

若年男性喫煙者における末梢血管内皮機能障害と一酸化窒素産生能との関連

Relationship Between Endothelial Dysfunction and Nitric Oxide Production in Young Male Smokers

堀 知行
松原 琢
石橋 隆治*
樋口浩太郎
落合 幸江
竹本 稔
今井 俊介
中川 巖
尾崎 和幸
畑田 勝治
目崎 亨
土田 圭一
那須野暁光
西尾 眞友*
相澤 義房

Tomoyuki HORI, MD
Taku MATSUBARA, MD
Takaharu ISHIBASHI, MD*
Kotaro HIGUCHI, MD
Sachie OCHIAI, MD
Minoru TAKEMOTO, MD
Shunsuke IMAI, MD
Iwao NAKAGAWA, MD
Kazuyuki OZAKI, MD
Katsuharu HATADA, MD
Tohru MEZAKI, MD
Keiichi TSUCHIDA, MD
Akimitsu NASUNO, MD
Matomo NISHIO, MD*
Yoshifusa AIZAWA, MD, FJCC

Abstract

Objectives. Endothelial function in the brachial arteries is impaired in smokers. However, little is known about this condition in young adult men. The relationship between nitric oxide (NO) production and the endothelial function was investigated in young smokers and compared with non-smokers.

Methods. Flow-mediated vasodilation of the brachial artery during reactive hyperemia was examined in 10 young smokers (mean age 31 years) and 12 control subjects (mean age 28 years). The vasodilator response in the brachial artery was measured by ultrasonography, and blood samples were obtained from the right cephalic vein. Blood samples were taken at baseline, 30 sec after cuff deflation, and before and 5 min after 0.3 mg of nitroglycerin administration. Blood flow was calculated by multiplying mean flow velocity and vessel cross-sectional area. Plasma NOx (nitrate + nitrite) levels were measured, and the percentage change of NOx production (NOx) was calculated as follows: $\text{NOx}(\%) = [(\text{NOx concentration at peak flow-mediated vasodilation or after 0.3 mg nitroglycerin administration}) - \text{baseline NOx concentration}] \times 100 / \text{baseline NOx concentration}$.

Results. Percentage changes in diameter of the brachial artery, NOx production and NOx in response to nitroglycerin were not statistically different between the two groups (smokers: $27.6 \pm 8.0 \mu\text{mol/l}$, control subjects: $34.0 \pm 8.7 \mu\text{mol/l}$). However, percentage change of flow-mediated vasodilation during reactive hyperemia in the young smokers was significantly smaller than that in the control subjects ($4.8 \pm 2.7\%$, $9.1 \pm 5.3\%$, respectively, $p < 0.05$). Moreover, NOx during reactive hyperemia in the smokers was significantly smaller than that in the control subjects ($388.8 \pm 90.2\%$, $738.0 \pm 284.5\%$, respectively, $p < 0.05$).

Conclusions. The impaired response to reactive hyperemia in young smokers might be associated with

新潟大学医学部 第一内科: 〒951-8510 新潟県新潟市旭町通り1-754; *金沢医科大学 薬理学, 石川

The First Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Niigata; *Department of Pharmacology, Kanazawa Medical University, Ishikawa

Address for correspondence: HORI T, MD, The First Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Asahi-machi-dori 1-754, Niigata, Niigata 951-8510

Manuscript received January 24, 2001; revised April 2, 2001; accepted April 2, 2001

decreases in flow-dependent NO production.

J Cardiol 2001; 38(1): 21-28

Key Words

Endothelium
Doppler ultrasound

Nitric oxide

Smoking(young adult)

はじめに

血管内皮細胞は単に血管内腔を被覆しているだけの細胞ではなく、さまざまな生理活性物質を産生・放出して血管の恒常性の維持に重要な働きをしていることが明らかになってきた。その生理的機能としては、血管のトーンスの調節、血管透過性の調節、抗凝固・抗血栓性の維持など、多岐にわたっていることが明らかにされている。

近年、動脈硬化症の初期変化の一つとして血管内皮細胞機能が低下することが示されてきた¹⁾。健康な内皮細胞を有する血管では、血管内の血流増加に伴い血管拡張が起こるとされているが、内皮機能障害のある患者では内皮由来血管拡張物質である一酸化窒素(nitric oxide: NO)を介した血流依存性血管拡張反応(flow-mediated vasodilation: FMD)が低下していることが報告されている²⁾。このFMDは末梢血管においては反応性充血の際の血管径の変化率としてとらえられ、喫煙者、高コレステロール血症、高血圧、加齢、糖尿病などで低下していることが知られている³⁾。これらの危険因子の中で、喫煙に関して我が国では若年喫煙者数が欧米先進諸国に比べて多いことが知られている。しかし、若年者での喫煙による生体への影響についての研究は乏しく、その影響が喫煙開始後どのように生じているのかも十分にわかっていない。喫煙は、以前より虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症に代表される動脈硬化との関連が指摘されてきたが^{4,5)}、最近ではその発症機序として内皮機能障害との関連が推測されている^{6,7)}。さらに、この喫煙者に認められる内皮機能障害の原因の一つとして、酸化ストレスの関与が報告されているが、いまだ不明な点が多い^{8,9)}。

今回、我々は他の冠危険因子をまったく有さない若年喫煙者を対象に反応性充血を施行し、NO代謝産物であるNOx(nitrate + nitrite)の動態を正常若年者と比較検討することにより、喫煙が血管内皮細胞機能に及ぼす影響を検討したので報告する。

対象と方法

1. 対 象

全例男性であり、喫煙群は10例(平均年齢31歳, 27-39歳)、非喫煙者である対照群は12例(平均年齢28歳, 24-34歳)であった。女性はエストロゲンと内皮機能との関係が報告されており、この研究対象からは除外した。対照群では肥満、高血圧、高コレステロール血症、糖尿病などの危険因子などはまったく有さず、喫煙群においても喫煙以外の危険因子は認められなかった。喫煙者の定義としては1日20本以上を最低5年以上継続していることとした。なお、被験者全員にこの検査に関して説明をし同意を得た。

2. 方 法

検査当日は、20分間ベッド上で安静にしたのち、まず反応性充血を右上腕で施行した。なお、喫煙は、この検査の最低2時間前から中止にした。反応性充血はCelermajorら⁶⁾の方法を参考にし、カフ圧を250-300mmHgに設定して5分間駆血後、カフを緩めて上腕動脈の血管径と流速を測る。血管径は中膜と外膜の間で拡張末期(心電図上はR波にだいたい一致させる)で計測し、駆血帯解除後45-60秒の間に測定した。流速は駆血帯解除後約40秒間を連続記録して最大流速を決定した。超音波装置はヒューレット・パッカー製(SONOS-2000)を使用した。7.5MHz探触子を使用しパルス・ドップラー法で角度70°に設定した。駆血帯解除後15分後に、血管径および流速がほぼ元に戻ったのを確認し、ニトログリセリンの舌下スプレー0.3mg/l噴霧を1回実施した。その5分後に再び上腕動脈の血管径と流速を計測した。対照群のドップラー所見の典型例をFig. 1に示した。

反応性充血前に右前腕に21Gの翼状針で採血用のラインを確保し、反応性充血前と駆血解除後約30秒、ニトログリセリン投与前と投与後5分にて採血した。血中NOの測定方法は、これまで我々が報告してきた

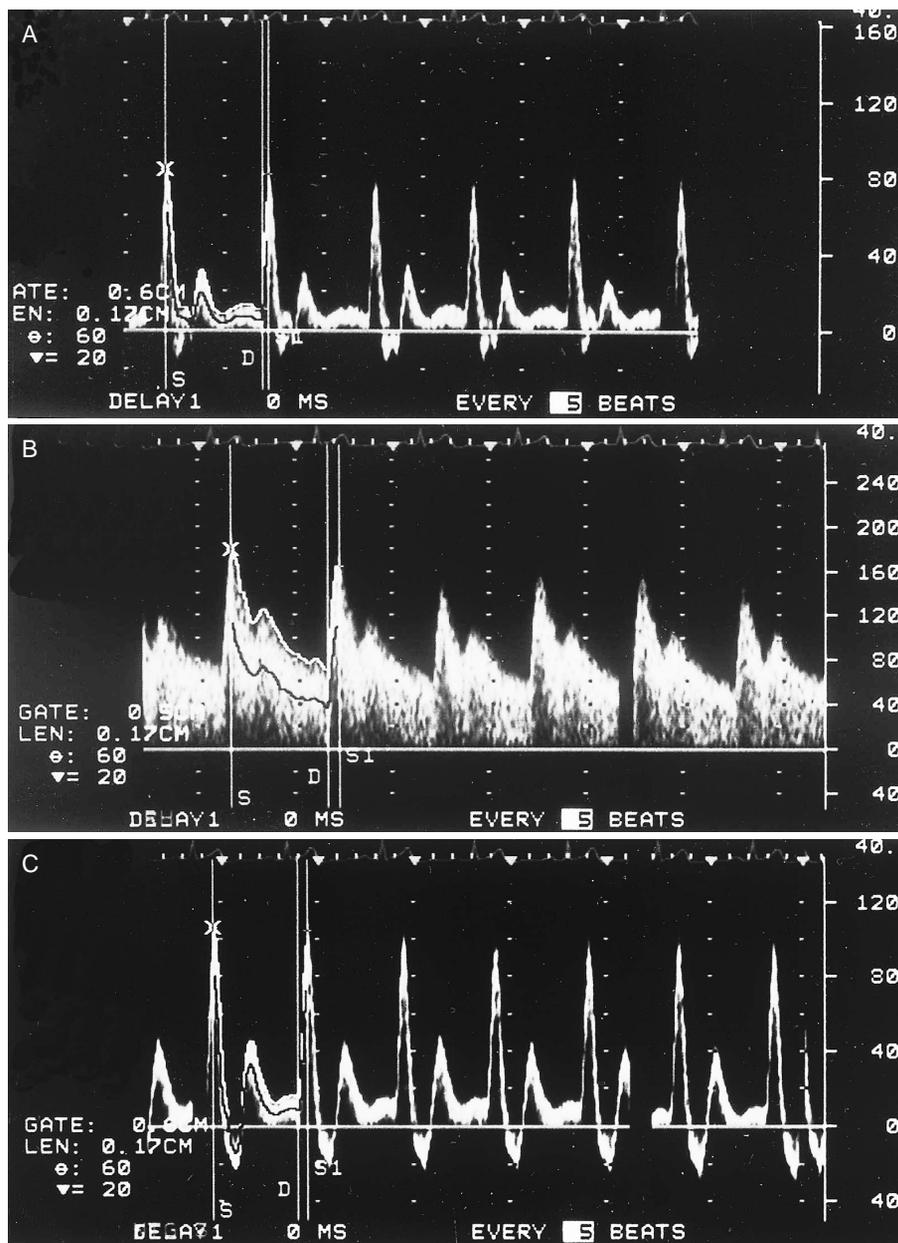


Fig. 1 Doppler flow images of the brachial artery in control subjects
 A: Baseline. B: Reactive hyperemia. C: Nitroglycerin administration.

ように，NOの最終代謝産物であるNOxを高速液体クロマトグラフィー-グリース法(ENO-10, EICOM)で測定した¹⁰⁾。また，上腕血流量，NOx産生量，NOx産生率は以下のようにして求めた。

$$\text{上腕血流量 (ml/min)} = (0.5 \times \text{上腕動脈血管径}) \times \text{平均流速 (cm/sec)} \times 60$$

$$\text{NOx産生量 (}\mu\text{mol/min)} = \text{上腕血流量 (ml/min)} \times \text{NOx濃度 (}\mu\text{mol/l)}$$

$$\text{NOx産生率 (\%)} = \frac{(\text{駆血帯解除後の上腕動脈流速最大時あるいはニトログリセリン投与後5分のNOx産生量} - \text{前値のNOx産生量}) \times 100}{\text{前値のNOx産生量}}$$

3. 統計学的解析

数値は平均 ± 標準偏差で示した。2群間の比較は対応のないt検定を用い， $p < 0.05$ を有意差の判定とし

Table 1 Patient characteristics

	Controls(n = 12)	Smokers(n = 10)	p value
Age(yr)	28 ± 3	31 ± 3	NS
Blood pressure(mmHg)	120 ± 10/74 ± 7	121 ± 12/76 ± 5	NS
Heart rate(beats/min)	58 ± 3	66 ± 8	< 0.01
Total cholesterol(mg/dl)	165 ± 22	177 ± 18	NS
Triglyceride(mg/dl)	73 ± 40	81 ± 38	NS
HDL-cholesterol(mg/dl)	62 ± 14	58 ± 14	NS

Values are mean ± SD.

HDL = high-density lipoprotein.

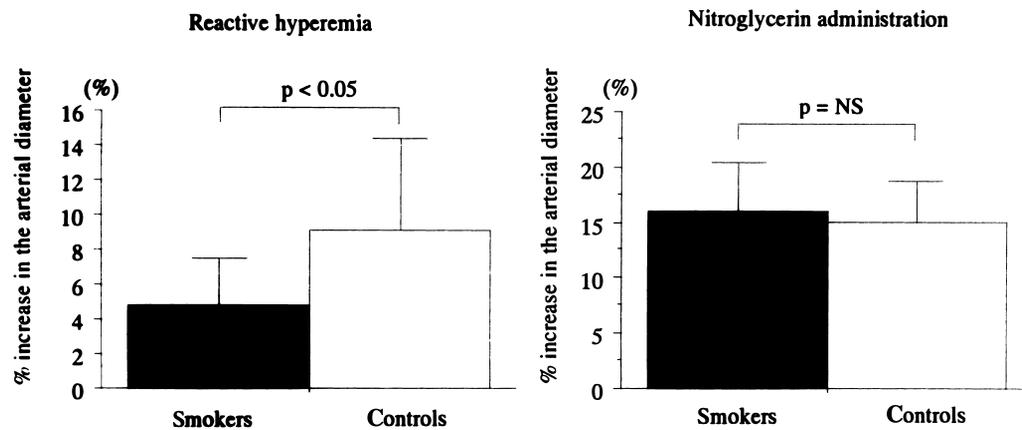


Fig. 2 Percentage change in brachial artery diameter in response to reactive hyperemia (left) and nitroglycerin administration (right) in control subjects (open bar) and smokers (solid bar)

た。

結 果

両群において糖尿病，高血圧，肥満は認められなかった。また，年齢，血清脂質の値は両群に差は認められなかった。収縮期血圧および拡張期血圧は両群で差は認められなかったが，心拍数においては，対照群でやや徐脈を呈していた (Table 1)。

検査施行前の血清 NOx 濃度は，対照群が $34.0 \pm 8.7 \mu\text{mol/l}$ ，喫煙群が $27.6 \pm 8.0 \mu\text{mol/l}$ であり，喫煙群においてやや低い傾向を認めたが有意ではなかった。安静時の上腕血流量は，対照群が $123 \pm 58 \text{ml/min}$ ，喫煙群が $203 \pm 58 \text{ml/min}$ であり，喫煙群で高値を呈していた。

安静時血管径に対する反応性充血時の血管径の増加率 (%FMD) は，対照群が $9.1 \pm 5.3\%$ ，喫煙群が $4.8 \pm$

2.7% であり，喫煙群で有意に低下 ($p < 0.05$) していたが，ニトログリセリン投与前後における血管径の増加率は，対照群が $14.9 \pm 3.6\%$ ，喫煙群が $16.1 \pm 4.3\%$ であり，両群で差は認められなかった (Fig. 2)。

反応性充血時における NOx 産生量は，両群間に有意差は認められなかったが (Table 2)，NOx 産生率は，対照群が $738.0 \pm 284.5\%$ ，喫煙群が $388.8 \pm 90.2\%$ であり，喫煙群で有意に低下していた ($p < 0.05$; Fig. 3)。

ニトログリセリン投与前後における NOx 産生量は，両群に有意差は認められず (Table 3)，また NOx 産生率も，対照群が $57.1 \pm 62.3\%$ ，喫煙群が $47.4 \pm 24.1\%$ であり，両群で有意差は認められなかった (Fig. 3)。

考 案

今回の若年喫煙者における検討では，従来の喫煙者での報告と同様に明らかに %FMD が低下していた。

Table 2 Brachial diameter and NOx production in response to reactive hyperemia in control subjects and smokers

	Controls(n = 12)	Smokers(n = 10)	p value
Brachial artery diameter			
Baseline(mm)	3.91 ± 0.22	4.09 ± 0.29	NS
Hyperemia(mm)	4.27 ± 0.34	4.29 ± 0.35	NS
NOx production			
Baseline(μmol/min)	4.53 ± 3.14	5.73 ± 2.77	NS
Hyperemia(μmol/min)	32.52 ± 17.35	27.44 ± 12.14	NS

Values are mean ± SD.
NOx = nitrate + nitrite.

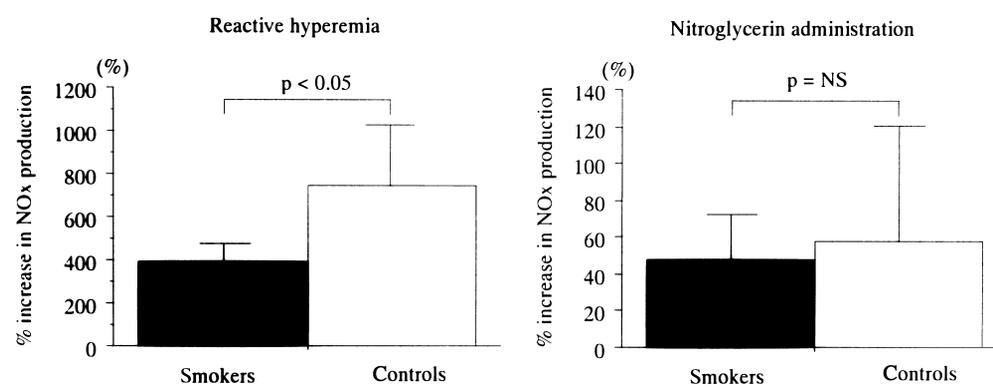


Fig. 3 Percentage increase in NOx production in response to reactive hyperemia(left)and nitroglycerin administration(right)in control subjects(open bar)and smokers(solid bar)
Abbreviation as in Table 2.

Table 3 Brachial artery diameter and NOx production in response to nitroglycerin in control subjects and smokers

	Controls(n = 12)	Smokers(n = 10)	p value
Brachial artery diameter			
Baseline(mm)	3.94 ± 0.19	4.09 ± 0.29	NS
After nitroglycerin(mm)	4.53 ± 0.32	4.74 ± 0.35	NS
NOx production			
Baseline(μmol/min)	3.95 ± 3.17	5.04 ± 3.81	NS
After nitroglycerin(μmol/min)	5.93 ± 4.28	7.36 ± 5.23	NS

Values are mean ± SD.
Abbreviation as in Table 2.

さらに今回の我々の結果から、若年喫煙者群における反応性充血時のNOx産生率が、対照群に比べて有意に低下していることが明らかになった。

Celermajorら⁶⁾は、喫煙者で反応性充血を施行

し、%FMDが低下していることを報告しており、喫煙群で4.0 ± 3.9%、対照群で10.0 ± 3.3%と、今回の我々の報告とほぼ同様な結果を示している。また、彼らは、1日の喫煙本数が多いほど%FMDが低下するこ

とも示しているが、今回の我々の研究では1日の煙草の本数はほぼ全員が20本程度であり、本数による違いは検討できなかった。これまでに喫煙者における内皮機能障害に関してはいくつかの要因が推測されている。煙草の煙は大量のスーパーオキシドアニオンやヒドロキシラジカルなどのフリーラジカルを含んでいるが^{11,12)}、これらはNO活性とFMDを低下させると考えられている¹³⁾。また、最近では喫煙者において生体内で過酸化脂質が生じていることも報告されている⁸⁾。この喫煙による血管内皮に対する障害は酸化ストレスの関与が大きいとする推測から、抗酸化物質であるビタミンC、あるいはビタミンEなどを用いて実際に内皮機能を改善させたという報告も散見されるようになった^{11,14)}。Motoyamaら¹²⁾は、高度の喫煙後に上腕動脈におけるFMDの急激な低下が10分以内に酸化ストレスの増加によって引き起こされ、この一過性のFMDの低下はビタミンCの静注によって軽減することを報告した。ただし、今回の我々の研究では最終喫煙から約2時間以上経過しており、喫煙直後に認められるとされる一過性の内皮機能障害よりは、慢性的な血管内皮への影響を観察していると思われる¹⁵⁾。

従来、反応性充血を用いたNOの生物学的活性の評価としては、*N*^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)などのNO合成酵素阻害薬を用いて間接的に評価されてきた。その理由の一つとしては、NO自体あるいはその代謝産物であるnitrateやnitriteの血中濃度の測定が容易ではなく、微量な変化が捉えがたかったことが挙げられる。我々の共同研究者のIshibashiら^{10,16)}は、さまざまな実験器具によってもNO_x濃度がかなり影響を受けることを明らかにし、最終的に0.1 μmol/lまでのnitrateおよびnitrite濃度を正確に評価できるようになった。これによって今回の検討では反応性充血時における生体内のNO_x動態を直接検討することが可能になった。Nodeら¹⁷⁾は、平均40歳代前半の喫煙者において血中のNO_x濃度を検討しているが、喫煙者群では非喫煙者群に比べて末梢血におけるNO_xの濃度が有意に低下していること、また、6ヵ月以上の禁煙により、この低下していたNO_x濃度がほぼ非喫煙者と同様のレベルにまで回復することを報告している。今回の我々の結果でも、喫煙群におけるNO_x濃度は対照群に比べてやや低い傾向が認められた。さらに、血中のNO_x濃度だけでなく血流量の変化を考慮し、

実際に流血中のNO_x産生量とNO_x産生率として計算した。その結果、喫煙群においては反応性充血前のNO_x産生量が対照群に比べてやや高い傾向にあったにもかかわらず、反応性充血時のNO_x産生率が対照群に比べて明らかに低下していた。このことは、反応性充血によるNO_x産生量が喫煙群では対照群に比べて低かったためと考えられた。さらに、喫煙群で血中のNO_x濃度は低い傾向があるにもかかわらず、NO_x産生量として計算すると高値であることは、喫煙者における上腕血流量が対照群に比べて多いことが原因と思われる。この理由としては、心拍数が対照群では有意に低かったことなども考えられるが、若年喫煙者においては、通常の高齢者よりも喫煙に対する血管収縮作用に拮抗するための生体反応が強く働く結果である可能性も推測される。さらに今後も同様な結果が認められるかを同年齢において検討するべきと考えられた。また、ニトログリセリン投与によるNO_x産生量およびNO_x産生率では両群間で差は認められなかった。このことは、今まで報告されていたニトログリセリン投与による内皮非依存性の血管拡張反応が、対照群、喫煙群において変化がないことを支持しているものと思われる。

最近では、コレステロール低下療法やアンジオテンシン変換酵素阻害薬投与によって血管内皮機能の改善がもたらされ、心血管事故の減少につながることもいわれており、血管内皮の血管保護作用の重要性が認識されてきている。今回の我々の結果、若年喫煙者において、血管内皮機能障害がすでに生じており、生体内におけるNO産生率の低下と関連していた。このことは若年からの喫煙が将来の心血管事故につながる可能性を示唆すると考えられた。

本研究の限界

今回は反応性充血の際にNOに着目し検討したが、喫煙による酸化ストレスの関与を評価するうえで、酸化ストレスの指標についても検討するべきであると考えられた。さらに今回の喫煙者が吸っていた煙草は、低タール・低ニコチンの製品ではなかったため、従来の製品に関する検討しかできなかった。この点についてもタール・ニコチンの違いにより結果が異なってくる可能性もあり、今後の検討課題と思われた。

結 語

若年男性喫煙者では反応性充血の際の血管拡張反応

は低下しており、その原因として血流増加に伴うNOの産生能が低下していることが考えられた。

要 約

目 的: 喫煙による内皮機能障害が報告されているが、若年者における影響に関してはいまだ不明な点が多い。本研究では若年喫煙者における末梢血管の内皮機能と一酸化窒素(NO)産生能との関連につき検討した。

方 法: 対象は全例男性で、喫煙群(10例, 平均31歳), 対照群(12例, 平均28歳)に反応性充血を施行した。上腕動脈の血管径と平均流速は高周波超音波装置を用いて計測し、採血を反応性充血時の駆血前と駆血解除後30秒, ニトログリセリン0.3mg投与前と投与後5分にて前腕から施行した。NOの最終代謝産物であるNOx(nitrate + nitrite)を測定した。上腕血流量は平均流速と血管径から求め、NOx産生量を血流量とNOx濃度の積として求めた。また、NOx産生率(%)は(駆血解除後30秒またはニトログリセリン0.3mg投与後のNOx産生量 - 前値のNOx産生量) × 100/前値のNOx産生量として求めた。

結 果: 検査施行前の血清NOx濃度は、対照群では $34.0 \pm 8.7 \mu\text{mol/l}$ 、喫煙群では $27.6 \pm 8.0 \mu\text{mol/l}$ であり、喫煙群においてやや低い傾向を認めたが、有意ではなかった。ニトログリセリン投与前後における血管径の増加率、NOx産生量およびNOx産生率は両群で差は認められなかった。反応性充血時の血管径の増加率は喫煙群で低下していた(対照群 $9.1 \pm 5.3\%$ 、喫煙群 $4.8 \pm 2.7\%$, $p < 0.05$)。また、その際のNOx産生率は喫煙群で有意に低下していた(対照群 $738.0 \pm 284.5\%$ 、喫煙群 $388.8 \pm 90.2\%$, $p < 0.05$)。

結 語: 若年男性喫煙者では反応性充血の際の血管拡張反応は低下しており、その原因として血流増加に伴うNOの産生能が低下していることが考えられた。

J Cardiol 2001; 38(1): 21 - 28

文 献

- 1) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993; **362**: 801 - 809
- 2) Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrang D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP: Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; **26**: 1235 - 1241
- 3) Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE: Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: Accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995; **74**: 247 - 253
- 4) Sackett DL, Gibson RW, Bross ID, Pickren JW: Relation between aortic atherosclerosis and the use of cigarettes and alcohol: An autopsy study. *N Engl J Med* 1968; **279**: 1413 - 1420
- 5) Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH: Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals. *Circulation* 1992; **86**: 1664 - 1669
- 6) Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; **88**: 2149 - 2155
- 7) Zeiher AM, Schachinger V, Minners J: Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary artery vasodilator function. *Circulation* 1995; **92**: 1094 - 1100
- 8) Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ: Increase in circulating products of lipid peroxidation(F2-isoprostanes) in smokers: Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995; **332**: 1198 - 1203
- 9) Reilly M, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA: Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996; **94**: 19 - 25
- 10) Ishibashi T, Matsubara T, Ida T, Hori T, Yamazoe M, Aizawa Y, Yoshida J, Nishio M: Negative NO₂-difference in human coronary circulation with severe atherosclerotic stenosis. *Life Sci* 2000; **66**: 173 - 184
- 11) Heitzer T, Just H, Munzel T: Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996; **94**: 6 - 9
- 12) Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H: Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery

- is impaired in smokers: Effect of vitamin C. *Am J Physiol* 1997; **273**: H1644 - H1650
- 13) Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Yasue H: Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF. *Am J Physiol* 1994; **266**: H874 - H880
- 14) Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, Zehetgruber M, Söregi G, Lehr S, Huber K, Maurer G, Weidinger F, Kostner K: Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol* 2000; **35**: 277 - 283
- 15) Lekakis JP, Papamichael CM, Vemmos CJ, Voutsas AA, Gika AP, Stamatelopoulos SF, Mouloupoulos SD: Endothelial dysfunction after acute cigarette smoking: Insights on duration of the phenomenon and development of tolerance. *Circulation* 1997; **96**(Suppl): -355 (abstr)
- 16) Ishibashi T, Himeno M, Imaizumi N, Maejima K, Nakano S, Uchida K, Yoshida J, Nishio M: NOx contamination in laboratory ware and effect of countermeasures. *Nitric Oxide* 2000; **4**: 516 - 525
- 17) Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M: Reversible reduction in plasma concentration of nitric oxide induced by cigarette smoking in young adults. *Am J Cardiol* 1997; **79**: 1538 - 1541