

更年期高血圧の成因におけるエストロゲンおよびCa代謝の役割

慶應義塾大学医学部内科 教授 猿田 享男

はじめに

従来、女性の脳梗塞や虚血性心疾患の罹患率は男性に比べて低いと考えられてきた。しかし、最近、女性の平均寿命が延び、急速に高齢化が進み、更年期以降、心血管系疾患の罹患率は急激に増加し男性をも凌ぐことが明らかにされてきた。すなわち、更年期以降の女性に、脳梗塞および虚血性心疾患が多発集積し、徐々に脳血管性痴呆や左室機能不全などの重大な合併症が引き起こされている。

更年期以降の女性に、心血管系疾患が急激に増加する要因の一つに閉経後の高血圧の発症が考えられる。しかしながら、現在までのところ、更年期高血圧症の病態および合併症発症の機序についてはほとんど検討がされていない。

本研究においては、更年期高血圧の臨床的特徴とされる、「高食塩食を摂取した際の血圧上昇」すなわち、食塩感受性に焦点をあて、食塩感受性を示す更年期高血圧の疾患モデルを新しく作成することから着手した。さらに、高血圧の成因となる、細胞内Ca動態を中心として更年期高血圧発症機構の解明を試みた。

研究の背景と目的

更年期以降、女性の高血圧、高脂血症の罹患率は急激に増加し、心血管系の合併症を引き起こすことが知られている¹⁾。心血管系の合併症は女性の死因の多くを占め、閉経に伴う女性ホルモン、特にエストロゲンの欠乏によるものと考えられる。ホルモン補充療法によりこれらの発症が減少することから、エストロゲンの動脈硬化の抑制作用が示唆されてきた^{2~4)}。このことは動物実験においても多く報告されている⁵⁾。エストロゲンの動脈硬化抑制作用の機序については、血漿リポ蛋白濃度の変化、内皮機能・血管抵抗への直接作用、カルシウム拮抗薬様の作用、インスリン抵抗性・糖代謝への影響、食塩感受性の変化、などが報告されているが未だ不明な点が多い^{10) 11)}。エストロゲンの投与は肝臓によるリポ蛋白への作用が動脈硬化の減少に関与すると考えられてきたが、この作用はエストロゲンの心血管系リスク軽減作用の25~50%に過ぎないという報告もある。

エストロゲンの血圧への作用については、不明な点が多く、更年期以降の血圧、ホルモン補充療法による降圧について、相反する報告がなされている^{6~9)}。動物実験において、Dahl食塩感受性ラット(DS)は食塩付加により高血圧を発症するが、高血圧発症に性差のあることが示されている²⁰⁾。すなわち、雌の卵巣を摘出することにより、雄と同様の高血圧を発症する²¹⁾。DSラットとダール食塩抵抗性ラット(DR)の間には高血圧発症前の段階で、圧利尿曲線に差が存在し、雌DSラットは卵巣摘出によ

り圧利尿反応が増悪し、食塩負荷で高血圧を発症するが、DRラットでは変化しないことが報告された²²⁾。

血小板凝集能の亢進は動脈硬化の発症及びその進展に重要な役割を果たし¹²⁾、心血管系合併症の発症病理に関わると考えられている。この変化は、食塩感受性の高血圧患者においてより亢進しているという報告がある¹³⁾。血小板機能にはさらに性差も報告されている¹⁴⁾。血小板機能が性ホルモンで修飾され¹⁵⁾ 16)、月経周期で変動すること¹⁷⁾、すなわち、エストロゲン高値の時期に血小板の凝集能は低下し¹⁸⁾、エストロゲンの補充でこの現象が消失することからエストロゲンがその主要因であるとされている¹⁵⁾ 19)。

また、閉経後に合併する骨粗鬆症は、これによる骨折によって、閉経後の女性のQuality of Lifeを低下させ、ひいては死亡率増加にも関与している。骨密度の減少は、高血圧と同等の脳梗塞の危険因子となるという報告がある³⁵⁾。しかも脳梗塞の発症は骨密度が直接関与するのではなく、いくつかの他の機序が骨粗鬆症と脳血管障害の両者に関わっていると考えられている³⁶⁾。また、脳卒中易発症高血圧自然発症ラットstroke-prone spontaneously hypertensive ratはコントロールラットに比して、骨塩量が低く骨折し易いという報告がある³⁷⁾。一方、エストロゲン補充療法は、骨粗鬆症による骨折を予防するが、脳梗塞の発症予防に関しては、一定していない。食塩負荷はカルシウム利尿により骨塩量減少をきたし、同時に高血圧発症、動脈硬化の増悪をも来しうる。以上の報告から、骨粗鬆症と、脳梗塞を始めとする心血管系合併症が、ある共通した機序により影響を受けていると考えられ、それは食塩負荷とエストロゲン補充により修飾を受ける可能性が示唆される。

今回、食塩感受性を示す更年期高血圧の疾患モデルを新たに作成し検討を始めた。成熟したDSラットに卵巣摘出を施すことにより、実験更年期モデルを作成し、このラットにエストロゲン補充を施したグループを作成し、女性ホルモン補充療法のモデルとした。このDSラットを用いて、卵巣摘出・食塩負荷により引き起こされる、血圧、血小板凝集能、脂質代謝、骨代謝の変化を検討し、さらにこの現象のエストロゲンの補充療法による改善を検討した。これに関わる機序としてのNitric Oxide合成系の関与についても検討を加えた。

近年、高血圧の発症においてNa代謝とCa代謝が密接に関係していることが指摘されている。食塩感受性を規定する細胞内の要因として細胞内Ca濃度が考えられる。そこで、本研究においては更年期高血圧における食塩感受性に対する女性ホルモンの果たす役割を細胞内Ca動態の面から検討した。血管平滑筋の収縮には細胞内Ca濃度の調節が最も重要な因子として寄与している。細胞内Ca動態の検討は血小板を用いて行った。血小板は細胞内Caを重要な2nd Messengerとして収縮し凝集する。血小板機能はin vivoにおける性ホルモンや食塩負荷の影響を反映し、動脈硬化の進展に対し重要な役割を演じている。今回、卵巣摘出したDSラットにおいて細胞内Ca濃度と凝集能との関係についても検討を行った。また、更年期高血圧発症に伴う細胞内Ca動態は未だ検討されていない。そこで、更年期高血圧において細胞内Ca²⁺濃度の増加を介して血圧上昇が引き起こされるかどうかを検討することを試みた。

以上をまとめると本研究においては、

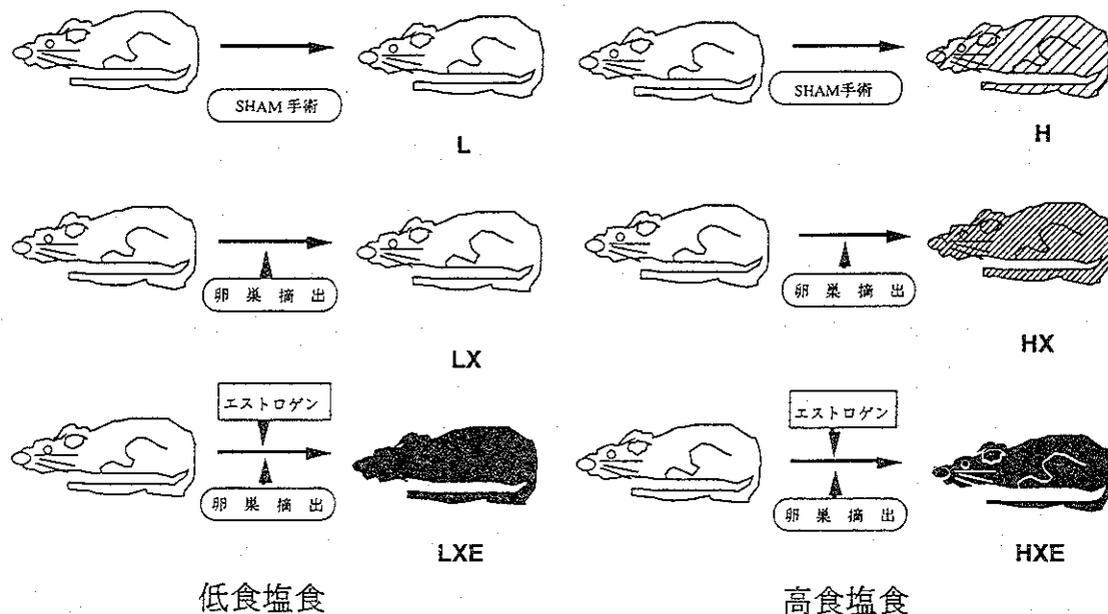
- (1) 雌性DSラットに卵巣摘出、食塩負荷を行い、食塩感受性を示す更年期高血圧のモデルを作成する。
- (2) 雌性DSラットの血小板を用いて、食塩感受性高血圧の発症における細胞内Ca動態の関与について調べる。

以上を目的とした。

材料および方法

生後より低食塩食(L:0.3%NaCl、オリエンタル酵母)で飼育した、雌性DSラット(エーザイ筑波実験動物センター)を実験に用いた。12週令においてエーテル麻酔下で腹部正中切開により両側卵巣を摘出した群(OVX)、あるいは卵巣摘出せずにSham-opeのみ施行した群(Sham)に分け、さらに卵巣摘出群を2群に分け、その1群に、 17β -エストラジオールの徐放性ペレット(0.5mg/pellet 60-day-release, Innovative Research of America, Ohio, USA)を腹部皮下に埋め込み、エストロゲン補充群(OVX+E)とした。他群はコントロールとして同型の錠剤を埋め込んだ。生理的なエストロゲン濃度を保つためにはラットにおいて10-40mg/kgの補充が必要とされ、本実験の投与量はその範囲に見合ったものである。8%の高食塩食で飼育したものについても、同様の群に分け全群を術後8週間飼育した。これらを以後L・LX・LXE・H・HX・HXEと表す(図1、各群N=4-6)。血中の 17β -エストラジオール濃度はradio-immunoassay法によって測定した。

図1 実験モデル



(1) 血圧測定

12週齢、および20週齢でtail-cuff法により、心拍数と収縮期血圧を測定した。20週齢において、体重を測定した後に屠殺し、心臓・子宮の臓器重量を測定した。この際、血中エストロゲン濃度、及

び子宮重量の変化により卵巣摘出・エストロゲン補充の有効性を評価した。

(2) 血小板凝集能測定

ラットをエーテルで麻酔し、頸動脈より3.8%クエン酸ナトリウム1mlで満たしたプラスチックシリンジで9mlの血液をゆっくり混和させながら採血し、これを血小板凝集能測定用とし、さらに3mlの検体を採取し、生化学の測定用とした。最初の血液を室温で遠心して得られた血小板濃厚血漿を、HEPES緩衝生食水(NaCl 145, KCl 5, MgSO₄ 1, Na₂HPO₄ 0.5, HEPES 10, and glucose 5 mmol/L, pH7.4)で平衡化したSepharose CL-2Bカラム(Pharmacia, Uppsala, Sweden)にてゲル濾過し、血小板を分離洗浄した。

測定には血小板凝集能測定器(メバニクス社製)を用い、100%凝集のコントロールとしてCalcium free bufferを用いた。血小板数を20万/mm³に調整した200μlの血小板浮遊液を、ガラス製のセルの中にいれ、塩化カルシウムを添加し終濃度1.5mmol/Lとした。小スターラーで1000回転/分で攪拌しながら37度で3分間保温した後、終濃度3mg/lのコラーゲンを添加して凝集曲線を記録し、5分後の最大凝集(%)を求めた。90分以内にすべての測定を終了した。

NOS系の評価のため、NO合成酵素阻害薬であるNitro-Arginine Methyl Ester(L-NAME)をコラーゲン刺激の1分前に検体に添加し、凝集を比較した。L-NAME添加前後での凝集の変化率をNOS系の活性の指標とした。

(3) 骨塩量測定

20週齢において屠殺されたラットから両側大腿骨を摘出し、エタノール保存した後、遠位端での骨密度(bone mineral density ; BMD)を、アロカ社製DCS-600により測定した。左右の大腿骨のBMDの平均を算出した。

(4) 細胞内Ca動態

離乳後より低食塩食(L:0.3%NaCl、オリエンタル酵母)で飼育した雌性Dahl食塩感受性(DS)ラットを実験に用いた。12週齢のラットをエーテル麻酔下で腹部正中切開により両側卵巣を摘出した群(OVX)と、卵巣摘出せずにSham-opeのみ施行した群(Sham)に分けた。さらに、血圧および血小板細胞内Ca動態に及ぼす卵巣摘出および高食塩食(H:8%NaCl)の影響を観察するため、12週齢まで実験1と同様に飼育したDSラットを以下の4群に分け術後4週間飼育した。

第1群：DS-Sham/Lラット、

第3群：DS-OVX/Lラット、

第2群：DS-Sham/Hラット、

第4群：DS-OVX/Hラット。

高血圧発症における卵巣摘出および食塩負荷の影響をCa代謝の面から検討するため、上記の第1～4群のDSラットをpentobarbitalで麻酔し、頸動脈より3.8%クエン酸Na 1mLで満たしたプラスチックシリンジで9mLの血液をゆっくり混和させながら採血した。採取した血液を室温で遠心(180g, 10分)して得られた血小板濃厚血漿をHEPES緩衝生食水(NaCl 145, KCl 5, MgSO₄ 1, Na₂HPO₄ 0.5, HEPES 10, and glucose 5 mmol/L, pH7.4)で平衡化したSepharose CL-2Bカラムにてゲル濾過し、血小板を分離した。得られた血小板に蛍光色素(fura-2/AM)を終濃度3micromol/Lになるように負荷し、

30分間22℃の恒温槽にてインキュベーションした。血小板を再度ゲル濾過し、細胞外の余分なfura-2/AMを取り除き血小板細胞数を 1×10^8 /mLに調製した。蛍光測定直前に終濃度1mmol/LになるようにCaCl₂を添加し3分間37℃にてインキュベーションした。蛍光測定には、蛍光分光光度計を用いた。測定は、1.5mLの血小板浮遊液を石英蛍光セルの中に入れ、小さなスターラーで攪拌しながら行い、測定中の温度は恒温槽により37℃に保たれた。蛍光色素を負荷された血小板は、340nmおよび380nmの2波長の紫外線により励起され510nm波長の発光を測定した。まず非刺激状態における蛍光を測定し、10秒後に4mmol/L EGTAを加え細胞外のCa²⁺をキレートすることにより細胞外にleakした蛍光色素を補正した。さらに10秒後、Thrombin(0.3U/mL)、あるいはIonomycin(5nmol/L)を加え蛍光の変化を観察した。測定終了時に、血小板細胞膜を50micromol/LのDigitoninにて破壊し蛍光色素のCa²⁺による最高飽和時の発光量を測定した。その後、過剰量のEGTAによりCa²⁺をキレートし、最小飽和時の発光量を測定した。340/380nmの励起波長比は検体の自己蛍光を差し引いた後に求めた。細胞内Ca²⁺濃度は、Grynkiewiczらの方法を用いて計算した。これらの実験は、蛍光色素が細胞外にもれる影響を考慮し室温において2度目のゲル濾過後30分以内に行った。

-80度に冷凍保存したDSラットの心臓を破碎した上でホモジェナイザーにて溶解し、RNA抽出用試薬を用いてmRNAを抽出した。Northern Blotting法にて、筋小胞体カルシウムポンプ遺伝子のうち、心筋において特に発現量の多いtype II bの発現を比較した。G3PDHをコントロールとして用いた。

統 計

本文中および図表の数値は、すべて平均±平均誤差で示した。有意差検定は分散分析後、有意差が認められたものに対してScheffe's F testを施行した。以上の解析処理にて危険率5%未満の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

(1) 血圧

12週齢においては各群間で体重および血圧に差は認めなかった(表1)。図2に示すように、20週齢において、収縮期血圧は、高食塩群(H, HX, HXE)は低食塩群(L, LX, LXE)よりも高値であった(高食塩群 164 ± 13 mmHg、低食塩群 142 ± 12 mmHg、 $p < 0.0001$)。低食塩群では、卵巣摘出群の血圧は、Sham手術群より有意に高値であり、エストロゲン補充群ではSham手術群と同程度の値を示した。高食塩群でも同様に、卵巣摘出群の血圧は、Sham手術群より有意に高値であり、エストロゲン補充群ではSham手術群と同程度の値を示した。

図3aに示すように、血圧は血中17β-エストラジオール濃度と、有意な負の相関を示した($r = -$

0.563、 $P < 0.01$)。ラットでは性周期により血中エストラジオール濃度は7~50pg/ml程度に変動するとされるが、表1の血中濃度から、今回の実験では、生理的変動内にコントロールされていることがわかる。性周期による女性ホルモンの差異を除外するため、子宮重量の体重との比を同時に検討した。子宮重量・体重比と血中17 β -エストラジオール濃度とは有意な正の相関を示した($r = 0.563$ 、 $P = 0.01$)。図3bに示すように、子宮重量・体重比とも、血圧は有意な負の相関を示した($r = -0.411$ 、 $P < 0.05$)。

なお、食塩負荷により血圧上昇とともにラットは著明な心肥大を示し、心臓重量と体重との比は収縮期血圧と有意な正の相関を示した。

Table 1. Effect of Ovariectomy and Estrogen Supplementation on Body and Uterus Weight, Blood Pressure, Heart Rate and 17 β -estradiol in Dahl Salt-Sensitive Rats.

(n = 5)	0.3% NaCl			8% NaCl			
	Sham	OVX	OVX+EST	Sham	OVX	OVX+EST	
BW (g)	12 w	224 \pm 2	228 \pm 1	221 \pm 2	226 \pm 2	223 \pm 5	221 \pm 2
	20 w	253 \pm 5	267 \pm 8	238 \pm 3	259 \pm 4	261 \pm 9	228 \pm 15
SBP (mm Hg)	12 w	135 \pm 3	137 \pm 3	131 \pm 3	137 \pm 1	139 \pm 3	135 \pm 2
	20 w	138 \pm 3	151 \pm 3*	131 \pm 5†	160 \pm 3	173 \pm 4‡	158 \pm 2 §
HR (/min)		373 \pm 7	390 \pm 13	374 \pm 18	372 \pm 7	388 \pm 11	345 \pm 7
UT/BW		0.17 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02*	0.24 \pm 0.02	0.17 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01‡	0.25 \pm 0.02
17 β -estradiol (pg/ml)		24.6 \pm 4.2	14.5 \pm 2.1	41.0 \pm 5.4†	19.5 \pm 2.1	12.7 \pm 0.3	27.0 \pm 5.0

図2

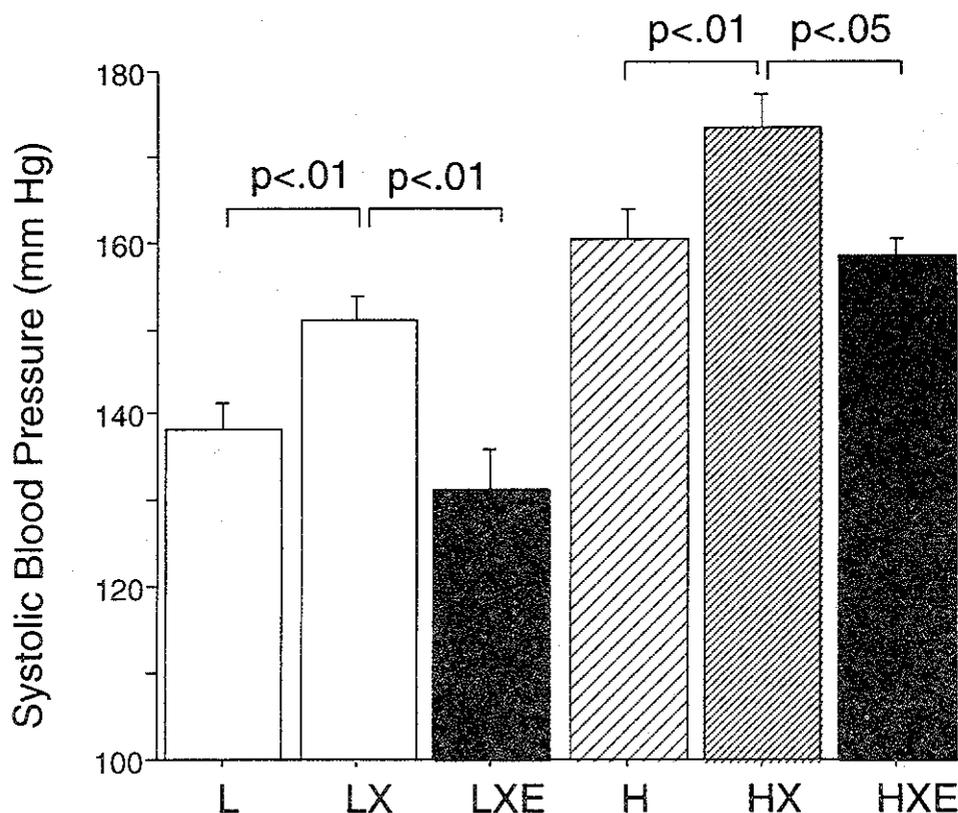


図 3 a

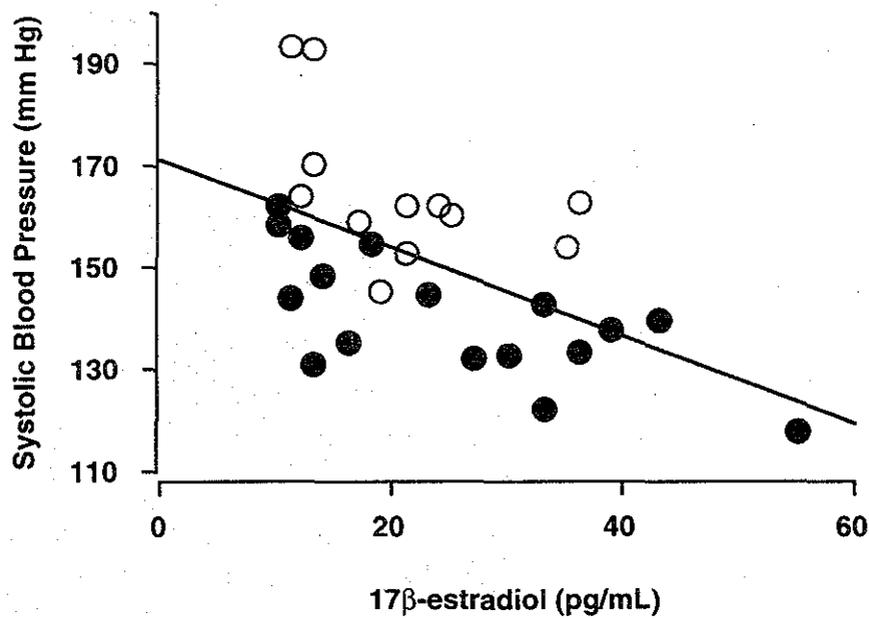
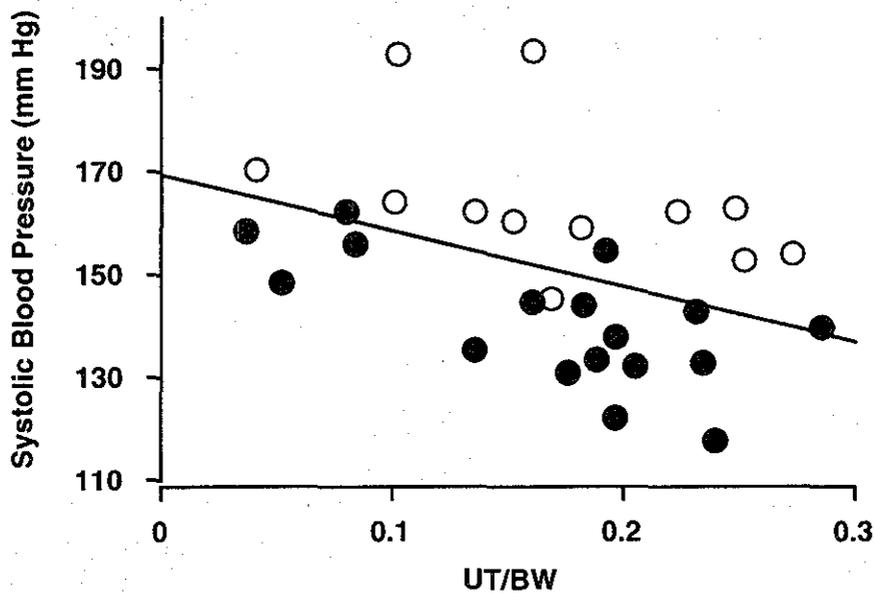


図 3 b



(2) 血小板凝集能

血小板凝集能は、高食塩群(H、HX、HXE)は低食塩群(L、LX、LXE)よりも高値であった(高食塩群 $55 \pm 6\%$ 、低食塩群 $28 \pm 6\%$ 、 $p < 0.01$)。

図 4 aに示すように、低食塩群において、卵巢摘出群の血小板凝集能はSham手術群より有意に高値であったが($p < 0.01$)、高食塩群では卵巢摘出では有意な変化を認めなかった。また、高食塩群において、エストロゲン補充群の血小板凝集能は卵巢摘出群よりも有意に減弱していたが($p < 0.05$)、低食塩群ではエストロゲン補充で有意な差異を認めず、血小板凝集能に対して、卵巢機能とエストロゲン動態と負荷食塩摂取量による交互作用を示した。

血小板凝集能は血中 17β -エストラジオール濃度と、有意な負の相関を示し($r = -0.543$ 、 $P < 0.05$)、

図 4 a

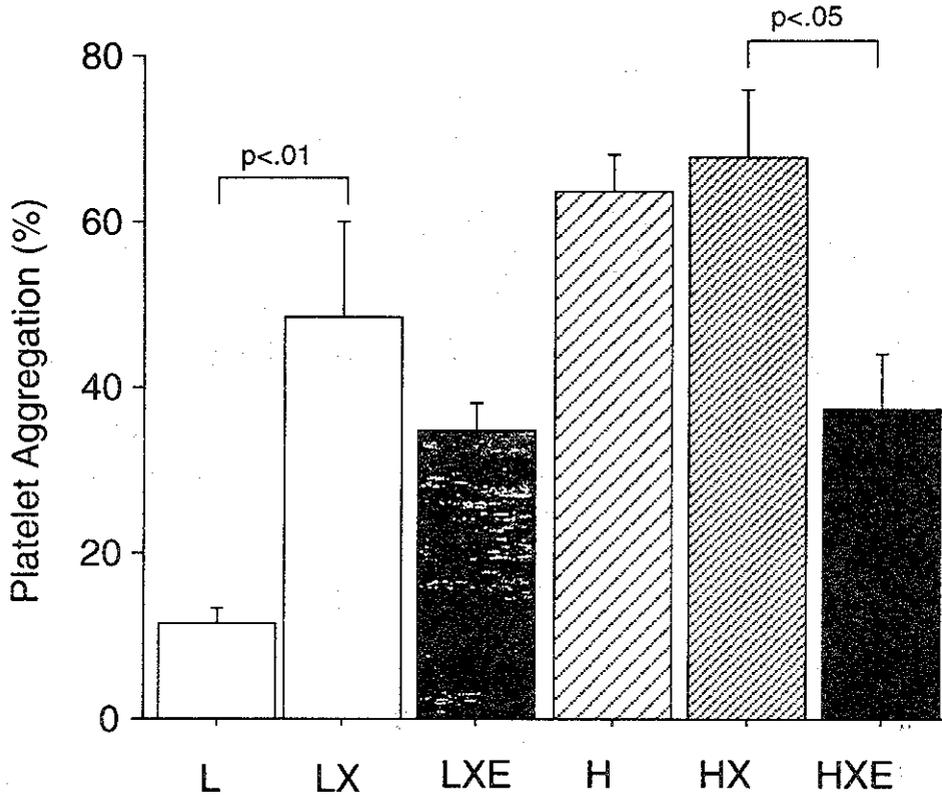
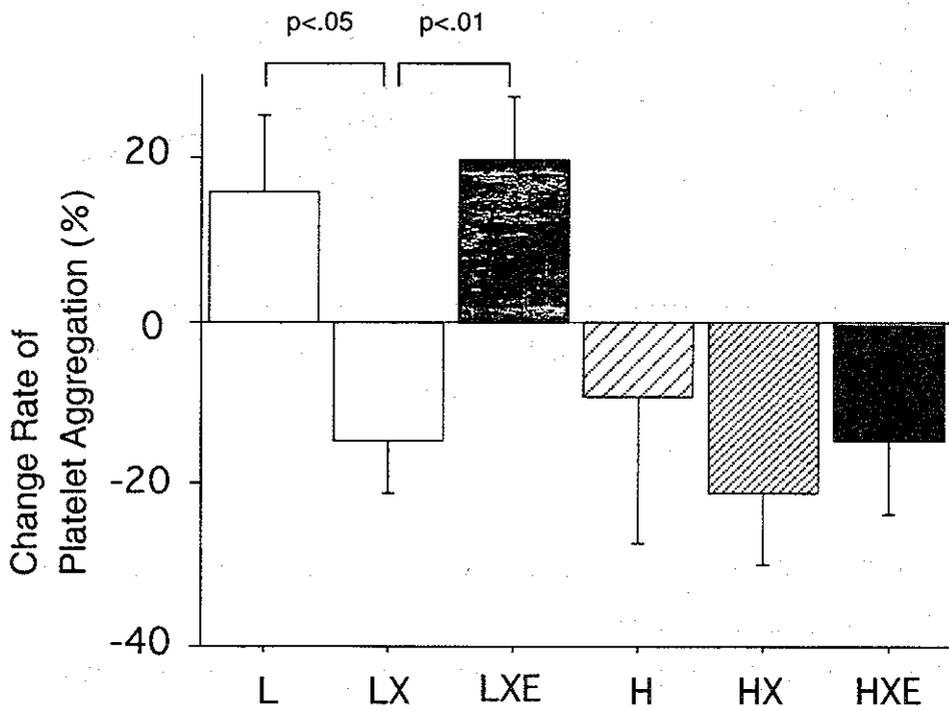


図 4 b

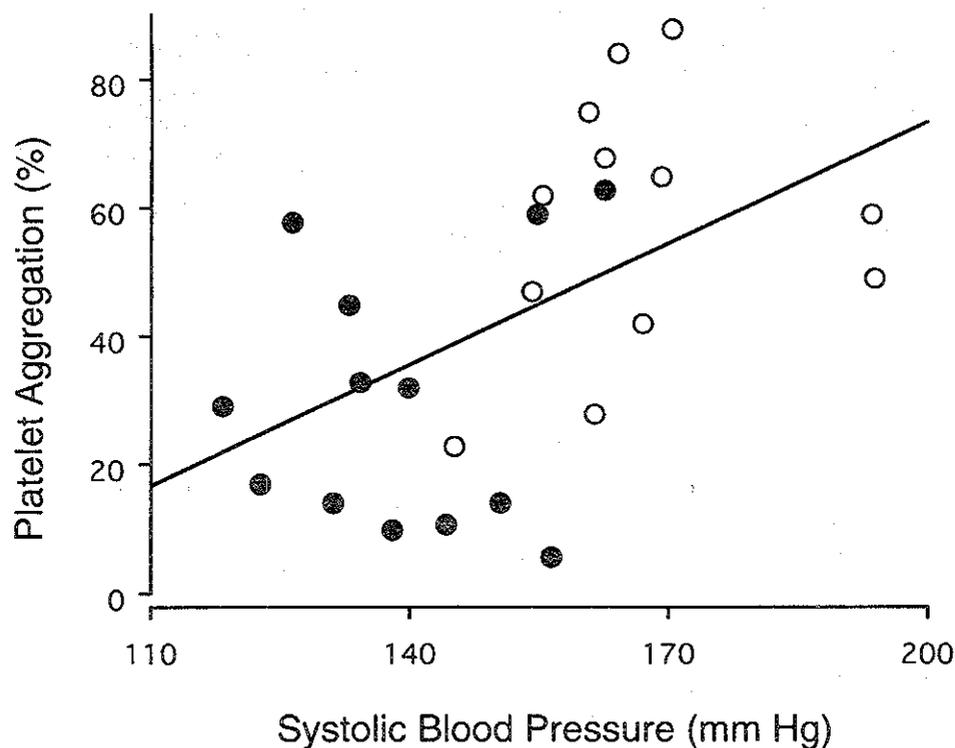


子宮重量・体重比とも、有意な負の相関を示した($r = -0.609$, $P < 0.05$)。図 5 に示すように、全体において血小板凝集能は、血圧と有意な正の相関を示した($r = 0.481$, $P < 0.01$)。

一酸化窒素は血小板の凝集抑制作用を有し、正常血小板においては一酸化窒素合成酵素阻害薬であるL-NAMEの添加後、コラーゲン刺激にて凝集の亢進が起こる。図 4 b に示すようにSham手術群

ではこの凝集能亢進が観察されたが、卵巣摘出群では、添加後の凝集亢進は有意に減弱した。エストロゲン補充群ではSham手術群と同程度に凝集の亢進が認められた。高食塩群においても同様の実験を行ったが、卵巣摘出・エストロゲン補充による上記のような有意な変化は認めなかった。

図5



(3) 脂質代謝

脂質代謝の指標として、総コレステロール(TC)・中性脂肪(トリグリセリドTG)の他に・HDL・LDL・VLDL・カイロミクロンなどのリポ蛋白を測定した。この中で、食塩負荷および卵巣摘出とエストロゲン補充の両者において、有意な差異を認めたのは、総コレステロール(TC)・とHDLのみであり、LDLは食塩負荷に関してのみ、またカイロミクロンはエストロゲン補充に関してのみ有意な差を認めた。

卵巣摘出および食塩負荷は総コレステロールを増加させる傾向にあったが、エストロゲン補充により、総コレステロールは増加した。総コレステロールとHDLコレステロールとの差を、HDLコレステロールで除したものを、動脈硬化指数Atherogenic Index(A. I.)とすると、LXとLXE間においては有意な差を示した。図6b・cに示すように、全体でA. I.と血中17β-エストラジオール濃度($r = -0.528$, $P < 0.01$)および、子宮重量・体重比($r = -0.454$, $P < 0.05$)とは、有意な負の相関を示した。

图 6a

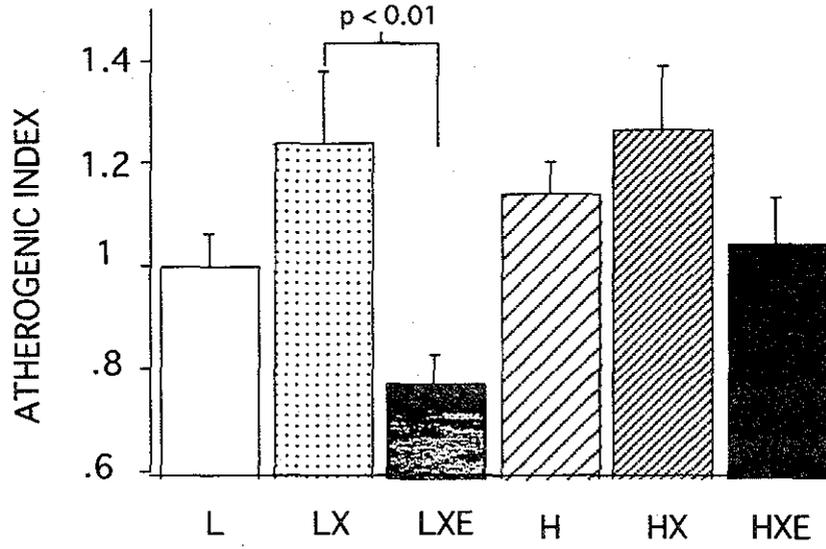


图 6b

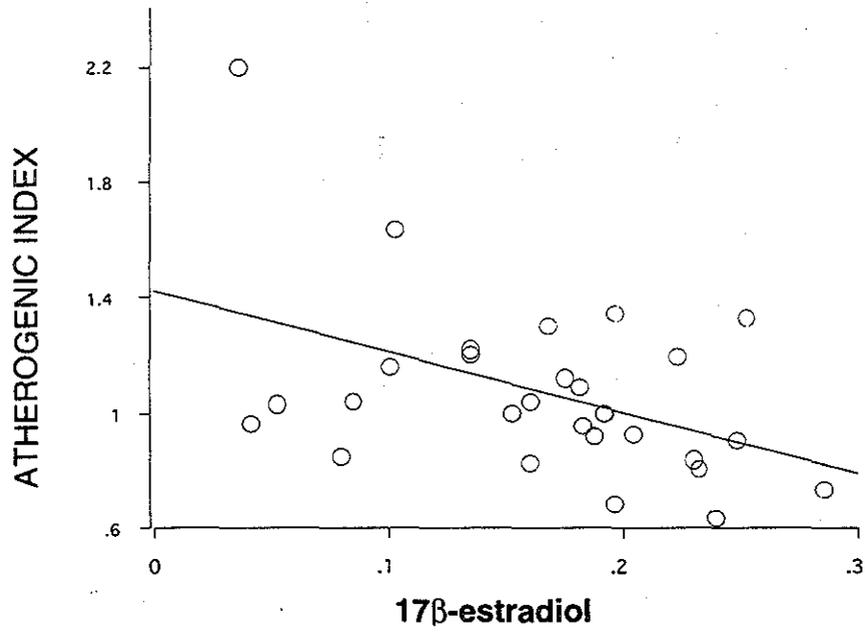
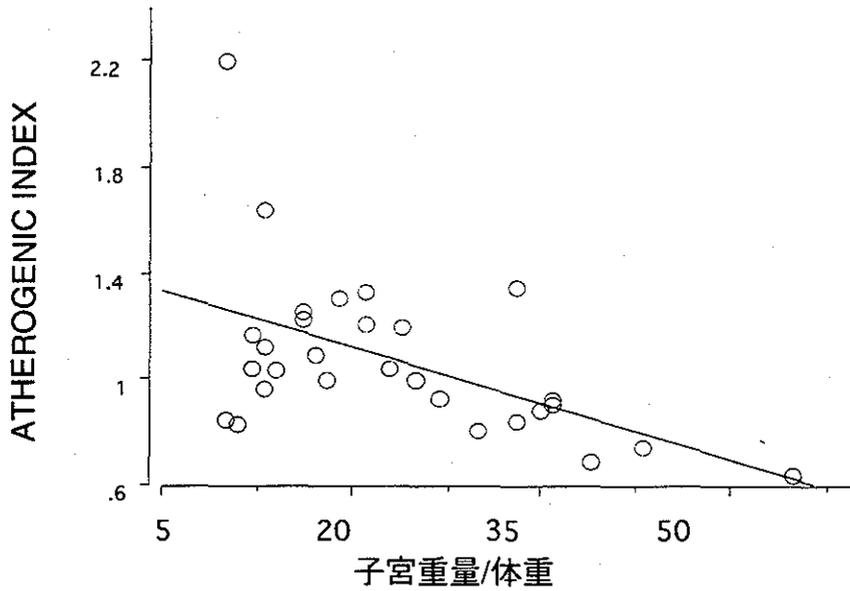


图 6c



(4) 骨塩量

骨塩量は、高食塩群(H、HX、HXE)は低食塩群(L、LX、LXE)よりも低値であった(高食塩群 $141.2 \pm 16.6 \text{g/cm}^2$ 、低食塩群 $146.2 \pm 10.4 \text{g/cm}^2$ 、 $p < 0.01$)。図7に示すように、すなわち、卵巣摘出と同様に、高食塩単独でも骨塩量を減少させた。低食塩・高食塩群ともに、卵巣摘出群のBMDはsham手術群より有意に低値となり、骨粗鬆症が悪化していた。さらに低食塩・高食塩群ともに、

図7 a

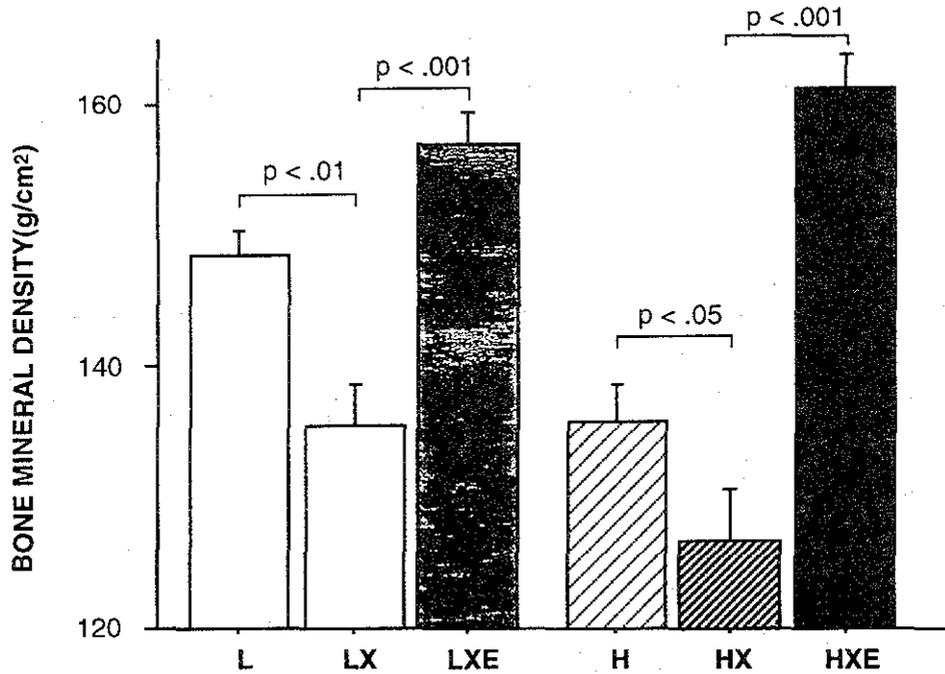
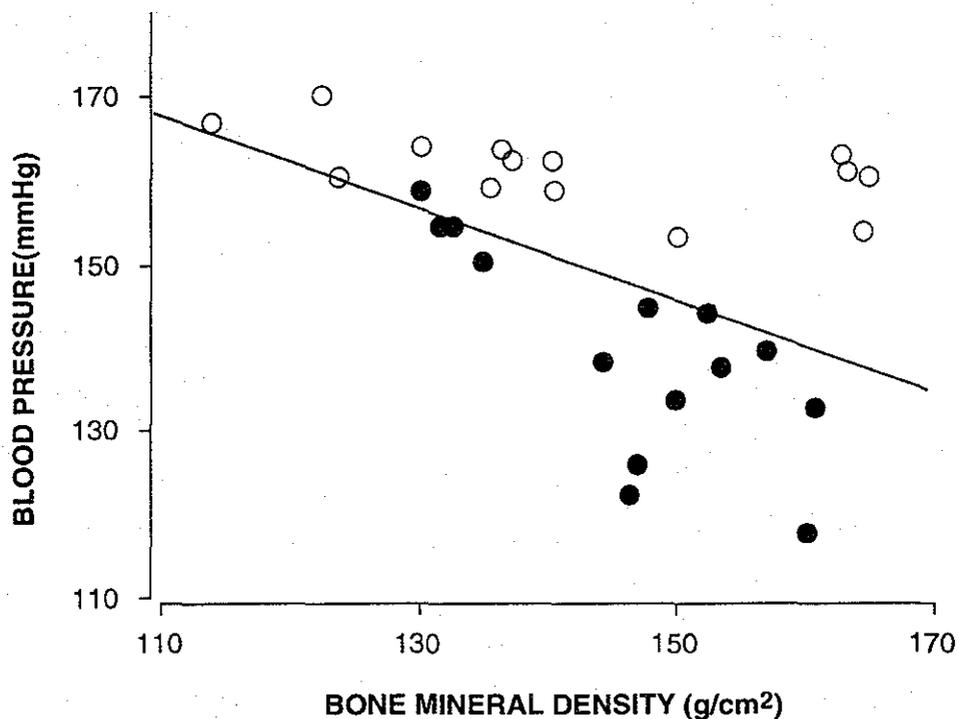


図7 b



エストロゲン補充群においては、BMDはsham手術よりも高値となり、特に高食塩では低食塩よりも高値となり、食塩負荷による悪化を越えた著明な改善を示した。

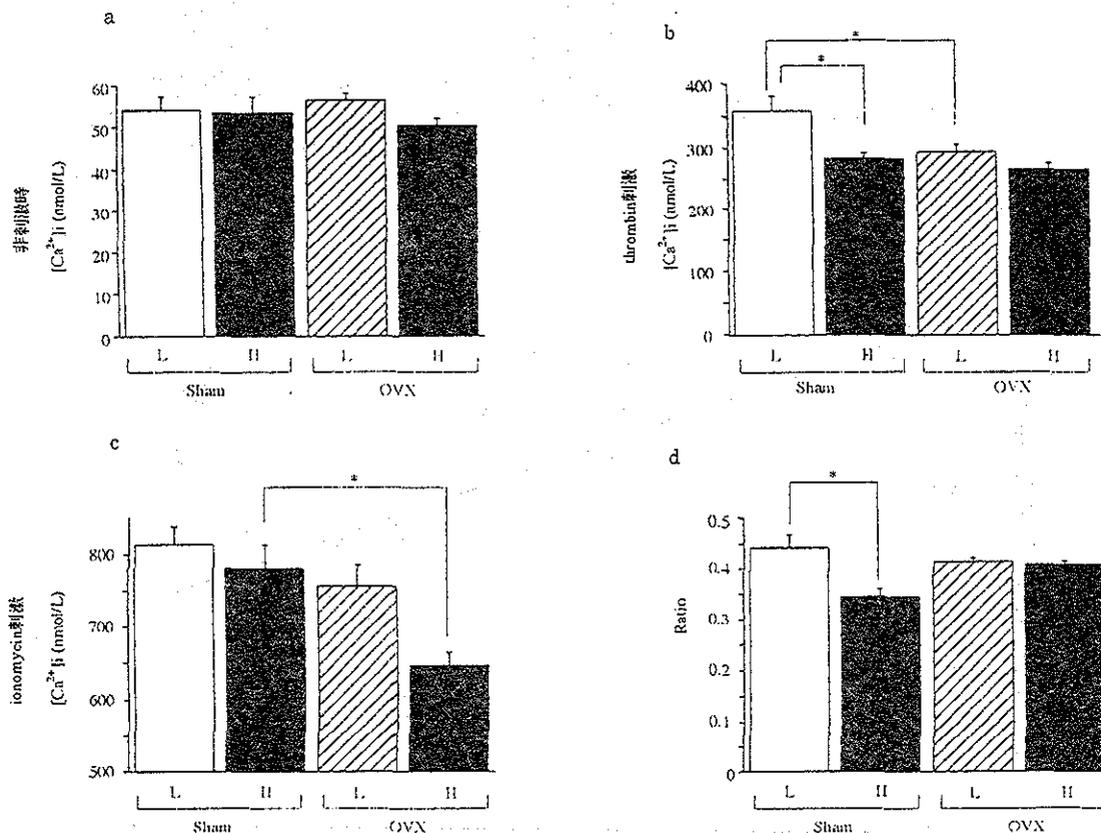
全体においてBMDは17β-血中エストラジオール濃度と有意な正の相関を示し($r=0.669$, $p<0.01$)、子宮重量・体重比とも有意な正の相関を示した($r=0.788$, $p<0.001$)。また、図7bに示すように、血圧とBMDとの間にも有意な負の相関が認められた($r=-0.480$, $p<0.01$)。

(5) 細胞内Ca動態

図8に示すように、16週齢のDSラットにおける非刺激時における血小板の細胞内Ca濃度($[Ca^{2+}]_i$)の基礎値は低食塩群で飼育した場合、卵巣摘出による変化を認めなかった($54 \pm 3 \text{ nmol/L}$ to $56 \pm 2 \text{ nmol/L}$, N. S.)。また食塩負荷の影響は、Sham群($54 \pm 3 \text{ nmol/L}$ to $54 \pm 4 \text{ nmol/L}$, N. S.)、卵巣摘出群($56 \pm 2 \text{ nmol/L}$ to $51 \pm 2 \text{ nmol/L}$, N. S.)いずれにおいても有意な変化を示さず血圧との関連を認めなかった。

図8 DSラット血小板細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)に及ぼす卵巣摘出および食塩の影響

a) 非刺激時における基礎値. b) 細胞外 Ca^{2+} 非存在下におけるthrombin刺激による細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 動員能. c) 細胞外 Ca^{2+} 非存在下におけるionomycin最大刺激による細胞内 Ca^{2+} 貯蔵量. d) 細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からのthrombinによる Ca^{2+} 動員(b)細胞内 Ca^{2+} 貯蔵量(c)比. Sham: sham operation, OVX: 卵巣摘出, L: 0.3% NaCl食, H: 8.0% NaCl食. 数値はmean \pm SEで表す。* $P<.05$



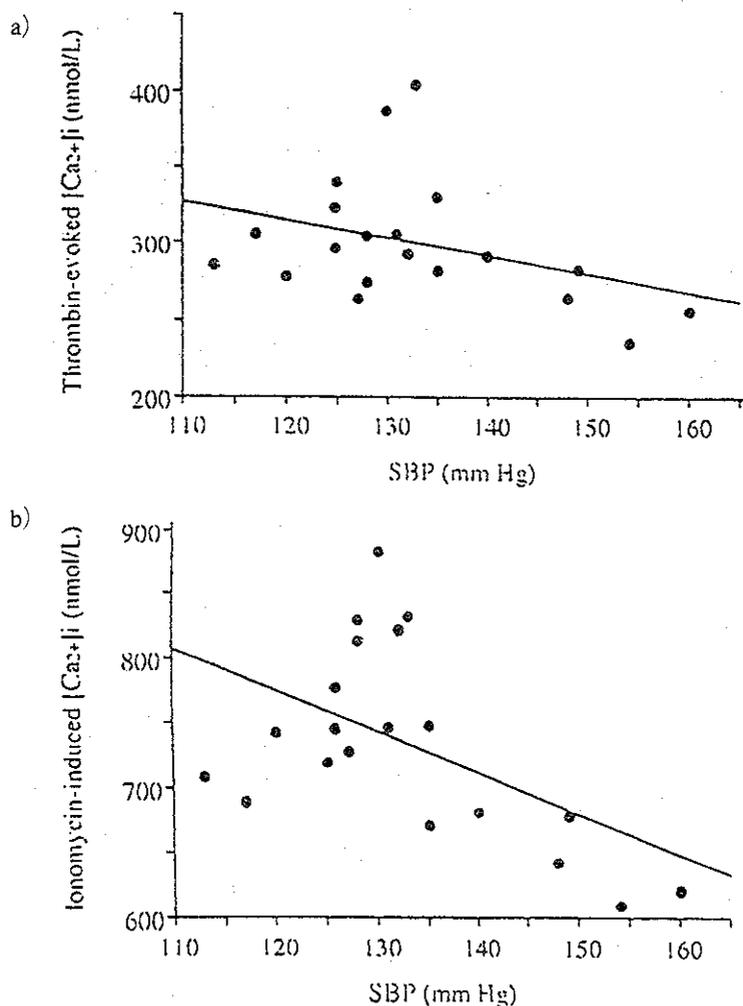
一般に、Thrombin刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、形質膜を介した細胞外からの流入と細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 動員の2つの要素から形成されると考えられている。本研究においては細胞内

Ca²⁺貯蔵部位に着目して血小板細胞内Ca²⁺動態について検討した。細胞外Ca²⁺をEGTAによりキレートし細胞外Ca²⁺非存在下におけるThrombin刺激(0.3U/mL)により細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺動員を検討した結果を図8bに示す。

Sham群においては、細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺動員は食塩負荷により減弱した(360±23nmol/L to 285±9nmol/L, P<.05)(第8図b)。しかしながら、この食塩負荷による効果は卵巣摘出群においては認められなかった。1つの可能性として、低食塩群で飼育した場合には、卵巣摘出のみで細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺動員が減弱したためであると考えられる(360±23nmol/L vs 297±10nmol/L, P<.05)(第8図b)。予想に反して、Thrombin刺激による細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺動員の大きさは血圧とは負の相関を認める傾向にあり(r=-.338, P=.17)(第9図a)、高血圧を発症した群においてもその値は低値を示した。

そこで次に血小板細胞内Ca²⁺貯蔵量が変化しているかどうかを調べた。同様に細胞外Ca²⁺をEGTAによりキレートし細胞外Ca²⁺非存在下における5nmol/LのIonomycin最大刺激によるCa²⁺動員から、細胞内Ca²⁺貯蔵量を推察した結果を第8図cに示す。高食塩食で飼育した卵巣摘出群において、高

図9 Dahl食塩感受性ラットにおける卵巣摘出時の収縮期血圧(SBP)と血小板凝集能との関係

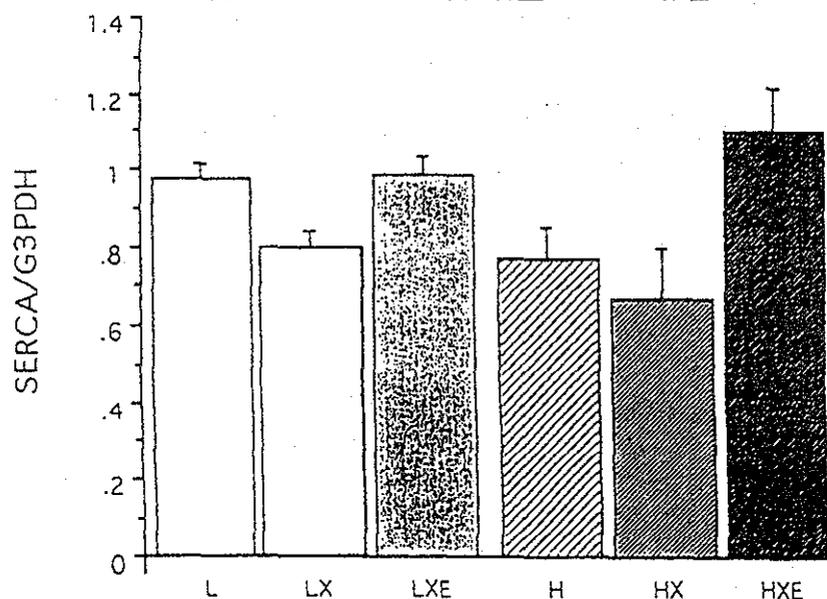


食塩食で飼育したSham群に比べて細胞内Ca²⁺貯蔵量が有意に減少していた(768±35nmol/L vs 648±15nmol/L, P<.05)(第8図c)。Ionomycin刺激による細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺動員の大きさは血圧とは負の相関を認めた(r=-.506、P=.03)(第9図b)

図8bに示した食塩負荷による細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺動員の減弱が、細胞内Ca²⁺貯蔵部位に依存しているかどうかを確認するため、細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺動員と細胞内Ca²⁺貯蔵量との比を第8図dに示す。Sham群において食塩負荷によりその比は減少したが(0.44±0.03 vs 0.35±0.02, P<.05)、卵巣摘出群においてはその比は保たれていた。

細胞内Ca²⁺貯蔵量を規定する筋小胞体Caポンプ遺伝子の発現量を心筋において検討したところ、低食塩、高食塩群ともに、卵巣摘出により減少し、エストロゲン補充により、正常群と同等となった(第10図)。

図10 Dahl食塩感受性ラットにおける卵巣摘出および食塩負荷の筋小胞体Ca²⁺ポンプ遺伝子Ⅱb(SERCA)発現量に及ぼす影響



考 案

(1) 血 圧

本研究により、食塩負荷の有無にかかわらず、卵巣摘出により収縮期血圧が上昇すること、そしてこの効果はエストロゲン補充により抑制されることが明らかになった。雌DSラットにおいて、エストロゲンの欠乏が高血圧の発症に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これは更年期以降に発症する食塩感受性高血圧に対してのエストロゲン補充療法の有用性を示したものと考えられる。しかし、この改善は食塩負荷による血圧上昇を抑制するまでには至らなかった。エストロゲン補充は悪化した食塩感受性を改善するが正常化させるまでの効果はないと考えられる。

血圧に対するエストロゲンの効果については月経周期による血圧の変動、妊娠中の高血圧の発症の増加、経口避妊薬による血圧の上昇など一見相反する報告がある²⁴⁾。女性ホルモン補充療法による高血圧への作用についても、下降・不変ともに多くなされているが、現時点まではむしろ不変であるという報告の方が多い。高血圧モデルによる動物実験においても、エストロゲン補充は行われてきたが、結果は様々である。高血圧自然発症ラット(SHR)ではエストロゲン補充により有意に血圧が低下したが、Wistar-Kyotoラットでは変化しなかった²⁵⁾。Brosnihanらはレニン遺伝子を多く有する遺伝子組換えラットである[TGR(mRen2)-27]ラットおよび、Sprague-Dawleyラットでは、卵巣摘出されたラットは、卵巣摘出の後にエストロゲン補充されたラットよりも、血圧が高値であったと報告した²⁶⁾。また一方では、Bachmannらは同じ遺伝子組み替えラットとstroke-prone spontaneously hypertensive rat(SHR-SP)では卵巣摘出後、血圧が低下したと報告している²⁷⁾。雌のDSラットにおいて、0.38%の低食塩食では、避妊用ステロイド投与は有意に血圧を低下させたが、4%の高食塩食ではこれらは有意に血圧を上昇させたとの報告もある²⁸⁾。しかしこの実験では、エストロゲン補充の前に卵巣摘出がなされていない点が今回の実験と異なる。Rowlandらは、卵巣摘出され、4%の高食塩食で飼育した雌のDSラットは雄ラットと同程度の高血圧を呈したが、これはエストラジオール補充では改善しなかったと報告した²¹⁾。この場合、エストロゲンの補充量は我々の約4分の1であり、食塩感受性高血圧の発症を阻止するにはエストロゲンの補充量が少なすぎたためと考えられる。

当研究室ではこれまでに、卵巣摘出による食塩感受性の増悪が更年期以降の高血圧の発症に重要であり²⁸⁾、また低下したナトリウム圧-利尿反応がDSラットの特徴であるが、卵巣摘出により悪化するという報告を行った³¹⁾。今回の研究も含め、食塩感受性の遺伝素因を有する場合、卵巣摘出が食塩負荷に並ぶ高血圧の増悪因子となって高血圧を発症し、またこの変化が性ホルモンの補充により可逆的であることが示唆された。

(2) 血小板凝集能

今回の研究ではエストロゲン欠乏は食事の食塩量によって血小板凝集能に対しては異なる効果を示した。megakaryocyteにおいてもエストロゲン受容体が存在することから、エストロゲンは血小板に何らかの作用を及ぼすと考えられている。我々は卵巣摘出され高血圧を発症したラットでは血圧と血小板機能はprotein kinase Cの活性化が関連していることを報告した³²⁾。また、血小板にはL-arginine-nitric oxide系が存在し、血小板凝集を調節していると考えられている。エストロゲンが血管平滑筋の培養細胞において一酸化窒素合成酵素(NOS)を誘導することも明らかにされている³³⁾。NOは血小板凝集能を抑制することが知られており、高血圧発症モデルでは、L-NMMAに対する感受性が低下していることが報告された³⁴⁾。今回の実験では低食塩食群において、L-NAMEによりsham手術群およびエストロゲン補充群で凝集の亢進がみられたが、卵巣摘出群での反応は減弱していた。これと対照的に、高食塩群においては、L-NAMEの添加により変化はみられなかったが、食塩負荷によりNOによる凝集抑制効果が減弱し、すでに血小板凝集能が亢進していたためと考えられた。し

かし、高食塩食群ではエストロゲン補充により血小板凝集能の減弱がみられ、これには一酸化窒素以外の機序が関与していることが考えられた。

血小板機能は“ずり応力”および圧負荷により影響を受けることも知られており、凝集能の亢進は、高血圧に伴う血小板の収縮機構の二次的变化によりもたらされている可能性もあるが、血小板凝集の測定は、採血後約60分後に行われており、血圧の直接的な影響だけでは説明できない。エストロゲンの直接刺激により血小板凝集能が減弱したという報告や、HDLコレステロールと血小板機能が逆相関したという報告もある。今回は、ゲル濾過法を用いて血漿蛋白成分を除いた上にbufferに浮遊した状態の血小板を用いており、血漿中の女性ホルモン・脂質などによる直接作用も除外し得ると考えられる。従って、今回観察された変化は、血小板内の遺伝子・蛋白合成のレベルでの情報伝達機構における変化を反映するものと考えられる。

(3) 脂質代謝・動脈硬化指数

卵巣摘出は脂質代謝にも種々の変化を引き起こした。ヒトにおける報告でも、エストロゲン補充による総コレステロール・LDL・HDL・VLDLコレステロール・中性脂肪などの変化については、様々であり、必ずしも一定の傾向は示していないが、今回も同様であった。しかし全体において動脈硬化指数での評価は、血圧と同様に、卵巣摘出により悪化しエストロゲン補充により改善するという傾向を示した点は興味深い。ヒトにおいては、避妊薬による血栓傾向も報告されてきたが、女性ホルモンは、投与量・投与方法・プロゲステロンとの組み合わせなどによって、相反する反応を引き起こす可能性が考えられ、今後の課題であると考えられる。

(4) 骨塩量

更年期以降に急速に進行する骨粗鬆症に見られるように、骨においてエストロゲンは骨塩量の減少というカルシウムの負のバランスを引き起こす。これまで、卵巣摘出や低カルシウム食による骨塩量減少の実験は多く行われているが、本研究のように、高食塩食にて同様の骨塩量の減少を観察したものは少ない。卵巣摘出に加えて、食塩負荷を行うことにより、骨塩量の減少が相加的に増悪したことは、食塩感受性モデルにおける骨粗鬆症増悪の危険因子としての食塩負荷の存在を示している。また、血圧の場合と異なり、エストロゲン補充により、食塩負荷による増悪をも越えて骨塩量が改善したことは、骨粗鬆症の予防・治療としてのホルモン補充療法の有用性を示すものと考えられた。全体において、血圧と骨塩量が負の相関を示したが、骨塩量の低下が、脳血管障害の危険因子となるという報告と考慮併せて、両者に、エストロゲンの欠乏と、それによって引き起こされる血圧・血小板凝集能・脂質代謝の変化が関与しているという今回の実験結果は、それを裏付けるものと考えられる。

閉経後の女性の代謝変化の機序の解明のモデルとして、このDSラットが有用であると考えられた。

(5) 細胞内Ca動態

血小板細胞内Ca²⁺動態の異常は、本態性高血圧および実験高血圧動物において数多く報告されている。本態性高血圧およびSHRにおいては、血小板細胞内Ca²⁺は正常血圧コントロールに比べて上

昇している、あるいは細胞内Ca²⁺動員能が亢進しているとの報告が多い。我々も、SHRにおいて遺伝的に血小板における細胞内Ca²⁺濃度が増加しており、SHRと呑龍ラットとの交雑実験において、細胞内Ca²⁺動態異常の候補遺伝子である2型筋小胞体Caポンプ遺伝子座位が血小板細胞内Ca²⁺濃度の増加に連鎖することを明らかにした。本研究においては細胞内Ca²⁺の基礎値は卵巣摘出ないし食塩負荷により変化せず、血圧との関連性はなかった。さらに卵巣摘出あるいは食塩負荷されたDSラットにおいては、高血圧発症以前にThrombin刺激によるCa²⁺動員はむしろ減弱しており、予想に反して高血圧発症後も減弱したままであった。このことから、細胞内Ca²⁺動態の異常が高血圧発症に先行して認められた可能性は残されるものの、血圧上昇はThrombin刺激によるCa²⁺動員の大きさと無関係に認められたため、少なくともDSラットの高血圧発症においては本態性高血圧やSHRにおいて認められるような細胞内Ca²⁺動態異常は存在しなかった。高血圧発症と細胞内Ca²⁺動態異常との関連は複雑で多様であることが改めて明らかとなった。

卵巣摘出および食塩負荷により生じたThrombin刺激時のCa²⁺動員の減弱は、それぞれ異なった機構を介していると考えられた。第9図によると、Thrombin刺激時のCa²⁺動員と細胞内Ca²⁺貯蔵量との比は、食塩負荷により減少していることから、細胞内シグナル伝達機構の減弱あるいは、細胞内Ca²⁺の細胞外への汲み出しが亢進していると予想された。しかしながら、この食塩負荷によるThrombin刺激時のCa²⁺動員の減弱作用は、卵巣摘出ラットにおいては認められなかった。この食塩負荷による減弱作用を血圧上昇に対する代償反応と考えれば、この減弱作用の消失が卵巣摘出ラットにおける食塩負荷高血圧の発症に一部関与している可能性が考えられた。一方、高食塩食で飼育された卵巣摘出DSラットにおいてはThrombin刺激時のCa²⁺動員/細胞内Ca²⁺貯蔵量比は正常に保たれていることから考えると、Thrombin刺激時のCa²⁺動員の減弱は主に細胞内Ca²⁺貯蔵量が有意に減少していることに起因すると考えられた。

エストロゲンは、骨や、子宮、心血管系の平滑筋細胞のCa²⁺代謝に影響を及ぼすことが知られている。またmegakaryocytesにおいてもエストロゲン受容体が存在することから血小板にも何らかの作用を及ぼすと考えられる。骨においては更年期骨粗鬆症に認められるようにエストロゲンの欠乏は骨量の減少、Ca²⁺の負バランスを引き起こす。卵巣摘出した兎において⁴⁵Ca²⁺の取り込みがエストロゲンあるいはプロゲステロンの投与により上昇する、あるいは妊娠ラットの子宮平滑筋細胞における筋小胞体Ca²⁺ポンプの蛋白量およびmRNAが上昇しているなどの報告は、平滑筋細胞におけるCa²⁺貯蔵量とエストロゲンの密接な関係を支持するものである。我々の心筋における筋小胞体Ca²⁺ポンプ遺伝子のmRNAの発現量が卵巣摘出で減少し、エストロゲン補充で回復するという結果は子宮平滑筋における成績と一致し、筋小胞体Ca²⁺ポンプ遺伝子の発現にエストロゲンによる調節領域がある可能性を示唆している。

総 括

更年期高血圧の実験モデルとしてダール食塩感受性ラットを用いて卵巣摘出及びエストロゲン補充、さらに食塩負荷による血圧、血小板凝集能、脂質代謝、骨密度への影響を観察した。

1. 血圧は高食塩群で低食塩群よりも上昇し、卵巣摘出により増悪し、エストロゲン補充により改善し、血中エストロゲンと負の相関を示した。
2. 血小板凝集能も高食塩群で低食塩群より亢進し、血圧と有意な正の相関を示した。しかし、血小板凝集能は低食塩食では卵巣摘出により増強し、高食塩食ではエストロゲン補充により減弱し、卵巣機能と食塩摂取量による相互作用により影響を受けた。これはエストロゲンが動脈硬化抑制作用を示す機序に対する新しい知見を示すものと考えられた。
3. L-NAME添加実験により、卵巣摘出後、血小板におけるNO合成酵素系が減弱している可能性を示唆し、凝集能亢進の原因の一部と考えられた。
4. 血清脂質によるAtherogenic Indexは、卵巣摘出で増悪し、エストロゲン補充で改善する傾向を示し、子宮重量・体重比と負の相関を示した。
5. 食塩負荷は卵巣摘出に匹敵する骨密度減少効果を示したが、エストロゲン補充は、これを上回る改善を示した。
6. 血小板を用いた細胞内Ca²⁺動態の検討からは、卵巣摘出後の食塩感受性増大に伴う高血圧発症においては細胞内Ca²⁺貯蔵量の減少を認め、本態性高血圧やSHRにみられる細胞内Ca²⁺動態異常とは異なったメカニズムが関与していることが示唆された。

文 献

1. Gordon T, Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM : Menopause and coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1978 ; 89 : 157-161.
2. Lerner DJ, Kannel WB : Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes : a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986 ; 111 : 383-90.
3. Eaker ED, Chesebro JH, Sacks FM, Wenger NK, Whisnant JP, Winston M : Cardiovascular disease in women. *Circulation* 1993 ; 88 : 1999-2009.
4. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, *et al.* : Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 756-62.
5. Riedel M, Rafflenbeul W, Lichtlen P : Ovarian sex steroids and atherosclerosis. *Clin Invest* 1993 ; 71 : 406-12.
6. Francesco P, Rancesco P : Relative influence of menopausal status, age, and body mass index on blood

- pressure. *Hypertension* 1997 ; 29 : 976-979.
7. van Berensteyn EC, van Hof MA, De Waard H : Contributions of ovarian failure and aging to blood pressure in normotensive peri-menopausal women : a mixed longitudinal study. *Am J Epidemiol* 1989 ; 129 : 947-55.
 8. Casiglia E, d'Este D, Ginocchio G, Colangeli G, Onesto C, Tramontin P, *et al.* : Lack of influence of menopause on blood pressure and cardiovascular risk profile : a 16-year longitudinal study concerning a cohort of 568 women. *J Hypertens* 1996 ; 14 : 729-36.
 9. Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, Kelsey SF, Caggiula AW, Wing RR : Menopause and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 1989 ; 321 : 641-646.
 10. Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK, *et al.* : Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigator. *N Engl J Med* 1993 ; 328 : 1069-75.
 11. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH : Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1987 ; 316 : 1105-1110.
 12. Ross R : The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med* 1986 ; 314 : 488-500.
 13. Somova L, Mufunda J : Platelet activity and salt sensitivity in the pathogenesis of systemic (essential) hypertension in black Africans. *Clin Exp Hypertens* 1993 ; 15 : 781-96.
 14. Kannell WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T : Menopause and the risk of cardiovascular disease. The Framingham study. *Ann Intern Med* 1976 ; 85 : 447-452.
 15. Orchard MA, Botting JH : The influence of sex hormones on rat platelet sensitivity to adenosine-diphosphate. *Thromb Haemostas* 1981 ; 46 : 469-9.
 16. Raman BB, Standley PR, Rajkumar V, Ram JL, Sowers JR : Effects of estradiol and progesterone on platelet calcium responses. *Am J Hypertens* 1995 ; 8 : 197-200.
 17. Poller L, Priest CM, Thomson JM : Platelet aggregation during oral contraception. *Br Med J* 1969 ; 4 : 273-4.
 18. Oyekan AO, Botting JH : The influence of adrenaline on gender difference in adenosine diphosphate-induced aggregation of platelets in the rat. *Thromb Haemostas* 1988 ; 60 : 481-485.
 19. Jacob B, Ron T, Jacob F : The effect of estrogen replacement therapy on platelet aggregation and adenosine triphosphate release in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1993 ; 81 : 261-264.
 20. Dahl LK, Knudsen KD, Ohanian EV, Muirhead M, Tuthill R : Role of the gonads in hypertension-prone rats. *J Exp Med* 1975 ; 142 : 748-759.
 21. Rowland NE, Fregly MJ : Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Hypertens* part A 1992 ; 14 : 367-375.
 22. Otsuka K, Suzuki H, Sasaki T, Ishii N, Itoh H, Saruta T : Blunted pressure natriuresis in ovariectomized

- Dahl-Iwaisalt-sensitive rats. *Hypertension* 1996 ; 27 : 119-24.
24. Von EA, Lutz HM, Gries J, Kretzschmar R : The protective mechanism of estrogen on high blood pressure. *Basic Res Cardiol* 1985 ; 80 : 191-201.
 25. Hoeg JM, Willis LR, Weinberger MH : Estrogen attenuation of the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1977 ; 233 : H369-H373.
 26. Brosnihan KB, Moriguchi A, Nakamoto H, Dean RH, Ganten D, Ferrario CM : Estrogen augments the contribution of nitric oxide to blood pressure regulation in transgenic hypertensive rats expressing the mouse Ren-2 gene. *Am J Hypertens* 1994 ; 7 : 576-582.
 27. Bachmann J, Wagner J, Haufe C, Wystrychowski A, Ciechanowicz A, Ganten D : Modulation of blood pressure and the renin-angiotensin system in transgenic and spontaneously hypertensive rats after ovariectomy. *J Hypertens* 1993 ; 11 (suppl 5) : S226-S227
 28. Stier FM, Woods JW, Dahl LK : Contraceptive steroids and hypertension. : An experimental model. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973 ; 143 : 561-564
 29. Tominaga T, Suzuki H, Ogata Y, Matsukawa S, Saruta T : The role of sex hormones and sodium intake in postmenopausal hypertension. *J Hum Hypertens* 1991 ; 5 : 495-500.
 30. Dahl LK : Effects of chronic salt ingestion ; Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension. *J Exp Med* 1962 ; 115 : 1173-1190.
 31. Roman RJ : Abnormal renal hemodynamics and pressure-natriuresis relationship in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol* 1986 ; 251 : F57-F65.
 32. Otsuka K, Ohno Y, Sasaki T, Yamakawa H, Hayashida T, Suzawa T, *et al.* : Ovariectomy aggravated sodium induced hypertension associated with altered platelet intracellular Ca^{2+} in Dahl rats. *Am J Hypertens* 1997 ; 10 : 1396-1403.
 33. Radomsky MW, Palmer RM, Moncada S : An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 5193-5197.
 34. Cadwgan TM, Benjamin N : Evidence for altered platelet nitric oxide synthesis in essential hypertensn. *J Hypertens* 1993 ; 11 : 417-20.
 35. Browner WS, Seeley DG, Vogt TM, Cummings SR : Non-traumamortality in elderly women with low bone density. *Lancet*. 1991 ; 338 : 355-358
 36. Browner WS, Pressman AR, Nevitt MC, Cauley JA, Cummings SR : Association between low bone density and stroke in elderly women. The study of osteoporotic fractures. *Stroke* 1993 ; 24 : 940-946
 37. Yamori Y, Fukuda S, Tsuchikura S, Ikeda K, Horie R : Stroke-prone SHR (SHRSP) as a model for osteoporosis. *Clin Exp Hypertens [A]*. 1991 ; A13 : 755-762