<原 著>

カテコールアミンと磷脂質の結合に関する研究

— 特にカテコールアミンによる家兎摘出大動脈

平滑筋の収縮を中心として —

葛谷文男* 吉峯 徳 小林倫子 森 邦雄 坂本信夫

<要 約> 著者等はすでにアドレナリンとレシチンが *in vitro* で結合する事並びにノルアドレナリンの *in vitro* における血小板凝集作用がレシチンとの incubation によって弱められる事を報告した。

今回はレシチンがノルアドレナリン、ドパミンとも *in vitro* で結果する事を同様な方法でたしかめた。さらにノルアドレナリンによる家兎大動脈摘出標本における平滑筋の収縮に対して、あらかじめ一定の混合比でレシチンとノルアドレナリンを incubation しておくと、ノルアドレナリン単独の場合の平滑筋収縮作用を100%阻止した。これはノルアドレナリンのはかいによるものではなく、レシチンとノルアドレナリンの結合によるものである事を実験的にたしかめた。

著者等¹⁾はさきにアドレナリン（以下Aと略す）が磷脂質特にレシチン（以下PLと略す）と *in vitro* で結合する事を報告した。in vitro における PL とノルアドレナリンとの preincubation はノルアドレナリンによる血小板凝集を *in vitro* で抑制する事も報告した²⁾。今回は *in vitro* で PL がノルアドレナリン（以下NAと略す）及びドパミン（以下DAと略す）と結合する事及び家兎摘出大動脈標本におけるNAの平滑筋収縮作用に及ぼすPLの影響を観察したので報告する。

実験方法

1) *in vitro* における NA, DA と PL との結合に関する実験方法。

既報¹⁾の如く脂肪乳剤 ediol 2ml に buffer (tris) 2ml を加へて PL 40mg を溶解した。この液1ml をとり ¹⁴C-norepinephrine (200μCi/ml) を0.02ml 加へて37°Cで2時間振盪、incubation した。incubation 終了後クロロホルム3mlを加へて脂質を抽出した。抽出液より2mlをとり、溶媒を蒸発濃縮して silicagel-G (0.5mm) にて薄層クロマトグラフィーを行い、各脂質分画を求めた。溶媒は hexane 23:4 diethyl-ether 60: acetic

acid 6 を用いた。展開終了後ヨード蒸気にあて発色させ、各スポットをマークし、ヨードを蒸発させて後、各 spot をかきとり liquid scintillation counter で計測した。

2) 家兎大動脈摘出標本における NA の平滑筋収縮作用に及ぼす PL の影響に関する実験方法。

体重2kg前後の雄の家兎を背位に固定し、頸部を切開して両側頸動脈を露出切断し、放血致死させた後、開胸して、下行大動脈を摘出し、血管周囲の組織を除去した後、ラセン状に切開し幅3mm長さ15mmの大動脈条片標本を作成した。大動脈条片標本はNAの濃度作用、経壁刺激およびNAのsingle用量におけるPLの影響を検するの供した。標本は容量20mlのmagnus槽の栄養液中に2gの負荷をかけて懸垂し、上端を Force-displacement transducer (SB-IT: 日本光電工業) に連結してその張力の変化を等尺性インク書き osillograph (Recticorder RIG-3004: 日本光電工業) 上に記録した。栄養液(1l中にNaCl 8.5g, KCl 0.4g, CaCl₂·2H₂O 0.32g, NaHCO₃ 1.25g, glucose 1.0g含有)は37°Cの定温に保ち95% O₂: 5% CO₂の混合ガスを通気した。NAは0.2mlをmagnus管に投与して目的の最終濃度になる様に蒸留水で調整した。PLはテフロンホモゲナイザーで蒸留水に suspension し、0.2mlをmagnus管に投与して目的の最終濃度になる様に調整した。

* F. Kuzuya, N. Yoshimine, S. Kobayashi, K. Mori N. Sakamoto: 名古屋大学医学部第3内科
受付: 1976. 5. 11

実験結果

1) in vitro における PL と NA, DA との結合に関する実験結果.

図1に示す如く薄層クロマトグラフィー上、磷脂質分画にのみ ^{14}C -NA, ^{14}C -DA, の radioactivity を観察得た. すなわち, さきに著者等が報告した¹⁾ A と PL との結合と同様 NA, DA も in vitro で PL と結合する事を確認した.

図 1

図 2 Rabbit's Aorta

2) 家兔摘出大動脈標本における NA 収縮に対する PL の影響に関する実験結果.

摘出大動脈標本は図2に示す様に NA の 10^{-9} ~ 10^{-5} g/ml 濃度の累積的投与により著明な収縮を引き起す. PL 10^{-3} g/ml の濃度の20分間前処置はこの NA の収縮反応に影響を及ぼさなかった. しかし図3に示す様に phenolamine の 5×10^{-8} ~ 10^{-6} M 濃度の前処置(20分間)は NA の濃度作用曲線を右に平行移動させ競合的な拮抗を

図 3 Phenolamine

示し, 血管平滑筋の α -receptor における拮抗を示した.

3) 摘出大動脈の経壁刺激に対する PL の影響に関する実験結果.

標本は経壁刺激を与えるために magnus 管内に固定した 2mm 間隔の 2枚の白金電極板 (7×5 mm) 間に巾し, 電子管刺激装置 (MSR-3R, 日本光電工業) により矩形波で刺激した. 刺激条件は強さ 80 V, 幅 0.3 msec, 頻度 5, 20, および 100/sec で刺激時間は各々 40'', 10'', 2'' とした. 大動脈条片標本は経壁刺激により一過性の収縮を引き起す. この一過性収縮は tetrodotoxine (3.1×10^{-7} M) により遮断される(図4)ことから, 血管平滑筋支配交感神経末端からの NA の遊離によると考えられる^{3,4)}. 各頻度における収縮反応に対する PL の影響は図4に示す通りである. PL の 10^{-3} g/ml の20分間前処置は経壁刺激反応に対して全く影響をおよぼさなかった.

4) 摘出大動脈標本における NA の single 濃度適用による PL の影響に関する実験結果.

図4に示すように大動脈条片標本の経壁(即ち神経)刺激によって引き起こされる著明な一過性の収縮高は

図4 Transmural stimulation (Rabbit's aorta)

図5 PL 10^{-3} g/ml Incubation time 0

外来の NA 2×10^{-8} g/ml 濃度の投与によって得られる収縮高にほぼ匹敵する。この神経刺激の収縮に匹敵する NA 2×10^{-8} g/ml の濃度の単一用量を適用し、収縮が安定するまで何回もくりかへして、収縮が一定した所で、その収縮反応を対照として NA と PL の incubation (37°C) による NA 収縮に対する PL の抑制効果を検すると同時に NA の濃度との関連について観察した結果は図5, 6, 7 に示されている。AN 2×10^{-8} g/ml, 10^{-7} g/ml および 5×10^{-7} g/ml と PL 10^{-3} g/ml の同時混合の場合は NA の収縮反応にはなんらの影響をおよぼさなかった。そこで予備試験的に NA と PL を 37°C で incubation し

図6 NA 2×10^{-8} g/ml Incubation time 1hr. 37°C

図7 NA 10^{-7} g/ml Incubation time 1hr. 37°C

図 8 NA 5×10^{-7} g/ml Incubation time 1hr. 37°C

表 1

Concentration of NA (g/ml)	Concentration of PL(Lecithin) (g/ml)	Inhibition %	
		Incubation Time (37°C)	
		0	1 hr.
2×10^{-8}	10^{-6}	0 (4)*	22 (2)*
	10^{-5}	0 (4)	17 (2)
	10^{-4}	0 (4)	77 (2)
	10^{-3}	0 (4)	100 (4)
10^{-7}	10^{-5}	0 (4)	19 (2)
	10^{-4}	0 (4)	12 (2)
	10^{-3}	0 (4)	100 (4)
5×10^{-7}	10^{-3}	0 (4)	6 (2)

* () 例数

て PL の効果と incubation 時間の関係をしらべたところ、1時間が最適であったので以後の実験において incubation 時間を1時間と設定し、PL による NA 収縮反応に対する抑制効果を検討した。NA 2×10^{-8} g/ml に対して、PL 10^{-4} g/ml の濃度適用は著明に NA の収縮を抑制 (77%) し、さらに PL 濃度を 10^{-3} g/ml に上げた場合は NA の収縮を完全に抑制した。又 37°C で1時間 incubation した NA の適用は対照の NA の収縮高に回復した。さらに NA の濃度を 10^{-3} g/ml に上げた場合、PL 10^{-4} g/ml の適用は NA 2×10^{-8} g/ml の時と異なりわずかに抑制の傾向を示したにすぎなかったが、 10^{-3} g/ml の適用は NA 2×10^{-8} g/ml の時と同様、完全に NA の収縮を抑制し、NA 単独保温の適用により対照の NA の収縮高に回復した。NA 5×10^{-7} g/ml に対しては PL 10^{-3} g/ml の適用によってもなんらの影響をおよぼさなかった (図 8)。これらの結果をまとめてみると表 1 の如くなる。

総括考按

以上の結果から PL と NA, DA は in vitro で結合す

る事があきらかとなった。さらに PL と NA との incubation による NA の平滑筋収縮効果 (大動脈) は同じ条件において NA のみを incubation した NA の適用により対照の NA の収縮高と同じ高さに回復する事から、少なくとも incubation による NA の分解によるものではない事を示している。すなわち PL と NA との適当な濃度比による incubation によって NA の平滑筋収縮作用は 100% 阻止され、これは PL と NA の結合によるものと推定される。又この結合は一定時間 (約1時間) の incubation 時間を要し (37°C において)、それより短時間の incubation では結合は不十分である事が推定出来る結果を得た。したがって PL と NA の結合は即時的ではないと結論される。

結 論

1) アドレナリン同様ノルアドレナリン、ドパミンも in vitro でレシチンと結合する。

2) 家兎大動脈摘出標本によるノルアドレナリンの平滑筋収縮作用に対して前もってノルアドレナリンとレシチンを incubation しておくとなルアドレナリンのこの作用が抑制された。これはノルアドレナリンのはかいによるものではなく、レシチンとノルアドレナリンの結合によるものである事がわかった。

文 献

- 1) 葛谷文男, 北川道弘: 磷脂質と epinephrine との結合に関する研究, 最新医学 29: 585, 昭和49年.
- 2) Kuzuya, F.: Studies on complex formation between epinephrine and phospholipid, Jap. Circulation J. 38: 579, 1974.
- 3) Paterson, G.: The response to transmural stimulation of isolated arterial strips and its modification by drugs, J. Pharm. Pharmacol. 17: 341, 1965.
- 4) Toda, N.: Influence of cocaine and desipramine on the contractile response of isolated rabbit pulmonary arteries and aortae to transmural stimulation, J. Pharmacol. Exp. Ther. 179: 198, 1971.

Abstract

**Studies on the Complex Formation of Catecholamine with Lecithin,
with Special References to Contraction of Smooth Muscle
in Rabbit Aortae by Noradrenaline**

Fumio Kuzuya, Noboru Yoshimine, Satoko Kobayashi, Kunio Mori and Nobuo Sakamoto

Authors reported already that adrenaline combined with phospholipid (lecithin) on SAISHIN IGAKU 29: 585, 1974, and in 15th Annual Meeting of Japanese Geriatr. Society in November 1973, and that in human plasma platelet aggregation was inhibited with incubation of catecholamine and lecithin in vitro, while it was induced by catecholamine, on Jap. Circul. J. 38: 579, 1974.

On this paper, authors observed that lecithin combined not only with adrenaline, but also with noradrenaline or dopamine in vitro: The radioactivity of ^{14}C -noradrenaline and ^{14}C -dopamine was detected on phospholipid area on thinlayerchromatography

The 3rd Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine, Showa-ku, Nagoya, Japan.

(Silica-Ge H), while no radioactive areas were detected on the others (cholesterol, cholesterol-ester, triglyceride or free fatty acid). Furthermore, we observed that the contraction of smooth muscle in rabbit aortae was inhibited perfectly by preincubation of noradrenaline and lecithin for one hour at 37°C , whereas it occurred in noradrenaline solution. This inhibitory effect of lecithin did not result from destruction of noradrenaline, because the contraction of aortae again occurred in noradrenaline solution incubating for one hour at 37°C . It was concluded that noradrenaline and/or dopamine combined with lecithin in vitro as same as adrenaline did, and that the contraction of smooth muscle in aortae of rabbit induced by noradrenaline was inhibited by preincubation of noradrenaline and lecithin.