

発表番号 64 (0537)

食塩負荷による昇圧反応及び交感神経活性化における脳内活性酸素の役割

廣岡 良隆 (九州大学冠動脈疾患治療部)
 相良 洋治 (九州大学循環器内科学)
 野副 純世 (九州大学循環器内科学)
 古閑 靖章 (九州大学循環器内科学)

【背景及び目的】

高食塩負荷は、自然発症高血圧ラット(SHR)において、交感神経系の亢進及び血圧上昇を生じることが知られている。中枢神経系を介する機序がこの反応に関与していると考えられている。我々はSHRにおいて、心血管中枢である頭側延髄腹外側野(RVLM; rostral ventrolateral medulla)の活性酸素産生が増加していることを報告した。従って、本研究では、高食塩食によってSHRのRVLM内の活性酸素産生が増加するか否か、もしそうであれば、血圧上昇と関連しているか否かを検討した。

【方法】

雄性SHR(6週齢)及び対照として正常血圧ラット(WKY, 6週齢)に対して、8%あるいは0.5%食塩食を負荷し、6週間観察した。血圧はテールカフ法を用いて測定した。尿中ノルエピネフリン排泄量は観察開始時期及び終了時に測定した。RVLMにおける活性酸素はthiobarbituric acid-reactive substances(TBARS)のレベルを測定することによって定量化した。血圧調節におけるRVLM内活性酸素の役割を確認するため、スーパーオキシド消去剤であるtempol(10 pmol, 100 pmol, 1 nmol)を両側RVLMへ微量注入して評価した。安静時交感神経活動が高食塩負荷で亢進しているか否かを評価するため、ヘキサメソニウム(40 mg/kg)を静脈内投与し降圧

反応の程度を比較した。

【結果】

収縮期血圧は高食塩負荷SHR群で低食塩負荷SHR群に比べ9週齢時より有意に高くなった(211 ± 6 mmHg vs 170 ± 7 mmHg, $P < 0.05$, $n = 5$)。しかし、WKYではそのような変化は認められなかった。尿中ノルエピネフリン排泄量は、高食塩負荷SHR群で低食塩負荷SHR群より12週齢時で有意に高かった(2.09 ± 0.97 $\mu\text{g/day}$ vs 1.47 ± 0.51 $\mu\text{g/day}$, $P < 0.05$, $n = 5$)。TBARSレベルは高食塩負荷SHR群のRVLMでは低食塩負荷SHR群に比べ有意に増加していた(9.94 ± 0.46 $\mu\text{mol/g tissue}$ vs 8.07 ± 0.61 $\mu\text{mol/g tissue}$, $P < 0.05$, $n = 5$)。WKYにおいてはこの変化は認められなかった。両側RVLMへのtempol微量注入によって、高食塩負荷SHR群で低食塩負荷SHR群より降圧の程度が大きかった。また、ヘキサメソニウムの静脈内投与でもより大きな降圧が高食塩負荷SHR群で認められた。

【結論】

以上の成績は、高食塩負荷はSHRのRVLMにおける活性酸素を増加させること、このことが交感神経系活性化を介した更なる血圧上昇機序に関与していることを示唆する。

助成番号 0537

食塩負荷による昇圧反応及び交感神経活性化における脳内活性酸素の役割

廣岡 良隆 (九州大学冠動脈疾患治療部)

相良 洋治 (九州大学循環器内科学)

野副 純世 (九州大学循環器内科学)

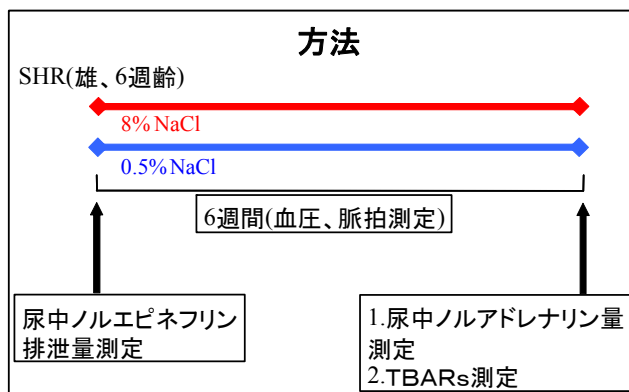
古閑 靖章 (九州大学循環器内科学)

①研究目的

高食塩負荷は、自然発症高血圧ラット(SHR)において、交感神経系の亢進及び血圧上昇を生じることが知られている。中枢神経系を介する機序がこの反応に関与していると考えられている。我々は SHR において、心血管中枢である頭側延髄腹外側野(RVLM; rostral ventrolateral medulla)の活性酸素産生が増加していることを報告した。従って、本研究では、高食塩食によって SHR の RVLM 内の活性酸素産生が増加するか否か、もしそうであれば、血圧上昇と関連しているか否かを検討した。

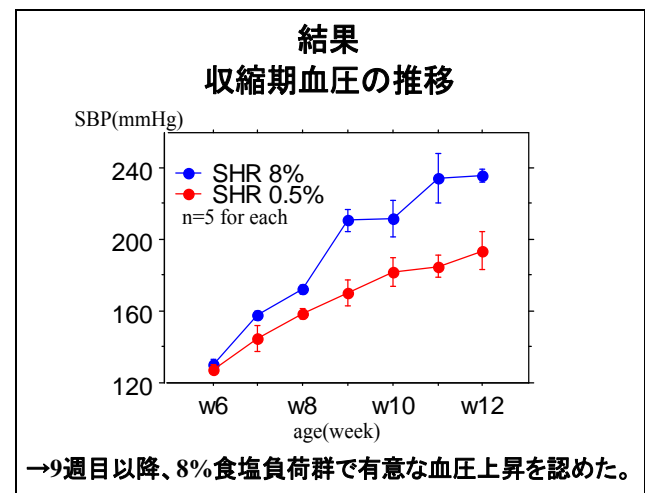
②研究方法

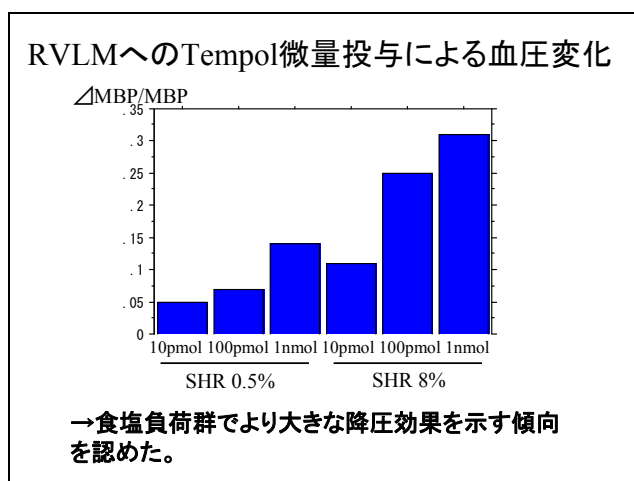
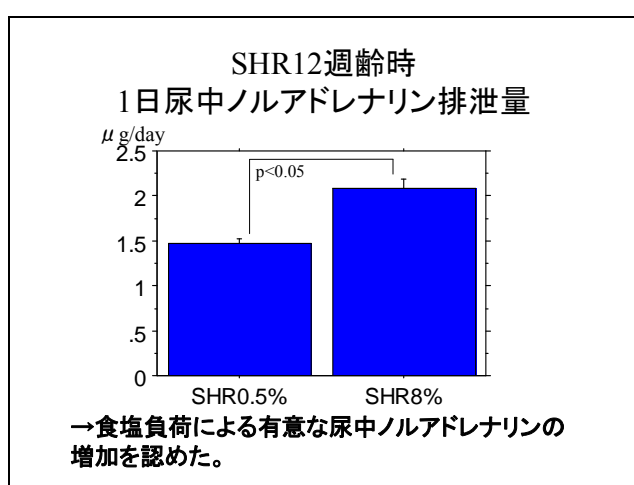
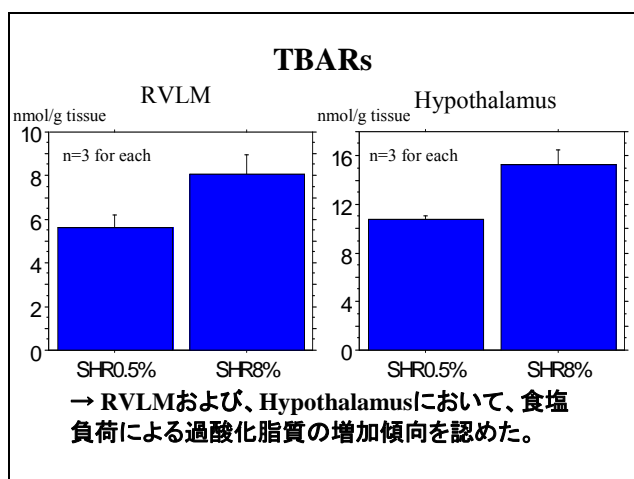
雄性 SHR (6 週齢) 及び対照として正常血圧ラット(WKY, 6 週齢)に対して、8%あるいは 0.5%食塩食を負荷し、6 週間観察した。血圧はテールカフ法を用いて測定した。尿中ノルエピネフリン排泄量は観察開始時期及び終了時に測定した。RVLM における活性酸素は thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) のレベルを測定することによって定量化した。血圧調節における RVLM 内活性酸素の役割を確認するため、スーパーオキシド消去剤である tempol (10 pmol, 100 pmol, 1 nmol) を両側 RVLM へ微量注入して評価した。安静時交感神経活動が高食塩負荷で亢進しているか否かを評価するため、ヘキサメソニウム (40 mg/kg) を静脈内投与し降圧反応の程度を比較した。



③研究結果

収縮期血圧は高食塩負荷 SHR 群で低食塩負荷 SHR 群に比べ 9 週齢時より有意に高くなった (211 ± 6 mmHg vs 170 ± 7 mmHg, $P < 0.05$, $n=5$)。しかし、WKY ではそのような変化は認められなかった。尿中ノルエピネフリン排泄量は、高食塩負荷 SHR 群で低食塩負荷 SHR 群より 12 週齢時で有意に高かった (2.09 ± 0.97 $\mu\text{g/day}$ vs 1.47 ± 0.51 $\mu\text{g/day}$, $P < 0.05$, $n=5$)。TBARS レベルは高食塩負荷 SHR 群の RVLM では低食塩負荷 SHR 群に比べ有意に増加していた (9.94 ± 0.46 $\mu\text{mol/g tissue}$ vs 8.07 ± 0.61 $\mu\text{mol/g tissue}$, $P < 0.05$, $n=5$)。WKY においてはこの変化は認められなかった。両側 RVLM への tempol 微量注入によって、高食塩負荷 SHR 群で低食塩負荷 SHR 群より降圧の程度が大きかった。また、ヘキサメソニウムの静脈内投与でもより大きな降圧が高食塩負荷 SHR 群で認められた。





④考 察

食塩負荷による血圧上昇機序は交感神経系による神経性の機序と体液性因子による両者が密接に関与している。また、従来、腎臓の役割が大きく取り上げられてきた。従って、その機序は多岐にわたり複雑である。本研究では、近年、神経性機序に焦点を絞り、特に交感神経

活動を規定する脳幹部の役割について検討した。また、最近、我々は同部位における活性酸素が交感神経活動亢進に関与していることを報告した。この機序が食塩負荷における交感神経活動亢進を介した血圧上昇機序に関与している可能性に着目した。その結果、この仮説を支持する成績を得た。

SHR はヒト本態性高血圧のモデル動物であり、食塩感受性を示すことがあらためて確認された。また、尿中ノルエピネフリン排泄量増加が大きかったことは交感神経系の活性化が血圧上昇に関与していることを強く示唆する。

高血圧で活性酸素産生が増加することは、主として血管系の実験によって数多く示されており、NAD(P)H oxidase を介するスーパーオキシド産生増加がその主たる経路であると考えられている。しかし、脳内活性酸素産生増加が交感神経系を活性化し高血圧の機序に関与していることを示したのは、我々が世界で最初である。最近、交感神経活動亢進がその病態に深く関与しておりその治療ターゲットとなっている心不全モデルでも、脳内活性酸素産生増加が報告されている。我々の成績は、交感神経系活性化の脳内機序としての活性酸素の重要性を示した点で一致している。さらに、脳内にアンジオテンシン II を注入して生じる高血圧では活性酸素産生が増加することも報告されている。さらに、最近、脳内活性酸素と交感神経活動の関係があることはアドレノメジュリンとの関係においても報告された。

食塩負荷によって通常はホルモンとしてのレニン-アンジオテンシン系は抑制されるはずである。しかし、高血圧ではその制御機構に異常が生じている。むしろ、高血圧では血管も含め組織レニン-アンジオテンシン系は活性化していることが知られている。同様のことが脳内でも生じており、正常な制御機構が破綻していることが推察される。Leenen らのグループは、食塩負荷が脳脊髄液の Na 濃度を上昇させ、脳内レニン-アンジオテンシン系の活性化、ウワバイン様物質の増加によって Na-K-ATPase を抑制が生じ、また、ENaC の活性化によって Na 輸送が増加して交感神経活動が亢進する機序を提唱している。我々の研究では、この点についての検討は行っていない。従って、脳内活性酸素がこの機序と関連しているか否かは不明である。

通常、長期の血圧調節異常について神経性因子の重要性を否定する報告もあるが、これは、動脈圧受容器反射が高い血圧閾にリセットされているからであるという考え及び腎臓の役割に重きを置いた考えからである。しかし、神経性因子の重要性は無視できない。事実、ヒトにお

ける研究でも交感神経系の亢進を示唆する報告が数多くなされている。特に、食塩負荷では動脈圧受容器反射に依存しない交感神経活動亢進が生じることが示唆されている。

食塩負荷によって影響を受ける脳内部位は、血液脳関門を欠くOVLТはもちろんのこと、視床下部、脳幹部など自律神経系調節に重要な部位が考えられている。本研究では、特に、脳幹部にあり、交感神経活動を規定するRVLMに着目した。食塩負荷によって、高血圧の遺伝的素因を有するSHRでRVLM内活性酸素産生が増加していた成績は交感神経活動亢進に活性酸素の役割を強く示唆するものである。

以上、本研究の成績は、高食塩負荷はSHRのRVLMにおける活性酸素を増加させること、このことが交感神経系活性化を介した更なる血圧上昇機序に関与していることを示唆する。

⑤今後の課題

本研究からは、どのような機序で食塩負荷によって脳内活性酸素産生が増加しているかは明らかではない。したがって、その産生系としてのNAD(P)H oxidase系の関与やスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)など消去系の異常についても検討する必要がある。また、脳内レニン-アンジオテンシン系が食塩負荷によって活性化され、活性酸素産生増加に関与しているか否かも重要な検討課題である。現在頻用されている降圧薬であるアンジオテンシン受容体拮抗薬の交感神経抑制作用に一部関与している可能性は十分考えられる。あるいは、カルシウム拮抗薬でどうか興味深い点である。通常使用されている降圧薬の新たな作用機序として、本研究の成績が関連していることがわかればその有用性やより脳内への親和性の高い薬剤の開発へ向けての展開が期待される。

文献等

1. Wyss JM. Pathways by which dietary salt affects blood pressure and the nervous system. *Hypertension* 47: 638-639, 2006.
2. Brooks VL, Haywood JR, Johnson AK. Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 426-432, 2005.
3. Carlson SH, Roysomutti S, Peng N, Wyss JM. The role of the central nervous system in NaCl-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 14: 155S-162S, 2001.
4. Grassi G, Dell'Oro R, Seravalle G, Foglia G, Trevano FQ, Mancia G. Short- and long-term neurogenic effects of moderate dietary sodium restriction in essential hypertension. *Circulation* 106: 1957-1961, 2002.
5. Osborn JW, Jacob F, Guzman P. A neural set point for the long-term control of arterial pressure: beyond the arterial baroreceptor reflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R846-R855, 2005.
6. Huang BS, van Vliet BN, Leenen HH. Increases in CSF [Na⁺] precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high salt diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1160-H1166, 2004.
7. Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, Davisson RL. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res* 95: 210-216, 2004.
8. Fujita M, Kuwaki T, Ando K, Fujita T. Sympatho-inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 45: 1165-1172, 2005.
9. Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 109: 2357-2362, 2004.
10. Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, Ito K, Kishi T, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. *Circ Res* 96: 252-260, 2005.
11. Hirooka Y, Kimura Y, Nozoe M, Sagara Y, Ito K, Sunagawa K. Amlodipine-induced reduction of oxidative stress in the brain is associated with sympatho-inhibitory effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 29: 49-56, 2006.

0537

Role of reactive oxygen species in salt-induced pressor and sympathoexcitatory responses

Yoshitaka Hirooka, Yoji Sagara, Masatsugu Nozoe, Yasuaki Koga
Department of Cardiovascular Medicine Graduate School of Medical Sciences
Kyushu University

Summary

High dietary sodium causes sympathetic hyperactivity and increases resting blood pressure (BP) in spontaneously hypertensive rats (SHR). Central nervous system mechanisms are thought to be involved in this response. Recent studies suggest that there is increased generation of reactive oxygen species (ROS) in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) in SHR. The present study examined whether a high salt diet increases ROS in the RVLM of SHR and, if so, whether this is associated with BP elevation. Male SHR (6-week-old) and male WKY (6-week-old) were fed a high salt (8%: HS) or low salt diet (0.5%: LS) for 6 weeks. BP was measured using the tail-cuff method. Norepinephrine excretion was measured at 6 and 12 weeks of age. We evaluated ROS in the RVLM by measuring the levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) at 12 weeks of age. To confirm the role of ROS in the RVLM in BP regulation, tempol (10 pmol, 100 pmol, and 1 nmol) was microinjected bilaterally into the RVLM of 12-week-old HS-SHR and LS-SHR. To determine whether basal sympathetic nerve activity is activated in HS-SHR, hexamethonium chloride was administered intravenously (40 mg/kg) at the end of the microinjection experiments. Systolic BP was significantly higher in HS-SHR than LS-SHR from 9 weeks of age on, but was not significantly different between HS-WKY and LS-WKY (211 ± 6 vs 170 ± 7 mmHg, $p < 0.05$ at 9 weeks of age, $n = 5$). Urinary norepinephrine excretion of HS-SHR was significantly higher than that of LS-SHR at 12 weeks of age (2.09 ± 0.97 vs 1.47 ± 0.51 $\mu\text{g/day}$, $p < 0.05$, $n = 4$). TBARs levels were significantly higher in the RVLM of HS-SHR than in the RVLM of LS-SHR (9.94 ± 0.46 vs 8.07 ± 0.61 $\mu\text{mol/g tissue}$, $p < 0.05$, $n = 5$), but were not significantly different between HS-WKY and LS-WKY. Bilateral microinjection of tempol into the RVLM tended to induce a greater depressor response in HS-SHR than in LS-SHR. These results suggest that a high salt diet increases ROS in the RVLM of SHR, which is associated with further increases in BP, at least in part via activation of the sympathetic nervous system.