原著

塩酸ジラゼブとアスピリン併用投与時の血小板凝集能ならびに血管壁 PGI₂ 産生能

山本 進* 中島 勝明* 永倉 正彦*
間瀬 勘史** 高山 進** 安永幸二郎**

Platelet aggregability and aortic prostacyclin production after the combined treatment with dilazep and aspirin in rats, rabbits and healthy volunteers

Susumu YAMAMOTO*, Katsuaki NAKAJIMA*, Masahiko NAGAKURA*,
Kanji MASE**, Susumu TAKAYAMA** and Kojiro YASUNAGA**

Key words: aspirin, dilazep, platelet aggregation, prostacyclin, synergetic effect

Aspirin (ASA) has been used as an antiplatelet drug in clinical trials to treat and prevent thrombosis. However, high doses of ASA have disadvantage not only inducing gastric lesion but also inhibiting prostacyclin (PGI₂) generation in vessel wall. The possibility of useful combined therapy of dilazep (DZP), a coronary vasodilator, and low doses of ASA was described.

Platelet aggregation in platelet-rich plasma (PRP) was measured according to the method of Born et al. using the platelet aggregometer (NKK, Hematracer-1). 6-keto-PGF_{1α} in reaction medium where isolated aortic rings had been incubated at 37°C for 10 min. was assayed for estimation of aortic PGI₂ production using the 6-keto-PGF_{1α} RIA kit (New England Nuclear).

A synergetic inhibitory action of the two drugs was demonstrated on platelet aggregation using rabbit PRP *in vitro*. In *ex vivo* experiments using rats 3 hr after the oral administration, ASA alone inhibited platelet aggregation at doses more than 6.25 mg/kg. However, it prevented aortic PGI₂ generation at 25 mg/kg or above. On the other hand, the combined doses of 6.25 mg/kg ASA + 100

* 興和株式会社東京研究所〔〒189 東京都東村山市野口町 2-17-43〕, Tokyo Research Laboratories, Kowa Co., Ltd. Tokyo, Japan.

** 関西医科大学内科学第一講座, The First Department of Internal Medicine, Kansai Medical college, Osaka, Japan. [1984年5月4日受付, 1984年9月6日受理]

mg/kg DZP and 6.25 mg/kg ASA + 300 mg/kg DZP exhibited markedly inhibitory effects on platelet aggregation corresponding to 25 mg/kg ASA alone, but had no significant effect on aortic PGI₂ generation.

In time-course experiments using rabbits, the combination of 300 mg/kg DZP and 6.25 mg/kg ASA showed an enhancement of antiplatelet effect from 3 to 6 hr after the oral administration. The combination effect of ASA (30mg) and DZP (100mg) on platelet aggregation was also observed in healthy volunteers from 3 to 6 hr after the dose.

Therefore, a desirable antiplatelet therapy may be performed with a combined dose of 100 mg DZP and a very low dose of ASA.

はじめに

血栓性疾患の治療あるいは予防において、aspirin (ASA) 等の抗血小板剤の有用性が認められてきている¹⁻³⁾が、問題点も少なくない。特に ASA は、消化管障害の誘発のみならず、血管壁における PGI₂ 産生の抑制発現が危惧されている。しかし、いくつかの報告⁴⁾⁵⁾は、血小板の cyclo-oxygenase と血管壁のそれでは ASA に対する感受性に差のあることを述べている。このことは、ASA 投与量の選択により、血管壁 PGI₂ 産生に影響を与えることなく、抗血小板作用のみを発現せしめる可能性を示唆している。したがって ASA 投与量の選択的軽減化は本剤の抗血小板療法上、意義あるものと考えられる。一方、dilazep (DZP) には膜安定化作用に基づく抗血小板作用が認められており⁶⁾、作用機序の異なる ASA との併用療法が期待される薬剤の一つである。

今回、著者らは ASA と DZP との併用投与を試み、血小板凝集能ならびに大動脈 PGI₂ 産生能に対する作用について検討した。

I. 方 法

1) 被検薬剤 : aspirin (ASA<局方品>), dilazep (DZP, <Comelian®>), dipyridamole (DP, <Persantin®>).

2) 実験方法 :

(1) In vitro による実験

ペントバルビタール麻酔 (30 mg/kg, i. p.) 下に雄性ウサギ (体重約 3 kg, 日本白色在来種) の頸動脈より血液 (3.8 % クエン酸ナトリウム

液 1/10 容を含む) を採取し、既報⁷⁾のごとく PRP と PPP を分離した。血小板凝集能は aggregometer (NKK, hematracr 1) を用いて測定した。すなわち、PRP 250 μ l を入れたガラスセルを aggregometer にセットし、被検薬液 10 μ l (共存の場合は 5 μ l 宛) を添加して、37°C, 10 分間 preincubation した。次いで collagen (Sigma) 懸濁液 10 μ l (最終濃度 10 μ g/ml) を添加して凝集曲線を経時的に記録した。これより最大凝集速度 (maximal slope, %/min) を求め、予め作成した濃度・反応曲線より血小板凝集能の抑制率を算出した⁷⁾。

(2) ラットへの経口投与実験

20 時間の絶食に処した体重 200~350 g の雄性ラット (Wistar 系) を用いた。薬液は 2 ml/kg 宛、経口用ゾンテを介して胃内投与した。DZP は精製水を用いて水溶液とし、ASA は 0.5 % carboxymethyl cellulose sodium (CMC) 溶液に懸濁して用いた。薬物投与後 3 時間の時点でペントバルビタール麻酔 (50 mg/kg, i. p.) を施し、腹部大静脈より血液 (3.8 % クエン酸ナトリウム液 1/10 容を含む) を採取した。血小板凝集能の測定は aggregometer を用いた。すなわち、ガラスセルに PRP 250 μ l 入れ, aggregometer にセットした。1 分後に collagen 液を 10 μ l (最終濃度 5, 10, 20 および 40 μ g/ml) 添加し、各種 collagen 濃度における凝集曲線をそれぞれ記録した。

また、採血後直ちに胸部大動脈を摘出し、約 2 mg の輪状切片を作製した。次いで、組織 1 mg 当たり 0.5 ml の borate buffered saline (BBS, 10 mM sodium borate in 0.9 % saline,

Fig. 1 Relationship between concentration of collagen added to platelet-rich plasma and maximal slopes obtained from the platelet aggregation curves.

pH 9.0) を加えて、37°C、10 分間攪拌しつつ incubation した後、反応液 0.1 ml を分取した。これに BBS 0.9 ml を加えて10倍希釈液とし、6-keto-PGF_{1α} 測定用 RIA キット (New England Nuclear 社製) を用いて PGI₂ 産生量を求めた。

(3) ウサギへの経口投与実験

体重 2.8~3.2 kg の雄性ウサギ (日本白色在来種) を用いた。薬液は胃内へ挿入したカテーテル (Nelaton Catheter®) を介して 1 ml/kg 宛投与した。血液は薬物投与前ならびに投与後 3, 6, 24 時間の時点で、耳介辺縁静脈より 4 ml (3.8 % クエン酸ナトリウム液 1/10 容を含む) 宛採取して、血小板凝集能をラットの実験に準拠して測定した。

(4) ヒトにおける臨床薬理試験

健康な成人男子10名 (mean±SD で示すと、年齢 27.8±2.1 歳、体重 69.0±6.7 kg、身長 169.8±4.8 cm) を用いた。2 名宛 5 群に分け、早朝空腹時に薬剤を内服させた。服用前および

服用後 3, 6, 24 時間の時点で肘静脈より血液 (3.8 % クエン酸ナトリウム液 1/10 容を含む) を採取し、血小板凝集能を測定した。collagen 添加量は最終濃度 0.5, 1, 2, 4 µg/ml とした。

(5) Aggregability の算出法

ラット、ウサギならびにヒトのいずれにおいても、各 collagen 濃度における凝集曲線から maximal slope (%/min) を求めると、collagen 濃度に依存した濃度・反応曲線が得られる (図1, before)。次いで、薬剤投与後の各時点での濃度・反応曲線を同様に求めると (図1, after)。この際、抗血小板作用が強く発現するほど濃度・反応曲線は右方向へ移動する。図1は薬剤投与後の血小板が投与前と同一の凝集反応を発現するためには2倍量の collagen が必要であることを示している。したがって凝集能 (aggregability) はこの逆数、すなわち 1/2 (50 %) に低下していると解釈できる。本報での ex vivo 実験における凝集能の変化率は、すべてこの方法に準拠して算出した。

Table 1 Inhibitory effects of aspirin plus dilazep and aspirin plus dipyridamole on rabbit platelet aggregation in vitro

combination Drugs conc. (μM)	ASA conc. (μM)						
	0	0.1	0.3	1	3	10	30
0	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	5 $\pm$ 3	7 $\pm$ 3	7 $\pm$ 4	15 $\pm$ 5	57 $\pm$ 10
Dilazep 5	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	7 $\pm$ 3	17 $\pm$ 6	13 $\pm$ 6	33 $\pm$ 4	57 $\pm$ 10
10	6 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	9 $\pm$ 7	23 $\pm$ 8	20 $\pm$ 5	46 $\pm$ 5	72 $\pm$ 5
25	4 $\pm$ 4	10 $\pm$ 2	34 $\pm$ 10	42 $\pm$ 6	45 $\pm$ 11	63 $\pm$ 2	74 $\pm$ 5
50	19 $\pm$ 8	17 $\pm$ 10	52 $\pm$ 8	52 $\pm$ 4	64 $\pm$ 3	74 $\pm$ 2	83 $\pm$ 2
75	18 $\pm$ 6	42 $\pm$ 8	55 $\pm$ 8	64 $\pm$ 2	63 $\pm$ 4	75 $\pm$ 1	85 $\pm$ 2
100	38 $\pm$ 9	48 $\pm$ 10	53 $\pm$ 11	70 $\pm$ 3	71 $\pm$ 2	78 $\pm$ 2	86 $\pm$ 1
200	62 $\pm$ 6	--	--	--	--	--	--
Dipyridamole 10	1 $\pm$ 6	4 $\pm$ 2	5 $\pm$ 5	14 $\pm$ 6	12 $\pm$ 5	34 $\pm$ 8	59 $\pm$ 11
25	6 $\pm$ 4	5 $\pm$ 3	5 $\pm$ 7	20 $\pm$ 6	13 $\pm$ 8	44 $\pm$ 8	61 $\pm$ 10
50	11 $\pm$ 7	14 $\pm$ 6	18 $\pm$ 8	27 $\pm$ 4	24 $\pm$ 12	54 $\pm$ 2	63 $\pm$ 10
75	27 $\pm$ 10	27 $\pm$ 9	33 $\pm$ 4	44 $\pm$ 8	49 $\pm$ 8	61 $\pm$ 7	69 $\pm$ 6
100	39 $\pm$ 6	32 $\pm$ 10	44 $\pm$ 2	52 $\pm$ 2	65 $\pm$ 4	71 $\pm$ 4	76 $\pm$ 4
200	58 $\pm$ 7	--	--	--	--	--	--

Values represent inhibitory percent (mean $\pm$ SE) against collagen-induced platelet aggregation. (n=4)

Table 2 Concentrations of combined drugs required for 50 % inhibition against collagen-induced rabbit platelet aggregation in vitro

Aspirin (μM)	25	22	12	4.2	0.92	0.63	0.48	0
Dilazep (μM)	0	5	10	25	50	75	100	140

Aspirin (μM)	25	—	20	14.2	8.9	3.3	0.72	0
Dipyridamole (μM)	0	—	10	25	50	75	100	150

II. 成 績

1. In vitro による実験

各薬剤の単独および ASA と DZP あるいは ASA と DP の共存時の凝集抑制率 (4 例の mean $\pm$ SE) を表 1 に示した. この際, control は薬剤無添加で, preincubation 1 分間のものを用いた. したがって, 薬剤無添加でも 10 分間の preincubation では 4 $\pm$ 2 % の抑制率を示し, 1 分間のそれに比べ, 若干の凝集能低下がうかがえる. 各薬剤の単独作用をみると, ASA は 10 μM で 15 $\pm$ 5 %, 30 μM で 57 $\pm$ 10 % の抑

制率を示し, IC₅₀ は 25 μM と算出された. DZP は, 100 μM で 38 $\pm$ 9 %, 200 μM で 62 $\pm$ 6 % の抑制率を示し, IC₅₀ は 140 μM であった. 同様に DP の IC₅₀ は 150 μM と算出された. 次に種々の ASA 濃度と DZP 5~100 μM あるいは DP 10~100 μM とをそれぞれ共存させると, いずれにおいても明らかな抑制作用の増強を示した (表 1).

これより, DZP あるいは DP が共存した際に凝集を 50 % 阻害するのに必要な ASA 濃度を算出すると, 表 2 に示す値が得られた. すなわち, ASA 単独では IC₅₀ は 25 μM であった

Table 3 Effects of aspirin alone, and combined treatment with aspirin and dilazep on platelet aggregability and aortic prostacyclin generation in rats

drug doses (mg/kg) (n)	collagen-induced platelet aggregation [maximal slope (%/min)]					PGI ₂ production [6-keto-PGF _{1α}]	
	collagen conc. (μg/ml)				aggregability (% change)	(ng/mg aorta/10min)	(% change)
Control (19)	40.7±4.1	71.7±1.3	84.5±1.6	96.4±2.0	100	1.13±0.08	100
Aspirin 3.1 (5)	47.2±9.7	74.0±5.9	87.0±5.5	98.6±1.1	108.1	1.18±0.16	104.4
Aspirin 6.25 (14)	23.6±5.6*	64.6±2.6*	81.1±1.8	92.4±9.6	85.5	0.98±0.09	86.7
Aspirin 12.5 (13)	6.1±3.3**	51.0±3.9**	75.3±3.4*	84.4±2.4*	76.9	1.17±0.10	103.5
Aspirin 25 (14)	1.0±1.0**	38.1±6.3**	69.6±3.1*	82.2±2.2*	55.6	0.55±0.09**	48.7
Aspirin 50 (8)	0±0**	28.8±8.0**	58.6±8.1*	70.8±7.4*	39.8	0.12±0.03**	10.6
Aspirin 100 (5)	0±0**	27.2±3.7**	50.2±3.2*	69.0±3.0*	32.3	0±0**	0
Dilazep 300 (5)	48.4±3.9	69.0±1.4	79.4±3.3	85.6±2.5*	80.0	1.10±0.16	97.3
Aspirin 6.25 + Dilazep 100 (6)	19.7±7.3*	61.8±3.8**	76.8±2.1*	86.7±2.7*	62.1	1.15±0.12	101.8
Aspirin 6.25 + Dilazep 300 (14)	9.9±4.1**	46.0±4.0**	67.2±2.7*	79.2±2.7*	48.8	0.98±0.07	86.7

Values represent mean ± SE.

Significantly different from control consisted of 19 non-treated rats (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

Fig. 2 Gaddum's analysis for the evaluation of antiplatelet effects of aspirin plus dilazep, or aspirin plus dipyridamole.

Solid linear line refers to an additional effect of aspirin and dilazep, and broken linear line refers to that of aspirin and dipyridamole. Solid and broken curves refer to experimental data obtained in this study.

DZP; dilazep, ASA; aspirin, DP; dipyridamole.

が, DZP 10 μM が共存すると, これは 12 μM に半減し, さらに DZP 25 μM の共存下では 4.2 μM と 1/6 に減少することが明らかとなった. これらの数値を Gaddum の方法⁸⁾で解析

し, 図示すると 図 2 となる. 各薬剤単独時の IC₅₀ を結んだ直線が両者の相加作用を意味するが, DZP と ASA あるいは DP と ASA 共存下では, いずれもこの直線より左下方に移動し

Fig. 3 Time course of antiplatelet effects after the oral administration of aspirin alone or aspirin plus dilazep in rabbits.

Values represent mean $\pm$ SE.

Significantly different from control at each point (**; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$).

た。したがってその作用発現は、両薬剤の相乗効果によるものであることを意味した。

2. ラットへの経口投与実験

薬剤投与後3時間の時点における血小板凝集能ならびに大動脈 PGI_2 産生能を表3に示した。control (無処置ラット) 群の各 collagen 濃度における maximal slope は、 $5 \mu\text{g/ml}$ で 40.7 ± 4.1 (mean $\pm$ SE) %/min であり、10, 20, $40 \mu\text{g/ml}$ では、それぞれ 71.7 ± 1.3 , 84.5 ± 1.6 , 96.4 ± 2.0 %/min であった。この濃度・反応曲線が示す凝集能を100%として各薬剤投与時の凝集能の変化率(% change)を求めると、ASA 3.1 mg/kg 単独投与では108.1%と凝集能の低下はみられなかった。しかし、 6.25 mg/kg では85.5%, 12.5 mg/kg , 25 mg/kg , 50 mg/kg および 100 mg/kg ではそれぞれ76.9, 55.6, 39.8 および 32.3%と用量依存的な凝集能の低下がみられた。他方、大動脈

PGI_2 産生量は control 群で 1.13 ± 0.08 (mean $\pm$ SE) ng/mg aorta/10 min を示した。これに対し、ASA 12.5 mg/kg 以下の投与においては PGI_2 産生量に変化がなかったが、 25 mg/kg (50%抑制) 以上では用量依存的な低下がみられ、 50 mg/kg では90%抑制、 100 mg/kg では完全抑制を示した。

DZP 300 mg/kg 単独投与群では、80.0%と凝集能の低下を示したが、 PGI_2 産生能は control 群と差がなかった。

さらに ASA 6.25 mg/kg と DZP 300 mg/kg の併用投与群では、血小板凝集能が48.8%を示し、ASA 25 mg/kg 単独投与に匹敵する抗血小板作用が発現した。しかし、 PGI_2 産生能の低下はみられなかった。この抗血小板作用のみの増強効果は、ASA 6.25 mg/kg と DZP 100 mg/kg 併用時においても同様にみられた(表3)。

Fig. 4 A clinical pharmacological trial for the evaluation of combined therapy of aspirin and dilazep in healthy volunteers.
Mean values of 2 subjects are shown.

3. ウサギへの経口投与実験

ウサギを用いて同一個体における血小板凝集能の推移を求めた。図3に薬剤投与前の凝集能を100%とした際の凝集能の% changeを経時的に示した。薬剤の代りに精製水を投与したcontrol群は、3, 6, 24時間のいずれの時点でも、ほぼ投与前値と同じ凝集能を示した。ASA 6.25 mg/kg 投与群では、3時間で $92 \pm 7\%$ 、6時間で $87 \pm 8\%$ とわずかな低下を示し、24時間では前値に復した。ASA 25 mg/kg 投与群では、3時間で $45 \pm 10\%$ 、6時間では $29 \pm 8\%$ 、と有意に低下した後、24時間では $76 \pm 16\%$ に回復した。これに対し、ASA 6.25 mg/kg とDZP 300 mg/kg 併用投与群では、3時間で $52 \pm 8\%$ の低下を示し、これが6時間まで持続した後、24時間ではほぼ前値に復した。

4. ヒトにおける臨床薬理試験

ウサギの実験に準じてヒトにおける臨床薬理試験を実施した成績(各群2例の平均値)を図4に示した。ASA 30 mg 投与では、3時間で75%、6時間で84%と若干の低下傾向を示した後、24時間で投与前値に復した。ASA 100

mg 投与では、3時間で29.5%、6時間で43%と低下し、24時間でも52%と抑制作用が持続した。ASA 300 mg 投与では、3時間で26%、6時間で26.5%、24時間で32%とさらに強い抑制作用を示した。これに対し、ASA 30 mg とDZP 100 mg の併用では、3時間で62.5%、6時間で63%と低下し、24時間では70.5%と回復傾向を示した。さらに、ASA 100 mg とDZP 100 mg の併用では、3時間で22.5%、6時間で27%と、ASA 300 mg 単独投与に匹敵する抑制効果を示したが、24時間では40.5%と回復傾向に転じた。

III. 考 察

抗血小板剤の中でも、特にASAはその作用をin vitroで検討する際には、血小板と薬剤との接触時間を配慮する必要がある。今回、PRP中への薬剤添加からcollagen添加までのpreincubation時間は37°C、10分間に設定した。従来の報告をみると⁹⁻¹¹⁾、in vitroにおけるASAの作用強度がまちまちで、しかもin vivoの作用強度を説明できないものが多い。

事実、著者らの予備検討によると、ウサギ血小板に対する ASA の IC_{50} は preincubation が 1 分で $300 \mu M$, 5 分で $60 \mu M$, 10 分で $25 \mu M$ となり、ASA の抗血小板作用の発現が preincubation 時間によって異なることを見出ししている。

さて、今回の実験条件では、ASA の IC_{50} は $25 \mu M$, DZP, DP の IC_{50} はそれぞれ $140 \mu M$, $150 \mu M$ と算出されたので、共存実験は、これらの濃度以下で行なうことにした。その結果、ASA と DZP あるいは ASA と DP の共存で相乗的抗血小板作用が発現することが明らかとなり、これら薬剤の併用投与の有用性が示唆された。

そこで、実験動物への投与実験、すなわち、ex vivo 実験を試みた。この際、血小板凝集能は前述のごとく、collagen 凝集の濃度・反応曲線をもとにして、% change で求めた。まず、ラットでは投与後 3 時間の時点における ASA の抗血小板作用発現最小用量、すなわち 6.25 mg/kg に DZP 100 あるいは 300 mg/kg を併用した結果、著しい抗血小板作用の増強がみられ、とくに後者では ASA 25 mg/kg 投与に匹敵する作用が発現した。この成績は、DZP の併用により ASA の投与量を $1/4$ に軽減しうることを示唆する。また、この際の大動脈 PGI_2 産生能は、ASA 25 mg/kg 投与で control 群の約 $1/2$ に低下するのに対し、ASA 6.25 mg/kg と DZP 300 mg/kg 併用投与では、 PGI_2 産生低下が生じないことも明らかとなった。

次にウサギを用いて、これら薬剤の併用効果を経時的に観察した結果、ASA 6.25 mg/kg と DZP 300 mg/kg の併用投与で 3 時間後に ASA 25 mg/kg 単独投与時の抗血小板作用に匹敵する成績が得られた。他方、作用の持続の面では、ASA 25 mg/kg 群が 24 時間後でも約 25% の抑制を示しているのに対し、併用群では、ほぼ完全回復が観察された。

健康成人男子 10 名を用いての臨床薬理試験では、ASA 30 mg 単独投与でわずかな抗血小板作用の発現を認めた。これに対し、ASA 30 mg と DZP 100 mg の併用で明らかな抗血小板作用の増強効果を認め、ほぼ動物実験と同様の結

果を得た。なお、臨床薬理試験に関しては、現在例数の追加ならびに単回投与と連日投与との比較等について検討中である。

以上の成績から、DZP と ASA の併用により、ASA 投与量の選択的軽減化が可能であると思われる。

文 献

- 1) Fields, W.S., et al.: Controlled trial of aspirin in cerebral ischemia. *Stroke*, **8**; 301~315, 1977.
- 2) 安永幸二郎: 抗血小板療法の臨床. *臨床科学*, **19**; 918~924, 1983.
- 3) 村井淳志: 抗血小板療法. *最新医学*, **38**; 59~65, 1983.
- 4) Basista, M., et al.: Prostacyclin and thromboxane generating system in rabbit pretreated with aspirin. *Pharmacol. Res. Commun.*, **10**; 759~763, 1978.
- 5) Hanley, S.P., et al.: Differential inhibition by low-dose aspirin of human venous prostacyclin synthesis and platelet thromboxane synthesis. *Lancet*, **1**; 969~971, 1981.
- 6) 安永幸二郎, 他: Dilazep dihydrochloride の血小板凝集抑制作用. *内科宝函*, **27**; 99~107, 1980.
- 7) 山本 進, 他: Ca^{++} 拮抗剤あるいは β -blocker と Dilazep との併用における血小板凝集抑制増強効果. *医学と薬学*, **7**; 1433~1437, 1982.
- 8) Gaddum, J.H.,; The combined effects of two drugs, *Pharmacology*, Oxford Univ. Press, London, 1959, p. 504.
- 9) Evans, G., et al.: The effect of acetylsalicylic acid on platelet function. *J. Exp. Med.*, **128**; 877~894, 1968.
- 10) Holmes, I.B.; A comparison of the effect of proquazone, a new non-steroidal antiinflammatory compound, and acetylsalicylic acid on blood platelet function in vitro and in vivo. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **228**; 136~152, 1977.
- 11) Richard, L., et al.; Inhibition of platelet aggregation by 2-(p-chlophenyl)-4-triazoleacrylic acid (Wy-23049) -comparison with acetylsalicylic acid. *Biochem. Pharmacol.*, **23**; 3273~3282, 1974.