

学位論文

$\alpha_1$ -および $\beta$ -アドレナリン受容体  
に関する研究

—  $\alpha_1$ -および $\beta$ -アドレナリン受容体  
サブタイプの存在様式と  
Nipradilolの薬理学的特性 —

乙第15号

March 1993

木南 純二

$\alpha_1$ -および $\beta$ -アドレナリン受容体に関する研究：

— $\alpha_1$ -および $\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプの  
存在様式とNipradilolの薬理学的特性—

木南 純二

# 目 次

略号一覧	1
緒 言	2
第1章 結合実験による $\alpha_1$ -受容体のサブタイプの分類	6
第1節 序 論	6
第2節 実験材料および方法	7
第3節 結 果	10
第4節 考 察	23
第2章 結合実験による $\beta$ -受容体のサブタイプの分類	27
第1節 序 論	27
第2節 実験材料および方法	28
第3節 結 果	30
第4節 考 察	45
第3章 Nipradilolおよび光学異性体の $\alpha_1$ -および $\beta$ -遮断作用の評価	48
第1節 序 論	48
第2節 実験材料および方法	50
第3節 結 果	52
第4節 考 察	64
第4章 総括および結論	67
謝辞	70
主論文一覧	71
参考文献	72

略号一覧

略号	正式名あるいは化学名
[ <sup>3</sup> H]DHA	[ <sup>3</sup> H]dihydroalprenolol
[ <sup>3</sup> H]CGP12177	4-(3-t-butylamino-2-hydroxypropoxy)-[5, 7- <sup>3</sup> H]benzimidazole-2-one hydrochloride
[ <sup>125</sup> I]ICYP	[ <sup>125</sup> I]iodocyanopindolol
HV-723	$\alpha$ 1-ethyl-3, 4, 5-trimethoxy- $\alpha$ -((3-(2-(2-methoxyphenoxy)-ethyl)-amino)-propyl)-benzen acetonitrile fumarate
WB-4101	2-(2, 6-dimethoxyphenoxyethyl)aminomethyl-1, 4 benzodioxane
SGB-1534	3-[2-[4-(0-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-ethyl]-2, 4-(1H, 3H)-quinazolinedione monohydrochloride
5-HT	5-hydroxytryptamine
Sgd101/75	4(2-imidazoline-amino)-2-methylindazol-chlorhydrate
BE2254, [ <sup>125</sup> I]HEAT	[ <sup>125</sup> I]-2-[ $\beta$ -(4-hydroxyphenyl)ethyl-aminomethyl] tetralone
ICI118551	erythro-DL-1-(7-methylindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol
PN200-110	isopropyl 4-(2, 1, 3-benzoxadiazol-4-yl)-1, 4-dihydro-2, 6-dimethyl-5-methoxycarbonyl-pyridine-3-carboxylate
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid
ADP	adenosine-5'-diphosphate
ATP	adenosine-5'-triphosphate

## 緒言

1948年 Ahlquist<sup>1)</sup> はアドレナリン受容体には $\alpha$ -および $\beta$ -受容体の2種類が存在することを提唱した。これは6種類の交感神経作用薬の効力順位が組織によって異なることを説明するための1つの考え方として、作用を受ける側の器官にアドレナリン受容体が2種類存在することを想定し、これらを $\alpha$ -および $\beta$ -受容体と命名したのである。この画期的な研究の報告以来、受容体サブタイプの存在が証明され、Ahlquistによって提唱された考え方が一般的に受け入れられるようになった。その結果、薬物の薬理作用や病態時の受容体の性状変化など、組織内に存在するアドレナリン受容体の重要性が脚光を浴びるようになってきた。

近年、薬理学、分子生物学および生化学などの分子レベルでの研究の進歩により、 $\alpha$ -受容体は $\alpha_1$ -受容体および $\alpha_2$ -受容体に<sup>2)</sup>、 $\beta$ -受容体は $\beta_1$ -受容体および $\beta_2$ -受容体に分類されるようになり<sup>3)</sup>、さらに、 $\alpha_1$ -受容体にはいくつかのサブタイプの存在が報告されている。 $\alpha_1$ -受容体サブタイプを解析する研究から、 $\alpha_1$ -受容体サブタイプをprazosin、WB-4101あるいはphentolamineに対する感受性の差によって $\alpha_{1A}$ および $\alpha_{1B}$ に分類する説<sup>4)</sup>、あるいはphenoxybenzamineの濃度の違いによるラット肛門尾骨筋の収縮抑制の差から $\alpha_{1s}$ とそれ以外の $\alpha_1$ -受容体サブタイプが存在するという説<sup>5)</sup>、prazosinおよびyohimbineの遮断力価から $\alpha_{1H}$ および $\alpha_{1L}$ とする説<sup>6)</sup>やchlorethylclonidineに対して感受性がある場合を $\alpha_{1a}$ 、感受性がない場合を $\alpha_{1b}$ とする説<sup>7-8)</sup>などが提唱され、また、 $\alpha_1$ -受容体の構造についてもSchwinnら<sup>9)</sup>がウシの $\alpha_{1B}$ -受容体の塩基配列を明らかにした。

一方、 $\beta$ -受容体にも $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -そして $\beta_3$ -受容体<sup>10)</sup>の存在が報告され、これらのサブタイプはそれぞれ独立した受容体として存在するが、一度刺激されるとcyclic AMPを増加させ、一定の反応を発現させる。また、 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体の密度は組織によって異なり、例えば、心臓の固有筋には $\beta_1$ -受容体が多く、また、気管支および血管には $\beta_2$ -受容体が優位に存在することが報告されているが、1つの組織にこれらのサブタイプが混在することも明らかとなった<sup>11-13)</sup>。しかし、このようにサブタイプの分類法に関する研究や機能的役割に関する研究が数多くなされているにもかかわらず、薬理作用とサブタイプの

分類を体系的に示したものは未だ報告されていない。これは受容体レベルでの分子生物学的方法による解析が不完全であることや受容体の特性の解析と薬理作用との関連性を明確にできないことなどによると考えられる。

他方、アドレナリン受容体は抗高血圧薬や抗狭心症薬の作用点として重要視されてきている。現在、抗高血圧薬として、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、 $Ca^{2+}$ 拮抗薬、利尿降圧薬および交感神経末梢遮断薬などが用いられているが、アドレナリン受容体遮断薬も数多く使用されるようになった。これらのうち、アドレナリン受容体遮断薬は $\alpha_1$ -遮断薬(prazosinなど)、 $\beta$ -遮断薬(propranololなど)や $\alpha_1$ ,  $\beta$ -遮断薬(labetalolなど)に分類される。 $\alpha_1$ -遮断薬には prazosinおよびbunazosinが良く知られ、prazosinは $\alpha_1$ -受容体に対する選択的かつ競合的遮断薬である。また、 $\alpha_1$ -遮断薬はシナプス前 $\alpha_2$ -受容体には作用せず、交感神経終末からのnegative feedbackによる制御を受け、その結果、降圧による反射性交感神経活性の増大が過剰にならず、 $\alpha_1$ -遮断効果に対する拮抗作用や頻脈傾向の少ない薬物であることが知られている。一方、 $\beta$ -遮断薬も循環器疾患薬として注目され、とくに、 $\beta$ -遮断薬の基本的な構造はarylethanolamineあるいはaryloxypropanolamine側鎖をもち、また、芳香環あるいは複素環のaryloxypropanolamine側鎖のパラ位あるいはオルト位に置換基を有し、抗高血圧薬、抗不整脈薬あるいは抗狭心症薬として数多くの薬物が臨床的に使用されている。しかし、 $\beta$ -遮断薬を投与すると代償的に $\alpha$ -作用が亢進し、副作用の発現や降圧効果の減弱をもたらす原因となる。そこで、 $\beta$ -遮断作用のほかに、 $\alpha_1$ -受容体を競合的に遮断する作用を併せもつ薬物が登場した。Labetalolはphentolamineの約 $1/10$ の $\alpha_1$ -遮断活性、propranololの約 $1/3$ の $\beta$ -遮断活性を併せもち、本態性高血圧治療薬として用いられている。さらに、nipradilol(図 1)はbenzopyran環の8位にaryloxypropanolamine側鎖を、3位にnitroxy基を有し、従来の $\beta$ -遮断薬とは異なる構造をもつ新規 $\alpha_1$ ,  $\beta$ -遮断薬である。また、nipradilolは薬理学的特性として、(i)持続性の降圧作用<sup>14)</sup>、(ii)末梢血管抵抗の亢進の抑制<sup>15)</sup>、(iii)静脈伸展性の改善<sup>16)</sup>、(iv)心臓の前負荷軽減作用<sup>17)</sup>、(v)太い冠動脈の拡張作用、などの作用を示す。Nipradilolは構造的にnitroxy基による抗狭心症作用やaryloxypropanolamine側鎖による $\beta$ -遮断作用を有することが予想され、抗高血圧効果は $\alpha_1$ -および $\beta$ -両受容体の遮断による相加的作用によるものと考えられるが、作用メカニ

ズムは十分解明されておらず、アドレナリン受容体サブタイプに対する詳細な遮断作用についての報告も未だなされていない。

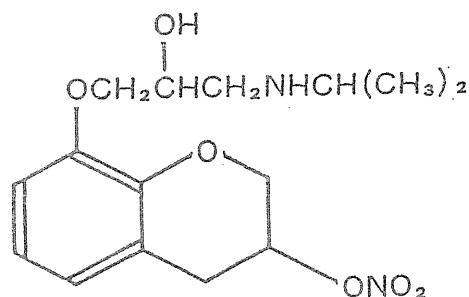


図 1 Nipradilolの化学構造式

受容体レベルでの研究の発展に大いに寄与した手法の1つに結合実験法がある。結合実験法とは放射性同位元素で標識した薬物を用い、組織より得られた膜分画に含まれる受容体への結合特性を検討するものである。この方法の開発により薬物受容体の概念が実体として捉えられるようになり、薬物受容体特性の解明や薬物の作用力価の評価など、益々その有用性が注目されている。したがって、詳細な薬物受容体サブタイプの存在様式の検討や薬物の受容体サブタイプに対する親和性の解析法の開発は抗高血圧薬などの詳細な薬理作用のメカニズムを受容体レベルで解明する上で大いに意義のあることと考える。

そこで、本研究は結合実験法によりラット脳、心臓および脾臓における $\alpha_1$ -および $\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプの存在様式を明らかにすることと、それらの結合実験法を用い、nipradilolおよび光学異性体の $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体サブタイプに対する親和性を調べ、置換力価から $\alpha_1$ -および $\beta$ -遮断作用の強度を評価できることを示し、本法の有用性を立証することを目的として行っ

た。それらの研究内容は i) ラット心臓、脳および脾臓における  $\alpha_1$ -受容体のサブタイプの種類を [ $^3\text{H}$ ]prazosin を用いる結合実験により行い、種々の薬物の  $\alpha_1$ -遮断力価を評価できる方法を検討すること、ii)  $\beta$ -受容体のサブタイプの種類を [ $^3\text{H}$ ]dihydroalprenolol (DHA)、 [ $^3\text{H}$ ]CGP12177 および [ $^{125}\text{I}$ ]iodocyanopindolol (ICYP) を用いたラット脳の実験によって調べ、種々の薬物の  $\beta$ -遮断力価を評価できる方法を検討すること、iii) 上記 i) および ii) に示した結合実験法が  $\alpha_1$ -および  $\beta$ -受容体サブタイプに対する薬物の作用力価の評価に有用であることを立証するために、これらの方法で得た nipradilol および光学異性体の置換力価と薬理学的手法により得た  $\alpha_1$ -および  $\beta$ -遮断活性とを比較検討すること、である。



## 第1章 結合実験による $\alpha_1$ -受容体のサブタイプ分類

### 第1節 序論

$\alpha_1$ -受容体は血管、心筋および脳など生体に広く分布し、生体の恒常性保持や調節に寄与している。また、 $\alpha_1$ -遮断薬は血管拡張を起こし、アドレナリンによる昇圧反応を逆転させ、ノルアドレナリン作用に拮抗するため、抗高血圧薬など、循環器疾患治療薬として使用されている。

Langerら<sup>2)</sup>は $\alpha$ -受容体に対するphenylephrine、methoxamine、clonidineおよびguanabenzなどの作動薬としての効力順位ならびにprazosin、phenoxybenzamineおよびyohimbineなどの遮断薬としての効力順位の差異から、 $\alpha$ -受容体を $\alpha_1$ -受容体および $\alpha_2$ -受容体の2種類に分類した。さらに、近年、 $\alpha_1$ -遮断薬の効果の程度が用いる組織で異なることから、 $\alpha_1$ -受容体にはサブタイプの存在が示唆され、その細分類法や機能的役割が注目されるようになった。 $\alpha_1$ -受容体サブタイプの分類法や機能的役割に関する報告には、ラット大脳皮質の結合実験において、prazosin、WB-4101あるいはphentolamineに対する感受性の差による分類<sup>4)</sup>、phenoxybenzamineの濃度の違いによるラット肛門尾骨筋の収縮抑制の差による分類<sup>5)</sup>、さらに、chlorethylclonidineに対する選択性などによる分類<sup>7・8)</sup>や血管収縮作用に対する数種の遮断薬の作用力価による分類<sup>6)</sup>などがある。

Nagatomoら<sup>18・19)</sup>は放射性リガンドとして<sup>3</sup>H]prazosinを用いたラット脳およびイヌ大動脈の結合実験が $\alpha_1$ -遮断薬の親和性を評価するために有用な方法であり、種々の $\alpha_1$ -遮断薬の親和性とラット大動脈の拮抗的強度との間に良好な相関性が認められることを報告し、さらに、ラット脳およびイヌ大動脈におけるScatchard解析により、単一の $\alpha_1$ -受容体サブタイプの存在を示唆した。しかしながら、血管には2つのサブタイプが存在するという報告<sup>6)</sup>もある。 $\alpha_1$ -遮断薬のサブタイプの分類法や作用力価の評価に関する研究はこれまで多く試みられているが、未だ体系づけられた見解は導かれておらず、 $\alpha_1$ -受容体のサブタイプの細分類法や薬理学的手法による解析が複雑であることなどの理由から、サブタイプの命名法が統一されず、機能との関連性が十分解明されていないのが現状である。したがって、今後、多くの実験結果の集積が必要であ

ると考えられる。

そこで、高血圧治療に重要である $\alpha_1$ -遮断薬の $\alpha_1$ -遮断作用と $\alpha_1$ -受容体サブタイプとの関連性を解明する細分類法の開発を目的とし、第1章ではラット心臓、脳および脾臓における $[^3\text{H}]$ prazosinの $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する結合特性を調べ、種々の薬物の $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する結合親和性について検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 1. 材料および動物

$[^3\text{H}]$ Prazosin (76.6 Ci/mmol)はNew England Nuclear/Dupont Ltd. (Boston, MA, USA)から、WB-4101はフナコシ薬品からそれぞれ購入し、HV-723 は北陸製薬から、SGB-1534は中外製薬からそれぞれ提供戴いた。

また、雄性Wistarラットは250-350 gを用い、断頭によって放血致死させた。

### 2. 膜画分の調製

ラットから心臓、脳(大脳皮質および小脳)および脾臓を摘出し、直ちに液体窒素で凍結して、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。膜画分は以下のごとく調製した。

組織は室温( $21^\circ\text{C}$ )で解凍し、10倍量の緩衝液 I (0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl緩衝液, pH 7.4)を加え、小剪刀で細かく破碎した。さらに、脳組織はガラスホモジナイザーで、心臓および脾臓は10 秒間 2回、ポリトロンホモジナイザーでそれぞれ処理した。得られたホモジネートは4層のガーゼで濾過し、濾液を $40000 \times g$ , 30 分間遠心した。沈澱物を緩衝液 II (120 mM Tris-HCl緩衝液, pH 7.4)で1回洗浄後、ガラスホモジナイザーを用い、緩衝液 II に懸濁し、膜画分とした。膜画分は液体窒素で $-80^\circ\text{C}$ に凍結保存し、使用直前に適当な濃度に緩衝液 II で希釈し使用した。なお、タンパク濃度はLowryら<sup>20)</sup>の方法を用いて測定した。

### 3. 結合分析

結合分析は膜懸濁液(0.1 mg タンパク)とともに $[^3\text{H}]$ prazosinや阻害薬を加

え、最終的に全量0.5 mlの60 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)の濃度になるようにし、23°Cで45 分間インキュベートした。

心臓におけるScatchard解析については0.1–5.0 nMの範囲の13濃度の $^3\text{H}$  prazosinを用い、置換実験における薬物の $\alpha_1$ 高親和性部位に対する結合親和性の評価は0.1 nMの $^3\text{H}$  prazosin濃度を用いた置換曲線から、薬物の $\alpha_1$ 低親和性部位に対する結合親和性の評価は $\alpha_1$ -高親和性部位を完全に阻害する1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamineの存在下で、0.6 nMの $^3\text{H}$  prazosin濃度を用いた置換曲線からそれぞれ測定した。また、脳および脾臓におけるScatchard解析については0.04–5.0 nMの範囲の13濃度の $^3\text{H}$  prazosinを用いた。脳の置換実験において、薬物の $\alpha_1$ 高親和性部位に対する結合親和性の評価は0.04 nMの $^3\text{H}$  prazosin濃度を用いた置換曲線から、薬物の $\alpha_1$ 低親和性部位に対する結合親和性は $\alpha_1$ 高親和性部位を完全に阻害する0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamineの存在下で、0.5 nMの $^3\text{H}$  prazosin濃度を用いた置換曲線からそれぞれ測定した。なお、脾臓の置換実験については0.2 nMの $^3\text{H}$  prazosin濃度で行った。

インキュベート終了時に溶液をGF/Cガラスフィルターを用いた急速濾過法で濾過し、フィルターを2 秒間緩衝液で洗浄し、30 秒間乾燥させ、フィルターの放射能を計測した。特異的結合は全結合から10  $\mu\text{M}$  phentolamineの存在下で測定した非特異的結合を差引くことによって求めた。なお、心臓あるいは脳の全結合に対する特異的結合の比はそれぞれ約75%および約45%であり、脾臓については約50%であった。

#### 4. キネティックス分析

すべてのキネティックス分析はMunsonおよびRodbardの理論<sup>21)</sup>にしたがった非線形回帰プログラム<sup>22-24)</sup>を用いてNEC PC-9801コンピュータで反復計算させることによって実施した。1受容体–1リガンドモデル(1相性)あるいは2受容体–1リガンドモデル(2相性)の理論値と実測値を比較し、モデル選択の基準として次のAkaikeの情報量基準(An Information Criterion; AIC)<sup>25)</sup>を用い、AIC値が小さいモデルを選択した。

$$\text{AIC} = n \cdot \ln \text{SS} + 2 \cdot m$$

n: 実測値の数

m: モデルの中のパラメータ数

SS: 残差平方和

置換実験の解析モデルの式は次に示すとおりである。

(i) 1受容体-1リガンドモデル

$$\frac{B_1}{B_0} = \frac{1}{1+x/IC_{50}}$$

(ii) 2受容体-1リガンドモデル

$$\frac{B_1}{B_0} = \frac{Z}{1+x/IC_{50a}} + \frac{1-Z}{1+x/IC_{50b}}$$

$B_1, B_0$ : 阻害薬の存在下および非存在下の放射性リガンド結合濃度

$x$ : 阻害薬の濃度

$IC_{50}$ : みかけの阻害定数(放射性リガンド結合を50%まで阻害する阻害薬の濃度)

$IC_{50a}, IC_{50b}$ : 受容体 a, bに対する阻害薬のみかけの阻害定数

$Z$ : 受容体 aと結合した阻害薬の比率

また、Scatchard解析モデルの式は次に示すとおりである。

(i) 2相性モデル

$$\frac{B}{F} = \frac{1}{2} \left[ \frac{R_1 - B}{K_{d1}} + \frac{R_2 - B}{K_{d2}} + \sqrt{\left( \frac{R_1 - B}{K_{d1}} - \frac{R_2 - B}{K_{d2}} \right)^2 + 4 \frac{R_1 \cdot R_2}{K_{d1} \cdot K_{d2}}} \right]$$

(ii) 1相性モデル

$$\frac{B}{F} = \frac{1}{K_{d1}} (R_1 - B)$$

$K_{d1}, K_{d2}$ : 受容体 1, 2の放射性リガンドの解離定数

$R_1, R_2$ : 受容体 1, 2の最大結合数

$B$ : 結合している放射性リガンド量

$F$ : 遊離している放射性リガンド濃度

これらの式から放射性リガンドの結合親和性( $K_d$ )および最大結合定数( $B_{max}$ )を求めた。置換実験における阻害定数( $IC_{50}$ )値は50%まで $[^3H]$ prazosin結合を阻害する阻害薬の濃度として得られるので、次のCheng & Prusoffの式<sup>26)</sup>から解離定数值( $K_i$ )を算出し、 $pK_i$ 値( $-\log K_i$ )を求めた。

$$K_i = IC_{50} / (1 + L / K_d)$$

L: 用いた放射性リガンド濃度

$IC_{50}$ : みかけの阻害定数(放射性リガンド結合を50%まで阻害する阻害薬の濃度)

放射性リガンドの受容体への結合特性を調べるために、Hill解析<sup>27)</sup>によりHill係数を測定した。また、阻害薬の置換特性を調べるために置換曲線のslope factorをDe Leanら<sup>28)</sup>が示した方法で算出した。Scatchard解析でのHill係数および置換曲線のslope factorは1受容体-1リガンドモデルの場合、1であり、2受容体-1リガンドモデルの場合、1以下を示した。

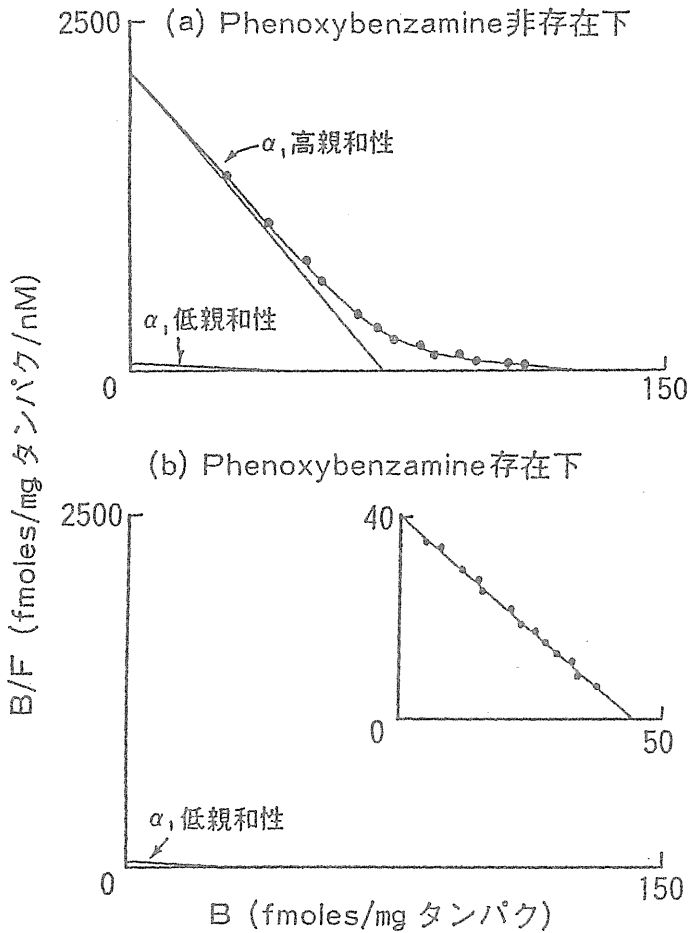
### 第3節 結果

#### 1. ラット心臓、脳および脾臓の $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する $[^3H]$ prazosinのScatchard解析

ラットの心筋、脳および脾臓膜画分における $[^3H]$ prazosin結合のScatchard解析したデータを図2、3および4に示し、それらの $B_{max}$ および $K_d$ 値を表1にまとめた。

心臓のScatchardプロットは2相性を示し、2つの結合部位の $[^3H]$ prazosinへの親和性の強度から、 $\alpha_1$ 高親和性と $\alpha_1$ 低親和性部位とした(図2a)。さらに、1  $\mu M$  phenoxy-benzamineを添加すると $\alpha_1$ 高親和性部位が消失し、 $\alpha_1$ 低親和性部位のみが認められた(図2b)。すなわち、心臓において1  $\mu M$  phenoxy-benzamineを添加したときに得られた $K_d$ 値および $B_{max}$ 値はphenoxybenzamine非存在下での $\alpha_1$ 低親和性部位のそれらと一致したことから、 $\alpha_1$ 高親和性部位は

1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamineによって完全に阻害されることが示唆された(表 1)。



- (a) 1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine非存在下における Scatchardプロットおよび非線形回帰解析の結果
- (b) 1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine存在下における Scatchardプロット挿入は縦軸の最長単位を40 fmoles/mgタンパク/nMとした時の Scatchardプロット

図 2 ラット心臓における $[^3\text{H}]$ prazosin結合の Scatchardプロット

表1 ラット心臓, 脳および脾臓の $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する  
[<sup>3</sup>H] prazosinの結合特性

		[ <sup>3</sup> H]Prazosin高親和性部位		[ <sup>3</sup> H]Prazosin低親和性部位	
		K <sub>d</sub> (pM)	B <sub>max</sub> (fmoles/mg タンパク)	K <sub>d</sub> (pM)	B <sub>max</sub> (fmoles/mg タンパク)
ラット心臓	(3)	32.39±10.33	71.18±4.27	1609.67±229.06+	57.66± 2.44 §
ラット心臓 (phenoxybenzamine 存在下)	(3)	—	0	1296.54± 94.84+	51.05±12.86 §
ラット脳	(5)	52.86±11.59	22.07±2.35	1975.95±301.09*	42.51± 7.39 #
ラット脳 (phenoxybenzamine 存在下)	(4)	—	0	1457.63±168.01*	45.50± 6.64 #
ラット脾臓	(9)	72.43± 4.34	16.10±1.00	—	0

( )内数値は実験実施回数, データは平均値±標準誤差。

+ : 1 $\mu$ M Phenoxybenzamine 存在下および非存在下間においてラット心臓の [<sup>3</sup>H] prazosin 低親和性部位の K<sub>d</sub> 値に有意差なし

§ : 1 $\mu$ M Phenoxybenzamine 存在下および非存在下間においてラット心臓の [<sup>3</sup>H] prazosin 低親和性部位の B<sub>max</sub> 値に有意差なし

\* : 0.1 $\mu$ M Phenoxybenzamine 存在下および非存在下間においてラット脳の [<sup>3</sup>H] prazosin 低親和性部位の K<sub>d</sub> 値に有意差なし

# : 0.1 $\mu$ M Phenoxybenzamine 存在下および非存在下間においてラット脳の [<sup>3</sup>H] prazosin 低親和性部位の B<sub>max</sub> 値に有意差なし

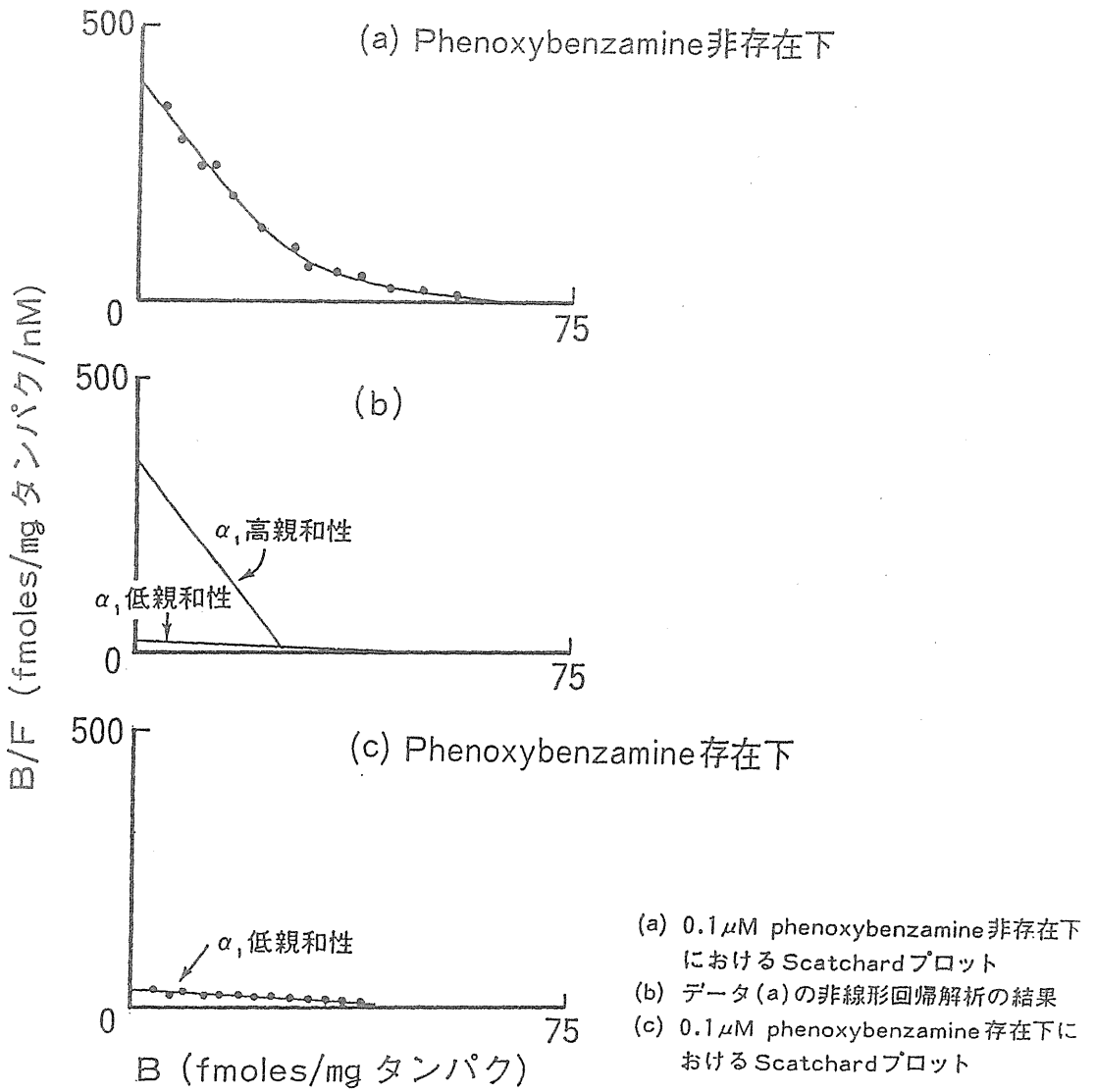


図 3 ラット脳における  $[^3\text{H}]$ prazosin 結合の Scatchard プロット



脳膜画分では心筋膜画分の場合と同様に、2つの結合部位、すなわち、 $\alpha_1$ 高親和性および $\alpha_1$ 低親和性部位が認められ(図 3a, b)、0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamineを添加した時、Scatchardプロット(図 3c)は直線性を示した。したがって、0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine存在下における脳膜画分の $K_d$ 値および $B_{\text{max}}$ 値はphenoxybenzamine非存在下における $\alpha_1$ 低親和性部位のそれらと一致し、 $\alpha_1$ 高親和性部位は完全に0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamineによって阻害された(表 1)。一方、脾臓膜画分のScatchardプロットは直線性を示した(図 4)。

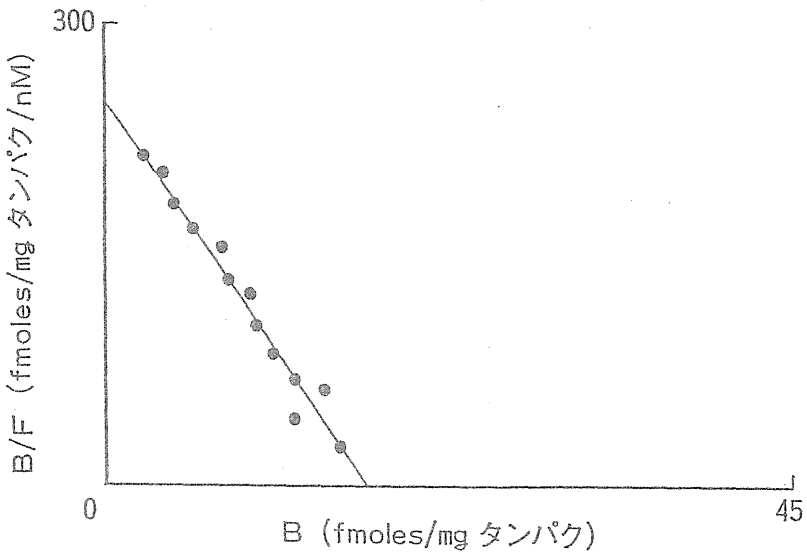


図 4 ラット脾臓における $[^3\text{H}]$ prazosin結合のScatchardプロット

## 2. ラット心臓、脳および脾臓の $\alpha_1$ -受容体サブタイプの置換実験

### 2.1. 置換実験による心臓、脳および脾臓における $\alpha_1$ -受容体サブタイプの分析

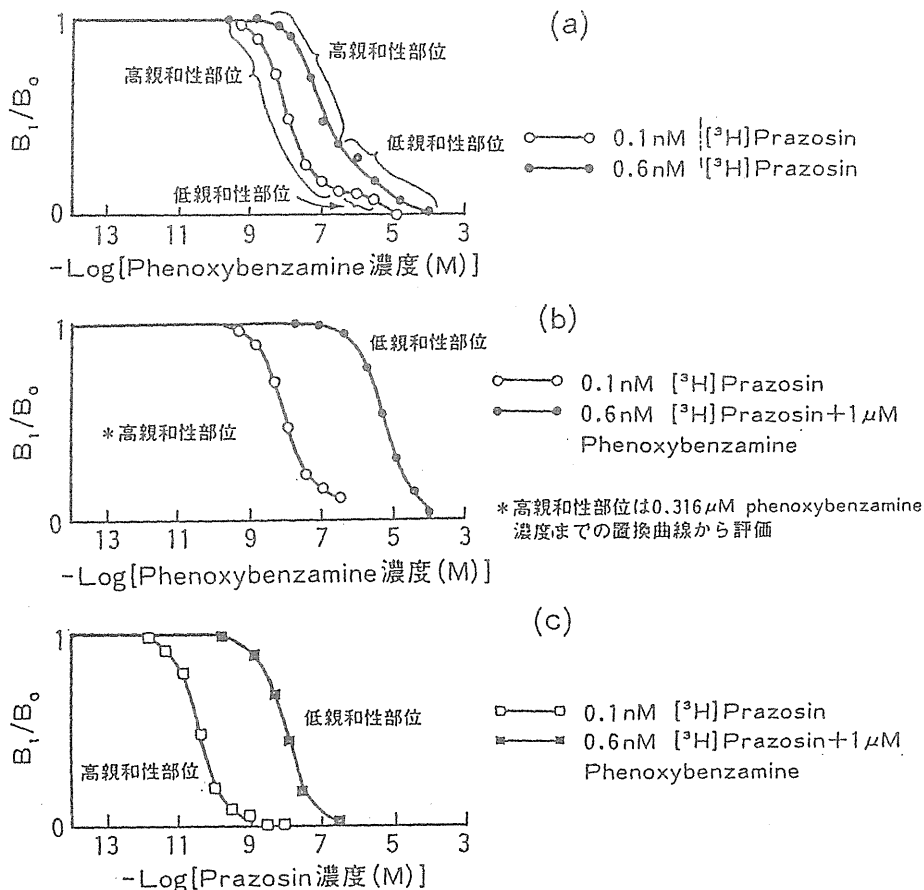
心臓および脳の $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対するphenoxybenzamineおよびprazosinの置換曲線を図 5および 6に示す。

心臓の場合、 $[^3\text{H}]$ prazosin濃度を0.1 nMあるいは0.6 nMを用いた時のphenoxybenzamineの置換曲線を図 5aに示す。両濃度においても、phenoxybenzamineの置換曲線は2相性を示したが、 $[^3\text{H}]$ prazosin濃度を0.1 nMから0.6 nMに増加した時、phenoxybenzamineに対する $\alpha_1$ 高親和性部位のみかけの比率(%)は92.5%から75.9%に減少するのに対し、 $\alpha_1$ 低親和性部位の比率は7.5%から24.1%に上昇した(図 5a)。これらの結果は、 $[^3\text{H}]$ prazosin濃度を変化させるとそれぞれの結合部位のみかけの存在比が変化すること、さらに、低濃度(0.1 nM)の $[^3\text{H}]$ prazosinを用いた場合、ほとんど $\alpha_1$ 高親和性部位のみを標識することを示している。また、0.6 nMの $[^3\text{H}]$ prazosinを用い、1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine存在下でのphenoxybenzamine(図 5b)およびprazosin(図 5c)の置換曲線は0.1 nMの $[^3\text{H}]$ prazosinを用い、1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine非存在下での置換曲線にくらべ、右へシフトして1相性を示し、 $\alpha_1$ 低親和性部位のみの曲線を示した。以上のことから、 $\alpha_1$ 高親和性部位については0.1 nMの $[^3\text{H}]$ prazosinでの置換曲線から評価し、実際、23種の被験薬物の $\alpha_1$ 高親和性部位の存在率は93%以上の範囲を占めるため、この $B_1/B_0$ を100%として薬物の阻害定数( $\text{IC}_{50}$ )を求め、また、 $\alpha_1$ 低親和性部位に対する薬物の阻害定数を求めるには1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine存在下で、0.6 nM  $[^3\text{H}]$ prazosinを用いた時の置換曲線から評価することができ、したがって、薬物の置換力価を測定するために必要な $[^3\text{H}]$ prazosinの至適濃度は $\alpha_1$ 高親和性部位に対して0.1 nM、 $\alpha_1$ 低親和性部位に対して0.6 nMであることが確認された(図 5b, c)。

また、脳についても心臓と同様な傾向が認められた。すなわち、0.04 nMあるいは0.5 nMの $[^3\text{H}]$ prazosin濃度におけるphenoxybenzamineの置換曲線を図 6aに示すが、phenoxybenzamineの置換曲線は0.04 nMあるいは0.5 nMの $[^3\text{H}]$ prazosin濃度においていずれも2相性を示し、 $[^3\text{H}]$ prazosin濃度を0.04 nMから0.5 nMまで増加したとき、phenoxybenzamineに対する $\alpha_1$ 高親和性部位のみ

かけの比率(%)は92.3%から70.9%に減少するのに対し、 $\alpha_1$ 低親和性部位は7.7%から29.1%に増加した(図 6a)。したがって、低濃度(0.04 nM)の $^3\text{H}$  prazosinを用いた場合、ほとんど $\alpha_1$ 高親和性部位のみを標識することになる。また、0.5 nMの $^3\text{H}$  prazosinを用い、0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine存在下でのphenoxybenzamine(図 6b)およびprazosin(図 6c)の置換曲線は、0.04 nMの $^3\text{H}$  prazosinを用い、0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine非存在下での置換曲線とくらべ、右へシフトして1相性を示し、 $\alpha_1$ 低親和性部位のみの曲線を示した。以上のことから、高親和性部位については0.04 nMの $^3\text{H}$  prazosinでの置換曲線から評価し、実際、23種の被験薬物の $\alpha_1$ 高親和性部位の存在率は92%以上の範囲を占めるため、この $B_1/B_0$ を100%として薬物の阻害定数( $\text{IC}_{50}$ )を求め、また、 $\alpha_1$ 低親和性部位に対する薬物の阻害定数を求めるには0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine存在下で、0.5 nMの $^3\text{H}$  prazosinを用いて得た置換曲線から評価することができ、したがって、薬物の置換力価を測定するために必要とする $^3\text{H}$  prazosin濃度は $\alpha_1$ 高親和性および $\alpha_1$ 低親和性部位に対してそれぞれ0.04 nMおよび0.5 nMが至適と考えられた(図 6b, c)。なお、phenoxybenzamineの置換曲線においては、 $\alpha_1$ 高親和性部位の存在率がラット心臓では93%、脳では92%であったが、これは稀で、大部分の被験薬物はprazosinの $\alpha_1$ 高親和性部位のように100%に近い比率であった。

一方、脾臓の $\alpha_1$ 受容体サブタイプに対するphenoxybenzamineおよびprazosinの置換曲線を図 7に示す。0.2 nMの $^3\text{H}$  prazosin濃度を用いて実施した場合、すべての被験薬物は1相性の置換曲線を示し、さらに、この結合部位に対する親和性は心臓および脳の $\alpha_1$ 高および低親和性部位の $K_d$ 値と比較すると $\alpha_1$ 高親和性部位に分類されると考えられる(表 1)。



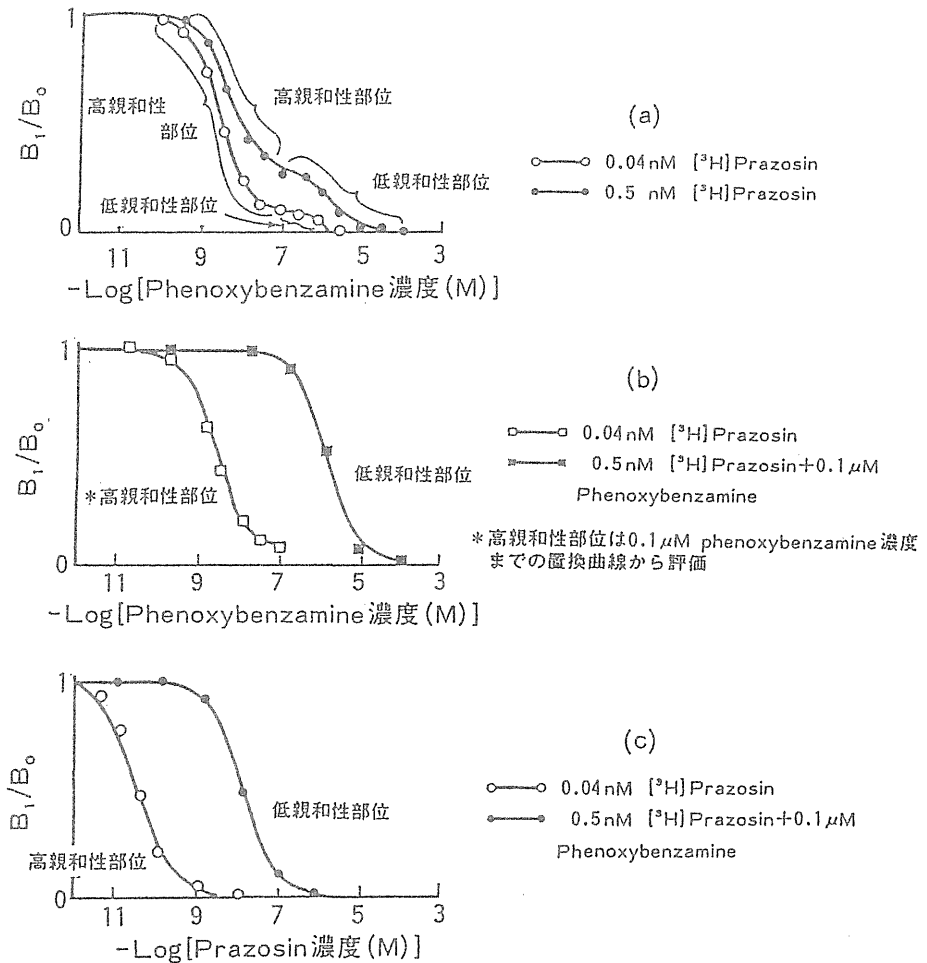
(a) 0.1 nM (○)および0.6 nM (●)  $[^3\text{H}]$ prazosinにおけるphenoxybenzamineの置換曲線  
 0.1 nM ;  $a_1$  高親和性部位 :  $a_2$  低親和性部位のみかり上の比率 : 92.5 : 7.5 (slope factor=0.82)  
 0.6 nM ;  $a_1$  高親和性部位 :  $a_2$  低親和性部位のみかり上の比率 : 75.9 : 24.1 (slope factor=0.78)

(b) 0.1 nM  $[^3\text{H}]$ prazosinにおける1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine非存在下の  
 phenoxybenzamineの置換曲線 (○) :  $a_1$  高親和性部位 (slope factor=0.94)  
 0.6 nM  $[^3\text{H}]$ prazosinにおける1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine存在下の  
 phenoxybenzamineの置換曲線 (●) :  $a_1$  低親和性部位 (slope factor $\approx$ 1.0)  
 (注) ただし、本置換曲線は1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine存在下で、さらに、競合薬物として  
 phenoxybenzamineの濃度を変えて得た。

(c) 0.1 nM  $[^3\text{H}]$ prazosinにおける1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine非存在下の  
 prazosinの置換曲線 (□) :  $a_1$  高親和性部位 (slope factor $\approx$ 1.0)  
 0.6 nM  $[^3\text{H}]$ prazosinにおける1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine存在下の  
 prazosinの置換曲線 (■) :  $a_1$  低親和性部位 (slope factor $\approx$ 1.0)

$B_0$  : 阻害薬非存在下での放射性リガンド結合濃度  
 $B_1$  : 阻害薬存在下での放射性リガンド結合濃度

図5 ラット心臓の $[^3\text{H}]$ prazosin結合に対する  
 phenoxybenzamine (a, b) および  
 prazosin (c) の置換曲線



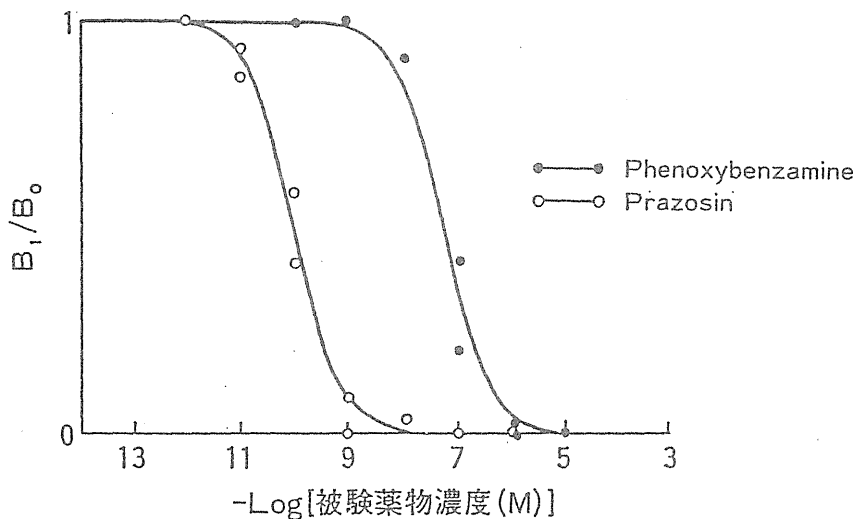
(a) 0.04 nM (○) および 0.5 nM (●)  $[^3\text{H}]$ prazosin における phenoxybenzamine の置換曲線  
 0.04 nM ;  $a_1$  高親和性部位 :  $a_1$  低親和性部位のみかり上の比率 : 92.1 : 7.9 (slope factor=0.79)  
 0.5 nM ;  $a_1$  高親和性部位 :  $a_1$  低親和性部位のみかり上の比率 : 70.6 : 29.4 (slope factor=0.68)

(b) 0.04 nM  $[^3\text{H}]$ prazosin における 0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine 非存在下の phenoxybenzamine の置換曲線 (□) :  $a_1$  高親和性部位 (slope factor=0.94)  
 0.5 nM  $[^3\text{H}]$ prazosin における 0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine 存在下の phenoxybenzamine の置換曲線 (■) :  $a_1$  低親和性部位 (slope factor=1.0)  
 (注) ただし、本置換曲線は 0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine 存在下で、  
 さらに、競合薬物として phenoxybenzamine の濃度を変えて得た。

(c) 0.04 nM  $[^3\text{H}]$ prazosin における 0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine 非存在下の prazosin の置換曲線 (○) :  $a_1$  高親和性部位 (slope factor=1.0)  
 0.5 nM  $[^3\text{H}]$ prazosin における 0.1  $\mu\text{M}$  phenoxybenzamine 存在下の prazosin の置換曲線 (●) :  $a_1$  低親和性部位 (slope factor=1.0)

$B_0$  : 阻害薬非存在下での放射性リガンド結合濃度  
 $B_1$  : 阻害薬存在下での放射性リガンド結合濃度

図 6 ラット脳の  $[^3\text{H}]$ prazosin 結合に対する phenoxybenzamine (a, b) および prazosin (c) の置換曲線



0.2nM [<sup>3</sup>H]prazosinにおけるphenoxybenzamine(●)およびprazosin(○)の置換曲線  
 (phenoxybenzamine : slope factor ≒ 1.0 ; prazosin : slope factor ≒ 1.0)  
 B<sub>0</sub> : 阻害薬非存在下での放射性リガンド結合濃度  
 B<sub>1</sub> : 阻害薬存在下での放射性リガンド結合濃度

図 7 ラット脾臓の<sup>3</sup>H]prazosin結合に対するphenoxybenzamineおよびprazosinの置換曲線

## 2.2. 置換曲線による各種薬物の $\alpha_1$ -受容体結合部位に対する結合親和性の評価

[ $^3\text{H}$ ]prazosin濃度を変えることにより、2つの異なった結合部位に対する阻害定数を求めることができた。したがって、これらの方法により求めたラット心臓、脳および脾臓のそれぞれの[ $^3\text{H}$ ]prazosin親和性部位に対する23種の薬物の $\text{pK}_i$ 値を表2に示した。同一組織内における $\alpha_1$ 高親和性部位および $\alpha_1$ 低親和性部位に対するほとんどの薬物の $\text{pK}_i$ 値は心臓および脳のいずれにおいても $\alpha_1$ 高親和性部位に高い値を示したが、心臓ではWB-4101、arotinolol、nifedipine、cinanserinおよびp-aminoclonidineの $\text{pK}_i$ 値において有意な差を認めなかった。また、脳では、bunazosin、dibenamine、p-aminoclonidineおよび5-HTにおいて有意差を認めなかったが、chlorethylclonidineの $\text{pK}_i$ 値が唯一 $\alpha_1$ 高親和性部位よりも $\alpha_1$ 低親和性部位に対して有意に高い値を示した。また、脾臓の $\alpha_1$ 高親和性部位において、ほとんどの薬物の $\text{pK}_i$ 値は心臓および脳の $\alpha_1$ 低親和性部位より高い値を示したが、心臓との比較では、benextramine、p-aminoclonidine、yohimbine、arotinolol、chlorethylclonidineおよびcinanserinの $\text{pK}_i$ 値において有意差を示さず、nifedipineの $\text{pK}_i$ 値が心臓の $\alpha_1$ 低親和性部位に対して有意に高い値を示した。脳との比較では、bunazosin、yohimbine、dibenamineおよび5-HTの $\text{pK}_i$ 値において差はなく、chlorethylclonidineの $\text{pK}_i$ 値が脳の $\alpha_1$ 低親和性部位に対して有意に高い値を示した。

心臓および脳における $\alpha_1$ 低親和性部位に対する薬物の $\text{pK}_i$ 値を比較したところ、心臓に対して有意に高い $\text{pK}_i$ 値を有する薬物(SGB-1534、terazosin、chlorpromazine、benoxathian、p-aminoclonidine、cinanserinおよびnifedipine)および脳に対して有意に高い $\text{pK}_i$ 値を有する薬物(bunazosin、HV-723、labetalol、dibenamineおよび5-HT)とに区別された。

一方、心臓、脳および脾臓の $\alpha_1$ 高親和性部位に対する薬物の $\text{pK}_i$ 値を比較すると、心臓および脳ではprazosin、chlorethylclonidineおよびdibenamineが心臓において有意に高い値を示し、HV-723、WB-4101およびlabetalolが脳において高い値を示した。また、心臓および脾臓ではprazosin、phenoxybenzamine、terazosin、chlorpromazine、chlorethyl-clonidine、dibenamineおよびnifedipineが心臓において有意に高い値を示し、脾臓において高い値を示す薬物は認められなかった。さらに、脳および脾臓ではphenoxybenzamine、

chlorpromazine、WB-4101、phentolamine、labetalol、yohimbineおよび nifedipineが脳において有意に高い値を示し、p-aminoclonidineのみが脾臓において高い値を示した。

また、 $\alpha_1$ 高親和性部位に対する薬物の置換力価は $\alpha_1$ -受容体に高い選択性のあるprazosinが10以上の $pK_i$ 値で最も高く、bunazosin、phenoxybenzamineやWB-4101も高い値を示したが、 $\alpha_2$ -受容体に選択的なyohimbineやclonidineは7以下の $pK_i$ 値を示し、これまで報告された $\alpha$ -受容体サブタイプに対する各薬物の置換力価と同等の結果が得られた。

以上の結果から、 $[^3H]$ prazosinの結合部位を $\alpha_1$ 高親和性部位および $\alpha_1$ 低親和性部位に分類できたが、被験薬物は組織や結合部位の違いによって異なる置換力価を示した(表 2)。



表2 各組織の $\alpha_1$ 受容体サブタイプに対する種々の薬物のpK<sub>i</sub>値

	[ <sup>3</sup> H]Prazosin高親和性部位			[ <sup>3</sup> H]Prazosin低親和性部位	
	ラット心臓	ラット脳	ラット脾臓	ラット心臓	ラット脳
Prazosin	11.14±0.04(4)+++**	10.60±0.13(3)	10.29±0.14(10)†††**	8.87±0.25(4)†††	8.04±0.23(3)***
Bunazosin	9.95±0.03(3)+++	9.79±0.24(3)	10.20±0.23(5)	8.61±0.11(4)§§§†††	9.87±0.10(5)
Phenoxybenzamine	9.27±0.23(3)+++	8.75±0.17(5)##	7.66±0.24(7)†**	5.98±0.17(4)†††	5.95±0.14(3)***
SGB-1534	9.25±0.18(3)+	9.64±0.02(3)	9.64±0.21(5)††	8.56±0.12(3)§	7.93±0.10(3)***
Terazosin	9.16±0.04(3)+++	9.05±0.16(3)	8.66±0.11(5)†††*	7.90±0.10(4)§§	6.85±0.20(3)***
Chlorpromazine	9.04±0.08(3)+++	9.05±0.08(3)†	8.46±0.13(4)†††*	7.02±0.02(3)§§§†††	5.97±0.09(3)***
HV-723	8.93±0.02(3)++*	9.23±0.08(3)	9.43±0.22(5)†	7.21±0.18(3)§§	8.25±0.06(4)***†
WB-4101	8.50±0.18(3)***	10.70±0.07(3)###	8.85±0.16(4)†	7.66±0.27(4)††	7.97±0.24(4)***
Benoxathian	8.44±0.18(4)+++	8.91±0.23(3)	8.49±0.09(4)†††	6.95±0.14(4)§§	6.12±0.13(3)***
Ketanserin	8.28±0.08(4)++	8.02±0.23(3)	8.07±0.04(4)†††	7.57±0.12(3)††	7.27±0.10(3)*
Amosulolol	7.85±0.17(3)++	8.23±0.21(4)	7.80±0.24(5)††	6.46±0.16(3)††	5.78±0.20(3)***
Phentolamine	7.68±0.20(3)+++	8.25±0.06(3)###	7.29±0.06(4)†††	5.30±0.20(3)†††	5.69±0.01(3)***
Benextramine	7.54±0.11(3)+	7.07±0.15(3)	7.35±0.18(3)†	6.83±0.15(3)	6.35±0.18(3)*
Labetalol	6.89±0.05(3)+++*	7.30±0.11(3)##	6.68±0.09(5)††	5.85±0.09(3)§§	6.24±0.03(4)***
p-Aminoclonidine	6.61±0.14(3)	6.02±0.17(3)†	6.81±0.15(3)††	7.31±0.34(3)§§	5.56±0.22(4)
Yohimbine	6.58±0.09(3)+	6.64±0.09(3)†	6.17±0.12(4)	5.87±0.17(4)	5.83±0.11(4)**
Clonidine	6.15±0.16(3)++	6.45±0.20(3)	6.02±0.10(4)††	4.66±0.21(3)††	5.05±0.21(4)**
Arotinolol	6.04±0.23(3)	6.49±0.20(3)	6.25±0.07(4)†††	5.97±0.27(4)	5.58±0.06(4)**
Chlorethylclonidine	6.03±0.10(4)++*	4.99±0.08(3)	5.03±0.12(4)†**	5.21±0.06(3)	5.60±0.17(3)*
Cinanserin	6.01±0.18(3)	5.82±0.12(3)	5.87±0.14(5)††	6.06±0.13(3)§§	5.20±0.06(4)***
Dibenamine	5.89±0.11(3)++*	5.43±0.02(3)	5.41±0.11(4)*	4.93±0.07(3)§§	5.40±0.07(5)
Nifedipine	5.38±0.02(3)	5.23±0.16(3)†	4.60±0.13(4)††**	5.67±0.17(3)§§§††	3.84±0.08(5)***
5-HT	4.42±0.03(3)++	4.62±0.09(3)	4.50±0.08(3)	3.84±0.10(3)§	4.29±0.10(4)

( )内の数値は実験実施回数, データは平均値±標準誤差。

各親和性部位に対するpK<sub>i</sub>値の有意差。

心臓(高):心臓(低);+:P<0.05, ++:P<0.01, +++:P<0.001

脳(高):脳(低);\*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001

脾臓(高):心臓(低);†:P<0.05, ††:P<0.01, †††:P<0.001

脾臓(高):脳(低);†:P<0.05, ††:P<0.01, †††:P<0.001

心臓(低):脳(低);§:P<0.05, §§:P<0.01, §§§:P<0.001

心臓(高):脳(高);\*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001

心臓(高):脾臓(高);\*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001

脳(高):脾臓(高);\*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001

## 第4節 考察

表 3にこれまでに報告された $\alpha_1$ -受容体サブタイプに関する分類法を列挙した。 $\alpha_1$ -受容体のサブタイプ分類法は受容体サブタイプに対する遮断薬の結合親和性や薬理学的手法による $pA_2$ 値を指標としてなされてきたが、未だ体系づけられた分類法は確立されていない。その理由は $\alpha_1$ -受容体サブタイプを介する反応機構をこれまでの結合実験によって得られた結果でうまく説明できなかったことや、 $\alpha_1$ -受容体の反応機構が $\beta$ -受容体のそれと比較して複雑であるためと考えられる。近年、1つの組織に複数の $\alpha_1$ -受容体サブタイプが存在することが示唆され、結合実験による $\alpha_1$ -受容体サブタイプの詳細な解析および細分類法の開発が期待されている。本研究ではラット心臓および脳のScatchard解析で2種類の $[^3H]$ prazosin親和性部位を認め、一定濃度のphenoxybenzamineの添加により $\alpha_1$ 高親和性部位が消失し、 $\alpha_1$ 低親和性部位のみが認められることにより、異なる $[^3H]$ prazosin濃度を用いた置換曲線によって2種類の親和性部位に対する各種薬物の結合親和性を評価する方法を見いだすことができた。その結果、本研究において心臓あるいは脳には2種類、脾臓には1種類の $[^3H]$ prazosinに異なる親和性を示す部位がそれぞれ存在することを明らかにした。

一方、これまでいくつかのサブタイプの分類法が提唱されているが、本研究で示した2種類の $\alpha_1$ 高親和性部位および $\alpha_1$ 低親和性部位が他の研究者によって分類されたサブタイプと一致するかどうかは最も重要な点である。本研究においては、 $\alpha_1$ 高親和性部位はprazosinおよびphenoxybenzamineに対して高い親和性を示し、phenoxybenzamineの濃度の違いによるラット肛門尾骨筋の収縮の差からの分類<sup>5)</sup>や、摘出血管の収縮に対する $\alpha_1$ -遮断作用に基づくprazosinおよびyohimbinの親和性力価による分類法( $\alpha_{1H}$ および $\alpha_{1L}$ )<sup>6)</sup>、あるいはchrolethylclonidineに対する選択性とWB-4101、benoxathianおよびnifedipineに対する感受性によって判定する方法<sup>7・8)</sup>などの結果と比較してみると、Flavehanら<sup>6)</sup>が分類した $\alpha_{1H}$ は $\alpha_1$ 高親和性部位と一致しており、また、Hanら<sup>7)</sup>が示した $\alpha_{1H}$ は $\alpha_1$ 高親和性部位と、 $\alpha_{1L}$ は $\alpha_1$ 低親和性部位とそれぞれ一致しているようであった。また、Coatsら<sup>5)</sup>はラット肛門尾骨筋の収縮に関与する $\alpha_1$ -受容体サブタイプの1つ( $\alpha_{1s}$ )が低濃度のphenoxybenzamineに感受性を示すことを報告した。本研究においてもScatchard解析から $\alpha_1$ 高親和性

表3 これまでに報告された $\alpha_1$ -受容体サブタイプの分類

著者名	サブタイプの名称	力価順位	選択的遮断薬	分類法	文献
Coates et al. (1982)	high( $\alpha_{1a}$ ) low		phenoxybenzamine	ラット肛門尾骨筋の ノルアドレナリン、Sgd101/75の収縮	(5)
Flavahan et al. (1986)	$\alpha_{1H}$ $\alpha_{1L}$	$-\log K_b$ : prazosin(9.8), yohimbine(6.6) prazosin(8.5), yohimbine(5.4)		ラットおよびウサギ血管平滑筋 収縮	(6)
Morrow et al. (1986)	$\alpha_{1A}$ $\alpha_{1B}$	WB-4101>prazosin>phentolamine prazosin>WB-4101> phentolamine		[ $^3H$ ]prazosinを用いた ラット脳の結合実験	(4)
Han et al. (1987)	$\alpha_{1a}$ $\alpha_{1b}$	WB-4101, benoxathianの親和性 海馬、輸精管( $\alpha_{1a, b}$ > $\alpha_{1b}$ )	chlorethylclonidine	[ $^{125}I$ ]BE2254を用いたラット 脾臓の結合実験	(7)
Han et al. (1987)	$\alpha_{1a}$ $\alpha_{1b}$		nifedipine	輸精管、脾臓のノルアドレナリン 収縮	(8)
Boer et al. (1989)	$\alpha_{1A}$ $\alpha_{1B}$		(+)-nigludipine	[ $^3H$ ]prazosin, [ $^{125}I$ ]HEAT を用いたラット脳の結合実験	(29, 30)
Muramatsu et al. (1990)	$\alpha_{1H}$ $\alpha_{1L}$ $\alpha_{1N}$	prazosin>HV723, WB-4101>yohimbine prazosin, HV723, WB-4101>yohimbine HV723>WB-4101>prazosin>yohimbine	chlorethylclonidine	豚、ウサギ、モルモットおよびラット血管 の作用強度(pA <sub>2</sub> 値)	(31)

部位が一定濃度のphenoxybenzamineに感受性を示し、Coatsらの提唱した $\alpha_1$ -受容体サブタイプと性状が良く類似していた。本研究で得られた $\alpha_1$ 高親和性部位もその収縮に関与する $\alpha_1$ -受容体サブタイプである可能性があるが、 $\alpha_1$ 低親和性部位の機能的役割に関しては現在のところ不明である。しかし、Morrowら<sup>4)</sup>が $[^3H]$ prazosinを用いたラット脳の結合実験においてphentolamineおよびWB-4101の親和性の順位から分類した $\alpha_{1A}$ および $\alpha_{1B}$ とは一致しなかった。以上のことから、本研究で分類した2つの $[^3H]$ prazosinに対して異なる親和性を示す結合部位はこれまでに報告された分類法で示された $\alpha_1$ -受容体サブタイプと一部一致することが明らかとなった。

また、本研究においてchlorethylclonidineおよびnifedipineは $[^3H]$ prazosin結合を阻害し、slope factorが $\alpha_1$ 高親和性および $\alpha_1$ 低親和性部位に対して1.0に近い値を示した。Hanら<sup>7)</sup>はchlorethylclonidineが $\alpha_1$ -受容体サブタイプを選択的に不活性化することを報告している。さらに、最近、nifedipineと同様の1,4-dihydropyridine系 $Ca^{2+}$ チャンネル遮断薬である(+)-niguldipineはprazosin高親和性部位( $\alpha_{1A}$ -受容体サブタイプ)に対して競合的で、感受性を示すことが半明した<sup>29,30)</sup>。以上のことから、 $\alpha_1$ -受容体サブタイプ(prazosin高親和性部位)と $Ca^{2+}$ チャンネルとの関連性が考えられ、これらの2つの受容体の構造の一部にprazosin結合に対して相同性を示す部位が存在することを示唆した。

$\alpha_1$ -受容体サブタイプの機能的役割に関する研究は少ない。また、心機能調節機構に関与する受容体はこれまで $\beta$ -受容体であると信じられてきた。しかしながら、現在、心筋の $\alpha$ -受容体刺激が心筋の収縮性制御に関与し、この刺激は陽性変力性作用を惹起し、また、心房筋、心室筋およびプルキンエ細胞などの活動持続時間を延長させるが、これらの効果は $Ca^{2+}$ チャンネル促進および $K^+$ チャンネル抑制によることが示唆されている。また、 $\alpha$ -受容体刺激による陽性変力性作用についてはcyclic AMPやcyclic GMPがその細胞内情報伝達過程に関与していないことが知られているが、これらの機能に対する $\alpha_1$ -受容体サブタイプの関与についてはほとんど知られていない。

また、本結合実験法により23種類の薬物の置換力価を調べた結果、 $\alpha_1$ 高親和性部位に対する薬物の置換力価はこれまで報告された $\alpha$ -受容体サブタイプの各薬物の置換力価と同等の結果が得られた。また、薬物の置換力価は組織

や $[^3\text{H}]$ prazosin親和性部位の違いによって異なることが解り、薬物の薬効評価には標的組織での結果が重要であることを示したが、 $\alpha_1$ -受容体をさらに2つの結合部位に分離し、それぞれの結合部位に対する薬物の詳細な置換力価を評価でき、薬理学的特性の解明や薬効の相対的強度の類推に有用な分類法であることが示唆された。

以上の結果より結論として、この章では、i) $[^3\text{H}]$ prazosinを用いる結合実験により1つの組織に存在する複数の $\alpha_1$ -受容体親和性部位の性状解析を可能ならしめたこと、ii)脾臓には1つ、心臓あるいは脳にはそれぞれ2つの $[^3\text{H}]$ prazosinに対して異なる親和性を示す結合部位が存在すること、iii)それぞれの組織において $[^3\text{H}]$ prazosin結合部位に対する薬物の親和性が異なること、を明らかにした。したがって、これらの結果から本結合実験法が $\alpha_1$ -受容体サブタイプの性状を詳細に明らかにすることができ、 $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する置換力価から薬物の薬理学的特性を類推できることを示唆した。

## 第2章 結合実験による $\beta$ -受容体のサブタイプ分類

### 第1節 序論

Ahliquist<sup>1)</sup>によって分類された $\beta$ -受容体は、Landsら<sup>3)</sup>によって心臓促進作用、気管支拡張作用などに対するカテコールアミン誘導体の効力順位から、さらに、2種の受容体に分類された。また、 $\beta_1$ -受容体は脂肪分解および心収縮や心拍動数の増加などの興奮的な作用を示すが、 $\beta_2$ -受容体は気管支、血管などの平滑筋を弛緩させ、抑制的な作用であることが報告されている。 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体は血管、心筋および肺など広く分布し、1つの組織に単一のサブタイプが存在するのではなく、 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体が混在することが数多く報告されている<sup>11-13)</sup>。 $\beta$ -遮断薬は高血圧、狭心症および不整脈の治療に広く用いられており、1つの組織に存在する $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する結合親和性を評価することは薬物の薬理学的特性を明らかにすることだけでなく、臨床応用を考える上でも意義深い。

Tsuchihashiら<sup>32, 33)</sup>はラット大脳皮質膜画分の $[^{125}\text{I}]$ ICYPの結合実験においてScatchardプロットの2相性より、高親和性部位および低親和性部位の存在を示唆した。さらに、それらの2つの高親和性および低親和性部位が $10\ \mu\text{M}$  5-HTあるいは $30\ \mu\text{M}$  1-metoprolol存在下で1相性を示しことから、それらがそれぞれ $\beta$ -受容体および5-HT<sub>1B</sub>-受容体に相当し、 $[^{125}\text{I}]$ ICYPは $\beta$ -受容体とともに5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対しても結合することを示した。一方、1-metoprololを用いた置換実験において、3相性の置換曲線を認め、 $[^{125}\text{I}]$ ICYPの選択性は $\beta_2 > \beta_1 > 5\text{-HT}_{1B}$ -受容体の順序であることを示した<sup>23)</sup>。したがって、 $[^{125}\text{I}]$ ICYPを用いる結合実験法は、1つの組織に混在する $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -および5-HT<sub>1B</sub>-受容体の複数のサブタイプの存在比の解析やこれらのサブタイプに対する薬物の遮断力価を評価する上で有用な方法であることが示唆された。

$\beta$ -受容体の結合実験には $[^3\text{H}]$ CGP12177、 $[^3\text{H}]$ DHA、 $[^3\text{H}]$ propranolol、 $[^3\text{H}]$ cyanopindololおよび $[^{125}\text{I}]$ ICYPなど、種々の放射性リガンドが用いられ、 $\beta$ -受容体のサブタイプ分類法や薬物の置換力価に関する研究は数多く報告されている。しかし、 $\alpha_1$ -受容体サブタイプ同様、詳細な分類や薬物の正確な作用力価を評価できる体系的な方法は未だ確立されていないのが現状である。

そこで、第2章では放射性リガンドとして汎用されている $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ 、 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ および $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ を用い、放射性リガンドの違いによりラット脳の膜画分における $\beta$ -受容体の標識や $\beta$ -受容体サブタイプに対する結合特性の違いを比較し、これらの結合実験法が薬物の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する親和性を特異的に評価できる細分類法として有用な方法であるかを検討した。また、 $\beta$ -遮断薬の作用部位の1つである心臓における力価評価は薬物の薬理作用を理解する上で意義深いことである。したがって、ラット心臓を用いた $\beta$ -受容体サブタイプに対する結合実験による $\beta$ -遮断薬の力価評価の結果と本研究で得たラット脳での結果との比較も検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 1. 材料

$[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$  (2200 Ci/mmol)および $[^3\text{H}]\text{DHA}$  (104.8 Ci/mmol)はNew England Nuclear Co. Ltd. より、(-)- $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  (53.1 Ci/mmol)はAmersham Japan Co. Ltd. からそれぞれ購入した。なお、ICI118551はICIファーマ製薬から提供戴いた。

### 2. 膜画分の調製

ラットの脳膜画分は第1章で述べた方法を用いて調製した。すなわち、300-350 gの雄性Wistarラットから脳を摘出後、大脳皮質を250 ml sucroseを含む10 ml Tris-HCl緩衝液(pH 7.6)とともに小直剪刀で細かく破碎し、ガラスホモジナイザーで懸濁液とした。懸濁液は4層のガーゼで濾過し、濾液を40000 × gで、30分間遠心することにより沈澱物を得た。沈澱物は25 ml  $\text{MgCl}_2$ を含む75 ml Tris-HCl緩衝液(pH 7.2)あるいは40 ml  $\text{MgCl}_2$ を含む120 ml Tris-HCl緩衝液(pH 7.2)で1回洗浄し、20 mlの同緩衝液を加え、ガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズした。

得られた膜画分を液体窒素で凍結し、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。使用直前に緩衝液で適当な濃度に希釈し、結合実験用の膜画分とした。なお、タンパク濃度はLowryらの方法で測定した<sup>20)</sup>。

### 3. 結合分析

結合分析はラットの大脳皮質の膜懸濁液(0.25 mgタンパク)とともに $[^3\text{H}]\text{CGP 12177}$ 、 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ あるいは $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ と阻害薬を加え、最終的に全量 0.5 ml、緩衝液濃度を20 mM  $\text{MgCl}_2$ を含む60 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.2)になるようにし、23°Cで60 分間インキュベートした。

Scatchard解析については、 $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ では0.1–5 nM、 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ では0.2–10 nMの濃度範囲でそれぞれ実施した。特異的結合は全結合から30  $\mu\text{M}$  1-metoprolol、10  $\mu\text{M}$  1-propranololあるいは1 mM dl-propranololの存在下で測定した非特異的結合を差し引いて算出した。なお、全結合に対する特異的結合の比は $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ を用いた時、80–90%で、 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ を用いた時、 $\beta$ -受容体部位では約60%、 $\beta$ -受容体以外の結合部位では約35%、 $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ を用いた時、60%以上であった。

また、置換実験については0.6 nMの $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ 、1.2 nMの $[^3\text{H}]\text{DHA}$ で実施し、 $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ については0.02 nMの濃度を用い、3つの結合部位( $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -および5-HT<sub>1B</sub>-受容体)に対して分析した。 $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -および5-HT<sub>1B</sub>-受容体のみかけ上の存在比(%)はこの濃度においてそれぞれ31%、19%および50%であった。

インキュベート終了時に溶液をGF/Cガラスフィルターを用いた急速濾過法で濾過し、フィルターを2 秒間緩衝液で洗浄し、30 秒間乾燥させ、フィルターの放射能を計測した。

### 4. キネティックス分析

すべてのキネティックス分析は第1章で示した通り、MunsonおよびRoadbardの理論<sup>21)</sup>にしたがった非線形回帰プログラム<sup>22-24)</sup>を用いてNEC-9801コンピュータで実施した。 $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ および $[^3\text{H}]\text{DHA}$ のキネティックス分析については第1章に示した方法にしたがい、1受容体–1リガンドモデルあるいは2受容体–1リガンドモデルを適用した<sup>25)</sup> また、Tsuchihashiらの結果<sup>23)</sup>から、ラット脳において $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ の選択性は $\beta_2 > \beta_1 > 5\text{-HT}_{1B}$ -受容体の順であったため、置換実験は次の式を用いて3受容体–1リガンドモデルで分析に供した。



受容体1、2および3がそれぞれ $\beta_1$ 、 $\beta_2$ -および5-HT<sub>1B</sub>-受容体に相当する時、Scatchard解析や置換曲線から得た3つの結合部位の比率や $K_d$ 値の平均値  $LT_1$  (0.05)、 $LT_2$  (0.09)、 $LT_3$  (0.86)、 $K_{d1}$  (30.9 pM)、 $K_{d2}$  (44.4 pM) および  $K_{d3}$  (369 pM) を<sup>23)</sup>、下記の式に代入し、各薬物の置換曲線をコンピュータ解析すると、3つの受容体部位の $K_i$ 値が算出できる。

$$\frac{B_1}{B_0} = \frac{\frac{L \cdot LT_1}{L + K_{d1}(1+x/K_{i1})} + \frac{L \cdot LT_2}{L + K_{d2}(1+x/K_{i2})} + \frac{L \cdot LT_3}{L + K_{d3}(1+x/K_{i3})}}{\frac{L \cdot LT_1}{L + K_{d1}} + \frac{L \cdot LT_2}{L + K_{d2}} + \frac{L \cdot LT_3}{L + K_{d3}}}$$

$B_1, B_0$ : 阻害薬の存在下および非存在下の放射性リガンド結合濃度

$x$ : 阻害薬の濃度

$L$ : 放射性リガンド濃度

$K_{i1}, K_{i2}, K_{i3}$ : 受容体1, 2, 3に対する阻害薬の阻害定数

$LT_1, LT_2, LT_3$ : 受容体1, 2, 3の比率( $LT_1 + LT_2 + LT_3 = 1$ )

$K_{d1}, K_{d2}, K_{d3}$ : 受容体1, 2, 3に対する放射性リガンドの解離定数

さらに、 $[^{125}I]$ ICYP結合において30  $\mu$ M 1-metoprololの存在下で行うと、 $\beta$ -受容体結合部位を完全に抑制することができるので、この方法を用いて5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する各薬物の $K_i$ 値の測定を1受容体-1リガンドモデルを用いて実施した。また、置換実験における $IC_{50}$ 値は50%まで $[^{125}I]$ ICYP結合を阻害する薬物濃度として得られるので、解離定数( $K_i$ 値)はCheng & Prusoffの式を適用することによって算出した。

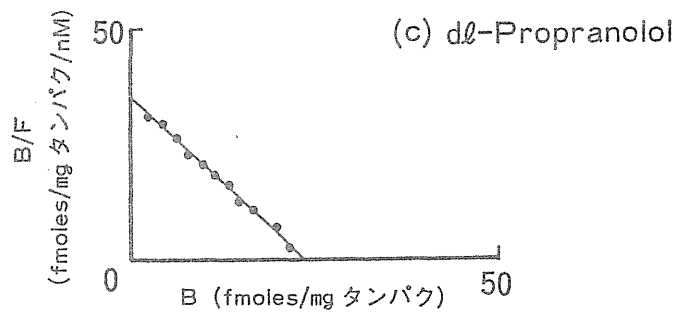
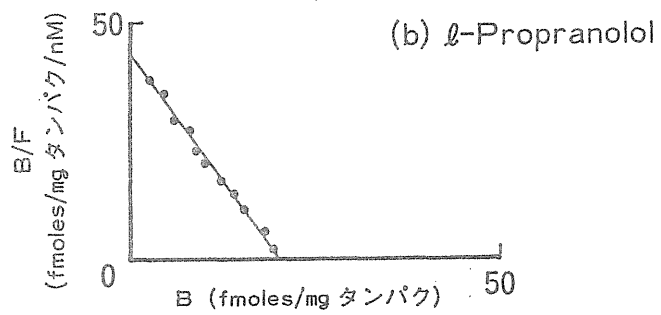
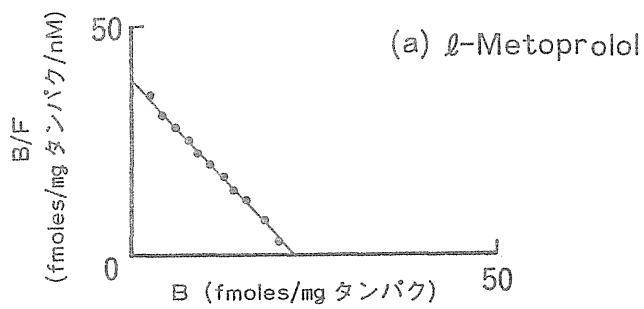
### 第3節 結果

#### 1. $[^3H]$ CGP12177および $[^3H]$ DHAのラット脳の $\beta$ -受容体サブタイプにおけるScatchard解析

Scatchard解析に際し、非特異的結合の測定に用いるリガンドの選択のため

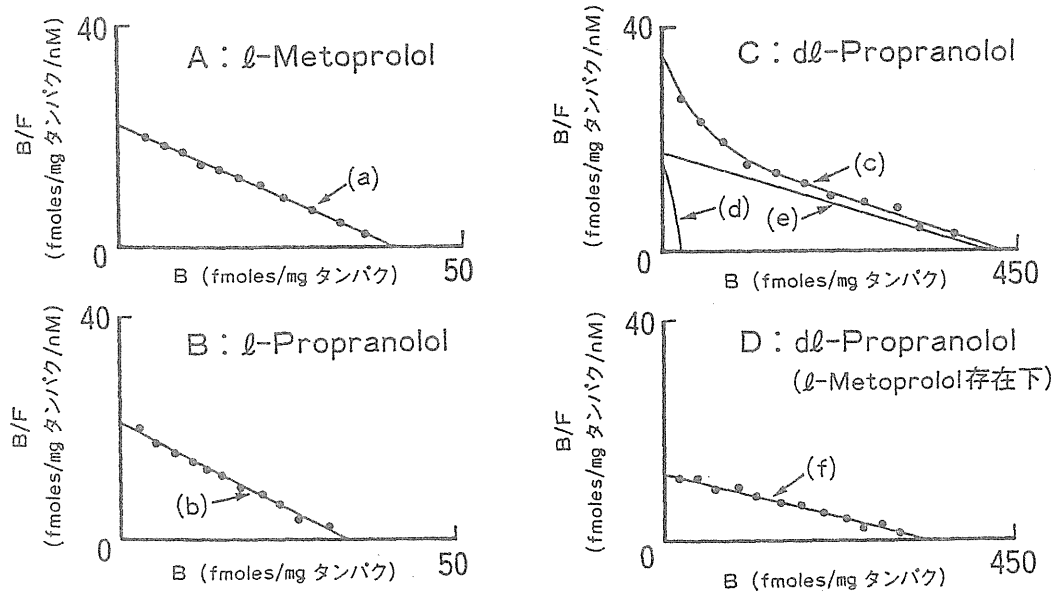
に1-metoprolol、1-propranololあるいはdl-propranololを用いて行った $[^3\text{H}]$ CGP12177のラット脳におけるScatchardプロットを図8に示した。その結果、(a)30  $\mu\text{M}$  1-metoprolol、(b)10  $\mu\text{M}$  1-propranololあるいは(c)1  $\text{mM}$  dl-propranololを用いたすべてのScatchardプロットは1相性を示し、これらの $K_d$ 値および $B_{\text{max}}$ 値に差を認めなかった(図8)。

同様に $[^3\text{H}]$ DHAのラット脳におけるScatchard解析についても非特異的結合の測定に用いるリガンドの選択のために1-metoprolol、1-propranololあるいはdl-propranololを用いた時のScatchard解析結果を図9に示した。30  $\mu\text{M}$  1-metoprololあるいは10  $\mu\text{M}$  1-propranololを用いた場合、Scatchardプロットは1相性を示したが(図9A, B)、図9Cに示す通り、1  $\text{mM}$  dl-propranololを用いた場合、2相性を示した。2つの結合部位の親和性の強さから高親和性部位(図9B-d)および低親和性部位(図9B-e)とした。また、1  $\text{mM}$  dl-propranololを用いた時の2相性のScatchardプロットは、さらに、30  $\mu\text{M}$  1-metoprololの存在下で高親和性部位が消失し、低親和性部位のみの1相性を示した(図9D-f)。 $\beta$ -受容体に強い選択性を示す1-metoprololの添加により、高親和性部位が消失したことから、この部位が $\beta$ -受容体部位であることを確認した。なお、低親和性部位については $\beta$ -受容体に対して選択的な薬物と置換しないため、未定義の結合部位と命名した。図8および図9のScatchard解析から得た $K_d$ 値および $B_{\text{max}}$ 値を表4にまとめた。 $[^3\text{H}]$ CGP12177結合における $K_d$ 値は $[^3\text{H}]$ DHA結合の高親和性部位のそれと有意な差が認められたが、 $B_{\text{max}}$ 値においては差は認められなかった。また、 $[^3\text{H}]$ DHA結合実験で認められた未定義の結合部位に対する $K_d$ 値および $B_{\text{max}}$ 値は $[^3\text{H}]$ CGP12177および $[^3\text{H}]$ DHA結合の高親和性部位のそれらよりも高かった(表4)。



非特異的結合は30  $\mu$ M 1-metoprolol(a), 10  $\mu$ M 1-propranolol(b)  
1 mM *dl*-propranolol(c)を用いて測定。

図8 ラット脳における $[^3\text{H}]$ CGP12177結合の  
Scatchardプロット



A, B : 非特異的結合は $30\mu\text{M}$  1-metoprolol(a),  $10\mu\text{M}$  1-propranolol(b)を用いて測定。  
 C : 非特異的結合は $1\text{mM}$  dl-propranolol(c)を用いて測定した。  
 直線(d, e)は2受容体-1リガンドモデルの式にあてはめ、各々 $\beta$ -受容体部位(高親和性部位)および未定義の結合部位(低親和性部位)の $K_d$ 値,  $B_{\text{max}}$ 値を測定。  
 D : 結合実験は $30\mu\text{M}$  1-metoprolol存在下で実施した。非特異的結合は $1\text{mM}$  dl-propranolol(f)を用いて測定。

図9 ラット脳における $[^3\text{H}]$ DHA結合のScatchardプロット

表4  $[^3\text{H}]$ CGP12177および $[^3\text{H}]$ DHAのラット脳における結合特性

薬物	高親和性部位 ( $\beta$ -受容体部位)		低親和性部位 (未定義の結合部位)	
	$K_d$ 値 (nM)	$B_{\max}$ 値 (fmol/mg タンパク)	$K_d$ 値 (nM)	$B_{\max}$ 値 (fmol/mg タンパク)
$[^3\text{H}]$ CGP12177				
a) l-Metoprolol (30 $\mu$ M) (3)	0.61 $\pm$ 0.08	24.07 $\pm$ 2.69		
b) l-Propranolol (10 $\mu$ M) (3)	0.48 $\pm$ 0.10	21.45 $\pm$ 3.30		
c) dl-Propranolol (1mM) (3)	0.63 $\pm$ 0.13	24.08 $\pm$ 3.87		
$[^3\text{H}]$ DHA				
d) l-Metoprolol (30 $\mu$ M) (3)	1.63 $\pm$ 0.31	37.31 $\pm$ 6.08		
e) l-Propranolol (10 $\mu$ M) (3)	1.55 $\pm$ 0.47	34.03 $\pm$ 7.47		
f) dl-Propranolol (1mM) (3)	1.30 $\pm$ 0.26	22.23 $\pm$ 4.47	23.84 $\pm$ 1.33	412.11 $\pm$ 16.10
g) l-Metoprolol (30 $\mu$ M) -dl-Propranolol (1mM) (3)			26.50 $\pm$ 3.25	336.35 $\pm$ 57.84

$K_d$ 値および $B_{\max}$ 値は1相性(a, b, c, d, e, g)あるいは2相性(f)のScatchard解析で得た。

$[^3\text{H}]$ CGP12177結合に関しては、非特異的結合は30 $\mu$ M l-metoprolol(a), 10 $\mu$ M l-propranolol(b), 1mM dl-propranolol(c)を用いて測定した。 $[^3\text{H}]$ DHAに関しては、非特異的結合は30 $\mu$ M l-metoprolol(d), 10 $\mu$ M l-propranolol(e), 1mM dl-propranolol(f, g)を用いて測定。(g)のデータは全結合および非特異的結合を測定するために30 $\mu$ M l-metoprololの存在下で実施。( )内の各値は実験実施回数。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。

2. [<sup>3</sup>H]CGP12177および[<sup>3</sup>H]DHAのラット脳のβ-受容体サブタイプに対する各種薬物の親和性の評価

[<sup>3</sup>H]CGP12177および[<sup>3</sup>H]DHA結合における高親和性部位(β-受容体部位に相当する)に対する薬物のpK<sub>i</sub>値を表 5に、[<sup>3</sup>H]DHAの未定義の結合部位に対する種々の薬物のpK<sub>i</sub>値を表 6にそれぞれ示した。[<sup>3</sup>H]CGP12177結合実験で求めたβ-受容体部位に対するl-propranololのpK<sub>i</sub>値は[<sup>3</sup>H]DHA結合のそれよりも有意に低い値を示した(表 5)。また、[<sup>3</sup>H]DHAの未定義の結合部位に対する親和性については、用いた薬物の中ではalprenololが若干高い親和性を示したが、他のβ-遮断薬およびCa<sup>2+</sup>拮抗薬はこの結合部位に対して低い親和性を示した(表 6)。

表 5 [<sup>3</sup>H]CGP12177および[<sup>3</sup>H]DHAのラット脳の  
高親和性結合部位(β-受容体部位)における薬物のpK<sub>i</sub>値

薬物	pK <sub>i</sub> 値
[ <sup>3</sup> H]CGP12177	
l-Propranolol (3)	8.54±0.09
dl-Propranolol (3)	8.31±0.05
d-Propranolol (3)	6.19±0.14
5-HT (3)	4.17±0.07
[ <sup>3</sup> H]DHA	
l-Propranolol (3)	9.45±0.24
5-HT (3)	4.44±0.05

非特異的結合は30μM l-metoprololを用いて測定。  
データは1受容体-1リガンドモデルの式にあてはめた。  
( )内の各値は実験実施回数。データは平均値±標準誤差。

表6  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ のラット脳の低親和性結合部位  
における種々の薬物の $\text{pK}_i$ 値

薬物	$\text{pK}_i$ 値
Alprenolol (3)	$7.24 \pm 0.46$
l-Propranolol (3)	$5.50 \pm 0.62$
Oxprenolol (4)	$4.40 \pm 0.41$
Pindolol (4)	$3.18 \pm 0.13$
Sotalol (2)	< 3
Verapamil (3)	$4.47 \pm 0.37$
PN200-110 (3)	$3.29 \pm 0.20$
Nifedipine (4)	< 3
5-HT (3)	$3.34 \pm 0.31$
Cinanserin (3)	$3.89 \pm 0.11$
Ketanserin (3)	$5.00 \pm 0.54$
Phentolamine (3)	$3.75 \pm 0.38$
Prazosin (3)	$4.62 \pm 0.39$
Clonidine (2)	< 3
l-Epinephrine (2)	< 3
l-Norepinephrine (2)	< 3
l-Isoproterenol (2)	< 3
Dopamine (3)	$3.36 \pm 0.44$
GABA (2)	< 3
Histamine (2)	< 3
Adenosine (2)	< 3
Deoxyadenosine (2)	< 3
ADP (2)	< 3
ATP (2)	< 3
Quinidine (3)	$3.84 \pm 0.07$
Lidocaine (3)	$3.28 \pm 0.10$

データは $30 \mu\text{M}$  l-metoprolol存在下で実施し、非特異的結合は $1 \text{ mM}$  dl-propranololを用いて測定。データは1受容体-1リカンドモデルの式にあてはめた。

( )内の各値は実験実施回数。データは平均値±標準誤差。

また、 $[^3\text{H}]$ CGP12177および $[^3\text{H}]$ DHA結合実験において、 $\beta_1$ -受容体に選択的な遮断薬1-metoprololに対して高親和性の結合を示す部位を $\beta_1$ -受容体結合部位、 $\beta_2$ -受容体に選択的な遮断薬ICI118551に対して高親和性の結合を示す部位を $\beta_2$ -受容体結合部位として、2相性の置換曲線から得た両化合物の $\text{pK}_i$ 値とそれらの比率を表 7に示した。2受容体-1リガンドモデル式を適用したところ、 $\beta_1$ : $\beta_2$ -受容体量の比率は0.6 nM  $[^3\text{H}]$ CGP12177を用いた場合では74:26、1.2 nM  $[^3\text{H}]$ DHAを用いた場合では46:56であった(表 7)。なお、各結合実験において、それぞれの受容体の比率は1-metoprololおよびICI118551ともほぼ等しく、 $\text{pK}_i$ 値はこれまでに報告された値と一致したことから、これらの $\beta$ -受容体サブタイプの判定は正しいと考えられる。以上の結果から、同一の膜画分を用いた $[^3\text{H}]$ CGP12177および $[^3\text{H}]$ DHA結合実験において、 $\beta$ -受容体サブタイプの $K_d$ 値、 $B_{\text{max}}$ 値および $\beta_1$ : $\beta_2$ -受容体比に違いが認められた。これは $[^3\text{H}]$ DHAが $\beta$ -受容体サブタイプの他に未定義の結合部位に非選択的に結合するのに対し、 $[^3\text{H}]$ CGP12177は $\beta$ -受容体サブタイプを選択的に標識することに起因するのかもしれない。しかし、異なる放射性リガンドを用いても得られる $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する薬物の $\text{pK}_i$ 値は一致した。



表7  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ および $[^3\text{H}]\text{DHA}$ のラット脳の  
 $\beta$ -受容体結合部位(高親和性結合部位)における  
1-metoprololおよびICI118551の $\text{pK}_i$ 値

薬物	$[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ 結合部位			
	$(\beta_1\text{-受容体部位})$		$(\beta_2\text{-受容体部位})$	
	$\text{pK}_i$ 値	%	$\text{pK}_i$ 値	%
l-Metoprolol (3)	$7.49 \pm 0.39$	$74.45 \pm 2.95$	$5.56 \pm 0.36$	$25.55 \pm 2.95$
ICI118551 (3)	$6.75 \pm 0.17$	$72.23 \pm 4.39$	$9.01 \pm 0.49$	$27.77 \pm 4.39$
薬物	$[^3\text{H}]\text{DHA}$ 結合部位			
	$(\beta_1\text{-受容体部位})$		$(\beta_2\text{-受容体部位})$	
	$\text{pK}_i$ 値	%	$\text{pK}_i$ 値	%
l-Metoprolol (3)	$7.64 \pm 0.18$	$46.34 \pm 5.37$	$5.50 \pm 0.01$	$53.66 \pm 5.37$
ICI118551 (3)	$5.93 \pm 0.23$	$44.29 \pm 6.19$	$8.96 \pm 0.37$	$55.71 \pm 6.19$

非特異的結合は $30\mu\text{M}$  1-metoprololを用いて測定。 $\beta_1$ -受容体部位あるいは $\beta_2$ -受容体部位/ $\beta$ -受容体部位の比率および $\text{IC}_{50}$ 値は2受容体-1リガンドモデルをもとにした式で算出。

( )内の各値は実験実施回数。データは平均値±標準誤差。

### 3. [ $^{125}$ I]ICYPのラット脳 $\beta$ -受容体サブタイプおよび5-HT $_{1B}$ -受容体に対する各種薬物の親和性の評価

序論に示したとおり、Tsuchihashiら<sup>23)</sup>は[ $^{125}$ I]ICYPのラット脳 $\beta$ -受容体サブタイプおよび5-HT $_{1B}$ -受容体に対する各種薬物の親和性の評価を報告した。この方法を用い、[ $^{125}$ I]ICYP結合におけるラット大脳皮質の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する種々の薬物のpK $_i$ 値を直接、3相性の置換曲線から求め、表 8に示した。

表 8に示すとおり、acebutolol、practolol、atenolol、betaxolol、l-、dl-およびd-metoprololは $\beta_1$ -受容体に、butoxamineおよびICI118551は $\beta_2$ -受容体にそれぞれ選択的な置換力価を示し、さらに、非選択的 $\beta$ -遮断薬としてよく知られているalprenololは本研究の結果では $\beta_2$ -受容体に選択的な置換力価を示した。また、arotinolol、pindolol、amosulalol、oxprenolol、labetalol、sotalol、d-、dl-およびl-propranololは $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体のいずれにも非選択的な置換力価を示した。なお、最も選択的な $\beta_1$ -遮断薬はl-metoprololで、 $\beta_2$ -遮断薬はICI118551であった。

また、Tsuchihashiらの方法<sup>23)</sup>にしたがい測定した5-HT $_{1B}$ -受容体に対する種々の薬物のpK $_i$ 値を表 9に示した。l-Metoprolol(30  $\mu$ M)を用い、 $\beta$ -受容体を完全に阻害することにより、5-HT $_{1B}$ -受容体のみを1受容体-1リガンドモデルで解析した結果(A法)と3相性の置換曲線から得た結果(B法)とを比較した。表 9に示すとおり、5-HT $_{1B}$ -受容体に対する各種薬物の置換力価を2つの方法で解析した結果、それらのpK $_i$ 値はほとんど一致した( $y=1.00x-0.24$ ;  $r=0.99$ )。多くの $\beta$ -遮断薬は[ $^{125}$ I]ICYP結合において5-HT $_{1B}$ -受容体に対する高い結合親和性を示し、中でもarotinololのpK $_i$ 値は最も高く、d-metoprololは最も低かった(表 9)。

さらに、A法で評価した5-HT $_{1B}$ -受容体と $\beta$ -受容体サブタイプとの[ $^{125}$ I]ICYP結合阻害に対する $\beta$ -遮断薬のpK $_i$ 値間の相関性を図 10に示した。[ $^{125}$ I]ICYPを用いて測定した $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する $\beta$ -遮断薬のpK $_i$ 値と5-HT $_{1B}$ -受容体に対するpK $_i$ 値(表 9の(A))との間に良好な相関が認められ、 $\beta$ -受容体と5-HT $_{1B}$ -受容体との関連性が示唆された( $\beta_1$ :5-HT $_{1B}$ ;  $r=0.87$ ,  $\beta_2$ :5-HT $_{1B}$ ;  $r=0.88$ )(図 10)。

表 8 [ $^{125}$ I]ICYP のラット脳 の  $\beta$ -受容体結合部位 における種々の薬物の  $pK_i$  値

薬物	$pK_i$ 値		有意差	選択性	$\beta_1-K_i/\beta_2-K_i$ 比
	$\beta_1$ -部位	$\beta_2$ -部位			
Arotinolol (3)	9.74 $\pm$ 0.40	9.26 $\pm$ 0.07	N	$\beta_1 = \beta_2$	3.0
Pindolol (3)	9.18 $\pm$ 0.36	9.50 $\pm$ 0.50	N	$\beta_1 = \beta_2$	0.48
l-Propranolol (3)	9.16 $\pm$ 0.21	9.34 $\pm$ 0.04	N	$\beta_1 = \beta_2$	0.66
dl-Propranolol (3)	8.55 $\pm$ 0.02	8.61 $\pm$ 0.05	N	$\beta_1 = \beta_2$	0.87
Alprenolol (3)	8.38 $\pm$ 0.07	9.24 $\pm$ 0.13	C	$\beta_1 < \beta_2$	0.14
Amosulalol (3)	8.36 $\pm$ 0.17	7.88 $\pm$ 0.20	N	$\beta_1 = \beta_2$	3.0
Oxprenolol (3)	8.11 $\pm$ 0.17	8.01 $\pm$ 0.26	N	$\beta_1 = \beta_2$	1.3
Labetalol (3)	7.92 $\pm$ 0.23	7.17 $\pm$ 0.19	N	$\beta_1 = \beta_2$	5.6
Betaxolol (3)	7.91 $\pm$ 0.13	5.69 $\pm$ 0.25	C	$\beta_1 > \beta_2$	170
l-Metoprolol (3)	7.86 $\pm$ 0.32	5.61 $\pm$ 0.12	C	$\beta_1 > \beta_2$	180
dl-Metoprolol (3)	7.20 $\pm$ 0.18	5.77 $\pm$ 0.25	C	$\beta_1 > \beta_2$	27
d-Propranolol (3)	7.09 $\pm$ 0.30	7.36 $\pm$ 0.30	N	$\beta_1 = \beta_2$	0.54
Atenolol (3)	7.01 $\pm$ 0.36	5.55 $\pm$ 0.08	B	$\beta_1 > \beta_2$	29
Acebutolol (3)	6.90 $\pm$ 0.07	5.15 $\pm$ 0.02	D	$\beta_1 > \beta_2$	56
ICI118551 (3)	6.71 $\pm$ 0.07	8.75 $\pm$ 0.10	D	$\beta_1 < \beta_2$	0.0091
Practolol (3)	6.61 $\pm$ 0.13	4.71 $\pm$ 0.15	D	$\beta_1 > \beta_2$	79
Sotalol (3)	5.65 $\pm$ 0.36	6.47 $\pm$ 0.31	N	$\beta_1 = \beta_2$	0.15
Butoxamine (3)	5.43 $\pm$ 0.04	6.33 $\pm$ 0.14	C	$\beta_1 < \beta_2$	0.13
d-Metoprolol (3)	4.89 $\pm$ 0.20	4.06 $\pm$ 0.19	A	$\beta_1 > \beta_2$	6.8

( )内の各値は実験実施回数。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。

A:  $P < 0.05$ , B:  $P < 0.02$ , C:  $P < 0.01$ , D:  $P < 0.001$ , N: 有意差なし

表9 [125I]ICYPのラット脳の5-HT<sub>1B</sub>-受容体結合部位における種々の薬物のpK<sub>i</sub>値

薬物	pK <sub>i</sub> 値		β <sub>1</sub> -K <sub>i</sub> /5-HT <sub>1B</sub> -K <sub>i</sub> 比	β <sub>2</sub> -K <sub>i</sub> /5-HT <sub>1B</sub> -K <sub>i</sub> 比
	A	B		
Arotinolol	7.97±0.08 (3)	8.16±0.24 (3)	59	19
dl-Propranolol	7.25±0.21 (3)	7.01±0.05 (3)	20	23
Pindolol	7.23±0.12 (3)	7.19±0.08 (3)	89	180
Alprenolol	7.15±0.08 (3)	7.04±0.03 (3)	17	120
l-Propranolol	7.11±0.05 (3)	7.19±0.03 (3)	110	170
Oxprenolol	6.76±0.05 (3)	5.93±0.02 (3)	22	18
Amosulalol	5.89±0.08 (3)	5.60±0.02 (3)	300	98
Labetalol	5.70±0.07 (3)	5.41±0.06 (3)	170	30
ICI118551	5.41±0.07 (3)	4.92±0.03 (3)	20	2200
Acebutolol	5.38±0.02 (3)	5.00±0.02 (3)	33	0.59
d-Propranolol	5.15±0.04 (3)	4.89±0.02 (3)	87	160
Betaxolol	4.18±0.09 (3)	3.56±0.10 (3)	5400	32
dl-Metoprolol	4.06±0.02 (3)	3.75±0.06 (3)	1400	51
l-Metoprolol	3.94±0.11 (3)	3.55±0.04 (3)	8300	47
Practolol	3.43±0.07 (3)	3.39±0.04 (3)	1500	19
Atenolol	3.43±0.12 (3)	3.35±0.08 (3)	3800	130
Sotalol	3.23±0.11 (3)	3.06±0.08 (3)	260	1700
Butoxamine	3.11±0.03 (3)	3.59±0.17 (3)	210	1700
d-Metoprolol	2.57±0.08 (3)	2.18±0.11 (3)	210	31

A: l-metoprololでβ-受容体部位を遮断し, 1受容体-1リガンドモデルの置換実験で算出した5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対するpK<sub>i</sub>値

B: 3受容体-1リガンドモデルの置換実験で算出した5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対するpK<sub>i</sub>値。

( )内の各値は実験実施回数。データは平均値±標準誤差。

β<sub>1</sub>-あるいはβ<sub>2</sub>-受容体と5-HT<sub>1B</sub>-受容体(A法)との比はK<sub>i</sub>値から求めた。

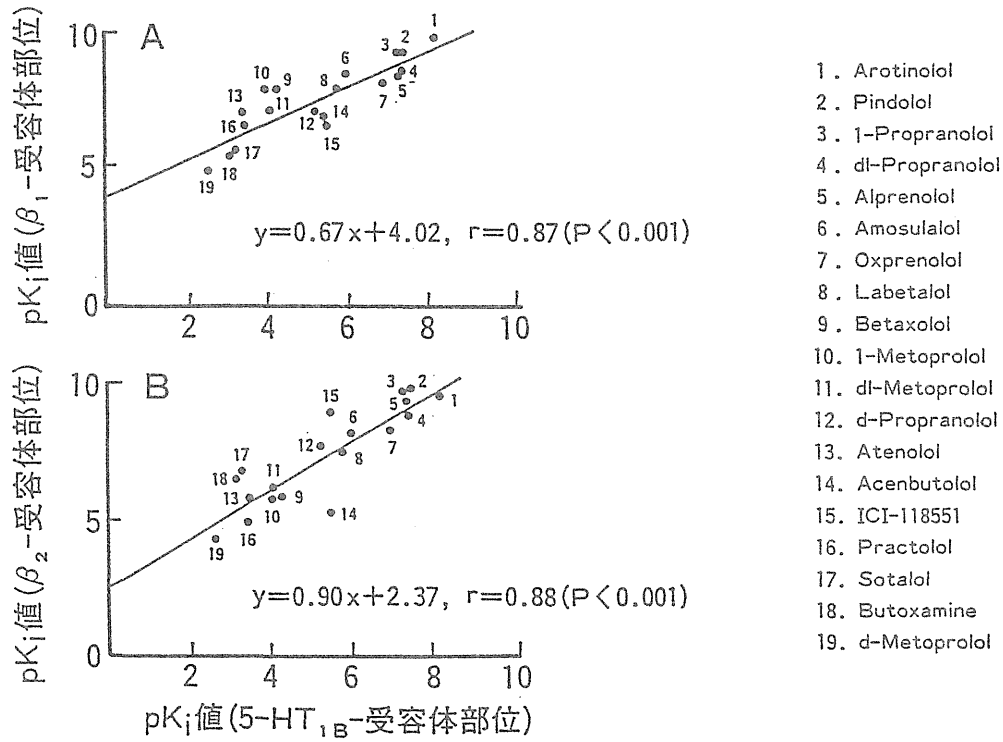
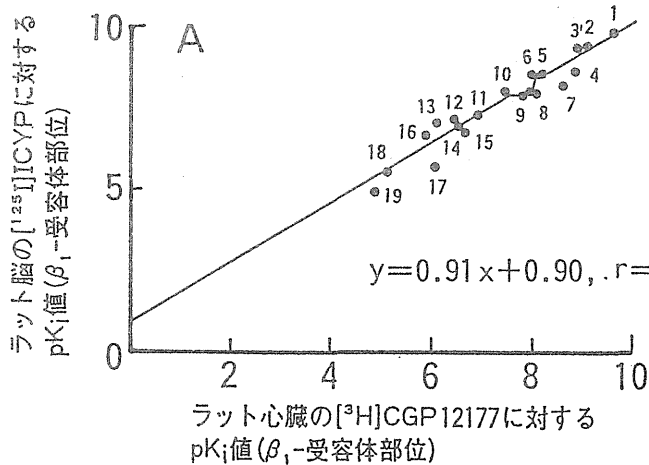


図10 <sup>125</sup>I]ICYPのラット脳のβ<sub>1</sub>-受容体(A)あるいはβ<sub>2</sub>-受容体(B)と5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する薬物のpK<sub>i</sub>値間の相関性

4. [ $^{125}\text{I}$ ]ICYPを用いたラット脳の結合実験および[ $^3\text{H}$ ]CGP12177を用いたラット心臓の結合実験で得た $\beta$ -受容体サブタイプに対する各種薬物の $\text{pK}_i$ 値の相関性

本研究で得た[ $^{125}\text{I}$ ]ICYPを用いた結合実験によるラット脳の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する種々の薬物の $\text{pK}_i$ 値と、Tsuchihashiら<sup>24)</sup>が報告した[ $^3\text{H}$ ]CGP12177を用いた結合実験によるラット心臓の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する薬物の $\text{pK}_i$ 値との相関性を図 11に示した。その結果、両実験で求めた $\beta_1$ -受容体および $\beta_2$ -受容体の $\text{pK}_i$ 値間にそれぞれ極めて良好な相関が認められた( $\beta_1$ :  $r=0.97$ ,  $\beta_2$ :  $r=0.96$ )。すなわち、これらの[ $^{125}\text{I}$ ]ICYPおよび[ $^3\text{H}$ ]CGP12177を用いる結合実験の結果、得られる薬物の親和性の力価の評価は同等であることが判明した。



1. Arotinolol
2. Pindolol
3. 1-Propranolol
4. di-Propranolol
5. Alprenolol
6. Amosulalol
7. Oxprenolol
8. Labetalol
9. Betaxolol
10. 1-Metoprolol
11. di-Metoprolol
12. d-Propranolol
13. Atenolol
14. Acenbutolol
15. ICI-118551
16. Practolol
17. Sotalol
18. Butoxamine
19. d-Metoprolol

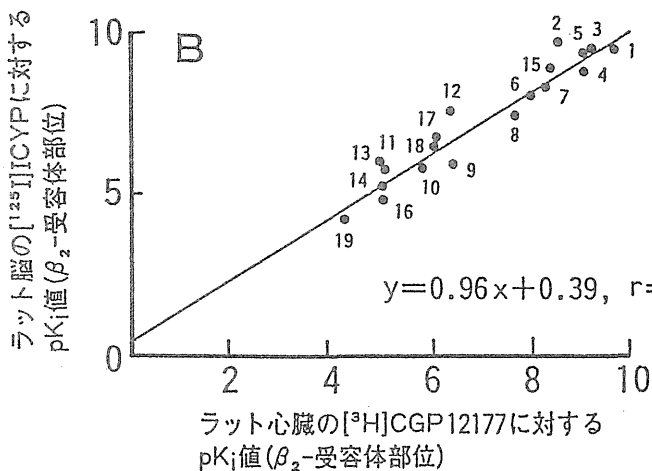


図11  $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$  および  $[^3\text{H}]\text{CGP 12177}$  のラット脳および心臓の $\beta_1$ -受容体(A)あるいは $\beta_2$ -受容体(B)に対する薬物の $\text{pK}_i$ 値間の相関性

## 第4節 考察

Landsら<sup>3)</sup>は15種類のカテコールアミン誘導体の効力順位から臓器によって、さらに、2種類のサブタイプ ( $\beta_1$ -受容体および $\beta_2$ -受容体) に分類できることを報告した。心臓や脂肪組織などに存在するものを $\beta_1$ -受容体、気管支筋や末梢血管などに存在するものを $\beta_2$ -受容体と呼んだ。しかしながら、放射性リガンドを用いた結合実験から $\beta$ -受容体は1つの組織において必ずしも1つのサブタイプが存在するわけではなく、 $\beta_1$ -受容体および $\beta_2$ -受容体が混在することが報告されるようになった<sup>11-13)</sup>。これは同一臓器でも $\beta_1$ -受容体および $\beta_2$ -受容体の存在比が各臓器あるいは動物種によって異なることも考えられ、本研究も1つの組織に2つのサブタイプが存在することを放射性リガンドを用いる結合実験によって証明した。

結合実験には種々の放射性リガンドが用いられる。とくに、 $\beta$ -受容体の研究には $[^3\text{H}]\text{DHA}$ 、 $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ 、 $[^3\text{H}]\text{propranolol}$ 、 $[^3\text{H}]\text{cyanopindolol}$ および $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ などが汎用されている。本研究で用いた $[^3\text{H}]\text{DHA}$ は $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体と未定義の結合部位を、 $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ は $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体を、 $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ は $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -および5-HT<sub>1B</sub>-受容体をそれぞれ標識し、用いる放射性リガンドによってサブタイプの標識部位数や受容体性状が異なった。本研究から i)  $[^3\text{H}]\text{DHA}$ は2つの $\beta$ -受容体サブタイプと他に $\beta$ -受容体以外の結合部位の3種類の結合部位を標識すること、ii)  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ および $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ は2つの $\beta$ -受容体サブタイプを標識するが、 $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ はさらに、5-HT<sub>1B</sub>-受容体をも標識することが明らかとなった。さらに、iii)  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ を用いる結合実験によって測定したラット心臓の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する薬物の $\text{pK}_i$ 値<sup>24)</sup>と本研究において $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ を用いた結合実験によって測定したラット脳の前 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する薬物の $\text{pK}_i$ 値との間に良好な相関性が得られた( $\beta_1$ -受容体: $r=0.97$ ;  $\beta_2$ -受容体: $r=0.96$ )。このように異なる放射性リガンドから得られるデータの相違は、放射性リガンドの選択性、性状あるいは種々の受容体への結合などによると考えられるが、本研究から、 $[^3\text{H}]\text{DHA}$ は $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体以外の未定義の結合部位へも結合するため、リガンド結合部位が証明された $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ および $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ を利用する方が $\beta$ -受容体サブタイプに対する薬物の結合親和性をより正確に評価する上で有用であるこ



とが示唆された。

一方、本研究においてすでに報告されている $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -および5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する $\beta$ -遮断薬の選択性を<sup>125</sup>I]ICYPを用いた結合実験によって評価したところ、 $\beta_1$ -受容体に選択的なacebutolol、atenolol、betaxolol、practolol、l-、dl-およびd-metoprololは $\beta_1$ -受容体に、 $\beta_2$ -受容体に選択的なbutoxamineおよびICI118551は $\beta_2$ -受容体にそれぞれ選択的な置換力価を示し、両 $\beta$ -受容体サブタイプに非選択的なarotinolol、pindolol、amosulalol、oxprenolol、labetalol、sotalol、d-、dl-およびl-propranololは $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対して非選択的な置換力価を示す結果が得られ、これまでに報告された結果と良く一致した。しかし、 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -遮断作用を有すると言われているalprenololは本結合実験の結果から $\beta_1$ -受容体よりも $\beta_2$ -受容体に対して7.2倍高い親和性を有することが明らかとなった(表8)。

また、本研究で測定した $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する $\beta$ -遮断薬のpK<sub>i</sub>値と、5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対するpK<sub>i</sub>値との間にも良好な相関性( $\beta_1$ :5-HT<sub>1B</sub>; 0.84,  $\beta_2$ :5-HT<sub>1B</sub>; 0.88)が認められたことから、 $\beta$ -受容体と5-HT<sub>1B</sub>-受容体との関連性が示唆された。非選択的な $\beta$ -遮断薬の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する親和性は5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する親和性の18-300倍であったが、選択的な $\beta$ -遮断薬のそれは33-8300倍であり、選択的 $\beta$ -遮断薬は非選択的 $\beta$ -遮断薬に比べ、5-HT<sub>1B</sub>-受容体よりも $\beta_1$ -あるいは $\beta_2$ -受容体に対して選択的な親和性を示した(表9)。このように、<sup>125</sup>I]ICYPは5-HT<sub>1B</sub>-受容体も標識することが判り、この結合実験法により、各薬物の5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する結合親和性を $\beta$ -受容体サブタイプのそれらと同時に評価でき、 $\beta$ -受容体と5-HTとの関連性を解明する上で、有用な方法であることが確認された。

一方、 $\beta$ -遮断薬の作用部位の1つである心臓における力価評価は薬物の薬理作用を理解する上で重要であるが、Nagatomoら<sup>34)</sup>およびTsuchihashiら<sup>35)</sup>は疎水性の放射性リガンドを用いたラット心臓の $\beta$ -受容体に対する結合実験は非特異的結合部位への結合率が高く、再現性が乏しいことを指摘している。また、Tsuchihashiらは親水性の放射性リガンドである<sup>3</sup>H]CGP12177を用いたラット心臓の結合実験で $\beta$ -受容体サブタイプを評価できることを報告している<sup>24)</sup>。そこで、<sup>3</sup>H]CGP12177を用いたラット心臓の結合実験と<sup>125</sup>I]ICYPを用いたラット脳<sup>36)</sup>の結合実験で得た $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体のpK<sub>i</sub>値との間の相関

性をみたところ、良好な相関性が認められた。したがって、用いる組織および放射性リガンドが異なる両法で得られた $\beta$ -受容体サブタイプに対する薬物の親和性の評価は同等の結果が得られた。

以上のことから、 $[^{125}\text{I}]$ ICYPを用いたラット脳の結合実験は $\beta$ -遮断薬の選択性、 $\beta$ -受容体と5-HT<sub>1B</sub>-受容体との関連性や薬物の相対的置換強度をより詳細に評価することができる方法であることが示唆された。

### 第3章 Nipradilolおよび光学異性体の $\alpha_1$ -および $\beta$ -遮断作用の評価

#### 第1節 序論

第1章においてラット脳の $[^3\text{H}]$ prazosinを用いた結合実験は $\alpha_1$ -受容体の性状や $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する $\alpha_1$ -遮断薬の選択性を明らかにすることができ、 $\alpha_1$ -遮断薬の親和性の力価評価に有用な方法であることを示唆した。また、第2章では $[^3\text{H}]$ CGP12177、 $[^3\text{H}]$ DHAおよび $[^{125}\text{I}]$ ICYPはいずれも $\beta$ -受容体サブタイプを標識するが、 $[^3\text{H}]$ DHAは $\beta$ -受容体以外の未定義の結合部位に結合するのに対し、 $[^3\text{H}]$ CGP12177および $[^{125}\text{I}]$ ICYPの結合実験法が $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する種々の薬物の選択性を置換曲線から直接調べることができることを見出した。さらに、5-HT $_{1B}$ -受容体に対する薬物の親和性もラット脳の $[^{125}\text{I}]$ ICYP結合の置換曲線から評価することができ、いくつかの $\beta$ -遮断薬が5-HT $_{1B}$ -受容体に対して高い親和性を有することを明らかにした。また、 $[^{125}\text{I}]$ ICYPを用いたラット脳の結合実験における $\beta$ -遮断薬の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する $\text{pK}_i$ 値と $[^3\text{H}]$ CGP12177を用いたラット心臓の結合実験における $\beta$ -遮断薬の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する $\text{pK}_i$ 値との間に良好な相関をみとめた。これらのことから、 $[^{125}\text{I}]$ ICYPを用いたラット脳の結合実験および $[^3\text{H}]$ CGP12177を用いたラット心臓の結合実験は薬物の $\beta$ -遮断作用の相対的な評価に有用であると考えられた。したがって、第1章および第2章では $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体に対する親和性を評価できる有用な結合実験法の確立を示唆した。

新規 $\alpha_1$ -、 $\beta$ -遮断薬nipradilolはbenzopyran環の8位にaryloxypropanol-amine側鎖を、また、3位にnitroxy基を有し、propranololを代表とする他の $\beta$ -遮断薬とは構造を異にしている。また、本薬物は2つの不斉炭素を有するため、RRとSSおよびRSとSRのラセミ体の混合物であり、4種の異性体が存在する(図12)。また、アドレナリン性遮断薬ではpropranolol<sup>36)</sup>、labetalol<sup>37-39)</sup>およびamosulalol<sup>40-41)</sup>など、光学異性体間でかなり生物活性が異なることが知られている。

また、nipradilolは血管拡張作用など $\alpha_1$ -遮断作用を有する強力な $\beta$ -遮断薬であり、血管脈管疾患に対して有用であることが報告され、抗高血圧薬および抗狭心症薬として注目されている<sup>42-43)</sup>。しかしながら、 $\alpha_1$ -、 $\beta_1$ -および

$\beta_2$ -遮断作用の強度はこれまで明確にされていない。そこで、第3章では第1章および第2章で示した結合実験法と、さらに、 $\beta$ -受容体に対する評価法として $[^3H]$ CGP12177を用いたラット心臓の結合実験法を加え、 $\alpha_1$ 、 $\beta$ -両遮断作用を有する上記に示したnipradilolおよび光学異性体を例に $\alpha_1$ -、 $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -および5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する遮断力価および選択性を調べ、さらに、薬理学的手法から求めた $\alpha_1$ -、 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -遮断活性(pA<sub>2</sub>値)と結合実験から得られたそれらの受容体サブタイプに対する置換力価(pK<sub>i</sub>値)との相関性について検討し、第1章および第2章で示した結合実験法が薬物の $\alpha_1$ -、 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -遮断作用を評価できる有用な方法であることを立証するために実施した。

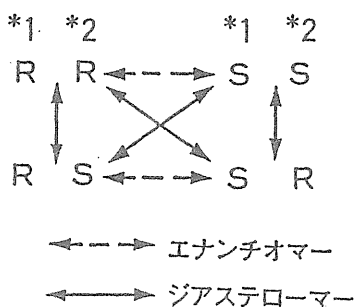
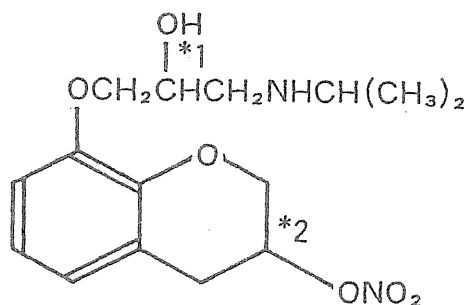


図12 Nipradilolおよび光学異性体の化学構造式

## 第2節 実験材料および方法

### 1. 材料

[<sup>3</sup>H]Prazosin、 [<sup>3</sup>H]CGP12177および [<sup>125</sup>I]ICYPは第1および2章に示したものをを用いた。Nipradilol (3, 4-dihydro-8-(2-hydroxy-3-isopropylamino)propoxy-3-nitroxy-2H-1-benzopyran)および4つの光学異性体は興和新薬から提供戴いた。

### 2. 膜画分の調製

ラット大脳皮質、心筋および脾臓の膜画分の調製およびタンパク濃度の測定は第1および2章に記述した方法に準じた。

### 3. 結合分析

$\alpha_1$ -受容体に対する結合実験は第1章に記述した方法で、また、 $\beta$ -受容体に対する [<sup>125</sup>I]ICYPを用いた置換実験は第2章で記述した方法に準じた。

さらに、 [<sup>3</sup>H]CGP12177を用いたラット心臓の結合実験はTsuchihashiらの方法<sup>24)</sup>にしたがって実施した。すなわち、心筋膜の調製は250–400 gのラットから心臓を摘出後、心室筋(約1 g)を250 mM sucroseを含む10 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4) 20 mlで細かく破碎した後、ポリトロンホモジナイザーで10秒間、2回ホモジナイズした。ホモジネートは4層のガーゼで濾過し、濾液を40000 × gで30分間遠心し、残渣を得た。残渣は40 mM MgCl<sub>2</sub>を含む120 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2)で1回洗浄し、次いで、20 mlの同緩衝液で10秒間、2回ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。 [<sup>3</sup>H]CGP12177の置換実験については0.6 nMの [<sup>3</sup>H]CGP12177を用いた。なお、全結合に対する特異的結合の比は90%であった。

### 4. キネティックス分析

すべてのキネティックス分析はNEC PC-9801コンピュータシステムで実施し、 $\alpha_1$ -受容体サブタイプおよび [<sup>125</sup>I]ICYPを用いた $\beta$ -受容体サブタイプの解析については第1および2章に記述した通りである。また、 [<sup>3</sup>H]CGP12177結合の置換曲線については2受容体–1リガンドモデルを適用し、受容体1, 2が

$\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に相当する時、置換曲線から得た2つの結合部位の比率や $K_d$ 値の平均値  $R_1$ (0.7)、 $R_2$ (0.3)、 $K_{d1}$ (243.03 pM)および $K_{d2}$ (442.87 pM)<sup>24)</sup>を次の式に代入し、各薬物の置換曲線をコンピュータ解析して、 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する薬物の $K_i$ 値をそれぞれ算出した。

$$\frac{B_1}{B_0} = \left( \frac{L \cdot R_1}{L + K_{d1}(1 + x/K_{i1})} + \frac{L \cdot R_2}{L + K_{d2}(1 + x/K_{i2})} \right) / \left( \frac{L \cdot R_1}{L + K_{d1}} + \frac{L \cdot R_2}{L + K_{d2}} \right)$$

$B_1, B_0$ : 阻害薬の存在下および非存在下の放射性リガンド結合濃度

$x$ : 阻害薬の濃度

$L$ : 放射性リガンド濃度

$K_{i1}, K_{i2}$ : 受容体1, 2に対する阻害薬の阻害定数

$R_1, R_2$ : 受容体1, 2の比率 ( $R_1 + R_2 = 1$ )

$K_{d1}, K_{d2}$ : 受容体1, 2に対する放射性リガンドの解離定数

## 5. 薬理学的検討

$\alpha_1$ -遮断作用はラットおよびモルモットの大動脈の収縮力をNagatomoらおよび

Tsuchihashiらの方法<sup>18, 19)</sup>にしたがって実施した。血管を2 mmの幅に切り、リング標本とし、Krebs-Henseleit緩衝液中に懸垂した。Krebs-Henseleit溶液組成は以下のごとくである: NaCl, 118 mM; KCl, 4.7 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM; glucose, 11 mM。溶液の温度は37°Cに維持し、95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを通気した。標本を張力トランスデューサ(日本光電RD-3, 三栄6M52)を用い、レコーダに記録した。大動脈は0.5-1 gの負荷をかけ、用量-反応曲線は薬物添加前後のphenylephrineに対する収縮力によって測定し、各薬物のpA<sub>2</sub>値をSchild法<sup>14)</sup>により、次式で算出した。

$$pA_2 = -\log \frac{\frac{(C)}{(B)}}{\frac{(A)}{(B)} - 1}$$

- (A): 被験薬物非存在下での最大収縮の50%を引き起こすphenylephrine濃度
- (B): 被験薬物存在下での最大収縮の50%を引き起こすphenylephrine濃度
- (C): 被験薬物濃度

また、 $\beta$ -遮断作用を次の方法で測定した<sup>24)</sup>。すなわち、isoproterenolの陽性変時性および陽性変力性に対する拮抗作用の強さ( $\beta_1$ -遮断効果)を評価するために、モルモットの左および右心房を用いた。陽性変時性作用については右心房の自発性収縮の拍動数を、陽性変力性作用については左心房を電気刺激装置で刺激し収縮張力を、それぞれオシログラフに記録した。また、 $\beta_2$ -遮断効果を評価するために、モルモットの摘出気管支平滑筋の調製はモルモットから摘出した気管を2 mm幅に切断後、7個の環状切片を軟骨で互いに糸で連結した。対側の軟骨を直剪刀で切り標本とし、標本の弛緩を張力トランスデューサを用い、レコーダに記録した。これらの標本は上記の組成のKrebs-Henseleit緩衝液に懸垂し、溶液の温度を32°Cに維持し、95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを通気した。用量-反応曲線は薬物添加前後のisoproterenolによる反応を測定し、Shild法によりpA<sub>2</sub>値を算出した。

なお、両法において、すべての標本は懸垂後2時間緩衝液中で保温し、phenylephrineあるいはisoproterenolは阻害薬を添加30分後に緩衝液中に加えた。

### 第3節 結果

#### 1. 結合実験によるnirpradilolおよび光学異性体の置換力価(pK<sub>i</sub>値)の比較

##### 1.1. ラット心臓、脳および脾臓の $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する置換力価(pK<sub>i</sub>値)

[<sup>3</sup>H]Prazosinのラット心臓、脳および脾臓の $\alpha_1$ -受容体結合部位に対するnirpradilolおよび光学異性体のpK<sub>i</sub>値を表10に示した。

同一組織内における $\alpha_1$ 高親和性および $\alpha_1$ 低親和性部位に対するpK<sub>i</sub>値を比

較したところ、心臓については、nirpradilol、SRおよびRRが $\alpha_1$ 高親和性部位に有意に高い値を示したが、逆にSSは $\alpha_1$ 低親和性部位に有意に高い値を示した。また、脳についてはSSが $\alpha_1$ 低親和性部位に有意に高い値を示したが、その他は有意差を示さず、同等の親和性が認められた。また、脾臓の $\alpha_1$ 高親和性部位と心臓および脳の $\alpha_1$ 低親和性部位の $pK_i$ 値を比較すると、nirpradilolおよびSRは有意差を示さないが、SS、RRおよびRSは $\alpha_1$ 低親和性部位の方が有意に高かった。各組織の $\alpha_1$ 高親和性部位に対する $pK_i$ 値は脾臓のRRが有意に低い値を示す他は有意差はなく、 $\alpha_1$ 低親和性部位に対する $pK_i$ 値は心臓に対してSSが、脳に対してSRがそれぞれ有意に高い値を示した。以上のことから、nirpradilolおよび光学異性体の $[^3H]$ prazosinに対する置換強度は異性体間でかなり異なり、 $\alpha_1$ 高親和性部位よりも $\alpha_1$ 低親和性部位が高いかあるいは同等の親和性が認められた。

心臓の $\alpha_1$ 高親和性部位に対するnirpradilolの $pK_i$ 値は5.61であり、prazosin、amosulalolおよびlabetalolより有意に低値を示し、さらに、4つの異性体もこれらの $\alpha_1$ 、 $\beta$ -遮断薬より低い効力順位を示した。Nirpradilolおよび光学異性体の心臓の $pK_i$ 値の効力順位は、SR > nirpradilol  $\geq$  RR  $\geq$  SS = RSであった。また、脳および脾臓の $\alpha_1$ 高親和性部位についても同様にnirpradilolおよび光学異性体の $pK_i$ 値は被験 $\alpha_1$ 、 $\beta$ -遮断薬の $pK_i$ 値よりも低く、効力順位においても同様の結果が得られ、組織による親和性の序列の違いはほとんどなかった。

一方、心臓および脳の $\alpha_1$ 低親和性部位に対するnirpradilolの $pK_i$ 値もlabetalolの $pK_i$ 値より有意に低く、nirpradilolおよび光学異性体の効力順位は心臓でSS > RR  $\geq$  SR  $\geq$  nirpradilol = RS、脳でSR  $\geq$  RR  $\geq$  SS = RS  $\geq$  nirpradilolであり、親和性の順は心臓および脳で全く異なった(表 10)。



表10 Nipradilolおよび光学異性体の各組織の $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対するpK<sub>i</sub>値

薬物	[ <sup>3</sup> H]Prazosin高親和性結合部位			[ <sup>3</sup> H]Prazosin低親和性結合部位	
	ラット心臓	ラット脳	ラット脾臓	ラット心臓	ラット脳
Nipradilol	5.61±0.03(3)+++	5.54±0.11(3)	5.41±0.10(6)	5.23±0.03(3)	5.43±0.27(4)
SR	5.96±0.01(3) <sup>+</sup>	6.10±0.15(3)	5.69±0.15(6)	5.47±0.14(3) <sup>§</sup>	6.18±0.20(3)
SS	5.06±0.16(3)++	4.90±0.13(3)	4.72±0.19(6) <sup>†</sup>	6.56±0.11(3)*** <sup>§</sup>	5.65±0.23(3)*
RR	5.62±0.03(3)	5.37±0.18(4) <sup>#</sup>	4.95±0.07(6)***	5.60±0.19(3)**	6.01±0.23(3)
RS	5.17±0.08(3)	4.98±0.18(3)	4.68±0.17(6) <sup>†</sup>	5.20±0.12(3)	5.60±0.19(3)
Prazosin	11.14±0.04(4)+++**	10.60±0.13(3)	10.29±0.14(10)***	8.87±0.25(4)***	8.04±0.23(3)***
Amosulalol	7.85±0.17(3)++	8.23±0.21(4) <sup>#</sup>	7.80±0.24(5) <sup>††</sup>	6.46±0.16(3) <sup>##</sup>	5.78±0.20(3)***
Labetalol	6.89±0.05(3)+++*	7.30±0.11(3)	6.68±0.09(5) <sup>††</sup>	5.85±0.09(3)***	6.24±0.03(4)***
Arotinolol	6.04±0.23(3)	6.49±0.20(3)	6.25±0.07(4)***	5.97±0.27(4)	5.58±0.06(4)**

( )内数値は実験実施回数, データは平均値±標準誤差。

各親和性部位に対するpK<sub>i</sub>値の有意差

心臓(高):心臓(低); +:P<0.05, ++:P<0.01, +++:P<0.001

脳(高):脳(低); \*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001

脾臓(高):心臓(低); †:P<0.05, ††:P<0.01, †††:P<0.001

脾臓(高):脳(低); ††:P<0.05, †††:P<0.01, ††††:P<0.001

心臓(低):脳(低); §:P<0.05, §§:P<0.01, §§§:P<0.001

心臓(高):脳(高); \*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001

心臓(高):脾臓(高); †:P<0.05, ††:P<0.01, †††:P<0.001

脳(高):脾臓(高); †:P<0.05, ††:P<0.01, †††:P<0.001

1.2. ラット心臓および脳の $\beta$ -受容体サブタイプに対する置換力価( $pK_i$ 値)

ラット心臓の $[^3H]$ CGP12177結合およびラット脳の $[^{125}I]$ ICYP結合における $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対するnipropradilolおよび光学異性体の $pK_i$ 値を表 11および12にそれぞれ示した。

$[^3H]$ CGP12177結合実験ではnipropradilolおよび光学異性体は $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対してほぼ同等の力価を示し、効力順位は $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体とも $SR \geq nipropradilol > SS \geq RR > RS$ であり、 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対して非選択的な親和性を示した(表 11)。また、 $[^{125}I]$ ICYP結合実験でも同様にnipropradilolおよび光学異性体は $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対してほぼ同等の力価を示した。Nipropradilolの $pK_i$ 値は $\beta_1$ -受容体ではlabetalolよりも高く、 $\beta_2$ -受容体ではamosulalolおよびlabetalolよりも高かった。4つの異性体の $pK_i$ 値については、 $\beta_1$ -受容体ではSRがamosulalolおよびlabetalolよりも高く、 $\beta_2$ -受容体ではnipropradilolと同等の $pK_i$ 値を示すSSがamosulalolおよびlabetalolよりも高い値を示した。Nipropradilolおよびその異性体の効力順位は $\beta_1$ -受容体では $SR \geq nipropradilol = SS > RS \geq RR$ 、 $\beta_2$ -受容体では $nipropradilol = SS \geq SR > RR \geq RS$ であり、 $[^3H]$ CGP12177の場合と同様に $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対して非選択的な親和性を示した(表 12)。

表 11  $[^3H]$ CGP12177のラット心臓の $\beta$ -受容体結合部位に対するnipropradilolおよび光学異性体の $pK_i$ 値

薬 物	$\beta_1$ -受容体部位	$\beta_2$ -受容体部位
Nipropradilol (4)	8.77±0.13	8.67±0.39
SR (6)	9.28±0.17	9.47±0.47
SS (4)	7.67±0.10	7.34±0.24
RR (4)	7.05±0.18	6.71±0.28
RS (4)	5.78±0.32	5.29±0.22

( ) 内の各数値は実験実施回数, データは平均値±標準誤差。

表 12  $[^{125}\text{I}]$  ICYP のラット脳 の  $\beta$ -受容体結合部位 に対する  
nipradilol および 光学異性体 の  $\text{pK}_i$  値

薬 物		$\beta_1$ -受容体部位	$\beta_2$ -受容体部位
Nipradilol	(4)	$8.34 \pm 0.17$	$8.37 \pm 0.11$
SR	(6)	$8.51 \pm 0.35$	$8.16 \pm 0.16$
SS	(4)	$8.29 \pm 0.27$	$8.37 \pm 0.26$
RR	(4)	$6.41 \pm 0.12$	$6.96 \pm 0.39$
RS	(4)	$6.62 \pm 0.32$	$6.73 \pm 0.35$
Arotinolol	(3)	$9.74 \pm 0.40$	$9.26 \pm 0.07$
dl-Propranolol	(3)	$8.55 \pm 0.02$	$8.61 \pm 0.05$
Amosulalol	(3)	$8.36 \pm 0.17$	$7.88 \pm 0.20$
Labetalol	(3)	$7.92 \pm 0.23$	$7.17 \pm 0.19$

( ) 内の各数値は実験実施回数, データは平均値  $\pm$  標準誤差。

### 1.3. ラット脳 の $5\text{-HT}_{1B}$ -受容体 に対する 置換力値 ( $\text{pK}_i$ 値)

Nipradilol および 光学異性体 の  $5\text{-HT}_{1B}$ -受容体 に対する  $\text{pK}_i$  値 を表 13 に示した。置換曲線 から求めた nipradilol の  $5\text{-HT}_{1B}$ -受容体 に対する 置換力値 は arotinolol および dl-propranolol よりも低く、amosulalol および labetalol より高かった。なお、A および B 法 で求めた 各薬物 の  $5\text{-HT}_{1B}$ -受容体 に対する  $\text{pK}_i$  値 はほぼ一致し、親和性の強度の順は等しかった。また、nipradilol および 光学異性体 の  $5\text{HT}_{1B}$ -受容体 に対する 親和性は  $\text{SS} \geq \text{SR} \approx \text{nipradilol} > \text{RS} > \text{RR}$  の順であった(表 13)。

表 13  $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ のラット脳の5-HT<sub>1B</sub>-受容体結合部位に対する nipradilol および光学異性体の pK<sub>i</sub> 値

薬 物	pK <sub>i</sub> 値		$\beta_1$ -K <sub>i</sub> 値/ 5-HT <sub>1B</sub> -K <sub>i</sub> 値比	$\beta_2$ -K <sub>i</sub> 値/ 5-HT <sub>1B</sub> -K <sub>i</sub> 値比
	A	B		
Nipradilol	6.55 ± 0.08 (3)	6.06 ± 0.13 (4)	170	130
SR	6.56 ± 0.04 (3)	6.26 ± 0.21 (6)	520	810
SS	6.91 ± 0.04 (3)	6.92 ± 0.13 (4)	5.8	2.7
RR	4.88 ± 0.05 (3)	4.53 ± 0.08 (4)	150	68
RS	5.41 ± 0.14 (3)	5.09 ± 0.12 (4)	2:3	0.76
Arotinolol	7.97 ± 0.08 (3)	8.16 ± 0.24 (3)	59	19
dl-Propranolol	7.25 ± 0.21 (3)	7.01 ± 0.05 (3)	20	23
Amosulalol	5.89 ± 0.08 (3)	5.60 ± 0.02 (3)	300	98
Labetalol	5.70 ± 0.07 (3)	5.41 ± 0.06 (3)	170	30

A: 1-metoprolol で  $\beta$ -受容体部位を遮断し, 1 受容体-1 リガンドモデルの置換実験で算出した 5-HT<sub>1B</sub>-受容体の pK<sub>i</sub> 値。  
 B: 3 受容体-1 リガンドモデルの置換実験で算出した 5-HT<sub>1B</sub>-受容体の pK<sub>i</sub> 値。  
 ( ) 内の名数値は実験実施回数, データは平均値 ± 標準偏差。

## 2. 薬理学的手法による nipradilol および光学異性体の $\alpha_1$ -および $\beta$ -遮断活性

### 2.1. Nipradilol および光学異性体の $\alpha_1$ -遮断活性 (pA<sub>2</sub> 値)

ラットおよびモルモット大動脈の収縮力から算出した nipradilol および光学異性体の  $\alpha_1$ -遮断作用 (pA<sub>2</sub> 値) を表 14 に示した。ラット大動脈における nipradilol の pA<sub>2</sub> 値は amosulalol および labetalol よりも低く、arotinolol よりも高かった。しかし、4 つの光学異性体のうち、SS および RS は arotinolol よりもさらに低い pA<sub>2</sub> 値を示した。ラット大動脈における nipradilol および光学異性体の pA<sub>2</sub> 値は SR = nipradilol = RR > SS ≥ RS の順であった。また、モルモット大動脈における nipradilol の pA<sub>2</sub> 値は amosulalol よりも低く、labetalol と同等で、arotinolol よりも高かった。しかし、4 つの光学異性体のうち、RS は arotinolol よりもさらに低い pA<sub>2</sub> 値を示した。また、モルモット大動脈における nipradilol および光学異性体の pA<sub>2</sub> 値は SR ≥ nipradilol ≥ RR ≥ SS ≥ RS の順であった (表 14)。

表14 Nipradilolおよび光学異性体の  
 $\alpha_1$ -受容体遮断作用 ( $pA_2$  値)

薬物	ラット大動脈	モルモット大動脈
Nipradilol	6.49±0.19(5)	6.62±0.18(6)
SR	6.53±0.12(5)	6.94±0.20(5)
SS	5.42±0.19(5)	6.05±0.22(5)
RR	6.43±0.15(5)	6.41±0.16(5)
RS	5.26±0.10(5)	5.46±0.28(5)
Amosulalol	7.89±0.08(7)	7.46±0.40(5)
Labetalol	6.89±0.12(5)	6.59±0.40(4)
Arotinolol	6.07±0.16(5)	5.95±0.29(5)

( ) 内数値は実験実施回数, データは平均値±標準誤差。

## 2.2. Nipradilolおよび光学異性体の $\beta$ -遮断活性( $pA_2$ 値)

Isoproterenolによる陽性変時性作用、陽性変力性作用および気管支平滑筋の弛緩作用に対するnipradilolおよび光学異性体の拮抗作用( $pA_2$ 値)を表15に示した。Nipradilolおよび光学異性体の陽性変時性作用の効力順位はSR>nipradilol>SS>RR>RSであり、陽性変力性作用および気管支平滑筋の弛緩作用の効力順位とほぼ一致した。したがって、nipradilolおよび光学異性体は $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対して非選択的な遮断作用を示した(表15)。

表 15 Nipradilol および光学異性体の  
 $\beta$ -受容体遮断作用 ( $pA_2$  値)

薬 物	陽性変時性作用	陽性変力性作用	気管支平滑筋弛緩作用
Nipradilol	8.36 $\pm$ 0.18 (5)	8.66 $\pm$ 0.23 (5)	9.00 $\pm$ 0.17 (6)
SR	9.04 $\pm$ 0.15 (6)	9.13 $\pm$ 0.13 (6)	9.49 $\pm$ 0.23 (5)
SS	7.45 $\pm$ 0.11 (6)	7.54 $\pm$ 0.12 (6)	7.74 $\pm$ 0.25 (5)
RR	6.70 $\pm$ 0.18 (6)	6.76 $\pm$ 0.21 (5)	7.08 $\pm$ 0.19 (5)
RS	5.77 $\pm$ 0.14 (6)	5.59 $\pm$ 0.17 (6)	5.73 $\pm$ 0.24 (5)

( ) 内の各数値は実験実施回数, データは平均値 $\pm$ 標準誤差。

### 3. Nipradilol および光学異性体の $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体サブタイプに対する置換力価 ( $pK_i$ 値) と遮断活性 ( $pA_2$ 値) との相関

#### 3.1. Nipradilol および光学異性体の $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する置換力価 ( $pK_i$ 値) と $\alpha_1$ -遮断活性 ( $pA_2$ 値) との相関

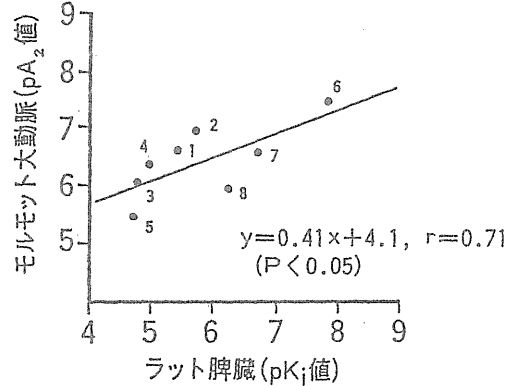
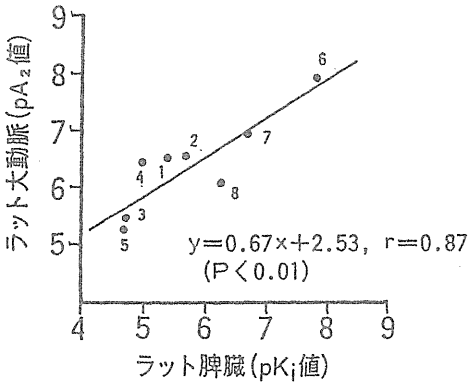
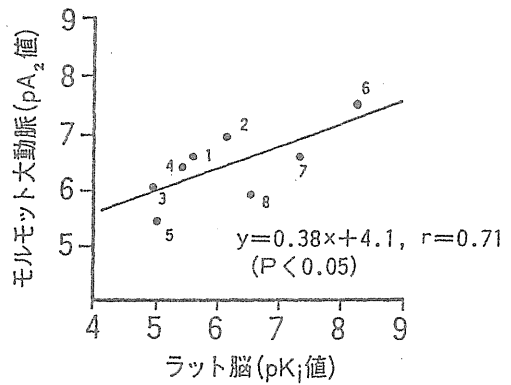
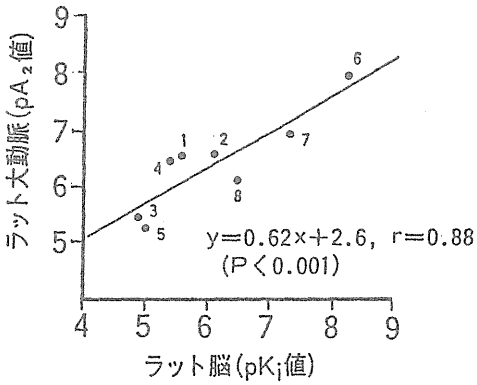
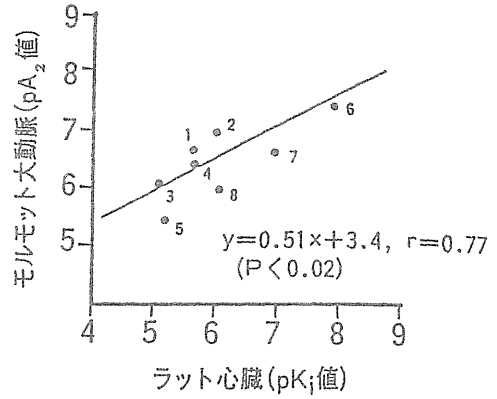
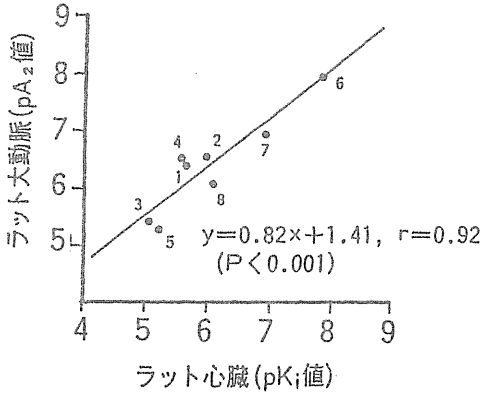
Nipradilol および光学異性体のラットの心臓、脳および脾臓の  $\alpha_1$  高親和性部位に対する  $pK_i$  値とラット大動脈あるいはモルモット大動脈に対する  $pA_2$  値との間の相関を図 13 に示した。その結果、ラットの心臓、脳および脾臓の  $\alpha_1$  高親和性部位に対する  $pK_i$  値とラット大動脈に対する  $pA_2$  値との間に良好な相関が認められ ( $r=0.87-0.92$ )、モルモット大動脈に対する  $pA_2$  値についてはラット大動脈に比べるとやや低い相関係数を示した ( $r=0.71-0.77$ ) (図 13)。なお、ラットの心臓および脳の  $\alpha_1$  低親和性部位に対する  $pK_i$  値とラット大動脈およびモルモット大動脈に対する  $pA_2$  値との間には全く相関が認められなかった (心臓あるいは脳の  $pK_i$  値: ラット大動脈の  $pA_2$  値;  $r=0.26-0.38$ , 心臓あるいは脳の  $pK_i$  値: モルモット大動脈の  $pA_2$  値;  $r=0.28-0.40$ ) (データは示さず)。

### 3.2. Nipradilolおよび光学異性体の $\beta$ -受容体サブタイプに対する置換力価( $pK_i$ 値)と $\beta$ -遮断活性( $pA_2$ 値)との相関

[ $^3H$ ]CGP12177および[ $^{125}I$ ]ICYPを用いた結合実験により求めたnipradilolおよび光学異性体の $\beta_1$ -受容体および $\beta_2$ -受容体に対する $pK_i$ 値と陽性変時性作用、陽性変力性作用および気管支平滑筋弛緩作用の $pA_2$ 値との相関を図 14, 15 に示した。

Nipradilolおよび光学異性体の[ $^3H$ ]CGP12177および[ $^{125}I$ ]ICYPの結合実験から求めた $\beta_1$ -受容体に対する $pK_i$ 値と陽性変時性作用および陽性変力性作用に対する $pA_2$ 値との間に良好な相関が認められた([ $^3H$ ]CGP12177:  $r=0.99$ , [ $^{125}I$ ]ICYP:  $r=0.87$ )。さらに、[ $^3H$ ]CGP12177および[ $^{125}I$ ]ICYPを用いた結合実験におけるnipradilolおよび光学異性体の $\beta_2$ -受容体に対する $pK_i$ 値と気管支平滑筋弛緩作用の $pA_2$ 値との間にも良好な相関が認められた([ $^3H$ ]CGP12177:  $r=0.998$ , [ $^{125}I$ ]ICYP:  $r=0.84$ )。また、 $\beta_1$ -遮断作用を示す陽性変時性作用および陽性変力性作用の $pA_2$ 値と $\beta_2$ -受容体部位に対する $pK_i$ 値、 $\beta_2$ -遮断作用を示す気管平滑筋弛緩作用の $pA_2$ 値と $\beta_1$ -受容体部位に対する $pK_i$ 値にもそれぞれ良好な相関がみられたが(図 14, 15)、これらの相関はnipradilolの非選択性によるものと考えられた。

さらに、データは示していないが、[ $^{125}I$ ]ICYPの結合実験で得たnipradilolおよび光学異性体の5-HT $_{1B}$ -受容体に対する $pK_i$ 値と陽性変時性作用、陽性変力性作用および気管支平滑筋弛緩作用の $pA_2$ 値との間には有意な相関性はなく( $r=0.6-0.7$ )、5-HT $_{1B}$ -受容体はnipradilolの $\beta$ -遮断作用に寄与していないことが明らかとなった。

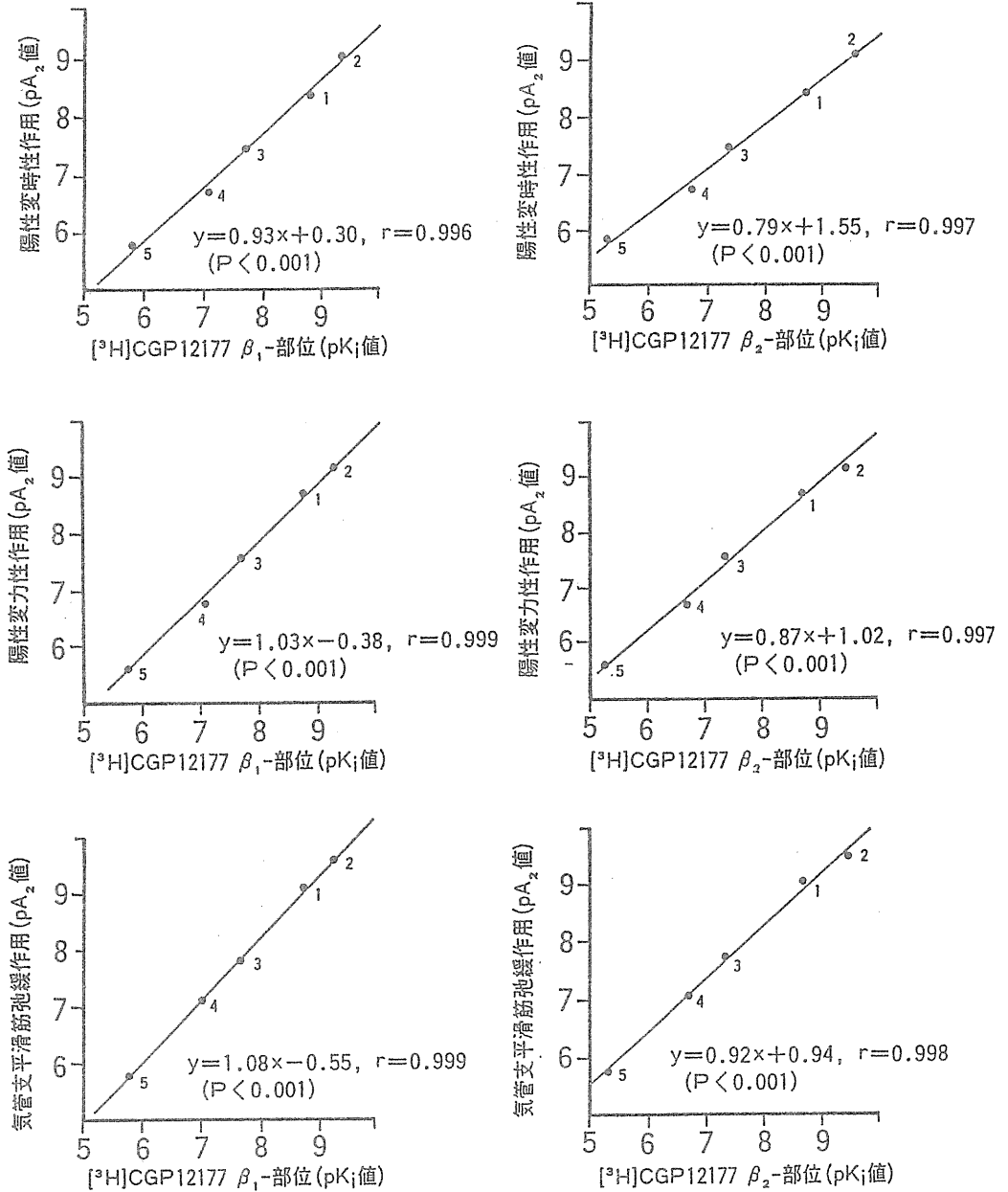


1. Nipradilol ; 2. SR ; 3. SS ; 4. RR ; 5. RS ; 6. Amosulalol ; 7. Labetalol ;  
8. Arotinolol

図 13 Nipradilolおよび光学異性体のラット心臓，脳および脾臓の [<sup>3</sup>H]prazosin高親和性結合部位に対する pK<sub>i</sub>値とラットおよびモルモット大動脈の α<sub>1</sub>-受容体遮断作用力価 (pA<sub>2</sub>値) との相関



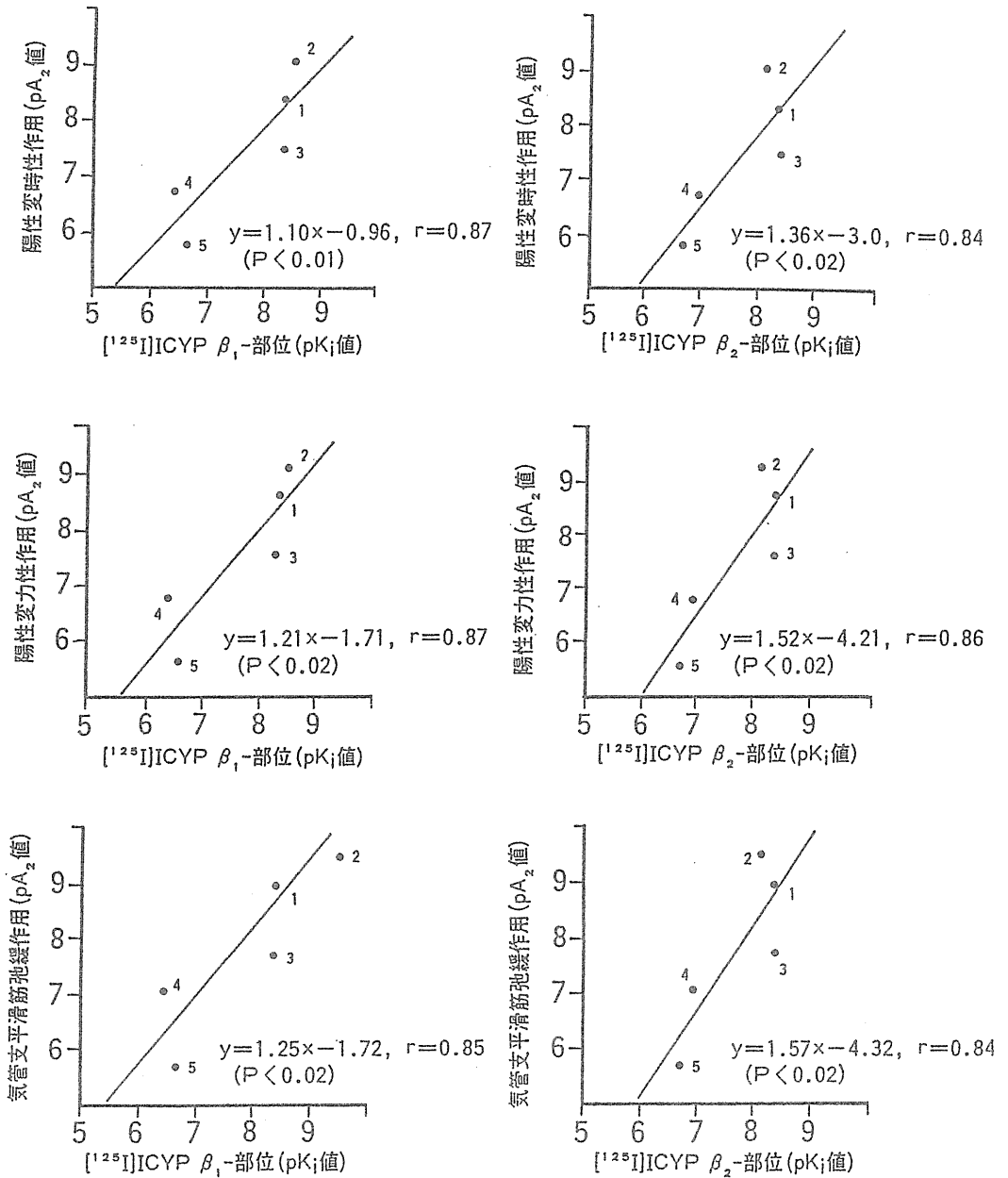
ラット心臓の $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ 結合実験



1. Nipradilol ; 2. SR ; 3. SS ; 4. RR ; 5. RS

図 14 Nipradilol および光学異性体のラット心臓の $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ に対するβ-受容体結合部位におけるpK<sub>i</sub>値とβ-受容体遮断作用力価(pA<sub>2</sub>値)との相関

ラット脳の $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ 結合実験



1. Nipradilol ; 2. SR ; 3. SS ; 4. RR ; 5. RS

図 15 Nipradilol および光学異性体のラット脳の $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ に対する $\beta$ -受容体結合部位における pK<sub>i</sub> 値と $\beta$ -受容体遮断作用力価 (pA<sub>2</sub> 値) との相関

## 第4節 考察

アドレナリン受容体は血圧、心機能あるいは循環動態などの循環器系機能と密接な関連がある。例えば、血圧を構成する主因子は2つあり、1つは心拍出量で $\beta_1$ -受容体を介し、他の1つは末梢血管抵抗で $\alpha_1$ -受容体を介すると言われている。したがって、アドレナリン受容体を遮断する $\alpha_1$ -遮断薬、 $\beta_1$ -遮断薬および $\alpha_1$ 、 $\beta_1$ -遮断薬は心拍出量の抑制作用や血管拡張作用を有し、高血圧の治療などの循環器疾患薬として今日重要視されている。第1章および第2章において、 $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体の親和性を評価できる解析法を開発することができ、 $\alpha_1$ -遮断薬および $\beta$ -遮断薬の薬効評価に適用できることが示唆された。そこで、第3章では $\alpha_1$ 、 $\beta$ -遮断薬であるnirpradilolを例に取り上げ、 $\alpha_1$ -および $\beta$ -遮断作用をサブタイプレベルで検討することにより、これらの結合実験法が薬物の $\alpha_1$ -および $\beta$ -遮断作用を評価できる有用な方法であるかを検討した。

Nirpradilolの $\beta$ -受容体に対する選択性はpropranololと同様に $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対して非選択的であり、両受容体に対してほとんど等しい $pK_i$ 値を示し、labetalolよりも高く、propranololと同等の $pK_i$ 値を示した。一方、 $\alpha_1$ 高親和性部位に対する遮断力価もlabetalolより弱いことが判明した。したがって、nirpradilolはpropranololと同等の $\beta$ -遮断作用をもつ $\alpha_1$ 、 $\beta$ -遮断薬と言える。 $\beta$ -遮断薬は原則として末梢血管抵抗を下降させないが、弱い力価であっても $\alpha_1$ -遮断作用を合わせもつ薬物は末梢血管抵抗の下降による降圧効果が期待できる。したがって、nirpradilolは純粋な $\beta$ -遮断薬であるpropranololより良好な降圧作用があると考えられ、nirpradilolの有用性の1つといえるかも知れない。また、一部の $\beta$ -遮断薬は血液-脳関門を通過し、脳組織への取り込み、局在化や脳室投与で降圧作用を示すことから、抗高血圧作用に関与していると推察されているが、nirpradilolは脳にほとんど分布しないことより<sup>45)</sup>、血液-脳関門を通過しにくく、中枢性の降圧機構は関与していないものと考えられる。

Nirpradilolには2つの不斉炭素が存在するため、4つの光学異性体からなる。1つの不斉炭素はbenzopyran環の3位で、もう一方はaryloxypropanolamine側鎖の2'位である。また、 $\beta$ -受容体の結合実験ではnirpradilolおよび光学異性

体が $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に非選択的で、 $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体サブタイプの阻害に対する置換強度は $SR > RR > SS = RS$  ( $\alpha_1$ -受容体)あるいは $SR > SS > RR > RS$  ( $\beta$ -受容体)の順であった。これらのことから、aryloxypropanolamine側鎖についてはS配置の方がR配置よりも、benzopyran環の3位についてはR配置の方がS配置よりも $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体サブタイプに対してより強い置換強度を示すと推察された。Howeら<sup>46)</sup>、Weinstockら<sup>47)</sup>、Dukesら<sup>48)</sup>およびDanilewiczら<sup>49)</sup>はaryloxypropanolamineタイプの $\beta$ -遮断薬において、S配置はR配置よりも $\beta$ -遮断作用が強いことを報告しており、aryloxypropanolamine側鎖の2'位の水酸基やbenzopyran環の3位のnitroxy基の絶対配置がnipradilolの拮抗的強度に重要であり、 $\alpha_1$ -および $\beta$ -遮断作用との間に構造活性相関が認められた。

また、本研究において、nipradilolおよび光学異性体は、 $[^3H]$ prazosinに対して高親和性を示す結合部位の置換力価( $pK_i$ 値)と $\alpha_1$ -遮断活性( $pA_2$ 値)との間に良好な相関性が認められ、 $[^3H]$ prazosin高親和性部位が血管の収縮機構( $\alpha_1$ -遮断作用)に関与していることが示唆された。しかし、nipradilolおよび光学異性体はこれまで用いた被験薬物とは異なり、 $[^3H]$ prazosin低親和性部位にも高親和性部位と同等か有意に高い $pK_i$ 値を示した。したがって、これらの $[^3H]$ prazosin低親和性部位は $\alpha_1$ -遮断作用以外のnipradilolの薬理作用に関与していることが推察された。

一方、最近の研究では、5-HTの取り込みを阻害することは $\beta$ -受容体の密度の減少を引き起こし<sup>50・51)</sup>、 $\beta$ -受容体機能は5-HTによって調節されている可能性が示唆された。

Tsuchihashiら<sup>24)</sup>も5-HT<sub>1B</sub>-受容体が $\beta$ -遮断薬によって拮抗されることを明らかにした。したがって、 $\beta$ -遮断薬の $\beta$ -受容体サブタイプに対する結合親和性ととも5-HT<sub>1B</sub>-受容体の結合親和性を評価することは被験薬物の薬理的特性を解明する上で意義深い。

Nipradilolおよび光学異性体については5-HT<sub>1B</sub>-受容体の $[^{125}I]$ ICYPの結合阻害に対して弱い親和性を示し、nipradilolおよび光学異性体の強さの順は $SS \geq SR = \text{nipradilol} > RS > RR$ であった。5-HT<sub>1B</sub>-受容体の置換強度は $\beta$ -受容体同様、aryloxypropanolamine側鎖のS配置の方が強く、 $\beta$ -受容体および5-HT<sub>1B</sub>-受容体との関連性が示唆されたが、5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する置換力価( $pK_i$ 値)と

$\beta$ -遮断作用( $pA_2$ 値)との間の相関性が認められなかったこと、nipradilolの $\beta$ -受容体サブタイプに対する親和性は5-HT $_{1B}$ -受容体に対するそれに比べ130-170倍を示したことから、5-HT $_{1B}$ -受容体はnipradilolおよび光学異性体の $\beta$ -遮断作用に寄与していないことが判明した。

以上の結果から、第1章および第2章で示した結合実験法により、nipradilolはpropranololと同等の非選択的な $\beta$ -遮断作用と $\alpha_1$ -遮断作用を有し、血管平滑筋弛緩作用、心機能抑制作用および降圧作用に寄与していることが示唆され、第3章の結果から、これらの結合実験法から得た $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体サブタイプに対する置換力値はアドレナリン受容体遮断薬の薬効評価に有用であることを立証できた。

## 第4章 総括および結論

本研究はラット心臓、脳および脾臓の結合実験法によって $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体サブタイプの存在様式を明らかにすることができた。さらに、これらの結合実験法の $\alpha_1$ -および $\beta$ -遮断薬の薬効評価に対する有用性を抗高血圧薬および抗狭心症薬として注目されているnitroxy基を有する新規 $\alpha_1$ 、 $\beta$ -遮断薬niprodilolを用い、 $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体サブタイプに対する置換力価の結果と摘出組織を用いる薬理学的評価法の結果との比較を検討し、以下の結果を得た。

1)  $\alpha_1$ -受容体に選択的な放射性リガンド $[^3\text{H}]$ prazosinを用いたラット心臓および脳の結合実験において、Scatchardプロットは両方とも2相性を示し、 $[^3\text{H}]$ prazosinに高親和性を示す結合部位と低親和性を示す2つの結合部位に分離することができた。また、ラット脾臓の結合実験においてScatchardプロットが1相性を示し、脾臓には心臓および脳と同等の解離定数を有する $[^3\text{H}]$ prazosin高親和性の結合部位が存在することを明らかにした。さらに、この方法で23種類の薬物の置換力価を調べた結果、 $[^3\text{H}]$ prazosin高親和性部位に対する置換力価はこれまでに報告された薬物の置換力価と良く一致した。したがって、薬物の置換力価は組織や $[^3\text{H}]$ prazosin親和性部位の違いによって異なるが、 $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する薬物の詳細な作用力価から薬理学的特性の解明や薬効を評価をできる分類法であることが示唆された。

2)  $[^3\text{H}]$ DHAを用いたラット脳の結合実験では、 $[^3\text{H}]$ DHAは $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -受容体および $\beta$ -受容体以外の定義できない結合部位を標識し、 $[^3\text{H}]$ CGP12177を用いたラット脳の結合実験では、 $[^3\text{H}]$ CGP12177は $\beta_1$ -受容体および $\beta_2$ -受容体を標識することを確認した。さらに、 $[^{125}\text{I}]$ ICYPを用いたラット脳の結合実験では、 $[^{125}\text{I}]$ ICYPは $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体の他に、5-HT<sub>1B</sub>-受容体も標識でき、この結合実験法は $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -および5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する薬物の置換力価を評価することができる有用な方法であることが明らかとなった。そこで、 $[^{125}\text{I}]$ ICYPを用いた結合実験で19種類の薬物の $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -および5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する置換力価を調べたところ、これまで報告された各薬物の $\beta$ -受容体サブ

タイプに対する選択性と良く一致した。さらに、本研究で用いたすべての $\beta$ -遮断薬が5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対して親和性を有することを認め、 $\beta$ -受容体と5-HT<sub>1B</sub>-受容体との関連が示唆された。また、 $\beta$ -遮断薬の作用部位の1つである心臓における $\beta$ -受容体サブタイプの力価評価は薬理作用を理解する上で重要である。<sup>[125I]</sup>ICYPを用いたラット脳 of 結合実験で得た種々の薬物の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対するpK<sub>i</sub>値と<sup>[3H]</sup>CGP12177を用いたラット心臓の結合実験で得たpK<sub>i</sub>値との間に良好な相関関係が認められ、2つの異なる結合実験で得られる薬物の $\beta$ -受容体サブタイプに対する親和性は同等のものが得られることが判明した。

3)  $\alpha_1$ 、 $\beta$ -遮断薬nipradilolおよび光学異性体について、<sup>[3H]</sup>prazosinを用いた結合実験により $\alpha_1$ -受容体サブタイプに対する置換力価を評価したところ、ラット心臓、脳および脾臓の $\alpha_1$ 高親和性部位に対する効力順位は組織による差を認めず、ほぼ同じ結果が得られ、nipradilolおよび光学異性体の $\alpha_1$ 高親和性部位に対するpK<sub>i</sub>値とラット大動脈の収縮による $\alpha_1$ -遮断作用(pA<sub>2</sub>値)との間に良好な相関が認められた。しかし、ラット心臓および脳 of <sup>[3H]</sup>prazosin低親和性部位に対するpK<sub>i</sub>値との相関性は認められず、nipradilolおよび光学異性体の $\alpha_1$ -遮断作用は<sup>[3H]</sup>prazosin高親和性部位の遮断に基づくことが確認された。さらに、<sup>[125I]</sup>ICYPを用いたラット脳 of 結合実験および<sup>[3H]</sup>CGP12177を用いたラット心臓 of 結合実験により、nipradilolおよび光学異性体の $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する置換力価を評価したところ、両法で得られたpK<sub>i</sub>値の効力順位は一致し、両法で得られた $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対する置換力価もそれぞれ同等の結果が得られ、nipradilolおよび光学異性体は $\beta_1$ -および $\beta_2$ -受容体に対して非選択的な親和性を示した。また、それらの置換力価と陽性変時性作用、陽性変力性作用および気管支平滑筋弛緩作用との間にも良好な相関性が認められた。また、nipradilolおよび光学異性体の5-HT<sub>1B</sub>-受容体に対する親和性は認められたが、それらの置換力価と陽性変時性作用、陽性変力性作用および気管支平滑筋弛緩作用との間にも全く相関性が認められず、さらに、 $\beta$ -受容体サブタイプに対する親和性は5-HT<sub>1B</sub>-受容体のそれよりはるかに高かった。したがって、5-HT<sub>1B</sub>-受容体はnipradilolおよび光学異性体の $\beta$ -遮断作用に寄与していないことが明らかとなった。

以上の結果から、 $[^3\text{H}]$ prazosinを用いたラット心臓、脳および脾臓の結合実験ならびに $[^{125}\text{I}]$ ICYPを用いたラット脳の結合実験および $[^3\text{H}]$ CGP12177を用いたラット心臓の結合実験より得た $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体サブタイプに対するnipradilolおよび光学異性体の置換力価は薬理学的手法による薬効評価の結果と良く相関し、nipradilolおよび光学異性体は弱いながら $\alpha_1$ -遮断作用と非選択的な $\beta_1$ -および $\beta_2$ -遮断作用を有し、nipradilolの抗高血圧および抗狭心症作用には $\alpha_1$ -および $\beta$ -受容体サブタイプが寄与しており、5-HT<sub>1B</sub>-受容体は $\beta$ -遮断作用に関与していないが明らかとなった。したがって、nipradilolの検討結果から、これらの結合実験法は $\alpha_1$ -、 $\beta$ -受容体サブタイプおよび5-HT<sub>1B</sub>-受容体の存在を明らかにすることができたこと、アドレナリン受容体遮断薬の $\alpha_1$ -および $\beta$ -遮断作用を置換力価から詳細に評価できたことより、薬物の薬理作用機序あるいは構造活性相関などの薬理学的特性の解明に多くの情報を与える有用な方法であることが明らかとなった。



## 謝辞

本研究を進める上で、終始にわたり御教示、御助言を戴きました新潟薬科大学教授 長友孝文博士、さらに、同大学 薬理学教室講師 土橋洋史博士ならびに教室員の方々に深く感謝の意を表します。また、本論文作成に際し、御教示、ならびに御校閲を賜りました城西大学薬学部教授 石谷良一博士に深甚なる謝辞を表します。

## 主論文一覽

### 第1章

- 1) H. Tsuchihashi, K. Maruyama, S. Baba, F. Mano, J. Kinami and T. Nagatomo :  
Comparison of  $\alpha_1$ -adrenoceptors between rat brain and spleen.  
Jpn. J. Pharmacol., 56, 523-530 (1991).
- 2) J. Kinami, H. Tsuchihashi, S. Baba, F. Mano, K. Maruyama and T. Nagatomo :  
 $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes in the rat ventricular muscle.  
J. Pharm. Pharmacol., 44, 97-100 (1992).

### 第2章

- 3) H. Tsuchihashi, J. Kinami, K. Watanabe and T. Nagatomo :  
Differences in binding characteristics of  $^3\text{H}$ -CGP12177 and  $^3\text{H}$ -dihydroalprenolol to  $\beta$ -adrenergic receptors in rat brain.  
Asia Pacific J. Pharmacol., 5, 195-199 (1990).
- 4) H. Tsuchihashi, Y. Nakashima, J. Kinami and T. Nagatomo :  
Characteristic of  $^{125}\text{I}$ -iodocyanopindolol binding to  $\beta$ -adrenergic and serotonin-1B receptors of rat brain: Selectivity of  $\beta$ -adrenergic agents.  
Jpn. J. Pharmacol., 52, 195-200 (1990).

### 第3章

- 5) H. Tsuchihashi, Y. Nakashima, H. Yokoyama, J. Kinami and T. Nagatomo :  
Assessments of nipradilol and its isomers by radioligand binding assay using  $^{125}\text{I}$ -iodocyanopindolol and  $^3\text{H}$ -CGP-12177 for  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -adrenoceptor and 5HT $_{1B}$ -serotonergic receptors.  
Asia Pacific J. Pharmacol., 5, 33-38 (1990).
- 6) J. Kinami, H. Tsuchihashi, K. Maruyama, K. Sasaki and T. Nagatomo :  
Nipradilol displays a unique pharmacological profile of affinities for the different  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes.  
Jpn. J. Pharmacol., 61, 81-86 (1993).

## 参考文献

1. R.P. Ahlquist : A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, 154, 586-600 (1948).
2. S.Z. Langer : Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol. Rev.*, 32, 337-362 (1981).
3. A.M. Lands, A. Arnold, J.P. McAuliff, F.P. Luduena and T.G. Brown, Jr. : Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature (London)*, 214, 597-598 (1967).
4. A.L. Morrow and I. Crees : Characterization of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes in rat brain: A reevaluation of [ $^3\text{H}$ ]WB4101 and [ $^3\text{H}$ ]prazosin binding. *Mol. Pharmacol.*, 29, 321-330 (1986).
5. J. Coates, U. Jahn and D.F. Weetman : The existence of a new subtype of  $\alpha$ -adrenoceptor on the rat anococcygeus is revealed by SGD 101/75 and phenoxybenzamine. *Br. J. Pharmacol.*, 75, 549-552 (1982).
6. N.A. Flavahan and P.M. Vanhoutte :  $\alpha_1$ -Adrenoceptor subclassification in vascular smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.*, 7, 347-349 (1986).
7. C. Han, P.W. Abel and K. P. Winneman : Heterogeneity of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors revealed by chlorethylclonidine. *Mol. Pharmacol.*, 32, 505-510 (1987).

8. C. Han, P.W. Abel and K.P. Minneman :  $\alpha_1$ -Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in smooth muscle. *Nature (London)*, 329, 333-335 (1987).
9. D.A. Schwinn, J.W. Lomasney, W. Lorenz, P.J. Szklut, R.T. Freneau Jr., T.L. Yang-Feng, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz and S. Cotecchia : Molecular cloning and expression of the cDNA for novel  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtype. *J. Biol. Chem.*, 265, 8183-8189 (1990).
10. L.J. Emorine, S. Marullo, M. Breind-Sutren, G. Patey, K. Tate, C. Delavier-Klutchko and A.D. Strosberg : Molecular characterization of the human  $\beta_3$ -adrenergic receptor. *Science*, 245, 1118-1121 (1989)
11. O.E. Brodde, J.J. Beckeringh and M.C. Michel : Human heart  $\beta$ -adrenoceptors: a fair comparison with lymphocyte  $\beta$ -adrenoceptors?. *Trends Pharmacol. Sci.*, 8, 403-407 (1987).
12. A. Herberg, F. Kempf Jr., M.E. Josephson and P.B. Molinoff : Coexistence of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in the human heart: Effects of treatment with receptor antagonists or calcium entry blockers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 234, 561-568 (1985).
13. A. Heiz, J. Schwartz and J. Velly :  $\beta$ -Adrenoceptors of the human myocardium : determination of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  subtypes by radioligand binding. *Br. J. Pharmacol.*, 80, 711-717 (1983).
14. Y. Uchida, M. Nakamura, S. Shimizu, Y. Shirasawa and M. Fujii : Vasoactive and  $\beta$ -adrenoceptor blocking properties of 3,4-dihydro-8-(2-hydroxy-3-isopropylamino)-piperoxy-3-nitroxy-2H-1-benzopyran (K-351), a new antihypertensive agent. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 262, 132-149 (1983).

15. 清水貞宏, 生田殉也, 山内洋一, 近藤章市, 中村政記 : 高血圧ラットにおけるNipradilolの降圧作用ならびに循環動態に及ぼす影響. 薬理と治療, 14, 609-623 (1986).
16. 藤井幹雄, 松本次郎, 白沢義章 : 高血圧自然発症ラットの静脈伸展性およびそれに対する抗高血圧薬Nipradilolの作用. 基礎と臨床, 20, 133-140 (1986).
17. M. Fujii, Y. Shirasawa, S. Kondo, K. Sawanobori and M. Nakamura : Cardiovascular effects of nipradilol, a beta-adrenoceptor blocker with vasodilating properties. Jpn. Heart J., 27, 233-250 (1986).
18. T. Nagatomo, H. Tsuchihashi, S. Sasaki, Y. Nakagawa, H. Nakahara and S. Imai: Displacement by  $\alpha$ -adrenergic agonists and antagonists of  $^3\text{H}$ -prazosin bound to the  $\alpha$ -adrenoceptors of the dog aorta and the rat brain. Jpn. J. Pharmacol., 37, 181-187 (1985).
19. H. Tsuchihashi and T. Nagatomo : Alpha-blocking potencies of antihypertensive agents (prazosin, terazosin, bunazosin, SGB-1534 and ketanserin) having with quinazoline or quinazolinedione as assessed by radioligand binding assay methods in rat brain. J. Pharmacobio-Dyn., 12, 170-174 (1989).
20. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
21. P. J. Munson and D. Rodbard : LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Anal. Biochem., 107, 220-239 (1980).

22. H. Tsuchihashi and T. Nagatomo : Characterization of  $^3\text{H}$ -dihydroalprenolol binding to  $\beta$ -adrenergic receptors of rat brain: Two binding sites of racemic propranolol in displacement experiments. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 35, 2979-2984 (1987).
23. H. Tsuchihashi, T. Nagatomo and S. Imai : Three binding sites of  $^{125}\text{I}$ -iodocyanopindolol, i.e.  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ -adrenergic and  $5\text{HT}_{1\text{B}}$ -serotonergic receptors in rat brain determined by the displacement and Scatchard analysis. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 12, 509-516 (1989).
24. H. Tsuchihashi, H. Yokoyama and T. Nagatomo : Binding characteristics of  $^3\text{H}$ -CGP12177 to  $\beta$ -adrenoceptors in rat myocardial membranes. *Jpn. J. Pharmacol.*, 49, 11-19 (1989).
25. H. Akaike : Fitting autoregressive models for prediction. *Ann. Inst. Statist. Math.*, 21, 243-247 (1969).
26. Y. C. Cheng and W. H. Prusoff : Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, 22, 3099-3108 (1973).
27. A. V. Hill : The mode of action of nicotine and curari, determined by the form of the contraction curve and the method of temperature coefficients. *J. Physiol. (London)*, 39, 361-373 (1909).
28. A. De Lean, P. J. Munson and D. Rodbard : Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102 (1978).

29. R. Boer, A. Grassegger, C. Schudt and H. Glossmann :  
(+)-Niguldipine binds with very high affinity to  $\text{Ca}^{2+}$  channels and to a subtype of  $\alpha_1$ -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 172, 131-145 (1989).
30. I. Graziadei, G. Zernig, R. Boer, H. Glossman : Stereoselective binding of niguldipine enantiomers to  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors labeled with [ $^3\text{H}$ ]5-methyl-urapidil. *Eur. J. Pharmacol.*, 172, 329-337 (1989).
31. I. Muramatsu, T. Ohmura, S. Kigoshi, S. Hashimoto and M. Oshita : Pharmacological subclassification of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 99, 197-201 (1990).
32. H. Tsuchihashi and T. Nagatomo : Biphasic binding of  $^{125}\text{I}$ -iodocyanopindolol to  $\beta$ -adrenergic receptors in rat cerebral cortical membranes. I. assessment by the use of agonists. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 35, 2966-2972 (1987).
33. H. Tsuchihashi and T. Nagatomo : Binding characteristics of  $^{125}\text{I}$ -iodocyanopindolol to  $\beta$ -adrenergic receptors: Biphasic Scatchard plots. II. Effects of selective antagonists. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 35, 3425-3432 (1987).
34. T. Nagatomo, M. Sasaki, H. Tsuchihashi and S. Imai : Binding characteristics of  $^3\text{H}$ -dihydroalprenolol to  $\beta$ -adrenoceptors of rat heart treated with neuraminidase. *Jpn. J. Pharmacol.*, 33, 851-857 (1983).

35. H. Tsuchihashi, M. Sasaki and T. Nagatomo : Binding characteristics of [<sup>3</sup>H]dihydroalprenolol to  $\beta$ -adrenergic receptors of rat brain: Comparison with those of rat heart treated with neuraminidase. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3972-3976 (1985).
36. A. M. Barrett and V. A. Cullum : The biological properties of the optical isomers of propranolol and their effects on cardiac arrhythmias. *Br. J. Pharmacol.*, 34, 43-55 (1968).
37. R. T. Brittain, G. M. Drew and G. P. Levy : The  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptor blocking potencies of labetalol and its individual stereoisomers in anaesthetized dogs and in isolated tissues. *Br. J. Pharmacol.*, 77, 105-114 (1981).
38. E. H. Gold, W. Chang, M. Cohen, T. Baum, S. Ennreich, G. Johnson, N. Prioli and E. J. Sybertz : Synthesis and comparison of some cardiovascular properties of the stereoisomers of labetalol. *J. Med. Chem.*, 25, 1363-1370 (1982).
39. E. J. Sybertz, C. S. Sabin, K. K. Pula, G. V. Vliet, J. Glennon, E. H. Gold and T. Baum : Alpha and beta adrenoceptor blocking properties of labetalol and its R,R-isomer, SCH19927. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218, 435-443 (1981).
40. K. Honda, A. Takenaka, A. Miyata-Osawa and M. Terai : Adrenoceptor blocking properties of the stereoisomers of amosulalol (YM-09538) and the corresponding desoxy derivative (YM-11133). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236, 776-783 (1986).



41. K. Honda, C. Nakagawa, O. Inagaki, M. Shibasaki, T. Takenaka and M. Takeda : Adrenoceptor blocking and cardiovascular effects of the optical isomers of amosulalol (YM-09538), a combined  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptor blocking agent, and the corresponding desoxy derivative (YM-11133) in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 41, 459-466 (1986).
42. M. Shiratsuchi, K. Kawamura, T. Akashi, M. Fujii, H. Ishihama and Y. Uchida : Synthesis and hypotensive activity of benzopyran derivatives. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 35, 632-641 (1987).
43. M. Shiratsuchi, K. Kawamura, T. Akashi, H. Ishihama, M. Nakamura and F. Takenaka : Synthesis and activity of optical isomers of nipradilol. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 35, 3691-3698 (1987).
44. O. Arunlakshana and H. O. Schild : Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 14, 48-58 (1956).
45. 鈴木準之助, 甲重雄, 木全秀樹, 米光正博, 小出高志, 中尾裕史 : Nipradilol(K-351)のラットにおける体内動態(第1報)  $^{14}\text{C}$ -Nipradilol単回投与による吸収、分布および排泄. *応用薬理*, 31, 409-421 (1986).
46. R. Howe and R. G. Shanks : Optical isomers of propranolol. *Nature (London)*, 210, 1336-1338 (1966).
47. L. M. Weinstock, D. M. Mulvery and R. Tull : Synthesis of the  $\beta$ -adrenergic blocking agent timolol from optically active precursors. *J. Org. Chem.*, 41, 3121-3125 (1976).

48. M. Dukes and L. H. Smith :  $\beta$ -adrenergic blocking agents.  
9. Absolute configuration of propranolol and of a number of related aryloxypropanolamines and aryethanolamines. *J. Med. Chem.*, 14, 326-328 (1971).
49. J. C. Danilewicz and J. E. G. Kemp : Absolute configuration by asymmetric synthesis of (+)-1-(4-acetamidophenoxy)-3-(isopropylamino)-propan-2-ol (practolol). *J. Med. Chem.*, 16, 168-171 (1973).
50. B. K. Koe, S. W. Koch, L. A. Label, K. W. Minor and M. G. Page : Sertraline, a selective inhibitor of serotonin uptake, induces subsensitivity of  $\beta$ -adrenoceptor system of rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 141, 187-194 (1987).
51. W. F. Byerley, E. J. McConnell, R. T. McCabe, T. M. Dawson, B. I. Grosser and J. K. Walmsley : Chronic administration of sertraline, a selective serotonin uptake inhibitor, decreased the density of  $\beta$ -adrenergic receptors in rat frontoparietal cortex. *Brain Res.*, 421, 377-381 (1987).