardiol* 87:121-125
 16. Tagawa T, Imaizumi T, Endo T, Shiramoto M, Harasawa Y, Takeshita A 1994 Role of nitric oxide in reactive hyperemia in human forearm vessels. *Circulation* 90:2285-2290
 17. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS 1972 Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502
 18. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419
 19. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y 2001 Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50:1126-1133
 20. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y 2002 Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8:731-737
 21. Cleland SJ, Petrie JR, Ueda S, Elliott HL, Connell JM 1999 Insulin-mediated vasodilation and glucose uptake are functionally linked in humans. *Hypertension* 33(1 Pt 2):554-558
 22. Petrie JR, Ueda S, Webb DJ, Elliott HL, Connell JM 1996 Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation* 93:1331-1333
 23. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA 2001 Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-1935

●特集／高血圧の臨床試験をめぐって

1. 臨床試験プロトコル

2) 対照薬・二次薬と試験成績の評価

琉球大学大学院医学研究科薬物作用制御学

植田 真一郎

1. はじめに

臨床試験はある薬剤の絶対的（対照薬はプラセボ）、比較的（対照薬はおもにこれまでの標準的治療）評価を行うものであるが、対照薬、二次薬の選択と投与量が結果の解釈に影響する。さらに、対象となる患者の臨床的背景と試験治療（介入）の相互作用もあり、やはり結果の解釈に大きく影響する。これらを踏まえ、これまでの主な降圧薬臨床試験を批判的にレビューし、今後あるべき臨床試験の介入デザインを、対照薬、二次薬に焦点を当てて考察する。

2. 降圧薬の絶対的評価

—プラセボを対照とした研究—

1) 「古い」試験薬で得られた結果をどのように解釈するか

降圧薬の臨床試験で最初に問われた問題は、「降圧薬による降圧は高血圧患者の予後を改善するか」であった。この時点では、悪性高血圧以外、降圧治療による予後改善のエビデンスはなく、したがって対照薬はプラセボで倫理的問題は生じなかった。試験薬としては、VA 研究当時は限られたものしかなく、降圧利尿薬、reserpine, hydralazine が使用された¹⁾。オーストラリア軽症高血圧研究（1980年）では、試験薬として降圧利尿薬、二次薬として methyldopa, β 遮断薬と現在の処方に近いものになり²⁾、MRC 研究（デザインされたのは1977年、発表は1985年）には β 遮断薬が降圧利尿薬と並んで一次試験薬として用いられた³⁾。二次薬は、降圧利尿薬には methyldopa, β 遮断薬には最初 guanethidine が用いられたが、後には methyldopa となった。現在では methyldopa の使用は少なくなり、この頃に比べると降圧利尿薬の投与

量も約 1/4 に減少している。これらの現在では用いられない投与量や二次薬を用いた試験の成績を、現在の降圧薬の処方を考慮したうえでどう解釈すべきだろうか。MRC 試験において降圧治療は、脳卒中のリスクを有意に減少させたが、その効率は決して満足できるものではなく、論文には軽症高血圧を治療するメリットは明らかではないと記載されている。また心筋梗塞の発生に関しては、有意な減少が得られなかった。英国高血圧学会の治療ガイドラインでも、この結果を反映して軽症高血圧の治療には積極的ではなかった。これは薬剤および投与量が「古い」からであろうか。この疑問には、残念ながら根拠ある答えは存在しない。なぜならば MRC 試験の後、降圧薬臨床試験はおもに高齢者、ハイリスク患者を対象として行われるようになり、比較的若年の軽症高血圧患者を対象とした臨床試験は行われていないからである。しかし、同時期に発表された Hypertension Detection and Follow up Program (HDFP) の結果⁴⁾と MRC 研究の結果の比較は、この疑問の一部に答えられるかもしれない。HDFP 研究では、プラセボではなく「通常の」治療（この当時は軽症高血圧を治療すべきというコンセンサスはなく、未治療に近い）と利尿薬を基礎薬とした、より intensive な「段階的治療」を比較したものである。「段階的治療」で用いられた降圧薬は、MRC 研究とほぼ同様である。しかし、この試験では MRC 研究と異なり、段階的治療により心血管死、心筋梗塞、脳卒中が MRC 研究よりも効率よく減少した。しかし MRC 研究との違いは治療薬ではなく、むしろ患者背景にある。HDFP 研究では心血管リスクの高い患者を対象としており、MRC 研究では糖尿病患者を除くなど低リスク患者を対象としている。この違いが、おそらく治療効率の違いに貢献していると考えられる。実際、その後行われた高リスク患者を対象とした試験では、降圧利尿薬（投与量は減少）を中心とし

〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原 207

Table 各種臨床試験の薬剤組み合わせ (下段が二次薬)

	対照薬	試験薬
STOP-2 ⁹⁾	β 遮断薬/降圧利尿薬	ACE 阻害薬, Ca 拮抗薬
	降圧利尿薬と β 遮断薬の組み合わせ	降圧利尿薬 (HCTZ 12.5~25 mg), β 遮断薬
UKPDS39 ¹⁸⁾	β 遮断薬 (atenolol 50~100 mg)	ACE 阻害薬 (captopril 50~100 mg)
		frusemide, nifedipine, prazosin, methyldopa
INSIGHT ¹⁰⁾	降圧利尿薬 (HCTZ 25~50 mg + amiloride)	Ca 拮抗薬 (nifedipine GITS 30~60 mg)
		atenolol 25 mg or enalapril 5 mg
CAPPP ¹¹⁾	β 遮断薬/降圧利尿薬	ACE 阻害薬 (captopril 50~100 mg)
	降圧利尿薬と β 遮断薬の組み合わせ, Ca 拮抗薬	降圧利尿薬, Ca 拮抗薬
NORDIL ¹⁵⁾	β 遮断薬/降圧利尿薬	Ca 拮抗薬 (diltiazem 180~360 mg)
	降圧利尿薬と β 遮断薬の組み合わせ, ACE 阻害薬, α 遮断薬	ACE 阻害薬, 降圧利尿薬, α 遮断薬
LIFE ¹²⁾	β 遮断薬 (atenolol 50~100 mg)	AII 受容体拮抗薬 (losartan 50~100 mg)
		降圧利尿薬 (HCTZ)
ALLHAT ⁸⁾	降圧利尿薬 (chlorthalidone 12.5~25 mg)	ACE 阻害薬 (lisinopril 10~40 mg), Ca 拮抗薬 (amlodipine 2.5~10 mg), α 遮断薬 (doxazosin)
		atenolol, reserpine, clonidine, hydralazine
ANBP2 ¹⁶⁾	降圧利尿薬	ACE 阻害薬
		β 遮断薬, Ca 拮抗薬, α 遮断薬

た治療で、より効率のよい心血管リスク減少が得られている。また、現在の降圧薬治療とほぼ同様の Ca 拮抗薬 (現在ではより長期作用型の Ca 拮抗薬が使用される) を中心とした Syst-eur 研究⁵⁾と、降圧利尿薬を中心とした SHEP 研究⁶⁾、MRC 高齢者高血圧研究⁷⁾と心血管リスク減少はほぼ同程度である。

3. 降圧薬の相対的評価 —比較研究—

現在の降圧薬臨床試験は、ほぼ比較試験である。巨額の資金が必要であることを考えると、完全な研究者主導型臨床試験は不可能であり、企業のプロモーションをある程度念頭に置いた試験のみ実施可能である。あるいは、ALLHAT 研究のように医療費削減のためのエビデンスを得るために、政府機関が主導するものもある⁸⁾。いずれにせよ、これらの試験は完全な中立性は保証されていない。このような背景を踏まえて、なお降圧薬同士の比較試験を行うことはどのような意義があるだろうか。降圧薬同士の治療群間の優劣は、企業のプロモーションには (あるいは ALLHAT のように、効果が同等であることを根拠に政府が医療費

を抑制しようとする場合) 重要であるが、臨床的にはある 1 人の患者さんにおける降圧薬の優劣 (反応の差) に比べると、さほど重要ではない。とくに、厳格なコントロールには多剤併用が必要であることを考えると、なおさらである。日本人高血圧患者の治療は、まず脳卒中の予防を念頭に置くべきであるが、これまでの臨床試験の成績からは、降圧薬の種類よりも降圧そのものが重要であるとされる。また、後に例を挙げて説明するが、単剤の比較にこだわると投与量が増え、有害事象の発現が多くなる可能性があり、さらに二次薬が実際の診療を反映しないものになる。とくに ALLHAT 研究のように 4 剤を比較するような試験では、二次薬がさらに限られたものになり、臨床の現場からはますます遠くなる。また、降圧を完全に同一にすることは困難であり、血圧で差が生じた場合のエンドポイントの差をどう解釈するか難しい。

1) STOP-2 研究⁹⁾ —現実には比較研究—

この研究は、高齢者高血圧において β 遮断薬や降圧利尿薬といったこれまで使用されてきた降圧薬と Ca 拮抗薬、ACE 阻害薬の比較を心血管死をエンドポ

イントとして行ったものである。β遮断薬と降圧利尿薬は、いわゆる“conventional drugs”として一括されており、その中での選択は無作為化されていない。β遮断薬、ACE阻害薬(enalapril 10 mg or lisinopril 10 mg)は、現在でも処方されている形に近い。しかし、Ca拮抗薬は長期作用型のものではなく、現在では用いられないものである。事実、頭痛、顔面紅潮等が他の治療群に比べ明らかに高頻度に出現しており、短期作用型Ca拮抗薬に関連する問題と考えられる。二次薬は他の試験に比べると現実的である。“conventional drugs”群には、ACE阻害薬やCa拮抗薬は使用できず、β遮断薬や降圧利尿薬の追加のみであるが、Ca拮抗薬にβ遮断薬、ACE阻害薬に降圧利尿薬の併用は可能であり、現実の診療を反映しているといえる。

2) INSIGHT 研究¹⁰⁾ 一単剤比較の落とし穴一

この研究は、残念ながら単剤同士の比較にこだわり過ぎた。そのため、nifedipine群では1日60 mgまで増量、利尿薬群ではhydrochlorothiazideを50 mgまで増量しているが、これは明らかに過剰投与である。降圧利尿薬の場合、代謝面での有害反応は用量依存性とされ、これまでの臨床薬理学的研究でも至適用量はほぼ12.5 mgとされている。そのため、利尿薬群ではカリウム保持性利尿薬と併用しているにもかかわらず、低カリウム血症や高血糖がnifedipine群に比べ多く出現し、またnifedipine群においても浮腫や頭痛が多く出現した。

3) CAPPP 研究¹¹⁾

一血圧の差が生じたことによる解釈の難しさ一

この研究もSTOP-2研究同様、新しい降圧薬としてのACE阻害薬captoprilと従来の降圧利尿薬/β遮断薬を比較したものである。Captoprilの二次薬としては利尿薬を使用できるし、従来治療も組み合わせることができるほか、両群ともにCa拮抗薬が使用可能である。したがって、従来治療群はむしろcaptopril非使用群と考えることができるため、臨床的には極めて妥当なプロトコルである。すなわち、本研究でcaptoprilを用いた降圧療法のメリット(あるいはデメリット)を同定できたはずである。しかし、残念ながら無作為化(ここでは封筒法が用いられている)の失敗による基礎血圧値の差、治療により達成された血圧値に差が生じたことにより、脳卒中はcaptopril群で有意に多く発生したという結果になった。糖尿病の発症に関しては、「captoprilを使用した降圧療法」が「使用しない降圧療法」に比べ有利であることが示唆

された。ただし、前者ではβ遮断薬を使用していないので、「β遮断薬を使用した降圧療法」が糖尿病発症に関して不利であるという解釈もできる。

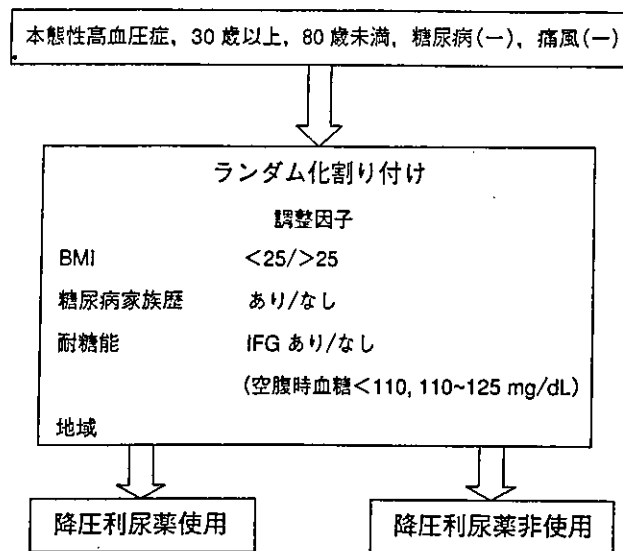
4) アンジオテンシンII受容体拮抗薬

—LIFE 研究の解釈—

LIFE 研究¹²⁾は、左室肥大を有する高血圧患者におけるアンジオテンシンII受容体拮抗薬losartanとβ遮断薬atenololの比較である。結果としては、心筋梗塞の発生には有意差はなく、脳卒中はlosartan群で有意に少なかった。しかし、なぜβ遮断薬との比較を行ったかは明らかではない。“Introduction”に書かれているように、β遮断薬は確かに冠動脈疾患二次予防には有効であるが、本態性高血圧における一次予防では降圧利尿薬に比べエビデンスもなく、第一選択薬とは言い難い。本研究は基本的に一次予防であり、β遮断薬を対照薬とした根拠は不明である。おそらくアンジオテンシンII受容体拮抗薬には降圧利尿薬の併用されることが多く、本来エビデンスの最も多い降圧利尿薬との比較試験は不可能であることが理由であろう。β遮断薬は心拍の減少をきたすため、ブラインドを維持することが難しく、徐脈に対する危惧からコンプライアンスの低下、中止や脱落が多い。本研究でもβ遮断薬群の心拍数が66と高く、実際にどの程度服用されていたかという疑問が残る。

本研究の二次薬は、基本的に低用量降圧利尿薬である。結果として両群とも約90%の患者で利尿薬を併用した。したがって、この試験は比較的臨床の現場を反映し、結果は降圧利尿薬に併用するにはどちらの降圧薬が望ましいか、というclinical questionに対する1つの答えとなっている。とくに糖尿病患者におけるサブ解析において、低カリウム血症の発生がlosartan+利尿薬群で有意に少なかったことなどは、併用の妥当性を支持するものである。

この研究の結果とある意味で対照的なのはUKPDS 39である¹³⁾。ここでは、糖尿病を伴う高血圧患者においてatenololとcaptoprilの比較を行った。LIFE研究と異なり、脳卒中の発生に有意差はなかった(心筋梗塞はLIFEでも差はない)。この2つは、もちろん患者背景も異なるため単純には比較できないが、二次薬の違いが関係しているかもしれない。すなわち、LIFEではatenololに降圧利尿薬を加えたが、UKPDSではfurosemide, nifedipine(長期作用型), prazosin等が併用できた。降圧薬としてfurosemideの選択は疑問であるが、糖尿病ということを考えれば、とくにatenololに対して比較的臨床的に妥当な



【介入内容】

降圧利尿薬使用群：降圧利尿薬 (trichlormethiazide または indapamide で 1 mg/日に相当) から開始し、降圧不十分な場合、他剤併用。降圧利尿薬は主治医の判断で減量も可能

降圧利尿薬非使用群：降圧利尿薬 (カリウム保持性利尿薬を含む) 以外いかなる降圧薬も使用可能

Fig. 降圧利尿薬臨床試験の概略

二次薬である。これは LIFE があくまでサブ解析なのに対し、UKPDS ははじめから糖尿病患者を対象とした試験であるからかもしれない。

5) ALLHAT 研究はガイドラインを変えうる研究か

ALLHAT 研究は、高リスク高血圧患者において降圧利尿薬、ACE 阻害薬、Ca 拮抗薬、 α 遮断薬を比較検討したものである。理由は妥当性を欠くが、 α 遮断薬は途中で中止となった。一次エンドポイントである冠動脈疾患死、および非致死性心筋梗塞の発生において、治療群間に差はなかった。この結果は、先頃発表されたアメリカのガイドライン、JNC VII に多大な影響を与えている。今回の指針は、降圧薬治療は基本的に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、二次薬の選択に関してさまざまな問題があり、極論すれば、いわばガイドラインのために設計された研究で、clinical question の解決を目標にしていない。臨床への適用は困難である。まず、二次薬が β 遮断薬や clonidine などと限られており、臨床の現場を反映するものではないこと、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とである。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り、clinical question の解決にはあまり貢献しない。すで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、母集団としてバイアスがかかっていたこと、心機能の面から (心駆出率 35% で適合とされた)、この 4 剤への割り付けは適切とは言いがたいことなども挙げられる。これらは降圧利尿薬を使用しない群には明らかに不利である。極端なことを述べれば、プロトコルがそもそも中立性を欠く。また、これまでの欧米での試験に比べ黒人の参加者が多く、降圧作用の人種差という confounding factor の影響も大きい。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¹⁴⁾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。

4. 今後の臨床試験において試験薬、二次薬、対照薬はどうあるべきか

これまでの臨床試験のレビューから、今後、ある降

圧薬の臨床的意義, すなわちある薬剤を使用することが適切なエンドポイントに関して有益であることを示すために, どのような臨床試験が適切か考察してみた。

まず単剤同士の比較は, 前に述べたように結果の臨床的意義や試験薬の投与量, 二次薬等に関して問題が生じる可能性があり, 避けるべきである。厳密な比較は, それがもし臨床的に重要であるならば, 代替エンドポイントを用いてクロスオーバー法で行ったほうがよい。長期間の観察が必要なエンドポイントには無理だが, 同一個体内での比較であるため, 比較的少ない症例数で行うことができる。

ある薬剤を使用することのメリット (優越性), あるいはそれが不利にならないこと (非劣性) を証明するためには, その薬剤を使用するか否かのみ無作為割り付けを行い (この介入がないと観察研究となってしまう), その後の二次薬などは主治医の判断で行うことができるようなプロトコルが望ましい。この方法ならば臨床の現場をよく反映し, 結果を適用しやすい。また, このような試験では二重盲検法を用いることは困難であり, 用いることはある意味で治療プロトコルの制限を生じ, 臨床の現場から離れることになるため, 基本的にオープン試験でエンドポイントの判定のみ治療薬をマスクして行う PROBE 法を使用すべきである。Fig. に筆者が研究代表者として行っている降圧利尿薬臨床試験の概略を示す。この試験では降圧利尿薬使用群, 非使用群への割り付けを無作為に行い, その後の降圧治療は $<140/<90$ mmHg を目標として, 主治医に一任される。したがって, 指定二次薬による非適合基準の増加等の問題もない。プラセボは使用しないが, アンジオテンシン II 受容体拮抗薬使用による糖尿病性腎症患者の腎機能低下の遅延を証明した RENAAL 研究¹⁵⁾と基本的な考え方は同じである。

文 献

- 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* 1967; 202: 1028-34.
- 2) The Australian Therapeutic Trial in mild hypertension. *Lancet* 1980; i: 1261-7.
- 3) Medical Research Council working party. MRC trial of treatment of mild hypertension: the principle results. *BMJ* 1985; 291: 1146-51.

- 4) Extension 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* 1979; 242: 2562-71.
- 5) Staessen JA, Fagard R, Thijs L, et al. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. *Lancet* 1997; 350: 757-64.
- 6) 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.
- 7) MRC Working party Medical Research Council trial of treatment of hypertension in older adult: principle results. *BMJ* 1992; 304: 405-12.
- 8) 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.
- 9) Hansson L, Lindholm LH, Ekblom T, Dahlöf B, Lanke J, Schersten B, Wester PO, Hedner T, de Faire U. Randomized trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity STOP-2 study. *Lancet* 1999; 354: 1751-6.
- 10) 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.
- 11) 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: CAPP randomized trial. *Lancet* 1999; 353: 611-6.
- 12) Dahlöf B, Devereux RB, de Faire U, 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.
- 13) UK Prospective Diabetes Study Group Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS39. *BMJ* 1998; 317: 713-20.
- 14) 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.
- 15) Hansson L, Hedner T, Lund-Johansen P, Kjeldsen SE, Lindholm LH, Syvertsen JO, Lanke J, de Faire U, Dahlöf B, Karlberg BE. Randomised trial of effects of calcium antagonists compared with diuretics and b blockers on cardiovascular mortality in hypertension: the Nordic Diltiazem Study. *Lancet* 2000; 356: 359-65.
- 16) Wing LMH, Reis CM, Ryan P, et al. A comparison of outcomes with angiotensin converting enzyme inhibitors and diuretics for hypertension in the elderly. *N Engl J Med* 2003; 348: 583-92.

わが国の高血圧介入試験の 不足点と今後

植田真一郎*

abstract

日本でも過去にさまざまな高血圧介入試験が行われてきたが、デザイン、方法論などに問題も多く、逆に欧米並みに計画された試験では、実現性に問題があり症例が集まらず、明確な結論が得られていない。しかし最近生物統計学者の参加、データマネージメントシステムの導入、CRCの関与、倫理指針の策定などにより日本でも臨床試験を取り巻く環境は徐々に改善している。事実これまでとは違った環境でCASE-J研究、JATOS研究、HOMED-BP研究などの臨床試験が進行している。しかしなお一層の臨床的妥当性をもつ試験を本来の意味の医師主導で計画すべきであるし、バイアスを除去するためにも優れた試験には十分な研究費が提供されるべきである。臨床試験の質の確保のためには現在多額の費用を要するが、公的機関による支援を行い、安価で質の高い試験を実現させるべきである。また治験の体制づくりばかりにこだわらず、臨床試験を促進できるような体制を政府も考慮すべきである。

これまで行われた日本の高血圧介入試験の臨床的、方法論的妥当性、および研究費の獲得など実現性の問題も含め考察し、今後のあるべき姿を論じる。

I 日本の臨床試験の 臨床的妥当性と取り扱うべき Clinical Question

臨床試験とは私たちが日々の臨床において遭遇するさまざまな疑問を解決するものであるべきである。逆にいえば、臨床試験の質を決める重要な点のひとつはどんなClinical Questionを解決しようとする試験か？ である。この点が曖昧なものや、あまりにも製薬会社の営業的な都合が反映されているものは日常臨床に役立たないばかりか、多額の費用、時間、患者さんの協力を無駄にすることになる。したがってどれだけ分別のある、試験で解明する価値のあるClinical Questionをもつかが、質の高い臨床

試験を行う第一歩である。臨床試験は実は医師のかかわる部分は多くない。生物統計学者、製薬会社の開発担当者、臨床試験支援施設（CRO）、臨床試験コーディネーター（CRC）などの関与する部分のほが多い。しかし、どんなに優れた生物統計学者も現場からのClinical Questionをもつことはできない。これは目の前の患者さんに、よりよい予後を提供したいと考えている医師の特権であり、この点を日本の医師も自覚し、臨床試験にかかわるべきである。研究計画書もスポンサーとなる製薬会社に任せて後に「検討」するのではなく、研究者自身が生物統計学者などの協力を得ながらあくまで自分自身で書くべきである。

臨床試験はまた優れた基礎生命科学研究、特に薬理学的研究の成果を検証するものでもある。ただし臨床試験で、ある薬剤の有効性を検証するまでには通常の治験以外にも多くの橋渡しの前臨床試験、

* 琉球大学大学院医学研究科薬物作用制御学 教授

- 1) 降圧薬の投与による降圧は患者の予後（心血管イベント）を改善するか？
VA研究（1967）、MRC軽症高血圧研究、ANBP研究など
- 2) 高齢者においても降圧薬による降圧は予後を改善するか？
MRC高齢者高血圧研究、SHEP研究、Syst-Eur研究
- 3) 降圧薬の選択は予後に影響するか？
STOP-2研究、CAPPP研究、INSIGHT研究、LIFE研究、ALLHAT研究など
（日本）CASE-J研究、HOMED-BP研究
- 4) 適切な降圧レベルは？
HOT研究、UKPDS研究
（日本）JATOS研究（高齢者）
- 5) レニン・アンジオテンシン系抑制は降圧に依存しない予後の改善をもたらすか？
HOPE研究
- 6) アスピリンやスタチン系薬剤は血圧のコントロールされた高血圧患者の予後を改善するか？
HOT研究、ASCOT研究

表1

これまでの高血圧臨床試験で問われたClinical Question
 VA: Veterans Administration,
 SHEP: Systolic Hypertension in the Elderly Program, Syst-Eur: Systolic Hypertension in Europe,
 STOP-2 (STOP-Hypertension 2): Swedish Trial in Old Patients with Hypertension 2, CAPPP: Captopril Prevention Project, LIFE: Losartan Intervention for Endpoint, HOMED-BP: Hypertension Objective Treatment based to Measurement by Electrical Devices of Blood Pressure study, UKPDS: UK Prospective Diabetes Study, HOPE: Heart Outcomes Prevention Evaluation

臨床薬理試験が必要であり、これらの積み重ねによりはじめて基礎的生命科学研究の成果を患者に適用できる。例えばレニン・アンジオテンシン系抑制が降圧に依存しない心血管イベント抑制効果をもつという仮説が基礎的生命科学研究の結果から提唱された。その後さまざまな研究を経て、心不全や糖尿病性腎症の進展に関しては臨床試験によりこの仮説が証明されている。

高血圧に関しては欧米でこれまで多くの臨床試験が行われてきた。そこで検証されたClinical Questionを表1に示す。日本でも高齢者高血圧においてプラセボとCa拮抗薬を比較する臨床試験が行われたが、残念ながら心血管イベントの発生に関して明確な結論が得られるほどの十分な症例数が集まらなかった。プラセボを対照とした研究を今後日本で行うことはおそらく不可能であり、JATOS (Japanese Trial to Assess Optimal Systolic Blood Pressure in Elderly Hypertensive Patient) 研究のように適切な降圧レベルに関する研究の結果が待たれる。しかし実は若年層の心血管リスクの少ない、血圧が140~159/90~99mmHgの患者において降圧薬による降圧の有益性を検証した臨床試験は欧米でもMRC (Medical Research Council) 軽症高血圧研究以外なく、この試験は「有効ではあるが、効率は悪い」と結論され、その後高血圧臨床試験は高リスク、高齢者を対象とされるようになり、結局この問題は解決されていない。しかし高血圧の診療は予防

医学であり、ハイリスクな患者をどう治療するかも重要であるが、ハイリスクにならないための診療をどうすべきか、その答えを提供しうる臨床試験は今後日本でも必要である。例えば代謝症候群のような病態にどのような介入を行えばリスクを減少できるか？ などである。しかし低~中リスク患者においては心血管イベントをエンドポイントに用いるよりも関連の強い代替エンドポイントを用いた試験が望ましいかもしれない。そのためには代替エンドポイントの正当性そのものを検証するような臨床研究も必要である。

降圧薬の比較に関しては最初に1984年に開始された軽症高血圧患者を対象としたJMDB研究会による試験（β遮断薬と降圧利尿薬の比較）¹⁾があるが、心血管イベントに関する解析は不可能であった。1989年開始の高齢者高血圧が対象のNICS-EH (National Intervention Cooperative Study for the Treatment of Elderly Hypertensives) 研究（降圧利尿薬とCa拮抗薬の比較）では目標症例数は達成できなかったものの、両治療群間に差はないと報告された²⁾。最近開始されたCASE-J (Candesartan Antihypertensive Survival Evaluation in Japan) 研究は高リスク高血圧患者を対象にCa拮抗薬アムロジピンとアンジオテンシンII受容体拮抗薬カンデサルタンの比較を行うものである。この研究はデザイン、症例登録システム、データマネージメントなどこれまで日本で行われた臨床試験にはない、質の

- 1) 比較的若年の低〜中リスク高血圧患者（代謝症候群などを有する患者も含む）におけるリスク増加阻止のための適切な代替エンドポイントを用いた介入研究
- 2) 1)で用いることができる心血管イベントを予測する代替エンドポイントの妥当性（臨床的、科学的、方法的）を検証する研究
- 3) 脳卒中をエンドポイントとしたスタチン系薬剤の研究
- 4) 降圧利尿薬の安全性に関する研究（現在筆者らにより進行中）
- 5) 薬力学的エンドポイントによる降圧薬の薬理遺伝学的研究および心血管イベントをエンドポイントとした介入試験における遺伝学的解析
- 6) 降圧薬の対費用効果に関する研究（降圧利尿薬に関しては筆者らにより進行中）

表2
今後日本の臨床試験において扱うべき問題

高いものであり、高血圧診療にかかわる臨床医なら誰もが興味をもつテーマである。このような試験は製薬企業のプロモーションの要素もあり、したがって研究費の獲得にも有利である。しかし降圧薬の比較は以下のような理由で臨床的な意義（答える Clinical Question の範囲）は制限される。まずHOT (Hypertension Optimal Treatment) 研究など最近の目標血圧値が低く設定された試験では、降圧薬は2剤以上併用されていることが多く、単剤同士の比較は意義が少ない。また単剤の比較にこだわるあまり、二次薬などに制限が生じるため、実際の臨床の現場を反映しなくなるし、研究に参加した臨床医にとってもやりにくい場合がある。例えばALLHAT (Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial) 研究やANBP (Australian National Blood Pressure) 2研究では本来併用すべきアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬と降圧利尿薬の比較を行っている。またあくまで単剤比較を行おうとすると、INSIGHT (International Nifedipine GITS Study Intervention as a Goal in Hypertension Treatment) 研究のように薬剤の投与量が増え、結果として有害反応が増加する。また一製薬企業のサポートによる試験の結果はさまざまな面からの中立性が完全に保証されているわけではない。このような問題点を考慮するといかに厳正に行われても患者への適用という意味で結果の解釈は簡単ではない。本来ある薬剤の効果を明らかにしようとするれば、その薬剤を使用するかどうかのみ割り付け、使用しない群と使用する群での比較を行うべきである。日本ではCa拮抗薬が高頻度に使用されているが、Ca拮抗薬使用群と非使用群(Ca拮抗薬以外すべて使用可能)の比較を、脳卒中

をエンドポイントとして行えば、Ca拮抗薬を用いた降圧の臨床的な意義が明瞭になる。他の薬剤も同様の方法を用いることが可能であり、筆者らは降圧利尿薬の安全性、特に新規糖尿病の発生をエンドポイントとした臨床試験を開始した。これは前述したように降圧利尿薬使用群と非使用群に割り付け、他の併用薬は主治医に一任される。糖尿病の新規発生をエンドポイントとしているが、これは降圧利尿薬が、多くのエビデンスをもちながらも使用頻度がおそらく副作用に対する懸念から低いこと、日本人の易糖尿病発症性が背景になっている。

さらに近年ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial) 研究で示されたように、血圧がコントロールされた状態でもスタチン系薬剤により脳卒中のリスクが減少する可能性がある。日本ではスタチン系薬剤は介入試験が行われないまま広く使用されているが、J-LIT (Japan Lipid Intervention Trial) などの観察研究からは欧米で報告されたような効率でのスタチン系薬剤による冠動脈疾患の一次予防は不可能である。むしろ日本人高血圧患者における脳卒中をエンドポイントとした研究が必要であろう。

表2に今後日本で行われるべき高血圧臨床試験/臨床研究のテーマを示した。

II 日本の臨床試験における方法論的妥当性

臨床試験がバイアスの除去のために無作為化を取り入れ現在のよう形になったのは1948年、MRCによるストレプトマイシン試験からである。この試験の成功の原因のひとつは生物統計学者を研究者と

して迎え入れたことにある。しかしこれまでの日本の高血圧臨床試験にはあまり生物統計学者の関与はなく、無作為化を行っていないものや、封筒法による簡易無作為化による割り付けが多く、登録事務局による割り付けシステムなどはようやくごく最近になってCASE-J研究などに取り入れられた。最近日本でも高血圧に限らず、さまざまな試験に生物統計学者が積極的に関与するようになり、質の向上、維持に貢献している。登録、割り付け、データマネージメントなどの介入試験の骨格というべきシステムもCROにより維持されるようになった。CRCの積極的な関与は医師、患者双方にメリットがあるうえ、プロトコル遵守、症例記録表の正確な記入など試験の質を明らかに向上させた。これらは試験の質の確保には不可欠である一方で試験の経費の高騰を招き、どんなにsensibleなClinical Questionをもっていても、たとえ公的な研究費が得られても一研究者が行えるようなものではなくなっている。この辺りについては、今後の問題点として認識されるべきである。

III 実現性の問題

これまでいくつもの臨床的妥当性のある臨床試験が日本においても計画され、開始された。しかし現実にはさまざまな要因により十分な症例数が確保できず、明確な結論が得られなかった例が少なくない。例えば高齢者高血圧を対象とし、プラセボとCa拮抗薬の比較を行う臨床試験としてJATE (Japanese Trial on the Efficacy of Antihypertensive Treatment in the Elderly) 研究が企画、実施された。しかし、残念ながら目標症例数2,000のうち登録された患者は329名に過ぎず、このうち中止86例、脱落70例と解析に必要な症例数が得られなかった。この研究に関して瀧下らはアンケート調査を行い、プラセボの使用、患者さんへのメリットのなさ、時間不足、患者さんや家族の理解が得られなかったことなどが、患者さんの登録数を増やせなかった理由として挙げている³⁾。

プラセボの使用に関しては客観性の維持のため重

要であるが、最近ではエンドポイントの判定をマスクして行い、試験そのものはオープンとするPROBE (Pro-spective Randomized Open Blinded Endpoint) 方式が採用されることが多い。実現性のためにはやむを得ないと考えられる。実現性のためには他の重要な点はなるべく簡単にし、あれもこれもと盛り込まないことである。

患者さんのメリットに関しては、厳密に言えば直接的なメリットはない。謝金の支払いは全面的に否定されるべきものではないが、それにより、より研究費の豊かな(例:企業がスポンサーになった)研究のみ進行する結果になっては意味がない。結局医療行為を行ううえで必要不可欠のものであることを納得して参加していただくしかない。そのためにも、より医療現場のClinical Questionを反映した試験であるべきである。また臨床試験が社会的に認知されるように啓蒙活動などを行っていく必要もあると思われる。

医師の側からは研究に参加する意志はあっても、多忙などの理由で積極的に参加できないとの意見があったが、これは前述したようにCRCの関与によって一部は解決可能である。症例を登録した医師に謝金などが支払われる例もあるが、これは報酬としてよりも本来はCRCの雇用など、質の高い臨床試験を行うための研究費として支払われるべきものである。

IV 研究費の問題

臨床試験が必ずしもClinical Questionを解決できるものではない理由のひとつが、多額の費用を要するため、表向きは研究者主導でも会社の意向を無視することができない点にある。なぜ多額の費用を要するかは前述したが、一方で試験の質の確保に必須であるというジレンマがある。これを解決するのは簡単ではないが、例えば①CRCを各中核施設(大学病院、国立病院など)で雇用し、教育し、地域の臨床試験に派遣する。これを業者に委託すると一訪問当たり4~8万円かかる②産学協同でデータマネージメントセンターを立ち上げる——などの方法があるかもしれない。もちろん臨床試験や臨床研究に使用