

9530 食塩感受性を規定する因子としての腎交感神経活動の役割

助成研究者：河南 洋 (宮崎医科大学 医学部)

共同研究者：加藤 和男 (宮崎医科大学)

國武 孝人 (宮崎医科大学)

花森 隆充 (宮崎医科大学)

食塩感受性の規定因子には種々のものが想定されているが、腎ナトリウム(Na)排泄機能の異常が係わっている可能性がある。腎交感神経系の亢進によってNa排泄は低下し、抑制によってNa排泄は促進する。食塩負荷時の腎交感神経系の応答、特にその時間経過の差異がNa排泄障害を介して食塩感受性に関与している可能性がある。これまで中枢性食塩負荷に対する腎交感神経系の応答は麻酔下の動物で検討されてきたが、その結果は必ずしも一定していない。また飲水行動との対応のもとの解析も未だ行われていない。麻酔により自律神経活動は強く修飾されることが知られているので、無麻酔下での検討が望まれる。

そこで本研究において、低ナトリウム食で飼育したDahl-食塩感受性(Dahl-S)とDahl-食塩抵抗性(Dahl-R)ラットを用いて、腎交感神経活動(RSNA)を無麻酔自由行動下で記録し、側脳室内微量NaCl溶液の注入に対するRSNAの変動を、血圧、心拍数、飲水行動と対応づけながら解析した。

側脳室内に高張食塩水(0.3M NaCl)を1 μ l/minのスピードで20分間注入すると、血圧上昇とRSNAの減少が認められた。心拍数は変動が大きく有意な変化は認められなかった。これらの変化を0.15M NaCl注入後のそれらと比較してみるとDahl-SラットではRSNAの有意な抑制反応は認められなかった。一方Dahl-Rラットでは0.15M NaCl投与時に比較して0.3M NaClで有意なRSNAの抑制反応が認められた。0.3M NaCl注入開始後30分間の飲水量はDahl-Rに比してDahl-Sラットでは有意に少なかった。これらの結果は意識下Dahl-Rラットの方がDahl-Sラットより中枢性食塩負荷に対するRSNAの抑制反応が顕著であることを示している。したがってDahl-Sラットでは中枢性食塩負荷に対するRSNAの抑制反応が減弱しており、尿中へのNa排泄能の低下が示唆された。

また今回、意識下Dahlラットから記録したRSNAのパターンには次の2つが大別された。その一つは群発性活動で心拍に同期しており、塩酸フェニールエフリンで血圧を上昇させた時、神経活動が減少し、一方塩酸ニトロプルシドで血圧を低下させた時増加し、さらに節遮断剤のヘキサメトニウムにより消失するものである。これらの特徴はこれまで報告された交感神経活動パターンと一致している。もうひとつのものはまずスパイク状で、群発性を示さず、血圧の変動に対してほとんど変化しなかったが、ヘキサメトニウム投与では完全に消失した。したがって後者もやはり遠心性節後線維からのものと思われる。この特異な神経活動はDahl-SとDahl-Rラットいずれでも観察されたが、今後、その起源並びに腎Naの排泄機能との関連で検討する必要がある。

9530 食塩感受性を規定する因子としての腎交感神経活動の役割

助成研究者：河南 洋 (宮崎医科大学 医学部)

共同研究者：加藤 和男 (宮崎医科大学)

國武 孝人 (宮崎医科大学)

花森 隆充 (宮崎医科大学)

研究目的

未だ病因の不明な本態性高血圧症患者の一部は食塩負荷で昇圧しやすく食塩感受性群 (salt-sensitive group) と呼ばれている。この規定因子には種々のものが想定されているが、腎ナトリウム (Na) 排泄機能の異常が係わっている可能性がある。腎交感神経系の亢進によって Na 排泄は低下し、抑制によって Na 排泄は促進する (1)。食塩負荷時の腎交感神経系の応答、特にその時間経過の差異が Na 排泄障害を介して食塩感受性に関与している可能性がある。これまで中枢性食塩負荷に対する腎交感神経系の応答は麻酔下の動物で検討されてきたが、その結果は必ずしも一定していない (2、3、4)。また飲水行動との対応のもとでの解析は未だ行われていない。Dahlラットはヒト本態性高血圧症のいいモデルと考えられている。高ナトリウム食での飼育により血圧が上昇するラット (Dahl-salt-sensitive rat, Dahl-S) としないラット (Dahl-salt-resistant rat, Dahl-R) があり、食塩感受性のメカニズムの解明上いい病態モデル動物である。そこで本研究において、低ナトリウム食で飼育した Dahl-S と Dahl-R ラットを用いて、腎交感神経活動 (RSNA) を自由行動下で記録し、側脳室内微量 NaCl 溶液の注入に対する RSNA の変動を、血圧、心拍数、飲水行動と対応づけながら解析した。我々の作業仮説は、食塩負荷に対して Dahl-S ラットの腎交感神経系の抑制反応が Dahl-R ラットに比較して減弱しているかというものである。

研究方法

低ナトリウム (0.4%NaCl 含有) 飼料と水は自由に摂取させ、明期は7:00-19:00、温度は $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度は40-50%の環境下で飼育した雄性 Dahl-S と Dahl-R ラットを用いた。体重は420-502g、週令は20-26週であった。ネンブタール (50mg/kg, i. p.) で麻酔したラットを脳固定装置に留置し、左側側脳室にステンレス・ガイドカニューレ (24ゲージ) を刺入し、固定ビスと歯科用セメントを用いて固定した。その後ホームケージにラットを戻した。

約1週間の回復期間の後、再びネンブタール (50 mg/kg, i. p.) で麻酔し、各々血圧測定と薬物投与のため、腹腔大動脈と下大静脈にカテーテルを、また胸部に心電図記録用テフロン被覆ステンレス線を留置し、皮下を通して後頭部から導出した。

腎交感神経活動（RSNA）を記録するため、顕微鏡下で経後腹膜のアプローチにより左腎神経を周囲組織より分離、剥離し、双極テフロン被覆ステンレス・ワイヤー電極（コーナー社、25本巻き、直径300 μ m）に装着した。S/N比の高い神経活動記録を確認したのち、シリコン樹脂（ワッカー・シルゲル社、“セミコシル”）で神経と電極を埋没固定した。神経活動用リード線も皮下を通して頭部より導出した。

手術終了後“回転式代謝ケージ”に動物を移動し、血圧、心電図と神経活動の記録を開始した。テストは手術終了後少なくとも24時間以上経過したのち、動物が充分摂食、飲水を行い、心拍数が1分間400以下にあることを確認したのち開始した。

中枢性食塩負荷のため、側脳室内へガイドカニューレを介してステンレス・パイプインジェクター（30ゲージ）を刺入して、マイクロシリンジポンプ（IITC社、KDS100）で、0.15M、0.3M NaCl溶液を1 μ l/minのスピードで20分間注入した。その時の血圧、心拍数、RSNAとともに飲水量を測定した。

神経活動の記録は前置増幅器（日本光電、AVB-10、100Hz-1kHzのバンドパスフィルター）を用い、オシロスコープ（日本光電、VC-10）で観察し、データレコーダ（テアック、RD-111T）で記録した。神経活動の定量的評価はまずヘキサメトニウム（20mg/kg、i. v.）投与後に残存する成分を除去し、次に1秒間あたりの積分値に変換したのち、ANOVAとFisher's法を用い統計学的に検定した。

研究結果

1. 意識下Dahl食塩感受性ラット（Dahl-S）の腎交感神経活動

安静時、記録したRSNAのパターンは次の2つに大別された（図1）。その一つは群発性活動で心拍に同期しており、塩酸フェニールエフリンで血圧を上昇させた時、神経活動が減少し、一方塩酸ニトロプルシドで血圧を低下させた時増加し、さらに節遮断剤のヘキサメトニウムにより消失するものである。これらの特徴はこれまで報告された交感神経活動パターンと一致している。もうひとつのものはまずスパイク状で、群発性はほとんど見られず、血圧の上、下変動に対して神経活動が変化しなかったが、ヘキサメトニウム投与後にはほぼ完全にその神経活動成分は消失した。したがって後者もやはり遠心性節後線維からのものと思われる。この2種類のタイプの神経活動はDahl-S並びにDahl-Rラットいずれでも観察された。またそれらの出現は混在しており、手術後経過時間と一定の関係は認められなかった。

次に圧受容器反射による心拍数の変化を調べた。塩酸フェニールエフリンと塩酸ニトロプルシドの静脈内投与による血圧の低下、上昇時の心拍数の変化の最大値を用いてDahl-SとDahl-Rラット間で比較した。両群間で有意な差は認められなかった（図2）。

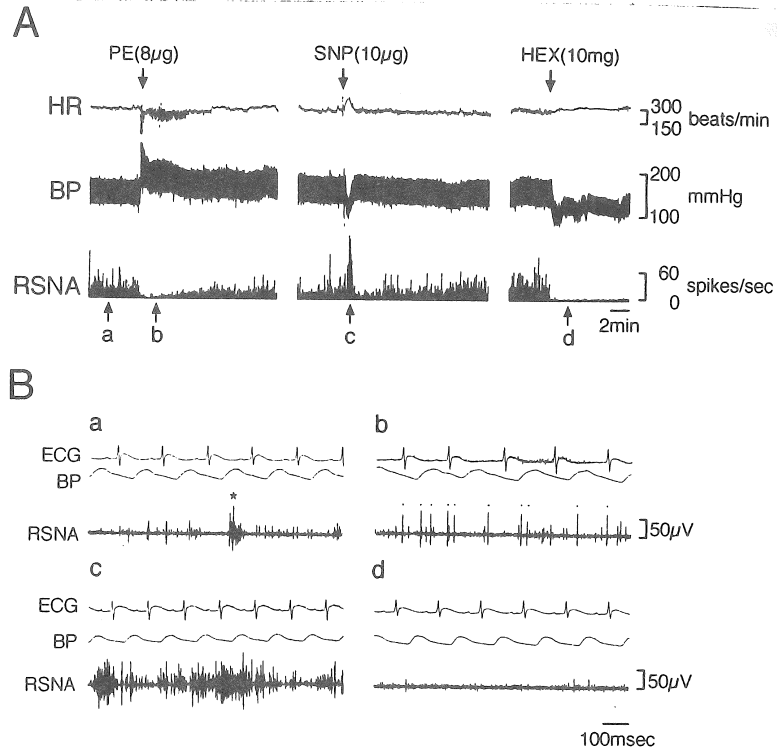


Fig. 1. Characteristics of renal sympathetic nerve activity in a conscious Dahl salt-sensitive rat. Records were obtained on the 2nd day after implantation of electrodes. (A) Traces from top: heart rate (HR), arterial blood pressure (BP) and rate meter records of renal sympathetic nerve activity (RSNA). Decreases in RSNA induced by phenylephrine chloride (PE) and hexamethonium chloride (HEX), and increase in RSNA by sodium nitroprusside (SNP). (B) Expanded records with a high speed thermal recorder taken at a, b, c and d marked in A. Note that two types of discharge pattern are intermingled; one is grouped and cardiac related (indicated by an asterisk) and the other non-grouped and non-cardiac related (indicated by dots).

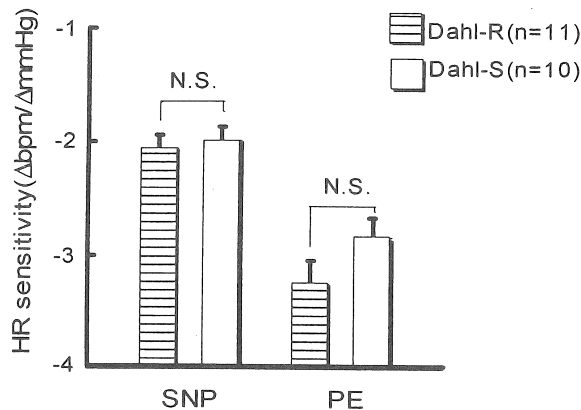


Fig. 2. Baroreflex control of heart rate (HR) in conscious Dahl salt-resistant (Dahl-R) and salt-sensitive (Dahl-S) rats. The sensitivity of reflex control of HR was evaluated on the basis of maximum change in HR after bolus injections of phenylephrine (PE) and sodium nitroprusside (SNP). Values are means \pm SE.

2. 高張食塩水の脳室内投与の効果

側脳室内に高張食塩水 0.3M NaCl を $1\mu\text{l}/\text{min}$ のスピードで 20 分間注入すると、血圧上昇と RSNA の減少が認められた (図 3)。心拍数は変動が大きく有意な変化は認められなかった。これらの変化を 0.15M NaCl 注入後のそれらと比較してみると Dahl-S ラットでは RSNA の有意な抑制反応は認められなかった (図 4)。一方 Dahl-R ラットでは 0.15M NaCl 投与時に比較して 0.3M NaCl で有意な RSNA の抑制反応が認められた。これらの結果は Dahl-S ラットでは食塩負荷に対する腎交感神経の抑制反応の閾値が高いことを示唆している。

20 分間の 0.3M NaCl 注入時に生じる飲水量を計測した。Dahl-R に比して Dahl-S ラットでは有意に飲水量が低下していた (図 5)。

また行動学上、両群間で差が認められた。Dahl-S に比して Dahl-R は特に高張食塩水投与後、不穏状態例えば探索、毛づくろい、前屈行動などをしばしば示した。

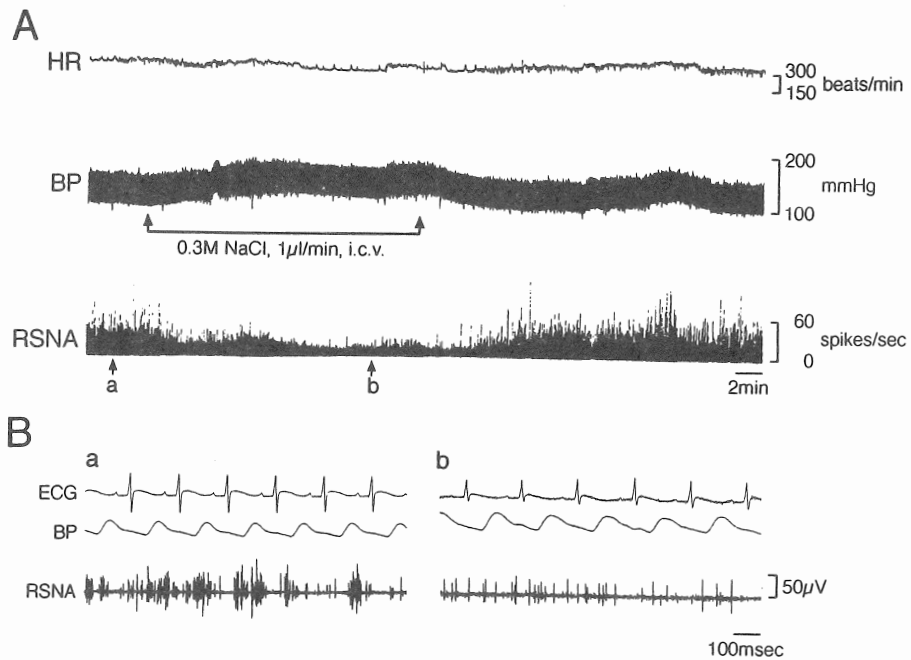


Fig. 3. (A) Representative records of changes in heart rate (HR), arterial blood pressure (BP) and renal sympathetic nerve activity (RSNA) in response to intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of 0.3 M NaCl ($1\mu\text{l}/\text{min}$) in a conscious Dahl salt-sensitive rats. (B) Expanded records taken at a and b marked in A. Note that i.c.v. infusion of 0.3 M NaCl elicited a decrease in RSNA and an increase in BP. Records were obtained on the 3rd day after implantation of electrodes.

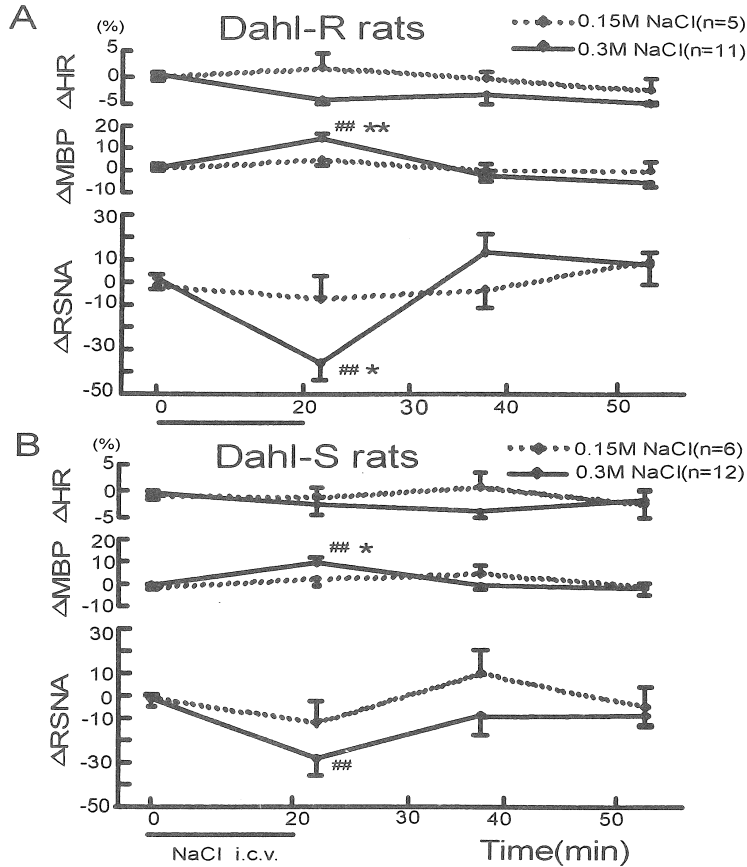


Fig. 4. Time course of changes in heart rate (HR), arterial mean blood pressure (MBP) and renal sympathetic nerve activity (RSNA) induced by i.c.v. infusion of 0.15 M and 0.3 M NaCl at 1 μ l/min for 20 min in conscious Dahl salt-resistant (A) and salt-sensitive (B) rats. Values are means \pm SE. ##p<0.01 vs. resting level. *p<0.05, **p<0.01 vs. 0.15 M NaCl injection in each group.

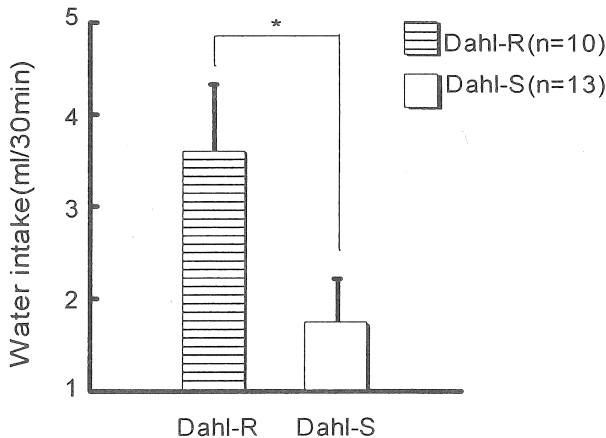


Fig. 5. Water intake after i.c.v. infusion of 0.3 M NaCl in conscious Dahl salt-resistant (Dahl-R) and salt-sensitive (Dahl-S) rats. Note that Dahl-S rats drank less water compared to Dahl-R rats. Values are means \pm SE.

考察

記録している神経活動がはたして交感神経活動であるかどうかの基準として広く一般に認められていることは、心拍に同期性を示すこと、圧受容器刺激に応じること、また節遮断剤により活動が消失することである。我達はこれまで数年間、意識下Wistarラットを用いてRSNAの記録を行ってきたが、この基準から逸脱する様な神経活動はほとんど認められなかった（6、7）。しかし今回、Dahl-SとRラットを用いた実験において、特異な神経活動成分が認められた。それは心拍に非同期性であること、圧受容器刺激に不反応であること、しかしヘキサメトニウム投与では完全に消失するものである。これまでに、心拍に同期性を示さない交感神経活動の存在はアンジオテンシンIIの静脈内投与時に報告されている（8）。しかしその起源は不明であり、機能の解明は今後の課題である。また意識下動物での記録において、S/N比の高い記録が何よりも重要であることが改めて示された。

これまでin vivo実験の多くは技術的な理由から麻酔下動物を用いて行われてきた。しかし麻酔によって種々の自律・体性反応が強く修飾されること、時には反応の方向性が逆転することが知られている（5）。したがって麻酔下動物で得られたデータの解釈には注意を要する。中枢内高張食塩水投与に対するRSNAの反応について、これまでの報告は抑制、無変化、また増加反応とその結果が一致していない（2、3、4）。その理由は不明であるが、実験条件の違い、例えば刺激方法や用いられた麻酔剤の違いが係っている可能性がある。

我々の作業仮説に一致して、意識下Dahl-Rラットの方がDahl-Sラットより中枢性食塩負荷に対するRSNAの抑制反応が顕著であった。この結果は食塩負荷に応じて、RSNAが抑制され、腎尿細管でのナトリウム再吸収並びにレニン分泌の抑制を介して、最終的に尿中へのナトリウム排泄増加をもたらす能力がDahl-Sラットでは減弱していることを示唆している。

これまで腎臓以外に循環系の異常がDahl-Sラットについて報告されている。循環血液量増大に伴うRSNAの抑制反応がDahl-Rに比べDahl-Sラットでは減弱しており、この変化に心肺体積受容器（volume receptor）の関与が報告された（9、10）。一方動脈圧受容器反射については異論があるが（11、12）、今回、フェニールエフリンあるいはニトロプルシドによる血圧の上昇、低下時の反射性心拍数の変化を基に推定した結果では差異は認められなかった。今後、圧受容器反射によるRSNAの変化についても検討する必要がある。ところで高張食塩水投与後のRSNAの抑制は血圧上昇による圧受容器反射を介して引き起された可能性がある。しかしDahl-SとDahl-Rラットで血圧の上昇度には差異がなく、また心拍数も有意な差は認められなかった。したがってこのRSNAの抑制反応への圧受容器反射の関与の可能性は低いと考えられる。

0.3M NaCl投与後の飲水量がDahl-Rに比べてDahl-Sラットで有意に少なかった。こ

の結果は、中枢性飲水誘起作用を有するアンギオテンシン系が Dahl-S ラットで低下しているとの報告と一致している (13)。なお飲水行動に伴って RSNA が変動することが知られているので、Dahl-S と Dahl-R ラット間で観察した RSNA の差異に、この飲水量の差が係っているか否かも検討する必要がある。

今後の課題

今回観察した特異な腎交感神経活動に関して、その性質を調べる上で、多神経線維束でなく単一神経線維標本での記録、また Dahl ラットと種を同じくする Sprague-Dawley (SD) ラットでの解析が必要である。また自律神経活動の定量的解析において、現在一般に用いられているパルスカウンターあるいは積分値を用いた方法では今回記録した様な特異な神経活動の適切な評価が困難である。今回我々は異なるタイプの神経活動成分を区分せずまとめて評価したが、今後区分して解析する必要がある。現在その解析法を検討中である。

長期的血圧調節においてホルモン-交感神経系連関の重要性が強調されている (14)。神経系が短期的血圧調節に関与していることはよく知られているが、長期的調節における役割は不明である。その根拠は主に 1) 循環系圧受容器はすぐ順応すること、2) 圧受容器の除神経は長期的な血圧レベルに影響を与えないことなどである。しかしこれらの論議において、末梢から脳へのフィードバック信号は神経系を介するという考えに基づいているが、それとは別にホルモン系-主にバゾプレッシンやアンギオテンシン-などを介するルートの可能性がある。このホルモン系は神経系と異なり順応することもなく、また長期的にも交感神経系出力に影響を与えることが知られている。食塩依存性高血圧もこのホルモン-交感神経系連関の障害によってもたらされている可能性がある。例えば、高張食塩水負荷に伴いバゾプレッシン分泌が生じる。この一旦末梢に分泌されたバゾプレッシンが再び、脳へのフィードバック信号系として働いて、RSNA の抑制反応をもたらしている可能性がある (15)。また最近、バゾプレッシンは、オキシトシンと共に心房性ナトリウム利尿ホルモンを介してナトリウム利尿作用を持つことが報告された (16)。したがって Dahl-S と Dahl-R ラット間でバゾプレッシン分泌に差があるのかどうか、また上記想定されるバゾプレッシンの中枢作用はいかなるレセプターを介するのかどうかも検討する必要がある。さらに高張食塩水によるバゾプレッシン分泌反応に脳内アンギオテンシン系 (AII) の関与が指摘されているので (17)、AII 系との連関も今後の研究課題である。

文献

1. DiBona GF: The functions of the renal nerves. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 94:75-181, 1982
2. Kawano Y, and Ferrario CM: Neurohormonal characteristics of cardiovascular response due to intraventricular hypertonic NaCl. *Am J Physiol* 247:H422-H428, 1984
3. Tobey JC, Fry HK, Mizejewski CS, Fink GD, and Weaver LC: Differential sympathetic responses initiated by angiotensin and sodium chloride. *Am J Physiol* 245: R60-R68, 1983
4. Abe I, Averill, DB, and Ferrario CM: Activation of renal sympathetic outflow by intracisternal hypertonic NaCl in dogs. *Am J Physiol* 256: H411-H416, 1989
5. Kannan H, Hayashida Y, and Yamashita H: Increase in renal sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol* 256: R1325-R1330,1989
6. Kannan H, Nakamura T, Jin XJ, Hayashida Y, and Yamashita H: Effects of centrally administered angiotensin on sympathetic nerve activity and blood flow to the kidney in conscious rats. *J Auton Nerv Syst* 34: 201-210, 1991
7. Kannan H, Tanaka H, Kunitake T, Ueta Y, Hayashida Y, and Yamashita H: Activation of sympathetic outflow by recombinant human interleukin-1 β in conscious rats. *Am J Physiol* 270: R479-R485, 1996
8. Aars H, and Akre S: Effect of angiotensin on sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand* 74: 134-141, 1968
9. Veelken R, Sawin LL, and DiBona GF: Dissociation of renal nerve and excretory responses to volume expansion in prehypertensive Dahl salt-sensitive and Dahl salt-resistant rats. *Hypertension* 13: 822-827, 1989
10. Mark AL, Victor RG, Ferrari A, Morgan DA, and Thorpe P: Cardiac sensory receptors in Dahl salt-resistant and salt-sensitive rats. *Circulation* 75(suppl I):I137-I140, 1987
11. Murphy CA, and McCarty R: Baroreflex control of heart rate in Dahl hypertensive (SS/Jr) and normotensive (SR/Jr) rats. *J Hypertens* 13: 1145-1151, 1995
12. Miyajima E, and Buñag RD: Exacerbation of central baroreflex impairment in Dahl rats by high-salt diets. *Am J Physiol* 252: H402-H409, 1987
13. Rowland NE, and Fregly MJ: Thirst and sodium appetite in Dahl rats. *Physiol Behav* 47: 331-335, 1990
14. Brooks, VL, and Osborn JW: Hormonal-sympathetic interactions in long-term regulation of arterial pressure: an hypothesis. *Am J Physiol* 268: R1343-R1358, 1995

15. Fujisawa Y, Miyatake A, Hayashida Y, Aki Y, Kimura S, Tamaki T, and Abe Y:
Role of vasopressin on cardiovascular changes during hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol* 267: H1713-H1718, 1994
16. Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, and Antunes-Rodrigues J: Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7902-7906, 1995
17. Sladek CD, and Joynt RJ: Role of angiotensin in the osmotic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology* 106: 173-178, 1980

Role of the renal sympathetic nerve activity in determining salt sensitivity.

Hiroshi Kannan, Kazuo Kato*, Takato Kunitake and Takamitsu Hanamori

Department of Physiology, Department of Medicine*

Miyazaki Medical College

Summary

Dahl salt-sensitive (DS) rats develop hypertension when fed a high-salt diet, but remain normotensive on a low-salt diet. The mechanisms underlying salt-dependent hypertension are not entirely known, although several abnormalities in DS have been proposed to be of pathogenic importance; involvement of the kidneys, including abnormal renal excretory and humoral mechanisms, is one such suggested contributory factor. Renal sympathetic nerve activity (RSNA) has a direct effect on the control of renal blood flow, renin release and urinary sodium excretion. We have recorded RSNA in free-moving Dahl-rats on a low NaCl diet to characterize the RSNA discharge pattern and evaluate the RSNA response to intracerebroventricular (i.c.v.) administration of hypertonic sodium chloride. Under resting conditions, two types of discharge patterns were seen, a grouped cardiac-related discharge (GD) and a non-grouped irregular discharge (NGD). The GD was inhibited by i.v. administration of phenylephrine chloride, while the NGD was not. Both GD and NGD were seen in DS and Dahl-salt-resistant (DR) rats and both were completely abolished by i.v. administration of the ganglionic blocker, hexamethonium chloride, indicating postganglionic efferent nerve involvement. I.c.v. infusion of 0.3 M NaCl at 1 μ l/min for 20 min significantly increased arterial blood pressure and decreased RSNA compared with the resting levels in both Dahl-R and Dahl-S rats. Heart rate did not significantly change. However, the RSNA response to 0.3 M NaCl injection was not significantly different from the response to 0.15 M NaCl injection in Dahl-S rats, while the response in Dahl-R rats remained significant. During 0.3 M NaCl infusion, water intake in Dahl-S rats was diminished compared with that in Dahl-R-rats. In addition, baroreflex control of heart rate did not differ in either group. These findings support the hypothesis that salt-sensitive hypertension is due to the failure to suppress RSNA in response to salt loading, and suggest the importance of recording with a high signal-to-noise ratio to evaluate autonomic nervous system activity.