

カルシウム摂取と血圧調節機序

和歌山県立医科大学

教授 増山善明

東京大学医学部

尾形悦郎

カルシウム (Ca) は血管平滑筋レベルにおいて、収縮に重要な働きを果しているが、経口Ca負荷を行なうと降圧が認められる。昨年度は、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行ない広く意見交換を行なった。本年度は、その成果を踏まえ経口Ca負荷による降圧とその機序について新たに知見を得た。まず、高血圧自然発症ラットでは血管反応性の亢進、細胞内カルシウム濃度の上昇、赤血球膜流動性の低下がみられるが、経口カルシウム負荷によりそれらが改善されること(増山善明)、さらに高血圧自然発症ラットおよびDahl食塩感受性ラットで経口Ca負荷による降圧にレニン・アンジオテンシン系の関与が示唆された。また本態性高血圧患者においてビタミンD代謝の異常があり、高血圧発症と食塩負荷時の昇圧に関与するとの結果を得た(尾形悦郎)。本業績報告書ではこれらの点につき個別研究2編を報告する。

(1) 経口カルシウム負荷による降圧機序

—高血圧自然発症ラットを用いた検討—

和歌山県立医科大学循環器内科

教授 増山 善明

羽野 卓三

馬場 章

武田 二郎

西尾 一郎

緒言

高血圧自然発症ラット (SHR:岡本・青木) における高血圧発症には、神経性因子、血管性因子が重要な役割を果していると考えられている。神経性因子としては、中枢交感神経系および末梢交感神経系の亢進があり、末梢交感神経終末からのノルエピネフリン遊離の増加¹⁾、血漿NEの増加などを認めている²⁾。

また、血管性因子としては、摘出分離灌流標本における血管反応性の亢進¹⁾や血管平滑筋のモデルとしての血小板の細胞内遊離Ca濃度の増加を示している³⁾。さらに、細胞膜異常について赤血球膜流動性の低下を明らかにしている⁴⁾。これら神経性因子および血管性因子の異常が高血圧の成因に関与していると考えられる。一方、高血圧においては、Ca代謝の異常が報告されており⁵⁾、経口Ca負荷では血圧が下降するとの報告がある⁶⁾。ここでは、経口Ca負荷による降圧に、交感神経系、血管反応性、膜流動性がどの様に関与するかを検討した。

対象と方法

1) 経口Ca負荷

生後4週齢のSHR およびWKY を用い、1.2 %CaCl₂ を3週間自由飲水として与えた。対照には蒸留水を同様に飲水として与えた。血圧、体重は毎週測定し、24時間Na排泄量、尿カテコラミン排泄量は3週間目に代謝ケージを用い測定した。血清Na、

ヘマトクリット、血症Na、ヘマトクリット、血漿ノルエピネフリン (NE) 濃度、血小板内Ca²⁺、赤血球膜流動性、上腸間膜動脈分離灌流標本を用いた血管反応性とNE overflow、中枢および末梢神経系におけるノルエピネフリン代謝率は3週目に測定した。

2) 血漿NEおよび尿中NE排泄量の測定

Pentobarbital 麻酔下に頸静脈より右心房内にpolyethylene cannula (PE10) を留置し、24時間後に無麻酔、無拘束下に血液を 500 μ l 採取した。血液は血清分離後、-80 $^{\circ}$ Cにて測定時まで保存した。

24時間尿は代謝ケージで塩酸蓄尿し、同様に-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

NE測定は、ECD を用いた高速液体クロマトグラフィーによった。

3) NE代謝率の検討

NEの合成阻害薬である α -methyl-1-p-tyrosine (300mg) を腹腔内投与し、5時間後に組織NE含量を測定し、心、小腸、前視床下部、後視床下部、脳幹の組織NE含量よりNE代謝率を計測した²⁾。

4) 腸間膜分離灌流標本の作成

上腸間膜動脈分離灌流標本は、大動脈より上腸間膜動脈にcannula を留置し、小腸を含めKrebs-Henseleit 液にて毎分3mlで灌流した。

電気刺激は5、10Hz、5 msec、1分間行い、昇圧反応と静脈側より滴下する灌流液中のNEを測定した¹⁾。

5) 血小板内遊離Ca濃度の測定

血液は心腔穿刺にて採取し、血小板を分離した。血小板は1 μ M fura-2を1時間負荷し、洗浄後10mM HEPES緩衝液に再懸濁後、蛍光法にて測定した³⁾。

6) 電子スピン共鳴法を用いた赤血球膜流動性の検討

血液は血小板と同様心腔内穿刺で採取し、赤血球を分離後、Tris buffer で洗浄し、Spin-label剤 (5'-nitroxy-stearic acid) で label後、電子スピン共鳴法により測定した⁴⁾。

結 果

1. 経口Ca負荷時の血圧、体重および各種パラメーターの変化

Ca負荷によりSHR の血圧は2週目より蒸留水を飲水として投与したSHR に比し有意に下降したが、WKY ではCa負荷による差を認めなかった。

体重はCa負荷によりSHR で減少を示したが、WKY においては有意な変化を認めなかった (図1)。

飲水量は経口Ca負荷を行なったSHR で少ない経口を認めたが、Ca負荷前後で有意な変化は認めなかった。Ca摂取量はWKY、SHR ともCa負荷を行なった群で大きかった。

Ca負荷によりSHR、WKY とも血清Na量に変化はなかった。また、ヘマトクリットはWKY に比しSHR で大きかったが、経口Ca負荷により変化は認められなかった。尿量はSHR、WKY とも経口Ca負荷群で少ない傾向を認めたが有意差はなかった。尿中Na排泄量は、蒸留水投与のSHR でWKY に比し大きかったが、経口Ca負荷前後では有意な差はなかった。

2. 経口Ca負荷の中枢および末梢交感神経系への影響

無麻酔、無拘束下に採取した血漿ノルエピネフリン濃度は、WKY に比しSHR で高値を示した。経口Ca負荷によりSHR の血漿NE濃度は低下した。一方、WKY ではCa負荷によっても血漿NE濃度は変化しなかった。

尿中NEおよびepinephrine 排泄量は、SHR、WKY とも経口Ca負荷により低下傾向を示したが、有意差はなかった。尿中dopamine排泄量は、SHR にてWKY に比し高値を示したが、経口Ca負荷による影響は認めなかった。

上腸間膜動脈分離灌流標本を用いた成績では、SHR はWKY に比し電気刺激によ

る血管反応性及びNE overflow は増加していたが、経口Ca負荷により血管反応性およびNE overflow はさらに増加した。一方、WKY ではCa負荷により有意な変化を認めなかった(図2)。

心、小腸のNE代謝率は、SHR において亢進しており、経口Ca負荷によりNE代謝率は低下傾向を示した。前視床下部、脳幹ではNE代謝率は亢進しており、前視床下部では、Ca負荷によりNE代謝率の低下を認めた。後視床下部、脳幹についてはCa負荷による有意な変化は示さなかった。

3. 経口Ca負荷時の血管反応性の変化および細胞内Ca濃度の変化について

上腸間膜動脈分離灌流標本を用いて、外因性NEに対する昇圧反応を検討した。SHR では昇圧反応は亢進していたが、経口Ca負荷により昇圧反応の亢進は抑制された。WKY における昇圧反応は経口Ca負荷により変化しなかった(図3)。そこで、その機序に細胞内遊離Ca濃度の変化が関与しているか否かを、血管平滑筋の1つのモデルとして血小板を用いて検討した。

SHR では、遊離Ca濃度は対象のWKY に比し増加していたが、経口Ca負荷により対照のWKY のレベルにまで改善した(図4)。

4. 経口Ca負荷による赤血球膜流動性への影響

SHR では細胞膜流動性は低下しており、invitro でのCa負荷により細胞膜流動性はさらに低下を示した。このことからSHR ではCa-handling の異常が示唆された⁸⁾。

SHR では経口Ca負荷により膜流動性の低下がWKY のレベルまで改善した。一方、WKY では有意な変化は認められなかった(図5)。

考 案

高血圧患者および各種実験高血圧ラットに経口Ca負荷を行なうと降圧することが報告されている。その機序としては、交感神経系、血管系、Ca調節因子などの関与が知られているが詳細な機構については不明な点が多い⁹⁾。本研究では、Ca負荷による中

枢および末梢交感神経系、血管反応性、膜流動性について主に検討した。

Ca負荷による降圧機序に尿中Na排泄量の増加を示唆する報告があり⁹⁾、尿中Na排泄量を測定したが少なくともCa負荷3週の時点ではNa利尿を認めず、Ca負荷によるこの時点での降圧にNa利尿の関与は少ないと考えられる。さらにviscosity の変化を認めるとの報告¹⁰⁾ があり、ヘマトクリットを測定したが有意な変化をみられなかった。

交感神経系の関与については、Ca負荷により血中NE濃度は低下しているにも拘らず、末梢交感神経終末でNE遊離の亢進があり、中枢からのimpulse が減少している可能性が考えられた。NE代謝の面からは、SHR の末梢交感神経系ではNE代謝率は高く、Ca負荷で低下傾向をみた。また、中枢神経系、特に前視床下部ではNE代謝率がCa負荷により低下を示したことより、中枢神経系の変化が結果的に中枢からのoutflow を減弱させ、末梢でのNE代謝率および血漿NE濃度が低下したと考えられる。

血管反応性について上腸間膜動脈を用いた成績から、SHR でみられる血管反応性の亢進は経口Ca負荷で抑制された。その機序に細胞内Caの変化が関与するか否かを、血管平滑筋の1つのモデルとして血小板を用いて検討した。経口Ca負荷により血小板遊離Ca濃度が低下したことから、血管反応性の低下の一部は、細胞内Ca⁺⁺ 濃度の低下に起因すると考えられる。

さらに、膜流動性の面から、経口Ca負荷により細胞膜におけるCa-handling の異常が改善され、赤血球膜流動性の低下が改善されることが示された。血管反応性についても同様に機序が関与しているものと思われる。また、赤血球自身については、血液のviscosity を低下させることにより血流改善の一要素となるものと考えられる。

総 括

交感神経系では経口Ca負荷により中枢神経系からのoutflow が抑制され、その結果末梢神経終末からのNE遊離の抑制が示唆される。また、細胞内Ca濃度の低下を介して、血管反応性が低下するものと思われる。さらに、Ca-handling の改善により、赤血球膜流動性低下や血管反応性の低下をきたした。Ca負荷による降圧には、これらの因子が関与するものと考えられる。

尚、本研究の一部は、文部省科学研究費補助金（課題番号62304041, 01770593）、牛乳栄養学術研究会委託研究補助金によった。

文 献

- 1) Hano T. et al.: Norepinephrine overflow in perfused mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 14:44-53, 1989
- 2) Masuyama Y.: The neural and vascular factors in the pathogenesis of hypertension. *高血压*, 11(2), 133-151, 1989.
- 3) Baba A. Intracellular free calcium concentration, Ca^{++} channel and calmodulin level in experimental hypertension in rats. *Jpn Circ J* 51:1216-1222, 1987.
- 4) Tsuda et al.: Electron spin resonance studies of erythrocytes from spontaneously hypertensive rats and humans with essential hypertension. *Hypertension* 9(suppl III):19-24, 1987.
- 5) McCarron DA. et al.: Enhanced parathyroid function in essential hypertension: A homeostatic response to urinary calcium leak. *Hypertension* 2:162-168, 1980.
- 6) McCarron DA.: Calcium metabolism and hypertension. *Kidney International* 35:717-736, 1989.
- 7) Brodie BB et al.: Application of steady kinetics to the estimation of synthesis rate and turnover time of tissue catecholamine. *J Pharmacol Exp Ther* 154:493-499, 1966.
- 8) Tsuda K et al.: Decreased membrane fluidity of erythrocytes and cultured vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats; an electron spin resonance study. *Clin Sci* 75:477-480, 1989.
- 9) Stern N et al.: Effects of high calcium intake on blood pressure and calcium metabolism in young SHR. *Hypertension* 6:639-646, 1984.
- 10) Hatton D. et al. : Dietary calcium and Fe interaction on hematocrit in the SHR. *FASEB J* 2:A969, 1988

(2) カルシウムの降圧作用機序に関する

臨床的ならびに基礎的研究

東京大学医学部 尾形悦郎

助教授 藤田敏郎

カルシウムは細胞レベルでは血管平滑筋収縮をもたらすが、生体レベルでは経口投与により血圧を低下させる。本研究では、カルシウムの血圧調節における役割を明らかにするために、以下の実験を行った。

<実験1>

自然発症高血圧ラットにおけるカルシウム摂取の血圧に及ぼす影響

1982年、McCarronらが米国での〔健康と栄養に関する調査〕を解析し、カルシウム(Ca)摂取量と高血圧症罹患率との関係を報告して以来、Ca摂取量と高血圧の疫学的因果関係を明らかにするために数多くの調査が行われている。それらの報告からは、McCarronらが述べているように、Ca摂取量が少ないほど高血圧の発症率が高いと言う結果を支持するものも多いが、両者間に因果関係を認め得ないとするものも少なくない。しかも、高Ca摂取により降圧効果が得られるとしても、その機序についてはナトリウム(Na)利尿作用、昇圧物質に対する血管反応性の変化、交感神経系の抑制、およびレニン-アンジオテンシン系の抑制などの説が提唱されてはいるものの、今なお不明な点が多い。

従来、食餌性Ca摂取の効果はNa依存性高血圧患者に、より明確に認められるとされてきた。しかしながら、異なるNa摂取下で食餌中のCa負荷の影響を比較検討した成績は見られない。そこで我々は食餌性NaとCaが血圧に及ぼす相互作用を明らかにする目的で、AIN-76飼料組成中のNaとCa含量のみを変えた4種類の実験食(2因子2水準系)を高血圧自然発症ラット(SHR)に与え、収縮期血圧(SBP)のほか、腎臓からのNa・Ca排泄、および各種ホルモン濃度に及ぼす影響について検討を加えた。

<結 果>

食餌性ナトリウム (Na) およびカルシウム (Ca) 摂取が高血圧自然発症ラットの収縮期血圧 (SBP) に及ぼす影響を明らかにする目的で、ラットを5週齢から16週齢まで低Na (30mg/ 100g 飼料) および高Na (2498mg/ 100g 飼料) 群に分け、その各々をさらに低Ca (250mg/ 100g 飼料)、高Ca (2761mg/ 100g 飼料) 食群の2群に分け、2因子2水準系で検討した。

その結果、Caの負荷によりNaの負荷状態にかかわらず、降圧効果が得られることが示された。また、高Na食により腎からのCa排泄の増加に基づく副甲状腺機能の亢進が認められたが、Caの負荷によりこれも抑制された。低Na食群では著明な血漿レニン活性の上昇が認められ、高Na食群ではこれは逆に抑制されていたが、いずれの群においてもCa負荷により血漿レニン活性は抑制傾向を示した。

<考 察>

以上の成績から、Naの摂取状態にかかわらず食餌性のCa負荷が副甲状腺機能の抑制と共に高血圧の改善をもたらすことが明らかとなった。このような食餌性Caの降圧効果が、Caの交感神経系あるいはレニン-アンジオテンシン系への作用を介するのか、また副甲状腺ホルモン、ビタミンD代謝物などをはじめとするCa代謝調節系への作用が、これにどのような影響を及ぼすのか、などについては更に今後の検討が必要である。

<実験2>

Dahl食塩感受性ラットにおけるカルシウム摂取の血圧に及ぼす影響

カルシウム負荷による高血圧の改善は、食塩依存性高血圧患者で著明に認められる。そこで、食塩依存性高血圧のモデルであるDahlラットを用いて、カルシウム負荷が高血圧発現に及ぼす影響とをその作用機序について検討した。

<方 法>

6週令のDahl salt-sensitive(S)ラットとDahl salt-resistant(R)ラットに対して、I群正食塩(1.0%)低Ca(0.1%)食、II群正食塩(1.0%)高Ca(2.8%)食、III群高食塩(2.5%)低Ca(0.1%)食、IV群高食塩(2.5%)高Ca(2.8%)食の4種類の食餌を20週間与えた。

<結 果>

Dahl Sラットでは高食塩食下では低食塩食下に比べて血圧の著しい上昇が認められた。しかし高Ca食を投与することにより、その血圧上昇が抑制された。

Dahl Rラットでは高食塩食、高Ca食の血圧に対する野望は認められなかった。

Dahl SラットではDahl Rラットに比べて尿中Na排泄の低下が認められた。特にカルシウム負荷によりDahl RラットではNa排泄の増加はみられたが、Dahl Sラットでは認められなかった。

カルシウム負荷により、Dahl Sラットでは血漿レニン活性が低下したが、Dahl Rラットではみられなかった。

Dahl SラットではRラットに比べて、尿中Ca排泄の増加が認められた。

Dahl Sラットでは食塩負荷により尿中ヒドロオキシプロリンの増加がみられたが、尿中cyclic AMPの増加は軽度であった。

<結 論>

1. Dahl Sラットでは腎Na排泄の異常が認められ、Na依存性低レニン高血圧の有用的なモデルである。
2. Dahl Sラットでは、腎性のCa排泄の増加が認められた。
3. カルシウム負荷はDahl Sラットの高血圧を著明に改善した。
4. カルシウムの降圧作用機序の一部に、内因性レニン・アンジオテンシン系の抑制の関与が考えられる。また、Dahl Sラットでは尿中Ca排泄増加に伴う二次性副甲状腺機能亢進があり、骨と腎に対する副甲状腺ホルモンの作用が異なり、それが食塩による血圧上昇と関係しているものと考えられた。

<実験3>

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)₂Dが上昇するとの報告がある。そこで、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)₂D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10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する。各最終日に、血中Ca、P、25 (OH) D、1, 25 (OH)₂D、24, 25 (OH)₂D濃度、尿中Na、Ca、P濃度を測定する。

<結果>

1. 高血圧症患者には高率に高Ca尿症が認められる。
2. 高血圧症患者の尿中Ca排泄は食塩負荷により更に増加する。
3. 食塩負荷に対する尿中Ca増加反応の反応性には正常者としての間に相異はない。
4. 高血圧症患者の血清1, 25 (OH)₂D値は高値傾向を示し、食塩負荷によりこの値は更に増加する。
5. 高血圧患者の血清Ca、P値、および副甲状腺機能は食塩負荷により明らかな変化を示さない。

<考察>

本態性高血圧症患者では血清1, 25 (OH)₂D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。以上の結果より、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。

<実験4>

SHR において、腎におけるVitamin Dの活性化障害を認める報告や、高血圧患者には血中1, 25 (OH)₂D₃ の高値が認められる。また、最近血管平滑筋細胞に1, 25 (OH)₂D₃ のレセプターが存在することが示されている。以上より、高血圧の発症メカニズムにおいて、1, 25 (OH)₂D₃ が関与している可能性が考えられる。さらに、近年1, 25 (OH)₂D₃ に拮抗作用を有するlactone 体が合成されており、これを用いてSHR における高血圧発症を抑制できるかどうか検討した。

SHR に1, 25 (OH)₂D₃ に拮抗作用を有する23(K)、25(K)-1d, 25(OH)₂D₃-26, 23-lactone を投与したが、血圧、体重、心拍数に変化を認めず、内因性1, 25 (OH)₂D₃ は高血圧の発症には直接影響を及ぼさないと考えられた。

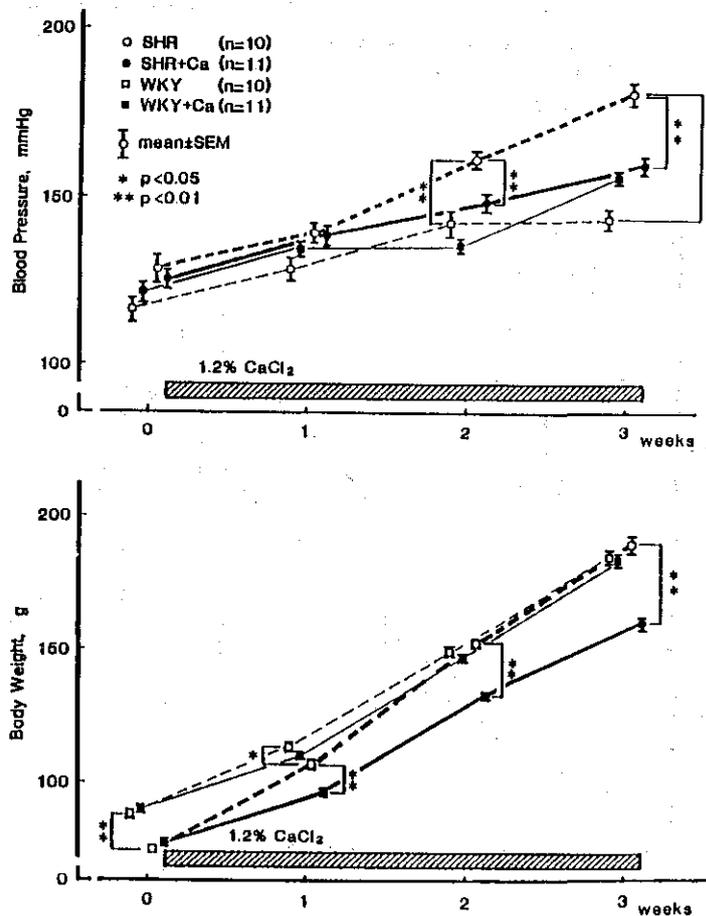


図1. 経口Ca負荷時の血圧および体重変化

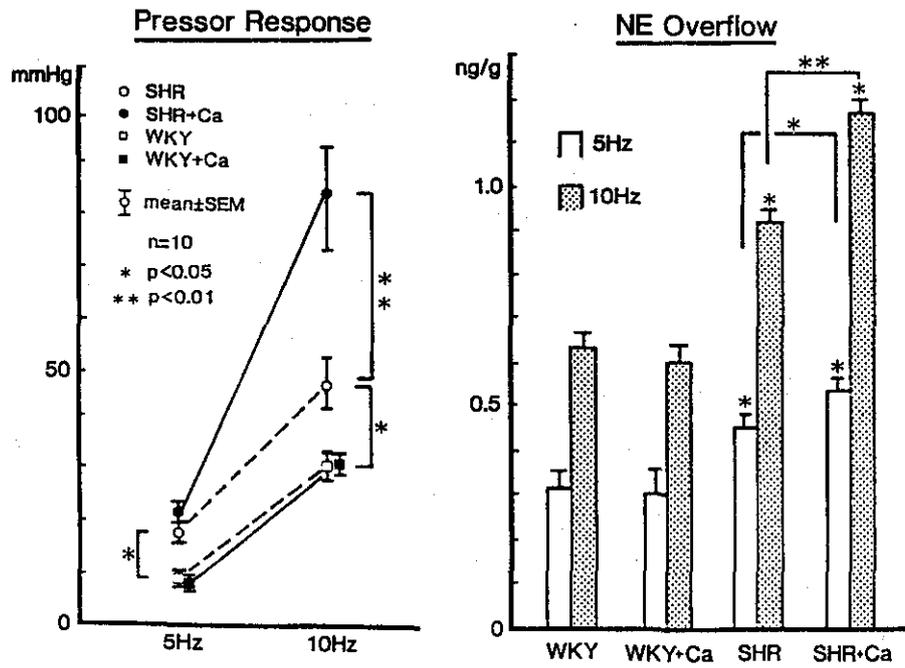


図2 上腸間膜動脈分離灌流標本における経口Ca負荷時の昇圧反応およびノルエピネフリン遊離

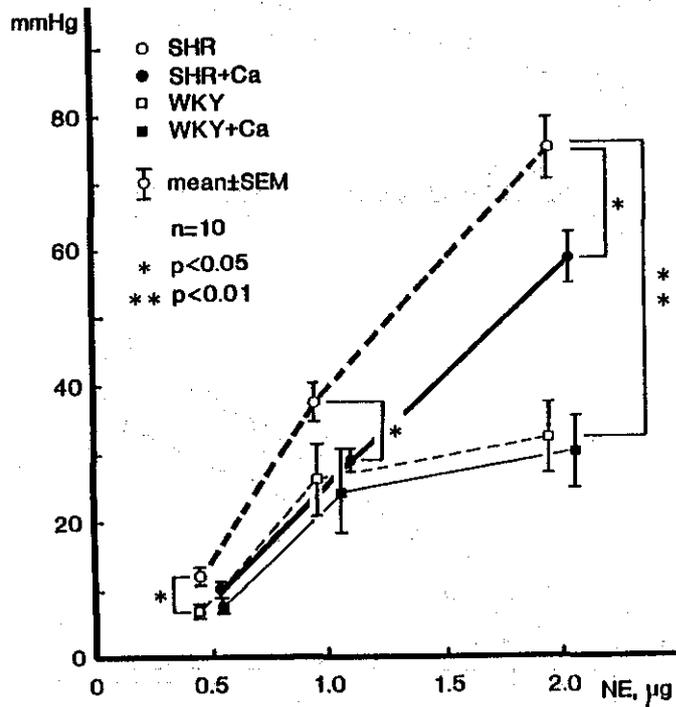


図3 経口Ca負荷時の外因性ノルエピネフリンによる昇圧反応の変化

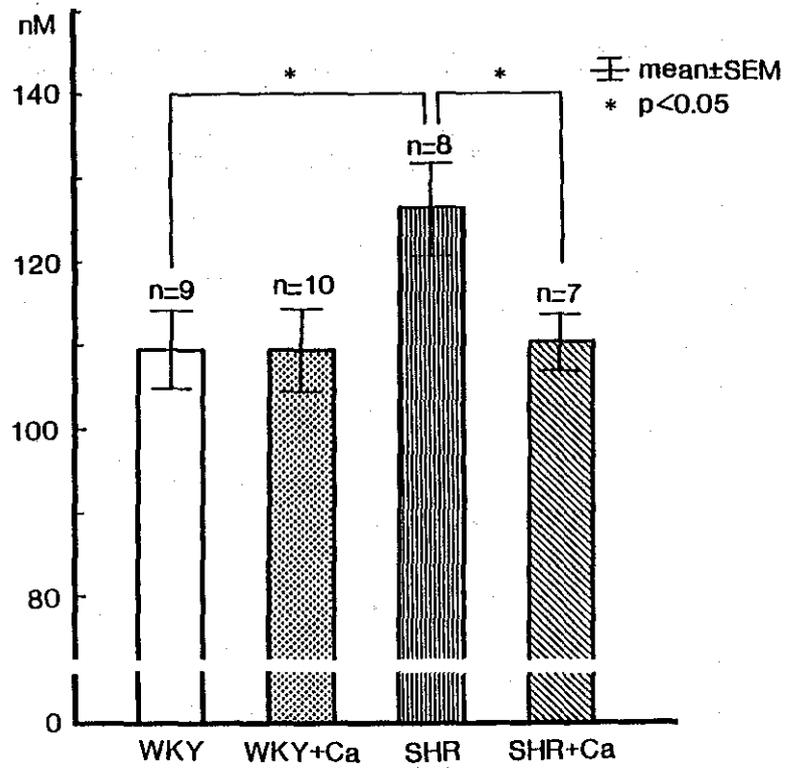


図4. 経口Ca負荷時の血小板内遊離Ca濃度の変化

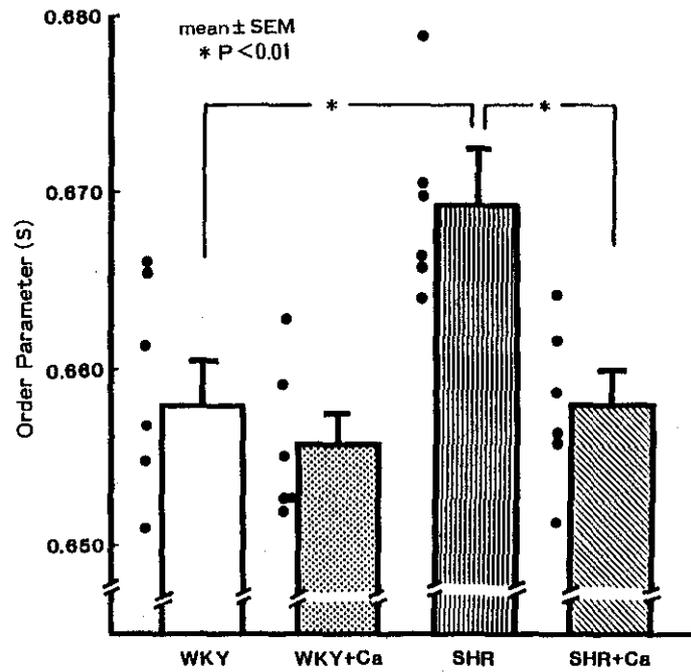


図5. 経口Ca負荷時の赤血球膜流動性の変化

Ca-supplementation in Spontaneously Hypertensive Rats

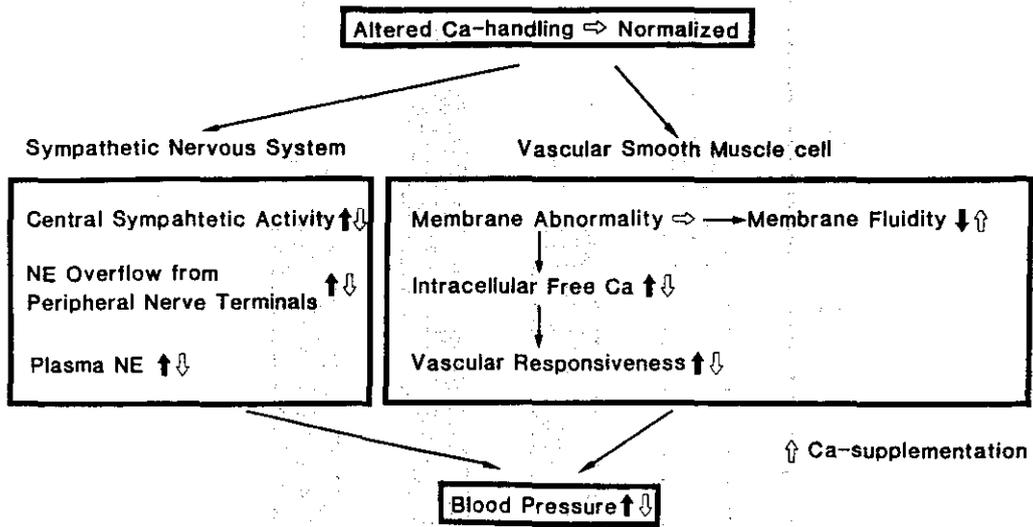


図 6. 高血圧自然発症ラットにおける
経口Ca負荷時の降圧機序