

発表番号 54

食塩感受性高血圧およびそれに伴う腎症進展における
糸球体尿細管フィードバック機構異常の関与

助成研究者：安部 陽一 (香川医科大学薬理学講座)

共同研究者：西山 成 (香川医科大学薬理学講座)

山本 徳則 (名古屋大学医学部泌尿器科)

玉置 俊晃 (徳島大学医学部薬理学講座)

岩尾 洋 (大阪市立大学大学院研究科分子病態薬理学)

木村 正司 (香川医科大学薬理学講座)

松向寺 孝臣 (香川医科大学第二内科学講座)

食塩感受性高血圧に随伴する腎症の進展に、糸球体尿細管フィードバック(Tubuloglomerular feedback: TGF)機構の異常が関与している可能性が指摘されているが、TGF 機構の評価が非常に困難であり、その解析は全く進んでいない。本研究では、最新の技術を駆使することによって細動脈レベルでのTGF反応の評価を可能とするシステムを確立し、食塩感受性高血圧に伴う腎症進展におけるTGF機構異常の関与について検討することを目的とした。さらに、アンジオテンシンIIならびに活性酸素がTGF機構に関与していることも示されていることから、Dahl食塩感受性(DS)ラットの腎内局所アンジオテンシンIIおよび酸化ストレスの産生についても検討を行った。実験はDSラットを、その対照としてDahl食塩抵抗性(DR)ラットに、high salt diet (H: 8%) もしくはlow salt diet (L: 0.3%) 添加飼料を4週間給飼して行った。DS/Hラットでは高血圧の進展に伴い、ボーマン腔の異常な拡大などの形態異常を生じている機能糸球体と、灌流されていない糸球体硬化像を示す無機能糸球体が存在していた。また、DS/Hラットの機能糸球体では輸入細動脈が著明に収縮していたが、輸出細動脈径はむしろ拡張している傾向を認めた。さらに、DS/HラットではアセタズラミドによるTGF活性の亢進に対する輸入細動脈の収縮反応が減弱していた。一方、DS/Hラットでは腎内局所アンジオテンシンII含有量が腎組織中アンジオテンシノーゼンの異常な過剰発現によって保たれており、腎組織中AT1受容体の発現も維持されていた。また、DS/Hラットでは腎内局所NAD(P)H oxidaseの発現亢進が生じており、大動脈壁からの活性酸素産生量および腎組織中のTBARS含有量が増加していた。DS/Hラットに対するAT1受容体拮抗薬ならびに抗酸化剤の投与は、大動脈壁活性酸素産生量および腎組織中TBARS含有量を対照値にまで減少させ、強い腎保護効果を示した。以上、食塩感受性高血圧ラットでは糸球体の形態異常のみならずTGF機構の異常が存在していることが証明された。また、食塩感受性高血圧症で生じる腎障害には腎内局所レニン・アンジオテンシン系の維持とそれに伴うNAD(P)H oxidase活性化を介した酸化ストレスの産生が深く関与しており、AT1受容体拮抗薬および抗酸化剤の投与が有用であると考えられた。

1

助成番号： 0232

食塩感受性高血圧およびそれに伴う腎症進展における糸球体尿細管
フィードバック機構異常の関与

助成研究者： 安部 陽一 (香川医科大学薬理学講座)
共同研究者： 西山 成 (香川医科大学薬理学講座)
山本 徳則 (名古屋大学医学部泌尿器科)
玉置 俊晃 (徳島大学医学部薬理学講座)
岩尾 洋 (大阪市立大学大学院研究科分子病態薬理学)
木村 正司 (香川医科大学薬理学講座)
松向寺 孝臣 (香川医科大学第二内科学講座)

【研究目的】

食塩感受性高血圧症に対して適切な治療を行わない場合、糸球体硬化症を始めとする難治性腎症を併発し末期腎不全に陥る¹⁾。その病態メカニズムについての詳細は不明であるが、近年糸球体尿細管フィードバック(Tubuloglomerular feedback: TGF)機構の異常が成因である可能性が指摘されている^{1,2)}。しかしながら、TGF機構の評価が非常に困難であるため、その解析は全く進んでいない。腎臓は非常に血流の豊富な実質臓器であり、微小循環を *in vivo* の状態で直接評価するのは不可能であるとされていた。これに対し最近我々は、高感度 CCD カメラに着目して腎微小循環の観察を直接可能とするシステムの確立を試みている³⁾。従来 CCD カメラの実質臓器における応用は、解像度の問題により比較的血流の少ない心臓や脳に限られていた。しかしながら最近になって、カメラの先端にペンシル型のレンズを装着することにより、光源を深部にまで浸透させ、広範囲での焦点調節を可能とした³⁾。本研究では、これら技術を駆使して今まで不可能であった細動脈レベルでの TGF 反応の評価を可能とするシステムを確立することを最初の目的とした。さらに、この画期的なシステムを用いて、食塩感受性高血圧に伴う腎症進展における TGF 機構異常の関与について検討した。

一方、最近の我々の研究により、腎内局所においてアンジオテンシン II は AT₁ 受容体を介して活性酸素を産生し、これが各種高血圧および腎症の進展に密接に関与することが明らかとなっている^{4,6)}。しかも、アンジオテンシン II ならびに活性酸素が TGF 機構異常に関与していることも証明されている^{7,8)}。ところが食塩感受性高血圧症では、血漿中レニンおよびアンジオテンシン II 濃度が低下しているという結果よりのみ、腎症の進展におけるアンジオテンシン II の関与が少ないとされてきた^{9,10)}。しかしながら腎内局所レニン・アンジオテンシン系は全身のそれとは完全に独立して機能していることから^{11,12)}、これを直

接評価することが必須である。そこで本研究は、食塩感受性高血圧症で生じる腎症に腎内局所アンジオテンシンIIのAT₁受容体を介した酸化ストレス産生が関与しているか否かを明らかにし、その予防および治療法としてAT₁受容体拮抗薬および抗酸化剤の有用性を検討した。

【研究方法】

1. 食塩感受性高血圧ラットにおける TGF 機構の評価

1.1 腎微小循環観察システムの確立

本研究で使用した腎微小循環観察システムは、川崎医科大学泌尿器科学・医用工学教室にて開発されたものを応用した³⁾(図1)。特殊ペンシル型レンズ(日本光電、PL-240S)に高感度 CCD カメラ (SONY, XC-E150) を装着し、得られた画像はカメラコントローラ(日本光電、CB-240S)を通してイメージエンハンサー(浜松フォトニクス、C6086)に送られ、処理された。次いで画像はアップスキャンコンバーターユニット(マイコンソフト、XVGA-1pro)およびビデオスキャンコンバーターユニット(マイコンソフト、XRGB-2plus)を通じて拡大された。その後、映像はビデオデッキ(SONY、DVCAM-DSR-20)にて録画され、モニター(SONY、PVN-20M2MDJ)に映し出された。映像は同時にコンピューターにも保存され、血管径の計測はNIH イメージもしくは WinRoof Professional (Mitani Co., Ltd) を使用して行われた。尚、本システムの最終的な倍率は、最大で4,200倍となった。

1.2 TGF 機構評価法の確立

本実験は、TGF 反応の評価法を確立する目的で行われた。7-10 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットをイナクチンあるいはペントバルビタール麻酔下に、薬剤投与および動脈圧モニター用として大腿動・静脈にそれぞれカテーテルを留置した。後腹膜切開により左腎露出後、腎被膜を3 mm x 3 mm の径で切除して腎表面に高感度 CCD カメラ付きペンシル型レンズを装着し、血管径を測定する腎輸入・輸出細動脈を特定して対照時の血管径を測定した。その後、静脈内にアセタゾラミドおよびフロセミドを投与して輸入・輸出細動脈径を直接計測することで糸球体レベルにおける TGF 反応の変化を観察した。これまでの我々の様々な実験系での研究により、アセタゾラミドおよびフロセミドはそれぞれ TGF 活性を亢進・減弱させることが明らかとなっている^{13,14)}。しかしながら、in vivo のラットを使用する実験系でのこれら薬剤の用量設定は確立されていなかった。そのため、まずアセタゾラミドおよびフロセミドをそれぞれ 0.5-5 mg/kg, bolus + 0.5-10 mg/kg/H, infusion の用量で静脈内投与し、有効に TGF 活性を亢進・減弱させる用量の設定を行った。その結果、アセタゾラミド (2 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/H, infusion, n=7) は全身循環に影響を与えることなく、輸入細動脈径を有意に収縮させることが明らかとなった(図2)。これに対し、輸出動脈径はアセタゾ

ラミドによって全く影響を受けなかった (図 2)。また、フロセミド(1 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/H, infusion, n=7)の静脈内投与は、アセタゾラミドによる輸入細動脈径の減少を完全に対照値にまで復した (図 2)。これらの実験結果をふまえて以下の実験では、アセタゾラミドは 2 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/H, infusion、フロセミドは 1 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/H, infusion の用量で静脈内に投与された。

1.3 Dahl 食塩感受性ラットにおける TGF 反応の評価

5-6 週齢雄性 Dahl 食塩感受性 (DS)ラットに high salt diet (H: 8%, n=5) もしくは low salt diet (L: 0.3%, n=5) 添加飼料を 4 週間給飼した。ペントバルビタール麻酔下に薬剤投与および動脈圧モニター用として大腿動・静脈にそれぞれカテーテルを留置した。上記のごとく腎表面に高感度 CCD カメラ付きペンシル型レンズを装着し、まず糸球体・ネフロン形態変化を観察した。その後血管径を測定する腎輸入・輸出細動脈を特定し、対照時の血管径を測定した。その後静脈内に、1)アセタゾラミド(2 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/H, infusion)、2)フロセミド(2 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/H, infusion)を投与し、輸入・輸出細動脈径を計測することで糸球体レベルにおける TGF 反応を観察した。

2. Dahl 食塩感受性ラットにおける腎内レニン・アンジオテンシン系および酸化ストレスの評価

実験は 5-6 週齢雄性 Dahl 食塩感受性 (DS)ラットを、その対照として Dahl 食塩抵抗性 (DR) ラットを用いて行われた。5-6 週齢より high salt diet (H: 8%) もしくは low salt diet (L: 0.3%) 添加飼料を 4 週間給飼した(DR/L; n=7, DR/H; n=7, DS/L; n=8, DS/H; n=9)。また、別の群の DS/H ラットに対して AT₁ 受容体拮抗剤である candesartan cilexetil (10 mg/kg/day, n=9)あるいは活性酸素スカベンジャーである 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidinoxyl (Tempol: 3 mmol/L, n=8)^{4,6)}を飲水投与した。さらに血圧の低下による腎保護効果を検討するため、別群の DS/H ラットに対して非特異的降圧薬であるヒドララジン(0.5mmol/L, n=7)を飲水投与した。4 週経過の後、断頭屠殺を行い血液および各臓器の採取を行った。弓部大動脈摘出後、直ちに活性酸素産生量を Lucigenin-chemiluminescence 法により測定し^{4,6)}、腎臓の一部はアンジオテンシン II 測定あるいは組織評価のためサンプル処置を行った¹¹⁾。その他の測定に使用する血漿・臓器はすべて液体窒素にて凍結し、後日アッセイを行った。レニン活性・アンジオテンシン II 濃度はラジオイムノアッセイにて^{11,15)}、アンジオテンシンノーゲンおよび AT₁ 受容体の蛋白量はウエスタンブロッティング法¹⁵⁾にて測定した。さらに、酸化ストレスのマーカーとして thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS)の腎組織中濃度を測定した¹⁶⁾。また、活性酸素の主な産生源である NAD(P)H Oxidase の重要な膜構成成分である p22^{phox}・Nox-1 の mRNA をノザンブロッティング法にて測定した¹⁶⁾。腎障害の評価は、蛋白尿あるいは腎臓組織中ヒドロキシプロリン含有量より算出したカラー

ゲン量の測定によって行われた¹⁷⁾。

成績は mean \pm SEM で表示し、統計学的検討には one-way analysis of variance と Newman-Keuls post hoc test を用いた。

【研究結果】

1. Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける糸球体血行動態および TGF 反応の異常

ペントバルビタール麻酔 DS/H ラットの平均動脈圧は 148 ± 9 mmHg ($n=5$)であり、DS/L ラットは 102 ± 5 mmHg であった($n=5$)。腎重量/体重比は、DS/L ラット($0.38\pm 0.01\%$)と比較して DS/H ラットで上昇していた($0.56\pm 0.02\%$)。CCD カメラにて直接映し出された DS/H ラットの糸球体形態では、糸球体内硬化に伴う無機能糸球体が観察された。また、DS/H ラットの機能している糸球体においても、ボーマン腔の異常な拡大などの形態異常が観察された (図 3C)。また、対照時における DS/H ラットの機能糸球体における輸入細動脈径は、 6.1 ± 1.3 μm であり、DS/L ラット(9.4 ± 0.3 μm)と比較して有意に狭小していた (図 3D)。一方、DS/H ラットの機能糸球体における輸出細動脈径は DS/L ラットと比較して拡張している傾向にあったものの、有意な変化は認められなかった。アセタゾラミドによって TGF 活性を亢進させると、DS/L ラットの輸入細動脈径は $-17.0\pm 2.9\%$ 減少した (図 3E)。この輸入細動脈径の減少は、Sprague-Dawley ラットのそれと同程度であった。これに対し、アセタゾラミドは DS/H ラットの機能糸球体における輸入細動脈径を $-3.7\pm 0.4\%$ しか減少させず、この変化は DS/L ラットと比較して有意に小さいものであった (図 3E)。

2. Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける腎内レニン・アンジオテンシン系および酸化ストレスの異常

DR ラットに高食塩を与えても Tail-cuff 法にて測定した収縮期血圧には有意な変化を生じなかったが(134 ± 4 mmHg)、DS/H ラットでは著明な高血圧が認められた (208 ± 7 mmHg)。DS/H ラットに対してカンデサルタンを投与しても、血圧の上昇に影響を与えなかった (199 ± 10 mmHg)。一方、Tempol およびヒドララジンは DS/H ラットの高血圧発症を同程度抑制した (Tempol: 152 ± 4 mmHg, ヒドララジ: 150 ± 4 mmHg)。DS/H ラットでは重篤な蛋白尿が観察された (DS/L ラット: 31 ± 1 mg/day, DS/H ラット: 348 ± 13 mg/day) が、この蛋白尿はカンデサルタン(128 ± 11 mg/day)および Tempol (97 ± 10 mg/day)投与によって著明に減少した。ヒドララジンは蛋白尿を減少させたが(198 ± 24 mg/day)、その効果はカンデサルタンあるいは Tempol と比較して有意に弱いものであった。同様の結果が、腎皮質中コラーゲン含有量でも認められた。

血漿中のアンジオテンシノーゲン蛋白量は、高食塩食給飼によって DR および DS の両ラットで同様に減少した (図 4A, B)。一方、アンジオテンシノーゲンの腎組織中蛋白量

および尿中排泄量は、DS/H ラットでのみで著明に増加していた (図 4C, D)。DR ラットおよび DS ラットは共に、高食塩食により血漿中レニン活性およびアンジオテンシン II 濃度が有意に減少した。同様に、腎組織中アンジオテンシン II 含有量は DR/L ラットと比較して (357 ± 54 fmol/g)、DR/H ラットでは減少していた (194 ± 9 fmol/g)。これに対し、DS/H ラットでは腎組織中アンジオテンシン II 含有量は維持されていた (図 4E)。DS/H ラットにカンデサルタンおよび Tempol 投与すると、腎組織中アンジオテンシン II 含有量は著明に減少した (図 4E)。一方、ヒドララジンは腎組織中アンジオテンシン II 含有量に対して影響を与えなかった (図 4E)。DR ラットに高食塩食を給飼すると腎皮質組織中 AT1 受容体の蛋白量は約 30% 減少したが、DS/H ラットでは AT1 受容体発現は維持されていた。

DR ラットに高食塩食を給飼しても腎皮質組織中 p22-phox, Nox-1 の発現量に変化は認められなかったが、DS/H ラットでは有意な腎皮質組織中 p22-phox, Nox-1 の発現量の増加を認めた (図 5A, B)。DS/H ラットの大動脈壁活性酸素産生量および腎組織中 TBRAS 含有量は、DS/L ラットよりも高値であった (図 5C, D)。カンデサルタンあるいは Tempol の投与は、血管壁活性酸素産生量および腎組織中 TBRAS 含有量を DS/L ラットと同程度の値にまで減少させた (図 5C, D)。ヒドララジンは血管壁活性酸素産生量および腎組織中 TBRAS 含有量を減少させたが、その効果はカンデサルタンあるいは Tempol と比較して有意に弱いものであった (図 2C, D)。

【考察】

高血圧に対する治療が不適切である場合、糸球体濾過の上昇にともない糸球体に対する負荷が増大して結果的には腎硬化症にいたる^{1,2)}。しかしながら、一時的な血圧上昇に伴う腎灌流圧の上昇に対しては、腎臓自身が能動的に腎血流量及び糸球体濾過量を適切に制御して生体の恒常性を保つのみならず、腎臓自らの機能を保護している¹⁴⁾。この現象は腎自己調節と呼ばれ、選択的な腎輸入細動脈の調節により機能しており、腎臓に特有な TGF 機構と筋原反応の二つの働きから構成されている¹⁴⁾。このうち我々は従来より TGF の腎自己調節における重要性かつ必然性を提唱してきた¹⁴⁾。特に食塩感受性高血圧症に伴う腎障害には TGF 機構の異常が重要な役割を果たしていると考えられているが²⁾、TGF 機構の評価自体が非常に困難であり詳細な解析は行われていなかった。今回、最新の技術を駆使することによって、腎細動脈レベルでの TGF 反応の評価を直接可能するシステムの確立に成功した。今後、この画期的なシステムによって今まで明らかとなっていなかった TGF 機構の解明が飛躍的に進むと考えている。

食塩感受性高血圧ラットで生じる腎障害には重篤な糸球体障害が伴うことが知られているが^{1,2)}、本研究の *in vivo* における観察ではボーマン腔の異常な拡大などの形態異常を生じている機能糸球体と、灌流されていない無機能糸球体が存在することが確認された。これらの観察結果は、機能糸球体が無機能糸球体の働きを代償しており、それによって機能

している残存糸球体の負荷がさらに上昇している可能性を示唆するものである。このような概念は hyperfiltration theory と言われ、糖尿病性腎症の進展などで提唱されているものであるが¹⁸⁾、これが実際に生体で存在していることが今回初めて示された。また今回の研究では、食塩感受性高血圧ラットの機能糸球体では、輸入細動脈が著明に収縮していることが示された。これに対して輸出細動脈径はむしろ拡張傾向を認めた。さらに正常血圧ラットと比較して、アセタゾラミドによる TGF 活性の亢進に対して輸入細動脈の収縮反応が減弱していることが明らかとなった。これらの実験結果は、食塩感受性ラットでは高血圧の進展に伴い TGF 反応がすでに増強されており、輸入細動脈が収縮して糸球体内圧を減少させ、糸球体自体を保護している可能性を示唆するものである。しかしながら単に輸入細動脈が障害を受けてこのような反応を生じている可能性も否定できず、今後さらなる検討が必要である。さらに、機能糸球体と無機能糸球体において異なった TGF 反応が存在している可能性も考えられる。したがって、糸球体障害が進展する過程、すなわち本実験モデルの場合、高食塩食負荷後 1-2 週での詳細な観察が必要である。

食塩感受性高血圧症では、血漿中レニンおよびアンジオテンシン II 濃度が低下しているという結果よりのみ、腎症の進展におけるアンジオテンシン II の関与が少ないとされてきた^{7,8)}。本研究では、食塩感受性高血圧ラットにおいて腎内局所アンジオテンシン II 含有量が腎組織中アンジオテンシノーゼンの異常な過剰発現によって保たれていることが明らかとなった。また、腎組織中 AT1 受容体の発現も維持されていることが示された。これらの実験結果は、腎内局所レニン・アンジオテンシン系が全身のそれとは全く独立して保たれていることを示すものである。実際、食塩感受性高血圧ラットに AT1 受容体拮抗薬であるカンデサルタンを投与しても血圧には変化を生じないにもかかわらず、著明な腎保護効果を示した。アンジオテンシン II によって生じる臓器障害には様々なメカニズムの関与が提唱されているが¹⁰⁾、その中で特に注目を集めているのが NAD(P)H oxidase を介した活性酸素の産生である^{4,6,16)}。本研究は、食塩感受性高血圧ラットで生じる腎障害に、腎内局所 NAD(P)H oxidase の発現亢進が伴っていることを明らかにした。さらに、大動脈壁からの活性酸素産生量および腎組織中の TBARS 含有量も増加していた。これらの実験結果は、食塩感受性高血圧ラットに随伴する腎障害には、腎内局所レニン・アンジオテンシン系の維持とそれに伴う NAD(P)H oxidase 活性化を介した酸化ストレスが深く関与していることを示唆するものである。実際、AT1 受容体拮抗薬の投与により大動脈壁からの活性酸素産生量および腎組織中の TBARS 含有量は対照値にまで減少した。また、抗酸化剤である Tempol も食塩感受性高血圧ラットで生じる腎障害に対して著明な腎保護効果を示した。一方で、非特異的抗圧薬であるヒドララジンは Tempol と同程度血圧を減少させたにもかかわらず、その腎保護効果は Tempol と比較して有意に弱いものであった。このように、Tempol の腎保護効果は血圧降下のみによって生じているのではなく、その抗酸化作用が重要な役割を果たしているものと考えられた。

【今後の課題】

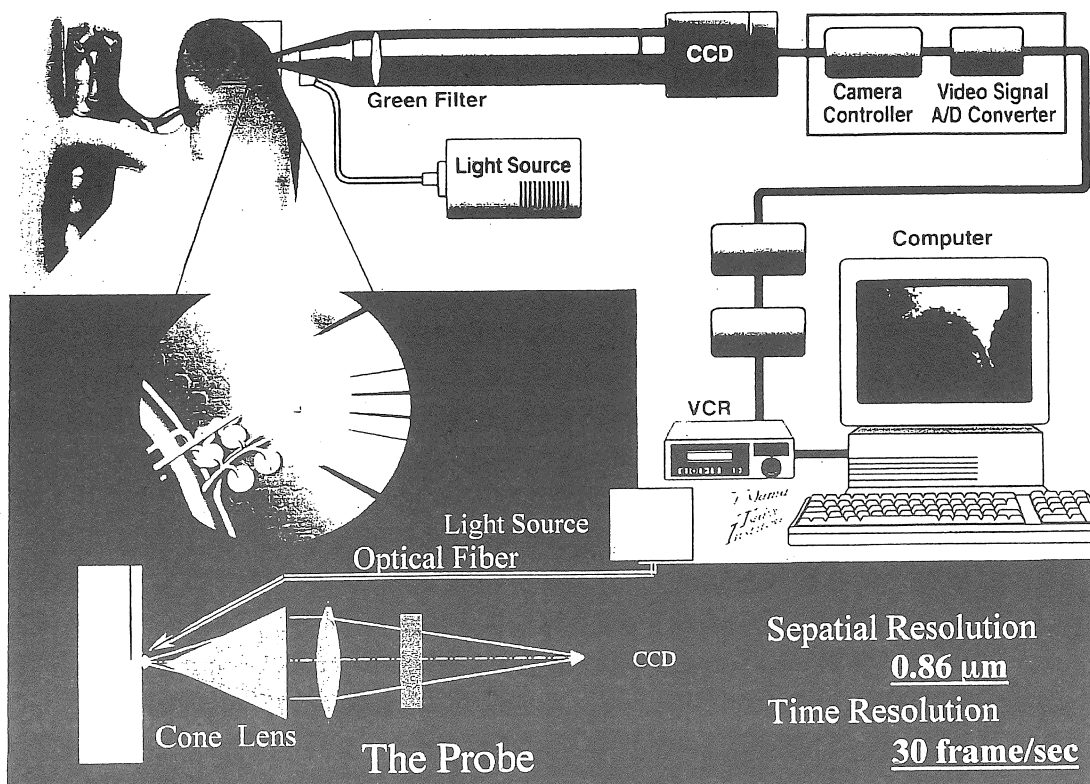
以上、本研究結果によって、食塩感受性高血圧ラットで発症する腎症の進展には TGF 反応の異常ならびに腎内局所レニン・アンジオテンシン系の維持と酸化ストレスの産生増大が伴っていることが明らかとなった。最近、アンジオテンシン II 依存性高血圧ラットや自然発症高血圧ラットにおいてアンジオテンシン II および活性酸素が TGF 機構異常に関与していることが示されている^{7,8)}。食塩感受性高血圧ラットで生じている腎内局所レニン・アンジオテンシンと酸化ストレス産生の異常が直接 TGF 機構の変化に関与しているか否かについて、今後さらなる検討が必要である。また、糸球体が基質的には障害されておらず、機能的にのみ障害される過程での TGF 機構の観察が必須であると考えられる。今後これら実験の遂行により、食塩感受性高血圧症およびそれに併発する腎症進展メカニズムが明らかとなり、実際に AT₁ 受容体拮抗薬や抗酸化剤の臨床応用が予後の著明な向上をもたらすことを期待している。

【文献】

1. Raij, L., Azar, S. and Keane, W.: Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int.*, 26: 137-143, 1984.
2. Wilcox, C.S. and Welch W.J.: TGF and nitric oxide: effects of salt intake and salt-sensitive hypertension. *Kidney Int Suppl.*, 55: S9-S13, 1996.
3. 山本徳則、戸村裕一、西山 成、山森伸二、森岡政明、小笠原康夫、梶谷文彦。高血圧および糖尿病ラット病態モデルにおける生体腎微小循環の可視化。
日本バイオレオロジー学会誌, 16: 91-100, 2003.
4. Nishiyama, A., Fukui, T., Fujisawa, Y., Rahman, M., Tian, RX., Kimura, S. and Abe, Y.: Systemic and regional hemodynamic responses to tempol in angiotensin II-infused hypertensive rats. *Hypertension.*, 37: 77-83, 2001.
5. Majid, D.S.A. and Nishiyama, A.: Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension.*, 39: 293-297, 2002.
6. hokoji, T., Nishiyama, A., Fujisawa, Y., Hitomi, H., Kiyomoto, H., Takahashi, N., Kimura, S., Kohno, M. and Abe, Y.: Renal sympathetic nerve responses to Tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.*, 41: 266-273, 2003.
7. Wilcox, C.S. and Welch, W.J.: Interaction between nitric oxide and oxygen radicals in regulation of tubuloglomerular feedback. *Acta. Physiol. Scand.*, 168: 119-124, 2000.
8. Ichihara, A., Imig, J.D. and Navar, L.G.: Neuronal nitric oxide synthase-dependent afferent arteriolar function in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension.*, 33: 462-466, 1999.
9. Otsuka, F., Yamauchi, T., Kataoka, H., Mimura, Y., Ogura, T. and Makino, H.: Effects of chronic inhibition of ACE and AT₁ receptors on glomerular injury in dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol.*, 274: R1797-R1806, 1998.

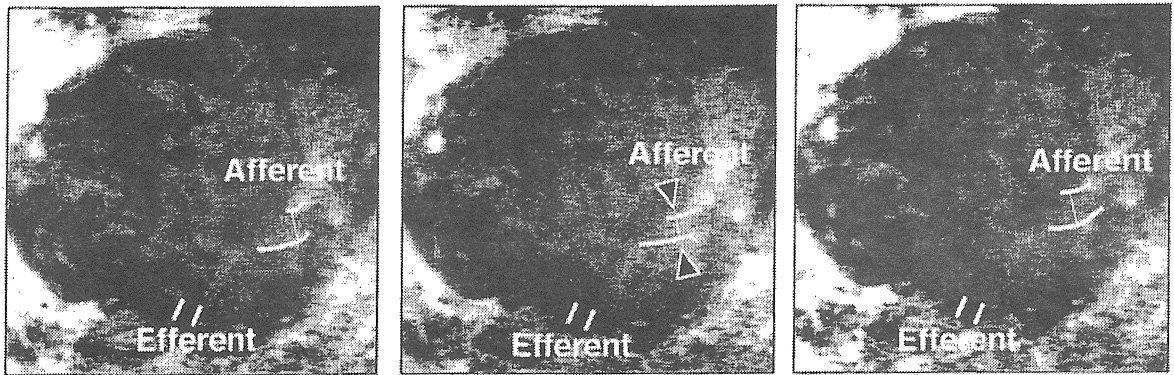
10. Zhao, X., White, R., Van Huysse, J. and Leenen, F.H.: Cardiac hypertrophy and cardiac renin-angiotensin system in Dahl rats on high salt intake. *J. Hypertens.*, 18: 1319-1326, 2000.
11. Nishiyama, A., Seth, D.M. and Navar, L.G.: Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats. *Hypertension.*, 39: 129-134, 2002.
12. Navar, L.G. and Nishiyama, A.: Intrarenal formation of angiotensin II. *Contrib. Nephrol.*, 135: 1-15, 2001.
13. Nishiyama, A., Majid, D.S., Taher, K.A., Miyatake, A. and Navar, L.G.: Relation between renal interstitial ATP concentrations and autoregulation-mediated changes in renal vascular resistance. *Circ. Res.*, 86: 656-662, 2000.
14. Nishiyama, A. and Navar, L.G.: ATP mediates tubuloglomerular feedback. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 283: R273-R275; discussion R278-R279, 2002.
15. Kobori, H., Nishiyama, A., Harrison-Bernard, L.M. and Navar, L.G.: Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension. *Hypertension.*, 41: 42-49, 2003.
16. Fukui, T., Yoshiyama, M., Hanatani, A., Omura, T., Yoshikawa, J. and Abe, Y.: Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281: 1200-1206, 2001.
17. Noma, T., Mizushige, K., Yao, L., Yu, Y., Kiyomoto, H., Hosomi, N., Kimura, S., Abe, Y., Ohmori, K. and Matsuo, H.: Alteration in aortic wall stiffness and accumulation of collagen during the prediabetic stage of type II diabetes mellitus in rats. *Jpn. Circ. J.*, 63: 988-993, 1999.
18. Neuringer, J.R. and Brenner, B.M.: Glomerular hypertension: cause and consequence of renal injury. *J. Hypertens. Suppl.*, 10: S91-S97, 1992.

Fig. 1. Schematic illustration of the microscope system



Pencil lens-probe	Nihon Kohden, CO., LTD., PL-240S.
CCD camera	SONY, XC-E 150.
Camera controller	Nihon Kohden, CO., LTD., CB-240S.
Video signal A/D converter	
Image-enhancing processor	Hamamatsu Photonics CO., LTD., C6086.
Scan converter unit	Miconsoft, XVGA-1pro and XRGB-2plus
VCR	SONY, DVCAM-DSR-20
Monitor	SONY, PVN-20M2MDJ.
Computer system	Mitani CO., LTD., WinROOF Professional or NIH image.

Fig. 2. Afferent and efferent arteriolar changes in responses to alterations in TGF activities

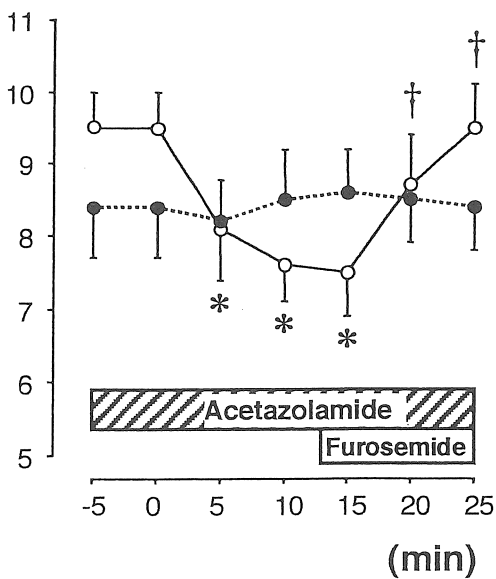


A: Control

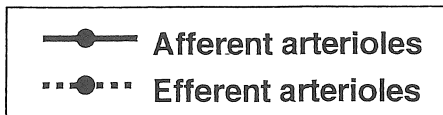
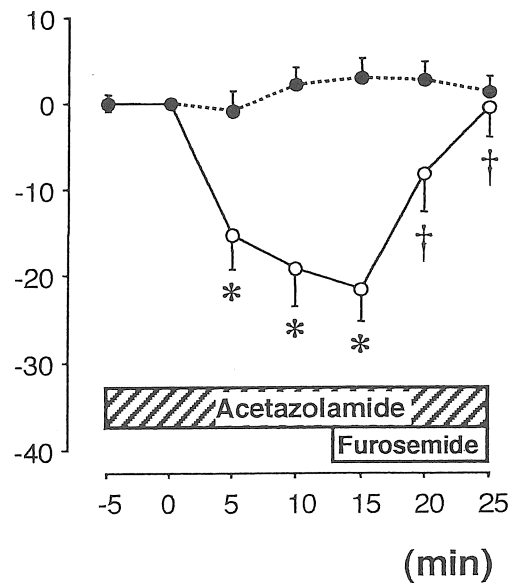
B: Acetazolamide

C: Acetazolamide + Furosemide

D: Diameter (μm)

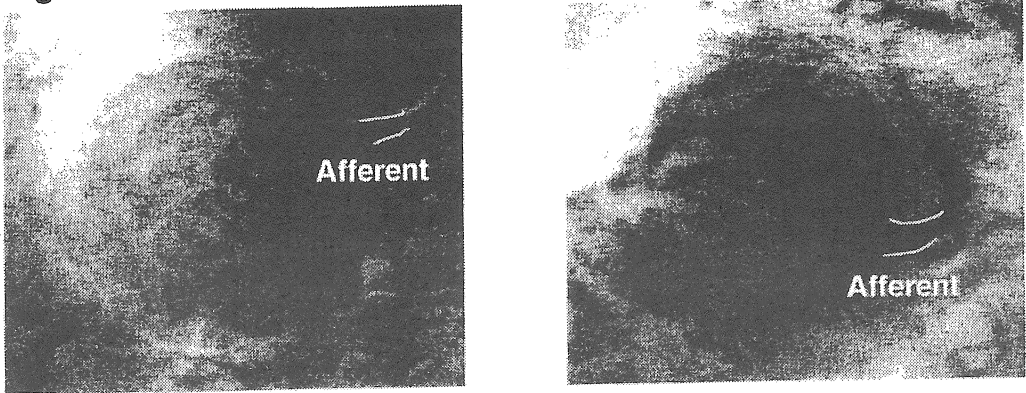


E: %changes in diameter



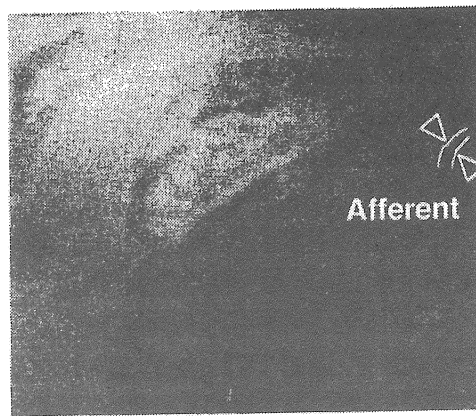
* $P < 0.05$ vs. 0 min, † $P < 0.05$ vs. Acetazolamide alone (15 min).

Fig. 3. Afferent arterioles in DS/L and DS/H rats



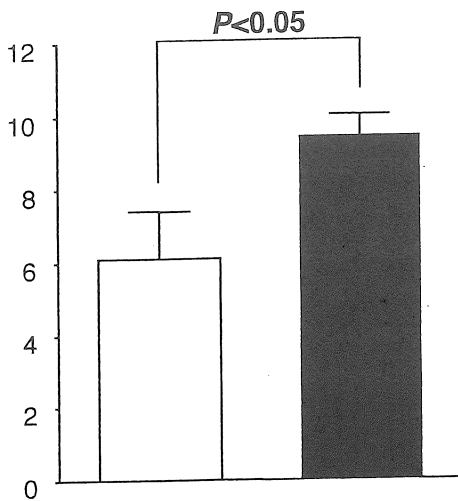
A: DS/L rats

B: DS/L rats

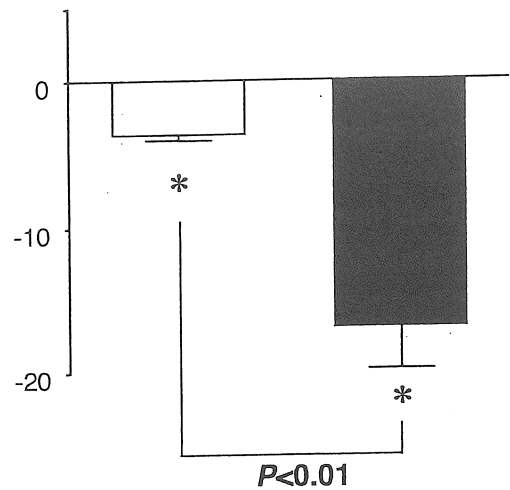


C: DS/H rats

D: Afferent arteriolar diameters (μm)



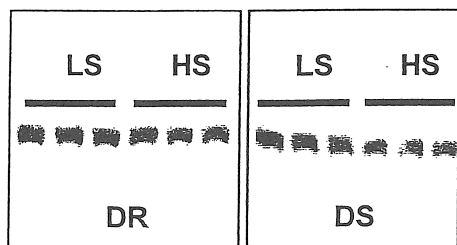
E: Afferent arteriolar responses to acetazolamide (%)



* $P < 0.05$ vs. baseline.

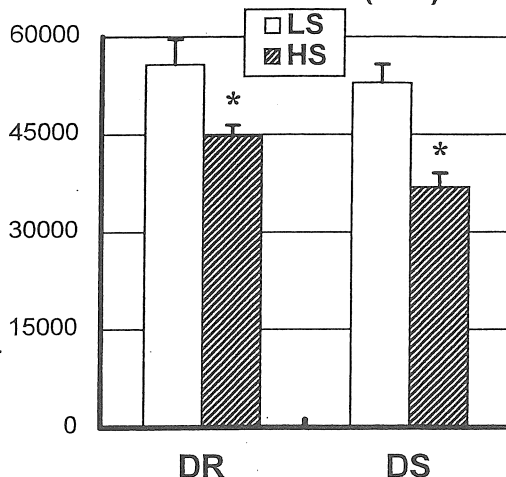
Fig. 4. Renin-angiotensin system in Dahl rats

A: Plasma angiotensinogen (AGT) levels

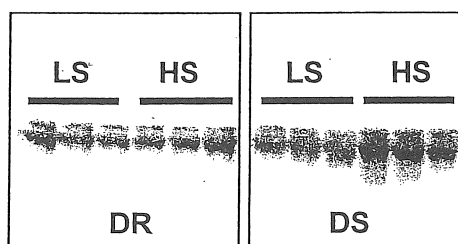


* $P < 0.05$ vs. DR rats.

B: Plasma AGT levels (IDV)

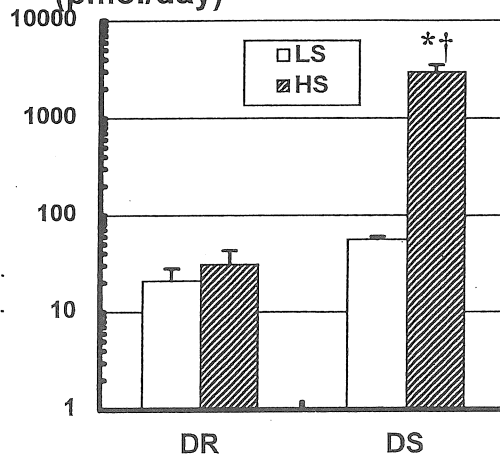


C: Kidney AGT levels



* $P < 0.05$ vs. DR rats.
† $P < 0.05$ vs. Low salt diet.

D: Urinary AGT excretion (pmol/day)



E: Kidney Ang II contents (fmol/g)

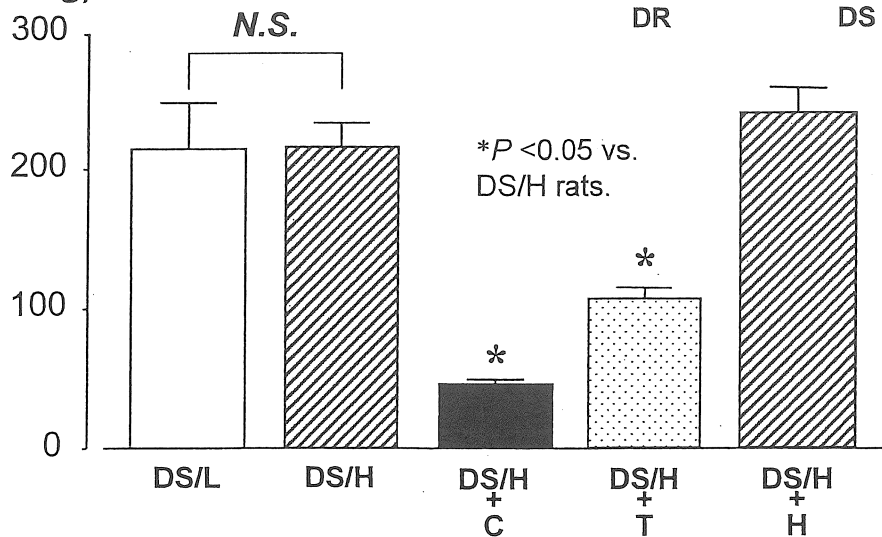
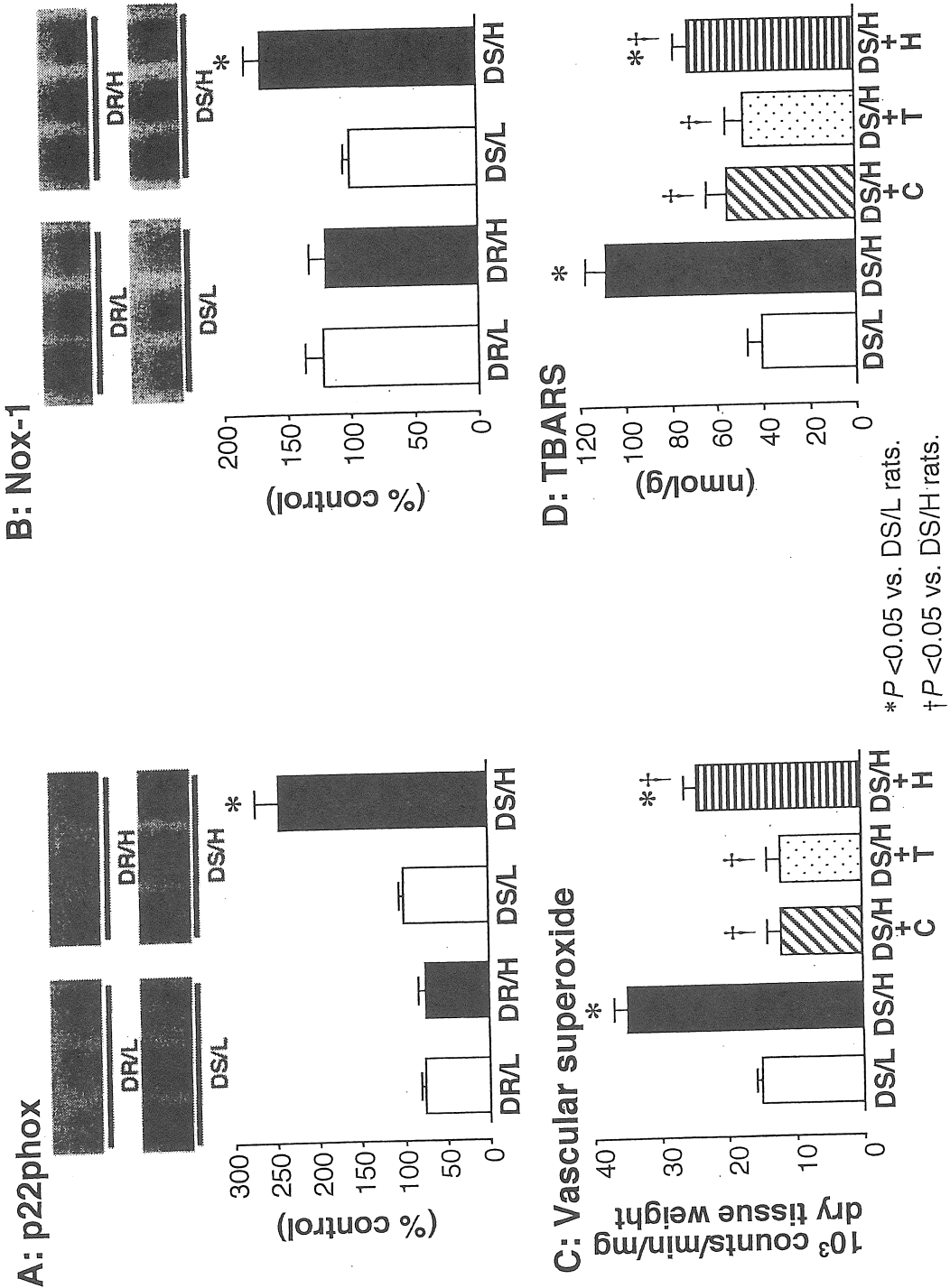


Fig. 5. Reactive oxygen species in the kidneys of Dahl rats



Involvement of altered tubuloglomerular feedback system in the renal injury during the development of salt-induced hypertension

¹Youichi Abe, ¹Akira Nishiyama, ²Tokunori Yamamoto, ³Toshiaki Tamaki, ⁴Hiroshi Iwao,
¹Shoji Kimura, ⁵Takatomi Shokoji

¹Dept. of Pharmacology and ⁵Second Dept. of Internal Medicine, Kagawa Medical University,

²Dept. of Urology, Nagoya University School of Medicine, ³Dept. of Pharmacology, The University of Tokushima School of Medicine, ⁴Dept. of Pharmacology, Osaka City University Medical School.

Summary

It has been suggested that tubuloglomerular feedback (TGF) mechanism plays a critical role in the progression of renal injury in salt-induced hypertension. Here, we conducted studies to visualize afferent arteriolar and efferent arteriolar responses to alterations in TGF activity directly in Dahl salt-sensitive (DS) rats. DS rats were maintained on high (H: 8.0% NaCl) or low (L: 0.3% NaCl) salt diet for 4 wk. An intravital tapered-tip lens-probe (pencil lens-probe) videomicroscopy with a charge-coupled device camera was used in anesthetized rats, and the superficial afferent and efferent arteriolar diameters were measured before and during the enhanced TGF activity induced by acetazolamide (ACZ). DS/H and DS/L rats were 148±9 and 102±5 mmHg, respectively. ACZ (2 mg/kg bolus and 4 mg/kg/h for 15 min, i.v.) decreased afferent arteriolar diameters with the magnitude of reductions in DS/H rats being significantly less than those in DS/L. Inhibition of the TGF response by furosemide (1 mg/kg bolus plus 4 mg/kg/h for 10 min, i.v.) following ACZ infusion revealed that the afferent arteriolar vasoconstriction caused by ACZ was reversed in these animals. Plasma Ang II levels were significantly reduced in DS/H rats compared with DS/L rats, but kidney Ang II contents and AT1 receptor levels were similar between these animals. Renal cortical expression of p22-phox and Nox-1, essential components of NAD(P)H oxidase, and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) contents as well as vascular superoxide production were significantly higher in DS/H rats than DS/L rats. AT1 receptor blockade with candesartan (10 mg/kg/day) and treatment of an antioxidant, Tempol (3mmol/L in drinking water), normalized vascular superoxide and renal TBARS levels, and ameliorated progressive sclerotic and proliferative glomerular changes in DS/H rats. These results provide direct evidence that the TGF responses were altered in DS rats. The present data also suggest that in DH rats, renal injury is accompanied by the production of reactive oxygen species induced by AT₁ receptor-mediated activation NAD(P)H oxidase.