

発表番号 47

食塩摂取による抗ストレス作用の機序

助成研究者：尾仲達史 (自治医科大学生理学講座統合生理部門)

共同研究者：本多一文 (自治医科大学内科学講座内分泌代謝科)

ヒトあるいは実験動物は、ストレスにさらされると、食塩の嗜好性が高まる。食塩摂取が増加すると、急性期には体液の浸透圧が増加する。一方、体液の浸透圧を増加させると、ストレスに対するACTH放出が低下することが知られている。この食塩の抗ストレス作用を考えると、ストレス時に食塩嗜好性が高まることは、急性期には生体にとって、有利な反応であると考えられる。しかし、この食塩摂取による抗ストレスのメカニズムは現在まで不明である。本研究の目的は、食塩摂取による抗ストレス作用の機序を明らかにすることである。

一方、様々なストレス刺激は、ACTHのみならず下垂体後葉からのオキシトシンを放出させる。我々は、このオキシトシンのストレス反応は、延髄A1あるいはA2からのノルアドレナリン入力により伝達されることを明らかにしてきた。即ち、侵害(痛み)刺激に対するオキシトシン放出は、延髄腹外側部のA1ノルアドレナリンニューロンを介すること、条件恐怖のような情動ストレス、或いは、CCK末梢投与による腹部迷走神経の活性化によるオキシトシン放出は延髄背内側部弧束路核のA2ノルアドレナリンニューロンを介することを明らかにしてきた。

本研究ではまず、このストレスに対するオキシトシン放出を実験モデルとして用い、このオキシトシン系においても、食塩負荷の抗ストレス作用が観察できるかを検討した。その結果、体液の浸透圧を増大させると侵害刺激に対する視床下部のノルアドレナリン放出とオキシトシン放出が選択的に減少することが明らかになった。これに対し、CCKによるオキシトシン反応は体液の浸透圧により大きな影響は受けなかった。体液の浸透圧を上昇させたときに、オキシトシンニューロンの細胞体が局在する視床下部視索上核においてグルタミン酸とオキシトシンが放出されることが示されている。また、グルタミン酸受容体の一つNMDA受容体を低容量のNMDAで活性化すると視索上核においてノルアドレナリン放出が減少する。そこで、NMDA受容体アンタゴニストあるいはオキシトシン受容体アンタゴニストの効果を検討した。NMDA受容体アンタゴニストを視床下部視索上核に局所投与すると、侵害刺激に対する視索上核のノルアドレナリン放出反応が増大し、血中へのオキシトシン放出反応も増大した。オキシトシン受容体アンタゴニストを局所投与すると侵害刺激に対するノルアドレナリン放出が減少し、血中へのオキシトシン放出反応も減弱した。

以上から、食塩負荷による抗ストレス作用には①ストレス選択性があること、②視床下部におけるNMDA受容体とオキシトシン受容体の活性化が関与することが示唆された。

3

助成番号 0234

食塩摂取による抗ストレス作用の機序

助成研究者:尾仲達史 (自治医科大学生理学講座統合生理部門)

共同研究者:本多一文 (自治医科大学内科学講座内分泌代謝科)

1. 研究目的

ヒトあるいは実験動物は、ストレスにさらされると、食塩の嗜好性が高まる (1)。食塩摂取が増加すると、急性期には体液の浸透圧が増加する。一方、体液の浸透圧を増加させると、ストレスに対するACTH放出が低下することが知られている (2)。この食塩の抗ストレス作用を考えると、ストレス時に食塩嗜好性が高まることは、急性期には生体にとって、有利な反応であると考えられる。しかし、この食塩摂取による抗ストレスのメカニズムは現在まで不明である。本研究の目的は、食塩摂取による抗ストレス作用の機序を明らかにすることである。

一方、様々なストレス刺激は、ACTHのみならず下垂体後葉からのオキシトシンを放出させる (3)。我々は、このオキシトシンのストレス反応は、延髄A1あるいはA2からのノルアドレナリン入力により伝達されることを明らかにしてきた。即ち、痛み刺激に対するオキシトシン放出は、延髄腹外側部のA1ノルアドレナリンニューロンを介すること (4)、条件恐怖のような情動ストレス、或いは、CCK末梢投与による腹部迷走神経の活性化によるオキシトシン放出は延髄背内側部弧束路核のA2ノルアドレナリンニューロンを介すること (5、6) を明らかにしてきた。

本研究ではまず、このストレスに対するオキシトシン放出を実験モデルとして用い、このオキシトシン系においても、体液の浸透圧上昇に抗ストレスは作用が観察できるかを検討した。即ち、①浸透圧を増大させるとストレス負荷時のオキシトシン放出、②視床下部におけるノルアドレナリン放出が減弱するかを調べた。

体液の浸透圧を上昇させたときに、オキシトシンニューロンの細胞体が局在する視床下部視索上核においてグルタミン酸が放出されることが示唆されている (7)。また、グルタミン酸受容体の一つNMDA受容体を低容量のNMDAで活性化すると視索上核においてノルアドレナリン放出が減少する (8)。そこで、③浸透圧上昇時にグルタミン酸が放出されるか、さらに、④浸透圧負荷時のノルアドレナリン放出の減弱にこのグルタミン酸のNMDA受容体の活性化が関与しているかを明らかにした。

最後に、浸透圧上昇時に視床下部でオキシトシンが放出することが示されている (9) ので、⑤オキシトシンが抗ストレス作用を担っている可能性を、オキシトシン受容体アンタゴニストを用いて検討した。

2. 研究方法

動物はウィスター系の成熟雄ラットを用いた。

2-1. オキシトシンニューロンの活動の測定

体液の浸透圧を慢性的に上昇させるために、2%食塩水を1週間自由飲水させる、あるいは、2M食塩水を13 μ l/分で静脈内に投与した。ストレス負荷刺激としては、痛み刺激として足掌部皮膚表面の電気刺激(フットショック)を用いた。また、別の動物を用い、腹部迷走神経刺激となるCCK (20 μ g/kg体重)の静脈内投与をした。これらの動物の血中のオキシトシン濃度をラジオイムノアッセイ法を用いて定量化した。

一部の動物は、ウレタン麻酔下でオキシトシンニューロンの細胞外電気活動を記録した。

2-2. 視床下部ノルアドレナリン放出の測定

視床下部の視索上核におけるノルアドレナリン放出を測定する目的で、ラットをウレタン麻酔し、腹側から視索上核を露出し、視索上核内にマイクロダイアリス用のプローブを刺入させ、視索上核内の細胞外灌流液を採取した。灌流液中のノルアドレナリン濃度は電気化学検出器付きのHPLCで定量化した(10)。

3. 研究結果

2%食塩水負荷をすると、浸透圧が、水道水摂取群(299 mOSM/kg H₂O)から303 mOSM/kg H₂Oに上昇し、血中オキシトシン濃度の基礎値も増加した。侵害刺激としてフットショックをくわえると、血中のオキシトシン濃度が上昇した。このフットショックによるオキシトシン濃度の増加反応は、食塩水負荷群で対照群に比べ有意に低値を示した(図1)。

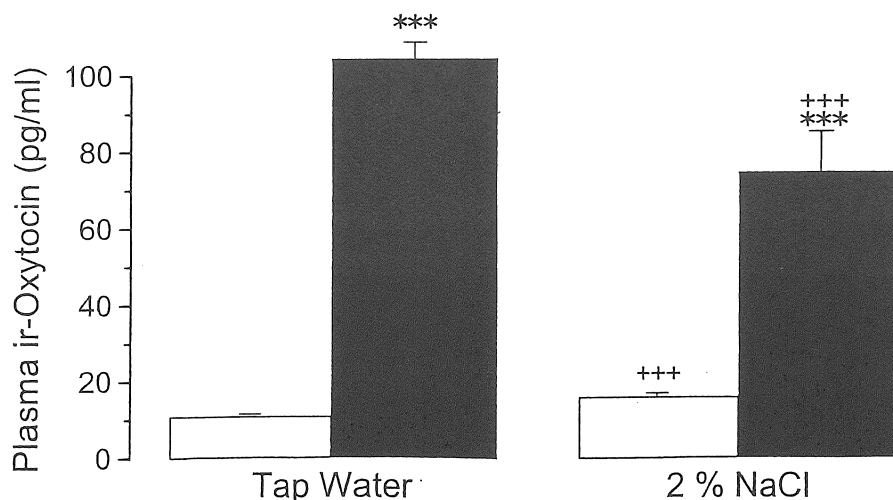


Fig. 1

Effects of salt loading upon oxytocin release after noxious stimuli

フットショックによるオキシトシンニューロンの活性化の上流は、視床下部におけるノルアドレナリン放出である。そこで、浸透圧負荷により、オキシトシン放出のみならず、その上流の視床下部のノルアドレナリン放出も減弱するかを検討した。まず、フットショックを加え、視床下部視索上核においてノルアドレナリン放出が観察されることを確認した。そこで、2M食塩水を13 μ l/分、45分間投与させ、血漿浸透圧を上昇させて、ふたたび、フットショックを加えた。すると、2度目のフットショックに対するノルアドレナリン放出は、浸透圧負荷をしていない1度目のフットショックに対するノルアドレナリン放出に比べ、有意に減弱した(図2)。この高張食塩水投与で血漿の浸透圧は11 mOSM/kg H₂O上昇した。これに対し、CCKに対する血中オキシトシン濃度の上昇反応(図3)、オキシトシンニューロンの興奮活動(図4)は、食塩水負荷で減少しなかった。

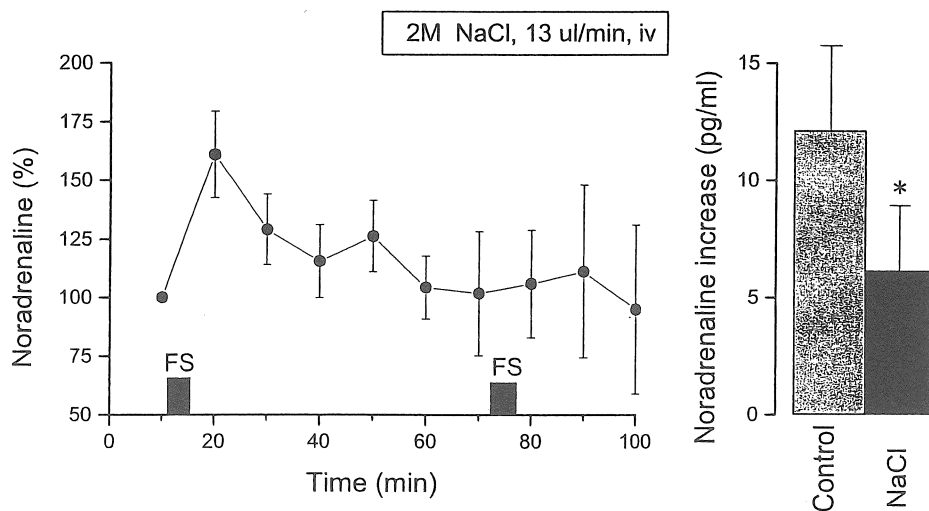


Fig. 2
Effects of salt loading upon noradrenaline release
within the supraoptic nucleus in response to noxious stimuli

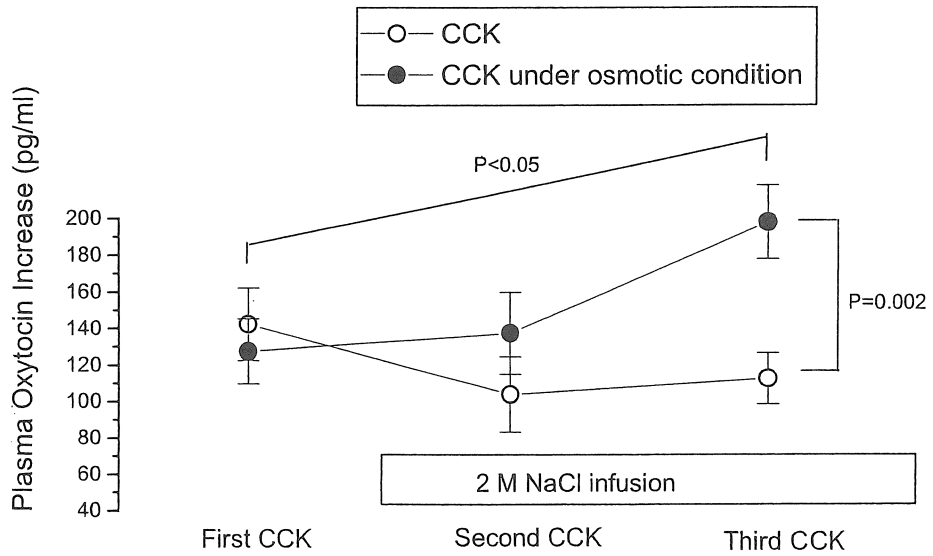
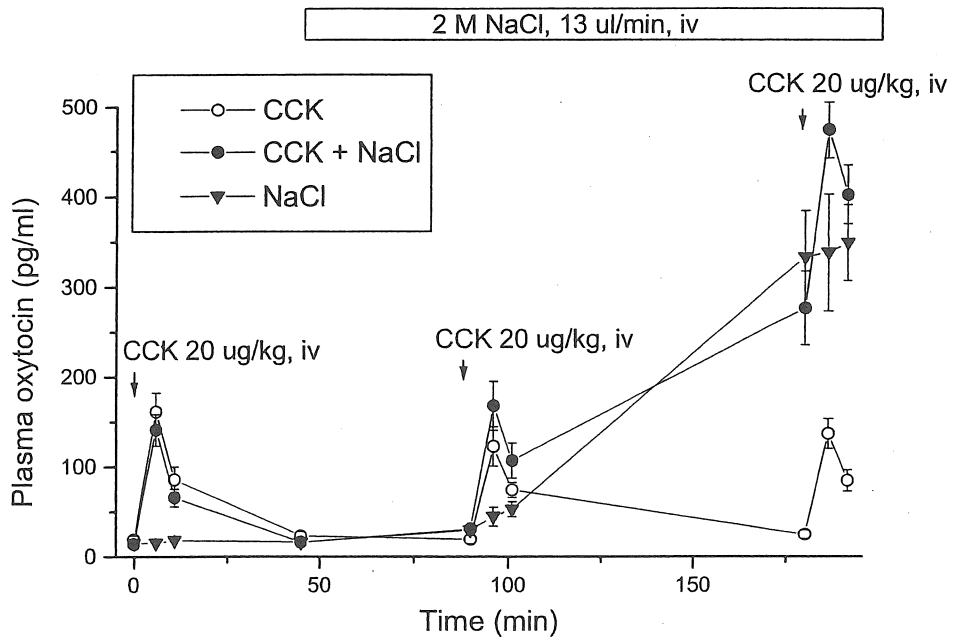


Fig.3 Effects of salt loading upon plasma oxytocin after CCK

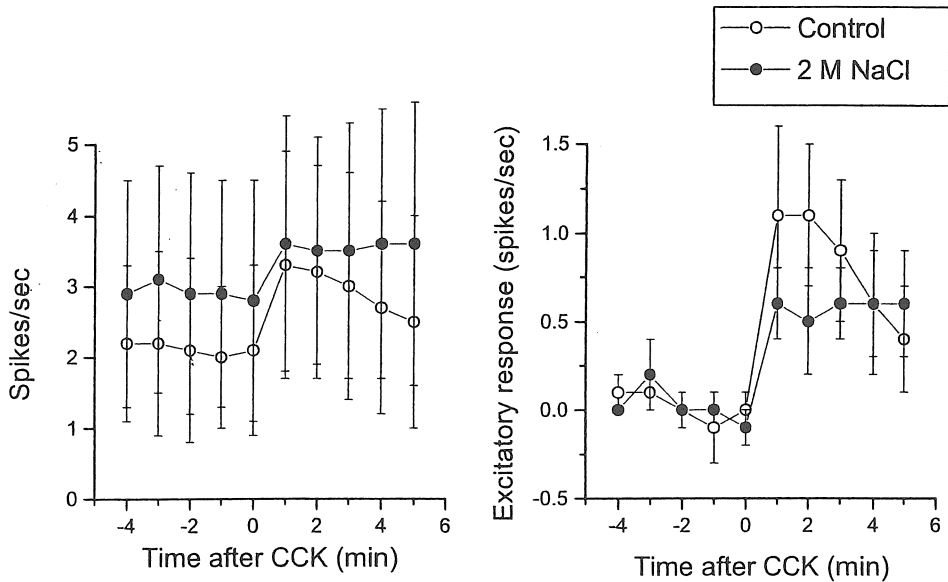


Fig.4

Effects of salt loading upon activity of oxytocin neurons after CCK

高張食塩水を負荷すると、視索上核内でグルタミン酸放出が増加した(11)。そこで、グルタミン酸の受容体の影響を明かにする目的で、NMDA受容体アンタゴニストを視索上核内の局所に注入し、ノルアドレナリン放出を検討した。NMDA受容体アンタゴニストを視索上核の局所に投与すると、ノルアドレナリン放出の基礎値が上昇した。フットショックによる視索上核内ノルアドレナリン放出は、NMDA受容体アンタゴニストの存在下において、有意に増強された(図5)。さらに、別の動物を用い、NMDA受容体アンタゴニストを投与し、フットショックに対するオキシトシン放出を検討した。NMDA受容体アンタゴニスト投与により、フットショックによる血中オキシトシン濃度の上昇がさらに増強された(図6)。これに対し、CCKによる血中オキシトシン濃度の上昇は、NMDA受容体アンタゴニストを投与しても有意には変化しなかった。

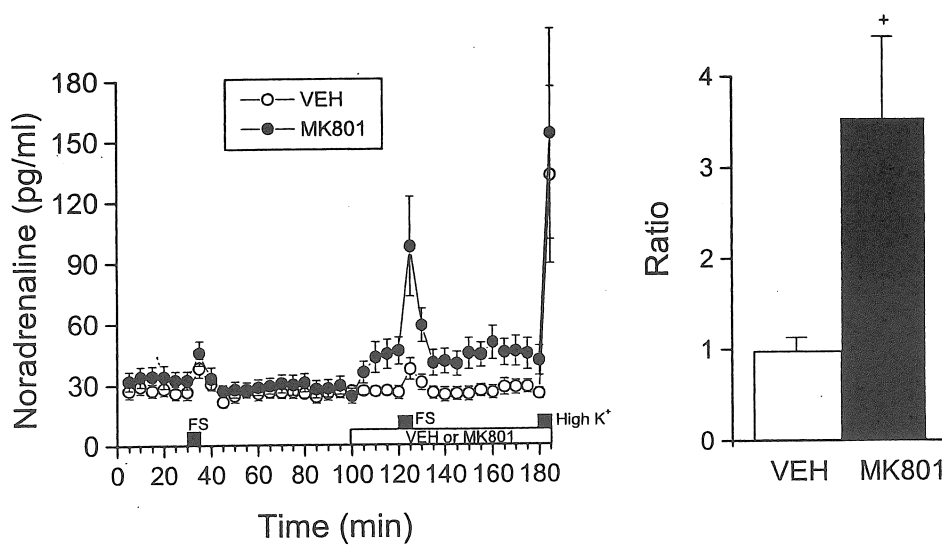


Fig. 5
Effects of an NMDA receptor antagonist upon noradrenaline release within the supraoptic nucleus after noxious stimuli

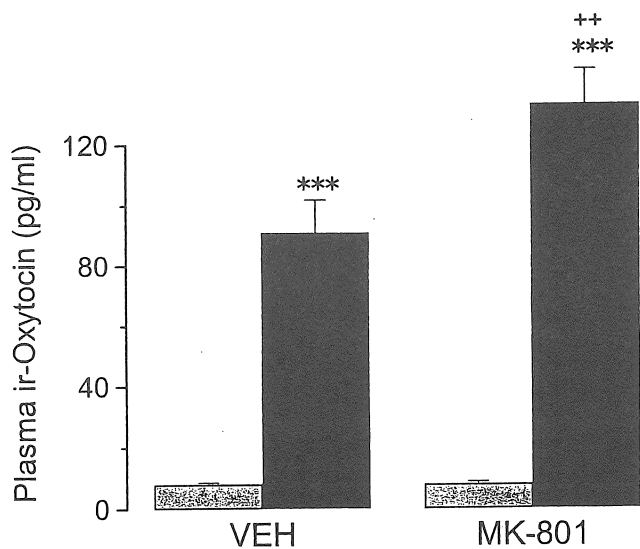


Fig. 6
Effects of an NMDA receptor antagonist upon plasma oxytocin after noxious stimuli

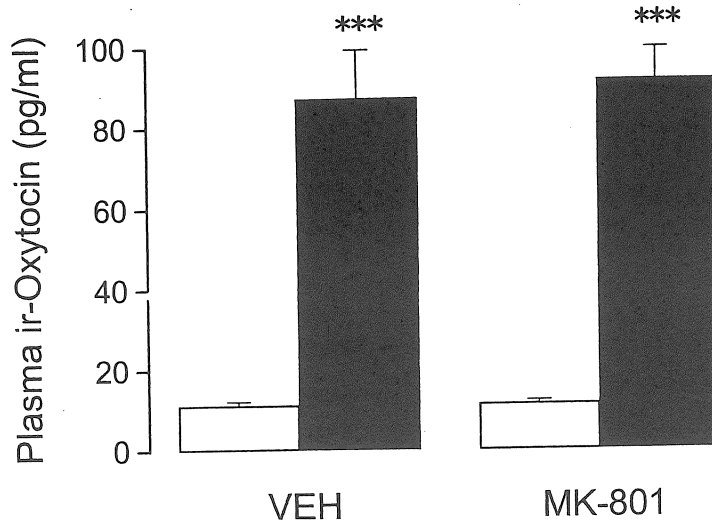


Fig. 7
Effects of an NMDA receptor antagonist upon plasma oxytocin after CCK

オキシトシン受容体アンタゴニストを視索上核内に投与するとフットショックによる視索上核内ノルアドレナリン放出が抑制された (図8)。さらに、オキシトシン受容体アンタゴニストを洗い流すと、フットショックに対するノルアドレナリン増強反応は回復した。また、オキシトシン受容体アンタゴニストの脳室内投与により、フットショックによる血中オキシトシン濃度の上昇が減弱された (図9)。

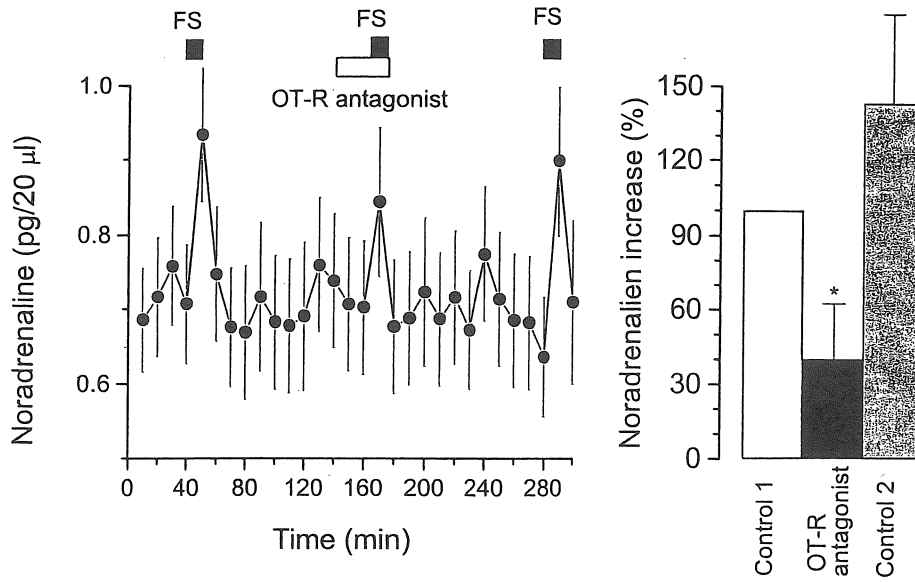


Fig. 8
Effects of an oxytocin receptor antagonist upon noradrenaline release within the supraoptic nucleus after noxious stimuli

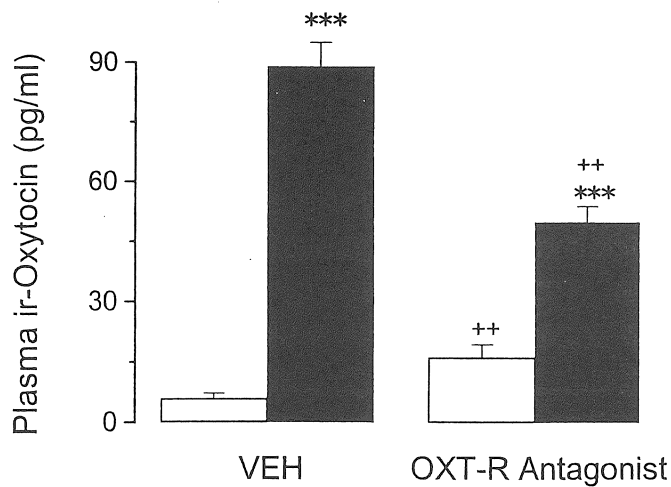


Fig. 9
Effects of an oxytocin receptor antagonist upon plasma oxytocin after noxious stimuli

4. 考察

侵害刺激に対する反応は、浸透圧負荷により減少したが、CCKに対する反応性は急性には有意に変化しなかった。したがって、浸透圧負荷によるストレス反応の修飾は、ストレスにより異なることと考えられる。侵害刺激に対する反応はA1ノルアドレナリンニューロンを介するものであり、CCKに対する反応はA2ノルアドレナリンニューロンを介するものである。このデータはまた、浸透圧刺激の抑制が、A2ノルアドレナリン系ではなくA1ノルアドレナリン系に対して、選択的であることを示唆している。A2ノルアドレナリン系は情動ストレス反応を担っていることが示唆されている。従って、食塩負荷による抗ストレス作用は身体的ストレスに選択的である可能性がある。

本実験では、NMDA受容体アンタゴニストは、視床下部におけるノルアドレナリン放出を増強し、血中へのオキシトシン放出も促進させた。これに対し、オキシトシン受容体アンタゴニストは、視床下部におけるノルアドレナリン放出を減少させ、血中へのオキシトシン放出も低下させた。従って、NMDA受容体はノルアドレナリン放出に抑制的に、それに対して、オキシトシン受容体は促進的に作用し、その結果、下垂体後葉からのオキシトシン放出をそれぞれ、抑制、促進していることが示唆された。

5. 今後の課題

浸透圧刺激は、視床下部において、グルタミン酸とオキシトシンの放出を促進させる。本研究は、NMDA受容体とオキシトシン受容体の活性化によるノルアドレナリンとオキシトシンのストレス反応の修飾を明かにした。従って、浸透圧負荷時においてNMDA受容体とオキシトシン受容体の活性化がストレス反応をそれぞれ抑制、促進しているかも知れない。今後これらの点を明かにしていきたい。さらに、これらの薬物を用いたストレスの治療に結びつく展開が期待される。

また、ストレスによる食塩嗜好性の機構も不明な点が多い。過剰で長期にわたる食塩負荷は生活習慣病の増悪因子である。今後、食塩嗜好性の機構の研究も行っていきたい。

6. 文献

- 1) Ely D, Herman M, Ely L, Barrett L, Milsted A. Sodium intake is increased by social stress and the Y chromosome and reduced by clonidine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000, 278: R407-12.
- 2) Chowdrey HS, Jessop DS, Patel H, Lightman SL. Altered adrenocorticotropin, corticosterone and oxytocin responses to stress during chronic salt load. *Neuroendocrinology*. 1991, 54: 635-8.
- 3) Onaka T. Catecholaminergic mechanisms underlying neurohypophysial hormone responses

- to unconditioned or conditioned aversive stimuli. *Exp Physiol*, 2000, **85S**: 101S-110S.
- 4) Onaka T, Yamashita T, Liu X, Honda K, Saito T, Yagi K. Medullary A1 noradrenergic neurones may mediate oxytocin release after noxious stimuli. *NeuroReport*, 2001, **12**: 2499-2502.
 - 5) Onaka T, Luckman SM, Antonijevic I, Palmer JR, Leng G. Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarii to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat. *Neuroscience*, 1995, **66**: 403-412.
 - 6) Zhu L, Onaka T. Involvement of medullary A2 noradrenergic neurons in the activation of oxytocin neurons after conditioned fear stimuli *Eur J Neurosci* 2002, **16**: 2186-2198.
 - 7) Onaka T, Yagi K. Involvement of N-methyl-D-aspartic acid receptor activation in oxytocin and vasopressin release after osmotic stimuli in rats. *J Neuroendocrinol*, 2001, **13**: 166-174.
 - 8) Xiu L, Onaka T, Yagi K. Facilitation of Ca²⁺ store-dependent noradrenaline release after an NMDA receptor antagonist in the rat supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol*, 2001 **13**: 894-904.
 - 9) Ludwig M. Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J Neuroendocrinol*. 1998, **10**: 881-95.
 - 10) Ludwig M, Onaka T, Yagi K. Vasopressin regulation of noradrenaline release within the supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol*, 2000, **12**: 477-479.
 - 11) Leng G, Brown CH, Bull PM, Brown D, Scullion S, Currie J, Blackburn-Munro RE, Feng J, Onaka T, Verbalis JG, Russell JA, Ludwig M. Responses of magnocellular neurons to osmotic stimulation involves coactivation of excitatory and inhibitory input: an experimental and theoretical analysis. *J Neurosci* 2001, **21**: 6967-6977.

Mechanisms underlying anti-stress effects of salt loading

Tatsushi Onaka¹ and Kazufumi Honda²

Department of Physiology¹, Department of Internal Medicine²,
Jichi Medical School

Summary

Salt loading has been shown to reduce ACTH release from the pituitary after stressful stimuli. The mechanisms underlying this anti-stress effect are not clear at present. Oxytocin release from the pituitary is also facilitated under stressful condition. Oxytocin release after stressful stimuli is mediated by noradrenergic neurones. Noxious stimuli activate oxytocin neurones in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei, and as a result, facilitate oxytocin release into the circulation. This oxytocin response has been shown to be mediated by activation of A1 noradrenergic neurones in the ventrolateral medulla oblongata. On the other hand, conditioned fear stimuli or CCK facilitate oxytocin release via A2 noradrenergic neurones in the dorsomedial medulla oblongata.

We firstly examined whether salt loading also reduces oxytocin responses to stressful stimuli in Wistar male rats. Noxious stimuli facilitated noradrenaline release within the supraoptic nucleus and increased plasma oxytocin concentrations. Salt loading reduced noradrenaline release within the hypothalamus in response to noxious stimuli and decreased plasma oxytocin concentrations after noxious stimuli. On the other hand, acute salt loading did not reduce plasma oxytocin response to CCK administration.

Osmotic stimulation has been shown to facilitate glutamic acid and oxytocin release within the supraoptic nucleus. We then examined role of NMDA receptor and oxytocin receptor activation upon oxytocin release after stressful stimuli. Local infusion of an NMDA receptor antagonist, MK-801, augmented hypothalamic noradrenaline release and potentiated plasma oxytocin response to noxious stimuli. On the other hand, an oxytocin receptor antagonist reduced hypothalamic noradrenaline release and decreased plasma oxytocin response to noxious stimuli.

All these data suggest that effects of salt loading upon oxytocin activation under stressful conditions are dependent upon stressful stimuli used, and that activation of NMDA receptors and oxytocin receptors is involved in oxytocin release in response to stressful stimuli via presynaptic modulation of noradrenaline release within the hypothalamus.