Deoxycorticosterone(DOC)－食塩高血圧ラット副腎球状層遊離細胞の鉱質コルチコイド産生に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 本定, 晃 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7729

Deoxycorticosterone (DOC) -食塩高血圧ラット副腎球状層遊離細胞の鉱質コルチコイド産生に関する研究

金沢大学大学院医学研究科内科学第二講座（主任：竹田亮祐教授）
本　定　晃

(昭和59年3月27日受付)

デオキシコルチコステロン(deoxycorticosterone以下DOCと略)-食塩高血圧ラットでみられるアルドステロン(aldosterone)分泌抑制の機序は不明である．本論文は，この点を明らかにする為，DOC-食塩高血圧ラット，普通食投与ラット，食塩負荷ラットから得た副腎遊離細胞を用い，α^{1-24}adrenocorticotropic hormone（以下ACTHと略），isoleucine-5-angiotensin II（以下A IIと略），K等に対する鉱質コルチコイドの反応性を比較検討した．体重50g前後のウィスター系雄性ラットを普通食群(0.23%Na, 0.95%K含有食と水)，食塩負荷群(同食と1%食塩水)，DOC高血圧群(同食と1%食塩水ならびにDOC投与）の3群に分け飼育した．酢酸デオキシコルチコステロン（DOC acetate）12.5 mg/kg体重を微晶性懸濁液の形で週1回，4週間皮下注射した．球状層細胞浮遊液はコラゲナーゼ処理により副腎被膜層より作製した．5.2×10^{-14}から5.2×10^{-6}モル濃度のA II，5.9×10^{-14}から5.9×10^{-6}モル濃度のACTH，または2.2から13 mEq/LのK，とともに細胞浮遊液2 mlを95%O_2-5%CO_2混合ガス下，37°C 2時間孵置した．球状層細胞のコルチコステロン（corticosterone: Kendall's compound B，以下B_Kと略）の基礎産生は普通食群に比し，DOC高血圧群で有意に低下していた．球状層細胞のアルドステロンの基礎産生は普通食群に比し，食塩負荷群，DOC高血圧群で有意に低下していた．普通食群では細胞孵置中に，アルドステロン，B_K産生はともに3種の刺激により増加した．DOC高血圧群ではB_K産生はACTHにのみ増加したが，一方アルドステロン産生はいずれの刺激に対しても増加しなかった．又，食塩負荷群ではアルドステロン，B_K産生はともにACTH，Kにより増加したが，A IIに対しては変化を示さなかった．ACTH，K刺激により産生されたアルドステロンとB_Kの比を求めると，普通食群に比し食塩負荷群で有意に低値を示した．以上より，DOC高血圧ラットでみられるアルドステロン分泌抑制の機序は主に，A IIに対する球状層細胞の感受性低下と副腎球状層におけるアルドステロン生合成のlate stepに与る酵素系抑制によると考えられた．なお，A IIに対する感受性低下は内因性A IIの欠乏と低K血症，さらに酵素系抑制はNa増大と内因性A IIの欠乏に，それぞれ起因すると思われる．

Key words　Isolated rat adrenal cell, Aldosterone biosynthesis, DOC-salt hypertensive rat.

1943年，Selyeら[1]は，ラットにデオキシコルチコステロン(deoxcorticosterone，以下DOCと略)を3週間にわたり毎日投与し，飲料水として1%食塩水を与えると高血圧が生ずることを報告した．このDOC-食塩高血圧ラットは，その後，高血圧の発症機序を研究するモデル動物として繁用されているが[2)3)]，常に著しい低レニン血症を呈する[4)5)]ことにより，ヒトにおける低レニン性本態性高血圧症[6)]の実験モデルとされている．

DOC-食塩高血圧ラットでは，低レニン血症に伴

Studies on the Mineralocorticoid Productipn by Isolated Adrenal Glomerulosa Cells of Deoxycorticosterone (DOC)-Salt Hypertensive Rats. **Akira Honjo**, Depertment of Internal Medicine (II) (Director: Prof. R. Takeda), School of Medicine, Kanazawa University.

なって，アルドステロン（aldosterone）分泌低下が認められることはよく知られた事実[7)~9)]であるが，アルドステロン分泌抑制の機序に関しては未だ明らかでない．アルドステロン分泌の調節機序は複雑であり，現在，幾多の stimulator ないし modulator の存在が知られているが[10)11)]，今なお不明な点も多い．従って，DOC-食塩高血圧ラットで認められるアルドステロン分泌抑制の機序を単一の機序あるいは因子で説明することは困難である．Na 貯留によるレニン・アンジオテンシン系の抑制，Na 貯留時に作動するとされる de Wardener ら[12)13)]のいう第3因子（Na 利尿ホルモン）の関与もそのひとつとして考えられる．

著者は，ステロイド生合成の面から，アルドステロン分泌抑制の機序を明らかにするために，DOC-食塩高血圧ラット（両側副腎及び腎臓存在下）を作製し，その副腎球状層ならびに束・網状層遊離細胞を用い，in vitro にて各種刺激に対するアルドステロンならびにコルチコステロン（corticosterone：Kendall's compound B，以下 B_K と略）の分泌反応性を検討したので報告する．

対象および方法

体重 50 g 前後のウイスター系雄性ラットを普通食群（0.23%Na，0.95%K 含有食と水投与），食塩負荷群（同上食と1%食塩水）ならびに DOC 高血圧群（同上食と1%食塩水ならびに DOC 投与）の3群に分け一定の条件下（点灯時間 0800 h-2200 h，室温 22±1°C）で4週間飼育した．なおミネラルコルチコイド（mineralocorticoid）として酢酸デオキシコルチコステロン（deoxycorticosterone acetate）12.5 mg/kg 体重をピーナッツ油に溶解し週1回，4週間皮下注射した．DOC 投与ラットでは収縮期血圧 150 mmHg 以上示すもののみを用いた．ラットの血圧測定は，ラット自動血圧記録 USM 型（ウエダ興産株式会社）を用い，尾動脈を利用した tail cuff 法により，収縮期血圧のみを測定し，3回連続計測の平均値を測定値とした．各群のラット数は 20 から 25 匹である．4週間飼育後，午前8時より9時の間に断頭屠殺し，採血後両側副腎を迅速に取り出した．

Ⅰ．遊離細胞作製

Haning ら[14)]の方法に準じた．その手順を Fig. 1 に示す．すなわち取り出した副腎を氷冷下生食中に集め，副腎周囲の脂肪組織，結合組織を剝離した後，副腎被膜を切開し，圧迫して束・網状層及び髄質を含む中心部（内層）を分離する．次に被膜層及び内層を，それぞれ氷冷した 0.2%グルコースを含む Krebs-Ringer 炭酸水素塩緩衝液（Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing glucose 以下 KRBG と略，pH 7.4，K 濃

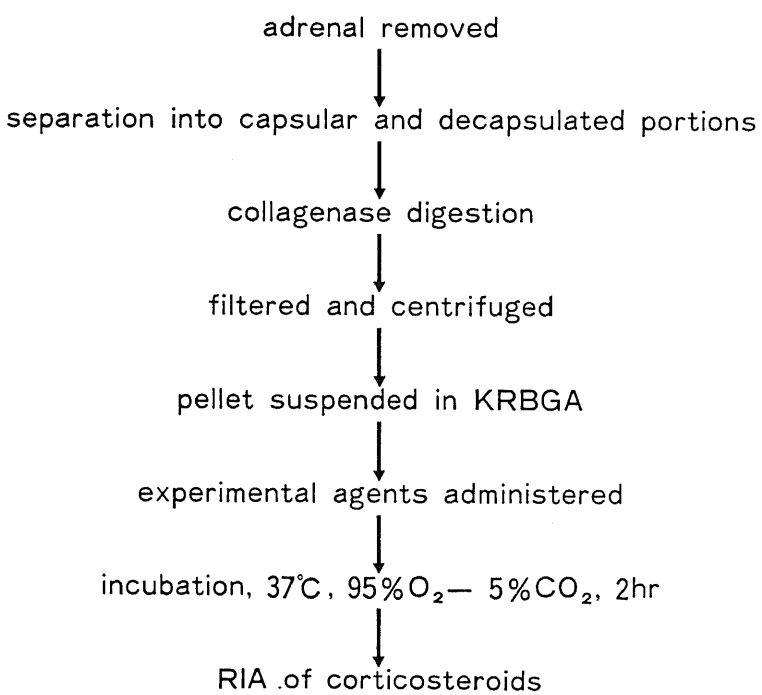

Fig. 1. Preparation of cell suspension and incubation procedure.

度を3.6 mM濃度に調整）約50 ml中に移す．ついでコラゲナーゼ液8 mlを含む反応フラスコに移し，95% O_2-5% CO_2混合ガス下，37°C恒温槽内で50分間，120回/分で振盪消化する．コラゲナーゼ液は，4%アルブミンを含むKRBG（以下KRBGAと略）にコラゲナーゼ（collagenase, type I, Worthington Biochem. Corp.）3.3 mg/ml及びデオキシリボヌクレアーゼ（deoxyribonuclease, Sigma Chem. Co.）0.05 mg/mlを加えて作製した．次に細胞を分散させるため，各層を含むコラゲナーゼ液をパスツールピペットにて吸い，ゆっくり約100回上げ下げを行う．さらに混合液を2枚重ねたナイロンメッシュ60で濾過し，粗大な組織を取り除き，濾液をプラスチック製遠心管に受け，100×gにて10分間遠心する．遠心後，上清を棄て，残ったcell pelletにKRBGA 10 mlを加え，パスツールピペットにより攪拌する．このような低速遠心操作（100×g, 10分間）を3回繰り返し，最後にcell pelletにKRBGAを加えて遊離細胞浮遊液を作製する．

II．インキュベーション，遊離細胞数，細胞生存能ならびに鉱質コルチコイド，アデノシン-3′：5′-環状リン酸（adenosine-3′：5′-cyclic monophosphate, 以下cyclic AMPと略）測定等について

細胞浮遊液0.9 mlを2.5 ml反応フラスコに刺激物質0.1 ml, KRBGA 0.1 mlと共に加え，総量2.0 mlとし，95% O_2～5% CO_2混合ガス下，37°C恒温槽内で，120回/分の振盪を加えて，インキュベートした後，メジウムを測定に供するまで−20°Cにて凍結保存した．刺激物質としてはα^{1-24}adrenocorticotropic hormone（以下ACTHと略，Cortrosin®, N. V. Organon社），isoleucine-5-angiotensin II（以下A IIと略）及びKを使用した．ACTHは，pH 4.0の生食水に溶解し，5.9×10^{-14}より5.9×10^{-6}モル濃度になるようにメジウム中に加え，又AIIはKRBGAに溶解し，5.2×10^{-14}より5.2×10^{-6}モル濃度になるようにメジウム中に加えた．さらにK投与は，メジウム中K濃度を2.2より13 mEq/Lに調整した．対照としてメジウム中にpH 4.0の生食水あるいはKRBGAを加えたものを用いた．

細胞数は細胞浮遊液の1部を染色することなしに直接血球計算盤に採取し，顕微鏡下（×400）で細胞数を数えた．副腎皮質細胞は，細胞質内に脂肪小顆粒を含み，一般に球状層細胞は束状層細胞よりも小さく，細胞質内小顆粒も少ないことより他の混入細胞と鑑別される[15]．

細胞生存能の検討は次の如く行った．試験管に細胞浮遊液0.5 mlを取り，さらに0.4%トリパンブルー液0.1 mlを加え，均等に混和し，5分後に細胞数を数え，染色されない細胞を生きた細胞とし，その割合を求めた．

ラットを断頭し，採取した血液を用いて血漿レニン活性（plasma renin activity，以下PRAと略），血漿アルドステロン（plasma aldosterone，以下PAと略），血漿B_K（plasma B_K，以下PB_Kと略）を測定した．血清Na, Kは溶血の影響を少なくするため，腹部大動脈より採取した血液を用い，すばやく遠心後，測定に供した．PRAは，Skinner法を改良したbioassayによった．本法による測定間の変動係数は10.9%であった．又血漿及びメジウム中アルドステロンはミドリ十字（株）のkitを用いてradioimmunoassay（以下RIAと略）により測定した．血漿及びメジウム中B_Kの測定は，血漿又はメジウムをhexane：benzene 80：20の溶液にて振盪し，交叉性の大きいコルチコステロイドをあらかじめ抽出除去した後，次にB_Kをhexane：benzene 20：80の溶液にて抽出し，B_K-3-oxime-bovine serum albuminに対する抗体を用いRIAにて行った．測定内及び測定間変動係数は，それぞれ6.8%，9.8%であった．メジウム中cyclic AMPはヘキストジャパン（株）のkitを用いてサクシニル化法によるRIAにて測定した．血清Na, Kは焔光光度計により測定した．なお，メジウム中ステロイド産生量は，実験間の遊離細胞数のバラツキを是正するため，細胞10^6個に対するステロイド産生量で表記した．メジウム中ステロイドならびにcyclic AMP測定値は平均値±標準誤差で示し，推計学的処理はstudent's t testにより行った．

成　　績

I．対象各群間の体重，副腎重量，血清電解質，PRA，PB_K，PA（平均値±標準偏差）について（Table 1）

体重は普通食群220±11 g，食塩負荷群233±12 g，DOC高血圧群276±34 gと食塩負荷群，DOC高血圧群で有意の体重増加を認めた（それぞれ$p<0.05$，$p<0.01$）．副腎重量（片側）は，普通食群23±5.4 mg，食塩負荷群22±4.5 mg，DOC高血圧群14±3.3 mgとDOC高血圧群で有意に低下した（$p<0.01$）．血圧は普通食群108±8 mmHg，食塩負荷群130±10 mmHg，DOC高血圧群では166±18 mmHgであった．血清Naには3群間で有意差を認めなかったが，血清KはDOC高血圧群2.8±0.2 mEq/Lと有意に低値であった（$p<0.01$）．PRA及びPAはそれぞれ普通食群7.3±1.5 ng/ml/h，10.6±2.1 ng/dl，食塩負荷群3.9±1.6 ng/ml/h，4.6±2.2 ng/dl，DOC高血圧群

3.2±1.5 ng/ml/h, 4.0±2.1 ng/dl であり，食塩負荷群，DOC高血圧群では普通食群に比し，PRA，PA ともに有意に低値であった($p<0.01$)．PB_Kには3群間で有意差を認めなかった．

II．副腎遊離細胞について

本実験で得られた副腎遊離細胞は，被膜層では副腎1個あたり平均1.6×10^5個，内層では副腎1個あたり平均2.9×10^5個であった．球状層細胞への束・網状層細胞の混入率は顕微鏡下で算出したところ平均9.8%であった．インキュベーション終了時点での細胞生存能の検索では，染色された細胞はほとんど見い出されなかった．Fig. 2 はインキュベーション時間とステロイド産生量の関係を示す．普通食群の ACTH に対する球状層細胞でのアルドステロン産生量と束・網状層細胞でのB_K産生量はともに時間とともに増加し，120分まではほぼ直線的増加を示した．以上より本実験ではインキュベーション時間を2時間と設定した．

III．対象各群より作製した副腎遊離細胞のアルドステロン，B_Kの基礎産生量について（Table 2）

1．副腎球状層細胞

アルドステロン産生量は普通食群 14.2±2.1 ng/10^6 cells，食塩負荷群 7.9±1.4 ng/10^6cells，DOC高血圧群 1.6±0.8 ng/10^6cells と食塩負荷群，DOC高血圧群で有意に低値となり($p<0.01$)，さらにDOC高血圧群は食塩負荷群に比しても明らかに低下していた（$p<0.01$)．B_K産生量は普通食群 180±75 ng/10^6cells，食塩負荷群 182±86 ng/10^6cells，DOC高血圧群 118±13 ng/10^6cells と DOC高血圧群において有意に低値を示した($p<0.05$)．アルドステロン/B_K比（平均値±標準偏差）を求めると，普通食群 0.098±0.032，食塩負荷群 0.053±0.018，DOC高血圧群 0.012±0.004 と食塩負荷群，DOC高血圧群で有意に低下していた($p<0.01$)．

2．副腎束・網状層細胞

B_K産生量は普通食群 139±78 ng/10^6cells，食塩負荷群 109±50 ng/10^6cells，DOC高血圧群 96±33 ng/10^6 cells で，3群間には有意差を認めなかった．

IV．各種刺激に対する副腎球状層遊離細胞のアルドステロン，B_K反応について

1．ACTH に対するアルドステロン，B_K分泌反応について（Fig. 3）

普通食群は，5.9×10^{-11}モル濃度にてアルドステロン 21.4±3.2 ng/10^6cells，B_K0.52±0.08 μg/10^6cells と共に有意に増加反応を示した（$p<0.01$)．用量反応曲線は，アルドステロン，B_K共に 5.9 ± 10^{-7}モル濃度にて最高値を有する logarithmic dose response を示した．最高値はアルドステロン 204 ±18 ng/10^6cells，B_K2.90±0.25 μg/10^6cells といずれも基礎値の約15～16倍反応したことになる．

食塩負荷群は 5.9×10^{-9} モル濃度にてアルドステロン 50.2±4.4 ng/10^6cells，B_K0.92±0.11 μg/10^6cells と共に有意に反応した（$p<0.01$)．用量反応曲線は 5.9×10^{-8} モル濃度にて最高値を有する logarithmic dose response を示した．最高値はアルドステロン 90.4±10.2 ng/10^6cells，B_K1.52±0.34 μg/10^6cells とそれぞれ基礎値の約8～11倍の増加にとどまった．

一方，DOC高血圧群ではアルドステロンは軽度の増加反応傾向を認めたが有意ではなかった．B_Kは 5.9×10^{-9}モル濃度にて 0.42±0.12 μg/10^6cells と有意に反

Table 1. Effects of treatment for 4 weeks with deoxycorticosterone acetate on body weight, adrenal weight, blood pressure, serum concentrations of sodium and potassium, plasma renin activity, plasma corticosterone, and plasma aldosterone. Each value represents mean ± SD. Number of rats per group is in parenthesis. **p<0.01 ; *p<0.05.

	Control	High sodium	DOC
Body Weight (g)	220±11 (22)	233±12* (20)	276±34** (57)
Adrenal weight (mg)	23±5.4 (21)	22±4.5 (21)	14±3.3** (23)
Blood Pressure (mmHg)	108±8 (43)	130±10** (40)	166±18** (57)
Serum Sodium (mEq/L)	143±3 (21)	143±3 (20)	142±1 (18)
Serum Potassium (mEq/L)	4.5±0.2 (21)	4.4±0.3 (20)	2.8±0.2** (18)
Plasma Renin Activity (ng/mℓ/h)	7.3±1.5 (21)	3.9±1.6** (20)	1.1±0.1** (14)
Plasma Corticosterone (μg/dℓ)	9.9±3.0 (21)	11.6±4.4 (20)	10.8±4.5 (14)
Plasma Aldosterone (ng/dℓ)	10.6±2.1 (21)	4.6±2.2** (20)	4.0±2.1** (14)

応した（$p<0.01$）．用量反応曲線は 5.9×10^{-7} モル濃度にて最高値を有する logarithmic dose response を示した．最高値は，B_K 1.69±0.21 μg/10^6cells と基礎値の約9倍で食塩負荷群と同程度であった．

さらに ACTH 刺激時のアルドステロン/B_K 比は，普通食群 0.062±0.023，食塩負荷群 0.057±0.016 と食塩負荷群において有意に低下していた（$p<0.01$）．

2．A II負荷に対するアルドステロンおよび B_K 分泌反応について（Fig. 4）

普通食群は 5.2×10^{-11} モル濃度にてアルドステロン 21.2±2.4 ng/10^6cells，5.2 ± 10^{-12} モル濃度にて B_K 0.39±0.05 μg/10^6cells と共に有意に増加反応を示した（$p<0.01$）．用量反応曲線は，アルドステロン，B_K 共に 5.2×10^{-8} ないし 5.2×10^{-7} モル濃度にて最高値に達する logarithmic dose response を示した．最高値は，アルドステロン 69±5.6 ng/10^6cells，B_K 0.76±

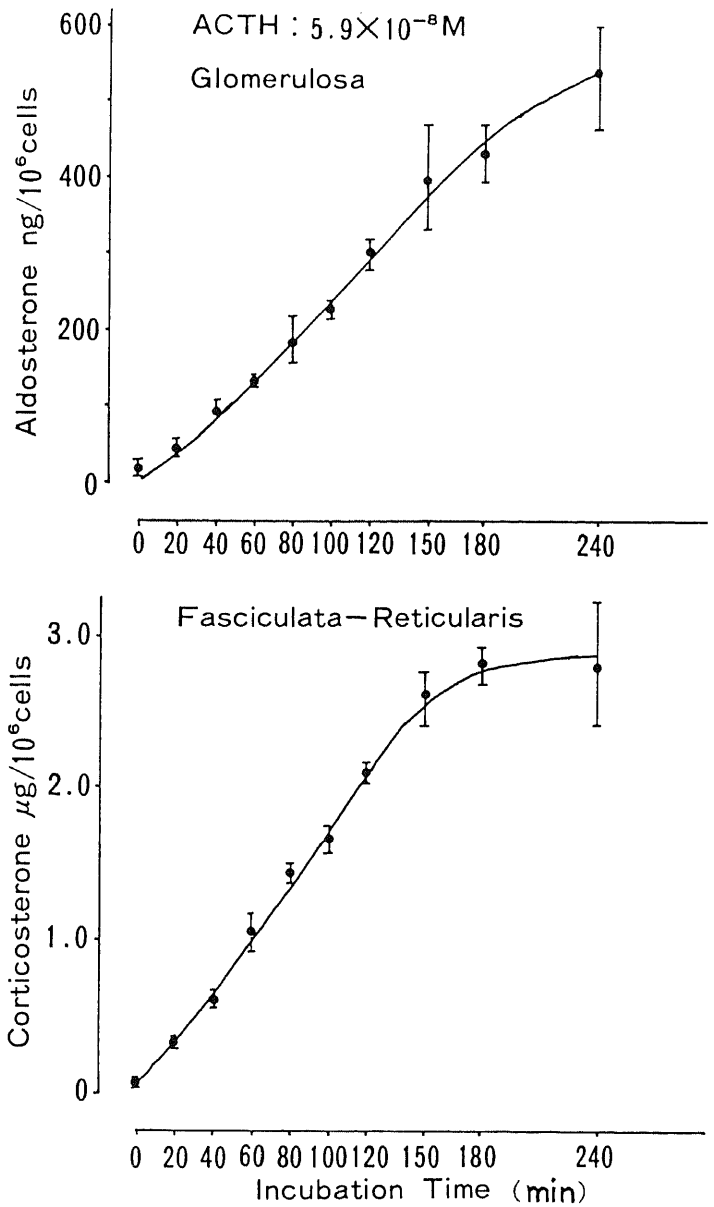

Fig. 2. Time course studies of steroidogenesis. Each point represents mean ± SEM of 4 experiments.

Table 2. Basal production of aldosterone and corticosterone by isolated rat adrenal cells. Each value represents mean ± SEM of 4 experiments. **p<0.01; *p<0.05.

	Glomerulosa cells ng/10⁶cells		Fasciculata-Reticularis cells ng/10⁶cells
	Aldosterone	Corticosterone	Corticosterone
Normal	14.2 ± 2.1	180 ± 75	139 ± 78
High sodium	7.9 ± 1.4**	182 ± 86	109 ± 50
DOC	1.6 ± 0.8**	118 ± 13*	96 ± 33

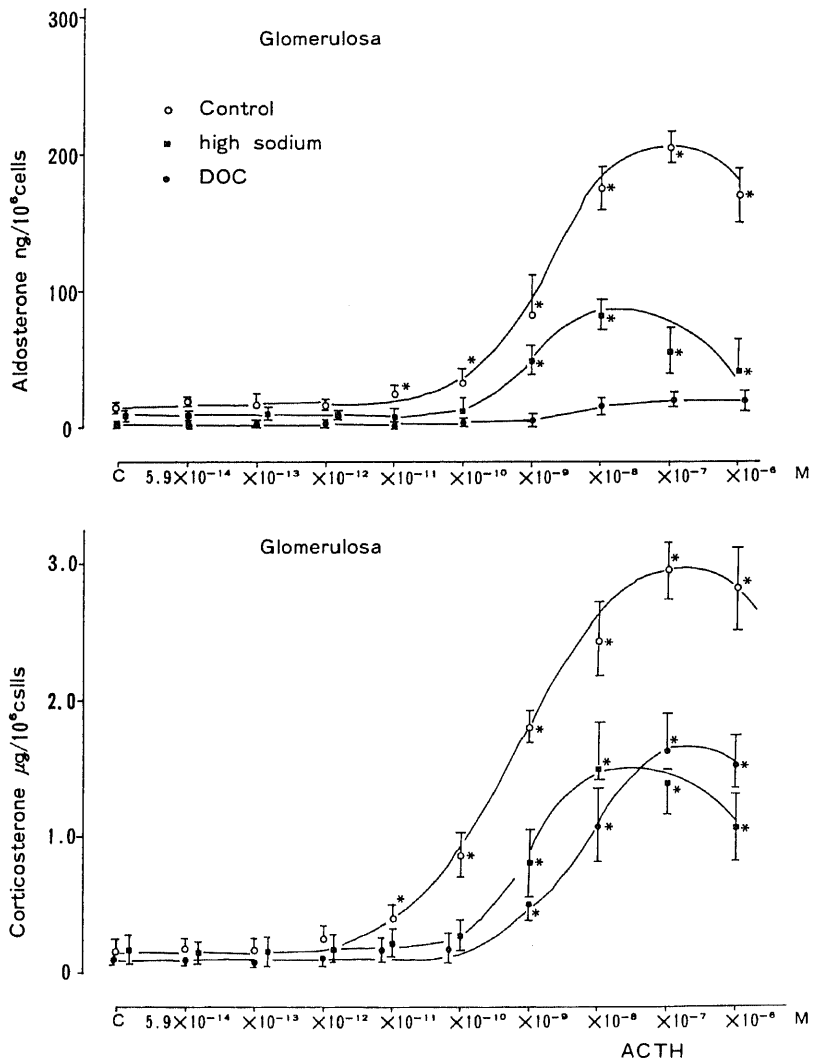

Fig. 3. Dose response curves of corticosteroids released by ACTH. Symbols: ○, control (normal rats); ■, high sodium (salt-loaded rats); ●, DOC (DOC-treated hypertensive rats). Each point represents mean ± SEM of 4 experiments. Significance ($p<0.01$) is noted with an asterisk.

0.11 μg/10⁶cells と共に基礎値の約5倍に達した．

食塩負荷群は増加傾向は認めたものの，いずれの濃度においてもアルドステロン，B_K共に有意の増加反応を認めなかった．

DOC高血圧群もA IIとほぼ同様にいずれの濃度においてもアルドステロン，B_K共に有意の反応を認めなかった．

3．K負荷に対するアルドステロン，B_K分泌反応について（Fig. 5）

普通食群は6 mEq/Lにてアルドステロン24.2±4.4 ng/10⁶cells，B_K0.56±0.06 μg/10⁶cells と共に有意に増加反応を示した（$p<0.01$）．9～10 mEq/Lにてアルドステロン58.2±13.6 ng/10⁶cells，B_K1.02±0.11 μg/10⁶cells と最高値を示したが，それぞれ基礎値の約4～6倍反応したことになる．

食塩負荷群は，7 mEq/Lにてアルドステロン15.3±4.9 ng/10⁶cells，8 mEq/LにてB_K0.53±0.11 μg/10⁶cells と共に有意の増加反応を示した（$p<0.01$）．最高値は，8 mEq/Lにてアルドステロン20.4±4.1 ng/10⁶cells，9 mEq/LにてB_K0.56±0.08 μg/10⁶cells とそれぞれ約3倍の増加反応を認めた．

一方，DOC高血圧群はアルドステロンは無反応，B_Kは軽度の増加反応をみたが，有意ではなかった．

又K負荷時のアルドステロン/B_K比（平均値±標準偏差）は，普通食群0.050±0.019，食塩負荷群0.032±0.011と食塩負荷群で有意に低下していた（$p<0.01$）．

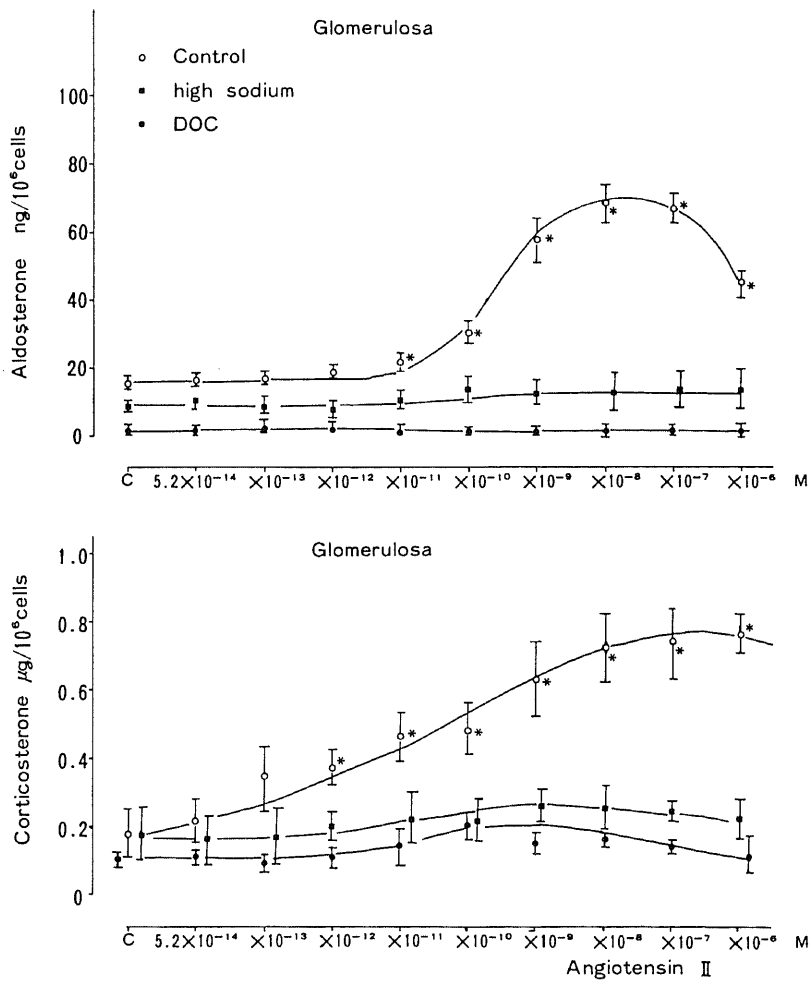

Fig. 4. Dose response curves of corticosteroids released by A II. Symbols: ○, control (normal rats); ■, high sodium (salt-loaded rats); ●, DOC (DOC-treated hypertensive rats). Each point represents mean ± SEM of 4 experiments.
Significance ($p<0.01$) is noted with an asterisk.

4．各種刺激に対する副腎遊離細胞の cyclic AMP 産生について（Fig. 6）

普通食群における各種刺激時のインキュベーションメジウム中 cyclic AMP を測定した．球状層細胞，束・網状層細胞共に A II，K 負荷に対し cyclic AMP の増加反応は認められなかった．しかし ACTH 負荷に対しては，束・網状層細胞では 5.9×10^{-9} モル濃度にて有意の増加反応を認めた（$p<0.01$，基礎値 0.306±0.112 pmol/10^6cells の約 4 倍）．球状層細胞でも軽度の増加傾向をみたが有意ではなかった．

考　　察

副腎遊離細胞調整法は，1968 年 kloppenborg ら[15]の報告に始まり，現在までに幾多の改良がなされている．本法による髄置実験法は多数の均一な検体が得られる点，薬剤の作用が副腎皮質細胞により均一に働く点，など副腎スライスを用いる方法に比較していくつかの利点を有している[15)~18)]．従って無疵の副腎皮質におけるステロイドの生合成とそれに対する薬剤の影響を in vitro で検討する上で有用な手段と考えられている．

本実験では，Haning ら[14]の方法に準じて，コラゲナーゼ処理によりラット副腎球状層及び束・網状層遊離細胞を作製した．その結果，副腎 1 個あたり被膜層では平均 1.6×10^5個，内層では平均 2.9×10^5個の遊離細胞が得られ，ほぼ Haning ら[14]の報告と一致した．この方法で最も問題になるのは球状層細胞への束・網状層細胞の混在である．著者の成績では，顕微鏡下に調べた束・網状層細胞の混和率は常に 10%以内であり，又内層細胞を用いた場合のアルドステロン産生はほと

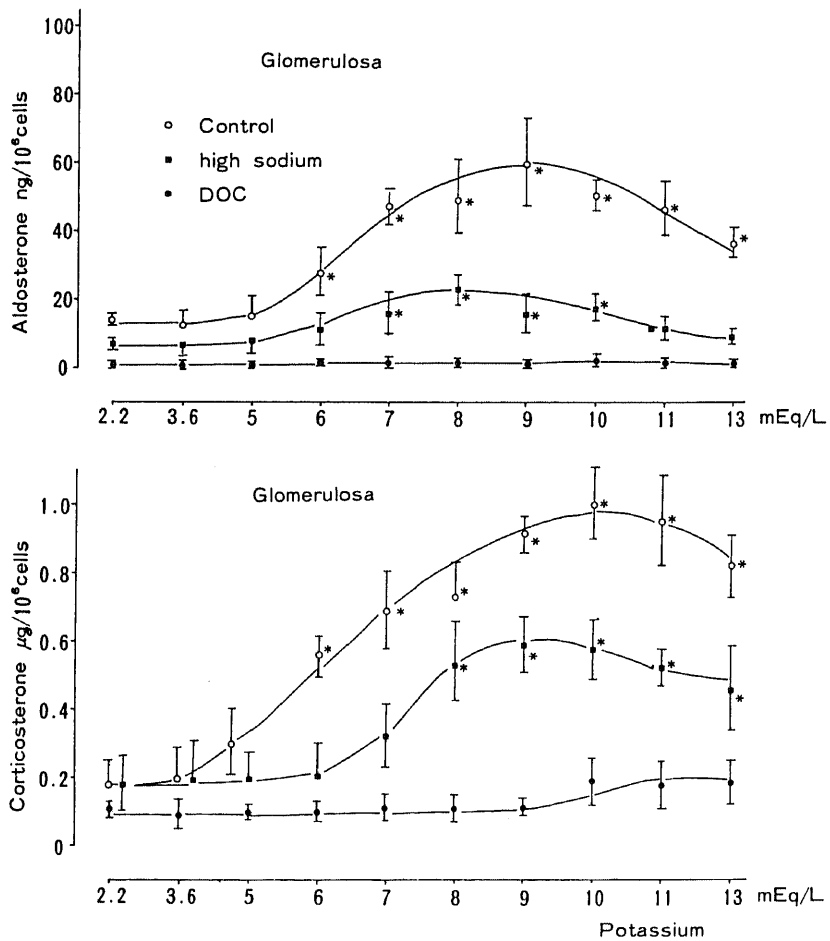

Fig. 5. Effect of potassium concentration on steroidogenesis. Symbols : ○, control (normal rats) ; ■, high sodium (salt-loaded rats) ; ●, DOC (DOC-treated hypertensive rats). Each point represents mean ± SEM of 4 experiments. Signiffcance ($p<0.01$) is noted with an asterisk.

んど認めないことなどから，ほぼ純粋な球状層遊離細胞標本と考えた．

Cambell ら[19]は，ラット副腎遊離細胞のステロイド産生に及ぼす細胞濃度の影響を検討し，遊離細胞濃度と単位細胞数あたりのアルドステロン基礎分泌量との間の用量依存関係を明らかにした．このことにより“novel aldosterone stimulating factor”の存在を推定したが，今後，副腎遊離細胞を使いアルドステロン分泌量を問題にする際には，常に細胞濃度の影響を考慮し，実験間の遊離細胞濃度のバラツキを極力少なくすることが必要と考えられる．

アルドステロンは，副腎皮質球状層細胞によって生成分泌され，主として遠位尿細管に作用し，Na 再吸収を促進するとともに，K 排泄を増大することにより生体の Na, K 代謝に大きく関与している．従って Na 代謝調節系に関与する多くの調節因子がアルドステロン分泌調節にも関与している可能性があるが，現在ヒトにおけるアルドステロン分泌調節因子[20]としては，A II の他 ACTH，K，Na，一部の prostaglandins[11]，dopamine，serotonine などが知られ，又最近 ACTH 以外の下垂体性の刺激因子の存在も示唆されている[21]．これら多くの刺激因子のうち，生理的状態下では A II が主導的役割を担っていると考えられている．一方，ラットにおいてはヒトと異なり，in vivo，in vitro いずれにおいても A II のアルドステロン分泌調節因子としての役割を疑問視する研究が多く報告されている[22)~25)]．しかし 1977 年 Braley ら[26]，Bing ら[27]はラット副腎球状層細胞に対する A II の感受性を検索し，生理的濃度の A II に対し有意のアルドステロン反応を認めることを初めて証明した．以後ようやくラットにおいても，アルドステロン分泌調節におけるレニン・アンジオテンシン系の重要性が認識されつつある．さらに近年，A II 受容体がラット副腎球状層においても証明されている[28]．

Fig. 7 はアルドステロン生合成過程を示す．このアルドステロン生合成過程には種属間で若干差異のあることが指摘され[29]，ラットにおいても，すべてが明らかにされているわけではない．特にラットでは，B_K が糖質コルチコイドとして作用するという特殊性もあり，鉱質コルチコイドの代謝においてヒトと異なることは

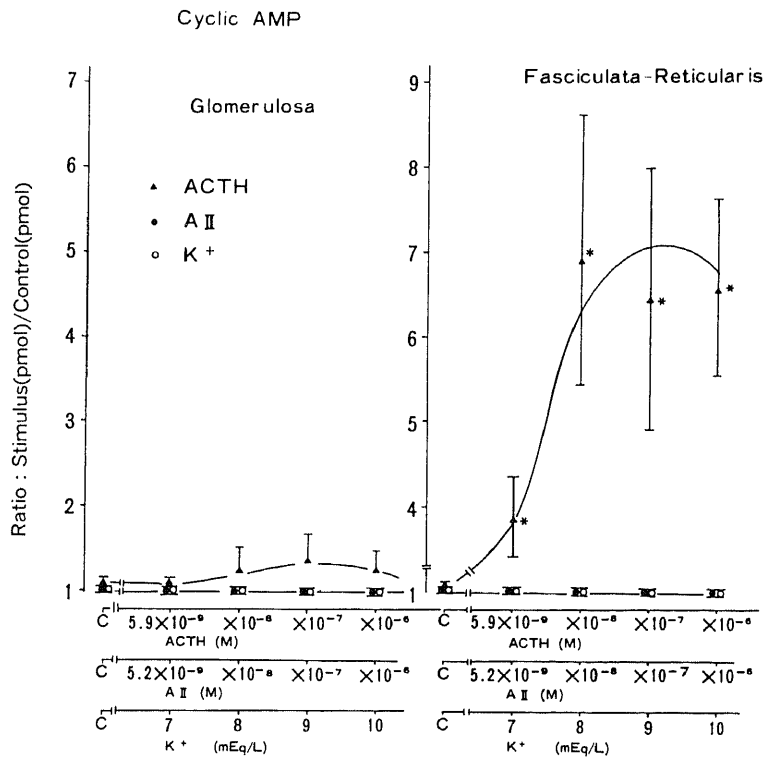

Fig. 6. Cyclic AMP production by rat adrenal cells exposed to ACTH, A II or potassium. Cyclic AMP output is expressed as ratio of stimulus (pmol) to control (pmol). Each point represents mean ± SEM of 4 experiments. Significance ($p<0.01$) is noted with an asterisk.

十分推定されるが詳細は不明である．B_Kがアルドステロン生合成過程における主要な前駆物質であることは広く認められ，一般的にはDOC → B_K → 18-hydroxycorticosterone（以下18-OH-B_Kと略）→アルドステロンが主経路と考えられている．しかしラット副腎を用いたin vitroの実験成績から，B_KよりむしろDOCを前駆物質としてDOC → 18-hydroxydeoxycorticosterone（以下18-OH-DOCと略）→ 18-OH-B_K →アルドステロン，又はDOC → 18-OH-DOC → 11-deoxyaldosterone →アルドステロンと進行する生合成経路を重要と考え，いわゆるalternate late pathwayとして主張する報告もあり一致していない[30)~32)]．

著者は，DOC-食塩高血圧ラットで認められる低アルドステロン血症の機序をステロイド生合成の面より明らかにするため，諸条件下の副腎遊離細胞を作製し，ACTH，A II，K負荷に対するアルドステロン，B_K反応を検討した．以下副腎遊離細胞のアルドステロン，B_K基礎産生量，各種刺激（ACTH，A II，K）に対する副腎遊離細胞のアルドステロン，B_K反応，メジウム中cyclic AMP濃度の順に考察を進めたい．

1．各群の副腎遊離細胞のアルドステロン，B_K基礎産生量について

普通食群に比し，食塩負荷群，DOC高血圧群では有意にアルドステロン産生量が低下していた．しかし，B_K産生量はDOC高血圧群のみ有意に低下していた．アルドステロン/B_K比を求めると食塩負荷群，DOC高血圧群で有意に低値を示した．Naがアルドステロン生合成系のlate step（すなわちB_Kからアルドステロンへの転換）に作用することはすでに報告され[33)34)]，減塩を行うとlate stepが活性化されアルドステロン生成が促進され，逆にNa負荷ではlate stepが不活性化されアルドステロン生成が低下することが明らかにされている．上記の成績はNaのlate stepへの影響を端的に示したものと思われる．さらに後述の如くA II欠乏によるlate stepの不活性化も加わっていると考えられる．

2．ACTH負荷に対する副腎球状層遊離細胞のアルドステロン，B_K反応について

著者の成績では，食塩負荷群，DOC高血圧群ともにACTH負荷に対するアルドステロン，B_Kの産生は普通食群に比し低下していた．さらにDOC高血圧群では，食塩負荷群に比しB_Kの増加反応はある程度保たれていたが，アルドステロンの反応は少なくアルドステロン，B_Kの反応に解離がみられた．ACTHのアルドステロン生合成過程への主要な作用部位はコレステロール（cholesterol，以下cholと略）からプレグネノロン（pregnenolone，以下Pregと略）への過程にあると考えられているが[35)~37)]最近，ACTHのlate stepへの影響も報告[32)]されている．今回の実験結果は，アルドステ

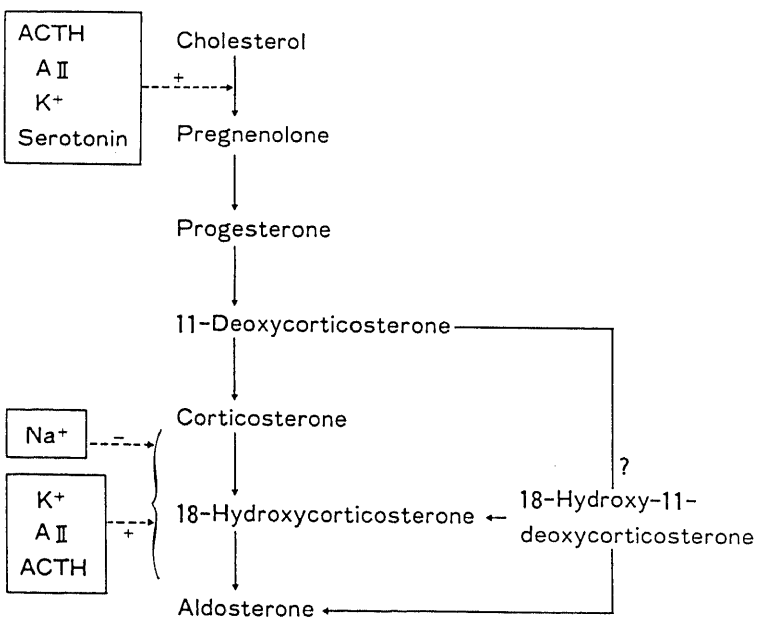

Fig. 7. Schematic presentation of aldosterone biosynthesis. Arrows with solid lines represent the synthetic process to aldosterone and those with broken lines indicate possible acting sites of peptides, amine and ions considered. +, stimulatory effect; −, inhibitory effect.

ロン生合成の late step に与る酵素の抑制を示唆している．普通食群と比較すると類似のアルドステロン，B_K増加反応が食塩負荷群においても認められたため，late step の抑制は DOC 投与で生じた Na 増大および内因性 A II の低下に起因すると考えた．

さて多くの内分泌腺のホルモン分泌に関し，フィードバック機構は生理的調節の最も重要な原則である．ヒト，動物を用いた in vivo および in vitro の系で糖質コルチコイドによる副腎皮質細胞のステロイド産生に対する直接抑制作用はすでに報告されている[38]．また鉱質コルチコイドについても原発性アルドステロン症患者において腺腫摘出後，一過性に残存副腎皮質機能が抑制される事実が知られており，アルドステロン分泌に関しフィードバック機構の存在が考えられている[39]．Debreceni ら[7]，さらに Müller[40]らは食塩制限ラットに DOC，9 α-fluorocortisol を投与してその副腎スライスからのアルドステロン分泌は抑制されないことを見い出し，少なくとも末梢レベルでの DOC の副腎直接抑制（特に late step の抑制）は否定的と思われる．

3．A II負荷に対する副腎球状層細胞のアルドステロン，B_K分泌反応について

本実験では普通食群において 5.2×10^{-10}M にて有意のアルドステロン増加反応を認めた．この濃度は，A II がインキュベーション過程で 80～90%破壊されるとすると，ラットの血中 A II レベル（20～50 pg/ml）に相当し，十分生理的範囲内といえる．Braley ら[26]が報告した如く，生理的濃度の A II に対しアルドステロン反応をきたしたことになる．一方，DOC 高血圧群，食塩負荷群はともにアルドステロン，B_K増加反応が認められないことより A II に対する副腎球状層細胞の感受性低下が示唆された．

ヒトにおいて，外因性 A II 負荷に対する血漿アルドステロン反応は，Na 摂取量により異なることが知られている．最近 A II 受容体活性の測定が可能となり，Na 欠乏は副腎皮質 A II 受容体数の増加を，逆に Na 過剰は減少をきたすことが報告された[41][42]．しかもこれら Na バランスの変化に伴う A II 受容体数の増減は Na バランスそのものの直接的な作用によるものではなく，流血中の A II 濃度の変化を介するものであることも明らかとなっている．つまり A II それ自体が副腎皮質における A II 受容体活性の調節に重要な役割を果たすものと考えられている[42]．

一方 K も副腎 A II 受容体活性を調節する重要な因子とする報告もあり，高 K 食摂取により血漿 A II 濃度とは無関係に A II 受容体数の増加をきたすことが明らかにされている[43]．

なお A II の副腎皮質アルドステロン生合成系への作用は，ACTH と同様 chol から preg への転換を促進すると考えられているが，A II の late step への影響も報告されている[32]．A II 拮抗物質の一種である des-asp^1-, isoleucine^8-A II によって A II 投与時のアルドステロン増加は抑制されても ACTH 投与時のアルドステロン増加は抑制されないことより，副腎皮質のアルドステロン分泌に関与する A II 受容体と ACTH 受容体とは異なるものと考えられている[44]．近年，水越ら[45]は in vivo の動物実験から慢性 Na 貯留時に A II に対する副腎皮質球状層細胞のアルドステロン分泌を抑制する未知因子の存在を推定し，さらにその未知因子が Na, K-adenosine triphosphatase inhibitor としての特性を有することを報告した．この点は今後さらに明らかにされるべきと思われる．

4．K 負荷に対する副腎球状層遊離細胞のアルドステロン，B_K分泌反応について

普通食群，食塩負荷群では，K 負荷によりアルドステロン，B_Kの有意の増加反応が認められたが，DOC 高血圧群ではアルドステロンとともに B_Kの反応も認められなかった．

さて，K 投与がアルドステロン分泌を亢進し，逆に K 欠乏が分泌を抑制することはよく知られている[46][47]．約 0.3 mEq/L というわずかな血清 K 濃度の上昇によっても明らかなアルドステロン分泌がみられること[48]，副腎皮質遊離細胞を用いた実験系でもメジウム中 K 濃度の上昇によりアルドステロン分泌も増加すること[49]，腎摘除術後，レニン産生が欠如している患者でも K 投与によりアルドステロン分泌増加が観察されること[50]より，K 自体がアルドステロン分泌の直接刺激になることが確認されている．しかし K のアルドステロン分泌刺激の機序は，現在でも明らかにされていない．副腎皮質細胞内 K 濃度を変えることにより作用するという Boyd ら[51]の仮設は現在，K の直接測定の結果，支持されていない[52]．K が副腎皮質球状層細胞におけるアルドステロン生合成系のどの段階に作用するかについては現在なお不明な点が多い．しかし一般的には early step, late step の両方に作用すると考えられている[32]．最近 K の効果は濃度により異なり，0～6 mEq/L の範囲の上昇は early step, late step 両反応を促進し，アルドステロン生合成の増加をもたらすが，5～12 mEq/L の高いレベルでの上昇は early step は促進するが，late step の反応を抑制する結果アルドステロン合成は増加しないと報告されている[53]．

DOC 高血圧群で K に対する反応がアルドステロンのみならず B_Kについても低下していた点の説明は困難である．おそらく，DOC 高血圧群では PRA が食塩

負荷群に比しさらに低値で，アルドステロン，B_Kの基礎産生量とも低下していたので，これらホルモンの基礎産生量の低下がKに対する反応性低下をもたらしていると推測される．

以上，各種刺激に対する副腎遊離細胞のアルドステロン，B_K反応について考察してきたが，次の3点に注目したい．まずACTH，A II，Kのいずれの刺激においてもある濃度以上の刺激濃度ではアルドステロン産生が低下する現象がみられる点である．この点に関連しFredlundら[54]は，腎のNa, K-adenosine triphosphataseが低濃度のA IIで刺激され，高濃度A IIでは刺激されない事実を報告している．第2に，アルドステロン産生についてACTHがA IIよりはるかに強力なstimulatorであった点である．この点についてはBraleyら[26]も同様の事実を指摘している．本実験では普通食群のアルドステロン最大反応量を比較すると，ACTHはA IIより約3倍のアルドステロンを産生していた．ヒトでの報告[55]とは若干異なるようである．ACTHはアルドステロン分泌に対し，許容作用をもつとする考えが支配的だが，上記の成績は少なくともラットのアルドステロン分泌調節にはA IIよりもACTHがより優勢にはたらいているとも考えられる．しかし一面，生理的濃度を越えた実験条件であり，急性刺激効果である点を考慮すべきであろう．中村ら[56]は，副腎A II受容体数は種属により著しく異なり，ウサギに比しラットでは少ないことを報告した．この点は上記の所見と関連があるのかも知れない．ラットの副腎ではangiotensin III（以下A IIIと略）に特異的な受容体が見い出されており[57]，さらにヒトやイヌと異なりラットでは，血漿中のA III濃度がA IIよりも高いことが知られている[58]．A IIIの昇圧作用はA IIの1/5で，アルドステロンの増加作用はA IIとほぼ等しいと考えられている[59]．これらの事実より，ラットではA IIIが生理学的に意味をもつ可能性があり，今後の検討を要する．第3にA II，ACTH，Kいずれの刺激もearly step，late step共に作用する可能性が示唆された点である．しかし両ステップの相対的重要性については不明である．late stepに与る酵素がrate-limitingでないなら，各種刺激のlate stepへの作用はほとんど生理学的な意義をもたないと考えられている[10]．

最後に，メジウム中cyclic AMPを測定した成績に言及する．今回の成績からはA II，Kのsteroidogenesisへのcyclic AMPの関与を積極的に示唆する成績は得られなかった．球状層細胞においてもACTHに対しcyclic AMPの有意の反応がみられなかったが，これは受容体の数が関連していると思われる．ACTHのsteroidgenesis刺激効果は，cyclic AMPを介するという学説が支配的であるが[60]，A II，Kに関しては結論が得られておらず，cyclic AMPの関与については否定的な報告が多い[61][62]．近年，A II，Kによるアルドステロン産生にCa^{++}が重要な役割を担っていると報告され[62]，注目されている．

結　　論

DOC-食塩高血圧ラットのアルドステロン分泌抑制の機序をアルドステロン生合成の面より明らかにするため，DOC高血圧群，食塩負荷群，普通食群より作製した副腎球状層ならびに束・網状層遊離細胞を用い，in vitroにて各種刺激に対する鉱質コルチコイド反応性を検討した．

1．副腎遊離細胞はHaningら[14]の方法に準じて，コラゲナーゼ処理により作製した．この方法で球状層側への束・網状遊離細胞の混入率は平均9.8%であった．また副腎1個あたり球状層側で平均1.3×10^5個，束・網状層側で平均2.4×10^5個の遊離細胞が得られた．

2．体重はDOC高血圧群，食塩負荷群，普通食群の順で有意の増加を認めた．副腎重量はDOC高血圧群で有意に低下していた．血清Naは3群間で有意差は認めなかったが，血清KはDOC高血圧群で有意に低値であった．PRA，PAは食塩負荷群，DOC高血圧群でともに有意に低値であったが，PB_Kには3群間で有意差は認めなかった．

3．対象各群の副腎球状層遊離細胞のアルドステロン，B_K基礎産生量をみると，食塩負荷群，DOC高血圧群においてアルドステロン産生量は有意に低下していたが，B_K産生量はDOC高血圧群においてのみ有意に低値を示した．アルドステロン/B_K比は食塩負荷群，DOC高血圧群において有意に低下していた．

4．対象各群の副腎球状層遊離細胞の各種刺激に対する鉱質コルチコイド分泌反応については，まずACTH負荷に対して，アルドステロンは，普通食群，食塩負荷群では有意の反応を示したが，DOC高血圧群では無反応であった．B_Kは3群とも有意の反応を認めた．A II負荷に対するアルドステロン反応はACTH負荷と同様の成績であったが，B_Kは食塩負荷群およびDOC高血圧群では，普通食群と異なりともに無反応であった．K負荷に対しても，普通食群，食塩負荷群ともにアルドステロン，B_Kの有意の反応を示したが，DOC高血圧群ではアルドステロン，B_Kともに無反応であった．ACTH，K負荷に対し反応の認められた食塩負荷群でもアルドステロン/B_K比は普通食群に比し有意に低下していた．ちなみにA II，K負荷に対しメジウム中cyclic AMP反応は認められなかった．

以上の如く，DOC高血圧群ではACTHに対しアルドステロンは無反応であるが，B_Kの反応は認められることより，アルドステロン生合成のlate stepに与る酵素系が抑制されている可能性が示唆された．又AIIに対しては，アルドステロンとともにB_Kの反応が認められないことより，AIIに対する副腎球状層の感受性が示唆された．なお食塩負荷群でも，アルドステロン生合成のlate step酵素系の抑制が推測されたことより，DOC高血圧群でみられたアルドステロン分泌抑制はは，副腎球状層細胞のAIIに対する感受性低下（AII欠乏と低K血症による）とアルドステロン生合成のlate stepに関与する酵素系抑制（Na増大とAII欠乏による）が主因をなしているものと考えられた．

謝　辞

稿を終えるにあたりにあたり，御指導，御校閲を賜った竹田亮祐教授，御教示，御鞭達を賜った金沢医科大学内分泌内科森本真平教授に深甚なる謝意を表します．

又御協力を頂いた金敬珠博士に心から感謝致します．

なお本論文の要旨は，第53回日本内分泌学会総会において発表した．

文　献

1) **Selye, H. C., Hall, C. E. & Rowley, E. M.**: Malignant hypertension produced by treatment with desoxycorticosterone acetate and sodium chloride. Can. Med. Ass. J., **49**, 88-92 (1943).

2) **Dusting, G. J., Harvis, G. S. & Rand, M. J.**: A specific increase in cardiovascular reactivity related to sodium retention in DOCA-salt-treated rats. Clin. Sci. Mole. Med., **45**, 571-581 (1973).

3) **Kazda, S., Phlova, I., Bibr, B. & Kockova, J.**: Norepinephrine content of tissues in DOCA hypertensive rats. Am. J. Physiol., **216**, 1472-1475 (1969).

4) **Pettinger, W. A., Marchelle, M. & Augusto, L.**: Renin suppression by DOC and NaCl in rat. Am. J. Physiol., **221**, 1071-1074 (1971).

5) **Menard, J. & Catt. K. J.**: Measurement of renin activity, concentration and substrate in rat plasma by radioimmunoassay of angiotensin I. Endocrinology, **90**, 422-430 (1972).

6) 宮本正治：低renin本態性高血圧症の副腎皮質機能に関する研究．十全医会誌，88, 549-562 (1979).

7) **Debreceni, L. & Csete, B.**: The role of a feedback mechanism in the regulation of aldotterone secretion in the rat. Acta Endocrinol., **73**, 282-288 (1973).

8) **Singer, B. & Stack-Dunne, M. P.**: Secretion of aldosterone and corticosterone by the rat adrenal. Nature, **174**, 790-791 (1954).

9) **Campbell, W. B. & Pettinger, W. A.**: Sodium chloride suppression of renin release in the unanesthetized rat. Endocrinology, **97**, 1394-1397 (1975).

10) **Fraser, R., Brown, J. J., Lever, A. F., Mason, P. A. & Robertson, J. I. S.**: Control of aldosterone secretion. Clinical Science, **56**, 389-399 (1979).

11) **Miller, R. T., Douglas, J. G. & Dunn, M. J.**: Dissociation of aldosterone and prostaglandin biosynthesis in the rat adrenal glomerulosa. Prostaglandins, **20**, 449-462 (1980).

12) **de Wardener, H. E., Mills, I. H., Clapham, W. F. & Hayter, C. J.**: Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. Clinical Science (Oxf.), **21**, 249-251 (1961).

13) **Mills, I. H., de Wardener, H. E., Hayter, C. J. & Clapham, W. F.**: Studies on the afferent mechanism of the sodium cloride diuresis which follows intravenous saline in the dog. Clinical Science (Oxf.), **21**, 259-261 (1961).

14) **Haning, R., Tait, S. A. S. & Tait, J. F.**: In vitro effects of ACTH, angiotensins, serotonin and potassium on steroid output and conversion of corticosterone to aldosterone by isolated adrenal cells. Endocrinology, **87**, 1147-1167 (1970).

15) **Kloppenborg, P. W. C., Island, D. P., Liddle, G. W., Michclakis, A. M. & Nicholson, W. E.**: A method of preparing adrenal cell suspension and its applicability to the in vitro study of adrenal metabolism. Endocrinology, **82**, 1053-1058 (1968).

16) **Kitabchi, A. E. & Sharma, R. K.**: Corticosteroidogenesis in isolated adrenal cells of rats. I. Effects of corticotropins and 3′, 5′-cyclic nucleotides on corticosterone production. Endocrinology, **88**, 1109-1116 (1971).

17) **Sayers, G., Swallow, R. L. & Giordano, N. D.**: An improved technique for the preparation of isolated rat adrenal cells.: A sensitive, accurate and specific method for the assay of ACTH. Endocrinology, **88**, 1063-1068 (1971).

18) **Sharma, R. K.**: Regulation of steroidogenesis by adrenocorticotoropic hormone in isolated

adrenal cells of rat. J. Biol. Chem., **248**, 5473-5476 (1973).

19) Campbell, D. J. : Increased steroidogenesis by rat zona glomerulosa cells with increased cell concentration in vitro : evidence for a novel aldosterone-stimulating factor and implications regarding aldosterone biosynthesis. J. Endocrinol., **94**, 225-241 (1982).

20) Fraser, R., Brown, J. J., Lever, A. F., Mason, P. A. & Robertson, J. I. S. : Control of aldosterone secretion. Clinical Science, **56**, 389-399 (1979).

21) Matsuoka, H., Mulrow, P. J. & Li, C. H. : β-Lipotropin : a new aldosterone-stimulating factor. Science, **209**, 307-308 (1980).

22) Müller, J. : Aldosterone stimulation in vitro III. Site of action of different aldosterone-stimulating substances on steroid biosynthesis. Acta Endocrinol., **52**, 515-526 (1966).

23) Müller, J. : Steroidogenetic effect of stimulators of aldosterone biosynthesis upon separate zones of the rat adrenal cortex. European J. Clin. Invest., **1**, 180-187 (1970).

24) Spät, A., Solyom, J., Sturgz, J., Meszaros, I. & Ludwig, E. : Effect of angiotensin superfusion on the rate of aldosterone production by incubated rat adrenals. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., **35**, -151 (1969).

25) Tait, S. A. S., Schulster, D., Okamoto, M., Flood, C. & Tait, J. F. : Production of steroid by in vitro superfusion of endocrine tissue. II. Steroid output from bisected whole, capsular and decapsulated adrenals of normal intact, hyperphysectomized and hypophysectomized-nephrectomized rats as a function of time of superinfusion. Endocrinology, **86**, 360-382 (1970).

26) Braley, L. M. & Williams, G. H. : Rat adrenal cell sensitivity to angiotensin II, α^{1-24} ACTH, and potassium : a comparative study. Am. J. Physiol., **233**, E402-E406 (1977).

27) Bing, R. F. & Schulster, D. : Steroidogenesis in isolated rat adrenal glomerulosa cells : Response to physiological concentration of angiotensin II and effects of potassium, serotonin and (Sar^1, Ala^8)-Angiotensin II. J. Endocrinol., **74**, 261-272 (1977).

28) Douglas, J., Aguilera, G., Kondo, T. & Catt, K. : Angiotensin II receptors and aldosterone production in rat adrenal glomerulosa cells. Endocrinology, **102**, 685-696 (1978).

29) Davis, W. W., Burwell, L., Casper, A. G. T. & Bartter, F. C. : Site of action of sodium depletion on aldosterone biosynthesis in the dog. J. Clin. Invest., **47**, 1425-1434 (1968).

30) Müller, J. : Alternate pathway of aldosterone biosynthesis. Acta endocrinol., (Suppl 212) **85**, 91 (1977).

31) Fattah, D, J., Whitehouse, B. J. & Vinson, G. P. : Biosynthesis of aldosterone from 18-hydroxylated precursors by rat adrenal tissue in vitro. J. Endocrinol., **75**, 187-195 (1977).

32) Aguilera, G. & Catt, K. J. : Loci of action regulators of aldosterone biosynthesis in isolated glumerulosa cells Endocrinology, **104**, 1046-1062 (1979).

33) Blair-West, J. R., Brodie, A., Coghlan, J. P., Denton, D. A., Flood, C., Goding, J. R., Sdoggins, B. A., Tait, J. F., Tait, S. A. S., Wintour, E. M. & Wright, R. D. : Studies on the biosynthesis of aldosterone using the sheep adrenal transplant. : Effect of sodium depletion on the conversion of corticosterone to aldosterone. J. Endocrinol., **46**, 453-476 (1970).

34) Tarjan, E., Spät, A., Balla, T. & Szekely, A. : Role of the renin-angiotensin system in the adaptation of aldosterone biosynthesis to sodium restriction in the rat. Acta Endocrinol., **94**, 381-388 (1980).

35) Kaplan, N. M. : The biosynthesis of adrenal steroids : Effects of angiotensin II, adrenocorticotropin, and potassium. J. Clin. Invest., **44**, 2028-2029 (1965).

36) Müller, J. : Aldosterone stimulation in vitro. III Site of action of different aldosterone-stimulating substances on steroid biosynthesis. Acta Endocrinol., **52**, 515-526 (1966).

37) Williams, G. H., Dluhy, R. G. : Aldosterone biosynthesis, Interrelationship of regulatory factors. Am. J. Med., **53**, 595-605 (1972).

38) Saito, E., Ichikawa, Y. & Homma, M. : Direct inhibitory effect of dexamethasone on steroidogenesis of human adrenal in vivo. J. Clin. Endocrinol. Metab., **48**, 861-863 (1979).

39) Biglieri, E. G., Slatone, P. E. & Silens, W. : Postoperative studies of adrenal function in

primary aldosteronism. J. Clin. Endocrinol. Metab., **26**, 553-558 (1966).

40) Müller, J.: Decreased aldosterone production by rat adrenal tissue in vitro due to treatment with 9-Fluorocortisol, Dexamethasone and Adrenocorticotrophin in vivo. Acta Endocrinol., **63**, 1-10 (1970).

41) Aguilera, G., Hauger, R. L. & Catt, K. J.: Control of aldosterone secretion during sodium restriction. Adrenal receptor regulation and increased adrenalsensitivity to angiotensin II. Proc. Natl. Acad. Sci., **75**, 975-979 (1978).

42) Aguilera, G., Schirar, A., Baukal, A. & Catt, K. J.: Angiotensin II receptors. Properties and regulation in adrenal glomerulosa cells. Circ. Res., 46 (suppl. I) 1-118 (1980).

43) Douglas, J. G.: Potassium iron as a regulator of adrenal angiotensin II reseptors. Am. J. Physiol., **239**, E317 (1980).

44) Ikeda, F., Kono, T., Oseko, F., Imura, H. & Endo, J.: Lack of inhibition of ACTH-induced aldosterone stimulation by des- asp^{1}-, ile^{8}-angiotensin II in man. Endocrinol. Japon., **26**, 631-634 (1979).

45) 三浦 清, 吉永 馨, 阿部圭志: 第12回河口湖カンファレンス, 高血圧とホルモン, 71-85頁, 医歯薬出版, 東京. 1978.

46) Funder, J. W., Blair-West, J. R., Coghlan, J. P., Denton, D. A., Scoggins, B. A.眷& Wright, R. D.: Effect of plasma (K^{+}) on the secretion of aldosterone. Endocrinology, **85**, 381-388 (1969).

47) Boyd, J. E. & Mulrow, P. J.: Further studies of the influence of potassium upon aldosterone production in rat. Endocrinology, **90**, 299-302 (1972).

48) Boyd, J. E. & Mulrow, P. J.: Intracellular potassium: the regulator of aldosterone production. J. Clin. Invest. **51**, 13a (1972).

49) Fredlund, P., Saltman, S., Kondo, T., Douglas, J. & Catt, K. J.: Aldosterone production by isolated glomerulosa cells: modulation of sensitivity to angiotensin II and ACTH by extracellular potassium concentration. Endocrinology, **100**, 481-486 (1977).

50) Bayard, F., Cooke, C. R., Tiller, D. J., Beitins, I. Z., Kowarski, A., Walker, W. G., Migenon, C. J.: The regulation of aldosterone secretion in anephric man. J. Clin. Invest., **50**, 1585-1595 (1971).

51) Boyd, J. E., Palmore, W. P. & Mulrow, P. J.: Role of potassium in the control of aldosterone secretion in the rat. Endocrinology, **88**, 556-565 (1971).

52) Mendelsohn, F. A. & Mackie, C.: Relation of intracellular K and steroidogenesis in isolated adrenal zone glomerulosa and fasciculata cells. Clinical Science and Molecular Medicine, **49**, 13-26 (1975).

53) Mckenna, T. J., Island, D. P., Nicholson, W. & Liddle, G. W.: The effects of potassium on early and late steps in aldosterone biosynthesis in cells of the zona glomerulosa. Endocrinology, **103**, 1411-1416 (1978).

54) Fredlund, P., Saltman, S., Catt, K. J.: Aldosterone production by isolated adrenal glomerulosa cells: Stimulation by physiological concentrations of angiotensin II. Endocrinology, **97**, 1577-1586 (1975).

55« Williams, G. H. & Eraley, L. M.: Effects of dietary sodium and potassium intake and acute stimulation on aldosterone output by isolated human adrenal cells. J. Clin. Endocrinol. Metab., **45**, 55-64 (1977).

56) 中村隆一, 猿内享男, 江口豊寿, 阿部由紀子, 伊藤 啓: 副腎及び大動脈アンジオテンシンIIレセプターの測定法の検討, 日内分泌会誌, **56**, 148-156 (1980).

57) Devynck, M. A., Pernollet, M. G., Matthews, P. G., Khosla, M. C., Bumpus, F. M. & Meyer, P.: Specific receptors for des-asp^{1}-angiotensin II (angiotensin III) in rat adrenals. Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 4029-4032 (1977).

58) Semple, P. F. & Morton, J. J.: Angiotensin II and angiotensin III in rat blood. Circ. Res., **38** (Suppl. 2), 122-126 (1976).

59) Kono, T., Ikeda, F., Oseko, F., Imura, H. & Endo, J.: Biological activity of des-asp^{1}-angiotensin II in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., **50**, 40-45 (1980).

60) 岡 博, 大沢仲昭, 加藤順三: ホルモンレセプター, 92-123頁, 中外医学社, 東京. 1977.

61) Peytremann, A., Nicholson, W. E. & Brown, R. D.: Comparative effects of angiotensin and ACTH on cyclic-AMP and steroidogenesis in isolated bovine adrenal cells. J. Clin. Invest., **52**, 835

-842 (1973).

62) **Saruta, T., Cook, R. & Kaplan, M.**: Adrenocortical steroidogenesis: Studies on the mechanism of angiotensin and electrolytes. J. Clin. Invest., **51**, 2239-2245 (1972).

63) **Fakunding, J. L., Chow, R. & Catt, K. J.**: The role of calcium in the stimulation of aldosterone production by adrenocorticotoropin, angiotensin II, and potassium in isolated glomerulosa cells. Endocrinology, **105**, 327-333 (1979).

Studies on the Mineralocorticoid Production by Isolated Adrenal Glomerulosa Cells of Deoxycorticosterone (DOC)-Salt Hypertensive Rats Akira Honjo, Department of Internal Medicine (II) (Director: Prof. R. Takeda), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **93**, 399–414 (1984)

Key words: Isolated rat adrenal cell, Aldosterone biosynthesis, DOC-salt hypertensive rat

Abstract

The mechanism underlying the suppressed secretion of aldosterone in deoxycorticosterone (DOC)-salt hypertensive rats is not clear. The present studies were designed to clarify this mechanism by evaluating the responsiveness of mineralocorticoid to isoleucine-5-angiotensin II (AII), α^{1-24} adrenocorticotropic hormone (ACTH) and potassium in isolated glomerulosa cells of DOC-salt hypertensive rats compared with that in those of normal and salt-loaded rats. Male Wister rats weighing about 50g were kept on normal sodium diet (0.23% Na, 0.95% K and tap water, normal rats), high sodium diet (0.23% Na, 0.95% K and 1% saline, salt-loaded rats) or high sodium diet plus DOC treatment (DOC-treated hypertensive rats). A dose of 12.5 mg/kg of DOC acetate, in a microcrystal suspension, was subcutaneously injected once a week for 4 weeks. Glomerulosa cell suspension was prepared from the adrenal capsules by collagenase digestion. Two milliliter aliquots of the cell suspension were incubated for 2 hr at 37°C under 95% O_2–5% CO_2, in the presence of a stimulant; AII at 5.2×10^{-14} – 5.2×10^{-6} M, ACTH at 5.9×10^{-14} – 5.9×10^{-6} M or potassium at 2.2–13mEq/L. Basal production of corticosterone (Kendall's compound B : B_K) by glomerulosa cells was significantly lower in the DOC-salt hypertensive rats than in the normal rats, while the production in the salt-loaded rats did not differ. Basal production of aldosterone by glomerulosa cells was significantly lower in both the DOC-treated hypertensive and the salt-loaded rats than in the normal rats. During cell incubation, in the normal rats B_K and aldosterone production were increased by the three stimuli. In the DOC-treated hypertensive rats, B_K production was increased only by ACTH, while aldosterone production was not increased by the three stimuli. In the salt-loaded rats, B_K and aldosterone production were increased by ACTH or potassium but not by AII. The ratios of aldosterone to B_K outputs after ACTH or potassium stimulation in the salt-loaded rats were significantly lower than those in the normal rats. These results suggest that main mechanisms underlying the suppressed secretion of aldosterone in DOC-salt hypertensive rats may be due to the reduced sensitivity of glomerulosa cells to AII and the inhibited enzyme activity in the late step of aldosterone biosynthesis in the adrenal zona glomerulosa. In addition, it appears that the reduced sensitivity to AII was caused by endogenous AII deficiency and hypokalemia and the inhibited enzyme activity by sodium excess and endogenous AII deficiency.