ラット脳内 constitutive Nitric Oxide Synthase の遺伝子発現調節

京都府立医科大学 臨床検査部

南部 昭

Expression of constitutive Nitric Oxide Synthase messenger RNA
in the Rat Brain

Akira NANBU

Department of Clinical Laboratory and Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine

Endogenous nitric oxide (NO), identified as one of the endothelium-derived relaxing factors, exists not only in the vascular endothelium, but also in other organs and tissues including the brain. Although the physiological roles of NO are not clearly defined yet, NO may be involved in the pressor mechanisms of salt loaded hypertension. To study the role of brain NO in the cardiovascular regulation of salt loaded hypertension, we measured semiquantitatively the constitutive NO synthase (cNOS) messenger RNA in salt-restricted or salt-loaded rats, and DOCA-salt hypertensive rats by using a reverse transcription-polymerase chain reaction. Relative expression levels of cNOS messenger RNA in the hypothalamus of the DOCA-salt hypertensive rats were significantly reduced as compared to those in the control rats, whereas urinary excretions of arginine vasopressin and norepinephrine were significantly increased in DOCA-salt hypertension. cNOS messenger RNA in the hypothalamus of salt-restricted rats showed a tendency to increase as compared to those in the high salt loaded rats. These results suggest that NO synthesized by cNOS in the hypothalamus may attenuate both the vasopressin releases and sympathetic nervous activities, which result in the inhibition of the pressor mechanisms of salt loaded hypertension.

Keywords: constitutive Nitric Oxide Synthase, mRNA, hypothalamus, brainstem, RT-PCR

緒 言

内皮由来弛緩因子 (EDRF) として同定された内因性一酸化窒素 (NO) は強力な血管拡張作用を示す¹⁾²⁾。NO は内皮のみならず血管平滑筋からも産生され³⁾, さらには神経伝達物質としての可能性も示唆され⁴⁾, 血圧調節因子として重要な役割を担う可能性がある。

免疫組織化学的検索⁵⁾ および組織化学的検索⁶⁾ により NO 合成酵素 (NO Synthase: NOS) は脳内にも広く分布することが明らかにされている。水・電解質代謝または交感神経系の上位中枢である視床下部・下垂体系では特に視索上核, 室傍核および外側視床下部, 下垂体後葉に NOS 様免疫活性物質が強く染色される。一方, 動脈圧受容器反射や血管運動の中枢であると考えられている延髄部では弧束核に NOS が多く認められている。

NO 合成阻害剤である N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) や N^G-nitro-L-arginine (L-NA) を静脈あるいは飲用により末梢投与すると明らかに昇圧し NO の安定な代謝物である硝酸イオンの尿中

排泄量は著減する⁷⁾⁸⁾。さらに NO 合成阻害剤をラット脳室内や大槽内に投与すると交感神経活動の亢進と共に昇圧が認められる⁹⁾。静脈内あるいは脳内への L-NMMA 投与時の昇圧ならびに交感神経活動の亢進は脊髄の切断によって完全に消失することより脳内に入った L-NMMA が NO 産生を阻害した結果、中枢性に末梢交感神経活動を亢進させ血圧を上昇させた可能性が示唆されている。

一方、食塩感受性の高血圧に NO が関与している可能性が示唆されており¹⁰⁾、著者らも DOCA-食塩高血圧ラットにおいて安定な NO の代謝物である硝酸イオンの尿中排泄を検討し、NO の産生減少が高血圧発現に強く関与する可能性のあることを報告した¹¹⁾。しかしながら未だ、脳内 NO の中枢性血圧調節機構に占める役割は明らかでない。今回、我々は DOCA-食塩高血圧ラットおよび食塩摂取量を変化させたラットの脳内 NOS の遺伝子発現量を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて定量的に測定し、脳内での NOS 遺伝子発現が水・電解質代謝および交感神経系ひいては血圧調節機構に占める役割を検討した。

対象および方法

1. アルギニン負荷モデルの作成

12週齢の雄性 Wistar 系ラットを4群に分け(各 n=8)、蒸留水を飲用させたものを I 群, L-arginine (L-Arg) 水溶液 (1 w/v%) を飲用させたものを II 群, D-arginine (D-Arg) 水溶液 (1 w/v%) を飲用させたものを III 群, および N^G-nitro-L-arginine (L-NA) 水溶液 (1 w/v%) を飲用させたものを IV 群とし、蒸留水群である I 群を対照群とした。実験開始後 7 日目に断頭屠殺し、ただちに視床下部を摘出後ドライアイスで氷冷し、RNA 抽出まで -80°C にて保存した。

2. DOCA-食塩高血圧モデルの作成

5週齢の雄性 Wistar 系ラットを用い、エチルエーテル麻酔下に片腎摘出を行った。続いて、既報¹²⁾の DOCA (D) 投与の有無と飲料水(蒸留水: water と 1%食塩水: salt)との組合せにより以下の4群に分けた。[D(-), water] 群 (n=8), [D(+), water] 群 (n=8), [D(-), salt] 群 (n=8), [D(+), salt] 群 (n=8)。なお [D(-), water] 群を対照群とした。術後 6 週目に断頭屠殺し、各々ただちに視床下部および延髄部を摘出後ドライアイスで氷冷し、RNA 抽出まで -80°C にて保存した。

3. 食塩負荷モデルの作成

8週齢の雄性 Wistar 系ラットを3群(各 n=16)に分けそれぞれ I 群: 常塩食群 (2% NaCl), II 群: 低塩食群 (0.3% NaCl), III 群: 高塩食群 (8% NaCl) を与えた。実験開始より10日目に各群の半数 (n=8) を断頭屠殺し、ただちに視床下部および延髄部を摘出後ドライアイスで氷冷し、RNA 抽出まで -80°C にて保存した。実験開始後 8 週目に残りの個体 (n=8) より同様の処置にて視床下部および延髄部を摘出し、保存した。

4. RT-PCR

上記各実験モデルより採取した組織から guanidinium thiocyanate/cesium chloride 法¹³⁾により総 RNA を抽出し、RT-PCR を施行した。RT-PCR には Gene AmpTM RNA PCR Kit (Perkin-Elmer, USA) を用いた。また、各サンプル間での総 RNA 量の差異の補正のため、house keeping gene である glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) を内部標準として用いた。

1) RT

4 μ l MgCl₂ solution (最終濃度 5 mM), 2 μ l 10×PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl), 1 μ l 滅菌蒸留水, 2 μ l dGTP, dATP, dTTP, dCTP (1 mM), 1 μ l RNase inhibitor (1 U/ μ l), 1

μl reverse transcriptase ($2.5 \text{ U}/\mu\text{l}$), $1 \mu\text{l}$ random hexamers ($2.5 \mu\text{M}$)。以上の試薬に総 RNA を $2 \mu\text{l}$ (10 ng) (総反応液量 $20 \mu\text{l}$) 加え混和。逆転写反応はサーマルサイクラー (OMUNIGENE, USA) を用い 42°C で40分間行い, 99°C で5分間熱変成させた。

2) PCR

RT 反応液を $18 \mu\text{l}$ 採取し $13 \mu\text{l}$ を NOS の PCR に, $5 \mu\text{l}$ を内部標準として用いる GAPDH の PCR に供した。なお試料はそれぞれ $18 \mu\text{l}$ になるように所定量の滅菌蒸留水を加えた。各々の試料 ($18 \mu\text{l}$) を別の PCR チューブに採取し以下に記す試薬を加えた。 $4 \mu\text{l}$ MgCl_2 solution (最終濃度 2 mM), $8 \mu\text{l}$ $10\times$ PCR buffer, $67.5 \mu\text{l}$ 滅菌蒸留水, $0.5 \mu\text{l}$ DNA polymerase ($25 \text{ U}/\text{ml}$), $1 \mu\text{l}$ primer 1 および primer 2 (NOS: $0.25 \mu\text{M}$, GAPDH: $0.5 \mu\text{M}$) (総反応液量 $100 \mu\text{l}$)。ミネラルオイルを $70 \mu\text{l}$ 重層し 94°C , 1 分間熱変性, 65°C , 1 分間アニーリング, そして 72°C , 3 分間の伸長を 1 サイクルとし, 30 サイクル PCR を行った。

3) プライマー

プライマーはラット脳における constitutive NOS のクローニングの報告¹⁴⁾をもとに合成した (TOYOBO 大阪)。プライマー 1 (アンチセンス); $5'\text{-GCCGGATCCTCCAGGAGGGTGTCCACCGCATG-3'}$, プライマー 2 (センス); $5'\text{-CCGGAATTCGAATACCAGCCTGATCCATGGAA-3'}$ 。GAPDH¹⁵⁾ のプライマー 1 (アンチセンス); $5'\text{-AGATCCACAACGGATACATT-3'}$, プライマー 2 (センス); $5'\text{-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'}$ 。

5. PCR 産物の解析

PCR 施行時に微量の $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ を付加して cDNA をラベルした。PCR 終了後 5 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し, オートラジオグラフィーを施行した。オートラジオグラムの解析は NIH-Image 解析システム (Image ver. 1.02) を用いた。

6. cNOS の相対的発現量の算出

NIH-Image システムのデンストメトリーにより求めた値を cNOS mRNA および GAPDH mRNA の発現量とし, GAPDH mRNA に対する cNOS mRNA 発現量の比 (N/G 比) を cNOS mRNA の相対的発現量とした。

7. 本実験系についての基礎検討

1) PCR のサイクル数の決定

10 ng の総 RNA を RT-PCR に供する試料とし PCR のサイクル数を 10 サイクルから 40 サイクルまで 5 サイクル毎に変化させたところ, cNOS mRNA, GAPDH mRNA 共に 20 から 35 サイクルの間においてサイクル数と PCR 産物との間に直線関係を認め (Fig. 1), PCR 産物の対数プロットが 20 から 30 サイクルの間のサイクル数に対して直線性を有することを確認した。この結果より, 使用する PCR サイクル数は 30 サイクルとした。

2) RT 反応に供する総 RNA 量の決定

100 ng の総 RNA を希釈し $50.0, 25.0, 12.5, 6.3, 3.1$ および 1.6 ng の試料を作成し RT-PCR を行った。PCR は前述の検討結果より 30 サイクル行った。cNOS mRNA, GAPDH mRNA 共に 3.1 から 12.5 ng の間において総 RNA 量と PCR 産物との間に直線関係を認め, よって RT 反応に供する総 RNA 量は 10 ng とした (Fig. 2)。

3) 本実験系の再現性

同一試料 ($n=4$) を用いて再現性を調べたところ N/G 比の変動係数は 8.9% であった。

Fig. 1 Relationships between PCR cycles and GAPDH (A) and cNOS (B) PCR products.

Fig. 2 Relationships between total RNA, applied as a RT-PCR sample, and GAPDH (A) and cNOS (B) PCR products.

8. 統計

結果値は平均値±標準誤差で表し、群間の差異は一次元分散分析を施行し、Duncan's multiple range test により判定した。

結 果

1. アルギニン負荷モデル

収縮期血圧は実験開始後4日目にL-NA飲用群において有意($p < 0.01$)な昇圧を認め、以後高血圧を持続した。実験開始後7日目、断頭屠殺時での収縮期血圧は対照群: 144 ± 10 (mmHg), L-Arg投与群: 137 ± 8 , D-Arg投与群: 140 ± 12 , L-NA投与群: 184 ± 8 であった。

L-Argを飲用させた群、D-Argを飲用させた群およびL-NAを飲用させた群はそれぞれ対照群と比し視床下部内cNOS mRNAの発現量に差異は認められなかった (Fig. 3)。

Fig. 3 Relative expression of cNOS-mRNA in the hypothalamus in four groups of rats. Relative level of cNOS-mRNA was expressed as a cNOS-mRNA (N) / GAPDH-mRNA (G) ratio.

2. DOCA-食塩高血圧モデル

収縮期血圧は術後1週から3週まで各群間で有意差を認めなかったが、術後4週以降対照群に比べ、DOCA-食塩群において有意に昇圧し、以後最終の6週まで持続した。また術後5, 6週にはDOCA-蒸留水群でも昇圧を認めた。術後6週目における収縮期血圧は[D(-), water]群: 155.6 ± 16.52 (mmHg), [D(+), water]群: 190.1 ± 22.78 , [D(-), salt]群: 164.0 ± 8.99 , [D(+), salt]群: 199.6 ± 28.34 であった。DOCA-食塩群において、尿中アルギニン・バソプレシン (AVP) 排泄量は対照群に比し術後1週目より増量を認め、尿中遊離型ノルエピネフリン排泄量は術後4週目より増量を認めた (Table 1)。

Table 1 Data from urinary excretions of free norepinephrin and arginine vasopressin in four groups of rats

Group (n = 8 each)		Week					
		1	2	3	4	5	6
f NE (% vs. D(-), water)	D(-), water	100 ± 9	100 ± 12	100 ± 11	100 ± 11	100 ± 9	100 ± 8
	D(+), water	73 ± 6	66 ± 7	110 ± 34	73 ± 12	82 ± 20	88 ± 6
	D(-), salt	89 ± 17	144 ± 20	117 ± 9	112 ± 16	114 ± 15	112 ± 17
	D(+), salt	133 ± 19	144 ± 18	186 ± 38	193 ± 45 †	147 ± 5 †	173 ± 19 ††
AVP (% vs. D(-), water)	D(-), water	100 ± 14	100 ± 46	100 ± 12	100 ± 51	100 ± 45	100 ± 13
	D(+), water	149 ± 15	116 ± 16	149 ± 16	67 ± 6	66 ± 5	167 ± 33
	D(-), salt	257 ± 94	346 ± 92	325 ± 76	103 ± 18	140 ± 24	252 ± 53
	D(+), salt	651 ± 121 ††	718 ± 113 ††	829 ± 138 ††	350 ± 32 ††	343 ± 34 ††	1330 ± 258 ††

fNE, free type norepinephrin; AVP, arginine vasopressin. D(-) and D(+) means sham-DOCA (D(-)) and DOCA (D(+)) treatment, respectively. Data were expressed as mean ± SEM. †† $p < 0.01$, † $p < 0.05$, vs. D(-), water group.

Fig. 4 (A): Relative expression of cNOS-mRNA in the hypothalamus at the 6th week of DOCA-salt treatment. D and Na means DOCA (D) and 1% sodium chloride (Na) treatment, respectively. * $p < 0.05$, vs. the D(-), Na(-) group. (B): Autoradiograms of cNOS and GAPDH mRNA in the brain of DOCA-salt hypertension rats. It is evident that expression of only cNOS-mRNA is decreased in the hypothalamus. bp; base pairs.

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 5 Relative expression of cNOS-mRNA in the lower brainstem at the 6th week of DOCA-salt treatment.

Fig. 6 Relationships between N/G ratio express relative expression of cNOS-mRNA in the hypothalamus, and systolic blood pressure (sBP) in the DOCA-salt hypertension rats. It is show significantly correlation between N/G ratio and sBP. $r^2 = 0.919$, $p < 0.01$

cNOS mRNA の相対的発現量を示す N/G 比は視床下部において対照群に比し DOCA-食塩水群では約60%の有意 ($p < 0.05$) の減少を示した (Fig. 4)。一方、延髄部における N/G 比は各群間での有意の差異は認められなかった (Fig. 5)。DOCA-食塩群において視床下部における N/G 比と血圧との間に有意な負の相関を認めた ($r^2 = 0.919$, $p < 0.01$) (Fig. 6)。

3. 食塩負荷モデル

収縮期血圧は対照群である常塩食群に比し、低塩食群では変化を認めなかったが高塩食群では塩分負荷3週目より上昇を認め8週目まで持続した (126 ± 3 mmHg vs. 143 ± 4 mmHg, $p < 0.01$)。実験開始後10日目の視床下部における N/G 比は常塩食群に対して低塩・高塩食群での有意差は認められな

Fig. 7 Relative expression of cNOS-mRNA in the hypothalamus in the salt loaded for 10 day (A) and for 8 week (B). In the experiment for 10 day salt loading, N/G ratio in the low salt group show a tendency to increase as compared to in the high salt group. normal salt, low salt and high salt means diet contains 2%, 0.3% and 8% NaCl. * $p < 0.1$

Fig. 8 Autoradiograms of cNOS and GAPDH mRNA in the hypothalamus of salt loaded rats.

かったが、低塩食群では高塩食群に対し増加傾向 ($p < 0.1$) を示した。また最終の 8 週目での N/G 比は各群間に差異を認めなかった (Fig. 7, Fig. 8)。一方、延髄部での cNOS-mRNA の相対的発現量を示す N/G 比は 10 日目 (常塩食群: 1.74 ± 0.492 , 低塩食群: 1.71 ± 0.447 , 高塩食群: 1.73 ± 0.227) および最終の 8 週目 (常塩食群: 1.05 ± 0.073 , 低塩食群: 1.01 ± 0.107 , 高塩食群: 1.30 ± 0.272) の両時期において各群間に有意の差異を認めなかった。

考 察

NO は強力な血管平滑筋弛緩作用や腎における圧-ナトリウム利尿曲線の左方変移作用¹⁶⁾ などに

よる末梢性の降圧因子として重要な役割を担っていると考えられているが、交感神経活動の調節因子としての役割^{7)~9)}など中枢においても血圧調節因子として作用する可能性が示唆されている。本実験より DOCA-食塩高血圧モデルでの視床下部内 cNOS 遺伝子発現の低下ならびに食塩摂取制限モデルでの cNOS 遺伝子発現の増加傾向が明らかとなった。これらの結果は脳内 NO がその機序は不明ながら中枢性の降圧機序に関与している可能性が示唆される。

DOCA-食塩高血圧モデルの血圧上昇はアルギニンバソプレシン (AVP) の過剰分泌¹⁷⁾¹⁸⁾ならびに末梢交感神経活動の亢進¹⁹⁾²⁰⁾が主たる原因であると考えられている。Mohring らは DOCA-食塩高血圧ラットの血漿中 AVP 濃度が対照群の10倍量であり、AVP に対し特異的な抗体を静脈内投与すると正常レベルまで降圧したことを報告しており¹⁷⁾、Champlain らは DOCA-食塩高血圧の発症・維持に末梢交感神経活動の亢進が重要であるとしている¹⁹⁾。現在ではそれら因子の相互作用により高血圧が発症・維持されているものと考えられている²⁰⁾。著者らの実験においても AVP および遊離型ノルエピネフリンの尿中排泄量は、DOCA-食塩群において有意に増加しており、これら両者が DOCA 食塩高血圧モデルの主要な昇圧機序と考えられる。

AVP 含有ニューロンである室傍核および視索上核を含む視床下部及び外側視床下野には NOS が多く存在しその活性を示す⁵⁾⁶⁾ことが知られている。また、ラットを用いた *in vivo* 及び *in vitro* の実験系において、視床下部内 NO が視床下部・下垂体系からの AVP 分泌を抑制的に調節していることが報告され²¹⁾²²⁾、視床下部内 NO は AVP 分泌の脳内調節因子の一つと考えられる。本実験において、尿中 AVP の分泌が亢進していた高血圧維持期に視床下部での cNOS 遺伝子発現が低下していたことは、DOCA-食塩群では、視床下部内 cNOS 産生の低下により NO 産生が低下し、そのため視床下部・下垂体系からの AVP 分泌に抑制がかからず、AVP 過剰分泌を促進した可能性がある。

L-NMMA をラット大槽内に投与すると血圧の上昇とともに末梢交感神経活動は亢進する⁹⁾。この実験結果は、脳内のある部位においては NO が末梢交感神経活動を抑制し、血圧上昇を押さえる働きがあることを示す。本 DOCA-食塩高血圧モデルでは、末梢交感神経活動の指標の一つである尿中遊離型ノルエピネフリン排泄量は増量しており、視床下部 cNOS 遺伝子発現の低下による NO 産生低下が末梢交感神経活動の亢進にあずかっている可能性は否定できない。

延髄部には動脈圧受容器反射の中枢である弧束核や血管運動中枢と考えられている延髄腹外側核など循環調節に重要な部位が存在し、それらの部位での血圧調節機構に NO が関与する可能性が示唆されているが²³⁾²⁴⁾、今回の検討で延髄部における cNOS の遺伝子発現は各群間で差異を認めず、延髄部の NO が本実験モデルにおける高血圧機序に関与している積極的な結果は得られなかった。延髄腹外側核での NO の作用は、その吻側と尾側とでは末梢交感神経活動及び血圧に対する反応は、逆となることが報告されている²³⁾など、延髄部位における血圧に対する NO の作用は複雑であると予想され、また、今回は組織をブロックとして採取し測定しているため、延髄の微小な部位での個々の cNOS の発現については不明であり、本実験モデルにおける、延髄部 NO の働きについては、より詳細な検討を必要とすると思われる。

食塩感受性モデルでは食塩の過剰摂取により血圧が上昇するがその機序として腎・体液性因子²⁵⁾および神経性因子²⁶⁾の関与が考えられている。本態性高血圧症の食塩感受性群に食塩負荷を行うと髄液 Na イオン濃度の上昇を引き起こし、その濃度と血圧上昇度とは正の相関を示すが非感受性群では相関を示さない²⁷⁾。またラット脳室内に食塩水を微量注入すると交感神経活動および AVP 分泌の亢進とともに容量依存的に昇圧する²⁸⁾ことから食塩感受性高血圧においては脳内 Na イオン濃度の

増加が交感神経活動を亢進させる昇圧機序の存在を示唆する。一方、食塩を負荷した Dahl-食塩感受性ラットは L-Arg により血圧が低下したが、自然発症性高血圧ラットでは血圧に影響しなかったことから食塩感受性高血圧への NO の関与が示唆されている¹⁰⁾。加えて本実験において低塩食摂取群では高塩食摂取群に比し視床下部内 cNOS 遺伝子発現量が増加傾向を示したことは食塩摂取制限による脳内 NO の増加が脳内 Na イオンによる交感神経活動亢進機序に対し抑制的に作用する可能性がある。

NO の産生動態は血圧変動に伴う結果であり原因ではないとする議論が存在する。しかしながら、本実験において DOCA-食塩群ならびに L-NA 投与群では共に有意な昇圧を認めたが、視床下部内 cNOS の遺伝子発現量は前者において対照群に比し有意な減少を示し、後者においては差異を認めなかった。さらに DOCA-食塩群において視床下部内 cNOS 遺伝子発現量を示す N/G 比と血圧との間に有意な負の相関を認めたが、軽度の高血圧が発現した DOCA-蒸留水群では相関を認めなかった。これらの成績は cNOS の遺伝子発現量が単に血圧変動に伴う二次的な変化ではないことを示している。

DOCA-食塩群で認められた視床下部内 cNOS 遺伝子発現量の減少が DOCA-蒸留水群では差異を認めなかったことは視床下部内 cNOS の遺伝子発現量に主として影響を与えるのは DOCA ではなく、食塩摂取量の可能性がある。しかしながら高塩食摂取のみでは減少傾向を示すものの統計学的に有意な変化を認めないことから、詳細な機序は不明ながら DOCA-食塩群では食塩と DOCA との相互作用が cNOS 遺伝子発現量の低下を著明にしたと推察できる。

以上、本実験により、DOCA-食塩高血圧モデルの高血圧維持期には、視床下部内 cNOS の遺伝子発現量が低下し、食塩摂取制限モデルではその発現量は増加傾向を示すことを明らかにした。視床下部内 cNOS 産生低下は脳内 NO 産生低下をもたらし、結果として交感神経活動亢進ならびに AVP 分泌亢進を助長し、高血圧維持機構の一つとなる可能性を示すとともに、食塩摂取量の変化が脳内 NO の産生量に関与している可能性が示唆される。

結 語

DOCA-食塩高血圧モデルの高血圧維持期における視床下部内 cNOS 遺伝子発現の低下ならびに食塩摂取制限ラットにおける視床下部内 cNOS 遺伝子発現の増加傾向を明らかにし、視床下部内 NO が中枢性における降圧性調節因子として作用する可能性を示した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導御校閲を賜りました京都府立医科大学第一生理学教室教授森本武利先生ならびに臨床検査医学教室教授吉村孝先生に深謝致します。また、直接御指導いただきました西村真人博士ならびに関西医科大学教授高橋伯夫先生に深謝致します。

文 献

- 1) Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987; 327: 524-526
- 2) Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988; 333: 664-666
- 3) Busse, R., Mulsch, A.: Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, 1990;

- 275: 87-90
- 4) Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess, Williams, R.: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 1988; 336: 385-388
 - 5) Bredt, D.S., Huang, P.M., Snyder, S.H.: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 1990; 347: 768-770
 - 6) Vincent, S.R., Kimura, H.: Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 1992; 46: 755-784
 - 7) Sakuma, I., Togashi, H., Yoshioka, M.: N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. *Circ. Res.*, 1992; 70: 607-611
 - 8) Wang, Y.-X., Pang, C.C.Y.: Possible dependence of pressor and heart rate effects of N^G-nitro-L-arginine on autonomic nerve activity. *Br. J. Pharmacol.*, 1991; 103: 2004-2008
 - 9) Togashi, H., Sakuma, I., Yoshioka, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Kitabatake, A., Saito, H., Gross, S.S., Levi, R.: A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992; 262: 343-347
 - 10) Chen, P.Y., Sanders, P.W.: L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J. Clin. Invest.*, 1991; 88: 1559-1567
 - 11) 南部 昭, 高橋伯夫, 西村真人, 坂本将稔, 中西 正, 森本武利, 吉村 学: DOCA-食塩高血圧モデルの高血圧発症に占める内因性一酸化窒素(NO)の役割. *医学のあゆみ*, 1994; 169: 829-830
 - 12) Takahashi, H., Iyoda, I., Yamasaki, H., Takeda, K., Okajima, H., Sasaki, S., Yoshimura, M., Nakagawa, M., Ijichi, H.: Retardation of the development of hypertension in DOCA-salt rats by renal denervation. *Jpn. Circ. J.*, 1984; 48: 567-574
 - 13) Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989.
 - 14) Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R., Snyder, S.H.: Cloned expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome p-450 reductase. *Nature*, 1991; 351: 714-718
 - 15) Fort, P., Marty, L., Piechacz, M., Sabrouy, S.E., Dani, C., Jeanteur, P., Blanchard, J.M.: Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigene family. *Nucleic Acids Res.*, 1985; 13: 1431-1442
 - 16) Ikenaga, H., Suzuki, H., Ishii, N., Itoh, H., Saruta, T.: Role of NO on pressure-natriuresis in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int.*, 1993; 43: 205-211
 - 17) Mohring, J., Mohring, B., Petri, M., Haack, D.: Vasopressin involved in the pathogenesis of malignant desoxycorticosterone hypertension in rats. *Lancet.*, 1976; i: 170-173
 - 18) Mohring, J., Mohring, B., Petri, M., Haack, D.: Vasodepressor role of ADH in the pathogenesis of malignant DOC hypertension. *Am. J. Physiol.*, 1997; 223: F260-F269
 - 19) De Champlain, J., van Ameringen, M.R.: Regulation of blood pressure by sympathetic nerve fibers and adrenal medulla in normotensive and hypertensive rats. *Circ. Res.*, 1972; 31: 617-628
 - 20) Berecek, K.H., Murray, R.D., Gross, F.: Significance of sodium, sympathetic innervation, and central adrenergic structures on renal vascular responsiveness in DOCA-treated rats. *Circ. Res.*, 1980; 47: 675-683
 - 21) Yasin, S., Costa, A., Trainer, P., Windle, R., Forsling, M.L., Grossman, A.: Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants. *Endocrinology*, 1993; 133: 1466-1469
 - 22) Kadowaki, K., Kishimoto, J., Gareth, L., Piers, C.E.: Up-Regulation of Nitric Oxide Synthase (NOS) Gene Expression Together with NOS Activity in the Rat Hypothalamo-Hypophyseal System after Chronic Salt Loading: Evidence of a Neuromodulatory Role of Nitric Oxide in Arginine Vasopressin and Oxytocin Secretion. *Endocrinology*, 1994; 134: 1011-1017
 - 23) Shapoval, L.N., Sagach, V.F., Pobegailo, L.S.: Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. *Neurosci. Lett.*, 1991; 132: 47-50
 - 24) Togawa, T., Imaizumi, T., Harada, S., Endo, T., Shiramoto, M., Hirooka, Y., Takeshita, A.: Nitric oxide influences neuronal activity in the nucleus tractus solitarius of rat brainstem slices. *Circ. Res.*, 1994; 75: 70-76
 - 25) Dahl, L.K., Heine, M.: Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats. *Circ. Res.*, 1975; 36: 692-696
 - 26) De Champlain, J., Farley, L., Cousineau, D., Van Ameringen, M.R.: Circulating catecholamine levels in human and experimental hypertension. *Circ. Res.*, 1976; 38: 109-114
 - 27) 後藤英司: 本態性高血圧症患者における脳脊髄液ナトリウム濃度と血圧, 食塩依存群と非依存群の比較. *日内会誌*, 1982; 71: 1528-1533

- 28) Sasaki, S., Takeda, K., Okajima, H., Takahashi, H., Yoshimura, M., Nakagawa, M., Ijichi, H.: Pressor responses to intracisternal injection of hypertonic NaCL in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1984; 6: 349-354

(受付日 : '95, 11, 14)

(採択日 : '96, 3, 15)