

高血圧症の中樞性機序に関する研究

久保孝夫

Mechanisms of Hypertension in the Central Nervous System

Takao KUBO

Showa Pharmaceutical University, 3-chome, Higashi-Tamagawagakuen, Machida City 194-8543, Japan

(Received June 9, 2006)

This article reviews studies by the author on central mechanisms of hypertension. Spontaneously hypertensive rats (SHR) have been developed as a rat model of genetic hypertension, and central acetylcholine has been implicated in hypertension in SHR. The rostral ventrolateral medulla (RVL), a major source of efferent sympathetic activity, has cholinergic pressor systems. The release of acetylcholine is enhanced in the RVL of SHR, leading to hypertension. The alteration of the RVL cholinergic system in SHR results from enhanced angiotensin systems in the anterior hypothalamic area (AHA). Angiotensin II-sensitive neurons are present in the AHA and they are tonically activated by endogenous angiotensins. The basal activity of AHA angiotensin II-sensitive neurons is enhanced in SHR, mainly due to enhanced sensitivity of AHA neurons to angiotensin II. The AHA angiotensin system is also responsible for hypertension induced by emotional stress and central Na^+ increases. These findings suggest that the AHA angiotensin system may play a critical role in the development of hypertension.

Key words—angiotensin; hypothalamus; hypertension; acetylcholine; medulla oblongata; genetic hypertension

1. はじめに

血圧が 140/90 mmHg 以上を高血圧症とされている。わが国の高血圧者数は 3500 万人以上と言われ成人病中最も多い疾病である。高血圧症の 90% 以上は原因不明のいわゆる本態性高血圧症である。本態性高血圧症の成因として、現在、遺伝因子とストレス、食塩等の環境因子が合わさって発症する、そして最終的には交感神経活性の増大が 1 つには関与していると考えられている。本態性高血圧者において一貫して交感神経活性の増大が認められるからである。交感神経の活性は中枢神経系によって調節されているから、中枢神経系に何か異常があってこれにより交感神経活性の増大が生じている可能性が考えられる。

ヒトの本態性高血圧症のモデルとして高血圧自然発症ラット (SHR) と呼ばれる遺伝的高血圧ラットが開発され広く高血圧の研究に使用されてい

る。¹⁾ SHR の血圧は生後 4 週目頃から自然に上昇し始め徐々に高血圧が発症する。SHR においても血清中のノルアドレナリンが増大していることから、1 つには交感神経活性の増大が高血圧の発症に関与していると考えられている。

古くから、脳内アセチルコリン受容体を刺激すると交感神経活性の増大を介して血圧が上昇することが知られている。^{2,3)} 筆者は、脳内 acetylcholine の血圧上昇機序に興味を持ち、末梢から投与しても脳内に入り脳のアセチルコリン受容体を刺激できる physostigmine と oxotremorine を SHR とその対照である正常血圧京都ウィスターラット (WKY) に静脈内注射したところ、確かに両薬物とも血圧上昇を生じるが両薬物の効果に違いがあることを発見した。⁴⁾ すなわち、コリンエステラーゼ阻害薬である physostigmine による昇圧反応は SHR において亢進していたが、直接アセチルコリン受容体を刺激する oxotremorine による昇圧反応は SHR と WKY の間に差はなかった。この結果は、SHR において脳のどこかで acetylcholine の遊離が増大していてこれが昇圧反応の亢進をもたらしていることを示唆する。筆者は、SHR におけるこの脳アセチルコリン

昭和薬科大学 (〒194-8543 町田市東玉川学園 3 丁目)

現住所: 〒251-0047 藤沢市辻堂 5-19-3

e-mail: t.kubo@cityfujisawa.ne.jp

本総説は、平成 17 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

系の異常の機序を明らかにすることにより, SHRの交感神経活性増大の機序, さらには高血圧の発症機序解明の糸口となると考え本研究を開始した.

2. 延髄血管運動中枢とアセチルコリン系

1世紀以上も前から延髄に血管運動中枢が存在すると考えられてきたが, 長い間その同定には至らなかった. 1980年代に入り, 組織化学的手法及び神経薬理学的手法の進歩により血管運動中枢は延髄の吻側腹外側部(RVL)に存在することが明らかにされた.⁵⁻⁸⁾ 尾頭側方向には, 延髄外側網様核の吻側端から疑核の吻側緻密部(後顔面神経核)まで, 背腹側方向には疑核のすぐ腹側から腹側表面にまで広がる領域である.

RVLには交感神経性ニューロンが存在し, これが脊髄の中間外側核(IML)に存在する血管支配交感神経の節前細胞へと投射している(Fig. 1). この交感神経性ニューロンはペースメーカーとして働いていて絶えず交感神経を活性化し血管の持続的な収縮を引き起こすことにより血圧の維持に機能している.⁹⁾ ラットにおいてはその数100個程度と言われている.

RVLの交感神経性ニューロンは, また, 末梢及び中枢からの血圧に係わる情報を受けこれらを統合している. 延髄尾側腹外側部(CVL)から圧受容器反射情報を, 孤束核(NTS)から化学受容器反

射情報を, また, 脊髄から感覚受容器反射情報を受けている. 視床下部を始め扁桃核, 小脳室頂核, 中脳水道周囲灰白質, 青斑核, 縫線核, 延髄外側被蓋野, 最後野からも直接, 間接に情報を受けている.

RVLには, 抑制性アミノ酸の γ -aminobutyric acid (GABA), 興奮性アミノ酸のL-glutamate/aspartate, その他catecholamines, serotonin, substance Pを始め多くの生体内活性物質を含有するニューロンが終末し交感神経性ニューロン活動の調節に関与している.¹⁰⁾ 例えば, GABAはCVLからの抑制性入力の伝達物質として機能し, その一部は圧受容器反射の伝達に関与している.¹¹⁾ L-glutamate/aspartateは孤束核からの興奮性入力の伝達物質として機能し, その一部は化学受容器反射を伝達している.^{12,13)}

RVLにはまたacetylcholineを含有する神経終末, acetylcholineの受容体であるムスカリン受容体が密に存在している.¹⁴⁻¹⁶⁾ RVLへacetylcholineを投与すると血圧上昇を生じ, この血圧上昇はムスカリン受容体拮抗薬のscopolamineにより遮断される. RVL交感神経性ニューロンの活動もacetylcholineにより増大しその増大はscopolamineにより遮断される. これらの事実は, RVLにはアセチルコリン系が存在していて昇圧性に機能していることを示唆している.

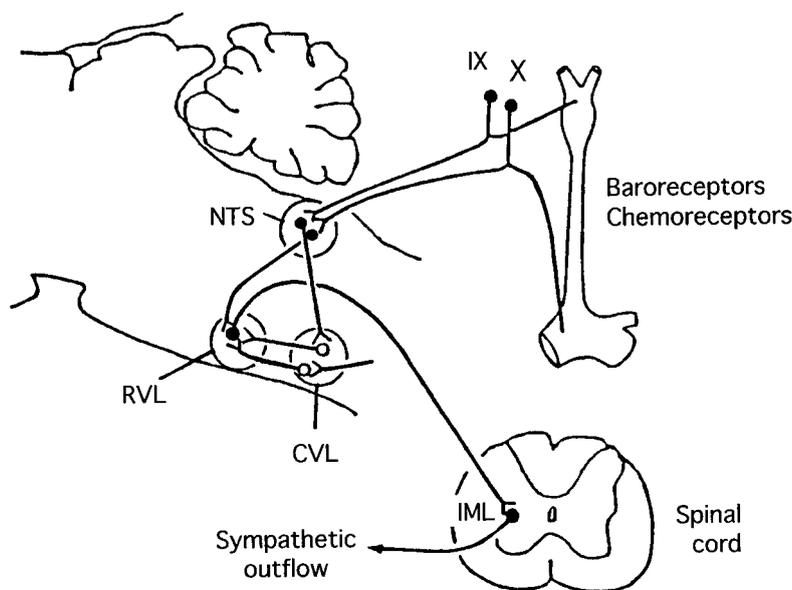


Fig. 1. Central Pathways Mediating Basal and Reflex Controls of Sympathetic Outflow

Filled circles: excitatory neurons, open circles: inhibitory neurons. CVL: caudal ventrolateral medulla, IML: intermediolateral nucleus, NTS: nucleus tractus solitarius, RVL: rostral ventrolateral medulla, IX: glossopharyngeal nerve, X: vagus nerve.

筆者は、まず、この RVL アセチルコリン系が先に述べた静脈内注射時の physostigmine の昇圧作用に関与しているか否かを検討した。Physostigmine を RVL 交感神経性ニューロン上へ電気泳動適用すると同ニューロン発火が増大した。¹⁷⁾ このニューロン発火の増大は同ニューロン上への scopolamine 電気泳動適用により抑制された。Physostigmine を静脈内注射するとやはり RVL 交感神経性ニューロン発火が増大しこの発火増大も同ニューロン上への scopolamine 電気泳動適用により抑制された。また、physostigmine の静脈内注射による昇圧作用も RVL へ微量投与した scopolamine により抑制された。これらの結果は、physostigmine を静脈内注射すると、RVL 交感神経性ニューロンが刺激されこれが交感神経活性を増大することにより昇圧反応が生じることを示唆する。

SHR の脳のどこかで acetylcholine の遊離が増大していることを先に示唆した。上記の結果から推察すると、SHR の RVL で acetylcholine の遊離が増大しているのではないかと予想される。実際、微小透析法を応用して RVL を Ringer 液で灌流すると、予想通り、灌流液中の acetylcholine 量は SHR において 2 倍以上に増大していることを見出した (Fig. 2)。¹⁸⁾ また、acetylcholine 遊離量の指標とされるコリンアセチルトランスフェラーゼ活性が SHR の RVL において増大していた。Physostigmine の RVL 微量投与による昇圧反応は WKY に比較して SHR において亢進していたが、直接にムス

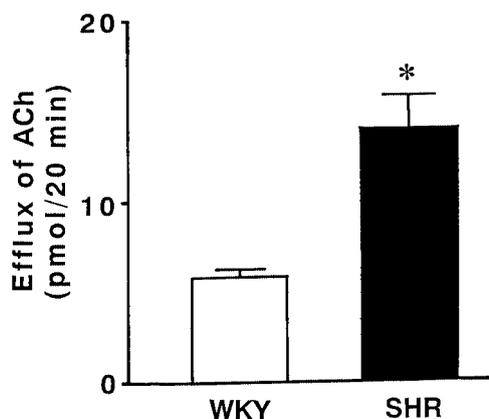


Fig. 2. Acetylcholine Efflux from RVL in WKY and SHR

The RVL was perfused with Ringer solution in Wistar Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR), and the average of acetylcholine (ACh) levels in 3 consecutive samples beginning 150 min after the start of perfusion was determined.

カリン受容体を刺激する acetylcholine 及び carbachol による昇圧反応は SHR と WKY の間に差はなかった。さらに重要な事実として、scopolamine を RVL へ微量投与すると血圧が下降しその血圧下降も WKY に比較して SHR で亢進していることを見出した。これらの結果は、RVL からの acetylcholine 遊離が SHR において増大していることが SHR の高血圧に寄与していることを示している。

それでは、いかなる機序で RVL からの acetylcholine 遊離が SHR において増大しているのだろうか。そこでまず、RVL へのアセチルコリン入力に係わる神経機構の検討を行った。

3. RVL へのアセチルコリン入力

逆行性輸送トレーサーを使用した組織化学的研究及び電気生理学的研究から、RVL は外側結合腕傍核 (LPBN)、中脳中心灰白質 (CG) 及び視床下部室傍核 (PVN) から神経投射を受けていることが証明されている。¹⁹⁻²⁶⁾ まず、これらの部位が RVL へのアセチルコリン入力に関与しているか否かを検討した。

外側結合腕傍核へニューロン興奮薬である L-glutamate を微量投与すると、血圧上昇と RVL 交感神経性ニューロン活動の増大が生じた。²⁷⁾ 本血圧上昇作用は、RVL への scopolamine 微量投与により抑制され physostigmine の微量投与により増強された。RVL ニューロン活動の増大も、また、同ニューロン上への scopolamine 電気泳動適用により抑制され physostigmine の電気泳動適用により増強された。さらに、外側結合腕傍核へ L-glutamate を微量投与すると RVL からの acetylcholine 遊離が増大した。これらの結果は、外側結合腕傍核に存在するニューロンは RVL へのアセチルコリン入力に関与していることを示唆する。

中脳中心灰白質へ L-glutamate を微量投与するとやはり血圧上昇と RVL 交感神経性ニューロン活動の増大が生じた。²⁸⁾ 本血圧上昇作用は、RVL への scopolamine 微量投与により抑制され physostigmine の微量投与により増強された。RVL ニューロン活動の増大もまた同ニューロン上への scopolamine 電気泳動適用により抑制された。さらに、中脳中心灰白質へ L-glutamate を微量投与すると RVL からの acetylcholine 遊離が増大した。これらの結果は、中脳中心灰白質に存在するニューロンは

RVL へのアセチルコリン入力に関与していることを示唆する。なお、中脳中心灰白質のニューロンは RVL のみならず外側結合腕傍核へも投射していることが組織化学的に証明されている。²⁰⁻²³⁾

視床下部の室傍核を電気刺激するとやはり血圧上昇と RVL 交感神経性ニューロン活動の増大が生じた。²⁹⁾ 本血圧上昇作用は、RVL への scopolamine 微量投与により抑制され physostigmine の微量投与により増強された。RVL ニューロン活動の増大も、また、同ニューロン上への scopolamine 電気泳動適用により抑制され physostigmine の電気泳動適用により増強された。さらに、室傍核へ L-glutamate を微量投与すると RVL からの acetylcholine 遊離が増大した。これらの結果は、室傍核に存在するニューロンは RVL へのアセチルコリン入力に関与していることを示唆する。なお、室傍核のニューロンは RVL のみならず中脳中心灰白質及び外側結合腕傍核へも投射していることが組織化学的に証明されている。^{22,30)}

外側結合腕傍核、中脳中心灰白質及び視床下部室傍核からは直接に RVL へ投射するコリン作動性ニューロンは見い出されていない。¹⁸⁾ したがって、多分、RVL の近傍に存在するコリン作動性ニューロンが介在ニューロンとして最終的に RVL へ投射していると推察される。

以上、外側結合腕傍核、中脳中心灰白質及び視床下部室傍核は RVL へのアセチルコリン入力に関与していることが明らかとなった。SHR においては、これらのアセチルコリン入力が増大していて、そのため RVL からの acetylcholine 遊離が増大し高血圧が発症している可能性が考えられる。実際、中脳中心灰白質、³¹⁾ 視床下部室傍核³²⁾ を破壊しておくとも SHR の高血圧発症が抑制されることが報告されている。

しかし、これらの3部位はあくまでも中継点であろうと考えられる。SHR においてはさらに上位中枢のどこかに異常な興奮発生部位が存在し、その異常興奮がこれらの部位を経由して RVL へ伝達されて acetylcholine 遊離の増大が生じているのだろうと考えられる。そこで次に SHR 脳の異常興奮部位としての脳アンジオテンシン系亢進部位の探索を行った。

4. SHR 脳アンジオテンシン系の亢進部位

脳内アンジオテンシン系の亢進が SHR の高血圧発症に関与していることは繰り返し示唆されてきている。³³⁻³⁸⁾ その亢進部位を探索するために、アンジオテンシン AT1 受容体拮抗薬の losartan を脳内各部位へ投与し血圧が下降する部位を検討した。³⁹⁾ その結果、視索前野内側部と視床下部腹内側核の間でかつ視神経交叉の背側に存在する、視床下部前野 (AHA) と呼ばれる部位を見出した (Fig. 3)。すなわち、losartan を AHA へ微量投与すると SHR においては血圧が下降したが WKY においては血圧が下降しなかった。逆に、AHA へ angiotensin II を微量投与すると血圧が上昇しその血圧上昇は SHR において著明に亢進していた。これらの結果は、SHR の AHA においてアンジオテンシン系が亢進していてこれが高血圧に関与していることを示唆している。

次に、この AHA と先に見い出した RVL アセチルコリン系との関連を検討した。⁴⁰⁾ AHA を電気刺激すると血圧上昇と RVL 交感神経性ニューロン活動の増大が生じた。本血圧上昇作用は、RVL への scopolamine 微量投与により抑制され physostigmine の微量投与により増強された。RVL ニューロン活動の増大も、また、同ニューロン上への scopolamine 電気泳動適用により抑制され physostigmine の電気泳動適用により増強された。さらに、AHA を電気刺激すると RVL からの acetylcholine 遊離が増大した。これらの結果は、確かに、AHA と RVL アセチルコリン系がつながっていることを示唆している。

AHA のアンジオテンシン系と RVL のアセチルコリン系もつながっていると予想される。実際、AHA への angiotensin II 微量投与による血圧上昇作用は RVL への scopolamine 微量投与により抑制された。⁴⁰⁾ また、acetylcholine の分解を抑制しておいたラットにおいて、angiotensin II を AHA へ微量投与すると RVL の acetylcholine 含量が増大することを見出した。これは、angiotensin II を AHA へ微量投与すると RVL からの acetylcholine 遊離が増大することを示唆している。これらの結果は、AHA のアンジオテンシン系が刺激されると RVL からの acetylcholine 遊離が増大しこれにより血圧上昇が生じることを示唆している。

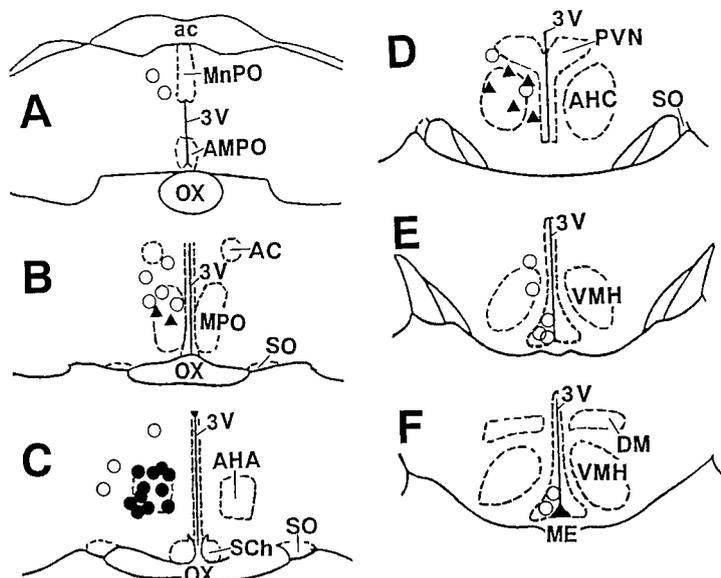


Fig. 3. Distribution of Losartan Microinjection Sites in Tissues around Rostral Parts of the Third Ventricle in SHR

Closed circles and closed triangles represent sites where an injection of losartan (0.22 nmol) caused decreases of more than 10 mmHg and of 5–9 mmHg, respectively, in mean blood pressure. Open circles indicate sites which no or only a small decrease in mean blood pressure was evoked. ac: anterior commissure, AHA: anterior hypothalamic area, anterior, AHC: anterior hypothalamic area, central, AMPO: anterior medial preoptic area, DM: dorsomedial hypothalamic nucleus, MnPO: median preoptic nucleus, OX: optic chiasm, PVN: paraventricular hypothalamic nucleus, Sch: supraoptic nucleus, SO: supraoptic hypothalamic nucleus, VMH: ventromedial hypothalamic nucleus.

以上の結果から推察すると、SHRにおいてみられた RVL acetylcholine 遊離の増大と AHA アンジオテンシン系の亢進は連関しているだろうと予想される。実際、AHA へ losartan を微量投与して AHA のアンジオテンシン系を抑制しておくと、RVL への physostigmine 微量投与による血圧上昇作用が SHR においては抑制されたが WKY においては抑制されなかった。⁴⁰⁾ これは、SHR においてみられる RVL acetylcholine 遊離の増大は AHA アンジオテンシン系の亢進に由来していることを示唆する。

それではこの AHA アンジオテンシン系から RVL アセチルコリン系へ至る連絡に先に示した外側結合腕傍核及び視床下部室傍核が中継点として関与しているのだろうか。GABA を微量投与して外側結合腕傍核あるいは視床下部室傍核を抑制しておくと、AHA の電気刺激による昇圧反応が抑制されることを見出した。⁴⁰⁾ この結果は、AHA から RVL への連絡に外側結合腕傍核及び視床下部室傍核が少なくとも一部に中継点として関与していることを示唆する。

AHA の昇圧部位の電気刺激による Fos 蛋白発現と RVL からの逆行性輸送トレーサーを組み合わせた研究により、AHA から中脳中心灰白質を経由し

て RVL へ達する経路が血圧上昇の伝導路であることが示唆されている。⁴¹⁾ また、ネコの AHA 電気刺激による冠動脈血管収縮にも RVL ニューロンが関与していることが示唆されている。⁴²⁾

以上から、SHR の RVL における acetylcholine 遊離の増大は実は AHA アンジオテンシン系の亢進に由来していることが明らかになった。次の問題は AHA アンジオテンシン系とはどのような機構であるのかである。これを明らかにするために、angiotensin II により興奮する AHA ニューロンの性質を電気生理学的に検討した。

5. AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン機構

麻酔ラットを使用して AHA に存在するニューロンの電気活動を細胞外誘導記録した。三連ガラス微小電極（先端 1.5–3.0 μm ）を使用して 1 本の電極からニューロンの電気活動を誘導し、他の 2 本から同ニューロン上へ angiotensin II, losartan 等の薬物を加圧適用 (10 psi) した。AHA から記録されたニューロンのうち、約 45% のニューロンは angiotensin II (10^{-7} M) の加圧適用 (10 psi, 5 s) により発火頻度が増大した (Fig. 4(A), (B)).⁴³⁾ このアンジオテンシン II 感受性ニューロンの自発発火頻度は 4.6 ± 0.2 spikes/s ($n=115$) であった。An-

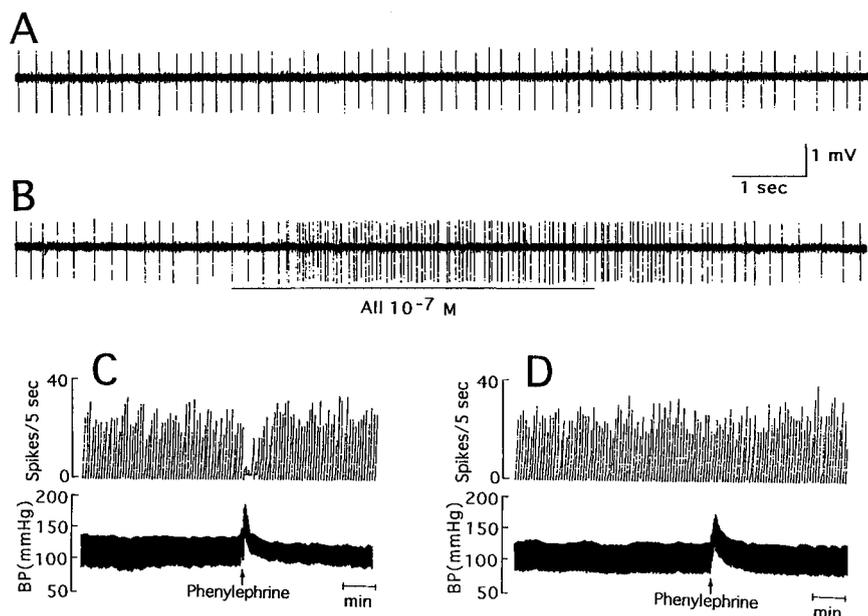


Fig. 4. Firing Responses of AHA Angiotensin II-sensitive Neurons to Angiotensin II and Phenylephrine

A and B show firings of an AHA angiotensin II-sensitive neuron before (A) and during (B) pressure application (10 psi) of angiotensin II (AII) in a Wistar rat. C and D show firing responses to intravenous phenylephrine (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in baroreceptor-intact (C) and baroreceptor-denervated (D) rats.

angiotensin II の 3×10^{-8} M 及び 10^{-7} M は濃度依存性に発火頻度を増大した。この発火頻度の増大は angiotensin II 10^{-7} M 加圧適用開始 1 秒以内に始まり、加圧適用終了後 2—5 秒で消失した。この angiotensin II による発火頻度の増大は、アンジオテンシン AT1 受容体拮抗薬の losartan により抑制されたが、アンジオテンシン AT2 受容体拮抗薬の PD123319 によっては影響を受けなかった。したがって、この angiotensin II による発火頻度の増大は AT1 受容体を介していると考えられる。

それでは、AHA に存在している内在性の angiotensins はこのアンジオテンシン II 感受性ニューロンの活動に関与しているのだろうか。Angiotensin II の前駆物質である angiotensin I (10^{-6} M) を加圧適用 (10 psi, 10 s) するとやはりアンジオテンシン II 感受性ニューロンの発火頻度が増大した。この発火頻度の増大は加圧適用開始後 30 秒から始まり 40—60 秒間持続した。この angiotensin I による発火頻度の増大は losartan 及びアンジオテンシン変換酵素阻害薬の captopril により抑制された。一方、losartan (3×10^{-8} — 10^{-6} M) を単独で加圧適用するとアンジオテンシン II 感受性ニューロンの自発発火は濃度依存性に抑制され、 10^{-6} M ではほぼ完全に抑制された。Captopril (10^{-6} M) の単独加

圧適用によっても同ニューロンの発火は抑制された。これらの結果は、AHA にはアンジオテンシン II 感受性ニューロンが存在し、これらのニューロンは、新しく合成され遊離された、内在性 angiotensins によって緊張性に活性化されていることを示唆する。

それではこの内在性 angiotensins はどこから遊離されるのだろうか、シナプスを介して神経性に遊離されているのだろうか。これを検討するためにカルモジュリン拮抗薬の *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride (W7) を使用した。すなわち、筆者らは、既に、W7 の 5×10^{-5} M を使用すると脳内伝達物質である glutamate のシナプス性遊離を遮断できることを見出ししている。また後述するように、中隔野外側部への carbachol 投与、⁴⁴⁾ 扁桃体内側部への corticotropin releasing factor (CRF) 投与、⁴⁵⁾ NaCl 溶液の脳室内投与⁴⁶⁾ により AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの発火頻度が増大すること、そしてこれらの AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン発火の増大にはそれぞれ glutamate, angiotensins 及びそれ以外の伝達物質の入力が関与していることも見出ししている。そこでまず、W7 (5×10^{-5} M) を AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン上へ加

圧適用した。その結果、中隔野外側部への carbachol 投与、扁桃体内側部への CRF 投与及び NaCl 溶液の脳室内投与によるアンジオテンシン II 感受性ニューロン発火の増大はやはりすべて完全に消失した (Fig. 5).⁴⁷⁾ 一方、この W7 (5×10^{-5} M) は、angiotensin II の加圧適用による AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン発火の増大には影響を与えなかった。これらの結果は、この濃度の W7 の加圧適用が AHA ニューロンへのシナプス入力をも遮断できることを示唆している。そこで、この条件下に W7 を AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン上へ単独で加圧適用した。しかし、同ニューロンの発火は全く影響されなかった。ところが、W7 の代わりに losartan (10^{-6} M) を AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン上へ単独で加圧適用すると、前述したように同ニューロン発火は消失した。これらの結果は、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンは内在性 angiotensins によって絶えず活性化されているが、その angiotensins はシナプスを介して神経性に遊離されたものではないことを示唆する。内在性 angiotensin II はニューロンのみならずグリア細胞にも存在することが証明されていることから、⁴⁸⁾ AHA アンジオテンシン II

感受性ニューロンは多分グリア細胞からパラクリン性に遊離された angiotensin II によって緊張性に活性化されていると推察される。

AHA にはムスカリン受容体も存在しその刺激によっても血圧が上昇する。³⁹⁾ しかし、acetylcholine をアンジオテンシン II 感受性ニューロン上へ加圧適用しても発火頻度に影響を与えなかった。⁴³⁾ 他方、アンジオテンシン II 非感受性ニューロンの一部は acetylcholine により反応し発火頻度が増大した。したがって、AHA においては angiotensin II も acetylcholine もともに昇圧性に作用するが、アンジオテンシン II 感受性ニューロンとアセチルコリン感受性ニューロンは別々のニューロンであると考えられる。

AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンは、また、圧受容器反射にも関与している。すなわち、nitroprusside を静脈内注射して血圧を下げると、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの発火頻度が増大した。⁴⁹⁾ この発火頻度の増大は同ニューロン上への losartan 加圧適用により消失した。また、この発火頻度の増大は、視床下部後核への scopolamine 微量投与により抑制され physostigmine 微量投与により増強された。⁵⁰⁾ さらに、この発

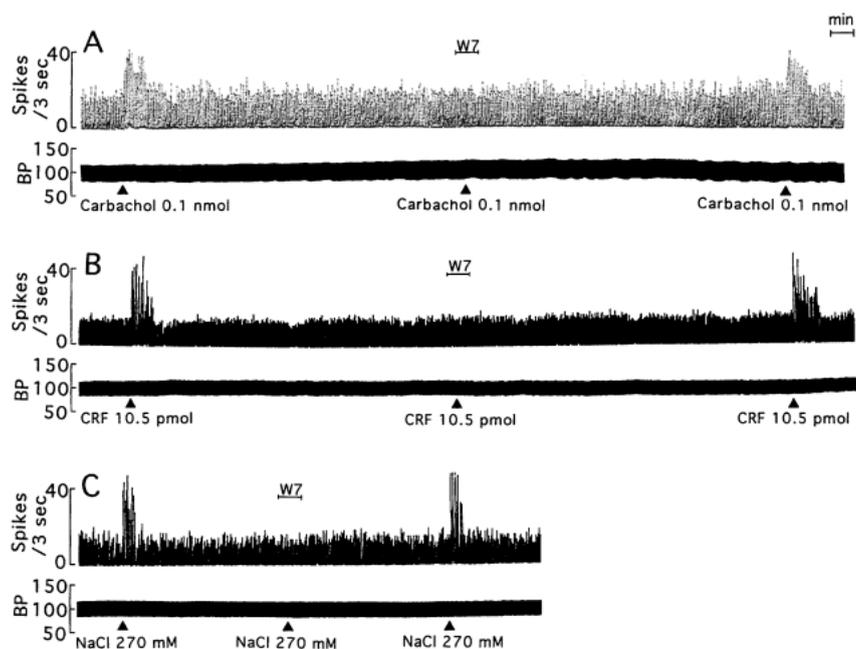


Fig. 5. Synaptic Inputs to AHA Angiotensin II-sensitive Neurons and Effects of W7 on These Synaptic Inputs

Microinjection of carbachol into the lateral septal area (LSV) (A), microinjection of corticotropin releasing factor (CRF) into the medial amygdaloid (MeA) (B) and intraventricular injection of hypertonic saline (NaCl) (C) increased firings of AHA angiotensin II-sensitive neurons in Wistar rats. W7 (5×10^{-5} M) pressure-applied onto the same neurons abolished the carbachol-, CRF- and NaCl-induced increases in firing rate.

火頻度の増大は圧受容器神経を除神経しておくで消失した。以上の結果は、血圧が下降すると孤束核を経由してまず視床下部後核アセチルコリン系が活性化され、これにより AHA へのアンジオテンシン入力が増大して AHA ニューロン活動の増大が生じると推察される。逆に、phenylephrine を静脈内注射して血圧を上げると、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの発火がほぼ完全に消失した (Fig. 4(C), (D)).⁴⁹⁾ この発火の抑制は、同ニューロン上への GABA 受容体拮抗薬の bicuculline の加圧適用により消失し、GABA 取り込み抑制薬の nipectic acid の加圧適用により増強された。以上の結果は、血圧が上昇すると GABA 入力が増大しこれにより AHA ニューロン活動の抑制が生じることを示唆する。

6. AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンと高血圧

前述したように、AHA アンジオテンシン系は SHR において亢進していることから、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの活性が SHR において亢進していると予想される。実際、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの自発発火頻度は 15—16 週齢雄性 WKY において 4.4 ± 0.1 spikes/s ($n=73$) であるのに対して、同週齢雄性 SHR のそれは 7.5 ± 0.1 spikes/s ($n=77$) であった ($p<0.05$)。⁵¹⁾ この自発発火頻度は圧受容器神経を除神経しても変化しなかった。したがって、この SHR と WKY 間の発火頻度の差は全身麻酔薬による血圧下降作用によって二次的に生じたものではないと考えられる。

AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの自発発火は内在性 angiotensins により生じていることから、この SHR における発火頻度の増大は、1 つには内在性 angiotensins の遊離が増大しているか、あるいは angiotensin II に対する感受性が亢進していることによる可能性が考えられる。微小透析法を応用して AHA を Ringer 液で灌流すると、灌流液中の angiotensins 量は WKY において 4.6 ± 0.4 pg/40 min ($n=7$)、SHR において 6.3 ± 0.6 pg/40 min ($n=7$) であった ($p<0.05$)。³⁹⁾ 一方、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンに対する angiotensin II の反応閾値は WKY において 3×10^{-8} M、SHR において 3×10^{-9} M であり ($p<0.001$)、実に、

angiotensin II の感受性が SHR において 10 倍亢進していた。⁵²⁾ 以上から、SHR における AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの自発発火の増大は、内在性 angiotensins 遊離の増大が一部に寄与しているけれども主として angiotensin II の感受性亢進が関与していると考えられる。

この angiotensin II の感受性亢進及び自発発火頻度の増大は高血圧発症以前である 4 週齢雄性 SHR においても既に同程度に認められた。⁵³⁾ したがって、SHR におけるこれらの変化は高血圧発症により二次的に生じたものではなく、SHR に生来備わった性質であると考えられる。

AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの自発発火に係わる内在性 angiotensins は、正常血圧ラットにおいてはシナプスを介して神経性に遊離されたものではなく、多分グリア細胞等から遊離された angiotensin II に由来していることを先に示唆した。しかし、W7 を SHR の AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン上へ加圧適用すると軽度ではあるが同ニューロンの自発発火が抑制されることを見出ししている (未発表)。したがって、SHR においては、シナプスを介さずに遊離された内在性 angiotensins に加えて、ごく一部ではあるがシナプスを介して遊離された内在性 angiotensins も自発発火の発現に関与していると考えられる。この考え方と一致して、視床下部後核へ scopolamine を微量投与して視床下部後核のアセチルコリン系を抑制すると、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン発火が SHR においてのみ軽度に抑制されることを見出ししている。

7. AHA アンジオテンシン系とストレス・食塩

以上から AHA は高血圧の発症に重要な中枢であると考えられる。そうだとすれば、高血圧の発症に係わる環境因子であるストレス及び食塩による高血圧発症にも AHA が関与しているのではないかと予想される。

まず、ストレスと AHA アンジオテンシン系との関連について検討を行った。両側の AHA へ losartan を微量投与しておく、情動ストレスの 1 つである拘束ストレス負荷による血圧上昇及び交感神経活性の増大が抑制された。⁵⁴⁾ この結果は、確かに AHA アンジオテンシン系は情動ストレスによる血圧上昇に関与していることを示唆する。

それではどのような機序でストレス時に AHA アンジオテンシン系が活性化されるのだろうか。これを検討するために、まず、神経興奮の指標とされる Fos 蛋白の免疫組織化学的染色を応用し、拘束ストレス負荷により活性化されるニューロン部位を探索した。その結果、ストレスにより、中隔野外側部 (LSV)、扁桃体内側部 (MeA) 及び視床下部後核 (PHN) のニューロンが特に強く興奮することを認めた。⁵⁵⁻⁵⁷⁾

中隔野外側部は、AHA へ密に神経投射している情動ストレス時の心血管反応の発現に関与していることが示唆されている。⁵⁸⁻⁶¹⁾ 実際、中隔野外側部のニューロンを化学的に抑制しておくことと拘束ストレス負荷に伴う血圧上昇が抑制された。⁵⁵⁾ 中隔野外側部にはまた昇圧に係わるアセチルコリン系が存在している。^{2,3)} 実際、中隔野外側部にコリン作動薬の carbachol を微量投与すると血圧上昇が生じ、その血圧上昇はムスカリン受容体拮抗薬の 4-diphenylacetoxymethylpiperidine (4-DAMP) により抑制された。^{62,63)} また、拘束ストレス負荷に伴う血圧上昇も中隔野外側部への 4-DAMP の微量投与により抑制された。⁶²⁾ そこで、中隔野外側部アセチルコリン系と AHA ニューロンとの関連を調べるために carbachol を中隔野外側部へ微量投与したところ、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの発火頻度が増大した (Fig. 5 (A)).⁴⁴⁾ この発火頻度の増大は、同ニューロン上への興奮性アミノ酸拮抗薬の kynurenate 加圧適用により抑制されたが、losartan の加圧適用によっては抑制されなかった。これらの結果は、中隔野外側部アセチルコリン系が刺激されると興奮性アミノ酸入力を介して AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン活動の増大が生じることを示唆する。

扁桃体内側部も、また、AHA へ神経投射している情動ストレス時の心血管反応の発現に関与していることが示唆されている。⁶⁴⁻⁶⁹⁾ 実際、扁桃体内側部のニューロンを化学的に抑制しておくことと拘束ストレス負荷に伴う血圧上昇が抑制された。⁵⁶⁾ 扁桃体内側部と AHA ニューロンとの関連を調べるために L-glutamate を扁桃体内側部へ微量投与したところ、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの発火頻度が増大した (Fig. 5 (B)).⁴⁵⁾ この発火頻度の増大は同ニューロン上への losartan の加圧適用によ

って抑制された。また、L-glutamate を扁桃体内側部へ微量投与すると AHA からの angiotensins 遊離が増大した。これらの結果は、扁桃体内側部のニューロンが刺激されるとアンジオテンシン入力を介して AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン活動の増大が生じることを示唆する。

脳内 corticotropin releasing factor (CRF) はストレスの発現に重要な役割を果たしている。⁷⁰⁾ 扁桃体内側部には CRF 及び CRF 受容体が分布していて、ストレス時にそれらの発現が増大することが報告されている。⁷¹⁻⁷³⁾ そこで扁桃体内側部へ CRF を微量投与したところ、やはり、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの発火頻度が増大した。⁴⁵⁾ しかし、この発火頻度の増大は同ニューロン上への losartan あるいは kynurenate の加圧適用によって抑制されなかった。これらの結果は、扁桃体内側部の CRF 受容体が刺激されると AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン活性の増大が生じるが、この入力には angiotensins 及び興奮性アミノ酸は関与していないことを示唆する。

視床下部後核も AHA へ密に神経投射している。⁷⁴⁾ 視床下部後核は行動時の心血管、呼吸及び運動機能の調節に重要な中枢である。視床下部後核にも昇圧に係わるアセチルコリン系が存在し、ムスカリン受容体が刺激されると血圧が上昇する。^{3,75,76)} この視床下部後核アセチルコリン系と AHA ニューロンとの関連を調べるために carbachol を視床下部後核へ微量投与したところ、AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロンの発火頻度が増大した。^{77,78)} この発火頻度の増大は同ニューロン上への losartan の加圧適用によって抑制された。これらの結果は、視床下部後核のアセチルコリン系が刺激されるとアンジオテンシン入力を介して AHA アンジオテンシン II 感受性ニューロン活動の増大が生じることを示唆する。

以上述べたように、AHA アンジオテンシン系が情動ストレス負荷に伴う血圧上昇に関与していること、そして扁桃体内側部及び視床下部後核は情動ストレスに係わっていてこれらの部位の刺激が AHA ニューロンへのアンジオテンシン入力を増大することから、情動ストレス負荷により、まず、扁桃体内側部及び視床下部後核のニューロンが刺激され、次にこれらの刺激が AHA アンジオテンシン II 感受

性ニューロンへのアンジオテンシン入力が増大を生じると推察される。

次に、食塩とAHAアンジオテンシン系との関連についての検討を行った。食塩の過剰摂取が高血圧を引き起こすことは周知の通りである。その機序は、高食塩食摂取により脳内Na⁺濃度が上昇しこれにより脳レニン・アンジオテンシン系が活性化されて血圧上昇が生じると考えられている。⁷⁹⁾ 実際、脳内Na⁺濃度を上昇すると脳アンジオテンシン系が活性化され血圧上昇が生じる。⁸⁰⁻⁸⁴⁾ そこで、ラットに高食塩餌を与える代わりにNaCl溶液を脳室内へ投与することにより脳内Na⁺濃度を上昇させた。NaCl (270 mM) を脳室内投与 (10 μ l) するとAHAアンジオテンシンII感受性ニューロン発火が増大した (Fig. 5(C)).⁴⁶⁾ しかし、同濃度のLiClを投与してもニューロン発火は変化しなかった。この脳室内NaCl投与によるAHAニューロン発火の増大は、同ニューロン上へのlosartanの加圧適用により消失した。また、このNaCl投与によるニューロン発火の増大は、アミロライド感受性Naチャンネル拮抗薬のbenzamilの脳室内投与によっても消失した。以上の結果は、脳脊髄液中のNa⁺濃度が上昇すると、まず脳Naチャンネルが刺激されこれによりAHAアンジオテンシンII感受性ニューロン活動の増大が生じること、そしてこのAHAニューロン活動の増大にもアンジオテンシン入力に関与していることを示唆する。実際、脳室内へNaCl溶液を投与するとAHAからのアンジオテンシン遊離が増大することを見い出している。また、脳室内NaCl投与による血圧上昇もAHAへのlosartan微量投与により抑制されることを見い出している。なお、脳室内投与したNaClの作用点に関して、脳室周囲系器官の1つである脳弓下器官 (SFO) を破壊しておくこととAHAアンジオテンシンII感受性ニューロン発火の増大が抑制されることを観察している (未発表)。

高食塩摂取によってすべてのヒトが高血圧を発症する訳ではなく、高血圧になり易いヒトなり難いヒトに分けることができる。動物においても、SHRは一般にWKYと比較して食塩感受性が高い。そこでNaClの脳室内投与によるAHAニューロン活動増大作用をSHRとWKY間で比較したところ、その感受性がSHRにおいて著明に亢進していること

が認められた。⁸⁵⁾ すなわち、NaClによるニューロン発火増大閾値はSHRにおいては 220 ± 0 mM ($n=39$)、WKYにおいては 247 ± 1 mM ($n=34$)であった ($p<0.05$)。SHRにおけるこのNaCl感受性亢進の機序として、脳室内投与したNaClによるAHAニューロン活動の増大は、主にアンジオテンシン入力を介して生じているから、SHRにおけるAHAニューロンに対するangiotensin IIの感受性亢進が大きく関与していると推察される。なお、脳室内投与したNaClによる血圧上昇作用もSHRにおいて同様に亢進していた。⁸⁶⁾

Dahlラットも食塩感受性 (Dahl S) と食塩非感受性 (Dahl R) に分けられている。脳室内投与したNaClの感受性及びAHAニューロンに対するangiotensin IIの感受性ともにやはりDahl Sラットにおいて亢進していることを見い出している。⁸⁶⁾ SHR及びDahl Sラットにおいて認められたこの脳内NaCl感受性亢進はこれらの動物における食塩感受性亢進に関与していると考えられる。以上の結果から、AHAアンジオテンシン系は食塩による高血圧発症にも関与している可能性があると考えられる。なお、Oparilらは、AHAのnoradrenaline及びatrial natriuretic peptideも高食塩負荷による高血圧発症に関与していることを見い出している。⁸⁷⁾

8. SHRにおけるアンジオテンシンII感受性亢進の分子機序

AHAアンジオテンシン系がSHRにおいて亢進していて、これは主にアンジオテンシンII感受性ニューロンに対するangiotensin IIの感受性亢進に由来していることを先に示唆した。このSHRにおけるangiotensin II感受性亢進の分子機序を次に検討した。

視床下部アンジオテンシンAT1受容体の発現がSHRにおいて増大していることはよく知られている。⁸⁸⁻⁹¹⁾ 筆者らも、実際、視床下部AT1受容体mRNAの発現及びAT1受容体数がSHRにおいて増大していることを確認した。このAT1受容体発現増大の機序として、1つにはAT1受容体遺伝子プロモーター領域に変異があるか、あるいはAT1受容体遺伝子発現に係わる転写因子に異常がある可能性が考えられる。^{92,93)} まずAT1受容体遺伝子プロモーター領域を含む核酸配列 (-2050/+57) を解読したところ、SHRの-1613においてAからT

への変異が認められた。⁹⁴⁾しかし、-2050/+57の転写活性をルシフェラーゼアッセイしたところ、むしろSHRにおいてその発現が低いことが認められ、この変異はSHRのAT1受容体発現増大に関与していないことが推定された。

AT1受容体遺伝子プロモーター領域には転写因子であるSp1, AP1及びAP2の結合部位、cAMP response element, glucocorticoid response elementなどが存在する。ゲルシフト法によりこれらの部位に結合する転写因子量をSHR及びWKYの視床下部細胞核分画を使用して検討した。その結果、アンジオテンシンAT1受容体の発現に重要な転写因子である、⁹⁵⁾Sp1がSHRにおいて増大していることを見出した。⁹⁶⁾ウェスタンブロット法でもSHRにおいてSp1蛋白が増大していた。転写因子結合部位の核酸配列断片(デコイODN)を使用すれば転写因子はこちらに多く結合するため本来のプロモーター結合部位には結合できずその転写因子の活性を止めることができる。^{97,98)}Sp1のデコイODN(5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3')を作成してSHRの脳室内へ投与したところSHRの血圧が下降した。このとき、視床下部アンジオテンシンAT1受容体遺伝子の発現及びAT1受容体数が減少していた。これらの結果から、SHRにおいてはSp1転写因子の発現が増大していて、これがAT1受容体の発現増大、さらにはangiotensin IIの感受性亢進に寄与していると考えられる。実際、脳室内投与したangiotensin IIによる昇圧反応はSp1デコイODN処置SHRにおいて減弱していた。

SHRのangiotensin II感受性亢進の機序としてもう1つ考えられるのは細胞内情報伝達系の異常である。ニューロンのアンジオテンシンAT1受容体が刺激されるとプロテインキナーゼC(PKC)が活性化され、これによりKチャネル透過性の抑制及びCaチャネル透過性の亢進を生じて神経興奮が起こることが知られている。^{99,100)}AHAアンジオテンシンII感受性ニューロン上へPKC活性化薬のphorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)を加圧適用すると発火頻度が増大し、その発火頻度の増大はWKYに比較してSHRにおいて著明に亢進していた。¹⁰¹⁾このPMAの作用はPKC拮抗薬の1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride(H-7)により抑制されたが、H7のネガティブ

コントロールであるN-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide hydrochloride(HA1004)によっては影響を受けなかった。また、angiotensin IIの加圧適用によるAHAニューロン発火の増大はやはりH7により濃度依存性に抑制され、その抑制はSHRにおいて亢進していた。さらに、H7を単独で加圧適用にするとSHRのAHAニューロンは抑制されたが、WKYのそれは影響を受けないことを見出した。これらの結果は、SHRのAHAアンジオテンシンII感受性ニューロンにおけるPKC活性が増大していて、その活性の増大がSHRにおけるangiotensin IIの感受性亢進に関与していることを示唆する。

PKCには11種以上の分子種が存在する。ニューロン興奮に係わる分子種を同定するために、1日齢のラットから作成した視床下部培養細胞を使用して神経興奮の指標とされるc-fos遺伝子の発現を検討した。PMAは濃度依存性にc-fosの発現を増大した。¹⁰²⁾PKC α , β , γ のみを刺激するthymeleatoxinも同様にc-fosの発現を増大した。一方、PKC δ , ϵ を刺激するがPKC α , β , γ を刺激できないingenolは無効であった。次にPKC α , β , γ のうちどれがc-fos遺伝子の発現に関与しているかをそれぞれのアンチセンスを使用して検討したところ、PKC β アンチセンスのみがPMAによるc-fosの発現を抑制した。これらの結果は、PKC分子種のうちPKC β が少なくとも一部にPMAのc-fos発現に関与していることを示唆する。

SHRから作成した視床下部培養細胞はWKYのそれに比較してPMAによるc-fosの発現が増大していた。このSHRにおけるc-fos発現の増大はやはりPKC β アンチセンスによって消失した。これらの結果は、SHRにおいてはPMAによるc-fos発現が増大していて、この発現増大にもPKC β が関与していることを示唆する。さらに筆者らは、15-16週齢のSHRにおいて、視床下部のPKC β 遺伝子の発現が増大していること、また、PKC β アンチセンスの脳室内投与により高血圧が下降することを見出ししている(未発表)。

9. おわりに

高血圧成因の基本的な考え方は腎機能の低下に由来するとする腎起因説である。¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾高血圧者において一貫して腎Na⁺排泄機能に低下が認められる

からである。¹⁰⁶⁾ 実際、正常血圧者の腎臓を高血圧者に移植すると高血圧が下降する。ラットにおいても、高血圧発症前の SHR の腎臓を WKY に移植すると WKY の血圧が上昇し、逆に、WKY の腎臓を高血圧発症前の SHR に移植すると SHR の高血圧の発症が抑制される。^{107,108)} 生体は、腎機能低下を償うホメオスタシス反応として、血圧を上昇させることによって Na⁺ を体外へ追い出そうとする、そしてこの血圧上昇を起こすために視床下部を亢進させて交感神経系の活性を増大するのだろうと考えられている。もう1つ、あくまでも第一義的に視床下部に異常があって、これにより高血圧が発症するのだろうとする考え方も一部にはある。胎児期の SHR の視床下部を摘出し、これを WKY に移植すると WKY の血圧が上昇するからである。^{109,110)} このとき視床下部の前部のみの移植でも血圧上昇が起こるが視床下部の後部のみの移植では無効であると言う。¹¹¹⁾ 腎起因説にしても中枢起因説にしてもいかなる機序で最終的に交感神経の活性が増大するのかは不明のままである。

本研究は、SHR において AHA のアンジオテンシン系が亢進していて、これが RVL からの acetylcholine 遊離の増大を引き起こし、交感神経活性の増大、高血圧発症へとつながっていることを明らかにした (Fig. 6)。この AHA アンジオテンシン系の亢進は主にアンジオテンシン II 感受性ニューロンに対する angiotensin II の感受性亢進に由来してい

ること、また、この angiotensin II の感受性亢進には Sp1 転写因子の発現増大による AT1 受容体の発現増大と PKC β の活性増大による細胞内情報伝達系の亢進が関与していることを示唆した。SHR におけるこの AHA アンジオテンシン系の亢進は高血圧発症前においても認められることから、この異常は SHR の生来の性質であると考えられ中枢起因説とも矛盾しない。最後に、AHA アンジオテンシン系は高血圧発症因子であるストレス・食塩による血圧上昇にも関与していることを示唆した。

以上、筆者は高血圧に係わる重要な中枢部位として AHA を同定した。さらにその上流及び下流を追求していくことにより高血圧発症機序の全貌を明らかにしていく必要がある。今後の研究に期待したい。

謝辞 本研究は、当研究室の田口恭治助教授 (現薬品作用学教育研究室教授)、福森隆次助教授 (現臨床化学分析教育研究室教授)、萩原幸彦助教授 (現薬品作用学教育研究室教授)、神戸敏江講師、大学院生、特別実習の学生の協力によるものであります。ここに慎んで感謝申し上げます。本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、日本学術振興会、私立大学学術研究高度化推進事業、小野薬品の御援助により行われました。ここに御礼申し上げます。

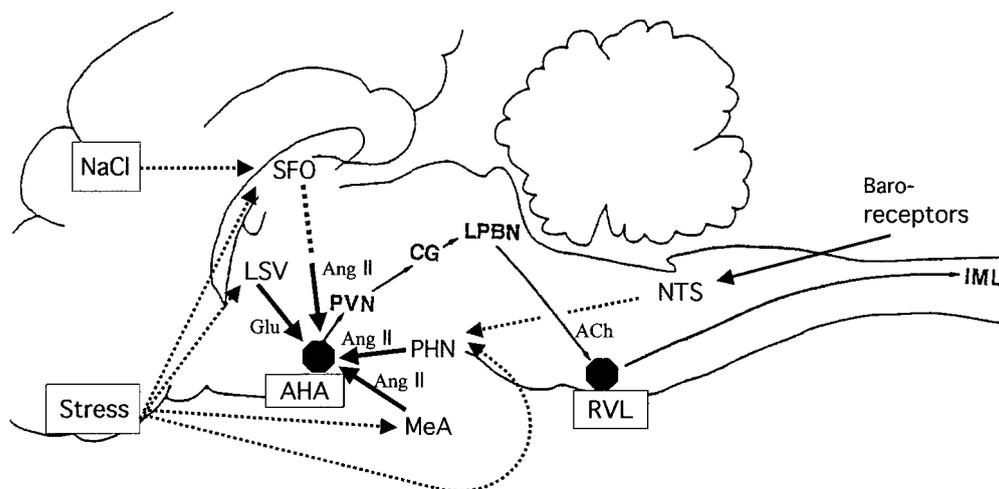


Fig. 6. Summary of Neural Connections and Neurotransmitters Described in This Paper

ACh: acetylcholine, AHA: anterior hypothalamic area, Ang II: angiotensin II, CG: periaqueductal gray matter, Glu: l-glutamate, IML: intermediolateral nucleus, LPBN: lateral parabrachial nucleus, LSV: lateral septal area, MeA: medial amygdaloid, PHN: posterior hypothalamic nucleus, PVN: hypothalamic paraventricular nucleus, RVL: rostral ventrolateral medulla, SFO: subfornical organ.

REFERENCES

- 1) Okamoto K., *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **7**, 227–270 (1969).
- 2) Brezenoff H. E., Giuliano R., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 341–381 (1982).
- 3) Buccafusco J. J., *Pharmacol. Rev.*, **48**, 179–211 (1996).
- 4) Kubo T., Tatsumi M., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **306**, 81–83 (1979).
- 5) Ross C. A., Ruggiero D. A., Park D. H., Joh T. H., Sved A. F., Fernandez-Pardal J., Saavedra J. M., Reis D. J., *J. Neurosci.*, **4**, 474–494 (1984).
- 6) Kubo T., Nagura J., Kihara M., Misu Y., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **279**, 150–161 (1986).
- 7) Willette R. N., Barcas P. P., Krieger A. J., Sapru H. N., *Neuropharmacology*, **22**, 1071–1079 (1983).
- 8) Brown D. L., Guyenet P. G., *Am. J. Physiol.*, **247**, R1009–R1016 (1984).
- 9) Sun M.-K., Young B. S., Hackett J. T., Guyenet P. G., *Brain Res.*, **442**, 229–239 (1988).
- 10) Sun M.-K., *Pharmacol. Rev.*, **48**, 465–494 (1996).
- 11) Amano M., Kubo T., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **348**, 146–153 (1993).
- 12) Amano M., Asari T., Kubo T., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **349**, 549–554 (1994).
- 13) Kubo T., Asari T., Amano M., Hagiwara Y., Fukumori R., *Neurosci. Lett.*, **232**, 103–106 (1997).
- 14) Arneric S. P., Giuliano R., Ernsberger P., Underwood M. D., Reis D. J., *Brain Res.*, **511**, 98–112 (1990).
- 15) Sundaram K., Krieger A. J., Sapru H., *Brain Res.*, **449**, 141–149 (1988).
- 16) Ernsberger P., Arango V., Reis D. J., *Neurosci. Lett.*, **85**, 179–186 (1988).
- 17) Kubo T., Taguchi K., Sawai N., Ozaki S., Hagiwara Y., *Brain Res. Bull.*, **42**, 199–204 (1997).
- 18) Kubo T., Ishizuka T., Fukumori R., Asari T., Hagiwara Y., *Brain Res.*, **686**, 1–9 (1995).
- 19) Swanson L. W., Sawchenko P. E., *Annu. Rev. Neurosci.*, **6**, 269–324 (1983).
- 20) Chen S., Aston-Jones G., *Neurosci. Lett.*, **195**, 140–144 (1995).
- 21) Farkas E., Jansen A. S. P., Loewy A. D., *Brain Res.*, **792**, 179–192 (1998).
- 22) Van Bockstaele E. J. V., Pieribone V. A., Aston-Jones G., *J. Comp. Neurol.*, **290**, 561–584 (1989).
- 23) Verberne A. J. M., Guyenet P. G., *Am. J. Physiol.*, **263**, R24–R33 (1992).
- 24) Fulwiler C. E., Saper C. B., *Brain Res. Rev.*, **7**, 229–259 (1984).
- 25) Agarwal S. K., Calaresu F. R., *Am. J. Physiol.*, **265**, R111–R116 (1993).
- 26) Ward D. G., *Brain Res.*, **462**, 383–390 (1988).
- 27) Kubo T., Hagiwara Y., Sekiya D., Fukumori R., *Brain Res.*, **789**, 23–31 (1998).
- 28) Kubo T., Hagiwara Y., Sekiya D., Fukumori R., *Brain Res. Bull.*, **50**, 41–46 (1999).
- 29) Kubo T., Hagiwara Y., Sekiya D., Chiba S., Fukumori R., *Brain Res. Bull.*, **53**, 275–282 (2000).
- 30) Krukoff T. L., Harris K. H., Linetsky E., Jhamandas J. H., *Neuroendocrinology*, **59**, 590–602 (1994).
- 31) Schenberg L. C., Brandao C. A. L., Vasquez E. C., *Hypertension*, **26**, 1125–1128 (1995).
- 32) Ciriello J., Kline R. L., Zhang T.-X., Caverson M. M., *Brain Res.*, **310**, 355–359 (1984).
- 33) Felix D., Schelling P., *Brain Res.*, **252**, 63–69 (1982).
- 34) Ganten D., Marquez-Julio A., Granger P., Hayduk K., Karsunky K. P., Boucher R., Genest J., *Am. J. Physiol.*, **221**, 1733–1737 (1971).
- 35) Healy D. P., Printz M. P., *Hypertension*, **7**, 752–759 (1985).
- 36) Naruse M., Naruse K., McKenzie J. C., Schelling P., Inagami T., *Brain Res.*, **333**, 147–150 (1985).
- 37) Nelson D. O., *Brain Res.*, **444**, 46–52 (1988).
- 38) Weyhenmeyer J. A., Phillips M. I., *Hypertension*, **4**, 514–523 (1982).
- 39) Kubo T., Yamaguchi H., Tsujimura M., Hagiwara Y., Fukumori R., *Brain Res. Bull.*, **52**, 291–296 (2000).
- 40) Kubo T., Hagiwara Y., Endo S., Fukumori R., *Brain Res.*, **953**, 232–245 (2002).
- 41) Semenenko F. M., Lumb B. M., *Neuroscience*, **94**, 163–174 (1999).
- 42) Goodson A. R., LaMaster T. S., Gutterman

- D. D., *Am. J. Physiol.*, **265**, R1311–R1317 (1993).
- 43) Hagiwara Y., Kubo T., *Brain Res.*, **1006**, 207–214 (2004).
- 44) Hagiwara Y., Kubo T., *Brain Res.*, **1049**, 203–209 (2005).
- 45) Hagiwara Y., Nishigori Y., Fukumori R., Kubo T., *Brain Res.*, **1033**, 128–134 (2005).
- 46) Hagiwara Y., Sasaki Y., Fukumori R., Kubo T., *Brain Res.*, **1046**, 165–171 (2005).
- 47) Kubo T., Hagiwara Y., *Neurosci. Lett.*, **400**, 92–96 (2006).
- 48) Hermann K., Raizada M. K., Sumners C., Phillips M. I., *Neuroendocrinology*, **47**, 125–132 (1988).
- 49) Hagiwara Y., Kubo T., *Neurosci. Lett.*, **384**, 250–253 (2005).
- 50) Hagiwara Y., Kubo T., *Neurosci. Lett.*, **390**, 61–65 (2005).
- 51) Kubo T., Hagiwara Y., *Brain Res.*, **1020**, 140–146 (2004).
- 52) Kubo T., Hagiwara Y., *Neurosci. Lett.*, **397**, 297–300 (2006).
- 53) Kubo T., Hagiwara Y., *Neurosci. Lett.*, **397**, 74–78 (2006).
- 54) Kubo T., Numakura H., Endo S., Hagiwara Y., Fukumori R., *Brain Res. Bull.*, **56**, 569–574 (2001).
- 55) Kubo T., Kanaya T., Numakura H., Okatani H., Hagiwara Y., Fukumori R., *Neurosci. Lett.*, **318**, 25–28 (2002).
- 56) Kubo T., Okatani H., Nishigori Y., Hagiwara Y., Fukumori Y., Goshima Y., *Neurosci. Lett.*, **354**, 84–86 (2004).
- 57) Chen X., Herbert J., *Neuroscience*, **64**, 675–685 (1995).
- 58) Risold P. Y., Canteras N. S., Swanson L. W., *J. Comp. Neurol.*, **348**, 1–40 (1994).
- 59) Risold P. Y., Swanson L. W., *Brain Res. Rev.*, **24**, 91–113 (1997).
- 60) Staiger J. F., Wouterlood F. G., *Cell Tissue Res.*, **261**, 17–23 (1990).
- 61) Smith O. A., Astley C. A., DeVito J. L., Stein J. M., Walsh K. E., *Fed. Proc.*, **39**, 2487–2494 (1980).
- 62) Kubo T., Okatani H., Kanaya T., Hagiwara Y., Fukumori R., Goshima Y., *Brain Res. Bull.*, **59**, 359–364 (2003).
- 63) Kanaya T., Okatani H., Hagiwara Y., Fukumori R., Goshima Y., Kubo T., *Brain Res. Bull.*, **61**, 505–510 (2003).
- 64) Prewitt C. M. F., Herman J. P., *J. Chem. Neuroanat.*, **15**, 173–185 (1998).
- 65) Siegel A., Schubert K. L., Shaikh M. B., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **21**, 733–742 (1997).
- 66) Arnold F. J., De Lucas B. M., Shiers H., Hancock D. C., Evan G. I., Herbert J., *Neuroscience*, **51**, 377–390 (1992).
- 67) Beck C. H., Fibiger H. C., *J. Neurosci.*, **15**, 709–720 (1995).
- 68) Cullinan W. E., Herman J. P., Battaglia D. F., Akil H., Watson S. J., *Neuroscience*, **64**, 477–505 (1995).
- 69) Iwata J., Chida K., LeDoux J. E., *Brain Res.*, **418**, 183–188 (1987).
- 70) Dunn A. J., Berridge C. V. W., *Brain Res. Rev.*, **15**, 71–100 (1990).
- 71) Rivest S., Laflamme N., Nappi R. E., *J. Neurosci.*, **15**, 2680–2695 (1995).
- 72) Kalin N. H., Takahashi L. K., Chen F. L., *Brain Res.*, **656**, 182–186 (1994).
- 73) Swiergiel A. H., Takahashi L. K., Kalin N. H., *Brain Res.*, **623**, 229–234 (1993).
- 74) Vertes R. P., Crane A. M., *J. Comp. Neurol.*, **374**, 607–631 (1996).
- 75) Brezenoff H. E., Xiao Y.-F., *Life Sci.*, **45**, 1163–1170 (1989).
- 76) Kubo T., *Brain Res. Bull.*, **46**, 475–481 (1998).
- 77) Hagiwara Y., Ohi M., Kubo T., *Brain Res. Bull.*, **67**, 203–209 (2005).
- 78) Kubo T., Hagiwara Y., *Brain Res.*, **1061**, 36–41 (2005).
- 79) Huang B. S., Van Vliet B. N., Leenen F. H. H., *Am. J. Physiol.*, **287**, H1160–H1166 (2004).
- 80) Yang R.-H., Jin H., Chen S.-J., Wyss J. M., Oparil S., *Hypertension*, **20**, 755–762 (1992).
- 81) Calhoun D. A., Zhu S.-T., Chen Y.-F., Oparil S., *Hypertension*, **26**, 285–289 (1995).
- 82) Carlson S. H., Roysomutti S., Peng N., Wyss J. M., *Am. J. Hypertens.*, **14**, 155S–162S (2001).
- 83) Teruya H., Muratani H., Takishita S., Sesoko S., Matayoshi R., Fukiyama K., *J. Hypertens.*, **13**, 883–890 (1995).
- 84) Yamashita Y., Takata Y., Takishita S., Tomita Y., Tsuchihashi T., Fujishima M., *J.*

- Hypertens.*, **10**, 741–747 (1992).
- 85) Kubo T., Hagiwara Y., *Brain Res. Bull.*, **68**, 335–340 (2006).
- 86) Sasaki Y., Fujimura M., Furukawa M., Kubo T., *Neurosci. Lett.*, **399**, 255–258 (2006).
- 87) Oparil S., Chen Y.-F., Peng N., Wyss J. M., *Front. Neuroendocrinol.*, **17**, 212–246 (1996).
- 88) Raizada M. K., Sumners C., Lu D., *J. Neurochem.*, **60**, 1949–1952 (1993).
- 89) Han N. L., Sim M. K., *Am. J. Physiol.*, **275**, H703–H709 (1998).
- 90) Ambuhl P., Gyurko R., Phillips M. I., *Regul. Pept.*, **59**, 171–182 (1995).
- 91) Komatsu C., Shibata K., Furukawa T., *Life Sci.*, **58**, 1109–1121 (1996).
- 92) Langford K., Frenzel K., Martin B. M., Bernstein K. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 1025–1032 (1992).
- 93) Takeuchi K., Alexander R. W., Nakamura Y., Tsujino T., Murphy T. J., *Circ. Res.*, **73**, 612–621 (1993).
- 94) Kambe T., Hiruki H., Kubo T., *Hypertens. Res.*, **26**, 245–250 (2003).
- 95) Kambe T., Kinjyo N., Hiruki H., Kubo T., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **31**, 96–100 (2004).
- 96) Kubo T., Kinjyo N., Ikezawa A., Kambe T., Fukumori R., *Brain Res.*, **992**, 1–8 (2003).
- 97) Morishita R., Sugimoto T., Aoki M., Kida I., Tomita N., Moriguchi A., Maeda K., Sawa Y., Kaneda Y., Higaki J., Ogihara T., *Nat. Med.*, **3**, 894–899 (1997).
- 98) Sawa Y., Morishita R., Suzuki K., Kagisaki K., Kaneda Y., Maeda K., Kadoba K., Matsuda H., *Circulation*, **96**, 280II–284II (1997).
- 99) Abe M., Endoh T., Suzuki T., *Arch. Oral Biol.*, **48**, 401–413 (2003).
- 100) Wang D., Gelband C. H., Sumners C., Posner P., *J. Neurophysiol.*, **78**, 1013–1020 (1997).
- 101) Kubo T., Hagiwara Y., *Brain Res.*, **1033**, 157–163 (2005).
- 102) Amemiya T., Kambe T., Fukumori R., Kubo T., *Brain Res.*, **1040**, 129–136 (2005).
- 103) Rettig R., Bandelow N., Patschan O., Kuttler B., Frey B., Uber A., *J. Hum. Hypertens.*, **10**, 641–644 (1996).
- 104) Woolfson R. G., De Wardener H. E., *Kidney Int.*, **50**, 717–731 (1996).
- 105) Cowley Jr. A. W., *Physiol. Rev.*, **72**, 231–300 (1992).
- 106) Rettig R., Schmitt B., Pelzl B., Speck T., *J. Hypertens.*, **11**, 883–891 (1993).
- 107) Rettig R., Folberth C., Stauss H., Kopf D., Waldherr R., Unger T., *Am. J. Physiol.*, **258**, F606–F611 (1990).
- 108) Grisk O., Kloting I., Exner J., Spiess S., Schmidt R., Junghans D., Lorenz G., Retti R., *J. Hypertens.*, **20**, 131–138 (2002).
- 109) Deschepper C. F., Li J. S., Schiffrin E. L., Welner S. A., *Hypertension*, **23**, 765–773 (1994).
- 110) Eilam R., Malach R., Bergmann F., Segal M., *J. Neurosci.*, **11**, 401–411 (1991).
- 111) Eilam R., Malach R., Segal M., *J. Neurosci.*, **14**, 4891–4902 (1994).