Nifedipine急性降圧反応における

リンパ球内 Ca^{2+} 濃度の意義

広島大学医学部第一内科 新宮哲司◇松浦秀夫 大島哲也 松本公治
井上一郎 木戸幸司 大月知文 梶山梧朗

概要 本態性高血圧症患者32例および正常血圧者11例を対象にnifedipine舌下投与を行い、nifedipineによる降圧度とリンパ球における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) および臨床的諸指標の関係について検討した。本態性高血圧症患者では正常血圧者に比し、nifedipineによる降圧度、リンパ球 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は高値を、血漿レニン活性 (PRA) は低値を示した。また、本態性高血圧症患者ではnifedipineによる降圧度はリンパ球 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と正の、PRAと負の相関を示し、その寄与率はリンパ球 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が有意に高かった。以上より、本態性高血圧症患者では細胞内 Ca^{2+} 流入が増強していることおよび Ca^{2+} 動態異常に血漿レニン活性が関係していることが示唆された。
〔日内会誌 78: 635~640, 1989〕

緒 言

Ca拮抗薬であるnifedipineは、細胞膜を介した細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を減少させることにより血管を拡張させる降圧薬¹⁾であり、臨床に広く用いられている。従って、同薬物は特に Ca^{2+} 動態異常の強い高血圧患者に有用であることが考えられる。

多くの研究者により、本態性高血圧症患者では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が正常血圧者に比し増加し、 Ca^{2+} 動態異常が存在することが示されている^{2)~4)}。この実験的証明は、本態性高血圧症患者に対しCa拮抗薬が有効であるという臨床的事実に一致する。しかしながら、本態性高血圧症患者の中でも個人個人によりCa拮抗薬に対する降圧反応性は異なっている。Ca拮抗薬に対する降圧反応の程度は、安静時血圧、年齢あるいは血漿レニン活性により予測可能であるという報告がある^{5)~8)}。すなわち、安静時血圧が高いほど⁵⁾⁶⁾、高齢者ほど⁵⁾あるいは血漿レニン活性が低値であるほど⁷⁾⁸⁾Ca拮抗薬に対する

反応が大きいとされている。しかしながら、Ca拮抗薬に対する反応において細胞レベルでの Ca^{2+} 代謝異常が如何に関与しているかという報告は未だ見ない。

そこで今回我々は、nifedipine急性降圧反応にリンパ球 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ および臨床的諸指標が如何に関与しているかということを明らかにする目的で、本態性高血圧症患者および正常血圧者に対してnifedipine舌下投与を行い、nifedipine投与前後の血圧、リンパ球 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ および臨床的諸指標の測定を行った。

対象および方法

入院中の未治療もしくは降圧薬を4週間以上休薬中のWHO I期あるいはII期の本態性高血圧症患者32例（男性15例、女性17例、平均年齢 54.0 ± 9.0 才）、正常血圧者11例（男性6例、女性5例、平均年齢 52.6 ± 18.0 才）を対象とした。本態性高血圧症患者は全例、日を変えて3回以上測定した外来血圧が $160/95\text{mmHg}$ 以上、かつ二次性高血圧

〔昭和63年12月23日受稿〕

Association of intracellular free calcium concentration in lymphocytes with acute hypotensive response to nifedipine in patients with essential hypertension.

Tetsuji SHINGU, Hideo MATSUURA, Tetsuya OSHIMA, Koji MATSUMOTO, Koji KIDO, Tomofumi OTSUKI, Ichiro INOUE and Goro KAJIYAMA, The First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima

症が否定された症例で、入院後1週間食塩摂取量を1日10g, Ca摂取量を600mgとした。正常血圧者は全例、外来血圧が140/90mmHg以下、かつ高血圧の家族歴をもたない症例で、外来にて食事指導により1日食塩摂取量が10g, Ca摂取量が600mgになるようにし、検査前1週間の1日尿中排泄量で確認した。全例に検査の内容について説明し、口頭で同意を得た。

検査当日は、朝絶食下に血管確保し、暗室にて30分間臥位安静の後、安静時血圧および脈拍を測定し、血清Na, K, Ca濃度、血漿レニン活性(PRA)、血漿ノルエピネフリン濃度(PNE)およびリンパ球[Ca²⁺]i測定用の採血を行った。安静時血圧は水銀血圧計にて10回、脈拍は触診法で1分間を2回測定しそれぞれ平均を用いた。引き続きnifedipine 10mgの舌下投与を行い、投与後60分まで5分毎に血圧を5回、脈拍を1回測定し血圧はその平均を用いた。nifedipineによる降圧度は、nifedipine投与前の平均血圧と投与後最大降圧に達した時点の平均血圧の差と定義した。

血清および尿中のNa, K, Ca濃度は自動分析機で、PRAはRIA法⁹⁾で、PNEは高速液体クロマトグラフィー¹⁰⁾を用いて測定した。リンパ球[Ca²⁺]iは以前報告した様にAmbrosioniらの変法を用い比重遠沈法によりリンパ球を分離し、細胞内Ca²⁺測定用蛍光指示薬quin 2を用いてTsienらの方法に準じ測定した¹¹⁾。すなわち、ヘパリン血20mlをRPMI-1640 (Gibco Laboratories, Ohio, USA)で2倍に希釈し、比重1077g/lのFicoll-metrizoate mixture (Lymphoprep, Nyegaard Co, Oslo, Norway)に重層し、400g, 35分間、室温で遠沈した。遠沈後リンパ球層を採取しRPMI-1640で100g, 10分間、室温で2回洗浄した後、RPMI-1640中でquin 2 tetraacetoxymethyl ester (quin 2 AM, 同仁化学, 熊本)を50mMの濃度で37℃, 40分間負荷した。Quin 2 AM負荷終了後RPMI-1640で洗浄し、RPMI-1640中で60分間室温に放置しquin 2AMを加水分解させた。加水分解後生理的緩衝液 (mmol/l: NaCl 145, KCl 5, NaHEPES 10, Na₂HPO₄ 1, CaCl₂ 1, MgSO₄

0.5, glucose 5, pH 7.4)で2回洗浄し、生理的緩衝液650μlに再浮遊させ測定に供した。蛍光測定には日立製作所の204S型分光蛍光光度計を用い、励起波長339nm, 蛍光波長492nm, スリット幅をそれぞれ4nm, 10nmとして測定した(F)。calibrationは、100μmol/l(最終濃度)digitoninにより細胞膜を破壊しCa²⁺を細胞内より遊離させquin 2との最大結合時の蛍光強度(Fmax)を求め、20mmol/l EGTAおよび20mmol/l TrisによりCa²⁺をキレートし、最小蛍光強度(Fmin)を求めて行った。[Ca²⁺]iはTsienらの報告した次式より算出した。[Ca²⁺]i=115nmol/l×(F-Fmin)/(Fmax-F)。115nmol/lは細胞内におけるCa²⁺とquin 2との解離定数。この測定系における変動係数は7%以下であり、日差変動は8%以下であった。

統計解析にはStatistical Analysis System Program (SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用した。本態性高血圧症患者と正常血圧者の比較にはWilcoxon's signed rank-sum testを、相関係数にはPearson's correlation coefficientを用いた。また多変量解析をnifedipineによる降圧度を目的変数とし、backward elimination変数選択法を用いて行った。結果はすべてmeans±SDで表示し、p<0.05を有意とした。

結 果

本態性高血圧症患者および正常血圧者の臨床的背景を表1に示す。本態性高血圧症患者では正常血圧者に比し平均血圧が有意に高値を、PRAが有意に低値(1.6±1.0 vs. 2.4±0.8ng/ml/h, p<0.05)を示した他は、年齢、性差、体重、血清Na, K, Ca濃度、尿中Na, K, Ca排泄量およびPNEに両群間で有意差を認めなかった。

リンパ球[Ca²⁺]iは、本態性高血圧症患者で141.1±11.7nmol/l、正常血圧者で125.8±12.6nmol/lと本態性高血圧症患者で有意に高値を示した(p<0.01; 図1A)。nifedipineによる最大降圧は両群ともに全例nifedipine投与後15分から30分の間に起こり、その降圧度は正常血圧者に比し本態性高血圧症患者で有意に大であった(20.8±7.0 vs. 4.4±2.5mmHg, p<0.01; 図1B)。

表 1. 本態性高血圧症患者および正常血圧者の臨床的背景因子

	HT	NT
Number	32	11
Male/Female	15/17	6/5
Age (years)	54±9	53±11
Body Weight (kg)	65±10	64±6
Mean Blood Pressure (mmHg)	110±10**	81±9
Serum Sodium Concentration (mmol/l)	142±3	141±2
Serum Potassium Concentration (mmol/l)	4.2±0.4	4.1±0.2
Serum Calcium Concentration (mmol/l)	2.3±0.1	2.3±0.1
Urinary Sodium Excretion (mmol/d)	157±11	158±10
Urinary Potassium Excretion (mmol/d)	46±11	42±7
Urinary Calcium Excretion (mmol/d)	3.3±1.0	3.4±0.6
Urinary Creatinine Excretion (g/d)	1.1±0.2	1.1±0.1
Plasma Renin Activity (ng/ml/時間)	1.6±1.0*	2.1±0.9
Plasma Norepinephrine Level (pg/ml)	155±59	171±78

正常血圧者に比し * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 1. 本態性高血圧症患者および正常血圧者における, A) リンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ と, B) nifedipine による降圧度 (ΔMBP with nifedipine) の比較検討

図 1B に示した様に, 本態性高血圧症患者の中でも nifedipine に対する降圧反応性が異なるため, 本態性高血圧症患者群で如何なる指標が nifedipine による降圧度に関係しているかを検討

図 2. Nifedipine による降圧度 (ΔMBP with nifedipine) とリンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ との関係, 本態性高血圧症患者 (●) では有意な正相関 ($r = 0.82$, $p < 0.01$) を認めたが, 正常血圧者 (○) では有意な相関を認めなかった ($r = -0.20$, NS). 回帰直線は本態性高血圧症患者を示す。

図 3. Nifedipine による降圧度 (ΔMBP with nifedipine) と血漿レニン活性 (PRA) との関係, 本態性高血圧症患者 (●) では有意な負の相関 ($r = -0.65$, $p < 0.01$) を認めたが, 正常血圧者 (○) では有意な相関を認めなかった ($r = 0.22$, NS). 回帰直線は本態性高血圧症患者を示す。

した, nifedipine による降圧度は, リンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ と正相関 ($r = 0.82$, $p < 0.01$; 図 2) を, PRA と負の相関 ($r = -0.65$, $p < 0.01$; 図 3) を示したが, 年齢 ($r = 0.23$, NS), 安静時平均血圧 ($r = 0.32$, NS) および PNE ($r = -0.29$, NS) とは有意な相関を示さなかった。また, PRA とリンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ との間に有意な負の相関を認めた ($r = -0.66$, $p < 0.01$; 図 4)。正常血圧者については, nifedipine による降圧度と諸指標の間にはいずれも有意な相関を認めなかった (図 2 ~ 4)。

本態性高血圧症患者の nifedipine による降圧度が如何なる指標によって説明可能かを検討するため, nifedipine による降圧度を目的変数, 年齢, 性

図4. リンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ と血漿レニン活性 (PRA) との関係。本態性高血圧症患者 (●) では有意な負の相関 ($r = -0.66$, $p < 0.01$) を認めたが、正常血圧者 (○) では有意な相関を認めなかった ($r = 0.44$, NS)。回帰直線は本態性高血圧症患者を示す。

表2. 本態性高血圧症患者における nifedipine による降圧度を目的変数とした重回帰分析

Variable	Coefficient	Standard error	F value
Constant	-62.156	1.672	
MBP	0.148	0.069	4.657
$[Ca^{2+}]_i$	0.472	0.060	62.016
R	0.845*		
R ²	0.715		

* $p < 0.001$

別、安静時平均血圧、リンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ 、PRA、PNEおよびnifedipineによる脈拍の変化度を説明変数として、重回帰分析を行った。それにより、安静時平均血圧およびリンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ が選択され、F値よりnifedipineによる降圧度に対する寄与度はリンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ が著明に大であった(表2)。安静時平均血圧およびリンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ を用いると、nifedipineによる降圧度の71.5%が説明可能であった ($R = 0.845$, $p < 0.001$)。

考 案

Nifedipine急性降圧反応における今回の我々の結果は、MacGregorらの報告⁵⁾と同様に、高血圧症患者で降圧度が大きであった。また、前回の我々の報告同様²⁾高血圧症患者では正常血圧者に比しリンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ が高値を示した。しかも、今回新しく得られた知見として、nifedipineによる降圧度とリンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ が正相関を示した。すなわち、リンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ が高いほどnifedipineによる

降圧度が大きであった。この知見は我々の知る限りでは初めての報告であり、本態性高血圧症の成因を考える上で重要な所見と考えられる。nifedipineの降圧効果は、抵抗血管に直接作用して、血管平滑筋細胞内へのCa²⁺流入を抑制し、血管拡張を引き起こすことによると考えられている¹⁾。従って、リンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ が高い高血圧症患者ほどnifedipineによる降圧度が大きであった事は、本態性高血圧症患者ではCa²⁺の細胞外から細胞内への流入が亢進していることを示唆する。

しかしながら、血圧と細胞内電解質代謝異常との関係を論じる際、血球細胞が実際に血管平滑筋細胞を反映するかということが問題となる。動物実験では、細胞内電解質代謝異常が各種の組織細胞内で類似した動態をするということが確認されている¹²⁾。Aalkjaerらは、Na-K pump活性について血管平滑筋細胞と白血球とで検討し、両細胞のNa-K pump活性の間には相関があったことを認めている¹³⁾。このことから、細胞内Ca²⁺動態について有核血球細胞と血管平滑筋細胞とは類似していると考えられる。また、nifedipine急性降圧反応の際に、圧受容体反射およびそれに引き続く交感神経活動の影響を考慮する必要がある。実際、Kiowskiらは、nifedipine負荷時の交感神経活動が高血圧症患者で低下しているためnifedipineによる降圧度が正常血圧者に比し大であるということを報告しており⁷⁾、我々の結果からそのことを否定はできないが、nifedipineによる降圧反応が $[Ca^{2+}]_i$ と密接な関係にあることは疑いのないところである。

治療前の血圧が、nifedipineによる降圧度を予測するよい指標となることが報告されている⁵⁾⁶⁾。今回の我々の結果では、nifedipineによる降圧度と治療前の血圧値との間に相関は認められなかった。他の研究者との相違は、対象患者の血圧値が異なることによると考える。つまり、今回の我々の研究では平均血圧が80~130mmHgと範囲が狭く、比較的軽症血圧患者を対象者に限ったためと考えられる。しかしながら、多変量解析の結果では治療前の平均血圧はnifedipineによる降圧

反応の予測因子として $[Ca^{2+}]_i$ に次いで選択され、我々の結果も諸家の報告⁵⁾⁶⁾を支持する結果であると言える。

我々は今回の研究から、以前報告した結果¹⁴⁾と同様にPRAが低いほど $[Ca^{2+}]_i$ が高値を示しnifedipineに対する降圧反応が大であることを認めた。PRAとnifedipineによる降圧度とが逆相関を示すという結果は、これまでのいくつかの臨床報告と一致する⁷⁾⁸⁾。Resnickらは血中イオン化Caが低レニン性高血圧症患者において低下しており、低レニン性高血圧症患者ほど、すなわち血中イオン化Caが低値を示す患者ほどnifedipineによる降圧度が大であると報告している⁹⁾。このことと今回の我々の得た低レニン性の高血圧症患者では、リンパ球 $[Ca^{2+}]_i$ が高値を示すという所見とを考え合わせると、低レニン性高血圧症患者では細胞外から細胞内へ Ca^{2+} が偏位していることが考えられるが、細胞外と細胞内の Ca^{2+} 動態の関係については詳細は不明である。多変量解析の結果ではPRAのnifedipineによる降圧度に対する寄与率は低く、 $[Ca^{2+}]_i$ の寄与率が極めて大であった。このことは、nifedipineによる降圧反応と $[Ca^{2+}]_i$ とが密接な関係にあり、PRAのnifedipineによる降圧反応に対する関係は $[Ca^{2+}]_i$ を介するものであることを強く示唆している。

細胞内Ca代謝異常が、低レニン性高血圧症患者で大であるという事実の機序については不明である。MacGregorらは、白血球を用いて低レニン性高血圧症患者で高レニン性高血圧症患者よりもNa輸送系が強く障害されていることを報告¹⁵⁾し、その機序として低レニン性高血圧症患者では循環血漿量の増加が大であり¹⁶⁾、そのため中枢性Na利尿ホルモンの分泌が増加し¹⁷⁾、それが細胞膜Na-K交換系を抑制し細胞内Na濃度を増加させ、Na-Ca交換系を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる¹⁸⁾と考えている。我々は、既にリンパ球を用いて細胞内Na濃度および Ca^{2+} 濃度を測定し、細胞内Na濃度と Ca^{2+} 濃度とが正相関すること²⁾¹⁴⁾、またそれらがPRAと負の相関を示すこと²⁾¹⁴⁾、また低レニン性高血圧症患者では、正レニン性高血圧症患者

に比し食塩に対する感受性が大であり、細胞内Na濃度および Ca^{2+} 濃度が高いこと¹¹⁾¹⁹⁾を報告している。このことは、MacGregorらの仮説を支持することであると考えられる。また、Resnickらは、低レニン性高血圧症患者では血清 Ca^{2+} 濃度が低下し、それによりCa調節ホルモンの分泌異常を来し、それが細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させていると考えている²⁰⁾。しかしいずれにしても、低レニン性高血圧症患者で細胞内Ca代謝異常が大であるという直接的な証明はなく、将来の研究に委ねるところである。

文 献

- 1) Vanhoutte PM: Calcium-entry blockers, vascular smooth muscle and systemic hypertension. *Amer J Cardiol* 55: 17B, 1985.
- 2) Oshima T, et al: Abnormalities in intralymphocytic sodium and free calcium in essential hypertension: Relation to plasma renin activity. *J Hypertens* 4: s334, 1986.
- 3) Erne P, et al: Correlation of platelet calcium with blood pressure effect of antihypertensive therapy. *New Engl J Med* 310: 1084, 1984.
- 4) Postnov Y, et al: Altered sodium permeability, calcium binding and Na-K ATPase activity in the red blood cell membrane in essential hypertension. *Pflugers Arch* 371: 263, 1977.
- 5) MacGregor GA, et al: Contrasting effects of nifedipine, captopril, and propranolol in normotensive and hypertensive subjects. *J Cardiovasc Pharmacol* 4: s35, 1982.
- 6) Magometshnigg D: Acute hypotensive response to nifedipine. *Hypertension* 5: II-80, 1983.
- 7) Kiowski W, et al: Hemodynamic and reflex responses to acute and chronic antihypertensive therapy with the calcium entry blocker nifedipine. *Hypertension* 5: I-70, 1983.
- 8) Resnick LM, et al: Calcium, the renin-aldosterone system, and the hypotensive response to nifedipine. *Hypertension* 10: 254, 1987.
- 9) Haber ET, et al: Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurement of plasma renin activity in normal healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metabol* 29: 1349, 1969.
- 10) Hallman H, et al: A sensitive method for the

- determination of plasma catecholamines using liquid chromatography with electrochemical detection. *Life Sci* 23: 1049, 1978.
- 11) Oshima T, et al: Intralymphocytic sodium and free calcium concentration in relation to salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Jpn Circ J* 51: 1184, 1987.
 - 12) Kwan CY: Dysfunction of calcium handling by smooth muscle in hypertension. *Canad J Physiol Pharmacol* 63: 366, 1985.
 - 13) Aalkjaer C, et al: Cell membrane sodium transport: A correlation between human resistance vessels and leucocytes. *Lancet* i: 649, 1986.
 - 14) Oshima T, et al: Intralymphocytic sodium and free calcium and plasma renin in essential hypertension. *Hypertension* 12: 26, 1988.
 - 15) Edmondson RPS, MacGregor GA: Leucocyte cation transport in essential hypertension: Its relation to the renin-angiotensin system. *Brit Med J* 282: 1267, 1981.
 - 16) Laragh JH, et al: Renin profiling for diagnosis and treatment of hypertension. *JAMA* 241: 151, 1979.
 - 17) de Wardener HE, MacGregor GA: Dahl's hypothesis that a saluretic substance may be responsible for a sustained rise in arterial blood pressure: Its possible role in essential hypertension. *Kidney Intern* 18: 1, 1980.
 - 18) Blaustein MP: Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: A reassessment and a hypothesis. *Amer J Physiol* 232: c165, 1977.
 - 19) Kido K, et al: Sodium chloride sensitivity, intracellular sodium concentration in erythrocytes and lymphocytes, and renin profile in essential hypertension. *Jpn Circ J* (in press).
 - 20) Resnick LM: Calcium metabolism, renin activity, and the antihypertensive effects of calcium channel blockade. *Amer J Med* 81: 6, 1986.
-