

鉍質コルチコイド誘発高血圧の発症維持における腎
鉍質コルチコイドレセプター機構の役割：

glycyrrhizinic

acidおよびdeoxycorticosterone投与ラットの腎鉍質
コルチコイドレセプターの性状

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	http://hdl.handle.net/2297/8901

鉱質コルチコイド誘発高血圧の発症維持における 腎鉱質コルチコイドレセプター機構の役割

glycyrrhizinic acid および deoxycorticosterone
投与ラットの腎鉱質コルチコイドレセプターの性状

金沢大学第二内科学教室 (主任: 竹田亮祐教授)

林 多喜王

(昭和56年2月21日受付)

Key words Hypertension, Mineralocorticoid, Glycyrrhizinic Acid, Deoxycorticosterone, Renal Mineralocorticoid Receptor

甘草は古来より漢方処方に広く用いられており、欧米では liquorice candy の甘味剤としても愛用されている。甘草の抽出物である glycyrrhizinic acid (GR) および glycyrrhetic acid (Fig. 1) は臨床的には肝疾患、アレルギー疾患および消化性潰瘍の治療に使用されている¹⁾²⁾。また GR の誘導体である carbenoxolone (Fig. 1) も抗消化性潰瘍剤として使用されている³⁾⁴⁾。1946年に Revers⁵⁾ は甘草末を消化性潰瘍の患者に使用し 20%の患者に浮腫が発生した

ことを報告したが、Molhuysen⁶⁾は甘草の水抽出物 (15%の GR を含む) を消化性潰瘍の患者に投与し、ナトリウムおよび水の貯留、低カリウム血症およびカリウムの排泄増加、高血圧等が発現したとし、これらの症候が GR の deoxycorticosterone (DOC) 様作用によることを示した。以来、liquorice candy, GR, あるいは carbenoxolone の大量摂取により、鉱質コルチコイド過剰状態を呈した症例の報告が多数みられ^{7)~26)}、Conn²⁷⁾はレニン-アルドステロン系の抑制が認められることより、liquorice-induced pseudoaldosteronism と呼んでいる。

原発性アルドステロン症²⁸⁾や、 17α -hydroxylase あるいは 11β -hydroxylase 欠損症²⁹⁾等の鉱質コルチコイド過剰状態で高血圧が発現することはよく知られており、低レニン性本態性高血圧症においても鉱質コルチコイド過剰を原因と考える研究者もある³⁰⁾³¹⁾。鉱質コルチコイドは腎の遠位尿管に作用しナトリウムの能動的再吸収を介して水分を体内に貯留させることにより高血圧を発現させると考えられているが、実験的鉱質コルチコイド過剰高血圧の代表である DOC 高血圧動物での実験では自律神経系の役割が重視されている³²⁾³³⁾ように、鉱質コルチコイド過剰高血圧の病因は必ずしも明らかではない。

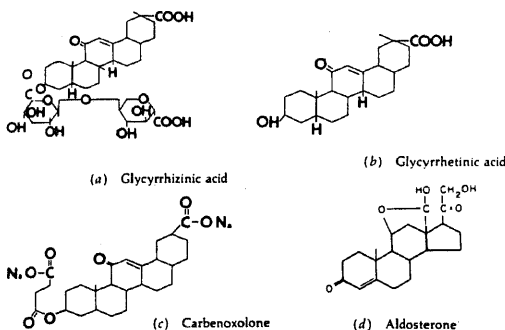


Fig. 1. Chemical structures of (a) glycyrrhizinic acid, (b) glycyrrhetic acid, and (c) carbenoxolone compared with that of (d) aldosterone.

The Role of Renal Mineralocorticoid Receptor Mechanisms in the Pathogenesis of Mineralocorticoid Excess Hypertension in the Rat: The characteristics of renal mineralocorticoid receptors in glycyrrhizinic acid or deoxycorticosterone induced hypertensive rats. **Takio Hayashi**, The Department of Internal Medicine (II), (Director: Prof. R. Takeda), School of Medicine, Kanazawa University.

一般にステロイドホルモンは標的細胞において特異蛋白を合成させることにより作用を発現させる。このホルモン作用の第1段階は細胞質内のホルモン結合蛋白であるレセプターとの結合であり、次いでホルモン-レセプター複合体は活性化されて核内へ移行しクロマチンアクセプターに結合し、さらにDNA依存性のメッセンジャーRNAを合成して特異的作用を発現すると考えられている^{34)~36)}。鉍質コルチコイドの作用にも同様のレセプター機構が存在し、標的器官での細胞質内レセプターの存在および鉍質コルチコイド-レセプター複合体の核内移行が証明されている³⁷⁾。Ulmannら³⁸⁾はGRおよびそのアグロコンであるglycyrrhetic acidがラット腎細胞質の鉍質コルチコイドレセプターに結合することを報告しているが、このような鉍質コルチコイドレセプター機構とその高血圧発現維持機序との関係を証明した報告はない。

最近、Takedaら³⁹⁾はGRによる偽性アルドステロン症がGRの投与中止後少なくとも1ヶ月間にわたって持続した症例を報告している。著者は上記のようにGRがその投与中止後も鉍質コルチコイド過剰状態を維持させる特徴に着目し、ラットにおいてGR投与中止後の血圧の変動とそれに伴う腎鉍質コルチコイドレセプター機構の変化を検討することによりGRが直接腎のレセプター機構を介して高血圧を発現維持する可能性について検討した。このことは鉍質コルチコイド過剰高血圧の病態の一端を解明することに役立つものと考えられた。

材料および方法

I. 実験動物および実験計画

1. 正常ラット腎細胞質アルドステロンレセプター性状の検討.

体重200g前後のウイスター系雄性ラット(北陸ラボウェア)を用いて実験を行なった。内因性副腎ステロイドの影響を除くため両側副腎摘出後、オリエンタル社製ラット標準固型飼料および1%食塩水を随意に摂取させ、7日目に以下のごとく腎細胞質アルドステロンレセプターの性状を検討した。

2. glycyrrhizinic acid (GR) 短期投与ラット腎細胞質アルドステロンレセプター性状および血圧の検討.

体重200g前後のウイスター系雄性ラットにGR(500mg/kg体重)を落下生油-エタノール(1:1)に懸濁して(100mg/ml)背部皮下に連続3日間投与した。投与終了後、第1週、第2週および第4週目に血圧を測定し、測定後ただちにそれぞれの群とも両側

副腎を摘出し腎細胞質アルドステロンレセプター性状を比較検討した。落下生油-エタノール混合液のみを同様に投与し、第4週目のラットを上記のように処置し対照として用いた。これらすべてのラットは4週間1%食塩水を随意に摂取させた。

3. glycyrrhizinic acid (GR) 短期投与ラット腎細胞質アルドステロンレセプターの核内移行の検討.

2.と同様に処置したラットを用い、GR投与後第2週目に実験を行なった。GR投与前に両側副腎摘出を行なった群およびGR投与後1週目に両側副腎摘出を行なった群を作成し、それぞれの群で落下生油-エタノール混合液のみを投与したラットを対照とした。また内因性副腎ステロイド自体の影響を観察する目的で、GR投与を行わずに両側副腎摘出を行なった群および開腹のみを行なった群を作成し、術後1週目に以下のごとく核内移行の実験を行なった。これらすべてのラットとも2週間1%食塩水を随意に摂取させた。

4. glycyrrhizinic acid (GR) 長期投与ラットにおけるGR投与中止後の腎細胞質アルドステロンレセプター性状および血圧の検討: deoxycorticosterone (DOC) 投与ラットとの比較.

体重50g前後の幼若ウイスター系雄性ラットの1側の腎および副腎を摘出し、GR(500mg/kg体重)またはDOC(1.25mg/kg体重)を2.と同様に背部皮下に過1回、連続12週間にわたって投与しその間の血圧および体重の変動を、落下生油-エタノール混合液のみを投与した対照ラットとともに観察した。投与終了時に各群の一部を断頭屠殺して血漿ナトリウムおよびカリウムを測定し、さらに投与中止後の血圧の推移を各群で観察した。GR投与群では投与中止直後、5週目および13週目に、DOC投与群および対照群では投与中止直後に残っている1側の副腎を摘出し、7日後に腎細胞質アルドステロンレセプターの性状を比較検討した。すべてのラットに経過中1%食塩水を随意に摂取させた。

II. ラット腎細胞質分画および核分画の調製

ベントバルビタール(600mg/kg体重)麻酔下に開腹し、氷冷した灌流液(133mM NaCl, 0.5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 6mM KH₂PO₄, 5mM glucose, 5mM tris-HCl 緩衝液pH 7.4) 50mlを用いて腹部大動脈より腎灌流を行ない血液成分を十分除去した。次に細切した腎に3倍量の緩衝液A(0.25M sucrose, 10mM tris-HCl 緩衝液pH 7.4)を加え、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズした後、4℃, 700×g, 10分間

遠心し、上清をさらに 4℃、20,000 × g あるいは 105,000 × g、60 分間遠心し上清を細胞質分画とした (約 4 mg 蛋白 / ml)。腎ホモジネートの 700 × g 遠心下層を緩衝液 A にて 1 回洗浄後、緩衝液 B (1.8M sucrose, 3mM MgCl₂, 10mM tris-HCl 緩衝液 pH 7.4) に重層し、4℃、20,000 × g、60 分間遠心したペレットを緩衝液 A にて 1 回洗浄し、緩衝液 A にサスペンションして核分画として用いた。

Ⅲ. 腎細胞質アルドステロンレセプター性状および各種ステロイドのアルドステロンレセプターに対する競合率の測定。

標準アッセイとして緩衝液 A を用いた総量 500 μl にて、2 nM の [³H] - aldosterone (50Ci/mM, New England Nuclear) と細胞質分画 (約 1 mg 蛋白) とを種々の濃度の非標識 aldosterone とともに 4℃、8 時間インキュベーションを行なった。インキュベーション後、緩衝液 A に溶解した 100 μl の活性化したチャーコール (100 mg / 100 μl, Norit A, Sigma) を加えて非結合 [³H] - aldosterone を吸着させた。4℃、1,500 × g、20 分間遠心した上清 200 μl にシンチレーター (Aquasol II, New England Nuclear) 10 ml を加えて、液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-671) にて放射活性を測定した。2 μM の非標識 aldosterone とともにインキュベートして得られた放射活性を非特異的結合として各放射活性より差し引き特異的結合を算出した。これらの特異的結合を用いて [³H] - aldosterone の非標識 aldosterone による解離曲線を描くとともに、Scatchard plot⁴⁰⁾ を行ない、腎細胞質アルドステロンレセプターと aldosterone との結合の解離定数 (Kd) およびレセプター数の指標となる最大結合能 (Bmax) を測定した。

各種ステロイドすなわち aldosterone (Sigma) DOC, DOC acetate, corticosterone, cortisol, progesterone, tetrahydrocortisol, dehydroepiandrosterone, dexamethasone (以上 Steraloids), glycyrrhetic acid (Nakarai), および 5α-dihydrocortisol (Dr. Kornel より提供される) の競合力の測定には、上記のように非標識 aldosterone および各種ステロイドによる [³H] - aldosterone の解離曲線を片対数グラフ上に描き、[³H] - aldosterone の特異的結合を 50% に抑制するそれぞれのステロイドの濃度を解離曲線より算出し、aldosterone の競合力を 100% として競合率 (aldosterone による 50% 抑制濃度 / 求めるステロイドによる 50% 抑制濃度 × 100) をパーセントで表わした。また同様に [³H] - dexamethasone (46Ci/mM, New England Nuclear) を

用いて上記の実験を行ない腎細胞質グルコルチコイドレセプターの性状を検討した。

Ⅳ. ラット腎アルドステロン - レセプター複合体の核内移行の実験

I. の 3. のごとく処置したラットより調製した細胞質分画 1 ml (約 4 mg 蛋白) を総量 2 ml のアッセイ系において、5mM の [³H] - aldosterone と 4℃、8 時間インキュベートし活性化したチャーコール 200 μl (400 mg / 200 μl) を加えて非結合 [³H] - aldosterone を除去し、アルドステロン - レセプター複合体を作成した。一部を上記のように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、[³H] - aldosterone と腎細胞質アルドステロンレセプターとの結合を各ラット群間で比較した。さらに 1 ml のアルドステロン - レセプター複合体と 1 ml の核分画サスペンションを 4℃、30 分間インキュベーションした後、4℃、700 × g、10 分間遠心し核分画を分離した。緩衝液 A にて 1 回洗浄し、1 ml の 0.4M KCl でクロマチン分画を抽して抽出液 500 μl の放射活性を上記のように測定した。細胞質分画および核クロマチン分画への結合とも、5 μM の非標識 aldosterone とともにインキュベーションして得られた放射活性を非特異的結合として各放射活性より差し引き特異的結合を算出した。細胞質レセプターと [³H] - aldosterone の結合は dpm / mg 細胞質蛋白で、クロマチンアクセプターへの結合は dpm / 0.25 mg クロマチン蛋白で表わした。

以上の実験はすべて duplicate で行なった。

Ⅳ. その他

ラットの血圧は、ラットを 40℃、15 分間保温した後、テイルカフ法により自動血圧計 (USM 105, 植田製作所) を用いて収縮期血圧を測定した。

蛋白量はウシ血清アルブミンを標準として Lawry らの方法⁴¹⁾ によった。

統計量は平均 ± 標準偏差あるいは平均 ± 平均誤差で表わし、2 群間の平均値の差の検定には大検定を用い、p < 0.05 を有意とした。相関係数は最小自乗法を用いた回帰直線による解析より求めた。

成 績

1. 正常ラット腎細胞質アルドステロンレセプター性状。

[³H] - aldosterone の特異的結合は、4℃、4 時間で平衡に達し、12 時間まで安定した結合が得られた (Fig. 2)。平衡に達した時点でインキュベーションの温度を 25℃ に上昇させると、すみやかに特異的結合は失われた (Fig. 3)。このため以後の実験は 4℃ あるいは

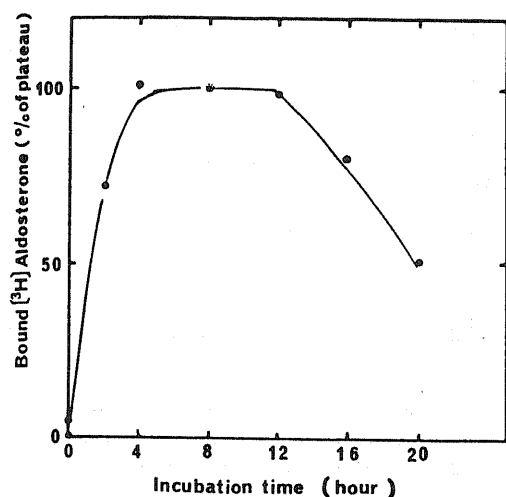


Fig. 2. Time course of specific binding of [³H]-aldosterone to rat kidney cytosol. [³H]-aldosterone (2 nM) with and without unlabeled aldosterone (2 μM) were incubated with rat kidney cytosol (1 mg protein) in 500 μl assay mixture at 4°C for varying period. After the incubation, unbound aldosterone was adsorbed by charcoal, and then the specific binding was calculated as described in method. Specific binding of [³H]-aldosterone at 8 hours incubation is taken as 100%. Each point represents the mean value of duplicate experiments.

は氷冷下で行ない、8時間のインキュベーション時間を用いた。Rousseauらの方法⁴²⁾によって活性化したチャーコール量を検討すると50～300 mg/tubeの間で特異的結合は一定となり (Fig. 4), 著者の用いた100 mg/tubeのチャーコール量は十分非結合 [³H]-aldosteroneを吸着していると考えられた。また [³H]-aldosteroneの特異的結合は細胞質分画の蛋白分画の蛋白濃度に比例した (Fig. 5)。Fig. 6に Scatchard plotによる解析の代表例を示す。図に示したように aldosteroneは2つのコンポーネントに結合すると考えられる性状を示した。親和性が高く結合数の少ない部分の解離定数(Kd)は 1.6 ± 0.5 nM (n = 5)であり、最大結合能(Bmax)は $3.1 \pm 0.2 \times 10^{-13}$ mol/mg蛋白 (n = 5)で以前の報告と一致した。以後 Scatchard plotは高親和性の結合部分だけを用いた。

この腎細胞質アルドステロンレセプターに対する各種ステロイドの競合力は、aldosterone 100%に対して、DOC 91%, corticosterone 84%, DOC acetate

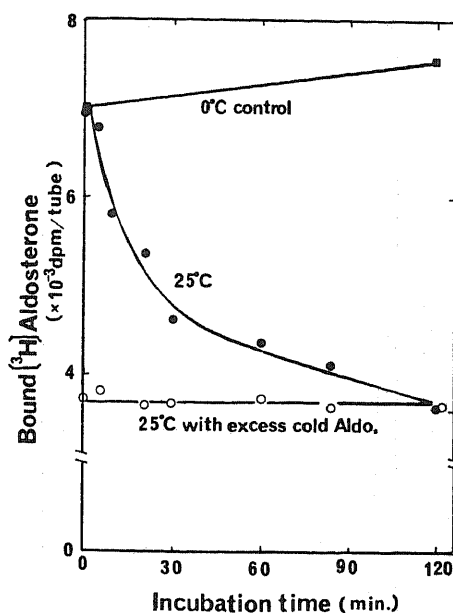


Fig. 3. Dissociation of [³H]-aldosterone bound to rat kidney cytosol by increased temperature. [³H]-aldosterone (2 nM) in the presence (—○—) or absence (—●—) of unlabeled aldosterone was incubated with rat kidney cytosol at 4°C for 8 hours. After incubation, the temperature of assay mixtures (—○—) was increased to 25°C for varying time period. The temperature of assay mixture of control (—●—) experiments was maintained at 0°C.

67%, dexamethasone 32%, cortisol 20%, progesterone 17%, 5α-dihydrocortisol 15%および glycyrrhetic acid 9%であったが、tetrahydrocortisol および dehydroepiandrosteroneは競合しなかった (Table 1)。

[³H]-dexamethasoneを用いて行なった同様の実験では、dexamethasoneは腎細胞質分画に1つの結合部位のみを持ち、解離定数(Kd) 11 nM, 最大結合能(Bmax) 9.9×10^{-13} mol/mg蛋白 (Fig. 7)であり、この結合に対する aldosterone および corticosteroneの競合力はそれぞれ20%と40%であった。

2. glycyrrhizic acid (GR) 短期投与ラットにおける腎細胞質アルドステロンレセプター性状および血圧。

GR投与前に 105 ± 3 mm Hgであった血圧は対照群および、GR投与後、第1週、第2週、第4週の群でそれぞれ 120 ± 5 , 139 ± 8 , 140 ± 7 , 126 ± 3 mm Hgで

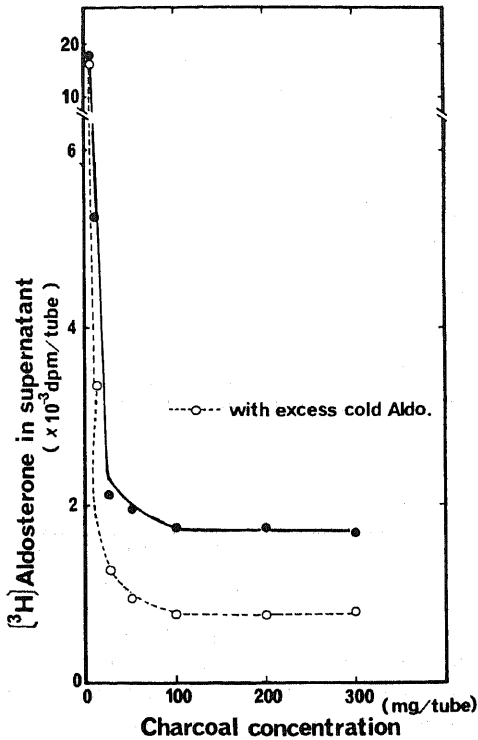


Fig. 4. Effect of the amount of charcoal on the measurement of $[^3\text{H}]$ -aldosterone binding to rat kidney cytosol. $[^3\text{H}]$ -aldosterone (2 nM) and rat kidney cytosol (1 mg protein/500 μl) were incubated with (—○) or without (—●) unlabeled aldosterone at 4°C for 8 hours. After the incubation, the 100 μl charcoal suspensions containing increasing amounts of activated charcoal were added to assay mixture, and radioactivity not adsorbed by charcoal was determined as described in method. Specific binding corresponds to the difference between the upper (●—●) and lower (○----○) curves in the figure.

あった (Fig. 8)。対照群に比し GR 投与群はすべて有意に血圧が高く、また GR 投与後、第 1 週および第 2 週目の群では第 4 週目の群より有意に血圧は高値を示したが、第 1 週および第 2 週目のラット間に差は認められなかった。これらのラット群より調製した細胞質分画を用いて、アルドステロンレセプターの性状を Scatchard plot にて比較すると (Fig. 9)。解離定数 (Kd) はすべての群で約 2 nM とほぼ同値であったが、最大結合能 (Bmax) は対照群 $32.0 \times 10^{-14} \text{mol/mg}$ 蛋白に比べて、GR 投与後、第 1 週に比べて、GR 投与後、第

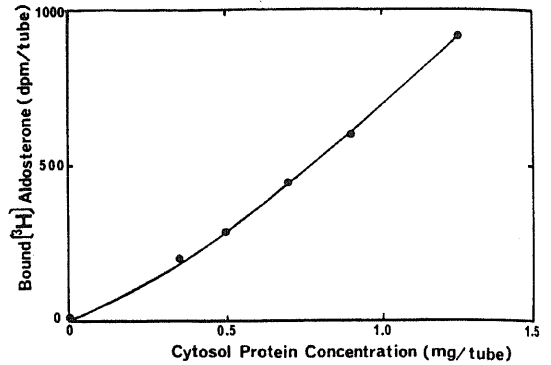


Fig. 5. Effect of protein concentrations of rat kidney cytosol on specific $[^3\text{H}]$ -aldosterone binding. $[^3\text{H}]$ -aldosterone (2 nM) and increasing concentrations of cytosol were incubated at 4°C for 8 hours with and without unlabeled aldosterone (2 μM). Unbound aldosterone was adsorbed by charcoal and specific binding was calculated as described in method. Protein concentrations were analyzed after charcoal adsorption in the tubes incubated without aldosterone.

1 週、第 2 週、第 4 週目の群でそれぞれ、9.0、4.4、11.0 $\times 10^{-14} \text{mol/mg}$ 蛋白であった。これらの Bmax の値、すなわち腎細胞質内のアルドステロンレセプターの数と、それぞれの収縮期血圧値の間には有意 ($p < 0.05$) の負の相関があり (Fig. 10)。血圧の高いものほどアルドステロンレセプター数が少ない関係が認められた。

3. glycyrrhizic acid (GR) 短期投与ラットにおける腎細胞質アルドステロン-レセプター複合体の核内移行。

I. の 3. のごとく処置したラットの腎細胞質分画と、 $[^3\text{H}]$ -aldosterone との特異的結合は、Fig. 11 に示すように、GR 投与前に両側副腎摘出を行なっても (Fig. 11 の Experiment II) あるいは GR 投与後に両側副腎摘出を行なっても (Fig. 11 の Experiment III)、GR を投与しない対照群に比して有意に特異的結合が少なく、アルドステロンレセプター数の減少が示唆された。また GR 投与を行なわなかったラットで両側副腎摘出を行なった群と開腹のみを行なった群との比較では (Fig. 11 の Experiment III)、開腹のみを行ない内因性ステロイドが存在する状態では腎細胞質分画への $[^3\text{H}]$ -aldosterone の特異的結合が、両側副腎摘出を行ない内因性ステロイドが存在しない状態に比べて有意に少なかった。すなわち GR 投与ラットでは GR 自体の作用により、内因性ステロイドの作用と

Table 1. Competition of various steroids with aldosterone binding to rat kidney cytosol receptors. [³H]-aldosterone (2 nM) and increasing concentrations of unlabeled steroids were incubated with rat kidney cytosol at 4°C for 8 hours. Unbound steroids were adsorbed by charcoal. Concentration of steroids shown in this table is that required for 50% displacement of [³H]-aldosterone (2 nM). Percentages in parentheses was $\left(\frac{\text{aldosterone concentration}}{\text{steroid concentration}} \times 100\right)$ at the concentrations required for 50% displacement of [³H]-aldosterone (2 nM).

Aldosterone	6.1 ± 1.6 nM	(100%)
Deoxycorticosterone	6.7 ± 2.0	(91)
Corticosterone	7.2 ± 2.2	(84)
Dexamethasone	19	(32)
Cortisol	31	(20)
Progesterone	36	(17)
5 α -dihydrocortisol	41	(15)
Glycyrrhetic acid	67	(9)
Tetrahydrocortisol	Infinite	
Dehydroepiandrosterone	Infinite	

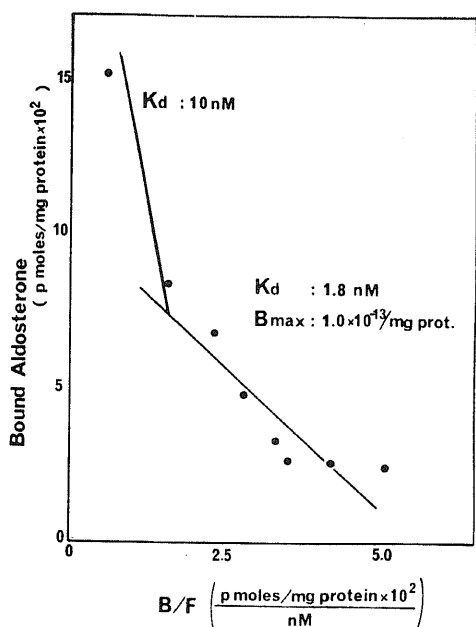


Fig. 6. Scatchard analysis of aldosterone binding to rat kidney cytosol prepared from normal rat. [³H]-aldosterone (2 nM) and increasing concentrations of unlabeled aldosterone (0-2 μ M) were incubated with rat kidney cytosol (1 mg protein) in 500 μ l assay mixture at 4°C for 8 hours. Unbound aldosterone was adsorbed by charcoal.

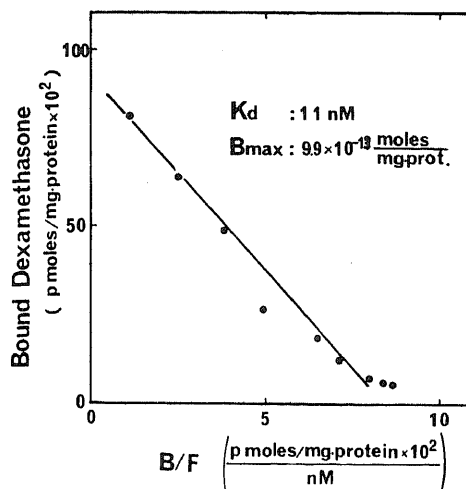


Fig. 7. Scatchard analysis of dexamethasone binding to kidney cytosol prepared from normal rat. [³H]-dexamethasone (2 nM) and increasing concentrations of unlabeled dexamethasone were incubated with kidney cytosol (1 mg protein) in 500 μ l assay mixture at 4°C for 8 hours. Unbound dexamethasone was adsorbed by charcoal.

同様に腎細胞質アルドステロンレセプター数の減少が認められた。

次にこれらのアルドステロン-レセプター複合体を用いて上記のように核内移行の実験を行なった。Fig. 12に示すように Experiment I (Fig. 11)においては、副腎摘出を行なったラットの腎細胞質分画より調製したアルドステロン-レセプター複合体は、Cに示す副腎摘出を行なわないラットの核よりも、Dに示す副腎摘出を行なった核に有意に多く移行した。また副腎摘出を行なわないラットの腎細胞質分画より調製したアルドステロン-レセプター複合体は、Aに示す副腎摘出を行なわないラットの核よりも、Bに示す副腎摘出を行なった核により多く移行する傾向を示した。Experiment II (Fig. 11)においても Fig. 13に示すようにほぼ同様な結果を得たが、GR 投与は GR 自体が内因性ステロイドと同様の効果を腎細胞質アルドステロン-レセプター複合体の核内移行に関して持つ

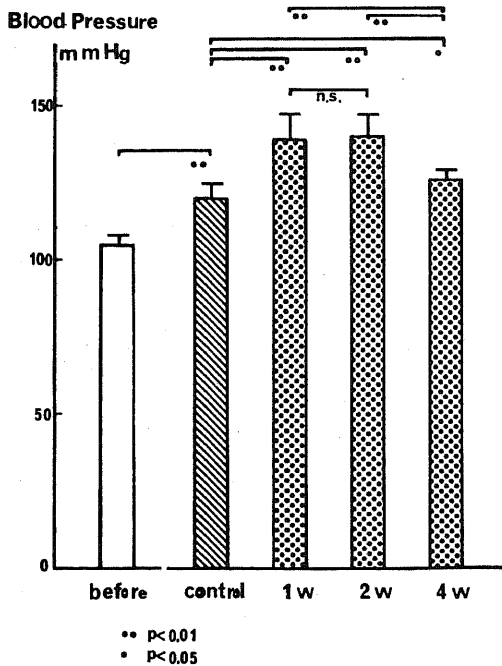


Fig. 8. Systolic blood pressures (mean \pm SD) in rats before treatment (before, $n=24$), in control rats 4 weeks after vehicle injection (control, $n=6$), in rats 1 (1W, $n=6$), 2 (2W, $n=6$), and 4 (4W, $n=6$) weeks after injection of glycyrrhizic acid (500 mg/Kg body weight/day for 3 days). Rats in control, 1W, 2W, and 4W were maintained in 1% NaCl for 4 weeks. n : number of rats in each group.

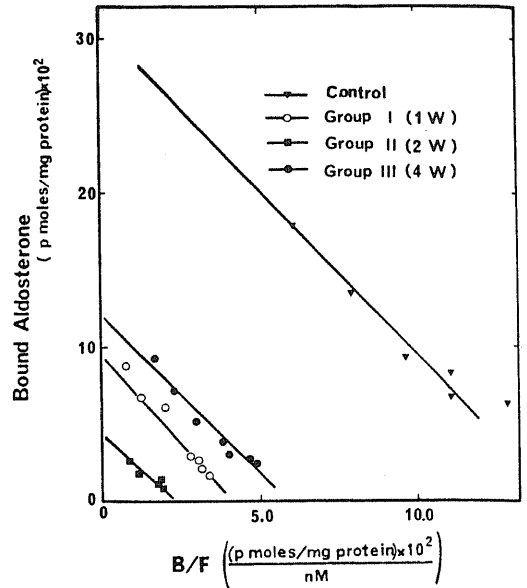


Fig. 9. Scatchard analysis of aldosterone binding to kidney cytosol prepared from control (\blacktriangledown) rats, rats 1 (\circ), 2 (\blacksquare), and 4 (\bullet) weeks after injection of glycyrrhizic acid.

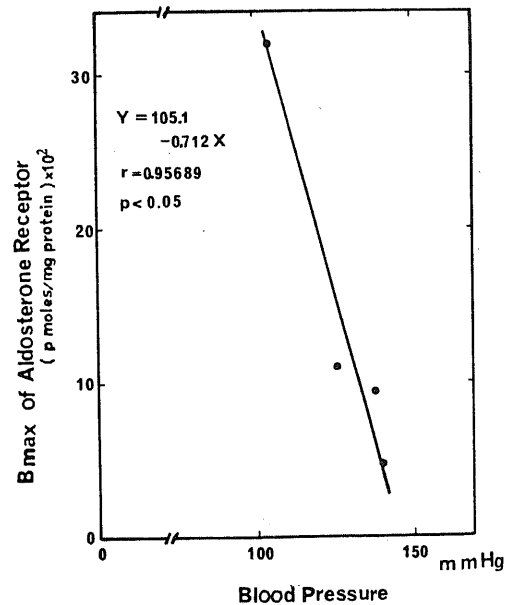


Fig. 10. Correlation between systolic blood pressure shown in Fig. 7. and Bmax of aldosterone receptor shown in Fig. 8.

ことが示された。

4. glycyrrhizinic acid (GR) 長期投与ラットにおける GR 投与中止後の腎細胞質アルドステロンレセプター決状および血圧:deoxycorticosterone (DOC) 投与ラットとの比較。

GR および DOC 投与により血圧は対照に比し有意に上昇したが (Fig. 14, 上), 体重の増加は各群間で差がなかった (Fig. 14, 下). Table 2 に示すように, GR, DOC 投与終了時に測定した血漿カリウム値は対照に比し有意に低値を示した. 12 週間で投与を中止した直ちに副腎摘出を行なったラットを用いて, 投与中止後, 1 週目の腎細胞質アルドステロンレセプターの性状を比較した. Fig. 15 に示すように DOC 投与ラットの腎細胞質アルドステロンレセプターは増照とほぼ同様の性状であったが, GR 投与ラットの腎細胞質分画に [³H]-aldosterone は結合せず, GR の影響が持続していた。

GR および DOC 投与中止後の血圧の変化を Fig.

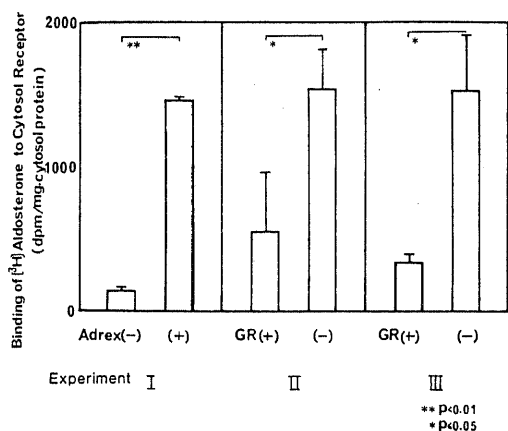


Fig. 11. Experiment (I): Specific binding of [³H]-aldosterone to kidney cytosol prepared from rats with adrenalectomy (Adrex+) or sham operation (Adrex-) 1 week before the study. The rats in both groups were injected with vehicle.

Experiment (II): The binding of [³H]-aldosterone to kidney cytosol receptors prepared from rats injected by glycyrrhizin, 500 mg/Kg BW/day for 3 days (GR+) or rats injected by vehicle 2 weeks before the experiment. Rats in either group were adrenalectomized just before the injection of glycyrrhizin or vehicle.

Experiment (III): The experimental design was the same as in experiment (II), except that the rats were adrenalectomized 1 week after injection of glycyrrhizin or vehicle.

16 に示した. DOC 投与群では血圧は高いまま維持されたが, GR 投与群ではゆっくりと正常にまで回復した. GR 投与中止後, 5 および 13 週目に残っている副腎を摘出し, 6 週および 14 週目の腎細胞質アルドステロンレセプターの性状を検討すると, 6 週目においても, [³H]-aldosterone の結合は約 10 % にしか回復していなかったが (Fig. 17, 上), 14 週目には完全に回復していた (Fig. 17, 下). すなわちこれらの実験においては, 血圧の回復と腎細胞質アルドステロンレセプター性状の回復は, GR 投与ラット群で, ほぼ出行して

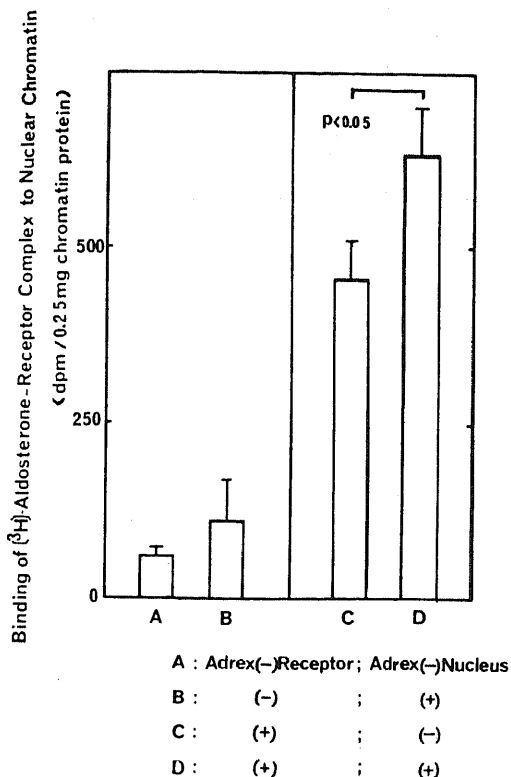


Fig. 12. Specific binding of [³H]-aldosterone receptor complex to nuclear chromatin (Mean ± SD). [³H]-aldosterone-receptor complex and nuclear suspension were prepared from the rat shown in Fig. 11 (I). A: binding of aldosterone-receptor complex of Adrex (-) rat to nucleus of Adrex (-) rat. B: binding of the complex of Adrex (-) rat to nucleus of Adrex (+) rat. C: binding of the complex cytosol of Adrex (+) rat to nucleus of Adrex (-) rat. D: binding of the complex of Adrex (+) rat to nucleus of Adrex (+) rat. Four rats in each group were used. Adrex(-): not adrenalectomized, Adrex(+): adrenalectomized.

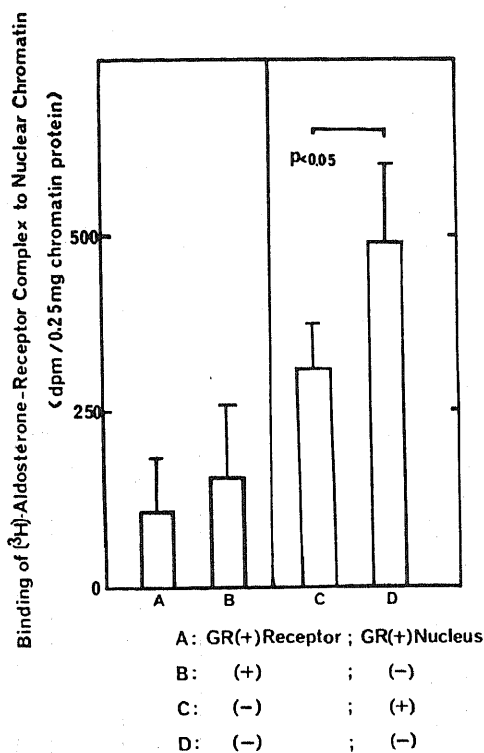


Fig. 13. Specific binding of [³H]-aldosterone-receptor complex to nuclear chromatin (mean ± SD). [³H]-aldosterone-receptor complex were prepared from the rat of Fig. 11 (II). A: [³H]-aldosterone-receptor complex of GR (+) rat to nucleus of GR (+) rat. B: the complex of GR (+) rat to nucleus of GR (-) rat. C: the complex of GR (-) rat to nucleus of GR (+) rat. D: the complex of GR (-) rat to nucleus of GR (-) rat. Four rats in each group were used. GR(-): not treated by glycyrrhizinic acid, GR(+): treated by glycyrrhizinic acid.

いたことが認められた。

考 察

Rousseau ら⁴³⁾はラット腎細胞質アルドステロンレセプターが2つの構成要素からなることを示し, aldosterone が細胞質内の鉱質コルチコイドレセプター (タイプ I) とグルココルチレセプター (タイプ II) に結合し, タイプ I レセプターは aldosterone に対し

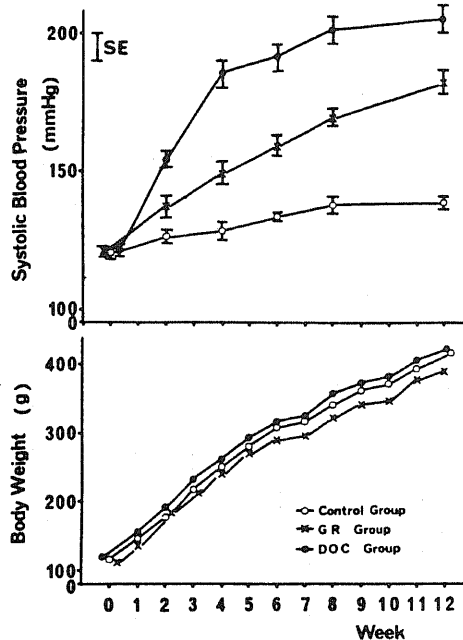


Fig. 14. Changes in systolic blood pressure (mean + SE) and body weight (mean) by treatments of glycyrrhizinic acid (—×—), DOC (—●—) or vehicle (—○—). Rats were adreno-nephrectomized unilaterally and then glycyrrhizinic acid (500 mg/Kg body weight) or DOC (1.25 mg/Kg body weight) were injected once a week. All rats were maintained on 1% NaCl.

Table 2. Blood pressures and plasma electrolytes in control rats, rats treated by glycyrrhizinic acid or DOC for 12 weeks.

		Control	Glycyrrhizinic acid	DOC
BLOOD PRESSURE	(mmHg)	138 ± 2	182 ± 5*	205 ± 5*
PLASMA Na	(mEq/l)	142 ± 1	141 ± 2	142 ± 1
K	(mEq/l)	3.9 ± 0.1	2.9 ± 0.2*	2.8 ± 0.2*

* p < 0.01 v.s. control

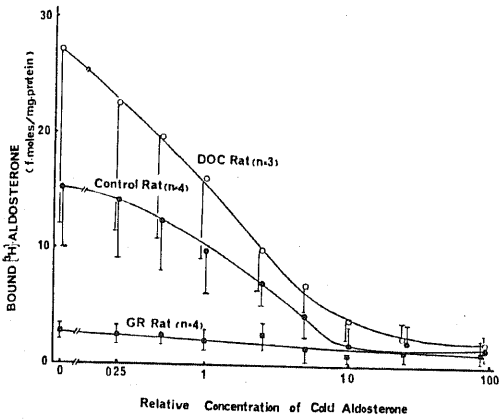


Fig. 15. Dissociation of $[^3\text{H}]$ -aldosterone (2 nM) from rat kidney cytosol receptors by increasing concentrations of unlabeled (cold) aldosterone 1 week after discontinuation of glycyrrhizic acid, DOC, or vehicle injection. Unilaterally adrenalectomized rats were injected glycyrrhizic acid (500 mg/Kg body weight/W), DOC (1.25 mg/Kg body weight/W) or vehicle (control) for 12 weeks and then residual adrenal glands were removed. One week after these treatments, this dissociation studies were performed using kidney cytosol prepared from glycyrrhizic acid treated rats (GR rat, \blacksquare), DOC treated rats (DOC rat, \circ) and control rats (control rat, \bullet).

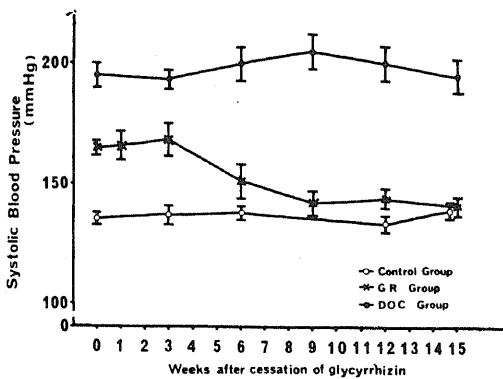


Fig. 16. Changes of systolic blood pressure (mean \pm SE) of rats following the cessation of glycyrrhizic acid (\rightarrow x) and DOC (\rightarrow ●) treatment and in control (\rightarrow ○) rats. Unilaterally adrenalectomized rats were injected by glycyrrhizic acid (500 mg/Kg body weight/W), DOC (1.25 mg/Kg body weight/W) or vehicle (control) once a week for 12 weeks and then these treatments were discontinued. All rats were maintained on 1% NaCl.

タイプIIレセプターより高親和性、低濃度であるとしている。著者の示した正常ラットにおける aldosterone と腎細胞質分画との結合の Scatchard plot も 2つの構成要素をもち Rousseauらの報告と一致した。

鉍質コルチコイドレセプターはグルココルチコイドレセプターに比し熱に不安定であることが Rafestin-Oblinら⁴⁴⁾によって示されており、著者も熱不安定性を示す実験結果を得た (Fig. 3)。そのため腎のスライスを用いて $[^3\text{H}]$ -aldosterone とインキュベーション後に細胞質分画を分離する方法が多くとられて来ている^{45)~52)}。これらのスライスを用いた実験では、37℃あるいは25℃においてタイプIレセプターと aldosterone の解離定数 (Kd) は 0.5 - 0.9nM であるが、腎細胞質分画を調製した後に aldosterone とインキュベーションして報告では⁵³⁾ 3nM である。Grekinら⁵⁴⁾は後者の方法においてインキュベーションバッファーに 0.1M のモリブデン酸ナトリウムを加えることにより、解離定数 (Kd) が 3nM から 0.5nM

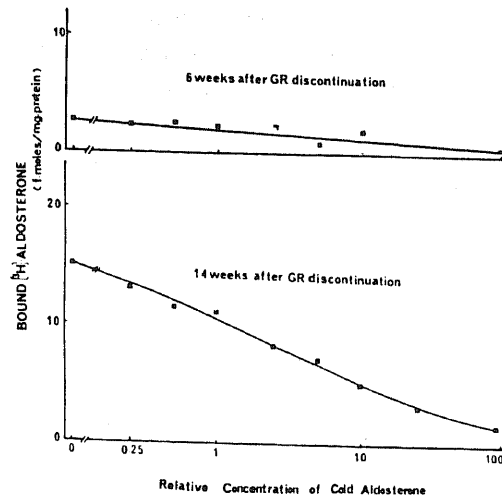


Fig. 17. Dissociation of $[^3\text{H}]$ -aldosterone (2 nM) from kidney cytosol receptor(s) by increasing concentrations of unlabeled (cold) aldosterone, prepared from glycyrrhizic acid treated rats 6 weeks (upper) and 14 weeks (lower) after the discontinuation of the treatment. Five and 13 weeks after the discontinuation of glycyrrhizic acid treatment (500 mg/Kg body weight/W for 12 weeks) in unilaterally adrenalectomized rats, residual adrenal glands were removed and 7 days after the adrenalectomy, this dissociation study were performed using kidney cytosol gathered from 3 rats in each study.

となり、結合親和性が増したと報告しているが、著者は同剤を用いていない。Scholer ら⁵⁹⁾は遊離の腎遠位尿細管を用いた実験で解離定数(Kd)は0.6nMであったとしている。著者は実験を安定化するため、0℃、8時間のインキュベーション条件下で、腎細胞質分画とaldosteroneを直接インキュベーションする方法にて解離定数(Kd)1.6nMを得たが、この値は上記の報告からみても鉱質コルチコイドレセプター(タイプI)とaldosteroneの結合親和性として十分高い値であると考えられた。

各種ステロイドの鉱質コルチコイドレセプターとの結合についてaldosteroneとの競合率で比較すると(Table 1)、生体にて鉱質コルチコイド作用の強い物質ほど競合率が高い傾向が認められた。

Chan ら³⁹⁾はステロイドホルモンレセプターの条件として、1) 高親和性、2) 有限の結合能、3) ホルモン特異性、4) 器官特異性および5) 生物反応との関連性をあげている。今回の実験結果は1)～4)の条件を満足していると考えられたが、5)は鉱質コルチコイドレセプターにおいてまだに証明されていない。

著者は本研究において、glycyrrhetic acidが*in vitro*にてaldosteroneとラット腎細胞質鉱質コルチコイドレセプターとの結合を阻害することを示した(Table 1)。9%の競合率は、実験条件の違いによるためかUlmann ら³⁹⁾の報告にくらべて高い値であるが、glycyrrhetic acidはcortisol等のグルココルチコイドに比較しても、鉱質コルチコイドレセプターに対してかなり低い親和性しか鉱質コルチコイドレセプターに対して持っていないことを示している。このことは、glycyrrhizic acid (GR)高血圧はGRを大量に投与しなければ発症しない臨床的事実を説明するものと考えられた。

さらに著者は、*in vivo*においてもGRが内因性ステロイドの影響を除くため施行した副腎摘出後少なくとも7日目にはまだaldosteroneの腎細胞質鉱質コルチコイドレセプターへの結合を低下させることを示した(Fig. 9, 11, 15)。このことはGRが腎細胞質コルチコイドレセプターとすでに結合し鉱質コルチコイド作用を発現すると同時にaldosteroneの結合を抑制している可能性が考えられた。核内移行の実験においても腎細胞質アルドステロン-レセプター複合体は、GR投与ラットより調製した核クロマチンアクセプターへの結合が減少しており(Fig. 13)、GRが核アクセプター部位も占拠している可能性が示唆された。Marver ら⁵⁹⁾は³H]-spiro lactoneが細胞質鉱質コルチコイドレセプターにaldosteroneと競合して結合

するが、spiro lactone-レセプター複合体は核内へ移行しないことを示し、このことがspiro lactoneの抗アルドステロン作用の本態であると報告している。著者は間接的ながら上記実験結果よりGRの核内移行を認め、GRのaldosterone agonistとしての作用をレセプター機構の面より確認できたと考えられた。またGR投与前に副腎摘出を行なった核内移行の実験でも同様の結果を得たためGR自体に鉱質コルチコイドホルモンとしての作用があると考えられた。

このようなGR投与ラットにおけるaldosteroneと腎細胞質鉱質コルチコイドレセプターおよび核クロマチンアクセプターとの結合の抑制は単なる腎障害の結果とは考えにくい。なぜなら一般に腎障害時、血漿カリウムは高値を示すのに反し、GR投与ラットの血漿カリウムは対照に比し有意に低値を示した。また著者はGR投与ラットの腎を光学顕微鏡的に検討したが、明確な組織障害を認めなかった。

GRおよびその誘導体であるglycyrrhetic acid, carbenoxoloneの鉱質コルチコイド作用の本態についての見解は一定していない。著者はそれ自体が鉱質コルチコイドとして作用するという見解を示したが、これまでの報告を総合すると以下の4つの説に分類できる。1) 肝におけるステロイド代謝を抑制することにより鉱質コルチコイドの不活性をさまたげる。2) 副腎皮質にACTH様作用として働き鉱質コルチコイド産生を上昇させる。3) 腎尿細管に対するaldosteroneの作用を増強させる。4) 腎尿細管に対する鉱質コルチコイドとして作用する。1)に関する報告では、熊谷⁵⁷⁾が*in vitro*においてglycyrrhetic acidが肝のステロイド代謝酵素である5 β -reductaseの活性を阻害しaldosteroneの不活化を抑制したと報告している。Epstein ら⁵⁸⁾も正常人に100～200gの甘草末を投与し尿中の非抱合型cortisolの排泄が2倍以上に増加したことを報告している。2)として、Mattingly ら⁵⁹⁾は十二指腸潰瘍患者にcarbenoxoloneを投与し血中の11-hydroxycorticoidを蛍光法で一括して測定し、carbenoxoloneが11-hydroxycorticoidを上昇させること、またdexamethasone投与により内因性ACTHを抑制した患者においても上昇作用があること、さらに副腎不全の患者ではこの上昇反応が認められないことより、肝におけるステロイド不活化抑制は否定的であるとして、carbenoxoloneがACTH様物質として副腎皮質に作用する可能性を示している。また松田ら⁶⁰⁾はラットにGRのアンモニウム塩を投与し副腎組織にコルチコイド染色をほどこし同剤の投与により球状層組織にも染色量の増大がみられたとして

いる。しかし上記2説とも甘草製剤による鉍質コルチコイド過剰状態では血中 aldosterone 濃度および尿中 aldosterone 排泄が減少している事実を十分説明することはできない。また Baron ら⁶¹⁾も carbenoxolone 投与により aldosterone 分泌が抑制されたことを報告している。Cushing 症候群にみられるような、グルココルチコイド過剰高血圧ともレニン抑制の状態が異なっている。3)の可能性として熊谷⁶²⁾は副腎摘出ラットに aldosterone を投与し尿中カリウム/ナトリウム比が GR 投与によりさらに増加したと報告している。また石川⁶³⁾はカエル皮膚の短絡電流を測定し、aldosterone の効果が glycyrrhetic acid により増強された結果を示している。副腎摘出ラットに GR を大量投与しても高血圧が発症しなかったとする報告⁶⁴⁾や、Addison 病の患者に GR を単独投与してもナトリウム貯留が認められなかったとの報告⁶⁵⁾もある。しかし Salassa ら⁶⁶⁾は甘草による電解質異常が鉍質コルチコイドレセプターの競合阻害物質である spironolactone により完全に正常化した症例を報告している。本研究においても上記のように4)の可能性を示唆する実験結果を得た。

著者は GR 投与ラットにおいて血圧と腎細胞胞質鉍質コルチコイドレセプター数が逆相関したことを示した (Fig. 10 曳。また血圧の正常化にしたがってレセプター数が回復する結果を得た (Fig. 16, 17)。Estrogen のレセプター占拠率と子宮増殖作用の関連性はレセプターを介する生物作用の証明として認められているが、著者の知るかぎり鉍質コルチコイドにおけるこのような関連性を示した報告はないが、この結果は Chan ら³⁹⁾のあげた、5) のステロイドホルモンレセプターの条件である作用と関連を鉍質コルチコイドにおいて証明する上で興味深いと考えられた。

本研究において GR の鉍質コルチコイド作用が GR 投与中止後も長期にわたって持続した理由は依然不明である。著者は GR を落下生油-エタノールに懸濁して背部皮下に投与する方法をとったが、このため GR

が投与中止後も徐々に吸収されたためかも知れない。しかし Takeda ら³⁹⁾の報告例では、GR は静脈内投与されており、また GR の血中半減期は数時間以内と考えられている。このため著者は GR が腎遠位尿管細胞内に何らかの形で長くとどまることで鉍質コルチコイド作用を発現しつづけるか、あるいは鉍質コルチコイドレセプター機構に変化を起し GR が存在しなくなっても作用が持続するという可能性を想定した。

DOC 投与ラットにおいては副腎摘出および投与中止7日目にすでに腎細胞質レセプターは正常にまで回復している (Fig. 15)。しかし血圧は投与中止後も高いままに維持される (Fig. 16)。また原発性アルドステロン症の 30~40% にアルドステロン産生腫瘍摘出後も高血圧が持続する症例があること⁶⁹⁾、しかし甘草製剤による偽性アルドステロン症は同剤の中止によりおそかれはやかれ全例が正常血圧まで回復することは、本研究結果と関連して、鉍質コルチコイド過剰高血圧の病態に質的な多様性のある可能性を示唆している。Tarazi ら⁶⁷⁾は原発性アルドステロン症においては、腺腫摘出後も末梢血管抵抗が高いままにとどまることを報告している。著者はこの末梢血管抵抗の上昇が、DOC 投与ラットにおいて、血圧を上昇したままにとどまらせる原因と考え、GR, aldosterone, DOC による高血圧発現維持作用を腫に対する作用と血管に対する作用に分けて Table 3 のごとく仮想してみた。この妥当性は今後の研究成果に待たなければならない。

結 論

鉍質コルチコイド過剰状態における高血圧の病態を鉍質コルチコイドレセプター機構より解明する目的で、glycyrrhizic acid (GR) 投与による鉍質コルチコイド過剰高血圧ラットを作成し、正常および deoxycorticosterone (DOC) 投与ラットと比較して、腎鉍質コルチコイドレセプターの性状およびその変動を検討した。

Table 3. The role of mineralocorticoids in the pathogenesis of development and maintenance of their hypertension.

	Renal Na transport	Vascular resistance
Glycyrrhizic acid	+	- ±
Aldosterone	+	+
Deoxycorticosterone	+	++

その結果は以下のごとくであった。

1. 正常ラットの aldosterone と腎細胞質鉱質コルチコイドレセプターとの結合の解離定数は約 1.6nM であった。この結合に対して各種ステロイドは生体における鉱質コルチコイド作用に応じて競合し、その競合率は aldosterone 100% に対し、DOC 97%、glycyrrhetic acid 9% であった。

2. GR 投与により対照に比して血圧の上昇が認められると同時に、腎細胞質鉱質コルチコイドレセプター数は減少し、両者の間に有意の負の相関が認められた。

3. GR 投与により腎細胞質鉱質コルチコイドレセプター複合体の核内移行が減少し、この変化は内因性ステロイドと同様の GR 自体による直接作用であることが示唆された。

4. GR および DOC 投与ラットに低カリウム血症および高血圧の発症が認められた。

5. GR 投与を中止してもラット腎細胞質鉱質コルチコイドレセプター数は長期にわたり減少しており、その回復は血圧の正常化と平行していた。DOC 投与ラットにおいてはレセプター数はただちに回復したが、DOC 投与中止によっても血圧は高いまま維持された。

以上の結果より glycyrrhizinic acid は腎鉱質コルチコイドレセプター機構を直接介して、高血圧を発現維持させることが示唆された。また、DOC 高血圧との差異より鉱質コルチコイド過剰高血圧の病態に質的な多様性の存在する可能性が考えられた。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接御指導、御助言を戴きました中井継彦助手、種々御協力を戴きました森本真平助教、および内田健三助手に深謝いたします。併せて援助協力を惜まれなかった当教室第2研究室および第6研究室の諸先生に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第51回(1978, 東京)、第52回(1979, 京都)、第53回(1980, 横浜)、日本内分泌学会総会、第1回日本高血圧学会総会(1978, 横浜)、The third international symposium on spontaneously hypertensive rat and relative study(1978, Kyoto)および The sixth international congress of endocrinology(1980, Melbourne)にて発表した。

文 献

1. 山本祐夫：肝疾患における免疫異常の意義とその対策。Miro. Med. Rev., 20, 145 - 154 (1975).
2. 鈴木宏・大田康幸・滝野辰郎・藤沢冽・平山千里・清水直容・麻生芳郎：強カミノファーゲンCの慢性肝炎に対する治療効果について：二重盲検法による検討。医学のあゆみ, 102, 562 - 578 (1977).

3. 山形敬一・石川誠・和田武雄・松永藤雄・原義雄・高橋忠雄・織田敏次・多賀須幸男・春日井達吉・増田正典・幹久朗・三好秋馬・石原国・佐藤八郎・佐藤倚男・清水直容：胃潰瘍に対する Carbenoxolone sodium の薬効評価：多施設二重盲検法の群間比較。臨床評価, 4, 247 - 269 (1976).

4. 山形敬一・石力誠・上野恒太郎・正宗研・桜田弘之・斎藤不二夫・金沢信徳・細谷雄太・熊田博克・小松寛治・藤井孝・大久保俊治：Carbenoxolone の胃潰瘍に対する治療効果。治療, 89, 167 - 172 (1977).

5. Revers, F. E. : Heeft Succus Liquiritae een gegenезде werking op de Maagweer? Nedel. T. Geneesk., 90, 135 - 137 (1946).

6. Molhuysen, J. A., Gerbbandy, J., de Vries, L. A., de Jong, J. C., Lenstra, J. B., Turner, K. P. & Brost, J. G. G. : A liquorice extract with deoxycortone-like action. Lancet, 2, 381 - 386 (1950).

7. Strong, J. A. : Serum potassium deficiency during treatment with sodium P. A. S. and liquorice extract. Br. Med. J., 2, 998 - 1002 (1951).

8. Roussak, N. J. : Fetal hypokalemic alkalosis with tetany during liquorice and P. A. S. therapy. Br. Med. J., 1, 360 - 361 (1952).

9. Cayley, F. E. de W. : Potassium deficiency in P-amino salicylate therapy : Cardiac and paralytic effect. Lancet, 1, 447 - 448 (1950).

10. Heard, K. H., Campbell, A. H. & Hurley, J. J. : Hypokalemia complicating sodium para-amino salicylate therapy for pulmonary tuberculosis. Med. J. Aust., 2, 606 - 612 (1950).

11. Mollaret, P., Goulon, J. & Tournilhac, M. : Quadriplégu avec hypokaliémie et alcalose métabolique secondaire a l'ingestion massive et prolongée d'extrait de réglisse chez un psychopathe éthylique et potomane. Bull. Soc. Med. Hop. Pairs, 76, 491 - 512 (1960).

12. Jenny, P. M., Muller, A. F., Fabre, J. & Mach, R. S. : Hypokaliémie et alcalose par ingestion abusive d'extrait de réglisse (liquorice) et d'ear bicarbonaté. Schweiz. Med. Wochenschr., 91, 869 - 875 (1961).

13. Mimvielle, J., Cristol, P. & Badach, L. : Labus de regaliz (glycyrrhizin). Expretion clinica : paralis con hipokaliemia (2 obser-

- vaciones). Hipertension arterial (25 observaciones). Discussion tisiopatologia. *Presse Med.*, **71**, 2020-2024 (1963).
14. **Drosdowski, M., Robel, P. & Sebaoum, J.** : Syndrome de déplétion potassique aimultantune maladie de Conn, Provoqué par la glycyrrhizine. *Presse Med.*, **39**, 294-295 (1961).
15. **Chodkiewicz, S. P., Clay, S. & Hecain, H.** : Deux nouvelles observations de paralysis avec hypokaliemie secondaire á l'ingestion excessive dxextrait de reglisse chez des ethyliques chroniques. *Rev. Neurol.*, **108**, 324-326 (1963).
16. **Salassa, R. M., Mattox, V. R. & Rosevear, J. W.** : Inhibition of the "Mineralocorticoid" activity of licorice by spironolactone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **22**, 1156-1159 (1962).
17. **Turpie, A. G. G. & Thomson, T. J.** : Carbenoxdone sodium in the treatment of gastric ulcer with special reference of side-effects. *Gut*, **6**, 591-594 (1965).
18. **Gross, E. D., Dexter, J. D. & Roth, R. G.** : Hypokalemic myopathy with myoglobinuria associated with liquorice ingestion. *N. Engl. J. Med.*, **274**, 602-606 (1966).
19. **Lefebvre, R. E. & Marc-Aurele, J.** : Licorice and hypertention. *Can. Med. Assoc. J.*, **99**, 230-231 (1968).
20. **Davies, G. J., Rhodes, J. & Calcrafft, B.** : Complications of carbenoxolone therapy. *Br. Med. J.*, **3**, 400 (1969).
21. **Chamberlain, T. J.** : Licorice poisoning, pseudoaldosteronism and heart failure. *JAMA*, **213**, 1343 (1970).
22. 杉田實・大鶴昇・宝来善次・山本智英・荻原俊男・藤村敏宏・打田日出夫: 甘草による pseudoaldosteronism の 1 症例. *日内会誌*, **63**, 1312-1317 (1974).
23. 花崎信夫・加藤弘己・篠村恭久・中尾皖英・森本靖産・矢野三郎: グルチルリチン大量投与による偽アルドステロン症について. *日本臨床*, **34**, 390-394 (1975).
24. **Epstein, M. T., Espiner, E. A., Donald, R. A. & Hoghes, H.** : Liquorice toxicity and the renin-angiotensin aldosterone axis in man. *Br. Med. J.*, **1**, 209-210 (1977).
25. **Comming, A. M. M.** : Metabolic effect of liquorice. *Br. Med. J.*, **1**, 906 (1977).
26. **Bannister, B., Ginsburg, R. & Shneerson, J.** : Cardiac arrest due to liquorice-induced hypokalemia. *Br. Med. J.*, **2**, 738-739 (1977).
27. **Conn, J. W., Rovner, D. R. & Cohen, E. L.** : Licorice-induced pseudoaldosteronism. Hypertension, hypokalemia, aldosteronopenia, and suppressed plasma renin activity. *JAMA*, **205**, 492-496 (1968).
28. **Kaplan, N. M. & Lieberman, E.** : Primary aldosteronism, p261-304. In N. M. Kaplan & E. Lieberman (ed), *Clinical hypertension*, 2nd ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1978.
29. **Biglieri, E. G.** : Adrenal enzymatic defects resulting in hypertension, p789-794. In J. Genet, E. Koiw & O. Kuchel (ed.), *Hypertension*, McGraw-Hill, New York, 1978.
30. **Bühler, F. R., Laragh, J. H., Sealey, J. E. & Brunner, H. R.** : Plasma aldosterone-renin interrelationships in various forms of essential hypertension. *Am. J. Cardiol.*, **32**, 554-561 (1973).
31. **Brown, R. D.** : Aldosterone metabolic clearance is normal in low-renin essential hypertension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **42**, 661-666 (1976).
32. **Onoyama, K., Bravo, E. L. & Tarazi, R. C.** : Sodium, extracellular fluid volume, and cardiac output changes in the genesis of mineralocorticoid hypertension in the intact dog. *Hypertension*, **1**, 331-336 (1979).
33. **Katholi, R. E., Naftilan, A. J. & Oparil, S.** : Importance of renal sympathetic tone in the development of DOCA-salt hypertension in the rat. *Hypertension*, **2**, 266-273 (1980).
34. **Baxter, J. D. & Funder, J. W.** : Hormone receptors. *N. Engl. J. Med.*, **301**, 1149-1161 (1979).
35. **Chan, L. & O'Malley, B. W.** : Steroid hormone action : Recent advance. *Ann. Int. Med.*, **89** (Part 1), 694-701 (1978).
36. **Feldman, D., Funder, J. W. & Edelman, I. S.** : Subcellular mechanisms in the action of adrenal steroids. *Am. J. Med.*, **53**, 545-560 (1972).
37. **Marver, D., Goodman, D. & Edelman, I. S.** : Relationships between renal cytoplasmic and

- nuclear aldosterone-receptors. *Kidney Int.*, **1**, 210-223 (1972).
38. **Ulmann, A., Menard, J. & Corvol, P.** : Binding of glycyrrhetic acid to kidney mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Endocrinology*, **97**, 46-51 (1975).
39. **Takeda, R., Morimoto, S., Uchida, K., Nakai, T., Miyamoto, M., Hashiba, T., Yoshimitsu, K., Kim, K. S. & Miwa, U.** : Prolonged pseudoaldosteronism induced by glycyrrhizin. *Endocrinol. Jpn.*, **26**, 541-547 (1979).
40. **Scatchard, G.** : The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.*, **51**, 660-672 (1949).
41. **Lowry, O. H., Rosbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.** : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
42. **Rousseau, G. G., Baxter, J. D., Higgins, S. J. & Tomkins, G. M.** : Steroid-induced nuclear binding of glucocorticoid receptors in intact hepatoma cells. *J. Mol. Biol.*, **79**, 539-554 (1973).
43. **Rousseau, G. G., Baxter, J. D., Funder, J. W., Edelman, I. S. & Tomkins, G. M.** : Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors for aldosterone. *J. Steroid Biochem.*, **3**, 219-227 (1972).
44. **Rafestin-Oblin, M. E., Michaud, A., Claire, M. & Carvol, P.** : Dramatic protective effect of mineralo- and gluco-corticoid receptors of rat kidney. *J. Steroid Biochem.*, **8**, 19-23 (1977).
45. **Funder, J. W., Feldman, D. & Edelman, I. S.** : The roles of plasma binding and receptor specificity in mineralocorticoid action of aldosterone. *Endocrinology*, **92**, 994-1004 (1973).
46. **Feldman, D. & Funder, J. W.** : The binding of 18-hydroxydeoxycorticosterone and 18-hydroxycorticosterone to mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the rat kidney. *Endocrinology*, **92**, 1389-1396 (1973).
47. **Funder, J. W., Feldman, D. & Edelman, I. S.** : Glucocorticoid receptors in rat kidney : The binding of tritiated-dexamethasone. *Endocrinology*, **92**, 1005-1013 (1973).
48. **Funder, J. W., Feldman, D., Highland, E. & Edelman, I. S.** : Molecular modification of anti-aldosterone compounds : Effects on affinity of spiro lactone for renal aldosterone receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 1493-1501 (1974).
49. **Fuller, P. J. & Funder, J. W.** : Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in human kidney. *Kidney Int.*, **10**, 154-157 (1976).
50. **Matulich, D. T., Spindler, B. J., Shambellan, M. & Baxter, J. D.** : Mineralocorticoid receptors in human kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **43**, 1170-1174 (1976).
51. **Feldman, D.** : Mineralocorticoid receptors and 18-hydroxydeoxycorticosterone binding in the kidney of spontaneously hypertensive rat. *Endocrinology*, **94**, 1185-1188 (1974).
52. **Baxter, J. D., Shambellan, J., Matulich, D. T., Spindler, B. J., Taylor, A. A. & Bartter, F. C.** : Aldosterone receptors and the evaluation of plasma mineralocorticoid activity in normal and hypertensive state. *J. Clin. Invest.*, **58**, 579-589 (1976).
53. **Higgins, J. R., Wambach, G., Kem, D. C., Gomez-Sanchez, C., Holland, O. B. & Kaplan, N. M.** : Interaction of 16 β -hydroxydehydroepiandrosterone with renal mineralocorticoid receptors. *J. Lab. Clin. Med.*, **2**, 250-256 (1977).
54. **Grekin, R. J. & Sider, R. S.** : Aldosterone receptor assay in rat kidney cytosol. *J. Steroid Biochem.*, **13**, 835-837 (1980).
55. **Scholer, D. W., Mishina, T. & Edelman, I. S.** : Distribution of aldosterone receptors in rat kidney cortical tubules enriched in proximal and distal segments. *Am. J. Physiol.*, **237**, F360-F366 (1979).
56. **Marver, D., Stewart, J., Funder, J. W., Feldman, D. & Edelman, I. S.** : Renal aldosterone receptors : studies with [3 H]-aldosterone and the anti-mineralocorticoid [3 H]-spiro lactone Metabolic (SC-26304). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1431-1435 (1974).
57. **熊谷朗** : グリチルリチンの作用とその機序. *Mino. Med. Rev.*, **23**, 181-189 (1978).
58. **Epstein, M. T., Espiner, E. A., Donald, R. A., Hughes, H., Comles, R. J. & Lun, S.** : Licorice

- raises urinary cortisol in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**, 397-400 (1978).
59. **Mattingly, D., Tyler, C. & Bilton, E.** : Plasma 11-hydroxycorticoid levels after carbenoxolone sodium. *Br. Med. J.*, **3**, 498-500 (1970).
60. 松田禎夫・小田欣一・河口道夫・林治生: glycyrrhizin の corticoid 代謝におよぼす組織化学的研究. *日新医学*, **49**, 465 - 481 (1962).
61. **Baron, J. H., Nabarro, J. D. N., Slater, J. D. H. & Tuffley, R.** : Metabolic studies, aldosterone secretion rate, and plasma renin after carbenoxolone sodium. *Br. Med. J.*, **2**, 793 - 795 (1969).
62. 熊谷朗: カンゾウの生理化学. *代謝*, **10**, 632 - 645 (1973).
63. 石川三衛・齊藤寿一: グリチルリチンのアルドステロンによるカエル皮膚ナトリウム能動輸送促進効果の増強作用. *医学のあゆみ*, **105**, 613 - 615 (1979).
64. **Girerd, R. J., Rassaert, C. L., DiPasquale, G. & Kroc, R. L.** : Endocrine involvement in licorice hypertension. *Am. J. Physiol.*, **198**, 718 - 720 (1960).
65. **Strong, J. A. & Wilson, J. M. G.** : Failure of glycyrrhetic acid to control adrenal insufficiency. *Lancet*, **2**, 150-151 (1955).
66. **Hunt, T. K., Shambellan, M. & Biglieri, E. G.** : Selection of patients and operative approach in primary aldosteronism. *Ann. Surg.*, **182**, 353 - 361 (1975).
67. **Tarazi, R. C., Ibrahim, M. M., Bravo, E. L. & Dustan, H. P.** : Hemodynamic characteristics of primary aldosteronism. *N. Engl. J. Med.*, **289**, 1330-1335 (1973).

The Role of Renal Mineralocorticoid Receptor Mechanisms in the Pathogenesis of Mineralocorticoid Excess Hypertension in the Rat: The Characteristics of Renal Mineralocorticoid Receptors in Glycyrrhizinic Acid or Deoxycorticosterone-induced Hypertensive Rats Takio Hayashi, Department of Internal Medicine (II) (Director: Prof. R. Takeda), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., 90, 282–299 (1981)

Key word: Hypertension, Mineralocorticoid, Glycyrrhizinic Acid, Deoxycorticosterone, Renal Mineralocorticoid Receptor.

Abstract

Liquorice or glycyrrhizinic acid (GR), active component of liquorice, causes hypertension, hypokalemia and suppression of the renin-aldosterone axis in man. The syndrome has a tendency to be sustained after the discontinuation of these reagents. The pathogenesis of mineralocorticoid-excess hypertension is not well understood. In order to elucidate the role of renal mineralocorticoid receptor mechanisms in the pathogenesis of mineralocorticoid-excess hypertension, the relationship between blood pressure and characteristics of renal mineralocorticoid receptors was studied in glycyrrhizinic acid induced hypertensive rats and was compared with that in deoxycorticosterone (DOC) induced hypertensive rats. Kidney cytosol prepared from rats bilaterally adrenalectomized 7 days prior to experiments were incubated with [³H]-aldosterone (2nM) in the presence or absence of increasing concentrations of unlabeled various steroids at 4°C for 8 hours. The apparent maximum binding (B_{max}) of aldosterone to renal mineralocorticoid receptors was $(3.1 \pm 0.2) \times 10^{-13}$ mol/mg cytosol protein and dissociation constant (K_d) was 1.6 ± 0.5 nM. The relative binding activities of various steroids were 100% for aldosterone, 91% for DOC, 84% for corticosterone, 20% for cortisol, 15% for 5 α -dihydrocortisol, and 9% for glycyrrhetic acid. However, dehydroepiandrosterone and tetrahydrocortisol did not compete for this binding. The following two experiments were performed.

- a) GR (500 mg/Kg) emulsified with peanut oil was injected subcutaneously for consecutive 3 days. One, 2 and 4 weeks after the first injection, renal cytosol receptor characteristics were studied. B_{max} were 9.0, 4.4, 11.0 and 32.0×10^{-14} mol/mg protein in the rats 1, 2 and 4 weeks after the injection and in the control rats, respectively. There were no differences among K_d (2nM) of four groups. Significantly negative correlation ($r = -0.96$, $P < 0.05$) was observed between blood pressure and B_{max}. Nuclear translocation of aldosterone-receptor complexes was studied in the rats 2 weeks after GR injection. Aldosterone-receptor complexes bound much less to nuclear chromatin acceptor (0.4 M KCl extract) of GR treated rats than to that of the control rats. These effects of GR treatment on nuclear translocation were also observed in the rats bilaterally adrenalectomized before GR injection. These results indicated that GR which occupied the renal mineralocorticoid receptor and acceptor might exhibit their action.
- b) GR (500 mg/Kg) or DOC (1.25 mg/Kg) was injected subcutaneously once a week for 12 weeks. Either GR or DOC treatment caused hypertension and hypokalemia. [³H]-aldosterone did not bind to renal mineralocorticoid receptors one week after the discontinuation of GR treatment. However, this binding was already recovered in the DOC treated rats at that time. Six weeks after GR discontinuation, this binding was recovered to 10% of maximum binding with concomitant decrease of blood pressure. Fourteen weeks after cessation of GR, B_{max} and K_d were comparable to those of the control rats. On the contrary, blood pressure did not decrease in the DOC treated rats after discontinuation of DOC. These findings suggest that

persistence of hypertension after GR discontinuation might be caused by long-standing effect of GR on renal mineralocorticoid receptor mechanisms. This phenomenon was in contrast with DOC induced hypertension. In DOC induced hypertension, extra-renal mechanisms might play a much more important role in the persistence of hypertension after DOC discontinuation than renal mechanisms.