

# Maturational Changes in Dopaminergic Inhibitory Regulation on Catecholamine Metabolism

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8229">http://hdl.handle.net/2297/8229</a>

## 小児期におけるドーパミンの役割と動態

## I. カテコールアミン分泌抑制因子としての内因性ドーパミン系の成熟過程

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

五十嵐 登

(平成2年11月1日受付)

カテコールアミン (catecholamine, CA) 代謝の抑制的制御因子としての内因性ドーパミン (dopamine, DA) 系が如何に成熟発達過程をたどるのかにつきラット及びヒトにおいて検討した。ラット副腎周辺灌流系において、DA 受容体拮抗剤のメトクロプラミド (metoclopramide, MCP)・ハロペリドール・スルピリドはいずれも用量依存性にノルエピネフリン (norepinephrine, NE)・エピネフリン (epinephrine, E) 分泌を促進し、この効果は DA 作動薬の前処理により阻害された。幼若ラット副腎の DA 拮抗剤に対する CA の分泌反応は成熟ラットに比較して有意に高値で、ほぼ3週齢までに成熟レベルにまで低下した。幼若ラット副腎のパーセント DA 含量は成熟ラットに比較して有意に高く、また DA 受容体の結合容量・親和性とも低値であった。以上よりラット副腎における DA による CA 分泌制御機構は幼若期において未熟であり、DA 受容体の機能的発達とともに成熟過程をたどる可能性が示唆された。ヒトでは MCP 負荷に対して、DA による分泌制御を受けるアルドステロン (aldosterone, ALD)・プロラクチン (prolactin, PRL) の基礎値・分泌頂値は乳幼児において高値であり、いずれも経年齢的に暫時低下した。また乳幼児期において NE・E の基礎値は高値であり、MCP 負荷に対して NE・E は低下した。以後年齢とともに MCP 負荷に対して NE・E の分泌増加反応を示すものの頻度は増加し、成人ではほぼ全例が増加した。DA の基礎値は乳幼児期において高値であり、MCP 負荷に対する DA の分泌反応・変動幅も乳幼児期において過大であった。また臍帯血リンパ球の DA 受容体は成人に比較して低親和性であった。以上よりヒトにおいても抑制系としての内因性 DA 系は年齢とともに成熟するものと推察された。

---

**Key words** ドーパミン, ドーパミン受容体, カテコールアミン, アルドステロン, プロラクチン

---

ドーパミン (dopamine, DA) は中枢神経系における神経伝達物質としての動きのほか、近年種々の末梢臓器に DA の特異的受容体が証明されその末梢作用が注目されている<sup>1)</sup>。DA は中枢において神経細胞の活動性を抑制し<sup>2)</sup>、また末梢においても副腎髄質や交感神経末端からのカテコールアミン (catecholamine, CA) 分泌を抑制すること<sup>3-7)</sup>、更にプロラクチン

(prolactin, PRL) やアルドステロン (aldosterone, ALD) などのホルモン分泌も抑制することが知られている<sup>8-10)</sup>。しかしこのような抑制的制御因子としての DA 系が幼若期においていかに機能しているかについてはほとんど解明されていない<sup>11)</sup>。今回中枢、末梢における内因性 DA 系がどのように発達成熟過程をたどるかにつきラット及びヒトにおいて検討した。

---

Abbreviations: AADC, aromatic L-amino acid decarboxylase; ALD, aldosterone; CA, catecholamine; DA, dopamine; DBH, dopamine  $\beta$ -hydrolase; E, epinephrine; HPLC, high performance liquid chromatography; MCP, metoclopramide; NE, norepinephrine; PRL, prolactin

## 対象および方法

## I. ラット副腎からの DA 分泌に関する検討

## 1. 実験動物

日齢4, 週齢1・2・3, 及び成熟雄(体重約200g)のウイスター系ラットを用いてエーテル麻酔下を開腹し副腎を摘出, 被膜, 皮質を除去した後以下の実験に供した。

## 2. 副腎周辺灌流実験(図1)

山田・中井らの方法<sup>13)</sup>に準じて灌流実験を施行した。即ち細切した副腎組織10~20mgを37°C温浴中のチェンバー(容量0.25ml)に入れ, 95% O<sub>2</sub>・5% CO<sub>2</sub>にて飽和したソルビトール加乳酸リンゲル液(ラクテック G<sup>®</sup>) (大塚, 東京) で流速0.25ml/分にて灌流した。あらかじめ6規定の過塩素酸20μlを添加した試験管に灌流液を3分毎採取した。CA放出が安定化した後 DA 受容体拮抗剤 [メトクロプラミド (metoclopramide, MCP) (プリンペラン<sup>®</sup>) (藤沢薬品, 大阪), スルピリド (ドグマチール<sup>®</sup>) (藤沢薬品), ハロペリドール (セレネース<sup>®</sup>) (大日本製薬, 大阪)] を単独, あるいは DA 作動薬 [DA (塩酸ドパミン) (Sigma, St. Louis, U.S.A.), アポモルフィン (塩酸アポモルフィン) (Sigma), ドーパ (L-ドーパ) (Sigma)] の前処置下に負荷して CA 分泌量を検討した。CA 分泌量は各薬物負荷直前値を基礎値とし%表示した。

灌流液は孔径0.45μmのメンブランフィルター(日本ミリポア工業, 米沢)にて濾過した後電気化学的検出法を用いた高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) に直接

注入しノルエピネフリン (norepinephrine, NE), エピネフリン (epinephrine, E) を測定した。HPLCの測定条件はカラム; OD-MP 5μm 100×4.6mm (Brownlee Labs, Santa Clara, U.S.A.) 室温, ポンプ; Shimazu LC-5A(島津, 京都) 流速1.2ml/分, 移動相; 50mM リン酸2水素ナトリウム, 50mM トリクロロ酢酸, 200mg/l ラウリル硫酸ナトリウム, 10mg/l エチレンジアミン及び15容量%アセトニトリル pH 3.4, 検出器; Coulo-chem Model 5100A 電気化学的検出器 (ESA, Bedford, U.S.A.) (検出器1-0.05V, 検出器2+0.20V, ガードセル+0.25V) である。

## 3. 副腎の CA 含量

摘出した副腎組織を0.1規定の過塩素酸1ml中でホモゲナイズし, 遠心上清を孔径0.45μmのメンブランフィルターにて濾過後直接 HPLC へ注入して NE, E, DA 含量を測定した。副腎の全 CA 含量に対する DA の比率を%表示した。

4. 副腎のドーパデカルボキシラーゼ (aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) 及びドーパミンベータハドロキシラーゼ (dopamine β-hydroxylase, DBH) 活性

副腎組織を50倍容の0.25Mショ糖水溶液にてホモゲナイズして酵素液とし, 蛋白質はトネイン TR-kit<sup>®</sup> (大塚アッセイ, 徳島) にて定量した。AADC 活性は Rahman らの方法<sup>13)</sup>に従い L-ドーパを基質として生成された DA を蛍光法にて測定し, DBH 活性は Nagatsu らの方法<sup>14)</sup>に従いチラミンを基質として生成されたオクトパミンを分光光度法により測定した。

## 5. 副腎の DA 受容体

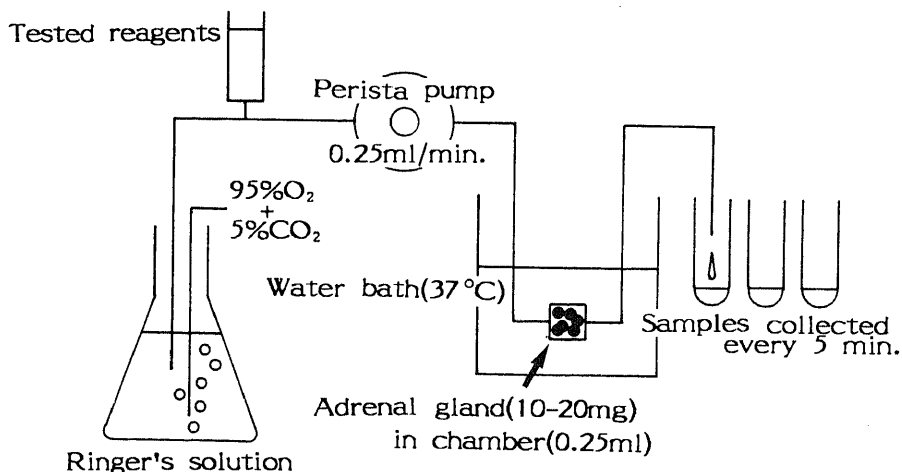


Fig. 1. Schematic diagram of rat adrenal gland perfusion system.

Gonzales らの方法<sup>9)</sup>に従い施行した。副腎組織を 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) にてホモゲナイズし、39,000g 15分遠心した沈渣を結合用緩衝液 (50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 120mM 塩化ナトリウム, 5mM 塩化カリウム, 2mM 塩化カルシウム, 1mM 塩化マグネシウム, 0.1%アスコルビン酸, 10  $\mu$ M パルジリン) にて蛋白量 1mg/ml に調整し受容体蛋白とした。受容体蛋白 100  $\mu$ l, <sup>3</sup>H-スπιペロン (0.25~10nM) (New England Nuclear, Boston, U.S.A.) 50  $\mu$ l 及びスπιペロン (エーザイ薬品, 東京より供与 終濃度として 10<sup>-9</sup>~10<sup>-10</sup>M) 5 0  $\mu$ l を 20°C, 30分インキュベートし水冷した結合用緩衝液 3ml を添加にて反応終了。グラスフィルター (Whatmann GF/C<sup>®</sup>) (Maidstone, U.S.A.) を用いた吸引濾過法により受容体結合トレーサーと遊離トレーサーを分離し、乾燥後液体シンチレーションカウンターにてカウントした。また <sup>3</sup>H-スπιペロンと受容体結合の温度 (0, 20, 37°C) 及び時間 (5~90分) 依存性、ならびに DA, ハロペリドール, スルピリド, スリピリド, NE との交叉性を検討した。

II. ヒトにおける DA 拮抗剤に対する CA, ALD, PRL の反応性の年齢的推移

1. 対象

基礎疾患のない健常小児 50 例, 成人 7 例 (男/女 = 6/1) を対象とした。小児は暫定的に (1) 0~1 歳 4 例 (男/女 = 2/2), (2) 1~6 歳 11 例 (5/6), (3) 6~12 歳 19 例 (11/8), (4) 12~16 歳 16 例 (8/8) の 4 群に群別した。

2. MCP 負荷試験

ヘパリン加生理食塩水にて静脈路を確保した後 MCP を 0.3mg/kg (最大量 10mg) 静脈内投与した。投与前, 投与 15 分, 30 分, 45 分後に採血 [(EDTA-2Na 含有採血管 VT-070NA<sup>®</sup>) (テルモ, 東京)] し, 直ちに, 血漿分離した後測定まで -20°C にて凍結保存した。各検体につき ALD 及び PRL は市販の RIA kit [(アルドステロン・I-125・キット<sup>®</sup>) (ミドリ十字, 千葉) 及び (プロラクチンキット「第一」II<sup>®</sup>) (第一ラジオアイソトープ, 東京)] にて測定した。血中 CA は血漿 1ml, 1M トリス塩酸緩衝液 pH 8.6 (エチレンジアミン 10mg/dl 添加) 2ml, ジハイロドシキベンジルアミン (Sigma) (内部標準) 500pg 及び活性アルナミ (和光純薬, 大阪) 10mg を 30 分ゆっくり攪混和してアルナミに吸着させた。アルナミを洗浄後 0.1 規定の過塩素酸 50  $\mu$ l 中に CA を抽出し, 前述の如く電気化学的検出器を備えた HPLC にて測定した。内部標準より求めた回収率は 53  $\pm$  3% で, 測定内及び測定間変動係数はそれぞれ 7 及び 11% であった。

3. 末梢リンパ球の DA 受容体の検討

Fur らの方法<sup>10)</sup>に準じて臍帯血, 成人末梢血中リンパ球の <sup>3</sup>H-スπιペロン結合能を検討した。ヘパリン加血約 20ml より Ficoll 法<sup>10)</sup>にてリンパ球を分離しハックス液にて 1  $\times$  10<sup>6</sup>/ml に調整した。このリンパ球浮遊液 1ml に <sup>3</sup>H-スπιペロン (2.5nM = ~50,000cpm) 50  $\mu$ l, 非標識スπιペロン (終濃度として 10<sup>-9</sup>~10<sup>-10</sup>M) 100  $\mu$ l 添加し 37°C, 1 時間振盪混和した。氷冷水浴中で氷冷ハックス液 2ml 添加にて反応を終了した。リンパ球結合トレーサーは前述の如くグラスフィルター吸引濾過法にて分離し, 液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。<sup>3</sup>H-スπιペロン結合能は添加した総カウントに対して%表示し, また 1/2 最大結合を示すスπιペロン濃度 (IC<sub>50</sub>) を比較した。

III. 統計学的処理

データはいずれも平均値  $\pm$  標準誤差にて標記した。2 群間の平均値の差の検定には Student の対応のない標本の t 検定を, また多群間の検定には一元配置分散分析の後 Scheffe もしくは Dannett の多重比較法を用いていずれも危険率を 5% 以下をもって有意差ありと判定した。

成 績

I. ラット副腎からの CA 放出に関する検討

1. 輻腎周辺灌流実験

図 2 の如く NE, E 分泌は灌流開始約 3 時間後にはほぼ一定となり, また 4~5 時間後においてもニコチンに対する反応性は保たれていた。従って以下の実験

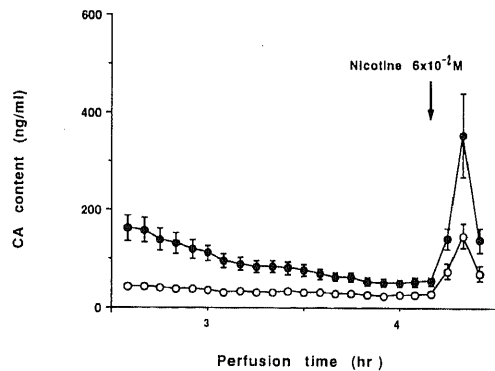


Fig. 2. Catecholamine (CA) concentrations in the perfusates of adult male rat adrenal glands perfusion study, and the CA response to nicotine stimulation (6  $\times$  10<sup>-2</sup> M). ○, norepinephrine; ●, epinephrine. Vertical bar, mean  $\pm$  SEM for five independent perfusion studies.

では3時間後より薬物負荷を開始した。灌流開始3時間後における各週齢ラット副腎からのCA分泌の基礎値はNE, Eともいずれの群間においても有意差は見られなかった(図3)。

成熟雄ラットにおいてMCP負荷前後におけるCA分泌のクロマトグラムを図4に示す。実験間のバラツキを小さくするため以下CA分泌反応は薬物負荷直前の値を100%としてパーセント表示した。成熟雄ラットにおいてDA拮抗剤に対するCA分泌反応はスルピリド, ハロペリドール, MCPいずれも用量依存性に増加した(図5)。また成熟ラットにおいてMCPによるCA分泌増加反応はDA, アポモルフィン, L-ドーパのDA作動薬 $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$ Mの前処理により用量依存性に抑制された(図6)。

日齢4の幼若ラット副腎のDA拮抗剤に対するCA分泌反応はMCP, ハロペリドール, スルピリドいずれにおいても成熟ラットに比較して有意に過大であった(図7)。このうち最も年齢差が顕著であったMCPにつき経年齢的に検討したところCA分泌反応は暫時低下し、ほぼ3週齢までには成熟ラットと同程度の反応となった(図8)。

## 2. 副腎のDAの含量(表1)

副腎の全CA含量に対するDAの%含量は幼若ラットにおいて最も多く経年齢的に暫時低下し、3週

齢でほぼ成熟ラットと同程度となった。

## 3. 副腎のAADC, 及びDBH活性(表1)

AADC, DBH活性いずれも幼若ラットにおいて有意に低値で年齢とともに暫時増加し、3週齢でほぼ成熟レベルに達した。

## 4. 副腎DA受容体

成熟雄ラットにおいて副腎組織の $^3$ H-スピペロン結合能は時間, 温度依存性で $20^{\circ}\text{C}$ , 30分で最大となり, また非標識スピペロン $10^{-5}\text{M}$ の添加により速やかに解離した(図9)。IC<sub>50</sub>はスピペロン<ハロペリドール<スルピリド<ドーパミン<ノルピネフリンであった(図10)。

スキッチャード解析により求めた週齢1の幼若ラット副腎の $^3$ H-スピペロン結合能は結合容量, 受容体親和性とも成熟ラットに比較していずれも有意に低値であった(図11)。

## II. ヒトにおけるDAによる抑制機構の成熟過程

### 1. MCP負荷試験に対する反応性の年齢的推移

#### 1) ALDの反応性(図12)。

ALDの分泌反応は乳幼児期において過大であり年齢と共に低下した。思春期頃までにはほぼ成人と同程度の反応となった。乳幼児期におけるALDは基礎値, 頂値とも成人に比較して有意に高値であった。

#### 2) PRLの反応性(図13)。

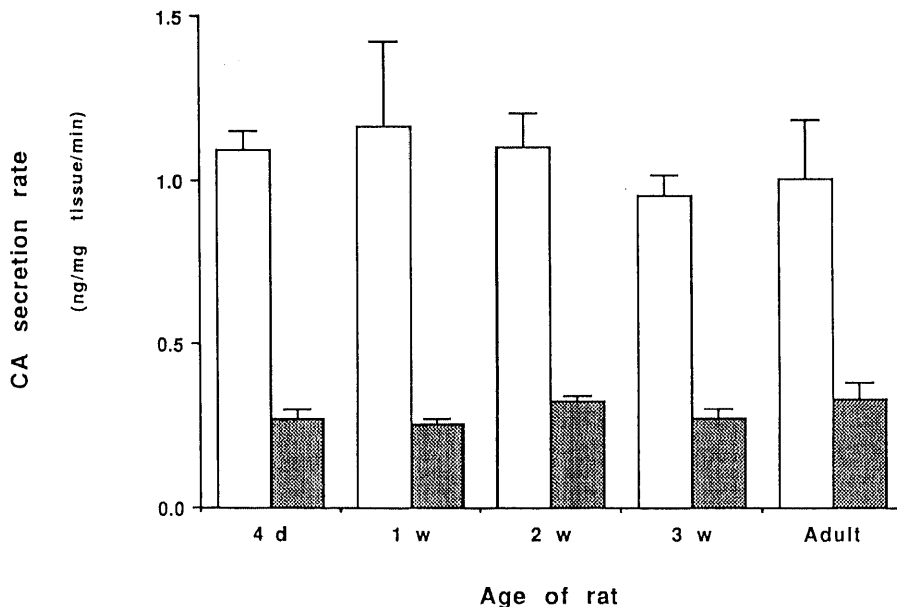


Fig. 3. Basal catecholamine secretion rate at three hours after the initiation of adrenal gland perfusion study in each age group rats. ■, norepinephrine; □, epinephrine. Vertical bar, mean±SEM for 4 independent perfusion studies.

PRL の分泌反応は乳幼児期において過大であり男児においてはほぼ年齢と共に低下したが、女児においては思春期以降著増した。乳幼児期における PRL は基礎値、頂値とも成人男性に比較して有意に高値であり、また思春期以降の女性の PRL 頂値は年齢相当の男性に比較して有意に高値であった。

### 3) CA の反応性

乳幼児期の NE, E の基礎値は成人に比較して有意に高値であった (図 14-a)。MCP 負荷に対して NE, E は各年齢層とも増加あるいは低下反応いずれも見られたが、全体としては低年齢層程 CA の変動幅が大きい傾向があった (図 14-b)。また NE, E の明らかな増加反応が確認されたものが各年齢層に占める比率は経年的に暫時増加し、成人においてはほぼ全例 NE, E は増加した (図 15)。DA の基礎値は乳児期において成人に比較して有意に高値であり、また MCP 負荷に対する DA の変動幅も乳児期において有意に高値であった (図 16)。

### 2. 末梢リンパ球の DA 受容体

臍帯血中リンパ球の  $^3\text{H}$ -スピペロン結合能は成人リンパ球に比較して高容量 (臍帯血  $6.0 \pm 0.8\% / 10^6 \cdot$  リンパ球, 成人血  $3.6 \pm 0.1\% / 10^6 \cdot$  リンパ球) であったが、非標識スピペロンに対する  $\text{IC}_{50}$  は有意に高値 (臍帯血  $7.8 \pm 0.4 \times 10^{-7}\text{M}$ , 成人血  $2.1 \pm 0.2 \times 10^{-7}\text{M}$ ) であり低親和性であった (図 17)。

## 考 察

今回のラット副腎周辺灌流系を用いた検討で DA 拮抗剤は用量依存性に CA 分泌を促進し、またこの促進効果は DA 作動薬の前処理によって阻害された。これまで牛、猫の副腎灌流系においても同様の結果が報告されている<sup>30)</sup>。また重富ら<sup>10)</sup>は我々と同じラット副腎周辺灌流系において DA の前処理が MCP による NE, E の分泌促進効果は抑制するが、グルカゴンによる NE, E の放出作用には影響しないことを示している。以上の知見は副腎髄質における CA 分泌が DA による特異的な抑制的制御を受けていることを示唆する。

末梢交感神経系に対して DA はシナプス前の特異的 DA 受容体を介して神経末端からの CA 分泌を抑制することが報告されている<sup>30)</sup>。末梢交感神経と副腎髄質クロム親和性細胞とは発生学的にも、また多くの機能的役割において類似している。従って副腎髄質においても特異的 DA 受容体を介した CA 分泌制御機構の存在が想定された。今回 DA 受容体拮抗剤である  $^3\text{H}$ -スピペロンを用いた副腎髄質膜分画の結合実験よ

り特異的 DA 受容体の存在が確認された。

DA 受容体にはアデニールサイクラーゼ活性と共役した  $\text{D}_1$  受容体と、共役しない (あるいは抑制的に共役した)  $\text{D}_2$  受容体とに分類されている<sup>17)18)</sup>。DA による交感神経末端での CA 分泌制御は  $\text{D}_2$  受容体を介するとされている<sup>7)</sup>。今回リガンドとして使用したブチロフェノン系薬剤であるスピペロンは低濃度では  $\text{D}_1$  受容体よりも  $\text{D}_2$  受容体に対する親和性が大きく<sup>19)</sup>、またより選択的な  $\text{D}_2$  受容体拮抗剤であるハロペリドール

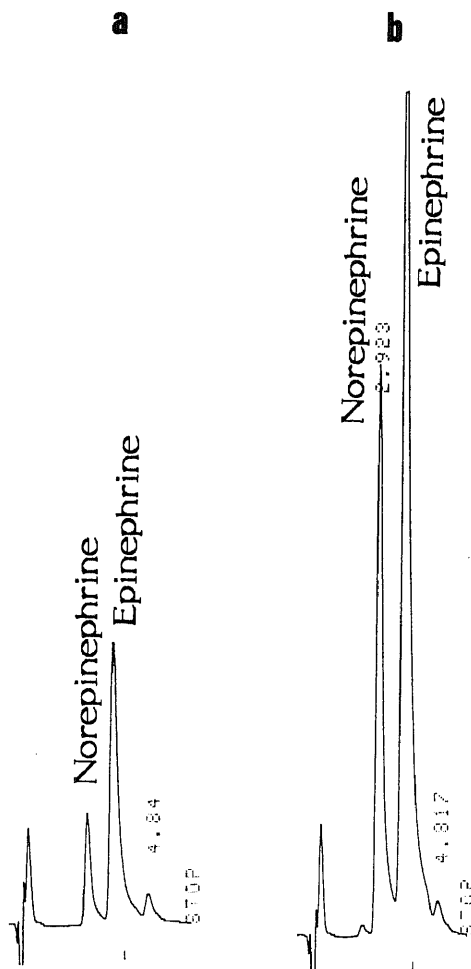
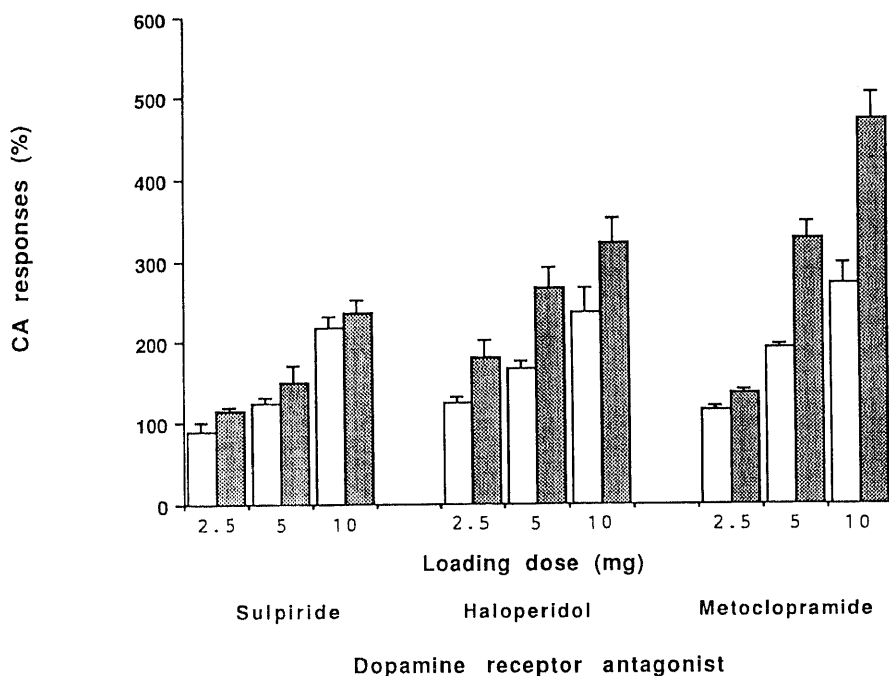
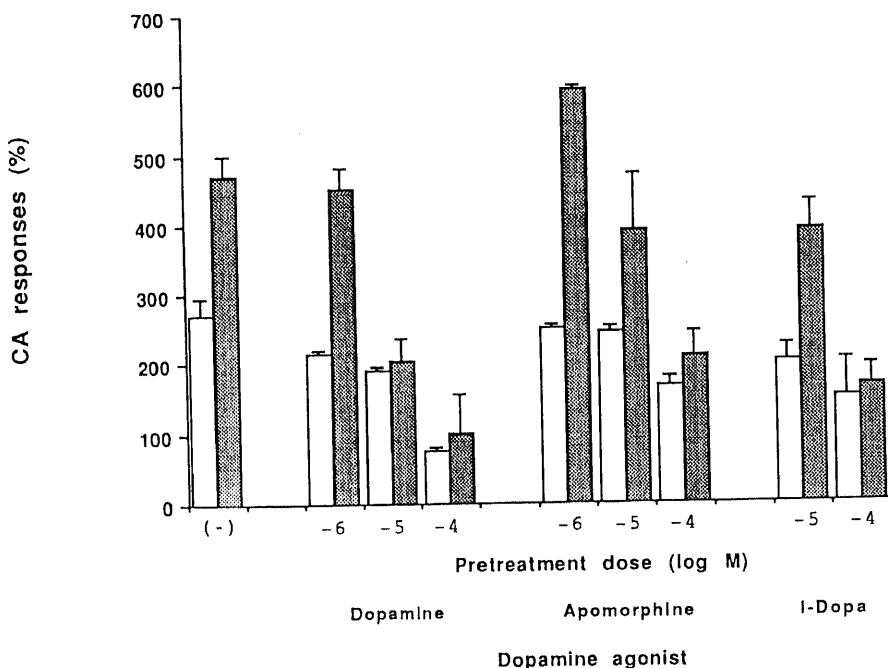


Fig. 4. Chromatogram showing the catecholamine (CA) responses to metoclopramide loading (10mg) in the perfusion of adult male rat adrenal gland. CA content was determined by using highperformance liquid chromatography with electrochemical detector. a, before metoclopramide loading; b, just after the loading.



**Dopamine receptor antagonist**  
 Fig. 5. Dose-dependent responses of catecholamine to dopamine receptor antagonists in the perfusion study of adult male rat adrenal glands. ■, norepinephrine; □, epinephrine. Vertical bar, mean±SEM for 4 independent perfusion study.



**Dopamine agonist**  
 Fig. 6. Catecholamine responses to metoclopramide (10mg) after pretreatment of dopamine agonists in the perfused study of adult male rat adrenal gland. ■, norepinephrine; □, epinephrine. Vertical bar, mean±SEM for 4 independent perfusion study.

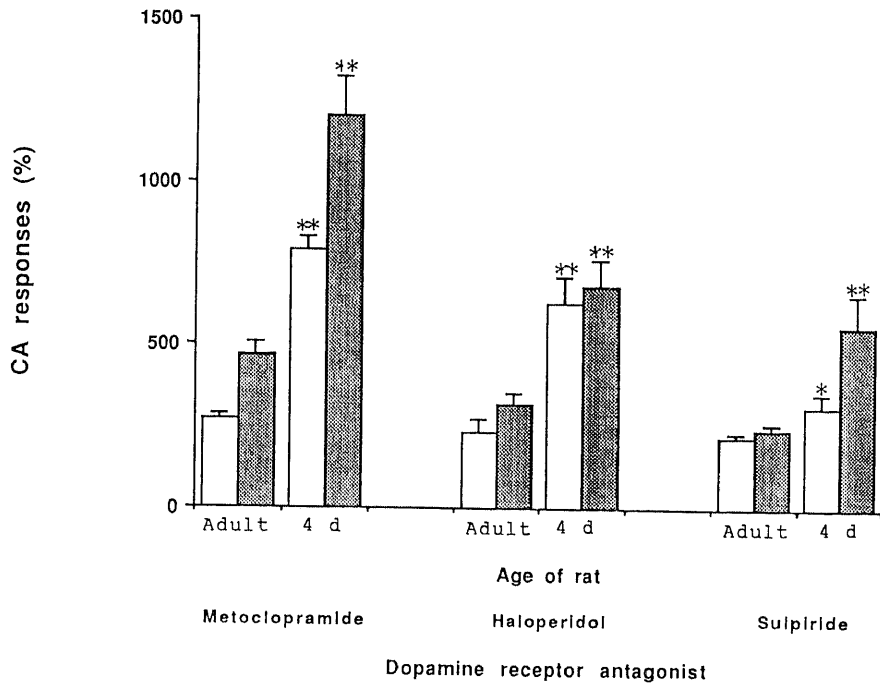


Fig. 7. Catecholamine responses to dopamine antagonist (10mg) in the perfusion studies of 4-day-old and adult rats adrenal glands. ■, norepinephrine; □, epinephrine. Vertical bar, mean±SEM of four or five perfusion studies. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01 vs adult rats.

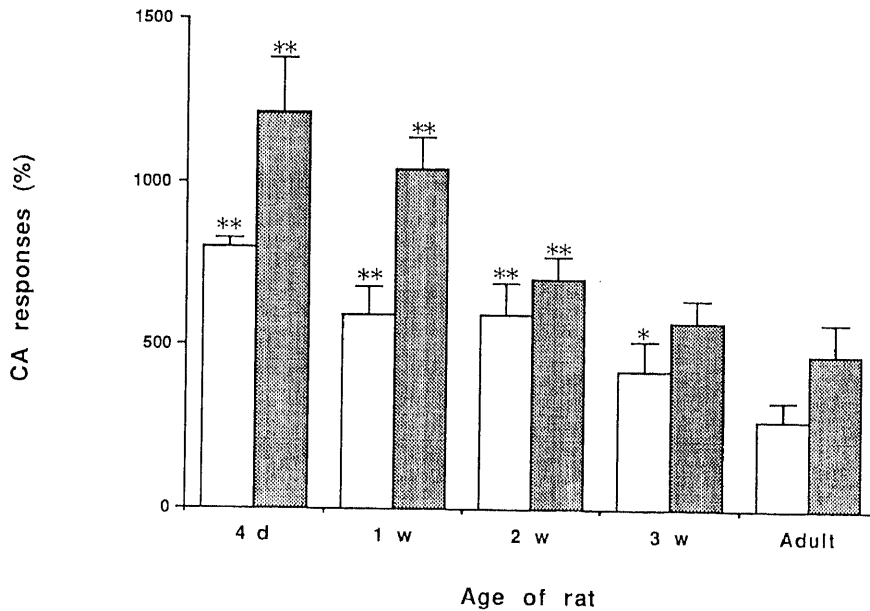


Fig. 8. Age-dependent catecholamine responses of rat adrenal gland to metoclopramide (10mg) in the perfusion study. ■, norepinephrine; □, epinephrine. Vertical bar, mean±SEM of four or five perfusion studies. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01 vs adult rats.



は他の DA 拮抗剤 ( $D_2$  受容体作用としては弱いスルピリド) に比較してより低濃度で  $^3\text{H}$ -スピペロン結合を解離した。以上よりラット副腎髄質には  $D_2$  受容体が存在するものと思われた。成熟雄ラット副腎  $^3\text{H}$ -スピペロン結合のスキッチャード解析より求めた DA 受容体の性状 (結合容量 = 114 fmol/mg. protein, 親和定数 = 6.7 nM) は牛副腎髄質 DA 受容体の報告値<sup>9)</sup> (結合容量 = 104 fmol/mg. protein, 親和定数 = 0.22 nM) よりも低親和性であったが、これは種族の差異による

ものかもしれない。実際今回の測定値はラット副腎球状層に同定される DA 受容体<sup>20)</sup> (結合容量 = 173 fmol/mg. protein, 親和定数 = 6.9 nM) とはほぼ同程度であった。

これまで免疫組織学的手法により胎児副腎の CA 合成酵素 (DBH, フェニルエタノールアミン H-メチルトランスフェラーゼ等) が妊娠中期後半には確認されており<sup>21)</sup>, また出生時に新生児副腎はストレスに対応して十分に CA を分泌しうることが示されている<sup>22,23)</sup>.

Table 1. Dopamine content, and AADC<sup>1)</sup> and DBH<sup>2)</sup> activities in adrenal gland in each age group rat

Property	Age of rat				
	4-day	1-week	2-week	3-week	Adult
Dopamine content (%) <sup>3)</sup>	8.6 ± 0.4**	6.2 ± 0.2**	2.0 ± 0.2**	1.4 ± 0.2**	1.0 ± 0.2
AADC activity (nmol/mg tissue/20min)	1.3 ± 0.3*	1.6 ± 0.3*	1.9 ± 0.2*	2.3 ± 0.3	2.5 ± 0.3
DBH activity (nmol/mg tissue/hr)	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.1*	1.9 ± 0.2*	2.1 ± 0.4	2.2 ± 0.4

Each data indicates the mean ± SEM in five to seven experiments.

1) AADC, aromatic L-amino acid decarboxylase

2) DBH, dopamine  $\beta$ -hydroxylase

3) Dopamine content was expressed as percentages to total catecholamine content of adrenal gland.

\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  vs adult rats

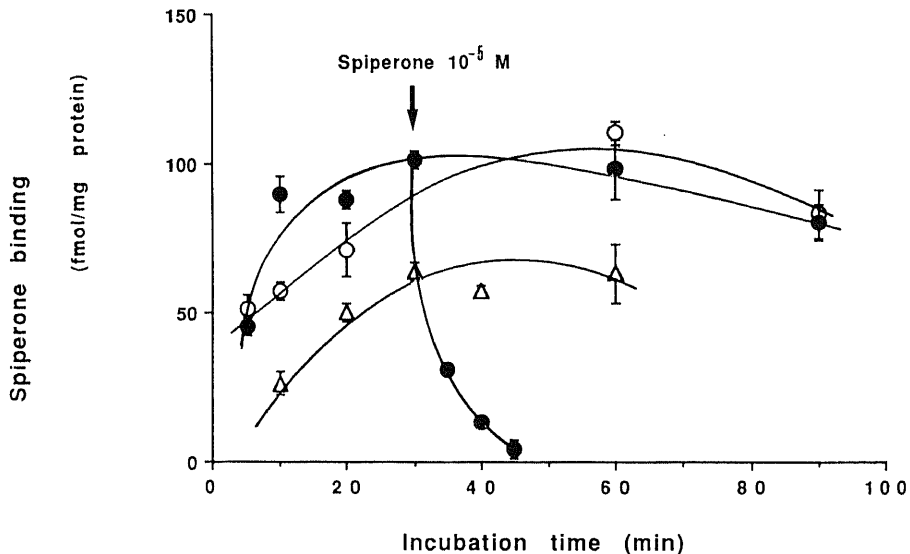


Fig. 9. Time kinetics and temperature dependency of binding and reversal of  $^3\text{H}$ -spiiperone to membrane fraction of rat adrenal gland.  $\circ$ ,  $0^\circ\text{C}$ ;  $\bullet$ ,  $20^\circ\text{C}$ ;  $\triangle$ ,  $37^\circ\text{C}$ . Vertical bar, mean  $\pm$  SEM.

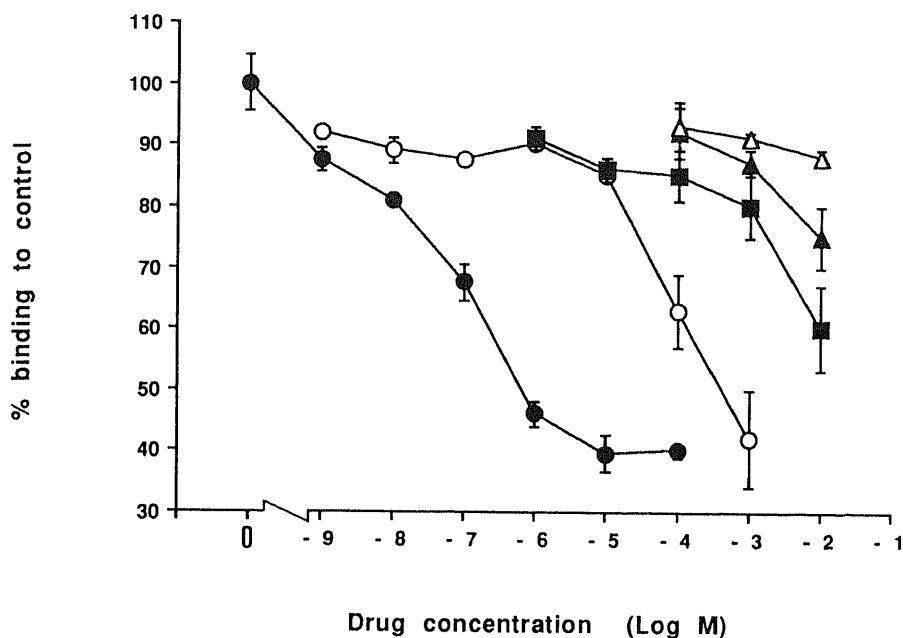


Fig. 10. Effects of spiperone (●), haloperidol (○), sulpiride (■), dopamine (▲) and norepinephrine (△) on binding of <sup>3</sup>H-spiperone to membrane fraction of rat adrenal gland. Data are expressed as percentages to the total binding in the absence of drug. Vertical bar, mean±SEM for triplicate assay.

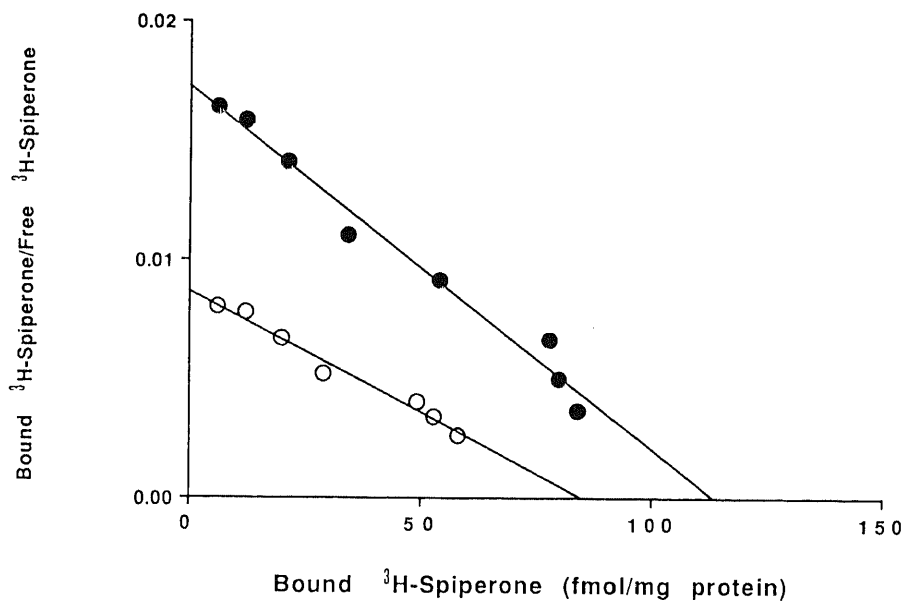


Fig. 11. Scatchard plot of <sup>3</sup>H-spiperone binding to membrane fraction of adult and neonatal (1 week-old) rat adrenal gland, in the absence and presence of 10  $\mu$  M spiperone to define the nonspecific and specific binding. Each plot is representative of the mean of three experiments performed in triplicate assay. Adult rat (●),  $B_{max}=114\pm 12$ fmol/mg protein,  $K_D=6.7\pm 1.0$ nM; neonatal rat (○),  $B_{max}=88\pm 8$ fmol/mg protein,  $K_D=10.5\pm 1.9$ nM.

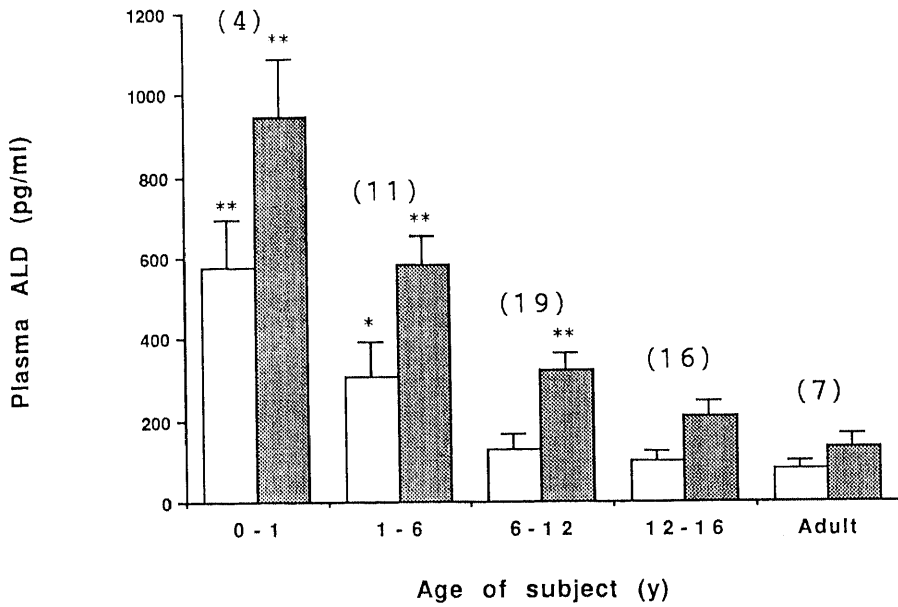


Fig.12. Age-related changes in basal (□) and peak (■) values of plasma aldosterone in metoclopramide loading test. Figure in parenthesis indicates the number of tested subjects. Vertical bar, mean±SEM. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01 vs adults.

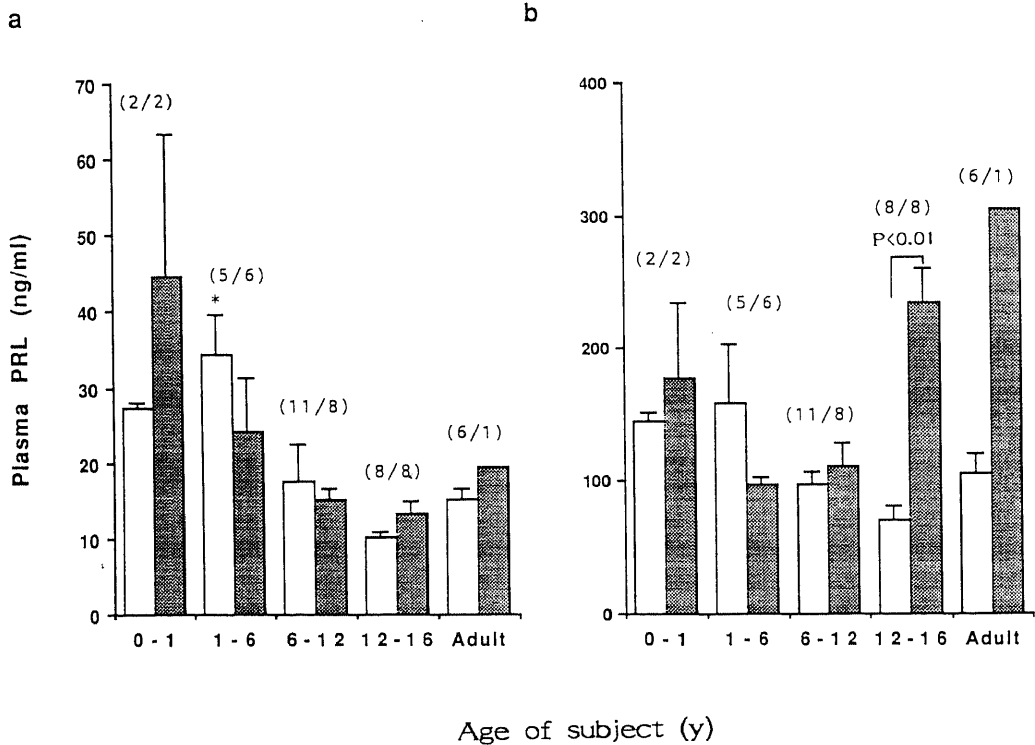


Fig.13. Age-related changes in basal (a) and peak (b) values of plasma prolactin (PRL) in metoclopramide loading test. Figure in parenthesis indicates the number of subjects tested (male/female). □, male; ■, female. Vertical bar, mean±SEM. \*, p<0.05 vs adult.

しかし幼若期における副腎からのCA分泌調節機構に関しては成人期に比較してほとんど解明されていない。今回の副腎周辺灌流実験において幼若ラット副腎はいずれのDA拮抗剤に対しても成熟ラットに比較

して有意に高いCA分泌反応を示した。副腎組織のDBHやAADC活性は経年的に暫時増加しており、幼若期におけるCA分泌亢進はCAの生合成に起因するものではなかった。また副腎の全CAに占める相対的

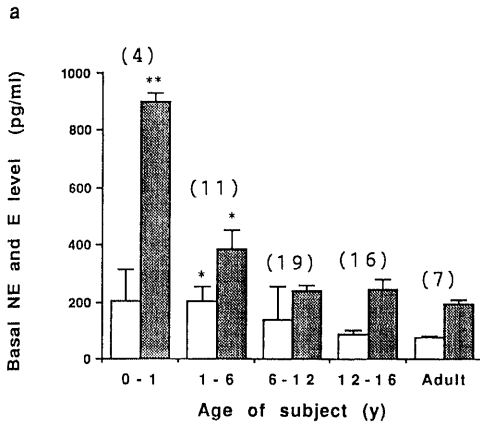


Fig. 14-a Basal norepinephrine (NE) and epinephrine (E) levels in each age group. Figure in parenthesis indicates the number of subjects tested. □, E; ■, NE. Vertical bar, mean ± SEM. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs adult.

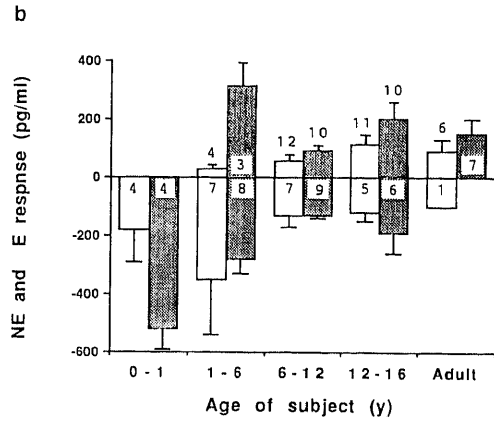


Fig. 14-b Responses of NE and E from basal values to metoclopramide administration in each age group. Figure in the column indicates the number of subjects tested. □, E; ■, NE. Vertical bar, mean ± SEM.

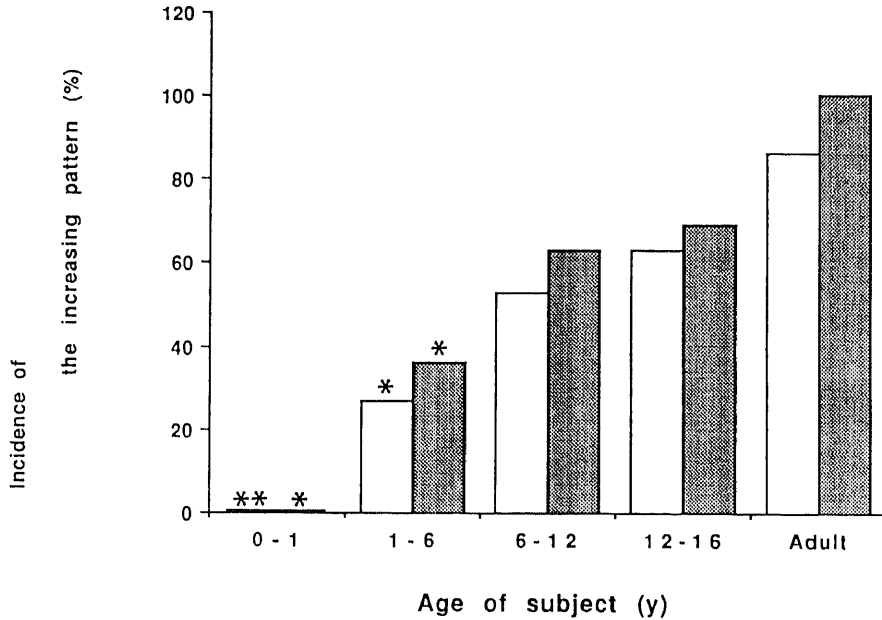


Fig. 15. Incidence of the increasing pattern of norepinephrine (NE) and epinephrine (E) responses to metoclopramide loading. □, E; ■, NE. \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01 vs adults.

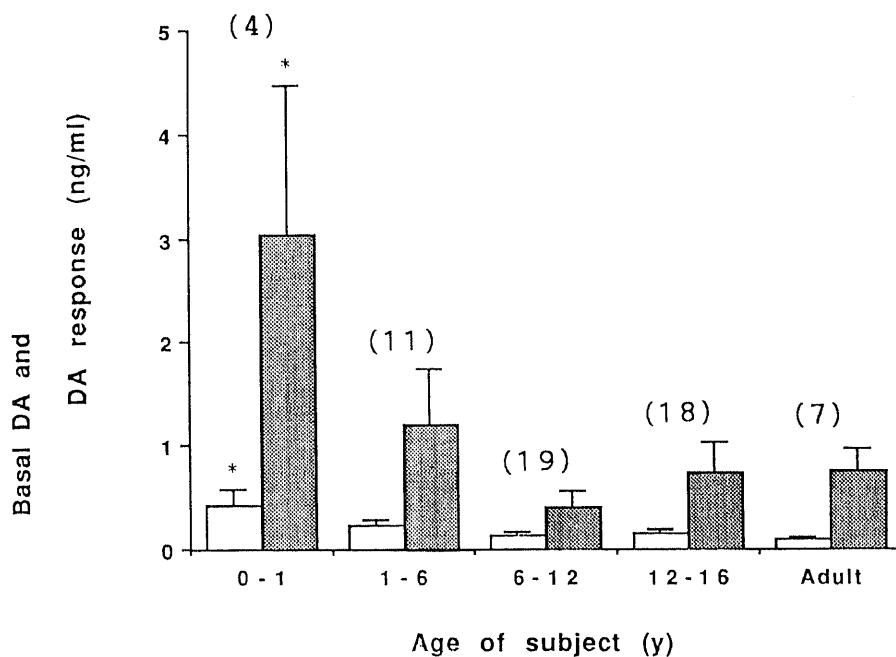


Fig. 16. Basal dopamine (DA) levels ( $\square$ ) and the absolute values of DA responses from basal levels after metoclopramide loading ( $\blacksquare$ ). Figure in the parenthesis indicates the number of subjects tested. Vertical bar, mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  vs adult.

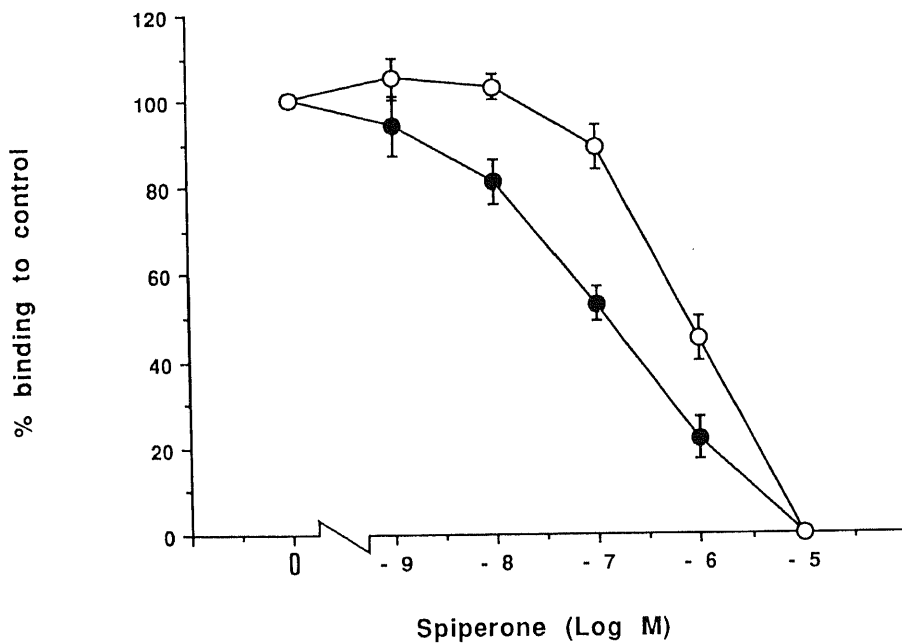


Fig. 17. Displacement curve of the binding of  $^3\text{H}$ -spiroperone to peripheral lymphocytes from adult ( $\bullet$ ) and cord blood ( $\circ$ ). Data are expressed as percentages to total binding in the absence of spiroperone. Each data is the mean  $\pm$  SEM of the five independent experiments for triplicate assay.

な DA 含量は幼若ラットにおいてむしろ高値であることより、DA 受容体を介した CA 分泌制御機構の未熟性が想定された。実際幼若ラット副腎の DA 受容体は成熟ラットに比較して低結合容量かつ低親和性であった。以上より幼若期においても DA は CA 分泌制御因子として作用しうること、また DA による制御機構は年齢とともに成熟すること、さらにこの成熟過程には DA 受容体の機能的発達が関与することが示唆された。

交感神経末端や副腎髄質からの CA 分泌同様に、下垂体からの PRL 分泌あるいは副腎皮質からの ALD 分泌もまた DA により抑制的に調節されている<sup>8-10</sup>。かかる制御機構も下垂体あるいは副腎皮質球状層に存在する DA 受容体を介するとされている<sup>12,20</sup>。MCP はプロカイナミド誘導体で、非選択的な DA 受容体拮抗剤としての作用を有している<sup>20</sup>。本剤は下垂体あるいは副腎の DA 受容体に直接作用し、DA による制御を解除することにより PRL 及び ALD の分泌を促進する<sup>20,27</sup>。従って MCP は内因性の DA によるホルモン分泌制御の程度を間接的に評価する手段として用いられる<sup>20</sup>。

今回のヒトにおける検討で、乳幼児期の PRL、ALD の基礎値及び MCP 負荷に対する分泌頂値は成人に比較して有意に高値であり、経年的に暫時低下した。このことは乳幼児期において DA による PRL、ALD の分泌制御機構が未熟であり、年齢とともに成熟過程をたどる可能性を示唆する。これまで MCP 負荷に対して ALD が過剰分泌する病態として原発性アルドステロン症が報告されている<sup>20</sup>。本症では血中の DA 濃度と鏡面的に ALD 濃度の推移することが報告されており<sup>20</sup>、DA による ALD 分泌制御機構を考える上で興味深い。実際 MCP 負荷に対する血中 DA の反応性・変動幅は乳幼児期においてより顕著であり、また末梢リンパ球の DA 受容体は臍帯血においてより低親和性であった。ヒトで末梢リンパ球の DA 受容体がどの程度に中枢・末梢交感神経系の DA 受容体を反映し得るかは今後の課題である。しかし少なくともラットではリンパ球上の DA 受容体と中枢神経系の DA 受容体の性状とは類似することが示されている<sup>15</sup>。以上の知見は幼若期において DA 受容体を介した DA による制御機構が未熟であるという可能性を支持する所見である。一方 Sulyok ら<sup>18</sup>は在胎 28~31 週の未熟児を対象に MCP を 3 日間経口投与した後、血中・尿中の ALD 濃度は低下したと報告している。今回の結果と全く対照的な彼らの成績は一つには対象や MCP 投与方法の違いによるものかもしれない

が、それ以上の解釈は困難である。また MCP による ALD、PRL の分泌機構には DA 拮抗剤作用の他にも抗セロトニン作用、コリン作動性機構、カリウムイオンの細胞内外での変位作用なども想定されており<sup>20-22</sup>結果の解釈には慎重を要する。更に思春期以降では女兒の PRL の反応性は男児とは明らかに異なっており、この点に関しては今後の課題である。

一方 NE、E の基礎値は乳幼児期において高値であったが、MCP に対する反応性は成人とは異なっていた。即ち、成人では MCP 負荷に対して NE、E 分泌は増加したが、低年齢ほど CA の増加反応を示すものの頻度は低下した。これまで成人では DA 作動薬（プロモクリプテン、L-ドーパなど）の投与により CA の基礎値及び立位負荷時の反応性が制御されること<sup>23,24</sup>、あるいは尿中 CA 排泄の低下することが報告されている<sup>25</sup>。以上の所見より DA による CA の分泌制御機構は成人において確立しているが、幼若期においてはやはり未熟で不安定なのかもしれない。

## 結 論

1. ラット副腎灌流系において各 DA 拮抗剤は用量依存性に CA 分泌を促進し、この促進効果は DA 作動薬存在下に用量依存性に阻害された。

2. 幼若ラット副腎の DA 拮抗剤に対する CA 分泌促進効果は成熟ラットに比較して有意に過大であり、3 週齢までにはほぼ成熟レベルに低下した。

3. 成熟ラットに比較して幼若ラット副腎の DA 含量比は有意に高値であり、また DA 受容体の結合容量・親和性とも低値であった。

4. ヒトでは MCP 負荷に対して乳幼児の ALD・PRL の基礎値、分泌頂値は成人に比較して有意に高値であった。また NE・E の基礎値は乳幼児期において高値であり、MCP 負荷に対して NE・E の分泌増加反応を示すものの頻度は経年論的に暫時増加し成人ではほぼ全例が増加した。

5. MCP 負荷に対する DA の分泌反応・変動幅は乳幼児期において過大であり、また臍帯血リンパ球の DA 受容体は成人に比較して高結合容量・低親和性であった。

以上の結果よりラット副腎における DA による CA 分泌制御機構は幼若期において未熟であり加齢とともにほぼ 3 週齢までに成熟レベルに達すること、またこの成熟過程には DA 受容体の機能的発達が関与する可能性が示唆された。またヒトにおいても受容体を介した内因性 DA の ALD・PRL・CA 分泌制御作用は乳幼児期において未熟であり、年齢とともに成熟す

ることが示唆された。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に深く感謝の意を表します。また終始直接の御指導と御助言を頂きました佐藤保助教授はじめ、研究に御協力頂きました小児科内分泌グループならびに教室員の諸先生方に心より感謝致します。またスピベロンを供与いただきましたエーザイ薬品に深謝致します。

なお本稿の要旨は 8th International Congress of Endocrinology (Kyoto, 1988), 第61回日本内分泌学会秋季大会(於大阪, 1988)において発表した。

### 文 献

- 1) Woodruff, G. N., Poat, J. A. & Roberts, P. J.: Dopaminergic Systems and Their Regulation, 1st ed., p97-212, VCH Publishers, Deerfield Beach, 1986.
- 2) Cooper, J. R. Bloom, F. E. & Roth, R. H.: The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 5th ed., p203-314, Oxford Univ. Press, New York, 1986.
- 3) Gonzales, M. C., Artalejo, A. R., Montiel, C., Hervas, P. P. & Garcia, A. G.: Characterization of a dopaminergic receptor that modulates adrenomedullary catecholamine release. *J. Neurochem.*, **47**, 382-388 (1986).
- 4) Artalejo, A. R., Garcia, A. G., Montiel, C. & Garcia, P. S.: A dopaminergic receptor modulates catecholamine release from the cat adrenal gland. *J. Physiol.*, **362**, 359-368 (1985).
- 5) Lokhandwala, M. F., & Buckley, J. P.: Analysis of presynaptic inhibitory actions of various dopamine analogs on sympathetic neurotransmission in mongrel dogs. *Life Sci.*, **20**, 507-516 (1977).
- 6) Hope, W., Majewski, H., McCulloch, M. W., Rand, M. J. & Story, D. F.: Evidence for a modulatory role of dopamine in sympathetic transmission. *Circ. Res.*, **46**, 77-79 (1980).
- 7) Cavero, I., Massingham, R. & Borg, F. L.: Peripheral dopamine receptors, potential targets for a new class of antihypertensive agents. *Life Sci.*, **31**, 1059-1069 (1982).
- 8) Noth, R. H., McCullum, R. W., Contion, C. & Havelick, J.: Tonic dopaminergic suppression of plasma aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 64-69 (1980).
- 9) Sequeira, S. J. & McKenna, T. J.: Examination of the effects of epinephrine, norepinephrine, and dopamine on aldosterone production in bovine glomerulosa cells in vitro. *Endocrinology*, **117**, 1947-1952 (1985).
- 10) Brouwers, J. R. B. J., Assies, J., Wiersinga, W. M., Huzing, G. & Tytgat, G. N.: Plasma prolactin levels after acute and subchronic oral administration of domperidone and of metoclopramide. *Clin. Endocrinol.*, **12**, 435-440 (1980).
- 11) Sulyok, E., Ertl, T., Varga, L., Bodis, J. & Csaba, I. F.: The effect of metoclopramide administration on electrolyte status and activity of renin-angiotensin-aldosterone system in premature infants. *Pediatr. Res.*, **19**, 912-915 (1985).
- 12) 山田律爾, 中井利昭: 周辺灌流システムを用いての副腎髄質よりのカテコラミン放出に対する $\alpha$ -Receptor blocker (phentlamine, レヂチン)の影響. *日内分泌会誌*, **53**, 250-258 (1977).
- 13) Rahman, M. K., Nagatsu, T. & Kato, T.: Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with L-dopa and L-5-hydroxytryptophan as substrates. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 645-649 (1981).
- 14) Nagatsu, T. & Kazuya, H.: A simple assay of dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity in homogenate of the adrenal medulla. *Enzymologia*, **36**, 31-36 (1969).
- 15) Fur, G. L., Phan, T. & Uzan, A.: Identification of stereo-specific  $^3\text{H}$ -spiroperidol binding sites in mammalian lymphocytes. *Life Sci.*, **26**, 250-258 (1980).
- 16) 重富秀一, 上野修一, 福地総逸: 副腎髄質からのノルエピネフリンおよびエピネフリン放出に対するドーパミンの効果: 心房性ナトリウム利尿ペプチドとの比較検討. *日内分泌会誌*, **63**, 836-845 (1987).
- 17) Keibian, J. W. & Calne, D. B.: Multiple receptors for dopamine. *Nature*, **277**, 93-96 (1979).
- 18) Stoof, J. C. & Keibian, J. W.: Two dopamine receptors: Biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sci.*, **35**, 2281-2296 (1984).
- 19) 小川紀雄: 新・脳のレセプター, 第1版, 159-179頁, 世界保険通信社, 大阪, 1989.
- 20) Dunn, M. G. & Bosmann, H. B.: Peripheral

- dopamine receptor identification: Properties of a specific dopamine receptor in the rat adrenal zona glomerulosa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 1081-1087 (1981).
- 21) Wilburn, L. A., Goldsmith, P. C., Chang, K. J. & Jaffe, R. B.: Ontogeny of enkephalin and catecholamine synthesizing enzymes in the primate fetal adrenal medulla. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **63**, 974-980 (1986).
- 22) Seidler, F. J. & Slotkin, T. A.: Adrenomedullary function in the neonatal rat: Responses to acute hypoxia. *J. Physiol.*, **358**, 1-16 (1985).
- 23) Lagercrantz, H. & Bistoletti, P.: Catecholamine release in the newborn infant at birth. *Pediatr. Res.*, **11**, 889-893 (1973).
- 24) Carey, R. M., Thorner, M. O. & Ortt, E. M.: Dopaminergic inhibition of metoclopramide-induced aldosterone secretion in man. *J. Clin. Invest.*, **66**, 10-18 (1980).
- 25) Barrett, R. J., Wright, K. F., Taylor, D. R. & Proakis, A. G.: Involvement of dopamine receptor subtypes in dopaminergic modulation of aldosterone secretion in rats. *Life Sci.*, **40**, 1499-1506 (1987).
- 26) Albibi, R. & McCullum, R. W.: Metoclopramide: Pharmacology and clinical application. *Ann. Int. Med.*, **98**, 86-95 (1983).
- 27) Pratt, J. H., Ganguly, A., Parkinson, C. A. & Weiberger, M. H.: Stimulation of aldosterone secretion by metoclopramide in humans: Apparent independence of renal and pituitary mediation. *Metabolism*, **30**, 129-134 (1981).
- 28) 清水泰行: 正常人, 原発性アルドステロン症および特異性アルドステロン症のミネラルコルチコイド分泌におけるドーパミン作動機構の意識. 日内分泌会誌, **60**, 1-15 (1984).
- 29) Kuchel, O., Buu, N. T., Vecsei, P., Bourque, M., Hamet, P. & Genest, J.: Are plasma aldosterone surges in primary aldosteronism due to a loss of an inhibitory dopaminergic control? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 337-344 (1980).
- 30) Campbell, D. J., Mendelsohn, F. A. O., Adam, W. R. & Funder, J. W.: Is aldosterone secretion under dopaminergic control? *Circ. Res.*, **49**, 1217-1227 (1981).
- 31) Ganguly, A.: Dopaminergic regulation of aldosterone secretion: How credible? *Clin. Sci.*, **66**, 631-637 (1984).
- 32) Fang, V. S. & Shian, L. R.: A Serotonergic mechanism of the prolactin-stimulating action of metoclopramide. *Endocrinology*, **108**, 1622-1627 (1981).
- 33) Whitfield, L., Sowers, J. R., Tuck, M. L. & Golub, M. S.: Dopaminergic control of plasma catecholamine and aldosterone responses to acute stimuli in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 724-729 (1980).
- 34) Carey, R. M., Loon, G. R. V., Baines, A. D. & Kaiser, D. L.: Suppression of basal and stimulated noradrenergic activities by the dopamine agonist bromocriptine in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **56**, 595-602 (1983).
- 35) Sato, T., Igarashi, I., Minami, S., Okabe, T., Hashimoto, H., Hasui, M. & Kato, E.: Recurrent attacks of vomiting, hypertension and psychotic depression: a syndrome of periodic catecholamine and prostaglandin discharge. *Acta Endocrinol.*, **117**, 189-197 (1988).



**Maturational Changes in Dopaminergic Inhibitory Regulation on Catecholamine Metabolism** Noboru Igarashi, Department of pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med. Soc., **99**, 963 - 978 (1990)

**Key words** dopamine, dopamine receptor, catecholamine, aldosterone, prolactin

#### **Abstract**

The author examined the maturational changes in dopaminergic (DA) inhibition of catecholamine (CA) secretion in rat and humans. DA receptor antagonists, metoclopramide (MCP), haloperidol and sulpiride, evoked CA release from perfused adrenal gland in a dose-dependent manner in adult rats, and these stimulatory effects were abolished by DA agonists. In neonatal rats, the CA release evoked by the DA antagonists was significantly higher than that in adult rats and gradually decreased with advancing age. In young rats, the percentage content of DA in the adrenal gland was higher, and the binding capacity and affinity of the adrenal DA receptor was less than those in adult rats. Basal levels and responses of aldosterone (ALD) and prolactin (PRL) to MCP, which are under the inhibitory regulation of DA, were significantly higher in younger children. Adults showed a definite increase of norepinephrine (NE) and epinephrine (E) to MCP. In contrast, infants showed a reduction of NE and E after MCP loading. Gradual shift from the infant to adult pattern was observed with aging. DA responses to MCP were markedly exaggerated in infants, and the binding affinity of the DA receptor in cord blood lymphocytes was less than that in adult peripheral lymphocytes. These results indicate that at a younger age, dopaminergic inhibition of CA, ALD and PRL secretion is immature in rats as well as in humans, and that the functional maturation of the DA receptor may be involved in the ontogenic development of the DA inhibitory mechanisms.