

食塩摂取量増加に伴う血圧変動性増大のモデル動物の開発と 機序解明および治療手段探索

加藤 丈司, 姜 丹鳳, 川越 由紀子, 桑迫 健二

宮崎大学フロンティア科学実験総合センター

概要 最近, 血圧上昇(高血圧)に加えて, 一定時間における血圧値の動揺(血圧変動性)の増大が, 心血管危険因子であることが報告され, 血圧変動性増大と脳卒中, 心不全, 腎不全, 認知症との関連が指摘されている。血圧変動性増大と関連する因子として, 加齢, 食塩摂取量の増加, 大血管硬度の増加, 圧受容器反射機能の低下等が想定されており, 食塩摂取量増加と心血管・腎疾患の発症進展の間をつなぐ因子として, 血圧変動性増大が, 両者の間に介在する可能性がある。本研究の目的は, 塩摂取増加による血圧変動性増大の病態生理と治療手段の解明に向けて, 食塩摂取増加に伴い血圧変動性が増大する食塩感受性動物モデルを開発することである。特に, 食塩摂取増加に第二の因子が加わることにより, 血圧変動性が食塩感受性になるとの仮説のもとに, 第二の因子の同定を試みた。9 週齢の雄性ウイスター系ラットを対象に, 慢性実験テレメトリーシステムを用いて, 腹腔内に留置した送信器より大動脈の圧波形をモニターした。得られた血圧データより, ヒト24時間自由行動下血圧測定(ABPM)に準じて, 24時間の血圧変動を, 15分毎の血圧値の変動係数(CV)を用いて評価した。ラットを8%高食塩食で飼育したところ, 若干の血圧上昇が観察されたが, 血圧変動性の増大は観察されなかった。第二因子の候補として, アンジオテンシン II(Ang II)を想定して以下の実験を行った。我々が開発した血圧変動性増大モデル・Ang II 持続投与(240 pmol/kg/分)モデルに, 利尿薬ヒドロクロチアジド(HCTZ; 15 mg/kg/日)を投与したところ, 血圧値が低下したが変動性は変化しなかった。次に, 血圧変動を増加させない低用量のAng II(24 pmol/kg/分)を持続投与しつつ, 8%高食塩食で飼育したところ, 若干の血圧上昇が観察され, 血圧変動性の増大傾向がみとめられたが, 顕著な変化ではなかった。以上より, ウイスター系ラットの血圧変動性は, 食塩非感受性と考えられ, Ang II 持続投与ラットの変動性増大も, 非感受性(体液量非依存性)であると想定された。一方, 低用量Ang IIにより, 血圧変動性が食塩感受性になることが示唆されたが, 食塩負荷+低用量Ang IIラットの変動性増大は, モデルとして不十分と思われた。現在, 第二の因子の同定と血圧変動性増大ラットモデル作成に向けて本研究を継続している。

1. 研究目的

本邦では, 未曾有の高齢化社会を迎えており, 持続可能な社会の構築に向けて, 国民の健康寿命延伸および高齢者の疾病予防の重要性が増しつつある。心血管系疾患には, 脳卒中や心臓病等の高齢者の生活の質(QOL)を低下させる疾患が含まれる。心血管系疾患は, 心血管危険因子(生活習慣病)を基盤として発症することから, これらの疾患の予防のためには, 心血管危険因子をコントロールする必要がある。高血圧は, 重要な心血管危険因子であるが, 最近, 血圧

上昇に加えて, 一定時間における血圧値の動揺(血圧変動性)の増大が, 心血管危険因子であることが報告され¹⁻⁴⁾, 血圧変動性増大は, 心血管系疾患のみでなく, 腎不全や認知症とも関連すると報告されている^{4, 5)}。高齢者では, 若年者と比較して, 血圧上昇と心血管疾患発症の関連性が薄れるが⁶⁾, その要因として血圧変動性増大が推測される。血圧変動性増大と関連する因子として, 加齢, 食塩摂取量の増加, 大血管硬度の増加, 圧受容器反射機能の低下等が想定されており^{2-4, 7)}, 食塩摂取量増加と心血管・腎疾患の発症進展

の間をつなぐ因子として、血圧変動性増大が、両者の間に介在する可能性が高い。本研究の目的は、食塩摂取増加による血圧変動性増大の病態生理と治療手段の解明に向けて、食塩摂取増加に伴い血圧変動性が増大する食塩感受性動物モデルを開発することである。特に、食塩摂取増加に第二の因子が加わることにより、血圧変動性増大が生じるとの仮説のもとに、第二の因子の同定を試みた。

2. 研究方法

2.1 実験動物と血圧モニタリング

雄性ウイスター系ラット(日本チャールズリバー)を対象に、慢性実験テレメトリー自動計測システム(Data Sciences International)を用いて、無麻酔無拘束下に連続血圧モニタリングを行った。塩酸メドミジン 0.15 mg/kg, ミダゾラム 2 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔のもと、8 週齢ウイスター系ラットの腹部大動脈に、血圧測定用のカテーテルを挿入固定して、送信器(HD-S10)を腹壁に固定して腹腔内に留置した。なお、ラットは 12 時間明(昼間)・12 時間暗(夜間)のサイクルにて、食塩 0.86%の標準飼料 CE-2(日本クレア)にて飼育した。

2.2 実験プロトコール

腹部大動脈カテーテル挿入・送信器植え込み手術より、7 日間の回復期の後に実験を開始した。実験群として、コントロール群(標準飼料飼育), 高用量 Ang II 投与群(240 pmol/kg/分), 高用量 Ang II 投与+利尿薬ヒドロクロチアジド(HCTZ; 15 mg/kg/日)投与群, 8%高塩食(オリエンタル酵母)群, 低用量アンジオテン

シン II(Ang II; 24 pmol/kg/分)持続投与群, 8%高塩食+低用量 Ang II 投与群の 6 群を作成した。Ang II については、塩酸メドミジン 0.15 mg/kg, ミダゾラム 2 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔のもと、浸透圧ミニポンプ Alzet モデル 2002(米国 Durect Corp)を皮下に留置することにより持続皮下投与とし、HCTZ は、飲水中に溶解して経口投与した。

2.3 血圧変動性の解析と統計処理

血圧データ解析ソフト Ponemah (Data Sciences International)を用いて、15 分毎に 10 秒間血圧を計測し、10 秒間の平均値をその時点の血圧値とした。24 時間で、96 ポイントの血圧データが得られ、それらの血圧値の変動係数(CV)を算出して血圧変動性を評価した。全ての実験データは、一元分散分析(ANOVA)で解析して、各実験群間の比較には、Scheffe 検定を用いて評価した。得られた結果は、平均±標準誤差で提示して、 $P < 0.05$ をもって統計的に有意と判断した。

3. 研究結果

Fig. 1 は、8%高塩食飼育前、後 7 日、後 14 日における 24 時間、15 分毎の収縮血圧変動を示している。高塩食投与前、標準食飼育下において、収縮期血圧は 120 mmHg 程度であり、一定の血圧変動が観察される。8%高塩食飼育後 7 日、後 14 日、若干の血圧上昇が認められるが、血圧変動の幅に大きな変化は観察されなかった。著者らは、高用量の Ang II の持続投与により、血圧変動性が顕著に増大することを報告した(Fig. 2)⁸⁾。

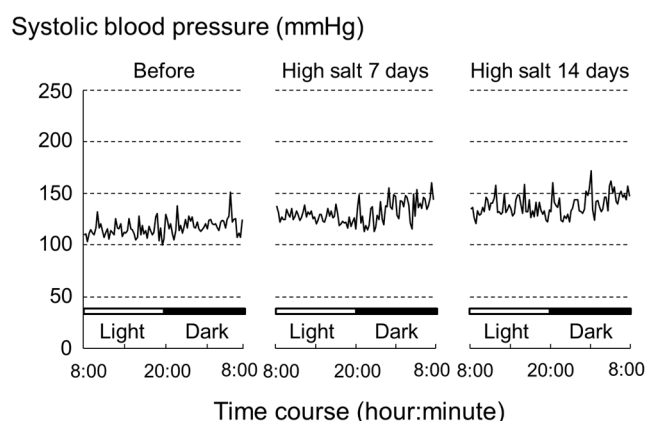


Fig. 1. 8%高塩食飼育前、後 7 日、後 14 日における 15 分毎の収縮期血圧値 SBP の変動

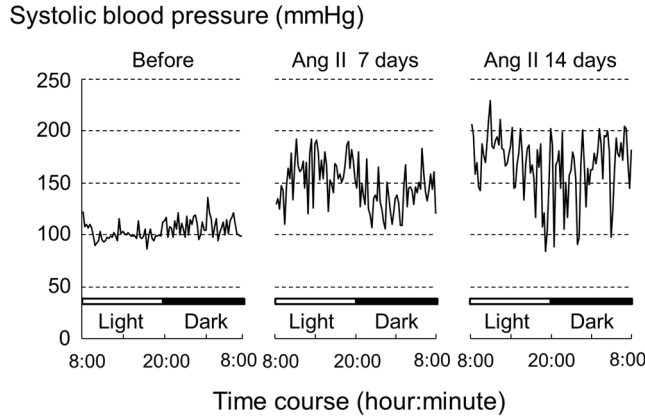


Fig. 2. 高用量 Ang II (240 pmol/kg/分) 持続皮下投与前, 後 7 日, 後 14 日における 15 分毎の収縮期血圧値 SBP の変動

Fig. 3 と **Fig. 4** は, 高用量 Ang II による血圧の上昇と変動性増大に対する HCTZ の作用を, それぞれ示している。HCTZ 投与により, 高用量 Ang II による血圧上昇が部分的に抑制されたが (**Fig. 3**), 血圧変動性増大は抑制されなかった (**Fig. 4**)。次に, 食塩負荷と血圧変動性増大を生じない低用量 Ang II の相乗効果の観察を試みた。**Fig. 5** に示すように, 8%高塩食飼育により, 部分的に血圧上昇が観察された。低用量 Ang II では明確な血圧上昇を生じなかったが, 8%高塩食飼育+低用量 Ang II により, 有意な血圧上昇が観察された。**Fig. 6** は, それらの実験群の血圧変動性であり, 8%高塩食飼育または低用量 Ang II のみの群では, 有意な変動性増大は観察されなかったが, 8%高塩食飼育+低用量 Ang II において, 投与 14 日後, 拡張期血圧の有意な変動性増加が観察された。なお, **Fig. 3**~**6** は, 昼間の血圧および血圧変動性を示しているが, 夜間の血圧および血圧変動性も同様の変化を示した。

4. 考察

血圧変動性とは, 一定時間における血圧値の動揺を意味し, 変動性を評価する時間軸の長短にかかわらず, 血圧変動性の増大は, 心血管疾患や腎疾患の危険因子である^{1-4, 9, 10}。本研究の目的は, 食塩依存性血圧変動性増大の動物モデルを作成して, 病態生理および治療手段の解明につなげることである。血圧変動性を増大させる要因として複数の因子が報告されて

おり, ヒトでは, 外的環境社会的因子と内的生物学的因子に大別することが出来る。前者には, 気候変動, 食塩過剰摂取, 精神的ストレス等が含まれ, 後者には, 交感神経系, レニン・アンジオテンシン系, 圧受容器機能異常, 大血管硬度上昇等の可能性が指摘されている^{2-4, 7, 8}。前者と後者は, 相互に関係しつつ, 血圧変動性を増大する。たとえば, 圧受容器機能異常が存在すると, 気候変動等の環境変化に対する血圧変動が増大すると考えられ, 後者が変動性増大を生じる基盤的要因である。著者らは, 外的環境社会的因子としての食塩過剰に加えて, 内的生物学的因子(第二の因子)が存在することにより, 食塩感受性の血圧変動性増大が生じるとの仮説に基づいて, 本研究を実施してきた。

これまでに, 本研究にて得られている知見として, 1) 正常血圧のウイスター系ラットにおいて, 食塩負荷により血圧は上昇するが変動性の増大は観察されない, 2) 利尿薬は高用量の Ang II 投与による血圧変動性増大には明確な抑制効果を発揮しない, 3) 食塩負荷+低用量 Ang II 投与により, 血圧変動性が増大する傾向はあったが顕著な変化ではなかった。著者らは, 血圧変動性増大の動物モデルの開発に継続的に取り組んでおり, 本研究により, Ang II 以外に, 因子 A 存在のもとに食塩を負荷すると, 変動性増大ラットモデルの作成が可能であることが示唆されている。因子 A の具体的な名称の公開を控えさせて頂くが, 同モデル開発により食塩感受性の血圧変動性増大の病態解明と治療

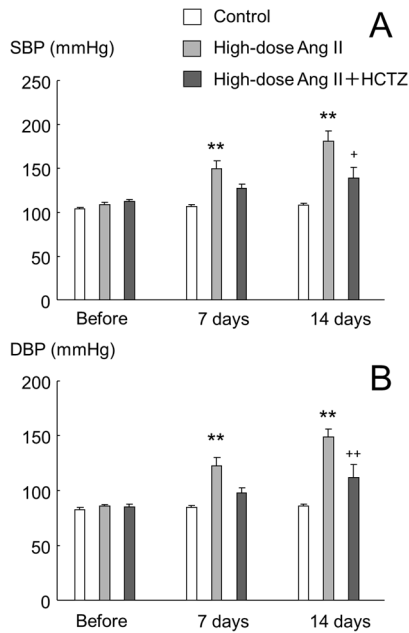


Fig. 3. コントロール群, 高用量 Ang II (240 pmol/kg/分) 持続皮下投与群, 高用量 Ang II + ヒドロクロロチアジド (HCTZ; 15 mg/kg/日) 群における投与前, 後 7 日, 後 14 日の昼間の収縮期血圧 SBP (A) と拡張期血圧 DBP (B)。平均 ± 標準誤差, n=6~10; **P<0.01, vs. コントロール群, +P<0.05, ++P<0.01, vs. 高用量 Ang II 群

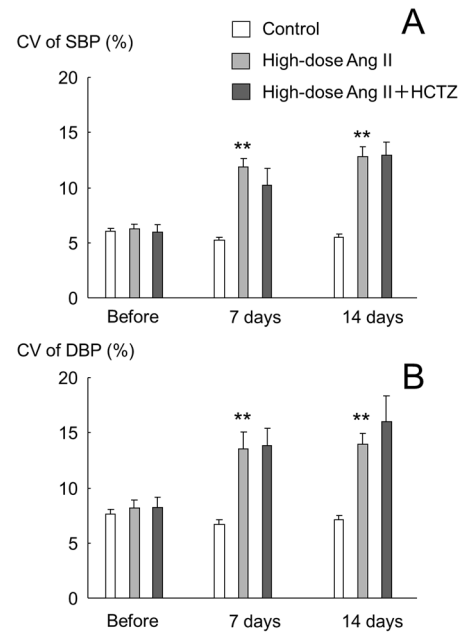


Fig. 4. コントロール群, 高用量 Ang II (240 pmol/kg/分) 持続皮下投与群, 高用量 Ang II + ヒドロクロロチアジド (HCTZ; 15 mg/kg/日) 群における投与前, 後 7 日, 後 14 日の昼間の収縮期血圧 SBP (A) および拡張期血圧 DBP (B) の変動係数 CV。平均 ± 標準誤差, n=6~10; **P<0.01, vs. コントロール群

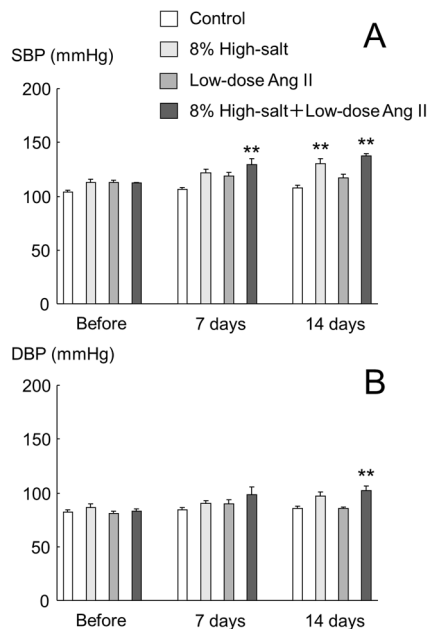


Fig. 5. コントロール群, 8%高塩食飼育群, 低用量 Ang II (24 pmol/kg/分) 持続皮下投与群, 8%高塩食飼育 + 低用量 Ang II 群における投与前, 後 7 日, 後 14 日の昼間の収縮期血圧 SBP (A) と拡張期血圧 DBP (B)。平均 ± 標準誤差, n=3~10; **P<0.01, vs. コントロール群

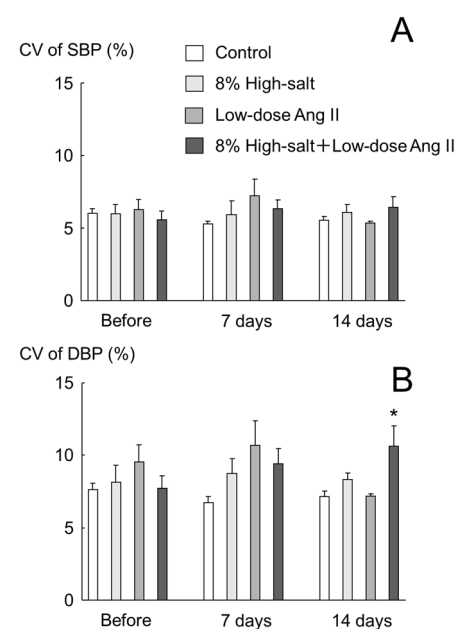


Fig. 6. コントロール群, 8%高塩食飼育群, 低用量 Ang II (24 pmol/kg/分) 持続皮下投与群, 8%高塩食飼育 + 低用量 Ang II 群における投与前, 後 7 日, 後 14 日の昼間の収縮期血圧 SBP (A) と拡張期血圧 DBP (B) の変動係数 CV。平均 ± 標準誤差, n=3~10; *P<0.05, vs. コントロール群

薬探索に向けた研究が可能となりうる。

Fig. 2に示すように、高用量の Ang II の持続皮下投与により、血圧変動性増大モデルが作成可能である⁸⁾。本研究では、同モデルの血圧変動性増大の食塩感受性(体液量依存性)の有無を調べるため、利尿薬の効果を観察したところ、血圧上昇は部分的に抑制されたが血圧変動性の増大は抑制されなかった。すなわち、高用量 Ang II 投与モデルの変動性増大は、食塩非感受性(体液量非依存性)であると推測される。一方、食塩の負荷のみでは、明確な血圧変動性の増大は観察されなかったが、変動性を増大させない低用量の Ang II の持続皮下投与下に、食塩を負荷すると拡張期血圧の変動性が増大する傾向が観察された。ただし、食塩負荷+低用量 Ang II 投与ラットの血圧変動性は、病態解明や治療手段探索が可能となる程、十分な変化ではなかった。血圧変動性増大と食塩摂取の増加の関連性が指摘されているが⁷⁾、その関連には、レニン・アンジオテンシン系や因子 A を含めた複数の因子が介在している可能性を示しているのかも知れない。

5. 今後の課題

著者らは、新たな心血管危険因子・血圧変動性増大の動物モデル開発を継続的に試みている。前述のように、本研究の過程で、因子 A の存在のもと、食塩感受性血圧変動性増大ラットモデルを作成しうる可能性が判明している。動物モデルの開発により、血圧変動性増大の病態生理の解析のみでなく、治療手段の探索が可能となる。ヒト食塩感受性血圧変動性増大の病態と動物モデルとの類似性を検討しつつ、血圧変動性増大に有効な薬剤を探索することにより、変動性増大を合併した疾患の治療向上および心血管疾患の予防を目指したい。

6. 文献

1) Rothwell PM, et al. Prognostic significance of visit-to-visit variability, maximum systolic blood pressure, and episodic hypertension. *Lancet* 2010;

375(9718): 895-905.

- 2) Parati G, et al. Assessment and management of blood-pressure variability. *Nat Rev Cardiol* 2013; 10: 143-155.
- 3) Stevens SL, et al. Blood pressure variability and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2016; 354, i4098.
- 4) Parati G, et al. Hypertension in chronic kidney disease part 2: role of ambulatory and home blood pressure monitoring for assessing alterations in blood pressure variability and blood pressure profiles. *Hypertension* 2016; 67: 1102-1110.
- 5) McDonald C, et al. Blood pressure variability and cognitive decline in older people: a 5-year longitudinal study. *J Hypertens* 2017; 35: 140-147.
- 6) Lewington S, et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; 360(9349): 1903-1913.
- 7) Simmonds SS, et al. Dietary salt intake exaggerates sympathetic reflexes and increases blood pressure variability in normotensive rats. *Hypertension* 2014; 64: 583-589.
- 8) Jiang D, et al. Augmented blood pressure variability in hypertension induced by angiotensin II in rats. *Am J Hypertens* 2016; 29: 163-169.
- 9) Kikuya M, et al. Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study. *Hypertension* 2000; 36: 901-906.
- 10) Kikuya M, et al. Day-by-day variability of blood pressure and heart rate at home as a novel predictor of prognosis: the Ohasama study. *Hypertension* 2008; 52: 1045-1050.

Development of Animal Models of Augmented Blood Pressure Variability Induced by High Salt Intake and Identification of the Mechanism and Therapeutic Methods

Johji Kato, Danfeng Jiang, Yukiko Kawagoe, Kenji Kuwasako

Frontier Science Research Center, University of Miyazaki

Summary

Augmentation of blood pressure (BP) variability has been recently recognized as a risk factor for cardiovascular and renal diseases including stroke, heart failure, renal failure, and dementia. BP variability is reportedly associated with aging, high-salt intake, stiffened large artery, and impaired baroreceptor function, assumably mediating the deteriorative effect of high-salt intake on cardiac or renal diseases. In the present study, we have developed rat models of BP variability augmentation induced by high-salt intake in order to clarify the pathophysiology and therapeutic method for salt-sensitive BP variability augmentation. Particularly, our effort is made to identify factors which render BP variability salt-sensitive. Nine-week-old male Wistar rats fed on 0.86% normal-salt or 8% high-salt diet were subcutaneously infused with the low or high dose (24 or 240 pmol/kg/min) of angiotensin II (Ang II) for 14 days without or with oral administration of 15 mg/kg/day hydrochlorothiazide. BP variability was evaluated using a coefficient of variation of blood pressure recorded every 15 min under an unrestrained condition via an abdominal aortic catheter by a radiotelemetry system. High-salt feeding slightly elevated BP level, but had no effect on BP variability. In rats infused with high dose of Ang II, hydrochlorothiazide reduced BP level, without an effect on BP variability. Low dose of Ang II had no effect on BP variability, while being fed on high-salt diet, rats infused with low dose of Ang II showed slightly augmented diastolic BP variability. The present findings suggest that BP variability of Wistar rats fed on normal-salt diet or of those infused with high dose of Ang II is salt-insensitive or fluid volume-independent. Meanwhile, BP variability became partially salt-sensitive in rats infused with low dose of Ang II. As augmentation of BP variability induced by high-salt feeding plus low dose Ang II seems insufficient as a model, our effort will continuously be made to develop rat models by identifying factors which make BP variability highly salt-sensitive.