

原 著

心不全の形成過程における Estrogen の心臓リモデリングおよび腎組織に あたえる影響 — Dahl 食塩感受性ラット心不全モデルを用いた検討 —

福島 理恵

Effects of Estrogen on the Process of Cardiac Remodeling and Nephrosclerosis in Dahl Hypertensive Rats with Heart Failure

Rie Fukushima (Department of Nephrology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Objective: This study was attempted to elucidate the role of estrogen in the process of cardiac remodeling and nephrosclerosis in Dahl-S female rats with myocardial infarction. **Methods:** 48 Dahl-S rats with myocardial infarction (MI) were divided into four groups as follows; Group 1: MI rats with normal-salt diet (LS, 0.5%NaCl diet), Group 2: MI rats with high-salt diet (HS, 8%NaCl diet), Group 3: MI rats with ovariectomy (OVX, 8%NaCl diet), Group 4: OVX rats with supplementation of estrogen (EST) (8%NaCl diet, 17 β estradiol 15 mg/pellet/90 days subcutaneous pellet). Myocardial infarction was made by coronary artery ligation. One week after surgery, ovariectomy was performed. After ovariectomy, high salt diet was fed and water was given *ad libitum* for 12 weeks. During the study, blood pressure (BP), heart rate, body weight, urine volume and urinary excretions of protein and sodium were measured every 2 weeks. Transthoracic echocardiogram (ejection fraction: EF, inter ventricular septal thickness: IVST) was performed under anesthesia at 12 weeks after surgery. At the end of the study, the heart and the kidney tissues were obtained for light microscopic examination and evaluations of the expression of mRNA of ACE (angiotensin converting enzyme) and eNOS (nitric oxide synthase). **Results:** 1. Blood pressure in HS group showed a gradual elevation from 132 $\pm$ 8 to 152 $\pm$ 10 mmHg (12 weeks) accompanied with the reduction of EF (LS:64 $\pm$ 4% vs. HS:46 $\pm$ 3%, $P<0.01$) and increases of IVST. Ovariectomy induced significant reduction in EF (OVX:26 $\pm$ 3%, $P<0.01$ vs. HS) and increases in IVST without any significant changes in systemic BP (OVX:174 $\pm$ 12 mmHg). 2. Ovariectomy induced no significant changes in plasma concentration of ACE, PRA (plasma renin activity), angiotensin I and angiotensin II. 3. In the heart obtained from OVX rats, expression of eNOS-mRNA was decreased and ACE-mRNA was increased. Ovariectomy induced aggravation of cardiac hypertrophy and fibrosis. Treatment with estrogen in OVX rats improved EF (EST:38 $\pm$ 4%, $P<0.01$ vs. OVX: 26 $\pm$ 3%) and cardiac hypertrophy, although blood pressure remained at the levels of 168 $\pm$ 8 mmHg. 4. In the heart obtained from EST rats, expression of eNOS-mRNA was significantly increased and ACE-mRNA was significantly suppressed compared to HS. 5. In HS rats, urinary excretion of protein was increased (182.2 $\pm$ 40.2 mg/day). Ovariectomy induced the reduction of urinary excretion of protein (125.4 $\pm$ 23.4 mg/day) and estrogen supplementation induced a significant increases of urinary excretion of protein (352.2 $\pm$ 48.0 mg/day). 6. Light microscopic findings in the kidney showed glomerulosclerosis and interstitial fibrosis in HS rats. Estrogen supplementation induced the aggravation of glomerulosclerosis and interstitial fibrosis accompanied with microangiopathy and thrombosis. **Conclusion:** These data indicate that estrogen might protect the development of cardiac hypertrophy and consuming heart failure. However, estrogen promotes microangiopathy and thrombosis in the kidney with progression of kidney insufficiency in Dahl-S rats with heart failure.

Keywords: Hypertension, Myocardial Infarction, salt-sensitivity

J Saitama Med School 2004;31:41-54

(Received December 10, 2003)

緒 言

虚血性心疾患、動脈硬化などの心血管病変の発症、進展に性ホルモンが関与していることは以前からよく知られている^{1,2)}。閉経前の女性と比較した場合、同年齢の男性の方が心血管系および腎疾患のリスクが圧倒的に高いこと³⁾、閉経後女性においてはそれら発症頻度が増加し男女における差が縮小しさらに逆転してしまうこと³⁾、さらにこのような女性に Estrogen 補充療法でそれを抑制できること^{4,5)}、更年期女性に心血管系の合併症が増加する理由として、閉経後には高血圧⁶⁾や高脂血症⁷⁾を合併することなど多数報告されている。高血圧は心臓血管系の合併症の大きな危険因子であり、腎機能に及ぼす作用として、腎臓機能障害を進展させ、糖尿病患者の合併症進展因子であることも報告されており⁸⁾、それに対し Estrogen は降圧作用がある^{9,10)}ことや、その他閉経後の骨粗鬆症の改善¹¹⁾、抗高脂血症作用¹²⁻¹⁵⁾および抗酸化作用¹⁶⁻¹⁸⁾による抗動脈硬化作用または心血管系疾患の予防などが期待されている。この Estrogen による臓器保護作用については現在、血管拡張作用、一酸化窒素（以下 NO と略す）¹⁹⁻²²⁾および prostaglandin の産生増加作用^{23,24)}、さらに Endothelin の産生抑制作用^{23,24)}、血管平滑筋内の Ca 減少作用²⁵⁾等多くの機序が推察されている。

一方 Estrogen の作用に関し否定的な意見も多数見られる。特にピル服用時のように経口的に Estrogen を補充すると腸管で吸収された Estrogen は門脈を経て直接肝臓へ流入し、angiotensinogen の産生が増加し、結果的に Renin-Angiotensin 系（以下 R-A 系と略す）の活性亢進をもたらす血圧の上昇を促す²⁶⁾、さらに女性ホルモンであるピル服用に伴う合併症として高血圧の発症や血栓症が知られている²⁷⁾。近年の大規模臨床研究の結果では、閉経後女性に対する Estrogen 補充療法は、脳血管疾患を減少させずむしろ合併症である血栓症ならびに乳癌の発現頻度を増加させ、その結果 Estrogen 補充療法の有意性は証明しえなかったことや^{8,28)}、さらに閉経期女性に対する心血管疾患の発症をエンドポイントとし行われた Estrogen と Progesterone の併用療法はプラセボ投与群と比較して冠動脈疾患の予防効果は認められず、むしろ有害事象の危険性の高い事が報告された^{29,30)}。このように、心血管疾患における Estrogen の有効性についての結果は一致していないが、腎臓における作用についてはさらに混乱しているのが実情である。その理由として、対象患者の差やホルモンの補充量の差など幾つかの可能性が報告されているが、その理由については現在なお不明な点が多い。

また、心不全の発症に腎臓が重要な役割を果たしていることは良く知られており、心不全時に腎臓機能障害が急激に進行することは臨床の現場でよく経験す

る。逆に心不全時には R-A 系が亢進し腎臓でのナトリウム（以下 Na と略す）再吸収が亢進し³¹⁾、さらに NO やヒト Na 利尿ペプチド（以下 hANP と略す）への反応性が低下し水利尿が低下³²⁾、心不全が増悪する。このような心臓と腎臓の連関や機序については現在明らかではなく、さらにこのような病態において、性ホルモンが如何に関与しているかに関する検討はなされていない。

今回は心不全合併時の腎機能障害進展に及ぼす Estrogen の影響を明らかにする目的で、Dahl 食塩感受性ラットの左冠動脈を結紮した心不全モデルを作成し、心機能ならびに腎機能障害の変化を観察した。このラットモデルに対して卵巣摘出手術ならびに Estrogen 補充を行い、心不全ならびに心臓肥大の進展における Estrogen の関与、さらに腎臓の組織障害及び機能障害進展に果たす Estrogen の役割につき主に昇圧系の主因子である R-A 系と Dahl 食塩高血圧ラットで高血圧の成因もしくは重要な役割を果たしていると考えられている NO の面からの検討を行った。

対象ならびに方法

対 象

10週齢、体重 180-200 g の Dahl 食塩感受性高血圧ラット（以下 Dahl-S ラットと略す）（セアック吉富工業株式会社、福岡、日本）の雌 100 匹を用いた。これらのラットに対して Diethyl Ether（和光純薬工業株式会社、東京、日本）麻酔下に左開胸下左冠動脈結紮手術を行い、手術後 7 日目に超音波検査を行い駆出率 65% の低下と心機能低下を確認できた 48 匹を対象とした。

実験方法

動物実験の認定

今回の実験については the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) に準じて行い、埼玉医科大学動物実験認定委員会（認定番号 000176）の認定のもとに行った。

心筋梗塞 Dahl-S ラットの作成

10 週齢の雌の Dahl S ラット 48 匹に対して、Nembutal (50 mg/kg, 腹腔内投与)（大日本製薬株式会社、東京）麻酔下にラット用喉頭鏡 SN480（シナノ製作所、東京、日本）にて喉頭を展開し静脈留置針ベニユーラ V-1 外針 16G 内針 19G（株式会社トップ、東京、日本）を気管内挿入留置し気道確保を行った。その後ラット用人工呼吸器 SN-480-7（シナノ製作所、東京、日本）に接続し、Tidal Volume 4.0 ml, 呼吸回数 85/分 に設定し、呼吸状態が安定した状態下に以下の手術を行った。

仰臥位に固定し、皮膚を切開さらに大胸筋、小胸筋を切開し左開胸後、第4肋間、第4肋骨ならびに第5肋骨を切断し開胸器で固定し、直視下に左冠動脈を医療用針付縫合糸（030331 角 1/2 11 mm 黒プレートシルク 7-0, 松田医科工業株式会社, 東京, 日本）を用いて縫合結紮し心筋梗塞を作成した。左冠動脈結紮後に肋骨ならびに肋間を縫合し（絹製縫合糸 5 号株式会社シラカワ, 東京, 日本）、胸腔を閉鎖し皮膚縫合後手術を終了した^{33, 34)}。手術終了後ペントシリン（三共製薬株式会社, 東京, 日本）100 mg を腹腔内投与した。その後約 3 時間の経過観察を行い自発呼吸の回復を確認した後にレスピレーターをはずし、呼吸状態の安定確認後抜管した。

実験プロトコール

Dahl-S ラットの左冠動脈結紮後 2 週間は普通食（0.5%NaCl 食, オリエンタル酵母（株）, 東京, 日本）15 g/日 連日投与下に 1 週間経過観察を行った。この間飲水は自由とした。1 週間目に Diethyl Ether（和光純薬工業株式会社, 東京, 日本）麻酔下に心臓超音波検査を施行し駆出率の低下、壁運動の低下を観察し心筋梗塞が来ていることを確認した。心臓超音波検査 1 週間後に Nembutal（50 mg/kg, 腹腔内投与）（大日本製薬株式会社, 東京）麻酔下それらの心筋梗塞ラットに対して卵巣摘出手術ならびに偽手術、さらに pellet 植え込み手術を行った（12 週齢）。ラットは正塩食群（以下 LS 群と略す）：0.5%NaCl 食一日 15 g 投与（n=12）、高塩群（以下 HS 群と略す）：偽卵巣摘出手術 + 8%NaCl 食一日 15g 投与（n=12）、卵巣摘出群（以下 OVX 群と略す）：両側卵巣摘出 + 8%NaCl 食一日 15 g 投与（n=12）、Estrogen 投与群（以下 EST 群と略す）：両側卵巣摘出 + Estradiol Pellet（Innovative Research of America Inc, FD, USA）（70 μ g/日）皮下埋め込み + 8%NaCl 食一日 15 g 投与（n=12）の 4 群とした。手術方法は、LS 群、OVX 群および HS 群は Nembutal 麻酔下に頸背部を切開し、皮下に placebo pellet（Innovative Research of America Inc, FD, USA）を移植した。OVX 群と EST 群は同様に左右の腰背部より開腹し左右の卵巣を摘出した。EST 群に対してはさらに頸背部を切開し、皮下に 15 mg/pellet/90 days の Estradiol（E2）を含有する pellet（Innovative Research of America, Inc. USA）を皮下移植した³⁵⁾。その後 LS 群に対しては正塩食（0.5%NaCl 食, オリエンタル酵母（株）, 東京, 日本）を、それ以外のラットに対し高塩食（8%NaCl 食, オリエンタル酵母（株）, 東京, 日本）15 g/日を投与し、12 週間にわたって経過観察を行った。測定項目としては、手術後 2 週間毎に血圧測定および体重測定を行った。2 週毎に血圧測定、尿量および尿中蛋白排泄量、尿中のナトリウム排泄量（以下尿中 Na 排泄量と略す）、を測定した。さらに実験開

始後 10 週目に Diethyl Ether 麻酔下に心臓超音波により心機能の測定を行った。12 週間の実験終了時（24 週齢時）に断頭採血し、血漿 Estradiol, angiotensin I（以下 Ang I と略す）および angiotensin II（以下 Ang II と略す）、Plasma aldosterone concentration（以下 PAC と略す）、Plasma renin activity（以下 PRA と略す）、および angiotensin converting enzyme（以下 ACE と略す）の測定を行った。さらに血清の総蛋白（以下 TP と略す）、blood urea nitrogen（以下 BUN と略す）、creatinine（以下 Cr と略す）、Na, カリウム（以下 K と略す）の濃度を測定した。その後、開胸にて摘出した心臓を脱血後重量を測定し 10%ホルマリン固定し、さらに開腹にて摘出した左腎臓を重量測定後 10%ホルマリン固定し病理組織標本を作製した。さらに心臓の一部（左心室）、右腎臓は液体窒素を用いて急速凍結し、-80°C で保存後 RNA を抽出し、endothelial constitutive nitric oxide synthetase（以下 ecNOS と略す）、ACE それぞれの mRNA の発現を、内部コントロールである GAPDH（glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase）の値で除して相対値を算出する半定量的 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction（以下 RT-PCR と略す）法を用いて確認した。

各種測定項目ならびに測定方法

血圧測定方法

収縮期血圧は tail cuff 法（ソフトロン非観血式自動血圧測定装置 BP-98A, 株式会社ソフトロン, 東京）を用いて 5 回連続して測定し、その最高ならびに最低血圧を除いた 3 回の平均血圧を用いた。

心臓超音波検査の測定方法

左冠動脈結紮手術後 1 週目ないし 12 週目に Diethyl Ether（和光純薬工業株式会社, 東京, 日本）麻酔下にラットの心臓超音波検査を施行した³⁷⁾。心臓超音波の測定方法としては、心臓超音波測定は超音波断層装置 SSA-550A TOSHIBA Nemio TM（Toshiba Medical Systems, Tokyo, Japan）を使用し左第 4 肋間より 14.0-MHz の周波数にて観察した³⁸⁾。左心室内腔短軸像の乳頭筋レベルで壁運動を、さらに M モードにて心拍数、左心室内腔径（収縮期、拡張期）、駆出率、左心室壁厚を観察した³⁹⁾。

尿量、尿蛋白排泄量ならびに尿中電解質の測定方法

尿量、尿蛋白排泄量、尿中 Na 排泄量は 2 週毎に測定し 12 週間経過観察した。採尿は、畜尿ゲージを用いて 24 時間毎の採取を施行し、その平均値を用いた。尿中蛋白排泄量はピロガロールレッド法⁴⁰⁾を用いて測定、さらに尿中 Na 排泄量は、イオン選択電極法⁴¹⁾を用いて測定した。尿中蛋白排泄量および、尿中 Na 排泄量は原則として、3 日間の測定を行いその平均値

とした。尿中 Cr 測定は酵素法⁴²⁾を、尿中 BUN 測定はウレアーゼ・UV 法⁴³⁾を用いた。

血液生化学的測定法

血漿 Estradiol, Ang I, Ang II, PAC, PRA および血清 ACE, TP, Alb, BUN, Cr, Na, K を測定した。採血した血液は、氷冷した ethylenediaminetetraacetic acid (以下 EDTA と略す) 2Na 入り採血管 (5 ml) に注入し、それぞれの検体は直ちに遠心分離後、上清を採取し、測定まで -20℃ で凍結保存した。Estradiol は、DPC- エストラジオール二抗体キット (Diagnostic Products Corporation, LA, USA) を用いて、RIA2 抗体法により測定した。Ang I, Ang II および Ald は第 1 抗体液として、抗ウサギ抗体ヤギ血清を用い、そして、トレーサー溶液として ¹²⁵I-angiotensin I, ¹²⁵I-angiotensin II^{44, 45)} および ¹²⁵I-aldosterone (アルドステロン・リアキット II, ダイナボット株式会社, 東京)⁴⁶⁾ を用いた Radioimmunoassay 抗体法を用いて測定した。PRA はガンマー・コート TM レニンキット (デイドベリング株式会社, 東京)⁴⁷⁾ を用いて測定した。

RNA の抽出

摘出した腎臓を液体窒素で凍結固定し、試料の 10 倍量の TRISOL (GIBCO BRL Rockville, MD, USA) を加えホモジナイザー、テフロンコッターを用いて均質化した。TRISOL の 1/5 量の chloroform を加え、よく攪拌した。5 分間室温に放置後、4 分間、4℃, 3500 rpm で遠心分離し、上清を採取した。次に、採取した量と等量の phenol/ chloroform/ isoamylalcohol (PCL) を加え、3 分間、4℃, 15000 rpm で遠心分離し上清を採取した。そして、等量のイソプロパノールを加え、10 分間、4℃, 12000 rpm で遠心分離し上清を捨て乾燥させた。その後 400 μ l の diethylpyrocarbonate 処理水 (DEPC 水) を加えて攪拌し、1000 μ l のエチルアルコールと 40 μ l の 3M の NaOAc を加えエタノール沈澱を行った。次に、15000 rpm で遠心分離後、上清を捨て 75% エタノールを加え 15000 rpm で遠心分離した。その後、上清を捨て乾燥し DEPC 処理水を加え実験に用いた。

RT-PCR 法による検出

逆転写酵素反応: Reverse transcription (以下 RT と略す) を用いて、あらかじめ RNA を鋳型とした cDNA の合成反応を行い、それを鋳型として PCR を Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Inc, MA, USA) を用いて行う。DEPC 処理水に溶かした RNA の Dnase I 処理を行う。Dnase I 10 $\times$ Buffer, Dnase I amplification Grade (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA) を加えて全量で 10 μ l を 37℃ で 15 分間加温し、

次に、それに EDTA 1 μ l 加え、さらに 70℃, 15 分間加温し、Dnase I の反応を停止する。これに Oligo (dT) primer (GIBCO, BRL GRAND Island, NY, USA) 3 μ l, 5 $\times$ first Buffer 6 μ l, DTT 3 μ l, dNTP mixture (TAKARA 東京) 6 μ l, 逆転写酵素である Super script II (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA) 0.7 μ l を加え、42℃, 60 分で保温し、RT 反応をさせる。この cDNA 1 μ l に DEPC 処理水 32.5 μ l, DMSO 5 μ l, 10 $\times$ PCR Buffer 5 μ l, dNTP mixture 4 μ l, Forward Primer (以下 Fw と略す) 1 μ l, Reverse Primer (以下 Rv と略す) 1 μ l, r Taq polymerase (TAKARA 東京) 0.5 μ l を加えて全量で 50 μ l とし、これを 94℃ で 5 分間、さらに 94℃ で 30 秒, 58℃ で 1 分間, 72℃ 2 分を 30 cycle という条件で PCR 反応させる。1% アガロースゲルを作成し、100V で 30 分間泳動後、エチデウムブロマイドで染色する。

Primer の作成

Primer の作成に関して ecNOS, ACE の各々のモチーフを保存している既知の部位が増幅するよう 5' 側と 3' 側に degenerate primer をつけて設計した。各種 Primer の構造については、以下に示す通りである。

ecNOS primer,

Forward Primer (Fw):

5'-GCAGCATCACCTACGATACC-3'

Reverse Primer (Rv):

5'-CTCAGTGATCTCCACGTTGG-3'

ACE primer,

Forward Primer (Fw):

5'-TCGCGTCAACTTCCTGGGTATGTACC-3'

Reverse Primer (Rv):

5'-AGGGTCACCTCAGGAGTGTCTGAGC-3'

GAPDH primer,

Forward Primer (Fw):

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

Reverse Primer (Rv):

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

組織学的検討

臓器の重量を測定後、摘出した心臓ならびに左腎を 10% ホルマリンと 10% グルタルアルデヒドに固定した。それを厚さ 2~3 μ m の切片を作製し、光顕は、ヘマトキシリン・エオジン (以下 HE と略す) 染色, 過ヨウ素酸シッフ (以下 PAS と略す) 染色, さらにマロリー染色をおこなった。

a. 糸球体変化の比較 (Sclerosis Index)

糸球体変化は PAS 染色により, Raiji の報告した^{48, 49)}

Sclerosis Index Score を基に判定した。基準としては糸球体変化のないもの (-), 軽度のメサンジウムの肥厚を示すもの (±), segmental sclerosis (+), global sclerosis (++) と基準を作製し, 50 個の糸球体で判定し, 糸球体硬化度としてそれぞれを 1-4 点とし, その平均を糸球体硬化指数 (Sclerosis Index) とした。

b. 間質病変の比較 (Interstitial Index)

間質病変については Nakamoto らの報告に基づき⁵⁰⁾, Interstitial cell infiltration Index を計算した。強拡大一視野中の間質の細胞浸潤数を計測し, その 20 視野の平均を間質細胞浸潤指数 (Interstitial cell infiltration Index) とした。

統 計

データはすべて平均値±標準誤差で表し, 統計解析は血圧, 心拍数, 尿量ならびに尿中排泄量については, Macintosh の Statview IV の Two-way analysis of variance を用いて群間比較を行ったあと Scheff's F を行い, すべて統計上 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。また 12 週目の血中ホルモンの変化, 体重および臓器重量, Sclerosis Index ならびに Interstitial Cell Infiltration Score については, One-way analysis of variance を用いたあと Scheff's F を行った。RT-PCR で増幅された遺伝子の発現量の測定値は, GAPDH の値で除して相対値として算出し, それらの平均値を記載した。有意差検定については One-way analysis of variance を用いたあと Scheff's F 検定を行った。

結 果

(1) 左冠動脈結紮 Dahl-S ラットの生存率

左冠動脈結紮による心筋梗塞作成後の Dahl-S ラットの 2 週間以内の死亡は 100 匹中 42 匹であり 42% の死亡率であった。特に手術後 24 時間以内に 36 匹が死亡したが (死亡率 36%), 7 日目以後の状態は安定しその後の死亡は認めなかった。主な死亡原因は, 21 匹は手術中の心筋梗塞作成直後の出血あるいは心停止によるものであった。またその他の 15 匹は, 手術後 24 時間以内の死亡であった。その他の 6 匹は手術後の回復が不良であり, 心筋梗塞作成後 1 週間以内に死亡した。それ以外の 58 匹は安定した状態であった。これらの 58 匹のラットに対して手術後 7 日目に Diethyl Ether 麻酔下心臓超音波を行い, 駆出率 65% 以下の 48 匹を実験に用いた。

(2) 収縮期血圧ならびに心拍数の経時的変化 (Fig. 1)

収縮期血圧は 0 週では 4 群間に有意差は見られなかった。LS 群では 0 週から 12 週に経過するにつれ有意な血圧の上昇を認めた (LS 群 0 週: 132 ± 5 mmHg 12 週: 153 ± 8 mmHg)。HS 群は, 12 週に経過するに

つれ有意な血圧の上昇を認め, さらに 6 週目以後の血圧は, LS 群と比較し有意に高値であった (HS: 12 週 176 ± 10 mmHg)。OVX 群, ならびに EST 群はいずれも LS 群と比較して有意な血圧の上昇を認めたが高塩負荷の HS 群, OVX 群, ならびに EST 群の 3 群間の血圧に有意差は見られなかった (Fig. 1a)。心拍数は LS 群は全経過を通じて有意差を認めなかった。LS 群と比較し高塩 3 群において高塩負荷後の心拍数は減少を認めた。また 3 群間における心拍数に有意差は認められなかった (Fig. 1b)。

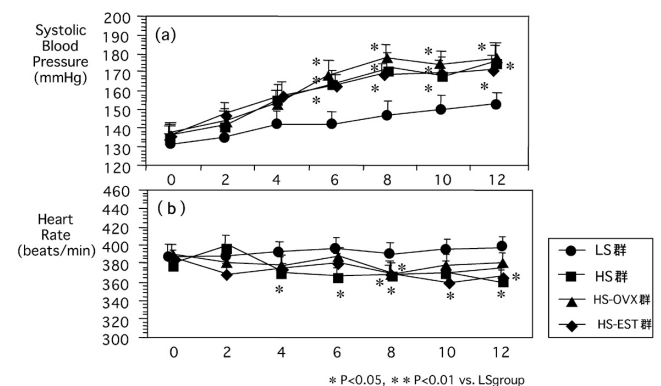


Fig. 1. Time course changes in blood pressure (upper panel) and heart rate (lower panel) in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction. Closed circle indicates low-salt group (LS), closed square indicates high-salt group (HS), closed triangle indicates ovariectomy group (OVX) and closed diamond indicates estrogen treated group (EST). Values are means±SEM. * $P < 0.01$ vs. LS group.

(3) 尿量および尿中 Na 排泄量の経時的変化 (Fig. 2)

高塩負荷前 0 週において 4 群間に尿量の有意差は見られなかった。尿量の経時的な変化では全経過を通じて尿量の有意な変化は認めなかった (LS 群 0 週: 12 ± 4 ml/日, 12 週目: 14 ± 4 ml/日)。高塩食負荷後, 高塩食負荷 3 群の尿量は 2 週以後有意な増加を認めた (HS 群 2 週: 66 ± 8 ml/日, 12 週: 76 ± 12 ml/日)。また 3 群間において尿量の有意差は認められなかった (Fig. 2a)。

経時的な尿中 Na 排泄量の変化は, 高塩負荷前 0 週において 4 群間に有意差は見られなかった。経時的な変化では LS 群は全経過を通じて尿量の有意差は認めなかった (LS 群 12 週: 1.9 ± 0.3 mEq/日)。高塩負荷の 3 群では高塩負荷後 2 週目以後尿中 Na 排泄量は有意に増加した (HS 群 12 週: 13.9 ± 2.8 mEq/日)。高塩食 3 群間において尿中 Na 排泄量の有意差は認められなかった (Fig. 2b)。

(4) 尿中蛋白排泄量の経時的変化 (Fig. 3)

尿中蛋白の排泄量では, 0 週ではいずれの群においても明らかな尿中蛋白の排泄は認められなかった。LS

群は経時的に有意な蛋白尿の増加を認めた。(LS群 12週: 40.2 ± 3.6 mg/日) HS群は尿中蛋白排泄量の著明な増加を認め(HS群 6週: 58.2 ± 5.9 mg/day, 12週: 210.2 ± 42.2 mg/日), 6週目以後LS群と比較して有意に尿蛋白は増加した。OVX群においては8週目でLS群と比較し尿蛋白の増加を認め, 12週ではさらに増加を認めた(OVX群 8週: 68.4 ± 8.6 mg/日, 12週: 126.4 ± 23.4 mg/日)。EST群は4週でLS群と比較して有意な尿蛋白排泄量の増加を認め, その後も著明に増加した。(EST群 4週: 50.2 ± 5.2 mg/日, 12週: 344.2 ± 48.0 mg/日)。この増加は他の高塩負荷群と比較しても著明であり, 6週目以後はHS群ならびにOVX群よりも有意に高値であった(Fig. 3)。

(5) Estradiol, R-A系および生化学的变化 (Fig. 4)

12週目(24週齢)の断頭採血によるEstradiol濃度では卵巣摘出によるOVX群のEstrogenの有意な低下とEstrogen pelletによるEstrogenの補充に伴うEstradiol血中濃度の有意な上昇を確認した。(LS群: 18.4 ± 2.8 pg/ml, HS群: 13.7 ± 2.8 pg/ml, OVX群: 3.8 ± 1.2 pg/ml, EST群: 52.6 ± 8.4 pg/ml)。血漿Ang Iは, 高塩負荷により有意に抑制されたが高塩負荷の3群間に有意差は認めなかった。Ang IIも高塩負荷により抑制を認めた。PRAも高塩負荷により抑制を認めた。PACも高塩負荷により抑制をみた。ACEはHS群に対しOVX群は増加を認めEST群は, LS群OVX群に対し有意な抑制を見た(OVX群: 12.8 ± 1.1 pg/ml, EST群: 10.8 ± 0.8 pg/ml)。LS群と比較し高塩負荷の3群のRAS系は有意に抑制されていた。HS群, EST群と比較しOVX群にて血中ACEの増加, 血中PRAおよびAngiotensin IIの増加をみた(Fig. 4)。

一方生化学検査所見については, EST群でLS群, HS群, ならびにOVX群と比較して有意なTPおよびAlbの低下を認めたが, その他のCr, BUN, Na, Kに有意な変化は認めなかった(Table 1)。

(6) 体重の変化と心臓および腎臓重量 (Table 2)

高塩食前0週(12週齢)において4群間の体重に有意差は見られなかった。LS群の体重量の変化は, 経時的に増加した(LS群 0週: 220 ± 10 g, 12週: 330 ± 13 g)。またOVX群12週ではLS群と比較して有意な体重の増加を認めた(OVX12週: 366 ± 14 g)。一方12週の体重はHS群, EST群では有意な差はなかった。

12週におけるDahl-Sラットの体重100gあたりの心臓重量はHS群はLS群と比較して有意な増加を認めた(LS群: 0.34 ± 0.02 g/100 gBW, HS群: 0.42 ± 0.02 g/100 gBW)。OVX群の心臓重量はHS群と比較して有意な心重量の増加を認めた(OVX群: 0.49 ± 0.03 g/100 gBW)。一方EST群では, OVX群で認めたHS群に対する心重量の増加は認められなかった(EST

群: 0.44 ± 0.02 g/100 gBW)。12週におけるDahl-Sラットの体重100gあたりの腎臓重量では, 4群間において有意差は認められなかった。

(7) 心臓超音波の変化 (Fig. 5, 6) (Table 3)

Fig. 6にはHS群の超音波による心臓の壁運動の変化を示す。対象の偽手術非冠動脈結紮Dahl-Sラットと比較して, 左冠動脈結紮に伴い手術後2週に明らかな左室の壁運動の低下ならびに左室内腔の著明な拡大を認めた。これらの所見は手術後12週目にはさらに著明となった。Fig. 7には各群の心臓超音波検

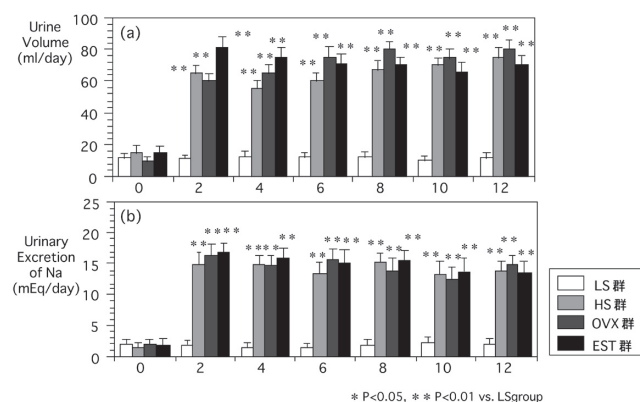


Fig. 2. Time course changes in urine volume (upper panel) and urinary excretion of sodium (lower panel) in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction. Closed circle indicates low-salt group (LS), closed square indicates high-salt group (HS), closed triangle indicates ovariectomy group (OVX) and closed diamond indicates estrogen treated group (EST). Open bar indicates LS group, small dot bar indicates HS group, large dot bar indicates OVX group and closed bar indicates EST group. Values are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. LS group.

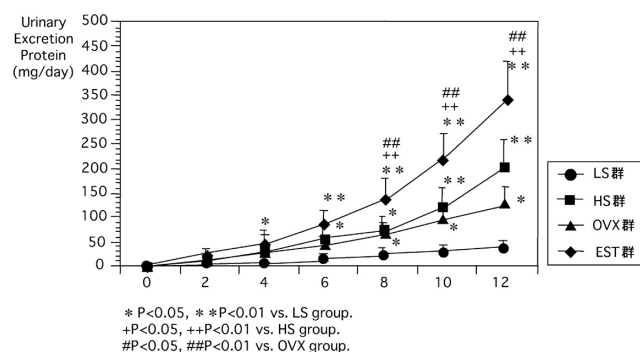


Fig. 3. Time course changes in urinary excretion of protein in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction. Closed circle indicates low-salt group (LS), closed square indicates high-salt group (HS), closed triangle indicates ovariectomy group (OVX) and closed diamond indicates estrogen treated group (EST). Values are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. LS group. + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ vs. HS group, and ### $P < 0.01$ vs. OVX group.

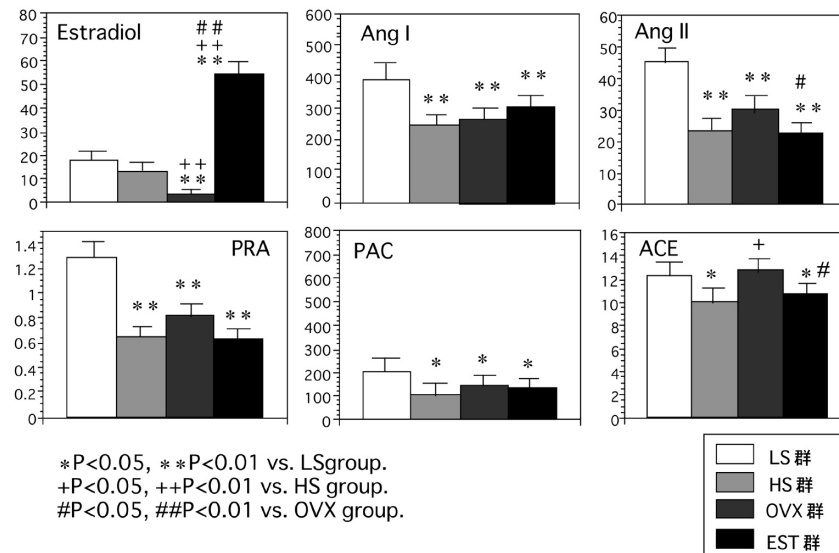


Fig. 4. Changes in plasma concentration of estrogen, angiotensin I, angiotensin II, plasma renin activity (PRA), plasma aldosterone concentration (PAC), and angiotensin converting enzyme (ACE) in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction. Open bar indicates LS group, small dot bar indicates HS group, and large dot bar indicates OVX group and closed bar indicates EST group. Values are means $\pm$ SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. LS group. +P<0.05, ++P<0.01 vs. HS group, and #P<0.05, ##P<0.01 vs. OVX group.

Table 1. Changes in total protein (TP), serum albumin (Alb), creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), sodium (Na), and Potassium (K). Values are means $\pm$ SEM. *P<0.05 vs. LS group. +P<0.05 vs. HS group, and #P<0.05 vs. OVX group.

	LS	HS	OVX	EST
TP(g/dl)	7.3 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.2	6.6 $\pm$ 0.3**#
Alb(g/dl)	4.0 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.2**#
Crtnn(mg/dl)	0.46 $\pm$ 0.06	0.49 $\pm$ 0.07	0.59 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.06
BUN(mg/dl)	24.6 $\pm$ 3.0	21.2 $\pm$ 2.7	24.7 $\pm$ 2.6	17.4 $\pm$ 2.8
Na(mEq/l)	138 $\pm$ 2	140 $\pm$ 3	139 $\pm$ 3	141 $\pm$ 3
K(mEq/l)	4.2 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.2

Table 2. Changes in body weight, heart weight and kidney weight in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction. Values are means $\pm$ SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. LS group. +P<0.05, ++P<0.01 vs. HS group, and #P<0.05, ##P<0.01 vs. OVX group.

	LS	HS	OVX	EST
Body Weight (g)	330 $\pm$ 13	356 $\pm$ 10	366 $\pm$ 14*	338 $\pm$ 12
Heart/100 BWt (g/100gBWt)	0.34 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.02**	0.49 $\pm$ 0.03** +	0.44 $\pm$ 0.02** #
Kidney Weight (g/100gBWt)	0.42 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.05

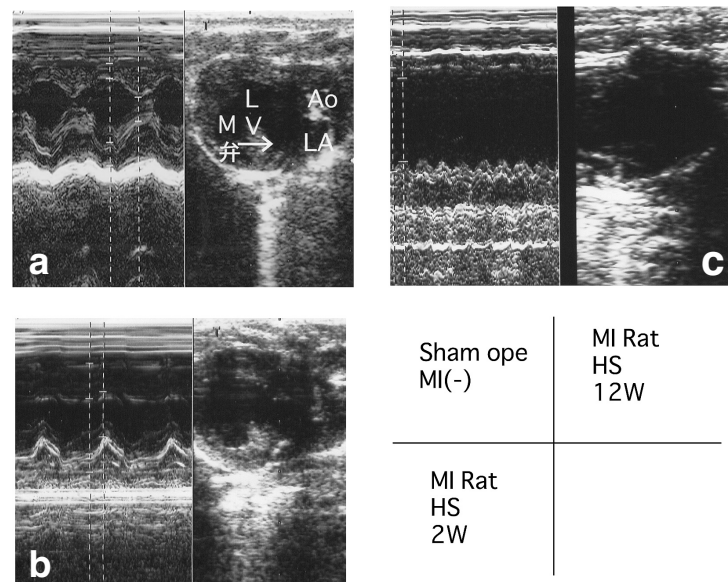


Fig. 5. Changes in echocardiography in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction. (a) sham operation rat, MI(-) (b) two weeks after surgery in Dahl-S rats with myocardial infarction with high salt loading, and (c) twelve weeks after surgery in Dahl-S rats with myocardial infarction with high salt loading.

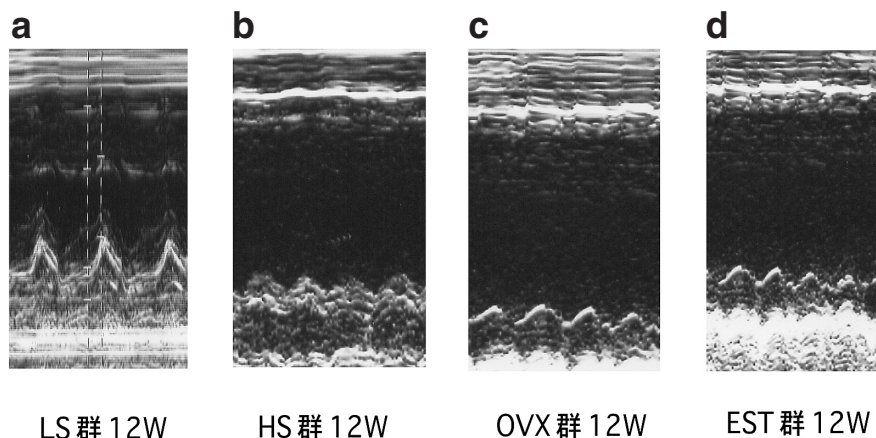


Fig. 6. Changes in echocardiography in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction at 12 weeks after surgery. (a) Low-salt group (LS) group, (b) high-salt (HS) group, (c) ovariectomy (OVX) group and (d) estrogen-treated (EST) group.

Table 3. Changes in left ventricular diameter of diastolic (LVDd), ventricular diameter of systolic (LVDs), and ejection fraction (EF). Values are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. LS group, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ vs. HS group, and # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. OVX group.

	LS	HS	OVX	EST
LVDd(mm)	9.1 $\pm$ 0.7	10.8 $\pm$ 1.2*	11.3 $\pm$ 1.3*	9.6 $\pm$ 0.9#
LVDs(mm)	6.6 $\pm$ 0.6	9.1 $\pm$ 0.7**	9.8 $\pm$ 0.6***	7.4 $\pm$ 0.5##
IVST(mm)	1.2 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1**	1.9 $\pm$ 0.2***	1.5 $\pm$ 0.2***
EF(%)	64 $\pm$ 4	46 $\pm$ 3**	26 $\pm$ 3***	38 $\pm$ 3***

査所見を示す。また Table 3 には各群のラットの心臓超音波の計測結果の平均値を示す。駆出率 (Ejection Fraction, 以下 EF と略す) は、12 週目において LS 群と比較し HS 群で有意な駆出率の低下を認めた (LS 群: 64 $\pm$ 4%, HS 群: 46 $\pm$ 3%)。OVX 群は HS 群と比較して有意な EF の低下を認めた (OVX 群: 26 $\pm$ 3%)。EST 群は OVX 群と比較して EF の有意な増加を認めた (EST 群: 38 $\pm$ 3%)。心室中隔壁厚は LS 群と比較し HS 群は有意な増加を認めた (LS 群: 1.2 $\pm$ 0.1 mm, HS 群: 1.6 $\pm$ 0.1 mm)。また OVX 群で HS 群と比較して有意な増加を認めた (OVX 群: 1.9 $\pm$ 0.2 mm)。EST 群では OVX 群と比較して有意な減少を認めた (EST 群: 1.5 $\pm$ 0.2 mm)。

(8) 12 週 (24 週齢) における腎臓の病理所見 (Fig. 7, 8, 9)

LS 群は軽度の間質への細胞浸潤は認めるものの、明らかな糸球体硬化は認めなかった (Fig. 8a)。HS 群は著明な糸球体の硬化像、間質への著明な細胞浸潤、間質の線維化の像を認めた。動脈壁は肥厚し、細動脈硬化の所見を認めた (Fig. 7b)。OVX 群においても HS 群と同様に、著明な糸球体の硬化像、間質への著明な細胞浸潤、間質の線維化、細動脈硬化の所見を認

めた (Fig. 7c)。EST 群においても同様な所見が認められたが、糸球体の硬化像は HS 群、OVX 群と比較し強く、間質への細胞浸潤も著明であった (Fig. 7d)。EST 群に特徴的な所見として、糸球体内の毛細血管、間質の細動脈内に多数の血栓が認められた。この所見は EST 群においてのみ認められる所見であった (Fig. 8a, 8b)。これらの腎臓病理所見の変化を糸球体硬化指数 (Sclerosis Index, 以下 SI と略す) と間質への細胞浸潤指数 (Interstitial cell infiltration cell filtration Index, 以下 IC と略す) の変化により比較検討を行った。

LS 群の糸球体の硬化 (SI: 1.1 $\pm$ 0.2)、間質病変 (IC: 161 $\pm$ 15) と比較し、HS 群で有意な糸球体硬化像の増悪 (SI: 2.2 $\pm$ 0.2, IC: 562 $\pm$ 46) を認めた。OVX 群は全体的に間質病変が強く、糸球体硬化像を認めたが HS 群と比較し有意な変化ではなかった (SI: 2.0 $\pm$ 0.2, IC: 443 $\pm$ 38)。その他 EST 群では糸球体硬化像、間質への細胞浸潤いずれも HS 群ならびに OVX 群と比較し有意な増悪を認めた (SI: 2.8 $\pm$ 0.3, IC: 862 $\pm$ 66) (Fig. 9)。

(9) 心室の ecNOS ならびに ACE の m-RNA の発現変化 (Fig. 10)

LS 群の ACE-mRNA の発現 0.38 $\pm$ 0.16 と比較して、HS 群は 0.52 $\pm$ 0.24 と有意な亢進が見られた。また OVX 群で ACE の発現が 0.75 $\pm$ 0.22 と HS 群ならびに LS 群と比較して有意な亢進が認められた。ecNOS は LS 群の 0.18 $\pm$ 0.03 と比較して HS 群は 0.44 $\pm$ 0.04 と有意な発現の亢進が見られた。また OVX 群は ecNOS の発現は 0.07 $\pm$ 0.01 と HS 群および LS 群と比較し有意な低下を示した。また EST 群は ACE-mRNA は 0.22 $\pm$ 0.011 と OVX 群に対し有意に抑制され、ecNOS は 0.62 $\pm$ 0.03 と LS 群ならびに OVX 群と比較して有意な発現亢進を認めた。

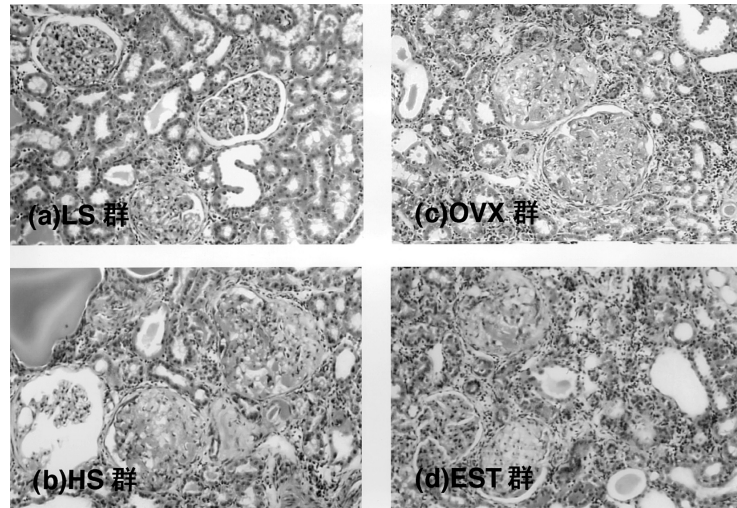


Fig. 7. Morphological changes in the kidney in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction at 12 weeks after surgery. (a) Low-salt group (LS) group, (b) high-salt (HS) group, (c) ovariectomy (OVX) group and (d) estrogen-treated (EST) group.

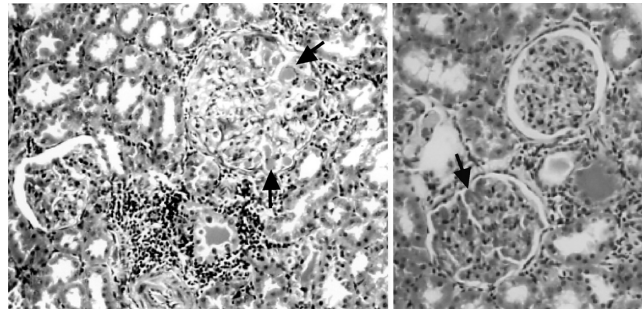


Fig. 8. Morphological changes in kidney in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction at 12 weeks after surgery (Estrogen treated group, Hematoxylin and Eosin stain, x200). Estrogen supplementation induced the aggravation of glomerulosclerosis and interstitial fibrosis accompanied with microangiopathy and thrombosis.

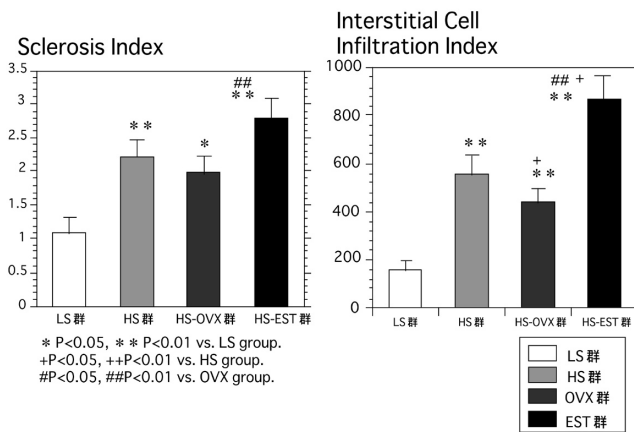


Fig. 9. Changes in sclerosis index (SI) and Interstitial Cell Infiltration Index (IC) in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction at 12 weeks after surgery. Open bar indicates LS group, small dot bar indicates HS group, large dot bar indicates OVX group and closed bar indicates EST group. Values are means $\pm$ SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. LS group. +P<0.05, ++P<0.01 vs. HS group, and #P<0.05, ##P<0.01 vs. OVX group.

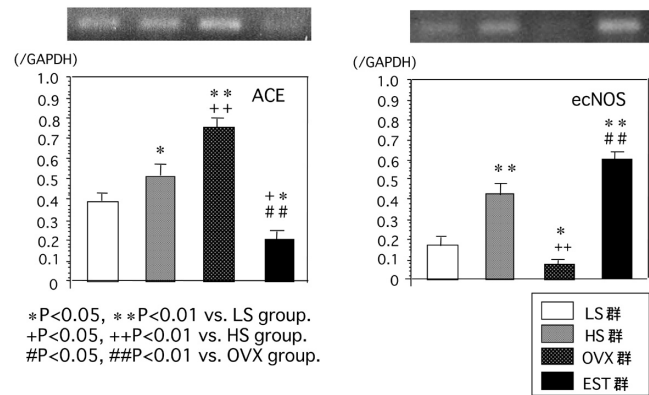


Fig. 10. Expression of angiotensin converting enzyme (ACE) -mRNA (left panel) and endothelium constitutive Nitric Oxide synthase (ecNOS) -mRNA in the heart in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction. Open bar indicates low-salt (LS) group, small dot bar indicates high-salt (HS) group, large dot bar indicates ovariectomy (OVX) group and closed bar indicates estrogen treated (EST) group. Values are means $\pm$ SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. LS group. +P<0.05, ++P<0.01 vs. HS group, and #P<0.05, ##P<0.01 vs. OVX group.

(10) 腎臓の ecNOS ならびに ACE の m-RNA の発現変化 (Fig. 11)

腎臓における ACE-mRNA の発現は, LS 群の 0.27 ± 0.02 と比較して, HS 群は 0.42 ± 0.03 , さらに OVX 群は 0.52 ± 0.03 と有意な亢進を認め, EST 群は 0.30 ± 0.04 と, HS 群, OVX 群と比較して ACE-mRNA の発現は有意に抑制されていた. 一方腎臓における ecNOS-mRNA の発現では, LS 群 0.35 ± 0.03 と比較し, HS 群は 0.75 ± 0.02 と有意な発現の亢進を認め, OVX 群は HS 群と比較し 0.43 ± 0.02 と有意な発現の低下を認めた. また EST 群は 0.83 ± 0.04 と OVX 群と比較し有意な発現の増加をみとめた.

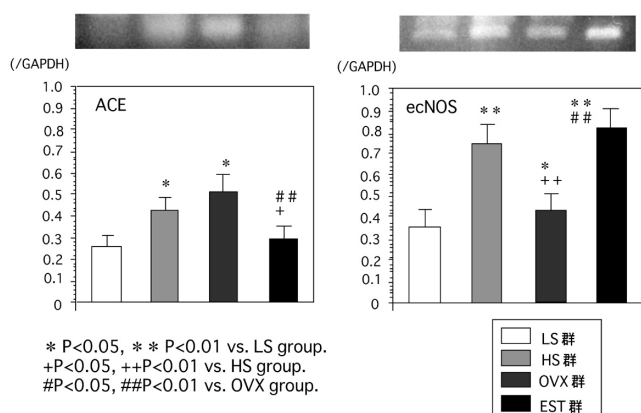


Fig. 11. Expression of angiotensin converting enzyme (ACE) -mRNA (left panel) and endothelium constitutive Nitric Oxide synthase (ecNOS) -mRNA in the kidney in Dahl salt sensitive (Dahl-S) rats with myocardial infarction. Open bar indicates low-salt (LS) group, small dot bar indicates high-salt (HS) group, large dot bar indicates ovariectomy (OVX) group and closed bar indicates estrogen treated (EST) group. Values are means $\pm$ SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. LS group. +P<0.05, ++P<0.01 vs. HS group, and #P<0.05, ##P<0.01 vs. OVX group.

考 察

Dahl 食塩感受性ラットに心筋梗塞を作成した後高塩食を負荷し, Estrogen の心筋のリモデリングと腎臓機能障害の進展に及ぼす影響につき検討を行った. その結果 Dahl-S ラットにおいて 8% 高塩食の負荷 (HS 群) は有意な血圧の上昇, さらに超音波検査で心機能の低下と心臓肥大をもたらした. 腎臓では尿蛋白の増加, 糸球体硬化, 間質の線維化をもたらした. 卵巣摘出 (OVX 群) に伴い血圧は有意な変化を認めなかったが, 心機能の低下と心臓肥大の増悪が認められた. Estrogen の補充 (EST 群) は血圧に有意な影響を与えなかったが, 心機能および心臓肥大の有意な改善が認められた. 一方腎臓において OVX 群では尿蛋白排泄

の有意な減少は見られず, 糸球体硬化ならびに間質病変の変化を認めなかった. Estrogen の補充 (EST 群) では, 著明な尿蛋白排泄の増加, 腎臓硬化病変の進行と間質の線維化病変の進展が認められ, さらに特徴的な所見として, 糸球体内ならびに細動脈に多数の微小血栓が確認された.

今回の結果では, 卵巣摘出ならびに Estrogen 投与は Dahl-S ラットの血圧に影響を与えなかった. 種々の動物実験において Estrogen 投与が血圧を下げ, 動脈硬化の進展を予防し, 心血管系合併症の予防効果があることは多数報告されている. 当教室の山内らは SHR の卵巣摘出後の血圧上昇が, Estrogen の投与により有意に抑制されたことを報告し³⁶⁾, この機序として Estrogen には直接の ACE 産生抑制効果があることを示した. Dahl-S ラットにおける検討でも, Estrogen は血圧を下げたとする報告^{51, 52)} と, 成長した Dahl-S ラットでは血圧の有意な変化は見られなかったとの報告⁵³⁾ が見られた, さらにその作用は性差でも異なることが知られている. また SHR では異なる結果も報告されていることから, 単純に血圧と Estrogen の関連を規定することには注意が必要と思われる. 今回の結果では, Dahl-S ラットにおいて卵巣摘出と Estrogen 投与は血圧と R-A 系への有意な変化をもたらさなかった. このような解離は, 高塩負荷モデルでは, 全身の R-A 系が抑制され Estrogen の影響が血圧や R-A 系に現れにくい可能性があり, さらに心不全モデルでは塩分負荷と血圧の影響が強く現れ, その場合も Estrogen の作用が明確にされない可能性が示唆される.

次に心臓病変についてみると, 卵巣摘出は心機能ならびに心臓肥大を有意に増悪し, 一方 Estrogen の投与はこれらを有意に改善した. その機序として R-A 系の関与の面から考えると, 卵巣摘出により血液中の ACE 活性の有意な増加を認めたが, 血液中の Angiotensin I ならびに Angiotensin II は有意な変化を示さなかった. このように血中の R-A 系の変化が見られなかったことから, 組織 R-A 系の関与を考え組織 ACE-mRNA と, R-A 系に拮抗する NOS 系の指標として組織 ecNOS-mRNA の面からの検討を加えた. 卵巣摘出により心臓において ecNOS-mRNA の発現は抑制され ACE-mRNA の発現は亢進し, 一方 Estrogen 投与により ecNOS-mRNA の発現は増加し ACE-mRNA の発現は抑制された. 以上の結果は Estrogen が心臓組織の R-A 系と NO 系に何らかの形で作用している可能性を示唆している. 事実, R-A 系や NO 系に Estrogen が様々な作用している報告は多数あり, これらから考え Estrogen には R-A 系を抑制する作用があり, ecNOS 発現亢進の相乗作用の結果として心臓肥大, 心機能の改善がもたらされた可能性が考えられる^{19, 54-56)}.

腎臓でも Estrogen の投与に伴い ACE-mRNA の抑制, ecNOS-mRNA の亢進が見られたにも関わらず, 腎臓病変は増悪傾向を認めた. また高塩負荷に伴い血圧の著明な上昇と糸球体硬化病変の進展, さらに間質病変の増悪を認めた. 今回の結果では, Estrogen は腎臓病変の進展を抑制しなかったばかりでなく, 逆に増悪させた. すなわち卵巣摘出は腎臓病変の進展を来さず, 逆に Estrogen の補充は腎臓病変の明らかな増悪をもたらした. この腎臓病変の進展機序として, 病理所見上多数の糸球体内血栓ならびに間質の血栓形成が認められたことから, これらが腎臓病変の進行に影響しているものと考えられた. これまでも腎臓機能障害に及ぼす性ホルモンの影響に関する報告は多数認められるが, 多くの報告では Estrogen は腎臓機能障害の進展を予防するとの報告であった. 一方 Stier Jr. らの報告では, これまでの報告と異なり蛋白尿の増悪と病理所見の悪化を認めている⁵⁷⁾. その理由として, 1) 実験に用いたモデルの差が考えられる. 今回用いた系は Dahl-S ラットに心筋梗塞を作成した心不全モデルであった. その結果全身の R-A 系は抑制されていたものの, 組織 R-A 系の指標と考えられる ACE-mRNA はむしろ亢進しており高塩負荷によりさらに亢進を認めた. これは Stier Jr. らの使用した SHR-SP においても R-A 系が亢進していることから, R-A 系の亢進と Estrogen との相乗作用によって腎臓における血栓形成が亢進した可能性が考えられる.

つぎに, 2) Estrogen 量の問題が考えられた. これまでの報告では 1-10 μg の Estrogen の皮下注射による投与によって血中 Estrogen 濃度は 250-2000 pg/ml まで上昇し, 6 時間で 60 pg/ml 以下へ低下したとの報告が見られる⁵⁸⁾. また Powers らの報告⁵⁹⁾ では, 週に 3 回の 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の皮下注射による Estrogen 投与によって血中の Estrogen 濃度は正常ラットの生理的範囲内である 30-140 pg/ml に維持されたと報告している. この容量は十分に生理的な作用を発現する容量であり, ラットの子宮の発育も促進しえたと報告している⁵⁹⁾. 今回我々の用いた 15mg/pellet/90days の Estradiol pellet を皮下移植によって移植後 12 週の血中濃度は 52.6 ± 4.4 pg/ml であり, 同時に測定した偽手術群の約 3 倍, 卵巣摘出群の約 10 倍の濃度であり, Estrogen の補充が十分に行われていたことが確認しえた. この投与容量は一日あたりの補充量として 70 $\mu\text{g}/\text{日}$ であり, 以前の報告と比較して高容量の投与となっていることより Estrogen の副作用である血栓形成や R-A 系の亢進が生じた可能性も考えられた.

結 論

1) Dahl ラットの心臓リモデリングと腎硬化症の進展に及ぼす Estrogen の作用につき Dahl 食塩感受性ラット心不全モデルを用いて検討をおこなった.

- 2) Dahl-S ラットにおいて 8% 高食塩食の負荷は有意な血圧の上昇をもたらした. 高塩負荷において卵巣の摘出 (OVX 群) ならびに Estrogen の補充 (EST 群) は有意な血圧の変化をもたらさなかった.
- 3) OVX 群では血中の ACE の発現を増加させたものの血中 Angiotensin I および Angiotensin II の有意な変化は見られなかった. EST 群でも有意な R-A 系の変化は見られなかった.
- 4) 心臓では OVX 群で ACE-mRNA は有意に発現が増加し, また ecNOS-mRNA を低下させ, 心筋の肥大を有意に増悪させた.
- 5) EST 群では有意な心機能の改善と心筋肥大の改善を認めた. 心筋では OVX 群と比較して ACE-mRNA の有意な低下と ecNOS-mRNA は有意な増加を認めた.
- 6) 腎臓では LS 群に対して HS 群で有意な尿蛋白の増加を認め, 病理所見では著明な糸球体硬化と間質病変を認めた. 一方 OVX では尿蛋白は減少傾向を示したが, 糸球体硬化と間質病変は有意な変化を認めなかった.
- 7) EST 群では HS 群に対し尿蛋白は有意に増加し, 糸球体硬化および間質病変の有意な進展を認めた.
- 8) EST 群では糸球体硬化ならびに間質病変の増悪がみられた. EST 群に特徴的な所見として, 糸球体内ならびに糸球体内の細動脈に多数の微少血栓が確認された.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導御校閲を賜りました埼玉医科大学腎臓内科鈴木洋通教授に深謝いたします. 直接御指導いただきました中元秀友助教授に深謝いたします. またいろいろと御指導御協力いただきました教室員各位に深謝いたします.

この研究の一部は第 29 回日本心脈管作動物質学会 (2002 大阪), 57TH Annual Fall Conference and Scientific of the Council for High Blood Pressure Research (2003 Washington), 第 26 回日本高血圧学会 (2003 宮崎) において発表した.

文 献

- 1) Hodis HN, Mack WJ, Azen SP, Lobo RA, Shoupe D, Mahrer PR, et al. Women's Estrogen-Progestin Lipid-Lowering Hormone Atherosclerosis Regression Trial Research Group. : Hormone therapy and the progression of coronary-artery atherosclerosis in postmenopausal women. N Engl J Med 2003;7:535-45.
- 2) Harrison-Bernard LM, Raij L. Postmenopausal hypertension. Curr Hypertens Rep 2000; 2: 202-7.
- 3) Silbiger SR, Neugarten J. The role of gender in the

- progression of renal disease. *Adv Ren Replace Ther* 2003;10:3-14.
- 4) Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1992;117:1016-37.
 - 5) 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.
 - 6) Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;335: 453-61.
 - 7) Fisman EZ, Tenenbaum A, Pines A. Systemic hypertension in postmenopausal women: a clinical approach. *Curr Hypertens Rep* 2002;4:464-70.
 - 8) Velkeniers B. Hormones after menopause? *Acta Clin Belg* 2001;56:113-21.
 - 9) Shoemaker ES, Forney JP, Macdonald PC. Estrogen treatment of postmenopausal women: benefits and risks. *J Am Med Assoc* 1977;238:1524-30.
 - 10) Kawecka-Jaszcz K, Czarnecka D, Olszanecka A, Rajzer M, Jankowski P. The effect of hormone replacement therapy on arterial blood pressure and vascular compliance in postmenopausal women with arterial hypertension. *J Hum Hypertens* 2002;16: 509-16.
 - 11) Valimaki MJ, Laitinen KA, Tahtela RK, Hirvonen EJ, Risteli JP. The effects of transdermal estrogen therapy on bone mass and turnover in early postmenopausal smokers. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1213-20.
 - 12) Tikkanen MJ, Kuusi T, Vartiainen E, Nikkila EA. Treatment of post-menopausal hypercholesterolaemia with estradiol. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1979;88:83-8.
 - 13) Blumenfeld Z, Aviram M, Brook GJ, Brandes JM. Changes in lipoproteins and subfractions following oophorectomy and oestrogen replacement in per-menopausal women. *Maturitas* 1983;5:77-83.
 - 14) Gardner CD, Tribble DL, Young DR, Ahn D, Fortmann SP. Population frequency distributions of HDL, HDL(2), and HDL(3) cholesterol and apolipoproteins A-I and B in healthy men and women and associations with age, gender, hormonal status, and sex hormone use. the Stanford Five City Project. *Prev Med* 2000;31:335-45.
 - 15) Urabe M, Yamamoto T, Kashiwagi T, Okubo T, Tsuchiya H, Iwasa K, et al. Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein lipase and lipids including apolipoprotein E in climacteric and elderly women. *Endocr J* 1996; 43:737-42.
 - 16) Kita T, Yokode M, Ishii K, Kume N, Nagano Y, Arai H, et al. The role of oxidized lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1992;20:37-42.
 - 17) Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6457-61.
 - 18) Jenkins DJ, Kendall CW, Garsetti M, Rosenberg-Zand RS, Jackson CJ, Agarwal S, et al. Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity-a controlled crossover trial. *Metabolism* 2000;49:537-43.
 - 19) McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN, Kontos HA. Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke* 1999;30:2186-90.
 - 20) Neugarten J, Ding Q, Friedman A, Lei J, Silbiger S. Sex hormones and renal nitric oxide synthases. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1240-6.
 - 21) Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2788-93.
 - 22) Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:257-62.
 - 23) Earley S, Resta TC. Estradiol attenuates hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L86-93.
 - 24) David FL, Carvalho MH, Cobra AL, Nigro D, Fortes ZB, Reboucas NA, et al. Ovarian hormones modulate endothelin-1 vascular reactivity and mRNA expression in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* 2001;38:692-6.
 - 25) Bracamonte MP, Miller VM. Vascular effects of estrogens: arterial protection versus venous thrombotic risk. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12: 204-9.
 - 26) Oparil S. Hypertension and oral contraceptives. *J*

- Cardiovasc Med 1981;6:381, 384-7.
- 27) Shlipak MG, Simon JA, Grady D, Lin F, Wenger NK, Furberg CD. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Investigators: Renal insufficiency and cardiovascular events in postmenopausal women with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:705-11.
 - 28) Cano A, Van Baal WM. The mechanisms of thrombotic risk induced by hormone replacement therapy. *Maturitas* 2001;40:17-38.
 - 29) 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.
 - 30) Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, et al. Women's Health Initiative Investigators: Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2003;349:523-34.
 - 31) Gabrielsen A, Bie P, Holstein-Rathlou NH, Christensen NJ, Warberg J, Dige-Petersen H, et al. Neuroendocrine and renal effects of intravascular volume expansion in compensated heart failure. *Am J Physiol Regul* 2001;281:R459-67.
 - 32) Charloux A, Piquard F, Doutreleau S, Brandenberger G, Geny B. Mechanisms of renal hyporesponsiveness to ANP in heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003;33:769-78.
 - 33) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbin MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. g Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;44:503-12.
 - 34) Selye H, Bajusz E, Grasso S, Memdell P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 1960;11:398-407.
 - 35) Li P, Ferrario CM, Ganten D, Brosnihan KB. Chronic estrogen treatment in female transgenic (mRen2)27 hypertensive rats augments endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Hypertens* 1997;10:662-70.
 - 36) 山内康弘. Estrogen はアンジオテンシン変換酵素の発現を制御する. 埼玉医科大学雑誌 2002;29:149-59.
 - 37) Beppu S, Matsuda H, Shishido T, Miyatake K. Functional myocardial perfusion abnormality induced by left ventricular asynchronous contraction: experimental study using myocardial contrast echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:1632-8.
 - 38) Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation* 1995;91:2642-54.
 - 39) Sakata Y, Masuyama T, Yamamoto K, Doi R, Mano T, Kuzuya T, et al. Renin angiotensin system-dependent hypertrophy as a contributor to heart failure in hypertensive rats: different characteristics from renin angiotensin system-independent hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:293-9.
 - 40) 渡辺 信子, 牧野和夫, 亀井幸子, 大久保昭行, 山中 学, 大沢 進. ピロガロールレッド・モリブデン錯体を用いる蛋白定量と日立 726 型自動分析機への適用. 臨床病理 1984; 32: 227.
 - 41) 桑 克彦. イオン選択電極. 臨床検査 1982; 34: 1353-8.
 - 42) 大澤 進. 最新臨床化学検査法 クレアチニン. Medical Technology 1998;26:389-95.
 - 43) Hallett CJ, Cook JGH. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-coupled reaction for emergency blood urea estimation. *Clin Chim Acta* 1971;35:33-7.
 - 44) Iwasawa M, Tokumoto M, Makiishi N, Takatori O. Fundamental evaluation no-extraction of angiotensin I and angiotensin II by radioimmunoassay. 医学と薬学 1996;36:297-303.
 - 45) 森本妙子, 青山正明, 後藤英司, 塩之入洋. フロリジル法による plasma angiotensin II の radioimmunoassay の開発と検討. 日内分泌会誌 (Folia endocrinol jap) 1983;59:215-29.
 - 46) 猿田享男, 斉藤郁夫, 山上恵一, 岡 匡嗣, 北島 和一, 小西 考之助, 他. 抽出を要しないアルドステロン Radioimmunoassay Kit の検討. 現代医療 1997;9:1137-40.
 - 47) 河野 剛. 血漿レニン活性. 日本臨床 1985;43:1108-11.
 - 48) Raiji L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, Hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 1984;26:137-43.
 - 49) Katsumata H, Suzuki H, Ohishi A, Nakamoto H, Saruta T, Sakaguchi H. Effects of antihypertensive agents on blood pressure and the progress of renal failure in partially nephrectomized spontaneously hypertensive rats. *Jpn Heart J* 1989;30:917-27.
 - 50) Nakamoto H, Carlos M, Ferrario B, Suzuki H. Role of Nitric Oxide in the evulsion of renal Ischemia in two-kidney one-clip Renovascular Hypertension. *Hypertension Res* 1998;21:267-77.
 - 51) Costerousse O, Lindpaintner K, Paul M, Ganten D,

- Kreutz R. Interstrain differences in angiotensin I-converting enzyme mRNA and activity levels. Comparison between stroke-prone spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. *Clin Exp Hypertens* 1999;21:377-93.
- 52) Zhang L, Kosaka H. Sex-specific acute effect of estrogen on endothelium-derived contracting factor in the renal artery of hypertensive Dahl rats. *J Hypertens* 2002;20:237-46.
- 53) Sasaki T, Ohno Y, Otsuka K, Suzawa T, Suzuki H, Saruta T. Oestrogen attenuates the increases in blood pressure and platelet aggregation in ovariectomized and salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 2000;18:911-7.
- 54) Tanaka M, Nakaya S, Watanabe M, Kumai T, Tateishi T, Kobayashi S. Effects of ovariectomy and estrogen replacement on aorta angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Jpn J Pharmacol* 1997;73:361-3.
- 55) Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*. 1999; 33:323-8.
- 56) Takaoka M, Yuba M, Fujii T, Ohkita M, Matsumura Y. Oestrogen protects against ischaemic acute renal failure in rats by suppressing renal endothelin-1 overproduction. *Clin Sci* 2002;103:434S-7S.
- 57) Stier CT Jr, Chander PN, Rosenfeld L, Powers CA. Estrogen promotes microvascular pathology in female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285: E232-9.
- 58) Medlock KL, Forrester TM, Sheehan DM. Short-term effects of physiological and pharmacological doses of estradiol on estrogen receptor and uterine growth. *J Recept Res* 1991;11: 743-56.
- 59) Powers CA, Hatala MA, Pagano PJ. Differential responses of pituitary kallikrein and prolactin to tamoxifen and chlorotrianisene. *Mol Cell Endocrinol*. 1989;66:93-100.