

つくば高血圧マウスに対する食塩負荷の影響

林 あつみ*, 村上 和雄**, 木元 幸一***

(平成 17 年 10 月 6 日受理)

Effects of Salt Intake on Tukuba Hypertensive Mice

HAYASHI, Atsumi MURAKAMI, Kazuo and KIMOTO, Koichi

(Received on October 6, 2005)

キーワード：つくば高血圧マウス, 食塩負荷, 尿中ナトリウム排泄量, 尿中アルブミン排泄量

Key words : Tukuba hypertensive mice, Salt load, Urinary sodium excretion, Urinary albumin excretion

緒 言

高齢化社会を迎えて、脳卒中や心臓病等の循環器疾患をいかに予防するかが社会的課題となっている。生活習慣病の中で最も頻度の高い本態性高血圧症は、環境因子および遺伝因子の影響を受ける多因子病であり、循環器疾患の主要リスクとなる。

高血圧発症率と食塩摂取量との間に相関があるという疫学調査結果はよく知られている¹⁾。また、食塩負荷に対する感受性・非感受性についてもよく知られるものとなってきた²⁾。多くの研究者がその機序の解明に取り組んでおり、現在食塩感受性遺伝子の特定がすすめられている³⁾。

食塩摂取による血圧上昇機序については、 Na^+ の摂取量と排泄量のバランス、つまり腎から尿中に排泄される Na^+ の排泄障害が遺伝的な高血圧の原因となるというものの^{4), 5)}、あるいは食塩中の Cl^- がレニン-アンギオテンシン (RA) 系のアンギオテンシン変換酵素 (ACE) を活性化して昇圧ペプチドであるアンギオテンシン II (A II) の生成を高めるためであるという報告もある⁶⁾。

RA系は、血圧や体内の水分量と電解質のバランスを調節している重要な調節系である。今回は、その高血圧発症の成因がヒトRA系亢進という単一因子によるトランスジェニックマウスであるつくば高血圧マウス

(THM)⁷⁾ を実験動物として用いた。THMと食塩摂取については、血圧への影響はないが、高血圧に伴う心肥大、腎硬化および血管病変等が進行することが報告されている⁸⁾。

本実験では、異なる数種の濃度の食塩水を飲水させることによりTHMの生体に及ぼす影響について検討を行った。また、遺伝子導入前の正常マウスであるC57BL/6を対照として比較、検討を行った。

研究方法

1. 実験動物および飼育方法

自家繁殖したTHMを生後5週齢で離乳し、個別ケージで飼育を行った。40匹のTHMを用い、実験群として0.4, 0.6, 0.7, 0.9, 1.0%の各食塩水投与群7匹ずつとし、食塩水無処理のcontrol群は5匹とした。実験期間は、7週齢から30日間とした。また、THMの対照マウスとして、C57BL/6 (日本クレア株式会社より購入) を用い、0.6, 0.9%食塩水投与実験を行った。いずれも飼料は、オリエンタル酵母社製のNMFを与え、自由摂取とした。飲料水については、各濃度に調製した食塩水あるいはcontrol群には給水ビンに入れた水道水を滅菌後、自由摂取とした。実験期間中は、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、そして12時間明暗周期 (明期 8:00~20:00) に保持した飼育室で飼育した。実験開始から10日間は代謝ケージに入れ、体重、摂食量、飲水量、尿量を毎日一定時刻に測定し、残り20日間は週に2~3回体重、摂食量、飲水量の測定を行った。

* 栄養学研究室

** 環境分析研究室

*** 栄養生化学研究室

2. 血圧測定

実験期間中、血圧は週に1回測定した。血圧測定は、無麻酔下、非観血法で尾動脈圧測定装置（ソフトロンBP98A）を用いて測定を行った。

3. 尿中Na, K測定法

尿中に排泄されたNa, K量の測定には原子吸光光度法を用いた。試料とする尿は、採取後-80℃で凍結保存したものを解冻後、それぞれ適当な濃度に希釈し、原子吸光分析装置（島津原子吸光/フレイム分光光度計AA625-11型）で測定した後、検量線よりNaおよびK量を算出した。試料は各種濃度の食塩水負荷前、負荷後1日目、5日目の3日分について分析した。

4. 尿中アルブミン排泄量の測定法

マウス尿中微量アルブミンの測定は、マウスアルブミンを西洋わさびペルオキシダーゼで標識した酵素標識を作製し、ELISA（Enzymed linked Immunosorbent assay）法により測定した。マイクロプレートにマウスアルブミン抗体（コスモバイオ社製）を固相し、マウスアルブミン標準液（コスモバイオ社製）と尿試料をアプライした後、標識したマウスアルブミンを加え4℃で2時間競合させた。未反応の抗原を洗った後、TMB溶液を基質として発色させ450nmの吸光度を測定し、検量線よりアルブミン量を算出した。

5. 解剖方法

30日間の実験期間終了後、ネブタール麻酔下解剖した。腹部大静脈より採血した後、心臓、肝臓および腎臓を摘出し、重量の測定を行った。

6. 統計処理

測定値は平均±標準偏差で表した。各群間の比較は分散分析（ANOVA）により平均値の差を検定後、有意差が認められたものについては、Dunnnettの多重比較により対照群との有意差検定を行った。有意水準は5%以下とした。

なお、本動物実験は「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和55年3月、総理府告示第6号）を遵守して実施した。

研究結果

1. 飼料摂取量および体重増加量の変化

図には示さなかったが、THM, C57BL/6ともに食塩水濃度による摂食量に対する影響は見られなかった。個体差はあったものの、実験期間中の増減もほとんど観察されなかった。

実験開始から10日間の体重変化をFig.1に示した。食塩水負荷を開始した日を0日として示した。THM (a) については各群間に有意な差はなかったが、食塩濃度が高い1.0%および0.9%負荷群において体重増加量が低い傾向が見られた。正常マウスであるC57BL/6 (b) については食塩水濃度が高い0.9%負荷群において体重増加が有意に抑制された。

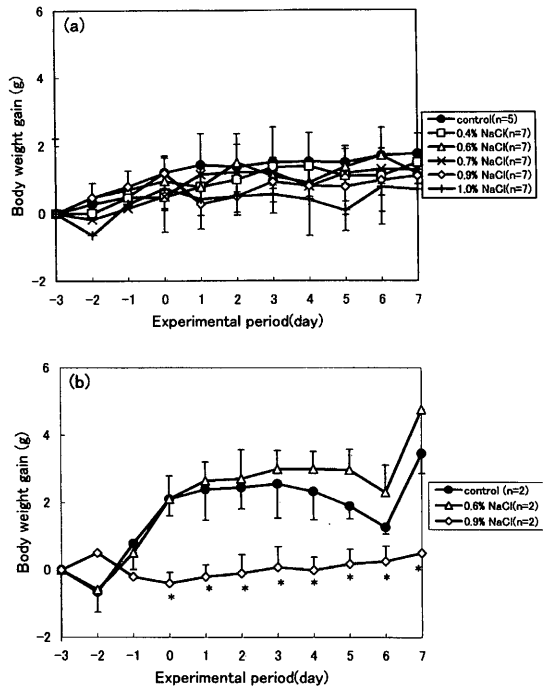


Fig.1 Change of body weight gain in THM and C57BL/6.

(a); THM, (b); C57BL/6. ●; control group, □; 0.4% NaCl group, △; 0.6% NaCl group, ×; 0.7% NaCl group, ◇; 0.9% NaCl group, +; 1.0% NaCl group. The values are expressed as mean ± SD. *p<0.05, compared with the control group.

2. 飲水量および食塩摂取量の変化

実験開始から10日間のTHMの飲水量変化をFig.2 (a)に示した。0.9%、0.7%負荷群および0.6%負荷群におい

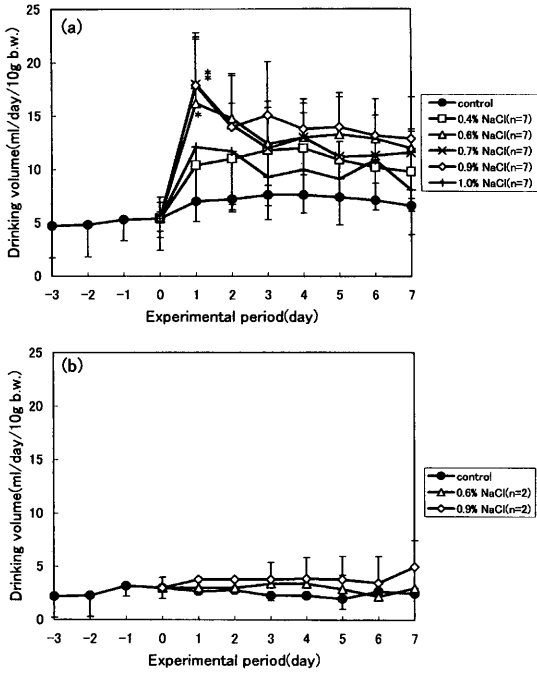


Fig.2 Drinking volume in THM and C57BL/6. (a); THM, (b); C57BL/6. ●; control group, □; 0.4% NaCl group, △; 0.6% NaCl group, ×; 0.7% NaCl group, ◇; 0.9% NaCl group, +; 1.0% NaCl group. The values are expressed as mean±SD.

て食塩水負荷後1日目でcontrol群の3倍近い量を摂取しており、有意な差が観察された。2日目以降は1日目に比較すると減少しているものの、いずれの群においてもcontrol群より多量を維持していた。C57BL/6 (b) については、食塩水濃度による飲水量の差は見られなかった。

また、各群の実験開始7日間の食塩としての平均摂取量を算出した結果をTable1に示した。その結果、最も平均摂取量が多かったのはTHMの0.9%群の124.16±31.961mgで、THM、C57BL/6ともに0.9%までは食塩濃度に比例して多くなった。しかし、THMの1.0%群は0.9%群より少ない結果となった。

Table1 食塩摂取量 (mg/day/10g b.w.)

	THM	C57BL/6
control	0	0
0.4% NaCl	44.90±13.292	
0.6% NaCl	85.97±19.816 *	20.36±10.203
0.7% NaCl	97.66±16.289 *	
0.9% NaCl	124.16±31.961 *	37.71±4.647
1.0% NaCl	122.21±45.807 *	

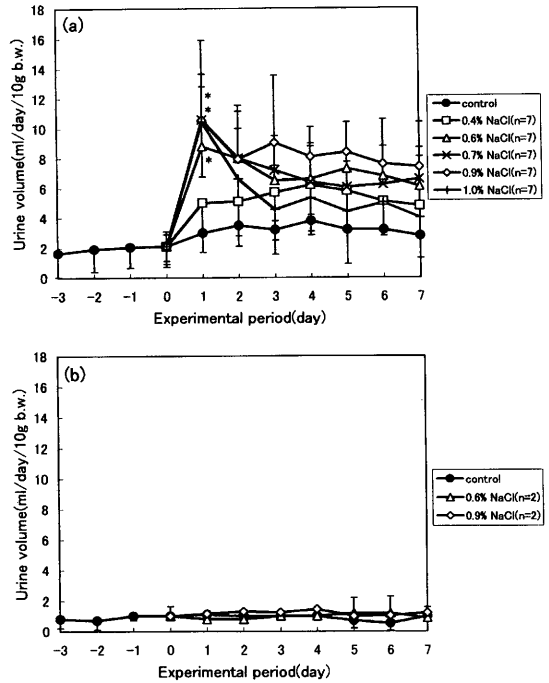


Fig.3 Urine volume in THM and C57BL/6. (a); THM, (b); C57BL/6. ●; control group, □; 0.4% NaCl group, △; 0.6% NaCl group, ×; 0.7% NaCl group, ◇; 0.9% NaCl group, +; 1.0% NaCl group. The values are expressed as mean±SD.

3. 尿量の変化

THMの尿量の変化をFig.3 (a) に示した。飲水量の増加に伴い0.4%群を除くすべての群において食塩水負荷後1日目に顕著に増加し、その後低下傾向を示した。その変化は飲水量と同様の傾向であった。C57BL/6 (b) については、実験期間中の増減は観察されなかった。また、食塩濃度による差も見られなかった。

4. 血圧および心拍数

実験期間中の血圧および心拍数を測定した。図には示さなかったが、いずれも各実験群による大きな変化は見られず、THMにおいて収縮期血圧は120~140mmHgの範囲にあり、THMの平均的な値を維持した。C57BL/6においては収縮期血圧100~110mmHgの範囲にあり、食塩水負荷の影響は観察されなかった。

5. 臓器重量

Table2に臓器重量の結果を示した。THM (a) では食塩負荷群はcontrol群に比べて心臓および腎臓につい

て有意な重量の増加が見られた。肝臓については0.7%群で有意な差がみられたものの、顕著な差は観察されなかった。

C57BL/6については、各群間に有意な差はなかった。

(a) THM Table2 臓器重量 (g/100g b.w.)

	Heart	Liver	Kidney
control	0.737±0.053	5.274±0.266	1.027±0.028
0.4% NaCl	0.930±0.173*	5.134±0.692	1.369±0.223
0.6% NaCl	0.825±0.098	5.330±0.189	1.336±0.140
0.7% NaCl	0.989±0.087*	6.010±0.410*	1.328±0.080*
0.9% NaCl	0.859±0.097*	5.720±1.044	1.593±0.291*
1.0% NaCl	1.023±0.240	5.522±0.290	1.892±0.862

(b) C57BL/6 (g/100g b.w.)

	Heart	Liver	Kidney
control	0.547±0.033	5.108±0.365	1.240±0.115
0.6% NaCl	0.555±0.090	5.871±0.112	1.244±0.037
0.9% NaCl	0.525±0.053	5.364±0.356	1.249±0.087

*p<0.05

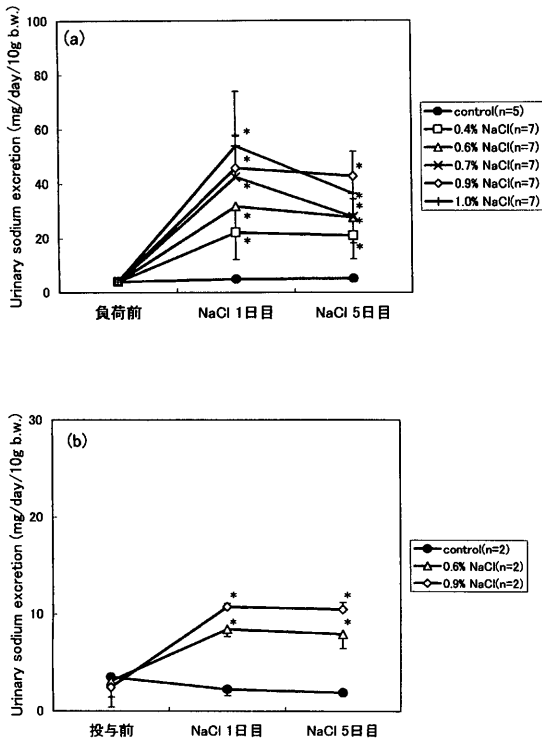


Fig.4 Urinary sodium excretion in the THM and C57BL/6. (a); THM, (b); C57BL/6. ●; control group, □; 0.4% NaCl group, △; 0.6% NaCl group, ×; 0.7% NaCl group, ◇; 0.9% NaCl group, +; 1.0% NaCl group. The values are expressed as mean±SD.

6. THMの死亡率

食塩負荷実験中に死亡する個体が見られた。死因は主に上行大動脈から大動脈弓にかけ、あるいは右腎もしくは左腎動脈分岐部からの出血であった。実験開始より10日以内に死亡する率が高く、0.4%および0.7%群では14%、0.9%群では40%、0.6%および1.0%群では60%と、食塩水濃度に比例した結果ではなかった。

7. 尿中Na, K排泄量

THMの尿中Na排泄量をFig.4 (a) に示した。食塩水負荷後1日目では食塩水濃度の高い群ほど尿中Na排泄量が多い傾向が見られた。5日目には0.7%群と1.0%群では1日目に比べ減少したが、その他の群では1日目と変化は見られなかった。C57BL/6 (b) では、負荷後1日目に食塩水負荷群において尿中Na排泄量が増加した。5日目では両実験群とも同様の増加を示した。

Fig.5 (a) にTHMの尿中K排泄量の変化を示した。K排泄量は食塩水負荷前と負荷後で有意な変化は見られなかった。C57BL/6 (b) においても、負荷による排泄

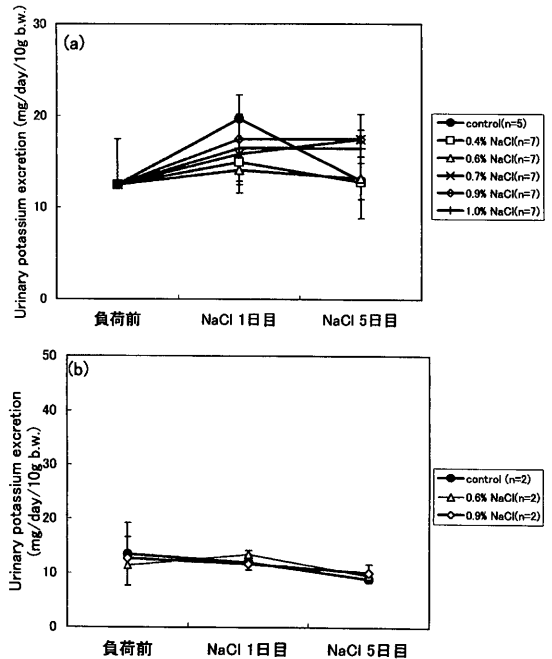


Fig.5 Urinary potassium excretion in the THM and C57BL/6. (a); THM, (b); C57BL/6. ●; control group, □; 0.4% NaCl group, △; 0.6% NaCl group, ×; 0.7% NaCl group, ◇; 0.9% NaCl group, +; 1.0% NaCl group. The values are expressed as mean±SD.

Table3 Na摂取量に対する排泄量の比率

(a) THM	排泄量/摂取量×100 (%)	
	NaCl負荷1日目	NaCl負荷5日目
0.4% NaCl	104.0	87.2
0.6% NaCl	69.3	72.7
0.7% NaCl	72.5	76.0
0.9% NaCl	64.4	76.5
1.0% NaCl	72.2	86.2

(b) C57BL/6	排泄量/摂取量×100 (%)	
	NaCl負荷1日目	NaCl負荷5日目
0.6% NaCl	39.1	60.1
0.9% NaCl	59.1	49.3

量の増減は観察されなかった。

さらに、尿中Na排泄量について摂取量に対する比率を求めた (Table3)。THMでは、Naの排泄量が摂取量の60~100%程度であったのに対し、C57BL/6では40~60%程度しか排泄されなかった。

8. 尿中アルブミン排泄量

Table4 に尿中アルブミン排泄量の結果を示した。正常マウスであるC57BL/6のcontrol群では0.051mg/day/10g b.w.であったのに対し、THMのcontrol群では10.324mg/day/10g b.w.であった。また、THMに食塩を負荷するとその値は食塩水0.4%、0.7%、0.9%群においてそれぞれ18.968、55.265、54.976mg/day/10g b.w.と顕著に増加し、0.7%および0.9%群においてはTHMのcontrol群と比較して有意な増加を示した。

Table4 尿中アルブミン排泄量 (mg/day/10g b.w.)

THM	control	10.324 ± 6.7578
	0.4% NaCl	18.968 ± 18.2799
	0.7% NaCl	55.265 ± 20.6690*
	0.9% NaCl	54.976 ± 31.9091*
C57BL/6		0.0510 ± 0.0185

考 察

高血圧と食塩の関係は、古くから注目されていた。しかし、一方で食塩制限の高血圧治療における意義に関し

て疑問視するものもある。その理由の一つに食塩感受性に個人差のあることがあげられている²⁾。さらに、食塩感受性は種々の因子により影響を受けることがわかってきている³⁾。食塩感受性には遺伝的素因が重要である。本態性高血圧症も遺伝的要因が大きいとされている。しかし、栄養条件によりある程度制御されていることも事実であり、栄養学の課題といえる。

今回我々は、高血圧の成因がヒトRA系の亢進によるトランスジェニックマウスであるTHMを用いて、各種濃度の食塩水負荷による影響を調べた。同時に、THMのコントロールマウスであるC57BL/6を対照として比較検討した。

体重増加量 (Fig.1) では、摂取量に差は見られなかったもののTHMにおいてC57BL/6に比べ増加量が少ない傾向があり、さらに食塩水負荷群においては食塩水濃度の高い群ほど増加量が減少した。このことより、THMは食塩水摂取により体重増加が抑制され、さらにTHM、C57BL/6の両マウスにおいて0.9%以上の濃度では食塩水がマウスの体重増加に何らかの影響を及ぼしたことが考えられた。

飲水量 (Fig.2) については、THMにおいて食塩負荷により有意に高い値を維持した。これは、主として食塩負荷による体液浸透圧の増大に伴う飲水欲亢進によるものであると考えられる。しかし、C57BL/6においては食塩負荷により飲水量の増加は見られず、高血圧マウスであるTHMはA IIの増加により口渴中枢に対する刺激の亢進が予測され、さらに一般に高血圧患者は食塩嗜好性が強い傾向にあることと一致する。また、食塩としての摂取量にすると、ほぼ食塩水濃度に比例して多くなったが、THMの1%食塩水群のみ飲水量が少なかったため、食塩としては摂取量が0.9%群より少なかった。一般にヒトは1日に食塩10gを上限目標としている。これをマウスに換算すると1日に3.3mgとなる。今回の実験では最低で6倍、最高では40倍もの量を摂取していたことになる。ヒトでは60~400gも摂取していたことになる。また、THMは正常マウスの約4倍の量を摂取しており、このことからTHMは高血圧によって食塩嗜好性が亢進していることが示された。

Fig.3 に示した尿量では、THM、C57BL/6とも飲水量と同様の結果となった。さらに尿中Na排泄量 (Fig.4) においても、食塩水負荷1日目で尿量と同様の傾向を示した。つまり、摂取量が多い群が尿量が多く、

同時にNa排泄量も多い結果となった。しかし尿中K排泄量 (Fig.5) については、THM, C57BL/6ともに食塩濃度による顕著な差は見られなかった。一般にNaの摂取量が増加するとNa排泄量、K排泄量ともに増加するが、体内のK含有量が減少してくるとK排泄量は抑制されるといわれている¹⁰⁾。本実験においては、Na摂取によりK排泄量に変化は認められなかった。

Table3にNa摂取量に対する排泄量の比率を求めた。THMではNaの排泄量が摂取量の60~100%程度であったのに対し、C57BL/6では40~60%程度であった。しかし、腎機能が正常な場合はNaの摂取量が増加すれば排泄量も増加し、摂取量が低下すれば排泄量も減少するといった平衡関係にあるとされている¹¹⁾。今回の結果では正常マウスのほうがその比率は小さくなったがその理由は不明である。

臓器重量 (Table2) では、正常マウスではcontrol群と食塩水負荷群の間に有意な差は見られなかったが、THMにおいて食塩水負荷群に心臓と腎臓の有意な増加が観察された。THMは若齢期より大動脈血管壁や臓器細動脈血管壁の肥厚が観察され、血管状態は変化していることが明らかになっている¹²⁾。そのTHMに食塩水を投与することによりさらに血管病変が進行して大動脈瘤を発生し、死亡する個体がみられることが報告されている³⁾。今回の実験においても食塩水負荷と飲水量の増大により腎臓や心臓に負荷がかかり、肥大したものと考えられた。SHRSPにおいても、最も早期に脳卒中を発生する1%濃度の食塩水¹³⁾を負荷したとき、体重の減少、腎機能の低下、脳、心臓および腎臓の重量比の増加が報告されている¹⁴⁾。

そこで次に、腎機能の指標として尿中アルブミン排泄量を測定した (Table4)。血中のアルブミンは、糸球体の濾過機能によりほとんど尿中には排泄されない。しかし、糸球体の機能に障害が生じた場合は、尿中に出現する。THMはcontrol群においても正常マウスと比べて有意にアルブミン排泄量が多いため、高血圧症者はそうでない者に比べ常に腎臓に負担をかけていることがうかがえる。さらに食塩水負荷により腎障害がさらに進行し、0.7%および0.9%群においてcontrolおよび0.4%群と比較して急激にアルブミン排泄量が増加した。

これらの結果は、腎障害あるいは心肥大の発症においてヒトRA系が重要な役割を果たしており、それはより

高濃度の食塩負荷によりさらに進行し、食塩摂取量と飲水量の何らかの関係により影響があるかもしれないことが示唆された。

謝 辞

本実験に真剣に取り組まれた東京家政大学平成12年度卒業栄養学科栄養学専攻の関口あかねさん、高橋美和さん、平成14年度卒業管理栄養士専攻庄司友美さんに感謝致します。

参考文献

- 1) Intersalt Cooperative Research Group: *BMJ*. **297**, 319 (1988)
- 2) Fujita T et al: *Am J Med*. **69**, 334 (1980)
- 3) 要伸也: 食塩感受性高血圧の遺伝子異常. *医学のあゆみ* **22**, 626 (2002)
- 4) R.G.Luke: *Hypertension*. **21**, 380 (1993)
- 5) R. Retting, et al: *J Hypertens*. **11**, 883 (1993)
- 6) H. Kato, H. Taguchi, H. Okuda, M. Kondo and M. Tanaka: *J. Trad. Med*. **11**, 198 (1994)
- 7) A. Fukamizu, K. Sugimura, E. Takimoto, F. Sugiyama, M.-S. Seo, S. Takahashi, T. Hatae, N. Kajiwara and K. Murakami: *J. Biol. Chem*. **268**, 11617 (1993)
- 8) N. Nishijo, F. Sugiyama, K. Kimoto, K. Taniguchi, K. Murakami, S. Suzuki, A. Fukamizu and K. Yagami: *Lab Invest*. **78**, 1050 (1998)
- 9) 島本和明: 血圧をみる・考える, 南江堂 (東京), 2000, p.35
- 10) 鈴木継美, 和田攻: ミネラル・微量元素の栄養学, 第一出版 (東京)
- 11) 第一出版編集部編: 厚生労働省策定 日本人の食事摂取基準 [2005年版], 第一出版 (東京), 2005, p. 194
- 12) N. Nishijo et al: *Exp. Anim*. **48**, 203 (1999)
- 13) 上野美穂, 松原利行: 富山県薬事研究所年報. **16**, 117 (1989)
- 14) 浜田香理, 福田好造, 菊森幹人, 元山行雄, 大塚実: *Pharma Med*. **21**, 81 (2003)

Abstract

One of the genetic diathesis in the essential hypertension is the renin-angiotensin system (RAS) which has been considered to play an important role the regulation of blood pressure and balance of the fluid volume, together with other biological responses. Fukamizu et al established hypertensive transgenic mice (THM) that were produced by cross-mating transgenic mice carrying the human renin gene with mice bearing the human angiotensinogen gene. In this thesis, the object was to clarify the reaction between salt and hypertension using transgenic model mice that overproduce angiotensin II (A II). As a result, human RAS is playing an important role in the progression of disease of the renal disorders or cardiac hypertrophy. Moreover, it was thought it progressed further by a higher concentration of salt solution loading. Also, it was suggested that it may be influenced by the quantity of salt and drinking water.