

## 食塩感受性と高血圧の予測に対する、尿中・血漿中アミノグラムの有効性に関する研究

谷田部 淳一<sup>1</sup>, 谷田部 緑<sup>1</sup>, 高野 梢<sup>1</sup>, 木村 純子<sup>1</sup>, 眞田 寛啓<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福島県立医科大学医学部医学科薬理学講座, <sup>2</sup>JA 福島厚生連ヘルスサイエンスリサーチ

### 概要 【研究①】 食塩感受性と体内アミノ酸動態との関係を調べる動物実験

**目的** ラットの体内アミノ酸動態は食塩摂取量や系統(WKYとSHR)により異なると報告した(日腎会誌 54(3) 2012: 285)。今回は Dahl 食塩感受性ラット(DSS)とその対照(DSR)を用い、アミノ酸プロファイルから食塩感受性を推定できるか検討した。

**方法** 0.28% 食塩食(NS)または4% 食塩食(HS)負荷下で得た24時間尿をLC/MS/MS法にて解析した(n=7/group)。

**結果** NSでは、一日アミノ酸排泄量に系統差は認められなかった。HSは尿中アミノ酸排泄に時間依存的影響を与えた。HS終了時では、DSRよりもDSSでサルコシン、アラニン、ヒドロキシプロリン、グルタミン、3-メチルヒスチジン、アルギニンの24時間尿中排泄量が有意に少なかった。これらのアミノ酸を説明変数とし、血圧を従属変数とした重回帰分析を行った。アラニン、ヒドロキシプロリン、3-メチルヒスチジンを説明変数とした際に、最も強い有意差で食塩による血圧上昇を求めることが出来た(決定係数0.79, F検定P=0.002)。

### 【研究②】 臨床試験による、高食塩食摂取が体内アミノ酸動態に与える影響の検討

**目的** 動物実験の結果から、尿中アミノ酸排泄量は、食塩摂取量や食塩感受性の推定に重要であることが示唆された。ヒトへの応用が可能であるかどうかについて、血漿サンプルを用いて予備的な検討を行った。

**方法** 本研究の趣旨に書面をもって同意した健常成人9名を対象とした。日常的に摂取している食事(日常食)をコントロールとし、低食塩食(3 g/day)7日間、高食塩食(20 g/day)7日間の試験食摂取を実施した。それぞれの試験食摂取終了日には、血圧・脈拍・体重測定、随時尿の採取と採血(血漿・血清各5 ml)を施行した。食塩感受性の判定にはSSI(Salt Sensitivity Index) = (高食塩食負荷後の平均血圧 - 低食塩食負荷後の平均血圧) / 低食塩食負荷後の平均血圧を用い、SSIが0.05以上の場合を食塩感受性、SSIが0.05未満の場合を食塩抵抗性とした。血漿アミノ酸濃度はLC/MS/MS法にて測定を行った。

**結果** 食塩負荷試験により、有害事象は生じなかった。低食塩食摂取時、高食塩食摂取時における尿中ナトリウム排泄量は、それぞれのナトリウム摂取量を反映した排泄量であった。低食塩食から高食塩食への切り替えにより、血漿ヒドロキシプロリン濃度は有意に上昇した。一方で、血漿メチオニンとフェニルアラニン濃度が有意に低下した。食塩負荷試験の結果から、3名が食塩感受性、6名が食塩非感受性と判定された。低食塩食終了後における血漿アミノ酸分析では、食塩感受性群において食塩抵抗性群よりも有意に血漿サルコシン濃度とリジン濃度が低かった。

### 1. 背景

高血圧の構成要素として、食塩感受性の有無が重要である。そのため、日々の食塩摂取量や食塩感受性の存在を予測する有用な手段の確立が望まれるが、簡便かつ確

実な方法論は少ない。近年、高血圧を含む生活習慣病の病態を知る新しい方法として、血中アミノ酸解析を用いる検討がなされている。複数の血中アミノ酸濃度を組み合わせ、疾患や健康の状態を明確に判別するスコアを作り出

す技術として、アミノインデックス<sup>1)</sup>の有用性が提唱された。しかし、各種病態における尿中アミノ酸プロフィール変化についての報告はない。

我々は高血圧自然発症ラット(SHR)とWistar-Kyotoラット(WKY)を用いて、食塩負荷が尿中アミノ酸プロフィールをダイナミックに変化させることを突き止めた。正常食塩食(正塩)にて飼育した場合、尿中アミノ酸プロフィールはWKY群、SHR群において有意な差異は認められなかった。しかし、リジンとモノエタノールアミンの24時間尿中排泄量は1週間の8%高食塩食負荷(高塩)により有意に増加した。またこれらのXYプロットにより、系統と食塩摂取量の違いを明瞭に分離し得た(図1)。即ち、食塩負荷による尿中排泄変化の特徴が異なるアミノ酸を組み合わせることにより、高血圧を現に来している個体や今後來し得る個体、食塩に感受性を持つ個体とそうでない個体を判別することが出来る可能性を示した<sup>2)</sup>。

本研究では、ダール食塩感受性ラットを用いることにより、食塩感受性と尿中アミノ酸排泄変化との関係を明らかにすることを目的とする。また、同様の手法で臨床試験を実施し、ヒトへの応用を目指す。

## 2. 方法

### 2.1 動物

8週齢のDahl食塩感受性ラット(DSS)とその対照ラット(DSR)に対し、0.28%(通常食塩食)または4%の食塩を添加した餌(高食塩食)を1週間与えた。負荷前、負荷後3日、5日、7日時点において、代謝ケージを用い24時間塩酸蓄尿を施行した。血漿サンプルは、負荷前、負荷後7日目のラットをそれぞれペントバルビタール(50 mcg/kg)の腹腔内注射により麻酔を行い、腹腔動脈からEDTA-2Naを添加した試験管に採血した。その際、急速脱血を行うことにより苦痛なく義死せしめた。すべての実験計画は、福島県立医科大学動物実験倫理委員会の審査により承認済みである(承認番号24049)。

### 2.2 Dahl食塩感受性ラットに対する食塩負荷が、尿中アミノ酸排泄と血漿中アミノ酸動態に与える影響の検討

蓄尿により得られた尿と採血後急速冷却の後得られた血漿を前処理した後、LC/MS/MS法にて尿中アミノ酸とその代謝物の濃度を測定した。対象とする物質は以下の41

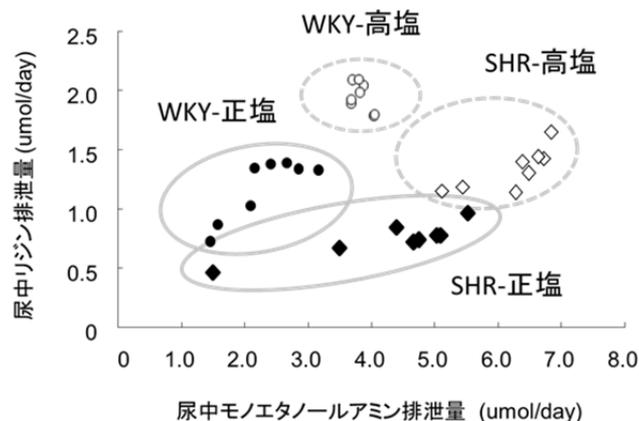


図1. 食塩負荷前後での、尿中リジン、モノエタノールアミン排泄量の動物間による違い

種(Alanine, Arginine, Asparagine, Cysteine, Glutamic acid, Glutamine, Glycine, Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Proline, Serine, Threonine, Tryptosine, Valine, 3-Methylhistidine,  $\alpha$ -Aminobutyric acid,  $\beta$ -Alanine,  $\beta$ -Amino-iso-butyric acid,  $\gamma$ -Aminobutyric acid,  $\gamma$ -Amino  $\beta$ -hydroxybutyric acid, Hydroxyproline, Ornithine, Sarcosine, Monoethanolamine, Phosphoethanolamine, Taurine, Urea, Aspartic acid, Tryptophan, 1-Methylhistidine,  $\alpha$ -Amino adipic acid, Anserine, Carnosine, Citrulline, Cystathionine, Homocystaine, Hydroxylysine)とした。得られたアミノ酸濃度につき、通常食または高塩食のDSS並びにDSRの4群比較でその差異を検討した。また食塩負荷がアミノ酸排泄に与える影響を、食塩負荷後の時間経過(time course)依存性から検討した。種差や食塩負荷による差異が明らかな尿中アミノ酸について血圧との相関を求めた。

### 2.3 健常者尿サンプルにおける1日食塩摂取量と血漿アミノ酸濃度の関連解析

ラットで得られた試験結果を基に、同様の現象がヒトで見られるかどうかの前臨床試験を行った。本研究の趣旨に書面をもって同意した健常成人9名を対象とした。日常的に摂取している食事(日常食)をコントロールとし、低食塩食(3 g/day)7日間、高食塩食(20 g/day)7日間の試験食摂取を実施した(図2)。試験食は管理栄養士がメニュー作成を行い、被験者自らが調理した。それぞれの試験食摂取終了日前日より24時間蓄尿を実施した。終了日には、血圧・脈拍・体重測定、随時尿の採取と採血(血漿・血

清各 5 ml)を施行した。本試験の実施は、福島県立医科大学倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号:1555)。食塩感受性の判定には SSI(Salt Sensitivity Index=(高食塩食負荷後の平均血圧-低食塩負荷後の平均血圧)/低食塩負荷後の平均血圧)を用い、SSI が 0.05 以上の場合を食塩感受性、SSI が 0.05 未満の場合を食塩抵抗性とした。得られた血清を用いて、血漿アルドステロン濃度、

血漿レニン活性を測定し、研究の妥当性を検討した。血漿アミノ酸濃度は、動物実験の場合と同様に LC/MS/MS 法にて測定を行った。

## 2.4 統計法

分散分析には、One-way ANOVA または Multiple repeated measures ANOVA を用いた。対応のある2群間検定には Student の t 検定を用いた。P<0.05 で統計的に有意とした。解析には、Statmate IV (株式会社アトムス)または GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) を利用した。

## 3. 結果

### 3.1 24 時間尿中アミノ酸排泄量と食塩感受性高血圧の関連

24 時間尿量は、通常食塩食下では DSR で有意に少なかったが、高食塩食下で有意な差は認められなかった。正常食塩食下では、一日アミノ酸排泄量に系統差は認められなかった(図 3)。高食塩食は尿中アミノ酸排泄に時間依存的影響を与えた(図 4)。7 日間の高食塩食負荷終了時では、DSR よりも DSS でサルコシン、アラニン、ヒドロキ

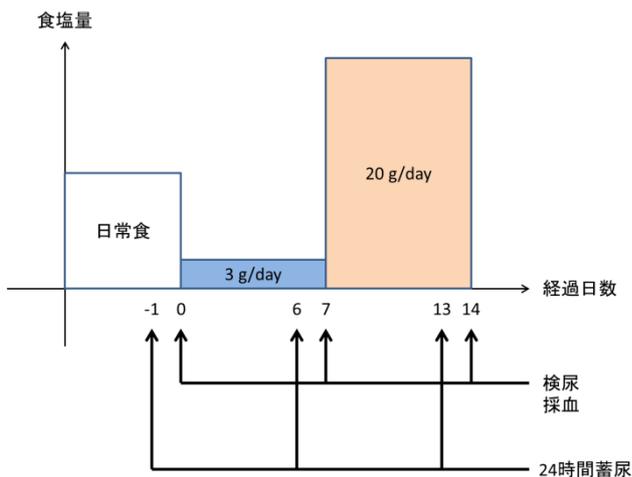


図 2. 食塩負荷臨床試験の概要図

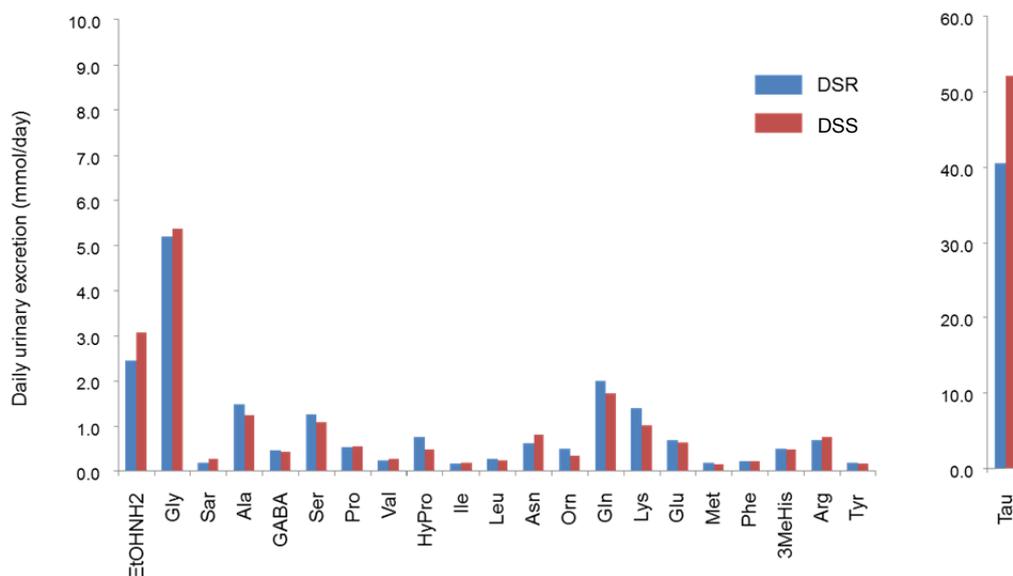


図 3. 食塩負荷前の 24 時間尿中アミノ酸とアミノ酸代謝物の排泄量のラット間比較。DSR: ダール食塩抵抗性ラット、DSS: ダール食塩感受性ラット、\*P<0.05、正常食塩食 vs 高食塩食、n=5-7/group, Unpaired t-test、EtOHNH2: モノエタノールアミン、Gly: グリシン、Sar: サルコシン、Ala: アラニン、GABA:  $\gamma$ -アミノ酪酸、Ser: セリン、Pro: プロリン、Val: バリン、HyPro: ヒドロキシプロリン、Ile: イソロイシン、Leu: ロイシン、Asn: アスパラギン、Orn: オルニチン、Gln: グリシン、Lys: リジン、Glu: グルタミン、Met: メチオニン、Phe: フェニルアラニン、3MeHis: 3-メチルヒスチジン、Arg: アルギニン、Tyr: チロシン、Tau: タウリン

シプロリン、グルタミン酸、3-メチルヒスチジン、アルギニンの24時間尿中排泄量が有意に少なかった(図5)。高食塩食負荷終了時に大きな有意差を持ってDSSで排泄量が少なかったサルコシン、アラニン、ヒドロキシシプロリン、グルタミン、3-メチルヒスチジン、アルギニンを説明変数とし、血圧を従属変数とした重回帰分析を行った。特に、アラニン、ヒドロキシシプロリン、3-メチルヒスチジンを説明変数とした際に、最も強い有意差で食塩による血圧上昇を求めることが出来た(決定係数0.79, F検定P=0.002)。

### 3.2 血漿アミノ酸濃度と食塩、食塩感受性の関連

血漿アミノ酸濃度の解析を行った。ラット系統との関連では、食塩の寡多に関係なく、DSSで血漿グリシン濃度が有意に高かった。一方で、血漿 $\alpha$ -アミノ酪酸濃度は常にDSSにおいて有意に低値であった(図6)。食塩との関連では、DSRとDSSの両群において、食塩負荷により血漿リジン濃度の有意な増加が見られた。一方、血漿トリプトファン濃度は両群で食塩負荷により有意に減少した(図7)。

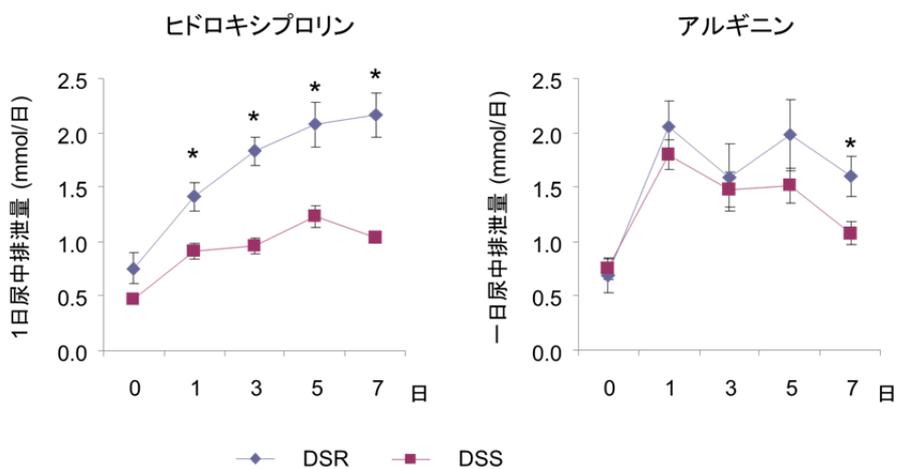


図4. 食塩負荷による1日尿中アミノ酸排泄量の変化。\*P<0.05、正常食塩食 vs 高食塩食、n=5-7/group、Multiple repeated measures ANOVA

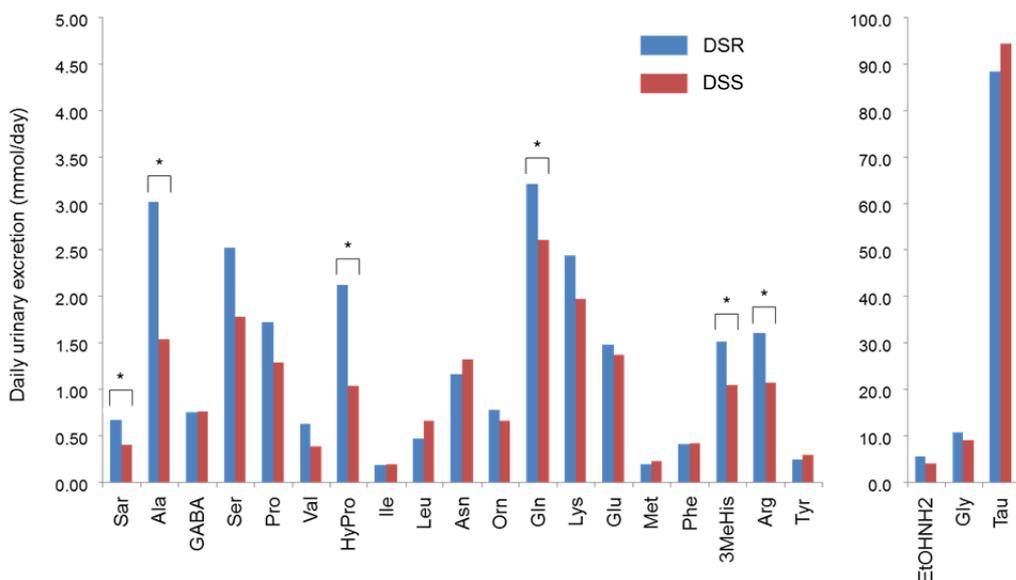


図5. 食塩負荷前の24時間尿中アミノ酸とアミノ酸代謝物の排泄量のラット間比較。DSR:ダール食塩抵抗性ラット、DSS:ダール食塩感受性ラット、\*P<0.05、正常食塩食 vs 高食塩食、n=5-7/group、Unpaired t-test、各アミノ酸の略号は図3の脚注を参照

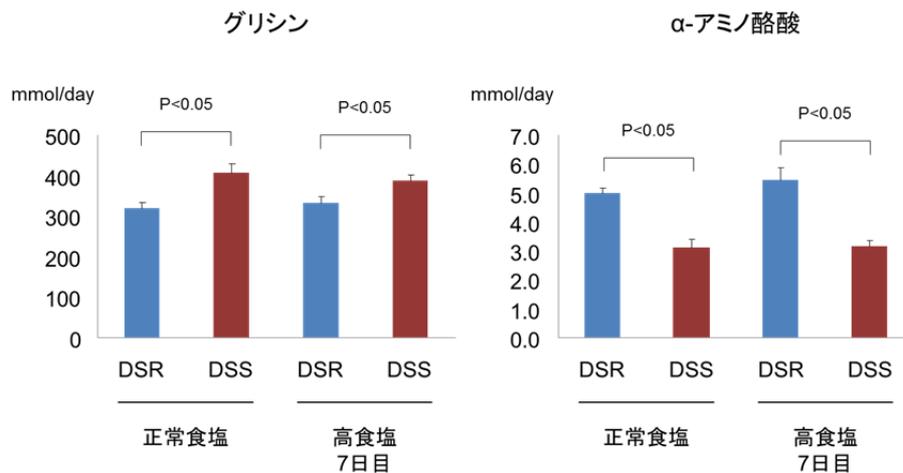


図 6. 血清アミノ酸濃度のラット種による違い。DSR:ダール食塩抵抗性ラット、DSS:ダール食塩感受性ラット、\*P<0.05、DSR vs DSS、n=5-7/group、One-way ANOVA

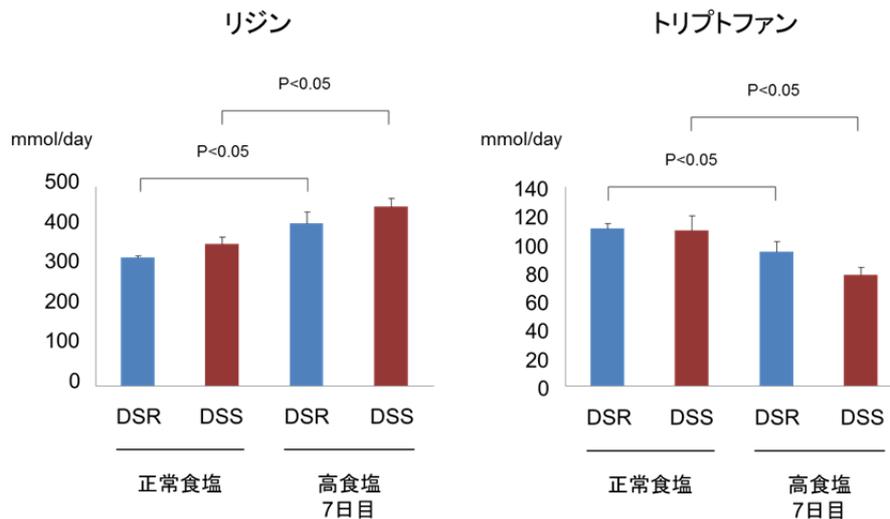


図 7. 食塩負荷が、血清アミノ酸濃度に与える影響。DSR:ダール食塩抵抗性ラット、DSS:ダール食塩感受性ラット、\*P<0.05、DSR vs DSS、n=5-7/group、One-way ANOVA

### 3. 3 ヒトにおいて、食塩摂取量と食塩感受性の有無が、血漿アミノ酸動態に与える影響

食塩負荷試験により、有害事象は生じなかった。低食塩食摂取時、高食塩食摂取時における尿中ナトリウム排泄量は、それぞれのナトリウム摂取量を反映した排泄量であった。高食塩食により、血漿アルドステロン濃度(低食塩食摂取 7 日目 vs 高食塩食摂取 7 日目:  $444.3 \pm 55.1$  vs  $96.7 \pm 35.6$  pg/ml)、血漿レニン活性(低食塩食摂取 7 日目 vs 高食塩食摂取 7 日目:  $3.63 \pm 1.3$  vs  $0.64 \pm 0.5$  ng/mL/時間)は有意に低下した。これらのことより、管理栄

養士が作成したメニューに従い自ら調理して行う食塩負荷試験の妥当性が示された。

低食塩食から高食塩食への切り替えにより、血漿ヒドロキシプロリン濃度は有意に上昇した。一方で、血漿メチオニンとフェニルアラニン濃度が有意に低下した(図 8)。

食塩負荷試験の結果から、3 名が食塩感受性、6 名が食塩非感受性と判定された。低食塩食終了後における血漿アミノ酸分析では、食塩感受性群において食塩抵抗性群よりも有意に血漿サルコシン濃度とリジン濃度が低かった(図 9)。

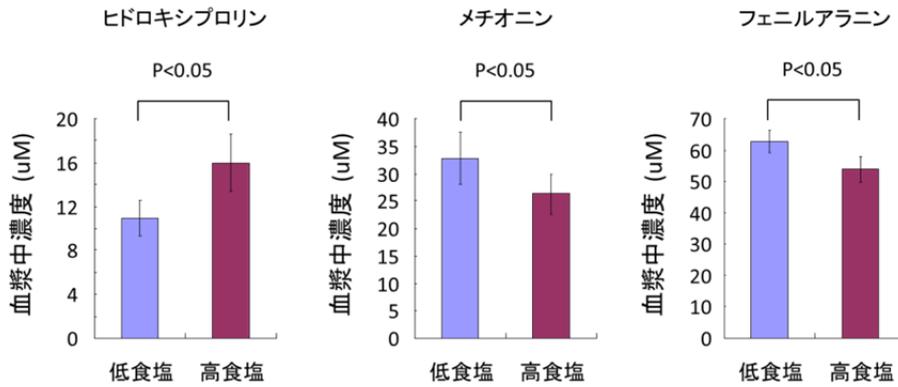


図 8. 食塩摂取量が血漿アミノ酸濃度に与える影響。P<0.05、Unpaired t-test

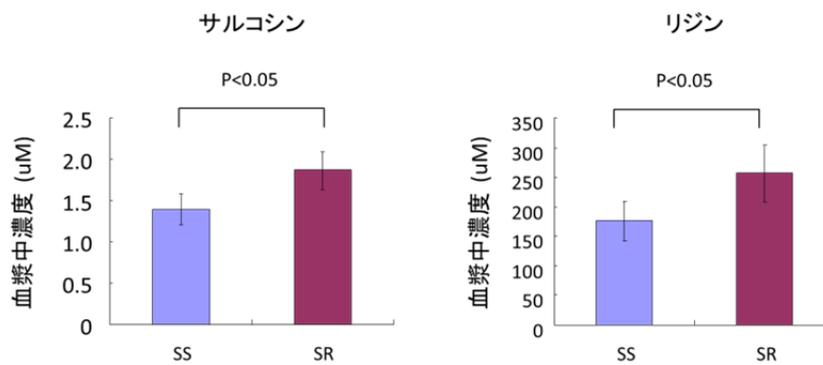


図 9. 食塩感受性と低食塩食時における血漿アミノ酸濃度の関連。SS: 食塩感受性、SR: 食塩抵抗性、P<0.05、Unpaired t-test

#### 4. 考 察

本研究は、食塩摂取が体内アミノ酸動態にどのような影響を及ぼすかを検討した初めての試験である。

ダール食塩感受性ラットにおける検討では、SHR と WKY において行った先行研究と同様、血漿中・尿中アミノ酸動態は食塩の摂取や系統の違いにより異なる影響を受けていた。食塩摂取による血圧の上昇度、すなわち食塩感受性は、尿中アラニン、ヒドロキシプロリン、3-メチルヒスチジンの排泄量と相関関係にあり、これらの指標を検討することにより、食塩感受性の有無を知り得る可能性がある。しかし、先に実施した SHR と WKY を用いた検討結果とは傾向が異なっているため、食塩が体内アミノ酸動態に与える影響は同じラットであっても系統により違う可能性がある。当然、動物種によっても異なっている可能性が高く、ヒトにおける臨床試験を実施する必要があった。

そこで、ヒトにおける食塩負荷試験を計画し、実際に行い得た。ヒトにおいても、過剰な食塩の摂取は血漿アミノ

酸濃度に影響を与えた。血漿ヒドロキシプロリンはダール食塩感受性ラットを用いた検討でも、食塩摂取量や食塩感受性の有無の影響を強く受けており、ヒトにおける検討結果を補強するものと考えられた。

しかし、例数が少ないため、今後同様の試験を多数例において検討していく必要がある。また、より簡便に採取できる尿中アミノ酸測定によっても食塩摂取量や食塩感受性の有無を推定しえるかどうかについて検討を行う必要がある。具体的には、多数例において、一日アミノ酸排泄量をスポット尿から算定することができるか、尿中アミノ酸プロフィールと塩分摂取量との相関関係、食塩摂取による血圧上昇度と尿中アミノ酸プロフィールの関連を解析する。また、末梢血球数算定、血清クレアチニン、BUN、Na、K、Cl、グルコース、インスリン、総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール、HbA1c、血漿レニン活性、総レニン、アルドステロンを測定し、アミノ酸プロフィールとの関係を解析したい。

また今回は、食塩による血漿中、尿中アミノ酸プロフィールの変化が生じる機序については検討を行うことが出来なかった。今後まずは、高血圧モデル動物から摘出した腎組織を用いて、CAT、BAT、LATファミリーなどの各種アミノ酸トランスポーターにつき、腎内の発現の食塩による変化や系統間の差を解析したい。

本研究の結果から、体内アミノ酸動態は、食塩摂取量や食塩感受性の有無に影響されることが明らかとなった。高血圧の病態を理解する上で血漿・尿中アミノグラムの解析が有用であり、今後ヒトにおける研究を更に進展させる必要があると考える。

## 謝 辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団平成 24 年度研究助成によって実施された。臨床試験の実施にあたり、9 名の福島県立医科大学医学部学生の協力を得た。

## 文 献

1. Noguchi Y, *et. al.* Am J Clin Nutr 83: 513S, 2006
2. 第 34 回日本高血圧学会総会、2011 年宇都宮

## Usefulness of Urinary and Plasma Aminograms in Predicting Salt Sensitivity and Hypertension

Junichi Yatabe

Fukushima Medical University

### Summary

#### 1) Characteristic alterations of plasma and urine amino acids in Dahl salt-sensitive rats

**Background:** We have previously reported that urine and plasma amino acid patterns differ by hypertensive strain (SHR) and salt loading (The Japanese Journal of Nephrology 54(3) 2012: 285). The current study explored if salt sensitivity can be determined by characteristic amino acid patterns.

**Methods:** Dahl salt-sensitive rats (DSS) and salt-resistant rats (DSR) were fed normal-salt (0.28%) or high-salt (4%) chow for 1 week. Urine and plasma amino acid and metabolite concentrations were measured by LC/MS/MS.

**Results:** Urine volume was significantly less in DSR on both diets. On normal salt, urinary amino acids did not differ by strain. On high-salt, urine excretions of sarcosine, alanine, hydroxyproline, glycine, 3-methylhistidine and arginine associated with strain. Multiple regression analysis showed that alanine, hydroxyproline and 3-methylhistidine presented significant relationship with the salt-sensitive strain ( $R^2=0.79$ ,  $P=0.002$ ). In plasma, glycine and alpha-aminobutyric acid concentrations differed significantly by strain.

**Conclusion:** Urinary amino acids changed dynamically in salt-sensitive animal model and with dietary NaCl.

#### 2) Effects of salt intake and salt sensitivity on amino acid dynamics in humans

**Background:** Animal studies suggested that amino acid patterns may be useful in predicting salt intake and salt sensitivity. A clinical study was performed to determine if it is applicable to humans.

**Methods:** Nine healthy volunteers were examined during their usual diet, low-salt diet (3 g NaCl/day) for 7 days, and high-salt diet (20 g NaCl/day) for 7 days. Blood pressure, urine, and blood samples were taken on the last day of each diet. Subjects with salt sensitivity index ( $SSI = (\text{mean blood pressure (MBP) during high-salt diet} - \text{MBP during low-salt diet}) / \text{MBP during low-salt diet}$ ) of greater than or equal to 0.05 were considered salt sensitive, and those with SSI below 0.05 were considered salt resistant. Amino acid measurements were by LC/MS/MS.

**Results:** There were no adverse events. Urinary sodium excretion reflected the salt intake on both diets. Change from low- to high-salt diet significantly increased the plasma hydroxyproline concentration while decreased the concentrations of methionine and phenylalanine. Plasma concentrations of sarcosine and lysine were significantly lower in the 3 salt-sensitive subjects than the 6 salt-resistant subjects during low-salt diet.

**Conclusion:** Results of the above studies suggest that amino acid patterns are significantly affected by salt intake and salt sensitivity. Aminograms from plasma and urine may aid our understanding of the pathophysiology of hypertension. Further clinical studies are necessary to explore their diagnostic possibility in the future.