

2. 学会発表

1. Tsuruda T, Masuyama H, Hatakeyama K, Imamura T, Kato J, Asada Y, Kitamura K: Soluble guanylate cyclase-cGMP stimulation on cardiovascular remodeling associated with hypertension. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism CVEM 2010, 2010-3 (Nara, Japan)
2. Sakamoto S, Tsuruda T, Hatakeyama K, Sekita Y, Imamura T, Asada Y, Kitamura K: Site specificity of adventitial inflammation during the development of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. European Society of Cardiology Congress 2010, 2010-8 (Stockholm, Sweden).
3. Tsuruda T, Nagamachi S, Endo G, Nishimura M, Matsuyama M, Hatakeyama K, Onistuka T, Imamura T, Asada Y, Kitamura K: Increased glucose metabolic activity in abdominal aortic aneurysm: relation to facilitative glucose transporters and matrix metalloproteinases. European

Society of Cardiology Congress 2010, 2010-8 (Stockholm, Sweden).

4. Tsuruda T, Masuyama H, Hatakeyama K, Imamura T, Asada Y, Kitamura K: Pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase modulates hypoxia inducible factor-1a in rat heart. 第74回日本循環器学会学術集会、2010年3月(京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 出願番号:特願 2010-187078

発明者:鶴田敏博、北村和雄

発明の名称:マトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物

出願人:国立大学法人宮崎大学

出願日:2010年8月24日

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合 研究事業）
分担研究報告書

安全で持続可能なアドレノメデュリン投与方法の決定

研究分担者 北 俊弘 宮崎大学医学部 講師

研究要旨

アドレノメデュリン(AM)を炎症性腸疾患の新たな治療薬として応用するための基盤研究を推進するにあたり、AM投与の安全性を検討することは必須である。AMは強力な血管拡張性ペプチドであるが、血中半減期が短く、治療薬として用いるには長時間の持続静注が必要である。人体にAMを持続静注すると、血管拡張による血圧低下、脈拍数増加がみられ、心拍出量も増加する。そこで、血行動態の変化を最小にして、安全かつ持続可能なAMの投与方法を決定するための検討を行った。比較的大量のAMを短時間投与することから開始して、投与量を減らしての長時間投与を検討した。24時間を超える持続投与では、心臓への負担も懸念されたことから、最終的には、AM 9 ng/kg/min、1日8時間投与(9-17時)、14日間連続というプロトコールに到達し、その安全性と有効性を検証した。

A. 研究目的

アドレノメデュリン(AM)は強力な血管拡張性ペプチドであるが、血中半減期が短く、治療薬として用いるには長時間の持続静注が必要である。AMを炎症性腸疾患の新たな治療薬として応用するための基盤研究を推進するにあたり、AM投与の安全性を検討することは必須である。

AMを人体に投与した場合、血管拡張作用に基づく血圧低下が予測されるが、同時に心機能、主要血管の血流にも影響が出ると考えられる。さらに、各種血中ホルモンや、炎症関連物質への影響も評価しておく必要がある。本

研究では、最初に安全性が担保できる最大投与量を短時間(90分)持続静注した場合の血行動態と各種ホルモンの変化を評価した。続いて、投与量を下げて長時間(27時間)投与した場合の、血行動態と各種ホルモンの変化を評価した。最後に、以上の結果を総合して、炎症性腸疾患の治療薬として使用する場合の、適正なAM投与量を決定した。

B. 研究方法

短時間投与は化学合成AM(30 ng/kg/min)を90分間投与し、投与前と60分後に血行動態、各種液性因子

の検討を行い、長時間投与では化学合成 AM (15 ng/kg/min) を 27 時間持続投与し、前、3、18、27 時間後と投与中止 15 時間後に血行動態、各種液性因子の検討を行った。

(倫理面への配慮)

事前に当大学の倫理委員会の承諾を得ており、患者には文書による十分な説明を行い、承諾書を得た。

C. 研究結果

【短時間投与試験】

既報の投与実験から、人体への最大投与可能量は AM 50 ng/kg/min と推定し、予備試験として健常人に投与した。しかし、この量では著明な血圧低下によるプレシヨック状態が惹起され、早期に投与を中止した。次に、投与量を 30 ng/kg/min に減量して、予備試験を行ったところ、安全性が担保できると判断した。そこで、以下の対象者に AM 30 ng/kg/min と対象薬としてニカルジピン 1-1.5 g/kg/min (AM と降圧度を一致) を投与した。

正常血圧者 (NT, n=10, 40.4±2.8 歳)
 高血圧患者 (HT, n=10, 49.6±2.4 歳)
 糖尿病患者 (DM, n=8, 48.5±3.3 歳)

全対象者をまとめて AM とニカルジピンの効果を比較すると、AM は拡張期血圧低下が大きく (収縮期血圧は両群で一致させてある)、心拍数増加、脈波伝播速度 (PWV、動脈硬度に指標) 低下、頸動脈弾性特性低下が有意に大

きかった (図 1)

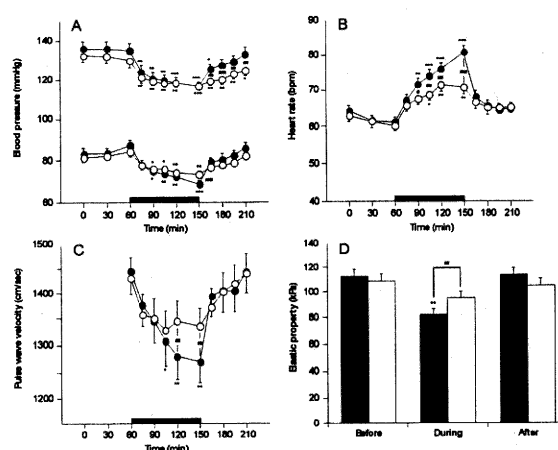


図 1 AM (黒) とニカルジピン (白抜き) の血行動態に与える効果

エコーによる総頸動脈血流 (CAF)、腎動脈血流 (RAF)、心拍出量 (CO) を比較すると、AM の方がニカルジピンより頸動脈血流、心拍出量増加が大きいことが明らかとなった (表 1)

表 1 エコーによる各血流量の変化比較

	Before	During	After	P in trend
Peak CAF				
AM	84.0 ± 2.5	130.2 ± 3.0 ^{**,##}	80.3 ± 2.5	< 0.0001
Nicardipine	83.9 ± 2.6	107.2 ± 2.5 ^{**}	84.2 ± 2.0	< 0.0001
Mean CAF				
AM	37.2 ± 1.2	53.8 ± 1.4 ^{**,##}	34.3 ± 1.1	< 0.0001
Nicardipine	36.4 ± 1.1	42.7 ± 1.2 ^{**}	34.7 ± 1.0	< 0.0001
Peak RAF				
AM	45.9 ± 2.4	61.2 ± 3.3 ^{**}	40.9 ± 2.1	< 0.0001
Nicardipine	46.1 ± 2.5	56.9 ± 2.8 ^{**}	45.0 ± 2.2 [#]	0.0017
Mean RAF				
AM	27.6 ± 1.3	34.0 ± 1.6 ^{**,#}	24.8 ± 1.1	< 0.0001
Nicardipine	27.7 ± 1.4	31.6 ± 1.6	27.3 ± 1.3 ^{##}	0.066
Cardiac output				
AM	4.59 ± 0.15	7.63 ± 0.25 ^{**,##}	4.77 ± 0.14	< 0.0001
Nicardipine	4.58 ± 0.14	6.18 ± 0.30 ^{**}	4.90 ± 0.27	< 0.0001

*P < 0.05, **P < 0.01 ニカルジピン群と比較、*P < 0.05, **P < 0.01 各群の基礎値と比較

各疾患群 (NT, HT, DM) で比較したところ、AM の作用に大きな違いはみられなかった。ただし、HT 群では NT 群より収縮期血圧の低下が有意に大きかった (データ提示なし)

血中生理活性物質に対する効果では、両群ともにレニン活性、ノルアド

レナリンの有意な上昇がみられたが、2群間で差は認められなかった。本プロトコールによるAM投与では、血中AM(総量としてのAM)は約3倍の上昇がみられ、second messengerであるcAMPも上昇した(表2)

表2 各群における生理活性物質の変化血中

	Before	During	After	P in trend
total AM, fmol/ml				
AM	13.9 ± 0.8	32.8 ± 1.8**	15.9 ± 0.6	<0.0001
Nicardipine	13.1 ± 0.4	12.4 ± 0.4**	12.8 ± 0.5**	n.s
mature AM, fmol/ml				
AM	1.9 ± 0.1	12.2 ± 8**	2.6 ± 0.1	<0.0001
Nicardipine	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.2**	1.7 ± 0.2**	n.s
cAMP, pmol/ml				
AM	11.8 ± 0.3	16.5 ± 0.5**	12.9 ± 0.4	<0.0001
Nicardipine	11.1 ± 0.4	11.0 ± 0.4**	11.1 ± 0.4**	n.s
cGMP, pmol/ml				
AM	3.5 ± 0.4	3.7 ± 0.3	3.4 ± 0.4	n.s
Nicardipine	3.6 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.0 ± 0.2	n.s
renin activity, ng/ml/min				
AM	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.3**	1.0 ± 0.1	0.006
Nicardipine	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.3**	1.1 ± 0.1	0.016
aldosterone, pg/ml				
AM	74.4 ± 5.2	69.7 ± 5.3	65.3 ± 3.7	n.s
Nicardipine	78.2 ± 4.7	77.2 ± 5.3*	71.0 ± 4.5	n.s
noradrenaline, pg/ml				
AM	245 ± 20	429 ± 33**	267 ± 21	<0.0001
Nicardipine	247 ± 19	423 ± 33**	346 ± 25**	<0.0001
adrenaline, pg/ml				
AM	27.6 ± 3.3	32.1 ± 3.8	25.8 ± 2.2	n.s
Nicardipine	21.8 ± 2.1*	24.4 ± 3.2**	31.8 ± 3.2**	0.04
ANP, pg/ml				
AM	21.8 ± 3.2	25.4 ± 4.1	22.7 ± 3.7	n.s
Nicardipine	17.0 ± 1.8	19.0 ± 2.0*	14.0 ± 1.2**	n.s
BNP, pg/ml				
AM	12.4 ± 2.0	11.4 ± 1.8	14.0 ± 2.2	n.s
Nicardipine	9.4 ± 1.6	10.0 ± 1.7	10.1 ± 1.6	n.s
IRI, μU/ml				
AM	7.2 ± 1.0	7.1 ± 0.9	6.0 ± 0.7	n.s
Nicardipine	8.0 ± 0.8	7.1 ± 0.7	6.4 ± 0.6	n.s
glucose, mg/dl				
AM	119 ± 6	116 ± 6	110 ± 5	n.s
Nicardipine	124 ± 8	121 ± 8	116 ± 7	n.s

ANP: 心房性Na利尿ペプチド, BNP: 脳性Na利尿ペプチド, IRI: インスリン

【長時間投与試験】

長時間投与した場合、薬剤の蓄積効果によりより強い反応が起こると予測されるため、投与量を15 ng/kg/minに半減して、健常人で予備試験を行った。この結果、安全性が担保できると判断し、高血圧患者9名(65.2 ± 2.5歳)に対して、AM 15 ng/kg/minを27時間持続静注した。

本プロトコールにより、血圧は最大で収縮期血圧30 mmHg、拡張期血圧20 mmHg低下したが、特に副作用は認められず、全員の対象者で試験を最後まで

続行することができた(表3)。なお、脈波伝播速度(PWV)、augmentation index(AI)、頸動脈弾性特性などの動脈硬化度(arterial stiffness)関連指標も有意に改善した。

表3 アドレノメデュリン用時間投与による血行動態の変化

時間	SBP	DBP	HR	PWV	AI	弾性特性
前	152.7 ± 5.6	95.2 ± 3.4	64.0 ± 2.2	1913 ± 93	88.1 ± 4.9	106.4 ± 8.9
3時間後	135.2 ± 6.0*	81.3 ± 3.2**	77.8 ± 2.8**	1645 ± 85*	71.6 ± 4.1*	83.6 ± 6.7*
翌朝	120.0 ± 4.8**	74.7 ± 4.0**	78.3 ± 3.5**	1514 ± 77**	74.4 ± 4.6*	69.6 ± 5.8**
終了時	120.7 ± 3.3**	71.4 ± 2.5***	78.3 ± 2.6**	1501 ± 71**	73.0 ± 3.7*	70.1 ± 5.8**
回復期	151.0 ± 7.9	92.0 ± 3.8	66.6 ± 3.8	1868 ± 101	87.7 ± 5.5	93.5 ± 7.0
p in trend	0.0001	<0.0001	0.001	0.002	0.024	0.002

P<0.05, **P<0.01, ***P<0.0001

一方、血中液性因子の変化は表4に示すとおりであり、血中AM濃度は約2.7倍に上昇した。短時間試験との最大の相違点は、脳性Na利尿ペプチド(BNP)が持続的に上昇している点であり、AM長時間等よりよる心臓への負担増加が懸念された。つまり、AMは血管拡張による血圧低下を引き起こすため、代償的に心拍出量が増加し、さらにAMには直接的な心臓刺激作用もあるため、心仕事量の増加がおき、長時間持続すると心臓への負担になると考えられた。なお、表には示していないが、血中のACTH、cortisol(早朝採血のみ)には有意な変化はみられなかった。また、酸化ストレスマーカーである尿中の8-isoprostaneと8-OHdGには有意な変化はみられなかった(データ提示なし)。

AMは通常抗炎症的に作用すると考えられており、炎症性腸疾患の治療薬としての応用もこの抗炎症作用を期待するものである。しかし、AMは場合

によっては炎症促進的に作用する場
 合があることは既に報告されており、
 炎症がほとんど存在しない状況下で
 は、軽度ではあるが IL-6 を介した CRP
 上昇反応を示すことが明らかとなっ
 た (表 4)。

表 4 アドレノメデュリン長時間投与による各種液性因子の変化

時間	t-AM	m-AM	cAMP	cGMP	ANP	BNP
前	14.3 ± 1.7	2.4 ± 0.4	142 ± 0.7	3.2 ± 0.2	150 ± 2.2	14.8 ± 2.8
3時間後	23.2 ± 1.3 [*]	7.8 ± 0.9 [*]	15.4 ± 0.5	4.0 ± 0.4	22.2 ± 5.3	11.3 ± 2.3 ^{**}
翌朝	38.3 ± 2.8 ^{***}	15.8 ± 2.2 ^{***}	15.7 ± 0.7	4.3 ± 0.6	28.7 ± 5.7 [*]	27.1 ± 8.3 [*]
終了時	38.4 ± 5.5 ^{***}	11.1 ± 2.1 ^{***}	14.9 ± 0.7	3.7 ± 0.3	30.2 ± 6.9 [*]	54.6 ± 12.6 ^{**}
回復期	14.1 ± 1.1	2.0 ± 0.5	14.2 ± 0.5	3.1 ± 0.2	18.3 ± 3.4	47.7 ± 10.4 ^{**}

時間	PRA	PAC	NA	IL-1β	IL-6	hsCRP
前	0.8 ± 0.3	92.8 ± 13.8	326 ± 43	12.3 ± 1.5	2.2 ± 0.4	12.2 ± 4.8
3時間後	1.1 ± 0.4 [*]	61.9 ± 10.0	341 ± 17	13.8 ± 1.7	3.2 ± 0.4	9.9 ± 2.9
翌朝	1.2 ± 0.4 ^{**}	61.5 ± 11.5 [*]	395 ± 31	11.4 ± 0.9	7.2 ± 1.0 ^{***}	30.4 ± 8.4
終了時	1.7 ± 0.9 ^{**}	53.3 ± 10.1 ^{**}	340 ± 36	11.4 ± 1.4	4.5 ± 0.7 [*]	85.3 ± 23.5 ^{**}
回復期	0.9 ± 0.3	89.3 ± 14.6	366 ± 49	13.8 ± 2.4	2.3 ± 0.3	101.9 ± 28.2 ^{***}

t-AM: total AM (fmol/ml), m-AM: mature AM (fmol/ml), cAMP (pmol/ml),
 cGMP (pmol/ml), ANP (pg/ml), BNP (pg/ml), PRA: plasma renin activity
 (ng/ml/h), PAC: plasma aldosterone concentration (pg/ml), NA:
 noradrenalin (pg/ml), IL-1-β (ng/L), IL-6 (ng/L), hsCRP: high
 sensitive CRP (mg/L)

D. 考察

以上の結果から、AM 持続静注は安全
 に施行できると判断したが、より安全
 に AM 投与を継続するには、AM 投与量
 をさらに削減する方が良いと判断し
 た。さらに心臓等への負担を減らすた
 めに、一回の投与持続時間を短縮し
 て、投与と投与の間にインターバルを設
 ける方法を選択した。動物実験にて、
 1 ヶ月間の持続投与データが得られて
 いることから、最大 2 週間の持続投与
 は安全であると判断した。よって、高
 い安全性を持って実施できる AM 投与
 方法として、以下のプロトコルを決
 定した。

※ AM 9 ng/kg/min、1 日 8 時間投与
 (9-17 時)、14 日間連続
 本プロトコルで、心疾患を有する患

者に実際に AM 投与を行ったが、血圧
 低下は収縮期血圧で 10 mmHg 程度で
 あり、特に有害作用は認められず、高
 い安全性を持って投与継続が可能であ
 った。また、血中 AM 濃度は約 1.8 倍
 増加することが確認できた。

E. 結論

AM は投与量を調整すれば、ヒトにお
 いても安全に持続投与できることが
 明らかとなった。最終的に、ヒトにお
 ける安全性の高い AM 投与プロトコ
 ルを決定することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kita T, Suzuki Y, Kitamura K:
 Hemodynamic and hormonal effects
 of exogenous adrenomedullin
 administration in humans and
 relationship to insulin resistance.
 Hypertens Res 33: 314-319, (2010).
2. Kita T, Tokashiki M, Kitamura K:
 Aldosterone antiseoretagogue and
 antihypertensive actions of
 adrenomedullin in patients with
 primary aldosteronism. Htpertens
 Res 33: 374-379, (2010).

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 出願番号:61/431,975

発明者:北俊弘、北村和雄、芦塚伸也、稲津東彦

発明の名称:Method for prevention or treatment of intractable inflammatory bowel disease

出願人:国立大学法人宮崎大学

出願日:2011年1月12日

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

潰瘍性大腸炎患者に対するアドレノメデュリン再投与の効果と安全性

研究分担者 稲津東彦 宮崎大学医学部 講師

研究要旨

Adrenomedullin (AM) は、発見当初、強力な血管拡張作用を有する生理活性ペプチドであることが確認された。その後の研究で心血管保護作用、血管新生作用や抗炎症作用など多彩な生理作用を有する事が判明している。我々は炎症性腸疾患モデル動物に対する AM の腸炎改善効果を明らかにし、炎症性腸疾患の新規治療薬としての応用研究を推進してきた。

潰瘍性大腸炎 (UC) は、原因不明の炎症性腸疾患である。その治療は、活動期に炎症を抑え寛解状態へ移行させる寛解導入療法と、寛解状態を維持する維持療法が行われる。近年、寛解導入困難な難治性潰瘍性大腸炎に対して、高用量ステロイド製剤に加えて、血球成分除去療法、免疫調節剤、生物学的製剤による治療の有効性が確認され、臨床応用されている。しかし、これらの治療でも効果不十分な症例や重症感染症の合併例があり、より安全で有効な新規治療が望まれている。

我々は、難治性 UC 患者へ AM 持続静注療法を行ってきたが、断続的に 2 回投与を行った症例を経験し、その効果と安全性を確認したので、これ報告する。

症例は 30 歳代、男性。発病から 20 年の再燃寛解型 UC。2010 年 10 月に再燃し、11 月当科紹介。外来検査にて UC の再燃、重症化と判断し、精査加療入院。高用量 PSL 療法と白血球除去療法、サイトメガロウイルス合併への抗ウイルス薬治療を行った。寛解が得られず、ステロイド抵抗性（難治例）と判断。潰瘍性大腸炎診療ガイドラインに従い、免疫抑制剤や生物学的製剤の投与について説明を行ったが、合併する有害事象を懸念し、アドレノメデュリン (AM) 療法を希望された。

12月、AM持続静注療法（AM1.5 μ mol/kg/min, 250 μ g/day, 8時間/day、連続14日間）を開始。

血圧低下等の副作用は認めず、臨床症状も軽快傾向を示し、PSLを漸減。AM持続静注療法終了後も2011年1月には腹痛や下痢・血便等の症状は消失していた。しかし、貧血・栄養状態の改善が認められず、大腸内視鏡検査では横行結腸から下行結腸脾彎曲部にかけて炎症性ポリープを伴う粘膜欠損を認め、粘膜生検よりCMV再感染が確認された。寛解に至らない状態と判断し、追加治療について説明。再度のAM持続静注療法を希望され、再度同療法を行った。治療後、貧血・栄養状態の改善を認め、内視鏡的軽快も確認された。再燃予防目的でイムラン50mg/日の投与を開始し退院。退院後3ヶ月まで薬剤に起因する合併症はなく、症状再燃なく、内視鏡像も治癒傾向が続いている。

UC患者に対するAM再投与の効果と安全性を示した。炎症性腸疾患に対する新たな治療戦略として期待されるAM持続静注療法は難治例に対する投与効果は高いが、14日間の投与で効果不十分な症例があり、再投与による安全性と寛解導入効果が確認された。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎(UC)は原因不明の炎症性腸疾患である。現在、寛解導入療法としてステロイド製剤、血球成分除去療法、免疫調節剤、生物学的製剤による治療の有効性が確認され、臨床応用されているが、効果不十分な症例や重症感染症の合併例があり、より安全で有効な新規治療としてAM持続静注療法断続再投与の効果と安全性を確認した。

B. 研究方法

1、平成21年度 当研究報告書P17-21の臨床研究プロトコールに準じた。

2、選択基準：下記①に加え、②または③を満たす。

① 難治性潰瘍性大腸炎患者

② 既存の治療では寛解導入が困難な患者

③ 種々の理由により免疫抑制剤・生物学的製剤が使用困難と判断される患者

3、除外基準：以下の項目を満たさない。

- ① 悪性腫瘍を有する患者
- ② 前癌病変（異型上皮）を有する患者
- ③ 重症で早期の手術が必要と患者
- ④ 全身状態が著しく不良である
- ⑤ 肝機能不全症を有する患者
- ⑥ 同意日1ヶ月以内に急性心不安定狭心症、心筋炎、脳梗塞した患者
- ⑦ 活動性の感染症を有する患者
- ⑧ 妊婦または妊娠している可ある患者
- ⑨ その他、担当医師が不適当と判断した患者

4、投与方法：

AM 持続静注療法（AM 1.5 pmol/kg/min、9時～17時（8時間/日）、連続14日間）

断続的に上記再投与

5、評価方法：

(1) 活動性評価：臨床症状（血便、下痢、腹痛、発熱）と血液検査所見を基に、潰瘍性大腸炎の活動性評価指標である Seo' s index（表1）を用いてAM投与前後で評価した。

(2) 内視鏡所見：AM投与前と投与終了後での大腸内視鏡所見の変化を評価した。

(3) 循環動態：AM投与中は、血圧と脈拍を持続モニターにより評価した。

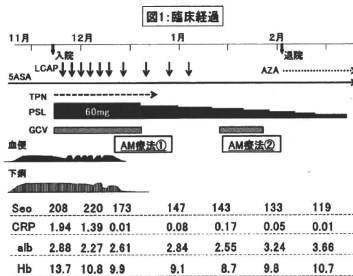
(4) 有害事象：入院下での投与とし、

投与中～投与後の臨床症状を嚴重に観察した。

表1:Seo' s index	
X1: 膿血便 × 60 無または極少量 0 有 1	
X2: 排便回数 × 13 4回/日以下 1 5～7回/日 2 8回以上/日 3	
X3: 血沈値(mm/h) × 0.5	
X4: Hb (g/dl) × -4	
X5: alb (g/dl) × -15	
Seo index = X1+X2+X3+X4+X5+200	
軽症: 150以下	
中等症: 150～220	
重症: 220以上	

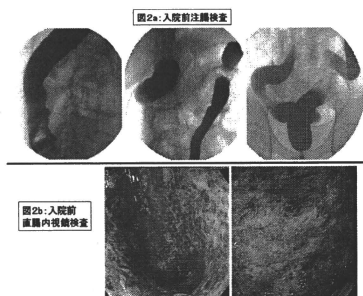
C. 研究結果

【症例経過】（図1）



症例は30歳代、男性。発病から20年の再燃寛解型UC。2010年10月、腹部膨満、腹痛、排便回数増加、血便が出現。通院中の診療所でS状結腸鏡で病勢悪化を認め、ペンタサ 1500mg/日から2250mg/日へ増量、ステロイド注腸（3mg/日）を開始されたが、効果が得られず、11月当科紹介。外来注腸

造影検査で直腸から連続性した鉛管状腸管所見、充盈像では辺縁に毛羽立ち所見を認めた(図2a, b)。



潰瘍性大腸炎の再燃、重症化と判断し、精査加療目的に入院。入院時頻回の血便、中等度の腹痛を認め、Seo's index は208点と中等症であった。ペンタサ4g/日、PSL 25mg/日で加療中であったが、内視鏡・透視所見より更なる重症化が予想され、TPN管理下、PSLを60mg/日に増量、週2回のLCAP(計10回)を併用。また、サイトメガロウイルス(CMV) antigenemia、生検組織診断ともに陽性であり、抗ウイルス剤(デノシン 600mg/日)の投与を開始。しかし、12月3日、ケチャップ状の血便(3回/日)が出現し、全身倦怠感、微熱を認めた。Seo scoreは220点まで上昇。ペンタサを大腸選択制の高いアサコール内服に切り替え、ペンタサ注腸を開始。CMVが陰性化し、12月8日にはSeo scoreは184点まで改善したが、CSではRa~下行結腸に浅い潰瘍、顆

粒状粘膜を認め、中等症の所見が残存した。ステロイド抵抗例と判断、免疫調節剤(シクロスポリン・タクロリムス)や生物学的製剤(レミケード療法)の適応について説明を行ったが、本人が副作用を懸念し、アドレノメデュリン(AM)療法を希望された。

12月13日よりAM持続静注療法(AM1.5 μ mol/kg/min, 250 μ g/day, 8時間/day、連続14日間)を開始。投与開始後、血圧低下などの副作用は認めず、臨床症状も軽快傾向を示した。PSLも漸減AM終了時のSeo's indexは治療前の173点から147点に改善。S状結腸鏡では潰瘍が再生上皮で被覆されていた(図3a, b)。2011年1月初旬には腹痛や下痢・血便等の症状は消失。しかし、臨床症状と比較して、貧血・栄養状態の改善が認められなかった。14日、深部大腸まで内視鏡の評価施行。横行結腸から下行結腸脾彎曲部にかけて広範な炎症性ポリープを伴う粘膜欠損を認めた。また、血清・粘膜生検よりCMV再感染が確認された。早期の再燃が懸念され、追加治療の必要性が高いと判断した。再度、免疫調節剤、生物学的製剤について説明を行ったが、再度の(AM)療法を希望された。1月19日より2回目のAM持続静注療法(同用量、2週間)、デノシン投与(2週間)を行い、有害事象なく終了。治療開始前のSeo indexは143点であり、

投与後は133点と改善を認め、血液検査上も貧血・栄養状態の改善を認めた。2月1日の内視鏡検査では、横行結腸の広範粘膜欠損部は再生上皮で覆われ、一部癒痕化していた(図4a, b)。PSL減量中の再燃予防目的でイムラン50mg/日の投与を開始し、2月2日退院。退院後も臨床症状の寛解は持続し、血清アルブミン値、貧血の改善傾向は続いている。

図4a: 第2回AM投与前内視鏡検査

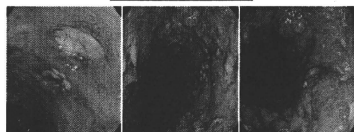


図4b: 第2回AM投与後内視鏡検査

評価項目

(1) 入院時から内視鏡検査で深部大腸までは観察出来ておらず、活動性はSeo's indexで評価。Seo's index: 入院時は208点と中等症スコアであったが、ステロイド療法、抗ウイルス療法により173点まで改善した。第1回AM療法後147点と軽症スコアまで改善し、第2回AM療法後143点から133点まで改善し、退院後も119点まで改善した。

(2) 内視鏡所見(図2, 3, 4): 入院時は直腸とS状結腸のみ観察。軽度

の浮腫とびらんの多発を認めた。中等症UCの所見であった(図2a, b)。PSL療法後、症状改善傾向は示すが、横行結腸には強い浮腫と潰瘍が残存した。第1回AM療法施行後、潰瘍辺縁には著明な再生粘膜が認められた(図3a, b)。第2回AM療法前には、横行結腸に打ち抜き様潰瘍が認められたが、治療後に著明な線維化(癒痕化)と血管拡張を認めた(図4a, b)。

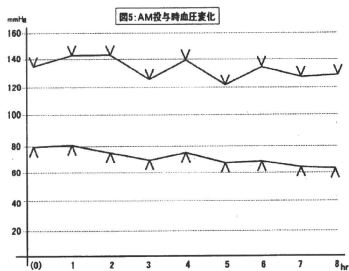
(3) 循環動態: AM投与開始3時間後に軽度の血圧低下傾向を示したが、心拍数に変化は認めなかった。自覚症状は皆無であった。AM投与中止後、循環動態は速やかに改善した。

(4) 有害事象: 軽度の血圧低下傾向の他は、初日のみ身体の軽いほてり感があった。

D. 考察

1993年、当科Kitamuraによって発見された新規生理活性ペプチドであるヒトAMは、発見当初、強力な血管拡張作用を有する生理活性ペプチドであることが確認された。さらに、AMは全身の臓器に広く分布し、その作用は、血管新生作用、血管内皮細胞アポトーシス抑制と血管再生、抗炎症作用、酸化ストレス抑制と多岐に渡る事が判明している。消化管領域では、酢酸誘発性大腸潰瘍、DSS腸炎およびTNBS腸炎モデル動物の腸炎改善効果以外

にも、胃潰瘍モデルラットに対する潰瘍改善効果が報告されており、消化管全般の粘膜修復作用が期待されている。我々は、新たな治療法として当大学の倫理委員会で承認を得たアドレノメデュリン (AM) 持続静注療法を難治性潰瘍性大腸炎患者に行った。悪性疾患および心血管系基礎疾患を有する患者は適応外と考えられ、本症例においても事前に確認した。投与量については、当科で過去に行った健常人への AM 投与のデータを元に、安全性が確認された量 (1.5 pmol/kg/min) で行い、日中のみの投与とした。投与中に軽度血圧低下が認められた (図5) が、臨床問題にはならなかった。投与後も有害事象は認めていない。



AM 持続静注投与の結果、臨床所見の改善が得られ、内視鏡検査所見の改善も認めた (図3, 4)。本症例の経過で認めた様に自覚症状軽快を目標とする臨床的寛解では、大腸粘膜障害の改善や血液検査値の十分な寛解が得られない場合が有り、再燃、難治化の

要因とも考えられる。このため、近年「粘膜治癒」の重要性が報告されている。特に UC においては、潰瘍やびらんなどの炎症が残存しない「粘膜治癒」状態が得られた症例に関しては、その後の再燃率が低いと報告されている。寛解導入療法としてステロイド製剤、血球成分除去療法に加えて、免疫調節剤、生物学的製剤による治療の有効性が確認されているが、治療目標を「粘膜治癒」とするためには、安全性の高い新規治療薬も期待されている。本例は、第1回の AM 療法後、血液検査値の改善が悪く、内視鏡検査で深部まで観察すると十分な粘膜治癒は得られておらず、追加の寛解導入療法が必要と考えた。希望により第2回の AM 療法を行い、血液検査値と共に内視鏡所見の改善が確認された。2回の AM 療法を通して有害事象は認められず、今回の用量での AM 療法は、安全な治療と考えられた。本治療は単独ではなく、合同療法として施行した。TPN、LCAP、抗ウイルス薬の中止、PSL の減量も得られ、少なくとも相乗効果は確認された。また、再投与でも効果は減弱しないことも確認された。免疫調節剤、生物学的製剤と異なり、効果、副作用共に遷延することはなく、反復投与も行い易い治療である。投与期間、用量、寛解導入への使用法については、改良の余地もあると考える。炎症性腸

疾患における腸管粘膜障害は、原因不明の炎症により粘膜の破壊、剥脱が潰瘍を形成する状態と考えられる。粘膜治癒は、炎症の停止とともに粘膜修復過程が必要である。当科での以前の治療で経験したUCの治癒と比較して内視鏡像では、粘膜再生が速い印象がある。少なくとも粘膜修復を阻害する恐れはなく、AM療法は「粘膜治癒」を寛解目標とする治療法に有力な治療法である。近年、選択肢が増えた炎症性腸疾患治療においても、本治療は寛解導入療法の有力な治療法であり、免疫調節剤とは異なる作用点があると考えられる。治癒経過の比較で、炎症性腸疾患の病態解明も期待される。

E. 結論

活動性UCに対するAM持続静注療法再投与の一例を報告した。AM療法は、UC患者においても臨床的改善効果を示し、粘膜治癒を認め、高い安全性が示された。さらに再投与においても効果は減弱することなく、安全に投与された。本治療は寛解導入療法の有力な治療法であり、免疫調節剤とは異なる作用点があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Kitamura K, Ashizuka S, Inagaki-Ohara K, Kuwasako K, Kato J, Inatsu H: Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation in mice administered dextran sulphate sodium. 14th International congress of endocrinology (ICE2010), 2010-3(Kyoto, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 出願番号:61/431,975

発明者:北俊弘、北村和雄、芦塚伸也、稲津東彦

発明の名称:Method for prevention or treatment of intractable inflammatory bowel disease

出願人:国立大学法人宮崎大学

出願日:2011年1月12日

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kita T, Suzuki Y, Kitamura K.	Hemodynamic and hormonal effects of exogenous adrenomedullin administration in humans and relationship to insulin resistance.	Hypertens Res.	33	314-319	2010
Kita T, Yokota N, Ichiki Y, Ayabe T, Etoh T, Tamaki N, Kato J, Eto T, Kitamura K.	One-year effectiveness and safety of open-label losartan/hydrochlorothiazide combination therapy in Japanese patients with hypertension uncontrolled with ARBs or ACE inhibitors.	Hypertens Res.	33	320-325	2010
Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J.	Structure-function analysis of helix 8 of human calcitonin receptor-like receptor within the adrenomedullin 1 receptor.	Peptides.	32	144-149	2010
Nishihira K, Shibata Y, Ishikawa T, Nomura K, Nakama T, Mine D, Inoue Y, Ashikaga K, Kuriyama N, Matsuyama A, Imamura T, Asada Y, Kitamura K.	Repeated sirolimus-eluting stent implantation to treat sirolimus-eluting stent and bare-metal stent restenosis.	Circ J.	74	2329-2333	2010
Fukuda A, Fujimoto S, Iwatsubo S, Kawachi H, Kitamura K.	Effects of mineralocorticoid and angiotensin II receptor blockers on proteinuria and glomerular podocyte protein expression in a model of minimal change nephrotic syndrome.	Nephrology (Carlton).	15	321-326	2010
Tsuruda T, Imamura T, Hatakeyama K, Asada Y, Kitamura K.	Stromal cell biology--a way to understand the evolution of cardiovascular diseases.	Circ J.	74	1042-1050	2010
Sumi T, Yamashita A, Matsuda S, Goto S, Nishihira K, Furukoji E, Sugimura H, Kawahara H, Imamura T, Kitamura K, Tamura S, Asada Y.	Disturbed blood flow induces erosive injury to smooth muscle cell-rich neointima and promotes thrombus formation in rabbit femoral arteries.	J Thromb Haemost.	8	1394-1402	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagata S, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K.	Plasma and tissue levels of proangiotensin-12 and components of the renin-angiotensin system (RAS) following low- or high-salt feeding in rats.	Peptides	31	889-892	2010
Kita T, Tokashiki M, Kitamura K.	Aldosterone antiseoretagogue and antihypertensive actions of adrenomedullin in patients with primary aldosteronism.	Hypertens Res.	33	374-379	2010
Ogawa T, Kawano Y, Imamura T, Kawakita K, Sagara M, Matsuo T, Kakitsubata Y, Ishikawa T, Kitamura K, Hatakeyama K, Asada Y, Kodama T.	Reciprocal contribution of pentraxin 3 and C-reactive protein to obesity and metabolic syndrome.	Obesity (Silver Spring).	18	1871-1874	2010

ORIGINAL ARTICLE

Hemodynamic and hormonal effects of exogenous adrenomedullin administration in humans and relationship to insulin resistance

Toshihiro Kita, Yoshihiko Suzuki¹ and Kazuo Kitamura

Although adrenomedullin (AM) is a potent hypotensive peptide that acts mainly as a vasodilative and proliferation inhibitory factor, there have been few hemodynamic studies on AM in humans, especially concerning arterial stiffness and hormonal effects. In addition, AM is a suppressive factor in insulin resistance, suggesting that the effects of AM in a state of insulin resistance are important. To evaluate the effects of AM in humans, 28 participants were intravenously administered AM ($5 \text{ pmol min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) for 90 min. They also received a representative vasodilator drug, nicardipine, as a reference drug. Blood pressure, heart rate, pulse wave velocity (PWV) and blood flow were monitored throughout the experiment. Hormonal changes were also monitored by blood tests. The effects of AM were compared with those of nicardipine. In addition, the effects of AM were re-evaluated against insulin resistance state. AM and nicardipine produced the same level of hypotension, but AM showed a more potent ability to increase heart rate, blood flow and cardiac output and reduce PWV. AM and nicardipine similarly stimulated plasma noradrenaline and renin activity. However, in the state of insulin resistance, favorable effects of AM on aortic stiffness were blunted and differences between AM and nicardipine disappeared. Furthermore, there was a significant correlation between maximum changes in the PWV induced by AM and the homeostasis model assessment of insulin resistance index ($r=0.58$, $P=0.001$). Our results suggest that AM may improve arterial stiffness and act as a compensatory factor against arterial sclerosis. Moreover, decreased reactivity of AM may participate in the progression of arterial sclerosis in insulin resistance. *Hypertension Research* (2010) 33, 314–319; doi:10.1038/hr.2009.236; published online 22 January 2010

Keywords: adrenomedullin; insulin resistance; nicardipine; pulse wave velocity

INTRODUCTION

Adrenomedullin (AM) is a potent hypotensive peptide found ubiquitously in tissues and organs, especially in cardiovascular tissues, the kidneys, lungs and endocrine glands. AM has multiple functions in a wide range of tissues and acts mainly as a vasodilative and proliferation inhibitory factor.¹ AM also has a role in the development of arterial sclerosis as an inflammatory modulator.^{2,3} Recently, it was shown that endogenous AM has a protective effect against cardiovascular injury, possibly through the inhibition of oxidative stress.⁴ Morphologically, dense manifestation of AM has been detected in macrophages within plaques of atherosclerotic lesions.⁵ Shinomiya *et al.*⁶ reported an association between plasma AM concentration and carotid atherosclerosis in patients with stroke. Furthermore, we previously reported a relationship between plasma AM levels and pulse wave velocity (PWV), an indicator of arterial stiffness, in patients.⁷ In addition, AM may counteract insulin resistance development through an antioxidant stress factor.^{8,9} Insulin resistance is well recognized as a major pathogenetic factor of arterial disorders,

including hypertension and arterial sclerosis. Accumulating data suggest that AM acts as an important modulator against arterial sclerosis and organ damage.

Exogenous AM administration has been shown to have beneficial effects in various stages of cardiovascular disease. In normotensive and hypertensive subjects, short-term AM infusion produced hypotension through vasodilation and increased cardiac output.^{10,11} AM also improved hemodynamics in heart failure patients. Specifically, AM administration reduced arterial pressure and cardiac filling pressure and also increased cardiac output and renal sodium excretion.¹² However, the effect of AM on the arteries, especially large arteries, has not been determined in humans. A sustained increase in arterial stiffness, as demonstrated by increased PWV, is closely correlated with morbidity and mortality in cardiovascular events.^{13–15} In this study, we investigated the effect of AM on arterial stiffness in human subjects. In addition, because the effect of AM may be affected by insulin resistance, we evaluated the relationship between the effects of AM and insulin resistance state in these subjects.

Division of Circulatory and Body Fluid Regulation, Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

¹Current address: Suzuki clinic, Miyazaki, Japan.

Correspondence: Dr T Kita, Division of Circulatory and Body Fluid Regulation, Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan.

E-mail: t-kita@po.sphere.ne.jp

Previous presentation of this article: Partial data concerning nicardipine administration were presented in a previous paper (*Hypertens Res* 2005; 28: 959–964).

Received 16 October 2009; revised 24 November 2009; accepted 9 December 2009; published online 22 January 2010

METHODS

Study subjects

Twenty-eight subjects that were normotensive ($n=11$), hypertensive ($n=9$) or diabetic ($n=8$) received AM. In addition, all subjects received nicardipine as a reference drug at least 1 week after AM. Subjects with one or more of the following conditions were excluded: (1) heart failure (ejection fraction <50%), (2) severe valvular diseases, (3) renal insufficiency (serum creatinine >1.0 mg per 100 ml), (4) peripheral artery diseases and (5) history of cardiovascular events. All subjects were completely free from any kind of drugs. The study was approved by the ethics committee of the institute, and all participants gave written informed consent.

Preparation of human AM

Chemically synthesized human AM was purchased from the Peptide Institute, Osaka, Japan. The homogeneity of human AM was confirmed by reverse-phase high-performance liquid chromatography and amino acid analysis. AM was dissolved in distilled water with 3.75% D-mannitol and 0.05% aminoacetic acid, then sterilized by passage through a 0.22- μ m filter (Millipore, Bedford, MA, USA). The chemical nature and content of the human AM in vials were verified by reverse-phase high-performance liquid chromatography.

Study protocol

All experiments began at 0900 hours with subjects in a fasted state. Experiments were conducted in our outpatient office, which provided a quiet environment with a constant temperature. A 20-gauge cannula was inserted into the forearm vein for infusion of 0.9% saline. Saline was infused at a rate of 100 ml h⁻¹ throughout the experiments (Figure 1). Baseline measurements were obtained after a 30-min equilibration period. Then AM (5 pmol min⁻¹ kg⁻¹) was intravenously administered at a rate of 5 ml h⁻¹ for 1.5 h followed by saline infusion for 1.5 h. One week after AM infusion, the same subjects were infused with nicardipine (1–1.5 μ g min⁻¹ kg⁻¹) as a reference drug. Blood pressure and pulse rate were monitored every 10 min by an automated hemodynamometer on a brachial cuff. Every 15 min, blood pressure, heart rate and PWV were measured using an automatic waveform analyzer (form PWV/ABI, BP-203RPE; Omron Colin, Komaki, Japan), as reported in our previous study.⁷ Carotid artery pulsation was measured using echo equipment at three time points, as indicated in Figure 1, and the elastic property¹⁶ was calculated. Using the Doppler echo method, blood flow in the common carotid artery and segmental renal artery were measured, as was cardiac output. In addition, blood samples were taken at three time points, namely, before, during and after AM infusion (Figure 1). Plasma total and mature AM were measured by specific immunoradiometric assay kits (Shionogi, Osaka, Japan). Plasma concentrations of other hormones were measured using a commercially available laboratory testing service (SRL, Hachioji, Japan).

Statistical analyses

All data were expressed as the mean \pm s.e.m. Comparisons of parameters between the two groups (AM vs. nicardipine) were carried out using paired Student's *t*-tests. Comparisons of the time course of parameters between the two groups were carried out by two-way repeated measures analysis of

variances followed by Bonferroni/Dunn's multiple comparison tests. A value of $P < 0.05$ was the criterion for statistical significance.

RESULTS

Table 1 presents the baseline characteristics of the participants. AM and nicardipine achieved the same levels of systolic blood pressure reduction in all subjects, as shown in Figure 2. However, AM produced a stronger diastolic blood pressure reduction and heart rate increase when compared with nicardipine (Figures 2a and b). Most interestingly, AM caused a significantly larger reduction of PWV and elastic property of the carotid artery when compared with nicardipine (Figures 2c and d). These changes rapidly recovered after termination of AM or nicardipine administration, except for the prolonged decrease in systolic blood pressure induced by nicardipine. Table 2

Table 1 Baseline characteristics of participants

	Normotensive	Hypertensive	Diabetic
N	11	9	8
Age (years)	40.8 \pm 2.5	50.0 \pm 2.7*	48.5 \pm 3.3
BMI (kg m ⁻²)	24.3 \pm 0.5	24.1 \pm 0.8	25.2 \pm 0.9
SBP (mm Hg)	118.9 \pm 1.8	155.4 \pm 4.8**	131.3 \pm 3.2**
DBP (mm Hg)	74.9 \pm 2.6	95.0 \pm 3.6**	81.0 \pm 2.2
Heart rate (b.p.m.)	59.5 \pm 2.4	65.8 \pm 3.6	63.1 \pm 2.5
PWV (cm s ⁻¹)	1263 \pm 52	1598 \pm 73**	1435 \pm 35*
Elastic property (kPa)	97.7 \pm 8.5	154.2 \pm 9.7**	107.1 \pm 7.6
Peak CAF (cm s ⁻¹)	87.1 \pm 2.7	76.8 \pm 3.0*	87.9 \pm 6.9
Mean CAF (cm s ⁻¹)	37.5 \pm 1.7	36.1 \pm 2.7	38.1 \pm 2.0
Peak RAF (cm s ⁻¹)	49.1 \pm 4.1	40.0 \pm 2.6	48.1 \pm 5.2
Mean RAF (cm s ⁻¹)	28.9 \pm 1.8	25.1 \pm 1.7	28.5 \pm 3.3
Cardiac output (l min ⁻¹)	4.52 \pm 0.28	4.55 \pm 0.28	4.73 \pm 0.25
IRI (μ U ml ⁻¹)	7.7 \pm 1.7	8.2 \pm 2.0	6.3 \pm 1.5
Blood sugar (mg per 100 ml)	99.4 \pm 2.2	104.9 \pm 3.3	165.0 \pm 11.5**
Total AM (fmol ml ⁻¹)	12.9 \pm 0.7	13.5 \pm 1.0	15.4 \pm 2.3
Mature AM (fmol ml ⁻¹)	2.0 \pm 0.2	1.9 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2
Adrenaline (pg ml ⁻¹)	20.4 \pm 2.9	32.8 \pm 7.6	25.3 \pm 2.6
Noradrenaline (pg ml ⁻¹)	255 \pm 39	282 \pm 32	188 \pm 24
Renin activity (ng ml ⁻¹ h ⁻¹)	0.76 \pm 0.28	0.73 \pm 0.15	1.24 \pm 0.26
Aldosterone (pg ml ⁻¹)	70.2 \pm 11.0	76.0 \pm 7.5	77.6 \pm 8.9
ANP (pg ml ⁻¹)	17.2 \pm 2.8	29.1 \pm 8.2	19.1 \pm 5.5
BNP (pg ml ⁻¹)	12.1 \pm 2.9	36.7 \pm 22.0	10.2 \pm 3.9
cAMP (pmol ml ⁻¹)	11.7 \pm 0.6	11.9 \pm 0.5	11.6 \pm 0.7
cGMP (pmol ml ⁻¹)	2.9 \pm 0.3	4.4 \pm 1.0	2.9 \pm 0.5

Abbreviations: AM, adrenomedullin; ANP, atrial natriuretic peptide; BMI, body mass index; BNP, brain natriuretic peptide; CAF, common carotid artery flow; DBP, diastolic blood pressure; IRI, immunoreactive insulin; PWV, pulse wave velocity; RAF, renal segmental artery flow; SBP, systolic blood pressure.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. normotensive.

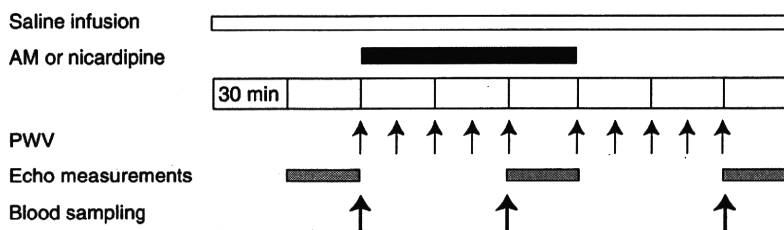


Figure 1 Experimental protocol. After a 60-min baseline period, AM (5 pmol min⁻¹ kg⁻¹) or nicardipine (1–1.5 μ g min⁻¹ kg⁻¹) was intravenously administered for 90 min followed by a 90 min post-infusion period.

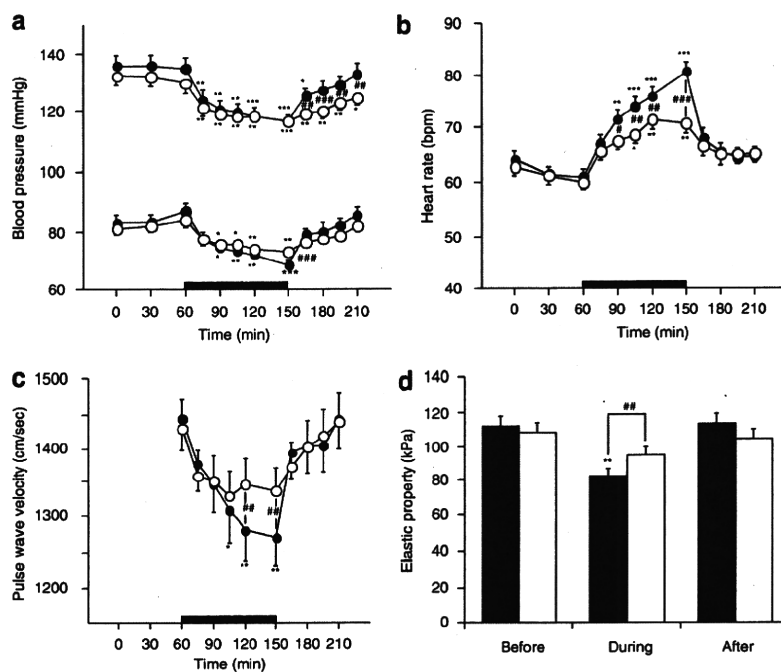


Figure 2 Changes in blood pressure (a), heart rate (b), pulse wave velocity (c) and elastic property of the carotid artery (d) during infusion of AM (closed symbols) or nicardipine (open symbols). Data are mean \pm s.e.m. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.0001 vs. each baseline; # P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.0001 vs. nicardipine.

Table 2 Changes of blood flow velocity and cardiac output

	Before	During	After	<i>P</i> in trend
Peak CAF ($cm\ s^{-1}$)				
AM	84.0 \pm 2.5	130.2 \pm 3.0** ##	80.3 \pm 2.5	<0.0001
Nicardipine	83.9 \pm 2.6	107.2 \pm 2.5**	84.2 \pm 2.0	<0.0001
Mean CAF ($cm\ s^{-1}$)				
AM	37.2 \pm 1.2	53.8 \pm 1.4** ##	34.3 \pm 1.1	<0.0001
Nicardipine	36.4 \pm 1.1	42.7 \pm 1.2**	34.7 \pm 1.0	<0.0001
Peak RAF ($cm\ s^{-1}$)				
AM	45.9 \pm 2.4	61.2 \pm 3.3**	40.9 \pm 2.1*	<0.0001
Nicardipine	46.1 \pm 2.5	56.9 \pm 2.8**	45.0 \pm 2.2	0.0017
Mean RAF ($cm\ s^{-1}$)				
AM	27.6 \pm 1.3	34.0 \pm 1.6** #	24.8 \pm 1.1##	<0.0001
Nicardipine	27.7 \pm 1.4	31.6 \pm 1.6	27.3 \pm 1.3	0.066
Cardiac output ($l\ min^{-1}$)				
AM	4.59 \pm 0.15	7.63 \pm 0.25** ##	4.77 \pm 0.14	<0.0001
Nicardipine	4.58 \pm 0.14	6.18 \pm 0.30**	4.90 \pm 0.27	<0.0001

Abbreviations: AM, adrenomedullin; CAF, common carotid artery flow; RAF, renal segmental artery flow.
Data are mean \pm s.e.m.
** P <0.01 vs. before.
* P <0.05, ## P <0.01 vs. nicardipine.

summarizes the increase in blood flow and cardiac output after AM or nicardipine administration. Both reagents clearly increased blood flow, but AM was more potent than nicardipine. AM induced significantly larger increases in cardiac output when compared with nicardipine.

The responses of these parameters were similar among normotensive, hypertensive and diabetic groups of subjects (data not shown). Next, subjects were divided into three groups according to the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, according to which the highest tertile (HOMA-IR \geq 2.0) corresponds to an insulin-resistant state in Japan. HOMA-IR values for each group were as follows: low = 0.31–1.39 (n = 9), middle = 1.43–1.78 (n = 10) and high = 2.00–6.96 (n = 9). As shown in Figure 3, only the reduction in PWV induced by AM was blunted in subjects with the highest HOMA-IR, despite the nearly identical reduction in systolic blood pressure. In this group, the reductions in PWV were similar for AM and nicardipine treatments. This phenomenon was also confirmed by the significant correlation between maximum changes in PWV induced by AM and HOMA-IR (Figure 4). The difference in elastic property reduction between AM and nicardipine treatment was not significant in the high HOMA-IR group (Figure 3c).

Table 3 summarizes the changes in humoral factors. AM administration produced significant increases in total AM (approximately 2.5-fold) and mature AM (approximately 7-fold) as well as an approximately 40% increase in the second messenger cAMP. AM and nicardipine produced the same degree of increase in noradrenaline and renin activity. There was no significant difference among the HOMA-IR groups for all humoral factor alterations (data not shown). Finally, AM and nicardipine had no effect on insulin and glucose levels.

DISCUSSION

In this study, we confirmed the hemodynamic effects of AM as a vasodilative agent in humans. AM increased heart rate and cardiac output and decreased blood pressure. In addition, AM increased blood flow in carotid and renal arteries. These effects were similar

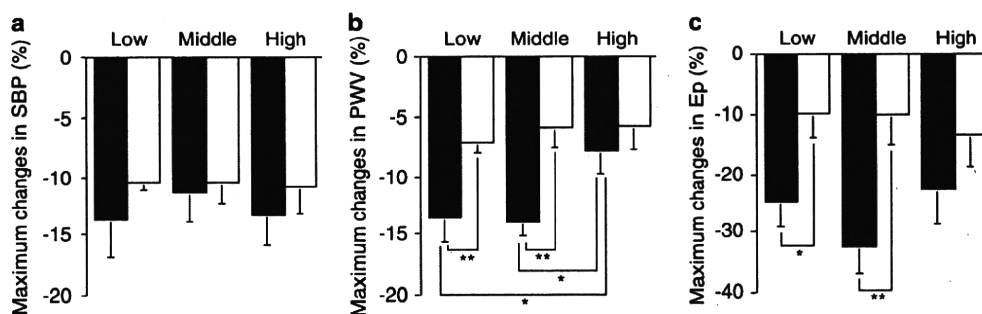


Figure 3 Maximum changes in systolic blood pressure (SBP, panel a), pulse wave velocity (PWV, panel b) and elastic property of the carotid artery (Ep, panel c) during infusion of AM (closed column) or nicardipine (open column) in each of the three groups divided by HOMA-IR index. Groups divided by HOMA-IR index include low ($n=9$), middle ($n=10$) and high ($n=9$) index groups. Data are mean \pm s.e.m. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

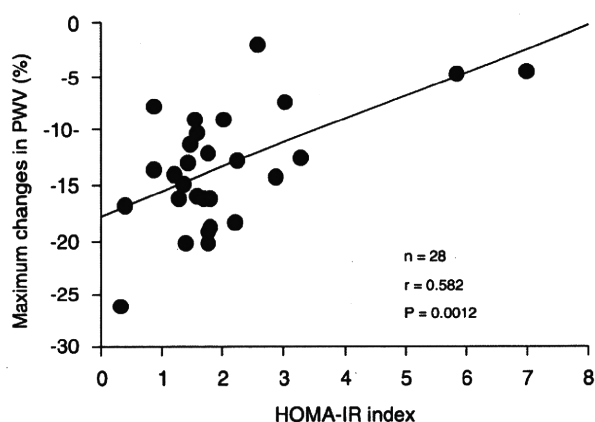


Figure 4 Relationship between maximum changes in pulse wave velocity (PWV) induced by AM administration and the HOMA-IR index.

to those of the common vasodilator nicardipine. However, AM produced greater increases in cardiac output and heart rate when compared with nicardipine (Table 2). The ventricular myocardium has abundant AM-binding sites; therefore, AM increases cardiac cAMP.^{17,18} This cAMP-dependent mechanism mediates the positive inotropic action of β -adrenergic stimulants. AM also enhances angiotensin-II-induced improvement of systolic function, resulting in a further increase in left ventricular ejection fraction.¹⁹ In addition, a cAMP-independent mechanism for the positive inotropic action of AM has been reported.²⁰ These data suggest that increased cardiac output, and probably heart rate, may be attributable not only to the decrease in cardiac afterload but also to the direct positive inotropic action of AM.

PWV is a convenient indicator of arterial stiffness and is applicable in the casual and prognostic estimation of risk for cardiovascular events. We used brachial ankle PWV (baPWV) in this study. As shown for authentic PWV, baPWV correlates well with blood pressure and aging,²¹ and increased baPWV is associated with cardiovascular diseases and risk factors.²² More importantly, high baPWV values predict poor prognosis in subjects.²³ Conversely, improvement of PWV by antihypertensive therapy may reduce the incidence of cardiovascular events.¹⁵ Strong expression of AM is found ubiquitously in blood vessels where AM functions as a vasodilator, coordinating with other vasodilators, such as nitric oxide, to regulate

vascular tonus.¹ AM is suggested to be a significant modulator of arterial stiffness, decreasing blood pressure and vascular wall tension and preventing future wall remodeling. In this study, AM had a greater effect on aortic stiffness, as assessed by baPWV or elastic property, when compared with a common vasodilator Ca^{2+} channel blocker (Figure 2). This feature may contribute to a vascular protective or compensatory function of AM against vascular deterioration and resulting vascular events.

baPWV is mainly altered by blood pressure, but other factors, such as increased heart rate, cardiac output and sympathetic nerve activity, may also increase baPWV. Indeed, the effect of nifedipine on baPWV was reduced by increased sympathetic activity.²⁴ Although decreases in systolic blood pressure were well matched in nicardipine and AM treatments, AM showed greater baPWV reduction despite larger increments in heart rate and cardiac output when compared with nicardipine (Figure 2 and Table 2). The increases in catecholamines and renin activity were equivalent in both treatments (Table 3). These alterations probably reduced or inhibited the decrease in baPWV in nicardipine treatment. Alternatively, it is conceivable that AM has greater potency against negative alterations to increase baPWV when compared with nicardipine.

AM and nicardipine produced a larger blood pressure reduction in hypertensive participants when compared with normotensive or diabetic participants, which is a common feature of hypotensive reagents (data not shown). However, other hemodynamic effects of AM and nicardipine evaluated within each treatment were essentially the same for each subgroup of participants. We evaluated potentially influential factors in the effects of AM, and we found that only the insulin resistance interfered with the effects of AM. Insulin resistance is an aggravating factor in vascular function and is an underlying cause of cardiovascular diseases. Insulin resistance also influences the sensitivity or efficacy of many drugs and bioactive substances. More importantly, increased arterial stiffness is commonly found in representative insulin resistance states, namely, metabolic syndrome and diabetes.²⁵⁻²⁷ As shown in Figures 3 and 4, favorable effects of AM on arterial stiffness were blunted in a state of insulin resistance. AM is thought to function as a suppressive factor against insulin resistance.^{8,9} As such, plasma concentration of AM was progressively increased in patients with impaired glucose tolerance, diabetes and diabetes with nephropathy.²⁸ In addition, an increase in AM was related to multiple metabolic factors.²⁸ AM and insulin resistance may conflict with each other. Specifically, decreased reactivity of AM may contribute to increased arterial stiffness during insulin resistance, and this alteration may accelerate the progression of arterial sclerosis in insulin resistance.

Table 3 Hormonal responses to adrenomedullin or nicardipine

	Before	During	After	P in trend
Total AM, fmol ml⁻¹				
AM	13.9±0.8	32.8±1.8**	15.9±0.6	<0.0001
Nicardipine	13.1±0.4	12.4±0.4##	12.8±0.5##	NS
Mature AM, fmol ml⁻¹				
AM	1.9±0.1	12.2±0.8**	2.6±0.1	<0.0001
Nicardipine	1.6±0.2	1.8±0.2##	1.7±0.2##	NS
cAMP, pmol ml⁻¹				
AM	11.8±0.3	16.5±0.5**	12.9±0.4	<0.0001
Nicardipine	11.1±0.4	11.0±0.4##	11.1±0.4##	NS
cGMP, pmol ml⁻¹				
AM	3.5±0.4	3.7±0.3	3.4±0.4	NS
Nicardipine	3.6±0.3	3.7±0.3	3.0±0.2	NS
Renin activity, ng ml⁻¹ h⁻¹				
AM	0.9±0.1	1.7±0.3**	1.0±0.1	0.006
Nicardipine	0.9±0.1	1.7±0.3**	1.1±0.1	0.016
Aldosterone, pg ml⁻¹				
AM	74.4±5.2	69.7±5.3	65.3±3.7	NS
Nicardipine	78.2±4.7	77.2±5.3#	71.0±4.5	NS
Noradrenaline, pg ml⁻¹				
AM	245±20	429±33**	267±21	<0.0001
Nicardipine	247±19	423±33**	346±25**.#	<0.0001
Adrenaline, pg ml⁻¹				
AM	27.6±3.3	32.1±3.8	25.8±2.2	NS
Nicardipine	21.8±2.1#	24.4±3.2##	31.8±3.2*.#	0.04
ANP, pg ml⁻¹				
AM	21.8±3.2	25.4±4.1	22.7±3.7	NS
Nicardipine	17.0±1.8	19.0±2.0#	14.0±1.2##	NS
BNP, pg ml⁻¹				
AM	12.4±2.0	11.4±1.8	14.0±2.2	NS
Nicardipine	9.4±1.6	10.0±1.7	10.1±1.6	NS
IRI, µIU ml⁻¹				
AM	7.2±1.0	7.1±0.9	6.0±0.7	NS
Nicardipine	8.0±0.8	7.1±0.7	6.4±0.6	NS
Glucose, mg per 100 ml				
AM	119±6	116±6	110±5	NS
Nicardipine	124±8	121±8	116±7	NS

Abbreviations: AM, adrenomedullin; ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; IRI, immunoreactive insulin; NS, not significant.
Data are mean ± s.e.m.
*P<0.05, **P<0.01 vs. before.
#P<0.05, ##P<0.01 vs. AM.

However, this intervention is only a temporary treatment, so further studies are required to clarify the relationship between AM and insulin resistance.

Plasma concentration of total AM was increased approximately 2.4-fold above the control value after AM administration (Table 3). This level of AM concentration has been found in renal failure or heart failure patients,²⁹ so the level of AM used was pathophysiological, not

pharmacological. AM administration also increased cAMP, which is a second messenger of AM, approximately 1.4-fold above the control value. Similar changes in AM and cAMP have been reported in previous studies.^{10–12} AM and nicardipine also produced similar hormonal alterations, namely, stimulated sympathetic activity and renin release, which was also observed in another study.^{10,11} The only difference between the effects of AM and nicardipine in our study was on aldosterone release. AM tended to inhibit aldosterone release despite increased renin activity, although this difference was not significant (P=0.051, Table 3). AM did not change aldosterone levels in healthy volunteers or patients with essential hypertension,^{10,11} but AM suppressed increased aldosterone levels in patients with heart failure.¹² Furthermore, AM may have renin-independent suppressive potency for aldosterone release, and this feature should be elucidated in future studies.

In conclusion, exogenous AM and Ca²⁺ channel blocker nicardipine caused similar vasodilations in humans, accompanied with resemble interactions with the renin–angiotensin and sympathetic nervous systems. However, AM had a greater potency in its cardiac inotropic action when compared with nicardipine. AM also more effectively decreased arterial stiffness, but the effect was weakened to a similar level as for nicardipine in a state of insulin resistance. Our results support the hypothesis that AM may modulate vasoactive substances and vascular tonus and also have a role in pathophysiological conditions, such as an insulin resistance state.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by Health and Labor Science Research Grants for Translational Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

- Eto T, Kato J, Kitamura K. Regulation of production and secretion of adrenomedullin in the cardiovascular system. *Regl Pept* 2002; **112**: 61–69.
- Elsasser TH, Kahl S. Adrenomedullin has multiple roles in disease stress: development and remission of the inflammatory response. *Microsc Res Tech* 2002; **57**: 120–129.
- Wong LY, Cheung BM, Li Y-Y, Tang F. Adrenomedullin is both proinflammatory and anti-inflammatory: its effects on gene expression and secretion of cytokines and macrophage migration inhibitory factor in NR8383 macrophage cell line. *Endocrinology* 2005; **146**: 1321–1327.
- Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, Kato S, Ando K, Fujita T. Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation* 2002; **105**: 106–111.
- Marutsuka K, Hatakeyama K, Sato Y, Yamashita A, Sumiyoshi A, Asada Y. Immunohistological localization and possible functions of adrenomedullin. *Hypertens Res* 2003; **26** (Suppl): S33–S40.
- Shinomiya K, Ohmori K, Ohyama H, Hosomi N, Takahashi T, Osaka K, Kohno M. Association of plasma adrenomedullin with carotid atherosclerosis in chronic ischemic stroke. *Peptides* 2001; **22**: 1873–1880.
- Kita T, Kitamura K, Hashida S, Morishita K, Eto T. Plasma adrenomedullin is closely correlated with pulse wave velocity in middle-aged and elderly patients. *Hypertens Res* 2003; **26**: 887–893.
- Shimosawa T, Ogihara T, Matsui H, Asano T, Ando K, Fujita T. Deficiency of adrenomedullin induces insulin resistance by increasing oxidative stress. *Hypertension* 2003; **41**: 1080–1085.
- Xing G, Shimosawa T, Ogihara T, Matsui H, Itakura K, Qingyou X, Asano T, Ando K, Fujita T. Angiotensin II-induced insulin resistance is enhanced in adrenomedullin-deficient mice. *Endocrinology* 2004; **145**: 3647–3651.
- Lainchbury JG, Troughton RW, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of short-term adrenomedullin infusion in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 1016–1020.
- Troughton RW, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Hemodynamic, hormone, and urinary effects of adrenomedullin infusion in essential hypertension. *Hypertension* 2000; **36**: 588–593.