

# 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) の食塩負荷による腎障害に対するトロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の腎保護作用

永谷 裕介 大島 佳奈 東野 英明

近畿大学医学部薬理学教室

## 抄 録

脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) の食塩負荷による腎障害に対してトロンボキサン A<sub>2</sub>/プロスタグランジン H<sub>2</sub> 受容体 (TPR) 拮抗薬である ONO-8809 の腎保護作用を検討した。6週齢の雄性 SHRSP/Kpo を通常食群 (n=9), 高食塩群 (2% NaCl, n=10), 高食塩・薬物投与群 (2% NaCl+0.6 mg/kg/day ONO-8809, n=10) の3群に分け, 8週間経口投与を行い, 血圧および腎機能評価 (組織学的, 免疫組織学的検討) をおこなった。血圧は3群共に有意差が無かったが, 通常食群に比べ高食塩群では腎機能の悪化, 腎組織での糸球体の硬化, 細動脈の増殖, 壊死像や線維化が見られたが, 薬物投与群でそれらは改善した。免疫組織学的検討では高食塩群で糸球体や尿管間質, 特に血管周囲にマクロファージの浸潤, MCP1, ニトロチロシンの発現がみられ, それを ONO-8809 は改善した。食塩負荷により血圧非依存性に炎症反応が起り, TPR を介して腎障害をきたし, 細動脈で炎症細胞の浸潤がみられたが, これらを TPR 拮抗薬の ONO-8809 が改善した。したがって, 食塩負荷 SHRSP の腎臓では血圧非依存性に TXA<sub>2</sub> を介した炎症が腎機能や腎組織の悪化に関与していたと推測でき, これを TPR 拮抗薬が改善させた。

**Key words:** SHRSP, TXA<sub>2</sub>, TPR, 食塩感受性腎障害, MCP1, 炎症

## 緒 言

食塩の過剰摂取により高血圧性臓器障害や慢性腎臓病が悪化すると報告されている<sup>1-4</sup>。高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rats: SHR)<sup>5</sup> および脳卒中易発症性 SHR (stroke-prone SHR: SHRSP)<sup>6</sup> はヒト本態性高血圧症のモデル動物として開発され, 高血圧性腎障害や食塩感受性腎障害のモデルとしても広く用いられている<sup>7,8</sup>。

トロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) は起炎作用<sup>9</sup>, 血小板凝集作用<sup>10</sup>, 血管平滑筋収縮作用<sup>11</sup> などを持ち, 腎臓においては腎血流の低下や糸球体濾過値の減少, 尿管系糸球体フィードバック (tubuloglomerular feedback: TGF) の増強, メサンギウム基質の増殖などに関わる<sup>12-14</sup>。一方, TXA<sub>2</sub> 合成酵素阻害薬は糸球体腎炎モデルラットの腎障害や炎症を改善したと報告されている<sup>15</sup>。

また, 食塩感受性高血圧での血管病変や SHRSP の腎障害に炎症が関与しているとの報告がある<sup>16,17</sup>。TXA<sub>2</sub> 合成酵素阻害薬および TXA<sub>2</sub>/プロスタグランジン H<sub>2</sub> 受容体 (TPR) 拮抗薬は食塩感受性モデルである Dahl 食塩感受性ラットやヒトレニン及びヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子を導入したダブルトランスジェニックラット (dTGR) での腎障害を改善させ<sup>18,19</sup>, 食塩負荷により腎皮質の TPR の遺伝子発現が増加したと報告されている<sup>20</sup>。以上の知見は, 高食塩負荷による腎障害に TXA<sub>2</sub> を介した炎症が強く関与していることを示唆している。そこで本研究では, 高食塩負荷 SHRSP を腎障害モデルとして用い, TPR 拮抗薬として ONO-8809 を選択して慢性経口投与をおこない, 腎保護作用について検討した。

## 材料と方法

### 1. 動物

実験には、6週齢の雄性 SHRSP/Kpo を近畿大学医学部実験動物共同研究室より購入して用いた。飼育は温度22°C、湿度50%、12時間の明暗サイクルの条件下にて行った。本研究プロトコルは近畿大学動物実験委員会で承認された (KAME 19-095)。また、全ての動物実験は、日本動物実験学会のガイドラインに則って実施した。

### 2. 処置

動物は通常食群 (n=9)、高食塩群 (n=10)、高食塩・薬物投与群 (薬物投与群) (n=10) の3群に分けた。通常食群には、NaCl 含量が0.4%の SP 飼料 (船橋農場, 千葉) を、高食塩群及び薬物投与群には、SP 飼料に食塩を添加して NaCl 含量を2%とし、それぞれを自由に摂取させた。通常食群及び高食塩群にはリン酸緩衝生理食塩水を、薬物投与群にはリン酸緩衝生理食塩水に溶解した ONO-8809 (経口TPR拮抗薬, 小野薬品工業より供与, 大阪) を投与した。投与量は以前報告にあった濃度を参考に予備実験を行い<sup>21,22</sup>, ONO-8809の濃度を0.6 mg/kg/day に決定した。すなわち, ONO-8809 0.6 mg/kg/day をラット用経口胃ゾンデにより毎日午前中に1回, 8週間強制経口投与した。

収縮期血圧は, ラットを保温チャンバーにて37°C, 10分間加温した後, 尾カフ法 (UR-5000, ウエダ製作所, 東京) を用いて測定した。尿採取は代謝ケージ (日本クレア, 東京) を用いて24時間尿を採取した。

8週間を経た実験終了時に, 50 mg/kg のペントバルビタール (ネンブタール, 大日本住友製薬, 大阪) を腹腔内に投与し, 麻酔下で腹部大動脈より全血を採取した後, 腎臓を摘出した。血液はヘパリンを加え遠心分離により血漿を分離し, 各測定時まで-80°Cで凍結保存した。摘出した腎臓は10%中性緩衝ホルマリン (マイルドホルム 10N, 和光純薬工業, 大阪) で固定を行った。

### 3. 腎機能の生化学検査

血漿および尿中クレアチニン濃度は Jaffe 法 (クレアチニン-テストワコー, 和光純薬工業, 大阪) で, 尿蛋白量はピロガロールレッド法 (マイクロテスト TP-テストワコー, 和光純薬工業) を用いて, 分光光度計 (U-2000 型ダブルビーム, 日立, 東京) により測定した。クレアチンクリアランスは, 24時間法により算出した。また, 尿中ナトリウム及びカリウム濃度は, 電極法を用いて測定した (三菱化学メディエンス, 東京)。

### 4. 脂質酸化ストレスマーカーの測定

血漿中のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) は TBARS Assay Kit (Cayman, Michigan, USA) で, 血漿 8-iso prostaglandin F<sub>2α</sub> は Bond Elut C18 (Varian, Inc. CA, USA) で固相抽出したのちに 8-Isoprostane EIA Kit (Cayman) を使用し, マイクロプレートリーダー (Bio Rad model 680, バイオ・ラッド, 東京) を用いて測定した。

### 5. 腎病変の病理組織学的検討

ホルマリン固定された腎臓組織に対しパラフィン包埋を行い, 2-3 μm の薄切病理切片を作製して, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色, 糸球体基底膜やメサンギウム基質を観察するために過ヨウ素酸シッフ (Periodic acid-Schiff; PAS) 染色, 過ヨウ素酸メセナミン銀 (Periodic acid-methenamine-silver; PAM) 染色および間質の線維化を観察するためにマッソン (Masson's trichrome) 染色を行い, 光学顕微鏡 (E-800, Canon, 東京) と CCD カメラ (VB-7000, キーエンス, 大阪) を用いて, 腎臓の被膜下皮質および傍髄質皮質における糸球体硬化及び細動脈硬化について検鏡, 写真撮影のうえ ImageJ software version 1.43q, (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて画像解析した。

糸球体の変化は, PAS 染色により, 今井らが報告した糸球体硬化スコア<sup>23</sup>に基づきスコア化を行った。すなわち個々の糸球体に関して, grade 1; 糸球体の変化のないもの, grade 2; 軽度のメサンギウムの肥厚を示すもの, grade 3; segmental sclerosis, grade 4; global sclerosis と判定して1-4点とし, 50個の糸球体を観察してその平均点を糸球体硬化指数 (Sclerosis index) とした。

血管病変については以前報告された細動脈硬化スコアを用いた<sup>24</sup>。その判定は, grade 0; 変化のないもの, grade 1; 血管壁の軽度の線維性肥厚が認められ, 細動脈硬化症と診断されるもの, grade 2; 内膜下よりさらに一部筋層まで血漿成分の浸潤がみられるが, 血管壁の細胞増殖の著しくないもの, grade 3; 筋層, 外膜細胞の著しい増殖が見られ onion skin pattern がみられるが管腔の完全閉塞がみられないもの, grade 4; 血管腔の閉塞がみられ, フィブリノイド壊死がみられるものとし, それぞれの細動脈硬化度を0-4点として30個の血管を評価し, その平均点を細動脈硬化指数 (Arteriosclerosis index) とした。

線維化測定については, マッソン染色で皮質間質の膠原線維が染色された領域を測定した。すなわち, 糸球体や大血管を除く (対物レンズ倍率×20) 重ならない20視野の線維化の割合 (染色領域/視野全領域) を ImageJ software version 1.43q で測定した。

なお、判定の公平化を図るため、実験プロトコールに関与していなかった研究者がスコア化した。

#### 6. 腎病変の免疫組織化学的検討

VECTASTAIN UNIVERSAL elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用い、アビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法にて、免疫染色を行った。一次抗体に、ED1 抗体 (Serotec, Oxford, UK), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) 抗体 (Novus Biologicals, Inc, Littleton, CO) を100倍希釈したもの、ニトロチロシン抗体 (Millipore, MA, USA) を200倍希釈したものを使用して、それぞれの免疫染色を以下のように実施した。

腎組織は、ホルマリン固定パラフィン包埋より、4  $\mu$ m の薄切病理切片を作製して脱パラフィン処理を行った。抗原賦活化は、ED1 ではトリプシン処理 (1 mg/ml) を5分間、MCP1, ニトロチロシンでは0.01 M クエン酸緩衝液による20分間の煮沸を行った。内因性ペルオキシダーゼの処理は0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノールで室温30分間、ウマ血清で室温20分間処理してブロックした。一次抗体を4°Cで一晩反応させた後に、ビオチン標識二次抗体を30分間反応させた。アビジン-ビオチン複合体で30分間反応させ、3,3-diaminobenzidine (SIGMAFAST, Sigma, St. Louis, MO) で発色させた。対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。各行程で tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBST) で5分間3回洗浄した。

免疫組織化学的評価として ED1 陽性細胞である monocyte/macrophage (細胞数/mm<sup>2</sup>) を腎皮質の糸球体20個と尿管管間質の20視野 (対物レンズ倍率 $\times$ 40) で、MCP1 とニトロチロシンは腎皮質の20視野 (対物レンズ倍率 $\times$ 40) で染色された範囲を検鏡して写真撮影し、ImageJ software version 1.43q を使用して測定した。なお、判定の公平化を図るた

め、実験プロトコールに関与していなかった研究者が陽性細胞数や免疫染色範囲を測定した。

#### 7. 統計処理

データは全て平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、統計解析は StatView Version 5.0 (SAS Institute Inc., NC, USA) を用いて実施した。各群間の比較は One-way analysis of variance (One-way ANOVA) を用いて多重比較検定とし、Tukey-Kramer 法を用いて、有意差の検定を行い、 $p < 0.05$  をもって統計的有意とした。

## 結 果

### 1. 体重および血圧の経時的変化

体重：6週齢の体重 (通常食群：110.0 $\pm$ 5.6 g, 高食塩群：109.0 $\pm$ 4.4 g, 薬物投与群：108.2 $\pm$ 6.7 g) と比べ14週齢の体重 (通常食群：290.9 $\pm$ 7.4 g, 高食塩群：249.9 $\pm$ 12.7 g, 薬物投与群：279.4 $\pm$ 10.8 g) は増加した。14週齢で高食塩群は通常食群に比べ有意に低値であった (表1)。

血圧：6週齢における血圧 (通常食群：149 $\pm$ 7 mmHg, 高食塩群：144 $\pm$ 6 mmHg, 薬物投与群：149 $\pm$ 5 mmHg) は3群間で有意差はなく、14週齢における血圧 (通常食群：263 $\pm$ 6 mmHg, 高食塩群：273 $\pm$ 5 mmHg, 薬物投与群：263 $\pm$ 10 mmHg) は6週齢よりも上昇したが、3群間で有意差は見られなかった (表1)。

### 2. 解剖時腎所見

腎重量は3群間で有意差は見られなかった (通常食群：1.19 $\pm$ 0.02 g, 高食塩群：1.22 $\pm$ 0.03 g, 薬物投与群：1.21 $\pm$ 0.03 g) が、腎重量体重比では高食塩群は通常食群より高値で、薬物投与で有意に低値であった (通常食群：4.11 $\pm$ 0.04 g/kg, 高食塩群：4.97 $\pm$ 0.19 g/kg, 薬物投与群：4.34 $\pm$ 0.10 g/kg) (表1)。

### 3. 尿所見

表1 各種パラメーターの比較

	通常食群 (n=9)	高食塩群 (n=10)	薬物投与群 (n=10)
体重 (g)	290.9 $\pm$ 7.4	249.9 $\pm$ 12.7*	279.4 $\pm$ 10.8
血圧 (mmHg)	263 $\pm$ 6	273 $\pm$ 5	263 $\pm$ 10
腎重量 (g)	1.19 $\pm$ 0.02	1.22 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.03
腎重量/体重 (g/kg)	4.11 $\pm$ 0.04	4.97 $\pm$ 0.19*	4.34 $\pm$ 0.10#
尿量 (ml/day)	22.0 $\pm$ 3.1	37.8 $\pm$ 4.8*	27.4 $\pm$ 2.3
尿蛋白 (mg/day)	54.4 $\pm$ 10.6	127.0 $\pm$ 22.0*	78.9 $\pm$ 14.6
尿中ナトリウム (mEq/day)	2.36 $\pm$ 0.12	4.24 $\pm$ 0.43*	5.38 $\pm$ 0.63*
尿中カリウム (mEq/day)	2.30 $\pm$ 0.05	1.85 $\pm$ 0.11*	2.08 $\pm$ 0.14

実験開始から8週間後 (14週齢) の各パラメーターの平均値 $\pm$ 標準誤差。

\* :  $p < 0.05$  vs 通常食群, # :  $p < 0.05$  vs 高食塩群 (One-way ANOVA, Tukey-Kramer)

尿量は14週齢で、高食塩群 (37.8±4.8 ml/day) で通常食群 (22.0±3.1 ml/day) と比べて有意に高値であったが、薬物投与群 (27.4±2.3 ml/day) は高食塩群と比べて低値の傾向であった。尿蛋白排泄量は14週齢で、高食塩群 (127.0±22.0 mg/day) で通常食群 (54.4±10.6 mg/day) と比べて有意に高値であったが、薬物投与群 (78.9±14.6 mg/day) は高食塩と比べて低値の傾向がみられた(表1)。尿中ナトリウム排泄は通常食群 (2.36±0.12 mEq/day) と比べて高食塩群 (4.24±0.43 mEq/day) と薬物投与群 (5.38±0.63 mEq/day) では有意に高値となり、尿中カリウム排泄は高食塩群 (1.85±0.11 mEq/day) では通常食群 (2.30±0.05 mEq/day) と比べ

て、有意に低値であったが、薬物投与群 (2.08±0.14 mEq/day) との間には差異はみられなかった (表1)。

4. 腎機能所見

血漿クレアチニンは14週齢で、高食塩群 (0.87±0.05 mg/dl) では通常食群 (0.68±0.04 mg/dl) と比べて有意に高値であったが、薬物投与群 (0.57±0.04 mg/dl) では高食塩群と比較して有意に低値であった。クレアチンクリアランスは14週齢で、高食塩群 (0.88±0.08 ml/min) が通常食群 (1.28±0.07 ml/min) と比べて有意に低値であったが、薬物投与群 (1.45±0.13 ml/min) では高値であった (図1)。

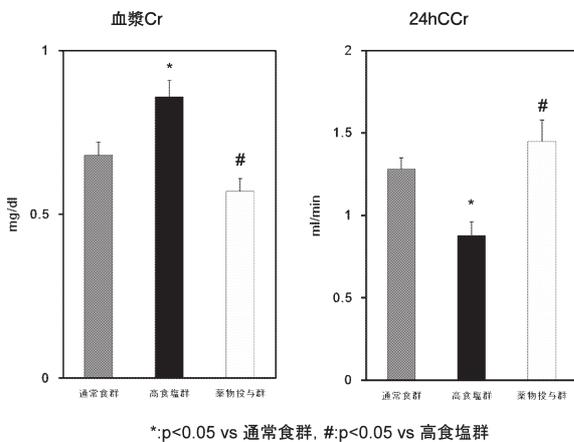


図1 腎機能の差異 (血漿中クレアチニン濃度 (血漿Cr) と24時間クレアチンクリアランス値 (24hCCr))  
 実験開始から8週間後 (14週齢) の平均値±標準誤差 n=9-10  
 \*: p<0.05 vs 通常食群, #: p<0.05 vs 高食塩群

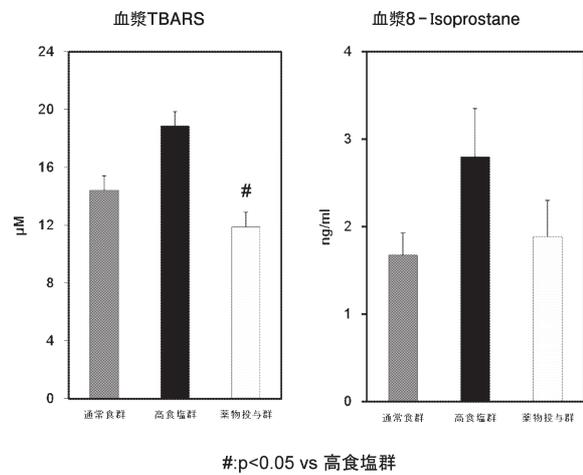


図2 酸化ストレス評価 (血漿 TBARS 濃度と血漿8-Isoprostane 濃度)  
 実験開始から8週間後 (14週齢) の平均値±標準誤差 n=9-10  
 #: p<0.05 vs 高食塩群

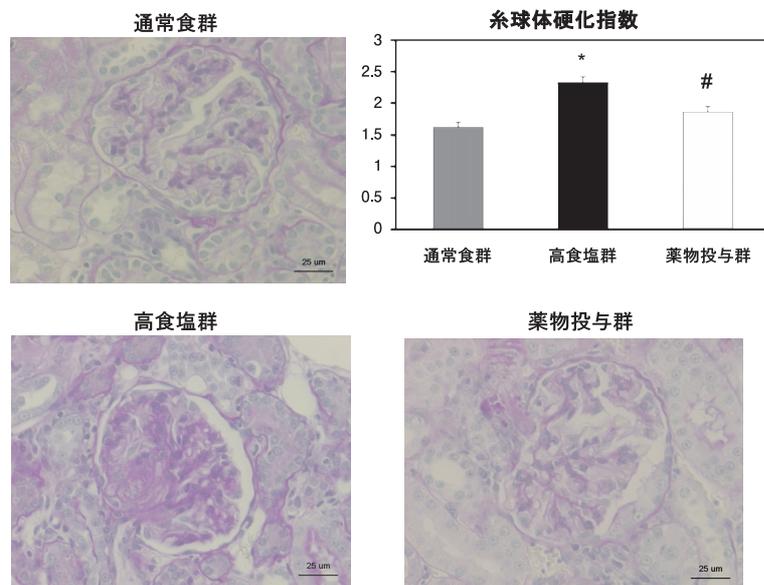


図3 腎組織の糸球体像 (Periodic acid-Schiff ; PAS 染色) と糸球体硬化指数 (Sclerosis index) とその評価 倍率は対物レンズ×40 平均値±標準誤差 n=9-10  
 \*: p<0.05 vs 通常食群, #: p<0.05 vs 高食塩群

5. 脂質酸化ストレス所見

脂質の酸化ストレス指標である血漿 TBARS は通常食群 ( $14.4 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ) と高食塩群 ( $18.9 \pm 1.9 \mu\text{M}$ ) では差異は無かったが、薬物投与群 ( $11.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$ ) では高食塩群に比べ有意に低値であった。血漿 8-isoprostane は高食塩群で高値、薬物投与群で低値の傾向があったが、3群間では有意差はなかった (通常食群:  $1.68 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ , 高食塩群:  $2.80 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$ , 薬物投与群:  $1.89 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$ ) (図2)。

6. 腎臓組織所見

弱拡大 HE 染色で検鏡したところ、高食塩群では通常食群に比べ小葉間動脈や輸入細動脈の onion skin lesion やフィブリノイド壊死がみられ、特に傍髄質皮質で糸球体の硬化、つまり基底膜やメサンギ

ウム基質が増加ないしは虚脱により集合してできた病変が観察されたが、それらは薬物投与群で改善が見られた。

糸球体の硬化像は高食塩群では通常食群に比べ増加し、薬物投与群で改善がみられた。細動脈の中膜の増殖および内膜の壊死像が高食塩群では通常食群に比べて多く観察され、それらは薬物投与群で改善された。(通常食群: Sclerosis Index:  $1.62 \pm 0.08$ , Arteriosclerosis Index:  $0.61 \pm 0.18$ , 高食塩群: Sclerosis Index:  $2.33 \pm 0.10$ , Arteriosclerosis Index:  $2.34 \pm 0.33$ , 薬物投与群: Sclerosis Index:  $1.87 \pm 0.08$ , Arteriosclerosis Index:  $1.05 \pm 0.27$ )。

線維化についてはマッソン染色で皮質間質の膠原

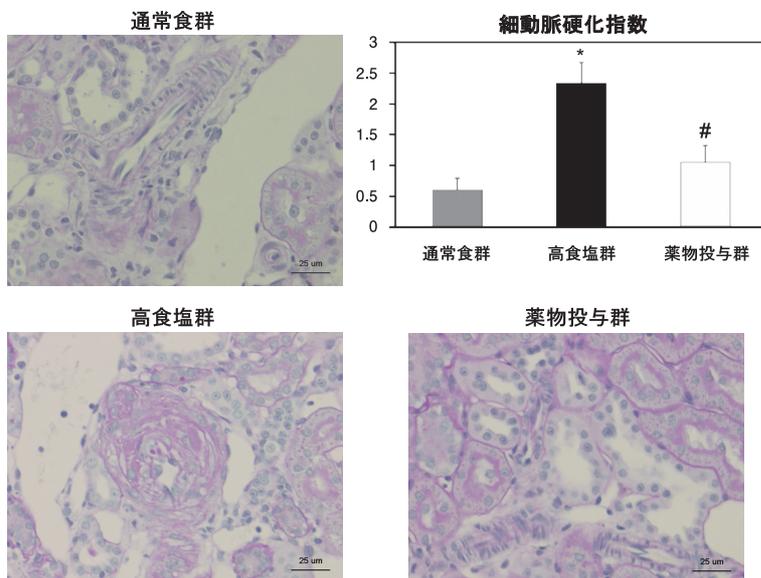


図4 腎組織の細動脈像 (Periodic acid-Schiff; PAS 染色) と細動脈硬化指数 (Arteriosclerosis index) とその評価 倍率は対物レンズ×40 平均値±標準誤差 n=9-10 \* : p<0.05 vs 通常食群, # : p<0.05 vs 高食塩群

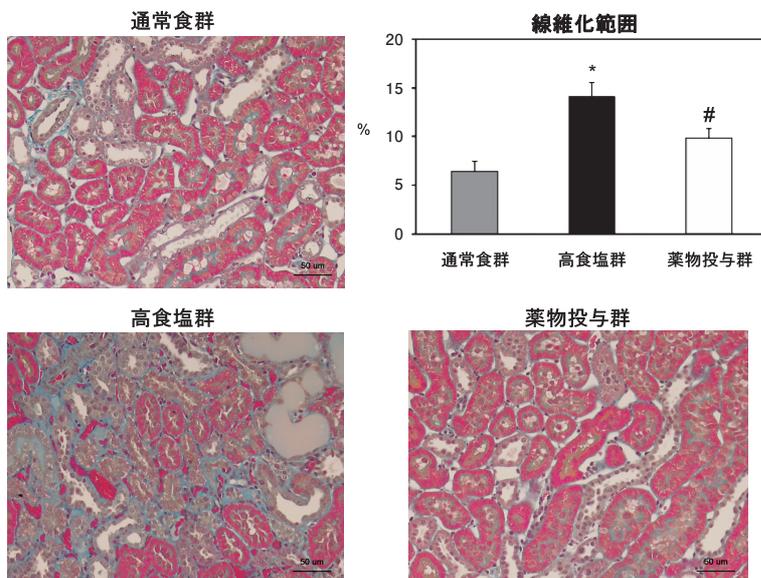


図5 腎組織の尿細管間質線維化像 (Masson's trichrome 染色) と線維化範囲の評価 倍率は対物レンズ×20 平均値±標準誤差 n=9-10 \* : p<0.05 vs 通常食群, # : p<0.05 vs 高食塩群

線維が青染された領域を測定した。通常食群に比べ、高食塩群で有意に間質の線維化がみられたが、薬物投与群では改善がみられた。(fibrosis area :  $6.43 \pm 0.99$  vs  $14.1 \pm 1.45$  vs  $9.80 \pm 1.0\%$ ) (図3-5)。

### 7. 免疫組織化学的所見

ED1 陽性のマクロファージの浸潤は、糸球体、間質ともに通常食群に比べ高食塩群で顕著にみられ、薬物投与群で有意に抑制された。間質ではとくに細動脈の onion skin lesion およびフィブリノイド壊死がみられた周囲にマクロファージの浸潤が見られた。(糸球体 ED1 陽性細胞数 :  $0.24 \pm 0.10$  vs  $2.02 \pm 0.55$  vs  $0.34 \pm 0.15$  cells/gcs) (図6) (間質 ED1 陽性細胞数 :  $56.5 \pm 22.6$  vs  $421.2 \pm 68.7$  vs  $92.8 \pm 39.0$  cells/mm<sup>2</sup>) (図7)。

また、炎症性ケモカインである MCP1 は集合管、ヘンレの太い上行脚および遠位尿細管で染色をみとめ、高食塩群ではさらに障害された動脈周囲で観察された。MCP1 染色範囲は通常食群にくらべ高食塩群で広くみられ、薬物投与群でそれは有意に抑制された (MCP1 染色範囲値 :  $18.2 \pm 1.0$  vs  $27.3 \pm 1.4$  vs  $19.0 \pm 0.8\%$ ) (図8)。パーオキシナイトライトによる生体内炎症のマーカーであるニトロシロシンは集合管、ヘンレの太い上行脚及び遠位尿細管で染色をみとめ、高食塩群ではさらに障害された動脈周囲で観察された。ニトロシロシン染色範囲は通常食群にくらべ高食塩群で広くみられ、薬物投与群で有意に抑制された (ニトロシロシン染色範囲値 :  $17.4 \pm 0.8$  vs  $28.0 \pm 1.3$  vs  $19.0 \pm 1.2\%$ ) (図9)。

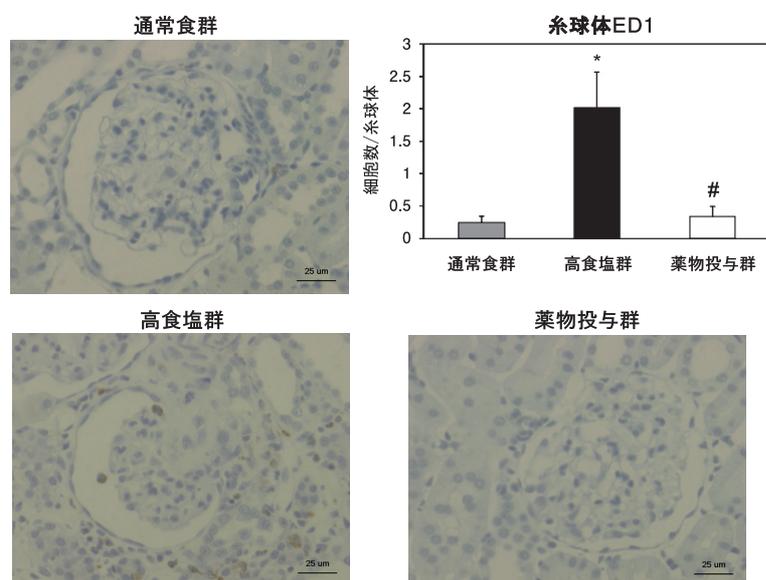


図6 糸球体部の ED1 陽性細胞(マクロファージ) 免疫組織染色像と陽性細胞数 倍率は対物レンズ×40 平均値±標準誤差 n=9-10 \* :  $p < 0.05$  vs 通常食群, # :  $p < 0.05$  vs 高食塩群

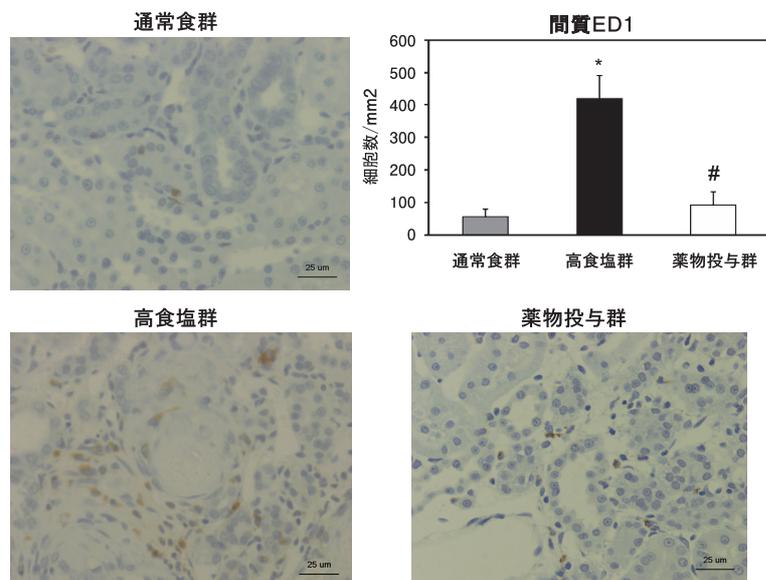


図7 腎皮質間質の ED1 陽性細胞(マクロファージ) 免疫組織染色像と陽性細胞数 倍率は対物レンズ×40 平均値±標準誤差 n=9-10 \* :  $p < 0.05$  vs 通常食群, # :  $p < 0.05$  vs 高食塩群

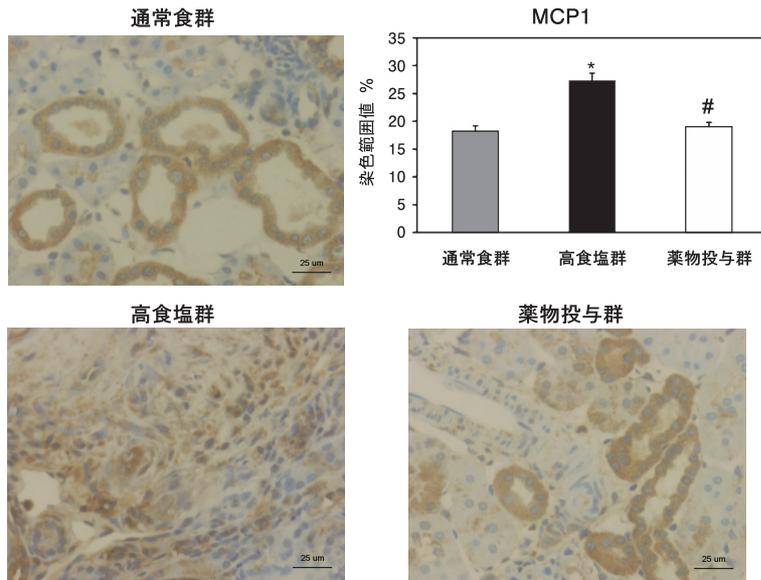


図8 腎皮質間質部 monocyte chemoattractant protein - 1 (MCP1) 免疫組織染色像と染色範囲値 倍率は対物レンズ×40 平均値±標準誤差 n=9-10 \* : p<0.05 vs 通常食群, # : p<0.05 vs 高食塩群

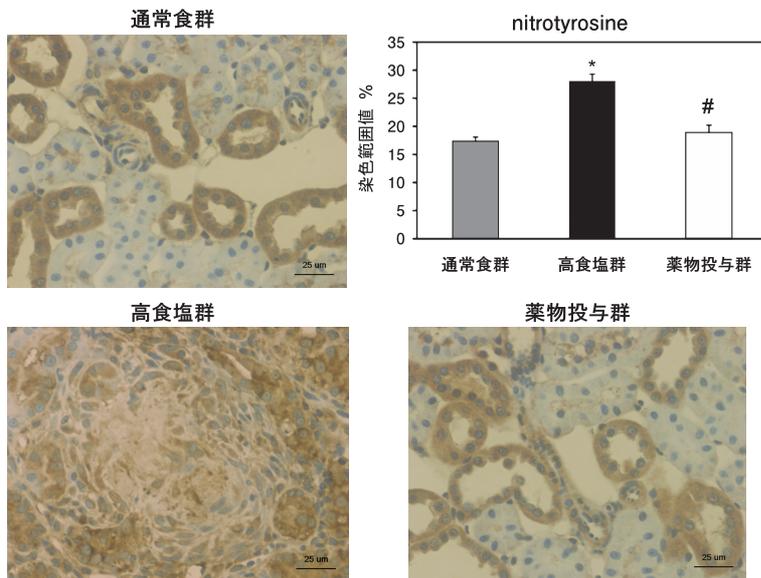


図9 腎皮質間質部 nitrotyrosine (ニトロチロシン) 免疫組織染色像と染色範囲値 倍率は対物レンズ×40 平均値±標準誤差 n=9-10 \* : p<0.05 vs 通常食群, # : p<0.05 vs 高食塩群

### 考 察

本研究では、腎障害モデルとして高食塩負荷 SHRSP を用い、TPR 拮抗薬である ONO-8809 の腎保護作用について検討を行った。その結果、高食塩負荷 SHRSP において、ONO-8809 の慢性投与は、血圧非依存性におこる腎組織の炎症を改善し、細動脈硬化や増殖を抑制した。これにより、TPR 拮抗薬は腎障害の悪化の予防に有効であることを見出した。

高食塩群の体重は通常食群と比べ、約40 g 減少していたが、薬物投与群では体重減少が改善傾向を示した。解剖時に通常食群では見られなかったが、高食塩群では10匹中4匹が脳出血や脳卒中を発症して

おり、薬物投与群では10匹中1匹が発症と高食塩群と比べその発症が抑制されていた。これは、高食塩負荷 SHRSP に対し TPR 拮抗薬により脳卒中の発症の減少や体重減少の改善がみられたとする報告と一致する結果であった<sup>22,25</sup>。本研究において高食塩群と通常食群間で血圧に有意差がみられなかったのは血圧に有意差がみられたと報告のある4% NaCl 食負荷<sup>26</sup>や1% NaCl 水負荷<sup>27</sup>にくらべ、2% NaCl 食負荷が高食塩負荷としては比較的穏やかだったためと考えられる。腎重量は3群間に差異は見られなかった。尿中ナトリウム排泄量は通常食群と比べ、高食塩群と薬物投与群で高値が見られた。これは食塩摂取量の増加によるもので、食塩負荷がされたことを意味する。薬物投与群では尿量は通常食

群と変わらなかったが、尿中ナトリウム排泄量は増加していた。これは ONO-8809 が髄質の障害を抑制して腎保護、濃縮能を改善した可能性がある。SHRSP の髄質で WKY に比べて血管拡張因子の  $\text{PGI}_2$  の代謝物である 6-keto-PGF $1\alpha$  と血管収縮因子の  $\text{TXA}_2$  の代謝物である  $\text{TXB}_2$  の比が低下し<sup>28</sup>、Sibouta らは TPR 拮抗薬/合成酵素阻害薬により saline volume-expanded SHR におけるその低下が改善され、尿中排泄の増加がみられたと報告している<sup>29</sup>。したがって、本研究において ONO-8809 が腎臓での  $\text{TXA}_2$  などの血管収縮因子と  $\text{PGI}_2$  などの血管拡張因子の不均衡を改善し、髄質の濃縮能を改善した可能性が考えられる。尿中カリウム排泄量は高食塩群では通常食群と比べ有意に低値であったが、薬物投与群では有意差はなかった。これは食塩負荷の尿細管障害に対して TPR 拮抗薬による再吸収や分泌の改善が関与したものと考えられた。

高食塩群では通常食群に比べ小葉間動脈や輸入細動脈の中膜の増殖および内膜の壊死像がみられ、特に傍髄質皮質で糸球体の硬化が顕著であったが、それらは薬物投与群で改善が見られた。SHRSP は加齢に伴い血圧が上昇するが、腎臓においては収縮期血圧が 230 mmHg 以上になると血管病変を生じることが明らかにされている<sup>30</sup>。高血圧の状態では傍髄質皮質の輸入細動脈に太い弓状動脈から分岐することにより高い流入圧がかかり、輸入細動脈の障害や自動調節能の障害がおり、糸球体高血圧から尿中にアルブミンが漏出すると考えられている<sup>31</sup>。本研究において SHRSP に対する 8 週間の 2% NaCl 食負荷は通常食に比し血圧に有意な差異はなかったが、尿蛋白量及び血漿クレアチニン濃度の増加、さらにはクレアチニンクリアランスの低下など、腎機能低下を促進することが観察された。

高食塩負荷 SHRSP に対する TPR 拮抗薬 ONO-8809 の慢性投与は、血圧への影響をほとんど認めなかった。TPR 拮抗薬の投与で腎血管高血圧モデルである 2K, 1C Goldblatt 高血圧ラットの血圧を有意に低下させたと報告されている<sup>32</sup>。しかし、最近の Gelosa らの報告では、TPR 拮抗薬の投与で高食塩負荷の SHRSP の血圧は変化しなかった。一方では、MCP1, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  などの炎症性の因子を減少させ、SHRSP の脳卒中の発生や死亡率を低下し、血管内皮を改善させたという報告もある<sup>25</sup>。本研究では TPR 拮抗薬 ONO-8809 の投与による血圧の変化が見られなかったにもかかわらず、血漿クレアチニン濃度の有意な低下、さらにはクレアチニンクリアランスの有意な上昇、尿蛋白量の抑制傾向を示した。これは TPR 拮抗薬が食塩負荷 SHRSP の

腎障害を含む臓器障害に対し血圧非依存性に改善する可能性を示す。病理学的所見においては、SHRSP の高食塩負荷により、腎組織での糸球体の硬化、細動脈の硬化、増殖及び尿細管間質の線維化が観察されたが、ONO-8809 の慢性投与によりこれらに著明な改善がみられたことより、ONO-8809 は、本モデルにおける腎機能障害の予防あるいは改善に有効であることが明らかとなった。

また、本研究において SHRSP への高食塩負荷により糸球体及び尿細管間質、細動脈周囲に ED1 陽性細胞であるマクロファージや単球つまり、炎症細胞の浸潤が見られた。Sironi らは 1% NaCl 水負荷の SHRSP で血圧を下げない用量のアングイオテンシン II (Ang II) 受容体拮抗薬 (ARB) で腎臓の障害や炎症が改善すると報告している<sup>17</sup>。食塩による腎障害における炎症には Ang II の関与が示唆されており<sup>16</sup>、Dahl 食塩感受性ラットにおいては抗酸化物質の N-acetyl-L-cysteine や一酸化窒素 NO の基質である L-Arginine の投与で  $\text{TXA}_2$  の代謝物である  $\text{TXB}_2$  や 8-isoprostane を低下させたと報告されている<sup>33,34</sup>。また、Ang II や食塩負荷で内皮由来血管拡張因子である NO の低下、血流障害に  $\text{TXA}_2$  の関与が指摘され、食塩負荷や 8-isoprostane の投与により TGF が増加し、TPR 拮抗薬により改善したとする報告もある<sup>13,35-37</sup>。これらの研究は食塩による腎機能や腎組織の障害は、 $\text{TXA}_2$  や TPR を介した炎症が関与していることを示している。

本研究において MCP1, ニトロチロシンは集合管、ヘンレの太い上行脚および遠位尿細管にその発現をみると、高食塩群ではさらに障害された動脈周囲で観察され、ONO-8809 の投与ではこれらに改善が見られた。石塚らは SHRSP の脳血管病変や炎症細胞に TPR を介した MCP1 の増加を報告しており、本研究の結果はそれに相当する所見であった<sup>9,38</sup>。また、ストレプトゾトシン糖尿病 apolipoprotein E ノックアウトマウスの腎臓におけるニトロチロシンの発現を TPR 拮抗薬 S18886 が改善し<sup>39</sup>、食塩負荷によりアラキドン酸カスケードや COX の亢進<sup>40,41</sup>、 $\text{TXA}_2$  を介する炎症<sup>22,25</sup> が起こることが報告されている。食塩負荷 SHRSP の腎障害、糸球体の硬化、尿細管間質の線維化、特に内膜の壊死や中膜の肥厚、フィブリノイド壊死や onion skin lesion がみられた小葉間動脈や輸入細動脈の周囲で MCP1 やニトロチロシンの発現が観察され、ONO-8809 はこれらを改善させた。

以上より、食塩負荷により SHRSP の腎障害、細動脈周囲に MCP1, ニトロチロシンなどの炎症因子が生じて、血圧非依存性に  $\text{TXA}_2$  を介した炎症を増

強したが、それらを TPR 拮抗薬の ONO-8809 は改善したと考えられた。

### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御協力頂きました近畿大学医学部共同研究施設実験動物共同研究室および分子形態共同研究室の先生方、近畿大学医学部薬理学教室の田淵正樹先生、丹羽淳子先生に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

1. Stamler J, Rose G, Stamler R, Elliott P, Dyer A, Marmot M (1989) INTERSALT study findings. Public health and medical care implications. *Hypertension* 14 : 570-577
2. Mallamaci F, Leonardis D, Bellizzi V, Zoccali C (1996) Does high salt intake cause hyperfiltration in patients with essential hypertension? *J Hum Hypertens* 10 : 157-161
3. Cianciaruso B, Bellizzi V, Minutolo R, Tavera A, Capuano A, Conte G, De Nicola L (1998) Salt intake and renal outcome in patients with progressive renal disease. *Miner Electrolyte Metab* 24 : 296-301
4. De Nicola L, Minutolo R, Bellizzi V, Zoccali C, Cianciaruso B, Andreucci VE, Fuiano G, Conte G (2004) Achievement of target blood pressure levels in chronic kidney disease : a salty question? *Am J Kidney Dis* 43 : 782-795
5. Okamoto K, Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27 : 282-293
6. Okamoto K, Yamori Y, Nagaoka A (1974) Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ Res* 34, 35, suppl 1 : S143-S153
7. Stier CT Jr, Benter IF, Ahmad S, Zuo HL, Selig N, Roethel S, Levine S, Itskovitz HD (1989) Enalapril prevents stroke and kidney dysfunction in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 13 : 115-121
8. Nagaoka A, Kakihana M, Suno M, Hamajo K (1981) Renal hemodynamics and sodium excretion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 241 : F244-F249
9. Ishizuka T, Sawada S, Sugama K, Kurita A (2000) Thromboxane A2 (TXA2) receptor blockade suppresses monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by stimulated vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 120 : 71-78
10. Seuter F, Perzborn E, Rosentreter U, Boshagen H, Fiedler VB (1989) Inhibition of platelet aggregation in vitro and ex vivo by the new thromboxane antagonist (3R)-3-(4-fluorophenylsulfonamido)-1, 2, 3, 4-tetrahydro-9-carbazolepropanoic acid. *Arzneimittelforschung* 39 : 1525-1527
11. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM (1990) Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 15 : 699-703
12. Wilcox CS, Folger WH, Welch (1994) Renal vasoconstriction with U-46,619 : role of arachidonate metabolites. *J Am Soc Nephrol* 5 : 1120-1124
13. Welch WJ, Peng B, Takeuchi K, Abe K, and Wilcox CS (1997) Salt loading enhances rat renal TxA2/PGH2 receptor expression and TGF responses to U-46,619. *Am J Physiol Renal Physiol* 273 : F976-F983
14. Bruggemen LA, Horigan EA, Horikoshi S, Ray PE, Klotman PE (1991) Thromboxane stimulates synthesis of extra cellular matrix proteins in vitro. *Am J Physiol* 261 : F488-F494
15. Lianos EA, Bresnahan BA (1999) Effect of thromboxane A2 inhibition and antagonism on prostaglandin and leukotriene synthesis in glomerular immune injury. *J Lab Clin Med* 134 : 478-482
16. Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ (2010) The role of renal microvascular disease and interstitial inflammation in salt-sensitive hypertension. *Hypertens Res* 33 : 975-980
17. Sironi L, Gelsa P, Guerrini U, Banfi C, Crippa V, Brioschi M, Gianazza E, Nobili E, Gianella A, de Gasparo M, Tremoli E (2004) Anti-inflammatory effects of AT1 receptor blockade provide end-organ protection in stroke-prone rats independently from blood pressure fall. *J Pharmacol Exp Ther* 311 : 989-995
18. Yamashita W, Ito Y, Weiss MA, Ooi BS, Pollak VE (1988) A thromboxane synthetase antagonist ameliorates progressive renal disease of Dahl-S rats. *Kidney Int* 33 : 77-83
19. Sebekova K, Ramuscak A, Boor P, Heidland A, Amann K (2008) The selective TP receptor antagonist, S18886 (tera troban), attenuates renal damage in the double transgenic rat model of hypertension. *Am J Nephrol* 28 : 47-53
20. Wilcox CS, Welch WJ (2003) Thromboxane synthase and TP receptor mRNA in rat kidney and brain : effects of salt intake and ANG II. *Am J Physiol Renal Physiol* 284 : F525-F531
21. Wakitani K, Matsumoto R, Imawaka H, Kamanaka Y, Naka M, Hamanaka N, Okegawa T, Kawasaki A (1991) Anti-thrombotic effect of ONO-8809, a novel TXA2/PG endoperoxide receptor antagonist. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 21B : 599-602
22. Ishizuka T, Niwa A, Tabuchi M, Nagatani Y, Ooshima K, Higashino H (2007) Involvement of thromboxane A2 receptor in the cerebrovascular damage of salt-loaded, stroke-prone rats. *J Hypertens* 25 : 861-870
23. 今井比呂恵 (2002) 糸球体硬化症モデルラットにおける腎障害発症機序に関する検討. *埼玉医大誌* 29 : 35-50
24. de Gasparo M, Hess P, Nuesslein-Hildesheim B, Bruneval P, Clozel JP (2000) Combination of non-hypotensive doses of valsartan and enalapril improves survival of spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1 : 151-158

25. Gelosa P, Ballerio R, Banfi C, Nobili E, Gianella A, Pignieri A, Brioschi M, Guerrini U, Castiglioni L, Blanc-Guillemaud V, Lerond L, Tremoli E, Sironi L (2010) Terutroban, a thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, increases survival in stroke-prone rats by preventing systemic inflammation and endothelial dysfunction: comparison with aspirin and rosuvastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 334: 199-205
26. Ishizuka T, Niwa A, Tabuchi M, Ooshima K, Higashino H (2008) Acetylsalicylic acid provides cerebrovascular protection from oxidant damage in salt-loaded stroke-prone rats. *Life Sci* 82: 806-815
27. Nagaoka A, Iwatsuka H, Suzuoki Z, Okamoto K (1976) Genetic predisposition to stroke in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 230: 1354-1359
28. Kawaguchi H, Saito H, Yasuda H (1987) Renal prostaglandins and phospholipase A2 in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 5: 299-304
29. Shibouta Y, Terashita ZI, Inada Y, Kato K, Nishikawa K (1982) Renal effects of pinane-thromboxane A2 and indomethacin in saline volume-expanded spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 85: 51-59
30. 鈴木庸之, 蓑田正照, 工藤恵康, 岡本耕造 (1981) 高血圧性血管病変の発生病理-SHRSPの腎臓における高血圧性血管病変. *近畿大医誌* 6: S33-S40
31. Ito S, Nagasawa T, Abe M, Mori T (2009) Strain vessel hypothesis: a viewpoint for linkage of albuminuria and cerebro-cardiovascular risk. *Hypertens Res* 32: 115-121
32. Wilcox CS, Cardozo J, Welch WJ (1996) AT1 and TxA2/PGH2 receptors maintain hypertension throughout 2K, 1C Goldblatt hypertension in the rat. *Am J Physiol* 271: R891-R896
33. Zhang L, Fujii S, Igarashi J, Kosaka H (2004) Effects of thiol antioxidant on reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hypertensive Dahl salt-sensitive rats. *Free Radic Biol Med* 37: 1813-1820
34. Fujii S, Zhang L, Igarashi J, Kosaka H (2003) L-arginine reverses p47phox and gp91phox expression induced by high salt in Dahl rats. *Hypertension* 42: 1014-1020
35. Welch WJ (2005) Effects of isoprostane on tubuloglomerular feedback: roles of TP receptors, NOS, and salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F757-F762
36. Bayorh MA, Ganafa AA, Eatman D, Walton M, Feuerstein GZ (2005) Simvastatin and losartan enhance nitric oxide and reduce oxidative stress in salt-induced hypertension. *Am J Hypertens* 18: 1496-1502
37. Kawada N, Dennehy K, Solis G, Modlinger P, Hamel R, Kawada JT, Aslam S, Moriyama T, Imai E, Welch WJ, Wilcox CS (2004) TP receptors regulate renal hemodynamics during angiotensin II slow pressor response. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F753-F759
38. Ishizuka T, Matsumura K, Matsui T, Takase B, Kurita A (2003) Ramatroban, a thromboxane A2 receptor antagonist, prevents macrophage accumulation and neointimal formation after balloon arterial injury in cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 41: 571-578
39. Xu S, Jiang B, Maitland KA, Bayat H, Gu J, Nadler JL, Corda S, Lavielle G, Verbeuren TJ, Zuccollo A, Cohen RA (2006) The thromboxane receptor antagonist S18886 attenuates renal oxidant stress and proteinuria in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Diabetes* 55: 110-119
40. Hocherl K, Endemann D, Kammerl MC, Grobecker HF, Kurtz A (2002) Cyclo-oxygenase-2 inhibition increases blood pressure in rats. *Br J Pharmacol* 136: 1117-1126
41. Athirakul K, Kim HS, Audoly LP, Smithies O, Coffman TM (2001) Deficiency of COX-1 causes natriuresis and enhanced sensitivity to ACE inhibition. *Kidney Int* 60: 2324-2329