

# 動脈硬化とカルシウム拮抗薬

齋藤 康\*

## はじめに

動脈硬化の成立過程，進展過程は複雑であり，多くの因子が関与していることが知られている。そしてその機構も多岐にわたっているのである。動脈硬化巣にはカルシウムの沈着がみとめられることが知られている。これが起こる機構についてつぎのようなことがしめされている。加齢とともに動脈壁のカルシウムの沈着と骨量の減少の間には密接な相関関係が存在し，加齢に伴い動脈のエラスチンのアミノ酸組成に変化が生じ，カルシウムとの親和性が増加するため動脈壁へのカルシウムの沈着が促進されると推測されている。さらにカルシウムの細胞内への流入を阻害することにより動脈硬化の発生を防止できることからカルシウムが動脈硬化のイニシエーターであることを示唆している<sup>1)</sup>。またコレステロールを負荷した実験動物でカルシウム拮抗薬は動脈硬化を抑制することがみられるという報告がされた<sup>2)</sup>。コレステロール負荷によって起こる動脈硬化の変化は必ずしも単純ではなく，薬剤の作用点も明確ではない。事実 Weinstein らは同様の実験でコレステロールのエステル化や細胞外マトリックス蛋白の合成阻害がみられると報告しているが，この機構はカルシウム流入機構とは異なった機能のようにおもわれるとしている<sup>3)</sup>。これらの事実は同じカルシウム拮抗薬でもその効果はかならずしも一定していないことの原因かもしれない(表1)。

臨床成績もいくつかだされているが，従来は狭心症や心筋梗塞の発生，心臓による突然死などへの効果として評価されてきた。それに対して血管撮影による血管病変を解析してその効果を検定す

る方法がなされるようになってきている。そのなかでも The international Nifedipine trial on antiatherosclerotic therapy (INTACT) は三年以上の間隔をおいて血管撮影をおこないその変化をとらえるというものである。現在も進行中でありその一部が報告されている<sup>4)</sup>。図1は三年間であらたに発生した病変(最初には見られなかった狭窄や閉塞が三年後にみられたもの)はカルシウム拮抗薬で抑制されることを示している。さらに3つの主幹枝を比較しても同様にカルシウム拮抗薬はあたらしい病変の出現を抑制した(図2)。

以上のようにカルシウム拮抗薬は動脈硬化の形成に作用し，それを抑制していることが伺えるのである。しかしそれがどのようにして抑制しているかについては必ずしも明かとはいえない。動脈硬化形成の複雑な機構のなかから平滑筋細胞の増殖と内膜肥厚，そして LDL 代謝について述べたい。

## 実験方法

### 1. カニキュレーション法による内膜肥厚の作成とニフェジピンの投与効果

ウィスター系ラット雄性250gを用い，住吉らの方法に準じて大腿動脈からポリ塩化ビニールチューブを腹部大動脈まで挿入，留置して，普通食にて飼育した。ニフェジピン投与の影響は次の3群に分け検討した。

第1群 対照群

第2群 カニキュレーション施行群

第3群 カニキュレーション施行+ニフェジピン40mg/kg/日経口投与群

各5匹ずつ作成し，4週間飼育した。

屠殺後，大動脈の内中膜のDNA含有量をKissaneの方法で測定し，大動脈内中膜の肥厚の

\*千葉大学第二内科

表1 実験的動脈硬化症に対する Ca<sup>++</sup>拮抗薬の効果 (折茂ら)

Authors	Drug	Dose(per day)	Animal	Effectiveness
Kramsch et al.	LaCl <sub>3</sub>	40 mg/kg p. o.	rabbit	+++
Kramsch et al.	LaCl <sub>3</sub>	40 mg/kg p. o.	rabbit	+++
Henry	nifedipine	40 mgp. o.	rabbit	+++
Rouleau et al.	LaCl <sub>3</sub>	35 mg/kg p. o.	rabbit	±
	verapamil	8 mg/kg p. o.		±
	varapamil	8 mg/kg p. o. +0.5 mg/kg p. o.		++
Ginsburg	LaCl <sub>3</sub>	40 mg/kg p. o.	rabbit	++
	diltiazem	103 mg/kg p. o.		+
	flunarizine	5.7 mg/kg p. o.		+
Naito et al.	LaCl <sub>3</sub>	40 mg/kg p. o.	rabbit	±
Naito et al.	nicardipine	20 mg/kg p. o. 70 mg/kg p. o.	rabbit	-
Stender et al	nifedipine	40 mg/kg p. o.	rabbit	-
Van Nieker et al.	nifedipine	40 mg/kg p. o.	WHHL rabbit	-
Tilton et al.	verapamil	46 mg/kg p. o. +0.25 mg/kg s. c.	WHHL rabbit	-
Willis et al.	nicardipine	40 mg/kg p. o.	rabbit	++
	nifedipine	" "		++
Thiery et al.	flunarizine	15 mg p.o.	rabbit	+

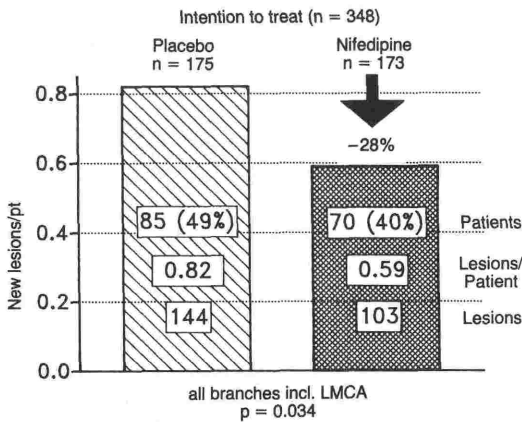


図1 Distribution of new lesions on placebo and nifedipine (see text)

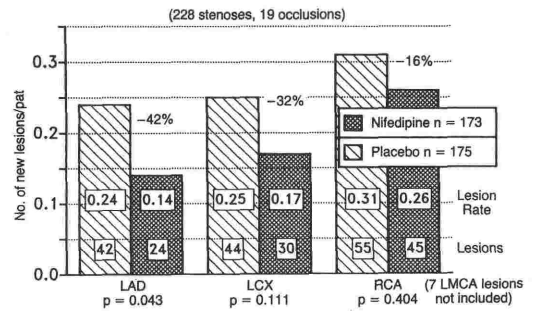


図2 New lesions formation on the three major coronary arteries (see text)

指標とした。

2. カニューレーション法による家兎大動脈の肥厚作成と、肥厚内膜細胞および中膜細胞の培養

日本白色在来種家兎の大腿動脈から腹部大動脈までカニューレを挿入留置し、4週間飼育した後大動脈を摘出し、肥厚内膜および中膜から Ex-

plant 法により培養、平滑筋細胞の調整を行った。培養液は Dulbecco modified Eagle medium (10%牛胎児血清含有)を用い95% CO<sub>2</sub>-5% O<sub>2</sub>で継代培養を行なった。

増殖能は、継代3代目のものを用い、細胞数をコールターカウンターにて測定した。

### 3. 中膜平滑筋細胞の脂質代謝に及ぼすニフェジピンの作用

先の方法で得られた培養中膜平滑筋細胞を用い LDL (1.019<d<1.063)はヒト血清より超遠心法で分離し、クロラミン T 法にて <sup>125</sup>I のラベルをおこなった。 <sup>125</sup>I-LDL の結合能は Goldstein らの方法に準じた。脂質合成能の検討は [ <sup>14</sup>C ] acetate, [ <sup>14</sup>C ] palmitate を基質として用い平滑筋細胞とインキュベーション 8 時間した後、Folch 法で脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー法で脂質を分画した。展開溶剤は Skipski の系を用い二段法で行なった。

#### 成績と考察

#### 1. カニューレレーション法による大動脈内膜肥厚とカルシウム拮抗剤の影響

ラット大動脈に大腿動脈から腹部大動脈までカニューレレーションを行ない 4 週間飼育した。図 3 に示すごとく動脈の DNA 含有量は未処置群では胸部と腹部とでは差がみられなかったが、カニューレレーション施行群では腹部大動脈の DNA 含有量の増加が見られた。この現象は Balloonig 法などによってもみることの出来るものでいわゆる “Response to injury theory” で説明されるよう

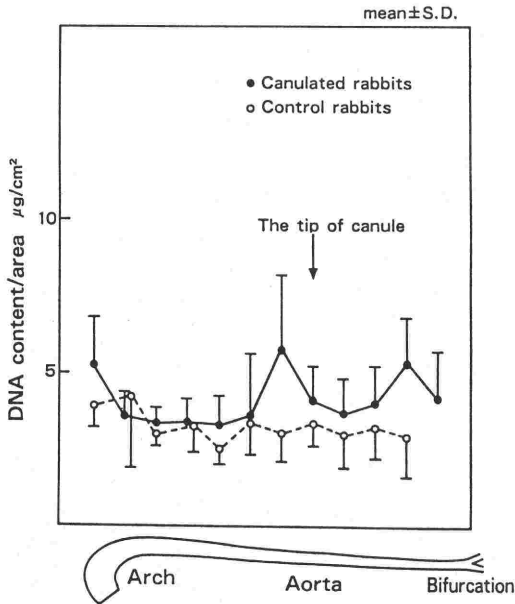


図 3 家兎大動脈へのカニューレレーションによる DNA 含有の変動。(カニューレは大腿動脈から ↓ 印まで挿入留意)

に内皮細胞の障害による平滑筋細胞の遊走と増殖という機構がその主たるものと推測される。従来からみられている高コレステロール血症による動脈硬化のカルシウム拮抗剤の抑制作用の機構の一つにはこの学説で説明されるものの存在が考えられる。そこで、この実験家兎におけるカルシウム拮抗剤の効果を検討した。

ラットにカニューレレーションを施行し、4 週間ニフェジピンを 40mg/kg/日経口投与し非投与群と腹部大動脈の DNA 含有量を比較した。図 4 に示すごとくカニューレレーションを施行した群では、しない群に比べて有意に腹部大動脈の DNA 含有量は高かった。ニフェジピン投与群では、有意にその増加が抑制された。この実験家兎における内膜肥厚は主として平滑筋細胞の増加によるものでされており、その機構は平滑筋細胞の中膜からの遊走の亢進、増殖の促進によるものと説明されている。カルシウム拮抗剤がこの内膜肥厚を抑制したことは、それらの検討が求められる。

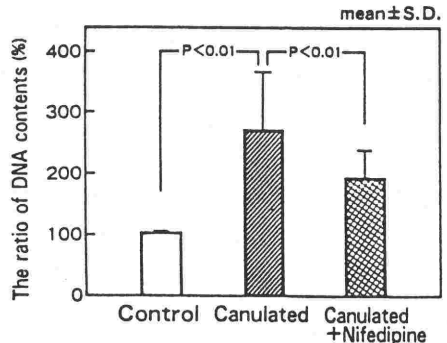


図 4 カニューレレーションによる DNA 含量増加に及ぼすニフェジピン投与の影響。  
左：DNA 含有量の変動

#### 2. カニューレレーション法による大動脈内膜肥厚部とから得られた平滑筋細胞の増殖能の比較とニフェジピンの作用

家兎大腿動脈よりポリ塩化ビニールチューブを腹部大動脈までカニューレレーションし、4 週間後内膜肥厚が生じた部分を Explant し得られた細胞の増殖能と中膜より同様に得られた平滑筋細胞のそれとを比較すると図 5 に示すごとく肥厚内膜から得られた平滑筋細胞は、その増殖能の高いことが認められた。

このような増殖能の高い内膜平滑筋細胞の増殖

に対するニフェジピンの作用を次に検討した。

図6に示すごとく、ニフェジピンはその量に依存的に低下することが認められた。これらの事実から Nifedipine には動脈硬化病巣の内膜肥厚にみられる細胞増殖を抑制する作用のあることが推測された。

### 3. 中膜平滑筋細胞の脂質代謝に及ぼすニフェジピンの作用

#### i) <sup>125</sup>I-LDL代謝

<sup>125</sup>I-LDL代謝の中膜平滑筋細胞への結合能および異化能は図7に示すごとくニフェジピンを加えても変動が見られず、ニフェジピンは LDL 代謝

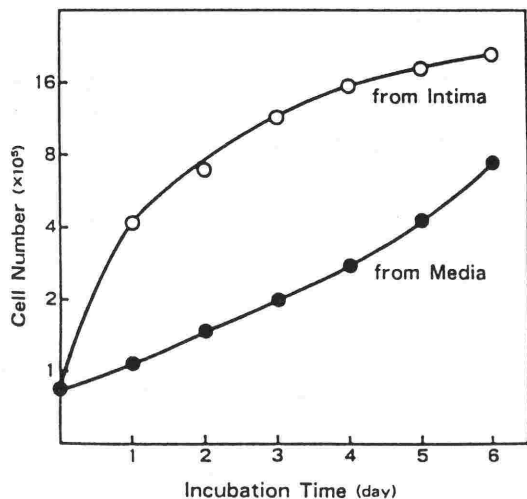


図5 中膜と内膜由来の平滑筋細胞の増殖能の比較。

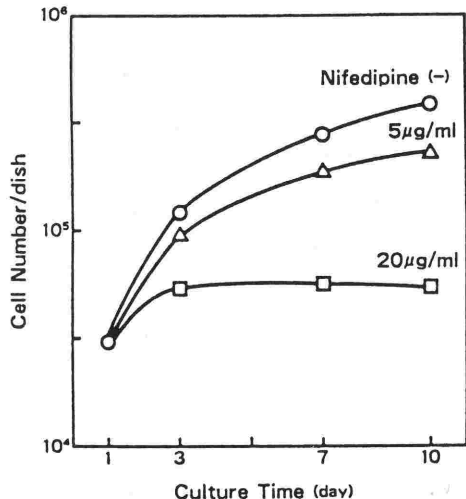


図6 内膜由来の平滑筋細胞増殖に及ぼすニフェジピンの作用。

のうち結合能および異化能に影響を有すと思われなかった。

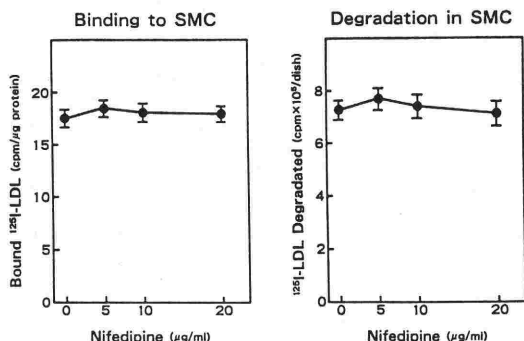


図7 血管壁平滑筋の LDL 代謝に及ぼすニフェジピンの作用。

#### ii) [<sup>3</sup>H]cholesterol のエステル化能

細胞内でコレステロールは acyl CoA cholesterol acyl transferase によってエステル化され蓄積脂質になるといわれる。図8に示すごとく [<sup>3</sup>H]cholesterol の uptake はかわらず、エステル化能は著明に抑制をうけた。

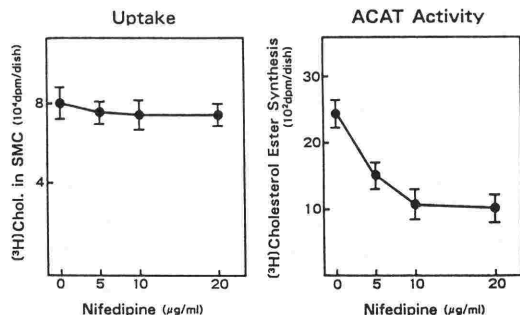


図8 血管壁平滑筋細胞のコレステロール代謝に及ぼすニフェジピンの作用。

左: [<sup>3</sup>H] コレステロールの貼り込み

右: [<sup>3</sup>H] コレステロールのエステル化能

#### iii) [<sup>14</sup>C]palmitate, [<sup>14</sup>C]acetate からの脂質への合成能 (図9)

[<sup>14</sup>C]palmitate からの中性脂肪への合成はニフェジピン投与によって増加がみられ、一方、リン脂質は増加、コレステロールエステルは増加傾向がみられたが、全体からすると数%にすぎなかった。[<sup>14</sup>C]acetate からの脂質分画への取りこみは、コレステロールへは減少がみられ、中性脂肪へは

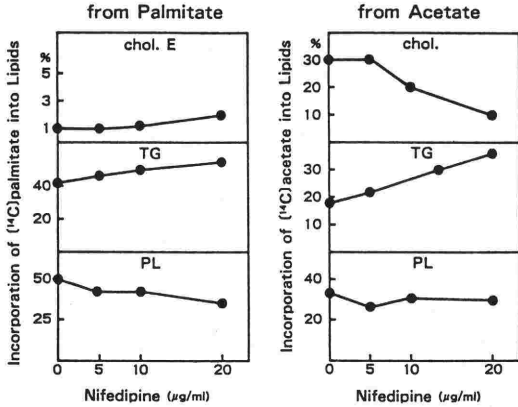


図9 血管壁平滑筋細胞の de novo 脂質合成に及ぼすニフェジピンの作用。

上昇がみられた。

まとめ

以上のような事実をくわえてカルシウム拮抗薬の動脈硬化に及ぼす効果は図10に示すようにまとめることができる。

- 1) リポ蛋白などの巨大分子の内皮細胞からの透過性昂進の抑制<sup>5)</sup>
- 2) 高コレステロール血症による内皮細胞からの因子の放出障害の保護 (たとえば EDRF の放出障害の保護など)<sup>6)</sup>
- 3) 血小板の接着凝集の抑制<sup>7)</sup>
- 4) マクロファージによる脂質取込みの抑制<sup>8)</sup>
- 5) 6) マクロファージや平滑筋細胞からの脂質放出の促進<sup>9, 10)</sup>
- 7) 平滑筋細胞遊走の抑制<sup>11)</sup>
- 8) 平滑筋細胞遊走の増殖<sup>12)</sup>
- 9) 平滑筋細胞による細胞外物質産生の抑制<sup>13)</sup>
- 10) カルシウム取込の抑制<sup>14)</sup>

先にものべたようにこれらの効果がすべてカルシウムの流入の変化を介して起こる現象とは言い難い。しかし動脈硬化の予防、治療に重要な意味をもつことは確かであろう。

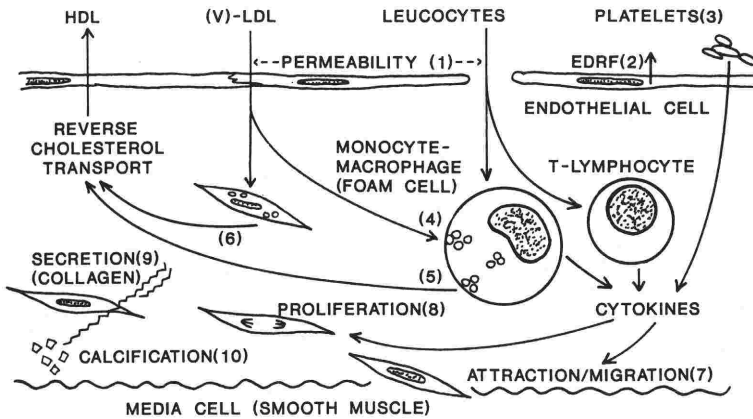


図10 Possible antiatherosclerotic mechanisms of action of calcium antagonists. 1 Prevention of endothelial hyperpermeability to macromolecules (lipoproteins) [5]. 2 Prevention of hypercholesterolemic endothelial paracrine dysfunction (such as defective release of endothelium-dependent relaxation factor, EDRF) [6]. 3 Prevention of platelet adhesion and aggregation [7]. 4 Inhibition of lipid uptake by macrophages [8]. 5, 6 Enhanced release of lipid from macrophages [9] and smooth muscle cells [10] (promotion of reverse cholesterol transport). 7 Inhibition of chemoattraction and migration of smooth muscle cells [11]. 8 Inhibition of replication (proliferation) of vascular smooth muscle cells [12]. 9 Inhibition of matrix protein production by vascular smooth muscle cells [13]. 10 Inhibition of calcium uptake in the absence and presence of hypercalcemia [14].

文 献

- 1) 折茂 肇: 動脈硬化と Ca: 動脈硬化症研究. の進歩, 8 : 3-26, 1985.
- 2) Henry, P. D. and Bentley, K. I.: Suppression of atherogenesis in cholesterol-fed rabbit treated with nifedipine, *J. Clin. Invest.*, 68:1366-1369, 1981.
- 3) Weinstein, D. B.: Heider JG: Protective action of calcium channel antagonists in atherogenesis and experimental vascular injury: *Am. J. Hypertension*, 2:205-212 1989.
- 4) Lichtlen, P. R., Hugenholtz, P. G. et al.: Retardation of angiographic progression of coronary arterydisease by nifedipine, *Lancet* 335: 1109-1113, 1990.
- 5) Tedgui, A., Chiron, B., Curmi, P., Juan, L.: Effect of nicardipine and varapamil on in vitroalbumin transport in rabbit thoracic aorta. *Arteriosclerosis* 7:80-87, 1987.
- 6) Habib, J. B., Bossaler, C., Wells, S., Williams, C., Morrisett, J. D., Henry, P. D.: Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbit by treatment with the calcium blocker PN 200110. *Circ Res* 58: 305-309, 1986.
- 7) Moore, J. B., Fuller, B. L., Falotian, R., Toman, E. L.: Inhibition of rabbit platelet phosphodiesterase activity and aggregation by calcium channel blockers. *Thromb Res* 40:401-411. 1985.
- 8) Daugherty, A, Rateri, D. L., Schonfeld, G., Sobel, B. E.: Inhibition of cholesteryl ester deposition in macrophages by calcium entry blockers: an effect dissociable from calcium entry blockade. *Br J Pharmacol* 91:113-118, 1987.
- 9) Schmits, G., Robenek, H. et al.: Ca<sup>++</sup> antagonists and ACAT inhibitors promotecholesterol efflux from macrophages by different mechanisms. *Arteriosclerosis* 8:46-56, 1988.
- 10) Etingin, OR, Hajjar, DP.: Nifedipine increases cholesteryl ester hydrolytic activity in lipid-laden rabbit arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 75:1554-1558, 1985.
- 11) Nomoto, A., Hirosumi, J., Sekiguchi, C., Mutoh, S., Yamaguchi, I., Aoki, H.: Antiatherogenic activity of FR34235 (Nilvadipine) a new potent-calcium antagonist. *Atherosclerosis* 64:255-261, 1987.
- 12) Nilsson, J., Sjolund, M., Palmberg, L., Von Euler, A. M., Jonzon, B, Thyberg, J: The calcium antagonist nifedipine inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis* 58:109-122, 1985.
- 13) Weinstein, D. B., Heider, J.G.: Antiatherogenic properties of calcium antagonists. *Am J Cardiol* 59:163B-172B, 1987.
- 14) Fleckenstein, A.: Calcium antagonism in heart and smooth muscle. Wiley, New York, pp. 272-279, 1983.