

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	冠攣縮性狭心症の臨床経過と血管内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）遺伝子-786T/C多型
Author(s)	西嶋，方展
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11089">http://hdl.handle.net/2298/11089</a>
Right	

# 学位論文 Doctor's Thesis

冠攣縮性狭心症の臨床経過と血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)遺伝子-786T/C多型  
(The Clinical Course of Patients with Coronary Spasm and the Endothelial Nitric Oxide  
Synthase Gene -786T/C Polymorphism)

西嶋 方展  
Tsunenori Nishijima

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学

指導教員

小川 久雄 教授  
熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学

2008年3月

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

論文題名 : 冠攣縮性狭心症の臨床経過と血管内皮型一酸化窒素合成酵素  
(eNOS)遺伝子-786T/C多型  
(The Clinical Course of Patients with Coronary Spasm and the Endothelial Nitric Oxide  
Synthase Gene -786T/C Polymorphism)

著者名 : 西嶋 方展  
Tsunenori Nishijima

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学  
小 川 久 雄 教授

審査委員名 : 生体機能薬理学担当教授	光 山 勝 慶
心臓血管外科学担当教授	川 筋 道 雄
代謝内科学担当教授	荒 木 栄 一

2008年3月

## 目次

1.	要旨	4-5
2.	関連論文	6
3.	謝辞	7
4.	略語一覧	8
5.	研究の背景と目的	9-19
	5-1	冠攣縮
	5-2	冠攣縮の特徴
	5-3	冠攣縮とアセチルコリン
	5-4	冠攣縮と一酸化窒素(NO)
	5-5	冠攣縮と喫煙
	5-6	冠攣縮と酸化ストレス
	5-7	冠攣縮の遺伝的因子
	5-8	内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)とNO
	5-9	eNOS 遺伝子
	5-10	冠攣縮と eNOS 遺伝子多型
	5-11	eNOS 遺伝子と-786T/C 遺伝子多型
	5-12	-786T/C 遺伝子多型と RPA1
	5-13	冠攣縮の治療
	5-14	本研究の目的

## 6. 研究方法

20-21

- 6-1 対象
- 6-2 冠攣縮の誘発
- 6-3 eNOS 遺伝子-786T/C 多型のスクリーニング
- 6-4 統計学的解析

## 7. 研究結果

22-28

- 7-1 追跡期間
- 7-2 患者背景
- 7-3 対象患者の予後
- 7-4 冠動脈疾患による再入院と eNOS 遺伝子-786T/C 多型
- 7-5 冠攣縮の再発作による再入院
- 7-6 カルシウム拮抗薬と冠攣縮による再入院

## 8. 考察

29-32

## 9. 結語

33

## 10. 参考文献

34-39

## 1. 要 旨

(目的) 冠攣縮性狭心症患者の長期予後は一般に良好であり、カルシウム拮抗薬の内服でさらに改善されることが報告されている。一方、カルシウム拮抗薬を内服しているにも関わらず、狭心症発作で再入院する症例も少なくない。血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase) 遺伝子-786T/C 多型は eNOS 遺伝子の転写活性を低下させ、冠攣縮や心筋梗塞と関連していることが報告されている。一方、同多型と長期予後との関連は不明であり、本研究にて検討した。

(方法) 熊本大学医学部附属病院に 1984 年から 2000 年まで入院した器質的な有意狭窄を有さない冠攣縮性狭心症患者において、遺伝子解析についてのインフォームドコンセントを得た連続 201 例(男性 100 名、女性 101 名、平均年齢 61.9 歳)を対象とした。全例でアセチルコリンによる冠攣縮誘発試験を行った。硝酸薬投与後に器質的狭窄(冠動脈径 50%以上)を有した症例は除外した。「あらゆる原因による死亡」と「狭心症の再発作や急性心筋梗塞による再入院」をエンドポイントとして検討した。

(結果) 観察期間は平均  $76 \pm 60$  (1~252)ヶ月であった。全ての症例は遺伝子型によって、eNOS 遺伝子-786T/C 変異を有する群(-786C/T 型または-786C/C 型)と有さない群(-786T/T 型)の 2 群に分けられた。2 群間のフォローアップ期間に有意差は認められなかった。また、2 群間の冠動脈疾患危険因子にも有意差は認められなかった。201 例中 55 例は-786C アレル(C/T:50 例、C/C:5 例)を有していた。観察期間中、心臓死はなかったものの、23 名が再発作により再入院した。その 23 名中 12 名は-786C アレル(C/T:11 例、C/C:1 例)を有していた。統計解析の結果、-786T/C 変異を有すると薬剤抵抗性冠攣縮を呈し、再入院が増えることが示された( $p=0.006$ )。再入院群 23 例中 4 例(17 %)は発作の抑制の為に2種類のカルシウム拮抗薬を使用しており、非再入院群 176 例中 5 例(3%)に比べ有意に多かった( $p=0.0016$ )。2種類のカルシウム拮抗薬を使用している再入院群の 4 例の遺伝子型は全例-786T/C 変異を有しており、非再入院群の 5 例中 1 例(20%)に比し有意に多かった ( $p=0.0164$ )。

(考察) 多変量解析により-786C アレルは冠攣縮性狭心症患者の再入院の独立した危険因子であることが明らかとなった。-786T/C 多型が eNOS 遺伝子の発現を減弱させ、冠攣縮の再発の素因となる可能性が考えられた。カルシウム拮抗薬や硝酸薬が無効の治療抵抗性の冠攣縮性狭心症に対しては、angiotensin II type 1 receptor blocker (ARB)や angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE-I)、HMG-CoA 還元酵素阻害薬などの治療薬の選択枝の追加も検討する必要があると考えられる。

(結論) 冠攣縮性狭心症の予後はカルシウム拮抗薬の内服により比較的良好である。しかしながら-786T/C 変異を有すると薬剤抵抗性冠攣縮が多くなり、カルシウム拮抗薬だけでは十分に発作を抑制できない。このような症例には他の新しい治療法が必要であると考えられる。

## Summary

**[Background]** We previously found a -786T/C polymorphism in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene and reported that this polymorphism is strongly associated with coronary spasm. In this study, we examined whether the polymorphism is a prognostic marker in coronary spasm patients.

**[Method]** We examined the clinical courses of 201 consecutive patients with coronary spasm who were admitted to our institution: 146 patients with the -786T/T genotype; 50 patients with the -786C/T genotype; and, 5 patients with the -786C/C genotype. The mean follow-up period was  $76\pm60$  months. All the patients took calcium channel blockers (CCB) and/or nitrate during the follow-up period.

**[Results]** In this study, no patients died due to a cardiac event. 25 patients were readmitted due to cardiovascular disease. Out of these 25 patients, 23 patients were readmitted due to a reattack of coronary spasm. The -786C allele was significantly associated with readmission due to coronary spasm ( $p=0.0072$ , Odds ratio: 3.37 in the dominant effect). Kaplan-Meier Analysis revealed that the occurrence of readmission was significantly higher in the patients with the -786C allele than in the patients without the -786C allele ( $p=0.0079$ ). Further, multiple logistic regression analysis revealed that the -786T/C polymorphism was an independent predictor for readmission due to reattack of coronary spasm ( $p=0.006$ ; relative risk=3.590).

**[Conclusions]** The eNOS -786C allele is an independent risk factor for readmission due to a recurrent attack of coronary spasm in patients with coronary spasm, even if the patients have taken CCB and/or nitrate.

## 2. 参考論文

### ① 関連論文

- 1 Nishijima T, Nakayama M, Yoshimura M, Abe K, Yamamuro M, Suzuki S, Shono M, Sugiyama S, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H.  
The endothelial nitric oxide synthase gene -786T/C polymorphism is a predictive factor for reattacks of coronary spasm.  
*Pharmacogenet Genomics*. 17: 581-587, 2007.

### ② その他の論文

- 1 Nakayama M, Yoshimura M, Sakamoto T, Abe K, Yamamuro M, Shono M, Suzuki S, Nishijima T, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H.  
A -786T>C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene reduces serum nitrite/nitrate levels from the heart due to an intracoronary injection of acetylcholine.  
*Pharmacogenet Genomics*. 16:339-345, 2006.



### 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薬学研究部循環器病態学 小川久雄教授、泰江弘文前教授(現熊本加齢医学研究所所長)、京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学 中尾一和教授、奈良県立医科大学第一内科学 斎藤能彦教授、国立循環器病センター動脈硬化・代謝内科、宮本恵宏先生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頂きました国立療養所菊池恵風園 中山雅文先生、東京慈恵会医科大学循環器内科学 吉村道博教授をはじめ多くの先生方に深く感謝いたします。

#### 4. 略語一覽

- ACh: acetylcholine
- ACE-I: angiotensin converting enzyme inhibitor
- AP-1: activating protein-1
- AP-2: activating protein-2
- ARB: angiotensin II type 1 receptor blocker
- ASO: allele specific oligo hybridization
- AT1: angiotensin type 1
- BMI: body mass index
- cGMP: cyclic guanosine 5'-monophosphate
- EDRF: endothelial derived relaxing factor
- ERE: estrogen-response element
- eNOS: endothelial nitric oxide synthase
- GMSA: gel mobility shift assay
- GTP: guanosine 5'-triphosphate
- HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
- iNOS: inducible nitric oxide synthase
- L-NMMA: N<sup>G</sup>-monomethyl L-arginine
- LPC: lysophosphatidylcholine
- NF-1: nuclear factor-1
- NF-IL6: nuclear factor-interleukin 6
- NF-κB: nuclear factor-κB
- nNOS: neuronal nitric oxide synthase
- NO: nitric oxide
- NOS: nitric oxide synthase
- PCR: polymerase chain reaction
- PCR-SSCP: polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism
- PRD: positive regulatory domain
- RPA1: replication protein A1
- RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction
- SNP: single nucleotide polymorphism
- SSRE: shear stress responsive element
- VE: vitamin E

## 5. 研究の背景と目的

### 5-1 冠攣縮

冠動脈のトーンスは、血管弛緩因子と収縮因子のバランスにより保たれている。そのバランスが破綻して、収縮性が異常に亢進することにより、心筋虚血が起こる状態を冠攣縮と定義され、冠攣縮による心筋虚血により胸痛が出現する場合、冠攣縮性狭心症と診断される[1, 2]。冠攣縮が起こると、冠血流が低下し、心筋虚血がおこるだけでなく、血小板凝集が亢進し、血液の凝固を促進し、線溶能が低下し血栓が形成されやすくなる。そのため、冠攣縮は、狭心症だけでなく、冠動脈血栓が原因となる急性冠症候群(急性心筋梗塞、虚血性突然死、不安定狭心症)など虚血性心疾患全般の発症において、重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている[3, 4]。

### 5-2 冠攣縮の特徴

冠攣縮の発生には、日内変動が見られ、夜間から早朝にかけての安静時に生じやすい。発作の約三分の二は自覚症状のない、無症候性心筋虚血発作である。冠攣縮は、早朝には軽労作でも誘発されることがあるが、午後からは激しい運動によっても誘発されないのが普通である[4]。(図 1) また、冠攣縮による狭心症のうち、安静時に出現し、心電図上 ST 上昇を伴うものは異型狭

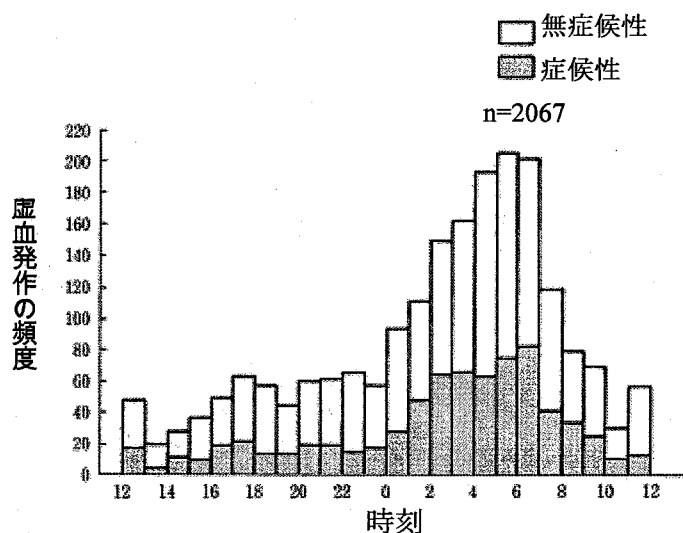


図 1(文献 2 から改変引用) が、時として重症化し、心筋梗塞、致死

性不整脈を誘発することがある。また、冠攣縮誘発検査として、アセチルコリンの冠動脈注が行われている

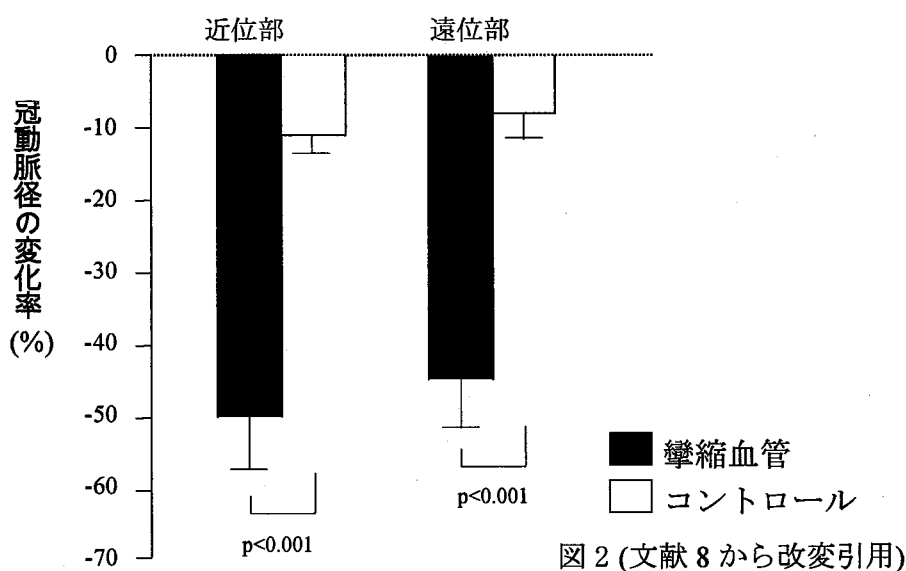
心症と呼ばれる[5]。心筋虚血の程度により、心電図上、ST 下降を伴うことも多く、同一の症例でも ST 上昇から下降への変化や労作による誘発が認められることもある[6]。また、精神的ストレス、アルコール過摂取時にも起きやすい。発作は、胸部圧迫感を始め背部痛や上腕、下顎の痛みとしてくることがある。殆どの場合、発作は、一過性である

### 5-3 冠攣縮とアセチルコリン

冠攣縮は、少量のアセチルコリン(50 $\mu$ g, 100  $\mu$ g)を冠動脈内に注入することにより、全身の血行動態に変動をきたすことなしに、高率に誘発される[7]。アセチルコリンに対する冠動脈の反応を正常者群と冠攣縮性狭心症群とで比較した結果、冠攣縮性狭心症の患者においては、冠動脈はアセチルコリンにより著明に収縮していることが示された(図2)[8]。

この反応は、アトロピンにより遮断されるので、アセチルコリンはムスカリン受容体を介して直接冠攣縮を誘発すると考えられる。アセチルコリンは血管内皮が正常であれば、血管を拡張させるが、内皮を剥離したり、あるいは内皮に障害があったりすると血管を収縮する。これは、血管の内皮が正常であればアセチルコリンによるムスカリン受容体の刺激により、内皮細胞から平滑筋を強力に弛緩する内皮由来血管弛緩因子(EDRF)、一酸化窒素(NO)が分泌されるためである[9]。

冠動脈径に対するアセチルコリン 50  $\mu$ g の投与の効果



### 5-4 冠攣縮と一酸化窒素(NO)

冠攣縮性狭心症患者の冠動脈は、アセチルコリン以外に、内皮依存性弛緩物質であるヒスタミンやセロトニン、エルゴノビンなどにより攣縮が誘発され硝酸薬の投与により著明に拡張する[10,11,12]。ニトログリセリンを含めた亜硝酸薬は生体内で NO に変換され、これが血管平滑筋の可溶性グアニル酸シクラーゼを刺激して cGMP を増加させて血管を拡張させる[13]。正常の血管内皮からは NO が生成放出されるので、冠攣縮をきたす動脈がニトログリセリンに対して過敏に反応するのは、これら動脈において内皮から NO の生成が低下しているためである可能性がある。NO は、NO 合成酵素(NOS)により、L-アルギニンが L-シトルリンに変換さえる際に産生されるが、この生成は L-NMMA によって阻害される[13]。冠攣縮患者の冠動脈における NO 産生が障害さ

れているかの検討では、コントロール例では、L-NMMA の注入により内径が収縮したのに対し、冠攣縮例では、内径の変化は認められなかった（図 3） [14]。

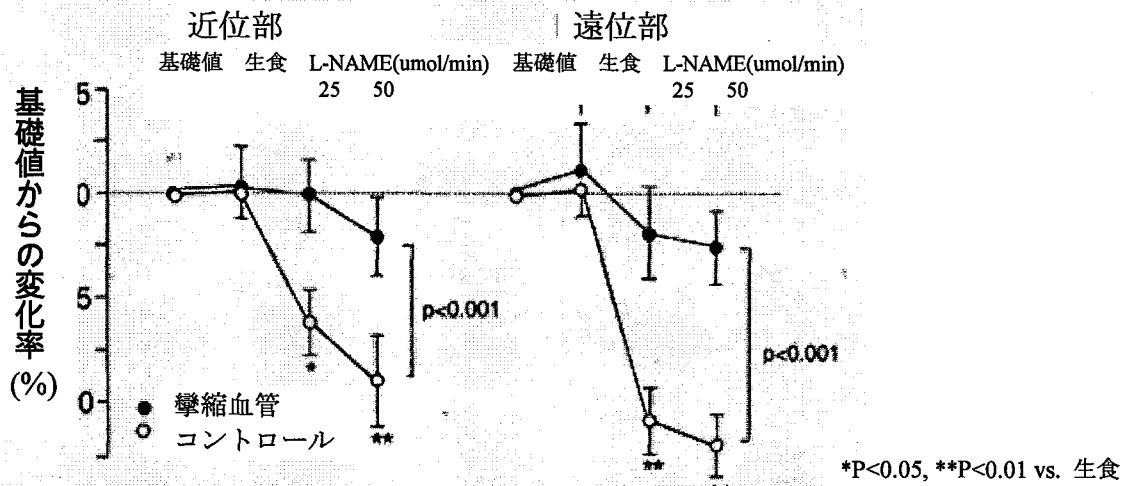


図3 (文献 14 より改変引用)

この結果から、健常人においては、冠動脈で産生・放出される NO は、血管収縮を抑制するが、冠攣縮症例の冠動脈においては基礎的な NO の産生・放出が不足し、血管の収縮性を高めていることが示された。冠攣縮を引き起こす冠動脈においてニトログリセリンによって著明に冠動脈が拡張する理由はここにあると思われる。また、アセチルコリンやセロトニン、エルゴノビン、およびヒスタミンなどの内皮依存性弛緩物質による冠攣縮が惹起されるのは、これらの物質による内皮からの NO の放出が障害されていることと関連があると考えられる。

## 5-5 冠攣縮と喫煙

喫煙が動脈硬化の危険因子であることがよく知られているが、動脈硬化に基づく器質性狭心症に比べても、冠攣縮性狭心症においては喫煙率が有意に高く、喫煙が冠攣縮ときわめて密接な関連を有する[15]。通常の冠動脈造影時に L-NMMA を喫煙者の冠動脈内に注入して、その前後で冠動脈内径の変化を計測した結果、喫煙者では L-NMMA の注入に対して内径の変化は認められず、さらに冠動脈のアセチルコリンによる収縮反応もほとんど影響を受けなかった(図 4) [8]。このことから、喫煙者では、冠攣縮と同様に冠動脈における basal およびアセチルコリン刺激の両条件下で NO の産生・放出が減少ないし欠如していることが明らかになった。従って、喫煙は内皮からの NO 産生・放出を障害することにより冠攣縮を来たしやすくすると考えられる。

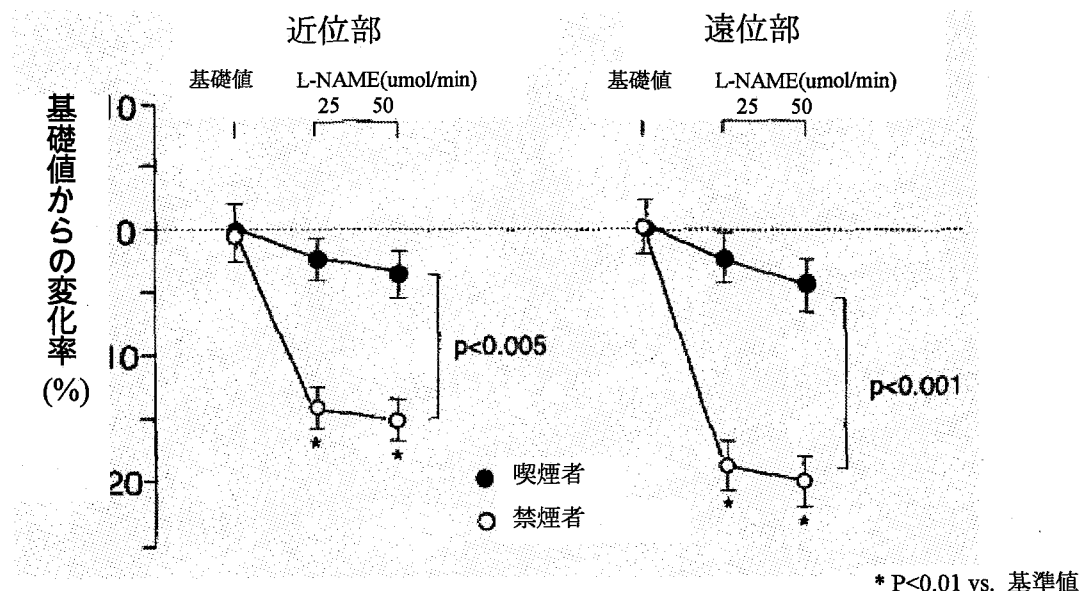


図 4 (文献 8 から改変引用)

## 5-6 冠攣縮と酸化ストレス

酸化ストレスは、生体において、酸化と抗酸化のバランスが崩れ、酸化に傾いた状態と定義される。スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素は、内皮を直接障害し、また内皮 NO を不活化することによって、血管内皮依存性拡張反応の低下を惹起させることが知られている。喫煙者または冠動脈硬化疾患を有する患者においては酸化ストレスが増加し、血管トーン亢進の原因の一つとなっている。抗酸化作用を有するビタミンCが、冠攣縮性狭心症患者において、アセチルコリンに対する冠動脈収縮反応の亢進を減弱させるという報告や[16]、ビタミンEが前腕動脈の内皮依存性血管拡張反応を改善させたとの報告もある[17]。(図 5) 冠攣縮性狭心症患者では、酸化ストレスのマーカーである血中チオレドキシン濃度が、コントロールに比べ、有意に上昇していることが報告されており、この結果は、冠攣縮の機序に酸化ストレスが関与し

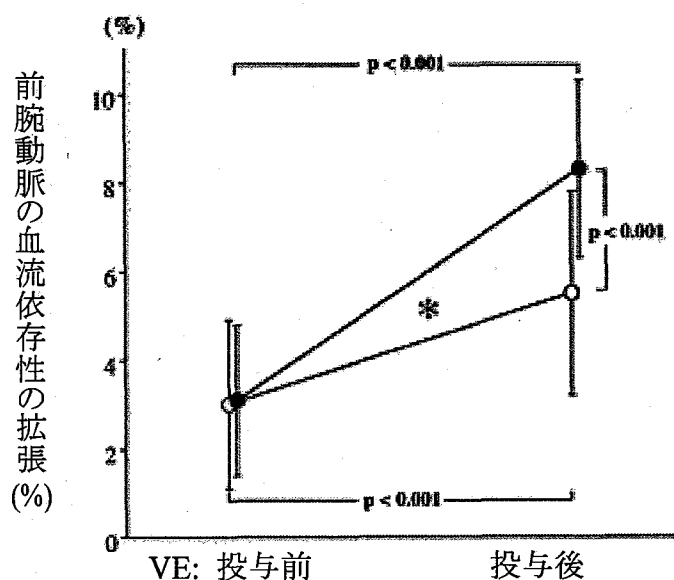


図 5 (文献 17 から改変引用)

## 5-7 冠攣縮の遺伝的因子

急性心筋梗塞亜急性期における冠攣縮誘発の割合は、欧米人と日本人とでは明らかな差があることが報告されており、日本人は欧米人の約3倍の陽性率であった[19]。(図6)また、泰江、小川らが中心となって行った厚生省班研究の結果では、わが国の多施設における連続した狭心症症例 2251 例のうち 921 例(40.9%)の高頻度で冠攣縮が認められた。このことから、遺伝的・人種的な要因が冠攣縮の発症機序にかかわっている可能性が示唆された。これまでの我々の研究により、冠攣縮性狭心症の発症には、血管内皮機能の低下が関与していることを明らかにしてきた。冠動脈からの NO の分泌が低下することが冠攣縮の大きな要因であることから、血管内皮にて NO を産生する eNOS 遺伝子と冠攣縮の関係について検討した。

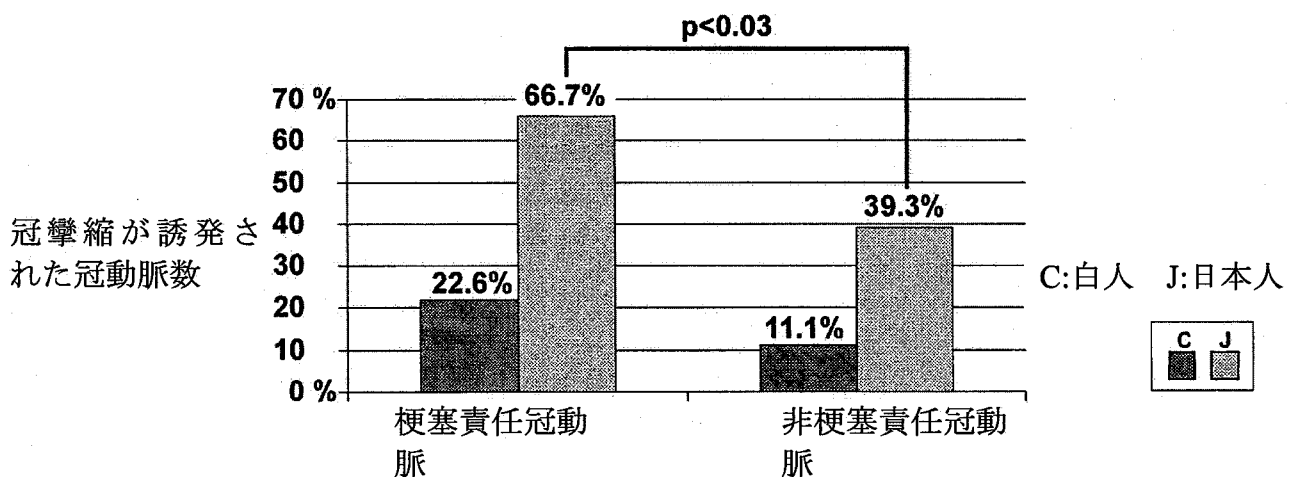


図 6 (文献 19 から改変引用)

## 5-8 内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)とNO

NO は、L-アルギニンから NOS によって生成されるが、NOS には、nNOS (neuronal NOS: NOS1)、iNOS (inducible NOS: NOS2)、eNOS (endothelial NOS: NOS3) の 3 種類が同定されている。その中で、eNOS は、ウシの大動脈内皮細胞で最初に同定された[20]。eNOS は、通常の条件下にて血管内皮細胞に存在するが、顆粒球、巨核球や血小板などの血球細胞、神経細胞などの内皮細胞以外のヒトの組織の様々な細胞でも発現している[21,22]。心血管系における eNOS の役割を調べるため、これまで eNOS ノックアウトマウスを使った様々な報告がある。eNOS ノックアウトマウスでは、高血圧や、内皮依存性の血管拡張反応の欠如、新生内膜の増殖などがみられる[23, 24]。さらに、ヘテロ型のノックアウトマウスでは、運動中の血管拡張反応が障害されるとの報告もある[25]。運動によって、eNOS の発現が亢進することが知られており、末梢動脈閉塞の患者では、14 日間の運動によって、内因性の NO 産生が増加する[26]。また、運動による eNOS の発現上昇は、ブタの冠動脈においては、小動脈や細動脈

、抵抗血管では認められるが、導血管では認められないという興味深い報告もある[27]。

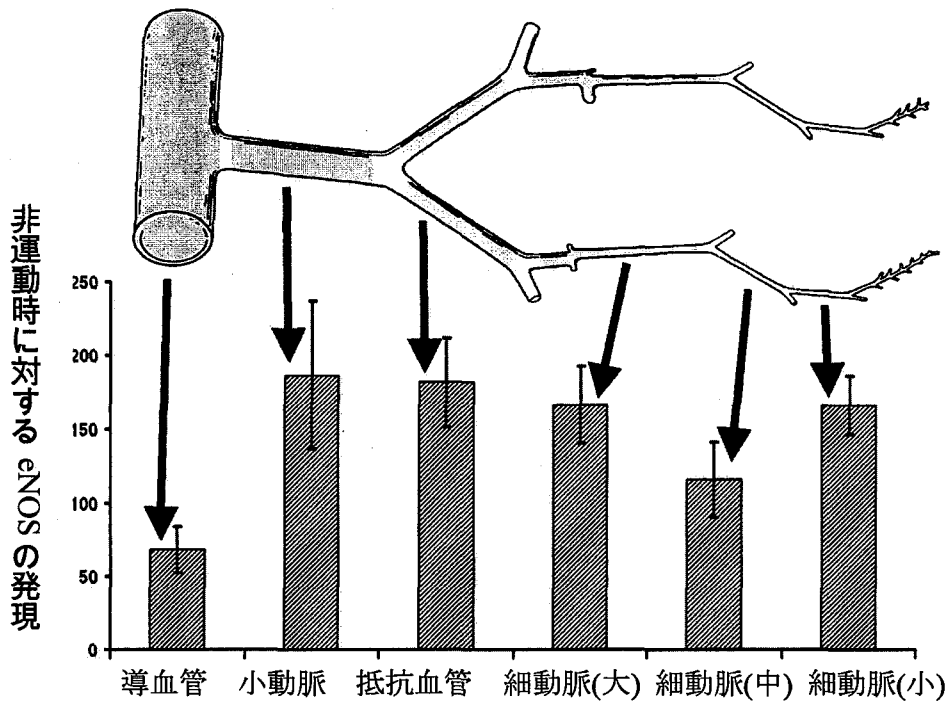


図 7(文献 27 から改変引用)

## 5-9 eNOS 遺伝子

1993 年に Marsden らによりヒト eNOS 遺伝子がクローニングされた[26]。ヒト eNOS 遺伝子は、染色体の 7q35-36 に存在し、26 エクソンからなる全長 21kb の遺伝子である。eNOS 遺伝子のプロモーター領域には、TATA box はなく、定常的に遺伝子発現を行わせる Sp1/GATA 配列が存在する[27]。AP-1, AP-2, NF-1, NF-IL6, NF- $\kappa$ B, p53 のような転写因子が結合する部位も、プロモーター領域には多く存在している[28, 29] (図 8)。また、ずり応力 (shear stress) の応答配列である Shear Stress Responsive Element (SSRE)があり、ずり応力に対して転写レベルで調節を受けいていると考えられ、さらに estrogen-response element (ERE)も存在していることから、エストロゲンによる調節も受けいていると考えられている[31]。

転写因子の結合による機能解析について、Sp1 結合部位の変異により、eNOS のプロモーター活性が約 85%低下する[30]。また、エストロゲンや LPC(Lysophosphatidylcholine)により Sp1 の結合活性が上昇する[31]。一方、GATA の結合部位の欠失は、eNOS のプロモーター活性の完全な停止が認められている[32]。また、糖質ステロイドは eNOS の GATA の結合活性を低下させ、プロモーター活性を約 30%低下させる[33]。Positive regulatory domain(PRD I、II)はプロモーター領域の近位部にあり、YY1 や Sp1/Sp3 の variants に結合し、プロモーター活性を亢進させる[34]。



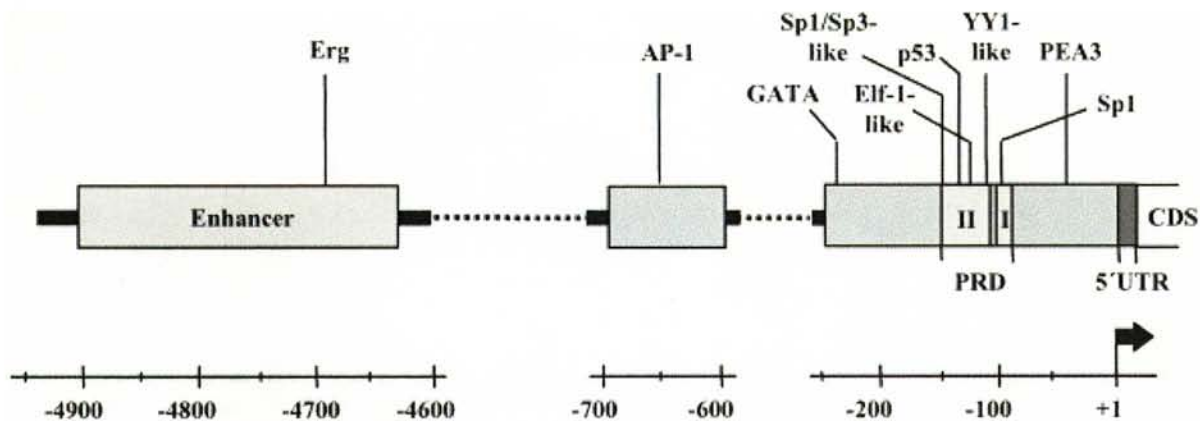


図 8 (文献 28 から引用)

## 5-10 冠攣縮と eNOS 遺伝子多型

我々は、冠攣縮症例において eNOS 遺伝子多型を検索した結果、eNOS 遺伝子のエクソン 7 に存在する Glu298Asp の変異と、5' 転写調節領域に存在する T-786C、A-922G、T-1468A の点変異を見出した。

まず、我々は、PCR-SSCP 法およびダイレクトシーケンシング法を用いて、eNOS 遺伝子のエクソン 7 において 298 番目のアミノ酸であるグルタミン酸がアスパラギン酸に変わるミスセンス変異 (Glu298Asp) を発見し (図 9)、Glu298Asp 変異の頻度は、冠攣縮の患者で有意に高頻度であることを報告した (表 1) [35]。この Glu298Asp 変異に関しては、その後、本態性高血圧症[36]ならびに心筋梗塞[37]とも関連していることがわかった。

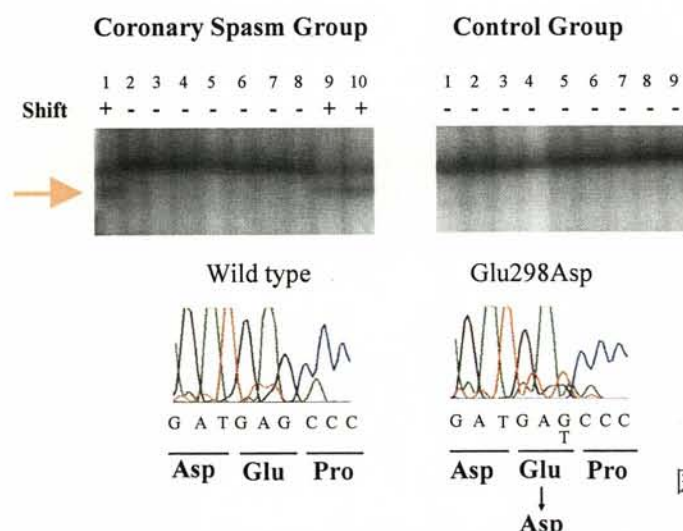


図 9 (文献 35 から改変引用)

	Control (n=100)	Coronary spasm (n=113)	Odds ratio (95% CI)	P value
eNOS/TT (Glu298Asp homozygote)	0/100 (0%)	1/113 (0.9%)	—	—
eNOS/TG (Glu298Asp heterozygote)	9/100 (9%)	23/113 (20.3%)	—	—
eNOS/GG (wild type)	91/100 (91.0%)	89/113 (78.8%)	—	—
T allele vs G allele	—	—	2.47 (0.87–6.99)	0.071
TT and TG vs GG <sup>a</sup>	—	—	2.73 (1.23–6.07)	0.014

表 1 (文献 35 から引用)

次に、eNOS 遺伝子の 5'転写調節領域で、転写開始点より上流 1468、922、786 塩基対に完全に連鎖し同一アレル上に存在する 3 ヶ所の SNPs (-786T/C、-922A/G、-1468T/A) があることを発見し (図 10)、この変異が、冠攣縮性狭心症患者群に有意に多く認めることを示した (表 2) [38]。また、この変異は、冠攣縮だけでなく冠動脈に有意狭窄のない心筋梗塞症例の 50%に認められた[39]。

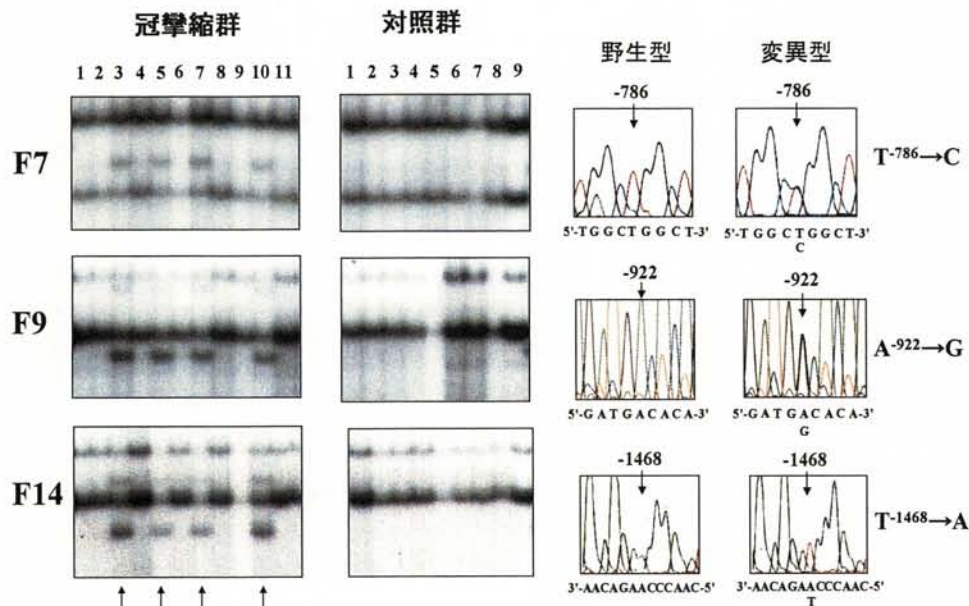


図 10 (文献 38 から改変引用)

### 冠攣縮群および対照群におけるeNOS遺伝子変異 (T-786→C, A-922→G, T-1468→A)の頻度

	対照群 (n=161)	冠攣縮群 (n=174)	Odds ratio (95% CI)	p value
eNOS mutant allele / T-786→C, A-922→G, and T-1468→A				
Abnormal homozygote	0/161 (0%)	3/174 (2%)	—	—
Heterozygote	11/161 (7%)	48/174 (28%)	—	—
Normal homozygote	150/161 (93%)	123/174 (70%)	—	—
Additive effect	—	—	5.19 (1.85-17.60)	<0.0001
Dominant effect	—	—	5.65 (2.82-14.66)	<0.0001
Recessive effect	—	—	infinite	0.1798

表 2 (文献 38 から改変引用)

また、我々はこの変異を有している症例では、アセチルコリンの冠動脈内注入により NO 産生が著明に低下していることを明らかにした[40]。

### 5-11 eNOS 遺伝子と-786T/C 遺伝子多型

5'転写調節領域に存在した 3ヶ所の SNPs に関しては、さらに、この変異が eNOS にどのような機能異常をもたらすかについて検討するために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを用いて eNOS 遺伝子の転写活性の解析を行った結果、3つの変異のうち、-786T/C 変異のみが、有意に eNOS 遺伝子の転写活性を低下させることが明らかとなった（図 11）[38]。

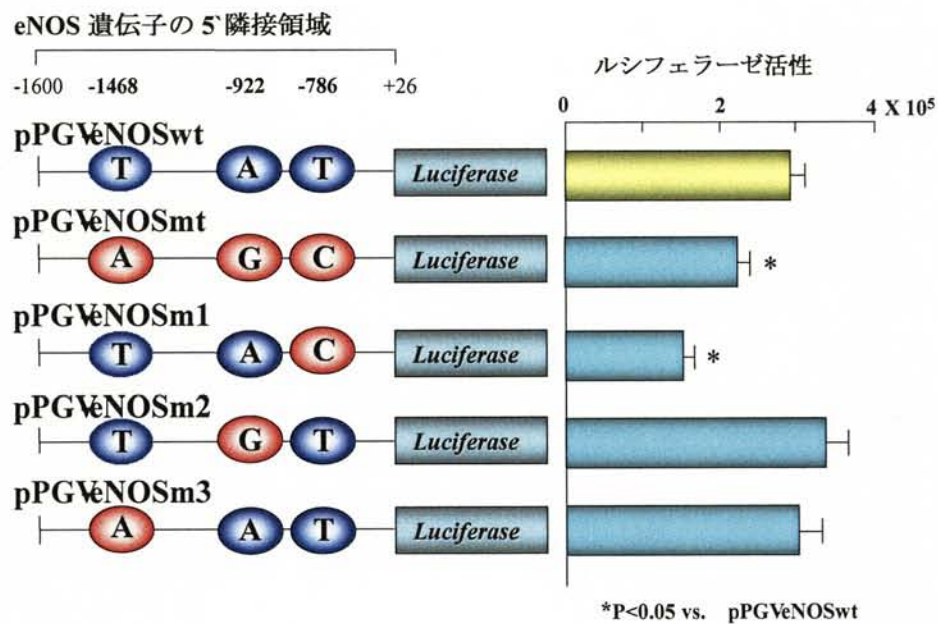


図 11(文献 38 から改変引用)



## 5-12 -786T/C 遺伝子多型と RPA1

我々は、-786T/C 変異周囲の 11 塩基対を欠如したコンストラクトを用いて、eNOS 遺伝子の転写活性を検討したところ、野生型の活性へ戻ることを明らかにした（図 12）[41]。

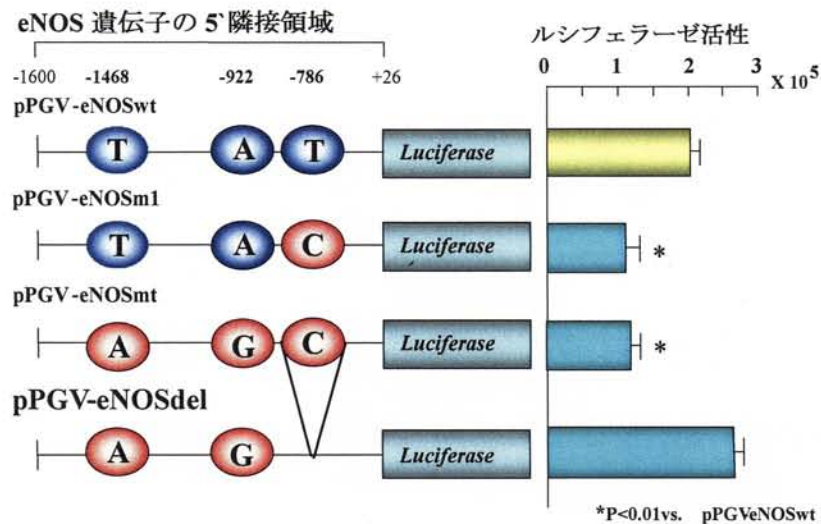


図 12（文献 41 から改変引用）

このことから、T-786C 変異を有する配列になんらかの repressor として働く転写因子が結合し、それが eNOS の転写活性を抑制することが考えられた。核蛋白質を抽出し、gel mobility shift assay (GMSA)を行ったところ、-786C プローブにのみ、シフトバンドを認め、-786C を有する配列に何らかの転写因子が存在することが示された。このシフトバンドを形成する蛋白を精製し、アミノ酸配列をスクリーニングした結果、T-786C に結合する転写因子が Replication Protein A1 (RPA1) であることが判明した[41]。また、RPA1 の存在下で、eNOS の mRNA の発現、及び血清中の硝酸/亜硝酸が、-786T/C 変異群でコントロールに比べ有意に低下していることも確認された[41](図 13)。RPA1 は、3 量体(70kDa, 32kDa, 14kDa)である Replication Protein A (RPA) の中の 70kDa のサブユニットにあたり、一般的に一本鎖 DNA と結合し作用する蛋白である[42]。RPA は、酵母 DNA では、一本鎖 DNA を認識することにより DNA の複製、修復、組み換えに働き、抑制因子として働くことが示されている[43]が、ヒトにおいて初めて、2 本鎖 DNA と結合し repressor として機能することが示された。この結果、この RPA1 が、変異した塩基 (-786C) に結合しやすく、eNOS 遺伝子の転写活性を抑制することで、NO 産生を低下させることで、虚血性心疾患と関連することが判明した。

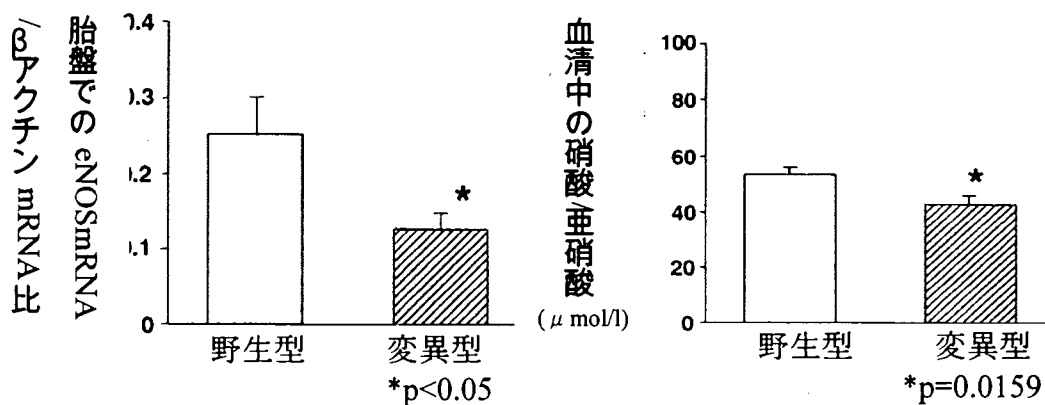


図 13 (文献 41 から改変引用)

### 5-13 冠攣縮の治療

冠攣縮の治療として、Ca 拮抗薬は、平滑筋の過収縮を予防する目的で、従来から使用されている。また、内皮機能障害による NO の産生、放出の低下を補うものとして、硝酸薬も使用されている。Ca 拮抗薬は Ca チャネルに作用し、Ca<sup>2+</sup>の細胞内への流入を阻害する。Ca チャネルをブロックすることで、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度は減少し、ミオシン軽鎖キナーゼの活性を抑制することで、血管平滑筋を弛緩させ冠攣縮を予防する。Ca 拮抗薬の内服は冠攣縮の予防に有効であり、特に多枝攣縮の症例において突然死を予防し予後を改善する [44]。一方、硝酸薬は生体内で NO に変換され、血管平滑筋に移動し、グアニル酸シクラーゼを活性化させ、ミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化を抑制することで、血管平滑筋を弛緩させ冠攣縮を予防する。

### 5-14 本研究の目的

冠攣縮の予防のため、Ca 拮抗薬や、硝酸薬は有用であり、多くの症例で使用されている。しかし、これらの内服を継続しているにも関わらず、発作を繰り返し入院する症例が少なからず認められる。本研究では、これらの治療抵抗性の冠攣縮の要因について調べるため、eNOS 遺伝子 -786T/C 多型の有無によって、冠攣縮性狭心症の予後、再入院率の違いについて検討した。

## 6. 方法

### 6-1 対象

対象は、1984 年 7 月から 2000 年 7 月まで熊本大学医学部附属病院に入院した冠攣縮性狭心症で、ゲノム DNA の取得について、インフォームドコンセントを得た 201 名の連続症例である(男性 100 名、女性 101 名、平均年齢 61.9 歳)。これらすべての症例で、アセチルコリン(ACh)の冠動脈内注入によって冠攣縮が誘発された。冠攣縮は、虚血性の心電図変化や胸痛と関連した虚血を伴う冠動脈の強い収縮と定義された。冠動脈にニトログリセリン投与の後、少なくとも 1 つの冠動脈に 50%以上の器質性狭窄が認められる器質性狭窄患者は除外された。また、内服を休薬している患者は、除外された。対象患者は、eNOS 遺伝子の遺伝子型により 2 つの群に分けられた。146 名の-786T/T の遺伝子型(74 人の男性と 72 人の女性(平均年齢 61.7 歳[25 歳~81 歳]))から構成される-786T 群、55 名の-786C/T 及び C/C の遺伝子型(28 名の男性と 27 名の女性(平均年齢 62.2 歳[40 歳~77 歳]))から構成される-786C 群に分けられた。-786C グループは、50 名の-786C/T の遺伝子型と 5 名の-786C/C 遺伝子型から構成される。我々は以下の 2 つのイベントすなわち、①すべての原因による死亡、②冠攣縮性狭心症の再発作、器質性狭窄による狭心症または急性心筋梗塞のための再入院について調べた。

### 6-2 冠攣縮の誘発

冠攣縮の誘発に影響を与えない目的で、被験者が内服していたすべての薬物は、心臓カテーテル検査の前に少なくとも 48 時間中止した。被験者が空腹時、冠動脈造影は、冠攣縮が誘発されやすい午前中に施行された。左右の冠動脈の造影の後、以前報告されたように、ACh の冠動脈内投与が施行された[45-48]。左冠動脈内には 50  $\mu$ g と 100  $\mu$ g の ACh が、4 分間隔で投与された。血管造影は、ACh の投与後、30 秒以内に施行された。次に、50  $\mu$ g の ACh が右冠動脈に投与された後、血管造影が施行された。最後に、1mg の硝酸イソソルビドの冠動脈内投与の後、左右の冠動脈造影を行い、器質性狭窄の程度を評価した。

### 6-3 eNOS 遺伝子-786T/C 多型のスクリーニング

eNOS 遺伝子-786T/C 多型のスクリーニングのため、我々は ASO(Allele Specific Oligo hybridization) 法で、遺伝子型を同定した。この方法は、<sup>32</sup>P 放射性同位元素で標識されたオリゴヌクレオチドを-786T アレルまたは-786C アレルに対するプローブとして、ハイブリダイゼー

ションを行うものであり以前、報告されている[38]。-786T/C 多型部位を含む 236 塩基の PCR 断片は、ナイロン膜の上へブロットされハイブリダイゼーションされた。-786T アレルに対するプローブの塩基配列は 5'-GGG TCA GCC AGC CAG GGAA-3、-786C アレルに対するプローブの塩基配列は 5'-GGG TCA GCCGGC CAG GGA A-3 であった。

#### 6-4 統計学的解析

結果は、平均値±標準誤差にて表記した。統計学的解析は、 $\chi^2$  検定を行い、p 値 0.05 未満を有意と判断した。冠攣縮の独立した予測因子を決定するための Wald 法多重ロジステック回帰分析は、統計ソフト SPSS(14.0J)を用いて行った。独立変数を以下のダミー変数としてコード化した。eNOS 遺伝子-786T/T 遺伝子型: 0、-786C/T または-786C/C 遺伝子型: 1; 性別、女性: 0、男性: 1; 年齢、55 歳未満: 0、55 歳以上: 1、BMI、25kg/m<sup>2</sup> 未満: 0、BMI 25 kg/m<sup>2</sup> 以上: 1、血清コレステロール値 220mg/dl 未満: 0、220 mg/dL 以上: 1、非喫煙: 0、喫煙者: 1、正常血圧: 0、高血圧: 1、非糖尿病: 0、糖尿病: 1。Kaplan-Meier 生存曲線による Log-Rank test は、被験者の予後と再入院率を比較するため使用された。

## 結果

### 7-1 追跡期間

この研究の対象患者は、2005 年 12 月 1 日現在までの予後、再入院について追跡調査された。全ての対象患者の平均追跡調査期間は、 $76 \pm 60$  カ月 (1~252 カ月) であった。また -786T 群と -786C 群の平均追跡調査期間はそれぞれ  $74 \pm 56$  カ月 (1~252 カ月)、 $81 \pm 68$  カ月 (1~235 カ月) と、両群間で、有意な差は認められなかった。

### 7-2 患者背景

本研究での対象患者の年齢、性別などの患者背景および高血圧や糖尿病、喫煙歴などの冠危険因子について、-786T、-786C 群の間で有意差は認められなかった(表 1)。Ca 拮抗薬、硝酸薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE-I) または抗血小板薬などの治療薬についても両群間で有意差は認められなかった。

表1. 本研究における患者背景

	-786T 群 (n=146)	-786C 群 (n=55)	P 値
年齢	62±11	62±10	N.S.
男性/女性	72/74	28/27	N.S.
高血圧	44/146(30%)	15/55(27%)	N.S.
喫煙	78/146(53%)	33/55(60%)	N.S.
糖尿病	28/146(19%)	11/55(20%)	N.S.
高脂血症	41/146(28%)	13/55(24%)	N.S.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23±3	23±3	N.S.
治療薬			
Ca拮抗薬	137/146(94%)	52/55(95%)	N.S.
硝酸薬	20/146(14%)	4/55(7%)	N.S.
ACE-I	12/146(8%)	7/55(13%)	N.S.
抗血小板薬	16/146(11%)	6/55(11%)	N.S.
HMG-CoA 還元酵素阻害薬	18/146(12%)	2/55(4%)	N.S.

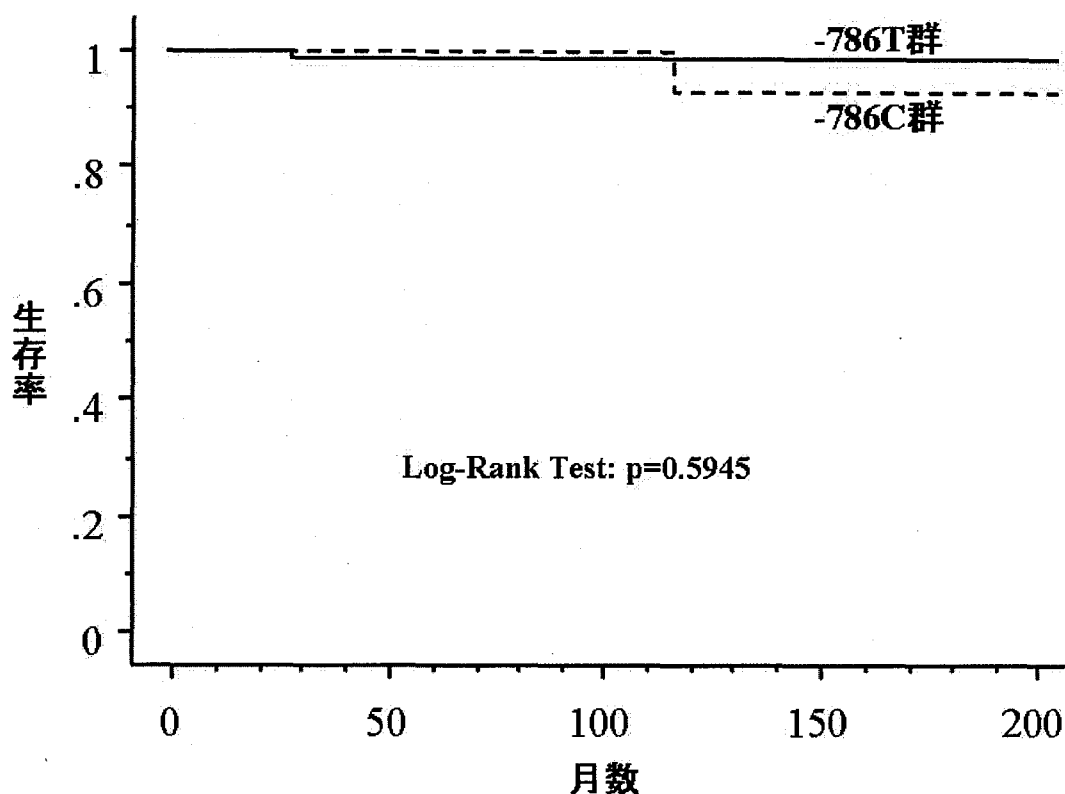
数字は患者数と平均±標準偏差を示す。 N.S.: not significant

### 7-3 対象患者の予後

本研究の追跡調査期間の終了時までには、192 名は生存していた。一方、9 名(3 名は肺癌、膵臓癌 1 名、脳腫瘍 1 名、胸部大動脈瘤 1 名、脳卒中 1 名、呼吸不全 2 名)は死亡していた。カプラン-マイヤー曲線による生存分析では、-786T、-786C 群間で死亡率に関して有意差は認められなかった(Log-Rank Test:  $p=0.5945$ ) (図 1)。



図1



#### 7-4 冠動脈疾患による再入院と eNOS 遺伝子-786T/C 多型

25 名の患者は、冠動脈疾患の再発により再入院した。これらの 25 名の患者のうち、23 名の患者は、冠攣縮の再発作による再入院であった。この 23 名中、1 名は、器質性狭窄を伴わない急性心筋梗塞による再入院であり、eNOS 遺伝子の遺伝子型は-786C/C であった。一方、冠動脈の器質的狭窄の進行のために再入院した 2 名の eNOS 遺伝子の遺伝子型は、両者とも-786T/T であった。-786C 群の冠動脈疾患による再入院率は 21.8%(12/55)と、-786T 群の 8.9%(13/146)よりも有意に高値であった ( $p=0.0134$ ) [表2]。さらに、冠攣縮の再発作による再入院率は、-786C 群で 21.8%(12/55)と、-786T 群の 7.5%(11/146)より有意に高値であった ( $P=0.0046$ )。

カプラン-マイヤー曲線による生存分析では、冠動脈疾患による再入院の発生率は、-786T 群が -786C 群よりも低値であった ( $p=0.0079$ ) (図 2)。さらに、冠攣縮による再入院の発生率は、-786T 群が -786C 群よりも低値であった ( $p=0.0032$ ) (図 3)。

表2. 冠動脈疾患による再入院率

	-786T 群 (n=146)	-786C 群 (n=55)	P 値
冠攣縮による再発作	11/146(7.5%)	12/55(21.8%)	0.0046
冠動脈狭窄の進行による再発作	2/146(1.4%)	0/55(0%)	0.3830
計	13/146(8.9%)	12/55(21.8%)	0.0134

数字は患者数を示す。

図2

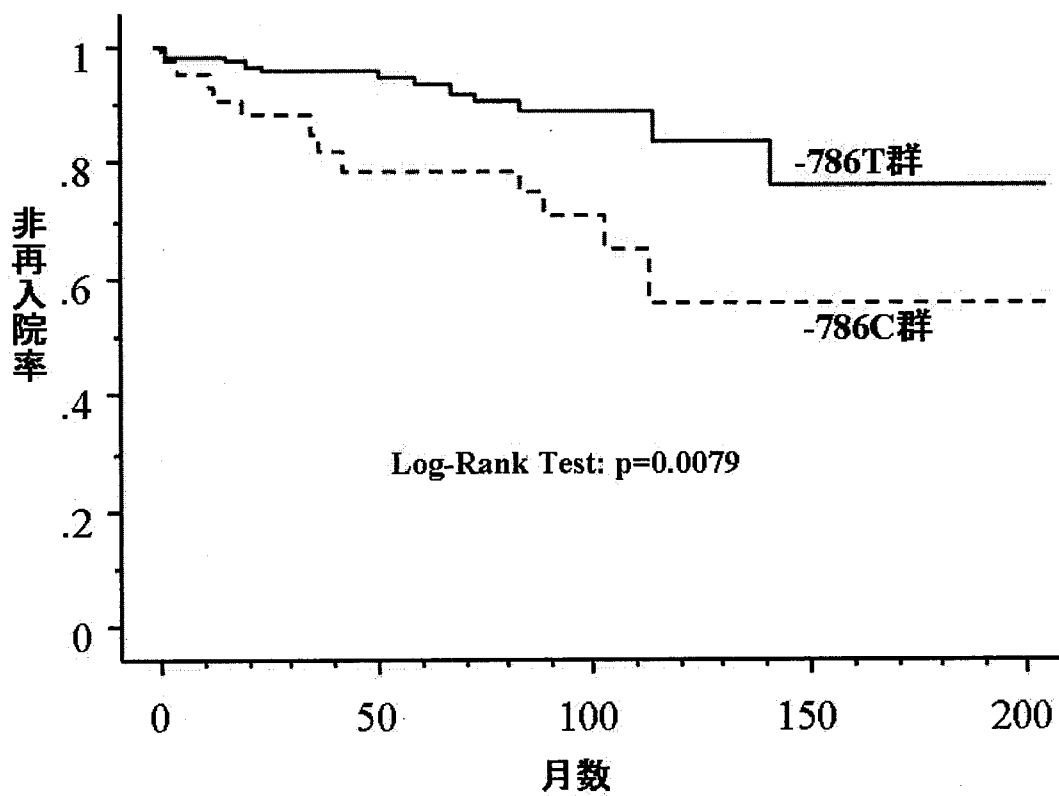
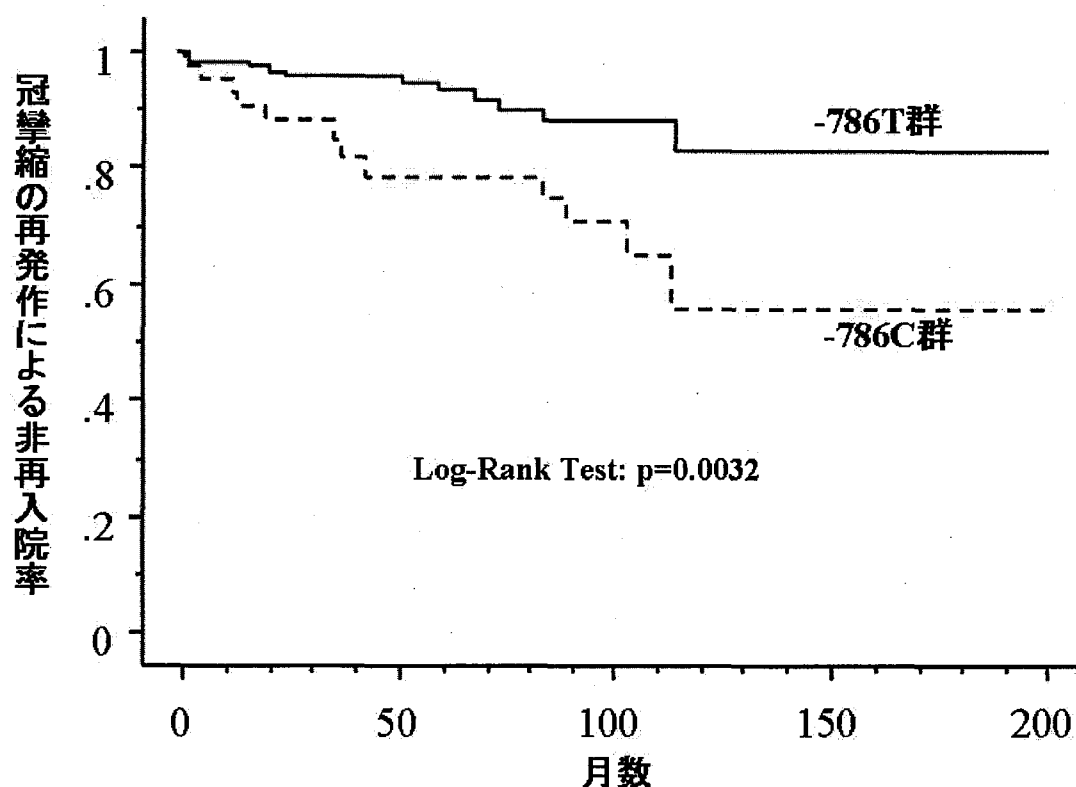


図3



#### 7-5 冠攣縮の再発作による再入院

我々は再入院群と非再入院群の間で、冠危険因子を比較した。冠攣縮の再発作のための再入院群は、非再入院群より低い年齢構成であった( $p=0.0044$ ) (表 3)。他の冠危険因子と内服薬の種類については、再入院群と非再入院群で有意差は認められなかった。

表 3. 冠攣縮の再発作による再入院と非再入院症例の患者背景

	非再入院 (n=176)	再入院群 (n=23)	P値
年齢	63±10	56±12	0.0044
男性/女性	86/90	12/11	N.S.
高血圧	51/176(29%)	8/23(35%)	N.S.
喫煙	95/176(54%)	14/23(61%)	N.S.
糖尿病	37/176(21%)	2/23 (9%)	N.S.
高脂血症	47/176(27%)	7/23(30%)	N.S.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23±3	23±3	N.S.
治療薬			
Ca拮抗薬	167/176(95%)	22/23(96%)	N.S.
硝酸薬	20/176(11%)	3/23(13%)	N.S.
ACE-I	16/176(9%)	2/23(9%)	N.S.
高血小板薬	22/176(13%)	0/23(0%)	N.S.
HMG-CoA	16/176(9%)	2/23(9%)	N.S.
還元酵素阻害薬			

数字は患者数と平均±標準偏差を示す。

N.S.: not significant

冠攣縮の再発作のための再入院率は、eNOS 遺伝子-786T/T、C/T、C/C の遺伝子型についてそれぞれ 7.6% (11/144)、22.0% (11/50) と 20.0% (1/5) であった。-786T/C 多型の割合は、冠攣縮の再発作のための再入院群が非再入院群に比べ、高値であった ( $p=0.0051$ )。-786C アレルが冠攣縮による再入院に有意に関連していた ( $p=0.0072$ , Odds ratio: 3.37) (表 4)。

表 4. 冠攣縮の再発作による再入院と非再入院症例における-786T/C 遺伝子多型頻度

遺伝子型	非再入院 (n=176)	再入院 (n=23)	Odds比 (95% 信頼区間)	P値
-786C/C	4/176 (2%)	1/23 (4%)	—	—
-786C/T	39/176 (22%)	11/23 (48%)		
-786T/T	133/176 (76%)	11/23 (48%)		
Additive	—	—	2.56 (1.26-5.21)	0.0097
Dominant	—	—	3.37 (1.39-8.20)	0.0072
Recessive	—	—	1.96 (0.21-18.29)	0.5569

数字は患者数を示す。

すべての冠危険因子と-786T/C 多型について、多変量解析を行った結果、冠攣縮の再発作による再入院の独立した危険因子が-786T/C 多型であることが分かった ( $p=0.006$ 、相対危険度=3.590) (表 5)。その他の冠危険因子について、冠攣縮による再入院の予測因子と考えられるものは認められなかった。

表 5. 冠攣縮による再発作による再入院に関する多変量解析

変数	$\beta$	標準誤差	相対危険率 (95%信頼区間)	P 値
-786T/C 多型	1.278	0.461	3.590 (1.455-8.853)	0.006
年齢	- 0.931	0.489	0.432 (0.151-1.028)	0.057
定数	- 2.141	0.346	0.117	0.000

## 7-6 カルシウム拮抗薬と冠攣縮による再入院

「研究の背景と目的」で述べたように、冠攣縮性狭心症の治療において、Ca 拮抗薬は最も基本的かつ重要な薬剤である。そこで、冠攣縮の発作による再入院と Ca 拮抗薬の関係を調べるため、本研究の対象患者が服用していた Ca 拮抗薬の種類と用量を分析した(表 6)。

表 6. 冠攣縮による再入院と非再入院群における Ca 拮抗薬の種類と用量

種類と用量 (一日あたり)	再入院群 (n=23)	非再入院群 (n=176)	P 値
ジルチアゼム (長時間作用型)			
200 mg	5/23(22%)	67/176(38%)	N.S.
100 mg	3/23(13%)	32/176(18%)	N.S.
ジルチアゼム (短時間作用型)			
240 mg	0/23(0%)	2/176(1.2%)	N.S.
180 mg	1/23(4%)	3/176(2%)	N.S.
150 mg	0/23(0%)	1/176(0.6%)	N.S.
120 mg	2/23(8%)	8/176(5%)	N.S.
90 mg	0/23(0%)	5/176(3%)	N.S.
60 mg	0/23(0%)	1/176(0.6%)	N.S.
ニソルジピン			
20 mg	1/23(4%)	3/176(1.7%)	N.S.
15 mg	1/23(4%)	0/176(0%)	N.S.
10 mg	4/23(17%)	21/176(12%)	N.S.
5 mg	0/23(0%)	6/176(3%)	N.S.
ニフェジピン			
80 mg	1/23(4%)	1/176(0.6%)	N.S.
60 mg	0/23(0%)	1/176(0.6%)	N.S.
40 mg	0/23(0%)	2/176(1.2%)	N.S.
20 mg	0/23(0%)	4/176(2.2%)	N.S.
ベニジピン			
8 mg	0/23(0%)	2/176(1.2%)	N.S.
アムロジピン			
5 mg	0/23(0%)	2/176(1%)	N.S.
2.5 mg	0/23(0%)	1/176(0.6%)	N.S.
2 種類の Ca 拮抗薬	4/23(17%)	5/176(3%)	0.0016

数字は患者数を示す。 N.S.: not significant

冠攣縮のための再入院の発生率は、Ca 拮抗薬 1 種類を服用している患者より 2 種類を服用している患者で高値であった ( $p=0.0016$ )。さらに、我々は、2 種類の Ca 拮抗薬を服用していた 9 名について、冠危険因子を調べた(表 7)。

表7. 2種類のCa拮抗薬を服用している症例の患者背景

患者番号	年齢	性別	-786T/C遺伝子型	高血圧	喫煙	糖尿病	高脂血症
非再入院群							
1	53	M	T/T	-	+	-	-
2	64	M	T/T	+	+	-	-
3	66	F	T/T	+	+	-	-
4	68	M	T/T	-	+	-	-
5	74	F	C/T	-	-	-	-
再入院群							
6	40	M	C/T	-	+	-	+
7	66	M	C/T	+	-	-	+
8	67	M	C/C	-	+	-	-
9	76	F	C/T	-	-	-	-

F: 女性; M: 男性

その結果、eNOS 遺伝子-786T/C 多型の割合は再入院群、非再入院群で、それぞれ 4/4(100%)、1/5(20.0%)であった。2 種類の Ca 拮抗薬を服用している患者において、eNOS 遺伝子-786T/C 多型は、非再入群より再入院群で高値であった(p=0.0164)。

## 8. 考 察

本研究においては、被験患者全員がCa拮抗薬や硝酸薬を服用しており、これらの患者において心臓血管死は本研究の追跡調査期間中には認められなかった。この結果は、冠動脈狭窄のない冠攣縮性狭心症患者の予後が比較的良好であるとの過去の報告と一致する[44, 49]。一方、冠攣縮の再発作や、冠動脈狭窄の進行による再発作による冠動脈イベントにより25名(12%)が再入院し、その92%は、冠攣縮の再発作によるものであった。これまでに、長時間作用型のCa拮抗薬や硝酸薬を服用していた冠攣縮性狭心症症例の42%に、冠攣縮性狭心症の再発作が認められたとの報告がある[50]。本研究では、さらに、11%の症例が冠攣縮の再発作により再入院しており、Ca拮抗薬や硝酸薬に抵抗性の難治性冠攣縮性狭心症が少なからず存在することが示唆された。

本研究においては、再入院した症例の年齢は、再入院しなかった症例より有意に若年であった。これは、高齢者より、若年者の方が冠攣縮性狭心症のいわゆる”disease activity”が高いか、もしくは、若年者は高齢者に比べ、冠攣縮による狭心症症状を自覚しやすく、症状の閾値が低い可能性も考えられる。今回の冠攣縮による再入院患者の平均年齢は56歳であり、働きざかりの社会的に主要な世代であり、これらの症例における再発作の予防は、社会的にも重要であると考えられる。

本研究での多変量解析により-786C アレルは冠攣縮性狭心症症例の再入院に対する唯一の独立した危険因子であることが明らかとなった。一方、他の遺伝因子として、以前、我々は、eNOS 遺伝子の Glu298Asp のミスセンス変異を有する症例が、冠攣縮に有意に多いことを報告している。しかし、本研究における予備調査では、このミスセンス変異と冠攣縮性狭心症の臨床経過との間に関連は認められなかった。このことは、以前我々が報告した、-786T/C 多型の方が Glu298Asp 多型に比し、より強力に冠攣縮に関連しているという結果に寄与するものかもしれないが、今後のさらなる解析が必要である[51]。eNOS 遺伝子-786T/C 多型を有する症例では、冠動脈内でのNO産生が減少し、グアニル酸シクラーゼを介した血管平滑筋の弛緩反応が障害されていると考えられる。これらの症例において、Ca拮抗薬は十分に、冠攣縮を抑制できていないのかもしれない。

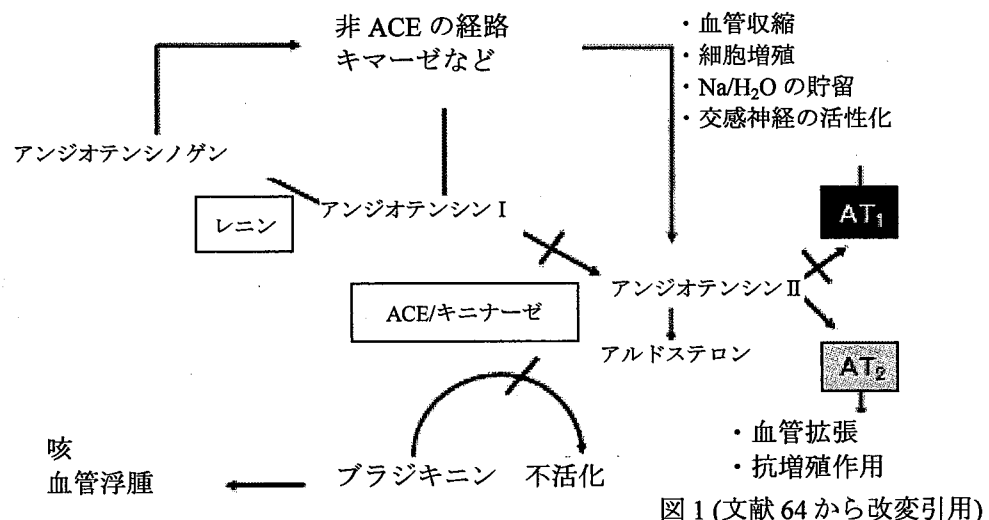
本研究において、追跡調査期間中に冠攣縮によると考えられる急性心筋梗塞を発症した一名のeNOS 遺伝子型は-786C/C型であった。この症例は67歳の男性で、冠動脈造影検査では、明らかな器質性の冠動脈狭窄の所見は認められず、Ca拮抗薬内服下で、重度の冠攣縮が再発し急性心筋梗塞に至ったものと考えられた。また、この症例では、喫煙の既往はあったものの10年以上禁煙状態であり、糖尿病、高脂血症、高血圧といった冠動脈疾患の危険因子もなかった。我々は以前、冠動脈の0枝病変の心筋梗塞症例において、アセチルコリンによる冠攣縮誘発試験の陰性例ではeNOS 遺伝子-786T/C多型はなく、陽性例の72%にeNOS 遺伝子-786T/C多型が認められたことを報告している[39]。冠攣縮による急性心筋梗塞とeNOS 遺伝子-786T/C多型との関連が示唆

されるこの症例では、-786C アレルは、ホモ型であり、ヘテロ型より、eNOS 遺伝子多型がさらに強く冠攣縮の発生に寄与している可能性がある。

Ca 拮抗薬の種類については、ジルチアゼム、ニフェジピン、ニソルジピン、ベニジピンなど数種類が冠攣縮性狭心症の治療に対して一般に使用されている。本研究において、それらのどの Ca 拮抗薬の種類間にも、冠攣縮の再発作による再入院率に有意な差は認められなかった。一方、臨床の現場では、1種類の Ca 拮抗薬では、発作のコントロールが難しい冠攣縮性狭心症に対しては、2種類の Ca 拮抗薬を使用することがある。本研究において、Ca 拮抗薬を2種類服用している冠攣縮性狭心症症例は1種類の Ca 拮抗薬を服用している患者に比べ、冠攣縮の再発作による再入院率が有意に高いことが明らかとなった。これらの2種類の Ca 拮抗薬を服用し冠攣縮の再発作による再入院に至った症例はすべて eNOS 遺伝子-786T/C 多型を有していた。以上の結果から eNOS 遺伝子-786T/C 多型を有する冠攣縮症例は、Ca 拮抗薬抵抗性の症例が存在し、重症冠攣縮と関連しているといえる。これらの症例には新たな治療戦略が必要である。

最近、我々は、HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン)であるフルバスタチンおよびシンバスタチンが、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞において eNOS の mRNA レベルを上昇させ、その安定性を改善することを示した

。さらに、フルバスタチンは eNOS 遺伝子の転写活性を上昇させることを見出した[52]。この転写活性の上昇は eNOS 遺伝子多型の有



無に関わらず認められたものの、フルバスタチンは、eNOS の転写抑制因子である replication proteinA1 の mRNA レベルを有意に抑制することにより、-786C/C 遺伝子型での転写活性が-786T/T 遺伝子型より強力に亢進することが明らかとなった。

また、これまでに、HMG-CoA 還元酵素阻害薬はメバロン酸の生合成を阻害する過程で、RhoA の活性を阻害し、eNOS の mRNA の安定性を高め NO 産生を上昇させることや、活性酸素種の産生を阻害することによって、血管内皮機能を改善することが報告されている [53, 54]。

一方、angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE-I)については、ACE-I の一つである



perindopril が血管内皮において、ACE の発現を減少させ、eNOS の発現を亢進させることが報告されている[55]。さらに、perindopril によって冠動脈疾患での心事故の発生率が減少することが証明された EUROPA(European Trial on Reduction of Cardiac Events with Perindopril in Stable Coronary Artery Disease)トライアルのサブ解析である PERTINENT(Perindopril-thrombosis, Inflammation, Endothelial Dysfunction and Neurohormonal Activation)トライアルでは perindopril 投与群は非投与群に比べ、有意に eNOS の活性が亢進しており血管内皮のアポトーシスが減少していたことが報告されている[56,57]。

ACE-I はブラジキニン依存性に、血管内皮からの NO の放出を増加させることや増加したブラジキニン自体が、血管内皮の B2 レセプターを介し、血流依存性の血管拡張作用を増大させる[58]。また、アンジオテンシン II の産生を減少させることによって、NADPH オキシダーゼを介した活性酸素種の発生を減少させ、血管内皮機能を改善する可能性が考えられている(図 1)。

血管内皮においてアンジオテンシン II の作用により増加した活性酸素種は NO を不活化するだけでなく、結果として発生した過酸化亜硝酸(peroxynitrite)が eNOS の補因子であるテトラヒドロピオプテリンを酸化し、eNOS の uncoupling をもたらす。uncoupling eNOS はさらに peroxynitrite を生み出すため、ACE-I によるアンジオテンシン II 合成の減少は血管内皮機能の改善に有用と考えられる[59]。

angiotensin II type 1 receptor blocker (ARB)も、AT-1 レセプターを介した NADPH オキシダーゼの産生を阻害することで、活性酸素種による血管内皮機能障害を抑制することや、細胞外の superoxide dismutase(SOD)を増加させ活性酸素種を抑制することなどが報告されている[60,61]。また、AT-1 レセプターのブロックにより、相対的にアンジ

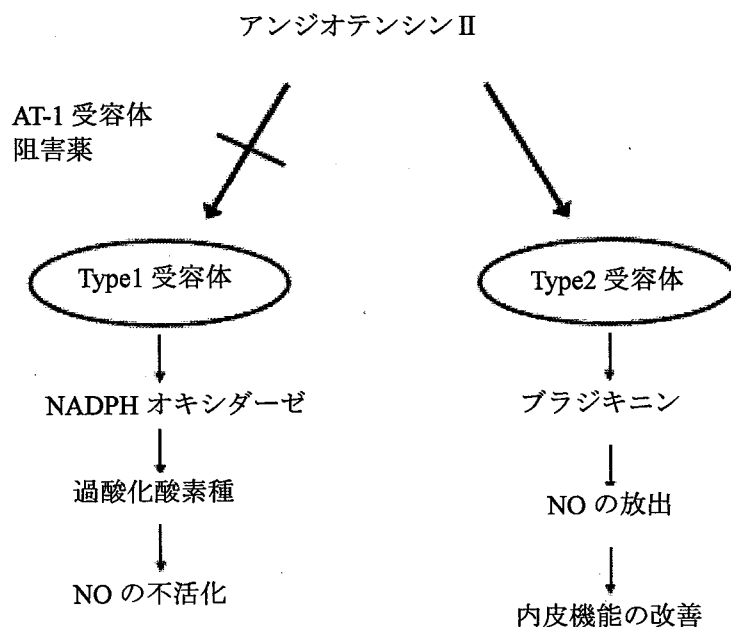


図 2 (文献 64 から改変引用)

オテンシン II が増加し、AT-2 レセプターを活性化させ、ブラジキニンを介した NO の放出が増加し、NO 依存性の血管拡張反応を促進することから血管内皮機能を改善するとの報告もある[62,63,64] (図2)。これら、スタチン、ACE-I、ARB は、Ca 拮抗薬や硝酸薬に対して抵抗性を有する冠攣縮性狭心症に有効である可能性がある。

本研究で、スタチン、ACE-I、ARB の使用頻度について、再入院群と非再入院群間で、有意な差は認められなかったが症例も少なく、これらの薬剤効果については、今後の症例の蓄積、前向き臨床試験が必要である。

冠攣縮の臨床経過についての人種差に関しては、西洋人では、一定期間の内服治療の後、冠攣縮性狭心症が自然軽快する症例が多いとの報告がある[65,66]。しかし、日本人では、発作のコントロールが良好な症例においても、再発作が突然起こることもあり、内服治療は継続するのが一般的である。本研究の結果から内服治療の期間中でも冠攣縮の再発作をきたす症例が少なからず認められたことから、eNOS 遺伝子-786T/C 多型の頻度が、人種間によって異なる可能性や、eNOS 遺伝子に関与する他の遺伝子多型が存在する可能性も考えられ、今後、更なる研究が必要であると考えられる。

冠攣縮の環境因子としては、喫煙が深く関与している。以前、我々は胸部症状により、心臓カテーテル検査の目的で入院した連続 447 例の検討により、eNOS 遺伝子-786T/C 多型を有する喫煙者の 92%、非喫煙者の 70%に冠攣縮を認めた。一方、eNOS 遺伝子-786T/C 多型を有さない症例では、喫煙者の 61%、非喫煙者の 35%に冠攣縮が認められ、喫煙が-786T/C 多型と相互に関与し、病態を悪化させることを報告している [67]。喫煙は環境因子としては唯一の独立した冠攣縮の危険因子であり、冠攣縮症例において、eNOS 遺伝子多型の有無に関係なく禁煙を勧めるべきである。本研究症例においても全ての症例で厳しい禁煙指導を行っている。また、喫煙と eNOS 遺伝子多型を組み合わせた結果得られた 92%という診断感度は、ACh 負荷による診断感度に匹敵する。心臓カテーテル検査での ACh 負荷試験は、今日においても、検者、被検者にとって精神的にも身体的にも大きな負担となっている。将来、遺伝子学的診断を充実させることにより、これらの負担を軽減できる可能性が示されるであろう。

本研究の結果を踏まえ、冠攣縮の発生と重症化の予防として、冠攣縮が発生する前の若年の時期に eNOS 遺伝子型を検査し、早期より禁煙を勧めることが重要であることを提案する。さらに、-786C アレルを有する冠攣縮性狭心症患者は、定期的な受診を増やすことや 24 時間心電図での虚血性変化の捕捉を頻回に行うなどの嚴重なフォローアップが必要と考えられる。現段階では遺伝子型をベッドサイドなどで簡便に確認する手段はなく、遺伝情報を取り扱う際の倫理的、社会的問題もあり、症状経過や心電図、冠動脈造影などの検査結果により、治療薬が決定されている。しかし近い将来、eNOS 遺伝子やその他の冠攣縮に関与する遺伝子多型に基づいた病態生理学的メカニズムが解明され、長時間作用型の Ca 拮抗薬や硝酸薬あるいはその他の薬剤を個々の症例に応じて組み合わせるテーラーメイド治療が可能となるであろう。

## 9. 結 語

eNOS 遺伝子-786T/C 多型は、冠攣縮性狭心症の予後に関与する重要な因子である。eNOS 遺伝子の-786C アレルを有する冠攣縮性狭心症患者は、Ca 拮抗薬の服用に関わらず、冠攣縮による再発作による再入院が多く、厳重なフォローアップが必要と考えられる。現時点では、-786T/C 多型を簡便に検索する方法はないが、将来、eNOS 遺伝子を含む冠攣縮に関与する遺伝子多型により、治療薬を選択するといった、より病態に適した治療が可能になるものと考えられる。

## 10. 参 考 文 献

1. Yasue H. Pathophysiology and treatment of coronary arterial spasm. *Chest*. 1980;78(Suppl 1):216-223.
2. Yasue H, Kugiyama K. Coronary spasm: clinical features and pathogenesis. *Intern Med*. 1997; 36:760-765.
3. Yasue H, Omote S, Takizawa A, Nagao M, Miwa K, Tanaka S. Exertional angina pectoris caused by coronary artery spasm: effects of various drugs. *Am J Cardiol*. 1979;43:647-652.
4. Yasue H, Omote S, Takizawa A, Nagao M. Coronary artery spasm in ischemic heart disease and its pathogenesis. *Circ Res*. 1983;52:I147-I152.
5. Prinzmetal M, Kennamer R, Merliss R, Wada T, Bor N. Angina pectoris. I. A variant form of angina pectoris: preliminary report. *Am J Med*. 1959;27:375-388.
6. Yasue H, Omote S, Takizawa A, Nagao M, Miwa K, Tanaka S. Circadian variation of exercise capacity in patients with Prinzmetal's variant angina: role of exercise-induced coronary arterial spasm. *Circulation*. 1979;59:938-948.
7. Yasue H, Horio Y, Nakamura N, Fujii H, Imoto N, Sonoda R, Kugiyama K, Obata K, Morikami Y, Kimura T. Induction of coronary artery spasm by acetylcholine in patients with variant angina: possible role of the parasympathetic nervous system. *Circulation*. 1986;74:955-963.
8. Kugiyama K, Yasue H, Ohgushi M, Motoyama T, Kawano H, Inobe Y, Hirashima O, Sugiyama S. Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smoker. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:1161-1167.
9. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
10. Okumura K, Yasue H, Matsuyama K, Matsuyama K, Morikami Y, Ogawa H, Obata. Effect of H1 receptor stimulation on coronary artery diameter in patients with variant angina: comparison with effect of acetylcholine. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:338-345.
11. McFadden EP, Clarke JG, Davies GJ, Kaski JC, Haider AW, Maseri A. Effect of intracoronary serotonin on coronary vessels in patients with stable angina and patients with variant angina. *N Engl J Med*. 1991;324:648-54.
12. Okumura K, Yasue H, Matsuyama K, Ogawa H, Kugiyama K, Ishizaka H, Sumida H, Fujii H, Matsunaga T, Tsunoda R. Diffuse disorder of coronary artery vasomotility in patients with coronary spastic angina. Hyperreactivity to the constrictor effects of acetylcholine and the dilator effects of nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:45-52.
13. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109-142.

14. Kugiyama K, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Fujimoto K, Nakao K, Yoshimura M, Motoyama T, Inobe Y, Kawano H. Nitric oxide activity is deficient in spasm arteries of patients with coronary spastic angina. *Circulation*. 1996;94:266-272.
15. Takaoka K, Yoshimura M, Ogawa H, Kugiyama K, Nakayama M, Shimasaki Y, Mizuno Y, Sakamoto T, Yasue H. Comparison of the risk factors for coronary artery spasm with those for organic stenosis in a Japanese population: role of cigarette smoking. *Int J Cardiol*. 2000;724:121-126.
16. Kugiyama K, Motoyama T, Hirashima O, Ohgushi M, Soejima H, Misumi K, Kawano H, Miyao Y, Yoshimura M, Ogawa H, Matsumura T, Sugiyama S, Yasue H. Vitamin C attenuates abnormal vasomotor reactivity in spasm coronary arteries in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:103-109.
17. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Tsunoda R, Moriyama Y, Miyao Y, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:1672-1679.
18. Miyamoto S, Kawano H, Sakamoto T, Soejima H, Kajiwarra I, Hokamaki J, Hirai N, Sugiyama S, Yoshimura M, Yasue H, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H. Increased plasma levels of thioredoxin in patients with coronary spastic angina. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6:75-80.
19. Pristipino C, Beltrame JF, Finocchiaro ML, Hattori R, Fujita M, Mongiardo R, Cianflone D, Sanna T, Sasayama S, Maseri A. Major racial deficiencies in coronary constrictor response between Japanese and Caucasians with myocardial infarction. *Circulation*. 2000;101:1102-1108.
20. Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fraction of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:1788-1792.
21. Wallerath T, Gath I, Aulitzky WE, Pollock JS, Kleinert H, Förstermann U. Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb Haemost*. 1997 ;77:163-167
22. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 ;91:4214-4218.
23. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995 21;377:239-242.
24. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL. Interaction of

- genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest.* 1998;101:1225-1232.
25. Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, Harrison DG. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation.* 2001 ;103:2839-2844.
  26. Arosio E, Cuzzolin L, De Marchi S, Minuz P, Degan M, Crivellente F, Zannoni M, Benoni G. Increased endogenous nitric oxide production induced by physical exercise in peripheral arterial occlusive disease patients. *Life Sci.* 1999;65:2815-2822.
  27. Laughlin MH, Pollock JS, Amann JF, Hollis ML. Training induces nonuniform increases in eNOS content along the coronary arterial tree. *J Appl Physiol.* 2001 ;90:501-510.
  28. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;268:17478-17488.
  29. Li Huige, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide.* 2002;7:132-147.
  30. Zhang R, Min W, Sessa WC. Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995 ;270:15320-15326.
  31. MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res.* 1997;81:355-362.
  32. German Z, Chambliss KL, Pace MC, Arnet UA. Molecular basis of cell-specific endothelial nitric-oxide synthase expression in airway epithelium. *J Biol Chem.* 2000;275:8183-9.
  33. Wallerath T, Witte K, Schäfer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr H. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96: 13357-62.
  34. Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SL, Kulkarni G, D'Abreo C, Wong GK, Miller TL, Chan Y, Atkins J, Wang Y, Chan Y, Atkins J, Wang Y, Marsden PA. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem.* 1999 29;274:3076-93.
  35. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet.* 1998;108:65-69.

36. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998;32:3-8.
37. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1506-1510.
38. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T<sup>-786</sup>→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999;99:2864-2870.
39. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Mizuno Y, Harada E, Nakamura S, Ito T, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K. T<sup>-786</sup>→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol*. 2000;86:628-634.
40. Nakayama M, Yoshimura M, Sakamoto T, Abe K, Yamamuro M, Shono M, Suzuki S, Nishijima T, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. A -786T>C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene reduces serum nitrite/nitrate from the heart due to an intracoronary injection of acetylcholine. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16:339-345.
41. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, Hino J, Ogawa E, Hamanaka I, Kamitani S, Takahashi N, Kawakami R, Kangawa K, Yasue H, Nakao K. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T→C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*. 2000;9:2629-2637.
42. Bochkarev A, Pfuetzner RA, Edwards AM, Frappier L. Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature*. 1997;385:176-181.
43. Wold MS, Kelly T. Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:2523-2527.
44. Yasue H, Takizawa A, Nagao M, Nishida S, Horie M, Kubota J, Omote S, Takaoka K,

- Okumura K. Long-term prognosis for patients with variant angina and influential factors. *Circulation*. 1988; 78: 1-9.
45. Yasue H, Horio Y, Nakamura N, Fujii H, Imoto N, Sonoda R, Kugiyama K, Obata K, Morikami Y, Kimura T. Induction of coronary artery spasm by acetylcholine in patients with variant angina: possible role of the parasympathetic nervous system in the pathogenesis of coronary artery spasm. *Circulation* 1986; 74: 955-963.
  46. Okumura K, Yasue H, Horio Y, Takaoka K, Matsuyama K, Kugiyama K, Fujii H, Morikami Y. Multivessel coronary spasm in patients with variant angina: a study with intracoronary injection of acetylcholine. *Circulation* 1988; 77: 535-542.
  47. Horio Y, Yasue H, Okumura K, Takaoka K, Matsuyama K, Goto K, Minoda K. Effects of intracoronary injection of acetylcholine on coronary arterial hemodynamics and diameter. *Am J Cardiol* 1988; 62: 887-891.
  48. Okumura K, Yasue H, Matsuyama K, Goto K, Miyagi H, Ogawa H, Matsuyama K. Sensitivity and specificity of intracoronary injection of acetylcholine for the induction of coronary artery spasm. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 883-888.
  49. Waters DD, Miller DD, Szlachet J, Bouchard A, Methe M, Kreeft J, Thérault P. Factors influencing the long-term prognosis of treated patients with variant angina. *Circulation*. 1983; 68: 258-265.
  50. Sueda S, Kohno H, Fukuda H, Watanabe K, Ochi N, Kawada H, Uraoka T. Limitations of medical therapy in patients with pure coronary spastic angina. *Chest* 2003; 123: 380-386.
  51. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Kaneshige T, Hiramatsu H, Yoshioka T, Kamitani S, Teraoka H, Nakao K. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-->C and missense Glu298Asp variants. *J Invest Med*. 2000 ;48:367-74.
  52. Abe K, Nakayama M, Yoshimura M, Nakamura S, Ito T, Yamamuro M, Sakamoto T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the - 786T>C polymorphism. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005; 15: 329-336.
  53. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 1998; 273: 24266-24271.
  54. Takemoto M, Liao. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 ; 21: 1712-1719.
  55. Zhuo JL, Mendelsohn FA, Ohishi M. Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT (1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension* 2002; 39; 634-638.



56. Fox KM, and European Trial on Reduction of Cardiac Events with Perindopril in Stable Coronary Artery Disease Investigators. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebocontrolled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 2003; 362:782–788.
57. Scientific Committee of the PERTINENT Sub-Study E-PI. PERTINENT — perindopril-thrombosis, inflammation, endothelial dysfunction and neurohormonal activation trial: a sub-study of the EUROPA study. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003; 17:83–91.
58. Hornig B, Kohler C, Drexler H. Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation*. 1997;95:1115-1118.
59. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003 ;111:1201-1209.
60. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1999 ;99:2027-33.
61. Hornig B, Landmesser U, Kohler C, Ahlersmann D, Spiekermann S, Christoph A, Tatge H, Drexler H. Comparative effect of ace inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase. *Circulation*. 2001;103:799-805.
62. Matrougui K, Loufrani L, Heymes C, Lévy BI, Henrion D. Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension*. 1999 ;34:659-65.
63. Carey RM. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. *Hypertension*. 2005 ;45:840-844.
64. Landmesser U, Drexler H. Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonism on endothelial function: role of bradykinin and nitric oxide. *J Hypertens Suppl*. 2006 ;24:S39-43.
65. Waters DD, Bouchard A, Thérout P. Spontaneous remission is a frequent outcome of variant angina. *J Am Coll Cardiol*. 1983 ;2:195-199.
66. Bott-Silverman C, Heupler FA Jr. Natural history of pure coronary artery spasm in patients treated medically. *J Am Coll Cardio*. 1983;2:200-205
67. Nakayama M, Yoshimura M, Sakamoto T, Shimasaki Y, Nakamura S, Ito T, Abe K, Yamamuro M, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Synergistic interaction of T-786-->C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene and smoking for an enhanced risk for coronary spasm. *Pharmacogenetics*. 2003;13:683-688.