

博士学位論文

カルシウム拮抗薬の動脈血管弾性に  
対する作用特性に関する研究

東邦大学大学院 薬学研究科

3020004 佐藤 啓

指導：薬物治療学研究室 高原 章 教授

## 目次

第1章 序論.....	3
第2章 実験方法.....	5
第1節 生体における血管弾性計測法.....	5
第2節 実験動物.....	6
第3節 生体位家兎血管弾性計測モデル.....	6
第4節 大動脈領域と大腿動脈領域における血管弾性の評価方法.....	7
第5節 動脈血管構造の組織学的特性の評価.....	10
第6節 試薬.....	10
第7節 統計学的解析法.....	11
第3章 Ca拮抗薬ニフェジピンが血管弾性に及ぼす影響.....	12
第1節 序.....	12
第2節 実験プロトコール.....	12
第3節 結果.....	12
第4節 考察.....	14
第5節 小括.....	15
第4章 Rhoキナーゼ阻害薬が血管弾性に及ぼす影響.....	16
第1節 序.....	16
第2節 実験プロトコール.....	17
第3節 結果.....	17
第4節 考察.....	22
第5節 小括.....	23
第5章 $\alpha_1$ 受容体遮断薬存在下においてニフェジピンが血管弾性に及ぼす影響.....	24
第1節 序.....	24
第2節 実験プロトコール.....	24
第3節 結果.....	25
第4節 考察.....	28
第5節 小括.....	29
第6章 L/N型Ca拮抗薬シルニジピンが血管弾性に及ぼす影響.....	30
第1節 序.....	30
第2節 実験プロトコール.....	30
第3節 結果.....	30
第4節 考察.....	32
第5節 小括.....	33
第7章 総括.....	34

謝辭.....	36
引用文献.....	37

## 第1章 序論

高血圧治療の目的は、持続的な高血圧により引き起こされる脳心血管病（脳卒中および心疾患）の発症や進展、再発を抑制し、これらによる死亡率を低下させることである。降圧薬で適切に血圧を下降させることにより、脳心血管病の発症を予防できることが多くの臨床研究で示され、この予防効果は降圧薬の種類によらず、降圧度の大きさに比例することが大規模臨床試験のメタ解析から示されている（1）。一方、高血圧に伴う臓器障害の進展を予防するためには、降圧薬を用いて血圧を下降させるとともに、臓器機能が長期間維持されるよう適切な灌流で管理することが必須である。

個々の高血圧患者に対し、降圧効果が高く、合併症の予防を視野に入れた作用を有する降圧薬が選択されるが、カルシウム（Ca）拮抗薬は其中で高血圧治療薬として頻用される薬物である。Ca拮抗薬は細胞膜上のL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルに結合し、細胞内へのCaイオン流入を阻害する薬物であり、化学構造によりジヒドロピリジン（DHP）系とベンゾチアゼピン系とフェニルアルキルアミン系に分類される。DHP系は降圧作用が強く適応となる患者が多いため降圧薬として汎用されており、日本を含めた各国の高血圧治療ガイドラインにおいて第一選択薬に位置付けられている（2-4）。Ca拮抗薬の主な薬理作用は、①冠動脈および末梢血管拡張作用、②心収縮力の抑制、③刺激伝導系の抑制である。DHP系Ca拮抗薬は血管拡張作用が急速・強力であり、心収縮力抑制作用や刺激伝導系の抑制作用は臨床用量域ではほとんどみられない。現在Ca拮抗薬の主流である長時間作用型は24時間にわたる確実な降圧作用を有し、左室肥大の抑制や動脈硬化の進展を抑制することも報告されている（5,6）。また、Ca拮抗薬を主体とする降圧療法は、上腕血圧では検出されない中心血圧の低下作用や、血圧変動性の低減作用にも優れることが示されており、降圧の質を高めるCa拮抗薬の特性として評価されている（7,8）。

DHP系Ca拮抗薬はその作用持続時間ならびに交感神経活性化作用の観点により第1世代から第4世代に分類され、Ca拮抗薬の間で心血管系に対する薬理作用は一律ではないことから各々の作用特性を理解した上での薬物選択が望まれる。DHP系Ca拮抗薬は強力な降圧作用にも関わらず臓器血流保持効果に優れる薬物群とされている。降圧時の臓器血流保持効果の機序を検討するためには、細動脈などの抵抗血管の緊張性に関するデータのみならず、導管動脈の血管弾性における血行力学特性についてもデータを得る必要がある。導管動脈の血管弾性測定については、臨床検査で応用されて

いる血管足首血管指数 (cardio ankle vascular index : CAVI) の測定法を麻醉ウサギに適用することで既にその手法を確立しており、CAVI を生体位で計測し血管作動物質の影響によって生じる分単位あるいは秒単位の急性的な血管弾性の機能的変化の検出を可能としている (9-11)。ウサギにおけるニログリセリンおよび  $\alpha_1$  受容体遮断薬ドキサゾシンの CAVI への急性作用 (9) はヒトにおける臨床成績 (12,13) と一致することが確認されており、ウサギは CAVI を指標とした研究に有用な動物種であると考えられる。導管動脈の血管弾性は、主要臓器への安定した血液分配に寄与する重要な生理機構の 1 つとして機能していると推定され、同機構に対する Ca 拮抗薬の直接的あるいは間接的な作用を包括的に解釈することは、本薬の臓器血流保持特性を理解する上で重要である。また、評価対象とした導管動脈の範囲には弾性血管 (主に大動脈領域) と筋性血管 (主に大腿動脈領域) が含まれており、血管平滑筋の占有割合が異なるなど解剖学的な特性の違いが存在することから、血管を効果器とする Ca 拮抗薬の作用を詳細に分析するには、各々の動脈領域で血管弾性を評価することは極めて重要である。

そこで本研究では、血管弾性を大動脈領域と大腿動脈領域で分離して計測可能な麻醉ウサギを用いた実験系を確立し、第 1 世代 Ca 拮抗薬ニフェジピンと第 4 世代 Ca 拮抗薬シルニジピンならびに血管拡張の機序が異なる Rho キナーゼ阻害薬が大動脈および大腿動脈領域の血管弾性に与える作用を検討し、Ca 拮抗薬が血管弾性の制御機構に及ぼす影響を薬理的に解析することを目的とした。

本論文は以下の原著論文を基礎とするものである。

1. Sato A, Nagasawa Y, Suzuki H, Sakuma K, Chiba T, Aimoto M, Takahara A. Differential Effects of Ca<sup>2+</sup> Channel Blockers Nifedipine and Cilnidipine on Arterial Elasticity in the Aortic and Femoral Arterial Segments of Anesthetized Rabbits. *Biol Pharm Bull.* 2023;46(9):1324-1331. doi: 10.1248/bpb.b23-00391.
2. Takahara A, Matsumoto M, Sato A, Inose S, Aimoto M, Nagasawa Y. Role of Rho Kinase in Regulating Arterial Stiffness in Anesthetized Rabbits. *Biol Pharm Bull.* 2023;46(12):1846-1850. doi: 10.1248/bpb.b23-00591.

## 第2章 実験方法

### 第1節 生体における血管弾性計測法

1980年に林らは、動脈が弾性体としての性質を有することに基づき、動脈の硬さを推定する指標として stiffness parameter  $\beta$  を提唱した(14)。Stiffness parameter  $\beta$  は、収縮期および拡張期の心拍動に伴う血管径の変化と測定時の血圧から算出され、局所の動脈の硬さを示す指標である。Young 率の関連式からもわかるように血管壁の伸展性は血圧変動の影響を受けるが、この指標は測定時血圧で補正することにより血圧変動の影響を受けにくい指標とされている。

[Young 率]

$$E = \frac{\Delta P}{h} \cdot \Delta D$$

E : Young 率、h : 動脈壁厚、 $\Delta P$  : 内圧変化量、 $\Delta D$  : 内径変化量

[stiffness parameter  $\beta$ ]

$$\text{Stiffness parameter } \beta = \ln\left(\frac{Ps}{Pd}\right) \cdot \frac{Dd}{Ds - Dd}$$

Ps : 収縮期血圧、Pd : 拡張期血圧、Ds : 収縮期血管径、Dd : 拡張期血管径

この関係式から stiffness parameter  $\beta$  は、動脈を線形弾性体としてとらえた場合の係数であり、動脈の硬さを示す。Stiffness parameter  $\beta$  の算出に必要な血管径の変化は超音波 M モード法による測定方法あるいはエコートラッキング法を用いた超音波変位法で測定される。

2006年に開発された CAVI は、stiffness parameter  $\beta$  を基本原理とした大動脈起始部から足首までの長さのある血管の硬さを反映する指標である(15)。Stiffness parameter  $\beta$  の血管径変化は脈波速度と関係し、Bramwell-Hill の式(16)から求められることから、CAVI の式は stiffness parameter  $\beta$  に Bramwell-Hill の式および容積変位と口径変位の関係式を組み合わせることにより、次のように示される。

[Bramwell-Hill の式]

$$PWV^2 = \frac{\Delta P}{\rho} \cdot \frac{V}{\Delta V}$$

PWV : 脈波伝播速度、 $\Delta P$  : 脈圧、 $\rho$  : 血液密度、V : 血管容量、 $\Delta V$  : 血管容量の変化

[容積変位と口径変位の関係式]

$$\frac{V}{\Delta V} = \frac{D}{2\Delta D}$$

V : 血管容量、 $\Delta V$  : 血管容量の変化、D : 血管径、 $\Delta D$  : 血管径の変化

[CAVI]

$$CAVI = a \left\{ \frac{2\rho}{\Delta P} \times \ln \frac{P_s}{P_d} \times haPWV^2 \right\} + b$$

$\rho$  : 血液密度、 $\Delta P$  : 脈圧、 $P_s$  : 収縮期血圧、 $P_d$  : 拡張期血圧、

haPWV : 心臓足首脈波伝播速度、a、b : 定数

CAVI で用いた haPWV (pulse wave velocity : 脈波伝播速度) は大動脈弁口からの大動脈部、大腿動脈、下腿動脈の広範な部位の平均 PWV を測定しており、対象とする血管には弾性動脈と筋性動脈が含まれている。CAVI は、心電図、心音図、血圧の測定によって算出されるため、非常に簡便な検査法として臨床応用された。また、この指標は年齢、冠動脈疾患の重篤度、中膜内膜複合体厚といった動脈硬化パラメータと正相関し、動脈の器質的変化に関連した血管弾性の変化を定量的に表す指標と位置付けられている (17-22)。

## 第 2 節 実験動物

本研究は「東邦大学薬学部における実験動物に関する指針」に従い、東邦大学動物実験委員会の承認を得て実施した。本実験では雄のニュージーランドホワイト (NZW) ウサギ (16週齢) を日本エスエルシー (浜松) より購入し、東邦大学薬学部実験動物センター内で飼育したものを使用した。

## 第 3 節 生体位家兎血管弾性計測モデル

ウサギに導入麻酔を目的としてケタミン塩酸塩 (35 mg/kg) とキシラジン塩酸塩 (5 mg/kg) を大腿部に筋肉内投与した。ウサギを背位に保定し、37°C で背側から保温し、気管カニューレを挿入して人工呼吸器 (SN-480-5、シナノ製作所) にて呼吸管理を行った。人工呼吸器の一回換気量および呼吸数は、それぞれ 6 mL/kg、40 strokes/min に設定した。維持麻酔にはイソフルランを用い、酸素を用いて気化器 (FLUO-V FLUOTHANE 1500、五十嵐医科工業) により 1.5% の濃度に気化し、人工呼吸器を介して吸入させた。左右の耳介静脈にサーフロー留置針を挿入し、それぞれ補液と薬剤の投与に用いた。図 1 に麻酔ウサギにおける血管弾性計測法の概略を示す。四肢誘導に

より第II誘導心電図を測定した（AB-611J、日本光電）。心音図は、胸郭上に留置したマイクロフォンにて記録した。ヘパリン化した動脈カニューレを右上腕動脈、腹部大動脈-左総腸骨動脈分岐部（大動脈分岐部）、右脛骨動脈に留置し、ひずみ圧力増幅器（AP-610J、日本光電）により血圧を測定した。右大腿動脈に血流測定用プローブを装着し、超音波血流計（T402、ニプロ・トランソニック）を介して大腿動脈血流量を計測した。得られたシグナルは、PowerLab system（AD Instruments, Bella Vista, New South Wales, Australia）、多ペンレコーダ（WR-3320, GRAPHTEC）にて記録した。得られた波形と心音図、血管長から CAVI 測定装置（VaSera VS-1500、フクダ電子）とリアルタイム stiffness parameter  $\beta$  評価システム（フクダ電子）を用い、後述する計算式にて血管弾性指数を算出した。

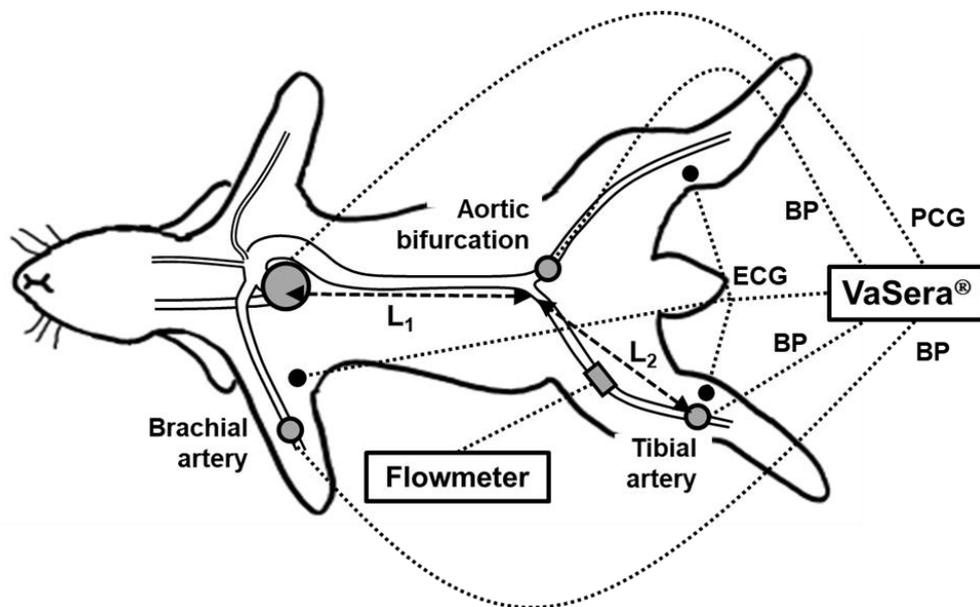


図1 麻酔下ウサギにおける血管弾性の測定方法

BP：血圧、ECG：心電図、PCG：心音図

L<sub>1</sub>：大動脈起始部から大動脈分岐部までの血管長

L<sub>2</sub>：大動脈分岐部から足首までの血管長

#### 第4節 大動脈領域と大腿動脈領域における血管弾性の評価方法

本研究では以下の3つの領域、①大動脈起始部から大動脈分岐部（腹部大動脈末端）（aortic  $\beta$ ）、②大動脈分岐部から足首（femoral  $\beta$ ）、③大動脈起始部から足首（ha  $\beta$ ：CAVIに相当）での血管弾性を評価した。動脈硬化のように血管が硬くなると弾性は低下し、その場合血管弾性指数（aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ および ha  $\beta$ ）は上昇する。逆に、血

管が軟らかくなると弾性は上昇し血管弾性指数は低下する。Aortic  $\beta$ 、femoral および ha  $\beta$  は CAVI の算出式を応用し、以下の計算式にて算出した。なお、血管弾性指数の計算式では上腕動脈の血圧を用いて算出した。

$$\text{aortic } \beta = \frac{2\rho [g/cm^3]}{\Delta P [mmHg]} \times \ln \frac{Ps [mmHg]}{Pd [mmHg]} \times \text{aortic PWV}^2 [m/s] \times 7.5$$

$$\text{femoral } \beta = \frac{2\rho [g/cm^3]}{\Delta P [mmHg]} \times \ln \frac{Ps [mmHg]}{Pd [mmHg]} \times \text{femoral PWV}^2 [m/s] \times 7.5$$

$$\text{ha } \beta = \frac{2\rho [g/cm^3]}{\Delta P [mmHg]} \times \ln \frac{Ps [mmHg]}{Pd [mmHg]} \times \text{ha PWV}^2 [m/s] \times 7.5$$

$\rho$  : 血液密度、Ps : 収縮期血圧、Pd : 拡張期血圧、 $\Delta P$  : 脈圧、PWV : 脈波伝播速度 (以下の式で算出した)

7.5 : 血圧の単位を mmHg から Pa へ、血液密度の単位を  $g/cm^3$  から  $kg/m^3$  へ変換する定数

$$\text{aortic PWV} = \frac{L_1 [m]}{T_1 [s]}$$

$$\text{femoral PWV} = \frac{L_2 [m]}{T_2 [s]}$$

$$\text{ha PWV} = \frac{L_1 + L_2 [m]}{T_1 + T_2 [s]}$$

$L_1$  : 大動脈起始部から大動脈分岐部までの血管長

$T_1$  : 大動脈弁から大動脈分岐部脈波の上昇開始点までの脈波伝播時間

$L_2$  : 大動脈分岐部から足首までの血管長

$T_2$  : 大動脈分岐部脈波の上昇開始点から脛骨動脈脈波の上昇開始点までの脈波伝播時間

心音図および動脈脈波は図 2 のような関連があり、上腕動脈脈波、大動脈分岐部脈波および脛骨動脈脈波を測定することで、時間 T を算出している。

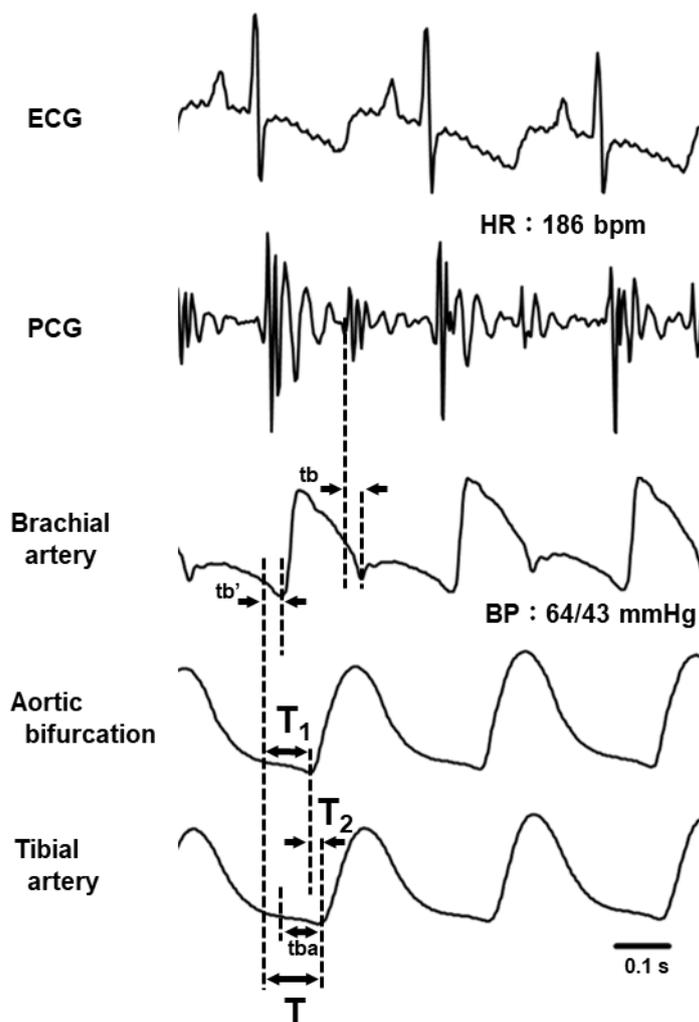


図2 生体位家兔血管弾性計測モデルでの脈波速度測定

ECG：心電図、PCG：心音図、HR：心拍数、BP：血圧

T：大動脈弁から脛骨動脈脈波の上昇開始点までの脈波伝播時間

T<sub>1</sub>：大動脈弁から大動脈分岐部脈波の上昇開始点までの脈波伝播時間

T<sub>2</sub>：大動脈分岐部脈波の上昇開始点から脛骨動脈脈波の上昇開始点までの脈波伝播時間

tba：上腕動脈脈波の上昇開始点から脛骨動脈脈波の上昇開始点までの脈波伝播時間

tb：大動脈弁の閉鎖音から上腕動脈脈波の重複切痕までの脈波伝播時間

tb は、大動脈弁の開放音から上腕動脈脈波の上昇開始点までの脈波伝播時間 (tb') と同じであり、時間 T の算出には tb' の代用として tb を使用

大動脈弁から大動脈分岐部脈波の上昇開始点までの脈波伝播時間 (T<sub>1</sub>) は CAVI 測定装置 (VaSera VS-1500、フクダ電子) を用いて測定し、大動脈分岐部脈波の上昇開始

点から脛骨動脈脈波の上昇開始点までの脈波伝播時間 ( $T_2$ ) は VS-1500 と同様のアルゴリズムを用いた LabVIEW (National instruments, Austin, TX, U.S.A.) を用いて測定した。

下肢血管抵抗は以下の計算式にて算出した。

$$\text{下肢血管抵抗 [mmHg} \cdot (\text{mL}/\text{min})^{-1}] = \frac{\text{上腕動脈血圧 [mmHg]}}{\text{大腿動脈血流量 [mL}/\text{min}]}$$

## 第5節 動脈血管構造の組織学的特性の評価

様々な動脈領域における動脈壁の解剖学的特性を確認するため、本研究における血管弾性測定範囲に相当する NZW ウサギの上行大動脈、胸部大動脈、腹部大動脈および大腿動脈を摘出し、10%ホルマリンで固定後パラフィンブロックに包埋した。4  $\mu\text{m}$  に薄切しエラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色を行った。

## 第6節 試薬

本研究では以下の試薬、医薬品を用いた。

- ・ニフェジピン (シグマ・アルドリッチ ジャパン)
- ・シルニジピン (シグマ・アルドリッチ ジャパン)
- ・ドキサゾシンメシル酸塩 (シグマ・アルドリッチ ジャパン)
- ・ファスジル塩酸塩 (ネオクリティケア製薬株式会社)
- ・リパスジル塩酸塩 (グラナテック®点眼液, 興和株式会社)
- ・イソフルラン (イソフルラン吸入麻酔液, ファイザー株式会社)
- ・キシラジン塩酸塩 (セラクター®2%注射液, バイエル薬品株式会社)
- ・ケタミン塩酸塩 (ケタラール®筋注用, 第一三共株式会社)
- ・ヘパリンナトリウム (ヘパリンナトリウム注1万単位/10mL 「AY」、エイワイファーマ株式会社)

ニフェジピンおよびシルニジピンは、50%ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60-エタノール溶液に溶解後に生理食塩水で希釈し使用した。ドキサゾシンメシル酸塩は、5%ブドウ糖液で溶解し使用した。ファスジル塩酸塩およびリパスジル塩酸塩は、生理食塩水で希釈し使用した。

## 第7節 統計学的解析法

実験で得られた値は、平均値±標準誤差で表した。また、有意差検定はGraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) を使用し、対応のある多群間のグループ内の比較は one-way repeated-measures ANOVA および Dunnett 検定を用いて  $p < 0.05$  を有意とした。また、対応のある2群間の比較は paired t-test を用いて  $p < 0.05$  を有意とした。

## 第3章 Ca拮抗薬ニフェジピンが血管弾性に及ぼす影響

### 第1節 序

我々の先行研究で、臨床用量のニカルジピンは血圧および大腿動脈の血管抵抗を低下させることに加え、CAVIで示される導管動脈の血管弾性に対し、低用量では影響を与えないが、用量の増加に伴い血管弾性を低下させる作用が出現することが示されている(9)。ニカルジピンが導管動脈の血管弾性を低下させた薬理的な作用機序は明らかにされていないが、導管動脈の血管弾性に対する薬物の作用特性全般に関する理解は降圧薬の臓器血流保持特性を説明する上で重要な点と考えられる。CAVIは動脈の血管弾性の生体位での計測を目的に確立された臨床指標であり、大動脈起始部から足首までの範囲の導管動脈を一塊として評価することが特徴である。第1章で述べたように、評価対象となる導管動脈の範囲には、弾性血管(大動脈領域)と筋性血管(大腿動脈領域)という血管平滑筋の占有割合が異なる血管が含まれており、血管平滑筋を効果器とするCa拮抗薬の作用を観察するには、各々の領域でそれぞれの血管弾性を評価する必要がある。本章では、大動脈および大腿動脈領域の血管弾性を計測可能な手法を麻酔ウサギを用いて確立し、代表的なCa拮抗薬であるニフェジピンが大動脈および大腿動脈領域の血管弾性に及ぼす影響を検討した。

### 第2節 実験プロトコール

各々の測定指標が安定した時点で、薬物投与前値を計測した。ニフェジピン30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を10分間かけて静脈内持続投与(0.2 mL/kg/min)し、各パラメータの変化を投与開始から30分後まで観察した。その後に、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ および300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を順次投与して薬物が各指標に及ぼす影響を評価した。

### 第3節 結果

心拍数、上腕動脈血圧、aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量および下肢血管抵抗に及ぼすニフェジピンの影響の経時変化を図3に示した。低用量と中用量のニフェジピン(30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ および100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )は、上腕動脈血圧および下肢血管抵抗を低下、大腿動脈血流量を増加させた。Aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ には影響を与えなかった。高用量のニフェジピン(300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )は、血圧および下肢血管抵抗を低下させ、投与中の大腿動脈血流量を統計学的な有意差が検出されない程度で低下させる傾向を認めた。300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ はaortic  $\beta$ を上昇させたが、femoral  $\beta$ およびha  $\beta$ には影響を与えなかった。

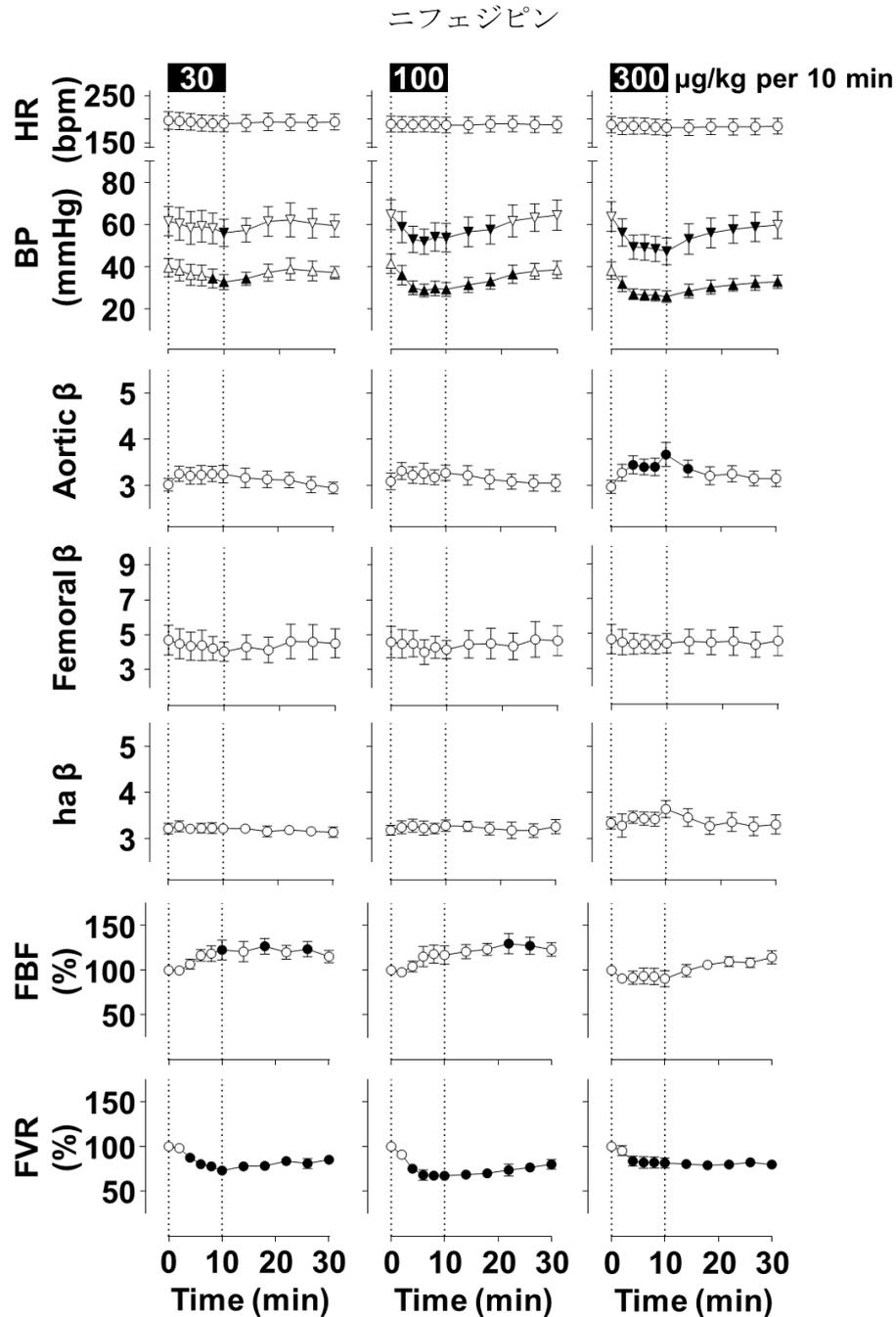


図3 心拍数、上腕動脈収縮期血圧、上腕動脈拡張期血圧、aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量、下肢血管抵抗におけるニフェジピンの影響の経時変化

実験開始前の値はそれぞれ  $198 \pm 19$  beats/min、 $61.7 \pm 7.0$  mmHg、 $39.7 \pm 4.4$  mmHg、 $3.0 \pm 0.1$ 、 $4.7 \pm 0.9$ 、 $3.2 \pm 0.1$ 、 $6.7 \pm 1.1$  mL/min、 $7.8 \pm 1.1$  mmHg $\cdot$ (mL/min) $^{-1}$ であった。大腿動脈血流量 (FBF; femoral arterial blood flow) および下肢血管抵抗 (FVR; femoral vascular resistance) は、変化率で示した。数値は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表した ( $n = 7$ )。黒印：各濃度の投与前値との統計学的有意差を示す ( $p < 0.05$ )。

#### 第4節 考察

図3で示したように、ニフェジピンは低用量である30 µg/kgから用量依存的に上腕動脈血圧および下肢血管抵抗を低下させ、30 および 100 µg/kg は大腿動脈血流量を有意に上昇させた。ニフェジピンは、L型Ca<sup>2+</sup>チャネル遮断を介して、血管平滑筋を拡張、末梢血管抵抗を低下させる薬物であり(23)、この作用が現れたものとする。

降圧用量のニフェジピンは femoral β に対して影響を与えず、300 µg/kg で aortic β を上昇させる特性を有することが本研究で明確にされた。ニフェジピンは下肢血管抵抗を低下させたが femoral β に影響を与えなかった。これは導管動脈よりも細動脈を拡張させるという DHP 系 Ca 拮抗薬の作用特性や、降圧に伴う反射性交感神経活性化といった二次的な影響が関与しているものと考えられる。我々の先行研究においてニフェジピンと類似した Ca 拮抗薬であるニカルジピンが低用量および中用量では CAVI を指標とした血管弾性に影響を与えず、高用量で CAVI を上昇させることを報告した(9)。CAVIは本研究における ha β に相当しており、ha β は aortic β と femoral β の総和である。そのため、先行研究におけるニカルジピンの血管弾性低下作用は主に大動脈領域の弾性低下に起因していると推定された。Ca 拮抗薬は L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル遮断により血管平滑筋細胞を弛緩させる作用を有することから、血管弾性を増加させると想定していた。しかしながら逆の結果が得られたことから、大動脈領域の血管弾性調節には血管平滑筋の弛緩以外の因子の存在を念頭におく必要があると考えられた。

一般的に Ca 拮抗薬は臓器血流保持効果に優れるとされる薬物である。Aortic β に影響を与えなかった用量(30 および 100 µg/kg)のニフェジピンは大腿動脈血流量を増加させており、末梢の血流保持効果を示すことが示唆される。一方、aortic β を上昇すなわち血管弾性を低下させる用量のニフェジピン(300 µg/kg)は投与中に大腿動脈血流量を減少させる傾向を認めており、臓器血流保持効果が失われている可能性が考えられる。本結果より、高用量の Ca 拮抗薬で示される大動脈領域の血管弾性低下は、臓器血流保持に対して抑制的に関与すると考えられた。臨床において Ca 拮抗薬の過剰量投与は臓器血流保持効果を失う可能性があるため、個々の患者において大動脈領域の血管弾性を低下させないことを意識した用量選択が重要と考えられる。

本研究で用いた麻酔ウサギの血管弾性計測モデルは外科的侵襲度が低いことが特徴である。他施設の開胸麻酔ウサギを用いた研究では、ニカルジピン(100 µg/kg)は大動脈領域の血管弾性を低下させ、大腿動脈領域の血管弾性を上昇させ(24)、本実験結果との相違が示されている。ニカルジピンとニフェジピンの薬理学特性は比較的類

似性が高いとされており、両薬で異なる実験結果が得られた原因は薬理特性では説明がつかない。開胸操作は陰圧に維持されている胸腔内圧を解除してしまうため、開胸に伴い、Ca拮抗薬の心血管機能への応答性に違いが生じた事が関係している可能性が推定される。血管弾性の機能的制御が単に血管の生理学的特性のみで考察できないことを暗示している可能性がある。

## 第5節 小括

低用量および中用量（30および100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）のニフェジピンは血管弾性に対して影響を与えなかった。高用量（300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）のニフェジピンは大動脈領域の血管弾性を低下させ、大腿動脈領域の血管弾性には影響を与えない作用特性を有することが明らかになった。血管平滑筋弛緩作用を有するニフェジピンが血管弾性を上昇させなかったことには、導管動脈よりも細動脈を拡張させるというDHP系Ca拮抗薬の作用特性や、降圧に伴う反射性交感神経活性化の関与といった何らかの要因が存在すると考えられた。

## 第4章 Rho キナーゼ阻害薬が血管弾性に及ぼす影響

### 第1節 序

第3章における検討で、ニフェジピンは大動脈領域の血管弾性を低下させ、大腿動脈の血管弾性に影響を与えないことが示された。この作用がニフェジピン特有の作用であるのか、あるいは血管拡張薬に共通の作用であるのかという疑問が生じた。本章では、Ca拮抗薬とは別の機序で血管を拡張させる2種類のRhoキナーゼ阻害薬ファスジルおよびリパスジルが血管弾性に及ぼす影響を検討した。

Rhoキナーゼは細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度非依存的に血管平滑筋細胞の収縮弛緩を制御している。ノルエピネフリン、エンドセリン、トロンボキササンA<sub>2</sub>などの血管収縮性作動物質の刺激により三量体GTP結合タンパク質に共役した受容体を介してRhoが活性化され、Rhoキナーゼが活性化される。活性化したRhoキナーゼは、ミオシン軽鎖を直接リン酸化するとともにミオシン軽鎖フォスファターゼをリン酸化することによりその活性を阻害する。その結果ミオシン軽鎖キナーゼとミオシン軽鎖フォスファターゼ活性のバランスが崩れ、結果的にミオシン軽鎖のリン酸化が上昇し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇しなくても血管平滑筋が収縮する(25)。このようなRhoキナーゼを介したCa<sup>2+</sup>濃度非依存性の血管平滑筋収縮は異常な血管攣縮に関わると考えられている。Rhoキナーゼに特異的な阻害薬としてファスジル、リパスジルがある。ファスジルはくも膜下出血後の脳血管攣縮およびこれに伴う脳虚血症状の改善薬として、日本で臨床応用されている(26)。くも膜下出血発症3日以内に手術を受けた患者に術後14日間ファスジンを投与すると、血管撮影上の脳血管攣縮の発生ならびに症候性脳血管攣縮の発生を抑制し、発症1ヵ月後の機能予後が改善したとの報告がある(27)。リパスジルは線維柱帯-シュレム管を介する主流出路からの房水流出を促進することにより眼圧を下降させる機序を有し、緑内障および高眼圧症患者に対する治療薬として臨床使用されている。

また、大動脈領域と大腿動脈領域では血管平滑筋の占有割合が異なるなど解剖学的な違いが存在することから、各血管領域の血管弾性に及ぼす作用の違いは血管構造の差に起因している可能性が考えられる。そこで、各動脈壁の解剖学的特性を確認するため、血管組織のEVG染色を行った。

## 第2節 実験プロトコール

各々の測定指標が安定した時点で、薬物投与前値を計測した。ファスジル0.3 mg/kgを10分間かけて静脈内持続投与(0.2 mL/kg/min)し、各パラメータの変化を投与開始から30分後まで観察した。その後に、1 mg/kg、3 mg/kgおよび10 mg/kgを順次投与して薬物が各指標に及ぼす影響を評価した。リパスジル(0.03、0.1、0.3、1 mg/kg)についても同様の手順で薬物が各指標に及ぼす影響を評価した。

## 第3節 結果

### ファスジルが血管弾性に及ぼす影響

心拍数、上腕動脈血圧、aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量および下肢血管抵抗に及ぼすファスジルの影響の経時変化を図4に示した。ファスジル0.3 mg/kgは心血管パラメータに影響を与えなかった。ファスジル1、3および10 mg/kgは、用量依存的に上腕動脈血圧および下肢血管抵抗を低下させ、大腿動脈血流量を増加させた。心拍数の増加が3 mg/kgで認められた。Aortic  $\beta$ の上昇が3および10 mg/kgで認められた。Femoral  $\beta$ の低下傾向が3 mg/kgで認められ、有意な低下が10 mg/kgで認められた。ファスジルはいずれの用量においてもha  $\beta$ に影響を与えなかった。

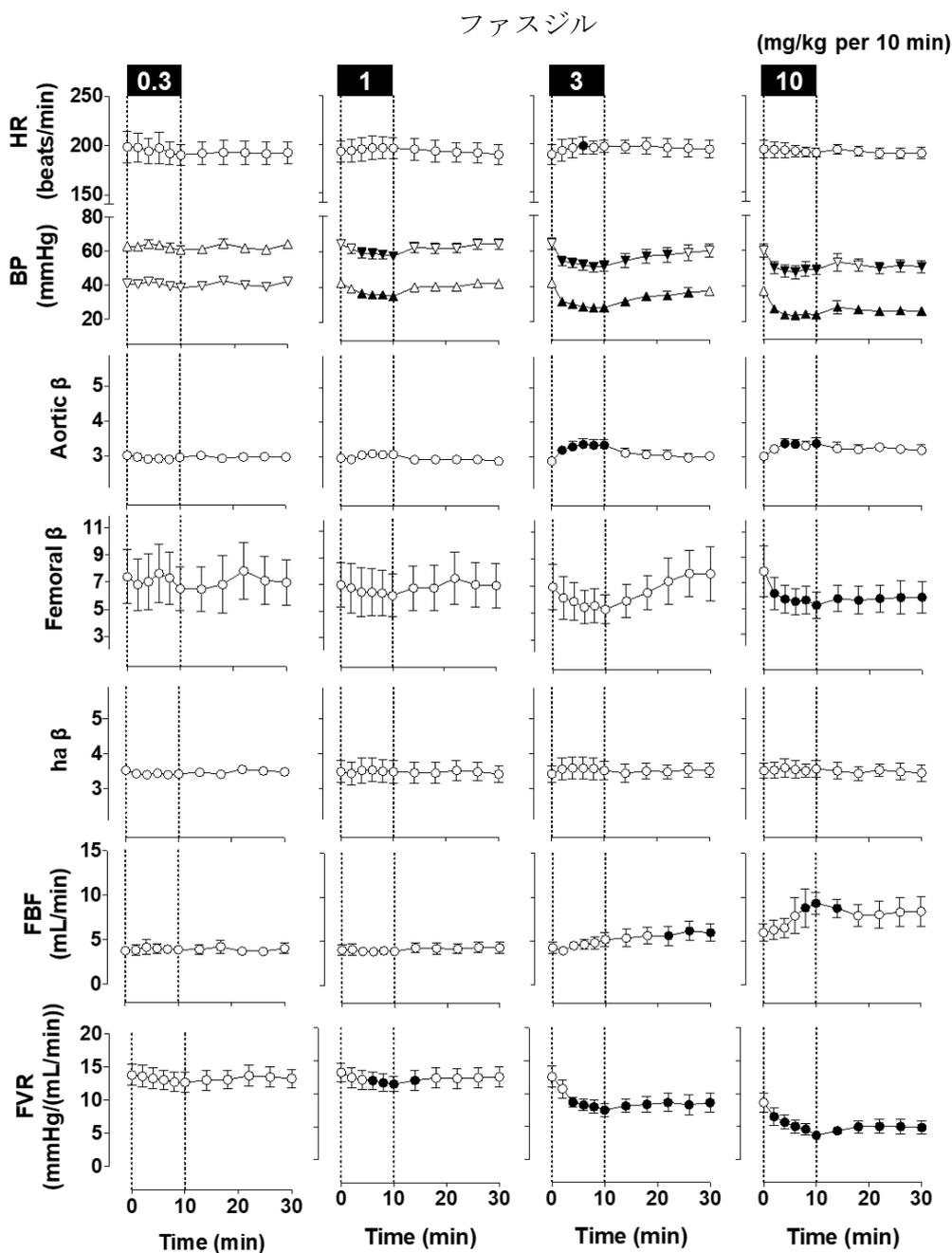


図4 心拍数、上腕動脈収縮期血圧、上腕動脈拡張期血圧、aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量、下肢血管抵抗におけるファスジルの影響の経時変化

実験開始前の値はそれぞれ  $197 \pm 16$  beats/min、 $63.0 \pm 1.9$  mmHg、 $41.0 \pm 0.7$  mmHg、 $3.0 \pm 0.1$ 、 $7.4 \pm 2.0$ 、 $3.5 \pm 0.3$ 、 $3.8 \pm 0.5$  mL/min、 $13.8 \pm 1.6$  mmHg $\cdot$ (mL/min) $^{-1}$ であった。大腿動脈血流量 (FBF; femoral arterial blood flow) および下肢血管抵抗 (FVR; femoral vascular resistance) は、変化率で示した。数値は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表した (n = 6)。黒印：各濃度の投与前値との統計学的有意差を示す ( $p < 0.05$ )。

### リパスジルが血管弾性に及ぼす影響

心拍数、上腕動脈血圧、aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量および下肢血管抵抗に及ぼすリパスジルの影響の経時変化を図 5 に示した。リパスジル 0.1、0.3 および 1 mg/kg は、用量依存的に上腕動脈血圧および下肢血管抵抗を低下、大腿動脈血流量を増加させた。Aortic  $\beta$  の上昇および femoral  $\beta$  の低下が 0.3 および 1 mg/kg で認められた。リパスジルはいずれの用量においても ha  $\beta$  に影響を与えなかった。

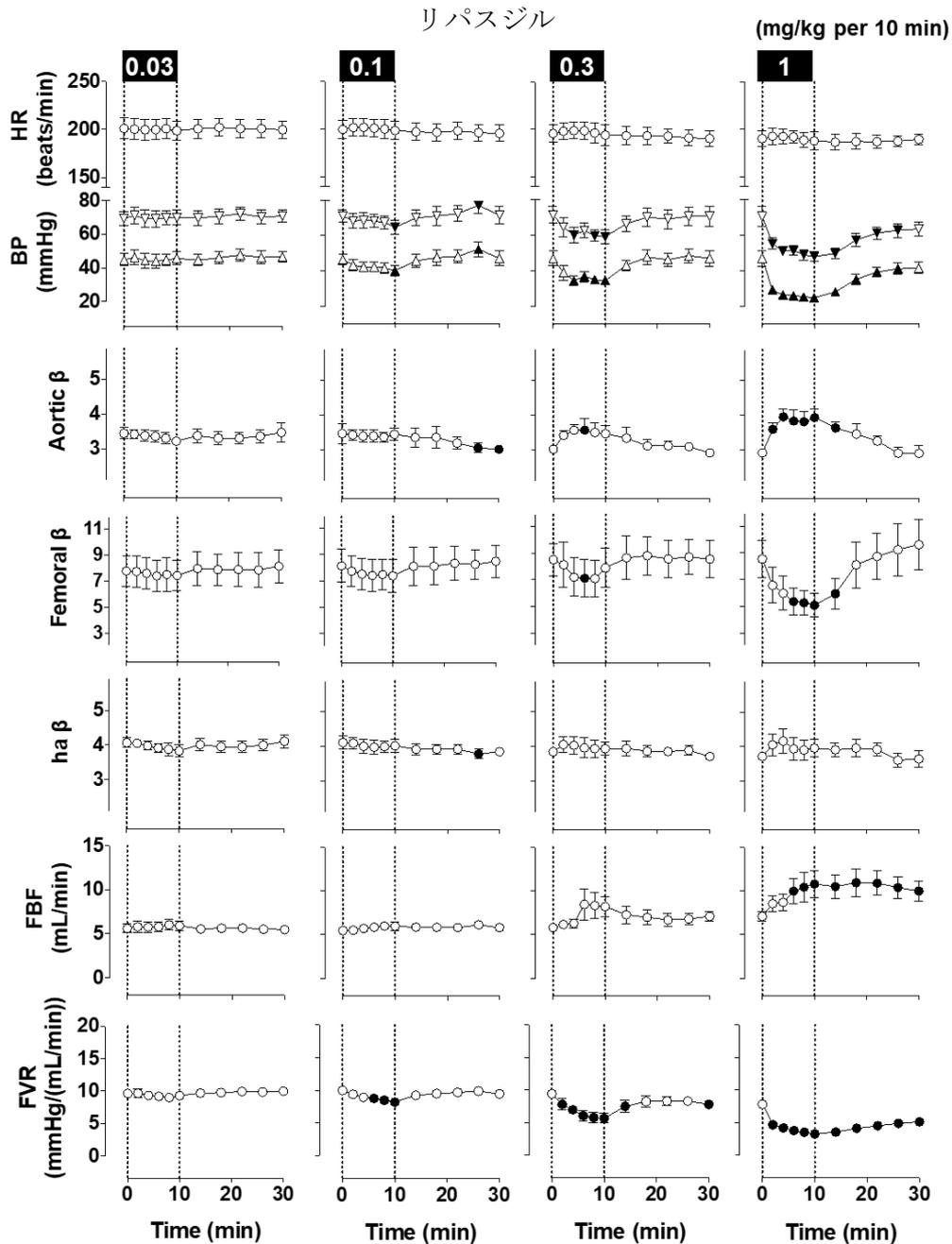


図5 心拍数、上腕動脈収縮期血圧、上腕動脈拡張期血圧、aortic β、femoral β、ha β、大腿動脈血流量、下肢血管抵抗におけるリパスジルの影響の経時変化

実験開始前の値はそれぞれ  $201 \pm 11$  beats/min、 $69.3 \pm 4.2$  mmHg、 $44.8 \pm 3.6$  mmHg、 $3.4 \pm 0.2$ 、 $7.7 \pm 1.3$ 、 $4.1 \pm 0.1$ 、 $5.6 \pm 0.5$  mL/min、 $9.6 \pm 0.5$  mmHg·(mL/min)<sup>-1</sup>であった。大腿動脈血流量 (FBF; femoral arterial blood flow) および下肢血管抵抗 (FVR; femoral vascular resistance) は、変化率で示した。数値は、平均値±標準誤差で表した (n = 6)。黒印: 各濃度の投与前値との統計学的有意差を示す (p < 0.05)。

### 動脈血管構造の組織学的所見

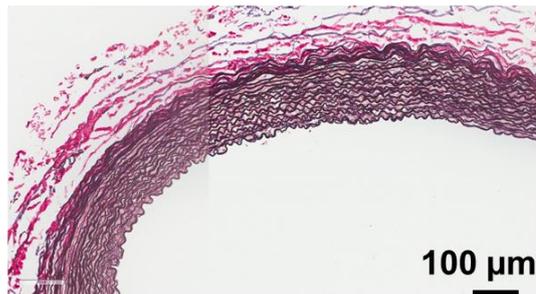
大動脈弓、胸部大動脈、腹部大動脈および大腿動脈の顕微鏡写真を図 6 に示す。大動脈弓および胸部大動脈では黒紫色で染色された弾性線維の占有率が高く、大腿動脈では黄色で染色された血管平滑筋や赤色で染色された膠原線維の占有率が高かった。腹部大動脈では弾性線維、膠原線維および血管平滑筋の混合が観察された。

### Elastica van Gieson (EVG) stain

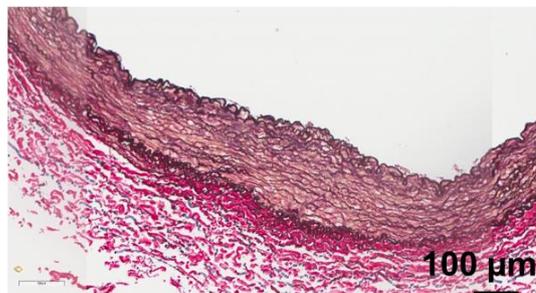
**Aortic  
arch**



**Thoracic  
aorta**



**Abdominal  
aorta**



**Femoral  
artery**

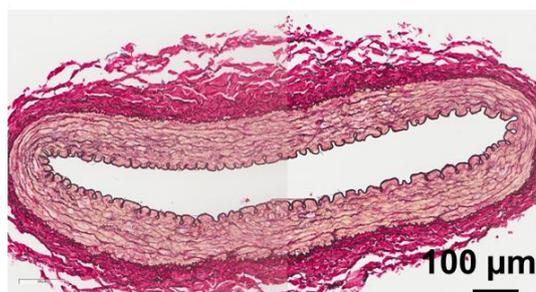


図 6 エラスチカ・ワンギーソン染色した大動脈弓、胸部大動脈、腹部大動脈、大腿動脈における組織学的所見

#### 第4節 考察

図4および図5に示すように、ファスジルおよびリパスジルは用量依存的に上腕動脈血圧および下肢血管抵抗を低下させ、大腿動脈血流量を上昇させた。この結果は、Rho キナーゼ阻害薬が大腿動脈を含む末梢動脈の血管平滑筋を弛緩させたことを示している。ウサギにおいて下肢血管抵抗を低下させたファスジルとリパスジルの用量比は、Rho-associated coiled coil-containing protein kinase (ROCK) 1 に対するファスジルとリパスジルの  $IC_{50}$  値がそれぞれ  $0.29 \mu\text{M}$  と  $0.051 \mu\text{M}$  であった従前の *in vitro* 研究と類似していた (28)。したがって、麻酔ウサギにおける Rho キナーゼの阻害作用は、ファスジルでは  $1 \text{ mg/kg}$  以上、リパスジルでは  $0.1 \text{ mg/kg}$  以上で出現したと考えられた。

ファスジルおよびリパスジルは aortic  $\beta$  を上昇させ、femoral  $\beta$  を低下させた。図6に示すように、ウサギの大動脈は収縮期に伸展し血液を蓄えるため弾性線維の割合が高く、大腿動脈は弾性線維が少なく血管平滑筋細胞が豊富であり、それぞれ弾性反動によって有効な血液分配に寄与している。Rho キナーゼ阻害薬は大動脈の弾性が低下した際には、末梢の大動脈がポンプ機能を代用するよう作用していると考えられた。ウサギ摘出大動脈を用いた過去の研究において、ファスジルは KCl または  $\alpha 1$  受容体作動薬フェニレフリンにより引き起こされた血管収縮を抑制した (29) が、今回の結果では高用量のファスジルおよびリパスジルは大動脈領域の血管弾性を低下させた。これは第3章で観察されたニフェジピンと同様の結果であり、血管拡張薬に共通した作用であることが示唆された。大動脈領域の血管弾性調節機構には、血管平滑筋細胞の弛緩以外の機序が関与していると考えられた。

一方、降圧用量のファスジルおよびリパスジルは大動脈領域の血管弾性を上昇させた。図6に示すように、ウサギの大動脈は血管平滑筋細胞が豊富であり、Rho キナーゼ阻害薬による血管平滑筋細胞の弛緩作用が大動脈領域の血管弾性上昇に寄与したものと考えられる。ファスジルは臨床的にはくも膜下出血術後の脳血管攣縮およびこれに伴う脳虚血症状の改善に用いられる薬物である。くも膜下出血は交感神経活性化により高血圧を合併することが多く、Rho キナーゼ阻害薬はこうした病態において大腿動脈を含めた筋性血管のコンプライアンスを増加させることで、末梢の血液循環維持に寄与している可能性が考えられた。

## 第5節 小括

Rho キナーゼ阻害薬はニフェジピンと同様に、大動脈領域の血管弾性を低下させた。大動脈領域の血管弾性低下は、血管拡張薬に共通性が高いことが示唆された。一方、Rho キナーゼ阻害薬は大腿動脈領域の血管弾性を上昇させることが確認された。この上昇は大腿動脈血管領域の解剖学的な特性を考慮すると、血管平滑筋における弛緩作用が大きく関与したものと考えられた。血管平滑筋弛緩作用は femoral  $\beta$  の低下として表現されうるが、ニフェジピンが femoral  $\beta$  の低下を示さなかったことに、何らかの要因が存在すると考えられた。

## 第5章 $\alpha_1$ 受容体遮断薬存在下においてニフェジピンが血管弾性に及ぼす影響

### 第1節 序

第3章と第4章における検討で、血管平滑筋弛緩作用を有するニフェジピンは大腿動脈領域の血管弾性に影響を与えず、Rho キナーゼ阻害薬は大腿動脈領域の血管弾性を上昇させる作用を有することが示された。ニフェジピンは速効性の強力な降圧作用を示すが、降圧に伴う反射性交感神経活性化をきたすことが知られている(30)。我々の先行研究において  $\alpha_1$  受容体作動薬であるフェニレフリンは本研究における  $\alpha_1$  に相当する CAVI を増加させることが報告されており(9)、ニフェジピンの大腿動脈領域の血管弾性に与える作用に、反射性交感神経活性化による  $\alpha_1$  受容体を介した経路が関与している可能性が考えられる。また、ニフェジピンが大動脈領域の血管弾性を低下させる作用にも、交感神経活性化が関与する可能性も考えられる。

本章では、ニフェジピンによる血管弾性修飾作用に対する  $\alpha_1$  受容体経路の関与を明らかにするため、 $\alpha_1$  受容体遮断薬ドキサゾシン存在下において、ニフェジピンが大動脈および大腿動脈領域の血管弾性に及ぼす影響を検討した。

### 第2節 実験プロトコール

各々の測定指標が安定した時点で、薬物投与前値を計測した。ニフェジピン300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を10分間かけて静脈内持続投与(0.2 mL/kg/min)し、各パラメータの変化を投与開始から30分後まで観察した。その後、ドキサゾシン1 mg/kgを急速静脈内投与(0.4 mL/kg)し、10分後に再度同じ用量のニフェジピンが各指標に及ぼす影響を評価した。

### 第3節 結果

心拍数、上腕動脈血圧、aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量および下肢血管抵抗におけるニフェジピンおよびドキサゾシン存在下でのニフェジピンの影響の経時変化を図7に示した。心拍数、上腕動脈血圧、aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量および下肢血管抵抗に対するドキサゾシンの影響を表1に示した。ドキサゾシン非存在下においてニフェジピン 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  は、上腕動脈血圧および下肢血管抵抗を低下させ、下腿動脈血流量、aortic  $\beta$ 、ha  $\beta$  を上昇させた。統計学的な有意差が検出されない程度の femoral  $\beta$  の上昇を認めた。ドキサゾシン 1  $\text{mg}/\text{kg}$  は、心拍数および上腕動脈血圧を低下させた。統計学的な有意差が検出されない程度 femoral  $\beta$  を低下させる傾向を認めた。aortic  $\beta$  および ha  $\beta$  には影響を与えなかった。ドキサゾシン存在下においてニフェジピン 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  は、上腕動脈血圧および下肢血管抵抗を低下させた。大腿動脈血流量、aortic  $\beta$  および ha  $\beta$  を上昇させ、統計学的な有意差が検出されない程度下腿動脈血流量を上昇させる傾向を認めた。ドキサゾシン非存在下と異なり、ドキサゾシン存在下においてニフェジピンは femoral  $\beta$  を低下させた。上腕動脈血圧、aortic  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量および下肢血管抵抗に対するニフェジピンの作用は、ドキサゾシン非存在下と存在下で変化がなかった。

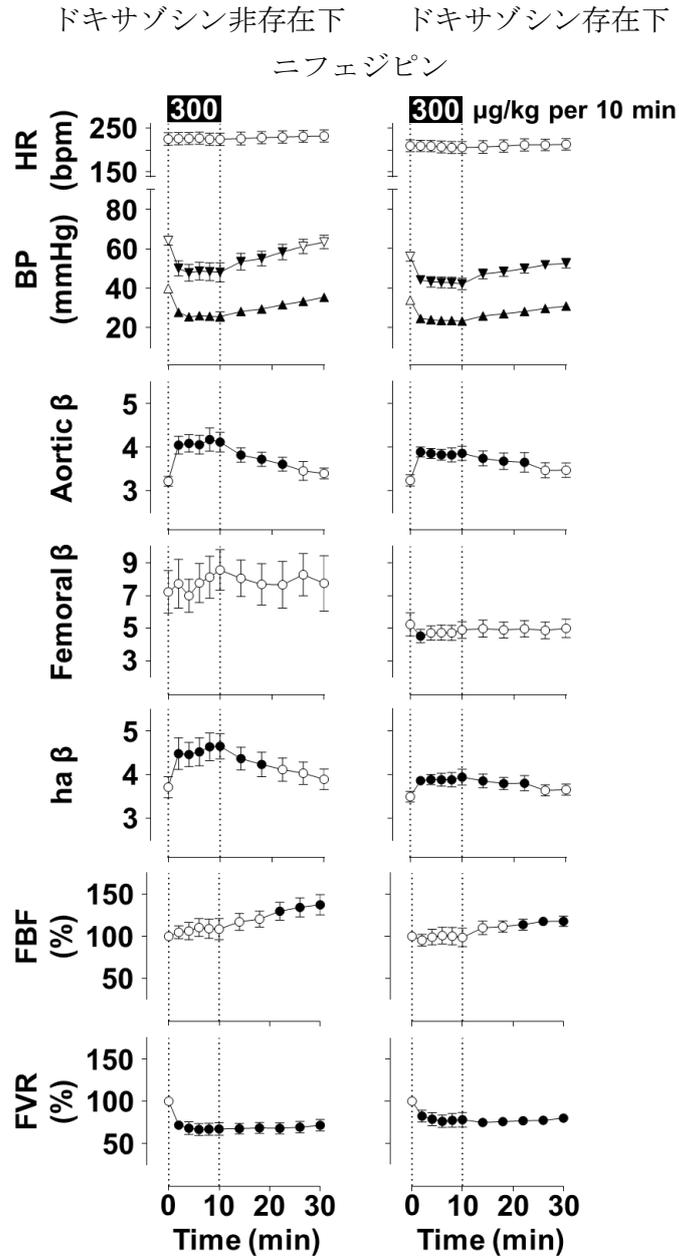


図7 心拍数、上腕動脈収縮期血圧、上腕動脈拡張期血圧、aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量、下肢血管抵抗におけるニフェジピンおよびドキサゾシン存在下でのニフェジピンの影響の経時変化

実験開始前の値はそれぞれ  $225 \pm 14$  beats/min、 $64.1 \pm 2.3$  mmHg、 $40.0 \pm 1.3$  mmHg、 $3.2 \pm 0.1$ 、 $7.2 \pm 1.3$ 、 $3.7 \pm 0.2$ 、 $9.4 \pm 1.2$  mL/min、 $5.5 \pm 0.5$  mmHg $\cdot$ (mL/min) $^{-1}$ であった。大腿動脈血流量 (FBF; femoral arterial blood flow) および下肢血管抵抗 (FVR; femoral vascular resistance) は、変化率で示した。数値は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表した (n = 7)。黒印：各測定の前値との統計学的有意差を示す (P < 0.05)

表 1 心拍数、上腕動脈収縮期血圧、上腕動脈拡張期血圧、aortic  $\beta$ 、femoral  $\beta$ 、ha  $\beta$ 、大腿動脈血流量、下肢血管抵抗におけるドキサゾシンの影響

	Doxazosin	
	Pre	Post
HR (bpm)	225 $\pm$ 14	211 $\pm$ 14*
Systolic BP (mmHg)	68 $\pm$ 3	56 $\pm$ 2*
Diastolic BP (mmHg)	41 $\pm$ 2	34 $\pm$ 2*
aortic $\beta$	3.3 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.1
femoral $\beta$	8.3 $\pm$ 2.0	5.2 $\pm$ 0.6
ha $\beta$	3.6 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.1
FBF (mL/min)	11.8 $\pm$ 1.8	10.9 $\pm$ 1.3
FVR (mmHg·[mL/min] <sup>-1</sup> )	4.9 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 0.6

ドキサゾシン 1 mg/kg の投与前および投与 10 分後の値を示した。数値は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表した (n = 7)。投与前値との統計学的有意差は、\* p<0.05 で示した。HR; heart rate、BP; blood pressure、FBF; femoral arterial blood flow、FVR; femoral vascular resistance

## 第4節 考察

### ドキサゾシンが血管弾性に及ぼす影響

表 1 に示すように、ドキサゾシン 1 mg/kg は上腕動脈血圧を低下させ、血管弾性指数には有意な変化を与えなかった。我々の先行研究においてドキサゾシンは ha  $\beta$  に相当する CAVI を低下させることが報告されている (9)。先行研究と異なる結果が得られた理由として、両測定系の実験方法に部分的な相違があることに起因していることが考えられる。本研究で用いたウサギ血管弾性計測モデルは大動脈領域と大腿動脈領域の脈波伝播時間を分けて計測するため、図 1 に示すように大動脈分岐部から左足首までの血流を遮断する実験系となっている。そのため、CAVI 測定系と異なり右大腿動脈領域の血管弾性のみが ha  $\beta$  に反映されることになる。ドキサゾシンにより大腿動脈領域の血管弾性低下が観察されたものの ha  $\beta$  に変化が観察されなかったが、左大腿動脈領域におけるドキサゾシンの作用が ha  $\beta$  に反映されないことが起因していると考えられる。

### ドキサゾシン存在下においてニフェジピンが血管弾性に及ぼす影響

図 7 に示すように、ドキサゾシン非存在下と異なり、ニフェジピン 300  $\mu$ g/kg はドキサゾシン存在下で femoral  $\beta$  を低下させた。序で述べた通り、ニフェジピンは反射性交感神経活性化をきたすことが知られている (30)。ニフェジピンによる大腿動脈領域の血管弾性の上昇がドキサゾシン投与により顕在化したことから、ニフェジピンは血管平滑筋細胞の弛緩により大腿動脈領域の血管弾性を上昇させる作用を有するが、この反応は反射性交感神経活性化に伴う  $\alpha_1$  受容体刺激によりマスクされていた可能性が考えられた。

一方、ニフェジピン 300  $\mu$ g/kg はドキサゾシン存在の有無に関わらず aortic  $\beta$  を上昇させた。ニフェジピンによる大動脈領域の血管弾性低下の機序には、降圧に伴う反射性交感神経活性化の関与は小さく、非神経性の機序の存在が考えられた。図 3 に示すように、ニフェジピン 300  $\mu$ g/kg は強い下肢血管抵抗低下を示したにも関わらず、投与中の大腿動脈血流を低下させる傾向を認めた。この用量のニフェジピンは心抑制作用により心拍出量が低下し、これが大動脈領域の血管弾性低下を引き起こした可能性が考えられる。過去の我々の検討の中で、脱血による血圧低下に付随した心拍出量の低下が大動脈領域の血管弾性を低下させることを血管内超音波画像診断装置 (Intravascular ultrasound : IVUS) を用いて確認している (31)。また、第 4 章におい

て Rho キナーゼ阻害薬は大動脈領域の血管弾性を低下させた。血管拡張に伴う血管内圧の低下が大動脈領域の血管弾性を低下させた可能性も考えられる。図 6 に示すように、大動脈は血管平滑筋よりも弾性線維が豊富である。ニフェジピンによる反射性交感神経活性化に伴う血管平滑筋収縮よりも心拍出量や血管内圧低下といった因子により感受性が高いものとする。この機序を証明するには今後のさらなる検討が必要である。

## 第 5 節 小括

ニフェジピンによる大動脈領域の血管弾性低下はドキサゾシン存在下で観察された。大動脈領域の弾性低下の機序には、降圧に伴う反射性交感神経活性化の関与は小さく、非神経性の機序の存在が考えられた。ニフェジピンによる大腿動脈領域の血管弾性の上昇がドキサゾシン投与により顕在化した。ニフェジピンは血管平滑筋の弛緩により大腿動脈領域の血管弾性を上昇させる作用を有するが、この反応は降圧に伴う反射性交感神経活性化によりマスクされた可能性が考えられた。

## 第6章 L/N型Ca拮抗薬シルニジピンが血管弾性に及ぼす影響

### 第1節 序

Ca拮抗薬は電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルに結合して細胞内へのCa<sup>2+</sup>イオンの流入を阻害することで作用を発揮する(32)。Ca<sup>2+</sup>チャンネルの中には不活化速度の遅いL(long-lasting)型以外に、神経終末などに存在するN(neural)型が知られており、N型Ca<sup>2+</sup>チャンネルは交感神経終末からのノルエピネフリン遊離に関与することが示されている(33)。シルニジピンはL型とN型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを同時に抑制できる特徴を有しており、そのN型Ca<sup>2+</sup>チャンネル抑制作用は細胞から生体のレベルで証明されている(34,35)。麻酔犬を用いた検討において、シルニジピンは血圧を低下させた際に、心拍数および心筋収縮力の増加を認められていない(36)。この実験結果は、シルニジピンは降圧用量で抗交感神経作用を現すことを示している。臨床成績においても、抗交感神経作用を示すデータが報告されている(37)。

第5章における検討で、大腿動脈領域の血管弾性に及ぼすニフェジピンの作用に交感神経活動が影響するという結果が示された。本章では交感神経活性化を抑制する特性を有するL/N型Ca拮抗薬シルニジピンが大動脈および大腿動脈領域の血管弾性に与える影響を検討し、ニフェジピンの作用と比較した。

### 第2節 実験プロトコール

各々の測定指標が安定した時点で、薬物投与前値を計測した。シルニジピン3μg/kgを10分間かけて静脈内持続投与(0.2 mL/kg/min)し、各パラメータの変化を投与開始から30分後まで観察した。その後、10μg/kgおよび30μg/kgを順次投与して薬物が各指標に及ぼす影響を評価した。

### 第3節 結果

心拍数、上腕動脈血圧、aortic β、femoral β、ha β、大腿動脈血流量および下肢血管抵抗に及ぼすシルニジピンの影響の経時変化を図8に示した。低用量のシルニジピン(3μg/kg)は、どの心血管パラメータにも影響を与えなかった。中用量のシルニジピン(10μg/kg)は、心拍数、上腕動脈血圧および下肢血管抵抗を低下させ、大腿動脈血流量、aortic β、femoral β、ha βには影響を与えなかった。高用量のシルニジピン(30μg/kg)は、上腕動脈血圧、下肢血管抵抗、femoral βおよびha βを低下させ、aortic βを上昇させた。

シルニジピン

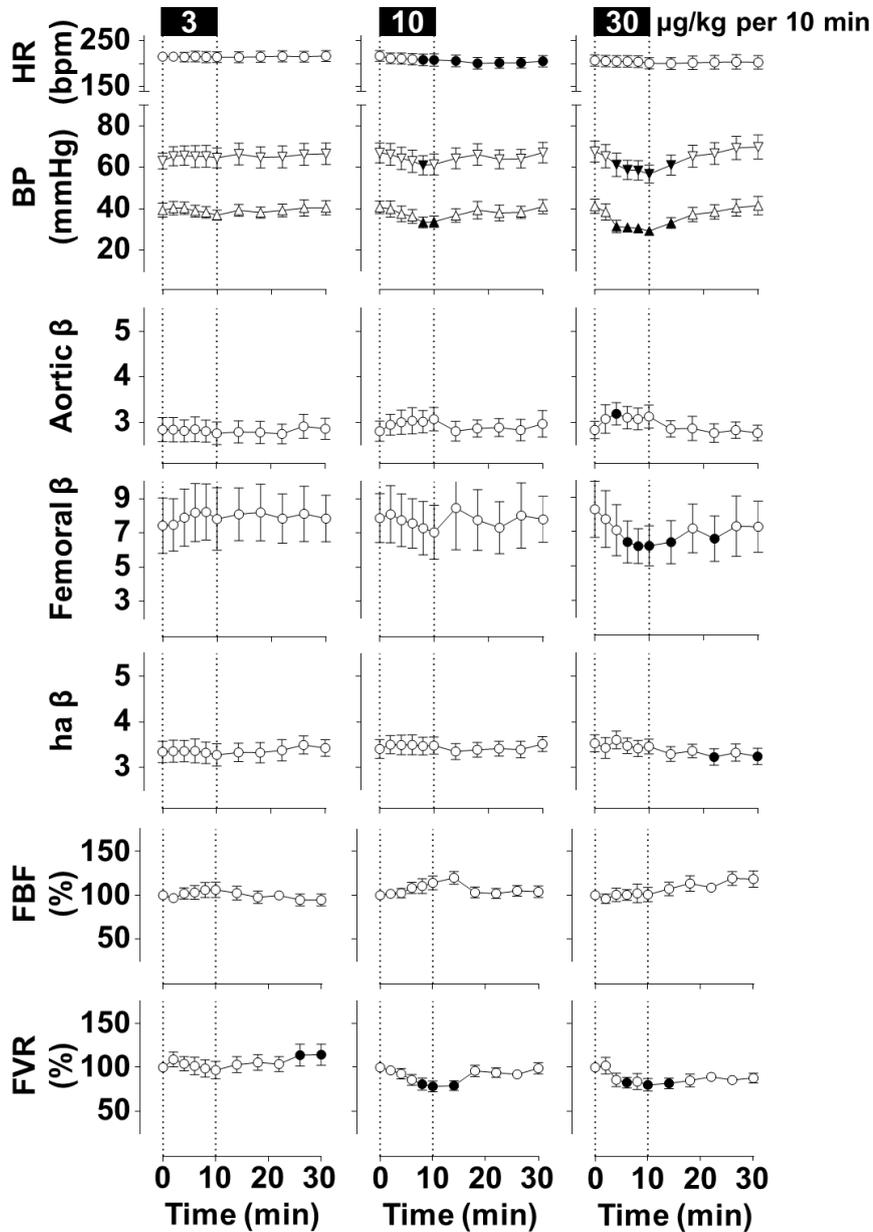


図8 心拍数、上腕動脈収縮期血圧、上腕動脈拡張期血圧、aortic β、femoral β、ha β、大腿動脈血流量、下肢血管抵抗におけるシルニジピンの影響の経時変化

実験開始前の値はそれぞれ  $215 \pm 9$  beats/min、 $63.1 \pm 3.9$  mmHg、 $39.4 \pm 3.4$  mmHg、 $2.8 \pm 0.3$ 、 $7.4 \pm 1.6$ 、 $3.3 \pm 0.2$ 、 $7.2 \pm 1.5$  mL/min、 $7.8 \pm 1.0$  mmHg·(mL/min)<sup>-1</sup>であった。大腿動脈血流量 (FBF; femoral arterial blood flow) および下肢血管抵抗 (FVR; femoral vascular resistance) は、変化率で示した。数値は、平均値±標準誤差で表した (n = 7)。黒印：各濃度の投与前値との統計学的有意差を示す (p < 0.05)。

## 第4節 考察

### シルニジピンが血管動脈弾性に与える影響

図8で示したように、シルニジピン 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  は上腕動脈血圧および下肢血管抵抗を低下させた。この用量の降圧度はニフェジピン 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と同程度であった。ニフェジピン 100 および 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の結果と異なり、シルニジピン 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  は femoral  $\beta$  を低下させた。この作用の違いは、シルニジピンが有する N 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル遮断作用に起因した可能性が考えられる。*In vitro* および *in vivo* の検討において、シルニジピンは交感神経終末からノルエピネフリン遊離を抑制することが報告されている (35,38)。第3章と第6章の結果から、シルニジピンおよびニフェジピンは L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル遮断作用により大腿動脈領域の血管弾性を上昇させる共通の作用があるが、その薬物が有する交感神経に対する特性によって修飾されうると考えられた。一方、シルニジピンは大動脈領域の血管弾性を低下させ、この反応はニフェジピンと類似しており、大動脈領域の血管弾性調節に対する反射性交感神経活性化の関与は小さいという我々の仮説を裏付けるものである。

降圧時に大動脈領域の血管弾性低下が見込まれる場合、末梢臓器血流を保持するためには、シルニジピンのような大腿動脈領域の血管弾性を上昇させポンプ機能に貢献するような薬物を選択することが望ましいと考えられる。臨床試験において、シルニジピンは蛋白尿の減少作用が L 型 Ca 拮抗薬に比較して優れていることが示されている (39)。この試験では腎血流量を測定していないが、シルニジピンの血管弾性維持または上昇作用が腎血流の保持に寄与し腎保護効果をもたらした可能性を考える。

### シルニジピン以外の Ca 拮抗薬が血管弾性に及ぼす影響

現在降圧薬として用いられる L 型 Ca 拮抗薬は長時間作用型のものが主流である。特に、アムロジピンは血中半減期および作用持続時間が長く、効果発現が緩徐であるため、反射性交感神経活性化を生じにくい。そのため降圧治療における有用性が高く評価され、最も頻用される降圧薬となっている。しかしながら、アムロジピンを麻酔犬に投与すると、ニフェジピンの反応より小さいものの、降圧に伴う反射性交感神経活性化により心拍数と心筋収縮力の増大が認められたことから (40)、大腿動脈領域における血管弾性に及ぼす作用はニフェジピンと類似した作用が得られると考えている。臨床試験において高血圧患者に対する慢性的なアムロジピン投与は、血圧を有意に低下させたものの CAVI は変化させなかった (41,42)。今後、アムロジピンが血管弾性

に及ぼす急性的な影響について検討する必要があると考える。

## 第5節 小括

3 および 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  のシルニジピンは血管弾性に対して影響を与えなかった。高用量のシルニジピン (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) は大動脈領域の血管弾性を低下させ、ニフェジピンと異なり大腿動脈領域の血管弾性を上昇させる作用を有することが確認された。この作用の違いはシルニジピンが有する N 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル遮断作用に起因するものと考えられた。

## 第7章 総括

本研究は Ca 拮抗薬の導管動脈血管弾性に対する作用特性を解明し、Ca 拮抗薬の臓器血流保持特性を理解することを目的に実施されたものである。

ウサギ血管弾性計測モデルを用いた本研究により以下の2点が明らかになった。

- ① Ca 拮抗薬は大動脈領域の血管弾性低下作用を示し、その作用は血管拡張薬に共通で観察されるものであった。この機序には、降圧に伴う反射性交感神経活性化は関与せず、非神経性機序の存在が考えられる。
- ② Ca 拮抗薬は大動脈領域では血管平滑筋弛緩作用により直接的に血管弾性を上昇させる作用を有し、この反応は反射性交感神経活性化により血管弾性を低下させる方向に修飾されうる。

本研究により、大動脈領域と大動脈領域の血管弾性に及ぼす作用が異なることが示された。現在臨床で血管弾性の指標として用いられている CAVI は大動脈起始部から足首までの血管弾性を一塊として測定されるため、各種薬物が有するそれぞれの動脈領域の血管弾性に対する作用を調査することはできなかった。血管弾性を動脈領域毎に測定することの重要性が明らかになった。臨床において、高血圧緊急症の1つである急性大動脈解離の治療では、迅速な降圧を目的に L 型 Ca 拮抗薬ニカルジピンが持続静注されるが、ニカルジピンは過度に血圧を低下させた場合には大動脈領域の血管弾性を機能的に低下させ、大動脈解離を発症しやすい状況に導く負の修飾因子となる可能性が考えられる。臨床現場においても動脈領域毎の血管弾性計測法が確立されれば、降圧療法のさらなる進展が期待される。

降圧治療の最終目的は標的臓器障害と脳心血管病の予防である。末梢臓器障害を予防するためには、降圧時に臓器血流を保持する必要があり、そのためには血管弾性が維持または向上することが重要と考えられる。降圧治療による臓器保護効果は、降圧薬間で異なることが報告されている。本研究により血管拡張薬は降圧時に大動脈の血管弾性を低下させる作用を有することが示唆されたが、その際にはより末梢の大動脈領域の血管弾性を上昇させポンプ機能に貢献するような薬物を選択することが望ましいと考える。本研究で用いたウサギ血管弾性計測モデルを活用し、ニフェジピン、シルニジピン以外の各種降圧薬が血管弾性に及ぼす影響に関する検討を進め、血管弾

性の維持または向上を加味した高血圧治療の確立に向けた基盤データを蓄積していくことが望まれる。また、血管拡張薬の導管動脈血管弾性に対する修飾機構と、細動脈の血管平滑筋収縮弛緩を主体とした末梢血管抵抗の調節機構は、それぞれ独立して制御されていることは興味深い点である。ウサギ血管弾性計測モデルの活用により、全身循環に関与する動脈血管弾性に対する薬理学的特性の解明が進み、新たな血管弾性の薬理学の分野が発展することが期待される。

加齢、性ホルモン、慢性的な高血圧といった内的要因は大動脈の弾性線維の変性により器質的な動脈硬化を引き起こすことが知られている。本研究は正常な血管機能に対する Ca 拮抗薬の作用を検討するために若年（16 週齢）のウサギを用いて行った。動脈硬化のように器質的な血管弾性低下が進展している場合、本研究で得られた Ca 拮抗薬の血管弾性に及ぼす作用は小さくなることが予想される。動脈硬化が進行している場合には健常な場合と比較して臓器の予備能は低下していると考えられ、血管弾性を維持または向上させる降圧薬の選択は重要であり、本研究結果は意義のあるものとする。老化、閉経後、高血圧モデル動物を用いた今後の研究が、各種病態における血管弾性に及ぼす Ca 拮抗薬の作用を明らかにすることが期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました東邦大学薬学部薬物治療学研究室 高原章教授に心からの感謝の意を表します。また、本研究成果を纏めるにあたり、親身なる御指導と貴重な御助言を頂きました永澤悦伸准教授、ならびに相本恵美 助教に深く感謝致します。種々の貴重な御助言、御討論を頂きました医療法人社団誠仁会みはま病院 白井厚治先生に深謝いたします。また、東邦大学医療センター大橋病院 佐久間清様、千葉達夫様、東邦大学薬学部薬物治療学研究室の皆様、山本智幸様をはじめとしたフクダ電子株式会社の皆様に心から感謝いたします。

本研究の審査に際して数々の有益なご助言、ご指摘を賜りました東邦大学薬学部薬物学教室 田中光教授、東邦大学薬学部実践医療薬学研究室 石井敏浩教授、東邦大学薬学部臨床薬学研究室 松尾和廣教授に深く感謝いたします。

## 引用文献

1. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ*. 2009 May 19;338:b1665.
2. Umemura S, Arima H, Arima S, Asayama K, Dohi Y, Hirooka Y, Horio T, Hoshida S, Ikeda S, Ishimitsu T, Ito M, Ito S, Iwashima Y, Kai H, Kamide K, Kanno Y, Kashihara N, Kawano Y, Kikuchi T, Kitamura K, Kitazono T, Kohara K, Kudo M, Kumagai H, Matsumura K, Matsuura H, Miura K, Mukoyama M, Nakamura S, Ohkubo T, Ohya Y, Okura T, Rakugi H, Saitoh S, Shibata H, Shimosawa T, Suzuki H, Takahashi S, Tamura K, Tomiyama H, Tsuchihashi T, Ueda S, Uehara Y, Urata H, Hirawa N. The Japanese Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension (JSH 2019). *Hypertens Res*. 2019 Sep;42(9):1235-1481.
3. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbigele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018 Jun;71(6):e13-e115.
4. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018 Sep 1;39(33):3021-3104.
5. Terpstra WF, May JF, Smit AJ, de Graeff PA, Havinga TK, van den Veur E, Schuurman FH, Meyboom-de Jong B, Crijns HJ. Long-term effects of amlodipine and lisinopril on left ventricular mass and diastolic function in elderly, previously untreated hypertensive patients: the ELVERA trial. *J Hypertens*. 2001 Feb;19(2):303-9.

6. Sipahi I, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Wolski KE, Nicholls SJ, Balog C, Crowe TD, Nissen SE. Effects of normal, pre-hypertensive, and hypertensive blood pressure levels on progression of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Aug 15;48(4):833-8.
7. Webb AJ, Fischer U, Mehta Z, Rothwell PM. Effects of antihypertensive-drug class on interindividual variation in blood pressure and risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010 Mar 13;375(9718):906-15.
8. Williams B, Lacy PS, Thom SM, Cruickshank K, Stanton A, Collier D, Hughes AD, Thurston H, O'Rourke M; CAFE Investigators; Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial Investigators; CAFE Steering Committee and Writing Committee. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation*. 2006 Mar 7;113(9):1213-25.
9. Chiba T, Yamanaka M, Takagi S, Shimizu K, Takahashi M, Shirai K, Takahara A. Cardio-ankle vascular index (CAVI) differentiates pharmacological properties of vasodilators nicardipine and nitroglycerin in anesthetized rabbits. *J Pharmacol Sci*. 2015 Aug;128(4):185-92.
10. Chiba T, Sakuma K, Komatsu T, Cao X, Aimoto M, Nagasawa Y, Shimizu K, Takahashi M, Hori Y, Shirai K, Takahara A. Physiological role of nitric oxide for regulation of arterial stiffness in anesthetized rabbits. *J Pharmacol Sci*. 2019 Jan;139(1):42-45.
11. Sakuma K, Shimoda A, Shiratori H, Komatsu T, Watanabe K, Chiba T, Aimoto M, Nagasawa Y, Hori Y, Shirai K, Takahara A. Angiotensin II acutely increases arterial stiffness as monitored by cardio-ankle vascular index (CAVI) in anesthetized rabbits. *J Pharmacol Sci*. 2019 Jun;140(2):205-209.
12. Shimizu K, Yamamoto T, Takahashi M, Sato S, Noike H, Shirai K. Effect of nitroglycerin administration on cardio-ankle vascular index. *Vasc Health Risk Manag*. 2016 Aug 3;12:313-9
13. Shirai K, Song M, Suzuki J, Kurosu T, Oyama T, Nagayama D, Miyashita Y, Yamamura S, Takahashi M. Contradictory effects of  $\beta_1$ - and  $\alpha_1$ - adrenergic receptor blockers on cardio-ankle vascular stiffness index (CAVI)--CAVI independent of blood pressure. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(1):49-55.

14. Hayashi K, Handa H, Nagasawa S, Okumura A, Moritake K. Stiffness and elastic behavior of human intracranial and extracranial arteries. *J Biomech.* 1980;13(2):175-84.
15. Shirai K, Utino J, Otsuka K, Takata M. A novel blood pressure-independent arterial wall stiffness parameter; cardio-ankle vascular index (CAVI). *J Atheroscler Thromb.* 2006 Apr;13(2):101-7.
16. Bramwell JC, Hill AV. The Velocity of the Pulse Wave in Man. *Proc Roy Soc.* 1922; B:298–306.
17. Nakamura K, Tomaru T, Yamamura S, Miyashita Y, Shirai K, Noike H. Cardio-ankle vascular index is a candidate predictor of coronary atherosclerosis. *Circ J.* 2008 Apr;72(4):598-604.
18. Namekata T, Suzuki K, Ishizuka N, Shirai K. Establishing baseline criteria of cardio-ankle vascular index as a new indicator of arteriosclerosis: a cross-sectional study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2011 Aug 10;11:51.
19. Takaki A, Ogawa H, Wakeyama T, Iwami T, Kimura M, Hadano Y, Matsuda S, Miyazaki Y, Matsuda T, Hiratsuka A, Matsuzaki M. Cardio-ankle vascular index is a new noninvasive parameter of arterial stiffness. *Circ J.* 2007 Nov;71(11):1710-4.
20. Izuhara M, Shioji K, Kadota S, Baba O, Takeuchi Y, Uegaito T, Mutsuo S, Matsuda M. Relationship of cardio-ankle vascular index (CAVI) to carotid and coronary arteriosclerosis. *Circ J.* 2008 Nov;72(11):1762-7.
21. Miyoshi T, Doi M, Hirohata S, Sakane K, Kamikawa S, Kitawaki T, Kaji Y, Kusano KF, Ninomiya Y, Kusachi S. Cardio-ankle vascular index is independently associated with the severity of coronary atherosclerosis and left ventricular function in patients with ischemic heart disease. *J Atheroscler Thromb.* 2010 Mar 31;17(3):249-58.
22. Horinaka S, Yabe A, Yagi H, Ishimura K, Hara H, Iemua T, Matsuoka H. Comparison of atherosclerotic indicators between cardio ankle vascular index and brachial ankle pulse wave velocity. *Angiology.* 2009 Aug-Sep;60(4):468-76.
23. Takenaka T, Ohno Y, Suzuki H. Clinical science of calcium channel blocker to inhibit hypertensive vascular injury. *Curr Hypertens Rev.* 2013 Aug;9(3):193-201.

24. Horikoshi Y, Katsuda SI, Fujikura Y, Hazama A, Shimura H, Shimizu T, Shirai K. Opposing Responses of the Calcium Channel Blocker Nicardipine to Vascular Stiffness in the Elastic and Muscular Arteries in Rabbits. *J Atheroscler Thromb.* 2021 Dec 1;28(12):1340-1348.
25. Tawara S, Shimokawa H. Progress of the study of rho-kinase and future perspective of the inhibitor. *Yakugaku Zasshi.* 2007 Mar;127(3):501-14.
26. Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, Sugimoto Y, Takakura K. A postmarketing surveillance study of fasudil treatment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol.* 2007 Aug;68(2):126-31
27. Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Nagata I, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H, et al. Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J Neurosurg.* 1992 Apr;76(4):571-7.
28. Isobe T, Mizuno K, Kaneko Y, Ohta M, Koide T, Tanabe S. Effects of K-115, a rho-kinase inhibitor, on aqueous humor dynamics in rabbits. *Curr Eye Res.* 2014 Aug;39(8):813-22.
29. Asano T, Ikegaki I, Satoh S, Suzuki Y, Shibuya M, Takayasu M, Hidaka H. Mechanism of action of a novel antivasospasm drug, HA1077. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 Jun;241(3):1033-40.
30. Meredith PA, Elliott HL. Dihydropyridine calcium channel blockers: basic pharmacological similarities but fundamental therapeutic differences. *J Hypertens.* 2004 Sep;22(9):1641-8.
31. Nagasawa Y, Shimoda A, Shiratori H, Morishita T, Sakuma K, Chiba T, Cao X, Kawakami S, Aimoto M, Miyazaki C, Sato S, Takahashi M, Shimizu K, Shirai K, Takahara A. Analysis of effects of acute hypovolemia on arterial stiffness in rabbits monitored with cardio-ankle vascular index. *J Pharmacol Sci.* 2022 Mar;148(3):331-336.
32. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev.* 2015 Oct;67(4):821-70.
33. Pruneau D, Angus JA. Omega-conotoxin GVIA is a potent inhibitor of sympathetic neurogenic responses in rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 1990 May;100(1):180-4.

34. Uneyama H, Takahara A, Dohmoto H, Yoshimoto R, Inoue K, Akaike N. Blockade of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  current by cilnidipine (FRC-8653) in acutely dissociated rat sympathetic neurons. *Br J Pharmacol*. 1997 Sep;122(1):37-42.
35. Nap A, Mathy MJ, Balt JC, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. The evaluation of the N-type channel blocking properties of cilnidipine and other voltage-dependent calcium antagonists. *Fundam Clin Pharmacol*. 2004 Jun;18(3):309-19.
36. Takahara A, Iwasaki H, Nakamura Y, Sugiyama A. Cardiac effects of L/N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker cilnidipine in anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol*. 2007 Jun 22;565(1-3):166-70.
37. Takahara A. Cilnidipine: a new generation Ca channel blocker with inhibitory action on sympathetic neurotransmitter release. *Cardiovasc Ther*. 2009 Summer;27(2):124-39.
38. Takahara A, Koganei H, Takeda T, Iwata S. Antisymphathetic and hemodynamic property of a dual L/N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker cilnidipine in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002 Jan 2;434(1-2):43-7.
39. Fujita T, Ando K, Nishimura H, Ideura T, Yasuda G, Isshiki M, Takahashi K; Cilnidipine versus Amlodipine Randomised Trial for Evaluation in Renal Disease(CARTER) Study Investigators. Antiproteinuric effect of the calcium channel blocker cilnidipine added to renin-angiotensin inhibition in hypertensive patients with chronic renal disease. *Kidney Int*. 2007 Dec;72(12):1543-9.
40. Ishizaka T, Takahara A, Iwasaki H, Mitsumori Y, Kise H, Nakamura Y, Sugiyama A. Cardiovascular effects of azelnidipine in comparison with those of amlodipine assessed in the halothane-anaesthetized dog. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010 Feb;106(2):135-43.
41. Miyashita Y, Saiki A, Endo K, Ban N, Yamaguchi T, Kawana H, Nagayama D, Ohira M, Oyama T, Shirai K. Effects of olmesartan, an angiotensin II receptor blocker, and amlodipine, a calcium channel blocker, on Cardio-Ankle Vascular Index (CAVI) in type 2 diabetic patients with hypertension. *J Atheroscler Thromb*. 2009 Oct;16(5):621-6.
42. Bokuda K, Morimoto S, Seki Y, Yatabe M, Watanabe D, Yatabe J, Ando T, Shimizu S, Itoh H, Ichihara A. Greater reductions in plasma aldosterone with aliskiren in hypertensive patients with higher soluble (Pro)renin receptor level. *Hypertens Res*. 2018 Jun;41(6):435-443.