

発表番号 55

食塩感受性高血圧ラットにおける自律神経中枢内 nNOS ニューロンと Ang II ニューロンによる交感神経活動の異常制御

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：晝間 恵、煙山健仁、平川晴久（防衛医科大学校生理学第二講座）

前4回の助成にて次のことが明らかにされた。a) 食塩感受性高血圧ラットに無麻酔・無拘束で nNOS 阻害剤である 7-nitroindazole の全身投与、または S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC) の脳室内投与すると、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（圧受容器除負荷交感神経活動）がおおよそ2倍～3倍にも増加する。b) 脳幹部の 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高値である。c) 抗 nNOS 抗体を用いた脳組織免疫染色法により、10種類の中枢神経核に nNOS ニューロンを認め、これらのうち8種神経核に存在する nNOS ニューロンの数が正常血圧ラットに比し食塩感受性高血圧ラットに多い。これらのことから、食塩感受性高血圧では、脳内 nNOS ニューロン系が upregulation されており、その upregulation された nNOS ニューロンにより交感神経活動が中枢性に抑制されていることがわかった。中枢神経性 nNOS ニューロンはこのように交感神経活動を抑制する方向に作用している。一方、中枢神経性 Angiotensin II ニューロンは交感神経活動を増幅すると考えられている、がしかし、反対の意見もあり、その作用方向性については未だに確定していない。

本研究の目的は、中枢神経性 nNOS ニューロンの作用をブロックした状態で Angiotensin II による交感神経活動への影響を調べることである。

【方法】(1) 正常血圧状態において、低angiotensin血症ラットと高angiotensin血症ラットのそれぞれに対し、nNOS による交感神経抑制をブロックした上で AT1 受容体をブロックし、内因性 angiotensin II 作用による交感神経活動への影響を比較する。この時、交感神経活動への影響を判定するに当たって、血圧に依存しない交感神経活動である圧受容器除負荷交感神経活動を用いる。(2) 抗 nNOS 抗体を用いた免疫組織染色法にて SD ラットの脳内 nNOS ニューロンの分布を調べる。(3) 中枢性 nNOS ニューロンが upregulation された食塩感受性高血圧ラットにおいて内因性 angiotensin II による交感神経活動への影響を調べる。

【結果】1) 無麻酔・無拘束の正常血圧ラットでは、あらかじめ高食塩食を投与し、nNOS antagonist である SMTC (S-methyl-L-thiocitrullin) を全身投与しておけば、AT1 antagonist である Losartan により圧受容器除負荷交感神経活動が上昇した。2) 一方、同条件であらかじめ低食塩食を投与しておれば、Losartan による圧受容器除負荷交感神経活動への影響は見られない。3) SD ラットにおける脳内 nNOS ニューロンの分布は食塩感受性高血圧ラットと同じであり、その nNOS ニューロン数にも有意差が認められなかった。4) 食塩感受性高血圧では未だ十分な結果は得られていない。

【結論】正常血圧ラットにおける、内因性 Angiotensin II によるオールオーバーな交感神経活動への影響は、脳局所における応答と異なり、抑制性に作用していることが示唆された。この際、低塩食または高 angiotensin 血症があると内因性 angiotensin II による抑制はマスクされてしまうことが示された。

7

助成番号 0435

食塩感受性高血圧ラットにおける自律神経中枢内 nNOS ニューロンと

Ang II ニューロンによる交感神経活動の異常制御

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：晝間 恵（防衛医科大学校生理学第二講座）

煙山 健仁（防衛医科大学校生理学第二講座）

平川 晴久（防衛医科大学校生理学第二講座）

1. 研究目的

過去4回の貴財団研究助成（9923, 0043, 0142, 0338）に支えられ次のような結果を得ていた。i) 食塩感受性高血圧ラットに無麻酔・無拘束で神経性一酸化窒素合成酵素阻害剤（nNOS inhibitor: 7-nitroindazole (7-NI) または S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC)）を全身投与、または脳室内投与し脳内 nNOS を阻害すると、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（圧受容器除負荷交感神経活動）がおよそ2倍～3倍にも増大する^(1,5)。ii) 脳幹部の脳組織 nNOS 活性および nNOS 酵素蛋白量は食塩感受性高血圧ラットに高値である^(2,5)。iii) 抗 nNOS 抗体を用いた脳組織免疫染色法により、視床下部視索上核（SON）、視床下部室傍核（PVN）、中脳中心灰白室背外側核（DLPAG）、脚橋被蓋核（PPT）、背側縫線核（DNR）、背外側被蓋核（LDT）、外側結合腕周囲核（LPB）、大縫線核（RM）、吻側腹外側延髄（RVLM）、弧束核（NTS）、以上10種類の中枢神経核に nNOS ニューロンを認め、これらのうち DNR と RM を除く8種の神経核に存在する nNOS ニューロンの数が正常血圧ラットに比し食塩感受性高血圧ラットに多い^(2,3,5)。これらのことから、食塩感受性高血圧では、脳内 nNOS ニューロン系が upregulation されており、その upregulation された nNOS ニューロンにより交感神経活動が中枢性に抑制されていることがわかった。

また、この nNOS ニューロンによる交感神経活動の抑制は、食塩感受性高血圧だけにみられるのではなく、食塩感受性正常血圧⁽⁵⁾、食塩抵抗性正常血圧⁽¹⁾、および正常実験動物⁽⁷⁾でもみられ、その一般性は多くの研究者が認めるに至っている。

中枢神経性 nNOS ニューロンはこのように交感神経活動を抑制する方向に作用している。一方、中枢神経性 Angiotensin II ニューロンは交感神経活動を増幅すると考えられている^(8,9)、がしかし、反対の意見^(10,11,12)もあり、その作用方向性については未だに確定していない。この原因として、1) これまで nNOS ニューロンによる強い交感神経活動抑制作用が知られていなかったことによる混乱、2) 交感神経活動は圧受容器反射の影響を強く

受けるため血圧作動性生理活性物質による交感神経への tonic な作用を判定し難い点、3) 循環血中 angiotensin II 濃度が脳内 angiotensin II ニューロン作用を修飾している可能性、4) 正常な生体状態では nNOS ニューロン性抑制系が微弱なためこれをブロックしてもあいまいな結果しか得られない、などが考えられる。

本研究の目的は、中枢神経性 nNOS ニューロンの作用をブロックした状態で Angiotensin II による交感神経活動への影響を調べることである。このため、まず、正常血圧状態において、低 angiotensin 血症ラットと高 angiotensin 血症ラットを作成し、これらの nNOS 活性をブロックした上で AT1 受容体をブロックし、内因性 angiotensin II 作用による交感神経活動への影響を比較する。この時、交感神経活動への影響を判定するに当たって、血圧に依存しない交感神経活動である圧受容器除負荷交感神経活動^(1,5)を用いる。次に、中枢性 nNOS ニューロンが upregulation された食塩感受性高血圧ラットにおいて、やはり nNOS 活性をブロックした上で AT1 受容体ブロックを行い、内因性 angiotensin II による交感神経活動への影響を、圧受容器除負荷交感神経活動を用いて調べる。

2. 研究方法

2.1 実験動物

2種類のラット・ストレインを用いた。正常血圧ラットとして Sprague Dawley (SD) ラットを、また食塩感受性高血圧ラットとして Dahl 食塩感受性 (DSS) ラットを用いた。SD ラットの9週齢から12週齢まで3週間高食塩食(8% NaCl 含有)を投与したものを正常血圧かつ低 angiotensin 血症ラットとし、またSDラットの10~11週齢から12週齢まで1~2週間低食塩食(0.04% NaCl 含有)を投与したものを正常血圧かつ高 angiotensin 血症ラットとした。DSS ラットの8週齢から12週齢に渡って4週間高食塩食(8% NaCl 含有)を投与したものを食塩感受性高血圧ラットとした。

これらラットの食塩負荷期間中、ネンブータル麻酔下で無菌的に後腹膜腔を開き腎交感神経に神経活動記録用電極を埋め込んだ。1週間の回復期間を経て、再度ネンブータル麻酔下・無菌的に動静脈カテーテルとフォガティのバルーン・カテーテル(1~2 Fr)を挿入した。バルーン・カテーテルはそのバルーンが胸腔内下大静脈内に位置するように設置した。すべてのカテーテルおよび電極は皮下を走らせ後頭部から導出し固定した。手術後抗生物質を皮下投与した。

実験動物の取り扱いはすべて日本生理学会動物実験倫理規定に従い、実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の許可を得て行った。

2.2 各ラット群における内因性 Angiotensin II 作用による交感神経活動への影響の測定

実験当日、ラットを飼育ケージごとシールドボックス内に移した後、神経活動記録用電極は神経活動計測機プレアンプに、動脈カテーテルは圧トランスデューサーにそれぞれ接続し、これらシグナルをポリグラフアンプで増幅して、腎交感神経活動(RSNA)、動脈圧

(AP)、平均動脈圧(MAP)、瞬時心拍数(HR)を測定した。測定データはデジタル変換(サンプリング速度:1,000 Hz)し、コンピュータ上でモニターしながら記録した。

ラットが安静化するのを待ち、無麻酔・無拘束で以下の実験を行った。コントロール状態で安静時 MAP、HR、RSNA を得た後、下大静脈内バルーンをゆっくり膨らませ血圧を低下させた。このとき圧受容器反射性に亢進する RSNA を測定し、その上限を圧受容器除負荷 RSNA (Baroreceptor-unloaded RSNA, Unload RSNA) とした。これを 2~3 回繰り返した後、S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC) の 10 mg/kg を i.v. した。血圧、その他が安定したところでコントロール期と同様に MAP、HR、RSNA、Unload RSNA を測定した。SMTC 投与後 40 分~1 時間 20 分後、AT1 receptor antagonist である Losartan の 10 mg/kg を i.v. した。血圧、その他が安定したところで再び、これまでと同様に MAP、HR、RSNA、Unload RSNA を測定した。

RSNA は、コントロール期安静時 RSNA レベルを 100% とし、これと比較して%表示で表した。また、RSNA のノイズレベルは、phenylephrine にて血圧を充分上昇させたとき、および実験終了後 hexamethonium にて交感神経節をブロックして、求めた。

2.3 抗 nNOS 抗体を用いた、SD ラットの脳幹部および視床下部の免疫組織染色法

ラットをネブタール麻酔 (40 mg/kg, i.p.) し、開胸下に右心房を切開した後、上行大動脈ヘカテーテルを挿入し、胸部大動脈を結紮した。約 200 ml の生理食塩水でラット頭部を還流し、続いて約 400 ml の固定液(4% paraformaldehyde 含有 0.1M Phosphate buffer, pH 7.2)にて脳を還流固定した。固定された脳を摘出し、30% sucrose 含有 0.1 M Phosphate buffer, pH 7.2 内にてオーバーナイト浸漬固定した。固定された脳を凍結し、クライオスタットにて約 40 μ m 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(-)に浸漬し、その後、抗 nNOS ラビット抗体(一次抗体)にて反応させた(4°C、3日間)。PBS(-)で洗浄後、Biotinylated anti-rabbit IgG(二次抗体)にて反応させた(25°C、1時間)。PBS(-)で洗浄後、Avidin-Biotin-HPR complex にて反応させ(25°C、1時間)、PBS(-)で洗浄後、DAB 反応(1mg/ml diaminobenzidine tetrahydrochloride / 0.01% H₂O₂ 含有 0.05M Tris-HCl buffer, pH7.2)にて発色させた。ABC 法⁽¹³⁾を一部改変した方法を用いた。

nNOS 陽性ニューロンを顕微鏡で同定し、その nNOS 陽性ニューロンの分布を調べ、nNOS 陽性細胞の全細胞数をカウントした。食塩感受性高血圧群と正常血圧 SD ラット群間でそれら分布と細胞数を比較した。

各測定値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計には、1 変数を多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 unpaired t-test を、それぞれ用いた。

3. 研究結果

実験は、(1)低 Angiotensin II 血症正常血圧ラットと高 Angiotensin II 血症正常血圧ラットにおける内因性 Angiotensin II 作用による交感神経活動への影響、(2)正常血圧 SD ラットの nNOS 陽性ニューロンの脳内分布、(3)nNOS 陽性ニューロンの細胞数を食塩感受性高血圧群と正常血圧 SD ラット群との比較、そして、(4)食塩感受性高血圧ラットにおける内因性 Angiotensin II 作用による交感神経活動への影響、の4部から構成される。

3.1 正常血圧ラットにおける内因性 Angiotensin II 作用による交感神経活動への影響

高食塩食 SD ラット(低 Angiotensin II 血症)について、Fig. 1 は MAP、HR、RSNA の典型的応答が示されている。SMTC 投与にてベースライン動脈圧はやや上昇するが、ベースライン RSNA および圧受容器除負荷 RSNA に著名な変化はみられなかった。一方、Losartan を追加投与したときの圧受容器除負荷 RSNA は増加した。実験結果を n=5 で平均し比較すると、Fig. 3 に示されたように、SMTC に続いて Losartan を投与した場合、圧受容器除負荷 RSNA は有意に増加した。

低食塩食 SD ラット(高 Angiotensin II 血症)では、Fig. 2 に示したように、Losartan の追加投与にてベースライン動脈圧の低下とベースライン RSNA の上昇が見られる。これは Angiotensin II の AT1 受容体刺激効果が低食塩食にて著名であり、この阻害により低血圧が生じ、圧受容器反射性にベースライン RSNA が増加したと考えられる。一方、圧受容器除負荷 RSNA は、SMTC にてやや抑制、続く Losartan ではコントロールと同じくらいを示した。実験結果を n=4 で平均し比較すると、Fig. 4 に示されたように、Losartan の血圧効果には有意差が得られたものの、圧受容器除負荷 RSNA は SMTC やこれに続く Losartan では有意な変化は生じなかった。

3.2 SD ラットにおける nNOS 陽性ニューロンの分布

これまでの報告(助成研究番号:0142、0338)と同じように、SD 正常食・正常血圧ラットにおいて nNOS 抗体による陽性ニューロンの分布を求めた。染色の程度などはこれまでと同様であり、得られた nNOS ニューロンの分布を Fig. 5 にまとめた。nNOS ニューロン数の違いはあるが、これらニューロンの存在分布は DSS ラットのそれと同じであった。

3.3 SD ラットにおける nNOS 陽性ニューロンの細胞数

SD 正常食・正常血圧ラットの各脳スライスから nNOS 陽性ニューロンの数をカウントした。その数値を Table 1 に、以前報告した DSS 食塩感受性高血圧ラットと比較して示した。2群同時染色ではないため、正確性に劣るものの、他系統ラットとの2群同時染色によるデータから間接的に比較できた。個々の神経核毎には幾分差がありそうであるが、トータルの nNOS 陽性ニューロン数には意外にも有意な差が無かった。

3.4 食塩感受性高血圧における内因性 Angiotensin II 作用による交感神経活動への影響

本実験をこれまで何度も試みたが、十分な結果は未だ得られていない。最大の原因は結果的に、低食塩食ラットの術後回復の大変な悪さ、および、神経活動記録時に電極と神

経とを固定するシリコンゲルおよび電極固定に使用していたシリコンチューブの劣化であった。昨年晩夏ごろから、神経活動の慢性記録に失敗が出始め、徐々に失敗の確立が上がり始め、今年冬にはついに研究室の誰も神経活動の慢性記録に成功しなくなった。その間、数々の修正・修復を加えるも成功率を改善するに至らなかった。シリコンゲルだけを生体外で反応させれば、充分重合反応を起こし、立派に固形化することが、シリコンゲルの劣化に気づくのを遅らせた。今年の春頃、すべての器具・材料を新品化したことでゲルの劣化とシリコンチューブの劣化であったことに気づいた。

その後、低食塩食正常血圧 SD ラットの実験をいくつか成功させ、やっと今回のデータ提示にこぎつけることができた。向後2ヶ月後の助成研究発表会で、食塩感受性高血圧における内因性 Angiotensin II 作用による交感神経活動へのデータを提示できることを期待したい。

4. 考 察

本研究では次の結果が得られた。1)無麻酔・無拘束の正常血圧ラットでは、あらかじめ高食塩食を投与し、nNOS antagonist である SMTC (S-methyl-L-thiocitrullin) を全身投与しておけば、AT1 receptor antagonist である Losartan により圧受容器除負荷交感神経活動が上昇した。2)一方、同条件であらかじめ低食塩食を投与しておけば、Losartan による圧受容器除負荷交感神経活動への影響は見られない。また、3)SD ラットにおける脳内 nNOS ニューロンの分布は食塩感受性高血圧ラットと同じであり、その nNOS ニューロン数にも有意差が認められなかった。

SD ラットに高食塩食を4週間投与しても安静時平均動脈圧は 101 ± 4 mmHg と正常を維持した。後ほど Losartan を i.v.しても動脈圧、HR や RSNA にも影響しないことから、高食塩食負荷ラットの血中 angiotensin による血圧維持性は低いと思われる。このラットに無麻酔・無拘束で圧受容器除負荷 RSNA を測定すると $337 \pm 75\%$ を示した。SMTC の充分量を i.v.すると、8~10分後平均動脈圧は 144 ± 7 mmHg に上昇する。このとき RSNA はフェニレフリンで同程度血圧を上げたほど抑制されない。また、このときの圧受容器除負荷 RSNA は Fig. 3 に示された $355 \pm 104\%$ と有意差はなかった。この投与後8~10分後のデータより、40分~100分の間に平均血圧はコントロールに近づいたときの圧受容器除負荷 RSNA を nNOS ブロック時の圧受容器除負荷 RSNA とした。コントロール相で得られた圧受容器除負荷 RSNA と有意差がなかった。この後、Losartan で AT1 受容体をブロックすると、血圧はコントロールレベルへ戻り、圧受容器除負荷 RSNA は $396 \pm 93\%$ となり、コントロール相の圧受容器除負荷 RSNA より有意に増加した。SMTC の 10mg/kg を i.v.した場合、脳内 NO 濃度低下は3時間以上に及ぶ⁽¹⁴⁾ことから、この相は nNOS および AT1 受容体の両者がブロックされた状態にあると考えられる。従って、低 Angiotensin 血症または高食塩食負荷状態で、交感神経抑制系の nNOS をブロックしておけば、内因性 angiotensin II は圧受容器除

負荷交感神経活動を抑制すると考えられる。

圧受容器除負荷交感神経活動は、以前の報告書(助成研究 9923 番、0043 番)や論文^(1, 5)でも述べたように、動脈圧を充分低下させたときに得られる交感神経活動であり、圧受容器反射性抑制がはずれた場合の交感神経活動に相当する。この交感神経活動は血圧に左右されない。また、圧受容器除負荷交感神経活動が増加するということは、いずれの動脈圧点にて比較しても常に交感神経活動が高くなっていることを意味する^(10, 15)。すなわち、圧受容器除負荷交感神経活動の増加は、血圧から独立した tonic な交感神経活動の増加を意味する。したがって、高食塩食負荷 SD ラットの結果から、低 Angiotensin 血症または高食塩投与状態で、交感神経抑制系である nNOS をブロックしておけば、内因性 angiotensin II が交感神経活動を tonic に抑制している状態が観察された、との結論になる。

また、低食塩食負荷ラットでは、尿中に失われる Na⁺イオンを補給することが難しく、この Na⁺イオンは細胞外液の主成分であるため、細胞外液量の低下をきたしていると予想される。このラットでは高 angiotensin 血症であろうことが、後ほどの Losartan i.v.後の MAP、HR、RSNA の応答 (Fig. 4) から推察される。この低食塩ラットでは、圧受容器除負荷交感神経活動がコントロール相と nNOS ブロックかつ AT1 受容体ブロック相とで有意差が得られなかった。すなわち、血中 Angiotensin II 濃度が高いか、または、低食塩摂取状態では、内因性 Angiotensin II による tonic な交感神経活動への修飾はマスクされて見られなくなる、ことを示唆する。

一方、交感神経活動をオーバーオールで抑制すると考えられている脳内 nNOS ニューロン系について考えてみる。この脳内 nNOS ニューロン系は食塩感受性高血圧ラットで食塩感受性正常血圧ラットより確かに upregulation されている^(1, 5)。また、食塩抵抗性ラットに正常食負荷したときも、高食塩食を負荷したときでも、これらの脳内 nNOS ニューロン数は食塩感受性正常血圧ラットと同程度に少ない^(3, 4)。ところが、不思議なことに、これら Dahl rat の素ラットである SD ラットでは Table 1 で示したように、脳内 nNOS ニューロン数は食塩感受性高血圧ラットと同程度に多いことが示された (Table 1, 6)。これは SD ラットの脳内 nNOS ニューロン系が既に upregulation されているかのように示唆するが、実は、Fig. 3 と 4 に示されたように、nNOS のブロック前後で圧受容器除負荷交感神経活動に有意差がない。すなわち、SD ラットでは食塩負荷をかけようがかけまいが、nNOS 性交感神経活動抑制系は不活発であることが示されている。これらのことから、nNOS ニューロン性交感神経抑制は angiotensin II 系以外からも強い制御を受けている可能性が示唆された。複雑なようである。

本研究の結果から、正常血圧ラットにおける、内因性 Angiotensin II によるオールオーバーな交感神経活動への影響は、脳局所における応答⁽⁸⁾とは異なり、抑制的に作用していることが示唆された。この際、食餌中食塩含有量もしくは血中 angiotensin II 濃度がこの抑制性効果を左右し、低塩食または高 Angiotensin 血症では内因性 angiotensin II による抑制

作用をマスクしてしまうことが示された。これらの結果は、Dampney らが示す Angiotensin II ニューロンによる興奮性作用とは相反する結果となった。この原因として、オールオーバーな交感神経活動への影響は、未知の、しかも影響力の強い因子が存在する可能性があるため、この未知の因子が関係しているのかもしれない。

5. 今後の課題

まずは、本報告書では報告できなかった 2 点を今後明らかにしたいと考える。(1)食塩感受性高血圧ラットにおいて、内因性 Angiotensin II による交感神経活動への影響、(2)SD ラットの脳組織 nNOS 活性も、ニューロン数と同じように食塩感受性高血圧ラットと同様に upregulation されているのか、の 2 点である。

また、貴財団に支えられ続けてきた食塩感受性高血圧に見られる中枢性 nNOS ニューロン upregulation は、論文レフリーや発表をお聞きになった多くの研究者から動物種特異的なものか、高血圧そのものが誘発しているのか、あるいは、食塩負荷そのものが誘発しているのか、いずれなのかを問いただされることが多い。この質問への回答を出したいと考えている。さらに、以前から共同研究にて nNOS ニューロンによる交感神経活動の中枢性制御神経回路を同定するべく働きかけているが、現在食塩感受性高血圧モデルの形成段階で失敗し、プロジェクトの前進が見られていない。この点も解決したいと考えている。

一方、angiotensin II ニューロンと nNOS ニューロンによる交感神経活動制御神経回路は依然として不明である。これに強く影響する他の因子の発見、および、中枢性作用と全身性作用の差のメカニズムの解明もなされなければならないと考えている。

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. 晝間 恵、煙山健仁、西田育弘 Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける脳内 nNOS 分布。 *日本病態生理学会雑誌* Vol. 12 (2): 57, 2003.
3. 晝間 恵、平川晴久、煙山健仁、西田育弘 Dahl ラット脳における神経性 NOS の分布。 *Jpn. J. Physiol.* 54 (Suppl.):S196, 2004.
4. 晝間 恵、平川晴久、煙山健仁、西田育弘 Dahl 食塩抵抗性ラットにおける脳内 nNOS 分布。 *日本病態生理学会雑誌* Vol.13 (2): 55, 2004.
5. Hiruma M, Horiuchi J, Sakamoto H, Kemuriyama T, Hirakawa H, Nishida Y. Brain nNOS neuron-mediated sympathoinhibition is enhanced in hypertensive Dahl rats. *J. Hypertension* 23 (4): 825-834, 2005.
6. 晝間 恵、平川晴久、煙山健仁、西田育弘 Dahl 食塩感受性高血圧ラットの中枢性

- nNOS は upregulate されているのか? *Jpn. J. Physiol.* 55 (Suppl.):S191, 2005.
7. Zanzinger J, Czachurski J, Seller H. Neuronal nitric oxide reduces sympathetic excitability by modulation of central glutamate effects in pigs. *Circ. Res.* 80 (4): 565-571, 1997.
 8. Dampney RAL. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rev.* 74:323-364, 1994.
 9. Liu JL, Murakami H, Sanderford M, Bishop VS, Zucker IH. Ang II and baroreflex function in rabbits with CHF and lesions of the area postrema. *Am. J. Physiol.* 277:H342-H350, 1999.
 10. Nishida Y, Ryan KL, Bishop VS. Angiotensin II modulates arterial baroreflex function via a central alpha 1-adrenoceptor mechanism in rabbits. *Am. J. Physiol.* 269:R1009-R1016, 1995.
 11. Schmid PG, Guo GB, Abboud FM. Different effects of vasopressin and angiotensin II on baroreflexes. *Fed. Proc.* 44(8): 2388-92, 1985.
 12. Kashihara K, Takahashi Y, Chatani K, Kawada T, Zheng C, Li M, Sugimachi M, Sunagawa K. Intravenous angiotensin II does not affect dynamic baroreflex characteristics of the neural or peripheral arc. *Jpn. J. Physiol.* 53 (2): 135-143, 2003.
 13. 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.
 14. Gozal D, Torres JE, Gozal YM, Littwin SM. Effect of nitric oxide synthase inhibition on cardiorespiratory responses in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.* 81 (5): 2068-2077, 1996.
 15. Nishida Y, Bishop VS. Vasopressin-induced suppression of renal sympathetic outflow depends on the number of baroafferent inputs in rabbits. *Am. J. Physiol.* 263: R1187-R1194, 1992.

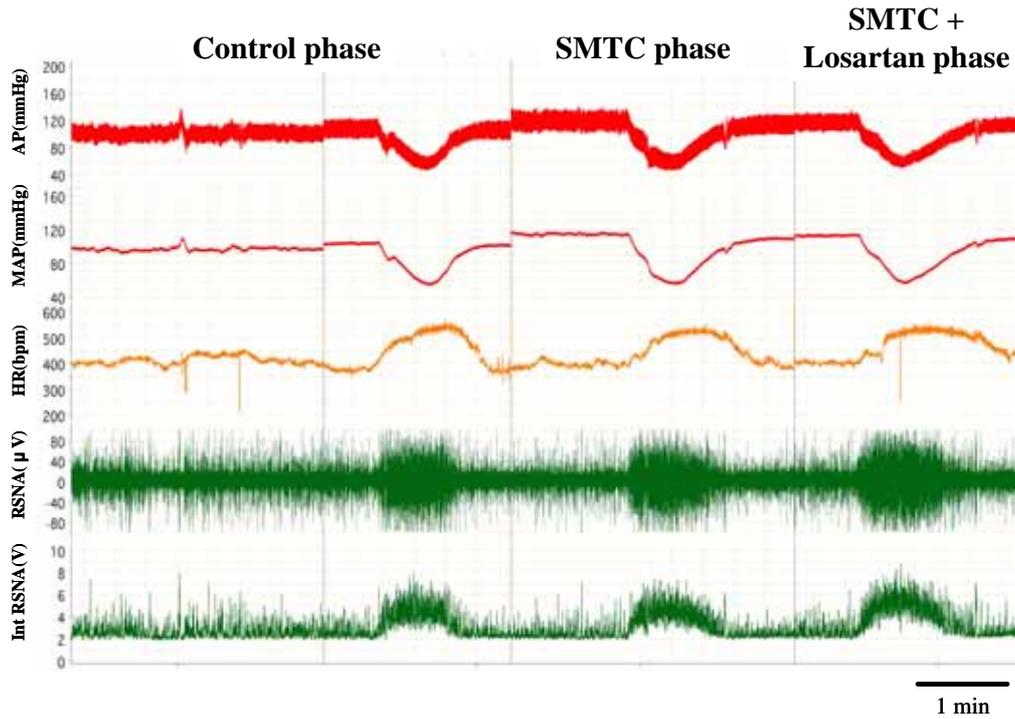


Fig. 1. 高食塩食負荷し低Angiotensin血症にした正常血圧SDラットの、コントロール相、SMTC (10 mg/kg, i.v.) 相、およびSMTC+Losartan (10 mg/kg, i.v.) 相における、動脈圧 (AP)、平均動脈圧 (MAP)、心拍数 (HR)、腎交感神経活動 (RSNA)、Integrated RSNA。各相において下大静脈の血管内バルーンを膨らませ、動脈圧を低下させた。圧受容器を徐負荷したときのRSNA (圧受容器徐負荷RSNA) を測定した。

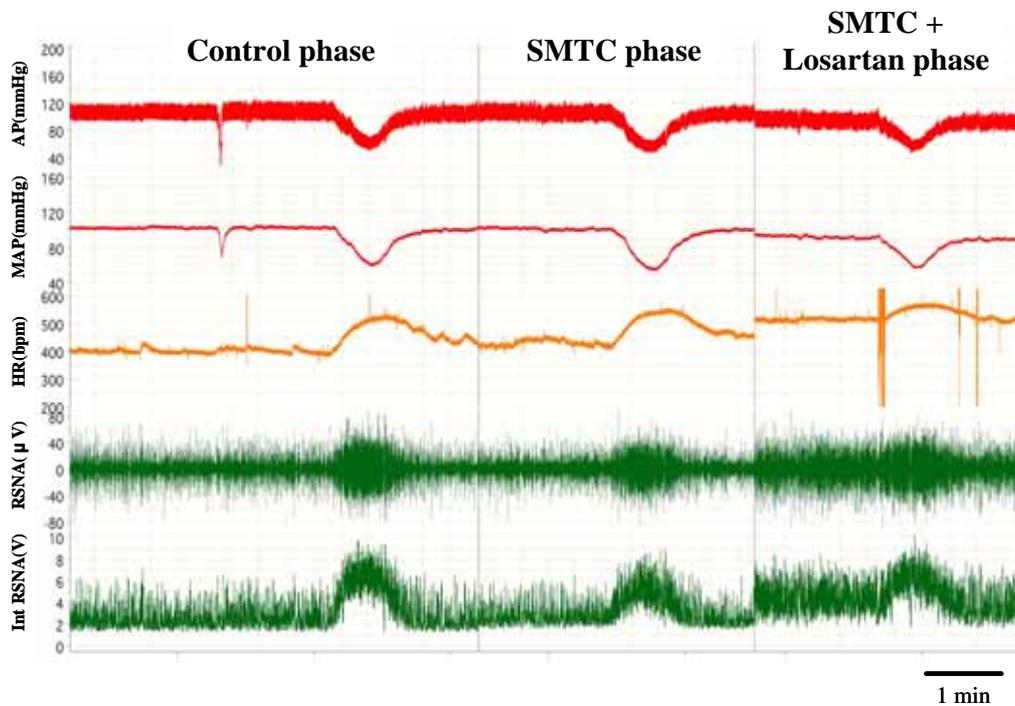


Fig. 2. 低食塩食負荷し高Angioensin血症にした正常血圧SDラットの、コントロール相、SMTC (10 mg/kg, i.v.) 相、およびSMTC+Losartan (10 mg/kg, i.v.) 相における、動脈圧 (AP)、平均動脈圧 (MAP)、心拍数 (HR)、腎交感神経活動 (RSNA)、Integrated RSNA。各相において下大静脈の血管内バルーンを膨らませ、動脈圧を低下させた。圧受容器を徐負荷したときのRSNA (圧受容器徐負荷RSNA) を測定した。

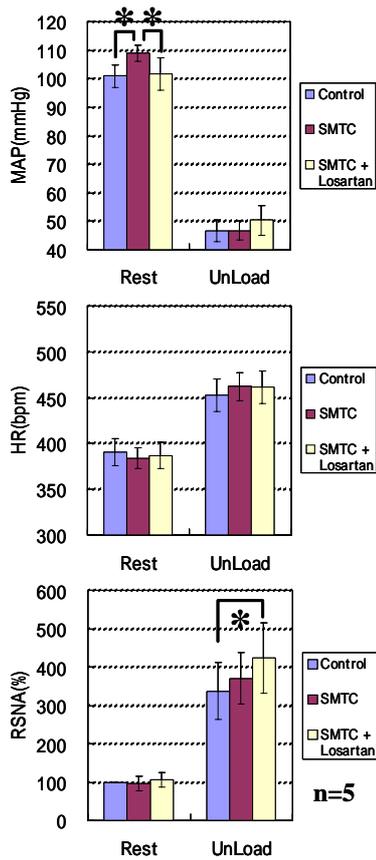


Fig.3. 高食塩食SDラット(n=5)の安静時および圧受容器徐負荷時のMAP、HR、RSNAの平均。*, p<0.05。

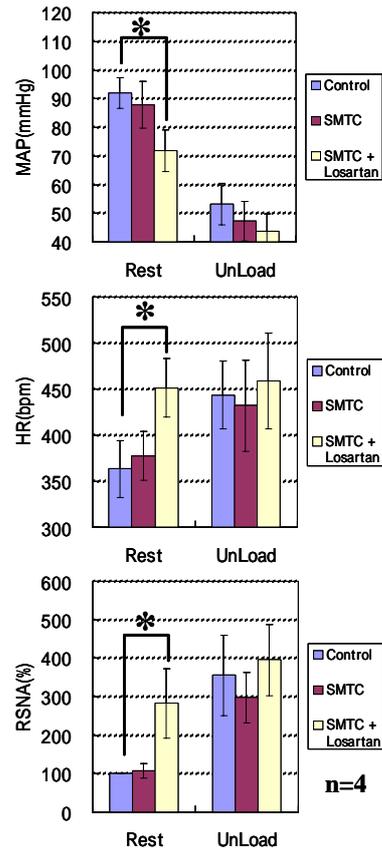


Fig.4. 低食塩食SDラット(n=4)の安静時および圧受容器徐負荷時のMAP、HR、RSNAの平均。*, p<0.05。

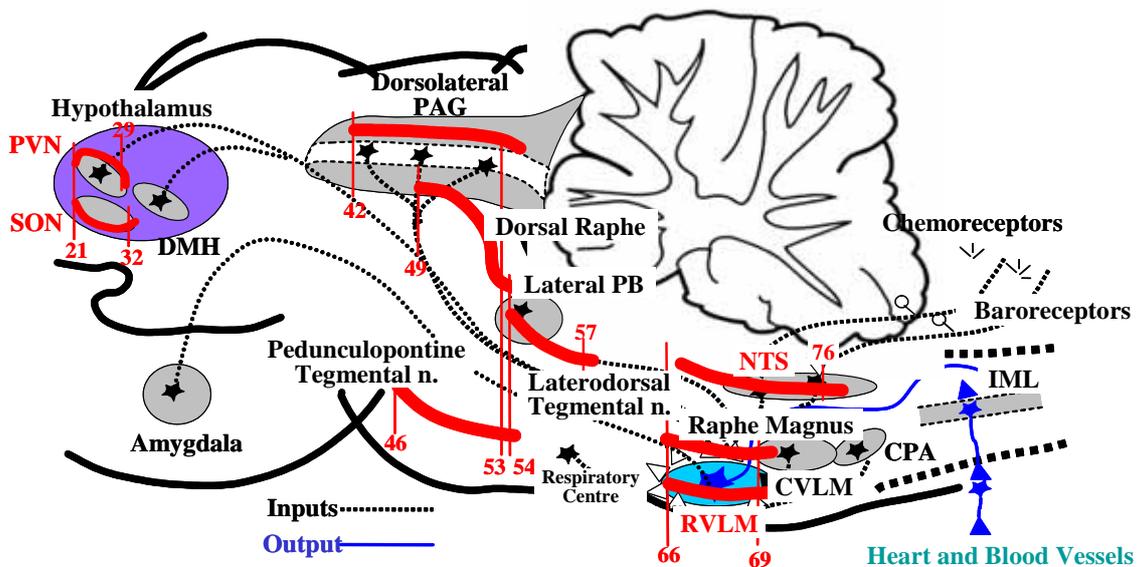


Fig.5 正常血圧SDラットのnNOS陽性ニューロンの分布。この分布はDSSラットにおけるnNOSニューロンの分布と同じであった。SON, suprapoptic nucleus (視索上核); PVN, paraventricular nucleus (室棒核); DLPAG, dorsolateral periaqueductal gray (中脳中心灰白質背外側核); PPT, pedunclopontine tegmental nucleus (脚橋被蓋核); DRN, dorsal raphe nucleus (背側縫線核); LDT, laterodorsal tegmental nucleus (背外側被蓋核); LPB, lateral parabrachial nucleus (外側結合腕周囲核); RM, raphe magnus (大縫線核); RVLm, rostral ventrolateral medulla (吻側腹外側延髄); NTS, nucleus tractus solitarius (弧束核)。

	DSS 8%	SD 0.4%
SON	4878 ± 28 (48)	4748 ± 94 (48)
PVN	2648 ± 69 (48)	3221 ± 112 (48) *
DLPAG	2159 ± 22 (56)	1552 ± 79 (56)
PPT	1812 ± 59 (56)	2097 ± 123 (56)
DRN	305 ± 38 (56)	242 ± 11 (56) *
LPB	1662 ± 43 (56)	1495 ± 82 (56)
LDT	3464 ± 300 (56)	3636 ± 130 (56)
RM	441 ± 8 (56)	394 ± 17 (60)
RVLM	2370 ± 80 (56)	1748 ± 42 (60) *
NTS	1066 ± 44 (56)	748 ± 41 (60) *
TOTAL	20804 ± 384 (164)	19881 ± 156 (116)

Table 1 DSS食塩感受性高血圧ラット(DSS 8%)とSD正常食正常血圧ラット(SD 0.4%)とのnNOS陽性ニューロンの数の比較。DLPAG, dorsolateral periaqueductal gray (中脳中心灰白質背外側核); PPT, pedunclopontine tegmental nucleus (脚橋被蓋核); DRN, dorsal raphe nucleus (背側縫線核); LDT, laterodorsal tegmental nucleus (背外側被蓋核); LPB, lateral parabrachial nucleus (外側結合腕周囲核); RM, raphe magnus (大縫線核); RVLM, rostral ventrolateral medulla (吻側腹外側延髄); NTS, nucleus tractus solitarius (弧束核); SON, suprapoptic nucleus (視索上核); PVN, paraventricular nucleus (室棒核)。数値は平均 ± SE。()内の数値はニューロンの数をカウントするのに用いたスライスの数。*: P<0.05 両群間での比較。

Interaction between nNOS neuron- and Ang II neuron-mediated sympathomodulatory effects in Salt-sensitive Hypertensive Dahl Rats.

Yasuhiro Nishida, Megumi Tandai-Hiruma, Takehito Kemuriyama,
Haruhisa Hirakawa
National Defense Medical College, Department of Physiology II

Summary

Background: We have demonstrated that the nNOS neuron-mediated sympathoinhibition is upregulated in salt-sensitive hypertensive Dahl rats, based on the 7-nitroindazole i.v. experiments and the S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC) icv experiments using conscious rats, the immunohistochemical study, and the tissue enzyme assay study.

Objective: To investigate the endogenous angiotensin II-mediated effects on the overall sympathetic outflow in normotensive Sprague Dawley (SD) rats and salt-sensitive hypertensive Dahl rats, under the condition of reduced nNOS-mediated inhibition.

Design and methods: Arterial pressure (AP), heart rate and renal sympathetic nerve activity (RSNA) were measured in conscious and free-moving SD rats. Baroreceptor-unloaded RSNA was measured when AP was decreased to produce the maximum RSNA with an intravascular balloon in the inferior vena cava. Endogenous angiotensin II-mediated effects on the baroreceptor-unloaded RSNA was measured with an AT1 receptor antagonist, losartan (10 mg/kg, i.v.), after nNOS-mediated sympathoinhibition was blocked with a selective nNOS inhibitor, SMTC (10 mg/kg, i.v.). SD rats were fed either a high-salt (8% NaCl) for 4 weeks or a low-salt (0.04% NaCl) for 1 or 2 weeks. Dahl salt-sensitive rats were fed a high-salt (8% NaCl) for 4 weeks. The distribution and number of nNOS neuron in the Brain of SD rats were examined with the immunohistochemical staining methods.

Results: After blocking of the nNOS-mediated sympathoinhibition, the losartan significantly increased the baroreceptor-unloaded RSNA in SD rats fed a high-salt diet, while did not significantly altered the baroreceptor-unloaded RSNA in SD rats fed a low-salt diet. The distribution of nNOS neurons in SD rats was similar to that in salt-sensitive hypertensive Dahl rats. Unexpectedly, the number of nNOS neurons in the whole brain of SD rats was also similar to that of salt-sensitive hypertensive Dahl rats.

Conclusions: These findings suggest that the endogenous Ang II suppresses overall tonic sympathetic outflow in normotensive SD rats which has lower plasma angiotensin concentration. However, the effect was masked when plasma angiotensin concentration was high. The high number of brain nNOS neurons was not represented by the inhibition experiment with a SMTC. These data leads to the possibility of the existence of other important factors for modulation of sympathetic outflow except for the nNOS neuron- or angiotensin II neuron-mediated actions.