

助成番号 9923

食塩感受性高血圧にみられる神経性NOによる交感神経活動調節異常

助成研究者：西田 育弘 (防衛医科大学校 生理学第二講座)

共同研究者：陳 慶輝 (テキサス大学 医学部 生理学講座)

晝間 恵 (防衛医科大学校 生理学第二講座)

一酸化窒素合成酵素 (NOS) は中枢神経系に広く存在が認められ、この酵素活性を阻害すると末梢交感神経活動に影響することが知られている。しかしこの反応は、動脈圧受容器反射系が正常の動物では圧受容器反射によりマスク・修飾されるため、神経性 NOS による末梢交感神経への影響は明確でない。一方、食塩感受性高血圧実験モデル動物である Dahl 食塩感受性高血圧 (S) ラットでは L-Arginine-Nitric Oxide 系に異常のあることが認められ、血圧調節異常との関係が論じられている。本研究では、神経性 NOS 阻害剤である 7-nitroindazole (7NI) を用い、S ラットの末梢交感神経活動に対する影響を調べ、さらにこの食塩感受性高血圧モデルにおける神経性 NO による調節異常を調べた。

【方法】S 及び食塩抵抗性 (R) ラットに、正常食塩食または高食塩食を 4 週間負荷した (4 実験動物群)。その後、意識下にて腎交感神経活動 (RSNA) を測定し、7NI (50 mg/kg) 腹腔内投与により神経性 NO 産生を阻害し、安静時 (resting) RSNA への効果を観察した。さらに 7NI 投与前後にて、下大静脈閉塞による動脈圧のランプ状降圧により、圧受容器反射による交感神経抑制を解除した RSNA (BR-unloaded RSNA) への影響も観察した。

【結果】高食塩食 S ラットでは、7NI により動脈圧が 15 ± 3 mmHg 増加し、かつ resting RSNA も $24 \pm 3\%$ から $38 \pm 6\%$ へ増加した。この時、BR-unloaded RSNA は 100% から $278 \pm 16\%$ へ著明な増加を示した。他 3 群のラットでは、resting RSNA には影響なかったが、BR-unloaded RSNA には、正常食塩食 S ラットでは $179 \pm 15\%$ へ、高食塩食 R ラットでは $177 \pm 15\%$ へ、正常食塩食 R ラットでは $133 \pm 4\%$ へ、それぞれ増加した。7NI の代わりに vehicle を投与したがいずれも効果がなかった。続けて L-arginine (100 μ mole/kg/min, 10 分間) 投与すると、高食塩食 S ラットのみ resting RSNA 及び BR-unloaded RSNA の両者に抑制が見られた。7NI 投与後、L-arginine を同量投与すると、7NI 単独投与により誘発された resting RSNA や BR-unloaded RSNA の変化はいずれも、どのラット群でも見られなくなった。

【結論】神経性 NO は、圧受容器反射による抑制がなければ、食塩負荷をしていない正常ラットでも交感神経活動を抑制していると思われる。従って、神経性 NO は、正常ラットの交感神経活動を、圧受容器反射系により抑制がかかる前段階で、抑制的に制御していると考えられる。食塩感受性高血圧では、この抑制が著明に強いいため、神経性 NO 性交感神経抑制機能が明確にみられる。今後、このメカニズムを解明したいと考える。

4

助成番号 9923

食塩感受性高血圧にみられる神経性NOによる交感神経活動調節異常

助成研究者：西田 育弘 (防衛医科大学校 生理学第二講座)

共同研究者：陳 慶輝 (テキサス大学 医学部 生理学講座)

晝間 恵 (防衛医科大学校 生理学第二講座)

1. 研究目的

本研究の目的は、新しい強力な生体調節因子として注目を浴びている一酸化窒素 (NO)、なかでも神経性 NO による交感神経活動調節異常と食塩感受性高血圧との関連を調べることである。

1987年に一酸化窒素 (NO) が新しい信号伝達物質であることが証明された当初より、神経系に比較的大量の NO 産生酵素 (NOS) が存在することがわかっていた (1)。また同時に、中枢神経へも強い制御作用を持つことが推定されたが (1)、神経性 NOS (nNOS) ノックアウトによる研究では著名な影響がないと報告 (3) されたことから次第に注目されなくなった。

しかしながらその後、免疫組織化学的手法などによりラット (3) やヒト (4) の中枢神経系や末梢自律神経系 (5) に広く NOS の存在することが確立された。また、NO donor や NOS 阻害剤などの脳内微量注入により循環中枢ニューロンに強い影響を及ぼすことが報告され (6、7)、神経性 NO が交感神経活動調節に関与していること確信されるようになった。ところがその影響は、促進するとの報告 (8)、抑制との報告 (9)、さらに非常に弱いとの報告 (10) があり、方向性さえも一定しなかった。Sakuma ら (11) は、当初より圧受容器反射をブロックしておけば、NOS を全身性に阻害すると交感神経を促進することを示していた。

一方、食塩感受性高血圧は NO 産生異常と密接な関係にあることが報告されており (12、13)、L-Arginine-Nitric Oxide 系に異常があるとされている。しかし、神経性 NO と食塩感受性高血圧との関わりについては報告がない。

本研究では、神経性 NOS 阻害剤である 7-nitroindazole (7NI) を用い、圧受容器反射による交感神経活動の修飾を解除することにより、ラットの末梢交感神経活動に対する神経性 NO の影響を調べた。さらに食塩感受性高血圧モデルにおける神経性 NO による調節異常について、同様の方法を用いて調べた。

2. 研究方法

Dahl 食塩感受性 (S) ラットに高食塩食 (8% NaCl 含有、S 8%群、n=9) または正常食塩食 (0.4% NaCl 含有、S 0.4%群、n=8) を、また Dahl 食塩抵抗性 (R) ラットに高食塩食 (R 8%群、n=8) または正常食塩食 (R 0.4%群、n=9) を、それぞれ8週齢から12

週齢に渡って4週間投与し、4群の実験群を作成した。

この食塩負荷期間中、ネンブタール麻酔下に開胸手術を無菌的に行い、下大静脈へ血管閉塞するためのオクルーダーを装着した。実験2日前、再度ネンブタール麻酔下に、動静脈カテーテルと腹腔内カテーテルおよび腎交感神経電極を埋め込み、各種カテーテルや電極の他端は皮下を通し、後頸部より出して置いた。

実験当日、ラットを飼育ケージごとシールドボックス内に移し、ラットが安静化するのを待って意識下かつ無拘束下で以下の実験を行った。神経活動測定用電極は交感神経計測機に、動脈カテーテルは圧トランスデューサーに各々接続し、腎交感神経活動（RSNA）、動脈圧（AP）、平均動脈圧（MAP）、瞬時心拍数（HR）を測定した。これらのデータはアナログレコーダーに記録すると共に、デジタル変換し（サンプリング速度：100Hz）コンピュータに記録した。安静時データを記録した後、下大静脈閉塞用オクルーダー・カテーテルに生食入りのシリンジを接続し、シリンジ・ポンプでゆっくり注入して動脈圧をランプ状に低下させた（Fig.2, Fig.4）。これにより、動脈圧および右心房圧を下げ、圧受容器からの信号を微小にし、圧受容器反射性交感神経抑制を解除した時のRSNA（BR-unloaded RSNA）を計測した。静脈カテーテルにはフェニレフリン（50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を接続し、動脈圧上昇によりRSNAのゼロレベルを確認した（Fig. 2, Fig. 4）。これらの操作を、7-nitroindazole（50 mg/kg、307 $\mu\text{mole}/\text{kg}$ に相当）の腹腔内投与によるnNOSブロック前（コントロールフェーズ）後（nNOS-ブロックフェーズ）、或いはまた、L-arginine（100 $\mu\text{mole}/\text{kg}$ ）の静脈内投与によるNO産生促進の前（コントロールフェーズ）後（nNOS-活性高進フェーズ）で行い、AP、MAP、HR、RSNA、及び平均RSNA（mean RSNA）への影響を観察・記録した。

RSNAはコントロールフェーズのunloaded RSNA値を100%として、各ラット毎に相対値（%）で標示した。また、各測定値は平均値 \pm 標準誤差で標示した。統計には、1変数を4群間で比較する時には、one-way ANOVA および Fisher's PLSD を、1変数を薬物投与の前後で4群間を比較する時には、two-way ANOVA および Contrast test を用いた。

3. 研究結果

3.1 安静時データ

4ラット群における安静時データをTable 1に示す。安静時動脈圧は、S 8%群のみで高値を示した。HRやRSNAには、4群間に差を認めなかった。

3.2 7-nitroindazoleによりnNOSをブロックした効果

Fig.1はR 0.4%群に7-nitroindazoleを投与した例を示した。意識下腹腔内投与によりラットは一時安静をなくすが、やがて安静を取り戻し、データが落ち着き、MAPやRSNAはコントロールレベル近くに戻った。7-nitroindazole投与前後で下大静脈のオクルーダーを膨張させBR-unloaded RSNAを得、これを比較した。Fig.2に示すように、投与後やや

増加した。Fig.3 は S 8%群に 7-nitroindazole を投与した例を示す。血圧や HR のデータが安定となっても RSNA は増加を示した。この時、BR-unloaded RSNA は投与前と比較して著明な増加が認められた (Fig.4)。

各ラット群毎の平均値を Fig.5 に示した。MAP は、 153 ± 4 mmHg から 167 ± 5 mmHg へ (Δ MAP : 14.7 ± 2.9 mmHg、S 8%群)、 104 ± 3 mmHg から 121 ± 3 mmHg へ (Δ MAP : 16.2 ± 2.3 mmHg、S 0.4%群)、 96 ± 3 mmHg から 110 ± 4 mmHg へ (Δ MAP : 13.8 ± 2.1 mmHg、R 8%群)、 97 ± 2 mmHg から 110 ± 2 mmHg へ (Δ MAP : 13.0 ± 2.2 mmHg、R 0.4%群)、いずれの群でも増加し、その増加分には 4 群間に差がなかった。RSNA は、S 8%群のみ 24.5 ± 3.2 % から 37.8 ± 5.7 % へ増加したが、他 3 群では有意な変化は見られなかった。unloaded RSNA はコントロールフェーズの 100% から、 278 ± 16 % (S 8%群)、 179 ± 15 % (S 0.4%群)、 177 ± 15 % (R 8%群)、 132 ± 4 % (R 0.4%群) へ増加した。Fisher の PLSD にて S 8%群は他群より有意に高く、R 0.4%群は他群より有意に低いと示された。

3.3 7-nitroindazole の vehicle (peanut oil 10 ml/kg) を投与後、L-arginine により NO 産生を促進した効果

vehicle の腹腔内投与では MAP、RSNA、unloaded RSNA のいずれにも有意な変化は見られなかった。

Fig.6 は、vehicle 投与後に L-arginine を投与した前後で各群の平均値の比較を示した。MAP はいずれの群でも有意な差は見られなかった。RSNA は S 8%群のみに 28.2 ± 2.1 % から 16.0 ± 3.0 % への低下が見られたが、他 3 群では有意な変化は見られなかった。unloaded RSNA は S 8%群のみに 107.7 ± 6.0 % から 69.2 ± 4.7 % へ減少を示したが、他 3 群では有意な変化が示されなかった。

3.4 7-nitroindazole による前処置後、L-arginine を投与した効果

Fig.7 は、7-nitroindazole 投与後に L-arginine を投与した前後で各群の平均値の比較を示した。MAP は、 163 ± 6 mmHg から 154 ± 6 mmHg へ (S 8%群)、 120 ± 3 mmHg から 114 ± 3 mmHg へ (S 0.4%群)、 106 ± 4 mmHg から 99 ± 4 mmHg へ (R 0.4%群)、 112 ± 3 mmHg から 103 ± 2 mmHg へ (R 0.4%群)、と変化したがいずれも有意差が得られなかった。RSNA は、S 8%群では 38.5 ± 4.8 % から 37.8 ± 4.7 % へと、前処置なしに L-arginine 投与した時にみられた低下は見られなくなった。他 3 群では、7-nitroindazole の単独投与と同様に変化は見られなかった。unloaded RSNA も、S 8%群では 270.4 ± 17.6 % から 264.5 ± 20.1 % へとやはり、前処置なしに L-arginine 投与した時にみられた低下は見られなくなった。他 3 群に変化はなかった。

3.5 D-arginine を投与した効果

L-arginine 投与のコントロールとして D-arginine $100 \mu\text{mole/kg/min}$ を 10 分間行い、その効果を測定した。いずれの群でも、MAP、RSNA、unloaded RSNA に有意な変化はみられなかった。

4. 考察

nNOS の阻害剤、7-nitroindazole を投与すると、いずれのラット群でも MAP が約 15 mmHg ほど上昇する。同時に、食塩感受性高血圧群（S 8%群）では RSNA が高進し、他群では RSNA に変化が見られなかった。これらの現象は、フェニレフリンで血圧を上げた場合に見られる交感神経活動抑制とは異なる。そこで、動脈圧を充分下げ、圧受容器反射による交感神経抑制を解除した時の交感神経活動を記録し、nNOS を阻害した影響を観察した。食塩感受性高血圧群では、圧受容器反射性抑制を解除した交感神経活動が約 3 倍もの著明な高進をした。他群でも、圧受容器反射性抑制を解除した交感神経活動の上昇が見られ、食塩抵抗性ラットに正常食塩食を与えた、いわゆるコントロール群でさえも約 1.3 倍の高進を示した。従って、7-nitroindazole は圧受容器反射により抑制される前段階の交感神経活動を高進させたと考えられる。この交感神経高進作用が、血圧の変化や RSNA の変化に影響を与えたと考えられる。

食塩感受性高血圧ラットでは、L-arginine により安静時交感神経活動の抑制および圧受容器反射性抑制を解除した交感神経活動の抑制の両者が見られた。この反応は、D-arginine では見られず、また、7-nitroindazole の前処置でブロックされる。これらの結果から、L-arginine の効果は NO 産生高進に基づき、また、7-nitroindazole の効果は nNOS ブロックによる神経性 NO 産生抑制に基づいたものと推定された。

しかしながら、L-arginine の効果は他の正常血圧群では見られなかった。7-nitroindazole 単独投与の結果を考え合わせると、食塩感受性高血圧群では nNOS による交感神経抑制系が著明に発達しており、7-nitroindazole や L-arginine の効果が明確に現われた。がしかし、正常血圧群では nNOS 性抑制系が弱いため L-arginine の効果が他の機能にマスクされてしまったのではないかと推測された。

以上の結果より、神経性 NO は、圧受容器反射により抑制がかかる前段階の交感神経活動を、正常血圧ラットでも抑制していると思われる。従って、神経性 NO は、交感神経の抑制性制御系であると考えられる。さらに、食塩感受性高血圧では、この抑制系が著明に高進していると考えられた。

5. 今後の課題

これの研究には 2 つの問題点があると思われた。第一は、7-nitroindazole は nNOS に特異性が低いとの報告 (14) があるため、今回の結果は、これらのデータだけから、神経性 NO による作用と断定できるか、という問題である。第二は、各種ブロッカーを全身投与しているため、その作用臓器を特定することが困難である点である。さらに、1 つの疑問点が残された。食塩感受性高血圧では、血管に見られる eNOS が正常血圧の血管のそれと比べると減少している、と報告されている (15)。今回、本研究の結果からは、nNOS

の量が上昇していると推定され、この過去の報告と対立する。

これらの問題点や疑問点を解決するためには、1) 食塩感受性高血圧ラットの脳内 nNOS の量を測定し、他の正常血圧群と比較すること、2) nNOS の阻害剤はいずれもその特異性に劣るため、nNOS のアンチセンスを脳室内投与し、今回の結果を確認すること、が各々必要であると考えられる。

6. 文献

1. Bredt, D.S., Hwang, P.M. and Snyder, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770, 1990.
2. Huang, P.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H. and Fishman, M.C. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*: 75:1273-1286, 1993.
3. Vincent, S.R. and Kimura, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neurosci.* 46: 755-784, 1992
4. Egberrongbe, Y.I., Gentleman S.M., Falkai, P., Bogerts, B., Polak, J.M., and Roberts, G.W. The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neurosci.* 59: 561-578, 1994.
5. Ceccattelli, S., Lundberg, J.M., Zhang, X., Åman, K., and Hökfelt, T. Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral autonomic nervous system. *Brain Res.* 656: 381-395, 1994.
6. Harada, S., Tokunaga, S., Momohara, M., Masaki, H., Tagawa, T., Imaizumi, T. and Takeshita, A. Inhibition of nitric oxide formation in the nucleus tractus solitarius increases renal sympathetic nerve activity. *Circ. Res.* 72: 511-516, 1993.
7. Tseng, C.J., Liu, H.Y., Lin, H.C., Ger, L.P., Tung, C.S. and Yen, M.H. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension* 27: 36-42, 1996.
8. Hakim, M.A., Hirooka, Y., Coleman, M.J., Bennett, M.R., and Dampney, R.A.L. Evidence for a critical role of nitric oxide in the tonic excitation of rabbit renal sympathetic preganglionic neurons. *J. Physiol.* 482: 401-407, 1995.
9. Zanzinger, J., Czachurski, J., and Seller, H. Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 268: R958-R962, 1995.
10. Hansen, J., Jacobsen, T.N. and Victor, R.G. Is nitric oxide involved in the tonic inhibition of sympathetic outflow in humans? *Hypertension* 24: 439-444, 1994.
11. Sakuma, I., Togashi, H., Yoshioka, Y., Saito, H., Yanagida, M., Tamura, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Gross, S.S. and Levi, R. NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo.

- Circ. Res.: 607-611, 1992.
12. Chen, P.Y. and Sanders, P.W. Role of nitric oxide synthase in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *Hypertension* 22: 812-818, 1993.
 13. Nishida, Y., Ding, J., Zhou, M.S., Chen, Q.H., Murakami, H., Wu, X.Z. and Kosaka, H. Role of nitric oxide in vascular hyper-responsiveness to norepinephrine in hypertensive Dahl rats. *J. Hypertens.* 16: 1611-1618, 1998.
 14. Zagvazdin, Y., Sancesario, G., Wang, Y.X., Share, L., Fitzgerald, M.E.C. and Reiner, A. Evidence from its cardiovascular effects that 7-nitroindazole may inhibit endothelial nitric oxide synthase in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 303: 61-69, 1996.
 15. Hayakawa, H. and Raiji, L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension*: 235-241, 1997.

R 0.4%

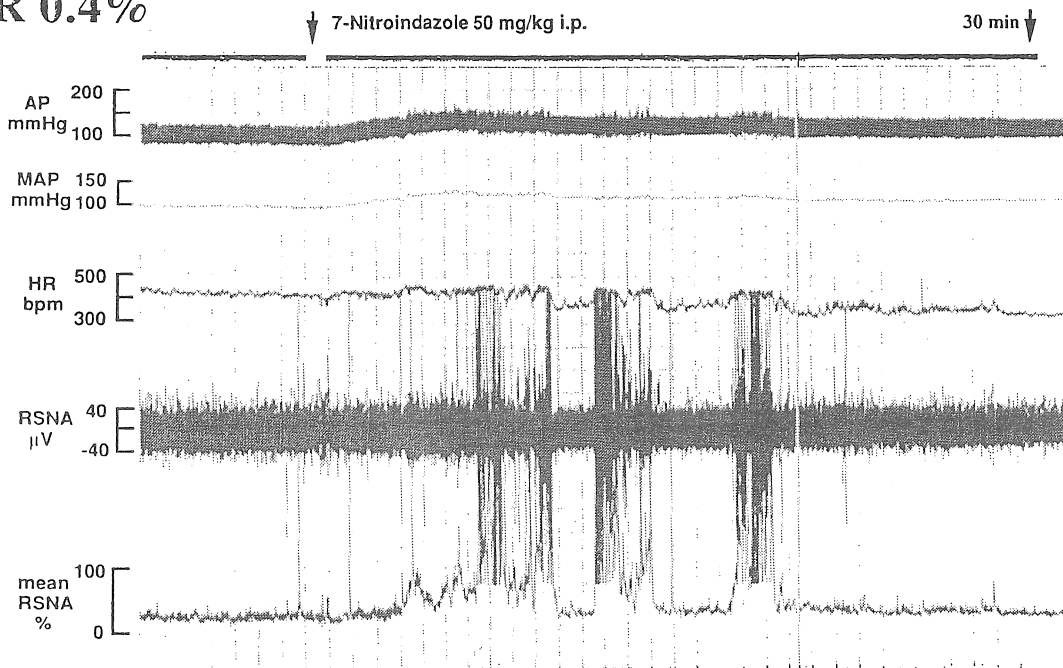


Fig. 1 — 1 min

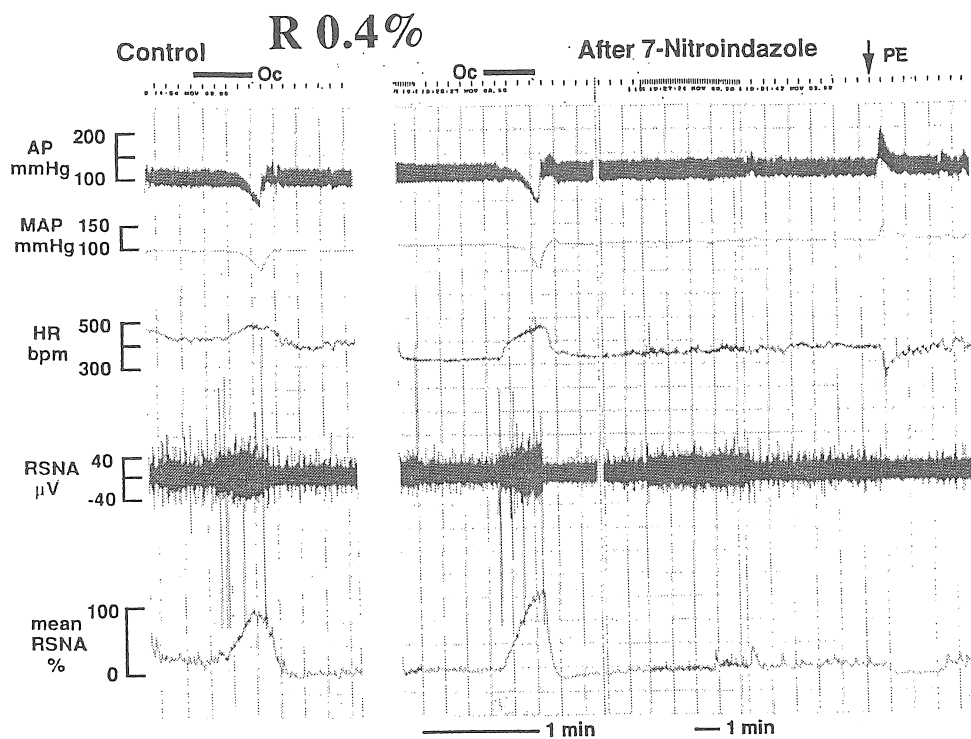


Fig. 2

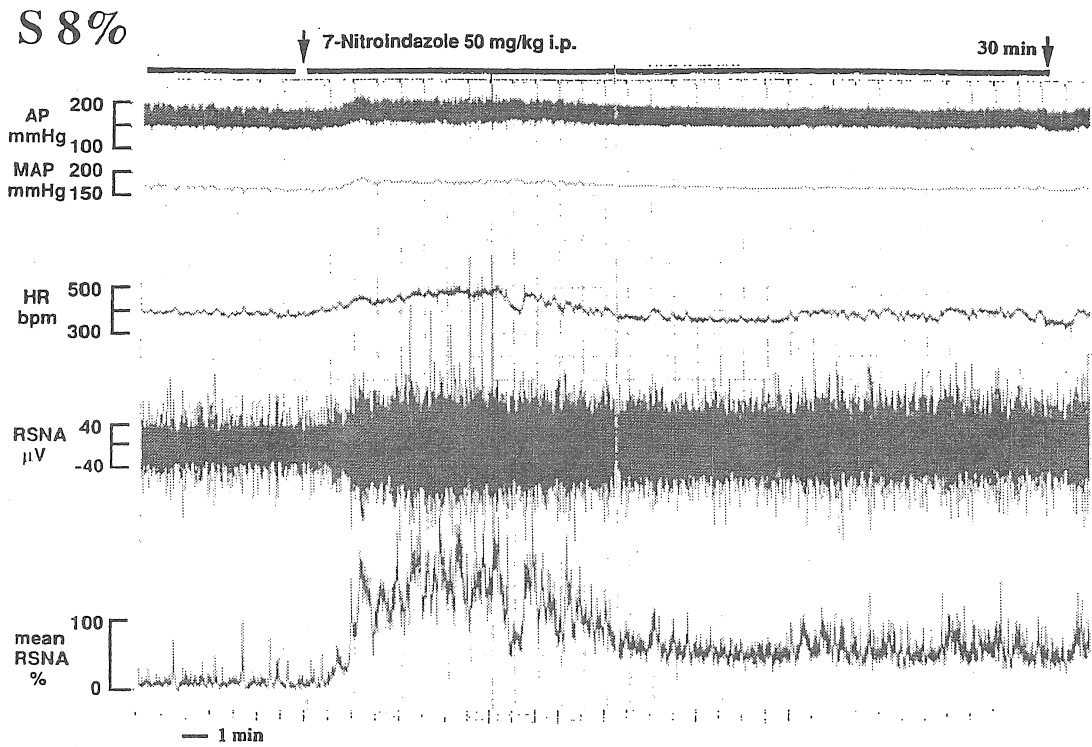


Fig. 3

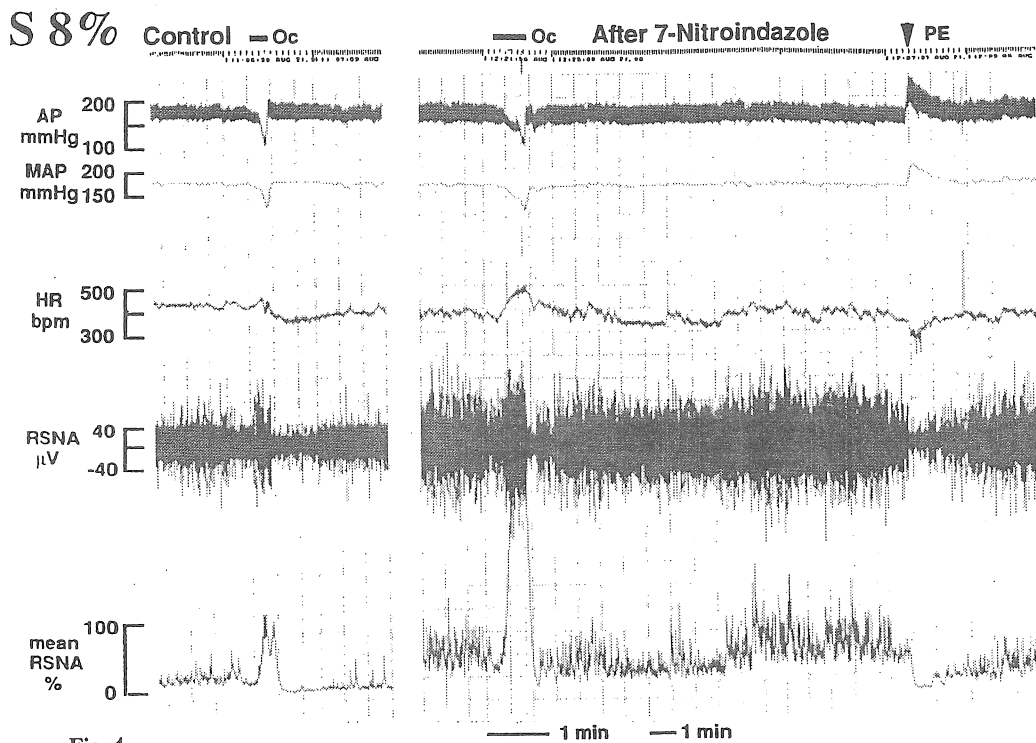


Fig. 4

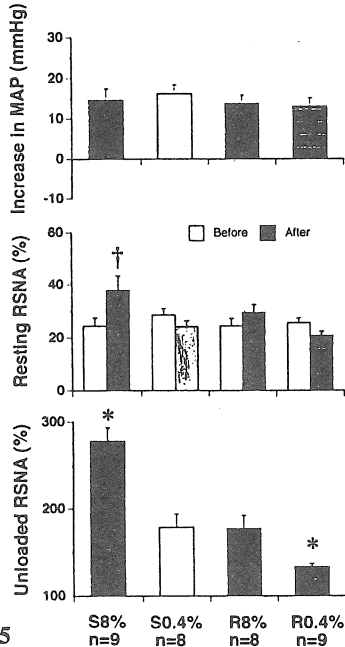


Fig. 5

Effects of 7-nitroindazole (307 μ mole/kg i.p.) on MAP, resting RSNA, and baroreceptor-unloaded RSNA. †, $p < 0.05$ vs other groups (two-way ANOVA, Contrast). *, $p < 0.05$ between 4 rat-groups.

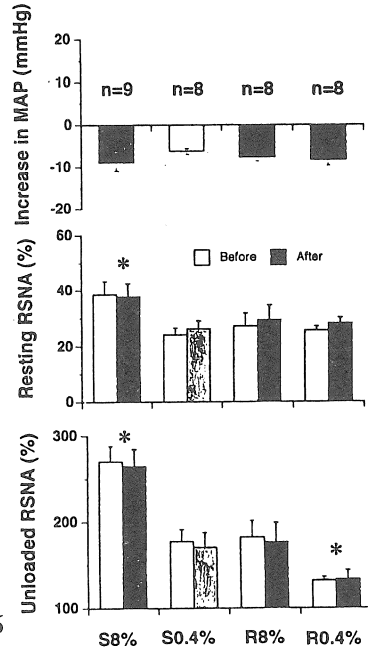


Fig. 6

Effects of L-Arginine (100 μ mole/kg/min for 10 min) with 7-nitroindazole on MAP, resting RSNA, and baroreceptor-unloaded RSNA. *, $p < 0.05$ between 4 rat-groups. No significant effect of L-Arginine was detected on RSNA.

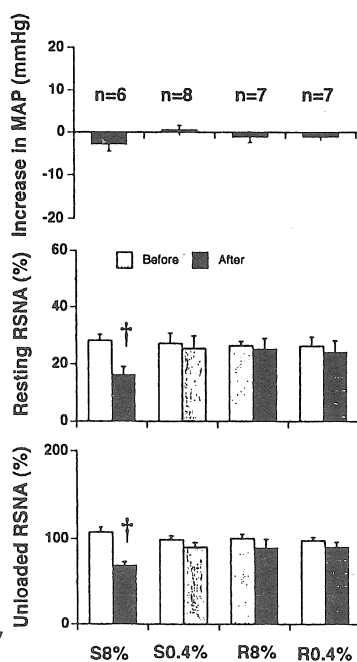


Fig. 7
 Effects of L-Arginine (100 μ mole/kg/min for 10 min) with Peanut Oil on MAP, resting RSNA, and baroreceptor-unloaded RSNA: †, $p < 0.05$ vs other groups.

Table 1. Resting levels of MAP, HR and %RSNA in control phase in each of 4 rat-groups.

	MAP (mmHg)	HR (bpm)	%RSNA (%)
S 8% (n=9)	153 \pm 4*	392 \pm 11	24.4 \pm 3.2
S 0.4% (n=8)	104 \pm 3	378 \pm 15	28.6 \pm 2.4
R 8% (n=8)	96 \pm 3	373 \pm 16	24.7 \pm 2.6
R 0.4% (n=9)	97 \pm 2	393 \pm 11	25.6 \pm 1.8

*, $p < 0.05$ between 4 rat-groups (One-way ANOVA, Fisher's PLSD)

Neural NO-mediated Super-suppression of Sympathetic Outflow
in Dahl Salt Hypertensive Rats.

Yasuhiro Nishida¹, Megumi Tandai-Hiruma¹, Chen Qing Hui²

¹National Defense Medical College, Department of Physiology,

²University of Texas Health Science Center at San Antonio, Department of Physiology.

Summary

Histochemical studies have shown a widespread distribution of nitric oxide synthase (NOS) in the brain. Systemic inhibition of NOS activity stimulates sympathetic outflow in baroreceptor-denervated animals, which is counteracted with pressor effect-elicited baroreflex in intact animals. On the other hand, Dahl salt-sensitive rats have been reported to have dysfunction in the L-arginine-nitric oxide (NO) system. We then investigated the effects of 7-nitroindazole, an inhibitor of neural NOS, on sympathetic outflow in Dahl rats.

Methods: Dahl salt-sensitive (DS) and -resistant (DR) rats were fed a regular salt (0.4% NaCl) or a high salt (8% NaCl) diet for 4 weeks. Using conscious rats instrumented chronically, renal sympathetic nerve activity (RSNA) was measured in both baroreceptor (BR)-loaded and -unloaded states. The BR unload was performed by decreasing arterial pressure with occlusion of the inferior vena cava.

Results: The neural NOS inhibitor increased resting RSNA from $24 \pm 3 \%$ to $38 \pm 6 \%$ with an increase of mean arterial pressure by 15 ± 3 mmHg and BR-unloaded RSNA from 100 % to $278 \pm 16 \%$ in high salt-DS rats (n=9). However, the inhibitor did not increase resting RSNA in other rat-groups but increased BR-unloaded RSNA from 100 % to $179 \pm 15 \%$, $177 \pm 15 \%$, or $133 \pm 4 \%$ in regular salt-DS (n=8), high salt-DR (n=8), or regular salt-DR rats (n=9), respectively. High salt diet significantly furthermore increased the BR-unloaded RSNA than regular salt diet did in Dahl rats. A vehicle of the inhibitor did not show any effect in each group of rats. After vehicle, L-arginine (100 μ mole/kg/min for 10 min) decreased both resting and unloaded RSNA in just high salt-DS rats. After the inhibitor, the L-arginine did not show any effect on resting or unloaded RSNA in each rat-group.

Conclusion: Neural NO may suppress sympathetic outflow even in normal diet or salt-resistant rats. This neural NO-mediated regulation of sympathetic outflow may markedly enhanced by salt load in Dahl rats. These findings suggest that neural NO may super-suppress sympathetic outflow in Dahl salt hypertensive rats.