
助成研究報告書

プロジェクト研究

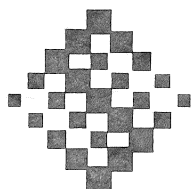
(1992-1994)

食塩の吸収・排泄の新しい調節機構因子に関する生理学的研究

Novel Regulatory Mechanisms for NaCl Absorption and Excretion

The Salt Science Research Foundation

Project Research Report



財団法人ソルト・サイエンス研究財団

食塩の吸収・排泄の新しい調節機構因子に関する生理学的研究

研究代表

香川医科大学 医学部 第二生理学

細見 弘

研究組織

所 属

氏 名

香川医科大学 医学部 第二生理学

細見 弘

香川医科大学 医学部 第二生理学

森田 啓之

香川医科大学 医学部 第一内科

石田 俊彦

名古屋工業大学 保健体育教室

下村 吉治

国立健康・栄養研究所

西牟田 守

食塩の吸収・排泄の新しい調節機構因子に関する生理学的研究

目 次

はじめに	1
細見 弘 (香川医科大学)	
意識下動物におけるNaClバランス研究法に関するパイロット実験	5
細見 弘 (香川医科大学)	
NaCl恒常性維持における肝臓内の役割	21
森田 啓之 (香川医科大学)	
食塩の糖および膵臓ホルモン代謝調節機序に関する研究	39
石田 俊彦 (香川医科大学)	
カルシウム代謝および糖代謝に対する食塩摂取の影響に関する研究	55
下村 吉治 (名古屋工業大学)	
尿中Ca排泄からみたNa (NaCl) の適正摂取量の推定 (ヒト)	75
西牟田 守 (国立健康・栄養研究所)	

はじめに

細見 弘（香川医科大学）

I 本プロジェクト研究の目的

体内総食塩量の変動は、興奮性細胞の興奮性異常や細胞周囲の体液量の異常をもたらす。興奮性異常が、生体の生命維持にとって重大な意味を有していることは明らかである。一方、体液量の異常は、細胞周囲の液体の量の変化あるいは血管内血液量の変化をもたらす。細胞周囲の液体の量の変化は、血管より細胞までの距離の変化をもたらす。細胞が必要とする酸素や栄養物の拡散による運搬が困難になる。また、細胞周囲の体液量が減少すると、細胞の代謝産物が細胞周囲に高濃度に蓄積し、細胞を取り巻く環境は好ましくなくなる。したがって、体液量すなわち体内総食塩量は、可成り狭い範囲内に保たなければならない。

体内総食塩量の調節は、主として腎臓で行われており、腎臓の排泄機能は種々の調節系によって調節されていると考えられてきた。体内総食塩量が増加した場合には、腎臓からの排泄によって減少させ得る。しかし、体内総食塩量が減少したときには、腎臓の機能によってこれを増加させることはできない。増加させ得るのは、経口摂取した塩が吸収されて初めて達成されるので、その主役は腸管である。

したがって、本研究班の主テーマを、食塩の吸収・排泄の調節機構すなわち腸管での吸収・排泄の機能を調節する機構を調べることにした。さらに、新たな腸管吸収・排泄調節機構の発見を副テーマとした。そのため、塩摂取時の生体の変化を研究し、その変化のメカニズムを明らかにすると、それは手掛かりとなる。そこで、塩の生体に及ぼす影響の研究をも行った。

主テーマについては、「肝腎反射」、「肝腸反射」などの新しい調節系の生理機能の研究が中心となるため、その発見者である細見と森田が担当した。細見は、これらの反射系が神経性反射系であるため長期に亘っても機能しうるか否かを研究した。森田は、肝臓にあるこれらの反射系の受容器の性質とその病態生理学的意義について研究した。石田は、塩の糖代謝に対する影響を研究した。下村は、塩のカルシウム代謝と糖代謝に対する影響を研究した。西牟田は、塩のカルシウム代謝に対する影響、特に運動時のカルシウム代謝を研究した。

これらの研究と平行して、国内外の研究動向を調査し、本プロジェクト研究にも反映させることが必要と考え、企画・調整、研究連絡係を置き、その担当として代表者（細見）が当たった。

II 研究組織並びに研究経過

【研究組織】

本プロジェクト研究は、次の分担課題並びに分担研究者をもって構成した。

- | | | |
|---|---|-------|
| A | 意識下動物におけるNaClバランス研究法に関するパイロット実験
香川医科大学・教授（生理学） | 細見 弘 |
| B | 食塩の吸収及び排泄調節における肝-腎反射、肝-腸反射の役割
香川医科大学・助教授（生理学） | 森田 啓之 |
| C | 食塩の糖および膵臓ホルモン代謝調節機序に関する研究
香川医科大学・助教授（内科学） | 石田 俊彦 |
| D | 尿中カルシウム排泄に対する食塩摂取の影響に関する研究
名古屋工業大学・助教授（保健体育） | 下村 吉治 |
| E | 尿中Ca排泄からみたNa（NaCl）の適正摂取量の推定（ヒト）
国立健康・栄養研究所（健康増進） | 西牟田 守 |
| F | 企画・調整・事務連絡
香川医科大学・教授（生理学） | 細見 弘 |

【研究経過】

初年度（平成4年）は、平成4年4月14日、第18森ビル2号館11階にて全分担者と会合し、本プロジェクト研究の全体目標と計画について確認した後、各分担課題についての意見交換を行った。

本研究の社会的責任を果たす上にも、ソルトサイエンス財団主催の助成研究発表会での研究発表に加えて、この研究発表に先立って約半年前に開催される日本病態生理学会で公開発表し、研究目的・方法・意義等について検討をする。その検討結果を参考にして、その後の研究を進めることとした。

- | | |
|------------------|-----------------------------|
| 平成5年（1993年）1月24日 | 第3回日本病態生理学会（東海大学・医学部） |
| 平成5年（1993年）7月29日 | 第5回助成研究発表会 |
| 平成6年（1994年）1月22日 | 第4回日本病態生理学会（千里ライフサイエンスセンター） |
| 平成6年（1994年）7月21日 | 第6回助成研究発表会 |
| 平成7年（1995年）1月22日 | 第5回日本病態生理学会（愛知医科大学） |
| 平成7年（1995年）7月19日 | 第7回助成研究発表会 |

さらに、例年の研究報告と3年間の纏めを行った。

【研究経費】

平成4年度	11,000千円
平成5年度	11,000千円
平成6年度	10,500千円

III 研究総括報告書について

本プロジェクト研究では各年度の報告書の他に、第3年度研究終了時に各分担者の3年間に亘る研究の総括報告書の提出を依頼した。報告書では研究の背景、3年間の研究成果の概要、および国内外の研究の推移、残された問題点について総括的に論説して頂いた。論説の焦点の関係上、論文の題名は分担研究とやや異なるものもあるが、各々の研究分野における現時点での問題点を明確にする上で貴重な記録である。

本誌の目次

はじめに

香川医科大学生理学講座第二生理学	細見 弘
意識下動物におけるNaClバランス研究法に関するパイロット実験	
香川医科大学生理学講座第二生理学	細見 弘
森田啓之 西田育弘 植村信久	村上 宏
溝端乃里夫 川田 徹 陳 慶輝	武田智博
NaCl恒常性維持における肝臓の役割—生理学のおよび病態生理学的検討—	
香川医科大学生理学講座第二生理学	森田啓之
松田恒則 田中邦彦	細見 弘
食塩の糖および膵臓ホルモン代謝調節機序に関する研究	
香川医科大学内科学講座第一内科学	石田俊彦
網野由香 細川 等 堀川 真	井川茅野
大久保廣 田所久徳 高原二郎	川西浩一
カルシウム代謝および糖代謝に対する食塩摂取の影響に関する研究	
名古屋工業大学保健体育教室栄養生化学	下村吉治
	村上太郎
尿中Ca排泄～みたNa (NaCl) の適正摂取量の推定 (ヒト)	
国立健康・栄養研究所	西牟田守
	児玉直子

意識下動物におけるNaClバランス研究法 に関するパイロット実験

分担研究者 細見 弘 (香川医科大学医学部生理学講座第二生理学)

研究協力者 森田 啓之 (香川医科大学医学部生理学講座第二生理学)
西田 育弘 (香川医科大学医学部生理学講座第二生理学)
植村 信久 (香川医科大学医学部生理学講座第二生理学)
村上 宏 (香川医科大学医学部生理学講座第二生理学)
溝端乃里夫 (香川医科大学医学部生理学講座第二生理学)
川田 徹 (香川医科大学医学部生理学講座第二生理学)
陳 慶輝 (香川医科大学医学部生理学講座第二生理学)
武田 智博 (香川医科大学医学部生理学講座第二生理学)

はじめに

体内総Na量(total body salt contents, TBSC)の変動は、興奮性細胞の興奮性異常や体液量異常をもたらし、生命を危機に陥れる。したがって、TBSCは厳密に調節されなければならない。従来、TBSCは主として腎臓で調節されると考えられてきた。しかし、NaClの代謝をnetで考えると、腎臓は排泄臓器である。すなわち、腎臓は増加したTBSCを減少させることはできるが、減少したTBSCを積極的に増加させることはできない。増加あるいは減少したTBSCを正常化できるのは腸管からの排泄あるいは吸収である。

腸管での水と塩の吸収・分泌に関与した調節系は数々報告されている¹⁾。これらの調節系の殆どは、ネガティブ・フィードバック調節系である。しかし、ネガティブ・フィードバック調節系は、生体に変化が起こって初めて機能し始めるので、生体は一旦危険に曝されることになり、この調節様式は必ずしも最適な調節系とは言えない。最適な調節系とは、生体に変化が現れる前に、予め変化を予測して、それを打ち消すように働く調節系である。これは、ネガティブ・フィードフォワード調節系である²⁾。

最近、われわれは腎臓と腸管でのNaClの代謝をネガティブ・フィードフォワード

的に調節する新しい調節系、「肝腎反射」^{3,4,5)}、「肝腸反射」^{6,7)}、「腎腸反射」⁸⁾を
 発見した。すなわち、腸管からNaClが吸収された結果起こる肝門脈内Na⁺濃度の上昇
 は、肝門脈にあるNa⁺濃度受容器によって神経信号に変換される。この神経活動の上
 昇は、反射性に腸管での吸収抑制（あるいは排泄増加）と腎臓からの排泄増加をもた
 らすことが判明している。これら
 の反射系の特徴は、肝門
 脈内Na⁺濃度の変化から近未
 来のTBSCを予測し、TBSCが
 変化する前に予防的に作動す
 る点にある。このように、
 「肝腎反射」と「肝腸反射」
 は短時間内にTBSCの変化を
 抑制しようとする神経性調節
 系である。

食塩の吸収・排泄の新しい
 調節機構因子を発見するた
 めには、塩摂取に伴う生体
 の反応を調べ、その反応を
 もたらす調節機構因子を追
 求することである。本プロ
 ジェクトでは、以下の実験
 を行った。

一般に、神経性調節系の動
 作時間範囲は短く、長期に
 互って働くことはないと思
 われている。そこで、まず
 「肝腎反射」と「肝腸反
 射」が、長期に互って高
 食塩食を摂取したときにも
 働くか否かを検討した。

次いで、「肝腎反射」と

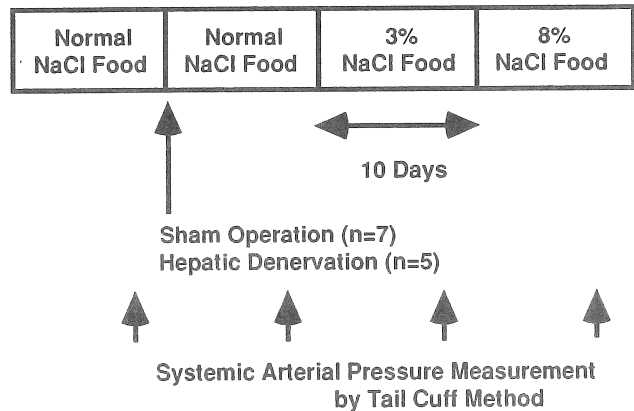
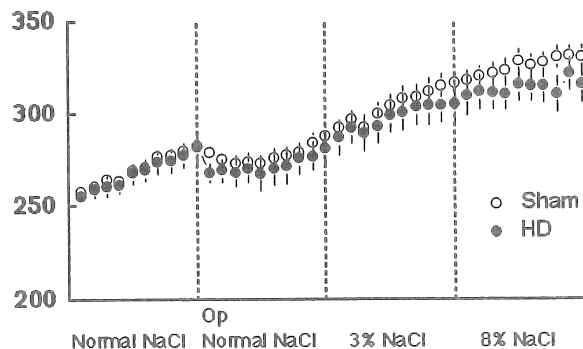


Fig. 1 Experimental protocol

Body Weight (g)



Food Intake (g / day)

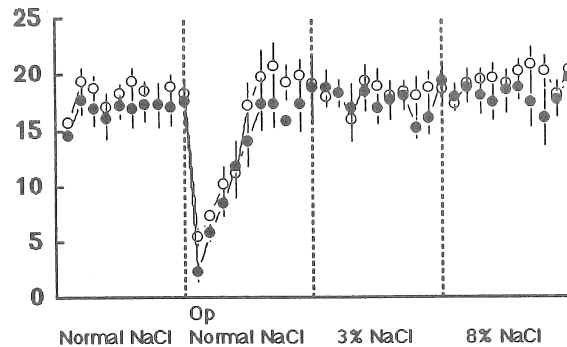


Fig. 2 Changes in body weight and food intake after the operation and during salt load

「肝腸反射」の遠心系は交感神経である。長期に食塩負荷したとき「肝腎反射」と「肝腸反射」が働き続けると、交感神経末端のノルアドレナリン（組織ノルアドレナリン、tNA）が変化する可能性がある。そこで、長期食塩負荷時のtNAの変化を研究した。

長期食塩負荷に伴う生体の反応が、自然界にも存在する反応であるか否かを研究するため、海、河口と川の上流のサケのtNAを調べた。

1 「肝腎反射」と「肝腸反射」の長期調節作用

8週齢の正常血圧Wistar-Kyotoラット(WKY) (12匹)を代謝ケージで飼育し、体重、摂食量、水摂取量、尿量、尿中ならびに便中NaCl排泄量と血圧を毎日測定し、総NaCl摂取量、総NaCl排泄量とNaClのバランスを求めた。

Fig.1に示すとおり、まず12匹全部を正常食塩食(0.4%NaCl含有)にて10日間飼育した。その後、5匹は肝臓神経を切断(HD群)し、7匹は肝臓神経を切断せず閉腹(SHAM群)し、10間は正常食塩食、次の10

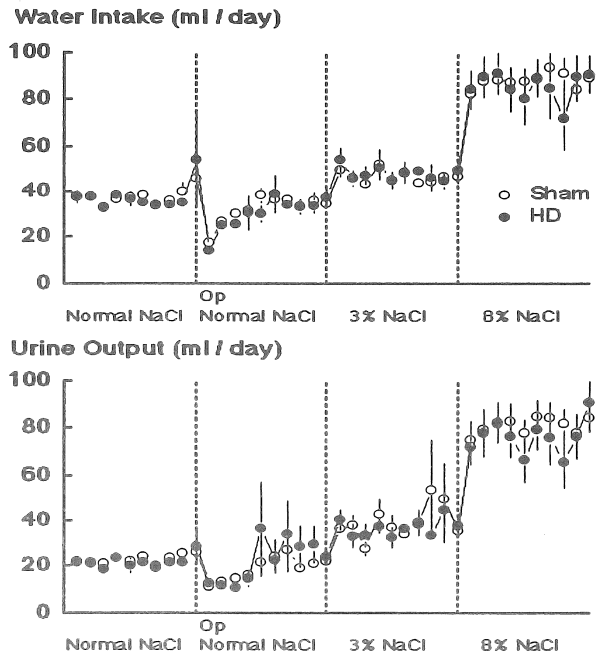


Fig. 3 Changes in water intake and urine output

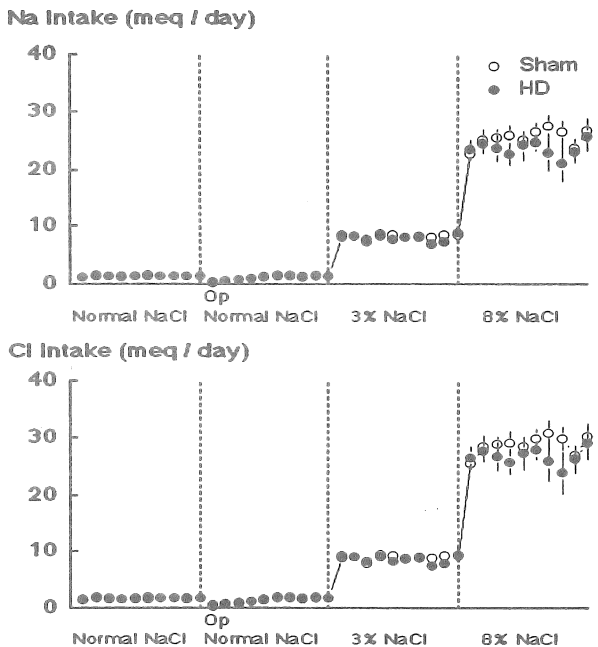


Fig. 4 Changes in Na and Cl intake

日間は3%食塩食、最後の10日間は8%食塩食にて飼育した。合計40日後、麻酔下で大腿動脈にチューブを挿入し血圧を測定した。屠殺後、肝臓組織を摘出し、HPLCにてノルエピネフリン濃度を測定した。

Fig. 2は、上段に体重、下段には食物摂取量を示している。HDとSHAM群に差はなかった。

Fig. 3は1日あたりの水摂取量（上段）と尿量（下段）を示している。両群に差はなかった。

Fig. 4は、1日当たりのNa（上段）とClの摂取量（下段）を示す。3%NaCl含有食の段階では、両群に差は認めなかった。8%NaCl含有食では統計的に有意ではないがHD群の方が多いい日がある。したがって、もしHD群のNaClの尿と便中への排泄がSHAM群より少なければ、HD群ではTBSCが増加すると考えられる。

Fig. 5は、尿中Na（上段）とClの排泄量（下段）の変化を示している。尿中NaとClの排泄量は、3%NaCl含有食を摂取している期間にはSHAM群に比較しHD群の方が低いのは10日のう

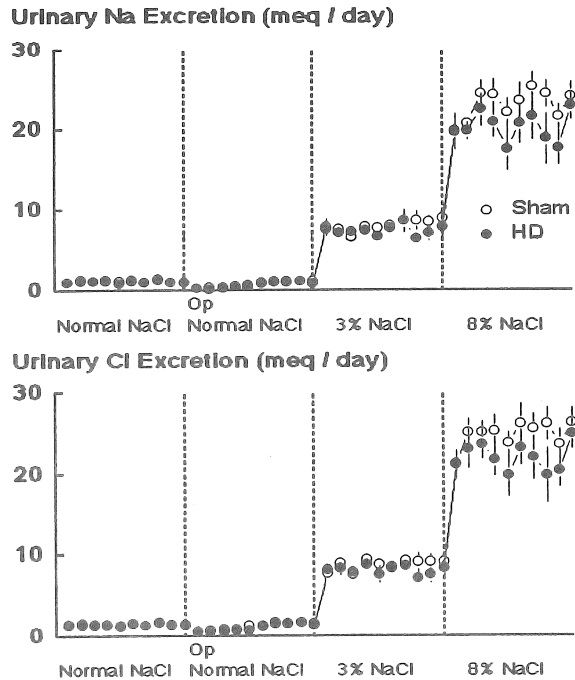


Fig. 5 Changes in urinary Na and Cl excretion

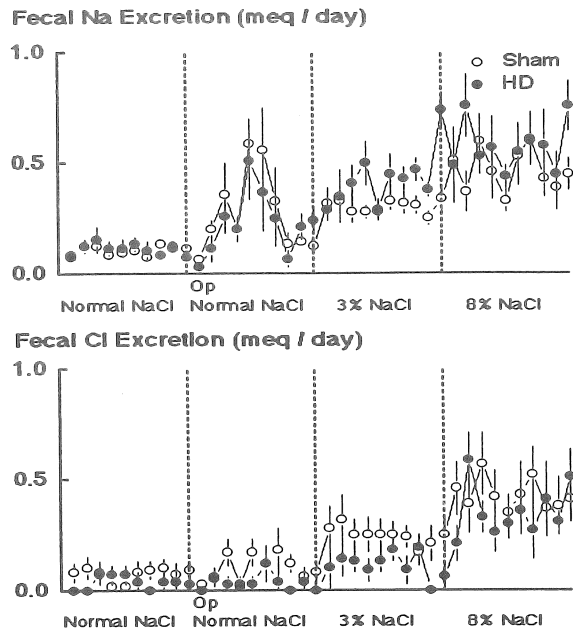


Fig. 6 Changes in fecal Na and Cl excretion

ち5日であった。また、8%NaCl含有食の時期には10日のうち9日が低くその差も大きかった。

もう一つの排泄臓器、あるいは吸収調節臓器である腸管でのNaClの代謝を調べるため便中のNa（上段）とClの排泄量（下段）を調べた(Fig. 6)。興味があるのは、術後0.4%NaCl含有食摂取時にSHAM群の便中Cl排泄量がHD群より多かったのは10日のうち7日であったことである。3%NaCl含有食摂取の時期には10日の内9日、SHAM群の方がHD群より便中Na排泄量は少なく、Cl排泄量は多かった。8%NaCl含有食摂取の時期にもこの傾向は見られたことである。しかし、統計的には有意ではなかった。

NaCl摂取量と尿中ならびに便中排泄量から、Na（上段）とClのバランス（下段）を計算した。Fig. 7にその結果を示す。3%NaCl含有食の時期には、SHAM群とHD群の差は明らかではないが、8%NaCl含有食の時期になるとHD群がNa、Clともにpositiveになる日が多かった。

Fig. 8に累積Naバランス（上段）を示す。8%NaCl含有食にな

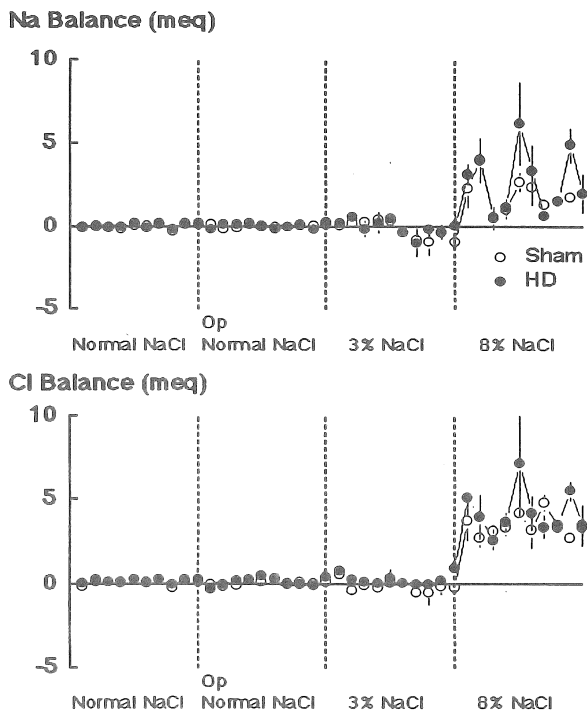


Fig. 7 Changes in Na and Cl balance

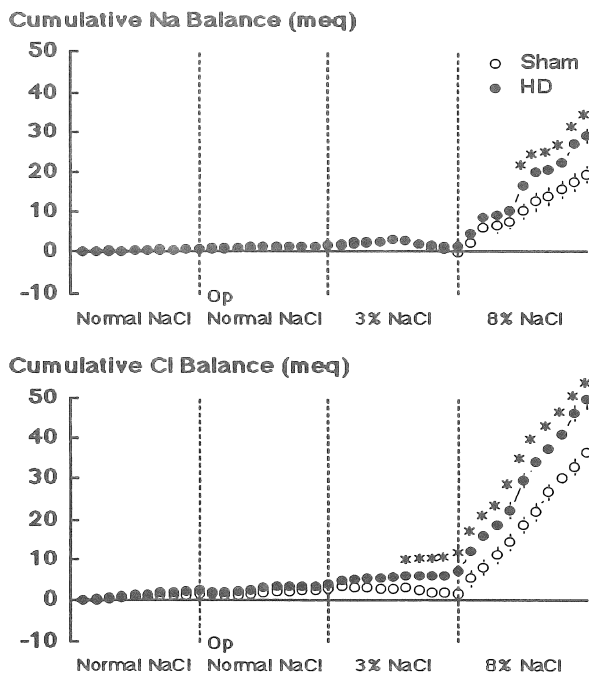


Fig. 8 Changes in cumulative Na and Cl balance

ると、HD群とSHAM群はともに正になった。また、HD群は常にSHAM群より上位にあった。

累積Clのバランス（下段）は、肝臓神経が切断されたHD群で手術直後より少しずつ上昇し、3%NaCl含有食の時期になると6日目より有意にSHAM群より上位になった。この傾向は、8% NaCl含有食の時期になるとより顕著になった。累積Naバランスと累積Clバランスが正になるとTBSCが増加する。

肝臓の組織カテコラミン濃度は、HD群では 0.8 ± 0.3 ng/g 組織、SHAM群では 73.9 ± 8.0 ng/g 組織であった。

本研究によって、1)正常食塩食での飼育では、HD群ならびにSHAM群ともにNaバランスに差は生じなかったが、ClバランスはHD群が正になる傾向があった。2)高食塩食で飼育すると、SHAM群は便中のCl排泄が増加した。3)高食塩食で飼育すると、HD群はSHAM群に比べ正のNaClバランスを示した。4)高食塩食で飼育すると、HD群はSHAM群に比べ高い平均動脈血圧を示した。以上の結果より、門脈内Na⁺濃度受容器が欠落すると、食塩感受性が高進し、NaClの蓄積を招く。

1. Naバランス

Naバランスは、正常食塩食で飼育した場合、HD群ならびにSHAM群ともに差を生じなかった。すなわち、Naの摂取量ならびに尿中・便中排泄量ともに差はなかった。したがって、僅かなNaの負荷に対しては、能動的な調節系が作動しなくても腎血流量の増加や糸球体濾過量の増加等の受動的機能によって調節される。

3%NaCl含有食の摂取では、Naの摂取量に差はないが、尿中Na排泄量はSHAM群の方が僅かながら多かった。これは、肝腎反射が腎交感神経を抑制し、腎臓からのNaの排泄を促進した結果と考えられる。一方、便中Na排泄量はHD群の方が多かった。これは、HD群では少なかった腎臓からのNaの排泄を、腸管で吸収制限することで代償しているのかもしれない。あるいは、正常な腸管では腸管自身がNaの吸収を抑制する機能を有しており、この抑制機能が腸管外からの調節系によって抑制されていたのが、肝腸反射が無くなったHD群ではその抑制も無くなり、Naが吸収されず便中に排泄されたとも考えられる。何れにしても結果としては、SHAM群とHD群のNaバランスには差が生じなかった。SHAM群では、腎臓からNaを排泄することでNaのバランスを保とうとしていることより、Naのバランスに関しては、肝腎反射による腎臓からのNaの排泄増加の方が肝腸反射による腸管からの吸収抑制よりも敏感であると考えられる。

8%NaCl含有食では、尿中Na排泄はSHAM群の方がHD群より多く、「肝腎反射」の関与が示唆された。また、

便中Na排泄はややHD群の方が多かったが、HD群のNaバランスが正に傾いたことより、腸管での吸収抑制作用だけでは

Naバランスを保つことができない。すなわち、他の調節系の関与が必要である。

2. Clバランス

Clバランスは、HD直後よりHD群の便中Cl排泄がSHAM群よりも少なかったために、HD群では上昇を

示した。これは肝腸反射が欠落したためと考えられ、肝腸反射はClの調節に対してより敏感であると考えられる。

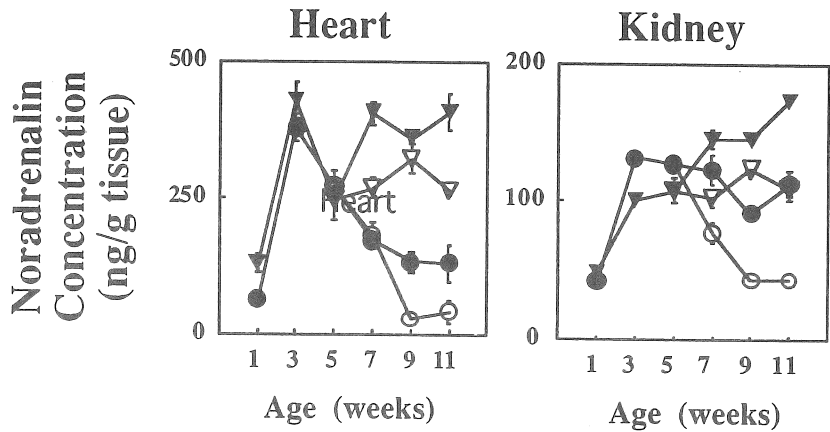


Fig. 9 Tissue Noradrenalin Concentration

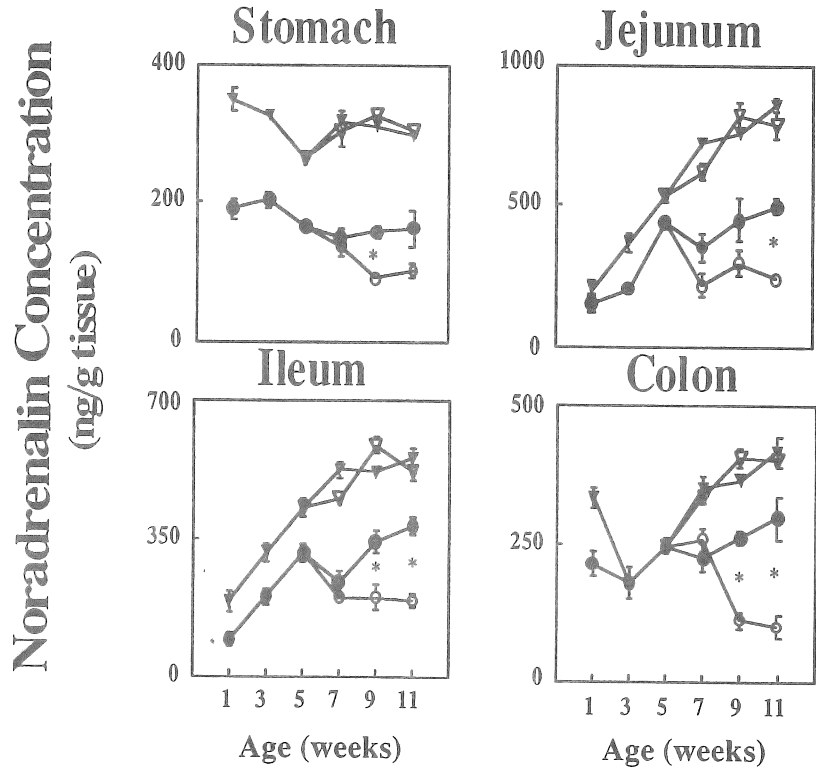
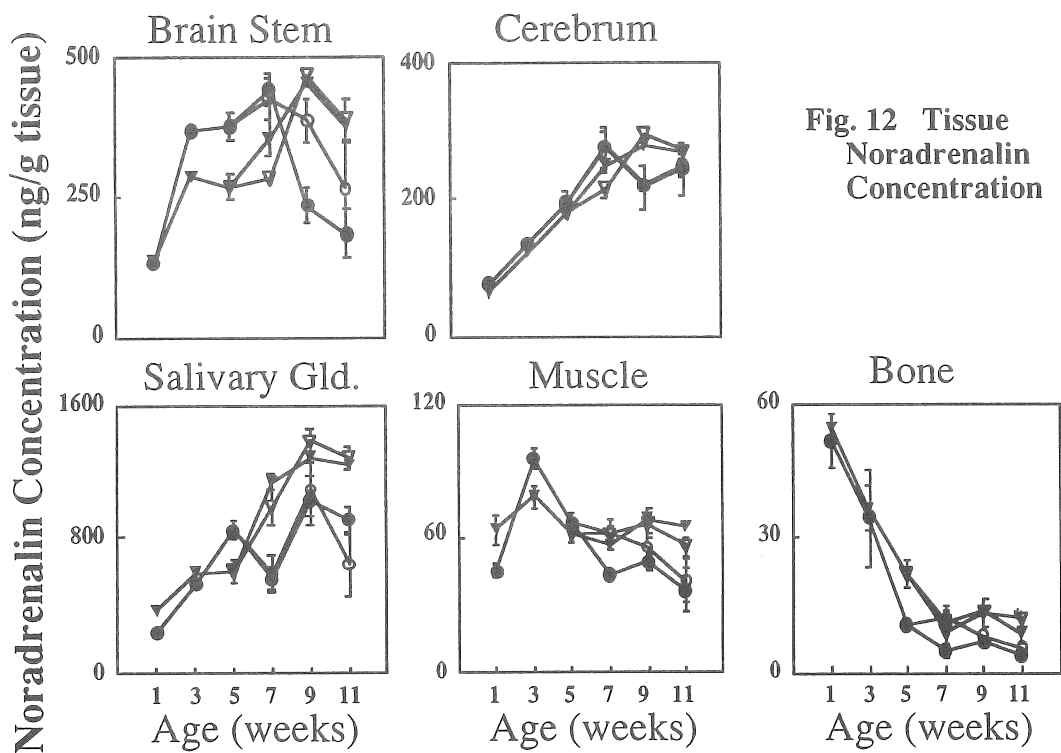
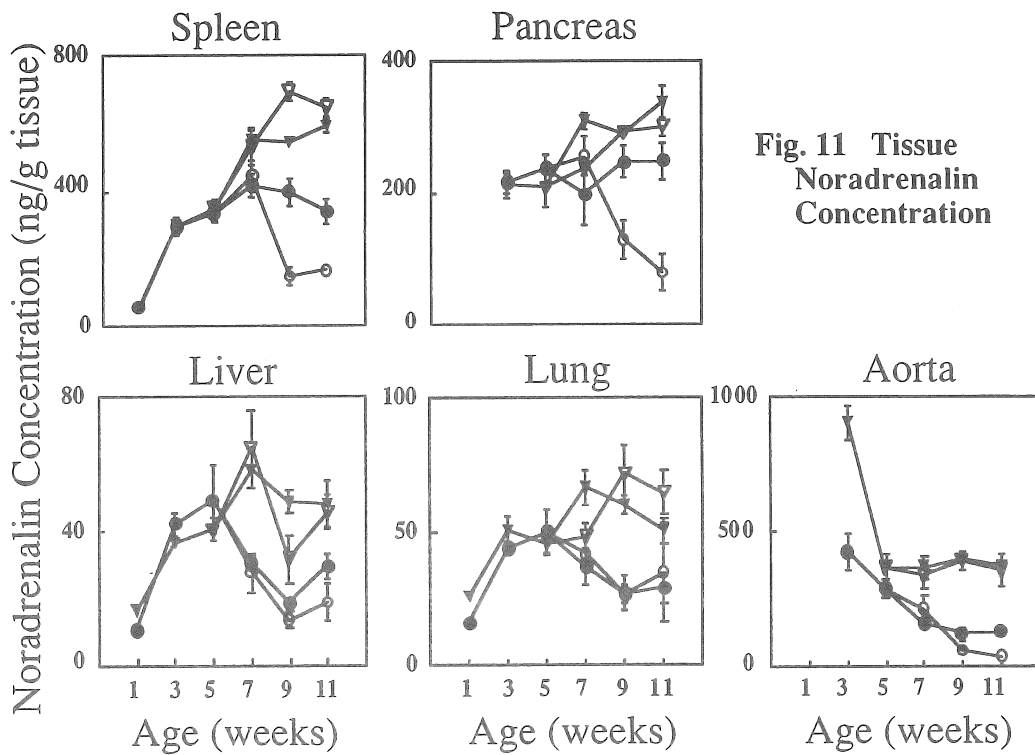


Fig. 10 Tissue Noradrenalin Concentration



3%NaCl含有食の摂取では、便中Cl排泄量はSHAM群の方がHD群より多く、SHAM群が広範囲に亘ってClバランスをほぼゼロを保ったのに対し、HD群のClバランスは有意に正になった。したがって、肝腸反射が正常な場合、NaCl負荷によって腸管からのClの排泄が増加する。

尿中Cl排泄はSHAM群の方がHD群より多く、「肝腎反射」の関与が示唆された。また、便中Cl排泄はHD群の方が悪かった。その結果、HD群のClバランスは大きく正に傾いた。

3. 肝腸反射と肝腎反射

累積Clバランスは、SHAM群が8%NaCl含有食開始までほぼ正常を保ったのに対し、HD群では手術直後より崩れた。Clバランスの主たる効果器は腸であった。したがって、Cl調節に肝腸反射が重要な働きをしていることを意味している。一方、腸管でのNa代謝は、肝腸反射が正常なSHAM群の方がHD群より悪かった。これは、「1. Naバランス」の項で述べた様な仮説が考えられ、検討すべき問題である。

8%NaCl含有食の摂取によって、腎臓からのNaとClの排泄はSHAM群の方がHD群よりも多かった。したがって、多量のNaClを摂取した時には、肝腎反射が強力に腎機能を高める。しかし、少量のNaCl摂取時にはSHAM群とHD群には明らかな差が無く、肝腎反射は強く関与しない。むしろ、受動的機能が主として調節すると考えられる。

肝腸反射と肝腎反射は、長期に亘る調節にも機能している。

II 高食塩負荷時の組織ノルアドレナリンの変化

NaClの摂取量が増加するとNaClバランスが破壊されるとともに、肝臓内のノルアドレナリンが減少することが示唆された（第2次変化）。そこで、高食塩食摂取の各段階で種々の臓器の組織ノルアドレナリン含有量(tNA)を測定した。この研究によって、塩の代謝を司っている代謝調節系、すなわち食塩の吸収・排泄の新しい調節機構因子の発見に繋がるものと考えた。

実験には、1週令のDahl塩感受性ラット(Dahl Salt-Sensitive rat: DSS)とDahl塩抵抗性ラット(Dahl Salt-Resistant rat: DSR)を用いた。各ラットを5週令までは0.4%NaCl飼料(0.4%食)にて飼育し、5週令以後は0.4%食あるいは8%NaCl飼料(8%食)によって7, 9, 11週令まで飼育した。1, 3, 5, 7, 9, 11週令目に断頭屠殺し、即座に心臓、肺臓、肝臓、腎臓、脾臓、胃、空腸、回腸、大腸、骨格筋、膵臓、大動脈、大脳、脳幹、唾液腺、頭

蓋骨を摘出し、各臓器の重量(OW)を測定した後、HPLCにてtNAを測定した。

1週令から5週令までは0.4%食にて飼育した。この間、DSSとDSRの心、腎、空腸、回腸、脾臓、肝臓、肺、脳幹、大脳、唾液腺は増加した。一方、大動脈と骨は低下した。その他の胃、大腸、膵臓、筋肉では殆ど変化しなかった。

5週令のDSSとDSRでは、離乳後0.4%食にて飼育されている。この時期のtNAを比較すると、心(Fig.9)、肺(Fig.11)、肝(Fig.11)、腎(Fig.9)、脾(Fig.11)、骨格筋(Fig.12)、脾(Fig.11)、大動脈(Fig.11)、大脳(Fig.12)では両群間に差はなかった。しかし、胃(Fig.10)、空腸(Fig.10)、回腸(Fig.10)、大腸(Fig.10)等の消化管と骨(Fig.12)では、DSRの方がDSSよりもtNAが多かった。また、脳幹(Fig.12)と唾液腺(Fig.12)では、DSSの方がDSRよりも高かった。

正常食塩食としてラットの飼育に使用されている飼料には、0.4%のNaClを含んでいる。したがって、この飼料で飼育した結果見られるDSRの変化(各図中▼)は、成長による変化であると考えられる。一方、8%食で飼育したDSR(▽)では心臓と腎臓のtNAが低下の傾向を示した。その他の臓器のtNAは、0.4%食と差がなかった。

5週令以後、0.4%食(●)で飼育したDSSのtNAは心、肺、肝、腎、脾、胃、空腸、回腸、大腸、骨格筋、大動脈、脳幹において減少し、8%食で飼育したDSR(▽)の値よりも低かった。しかし、膵、大脳、副腎、唾液腺、骨での変化は、加齢の変化と大差がなかった。

5週令以後、DSSを8%食(○)で飼育すると、tNAは心、肺、肝、腎、脾、胃、空腸、

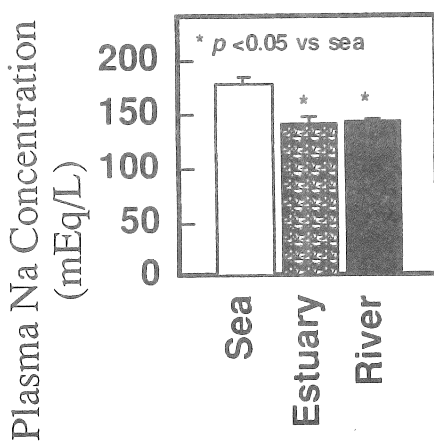


Fig. 13 Plasma Na Concentration

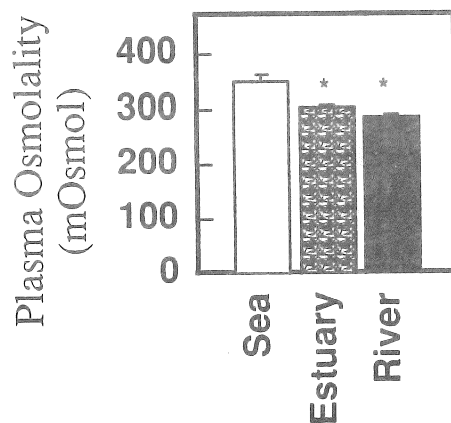


Fig. 14 Plasma Osmolality

Salmon Tissue Noradrenalin Concentration (ng/g tissue)

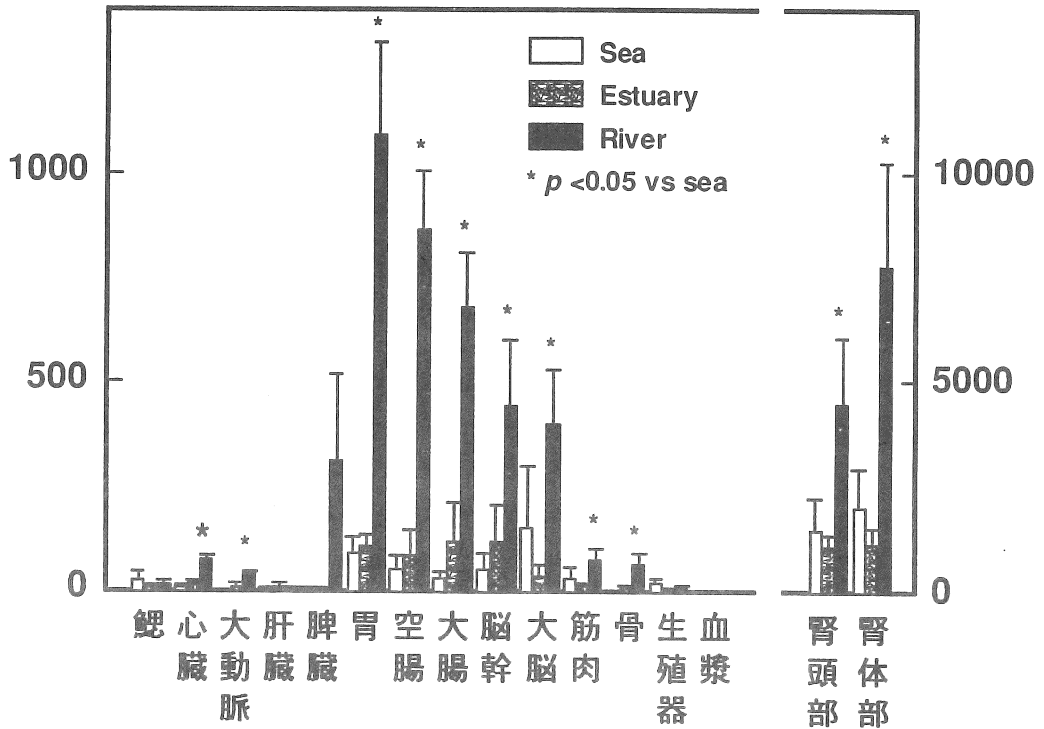


Fig. 15 海、河口と川のサケの組織ノルアドレナリンの変化

回腸、大腸、骨格筋、脾、大動脈、脳幹、唾液腺において減少した。しかし、大脳、副腎、骨では、加齢の変化と平行していた。臓器重量は、腎臓と心臓で大きかった⁹⁾。

本研究によって、(1)8%食によって、DSSの組織カテコラミンは大脳、副腎、骨以外の臓器において著明に減少した。(2)8%食によって、塩抵抗性ラット(DSR)の組織カテコラミンは軽度ながら減少した。(3)正常食塩食と考えられている0.4%食によって、多くの臓器で組織カテコラミンは軽度ながら減少の傾向を示した。(4)5週令の消化管の組織カテコラミンは、DSSの方がDSRよりも低かった。(5)DSSとDSRの両群とも多くの臓器のtNAは、1週令では低く成長と共に5週令まで増加した。

高食塩食によって各臓器の組織カテコラミンは減少した¹⁰⁾。この結果は、従来の多くの報告と一致した。この減少の原因として、(1)合成の阻害、(2)消費の高進、(3)組織に分布する交感神経繊維の減少、等が考えられる。Saavedraら¹¹⁾は、副腎でのカテ

コラミン合成過程の酵素活性を調べた。その結果、DSSに高食塩食を与えると、Tyrosine Hydroxylase (TH) と Phenylethanolamine N-Methyl transferase (PNMT) が高進し、Dopamine β -Hydroxylase には差は見られなかった。したがって、高食塩食によって、DSSではカテコラミン合成が高進していると結論している。

NaClに抵抗性があると考えられているDSRでも、軽度ではあるが、高食塩食によって組織カテコラミンが減少した。したがって、DSRも8%より多くのNaClを含む飼料を摂取すると、DSSと同程度の組織カテコラミンの減少が起こるのではないだろうか。したがって、何れの動物もNaClに対して感受性があり、その程度が遺伝的に決定されていると考えられる。

DSSに0.4%食を与えると組織カテコラミンは減少したことから、正常食と考えられている0.4%NaCl食でも、その個体の塩感受性によって、高食塩食に類似の変化が現れると考えられる。

III 海、河口と川のサケの組織カテコラミン

食塩を摂取すると、塩感受性動物は勿論非感受性動物であっても、組織カテコラミン (tNA) は減少した。塩の摂取に伴うtNAの減少が、陸上の動物にのみ見られる現象で魚類、例えばサケ、などでも見られる自然現象であるか否かを調べるため、海と河口と川のサケの組織カテコラミンを測定した。

サケは、川で孵化し、海で成長して、再び川に遡上してくる。したがって、海のサケは海水から多量の塩を取り、川に遡上してきたサケは塩を殆ど取らない。そこで、海のサケ、海から川に遡上を開始した河口付近のサケ、川の上流にまで遡上したサケのtNA、血漿Na⁺濃度と血漿浸透圧を測定した。

海(sea)、河口(estuary)と川(river)のサケの血漿Na⁺濃度 (Fig. 13) と血漿浸透圧 (Fig. 14) は、海が河口と川よりも高かった。

海、河口と川のサケのtNA (Fig. 15) は、塩を摂取しない川で鰓(gill)、肝(liver)、生殖器(sexual organ)、血漿(plasma)を除く多くの臓器で高値を示した。河口のサケのtNAは、海のサケのtNAに近かった。このように、海のサケのtNAは、河口と川のサケのtNAよりも低かった。

塩摂取に伴うtNAの低下が、ラットやウサギなどの陸上動物にのみ見られる現象か否かを調べるため、塩を多く摂取する海のサケ、川へ遡上する途中の河口のサケと川

のサケのtNAの変化と血漿Na⁺濃度と血漿浸透圧を調べた。海のサケと比較して、河口と川のサケの血漿Na⁺濃度と血漿浸透圧は低かった。したがって、海のサケは塩を多く摂取するために血漿Na⁺濃度は上昇し、血漿浸透圧も上昇したものと考えられる。このように、環境の変化に応じて生体を変化させて環境に適応している。この場合、血漿Na⁺濃度と血漿浸透圧の恒常性はむしろ2番目に重要なものとしているようである。こうした環境適応に際して、海のサケのtNAは川のサケのtNAよりも多くの臓器で低値であった。FloysandとSerck-Hanssen¹²⁾は、大西洋のサケのtNAについて調べ、ほぼ同様な結果を報告している。しかし、河口や川のサケについては調べていない。われわれの研究で、塩を多く摂取する海のサケではtNAを低下させることで環境に適応しており、食塩摂取に伴うtNAの低下は単に陸上の動物だけではなく魚類にも見られる自然界に共通した適応現象であると考えられる。川に遡上すると塩の摂取量が極端に減少する。その結果、tNAが増大する。この機序は未だに不明であるが、塩を保持するための適応現象であるとも考えられる。こうした適応機能を進化の過程で喪失した動物、あるいは適応機能を発展させ得なかった動物の場合には、低食塩食摂取環境あるいは高食塩食摂取によって生体の恒常性を維持することができない。

まとめ

食塩の吸収・排泄の新しい調節機構因子として、我々が発見した「肝腎反射」、 「肝腸反射」等のネガティブ・フィードバック調節機構について、これらの調節系が長期にも機能しているか否かを調べた。その結果、NaClの代謝に関与している肝臓からの求心性神経を切断すると、この調節系が働かないため、塩のバランスは正となる。すなわち、あたかも塩感受性動物に似た食塩代謝を示すようになった。

さらに、食塩の吸収・排泄の新しい調節機構因子を発見するためには、食塩摂取に伴う生体の反応をまず把握し、次いでこの現象をもたらす機構を明らかにすると、新しい調節系が発見できる可能性がある。そこで、食塩の多量摂取が、組織カテコラミンの濃度に対して影響を及ぼすか否かを調べた。その結果、組織カテコラミンは減少することが判明した。組織カテコラミンの減少は、塩感受性ラットのみならず、塩非感受性ラットでも起こる。

塩摂取に伴う組織カテコラミンの減少が、ラットなどの陸上の動物のみに起こるのかあるいは海の魚でも起こるのかを調べるため、海、河口と川のサケの組織カテコラ

ミンを測定した。海水から塩を多く取る海のサケの組織カテコラミンは低く、川に遡上すると高くなる。したがって、塩の摂取が組織カテコラミンを減少させる現象は、自然界に共通した現象であると考えられる。

以上の結果より、今後の課題として以下の問題を挙げることができる。

- 1) 塩の代謝を調節するネガティブ・フィードフォワード調節系の探索、
 - 2) 腸管のNa代謝調節作用と肝腸反射の関係
 - 3) Naバランスにおける肝腎反射と肝腸反射の機能分担
 - 4) Clバランスにおける腸と肝腸反射の役割
 - 5) 塩感受性動物（例えば、SHR、Dahl-salt sensitive rat）における体液量調節系の動作状態
 - 6) 食塩摂取によって高血圧が発症するメカニズムの解明。
 - 7) 食塩摂取の組織カテコラミンに対する影響の解明
 - 8) 腸管での食塩吸収に影響する要因の研究
 - 9) 高食塩食の摂取による組織カテコラミンの減少が、経静脈投与でも起こるか否かを調べる
 - 10) 塩摂取の組織カテコラミン合成系に対する影響
 - 11) 胎児は塩を含む羊水を飲んでいるので、海のサケに近いと考えられる。一方、誕生以後は塩の摂取が減少するので、川のサケに近いと考えられる。これは、1週令のサケのtNAが低く、徐々に上昇してくることからも窺える。したがって、羊水の変化と胎児の変化を調べる。
 - 12) 塩誘発性高血圧発症物質の同定
- 等である。

謝辞

本研究は、平成4,5,6年度ソルトサイエンス研究財団からの研究助成金によった。

文献

- 1 細見 弘、森田啓之 腸管での水とNaClの吸収-分泌に対する調節系。自律神経 27:453-458, 1990.
- 2 細見 弘 予測制御：思想と研究法。生体の科学 印刷中 1996.

- 3 H. Morita, K. Ishiki, H. Hosomi. Effects of hepatic NaCl receptor stimulation on renal nerve activity in conscious rabbits. *Neuroscience Letters*, 123:1-3, 1991.
- 4 H. Morita, T. Nishida, H. Hosomi. Neural control of urinary sodium excretion during hypertonic NaCl load in conscious rabbits: role of renal and hepatic nerves and baroreceptors. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 34:157-170, 1991.
- 5 H. Morita, T. Matsuda, F. Furuya, M. R. K. Chowdhury, H. Hosomi. Hepatorenal reflex plays an important role in natriuresis after high-NaCl food intake. *Circ. Res.*, 72:552-559, 1993.
- 6 H. Morita, H. Ohyama, M. Hagiike, T. Horiba, K. Miyake, H. Yamanouchi, K. Matsusita, and H. Hosomi. Effects of portal infusion of hypertonic solution on jejunal electrolyte transport in anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.*, 259:R1289-R1294, 1990.
- 7 H. Morita, T. Matsuda, T. Horiba, K. Miyake, H. Yamanouchi, H. Ohyama, M. Hagiike, H. Hosomi, K. Ikeda, Y. Nara, Y. Yamori. Suppressed hepatointestinal reflex in spontaneously hypertensive rats. *Genetic Hypertension*, 218:531-533, 1992.
- 8 S. Suzuki, M. R. K. Chowdhury, N. Uemura, H. Morita, H. Hosomi. Renojejunal reflex controlling jejunal absorption of fluid and NaCl. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 39:219-228, 1992.
- 9 W. Snedden, P. G. Fernandez, D. Fernandez, S. Vasdev, E. Z. Rabin. Correlation of left ventricular hypertrophy and its regression by lisinopril with salt-induced hypertension. *Can. J. Cardiol.*, 4(5):237-42, 1988
- 10 Q. H. Chen, H. Morita, Y. Nishida, H. Hosomi. Effects of high salt diet on tissue noradrenalin concentrations in Dahl-salt -resistant and -sensitive rats. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.*, (in press), 1995
- 11 J. M. Saavedra, R. D. Carmine, R. McCarty, P. Guicheney, V. Weise, J. Iwai. Increased adrenal catecholamines in salt-sensitive genetically hypertensive Dahl rats. *Am. J. Physiol.*, 245:H762-H766, 1983.
- 12 R. Floy sand, G. Serck-Hanssen. Determination of tissue content of catecholamines in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a comparison of HPLC-EC and the trihydroxyindol fluoremetric method *Comp. Biochem. Physiol. C.* 99(3): 457-462, 1991.

NaCl恒常性維持における肝臓の役割 —生理学のおよび病態生理学的検討—

助成研究者：森田啓之 (香川医科大学第2生理学講座)
共同研究者：松田恒則 (香川医科大学第2生理学講座)
共同研究者：田中邦彦 (香川医科大学第2生理学講座)
共同研究者：細見 弘 (香川医科大学第2生理学講座)

はじめに

浸透圧受容器、イオン受容器、圧受容器等、多くの受容器が肝臓に含まれていることはよく知られている(1, 2, 3, 10, 11)。肝臓以外の場所に存在する浸透圧受容器、イオン受容器、圧受容器等の働きから考えて、肝臓のこれらの受容器も体液恒常性維持に何らかの役割を果たしているものと考えられる。最近我々は、肝門脈内のNaCl濃度が上昇すると、腎神経活動が減少し、尿中NaCl排泄が増加することを報告した(6, 7)。しかし、肝臓内NaCl受容器が体液恒常性維持に果たす生理的あるいは病態生理的意義は、未だ不明である。従って、助成を受けた3年間では、肝臓内NaCl受容器が体液恒常性維持にどのような役割を果たしているかについて、次の3点に注目し、実験を行った。1) 日常の摂食の様な生理的狀態での体液恒常性維持にどのような役割を果たしているか? 2) 長期の体液恒常性維持にどのような役割を果たしているか? 3) 肝硬変のような肝臓が障害され、体液調節異常が見られる場合に、肝臓内NaCl受容器が体液恒常性維持にどのような役割を果たしているか?

1) 肝臓内NaCl受容器の生理的意義

方法

全ての実験は慢性に測定器具を埋め込んだ18匹の意識下雑種成犬(雌、体重7-13kg)を用いて行った。

正常犬

6匹のイヌはペントバルビタール(30mg/kg)にて麻酔後、動脈カテーテルと静脈カテーテルを埋め込んだ。正中切開にて開腹後、肝臓除神経のsham手術を行い、閉腹した。最初の手術から2週間後2度目の手術を行った。ペントバルビタール(30mg/kg)にて麻酔後、左側腹開腹し、後腹膜より腎臓に到達した。腎交感神経を剥離し、双極電極を装着してその周りをシリコンで固め閉腹した。

動脈血圧は、埋め込んだ動脈カテーテルに圧トランスデューサーを接続することにより測定した。心拍数は動脈圧波形によりトリガーし、心拍数計にて測定した。時定数2秒のR-Cフィルターを用いて平均動脈血圧を求めた。腎交感神経活動は50Hz-1kHzのバンドパスフィルターを通した後増幅し、ゲートサーキットを通してノイズを除去した後、全波整流した。この出力を時定数4秒のR-Cフィルターを用いて積分し、平均腎交感神経活動を求めた。摂食直前の値を100%とし、腎神経活動を定量化した。

少なくとも手術後2日間の回復期間の後、摂食実験を行った。実験前24時間は絶食したが、水は自由に与えた。全ての実験は意識下の状態で、Pavlovスタンドに緩く

固定した状態で行った。動脈血圧、心拍数、腎交感神経活動を連続的に測定した。採尿カテーテルを挿入し20分間づつの尿サンプルを測定した。動脈血圧、心拍数、腎交感神経活動及び尿量が安定してから、コントロール期間の測定を開始した。1時間のコントロール期間の後、無食塩食（全粥、20g/kg）、あるいは高食塩食（全粥、20g/kg + NaCl, 0.4g/kg）を与えた。全てのイヌは2-7分で与えられた食餌を食べ終えた。動脈血圧、心拍数、腎交感神経活動及び尿量は食後4時間目まで測定した。無食塩食を与えるか高食塩食を与えるかは無作為にし、2つの実験の間は少なくとも2日間開けた。

肝機能検査、腎機能検査のための静脈血サンプル（5 ml）を摂食1時間前に採取した。血清Na、Cl濃度測定のための静脈血サンプル（1 ml）を摂食前30、10分、摂食後10、30、60、90、120、180、240分に採取した。Na、Cl濃度は蛍光光度計とCl電極を用いて測定した。

肝臓除神経犬

高食塩食摂取後の腎交感神経活動応答における、肝臓神経の役割を調べるため、肝臓除神経犬において、同様の高食塩食摂取実験を行った。6匹のイヌにおいて、ペントバルビタール（30mg/kg）麻酔後、正中切開にて開腹後肝臓除神経を行った。肝動脈、肝門脈及び総胆管周囲の神経叢と結合組織を剥離切断し、周囲に5%フェノールを塗布した。手術2週間後、前述の方法でカテーテルと腎交感神経活動測定用の電極を埋め込んだ。手術2-4日後、高食塩食摂取実験を行った。

腎臓除神経犬

高食塩食摂取後の尿中NaCl排泄増加における腎交感神経の役割を調べるため、腎臓除神経犬においても同様の高食塩食負荷実験を行った。6匹のイヌにおいて、ペントバルビタール（30mg/kg）麻酔後、両側側腹切開にて両側の腎臓を露出させた。腎動脈、腎静脈、尿管周囲の神経叢及び結合組織を剥離切断後、5%フェノールを塗布した。手術1-2週間後、前述の方法で高食塩食摂取実験を行った。ただし、腎臓除神経群においては腎交感神経活動は測定していない。

肝臓除神経および腎臓除神経の完全性は実験終了後、肝臓と腎臓のカテコラミン含有量を測定することにより確かめた。

平均動脈血圧、心拍数、腎交感神経活動はA-Dコンヴァーターを用い、1分間に100個の頻度でサンプリングし、5分間の平均を1個のデータポイントとした。これらのデータは同一群内でまとめ、平均±標準誤差を求めた。摂食前のコントロール値と摂食後の値は2元配置法を用い比較した。F値が0.05以下の時にはDunnett法を用い、コントロール値と各々の値の間に有意差があるか検定した。

結果

Table 1 に示す様に肝臓除神経犬及び腎臓除神経犬においては、肝機能及び腎機能は生化学的な検査でみる限り異常は無かった。しかし、肝臓除神経犬においては肝臓ノルエピネフリン含有量、腎臓除神経犬においては腎臓ノルエピネフリン含有量が正常犬の2%以下にまで低下していた。従って、肝臓除神経、腎臓除神経はほぼ完全に行われたものと推測される。

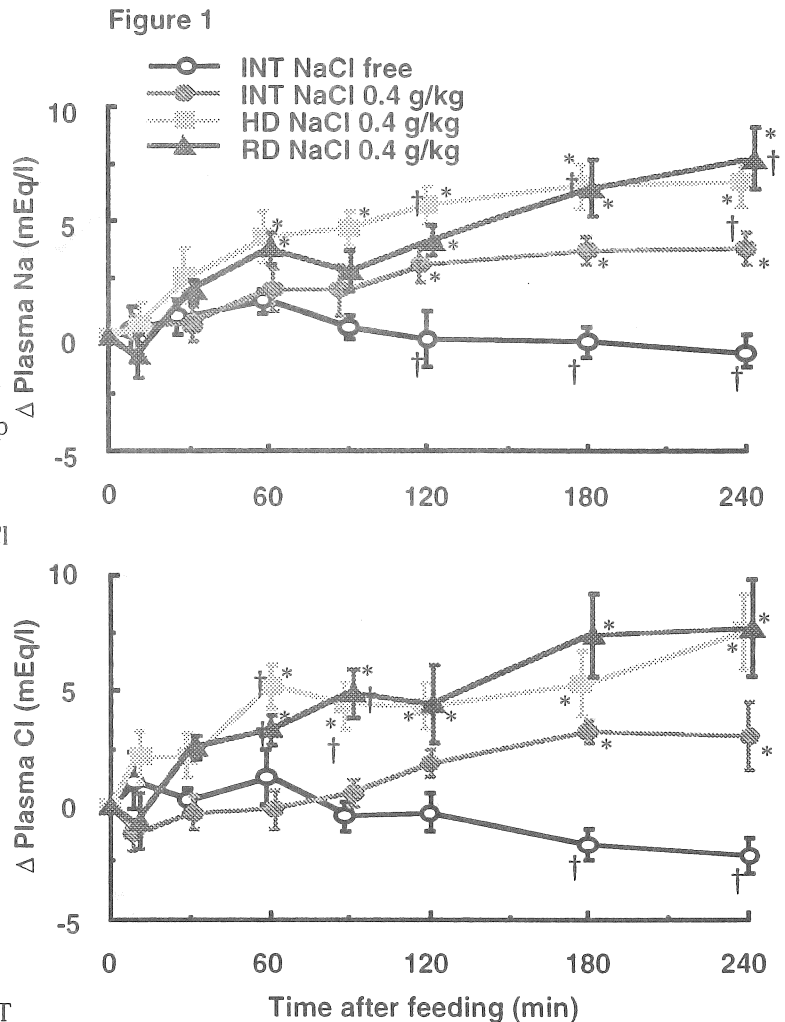
Table 1. Biochemical markers of liver and kidney function in intact dogs (INT), dogs with hepatic denervation (HD), and dogs with renal denervation (RD). *p<0.05 vs the INT group.

	INT	HD	RD
Body weight (kg)	9.8 ± 0.7	8.8 ± 1.1	10.1 ± 0.8
Total bilirubin (mg/dl)	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.5	0.1 ± 0.0
GOT (IU/l)	36.5 ± 2.7	29.7 ± 7.4	36.7 ± 12.2
GPT (IU/l)	29.1 ± 4.4	29.5 ± 9.5	45.7 ± 14.4
Total protein (g/dl)	5.6 ± 0.5	4.8 ± 0.3	5.0 ± 0.3
Albumin (g/dl)	2.7 ± 0.1	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2
BUN (mg/dl)	8.5 ± 1.0	9.7 ± 1.5	13.6 ± 3.1
Creatinine (mg/dl)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2
Liver norepinephrine (ng/g)	291 ± 48	3 ± 1*	
Liver epinephrine (ng/g)	6.0 ± 1.9	0.6 ± 0.5*	
Kidney norepinephrine (ng/g)	320 ± 39		4 ± 1*
Kidney epinephrine (ng/g)	17.2 ± 8.1		2.1 ± 0.5*

正常犬

Figure 1に摂食後の血中Na及びCl濃度の変化を示す。Figure 2には平均動脈血圧、心拍数、腎交感神経活動の変化を示す。Figure 3には尿量、尿中Na排泄量、尿中Cl排泄量の変化を示す。

Figure 1. Graphs showing changes of plasma Na (top panel) and Cl (bottom panel) concentrations induced by diet. INT NaCl free, intact dogs fed a NaCl free diet; INT NaCl 0.4 g/kg, intact dogs fed a high NaCl diet; HD NaCl 0.4 g/kg, dogs with hepatic denervation fed a high NaCl diet; RD NaCl 0.4 g/kg, dogs with renal denervation fed a high NaCl diet. Values are means ± SEM. * p<0.05 vs. the prefeeding control level. † p<0.05 vs. the INT



NaCl 0.4 g/kg group.

無食塩食摂取しても血中NaCl濃度の有意な変化は起こらなかった。一方、高食塩食摂取により血中NaCl濃度は徐々に増加し、摂食後4時間でNa濃度は 3.8 ± 0.7 、Cl濃度は 3.0 ± 1.5 mEq/l増加した。

Figure 2. Graphs showing responses of mean arterial pressure, heart rate, and renal nerve activity in intact dogs fed a NaCl free diet (INT NaCl free) and intact dogs fed a high NaCl diet (INT NaCl 0.4 g/kg). Food was given at time 0. * $p < 0.05$ vs. the prefeeding control level.

平均動脈血圧、心拍数、腎交感神経活動とも無食塩食摂取により有意な影響は受けなかった。一方、高食塩食摂取により腎交感神経活動は徐々に低下し、摂食後100分で39%にまで低下した。この腎交感神経活動の低下は摂食後4時間以上続いた。

Figure 3. Graphs showing responses of urine volume, urinary Na excretion, and urinary Cl excretion in intact dogs fed a NaCl free diet (INT NaCl free) and intact dogs

Figure 2

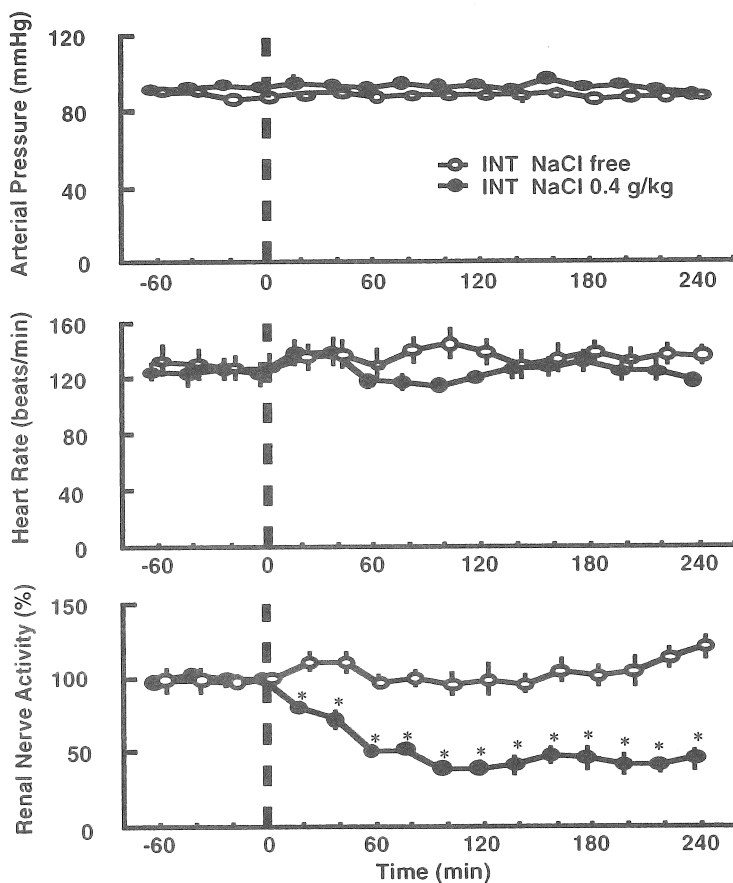
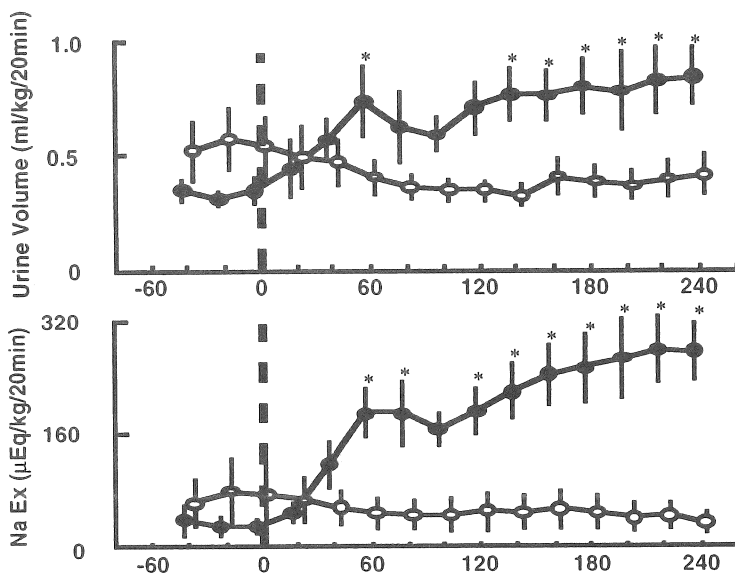


Figure 3



fed a high NaCl diet (INT NaCl 0.4 g/kg). Food was given at time 0. * $p < 0.05$ vs. the prefeeding control level.

肝臓除神経犬及び腎臓除神経犬

Figure 4には平均動脈血圧、心拍数、腎交感神経活動に及ぼす高食塩食摂取の影響を示す。Figure 5には尿量、尿中Na排泄量、尿中Cl排泄量に及ぼす高食塩食摂取の影響を示す。

Figure 4. Graphs showing responses of mean arterial pressure, heart rate, and renal nerve activity in intact dogs (INT), dogs with hepatic denervation (HD), and dogs with renal denervation (RD). Food was given at time 0. * $p < 0.05$ vs. the prefeeding control level.

肝臓除神経犬及び腎臓除神経犬では、高食塩食摂取後の血中NaCl濃度の増加が正常犬と比較して有意に大きかった (Figure 1)。高食塩食摂取により正常犬と同様、平均動脈血圧、心拍数は変化しなかった。しかし、正常犬でみられた、高食塩食摂取による腎交感神経活動の減少は、血中

NaCl濃度の大きな増加にもかかわらず、肝臓除神経犬では完全にみられなくなった。従って、高食塩食摂取による腎交感神経活動の減少の求心経路に肝臓神経が関与していることが分かった。肝臓除神経犬及び腎臓除神経犬では、正常犬と比べ有意に大きな血中NaCl濃度の増加にも関わらず、高食塩食摂取後の尿量の増加、尿中NaCl排泄量の増加はほとんどみられなかった。正常犬では摂食後4時間で摂取した $36 \pm 5\%$ のNa、 $36 \pm 4\%$ のClが排泄されたのに比べ、肝臓除神経犬ではわずか $9 \pm 5\%$ のNa、 $7 \pm 3\%$ のCl、腎臓除神経犬では $15 \pm 5\%$ のNa、 $9 \pm 3\%$ のClしか排泄されなかった。

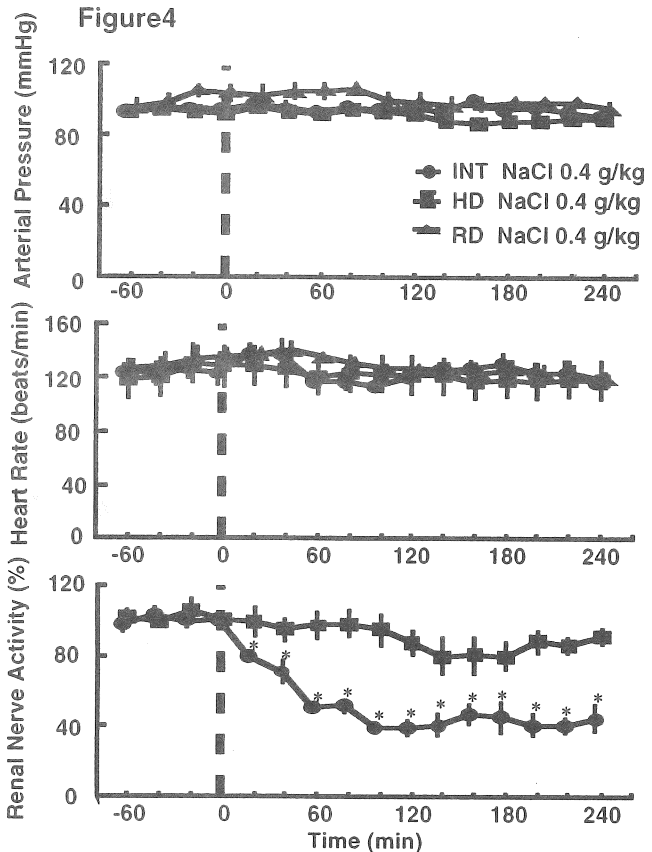
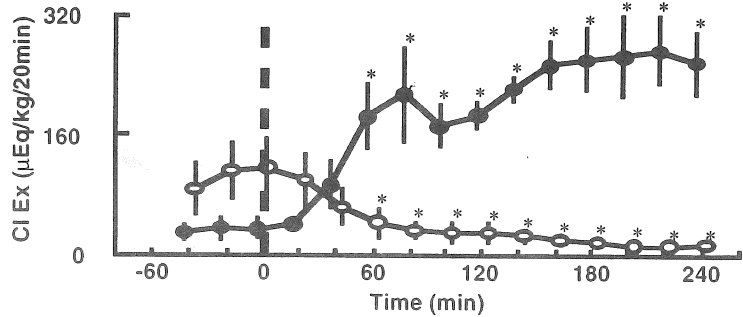


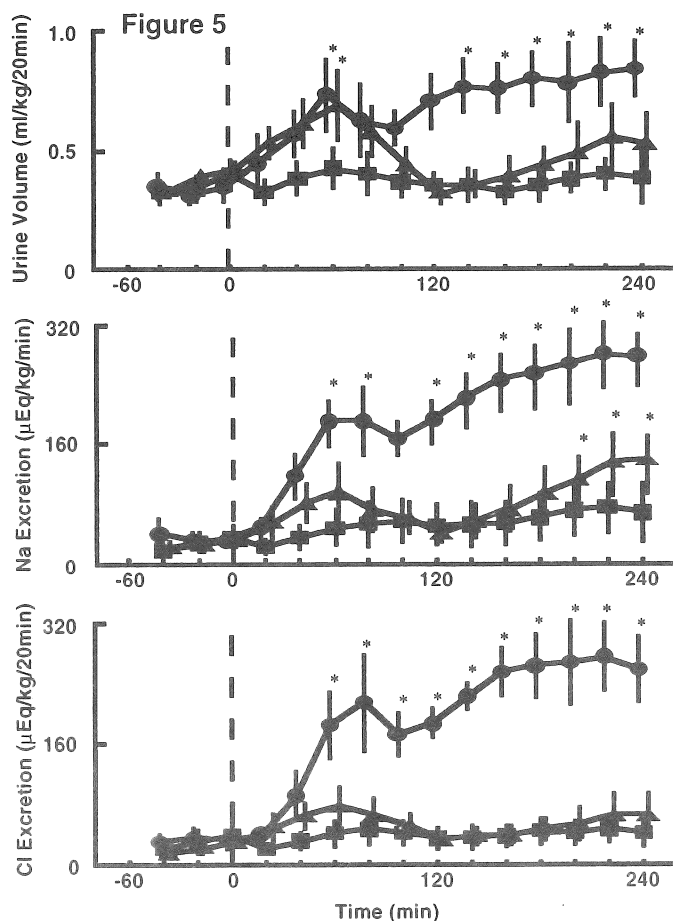
Figure 5. Graphs showing responses of urine volume, urinary Na excretion, and urinary Cl excretion in intact dogs (INT), dogs with hepatic denervation (HD), and dogs with renal denervation (RD). Food was given at time 0. * $p < 0.05$ vs. the prefeeding control level.

考察

本実験により下記の点が明らかになった。1) 無食塩食摂取は腎交感神経活動に有意な変化をもたらさない。2) 高食塩食摂取により腎交感神経は減少し、尿中Na及びCl排泄量は増加する。3) 高食塩食摂取後のNaCl利尿機構の求心路は肝臓神経であり、遠心路は腎交感神経である。4) 従って、肝-腎反射は摂食のような非常に生理的な状態においても、NaCl恒常性維持に重要な役割を果たしている。

等張溶液を静脈内投与すると腎交感神経活動が減少する。この腎交感神経活動の減少は圧受容器除神経だけでは影響を受けず、圧受容器除神経+迷走神経切断によりブロックされる(4)。このことより、等張性溶液による容量負荷時の腎交感神経活動減少の求心路は心肺領域の容量受容器であることが分かる。一方、高張食塩水静脈内投与による腎交感神経活動の減少は圧受容器除神経+迷走神経切断+肝臓除神経によりブロックされる。従って、高張食塩水投与時の腎交感神経活動減少の求心路は、圧受容器、容量受容器、肝臓内の受容器の3つが関与しており、等張溶液投与時の応答とは異なる(7)。さらに、今回の実験では、経口的食塩負荷の場合の腎交感神経活動の減少は肝臓除神経により完全にブロックされた。従って、経口的食塩負荷時の腎交感神経活動減少の求心機構は肝臓神経のみで説明される。この様に、その負荷形式により求心機構が異なるということは非常に興味深いことである。しかし、いずれの場合も腎交感神経活動の減少はその時起こるNaCl利尿に重要な役割を果たしている。

肝臓が多くの受容器を含んでいることはよく知られたことである。これらの受容器として浸透圧受容器、圧受容器、NaCl受容器等が知られている(1, 2, 3, 10, 11)。NaCl感受性の受容器が肝臓内に存在するという事は電気生理学的にも証明されている(2)。すなわち、肝臓還流液中のNaCl濃度の増減に従い、その神経活動が増



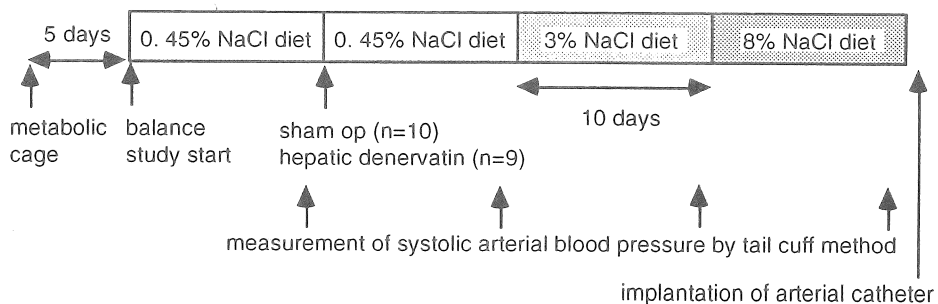
減する線維が肝臓神経内に存在する。しかし、これら肝臓内NaCl受容器の生理的な役割については未だよく分かっていない。最近我々は、肝臓内のNaCl受容器が空腸でのNaCl吸収を調節していることを報告した(5)。すなわち、門脈内に高張NaCl溶液を投与すると空腸でのNaCl吸収が抑制された。さらに、今回の実験では肝臓内の受容器が高食塩食摂取後のNaCl排泄に重要な役割を果たしていることを示した。これらのことより、肝臓内の受容器はNaClの腸管での吸収及び腎臓での排泄を調節することにより、NaClの恒常性維持に関わっていることが分かった。今後、これらの肝臓内受容器が長期間のNaCl恒常性維持に果たす役割を調べる必要がある。

2) 長期のNaCl恒常性維持における肝臓内NaCl受容器の役割

研究方法

全ての実験は雄のWistar Kyotoラットを用いて行った。実験のタイムテーブルをFigure 6に示す。8週齢のラットを個々の代謝ケージに入れ5日間ケージに慣らした後、NaClのバランス実験を開始した。毎日午前8時から12時の間にラットの体重、摂食量、飲水量、尿量、糞便量を測定した。食餌中、尿中、糞便中のNaCl量を蛍光光度計により測定し、1日毎のNaClバランスを求めた。最初の10日間は0.45% NaCl食で飼育し、10日目にペントバルビタール(60mg/kg)の腹腔内注射により麻酔後、腹部正中切開により肝臓除神経手術(n=10)あるいはsham手術(n=9)を手術用顕微鏡下で行った。肝臓除神経は肝門脈、肝動脈、総胆管を剥離し、周囲の神経を切除後、周囲の組織に90%フェノール溶液を塗布し、閉腹した。Sham手術は肝門脈、肝動脈、総胆管を剥離しただけで、周囲の神経及び組織は正常のまま残し、閉腹した。その後10日間同様の0.45% NaCl食で飼育後、3% NaCl食10日間、8% NaCl食10日間と続け、合計40日間のバランス実験を行った。各10日間の食餌期間の8日目と9日目にはtail cuff法により収縮期動脈血圧を測定した。40日間のバランス実験終了後、ペントバルビタール腹腔内注射により麻酔後、動脈カテーテルを左大腿動脈から腹部大動脈にまで挿入した。動脈カテーテルは皮下を通し、肩胛骨の間に固定した。4~5日間の回復期間の後カテーテルを圧トランスデューサー及び圧アンプに接続し平均動脈血圧を30分間連続で記録した。アンプの

Figure 6: Time table of the experimental protocol



出力はアログ-デジタル変換器に接続し1分間に100ポイントの割合でサンプリングし、合計3000ポイントの平均をその個体の代表値とした。

全ての実験終了後、肝臓を取り出し、肝臓内ノルアドレナリン濃度を測定し、肝臓

除神経の指標とした。
 全ての結果は平均値±標準誤差で表した。群間の統計は分散分析を行った後、有意であればDuncan's multiple testを適応した。P<0.05であれば有意と判定した。
 研究結果

肝臓内ノルアドレナリン含有量はsham群で76±6、肝臓除神経群で1±1 ng/gであり、ほぼ完全に除神経されていると思われる。

Figure 7: ○はsham、●は肝臓除神経群を表す。体重はsham手術及び肝臓除神経により、一時的に減少したが、その後両群とも順調に回復し、両群間では有意の差はなかった。Sham手術及び肝臓除神経術により摂食量は一時的に低下するが、両群とも術後5日目には術前の値に回復した。3%及び8%の高食塩食でも摂食量に有意な変化は見られなかった。

Figure 8: 0.45% NaCl食から3% NaCl食及び8% NaCl食に換えると飲水量は階段状に増加した。両群間で飲水量に有意な差は見られなかった。尿量も飲水量と同様NaCl摂取量の増加と共に階段状に増加した。尿量にお

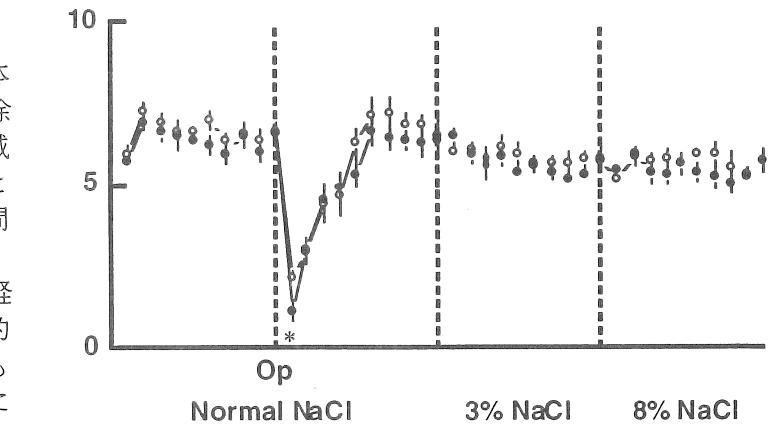
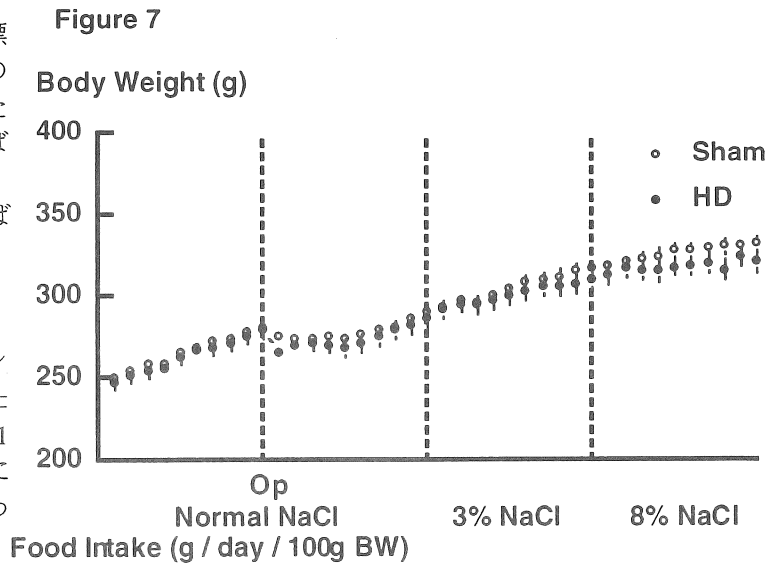
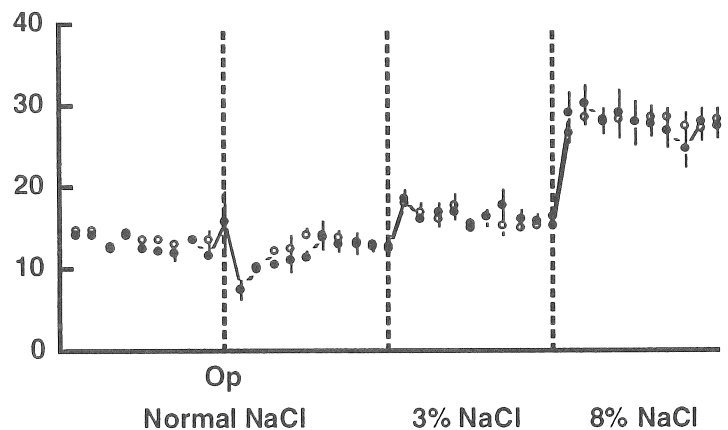


Figure 8

Water Intake (ml / day / 100g BW)



いても両群間で有意な差はみられなかった。

Figure 9: 8% NaCl給餌期間中、積算尿中Na排泄量は肝臓除神経群と比べsham群で多い傾向にあったが、有意な差ではなかった。積算尿中Cl排泄量もNa排泄量と同様sham群で多い傾向があった。

Urine Output (ml / day / 100g BW)

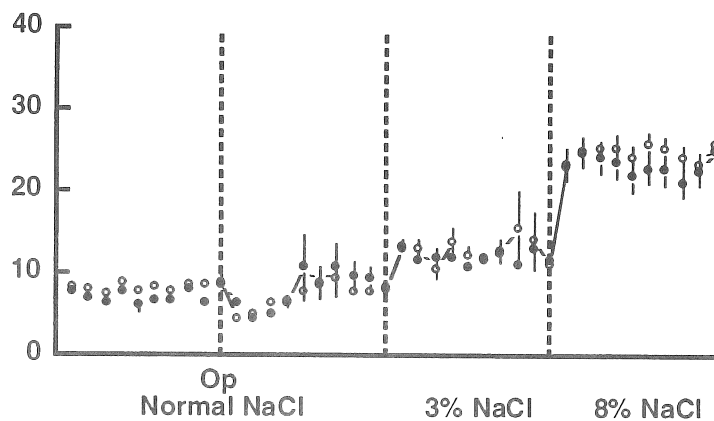


Figure 9

NaCl摂取量、尿中NaCl排泄量、糞便中NaCl排泄量からNaClバランスを計算した。

Figure 10: 積算Naバランスは、3% NaCl食までは両群ともほぼ0のレベルに保たれていたが、8% NaCl食に換えると両群とも正のバランスに傾いた。3% NaCl食までは両群間で有意な差はなかったが、8% NaCl食に換えて2日目からsham群に比べ肝臓除神経群が有意に大きな正のバランスを示した。積算Clバランスはより顕著で、3%の高食塩食後半からsham群に比べ肝臓除神経群が有意に大きな正のバランスを示した。

Cumulative Urinary Na Excretion (meq / 100g BW)

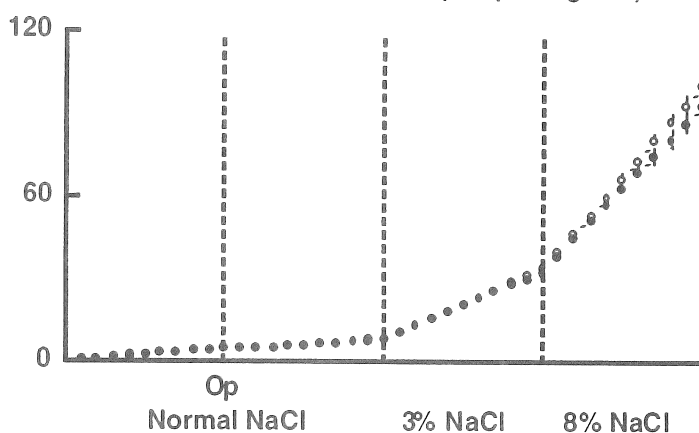
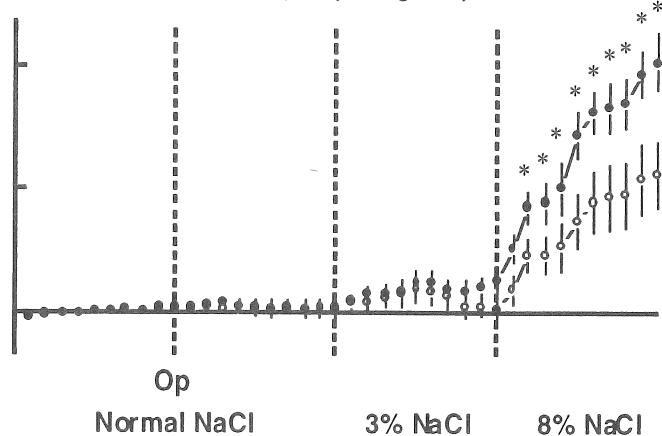


Figure 10

Tail Cuff法で測定した収縮期血圧の変化をFigure 11に示す。Sham手術及び肝臓除神経手術自体では収縮期血圧は変化しなかった。Sham群は3%NaCl食にしても収縮期

Cumulative Na Balance (meq/100g BW)



血圧は 124 ± 3 から 127 ± 3 mmHgへと有意な変化は見られなかった。8% NaCl食にしても 134 ± 3 mmHgと有意な変化ではなかった。一方、肝臓除神経群では3% NaCl食にすると 123 ± 4 から 137 ± 4 mmHgへと有意に増加した。8% NaCl食に換えても収縮期血圧はそれ以上の増加を示さなかった (139 ± 3 mmHg)。

慢性に埋め込んだカテーテルにより無拘束下で測定した平均動脈血圧は、8% NaCl食終了時においてsham群 108 ± 3 mmHg、肝臓除神経群では 120 ± 2 mmHgであり、肝臓除神経群で有意に上昇していた。

考察

今回の研究により次の点が明らかになった。1) 肝臓除神経しても正常食塩食を摂取している間はNaClバランスの障害は起こらなかった。2) しかし、8%の高食塩食を摂取すると肝臓除神経群はsham群に比べ有意に正のNaClバランスを示した。3) 肝臓除神経群に高食塩食を摂取させるとsham群に

比べ有意に血圧が上昇した。以上のことより、NaClバランス及び血圧調節における肝臓神経の長期的な役割が推測できる。

我々は前年度の研究により、高食塩食を摂食させると腎神経活動が減少し、NaCl利尿が起こることを報告した(8)。腎神経活動の減少は肝臓除神経により完全にブロックされること及びNaCl利尿も大きく損なわれることから、摂食のような非常に生理的な状態でも門脈肝臓領域の受容器は重要な役割を果たしていることが分かった。しかし、門脈肝臓領域のNaCl受容器がNaCl恒常性維持に果たす長期の役割は未だ不明であった。従って、本年度の研究では門脈肝臓領域のNaCl受容器がNaCl恒常性維

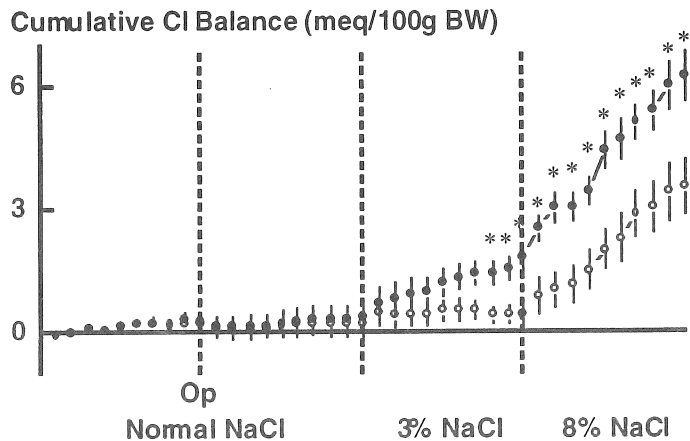
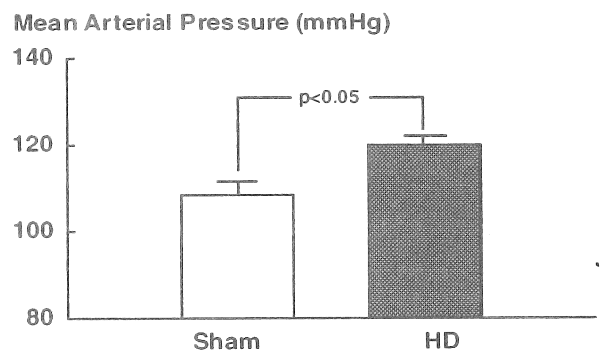
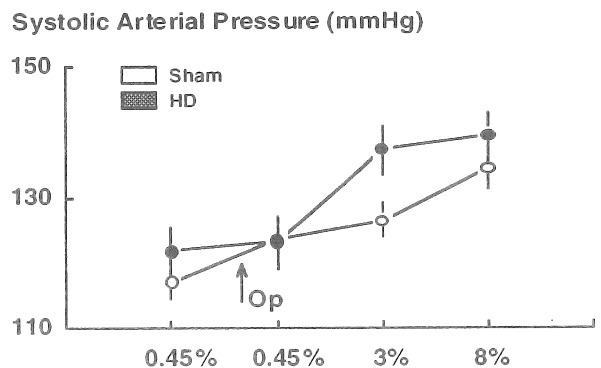


Figure 11



持に果たす長期の役割について調べた。

肝臓除神経群でも正常NaCl食で飼育する限りNaClバランスはsham群と同様ほぼ0のあたりに保たれていた。しかし、8% NaCl食では肝臓除神経群ではsham群に比べ有意に大きな正の積算Naバランスを示した。この傾向はCl⁻においてより著明であった。積算Cl⁻バランスは3% NaCl食の後半からすでに両群間で差が見られ始めた。これらのデータと血圧のデータを比較してみるとさらに興味深い。Tail cuff法で測定した収縮期血圧は正常NaCl食では両群間に有意な差はないが、3% NaCl食にすると、肝臓除神経群の方がsham群に比べ10 mmHg高かった。8% NaCl食10日間負荷後、自由行動下で直接測定した平均動脈血圧は肝臓除神経群の方がsham群に比べ12 mmHg高かった。以上の結果から、肝臓神経を介するNaCl調節系は高食塩食負荷時に重要になってくることが分かる。これは前年度に我々が行った高食塩食摂食直後のNaCl利尿に関する実験でも同様であった。この実験では、高食塩食摂取直後に起こるNaCl利尿は肝臓除神経により大きく抑制された。しかし、正常食塩食で飼育中は血中NaCl濃度、血圧などに両群間で有意な差はなかった。

本年度の研究により、長期の高食塩食負荷時のNaClバランスを保つために肝臓神経は重要な役割を果たしていることが分かった。さらに、長期にわたり高食塩食負荷を行うと、肝臓除神経群で動脈血圧が上昇することから、肝臓神経はいわゆる食塩感受性の修飾因子の1つである可能性が示唆された。

3) 肝硬変時の体液調節破綻における肝臓内NaCl受容器の役割

研究方法

全ての実験は12週齢のWistarラットを用いて行った。肝硬変はオリーブオイルに溶解したCCl₄ (13 ml/kg) を1週間に2回、12週間皮下注射することにより作成した。対照群は同量のオリーブオイル皮下注射した。

(1) Naバランスの測定：

12週間のCCl₄あるいはオリーブオイルの皮下注射終了後ラット (24週齢) を2群に分け、もう1週間代謝ケージにて飼育した。1群は正常食塩食 (0.45% NaCl) を、もう1群は高食塩食 (8% NaCl) を与え、Na摂取量、尿中および糞便中Na排泄量を毎日測定し、Naバランスを計算した。各群はそれぞれ6匹の正常ラットと6匹の肝硬変ラットからなる。

(2) 肝臓求心神経活動の測定：

12週間のCCl₄あるいはオリーブオイルの皮下注射終了4日目、肝臓求心神経活動を測定した (正常ラットn=6、肝硬変ラットn=6)。24時間の絶食後、ペントバルビタールを50 mg/kg腹腔内に投与し、正中開腹後、肝門脈内にカテーテルを挿入した。肝動脈周囲の肝臓神経 (前神経叢) を剥離し2本の電極を神経に装着し、神経と電極をシリコンで覆い固めた。求心性の神経活動のみを記録するため、神経の中核側を結紮した。神経活動は50 Hz - 3 kHzのフィルターをもつアンプで増幅した後、ベースラインノイズを取り除き、整流し、時定数2秒のR-Cフィルターを通して平均化した。神経活動を定量化するため、肝門脈内に溶液を投与する直前の値を100%とし、投与後の変化を%表示した。肝門脈内には1.5 Mのマンニトール溶液、0.15 Mおよび0.75 MのNaCl溶液を投与した。各投与は神経活動が投与前の値に戻ってから行った。

(3) 肝臓内ノルエピネフリン含有量の測定：

代謝ケージでの実験終了後、肝臓を取り出し、総肝重量を測定し、HPLC法により肝臓内ノルエピネフリン含有量を測定した。また、肝臓の一部をヘマトキシリン・エオジン染色し、組織学的に検索した。

(4) 統計：

体重、Na摂取量、Na排泄量、Naバランス、肝臓求心神経活動の群内および群間変動は分散分析により比較した。総肝重量および肝臓内ノルエピネフリン含有量の群間比較は2標本t検定にて行った。P<0.05の時、統計学的に有意であると判断した。

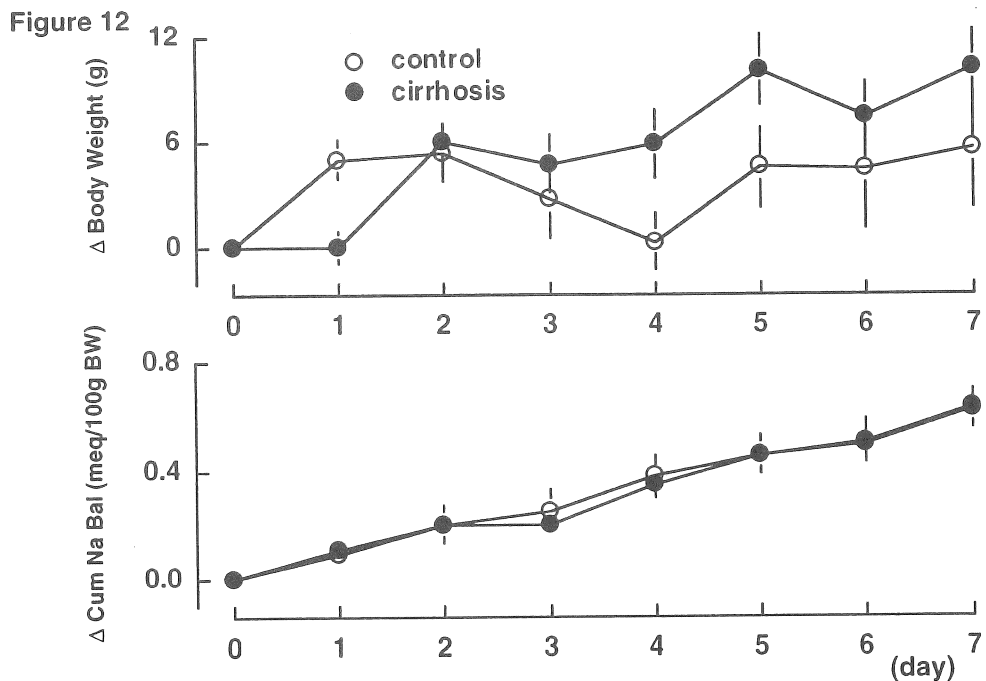
結果

肝臓の組織学的検索により、CCl₄投与ラットはグリソン鞘領域の線維化と偽小葉の形成が認められ、軽度の肝硬変であることが分かった。一方、オリーブオイルのみを投与したラットは正常の肝臓組織像を示していた。両群とも腹水は認められなかった。

12週間にわたる肝硬変作成期間において、肝硬変群は対照群に比べ有意に多い積算摂食量を示したにもかかわらず、体重は12週の終わりで肝硬変群で319±10gであり対照群の369±15gに比べ有意に少なかった。

(1) Naバランス：

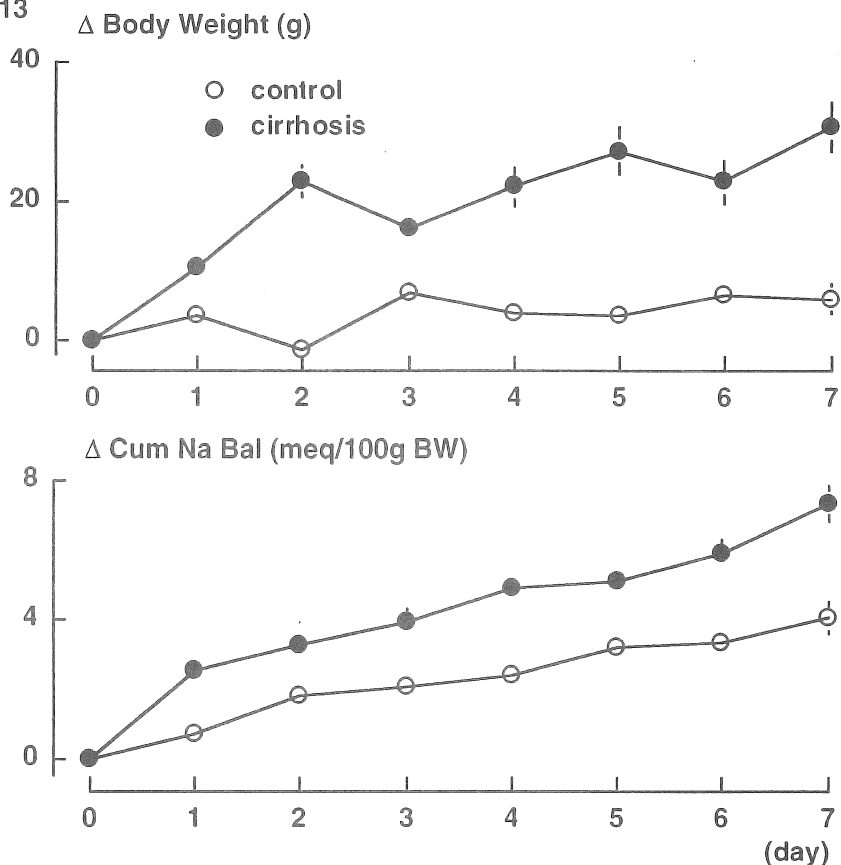
12週間の肝硬変作成期間に引き続き、1週間のNaバランスの測定を行った。正常食塩食摂取群の結果をFigure 12に、高食塩食摂取群の結果をFigure 13に示す。体重およびNaバランスは12週間の肝硬変作成期間の最後の日を0とし、それからの変化量で表した。正常食塩食摂取では、体重の増加および積算Naバランスとも対照群肝硬変群の間で有意な差はなかった。



一方、Figure 13に示すように、高食塩食摂取時には、対照群では体重の増加が6.1 ± 2.2gでえあるのに対し、肝硬変群では30.5 ± 3.5であり、肝硬変群において有意に多

い体重の増加を認めた。さらに、積算Naバランスは対照群では 4.0 ± 0.5 meq/100g BWであるのに対し、肝硬変群では 7.3 ± 0.5 meq/100g BWであり、肝硬変群において有意に多いNaの蓄積を認めた。

Figure 13



(2) 肝臓求心神経活動：

肝門脈内高張NaCl溶液投与に対する肝臓求心神経活動の応答をFigure 14に示す。肝門脈内0.75 M NaCl溶液投与に対し、肝臓求心神経活動は容量依存性に増加した。しかし、1.5 M マンニトール溶液投与あるいは0.15 M NaCl溶液投与に対しては、対照群および肝硬変群のラットとも応答しなかった。また、肝門脈内0.75 M NaCl溶液投与に対する応答は、対照ラットに比べ肝硬変ラットでは大きく抑えられていた。各群6匹ずつのラットの結果をFigure 15にまとめた。両群とも肝門脈内0.75 M NaCl溶液投与に対して、肝臓求心神経活動は容量依存性に増加するが、その応答は肝硬変群で有意に抑制されていた。すなわち、最大量の投与に対し、対照群では $761 \pm 134\%$ に増加したのに対し、肝硬変群では $190 \pm 22\%$ にしかならなかった。

(3) 肝臓内ノルエピネフリン含有量：

総肝重量は対照群と肝硬変群で差はなかったが、体重は肝硬変群で有意に少なかったため、体重当たりの肝重量は対照群に比べ肝硬変群で有意に多くなった (3.7 ± 0.1 vs 3.2 ± 0.2 g/100g BW)。肝臓ノルエピネフリン含有量は肝硬変群は対照群の57%にまで低下していた。

Figure 14

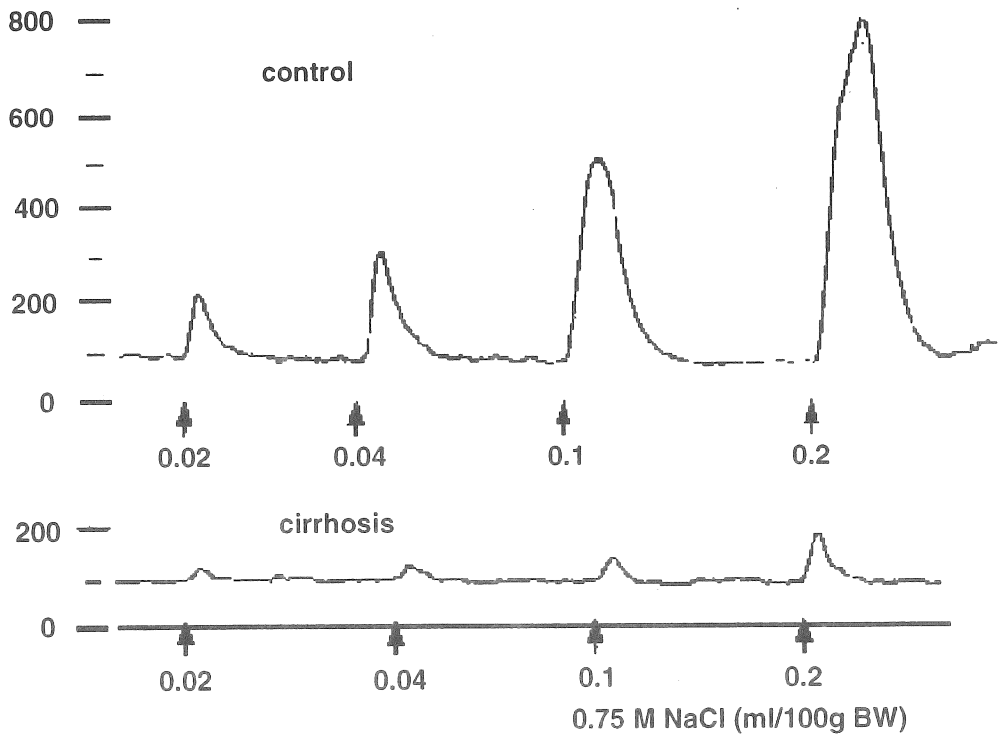
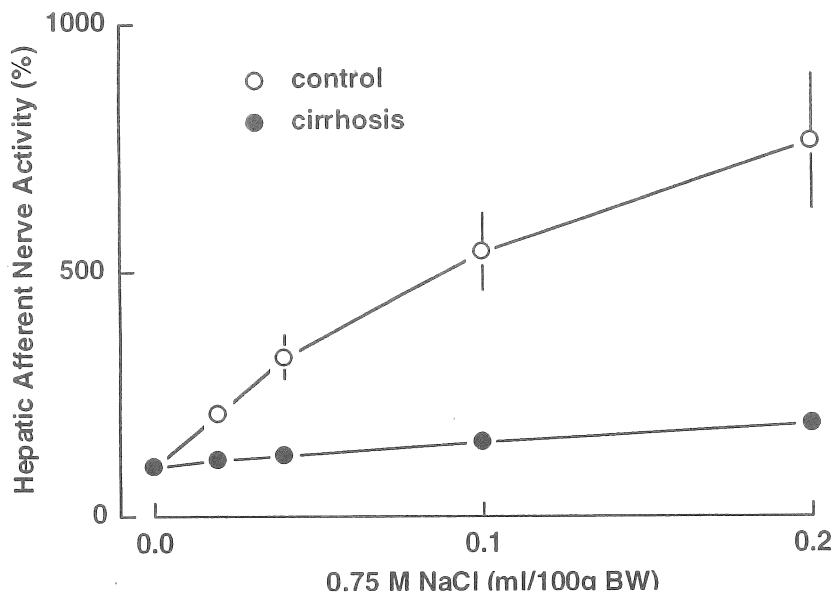


Figure 15



考察

今回の研究により次の点が明らかになった。1) 肝門脈内高張食塩水投与に対する

肝臓求心神経活動の応答は肝硬変ラットでは大きく抑制されている。2) Naバランスは、正常食塩食摂取時にはでは対照群と肝硬変群の間で差がないが、高食塩食摂取時には肝硬変群においてより多いNaの蓄積を認めた。

NaCl、浸透圧、あるいは圧に応答する機構が門脈肝臓領域に存在することは多くの電気生理学的実験により確かめられている(1, 2, 3, 10, 11)。今回我々が測定した肝臓求心神経活動は、肝動脈周囲の神経叢からのものであり、高張NaCl溶液の肝門脈内投与に対して容量依存性に増加したが、等張NaCl溶液と高張マンニトール溶液に対しては応答しなかった。従って、この神経は浸透圧や圧ではなしに、NaClの濃度に対して応答するものと思われる。最近我々はこの門脈肝臓領域のNaCl受容機構の生理学的役割について検討した。その結果、この受容機構が刺激されると腸管でのNaClの吸収が抑制される肝一腸反射(5)、腎臓からのNaCl排泄が増加する肝一腎反射(6, 7)が存在することが分かった。さらに、肝臓を除神経すると、高食塩食摂取直後のNaCl排泄増加が抑制されること(8)、および長期の高食塩食負荷によりNaClが蓄積すること(9)を報告した。以上の研究により、門脈肝臓領域のNaCl受容機構および肝臓神経は、短期および長期のNaCl恒常性維持に重要な役割を果たしていることが分かる。門脈肝臓領域のNaCl受容機構の局在は今のところ分かっていないが、肝臓の再構築を来す肝硬変では、門脈肝臓領域のNaCl受容機構が障害される可能性がある。実際、NaCl恒常性維持機構の破綻が肝硬変に合併することはよく知られている。今回の実験においてこの可能性を調べた。

肝門脈内高張NaCl溶液投与に対する肝臓求心神経活動の応答は、対照群に比べ肝硬変群では有意に抑制されていた。従って、肝硬変では門脈肝臓領域のNaCl受容機構の感度が低下していることが分かった。この機序として、2つの可能性が考えられる。まず、 CCl_4 は肝細胞膜を障害することが知られている(12)。従って、NaCl濃度の変化を感知する受容器細胞自体が障害を受ける可能性がある。ついで、肝臓の再構築により肝臓の神経支配が障害される可能性がある。今回の実験において、交感神経遠心性線維の神経支配の指標である肝臓内ノルエピネフリン含有量が、肝硬変ラットにおいて対照群の半分程度に低下していた。このことはUngvaryとDonath(13)の報告においても確かめられている。彼らは、 CCl_4 により肝硬変を引き起こした後2週間目までは、アドレナリン作動性神経線維は肝組織中にはほとんど無いということを報告している。同様の神経支配の低下が求心神経にも起こる可能性が考えられる。

今回の実験ではNaバランスも測定した。正常食塩食摂取時には対照群と肝硬変群との間でNaバランスに差がなかったが、高食塩食摂取時には肝硬変群において有意に多いNaの蓄積を認めた。同時に肝硬変群において、有意に多い体重の増加も認めた。この体重の増加は、Naの体内蓄積に伴って、水が体内に蓄積したものと考えられる。同様の結果は肝臓除神経ラットを用いた最近の我々の研究においても観察された(9)。すなわち、正常食塩食摂取時には対照群と肝臓除神経群との間でNaバランスの差はなかったが、高食塩食摂取時には肝臓除神経群において有意に多いNaの蓄積を認めた。さらに、肝臓求心神経を介する腎神経活動の低下は高食塩食摂取後に起こるが、低食塩食摂取後には起こらない(8)。従って、門脈肝臓領域のNa感受性機構および肝臓神経を介するNaCl調節機構は高食塩食負荷時にのみ重要な役割を果たすことが分かる。

以上一連の研究により、正常食塩食摂取時にはNaバランスの異常を起こさないよう

な軽度の肝硬変においても、門脈肝臓領域のNa感受性機構の感度は低下しており、この時高食塩食を摂取すると、Naの異常な蓄積が起こることが分かった。

今後の課題

これまでの研究により門脈肝臓領域のNaCl感受性機構の生理学および病態生理学的役割が明らかになってきた。門脈肝臓領域は、腸管の粘膜を越えて吸収された物質が先ず最初に通過するところである。この領域にNaCl感受性機構が存在し、体液NaCl濃度の変化が起こる前に、やがて起こるであろうNaCl濃度変化を予測して、その変化を最小に止めるような、一種の予測制御機構が存在するという事は非常に興味深いことである。今後の課題として次のことを考えている。

1) 門脈肝臓領域のNaCl感受性機構の肝臓内の局在は何処か？その形態および受容機構はどの様なものか？

2) 門脈肝臓領域のNaCl感受性機構を介する他の調節機構の解明。我々は今までに肝一腎反射、肝一腸反射の存在を明らかにしてきたが、門脈肝臓領域のNaCl感受性機構を介し、腎臓、腸管以外の効果器の機能も調節されているのではないか？体液恒常性維持に関する生体の持つ最も重要な調節機構は行動である。門脈肝臓領域のNaCl感受性機構により飲水行動、NaCl嗜好性等が調節されているのではないか？

3) NaClおよび体液恒常性維持に関するネガティブ・フィードバック機構はよく研究されているが、予測制御的な機構についての研究はほとんど無い。我々の一連の研究により明らかになったように、門脈肝臓領域のNaCl感受性機構を介する予測制御的な体液恒常性維持機構は生理学的にも病態生理学的にも非常に重要な役割を果たしている。今後、他の受容器、例えば、口腔から消化管に至るまでの間にNaCl感受性機構が存在するかどうか？もしあれば、それらのNaCl感受性機構により体液はどの様に調節されているかを調べる必要がある。

謝辞

「肝臓内NaCl受容器の生理的および病態生理的意義」に関する一連の研究を、3年間にわたりサポートして下さいましたソルトサイエンス研究財団に感謝いたします。

文献

- 1) Adachi A, Niiijima A, Jacobs HL. An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioral studies. *Am J Physiol*, 231: 1043-1049, 1976.
- 2) Andrews WHH, Orbach J. Sodium receptors activating some nerves of perfused rabbit livers. *Am J Physiol*, 227: 1273-1275, 1974.
- 3) Sawchenko PR, Friedman MI. Sensory function of the liver - A review. *Am J Physiol*, 236: R5-R20, 1979.
- 4) Morita H, Vatner SF. Effects of volume expansion on renal nerve activity, renal blood flow, and sodium and water excretion in conscious dogs. *Am J Physiol*, 249: F680-F687,

1985.

5) Morita H, Ohyama H, Horiba T, Miyake K, Yamanouchi H, Matsushita K, Hosomi H. Effects of portal infusion of hypertonic solution on jejunal electrolyte transport in anesthetized dogs. *Am J Physiol*, 259: R1289-R1294, 1990.

6) Morita H, Ishiki K, Hosomi H. Effects of hepatic NaCl receptor stimulation on renal nerve activity in conscious rabbits. *Neurosci Lett*, 123: 1-3, 1991.

7) Morita H, Nishida Y, Hosomi H. Neural control of urinary sodium excretion during hypertonic NaCl load in conscious rabbits: role of renal and hepatic nerves and baroreceptors. *J Auton Nerv Syst*, 34: 157-170, 1991.

8) Morita H, Matsuda T, Furuya F, Chowdhury MR, Hosomi H. Hepatorenal reflex plays an important role in natriuresis after high-NaCl food intake in conscious dogs. *Circ Res*, 72: 552-559, 1993.

9) Morita H, Chen Q, Hosomi H. Role of hepatic nerves in long term control of NaCl homeostasis in Wistar-Kyoto rats. *J Auton Nerv Syst*, 54: 9-15, 1995.

10) Morita H, Matsuda T, Tanaka K, Hosomi H. Role of hepatic receptors in controlling body fluid homeostasis. *Jpn J Physiol*, 45: 355-368, 1995

11) Nijijima A. Afferent discharges from osmoreceptors in the liver of guinea pig. *Science* 166: 1519-1520, 1969.

12) Reckangel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev*, 19: 145-208, 1967.

13) Ungváry GY, Donáth. Changes of the peripheral autonomic nervous system in altered internal environment. *Z Mikrosk Anat Forsch*, 94: 985-998, 1980.

食塩の糖および膵臓ホルモン代謝調節機序に関する研究

助成研究者 石田俊彦（香川医科大学第1内科）
共同研究者 網野由香、細川 等、堀川 眞、井川茅野、
大久保廣、田所久徳、高原二郎（香川医科大学第1内科）
河西浩一*（検査部*）

はじめに：

近年、軽度の耐糖能異常、肥満、高血圧、高脂血症等を伴った症例において虚血性心疾患が高率に認められることが報告されており、その病態としてインスリン抵抗性の存在が注目されている。即ち、インスリン抵抗性症候群という概念が提唱され、高血圧症の成因及び動脈硬化性病変の進展に高インスリン血症が関与している可能性が論議されている(1, 2)。しかし、本邦における糖尿病の高血圧発症機序は明かにされていないが、本邦では欧米に比してインスリン抵抗性の程度が軽度であり高インスリン血症をあまり認めないことと、従来より欧米に比して食塩の摂取量はるかに多いことより、欧米で見られるものとは、その成因が異なっている可能性が推察される。食塩摂取の多い地域では脳出血が高率に認められていたが、最近の食塩制限によりその発症は減少している。しかし、それらの地域でも脳や心臓の動脈梗塞の症例が増加しているのが明らかにされており、その原因として動物性脂肪やタンパク質の摂取増加が推察されているが、食塩制限による影響についての報告は全く見られていない。

従って、食塩過剰摂取あるいは過度の制限が糖代謝、膵臓内分泌動態に及ぼす影響を検討することは、糖尿病や循環器疾患の発症予防に重要であるが、ヒトにおいてわずかな報告を見るのみである(3, 4, 5, 6)。

私達は、人工膵臓を用いたHyperinsulinemic euglycemic clamp法と経口糖負荷との併用によりインスリン抵抗性を末梢インスリン抵抗性（末梢組織での糖利用障害）と肝臓インスリン抵抗性（経口投与された糖の肝臓での取り込み）とに区別して検討する方法を考案しその重要性を明かにしてきた(7, 8)。それにより、本態性高血圧症患者は、明かな耐糖能異常が認められない状態で既に、末梢での糖利用率の低下と、経口糖負荷後の肝臓での糖の取り込みの低下に基づく多量の糖の末梢への放出の増加を認めて、末梢と肝臓の両組織においてインスリン抵抗性が存在していることを明かにしている(9)。しかし、それらの症例では空腹時の高インスリン血症はなく、糖負荷後の高インスリン血症のみを認めている。

今回は、始めに食塩の投与経路の違いが、糖負荷後の肝臓と末梢組織との臓器別に糖の流れとインスリン分泌に及ぼす影響を無麻酔犬を用いて検討した。

次には、食塩の糖の流れにおよぼす影響の中で、肝臓における影響を少なくし末梢組織のみに焦点を絞る目的で糖の末梢静脈内投与と下での検討を試みた。食塩投与による動脈血Naあるいは肝類洞Na濃度の増加が末梢糖利用に及ぼす効果を検討した。さらに一部の犬では肝神経を切除してNa上昇による末梢糖利用促進効果への肝神経の影響も併せて検討した。最後に臨床症例を用いて異なる耐糖能状態において、経口糖負荷後の糖の流れとインスリン分泌に及ぼす食塩の急性負荷の影響を検討した。

実験方法：

1: 慢性動物実験

10-16kgの正常成熟雑犬を用い、ネブタール麻酔下に開腹し、採血用カテーテルを門脈(PoV)、肝静脈と大動脈(A)に、注入用カテーテルを末梢静脈と肝動脈に、ドップラー血流測定端子をPoVと肝動脈に慢性的に埋めこんだ慢性実験モデルを作製し、術後10日目より無麻酔無拘束下に以下の実験を行なった(10, 11)。一部の犬では肝神経切除を施行した徐肝神経犬を作製し同様の負荷を施行した。

1-1) 30分間のコントロール期間の後、食塩0.2g/kgと糖1g/kgの糖食塩水を経口投与した。

1-2) 30分間のコントロール期間の後、食塩5mg/kg/minのPoV内持続注入(0-180分)下で、糖1g/kgを注入開始時に経口投与した。

1-3) 30分間のコントロール期間の後、糖10mg/kg/minのPoV内持続注入(0-240分)下で、食塩5mg/kg/minのPoV内持続注入(80-160分)を行った。

1-4) 30分間のコントロール期間の後、対照犬において糖12mg/kg/minの末梢静脈内持続注入下(240分)で食塩10から5mg/kg/minを末梢静脈内に持続投与(80分)して、各脈管の血糖を測

定した。

1-5) 30分間のコントロール期間の後、対照犬において糖12mg/kg/minの末梢静脈内持続注入下(240分)で食塩2から1mg/kg/minを肝動脈内に持続投与(80分)して、各脈管の血糖を測定した。

1-6) 30分間のコントロール期間の後、肝神経切除犬において糖12mg/kg/minの末梢静脈内持続注入下(240分)で食塩10から5mg/kg/minを末梢静脈内に持続投与(80分)して、各脈管の血糖を測定した。

1-7) 30分間のコントロール期間の後、対照犬でインスリン(4mU/kg/min)投与時の正常血糖クランプ下での食塩10から5mg/kg/minの末梢静脈内投与による末梢糖利用率の変化を求めた。

1-8) 対照として糖1g/kgの経口投与。

PoV、肝静脈、Aの血糖、インスリンと血流量を測定し、消化管からの糖の吸収率、吸収された糖の肝での取り込み率(HGU)を求めた(10,11)。

2;臨床実験

2-1) 耐糖能正常群のうち5名、境界型耐糖能異常群のうち5名と糖尿病群のうちの5名において、人工臍臓を用いてインスリン4mU/kg/min投与下での正常血糖クランプを行い、糖注入量が一定になった1時間後に、食塩10gの経口負荷を行い、糖注入量の変動より、食塩の末梢糖利用に及ぼす影響を検討した。末梢糖抵抗性は、糖注入量(mg/kg/min)を血糖値で除した糖クリアランス率(ml/kg/min)で表した。

結果:

動物実験

1-1) 食塩経口負荷時の経口投与された糖の流れへとインスリン分泌の影響

食塩の経口摂取により、PoV血清Na濃度は10分で平均5mEq/L上昇し180分まで高値を持続した。PoV血血糖は対照群の頂値が60分で140mg/dlであったのに対して、食塩併用負荷群では60分で180mg/dlと有意の上昇を示した(図1)。消化管よりの糖の吸収は、食塩併用により10分で9.4mg/kg/minと対照群の5.4mg/kg/minに比して急速にもたらされ吸収速度において差が認められたが、150分ですでに吸収が終了した(図2)。しかし3時間にわたる糖の消化管からの吸収量は両者ともに投与量の64%と同程度であった。消化管より吸収された糖のHGUは、対照群では肝へ到達した量の43%であったのに対して、食塩併用では30%と有意に抑制され、Splanchnic Glucose Output(SGO)の著明な上昇が認められた(図2)。

臍臓からのインスリン分泌を見ると、対照群ではA血糖頂値が60分で118mg/dlとなりPoV血インスリン頂値は60分で110uU/mlと分泌増加が見られた。しかし、食塩併用群ではA血糖頂値は60分で142mg/dlと有意の増加が認められたにも拘らず、PoV血インスリン頂値は45分で45uU/mlと、逆に低下しており、血糖刺激によるインスリン分泌の抑制が認められた。

1-2) 食塩の門脈内負荷の経口投与された糖の流れとインスリン分泌への影響

食塩のPoV内投与により、PoV血清Na濃度は10分で平均7mEq/L上昇したあと、その後180分まで上昇し続けの平均18mEq/Lの増加が得られた。経口糖負荷後のPoV血血糖の頂値は90分で170mg/dlで対照群と比較して有意の差は認められなかった(図3)。消化管よりの糖の吸収は、食塩のPoV内投与群では10分で6.2mg/kg/minと対照群のそれと比較して有意の変化は認められず、3時間にわたる糖の吸収量も投与量の69%と同程度であった(図4)。消化管より吸収された糖のHGUは、対照群の43%に比して18%と著明に抑制され、SGOの著しい上昇が認められた。しかしながら、両者間でのA血血糖値には有意の差は見られなかった(図4)。

食塩PoV内注入下での、糖負荷後のA血血糖頂値は90分で140mg/dlとなり、PoV血インスリン頂値は75分で85uU/mlと分泌増加がみられ、これは対照群のそれと比較して有意の変化ではなかった。

1-3) 門脈内糖投与時の糖の流れとインスリン分泌におよぼす食塩の門脈内負荷の影響

糖(10mg/kg/min)がPoVに持続注入されると、PoV血血糖は170mg/dl、A血血糖は122mg/dlと増加し、その時、肝は肝に到達する糖の49%を取り込んでいる。しかし、食塩負荷によりPoV血清Na濃度は平均12mEq/Lと増加し、PoV血、A血血糖値はともに低下傾向を示し、それは食塩の投与中止により前値に復した(図5)。食塩負荷は、増加していたHGUを著明に抑制し、その間のHGU率は15%と低下していた(図6)が、それも食塩の投与中止によりその抑制は解除された。

糖のPoV内投与によりA血血糖頂値は128mg/dlで、その時のPoV血インスリン頂値は60uU/m

1であったが、食塩投与によるA血血糖の低下によりインスリン分泌は減少傾向を示した。

1-4) 食塩末梢静脈負荷が末梢より投与された糖の流れに及ぼす影響

糖の末梢静脈内投与により、各脈管の血糖値はほぼ同程度に増加した。動脈血血糖値は82mg/dlから143mg/dlと増加した。食塩の静脈内投与により動脈血Na濃度は143mEq/Lより151mEq/Lまで上昇し、それとともに上昇していた動脈血血糖値は111mg/dlまで有意に減少した。しかし食塩の投与中止により血糖値は再び有意に増加した(図7)。末梢静脈より投与された糖の消費部位は肝臓よりも主として末梢組織であるので、食塩負荷による血糖降下作用は末梢組織での糖利用促進によることが推察される。

1-5) 肝動脈内負荷された食塩が末梢より投与された糖の流れに及ぼす影響

食塩の肝動脈内投与により、肝動脈血血清Na濃度は20分で平均8mEq/L上昇したあと、その後160分まで上昇し平均10mEq/Lの増加が得られた。(図8)。全身の血清Na濃度が有意に変動しなくとも、肝動脈血Na濃度の平均6mEq/Lの増加は、同様に糖負荷にて増加していた動脈血血糖値の軽度の低下をもたらした。

1-6) 食塩末梢静脈負荷が末梢より投与された糖の流れに及ぼす肝神経支配の影響

基礎時の血糖値とNa濃度は対照群と肝神経切除群とでは差がなかった。糖の末梢静脈内投与により、動脈血血糖値は84mg/dlから143mg/dlと増加した。食塩の静脈内投与により動脈血Na濃度は142mEq/Lより151mEq/Lまで増加し、それに伴って上昇していた動脈血血糖値も109mg/dlまで有意に減少した。しかし食塩の投与中止により血糖値は再び有意に増加した。

1-7) 高インスリン正常血糖クランプ下での末梢糖利用に及ぼす食塩静脈内負荷の影響

インスリン(4mU/kg/min)静脈内持続注入下での、血清インスリン値は192uU/mlと一定の値を保っており、M値は10.8ml/kg/minであった。食塩の静脈内投与により動脈血Na濃度は141mEq/Lより147mEq/Lまで増加し、それに伴って糖の注入量も有意に上昇しM値は14.2ml/kg/minを呈した。しかし食塩の投与中止により糖の注入量は前値に復した(図9)。

臨床実験

2-1) 耐糖能正常群のうち5名、境界型耐糖能異常群のうち5名と糖尿病群のうちの5名において、高インスリン正常血糖クランプを施行した。インスリン4mU/kg/min投与下の血糖値は3群ともに86mg/dlに保つように、糖を注入した。糖のクリアランス率は、それぞれ正常群で10.5ml/kg/min、境界型糖尿病群で6.8ml/kg/min、糖尿病群で3.8ml/kg/minであり、3群間に有意差が認められた。糖注入量が一定に達した後、食塩10gを経口したところ、正常群において糖のクリアランス率は11.8ml/kg/min、境界型糖尿病群で8.2ml/kg/minとそれぞれ有意に上昇した。他方、糖尿病群では食塩負荷後もそれは4.1ml/kg/minであり有意には増加しなかった(図10)。このように、食塩急性負荷は正常群と境界型耐糖能異常群において末梢糖利用を増加させたが、糖尿病において著明に抑制されている末梢糖利用には有意の変化をもたらさなかった。

考察:

我々は、無麻酔無拘束の正常雑犬において、食塩の経口摂取は経口的に投与された糖の肝での取り込みを著明に抑制し、大量の糖を肝より体循環に放出させることを明かにした。この食塩の肝糖取り込み抑制作用は食塩の投与経路の違いに拘らず認められたことより、門脈血血清Na濃度の増加が肝に直接作用し肝での糖の流れを障害させていることが推察された。しかし、糖の門脈内持続注入による血糖クランプ実験より、食塩は糖の肝での取り込みを抑制したにも拘らず、血糖値を低下させたことは、食塩が末梢組織に主として作用し糖の利用を著しく増加させていることを示唆するものと思われる。このように食塩は末梢組織に作用し糖利用を増加させ、血糖低下作用を有することが推察された。従って、食塩は肝臓では糖抵抗性に働き、逆に、末梢では糖抵抗性改善の方向により強く作用し、その結果としてインスリン抵抗性を改善させるように、臓器によって作用方向が異なることが推察された。しかし、経口あるいは経門脈より投与された糖の処理は、肝臓と末梢組織の両者が関与しているために、両者の役割を区別して解析することは困難であった。従って、末梢作用のみが解析できる末梢静脈経路より投与された糖の流れの末梢組織での役割の解析を試みたところ、食塩投与による動脈血Na濃度の上昇は糖末梢静脈内負荷後の血糖の上昇を著明に抑制した。この動脈血Na濃度上昇による糖負荷後の血糖上昇の抑制は肝神経切除にても有意の変化は示さなかった。全身の血中Na濃度の上昇は認めず、肝類洞Na濃度のみの増加の場合でも、糖負荷後の血糖の上昇は抑制された。さらに高インスリン血症下正常血糖クランプにより、動脈血Na濃度上昇による糖負荷後の血糖上昇抑制は末梢組織での糖利用促進効果に基づくことが明らかにされた。以上より、食塩はいずれの投与経路でも

肝類洞内Na濃度の増加を伴って糖負荷による血糖上昇を抑制した。その機序として肝類洞内Na濃度の増加によりその部のNa受容体が刺激され、反射的に交感神経活動が抑制されて末梢血管が拡張したために、末梢での糖利用が促進されたのではないかと推察される。従って、肝類洞Na受容体と末梢組織との間には神経系が存在しそれが食塩負荷による末梢糖利用の促進との関与していることが推察される。しかし、除神経肝の実験より肝類洞と中神経との間の神経支配はこの機序には関与していないことが明らかにされた。

さらに人において食塩の急性経口負荷は、末梢糖利用を著明に促進させることにより、耐糖能異常を改善させる方向に作用していることを明らかにした。この耐糖能改善効果は、軽度の耐糖能異常群においてのみ認められ、糖尿病のように著しい耐糖能異常群では認められなかった。従って、食塩経口摂取は末梢組織でのインスリン抵抗性を少なくとも悪化させることなく、軽度耐糖能異常群においては明らかにインスリン抵抗性を改善させることが明らかにされことより、食塩の過度の制限はインスリン抵抗性をかえって悪化させる方向に向かうことが考えられるので、糖抵抗性増加による血管合併症の阻止に適切な食事療法を再検討する必要性が示唆された。

今回の結果より、食塩は末梢組織に作用し糖利用を増加させ、血糖低下作用を有することが示唆された。従って、食塩は肝臓では糖抵抗性に働き、逆に、末梢では糖抵抗性改善の方向により強く作用し、その結果としてインスリン抵抗性を改善させるように、臓器によって作用方向が異なることが推察された(図11、12)。

経口糖負荷後の糖の流れとインスリン分泌に及ぼす食塩の影響については、いくつかの報告があるが未だ一定の見解は得られていない(3,4,5,6)。Ferranniniら(3)は、ヒトでの食塩併用経口糖負荷後の血糖上昇は、食塩の消化管からの糖の吸収促進作用によるもので、末梢の糖利用障害によるものではないことを報告している。一方、*in vitro*では、食塩は小腸粘膜でのNa依存性糖輸送を促進させるとの報告が多く(12,13,14)、私達の動物実験結果もそれらを支持するものである。しかし、今回の軽症型糖尿病における耐糖能の改善は、食塩による糖の消化管からの吸収促進による血糖上昇効果をうわまる末梢糖利用の増加によるものと推察される。Thorburnら(4)は、さらに食塩は糖負荷後の血糖のみならずインスリン濃度も増加させたと述べており、インスリン反応に関しては私達の結果と乖離しているが、その原因は種差以外明らかではない。しかし、最近のヒトでの報告では、いずれも食塩は糖負荷後の血糖及びインスリン動態に影響を与えなかったとされている(9)が、末梢レベルの成績のみで推論することは、糖及びインスリン共に肝でかなり代謝されることを考慮しないと誤った結論を引き出す恐れがある。しかし、今回の結果では食塩は肝でのインスリン取り込み率には有意の変動をもたらさなかった。

血糖上昇を介するインスリン分泌増加の食塩による抑制機序の詳細は不明であるが、消化管に投与された食塩がEnteroinsular axisの作動を阻害したり、交感神経を刺激している可能性が考えられる(15,16)。従って、この仮説を支持するにはGIP、GLP-1、カテコラミン等の測定が必要である。

血清Na濃度と、末梢インスリン抵抗性に関する報告は未だなされていないが、我々の結果より、末梢インスリン抵抗性は血清Na濃度に相関して改善されることが推察された。その機序は不明であるが、交感神経活動抑制による末梢血管拡張作用、一酸化窒素を介する末梢血管拡張作用、インスリン抵抗性の分子生物学的機序が糖輸送担体やインスリン作用の細胞内伝達様式などに及ぼすNa濃度の検討が必要である。

まとめ

血清Na濃度の糖代謝への影響は、肝臓では糖放出促進に作用するが、他方、末梢組織では糖取り込み促進に作用し、両者の結果として*in vivo*では血糖値の低下が期待されることより、糖尿病患者への食塩過度の制限が糖代謝の面からして有用か否かを明かにする必要がある。次に、肝臓と末梢のそれぞれの異なった糖輸送担体の発現におよぼすNa濃度の影響も併せて検討する必要がある。

謝辞

本研究はソルトサイエンス研究財団よりのプロジェクト研究94研究助成金により行われた。

文献：

1. Reaven G.M.
Role of insulin resistance in human disease.
Diabetes 37:1595-1599, 1988
2. Kaplan N.M.
The deadly quartet-Upper-body obesity, glucose intolerance,
hypertriglyceridemia, and hypertension.
Arch. Intern. Med. 149:1514-1519, 1989
3. Ferrannini E., Barrett E., Bevilacqua S., Dupre J. and DeFronzo R.A.
Sodium elevates the plasma glucose response to glucose ingestion in man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 54, 455-458, 1982
4. Thorburn A.W., Brand J.C. and Truswell A.S.
Salt and the glycemic response.
Br. Med. J. 292, 1697-1699, 1986
5. Gans R.O.B., Heine R.J., Donker A.J.M. and Veen E.A.
Influence of salt on glycemic response to carbohydrate loading.
Br. J. Med. 294, 1252-1253, 1987
6. Slyper A., Schectman G., Pleuss J. and Anderson A.
Lack of effect of salt on the glucose and insulin response to mashed
potatoes, white rice, and lima beans.
Metabolism 40, 747-750, 1991
7. Ishida T., Hosokawa H., Kawanishi K. and Irino S.
The different role of liver and peripheral tissue on glucose metabolism in
NIDDM.
In Best approach to the ideal therapy of diabetes mellitus. Shigeta Y.,
Lebovitz J.E., Malaisse W.J. (eds), Elsevier Science Publishers BV, pp297-300, 1987
8. 石田俊彦 肝疾患と糖代謝—肝のインスリン抵抗性—
Diabetes Frontier 4, 183-190, 1993
9. 石田俊彦、網野由香、細川 等、大工原裕之
高血圧症における肝および末梢での糖利用障害と食塩の影響
糖尿病記録号 1992、東京、医学図書出版、p171-175、1993
10. Ishida T., Lewis R.M., Hartley C., Entman M. and Field J.B.
Comparison of hepatic extraction of insulin and glucagon in conscious and
anesthetized dog.
Endocrinology 112, 1098-1109, 1983
11. Ishida T., Chap Z., Lewis R.M., Hartley C., Entman M. and Field J.B.
Differential effects of oral, peripheral intravenous, and intraportal
glucose uptake and insulin and glucagon extraction in conscious dogs.
J. Clin. Invest. 72, 590-601, 1983
12. Olsen W.A. and Ingelfinger F.J.
The role of sodium in intestinal glucose absorption in man.
J. Clin. Invest. 47, 1133-1138, 1968
13. Saltzman D.A., Rector F.C. Jr. and Fordtran J.S.
The role of intraluminal sodium in glucose absorption in vivo.
J. Clin. Invest. 51, 876-885, 1972
14. Bieberdorf F.A., Morawski S. and Fordtran J.S.
Effect of sodium, mannitol, and magnesium on glucose, galactose,
3-O-methylglucose, and fructose absorption in the human ileum.
Gastroenterology 68, 58-66, 1975
15. 石田俊彦 糖代謝における肝臓の役割
Diabetes Frontier 2, 393-405, 1991
16. 石田俊彦、細川 等、河西浩一
肝でのインスリンおよび糖代謝における enteroinsular axis の意義
糖尿病記録号 1991、p332-336、1992

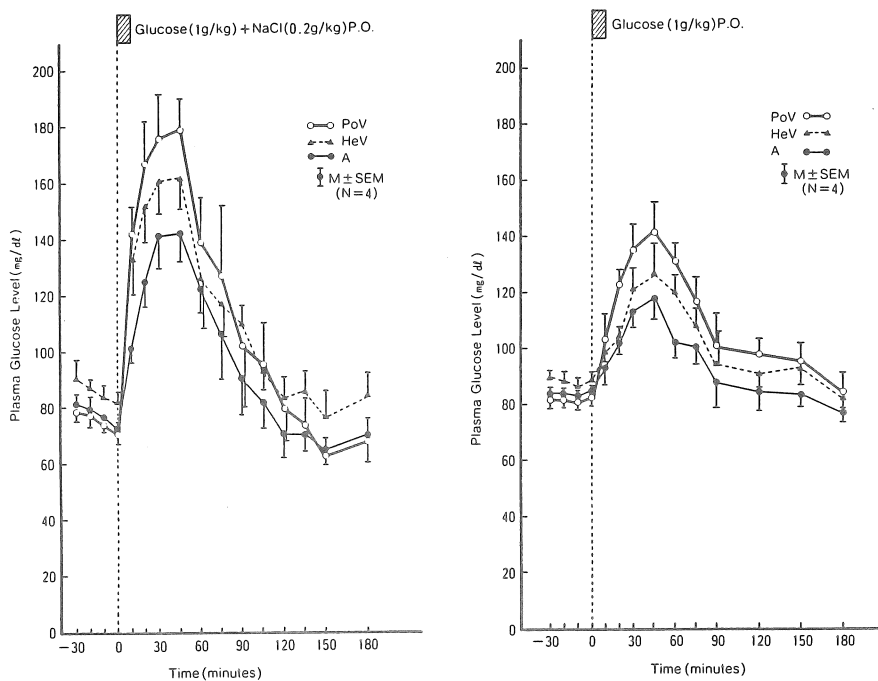


Fig.1: The effect of oral sodium chloride on the plasma glucose responses of the portal vein (PoV), hepatic vein (HeV) and aortic aorta (A) after oral glucose administration (left). Plasma glucose curves after oral glucose as control (right).

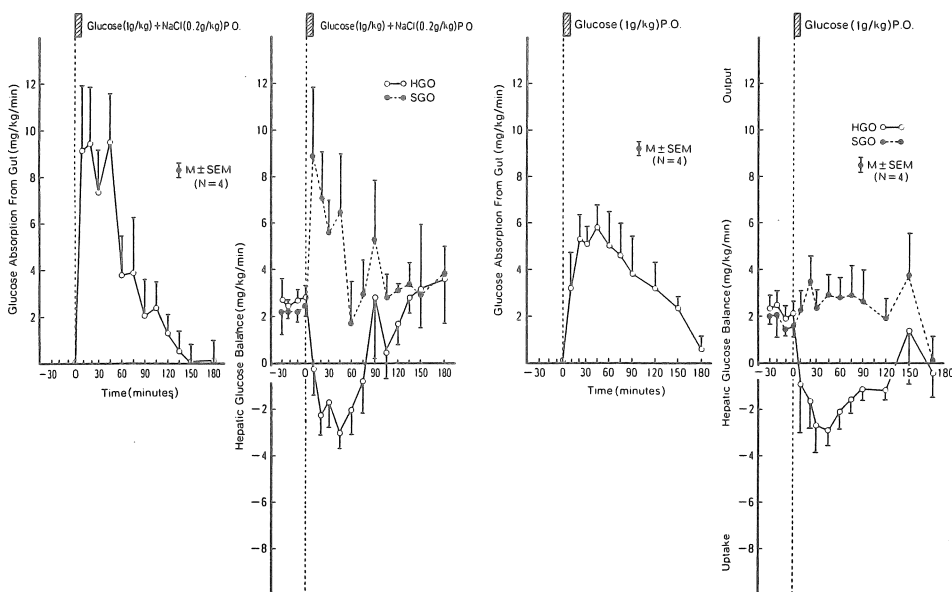


Fig.2: The fate of administered glucose orally. Glucose appearance into the portal vein and hepatic glucose balance and splanchnic glucose output were measured after oral glucose with or without sodium chloride ingestion.

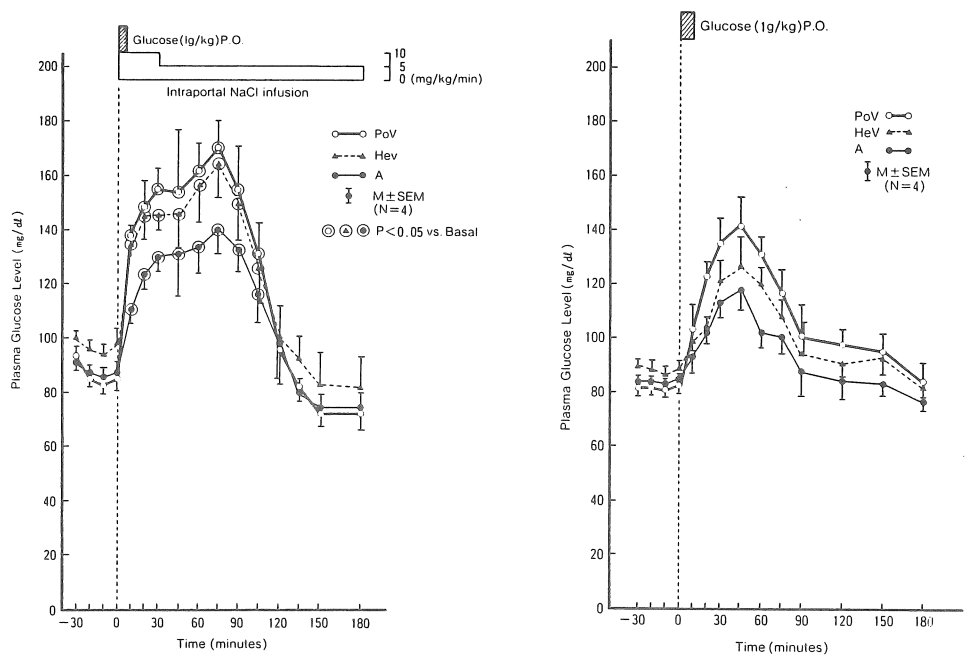


Fig.3: The effect of intraportal sodium chloride infusion on the plasma glucose responses of the portal vein (PoV), hepatic vein (HeV) and aortic aorta (A) after oral glucose administration (left). Plasma glucose curves after oral glucose as control (right).

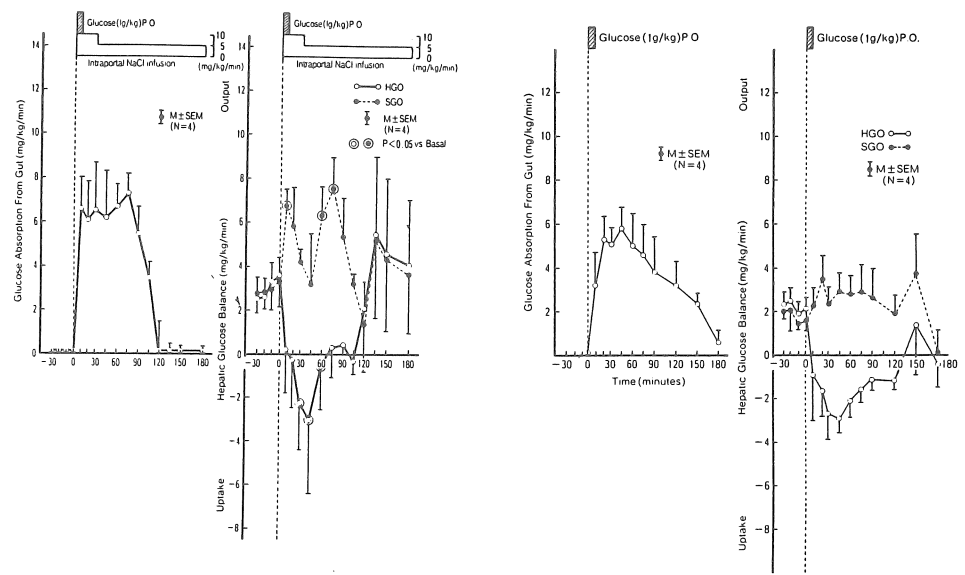


Fig.4: The fate of administered glucose orally. Glucose appearance into the portal vein and hepatic glucose balance and splanchnic glucose output were measured after oral glucose with or without intraportal sodium chloride infusion.

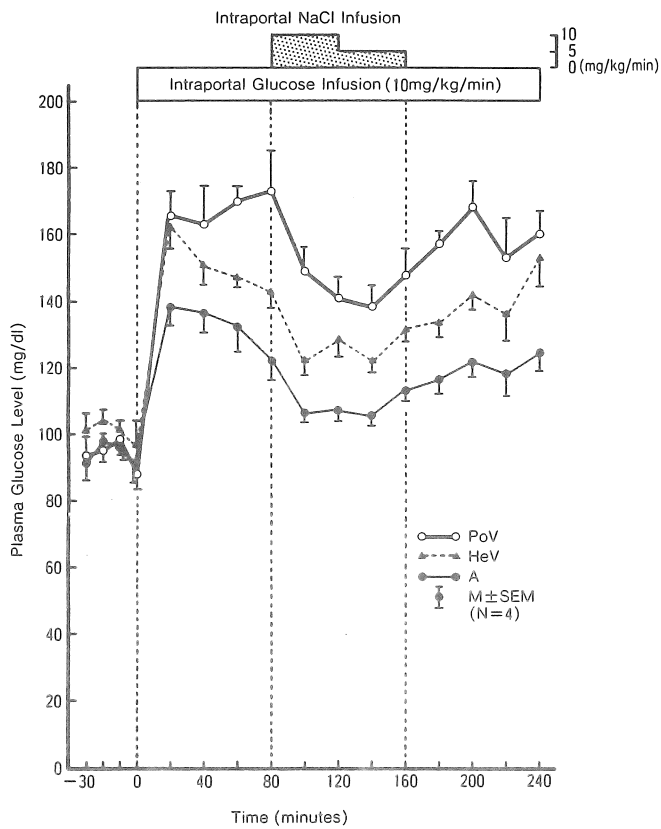


Fig.5: The effect of intraportal sodium chloride infusion on the plasma glucose responses of the portal vein (PoV), hepatic vein (HeV) and aortic aorta (A) under continuous intraportal glucose infusion.

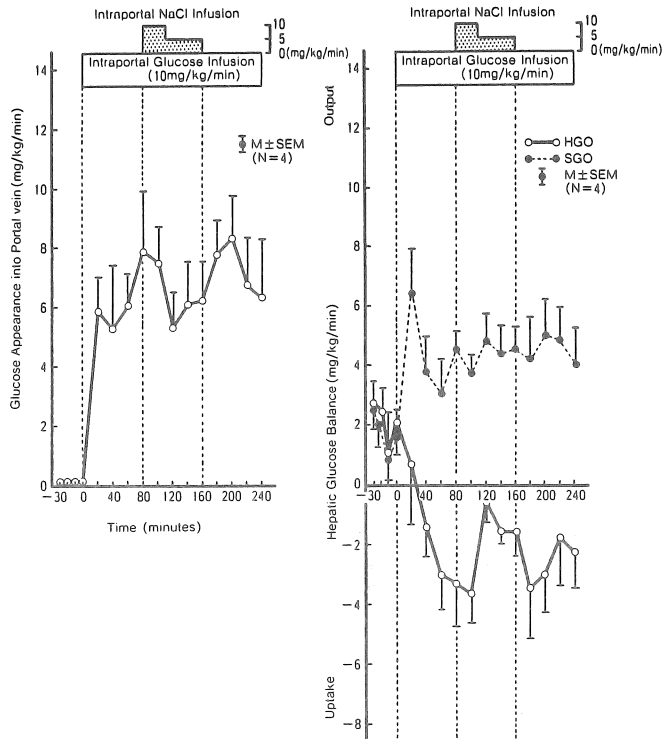


Fig.6: The fate of administered glucose intraportally. Glucose appearance into the portal vein and hepatic glucose balance and splanchnic glucose output were measured after oral glucose with or without intraportal sodium chloride infusion.

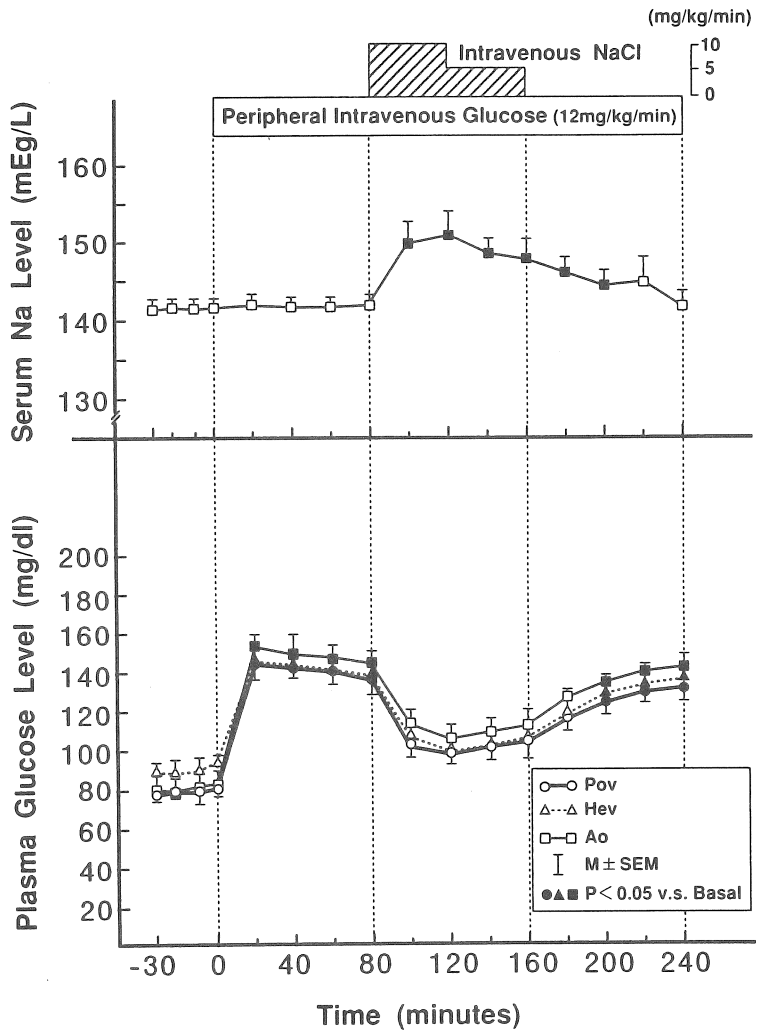


Fig.7:Serum sodium level of aortic artery(A) (Upper panel) and plasma glucose responses of the portal vein(PoV),hepatic vein(HeV) and aortic artery(Ao) (Lower panel) after intravenous sodium chloride administration under continuous peripheral intravenous glucose infusion in conscious dogs.

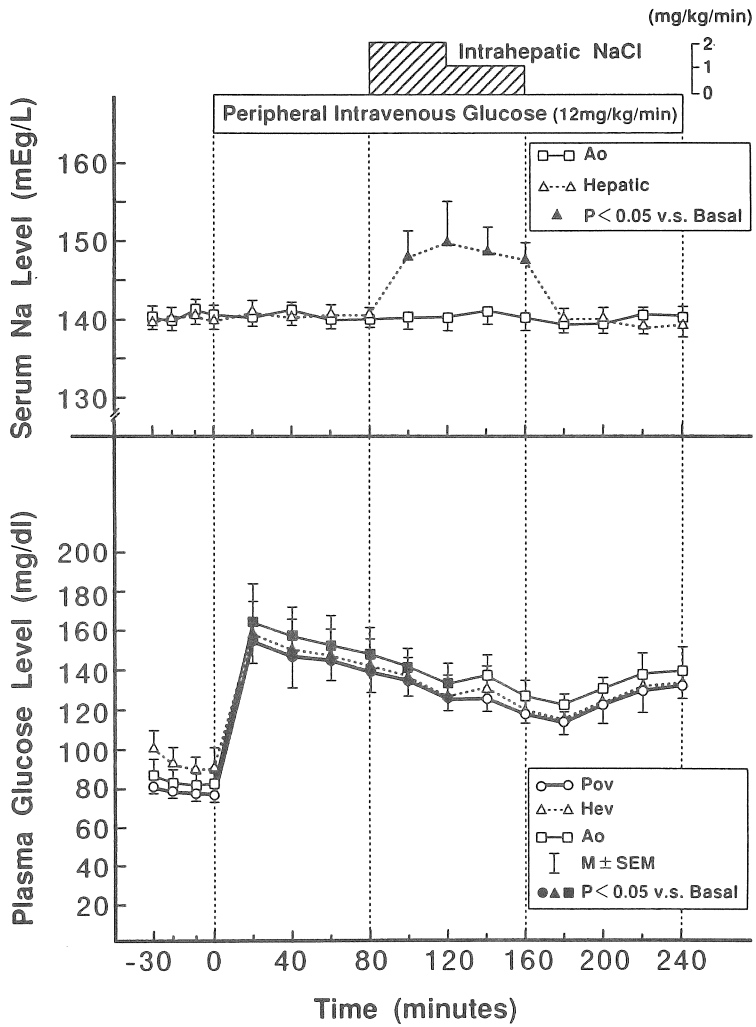


Fig.8:Serum sodium level of aortic artery(Ao) (Upper panel) and plasma glucose responses of the portal vein(PoV),hepatic vein(HeV) and aortic artery(Ao) (Lower panel) after intrahepatic sodium chloride infusion under continuous peripheral intravenous glucose infusion in conscious dogs.

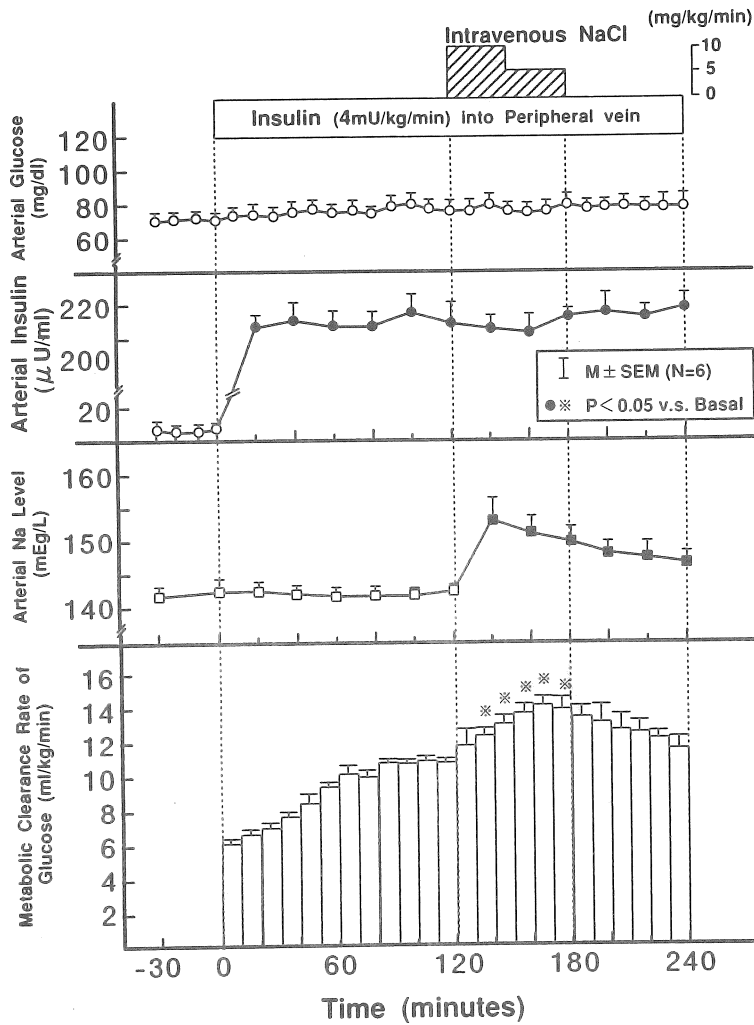


Fig.9: The effect of arterial sodium level on the metabolic clearance rate of glucose under hyperinsulinemic euglycemic clamp in conscious dogs. Arterial glucose levels (Upper panel), arterial plasma insulin levels (the second panel), arterial plasma sodium concentration (the third panel) and the metabolic clearance rate of glucose under hyperinsulinemic euglycemic clamp (Lower panel).

Effect of Oral NaCl on Peripheral Glucose Metabolism

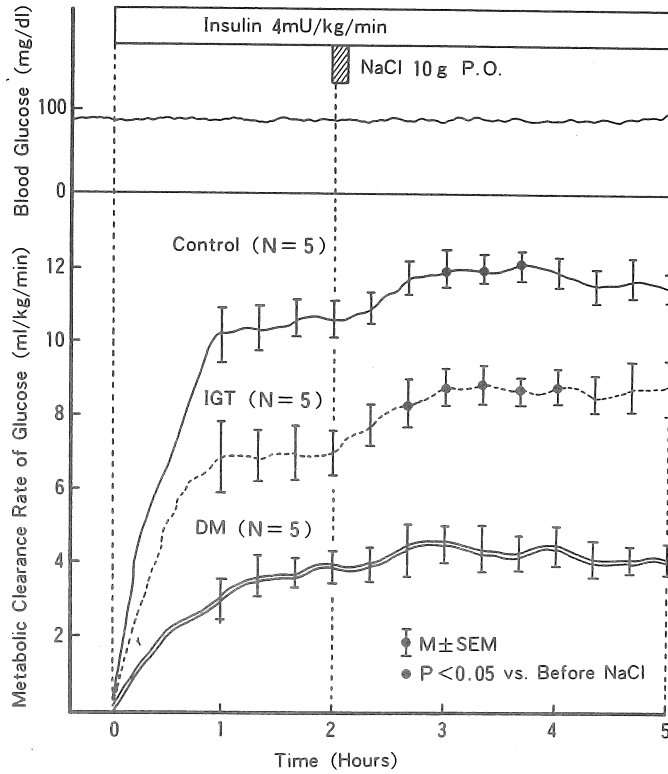


Fig.10: The effect of oral sodium chloride on peripheral glucose utilization after hyperglycemic euglycemic clamp in normal, impaired glucose tolerance and diabetic subjects.

末梢より投与された糖の末梢での利用に及ぼすNaの濃度と肝神経切除の影響

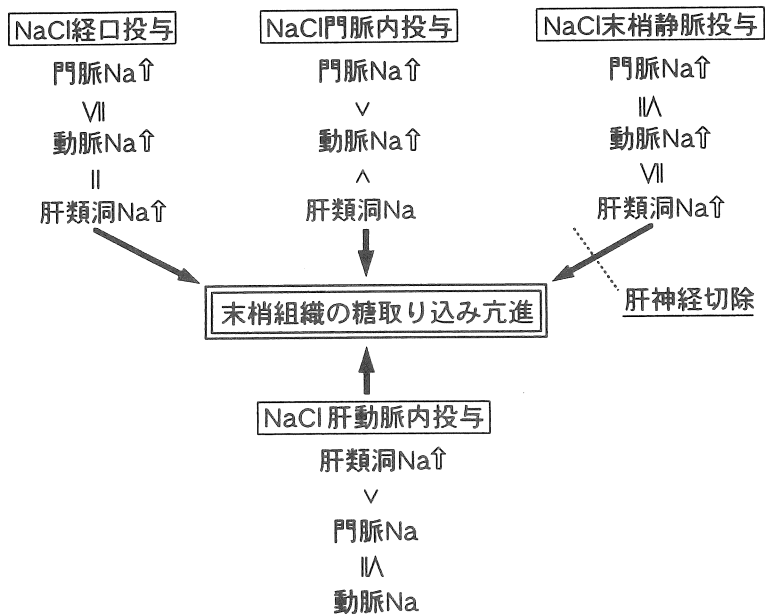


Fig.11: The effects of sodium chloride levels of the portal vein, hepatic artery and hepatic sinusoidal vein on the peripheral glucose utilization after glucose administered intravenously.

食塩の糖代謝および膵内分泌への作用

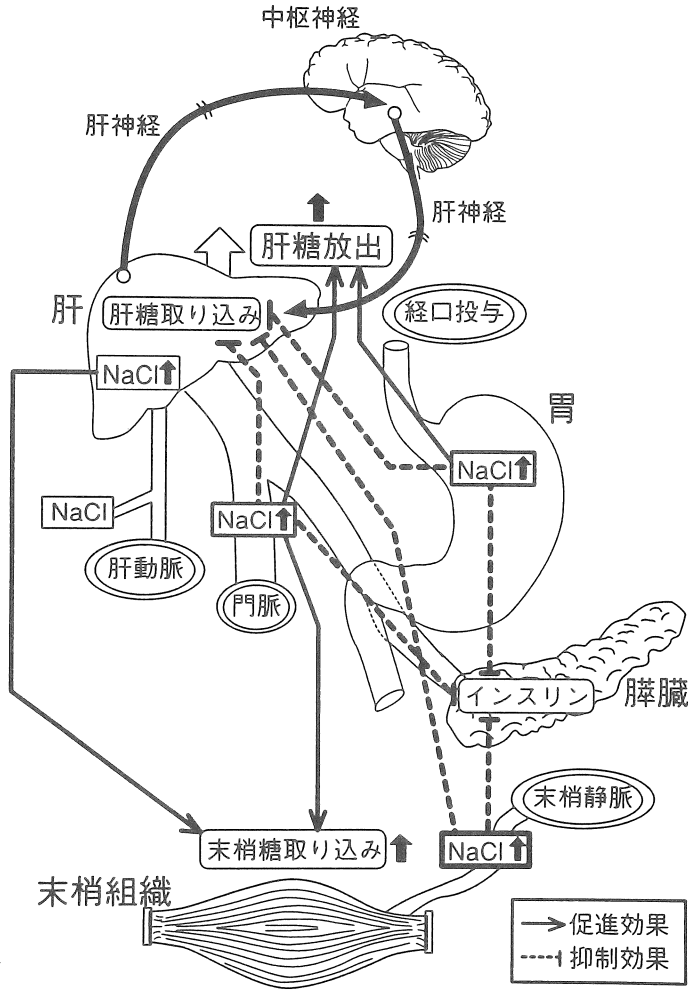


Fig.12: The different effects of sodium chloride levels administered orally, intraportally, intravenous peripherally, and intrahepatic artery on the glucose flux (hepatic glucose output, hepatic glucose uptake, splanchnic glucose output, and peripheral glucose utilization) in conscious dogs.

食塩の吸収・排泄の新しい調節機構因子に関する生理学的研究： カルシウム代謝および糖代謝に対する食塩摂取の影響に関する研究

下村吉治 (名古屋工業大学・保健体育教室・栄養生化学研究室)
村上太郎 (名古屋工業大学・保健体育教室・栄養生化学研究室)

はじめに

食塩は生体に必須なミネラルであるが、その摂取する量により生体の代謝に及ぼす影響は異なる。これまでの研究において、高食塩食摂取により、尿中へのカルシウム排泄が増加することが知られている。我々はこの現象を人とラットにおいて確認し、さらに、運動はこの高食塩食摂取の影響を軽減する作用のあることを認めた [1]。尿中へのカルシウム排泄の増加は、骨粗鬆症を誘発させる危険因子となりうることが示唆されているので [2、3]、食塩摂取が如何なるメカニズムで生体内のカルシウム代謝に影響を及ぼすか明らかにすることは重要である。

人におけるこれまでの研究において、 NH_4Cl 投与によりアシドーシスを起こすと、尿中へのカルシウム排泄が増大することが報告されている [4、5]。また、イヌを用いたカルシウム再吸収に対するアシドーシスとアルカローシスの影響を検討した研究において、 NH_4Cl 投与による急性アシドーシスでは腎尿細管でのカルシウムの再吸収が抑制され、急性アルカローシスでは腎尿細管でのカルシウムの再吸収が高められることを認めている [6]。一方、アシドーシスの成因の一つに大量の食塩負荷が知られており、それは食塩の負荷により細胞外液量が増加しその HCO_3^- イオン濃度が減少することにより引き起こされると考えられている [7]。そこで、本研究では、多量な食塩摂取による尿中カルシウム排泄の増大は、アシドーシスにより引き起こされたものなのかどうか、さらに多量な食塩摂取下でカルシウム代謝の動態に HCO_3^- イオンは重要な影響因子になりえるかどうかをラットにおいて検討した。

一方、内分泌系によるカルシウム代謝の調節については多くの研究があるが、多くの代謝系に強力な作用を持つインスリンが尿中へのカルシウム排泄に対してどのように作用しているか、またそのインスリン作用に対して高食塩食摂取が如何に影響するかは興味ある問題であるが今のところ不明である。また、インスリンの分泌およびその作用の低下する糖尿病では、水分摂取と排尿の増加により尿中へのカルシウム排泄も変動する可能性が高い。そこで、本研究では、ラットにストレプトゾトシン処理をしてインスリン分泌不全による糖尿病を発症させたときの尿中へのカルシウム排泄と、さらにこのラットに高食塩食を摂取させたときの尿中へのカルシウム排泄を測定し、尿中へのカルシウム排泄に対するインスリンの関与とそれに対する高食塩食摂取の影響を検討した。また、糖尿病ではグルコース代謝が著しく阻害されるので、糖尿病時のグルコース代謝調節系に対する高食塩食摂取の影響も合わせて検討した。

方法

[実験1]

実験動物は、8週齢のFischer系雄ラット（日本クレア、東京）21匹を使用した。飼育条件は室温を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ とし明期を07:00-19:00時とした。ラットは個別飼育し、06:00-08:00時と19:00-21:00時に給餌させる1日2食制のmeal-feeding法を用いた。本実験にラットを適応させるために3日間のad libitum feeding、続いて7日間の1日2食制のmeal-feedingによる予備飼育を行なった。予備飼育終了後、7日間にわたり本実験を行なった。実験群は対照群6匹と高食塩食群15匹に分けた。実験食の食塩量は、対照群で0.5%、高食塩食群で4.0%とし、実験食の食塩量の差は、コーンスターチの添加量で調節した。飲水は脱イオン水を用い24時間自由とした。本実験期間の最終日（7日目）の08:00時と21:00時（給餌終了後）に、対照群と高食塩食群15匹中7匹には生理食塩水を、残り8匹の高食塩食群には重炭酸ナトリウム含有生理食塩水(0.5M NaHCO₃)を37°Cで温めそれぞれ2ml腹腔内投与した。24時間尿の採集は代謝ケージを用いて行なった。24時間尿の採集後、ただちに眼窩静脈より血液を採取した。

上記のラットを引き続いて用い、尿中ミネラル排泄量の経時的変動を測定した。上記実験終了後、1週間の調整期間をおいた。19:00-21:00時に給餌させた後、投与実験前の12時間と実験中を絶食した。飲水は投与6時間前までとした。03:00-07:00時の間の4時間尿を投与前尿として採取した。対照群には0.9%食塩水（生理食塩水）を、高食塩食群には8.0%食塩水（高張食塩水）を07:00時にそれぞれ3ml経口投与した。さらに上記実験と同様に、対照群6匹と高食塩食群15匹中7匹には偽投与として生理食塩水を、残り8匹の高食塩食群には重炭酸ナトリウム含有生理食塩水（0.5 M NaHCO₃）を37°Cに加温し2mlずつ腹腔内投与した。以後4時間ごとに3回採尿を行なった。なお採尿は代謝ケージ内での自然排尿によって行なった。

[実験2]

8週齢のSprague-Dawley系雄ラット40匹をもちいた。任意に選択した28匹のラットに生理食塩水に溶解したストレプトズトシン（60 mg/kg体重）を尾静脈より投与し糖尿病を発症させた。残りの12匹のラットにはコントロールとして生理食塩水のみを投与した。ストレプトズトシンを投与した2日後に尾静脈より採血して血糖を測定し、糖尿病が発症したことを確認した。その翌日から実験最終日まで、半数の糖尿病ラットにインスリン（5ユニット/100g体重）を1日2回投与した。すなわち、コントロール群、糖尿病群、および糖尿病+インスリン群の3群を調製した。ストレプトズトシン投与5日目より各群の半数のラットに食塩含量0.6%のコントロール食を、残りの半数のラットに食塩含量5%の高食塩食を与えて実験最終日まで（9日間）飼育した。実験食に切り替えた3日目にラットを代謝ケージに移し、最後の3日間尿を採取した。採尿後、シャ血によりラットを屠殺し、速やかに心臓を採取し、分析まで-80°Cで保存した。また、得られた血液より血清を分離して-80°Cで保存した。

血糖はグルコース・キット（和光）を、血清遊離脂肪酸はNEFA ICテスト（和光）

を用いて測定した。血清インスリンはラジオイムノアッセイにより定量した。

心筋からのピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 複合体の抽出は、以前に報告した分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素複合体の抽出法 [8] に従って行い、その活性は $[1-^{14}\text{C}]$ ピルビン酸を基質として測定した。

PDHキナーゼ活性の測定は、ATP存在下におけるPDH複合体の不活性化率を測定することにより分析した [9]。この際、PDH複合体活性は分光学的に測定したが、組織に含まれる乳酸脱水素酵素活性が分光学的なPDH複合体活性の測定を妨害するため、あらかじめ組織抽出液からフェニル-セファロースカラムクロマトグラフィーにより乳酸脱水素酵素を除去した後分析を行った。

心筋の総RNAをChomczynski and Sacchiの方法 [10]により抽出し、PDHキナーゼ [9] およびグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素 (G3PDH) のmRNAをノーザン・ブロット法により定量した。 β -アクチンmRNAの発現量を内部標準とし他のmRNA量を補正した。

結果

[実験1]

1. 尿のpH

尿のpHは、コントロール食群で6.6であり、高食塩食 (生理食塩水投与) 群では有意ではないがそれよりも低値の6.3であった (Fig. 1)。高食塩食群に重炭酸ナトリウムを投与した群では、尿のpHは他の2群よりも有意に高く、7.4を示した (Fig. 1)。

2. 尿中へのミネラルの排出

尿中へのナトリウム排泄量は、食塩摂取量を反映してコントロール食群よりも高食塩群でかなり高かった (Fig. 2)。尿中のカルシウム排泄は、高食塩食摂取により有意に上昇した (Fig. 2)。この結果は、以前に我々が観察した結果と一致している [1]。一方、重炭酸ナトリウムを投与した高食塩食群の尿中カルシウム量は、生理食塩水を投与した高食塩食群よりも有意な低値を示し、コントロール食群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 2)。各群における尿中のマグネシウム排泄量は、カルシウム排泄量とほぼ同じ傾向にあり、高食塩食摂取により増大した排泄量は、重炭酸ナトリウム投与により低下した (Fig. 2)。尿中のリンとカリウムの排泄は、高食塩食摂取および重炭酸ナトリウム投与の影響はごくわずかであった (Fig. 2)。

3. 血清中のミネラル濃度

血清中のナトリウム、カルシウム、リンおよびマグネシウム濃度は、高食塩食摂取および重炭酸ナトリウム投与の影響をほとんど受けなかった。血清中の遊離カルシウム (ultrafilterable calcium) 濃度は、総カルシウム濃度の約半分であるが、これも高食塩食と重炭酸ナトリウム投与の影響を受けなかった。

4. 尿のpHの変化が尿中ミネラル排泄に及ぼす影響の確認実験

上記の実験の結果をさらに確認するために、コントロール食群と高食塩食群の一部のラットに生理食塩水を、残りの高食塩食群ラットに重炭酸ナトリウムを投与した後、経

時的に尿を採取して、そのpHとミネラルを測定した。

ラットには、投与6時間前より摂水を制限したので、投与後12時間の採尿期間の尿量は、いずれの群も漸減した (Fig.3)。しかし、尿量は、コントロール食群に比べて高食塩食群で著しく多い傾向にあった。

投与後の尿のpHは、尿量と関係なく、コントロール食群で、6.1~6.5であり、生理食塩水を投与した高食塩食群で5.8~6.3の低値を示したが、重炭酸ナトリウムを投与した高食塩食群では7.1~8.3の高値を示した (Fig. 3)。

尿中へのナトリウム排泄は、高食塩食群で高く、コントロール食群で低かったが、重炭酸ナトリウム投与による影響はなかった (Fig. 4)。尿中へのカルシウムとマグネシウム排泄は、上記実験の結果と同様に高食塩食摂取で上昇するが、重炭酸ナトリウム投与により高食塩食摂取の効果はかなり軽減された (Fig. 4)。尿中へのリンとカリウムの排泄は重炭酸ナトリウム投与による影響をほとんど受けなかった (Fig. 4)。

[実験2]

1. 摂食量および尿量

正常ラットでは、コントロール食群と高食塩食群の摂食量はほぼ同じであった (Fig. 5)。糖尿病ラットの摂食量は正常ラットのそれよりもかなり多かったが、コントロール食群に比べて高食塩食群でわずかに少なかった (Fig. 5)。糖尿病ラットの摂食量はインスリン投与により低下する傾向にあったが、依然として正常ラットよりも有意に多かった (Fig. 5)。インスリン投与ラットでは両食事群間で差はなかった (Fig. 5)。

尿量は、正常、糖尿病およびインスリン投与のいずれのラットにおいてもコントロール食群よりも高食塩食群で多い傾向にあった (Fig. 5)。糖尿病により尿量は著しく増加したが、インスリン投与によりかなり減少した (Fig. 5)。しかし、コントロール食群に比べて高食塩食群ではインスリン投与による尿量の減少率は低かった (Fig. 5)。

2. 尿中ナトリウムおよびカルシウム

尿中ナトリウムの排泄量は、正常、糖尿病およびインスリン投与のいずれのラットにおいても高食塩食群で多かった (Fig. 6)。コントロール食群のナトリウム排泄量は糖尿病およびインスリン投与によりほとんど影響されなかったが、高食塩食群では糖尿病によりほぼ2倍に増加し、インスリン投与によりわずかに低下した (Fig. 6)。

正常ラットの尿中カルシウム排泄量は、以前に観察されたのと同様に高食塩食群で増大する傾向にあった (Fig. 6)。糖尿病により、カルシウムの排泄は有意に増加したが、高食塩食群でその増加は著しく、コントロール食群の2倍以上のカルシウム排泄であった (Fig. 6)。インスリン投与により両食群のカルシウムの排泄はかなり低下したが、高食塩食群では依然として正常ラットよりも有意に増大していた (Fig. 6)。

3. ラットの血糖と血清遊離脂肪酸濃度

正常ラットにおける血糖値は、両食餌群間に差はなかった (Fig.7)。ストレプトゾトシンによる糖尿病ラットの血糖値は、両食餌群とも著しい高値を示した (Fig.7)。インスリン処理ラットでは、両食餌群共に正常ラットの値よりも低値を示し、特に高食塩食群では低かった (Fig.7)。この理由は、インスリンの作用を明確に現すために一般的に用いら

れるインスリン投与量よりも多量のインスリンを投与したためと考えられる。しかしながら、高食塩食群の血糖がコントロール食群よりも有意に低かったことは、投与したインスリンの作用が高食塩食摂取により増大する可能性を示唆しており、今後さらに検討が必要であると考えられる。

正常ラットにおける血清遊離脂肪酸濃度は、以前の人における報告 [11] のように高食塩食摂取により上昇する傾向にあった(Fig. 8)。糖尿病ラットでは、高食塩食群で有意な高値を示した(Fig. 8)。インスリン処理ラットでは、ほぼ正常ラットのレベルに回復した(Fig. 8)。

4. 心筋のPDH複合体とPDHキナーゼ活性

心筋に含まれる全てのPDH複合体を脱リン酸化して測定したPDH総活性は、いずれのラットおよび食餌群間にも差が認められなかった(Fig. 9)、PDH総活性は糖尿病および高食塩食摂取の影響を受けないと結論できる。

一方、PDH複合体の活性型の割合においては、正常ラットでは両食餌群間に差は認められなかったが、糖尿病ラットでは高食塩食群で著しく高かった(Fig. 9)。コントロール食群の正常と糖尿病ラットを比較すると、後者がわずかではあるが有意に低値を示した(Fig. 9)。糖尿病ラットにおいてみられたPDH複合体活性型の低下は、インスリン処理により両食餌群とも正常ラットのレベルに回復した。

PDH複合体活性を調節するPDHキナーゼ活性の典型的な結果をFig. 10の上段に示し、そのまとめを下段に示した。正常ラットでは両食餌群間に差はなかったが、糖尿病ラットではコントロール食群よりも高食塩食群で約2倍の高値を示した。コントロール食群の正常と糖尿病ラットを比較すると、後者がわずかではあるが有意な高値を示した。糖尿病ラットにおいてみられたPDHキナーゼ活性の増加は、インスリン処理により両食餌群とも正常ラットのレベルに回復した。

5. PDHキナーゼおよびG3PDHのmRNAの発現

PDHキナーゼのmRNA量は、糖尿病ラットの高食塩食群でわずかではあるが有意に増加した(Fig. 11)。他の群には有意な変化は認められなかった。

解糖系に存在し細胞内で多く発現している酵素であるG3PDHのmRNA量は、糖尿病および高食塩食摂取により影響されなかった(Fig. 11)。

考察

尿のpHは、高食塩食を摂取することにより有意ではないが低下する傾向にあり、重炭酸ナトリウムを投与すると、そのpHは1以上上昇した。尿中に排泄されるカルシウムとマグネシウムの量は、この尿のpHに鋭敏に反応し、高食塩食摂取で促進される両ミネラルの尿中排泄は、尿のpHを高めることにより抑制されることが本研究において明らかになった。これらの所見は、高食塩食摂取による尿中へのカルシウム及びマグネシウムの排泄増加が尿の酸性化と深く関係しており、その機構は、代謝性アシドーシスによる作用と類似のものであることを示唆している。

糖尿病により、尿中へのカルシウムの排泄は有意に増加したが、高食塩食群でその増

加は著しく、コントロール食群の2倍以上の排泄量であった。これらの結果は、尿中へのカルシウム排泄の調節に対してインスリンが関与する可能性を示唆するものであるが、カルシウムの排泄量が糖尿病と高食塩食により増加した尿量にかなりよく対応することから考えると、インスリンの作用は尿量の変動を介した二次的なものであらうと考えられる。即ち、尿量がカルシウムの排泄量を決定する一時的因子として示唆される。しかし、糖尿病ラットでは高食塩食群の尿量がコントロール食群の約1.3倍であるが、前者のカルシウム排泄量は後者の2倍以上であるので、高食塩食摂取は糖尿病時の尿中カルシウム排泄を促進すると考えられる。

ラット心筋の活性型PDH複合体の割合は、糖尿病によりわずかではあるが有意に低下し、さらに糖尿病ラットが高食塩食を摂取することにより著しく低下した。これらの結果より、ストレプトズトシンによる糖尿病ラットの心筋では、PDH複合体活性が低下することによりグルコース代謝が抑制され、その抑制は高食塩食摂取によりかなり高められることが示唆された。

PDH複合体の活性調節にはPDHキナーゼが強く関与することが明らかにされている。PDHキナーゼ活性は糖尿病によりわずかではあるが有意に上昇し、さらに糖尿病ラットが高食塩食を摂取することによりかなり上昇した。PDHキナーゼ活性の上昇は、PDH複合体を不活性化するので、糖尿病ラットにおけるPDH複合体の活性型の減少はPDHキナーゼの活性の増加により説明できると考えられる。さらに、高食塩食摂取による糖尿病ラットのPDHキナーゼ活性上昇のメカニズムとして、血清遊離脂肪酸濃度の上昇が関与していると考えられる。すなわち、血清遊離脂肪酸濃度の上昇は、組織におけるその酸化を促進しアセチル-CoAを増加する。アセチル-CoAはPDHキナーゼの活性化因子であることが明らかにされているので [12]、糖尿病ラットに対する高食塩食の影響はアセチル-CoAの増加を通して発揮されることが示唆される。

一方、PDHキナーゼのmRNA量は糖尿病ラットの高食塩食群でわずかではあるが有意に増加したので、糖尿病ラットの高食塩食摂取によるPDHキナーゼ活性の増加は、その酵素の遺伝子からの転写の増加によっても一部説明できると考えられる。

まとめ

本研究では、正常ラットにおける高食塩食摂取による尿中カルシウム排泄増加の機構と、ストレプトズトシンによる糖尿病ラットの尿中カルシウム排泄と心筋のPDH複合体活性に対する高食塩食摂取の影響を検討した。その結果、高食塩食摂取による尿中へのカルシウムの排泄増加は尿の酸性化と深く関係しており、さらにその排泄は糖尿病と高食塩食摂取の組み合わせにより著しく増加することが明かとなった。また、糖尿病ラット心筋のPDH複合体活性は高食塩食摂取により著しく低下したので、糖尿病ラットの心筋におけるグルコース代謝は、高食塩食摂取によりさらに抑制されることが示唆された。さらに、PDH複合体の活性低下はPDHキナーゼの活性上昇に因るものであることが強く示唆された。

しかしながら、本実験で用いたストレプトズトシン糖尿病は動物実験において極めて

一般的に用いられる糖尿病モデルであるが、いわばtype I型の糖尿病であり、全世界的に一般的であるtype II型の糖尿病に対する高食塩食摂取の影響は不明である。我々の予備的な実験において、耐糖能の低下した6 2週齢の老齢ラットに高食塩食を摂取させたところ、血糖と血清遊離脂肪酸濃度の低下、および心筋PDH複合体活性の上昇が観察された (Fig.12)。すなわち、インスリンは分泌されるが筋肉などのその感受性が低下するtype II型の糖尿病では、高食塩食摂取の影響がtype I型の糖尿病の場合とは逆にできる可能性を示唆している。よって、今後は老齢もしくはtype II型の糖尿病動物モデルを用いて高食塩食摂取の影響を検討する必要があると考えられる。

謝辞

本研究は、財団法人ソルト・サイエンス研究財団の特別プロジェクト研究として研究助成金を受けて行われた。ここにこれを表記し、財団に深甚なる謝意を表す。また、実験の終始にわたり協力していただいた名古屋大学医学部大学院生の中井直也氏に深く感謝する。

参考文献

1. Suzuki, M., Totsuka, Y., Hirawata, Y., and Shimomura, Y. (1993) Increased calcium excretion in urine by high salt diet intake in man and rat. In "Proceedings of Seventh Symposium on Salt", Vol. II, 383-388, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
2. Goulding, A., and Campbell, D.R. (1983) *J. Nutr.* 113, 1409-1414.
3. Goulding, A., and Campbell, D.R. (1984) *Mineral Electrolyte Metab.* 10, 58-62.
4. Lemann, J., Jr., Lennon, E.J., Goodman, A.D., Litzow, J.R., and Relman, A.S. (1965) *J. Clin. Invest.* 44, 507-517.
5. Lemann, J., Jr., Litzow, J.R., and Lennon, E.J. (1967) *J. Clin. Invest.* 46, 1318-1328.
6. Sutton, R.A., Wong, N.L.M., and Dirks, J.H. (1979) *Kidney Int.* 15, 520-533.
7. Asano, S., Kato, E., Yamauchi, M., Ozawa, Y., Iwasa, M., Wada, T., and Hasegawa, H. (1966) *Lancet* (1), 1245-1246.
8. Shimomura, Y., Suzuki, T., Saitoh, S., Tasaki, Y., Harris, R.A., and Suzuki, M. *J. Appl. Physiol.* 68, 161-165.
9. Popov, K.M., Kedishvili, N.Y., Zhao, Y., Shimomura, Y., Crabb, D.W., and Harris, R.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 26602-26606.
10. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
11. Donovan, D.S., Solomon, C.G., Seely, E.W., Williams, G.H., and Simonson, D.C. (1993) *Am. J. Physiol.* 264, E730-E734.
12. Behal, R.H., Buxton, D.B., Robertson, J.G., and Olson, M.S. (1993) *J. Nutr.* 13, 497-520.

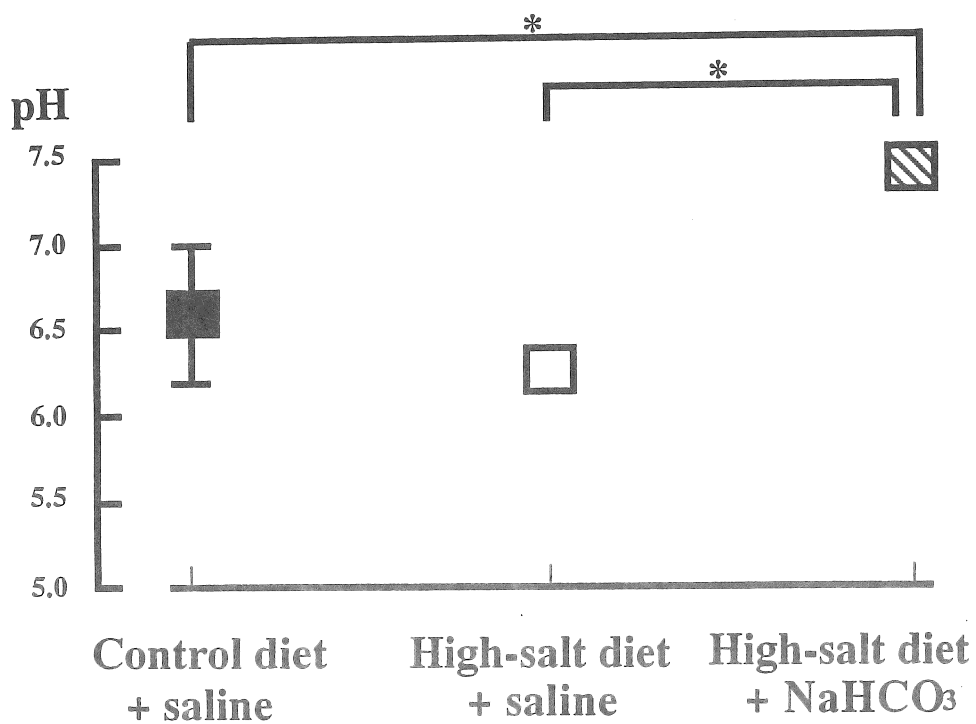


Fig. 1. Urinary pH.
Values are means \pm SEM. *P<0.05.

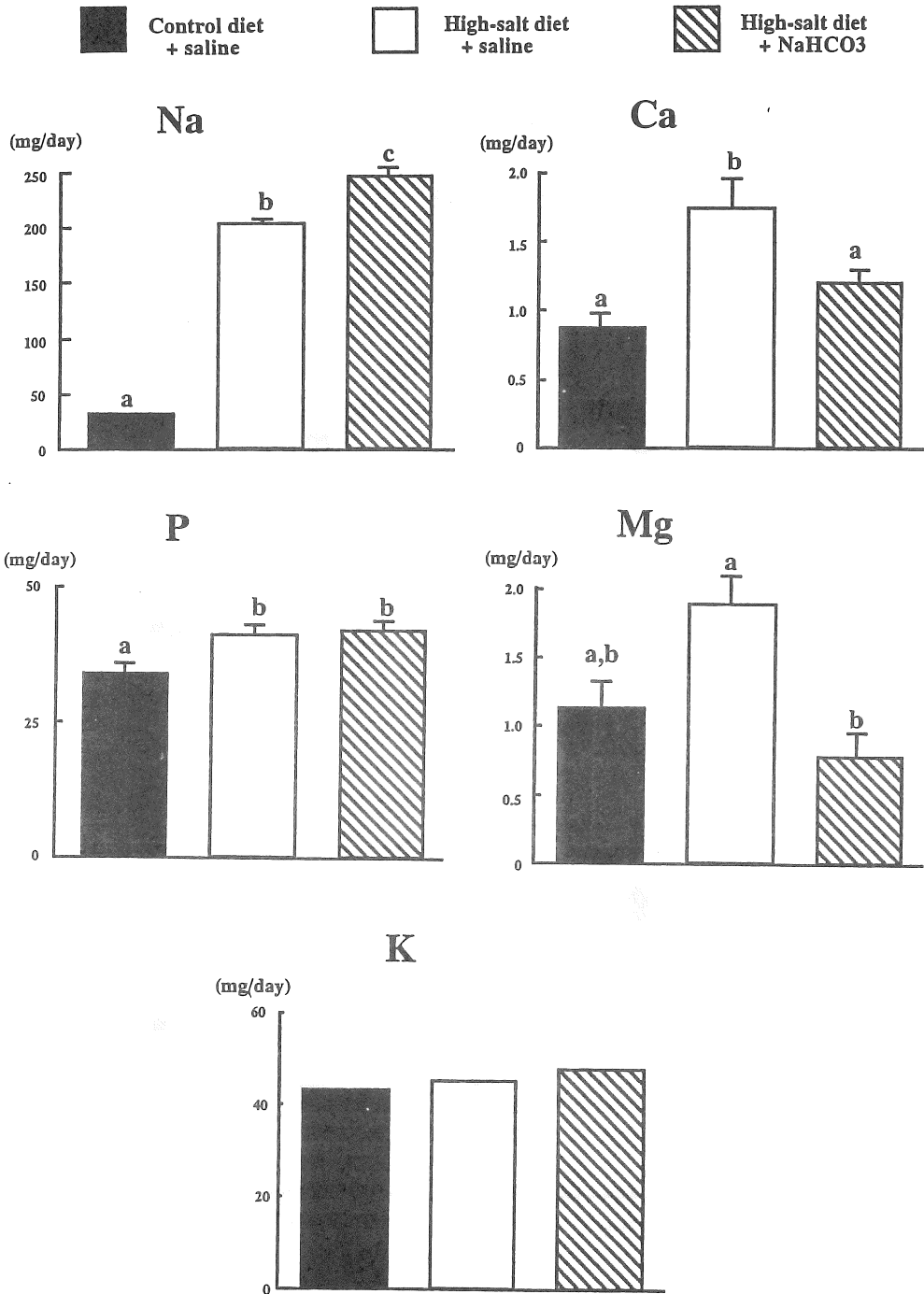


Fig. 2. Na, Ca, P, Mg and K excretion in urine. Values are means \pm SEM. Values not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

Control diet + saline
 High-salt diet + saline
 High-salt diet + NaHCO₃

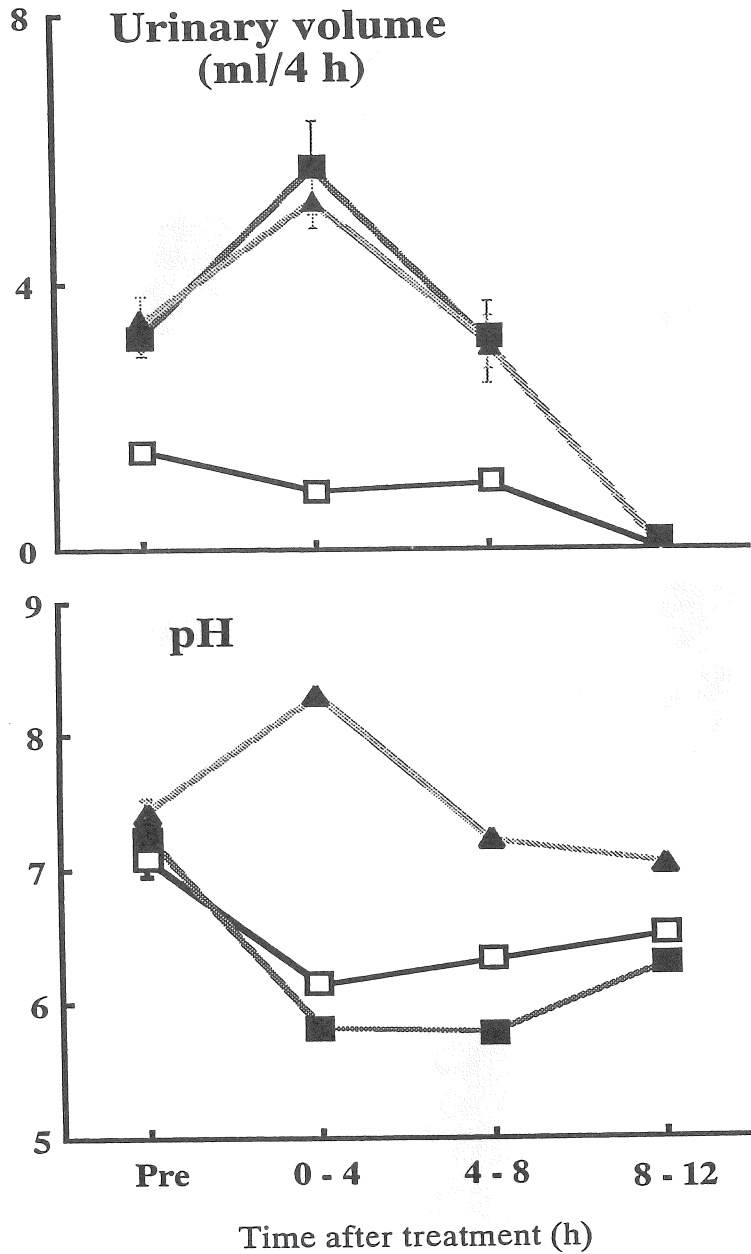


Fig. 3. Urinary volume and pH.
 Values are means \pm SEM.

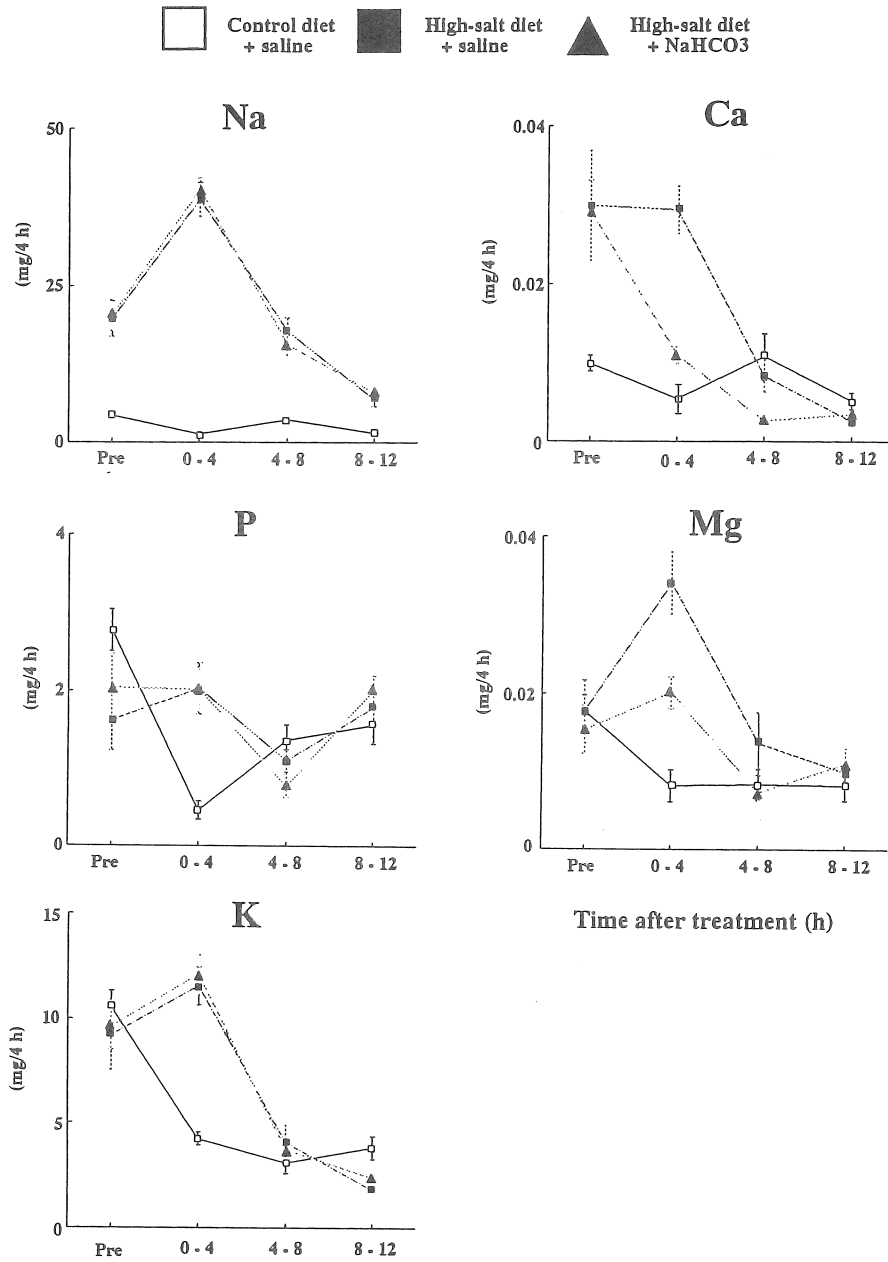


Fig. 4. Na, Ca, P, Mg and K excretion in urine. Values are means \pm SEM.

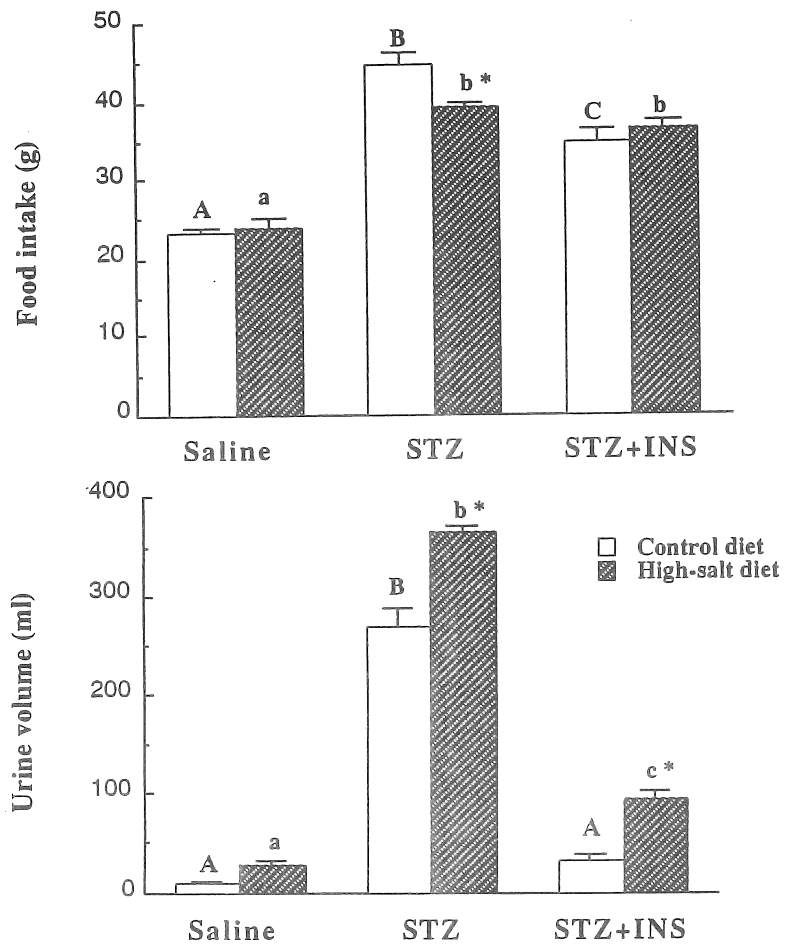


Fig. 5 Food intake and urine volume of rats fed a control and a high-salt diet. Values are mean \pm SEM. Values not sharing a common letter in each diet group are significantly different ($P < 0.05$). *Significantly different from the corresponding control diet group ($P < 0.05$). Saline, normal rats; STZ, streptozotocin-induced diabetic rats; and STZ + INS, STZ-diabetic rats treated with insulin.

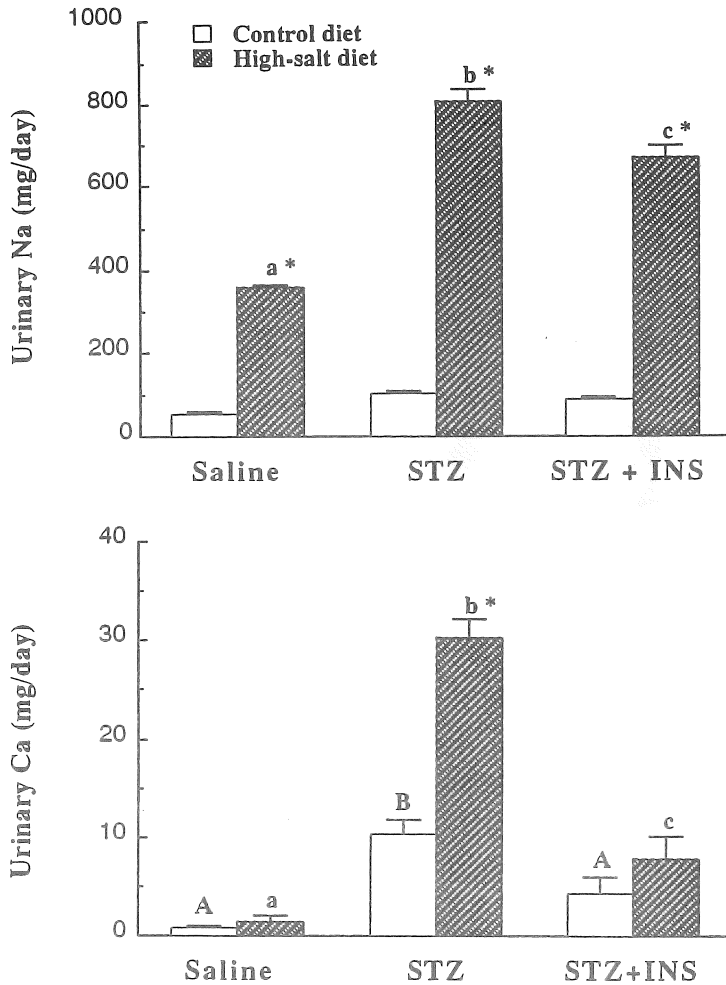


Fig. 6. Sodium and calcium excretion in urine. Values are means \pm SEM. Values not sharing a common letter in each diet group are significantly different ($P < 0.05$). *Significantly different from the corresponding control diet group ($P < 0.05$). Saline, normal rats; STZ, streptozotocin- induced diabetic rats; and STZ + INS, STZ-diabetic rats treated with insulin.

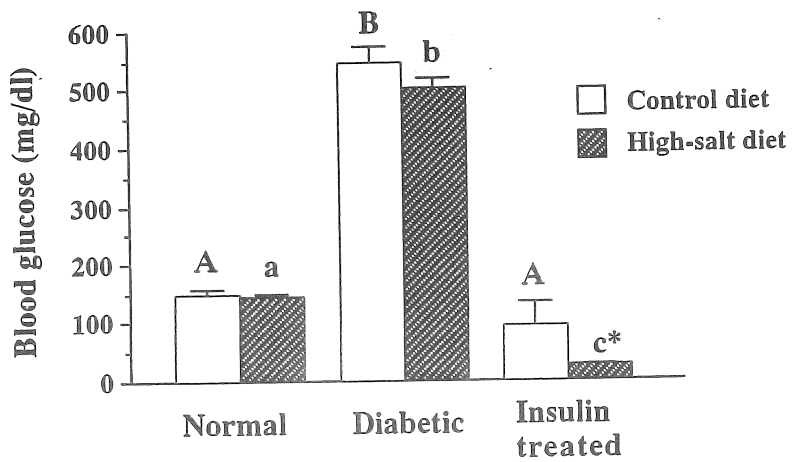


Fig. 7. Blood glucose.

Values are means \pm SEM. Values not sharing a common letter in the same diet group are significantly different ($P < 0.05$).

*Significant difference from control diet group.

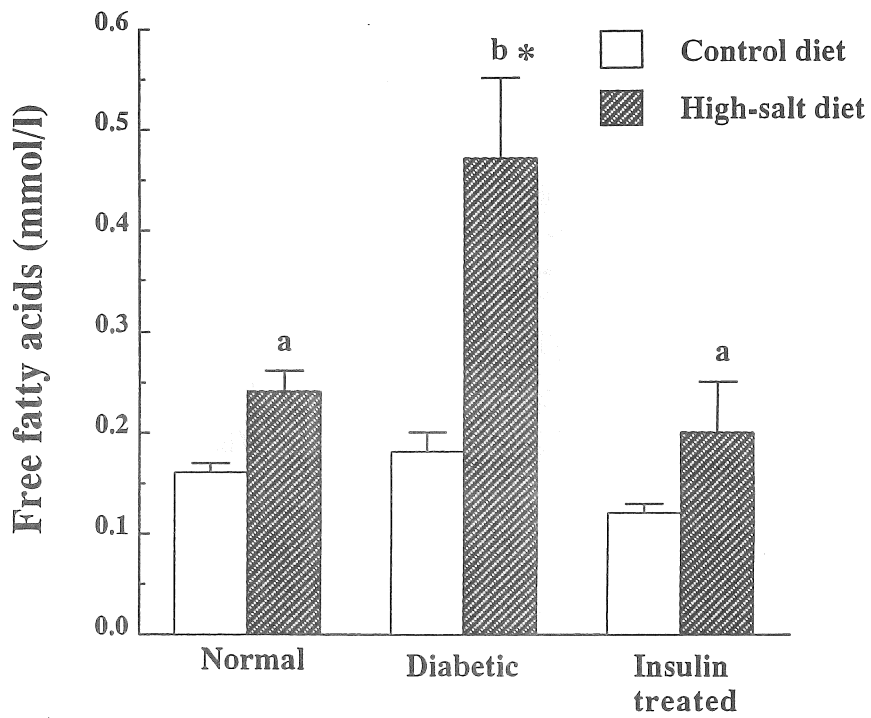


Fig. 8. Serum free fatty acid concentration. Values are means \pm SEM. Values not sharing a common letter in the same diet group are significantly different ($P < 0.05$). *Significant difference from control diet group.

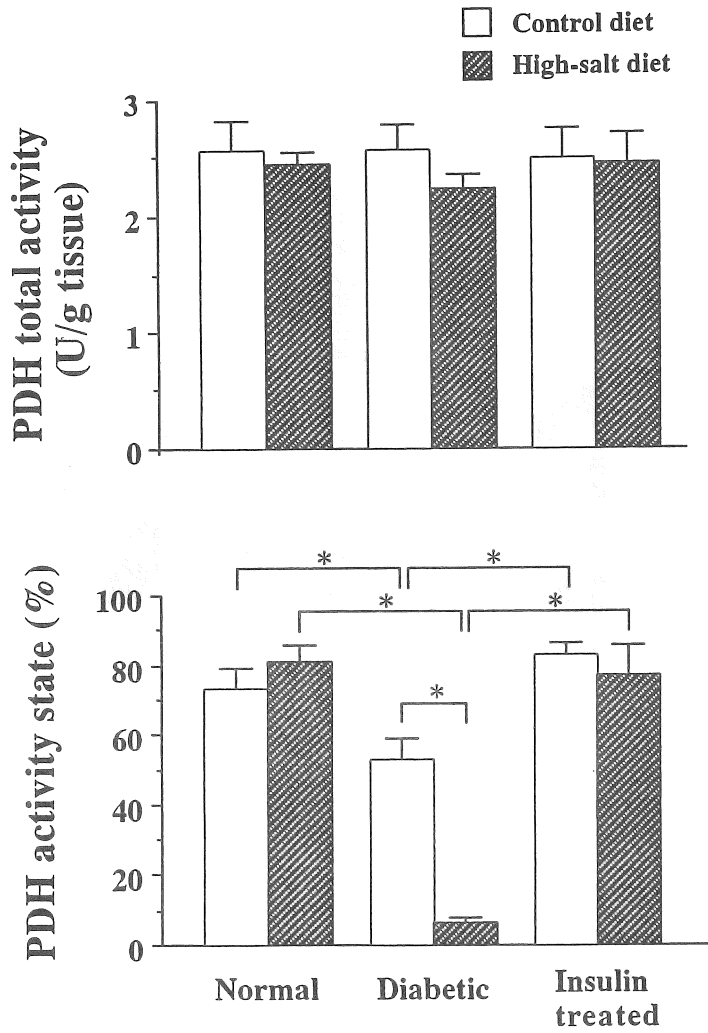
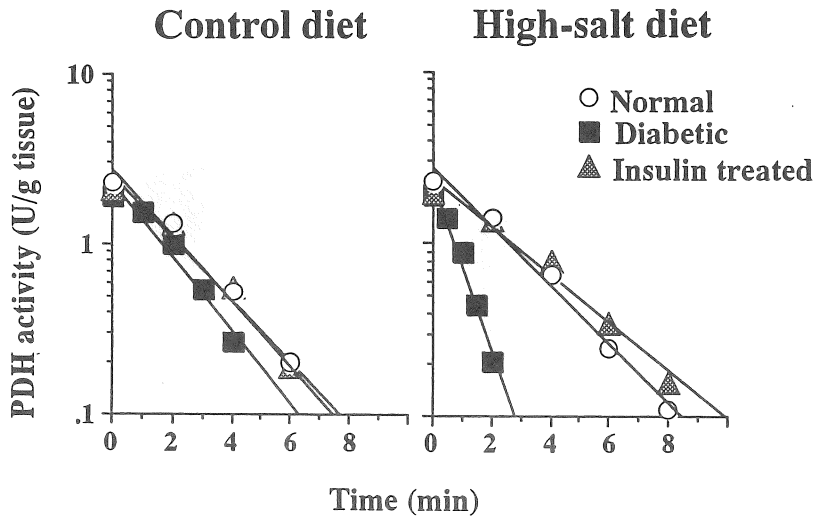


Fig. 9. Total activity and activity state of PDH complex. Values are means \pm SEM. *P<0.05.

PDH inactivation by kinase in the presence of ATP
(Typical data)



PDH kinase activity
(Summary)

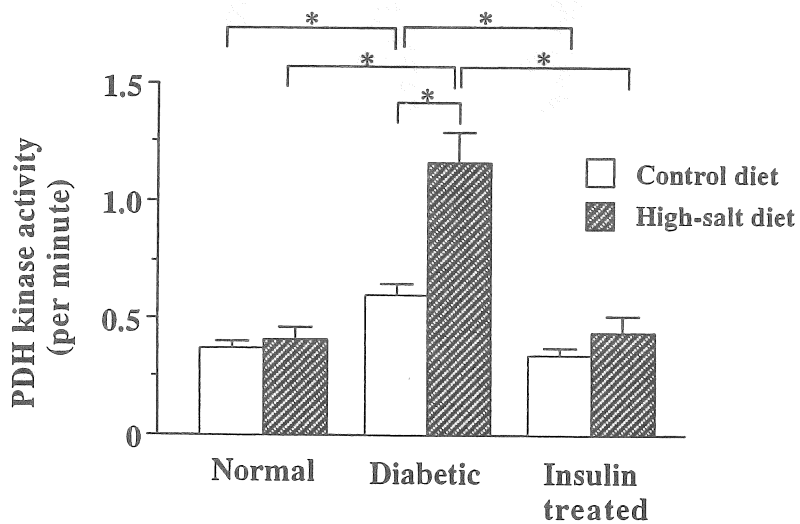


Fig. 10. PDH kinase activity in rat heart. Values are means \pm SEM. *P<0.05.

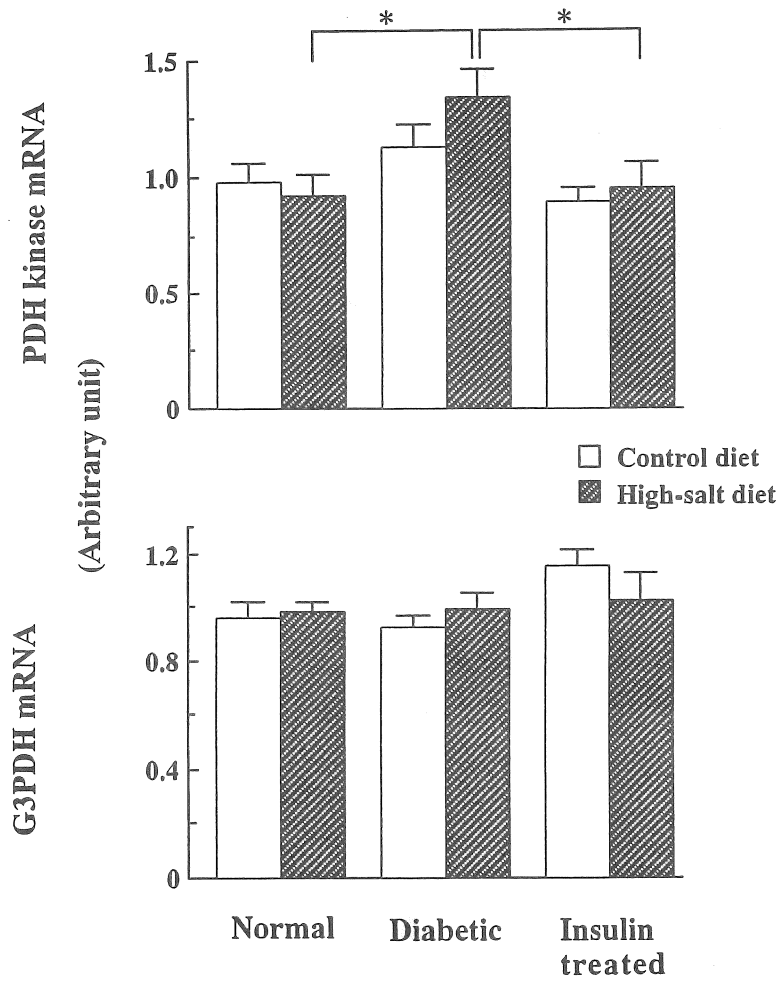


Fig. 11. mRNA levels of PDH kinase and G3PDH. Values are means \pm SEM. *P<0.05.

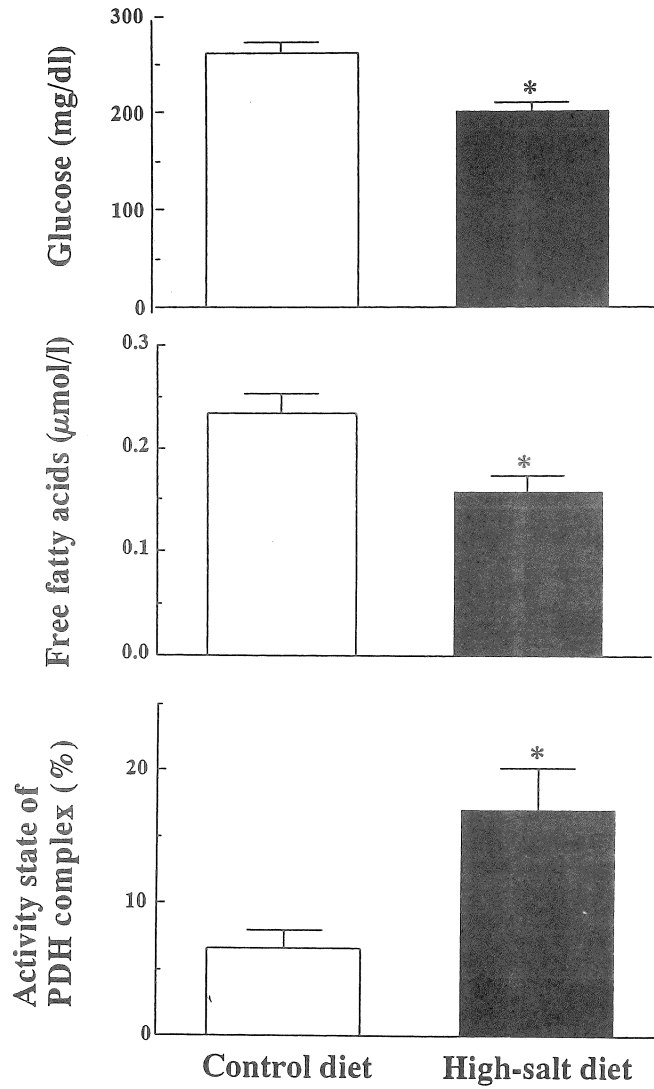


Fig. 12. Blood glucose and serum free fatty acid concentrations, and activity state of heart PDH complex in 62 weeks old rats. Values are means \pm SEM. *P<0.05.

尿中Ca排泄からみたNa(NaCl)の適正摂取量の推定（ヒト）

助成研究者：西牟田 守（国立健康・栄養研究所）
共同研究者：児玉 直子（国立健康・栄養研究所）

はじめに

ナトリウム（Na）は食塩の主成分であり、ヒトにおいて必須栄養素である。ナトリウムはその生理的分布特性¹⁾から細胞外ミネラルであるとともに、骨ミネラルである。細胞外液のNa濃度は恒常性が維持されており、体内におけるNaの過不足は1)細胞外液量の変化、2)細胞内のNa濃度の変化、に加え、3)骨中のNa存在量の変化の何れかとして反映される。

生理的条件下では、摂取したNaに見合うNaの排泄が腎臓または皮膚汗腺を経由して行われておりNaの過不足は起こらないとされている。

非生理的条件下では、Naは水とともに細胞外液に貯留し、浮腫（むくみ）として認識されている。しかし、細胞内または骨Naの挙動に関しては注目されないままであった。

しかし、食塩摂取量一日6gの条件でややきつい運動を連日負荷し、腕汗中のNa、カリウム（K）、カルシウム（Ca）、マグネシウム（Mg）の濃度を測定すると、Naの濃度は低いレベルであったのに対し、Kは食塩制限しない場合と同濃度であり、CaとMgの濃度は漸増した²⁾。この結果の解釈として、Naの供給量が必要量に満たない場合には、骨に貯蔵されているNaが動員され、Naの恒常性は維持されるが、同時に骨からCaとMgも動員され、それらの一部は汗などから排泄されるという仮説を提唱した。

この仮説を検証し、かつ運動の影響を調べる目的で、食塩の摂取量を一日6gとし、軽運動を連日負荷し、Na、Ca、Mgの出納を測定すると、Naの出納は僅かに負となり、CaとMgの出納は明らかに負となり、前記仮説は支持された。しかし、軽運動によっては汗中のミネラル濃度は大きくは変動しなかった³⁾。

そこで、本研究の実験1では、食塩摂取量を一日6gまたは12gに設定し、クロスオーバー方式で食塩摂取量を変化させ、食塩摂取量の違いがカルシウムとマグネシウムの代謝出納に及ぼす影響を測定した。

また、実験2では、マグネシウムの摂取量を一日160mgと340mgに設定し、マグネシウム摂取量の違いがカルシウム、ナトリウムの代謝出納に及ぼす影響を測定した。

方 法

実験 1.

被検者は、あらかじめ実験内容の説明を受け、書類により実験への参加を希望した、大学生女子7名である。被検者の身体特性（平均±標準偏差）は年齢 21 ± 1 歳、身長 158 ± 3 cm、体重 52 ± 9 kgであった。実験は冬期の17日間（正味15日間）、国立健康・栄養研究所被検者実験棟に被検者を宿泊させ、実施した。そのうち10日間を出納実験にあて、その前の2日間（pre）、と後の3日間は予備期間とした。また、出納期間は一期5日の2期（step 1、step 2）に、被検者はA（3人）、B（4人）グループにそれぞれ分割した。

食事は一期5日のサイクルメニューとし、1日の食塩摂取量は5gまたは11gとし、preでは全員11g、postでは全員5gとし、step 1ではAグループ11g、Bグループ5g、step 2ではAグループ5g、Bグループ11gとし、出納期間の食塩摂取量をクロスオーバー法で変化させた。

運動は、実験期間中、採血をしない日に一日一回一時間、目標心拍が得られるように負荷強度が設定されるブリジストン社製自転車エルゴメータにより実施した。予備期（pre）に予め運動負荷試験を行い、推定式に従い最大酸素摂取量の50%、ならびに65%に相当する心拍数を計算し、前者を弱運動、後者を強運動時の心拍数とし、それぞれの被検者がその心拍となるように運動負荷強度を調節した。弱運動は各期の第2、3日目に60分、強運動は各期の第4、5日目に40分それぞれ行った。

実験 2.

被検者は、あらかじめ実験内容の説明を受け、書類により実験への参加を希望した青年男子10名である。被検者は身長体重が等しくなるようにA、Bの二群に分けた。それぞれの群における被検者の身体特性（平均±標準偏差；A、B）は年齢（ 20 ± 1 、 21 ± 1 歳）、身長（ 174 ± 9 、 171 ± 7 cm）、体重（ 63 ± 5 、 66 ± 8 kg）であった。実験は17日間（正味15日間）、実験1と同様に実施した。そのうち8日間を出納実験にあて、その前の4日間（pre）、後の3日間（post）は予備期間とした。また、出納期間は一期4日の2期（step 1、step 2）に分割した。

食事はマグネシウムの摂取量をできる限り制限した一期4日のサイクルメニューとし、1日の食塩摂取量は8gとした。また、B群には酸化マグネシウム300mg（マグネシウムとして180mg）を分3で食事時間中に補足した。

なお、両実験とも起床時および就寝時には体重および身長を測定し、また、実験1では運動の前後で体重を測定し（感量10g）運動時の発汗による無機質の損失を推定した。

食事は、両実験とも食塩以外の栄養素供給量は栄養所要量⁴⁾を充足させ

ることとし、各被検者に均等に栄養素が供給できる食品を選択し献立を作成し、脱イオン水を用いて調理し、供給した。また、あらかじめ栄養素供給量に関しては四訂日本食品標準成分表⁵⁾ (成分表)を用いて算出した。飲水は脱イオン水の自由摂取としたが、摂取量は記録した。また、各食事ごとに陰膳を採取した。陰膳は秤量後ミキサーで攪拌均一化し、その20.0gを4本、予め王水処理をしたポリプロピレン容器に収納し、その5%に相当する濃硝酸を加え室温保存した。

糞便は各出納期間およびpostのそれぞれ第1日目の朝食直前に色素(カルミン)を服用し、各出納の食事に由来する糞便を識別し、出納期間の食事に由来する糞便を全量採取した。採取後の処理法は食事と同様としたが、試料は40.0gずつ収納した。

尿は午前8時30分を一日の区切りとして、起床(午前7時)から朝食(午前8時30分)までに産成された尿を分離採取し、その他は蓄尿し、実験期間中の24時間尿を全量採取した。また、出納期間中の第2、4日目には分割尿を採取した。尿試料は、尿量測定後、その一部を冷凍保存した。

血液は各出納期およびpostの第一日早朝空腹時に肘静脈より採取した。採血直後にその1.0mlを全血試料とし、残りは血清分離した。また、血清の一部は限外濾過フィルター(セントリコン10、グレース社)を通し試料とした。

さらに、実験1では、運動時に腕汗を採取し、0.1 μ mポアサイズの膜フィルター(フロロポア、住友電工)で濾過した後試料とした。

得られた試料は、必要に応じて硝酸と過酸化水素水による湿式灰化をおこない、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)、亜鉛(Zn)、鉄(Fe)、マンガン(Mn)、銅(Cu)(以上原子吸光法)、りん(P)(モリブデンブルー法)を測定した。

統計処理は一元分散分析後、対応のあるまたは対応のないt-検定を行い、危険率5%以下の場合に有意差ありと判定した。

結 果

人体における諸物質の代謝出納を生理学的に考察する場合には、それらの相互作用を広い角度から検討する必要がある。そこで、測定可能な物質に関しては、できる限り定量化して、検討してきた。しかし、本報告書では、ナトリウム(食塩)またはマグネシウムの摂取量を変化させ、それらがその他のミネラル代謝に影響を及ぼすか否かを検討することが目的であるので、直接関与する結果についてのみ記述する。

1. 食事による栄養素供給量

実験 1

使用した食品のうち、「牡蛎の干物」および「スモークレバー」は成分表に代用できる食品が収載されていないためにミネラルを別途測定し、測定したミネラルについてのみ供給量を計算値に加算した値である。

表 1 実験 1 の栄養素供給量 (1 日当たり)				
	計算値		測定値	
エネルギー	1700	kcal		
タンパク質	75	g		
炭水化物 (糖質)	230	g		
脂 質	47	g		
Na (食塩相当量)	5.5	g	4.9	g
K (カリウム)	2.7	g	2.2	g
Ca (カルシウム)	750	mg	650	mg
Mg (マグネシウム)	220	mg *	215	mg
P (リン)	1200	mg	1180	mg
Fe (鉄)	12	mg	11	mg
Zn (亜鉛)			13	mg
Cu (銅)			2.2	mg
Mn (マンガン)			2.9	mg

* 四訂成分表の灰分と食塩相当量から算出 (文献 4)

実験 2

マグネシウムの摂取量をできる限り制限した食品構成となったために、被検者のエネルギー所要量（20代男子生活活動強度：軽い）⁴⁾より低いエネルギー摂取量となった。

表 2 実験 2 の栄養素供給量（1日当たり）				
	計算値		測定値	
エネルギー	2,000	k c a l		
タンパク質	70	g		
炭水化物（糖質）	290	g		
脂 質	55	g		
Na（ナトリウム）		g	3200	mg
K（カリウム）		g	2000	mg
Ca（カルシウム）		mg	680	mg
Mg（マグネシウム）		mg	150	mg
P（リン）		mg	1200	mg
Fe（鉄）		mg	10	mg
Zn（亜鉛）			11	mg
Cu（銅）			1.9	mg
Mn（マンガン）			3.2	mg

2. 血液、尿および糞便中排泄量の経日変化

実験 1

(Na)

実験 1 では、実験期間中に食塩摂取量が増加しており、それに伴って尿中食塩排泄量も増加した (図 1)。そこで、食塩摂取量をもとに step1 と step2 のデータを合成し図示したところ、摂取量が多い場合に尿中排泄量も有意に高かった (図 2)。

(Ca)

Ca の摂取量は実験期間中変化していないが、食塩摂取量の変化に伴って尿中排泄量が増加した。そこで、食塩摂取量をもとにデータを合成したところ、食塩摂取量が多い場合に Ca の尿中排泄量が高かった (図 3)。Ca の場合には腸管での吸収が制御されているので、糞中排泄量を測定し、出納結果として表示したところ、糞中排泄量には一定の傾向は見られなかった (図 4)。

(K)

K の摂取量も実験期間中変化していないが、食塩摂取量をもとにデータを合成したところ、食塩摂取量が多い場合に K の尿中排泄量が高かった (図 5)。また、出納結果は汗中の排泄量を加味して検討した。2 名の被検者では食塩摂取量が高い場合に糞中排泄量が低下し吸収量が増加したが、そのほかの被検者では step 間で吸収量の大きな違いは観察されなかった (図 6)。

(Mg)

Mg の摂取量は 215mg/d であったが、尿中排泄量は個人差が多かったが、食塩摂取量によってデータを合成しても、食塩摂取量の違いによっては、尿中排泄量は有意な変化を示さなかった (図 7)。また、出納はほぼ 0 となった (図 8)。

(P)

P の摂取量はほぼ 1200mg/d であったが、食塩摂取量によってデータを合成すると、第 3 日目の尿中排泄量は食塩負荷時の方が有意に高かったが、全体で比較すると有意差はなかった (図 9)。また、出納結果は個人差が大きかった (図 10)。

以上実験 1 の結果をまとめると、食塩摂取量 11mg/d と 5mg/d のデータを比較すると、出納上は有意な変化は認められなかった。しかし、尿中排泄量は、Na, K, Ca では全体的に、P では部分的に 11mg/d の方が尿中排泄量は有意に高かった。また、Mg の尿中排泄量と出納は、食塩摂取量の有意な影響を受けなかった。

実験 2

1. Mg供給量の多寡に関する検討

1) 血清中Mg濃度について

血清Ca, Mg, iPの経日変化を図11に示した。血清Mg濃度は、両群とも、また、いずれの採血によっても正常レベルであり、2群間に有意差は認められなかった。また、経時変化では、Mg非補足群で、2回目の採血では、1回目、3回目と比較して有意な低値であり、4回目は1回目と比較すると有意に低値であった。Mg補足群では、4回の採血のいずれにおいても有意な変化はみられなかった(図11)。

2) 尿中Mg排泄量について

全実験期間における尿中Mg, Ca, P, Na, K排泄量の推移を図12に示した。実験3日目より尿中Mg排泄量は、Mg摂取レベルの違いによる差がみられ、Mg補足群は、Mg非補足群と比較して有意に高い値を示し、これは全実験期間を通して観察された。さらに図13に各期間ごとの変化を検討するため期間ごとの平均値で示した。予備期間(Post)は他の期間と比較して日数が1日少ないため、それぞれはじめの3日間の平均値で比較した。Mg補足群では、Preに比してStep 1で有意に高い値を示し、その後は低下する結果が得られたのに対し、Mg非補足群では、Preに比してStep 1, Postで有意な減少がみられた。

3) Mgの出納について

出納測定期間のMg, Ca, P出納を図14に示した。Mgの出納は補足群、非補足群ともにほぼ平衡状態であり、摂取量と排泄量はほぼ等しかった。

従って、本実験のMg非補足群におけるMg供給レベルは最低必要量よりは多いレベルであったものと考えた。

2. Na出納に関する検討

ナトリウム(Na)の摂取量は両群とも3200mg/d(食塩相当量として約8g/d)であり、これまで食塩制限実験と比較すると供給量は多かった。

尿中Na排泄量は、供給量に比較するとやや低値であったが、Mg補足群では非補足群に比較すると低値傾向となった(図12)。Naの場合には、糞便への排泄は僅かであり、出納を計算してもこの傾向は変わらなかった。

従って、食塩摂取量一日8gは、本実験の他の条件の範囲内では充分量であったものと考えられ、Mg摂取レベルが充分量であったと考えられるMg補足群では生理的貯蔵庫である骨に蓄積されたものと考えた。

3. Ca出納に関する検討

カルシウム(Ca)の摂取量は、両群とも680mg/dであり、最低必要量、および、我が国の栄養所要量を充足したものであった。

尿中Ca排泄量は、食塩制限(食塩1日6g)の場合より少なく、食塩制限をしていない他の実験と同レベルであるが、本実験の両群を比較するとMg補足群のCa尿中排泄量は非補足群に比較して低値であった(図12、13)。吸収量は両群でほぼ等しかったので、蓄積量はMg補足群で大きい傾向にあった(図14)。

以上実験2をまとめると、Mg摂取量150mg/dの場合も、330mg/dの場合もMgの出納は維持された。Mgの尿中排泄量、糞便中排泄量は330mg/dの場合が150mg/dの場合より高値であった。骨を構成するNaの尿中排泄量はMgの補足によって一過性に抑制傾向となったが、Kの尿中排泄量はMgの補足によって、逆に、一過性に増加傾向となった。また、Caの尿中排泄はMgの補足により低下傾向になった。しかし、Pの尿中排泄にはMg補足の影響は観察されなかった。

考 察

食塩(ナトリウム:Na)の適正な摂取量に関しては、摂取過剰が血圧上昇を来す場合があることから、その上限を検討する研究が一般的である。また、最低必要量に関しては、食塩の欠乏症状がヒトにおいては明らかではなく、また、調味料として食塩を全く用いない人々が存在することから、少なければ少ない程良いとされてきた。

しかし、動物には塩に対する欲求(salt appetite)が存在し、牛を飼育する場合に、塩のブロックを放牧地に置く方策がとられている。

一方、恒常性維持機構が発動し、血漿のNa濃度は一定の範囲に保たれるために、血清のNaを測定することによっては、食塩の過不足は判定できない。

また、尿中Naを測定すると、通常は摂取に見合う尿中排泄があり、尿中Na排泄量を測定しても食塩の過不足は判定できない。ところが、体内で過剰となった物質や代謝された老廃物が尿中に排泄されるという誤った認識によって、尿中Na排泄を指標とし、尿中にナトリウムが排泄される限り、ナトリウムは不足していないと評価されてきた。

しかし、ナトリウムの場合、生理的貯蔵庫として骨が存在し、血漿のNa濃度または浸透圧を維持するために、体内のNaは血漿と骨の間を移行していると考えられる。その他に、非生理的条件下では細胞内のNa濃度が上昇したり、細胞外液量が増減することによって、血漿Na濃度の恒常性が維持

されているとも考えられる。

これまでに日本人青年を対象に、日本人の通常の食塩摂取レベルより明らかに少ない食塩摂取レベル（食塩として約6g/d:100mmol/d）の食事を供給しながら運動を負荷し、汗中のミネラル濃度を測定すると、Naの濃度が低値を示すとともに、Naと同様に骨を構成するカルシウム(Ca)とマグネシウム(Mg)の濃度が漸増し、血漿Na濃度の恒常性維持に骨のNaが動員される機構の存在が示唆されてきた²⁾。

実験1では、食塩摂取量をクロスオーバー方式で増減させ、食塩摂取量が低くなると骨のNaが動員され、Caの尿中排泄量が増加し、Caの出納が負となると想定した。しかし、食塩の摂取量が高い場合に尿中Ca排泄量有意に高くなり、作業仮説は棄却された。

実験1では、運動時の腕汗も測定したが、食塩摂取量が低下しても汗中のNa濃度は低下せず、CaとMgの濃度も上昇しなかった。また、Naの出納は食塩5g/dの場合に負となったが、Caの出納は明らかに正となった。したがって、実験1の被検者は内分泌系などの調節によって食塩5g/dの摂取によってNaの平衡を維持させたために食塩の不足状態とはならなかったと考えた。

食塩の摂取量が同じレベルでありながら、これまでの実験と異なりNaの出納が維持できたことは、被検者や実験時期（これまでの実験は夏期）Naの調節系が多くの因子から構成されており、これまでの実験と異なった調節系が関与したためと考えられるが、食塩摂取量が低い場合にCa出納が負になる条件を抽出することが今後の課題となろう。

実験2では、マグネシウム(Mg)の摂取レベルが、骨を構成する他のミネラルの出納に及ぼす影響を調べたところ、Mgの補足によって骨ミネラルのうち細胞外濃度の高いNaとCaの尿中排泄が低くなるとともに、細胞を構成するKの尿中排泄量が高くなる傾向が示された。

すなわち、骨を構成するミネラルはその代謝がそれぞれ独立しているのではなく、お互いに影響を及ぼしていることが示唆された。

これまでに、成人病危険因子である過食によってCa、Mg、Pの尿中排泄量が増大し、肉体的、精神的ストレスによってCaとMgの尿中排泄が増大することが明らかとなっているが、食塩の摂取低下がCaまたはMgの不足が関与する病態をさらに悪化させる因子となり得ると示唆される。食塩を含めミネラル摂取の過不足が健康に及ぼす影響については、来るべき高齢化社会を前に、緊急に解決すべき問題であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Nishimuta M: The concept (intra and extra cellular minerals). In Collery LA et al eds: Metal ions in Biology and Medicine. John Libbey Eurotext, Paris, 1990, pp. 69-74.
- 2) 西牟田守、他：運動時の汗中マグネシウム. マグネシウム 4：13-2 (1985)
- 3) 西牟田守、他：(未発表)
- 4) 厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：第四次改定日本人の栄養所要量. 第一出版、東京 (1989)
- 5) 科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表. 大蔵省印刷局. 東京 (1982)

図の説明

図1 尿中Na排泄量の経日変化（実験1）

食塩摂取量を5g/d(Naとして2g/d)に減少させると、4日目まで漸減し、摂取レベル以下になるが、その後微増し、摂取レベルとなった。

図2 尿中Na排泄量の食塩摂取レベルによる変化（実験1）

図1を食塩摂取レベルをもとに合成した。第2日以降食塩11g/dの場合の尿中Na排泄量は有意に高くなった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (paired-t test)

図3 食塩摂取レベルをもとに合成した尿中Ca排泄量の変化（実験1）

尿中Na排泄量に有意差がある第2日以降では、尿中Ca排泄量も食塩11g/dの場合の方が有意に高くなった。

図4 Caの出納図（実験1）

縦軸(y)に尿中排泄量、横軸(x)に糞中排泄量を取り、各被検者の出納結果を個人ごと、食塩摂取量の異なるstepごとに示した。

尿中排泄量(y)+糞中排泄量(x)=摂取量、となる線分を同時に表示した。この線分より原点に近い領域に結果が示される場合には正の出納となる。

尿中排泄量は食塩11g/dの方が高いが、糞中排泄量では一定の傾向は示されない。

図5 食塩摂取レベルをもとに合成した尿中K排泄量の変化（実験1）

尿中Na排泄量に有意差のない第1日から、尿中K排泄量は食塩11g/dの場合の方が有意に高くなった。

図6 Kの出納（実験1）

尿中K排泄量は食塩11g/dの場合の方が高かったが、糞中排泄量が変わらなかった2名の被検者では出納が負となった。しかし、糞中排泄量が低下した2名の被検者では正の出納を維持した。

図7 食塩摂取レベルをもとに合成した尿中Mg排泄量の変化（実験1）

尿中Mg排泄量は食塩摂取レベルに影響されなかった。

図8 Mgの出納（実験1）

Mgの糞中排泄量、尿中排泄量のいずれも食塩摂取レベルに影響されなかったので、step1,2を合わせた出納結果を示した。尿中排泄量の多い被検者ではそれに見合う腸管からの吸収があり、被検者の出納は全員維持された。

図9 食塩摂取レベルをもとに合成した尿中P排泄量の変化（実験1）

尿中P排泄量は第3日のみ食塩摂取レベルに影響を受け食塩11g/dの場合の方が有意に高値となった。しかし、step全体では有意差は認められなかった。

図10 Pの出納（実験1）

Pの糞中排泄量、尿中排泄量のいずれも食塩摂取レベルに影響されなかったため、step1,2を合わせた出納結果を示した。Mgの出納と比較すると糞中排泄量、尿中排泄量のいずれもが狭い範囲に分布しているが、出納結果は個人差が多く、明らかな正負を示す被検者が存在した。

図11 血清Mg,Ca,P濃度（実験2）

Mg非補足群では、血清Mg, Ca濃度は実験開始後一過性に有意に低下した。また、4回目の血清Mgは1回目より有意に低値であった。しかしいずれも正常範囲にあった。

図12 尿中ミネラルの経日変化（実験2）

Mg補足群では尿中Mg排泄量は有意に高いが、K排泄量も高値傾向を示した。しかし、骨を構成するMg以外のミネラル(CaとNa)の尿中排泄量は逆に低値傾向を示した。しかし、両群間に有意差はない。

図13 期間ごとの尿中Mg,Ca,P排泄量の比較（実験2）

Mg補足群ではpreのCa排泄量が有意に高い。また、step1のP排泄量が両群とも有意に高い。

図14 出納期間の出納結果（実験2）

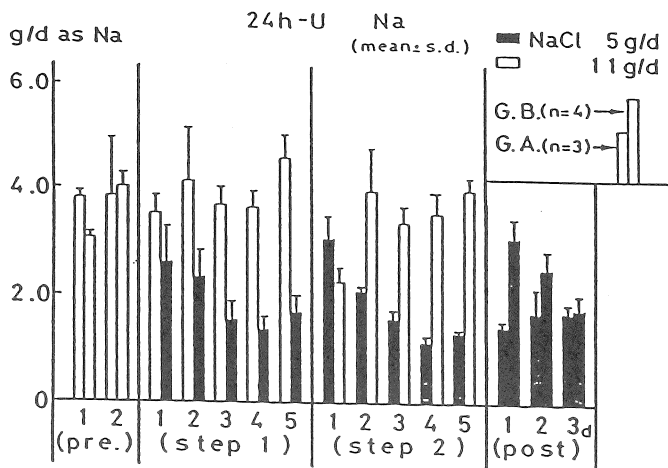


図1 尿中Na排泄量の経日変化(実験1)

食塩摂取量を5g/d(Naとして2g/d)に減少させると、4日目まで漸減し、摂取レベル以下になるが、その後微増し、摂取レベルとなった。

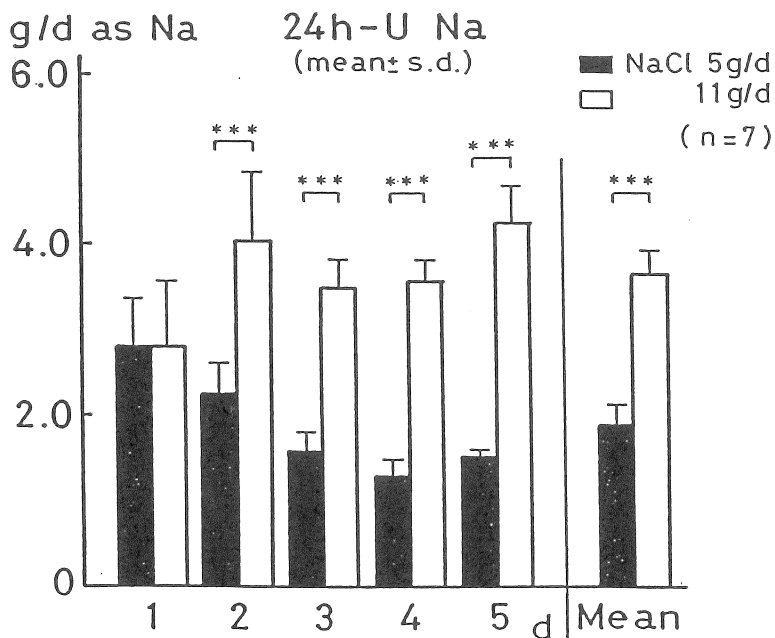


図2 尿中Na排泄量の食塩摂取レベルによる変化(実験1)

図1を食塩摂取レベルをもとに合成した。第2日以降食塩11g/dの場合の尿中Na排泄量は有意に高くなった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (paired-t test)

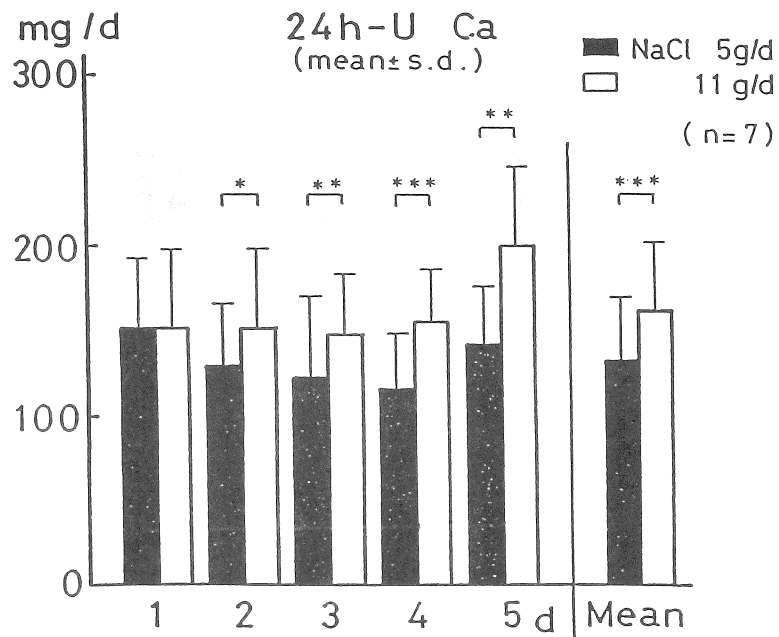


図3 食塩摂取レベルをもとに合成した尿中Ca排泄量の変化（実験1）
尿中Na排泄量に有意差がある第2日以降では、尿中Ca排泄量も食塩11g/dの場合の方が有意に高くなった。

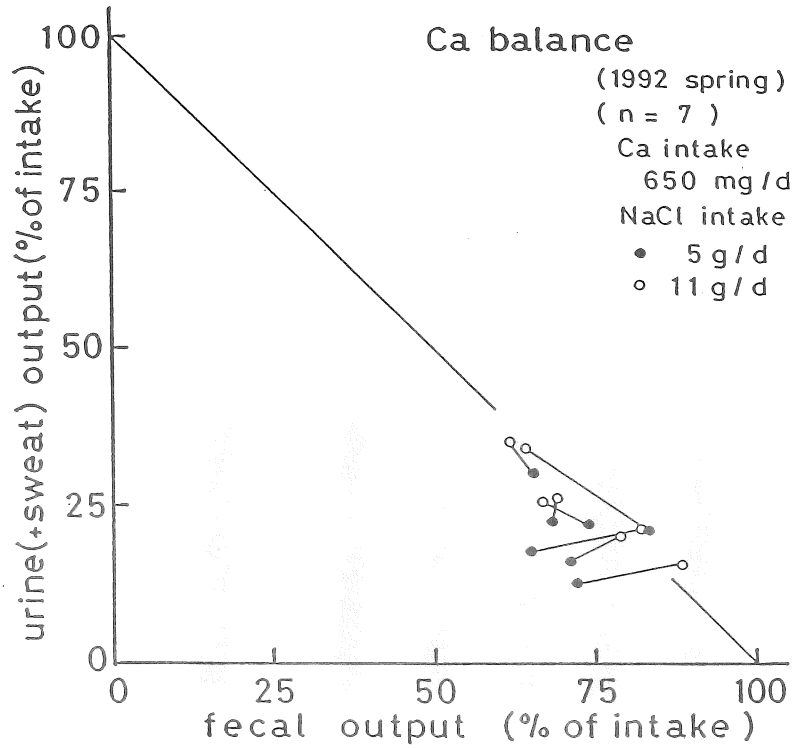


図4 Caの出納図(実験1)

縦軸(y)に尿中排泄量、横軸(x)に糞中排泄量を取り、各被検者の出納結果を個人ごと、食塩摂取量の異なるstepごとに示した。

尿中排泄量(y)+糞中排泄量(x)=摂取量、となる線分を同時に表示した。この線分より原点に近い領域に結果が示される場合には正の出納となる。

尿中排泄量は食塩11g/dの方が高いが、糞中排泄量では一定の傾向は示されない。

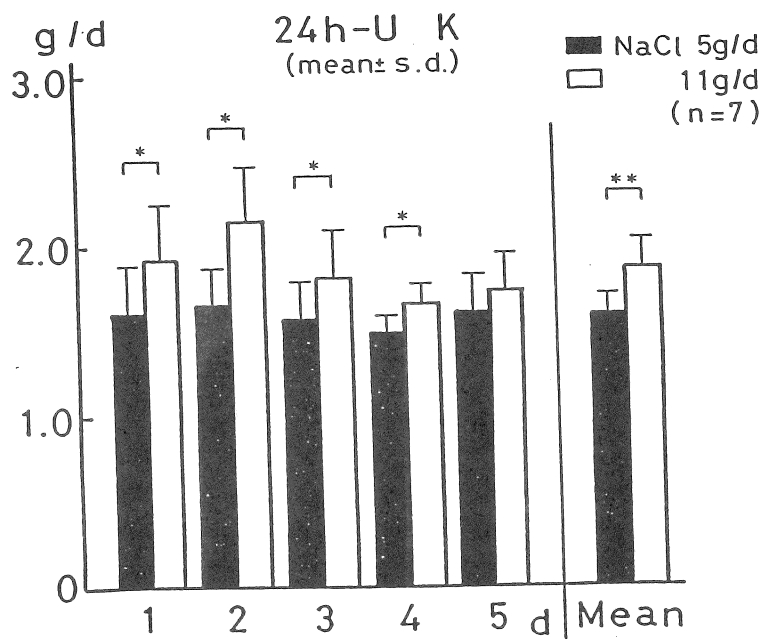


図5 食塩摂取レベルをもとに合成した尿中K排泄量の変化(実験1)
尿中Na排泄量に有意差のない第1日から、尿中K排泄量は食塩11g/dの場合の方が有意に高くなった。

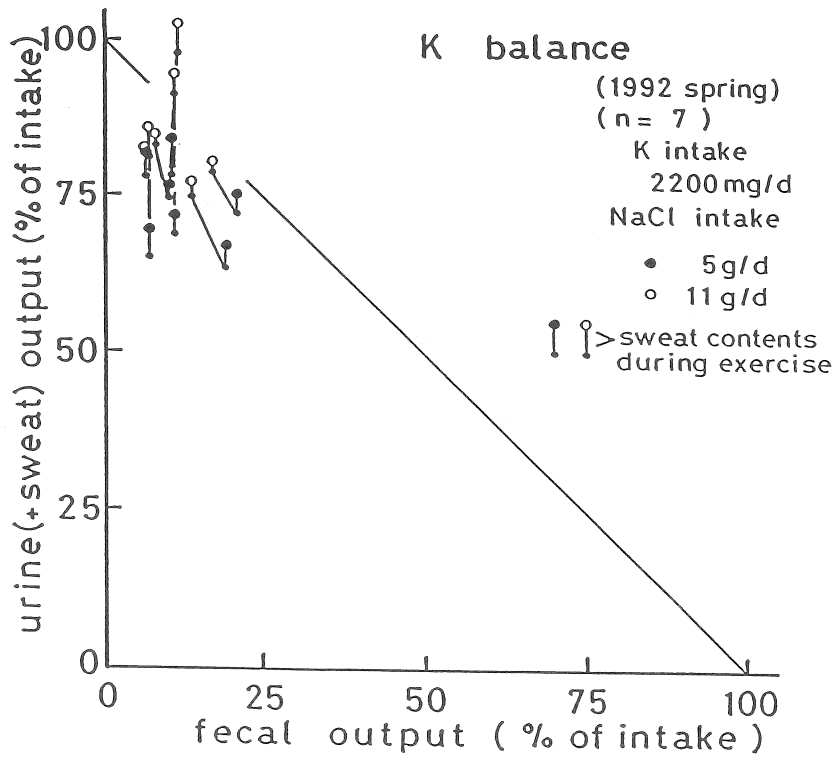


図6 Kの出納（実験1）

尿中K排泄量は食塩11g/dの場合の方が高かったが、糞中排泄量が変わらなかった2名の被検者では出納が負となった。しかし、糞中排泄量が低下した2名の被検者では正の出納を維持した。

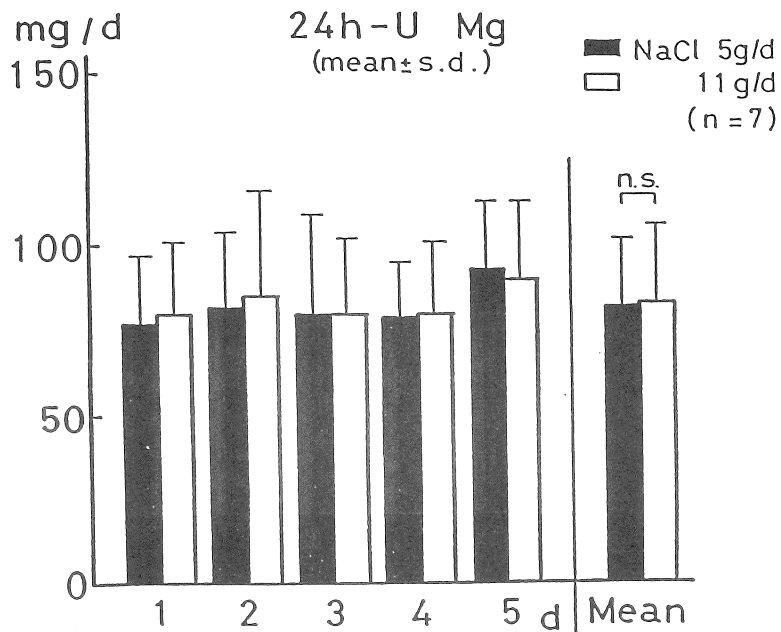


図7 食塩摂取レベルをもとに合成した尿中Mg排泄量の変化（実験1）
尿中Mg排泄量は食塩摂取レベルに影響されなかった。

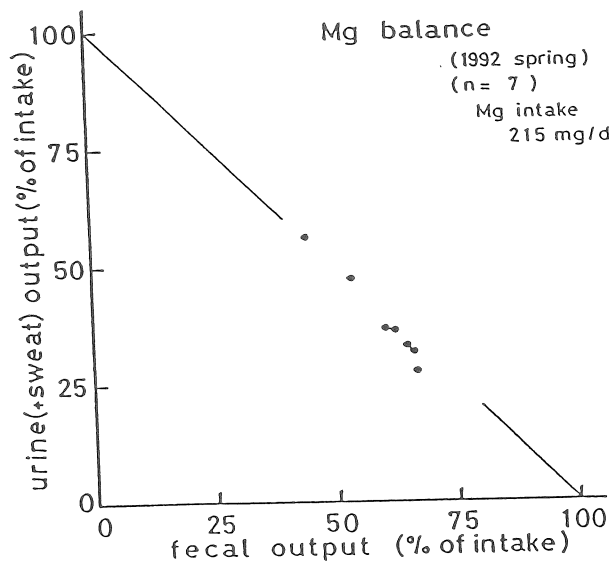


図8 Mgの出納（実験1）

Mgの糞中排泄量、尿中排泄量のいずれも食塩摂取レベルに影響されなかったため、step1,2を合わせた出納結果を示した。尿中排泄量の多い被検者ではそれに見合う腸管からの吸収があり、被検者の出納は全員維持された。

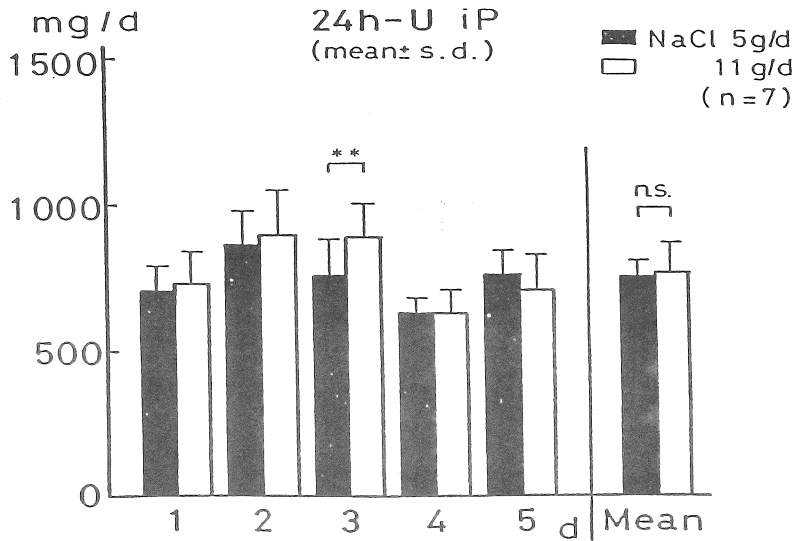


図9 食塩摂取レベルをもとに合成した尿中P排泄量の変化(実験1)
 尿中P排泄量は第3日のみ食塩摂取レベルに影響を受け食塩11g/dの場合の方が有意に高値となった。しかし、step全体では有意差は認められなかった。

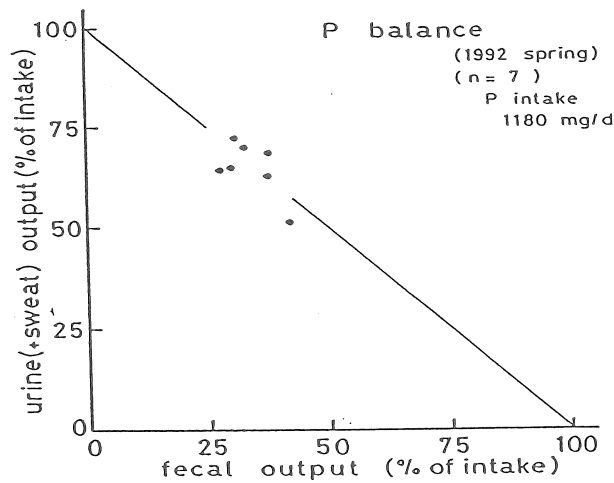


図10 Pの出納(実験1)
 Pの糞中排泄量、尿中排泄量のいずれも食塩摂取レベルに影響されなかったため、step1,2を合わせた出納結果を示した。Mgの出納と比較すると糞中排泄量、尿中排泄量のいずれもが狭い範囲に分布しているが、出納結果は個

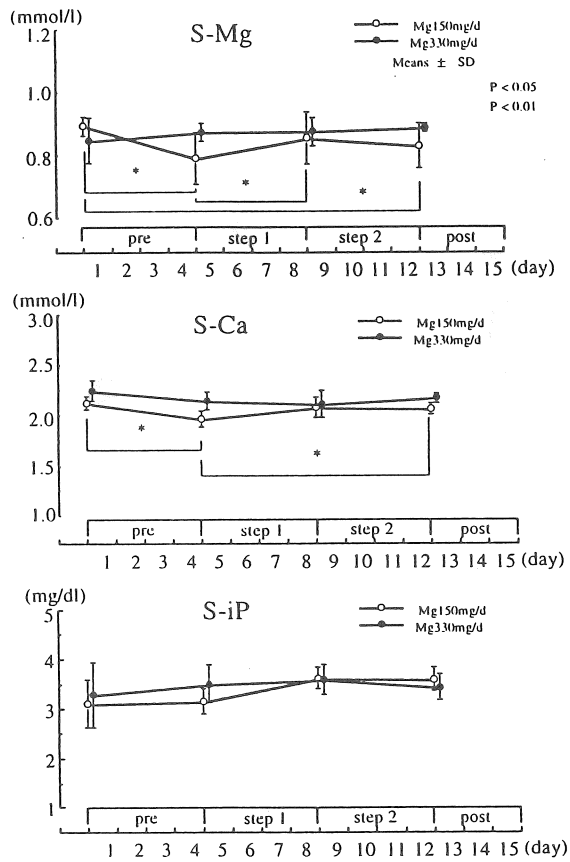


図11 血清Mg,Ca,P濃度 (実験2)

Mg非補足群では、血清Mg, Ca濃度は実験開始後一過性に有意に低下した。また、4回目の血清Mgは1回目より有意に低値であった。しかしいずれも正常範囲にあった。

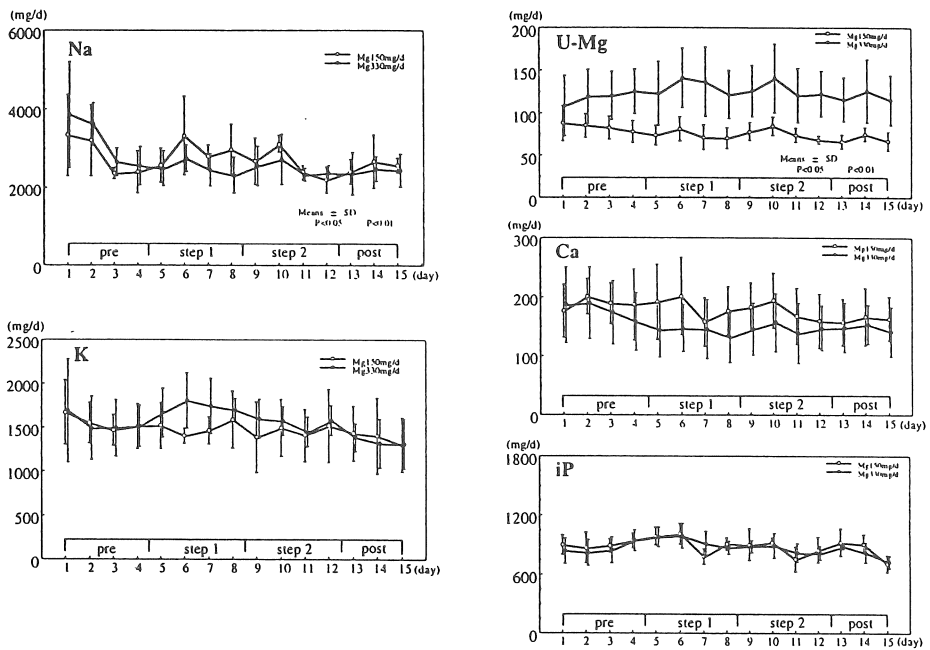


図12 尿中ミネラルの経日変化（実験2）

Mg補足群では尿中Mg排泄量は有意に高いが、K排泄量も高値傾向を示した。しかし、骨を構成するMg以外のミネラル(CaとNa)の尿中排泄量は逆に低値傾向を示した。しかし、両群間に有意差はない。

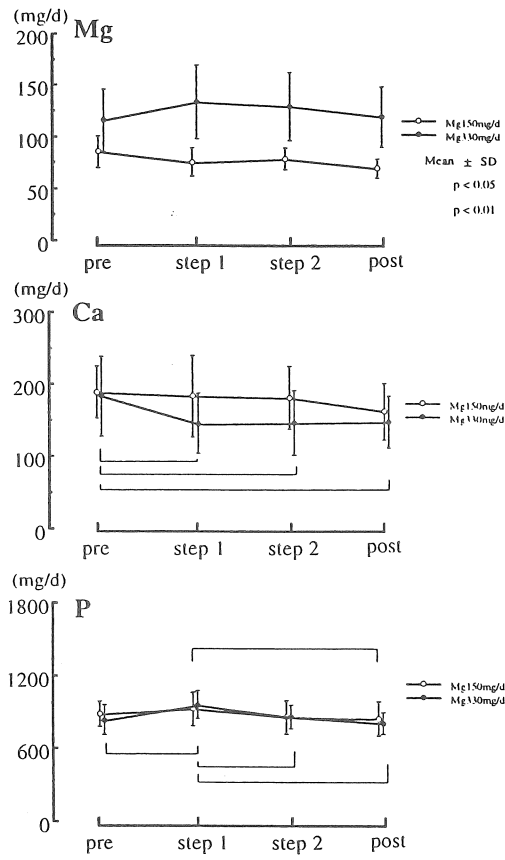
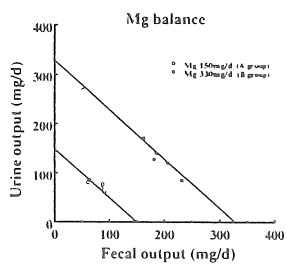


図13 期間ごとの尿中Mg,Ca,P排泄量の比較（実験2）

Mg補足群ではpreのCa排泄量が有意に高い。また、step1のP排泄量が両群とも有意に高い。



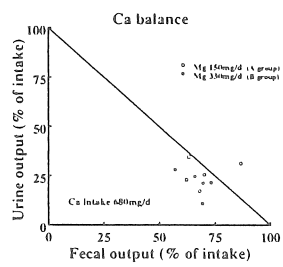
Result balance study for Mg

	Intake (mg)	Fecal output (mg)	Absorption (%)	Urine output (mg)	Retention (mg)
A group	154	74 ± 12	52 ± 8	75 ± 10	4 ± 10
B group	334	193 ± 26	42 ± 8	129 ± 31	11 ± 10

Values are mean ± SD

p<0.05

p<0.01



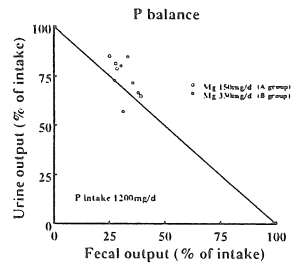
Result balance study for Ca

	Intake (mg)	Fecal output (mg)	Absorption (%)	Urine output (mg)	Retention (mg)
A group	673	473 ± 66	30 ± 10	178 ± 46	24 ± 90
B group	676	455 ± 41	33 ± 6	144 ± 43	76 ± 39

Values are mean ± SD

p<0.05

p<0.01



Result balance study for P

	Intake (mg)	Fecal output (mg)	Absorption (%)	Urine output (mg)	Retention (mg)
A group	1223	361 ± 68	70 ± 6	891 ± 66	-37 ± 66
B group	1223	411 ± 39	66 ± 3	895 ± 74	-91 ± 95

Values are mean ± SD

p<0.05

p<0.01

図14 出納期間の出納結果 (実験2)

プロジェクト 助成研究報告書 (生理学)
Project Research Report 1992-1994
physiology

平成8年3月
March, 1996

財団法人 ソルト・サイエンス研究財団
The Salt Science Research Foundation

〒106 東京都港区六本木 7-15-14 塩業ビル
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106 Japan

Tel. 03-3497-5711 / Fax. 03-3497-5712

プロジェクト 助成研究報告書 (生理学)
Project Research Report 1992-1994
physiology

平成8年3月
March, 1996

財団法人 ソルト・サイエンス研究財団
The Salt Science Research Foundation

〒106 東京都港区六本木 7-15-14 塩業ビル
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106 Japan

Tel. 03-3497-5711 / Fax. 03-3497-5712
