α_1 -アドレナリン受容体を介する反応に対する Isradipine の作用と その加齢に伴う変化

金井三良,^{*,a} 芦川直也,^b 佐藤光利^b

東邦大学医学部附属大森病院薬剤部,^{*,a} 東邦大学薬学部^b

Age-Related Alteration of Inhibitory Effects of Isradipine on α_1 -Adrenoceptor Mediated Responses

Saburo KANAI,^{*,a} Naoya ASHIKAWA,^b and Mitsutoshi SATOH^b

Department of Pharmacy, Toho University School of Medicine, Omori Hospital,^a

Omori-nishi 6-11-1, Ota-ku, Tokyo 143, Japan and Department of

Chemical Pharmacology, Toho University School of

Pharmaceutical Sciences,^b Miyama 2-2-1,

Funabashi, Chiba 274, Japan

(Received May 16, 1996)

We studied age-related alteration of inhibitory effects of a Ca^{2+} channel antagonist, isradipine, on α_1 -adrenoceptor mediated responses in 6-, 10-, and 40-week-old rats.

Age-related changes were observed in the inhibitory effects of isradipine on the norepinephrine-induced maximum contractions in the isolated thoracic aorta, the amplitude of the Ca^{2+} -evoked increase of intracellular Ca^{2+} concentration and sustained contraction in fura-2-loaded preparations and the maximum number of binding sites (B_{max}) of [^3H](+)-isradipine to aortic membranes. The dissociation constant (K_D) of [^3H](+)-isradipine did not alter with age. In anesthetized rats, isradipine inhibited the dose-response curves of norepinephrine on the blood pressure in 6- and 40-week-old animals more effectively than those in 10-week-old animals. An inverse relationship between the potency of norepinephrine in the isolated thoracic aorta, the inhibitory effects of isradipine on the norepinephrine-induced maximum contractions and the logarithm of B_{max} obtained in the [^3H](+)-isradipine binding experiment were found.

These results suggest that the age-related alteration of inhibitory effects of isradipine on α_1 -adrenoceptor mediated contractile responses and the increase of blood pressure are due to changes in the α_1 -adrenoceptor density and the population of voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels, rather than changes in the affinity of drug to the α_1 -adrenoceptor or Ca^{2+} -sensitivity of contractile elements of aortic smooth muscle.

Key words—ageing; α_1 -adrenoceptor; Ca^{2+} channel; blood pressure; contractile response; rat thoracic aorta

緒

言

血管平滑筋細胞の Ca^{2+} チャネルを介して調節される細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) は、血管の緊張を調節する重要な因子であり、このことは亢進した血管の緊張や血圧が、 Ca^{2+} チャネル拮抗薬で低下することからも明らかである。ところで、これらの反応は加齢に伴って変化し、た

例えば 摘出ラット胸部大動脈標本において, norepinephrine の収縮反応に対する Ca^{2+} チャネル拮抗薬 diltiazem の抑制作用は, 幼若ラットより成熟ラットの方が顕著なことが知られている。¹⁻³⁾ また, 高齢ラットで認められる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの機能的変化に由来しているとの報告,⁴⁻⁷⁾ あるいは加齢に伴った $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化が L 型 Ca^{2+} チャネル数の変化に由来するとの報告もある。^{8,9)} 著者らはこれまでの実験から, norepinephrine による収縮に及ぼす L 型 Ca^{2+} チャネル拮抗薬 isradipine の抑制作用が, 3 週齢から 10 週齢まで週齢と共に低下し, 10 週齢から 40 週齢まで増強したことを報告した。⁹⁾ この抑制作用の変化と Ca^{2+} による持続的収縮の大きさには有意な相関があったことから, isradipine の抑制作用の週齢による変化が Ca^{2+} チャネル数の変化に依存し, 動脈平滑筋の収縮要素に対する Ca^{2+} 感受性の変化には依存しないことを示唆した。⁹⁾

今回 norepinephrine の血管収縮反応に対する isradipine の抑制作用に及ぼす加齢の影響とその機序を明らかにする目的で, 6, 10, 40 週齢ラットの摘出胸部大動脈標本に fura-2 を付加し, 張力と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を同時に測定した。また胸部大動脈膜標本における $[^3\text{H}](+)\text{-isradipine}$ の結合数と親和性の変化を検討した。さらに, 6, 10, 40 週齢の麻酔ラットで, norepinephrine の血圧上昇反応に及ぼす isradipine の抑制作用について, 加齢に伴う影響についても検討した。

実 験 の 部

1. 摘出胸部大動脈を用いた機械的実験 ① Norepinephrine による収縮実験——6, 10, 40 週齢の Wistar 系雄性ラットの頭部を殴打し, 頸動脈より放血致死させた後, 胸部大動脈を摘出した。内皮依存性の血管反応を除外するため, 血管内腔表面を綿棒で約 20 回軽く擦って内皮細胞を剥離し, 長さ 10 mm, 幅 2 mm のラセン状標本作製した。この標本を, 95% O_2 -5% CO_2 混合ガス通気下で 37°C の Krebs 液 (NaCl 118 mM, KCl 4.95 mM, CaCl_2 2.54 mM, MgSO_4 1.20 mM, NaHCO_3 25 mM, KH_2PO_4 1.19 mM, ブドウ糖 11 mM) 20 ml の入ったオルガンバス中に懸垂した。標本は, 6 週齢では 0.7 g, 10 週齢と 40 週齢では 1.0 g に相当する一定の負荷をかけて, 等張性に収縮反応を記録した。なお, 実験前に acetylcholine (1×10^{-6} M) 投与による弛緩反応が認められないことによって内皮細胞の機能消失を確認した。実験は, 標本を 1 時間静置して定常状態になった後, norepinephrine を 1×10^{-10} M から 1×10^{-6} M まで 9 段階の濃度範囲で低濃度より漸次累積投与した。この時得られた最大反応を 100% として反応率を求め濃度反応曲線を得た。Norepinephrine の効力の指標としては, 最大反応の 50% を起こす活性薬の濃度 (EC_{50}) の負対数値を示す pD_2 値を使用した。収縮反応は, 張力トランスジューサー (ME-4012, M.E. Commercial) 及びアンプ (ME-4013, M.E. Commercial) を介しレコーダー (R-21, M.E. Commercial) 上に記録した。

② Isradipine 存在下における Norepinephrine による収縮実験——Isradipine 3×10^{-9} , 3×10^{-8} 及び 3×10^{-7} M を添加し 30 分後, 前述の単独投与実験と同様に norepinephrine を低濃度から漸次累積投与した。Norepinephrine 単独投与時の最大収縮反応を 100% として反応率を求め濃度反応曲線を得た。

③ 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\text{R}_{340/380}$)) 及び収縮の同時測定——実験は佐藤ら¹¹⁾ 及び唐木ら¹²⁾ が報告した方法で行った。試験管に Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura-2/AM を 1 mM 含む DMSO 溶液 20 μl をとり, 界面活性剤 Clemophor EL 8 μl を加えてよく練合した後, 栄養液 (normal-PSS) 4 ml を加え攪拌, さらに 5 分間超音波処理し, 5 μM fura-2/AM を含む栄養液とした。この栄養液に前述のように作製したラセン状標本を浸し, 1 時間毎に栄養液を交換しながら 3 時間イン

キュベートし細胞内に fura-2/AM を取り込ませた。インキュベート終了後、100% O₂ ガスを通した 37°C の栄養液中に標本を 10 分間浸して細胞外 fura-2/AM を除去した。この標本を細胞内カルシウム測定装置 (CAF-100, 日本分光, 東京) に取り付けられたオルガンバス中に 2 本のステンレススチールワイヤーで水平に固定し、0.5 g の張力を負荷させ、10 分間放置し定常状態にした。細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) は、340 nm と 380 nm の二波長励起による 500 nm の蛍光比 (R_{340/380}) を求め指標とした。バス内に高濃度 K⁺ 栄養液 (K⁺ として 72.5 mM) を繰り返し投与し、カリウムによる収縮及び R_{340/380} が一定になった時の反応を 100% とした。Ca²⁺ による収縮を測定する際は、バス内を Ca²⁺-free 栄養液に置換し 5 分間放置した後、norepinephrine 1×10⁻⁶ M を投与し、収縮が一定になってから、isradipine 3×10⁻⁷ M を添加し 15 分後に Ca²⁺ 2 mM を投与した。この時の収縮と R_{340/380} 値の変化を同時に測定した。なお実験はすべて暗所にて室温で行った。

2. 血管平滑筋膜画分の調製と結合実験 ① 膜画分の調製——ラットから胸部大動脈を摘出し結合組織と内皮を注意深く除去した後十分に細切し、氷冷した Tris 緩衝液 (Tris HCl 5 mM, Sucrose 0.25 M, pH 7.4) 10 ml に懸濁し、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。これを 4°C で 5000×g, 20 分間遠心して上清を冷却超遠心分離機により 4°C で 100000×g, 60 分間遠心分離した。沈査を同量の緩衝液 (Tris HCl 5 mM, pH 7.4) で懸濁し、再度 4°C で 100000×g, 60 分間遠心分離した。ここで得られた沈査を緩衝液で再懸濁させ結合実験に使用した。蛋白定量は、Lowry ら¹³⁾ の方法で行い、標準液としてウシ血清アルブミン (Sigma, 東京) を使用した。

② 結合実験——受容体標識リガンドとして [³H](+)-isradipine (比活性 83 Ci/mmol, New, Boston, U.S.A.) を用いた。膜画分を、0.1 nM から 2.0 nM まで 7 濃度の [³H](+)-isradipine Tris HCl 緩衝液中で 25°C で 30 分間インキュベートした後、あらかじめ 0.1% ポリエチレンイミン処理しておいたガラス線維濾紙 (Whatman GF/B) で急速吸引濾過して反応を中止させた。濾紙は冷却した 4 ml の緩衝液で 3 回洗浄後、液体シンチレーションカウンター (LSC-100, アロカ, 東京) で放射活性 β 線量 (dpm) を測定した。実験はすべて duplicates で各週齢 4 回ずつ行った。[³H](+)-Isradipine の特異的結合は、[³H](+)-isradipine の総結合から 10 μM の非放射性 isradipine を添加した時に得られた非特異的結合を差し引いた値として求めた。[³H](+)-Isradipine 結合の解離定数 (K_D) と最大結合数 (B_{max}) すなわちチャネル数は、Scatchard 解析¹⁴⁾ により算出した。また、Hill 定数は Hill 解析によって求めた。

3. 麻酔ラットの血圧測定 6, 10, 40 週齢の Wistar 系雄性ラット (体重は 6 週齢が 216±5 g, n=7, 10 週齢が 386±11 g, n=9, 40 週齢が 632±18 g, n=6) を、urethane 600 mg/kg, i.p., α-chloralose 60 mg/kg, i.p. で麻酔し、大腿動脈に血圧測定用カニューレを、大腿静脈には薬物注入用カニューレを装着した。実験は気管カニューレを装着し人工呼吸器 (SN-480-7, シナノ製作所) による管理下で行った。Norepinephrine は、0.1 μg/kg から 100 μg/kg まで 7 段階の濃度範囲で、血圧及び心拍数が基線に復帰するまで 5 分以上の間隔をおいて、低用量より順次投与した。血圧は、α₁-アドレナリン作動薬 (norepinephrine) の血管に対する反応をより反映するとされる拡張期血圧の増加を指標とし、最大投与量 100 μg/kg の投与後における拡張期血圧の増加を 100% とし、反応率を求め用量反応曲線を得た。効力の指標として最大反応の 50% の反応を起こす活性薬の投与量 (ED₅₀) を用いた。Isradipine は、100 μg/kg を緩徐に投与し、少なくとも 15 分おいてから、前述と同様に norepinephrine を投与した。血圧は、圧力トランスジューサー (MPU-0.5A) 及びひずみ圧力用アンプ (AP-621G, 日本光電工業) を介しレコーダー (WR3310,

Graphtec) 上に記録した。

4. 統計処理 得られた実験結果は、平均値±標準誤差で示した。統計処理は、Duncan の多重検定法と Student's *t*-test を用い、危険率 0.05 以下で有意差ありと判定した。

5. 試薬 使用した主な試薬を次に示す。

(-)Norepinephrine hydrogen tartrate monohydrate, α -chloralose, heparin sodium, polyethyleneimine (和光純薬, 大阪); isradipine(($\pm$)-PN200-110) (RBI, Natick, MA, USA); fura-2 pentaacetoxymethylester (fura-2/AM), ethyleneglycolbis (β -aminoethylether) *N,N'*-tetraacetic acid (EGTA), ethylenediamine *N,N'*-tetraacetic acid (EDTA·2Na), *N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-ethanesulphonic acid (HEPES), *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridyl-methyl)ethylenediamine (TPEN) (同人堂化学, 熊本); Cremophor EL (ナカライ化学, 京都); acetylcholine chloride, tris[hydroxymethyl]aminomethane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.); [3 H]isradipin (PN200-110) (specific activity 83 Ci/mmol, NEN, Boston, U.S.A.).

他の試薬はすべて特級を使用した。いずれも粉末で, isradipine は methanol に溶解後, 蒸留水で使用する濃度まで希釈し遮光して使用した。他の薬物は蒸留水に溶解して使用した。

結 果

1. Norepinephrine の血管収縮反応に対する Isradipine の影響

ラットの摘出胸部大動脈標本に対する norepinephrine による血管収縮反応は週齢依存性が認められ, norepinephrine の pD_2 値は 6 週齢から 10 週齢まで加齢と共に有意に増加 ($p < 0.01$) し, その後 10 週齢から 40 週齢までは有意に減少 ($p < 0.05$) した。Isradipine は norepinephrine の収縮反応を濃度依存的に抑制し, 最大収縮反応の抑制率は, 6 週齢から 10 週齢まで加齢と共に有意に減少 ($p < 0.01$) し, その後 10 週齢から 40 週齢までは有意に増加 ($p < 0.05$) した (Fig. 1 及び Table 1)。

2. 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$)) と Ca^{2+} による収縮の同時測定

Fura-2 を付加した標本で, Ca^{2+} 除去下 norepinephrine (10^{-6} M) の投与により, 一過性の $[Ca^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) の上昇と収縮, さらにこれに続く持続的な収縮が認められた。持続的な収縮は

Fig. 1. Inhibitory Effects of Isradipine on Concentration Response Curves for Norepinephrine in Aorta from (A) 6-, (B) 10- and (C) 40-week-old Rats

Ordinate: percent of maximum response to norepinephrine (10^{-6} M). Abscissa: logarithm of molar concentration of norepinephrine. ●, ○, ▲ and △ represent norepinephrine alone, and with isradipine at 3×10^{-9} M, 3×10^{-8} M, 3×10^{-7} M, respectively. Each value is presented as the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments.

Table 1. The pD₂ Values of Norepinephrine and Maximum Inhibition by Isradipine to the Norepinephrine-Induced Contraction in the Aorta from Rats of Different Ages

Age (week)	pD ₂ value			Maximum inhibition (%)
	Untreated	Isradipine (3 × 10 ⁻⁸ M)	Isradipine (3 × 10 ⁻⁷ M)	
6	7.96 ± 0.01 ^{a)}	7.48 ± 0.11	7.23 ± 0.07	61.2 ± 3.2 ^{a)}
10	8.58 ± 0.05	7.62 ± 0.05	7.58 ± 0.06	39.4 ± 3.2
40	8.08 ± 0.02 ^{b)}	7.74 ± 0.05	7.40 ± 0.03	48.9 ± 2.5 ^{b)}

Each value is presented as the mean ± S.E. of 4 experiments. Statistical significance was calculated by Duncan's new multiple test. a) $p < 0.01$. Significantly different from the value obtained in the strips from 10 weeks old rats. b) $p < 0.05$. Significantly different from the value obtained in the strips from 10 weeks old rats.

isradipine (3×10^{-7} M) の投与によって変化しなかったが, Ca^{2+} (2 mM) の添加によって, 持続的な収縮の増強と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) の上昇が観察された (Fig. 2). 高濃度 K^+ による反応に対する Ca^{2+} 添加後の持続的な収縮の割合及び $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) 上昇の割合は, 6 週齢から 10 週齢まで加齢と共に有意に増加 ($p < 0.05$) したが, その後 10 週齢から 40 週齢までは有意に減少 ($p < 0.05$) した (Table 2). しかし, 収縮張力と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) の変化との相関関係には週齢の違いが認められなかった.

3. 血管平滑筋膜画分に対する [³H](+)-Isradipine の結合実験

血管平滑筋膜画分は, 湿重量 1 g 当り蛋白 0.5—0.8 mg を含み, 週齢による違いはなかった. ラットの各週齢で, 摘出胸部大動脈膜画分に対する [³H](+)-isradipine の特異的結合量 (0.1—2.0 nM) は [³H](+)-isradipine として 1.5—2.0 nM の濃度で定常状態に達し飽和した (Fig. 3). 特異的結合の Scatchard plot は直線となり, Hill plot から得られた Hill 定数が約 1 であることより, [³H](+)-isradipine と Ca^{2+} チャネルは 1:1 に結合し, 高親和性 ($K_D = 0.28—0.64$ nM) を示した. 一方, 非特異的結合は [³H](+)-isradipine 濃度依存性の直線となり, 全結合の 5—58% を占めた. [³H](+)-Isradipine の最大結合数 ($B_{\max}$) は, 6 週齢から 10 週齢まで加齢と共に有意に減少 ($p < 0.01$) したが, その後 10 週齢から 40 週齢まで有意に増加 ($p < 0.01$) した. しかし, [³H](+)-isradipine の解離定数 (K_D) は, 週齢によって変化しなかった (Table 3).

4. 麻酔ラットの血圧測定 (Norepinephrine による血圧上昇に対する Isradipine の影響)

麻酔ラットを用いた実験で, 薬物投与前の心拍数は, 6 週齢が 458 ± 10 回/分 ($n = 7$), 10 週齢が 427 ± 11 回/分 ($n = 9$), 40 週齢が 414 ± 10 回/分 ($n = 6$) で, 拡張期血圧は, 6 週齢が 56.6 ± 3.3 mmHg ($n = 7$), 10 週齢が 58.3 ± 4.3 mmHg ($n = 9$), 40 週齢が 59.0 ± 4.4 mmHg ($n = 6$) であり, それぞれ週齢による違いはなかった. 拡張期血圧は, norepinephrine の投与量に依存して上昇し, 100—300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で血圧上昇反応は最大となった. Fig. 4 に, norepinephrine 単独投与及び isradipine (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) 前処理後の norepinephrine の用量反応曲線を示した. Norepinephrine の ED₅₀ 値は, 6 週齢から 10 週齢まで加齢と共に有意に減少 ($p < 0.01$) したが, その後 10 週齢から 40 週齢まで有意に増加 ($p < 0.05$) した (Table 4). Isradipine (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) の投与後, norepinephrine の用量反応曲線は右に平行移動し, その阻害効力の程度が 10 週齢ラットは 6 週齢及び 40 週齢ラットに比較して少ないことから, 10 週齢ラットは 6 週齢及び 40 週齢ラットに比較して isradipine に対する感受性が高いことが示された.

Fig. 2. Typical Traces of Intracellular Ca^{2+} Concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) and Tension in Fura-2-loaded Aortic Strips from (A) 6-, (B) 10- and (C) 40-week-old Rats

Preparations were contracted with 72.5 mM KCl physiological saline solution (K^+ -PSS) (K) as indicated by the striped line. Ca^{2+} free PSS was indicated by the open bar. Nor-epinephrine (NE 10^{-6} M) was applied as indicated by the bar. Isradipine (ISR 3×10^{-7} M) was applied as indicated by the hatched bar.

Table 2. Ca^{2+} -Evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) and Tension with Isradipine Pretreatment in the Presence of Norepinephrine

Age (week)	<i>n</i>	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) (%)	Tension (%)
6	4	$45.73 \pm 3.71^a)$	$32.80 \pm 3.70^a)$
10	4	55.03 ± 2.67	47.00 ± 1.78
40	4	$49.73 \pm 1.98^a)$	$38.18 \pm 3.64^a)$

Each value is presented as mean $\pm$ S.E. for *n* experiments. *a)* $p < 0.05$. Significantly different from the value obtained in the strips from 10 weeks old rats.

Fig. 3. Saturation Binding (1), Scatchard Plot (2) and Hill Plot (3) of [^3H](+)-Isradipine to Membranes Prepared from (A) 6-, (B) 10- and (C) 40-week-old Rats

Increasing concentrations of [^3H](+)-isradipine (0.1–2.0 nM) were bound to membranes. Non-specific binding was defined as that which was saturable and best fit was determined with a one-site model (Munson and Rodbard, 1980). The data shown are means of duplicate determinations in a representative experiment. (○) total binding, (▲) non-specific binding, (●) specific binding.

考 察

加齢に伴う変化は, norepinephrine の最大収縮反応に対する isradipine の抑制率, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) の上昇度, 大動脈膜画分に対する [^3H](+)-isradipine の最大結合数 (B_{max}) で認められ

Table 3. Maximum Binding ($B_{\max}$), Apparent Dissociation Constant (K_D) and Hill Coefficient Obtained from Specific Binding of [^3H]Isradipine to Membrane Preparations from Rat Thoracic Aorta of Different Ages

Age (week)	<i>n</i>	$B_{\max}$ (fmol/mg protein)	K_D (nM)	Hill coefficient
6	4	$152.1 \pm 29.6^a)$	0.28 ± 0.07	1.06 ± 0.07
10	4	64.6 ± 4.6	0.49 ± 0.22	1.01 ± 0.11
40	4	$110.7 \pm 12.4^a)$	0.64 ± 0.06	0.99 ± 0.01

Each value is presented as the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments. a) $p < 0.01$. Significantly different from the value obtained in the strips from 10 weeks old rats.

Fig. 4. Effects of Isradipine on Percentage Changes of Diastolic Blood Pressure Induced by Norepinephrine in Anesthetized (A) 6-, (B) 10- and (C) 40-week-old Rats

Ordinate: percentage of diastolic blood pressure induced by norepinephrine ($100 \mu\text{g/kg}$ i.v.). Abscissa: logarithm of μg per body weight (kg) of norepinephrine. (●) norepinephrine alone, (○) with isradipine ($100 \mu\text{g/kg}$ i.v.)-pretreatment 20 min before the application of norepinephrine. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of value from 9–10 experiments.

Table 4. The ED_{50} Values of Norepinephrine-Induced Diastolic Blood Pressure Increment with Isradipine Pretreatment or Untreatment in the Rats of Different Ages

Age (week)	<i>n</i>	Untreatment	Isradipine ($100 \mu\text{g/kg}$)
6	9	$16.3 \pm 3.8^b)$	$44.1 \pm 3.9^a)$
10	10	3.0 ± 0.3	6.9 ± 1.4
40	9	6.6 ± 2.2	$29.0 \pm 7.5^b)$

ED_{50} , the dose producing 50% of maximum pressure response. Each values represented as a mean $\pm$ S.E. for *n* experiments. Statistical significance was calculated by Duncan's new multiple test. a) $p < 0.01$. Significantly different from the values obtained from 10 weeks old rats. b) $p < 0.05$. Significantly different from the values obtained from 10 weeks old rats.

た。しかし [^3H](+)-isradipine の解離定数 (K_D) には変化が認められなかった。また、麻酔ラットの血圧実験で、10週齢ラットは他のラットに比較して isradipine に対する感受性が高いことが明らかになった。これらの結果は、 α_1 -アドレナリン受容体機構を介する血管収縮反応と血圧上昇反応に及ぼす isradipine の抑制作用の加齢に伴う変化が、 α_1 -アドレナリン受容体数又は Ca^{2+} チャネル数の変化と密接な関わりを持っていることを示している。

これまでのラットを用いた実験で、 α_1 -アドレナリン受容体を介した血圧上昇反応と血管収縮

反応に及ぼす加齢の影響について、phenylephrine の効力と $[^3\text{H}](+)\text{-prazosin}$ の最大結合数 ($B_{\max}$) との関係を検討し、phenylephrine による血圧上昇及び胸部大動脈標本での収縮反応の加齢に伴う変化は、主として α_1 -アドレナリン受容体数の変化によるものであり、受容体の感受性の変化あるいは受容体を介した反応過程の変化ではないことを明らかにした。¹⁰⁾ 高柳ら³⁾ は α_1 -アドレナリン受容体数の変動と norepinephrine による収縮とが相関していることを収縮実験から示唆し、さらに佐藤ら⁹⁾ は $[^3\text{H}](+)\text{-prazosin}$ を用いた結合実験によって、加齢に伴う α_1 -アドレナリン受容体数の変動が norepinephrine による収縮と相関することを示した。また Ca^{2+} チャネルを介した血管収縮機構に及ぼす加齢の影響については、norepinephrine の血管収縮反応に対する Ca^{2+} 拮抗薬 isradipine の血管収縮抑制作用の変化が、 Ca^{2+} チャネル数又は感受性の変化によるもので収縮要素に対する Ca^{2+} 感受性の変化ではないことを示唆した。⁹⁾

本報で示した norepinephrine の血管収縮反応と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) の上昇に対する isradipine の抑制作用についての成績は、佐藤らがすでに報告しているように norepinephrine の収縮に及ぼす isradipine の濃度反応曲線より算出された阻害効力 (pIC_{50}) は変化しないが、isradipine による最大抑制率が、3 週齢から 10 週齢まで週齢と共に減少し、その後 10 週齢から 40 週齢まで増加するとの報告⁹⁾ さらに Ca^{2+} 除去液中 isradipine 存在下における norepinephrine 処理後 Ca^{2+} の添加によって生じた持続的収縮の程度も同様な結果を示したとの報告⁹⁾ によっても支持される。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) と収縮張力の変化の関係から得られた回帰直線の傾き (感受性) は週齢間に有意差が認められなかったことから、各週齢のラット大動脈には収縮要素の Ca^{2+} 感受性に違いがないことが分かる。したがって、norepinephrine 及び isradipine 存在下での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) と収縮の加齢に伴う変化は、血管平滑筋での Ca^{2+} に対する収縮機構の感受性の変化には依存しないことになる。さらに、Fig. 5 に示したようにこの実験条件で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($R_{340/380}$) と収縮張力には正の相関が見られた。また、 Ca^{2+} 除去液中 norepinephrine 処理後認められた持続的な収縮の程度が isradipine の投与によって変化せず、高濃度 K^+ 収縮の大きさに対する割合に週齢間で差が認められなかったことから、 α_1 -アドレナリン受容体を介した反応に対する isradipine の血管収縮抑制作用の変化が、平滑筋の収縮要素以外の変化によること、すなわち Ca^{2+} チャネル数の変化又は Ca^{2+} 透過性の変化によることを示唆している。Table 3 に示すように、異なる週齢のラット胸部大動脈の膜画分を用いた $[^3\text{H}](+)\text{-isradipine}$ の結合実験から得られた $[^3\text{H}](+)\text{-isradipine}$ の解離定数は加齢によって変化しなかったが、最大結合数 ($B_{\max}$) は、6 週齢から 10 週齢まで週齢と共に有意に減少し、その後 10 週齢から 40 週齢まで増加した。池田ら⁸⁾ は、自然発生高血圧ラット及び正常血圧の Wistar-Kyoto ラットから得られた大動脈の細胞膜で $[^3\text{H}](+)\text{-isradipine}$ による結合実験で得た最大結合数 ($B_{\max}$) は 4 週齢から 13 週齢まで減少したが、解離定数は加齢によって変化しなかったと報告している。彼らの報告は、我々が行った結合実験の結果を強く支持す

Fig. 5. Relationship between the $R_{340/380}$ (%) and Tension (%) of Ca^{2+} -Evoked Responses with Isradipine in the Presence of Norepinephrine

The number 6, 10 and 40 refer to the age of the rats in weeks. A correlation was found ($r=0.995$, $p<0.05$) and the line of best fit ($y=1.568x-39.493$) is shown.

Fig. 6. Relationship between the Logarithm of $B_{\max}$ and the Maximum Inhibition (%) of Norepinephrine-Induced Contraction in the Presence of Isradipine

The number 6, 10 and 40 refer to the age of the rats in weeks. A correlation was found ($r=0.943$, $p<0.05$) and the line of best fit ($y=59.302x-68.810$) is shown.

Fig. 7. Relationship between the Logarithm of $B_{\max}$ and the pD_2 Value of Norepinephrine

The number 6, 10 and 40 refer to the age of the rats in weeks. A correlation was found ($r=0.978$, $p<0.05$) and the line of best fit ($y=-0.967x+9.338$) is shown.

る。Fig. 6 に示すように、摘出大動脈における norepinephrine の収縮反応に対する isradipine の最大抑制率及び $[^3H](+)$ -isradipine の結合実験より得られた最大結合数 ($B_{\max}$) の対数値との間に有意な相関が認められた ($p<0.05$) ことは、これらの結果を裏づける。一方、Fig. 7 に示すように摘出大動脈に対する norepinephrine の効力 (pD_2 値) と最大結合数 ($B_{\max}$) の対数値との間にも有意な負の相関が認められた ($p<0.05$) ことは、 α_1 -アドレナリン受容体機構を介する血管収縮反応に及ぼす isradipine の抑制作用の加齢に伴う変化が、平滑筋における電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル数の変化と関連していることを示唆している。これまで、norepinephrine による収縮に及ぼす isradipine の最大抑制の程度について加齢に伴う変化が、 $[^3H]$ prazosin によって標識された α_1 -アドレナリン受容体数の変化に伴っていること、あるいは組織における Ca^{2+} チャネルの分布及び収縮反応に及ぼす各々の Ca^{2+} チャネル (電位依存性 Ca^{2+} チャネル及び受容体作動性 Ca^{2+} チャネル) の依存性が過齢と共に変化すること、さらには α_1 -アドレナリン受容体及び Ca^{2+} チャネルの加齢に伴う変化が相互に関係する可能性を示した。⁹⁾ 新しい非選択的 Ca^{2+} チャネル拮抗薬 SKF96365 は、norepinephrine による収縮を同様な阻害効力 (pIC_{50}) で弛緩させた。¹⁵⁾ この報告は、 α_1 -アドレナリン受容体を介した収縮において Ca^{2+} チャネル (電位依存性 Ca^{2+} チャネル及び受容体作動性 Ca^{2+} チャネル) の総合的な機能が過齢と共に変化しない可能性を示唆した。例えば電位依存性 Ca^{2+} チャネル (isradipine で標識された Ca^{2+} チャネル) が α_1 -アドレナリン受容体数の増加に伴い減少するか、逆に受容体作動性 Ca^{2+} チャネルが α_1 -アドレナリン受容体数の増加に伴い増加する可能性が考えられる。今回の実験で得られた $[^3H](+)$ -isradipine の最大結合数 ($B_{\max}$) の過齢による変化はこの仮説を支持している。

血圧は α_1 -アドレナリン受容体を介する機構だけでなく acetylcholine, serotonin, angiotensin, endothelin, ホルモンなど様々な体液性化学物質により調節されている。高柳ら,³⁾ 佐藤ら⁹⁾ 及び小池ら¹⁰⁾ は摘出血管標本において、加齢と共に pD_2 値が増加した後減少することを示し、これが α_1 -アドレナリン受容体数の変動と相関することを明らかにした。したがって、ラット血圧に

における norepinephrine の ED_{50} 値の加齢に伴う変動は血管平滑筋の α_1 -アドレナリン受容体数の変動によることを示唆している。他の transmitter と Ca^{2+} チャネルとの関連など今後明らかにすべき多くの問題があるが、Fig. 4 及び Table 4 に示したように、norepinephrine の用量反応曲線から、10 週齢ラットが 6 週齢及び 40 週齢ラットに比較して isradipine に対する感受性が高いことが明らかになった。これらの結果は、 α_1 -アドレナリン受容体機構を介する血圧上昇反応に及ぼす isradipine の抑制作用の加齢に伴う変化が、 α_1 -アドレナリン受容体数及び Ca^{2+} チャネル数の変化と密接な関わりを持っていることを示している。

本研究は、 α_1 -アドレナリン受容体機構を介する血管収縮反応と血圧上昇反応に及ぼす isradipine の抑制作用の加齢に伴う変化が、 α_1 -アドレナリン受容体数及び電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル数の変化に依存しており、 α_1 -アドレナリン受容体に対する薬物の親和性又は動脈平滑筋の収縮要素に対する Ca^{2+} 感受性の変化には依存しないことを明らかにした。

謝辞 この研究は文部省科学研究の研究助成金によって行われた (No. 07772190)。ご指導を賜った東邦大学薬学部薬理学教室 高柳一成教授に深謝いたします。

引用文献

- 1) Wanstall J. C., O'Donnell S. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 1016 (1988).
- 2) Wanstall J. C., O'Donnell S. R., *Eur. J. Pharmacol.*, **159**, 241 (1989).
- 3) Takayanagi I., Shinkai M., Yamasawa K., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **67**, 1398 (1989).
- 4) Bolzon B. J., Cheung D. W., *Hypertension*, **14**, 137 (1989).
- 5) Sada T., Koike H., Nishino H., Oizumi K., *Hypertension*, **13**, 582 (1989a).
- 6) Sada T., Koike H., Miyamoto M., *Hypertension*, **14**, 652 (1989b).
- 7) Bruner C. A., Webb R. C., *Pharmacology*, **41**, 24 (1990).
- 8) Ikeda S., Amano Y., Adachi-Akahane S., Nagao T., *Eur. J. Pharmacol.*, **264**, 223 (1994).
- 9) Satoh M., Kanai S., Ashikawa N., Takayanagi I., *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **330**, 190 (1995).
- 10) Koike K., Satoh M., Kanai S., Ohtsuki H., Takayanagi I., *Pharmacology*, **52**, 16 (1996).
- 11) Sato K., Ozaki H., Karaki H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **246**, 294 (1988).
- 12) Karaki H., Sato K., Ozaki H., *Eur. J. Pharmacol.*, **151**, 325 (1988).
- 13) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 14) Scatchard G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660 (1949).
- 15) Merritt J. E., Armstrong W. P., Benham C. D., Hallam T. J., Jacob R., Axa-Camiec A. J., Leigh B. K., McCarthy S. A., Moores K. E., Rink T. J., *Biochem.*, **271**, 515 (1990).
- 16) Munson P. J., Rodbard D., *Anal. Biochem.*, **107**, 220 (1980).