

水・ナトリウム代謝に関わる 腎交感神経活動の中枢性調節メカニズム：

－高張食塩水と新規ペプチドの脳室内投与の効果－

宮崎医科大学生理学第一講座

河南洋、加藤和男、斉田光彦、白阪哲朗、金清華、國武孝人

要旨：体液の恒常性は主に水・電解質の体外からの摂取と腎臓からの排泄のバランスによって営まれている。腎臓は長期的体液バランス維持には特に重要な働きをしている。腎臓の排泄機能は液性因子と共に神経性因子により調節されている。腎交感神経は腎臓内の血行動態以外にレニン分泌や腎尿細管でのナトリウムの再吸収調節に関わっている。例えば循環血液量が減少すると反射的に腎交感神経活動(RSNA)が増加して、腎血流量は減少しレニン分泌とナトリウム再吸収は増加する。このRSNAに対する心血管系や腎臓由来の反射調節機構はよく調べられているが、脳由来の中枢性調節メカニズム、特に脳内での情報伝達を担う化学物質は色々想定されているが、まだ充分明らかでない。これまでin vivo実験の多くは技術的理由から麻酔下動物を用いて行われてきたが、自律機能は麻酔や手術によって強く影響を受ける。そこで我々は自由行動・意識下ラットの脳室内へ投与した高張食塩水と新規ペプチド(アドレノメジュリン、オレキシン、ノシセプチン)のRSNAに対する効果について調べた。高張食塩水(0.3, 0.67, 1.0 M)は用量依存的にRSNAを抑制し、この反応に動脈圧受容器反射と内因性バゾプレッシン系が関与していた。オレキシンは興奮反応を、一方アドレノメジュリンとノシセプチンは各々抑制-興奮の2相性反応、抑制反応を用量依存的に引き起こした。これら新規ペプチドの中枢性体液調節に於ける神経伝達/修飾物質としての可能性について述べた。

キーワード：腎交感神経、水・ナトリウム代謝、食塩負荷、新規ペプチド

1 はじめに：

水・ナトリウム代謝の恒常性は主に経口的に外部から摂取したものと、腎臓から体外に排出したものととのバランスにより維持されている。腎臓からの水・ナトリウム排泄調節に関わる外来性のもとしては神経性と液性因子に大別できる。液性因子としてはレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系、バゾプレッシン、心房性ナトリウム利尿ホルモン(ANP)等があげられる。一方、神経性因子として腎交感神経活動(RSNA)がある¹⁾。RSNAが増加すると、腎血管の収縮、糸球体濾過率の低下、腎尿細管でのナトリウムの再吸収増加とレニン分泌増加が起こる。例えば出血時、RSNAの反射性増大が起こり、血圧上昇や循環血液量の増加がもたらされる。一方、大量の輸液時にはRSNAの低下が起こる。これら末梢循環系受容器(圧、容積、化学受容器)からの反射調節系はよく調べられているが、一方、脳由来の調節メカニズム、特に脳内での情報伝達に関わる液性因子については未だ充分明らかではない²⁾。古典的神経伝達物質(ノルアドレナリン、アセチルコリン、アミノ

酸など)に加えて近年数多くの新しい生理活性物質が脳内で認められ、情報伝達に関わっていることが示唆されている。本稿では中枢性浸透圧受容器と新規ペプチドによるRSNA調節メカニズムに関連した我々の最近の仕事を紹介する。

2 中枢内浸透圧受容器刺激：

生体は過剰食塩摂取による浸透圧上昇に対して、下垂体後葉ホルモンのバゾプレッシン分泌の増加、飲水行動誘起やレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系の抑制により浸透圧を低下させ、過剰な食塩を体外へ排泄し、体液の恒常性を維持する。この適応機構へのRSNAの関与についてはまだ不明な点がある。例えば急性食塩負荷に対してRSNAは如何なる振る舞いをするかについて、増加、不変、減少といった報告があり、一致した結果が得られていない。その理由の一つに実験条件の違い、例えば麻酔・手術の影響が考えられる。自律神経応答がこれらの要因により強く修飾されることはよく知られており、場合によっては反応が逆転す

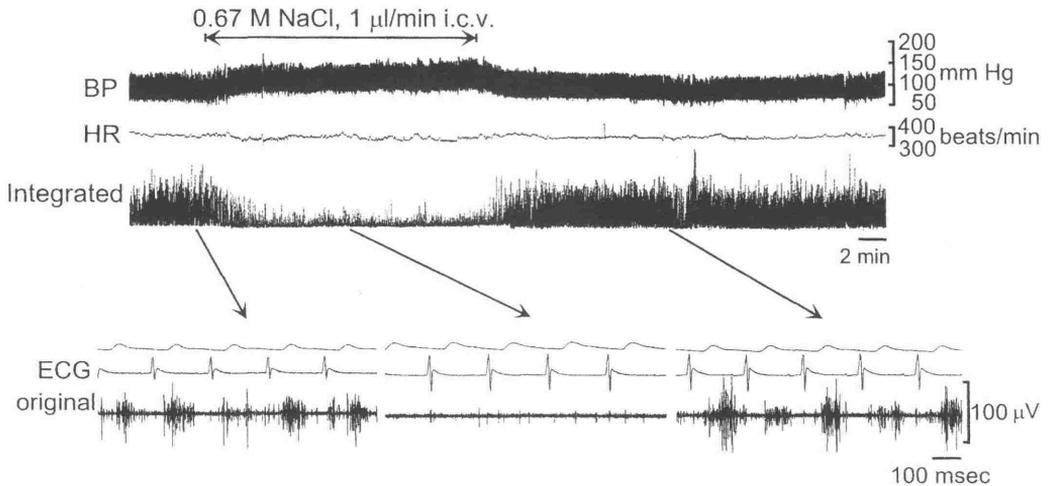


図1 自由行動・意識下ラットの側脳室内への高張食塩水投与に対する腎交感神経活動応答の一例
0.67 M NaClを1 µl / 分の速度で20分間投与。腎交感神経活動は積分値(Integrated)として表示し、
下段は拡大して示した原波形(original)の記録。(文献4) より)

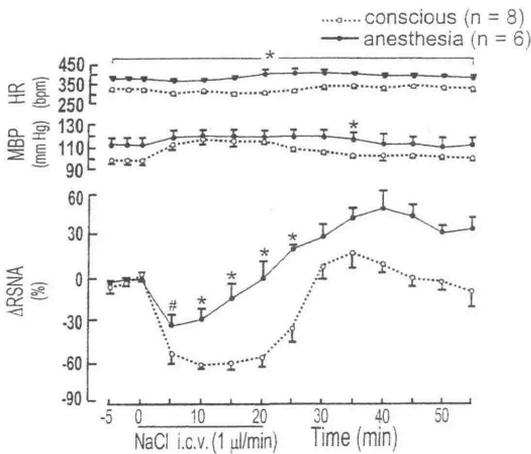


図2 側脳室内への高張食塩水(0.67 M)投与に対する心拍数(HR)・血圧(MBP)・腎交感神経活動変化(ΔRSNA)。

応答の時間経過と麻酔薬(sodium pentobarbital, 25 mg /kg, 静脈内投与) による影響を示す。(文献4) より)

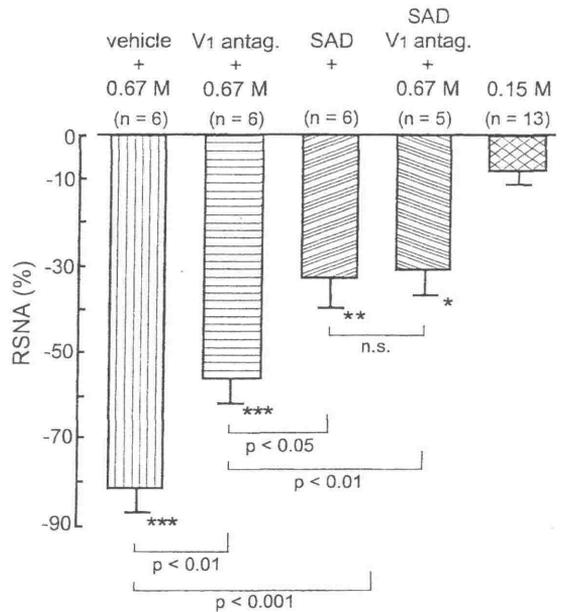


図3 種々な実験条件下での高張食塩水脳室内投与に対する腎交感神経活動(RSNA)の抑制反応。

vehicle+0.67 M; 溶媒を前投与した後高張食塩水(0.67 M)投与テスト。V₁ antagon+0.67 M; バゾプレッシンV₁レセプター・アンタゴニスト(OPC-21268, 5mg/kg, 静脈内投与)の前投与10分後にテスト。SAD+0.67 M; あらかじめ作成した動脈圧受容器除神経動物でのテスト。SAD+V₁ antagon+0.67 M; 動脈圧受容器除神経動物にバゾプレッシンV₁レセプター・アンタゴニストを前投与後テスト。0.15 M; 生食水投与テスト。(文献4) より)

ることもある³⁾。そこで自由行動・意識下ラットを用いて脳室内や脳局部へ高張食塩水を投与した時の変化について調べた⁴⁾。

1) 心血管系と腎交感神経活動(RSNA)反応: 投与食塩水の濃度(0.3, 0.67, 1.0 M)に依存して血圧上昇とRSNA低下が認められた(図1)。心拍数は変化を示さなかった。0.3 Mの食塩水で血圧には変化がなくRSNAは有為に低下した。先ほど述べたように麻酔薬投与によりこのRSNA反応が強く修飾されることも判明した

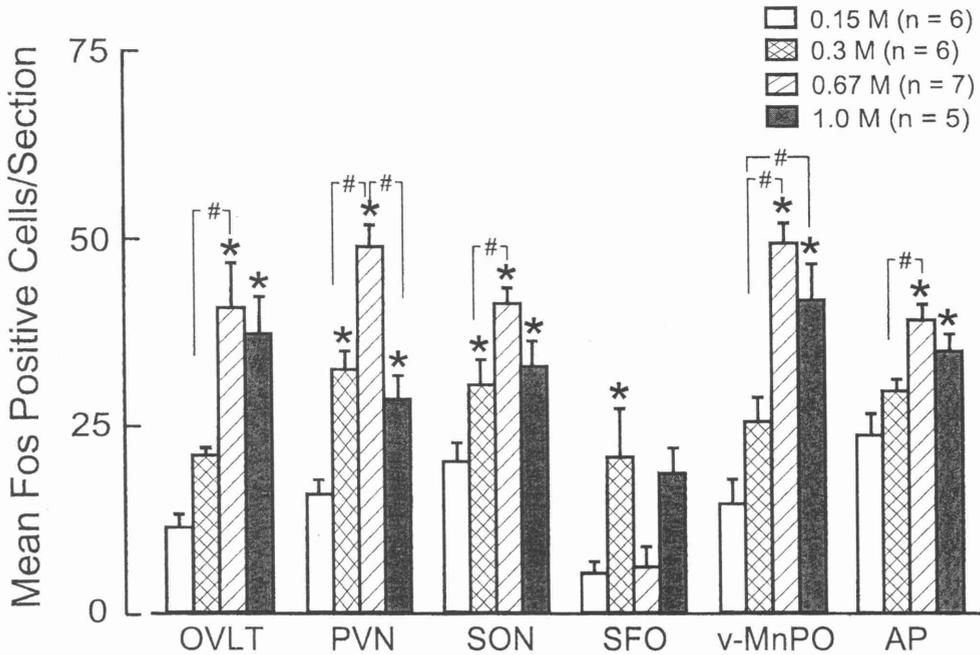


図4 側脳室内への高張食塩水投与により活性化された脳内部位。c-Fos蛋白陽性細胞数を基に評価。略字は本文参照。

(図2)。この結果は改めて麻酔下で得られた結果の解釈には注意が必要であることを示している。RSNAの抑制反応は圧受容器除神経(SAD)ラット並びに非ペプチド性バゾプレッシンV₂(OPC-31260,大塚)でなくV₁レセプター・アンタゴニスト(OPC-21268,大塚)の前投与により減弱した(図3)。従ってRSNAの抑制反応には動脈圧受容器反射並びにバゾプレッシンがV₁レセプターを介して関わっていることが明かとなった。興味深いことにV₁レセプター・アンタゴニストの効果は健全な動脈圧受容器入力に依存していた。

2) 脳内活性部位:前初期遺伝子(immediate early gene, IEG)c-fos由来のc-Fos蛋白陽性細胞を免疫組織化学的に検出し、脳室内高張食塩水投与により興奮する部位を調べた。脳室周囲器官の終板器官(OVLT)と最後野(AP)、視床下部室傍核(PVN)、視索上核(SON)、正中中心核(MnPO)ニューロンは投与食塩水の濃度に依存して興奮した(図4)。しかし、脳弓下器官(SFO)ではそのような濃度依存性が認められなかった。次に内因性バゾプレッシン系が如何に

これらc-Fos発現に関わっているかをバゾプレッシンアンタゴニストを用いて検討した。V₁レセプター・アンタゴニスト前処置によりPVNとSONのc-Fos陽性細胞数が有意に増加し、一方APでは減少した。SFO、OVLTとMnPOでは変化は見られなかった。この結果は先の内因性バゾプレッシンによるRSNAの修飾作用に上記部位(PVN, SON, AP)が関わっていることを示唆している。特にPVNは内分泌系と自律神経系の上位統合中枢であり、細胞構築学的に大細胞ニューロン群と小細胞ニューロン群に大別される⁵⁾。前者は下垂体後葉ホルモンのバゾプレッシンとオキシトシン分泌調節に、後者は下垂体前葉ホルモンのACTHやTSH分泌調節、また延髄や脊髄の自律神経節前ニューロンと直接シナプス結合しており、自律神経出力をコントロールしている。またAPは延髄の背側部に位置する脳室周囲器官の一つで色々な内因性化学物質の検出や動脈圧受容器反射に関わっていることが知られている。従ってこれらの部位が液性因子(バゾプレッシン)と神経性因子の相互会話(クロストーク)の場の可能性が大きい。

3) 高張食塩水の脳内受容メカニズム: はたして浸透圧あるいはナトリウムイオンいずれが有効刺激因子であるかについて論議されているが、少なくとも浸透圧は重要因子である⁶⁾。しかし特定の部位・機能についてはナトリウムイオンが特異的に関与している可能性がある。受容部位としては、第三脳室前壁腹側部にあるOVLtとMnPOが主要であると考えられているが、さらにSONとPVNの神経内分泌ニューロン自身も感受性を持つ⁷⁾。受容イオンメカニズムに関して主にin vitro実験より、非選択的陽イオンチャネルが働き、高浸透圧刺激に対して興奮すること⁶⁾、さらに低浸透圧受容にはアミノ酸の一つ、タウリンがグリア細胞から分泌され、ニューロン細胞膜にあるグリシン・レセプターのアゴニストとして働き、Cl⁻チャネルを介してニューロンの興奮性を低下させることが明らかにされた⁸⁾。しかし、はたしてin vivoにおいてそのようなメカニズムが働いているかどうかは不明である。そこで中枢性浸透圧受容にともなう生体適応機構、特に心血管系反応発現に関わる伝達物質の解明を目的として、自由行動・意識下ラットを用いてin vivo microdialysis法で検討した。浸透圧受容部位としてPVNを取り上げ、高張食塩水(0.3, 0.45, 0.67 M)をPVN領域にあらかじめ留置したin vivo microdialysis probeを介して局所灌流した。脳室内投与の場合と同様に濃度依存的に血圧と心拍数の増加が認められた。これらの閾値は0.45 Mであった。灌流液中のアミノ酸、ノルアドレナリン(NE)、一酸化窒素(NO)代謝産物(NO⁻², NO⁻³)を電気化学検出器付きのHPLCで測定した。高張食塩水灌流によりこれら測定したパラメーターはいずれも増加したが、その閾値が血圧・心拍数増加反応と一致したのはアミノ酸(グルタミン酸)であった。一方、一酸化窒素(NO)代謝産物は0.3 M食塩水で、ノルアドレナリンは0.67 Mで有意に増加した。PVN刺激により交感神経活動と血圧上昇が起こること、またグルタミン酸は中枢神経系において強力な興奮性伝達物質の一つであり、PVNニューロンはグルタミン酸により興奮することが知られている。そこで食塩水局所灌流による血圧・心拍数増加反応へのグルタミン酸の関与をグルタミン酸レセプター・アンタ

ゴニストを用いて調べた。NMDAアンタゴニストであるMK801を灌流液中に追加すると食塩水局所灌流による血圧・心拍数増加反応が有意に減弱した。しかしnon-NMDAアンタゴニストであるCNQXによっては影響されなかった。従って浸透圧刺激によりグルタミン酸がPVN局所で分泌され、PVNニューロンをNMDAレセプターを介して興奮させ、血圧・心拍数増加反応をもたらしていることが示唆された。しかしこのグルタミン酸の由来またその分泌様式は今後の研究課題である。最近局所浸透圧灌流によりオキシトシン、バゾプレッシンやアンジオテンシンなどペプチドも分泌されることが明らかになり、オートクライン/パラクライン的にニューロンの興奮性に影響を与えている可能性がある⁹⁾。

3 新規ペプチドの脳室内投与:

1) アドレノメジュリン(AM):

AMは1993年、宮崎医科大学の北村らによってヒト褐色細胞腫から分離・同定された強力な血管拡張作用をもつペプチドで、分子量は約5000、calcitonin gene related peptide (CGRP)と相同性を示す¹⁰⁾。その存在部位としては副腎、血管、肺や心臓など末梢組織のみならず、脳内にもその存在が免疫組織化学方法で明かにされた。体液調節との関連ではAMは飲水行動、ナトリウム摂取、バゾプレッシンやACTH分泌に対していずれも抑制作用を持つことが報告されている。また病態生理学との関係では重症心不全、高血圧や敗血症などの時末梢血中とともに組織でそのmRNAの増加が認められている。これらの結果はAMが循環ホルモン以外にパラクライン/オートクライン的作用も持つことを示唆している。我々は自由行動・意識下ラットの静脈と脳室内へAMを投与して血圧、心拍数と腎交感神経活動(RSNA)の変化を調べた¹¹⁾。末梢投与では血圧の低下、心拍数とRSNAの増加がみられ、これらの変化の内、後者(心拍数とRSNA)は動脈圧受容器反射を介することが圧受容器除神経(SAD)実験より明らかとなった。一方側脳室内投与により、血圧と心拍数は増加し、RSNAは早期抑制のち興奮の二相性変化を示した(図5)。このRSNAの早期抑制反応はSAD標本でも認められたの

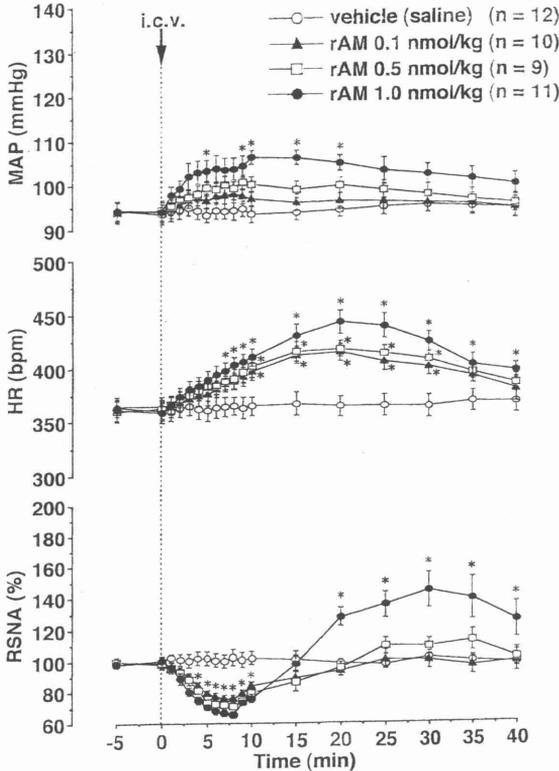


図5 自由行動・意識下ラットの側脳室内(i.c.v)投与したラット・アドレノメジュリン(rAM)の平均血圧(MAP)、心拍数(HR)と腎交感神経活動(RSNA)への効果。(文献11)より

で動脈圧受容器反射によるものではない。想定されている二つのAMアンタゴニスト、AM(22-52)とCGRP(8-37)を用いて関与するレセプターについて調べた。AM(22-52)の前投与によりRSNAの早期抑制反応が、一方CGRP(8-37)の前処置により血圧増加、心拍数増加とRSNAの後期増加反応が、選択的に抑制された。従ってAMの中樞作用は少なくとも異なった2つのレセプターを介することが示唆された。

前駆物質がAMと同じであるもう一つの関連ペプチド proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP)はその効果がAMとは異なっていた¹²⁾。PAMPは中樞作用を全く示さず、静脈投与でも血圧低下作用が弱く一過性であった。今後これらの生理・病態生理的意義の解明が待たれる。

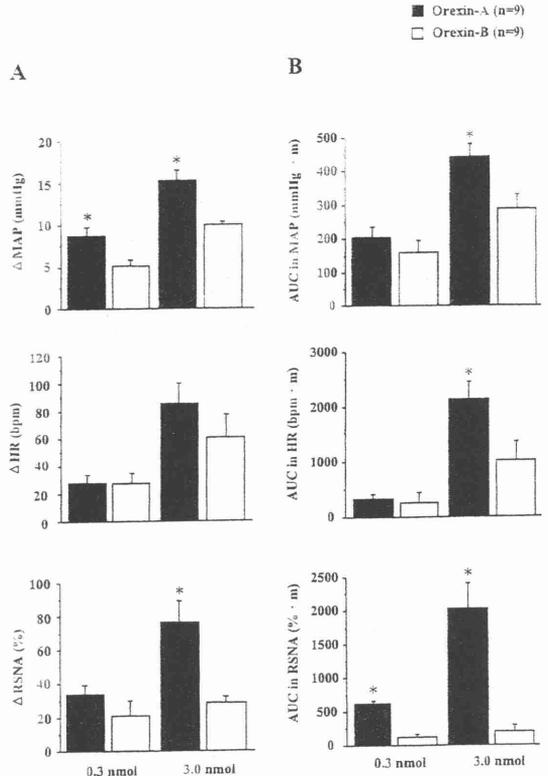


図6 オレキシンの効果。Aは最大反応値、Bは反応の時間経過も考慮し積分値で評価し、比較した。

オレキシンA(orexin-A)はオレキシンB(orexin-B)より心血管系と腎交感神経活動に対する促進作用が強い。(文献14)より

2) オレキシン :

オレキシンは1998年桜井らによって視床下部外側野から見つけられた新しい摂食促進ペプチドであり、エネルギー代謝に関係していると考えられた¹³⁾。その後ストレスや覚醒・睡眠との関連性が示唆されている。またその脳内投射部位が免疫組織化学的に調べられ、自律神経系や内分泌系の調節に深く関わった部位と一致しており、オレキシンのこれらの機能調節への関与が考えられる。例えばオレキシンはLHRHホルモンを介して卵胞刺激ホルモン(LH)の下垂体前葉からの分泌を促進する。またオレキシン/オレキシンレセプター・ノックアウトマウスが作成され、ヒト・イヌのナルコレプシーと類似した症状を呈することが判明した。自由行動・意識下ラットの脳室内にオレキシンを投与

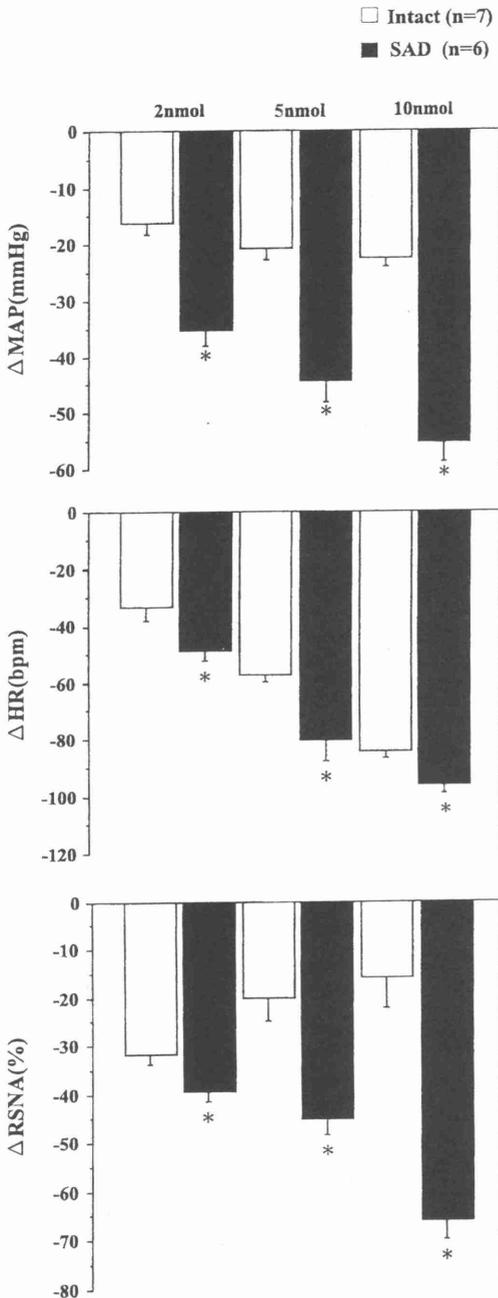


図7 ノシセプチンの効果。正常(Intact)ラットと動脈圧受容器除神経(SAD)ラットでの比較
動脈圧受容器反射の影響を排除すると、腎交感神経活動は用量依存的に減少した。(文献16)より)

すると血圧上昇、心拍数増加と腎交感神経活動(RSNA)増加が認められた(図6)¹⁴⁾。さらに血液中カテコラミン(アドレナリンとノルアドレナリン)濃度も増加した。従ってオレキシンは全身の交感神経系の活性化をもたらすことが示唆された。尚これらの効果はオレキシンBよりオレキシンAの方が大きかった。最近肥満と生活習慣病との関連性が指摘され、食生活指導と運動療法の重要性が述べられているが、それらの効果にはいずれも交感神経系が介在しており、オレキシンの関与の可能性もある。最近オレキシンの飲水行動促進作用が報告された。

3) ノシセプチン :

オピオイドレセプターには μ 、 κ 、 δ タイプがある。これらと構造的には類似しているが、これまで知られている内因性オピオイドのいずれとも全く結合しない新しいレセプター(opioid receptor like-1, OPL-1)が見つけた。ノシセプチンはこのORL-1レセプターの内因性リガンドとして見つかったもので、17個のアミノ酸からなり、オピオイド κ アゴニストのダイノルフィンと相同性を示す¹⁵⁾。最初、マウス脳室内投与で痛覚過敏作用が見られることから発痛物質と考えられたが、その後脊髄内投与では逆に鎮痛作用が認められており、今だ痛覚受容におけるその役割については論議がある。また中枢作用として痛覚以外に摂食や自発行動といった幅広い作用を有している。ノシセプチンレセプター・ノックアウトマウスが作成され痛覚に関しては異常が認められなかったが、聴覚や学習・記憶との関連性が示唆された。体液調節との関連ではナトリウム利尿や抗利尿作用が報告され、また麻酔下動物において静脈内投与で血圧低下が報告された。そこで自由行動・意識下ラットを用いて脳室内投与の効果を検討した¹⁶⁾。血圧・心拍数は用量依存的に減少した。腎交感神経活動(RSNA)は低用量投与では有意な減少が認められたが、高用量ではその減少反応が逆に減弱した。動脈圧受容器反射の関与を動脈圧受容器除神経(SAD)操作で除くと、用量依存的にRSNAは抑制された(図7)。従って中枢性ノシセプチン自体は心血管系と交感神経系に抑制的作用を及ぼしていることが示唆された。

表1. 自由行動・意識下ラットにおける脳室内投与の腎交感神経活動に対する効果

促進:	抑制:	無効果:
バゾプレッシン	アンギオテンシン II	心房性ナトリウム利尿ペプチド
コルチコトロピン放出因子	エンドセリン(低用量)	オキシトシン
カルシトニン遺伝子関連ペプチド	アドレノメジュリン(低用量)	PAMP
インターロイキン1β	ノシセプチン	
オレキシンA,B		
エンドセリン(高用量)		
アドレノメジュリン(高用量)		

4 まとめ

水・ナトリウム代謝調節、特に腎臓からの排泄調節に関わる神経性因子として働いている腎交感神経活動(RSNA)が中枢性浸透圧受容器や新規ペプチドによってどのように修飾されているかについて述べた。表1はこれまで我々が自由行動・意識下ラットを用いて脳室内に投与して調べた生理活性物質のRSNAに対する効果をまとめたものである。それらの作用は多様で中には末梢作用と逆の効果を示すものもあり、複雑である。浸透圧/ナトリウム受容メカニズムやペプチドの産生細胞の同定、作用部位、また関与するレセプター、細胞内情報伝達系の解明は今後の課題である。特にそれらの病態生理学的意義の解明に関して、最近盛んに行われている遺伝子操作された病態モデル動物を用いた研究の成果が待たれる。

文献

- 1) DiBona,G.F., The functions of the renal nerves. Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol., 94: 75-181, 1982.
- 2) Kannan,H., Changes in renal sympathetic nerve activities in the regulation of body fluid balance with special reference to central neuropeptides in conscious rats. Jpn.J.Physiol., 46: 111-122, 1996.
- 3) Kannan,H., Hayashida,Y. and Yamashita,H., Increase in renal sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats.

Am J.Physiol., 256: R1325-R1330, 1989.

- 4) Kato,K., Shirasaka,T., Kunitake,T. et al., Participation of arterial baroreceptors input and peripheral vasopressin in the suppression of renal sympathetic nerve activity induced by central salt loading in conscious rats. J.Auton.Nerv.Syst., 76: 83-92, 1999.
- 5) Swanson,L.W. and Sawchenko,P.E., Hypothalamic integration organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. Annu.Rev.Neurosci., 6: 269-324, 1983.
- 6) Bourque,C.W., Oliet,S.H.R. and Richard,D., Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. Front. Neuroendocrinol., 15: 231-274, 1994.
- 7) Inenaga,K., Cui,L-N., Nagatomo,T. et al., Osmotic modulation in glutamatergic excitatory synaptic inputs to neurons in the supraoptic nucleus of rat hypothalamus in vitro. J.Neuroendocrinol.,9:63-68, 1997.
- 8) Deleuze,C.,Duvold,A.,Moos,F.C. et al., Tyrosine phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic ucleus.J.Physiol., 523:291-299.2000.
- 9) Ludwig,M., Dendritic release of vasopressin and oxytocin. J.Neuroendocrinol., 10: 881-895, 1998.
- 10)Kitamura,K., Sakata,J., Kangawa,K. et al., Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. Biochem.Biophys.Res.Comm., 194: 720-725, 1993.

- 11) Saita, M., Shimokawa, A., Kunitake, T. et al., Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am.J.Physiol.*, 274: R979-R984, 1998.
- 12) Saita, M., Ishizuka, Y., Kato, K. et al., Cardiovascular and sympathetic effects of proadrenomedullin NH2-terminal 20 peptide in conscious rats. *Regul.Peptides*, 77:147-153, 1998.
- 13) Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M. et al., Orexins and orexin receptors : a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 92: 573-585, 1998.
- 14) Shirasaka, T., Nakazato, M., Matsukura, S. et al., Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am.J.Physiol.*, 277: R1780-R1785, 1999.
- 15) Reinscheid, R.K., Nothacker, H.-P., Bourson, A. et al., Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid like G protein-coupled receptor. *Science*, 270: 792-794, 1995.
- 16) Shirasaka, T., Kunitake, T., Kato, K. et al., Nociceptin modulates renal sympathetic nerve activity through a central action in conscious rats. *Am.J.Physiol.*, 277: R1025-R1032, 1999.

Central Mechanism on Control of Renal Sympathetic Nerve Activity Involved in the Regulation of Body Fluid Balance by Chemical Factors : Hypertonic Saline and Neuropeptides

Kannan H., Kato K., Saita M., Shirasaka T.*, Jin Q.-H. and Kunitake T.

Departments of Physiology and Anesthesiology, * Miyazaki Medical College

Abstract

The homeostasis of body fluid is primarily maintained by the balance between those mechanisms controlling the intake of water and electrolytes and those regulating water and electrolyte loss in the kidney. The kidney is the most important organ for the maintenance of body fluid balance. Renal excretory functions are mainly regulated by neural and humoral factors. The renal sympathetic nerve exerts multiple effects on the renal function. An increase in renal sympathetic nerve activity (RSNA) causes a decrease in renal blood flow, increases in renin release and renal sodium reabsorption. RSNA is influenced by several reflex mechanisms, such as the cardiovascular and renal reflexes. In addition, a central drive such as emotional stress induces drastic changes in RSNA. However, the role of the chemical mediators in the brain which are responsible for controlling the renal function via RSNA is not clear. The use of anesthesia in the majority of experiments designed to investigate the central effects of chemical mediators complicates the interpretation of the data in terms of normal physiology. In this article, we demonstrated the central effects of the following chemical factors on RSNA in conscious unrestrained rats: 1) The intracerebroventricular (i.c.v.) administration of hypertonic NaCl elicited the suppression of RSNA, which mainly depends on arterial baroreceptor input and the "additive" action of peripheral vasopressin. 2) In a dose-related manner, two recently identified neuropeptides, adrenomedullin and nociceptin (i.c.v.), elicited the inhibition followed by activation and inhibition of RSNA, respectively, while orexin activated RSNA. The possible role of RSNA in the regulation of body fluid balance was discussed with special reference to the central actions of neuropeptides.

Key words: Renal sympathetic nerve activity, water-sodium balance, salt loading, neuropeptides