

助成番号 9928

門脈-肝臓領域 Na^+ 、 K^+ 受容器を介する体液調節機構に関する研究

助成研究者：森田 啓之 (岐阜大学 医学部 第一生理学講座)

共同研究者：中島 茂 (岐阜大学 医学部 第一生理学講座)

我々は門脈-肝臓領域 Na^+ 受容器が体液恒常性維持に重要な役割をはたしていることを報告してきた。この調節系の求心路は肝動脈周囲の肝神経であり、遠心路は腎交感神経である。また、中枢経路には孤束核、最後野、室傍核、視索上核等が含まれている。しかし、門脈-肝臓領域 Na^+ 受容器の Na^+ 感知機構に関しては未だ明らかでない。門脈-肝臓領域以外の場所に存在する Na^+ 受容器として、味蕾および macula densa (Na^+ 受容器というよりはむしろ Cl^- 受容器) が知られており、それぞれ amiloride-sensitive Na^+ channel および $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter を介し Na^+ 濃度を感知することが知られている。門脈-肝臓領域 Na^+ 受容器も同様に何らかの Na^+ 輸送機構を介して、 Na^+ を感知しているものと考えられる。従って、本研究の目的はこの仮説を確かめることである。さらに、研究過程で Na^+ 感知機構に $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter が関与していることが明らかになり、この受容器は K^+ 受容器として働く可能性が示された。従って、第2の目的は門脈-肝臓領域 K^+ 受容器の生理的役割を検討することである。

全ての実験はペントバルビタール麻酔下の Sprague Dawley ラットを用いておこなった。肝門脈内に 0.75 M NaCl 溶液を投与すると、肝臓求心神経活動は投与量依存性に増加した。Amiloride および SITS 前処置は肝臓求心神経活動応答に有意な影響を与えなかったが、ouabain, furosemide, bumetanide 前処置により肝臓求心神経活動応答は用量依存性に抑制された。また、この神経は肝門脈内等張 KCl + NaCl 溶液投与に対しても K^+ 濃度依存性に神経活動が増加し、その応答も bumetanide 前処置により用量依存性に抑制された。従って、門脈-肝臓領域に Na^+ 、 K^+ 受容器が存在し、その感知機構に $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter が関与していると推測される。さらに、門脈-肝臓領域 K^+ 受容器の役割を調べるため、50 mM KCl + 100 mM NaCl 溶液投与に対する尿中 K^+ 排泄量を下大静脈内投与と肝門脈内投与とで比較した。肝門脈内投与時の応答は下大静脈内投与時の応答に比し、有意に大きく、しかもその応答は迅速、強烈であり、投与終了後 30 分で投与総量とほぼ等しい K^+ が排泄された。この肝門脈内投与に対する尿中 K^+ 排泄増加応答は肝臓除神経により抑制された。従って、肝門脈内 50 mM KCl + 100 mM NaCl 溶液投与による尿中 K^+ 排泄量増加応答は、門脈-肝臓領域 K^+ 受容器を刺激する事により引き起こされたと考えられる。

以上の結果から、門脈-肝臓領域に bumetanide-sensitive Na^+ 、 K^+ receptor が存在し、肝門脈血中の Na^+ 、 K^+ 濃度が増加すると、腎臓からの Na^+ 、 K^+ 排泄が増加する肝-腎反射が存在することが分かった。この調節系の重要な点は、肝血流量が心拍出量の 20~25 %であるということである。従って、摂食による肝門脈血中 Na^+ 、 K^+ 濃度の増加は、体循環系に回ると 1/5 に圧縮される。逆に言えば、門脈-肝臓領域 K^+ 受容器は体循環系に存在する受容器の 5 倍の感度で K^+ 濃度変化を感知することができると考えられる。しかし、この調節系は門脈血中 Na^+ 、 K^+ 濃度を参照し、体循環系の Na^+ 、 K^+ 濃度を予測して、調節しているため、調節誤差が生じる。このような誤差はより厳密な調節が可能であるネガティブ・フィードバック調節系により調節されるのであろう。

助成番号 9928

門脈-肝臓領域 Na^+ 、 K^+ 受容器を介する体液調節機構に関する研究

助成研究者：森田 啓之 (岐阜大学 医学部 第一生理学講座)

共同研究者：中島 茂 (岐阜大学 医学部 第一生理学講座)

【研究目的】

1965年 Haberich 等 (1) により、門脈-肝臓領域に浸透圧受容器が存在する可能性が初めて報告されて以来、この分野に関する多くの研究がなされてきた。その結果、浸透圧、血管内圧、イオン、グルコース、アミノ酸等に対する多くの受容機構が存在する事が明らかになり、よく知られている代謝、解毒、貯蔵臓器としての機能ばかりでなく、受容器臓器としての肝臓の役割が注目されている (2, 3, 4)。

門脈-肝臓領域に受容器が存在する利点として、以下の2点が挙げられる：

- 経口摂取された物質は、腸管で吸収され、体循環系に回る前にまず門脈-肝臓領域を通過する。従って、この領域の受容器は体循環系の血流により約5倍に希釈される前の高い濃度の物質を感知することが出来る。
- この情報に基づき、体循環系の状態が変化する前に、体循環系の未来の状態を予測して現在の状態を制御することが出来る。すなわち、広義の予測制御あるいはネガティブ・フィードフォワード的制御が可能になる。

これらのことを考慮に入れ、門脈-肝臓領域に存在する受容器のうち Na^+ 受容器を介する体液恒常性維持機構について、我々は以下の報告を行ってきた。

1. 門脈-肝臓領域 Na^+ 受容器を刺激すると、腎臓からの Na^+ 排泄が促進され、腸管からの Na^+ 吸収が抑制される (5, 6)。
2. 求心路は肝臓求心神経であり、この神経は延髄孤束核および最後野、視床下部の室傍核および視索上核に投射する (7)。
3. 遠心路はそれぞれ腎交感神経、腸管のコリン作動性神経である (5, 6, 8)。
4. この応答は摂食のような生理的状态および長期の食塩負荷時にも作動し、体液恒常性維持に重要な役割を果たしている (9, 10, 11)。
5. 肝硬変では、この応答の感度が低下し、体液恒常性維持の破綻が起こる (12, 13)。

しかし、門脈-肝臓領域 Na^+ 受容器の Na^+ 感知機構は不明である。門脈-肝臓領域以外の場所に存在する Na^+ 受容器として、味蕾およびmacula densa (Na^+ 受容器というよりはむしろ Cl^- 受容器) が知られており、それぞれamirolide-sensitive Na^+ channel および $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter を介し Na^+ 濃度を感知することが報告されている (14, 15)。門脈-肝臓領域 Na^+ 受容器も同様に何らかの Na^+ 輸送機構を介して、 Na^+ を感知しているものと考えられる。従って、平成11年度申請の研究目的はこの仮説を確かめることである。さらに、研究過程で Na^+ 感知機構に $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter が関与していることが明らかになり、この受容器

は K^+ 受容器として働く可能性が示された。従って、第2の目的は門脈 - 肝臓領域 K^+ 受容器の生理的役割を検討することである。

【研究方法】

全ての実験はペントバルビタール麻酔下の Sprague Dawley ラット（体重 300～360 g, n=73）を用いておこなった。実験は日本生理学会規定の“Guiding Principles for Care and Use of Animals in the Field of Physiological Science”に従って行った。

門脈 - 肝臓領域 Na^+ 感知機構における Na^+ 輸送機構の役割 (16)

腹腔内ペントバルビタール（50 mg/kg）注射により麻酔したラットの下大静脈に、麻酔追加用のカテーテルを挿入した。正中開腹後、肝門脈カテーテルを挿入し、肝動脈周囲の肝神経を剥離し、双極電極を装着した。神経の中樞側は結紮し、肝臓からの求心性神経活動だけが記録できるようにした。神経および電極は2液混合性のシリコンにより包埋固定した。神経活動は50 Hz～1 kHzのバンドパス・フィルターを持つアンプで増幅した後、A-D変換器（100 samples/s）を介して、コンピュータ上に記録した。

0.75 Mの高張NaCl溶液を0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ml/kg肝門脈内に投与したときの肝臓求心神経活動の応答を各種 Na^+ 輸送体阻害薬肝門脈投与前後で比較した。阻害薬としては以下の6種類：amiloride（n=6, 30, 300 μ mol/kg）、ouabain（n=6, 1, 10 μ mol/kg）、SITS（n=6, 3, 30, 100 μ mol/kg）、furosemide（n=6, 3, 30, 300 μ mol/kg）、bumetanide（n=6, 3, 30, 100 μ mol/kg）、chlorothiazide（n=6, 3, 30, 100 μ mol/kg）を用いた。肝臓求心神経活動の定量化のため、阻害薬投与前の0.75 M NaCl溶液1.0 ml/kg投与時の応答を100%として、その他の応答を%表示した。

門脈 - 肝臓領域 K^+ 受容器 (17)

門脈 - 肝臓領域に K^+ 受容機構が存在するかどうかを確かめるため、上述の方法で肝臓求心神経活動を測定しながら、肝門脈内に種々の濃度のKCl + NaCl溶液を投与した（n=6）。またKCl + NaCl溶液投与に対する肝臓求心神経活動応答がbumetanide投与によりどのような影響を受けるかを調べるため、50 mM KCl + 100 mM NaCl溶液投与に対する肝臓求心神経活動応答をbumetanide肝門脈投与前後で比較した（n=7）。

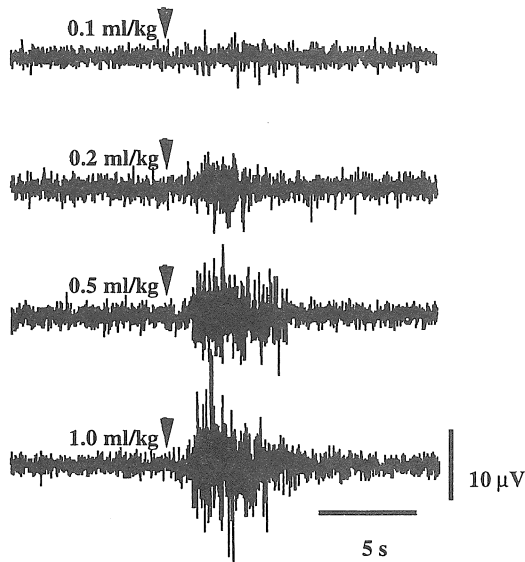
さらに、腎臓からの K^+ 排泄調節における門脈 - 肝臓領域 K^+ 受容器の役割を調べるため、両側尿管に採尿用カテーテルを挿入したラットにおいて、肝門脈（n=8）あるいは下大静脈（n=8）から50 mM KCl + 100 mM NaCl溶液を50 μ l/kg/minのスピードで30分間投与し、尿中 K^+ 排泄量を測定した。さらに、肝臓神経を除神経したラット（n=8）において、肝門脈内投与実験を行った。

【研究結果】

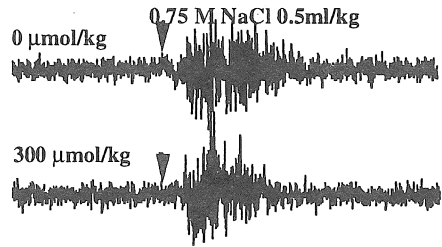
門脈 - 肝臓領域 Na⁺感知機構における Na⁺輸送機構の役割 (16)

Figure 1-A に肝門脈内 0.75 M NaCl 溶液投与に対する、肝臓求心神経活動応答の典型例を示す。0.75 M NaCl 溶液肝門脈内投与後短い潜時の後、投与量依存性に肝臓求心神経活動が増加した。肝臓求心神経活動の NaCl 溶液投与に対する応答は肝門脈内 amiloride 投与により影響を受けなかったが (Figure 1-B), bumetanide 投与により用量依存性に抑制された (Figure 1-C)。

A: Dose Response to 0.75 M NaCl



B: Amiloride



C: Bumetanide

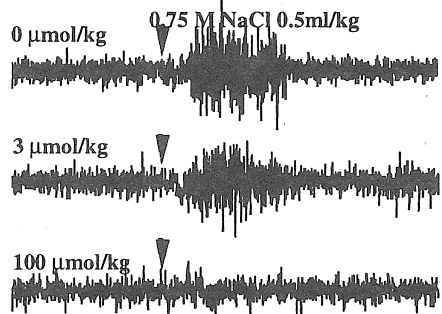


Figure 1 : Original records illustrating hepatic afferent nerve activity in response to intraportal bolus injection of 0.75 M NaCl (shown by the arrowheads). (A) shows the dose-dependency of the hepatic afferent nerve activity response to 0.75 M NaCl solution. (B) shows the effects of amiloride pretreatment (300 $\mu\text{mol/kg}$ into the portal vein) on the hepatic afferent nerve activity response, while (C) shows the effects of bumetanide pretreatment (3 and 100 $\mu\text{mol/kg}$ into the portal vein).

各種の Na⁺輸送機構阻害薬の作用の平均値±標準誤差のデータを Figure 2 に示す。Amiloride および SITS 前処置は肝臓求心神経活動応答に有意な影響を与えなかったが、ouabain, furosemide, bumetanide, chlorothiazide では肝臓求心神経活動応答が抑制された。しかし、その抑制程度は chlorothiazide と他の阻害剤とで差が見られた。すなわち、ouabain, furosemide, bumetanide では用量依存性に応答が抑制され、それぞれ 10, 300, 100 $\mu\text{mol/kg}$ の量で増加応答は完全に抑制されたが、chlorothiazide では 3, 30, 100 $\mu\text{mol/kg}$ と投与量を増加させても、抑制の程度は変化しなかった。

門脈 - 肝臓領域 K⁺受容器 (17)

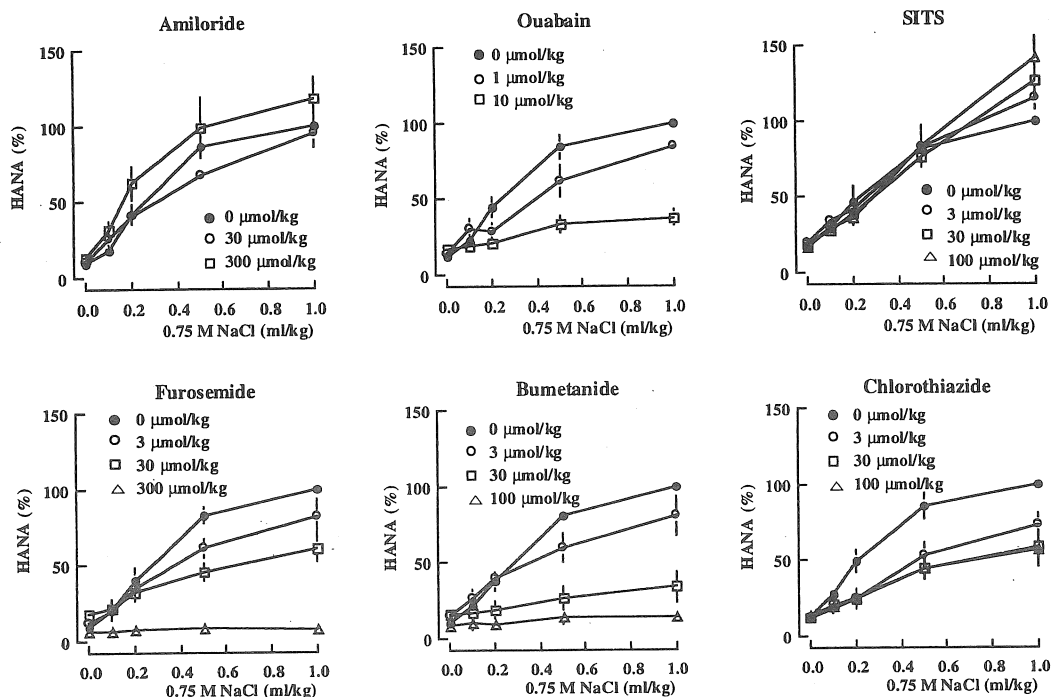


Figure 2: Summarized data showing responses of hepatic afferent nerve activity to intraportal bolus injection of 0.75 M NaCl before and after intraportal infusion of amiloride, ouabain, SITS, bumetanide, or chlorothiazide.

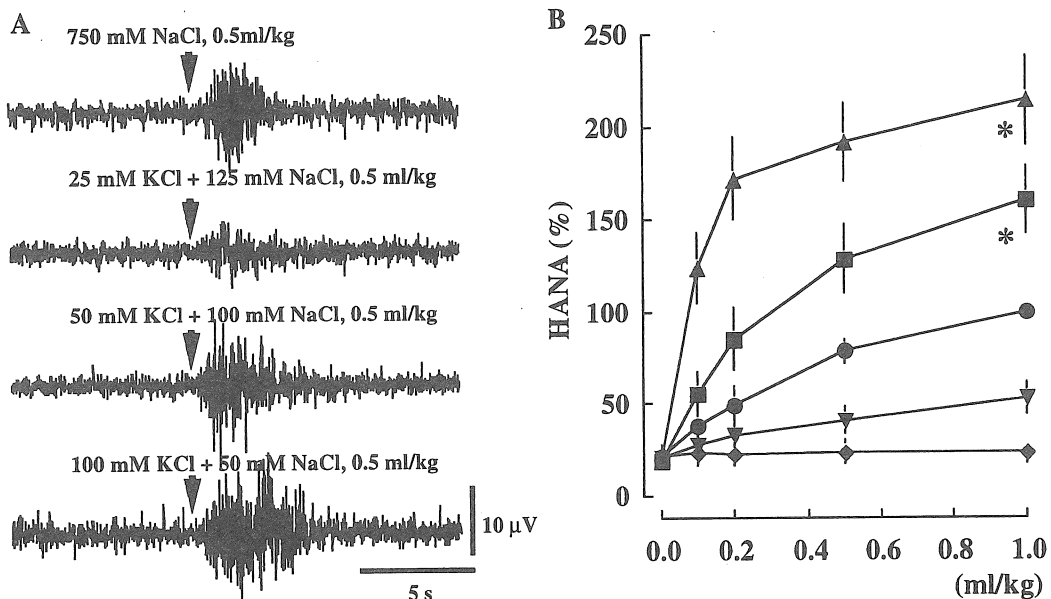


Figure 3: A: original records illustrating hepatic afferent nerve activity responses to intraportal bolus injection (arrowheads) of 750 mM NaCl, 25 mM KCl + 125 mM NaCl, 50 mM KCl + 100 mM NaCl, or 100 mM KCl + 50 mM NaCl. Summarized data for 6 rats are shown at B. ●, 750 mM NaCl; ◆, 750 mM LiCl; ▼, 25 mM KCl + 125 mM NaCl; ■, 50 mM KCl + 100 mM NaCl; ▲, 100 mM KCl + 50 mM NaCl. *P < 0.05: responses to other combinations of KCl + NaCl are significantly different from those to injection of 25 mM KCl + 125 mM NaCl.

Figure 3-A に肝門脈内高張 NaCl 溶液あるいは等張 KCl + NaCl 溶液投与に対する肝臓求心神経活動応答の典型例を示す。肝門脈内投与後短い潜時の後肝臓求心神経活動は増加し、数秒後元のレベルに戻る。6 匹の平均±標準誤差のデータを B に示す。この肝臓神経は高張 LiCl の肝門脈内投与には全く応答しないが、高張 NaCl あるいは等張 KCl + NaCl 溶液に対しては容量依存性、K⁺濃度依存性に神経活動が増加した。従って、この神経は肝門脈領域の Na⁺および K⁺濃度に応答すると考えられる。

Figure 4 に 50 mM KCl + 100 mM NaCl 溶液を 50 μl/kg/min のスピードで 30 分間投与した時の静脈血中電解質濃度および尿量変化を示す。肝門脈内投与グループも下大静脈内投与グループも静脈血中 K⁺, Na⁺, Cl⁻濃度は有意な変化を示さなかった。しかし、肝臓除神経グループの Cl⁻濃度はわずかだが有意な上昇を示した。尿量は全てのグループで有意な変化は示さなかったが、肝門脈内投与グループでは増加傾向が見られた。

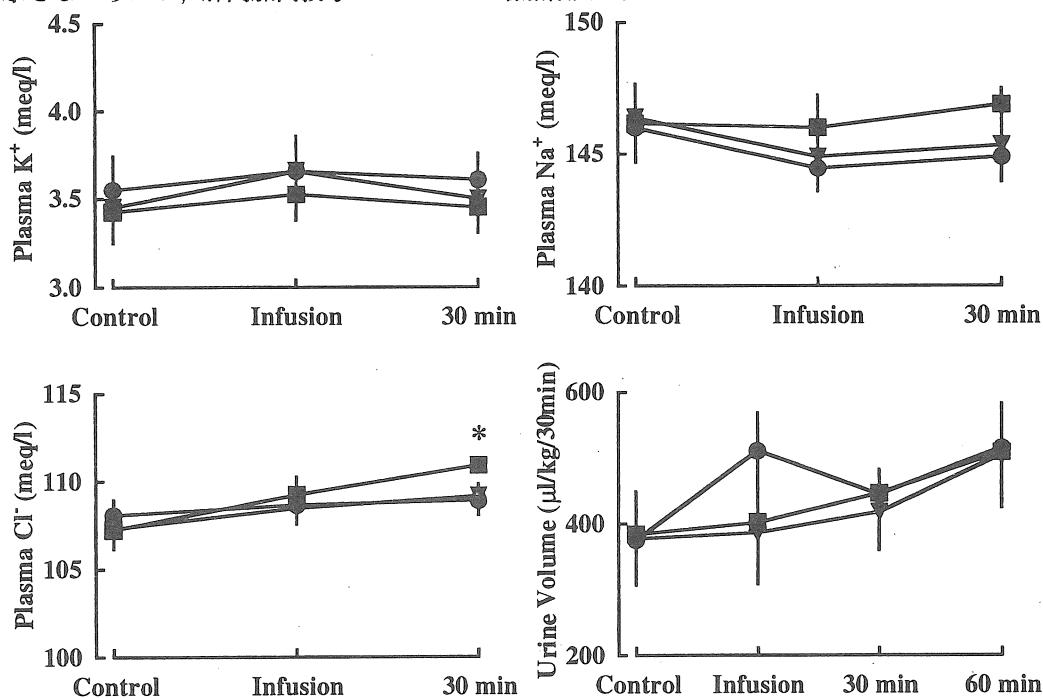


Figure 4. Plasma K⁺, Na⁺, and Cl⁻ concentration and urine volume responses to infusion of 50 mM KCl + 100 mM NaCl solution into the portal vein (●), the inferior vena cava (▼), or the portal vein in hepatic denervated rats (■). *P<0.05: the response is significantly different from that in the control.

Figure 5 の上段に尿中 K⁺, Na⁺, Cl⁻濃度、下段には尿中排泄量を示す。尿中 K⁺濃度は下大静脈内投与グループおよび肝臓除神経グループでは有意な変化は起こらなかった。肝門脈内投与グループでは増加傾向はあるものの、有意な変化ではなかった。しかし、尿中 K⁺濃度と尿量の積である尿中 K⁺排泄量は肝門脈内投与グループでは有意な増加を示した。一方、下大静脈内投与グループおよび肝臓除神経グループではこの増加は見られなかった。投与総量に対する排泄積算量の割合を Figure 6 に示す。肝門脈内投与グループでは 30 分間の投与中に投与総量の 45 ± 10 %, 投与後 60 分で 154 ± 18 % の K⁺が排泄されたが、他のグループで

は投与後 60 分で 50% 程度の K^+ しか排泄されなかった。

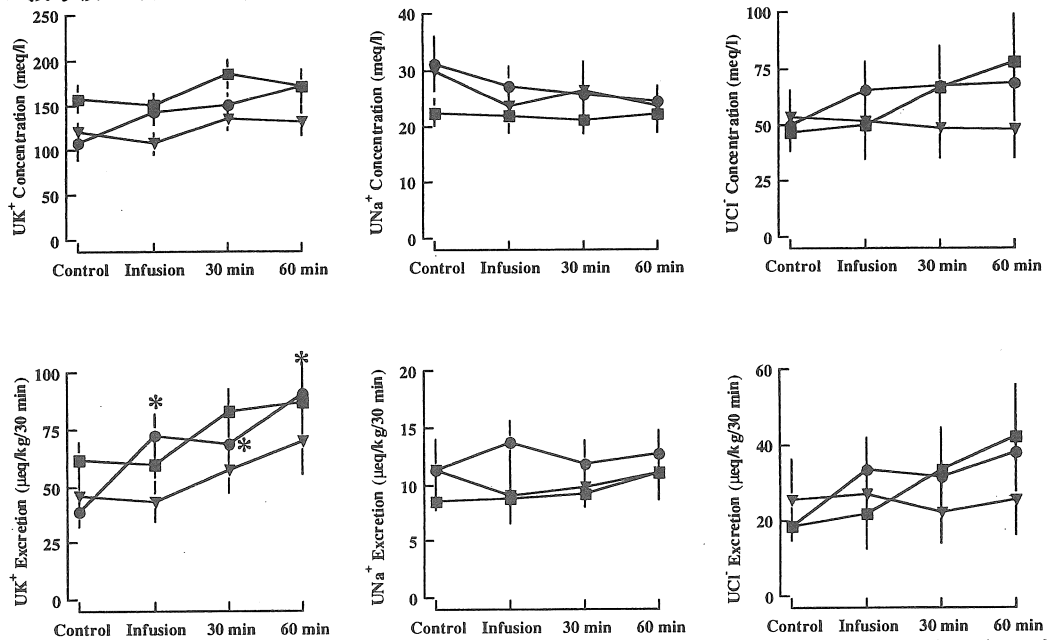


Figure 5. The upper panels show of urinary K^+ , Na^+ , and Cl^- concentration responses to the infusion of 50 mM KCl + 100 mM NaCl into the portal vein (●), the inferior vena cava (▼), or the portal vein in hepatic denervated rats (■). The lower panels show of urinary K^+ , Na^+ , and Cl^- excretion responses to the infusion of 50 mM KCl + 100 mM NaCl into the portal vein (●), the inferior vena cava (▼), or the portal vein in hepatic denervated rats (■). * $P < 0.05$: the response is significantly different from that in the control.

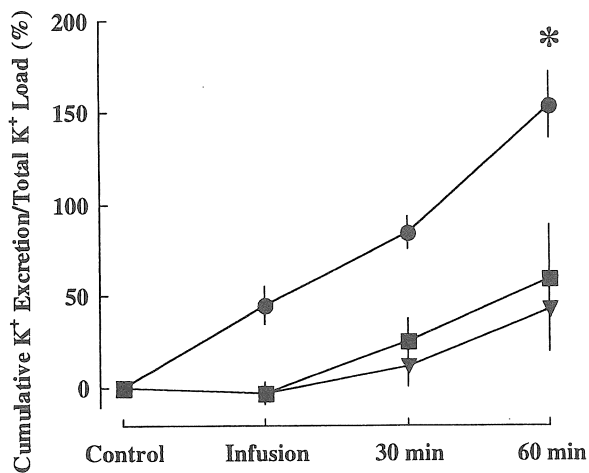


Figure 6. Cumulative K^+ excretion as a percentage of the total loaded K^+ . ●: portal venous infusion, ▼: inferior vena caval infusion, ■: portal venous infusion in hepatic denervated rats. * $P < 0.05$: the responses are significantly different from those in the inferior vena caval infusion group.

【考察】

肝細胞側底膜側には数種類の Na^+ 輸送機構が存在することが報告されている (18-21)。 Na^+ K^+ ATPase により作り出された細胞内外の Na^+ 濃度較差により, それらの Na^+ 輸送機構を介し, Na^+ が細胞内に流入する。 Na^+/H^+ exchanger と $Na^+ HCO_3^-$ cotransporter は各々 amiloride と SITS で阻害され, 肝細胞の pH 調節に関与している (20, 21)。 $Na^+ K^+ 2Cl^-$ cotransporter は furosemide

で阻害され、肝細胞の容積調節に関与している（18-20）。従って、本研究では肝門脈内高張 NaCl 溶液投与に対する肝臓求心神経活動増加応答がこれらの阻害薬によりどの様に変化するかを調べた。

高張 NaCl 溶液肝門脈内投与に対する肝臓求心神経活動増加応答は、furosemide により用量依存性に抑制された。Furosemide は $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter を阻害する一方で、 $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ cotransporter も阻害することが知られている。従って、 $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter と $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ cotransporter のより特異的な阻害薬である bumetanide と chlorothiazide を使用した。肝臓求心神経活動応答は bumetanide により用量依存性に抑制され、100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ で完全に抑制されたが、chlorothiazide では 3~100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ で抑制の程度は変化しなかった。さらに、肝門脈血中 K^+ 濃度増加に対する肝臓求心神経活動増加も bumetanide により抑制された。従って、門脈 - 肝臓領域の Na^+ および K^+ 受容機構に $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter が主要な役割を果たしていると思われる。

Na^+ および K^+ 濃度の増加が $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter を介し、どのような機序により活動電位発生という電気的な変化に変換されるかに関しては今回の研究では不明であるが、次の2つの可能性が考えられる。ひとつは、肝細胞側底膜側に $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter が存在し、その肝細胞に神経末端が接続しているという可能性である。 $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter は肝細胞の容積を調節していることから、側底膜側の Na^+ あるいは K^+ 濃度が増加すると、 $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter を介し肝細胞内に流入し、それに伴って水が流入し、肝細胞の容積が増加する。容積増加により神経末端が伸展され、伸展受容器として働き、肝臓求心神経活動が増加するという説である。もうひとつは、神経末端自体に $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter が存在し、 Na^+ あるいは K^+ の細胞内流入により脱分極し、肝臓求心神経活動が増加するという説である。実際、中枢神経系および末梢神経系の細胞体および樹状突起に $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter が存在していることが報告されている（22）。

本研究では肝動脈周囲の神経叢から神経を剥離し、求心神経活動を記録した。この神経は肝門脈血中の Na^+ 、 K^+ 濃度増加には応答するが、浸透圧、 Li^+ 、 Cl^- 濃度増加には応答しなかった。門脈 - 肝臓領域 Na^+ 受容器の役割について、我々は多くの報告を行ってきたが（2, 3, 5, 6, 9-11）、 K^+ 受容器については不明であった。門脈 - 肝臓領域 K^+ 受容器の役割を調べるため、50 mM KCl + 100 mM NaCl 溶液投与に対する尿中 K^+ 排泄量を下大静脈内投与と肝門脈内投与とで比較した。肝門脈内投与時の応答は下大静脈内投与時の応答に比し、有意に大きく、しかもその応答は迅速、強烈であり、投与終了後 30 分で投与総量とほぼ等しい K^+ が排泄された。この肝門脈内投与に対する尿中 K^+ 排泄増加応答は肝臓除神経により抑制された。従って、肝門脈内 50 mM KCl + 100 mM NaCl 溶液投与による尿中 K^+ 排泄量増加応答は、門脈 - 肝臓領域 K^+ 受容器を刺激する事により引き起こされたと考えられる。

門脈 - 肝臓領域 K^+ 受容器は、体循環血の K^+ 濃度が増加する前に起こる肝門脈血の K^+ 濃度増加に応答し、反射的に尿中 K^+ 排泄を増加させる。この調節系の重要な点は、肝血流量が

心拍出量の 20~25 %であるということである。従って、肝門脈血中 K^+ 濃度の摂食による増加は、体循環系に回ると 1/5 に圧縮される。逆に言えば、門脈 - 肝臓領域 K^+ 受容器は体循環系に存在する受容器の 5 倍の感度で K^+ 濃度変化を感知することができる。しかし、この調節系は門脈血中 K^+ 濃度を参照し、体循環系の K^+ 濃度を予測して、調節しているため、調節誤差が生じる。実際、本実験において肝門脈内投与後 60 分で投与 K^+ 量の 1.5 倍の K^+ が排泄された。このような誤差はより厳密な調節が可能であるネガティブ・フィードバック調節系により調節されるのであろう。

【今後の課題】

門脈 - 肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器について以下の点を明らかにするため、研究を継続中である。

1. $Na^+ K^+ 2Cl^-$ cotransporter の肝臓内局在は何処であるのか？
2. 高 Na^+ 食, 高 K^+ 食負荷により門脈 - 肝臓領域 Na^+ , K^+ 受容器の感度および $Na^+ K^+ 2Cl^-$ cotransporter の mRNA 発現がどの様な修飾を受けるのか？
3. Na^+ および K^+ 濃度の増加が $Na^+ K^+ 2Cl^-$ cotransporter を介し、どの様な機序により活動電位発生という電気的な変化に変換されるのか？

【文献】

1. Haberich FJ, Aziz O, Nowacki PE: Über einen osmoreceptorisch tätigen Mechanismus in der Leber. Pflügers Arch 285: 73-89, 1965.
2. 森田啓之: 受容器の宝庫肝臓: 門脈 - 肝臓領域 Na^+ 受容機構による予測制御的 Na^+ 恒常性維持。膜 (Membrane) 24: 64-71, 1999.
3. Morita H, Matsuda T, Tanaka K, Hosomi H: Role of hepatic receptors in controlling body fluid homeostasis (review). Jpn J Physiol 45: 355-368, 1995.
4. Sawchenko PE, Friedman MI: Sensory functions of the liver: a review. Am J Physiol 236: R5-R20, 1979.
5. Morita H, Ohyama H, Hagiike M, Horiba T, Miyake K, Yamanouchi H, Matsushita K, Hosomi H: Effects of portal infusion of hypertonic solution on jejunal electrolyte transport in anesthetized dogs. Am J Physiol 259: R1289-R1294, 1990.
6. Morita H, Nishida Y, Hosomi H: Neural control of urinary sodium excretion during hypertonic $NaCl$ load in conscious rabbits: role of renal and hepatic nerves and baroreceptors. J Auton Nerv Syst 34: 157-170, 1991.
7. Morita H, Yamashita Y, Nishida Y, Tokuda M, Hatase O, Hosomi H: Fos induction in rat brain neurons after stimulation of the hepatportal Na^+ -sensitive mechanism, Am J Physiol 272: R913-R923, 1997.

8. Morita H, Ishiki K, Hosomi H: Effects of hepatic NaCl receptor stimulation on renal nerve activity in conscious rabbits. *Neurosci Lett* 123: 1-3, 1991.
9. Morita H, Matsuda T, Furuya F, Khanchowdhury MR, Hosomi H: Hepatorenal reflex plays an important role in natriuresis after high-NaCl food intake in conscious dogs. *Circ Res* 72: 552-559, 1993.
10. Morita H, Chen Q, Hosomi H: Role of hepatic nerves in long-term control of NaCl homeostasis in Wistar-Kyoto rats. *J Auton Nerv Syst* 54: 9-15, 1995.
11. Morita H, Tsunooka K, Hagiike M, Yamaguchi O, Lee K: Role of the liver in long-term control of drinking behavior, Na balance and arterial pressure in Dahl rats. *Am J Physiol* 274: R1111-R1118, 1998.
12. Tanaka K, Matsuda T, Morita H, Hosomi H: Depressed sensitivity of the hepatoportal NaCl receptors in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Am J Physiol* 269: R1390-R1395, 1995.
13. Matsuda T, Morita H, Hosomi H, Okada M: Response of renal nerve activity to high NaCl food intake in dogs with liver cirrhosis. *Hepatology* 23: 303-309, 1996.
14. Lindemann, B: Taste reception. *Physiol Rev* 76: 719-766, 1996.
15. Schlatter, E: Effect of various diuretics on membrane voltage of macula densa cells, Whole-cell patch-clamp experiments. *Pflügers Arch* 423: 74-77, 1993.
16. Morita H, Fujiki N, Hagiike M, Yamaguchi O, Lee K: Functional evidence for involvement of bumetanide-sensitive $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransport in the hepatoportal Na^+ receptor of the Sprague-Dawley rat. *Neurosci Lett* 264: 65-68, 1999.
17. Morita H, Fujiki N, Miyahara T, Lee K, Tanaka K: Hepatoportal bumetanide-sensitive K^+ -sensor mechanism controls urinary K^+ excretion. *Am J Physiol* 278: R1134-R1139, 2000.
18. Dahl SV, Häussinger D: Bumetanide-sensitive cell swelling mediates the inhibitory effect on ethanol on proteolysis in rat liver. *Gastroenterology* 114: 1046-1053, 1998.
19. Fiegen RJ, Rauen U, Hartmann M, Decking UKM, de Groot H: Decrease of ischemic injury to the isolated perfused rat liver by loop diuretics. *Hepatology* 25: 1425-1431, 1997.
20. Graf j, Häussinger D: Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism. *J Hepatol* 24: 53-77, 1996.
21. Renner EL, Lake JR, Scharschmidt BF, Zimmerli B, Meier PJ: Rat hepatocytes exhibit basolateral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport. *J Clin Invest* 83: 1225-1235, 1989.
22. Plotkin MD, Kaplan MR, Peterson LN, Gullans SR, Hebert SC, Delpire E: Expression of the $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter BSC2 in the nervous system. *Am J Physiol* 272: C173-C183, 1997.

HEPATOPORTAL BUMETANIDE-SENSITIVE Na⁺- and K⁺-SENSOR MECHANISMS

Hironobu Morita and Shigeru Nakashima

Department of Physiology and Biochemistry, Gifu University School of Medicine,
40 Tsukasa-Machi, Gifu 500-8705, Japan

Summary

We have demonstrated that Na⁺ receptor exists in the hepatoportal region plays an important role in regulating body fluid homeostasis. The afferent pathway is the periarterial hepatic nerve, the efferent pathway is the renal sympathetic nerve, and the central pathway involves nucleus solitary tract, area postrema, periventricular hypothalamic nucleus, and supraoptic nucleus. However, sensing mechanism of Na⁺ has been unclear. To investigate mechanisms involved in hepatoportal Na⁺ sensing, responses of hepatic afferent nerve activity (HANA) to intraportal hypertonic NaCl injection were measured before, and after, intraportal infusion of inhibitors of Na⁺ transport systems. HANA increased in response to the intraportal injection of 0.75 M NaCl in a dose-dependent manner. The HANA response was not affected by amiloride or SITS, but was suppressed in a dose-dependent manner by intraportal infusion of ouabain, furosemide, or bumetanide. These results indicate that the hepatoportal Na⁺ receptor senses the Na⁺ concentration via the bumetanide-sensitive Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ cotransporter. Although the linkage between the Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ cotransporter and the increased HANA is unclear, two possibilities can be considered. Firstly, an increase in hepatocellular volume, induced by Na⁺ influx via the Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ cotransporter, might stimulate the connected nerve terminal. Secondly, the nerve terminal itself might bear the Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ cotransporter and the increasing Na⁺ concentration might depolarize the nerve terminal. If either of these is true, the possibility exists that the bumetanide-sensitive Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ cotransporter also senses the K⁺ concentration in the portal vein. Accordingly, to determine whether a K⁺-sensor mechanism exists in the hepatoportal region, HANA responses to intraportal injection of KCl were examined in anesthetized rats. Hepatic afferent nerve activity increased in response to intraportal injection in a K⁺ concentration-dependent manner and the increase was attenuated by inhibition of the Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ cotransporter by bumetanide in a dose-dependent manner. These results suggest that a bumetanide-sensitive K⁺-sensor mechanism exists in the hepatoportal region. Stimulation of this mechanism by intraportal KCl infusion elicited an immediate and powerful kaliuresis with no significant change in the plasma K⁺ concentration; this was significantly greater than the kaliuresis induced by intravenous KCl infusion and was attenuated by severing the periarterial hepatic nervous plexus. These results indicate that a hepatoportal bumetanide-sensitive K⁺-sensor mechanism senses the portal venous K⁺ concentration and that stimulation of this sensor mechanism causes kaliuresis, which is mainly mediated by the periarterial hepatic nervous plexus.