

発表番号 52 (0535)

食塩感受性高血圧性心不全における自律神経制御異常および 新心臓作用ペプチド・サルーン異常の解析

西田 育弘 (防衛医科大学校生理学第二講座)

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)

前5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・無拘束で神経性一酸化窒素合成酵素阻害剤(7-nitroindazole (7-NI)またはS-methyl-L-thiocitrullin (SMTC))を全身投与、または脳室内投与すると、交感神経活動が増加した。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倍にも増大することから血圧非依存性にプレモーターニューロンレベルで亢進すると思われた。b) 食塩感受性高血圧ラットの脳幹部における脳組織 nNOS 活性および nNOS 酵素蛋白量は食塩感受性正常血圧ラットのそれより高い。c) 抗 nNOS 抗体を用いた脳組織免疫染色法により、10種類の中樞神経核に 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。また、d) 低 renin-angiotensin 状態では内因性 Angiotensin II は交感神経活動を抑制的に作用しているが、高 renin-angiotensin 状態にするとこの作用はマスクされ見えなくなる。これは、Dampney らが報告している脳局所性 angiotensin II による交感神経亢進作用とは異なる。一方、心不全における交感神経活動制御異常のメカニズムに注目が集まっている。また、最近新たな内因性

心臓作用ペプチド・サルーンが発見された。

本研究の目的は、中枢性 nNOS が up-regulation された食塩感受性高血圧では、NO 性と angiotensin 性交感神経活動制御がどのように変化しているのか、また、サルーンの異常を検討することである。

【方法】

(1) 高食塩による高血圧性心不全モデルの作成、(2) 高血圧性心不全モデルに、SMTC と Losartan を静脈内投与し、交感神経活動に及ぼす影響を測定、(3) 中枢性 nNOS 活性の比較、(4) サルーンの投与実験。

【結果】

1) 無麻酔・無拘束の高血圧性心不全では、nNOS 阻害にて交感神経活動は抑制された。2) さらに AT1 受容体を阻害すると nNOS による抑制が解除された。3) 高血圧性心不全の脳幹部 nNOS 活性に変化はないが、間脳部 nNOS 活性は低下していた。4) サルーンの投与実験では期待される効果が見られなかった。

【結論】

食塩感受性高血圧性心不全では、ペーシング心不全モデルと異なり、中枢性 nNOS 由来 NO により交感神経活動は促進され、中枢性 angiotensin による交感神経活動への作用は認められなかった。これらのことから、心不全では、交感神経制御異常を招くさらに強力な制御系の存在が窺われた。サルーンは今後も検討が必要である。

助成番号 0535

食塩感受性高血圧性心不全における自律神経制御異常および 新心臓作用ペプチド・サルーシン異常の解析

西田 育弘 (防衛医科大学校生理学第二講座)
 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5回の貴財団研究助成(9923, 0043, 0142, 0338, 0435)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(7-nitroindazole (7-NI)またはS-methyl-L-thiocitrullin (SMTC))を全身投与、または脳室内投与すると、交感神経活動が増加した。血圧に依存しない、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)ことから、血圧非依存性にプレモーターニューロンレベルで亢進していると考えられた。

ii) 食塩感受性高血圧ラットの脳幹部における脳組織nNOS活性およびnNOS酵素蛋白量は食塩感受性正常血圧ラットのそれより高い^(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)、の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ニューロンの数が食塩感受性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, 4, 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up-regulationされており、そのup-regulationされたnNOSニューロンは交感神経活動を抑制的に働いている。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一般性がある^(7, 8, 9)。食塩感受性高血圧ラットではそれにもかかわらず末梢交感神経活動はなお高く、血圧も高い。

iv) 低renin-angiotensin状態では内因性Angiotensin IIは交感神経活動を抑制的に作用しているが、高renin-angiotensin状態にするとこの作用はマスクされ見え

なくなる(ソルトサイエンス報告書 0435)。これは、Dampneyらが報告している脳局所性angiotensin IIによる交感神経亢進作用⁽⁸⁾とは異なった。

近年、心不全の病態生理について、その概念が大きく変わりつつあり、その自律神経性調節異常の病態生理に注目が集まっている^(9, 10)。ペースング心不全モデルでは、中枢性angiotensin IIによる交感神経興奮作用が増強され、中枢性NOによる交感神経抑制作用が減弱していると報告される⁽⁹⁾。一方また、ごく最近、心臓作用の強い内因性ペプチド、サルーシンが報告され^(11, 12)、心不全への関与が注目されている。

本研究の目的は、nNOSニューロン性交感神経抑制機構が非常に増幅された食塩感受性高血圧に、さらに心不全が加わったとき、中枢性nNOSニューロンとAngiotensin IIニューロンは果たして、ペースング心不全モデルと同じような役割を果たすのか、或いは、心不全モデルが異なればこれら両ニューロンの関係も異なるのか、また、新心作用ペプチドサルーシンが食塩感受性高血圧性心不全に特有のビヘイビアをしていないか、を解析することである。

2. 研究方法

2.1 実験動物

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血症ラットとした。Dahlラットの6週齢から15週齢に渡って10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性心不全(SHF)ラットとした。対照として普通食を投与した。

これら食塩負荷期間中、ネンブータル麻酔下に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に無菌的に動静脈カテーテルを挿入し、フ

オガティーのバルーン・カテーテル(1~2 Fr)の挿入を行った。一部ラットには、予め無菌・開胸下に下大静脈周囲にオクルーダーの設置を行った。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 心不全モデルの検証方法

形態学的検証のため、6週齢から15週齢まで高食塩食を投与したDahl食塩感受性ラットの体重を測定後、断頭にて脳と心臓を摘出した。脳は直ちに凍結し酵素活性測定実験に用いた。心臓は全重量、左心室重量、右心室重量を測定し、一部はヘマトキシリン・エオジン染色を行い組織学的検索を行った。このとき対照には、常食を投与した15週齢のDahl食塩感受性ラットを用いた。

生理学的検証のため、6週齢から15週齢まで高食塩食を投与したDahl食塩感受性ラットをネブタール麻酔下に頸動脈より左心室内腔まで動脈圧測定用カテーテルを挿入し、左心室内の拡張終末期圧を測定した。対照には普通食 Sprague-Dawley rat を用いた。

2. 3 内因性神経性 NO 作用および内因性 Angiotensin II 作用による交感神経活動への影響

ラットを飼育ケージごとシールドボックス内に移し、電極他端は神経活動測定用プレアンプに、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デジタルデータを記録した。

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 を記録した(Fig. 3 左の Control Phase)後、下大静脈内(または外)バルーンをゆっくり膨らませ(Fig. 3 'Occl' の下線部)血圧を低下させた。このとき圧受容器反射性に増加する 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 回繰り返す。増加程度を確認する。次に、S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC、シグマ社)の 10 mg/kg を i.v.した。血圧、その他が安定したところ(投与後およそ 40 分)にコントロール期同様 MAP、HR、RSNA、Unload RSNA を測定した(Fig. 3 中、SMTC Phase)。SMTC 投与後 50 分~1 時間 10 分後、AT1 receptor antagonist である Losartan (萬有製薬から提供)

の 10 mg/kg を i.v.した。血圧、その他が安定したところ(投与後およそ 40 分)に再び、これまでと同様 MAP、HR、RSNA、Unload RSNA を測定した(Fig. 3 右、SMTC+Losartan Phase)。

RSNA は、コントロール期安静・安定期の RSNA レベルを 100%とし、これと比較して%表示した。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、求めた。

2. 4 脳組織 nNOS 酵素活性測定法

摘出脳は生理食塩水にて洗浄後、脳幹と間脳に分け直ちに液体窒素にて凍結し、測定まで-80℃にて保存した。凍結組織を、50 mM HEPES, pH 7.7 緩衝液(0.2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 5 μM BH₄, 0.1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 10 μg/ml pepstatin, 10 μg/ml aprotinin を含有)の 25% W/V 量に入れ、4℃にてテフロンガ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、その上清液から 2' 5'-ADP Sepharose を用いた nNOS の部分精製・抽出を行った。抽出には 10 mM 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/mmol)を用いたシトルリン法に従った。反応液には、10 μM L-Arginine, 100 μM NADPH, 0.2 mM CaCl₂, 0.1 μM calmodulin, 10 μM BH₄, 1 μM FAD, 1 μM 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, 2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM 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。

2. 5 サルーシン投与実験

我々の実験系でサルーシンの作用を確認するため、常食の正常血圧 Sprague-Dawley ラット(350 g)に無麻酔・無拘束でサルーシンの静脈内投与を行い、血圧・心拍数・交感神経活動を測定した。サルーシン-β(東京医科歯科大学大学院平田教授により提供)2 nmol/kg と 14 nmol/kg を投与した。別のラット群では、ネブタール麻酔下に同様の実験を行った。さらに別のラット群では、予め、麻酔下無菌手術にて動脈圧受容器を除神経⁽¹³⁾し、2 週間後再度麻酔下無菌手術にて動脈圧カテーテルを挿入し、さらに 1 週間後無麻酔・無拘束でサルーシン β

10 nmol/kg を投与した。

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) 心不全の評価、(2) 食塩感受性高血圧性心不全ラットにおける内因性神経性 NO と内因性 Angiotensin II 作用による交感神経活動への影響、(3) 食塩感受性高血圧性心不全ラットの脳内 nNOS 活性、(4) サルーシン投与実験、の 4 部から構成される。

3.1 心不全の評価

Table 1 に体重、心臓重量、左心室重量、心重量の体重比、左心室重量の体重比を心不全群と対照群で比較した。心不全ラットの全身状態は悪く体重が減少し、いわゆる Cardiac cachexia を示した。一方心重量と左心室重量は増加し、その体重比は明らかな差を示した。Fig. 1 に心不全ラットとコントロールラットの心室横断面の弱拡張組織像を示す。不全心の方があきらかに肥大・拡張していることがわかる。

心不全ラットの拡張終末期の左心室内圧は 12 ± 2 mmHg を示し、コントロール群の 4 ± 1 mmHg より明らかに上昇していた。

Table 1 体重(BW)、心臓重量(H)、左心室重量(LV)、心重量の体重比(H/BW)、左心室重量の体重比(LV/BW)。Dahl 食塩感受性高血圧性心不全群(SHF)とコントロール群(Control)の比較。

	SHF (n=19)	Control (n=22)
Body weight (BW, g)	$308 \pm 8^{**}$	396 ± 5
Heart weight (H, g)	$1.7 \pm 0.03^{**}$	1.3 ± 0.02
LV weight (LV, g)	$1.2 \pm 0.02^{**}$	0.9 ± 0.01
H/BW (mg/g)	$5.7 \pm 0.15^{**}$	3.2 ± 0.05
LV/BW (mg/g)	$3.8 \pm 0.1^{**}$	2.2 ± 0.04

コントロール群には心不全群と同週齢の正常血圧 Dahl 食塩感受性ラットを用いた。データは平均±標準誤差で表示。**:p<0.01。

3.2 食塩感受性高血圧性心不全ラットにおける内因性神経性 NO と内因性 Angiotensin II 作用による交感神経活動への影響(Fig. 5)

心不全ラットに SMTC を投与し nNOS を阻害すると、交感神経活動は $68 \pm 8\%$ に抑制された。これは、血圧が約 27 mmHg 上昇した影響もある。血圧に影響されない圧受容器除負荷 RSNA でもやはり SMTC 投与前の 280

$\pm 57\%$ から $210 \pm 24\%$ に抑制されていた。これは、コントロール群(高食塩負荷正常血圧群、Fig. 4)の無変化、或いは、これまでに報告してきた高食塩負荷高血圧群での著名な増加、と明らかに異なった結果を示した。

さらに Losartan を追加すると、交感神経活動は $144 \pm 20\%$ に増加した。このときもやはり血圧が約 39 mmHg 低下した。圧受容器除負荷 RSNA では $283 \pm 39\%$ と SMTC 投与前より増加したが、薬剤投与なし時の $280 \pm 57\%$ とは差がなかった。この心不全群の結果は、高食塩負荷正常血圧群の圧受容器除負荷 RSNA が $337 \pm 75\%$ から $424 \pm 92\%$ へ(Fig. 4 RSNA)と軽度ながらも有意に増加した結果とも異なった。

3.3 食塩感受性高血圧性心不全ラットにおける内因性神経性 NO と内因性 Angiotensin II 作用による心拍数への影響(Fig. 5)

心不全ラットの nNOS を阻害すると心拍数は抑制される傾向にあった(375 ± 19 から 356 ± 17 bpm)。血圧上昇の影響も考えられたが、圧受容器除負荷心拍数(370 ± 15 bpm)は殆ど変化を示さなかった。これらの反応は、高食塩負荷正常血圧群の心拍数変化(Fig. 4、安静時心拍数 391 ± 15 から 384 ± 11 bpm、圧受容器除負荷心拍数 453 ± 18 から 462 ± 15 bpm)と比較すると、圧受容器除負荷心拍数のみ有意に抑制されていた。

Losartan 追加により、心拍数は 413 ± 14 bpm へ有意に増加した。また、圧受容器除負荷心拍数も 451 ± 15 bpm へ有意に増加した。これらの増加した値は、高食塩負荷正常血圧群の値と有意差がなかった。

3.4 食塩感受性高血圧性心不全ラットの脳内 nNOS 活性

脳幹部の組織 nNOS 活性は心不全ラットと Dahl 食塩感受性の正常血圧非心不全ラットとの間に有意はみられなかった。一方、間脳の組織 nNOS 活性は心不全ラットでは有意に抑制されていた(Fig. 6)。

3.5 サルーシン投与実験

無麻酔・無拘束実験でサルーシン 2 nmol/kg を投与したところ血圧、心拍数、腎交感神経活動に有効な変化はみられなかった。そこで、14 nmol/kg の投与をラット数匹に試みた。その典型例を Fig. 7-左に示す。やはり、有意な変化が見られなかった。論文⁽¹²⁾に従い、麻酔下で同様の実験を行ったがやはり有意な変化は得られなかった。そこで、圧受容器を除神経したラットに無麻酔・無拘束でも同様の実験をおこなった。やはり、有意な変化は観察されなかった(Fig. 7-右)。

4. 考察

本研究では次の結果が得られた。1) Dahl 食塩感受性ラットに6週齢から15週齢まで高食塩食を投与し、食塩感受性高血圧性心不全モデルが得られた。2) この高血圧性心不全モデルでは、nNOSを阻害すると交感神経活動は抑制された。また、3) nNOSを阻害した状態でさらにAT1受容体を阻害すると交感神経活動は増加するが、これは圧受容器反射性増加であり、交感神経系を増幅させたものではなかった。4) この高血圧性心不全モデルでは脳幹部組織 nNOS 活性には変化がなく、間脳の組織 nNOS 活性が低下した。5) 心機能抑制ペプチドであるサルーシンは今回は良好な作用を示さなかった。

我々はこれまで、食塩感受性高血圧ラットで中枢性 nNOS ニューロンが増殖し、nNOS ニューロン性交感神経抑制機能が up-regulation されていることを機能的・形態的・生化学的に示してきた⁽¹⁻⁶⁾。一方、nNOS ニューロンによる中枢性交感神経抑制作用⁽⁷⁾や angiotensin II ニューロンによる中枢性交感神経促進作用^(8, 9, 10)や抑制作用^(14, 15)も一般に知られるところである。しかし、この NO と angiotensin II による交感神経制御作用は必ずしも一定方向に作用しないようにも思われた(ソルトサイエンス報告 0435)。

今回我々は、中枢性 nNOS ニューロンが明瞭に増殖し up-regulation されている食塩感受性高血圧ラットモデルを用い、さらにすすんで心不全が加わった心不全モデルでも、Zuckerらが述べる NO 抑制系の低下と angiotensin II 促進系の亢進^(9, 10)という制御異常が見られるか、その一般性の検証を試みた。

Dahl 食塩感受性ラットを用いた心不全モデル作成については複数の報告が見られる^(16, 17, 18)。6週齢から15週齢まで 8% NaCl を含有する高食塩食を投与すると、Inokoら⁽¹⁸⁾や Klotzら⁽¹⁶⁾が報告しているのと類似の心不全状態が形成された。これは、体重減少で代表されるような cachexia や、心肥大・拡張、そして拡張終末期左室内圧の上昇により示された。

この高血圧性心不全モデルにおいて nNOS を全身性にブロックすると、安静時交感神経活動は 68%程度まで抑制された。しかし、この時血圧が 27 mmHg も上昇しているので、単に圧受容器反射性抑制かもしれない。そこで、血圧を下大静脈閉塞により低下させ圧受容器からの抑制を解除した交感神経活動^(19, 1, 5)を比較すると、nNOS 阻害前では 280%程度であったのが 210%程度と有意に抑制されていた。これは、以前から報告していた食塩感受性高血圧での著名な増加と対照的に相反する結果となった。高食塩食投与した正常血圧ラットと比較し

た。nNOS 阻害前では 337%程度であったのが 370%程度となり有意差はなかった。この結果も高血圧性心不全では nNOS 性 NO は交感神経促進性に作用しており、Zuckerらのペースング心不全の場合^(9, 10)とは真つ向から相反した。

nNOS と AT1 受容体とを同時に阻害した場合、交感神経活動は投与前と差が生じない。また、圧受容器除負荷交感神経活動でも投与前と差がない。つまり、内因性 Angiotensin II は nNOS 性 NO によって惹起された交感神経活動抑制を解除しただけの作用に相当する。この点でも、Zuckerらの報告する内因性 angiotensin II の交感神経促進作用^(9, 10)とは正反対の結果を示した。

我々の高血圧性心不全とペースング心不全とでは、なぜこのように NO 性制御と angiotensin 性制御に明らかな差を生じるのか、今のところ不明である。ただ、昨年度のソルトサイエンス報告書(0435)で、高食塩食負荷により systemic renin-angiotensin 系が抑制された場合と低食塩食負荷により同系が亢進した場合とで、NO 性交感神経制御や angiotensin 性交感神経制御に差が生じたことを示したように、これらの制御性は固定的ではなく、状態に応じて変化するのかもしれない。即ち、Zuckerらが考えている状態ではなく、もっと流動的で、あるいは他に主力となる制御系の存在があり、その影響を強く受けるのかもしれないという可能性も出てきた。

最後に、サルーシンは Izumiyamaらが報告している量⁽¹²⁾の2倍から10倍程度を投与しても期待された反応は得られなかった。このため、高血圧性心不全におけるサルーシンの異常に関しては研究を進められなかった。この原因は現在検討中である。

5. 今後の課題

今回、高血圧性心不全モデルを確立することができた。今後、このモデルを利用して、ペースング心不全と高血圧性心不全とで、何故中枢性交感神経制御機構に差が生じるのか、を明らかにしたい。当面、静脈内投与による全身性阻害ではなく、脳室内投与による中枢性阻害においてこの問題を検討したいと考えている。

また、中枢性 NO による交感神経制御と中枢性 angiotensin による交感神経制御とに大きく影響を及ぼす新たな制御系を見出し、明らかにしたいと考えている。

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樞性 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 J-L, Zucker IH. Regulation of sympathetic nerve activity in heart failure: A role for nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 84: 417-423, 1999.
 10. Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, Zucker IH. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: Role of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ. Res.* 2004; 95(9): 937-944.
 11. Shichiri M, Ishimaru S, Ota T, Nishikawa T, Isogai T, Hirata Y. Salusins: newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities. *Nature Med* 9: 1166-1172, 2003.
 12. Izumiyama H, Tanaka H, Egi K, Sunamori M, Hirata Y, Shichiri M. Synthetic Salusins as cardiac depressors in rats. *Hypertens* 45: 419-425, 2005.
 13. Oikawa S, Hirakawa H, Kusakabe T, Nakashima Y, Hayashida Y. Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. *Autonom Neurosci Basic Clinical* 117: 105-114, 2005.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Klotz S, Hay I, Zhang G, Mauer M, Wang J, Burkhoff. Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection. *Hypertens* 47: 901-911, 2006.
 17. Doi R, Masuyama T, Yamamoto K, Doi Y, Mano T, Sakata Y, Ono K, Kuzuya T, Hirota S, Koyama T, Miwa T, Hori M. Development of different phenotypes of hypertension heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 18: 111-120, 2000.
 18. Inoko M, Kihara Y, Morii H. Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol* 267: H2471-H2482, 1994.
 19. 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.

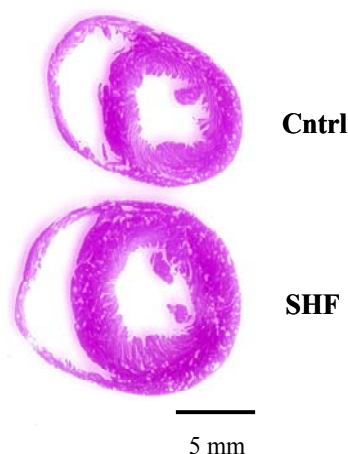


Fig. 1 左心室断面増(HE染色)。Dahl食塩感受性高血圧性心不全群(SHF)とコントロール群(Cntrl、同週齢の正常血圧 Dahl食塩感受性ラット)の比較。心不全群の方が心肥大が進行している。

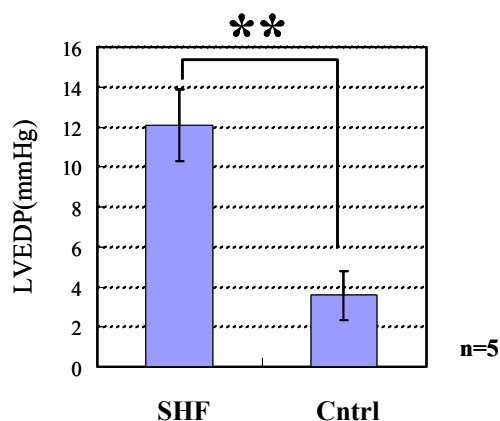


Fig. 2 左心室拡張終末期圧(LVEDP)。Dahl食塩感受性高血圧性心不全群(SHF)とコントロール群(Cntrl、Sprague-Dawley rats)の比較。
**: $p < 0.01$ 。拡張終末期心室内圧は心不全群の方で有意に上昇している。

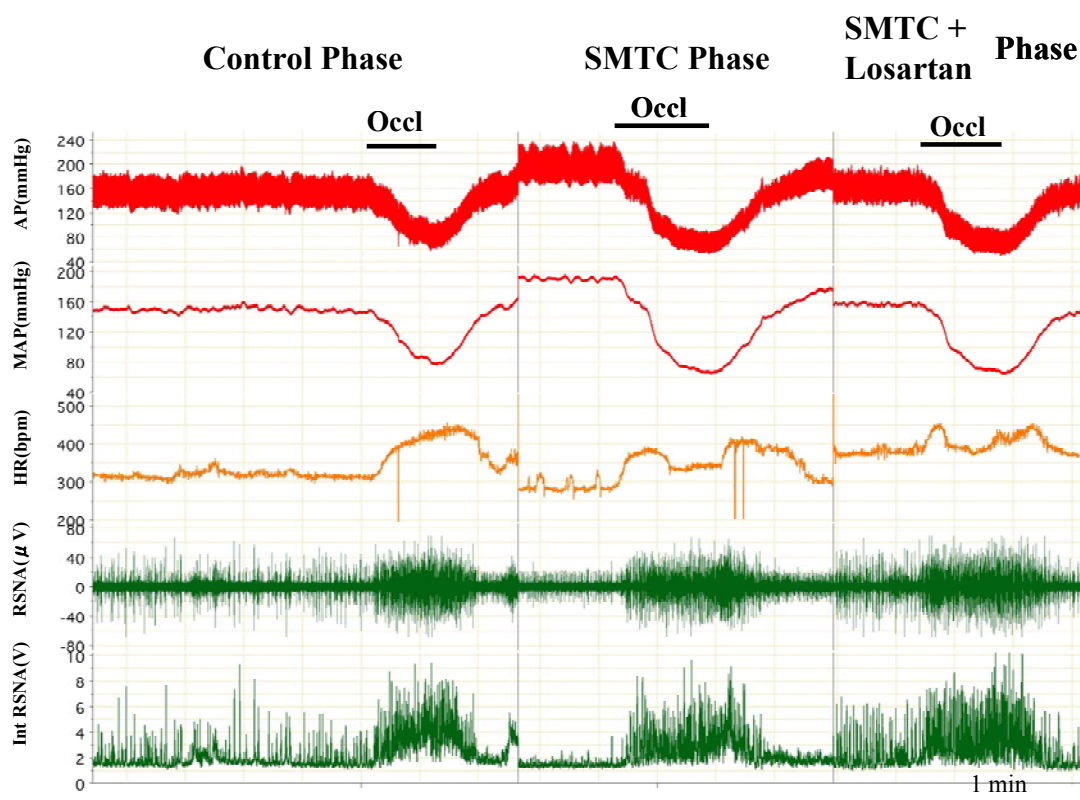


Fig. 3 食塩感受性高血圧性心不全ラットの、コントロール相、SMTC(10 mg/kg, i.v.)相、および SMTC+Losartan(10 mg/kg, i.v.)相における、動脈圧(AP)、平均動脈圧(MAP)、心拍数(HR)、腎交感神経活動(RSNA)、Integrated RSNA(Int RSNA)。各相において下大静脈の血管内バルーンを膨らませ(Occl.)、動脈圧を低下させた。動脈圧によって抑制される以前の圧受容器序負荷RSNAを測定した。

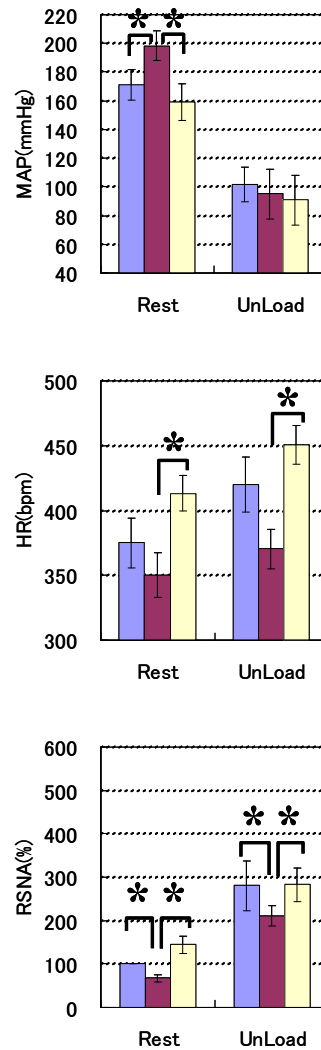
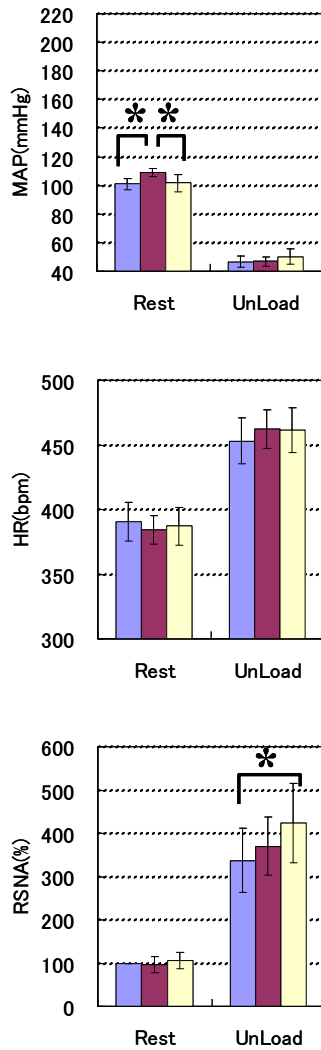


Fig. 4 高食塩食負荷した正常血圧の Sprague-Dawley ラット (n=5) の平均血圧 (MAP) と %腎交感神経活動 (%RSNA)。安静時 (Rest) および圧受容器徐負荷時 (Unload),
 ■:薬剤投与なし、■:SMTc 投与、■:SMTc+Losartan 投与。
 *: p<0.05。

Fig. 5 高食塩負荷 (6 週齢~15 週齢) した高血圧性心不全を呈した Dahl 食塩感受性ラット (n=5)。記号などの説明は Fig. 4 と同じ。

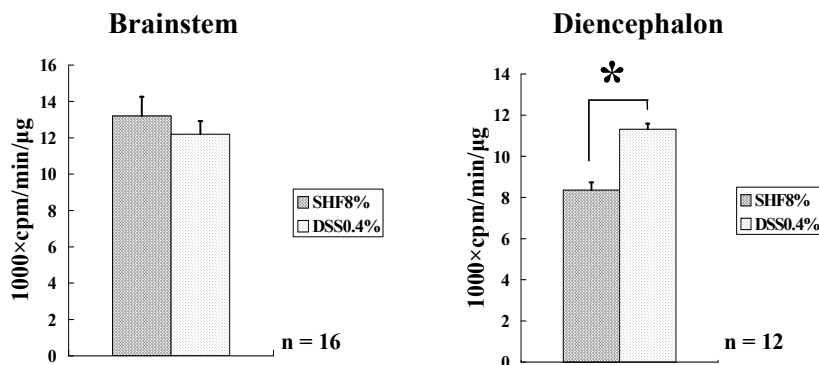
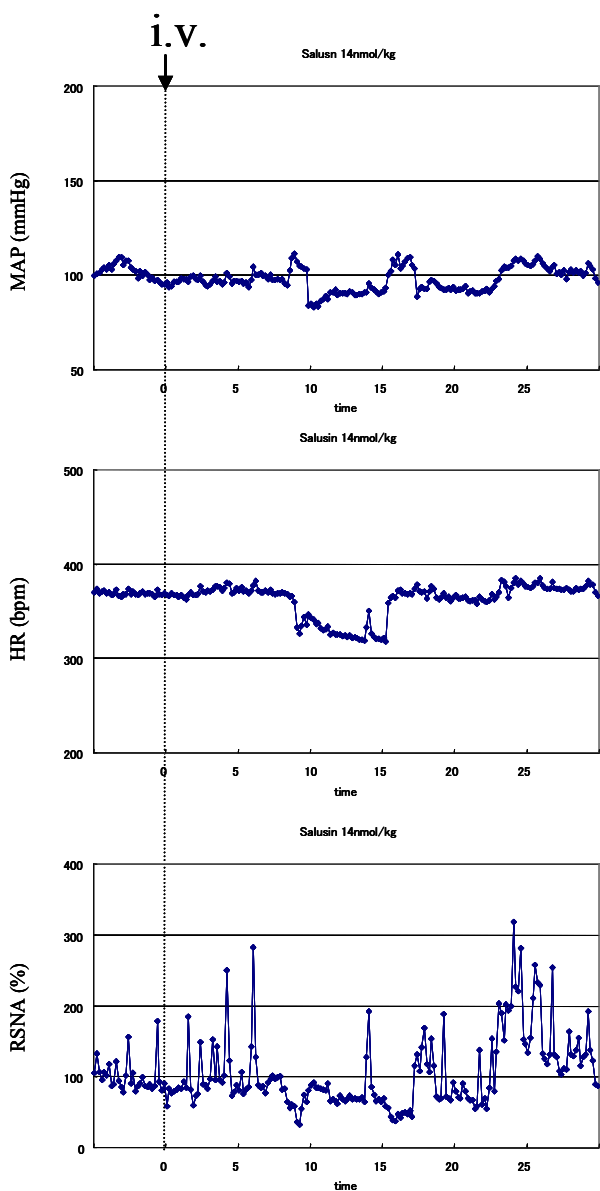


Fig. 6 脳組織 nNOS 活性。Dahl 食塩感受性高血圧性心不全ラット (SHF 8%) を Dahl 食塩感受性正常血圧非心不全ラット (DSS 0.4%) 比較。*, p<0.05。心不全ラットでは脳幹部 nNOS 活性は変化しないが、間脳部 nNOS 活性は抑制させる。心不全に至らない高血圧ラットとは逆の結果が示された。

Conscious Rat



Conscious Rat with SAD

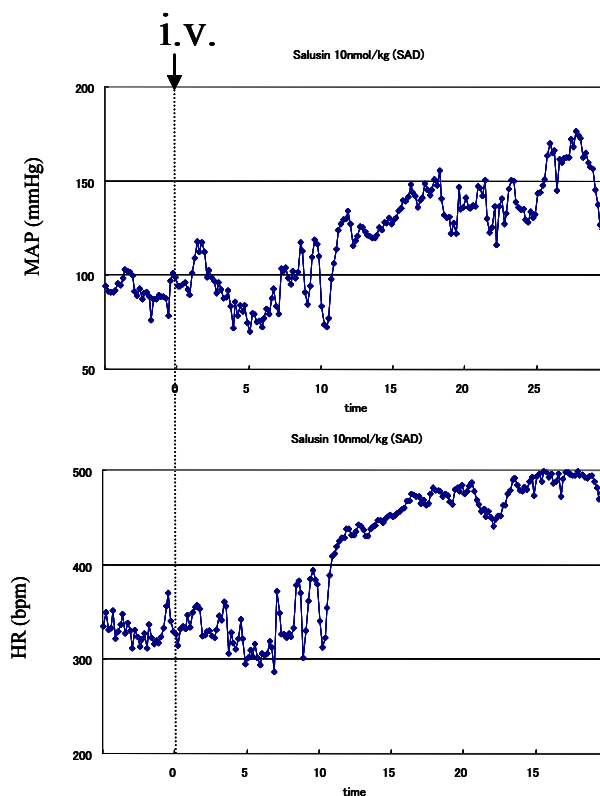


Fig 7 常食を与えた正常血圧 Sprague-Dawley ラットに無麻酔・無拘束で Salusin の 14 nmol/kg を静脈内投与し、または、常食を与えた圧受容器除神経 (SAD) ラットに無麻酔・無拘束で Salusin の 10 nmol/kg を静脈内投与し、血圧 (MAP)、心拍数 (HR) および腎交感神経活動 (RSNA) への作用を検討した。論文 (10) 使用量の約 10 倍量を投与したが、血圧・心拍・交感神経活動へは論文 (10) に述べられているような効果は得られなかった。圧受容器反射により反応がマスクされているかもしれないので、圧受容器除神経を行ったが、やはり期待される効果が得られなかった。

0535

nNOS neuron- and Ang II neuron-mediated sympathomodulatory effects in heart-failed Dahl rats with chronic salt-sensitive hypertension.

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 up-regulated 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 studies, and the tissue enzyme assay studies.

Objective: To investigate the endogenous nNOS-mediated or angiotensin II-mediated effects on overall sympathetic outflow in heart-failed Dahl rats with chronic salt-sensitive hypertension.

Design and methods: Dahl salt-sensitive or Sprague-Dawley rats were fed either a high-salt (8% NaCl) or regular diet from 6-week-old to 15-week-old for 10 weeks. Arterial pressure (AP), heart rate and renal sympathetic nerve activity (RSNA) were measured in conscious and free-moving rats. Baroreceptor (baro)-unloaded RSNA was measured when AP was decreased to produce the maximum RSNA with a perivascular occluder in the inferior vena cava. SMTC of 10 mg/kg was intravenously injected. About 40 min later after SMTC, losartan of 10 mg/kg was intravenously injected. The brain-tissue nNOS activities were determined by the citrulline method with tritiated L-arginine after partial purification by the affinity chromatography with 2', 5'-ADP Sepharose. The amount of partial purified enzyme was determined by the Bradford method.

Results: Chronic hypertensive Dahl rat fed high-salt diet for 10 weeks showed decreased body weight from 396 ± 5 to 308 ± 8 g, increased heart weight from 1.3 ± 0.02 to 1.7 ± 0.03 g, and increased end-diastolic left ventricular pressure from 3.6 ± 1.2 to 12.1 to 1.8 mmHg. SMTC did not significantly alter resting RSNA or the baro-unloaded RSNA in high-salt SD rats, but decreased resting RSNA to $68 \pm 8\%$ and the baro-unloaded RSNA from 280 ± 57 to $210 \pm 24\%$ in heart failed Dahl rats. SMTC plus losartan did not significantly alter resting RSNA but increased the baro-unloaded RSAN from 337 ± 75 to $424 \pm 92\%$ in high-salt SD rats, but reversed resting RSNA and the baro-unloaded RSNA to $283 \pm 39\%$ in heart failure rats. Tissue nNOS activity in the brainstem did not significantly alter but that in the diencephalon decreased from 11.3 ± 0.2 to 8.4 ± 0.4 kcpm/min/ μ g.

Conclusions: These findings suggests that endogenous nNOS system may be down-regulated but enhance slightly sympathetic outflow at the level of pre-motor neurons but endogenous AT1 receptor-mediated effect on sympathetic outflow was suppressed in heart-failed Dahl rats with chronic salt-sensitive hypertension.