

《原 著》

N-Isopropyl-p-(I-125)Iodoamphetamine のラット脳における
結合部位および細胞下分布森 厚文* 柴 和弘* 辻 志郎** 松田 博史**
久田 欣一**

要旨 N-Isopropyl-Iodoamphetamine (IMP) の脳内局在機序の解明のため、ラット脳を用いて結合アッセイならびに細胞分画実験を行い、IMPの結合部位および細胞下分布について検討した。飽和実験より¹²⁵I-IMP結合の最大結合量 (B_{max}) および解離定数 (K_d) はそれぞれ 15.7 nmol/mg タンパク および 56 μ M と非常に高い値を示し、IMP はアミン受容体のみではなく、より大容量で親和性の低い細胞成分に結合していると推定された。阻害実験では薬物による阻害特異性が認められ、IMP 結合にはパラの位置にハロゲンのついたベンゼン環とアミン部の存在および両者の配置が重要と考えられた。また細胞分画実験よりシナプス膜分画の単位タンパク量当たりの取り込み率が全脳平均の約4倍と高く、神経細胞に特有な構造であるシナプス膜にIMPに結合しやすい化学構造を有する成分が多いことが示唆された。

I. はじめに

1980年 Winchell ら¹⁾によって開発された N-Isopropyl-p-(¹²⁵I)Iodoamphetamine (¹²⁵I-IMP) は脂溶性薬剤であり初回循環で高率に脳組織に取り込まれ、しかも組織からの洗い出しが遅いため、Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) に適した新しい局所脳血流測定用薬剤として注目されている。本薬剤の脳血管性障害、脳腫瘍、てんかんなどにおける臨床的有用性に関する報告は多い²⁻¹¹⁾。しかし得られる画像の正しい臨床的評価ならびに、より優れた局所脳血流測定用薬剤の開発のためには、脳内局在機序の基礎的研究が重要と考えられるが、その報告は少ない¹²⁾。

そこで今回われわれは、¹²⁵I-IMP を用いてラット脳における結合アッセイおよび細胞分画実験

を行い IMP の結合部位および細胞下分布について検討を行ったので報告する。

II. 方 法

1. 結合アッセイ

1) 組織試料の作製

Hauger ら¹³⁾の方法に準じて Sprague-Dawley ラット (雄 210~240 g) の脳組織を氷冷 40 倍量の 0.32 M ショ糖溶液に入れ、ポッター型ホモジナイザーで破碎した。このホモジネートを 1,000 g, 10 分間遠心し、その上清を 27,000 g, 20 分間遠心を行って得られたペレットを氷冷 0.32 M ショ糖溶液に混和しながら再懸濁させ 27,000 g, 20 分間遠心した。このペレットを氷冷 40 倍量の 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) に再懸濁し粗シナプトゾーム (P₂) 分画を得た。P₂ 分画のタンパク定量は Lowry 法¹⁴⁾で行った。

2) 飽和実験

50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4, 全結合量測定用) あるいは非放射性 IMP (300 μ M, 非特異的結合測定用) 100 μ l, 種々の濃度 (0.75~30 μ M) の ¹²⁵I-IMP (ラセミ体, 250~340 mCi/mmol) 100 μ l, および P₂ 分画 (タンパク量 310~405 μ g) 400 μ l を混

* 金沢大学アイソトープ総合センター

** 同 医学部核医学科

受付: 61年1月7日

最終稿受付: 61年8月4日

別刷請求先: 金沢市宝町13-1 (☎920)

金沢大学アイソトープ総合センター

森 厚文

合し氷上 (0~4°C) にて 30 分間インキュベーションした後、グラスファイバー・フィルター (Whatman GF/B) で吸引濾過し、5 ml の緩衝液にて 2 回洗浄した。このフィルターの放射能をオートウエルシンチレーションカウンター (アロカ製 ARC-305) にて測定した。なお特異的結合は 300 μ M 非放射性 IMP の存在下と非存在下での結合の差として求めた。

3) 阻害実験

125 I-IMP 特異的結合を 50% 阻害する各種薬剤の濃度 (IC₅₀) を検討した。用いた薬剤は非放射性 IMP, ドーパミン, スピペロン (D₂, S₂ 拮抗剤), ハロペリドール (D₂, S₂ 拮抗剤), 2-Amino-6, 7-dihydroxy-tetralin (ADTN, D₂ 拮抗剤), セロトニン, ケタンセリン (S₂ 拮抗剤), ノルアドレナリン, ヨヒンビン (α -ノルアドレナリン拮抗剤) および L-グルタミン酸であった。方法は種々の濃度 (1 μ M~50 mM) の上記薬剤を含む 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) 100 μ l, 125 I-IMP 溶液 (200 nM) 100 μ l および P₂ 分画 (タンパク量 250~400 μ g) 400 μ l を混合し、氷上にて 30 分間インキュベシ

ョンした後、飽和実験と同様にグラスファイバーフィルターで吸引濾過、洗浄し、その放射能をオートウエルシンチレーションカウンターにて測定した。なお、飽和実験、阻害実験ともに 3 回実験を行いその平均を求めた。

2. 細胞下分布

Sprague-Dawley ラット (雄 220~230 g) に 125 I-IMP 溶液 25 μ Ci (925 kBq, 94 nmol) を尾静脈より注入し、2 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間および 24 時間後に各 3 匹ずつ断頭屠殺した。摘出した脳に氷冷の 10 倍量 0.32 M ショ糖溶液を加え、ポッター型ホモジナイザーで破碎し、ナイロン・メッシュで濾過してホモジネートを作成した。このホモジネートを De Robertis¹⁵⁾ の方法に準じて分画した (Fig. 1)。各分画に含まれる放射能をオートウエルシンチレーションカウンター (アロカ製 ARC-305) で測定し、各分画の投与量に対する臓器 1 g 当たりの取り込み率 (% dose/細胞下分画/臓器 1 g, 以下は取り込み率と略す) を算定した。次に Lowry 法¹⁴⁾ によりタンパク量を測定し、タンパク単位重量当たりの取り込み率

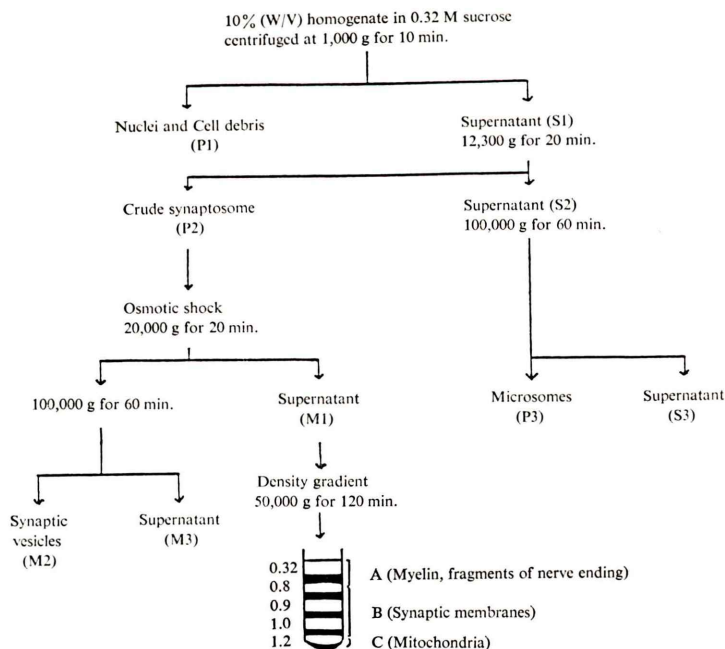


Fig. 1 Scheme summarizing preparation of subcellular fractions of brain.

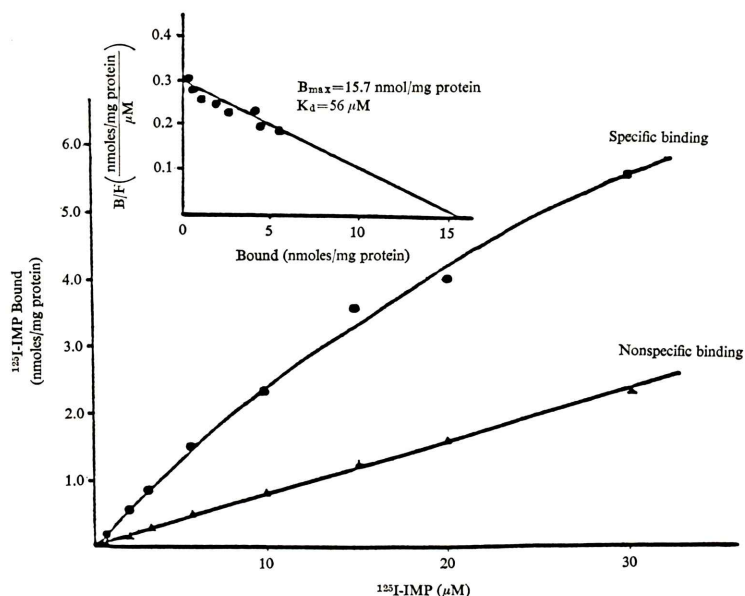


Fig. 2 Saturation analysis and Scatchard plots of ¹²⁵I-IMP binding to crude synaptosomal fraction.

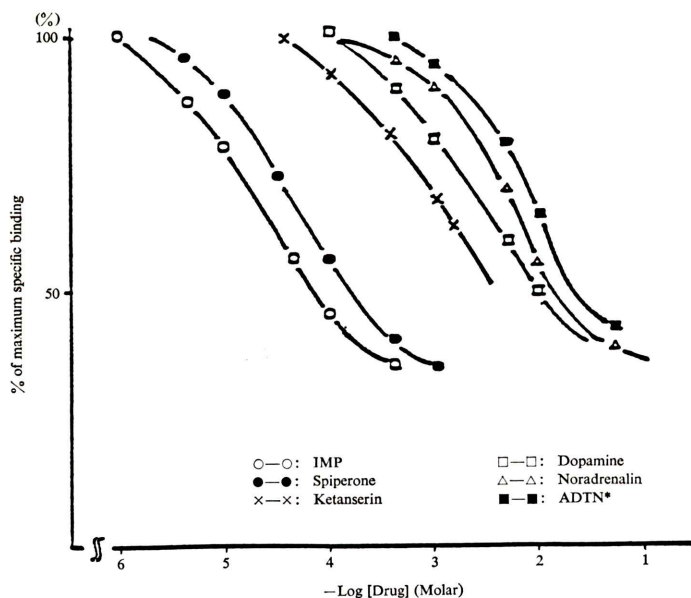


Fig. 3 Inhibition of ¹²⁵I-IMP binding to crude synaptosomal fraction by various drugs.
*2-amino-6, 7-dihydroxy-tetralin

を求め、比較を容易にするため投与2分後の全脳の値を1.0とする相対的なタンパク当たりの取り込み率に換算した。

III. 結果

1. 結合アッセイ

1) 飽和実験

種々の濃度の ^{125}I -IMP を用いた飽和実験の結果を Fig. 2 に示す. 非特異的結合は濃度が高くなるにつれ直線的に増加するのに対し, 特異的結合は飽和に達する傾向を示した. この飽和曲線より Scatchard 解析¹⁶⁾ を行い, 最大結合量 (B_{max}) および解離定数 (K_d) を算定すると, それぞれ 15.7 nmol/mg タンパクおよび 56 μM であった.

2) 阻害実験

^{125}I -IMP 結合に対する薬剤阻害効果を示す曲線を Fig. 3 (主な薬剤のみ示す), IC_{50} を Table 1 に示す. IMP が最も阻害効果が強く次いでスピペロン, ハロペリドールが強かった. その他の薬剤は阻害効果は弱く, ケタンセリン, ドーパミン, ノルアドレナリン, ヨヒンビン, セロトニン, L-グルタミン酸, ADTN の順で弱くなった.

Table 1 Competition by various agents for ^{125}I -IMP binding

Drug	IC_{50} (μM)
IMP	25
Spiperone	60
Haloperidol	60
Ketanserin	1,800
Dopamine	4,200
Noradrenalin	7,400
Yohimbine	7,400
Serotonin	8,300
L-Glutamic acid	9,200
ADTN	10,300

2. 細胞下分布

脳の各分画当たりの取り込み率 (以下に示す数字は単位を省略し, 平均値 \pm 標準偏差で示す) を

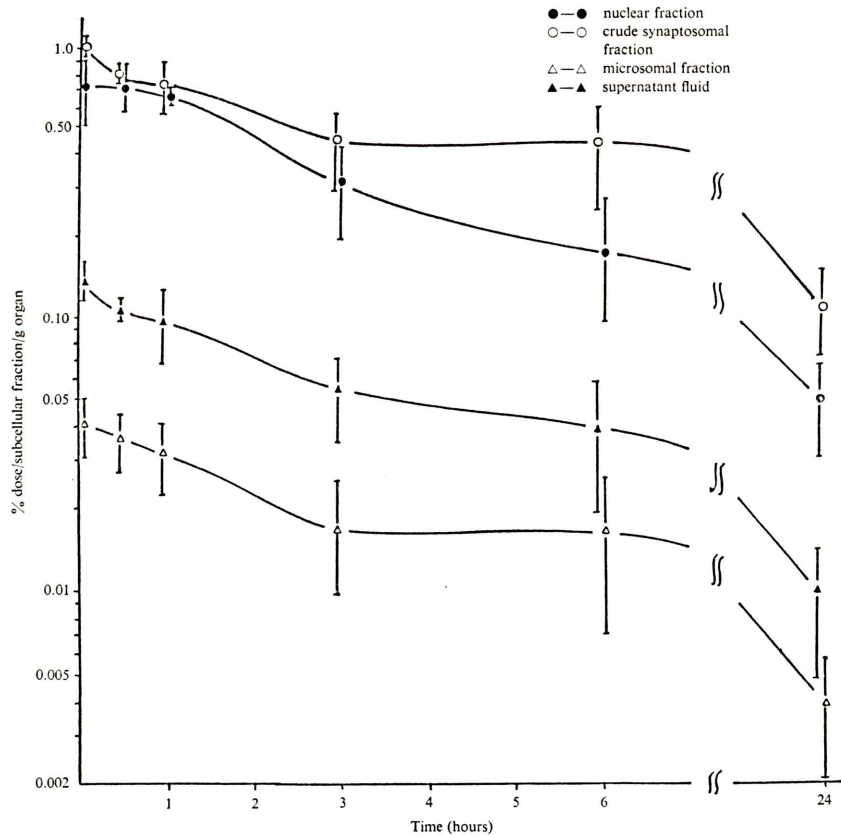


Fig. 4 Subcellular distribution of ^{125}I -IMP in brain. Values represent mean \pm SD ($n=3$).

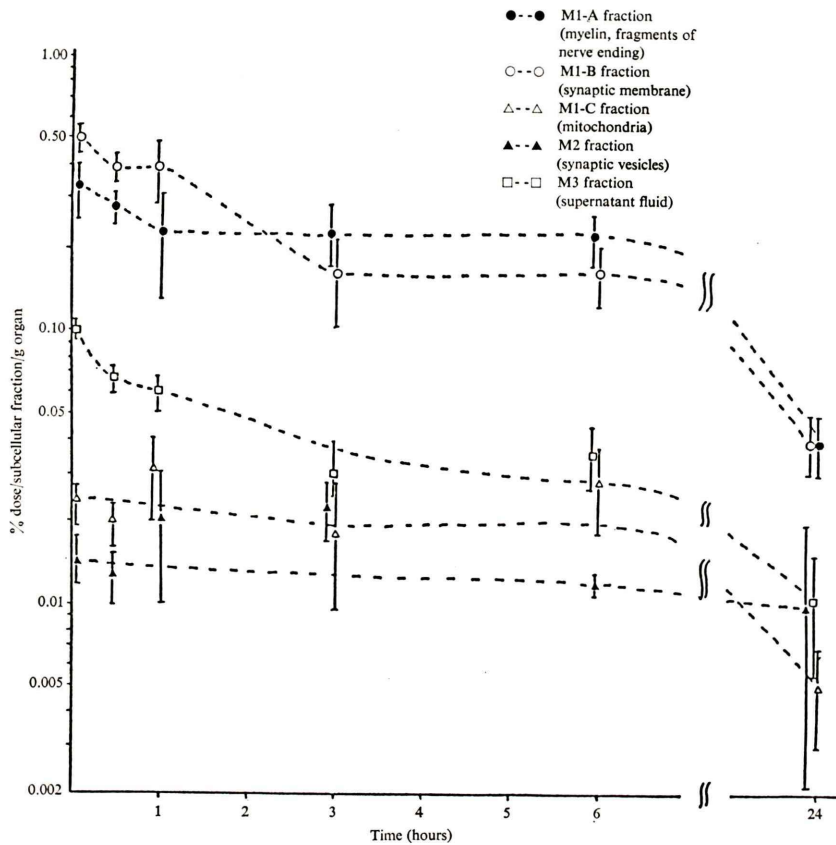


Fig. 5 Subfractional distribution of ^{125}I -IMP in crude synaptosomal fraction of brain. Values represent mean \pm SD (n=3).

Fig. 4 および 5 に示す。投与 2 分後では粗シナプトゾーム分画および核分画 (P₁, 核以外に毛細血管断片, ミエリン, 神経終末断片を含む) がそれぞれ 1.03 ± 0.06 および 0.73 ± 0.22 と高値を示したのに対し, 上清分画 (S₃) およびマイクロゾーム分画がそれぞれ 0.14 ± 0.02 および 0.04 ± 0.01 と低値を示した。粗シナプトゾーム分画を低張処理後, 不連続 ∇ 糖密度勾配遠心法で亜分画したところ M₁ 分画のうち A (ミエリン分画であるが, 神経終末断片が混入), B (シナプス膜) および C (ミトコンドリア) 分画がそれぞれ 0.33 ± 0.08 , 0.50 ± 0.02 および 0.025 ± 0.01 , M₂ (シナプス小胞), M₃ (上清) 分画がそれぞれ 0.015 ± 0.005 および 0.10 ± 0.01 と M₁ の A および B 分画が高値 (両者

合わせて全脳の約 40%), 他の分画は低値を示した。以上の傾向は経時的にほとんど変化は認められなかった。次にタンパク 1 g 当たりの相対的な取り込み率を Fig. 6 および 7 に示す。投与 2 分後では核分画および粗シナプトゾーム分画がそれぞれ 1.30 ± 0.23 および 1.26 ± 0.11 と全脳平均 1.0 より高値, 上清分画 (S₃) およびマイクロゾーム分画がそれぞれ 0.37 ± 0.06 および 0.28 ± 0.04 と低値を示した。粗シナプトゾーム分画の亜分画のうち M₁ の B 分画 (シナプス膜) が 3.99 ± 0.42 と非常に高い値を示し, 次いで M₁ の A 分画 (ミエリン等) が 1.72 ± 0.17 と高値, M₃ 分画, M₁ の C 分画および M₂ 分画がそれぞれ 0.71 ± 0.17 , 0.11 ± 0.01 および 0.10 ± 0.01 と低値を示した。この傾

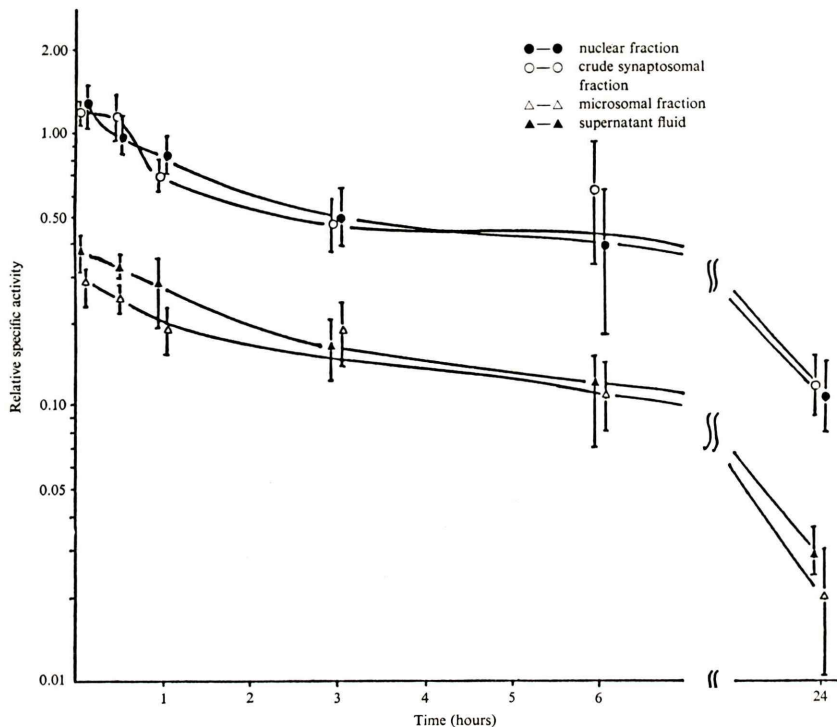


Fig. 6 Relative specific activity of ^{125}I -IMP in subcellular fractions of brain. Relative specific activity is expressed as ratio to specific activity (% dose/g protein) of brain homogenate at 2 minutes after administration. Values represent mean \pm SD (n=3).

向は経時的にほとんど変化は認められなかった。

IV. 考 察

最近 ^{125}I -IMP が優れた局所脳血流測定用薬剤として注目されているが、その原理は従来の microsphere 法と同じである。すなわち IMP は脂溶性で脳組織に高度に移行し、しかも長時間脳内に停滞するためいわゆる化学的小塞栓子 (chemical microsphere) として microsphere 法が応用可能である¹⁷⁾。このように脳組織に長時間停滞する理由として、1) pH shift 薬剤として作用、2) 非透過性 (水溶性) 代謝物に代謝または、3) 非特異的細胞成分との結合が考えられている¹⁸⁾。pH shift 薬剤は、血中 pH の 7.4 では非電離型脂溶性で脳組織に容易に移行するが脳内 pH の約 7.0 では荷電し、水

溶性に変化するため脳組織外に拡散されず脳組織内に停滞するという概念に基づく¹⁹⁾。Kung ら²⁰⁾ は pH shift 薬剤であるジアミンの中で N, N, N'-Trimethyl-N-(2-Hydroxy-3-Methyl-5-Iodobenzyl)-1, 3-Propanediamine (HIPDM) が局所脳血流イメージング剤として最も優れており、HIPDM と IMP が pH による分配係数の変化、蛋白結合能、体内分布 (脳集積率は IMP の方が高い²¹⁾) などが類似しているため、IMP の脳集積には pH shift の機序が関与していると推定している。しかし Loberg²²⁾ は Kung らの主張する pH shift 薬剤の脳/血液比は pH shift 説から算定される値よりはるかに高いため、脳内長時間停滞の説明に pH shift 説を適用するには問題があると述べている。IMP も同様の理由で真の pH shift 薬剤とはいえ

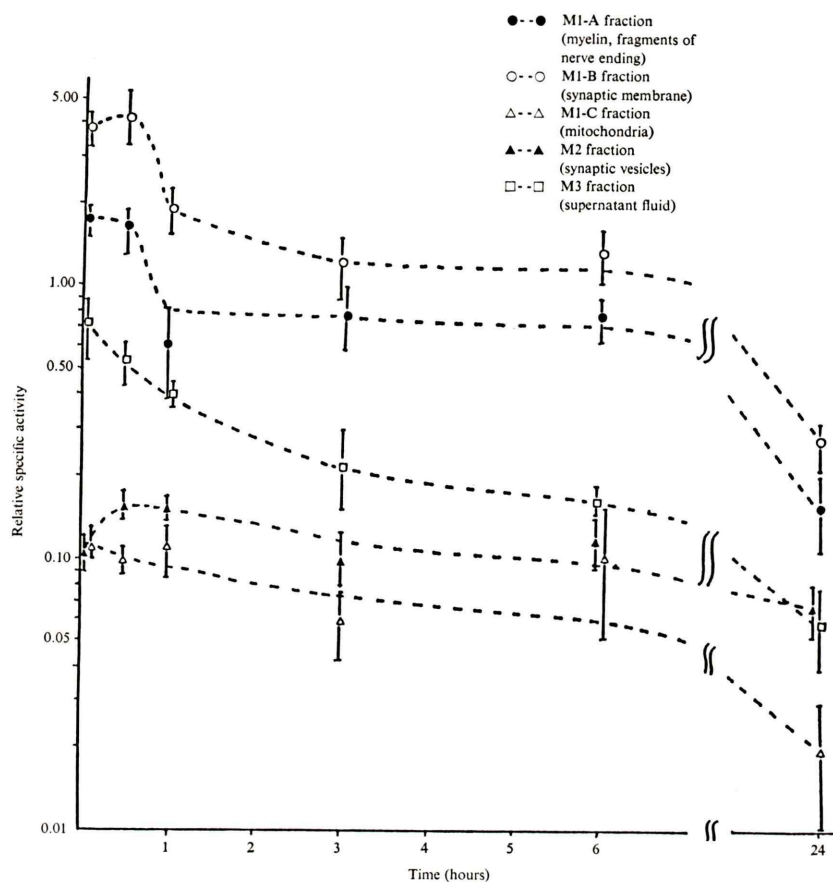


Fig. 7 Relative specific activity of ¹²⁵I-IMP in subfractions of crude synaptosomal fraction of brain. Relative specific activity is expressed as ratio to specific activity (% dose/g protein) of brain homogenate at 2 minutes after administration. Values represent mean \pm SD (n=3).

ないと考えられる。次に IMP が脳組織内において代謝されて細胞膜に対して非透過性(水溶性)物質となるため、脳内に停滞することが考えられる。しかし Rapin ら^{23,24}は脳における IMP の代謝物は P-ヨードアンフェタミンであり、これは IMP より脂溶性が低くしたがって膜透過性が低いにもかかわらず、IMP と同程度に脳組織に移行すると報告している。したがって IMP の脳内長時間停滞の要因として非透過性代謝物の関与は考えにくい。

IMP は構造的にドーパミンやノルアドレナリ

ンのようなアミンと近似しているため、Winchell ら¹²は、³H-標識ドーパミン、ノルアドレナリンおよびセロトニンを用いてラット脳皮質のシナプトゾームにおけるアミン摂取阻害および放出実験を行い、IMP の脳内長期停滞は大容量のアミン受容体の比較的非特異的結合に関連していると推定している。しかしこれらの阻害および放出実験で IMP との比較のために用いられた薬剤は D-アンフェタミンと p-クロロアンフェタミンのみであり、ドーパミン等のアミンおよびその拮抗剤との比較はなされていない。しかもこれらの実験

では IMP がアミン受容体以外の成分にも結合しているか否かの評価はできず上記の推論には無理があると考えられる。

そこでわれわれは、粗シナプトゾーム分画との ^{125}I -IMP 結合アッセイおよび *in vivo* 細胞分画実験を行い、以下の新知見を得た。すなわち ^{125}I -IMP 結合アッセイの結果、 B_{max} は 15.7 nmol/mg タンパク、 K_d は 56 μM であった。これらの値は Howlett ら²⁵⁾の ^3H -スピペロンを用いたラット脳線状体における高親和性結合部位の B_{max} 280 fmol/mg タンパク、 K_d 31 pM および低親和性結合部位の B_{max} 700 fmol/mg タンパク、 K_d 325 pM と比べ著しい高値であった。したがって IMP の結合部位は大容量で、親和性の低い細胞成分であり、アミン受容体のみとは考えにくい。今回は正常ラットの全脳を用いて実験したが、IMP が正確に局所脳血流を反映することを確かめるためには、厳密には種々の解剖学的部位で B_{max} および K_d が同じであることを証明する必要がある。

次に IMP と結合部位との関係を知るため、非放射性 IMP、神経伝達物質またはその拮抗剤による IMP と粗シナプトゾーム分画との結合阻害効果を調べた。その結果、阻害効果の強い IMP でも IC_{50} が 25 μM (使用したリガンド濃度 200 nM) と阻害するために高濃度を必要とし、IMP 結合の特異性は低いといえる。しかし IMP に次いでスピペロン、ハロペリドールが阻害効果の強いに対し、その他の薬剤は弱く、薬物による阻害特異性が認められた。したがって IMP 結合は、神経伝達物質とその受容体との結合のような立体特異性を有していないとしても何らかの化学構造上の特徴を有する部位と結合すると考えられる。スピペロンおよびハロペリドールの化学構造で IMP と共通なのは Fig. 8 に示すように、パラの位置にハロゲンのついたベンゼン環 (以下 P-ハロベンゼンと略す) であり、IMP 結合に P-ハロベンゼンが関与していると推測される。しかし P-ハロベンゼンを有するケタンセリンは、今回実験に使用した神経伝達物質の中で最も阻害効果の強いドーパミンより強いが、スピペロン、ハロペリ

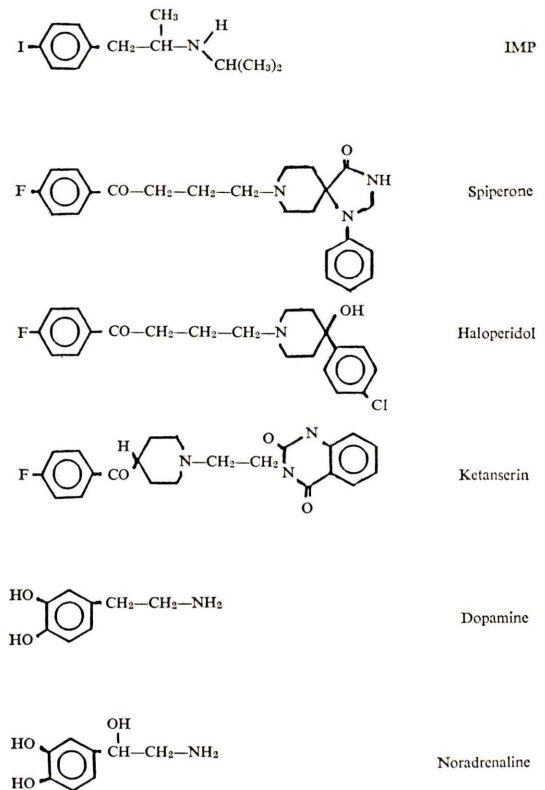


Fig. 8 Structure of IMP, some agonists and antagonists of neurotransmitter.

ドールより明らかに阻害効果が弱い。したがって IMP 結合には、P-ハロベンゼンだけでなくアミン部位の窒素との結合ならびに両者の配置が関与していると考えられる。すなわちケタンセリンは P-ハロベンゼンとアミン部の窒素との間にピペリジニル基が介在し、構造的に自由度が制限されるため、スピペロンやハロペリドールと比較して阻害効果が弱いと考えられる。しかし以上の推論を結論づけるためには、1) IMP とその脱ハロゲン体との比較による P-ハロベンゼン効果の確認、2) P-ハロベンゼンとアミン部位の窒素との配置すなわち両者間のアルキル炭素数の異なる IMP 類似体の比較による両者間の距離による影響の確認および 3) IMP 光学異性体の比較による立体特異性の有無の確認などの検討が必要と考えられる。現時点では IMP 結合成分が何であるかは不明

であるが、アンフェタミンの場合はその結合部位は既知の神経伝達物質受容体よりはむしろイオンチャンネルあるいは酵素のような大きな膜成分の可能性が示唆されている¹³⁾。IMP の B_{max} はアンフェタミンと比較しても約 250 倍と高く、IMP 結合成分はアンフェタミン結合部位よりも多量に存在し、親和性の低い成分と考えられる。

なお細胞分画実験では、シナプス膜分画のタンパク量当たりの取り込み率が全脳平均の約 4 倍と高く、神経細胞に特有の構造であるシナプス膜に IMP に結合しやすい化学構造を有する成分が多いことが示唆される。したがって病態により結合成分が欠如あるいは少なくなると IMP は局所脳血流を正確に反映しなくなる可能性がある。さらに結合性の低下、IMP およびその代謝物の血液脳関門透過率、脳内 pH、IMP の代謝経路あるいはその代謝速度の変化などにより IMP のトラッピングや放出機構が変化する場合には、その測定値の評価には注意を要する。しかし IMP 検査は脳のトラッピングおよび放出機構が正常な場合、あるいは検査時間内ではこれらに有意な変化が起らない場合はもちろんのこと、たとえトラッピング、放出機構の変化のため血流の絶対値が得られなくても、左右差²⁶⁾や経時的な分布パターンの変化などを検出することにより病巣検出が可能となることが推定される。したがって評価する際、上記の注意点に留意すれば IMP 法は脳血管性障害などの診断、治療指針および治療経過の評価に有効な検査法と期待される。

¹²⁵I-IMP および非放射性 IMP をご提供下さいました日本メジフィジックス社、ケタンセリンをご提供下さいました協和醸酵工業㈱、ヤンセン協和㈱に感謝します。なお本論文の要旨は、第25回日本核医学会総会(1985年、於徳島)にて報告した。

文 献

- Winchell HS, Baldwin RM, Lin TH: Development of I-123-labeled amines for brain studies: Localization of I-123-iodophenylalkyl amines in rat brain. *J Nucl Med* **21**: 940-946, 1980
- LaFrance ND, Wagner HN Jr, Whitehouse P, et al: Decreased accumulation of Isopropyl-Iodoamphetamine (I-123) in brain tumors. *J Nucl Med* **22**: 1081-1083, 1981
- Holman BL, Hill TC, Magistretti PL: Brain imaging with emission computed tomography and radio-labeled amines. *Invest Radiol* **17**: 206-215, 1982
- Hill TC, Holman BL, Lovett R, et al: Initial experience with SPECT (single-photon computerized tomography) of the brain using N-isopropyl I-123-P-iodoamphetamine: Concise communication. *J Nucl Med* **23**: 191-195, 1982
- Lee RGC, Hill TC, Holman BL, et al: Comparison of N-isopropyl (I-123) P-iodoamphetamine brain scans using anger camera scintigraphy and single-photon emission tomography. *Radiology* **145**: 789-793, 1982
- Lee RGC, Hill TC, Holman BL, et al: N-isopropyl (I-123) P-iodoamphetamine brain scans with single-photon emission tomography: Discordance with transmission computed tomography. *Radiology* **145**: 795-799, 1982
- Magistretti PL, Uren RF, Blume H, et al: Delineation of epileptic focus by single photon emission tomography. *Eur J Nucl Med* **7**: 484-485, 1982
- Lassen NA, Henriksen L, Holm S, et al: Cerebral blood flow tomography: Xe-133 compared with isopropyl-amphetamine-iodine-123: Concise communication. *J Nucl Med* **24**: 17-21, 1983
- Oleary DH, Hill TC, Lee RGL, et al: The use of I-123-iodoamphetamine and single-photon emission computed tomography to assess local cerebral blood flow. *AJNR* **4**: 547-549, 1983
- Holman BL, Hill TC, Polak JF, et al: Cerebral perfusion imaging with iodine 123-labeled amines. *Arch Neurol* **41**: 1060-1063, 1984
- Hill TC, Magistretti PL, Holman BL, et al: Assessment of regional cerebral blood flow (rCBF) in stroke using SPECT and N-isopropyl-(I-123) P-iodoamphetamine. *Stroke* **15**: 40-45, 1984
- Winchell HS, Horst WD, Braun L, et al: N-isopropyl-I-123 P-iodoamphetamine: Single-pass brain uptake and washout: Binding to brain synaptosomes; and localization in dogs and monkey brain. *J Nucl Med* **21**: 947-952, 1980
- Hauger RL, Hulihan-Giblin B, Skolnick P, et al: Characteristics of (H-3) (+)-amphetamine binding sites in the rat central nervous system. *Life Sciences* **34**: 771-782, 1984
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951
- De Robertis ED: Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region. *Science* **156**: 907-914, 1967
- Scatchard D: The attraction of proteins for small

- molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* **51**: 660–672, 1949
- 17) Kuhl DE, Barrio JR, Huang SC, et al: Quantifying local cerebral blood flow by N-isopropyl-P-I-123 iodoamphetamine (IMP) tomography. *J Nucl Med* **23**: 196–203, 1982
- 18) Holman BL, Hill TC, Lee RGL, et al: *Nuclear Medicine Annual 1983*, Freeman LM, Weissmann HS, eds, Raven Press, New York, 1983, p. 131
- 19) Kung HF, Blau M: Regional intracellular pH shift: A proposal new mechanism for radiopharmaceutical uptake in brain and other tissues. *J Nucl Med* **21**: 147–152, 1980
- 20) Kung HF, Tramosch KM, Blau M: A new brain perfusion imaging agent: (I-123) HIPDM: N, N, N'-trimethyl-N'-(2-hydroxy-3-methyl-5-iodobenzyl)-1, 3-Propanediamine. *J Nucl Med* **24**: 66–72, 1983
- 21) Holman BL, Lee RGL, Hill TC, et al: A comparison of two cerebral perfusion tracers, N-isopropyl I-123 P-iodoamphetamine and I-123 HIPDM, in the human. *J Nucl Med* **25**: 25–30, 1984
- 22) Loberg MD: Radiotracers for cerebral functional imaging—A new class. *J Nucl Med* **21**: 183–186, 1980
- 23) Rapin JR, Duterte D, Le Poncin-Lafitte M, et al: Iodoamphetamine derivatives as tracers for cerebral blood flow or not? Autoradiographic and auto-historadiographic studies. *J Cereb Blood Flow Metabol* **3** (Suppl 1): S 105–S 106, 1983
- 24) Rapin JR, Le Poncin-Lafitte M, Duterte D, et al: Iodoamphetamine as a new tracer for local cerebral blood flow in the rat: Comparison with isopropyl-iodoamphetamine. *J Cereb Blood Flow Metabol* **4**: 270–274, 1984
- 25) Howlett DR, Nahorski SR: Quantitative assessment of heterogenous H-3-spiperone binding to rat neostriatum and frontal cortex. *Life Sciences* **26**: 511–517, 1980
- 26) 松田博史, 関 宏恭, 石田博子, 他: 指運動および音読時における局所脳血流変化の検討—N-Iso-propyl-P-(I-123) Iodoamphetamine—静注法とXe-133 吸入法の比較—. *核医学* **21**: 859–865, 1984

Summary

Binding Sites and Subcellular Distribution of N-Isopropyl-p-(I-123)Iodoamphetamine in the Rat Brain

Hirofumi MORI*, Kazuhiro SHIBA*, Shiro TSUJI**, Hiroshi MATSUDA** and Kinichi HISADA**

*Radioisotope Center, **Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa 920, Japan

N-Isopropyl-p-(I-123)Iodoamphetamine (IMP) is a radioactive tracer with high lipophilic properties that has turned out useful for the assessment of regional cerebral blood flow using single-photon emission computed tomography. In this study the binding sites and subcellular distribution of IMP in the rat brain were assessed in order to elucidate the mechanism for localization of IMP in the brain.

Binding assays showed that specific binding of I-125-IMP (IMP binding) in crude synaptosomal fraction was saturable with an apparent dissociation constant, K_d of $56 \mu\text{M}$ and an estimated maximum number of binding sites, B_{max} of $15.7 \text{ nmol/mg protein}$. These very high density binding sites suggest that IMP binding may be associated with the high-capacity, relatively non-specific binding sites rather than any previously described

amine receptor site.

The pharmacological experiments demonstrated that IMP binding to crude synaptosomal fraction was inhibited by various drugs. The presence of both of the benzene ring with halogene at the para position and the N region of the amine, and the distance of these functional groups might be related closely with IMP binding. Furthermore, it was suggested that the synaptic membrane has relatively high density of binding sites for IMP, since the subcellular fraction study showed that the synaptic membrane fraction had higher specific activity (% dose/g protein) than other fractions.

Key words: N-isopropyl-p-Iodoamphetamine, Binding assay, Subcellular distribution, Synaptic membrane, Brain.