

9 8 3 3 食塩は動脈硬化発症を促進させるか？

助成研究者：国友 勝 (武庫川女子大学 薬学部)
 共同研究者：籠田 智美 (武庫川女子大学 薬学部)
 山口 優 (武庫川女子大学 薬学部)
 中村 一基 (武庫川女子大学 薬学部)

近年、長寿社会の到来とともに動脈硬化性疾患による死亡数が増加していることから、動脈硬化の研究ならびに治療薬の開発が益々重要となってきている。動脈硬化の成因には血管内皮細胞の機能障害が関与している。内皮細胞が放出する生理活性物質のうち、内皮由来血管拡張因子である一酸化窒素(NO)は、動脈硬化の発生を様々な面から防止する防御因子として注目されている。

我々はこれまでに、食塩感受性高血圧のモデルである Dahl ラットにおいて、高血圧の発症に伴い血管内皮細胞からの NO 放出が著しく低下すること、さらに高コレステロール食を負荷すると大動脈に動脈硬化の発症が生じることを報告してきた。しかし、このような変化は本態性高血圧のモデルである高血圧自然発症ラット (SHR) では生じないことから、高血圧ラットへの高コレステロール食負荷による動脈硬化発症には“高食塩摂取が関わっているのではないか”との考えに至った。

本研究では、SHR を用いて高食塩を摂取させたときの血管内皮および平滑筋機能の変化および食塩とコレステロールを過剰摂取させたときの動脈硬化発症の有無について検討し、以下のことを明らかにした。

- 1) SHR に高食塩食を 4 週間連日与えると、収縮期血圧は著明に上昇した。
- 2) 高食塩食摂取により、胸部大動脈において NO 産生の低下は生じず、平滑筋の NO に対する反応性の低下、すなわちグアニル酸シクラーゼを介する cGMP 生成能の低下が生じた。
- 3) 腎動脈においては、内皮由来収縮因子の産生亢進および内皮由来過分極因子の産生低下が生じ、NO 産生はむしろ亢進していた。
- 4) 高食塩食負荷 SHR に降圧薬を投与し対照の SHR の血圧レベルまで下降させても大動脈および腎動脈における血管反応性の異常は改善されなかった。
- 5) 高食塩食かつ高コレステロール食を SHR に長期間負荷しても、高食塩食負荷 SHR に比べ血圧のさらなる上昇、血管機能低下の増悪、動脈への脂質沈着といった Dahl ラットでみられた作用は生じなかった。

以上の結果より、SHR に高食塩食を負荷しても抗動脈硬化作用の強い NO の産生が低下しないため、高コレステロール食を追加負荷しても動脈硬化の発症にはつながらなかったと考えられる。このことから、「食塩の過剰摂取が必ずしも動脈硬化の発症を促進するわけではない」ことが示唆された。

9 8 3 3 食塩は動脈硬化発症を促進させるか ?

助成研究者：国友 勝 (武庫川女子大学 薬学部)
 共同研究者：籠田 智美 (武庫川女子大学 薬学部)
 山口 優 (武庫川女子大学 薬学部)
 中村 一基 (武庫川女子大学 薬学部)

1. 研究目的

近年、長寿社会の到来とともに狭心症、心筋梗塞、脳血管障害など動脈硬化性疾患による死亡数が増加してきており、動脈硬化およびその基礎疾患である高血圧症、高脂血症、糖尿病などの研究ならびに治療薬の開発が益々重要となってきている。血管壁の疾患ともいえる動脈硬化や高血圧の成因には、血管内皮細胞の機能障害が共通している。血管内皮細胞は多くの生理活性物質を産生・放出し血管壁を保護しているが、なかでも内皮由来血管拡張因子である一酸化窒素 (NO) は、動脈硬化の発症を様々な面から防止している防御因子として注目されている。

我々はこれまでに、食塩感受性高血圧の動物モデルである Dahl ラットにおいて、高血圧の発症に伴い血管内皮細胞からの NO 放出が著しく低下すること、また、この動物に高コレステロール食を負荷すると大動脈に有意な脂質沈着 (粥状動脈硬化の発症) が生じることを見出した¹⁾。しかし、そのような血管壁の変化は、本態性高血圧の動物モデルである高血圧自然発症ラット (SHR) ではみられなかった^{2,3)}。これらのことから、高血圧ラットへの高コレステロール食負荷による動脈硬化発症には“高食塩摂取が深く関わっているのではないか”との考えに至った。

そこで本研究では、SHR を用い、まず、高食塩食を摂取させたときの種々血管の内皮機能および平滑筋機能の変化を明らかにし、次いで、SHR においても高食塩かつ高コレステロール食を同時摂取させたとき動脈硬化を発症させるか否かについて検討した。

2. 研究方法

2.1 実験動物

2.1.1 高食塩食負荷 SHR

4 週齢の雄性 SHR/Izm 及び WKY/Izm にそれぞれ基礎食 (0.3% NaCl) または高食塩食 (8% NaCl、日本 SLC 社製) を与え 4 週間飼育した。動物数は各群 6 匹とした。

2.1.2 高食塩食負荷 SHR への降圧薬処置

高食塩食 (8% NaCl) を負荷した雄性 SHR/Izm (4 週齢) に、ニフェジピン (30

mg/kg/day, p.o.) またはエナラプリル (50 mg/kg/day, p.o.) をそれぞれ連日投与して4週間飼育した。動物数は各群6匹とした。

2.1.3 高食塩かつ高コレステロール食負荷 SHR

4週齢の雄性 SHR/Izm に高食塩 (6% NaCl) および高コレステロール (1.5% コレステロールおよび 0.5% コール酸) 添加食を与え8週間飼育した。動物数は各群6匹とした。

2.2 血圧測定

無麻酔下にラット尾動脈の収縮期血圧を tail-cuff 法 (非観血血圧心拍数記録装置 MK 1000 型、室町機械) により測定した。

2.3 血管反応測定

動物をペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) により麻酔し、放血死させた後、直ちに胸部大動脈および腎動脈を摘出、それぞれ幅 3 mm のリング状標本を製作した。各標本を 95% O₂ および 5% CO₂ の混合ガスを通気した Krebs-Henseleit 液 (37 °C、pH 7.4) で満たしたマグヌス管 (10 ml) 内に静止張力 (大動脈 1.0 g、腎動脈 0.5 g) を負荷して懸垂した。各標本をあらかじめノルアドレナリン (大動脈 10⁻⁷ M、腎動脈 10⁻⁶ M) を添加することにより最高収縮高の約 80% に収縮させた。収縮が一定になったところで下記の弛緩薬を累積的に添加した。その結果生じる等尺性張力変化をトランスデューサー (Model T-7、NEC San-Ei) を介してレコーダー (Model 8K21、NEC San-Ei) に記録した。また、下記の各種阻害薬を処置した後の ACh に対する弛緩反応も測定した。弛緩反応の大きさは、非特異的弛緩薬パピペリン (10⁻⁴ M) によって生じる弛緩反応に対する百分率で示し、濃度-弛緩反応曲線を作図した。

2.3.1 血管弛緩薬と使用濃度

- ① アセチルコリン (ACh) : 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁵ M
- ② ニトロプルシドナトリウム : 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁶ M
- ③ フォルスコリン : 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁶ M
- ④ 8-bromo-cGMP : 10⁻⁶ ~ 10⁻⁴ M
- ⑤ Dibutyl cAMP : 10⁻⁶ ~ 10⁻⁴ M

2.3.2 各種阻害薬ならびに使用濃度と反応時間。

- ① インドメタシン : 10⁻⁵ M, 20 min
- ② ONO 3708 : 10⁻⁶ M, 20 min
- ③ OKY 046 : 10⁻⁴ M, 20 min
- ④ superoxide dismutase (SOD) : 150 U/ml, 20 min、catalase : 1200 U/ml, 20 min
- ⑤ 97-139 : 10⁻⁸ M, 15 min

⑥ N^G -nitro-L-arginine methyl ester (LNAME) : 10^{-4} M, 30 min

⑦ charybdotoxin (CTX) : 10^{-7} M, 30 min

2.4 NO 遊離量の測定：サンドイッチ法

胸部大動脈より作製した内皮無傷標本 (donor 標本) および内皮除去標本 (detector 標本) を血管内腔側で密着させてサンドイッチ標本を作製し、マグヌス管内に懸垂した。両標本のアセチルコリンに対する弛緩反応の変化をそれぞれのトランスデューサーを介して同時に記録した。

donor 標本：高食塩食負荷または非負荷 SHR の胸部大動脈

detector 標本：正常血圧の Wistar ラット胸部大動脈

2.5 cGMP 測定法

大動脈および腎動脈内皮無傷標本にノルアドレナリン (10^{-7} M) を 5 分間作用させた後、アセチルコリン (10^{-7} M) を 1 分間またはニトロプルシドナトリウム (10^{-7} M) を 3 分間それぞれ正確に作用させた。反応直後に標本を液体窒素にて凍結、6% トリクロロ酢酸 1 ml 中に入れてガラスホモジナイザーを用いてホモジネートし、遠心分離後の上清をエーテル抽出にてトリクロロ酢酸を除き、残液を凍結乾燥して得られたサンプル中の cGMP 量を酵素免疫測定法 (cGMP EIA system kit、Amersham) を用いて定量した。また、沈渣中のタンパク量を Lowry らの方法⁴⁾ により測定した。

2.6 血漿中および動脈中のコレステロール量の測定

動物から EDTA 存在下に採血、遠心分離 (3000 g、10 分) して血漿を得た後、そのコレステロール値を蛍光酵素法⁹⁾ にて測定した。また、血管反応の実験に使用した各動脈標本を凍結乾燥した後、クロロホルム：メタノール (2:1 v/v) 混液にて脂質を抽出し、溶媒を留去後、コレステロール量を同様に測定した。

2.7 血漿中および尿中 $NO_3 + NO_2$ (NO_x) 量の測定

血漿及び尿中の NO_x 量は、各サンプル中の NO_3 を nitrate reductase により NO_2 に還元した後、Griess 法 (NO_3+NO_2 Assay kit-C、同仁化学) により測定し、 $NO_3 + NO_2$ 総和量とした。

3. 研究結果

3.1 高食塩食摂取の血管内皮および平滑筋機能に及ぼす影響とその機序の検討

3.1.1 血圧の変化

高食塩食負荷 SHR の収縮期血圧は、対照の SHR に比べ著明に上昇した (252 ± 6

vs. 196 ± 4 mmHg, $P < 0.05$)。高食塩食負荷 WKY も対照の WKY に比べ血圧が上昇したが (157 ± 2 vs. 138 ± 4 mmHg, $P < 0.05$)、その程度は SHR の場合に比べ小さかった。

3.1.2 血管反応性の変化

3.1.2.1 内皮依存性弛緩反応の変化

高食塩食負荷 SHR の胸部大動脈において、ACh に対する内皮依存性弛緩反応は、対照の SHR に比べ著しく減弱していた (Fig. 1 左下)。高食塩食負荷 WKY においても弛緩反応の減弱が生じたが、その程度は小さかった (Fig. 1 左上)。

また、高食塩食負荷 SHR の腎動脈においても、ACh に対する内皮依存性弛緩反応は、対照の SHR に比べ著しく減弱していた (Fig. 1 右下)。一方、高食塩食負荷 WKY においては、対照の WKY と弛緩反応にほとんど差はみられなかった (Fig. 1 右上)。

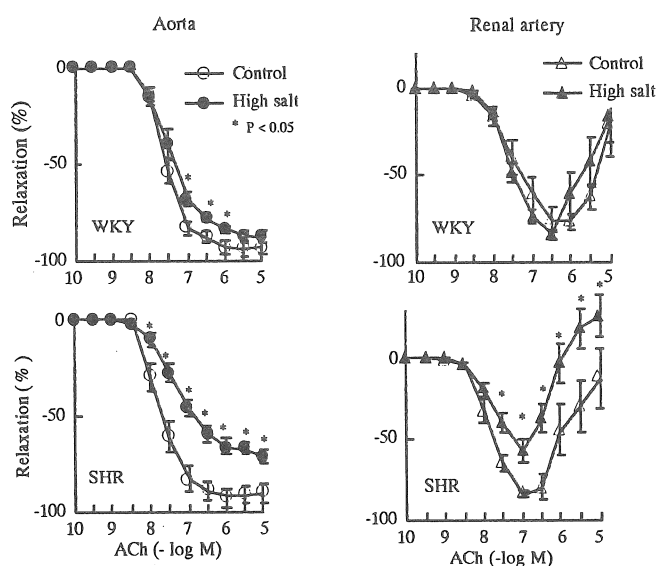


Fig. 1. Effects of high salt intake on relaxations in response to acetylcholine (ACh) in thoracic aortas and renal arteries from WKY and SHR. WKY and SHR were fed a basal diet (0.3% NaCl) or a high salt diet (8% NaCl) for 4 weeks. Each point represents the mean \pm S.E.M. ($n=6$).

3.1.2.2 AChによる弛緩反応に関与する内皮由来因子の検討

対照の SHR の胸部大動脈において、ACh に対する弛緩反応はシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシン前処置により影響を受けなかったが、NO 合成酵素阻害薬である LNAME 前処置により完全に消失した (Fig. 2 左)。一方、腎動脈における ACh に対する弛緩反応はインドメタシン前処置により有意に増強された。また、この弛緩反応はインドメタシンと LNAME との併用処置により一部抑制され、さらに K^+ チャネルブロッカーである CTX の追加処置によりほぼ完全に消失した (Fig. 2 右)。

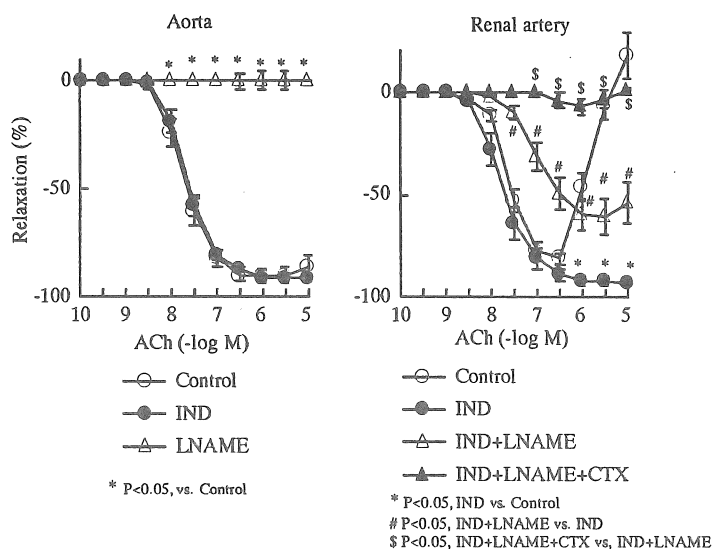


Fig. 2. Effects of indomethacin (IND, 10^{-5} M, 20 min), N^G -nitro-L-arginine methyl ester (LNAME, 10^{-4} M, 30 min) and charybdotoxin (CTX, 10^{-7} M, 20 min) on relaxations in response to acetylcholine (ACh) in thoracic aortas and renal arteries from SHR fed a basal diet (0.3% NaCl) for 4 weeks. Each point represents the mean \pm S.E.M. (n=6).

また、ACh に対する弛緩反応は、収縮性プロスタノイド (PGH_2/TXA_2) 受容体拮抗薬である ONO 3708 により有意に増強されたが、 TXA_2 生合成酵素阻害薬である OKY 046 によっては影響を受けなかった。

高食塩食負荷 SHR の胸部大動脈において、ACh に対する弛緩反応の減弱はインドメタシン (Fig. 3 左上)、活性酸素消去剤である SOD + カタラーゼ、エンドセリン A 受容体拮抗薬である 97-139 のいずれの薬物前処置によっても改善されなかった。しかし、LNAME 前処置によって弛緩反応は完全に消失した (Fig. 3 左下)。一方、腎動脈においては、ACh に対する弛緩反応の減弱は、インドメタシン前処置により改善され、対照の SHR の場合と同程度の弛緩反応を示した (Fig. 3 右上)。また、インドメタシンと LNAME を併用処置すると弛緩反応はほぼ完全に抑制され、抑制の程度は対照の SHR の場合に比べ有意に大きかった (Fig. 3 右下)。

3.1.2.3 内皮非依存性弛緩反応

高食塩食負荷 SHR の胸部大動脈において、NO ドナーでグアニル酸シクラーゼ活性化薬であるニトロプルシドナトリウムに対する弛緩反応は、対照の SHR のそれに比べ著しく減弱していたが (Fig. 4 左上)、アデニル酸シクラーゼ活性化薬であるフォルスコリン (Fig. 4 右上) や、cGMP 安定体である 8-bromo-cGMP (Fig. 4 左下)、cAMP 安定体である dibutyryl cAMP (Fig. 4 右下) に対する弛緩反応に変化はみられなかった。一方、高食塩食負荷 SHR の腎動脈においては、ニトロプルシドナトリウムに対する弛緩反応は対照の SHR の場合と同様であった。

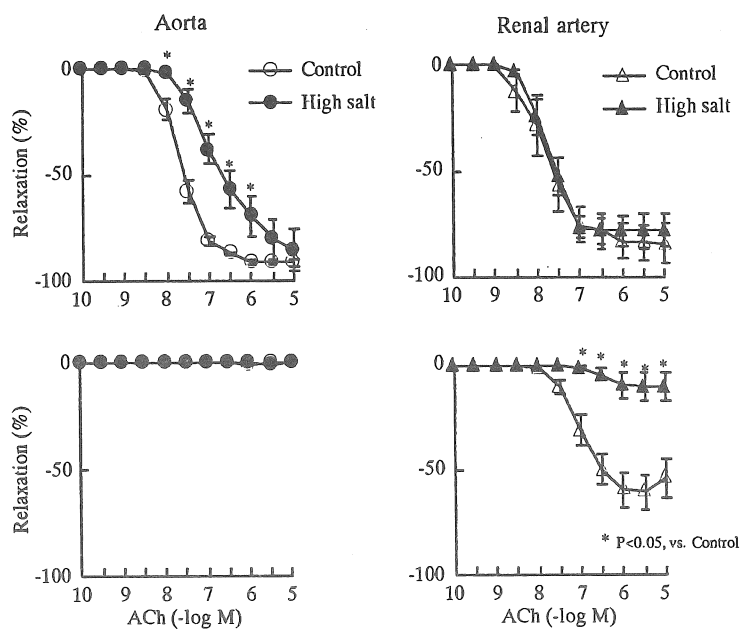


Fig. 3. Effects of indomethacin (10^{-5} M, 20 min) (upper) and N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} M, 30 min) (lower) on relaxations in response to acetylcholine (ACh) in aortas and renal arteries from SHR fed a basal diet (0.3% NaCl) or a high salt diet (8% NaCl) for 4 weeks. Each point represents the mean \pm S.E.M. (n=6).

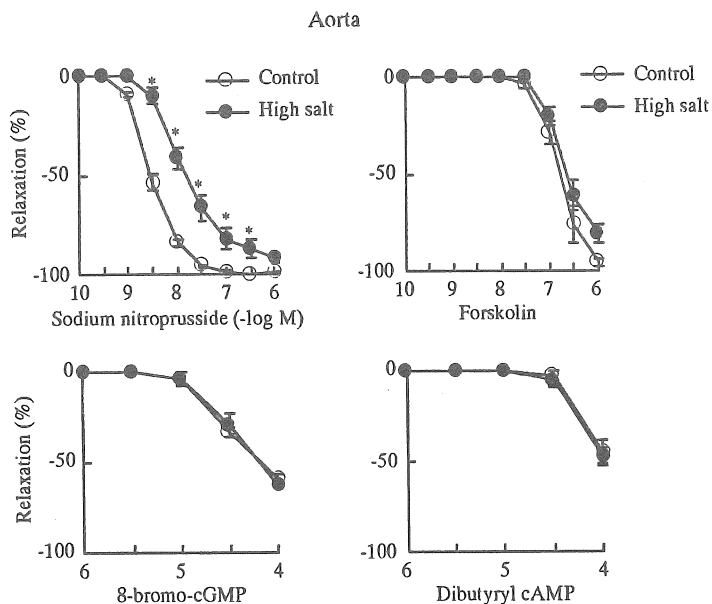


Fig. 4. Effects of high salt intake on relaxations in response to sodium nitroprusside, forskolin, 8-bromo-cGMP and dibutyryl cAMP in thoracic aortas from SHR fed a basal diet (0.3% NaCl) or a high salt diet (8% NaCl) for 4 weeks. Each point represents the mean \pm S.E.M. (n=6).

3.1.3 NO 産生・遊離量の変化

サンドイッチ標本において、高食塩食負荷 SHR の胸部大動脈より作製した donor 標本の ACh に対する弛緩反応は対照の SHR のそれに比べ有意に減弱していたが (Fig. 5 左)、ACh 刺激によって donor 標本から detector 標本へ伝達される弛緩反応、すなわち donor 標本から産生・遊離される NO 量には差はみられなかった (Fig. 5 右)。

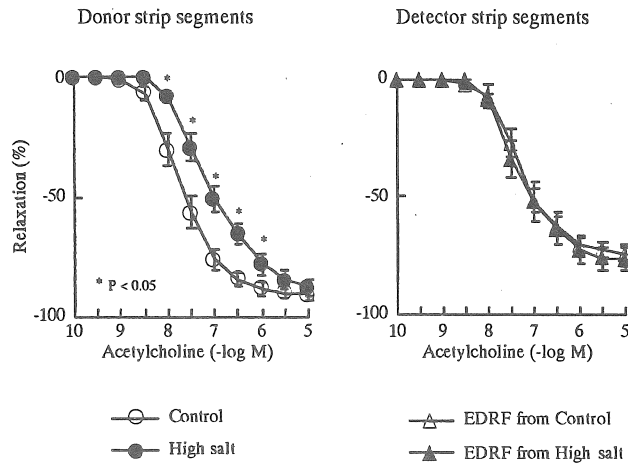


Fig. 5. Relaxations in response to acetylcholine (ACh) in donor and detector strip segments of the sandwich preparation. Aortas from SHR fed a basal diet (0.3% NaCl) or a high salt diet (8% NaCl) for 4 weeks were used as donor strip segments and aortas from Wistar rats were used as detector strip segments. Each point represents the mean \pm S.E.M. (n=6).

3.1.4 cGMP 産生量の変化

高食塩食負荷 SHR の胸部大動脈において、ACh 刺激による cGMP 産生量は対照の SHR のそれに比べ有意に減少していた (Fig. 6 左上)。また、ニトロプルシドナトリウム刺激による cGMP 産生量も同様に減少していた (Fig. 6 左下)。一方、腎動脈においては、ACh 刺激による cGMP 産生量は、対照の SHR に比べ増加する傾向を示した (Fig. 6 右上)。

3.1.5 血漿中および尿中 NOx 量の変化

高食塩食負荷 SHR の血漿中 NOx 量は、対照の SHR に比べ減少する傾向がみられたが有意な差はなかった (22.9 ± 3.2 vs. $29.4 \pm 4.7 \mu\text{M}$)。また、尿中 NOx 量は、対照の SHR に比べ著明な増加を示した (9.06 ± 0.58 vs. $2.75 \pm 0.65 \mu\text{mol/day}$, $P < 0.05$)。

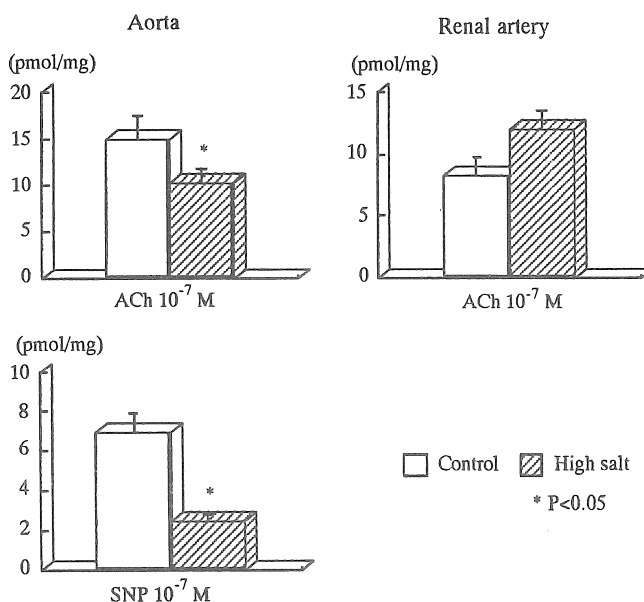


Fig. 6. cGMP levels stimulated by acetylcholine (ACh, 10⁻⁷ M, 1 min) and sodium nitroprusside (10⁻⁷ M, 3 min) in thoracic aortas and renal arteries from SHR fed a basal diet (0.3% NaCl) or a high salt diet (8% NaCl) for 4 weeks. Each point represents the mean \pm S.E.M. (n=6).

3.2 血管機能の異常は高食塩食の直接作用かあるいは高血圧による二次的作用か； 降圧薬処置による影響

3.2.1 血圧の変化

対照の SHR に比べ高食塩食負荷 SHR の収縮期血圧は有意に上昇した (244 \pm 7 vs. 192 \pm 3 mmHg, P < 0.05) が、ニフェジピン投与により対照の SHR の血圧レベルにまで低下した (187 \pm 5 mmHg, P < 0.05)。一方、エナラプリル投与によっては変化はみられなかった (252 \pm 5 mmHg)。

3.2.2 血管反応性の変化

高食塩食負荷 SHR の胸部大動脈 (Fig. 7 左) および腎動脈 (Fig. 7 右) に生じる ACh に対する内皮依存性弛緩反応の減弱は、ニフェジピンまたはエナラプリル投与により改善されなかった。また、ニトロプルシドナトリウムに対する弛緩反応の減弱も、ニフェジピンおよびエナラプリル投与により改善されなかった。さらに、高食塩食負荷 SHR の腎動脈のニトロプルシドナトリウムに対する弛緩反応もニフェジピンまたはエナラプリル投与により影響されなかった。

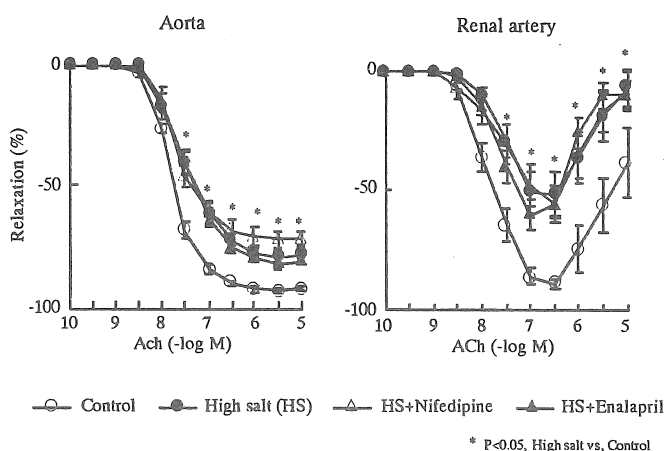


Fig. 7. Effects of nifedipin (30 mg/kg/day, p.o.) or enalapril (50 mg/kg/day, p.o.) treatment on relaxations in response to acetylcholine (ACh) in thoracic aortas and renal arteries from SHR fed a high salt diet (8% NaCl) for 4 weeks. Each point represents the mean \pm S.E.M. (n=6).

3.3 食塩とコレステロールの過剰摂取は動脈硬化発症を促進させるか

3.3.1 血圧の変化

対照の SHR に比べ高食塩食負荷 SHR の収縮期血圧は有意に上昇した (226 ± 6 mmHg vs. 202 ± 4 mmHg, $P < 0.05$) が、高食塩にさらに高コレステロール食を負荷しても血圧に変化は生じなかった (209 ± 7 mmHg)。一方、高コレステロール食のみを負荷した SHR の収縮期血圧は、対照の SHR に比べ低下傾向を示した (192 ± 5 mmHg)。

3.3.2 血漿および動脈コレステロール値の変化

高コレステロール食負荷 SHR の血漿コレステロール値は、対照の SHR に比べ有意に増加したが (93.5 ± 5.8 vs. 54.9 ± 4.4 mg/100 ml, $P < 0.05$)、これに高食塩食を併用負荷してもコレステロール値に変化は生じなかった (98.5 ± 3.6 mg/100 ml)。一方、高食塩食のみを負荷した SHR の血漿コレステロール値は、対照の SHR の値と同程度であった (59.3 ± 2.3 mg/100 ml)。胸部大動脈および腎動脈のコレステロールおよびコレステロールエステル含量には 4 群間で差は認められなかった。

3.3.3 血管反応性の変化

前述したように対照の SHR に比べ高食塩食負荷 SHR の胸部大動脈 (Fig. 8 左) および腎動脈 (Fig. 8 右) における ACh に対する弛緩反応は有意に減弱していたが、高食塩食に高コレステロール食を併用負荷しても減弱の強さに変化はみられなかった。

一方、高コレステロール食のみ負荷の SHR の胸部大動脈 (Fig. 8 左) および腎動脈 (Fig. 8 右) における ACh に対する弛緩反応は、対照の SHR の場合と同じであった。胸部大動脈および腎動脈におけるニトロプルシドナトリウムに対する弛緩反応は、高食塩食負荷 SHR と高食塩食+高コレステロール食負荷 SHR で差はなかった。

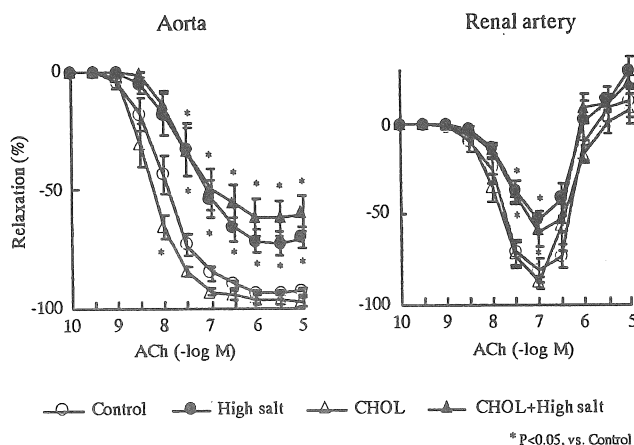


Fig. 8. Effects of high cholesterol intake on relaxations in response to acetylcholine (ACh) in thoracic aortas and renal arteries from SHR fed various diets; a basal diet (0.3% NaCl), a high salt diet (6% NaCl), a high cholesterol diet (1.5% cholesterol) and a high salt plus high cholesterol diet for 8 weeks. Each point represents the mean \pm S.E.M. (n=6).

4. 考察

4.1 高食塩食摂取の血管内皮および平滑筋機能に及ぼす影響

本態性高血圧症の動物モデルである SHR に高食塩食 (8% NaCl) を 4 週間連日摂取させると、対照の SHR に比べ血圧は著明に上昇し、胸部大動脈および腎動脈における内皮依存性弛緩反応が著しく減弱することが明らかとなった。しかし、SHR の起原動物である WKY においては血圧上昇が軽度のみられたものの、血管反応性にほとんど変化がなかった。高血圧の発症要因をもつ SHR は、正常血圧の WKY に比較して食塩に対する感受性が高いと考えられる。

次に、高食塩食負荷 SHR の胸部大動脈および腎動脈にみられる弛緩反応の減弱機序について検討した。その結果、胸部大動脈において、1) ACh 刺激により内皮細胞から NO のみが産生・遊離されること、また、この NO 産生・遊離に対し高食塩負荷は影響を及ぼさないこと、2) 高食塩負荷により内皮由来収縮因子 (EDCF) の産生が起らないこと、3) 高食塩負荷によりアゴニスト刺激による cGMP 生成量が減少すること、4) 高食塩負荷によりグアニル酸シクラーゼを介する弛緩反応が減弱するが、アデニル酸シクラーゼを介する弛緩反応は影響されないこと、5) 高食塩負荷により

cGMP 以降の弛緩反応には影響が生じないこと、が明らかとなった。また、SHR の腎動脈においては、1) ACh 刺激により内皮細胞から NO のみでなく EDHF および EDCF が産生・遊離されること、2) 高食塩負荷により EDCF 産生の亢進と EDHF 産生の低下が生じること、3) 高食塩負荷により NO 産生はむしろ増強すること、が明らかとなった。

以上の結果から、高食塩食負荷 SHR の胸部大動脈に生じる ACh に対する弛緩反応の減弱には、平滑筋の NO に対する反応性の低下、すなわち平滑筋におけるグアニル酸シクラーゼによる cGMP 生成能の低下が関与していること、また、腎動脈に生じる弛緩反応の減弱には、EDCF 産生の亢進および EDHF 産生の低下が関与していることが示唆された。Dahl ラットの場合²⁾と異なり、いずれの動脈においても高食塩負荷により NO 産生の低下は認められなかった。このように、Dahl ラットと SHR は、ともに食塩過剰摂取により弛緩反応の減弱が生じるにもかかわらず、その機序は全く異なっていることが明らかとなった。SHR の胸部大動脈および腎臓における NO の合成酵素発現量およびその活性は WKY に比べむしろ亢進している⁶⁾との報告があることから、Dahl ラットとは異なり、SHR における NO 合成能は血圧上昇によって影響を受けにくいと考えられる。また、SHR の腎動脈においては NO 産生と EDHF 産生との間にバックアップ機構の存在することが示唆された。最近、ウサギ腎動脈においても同様の機構が報告されており⁷⁾、いまだ明らかにされていない EDHF の生理的意義の1つの可能性が考えられる。

4.2 血管機能の異常は高食塩食の直接作用かあるいは高血圧による二次的作用か

高食塩食負荷 SHR に降圧薬を投与して対照の SHR のレベルまで血圧を下降させた場合、血管反応性の異常が改善されるか否かについて検討した。本実験では臨床上に汎用されているアンジオテンシン変換酵素阻害薬であるエナラプリルとカルシウム拮抗薬であるニフェジピンを用いた。その結果、高食塩食負荷 SHR の収縮期血圧はニフェジピン投与によって対照の SHR の血圧レベルにまで低下したが、今回用いたエナラプリルの投与量では血圧上昇を抑制できなかった。これは、SHR は食塩過剰摂取により血漿レニン活性が低下する⁸⁾との報告があり、このことがエナラプリルの降圧効果が十分に生じなかった原因であると考えられる。

高食塩負荷により大動脈および腎動脈に生じる血管反応性変化は、エナラプリル投与のみならず降圧効果のあったニフェジピン投与によっても改善されなかった。これまで、SHR の高血圧を改善すると弛緩反応の減弱が改善される⁹⁾との報告が多くなされているが、本実験の結果はこれとは異なるものであった。これらのことは、食塩の過剰摂取により生じる血管反応性変化は、高食塩摂取により生じる血圧上昇に伴う二次的な変化ではなく、高食塩自身による直接作用であることが示唆された。

4.3 食塩とコレステロールの過剰摂取は動脈硬化発症を促進させるか

SHR に高食塩食と高コレステロール食を長期間併用負荷しても、Dahl ラットの場合とは異なり⁹⁾、血圧のさらなる上昇、血管機能低下の増悪、大動脈への脂質沈着といった作用は全く認められなかった。同じ高血圧動物モデルでありながらなぜこのような違いが生じるのであろうか。その理由の可能性として、高食塩負荷による血管内皮-平滑筋機能への影響の違いが考えられる。すなわち、高食塩負荷により Dahl ラットでは内皮細胞からの NO 産生低下が生じる¹⁰⁾のに対し、SHR では NO 産生低下は起こらずに、NO に対する平滑筋の反応性の低下、EDCF 産生亢進、EDHF 産生低下といった変化が生じる。NO は血管緊張性の調節ばかりではなく、動脈硬化の引き金となる血小板粘着・凝集、平滑筋細胞の増殖、白血球粘着などを抑制する作用をもっている。NO が内因性の抗動脈硬化因子である¹¹⁾といわれる由縁である。したがって、NO 産生の低下を起こしにくい SHR は、食塩およびコレステロール過剰摂取による動脈硬化の発症に抵抗性を示したと考えられる。食塩の過剰摂取は必ずしも動脈硬化の発症につながらないものと思われる。

5. 今後の課題

本研究により、食塩過剰摂取により血管平滑筋のグアニル酸シクラーゼ活性低下、内皮細胞からの EDCF 産生促進と EDHF 産生低下が生じることが明らかとなった。今後は、酵素量や産生量の定量を行いその作用機序の詳細について検討する必要がある。また、同じ血管弛緩作用をもつ NO と EDHF が諸条件によって互いにバックアップしあう機構が存在することは、いまだ十分に明らかにされていない EDHF の生理的意義の解明につながると考えられ、今後詳細に検討する必要がある。

6. 文献

- 1) Kitagawa S, Yamaguchi Y, Shinozuka K, Kwon YM, Kunitomo M. Dietary cholesterol enhances impaired endothelium-dependent relaxation in aortas of salt-induced hypertensive Dahl rats. *Eur. J. Pharmacol.* **297**, 71-76 (1996)
- 2) Kitagawa S, Sameshima E, Yamaguchi Y, Kwon YM, Shinozuka K, Kunitomo M. Comparison of the effects of hypercholesterolaemia on relaxation responses in aortas of spontaneously hypertensive rats and Dahl salt-sensitive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **22**, S251-S253 (1995)
- 3) Yamaguchi Y, Kitagawa S, Kwon YM, Shinozuka K, Kunitomo M. Different cholesterol deposition in aorta of Dahl salt-sensitive rats and spontaneously hypertensive rats fed high-cholesterol diet. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **22**, S249-S250 (1995)

- 4) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
- 5) Kunitomo M, Yamaguchi Y, Matsushima K, Bando Y. Cholesterol metabolism in serum and aorta of inbred mice fed a high-cholesterol diet. *Jpn. J. Pharmacol.* **34**, 153-158 (1984)
- 6) Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **31**, 1248-1254 (1998)
- 7) Brandes RP, Behra A, Lebherz C, Boger RH, Dode-Boger SM, Phivthong-Ngam L, Mugge A. N^G-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **135**, 49-55 (1997)
- 8) Vaskonen T, Mervaala E, Krogerus L, Teravainen TL, Laakso J, Karppanen H, Vapaatalo H. Cardiovascular effects of chronic inhibition of nitric oxide synthesis and dietary salt in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* **20**, 183-92 (1997)
- 9) Dohi Y, Criscione L, Pfeiffer K, Luscher TF. Angiotensin blockade or calcium antagonists improve endothelial dysfunction in hypertension: studies in perfused mesenteric resistance arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **24**, 372-9 (1994)
- 10) Luscher TF, Raiji L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension* **9**, 157-163 (1987)
- 11) Maxwell AJ, Tsao PS, Cooke JP. Modulation of the nitric oxide synthase pathway in atherosclerosis. *Exp. Physiol.* **83**, 573-584 (1998)

Does excessive salt intake promote progression of atherosclerosis?

Masaru KUNITOMO, Satomi KAGOTA, Yu YAMAGUCHI and Kazuki NAKAMURA

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Mukogawa Women's University

Summary

We have already demonstrated that in aorta from hypertensive Dahl salt-sensitive rats, excessive cholesterol intake results in suppression of NO release which might lead to the initiation of atherosclerosis, but such suppression does not occur in spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of essential hypertension. These findings suggest that excessive salt intake per se can promote the development of atherosclerosis. In this study, we used SHR to investigate whether excessive salt intake would alter the function of the vascular endothelium and smooth muscle, and also whether excessive salt and excessive cholesterol intake would cause initiation of atherosclerosis. The results obtained were as follows:

- 1) The blood pressure was markedly increased by a high salt diet (8% NaCl) given for 4 weeks.
- 2) In the aorta, excessive salt intake impaired not only endothelium-dependent relaxations but also endothelium-independent relaxations. The impairment is thought to be due to the reduced guanylate cyclase activity in smooth muscle cells but not the decreased release of nitric oxide (NO) from endothelial cells.
- 3) In the renal artery, excessive salt intake impaired endothelium-dependent relaxations but not endothelium-independent relaxations. This functional change is probably due to the increased release of endothelium-derived contracting factors (EDCF) and the decreased release of endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF), but not a decreased release of NO.
- 4) These changes in vascular reactivity induced by excessive salt intake were not alleviated by treatment with an anti-hypertensive drug, nifedipine.
- 5) Intake of excessive cholesterol in addition to excessive salt did not lead to further aggravation of the abnormality of vascular reactivity or the increased blood pressure induced by excessive salt intake, nor was lipid accumulation detected in the arteries.

It has been known that NO is an endogenous anti-atherosclerotic factor. We concluded that in SHR, unlike in Dahl rats, excessive salt intake is not related to the initiation of atherosclerosis via endothelial dysfunction, because the release of NO cannot be suppressed by high blood pressure, high salt or high cholesterol intake.