尿失禁に対する基礎的研究

第2報 ウサギ尿道平滑筋の α -adrenoceptor subtype における性差について

秋田大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 土田正義教授)

森 田 隆

EXPERIMENTAL STUDIES ON URINARY INCONTINENCE

II. Function and Distribution of α_1 - and α_2 -Adrenoceptors in Male and Female Rabbit Urethral Smooth Muscle

Takashi Morita

Department of Urology, School of Medicine Akita University

(Director: Prof. Seigi Tsuchida)

The effects of various α -adrenergic agonists and antagonists on the contractile properties of the isolated urethra of male and female rabbits were examined and the population of α_1 - and α_2 -adrenoceptors, using radioligand receptor binding techniques, was also quantified to define the functional role of postsynaptic α -adrenoceptors in urethral smooth muscle.

Norepinephrine, epinephrine (non-specific α -adrenergic agonists) and phenylephrine (α_1 -adrenergic agonists) induced increases in contractile force in both the male and female urethra. Clonidine (α_2 -adrenergic agonist) caused a relatively large contractile response in the female urethra but only a small contractile response in the male urethra. Receptor binding studies indicated that the male urethra contains almost equal amounts of α_1 - and α_2 -adrenoceptors (32 vs. 34 fmol/mg protein, respectively) whereas the female urethra contains a significantly greater density of α_2 - than α_1 -adrenoceptors (122 vs. 34 fmol/mg protein, respectively). Our studies have indicated that: (1) both α_1 - and α_2 -adrenoceptors cause contractile responses in male and female rabbit urethra; (2) the greater response to α_2 -agonist in female than male urethra is correlated with a higher density of α_2 -adrenoceptors in this tissue.

要旨: 雄および雌ウサギの尿道平滑筋において, それから採取した muscle strip の収縮に対する種々の α 刺激剤および α 遮断剤の効果を検討すると同時に, radioligand binding 法を用いて α_1 , α_2 受容体の分布を調べた。 α 刺激剤である norepinephrine, epinephrine および α_1 刺激剤である phenylephrine は, 雄と雌両方の尿道平滑筋 muscle strip を著明に収縮させた。 それに対し, α_2 刺激剤の clonidine は雌尿道平滑筋 muscle strip を著明に収縮させたものの, 雄尿道平滑筋 muscle strip をほんの少ししか収縮させなかった。 Receptor binding 法によれば, 雄尿道平滑筋にはほとんど同量の α_1 , α_2 受容体が存在するのに対し, 雌尿道平滑筋には α_1 受容体に比べ約4倍の α_2 受容体が存在することが判明した。 これらの結果は, (1) ウサギ尿道平滑筋には α_1 , α_2 両方の受容体が存在し, いずれも収縮作用に関与していること, および, (2) 雄よりも雌において α_2 刺激剤の惹起する収縮反応が著明に大きかったが, この反応には雌尿道平滑筋に多量に存在する α_2 受容体が postsynaptic α -receptor として関与していること, を示唆していると考えられる。

結 言

α -adrenoceptor を刺激する薬剤の投与によって種々の動物から摘出した尿道平滑筋が収縮し, 尿道内圧も上昇することから, 尿道平滑筋の緊張に α -

adrenoceptor が関与していることには疑いがない^{1)~6)}。 また, 解剖学的にも尿道平滑筋には豊富に交感神経末端が認められるという報告がある^{7)~10)}。 ところで最近, 尿道平滑筋における α -adrenoceptor の

subtype に関して、薬理学的方法や receptor binding 法を用いて検討されるようになったが、それらの報告を見ると必ずしも一致していない^{5)6)11~13)}。例えば、Andersson ら¹¹⁾は、雌ウサギの膀胱底部と尿道の平滑筋の α -adrenoceptor は25%が α_1 、75%が α_2 であり、 α_1 、 α_2 のいずれの adrenoceptor も尿道平滑筋の収縮に関与すると述べ、それに対し、国沢ら¹³⁾はヒト尿道平滑筋において収縮に関与する α -adrenoceptor は α_1 -subtype のみであって、 α_2 -subtype ではないことを明らかにしている。私は、これまでの諸家の報告を検討した結果、Anderson ら¹¹⁾の報告と国沢ら¹³⁾の報告の違いは性的な差に依るのかも知れないと考えるようになった。そこで、尿道平滑筋の収縮に関与する α -adrenoceptor subtype を雄と雌とで比較する目的で、雄および雌ウサギ尿道平滑筋切片に種々の α 刺激剤および α 遮断剤を投与して収縮の反応を検討し、同時に、radioligand binding 法を用いてウサギ尿道平滑筋の α -adrenoceptor subtype の量を調べた。

実験対象および方法

約3.5kgの生後6カ月の雄雌白色ウサギを脱血屠殺し、近位尿道を摘出した。摘出した尿道から雄では前立腺を、雌では膀胱を剥離し輪状の尿道平滑筋のみとした。摘出した尿道平滑筋から膀胱に最も近い部分を約3mmの幅で輪状に切除し、尿道の後壁で開いて、幅3mm長さ10mmの平滑筋切片を作製した(図1)。

1. 収縮張力の測定

得られた尿道平滑筋切片を、95%O₂ + 5%CO₂を通

気した Krebs 液を満たした恒温槽内に牽引し、一端を4-0 絹糸を用いて恒温槽の底に固定し、他端を4-0 絹糸を介して Statham 製 UC-2型 force transducer に接続した。1gの基礎張力を負荷して基線が安定するまで約60分間放置した。基線が安定した後の基礎張力は約0.3gであった。

用量負荷曲線の作製：非選択的 α 刺激剤(norepinephrine, epinephrine)および選択的 α_1 刺激剤(phenylephrine)および選択的 α_2 刺激剤(clonidine)による用量負荷曲線(dose response curve)は、薬剤を濃度累積的に投与して作製し、ED₅₀を決定した。同一の筋切片で4つの薬剤による用量負荷曲線を作成する場合、1つの薬剤による曲線を作成してから4回37℃ Krebs 液で洗浄し、60分間放置してから次の薬剤による曲線を作成した。全ての切片において、常にまず norepinephrine による用量負荷曲線を作成し、4つの薬剤による用量負荷曲線が得られた後、再び norepinephrine を投与して最初に得られた最大収縮と同程度の収縮が得られることが確認できた切片だけを評価の判定に用いた。また最初の濃度の α 刺激剤を投与する10分前に β 遮断剤の propranolol 10⁻⁶M を投与しておいた。

解離定数(dissociation constant: KB)の決定：刺激剤として norepinephrine を使用し、選択的 α_1 遮断剤である prazosin (10⁻⁹~10⁻⁷M) および選択的 α_2 遮断剤である yohimbine (10⁻⁸~10⁻⁶M) の解離定数を Arunlakshana and Schild¹⁴⁾の方式によって決定した。即ち、norepinephrine による用量負荷曲線を作成

図1 雄および雌尿道平滑筋 muscle strip の作製

した後、Krebs 液で 4 回洗浄後 60 分間安定させた。一定濃度の遮断剤を槽内に投与し 30 分間反応させてから、遮断剤の存在下における norepinephrine による用量負荷曲線を作成し、さらに 4 回洗浄および 60 分間安定させた後にさらに高濃度の遮断剤を投与し同様の記録を行った。この際、遮断剤非存在下の norepinephrine による用量負荷曲線の最大収縮を 100% とした時、遮断剤存在下における最大収縮が 80% 以上のものを有効とした。Dose ratio (遮断剤存在下での norepinephrine による用量負荷曲線の ED_{50} /遮断剤非存在下での norepinephrine による用量負荷曲線の ED_{50}) を prazosin (10^{-9} , 10^{-8} および 10^{-7} M) および yohimbine (10^{-8} , 10^{-7} および 10^{-6} M) について計算し、解離定数を $KB = \text{遮断剤のモル濃度} / \text{Dose ratio} - 1$ なる式から算出した。受容体の薬理学的性質を知るために $pA_2 = -\log KB$ により pA_2 を求めた。

Schild plot: Arunlakshana and Schild¹⁴⁾によれば、横軸に $-\log$ (遮断剤のモル濃度)、縦軸に $\log$ (Dose ratio-1) をとった時、刺激剤と遮断剤が競合的に働いていれば直線の傾きは 1 であることが知られているので、prazosin, yohimbine の norepinephrine に対する Schild plot を作製し傾きを計算した。

2. Radioligand 結合実験

収縮張力の測定と同様にして採取した尿道平滑筋切片を 0℃ の Krebs 液に入れ、実体顕微鏡で尿道粘膜、脂肪および結合織をできるだけ取り除いた。液体窒素で瞬間凍結し、-70℃ で保存した。

凍結標本を解凍し約 50 倍量の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0, 25℃) 中で homogenize した。これを 4℃ 49000 × g で 20 分間遠心し上清を棄てた後、沈渣を回収し再び 4℃, 49,000 × g で 20 分 homogenize し、100 μm pore のナイロンメッシュフィルターで濾過した後、さらに再び 4℃, 49,000 × g で 20 分間遠心した。こうして得られた沈渣を 60 倍量の 25 mM glycylglycine buffer (pH 7.4, 25℃) に希釈溶解して assay に使用した。蛋白含有量は Lowry 法¹⁵⁾により牛のアルブミンを標準として測定した。

飽和結合実験：放射性 ligand と細胞膜中の受容体とを飽和状態まで結合させて、最大結合量 (maximum number of binding sites: Bmax) および解離実数 (equilibrium dissociation constant: KD) を求めた。細胞膜の試料と低濃度から高濃度までの [³H]-ligand とを 10^{-5} M phentolamine を加えた場合と加えない場合に分けて、23℃ で 30 分 incubation した。その incuba-

tion した混合液を Whatman GF/B フィルターで濾過した。濾過したフィルターを 50 mM Tris-HCl (pH 8.0, 25℃) 8~12 ml で洗浄した。洗浄後フィルターを回収し 10 ml のトルエンを基にした scintillation fluid を加えてフィルターに付着した放射能活性を 40~45% の回収効率で測定した。飽和結合実験は [³H] prazosin 0.02~1.0 nM および [³H] yohimbine 0.2~3.5 nM の範囲で行った。Bmax および KD は、結合実験で得られた飽和結合曲線を、Rosenthal の方法により、結合した ligand の量/結合しない ligand の量 (bound/free) を縦軸に、結合した ligand の量 (bound) を横軸にプロットした直線に変換して、直線と横軸との交点から Bmax を、直線の傾きの負の逆数から KD を算出した。

3. 薬剤

使用した薬剤およびアイソトープは次の如くである。1-norepinephrine bitartrate, 1-epinephrine bitartrate, 1-phenylephrine hydrochloride, prazosin hydrochloride および yohimbine hydrochloride (Sigma), phentolamine hydrochloride (Ciba-Geigy), [³H] prazosin (80.9 Ci/mmol) および [³H] yohimbine (80.9 Ci/mmol) (Amersham)。Prazosin, 10^{-3} M および yohimbine, 10^{-3} M は 70% エタノールに溶解し、蒸留水を用いて必要な濃度に調整した。全ての α 刺激剤は 1 mg/ml の ascorbic acid を含んだ蒸留水で溶解した。

4. 検定

有意差の検定には non-paired t-test を用い $p < 0.05$ を有意と判定した。

結 果

1. 収縮張力の測定成績

Norepinephrine, epinephrine および phenylephrine は雄ウサギ尿道平滑筋切片において、著明な用量依存性の収縮を引き起こした。雄ウサギ尿道平滑筋において clonidine も用量依存性の収縮を引き起こしたが、その収縮はかなり小さかった (図 2)。Norepinephrine, epinephrine, phenylephrine および clonidine による最大収縮値と ED_{50} 値を表 1 に示す。phenylephrine によって引き起こされる最大収縮は他の刺激剤によって引き起こされる最大収縮よりも有意に大きく、clonidine の ED_{50} 値は norepinephrine, epinephrine および phenylephrine の ED_{50} 値よりも有意に大きかった。

Norepinephrine, epinephrine, phenylephrine および clonidine のいずれも雌ウサギ尿道平滑筋切片にお

表1 雄、雌尿道平滑筋 muscle strip において種々の α 刺激剤が誘発する最大収縮値と ED₅₀ 値. 測定は 8~12 の muscle strip を用いて行い, 平均 $\pm$ S.E. で表した.

Agonists	Male		Female	
	Maximum		Maximum	
Norepinephrine	4052 $\pm$ 52	$3.5 \pm 0.4 \times 10^{-6}$	3150 $\pm$ 87	$3.5 \pm 0.2 \times 10^{-6}$
Epinephrine	3602 $\pm$ 308	$5.1 \pm 0.7 \times 10^{-6}$	3300 $\pm$ 108	$5.0 \pm 0.4 \times 10^{-6}$
Phenylephrine	4568 $\pm$ 240	$6.1 \pm 0.2 \times 10^{-6}$	3075 $\pm$ 75	$3.8 \pm 0.3 \times 10^{-6}$
Clonidine	783 $\pm$ 117	$15.0 \pm 0.2 \times 10^{-6}$	2327 $\pm$ 54	$2.8 \pm 0.3 \times 10^{-6}$

図2 雄および雌尿道平滑筋 muscle strip において norepinephrine (●), epinephrine (○), phenylephrine (■) および clonidine (□) の惹起する収縮反応の用量負荷曲線. 収縮張力は 8~12 の muscle strip の平均 $\pm$ S.E. で表した. *は control (投与前) と比較して有意な収縮を表している.

いて著明な用量依存性の収縮を発生させた (図2). Norepinephrine, epinephrine および phenylephrine によって誘発される収縮の大きさには有意差は認められなかった. また雌尿道平滑筋における norepinephrine, epinephrine, phenylephrine および clonidine のそれぞれの ED₅₀ 値の間には有意な差異は認められなかった (表1).

Norepinephrine および phenylephrine による最大収縮は雌尿道平滑筋よりも雄尿道平滑筋において有意に大きかった. clonidine による最大収縮は雄尿道平滑筋よりも雌尿道平滑筋において有意に大きかった. また, Epinephrine によって発生する最大収縮の大きさは雄と雌の尿道平滑筋において有意に異ならなかった. Norepinephrine と epinephrine の ED₅₀ 値は雄と雌の尿道平滑筋で有意に異ならなかったが, clonidine の ED₅₀ 値は雄と雌では異なり雌よりも雄において有意に大きかった.

Prazosin あるいは yohimbine を前投与しておいた時の norepinephrine による用量負荷曲線を図3に示し, prazosin, yohimbine のそれぞれの濃度における pA₂ の値を表2に示した. 雄尿道平滑筋においては, prazosin に対する pA₂ 値は, prazosin の濃度によって変わることなく, yohimbine に対する pA₂ 値も yohimbine の濃度が変わっても有意に変わらなかった. それに対し雌尿道においては, 10⁻⁹, 10⁻⁸ M prazosin に対する pA₂ 値は, 10⁻⁷ M prazosin に対する pA₂ よりも有意に大きく, 10⁻⁸ M yohimbine に対する pA₂ 値は, 10⁻⁷, 10⁻⁶ M yohimbine に対する pA₂ 値より有意に大きかった. さらに prazosin に対する pA₂ 値は雄と雌尿道において有意に異ならなかったのに対し, yohimbine に対する pA₂ は雄においてよりも雌において有意に大きかった.

雄尿道における prazosin, yohimbine に対する Schild plot の slope は, それぞれ 0.84 $\pm$ 0.16, 0.89 $\pm$ 0.08 で 1.0 と有意に異ならなかったが, 雌尿道における prazosin, yohimbine に対する Schild plot の slope はそれぞれ 0.49 $\pm$ 0.25, 0.42 $\pm$ 0.18 で 1.0 とは有意に異なっていた (図4).

2. Radioligand 結合実験成績

雄および雌尿道平滑筋における [³H] prazosin および [³H] yohimbine を用いた飽和結合実験の結果を表3に示す. [³H] prazosin binding に対する雄尿道の最

図3 種々の濃度の prazosin (α_1 遮断剤), yohimbine (α_2 遮断剤) 存在下での norepinephrine 投与時の雄, 雌尿道平滑筋 muscle strip の収縮反応の用量負荷曲線, 張力の値は遮断剤を使用しない時の norepinephrine による最大収縮を100%としてそれに対する割合で表した. 測定は12~18の muscle strip について行い平均として表した.

表2 雄, 雌尿道平滑筋における prazosin, yohimbine に対する pA_2 値. 刺激剤としては norepinephrine を用い, 測定は12~18の muscle strip で行った. 値は平均 $\pm$ S.E. で表した.

	Prazosin (M)			Yohimbine (M)		
	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
Male	8.83 ± 0.07	8.70 ± 0.16	8.50 ± 0.14	6.40 ± 0.13	6.25 ± 0.16	6.16 ± 0.18
Female	8.63 ± 0.13	8.54 ± 0.08	7.67 ± 0.09	8.08 ± 0.18	7.23 ± 0.09	7.05 ± 0.05

表3 雄, 雌尿道平滑筋に対する ^3H -ligand binding. 測定はそれぞれ6~8の尿道について行い, 結果は平均 $\pm$ S.E. で表した.

	^3H -Prazosin		^3H -Yohimbine	
	Bmax (fmol/mg)	K_D (nM)	Bmax (fmol/mg)	K_D (nM)
Male	32 ± 4	0.07 ± 0.01	34 ± 6	1.12 ± 0.07
Female	34 ± 2	0.08 ± 0.01	$122 \pm 12^*$	0.91 ± 0.05

* は雄と有意に異なることを示している.

大結合量 (Bmax) の値は $32 \pm 4 \text{ fmol/mg protein}$, 雌尿道の Bmax の値は $34 \pm 2 \text{ fmol/mg protein}$ であり類似していた. $[^3\text{H}]$ prazosin の binding における解離実数 (K_D) 値も, 雄, 雌で類似していた. それに対し,

$[^3\text{H}]$ yohimbine binding に対する Bmax 値は雄尿道では $34 \pm 6 \text{ fmol/mg protein}$, 雌尿道では $122 \pm 12 \text{ fmol/mg protein}$ であり著明に雌尿道において大きかった. しかし $[^3\text{H}]$ yohimbine に対する K_D 値は雄, 雌では

図4 雄、雌尿道平滑筋における prazosin (●) と yohimbine (○) に対する Schild plot.

とんど同じであった。

考 察

Norepinephrine および phenylephrine は雄、雌両方の尿道平滑筋において著明な収縮を誘発した。雄尿道では phenylephrine の誘発する最大収縮力は norepinephrine, epinephrine, clonidine の誘発する最大収縮力よりも有意に大きいのにに対し、雌尿道では nore-

pinephrine epinephrine, phenylephrine の誘発する最大収縮力はほとんど同じであった。また norepinephrine および phenylephrine の誘発する最大収縮力は雌尿道においてよりも雄尿道において有意に大きいのにに対し、epinephrine の誘発する最大収縮力は雄と雌の間で有意差はみられなかった。

Clonidine が誘発する収縮は、norepinephrine, epinephrine, phenylephrine の誘発する収縮よりも有意に小さいものであったが、clonidine による最大収縮力は雄よりも雌において有意に大きかった。Clonidine による最大収縮を norepinephrine による最大収縮力と比較すると、雄では約15%であるのにに対し、雌では約80%であった。しかも、clonidine による ED_{50} 値は雄より雌において有意に小さかった。これらの収縮張力を測定した薬理学的成績は、雌尿道平滑筋は雄尿道平滑筋よりも有意に大きな α_2 受容体の機能を有することを示唆している。

$[^3H]$ prazosin および $[^3H]$ yohimbine は α 受容体の subtype を調べるための ligand として既に脳¹⁶⁾、心臓¹⁷⁾、肺¹⁷⁾¹⁸⁾、血管¹⁹⁾等の組織で用いられている。私は雄および雌ウサギ尿道平滑筋において $[^3H]$ prazosin および $[^3H]$ yohimbine を用いて α_1 および α_2 受容体の最大結合量を調べた。その結果、雄尿道平滑筋よりも雌尿道平滑筋において有意に高い密度で α_2 受容体が存在し、一方 α_1 受容体は雄、雌尿道で同程度に存在することが判明した。

pA_2 値は受容体の性質を知るために有効な指標である。Doxey²⁰⁾らは prazosin が α_1 受容体と反応する場合の pA_2 値は8.2前後であるのにに対し、 α_2 受容体と反応する場合の pA_2 値は6.6以下であり、一方 yohimbine が α_1 受容体と反応する場合の pA_2 値は6.4前後であるのにに対し、 α_2 受容体と反応する場合の pA_2 値は、8.2前後であると報告している。Ruffolo²¹⁾らも yohimbine の pA_2 値について、 α_1 受容体と反応する場合は5.5~6.8、 α_2 受容体と反応する場合は7.2~8.4であることを報告している。私の結果は、ウサギ雄尿道においては prazosin の pA_2 値は8.50~8.83、yohimbine の pA_2 値は6.16~6.40であったことから、雄尿道では prazosin も yohimbine も α_1 受容体と反応していることを示し、ウサギ雄尿道における norepinephrine の収縮反応には α_1 受容体のみが関与することを示唆している。しかし、radioligand binding の実験結果からウサギ雄尿道には α_2 受容体も存在することは明らかであり、わずかではあるが、選択的 α_2 刺激剤の clonidine

によって雄尿道が収縮した事実は、ウサギ雄尿道収縮における α_2 受容体の関与を否定できないことを示唆している。一方、ウサギ雌尿道においては prazosin 10^{-9} M, 10^{-7} M における pA_2 値はそれぞれ 8.6, 7.7 であり, yohibine 10^{-8} M, 10^{-6} M における pA_2 値はそれぞれ 8.1, 7.1 であった。この結果は雌尿道においては prazosin は 10^{-9} M では主に α_1 受容体と結合し, 10^{-7} M では α_1 , α_2 の両方の受容体と結合することを示している。同様 yohimbine は 10^{-8} M では主に α_2 受容体と結合し, 10^{-6} M では α_1 , α_2 両方の受容体と結合することを示している。

Arunlakshana and Schild¹⁴⁾によれば、横軸に遮断薬のモル濃度の負対数、縦軸に (dose ratio-1) の対数をとった時、組織において作動薬の遮断薬に対し競合的に働いていれば、その直線の slope は 1.0 であることが知られている。即ち Schild plot の slope が 1.0 であるならば組織の受容体の単一性が示唆される。私の結果は、雄尿道においては slope は 1.0 と有意に異なっておらず α 受容体の単一性、即ち subtype が α_1 のみであることを示唆しているが、雌尿道においては slope は prazosin, yohimbine とともに 1.0 より有意に小さく、1.0 とは異なっており、雌尿道では α 受容体は単一ではなく α_1 と α_2 の混合であると考えられた。

Radioligand binding 実験結果において、雄と雌の尿道において [3 H] prazosin の最大結合量がほぼ同じであったにも拘らず、選択的 α_1 刺激剤である phenylephrine は、雌尿道平滑筋よりも雄尿道平滑筋において約 50% も大きな収縮を誘発した。この事実は、尿道平滑筋の α_1 受容体を介して誘発される収縮張力が、単にひとつの subtype によって決定されるものでなく、 α_2 受容体の密度が雄と雌の尿道において著明に異なっている (雄: 34fmol/mg, 雌: 122fmol/mg) ことが、 α_1 受容体を介する反応にも影響を及ぼしている可能性を示唆している。また、 α_2 受容体刺激剤である clonidine が雄尿道ではほんの小さな収縮しか惹起しなかったにも拘らず雌尿道では norepinephrine の約 80% にも達する大きな収縮を惹起した事実は、雌においては、雄尿道の約 4 倍もの高密度で存在する α_2 受容体が尿道の収縮の役割をも担っていることを示唆している。

Estrogen を投与されたウサギの子宮²²⁾において、 α 受容体の密度が増えることは良く知られており、Larsson²³⁾らは estrogen を投与されたウサギの尿道では、 α_2 受容体の数が増すと同時に norepinephrine に対する収縮反応が大きくなることを報告している。本

研究において明らかになったように、尿道平滑筋における α_1 , α_2 の受容体の密度と α_1 , α_2 刺激剤に対する尿道平滑筋の反応が雄と雌で著明に異なっており、尿道平滑筋における α 受容体 subtype の分布と機能には性差が存在することは、尿道平滑筋における estrogen の役割を表しているのかも知れない。

References

- 1) Awad, S.A. and Downie, J.W.: The effect of adrenergic drugs and hypogastric nerve stimulation on the canine urethra. *Invest. Urol.*, 13, 298—301, 1976.
- 2) Donker, P.J., Ivanovici, F. and Noach, E.L.: Analysis of the urethral pressure profile by means of electromyography and the administration of drugs. *Br. J. Urol.*, 44, 180—193, 1972.
- 3) Ek, A., Alm, P., Anderson, K.E. and Persson, C. G.A.: Adrenoceptor and cholinergic mediated responses of the isolated human urethra. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 11, 97—102, 1977.
- 4) Hassouna, M., Abdel-Hakim, A., Abdel-Rahman, M., Galeano, C. and Elhilali, M.: Responses of the urethral smooth muscles to pharmacological agents. I. Cholinergic and adrenergic agonists and antagonists. *J. Urol.*, 129, 1262—1264, 1983.
- 5) Larsson, B.: Demonstration of alphaadrenoceptors in the rabbit bladder base and urethra with 3 H-dihydroergocryptine ligand binding. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 52, 188—194, 1983.
- 6) Levin, R.M. and Wein, A.J.: Quantitative analysis of alpha and beta adrenergic receptor densities in the lower urinary tract of the dog and the rabbit. *Invest. Urol.*, 17, 75—77, 1979.
- 7) Benson, G.S., Jacobowitz, D., Raezer, D.M., Corriere, J.N. Jr. and Wein, A.J.: Adrenergic innervation and stimulation of canine urethra. *Urology*, 7, 337—340, 1976.
- 8) Gosling, J.A., Dixon, J.S. and Lendon, K.G.: The autonomic innervation of the human male and female bladder neck and proximal urethra. *J. Urol.*, 118, 302—305, 1977.
- 9) Sundin, T. and Dahlstrom, A.: The sympathetic innervation of the urinary bladder and urethra in the normal state and after parasympathetic denervation at the spinal root level. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 7, 131—149, 1973.
- 10) Watanabe, H. and Yamamoto, T.: Autonomic innervation of the muscles in the wall of the bladder and proximal urethra of male rats. *J.*

- Anat., 128, 873—886, 1979.
- 11) Andersson, K.E., Larsson, B. and Sjogren, C.: Characterization of the α -adrenoceptors in the female rabbit urethra. *Br. J. Pharmac.*, 81, 293—300, 1984.
 - 12) John, A.: Alpha and beta-adrenergic and muscarinic cholinergic binding sites in the bladder and urethra of the rabbit. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 61, 61—66, 1982.
 - 13) Kunisawa, Y., Kawabe, K., Nijima, T., Honda, K. and Takenaka, T.: A pharmacological study of alpha adrenergic receptor subtypes in smooth muscle of human urinary bladder base and prostatic urethra. *J. Urol.*, 134, 396—398, 1985.
 - 14) Arunlakshana, O. and Schild, H.O.: Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmac.*, 14, 48—58, 1959.
 - 15) Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
 - 16) Bylund, D.B.: Heterogeneity of alpha 2 adrenergic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 22, 835—843, 1985.
 - 17) Latifpour, J. and McNeill, J.H.: Cardiac autonomic receptors: Effect of long term experimental diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 230, 242—249, 1984.
 - 18) Latifpour, J., Jones, S.B. and Bylund, D.B.: Characterization of [3 H] yohimbine binding to putative alpha-2 adrenergic receptors in neonatal rat lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 223, 606—611, 1982.
 - 19) Bobic, A.: Identification of alpha-adrenoceptor subtypes in dog arteries by 3 H-yohimbine and 3 H-prazosin. *Life Sci.*, 30, 219—228, 1982.
 - 20) Doxey, J.C., Smith, C.F.C. and Walker, J.M.: Selectivity of blocking agents for pre- and postsynaptic α -adrenoceptors. *Br. J. Pharmac.*, 60, 91—96, 1977.
 - 21) Ruffolo, R.R. Jr., Waddell, J.E. and Yaden, E.L.: Postsynaptic alpha adrenergic receptor subtypes differentiated by yohimbine in tissues from the rat. Existence of alpha-2 adrenergic receptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 217, 235—240, 1981.
 - 22) Roberts, J.M., Insel, P.A., Goldfein, R.D. and Goldferin, A.: Alpha adrenoceptors but not beta-adrenoceptors increases in rabbit uterus with estrogen. *Nature (London)*, 270, 624—625, 1977.
 - 23) Larsson, B., Andersson, K.E., Batra, S., Mattiasson, A. and Sjogren, C.: Effects of estradiol on norepinephrine-induced contraction, alpha adrenoceptor number and norepinephrine content in the female rabbit urethra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 229, 557—563, 1984.

(1988年11月28日受理)