

発表番号 47 (0344)

超微量元素ニッケルの欠乏による食塩感受性高血圧発生機序の解明 ーニッケルと環状ヌクレオチド依存性ナトリウムチャンネルの相互作用ー

助成研究者：横井 克彦（聖徳大学人文学部生活文化学科）

共同研究者：江指 隆年（聖徳大学人文学部生活文化学科）

ニッケルが高等動物にとって必須であるとする状況証拠はあるが、ニッケルの生理機能は明らかにされていない。Gordon と Zagotta (1995) は、*in vitro* でニッケルが環状ヌクレオチド作動性カチオンチャンネル (CNG) の機能を調節することを発見した。ニッケルは、網膜桿状体型の CNG の開放状態を安定化し、嗅粘膜型 CNG の閉鎖状態を安定化する。Yokoi ら (2003) は、ラットのニッケル欠乏では、精巣上体中精子数と精子運動能が低下し、精子の精巣上体通過時間が短縮し、前立腺と精囊の重量が低下することを報告している。これらの知見に基づき、生体内においても CNG の機能発現に対してニッケルが重要な役割を果たしているという仮説の検証を行った。そこで、CNG の機能に関与している生理機能、すなわち、血圧調節、ナトリウム利尿、照度弁別に対するニッケル欠乏の影響を検討した。32 匹の 3 週令 Sprague-Dawley 系雄ラットを 8 匹ずつの 4 群に分け、16 週間飼育の 2 要因実験に割り付けた。処置は、餌への 0 または 1 mg/kg のニッケル補充と 0 または 8 g/kg の塩化ナトリウム補充とした。食餌性ニッケル欠乏により収縮期血圧が有意に上昇した。ニッケル欠乏、塩化ナトリウム過剰飼料を摂取したラットでは、アルブミンと N-acetyl glucosaminidase の尿中排泄が有意に増加した。ニッケル欠乏ラットでは、経口塩化ナトリウム負荷後の、尿中ナトリウム/クレアチニン比が有意に低下した。ニッケル欠乏によって 10 lux における照度弁別が消失した。これらの結果から、ニッケル欠乏はナトリウム利尿の障害を伴う高血圧症と網膜の光受容の障害を発症することが示唆された。恐らく、これらの異常は CNG 機能の障害に基づくものと推察された。

超微量元素ニッケルの欠乏による食塩感受性高血圧発生機序の解明 - ニッケルと環状ヌクレオチド依存性ナトリウムチャンネルの相互作用 -

助成研究者： 横井 克彦（聖徳大学人文学部生活文化学科）

共同研究者： 江指 隆年（聖徳大学人文学部生活文化学科）

1. 研究目的

食塩の過剰摂取は食塩感受性高血圧を招く。減塩は、その代表的な治療法であるが、減塩によって一食、味気ない生活を過ごす場合も多く、生活の質の低下が問題である。ニッケルがナトリウムチャンネルの一種、サイクリックヌクレオチド依存性陽イオンチャンネル（cyclic nucleotide-gated cation channel、以下CNG）の機能に必要であるならば、ニッケル欠乏によって食塩感受性高血圧を発生し、ニッケル欠乏を原因とする高血圧はニッケル栄養の改善によって治療可能であると考えられる。

ニッケルは不足によってラット(1)やヤギ(2)の成長低下・繁殖率低下、ラットのミネラル代謝異常(3, 4)などを招く必須超微量元素である。生理的濃度のニッケルは、ナトリウムチャンネルの1種である網膜桿状体CNGの開放確率を高める一方、嗅粘膜型CNGの閉鎖確率を高め、CNG機能に必要である(5)。CNGは腎臓や血管平滑筋、心臓、精子などに広く分布しており、腎集合管でのナトリウム再吸収(6)などのナトリウム代謝、血圧調節、心機能の調節、網膜でのナトリウムによる光受容に伴う膜電位変化(7)や精子でのカルシウムを介する細胞内情報伝達(8)を担っている。腎集合管では食塩過剰の場合、心房性ナトリウム利尿ホルモン（ANP）や一酸化窒素（NO）を介してcGMPが生成され、ナトリウムの再吸収が抑制されて、ナトリウム利尿を起こし、過剰のナトリウムが排泄される(6)。

わが国では食塩過剰摂取による高血圧発生が続いており、減塩の効果も頭打ちの傾向がある。ニッケルは主に豆類や種実類に含まれるが、わが国では近年その摂取量が減少傾向にあり、今後ニッケルの摂取不足を招く危険性がある。本研究はまず、ニッケルとナトリウムチャンネルであるCNGの相互作用に着目して、ニッケル欠乏による高血圧発生メカニズムを明らかにすることを目的としている。

2. 研究方法

2.1 動物

実験には、3週令のSprague-Dawley系雄ラットを用いた。実験変数として飼料中ニッケル含有量と食塩含有量を選び、各群8匹づつとする実験計画法に基づく4群を設定した。基本飼料の組成はTable 1に示した。ニッケルの添加量は、0または1 mg/kg、塩化ナトリウ

ムの添加量は、0 または 80 g/kg とした。なお、基本飼料には必要量のナトリウムを供給するため、予め塩化ナトリウムが、2.6 g/kg加えられている。したがって、Ni+ NaCl-群（対照群）には、ニッケル充足:塩化ナトリウム正常食、Ni+ NaCl+群には、ニッケル充足:塩化ナトリウム過剰食、Ni- NaCl-群には、ニッケル欠乏:塩化ナトリウム正常食、Ni- NaCl+群には、ニッケル欠乏:塩化ナトリウム過剰食を与えた。ラットは、明期12時間：暗期12時間の周期、室温23 °Cの動物飼育室内に設置したプラスチック製個別ケージ内で飼育した。飼料と脱イオン水は、自由摂取とした。

Table 1

Composition of Basal Diet

Ingredient	g/kg diet	
Vitamin free casein	150.00	Vitamin mixture provided 0.75 mg vitamin K ₁ , 30 mg nicotinic acid, 0.2 mg biotin, 6 mg thiamin hydrochloride, 16 mg calcium panthotenate, 25 µg vitamin B ₁₂ , 18 mg dl-α-tocopherol acetate, 6 mg riboflavin and 1 mg folic acid, 7.5 mg pyridoxine hydrochloride, 2.201 mg retinyl palmitate, and 25 µg vitamin D ₃ per 1 kg diet. Mineral mixture provided 12.5 g CaCO ₃ , 2.0 g KCl, 2.6 g NaCl, 8.8 g KH ₂ PO ₄ , 0.8 g MgO, 2.48 g ferric sulfate mixture, 10 mg ZnO, 40 mg MnSO ₄ ·4H ₂ O, 20 mg CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0.5 mg KI, 0.6 mg Na ₂ SeO ₃ , 0.27 mg (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O, 2 mg Cr(C ₂ H ₃ O ₂) ₃ ·H ₂ O, 6 mg NaF, 6 mg H ₃ BO ₃ , 0.5 mg NH ₄ VO ₃ , 2 mg Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O, 102 mg NaSiO ₃ ·9H ₂ O per 1 kg diet. Ferric sulfate mixture provided 35 mg iron per 1 kg diet.
Corn starch	150.00	
Sucrose	526.50	
Cellulose fiber	50.00	
Corn oil	80.00	
Vitamin mixture	5.00	
Mineral mixture	35.00	
L-Cystine	3.00	
Choline chloride	0.50	

2.2 プロトコール

- ・ 飼育 9 週間後に、tail-cuff/plethysmograph 法により収縮期血圧を測定した。
- ・ 飼育 10 週間後に、代謝ケージを用いて絶食下で 16 時間、尿を採取し、分析まで-80 で保存した。
- ・ 飼育 14 週間後に照度弁別テストを行った。
- ・ 飼育 15 週間後に、tail-cuff/plethysmograph 法により収縮期血圧を再び測定した。
- ・ 飼育 16 週間後に、1 晩絶食させ、エーテル麻酔下で、ヘパリンを加えたシリンジで腹部大静脈より血液を採取した。血液を遠心分離して血漿を採取し、分析まで-80 で保存した。

2.3 試料の測定

尿中アルブミンは、プロモクレソールグリーン法で測定した。尿中クレアチニンは Jaffé

法で測定した(9)。尿中 N-acetyl-D- β -glucosaminidase (NAG)活性は、塩野義社製 NAG キットで、尿中 Alkaline phosphatase (ALP)活性は、Bessey-Lowry 法で(10)測定した。尿中硝酸/亜硝酸イオン濃度は、Grishman らの方法(11)で測定した。尿中 cGMP 濃度は ELISA 法(R&D Systems, Minneapolis, MN)、尿中プロスタグランジン E₂ 代謝物は ELISA 法 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)、尿中アルドステロン濃度は ELISA 法 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) で測定した。尿中カリクレイン活性は、Kato らの蛍光法で測定した(12)。尿は硝酸、過酸化水素で湿式灰化し、ニッケル濃度を原子吸光法で測定した(13)。

2.4 照度弁別テスト(brightness discrimination test)

3つの小部屋がセンターピースでつながり、互いに120度の角度で開いているY迷路を準備し、小部屋の床における照度を2.5、5、10 luxに調節した。一つの小部屋のみ光を遮蔽し、ラットを迷路の内に入れた。その後、ラットを投入する小部屋と遮光位置のすべての組み合わせを含む6回各60秒間の試行、計360秒の間に、ラットが遮光された小部屋に滞在した時間(暗所滞在時間)を記録した。ラットは夜行性であるので、本能的に暗所を好み、照度を弁別した場合、照度を弁別しない場合の理論値120秒より、暗所滞在時間が延長する(14)。

2.5 統計処理

データは2元配置分散分析で分析し、ニッケルと塩化ナトリウムの主効果、並びに交互作用について検討した。また、1元配置分散分析の後、Dunnettの多重比較検定法により、対照(ニッケル添加、標準食塩)との有意差を検討した。統計処理には、SYSTAT Version 5.0 (Systat, Inc., Evanston, IL)を用い、危険率5%未満を統計学的に有意とした。

3. 研究結果

初期体重平均値は、30.4から30.6gであった。

Figure 1に飼育16週間後の体重を示す。塩化ナトリウムの過剰摂取は、有意に体重増加量を低下させた($p < 0.01$)。

Figure 2に飼育16週間後の腎臓重量を示す。Ni-Na+群の腎臓重量は、Ni+NaCl-群(対照群)に比べて有意に重かった。塩化ナトリウムの過剰摂取は、有意に腎臓重量を上昇させた($p < 0.01$)。

Figure 3に、飼育16週間後の心室重量を示す。Ni+NaCl+とNi-NaCl+群の心室重量は、Ni+NaCl-群(対照群)に比べて有意に重かった。塩化ナトリウムの過剰摂取は、有意に心室重量を上昇させた($p < 0.01$)。

Figure 4に、飼育16週間後の心耳を除く心房の重量を示す。Ni+NaCl+とNi-NaCl+群の心房重量は、Ni+NaCl-群(対照群)に比べて有意に重かった。塩化ナトリウムの過剰摂取

は、有意に心室重量を上昇させた ($p < 0.01$)

Figure 5 に、飼育 15 週間後の収縮期血圧を示す。Ni-NaCl⁻、Ni+NaCl⁺、Ni-Na⁺群の収縮期血圧は、Ni+NaCl⁻群 (対照群) に比べて有意に高かった。ニッケル欠乏並びに塩化ナトリウムの過剰摂取は、有意に収縮期血圧を上昇させた (Ni: $p < 0.01$, NaCl: $p < 0.01$)。データは示さないが、飼育 9 週間後における収縮期血圧も、同様に、ニッケル欠乏と塩化ナトリウム過剰摂取によって有意に上昇した。

Figure 6 に、飼育 10 週間後の尿中アルブミン排泄速度を示す。Ni-NaCl⁺群の尿中アルブミン排泄速度は、Ni+NaCl⁻群 (対照群) に比べて有意に高かった。ニッケル欠乏並びに塩化ナトリウムの過剰摂取は、有意に尿中アルブミン排泄速度を上昇させた (Ni: $p < 0.05$, NaCl: $p < 0.05$)。塩化ナトリウムを過剰に投与した場合、標準偏差が非常に大きくなるので、Ni+NaCl⁻と Ni-NaCl⁻群のみ比較すると、有意差が認められた。

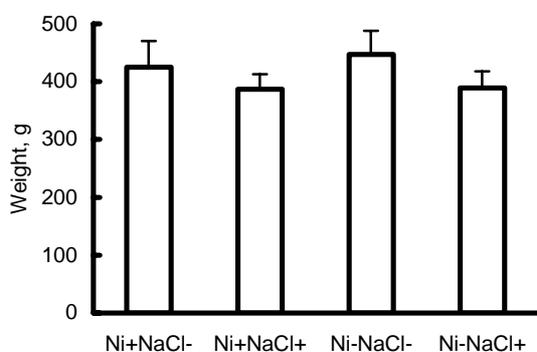


Figure 1. Final body weight of rats

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

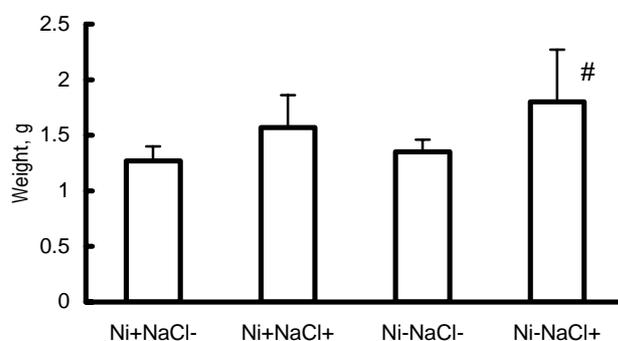


Figure 2. Kidney weight of rats

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

Significantly different from Ni+NaCl⁻, [#] $p < 0.01$.

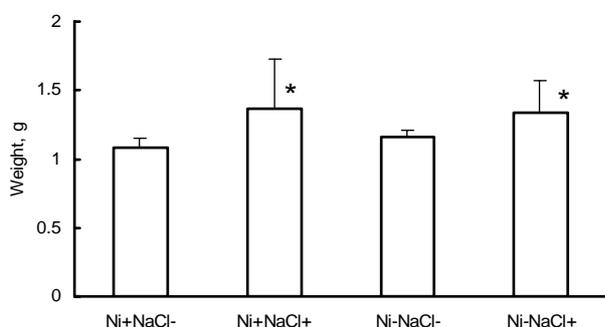


Figure 3. Cardiac ventricle weight of rats

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

Significantly different from Ni+NaCl⁻, ^{*} $p < 0.01$.

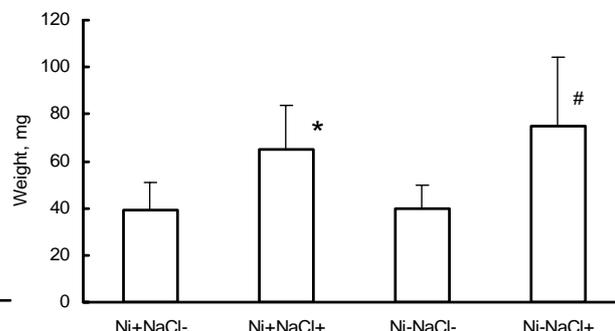


Figure 4. Cardiac atrium weight of rats

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

Significantly different from Ni+NaCl⁻, ^{*} $p < 0.01$.

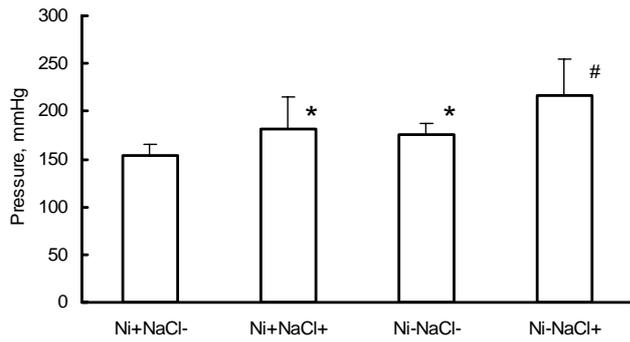


Figure 5. Systolic blood pressure

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

Significantly different from Ni+NaCl-;

#p < 0.01, *p < 0.05.

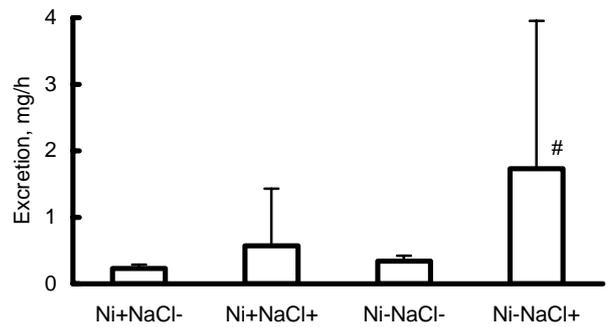


Figure 6. Urinary albumin excretion

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

Significantly different from Ni+NaCl-, #p < 0.01.

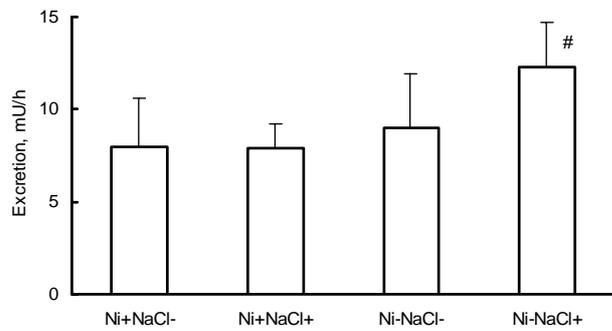


Figure 7. Urinary excretion of N-acetyl glucosaminidase

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

Significantly different from Ni+NaCl-;

#p < 0.01.

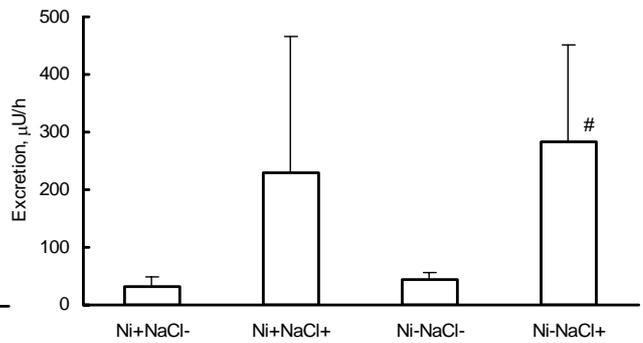


Figure 8. Urinary excretion of alkaline phosphatase

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

Significantly different from Ni+NaCl-;

#p < 0.01.

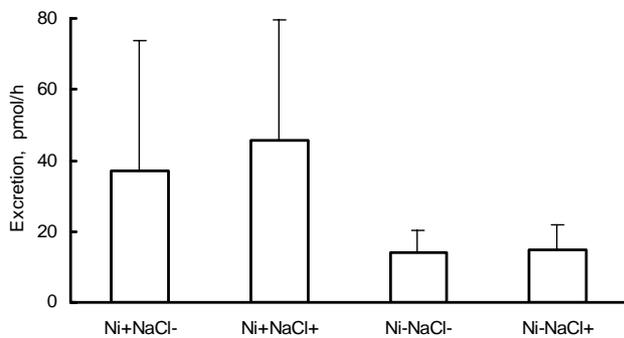


Figure 9. Urinary nickel excretion

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

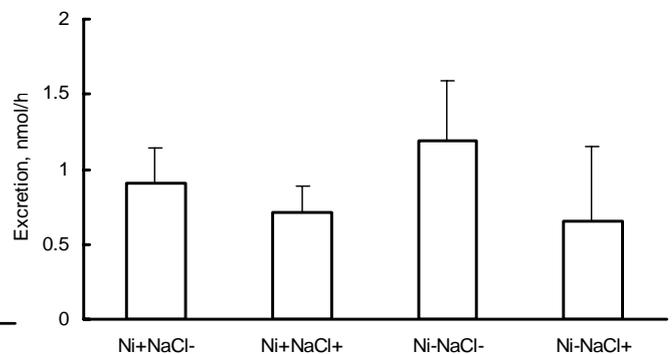


Figure 10. Urinary cGMP excretion

The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

Figure 7 に、尿中 NAG 排泄速度を示す。尿中 NAG に対しては、ニッケル欠乏並びにニッケル欠乏と塩化ナトリウム過剰摂取の交互作用が有意であった (Ni: $p < 0.01$, Ni x NaCl: $p < 0.05$)。Ni-NaCl+群の尿中 NAG 排泄速度は、Ni+NaCl-群 (対照群) に比べて有意に高かった。

Figure 8 に、尿中 ALP 排泄速度を示す。尿中 ALP に対しては、塩化ナトリウム過剰摂取の効果が有意であった ($p < 0.01$)。Ni-NaCl+群の尿中 ALP 排泄速度は、Ni+NaCl-群 (対照群) に比べて有意に高かった。

Figure 9 に尿中ニッケル排泄速度を示す。尿中ニッケルに対して、ニッケル欠乏の効果が有意であり ($p < 0.01$)、ニッケル欠乏によって尿中ニッケル排泄速度が低下した。

Figure 10 に尿中 cGMP 排泄速度を示す。尿中 cGMP に対して、塩化ナトリウム過剰摂取の効果が有意であり ($p < 0.01$)、塩化ナトリウム過剰摂取によって尿中 cGMP 排泄速度が低下した。

Figure 11 に尿中硝酸/亜硝酸イオン排泄速度を示す。尿中硝酸/亜硝酸イオンに対して、塩化ナトリウム過剰摂取の効果が有意であり ($p < 0.01$)、塩化ナトリウム過剰摂取によって尿中硝酸/亜硝酸イオン排泄速度が低下した。

Figure 12 に尿中アルドステロン排泄速度を示す。尿中アルドステロンに対して、塩化ナトリウム過剰摂取の効果が有意であり ($p < 0.01$)、塩化ナトリウム過剰摂取によって尿中アルドステロン排泄速度が低下した。

Figure 13 に尿中カリクレイン排泄速度を示す。尿中カリクレインに対して、塩化ナトリウム過剰摂取の効果が有意であり ($p < 0.01$)、塩化ナトリウム過剰摂取によって尿中カリクレイン排泄速度が低下した。

Figure 14 に尿中プロスタグランディン E₂ 代謝物排泄速度を示す。尿中プロスタグランディン E₂ 代謝物に対して、ニッケル欠乏並びにニッケル欠乏と塩化ナトリウム過剰摂取の交互作用が有意であった (Ni: $p < 0.01$, Ni x NaCl: $p < 0.05$)。

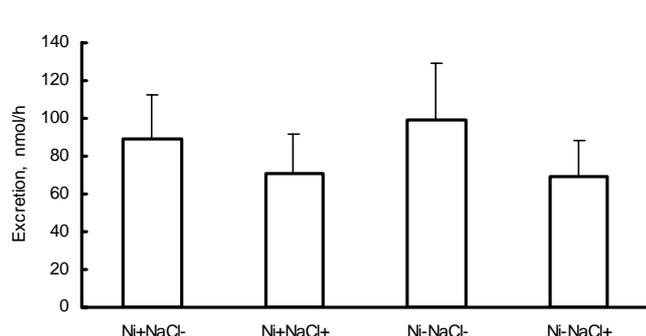


Figure 11. Urinary nitrate/nitrite excretion
The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

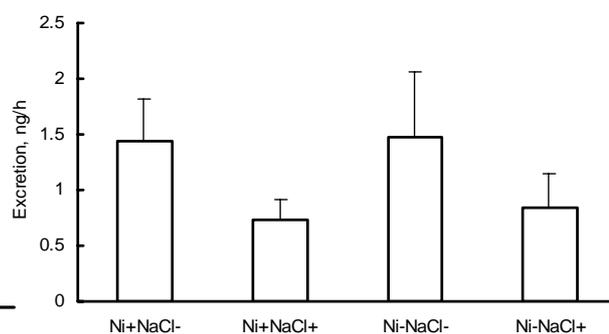


Figure 12. Urinary aldosterone excretion
The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

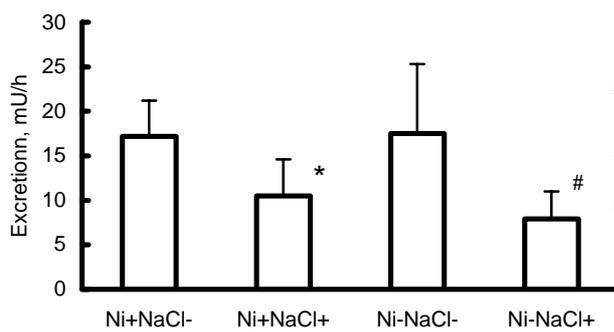


Figure 13. Urinary kallikrein excretion
The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.
Significantly different from Ni+NaCl-;
*p < 0.05, #p < 0.01.

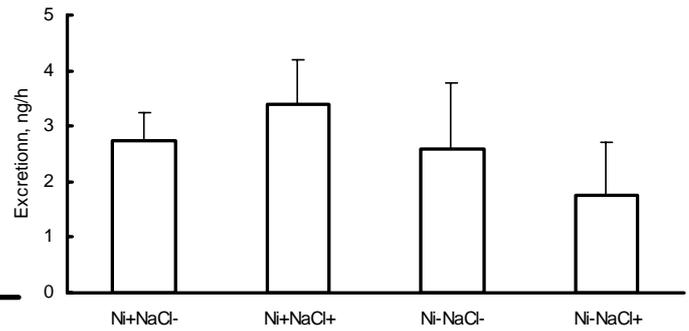


Figure 14. Urinary excretion of prostaglandin E₂ metabolite
The columns indicate means and the short bars indicate standard deviation.

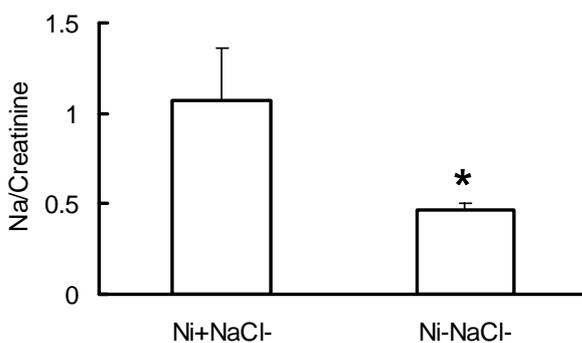


Figure 15. Urinary sodium/creatinine ratio after oral sodium chloride load
The columns indicate means and the short bars indicate standard error. * p < 0.05.

Figure 15 に、経口塩化ナトリウム負荷後 4 時間にわたって採取した尿中のナトリウム/クレアチニン比を示す。ナトリウム/クレアチニン比は、ニッケル欠乏によって有意に低下した。

Figure 16 に照度弁別テストの結果を示す。照度 2.5 lux では、いずれの群においても、暗所滞在時間が、照度弁別のない理論値、すなわち全滞在時間の 3 分の 1 に相当する 120 秒程度であった。照度 5 および 10 lux においても、Ni-NaCl+ 群には暗所嗜好性が認められなかったが、他

の群では暗所滞在時間が延長し、暗所嗜好性が確認された。照度 10 lux において、暗所滞在時間に対するニッケル欠乏および塩化ナトリウム過剰摂取の有意な効果が認められた (Ni: p < 0.01, NaCl: p < 0.01)。

4. 考察

Gordon ら(15)が、*in vitro* の系で行った CNG とニッケルの相互作用の研究から、ニッケルが CNG 機能の発現に重要な役割を果たしている可能性が想定される。もしも生体内においても、ニッケルと CNG の相互作用が、ニッケルの栄養素としての機能の発現に重要な役割を果たしているならば、ニッケルの欠乏によって CNG が関与している生理機能が障害されると考えられる。

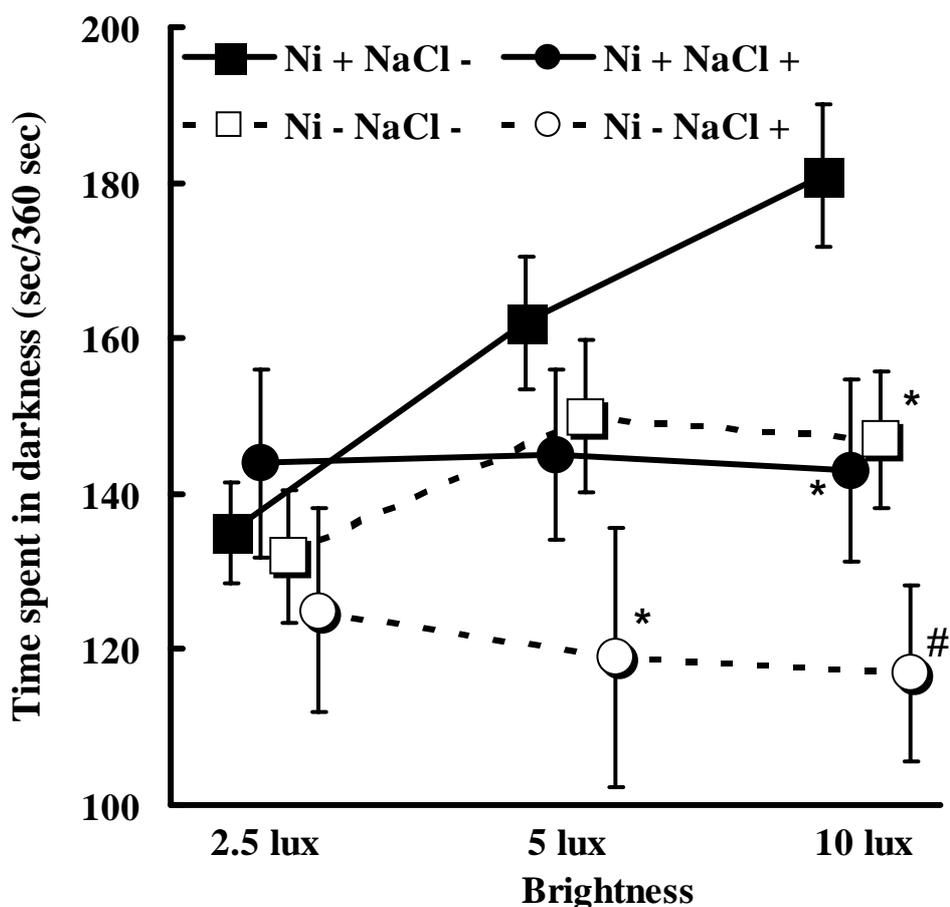


Figure 16. Brightness discrimination test

Marks show the mean time spent in the dark arm in a 360-second session. Short bars on marks show the standard error of the means.

Significantly different from Ni+NaCl-; # $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Nielsen ら(1)は、ニッケル欠乏のラットでは繁殖率が低下し、Anke ら(2)は、ニッケル欠乏のヤギでは、受精率が低下することを報告している。Yokoi ら(16)は、ニッケル欠乏のラットでは、精巣における精子産生速度の低下、精巣上体中精子数の減少、精子運動能の低下、精巣上体通過速度の短縮、前立腺および精嚢重量の低下が見られ、ニッケル欠乏は広範な男性生殖機能障害を招くことを報告している。ニッケル欠乏による男性不妊発現の機構は明らかではないが、精子鞭毛運動の開始と調節に CNG の存在が必要であること(17)を考慮すると、ニッケルが、精子において CNG の調節を通じて生理機能を発現している可能性が高い。

今回、研究の対象としたのは、CNG が重要な役割を担っている血圧調節、腎機能、網膜における光受容である。ニッケル欠乏ラットでは、収縮期血圧の上昇、尿中アルブミン排泄の増加、尿中 NAG 排泄の増加が見られ、ニッケル欠乏によって腎機能障害を伴う高血圧を生ずることが明らかとなった。経口塩化ナトリウム負荷試験では、ニッケル欠乏によ

って塩化ナトリウム負荷後の尿中ナトリウム/クレアチニン比が低下し、ニッケル欠乏によってナトリウム利尿が低下することが示唆された。

CNGは、集合管におけるナトリウム再吸収を通じて、ナトリウム利尿を起こす。すなわち、ナトリウム過剰摂取がシグナルとなって、心房性ナトリウム利尿ホルモン cGMP CNGの閉鎖、NO cGMP CNGの閉鎖、グアニリン cGMP CNGの閉鎖という経路によりナトリウム利尿がおこると考えられる。さらに、プロスタグランジン E₂代謝物の排泄量が、ニッケル充足時には塩化ナトリウムの過剰によって増加するが、ニッケル欠乏時には塩化ナトリウムの過剰によってむしろ減少するという結果が得られた。プロスタグランジン E₂は、その受容体が集合管に分布し、ナトリウム利尿作用を発現する(18)。また、*in vitro*の系ではプロスタグランジン E₂とニッケルが、血管内皮細胞のCNGに結合してその機能を調節することが知られている(19)。

塩化ナトリウム過剰摂取がニッケル欠乏に重なると、血圧はさらに上昇し、尿中アルブミンの排泄、尿中NAGの排泄、腎肥大が著明となり、臨床的には悪性高血圧の状態になることが示唆された。近年、大豆製品や豆類、種実類(ナッツ)に抗高血圧作用のあることが報告されている(20-22)。豆類や種実類の抗高血圧作用の機序は不明であるが、豆類や種実類はニッケルの豊富な給源であり、抗高血圧作用に寄与している可能性がある。

ニッケル欠乏ラットでは、暗所嗜好性が低下し、網膜の光感受性が低下している可能性がある。網膜桿状体には、網膜型のCNGが存在し、光感知情報の神経への伝達を担っている。*in vitro*の研究では、CNG機能にとってニッケルが必要であることが報告されており、今回、得られた結果は、生体内でもニッケルが、網膜のCNGの機能に必要なことを示唆している。一方、ニッケル欠乏ラットでも、網膜では光を感知はしたが、光を避ける本能そのものが損なわれて、光忌避の行動を取らなかった可能性も否定できない。また、塩化ナトリウム過剰摂取によっても暗所嗜好性が低下していたので、高血圧を介して網膜が変性し、網膜の光感受性が低下した可能性も考えられる。

以上の結果より、ニッケル欠乏によって高血圧、腎機能障害、ナトリウム利尿の低下、網膜光感受性の低下を招くことが明らかとなり、CNGの機能発現に対してニッケルが重要な役割を果たしていることが示唆された。ヒトにおけるニッケル欠乏症はまだ報告されていないが、ニッケル欠乏が食塩感受性高血圧の発症に寄与している可能性があるだろう。

6. 今後の課題

- ・悪性高血圧は重篤な疾患であり、その予防法が求められているが、コントロールが可能な発症要因や危険因子は知られていない。また、溶鋳作業従事者の集団では、精漿中ニッケル濃度の低下と血圧上昇を併発していたという報告もある(23)。そこで、一般公衆におけるニッケルの摂取量、尿中排泄量、血圧の関連について調査する必要があるだろう。
- ・長期完全静脈栄養法を施行した小児では、血清中ニッケル濃度が低下していることが報

告されており(24)、ヒトにおけるニッケル欠乏症の探索と生理作用の解明を行う必要があるだろう。

・ニッケル欠乏が、NO 並びに心房性ナトリウム利尿ホルモン誘導性ナトリウム利尿に及ぼす影響を明らかにする必要があるだろう。また、細胞・組織におけるニッケルの分布を明らかにし、CNG とニッケルの相互作用の場を研究する必要があるだろう。

・ニッケル欠乏動物における網膜機能の変化を追及する必要があるだろう。

6. 文献

1. Nielsen FH, Myron DR, Givand SH, Zimmerman TJ, Ollerich DA. Nickel deficiency in rats. *J Nutr* 1975;105:1620-1630.
2. Anke M, Groppe B, Krause U. Further data on the biological essentiality of nickel. In: Hurley LS, Keen CL, Lonnerdal B, eds. *Trace Elements in Man and Animals 6*. New York: Plenum, 1988:467-469.
3. Nielsen FH. Effect of form of iron on the interaction between nickel and iron in rats: growth and blood parameters. *J Nutr* 1980;110:965-73.
4. Nielsen FH, Zimmerman TJ, Collings ME, Myron DR. Nickel deprivation in rats: nickel-iron interactions. *J Nutr* 1979;109:1623-32.
5. Gordon SE, Zagotta WN. Localization of regions affecting an allosteric transition in cyclic nucleotide-activated channels. *Neuron* 1995;14:857-64.
6. Vandorpe DH, Ciampolillo F, Green RB, Stanton BA. Cyclic nucleotide-gated cation channels mediate sodium absorption by IMCD (mIMCD-K2) cells. *Am J Physiol* 1997;272:C901-10.
7. He Y, Ruiz M, Karpen JW. Constraining the subunit order of rod cyclic nucleotide-gated channels reveals a diagonal arrangement of like subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:895-900.
8. Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol* 1998;142:473-484.
9. Raphael SS. *Lynch's Medical Laboratory Technology*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1976.
10. Bessey OA, Lowry HO, Brock MJ. Method for rapid determination of alkaline phosphatase with 5 cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946;164:321-329.
11. Grishman MB, Johnson GG, Lancaster JR, Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol* 1996;268:237-246.
12. Kato H, Adachi N, Iwanaga S, Abe K, Takada K, Kimura T, Sakakibara S. A new

- fluorogenic substrate method for estimation of kallikrein in urine. *J Biochem* 1980;87:1127-1132.
13. Nielsen FH, Zimmerman TJ, Shuler TR. Interaction among nickel, copper, and iron in rats. Liver and plasma content of lipids and trace elements. *Biol Trace Elem Res* 1982;4:125-143.
 14. Yokoi K, Uthus EO, Penland JG, Newman SM, Jr., Nielsen FH. Nickel deficiency alters eye mitochondrial morphology and impairs brightness discrimination of rats. *FASEB J* 2004;18:A527.
 15. Gordon SE, Zagotta WN. Subunit interactions in coordination of Ni²⁺ in cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10222-6.
 16. Yokoi K, Uthus EO, Nielsen FH. Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats. *Biol Trace Elem Res* 2003;93:141-154.
 17. Weyand I, Godde M, Frings S, Weiner J, Muller F, Altenhofen W, Hatt H, Kaupp UB. Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 1994;368:859-863.
 18. Breyer MD, Breyer RM. Prostaglandin receptors: their role in regulating renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9:23-29.
 19. Rimon G, Rubin M. Channel modulators affect PGE(2) binding to bovine aortic endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1570:113-20.
 20. Rivas M, Garay RP, Escanero JF, Cia P, Jr., Cia P, Alda JO. Soy milk lowers blood pressure in men and women with mild to moderate essential hypertension. *J Nutr* 2002;132:1900-2.
 21. Lukito W. Candidate foods in the asia-pacific region for cardiovascular protection: nuts, soy, lentils and tempe. *Asia Pac J Clin Nutr* 2001;10:128-33.
 22. Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Association of blood pressure with intake of soy products and other food groups in Japanese men and women. *Prev Med* 2003;36:692-7.
 23. Dawson EB, Evans DR, Harris WA, Powell LC. Seminal plasma trace metal levels in industrial workers. *Biol Trace Elem Res* 2000;74:97-105.
 24. Dahlstrom KA, Ament ME, Medhin MG, Meurling S. Serum trace elements in children receiving long-term parenteral nutrition. *J Pediatr* 1986;109:625-630.

A study on the mechanism of salt-sensitive hypertension induced by deficiency of nickel, an ultratrace element

-Interaction between nickel and cyclic nucleotide-gated sodium channel-

Katsuhiko Yokoi and Takatoshi Esashi

Department of Human Life and Culture, Faculty of Humanities, Seitoku University

Summary

Although there are circumstantial evidences that nickel is essential for higher animals, the physiological function of nickel is not clarified. Gordon and Zagotta (1995) found that nickel modulates the function of cyclic nucleotide-gated cation channels (CNG) *in vitro*. Nickel stabilizes the open status of rod-type CNG and the closed status of olfactory-type CNG. Yokoi et al (2003) found that nickel deprivation in rats caused decreased sperm number and motility in epididymides, shortened epididymal transit time of spermatozoa, and decreased weights of prostates and seminal vesicles. This prompted us to test the hypothesis that nickel has an important role in CNG functions *in vivo*. Therefore, we tested effect of nickel deficiency on physiological functions that relate to CNG, i.e., blood pressure regulation, natriuresis and brightness discrimination. Thirty-two three-week-old male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups of 8 assigned to the 16-week 2 x 2 factorially arranged experiment. The treatments were supplemental dietary nickel of 0 and 1 mg/kg and supplemental dietary sodium chloride (NaCl) at 0 and 80 g/kg. Dietary nickel deficiency elevated systolic blood pressure. In the rats fed nickel-deficient, NaCl-excessive diet, urinary excretion of albumin and N-acetyl glucosaminidase was significantly increased. Urinary sodium/creatinine ratio after oral NaCl load was significantly decreased in nickel-deficient rats. Nickel deficiency caused loss of brightness discrimination at 10 lux. These results suggest that nickel deficiency evokes hypertension with impaired natriuresis and impaired retinal photoreception, probably through the impaired CNG function.