

世代を超えて食塩感受性血圧上昇を減弱する食事因子の解明

大崎 雄介¹, 角田 梨紗子², 長澤 将³

¹ 東北大学大学院農・栄養学, ² 東北大学病院耳鼻咽喉頭頸部外科, ³ 東北大学大学院医・腎臓内科学

概要

【背景】 高血圧は心血管疾患や脳血管疾患, 総死亡のリスク因子である。食塩の摂取は体液量の増加を介して血圧上昇に寄与することが知られている。食塩以外にも, 母体の低栄養状態が児の高血圧リスクと関連するという疫学調査や, 食塩感受性高血圧ラットへの高たんぱく質飼料の給餌が血圧上昇と腎障害を悪化させる動物実験などの報告があるが, 特定の成長ステージに注目した栄養状態の変化による血圧や腎障害への影響については十分には解明されていない。本研究では成熟期, あるいは胎児期/哺乳期の食塩感受性高血圧ラットへの高たんぱく質飼料給餌が血圧と腎障害に与える影響について比較解析することを目的とした。

【方法】 実験には Dahl 食塩感受性高血圧ラットを使用した。[成熟期給餌試験] 市販固型飼料 MR ストックを与えて 9 週齢まで飼育したラットに 18%カゼインを含む通常たんぱく質 (NP) 飼料, 8%食塩含有 NP (NPHS) 飼料, 30%カゼインを含む高たんぱく質 (HP) 飼料または 8%食塩含有 HP (HPHS) 飼料与えて 3 週間飼育した。[胎児期・哺乳期給餌試験] 親ラットの交配期間, 哺育期間は NP 飼料または HP 飼料を給餌し, 4 週齢で離乳した仔ラットには全て HP 飼料を与えて, 9 週齢まで飼育し, HP または HPHS 飼料に変更してさらに 3 週間飼育した。高食塩飼料給餌期間中は週 1 回テールカフ法により血圧を測定し, 腎障害マーカーとして 24 時間尿中タンパク質排泄量 (UP) を測定した。

【結果】 [成熟期給餌試験] 摂餌量及び体重は飼料による変化はなかった。高食塩飼料給餌は収縮期血圧, UP を有意に上昇させた。UP は NPHS 群と比較して HPHS 群で有意に上昇した。

[胎児期・哺乳期給餌試験] 胎児期/哺乳期に HP 飼料を給餌したラットでは, 体重が有意に上昇した。高食塩飼料給餌開始後 3 週目の摂餌量ならびに体重は減少し, 収縮期血圧, UP は上昇した。胎児期・哺乳期に HP 飼料を給餌したラットでは, 同時期に NP 飼料を給餌したラットと比較して, 成熟期に高食塩飼料を給餌した際の UP が有意に低下した。

【結論】 高たんぱく質飼料給餌は, 成熟期では食塩感受性高血圧による腎障害を, 血圧非依存的に悪化させた。一方で, 胎児期/哺乳期では逆に仔の食塩感受性高血圧による腎障害を, 血圧非依存的に軽減させる可能性が示唆された。

1. 研究目的

食塩は古来より使用され, 食品の保存ならびに調味において非常に重要な調味料である。一方でヒトをはじめとする哺乳類では, 血漿中のナトリウムイオン濃度は厳密に制御されることから, 食塩の摂取による体内のナトリウム量の増加は体液量を増加させて血圧を上昇させる要因となりうる。血圧の上昇は心臓や脳といった, 生命の維持に重要な臓器の血管事故リスクを上昇させ,

生活の質あるいは生命予後を著しく低下させることが多くの研究から明らかにされている¹⁾。心臓の冠動脈や脳血管の穿通枝, 眼の中心網膜動脈, 腎臓の傍髄質糸球体の輸入細動脈といった, 生命の維持に重要な臓器の血管には解剖学的に似通った特徴があり, 全身血圧のかかる動脈から相対的に細く, 血圧の低い血管が直接分支していることから, 圧格差が生じやすい strain vessel 構造となっている²⁾。実際に高血圧は心不全や,

日本人の主要な死因である脳血管疾患の重要なリスクファクターであることが報告されている³⁾。血圧が正常に保たれている間はこれらの血管の障害は少ないが、血圧が上昇すると圧格差が拡大することから障害が生じやすい構造となっている。この血管構造は脱水や出血などにより循環血漿量が低下した際にも生命の維持に重要な臓器に血液循環を供給するのに都合がよく、生活圏を水中から陸上へ移した動物種にとっては生存確率を上昇させる進化であったと推察されるが、塩分や水分の摂取が容易である現代においては、かえって臓器障害を引き起こしやすい構造としてネガティブに作用している可能性がある⁴⁾。体液量と血圧の適正化と臓器障害の予防のために、日本高血圧学会では日本人の食塩摂取量を1日当たり6g以下とすることを推奨しているが、実際には1日当たりおよそ10gが摂取されている状況であり⁵⁾、日本では約3人に1人が高血圧症であると推計されている⁶⁾。

一般的に、健常人ではナトリウムを摂取により血圧が上昇しても、上昇した血圧により尿中へのナトリウム排泄が促進される機構(圧-ナトリウム利尿)が存在することから、ナトリウム摂取により誘導される血圧上昇は一時的なものに限られる。腎臓皮質表層糸球体では比較的長い小葉間動脈と自動調節能を有する糸球体により血圧と血流量が制御され、血圧が上昇しても腎臓皮質血流量が保たれる一方で、弓状動脈と小葉間動脈間が短いことに加えて糸球体内圧自動調節能が乏しい傍髄質糸球体輸出細動脈から直血管へと供給される腎臓髄質領域では、全身血圧の上昇に伴って血流量が増加する。直血管の血流量の上昇による直血管内圧力の上昇が腎臓間質静水圧を上昇させて腎臓尿細管におけるナトリウムの再吸収を抑制し、結果、尿中へのナトリウム排泄が促進されて体液量が減少して血圧が正常化するという機序により、圧-ナトリウム利尿が維持されている⁷⁾。したがって、この圧-ナトリウム利尿機構が障害されると体液上昇に伴って血圧が上昇しても、腎尿細管でのナトリウム再吸収が十分には抑制されないこととなり、尿中へのナトリウム排泄が損なわれて血圧も十分には低下させることができないという、ナトリウム感受性高血圧の病態が生じてし

まう⁸⁾。圧-ナトリウム利尿が障害される原因や機序は完全には解明されているわけではないが、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の亢進や酸化ストレスの上昇など、多くの因子が関与することが示されている⁹⁾。

食塩以外の食事成分についても高血圧との関連が広く研究されており、例えば高たんぱく質飼料の給餌は食塩感受性高血圧ラットにおける高食塩飼料給餌時の血圧を上昇させて腎障害を悪化させるという報告がある¹⁰⁾。一方で、ヒトを対象とした疫学調査から、妊娠期の母体の低栄養状態は出生児が将来的に高血圧となるリスクと関連するという報告があるものの¹¹⁾、特定の成長ステージに注目した栄養状態の変化による血圧や腎障害への影響については十分には解明されていない。本研究ではDahl食塩感受性高血圧ラットをモデル動物として、成熟期、あるいは胎児期・哺乳期に高たんぱく質飼料を給餌することが、血圧と腎障害に与える影響について比較解析することにより、成長ステージにおける栄養素摂取状況の違いが、食塩感受性高血圧と腎障害の発症に与える影響について解明することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 動物実験

本研究における動物実験は、すべて東北大学における動物実験等に関する規程に基づき、東北大学・環境安全委員会動物実験専門委員会の承認と東北大学動物・遺伝子実験支援センターの助言を得て実施した。実験動物に使用したDahl食塩感受性高血圧ラットは東北医科薬科大学より譲渡を受け、市販固型飼料(ラボMRストック、日本農産)を与えて、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、12時間の明暗サイクル(明期8時00分から20時00分)に設定された飼育室で自家繁殖により維持した。

たんぱく質濃度の異なる精製飼料はMiguelらの方法を改変し、実験動物のための標準飼料であるAIN-93G組成からたんぱく質源であるカゼインと炭水化物源であるコーンスターチの割合を変更して作成した¹⁰⁾。18%カゼイン含有飼料と30%カゼイン含有飼料を、それぞれを通常たんぱく質飼料、高たんぱく質飼料とし、これらの飼料に塩化ナトリウムを8%の割合で添加したものを、正常たんぱく質高食塩飼料または高たんぱく質高食塩飼料とした。

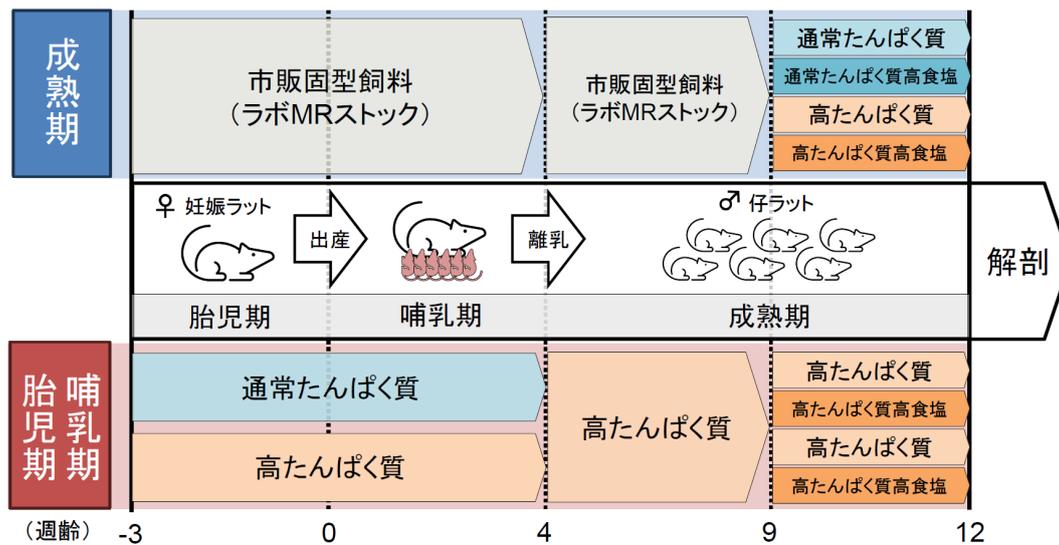


Fig 1. 動物試験の概略

成熟期の試験では、離乳した雄性 Dahl 食塩感受性高血圧ラットを 9 週齢になるまで市販固型飼料を与えて飼育し、9 週齢から 12 週齢までの 3 週間は通常たんぱく質飼料、通常たんぱく質高食塩飼料、高たんぱく質飼料、高たんぱく質高食塩飼料を与えて飼育した。

胎児期・離乳期の試験では、自家繁殖をしている Dahl 食塩感受性高血圧ラットの交配開始時から出生した仔を 4 週齢で離乳するまでの間は通常たんぱく質飼料または高たんぱく質飼料を給餌し、離乳後はすべての雄性ラットに高たんぱく質飼料を 9 週齢になるまで自由摂食で給餌した。この 9 週齢の雄性ラットに、高たんぱく質飼料または高たんぱく質高食塩飼料飼料を与えて 3 週間の飼育を行った。

成熟期試験、胎児期・離乳期試験ともに高食塩飼料を与えた 9 週齢から 12 週齢の間、体重、摂食量、摂水量を週に 1 回測定した。また、代謝ケージにより週 1 回の採尿を行い、尿量並びに Bradford 法による尿中タンパク質排泄量を測定した。収縮期血圧は MK-2000 (室町機械) を使用して週に 1 回測定した。飼育期間終了時にラットをケタミン (40 mg/kg 体重)、キシラジン (3 mg/kg 体重) の筋肉内投与により麻酔し、腎臓皮質領域を採取して RNAlater に浸漬し、-20°C で保存した。

2. 2 RT-PCR 法による腎障害マーカー遺伝子 mRNA 発現量の評価

ISOGEN (日本ジーン) を使用して腎組織から抽出した total RNA のうち 2 µg を鋳型として SuperScript Reverse

Transcriptase III (Thermo Fisher Scientific) を使用して cDNA を合成した。得られた cDNA の一部を鋳型として THUNDERBIRD qPCR Mix (TOYOBO) と CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を使用し、transforming growth factor $\beta 1$ (*Tgfb1*, Fw: TGCGCCTGCAGAGATTCAAG, Rv: AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA), collagen type I $\alpha 1$ chain (*Coll1a1*, Fw: CCTACAGCAGCCTTGTGGAT, Rv: ACTGTCTTGCCCCAAGTTCC), fibronectin 1 (*Fnl1*, Fw: CTGAACCCAGTCCCGATGGTA, Rv: CACGTCCAACGGCATGAAG), Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (*Ngal*) (*Lcn2*, Fw: AGGAGCGATTTCGTCAGCTTTG, Rv: GAACCATCAGGCCACTGCAC), kidney injury molecule-1 (*Kim-1*, *Havcr1*, Fw: GTACCAACATCAACCAGAGTCTCCA, Rv: TCTGTACCTCAGCAGTTGTCTCA), osteopontin (*Opn*, *Spp1*, Fw: TCCTGCGGCAAGCATTCTC, Rv: CTGCCAAACTCAGCCACTTTCA), Nephtrin (*Nphs1*, Fw: TGATTGGCGGCTAGGACTTAGG, Rv: TAAGCATGCACACATCGCACA), podocin (*Nphs2*, Fw: TCCGTCTCCAGACCTTGGAATAC, Rv: TGGATGGCTTTGGACACATGA),

Monocyte chemoattractant protein-1 (*Ccl2*, Fw: CTATGCAGGTCTCTGTACGCTTC, Rv: CAGCCGACTCATTGGGATCA) に特異的なプライマーを用いて増幅した。なお、すべての mRNA 発現量は eukaryotic translation elongation factor 1 α 1 (*Eef1a1*, Fw, GATGGCCCCAAATTCTTGAAG, Rv, GGACCATGTCAACAATTGCAG) 発現量により補正した。

3. 研究結果

3.1 成熟期における高たんぱく質飼料給餌の影響

飼育期間中の摂餌量ならびに体重の推移を **Fig. 2 上段** に示した。高食塩飼料を給餌した群と比較して正塩飼料を給餌した群では摂餌量に一時的な低下がみられたが、期間全体では群間に差はみられなかった。体重も群間に差は認めなかった。飼育期間中の尿量並びに飲水量を **Fig. 3 上段** に示した。正食塩飼料給餌群では飼育期間中に尿量の変動は見られなかった。高食塩飼料を給餌した群では第 0 週と比べて第 1 週以降でいずれも有意に尿量が上昇し、それぞれ正食塩飼料を給餌した群と比較しても有意な高値を示した。高食塩飼料を給餌した群の中で比較すると、高食塩飼料給餌後第 3 週目の尿量は通常たんぱく質高食塩飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群で有意な高値を示した。飲水量は尿量とほぼ同様に推移したが、尿量の結果とは異なり、通常たんぱく質高食塩飼料群と高たんぱく質高食塩飼料群との間に差は認められなかった。

高食塩飼料給餌期間中の収縮期血圧の推移を **Fig. 4 上段左** に示した。正食塩飼料を給餌した通常たんぱく質飼料群ならびに高たんぱく質飼料群では試験期間を通して収縮期血圧の変化を認めなかった。一方で、高食塩飼料を給餌した通常たんぱく質高食塩飼料群ならびに高たんぱく質高食塩飼料群は高食塩飼料給餌開始後第 2 週目以降で第 0 週と比較して有意な血圧の上昇を認めた。このことから、通常たんぱく質高食塩飼料群ならびに高たんぱく質高食塩飼料群の収縮期血圧は、それぞれ通常たんぱく質飼料群、高たんぱく質飼料群と比較して高食塩飼料給餌開始後第 2 週以降で有意な高値を示した。Dahl 食塩感受性高血圧ラットでは高食塩飼料の給餌により腎障害が生じる¹²⁾ことから、腎障害マーカーとして尿中タンパク質排泄量を測定した (**Fig. 4 上段右**)。高食塩飼料を給餌しなかった群では試験期間を通して尿中タンパク質排泄量に変化はみられなかった。一方で、高食塩飼料の給餌は速やかに尿中タンパク質排泄

量を上昇させ、高食塩飼料給餌開始前と比較して給餌後第 1 週以降で有意な高値を示した。また、高食塩飼料を給餌した群の中でも、高たんぱく質高食塩飼料群では通常たんぱく質高食塩飼料群と比較して高食塩飼料給餌開始後第 2 週以降では尿中タンパク質排泄量がより高値を示した。

飼育期間終了時の体重あたりの腎臓、肝臓、腓腹筋重量を **Fig. 5 上段** に示した。腎臓重量は正食塩群と比較して高食塩飼料群では有意な高値を示した。通常たんぱく質高食塩飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群の腎臓重量はさらに高値を示した。肝臓並びに腓腹筋重量は群間に差を認めなかった。

腎障害マーカーとして測定した尿中タンパク質排泄量が高食塩飼料の給餌で上昇し、高食塩含有高たんぱく質飼料の給餌でさらに上昇したことから、腎臓皮質領域における腎障害マーカー遺伝子 mRNA 発現量を qRT-PCR 法により評価した (**Fig. 6**)。腎臓線維化マーカーとして測定した *Tgfb1*, *Colla1*, *Fn1* の mRNA 発現量は高食塩飼料給餌ならびに高たんぱく質飼料給餌の影響を受けなかった。糸球体スリット膜構成たんぱく質である *Nphs1* の mRNA 発現も飼料による影響を受けなかった。一方で、腎尿細管障害マーカーとして測定した *Ngal*, *Kim-1*, *Opn* については通常たんぱく質飼料群と通常たんぱく質高食塩飼料群の間には差は認められなかったものの、高たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群では有意な上昇を認めた。また、炎症マーカーとして測定した *Mcp-1* の mRNA 発現量も同様に、通常たんぱく質飼料群と通常たんぱく質高食塩飼料群には差はなかったが、高たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群は有意に上昇していた。

3.2 胎児期・哺乳期における高たんぱく質飼料給餌の影響

高食塩飼料給餌期間中の摂餌量ならびに体重の推移を **Fig. 2 下段** に示した。正食塩飼料を給餌した群では摂餌量は変化しなかった。一方で、高食塩飼料は給餌開始後 3 週目に有意な摂餌量の減少が認められ、通常たんぱく質高食塩飼料群と高たんぱく質高食塩飼料群の摂餌量はそれぞれ正食塩飼料を与えた通常たんぱく質飼料群、高たんぱく質飼料群に対して有意な低値を示した。体重は高食塩給餌期間開始時点で、胎児期・哺乳期に通常たんぱく質飼料を給餌した群と比較して高たんぱく質飼料を給餌した群で有意な高値を示した。高食塩飼料の給餌により体重の上昇は鈍化し、高食塩飼料給餌開始 3 週

間目において高たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群では体重が低値傾向を示し、通常たんぱく質飼料群と比較して通常たんぱく質高食塩飼料群では有意な低値を示した。

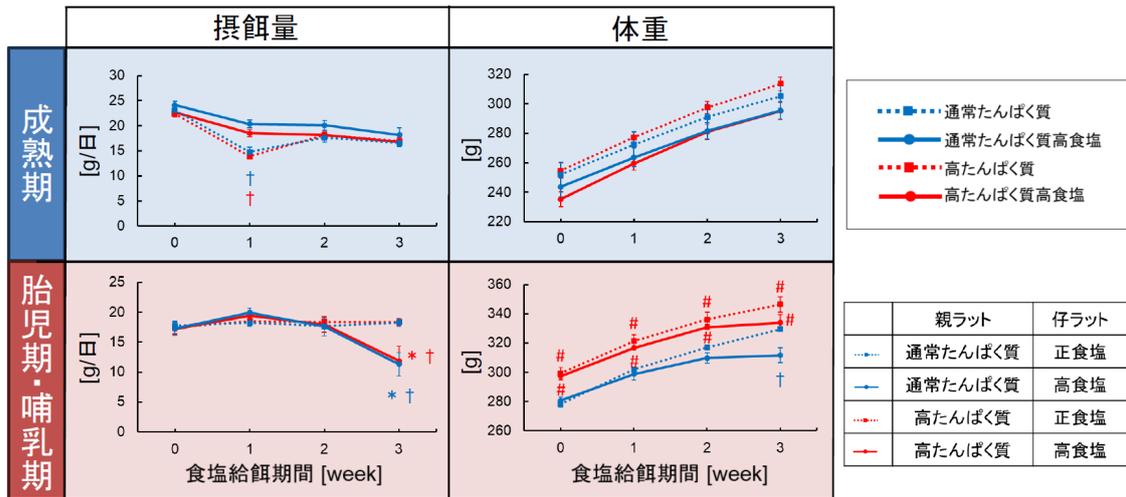
飼育期間中の尿量並びに飲水量を **Fig. 3 下段** に示した。正食塩飼料給餌群では飼育期間中に尿量の変動は見られなかった。高食塩飼料の給餌により、通常たんぱく質高食塩飼料群ならびに高たんぱく質高食塩飼料群では第 0 週と比べて第 1 週以降第 3 週まで有意に尿量が増加し、それぞれ正食塩飼料を給餌した通常たんぱく質飼料群あるいは高たんぱく質飼料群と比較しても有意な高値を示した。一方で、通常たんぱく質高食塩飼料群と高たんぱく質高食塩飼料群の間に尿量の差は認められず、成熟期の試験の結果とは異なっていた。飲水量は尿量と同様に推移した。

高食塩飼料給餌期間の収縮期血圧の推移を **Fig. 4 下段左** に示した。正食塩飼料を給餌した通常たんぱく質飼料群、高たんぱく質飼料群では試験期間を通して収縮期血圧に変動を認めなかった。一方で、高食塩飼料を給餌した通常たんぱく質高食塩飼料群ならびに高たんぱく質高食塩飼料群では、高食塩飼料給餌後第 1 週目以降で第 0 週と比較して有意な収縮期血圧の上昇を認めた。このため、通常たんぱく質飼料群と比較して通常たんぱく質高食塩飼料群では第 1 週から、高たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群では第 2 週以降で収縮期血圧は有意な高値を示した。尿中タンパク質排泄量の結果を **Fig. 4 下段右** に示した。正食塩飼料を給餌した通常たんぱく質飼料群ならびに高たんぱく質飼料群は試験期間を通して尿中タンパク質排泄量に変化は見られなかった。一方で、高食塩飼料を給餌した通常たんぱく質高食塩飼料群ならびに高たんぱく質高食塩飼料群では高食塩飼料給餌開始後第 1 週目から第 3 週までの間、第 0 週と比較して有意な尿中タンパク質排泄量の増加を認めた。このことから、通常たんぱく質高食塩飼料群ならびに高たんぱく質高食塩飼料群は、それぞれ通常たんぱく質飼料群ならびに高たんぱく質飼料群と比較して高食塩飼料給餌開始後第 1 週目から有意な高値となっていた。高食塩飼料を給餌した群の中で比較すると、通常

たんぱく質高食塩飼料群は高たんぱく質高食塩飼料群と比較して尿中タンパク質排泄量が高食塩飼料給餌開始後第 2 週目以降で有意な高値を示し、成熟期の試験とは逆の結果となっていた。

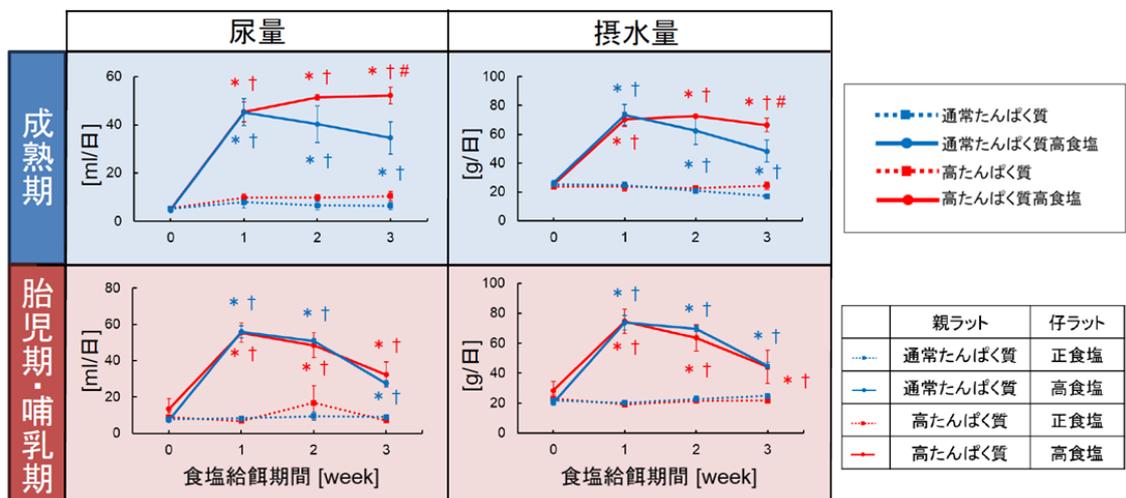
飼育期間終了時の体重あたりの臓器重量を **Fig. 5 下段** に示した。腎臓重量は高食塩飼料を給餌した通常たんぱく質高食塩飼料群ならびに高たんぱく質高食塩飼料群がそれぞれ通常たんぱく質飼料群、高たんぱく質飼料群に対して有意に上昇していたが、飼料中たんぱく質濃度による差は見られなかった。肝臓重量ならびに腓腹筋重量には高食塩ならびに飼料中たんぱく質濃度による差は見られなかった。

腎臓皮質領域における腎障害マーカー遺伝子 mRNA 発現量を qRT-PCR 法により評価したところ、腎臓線維化マーカーとして測定した *Tgfb1*, *Coll1* は飼料による変化は認められなかったが、*Fnl* の mRNA 発現量は通常たんぱく質飼料群あるいは高たんぱく質飼料群と比較して、それぞれ通常たんぱく質高食塩飼料群と高たんぱく質高食塩飼料群は有意な上昇を認めた (**Fig. 7**)。さらに高たんぱく質高食塩飼料群では通常たんぱく質高食塩飼料群と比較して有意な高値を示した。糸球体スリット膜構成たんぱく質である *Nphs1* の mRNA 発現は高食塩飼料を給餌しなかった通常たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質飼料群で有意な高値を示した。また、高食塩飼料の給餌により発現が減少し、通常たんぱく質飼料群と比較して通常たんぱく質高食塩飼料群、高たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群で有意な低値を示した。*Neph2* の mRNA 発現も高たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群で有意に低値を示した。尿細管障害マーカーとして測定した *Ngal*, *Kim-1*, *Opn* の mRNA 発現量は高食塩飼料の給餌により上昇し、通常たんぱく質飼料群と比較して通常たんぱく質高食塩飼料群、高たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群で有意に上昇したが、飼料中たんぱく質濃度による影響は見られなかった。炎症マーカーとして測定した *Mcp-1* の mRNA 発現量は高たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質高食塩飼料群で有意な高値を示した。



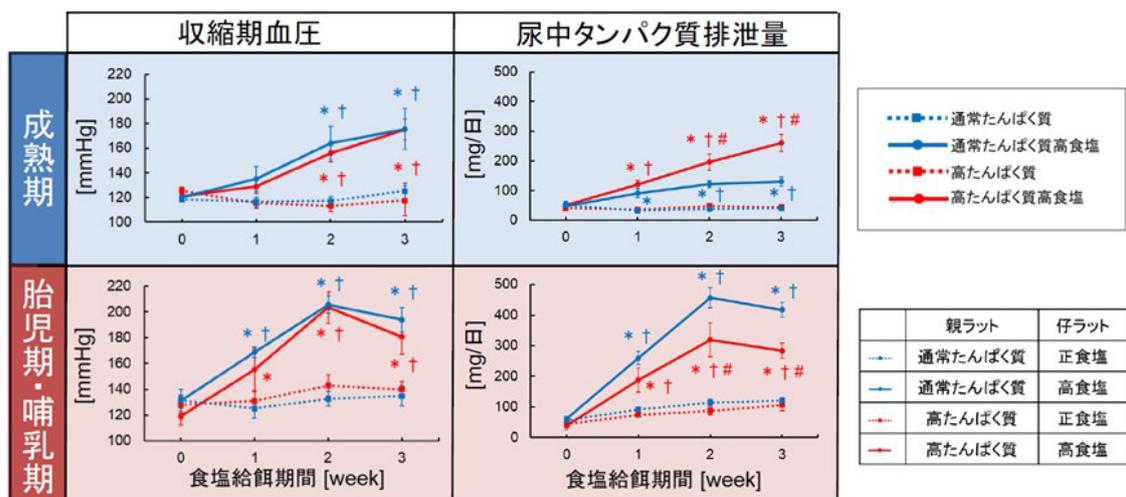
mean ± SE, n=3-6. Two-way RM ANOVA, Tukey-Kramer. *p < 0.05 vs. 0 w, †p < 0.05 vs. 正食塩, #p < 0.05 vs. 通常たんぱく質.

Fig 2. 試験期間中の摂餌量ならびに体重の推移



mean ± SE, n=4-6. Two-way RM ANOVA, Tukey-Kramer. *p < 0.05 vs. 0 w, †p < 0.05 vs. 正食塩, #p < 0.05 vs. 通常たんぱく質.

Fig 3. 試験期間中の尿量と摂水量の推移



mean ± SE, n=4-6. Two-way RM ANOVA, Tukey-Kramer. *p < 0.05 vs. 0 w, †p < 0.05 vs. 正食塩, #p < 0.05 vs. 通常たんぱく質.

Fig 4. 試験期間中の収縮期血圧と尿中タンパク質排泄量の推移

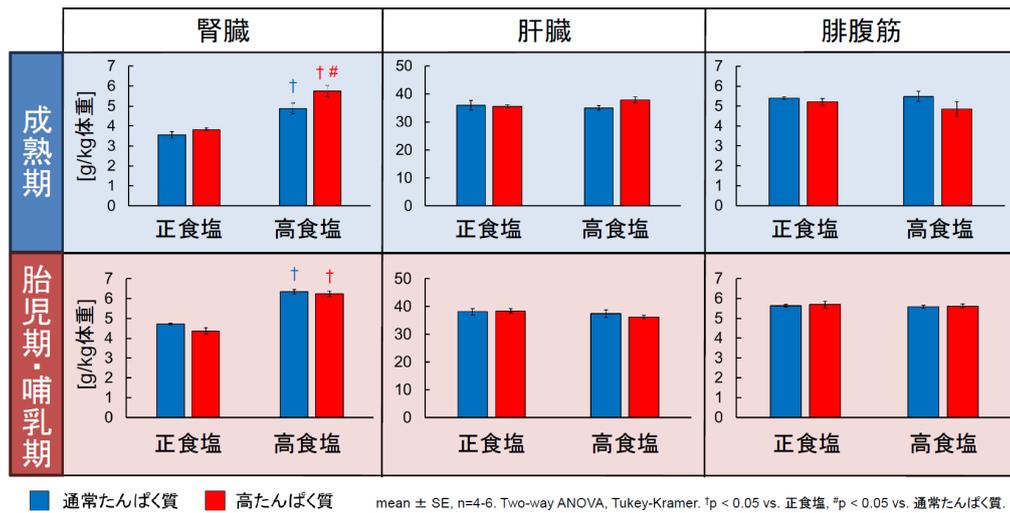


Fig 5. 飼育期間終了時の臓器重量

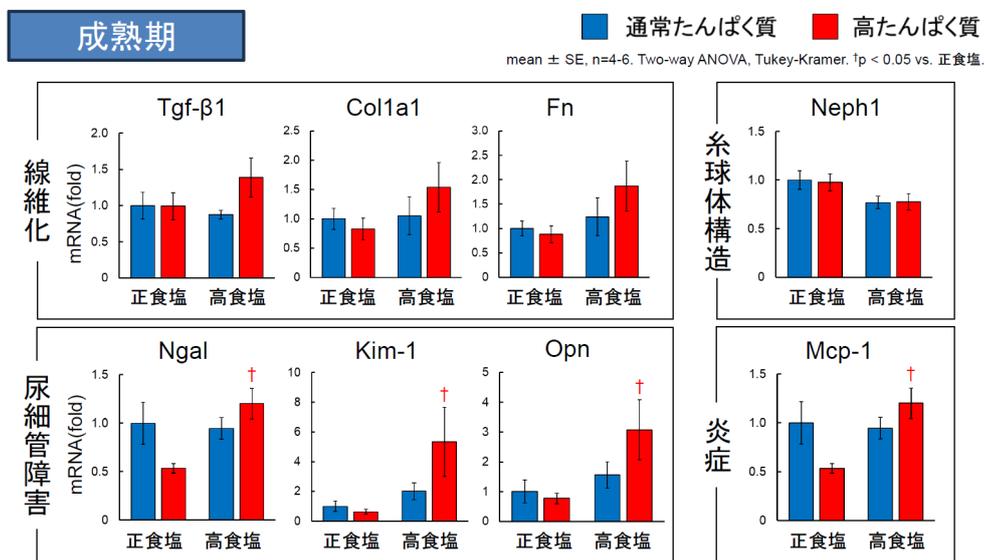


Fig 6. 腎障害マーカーmRNA 発現量 (成熟期の検討)

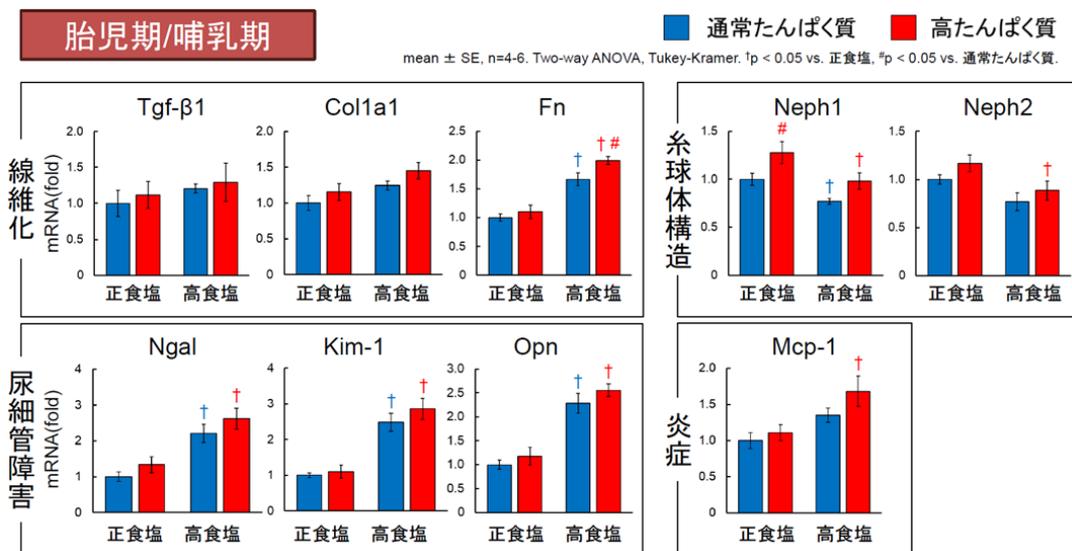


Fig 7. 腎障害マーカーmRNA 発現量 (胎児期・哺乳期の検討)

4. 考察

本研究ではライフステージのある一時期に摂取した食事が食塩感受性高血圧やそれに伴う腎障害に与える影響を解析することを目的に、Dahl 食塩感受性高血圧ラットの成熟期(9 週齢から 12 週齢),あるいは胎児期・哺乳期(親の交配時期から子が 4 週齢に達するまでの期間)に高たんぱく質飼料を給餌し、いずれの群にも 9 週齢から 12 週齢までの期間に高食塩飼料を給餌して収縮期血圧と腎障害マーカーである尿中タンパク質排泄量を測定した。

胎児期・哺乳期に高たんぱく質飼料を給餌した群では、9 週齢時点の仔ラットの体重が通常たんぱく質群と比較して有意に上昇していた一方で、成熟期のラットへの高たんぱく質飼料の給餌は体重に変化をもたらさなかったことから、胎児期や成長期の期間に親のたんぱく質摂取量はこの体重増加に影響を及ぼす一方で、成長期を経過した後のたんぱく質摂取量は体重に対する影響は小さい可能性が示唆された。

収縮期血圧は高たんぱく質飼料を成熟期,あるいは胎児期・哺乳期に給餌した両検討において、いずれも高食塩飼料の給餌により上昇し、高たんぱく質群と低たんぱく質群の間には差が認められなかったという、類似した結果が得られている。しかし、成熟期での検討では、高食塩飼料給餌開始後、第 3 週目にかけて経時的に収縮期血圧が上昇して最終的には 180 mmHg に達したのに対して、胎児期・哺乳期の検討では高食塩飼料給餌開始後第 2 週目にはピークである 200 mmHg に達し、有意な変化ではなかったものの第 3 週にかけては収縮期血圧が低下する傾向にあった。これは高食塩飼料給餌期間に達する前に給餌していた飼料による差が大きいものと推察される。これは成熟期の検討で高たんぱく質飼料を給餌した群において、収縮期血圧には差が生じなかったものの腎障害マーカーである尿中タンパク質排泄量が有意に上昇していたことから、成熟期の高たんぱく質飼料の給餌が腎機能を悪化させる可能性を示唆しており、胎児期・哺乳期の検討では離乳後の仔ラットには高食塩飼料給餌期間まですべて高たんぱく質飼料を給餌していたため、高食塩飼料給餌開始時に潜在的な腎機能に変化が生じており、このために高食塩飼料の摂取による血圧の上昇がより増大していた可能性が考慮される。このことは、成熟期の検討では高たんぱく質飼料給餌群において高食塩飼料給餌

開始後第 2 週時点で尿中タンパク質排泄量が 200 mg/日程度,第 3 週時点においても 250 mg/日程度であったのに対して、胎児期・哺乳期の検討では尿中タンパク質排泄量が第 2 週時点で 300 mg/日に達しており、胎児期・哺乳期の検討における通常たんぱく質飼料群では高食塩飼料給餌開始後第 2 週時点で 400 mg/日を越えていたという結果とも一致する。この仮説を検証するためには、同様の実験で離乳後から 9 週齢になるまでの飼料を通常たんぱく質飼料と高たんぱく質飼料の 2 種類に割り付けて、さらに 9 週齢から高食塩飼料を給餌する試験による検討が必要であると考えられる。

本研究において、高食塩飼料給餌開始後の尿タンパク質排泄量が、成熟期の検討では高たんぱく質飼料給餌群で高く、胎児期・哺乳期における検討では通常たんぱく質飼料を給餌した群で高かったという、逆の結果が得られたという点は、非常に興味深い結果であると考えられる。本研究の研究限界として、週 1 回の収縮期血圧測定を夜行性のラットが飼料を摂取する夜間ではなく、主に休息している日中に行っていた点が挙げられる。覚醒下で 24 時間の連続血圧測定を行った研究においては、Dahl 食塩感受性高血圧ラットの血圧は、高食塩飼料を摂取する夜間に置いて顕著に上昇することが示されていることから¹²⁾、本研究における成熟期の検討に関しては、日中に測定した収縮期血圧は飼料中たんぱく質濃度の影響を受けなかったという結果であったが、通常たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質飼料群で夜間の収縮期血圧が高くなっていた可能性については排除しきれない。一方で、Miguelらの検討では午前中に血圧測定を行っていたものの、血圧の測定方法が観血的方法であったのに対し、我々の検討ではテールカフ法による非観血的方法であったこと、動物実験におけるテールカフ法による血圧測定は自立神経系への刺激を介して血圧に影響を与える可能性が示唆されていることから、過去の報告の結果一部が一致しない点については、実験手法の際による可能性も考えられる。これらの点については、テレメトリー装置などの使用による 24 時間連続血圧モニタリングによる血圧変動の詳細な解析により明らかにすることが可能であると推察される。

一方で、胎児期・哺乳期に高たんぱく質飼料を給餌した群では、通常たんぱく質飼料を給餌した群と比較して、

9 週齢時から 3 週間高食塩飼料を給餌した期間の尿中タンパク質排泄量が低値を示した。腎障害マーカー遺伝子 mRNA の解析結果から高食塩飼料を給餌しなかったラットの Neph1 の mRNA 発現が通常たんぱく質飼料群と比較して高たんぱく質飼料群で有意な高値を示したことから、糸球体数、ひいてはネフロン数が高たんぱく質飼料給餌により上昇し、糸球体 1 個あたりの濾過に対する負荷が減少した可能性も考えられたが、他の遺伝子発現解析では顕著な差を見出すことができなかったことから、この仮説は想像の域を出ず、他に機序を示唆する情報が少ないことから、今後は腎臓の組織学的評価を含めた、さらなる解析が必要である。

5. 今後の課題

本研究では高食塩飼料の給餌により、速やかに収縮期血圧が上昇して尿中タンパク質排泄量が増加したことを根拠に、食塩感受性高血圧による腎障害が生じていたものと推察している。一方で、腎臓中障害マーカー遺伝子 mRNA 発現の変化が、尿中タンパク質排泄量から推察される腎障害の程度とは必ずしも一致しないことから、腎臓の組織学的な解析によって腎障害の程度を解析することが必要である。特に腎臓は血管、糸球体、種々の尿細管と多数のセグメントに分かれることから、病理学的解析によりどの部位が傷害されていたのかを明らかにすることは機序解明において重要な手がかりになるものと期待される。

また、飼料組成の変化は腸内細菌構成を容易に変化させること、ならびに、動物実験において腸内細菌の変化が食塩感受性高血圧に影響することを示すデータが報告されている^{13, 14}。本研究で観察された変化に腸内細菌構成の変化が関与しているかについて、メタゲノム解析あるいは腸内細菌への介入により検討していく余地も存在するものと考えられる。

日本人は食塩摂取量が多く、脳血管疾患や総死亡の低減のためには減塩することを強く推奨される一方で、食事の調理、調味の課程で食塩が果たす役割は非常に多く、実際に減塩を取り入れることは容易ではない。本研究の発展により、食事構成の変化を活用することにより、食塩摂取量を維持したままでも臓器障害のリスクが軽減できる方法が開発されれば、おいしい食事と健康の両立が苦痛なく実施できる可能性を秘めており、今後さらなる研究が必要である。

6. 文献

1. Cook NR, Appel LJ, Whelton PK, J Am Coll Cardiol 2016;68 (15):1609-1617.
2. Nagasawa T, Mori T, Ohsaki Y, Yoneki Y, Guo Q, Sato E, Oba I, Ito S. Albuminuria indicates the pressure-associated injury of juxtamedullary nephrons and cerebral strain vessels in spontaneously hypertensive stroke-prone rats. Hypertens Res. 2012;35(10):1024-31.
3. Ikeda N, Saito E, Kondo N, Inoue M, Ikeda S, Satoh T, Wada K, Stickley A, Katanoda K, Mizoue T, Noda M, Iso H, Fujino Y, Sobue T, Tsugane S, Naghavi M, Ezzati M, Shibuya K. What has made the population of Japan healthy? Lancet 2011;378: 1094-1105.
4. Ito S, Nagasawa T, Abe M, Mori T. Strain vessel hypothesis: a viewpoint for linkage of albuminuria and cerebrocardiovascular risk. Hypertens Res. 2009;32(2):115-21.
5. Kurtz TW, DiCarlo SE, Pravenec M, Morris RC, Functional foods for augmenting nitric oxide activity and reducing the risk for salt-induced hypertension and cardiovascular disease in Japan, J Cardiol, 2018;72(1):42-49.
6. 日本高血圧学会 高血圧治療ガイドライン 2019, 2019.
7. Cowley AW Jr, Roman RJ, Mattson DL, Franchini KG, O'Connor PM, Makino A, Taylor NE, Evans LC, Mori T, Dickhout JG, Jin C, Miyata N, Nakanishi K, Szentiványi M Jr, Park F, Skelton MM, Kurth T, Shimada S. Renal Medulla in Hypertension. Hypertension. 2024;81(12):2383-2394.
8. Cowley AW Jr. Role of the renal medulla in volume and arterial pressure regulation. Am J Physiol. 1997 ;273(1 Pt 2):R1-15.
9. Gross V, Roman RJ, Cowley AW Jr. Abnormal pressure-natriuresis in transgenic renin gene rats. J Hypertens. 1994 Sep;12(9):1029-34.
10. De Miguel C, Lund H, Mattson DL. High dietary protein exacerbates hypertension and renal damage in Dahl SS rats by increasing infiltrating immune cells in the kidney. Hypertension. 2011;57(2):269-74.
11. Miyoshi M, Sato M, Saito K, Otani L, Shirahige K, Miura F, Ito T, Jia H, Kato H, Maternal Protein Restriction Alters the Renal Ptger1 DNA Methylation State in SHRSP Offspring, Nutrients 2018;10(10):1436.

12. Mori T, Polichnowski A, Glocka P, Kaldunski M, Ohsaki Y, Liang M, Cowley AW Jr. High perfusion pressure accelerates renal injury in salt-sensitive hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Aug;19(8):1472-82.
13. Wilck N, Matus MG, Kearney SM, Olesen SW, Forslund K, Bartolomaeus H, Haase S, Mähler A, Balogh A, Markó L, Vvedenskaya O, Kleiner FH, Tsvetkov D, Klug L, Costea PI, Sunagawa S, Maier L, Rakova N, Schatz V, Neubert P, Frätzer C, Krannich A, Gollasch M, Grohme DA, Côte-Real BF, Gerlach RG, Basic M, Typas A, Wu C, Titze JM, Jantsch J, Boschmann M, Dechend R, Kleinewietfeld M, Kempa S, Bork P, Linker RA, Alm EJ, Müller DN. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature.* 2017;551(7682):585-589.
14. Abais-Battad JM, Mattson DL. Influence of dietary protein on Dahl salt-sensitive hypertension: a potential role for gut microbiota. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2018;315(5):R907-R914.

Elucidation of Dietary Factors Which Alleviate Salt-Sensitive Blood Pressure Increases Across Generations

Yusuke OHSAKI¹, Risako KAKUTA², Tasuku NAGASAWA³

¹Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, ²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Tohoku University Hospital, ³ Department of Nephrology, Tohoku University School of Medicine

Summary

[Background] Salt intake increases the risk factor of hypertension, which is a risk factor for cerebrovascular disease and total mortality. In addition to salt, maternal malnutrition has been linked to the risk of hypertension in offspring, and high-protein diet can increase blood pressure and kidney damage in Dahl salt sensitive (DahIS) rats. However, the effects of changes in nutritional status at specific life stages on blood pressure and renal injury have not been fully elucidated. In this study, we aimed to comparatively analyze the effects of feeding high-protein diets on blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertensive rats at the adult or fetal/lactating stages.

[Methods] DahIS rats were used for the experiment. At the 9 weeks old, rats were fed either normal protein (NP) diet containing 18% casein, 8% NaCl containing NP (NPHS) diet, high protein (HP) diet containing 30% casein, or 8% NaCl containing HP (HPHS) diet for 3 weeks. Other rats were fed NP or HP diet during the mating and lactating periods, and all pups weaned at 4 weeks of age were fed HP diet until they reached 9 weeks old, then the diets were switched to HP or HPHS diet for another 3 weeks. During the high salt diet period, systolic blood pressure and 24-hour urinary protein excretion were measured.

[Results] Feeding a high-salt diet significantly increased systolic blood pressure regardless of the timing of feeding the HP diet. Urinary protein excretion also increased with feeding a high-salt diet, but the urinary protein excretion was higher in the HPHS group fed HP during maturity than in the NPHS group. On the other hand, the urinary protein excretion was lower in the HPHS group fed HP during fetal and lactation than in the NPHS group.

[Conclusion] These results indicate that the effect of feeding a high-protein diet on renal damage may vary depending on the life stage.