42

助成番号 0142

食塩感受性高血圧に強く見られる脳内ｎＮＯＳ性交換神経抑制機構の作動機序と意義

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：畫間　恵（防衛医科大学校　生理学第二講座）
堀内城司（防衛医科大学校　生理学第二講座）
坂本宏史（山梨医科大学　解剖学第二講座）

これまでに次のことがわかった。a)食塩感受性高血圧ラットに 7-nitroindazole を全身投与し神経性一酸化窒素合成酵素（nNOS）を抑制すると、交感神経活動が増加する。特に、圧受容器反射性に抑制される前段階の交感神経活動はおよそ3倍にも増大する。b) 脳室内に、全身投与の1000分の1量の S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC)を投与しても a)と同様の結果を得たことから、交感神経の緊張性活動を抑制しているは脳内の nNOS により産生される一酸化窒素（NO）である。c) 延髄の nNOS 活性および nNOS 酵素蛋白量は食塩感受性高血圧ラットでは高値である。これらの結果から、食塩感受性高血圧ラットでは、脳内 nNOS が強力に誘導され、これによって産生される NO が交感神経活動を抑制性に調節している、と考えられた。

本研究の目的は、(i) 脳幹部nNOSを免疫組織染色し、nNOSの形態的存在部位を同定する、(ii) 脳幹部以外の脳内 nNOS 活性を定量する、(iii) 高食塩食負荷と脳内制御系の増幅との間をつなぐメカニズムは何か？正常血圧から高血圧へ生物学的異常を伴う状態へ移行する時期、いわゆる高血圧への『Critical Period』との関係を探る目的で、食塩感受性ラットおよび食塩抵抗性ラットの各々の成長過程での脳内 nNOS 活性を比較する。【方法】食塩感受性及び抵抗性ラットに、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）。負荷後断頭にて脳幹を摘出し、ホモジナイズした後 2' 5'-ADP-sepharose にて nNOS を部分精製・抽出した。nNOS 酵素活性は、トリチウム化 L-Arginine を用いたシトルリン法に従い充分量 nNOS 阻害剤の有無の較差にて測定した。免疫組織染色は、抗 nNOS 抗体を一次抗体に、Biotinylated anti-rabbit IgG を二次抗体に用い、ABC 法の変法に従って行った。【結果】脳幹部では、上丘レベルの中脳水道周囲背側部から橋の中位レベル（Parabrachial N.近傍）第4脳室腹側部までの範囲に渡り、複数種類の神経核の神経細胞内に強い nNOS タンパクの発現が認められた。脳幹部 nNOS ニューロンの細胞数は高血圧ラットに多かった。12週齢ラットの4群を比較すると、脳幹だけが高血圧ラットに組織 nNOS 活性の高値を示したが、間脳と小脳の組織 nNOS 活性には差が認められなかった。また、成長過程においても食塩感受性と抵抗性両ラット間に nNOS 活性の差は認められなかった。【結論】食塩感受性高血圧ラットにみられる、中枢神経の nNOS 性交感神経抑制機構の up-regulation を操作しているのは、脳幹部に分布する複数核に見られる nNOS ニューロンであろう、と考えられた。また、この脳幹部 nNOS ニューロンの up-regulation は、食塩負荷や高血圧負荷なしでは生じないと考えられた。

6

助成番号　０１４２

食塩感受性高血圧に強く見られる脳内ｎＮＯＳ性交換神経抑制機構の作動機序と意義

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：畫間　恵　（防衛医科大学校生理学第二講座）
堀内城司　（防衛医科大学校生理学第二講座）
坂本宏史　（山梨医科大学解剖学第二講座）

１．研究目的

過去２年間貴財団研究助成に支えられ次のような結果を得ていた。a）食塩感受性高血圧ラットに 7-nitroindazole を全身投与し神経性一酸化窒素合成酵素（nNOS）を抑制すると、交感神経活動が増加する。特に、圧受容器反射性に抑制される前段階の交感神経活動はおよそ３倍にも増大する（１）。b）脳室内に、全身投与の 1000 分の１量の S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC)を投与しても a）と同様の結果を得たことから、交感神経の緊張性活動を抑制しているは脳内の nNOS により産生される一酸化窒素（NO）である。（c）延髄の nNOS 活性および nNOS 酵素蛋白量は食塩感受性高血圧ラットでは高値である（2, 3, 4）。これらの結果から、食塩感受性高血圧ラットでは、脳内 nNOS が強力に誘導され、これによって産生される NO が交感神経活動を抑制性に調節し、高血圧を代償している、と考えられた。また、食塩感受性高血圧に限らず、正常血圧ラットでも、圧受容器反射抑制がかかる前段階の交感神経活動を nNOS が抑制していることから、正常ラットでも脳内 nNOS 性 NO が交感神経系を抑制性に制御していると考えられた。

しかし、以上のように高血圧ラット脳幹部に酵素活性が高いことがわかっても、脳幹の神経細胞内なのか細胞外なのか、細胞内としたらどこの神経核に nNOS ニューロンが多いのかなど、形態的存在が不明である。また、脳幹部以外の脳内 nNOS 活性はまだ検討されておらず、Hayakawa ら（5）、Ni ら（6）や Ikeda（7）らによる、食塩感受性高血圧ラットでは NOS 活性が低いという報告を充分覆してはいない。さらに、第３番目の疑問は、食塩感受性高血圧では、どういうメカニズムで、これほどまでに NO 性交感神経抑制機能が増幅されるのだろうか？という点である。高食塩食負荷と脳内制御系の増幅との間をつなぐメカニズムは何か？これは、比較的長期的な負荷に反応していることから、長期的影響の時間経過を観察する必要がある。長期故に、正常血圧から高血圧へ生物学的異常を伴う状態へ移行する時期、いわゆる高血圧への『Critical Period』（8）と関係している可能性もある。

本研究の目的は、これらの問題を解決するために、（i）脳幹部 nNOS を免疫組織染色し、nNOS の形態的存在部位を同定する、（ii）脳幹部以外の脳内 nNOS 活性を定量する、（iii）食塩感受性ラットおよび食塩抵抗性ラットの各々の成長過程に見られる脳内 nNOS 活性にどのような差がみられるか、を明らかにすることである。

２．研究方法

2.1　実験動物

Dahl 食塩感受性（S）ラットに高食塩食（8% NaCl 含有、S 8%群）または正常食塩食（0.4% NaCl 含有、S 0.4%群）を、８週齢から１２週齢に渡って４週間投与し、２群の実験群を作成した。また Dahl 食塩抵抗性（R）ラットにも高食塩食（R 8%群）または正常食塩食（R 0.4%群）を、それぞれ８週齢から１２週齢に渡って４週間投与し、合計４群の実験群も作成した。

成長過程の検討には、Dahl 食塩感受性（S）ラットおよび Dahl 食塩抵抗性（R）ラットの２週齢、４週齢、８週齢、および１２週齢を用い、いずれも正常食塩食或いは正常食塩食飼育母体の授乳にて飼育した。

2.2 脳幹部 nNOS の免疫組織染色法

ABC 法（9）を一部改変した方法を用いた。ラットをネンブタール麻酔（40mg/kg, i.p.）し、開胸下に右心房を切開した後、左心室へカテーテルを挿入した。約 100ml の生理食塩水で全身を還流し、続いて約 400ml の固定液（4% paraformaldehyde 含有 0.1M Phosphate buffer, pH7.2）にて脳を還流固定した。固定された脳を摘出し、30% sucrose 含有 0.1M Phosphate buffer, pH7.2 内にてオーバーナイト浸漬固定した。固定された脳から脳幹部を切り出し、これを凍結し、クライオスタットにて約 40μm 厚の切片に切った。脳幹切片は PBS(-)にて洗浄後、3% non-specific goat serum / 0.3 % triton – PBS(-)に浸清し、その後、抗 nNOS ラビット抗体（一次抗体）にて反応させた（４℃、３日間）。PBS(-)で洗浄後、Biotinylated anti-rabbit IgG（二次抗体）にて反応させた（25℃、１時間）。PBS(-)で洗浄後、Avidin-Biotin-HPR complex にて反応させ（25℃、１時間）、PBS(-)で洗浄後、DAB 反応（1mg/ml diaminobenzidine tetrahydrochloride / 0.01% H_2O_2 含有 0.05M Tris-HCl buffer, pH7.2）にて発色させた。

2.3 脳内 nNOS 活性測定法

ラットを断頭し脳を摘出した。摘出脳は生理食塩水にて洗浄後、脳幹、間脳、小脳に分け直ちに液体窒素にて凍結した。測定に利用するまで-80℃にて保存した。凍結組織を、50mM HEPES, pH 7.7 緩衝液（0.2 mM EDTA, 0.2mM EGTA, 5mM BH4, 0.1mM DTT, 0.2mM PMSF, 10mg/ml pepstatin, 10mg/ml aprotinin を含有）の 25% W/V 量に入れ、４℃にてテフロングラスホモジナイザーにてホモジナイズした。このホモジネートを 15.000xg・15 分間で２回超遠心し、その上精液から 2' 5'-ADP Sepharose を用いた nNOS の部分精製・抽出を行った。抽出には 10mM NADPH 含有上記 HEPES 緩衝液を用いた。部分精製した nNOS 分画の蛋白量は、Bradford 法に従って測定した。nNOS 酵素活性の測定には、トリチウム化 L-Arginine（77 Ci/mmole）を用いたシトルリン法に従った。反応液には、10 mM L-Arginine, 100 mMNADPH, 0.2mM $CaCl_2$, 0.1mM calmodulin, 10 mM BH4, 1mM FAD, 1mM FMN 含有 50 mM HEPES, pH 7.4 を用い、30℃・５分間の反応時間後冷却ストップ液（10 mM sodium acetate, pH 5.5, 2mMEDTA, 0.2mM EGTA, 1mM citrulline）にて反応を止め、Dowex AG50W-X8 にて未反応基質を除去した後、酵素反応で形成されたトリチウム化 citrulline をシンチレーションカウンターにて計測した。組織酵素活性量は、カウンターによる計測値を Bradford 法で求めた蛋白量で除し、比活性値（cpm/min/μg）にて表示した。

各測定値は平均値 ± 標準誤差で表示した。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２群間で比較する時には unpaird t-test を、それぞれ用いた。

３．研究結果

実験は、(i) 食塩感受性高血圧ラットの脳幹部に高活性を示す nNOS 酵素タンパクの免疫組織染色、(ii) 食塩感受性高血圧ラットの間脳および小脳における脳組織内 nNOS 活性の測定、そして、(iii) 食塩負荷をしていない食塩感受性ラットと食塩抵抗性ラットの脳内 nNOS 活性について２週齢から１２週齢までの成長過程の比較、の

3部から構成される。

3.1　食塩感受性ラットの脳幹部 **nNOS** の免疫組織染色

S8%群高血圧ラットおよびS0.4%群正常血圧ラットの脳幹部を取り出し、抗nNOS抗体を用い nNOS 酵素タンパクを免疫組織染色した。脳幹部では神経細胞外より神経細胞内に nNOS タンパクが染色された（Fig. 1）

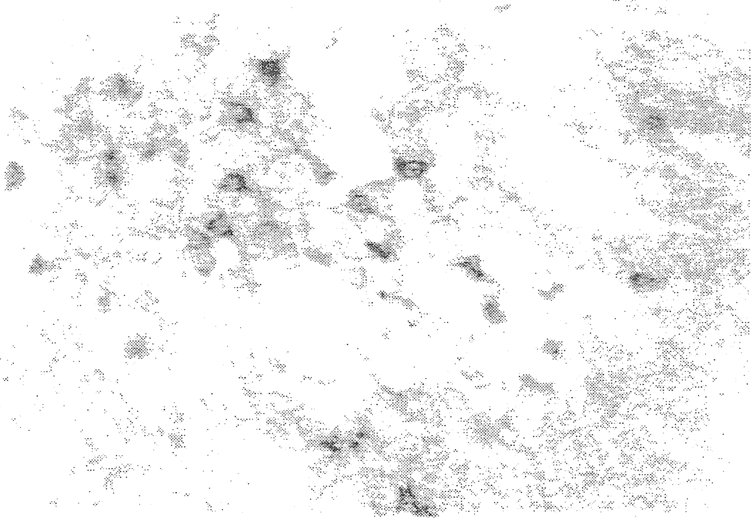

Fig. 1 Immunohisotochemical Staining for nNOS in the brainstem of a S8% rat. nNOS is strongly expressed in the neuronal cells. Magnification ×400.

S8%群高血圧ラットと S0.4%群正常血圧ラットは、ともに上丘レベルの中脳水道周囲背側部から橋の中位レベル（結合腕周囲核 Parabrachial Nuclei）の第4脳室腹側部に及ぶ範囲内の複数個の神経核の神経細胞内に nNOS が明瞭に染色された。

Figure 3 と Figure 4 は、それぞれ S8%群ラットおよび S0.4%群ラットの橋を nNOS の免疫組織染色した比較的弱拡大の写真を示す。両者は、Fig.2 に示されたレベルとほぼ同じ橋のレベルの切片である。

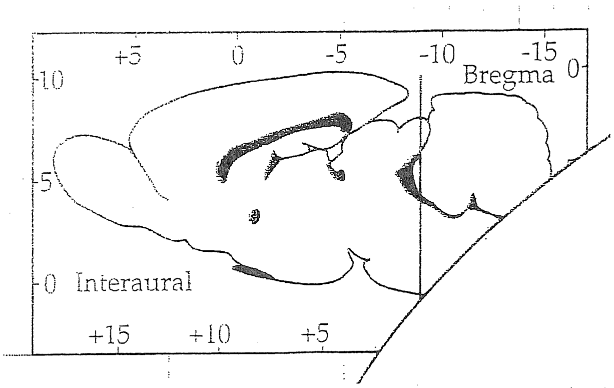

Fig. 2.　切片のレベルを縦線で示す。文献（10）より引用。

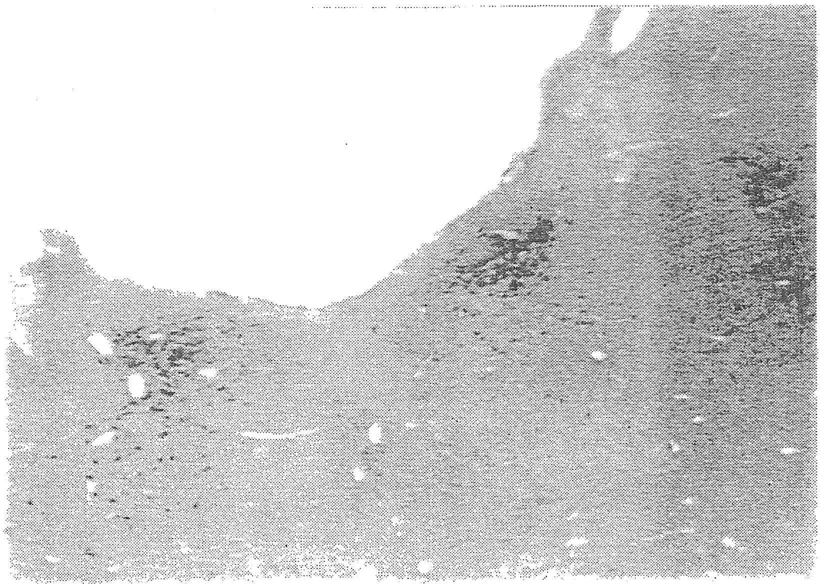

Fig. 3. Immunohisotochemical Staining for nNOS in the ponse of a S8% rat. Magnification ×40.

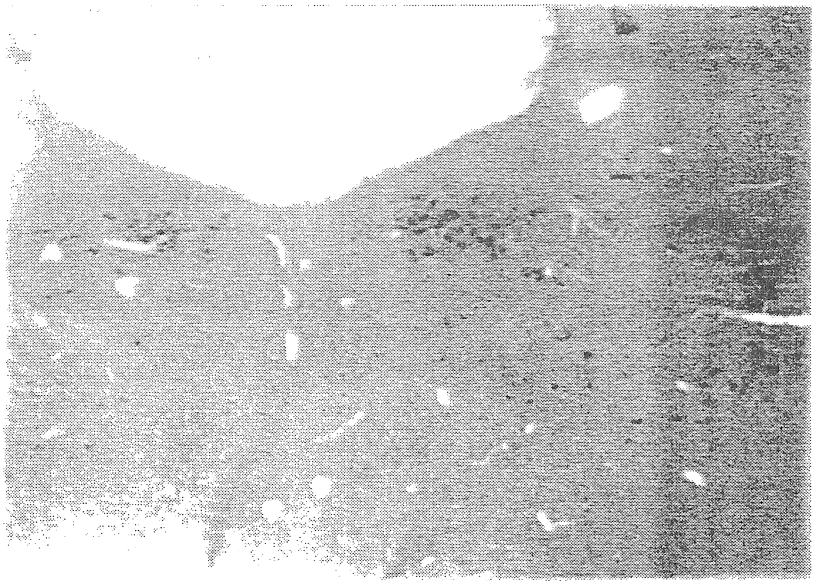

Fig. 4. Immunohisotochemical Staining for nNOS in the ponse of a S0.4% rat. Magnification ×40.

食塩感受性高血圧ラット（S8%, Fig.3）の方が正常血圧ラット（S0.4%, Fig.4）に比較するとnNOSタンパクが染色される神経細胞の数が多い。S8%ラット脳幹のnNOS染色細胞数は8239個、S0.4%ラット脳幹のnNOS染色細胞数は6796個であった。第2セットであるS8%ラット脳幹とS0.4%ラット脳幹に見られたnNOS染色細胞数は、

それぞれ 10535 個と 9913 個であった。今回調べた２セット（ラット４匹）ではいずれも食塩感受性高血圧ラットの方に nNOS 含有神経細胞が多く見られた。

3.2　１２週齢ラットの脳幹、間脳、小脳における、脳組織内 **nNOS** 活性

脳幹、間脳、小脳の各組織から nNOS を部分精製しその比活性を４群間で比較すると、S8%群の脳幹部 nNOS 活性（7470 ± 562 cpm/min/μg）が他群（S0.4%群は 5582 ± 342 cpm/min/μg、R8%群は 5910 ± 95 cpm/min/μg、R0.4%群は 5643 ± 237 cpm/min/μg）に比して有意に高値を示した（*Fig. 5*）。

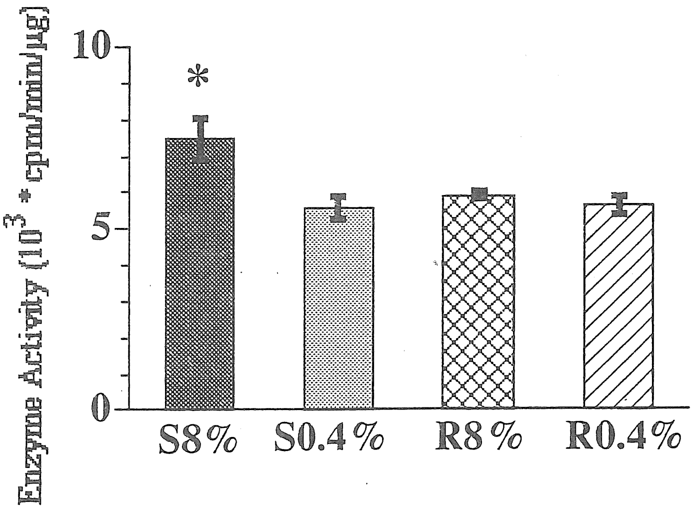

*Fig. 5. Brain stem nNOS activity in the S8%, S0.4%, R8% and R0.4% rat-groups. n=4 for each group. *, p<0.05 between the 4 rat-groups.*

間脳部 nNOS 活性は、S8%群：5530 ± 519 cpm/min/μg、S0.4%群：5458 ± 502 cpm/min/μg、R8%群：5185 ± 212 cpm/min/μg、R0.4%群：5149 ± 597 cpm/min/μg となり４群間に有意差は認められなかった（*Fig. 6*）。

小脳部 nNOS 活性は、S8%群：16803 ± 1731 cpm/min/μg、S0.4%群：16686 ± 1735 cpm/min/μg、R8%群：13314 ± 1501 cpm/min/μg、R0.4%群：15661 ± 2090 cpm/min/μg となり４群間に有意差はみとめられなかった（*Fig. 7*）。

以上から、食塩感受性高血圧群および正常血圧群の両群とも、脳幹、間脳および小脳のいずれにも nNOS 活性が認められたが、脳幹の組織 nNOS 活性だけが高血圧群に有意に高値が示された。間脳と小脳の組織 nNOS 活性はいずれも４群間に有意差が認められなかった。

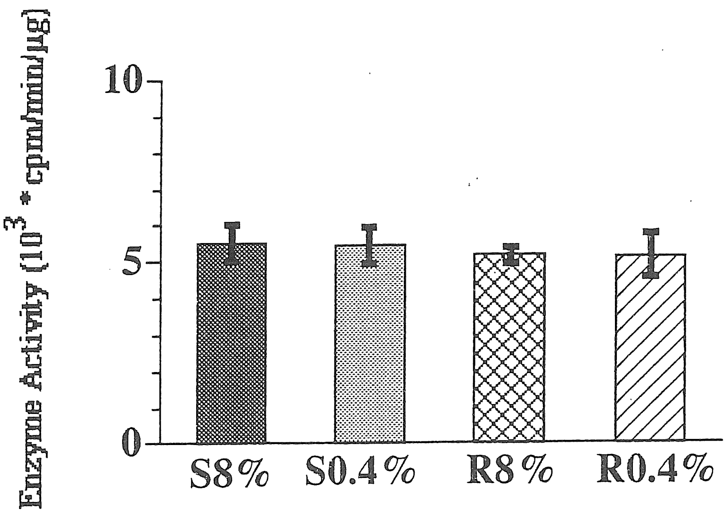

Fig. 6. Diencephalons nNOS activity in the S8%, S0.4%, R8% and R0.4% rat-groups. n=6 for each group. No significant difference was detected between the 4 rat-groups.

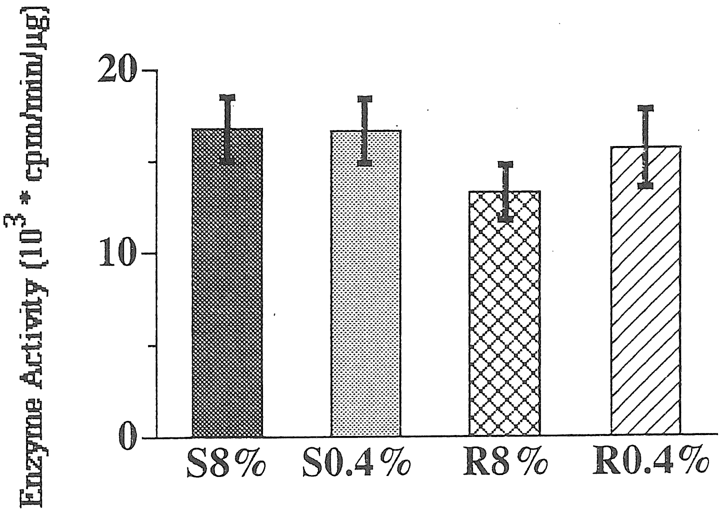

Fig. 7. Cerebellum nNOS protein activity in the S8%, S0.4%, R8% and R0.4%rat-groups. n=8 for each group. No significant difference was detected between the 4 rat-groups

3.3　食塩感受性および抵抗性ラットの脳内 **nNOS** 活性と発育過程

食塩感受性高血圧では脳幹部の nNOS 活性が高い。この高活性は高血圧形成過

程のどの時期に確立されるのかを調べるにあたり、先ずDahl食塩感受性ラットとDahl食塩抵抗性ラットとの間でそれぞれの成長過程中脳組織 nNOS 活性に遺伝的な差が生じていないかを調べた。高血圧では成長過程中に高血圧への‘critical period’（8）を示すからである。

Table 1 には、２週齢から１２週齢までの両ラットラインにおける脳幹、間脳、小脳の各組織 nNOS 活性を示した。

Table 1. Brain tissue nNOS activities of the 2-week-old (2W), 4-week-old (4W), 8-week-old (8W) and 12-week-old (12W) S8% and S0.4% rats.

	Brainstem		Diencephalon		Cerebellum	
	S0.4% (n=4)	R0.4% (n=4)	S0.4% (n=4)	R0.4% (n=4)	S0.4% (n=4)	R0.4% (n=4)
2W	9.11±1.70*	6.85±1.65*	12.52±3.02*	9.57±0.95*	8.86±1.13*	7.27±1.37*
4W	5.90±0.74	4.29±0.64	8.93±0.41*	7.10±0.61*	16.78±2.16*	14.98±2.91*
8W	5.66±0.41	5.40±0.47	7.35±1.06	6.70±0.41	22.53±4.68	18.19±2.76
12W	5.58±0.40	4.02±0.54	6.30±1.38	5.11±0.81	21.37±2.16	22.99±5.33

**. $P<0.05$ compaired with 12-week-old rats of each rat groups. There is no significant difference between the S0.4% and R0.4% rat groops at any age.*

Table 1 の結果から、いずれの脳組織においても成長過程において食塩感受性または抵抗性ラットの両ライン間には顕著な差がないことが示された。

４．考察

今回行われた nNOS 免疫組織染色により、脳幹部では、複数個の神経核に nNOS ニューロンが多数認められた。上端では上丘レベル中脳の中脳水道周囲背側部の神経細胞群に nNOS ニューロン群が認められ、一方下端では橋の中位レベル（結合腕周囲核 Parabrachial Nuclei 近傍）の第４脳室腹側部に nNOS ニューロン群が認められた。これらの神経核の中には、中脳周囲灰白質（PAG）や結合腕周囲核（Parabrachial Nuclei）なども含まれているように思われたが、その確認は今回の報告に間に合わなかった。おおよそ４種類以上の神経核に nNOS ニューロンが分布しているものと思われた。

これら染色された脳幹部 nNOS ニューロンについて、その数を Dahl 食塩感受性ラットの高血圧群と正常血圧群とで比較したところ、高血圧群の方が nNOS ニューロン数が多かった。これは、平成１２年度貴財団に支えられた研究結果（平成１２年度報告書、2、3、4）である、組織 nNOS 活性および nNOS 酵素蛋白量は食塩感受性高血圧ラットの方が高いという結果と一致した。従って、食塩感受性高血圧にみられる脳幹部組織 nNOS の高活性は形態学的にも証明されるに至った。

Hayakawa ら（4）や Ikeda ら（6）は Dahl 食塩感受性高血圧ラットの血管および腎臓では NOS 活性が低下していると報告した。これに対し我々は、組織 nNOS 活性および組織 nNOS 酵素蛋白量、さらに免疫組織染色法により、脳幹部では nNOS 活

性が増加していることを証明した。しかし、脳幹以外の脳組織についてはまだ調べられていなかったので、今回間脳と小脳についても組織 nNOS 活性を測定した。その結果、間脳や小脳では4群間に有意差は認められないことがわかった。この結果から、食塩感受性高血圧に見られる交感神経系を抑制しているのは、間脳や小脳に分布する nNOS ニューロンの可能性或いは寄与率は少なく、脳幹部 nNOS ニューロンが主体であろうと考えられた。

これまで報告してきたように(平成11年度報告書、平成12年度報告書、1、2、3、4)、脳内の nNOS 活性を阻害すると交感神経活動が亢進する。この現象は特に食塩感受性高血圧で著明に現れ、緊張性交感神経活動の上昇だけでなく、圧受容器反射性抑制がかかる前のオリジナルな緊張性交感神経活動の著明な上昇も見られる。これら交感神経活動の抑制性調節は、昨年度までの研究結果でも、脳幹部 nNOS 活性に由来しているだろうと推定していた。今回の免疫組織染色の結果や間脳・小脳の結果を考慮すると、食塩感受性高血圧では、間脳や小脳ではなく脳幹部に広く分布する nNOS ニューロンが up-regulation され、これらニューロンによる交感神経活動の抑制性制御が増強されたものと考えられるに至った。これにより、nNOS ニューロンによる交感神経系抑制性制御の機構が一段と具体化してきた。

交感神経の新たな抑制性制御機構が明らかになりつつあるということは、大変興味がそそられ、かつ重要なことであるが、高食塩と交感神経活動のつながりを明らかにするのに、もう一つ重要な点がある。食塩感受性高血圧になると nNOS 性交感神経抑制機構が大幅に増幅されるのはいったいどのようなメカニズムによるものだろうか?これを調べるには、先ず、食塩感受性のあるラットとないラットでは成長過程で脳内 nNOS 活性の発現に差があるか否かを明らかにしておく必要がある。なぜなら、高血圧プローン動物では高血圧がまだ発症していないある成長時期に成長してからの高血圧状態を決定するある重要な一時期、'Critical period' が報告されているからである (8)。この時期ではまだ解明されていないある種の生物学的差異を示すのである。また、食塩負荷や高血圧という負荷がない状態で、成長過程における脳内 nNOS 発現に差があれば、脳内 nNOS 活性の発現そのものに遺伝的原因が推定される。しかし、今回の研究では、食塩負荷を与えなければ、各年齢の成長過程で脳組織 nNOS 活性の発現に両ラットライン間に有意差は生じないことがわかった。このことから、食塩負荷という入力により nNOS ニューロン性交感神経抑制機構の増幅が始まる、ということが明らかとなった。

5. 今後の課題

今回の研究により、圧受容器反射性抑制前交感神経活動に対して抑制性に制御している新たな抑制性調節系は、脳幹部に見られる4つ以上の神経核に分布する nNOS ニューロンであることが判明した。しかし、これらのニューロンとこれまでに確立されている既存の交感神経調節系とのつながりや、脳幹部のどの神経核の nNOS ニューロンが主体となっているのか、また、視床下部の nNOS ニューロンとの関係など、まだまだ不明な点が数多くある。一口で言えば、新たに発見された nNOS ニューロン性交感神経調節機構のシグナリング・パスウェイが全く不明である。これらの点を明らかにするため、今後、慢性破壊実験や電気生理学的手法を用いたいと考えている。

また、今回の研究では間脳や小脳の免疫組織染色を終了さすことが出来なかった。食塩感受性高血圧における nNOS ニューロンの脳内分布の全容を明らかにする

べく、これらの脳組織での免疫組織染色を完了したいと考えている。

食塩感受性のあるラットと無いラットとは、その成長過程において食塩負荷を与えないと脳内組織 nNOS 活性に差が生じないことがわかった。今後は、食塩負荷をかけた2群のラットの組織 nNOS 活性を測定し、成長過程、特に critical period と nNOS 活性発現との関係を調べたいとも考えている。

6．文献

1. Nishida Y, Chen QH, Tandai-Hiruma M, Terada S, Horiuchi J. Neuronal nitric oxide strongly suppresses sympathetic outflow in high-salt Dahl rats. *J. Hypertension* 19 (3): 627-634, 2001.
2. Nishida, Y., Horiuchi, J., Tandai-Hiruma, M., and Terada, S. Neuronal NOS inhibition dramatically increased tonic sympathetic discharge in salt-sensitive hypertensive Dahl rats. *XXXIV International Congress of Physiological Sciences Program Booklet*, pp. 24, 2001 and *Abstract CD-ROM of XXXIV International Congress of Physiological Sciences.*
3. 西田育弘、書間　恵、堀内城司　食塩感受性高血圧ラットにおける脳内 nNOS 活性の交感神経系に対する機能。*日本病態生理学会雑誌* Vol. **10** (**2**): 43, 2001.
4. 西田育弘、書間　恵、堀内城司　食塩感受性高血圧ラットでは脳幹部 nNOS 活性の亢進により交感神経活動を抑制している。*Japanese Journal of Circulation Research* **25** (**1**): 7, 2002.
5. Hayakawa H, Raiji L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension* **96**: 235-241, 1997.
6. Ni Z, Oveisi F, Varizi ND. Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt resistance Dahl rats. *Hypertension* **34**: 552-557, 1999.
7. Ikeda Y, Saito K, Kim J-Il, Yokoyama M. Nitric Oxide synthase isoform activities in kidney of Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* **26**: 1030-1034, 1995.
8. Zicha J, Kunes J. Ontogenetic Aspects of Hypertension Development: Analysis in the Rat. *Physiol Rev* **79**: 1227-1282, 1999.
9. Hsu SM, Raine L, Fanger H., Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29**:577-580, 1981.
10. Paxinos G, Watson C. Plate 55. (In) The Rat Brain in stereotaxic coordinates. 4th Edition. Academic Press, San Diego, 1998.

Brain-tissue nNOS activities and nNOS immunohistochemical reactivities in Dahl salt hypertensive rats.

Yasuhiro Nishida[1], Megumi Tandai-Hiruma[1], Jouji Horiuchi[1], Hiroshi Sakamoto[2]

[1]National Defense Medical College, Department of Physiology II
[2]Yamanashi Medical University, Department of Anatomy

Summary

We have demonstrated that intraperitoneal administration of 7-nitroindazole or intracerebroventricular injection of S-methyl-L-thiocitrullin markedly increases tonic sympathetic discharge, especially sympathetic discharge generated before baroreflex-mediated inhibition, in Dahl salt-sensitive (DS) hypertensive rats. In the present study, we have focused on the brain-tissue nNOS activities in the brainstem, diencephalons and cerebellum, and also nNOS immunohistochemical reactivities in the brainstem of Dahl salt hypertensive rats.

Methods and Results: DS and Dahl salt-resistant (DR) rats were fed a regular salt (0.4% NaCl) or a high salt (8% NaCl) diet for 4 weeks. After the sodium load, nNOS activities of the brain stem, diencephalons and cerebellum were determined by the citrulline method. The DS hypertensive rats showed significant increase in nNOS activity of the brain stem but did not of the diencephalons or cerebellum. Brain-tissue nNOS activities at 2-week-old, 4-week-old, 8-week-old and 12-week-old ages were compared between in normotensive DS and DR rats. However, there was no significant difference at any age or in any parts of brain between the two rat lines. Immunohistochemical reactivities of nNOS were examined in the brainstem of hypertensive and normotensive DS rats by the modified ABC method. nNOS was strongly expressed in the neuronal cells of several nuclei in the brainstem of both hypertensive and normotensive Dahl rats. More than 4 nuclei in the brainstem showed nNOS reactivities. The total number of nNOS-reactive cells was larger in hypertensive rats than in normotensive rats.

Conclusion: nNOS neurons in the brainstem but not in the diencephalons or cerebellum may be up-regulated in salt-sensitive hypertensive rats. The up-regulated nNOS neurons may strongly suppress tonic sympathetic discharge, generated before baroreflex-mediated inhibition, in hypertensive Dahl rats. The neuronal NO-mediated suppression mechanism may be markedly enhanced in salt-induced hypertension. The genetic differences between DS and DR rats do not produce any significant difference in brain-tissue nNOS expressions without sodium load or hypertensive load.