

## カルシウム摂取と血圧調整機序

主任研究者

和歌山県立医科大学 増山善明

分担研究者

東京大学医学部 尾形悦郎

自治医科大学 岸浩一郎

カルシウム (Ca) は細胞内伝達機構において重要な働きを果たしているが、一方、高血圧患者に Ca を経口負荷すると降圧が認められる。本研究は、このように一見矛盾する Ca の作用を明らかにするため、高血圧の Ca 代謝に関する国際セミナーを開催し、この分野の専門家と広く意見交換を行い研究の基礎資料とした。このセミナーの討論を踏まえ、まず、本態性高血圧患者における食塩負荷の Ca 代謝に及ぼす影響について検討した (尾形悦郎)。さらに、遺伝性高血圧の実験モデルである高血圧自然発症ラット (SHR) を用い、血管反応性におよぼす Ca の関与 (岸浩一郎)、血小板内遊離 Ca の ADP に対する反応、レニン遊離に及ぼすカルモデュリン、Cキナーゼの関与 (増山善明) についても検討し、高血圧における血圧調節機序への Ca の関与について知見を得た。本報告書では、国際セミナーの意義・成果と、個別研究4編について報告する。

高血圧症のカルシウム代謝に関する国際セミナー  
(AN INTERNATIONAL SEMINAR ON  
CALCIUM METABOLISM IN HYPERTENSION)  
についての意義, 成果

和歌山県立医科大学循環器内科 増山善明  
東京大学医学部第4内科 尾形悦郎  
自治医科大学薬理 岸浩一郎

高血圧症のカルシウム代謝に関する国際セミナー (AN INTERNATIONAL SEMINAR ON CALCIUM METABOLISM IN HYPERTENSION) は, 1988年8月29日から9月2日まで東京で開催された。本国際セミナーの開催目的は, 高血圧発症における個体レベルおよび細胞レベルでのカルシウムの役割を討議することであった。すなわち細胞レベルでは, 高血圧症において血管平滑筋細胞でのカルシウムの流入異常が指摘されており, 一方個体レベルでは, 疫学的にはカルシウム欠乏が高血圧を招くこと, また動物実験ではカルシウムの投与が高血圧発症を予防することが報告されており, これらのカルシウム代謝と高血圧症の複雑な関係の解明に向けて討議することを目的とした。

当初のオーガナイザーの一人であった曾我部博文教授が急逝されたため, 本国際セミナーは故曾我部教授の追悼会となり, 米国オレゴンの McCarron 教授がオーガナイザーを務めた。事務局は自治医科大学薬理学教室が運営した。国外より17名, 国内より35名の研究者が参加した。

第1部では, 米国 NIH の Cutler 博士がカルシウム摂取の不足と高血圧発症に関する疫学的検討についてまとめた。また東京大学の折茂教授がカルシウム摂取の不足と動脈硬化および高血圧症の関係についてまとめ, 特に日本においてはカルシウム摂取の不足が目立つことを指摘した。

第2部では, カルシウム代謝調節ホルモンと高血圧症の関係が討議された。とくに McCarron 教授のグループは, 高血圧症における血漿 PTH レベルの上昇につい

ては性差が存在することを報告した。

第3部では、種々の実験高血圧症モデルにおいて、種々の器官および細胞レベルでカルシウム・ハンドリングの異常があることが報告された。

第4部では、高血圧症におけるカルシウム代謝の変化とナトリウム代謝の変化との関連性について討議された。

第5部では、大阪大学の三上博士が高血圧症におけるカルシウム投与により血圧低下についてまとめた。また McCarron 教授は高血圧症におけるカルシウムの降圧効果が、年齢、性別、カルシウム摂取法などにより異なることを報告した。さらに第6部では、カルシウムによる降圧の機序について討議された。

第7部では、血管平滑筋収縮の機序および細胞内情報伝達系に関する最近の知見が多く報告された。

最後に総合討論が行われ、今回の国際セミナーにおいて、高血圧症とカルシウム代謝異常の関係が網羅されたこと、しかし決定的な結論が出たわけではないこと、そして今後、血管収縮機序の知識および中枢神経系を介した血圧調節の知識も含めて、高血圧症の発症原因とカルシウム代謝の関係に関する研究をさらに深めて行くことが確認された。

なお本国際セミナーの様子は、全国牛乳普及協会企画のビデオ「カルシウムと健康」に収録された。

参考資料：国際セミナープログラム要旨および補遺（略）

# 高血圧自然発症ラット単離糸球体からのレニン遊離に 及ぼすカルモデュリン、Cキナーゼの影響について

和歌山県立医科大学循環器内科

増山善明

塩谷雅彦 羽野卓三

馬場章 西尾一郎

## 緒言

傍糸球体細胞 (JG 細胞) からのレニン分泌への Ca の関与については、腎血流の影響を除外できるスライス腎や単離糸球体を用いた最近の報告では抑制的に作用しているとする報告<sup>1, 2)</sup>が多い。また、近年細胞内情報伝達物質としての Ca およびそれに連なるカルモデュリン、Cキナーゼの重要性が指摘されている<sup>3, 4)</sup>。我々はすでに高血圧自然発症ラット (SHR, 岡本, 青木) において血小板内遊離 Ca 濃度が高値をとること<sup>5)</sup>を報告しており、レニン分泌に及ぼすカルモデュリン、Cキナーゼの関与に差がある可能性がある。本研究では、この点を明らかにするため、SHR の単離糸球体を用いレニン遊離における、カルモデュリン阻害薬 (W-7)、Cキナーゼ拮抗薬 (H-7) の関与を検討した。

## 対象と方法

実験には7週齢のSHRと同週齢のWYK、各24匹を用いた。Beierwaltesらの方法<sup>6)</sup>に準じ糸球体を単離し、1腎あたりの糸球体を100 $\mu$ lのKrebs-Ringer液に拡散した。100 $\mu$ l中に含まれる単離糸球体を37 $^{\circ}$ Cに保ったsuperfusion chamberに封入し、95%O<sub>2</sub>・5%CO<sub>2</sub>にて通気したKrebs-Ringer液により毎分0.3mlの流速で定流灌流した。灌流液は、灌流開始25分以降5分間隔で採取した。

灌流液中のレニン濃度はBoucherらの方法<sup>7)</sup>にて予め作成した過剰のラットレニン基質を加え、生成されたアンジオテンシン1をRIA法にて測定し、糸球体10<sup>4</sup>個、1時間あたりのアンジオテンシン1生成量で表わした。

基礎検討として、SHR, WKYにおける灌流後の基礎レニン分泌量の経時的变化を検討した。さらに、カルモデュリン阻害薬であるW-7 ( $10^{-4}$ M)を10分間灌流液中に投与し、投与前10分間および投与後10分間のレニン分泌への影響を見た。Cキナーゼ阻害薬であるH-7 ( $10^{-4}$ M)についても同様に投与しレニン分泌への影響をみた。

## 成績

収縮期血圧は、SHR  $156 \pm 4$  mmHg, WKY  $129 \pm 4$  mmHg, 体重はSHR  $168 \pm 12$  g, WKY  $187 \pm 12$  gであった。腎重量はSHR  $0.80 \pm 0.02$  g, WKY  $0.86 \pm 0.02$  g, 1腎あたりの糸球体数はSHR  $27200 \pm 1200$ , WKY  $26900 \pm 700$ と両群間に差はなかった。

### 1) 経時的变化の影響

灌流後レニン遊離は著明に減少するが、25分以降ほぼ一定の値を示した。SHR, WKYにおいて有為な差を認めなかった(図1)。

単離糸球体のレニン含量はSHR  $1700 \pm 12$  ng ATI/hr/ $10^4$  glomeruli, WKY  $1690 \pm 41$ で両者間で有為な差を認めなかった。

### 2) SHRにおけるカルモデュリン阻害薬の影響

W-7投与後のレニン分泌はSHR, WKYとも有意の上昇を示した(図2)。最大増加率はSHR  $86 \pm 11\%$ , WKY  $45 \pm 11\%$ でありSHRにおいて有意に大きかった。

### 3) Cキナーゼ阻害薬の影響

H-7によりレニン遊離は、濃度依存性に上昇した(図2)。H-7投与による最大レニン遊離増加度はSHR  $27 \pm 11\%$ , WKY  $93 \pm 20\%$ であり、WKYに比しSHRで有為に小であった。

## 考案

基礎レニン遊離量は灌流後20分間は減少するが、25分以後はほぼ一定の値を示した。基礎分泌の経時的变化にはSHR, WKY間に差は認められなかった。

W-7投与によりWKYに比しSHRで有意にレニン分泌が増加したことから、Ca-カルモデュリン系によるレニン分泌の抑制はSHRにおいて亢進していることが示唆される。SHRでは、細胞内Caの増加や血管床におけるCa-カルモデュリン系の関与が大きいことが報告<sup>8)</sup>されており、傍糸球体細胞からのレニン分泌に関しても同様のことが考えられる。

Cキナーゼは細胞内のCaを介する情報伝達系に重要な働きを担っている<sup>4)</sup>といわれている。灌流液中にCキナーゼの選択的阻害薬であるH-7を加えるとレニン遊離が増加したことからCキナーゼは、レニン遊離に抑制的に作用していると考えられる。Kurtzらの報告<sup>9)</sup>においても同様な結果が示されている。その機序としては、CキナーゼがCaチャンネルを活性化しCa透過性を亢進させた結果、細胞内Ca濃度が増加することによるとしている。本研究においてはレニン遊離に対するCキナーゼの関与はWKYに比しSHRで小さいと考えられる。

## 結 語

ラット単離糸球体を用いて、レニン遊離へのカルシウム・カルモデュリン系およびCキナーゼの関与をみる目的でカルモデュリン阻害薬、Cキナーゼ阻害薬のレニン遊離への影響を検討した。その結果以下の知見をえた。

- 1) 単離糸球体からのレニン遊離には、カルシウム・カルモデュリン系、Cキナーゼは抑制的に作用していると考えられる。
- 2) 高血圧自然発症ラット (SHR) におけるレニン遊離へのカルシウム・カルモデュリン系の関与は大きく、Cキナーゼの関与は小さいことが示唆された。

SHRにおけるカルモデュリン、Cキナーゼの関与の差がこれまでの他の成績とあわせ、SHRの病態に関与しているものと考えられる。

## 文 献

- 1) Keeton T. K., Cambell W. B. : The pharmacologic alteration of renin release. Pharmacological Rev 31:81-227, 1981.

- 2) Park C. G. and Malvin R. : Calcium in the control of renin release.  
Am J Physiology 235(1):F22—25, 1978.
- 3) Means A. R. and Dedman J. R. : Calmodulin intracellular calcium receptor.  
Nature 285:73—77, 1980.
- 4) Nishizuka Y. : Studies and perspectives of protein kinase C.  
Science 233:305—312, 1986.
- 5) Baba A., et al. : Intracellular free calcium concentration, Ca<sup>++</sup> channels and calmodulin levels in experimental hypertension in rats.  
Jpn Circ J 51:1216—1222, 1987.
- 6) Beierwaltes W. H. et al : Interaction of the prostaglandin and renin—angiotensin systems in isolated rat glomeruli.  
Am J Physiol 239:F602—608, 1980.
- 7) Boucher R. et al : A micromethod for measurement of renin in the plasma and kidney of rats. Can J Pharmacol 45:881—890, 1967.
- 8) Huang S. L. et al : Abnormality of calmodulin activity in hypertension. Evidence of the presence of an activator. J Clin Invest 82:276—281, 1988.
- 9) Kurz A., et al : Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. Am J Physiol 250:C563—571, 1986.

図 1 SHR、WKYにおける基礎レニン遊離の経時的変化

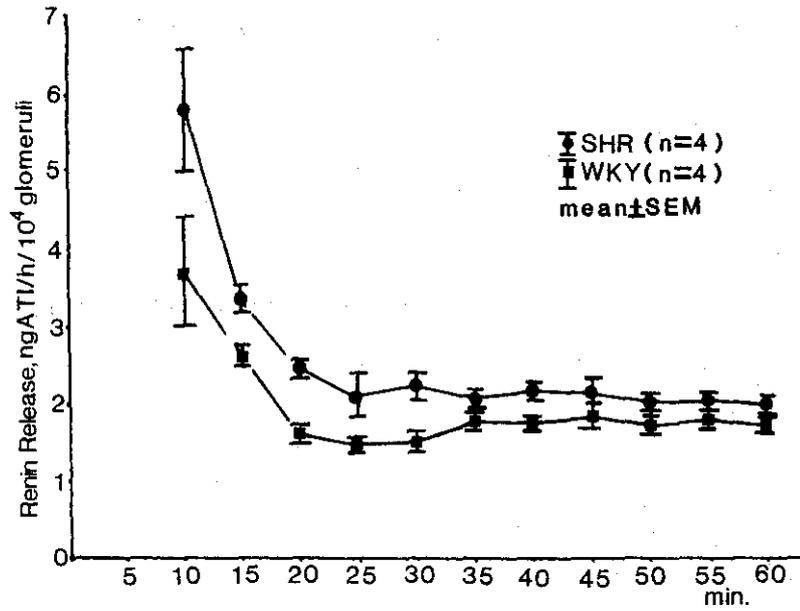
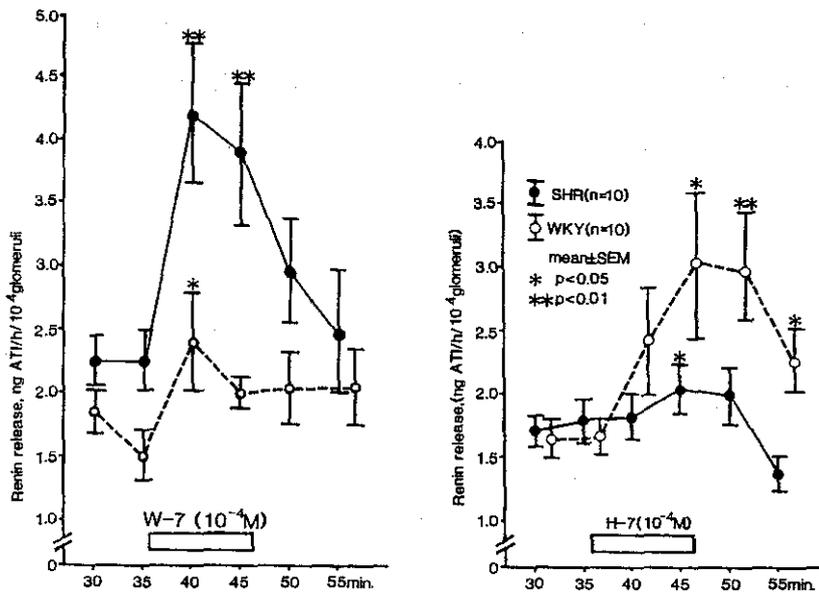


図 2 単離糸球体からのレニン遊離に及ぼす W-7、H-7 の関与



# 高血圧自然発症ラットの血小板内Ca<sup>++</sup>の ADP に対する反応の検討

和歌山県立医科大学循環器内科

増山善明, 馬場 章, 福田和也, 羽野卓三,  
塩谷雅彦, 吉川博之, 浦 雅子, 中村吉成,  
口井正人, 西尾一郎

## 目 的

高血圧自然発症ラットや本態性高血圧で Ca<sup>++</sup> handling に異常のあることが報告され, 私たちも既に高血圧自然発症ラットの血小板 Ca<sup>++</sup> 濃度が上昇していることを報告した。細胞内 Ca<sup>++</sup> は細胞外からの流入, 細胞外へのくみ出し, 細胞内貯蔵部位との出入りによって調節されているが, どの機構に異常があるのかは, まだ十分には解明されていない。そこで今回は, 刺激に対する細胞内 Ca<sup>++</sup> が存在する時と, 存在しない時とで比較し, 高血圧自然発症ラットの細胞内 Ca<sup>++</sup> 調節機構の異常について検討した。

## 方 法

4週齢および7週齢の雄性高血圧自然発症ラット (SHR, 岡本・青木) を用い, 同週齢のオス Wistar-Kyoto ラット (WKY) を対照とした。Pentobarbital 腹腔内麻酔下に心穿刺によりクエン酸採血を行い, 多血小板血漿から Sepharose CL-2B column により血小板を分離した。1 $\mu$ M の fura-2/AM とともに 25℃ にて 60 分間 incubation を行い, 洗浄後 10mM HEPES buffer, pH7.4 に再懸濁した。HEPES buffer は 1mM Ca<sup>++</sup> を含むものと 1mM EGTA により Ca<sup>++</sup> をキレートしたものをを用いた。蛍光の測定は, 励起波長 350nm と 385nm, 蛍光波長 500nm にて行い, 350nm と 385nm との蛍光強度の比から細胞内 Ca<sup>++</sup> 濃度を算出した。さらに, ADP (1 $\times$ 10<sup>-4</sup>M) を加えたときの蛍光の変化から細胞内 Ca<sup>++</sup> 濃度の変化を測定した。

## 結果

1mMのCa<sup>++</sup>を含むbufferでは、非刺激時の血小板内Ca<sup>++</sup>濃度は、4週齢、7週齢ともSHRに比べ、WKYの方が有意に高値であった（4週齢：SHR（n=8）107.6±8.4, WKY（n=6）77.3±8.6, p<0.05；7週齢：SHR（n=8）115.2±4.6, WKY（n=6）77.3±8.6nM, p<0.05）。しかし、EGTAでCa<sup>++</sup>をキレートした溶液中ではSHRとWKYの間に有意な差はみられなかった（4週齢：SHR（n=7）52.8±2.1, WKY（n=5）53.1±3.9nM；7週齢：SHR（n=9）80.9±1.6, WKY（n=8）77.0±2.3nM）（図1）。1X10<sup>-4</sup>MのADPにより細胞

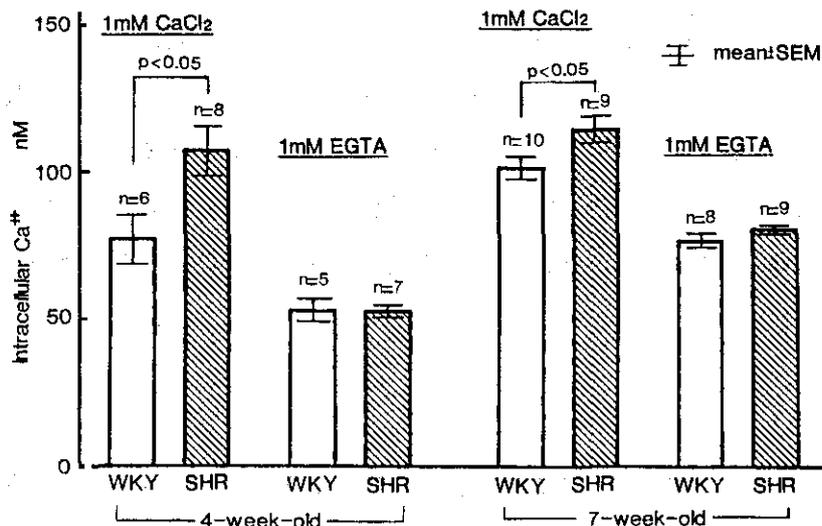


図1. 高血圧自然発症ラットの非刺激時の血小板内Ca<sup>++</sup>濃度

内Ca<sup>++</sup>は、1mM Ca<sup>++</sup>存在下では、SHR、WKYいずれも増加がみられたが、両群間に有意な差はみられなかった（4週齢：SHR（n=3）153.2±15.5, WKY（n=3）145.8±23.8nM；7週齢SHR（n=9）200.3±5.9nM, WKY（n=10）187.8±13.3nM）。しかし、Ca<sup>++</sup>を含まない溶液中では、SHRの方がWKYに比べ、ADPに対する反応は有意に低値であった（4週齢SHR（n=7）72.0±8.5,

WKY (n = 4) 117.6 ± 12.3 nM, p < 0.05; 7週齢: SHR (n = 8) 114.5 ± 3.0 nM, WKY (n = 8) 125.2 ± 2.9 nM, p < 0.05) (図 2)。

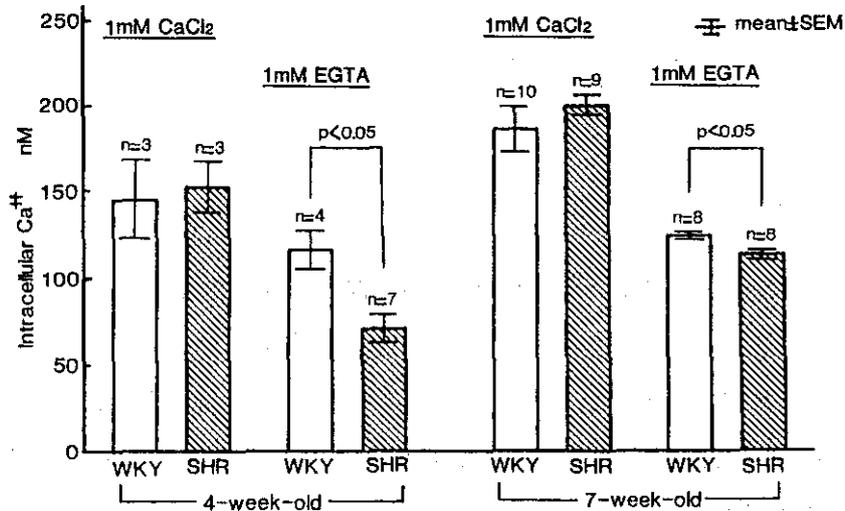


図 2. 高血圧自然発症ラットの  $1 \times 10^{-4}$  M ADP による刺激時の血小板内  $Ca^{2+}$  濃度

### 考 察

細胞外液の  $Ca^{2+}$  を 1mM として測定した非刺激時の血小板内  $Ca^{2+}$  濃度は、SHR で有意に高値であり、以前、quin2 を用いて測定した結果と同様の成績が得られた。しかし、細胞外の  $Ca^{2+}$  をキレートした状態ではこの差はみられないことから、SHR では細胞膜での  $Ca^{2+}$  流入の亢進が示唆された。ADP により刺激した際の血小板内  $Ca^{2+}$  の増加は、細胞外液に  $Ca^{2+}$  が存在する時には SHR と WKY の間に差はなく、 $Ca^{2+}$  非存在時には SHR の方が小であった。細胞外に  $Ca^{2+}$  が存在するときには、アゴニストによる血小板内  $Ca^{2+}$  の増加は、細胞外からの流入と細胞内貯蔵部位からの動員によるが、細胞外に  $Ca^{2+}$  が存在しないときには細胞内貯蔵部位からの遊離だけによっておこると考えられる。従って、以上の成績から SHR では、細胞内の  $Ca^{2+}$  貯蔵部位からの動員が少なく、細胞外の  $Ca^{2+}$  への依存が大きいと考えられる。

# 本態性高血圧患者における食塩負荷のCa代謝に及ぼす影響

東京大学医学部第4内科

尾形悦郎

岡崎亮, 松本俊夫

藤田敏郎

## 目的

本態性高血圧症患者では、尿中Ca排泄の亢進があり、血清Ca値は低下傾向にある。最近、正常者に食塩を負荷すると尿中Ca排泄の増加とともに、血中1, 25(OH)<sub>2</sub>Dが上昇するとの報告がある。そこで今回、本態性高血圧症患者に食塩負荷を行い、尿中Ca排泄増加反応と血清1, 25(OH)<sub>2</sub>Dの変化について検討し、本症におけるCa代謝異常について明らかにしようとした。

## 方法

未治療または降圧剤中止後3週間以上を経た入院中の高血圧患者4名に対してCa 400mg/日, p 700mg/日, NaCl 18g/日の一定食を投与後, Ca 400mg/日, p 700mg/日, NaCl 3g/日の食塩制限食を投与した。各最終日に、血中Ca, P, 25(OH)D, 1, 25(OH)<sub>2</sub>D, 24, 25(OH)<sub>2</sub>D濃度、尿中Na, Ca, P濃度を測定した。

## 結果

- 1) 高血圧患者では食塩投与により、尿中Ca排泄の増加が認められた(図1)。
- 2) 高血圧患者では正常者に比べて血清1, 25(OH)<sub>2</sub>D濃度は高値傾向を示し、食塩負荷によりこの値は更に増加した(図2)。

しかし、血清24, 25(OH)<sub>2</sub>D及び25(OH)D濃度は食塩負荷により変化しなかった。

- 3) 血清Ca, P値および副甲状腺機能は食塩負荷により著明な変化を示さなかった。

### 考 察

高血圧患者では，血清 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度の上昇がみられ，かつ食塩負荷によりさらに上昇したことから，これらビタミンD代謝異常が本症における高血圧の発症維持機構および食塩負荷時の血圧上昇機構に関与している可能性が考えられた。しかし，その関与様式の詳細については今後明らかにされる必要がある。

図 1. 空腹時尿中Ca排泄

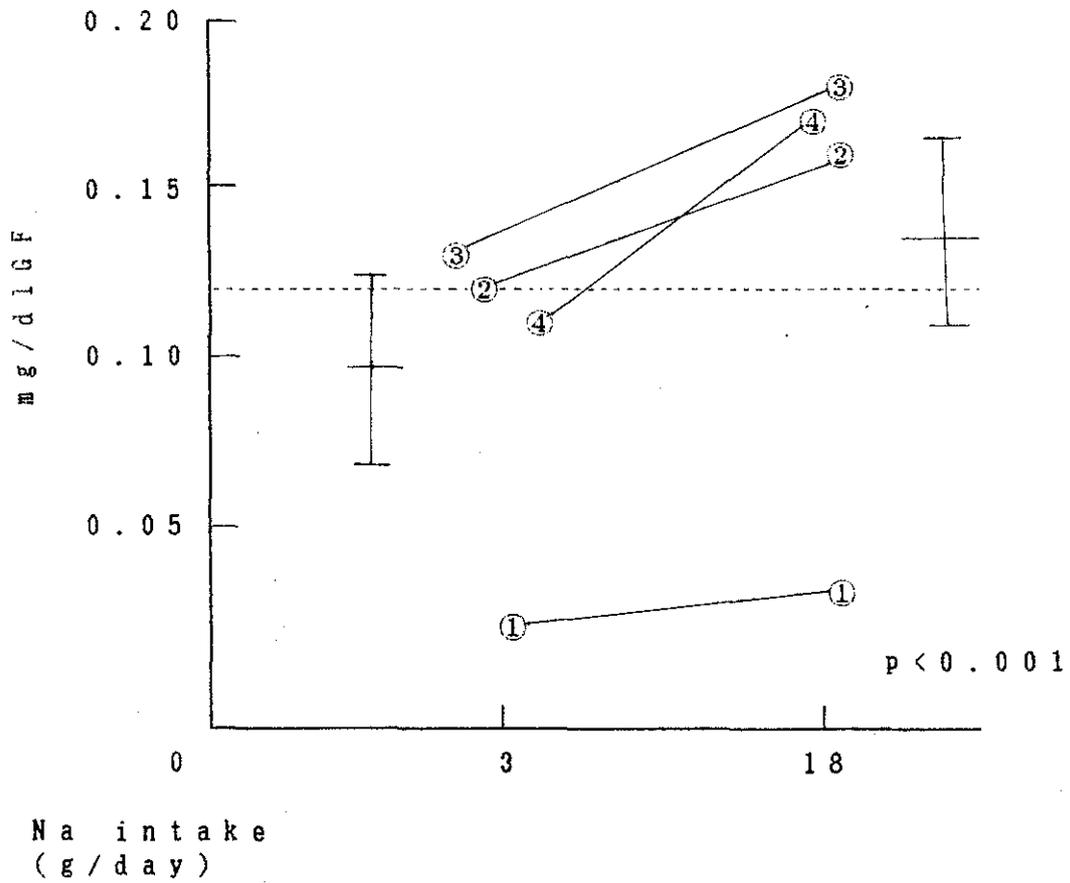


图 2.

图 2-1. 血清 1,25(OH)<sub>2</sub>D 浓度

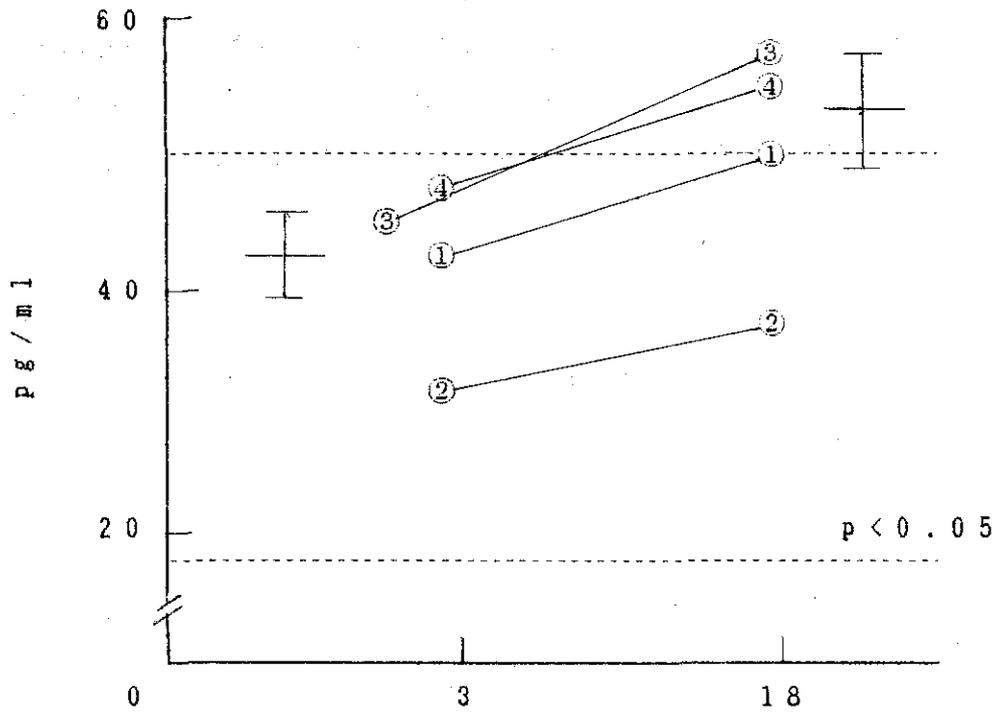


图 2-2. 血清 24,25(OH)<sub>2</sub>D 浓度

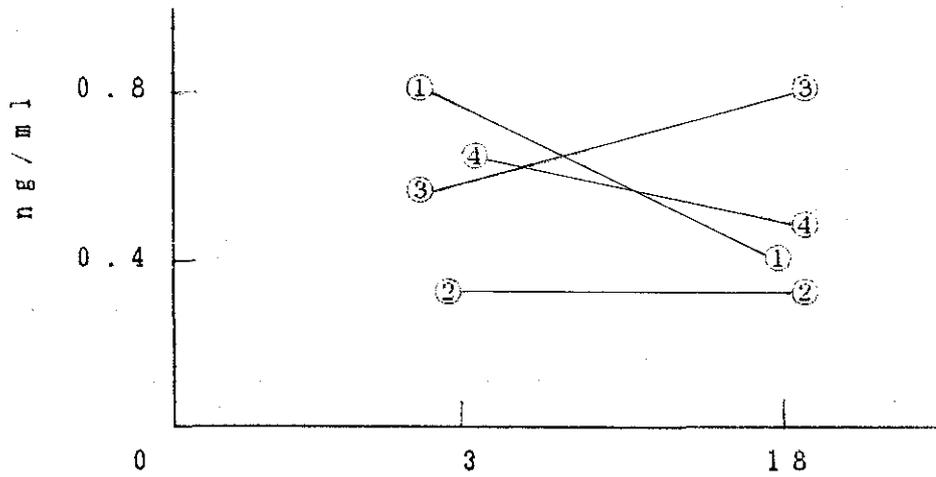
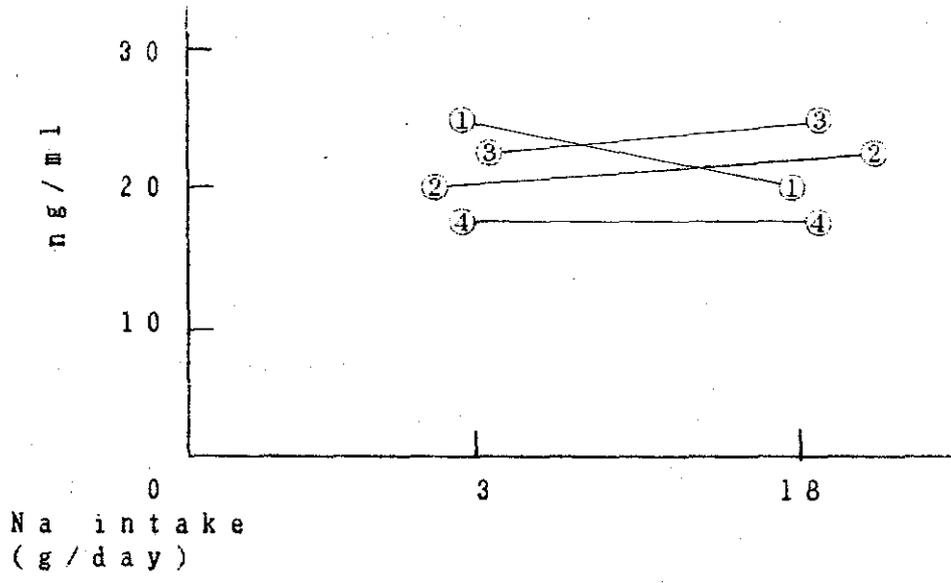


图 2-3. 血清 25(OH)<sub>2</sub>D 濃度



## 高血圧自然発症ラットの抵抗血管における構造変化とカルシウムイオンに依存した機能の変化

自治医科大学 薬理

岸 浩一郎

ヒト本態性高血圧症の優れた動物モデルである高血圧自然発症ラット (SHR) における高血圧発症の原因の1つは、抵抗血管の変化 (異常収縮と中膜肥厚) であると考えられている。またSHRにカルシウムを投与すると、抵抗血管の反応性の正常化により血圧が低下するという報告がある。このようにSHRにおいては、高血圧発症においても、カルシウム投与による血圧低下においても、抵抗血管の機能や構造の変化が大きな役割を果たしているものと考えられる。そこで本研究では、これらの現象解明の基礎を築くために、SHRの抵抗血管の変化と高血圧発症過程との関係を詳細に調べた。

高血圧発症初期 (6週齢)、発症中期 (11週齢)、確立期 (18週齢) のSHRの腸間膜血管床灌流標本を用いて、その反応性と血管構造変化を調べた。SHRの抵抗血管中膜の平滑筋細胞層数は、対照ラット (WKY) に比べ、高血圧発症初期より増加していた。またその後の中膜細胞層数の増加と血圧の上昇は並行して進行していた。一方、一定の条件下でみたノルエピネフリンに対する収縮反応は、灌流液中のカルシウムイオンの存在に大きく依存しており、SHRの高血圧発症初期においてのみ、中膜肥厚から予想される以上に、著しく上昇していた。

以上の結果より、SHRの高血圧発症初期には、抵抗血管の中膜の肥厚とノルエピネフリンに対する異常反応が深く関わっていることが考えられる。またその後の血圧の上昇には、抵抗血管の中膜の肥厚が関与しているものと考えられる。これら2つの抵抗血管の変化はともに平滑筋細胞のノルエピネフリンに対する情報伝達系の異常により説明できる。今後、抵抗血管平滑筋細胞の情報伝達系異常の根本原因を追求することにより、SHRの高血圧発症原因が明らかになり、カルシウム投与による血圧低下の機序の解明の糸口も得られるものと考えられる。

## 日本動脈硬化学会委託研究

1. アポリポ蛋白質遺伝子の転写調節に及ぼす牛乳中に  
含有される各種脂肪酸の作用

国立栄養研究所病態栄養部

松本明世

2. 牛乳摂取の血漿リポ蛋白に及ぼす影響  
—特にHDL粒子サイズ分布について—

東京慈恵会医科大学青戸病院内科

石川俊次

加々美明彦

3. 各種脂肪摂取後TG—リッチリポ蛋白の血漿および  
細胞内代謝過程におよぼす影響

福井医科大学第3内科

中井継彦

玉井利孝

笈田耕治

