

学位論文  
Doctor's Thesis

冠攣縮性狭心症患者においてアンジオテンシン II 受容体拮抗薬は  
ニトログリセリン耐性と酸化ストレスを減弱させる

Attenuation of Nitrate Tolerance and Oxidative Stress by an Angiotensin  
II Receptor Blocker in Patients With Coronary Spastic Angina

平井 信孝  
Nobutaka Hirai

指導教官  
熊本大学大学院医学研究科 循環器内科学  
小川 久雄 教授

2003 年度

# 学位論文

## Doctor's Thesis

論文題名： 冠攣縮性狭心症患者においてアンジオテンシン II 受容体拮抗薬は  
ニトログリセリン耐性と酸化ストレスを減弱させる  
Attenuation of Nitrate Tolerance and Oxidative Stress by an Angiotensin  
II Receptor Blocker in Patients with Coronary Spastic Angina

著者名： 平井 信孝  
Nobutaka Hirai

指導教官名： 循環器内科担当教授  
小川 久雄

審査委員名： 代謝内科学 荒木 栄一  
第三内科学 富田 公夫  
第一外科学 川筋 道雄  
第一薬理学 中西 宏之

2003 年度

## 目次

1. 要旨	3-4
2. 学位論文の骨格となる参考論文	5-7
3. 謝辞	8
4. 略語一覧	9
5. 研究の背景と目的	10-12
6. 実験方法	13-17
7. 実験結果	18-24
8. 考察	25-28
9. 結語	29
10. 参考文献	30-34

## 1 要旨

[背景] ニトログリセリンは冠動脈疾患の治療に広く用いられているが、その使用早期から耐性を生じることが知られ問題となっている。近年レニン-アンジオテンシン系がニトログリセリン耐性発症に重症な役割を果たしていることが解ってきた。

[方法] ニトログリセリン耐性にアンジオテンシン II タイプ1受容体拮抗薬(ARB)が及ぼす影響について 64 名の冠攣縮性狭心症患者を対象に研究を行なった。ニトログリセリン経皮吸収剤(10mg/day)と ARB(Candesartan: 8mg/day)を 3 日間、21 名の患者に投与し GTN+ARB 群とした。一方、ニトログリセリン経皮吸収剤とプラセボを 19 名の患者に投与し GTN 群とした。残りの 18 名にはプラセボの皮膚パッチと錠剤を 3 日間投与した(Control 群)。経皮的ニトログリセリン投与の前後で上腕動脈の血管径を測定し、同時にニトログリセリンの静脈内漸増投与による血管径の変化率を観察した。また経皮的ニトログリセリン投与の前後で酸化ストレスのマーカーである血漿チオレドキシニン濃度を測定した。

[結果] 経皮的ニトログリセリン投与前では各群においてニトログリセリンの静脈内漸増投与で用量依存性に血管径も増加した。経皮的ニトログリセリン投与後では GTN 群の血管径の変化率は有意に抑制されていたが、GTN+ARB 群、Control 群では経皮的ニトログリセリン投与前と変化がなかった。また血漿チオレドキシニン濃度も GTN 群では上昇していたものの GTN+ARB 群、Control 群では変化していなかった。

[結論] ARB は経皮的ニトログリセリン投与におけるニトログリセリン耐性を抑制した。以上の結果はアンジオテンシン II 賦活化によって誘導された酸化ストレスがニトログリセリン耐性の発現に大きく関わっている事を示唆するものである。

## Summary

**Background-** Nitrates are widely used to treat coronary artery disease, but their therapeutic value is compromised by the rapid development of tolerance. Recently, the renin-angiotensin system has been suggested to play an important role in the development of nitrate tolerance.

**Methods and Results-** Sixty-four patients with coronary spastic angina were investigated to clarify the effect of angiotensin II type 1 receptor blocker (ARB) therapy on nitrate tolerance. Transdermal nitroglycerin (10 mg/day) plus an ARB (candesartan: 8 mg/day) were administered to 21 patients (GTN+ARB group) for 3 days, while transdermal nitroglycerin plus placebo were administered to 19 patients (GTN group). Another 18 patients were treated with placebo skin patches and placebo tablets for 3 days (Control group). The brachial artery response to incremental doses of intravenous nitroglycerin (0.01, 0.1, and 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) was measured by ultrasound before and after transdermal nitroglycerin therapy. Before treatment, the arterial diameter was increased by nitroglycerin injection in each group. After treatment, the increase of arterial diameter was significantly suppressed in the GTN group, but not in the Control or GTN+ARB groups. The plasma level of thioredoxin (a marker of oxidative stress) was increased in the GTN group after treatment ( $p < 0.01$ ), but not in the Control or GTN+ARB groups.

**Conclusions-** An ARB suppressed the development of nitrate tolerance during transdermal nitroglycerin therapy. These results suggest that increased oxidative stress induced by activation of angiotensin II may play an important role in the development of nitrate tolerance.

## 2 参考論文

### 2.1 学位論文の骨格となる参考論文

Hirai N, Kawano H, Yasue H, Shimomura H, Miyamoto S, Soejima H, Kajiwara I, Sakamoto T, Yoshimura M, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H. Attenuation of Nitrate Tolerance and Oxidative Stress by an Angiotensin II Receptor Blocker in Patients with Coronary Spastic Angina. *Circulation* 2003; 108: 1446-50.

### 2.2 その他の論文

- (1) Kawano H, Yasue H, Kitagawa A, Hirai N, Yoshida T, Soejima H, Miyamoto S, Nakano M, Ogawa H. Dehydroepiandrosterone supplementation improves endothelial function and insulin sensitivity in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 3190-5.
- (2) Miyamoto S, Kawano H, Sakamoto T, Soejima H, Kajiwara I, Shimomura H, Kojima S, Hokamaki J, Sugiyama S, Hirai N, Yoshimura M, Ozaki Y, Ogawa H. Formation of platelet microaggregates correlates with adverse clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2003; 89: 681-6.
- (3) Hirai N, Fukunaga T, Kawano H, Honda O, Sakamoto T, Yoshimura M, Kugiyama K, Ogawa H. Platypnea - orthodeoxia syndrome with atrial septal defect. *Circ J.* 2003 Feb;67(2):172-5.
- (4) Kawano H, Motoyama T, Yasue H, Hirai N, Waly HM, Kugiyama K, Ogawa H. Endothelial function fluctuates with diurnal variation in the frequency of ischemic episodes in patients with variant angina. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40: 266-70.
- (5) Yoshimura M, Mizuno Y, Nakayama M, Sakamoto T, Sugiyama S, Kawano H, Soejima H, Hirai N, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H B-type natriuretic peptide as a marker of the effects of enalapril in patients with heart failure. *Am J Med.* 2002; 112: 716-20.
- (6) Soejima H, Ogawa H, Hirai N, Kawano H, Sakamoto T. Infective endocarditis with perivalvular pseudoaneurysm. *Circ J.* 2002 ; 66: 211-2.
- (7) Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Kugiyama K, Yasue H, Ogawa H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is improved by L-arginine administration:

- possible role of oxidative stress. *Atherosclerosis*. 2002; 161: 375-80.
- (8) Motoyama T, Kawano H, Hirai N, Tsunoda R, Moriyama Y, Miyao Y, Sakamoto T, Yoshimura M, Kugiyama K, Yasue H, Ogawa H. The relationship of left ventricular mass to endothelium-dependent vasodilation of the brachial artery in patients with hypertension. *Cardiology*. 2001; 96: 7-15.
- (9) Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Estradiol supplementation suppresses hyperventilation-induced attacks in postmenopausal women with variant angina. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37: 735-40.
- (10) Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Yoshimura T, Kugiyama K, Ogawa H, Okamura H, Yasue H. Effect of medroxyprogesterone acetate plus estradiol on endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Am J Cardiol*. 2001; 87: 238-40, A9.
- (11) Hirai N, Kawano H, Hirashima O, Motoyama T, Moriyama Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Nakao K, Yasue H. Insulin resistance and endothelial dysfunction in smokers: effects of vitamin C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279: H1172-8.
- (12) Hirashima O, Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Ohgushi M, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Improvement of endothelial function and insulin sensitivity with vitamin C in patients with coronary spastic angina: possible role of reactive oxygen species. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35: 1860-6.
- (13) Sakamoto T, Ogawa H, Kawano H, Hirai N, Miyamoto S, Takazoe K, Soejima H, Kugiyama K, Yoshimura M, Yasue H. Rapid change of platelet aggregability in acute hyperglycemia. Detection by a novel laser-light scattering method. *Thromb Haemost*. 2000; 83: 475-9.
- (14) Takazoe K, Ogawa H, Yasue H, Sakamoto T, Oshima S, Arai H, Moriyama Y, Shimomura H, Hirai N, Kaikita K, Soejima H, Misumi K, Hosoda K. Association of plasma levels of activated protein C with recanalization of the infarct-related coronary artery after thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. *Thromb Res*. 1999; 95: 37-47.
- (15) Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1999;

34: 146-54.

- (16) Kugiyama K, Motoyama T, Doi H, Kawano H, Hirai N, Soejima H, Miyao Y, Takazoe K, Moriyama Y, Mizuno Y, Tsunoda R, Ogawa H, Sakamoto T, Sugiyama S, Yasue H. Improvement of endothelial vasomotor dysfunction by treatment with alpha-tocopherol in patients with high remnant lipoproteins levels. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 33: 1512-8.
- (17) Moriyama Y, Ogawa H, Oshima S, Arai H, Takazoe K, Shimomura H, Hirai N, Suefuji H, Soejima H, Nishiyama K, Misumi K, Yasue H. Relationship between serum angiotensin-converting enzyme activity and plasma plasminogen activator inhibitor activity in patients with recent myocardial infarction. *Coron Artery Dis*. 1998 ;9: 691-6.



### 3 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御支援下さいました熊本大学大学院医学研究科循環器内科学講座 小川 久雄 教授および泰江 弘文 前教授に深甚なる謝意を表します。

また本研究において直接御指導をいただきました熊本大学大学院医学研究科集中治療部講座 河野 宏明 講師、熊本大学大学院医学研究科循環器内科学講座 吉村 道博 助教授、熊本大学大学院医学研究科循環器内科学講座 坂本 知浩 講師、さらに酸化ストレスのマーカーであるチオレドキシンについてご指導いただきました京都大学ウイルス研究所生体応答学研究部門感染防御分野 淀井 淳司 教授、中村 肇 助教授をはじめ多くの先生方に深く感謝いたします。

#### 4 略語一覧

ACE; Angiotensin Converting Enzyme

アンジオテンシン変換酵素

ARB; Angiotensin II type 1 receptor blocker

アンジオテンシンタイプ1受容体遮断薬

GTN; Glyceril trinitrate

ニトログリセリン

## 5 研究の背景と目的

### 5.1 硝酸薬の作用機序

ニトログリセリンに代表される硝酸薬は 100 年以上も前から狭心症や心不全の治療薬として広く用いられている薬剤である<sup>1,2</sup>。ニトログリセリンは硝酸とグリセリンの化合物であり分子式  $C_3H_5N_3O_9$  で表わされる分子量 227.09 の物質である。

硝酸薬の薬効の主体は強力な血管拡張作用であることは知られていたが、その詳細なメカニズムについては近年まで不明であった。内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) の本体が一酸化窒素 (NO) であることが解明<sup>3</sup>されて以来、硝酸薬は外因性の NO ドナーとして注目を集め、その作用メカニズムが研究の対象となった。硝酸薬からの NO 産生には主に次の 3 つの経路が考えられている。第一にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を酵素として NO が産生される系<sup>4</sup>、次にチオール基と反応し S-ニトロソチオールが産生され、この S-ニトロソチオールから NO が遊離される系<sup>5</sup>、またヘム蛋白の一つであるチトクローム P-450 が関与して NO を産生させる系<sup>6</sup>である。このように硝酸薬から代謝された NO は主として血管平滑筋内の可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を活性化させ GTP からサイクリック GMP (cGMP) を産生させる<sup>7</sup>。cGMP は主として cGMP 依存性蛋白キナーゼ (protein kinase G; PKG) を活性化し種々のタンパク質をリン酸化することで細胞機能を調節するが、とくに平滑筋細胞内への Ca 流入を抑制し血管を弛緩させる<sup>8</sup>。

### 5.2 硝酸薬の耐性

硝酸薬は狭心症や心不全などの病態に対して治療開始直後には大変有効であるものの、治療を続けている間に早期に耐性を生じ治療効果が減弱してしまうことが問題視されている<sup>2,9</sup>。硝酸薬耐性の機序には様々な説が提唱されており、例えば血管平滑筋細胞中のスルフヒドリル (-SH 基) の枯渇、ニトログリセリンの血圧低下作用によっ

て惹起される神経体液性因子の活性化と血漿量の増加、sGC の感受性低下または PDE 活性の亢進、さらには酸化ストレスなど多くのものが報告されている。<sup>2,9,10</sup>。近年、Munzelらはニトログリセリンの代謝がスーパーオキシド生産を伴っており、これが硝酸薬耐性発生に関連していることを報告した<sup>10,11</sup>。彼らはアンジオテンシン II 受容体の活性化は硝酸薬耐性につながる最初の段階であると考えており、アンジオテンシン II により産生されたスーパーオキシドが最終的な媒介物質となって、投与された硝酸薬あるいは血管内皮から放出される酸化窒素を不活性化するとしている<sup>10</sup>。しかし、硝酸薬耐性発生におけるアンジオテンシン II の役割についてはいまだ議論の分かれるところである。

### 5.3 冠攣縮性狭心症と硝酸薬

狭心症は心筋の酸素需要に対して供給が追いつかずに心筋が酸素不足に陥ることによって発生する臨床症候群である。その発作は身体的あるいは精神的な労作によって誘発され、安静またはニトログリセリンの舌下によって消失すること、および発作時の心電図で ST 部分の低下を伴うことが以前から知られている<sup>12</sup>。しかしながら Prinzmetalらは1959年に労作時ではなく安静時に生じ、しかも発作時に心電図で一過性の ST 上昇を伴う狭心症を記載し、これを異型狭心症 (variant form of angina) と名づけた<sup>13</sup>。現在では異型狭心症はそのほとんどが冠攣縮によるものであることが判明している<sup>12</sup>。冠攣縮性狭心症の発作は典型的には早朝の安静時に生じることが多く、ニトログリセリンの舌下投与で速やかに改善する。ニトログリセリンは血管拡張薬であり、冠動脈も拡張させるが、器質性狭心症ではむしろ末梢の静脈を拡張させることで心臓への血液還流量を減少 (前負荷軽減) させ、また血圧を下げることで後負荷を減らし心筋の酸素需要を少なくすることにより発作を緩解させる。一方、冠攣縮性狭心症では、硝酸薬は攣縮をおこした冠動脈を直接的に拡張させ発作を寛解させる<sup>12</sup>。

硝酸薬耐性の問題は冠攣縮性狭心症の治療上、大変重要な問題である。

#### 5.4 本研究の目的

我々は本研究において冠攣縮性狭心症患者を対象に、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体遮断薬 (ARB) であるカンデサルタンの硝酸薬耐性発生に対する作用について検討し、さらに酸化ストレスのマーカーとして血漿チオレドキシシン濃度を測定し検討した。

## 6 実験方法

### 6.1 対象

当施設で冠攣縮性狭心症と診断した 64 名の患者(平均年齢 63.5±2.2 歳)を対象とした。対象者は心臓カテーテル検査でアセチルコリン冠動脈内注入により ST 変化を伴った冠攣縮が誘発<sup>14</sup>された症例であり、またニログリセリン投与によっても冠動脈の器質的病変を有しないことを条件とした。糖尿病、陳旧性心筋梗塞、心エコーや心臓カテーテル検査で低左心機能の症例は除外した。試験開始前には全対象者より承諾を得た。

### 6.2 研究デザイン

64 名の対象者を次のような 3 つの群に分け試験を行なった。23 名は経皮的ニログリセリン製剤(10mg/day、日本化薬、東京)貼付および ARB(カンデサルタン 8mg/day、武田薬品、大阪)を 3 日間投与し、これを GTN+ARB 群とした。他の 23 名には 3 日間の経皮的ニログリセリン製剤貼付および ARB のプラセボを投与し GTN 群とした。さらに 18 名にはプラセボの ARB 内服およびプラセボの皮膚テープを 3 日間貼付し Control 群とした。GTN+ARB 群のうち 2 名、また GTN 群のうち 4 名がニログリセリン貼付による頭痛のため試験を中止した。Control 群では脱落者はいなかったため、最終的に Control 群 18 名、GTN 群 19 名、GTN+ARB 群 21 名で試験を行なった。最終的な患者背景は表 1. に示した。

試験のプロトコールであるが、まず初日に次項で述べるような方法を用いて各被検者の上腕動脈の血管径を測定した(初日、6:30am)。また同時に脂質分画と血漿チオレドキシシン濃度を測定するための血液検査を行なった。それらの測定が終了した後(初日、7:00am)、経皮的ニログリセリン(またはプラセボ)およびカンデサルタン(またはプラセボ)の投与を開始した。経皮的ニログリセリンは初日、1 日目、2 日目に 1 日

2回(7:00am、7:00pm)1枚ずつ貼付し、最終的に3日目の5:30に抜去した。カンデサルタンは初日、1日目、2日目の朝(7:00am)に内服させた。3日目に上腕動脈の血管径を再計測し、同時に採血も行なった(6:30am)。3日目の上腕動脈血管径などの測定は血中に残存するニトログリセリンの影響を少なくするため、経皮的ニトログリセリンテープ抜去後1時間で測定した。試験プロトコールの概要は図1.に示した。

### 6.3 上腕動脈血管径の測定

血管超音波装置(SONOS 2500, Philips, Netherlands)を用いてニトログリセリン静脈内投与に対する上腕動脈血管径の変化率を測定した。静脈内投与するニトログリセリンは0.01, 0.1, and 1.0  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ と漸増投与した。またニトログリセリン静脈内投与による測定終了後5分でニトログリセリン(0.3mg)舌下投与を行ない、同様に血管拡張度を測定した。画像はすべてsuper-VHSビデオレコーダー(BR-S601M, 日本ビクター, 東京)に記録し解析を行なった。血管径は血管の内膜と外膜の間にある”m”lineを同定し、血管前壁と後壁の”m”line間の距離を測定した<sup>15</sup>。また心電図を同時記録し常に拡張末期で計測し、さらに各々の画像の中で得られる解剖学的な目印をもとに一定の部位で測定されるように工夫した。なお血管径は4心拍分測定しその平均値を用いた。以上の血管径測定的时间経過は図2.に示した。

### 6.4 血液採取と測定

血液検体は治療初日と3日目に採取した。空腹時の総コレステロールと中性脂肪は酵素法により、またHDLコレステロールは沈殿法(ヘパリン- $\text{Ca}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$  沈殿法)により測定した。また細胞の抗酸化活性の指標となる血漿チオレドキシニン濃度<sup>16</sup>をELISAキット(Redox Bioscience, Inc., Kyoto, Japan)を用いて測定した。このキットの検出限界は2.0ng/mlであり、測定内誤差と測定間誤差はそれぞれ0.81-3.74%および4.87-6.97%であった<sup>17</sup>。

## 6.5 統計解析

3群間のデータの比較には one-way analysis of variance (ANOVA)と Bonferroni 法による多重比較検定を行なった。喫煙者率の比較にはカイ二乗検定を用いた。また3群間の変化量の比較には repeated measures ANOVA および Scheffe 法による多重比較検定を用いた。さらに2群の平均値の比較には状況に応じて Student's paired *t*-test または unpaired *t*-test を行なった。また  $p < 0.05$  を統計学的に有意とした。



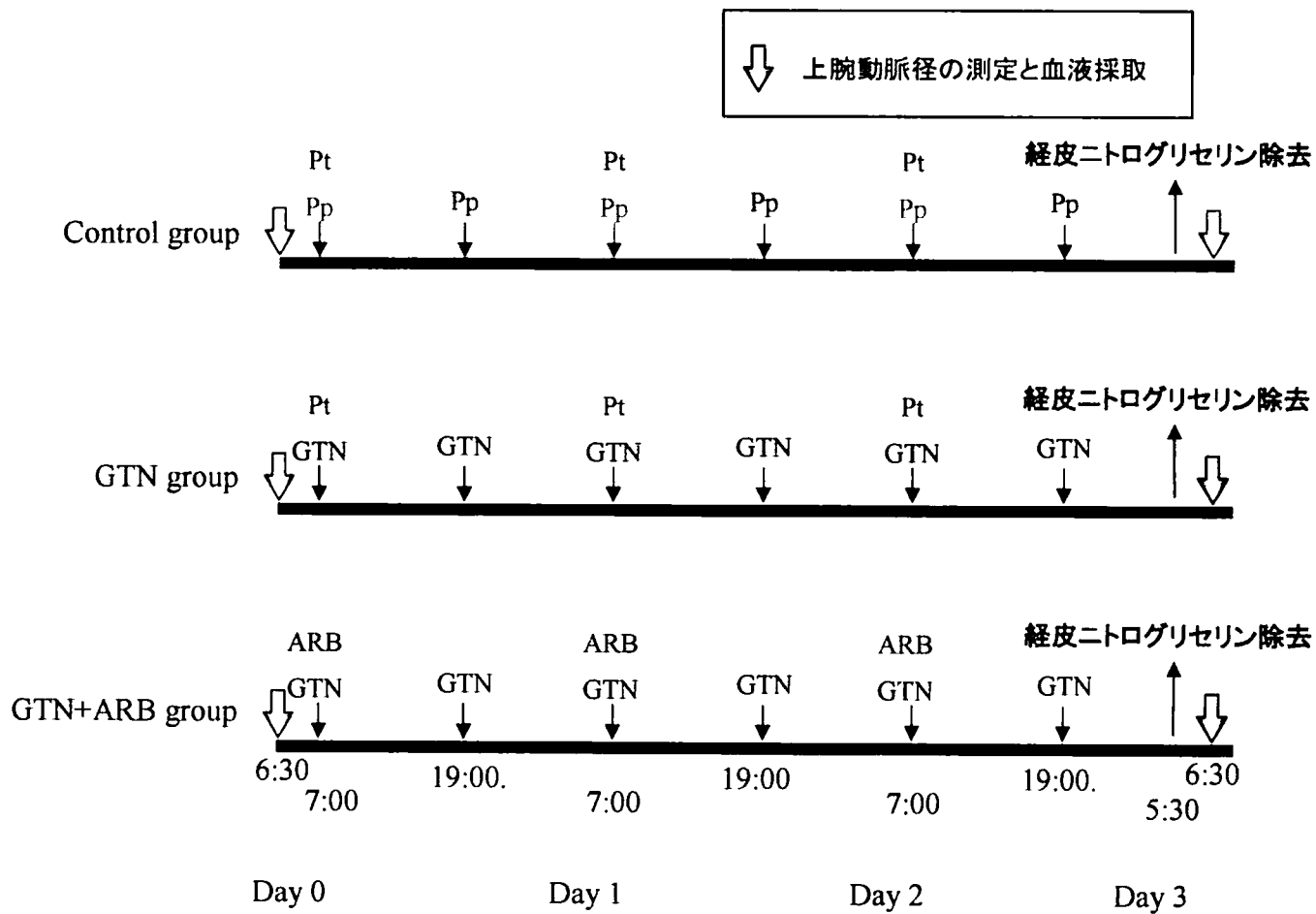


図 1: 試験プロトコールの概要

ARB: angiotensin II receptor blocker, GTN: nitroglycerin, Pp: placebo patch, Pt: placebo tablet



## 7 実験結果

- 7.1 3群間に年齢、肥満指数 (Body Mass Index: BMI)、脂質分画および喫煙者の割合の差はなかった(表 1)。またいずれの群においても3日間の経皮的ニトログリセリン(プラセボ)投与前後で血圧、脈拍数の有意な変化はなかった(表 2)。
- 7.2 試験初日、薬剤投与前の上腕動脈の血管径は3群間で有意差は認められなかった(Control 群:  $3.71 \pm 0.14$ 、GTN 群  $3.66 \pm 0.15$ 、GTN+ARB 群:  $3.66 \pm 0.11$ mm、 $p = \text{NS}$ , by ANOVA)。また3日間の経皮的ニトログリセリン投与後、薬剤負荷前の上腕動脈の血管径に有意な差は認められなかった(対照群:  $3.70 \pm 0.18$ 、GTN 群:  $3.86 \pm 0.15$ 、GTN+ARB 群:  $3.78 \pm 0.08$ mm、 $p = \text{NS}$ , by ANOVA)。
- 7.3 初日にニトログリセリンを漸増しながら静脈内投与したときの上腕動脈径の変化率は3群間で同等であった(Control 群:  $0.9 \pm 0.6$ ,  $9.3 \pm 1.2$ , and  $19.6 \pm 1.8\%$ ; GTN 群:  $1.3 \pm 1.0$ ,  $9.9 \pm 1.4$ , and  $18.6 \pm 1.6\%$ ; GTN+ARB 群:  $2.2 \pm 1.0$ ,  $9.0 \pm 0.8$ , and  $17.5 \pm 2.0\%$  at 0.01, 0.1, and 1.0  $\mu\text{g/Kg}$ ,  $p = \text{NS}$  by ANOVA) (図 3A)。しかし、経皮ニトログリセリン(プラセボ)投与3日目のGTN群の反応は他の2群と比較すると有意に低下していた(Control 群:  $2.4 \pm 0.7$ ,  $11.1 \pm 1.3$ , and  $19.7 \pm 1.1\%$ ; GTN 群:  $0.1 \pm 0.7$ ,  $4.6 \pm 1.1^{\dagger\ddagger}$ , and  $11.9 \pm 1.5\%^{\dagger\ddagger}$ ; GTN+ARB 群:  $1.9 \pm 0.8$ ,  $10.0 \pm 1.4$ , and  $19.2 \pm 1.9\%$  at 0.01, 0.1, and 1.0  $\mu\text{g/Kg}$ ,  $\dagger p < 0.01$  vs. Control,  $\ddagger p < 0.01$  vs. GTN+ARB by ANOVA) (図 3B)。
- 7.4 3日間の経皮的ニトログリセリン貼付の後、ニトログリセリン錠舌下投与に対する上腕動脈の反応もControl群やGTN+ARB群と比較してGTN群では有意に低下していた(Control 群:  $20.5 \pm 1.8$  (before) vs.  $21.0 \pm 2.1\%$  (after), GTN 群:  $22.0 \pm 2.0$  vs.  $17.7 \pm 2.7$ ,  $p < 0.05$ ; GTN+ARB 群:  $21.6 \pm 2.2$  vs.  $22.6 \pm 2.4\%$ ) (図 4)。
- 7.5 血漿チオレドキシシン濃度はGTN群において投与開始3日後に増加したが、Control群あるいはGTN+ARB群では変化しなかった(Control 群:  $32.2 \pm 5.4$  vs.

33.2 ± 6.3, GTN 群: 36.9 ± 7.8 vs. 59.2 ± 9.9†‡; GTN+ARB 群: 30.9 ± 3.9 vs. 26.6 ± 4.6 ng/ml, respectively, †p<0.01 vs. Control 群, ‡p<0.01 vs. GTN+ARB 群 by ANOVA) (图 5)。

表 1 対象者の背景

		Control群	GTN群	GTN+ARB群
人数		18	19	21
男性/女性		8/10	11/8	9/12
年齢	歳	62.3±2.8	61.3±2.4	66.5±1.6
Body mass index	kg/m <sup>2</sup>	23.2±0.8	23.8±0.9	22.8±0.8
総コレステロール	mg/dl	197.1±5.4	187.8±7.4	196.7±7.1
HDL-コレステロール	mg/dl	52.5±4.0	52.9±4.1	58.3±3.0
LDL-コレステロール	mg/dl	126.9±6.1	111.1±7.9	99.1±7.0
中性脂肪	mg/dl	123.6±20.4	110.3±7.1	122.3±6.4
喫煙		7 (39%)	6 (32%)	6 (29%)

ARB: angiotensin II type 1 receptor antagonist, GTN: nitroglycerin, HDL: high-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein.

数値は平均±標準誤差で示した。

Table 2 血行動態変化

		Control		GTN		GTN+ARB	
		初日	3日目	初日	3日目	初日	3日目
心拍数	bpm	67.3 ±2.5	66.2±2.2	64.7±2.3	65.6±1.8	69.4±2.3	69.1±2.6
収縮期血圧	mmHg	115.3±4.2	116.7±3.7	114.1±3.4	113.2±4.0	118.2±3.9	117.2±3.7
拡張期血圧	mmHg	70.4±2.2	68.2±3.0	71.3±1.8	71.9±3.2	69.2±1.8	66.9±1.4

ARB: angiotensin II type 1 receptor blocker, GTN: nitroglycerin.

数値は平均±標準誤差で示した。

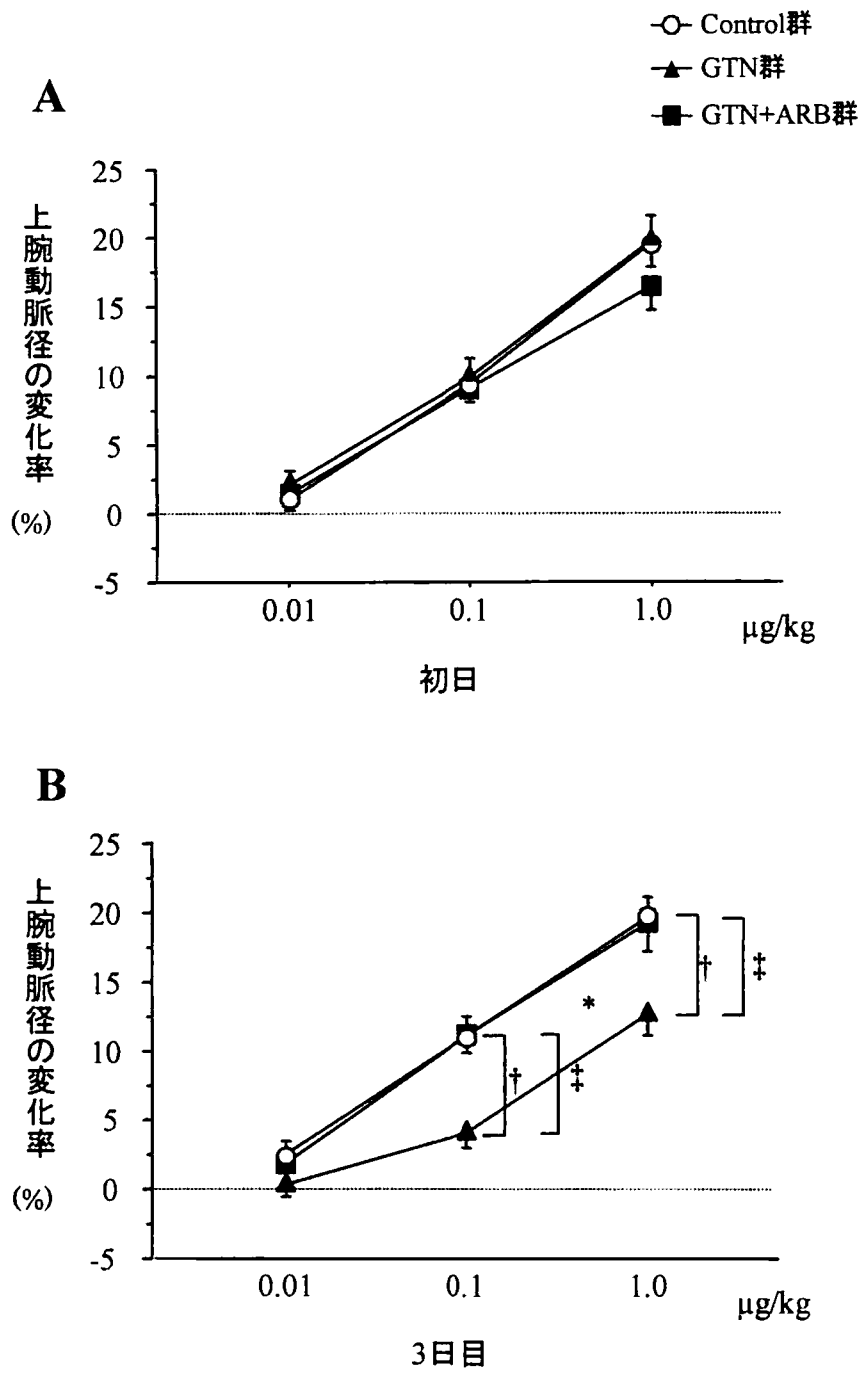


図 3： ニトログリセリン静脈内漸増投与に対する血管径の変化(初日；図3A、3日目；図3B)

†  $p < 0.01$  vs. Control group, ‡  $p < 0.01$  vs. GTN+ARB group, \*  $p < 0.01$  by ANOVA; GTN: nitroglycerin, ARB: angiotensin II receptor blocker

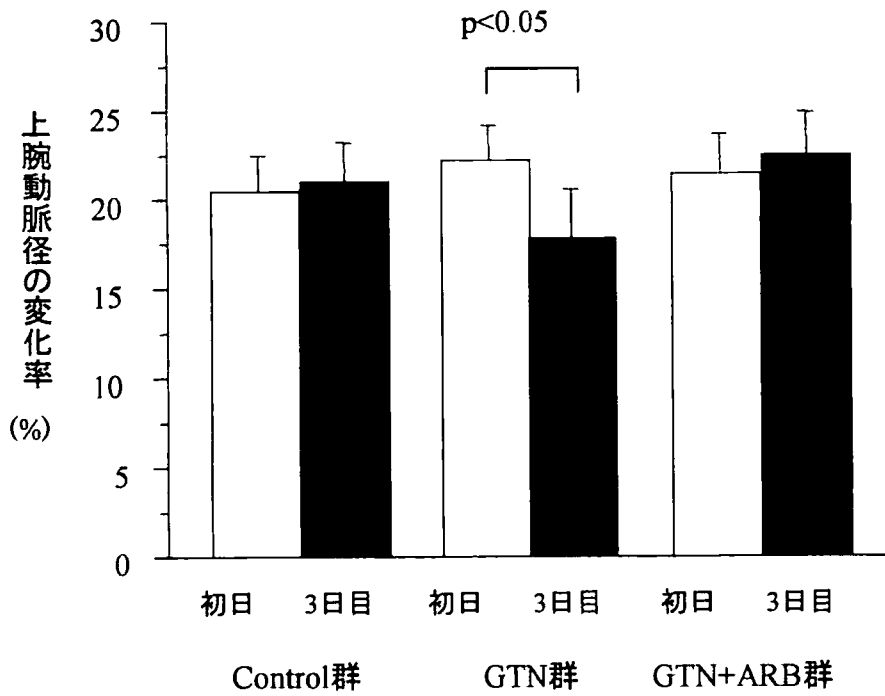


図 4： ニトログリセリン舌下投与に対する血管径の変化

GTN: nitroglycerin, ARB: angiotensin II receptor blocker



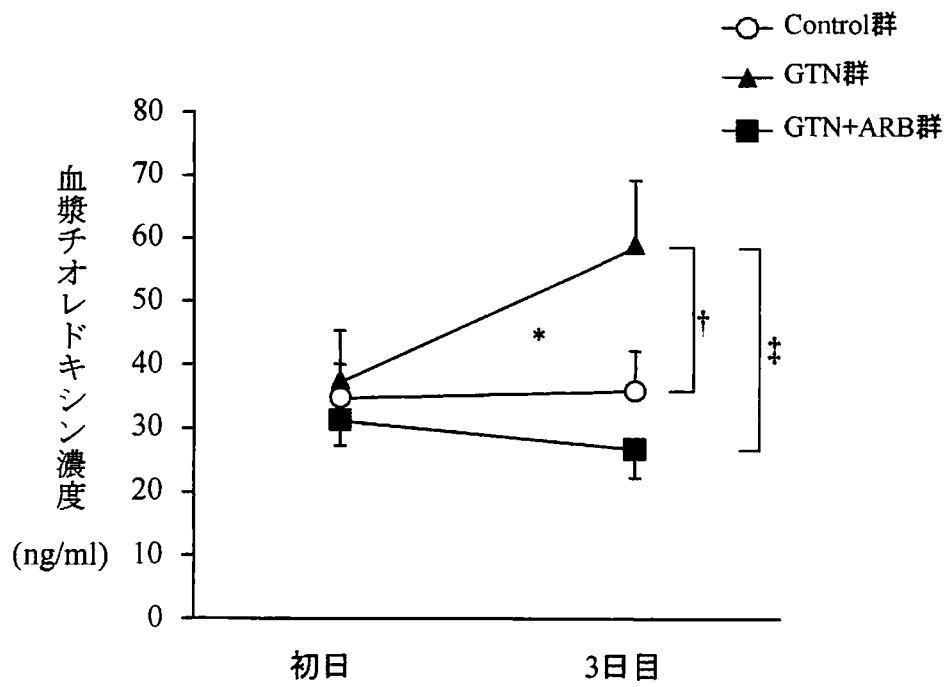


図5: 血漿チオレドキシンの変化

† p < 0.01 vs. Control group, ‡ p < 0.01 vs. GTN+ARB group, \* p < 0.05 by ANOVA; GTN: nitroglycerin, ARB: angiotensin II receptor blocker

## 8 考察

本研究では経皮的ニトログリセリン製剤を3日間貼付することにより、ニトログリセリンの静脈内投与および舌下投与に対する上腕動脈径の増加率がGTN群で低下し、また一方で血漿チオレドキシン濃度が上昇することが示された。Control群とGTN+ARB群では同様の変化は認められなかった。これらの結果は冠攣縮性狭心症患者の治療においてカンデサルタンをニトログリセリンと併用することによって、硝酸薬耐性の発生を抑制できるという可能性を示している。

硝酸薬耐性の現象は20世紀の初頭に初めて報告され、当時はニトログリセリンに対して血管組織が反応できなくなるためと考えられていた<sup>18</sup>。硝酸薬耐性の機序には様々なものが提唱されており、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬が硝酸薬耐性予防に効果的であるということは我々<sup>19</sup>だけでなく他の研究者<sup>10,11,20,21</sup>によっても多く報告されている。しかし、ACE阻害薬は硝酸薬の耐性に影響を与えないとする報告もある<sup>22,23</sup>。Parkerらも健常ボランティアにおいてロサルタンは硝酸薬耐性に何の影響も与えなかったと報告している<sup>24</sup>。本試験の所見はこれらのうつ血性心不全患者<sup>22,23</sup>、虚血性心疾患患者<sup>23</sup>および健常ボランティア<sup>24</sup>においてACE阻害薬と硝酸薬耐性を検討した否定的な試験とは矛盾するものである。しかし彼らは血行力学<sup>22,24</sup>あるいはプレチスモグラフィを用いた血管抵抗<sup>24</sup>に対する硝酸薬の作用を検討しているが、我々は冠攣縮性狭心症患者の上腕動脈径を直径計測することによって硝酸薬耐性に対するARBの作用を評価した。またJeserichらは24時間および48時間のニトログリセリン静脈内持続投与後にニトログリセリンを追加注入しても橈骨動脈の血管径は変化しないと報告しており、ニトログリセリンの48時間連続静脈内注入後に容量血管での硝酸薬耐性はないと結論づけた<sup>25</sup>。我々の所見とJeserichの結果の差は2つの因子が原因と考えられる。第一はニトログリセリン投与期間が我々のプロトコールの方が長かったことである。第二に彼らはニトログリセリン静脈内持続注入中にさらにニトログリセリンを追加注入しているのに対し、我々は硝酸薬投与を一旦中止した後に上腕動脈直径に対するニトログリセリンの作

用を観察している点である。Jeserichらは硝酸薬の投与中止後 35 分以内に動脈直径がベースライン値に復帰したと報告しており<sup>25</sup>、この所見は我々が動脈直径を測定したタイミングを支持するものと考えられる。

冠動脈の攣縮は異型狭心症だけでなく急性心筋梗塞や突然死を含む虚血性心疾患の病因においても重要な役割を果たしている<sup>12</sup>。冠攣縮性狭心症は心外膜側の冠動脈の攣縮によって誘発され<sup>12</sup>、我々は過去に冠攣縮性狭心症患者の冠動脈はニトログリセリンに対して過敏な拡張反応を有することを報告している<sup>26</sup>。本試験の方法は導管動脈に対する作用を直接測定できるため、冠攣縮性狭心症患者に適しているものと考えられる。

近年、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体の活性化が血管内皮の NADH/NADPH オキシダーゼを刺激し、活性酸素種を生成させることが明らかになった<sup>27</sup>。Munzel らは硝酸薬持続投与によるアンジオテンシン II タイプ 1 受容体の活性化促進が、内皮細胞と平滑筋細胞の双方において酸素ラジカルの生産を増加させることを報告した<sup>10,11</sup>。これらのラジカルは酸化窒素を不活性化し、cGMP 生産を低下させ、さらには硝酸薬耐性を引き起こすと考えられる。事実、ビタミン C やビタミン E などの抗酸化薬は硝酸薬持続投与時の硝酸薬耐性発生を防止すると報告されている<sup>28,29</sup>。また近年 ARB の抗酸化作用も認められるようになってきた<sup>30-33</sup>。ARB は酸化ストレスのマーカーであるチオバルピツール酸反応性物質を動物モデルで減少させ<sup>32</sup>、高コレステロール血症患者における 8-イソプロスタノール濃度を低下させた<sup>33</sup>。我々の得た結果はこれらの報告によって裏付けられるものと考えられる。

本試験で我々は酸化ストレスマーカーとして血漿チオレドキシンを測定した。チオレドキシンは活性部位に酸化還元活性ジチオール/ジスルフィドを有する小型蛋白質であり、蛋白質機能の酸化還元制御やチオールの酸化還元状態調節によるシグナル伝達に重要である<sup>34</sup>。チオレドキシンは酸化ストレスによって誘導され、酸化ストレスに対する防御、細胞成長の制御やアポトーシスの調節など多くの機能を有している<sup>34-36</sup>。過去の

研究ではチオレドキシンの血漿/血清濃度は、虚血性再灌流傷害<sup>16</sup>やウイルス感染<sup>37</sup>など酸化ストレスが関与する病態で上昇することが示されている。したがって、チオレドキシンの血漿/血清濃度は酸化ストレスに対する宿主反応の良好なマーカーであると考えられている。

#### 試験上の制約

我々は外因性のニトログリセリンに反応する上腕動脈径の変化率を測定したため、ベースラインでの直径が変化率に影響する可能性がある。3日目の測定ではベースラインでの径に対するニトログリセリン貼付剤の影響を最小限にするために、測定1時間前に貼付剤を剥がした。ニトログリセリンの血漿での半減期は約1~4分であるが<sup>10</sup>、生物活性のある二硝酸塩代謝物の半減期は約40分であるので<sup>10</sup>、1時間の休薬でも血管径に対する二硝酸塩の影響を完全には排除できていない可能性は否定できない。

カンデサルタンシレキセチルは消化管からの吸収時に活性化化合物のカンデサルタンへ急速かつ完全に加水分解される<sup>38</sup>。カンデサルタンシレキセチルの単回投与は高血圧患者への投与4時間後に動脈圧を低下させることが知られている<sup>39</sup>。カンデサルタンシレキセチル(8mg)をヒトボランティアに投与した後の最大血漿濃度に達する時間( $t_{max}$ )、血漿内半減期( $t_{1/2\beta}$ )および平均滞留時間はそれぞれ4.3~4.4時間、9.05~9.4時間および11.6時間であった<sup>40</sup>。我々の被験者で血行力学的変化が認められなかったのは、カンデサルタンの投与期間が短かったこと(3日間)、血圧がピーク値ではなくトラフ値であったことが原因であると考えられる(図1)。

今回の研究では3日間という比較的短い時間で耐性を誘導したが、硝酸薬耐性の短期機序と長期機序は異なっているかもしれない。Munzelらは耐性と偽耐性の発生についての経時変化を報告している<sup>11</sup>。彼らによると、偽耐性は硝酸薬投与開始直後に始まるが、真の耐性は少なくとも3日間の投与を必要とすると述べている。硝酸薬療法を行っている間の上腕動脈径とチオレドキシンの濃度の長期的な変動を評価するためには、さ

らに研究を進めなければならない。

また、冠攣縮性狭心症患者における硝酸薬耐性に対する ARB 療法の作用は、その他のタイプの冠動脈疾患患者と同じではない可能性もあり、アテローム硬化性疾患患者における硝酸薬耐性機序についてもさらに詳細に検討する必要がある。

## 9 結語

今回我々は ARB 投与が経皮的ニトログリセリン療法時の硝酸薬耐性の発生を抑制したことを報告した。この所見はアンジオテンシン II 活性化により誘発された酸化ストレスの増加が硝酸薬耐性の発生において重要な役割を担っていることを示唆している。

## 10 参考文献

1. Parker JD, Parker JO. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *N Engl J Med* 1998; 338: 520-31.
2. Elkayam U. Nitrates in the treatment of congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1996; 77: 41C-51C.
3. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-6.
4. Hill KE, Hunt RW Jr, Jones R, Hoover RL, Burk RF. Metabolism of nitroglycerin by smooth muscle cells. Involvement of glutathione and glutathione S-transferase. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43: 561-6.
5. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res.* 1989; 65: 1-21.
6. Servent D, Delaforge M, Ducrocq C, Mansuy D, Lenfant M. Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: involvement of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 163: 1210-6.
7. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1977; 3: 23-35.
8. Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 1991; 40: 923-31.
9. Glasser SP. Prospects for therapy of nitrate tolerance. *Lancet* 1999; 353: 1545-6.
10. Munzel T, Kurz S, Heitzer T, et al. New insights into mechanisms underlying nitrate

- tolerance. *Am J Cardiol* 1996; 77: 24C-30C.
11. Kurz S, Hink U, Nickenig G, et al. Evidence for a causal role of the rennin-angiotensin system in nitrate tolerance. *Circulation* 1999; 99: 3181-7
  12. Yasue H, Kugiyama K. Coronary spasm: clinical features and pathogenesis. *Intern Med.* 1997; 36: 760-5.
  13. Printzmetal M, Kennamer R, Merliss R, Wada T, Bor N. Angina pectoris. I. A variant form of angina pectoris; preliminary report. *Am J Med.* 1959; 27: 375-88.
  14. Okumura K, Yasue H, Horio Y, et al. Multivessel coronary spasm in patients with variant angina: a study with intracoronay injection of acetylcholine. *Circulation* 1988; 77: 535-42.
  15. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, et al. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986; 74: 1399-1406.
  16. Nakamura H, Vaage J, Valen G, et al. Measurements of plasma glutaredoxin and thioredoxin in healthy volunteers and during open-heart surgery. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1176-86.
  17. Kogaki H, Fujiwara Y, Yoshiki A, et al. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for adult T-cell leukemia-derived factor and normal value measurement. *J Clin Lab Anal* 1996; 10: 257-61.
  18. Crandall LA, Leake CD, Loevenhart AS, et al. Acquired tolerance to and cross-tolerance between the nitrous and nitric acid esters and sodium nitrite in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1931; 41: 103-19.
  19. Murohara T, Tayama S, Tabuchi T, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor alacepril in patients with stable effort angina during chronic isosorbide dinitrate treatment. *Am J Cardiol* 1996; 63: 1159-63.
  20. Watanabe H, Kakihana M, Ohtsuka S, et al. Preventive effects of angiotensin-converting



- enzyme inhibitors on nitrate tolerance during continuous transdermal application of nitroglycerin in patients with chronic heart failure. *Jpn Circ J.* 1998; 62: 353-8.
21. Elkayam U, Johnson JV, Shotan A, et al. Double-blind, placebo-controlled study to evaluate the effect of organic nitrates in patients with chronic heart failure treated with angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation.* 1999; 99: 2652-7.
  22. Dupuis J, Lalonde G, Bichet D, et al. Captopril does not prevent nitroglycerin tolerance in heart failure. *Can J Cardiol.* 1990; 6: 281-6.
  23. Dakak N, Makhoul N, Flugelman MY, et al. Failure of captopril to prevent nitrate tolerance in congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1990; 66: 608-13.
  24. Parker JD, Parker JO. Effect of therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor on hemodynamic and counterregulatory responses during continuous therapy with nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 21: 1445-53.
  25. Jeserich M, Munzel T, Pape L, et al. Absence of vascular tolerance in conductance vessels after 48 hours of intravenous nitroglycerin in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26 :50-6.
  26. Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, et al. Supersensitive dilator response to nitroglycerin but not to atrial natriuretic peptide in spastic coronary arteries in coronary spastic angina. *Am J Cardiol.* 1997; 79: 606-10.
  27. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-8.
  28. Bassenge E, Fink N, Skatchkov M, et al. Dietary supplement with vitamin C prevents nitrate tolerance. *J Clin Invest* 1998; 102: 67-71.
  29. Watanabe H, Kakihana M, Ohtsuka S, et al. Randomized, double-blind,

- placebo-controlled study of vitamin E supplementation on attenuation of development of nitrate tolerance. *Circulation* 1997; 96: 2545-50.
30. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996; 97: 1916-23.
31. Khaper N, Singal PK. Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI rats. *Am Coll Cardiol.* 2001; 37: 1461-6.
32. Padi SS, Chopra K. Selective angiotensin II type 1 receptor blockade ameliorates cyclosporine nephrotoxicity. *Pharmacol Res.* 2002; 45: 413-20.
33. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1208-12.
34. Arner ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6102-9.
35. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 351-69.
36. Shioji K, Kishimoto C, Nakamura H, et al. Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2002; 106: 1403-9.
37. Nakamura H, De Rosa S, Roederer M, et al. Elevation of plasma thioredoxin levels in HIV-infected individuals. *Int Immunol* 1996; 8: 603-11.
38. Hubner R, Hogemann AM, Sunzel M, et al. Pharmacokinetics of candesartan after single and repeated doses of candesartan cilexetil in young and elderly healthy volunteers. *J Hum Hypertens.* 1997; 11: S19-25.

39. Fridman K, Andersson OK, Wysocki M, et al. Acute effects of candesartan cilexetil (the new angiotensin II antagonist) on systemic and renal haemodynamics in hypertensive patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998; 54: 497-501.
40. McClellan KJ, Goa KL. Candesartan cilexetil. A review of its use in essential hypertension. *Drugs.* 1998; 56: 847-69.