正常SDラット腎におけるカテコールアミン α_1 受容体の研究

ドーパミンがおよぼす影響について

富山医科薬科大学泌尿器科学教室 (主任: 片山 喬教授)

古田 秀勝 中田 英浩 片山 喬

STUDY OF THE EFFECTS OF DOPAMINE HYDROCHLORIDE ON α_1 -ADRENOCEPTORS IN RAT KIDNEY

Hidekatsu Furuta, Teruhiro Nakada and Takashi Katayama

Department of Urology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan

We studied the number and affinity of catecholamine receptors in SD rat kidney by radioreceptor technique.

The following conclusions were obtained:

1) By using ^3H -prazosin, the numbers of α_1 -receptor (B_{max}) in rat renal cortex were greater than those in rat kidney medulla. As for affinity (K_d), the significance was not recognized between the two. B_{max} of the rat renal cortex to ^3H -prazosin binding was 96.1 fmol/mg protein, and K_d was 0.17 nM, and for the rat renal medulla these values were 44.5 fmol/mg protein and 0.13 nM, respectively.

2) By measurement of D1-receptor using ^3H -SKF38393 in the rat renal cortex in the Scatchard plot analysis, positive cooperativity was observed under the low concentration of hot ligand which was less than 1 nM. But at the concentration of hot ligand over 1 nM, the plots showed a straight line. B_{max} of the rat renal cortex to ^3H -SKF38393 was 2.5 pmol/mg protein and K_d was 5.3 nM.

3) Based on displacement by dopamine for ^3H -prazosin binding to rat renal cortex, it was surmised that high concentration of dopamine had an affinity to α_1 -adrenoceptors.

4) There was no change in the K_d and B_{max} of α_1 -receptor in the rat renal cortex after incubation of samples with low concentration of dopamine. However, in the case of high concentration of dopamine, a remarkable decrease of the affinity (K_d) of α_1 -adrenoceptor was observed.

Key words: kidney, dopamine hydrochloride, α_1 -adrenoceptor

要旨: Sprague-Dawley ラット (SD ラット) 腎膜分画を用いて receptor assay によりカテコールアミン受容体の受容体数ならびに親和性の検討を行った。 ^3H -prazosin を使用したラット腎皮質の α_1 受容体測定では解離定数 (K_d) は 0.17 ± 0.02 (nM), 最大結合能 (B_{max}) は 96.1 ± 7.33 (fmol/mg protein) であった。一方ラット腎髄質の解離定数は 0.13 ± 0.03 (nM), 最大結合能は 44.5 ± 8.2 (fmol/mg protein) であった。ラット腎髄質に比べラット腎皮質には α_1 受容体が単位蛋白あたり約 2 倍多く存在した。ラット腎皮質に対し, ^3H -SKF38393 を使用したドーパミン D1 受容体測定では, Scatchard plot 上, hot ligand が 1 nM 以下の低濃度では上方に突出した正の協同作用を示したが, 1 nM 以上では直線上にあてはまった。この高濃度部での K_d は 5.3 (nM), B_{max} は 2.5 (pmol/mg protein) であった。さらに腎皮質膜分画浮遊液の ^3H -prazosin binding に対するドーパミンの置換作用が認められた。高濃度のドーパミンは, α_1 受容体に対し親和性があるものと考えられた。dopaminergic 作用を示す低濃度のドーパミンと, 腎皮質膜分画を preincubation しても α_1 受容体の数や薬物親和性に変化を認めなかった。しかし高濃度のドーパミンを preincubation した試料では, ^3H -prazosin binding による B_{max} の値に変化を認めなかったがその親和性が低下した。

キーワード: 腎, 塩酸ドーパミン, α 受容体

緒 言

臨床的にはドーパミンは、腎機能低下や腎不全、さらにはショック時に尿量増加、血圧上昇を目的として投与される。一方、临床上 norepinephrine だけを単独で使用することは、あまり行われないが、尿量低下を伴ったショック時に尿量維持のためドーパミンを投与し、norepinephrine をさらに使用して昇圧の効果をあげることがなされる¹⁾²⁾。またカテコールアミン産生腫瘍でも、norepinephrine 産生に加えドーパミンを産生しているもののなかに、高血圧を呈さないものがあるとの報告がある³⁾。われわれは、このようにドーパミン存在下において norepinephrine の投与が行えるのは、ドーパミン投与によって腎皮質カテコールアミン α 受容体の norepinephrine に対する親和性の変化や、 α_1 受容体の特異的な結合になんらかの変化を与えるのではないかと考えた。この問題を研究するため Sprague-Dawley ラット (SD ラット) 腎を対象として、塩酸ドーパミン存在下での α_1 受容体数並びに α_1 受容体の親和性の変化について in vitro で radioreceptor assay により検討した。

研究材料および方法

1. ラット腎の摘出

生後 8 週 SD 成熟雄ラットを普通固形飼料 (CE-II, Japan Clea. Co), 自由飲水下にて飼育し、体重 260~280g に達したものを使用した。pentobarbital (30mg/kg) を腹腔内に注射した後開腹した。腹部大動脈および腹部大静脈を露出し、腹腔動脈のさらに上位の高さで、これらの動脈および静脈に鉗子をかけてクランプした。カニューレを腹部大動脈の最下部から挿入し、同時に腹部大静脈の最下部を切開した。脱血と可及的速やかに腎組織を冷却する目的で大動脈に挿入

したカニューレから生理食塩水を約 30ml 緩徐に注入し腎を灌流した (Fig. 1a)。灌流の目安として、腎および肝が灰白色を呈するまで行い腎を摘出した。薄く数枚の切片とした腎を実体顕微鏡下で腎皮質と腎髄質の間に切開分離した (Fig. 1b)。以上の操作はすべて 4℃ で行った。

2. 腎受容体標本の作製

腎組織を細切し、320mM sucrose を含む 25mM Tris/Hcl 緩衝液 (pH7.4) を 10~20 倍量加えて homogenize した。1,000×g で 10 分間遠沈後、沈査を除去しさらに上清を 50,000×g で 20 分間遠沈した。得られた沈査を、25mM Tris Hcl 緩衝液 (pH7.4) 3ml を加え、ソニケーターにて攪拌、浮遠させ 50,000×g で 10 分間遠沈した (洗浄)。同様な操作で計 3 回沈査膜分画を洗浄した後、50mM Tris/Hcl 緩衝液 (pH7.4) に浮遊させ、これを膜分画受容体粗標本として用いた (Fig. 2)。

3. radioreceptor assay の方法

Bradford⁴⁾ の方向に準じて受容体粗標本の蛋白質定量を行い一定濃度に調整した。蛋白濃度は 300 μ g/ml 前後となるようにした。receptor assay は Williams⁵⁾ らの方法に準じて行った。まず受容体浮遠液 800 μ l に放射性リガンド溶液 100 μ l を加え全量を 900 μ l とした。hot ligand としては α_1 受容体についてはその antagonist である ³H-prazosin を、ドーパミン受容体は D1 agonist の ³H-SKF38393 を使用した。total binding についてはこの試験管浮遊液の中に 50mM Tris/Hcl 緩衝液 (pH7.4) を 100 μ l 加えて総量を 1000 μ l とした。non-specific binding については、hot ligand の 1000 倍以上の高濃度の cold ligand をこの試験管浮遊液の中に 100 μ l 加えて総量を 1000 μ l とした。cold ligand として α_1 受容体に対して phentolamine、ドーパミン受容

Fig. 1 SD ラット腎の灌流方法 (a), 並びに腎皮質、髄質の切開方法 (b)。

Fig. 2 膜分画浮遊液の作製方法.

Fig. 3 Radioreceptor assay の方法.

体に対し dopamine hydrochloride を使用した。それぞれの non-specific binding preparation と total binding preparation を α_1 受容体については 37°C , 30 分間, ドーパミン受容体 D1 については 37°C , 45 分間 incubate した。ドーパミンを添加して preincubation し, α_1 受容体に及ぼす影響をみる実験では, ドーパミンの濃度を変えて, 受容体膜分画浮遊液と 30 分間 incubate した後に前述の α_1 受容体測定の方法と同様に行った。これらの incubation mixture に冷却した 50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH7.4) を 5ml 加え反応を停止させた後 Whatman GF/B glass filter により結合受容体分画を分離採取した。ついで, この glass filter をカウンティングバイアルに移し, Clear-sol 液体シンチレーター 8ml を加え, 室温にて一晩放置しシンチレーション

Fig. 4 SD ラット腎皮質膜分画への ^3H -prazosin 結合の Saturation curve (A) 並びに Scatchard plot (B).

ンカウンターにて標識トリチウム量を測定した (Fig. 3).

結 果

1. ラット腎膜分画と ^3H -prazosin 結合

ラット腎皮質の膜分画と ^3H -prazosin を使用し saturation curve 並びに Scatchard plot を描くことが可能であった (Fig. 4). 同様に腎髄質膜分画についても ^3H -prazosin 結合による saturation binding curve が描けた。Scatchard plot は直線となった (Fig. 5). これらの結果より, ^3H -prazosin 結合による腎皮質の α -adrenoceptor の解離定数 (K_d) は 0.17 ± 0.02 (nM), 最大結合能 ($B_{\max}$) は, 96.1 ± 7.33 (fmol/mg protein), また腎髄質の解離定数は, 0.13 ± 0.03 (nM), 最大結合能は 44.5 ± 8.2 (fmol/mg protein) であった。腎髄質に比べ腎皮質には α_1 受容体が約 2 倍多く存在した (Table 1).

2. ラット腎皮質膜分画と ^3H -SKF38393 結合

α_1 受容体が多く存在するラット腎皮質を使用し, ^3H -SKF38393 による saturation curve を描くことが可能であった (Fig. 6A). Scatchard plot は 1nM 以下の低濃度では上方に突出を示した。 1nM を越える高濃度では直線上にあてはまった。この高濃度部での解離

Fig. 5 SD ラット腎髄質膜分画に対し³H-prazosin を用いた Scatchard plot.

Table 1 SD ラット腎皮質, 並びに腎髄質膜分画の ³H-prazosin bindingによるカテコールアミンレセプターの解離定数(Kd)並びに最大結合能(Bmax).

material	no. of assays	α_1 -adrenoceptor (³ H) Prazosin	
		Kd (nM)	B max (f mol/mg protein)
cortex	5	0.17±0.02	96.1±7.33
medulla	4	0.13±0.03	44.5±8.2*

Values are given as mean±S.E.
Asterisk shows statistically significant difference from the medulla. : *P<0.01

定数は5.3(nM), 最大結合能は2.5(pmol/mg protein)であった (Fig. 6B). 以上の結果から, 腎皮質には α_1 受容体に比単位蛋白あたり約20倍以上のドーパミン D1受容体が存在する事が推測された.

3. ラット腎皮質膜分画の³H-prazosin に対する norepinephrine, dopamine による置換曲線

ラット腎皮質膜分画を使用し, 0.1nM の³H-prazosin 結合に対しドーパミン, および norepinephrine での置換を行った. 置換曲線は両方が1相性を示し, IC₅₀はそれぞれ 5×10^{-5} M, 3×10^{-6} Mであった. これらの, 結果から³H-prazosin 結合による, α_1 受容体に対し norepinephrine と同様にドーパミンが置き換わることから高い濃度ではドーパミンが α 作用を有することが理解された (Fig. 7).

4. dopamine 添加がラット腎皮質膜分画への³H-prazosin 結合におよぼす影響

ラット腎皮質膜分画浮遊液にドーパミンを添加し preincubation して α_1 受容体数ならびに親和性の変化

Fig. 6 SD ラット腎皮質膜分画に対し³H-SKF38393 を用いた Saturation curve (A) 並びに Scatchard plot (B).

Table 2 ラット腎皮質膜分画と dopamine を preincubation した試料に対する, α_1 レセプターの 解離定数 (Kd) 並びに最大結合能 (Bmax) の値.

DOPAMINE CONCENTRATION	no. of assays	Bmax (f mol/mg protein)	Kd (nM)
FREE	3	103.4±5.4	0.16±0.01
5×10^{-3} M	3	102.7±6.2	0.17±0.02
5×10^{-7} M	3	102.9±8.7	0.16±0.01
5×10^{-5} M	3	104.0±8.5	0.24±0.02*

Results are shown in mean±S.E.
Asterisk shows statistically significant difference from the dopamine free : *P<0.01.

をみた. ドーパミン濃度は, D1受容体に関する Kd 値 5×10^{-9} M, ドーパミン置換で得られた IC₅₀ 値 5×10^{-5} M およびこの中間の濃度の 5×10^{-7} M で行い Scatchard plot を描いた (Fig. 8). この結果を Table 2 に示す. これらのドーパミン濃度による α_1 受容体への影響についてはあるが, いずれの濃度でも最大結合能 (Bmax) には変化がなかったが, 解離定数 (Kd) はドーパミン濃度 5×10^{-5} M で有意に高値を呈した. これらの結果から低い濃度のドーパミン preincubation によって α_1 受容体に対する親和性に变化を認め

Fig. 7 ラット腎皮質膜分画への ^3H -prazosin binding に対し, norepinephrine, dopamine による置換曲線 (A) 並びに pseudo Hill plot (B).

Fig. 8 ラット腎皮質膜分画にそれぞれの濃度の dopamine を preincubate した試料を用いた ^3H -prazosin binding による Scatchard plot.

なかった。

α_1 受容体との置換作用が認められる高濃度のドー

パミン preincubation では α_1 受容体に対する親和性が低下することが認められた。しかしながら, Bmax については, ドーパミンの preincubation によっても変化が認められなかった。

考 察

腎に α 受容体が存在する事は, すでに諸家の報告により明らかであるが, 種によって局在部位が異なるようである。McPherson ら⁶⁾は α_1 受容体がモルモット腎には認められなかったがラット腎では認められたと報告している。またその腎内局在にも違いがあり, ラットでは皮質と髄質を比較すると皮質に多く存在したと報告している。われわれの実験結果でも SD ラット腎では, 髄質と皮質を比べると後者に前者の約 2 倍多くの α_1 受容体が存在していた。彼らの実験結果は最大結合能が wet weight tissue あたりで算定してあり, われわれの実験では膜分画蛋白定量による mg protein あたりの算出法である。算定方法に違いがあるため Bmax は, 単純な比較ができないが, Kd 値は, ほぼ同様な値であった。重富ら⁷⁾は, Wistar 系ラットの全腎を使用し, 非選択的な α -antagonist である ^3H -dihydroergocryptine を用いて α 受容体を測定したところ Bmax は 363 fmol/mg protein であったとしている。Snively ら⁸⁾によると, SD ラット腎皮質の α_1 受容体数は 93 fmol/mg protein で α_1 受容体数と α_2 受容体数の比は 1 : 3 であるという。この比率で重富ら⁷⁾の値を計算すると α_1 受容体はおよそ 90.75 fmol/mg protein と計算される。われわれの実験結果の値は, 96.1 fmol/mg protein でありこれら諸家の報告の値とほぼ同じ結果であった。

臨床的にはドーパミンは, 腎機能低下や腎不全, さらにショック時に尿量増加, 血圧上昇を目的として投与される。一方, 临床上 norepinephrine だけを単独で使用することは, あまり行われなないが, ショック時に尿量維持のためドーパミンを投与し, norepinephrine を同時に使用して昇圧の効果をあげることがなされる¹⁾²⁾。またカテコールアミン産生腫瘍でも, norepinephrine 産生に加えドーパミンを産生しているもののなかに, 高血圧を呈さないものがあるとの報告がある³⁾。われわれは, ドーパミン存在下における norepinephrine の投与や作用がどのような意味あいをもつかを in vitro で radioreceptor assay により検討した。ドーパミンは, 低濃度では腎動脈などの内臓動脈に対し, 血管拡張作用を有し, 全体として末梢血管抵抗を減少させる。しかしながら, 高濃度でのドーパミ

ン投与では、むしろ α -adrenergic agonist 作用が強く出て、昇圧作用ばかりが顕著に現れると言われる⁹⁾。ドーパミン受容体は、その活性化により、腎血流量を増加させ、GFR、Na 排泄を亢進させるとされている。Rosenblum ら¹⁰⁾の報告によれば、2~6 μ g/kg/min 投与で、腎の GFR 増加、RPF 増加、Na 排泄増加、末梢血管抵抗の減少を認めるという。われわれが行った、in vitro での実験でもこれを裏付けるようにドーパミン D1 受容体の解離定数付近の濃度では α_1 受容体に対し、なんら影響を与えなかったが、高濃度では Scatchard plot 上 α_1 受容体に対しその親和性を低下させた。高濃度のドーパミンは α_1 receptor site に親和性を持つものと考えられる。実際に臨床で、ドーパミンは、10 μ g/kg/min を越える速度で投与した場合には α 作用が強くと現れるといわれる。臨床的には、ドーパミンと norepinephrine と同時投与する場合、ドーパミンは昇圧の目的で投与されているわけではなく、腎血流量を増し尿量を保つ事が主目的である。Edwards ら¹¹⁾は in vitro で行った実験で、腎の efferent ならびに afferent arteriole を norepinephrine や angiotensin II により収縮させた後これにドーパミン DA1 selective agonist を作用させると、この収縮した血管が弛緩拡張すると報告している。この薬剤と受容体の解離定数は、efferent arteriole で 8.3nM, afferent arteriole で 10.5nM であるという。ドーパミン受容体のサブタイプである DA1 受容体は、末梢神経のシナプス後受容体で平滑筋に存在し、その刺激により平滑筋を弛緩させる。われわれが、今回用いた ³H-SKF38393 により同定された D1 受容体は、adenylate cyclase とリンクするサブタイプである。この受容体はシナプス後膜に存在する受容体であり、中枢神経系や副甲状腺に存在する。DA1 受容体と D1 受容体は同一ではないとする説と、ほぼ類似するものであるとする説¹²⁾があるが、これら二つのサブタイプは同一であるかどうかの結論は出ていない。しかしながら、SKF38393 は選択的な D1 受容体 agonist であるが DA1 受容体にも作用するともいわれる¹³⁾¹⁴⁾。これらの事実を考慮し、われわれはドーパミンの Kd 値を算定する目的で SKF38393 を使用した。臨床で低濃度のドーパミンが作用している状態でさらに、norepinephrine を投与できるのは、内臓血管に対し α 受容体刺激により生じる末梢血管収縮よりも、ドーパミン受容体刺激によるこれら臓器血管の弛緩拡張が強いいため、循環不全を起こさず血圧が上昇するためであると考えられる。ドーパミン産生を伴うカ

テコールアミン産生腫瘍で血圧上昇を認めない症例があることも同様な機序で説明が可能と思われる。

われわれの実験結果から低濃度のドーパミンは、 α 受容体に対する直接作用を示さないが、高濃度では α -adrenergic 作用を示した。このことは、従来報告されているような臨床結果をうらづけるものと思われる。ショック時にドーパミンを使用し、さらに norepinephrine を追加使用するのは、ドーパミン受容体を介し、臓器血管拡張により末梢循環を改善させ、血流を十分に保ったまま、 α 受容体を刺激して末梢血管を収縮させ、これによる昇圧の効果を期待したものと推測される。従って、ドーパミン自体が α 受容体を遮断することによるのではないと考えられる。

結 語

SD ラット腎カテコールアミン受容体について receptor assay により検討を行い、つぎの結果を得た。

1. ³H-prazosin 使用による α_1 受容体測定では腎髄質にくらべ、皮質に α_1 受容体が多く存在した。

2. ³H-SKF38393 による腎皮質ドーパミン D1 受容体測定では Scatchard plot 上、1nM 以下の低濃度で正の協同作用を示したが、1nM を越える濃度ではほぼ直線を示した。

3. 腎皮質膜分画への ³H-prazosin 結合に対しドーパミンによる置換作用が認められた。高濃度のドーパミンは、 α 受容体に対し親和性があるものと考えられた。

4. dopaminergic 作用を示す低濃度のドーパミンと、腎皮質膜分画を preincubation しても α_1 受容体に何ら変化を認めなかった。しかし、高濃度のドーパミン存在下では、³H-prazosin 結合の親和性が低下した。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました、富山医科大学薬科大学薬理学教室、中西顕央教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 前川信博, 池垣淳一: ショックの薬物療法, 小児内科, 96, 1465—1469, 1987.
- 2) 藤井千穂, 鈴木幸一郎, 高須伸克, 石松伸一: ショックと昇圧薬, 外科, 49, 1253—1260, 1987.
- 3) Puyo, A., Levin, G., Armando, I. and Barontini, M.: Total plasma dopamine/norepinephrine ratio in catecholamine secretion tumors. Its relation to hypertension. Inter-American Society Proceedings, Suppl. 1. Hypertension, 11, 202—206, 1988.
- 4) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248—254, 1976.
- 5) Williams, L.T. Mullikin, D. and Lefkowitz, R. J.: Identification of α -adrenergic receptor in uterine smooth muscle membrane by ^3H -dihydroergocryptine binding. *J. Biol. Chem.*, 251, 6915—6923, 1976.
 - 6) McPherson, G.A. and Summers, R.J.: [^3H] prazosin and [^3H]clonidine binding to α -adrenoceptors in membranes prepared from regions of rat kidney. *J. Pharm. Pharmacol.*, 33, 189—191, 1981.
 - 7) 重富秀一, 橋本重厚, 佐藤啓二, 佐藤 衛, 上野修一, 国井伸泰, 戸崎英夫, 福地総逸: Radioreceptor assay による腎交感神経 α および β 受容体の解析. *日腎誌*, 26, 1355—1360, 1984.
 - 8) Snively, M.D. and Insel, P.A.: Characterization of alpha-adrenergic receptor subtypes in the rat renal cortex. *Mol. Pharmacol.*, 22, 532—546, 1982.
 - 9) McNay, J.L., McDonald, R.H. and Goldberg, L. I.: Direct renal vasodilation produced by dopamine in the dog. *Circulation Research*, 16, 510—517, 1965.
 - 10) Rosenblum, R., Tai, A.R. and Lawson, D.: Dopamine in man: Cardiorenal hemodynamics in normotensive patients with heart disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 183, 256—263, 1972.
 - 11) Edwards, R.M.: Comparison of the effects of fenoldopam, SKF R-87516 and dopamine on renal arterioles in vitro. *European J. Pharmacol.*, 126, 167—170, 1986.
 - 12) Schmidt, M., Krieger, J.P., Giesen-Crouse, E.M. and Imbs, J.L.: Vascular effects of selective dopamine receptor agonists and antagonists in the rat kidney. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 286, 195—205, 1987.
 - 13) Willelms, J.L., Buylaert, W.A., Lefebvre, R.A. and Bogaert, M.G.: Neuronal dopamine receptors on autonomic ganglia and sympathetic nerves and dopamine receptors in the gastrointestinal system. *Pharmacol. Rev.*, 37, 165—216, 1985.
 - 14) Caverio, I., Massingham, R. and Lefevre-Borg, F.: Peripheral dopamine receptors, potential targets for a new class of antihypertensive agents. Part 1: Subclassification and functional description. *Life Science*, 31, 939—948, 1982.

(1989年8月9日受理)