

血圧のスペクトラム解析による交感神経活動の評価：自然発症高血圧ラットにおける食塩負荷高血圧と経口カルシウム補充による降圧作用

東京大学医学部内科 教授 藤田 敏郎

【緒 言】

Ca降圧作用は疫学研究から始まる。古くから飲料水の硬水度と心血管合併症の死亡率との間には密接な関係があることが知られていた。飲料水の重金属の成分と心血管合併症の死亡率との関連を分析した結果より、Caは保護的に作用するものの一つであるということが報告されている(Neri LC et al *Ann New York Acad Sci* 1978; 304: 203)。すなわち、Ca摂取量と心血管合併症の死亡率の間には負の相関関係があった。さらに、McCarronらの疫学研究(*Science* 1982; 217: 267)で高血圧患者ではCa摂取量が少ないことが示されているので、血圧の変化がCaと心血管合併症の関連に重要な役割を果たしているものと考えられる。このことから経口的なCaの補充は血圧の低下を生じることが推測され、実際、本態性高血圧患者(Resnick LM, et al: *Fed Proc* 1986; 45: 2739, Saito K, et al: *Hypertension* 1989; 13: 219)や高血圧モデル動物(DiPette DJ, et al: *Hypertension* 1989; 13: 77, Peuler JD, et al: *Hypertension* 1987; 9[suppl III]: III-159, McCarron DA, et al: *J Clin Invest* 1985; 76: 1147)においてCaの降圧効果が示されている。しかし、経口Ca補充の血圧への影響については一致した成績が得られておらず、臨床研究では約3分の1で効果を認めなかったという(Hatton CD, et al: *Hypertension* 1994; 23: 513)。この理由として経口Ca補充による降圧の有無や程度は被験者自身の背景やその時の状態によって異なるということが考えられる。

すなわち、食塩感受性が亢進しているもので著明な降圧効果が得られ、食塩非感受性群では降圧は僅かであることが指摘されている(Resnick LM, et al: *J Hypertens* 1986; 4[suppl 6]: S679, Saito K, et al: *Hypertension* 1989; 13: 219, Weinberger MH, et al: *Am J Hypertens* 1993; 6: 799, Ando K, et al: *Am J Physiol* 1991; 261: R1070, Ono A, et al: *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23: 624, Ono A, et al: *Hypertension* 1997; 29: 808)。この点は経口Ca負荷の降圧作用機序を考える上で重要と考えられ、高血圧自然発症ラット(SHR)にCa負荷を行った報告では降圧はナトリウム(Na)利尿を伴うことが指摘されている(Ayachi S: *Metabolism* 1979; 28: 1234, Stern N et al: *Am J Physiol* 1987; 252: H1112)。さらに、DOCA-食塩高血圧ラット(DiPette DJ, et al: *Hypertension* 1989; 13: 77)や食塩負荷 SHR(Ono A, et al: *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23: 624)における検討ではCa負荷により降圧に伴う腎血流量の増加が指摘されている。これに対して、Caの降圧効果にはNa利尿を伴わなかったという成績もあるが、これらの報告では降圧がわずかであった(Luft FC, et al: *Clin Pharmacol Ther* 1986; 39: 414, Lau K, et al: *Am J Physiol* 1984; 246: H 324)。さらに、食塩摂取の状態によってCaのNa利尿ないしは降圧効果は異なるという成績もある(Resnick LM, et al: *J Hypertens* 1986; 4[suppl 6]: S679)。以上より、Caの降圧効果にはNa利尿作用の関与

の可能性がある。

しかし、Na利尿を伴わなくともわずかであるがCaは降圧作用を有していることから、Na利尿のみではCaの降圧作用は十分に説明はできないと考えられる。ここで、食塩感受性高血圧の発症にはこの腎臓のNa排泄低下の機序として交感神経活動の調節異常(亢進状態)が関与していることが示唆されているので、(Fujita T et al : *Am J Med* 1980 ; 69 : 334, Sato Y, et al : *Am J Physiol* 1991 ; 260 : R21) Ca負荷は交感神経系を抑制し、それがNa利尿さらには血管抵抗性の低下などを来し、降圧をもたらしている可能性がある。実際、研究者らはこのことを示唆する成績を得ている。すなわち、食塩感受性高血圧モデル動物であるアンジオテンシンII-食塩高血圧ラットを用いて交感神経系の関与を調べた(Ando K, et al : *Am J Physiol* 1991 ; 261 : R1070)ところ、この高血圧モデル動物では血圧の上昇に伴い、血漿カテコラミン濃度が上昇し、交感神経の亢進を伴っていることが確認された。このアンジオテンシンII-食塩高血圧ラットに、Caを食餌性に負荷すると血圧上昇は抑制され、この際、血漿カテコラミンは正常化し、Caの交感神経系抑制作用が示唆された。同様の成績は他の研究者によっても示されている。すなわち、Dahlの食塩感受性(S)ラットでも節遮断薬chlorisondamineによる降圧反応が食塩のみ負荷したラットに比べて食塩に加えてCaを負荷したラットで低値を示し、Caを負荷すると食塩負荷Dahl Sラットで血圧上昇時の腎交感神経活性の低下反応が亢進していた(Peuler JD, et al : *Hypertension* 1987 ; 9[suppl III] : III-159)。また、食塩負荷SHRにおけるストレス時の昇圧がCa投与で抑制されたという報告もある(Hatton DC, et al : *Am J Physiol* 1987 ; 252 : R48 ; われわれも類似の成績を得ている : 安東他 : 臨床薬理の進歩1994 ; 15 : 97)。したがって、経口Ca補充による降圧の機序として、交感神経系亢進の改善の関与が示唆された。

従来より、交感神経活動のパラメーターとしていくつかの指標が用いられているが、これらの指標には測定上の問題点がある。血中カテコラミン濃度は全身の交感神経系の指標として古くから幅広く用いられており、簡便で信頼性の高い測定法も確立している(Ito Y, et al : *Clin Exper Hypertens* 1989 ; All[suppl 1] : 363)。しかし、とくに交感神経系を反映するノルエドネフリンの場合、交感神経シナプスから血中に漏れ出たものを測定しているわけであり、血中濃度をいかに正確に測定できたとしても神経終末におけるreuptakeや組織での取り込み、カテコラミン代謝酵素による分解などにより交感神経シナプスでの値は修飾され、血中濃度が交感神経活動を正確に反映しているかどうかについては疑問が残る。これに対して、より正確な方法として各臓器におけるカテコラミン代謝回転率も交感神経活動の指標として利用されている(Sato Y, et al : *Hypertension* 1987 ; 9 : 81)。しかし、これは測定方法が煩雑であるという以外にも、薬理的にカテコラミンの合成をストップして組織からの消失率を測定するので、一瞬ごとに変化する交感神経系を測定するのではなく、大きな変化を全体的にとらえる方法であるという限界を残している。交感神経活動の直接記録も行われている(Ono A, et al : *Hypertension* 1997 ; 29 : 808)が、技術的に難しく主に麻酔下の成績になり、侵襲的でもあることから、生体の真の状態を反映しない場合もあり得る。これらの方法に加えて、最近、交感神経活動の新しい指標として心拍、血圧変動のパワースペクトル解析が利用されている(Itoh H, et al : *J Autonom Nerv Syst* 1995 ;

54 : 155 Munakata M, et al : J Autonom Nerv Syst 1995 ; 52 : 213)。血圧変動のパワースペクトルは低周波成分(LF)と高周波成分(HF)から構成され、一般的にLFは交感神経活動を反映し、HFは呼吸活動に関連していると考えられる。この方法の利点是非侵襲的であり、経時的に変化を追え、簡便であることであり、これまでも高血圧動物や高血圧患者においてLFが増加している(交感神経活性が増加している)との報告がある。

そこで今回、幼若期のSHRを用い、食塩負荷および経口Ca負荷が血圧にどのように影響するかを調べ、同時に腎交感神経活動測定や血圧変動のパワースペクトル解析によりこれらの食餌性因子が交感神経活動に与える影響を検討した。

【研究方法】

6週齢のSHRを3群に分け、それぞれ普通食(0.66% NaCl, 1.17% Ca)、高Na食(8.00% NaCl, 1.17% Ca)、高Na+高Ca食(8.00% NaCl, 4.07% Ca)で4週間飼育した。その後、まずエーテル麻酔下に気管および大腿動静脈にカテーテルを挿入し、d-tubocurarine chloride(初めに0.1mg/ratを静注し、その後0.1mg/hrで持続静注)により非動化した後、人工呼吸(2.5Hz)によりハロセン麻酔を施した。ハロセン濃度は手術時には1.0-1.5%に保ち、その後測定時には0.6-0.8%に減じた。麻酔の深度が適正であることは後肢のピンチにて血圧、心拍数、腎交感神経活動(RSNA)が変化しないことにより確認した。

腎交感神経活動(RSNA)は左腎動脈近傍の腎神経から記録した。左側腹部切開により後腹膜より左腎臓にアプローチし、左腎動脈近傍の腎神経に電極をおいた。カットオフした低ないし高周波数は100および3000Hzである。また、血圧信号は大腿動脈より腹大動脈まで挿入したカテーテル(内径0.5mm)により測定し、増幅した後、FMテープレコーダーに記録した。脈拍は血圧信号から得た。

圧受容体の機能を検討する目的で平均血圧(MAP)-RSNA関係を調べた。MAPは降圧薬としてsodium nitroprusside(1-30 μ g)、昇圧薬としてphenylephrine(1-30 μ g)の静脈内投与を行い約50-230mmHgの間を変動させた。薬剤は生理食塩水に溶解しそれぞれ100 μ lの容量で投与した。それぞれの投与の間に5-10分間のコントロール期間をおいた。反射性のRSNAの変化を測定し、それぞれのピーク値とMAPの関係を調べた。RSNAは実験的に得られた最大値あるいはMAP 50mmHg近傍の値に対する百分率で表した。個々のラットのデータは対数曲線にあてはめ(Kaleida Graph, Synergy Software, PA使用)、MAP-RSNA関係を得た($y = p4 + p1 / (1 + \exp[p2(x - p3)])$)。ここで、p1はyの変化の範囲(すなわち100%)、p2はゲインを計算する際の係数、p3はRSNAが半分(すなわち50%)の時のMAP、p4はyの最低値である。対数曲線の最大ゲイン(G_{max})はMAP₅₀における曲線の傾きで、圧受容体機能の最大活性を示す。個々の対数曲線はMAP₅₀と G_{max} からグループごとに再構成し比較した。

記録されたすべての血圧信号をサンプリング周波数500HzにてA/D変換(16bit, Biopac system, MP100)後、パーソナルコンピューターに取込み、ピーク検出法によって、収縮期血圧(SBP)を検出した。各データの長さは8分間(2000~2600個)である。SBPの変動の周波数成分は自己回帰モデルによるパ

ラメトリックパワースペクトル手法を使って求めた。得られたパワースペクトラムは累積パワーで標準化した。各群の統計的比較には一元配置分散分析を用い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

【研究結果】

麻酔下MAPは普通食群の 119 ± 12 mmHgに比べ高Na食群は 132 ± 5 mmHgと有意に高かった(図1： $p < 0.05$)。しかし、高Na+高Ca食群は高Na食群に比べ 99 ± 12 mmHgと有意に低かった($p < 0.01$)。SAPも同様に、普通食群(142 ± 13 mmHg)に比べ高Na食群(161 ± 6 mmHg)が有意に高く($p < 0.05$)、高Na食群に比べ高Na+高Ca食群(132 ± 9 mmHg)が有意に低かった($p < 0.05$)。拡張期血圧(DAP)は普通食群(100 ± 11 mmHg)と高Na食群(109 ± 7 mmHg)に有意差はなかったが、高Na食群に比べ高Na+高Ca食群(79 ± 12 mmHg)が有意に低かった($p < 0.01$)。これらの血圧値いずれも普通食群と高Na+高Ca食群間に有意差は認めなかった。PRは3群間で有意差を認めなかった(図2：普通食群： 365 ± 23 bpm、高Na食群： 351 ± 40 bpm、高Na+高Ca食群： 346 ± 40 bpm)。

図3はRSNAの測定結果を示したものであるが、普通食群(177 ± 14 pulses/s)に比較して高Na食群で

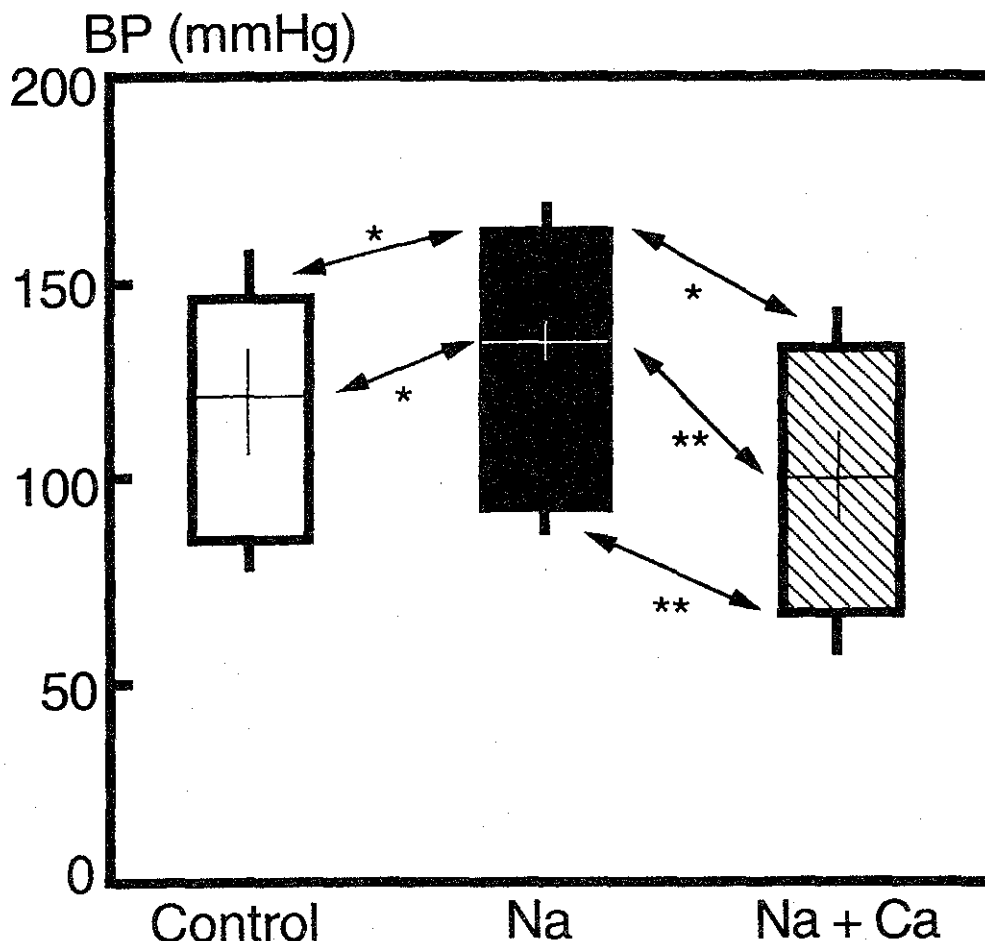


図1 普通食群(Control)、高Na食群(Na)、高Na+高Ca食群(Na+Ca)における麻酔下MAP、SAP、DAP。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

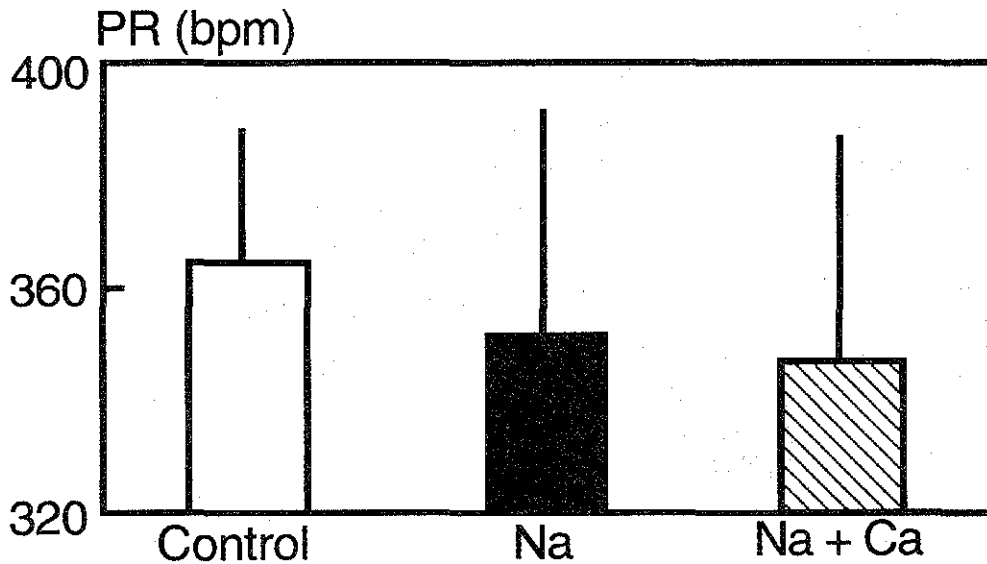


図2 普通食群(Control)、高Na食群(Na)、高Na+高Ca食群(Na+Ca)における麻酔下脈拍数(PR)。

有意の高値を示し(336 ± 26 pulses/s, $p < 0.01$)、これに対して高Na+高Ca食群は高Na食群より低値であった(185 ± 19 pulses/s, $p < 0.01$)。また、普通食群と高Na+高Ca食群のRSNAの有意差はなかった。

Sodium nitroprusside (1~30 μ g) と phenylephrine (1~30 μ g) を用いて血圧を50~230mmHgの範囲で変動

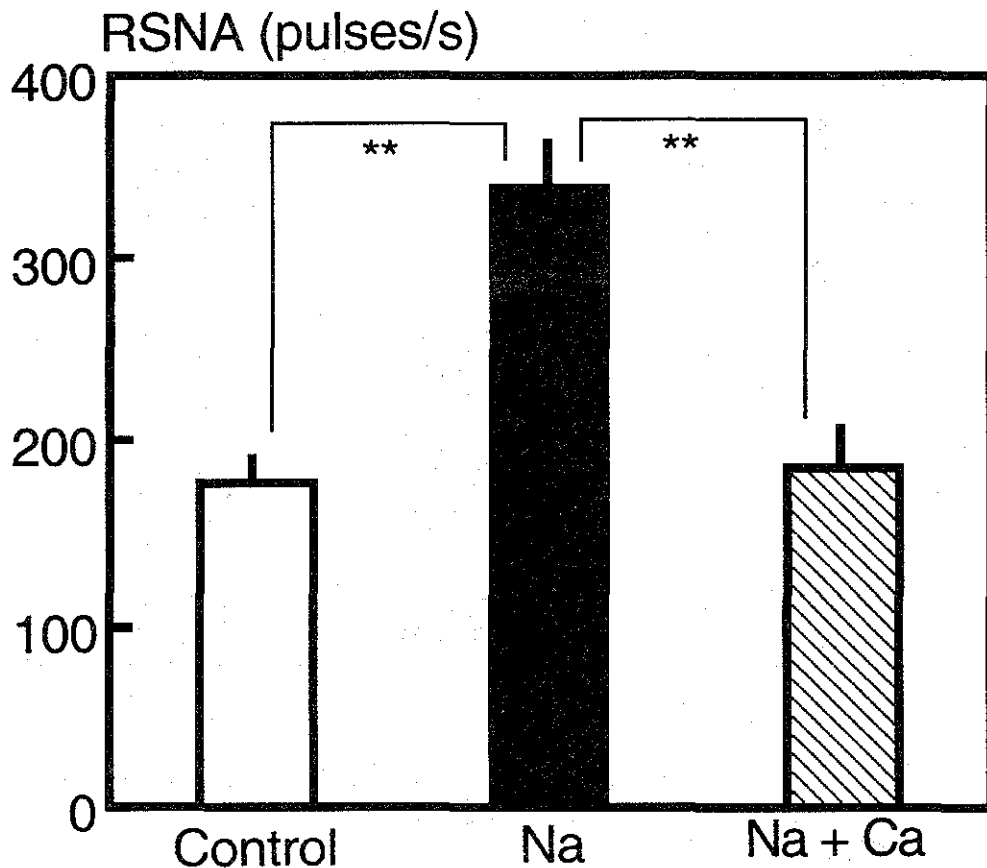


図3 普通食群(Control)、高Na食群(Na)、高Na+高Ca食群(Na+Ca)における腎交感神経活性(RSNA)。** $p < 0.01$

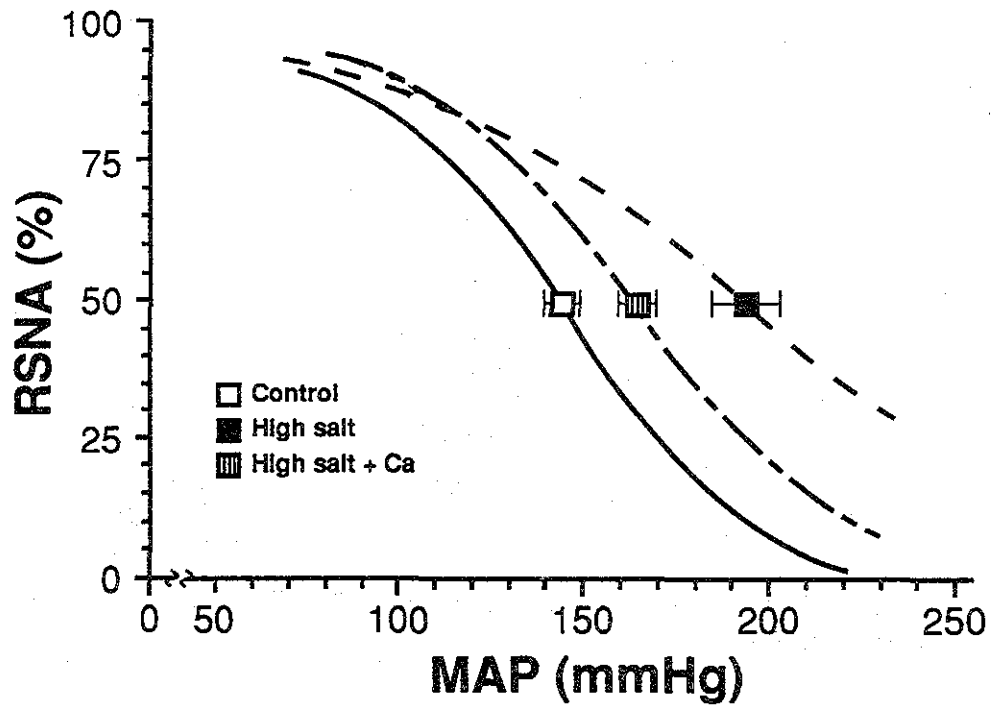


図4 普通食群(Control)、高Na食群(Na)、高Na+高Ca食群(Na+Ca)における平均血圧(MAP)-腎交感神経活性(RSNA)関係。

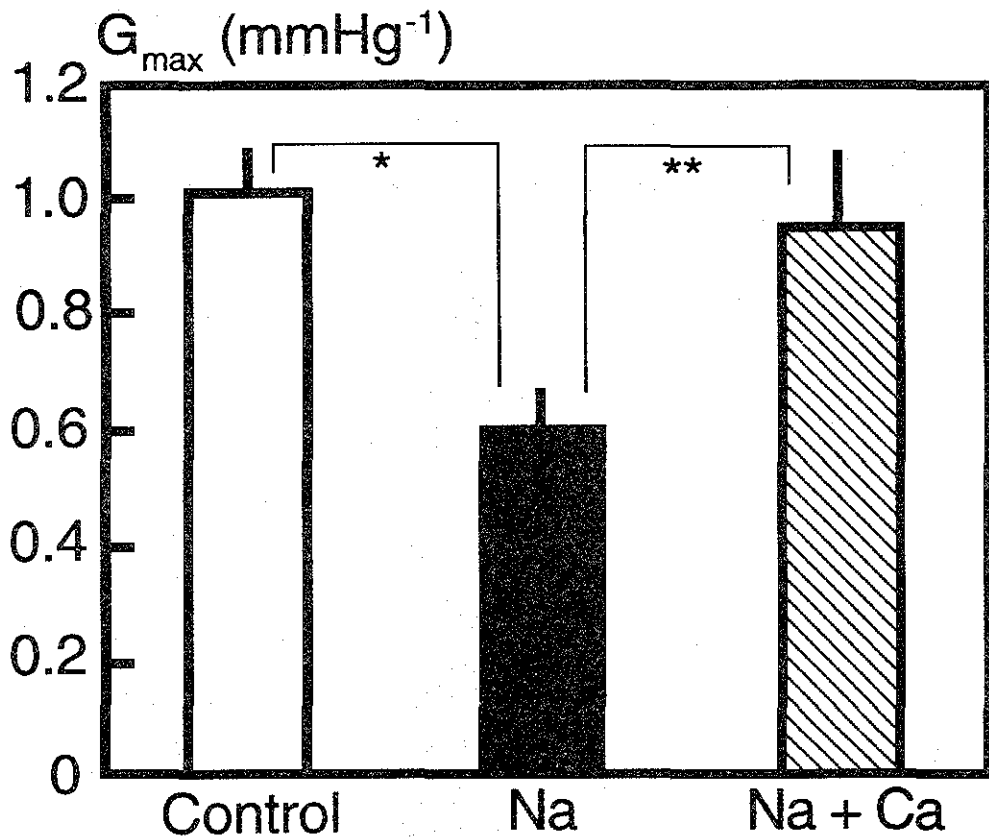


図5 普通食群(Control)、高Na食群(Na)、高Na+高Ca食群(Na+Ca)における平均血圧(MAP)-腎交感神経活性(RSNA)関係の最大ゲイン(G_{max})。
*p<0.05、**p<0.01。

させたときのRSNAの変化は図4のように普通食群に比べて高Na食群で右にシフトしていたが、同時にCaを負荷することにより普通食群と同程度にまで回復した。また、これらの最大ゲインをとって比較すると(図5)、普通食群の $1.02 \pm 0.06/\text{mmHg}$ に比較して高Na食群は $0.60 \pm 0.06/\text{mmHg}$ で有意の($p < 0.05$)低値を示し、これに対して高Na+高Ca食群は 0.95 ± 0.12 と普通食群と同等であった(高Na食群に比べ $p < 0.01$ で有意に高値である)。

さらに、各群の収縮期血圧の変動からパワースペクトラムを求め、LFとHFの平均パワーを算出すると図6のようになる(LFとHFのパワーはそれぞれ低周波数領域[LF:0.005~0.1Hz]と高周波数領域[HF:1.0~1.5Hz]の面積より求めた)。LFパワー(LFP)は普通食群に比べ高Na食群では有意に増加しており、高Na食群に比べ高Na+高Ca食群で有意に減少していた。普通食群と高Na+高Ca食群間に有意差はなかった。また、HFパワー(HFP)は普通食群に比べ高Na食群では有意に減少していたが、高Na食群と高Na+高Ca食群間に有意差は認めなかった。普通食群と高Na+高Ca食群間に有意差はなかった。

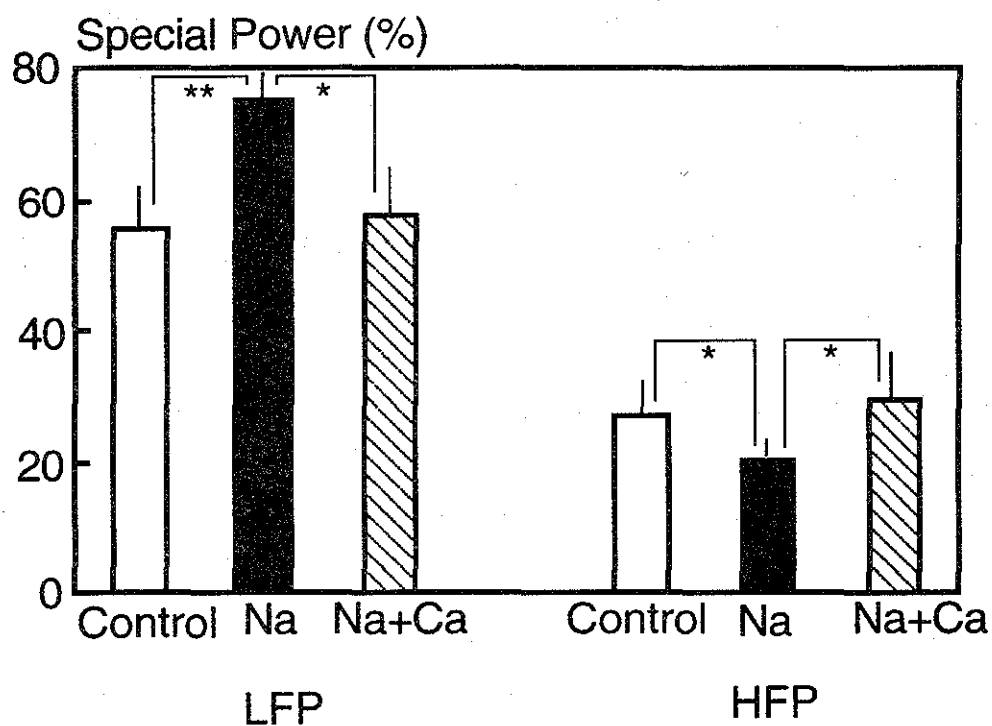


図6 普通食群(Control)、高Na食群(Na)、高Na+高Ca食群(Na+Ca)における各群の収縮期血圧(SBP)の変動からパワースペクトラムを求め、それより算出したLFとHFの平均パワー(LFP、HFP)。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

【考 察】

幼若期のSHRにおいては食塩負荷で血圧が上昇し、Ca補充で正常化した。この際、RSNAおよび腎神経の圧受容体反射機能、収縮期血圧から求めたパワースペクトラムの変化を伴っていた。すなわち、高Na食によりRSNAは亢進し、交感神経活動を反映するLFPも増加した。また、Ca補充によりRSNAの亢進やLFPの増加は正常化した。同時に、食塩負荷に基づく腎神経の圧受容体反射機能の異常もCa補充で正常化した。したがって、食塩負荷による血圧上昇と経口Ca補充による降圧には、交感神経活動の変化を伴うことが示唆された。この成績はこれまでの報告と一致するものである (Peuler JD, et al : *Hypertension* 1987 ; 9[suppl III] : III-159, Oparil S, et al : *Am J Hypertens* 1990 ; 8 : 947, Oparil S, et al : *Am J Clin Nutr* 1991 ; 54 : 227S, Ono A, et al : *J Hypertens* 1992 ; 10[suppl] : S109, Ando K, et al : *Am J Physiol* 1991 ; 261 : R1070)。

このCaの交感神経抑制作用は中枢性のものと考えられ、研究者らの成績では大動脈降圧神経(ADN)の電気刺激によるRSNAの抑制反応も幼若SHRでは食塩負荷により減弱し、Caを同時に投与することによって正常化した(Ono A, et al : *Hypertension* 1994 ; 24 : 83)。このCaの中枢作用を示唆する所見はこれまでも報告されている。たとえば、経口的に投与されたCaは中枢神経系に移行し、血圧低下を来すという報告がアンジオテンシンII高血圧ラットで報告されている(Kim S, et al : *Clin Exp Hypertens* 1993 ; 15A : 307)。これに加えて、側脳室(Kim S, et al : *Clin Exp Hypertens* 1993 ; 15A : 307, Borowitz JL, et al : *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 1987 ; 55 : 67)や孤束核(これはADNのAfferentが出ている部位である)のような中枢神経核(Higuchi S, et al : *Am J Physiol* 1986 ; 250 : H226)のCa濃度の変化は血圧変動に関与しているという成績もある。したがって、中枢神経系への影響が重要であると考えられる。ただし、末梢神経への影響が多少なりとも関与している可能性は否定できない。実際、低Ca食と高Ca食では環境ストレスに対する反応性が異なり、低Ca食で亢進しているという報告があるが、この研究では血漿ノルエピネフリンの増加の程度は両者で差が無く、むしろ、血管反応性などシナプス後の変化が重要であることが示唆された(Hatton DC, et al : *Am J Physiol* 1987 ; 252 : R48)。また、幼若SHRで高Ca食は $\alpha 1$ 交感神経受容体を介する反応を改善して血圧を下げるという報告もこのことと合致する(Hatton DC, et al : *Am J Physiol* 1993 ; 264 : F234)。したがって、交感神経の関与に関しては更なる検討が必要と考えられる。

交感神経系以外のCa負荷時の降圧機序についても示唆されている。一つには、Caの血管平滑筋に対する直接作用があげられる。Caイオン自体が細胞におけるCa流入を抑制すること(Hurwitz L, et al : *J Pharmacol Exp Ther* 1982 ; 220 : 382)やCaの膜安定化作用(Bohr DF, et al : *Am J Med* 1984 ; 77 : 3)がその説明として提唱されている。しかし、この仮説は細胞外Ca濃度の極めて高い状態における*in vitro*の成績に基づいており、食事性にCaを負荷した場合にこのような高Ca血症には至らないことから否定的である。二つ目はCa調節ホルモンの関与である。食事性のCa補充は副甲状腺ホルモン(PTH)や $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃($1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$)を下げる(Resnick LM, et al : *J Hypertens* 1986 ; 4(suppl 6) : S679)。

PTHは血管拡張作用(Hatton DC, et al : *Hypertension* 1994 ; 23 : 513)があるので、これでは説明できない。1, 25(OH)₂D₃は血管収縮作用があるが(Shimosawa T, et al : *Hypertension* 1993 ; 21 : 253)、1, 25(OH)₂D₃投与による血圧変化については一致した成績がない(Hatton DC, et al : *Hypertension* 1994 ; 23 : 513)。以上のように、交換神経系以外の機序に関しては、可能性は示唆されているものの、確定的なものはなく、今後の検討が必要である。

血圧変動のパワースペクトル解析により算出したLFPの成績は、他の交感神経系の指標の変化と一致しており、全身の交感神経活動を反映すること、神経活動の直接記録のための手技が不用である点に特徴があり、食餌と交感神経活動の関連を調べるのに有用であった。今後は人への応用を含めて期待される測定法であると考えられる。

【関連する報告】

1. Nagase M, Shimosawa T, Ando K, Fujita T : Local renin-angiotensin system in sympathetic overactivity of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 1996 ; 19 : 171-177.
2. Shimosawa T, Ando K, Fujita T : Effect of insulin on norepinephrine overflow at peripheral sympathetic nerve endings in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1996 ; 9 : 1119-1125.
3. Shimosawa T, Fujita T : Hypotensive effect of a newly identified peptide, proadrenomedullin N-terminal 20 peptide. *Hypertension* 1996 ; 28 : 325-329.
4. Ando K, Fujita T : Role of intracellular alkalization in inhibition of acetylcholine-induced relaxation by FMLP in rat aorta. *Am J Physiol* 1996 ; 271 : H2405-H2410.
5. Takano K, Yamashita N, Fujita T : Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide inhibits the voltage-gated Ca²⁺ channel current through a pertussis toxin-sensitive G protein in rat pheochromocytoma-derived PC 12 cells. *J Clin Invest* 1996 ; 68 : 14-17.
6. Chang H, Fujita T : Lack of mutations in epithelial sodium channel β -subunit gene in human subjects with hypertension. *J Hypertens* 1996 ; 14 : 1417-1419.
7. Yoshiuchi K, Nomura S, Ando K, Ohtake T, Shimosawa T, Kumano H, Kuboki T, Suematsu H, Fujita T : Hemodynamic and endocrine responsiveness to mental arithmetic task and mirror drawing test in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997 ; 10 : 243-249.
8. Nagase M, Ando K, Katafuchi T, Kato A, Hirose S, Fujita T : Role of natriuretic peptide receptor type C in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension* 1997 ; 30 : 177-183.
9. Ando K, Omi N, Shimosawa T, Fujita T : Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) inhibits proliferation of human neuroblastoma TGW cells. *FEBS Lett* 1997 ; 413 : 462-466.
10. Shimosawa T, Ando K, Fujita T : A newly identified peptide, proadrenomedullin N-terminal 20 peptide, induces hypotensive action via pertussis toxin-sensitive mechanisms. *Hypertension* 1997 ; 30 : 1009-1014.

11. Nakano M, Nomura S, Shimosawa T, Yoshiuchi K, Kumano H, Kuboki T, Suematsu H, Fujita T : Clinical effects of blood pressure biofeedback treatment on hypertension by auto-shaping. *Psychosom Med* 1997 ; 59 : 331-338.
12. Hayashi M, Shimosawa T, Isaka M, Yamada S, Fujita R, Fujita T : Plasma adrenomedullin in diabetes [letter]. *Lancet* 1997 ; 350 : 1449-1450.
13. Nagase M, Hirose S, Sawamura T, Masaki T, Fujita T : Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Comm* 1997 ; 237 : 496-498.
14. Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T : Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtype in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1997 ; 15 : 1235-1243.
15. Ono A, Kuwaki T, Kumada M, Fujita T : Differential central modulation of the baroreflex by salt loading in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997 ; 29 : 808-814.
16. Sekine N, Wollheim CB, Fujita T : GH signaling in pancreatic b-cells. *Endocrine J* 1998 ; 45(suppl) : S33-S40.
17. Isshiki M, Ando J, Korenaga R, Kogo H, Fujimoto T, Fujita T, Kamiya A : Endothelial Ca^{2+} waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 5009-5014.
18. Ando K, Ito Y, Kumada M, Fujita T : Oxidative stress increases adrenomedullin mRNA levels in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 1998 ; 21 : 187-191.