

9546 Salt appetiteの発現に対する浸透圧刺激の抑制効果

助成研究者：鷹股 亮 (京都府立医科大学 医学部)

共同研究者：森本 武利 (京都府立医科大学)

能勢 博 (信州大学)

浸透圧刺激のナトリウム欠乏性salt appetite に対する影響を明らかにすることを目的として実験を行った。ラットの体内のナトリウム量を減少させるために利尿剤である furosemide を2回投与(2時間間隔;各々5mg;i.p.)し、2回目の投与後2時間後より等張性(laCSF)または、高張性の人工髄液(HaCSF)を36 μ l/hの速度で持続的に輸液した。輸液開始後1時間よりラットに水および0.3M NaClを与え自由に選択、摂取させ、8時間にわたって水、ナトリウムの摂取量および尿への排泄量を測定した。

Furosemideの投与による尿中への水の損失量は飲水開始直前で、12-13mlであった。また、ナトリウムの尿中への排泄量は1.3-1.4meqでこれは、細胞外液の総ナトリウム量の15%以上に相当する。

Furosemide投与により、ラットの0.3M NaCl および水の摂取量はそれぞれ、ナトリウム欠乏をしていないラットの各々約4倍、2.6倍に増加した。同様のナトリウム欠乏状態にも関わらず、HaCSFを輸液したラットではlaCSFを輸液したラットに比べ有意に0.3M NaClの摂取量が減少した。摂取開始後8時間における0.3M NaClの摂取量は、HaCSF群では、laCSF群の約32%となり、ナトリウム欠乏を起こしていないラットの摂取量と有意な差が認められなかった。水の摂取量には、HaCSF輸液の影響はみられなかった。また、HaCSFを輸液したラットではナトリウム利尿が起こり、尿中へのナトリウム損失量は大きかった。laCSFを輸液したラットでは、摂取開始8時間後では、furosemide投与によるナトリウム損失のほぼ100%を回復したが、HaCSF輸液ラットでは損失量の僅か20%の回復しか示さなかった。

以上の結果より、浸透圧刺激は、salt appetiteを抑制し、更にナトリウム利尿を誘発して、ナトリウム欠乏時のナトリウムバランスの回復を抑制することが明かとなった。

9546 Salt appetiteの発現に対する浸透圧刺激の抑制効果

助成研究者：鷹股 亮（京都府立医科大学 医学部）

共同研究者：森本 武利（京都府立医科大学）

能勢 博（信州大学）

1. 研究目的

体液は、浸透圧調節系と容量調節系が協調して、その組成および量が保たれている。体液の容量調節系においては、主に細胞外液の主要な陽イオンであるナトリウムの調節が行われる。Salt appetiteは、行動性の容量調節で体内のナトリウム量が減少した際、ナトリウム摂取を増加させる。Salt appetiteの発現は、主に草食動物において、多くの動物種において報告されている³⁾。

最近、我々はヒトに高温環境下で運動負荷を与えて大量の発汗を起こさせ、体内ナトリウム量が減少した際にsalt appetiteが発現することを明らかにした⁹⁾。この実験では、salt appetiteの発現は大量の発汗により体内のナトリウム量が減少しているにも関わらずすぐには起こらず、体液に浸透圧が低下した後暫くの間を経た後に起こった。また、ラットにおいても温熱脱水後、salt appetiteはすぐには発現せず、血漿のナトリウム濃度が脱水前のレベルに回復した後に起こることが報告されている^{8, 15)}。以上の実験事実よりsalt appetiteの温熱脱水後の発現の遅れは、浸透圧刺激による抑制効果であると考えられる。即ち体内のナトリウム量が減少しても温熱脱水後には、浸透圧調節が優先され、浸透圧刺激がSalt appetiteを抑制するのでは無いかという仮説をたてた。

そこで本研究では、浸透圧刺激の行動性の容量調節系であるsalt appetiteに対する影響を明らかにすることを目的として、利尿剤を用いてナトリウムを損失させたラットの脳室に高張性の人工髄液を輸液し、血液量を減少させたまま浸透圧刺激を加え、ナトリウム欠乏時のsalt appetiteと行動性の浸透圧調節である口渴との関係を検討した。また、ナトリウム欠乏時の腎臓における水分塩分の調節に対する浸透圧刺激の影響についても検討し、水分・塩分バランスを求めた。

2. 方法

2.1. 実験動物および飼育条件

実験には、Wistar系雄ラット（Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan）、体重250 - 300 gを用いた。ラットを2-3日間代謝ケージで飼育し、水および0.3 M NaClのノズルの位置を学習させた後、右側脳室内にステンレス製ガイドカニューラを慢性的に

埋め込んだ。手術後、代謝ケージで室温 24 ± 2 °C の環境で、餌、水、および食塩水は自由に摂取させ飼育した。手術後、少なくとも5日間の回復期間をおき、1日あたりの節水、摂食量が、手術前と差がないことを確認して実験を行った。

2.2. プロトコール

実験当日は、13:00 に1回目のfurosemide (Lasix; Hoechst JAPAN) 投与 (5 mg/rat, i.p.) を行い、2回目の投与を15:00 に行った。体内ナトリウム量を変化させないコントロールとして、furosemide の代わりに同量の 0.9 % NaCl を投与する実験も行った (コントロール群; n = 5)。2回目の投与2時間後より等張性 (laCSF 群; n = 6) のまたは、高張性 (HaCSF 群; n = 6) の人工髄液を輸液用のカニューラを介して36 μ l/hr の速度でシリンジポンプ (KDS210; IITCF; Woodland, CA) を用いて持続的に輸液した。人工髄液の組成は、等張性人工髄液では以下の通りである (Na, 150 mM; K, 3.0 mM; Ca, 2.0 mM; Mg, 1.6 mM; HCO₃, 25 mM; Cl, 135 mM; PO₄, 0.5mM)。高張性人工髄液は、等張性人工髄液にNaCl を加え、最終のNa濃度を500mM となるよう調製した。

人工髄液の輸液開始1時間後よりラットに水と0.3 M NaCl を与えて、自由に選択、摂取させた。実験中は、餌を与えなかった。摂取開始8時間の水および0.3 M NaCl の摂取量、および尿量を測定した。

2.3. 測定

水および0.3M NaCl の摂取量は、ドリンコメータ (室町器械、MINITURE DRINKOMETER Model LA-1) を用いて測定し、5分毎の積算の滴数をコンピューターに取り込み30分毎の積算量をその後の分析に用いた。尿は代謝ケージの下にチューブを接続して、フラクションコレクタ (Gilson FC-80 K, Middleton, WI) を用いて、1時間毎に各々の試験管に採取し、尿量および尿中のナトリウムとカリウムの測定に用いた。

尿中のナトリウムおよびカリウムの濃度は蛍光光度計 (Corning M480, Medfield, MA) を用いて測定した。

2.4. データ分析

水および0.3 M NaCl の摂取量の和より総水分摂取量を求めた。また、総水分摂取量と尿量の差から水分バランスを計算した。ナトリウム摂取量および尿中ナトリウム排泄量は、各々摂取溶液のナトリウム濃度 (300 mM) および尿中ナトリウム濃度と0.3 M NaCl 摂取量、尿量の積から求め、ナトリウムバランスはナトリウム摂取量と排泄量の差から求めた。

各平均値の群間の有意差の検定は分散分析を行い、有意であった場合はさらに Fisher protected least significance difference test を用いて検定した。有意差は、 $p < 0.05$ に設定した。

3. 結果

Furosemide の投与による尿中への水の損失量は飲水開始直前で、laCSF、HaCSF 群でそれぞれ 12.9 ± 1.1 ml、 11.9 ± 1.4 ml であった。また、ナトリウムの尿中への排泄量は laCSF、HaCSF 群でそれぞれ、 1.39 ± 0.15 meq、 1.29 ± 0.10 meq で水の排泄量と同様に両群間で差が無かった。また、コントロール群の飲水開始前の水およびナトリウムの排泄量は、 0.7 ± 0.1 ml、 0.04 ± 0.01 meq で furosemide を投与した群と比べ有意に低い値を示した。

Figure 1 に各群の水および 0.3 M NaCl の累積摂取量の時間経過を示す。コントロールでは、摂取開始後 8 時間での水および 0.3 M NaCl の摂取量は、各々 3.1 ± 1.0 ml、 1.2 ± 1.0 ml であったのに対し、laCSF 群では、水および 0.3 M NaCl の摂取量は、各々 8.2 ± 1.6 ml、 4.7 ± 0.9 ml であった。Furosemide 投与により、laCSF 群ではコントロール (Saline + isotonic aCSF) に比べて、水の摂取量が 2.6 倍、0.3 M NaCl の摂取量が 3.9 倍増加した。HaCSF 群における摂取開始後 8 時間の水および 0.3 M NaCl の摂取量は、各々 8.5 ± 1.2 ml、 1.5 ± 0.7 ml であった。高張性の aCSF を側脳室に持続的に輸液する事により、0.3 M NaCl の摂取量が等張性の aCSF を輸液した時に比べ有意な低下を示した。平均値で比較すると、HaCSF 群では 8 時間での摂取量は laCSF 群の約 32 % に低下し、コントロールとの差が認められなかった。一方、水の摂取に関しては、HaCSF 群が laCSF 群に比べて飲水開始直後に多量の水を一度に飲む傾向が見られたが、8 時間後の水摂取量は両群間に有意な変化は認められなかった。

摂取開始時を 0 とした累積総水分摂取量、累積尿量および正味の体液量の変化を Figure 2 に示す。コントロールでは、水分バランスは摂取開始前と殆ど変化しなかった ($+1.5 \pm 1.4$ ml)。摂取開始 8 時間後における総水分摂取量は、laCSF 群では 12.9 ± 2.2 ml、HaCSF 群では 10.0 ± 2.1 ml で laCSF 群の方が 0.3 M NaCl 摂取量の多い分、多い傾向を示したが有意な差は認められなかった。しかし、HaCSF 群における正味の水分の増加は、摂取開始 8 時間後では 7.4 ± 1.3 ml で、laCSF 群 (11.9 ± 2.1 ml) に比べて有意に低い値を示した。

Figure 3 は摂取開始時を 0 とした累積ナトリウム摂取量、尿中ナトリウム排泄量、および正味のナトリウム量の変化を示している。摂取開始 8 時間後におけるナトリウム摂取量は HaCSF 群では、laCSF 群に比べて有意に低い値を示し、コントロールと比べて有意な増加がみられなかった。また、尿中へのナトリウムの排泄量は

HaCSF 群では laCSF 群に比べて有意に増加した。その結果、正味のナトリウム量の増加は HaCSF 群では 0.28 ± 0.23 meq となり、laCSF 群の 1.31 ± 0.3 meq に比べて有意に低かった。

Figure 4 は、水およびナトリウムの摂取開始前の損失量に対する摂取開始後 8 時間における水分およびナトリウムの回復のパーセンテージを示している。摂取開始後 8 時間における水分の回復率は、laCSF 群の方が HaCSF 群に比べて高い傾向を示したが、有意な差は認められなかった ($P = 0.09$)。摂取開始 8 時間後のナトリウムの回復率は、laCSF 群では、平均値でほぼ 100 % で、HaCSF 群の 19.4 ± 15.8 % に比べて有意に高い回復率を示した。

4. 考察

4.1. Furosemide 投与による salt appetite の発現

本実験で用いた Furosemide の投与プロトコールにより約 1.3 meq のナトリウムが尿中に排泄された。これは、体重 270 g のラットの総細胞外液内ナトリウム量の約 16 % に相当する。このプロトコールによりラットの 8 時間の 0.3 M NaCl 摂取量は約 4 倍増加し、水分摂取量も有意に増加した。従って、我々が本実験で用いた細胞外液量を減少させるプロトコールはナトリウム欠乏性の salt appetite および細胞外液量の減少による口渴を誘発するのに妥当なプロトコールであると考えられる。また尿は、ほぼ等張性に排泄されているため、摂取開始前の血漿の浸透圧はほぼ一定に保たれていると推定される。

4.2. ナトリウム欠乏性 salt appetite に対する脳脊髄液浸透圧刺激の影響

laCSF 群と HaCSF 群では、摂取開始直前のナトリウムの損失量が等しいにも関わらず、0.3 M NaCl の摂取量は、laCSF において有意に抑制され、コントロールと有意な差がみられなくなった (Fig. 1)。従って浸透圧 (高ナトリウム) 刺激は、ナトリウム欠乏性の salt appetite を抑制することが明らかになった。

Blackburn ら¹⁾ は、polyethylene glycol を皮下に投与し、細胞外液量を減少 (移動) させたラットの血中に高張性の食塩水またはマニトールを投与することによって salt appetite が抑制されることを報告した。しかし、Blackburn らの実験方法では、高張性の溶液を体循環に投与することによって salt appetite を抑制する細胞外液量の増加がおこるといった問題点があり、結果を過大評価する可能性がある。我々の実験方法を用いても同様の結果が得られたことより、浸透圧刺激の salt appetite の抑制に対する影響は、高浸透圧の溶液を体循環に輸液したことによる fluid shift の結果以外のメカニズムが主要な役割を果たしていることが示唆された。

体循環に Angiotensin II を投与しても salt appetite は発現せず、脳室内に

Angiotensin II を投与すると salt appetite が発現することがから、脳内の Angiotensin II が salt appetite に主要な役割を果たしていると考えられている³⁾。実際、ナトリウム欠乏性の salt appetite の発現は、ラットの脳室内に転換酵素の阻害剤である captopril を投与することによって抑制される¹⁴⁾。一方、高浸透圧刺激による口渴および vasopressin 分泌が Angiotensin II の AT1 receptor の阻害剤である Losartan によって抑制されるという報告より^{2, 6)}、高浸透圧刺激による口渴にも Angiotensin II が関与しているものと考えられる。しかし、ナトリウムが欠乏し、浸透圧刺激が加わっている本実験の様な状態で、salt appetite および口渴の各々に対して Angiotensin II がどの部位でどの様に関わっているのかは脳室内にブロッカーを投与する実験からでは説明は不可能であり、新たな研究方法が望まれる。

浸透圧上昇による salt appetite の抑制のメカニズムに関しては、今後の検討課題であるが、脳内の oxytocin および ANP の関与が示唆されている²⁾。また、脳室内に高浸透圧の人工髄液を注入すると、血圧の上昇が起こるが^{5, 11)}、Thrunhorst ら¹⁰⁾が、高圧系の圧受容器からの入力がナトリウム欠乏性の salt appetite に重要な役割を果たしていることを示していることから、血圧の上昇による抑制効果に関しても検討を加える必要があると考えられる。

4.3. 浸透圧刺激のナトリウム欠乏時の水分およびナトリウムバランスに対する影響

本研究では、行動性の体液調節である salt appetite および口渴に加えて、腎臓による水分、ナトリウムの排泄量も測定し体液バランスの変化についても検討した。

本実験においては、HaCSF 群では摂取開始 8 時間後の正味のナトリウム量の増加が laCSF 群に比べて有意に低い値を示した。laCSF 群では、ほぼ摂取前の損失量を 100% 回復したのに対し、HaCSF 群では平均で摂取前のナトリウム損失量の僅か 25% の回復であった (Fig. 4)。この正味のナトリウム量の増加が有意に低下したのは、ナトリウムの摂取量の有意な減少に加えて尿中へのナトリウムの排泄量の有意な増加による。ラットは、浸透圧刺激が加わるとナトリウム利尿がおこる^{7, 11)}。また、脳室内の Angiotensin II がナトリウム利尿に関与していることが知られている¹¹⁾。浸透圧の上昇による血中の oxytocin のナトリウム利尿に対する関与も示唆されている¹²⁾。従って、HaCSF 群で尿中へのナトリウムの排泄量が増加したのは、浸透圧刺激による調節機構であると考えられる。

以上の結果より、浸透圧刺激は、salt appetite を抑制し、更にナトリウム利尿を誘発して、ナトリウム欠乏時のナトリウムバランスの回復を抑制することが明かとなった。

5. 今後の課題

浸透圧刺激がナトリウム欠乏性の salt appetite を抑制することが明かとなったが、浸透圧の低下がナトリウム欠乏性の salt appetite にどの様に影響を及ぼすのかは未だに良く解っていない。Denton らのグループが、髄液ナトリウムの低下が salt appetite を引き起こすことをヒツジで示したが、ラットにおいては髄液のナトリウムの低下だけでは salt appetite が起こらないと報告されている⁴⁾。しかし、ラットで浸透圧刺激がナトリウム欠乏性の salt appetite を抑制することから、髄液のナトリウム濃度が salt appetite の発現の modulator として働いている可能性が示唆された。今後、ナトリウム欠乏性の salt appetite の発現に浸透圧の低下がトリガーとなっているのかを検討したい。そして、浸透圧調節と容量調節が脳内でどの様に協調して機能し、体液の恒常性を維持しているのかを今後更に明らかにしていきたい。

6. 文献

- 1) Blackburn, R.E., W.K. Samson, R. J. Fulton, E.M. Stricker, and J.G. Verbalis. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.* 269: R245-R251, 1995.
- 2) Blair-West, J.R., P. Burns, D.A. Denton, T. Ferraro, M.I. McBurnie, E. Tarjan, and R.S. Weisinger. Thirst induced by increasing brain sodium concentration is mediated by brain angiotensin. *Brain Res.* 637: 335-338, 1994.
- 3) Denton, D.A. *The Hunger for Salt*. Berlin: Springer-Verlag, 1982.
- 4) Epstein, A.N., D. Zhang, J. Schultz, M. Rosenberg, P. Kupsha, and E. Stellar. The failure of ventricular sodium to control sodium appetite in the rat. *Physiol. Behav.* 32: 683-686, 1984.
- 5) Hirose, M., H. Nose, M. Chen, and T. Yawata. Cerebrospinal fluid sodium concentration and osmosensitive sites related to arterial pressure in anaesthetized rats. *Pflügers Arch.* 431: 807-813, 1996.
- 6) Hogarty, D.C., D.N. Tran, and M.I. Phillips. Involvement of angiotensin receptor subtypes in osmotically induced release of vasopressin. *Brain Res.* 637: 126-132, 1994.
- 7) McKinley, M.J., D.A. Denton, J.F. Nelson, and R.S. Weisinger. Dehydration induces sodium depletion in rats, rabbits, and sheep. *Am. J. Physiol.* 245: R287-R292, 1983.
- 8) Sugimoto, E. Analysis of salt and water intake by continuous determination of blood volume and plasma sodium concentration. *Jpn. J. Physiol.* 38: 519-529, 1988.
- 9) Takamata, A., G.W. Mack, C.M. Gillen, and E.R. Nadel. Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement. *Am. J. Physiol.* 266: R1493-R1502, 1994.
- 10) Thunhorst, R.L., and D.A. Fitts. Peripheral angiotensin causes salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.* 267: R171-R177, 1994.

- 11) Rohmeiss, P., C. Beyer, E. Nagy, C. Tschöpe, S. Höhle, M. Strauch, and T. Unger. NaCl injections in brain induce natriuresis and blood pressure responses sensitive to ANG II AT1 receptors. *Am. J. Physiol.* 269: F 282-F288, 1995.
- 12) Verbalis, J.G., M.P. Mangione, and E.M. Stricker. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology* 128: 1317-1322, 1991.
- 13) Weisinger, R.S., D.A. Denton, M.J. McKinley, and J.F. Nelson. Dehydration-induced sodium appetite in rats. *Physiol. Behav.* 34: 45-50, 1985.
- 14) Weiss, M.L., K.E. Moe, and A.N. Epstein. Interference with central actions of angiotensin II suppresses sodium appetite. *Am. J. Physiol.* 250: R250-R259.
- 15) Yawata, T., T. Okuno, H. Nose, and T. Morimoto. Change in salt appetite due to rehydration level in rats. *Physiol. Behav.* 40: 363-368, 1987.

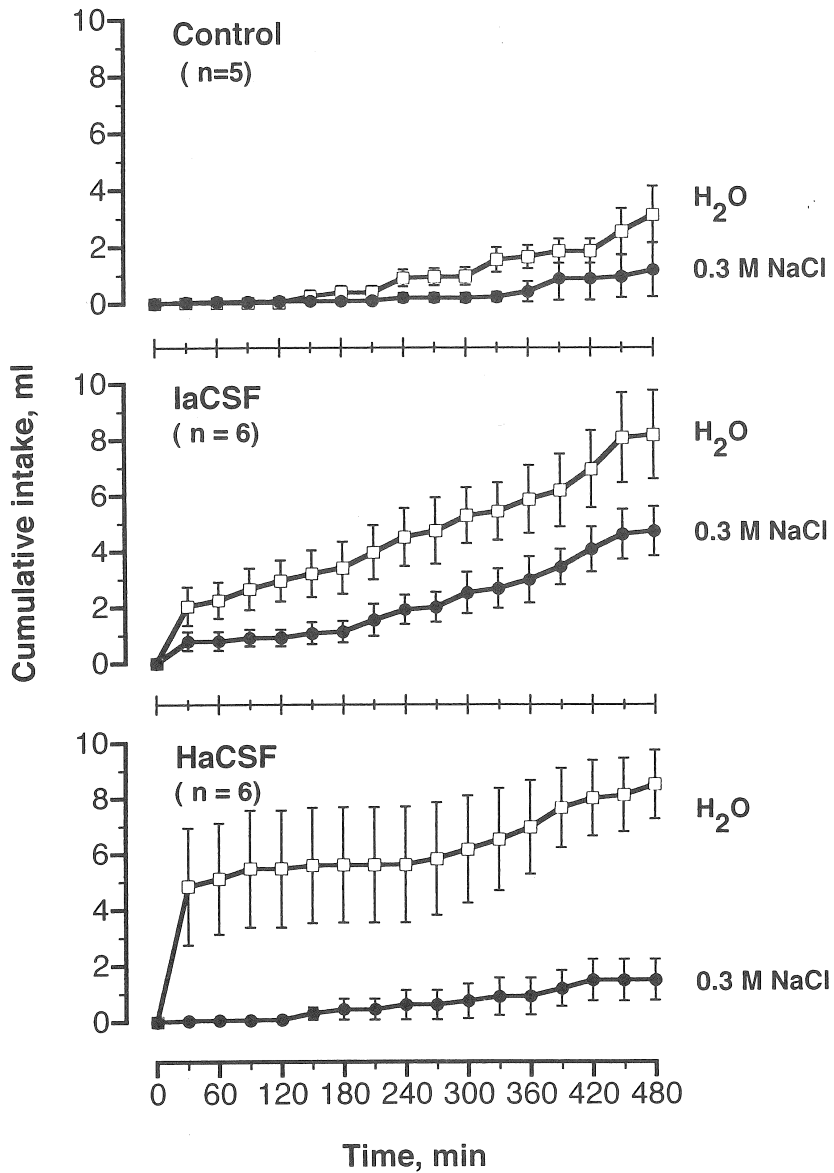


Figure 1. Cumulative intake of water and 0.3 M NaCl solution following i.p. injection of saline (control) or furosemide (laCSF and HaCSF). laCSF, isotonic artificial CSF infusion; HaCSF, hypertonic artificial CSF infusion. Values are mean \pm SE.

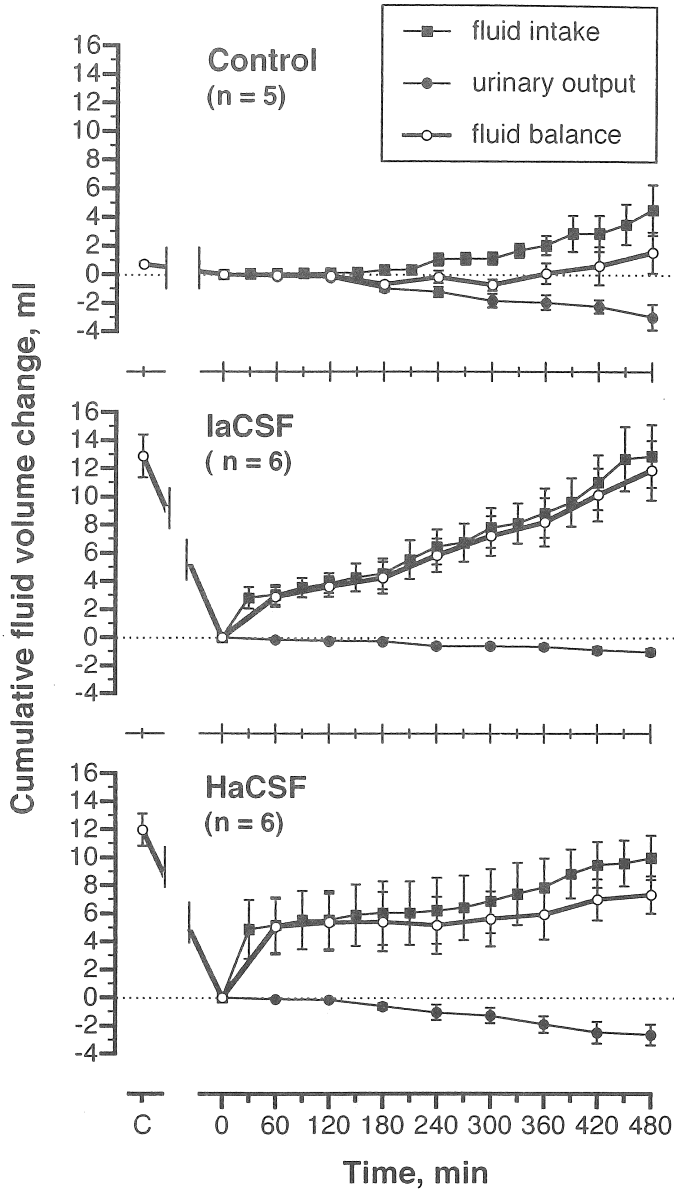


Figure 2. Total fluid intake, urinary fluid loss, and change in total body fluid volume from 0 min of the access period. C on the time scale indicates the time before i.p. saline or furosemide injection. Values are mean and S.E.

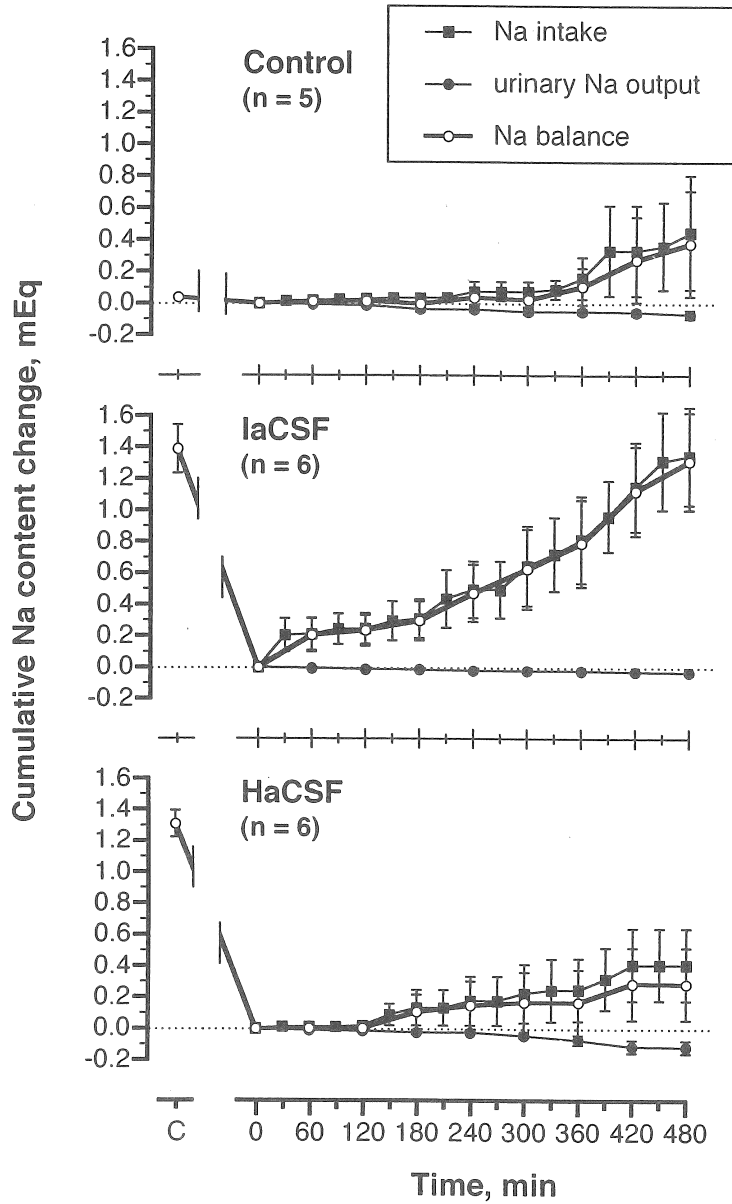


Figure 3. Sodium intake, urinary sodium loss, and sodium balance from 0 min of the access period. C on the time scale indicate the time before i.p. saline or furosemide injection. Values are mean \pm S.E.

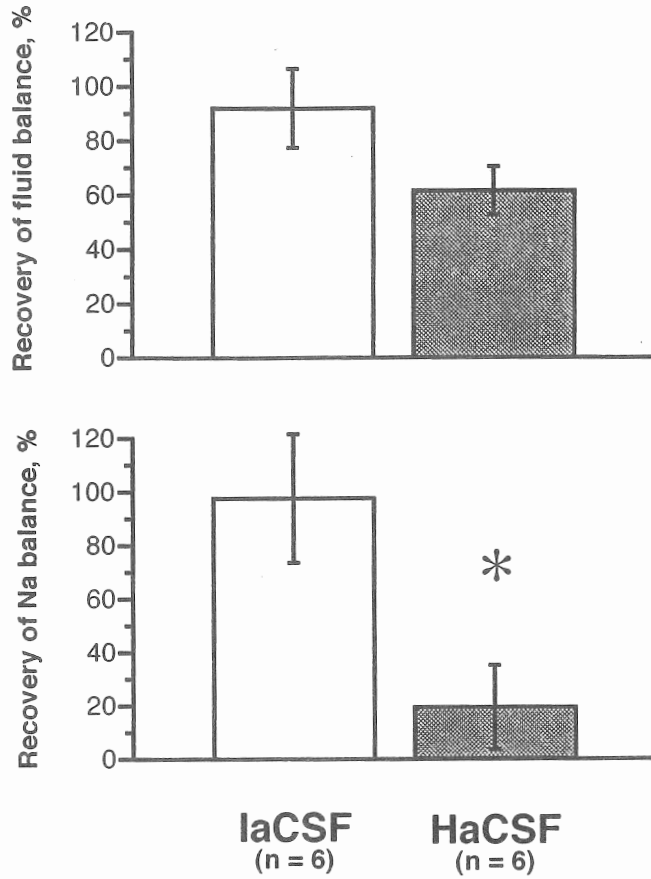


Figure 4. Recovery ratio of fluid volume and Na during the 8 h access period from furosemide induced depletion. Values are mean and SE.

Effect of cerebrospinal fluid hyperosmolality on sodium depletion-induced salt appetite in rats

Akira Takamata, Taketoshi Morimoto, and Hiroshi Nose*

Department of Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kamigyo-ku, Kyoto, 602, Japan.

* Present address: Department of Sports Medicine, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, 390, Japan.

Summary

We examined the effect of cerebrospinal fluid (CSF) hyperosmolality on sodium depletion-induced salt appetite in rats. Sodium depletion was produced by two injections of furosemide (5mg/rat; i.p.), 2 h apart. Following the 2nd furosemide injection rats were infused either isotonic artificial CSF (IaCSF; [Na] = 150 mM) or hypertonic artificial CSF (HaCSF; [Na] = 500 mM) at a rate of 36 μ l / h. One hour after the onset of infusion, access to water and 0.3 M NaCl solution was provided. Na content reduced by 1.3 - 1.4 meq, which is corresponding to the Na content of more than 15 % of total extracellular fluid Na, and water by 12-13 ml before the access was provided. Furosemide treatment induced salt appetite and thirst, the intake of 0.3 M NaCl increased about 4 times more and water intake about 2.5 times more than sodium repleted control rats during 8 h access period, which were injected with saline instead of furosemide. Intracerebroventricular infusion of HaCSF significantly attenuate 0.3 M NaCl intake in sodium depleted rats, the 0.3 M NaCl intake for 8 h in HaCSF infused rats reduced to only 32 % of IaCSF infused rats, which was not different from control rats. Water intake was not significantly influenced by the infusion of HaCSF. The Na excretion into the urine increased in HaCSF infused rats compared to IaCSF infused rats. The rats infused with IaCSF recovered almost 100 % of total Na loss induced by the furosemide treatment, while the recovery ratio of Na during the 8 h access period in HaCSF infused rats was only 20 % of total Na loss. These results indicate that increased CSF osmolality inhibits salt appetite and also induces natriuresis, which results in a large Na deficit during the 8 h access period.