

723
咳嗽反射と鎮咳作用(薬)に関する基礎的研究

黒田喜代志

咳嗽反射と鎮咳作用(薬)に関する基礎的研究

昭和53年3月

黒田喜代志

目 次

緒 論	1
第 1 部 鎮咳作用の評価法に関する検索—特に咳反射誘発法と既知鎮咳物質の活性—	2
緒 言	2
第 1 章 咳嗽反射誘発法に関する基礎的検討	3
第 1 節 実験材料ならびに実験方法	3
Ⅰ. 機械的 刺激法	3
Ⅱ. 電氣的 刺激法	4
Ⅲ. 化学的 刺激法	4
第 2 節 実験成績	5
Ⅰ. 咳反射誘発の 確実性	5
1. 咳嗽犬法	5
2. 咳嗽猫法	5
3. 猫上喉頭神経電気刺激法	6
4. モルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法	6
Ⅱ. 各個体における咳反射の 安定性	6
1. 咳嗽犬法	6
2. 咳嗽猫法	7
3. 猫上喉頭神経電気刺激法	7
4. モルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法	7
第 3 節 小括ならびに 考察	8
第 4 節 結 論	9
第 2 章 既知鎮咳活性物質の効力検定	9
第 1 節 実験材料ならびに実験方法	9
第 2 節 実験成績	10
Ⅰ. 麻薬性鎮痛薬	10
1. Morphine hydrochloride	10
2. Dimethylthiambutene hydrochloride	10
3. Pethidine hydrochloride	11
Ⅱ. 麻薬性鎮咳薬	11
1. Codeine phosphate	11
2. Oxymetebanol hydrochloride	12
Ⅲ. 非麻薬性鎮咳薬	12
1. Dextromethorphan hydrobromide	13
2. Noscapine hydrochloride	13
3. Tiopepidine citrate	14
4. Picoperidamine hydrochloride	14

5. Chloperastine hydrochloride	14
6. Alloclamide hydrochloride	14
7. Benproperine phosphate	15
第3節 小括ならびに考察	15
第4節 結 論	19

第2部 新規化合物 isoaminile の鎮咳活性に関する検索

一特に鎮咳作用と他の中枢作用との比較一	21
緒 言	21
第1章 新規化合物 isoaminile の鎮咳活性に関する検索	21
第1節 実験材料ならびに実験方法	21
Ⅰ. 「咳嗽犬および猫」法	22
Ⅱ. 猫上喉頭神経電気刺激法	22
Ⅲ. 猫延髄電気刺激法	22
第2節 実験成績	23
Ⅰ. 咳嗽犬法における鎮咳作用	23
1. 静脈内注射した場合	23
2. 経口投与した場合	23
Ⅱ. 咳嗽猫法における鎮咳作用	24
Ⅲ. 猫上喉頭神経電気刺激法	25
Ⅳ. 猫延髄電気刺激法	26
第3節 小括ならびに考察	27
第4節 結 論	28
第2章 新規化合物 isoaminile の中枢神経系に対する作用	28
第1節 実験材料ならびに実験方法	28
Ⅰ. 鎮痛(様)作用	28
Ⅱ. 鎮痛(様)作用に対する levallorphan の拮抗	29
Ⅲ. 脊髓反射に対する作用	29
Ⅳ. 脊髓反射活動電位におよぼす影響	29
Ⅴ. 麻酔増強作用	30
Ⅵ. 脳波学的検索	30
1. 脳波急性実験	30
a) ウサギの場合	30
b) ネコの場合	30
2. 脳波慢性実験(ウサギ)	30
第2節 実験成績	31
Ⅰ. 鎮痛(様)作用	31
1. d'Amour-Smith 法	31
2. Haffner 法	31

Ⅱ. 鎮痛(様)作用に対する levallophan の拮抗	32
Ⅲ. 脊髓反射に対する作用(マウス)	32
Ⅳ. 脊髓反射活動電位におよぼす影響(ネコ, イヌ)	32
Ⅴ. 麻酔増強作用	33
Ⅵ. 脳波学的検索	34
1. 脳波急性実験	34
a) ウサギの場合	34
b) ネコの場合	36
2. 脳波慢性実験(ウサギ)	38
第3節 小括ならびに考察	39
第4節 結 論	42

第3部 新規鎮咳活性物質 isoaminile の有用性と安全性に関する検索

一特に薬理学的, 毒性学および麻薬性に関する検索一	44
緒 言	44
第1章 親規鎮咳活性物質 isoaminile の有用性と安全性に関する薬理学的検索	44
第1節 実験材料ならびに実験方法	44
Ⅰ. 急性毒性	44
1. マウスの場合	44
2. イヌの場合	45
Ⅱ. 中枢神経系に対する作用	45
1. 抗痙攣作用	45
a) 最大電撃痙攣法	45
b) Pentetrazol 痙攣法	45
2. 抗 tremorine 作用	45
Ⅲ. 気管に対する作用	45
1. ウサギ生体気管支筋に対する作用	45
2. モルモット摘出気管筋に対する作用	45
Ⅳ. 呼吸および血圧に対する作用	46
Ⅴ. 上頸神経節と瞬膜に対する作用	46
Ⅵ. 心臓に対する作用	46
1. 食用カエル摘出心臓に対する作用	46
a) Straub 法	46
b) 八木法	46
c) 八木変法	46
2. ウサギ摘出心臓に対する作用	46
Ⅶ. 腸管に対する作用	46
1. 生体腸管内容輸送抑制作用	46
2. ウサギ摘出腸管自働運動能に対する作用	46

3. モルモット摘出腸管に対する作用	47
VII. 子宮筋に対する作用	47
IX. アナフィラキシーショックに対する作用	47
X. 局所麻酔作用	47
1. 表面麻酔作用	47
2. 浸潤麻酔作用	47
第2節 実験成績	47
I. 急性毒性	47
1. マウスの中毒症状	47
2. イヌの中毒症状	48
3. 50% 致死量 (LD ₅₀ 値) の算出	49
4. 他の鎮咳薬の毒性との比較	49
5. 鎮咳作用における安全域 (safety margin) の算出および他の鎮咳薬との比較	49
II. 中枢神経系に対する作用	50
1. 抗痙攣作用	50
a) 最大電撃痙攣法	50
b) Pentetrazol 痙攣法	50
2. 抗 tremorine 作用	50
III. 気管に対する作用	51
1. ウサギ生体気管支筋に対する作用	51
a) 単独作用	51
b) Histamine (Hist) により惹起した痙攣性収縮に対する作用	51
2. モルモット摘出気管筋に対する作用	51
a) 単独作用	51
b) Hist により惹起した痙攣性収縮に対する作用	51
c) Acetylcholine (Ach) により惹起した痙攣性収縮に対する作用	52
d) Barium (Ba ⁺⁺) により惹起した痙攣性収縮に対する作用	52
IV. 呼吸および血圧に対する作用	52
1. ウサギの場合	52
2. イヌの場合	53
V. 上頸神経節と瞬膜に対する作用	54
IV. 心臓に対する作用	55
1. 食用カエル摘出心臓に対する作用	55
a) Straub 法	55
b) 八木法	55
c) 八木変法	55
2. ウサギ摘出心臓に対する作用	55
VII. 腸管に対する作用	55
1. 生体腸管内容輸送抑制作用	55

2. ウサギ摘出腸管自働運動能に対する作用	56
3. モルモット摘出腸管に対する作用	56
a) 単独作用	56
b) Hist により惹起した痙攣性収縮に対する作用	56
c) Ach により惹起した痙攣性収縮に対する作用	57
d) Ba ⁺⁺ により惹起した痙攣性収縮に対する作用	57
VIII. 子宮筋に対する作用	57
IX. アナフィラキシーショックに対する作用	58
X. 局所麻酔作用	58
1. 表面麻酔作用	58
2. 浸潤麻酔作用	59
第3節 小括ならびに考察	59
第4節 結 論	61
第2章 新規鎮咳活性物質 isoaminile の有用性と安全性に関する毒性学的検索	63
第1節 実験材料ならびに実験方法	63
I. 急性毒性試験	63
1. マウスの場合	63
2. ラットの場合	63
II. 亜急性毒性試験	63
1. 使用動物および飼育条件	63
2. 投与方法および投与量	63
3. 検査項目および方法	63
III. 慢性毒性試験	64
1. 使用動物および投与量	64
a) ラットの場合	64
b) イヌの場合	64
2. 検査項目および方法	64
第2節 実験成績	64
I. 急性毒性試験	64
1. 一般症状観察	64
a) マウスの場合	65
i 皮下注射	65
ii その他の投与方法	65
b) ラットの場合	65
i 皮下注射	65
ii その他の投与方法	65
2. LD ₅₀ 値の算出	65
II. 亜急性毒性試験	66
1. 一般症状観察	66

2. 死亡数	66
3. 体重変化	66
4. 飼料摂取量	66
5. 血液検査	66
6. 解剖所見および臓器重量	67
7. 病理組織所見	71
Ⅲ. 慢性毒性試験	71
1. ラットの場合	71
a) 一般症状観察	71
b) 死亡数	71
c) 体重変化	72
d) 飼料摂取量	72
e) 血球数および血球像	73
f) 解剖所見	74
g) 臓器重量	75
h) 病理組織所見	75
2. イヌの場合	75
a) 一般症状観察	75
b) 死亡数	76
c) 体重変化	76
d) 血球数	76
e) 血球像	76
f) 血液性状	76
g) 肝機能	77
h) 腎機能	80
i) 解剖所見	82
j) 病理組織所見	82
第3節 小括ならびに考察	82
第4節 結 論	85
第3章 新規鎮咳 活性物質 isoaminile の麻薬性に関する検索	85
第1節 実験材料ならびに実験方法	85
Ⅰ. Lavallorphanによる拮抗実験	86
Ⅱ. 耐性形成に関する実験	86
Ⅲ. Codeine との交叉耐性に関する実験	86
Ⅳ. 身体依存性形成に関する実験	86
1. イヌにおける禁断症状の観察	86
2. ラットにおける禁断症状の観察	86
第2節 実験成績	87
Ⅰ. Lavallorphan による拮抗実験	87

Ⅱ. 耐性形成に関する実験	88
1. Isoaminile cyclamate 投与群	88
2. Codeine phosphate 投与群	89
Ⅲ. Codeine との交叉耐性形成に関する実験	89
Ⅳ. 身体依存性形成に関する実験	89
1. イヌにおける禁断症状の観察	89
2. ラットにおける禁断症状の観察	90
第3節 小括ならびに考察	92
第4節 結 論	92
 第4部 新規合成非麻薬性鎮咳薬 isoaminile の作用機作に関する研究	94
緒 言	94
第1節 実験材料ならびに実験方法	94
I. 薬物投与経路の相違による有効量の比較	94
Ⅱ. 気管粘膜内の知覚受容器に対する作用	94
Ⅲ. 知覚インパルスの求心性経路に対する作用	95
Ⅳ. 末梢性および中枢性に誘発した咳に対する作用	95
V. 上喉頭神経刺激で誘発される反回神経の evoked potential および burst 状 discharge への影響	95
Ⅵ. 呼吸中枢に対する影響	95
Ⅶ. 遠心性経路への作用	96
Ⅷ. 除脳の影響	96
Ⅸ. Stretch receptor への影響	96
X. 気管支筋に対する作用	97
第2節 実験成績	97
I. 薬物投与経路の相違による有効量の比較	97
Ⅱ. 気管粘膜内の知覚受容器に対する作用	97
Ⅲ. 知覚インパルスの求心性経路に対する作用	98
Ⅳ. 末梢性および中枢性に誘発した咳に対する作用	98
V. 上喉頭神経刺激で誘発される反回神経の evoked potential および burst 状 discharge への影響	98
Ⅵ. 呼吸中枢に対する影響	98
Ⅶ. 遠心性経路への作用	100
Ⅷ. 除脳の影響	100
Ⅸ. Stretch receptor への影響	100
X. 気管支筋に対する作用	100
第3節 小括ならびに考察	100
第4節 結 論	103

第5部 総括ならびに考察	105
第6部 結 論	110
謝 辞	112
本研究に使用した鎮咳活性物質の化学構造	113
参考文献	115
論文要旨 (別冊)	
Abstract (別冊)	

緒 論

咳嗽反射すなわち咳発作は、多くの疾患に随伴し、呼吸困難と共に患者（患者）を悩ます日常最も頻繁に遭遇する病状である。特に感冒、上気道疾患（咽頭炎、喉頭炎、扁桃炎）、気管、気管支疾患（急性および慢性気管支炎、喘息様気管支炎、アレルギー性気管支炎、気管支肺炎）、肺疾患（肺炎、肺結核、肺気腫、肺化膿症、肺アスペルギルス症）、胸膜疾患（胸膜炎、肋膜炎）、気管支喘息、百日咳、麻疹、異物吸入（細菌、塵埃、刺激性ガス）などの際に遭遇する。このような場合鎮咳剤を使用し咳発作を軽減する事は臨床医学 および 臨床獣医学上 のみならず 畜産学上においても極めて重要な意義を有する事は周知の事実である。すなわち、喀痰を伴う湿性咳嗽や異物の排出を伴う合理的な咳嗽は別として、排痰を伴わない激しい乾性咳嗽、あるいは基質的病変（気管瘻、気管支拡張症、肺線維症、肺癌、フィリプ症、胸膜炎、肋膜炎、脳出血、脳腫瘍）、心臓疾患（心臓弁膜症、心房中隔欠損症、心筋硬塞）に伴う咳嗽、あるいは心因性の咳嗽は、本来の生体防衛機能の目的から逸脱し、1）生体機能、特に呼吸循環器系機能を著しく阻害し、鼻血、眼瞼浮腫、肺組織の断裂、肺気腫、喀血、意識障害、時には頓死の危険性を伴う。2）睡眠障害、嘔吐などにより無益な体力を消耗し、成長を阻害するのみならず、原因疾患を逆に増悪する。3）呼吸器系伝染性疾患の際は病原体を気道の内外に広く飛散し、周辺への感染を促進する。4）愛玩動物の場合には患者の苦悶のみならず畜主を不愉快にし、安眠を妨げる等多くの弊害を誘発し、原因疾患の治療に先行あるいは平行して、是非とも咳発作を軽減させる必要がある。^{[7][8][9][22][26][38][48][62][65][105]}

戦後、dextromethorphanやnoscapineをはじめとして数多くの新しい鎮咳剤が治療に取り入れられる様になり、codeine,dihydrocodeineだけの時代から脱皮し、薬理学的にも独立した領域を占める様になった。^{[35][71][75]}

この発展には動物を用い鎮咳作用を測定出来る評価法の開発が大きく貢献したものである。しかし、これらの臨床効果は確実性を欠く事が少なからずあり、このような場合codeineに期待せざるを得ない事もよく知られている。ところが麻薬性薬剤の使用は麻薬取締法に基づく取扱上の不便のみならず、それ以上に呼吸抑制、消化器障害（便秘）、循環器障害（血圧低下）、耐性形成、依存性（身体的、精神的）形成等医用上の厄介な有害作用を随伴すると同時にさらに薬物乱用、凶悪犯罪等社会的あるいは国家的問題を引起す可能性を有している。^{[40][45][86][103]} この様な理由から非麻薬性で確実に奏効する新薬の開発が古くから社会的に要求されている。

以上のことから明らかな様に、鎮咳薬の開発研究上当面必要な事は、臨床効果を反影する評価法を確立する事である。1950年以降現在もお新しい実験法が漸次発表されているという事実はまだ決定的な評価法が確立されていない事を裏付けていると同時に、この領域の研究が今だ完成の域に達していない事を示すものである。そこで著者は基礎医学の立場から、次の四段階の研究^{[76][81][82][83][84][85][134]}

第1部 鎮咳作用の評価法に関する検索—特に咳反射誘発法と既知鎮咳物質の効力検定—

第2部 新規化合物 isoaminile の鎮咳活性に関する検索—特に鎮咳作用と他の中枢作用との比較—

第3部 新規鎮咳活性物質 isoaminile の有用性と安全性に関する検索—特に薬理学的、毒性学および麻薬性に関する検索—

第4部 新規鎮咳薬 isoaminile の作用機作に関する検索

を実施し、1）古くより社会的に要求されていた強力に副作用の少ない非麻薬性鎮咳薬の開発、2）咳嗽反射発現の生理、特に「咳中枢」(cough center)と呼吸中枢の相互関係、3）細胞レベルにおける「咳中枢」の解明、4）鎮咳作用と鎮痛作用の相互関係、5）鎮咳作用と麻薬性の相互関係などの諸観点から、生理学、薬理学、薬物学、毒性学、獣医学的に興味深い新知見を発見した。以下これらの諸点について論述する。

第1部 鎮咳作用の評価法に関する検索—特に咳嗽反射誘発法と既知鎮咳物質の活性—

緒 言

咳 (cough, husten, tussis) は前記したごとく、気道内の異物を排除する為の生体の重要な保護反射である。先ず、吸入された空気は、鼻腔入口の毛によって大きな異物の進入が阻止され、加温され咽頭、喉頭、気管支に達し、更に細かく分岐した気管支枝を経て肺胞に至る。鼻腔を通過した微細な異物は a) 気道粘膜の分泌物によって溶解あるいは被覆され、細菌の場合は白血球によって摂食される。b) このように処理された異物は、粘膜上皮の繊毛運動と気管支筋の蠕動様収縮によって口腔側に運ばれ、痰として喀出されるかあるいは嚥下される。c) 異物の刺激が、粘膜内の知覚神経末端 (receptor) を興奮させるに充分であれば咳が起こり、一気に気道外に排出される。これらのうち最も重要なものが咳嗽反射である。^[75]

咳嗽反射の起こり方を詳細に観察すると以下の三段階に区別出来る。(Bucher: 1958)^[16] 1) 急速かつ深い吸息と声門の閉鎖 (吸息期) (Floersheim: 1959)^[36] 2) 横隔膜を一定位置に固定し、胸腹壁筋、特に呼吸筋の強い収縮による腹腔内圧の上昇 (加圧期)。3) さらに横隔膜緊張の急激な上昇により加圧し、同時に声門を開放し、気道内の異物を瞬時に体外に運び去る (排出期)。また気管支筋の収縮による気管支内腔の挟搾が気流の加速に寄与し、声門附近の気流速度は 50 ~ 120 m/sec に達するとされている。

ところで鎮咳薬の研究においては、動物に実験的な咳を起こさせる事が第1条件である。それには咳反射弓の求心性経路に種々の刺激を加えるか又は「咳中枢」を電氣的に刺激すればよいはずである。

Larsell and Burget (1924)^[87] はイヌの気管粘膜をラクダの毛のブラッシュで機械的にあるいはアンモニア、エーテル、酢酸等で化学的に刺激し、実験的な咳を最初を起こし、若干の薬物効果をみている。次いで Ernst (1938)^[33] はネコの胸膜腔内に Lugol 氏液を無菌的に注入して、人工的に胸膜炎を起しておき、実験時に胸部をたたいて機械的刺激を加え、咳を起こさせる方法を発表した。これらの方法はいずれも咳の誘発が不確実であり、その後殆んど顧みられていない。また、Eichler and Smiatek (1940)^[27] はモルモットに硫酸エアゾルを吸入させる方法を用いたが、この方法も複雑な装置と不確実な成績の為広く使用されるに至らなかった。しかし、1950年代に入ると時を同じくして多くの方法が発表される様になった。その後の報告を刺激法により、1) 機械的、2) 化学的、3) 電氣的、に分類し簡単に顧みる (以下使用動物、刺激部位、刺激物の順に記載)。

1 機械的刺激法としては、Kroepfli (1950)^[80]; (麻酔ネコ、気管粘膜、石けん末), Kasé (1952)^[54], (1954, 1955)^[55]; (無麻酔イヌ、気管粘膜、ブタの毛数本を束ねた刺激毛), Konzett and Rothlin (1954)^[78]; (麻酔ネコ、気管粘膜、ニワトリの羽毛), May and Widdicombe (1954)^[92]; (麻酔ネコ、気管粘膜、ポリエチレン細管), Green and Ward (1955)^[39]; (麻酔ネコおよび麻酔イヌ、気管粘膜、ポリエチレン細管), Tedeschi et al. (1959)^[155]; (無麻酔イヌ、気管粘膜、あらかじめ気管内腔に小鉄片をつるしておき、実験時に前頸部に電磁石をあててその小鉄片を振動させる), 高木ら (1960)^[148]; (麻酔モルモット、気管粘膜、ブタの毛1本), 等の報告がある。

2 化学的刺激法としては、Kroepfli (1950)^[80]; (麻酔ネコ、石けん末吸入), Winter and Flataker (1952)^[158]; (無麻酔イヌ、硫酸エアロゾルの吸入), De Vleeschhouwer (1954)^[24]; (無麻酔イヌ、硫酸エアロゾルの吸入), Pellmont and Bachtold (1954)^[112]; (麻酔ネコ、石けん末の吸入), Winter and Flataker (1954)^[159]; (無麻酔モルモット、アンモニア水エアロゾルの吸入), Friebel and Reichle (1955)^[37]; (無麻酔モルモット、亜硫酸ガスの吸入), Winder et al. (1955)^[160], Rosiere (1955)^[121], (1956)^[122]; (無麻酔イヌ、アンモニア水エアロゾルの吸入), Bein and Bucher (1957)^[4]; (麻酔ネコ、石けん末の吸入), Silvestrini and Maffii (1959)^[138]; (無麻酔モルモット、アクロレインガスの吸入),

高木ら^[148](1960);(無麻醉モルモット, 亜硫酸ガスの吸入), Silvestrini and Pozzatti^[139](1960,^[140]1961,^[141]1963);(無麻醉モルモット, アクロレインガスの吸入), Chen et al.^[20](1960);無麻醉イヌ, 硫酸エアロゾルの吸入), Stefko et al.^[144](1961);(麻醉ネコ, アンモニアガスの吸入), Silvestrini and Pozzatti^[140](1961);(無麻醉モルモット, アンモニア水エアロゾルの吸入), Charlier^[19](1961);(無麻醉モルモット, クエン酸エアロゾルの吸入), Ellis et al.^[29](1963);(麻醉ネコ, アンモニアガスの吸入), Sanzari et al.^[124](1968,^[125]1969);(麻醉ネコ, DMPP;1.1 dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide の静注)等の報告がある。

3 電気刺激法としては, Borison^[11](1948);(麻醉ネコ, 延髄特定部位), Schroeder^[129](1951);(無麻醉イヌ, 迷走神経刺激), Bobb and Ellis^[10](1951);無麻醉イヌ, 迷走神経刺激), Kasé^[54](1952);無麻醉イヌ, 上喉頭神経刺激), Domenjoz^[25](1952);(麻醉ネコ, 上喉頭神経刺激), Toner and Macko^[157](1952);(麻醉ネコ, 上喉頭神経刺激), Stefko and Benson^[143](1953);(無麻醉イヌ, 気管粘膜下織刺激), Plisnier^[115](1954);(麻醉ネコ, 上喉頭神経刺激), Pellmont and Bach-told^[112](1954);(麻醉ネコ, 上喉頭神経刺激), Levis et al.^[88](1955);(麻醉ネコ, 上喉頭神経刺激), Hass^[43](1955);(麻醉ネコ, 上喉頭神経刺激), Green and Ward^[39](1955);(麻醉ネコ, 上喉頭神経刺激), Chakravarty et al.^[18](1956);(麻醉ネコ, 延髄特定部位刺激), 柳浦^[163](1958);(無麻醉イヌ, 気管粘膜刺激), Hara and Yanaura^[42](1959);(無麻醉イヌ, 気管粘膜刺激), Charlier et al.^[19](1961);(麻醉ネコ, 上喉頭神経刺激), Charlier et al.^[19](1961);(麻醉イヌ, 胸膜刺激), Kasé et al.^[72](1970)(麻醉あるいは除脳ネコ, 延髄特定部位刺激)等の報告がある。

一方, 鎮咳作用の効力検定法としては, 理想的には以下の諸条件を満たすことが必要と思われる。^[62]^[75]1) 必要な時にはいつでも容易にかつ確実に咳を起こし得ること。2) 刺激の強さを定量的に調節でき, 起した咳の強さとその数が実験期間中ほぼ一定で動揺が少ないこと。3) 得られた実験結果が臨床成績と平行すること。4) 操作が簡単で実験経過が記録できること。5) 麻醉の影響をさける為, 無麻醉で実験が可能であること。6) 使用動物の個体差を少なくするため, 同一動物のくり返し使用が可能であること等を挙げることができる。本研究では, 上記方法のなかから比較的これらの条件を満たしていると思われる方法を選択改変し, その有用性について比較検討した。

第1章 咳嗽反射誘発法に関する基礎的検討

既述した効力検定法としての必要な諸条件を比較的満たしていると思われる方法を2, 3選択し, その有用性について検討した。

第1節 実験材料ならびに実験方法

実験に供した薬物は pentobarbital sodium(Nembutal[®], 大日本製薬) ammonium hydroxide (岩井化学), liquid paraffin (和光純薬)である。

I 機械的刺激法

Kasé の「咳嗽犬および猫」法を選択し, 検討を加えた。すなわち, 体重5~10kgの比較的小型の雑種成犬(ネコは2~4kg)を pentobarbital sodium (30mg/kg, i.p.) 麻醉し, 背位に固定し, 前頸部を剪毛, 消毒後, 喉頭骨より2~3cm(ネコ1cm)尾側の, 正中線上を切開し, 直下の頸筋を左右に押し開き, 気管を露出し, その前壁の輪状軟骨1~2本を切除し, 気管カニューレが前壁部より挿入可能な孔を開ける。術後約1

週間で皮下組織は癒着し、瘻管が形成される。この様な「咳嗽犬」10頭、「咳嗽猫」10匹を準備した。実験にはイヌは無麻酔の状態、ネコはpentobarbital-Na 20~25mg/kg, i.p.投与により軽麻酔した状態で側臥位に固定し、気管カニューレ（本実験に適した特殊Y字型ガラスカニューレ）の一端を瘻管を介して気管内に深く挿入し、抜けない様にヒモで頸部に固定する。（Fig. 1-1, Fig. 1-2）。カニューレの管口の一方はゴム管を介してタンブールに連結し、気管内圧の変化を煤紙上に記録した。なお後には、気管内圧の変化を低圧用トランスジューサー（TOYO MEAS, LPU-0.1-360-0-Ⅲ）にて電気的変換し、ポリグラフ（日本光電, RM-50）を介し、広振巾インク書オシログラフ（日本光電, WI-260）に連続記録できる様に改変した。また他の管口からは刺激のつど、刺激毛（イヌ用はブタの毛5本、ネコ用はウサギのヒゲ5本を放射状にギター弦の先端に取り付けたもの）を気管内に向けて深く挿入し、気管分岐部粘膜をくすぐる様に軽く刺激する。刺激頻度は大体2~4秒に1回の割合で10回刺激した。

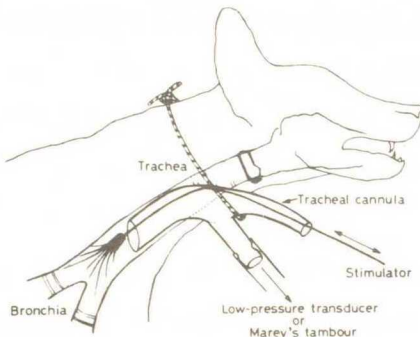


Fig. 1-1 Diagram of mechanical stimulation of the tracheal mucosa in dog

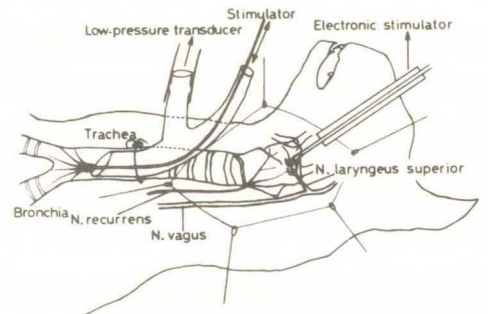


Fig. 1-2 Diagram of mechanical stimulation of the tracheal mucosa and electrical stimulation of N. laryngeus superior in cat.

Ⅱ 電気的刺激法

Schroeder (1951)^[129], Bobb and Ellis (1951)^[10]等は無麻酔イヌの頸部迷走神経を, Domenjoz (1952)^[25]は軽麻酔ネコの上喉頭神経を, Kasé (1952)^[54]は無麻酔イヌの同神経を電気刺激する事により咳発作を起こしうる事を報告している。これらの中で最もよく用いられているDomenjoz^[25]の猫上喉頭神経電気刺激法を選択し検討を加えた。

体重2~4kgのネコをpentobarbital-Na 20mg/kg, i.p.で軽麻酔した後、背位に固定し、常法に従って、正中線上の前頸部の皮膚を切開し、気管を露出し、T字型気管カニューレを挿入し、カニューレの一方の管口をタンブールに連結し、気管内圧の変化を煤紙上に記録した。後には、^{[54][55][56][59]}「咳嗽犬および猫」法の場合と同様インク書オシログラフに連続記録出来る様改変した。上喉頭神経は甲状軟骨の背部を切開し、周囲組織から分離し、出来るだけ末梢側を糸で結紮し、その末梢端を切断する。また神経の乾燥を防ぐため周辺組織を開創器で開き、流動パラフィンのプールを作り、プール内で白金双極電極上に本神経をのせ、矩形波（パルス幅1 msec, 頻度5~20 cps, 電圧0.2~3 v）で20秒間刺激した（Fig. 1-2）。

Ⅲ 化学的刺激法

大別すると、密閉容器に動物を入れ、刺激性のガスまたはエアロゾルをその中へ間接的に、あるいは動物の気管内に直接噴出させる方法が報告されている。本実験にはWinter and Flataker^[159](1954)のモルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法を選択し、多少改変し検討を加えた。すなわち体重300~400gのHartley系雄性モルモットを1群10匹として、内容量2ℓ（10cm×20cm×10cm）の透明アクリル密閉容器にモルモットを1匹ずつ入れ、容器の側面下部から2.8%アンモニア溶液を日商式超音波ネブライザー（シャープ, MU31）にて5分間噴霧し、その間に咳様発作が起きた回数を肉眼的に測定した。Fig. 1-3に試作した装置の略図とその写真（Fig. 1-4）を示す。

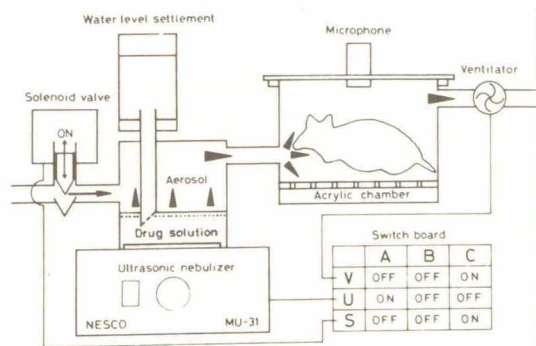


Fig. 1-3 Diagram of aerosolizer

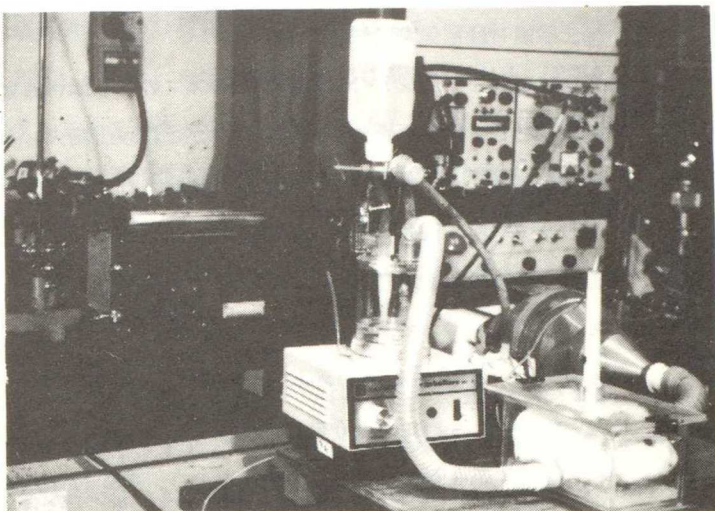


Fig. 1-4 Photogram of aerosolizer

第2節 実験成績

I 咳反射誘発の確実性

鎮咳作用の効力を検定するには、既述した様に先ず動物に咳反射を起させる事が第一課題である。すなわち、必要な時にはいつでも容易にかつ確実に咳を起し得るか否かである。この点について前記の4方法について検討した。^{[54][55][56]}

1 咳嗽犬法

用意された10頭の「咳嗽犬」について、イヌ用刺激毛で5分毎に大体2～4秒に1回の割合で、10回気管分岐部を機械的に刺激した際誘発された咳反射数は、Fig. 1-5-Aに示す如く、10例の平均値(±SD)で、第1回目刺激21.2(±5.82)、第2回目刺激22.8(±5.63)、第3回目刺激25.6(±4.84)とやや増加傾向を示した。しかし第3回目以降の刺激に対しては、ほぼ安定した反応数を示した。

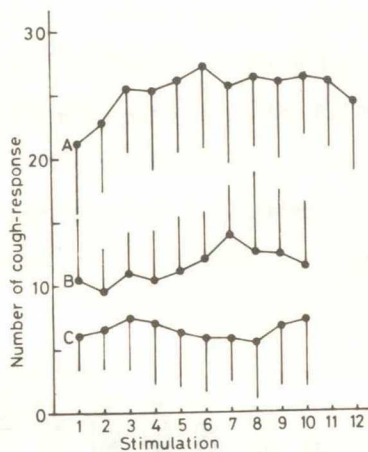


Fig. 1-5 Number of cough-response in dog and cat
A: "Coughing dog" method (Unanesthetized dog)
B: "Coughing cat" method (Anesthetized cat)
C: Electrical stimulation of the superior laryngeal nerve in anesthetized cat (Domenjoz's method)

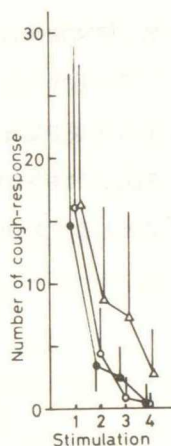


Fig. 1-6 Number of cough-response in unanesthetized guinea pig
Coughing was induced by aerosol of ammonium hydroxide
(Modified method of Winter and Flataker)

2 咳嗽猫法^[59]

用意された10匹の「咳嗽猫」(軽麻酔下)について、ネコ用刺激毛で5分毎に大体1～3秒に1回の割合で10回気管粘膜分岐部を機械的に刺激した際誘発された咳反射数はFig. 1-5-Bに示す如く、10例の平均値(±SD)で、第1回目刺激10.5(±4.81)、第2回目刺激9.6(±3.56)、と初期ほぼ一定した反応数を示した。しかしその後第7回目刺激まではやや増大傾向を示したが、その後は逆に減少傾向を示した。

3 猫上喉頭神経電気刺激法^[25]

Pentobarbital-Na 軽麻酔下のネコの上喉頭神経を矩形波で電気刺激し、咳を誘発する最低電圧（閾値刺激）とさらに電圧を上げて咳の強さがこれ以上増大しない最大電圧（極大刺激）を求め、この中間の電圧（中等度刺激）を5分毎に与えた場合、誘発された咳反射数はFig. 1-5-Cに示す如く、10例の平均値（±SD）で、第1回目刺激6.1（±2.60）、第2回目刺激6.6（±3.10）、第3回目刺激7.4（±4.00）、とやや増加傾向を示したが、その後はやや減少傾向を示し、8回目刺激以後は再び増加傾向を示した。

4 モルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法^[159]

モルモットに2.8%アンモニア水のエアロゾルを10分毎に5分間吸入させた場合、誘発された咳反射数はFig. 1-6に示す如く、10例の平均値（±SD）は、第1回目刺激16.1（±13.63）、第2回目刺激4.5（±3.72）、第3回目刺激0.9（±1.29）、第4回目刺激0.4（±0.70）となり、第2回目以降の刺激では急激な反応数の減少を示し、第4回目刺激では10例中7例が咳反射の完全な消失を示した（○—○）。さらに20分毎に5分間吸入させた場合（●—●）、60分毎に5分間吸入させた場合（△—△）について検討を加えたがいずれの場合にも第2回目刺激以降の咳反射数は急激に減少し、第4回目刺激では各々10例中7例（20分毎刺激）10例中5例（60分毎刺激）が咳発作の完全な消失を示した。

II 各個体における咳反射の安定性

効力検定法としての第2の条件は既述した如く、刺激の強さを定量的に調節でき、起した咳反応（数と強さ）が実験中安定することである。この点について前記4法について比較検討した。

1 咳嗽犬法^{[54][55][56]}

用意された10頭の「咳嗽犬」の各個体について、

- a) 各刺激毎に誘発される咳反射数の安定性についてみると、5分毎に12回刺激した場合（55分間）、1刺激当りの咳発作数（咳嗽曲線の振巾の数）の平均値はFig. 1-7-Aに示す如く、10例中9例が20～31回の範囲内に入り、その標準偏差（SD）は全べて平均値の20%以下であった。すなわち各刺激毎に誘発される咳発作数の変動は実験期間を通じて非常に軽微であった。また残りの1例は1刺激当りの咳反射数が14.42であり、他の9例に比べると明らかに少いがそのSDは平均値の20.8%であり、他の9例と殆んど差がなく、各刺激毎に誘発される咳反射数は実験期間を通じて安定していた。

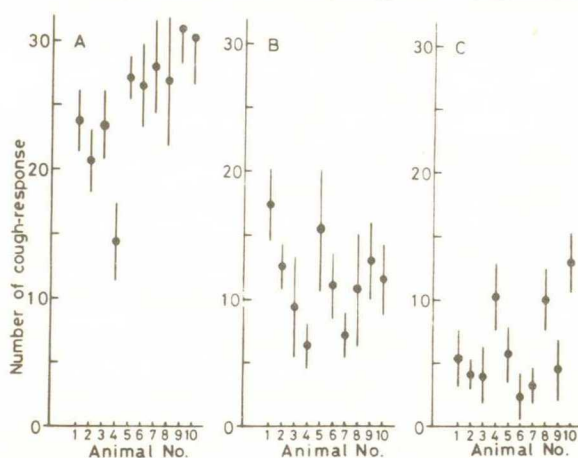


Fig. 1-7 Number of cough-response in dog and cat

A: "Coughing dog" method
B: "Coughing cat" method
C: Domenjoz's method

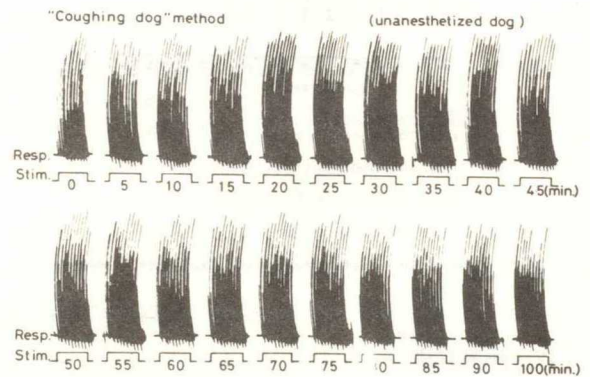


Fig. 1-8 Cough-response curve in "coughing dog" method

Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)
Stim.: Stimulation

b) 各刺激毎に誘発される咳反射の強さ(咳嗽曲線の振巾の高さ)の安定性についてみると、10例中8例はFig. 1-8に示す如く、5分毎に12回刺激した場合(55分間)、いずれの場合にも殆んど等しい振巾高を示し、咳発作の強さは55分間減弱したり、変動することはなかった。しかし他の1例は第10回目刺激(45分)以降振巾が漸次減少した。また残り1例は第8回目刺激(35分)以降、鳴き喚き(vocalization)、体動が激しく安定した咳嗽曲線が得られなかった。

2 咳嗽猫法^[59]

用意された10匹の「咳嗽猫」の各個体について、

a) 各刺激毎に誘発される咳反射数の安定性についてみると、5分毎に10回刺激した場合(45分間)、1刺激当りの咳反射数(咳嗽曲線の振巾の数)の平均値(±SD)はFig. 1-7-Bに示す如く、6~18回の範囲内に10例全例が入り、10例中8例のSDは平均値の20%以下であり、他の2例は30%以下であった。すなわち各刺激毎に誘発される咳反射数の変動は実験期間を通じて軽微であった。

b) 各刺激毎における咳反射の強さの反定性についてみると、10例中6例はFig. 1-9に示す如く、5分毎に10回刺激した場合(45分間)、いずれの刺激に対しても殆んど等しい振巾高を示し、咳反射の強さは45分間を通して殆んど変動しなかった。しかし他の4例は第5~6回目刺激(20~25分)時より振巾が増大する傾向を示し、その内の2例は9回目刺激(40分)時より麻酔深度が浅くなり、体動が著しく、明らかに振巾の増大が認められた。

3 猫上喉頭神経電気刺激法^[25]

本実験に用いた10匹の軽麻酔ネコの各個体について、

a) 各刺激毎に誘発される咳反射数の安定性についてみると、5分毎に10回刺激した場合(45分間)、1刺激当りの咳反射数の平均値(±SD)はFig. 1-7-Cに示す如く、2~13回の範囲内に10例全例が入ったが平均値に対するSDの割合が大となった。すなわち20%以下である例数は10例中1例、21~30%に入る例数は10例中3例で、残りの10例中6例は31~77%であった。すなわち各刺激毎に誘発される咳反射数(45分間)の変動は上記2方法に比べてはるかに大であった。

b) 各刺激毎における咳反射の強さの安定性についてみると、10例中5例はFig. 1-10に示す如く、いずれの刺激に対しても比較的安定した振巾高を示し、咳反射の強さは比較的変動しなかった。しかし、他の5例は第5~6回目刺激(20~25分)時より振巾が増大する傾向を示し、第8~9回目刺激(35~40分)時より体動が出現し、安定した咳嗽曲線が得られなかった。

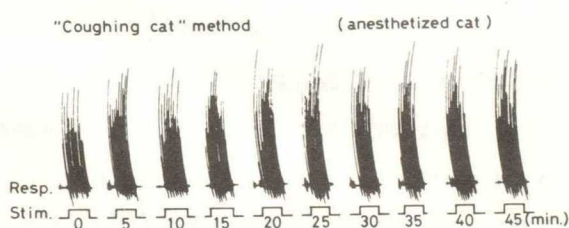


Fig. 1-9 Cough-response curve in "coughing cat" method

Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)
Stim.: Stimulation

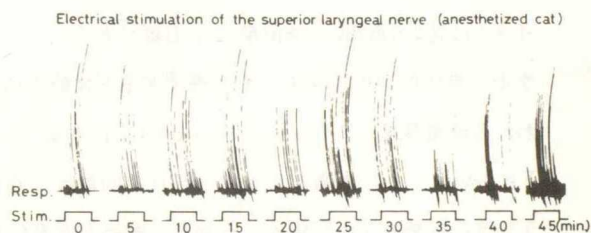


Fig. 1-10 Cough-response curve in Domenjoz's method

Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)
Stim.: Stimulation

4 モルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法^[159]

本実験に用いた10匹(1群)のモルモットの各個体について、

a) 各刺激毎に誘発される咳発作数の安定性についてみると、1刺激当りの咳反射数の平均値(±SD)はFig. 1-11に示す如く、

A: 10分毎に4回刺激した場合(○)は1~14回、B: 20分毎に4回刺激した場合(●)は1~13回、

C: 60分毎に4回刺激した場合(△)は1~24回と個体差が大きくしかも大多数のSDは平均値より大きな値を示した。すなわち各刺激毎に誘発される咳反射数の変動は刺激間隔を60分まで延長した場合にも、上記3方法に比べてはるかに大であった。

b) 各刺激毎における咳反射の強さの安定性については、上記3方法の様に咳反射状態を記録出来ず、定量的比較は出来なかった。

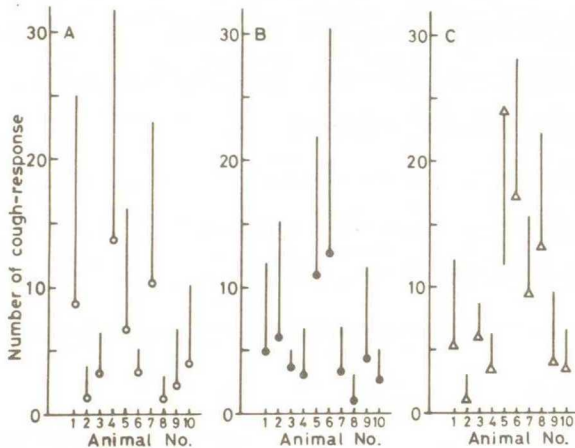


Fig. 1-11 Number of cough-response in modified method of Winter and Flataker

A: Coughing was induced every 10 minutes

B: Coughing was induced every 20 minutes

C: Coughing was induced every 60 minutes

第3節 小括ならびに考察

1 咳嗽犬法は無麻酔イヌの気管粘膜を刺激毛で機械的に刺激し、咳反射を誘発し、その気管内圧の変化を咳嗽曲線として記録する。実験終了後咳嗽曲線の振巾の高さと頻度を計測することにより咳反射の状態変化を観察できる。

初回刺激時における咳反射回数(咳嗽曲線の振巾の数)は10例の平均で21.5回と高い反応値を示し、しかも5分毎に刺激を12回繰り返した場合にも途中で咳反射数が減少したり又消失したりせず、実験中ほぼ安定する事が判明した。また各個体について第1~

12回の刺激を通じた咳反射数(平均値)お

よびその強さ(咳嗽曲線の振巾の高さ)について検討した結果、咳反射回数は10例中9例が20~31回の範囲内にあり、個体差は非常に少なく、また咳の強さも10例中8例が第12回目刺激まで動揺せず安定した咳嗽曲線が得られた。ただ10例中1例が第8回目刺激以降に(実験開始後30~45分)厭きてきたのか落ち着きなく、体動し安定した咳嗽曲線が得られなかった。これらの事から実験にはあらかじめおとなしいイヌを選択するか、また長時間測定を必要とする場合には本実験に先だち訓練した方が良い結果が得られるものと考えられる。

2 咳嗽猫法は^[59]軽麻酔ネコの気管粘膜を咳嗽犬法と同様に機械的刺激し、咳反射を誘発記録する方法である。ネコはイヌとは異なり取扱い上無麻酔では困難であった。また、咳反射の誘発は^[69]麻酔深度と密接に関連し、少し麻酔が深くなると咳反射が出現せず、また浅すぎると体動が出現し安定した咳嗽曲線が記録出来なかった。本実験に相当と思われる麻酔深度は、pentobarbital-Na 20~25 mg/kgを腹腔内投与した場合であり、この麻酔条件下において、初回刺激時における咳反射回数は10例の平均で10.5回であり比較的高い反応値を示した。しかも5分毎に刺激を10回繰り返した場合、咳反射回数は初期増加傾向を示すが実験中ほぼ安定していた。また各個体について第1~10刺激を通じた咳反射数(平均値)およびその強さ(咳嗽曲線の高さ)について検討した結果、咳反射回数は全例が6~18回の範囲内にあり、また咳反射の強さも10例中6例が第10刺激まで安定した咳嗽曲線が得られた。しかし、他の4例は第5~6刺激(20~30分)以降増大傾向を示した。これらのことから、(軽)麻酔下における本実験は、取扱い上の困難性のみならず反応性およびその安定性についても無麻酔実験(咳嗽^{[54][55][56]}犬法)に比べて多少劣る点もあるが有用性は充分あるものと思われる。

3 猫上喉頭神経電気刺激法は^[25]咳嗽猫法と同様、^[59]軽麻酔下ネコの上喉頭神経を電気刺激し、咳反射を誘発記録する方

法である。初回刺激時における咳反射回数は10例の平均で6.1回であり、咳嗽猫法に比べるとやや低い反応値であるが、初回より安定していた。また各個体について、第1～10刺激を通じた咳反射数（平均値）およびその強さについて検討した結果、咳反射回数は全例が2～13回の範囲内に入り、また咳反射の強さも10例中5例は第10刺激までほぼ安定した咳嗽曲線が得られた。しかし他の5例は第5～6回目刺激（実験開始後20～25分）より咳嗽曲線が動揺しはじめ、咳嗽猫法に比較して安定性が劣っていた。これらの事から本法は麻酔深度が安定している時期には上喉頭神経を定量的に電気刺激することが可能であり非常に安定した咳反射が得られる。しかし麻酔深度が浅くなり体動がわずかでも出現する状態下では、刺激電極と神経の間で生ずる機械的刺激が電気刺激に相加されたり、また刺激電極と神経の間の接触抵抗の変化を生じてかえって刺激強度が変動し、咳反応が動揺しやすい事が判明した。

- 4 ^[159] モルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法は刺激性を有するアンモニア溶液のエアロゾルをモルモットに吸入させ、咳反射を誘発しその数を肉眼的に計測する方法である。初回刺激時における咳反射回数は10例の平均で3群共に14～16回の範囲内に入り、比較的高い反応値を示した。しかし平均値に対するSDの割合は71～85%となり非常に個体差が大きい事が判明した。さらに加えて不都合な点は第2回目刺激以降咳反射回数が急激に減少し、第4回目刺激では殆んど例において咳反射が消失したことである。これらの事から本法は効力検定法として採用するにはかなりの制約を伴う為に不適当と思われる。

第4節 結 論

以上の4方法について効力検定法としての有用性について比較検討すると、咳嗽犬法は前述（^{[54][55][56]}p. 3）した検定法の必要条件1）、2）、4）、5）、6）を、また咳嗽猫法は1）、2）、4）、6）を、猫上喉頭神経電気刺激法は1）、2）を満足させるが、モルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法は5）を満足させるのみで、他のいずれの条件をも満足していない。すなわち現時点においては、効力検定法として咳嗽犬法が最も適当であり、次いで咳嗽猫法、猫上喉頭神経電気刺激法の順に実用性が認められ、モルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法は今回使用した実験条件下では不適当であるという結論に達した。

第2章 既知鎮咳活性物質の効力検定

前章において、鎮咳作用の効力検定法として咳嗽犬法が最も適当であり、次いで咳嗽猫法、猫上喉頭神経電気刺激法の順に有用である事を結論した。しかし前述（^{[54][55][56]}p. 3）した効力検定法としての必須条件3）、すなわちこれらの方法で得られた結果が臨床成績と一致するか否かについての検討が残されている。

本章では鎮咳剤の基準薬であるcodeine phosphate および臨床効果の確認されている2、3の鎮咳剤について咳嗽犬法における成績を中心に臨床成績との相関について検討した。

第1節 実験材料ならびに実験方法

体重5～11kgの健康成熟雑種のイヌ、あるいは2～4kgの成熟ネコを雌雄の別なく1群5匹以上、4群以上使用し、^{[54][55][56][59]}「咳嗽犬および咳嗽猫」法を用い検討した。鎮咳効果の判定は記録紙上にあらわれた咳嗽曲線の振巾と頻度の両者あるいは一方（特に前者）が薬物投与前対照の振巾と頻度に比べ20%以上抑制され、かつその抑制が薬物投与後少なくとも20分間以上持続した場合を有効と判定した。各投与量毎に得られた有効率から^[89]Litchfield-Wilcoxon法により、50%鎮咳有効量（50% Antitussive effective dose, AtD₅₀）とその信頼限界を算出した（P=0.05）。

実験に使用した薬物はmorphine hydrochloride (塩野義, Fig. 5-1), codeine phosphate (塩野義, Fig. 5-2), oxymetobanil hydrochloride (Metebanyl[®], 三共, Fig. 5-4), dimethylthiambutene hydrochloride (Ohton[®], 小野薬品, Fig. 5-7), pethidine hydrochloride (Opystan[®], 田辺, Fig. 5-6), dextromethorphan hydrobromide (塩野義, Fig. 5-3), noscapine hydrochloride (岩城製薬, Fig. 5-5), pentobarbital sodium (Nembtal[®], 大日本製薬), ether (昭和エーテル), liquid paraffin (和光純薬) などである。また tipepidine hibezoate (Asverin[®], 田辺, Fig. 5-8), picoperidamine hydrochloride (Coben[®], 武田, Fig. 5-20), chloperastine hydrochloride (Hustazol[®], 武田, Fig. 5-18), alloclamide hydrochloride (Hexacol[®], 藤沢, Fig. 5-23), benproperine phosphate (Flaveric[®], 台糖フェイザー, Fig. 5-16) 等は各商品より抽出精製し、融点測定、原素分析にて確認した後実験に供した。また tipepidine は水溶性のクエン酸塩に変換し使用した。

第2節 実験成績

I 麻薬性鎮痛薬

強力な鎮痛作用を有するアヘンアルカロイドおよびその誘導体あるいは麻薬性合成鎮痛剤は臨床的に強力な鎮痛作用を具えている事が知られているので本項ではmorphine, dimethylthiambutene, pethidine, について検討した。

1 Morphine hydrochloride

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]} 0.23 mg/kg, i.v. 以下の用量では投与後5～10分間は振巾、頻度共に20%程度抑制する例もみられたが、15～20分後には5例全例投与前の状態に回復し、判定基準に達しなかった。また投与直後眼球を左右上下に動かし、不安様症状(restlessness)を呈し、次いで鎮静、弱い呼吸抑制を示す例が認められた。0.28 mg/kg, i.v. に増量すると、5例中1例が判定基準に達し有効となった。しかし明らかな鎮静作用と呼吸抑制作用が認められた。以下0.33 mg/kg, i.v. では5例中3例が、0.4 mg/kg では6例中4例が、0.48 mg/kg では5例全例が判定基準に達し有効となり、Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出したAtD₅₀値は0.3(0.25～0.37) mg/kg, i.v. となった。また0.48 mg/kg, i.v. 以上の用量では全例に明らかな呼吸抑制と鎮静作用が認められた。Fig. 1-12にmorphine hydrochloride 0.48 mg/kg, i.v. 投与した場合の典型的な咳嗽曲線を示す。

b) 咳嗽猫法の場合：^[59] 0.11 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例無効であった。0.16 mg/kg, i.v. に増量すると6例中2例が、0.23 mg/kg, i.v. では6例中4例が、0.33 mg/kg, i.v. では5例中4例が、0.48 mg/kg, i.v. では5例全例が判定基準に達し有効となり、Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出したAtD₅₀値は0.21(0.16～0.27) mg/kg, i.v. となった。また0.23 mg/kg 以上の用量では投与直後より明らかな呼吸抑制が、また0.33 mg/kg, i.v. 以上の用量では咳嗽曲線が投与前の状態まで完全に回復しない例が認められた。

2 Dimethylthiambutene hydrochloride

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]} 0.58 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例無効であった。0.69 mg/kg, i.v. に増量すると5例中1例が、0.83 mg/kg, i.v. および1.00 mg/kg, i.v. では各々5例中4例が、1.2 mg/kg, i.v. では5例全例が判定基準に達し有効となり、Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出したAtD₅₀値は0.79(0.68～0.92) mg/kg, i.v. となった。またmorphineの場合と

同様鎮咳有効量で明らかな呼吸抑制と鎮静作用が、さらに1.0 mg/kg以上の用量では頭部の振せんを発現する例が認められた。Fig. 1-13にdimethylthiambutene hydrochloride 1.0 mg/kg, i.v.投与した場合の典型的な咳嗽曲線を示す。

- b) 咳嗽猫法^[59]の場合：0.28 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例無効であった。0.40 mg/kg, i.v. に増量すると5例中1例が、0.58 mg/kg, i.v. では各々5例中3例が、1.2 mg/kg, i.v. では5例中4例が、1.73 mg/kg, i.v. では5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出したAtD₅₀値は0.65 (0.45~0.92) mg/kg, i.v. となった。また、morphineの場合と同様、鎮咳用量では明らかな呼吸抑制作用と、高用量では咳嗽曲線が投与前の状態まで回復しない例が認められた。

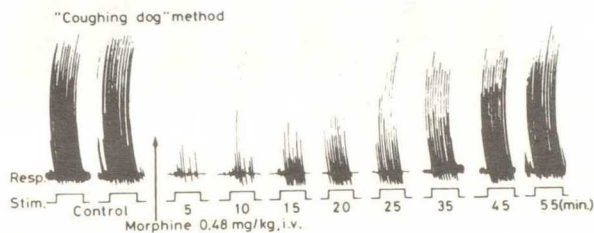


Fig. 1-12 Antitussive effect of morphine hydrochloride 0.48 mg/kg, i.v. in "coughing dog" method

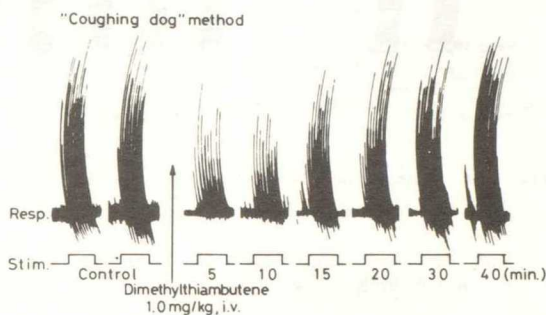


Fig. 1-13 Antitussive effect of dimethylthiambutene hydrochloride 1.0 mg/kg, i.v. in "coughing dog" method

3 Pethidine hydrochloride

- a) 咳嗽犬法^{[54][55][56]}の場合：1.44 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例が無効であった。2.07 mg/kg, i.v. 2.99 mg/kg, i.v. および4.3 mg/kg, i.v. では各々5例中3例が、6.19 mg/kg, i.v. では5例全例が有効となりLitchfield-Wilcoxon^[89]法により算出したAtD₅₀値は3.3 (2.68~4.06) mg/kg, i.v. となった。また呼吸抑制作用は鎮咳量で認められたがmorphineの場合と異なり、持続時間が短い。すなわち投与5分後における咳反射が殆んど消失する程度まで増量した場合にも、10~15分後には鎮咳作用、呼吸抑制作用共に急速に回復し、30~35分後には投与前の状態まで回復した。Fig. 1-14にpethidine hydrochloride 5.16 mg/kg, i.v.投与した場合の典型的な咳嗽曲線を示す。
- b) 咳嗽猫法^[59]の場合：1.2 mg/kg, i.v. および1.44 mg/kg, i.v. で各々5例中1例が有効となり、1.73 mg/kg, i.v. および2.07 mg/kg, i.v. で各々5例中3例、2.48 mg/kg, i.v. で5例中4例、2.99 mg/kg, i.v. で5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出したAtD₅₀値は1.85 (1.23~2.42) mg/kg, i.v. となった。また作用の持続時間は咳嗽犬法^{[54][55]}における場合と同様に短く、高用量を投与した場合にも少数例を除き咳嗽曲線は投与前の状態まで回復した。^[56]

II 麻薬性鎮咳薬

アヘンアルカロイドの中でcodeineは鎮痛作用、耐性、耽溺性その他の中枢作用がmorphineに比べ弱く、強力な鎮咳作用を保持していることから、古くより優れた鎮咳剤として臨床使用されてきた。一方Kobayashi et al.^[77]は14-hydroxymorphine誘導体の鎮咳作用を検討し、oxymetkebanolはcodeineの5~25倍に匹敵する活性を有するが、鎮痛作用はcodeineの2~4倍にすぎず、特異的で強力な鎮咳剤となり得る可能性を示唆した。本項ではcodeineとoxymetkebanolの鎮咳作用について検討した。

1 Codeine phosphate

- a) 咳嗽犬法^{[54][55][56]}の場合：1.44 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例無効であった。1.73 mg/kg, i.v. および2.07 mg/kg, i.v. に増量すると各々5例中2例が、2.48 mg/kg, i.v. では6例中4例が、2.99 mg/kg, i.v. では5例中4例が、3.58 mg/kg, i.v. では6例中5例が、4.30 mg/kg,

i.v. では5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出した AtD_{50} 値は2.40 (2.10~2.74) mg/kg, i.v. となった。またmorphineと同様、鎮咳用量で明らかな呼吸抑制作用と鎮静作用が認められた。また鎮咳作用、呼吸抑制作用の持続時間はmorphineより短く、高用量を用いた場合にも60~90分以内に全例投与前の状態に回復した。Fig. 1-15にcodeine phosphate 2.48 mg/kg, i.v. 投与した場合の典型的咳嗽曲線を示す。

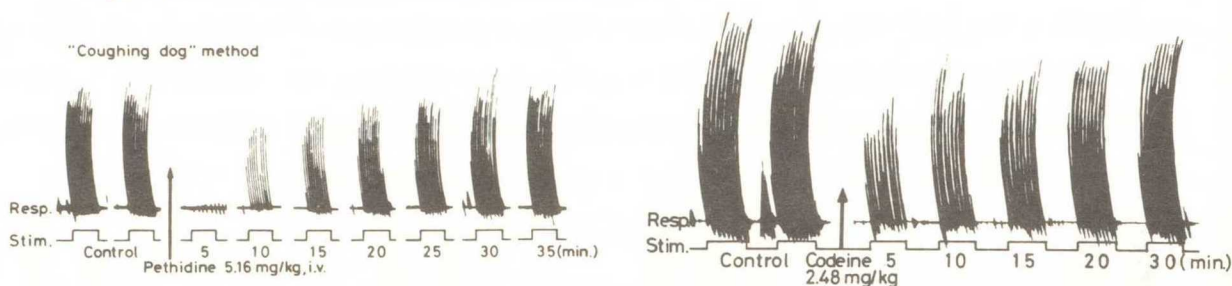


Fig. 1-14 Antitussive effect of pethidine hydrochloride 5.16mg/kg, i.v. in "coughing dog" method
Fig. 1-15 Antitussive effect of codeine phosphate 2.48mg/kg, i.v. in "coughing dog" method

b) 咳嗽猫法の場合：^[59]1.0 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例無効であった。1.44 mg/kg, i.v. に増量すると5例中2例が、2.07 mg/kg, i.v. および 2.9 mg/kg, i.v. では各々5例中3例が、4.3 mg/kg^[89]では5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon法により算出した AtD_{50} 値は2.25 (1.83~2.77) mg/kg, i.v. となった。またmorphineと同様鎮咳用量では明らかな呼吸抑制が認められ、高用量投与群では咳嗽曲線が投与前の状態まで回復しない例が認められた。

2 Oxymetobanol hydrochloride

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]}0.065 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例が無効であった。0.093 mg/kg, i.v. に増量すると5例中1例が、0.13 mg/kg, i.v. では6例中3例が、0.19 mg/kg, i.v. では5例中3例が、0.28 mg/kg, i.v. では5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出した AtD_{50} 値は0.16 (0.12~0.19) mg/kg, i.v. となった。また呼吸抑制作用は鎮咳有効量より少ない用量から発現しはじめ、その持続時間はmorphineより長く、高用量投与群では咳嗽曲線が投与前の状態まで回復しない例が認められた。Fig. 1-16にoxymetobanol hydrochloride 0.33mg/kg, i.v. 投与した場合の典型的咳嗽曲線を示す。

b) 咳嗽猫法の場合：^[59]0.078 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例無効であった。0.093 mg/kg, i.v. に増量すると5例中1例が、0.11 mg/kg, i.v. では各々5例中2例が、0.16 mg/kg, i.v. では5例中4例が、0.19 mg/kg, i.v. では5例中3例が、0.23 mg/kg, i.v. では5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出した AtD_{50} 値は0.14 (0.11~0.17) mg/kg, i.v. となった。また呼吸抑制作用はイヌの場合と同様morphineより持続的であり、高用量投与群では殆どの例で咳嗽曲線が投与前の状態まで回復しなかった。

Ⅱ 非麻薬性鎮咳薬

麻薬性鎮痛薬および鎮咳剤は前述したごとく、動物実験においても強力な鎮咳活性を有することが実証出来たが、同時に呼吸抑制作用を認めた。また臨床的には呼吸抑制の他に便秘、悪心、耐性形成、耽溺性(身体的依存性、精神的依存性)形成等の重大な副作用(adverse reaction)を有する事が判明している。これら麻薬の欠点を持たない非麻薬性鎮咳薬の開発が強く要望されていた。本項ではその第1号で、1953年WHOが麻薬から除外したdextromethorphan(morphineと類似構造)およびnoscapine(アヘンアルカロイド)、ま

た麻薬性合成鎮痛薬 thiambutene (Fig. 5-7) の誘導体である tipepidine また抗 histamine 薬 diphenhydramine (Fig. 5-17) の誘導体である chloperastine, アルケニルオキシ安息香酸の誘導体である alloclamide, また tripelennamine (Fig. 5-19) 誘導体である picoperidamine 等について鎮咳作用を検討した。

1 Dextromethorphan hydrobromide

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]} 8.91 mg/kg, i.v. 以下の用量では鎮静, 流涎, 弱い呼吸抑制等の中毒症状を認めたが, 鎮咳作用は 5 例全例が判定基準に達せず全例無効であった。10.7 mg/kg, i.v. に増量すると, 5 例中 1 例が判定基準に達し有効となった。12.8 mg/kg, i.v. に増量すると 7 例中 2 例が有効となり, 明らかな鎮静, 流涎, 呼吸抑制, 実験終了後固定台より放した場合に歩行異常を示すなどの中毒症状が認められた。15.4 mg/kg, i.v. に増量すると 9 例中 5 例が有効となった。しかし投与直後より眼球の異常運動, 不安様症状 (restlessness), 流涎, 5~10 分後より刺激中に強直性痙攣を発現する例や, 固定台より開放した際に立脚不能又は間代性痙攣を発現する例, 又痙攣を発現しない場合にも筋の明らかな rigidity が認められた。18.49 mg/kg, i.v. に増量すると 5 例中 4 例が有効となり, 著しい呼吸抑制, 嘔吐, 流涎, 間代性痙攣, 脱力, 歩行不能などが認められた。22.18 mg/kg, i.v. に増量すると 5 例全例が有効となったが, 35~55 分後に 2 例が死亡した。Litchfield-Wilcoxon 法^[89]により算出した AtD_{50} 値は 14.5 (12.5~16.8) mg/kg, i.v. となった。Fig. 1-17 に dextromethorphan hydrobromide 18.49 mg/kg, i.v. 投与した場合の典型的咳嗽曲線を示す。

b) 咳嗽猫法の場合：^[59] 2.49 mg/kg, i.v. 以下の用量では投与直後呼吸抑制を示す例が認められたが, 鎮咳作用は 5 例全例が判定基準に達せず無効であった。3.58 mg/kg, i.v. に増量すると 5 例中 1 例が, 6.19 mg/kg, i.v. では 5 例中 3 例が, 8.19 mg/kg, i.v. では 5 例全例が有効となり, Litchfield-Wilcoxon 法により算出した AtD_{50} 値は 4.85 (4.18~5.63) mg/kg, i.v. となった。中毒症状はイヌの場合とは異り, 呼吸抑制が認められる程度で, 痙攣などは発現しなかった。

2 Noscapine hydrochloride

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]} 6.19 mg/kg, i.v. 以下の用量では, 投与直後より不安様症状 (restlessness) と鳴き (vocalization) が多くなり興奮傾向となったが, 鎮咳作用は 5 例全例が判定基準に達せず無効であった。8.91 mg/kg, i.v. に増量すると, 5 例中 2 例が投与 3~5 分後に水様便を激しく脱糞 (噴射) し, 鳴き, 体動が多くなり, 呼吸は興奮的となったが, 鎮咳作用は有効と判定された。他の 3 例は鳴き, 体動呼吸興奮などの中毒症状は発現したが鎮咳作用は無効であった。12.8 mg/kg, i.v. では 5 例全例が有効となったが, 全例に激しい脱糞, 鳴き, 体動, 頭部振せん, 間代性痙攣が認められた。Litchfield-Wilcoxon 法^[89]により算出した AtD_{50} 値は 10.5 (8.90~12.4) mg/kg, i.v. となった。

Fig. 1-18 に noscapine hydrochloride 12.8 mg/kg, i.v. 投与した場合の典型的咳嗽曲線を示す。

b) 咳嗽猫法の場合：^[59] 7.43 mg/kg, i.v. 以下の用量では呼吸抑制を示す例が認められたが, 鎮咳作用は 5 例全例が無効であった。10.70 mg/kg, i.v. に増量すると 5 例中 1 例が, 15.4 mg/kg, i.v. では 5 例中 4 例が, 22.18 mg/kg, i.v. では 5 例全例が有効となり, Litchfield-Wilcoxon 法^[89]により算出した AtD_{50} 値は 13.0 (11.3~14.8) mg/kg, i.v. となった。中毒症状はイヌの場合とは異り, 呼吸興奮, 脱糞, 振せん, 痙攣等は発現しなかった。

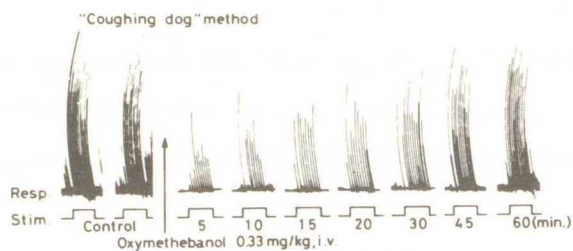


Fig. 1-16 Antitussive effect of oxymetnebanol hydrochloride
0.33mg/kg, i.v. in "coughing dog" method

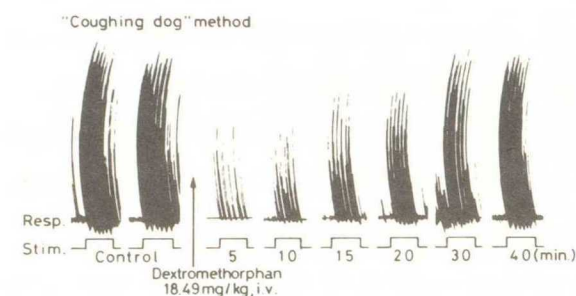


Fig. 1-17 Antitussive effect of dextromethorphan hydrobromide
18.49mg/kg, i.v. in "coughing dog" method

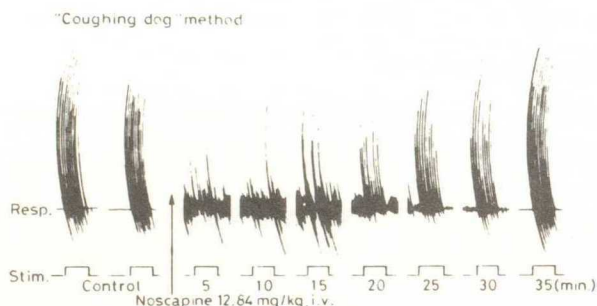


Fig. 1-18 Antitussive effect of noscapine hydrochloride
12.8mg/kg, i.v. in "coughing dog" method

3 Tlpepidine citrate

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]}1.4 4 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例が判定基準に達せず、鎮咳作用は全例無効であった。1.7 3 mg/kg, i.v. に増量すると5例中1例が、2.4 8 mg/kg, i.v. では5例中3例が、3.5 8 mg/kg, i.v. では5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon 法により算出したAtD₅₀値は2.3 6 (1.9 5~2.9 1) mg/kg, i.v. となった。2.4 8 mg/kg, i.v. 以上の用量では頭部振せん、不安様症状 (restlessness) が、2.9 9 mg/kg, i.v. 以上では鳴き、眼球運動、体動、呼吸興奮が、3.5 8 mg/kg, i.v. では間代性痙攣等の中毒症状が認められた。

4 Picoperidamine hydrochloride

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]}1.7 3 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例が判定基準に達せず鎮咳作用は全例無効であった。2.0 7 mg/kg, i.v. に増量すると5例中1例が、2.4 8 mg/kg, i.v. では5例中3例が、2.9 9 mg/kg, i.v. では5例中4例が、3.5 8 mg/kg, i.v. では5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon 法により算出したAtD₅₀値は^[89]2.4 9 (2.1 5~2.8 8) mg/kg, i.v. となった。2.0 7 mg/kg, i.v. 以上の用量では、頭部振せん、不安様症状 (restlessness)、眼球運動、鳴

き、2.4 8 mg/kg, i.v. 以上の用量では咬筋の間代性痙攣、呼吸興奮、流涎などの中毒症状が認められた。3.5 8 mg/kg, i.v. では全例に激しい全身性の振せん、間代性および強直性の痙攣、放尿、脱糞、などが認められた。

5 Chloperastine hydrochloride

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]}2.4 8 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例が判定基準に達せず鎮咳作用は全例無効であった。2.9 9 mg/kg, i.v. および3.5 8 mg/kg, i.v. に増量すると各々5例中2例が、4.3 0 mg/kg, i.v. および5.1 2 mg/kg, i.v. では各々5例中3例が、6.1 9 mg/kg, i.v. では5例中4例が、^[89]7.4 3 mg/kg, i.v. では5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon 法により算出したAtD₅₀値は4.1 2 (3.2 3~5.1 5) mg/kg, i.v. となった。2.9 9 mg/kg, i.v. 以下の用量では鎮静傾向が認められたが、3.5 8 mg/kg, i.v. 以上の用量では鳴き、不安様症状、5.1 2 mg/kg, i.v. 以上の用量では咬筋の間代性痙攣、全身性の振せんなどの中毒症状が認められた。

6 Alloclamide hydrochloride

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]}2.4 8 mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例が判定基準に達せず鎮咳作用は全例無効であった。2.9 9 mg/kg, i.v. に増量すると5例中2例が、3.5 8 mg/kg, i.v. では5例中3例が、4.3 0 mg/kg, i.v. では6例中3例が、5.1 2 mg/kg, i.v. では5例中4例が、6.1 9 mg/kg, i.v.

では5例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon^[89]法で算出したAtD₅₀値は3.72(2.96～4.15)mg/kg, i.v. となった。2.99mg/kg, i.v. 以上の用量では投与後一時的に鎮静傾向を示し、3.58mg/kg, i.v. 以上の用量では鎮静の後不定様症状・鳴き、呼吸興奮が、4.30mg/kg, i.v. 以上の用量では投与直後より鳴き、頭部振せん、眼球運動が発現し、投与10～20分後より著しい呼吸興奮が、5.12mg/kg, i.v. 以上の用量ではまれに間代性痙攣が認められた。

7 Benproperine phosphate

a) 咳嗽犬法の場合：^{[54][55][56]}2.07mg/kg, i.v. 以下の用量では5例全例が判定基準に達せず鎮咳作用は全例無効であった。2.99mg/kg, i.v. に増量すると5例中1例が、4.30mg/kg, i.v. では5例中3例が、6.19mg/kg, i.v. では5例中4例が、8.91mg/kg, i.v. では5例全例が有効となり、Litcfield-Wilcoxon^[89]法により算出したAtD₅₀値は4.10(2.82～5.95)mg/kg, i.v. となった。中毒症状は弱く、6.19mg/kg, i.v. 以上の用量で投与直後～5分後に舌なめずり(licking), 流涎(salivation)を発現する程度であった。Table 1-1 に使用した各薬剤の「咳嗽犬および猫法」におけるAtD₅₀値および経口投与時の標準的一回臨床使用量(mg)を要約する。

Table 1-1 Antitussive activity in dogs and cats

Group	Drug	Salt	Animal	AtD50 ₀ (mg/kg, i.v.)	Confidence limits (p=0.05)	Ratio to ^{a)} morphine	Ratio to ^{b)} codeine	Clinical dose (mg/man) Times to codeine ^{c)}	
I	Morphine	HCl-salt	dog cat	0.30* 0.21	0.25-0.37 0.16-0.27	1.00 1.00	8.00 10.71	2-5	$\frac{1}{4-7.5}$
	Dimethyl- thiambutene	HCl-salt	dog cat	0.79* 0.65	0.68-0.92 0.45-0.92	0.38 0.32	3.04 3.56	10-15	$\frac{1}{1.3-1.5}$
	Pethidine	HCl-salt	dog cat	3.30* 1.85	2.68-4.06 1.23-2.42	0.09 0.11	0.73 1.22	25-50	1.7-2.5
II	Codeine	H ₃ PO ₄ -salt	dog cat	2.40* 2.25	2.10-2.74 1.83-2.77	0.13 0.09	1.00 1.00	15-20	1.0
	Oxymethobanol	HCl-salt	dog cat	0.16* 0.14	0.12-0.19 0.11-0.17	1.88 1.50	15.00 16.07	2.0	$\frac{1}{7.5-10}$
III	Dextro- methorphan	HBr-salt	dog cat	14.5*** 4.85	12.5-16.8 4.18-5.63	0.002 0.043	0.17 0.46	15-20	1.0
	Noscapine	HCl-salt	dog cat	10.5*** 13.0	8.90-12.4 11.3-14.8	0.029 0.016	0.23 0.17	20-30	1.3-1.5
	Tipecidine	Citrate	dog	2.36**	1.95-2.91	0.127	1.04	20-30	1.3-1.5
	Picoperidamine	HCl-salt	dog	2.49***	2.15-2.88	0.120	0.96	60	3-4
	Chloperastine	HCl-salt	dog	4.12**	3.23-5.15	0.073	0.58	10-20	1-1.5
	Allocalamide	HCl-salt	dog	3.72**	2.96-4.51	0.081	0.65	20-25	1.3
	Benproperine	H ₃ PO ₄ -salt	dog	4.10	2.82-5.95	0.073	0.59	26.4	1.3-1.8

Coughing was induced by mechanical stimulation on the tracheal mucosa

a) : Ratio of efficacy to that of morphine

b) : Ratio of efficacy to that of codeine

c) : Times of clinical dose to that of codeine

* : Depression of respiration and sedation occurred

** : Tremor, Vocalization and restlessness occurred

*** : Convulsion occurred

第3節 小括ならびに考察

Morphine を代表とするアヘンアルカロイドおよびその誘導体、あるいは麻薬性合成鎮痛薬が臨床的に強力な鎮咳作用を具えている事はよく知られている。1950年以前すなわち鎮咳作用の効力検定法が確立されていない時代にはこれら麻薬性鎮痛薬の副作用である鎮咳作用を鎮咳の目的に使用せざるを得ない状態であった。本章では咳嗽犬法および咳嗽猫法を用いてこれら麻薬性鎮痛薬及び麻薬性鎮咳薬、又鎮咳作用の効力検定の進歩と共に開発された非麻薬性鎮咳薬の鎮咳効果を再評価し、本法における実験成績が臨床効果と相関するか否かについて検討した。

Morphine は Sertürner (1805) によってはじめてアヘンより単離され、Gulland and Robinson (1925) により提案された化学構造が合成的証明のないまま第2次大戦後まで一般に認められていた。

しかし Gates and Tschudi (1952) により全合成され、結晶単離後一世紀半にしてようやくその構造が確定した。^[108] 一方 morphine の鎮咳作用を動物を用いて最初に検討したのは Ernst (1938)^[33] であり、胸膜腔に Lugol 氏液を注入し無菌の胸膜炎を起しておき、咳をしやすくした猫の気管をつかむか、胸をたたいて咳を起させ、肉眼的に咳の数を数える方法を用いた。その後 Eichler and Smiatek (1940)^[27] : モルモットに 0.5 N Sulphuric acid を吸入させ咳を起す方法、Kroepfli (1950)^[80] : 麻酔ネコに soap powder を吸入させる方法、Kasé (1952)^[54] : イヌの気道粘膜を刺激毛で機械的に刺激する方法、Stefko and Benson (1953)^[143] : イヌの気管粘膜下織を電氣的に刺激する方法、May and Widdicombe (1954)^[92] : 麻酔ネコの気道粘膜を機械的に刺激する方法、Green and Ward (1955)^[39] : 麻酔ネコおよび麻酔モルモットの上喉頭神経 (SLN) を電氣的に刺激する方法、Hass (1955)^[43] : 麻酔ネコの SLN を電氣的に刺激する方法、Matallana and Borison および Chakravarty et al. (1956)^[18] : 除脳ネコの延髄特定部位を電氣的に刺激する方法、等により検討された。いずれの方法においても、morphine は動物に誘発した咳様反応を明らかに抑制することが実証された。一方著者の実験でも、咳嗽犬法の場合には 0.28 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、その AtD₅₀ 値は 0.30 mg/kg, i.v. となり、又咳嗽猫法の場合には 0.16 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、その AtD₅₀ 値は 0.21 mg/kg, i.v. となった。無麻酔イヌおよび軽麻酔ネコのいずれの場合にも先駆者の研究結果と同様に morphine の鎮咳作用を確認出来た。

Dimethylthiambutene は Adamson (1950)^[57] により合成された。動物における鎮咳作用は Kasé et al. (1955, 1958, 1959)^{[57][58][60]}, Kasé and Yuizono (1959)^[61] により検討され、無麻酔イヌでは morphine の 0.4 倍、麻酔ネコでは morphine の 0.17 倍に相当する鎮咳活性を有する事が報告されている。一方著者の実験でも、咳嗽犬法の場合には 0.69 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、その AtD₅₀ 値は 0.79 mg/kg, i.v. となり、morphine の 0.38 倍、咳嗽猫法の場合には 0.4 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、その AtD₅₀ 値は 0.65 mg/kg, i.v. となり、morphine の 0.32 倍に相当する事が確認出来た。

Pethidine はアトロピン類似化合物の開発研究にて Eisleb (1939) により偶然発見された最初の合成麻薬であり、現在も優れた鎮痛剤として臨床使用されている。^[107] しかしその鎮咳作用については Segal (1950)^[131] が特に喘息時の咳発作に有用である事を報告しているが、鎮咳作用を目的としてはあまり臨床使用されていない。一方、動物における鎮咳作用は Hass (1955)^[43], Kasé et al. (1958, 1963)^{[58][62]} により検討されてその鎮咳作用が実証された。一方、著者の実験でも咳嗽犬法の場合には 2.07 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、その AtD₅₀ 値は 3.3 mg/kg, i.v. となり、morphine の 0.09 倍に相当する活性を、咳嗽猫法の場合には 1.20 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられその AtD₅₀ 値は 1.85 mg/kg, i.v. となり、morphine の 0.11 倍に相当する活性を有することが確認出来た。しかし実験成績の項において指摘した如く、投与 5 分後における咳反応が殆んど消失する程度まで用量を増加した場合にも 10~15 分後には殆んど投与前の状態にまで急速に回復し、その持続時間が非常に短いことが他の鎮痛、鎮咳薬と大きく異っていた。この様に持続的でないことが臨床効果とある程度関連するものと考えられる。

以上、麻薬性鎮痛薬の鎮咳作用を咳嗽犬法および咳嗽猫法により検討した結果いずれの薬剤にも明白な鎮咳作用を確認出来た。又、Table 1-1 に示す如く本法における各薬剤の AtD₅₀ 値の比率と臨床用量 (標準的 1 回用量) の比率は大体一致することが判明した。しかしこれら麻薬性鎮痛剤にはすべて鎮咳用量において呼吸抑制作用および鎮静作用が認められ、鎮咳薬としては好ましくない作用 (adverse reaction, untoward effect, unwanted effect) を併有していることも判明した。次いで、麻薬性鎮痛剤に比し鎮痛作用をはじめその他の中枢作用が緩和で、比較的鎮咳作用が選択的である codeine および oxymetobanол について検討した。

CodeineはRobiquet (1832) がアヘンからmorphine を製造しているとき不純物として発見され、Grimaux (1881) により初めて合成された。^[109] 一方動物におけるcodeineの鎮咳作用については、Ernst (1938),^[33] Elchler and Smiatek (1940),^[27] Witer and Flataker (1952):^[158] イヌに0.5N Sulphuric acid を吸入させる方法、Kasé (1952),^[54] Toner and Macko (1952):^[157] 麻酔ネコのSLNを電氣的に刺激する方法、Stefko and Benson (1953),^[143] Konzett and Rothlin (1954):^[78] 麻酔ネコの気管粘膜をニワトリの羽毛で刺激する方法、Winter and Flataker (1954):^[159] モルモットにアンモニア水エアロゾルを吸入させる方法、May and Widdicombe (1954):^[92] Pellmont and Bachtold (1954):^[112] 麻酔ネコのSLNを電氣的に刺激する方法、Pellmont and Bachtold (1954):^[112] イヌの気管粘膜下織を電氣的に刺激する方法、Green and Ward (1955):^[34] イヌの気管粘膜をポリエチレン細管で刺激する方法、Levis et al. (1955):^[88] 麻酔ネコのSLNを電気刺激する方法、Hass (1955):^[43] Green and Ward (1955),^[39] Friebel and Reichle (1955):^[90] モルモットに亜硫酸ガスを吸入させる方法、Matalana and Borison (1955),^[90] Chakravarty et al. (1956):^[18] Chen et al. (1960):^[20] モルモットに1.0N亜硫酸を吸入させる方法、Hass (1955):^[43] Green and Ward (1955),^[39] Friebel and Reichle (1955):^[37] モルモットに亜硫酸ガスを吸入させる方法、Matalana and Borison (1955):^[90] Chakravarty et al. (1956):^[18] Chen et al. (1960):^[20] モルモットに1.0N亜硫酸を吸入させる方法、Stefko et al. (1961):^[144] ネコに7%アンモニア水を吸入させる方法、等により検討されいずれの方法においても動物に誘発した咳様反応をcodeineは抑制する事が実証された。一方著者の実験でも咳嗽犬法の場合には1.73mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は2.40mg/kg, i.v. となりmorphineの0.3倍、咳嗽猫法の場合には1.44mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は2.25mg/kg, i.v. となりmorphineの0.09倍に相当する活性を有することが確認出来た。

Oxymethobanolはmorphineの14-hydroxy誘導体であり関^[132] (1963)により合成された。その動物における鎮咳作用は高木ら^[153] (1969), Kobayashi et al. (1970):^[77] により検討され、モルモットの気管粘膜を機械的の刺激する方法ではcodeineの25倍(皮下), 14倍(経口), 又モルモットにアンモニアガスを吸入させる方法では約10倍(皮下), 約5倍(経口)に相当する活性を有することが報告されている。一方著者の実験では、^{[54][55][56]} 咳嗽犬法の場合には0.093mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は^[59] 0.16mg/kg, i.v. となりmorphineの1.88倍、咳嗽猫法の場合には0.093mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は0.14mg/kg, i.v. となりmorphineの1.50倍に相当する活性を有することが確認出来た。以上、麻薬性鎮咳剤の場合にもTable 1-1に示す如く、本法における各薬剤のAtD₅₀値の比率と臨床用量の比率は非常によく一致することが判明した。またcodeine, oxymethobanolいずれも麻薬性鎮痛薬の場合と同様に鎮咳有効量では明らかな呼吸抑制作用と鎮静作用を発現することも判明した。

さらにdextromethorphan, noscapine, tipecidine, picoperidamine, chloperastine, alloclamide, benproperine等の非麻薬性鎮咳剤についても^{[54][55][56]} 咳嗽犬法により鎮咳作用を再評価し、臨床効果との相関を検討した。

Dextromethorphanはmorphine誘導体としてSchnider et al. (1950):^[128] により合成され、薬理的にはBenson et al. (1953):^[5] により検討された。特に動物における鎮咳作用は、Pellmont and Bachtold (1954):^[112] Matalana and Borison (1955):^[90] Chakravarty et al. (1956):^[18] Chen et al. (1960):^[20] Stefko et al. (1961):^[144] 等により検討され右旋性である本化合物は左旋性異性体とは異なり鎮痛作用を殆んど示さないがcodeineより強力な鎮咳作用を有することが報告された。又Isbell

et al. (1952,^[46] 1953^[47]) の人体実験で麻薬様の耽溺現象が認められないこと、更に禁断症状を発現しているアヘン中毒患者に本化合物を投与した場合にも禁断症状が依然残存することなど、morphineとは全く異なる作用を有することが報告され、WHOでは1953年本化合物を麻薬から除外した。一方著者の実験では、咳嗽大法^[54]の場合には10.7 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は14.5 mg/kg, i.v. となりcodeineの0.17倍、咳嗽猫法^[59]の場合には3.58 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は4.85 mg/kg, i.v. となりcodeineの0.46倍に相当する活性を有することが確認出来た。

Noscapineはアヘン中にmorphineについて多く、3~10%含有するアルカロイドであり、Derosne(1803)により単離されmorphine様作用を有するとしてnarcotineなる名称がつけられた。しかしその後多くの研究者により検討され、期待されたmorphine様麻酔作用、鎮痛作用の存在は否定され、毒性の弱い薬理学的不活性物質であることが判明し、長い間見捨てられる結果となった。ところがToner and Macko (1952)^[157]の「鎮咳作用は必ずしもその薬物の麻酔作用や鎮痛作用の強弱に依存するものではない」との提唱が契機となり、noscapineの鎮咳作用がWinter and Flataker(1954)^[159]、Konzett and Rothlin(1954)^[78]、Hass(1955)^[43]などによりあらためて検討され、codeineに匹敵する活性を有することが報告され、再び脚光を浴びる様になった。又morphineとは異なり鎮痛作用は無く、他の薬理作用も非常に軽微であることが確認され、WHOは1953年にdextromethorphanと同様麻薬から除外した。一方著者の実験では、咳嗽大法の場合には8.91 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は10.5 mg/kg, i.v. となりcodeineの0.23倍、咳嗽猫法の場合には10.7 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は13.0 mg/kg, i.v. となりcodeineの0.17倍に相当する鎮咳活性を有することが確認出来た。

TipepidineはKasé et al. (1955)^[57]の“Ohton[®]; dimethylthiambuteneは鎮痛、鎮咳の両作用を有し、iso-Ohtonでは鎮痛作用を殆んど消失するが鎮咳作用は残存する。さらにpiperidino-Ohtonでは鎮咳作用が最強となる。”という知見にもとずき、Okumura et al. (1958)^[110]により合成された。薬理学的にはKasé et al. (1959)^[61]により検討され、鎮咳作用はイヌではcodeineの1.6倍、ネコでは0.9倍に相当する活性を有し、N-allylnormorphine (NANM)により拮抗されず、連続投与により耐性、蓄積性が認められず、又連続投与後突然投薬を中止した場合、さらにNANMを投与した場合にも禁断症状を誘起しないことが報告されている。一方著者の実験では、咳嗽大法^{[54][55][56]}において1.73 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は2.36 mg/kg, i.v. となりcodeineの1.04倍に相当する活性を有することが確認出来た。

Picoperidamineはethylenediamine系抗histamine薬tripelennamineの誘導体であり、Kasé and Yuizono(1959)^[61]の“分子内にpiperidino-基を導入することにより、鎮咳作用が強化する”という仮説にもとずき、Miyano et al. (1970)^[94]により合成された。薬理学的にはKasé et al. (1969,^[70] 1970^[73])、加瀬ら(1970)^[74]により検討され、鎮咳作用はイヌではcodeineにほぼ匹敵する(静注)か、または僅かに弱い(経口)程度であるがネコでは弱い、又その機序は主に咳中枢の選択的な抑制作用であるが、麻薬性鎮咳剤のそれとははっきり異なることが報告されている。一方、著者の実験では、咳嗽大法^{[54][55]}において2.07 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、そのAtD₅₀値は2.49 mg/kg, i.v. となりcodeineの0.96倍に相当する活性を有することが確認された。

Chloperastineはdimethylaminoethylether系抗histamine薬diphenhydramine^[149]の誘導体であり、分子内にpiperidino-基を含有している。動物における鎮咳作用は高木ら(1961)により検討され麻酔モルモットの気道粘膜を刺激毛(ブタの毛一本)で機械的刺激する方法にて、codeineの1.9倍、^[152]又高木ら(1967)^{[54][55][56][59]}は咳嗽大法および咳嗽猫法にて検討し、イヌではcodeineの0.6倍、ネコではcodeine

にほぼ匹敵する活性を有することを報告している。一方著者の実験でも、咳嗽犬法^{[54][55][56]}において、 2.99 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例がみられ、その AtD_{50} 値は 4.12 mg/kg, i.v. となりcodeineの0.58倍に相当する活性を有することが確認された。

Alloclamideは1964年にフランスのCentre Européen de Recherches Mauverney (CERM)社において、アルケニールオキシ安息香酸誘導体の薬理作用を検討中、麻酔ネコのS LNを電気刺激するDomenjoz法^[25](1952)にて発見された。またKasé et al. (1966)^[66]はイヌでcodeineの0.29倍、ネコでは0.26倍に相当する活性を有することを報告している。一方、著者の実験でも咳嗽犬法^{[54][55][56]}において、その AtD_{50} 値は 3.72 mg/kg, i.v. となりcodeineの0.65倍に相当する活性を有することが確認された。

BenproperineはスエーデンのPharmacia Research Laboratory (Pharmacia 社)において、benzyl-phenoxy-Propan誘導体として合成され分子内にpiperidino-基を含有している。動物における鎮咳作用については、Johansen et al. (1963)^[52]が麻酔したイヌおよびネコを用いた実験においてcodeineの2~4倍の活性を有し、又その機序は肺伸張受容器(pulmonary stretch receptor)からの求心性impulseを遮断することであり、中枢(呼吸)抑制作用が極めて弱い事を報告している。また、Kasé et al. (1967)^[67]はイヌ・ネコいずれの場合にもcodeineに匹敵する活性を有し、NAN Mにより拮抗されないことを報告している。一方、著者の実験では、咳嗽犬法^{[54][55][56]}において 2.99 mg/kg, i.v. 以上の用量で有効例を認め、その AtD_{50} 値は 4.1 mg/kg, i.v. となりcodeineの0.59倍に相当する活性を有することが確認出来た。

以上、非麻薬性鎮咳剤についてもその鎮咳活性を咳嗽犬法^{[54][55][56]}(一部咳嗽猫法)^[59]により再評価した結果Table 1-1に示す如く、本法における各薬剤間の AtD_{50} 値の比率と臨床用量の比率は極く少数例を除き大体一致することが判明した。また大部分の鎮咳剤は鎮咳用量で著明な中毒症状を発現することも判明した。特にdextromethorphan, noscapine, picoperidamineは強く、 AtD_{50} 値に近い用量で間代性痙攣が認められた。又、tipepidine, chloperastine, alloclamideは AtD_{50} 値に近い用量で振せん、発声、不安様症状、又 AtD_{100} 値に近い用量で間代性および強直性痙攣などの強い中毒症状を発現する例も認められた。一方、benproperineは AtD_{100} 値に近い用量でも、投与直後一時的に舌なめずり、流涎などの弱い中毒症状を発現する程度であった。

第4節 結 論

第1部第1章において、鎮咳薬の効力検定法として咳嗽犬法^{[59][55][56]}が最も適当で、次いで咳嗽猫法^[59]が実用的であることを結論した。本章ではこれらの方法が効力検定法として最も重要な条件である「得られた成績が臨床効果と一致する」という条件を満たすか否かについて検討し、以下の結果を得た。

- 1 麻薬性鎮痛剤である1) morphine 2) dimethylthiambutene, 3) pethidineなどの本法における AtD_{50} 値の比率と標準的臨床用量の比率は大体一致する。
- 2 麻薬性鎮咳剤である 1) codeine, 2) oxymethobanolなどの本法における AtD_{50} 値の比率と標準的臨床用量の比率は非常によく一致する。
- 3 非麻薬性鎮咳剤である 1) dextromethorphan, 2) noscapine, 3) tipepidine, 4) picoperidamine, 5) chloperastine, 6) alloclamide, 7) benproperineなどの本法における AtD_{50} 値の比率と標準的臨床用量の比率は極少数例(dextromethorphanの咳嗽犬法^[54]における AtD_{50} 値およびnoscapineの咳嗽猫法^[59]における AtD_{50} 値)を除き大体一致する。

すなわち 1) 咳嗽犬法^{[54][55][56]}は第1部緒論(p. 3)に列記した諸条件をすべて満し、さらに被験薬の中毒症状を同時

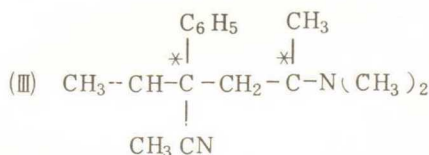
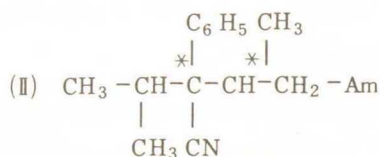
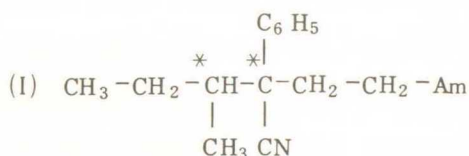
に観察でき、ある程度急性毒性、副作用の推測が可能であるなど、鎮咳活性物質の primary screening および効力検定法としては、最も優れている。2) また被験薬によっては、動物種属差を発現する場合も予想される^[59] 為、咳嗽猫法を併用すれば一層正確な評価が可能であるという結論に達した。

第2部 新規化合物 isoaminile の鎮咳活性に関する検索

一特に鎮咳作用と他の中枢作用との比較一

緒 言

Stühmer and Funke^[146](1957)は隣接する2個の不斉炭素原子を有する aminonitril 化合物(I, II)が強力な鎮痛作用を有することを見出した。さらに強力な鎮痛作用をめざして, Stühmer and Funke^[147](1959)



Am: dialkylamino or cyclicamino group

et al.^[21](1958)はBickerman et al.^[6](1954)のクエン酸エアロゾル法により, またPrime^[118](1965)はアセチルコリンエアロゾル法により健康人に咳を起させ, 本化合物がcodeineと同程度, あるいはそれ以上の鎮咳作用を有することを報告した。このほか若干の報告(Zehbe,^[164]1958; Baumann,^[3]1959; Eidmann,^[28]1959; Schmiedel,^[127]1959; Brenner-Gödderz,^[12]1959; Schumacher,^[130]1959; Petersen,^[113]1960)があるが, いずれも臨床報告で, 鎮咳作用に関する基礎的実験はKrause^[79](1958)の報文のみである。このたび著者は, Krauseが報告しているisoaminile citrate, および甘味を帯びて吸湿性が悪く, 医薬品として物理学的性質上好都合なisoaminile cyclamate を入手し, 両薬物の鎮咳作用およびその他の薬理作用について比較検討した。

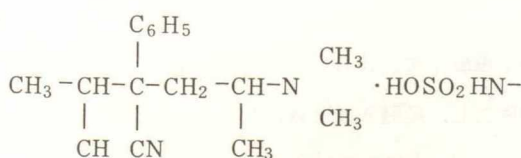
第1章 新規化合物 isoaminile の鎮咳活性に関する検索

第1節 実験材料ならびに実験方法

実験に供した α -(isopropyl)- α -(β -dimethylaminopropyl)phenylacetoneitril cyclamate およびcitrateは下記物理化学的性質を有し, 西ドイツKali-Chemie社より提供を受けた。

Isoaminile cyclamate

分子式:



化学式: $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$

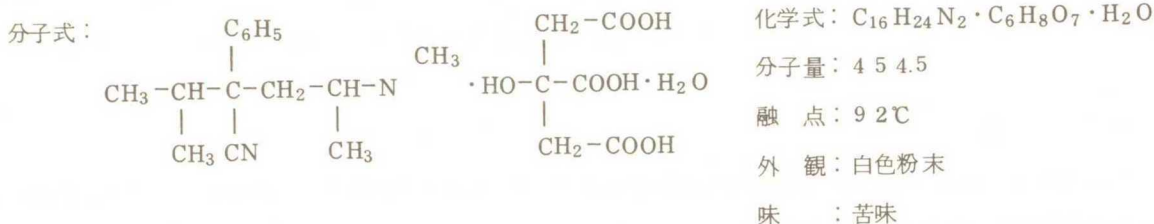
分子量: 426.63

融点: 134~138℃

外観: 白色粉末

味: 甘味

Isoaminile citate



その他の使用薬剤は、codeine phosphate (塩野義), dextromethorphan hydrobromide (塩野義), noscapine hydrochloride (岩城製薬), benzonatate (Ciba, Fig. 5-30), sodium dibunate (Keuten[®], 鳥居薬品, Fig. 5-31), eprozinol dihydrochloride (CERM, Fig. 5-22), 898-CE (CERM, Fig. 5-24), diphenhydramine hydrochloride (興和, Fig. 5-17), tripelennamine hydrochloride (Pyribenzamine[®], Ciba, Fig. 5-19), promethazine (Pyrethia[®], 塩野義, Fig. 5-25), methylephedrine hydrochloride (三和化学, Fig. 5-26), ephedrine hydrochloride (三和化学, Fig. 5-27), guaiacolglyceryl ether (Hustosil[®], 稲畑産業, Fig. 5-29), pentobarbital sodium (Nembutal[®], 大日本製薬), ether (昭和エーテル) 等である。また oxeladin citrate (Hustopan-OX[®], 太田製薬, Fig. 5-13), carbetapentane citrate (Oxarmin[®], 第一製薬, Fig. 5-15), clobutinol hydrochloride (Silomat[®], 森下製薬, Fig. 5-12), eprazinon dihydrochloride (Resplen[®], 中外製薬, Fig. 5-21), methoxyphenamine hydrochloride (Orthoxine[®], Upjohn, Fig. 5-28) 等は各商品より抽出精製し、融点測定、原素分析により確認した後、使用直前に蒸留水又は生理食塩液に溶解し使用した。

[54][55][56][57]

I 「咳嗽犬および猫」法

体重5～11kgの健康成熟雑種のイヌ、あるいは2～3kgの成熟ネコを雌雄の別なく、1群5匹以上とし、原則として5群以上を使用した。また被験薬を経口投与する場合は14～18時間絶食後実験に供した。

II 猫上喉頭神経電気刺激法 (Domenjoz 法)^[25]

体重2～3kgの成熟ネコを1群5匹とし、4群以上使用した。咳嗽反射の誘発は軽麻酔ネコの上喉頭神経 (N. laryngicus superior) の中枢側断端を電子管刺激装置 (日本光電, MSE-3) を用い、矩形波 (パルス巾1msec., 頻度10cps, 電圧0.5～2.5v) で電気刺激した。

実験I, II いずれの場合にも、咳発作時の気管内圧の変化をカニューレの他の管口に連結したタンブールを介し煤紙上に描記させるか、あるいは低圧用トランスデューサーを介しインク書きオシログラフに記録した。鎮咳効果の判定は、煤紙上あるいはオシログラフに記録された咳嗽曲線の振巾と頻度の両者あるいは一方 (特に前者) が薬物投与前対照の振巾と頻度に比べ少くとも20%以上抑制され、かつその抑制が薬物投与後、少くとも20分以上 (経口投与時には作用発現後少くとも30分以上) 持続した場合を有効とみなした。各投与量毎に得られた有効率から Litchfield-Wilcoxon 法^[89]により、50%鎮咳量 (50% Antitussive Dose, AtD₅₀ 値) とその信頼限界を算出した (p=0.05)。なお一部の化合物については、3～4群の有効率から AtD₅₀ 値の近似値を求めた。

[11]

III 猫延随電気刺激法

体重3～4kgの成熟ネコ4匹を使用した。まず ether 麻酔下に気管カニューレを装着し、頭部を脳定位固定装置に固定し、頭頂～後頭部の頭蓋骨を切除後小脳を吸引除去し、延髄表面を露出した。その後は ether 麻酔を中止し、pentobarbital-Na 軽麻酔 (20mg/kg, i.p.) 下にて実験を行った。刺激部位は Borison^[11] (1948) の指摘したいわゆる expiratory pacemaker area を選び、電子管刺激装置 (日本光電,

MSE-3)を用い矩形波(1 msec, 20 cps, 0.2~5 v)で10秒間電気刺激し, 中枢性に咳嗽反射を誘発した。刺激電極はカシュー塗料により絶縁した外径1 mm, 極間距離0.5 mmのステンレス製同心電極を用いた。

第2節 実験成績

[54][55][56]

I 咳嗽犬法における鎮咳作用

1 静脈内注射した場合

Isoaminile citrate 2.48 mg/kgの用量では使用した8例全例が判定基準に達せず無効であった。3.58 mg/kgに増量すると8例中1例は咳嗽曲線の振幅, 頻度がともに30%以上減少し, 20分間持続し有効と判定された。5.16 mg/kgでは8例中2例が有効(振幅は30~45%, 頻度は30~35%それぞれ減少し, 20~25分間持続)となり, 15.4 mg/kgまで増量すると8例全例が有効(振幅は35~70%, 頻度は30~80%それぞれ減少し, 25~75分間持続)となり, Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出した AtD_{50} 値は8.00(5.08~11.0)mg/kgとなった。一方isoaminile cyclamate投与群の場合は, クエン酸塩投与群と殆んど同程度の鎮咳作用が認められ, その AtD_{50} 値は7.72(5.25~11.3)mg/kgとなった。中毒症状はクエン酸塩, シクラミン酸塩いずれの場合にも観察されなかった。Isoaminile citrate 7.43 mg/kgおよびisoaminile cyclamate 7.43 mg/kgを静脈内投与した際得られた咳嗽曲線の典型例をFig. 2-1, Fig. 2-2に示す。

Perocan citrate

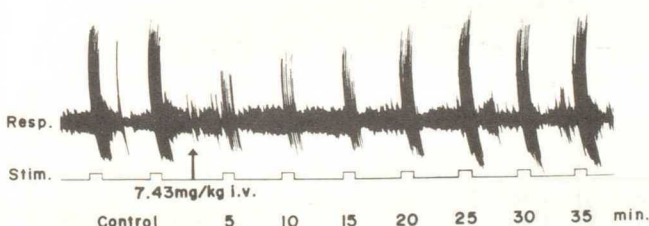


Fig. 2-1 Antitussive effect of isoaminile citrate (Perocan citrate) in "coughing dog" method.

At the arrow, 7.43 mg/kg, i.v. of the drug was administered.

Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)

Stim: Stimulation

Perocan cyclamate

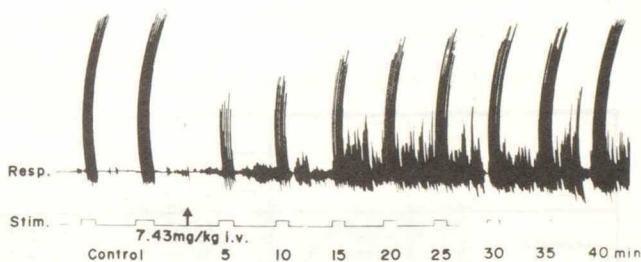


Fig. 2-2 Antitussive effect of isoaminile cyclamate (Perocan cyclamate) in "coughing dog" method.

At the arrow, 7.43 mg/kg, i.v. of the drug was administered.

Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)

Stim.: Stimulation

2 経口投与した場合

Isoaminile citrate 10.0 mg/kgを投与した場合には5例全例判定基準に達せず無効であった。14.4 mg/kgに増量すると6例中2例が有効(振幅, 頻度ともに20~25%減少し, 30~45分間鎮咳作用が持続)となった。以下20.3 mg/kgでは6例中4例が, 29.9 mg/kgでは6例中5例が, 43 mg/kgでは6例全例が有効となり, Litchfield-Wilcoxon^[89]法により算出した AtD_{50} 値は19.0(13.5~26.6)mg/kgとなった。一方isoaminile cyclamate投与群の場合にはクエン酸塩投与群と殆んど同程度の鎮咳作用が認められ, その AtD_{50} 値は21.0(16.5~26.6)mg/kgとなった。なお43 mg/kgを投与した際, クエン酸塩を投与した6例中3例に, またシクラミン酸塩を投与した5例中4例に軽度の振せんが観察された。Isoaminile citrateおよびisoaminile cyclamate 17.2 mg/kgを経口投与した際得られた咳嗽曲線の典型例をFig. 2-3, Fig. 2-4に示す。

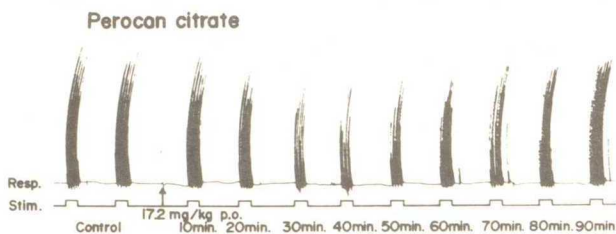


Fig. 2-3 Antitussive effect of isoaminile citrate (Perocan citrate) in "coughing dog" method.

At the arrow, 17.2mg/kg, p.o. of the drug was administered.

Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)

Stim.: Stimulation

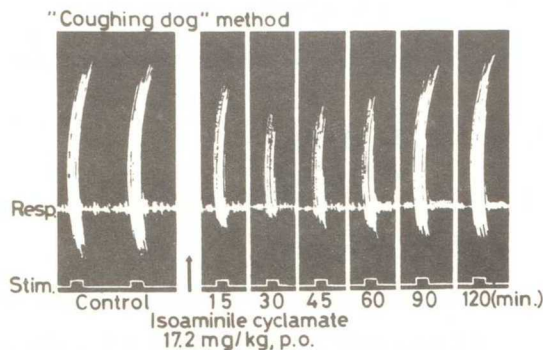


Fig. 2-4 Antitussive effect of isoaminile cyclamate in "coughing dog" method.

At the arrow, 17.2mg/kg, p.o. of the drug was administered.

Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)

Stim.: Stimulation

以下同様に, codeine phosphate, dextromethorphan hydrobromide, noscapine hydrochloride についても AtD_{50} 値を求めた。Table 2-1 に咳嗽犬法により得られた isoaminile citrate および cyclamate の AtD_{50} 値, またそれを塩基に換算した値を codeine, dextromethorphan, noscapine のそれと共に示す。その他市販されている大部分の鎮咳剤あるいは鎮咳活性物質についても咳嗽犬法により鎮咳作用を検討し, AtD_{50} 値あるいは AtD_{50} 近似値を求めた。Table 2-2 にその結果を要約する。市販されている大部分の鎮咳剤は, 鎮咳用量において明らかな中毒症状 (Table 2-2 参照) を認めた。

Table 2-1. Antitussive activity of isoaminile in dogs.

Drug	salt	M.S.			M.S.		
		AtD_{50} (mg/kg, i.v.)	Confidence limits ($p=0.05$)	Ratio ^{a)}	AtD_{50} (mg/kg, p.o.)	Confidence limits ($p=0.05$)	Ratio ^{a)}
Isoaminile	citrate base	8.00	5.08-11.0	0.30	19.0	13.5-26.6	0.44
		4.32	2.74-5.94	0.39	10.3	7.29-16.36	0.58
Isoaminile	cyclamate base	7.72	5.25-11.3	0.31	21.0	16.5-26.6	0.40
		4.40	2.99-6.44	0.39	12.0	9.41-15.2	0.50
Codeine	phosphate Base	2.40*	2.07-2.89	1.00	8.4*	7.53-9.38	1.00
		1.70	1.53-2.12	1.00	6.0	5.57-6.96	1.00
Dextromethorphan	HBr-salt base	15.3**	12.9-18.2	0.16	Ineffective up to 62.0**		0.14>
		11.2	9.50-13.3	0.16			
Noscapine	HCl-salt base	17.0**	13.8-21.0	0.14	80.0** (minimal effective dose)		0.11>
		15.6	12.6-19.2	0.11			

M.S. : Mechanical stimulation of tracheal mucosa

a) Ratio of efficacy to that of codeine

* Depression of respiration and sedation occurred

** Clonic convulsion occurred

[59]

II 咳嗽猫法における鎮咳作用

Isoaminile citrate 0.69mg/kg, i.v. 投与した場合には7例全例判定基準に達せず無効であった。0.83mg/kg, i.v. に増量すると6例中1例が有効(振幅は30%, 頻度は10%それぞれ減少し, 20分間持続)となった。以下1.0mg/kg, i.v. では7例中2例が, 1.20mg/kg, i.v. では7例中5例が, 1.44mg/kg, i.v. では7例中6例が, 1.73mg/kg, i.v. では7例全例が有効となり, Litchfield-Wilcoxon 法により算出した AtD_{50} 値は1.10 (0.97~1.23) mg/kg, i.v. となった。一方 isoaminile cyclamate 投与群の場合はクエン酸塩投与群と殆んど同程度の鎮咳作用が認められ, その AtD_{50} 値は1.30 (1.16~1.45) mg/kg, i.v. となった。

Isoaminile citrate 1.20mg/kg, i.v. および isoaminile cyclamate 1.20mg/kg, i.v.

投与した際得られた咳嗽曲線の典型例をFig. 2-5 , Fig. 2-6 に示す。

Table 2-2 Antitussive activity of reference drug in dogs.

Drug	salt	AtD50 (mg/kg, i. v.)	Confidence limits (p=0.05)	Ratio ^{a)}
Codeine	phosphate	2.40*	2.07-2.86	1.00
Oxeladin	citrate	12.3***b)		0.20
Carbetapentane	citrate	8.90**b)		0.27
Oxolamine	citrate	13.0**b)		0.18
Clobutinol	HCl-salt	7.60***b)		0.32
Benzonatate		3.00**b)		0.80
Sodium dibunate		66.1<***		0.047
Eprazinon	2·HCl-salt	6.60*b)	6.17-7.88	0.36
Eprozinol	2·HCl-salt	6.98*		0.34
898-CE	HCl-salt	3.80***b)	4.09-5.73	0.63
Diphenhydramine	HCl-salt	4.87***	2.41-3.54	0.49
Tripelennamine	HCl-salt	2.93***	3.89-6.06	0.82
Promethazine	HCl-salt	5.02**		0.48
dl-Methylephedrine	HCl-salt	12.0 ^{b)}	5.99-9.12	0.20
dl-Ephedrine	HCl-salt	7.54	10.7-27.8	0.32
Methoxyphenamine	HCl-salt	23.1		0.10
Guaiacolglyceryl ether		114.3<		0.02>

Coughing was induced by mechanical stimulation on the tracheal mucosa

- a) : Ratio of efficacy to that of codeine
- b) : Approximate value
- * : Depression of respiration and sedation occurred
- ** : Tremor, Vocalization and restlessness occurred
- *** : Convulsion occurred

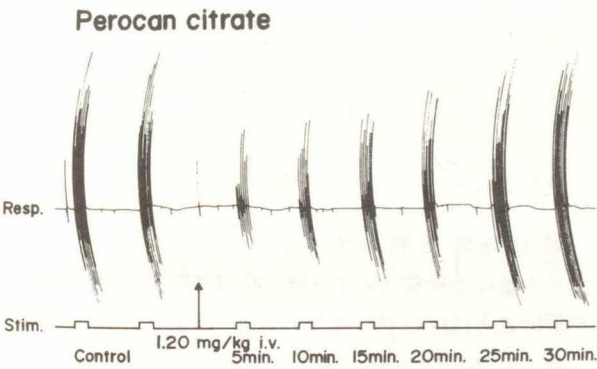


Fig. 2-5 Antitussive effect of isoaminile citrate (Perocan citrate) in "coughing cat" method.
At the arrow, 1.2mg/kg of the drug was administered.
Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)
Stim.: Stimulation

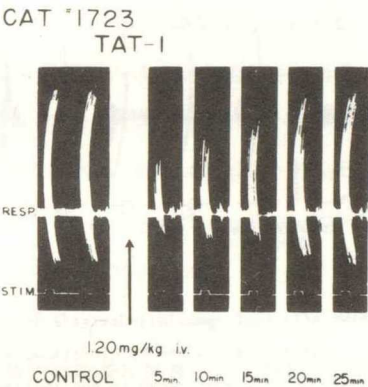


Fig. 2-6 Antitussive effect of isoaminile cyclamate (TAT-1) in "coughing cat" method.
At the arrow, 1.2mg/kg, i. v. of the drug was administered.
Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)
Stim.: Stimulation

以下同様に, codeine phosphate, dextromethorphan hydrobromide, noscapine hydrochlorideについてもAtD₅₀ 値求めた。Table 2-3に咳嗽猫法により得られたisoaminile citrate およびisoaminile cyclamateのAtD₅₀ 値, またそれを塩基に換算した値をcodeine, dextromethorphan, noscapineのそれと共に示す。

[25]

Ⅲ 猫上喉頭神経電気刺激法

Isoaminile citrate 1.0 mg/kg, i. v. を投与した場合には使用した5例全例が判定基準に達せず無

Table 2-3 Antitussive activity of isoaminile in cats

Drug	Salt	M.S.			E.S.N.			E.S.M.
		AtD ₅₀ (mg/kg, i.v.)	Confidence limits (p=0.05)	Ratio ^{a)}	AtD ₅₀ (mg/kg, i.v.)	Confidence limits (p=0.05)	Ratio ^{a)}	No. of efficacy
Isoaminile	citrate base	1.10 0.59	0.97-1.23 0.52-0.66	2.05 2.71	1.32 0.71	1.21-1.44 0.65-0.78	1.92 2.63	1.73mg/kg, i.v. 3/4
Isoaminile	cyclamate base	1.30 0.74	1.16-1.45 0.66-0.83	1.73 2.16	1.20-1.44 0.68-0.82		1.92 2.49	
Codeine	phosphate base	2.25 1.60	1.95-2.61 1.44-1.93	1.00 1.00	2.07-2.98 1.53-2.21		1.00 1.00	
Dextromethorphan	HBr-salt base	5.00 3.67	4.35-5.75 3.23-4.22	0.45 0.44				
Noscapine	HCl-salt base	23.8 21.8	10.0-8.30 18.2-25.9	0.09 0.07				

M.S. Mechanical stimulation of the tracheal mucosa

E.S.N. Electric stimulation of the superior laryngeal nerve

E.S.M. Electric stimulation of the expiratory pace-maker area at the dorso-lateral part of the medulla

効であった。1.2 mg/kg, i.v. に増量すると、5 例中 1 例が咳嗽曲線の振幅、頻度ともに 20% 以上減少し、20 分間持続し有効と判定された。1.44 mg/kg, i.v. では 5 例中 2 例が、1.73 mg/kg, i.v. では 5 例全例が有効となり、Litchfield-Wilcoxon 法^[89]により算出した AtD₅₀ 値は 1.32 (1.21~1.44) mg/kg, i.v. となった。一方 isoaminile cyclamate の場合には 1.2 mg/kg, i.v. で 4 例中 1 例が、1.44 mg/kg, i.v. では 4 例中 3 例が有効となり、AtD₅₀ 値は 1.20~1.44 mg/kg, i.v. の間にあるものと推定された。Isoaminile citrate 1.73 mg/kg, i.v. 投与した際得られた咳嗽曲線の典型例を Fig. 2-7 に示す。

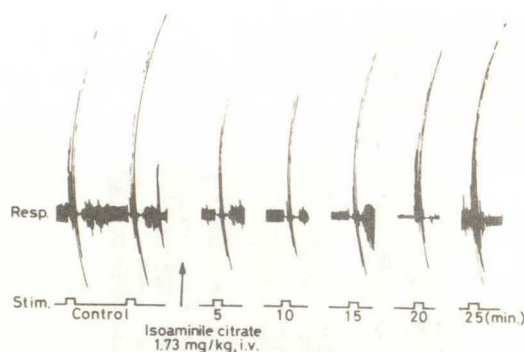


Fig. 2-7 Antitussive effect of isoaminile citrate in Domenjoz's method. Coughing was induced by electrical stimulation of the superior laryngeal nerve in anesthetized cat. At the arrow, 1.73mg/kg, i.v. of the drug was administered.

Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)

Stim.: Stimulation

咳嗽曲線の振幅、頻度ともに 20~60% 抑制され、20~50 分後に殆んど投与前の状態に回復した。

残りの 1 例は投与後約 30 分間は最強度刺激に対しても咳嗽反射は全く出現せず、その後徐々に回復したが、75 分後においても投与前の状態には回復しなかった。すなわち、4 例中 3 例が有効と判定された。一方, codeine phosphate は 2.48 mg/kg, i.v. で 4 例中 2 例が有効であった。Isoaminile citrate 1.73 mg/kg, i.v. および codeine phosphate 2.48 mg/kg, i.v. 投与した際得られた咳嗽曲線の典型例を Fig. 2-8, Fig. 2-9 に示す。

以下同様に codeine phosphate についても AtD₅₀ 値 (近似値) を求めた。Table 2-3 に猫上喉頭神経電気刺激法^[25]により得られた isoaminile citrate および isoaminile cyclamate の AtD₅₀ 値, またそれを塩基に換算した値を codeine のそれと共に示す。^[11]

IV 猫延随電気刺激法

投与量は咳嗽猫法および猫上喉頭神経電気刺激法における AtD₁₀₀ 値, すなわち 1.73 mg/kg, i.v. を選定した。Isoaminile citrate

1.73 mg/kg, i.v. 投与後, 4 例中 1 例は閾値電圧が軽度上昇したにすぎず, 中等度, 最強度刺激に対する咳嗽反射は投与前に比較して殆んど変化しなかった。他の 2 例は, 中等度, 最強度刺激に対して,

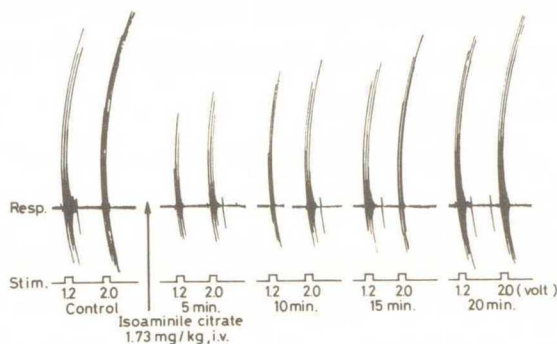


Fig. 2-8 Antitussive effect of isoaminile citrate in Borison's method. Coughing was induced by electrical stimulation of the expiratory pace-maker area of medulla in cat. At the arrow, 1.73mg/kg, i.v. of the drug was administered.

Resp.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)

Stim.: Stimulation

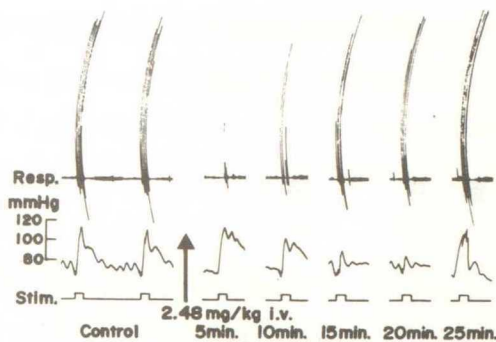


Fig. 2-9 Antitussive effect of codeine phosphate in Borison's method. Coughing was induced by electrical stimulation of the expiratory pace-maker area of medulla in cat. At the arrow, 2.48mg/kg, i.v. of the drug was administered.

Res.: Respiration (intratracheal pressure, expiration recorded up wards)

Stim.: Stimulation

第3節 小括ならびに考察

Isoaminile の鎮咳作用について、Krause (1958)^[79] は urethane 1.2 g/kg, s.c. 投与により麻醉したモルモットの気管粘膜を10秒間電気刺激(パルス巾: 5 msec, 頻度: 10 cps, 電流: 5~15 mA)し、咳嗽反射を惹起する方法を用い、最初に見出した。すなわち isoaminile citrate の ED₅₀ 値は 5.4 (4.13~7.10) mg/kg, i.v., codeine phosphate の ED₅₀ 値は 7.0 (5.6~8.75) mg/kg, i.v. となり, isoaminile citrate は codeine より強力な鎮咳作用を有する事を報告した。その後 Christoffel (1958)^[21] は健康なヒトに 7.5 % クエン酸エアロゾルを5分間吸入させ咳を惹起させる Bickerman et al. (1954)^[6] の方法を用い, isoaminile citrate は codeine と同程度の鎮咳作用を有することを, 又 Prime (1965)^[118] は健康なヒトに 1 % アセチルコリンエアロゾルを1分間吸入させ咳を惹起させる Woolf et al. (1964)^[61] の方法を用い, isoaminile citrate は codeine より優れた鎮咳効果を有することを報告している。その他2, 3の臨床報告があるのみで, 基礎的研究に関する報告はKrause の他に全くみない。著者はイヌおよびネコを使用し, isoaminile citrate および isoaminile cyclamate の鎮咳作用を比較検討した結果, 咳嗽猫法における AtD₅₀ 値はクエン酸塩の場合 8.0 (5.08~11.0) mg/kg, i.v., 19.0 (13.5~26.6) mg/kg, p.o. となった。一方シクラミン酸塩の場合は 7.72 (5.25~11.3) mg/kg, i.v., 21.0 (16.5~26.6) mg/kg, p.o. となった。すなわち isoaminile の鎮咳活性は塩基に換算すると静脈内投与する場合, 「塩」の違いによる差は無いが, 経口投与する場合にはクエン酸塩の方がやや活性が強いことが判明した。この差異はおそらく腸管壁からの吸収率(速度)の差異に起因するものと考えられる。咳嗽猫法における AtD₅₀ 値はクエン酸塩の場合 1.10 (0.97~1.23) mg/kg, i.v., シクラミン酸塩の場合には 1.30 (1.16~1.45) mg/kg, i.v. となり, イヌにおける場合よりもはるかに少量で鎮咳作用を発見することが判明した。この鎮咳効果におけるイヌとネコの差異の原因としては, 1) 動物の種属差, 2) 麻醉の影響などが考えられるが現時点ではそのいずれであるかは推論出来ない。また, 猫上喉頭神経電気刺激法における AtD₅₀ 値はクエン酸塩の場合には 1.32 (1.21~1.44) mg/kg, i.v., シクラミン酸塩の場合には 1.2~1.44 mg/kg, i.v. (推定) となり, 咳嗽猫法における場合と殆んど等しい用量で鎮咳作用を発現することが判明した。この知見は isoaminile の鎮咳作用発現の機序(作用部位)として気道粘膜の知覚受容器が殆んど関与(局所麻醉作用)していないことを示唆するものと考えられる。さらに, isoaminile citrate は咳嗽猫法および上喉頭神経刺激法における AtD₁₀₀ 値に相当する 1.73 mg/kg を静脈内に投与すると, ネコの延髄特定部位を直接電氣的に刺激し中枢性に惹起した咳嗽反射に対しても, 4例中3例に

おいて末梢性に惹起した咳嗽反射に対する場合と同様に抑制した。ところで、「咳中枢」が延髄に存在することについては疑う余地はなく、この知見は isoaminile の鎮咳作用機序として少なくとも延髄が関与していることを実証したといえる。

第4節 結 論

isoaminile の鎮咳作用を a) 咳嗽犬法^{[54][55][56]}、b) 咳嗽猫法^[59]、c) 猫上喉頭神経電気刺激法^[25]、d) 猫延髄電気刺激法^[11]により検討し以下の結論を得た。

1. Isoaminile の鎮咳効果は、クエン酸塩、シクラミン酸塩のいずれの場合にも大差なく、塩基に換算した AtD₅₀ 値で比較すると、咳嗽犬法では codeine の 39~58%^{[54][55][56]}、咳嗽猫法では 216~271%^[59]、猫上喉頭神経電気刺激法では 249~263%^[25]に相当し、codeine にほぼ匹敵する。
2. 既存の鎮咳剤あるいは鎮咳活性物質の多くは、鎮咳用量において明らかな中毒症状を伴うのに反して、isoaminile はクエン酸塩、シクラミン酸塩のいずれの場合にも経口投与時の最高用量 (AtD₁₀₀) においてのみ軽度の振せんを発現するにすぎず、選択性の高い安全な鎮咳活性物質である。
3. Isoaminile の鎮咳作用発現機序 (作用部位) は以下の理由から「咳中枢」そのものの抑制であろうと推定される。a) 気道粘膜や上喉頭神経の刺激により惹起した末梢性咳嗽反射と同様、延髄の電気刺激により惹起した中枢性咳嗽反射をも抑制する。b) 麻酔動物 (ネコ) における鎮咳効果が無麻酔動物 (イヌ) に比べはるかに強力である。c) 咳嗽猫法と猫上喉頭神経電気刺激法における AtD₅₀ 値が殆んど等しい^{[59][25]}。d) 鎮咳用量において呼吸抑制作用を発現しない。

以上、isoaminile は codeine に匹敵する強力な鎮咳作用を有し、しかも選択性の高い安全な鎮咳活性物質であるという結論に達した。

第2章 新規化合物 isoaminile の中枢神経系に対する作用

第1節 実験材料ならびに実験方法

実験に供した isoaminile citrate および isoaminile cyclamate は西ドイツ Kali-Chemie 社より提供を受けた。その他の使用薬剤は codeine phosphate (塩野義), morphine hydrochloride (塩野義), pethidine hydrochloride (Opystan[®], 田辺製薬), myanesin (Myanol[®], 中外製薬), ether (昭和エーテル), pentobarbital sodium (Nembutal[®], 大日本製薬), hexobarbital sodium (武田), gallamine triethiodide (長瀬産業), levallorphan bitartrate (Lorfan[®], 武田) である。

I 鎮痛(様)作用

体重 15~20g の健常な dd 系雄性マウスを 1 群を 6 匹、5 群を使用して、d' Amour-Smith 法^[23] および Haffner 法^[41]により検した。

d' Amour-Smith 法^[23]: 赤外線ランプから一定の強さの輻射熱を小孔を通して、マウスの尾の先端 (あらかじめ炭末を塗っておく) に照射すると、この熱刺激により尾の先端をピリピリと痙攣的にふるわせる。これを疼痛反射の示標とした。被検薬投与後 10 分間隔で熱刺激を与え、この反応時間が 12 秒延長され、かつ 2 回以上連続して延長した場合鎮痛効果陽性とみなした。なおマウスは熱刺激に対して 3 秒以内に反応するもののみを選択し使用した。

Haffner 法^[41]: マウスの尾根部を無鉤鉗子で挟むと、鳴き声を発したり、鉗子に咬みつこうとする防禦反応を

示す。これを疼痛反射の示標とした。被験薬投与後10分間隔で刺激を加え、この反応が2回以上連続して消失した場合を鎮痛効果陽性とみなした。

いずれの方法においても、被験薬は背部皮下に注射し、各投与量における有効率から、Litchfield-Wilcoxon法により50%鎮痛量(50% Analgesic Dose, AD_{50} 値)およびその信頼限界を算出した($P=0.05$)。

II 鎮痛(様)作用に対する levallorphan の拮抗

鎮痛試験に使用したマウス(isoaminile cyclamate 1.0mg/10g 投与群)を5日後、本実験に使用した。isoaminile cyclamateの1.0mg/10gを皮下に投与し、5分後isoaminile投与量の1/10量に相当するlevallorphan 0.1mg/10gを皮下に投与し、^[23]d'Amour-Smith法および^[41]Haffner法を用い、10分間隔で試験し、isoaminile cyclamateを単独に投与した場合と比較した。

一方、対照薬として、morphine hydrochloride 0.08mg/10gおよびcodeine phosphate 0.2mg/10gを皮下に投与し、5分後にそれぞれの投与量の1/10量に相当するlevallorphanを皮下に投与して、isoaminileの場合と同様の方法で試験した。

III 脊髄反射に対する作用

体重10~15gの健全なdd系雄性マウスの脊髄を第4~10胸髄の高さで切断し、24時間経過した脊髄マウスを1群10匹、6群を使用した。刺激としては、上島^[53](1954)の方法により、後肢先端を $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の温水中に10分間隔で一定の深さに浸漬し、後肢の振せんおよび屈曲挙上反応を示すまでの時間(秒)をストップウォッチを用い測定した。なお、熱刺激に対する慣れによって成績が不正確になるのを防ぐために、各実験毎に新しい脊髄マウスを、また、反応の鈍い脊髄マウスは衰弱によるものと思われたので取り除き、浸漬とほとんど同時(大部分は0.2~0.3秒)に反応を示す脊髄マウスのみを選択して用いた。

この方法によって得られた反射時間が0.5秒以上に延長し、しかも10分間隔で試験した場合、2回以上連続して延長した場合を反射抑制効果陽性とみなした。また同時に、薬物投与前と投与後の反射時間の閾値上昇率をも求めた。

閾値上昇率は次の式によって算出した。

$$R = \frac{b - a}{a} \times 100$$

R : 閾値上昇率

a : 薬物投与直前の反応出現時間(秒)。(10匹の平均値)

b : 薬物投与後の反応出現時間(秒)。(10匹の平均値のうちで最も大きい平均値)

IV 脊髄反射活動電位におよぼす影響

Shibuya and Anderson^[133](1968)の方法によりネコおよびイヌを使用し、脊髄反射に対する作用を検討した。すなわち後根を電氣的に刺激した際に前根に発生する活動電位(monosynaptic reflex action potential および polysynaptic reflex action potential)を標識として検索した。

ネコは体重3.0~4.0kgの成熟したもの、イヌは2.5~4.0kgの仔イヌを雌雄の別なく各々5匹を使用した。

まずether麻酔を施した後気管カニューレを装着し、人工呼吸下に第1頸椎(C_1)と第2頸椎(C_2)の間で脊髄を切断し、上位中枢の影響を完全に遮断した。次で脊髄を露出するため大体第3腰椎(L_3)から仙骨の中央部まで皮膚を切開し、棘突起のすぐ脇にメスを入れ、棘突起の付根まで筋の付着部を剝離し、さらに開創器で筋を両側に押し分け横突起の先端まで十分に露出し、更に L_3 から S_3 まで脊椎弓切除術(laminectomy)を行ない、その部位に 37°C に加温された流動パラフィンを流し込みプールを作ったのち、硬膜の背面正中線を切開し第7腰髄神経(L_7)の一侧を前根と後根にガラス細管を用いて分離し、後根は刺激電極上に、前根は誘導電極上におき、また L_3

からS₃までの脊髄神経は硬膜外で全部切断した後、前根の活動電位を誘導した。なお実験中、流動パラフィンブールの温度は赤外線照射式保温装置（三栄測器、東京医大薬理型）を使用し、37℃±0.5℃になる様留意した。また刺激および誘導電極は直径0.5mmの白金線で極間距離6～8mmのものを使用し、刺激装置は電子管刺激装置（日本光電MSE-3R型）を使用し、矩形波（パルス巾0.1 msec, 頻度0.2 cps, 電圧1.0～3.0 v）で刺激した。また増巾器は生体電気高感度増巾器（日本光電AVH-2型）を使用し、記録にはオシロスコープ（日本光電VC-7型）を用いて写真撮影を行なった。

V 麻酔増強作用

ddy系雄性マウスを1群12匹, 8群を用い, hexobarbital sodium 0.5mg/10g 静脈内投与時における麻酔時間に対する作用を検討した。被検薬はhexobarbital 投与15分前に腹腔内に投与した。なお対照群には生理食塩液0.1 ml/10gを同様に腹腔内投与した。

VI 脳波学的検索

1 脳波急性実験

ウサギ及びネコを使用し皮質（新, 旧, 古皮質）の自発脳波（spontaneous EEG）及び中脳網様体高頻度電気刺激による脳波覚醒反応（reticular arousal reaction）に対する作用を検索した。

a) ウサギの場合

体重2.7～3.0kgのウサギ8羽を使用した。まずether麻酔を施しJohnson型脳定位固定装置に固定しSawyer et al. (1954)^[126]およびMonnier et al. (1961)^[95]の脳座標図に基づいて脳波誘導用電極を固定した。即ち、皮質脳波誘導には知覚運動野の硬膜上に極間距離3mm, 直径1mmの双極電極を固定し、扁桃核、海馬、中脳網様体などの深部脳波誘導にはカニューレ塗料より絶縁した直径2.5mmのステンレス製同心電極（極間距離0.5mm）を固定した。脳波の誘導は電極固定後2時間以上経過し、麻酔から完全に覚醒した後に筋弛緩薬無処置、拘束下で行なった。なお、増幅記録にはポリグラフ（日本光電R-1500CS型）を使用し、時定数は0.3で行なった。また、中脳網様体刺激には電子管刺激装置（日本光電MSE-3R型）を使用し、矩形波（パルス幅1 msec, 頻度100 cps, 電圧0.5～4.0 v）で6秒間刺激した。また同時に第Ⅱ誘導法により心電図を記録した。

b) ネコの場合

体重2.5～3.1kgの健康な雄性ネコ5匹を使用した。ウサギの場合と同様ether麻酔を施し, Johnson型脳定位固定装置に固定し, Jasper et al. (1956)^[51]およびSnider et al. (1961)^[142]の脳座標図に基づき新皮質の運動野および知覚野, 扁桃核, 海馬, 中脳網様体に同様の電極を刺入固定した。脳波の誘導および中脳網様体刺激は麻酔より完全に覚醒した後gallamine処置, 人工呼吸下で行なった。

2 脳波慢性実験（ウサギ）

皮質（新, 旧, 古皮質）の自発脳波及び中脳網様体高頻度電気刺激によるreticular arousal reactionを指標として行なった。また、同時にbehavior観察を行なった。ウサギは体重2.7～3.0kgの健康なもの8羽を使用した。慢性電極植込みウサギの作成にあたっては急性実験と同様にして新皮質の運動野, 知覚野, 扁桃核, 海馬, 中脳網様体に電極を刺入し, 歯科用セメント（合成樹脂）で頭蓋骨に固定したのち頭部皮膚を縫合した。また細菌感染を予防するため電極刺入後最初の3日間はpenicilinを創面及び筋肉内に投与した。なお実験には電極刺入後2週間以上を経過したもので、食欲、一般行動、姿勢等に異常がなく、健康と思われるもので、各部位の脳波も各々特有のpatternを示したもの（5例）を使用した。また脳波の誘導記録に際してはウサギを飼育ケージ内で無拘束とし、且つ自由に行動出来る様にしてbehaviorの観察を行なった。また慢性実験では同一動物を繰り返し使用するため、実験日の違い、各投与順序等による影響を出来るだけ少なくすることを考慮し、

II 鎮痛(様)作用に対する levallorphan の拮抗

実験 I において、isoaminile に鎮痛作用らしきものが認められたのでこの作用がはたして morphine や codeine と類似する真の鎮痛作用であるか否かについて検する為、levallorphan による拮抗実験を試みた。すなわち、実験 I に使用したマウスに、5 日後再び isoaminile cyclamate 100 mg/kg, s.c. 投与し、その 5 分後に levallorphan 10 mg/kg, s.c. 投与し、実験 I と同様に d'Amour-Smith 法^[23]および Haffner 法^[41]により仮性疼痛反応の消失を指標として検した。しかし、反応経過および鎮痛作用陽性例数は、実験 I における isoaminile 単独投与時と殆んど変わらず、拮抗されなかった。一方、対照として用いた morphine hydrochloride 8 mg/kg, s.c. 投与群、および codeine phosphate 20 mg/kg, s.c. 投与群では levallorphan 処置後すみやかに仮性疼痛反応が出現し、鎮痛作用は完全に拮抗された。

III 脊髓反射に対する作用(マウス)

実験 I, II の成績から、isoaminile の一見鎮痛作用とみられる反応は真の鎮痛効果によるものかどうか疑わしく、中毒に起因する種々の障害、特に脊髓反射の抑制作用の関与が考えられた。この点確かめる為、脊髓マウスを用い isoaminile の脊髓反射に対する作用を検した。Isoaminile cyclamate 50 mg/kg, s.c. 投与群では 10 例中 1 例、また 100 mg/kg, s.c. (AD₅₀ 値に相当) 投与群では 10 例中 5 例において後肢の屈曲挙上反応時間が 0.5 秒以上(判定基準)に延長し、脊髓反射抑制作用陽性となった。一方、反射発現時間の閾値上昇率もそれぞれ 31%, 121% となり用量依存的な脊髓反射抑制作用を示した。また、active control として用いた myanesin は、100 mg/kg, s.c. 投与群は 10 例中 3 例が、200 mg/kg, s.c. 投与群は 10 例中 7 例が反射抑制作用陽性となり、閾値上昇率もそれぞれ 116%, 252% と著明な抑制作用が認められた。しかし、morphine hydrochloride は AD₅₀ 値(5~8 mg/kg, s.c.) よりはるかに多い 10 mg/kg, s.c. および 20 mg/kg, s.c. を投与した場合にも明らかな抑制作用は認められなかった。Table 2-5 に isoaminile, myanesin, morphine の陽性率および閾値上昇率を要約する。

Table 2-5 Comparison of inhibitory effect on spinal reflex of isoaminile cyclamate

Drugs	dose mg/kg, s.c.	No. of effective case / No. of mice used	Reflex time		$\frac{b-a}{a} \times 100$ (%)
			Control sec. (a)	after administration sec. (b)	
Isoaminile	50	1/10	0.32	0.42	31
	100*	5/10	0.23	0.51	121
Myanesin	100	3/10	0.25	0.54	116
	200	7/10	0.27	0.94	252
Morphine	10	2/10	0.23	0.32	43
	20	2/10	0.25	0.35	40

* Intoxication symptoms appeared

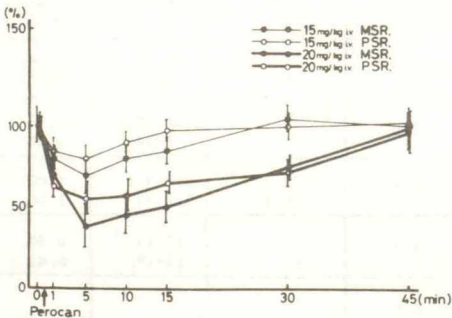


Fig. 2-10 Comparison of the effect of isoaminile cyclamate (Perocan) on the monosynaptic spike height (MSR) and polysynaptic potential area (PSR) in cats.

IV 脊髓反射活動電位におよぼす影響(ネコ、イヌ)

実験 III において、isoaminile はマウスの脊髓反射を抑制することが明らかとなったが、さらに、ネコ、イヌを用い、電気生理学的手法により単シナプス反射(monosynaptic reflex)および多シナプス反射(polysynaptic reflex)のいずれを選択的に抑制するのかを詳細に検討した。脊髓反射の活動電位に及ぼす影響は isoaminile cyclamate を上腕静脈内に投与した後、monosynaptic reflex

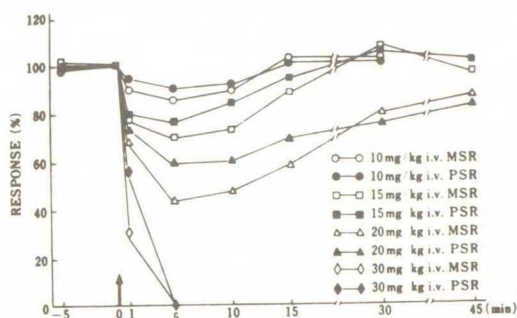


Fig. 2-11 Comparison of the effect of isoaminile citrate on the monosynaptic spike height (MSR) and polysynaptic potential area (PSR) in cats.

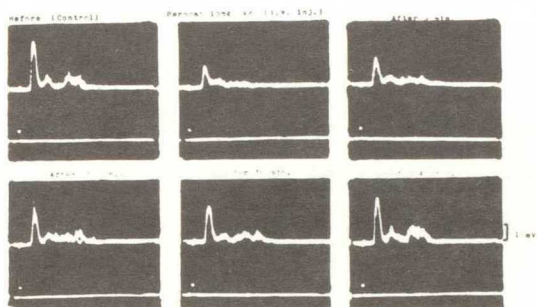


Fig. 2-12 Effect of isoaminile cyclamate (Perocan) 15mg/kg.i.v. on the spinal reflex action potential in cat.

(M. S. R.) の高さ及び polysynaptic reflex

(P. S. R.) の面積比を指標として比較検討した。

1.0, 2.0, 5.0mg/kg では全例変化なく, 10mg/kg で5例中1例が5分後にM. S. R. は30%弱, P.S.R. は20%弱抑制したが, 15分後に, M. S. R. およびP. S. R. は共に回復した。しかし, イヌに於ては著しい変化は認められず, ネコに於けるほどM. S. R. およびP. S. R. の抑制は認められなかった。

15mg/kg, i.v. 投与の場合。ネコでは5例中3例に於てM. S. R., P. S. R. とともに抑制が認められた。即ち, M. S. R. は5分後に40~60%抑制し, 45分後には回復した。一方, P. S. R. は5分後に45%抑制し, 45分後には回復した (Fig. 2-10)。他の2例とイヌ (全例) では殆んど変化は認められなかった。

20mg/kg, i.v. の場合。ネコでは全例に於てM. S. R., P. S. R. とともに著明に抑制された。5分後にM.S.R. は50~80%, P. S. R. は80~95%抑制し, 20~40分持続し, 60~75分後には50~75%まで

回復した (Fig. 2-10)。イヌは2例においてM. S. R., P. S. R. とともに著明に抑制した。すなわち, 5分後にM. S. R. は20~50%, P. S. R. は10~20%抑制し, 30~45分持続し, 45~60分後に回復した。

30mg/kg, i.v. の場合。ネコは全例に於てM. S. R., P. S. R. とともに消失し完全に抑制した。この抑制は20~60分持続し, 30~60分後よりP. S. R. が出現しはじめ, 60~180分後なお完全な回復には至らなかった。M. S. R. は45~60分後より出現しはじめたが, 90分を過ぎても30~50%まで回復したにすぎなかった。イヌでは全例に於てM. S. R. は消失し完全に抑制された。このM. S. R. の抑制は20~45分持続し, 30~60分後よりaction potential が出現しはじめ, 90分後に50~80%まで回復した。一方, P. S. R. に5例中3例が完全に消失し, 他の2例は50~80%抑制した。これらの抑制は30~75分後には回復した。また, isoaminile citrate についてもネコを用い同様に検討したが, isoaminile cyclamate の場合と質的にも大差なかった (Fig. 2-11)。

Fig. 2-12はisoaminile cyclamate 15mg/kg をネコに静脈内投与した際得られた脊髄反射活動電位の典型例を示す。

V 麻酔増強作用

Isoaminile citrate 及び isoaminile cyclamate は大量を単独投与した場合にも麻酔作用を発現することは認められていないが, hexobarbital sodium 0.5mg/10g, i.v. 投与による麻酔に対しては増強する作用を示した。すなわち, Table. 2-6 に示すごとく, isoaminile citrate 20mg/kg および isoaminile cyclamate 20mg/kg 前処置群の睡眠時間は12匹の平均でそれぞれ16.08分, 13.83分となり, 対照群の13.94分と比較し有意ではないが, 50mg/kg に増量すると, isoaminile citrate 投与群では46.69分, isoaminile cyclamate 投与群では31.05分と明らかに延長し, 対照群に比し有意であった。一方, codeine phosphate 50mg/kg 前処置時には15.06分となり対照群に比し有意でないが, 100mg/kg に増量すると22.13分となり対照群に比し有意となった。

Table 2-6 Prolongation of hexobarbital sleeping time in mice.

Treatment		No. of animals used	Sleeping time and Confidence limits (p=0.05)	Ratio	Significance
0.9% saline solution 0.1ml/10g i.p. + H.B. 0.5mg/10g i.v.		24	13.94(11.88-16.00)	1.00	
Isoaminile citrate	0.2mg/10g i.p. + H.B. 0.5mg/10g i.v.	12	16.08(11.87-20.29)	1.15	N.S. (p=0.05)
	0.5mg/10g i.p. + H.B. 0.5mg/10g i.v.	12	46.69(40.90-52.48)	3.35	Sig. (p=0.01)
Isoaminile cyclamate	0.2mg/10g i.p. + H.B. 0.5mg/10g i.v.	12	13.83(9.16-18.48)	0.99	N.S. (p=0.05)
	0.5mg/10g i.p. + H.B. 0.5mg/10g i.v.	12	31.05(24.64-37.46)	2.27	Sig. (p=0.01)
Codeine phosphate	0.5mg/10g i.p. + H.B. 0.5mg/10g i.v.	12	15.06(10.85-21.08)	1.08	N.S. (p=0.05)
	1.0mg/10g i.p. + H.B. 0.5mg/10g i.v.	12	22.13(17.91-26.34)	1.58	Sig. (p=0.05)

H.B.: Hexobarbital sodium

N.S.: Significant

Sig.: Significant

Ⅵ 脳波学的検索

1 脳波急性実験

a) ウサギの場合

Isoaminile cyclamateを耳介静脈内に投与した後、新皮質知覚運動野（以下S.M.と略記）、扁桃核（以下AMGと略記）、海馬（以下HIPと略記）における自発脳波を経時的に記録した。また、投与前と投与後におけるreticular arousal reactionを比較した。その際、心電図（E.C.G.）も記録し観察した。

1.0, 2.0, 5.0 mg/kg, i.v. の場合。各自発脳波は8例ともに投与前の対照と比較して殆んど変化を示さなかった。即ち、S.M.では低振幅速波（20～70 μ v, 8～10 cps）が認められた。AMGでは低振幅速波（30～60 μ v, 30～50 cps）に時おり amygdala burst（40～80 μ v, 40～50 cps）が認められた。HIPではhippocampal regular θ wave（100～200 μ v, 4～8 cps）と不規則な高振幅徐波（100～400 μ v, 5～10 cps）が認められた。一方、reticular arousal reactionは8例とも投与前の対照と比較して殆んど変化が現われなかった。即ち、S.M.では低振幅速波（30～50 μ v, 30～40 cps）が著明となり、20秒以上持続し、AMGでは低振幅速波に重畳する amygdala burst（50～120 μ v, 40～50 cps）の発現が認められ、HIPではhippocampal arousal slow wave（150～200 μ v, 5～7 cps）が15～20秒以上持続した。また、E.C.G.には変化が現われなかった。

10 mg/kg, i.v. の場合。自発脳波は8例中7例に於てS.M.では高振幅徐波化（50～80 μ v, 8～20 cps）を現わし、spindle burst（50～150 μ v, 8～10 cps）にやや変化が現われた。しかし、これらの変化は10～20分後には対照の脳波 pattern に回復した。AMGでは低振幅速波に amygdala burst（50～120 μ v, 40～50 cps）が頻発するのが認められた。更に、HIPではhippocampal regular wave がややくずれ、時おり spike の混入が認められた。AMGとHIPに於けるこれらの変化は20～30分後には対照の脳波 pattern を示すようになった。残りの1例は自発脳波に殆んど変化を現わさなかった。一方、reticular arousal reactionはS.M.では殆んど変化を現わさず、AMGでは amygdala burst の発現頻度の増加及び振幅の増大が認められ、持続時間の延長（30～90 sec）が認められた。HIPではhippocampal arousal slow wave が対照の脳波 pattern と同様に発現したが、持続時間は8例中5例に於てやや短縮された。E.C.G.には特に変化は認められなかった。

15 mg/kg, i.v. の場合。自発脳波は全例に於てS.M.では高振幅徐波（50～150 μ v, 5～10 cps）化した。また、spindle burst の頻発が認められ、15～30分後まで持続した。これらの変化は全例30～60分後に正常状態に回復した。AMGでは2分後より amygdala burst は高振幅（100～150 μ v）

となり、頻度も増加した。HIPでは irregular high voltage slow wave ($150\sim300\mu\text{v}$, $5\sim10\text{cps}$)が増加した。AMG, HIPに於けるこれらの変化は45~60分後には対照の脳波 pattern にまで回復した (Fig. 2-13)。一方, reticular arousal reaction は S.M. では投与前と同様の低振巾速波が発現するが、その持続時間は5分後に於てやや短縮され、10分以後では投与前と同程度持続した。AMGでは amygdala burst が投与前よりも高振巾、高頻度が発現し、その持続時間の延長 ($60\sim120\text{sec}$) が認められた。HIPでは投与15分後までは hippocampal arousal wave は発現せず、50分以後に於て殆んど対照の脳波 pattern にまで回復した。(Fig. 2-14)。また、E.C.Gは投与直後一過性に R-R 間隔の延長を示す例も認められた。

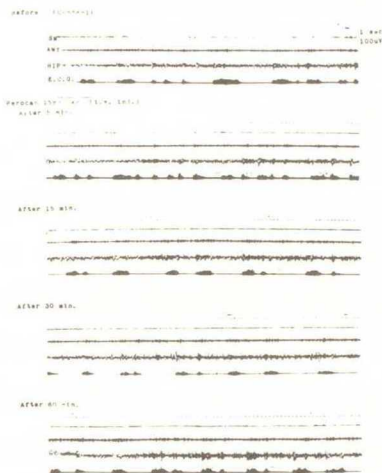


Fig. 2-13 Effect of isoaminile cyclamate (Perocan) 15mg/kg, i.v. on the spontaneous EEG in rabbit.

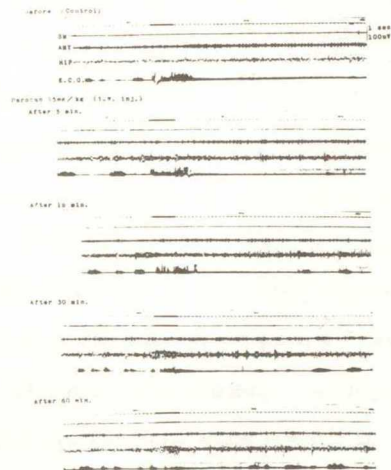


Fig. 2-14 Effect of isoaminile cyclamate (Perocan) 15mg/kg, i.v. on the EEG arousal response in rabbit.

30 mg/kg, i.v. の場合。自発脳波は投与途中より全例に於て、S.M. では高振巾徐波 ($100\sim200\mu\text{v}$, $3\sim8\text{cps}$) が著明となり、時おり $200\sim400\mu\text{v}$ の sharp wave を混ざる様になり、高振巾の spindle burst ($100\sim200\mu\text{v}$, $10\sim15\text{cps}$) が頻発した。この状態は長時間持続し、150分以内に回復したものは8例中3例で、150~240分後に回復したものは8例中3例で、他の2例は300分を過ぎても正常に回復しなかった。AMGでは投与前に認められた低振巾速波 ($50\sim70\mu\text{v}$, $30\sim50\text{cps}$) は低振巾徐波 ($30\sim50\mu\text{v}$, $8\sim15\text{cps}$) 化し、時おり spike の混入を認めた。HIPでは、hippocampal regular θ wave ($100\sim200\mu\text{v}$, $4\sim8\text{cps}$) は殆んど消失し、不規則な高振巾速波 ($150\sim300\mu\text{v}$, $10\sim20\text{cps}$) となり、spike を頻発した。その後、高振巾速波は次第に低振巾徐波 ($50\sim100\mu\text{v}$, $3\sim8\text{cps}$) となり、時おり高振巾律動徐波の混入を認めた。AMG, HIPに於けるこの様な変化が150分以内に回復したものは8例中2例で、150~240分後に回復したものは8例中3例で、他の3例は300分を過ぎても回復しなかった。一方, reticular arousal reaction は S.M. では投与後15~30分までは著明でなく、持続時間の短縮が認められた。しかし、45~60分後には全例に対照と同様の arousal reaction が認められる様になった。AMGでは投与後15~30分までは著明な arousal reaction は認められず、持続時間も短縮した。しかし、45~60分後には全例に対照と同様の arousal reaction が認められる様になった。AMGでは投与後15~30分までは amygdala burst は消失し、45~60分で amygdala burst の発現が認められた。HIPでは投与後5~15分までは hippocampal arousal wave は消失し、75~90分後には殆んど対照時の pattern に回復した。また、E.C.G.は一過性に R-R 間隔の延長と R 波の減小が認められた。

4 5 mg/kg, i. v. の場合。5 例中 2 例は投与中より各自発脳波は平坦化し, 1 ~ 2 分後に E. C. G. も消失して死亡した。他の 3 例は 3 0 mg/kg 投与時と殆んど同様の pattern を示したが, 持続時間は更に延長され, 3 0 0 分を経過しても全例 (3 例共) 正常に回復しなかった。また, reticular arousal reaction は 3 例中 1 例が 1 5 0 分後に回復し, 他の 2 例は 3 0 0 分以内では正常に回復しなかった。また, E. C. G. は 3 例とも R - R 間隔の延長と R 波の減小が著明に認められた。しかし, この変化は 1 0 分以内に殆んど正常に回復した。

b) ネコの場合

Isoaminile cyclamate を上腕静脈内に投与した後, 運動野 (M. A.), 知覚野 (S. A.), 扁桃核 (AMG), 海馬 (HIP) より自発脳波を記録した。また投与前と投与後に於ける中脳網様体高頻度電気刺激による覚醒反応 (reticular arousal reaction) に及ぼす影響を比較検討した。

1. 0 , 2. 0 mg/kg, i. v. の場合。各自発脳波は 5 例ともに投与前と殆んど変らず, M. A. , S. A. では低振巾速波 (3 0 ~ 1 5 0 μ v, 1 0 ~ 3 0 cps) に時おり高振巾 (1 5 0 ~ 2 5 0 μ v, 6 ~ 1 3 cps) の spindle burst が混入した。HIP では hippocampal arousal wave (1 0 0 ~ 2 0 0 μ v, 1 0 ~ 2 5 cps) と不規則な高振巾速波 (1 0 0 ~ 2 0 0 μ v, 1 0 ~ 2 5 cps) が交互に発現した。一方, reticular arousal reaction は M. A. , S. A. ともに対照の脳波 pattern と殆んど変らず, 刺激と同時に低振巾速波 (3 0 ~ 6 0 μ v, 2 0 ~ 4 0 cps) が著明に発現し, 2 0 秒以上持続した。AMG では低振巾速波 (5 0 ~ 1 0 0 μ v, 1 5 ~ 3 0 cps) が著明となり, amygdala burst (1 0 0 ~ 2 0 0 μ v, 5 ~ 2 0 cps) の発現頻度が増加した。HIP では著明な hippocampal arousal wave (1 0 0 ~ 2 0 0 μ v, 2 ~ 8 cps) が発現して 2 0 秒以上持続した。

5 mg/kg, i. v. の場合。自発脳波は 5 例中 3 例に於て M. A. , S. A. では高振巾徐波 (5 0 ~ 2 0 0 μ v, 5 ~ 1 5 cps) が現われ, spindle burst (2 0 0 ~ 3 0 0 μ v, 6 ~ 1 3 cps) がしばしば発現した。AMG では低振巾速波 (5 0 ~ 8 0 μ v, 1 0 ~ 3 0 cps) が徐波化し, amygdala burst の発現は不規則となった。HIP では不規則な高振巾速波 (1 0 0 ~ 3 0 0 μ v, 1 0 ~ 2 5 cps) が発現し, hippocampal arousal wave は一過性に消失した。これらの変化は 1 0 ~ 2 0 分間持続した後正常に回復した。また, 他の 2 例に於ては殆んど変化を示さなかった。一方, reticular arousal reaction は M. A. , S. A. , HIP ともに著明な arousal reaction を発現し, その持続時間にも影響を及ぼさなかった。

1 0 mg/kg, i. v. の場合。自発脳波は全例に於て M. A. , S. A. では高振巾徐波 (5 0 ~ 2 0 0 μ v, 5 ~ 1 0 cps) 化し, spindle burst (2 0 0 ~ 3 0 0 μ v, 6 ~ 1 3 cps) と 2 0 0 ~ 4 0 0 μ v の sharp wave が出現した。AMG では不規則な低振巾速波 (5 0 ~ 1 0 0 μ v, 5 ~ 2 0 cps) が発現し, 時おり spike の出現が認められた。HIP では不規則な低振巾速波 (5 0 ~ 2 0 0 μ v, 1 0 ~ 3 0 cps) が発現し, 時おり spike の混入が認められた。これらの変化は 3 0 ~ 6 0 分間持続した後正常に回復した。一方, reticular arousal reaction は 5 例中 3 例に於て M. A. , S. A. , AMG, HIP で覚醒反応の消失または減弱が認められた。その作用は 2 0 ~ 3 0 分間持続し, 3 0 ~ 4 0 分後には全例対照の脳波 pattern にまで回復した。

1 5 mg/kg, i. v. の場合。自発脳波は全例著しく変化した。即ち, M. A. , S. A. では高振巾徐波 (1 0 0 ~ 3 0 0 μ v, 5 ~ 1 0 0 cps) を基礎波として spindle burst (2 0 0 ~ 3 0 0 μ v, 6 ~ 1 3 cps) と 2 0 0 ~ 4 0 0 μ v の sharp wave が不規則に頻発し, 且つ持続した。AMG では不規則な低振巾速波に時おり spike が混入し, amygdala burst は一過性に消失した。HIP では hippocampal arousal wave は殆んど消失し, 低振巾速波 (1 0 0 ~ 1 5 0 μ v, 1 5 ~ 2 0 cps) 化を示し, spike の出現を認めた (Fig. 2-

15)。一方, reticular arousal reaction は全例に於て30~60分まで消失または減弱した。60~90分後には arousal reaction は回復した(Fig.2-16)。

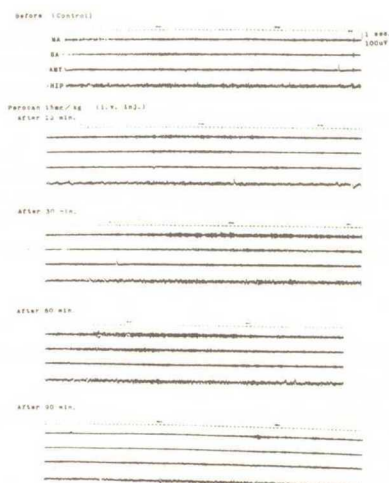


Fig. 2-15 Effect of isoaminile cyclamate (Perocan) 15mg/kg, i.v. on the spontaneous EEG in cat.

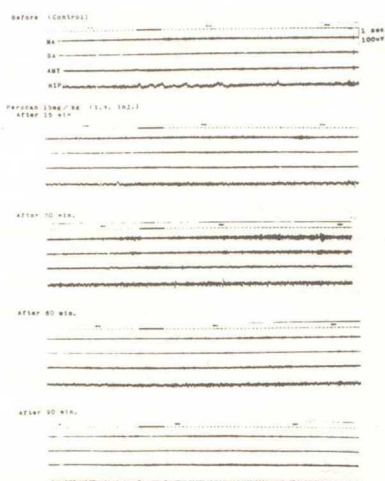


Fig. 2-16 Effect of isoaminile cyclamate (Perocan) 15mg/kg, i.v. on the EEG arousal response in cat.

30mg/kg, i.v. の場合。5例中1例は投与直後より各自発脳波は平坦化し, 3分後には完全に消失して死亡した。他の4例は15mg/kg 投与時と殆んど同様の pattern と経過をたどり, 150分後に1例は殆んど正常状態に回復し, 他の3例は300分以内では正常に回復しなかった。また reticular arousal reaction も1例は60分後に回復したが, 他の3例は300分以内では正常状態には回復しなかった。

45mg/kg, i.v. の場合。4例とも, 投与中より各自発脳波は平坦化し, 全部位に間歇的な spike を発射し, 1~10分後に全例死亡した。

一方, isoaminile citrate を上腕静脈内に投与した場合についても検討した。

2.0mg/kg, i.v. 以下の場合。5例全例, 自発脳波, reticular arousal reaction いずれも投与前に比べ変化しなかった。

5.0mg/kg, i.v. の場合。自発脳波は新皮質系では高振巾徐波(50~200 μ v, 5~15 cps)と spindle burst (200~300 μ v, 6~13 cps)が, AMGでは低振巾不規則速波(50~80 μ v, 10~30 cps)がしばしば見受けられた。これらの脳波 pattern は5例中3例にみとめられ, 10~20分間持続した。他の2例では変化はみられなかった。一方, reticular arousal reaction は全例変化しなかった。

15mg/kg, i.v. の場合。自発脳波は新皮質系ではさらに高振巾徐波(100~300 μ v, 5~10 cps)化し, spindle burst (200~300 μ v, 6~13 cps)と sharp wave (200~400 μ v)が, AMGでは低振巾不規則速波(50~100 μ v, 10~30 cps)が, HIPでは脱同期性の低振巾不規則速波(50~150 μ v, 15~20 cps)と sharp wave がしばしばみとめられ, 60~90分間持続した。一方, reticular arousal reaction は5例中4例が明らかに抑制され, 60~90分間持続した。他の1例は殆んど変化しなかった。

30mg/kg, i.v. の場合。自発脳波 pattern は質的には上述したものと同様であった。5例中1例は300分後に投与前の状態に回復したが, 他の3例は回復しなかった。また, 残りの1例は3分以内に死亡した。一方, reticular arousal reaction は全例において完全に消失した。5例中1例は60分後に回復したが, 残りの3例は300分後においても回復しなかった。

Isoaminile citrate 15mg/kg, i.v. 投与した際の典型的自発脳波をFig.2-17に、また、典型的 reticular arousal reaction をFig.2-18に示す。

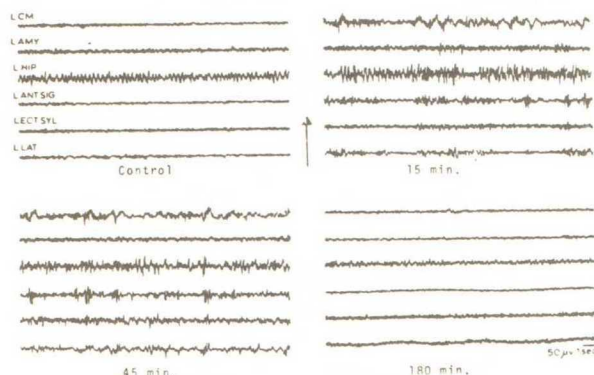


Fig. 2-17 Effect of isoaminile citrate on the spontaneous EEG

in cat.

At the arrow, 15mg/kg, i.v. of the drug was administered.

L.CM: Left centre median nucleus of the thalamus

L.AMY: Amygdala L.HIP: Hippocampus

L.ANT.SIG: Anterior sigmoid gyrus

L.ECT.SYL: Middle ectosylvian

L.LAT: Lateral gyrus

2 脳波慢性実験 (ウサギ)

脳波慢性実験に用いたウサギの自発脳波は、運動野(M.A.)、知覚野(S.A.)に於ては低振巾速波(30~50 μV, 10~20 cps)に時おり高振巾の spindle burst (50~150 μV, 5~13 cps)の混入するもの、AMGに於ては低振巾速波(50~100 μV, 20~40 cps)に amygdala burst (40~150 μV, 20~40 cps)が混入するもの、HIPに於ては hippocampal regular θ wave (100~250 μV, 5~15 cps)に低振巾速波(20~50 μV, 30~40 cps)と不規則な高振巾徐波(100~300 μV, 5~8 cps)の相が不規則に出現したもので、かつ reticular arousal reaction はM.A., S.A.の脳波では低振巾速波(30~50 μV, 20~30 cps)が著明に発現して20秒以上持続し、AMGでは amygdala burst (100~150 μV, 20~40 cps)が著明に発現して20秒以上持続し、HIPでは hippocampal arousal wave が著明に発現して20秒以上持続するものを選択して使用した。

1.0, 2.0, 5.0mg/kgの場合。全例に於て自発脳波, reticular arousal reaction とともに投与前に比し殆んど変らなかった。また, behavior に対しても影響を及ぼさなかった。

10mg/kgの場合。自発脳波は全例(5例)に於てM.A., S.A.ともに高振巾徐波(50~200 μV, 5~12 cps)化し, 高振巾の spindle burst (150~200 μV, 8~13 cps)の出現が認められた。AMGでは amygdala burst が減弱した。HIPでは hippocampal arousal wave は不規則化し, 高振巾速波(100~150 μV, 20~30 cps)が増加した。一方, reticular arousal reaction はM.A., S.A.では明らかに出現し, 20秒以上持続した。しかし, AMG, HIPではかえって減弱され, 持続時間も短縮した。30~90分後には正常の状態にまで回復した。また behavior は脳波変化に一致して運動がやや減少した。

15mg/kgの場合。自発脳波は全例に於て変化が現われ, M.A., S.A.では高振巾徐波(150~300 μV, 3~10 cps)化し, 高振巾の spindle burst (200~300 μV, 5~13 cps)や高振巾の sharp wave (200~400 μV)が頻発した。AMGでは amygdala burst は一過性に消失したが, 10~30分後より再び出現しはじめた。HIPでは hippocampal arousal wave が消失し, 不規則な高振巾速波(100~300 μV, 5~20 cps)が基礎波となり, 低振巾速波(30~100 μV, 10~25 cps)と spike が混

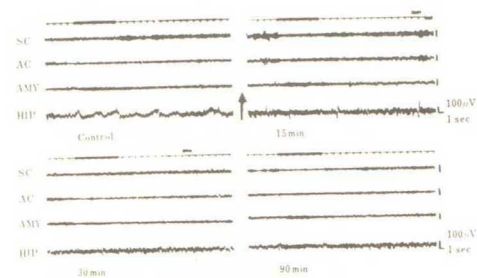


Fig. 2-18 Effect of isoaminile citrate on the EEG arousal response in cat.

At the arrow, 15mg/kg, i.v. of the drug was administered.

SC: Somatosensory area of cortex

AC: Auditory area of cortex

AMY: Amygdala

HIP: Hippocampus

在した。これらの変化は45～75分持続し、60～90分後には殆んど回復した(Fig. 2-19)。一方, reticular arousal reaction はM.A., S.A. では一過性に消失した。しかし, このarousal reaction は漸次出現し, 30～45分後には正常に回復した。AMG, HIPでは投与後5～30分間 arousal reaction は消失または減弱し, その持続時間も短縮した。覚醒反応に於けるこれらの変化は60～90分後に全例回復した。(Fig. 2-20)。また, behavior は自発運動が著明に抑制された。しかし, ときに振顫を発現する例も認められた。

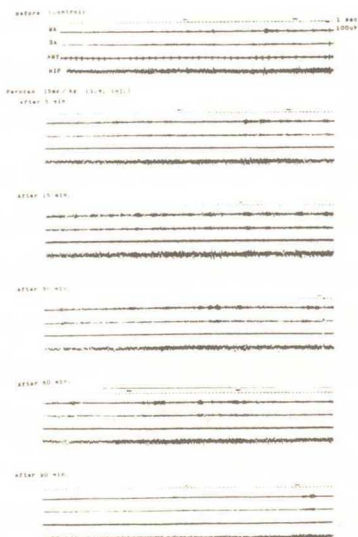


Fig. 2-19 Effect of isoaminile cyclamate (Perocan) 15mg/kg, i.v. on the spontaneous EEG in rabbit with chronically implanted electrodes.

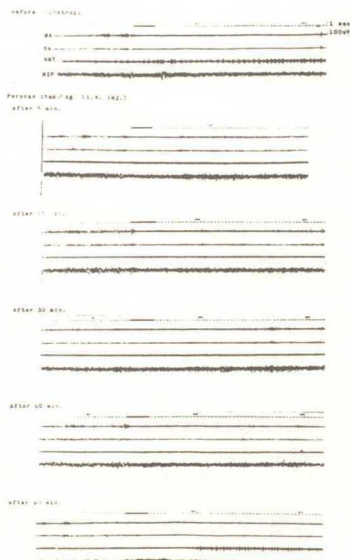


Fig. 2-20 Effect of isoaminile cyclamate (Perocan) 15mg/kg, i.v. on the EEG arousal response in rabbit with chronically implanted electrodes.

30mg/kgの場合。全例(5例)とも直ちに振顫及び間代性の痙攣を発現し, 更に横転して歩行様痙攣を示す例も認められた。30～60分で座位を保ちうる様になり, その際, 振顫が認められた。一方, 上記の behavior に対し自発脳波は全例に於てM.A., S.A. では1～5分後より低振巾の徐波(10～20 μ v, 0.5～3.0 cps)に高振巾の spike 発射及び高振巾の sharp wave が混入する様になった。これらの変化は300分以内には正常には回復しなかった。AMGは低振巾徐波(50～80 μ v, 5～15 cps)となり, amygdala burst は完全に消失したが, 150～240分後には殆んど正常に回復した。HIPでは不規則な高振巾徐波に連続的な spike 発射を認めた。これらの変化は200～240分後に殆んど正常に回復した。一方, reticular arousal reaction はM.A., S.A., AMG, HIPのいずれも一時完全に消失した。これらの変化は150～240分後には殆んど投与前の pattern に回復した。

45mg/kgの場合。5例中4例は投与直後より, 間代性の痙攣を発現し, 投与後2～3分より呼吸はCheyne-Stokes型の呼吸を呈した後死亡した。他の1例の自発脳波はM.A., S.A., AMG, HIPともに平坦化し, 時おり spike 発射を認めたが, 300分を過ぎても殆んど回復を示さなかった。なお, reticular arousal reaction は340分後に回復した。

第3節 小括ならびに考察

鎮咳剤の中樞神経系に対する重要な薬理作用として先ず鎮痛作用があげられる。特に本化合物は鎮痛作用を目的として合成された化合物であり, また化学構造的には麻薬性鎮痛剤methadone (Fig. 5-9)に類似しているので特に詳細に検討した。

[23]

d'Amour-Smith法におけるAD₅₀値はisoaminile citrateの場合120(95～150)mg/kg, s.c., isoaminile cyclamateの場合105(95～116)mg/kg, s.c.と算出された。この活性は塩基に換算した

AD₅₀ 値で比較すると, morphine の 6%, 母化合物と考えられる methadone の 5~6% に相当する。一方, Haffner^[41] 法における AD₅₀ 値は isoaminile citrate の場合 148 (108~203) mg/kg, s.c., isoaminile cyclamate の場合 96 (75~113) mg/kg, s.c. となり, 塩基に換算した AD₅₀ 値で比較すると, morphine の 7~11% に相当した。しかし, 1) これらの用量では isoaminile citrate および isoaminile cyclamate いずれの場合も著明な中毒症状 (自発運動亢進, 刺激時に弱い挙尾反応, 後肢の運動障害, 全身性の振顫, 後肢の強直性伸展, まれに間代性および強直性痙攣, 第 3 部第 1 章の中毒症状の項を参照) を伴っている。2) 安全域 (Safety margin, LD₅₀/AD₅₀) が 1.2~1.7 と, active control である codeine, morphine, pethidine, methadone などに比べ極めて小さい事。3) 今回用いた d' Amour-Smith^[23] 法および Haffner^[41] 法は特に前者においては, 脊髓反射を抑制する薬物であればあたかも鎮痛効果を持つかの様に誤って判定される事があり得るなどから, isoaminile の一見鎮痛と思われる作用は果して真の鎮痛作用であるかどうかは疑問に思われた。この点を確認する為, 本作用が morphine や codeine と類似する真の鎮痛作用であるか否かを知る為麻薬拮抗薬である levallorphan により拮抗されるか否かについて検討した。morphine 8 mg/kg, s.c. および codeine 20 mg/kg, s.c. 投与群では levallorphan 処置後すみやかに仮性疼痛反応が出現し, 鎮痛作用は完全に拮抗されたが, isoaminile 100 mg/kg, s.c. 投与群では levallorphan 処置後も仮性疼痛反応の消失率およびその時間的経過は単独投与時と殆んど変化なく拮抗されなかった。すなわち isoaminile による仮性疼痛反応の消失機序は morphine や codeine の場合とは本質的に異なる事が判明した。次いで脊髓反射に対する作用について検討した。まず, 脊髓マウスを用い予備的に脊髓反射に対する作用を試みたところ, isoaminile 50 mg/kg, s.c. 投与群では 10 例中 1 例が, 100 mg/kg, s.c. (AD₅₀ 値に相当) 投与群では 10 例中 5 例が判定基準に達し, 脊髓反射抑制作用陽性と判定された。すなわち isoaminile は高用量 (50 mg/kg, s.c. 以上) 投与時にはマウスの脊髓反射を用量依存的に抑制する事が判明した。さらに, ネコ, イヌの脊髓後根を電気刺激した際, 前根に誘発される脊髓反射活動電位を電気生理学的手法により導出記録し, 単シナプス反射あるいは多シナプス反射のいずれを抑制するかについて詳細に検討した。ネコの場合には, isoaminile cyclamate 5 mg/kg, i.v. 以下の用量では単シナプス反射, 多シナプス反射のいずれにも影響しないが, 10 mg/kg, i.v. に増量すると, 投与 5 分後に単シナプス反射が約 30%, 多シナプス反射が約 20% 抑制された。しかし 15 分後にはいずれも回復した。以下 15 mg/kg, i.v., 20 mg/kg, i.v. と増量するにつれ, いずれも用量依存的に抑制され, 30 mg/kg, i.v. 投与時には全例いずれの活動電位も投与 5 分後には完全に消失した。すなわち, isoaminile は 10~15 mg/kg, i.v. 以上の用量でネコの脊髓反射を用量依存的に抑制する事が判明した。一方, イヌの場合には, 20 mg/kg, i.v. より単シナプス反射, 多シナプス反射いずれも抑制される傾向を示し, 30 mg/kg, i.v. では全例いずれの活動電位も完全に消失した。すなわち, isoaminile は 20 mg/kg, i.v. 以上の用量でイヌの脊髓反射も抑制することが判明した。又, ネコ, イヌいずれの場合にも単シナプス反射が多シナプス反射に比し, より選択的に抑制される事も判明した。

一方, Krause^[79] (1958) は鎮痛作用について Meyer et al.^[93] (1952) の方法を用い検討した。すなわち, 白ネズミの鼻口部に熱刺激を与え, 仮性疼痛反応の発現時間を測定した。本法では morphine hydrochloride 1 mg/kg 投与により, 反応発現時間が著明に延長する (尾に熱光線を加える方法では morphine は 5 mg/kg ではじめて 1.3 秒から 2.3~3 秒に延長した)。しかしこの反射発現時間は, 用量を 50 mg/kg, 75 mg/kg と増量した場合にも延長せず, 作用の持続時間だけが延長する点で, morphine, codeine 類似の鎮痛剤の作用とは明らかに異なっている事, 又尾に熱刺激を加える通常の方法では isoaminile の鎮痛作用は測定出来ない事を報告している。つまり, Krause も著者も, isoaminile は高用量を投与した場合には「鎮痛作用らしき」作用を発現するが,

morphine, codeine などの麻薬性薬剤とは本質的に作用機序を異にするという一致した結論に達した。著者はさらに、本作用の発現機序の解明を企てた。すなわち、中毒症状の種類、鎮痛作用測定法の性質を考慮し、脊髓反射の抑制作用の関与を推定し、鎮痛、鎮咳実験に使用したマウス、ネコ、イヌを選択し詳細に検討した。予想した通り、isoaminile はマウスでは最少中毒量に相当する 50 mg/kg , s.c. 以上の用量で脊髓反射を抑制し、 AD_{50} 値に相当する 100 mg/kg , s.c. では10例中5例が脊髓反射抑制作用陽性となり、鎮痛作用と脊髓反射抑制作用の陽性率がみごと一致した。つまり、isoaminile の一見鎮痛作用とみられる反応は脊髓反射の抑制作用に起因するという推論は的中した。又この点でも morphine とは作用機序を全く異にする事が判明した。Isoaminile の脊髓反射抑制作用はマウスだけでなく、ネコ、イヌにおいても明らかに認められた。特に単シナプス反射が多シナプス反射に比し、強く抑制されたことは先の推論をさらに支持するものと思える。

鎮咳剤は中枢神経系に対して抑制的に作用する場合が非常に多いので、中枢神経系に対しては十分な検討を必要とすると考えた。はじめに中枢抑制薬である hexobarbital sodium との併用、すなわち、hexobarbital の催眠効果が isoaminile により延長されるか否かを試みた。Isoaminile は hexobarbital の麻酔時間に対し 20 mg/kg , s.c. 以下の用量では何ら影響しないが、 50 mg/kg , s.c. 以上の用量では著明に延長し、codeine より強い麻酔増強作用を有することが判明した。この知見は isoaminile が中枢神経系（咳中枢を含む）を介して鎮咳作用を発現する可能性を示唆するものと考えられる。又、第1章において isoaminile の鎮咳効果がネコとイヌの場合とで著明な差が認められることを報告したが、この原因としては、1) 動物の種属差、2) 実験条件すなわち麻酔の影響が考えられるが、この知見を考慮に入れるとやはり2) の場合、すなわち麻酔の影響が大とみるのが妥当と思われる。

次にウサギを用いた急性脳波実験と慢性脳波実験、さらにネコを用いた急性脳波実験を企てて、意識水準に対する作用について詳細に検討した。まず無麻酔、非不動化で拘束状態下のウサギに isoaminile の $1\sim 45\text{ mg/kg}$ を静脈内投与した。 5 mg/kg 以下では各自発脳波および中脳網様体高頻度電気刺激による脳波覚醒反応 (reticular arousal reaction) には殆んど影響を及ぼさない。また、 10 mg/kg では自発脳波に対し一過性に影響する。即ち、知覚運動野脳波では高振巾徐波化の傾向を示し、扁桃核では amygdala burst の発現頻度が増加し、海馬では hippocampal arousal wave がやや崩れ spike が混入した。一方、reticular arousal reaction は殆んど変化を示さない。また、 15 mg/kg では知覚運動野に於て高振巾徐波化が著明となり spindle burst が頻発する。扁桃核に於ては amygdala burst が高振巾化し、発現頻度の増加が認められる。海馬に於ては不規則な高振巾徐波化を示し、時おり spike の発現が認められる。一方、reticular arousal reaction も減弱が認められる。また、 30 mg/kg , 45 mg/kg では自発脳波、reticular arousal reaction とともに 15 mg/kg 投与時に認められた pattern がさらに著しくなり、 45 mg/kg では死亡例を認めることなどが判明した。Takagi and Ishida (1964)^[150] は無麻酔、非不動化、拘束状態での無処置正常ウサギの基本脳波を検討し 1) alert pattern, 2) resting pattern, 3) mixed pattern の3型に大別している。この報告を考慮すると、 15 mg/kg 以上の isoaminile は mixed pattern から resting pattern に移行させるものと思われる。

次いで、無麻酔、不動化、拘束状態でネコに isoaminile の $1\sim 45\text{ mg/kg}$ を静注した。 2.0 mg/kg 以下では自発脳波および reticular arousal reaction に対しては殆んど影響をおよぼさない。 5.0 mg/kg では自発脳波は一過性に軽度の徐波化傾向を示す例も認められたが著変なく reticular arousal reaction にも殆んど影響をおよぼさない。 $10, 15\text{ mg/kg}$ では自発脳波に於て運動野および知覚野の脳波は明らかに徐波化を示し、扁桃核では amygdala burst が減弱し、海馬では不規則な pattern が出現する。 30 mg/kg では死亡例が認められ、自発脳波、reticular reaction はともに著しく抑制される。 45 mg/kg では全例死亡することなどが判明した。

ネコを用いた脳波急性実験に関してはMoruzzi and Magoun(1949)^[102]、中島(1955)^[104]、時実(1958)^[156]、山本(1959)^[162]等の報告がある。しかし、急性実験に於ては電極刺入手術による侵襲や麻酔の影響、また、動物が固定されているという物理的束縛、さらに筋弛緩剤の使用により行動観察が不可能であるなどの欠点が指摘されている。しかし、山本ら(1959)^[162]はネコの基本脳波、特に急性実験と慢性実験に於ける基本脳波の相違について詳細に検討し、固定猫(急性実験)と無拘束猫(慢性実験)のそれぞれ対応した意識水準に於ける脳波 pattern を比較すると、両者の間には本質的な差異は認められず、各 stage に於ける脳波 pattern は固定猫の方が鮮鋭である事を報告している。以上、ウサギおよびネコに於ける脳波急性実験結果から、isoaminile の脳波 pattern におよぼす影響は、ウサギおよびネコの両者間に著しい量的、質的差異はないものと思われ。

最後に、無拘束、無麻酔ウサギ(慢性実験)に isoaminile の 1~45mg/kg を投与してみたが、ウサギ脳波急性実験の結果と殆んど変化なかった。すなわち 5mg/kg 以下では各自発脳波および reticular arousal reaction に対し殆んど影響をおよぼさない。10mg/kg では運動野脳波、知覚野脳波は高振巾徐波化を示し、扁桃核では amygdala burst の発現頻度が増加し、海馬では hippocampal arousal wave がやや不規則化を示す。しかし、reticular arousal reaction に対しては殆んど変化を及ぼさない。15mg/kg では運動野脳波、知覚野脳波ともに高振巾徐波化が著明となり、spindle burst や sharp wave が頻発する。扁桃核では amygdala burst が高振巾化し、発現頻度が増加する。また、時おり spike が出現する。海馬では不規則な高振巾徐波化が見られ、spike の出現がみられることもある。また、reticular arousal reaction も抑制される。30mg/kg、45mg/kg では自発脳波、reticular arousal reaction とともに 15mg/kg 投与時に認められた pattern の変化が増強されることが判明した。

以上、ウサギを用いた急性脳波実験と慢性脳波実験の実験結果を比較すると、isoaminile の脳波 pattern に及ぼす影響は 15mg/kg 以上で抑制傾向を示し、急性と慢性の両者の間に有意な質的差異はないものと思われ。

また、先に isoaminile の作用部位は、麻酔延長作用、脊髓反射抑制作用等の実験成績から中枢であろうと推論したが、この脳波に関する実験結果と比較検討すると、isoaminile は「咳中枢」より高次の中枢(新皮質、旧皮質、古皮質)に対しては、鎮咳有効量の 4 倍以上の用量ではじめて影響することが判明した。

第 4 節 結 論

以上、isoaminile の中枢作用を検討し以下の結論を得た。

- 1 Isoaminile は化学構造上麻薬性鎮痛薬である methadone に類似しており、高用量において一見「鎮痛らしき」作用を発現する。しかし本作用は麻薬拮抗作用を有する levallorphan により拮抗されず、その機序は morphine、codeine 等の麻薬性薬剤の場合とは本質的に異なる。
- 2 Isoaminile の一見「鎮痛らしき」作用の発現機序は本化合物の脊髓反射抑制作用と密接に関連している。
- 3 Isoaminile は単独投与では麻酔作用を発現しないが、高用量において hexobarbital による麻酔時間を延長する。
- 4 ネコにおいて、isoaminile は AtD_{50} 値 (1.1~1.3mg/kg, i.v.) よりもかなり多い 5~10mg/kg, i.v. 以上の用量で「咳中枢」の高位中枢である新皮質、旧皮質、古皮質の自発脳波および中脳網様体高頻度電気刺激により誘発される脳波覚醒反応に影響をおよぼし、意識レベルを下降させる。本作用はウサギにおいても 10~15mg/kg, i.v. 以上の用量で認められる。
- 5 Isoaminile は高用量 (10~15mg/kg, i.v.) において、ネコの脊髓反射活動電位に影響をおよぼし、単シ

ナッブス反射および多シナッブス反射を抑制する。本作用はイヌ(20mg/kg, i.v. 以上)においても認められる。以上要するに, isoaminile は鎮咳有効量の5~10倍,あるいはそれ以上投与した場合には中枢神経系に対し抑制的に作用することが判明した。すなわち, isoaminile は選択性の高い安全な鎮咳活性物質であるという結論に達した。

第3部 新規鎮咳活性物質 isoaminile の有用性と安全性に関する検索

—特に薬理学的、毒性学および麻薬性に関する検索—

緒 言

第1部において、動物に実験的咳嗽反射を必要時に確実に誘発させる方法を検討し、1) 無麻酔イヌの気道粘膜をブ
タの毛5本を束ねた刺激毛で機械的に刺激し、咳嗽反射を惹起する咳嗽犬法が最も適当であり、2) 次いで軽麻酔ネコ
の気道粘膜をウサギのヒゲ5本を束ねた刺激毛で機械的に刺激する咳嗽猫法、また軽麻酔ネコの上喉頭神経を電気刺激
する方法が実用的である事を見出した。さらにこれらの方法により誘発した咳嗽反射が既存の鎮咳剤により鎮静され、
その強度が臨床成績と大体一致することも見出した。

第2部では、これらの方法、主に咳嗽犬法および咳嗽猫法を用い、今回注目した isoaminile の鎮咳活性が既存の
鎮咳剤と比較し、どの程度であるかについて検討し、総体的には codeine に匹敵する優れた薬物であることを見出
した。さらに、鎮咳作用と密接に関係する中枢神経系に対する作用、特に鎮痛作用、麻酔増強作用、脊髓反射および意
識レベルに対する作用について詳細に検討し、1) isoaminile は一見「鎮痛らしき」作用を発現するが、それは脊
髓反射の抑制作用に起因しており、morphine, codeine 等とは本質的に機序を異にする。2) isoaminile は
高用量において麻酔増強作用、脊髓反射抑制作用、意識レベルの低下作用等の中枢抑制作用を発現するが、それは鎮咳
有効量の5~10倍あるいはそれ以上の隔りがある為、安全で、選択性の高い優れた鎮咳活性物質であることを報告し
た。

第3部では、isoaminile が仮に医薬品(鎮咳剤)として使用された場合の有用性ならびに安全性、特に潜在的有害
作用について、すなわち第1章で薬理学的側面より、第2章では毒性学的側面より、第3章では麻薬性に関して詳細に
検討した。

第1章 新規鎮咳活性物質 isominile の有用性と安全性に関する薬理学的検索

第1節 実験材料ならびに実験方法

実験に供した isoaminile citrate および isoaminile cyclamate は西ドイツ Kali-Chemie 社より提供
を受けた。その他の使用薬剤は codeine phosphate (塩野義), morphine hydrochloride (塩野義),
diphenylhydantoin sodium (Aleviatin[®], 大日本製薬), phenobarbital sodium (Phenobal[®] 三
共), trimethadione (Minoaleviatin[®] 大日本製薬), atropine sulfate (小宗化学), diphenhy-
dramine hydrochloride (和興), papaverine hydrochloride (岩城製薬), urethane (Merck),
pentobarbital sodium (Nembtal[®], 大日本製薬), histamine dihydrochloride (和光純薬),
acetylcholine chloride (第一化学), barium chloride (関東化学), procaine hydrochloride (小
林製薬), pentetrazol (Cardiazol[®], 三共), tremorine dihydrochloride (Nutritional Bioch
emicals Corporation), hexamethonium bromide (Methobromin[®], 山之内), phentramine
(Regitine[®], Ciba) であり、適宜生理食塩液(蒸留水または種々の栄養液)に溶解し使用した。

I 急性毒性

1 マウスの場合は体重 15~20g の健常な ddy 系雄性および雌性マウスを1群6匹とし4群以上を使用した。

Isoaminile citrate および cyclamate は生理食塩液に溶解し静脈内、皮下およびゾンデを介し胃内に投与
し、経時的に中毒症状を観察すると共に72時間後の死亡率から Litchfie'd-Wilcoxon 法により50%致死
量(LD₅₀ 値)およびその信頼限界を求めた(p=0.05)。投与液量は、静注は0.2ml 以内、その他の場合も

0.5 ml 以内となるよう濃度を調整した。また、経口投与の場合は18時間絶食後実験に供した。

- 2 イヌの場合は、体重5～10kgの健常成熟雑種のイヌを雌雄の別なく、1群3頭、4群を使用した。被験薬は前肢静脈より投与し、一般症状を観察するとともに、各投与量毎に24時間後の致死率を求め、Litchfield-Wilcoxon法^[89]によりLD₅₀値およびその信頼限界を算出した($p=0.05$)。

Ⅱ 中枢神経系に対する作用

1 抗痙攣作用

a) 最大電撃痙攣法

体重20～25gのddy系雄性マウスを1群10匹とし使用した。痙攣発作の誘発には生理食塩水を点眼した両眼球に電極をあてelectroshock apparatus type ESA-101 (新栄電機)を用い2 kv, 30 mAの交流を0.2秒間通電した。抗痙攣作用の判定基準は後肢の強直性伸展 (full tonic extension以下TEと略記) が完全に消失した場合はもちろんTEが発現した場合にも発現時間が5秒以上に延長し、TEの程度が微弱でその持続時間が5秒以下に短縮した場合を抗痙攣作用陽性と判定した。なお被検薬は電撃刺激30分前に皮下注射した。

b) Pentetrazol 痙攣法

体重18～22gのddy系雄性マウスを1群6匹とし使用した。痙攣発作の誘発にはpentetrazol 170 mg/kgを腹腔内に注射した。抗痙攣作用の判定基準は初期に発現する間代性痙攣 (clonic convulsion以下CLと略記)、および次いで発現するTEが完全に消失し、behaviourが平常とほとんど変化せず生存する場合を抗痙攣作用陽性と判定した。なお被検薬はpentetrazol投与30分前に皮下注射した。

2 抗tremorine作用

体重18～22gのddy系雄性マウスを1群6匹として使用した。tremorine dihydrochloride 20mg/kgを頸部背側皮下に注射し振せんを誘発させた。抗tremorine作用の判定基準は振せん、発汗、流涎が完全に消失した場合はもちろん、発現した場合でもその程度が非常に微弱で、その持続時間が1時間以下に短縮した場合を抗tremorine作用陽性と判定した。なお被検薬はtremorine投与20分前に腰部背側皮下に注射した。

Ⅲ 気管に対する作用

1 ウサギ生体気管支筋に対する作用

ウレタン麻酔 (1.2 g/kg皮下) ウサギを用いJackson法^[49]により生体内気管支筋に対する作用を検した。本法における呼吸曲線の頻度と振巾はすべて人工呼吸によって与えられ、常に一定である。呼吸曲線の振巾の減少、あるいは増大は、それぞれ気管支筋の収縮あるいは弛緩による気道抵抗の増大あるいは減少を意味する。横隔神経は胸腔内で両側とも切断し、自発呼吸の発現および横隔膜の移動による胸腔容積の変化を防止した。被検薬を股静脈内に投与し、正常時の気管支筋緊張、およびhistamine·2HCl (Hist) 5～15 μg/kg静注により惹起した気管支筋収縮に対する緩解作用を検した。

2 モルモット摘出気管筋に対する作用

体重400～500gのHartley系雄性モルモットの気管平滑筋標本 (気管平滑筋の両際を2～4 mm隔して縦方向に切断し平滑筋以外の余分な組織を切除したものを輪状軟骨の2～3個の巾で両際より交互に横方向に切断し、その両際をセルフリンで摘む) を各濃度に5例以上使用し、Magnus法^[135]により摘出気管平滑筋に対する単独作用およびHist 1×10^{-6} g/ml, acetylcholine chloride (Ach) 1×10^{-6} g/ml, barium chloride (Ba^{++}) 5×10^{-4} g/mlで惹起した痙攣性収縮に対する作用を検した。なお、検体は痙攣性収縮

が最高に達した後、経時的に低濃度から適用濃度を上げるようにした。又、栄養液はTyrode液を使用し、浴槽内温度は $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保持した。

IV 呼吸および血圧に対する作用

ウレタン麻酔(urethane 1.2 g/kg 皮下)した体重 $2.5 \sim 3\text{ kg}$ の健常な雄性ウサギおよびウレタン・モルヒネ麻酔(urethane $1.2\text{ g} + \text{morphine } 10\text{ mg/kg}$ 皮下)あるいはペントバルビタール麻酔(pentobarbital 25 mg/kg 静注)した体重 $5 \sim 9\text{ kg}$ の健常な成熟雑種のイヌを雌雄の別なく使用した。呼吸は気管内圧の変化を低圧用 transducer(日本光電)を介し、血圧は股動脈圧を高圧用 transducer(日本光電)を介し記録した。又被検薬は股静脈内に挿入したポリエチレン細管を介し投与した。

V 上頸神経節と瞬膜に対する作用

体重 $2 \sim 4\text{ kg}$ のネコを雌雄の別なく5匹使用した。ether麻酔下に第1頸椎の高さで脊髄を切断した。その後は無麻酔人工呼吸下にて上頸部交感神経を露出し、節前線維あるいは節後線維に白金刺激電極を装着した。神経刺激は節前および節後線維を交互に電子管刺激装置(日本光電MSE-3)を用いて supramaximal voltage($3 \sim 6\text{ V}$)の矩形波(パルス巾: 1 msec , 頻度: 20 cps)にて60秒間行い、同側の瞬膜の収縮を isotonic transducer(Ugo Basile)を介して導出記録した。また同時に股動脈圧も高圧用 transducer(日本光電)を介し導出記録した。被検薬は股静脈内に挿入したポリエチレン細管を介し投与した。

VI 心臓に対する作用

1 食用カエル摘出心臓に対する作用

300 g 以上の食用カエル心臓を常法により摘出し、

- a) Straub^[145]法により検体の一定濃度液を心室灌流し、心収縮運動をヘーベルを介しキモグラフ上に記録した。
- b) 八木法^[136]により検体の一定濃度液を心房、心室灌流し、心収縮運動をヘーベルを介しキモグラフ上に記録した。
- c) 八木変法: electromagnetic flow-meter type MF25(日本光電)および pulse rate tachometer type RT-5(日本光電)を用い直接心拍出量および心拍数を記録した。なお栄養液は Ringer 液を使用し、常時 $95\%\text{ O}_2$, $5\%\text{ CO}_2$ の混合ガスを通気した。

2 ウサギ摘出心臓に対する作用

体重 $2 \sim 2.5\text{ kg}$ のウサギ心臓を常法により摘出し、Langendorff^[137]法により冠流量、心収縮力、心拍数を electromagnetic flow-meter MF-25(日本光電), F-D transducer type SB-IT(日本光電), pulse rate tachometer type RT-5(日本光電)を用い直接記録した。なお栄養液は Krebs-Hensleit 液を用い、灌流温は心臓の直前で $36 \sim 37^{\circ}\text{C}$ となる様調整した。

VII 腸管に対する作用

1 生体腸管内容輸送抑制作用

18時間絶食した体重 $15 \sim 20\text{ g}$ の健常な ddy 系雄性マウスを1群6匹5群を使用して、charcoal^[50]法により検した。被験薬は 0.2 ml 以上にならないように調整して腹腔内に注射した。20分後、 5% アラビアゴム液に 10% になるように懸濁した炭末液を 0.3 ml ずつ経口投与し、150分後マウスを殺し、開腹して虫様突起内まで炭末が輸送されているか否かを調べた。虫様突起がまったく炭末を含まず白い場合(white appendix)は抑制効果陽性、少しでも炭末が入っている場合(black appendix)は抑制効果陰性とし、各投与量毎の反応率から、Litchfield-Wilcoxon^[89]法により、 50% 腸管内容輸送抑制有効量(ED_{50} 値)およびその信頼限界を算出した($p=0.05$)。対照として codeine phosphate を用いた。

2 ウサギ摘出腸管の自働運動能に対する作用

常法によりウサギの回腸を摘出し、Magnus法を用い、腸管の緊張度、運動巾(振巾)、運動数(振巾数)

について検討した。

3 モルモット摘出腸管に対する作用

体重400～500gのHartley系雄性モルモットの回盲部標本を各濃度に5例以上使用し、Magnus法により摘出腸管に対する単独作用およびHist 1×10^{-6} g/ml, Ach 1×10^{-6} g/ml, Ba⁺⁺ 5×10^{-4} g/ml で惹起する痙攣性収縮に対する作用を検討した。なお被験薬は収縮薬適用3分前に処置した。又、栄養液はTyrode液を使用し、浴槽内温度は $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保持した。

VII 子宮筋に対する作用

非妊娠ラットの発情期子宮を摘出しMagnus法^[135]により、子宮筋緊張および子宮運動に対する作用を 37°C のTyrode液を用い検討した。

VIII アナフィラキシーショックに対する作用

体重300～350gの雄性モルモットを1群6匹として使用した。感作はモルモット皮下に卵白アルブミン（和光純薬）1mg/個体を隔2日に計4回投与する能動感作方式を用いた。ショックの誘発は最終感作注射後17～18日目に同一卵白アルブミン5mg/個体を後肢先端の静脈内に投与した。死亡例はただちに解剖し、肺、腹膜、消化管などを肉眼的に観察した。抗アナフィラキシーショック作用の判定基準は、種々のショック症状がほとんど発現せず20分以上生存する場合を抗ショック作用陽性と判定した。なお被験薬は誘発注射の30分前に皮下注射した。

X 局所麻酔作用

体重400g前後の健常雄性Hartley系モルモットを1群3匹、3群以上を使用した。表面麻酔作用および浸潤麻酔作用はBulbring-Wajda^[17]の方法により検した。

1 表面麻酔作用

結膜嚢内に、 $\frac{1}{4}$ 注射針で被検薬の生理食塩水溶液3滴を点眼し、その後5分毎に、毎回10回、 $\frac{1}{4}$ 注射針用のマンドリン線で同一程度の機械的圧迫を角膜表面に加え、薬物投与後30分間における角膜反射の消失回数を測定し、表面麻酔効果を検した。一方の眼にisoaminileを、他方に対照薬のprocaineを投与した。

2 浸潤麻酔作用

モルモットの背部の毛を脱毛剤で完全に除き、24時間後実験に供した。背部正中線の一侧に被検薬の生理食塩水溶液0.2mlを皮内に注射して直径約1cmの丘疹を作り、その境をインクで記し、その後5分毎に、毎回丘疹の中心およびインクで記した境界線の少し内側を前後左右あわせて5ヶ所を、 $\frac{1}{4}$ 注射針で同一程度に圧迫し、機械的刺激を加えた。薬物投与後、30分間における疼痛刺激で起した皮膚の反射性痙攣性収縮の消失回数を測定し、浸潤麻酔作用を検した。他側にはprocaine hydrochlorideを対照として注射した。

第2節 実験成績

I 急性毒性

Isoaminile citrateおよびcyclamateの急性毒性を雄性、雌性マウスを同一条件下におき中毒症状を観察すると共にLD₅₀値を算出し、両薬物のLD₅₀値の差の検定および雄性マウスと雌性マウスのLD₅₀値間に差が有か否かを検した。

1 マウスの中毒症状

a) 皮下注射の場合

10, 20 mg/kg: 無処置マウスの場合とほとんど同様であった。

50 mg/kg: 自発運動の亢進および外来刺激に対し挙尾の傾向を示した。

100 mg/kg: 注射10分後より自発運動の亢進、弱い挙尾反応、歩行時に後肢の円滑性を欠き、時々発

作的に疾走する等の中毒症状を認めた。60～90分後には全例投与前の状態に回復した。

120 mg/kg: 注射後一時、自発運動の減少がみられたが5～10分後より自発運動の亢進、強い振せんを認め、時々後肢の強直性伸展(tonic extension)を認めた。60～90分後にはほとんど正常状態に回復した。

173 mg/kg: 上記症状の他に間代性痙攣や、尾を背部までつける強い挙尾反応、旋回運動が認められ、強直性痙攣発作中に呼吸停止した。207 mg/kg, 299 mg/kgと増量するにつれ上記中毒症状は強くなり持続時間も延長し、isoaminile citrate 投与群は雄性マウス、雌性マウス共に244 mg/kgで全例死亡した。しかしisoaminile cyclamate 投与群は雄性マウス、雌性マウス共に6例中1例が生存し、299 mg/kgで全例死亡した。

b) その他の投与方法

静脈内および経口投与の場合も症状は皮下注射の場合とほとんど同様で、致死の原因は強直性痙攣発作中の呼吸停止であった。静脈内投与では20 mg/kgより自発運動の亢進がみられ、69 mg/kgまで死亡例はなく、89.2 mg/kgで全例死亡した。一方、経口投与では358 mg/kgまで死亡例はなく、892 mg/kgで全例死亡した。

以上のことからisoaminile citrateおよびcyclamateのマウスにおける中毒症状は雄性マウス、雌性マウスともに自発運動の亢進、後肢の運動障害、挙尾反応、振せん、間代性および強直性痙攣を主とし、強直性痙攣発作中の呼吸麻痺により死亡することが判った。

2 イヌの中毒症状

Isoaminile cyclamateを上腕静脈内に投与した後、経時的に中毒症状を観察した。

1.0, 2.0, 5.0 mg/kg: ほとんど変化が認められなかった。

10.0 mg/kg: 注射直後に軽度の舌なめずりおよび流涎がみられた(8例中3例)が、その他の症状は認められなかった。

20.0 mg/kg: 注射直後より呼吸数が著明に増加し、心搏数も10～15%程度増加した。2分後やや落ち着いたが、歩行時に後肢の運動障害がみられ、また流涎および軽度の振せんが認められた。嘔吐およびその他の症状はみられず、60分後には正常に回復した。

40.0 mg/kg: 注射直後より呼吸興奮、全身性の振せんおよび後肢の脱力がみられ、歩行不能となった。1分後より側臥位をとり、ついで間代性および歩行様痙攣に移行し、また後肢足蹠の肉趾を鉗子で挟んだ際の疼痛反射の感受性低下をみとめた。2分後より30秒～1分間隔で後弓反張を数回繰返した後、旋回運動に移行した。10分後には歩行様、間代性および強直性痙攣は消失し、疼痛反射および心搏数も正常に回復し、また呼吸数もほとんど正常に回復した。しかし腰部および後肢の振せんは依然認められ、また後肢で立とうと努力するが成功しなかった。60分後、振せんは消失し、呼吸数は正常に回復したが、ややもすれば座り込み、無理に歩かせると後肢運動は円滑を欠いた。120～150分後にはほとんど投与前の状態に回復した。

61.9 mg/kg: 注射直後より強い振せん、後弓反張、強直性痙攣および瞳孔散大をきたし、四肢を伸張し後肢の疼痛反射(前述)も消失した。10分後には後弓反張、強直性痙攣は消失したが、依然弱い間代性痙攣を認め、正常体位を保てなかった。30分頃より次第に振せんは消失し、90分後には後肢の歩行障害が認められたが、正常体位を保ち得るようになり、疼痛反射もほとんど正常に回復した。120分後より呼吸数もほとんど正常に回復し、180分後には全例投与前の状態に回復した。この投与量までは死亡例はなかった。

74.3 mg/kg: 注射途中より強い振せん、間代性および強直性痙攣、瞳孔散大がみられ、注射終了とともに後弓反張をきたし、一時無呼吸となり、口腔粘膜および舌にチアノーゼをみとめた。2～6分後、周期的な強直

性痙攣による無呼吸と、痙攣消失時の正常呼吸が交互に発現した。5～10分後に8例中2例が強直性痙攣発作中に呼吸停止した。呼吸停止後もなお心搏動は触知し得た。剖検の結果、心室は拡張位に停止していたが、肺、肝、腎、脾臓などには肉眼的に異常は認められなかった。他の6例は6～10分後に強直性痙攣が消失し、61.9 mg/kg投与の場合と同様の経過をたどり、240～360分後に投与前の状態にほとんど回復した。

89.2 mg/kg：上記症状がさらに重篤となり、注射直後に8例中の2例、5～15分後にさらに5例が呼吸停止した。他の1例は400分後に大体注射前の状態に回復した。

107 mg/kg：8例とも注射途中あるいは直後に呼吸停止した。呼吸停止後も心搏動は触知し得た。
以上の結果から、イヌにおける中毒症状もマウスの場合とほとんど同様で、呼吸興奮、振せん、後肢に特に強い運動失調、間代性および強直性痙攣を主とし、強直性痙攣発作中あるいはその後の呼吸麻痺により死亡することが判った。

3 50%致死量(LD₅₀ 値)の算出

IsoaminileのマウスにおけるLD₅₀ 値はTable 3-1 に示す如く、いずれの投与法においても、クエン酸塩とシクラミン酸塩の間で有意な差は認められなかった。又雄性マウスと雌性マウスの間で有意な差は認められなかった。一方、イヌにおけるLD₅₀ 値は、isoaminile cyclamateの場合は84 mg/kg、クエン酸塩の場合は80 mg/kgと算出された。

Table 3-1 Comparison of LD50 value of isoaminile with other control drugs.

Drugs	Mice					Dogs		
	Route	Sex	LD50(mg/kg)	Ratio of toxicity to codeine	Sex difference	Route	LD50(mg/kg)	Ratio of toxicity to codeine
Isoaminile citrate	i.v.	M	92(69-121)	76	N.S.			
		F	94(75-118)	74				
	s.c.	M	172(156-193)	111	N.S.			
F	177(164-176)	107						
Isoaminile cyclamate	p.o.*	M	450(375-542)	64	N.S.			
		F	425(372-486)	68				
	i.v.	M	86(77-96)	81	N.S.			
F	96(80-119)	73						
s.c.	M	175(146-210)	109	N.S.	i.v.	84(72-98)	116	
F	200(166-240)	96						
Codeine phosphate ^{a)}	p.o.*	M	410(315-533)	70	N.S.			
		F	380(315-465)	76				
	i.v.	M	70(58-85)	100				
s.c.	M	191(178-205)	100					
p.o.*	M	290(244-341)	100					
Morphine HCl-salt	i.v.	M	194(132-284)	36		i.v.	175(156.8-195.3)	56
	s.c.	M	354(289-433)	54				
Dextromethorphan HBr-salt ^{b)}	s.c.	M	153(134-174)	124		i.v.	30**	326
Noscapine HCl-salt	s.c.	M	1810(1520-2110)	11		i.v.	80**	122

Figures in parenthesis show confidence limits (p=0.05)
a) Contains 1.5 mol of H₂O b) Contains 1 mol of H₂O
* Fasting for 16 hours N.S.: not significant
** Minimal lethal dose
M: Male
F: Female

4 他の鎮咳薬の毒性との比較

Isoaminileの毒性を既知の鎮咳薬の毒性と比較するため、LD₅₀ 値としてTable 3-1に示す。それぞれの塩基のLD₅₀ 値で比較すると、isoaminileの毒性は、マウスでは皮下、腹腔、静注ともにほぼcodeineに等しく、経口ではcodeineの約 $\frac{2}{3}$ である。イヌにおける毒性はcodeine, morphineより強く、noscapineよりやや強いが、現在広く使用されているdextromethorphanよりは弱く $\frac{1}{2}$ 以下に相当する。

5 鎮咳作用における安全域(safety margin)の算出および他の鎮咳薬との比較

鎮咳作用における安全域 (LD_{50} 値/ AtD_{50} 値) はイヌに静脈内投与した場合, isoaminile citrate は $80/8.0=10.0$, isoaminile cyclamate は $84/7.72=10.9$ となり codeine phosphate の 39.1 , morphine hydrochloride の 583.3 に比しはるかに小さいが, 現在鎮咳薬として頻繁に使用されている dextromethorphan の 2.0 , noscapine の 4.7 に比較すればかなり大きく安全であることが判った。

II 中枢神経に対する作用

1 抗痙攣作用

a) 最大電撃痙攣法

実験方法の項で記した様に 2 kv , 30 mA の交流を 0.2 秒間マウスの両眼球に通電すると, マウスはその直後 (1 秒以内) より典型的な TE を発現し 18.1 (標準誤差 ± 1.40) 秒持続する。その後, 間代性痙攣, 脱力, 鎮静症状を経て回復する例は $30\sim 50\%$ 有り, 他の $50\sim 70\%$ は痙攣が緩解すると同時に放尿致死する。判定基準は上記症状の経過より TE が完全に消失した場合はもちろん, TE が発現した場合にも発現時間が 5 秒以上に延長し, TE の程度が微弱で, その持続時間が 5 秒以下に短縮した場合を抗痙攣作用陽性と判定した。Isoaminile citrate および cyclamate は共に 20 mg/kg 以下では全例無効であるが, 40 mg/kg に増量すると前者では 60% , 後者では 50% 有効となり, 80 mg/kg では両者共に全例有効であった。一方, 対照薬として用いた phenobarbital sodium, diphenylhydantoin sodium, codeine phosphate, morphine hydrochloride などの抗痙攣作用は Fig. 3-1 に示す如くである。

b) Pentetrazol 痙攣

Pentetrazol 腹腔内投与後 47.8 (標準誤差 ± 3.9) 秒に間代性痙攣が発現し次いで典型的な TE が発現し, 83.5 (標準誤差 ± 2.04) 秒後には全例死亡する。判定基準は上記症状の経過より CL および TE が消失し, behavior が平常と変化せず死亡しない場合を抗痙攣作用陽性と判定した。Isoaminile citrate および cyclamate は共に 20 mg/kg 以下では全例無効であるが, 40 mg/kg に増量すると前者では 66% , 後者では 33% 有効となり, 80 mg/kg に増量すると両者共に 83% 有効であった。一方, 対照薬として用いた trimethadione, phenobarbital sodium, diphenylhydantoin sodium, codeine phosphate, morphine hydrochloride などの抗痙攣作用は Fig. 3-2 に示す如くである。

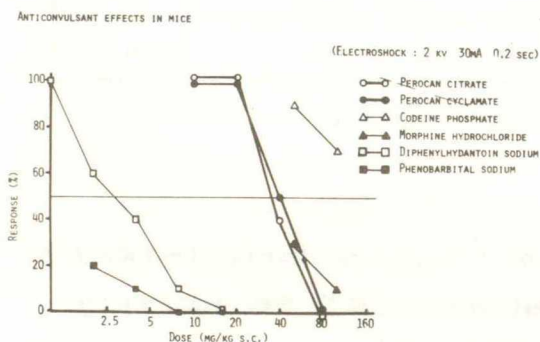


Fig. 3-1 Anticonvulsant effect of isoaminile (Perocan) in mice.
Convulsion was induced by electroshock.

2 抗 tremorine 作用

Tremorine 20 mg/kg を皮下注射するとその $10\sim 15$ 分後には必ず著明な振せん, 発汗, 流涎などが発現し 2 時間以上持続する。判定基準は上記症状が完全に消失した場合はもちろん, 発現した場合にもその程度が非常に微弱でその持続時間が 1 時間以下に短縮した場合を抗 tremorine 作用陽性と判定した。Isoaminile citrate および cyclamate は共に 20 mg/kg より抗 tremorine 作用を発現し, 40 mg/kg に増量す

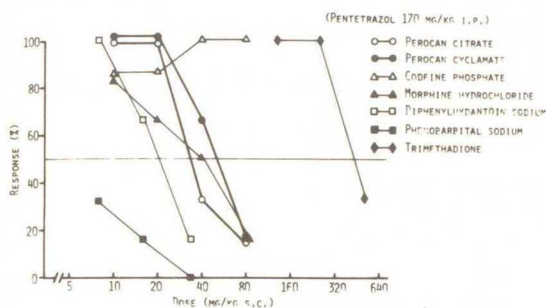


Fig. 3-2 Anticonvulsant effect of isoaminile (Perocan) in mice.
Convulsion was induced by pentetrazol 170mg/kg, i.p.

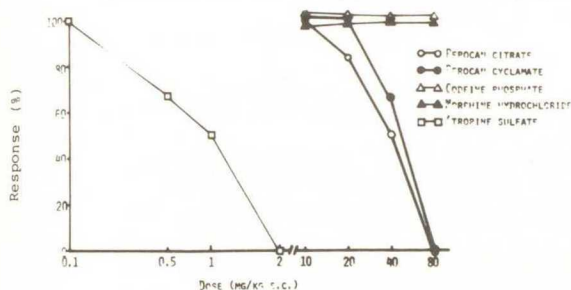


Fig. 3-3 Antitremor effect of isoaminile (Perocan) in mice.
Tremor was induced by tremorine dihydrochloride 20mg/kg, s.c.

Isoaminile citrate および cyclamate をそれぞれ 5.0~8.0mg/kg, i.v. 投与した場合, この気管支筋痙攣に対し完全な緩解作用を示した。一方, 0.1~0.2mg/kg, i.v. の diphenhydramine・HCl もまた気管支筋痙攣を完全に抑制した。Fig. 3-4 および Fig. 3-5 はウレタン麻酔ウサギを用いて, isoaminile citrate および cyclamate の緩解作用を diphenhydramine・HCl と比較したものである。

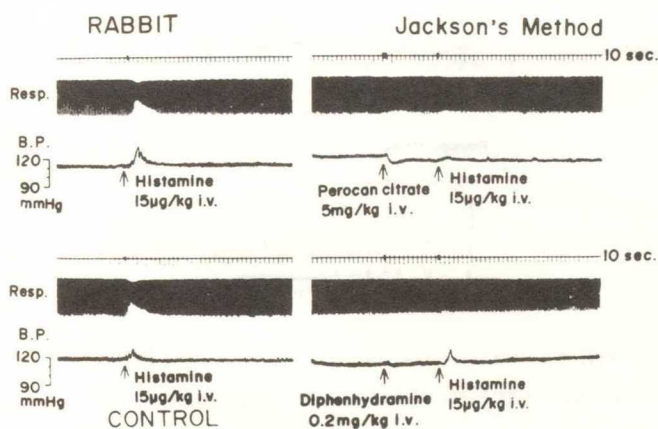


Fig. 3-4 Effects of isoaminile citrate and diphenhydramine-HCl

on the bronchial muscles in an anesthetized rabbit. Tested by Jackson's method. Upper: The effect of isoaminile citrate (5.0mg/kg, i.v.) on the bronchial muscle contraction induced by an i.v. dose of 15µg/kg of histamine・2HCl

Resp.: Respiration (intratracheal pressure) given by artificial ventilation is maintained at a constant state in tone of the bronchial muscles.

B.P.: Blood pressure in mmHg. Time in 10 sec.

の緊張に対し殆んど変化を示さないが, 1×10^{-5} g/ml 以上の濃度で軽度の緊張の低下を認め, 1×10^{-4} g/ml 以上の濃度では急激に著明な緊張の低下を認めた。

b) Histにより惹起した痙攣性収縮に対する作用

と前者では 50%, 後者では 33% が有効となり, 80 mg/kg に増量すると両者共に全例が有効と判定された。一方, 対照薬として用いた atropine sulfate, codeine phosphate, morphine hydrochloride などの抗 tremorine 作用は Fig. 3-3 に示す如くである。

II 気管に対する作用

1 ウサギ生体気管支筋に対する作用

a) 単独作用

[49]

ウレタン麻酔したウサギを用いて Jackson 法で試験した場合, isoaminile citrate および cyclamate 0.1~8.0 mg/kg, i.v. では, 正常気管支筋緊張に対してなら作用を認めなかった。

b) Histにより惹起した痙攣性収縮に対する作用

Hist 8~15µg/kg, i.v. により, 呼吸曲線の振巾は著明に減少し, 注射前の 20~50% に達した。

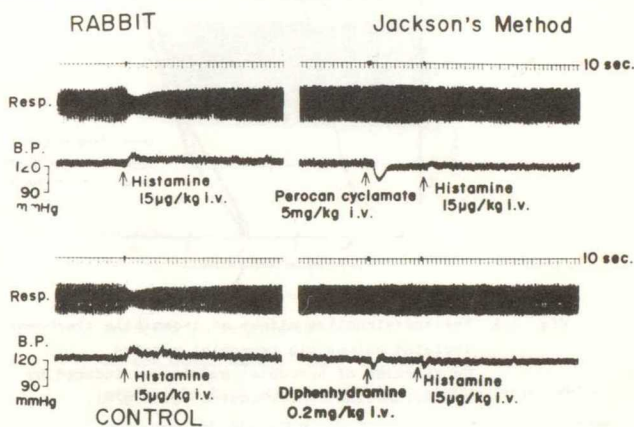


Fig. 3-5 Effect of isoaminile cyclamate and diphenhydramine-HCl on the bronchial muscles in an anesthetized rabbit. Tested by Jackson's method.

2 モルモット摘出気管筋に対する作用

a) 単独作用

Isoaminile citrate および cyclamate は共に 1×10^{-6} g/ml 以下の濃度では摘出気管筋

Isoaminile citrate および cyclamate は共に $1 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$ 以下の濃度では殆んど変化を示さないが、 $1 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ 以上の濃度より抑制作用を発現し、 $1 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ の濃度では 65 ~ 70 % の抑制を認めた。Isoaminile citrate, isoaminile cyclamate および diphenhydramine hydrochloride の濃度-作用曲線を Fig. 3-6 に、又その 1 例を Fig. 3-7 に示す。

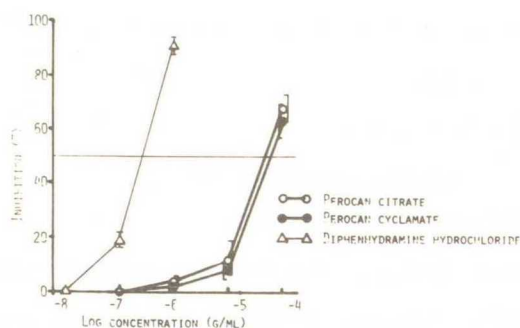


Fig. 3-6 Antihistaminic effect of isoaminile (Perocan) in isolated guinea pig bronchial muscles. Contraction of bronchial muscle was induced by histamine·2HCl $1 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$

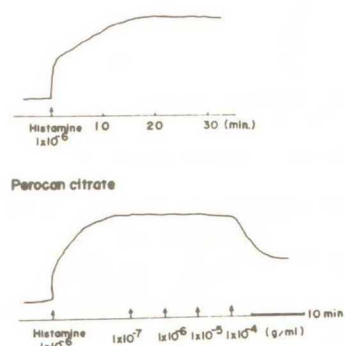


Fig. 3-7 Antihistaminic effect of isoaminile (perocan) citrate

c) Ach により惹起した痙攣性収縮に対する作用

Isoaminile citrate および cyclamate は共に、 $1 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ 以下の濃度では殆んど変化を示さないが、 $1 \times 10^{-5} \text{ g/ml}$ 以上の濃度より抑制作用を発現し、 $1 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ の濃度では 90 % 以上の抑制を認めた。Isoaminile citrate, isoaminile cyclamate および atropine sulfate の濃度-作用曲線を Fig. 3-8 に、又その 1 例を Fig. 3-9 に示す。

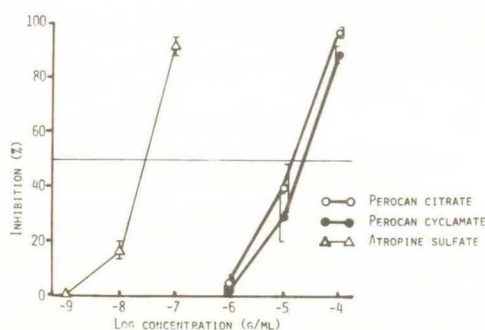


Fig. 3-8 Antiacetylcholine effect of isoaminile (Perocan) in isolated guinea pig bronchial muscles. Contraction of bronchial muscle was induced by acetylcholine hydrochloride $1 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$.

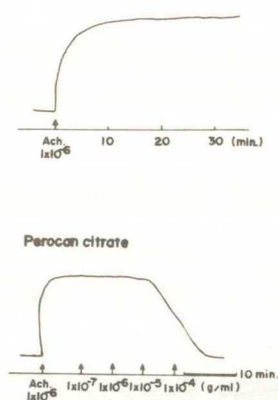


Fig. 3-9 Antiacetylcholine effect of isoaminile (Perocan) citrate

d) Ba^{++} により惹起した痙攣性収縮に対する作用

Isoaminile citrate および cyclamate は共に、 $1 \times 10^{-5} \text{ g/ml}$ 以下の濃度では殆んど変化を示さないが、 $1 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ の濃度で 40 ~ 50 % の抑制を認めた。Isoaminile citrate, Isoaminile cyclamate および papaverine hydrochloride の濃度-作用曲線を Fig. 3-10 に、又その 1 例を Fig. 3-11 に示す。

IV 呼吸および血圧に対する作用

1 ウサギの場合

Isoaminile citrate および cyclamate は静脈内投与した場合、共に 1 mg/kg 以下では呼吸および血圧のいずれに対してもほとんど変化を示さない。 2 mg/kg では血圧が $5 \sim 15 \text{ mm Hg}$ 一過性に下降し、一過性

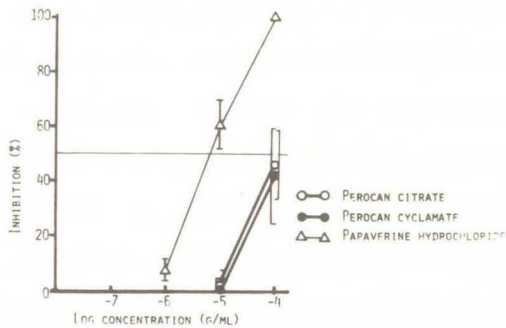


Fig. 3-10 Antibarium effect of isoaminile (Perocan) in isolated guinea pig bronchial muscles. Contraction of bronchial muscle was induced by barium chloride 5×10^{-4} g/ml.

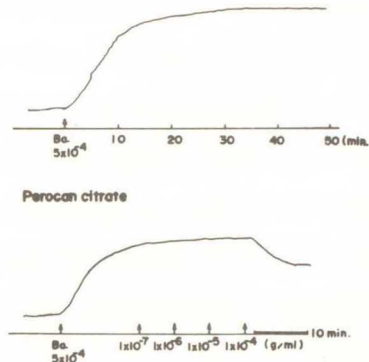


Fig. 3-11 Antibarium effect of isoaminile (Perocan) citrate

の呼吸興奮の後、振巾が軽度抑制される例を認めた。5 mg/kg では全例に血圧が 5 ~ 20 mmHg 一過性に下降し、一過性の呼吸興奮の後、2 ~ 3 分間振巾が抑制された。10 mg/kg では全例に血圧が 40 ~ 70 mmHg 一過性に下降し、呼吸数の著明な減少が 3 ~ 7 分間認められた。20 mg/kg では血圧下降および呼吸抑制はさらに強くなり、前者では 6 例中 4 例が、後者では 6 例中 3 例が死亡し、30 mg/kg では全例が死亡した。典型例を Fig. 3-12 に示す。

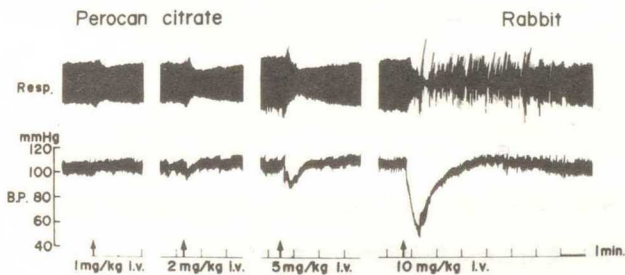


Fig. 3-12 Effect of isoaminile (Perocan) citrate on the blood pressure and respiration of the rabbit. At the arrow, various doses of the drug were administered intravenously. Resp.: Intratracheal pressure B.P.: Blood pressure in mmHg Time in one minute.

2 イヌの場合

Isoaminile citrate および cyclamate は静脈内投与した場合、共に 5 mg/kg 以下では呼吸および血圧に対しほとんど変化を示さない。10 mg/kg では全例に血圧が 10 ~ 30 mmHg 一過性に下降し、一過性の呼吸

興奮の後、振巾の軽度抑制を示す例を認めた。20 mg/kg では全例が、血圧は 20 ~ 60 mmHg 下降し、次いで振巾の軽度の減少を示し、30 ~ 50 分後には全例投与前の状態に回復した。40 mg/kg では全例注射途中より血圧は下降しはじめ投与 1 ~ 3 分後には 60 ~ 140 mmHg 下降し、前者では 6 例中 2 例が後者では 6 例中 3 例が血圧の回復をみることなく死亡した。他の 4 例は徐々に回復し、100 ~ 160 分後にはほとんど投与前の値に回復した。呼吸は血圧下降の初期に 3 ~ 5 回欠如しそのまま呼吸停止する例と、その後急激に振巾、頻度ともに増加し、5 ~ 15 分間持続した後振巾が軽度抑制され、150 ~ 200 分後にほとんど投与前の状態に回復する例を認めた。50 mg/kg では注射途中より血圧は著明に下降し、2 ~ 5 分後に血圧が 0 値まで下降し死亡した。呼吸は血圧下降

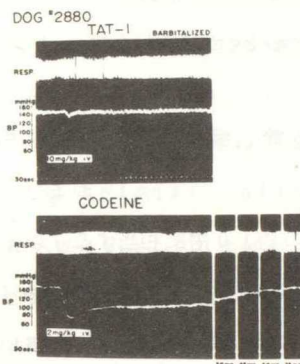


Fig. 3-13 Effect of isoaminile cyclamate (TAT-1) and codeine phosphate on the blood pressure and respiration in dog.

Ten mg/kg of isoaminile showed only a transitory fall (10-15 mmHg) in blood pressure and no change occurred in respiration. On the other hand, 2.0mg/kg of codeine caused a remarkable fall (60-70 mmHg) in blood pressure which recovered 75 min after administration and an increase in rate and depth of respiration, followed by long-lasting depression. Resp.: Intratracheal pressure B.P.: Blood pressure

途中より停止し、10～30回の不規則な呼吸 (gasp ing) の後死亡した。また上記した様な isoaminile citrate および cyclamate の血圧下降、呼吸興奮に続く呼吸抑制は atropine sulfate 又は dephenhydramine hydrochloride により遮断されることはなかった。一方、codeine phosphate の場合は 1.0mg/kg で投与直後、血圧は一過性に 10～30 mmHg 下降し、呼吸は頻度を若干減少したのみで、振巾にはほとんど変化がみられなかった。2.0 mg/kg で投与直後、血圧は 40～70 mmHg 下降し、3～5 分後より徐々に回復し、50～70 分後に投与前の値に回復した。呼吸は血圧下降に伴って反射性に興奮し、その後振巾、頻度ともに若干抑制された状態が続いたが、40～60 分後にはほとんど投与前の状態に回復した。5.0 mg/kg で投与直後より血圧は急激に下降し、1～2 分後には 40～80 mmHg 下降し、その後徐々に回復し、60～90 分後に投与前の値に回復した。呼吸は血圧下降時に著明な興奮が認められたが、15 分後より振巾、頻度ともに減少し、呼吸抑制がみられた。90～120 分後に投与前の状態に大体回復した。

以上の成績より、isoaminile は 10mg/kg 以下の用量では呼吸および血圧に対しほとんど変化を示さなかったが、20 mg/kg 以上の用量では血圧下降とこれに伴う呼吸興奮がみられた。40～50 mg/kg 以上の量では著明な血圧下降が急激にあらわれ、つづいて不規則な呼吸 (gasp ing) がみられ、ついに呼吸停止をきたした。一方、codeine phosphate は AtD_{50} 値より少ない用量、すなわち 1～2 mg/kg で著明な血圧下降および弱い呼吸抑制を認め、5.0 mg/kg ではさらに増強された。Isoaminile cyclamate の 10mg/kg および codeine の 2mg/kg を同一イヌに静注した場合の呼吸・血圧曲線を Fig. 3-13 に、また isoaminile citrate 15mg/kg を静注した場合の呼吸、血圧変化が atropine sulfate で影響されなかった 1 例を Fig. 3-14 に示す。

V 上頸神経節と瞬膜に対する作用

Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate は 10.7 mg/kg, i.v. (咳嗽猫法における AtD_{50} 値の約 10 倍に相当する) 以下の用量ではネコ瞬膜の緊張状態および上頸神経節の節前線維又は節後線維の電気刺激により惹起される瞬膜収縮および血圧変動に対して使用した 5 例全例何ら影響しなかった。

一方、hexamethonium bromide (C_6) は 2.0 mg/kg, i.v. の用量で 4 例中 3 例において節前線維の電気刺激による瞬膜収縮を完全に阻止した。又、節後線維の電気刺激による瞬膜収縮は phentolamine 3.0～5.0 mg/kg, i.v. により阻止された。Fig. 3-15 はネコの頸部交感神経の節前および節後線維の電気刺激によって惹起される瞬膜収縮に対する isoaminile citrate 10.7 mg/kg, i.v. の作用を示す。

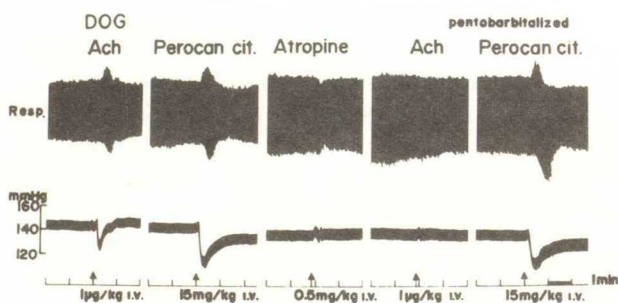


Fig. 3-14 Effect of isoaminile citrate (Perocan cit.) and acetylcholine on the blood pressure and respiration in pentobarbitalized dog.

The pretreatment with 0.5mg/kg, i.v. of atropine sulfate did not inhibit the blood pressure fall induced by 15mg/kg, i.v. of isoaminile citrate

Ach.: Acetylcholine chloride

Resp.: Intratracheal pressure

mmHg: Blood pressure in mmHg. Time in one minute

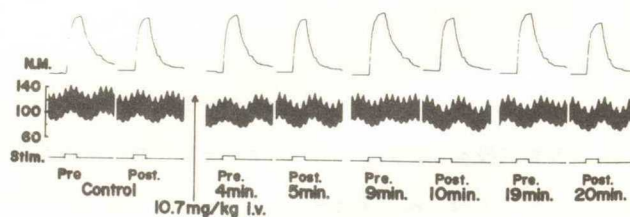


Fig. 3-15 Effects of isoaminile citrate (Perocan citrate) on the contraction of the nictitating membrane and on the blood pressure in spinal cat.

Stimulations were applied to both the preganglionic fiber and post ganglionic fiber of the cervical sympathetic nerve.

At the arrow, 10.7mg/kg, i.v. of the drug was administered.

NM: Contraction of the nictitating membrane

B.P.: Blood pressure in mmHg

Stim.: Stimulation

VI 心臓に対する作用

1 食用カエル摘出心臓に対する作用

a) Straub法^[145] Isoaminile citrateおよびcyclamateは共に、 1×10^{-6} g/ml以下の濃度では振巾（心収縮運動）および心拍数のいずれにおいても殆んど変化を示さないが、 1×10^{-5} g/ml以上の濃度より振巾が投与前対照に比べ10～30%抑制されたが、心拍数は変化を示さなかった。 1×10^{-4} g/mlの濃度では振巾は著明に抑制され、1～2分後に心室は拡張位に停止した。しかし、心房は依然正常な規則正しい運動を持続し、心室もRinger液を数回置換することにより再び正常な運動に戻った。1例をFig.3-16に示す。

b) 八木法^[136] Isoaminile citrateおよびcyclamateは共に、 1×10^{-6} g/ml以下の濃度では振巾心拍数のいずれにも変化を示さないが、 1×10^{-5} g/ml以上の濃度より振巾の抑制を認め、 1×10^{-4} g/mlでは振巾の著明な減少と心拍数の軽度の減少が認められた。1例をFig.3-17に示す。

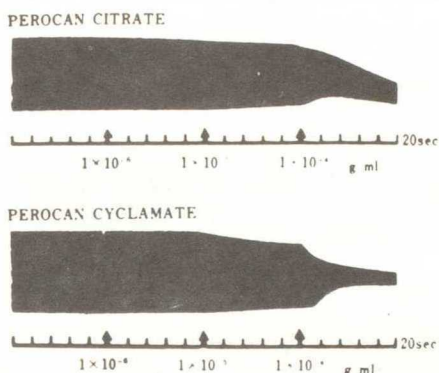


Fig. 3-16 Effect of isoaminile (Perocan) on the isolated bull frog heart.
Tested by Straub's method.

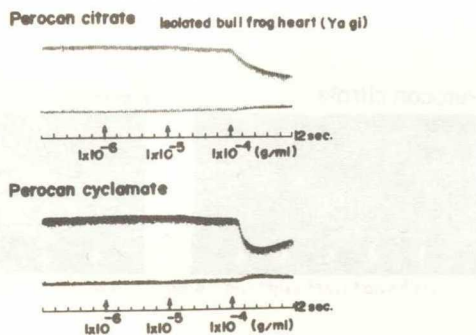


Fig. 3-17. Effect of isoaminile (Perocan) on the isolated bull frog heart.
Tested by Yagi's method.

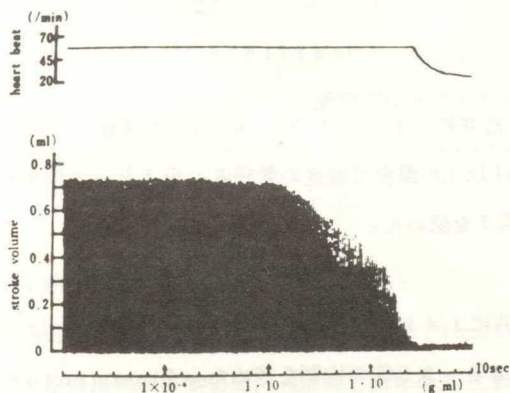


Fig. 3-18 Effect of isoaminile on the isolated bull frog heart.
Tested by modified method of Yagi.

c) 八木変法 上記二方法は心臓機能を検するのに一般的に用いられている方法で、心臓の収縮運動を isotonic に記録したものである。今回我々は心臓の真の生理的機能は収縮運動する事だけでなく、血液を拍出する事であることに注目し、心拍出量を直接記録出来る様に装置を工夫し、上記方法における成績と比較した。Isoaminile citrateおよびcyclamateは共に、 1×10^{-6} g/ml以上の濃度より心拍出量の減少を発現しはじめ、 1×10^{-5} g/mlの濃度では心拍出量は40～50%減少する。 1×10^{-4} g/mlの濃度では心拍出量は急激に減少し、20～30秒後には完全に消失し心拍数も減少した。1例をFig.3-18に示す。

2 ウサギ摘出心臓に対する作用

Isoaminile citrateおよびcyclamateは共に、 1×10^{-4} g/ml液を0.1 ml適用した場合には冠流量、心拍数、心収縮力のいずれにも殆んど変化を示さないが、 1×10^{-3} g/ml液を0.1 ml適用した場合には冠流量は軽度の増加を、又心拍数及び心収縮力は軽度の減少を認め、 1×10^{-2} g/ml液を0.1 ml適用した場合には冠流量は明らかに増し、又心拍数及び心収縮力も著明に減少した。1例をFig.3-19, Fig.3-20に示す。

VII 腸管に対する作用

1 生体腸管内容輸送抑制作用

Isoaminile citrateおよびcyclamateは共に107 mg/kg, i. p. 以下では腸管内容輸送抑制作用

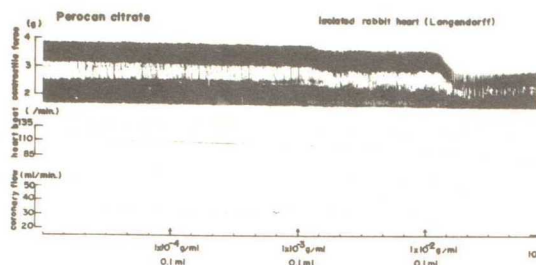


Fig. 3-19 Effect of isoaminile citrate on the isolated rabbit heart.

Tested by Langendorff's method.

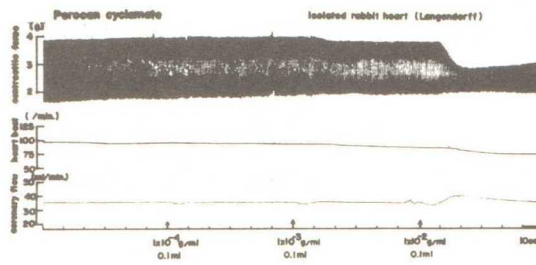


Fig. 3-20 Effect of isoaminile cyclamate on the isolated rabbit heart.

Tested by Langendorff's method.

は認められなかった。128 mg/kg, i.p. に増量すると前者では6例中1例が死亡し、生存する5例中4例に抑制作用が認められ、一方後者では6例中3例に抑制作用が認められた。さらに154 mg/kg, i.p. に増量すると、前者では6例中3例が死亡し、生存した3例は全例抑制作用が認められた。一方後者では6例中4例が死亡し、生存した2例は全例抑制作用が認められた。対照薬として用いた codeine phosphate, morphine hydrochloride, atropine sulfate などの腸管内容輸送抑制作用は Fig.3-21 に示す如くである。

2 ウサギ摘出腸管自動運動能に対する作用

Isoaminile citrate および cyclamate は共に 1×10^{-6} g/ml 以下の濃度では腸管の緊張度、運動幅(振幅数)、運動数(振幅数)のいずれに対しても5例全例ほとんど影響しなかった。 1×10^{-5} g/ml の濃度では5例中2例(citrate)~3例(cyclamate)において、振幅高は10~30%減少し、緊張度が軽度低下した。しかし、振幅数は全例変化しなかった。 1×10^{-4} g/ml の濃度では3例全例、振幅高は次第に減少し、緊張度は急激に低下し、数分後に自動運動は完全に停止した。しかし栄養液を数回置換する事により殆んど元の状態まで回復した。1例をFig.3-22に示す。

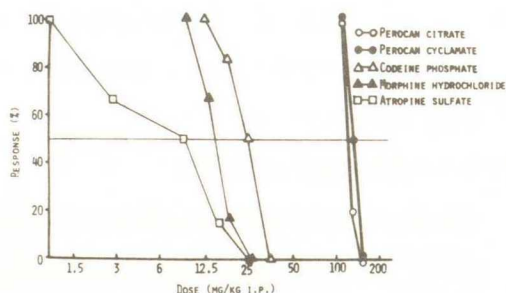


Fig. 3-21 Inhibitory effect of isoaminile (Perocan) on the transportation of intestinal contents in mice. Tested by charcoal meal test.

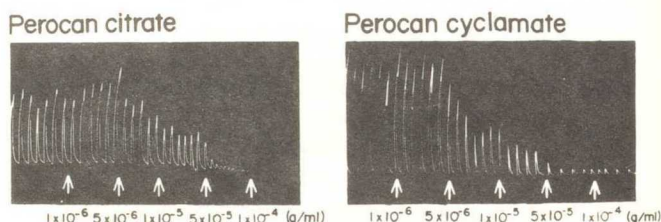


Fig. 3-22 Effect of isoaminile (Perocan) on the isolated rabbit ileum. Tested by Magnus's method.

3 モルモット摘出腸管に対する作用

a) 単独作用

Isoaminile citrate および cyclamate は共に、 1×10^{-6} g/ml 以下の濃度では摘出腸管の緊張度に対し殆んど変化を示さないが、 1×10^{-5} g/ml 以上の濃度で軽度の緊張度の低下を示す例を認め、 1×10^{-4} g/ml 以上の濃度では全例著明な緊張度の低下を認めた。

b) Histにより惹起した痙攣性収縮に対する作用

Isoaminile citrate および cyclamate は共に 1×10^{-7} g/ml ~ 1×10^{-6} g/ml 以上の濃度より抑制作用を発現し、 1×10^{-4} g/ml の濃度では80~90%の抑制を認めた。Isoaminile citrate, isoaminile cyclamate および diphenhydramine hydrochloride の濃度-作用曲線をFig.3-23に、又その1例をFig.3-24に示す。

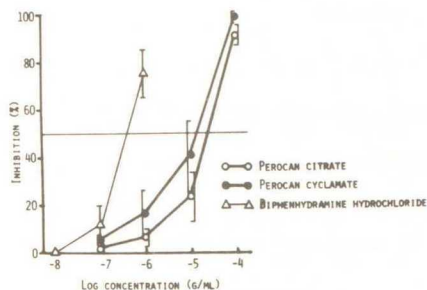


Fig. 3-23 Antihistaminic effect of isoaminile (Perocan) on the isolated guinea pig ileum. Contraction of ileum was induced by histamine·2HCl 1×10^{-6} g/ml.

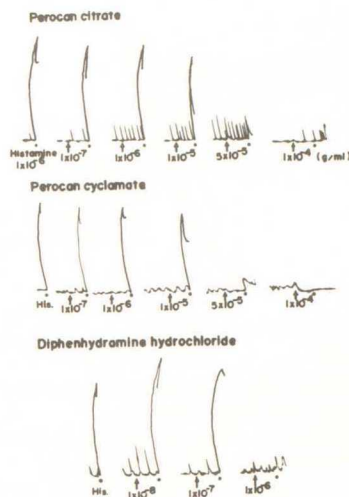


Fig. 3-24 Antihistaminic effect of isoaminile (Perocan)

c) Achにより惹起した痙攣性収縮に対する作用

Isoaminile citrateおよびcyclamateは共に 1×10^{-7} g/ml \sim 1×10^{-6} g/ml 以上の濃度より抑制作用を発現し, 1×10^{-4} g/ml の濃度では殆んど完全な抑制を示した。Isoaminile citrate, isoaminile cyclamate および atropine sulfate の濃度-作用曲線をFig.3-25に, 又その1例をFig.3-26に示す。

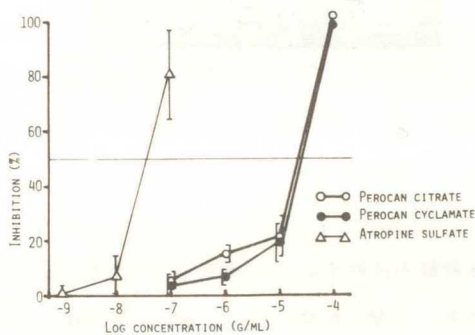


Fig. 3-25 Antiacetylcholine effect of isoaminile (Perocan) on the isolated guinea pig ileum. Contraction of ileum was induced by acetylcholine chloride 1×10^{-7} g/ml.

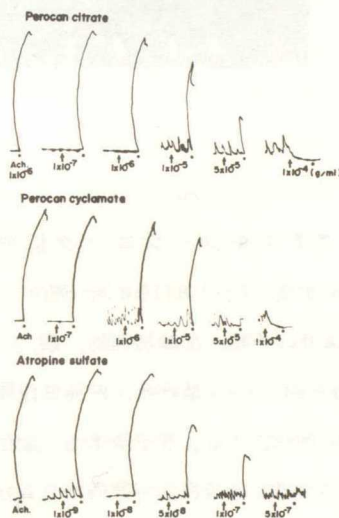


Fig. 3-26 Antiacetylcholine effect of isoaminile (Perocan)

d) Ba⁺⁺により惹起した痙攣性収縮に対する作用

Isoaminile citrateおよびcyclamateは共に 1×10^{-5} g/ml 以上の濃度より抑制作用を発現し, 1×10^{-4} g/ml の濃度では80~90%の抑制を示した。Isoaminile citrate, isoaminile cyclamate および papaverine hydrochloride の濃度-作用曲線をFig.3-27に, 又その1例をFig.3-28に示す。

VIII 子宮筋に対する作用

Isoaminile citrateおよびcyclamateは共に 1×10^{-7} g/ml 以下の濃度では, 非妊娠, 発情期ラットの子宮筋摘出標本の緊張度, 運動幅(振幅高), 運動数(振幅数)のいずれに対しても5例全例殆んど影響しなかった。 1×10^{-6} g/ml の濃度では5例中3例は殆んど影響しなかったが, 他の2例は振幅高が軽度減少した。 1×10^{-5} g/ml の濃度では全例において振幅高の明らかな減少がみられ, 1×10^{-4} g/ml の濃度では全例緊張度が

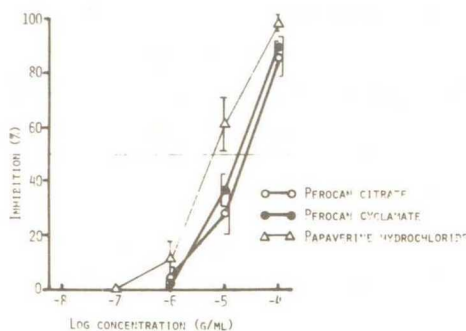


Fig. 3-27 Antibarium effect of isoaminile (Perocan) on the isolated guinea pig ileum. Contraction of ileum was induced by barium chloride 5×10^{-4} g/ml.

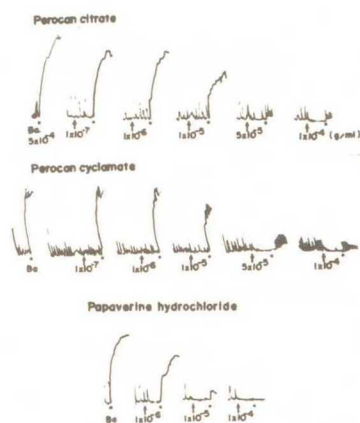


Fig. 3-28 Antibarium effect of isoaminile (Perocan)

急激に低下し、自働運動も完全に停止した。栄養液を数回置換することにより 5 例中 4 例は殆んど元の状態に回復したが、他の 1 例は完全には回復しなかった。Fig. 3-29 に isoaminile citrate および cyclamate の摘出子宮筋の自働運動に対する作用を示す。

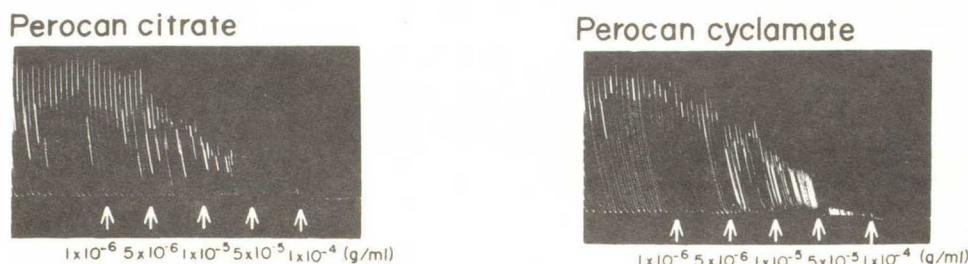


Fig. 3-29 Effect of isoaminile (Perocan) on the isolated rat uterus. Tested by Magnus's method.

Ⅸ アナフィラキシーショックに対する作用

最終感作注射後 17～18 日目に同一卵白アルブミン 5 mg/個体を静脈内注射すると、生理食塩液処置動物では誘発注射後約 1 分より、不穏、洗顔様運動、咳、くしゃみ、立毛、呼吸不整、流涎、粘膜の cyanosis、跳躍、歩行失調、Cheyne-Stokes 型呼吸、伸展性痙攣、脱糞尿などの典型的なアナフィラキシーショック症状を発現し、3～4 分後には全例死亡する。判定基準は上記症状の経過よりアナフィラキシーショック症状が消失した場合はもちろん、発現した場合でもその程度が微弱で 20 分以上生存した場合を抗ショック作用陽性と判定した。Isoaminile citrate および cyclamate は共に 40～80 mg/kg でアナフィラキシーショック症状を軽減する例や、死亡時間を延長する例が認められたが全例無効であった。すなわち isoaminile citrate および cyclamate には 10 mg/kg～80 mg/kg では抗アナフィラキシーショック作用は認められなかった。一方、対照薬として用いた dihenhydramine hydrochloride, codeine phosphate, morphine hydrochloride の抗アナフィラキシーショック作用は Fig. 3-30 に示す如くである。

X 局所麻酔作用

1 表面麻酔作用

Isoaminile citrate および cyclamate の 0.5, 1.0, 2.0 % 溶液を用い、同一濃度の procaine hydrochloride のそれと比較した。6 点法^[2]により効力比を算出したところ、isoaminile の表面麻酔作用は procaine に比較して、クエン酸塩では 82 (53.9～119) %, シクラミン酸塩では 79 (52～115) % に相当した ($p=0.05$)。

2 浸潤麻醉作用

Isoaminile citrateおよびcyclamateの0.25, 0.5, 1.0%溶液を用い、同一濃度のprocaine hydrochlorideのそれと比較した。濃度-作用曲線をFig. 3-31に示す。6点法により効力比を算出したところ、isoaminileの浸潤麻醉作用はprocaineに比較して、クエン酸塩では93(92~94)%、シクラミン酸塩では94(80~109)%に相当した($p=0.05$)。

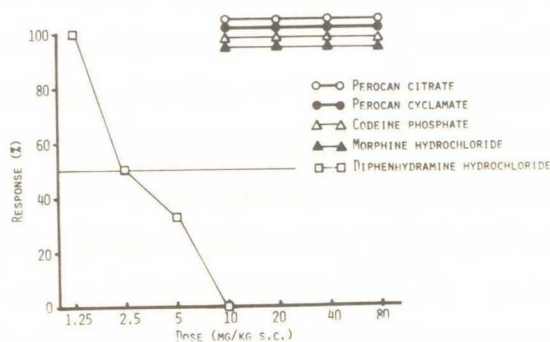


Fig. 3-30 Antianaphylactic effect of isoaminile (Perocan) in guinea pig.
Total anaphylactic shock was caused by re-injection of the antigen. (White egg albumin).

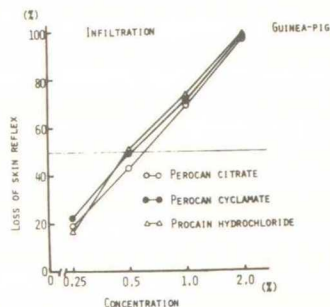


Fig. 3-31 Concentration-response curves of local anesthetic action of isoaminile (Perocan)

第3節 小括ならびに考察

Krause^[79]はマウスにおけるisoaminile citrateの中毒症状として、皮下注射で75 mg/kgより、経口投与で200 mg/kgより自発運動の亢進、挙尾反応、さらに増量した場合、間代性および強直性痙攣を認め、LD₅₀値は静脈内投与で65 mg/kg、皮下投与で240 mg/kg、経口投与で720 mg/kgであることを報告している。著者の成績では、マウスおよびイヌに共通の中毒症状として振せん、後肢の運動失調、間代性および強直性痙攣を観察し、強直性痙攣中あるいはその後の呼吸停止により死亡することを認めた。その他マウスでは自発運動の亢進、挙尾反応、イヌでは呼吸興奮を認め、Krause^[79]の報告とほとんど一致している。又、マウスにおけるLD₅₀値はisoaminile citrateの場合、静脈内投与で92(♂)~94(♀) mg/kg、皮下投与で172(♂)~177(♀) mg/kg、経口投与で425(♀)~450(♂) mg/kgとなり、性差を認めなかった。isoaminile cyclamateの場合は、静脈内投与で86(♂)~96(♀) mg/kg、皮下投与で175(♂)~200(♀) mg/kg、経口投与で380(♀)~410(♂) mg/kgとなり、性差を認めなかった。又、いずれの投与方法においても、クエン酸塩とシクラミン酸塩の間に大差は認められなかった。これをKrause^[79]の成績(LD₅₀値)と比較すると、静脈内投与方法、皮下投与方法ではそれほど差がないが、経口投与方法では明らかに著者のLD₅₀値が小さく、毒性が強いという結果になった。この原因としては、1)系統差、2)体重差、3)週令差、4)飼育条件差、5)実験室条件差、6)絶食条件差などが考えられるが、特に著者の実験では15~20 gと比較的幼若な動物を用い、しかも18時間絶食後、被験薬を経口投与しているため、このような差異が生じたものと思われる。一方、イヌにおけるLD₅₀値は静脈内投与で、80(クエン酸塩)~84(シクラミン酸塩) mg/kgとなり、「塩」の相異により大差はみられなかった。

以上、isoaminileの急性毒性をLD₅₀値でcodeine phosphateのそれと比較すると、マウスの場合にはcodeineより弱く(皮下投与では同程度かやや強い)、イヌではやや強いと思われる。又、その中毒症状は中枢の興奮によるものと推定され、死因は呼吸中枢の麻痺によるものと思われる。第2部において著者はイヌおよびネコを使用し、isoaminileの鎮咳作用を検した結果、^{[54][55][56]}「咳嗽犬」法において、静注でcodeineの30~39%、^[59]経口で40~44%に相当する鎮咳作用を、^[25]「咳嗽猫」法(静注)ではcodeineの173~205%に相当する鎮咳作用を、^[11]又猫上喉頭神経電気刺激法(Domenjoz)および猫延髄電気刺激法(Borison)においても、「咳嗽猫」

^[59]
法と同程度の鎮咳作用を有することを観察した。この知見と本章で得られたイヌにおける毒性 (LD_{50} 値) から鎮咳作用における安全域を算出すると、10.0 (クエン酸塩) ~ 10.9 (シクラミン酸塩) となりいずれも現在臨床で使用されている dextromethorphan, noscapine よりはるかに安全であることを認めた。以上の結果より、Isoaminile は少なくとも codeine に匹敵する鎮咳作用を有し、かつ安全な鎮咳薬であると推定される。

咳反射の発現機序については Bucher^[15]、Borison^[16] および加瀬^[11]、Kase^[62] 等の総説において詳述されているが、鎮咳薬は反射経路のうち知覚受容器 → 求心性経路 → 延髄の「咳中枢」 → 遠心性経路 → 効果器のどこかを抑制するか、または咳の強さを調節する stretch receptor の働き (Bucher^[14]) を抑制する筈である。Isoaminile がどの部位に作用しているかについてはさらに詳細な実験を必要とするが、現在までに得られている成績を基礎として検討してみると、末梢の知覚受容器については、Krause^[79] はモルモットを使用し、表面麻酔作用および浸潤麻酔作用を調べ、さらに zipf の方法により stretch receptor に対する麻酔作用をも検し、isoaminile の局所麻酔作用は procaine と同程度であることを報告している。一方、著者は気管粘膜内刺激受容体および stretch receptor に対する効果は未だ調べていないが、isoaminile の表面麻酔作用は procaine の 79 ~ 82 %、浸潤麻酔作用は 93 ~ 94 % に相当することを認めた。これらのことから、isoaminile のもつ局所麻酔作用は stretch receptor の抑制にある程度貢献しているかも知れない。

求心性神経自体に働くとは通常考え難いので、次に、果して中枢性に作用し得るか否かを検討してみると、直接実験をしていないのであくまで推定にとどまるが、既述した様に 1) 麻酔延長作用を有すること、2) 麻酔したネコでの鎮咳作用が無麻酔のイヌの場合よりもはるかに著明であること、3) 気道粘膜や上喉頭神経の刺激により誘発した末梢性咳反射と同様に、延髄の刺激により誘発した咳反射も抑制すること、4) 脊髄の抑制作用がみられること、5) 脳波所見より意識レベルの低下が推測されること、また、本章で明らかになった 1) マウス、イヌにおける中毒症状が中枢の興奮によるものと推定され、死因は呼吸中枢麻痺によるものと考えられる。2) 40 ~ 80 mg/kg と比較的高用量ではあるが明らかな抗痙攣作用、抗振せん作用を有する。などから中枢作用を有することは容易に類推出来る。さらに推測することを許されるなら、おそらく「咳中枢」に作用して効果をあらわすのではないかと考えられる。

遠心性経路については、現在のところ推論の手がかりになるデータは全くない。しかし、効果器のうち、気管支筋に対しては、本章で明らかとなった様に生体内の正常な気管支筋の緊張に対しては影響はしないが、histamine で惹起した気管支筋収縮に対し、isoaminile citrate および cyclamate はいずれも 5 ~ 8 mg/kg i.v. の投与により完全な緩解作用を示す。また、摘出気管筋、摘出腸管において、抗 Ach, 抗 Hist, 抗 Ba^{++} 作用を有すること、またラット摘出子宮の緊張度および自働能に対しても抑制的に作用することが明らかとなった。よって本薬物は一般の平滑筋臓器には抑制的に働くものと思われる。このうち気管支筋への作用は、やはり本薬物の鎮咳効果にある程度貢献しているものと考えるのが妥当であろう。もちろん作用点の確定については、今後さらに詳細に検討すべき問題である。

^[79]
呼吸、血圧に対しては、Krause はクロラローズ麻酔 (40 mg/kg, i.v.) したイヌおよびネコを用い、isoaminile citrate を 2 mg/kg/min の速さで投与した場合、5 mg/kg で 30 ~ 70 mm Hg の一過性の血圧下降を示すことを報告している。著者の実験では、ウレタン麻酔ウサギを用いた場合には、isoaminile citrate および cyclamate はいずれも 2 mg/kg, i.v. 以上の用量で血圧下降、呼吸変化を発現し、30 mg/kg では全例死亡することを認めた。しかし、ウレタン・モルヒネ麻酔あるいはペントバルビタール麻酔したイヌを用いた場合には、isoaminile citrate および cyclamate はいずれも 10 mg/kg, i.v. 以下の用量では呼吸血圧に殆んど影響なく、50 mg/kg, i.v. で急激な血圧下降とこれに続くあえぎ呼吸 (gasping) の後全例死亡する (codeine では同一動物において AtD_{50} 値より少ない 2 mg/kg で 40 ~ 70 mm Hg の血圧下降

と持続性の呼吸抑制を示した。)ことが判明した。また摘出心臓を用いた実験においても isoaminile citrate および cyclamate は 1×10^{-6} g/ml 以下の濃度では心臓運動に何ら影響しない事が判明した。これらのことから、isoaminile の呼吸器系および循環器系におよぼす影響は codeine に比し極めて弱いものと考えられる。また、血圧下降に関する機序について現在得られている成績を基に検討してみると、1) 脊髄ネコの上頸交感神経節の節前および節後線維の電気刺激により誘発される瞬膜収縮および血圧変動が、isoaminile 10.7 mg/kg, i.v. 以下の用量では影響されない。2) ペントバルビタール麻酔イヌに isoaminile 15 mg/kg, i.v. を投与した際誘発される血圧下降および呼吸興奮、続いて起る呼吸抑制作用が acetylcholine chloride 1 μ g/kg, i.v. の作用を完全に阻止する atropine sulfate 0.5 mg/kg, i.v. を前処置した場合にも殆んど影響されないことなどを考慮すると、自律神経系の関与、すなわち、交感神経系の抑制あるいは副交感神経系の興奮に起因するもので無いことが推論出来る。残された可能性として、効果器(心筋、血管平滑筋)の興奮性、代謝に関する問題があるが、これについては現在推論の手がかりになる成績が全くない。

Ramos et al. (1965, a. b. ^{[119][120]}) はペントバルビタール麻酔(pentobarbital sodium 30 mg/kg, i.v.)したイヌの顎下腺からの唾液量を計測することにより、isoaminile の副交感神経遮断作用を観察している。すなわち、isoaminile citrate の $8.0 \sim 10$ mg/kg, i.v. は acetylcholine および pilocarpine の効果を遮断し、また鼓索および迷走神経の電気刺激に対しても抑制作用を示した。一方、著者も本章において、isoaminile citrate および cyclamate は副交感神経刺激効果惹起作用を有する tremorine dihydrochloride をマウスに投与した際みられる著明な振せんと流涎を用量依存的に抑制することを見出した。このような isoaminile の副交感神経遮断効果、特に中枢神経系における本作用は鎮咳作用の機序とも関連しそうである。

Codeine は代表的な鎮咳剤であるが、その副作用(有害作用)の一つに便秘があげられることは周知の事実である。この点について検討してみると、isoaminile citrate および cyclamate はいずれも死亡例の発現する用量で、はじめてマウスの生体腸管内容輸送能を抑制する程度であり、codeine, morphine, atropine などに比べるとはるかに弱い事が判明した。またウサギの摘出腸管自働運動能に対しても、 1×10^{-6} g/ml 以下の濃度では緊張度、運動幅、運動数のいずれに対しても全く影響なく、 1×10^{-5} g/ml の濃度で軽度の緊張低下および運動幅の減少を発現するにすぎないことが判明した。これらのことから、isoaminile の消化器系、特にその運動機能におよぼす影響は codeine に比し極めて弱いことは明白であり、臨床使用上有害作用を発現する可能性は非常に少ないものと考えられる。

in vitro の実験において、isoaminile citrate および cyclamate はいずれも弱い抗mediator作用を有している(抗histamine作用はdiphenhydramine hydrochloride の $1/50 \sim 1/100$, 抗acetylcholine作用はatropine sulfate の $1/500 \sim 1/800$)。しかし、卵白アルブミンを間欠投与し、能動感作したモルモットのアナフィラキシーショック症状に対しては殆んど防御作用を示さないことが判明した。

第4節 結 論

1 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate のマウスにおける中毒症状は自発運動の亢進、挙尾反応、振せん、後肢の運動失調、間代性および強直性痙攣を主とし、強直性痙攣発作中の呼吸麻痺により死亡する。

2 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate のイヌにおける中毒症状は、マウスの場合と類似し、呼吸興奮、振せん、後肢の運動失調、間代性および強直性痙攣を主とし、強直性痙攣発現中ある

いはその後の呼吸麻痺により死亡する。

- 3 Isoaminile のマウスにおける LD_{50} 値は、クエン酸塩の場合は静脈内投与：92(♂)～94(♀)mg/kg
皮下投与：172(♂)～177(♀)mg/kg，経口投与：425(♀)～450(♂)mg/kg であり，性差を示さない。又
シクラミン酸塩の場合は静脈内投与：86(♂)～96(♀)mg/kg，皮下投与：175(♂)～200(♀)mg/kg，経口
投与：380(♀)～410(♂)mg/kg であり性差を示さない。又いずれの投与法においても「塩」の相違によ
る差異を示さない。
- 4 Isoaminile のイヌにおける LD_{50} 値は静脈内投与法で，クエン酸塩の場合は 80 mg/kg，シクラミン酸
塩の場合は 84 mg/kg となり，「塩」の相違による差異を示さない。
- 5 Isoaminile のイヌにおける鎮咳作用の安全域は静脈内投与法で，クエン酸塩の場合は $80/8.0=10.0$ ，
シクラミン酸塩の場合は $84/7.7=10.9$ となり，dextromethorphan hydrobromide や，nos-
capine hydrochloride に比較し，はるかに安全である。
- 6 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate はいずれも高用量では明らかな抗痙攣作
用ならびに抗振せん (tremor) 作用を示す。
- 7 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate の呼吸，血圧に対する作用は code-
ine phosphate に比較しはるかに軽微である。
- 8 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate はいずれも上頸交感神経節および瞬
膜収縮に対し影響をおよぼさない。
- 9 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate は摘出カエル心臓，摘出ウサギ心臓の
運動機能に対し， 1×10^{-6} g/ml 以下の濃度では殆んど影響をおよぼさない。
- 10 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate はいずれも最少致死量 (MLD) 以下
の用量では生体腸管内容輸送能に対し殆んど影響をおよぼさず，また摘出ウサギ腸管の自動運動能に対しても，
 1×10^{-6} g/ml 以下の濃度では殆んど影響をおよぼさない。このことは codeine phosphate の消化
器系，特にその運動機能に対する作用とは全く異っている。
- 11 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate はいずれも摘出ラット子宮の自動運動
能に対し， 1×10^{-7} g/ml 以下の濃度では殆んど影響をおよぼさない。
- 12 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate はいずれも，in vitro では軽微な抗
histamine 作用 (diphenhydramine hydrochloride の $1/50 \sim 1/100$)，抗 acetylcholine
作用 (atropine sulfate の $1/500 \sim 1/800$)，抗 barium 作用 (papaverine hydrochlor-
ide の約 $1/10$) を有する。
- 13 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate はいずれも，アナフィラキシーショッ
ク (IgG 関与) 症状に対し殆んど影響をおよぼさない。
- 14 Isoaminile citrate および isoaminile cyclamate はいずれも procaine hydro-
chloride に匹敵する表面麻酔作用ならびに浸潤麻酔作用を有する。

以上，isoaminile citrate および isoaminile cyclamate の薬理学的性質を広い範囲にわ
たって検討した結果，鎮咳剤として不都合な成績は何ら得られなかった。むしろ有益な作用（腸管内容輸送能に
対する作用）や好都合と思われる作用（生体気管支筋緩和作用，適度な局所麻酔作用）などが判明し，既存の鎮
咳剤に比較しその有用性をさらに実証したものといえる。

第2章 新規鎮咳活性物質 isoaminile の有用性と安全性に関する毒性学的検索

第1章では isoaminile の薬理作用を幅広く検討し、鎮咳剤として使用した場合の潜在的有害作用について薬理的に検討した。本章では毒性学的見地よりその安全性を確認する為 1) 急性毒性試験 2) 亜急性毒性試験 3) 慢性毒性試験を実施した。

第1節 実験材料ならびに実験方法

実験には、西ドイツ Kali-Chemie 社より提供をうけた isoaminile citrate (Lot No.533) および isoaminile cyclamate (Lot No.247) を生理食塩液 (又は蒸留水) に適宜溶解し使用した。

I 急性毒性試験

1 マウスの場合

体重14～17gの健常な ddy 系雄性および雌性マウスを1群10匹とし、5群以上使用した。Isoaminile citrate または cyclamate を1匹当たり0.3 ml 以内になる様生理食塩液に溶解し、背部皮下、尾静脈内、および経口ゾンデにより胃内へ投与した。中毒症状の観察は投与後100分間実施し、生存した動物は投与後7日間、恒温恒湿下、固型飼料で飼育し、飼料摂取量、体重変化、行動変化などについて観察した。LD₅₀ 値は薬物投与後72時間後の死亡率から、Litchfield-Wilcoxon^[89]法に従って算出した。

2 ラットの場合

体重120～140gの健常な Wistar 系雄性および雌性ラットを1群10匹とし、5群以上使用した。Isoaminile citrate および cyclamate は生理食塩液に溶解し、一匹当たりの投与量が皮下で4 ml/kg、静脈内で2 ml/kg 経口で10 ml/kg 以内になるように調製した。症状の観察はマウスと同様の方法で行なった。

II 亜急性毒性試験

1 使用動物および飼育条件

体重40～50gの Wistar 系雌雄ラットを温度24±1℃、湿度50～60%の室内に固型飼料および水を自由に摂取できるように飼育し、体重が順調に80gに達したものをを選び雌雄とも1群10匹とし、それぞれの薬物について4群を使用した。

2 投与方法および投与量

各群、ラットの平均体重が120gに達した日から、下記用量の検体を毎日1回一定時に経口投与し、isoaminile citrate については28日間、cyclamate については33日間連続投与した。薬物は水溶液とし、各投与量が4 ml/kg となるよう濃度を調整して投与した。Isoaminile citrate と cyclamate の LD₅₀ 値にはほとんど差が認められなかったため、両薬物とも同じ投与量を用いた。

すなわち；

第1群(対照群)：水4 ml/kg

第2群：Isoaminile citrate あるいは cyclamate 200 mg/kg (推定常用量の50倍)

第3群：Isoaminile citrate あるいは cyclamate 250 mg/kg (推定常用量の62.5倍)

第4群：Isoaminile citrate あるいは cyclamate 300 mg/kg (推定常用量の75倍)

3 検査項目および方法

a) 投与期間中毎日一般症状を観察し、体重および飼料水摂取量を測定した。

b) 実験終了時尾より採血し、血液検査を行い、その後全群をエーテル麻酔下に開腹、全採血し、主要臓器の肉眼的観察および重量の測定、血液の臨床化学的検査を実施した。

- c) 主要臓器の病理組織標本は、通常の光学顕微鏡標本を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、100ないし400倍の拡大にて観察した。

II 慢性毒性試験

Isoaminile cyclamate について、Wistar 系ラットにて136日間およびイヌにて180日間連続経口投与による慢性毒性試験を行なった。

1 使用動物および投与量

Isoaminile cyclamate の急性毒性および亜急性毒性試験で性差のないことが判明したので、本慢性毒性試験では雄性動物のみを使用した。使用動物は亜急性毒性試験と同様Wistar 系ラットを用いた。また鎮咳作用はじめ種々の試験がイヌでなされているためイヌについても慢性毒性試験を実施した。

投与量は急性毒性試験における中毒症状およびLD₅₀ 値、また亜急性毒性試験における死亡率および体重変化を参考として次の投与量を選定した。なお、本薬物は臨床的に経口投与されるので両動物に経口投与した。

a) ラットの場合

経口投与時において中毒症状を発現しない最大量は100mg/kgであるため、最大投与量をこれよりやや多い120mg/kgとして下記の4段階に分けた。

1群(対照群): 水4ml/kg

2群: Isoaminile cyclamate 20mg/kg(推定常用量の約5倍)

3群: Isoaminile cyclamate 40mg/kg(推定常用量の約10倍)

4群: Isoaminile cyclamate 80mg/kg(推定常用量の約20倍)

5群: Isoaminile cyclamate 120mg/kg(推定常用量の約30倍)

b) イヌの場合

あらかじめ行なった急性毒性試験の結果、経口投与時における中毒症状は、30mg/kgでは軽度の舌なめずりおよび流涎を示す例がみられる程度であり、50mg/kgでは著名な自発運動の亢進、舌なめずり、流涎、挙動不穏を示し、弱い振せんと後肢の運動障害をみとめる例も出現した。100mg/kgでは間代性および強直性痙攣をみとめ死亡例をみとめ(4例中1例)、150mg/kgでは4例中3例が死亡した。

この成績からイヌの最大安全量は30mg/kgであり、50mg では著明な中毒症状を示し、またLD₅₀ 値は100~150mg/kgと推定された。これらのことから、最大投与量を50mg/kgよりやや多い60mg/kgとし、下記の4段階に分けて投与した。

1群(対照群): 水3ml/kg

2群: Isoaminile cyclamate 15mg/kg(推定常用量の約3.8倍)

3群: Isoaminile cyclamate 30mg/kg(推定常用量の約7.5倍)

4群: Isoaminile cyclamate 45mg/kg(推定常用量の約11.3倍)

5群: Isoaminile cyclamate 60mg/kg(推定常用量の約15倍)

2 検査項目および方法

ラットでは体重変化、飼料摂取量、臓器重量および主要臓器の組織学的検査に重点を置き、またイヌでは中毒症状、血液検査および臨床化学検査に重点を置いて検討した。検査方法は、亜急性毒性試験の場合と同様である。

第2節 実験成績

I 急性毒性試験

1 一般症状観察

Isoaminile citrateおよびcyclamate はマウス、ラットとも下記のような中毒症状を示し、両薬物の投与により発現する一般症状には差が観察されなかった。

a) マウスの場合

i) 皮下注射

10, 20mg/kgでは雌雄とも変化は観察されず、50mg/kgでは雌雄に軽度の自発運動亢進および弱い挙尾反応を示す例が観察され、100mg/kgより雌雄全例に強い自発運動亢進、挙尾および発作的疾走がみられ、ときどき強直性伸展が観察されたが、この投与量では死亡例が観察されなかった。

Isoaminile citrate 投与群では144mg/kgの用量より、自発運動の亢進、挙尾、振せん、間代性痙攣ののち強直性痙攣を起して死亡する例が観察されたが、剖検の結果、内臓に肉眼的異常は認められなかった。209mg/kgに増量すると全例が同様の強直性痙攣を起し死亡した。

Isoaminile cyclamate 投与群の場合、死亡例が158mg/kgより観察され、209mg/kgで全例死亡した。

ii) その他の投与方法

経口および静脈内投与した場合も、一般症状は上記と同様でとくに異なった中毒症状の発現は観察されなかった。

b) ラットの場合

i) 皮下注射

Isoaminile citrate 投与群の場合、173mg/kgの用量で、雌雄とも激しい自発運動の亢進、後肢運動失調、間代性および強直性痙攣が発現するが全例回復した。しかし200mg/kgに増量すると雌雄とも強直性痙攣を発現して全例死亡した。

Isoaminile cyclamate の場合、120mg/kgで全例が死亡した。

ii) その他の投与方法

経口および静脈内投与した場合も上記同様の中毒症状が観察され、剖検の結果、死亡例には内臓の肉眼的異常をとくに認めなかった。

2 LD₅₀ 値の算出

Litchfield-Wilcoxon^[89] 法により算出した。マウスおよびラットのLD₅₀ 値とその信頼限界 (P=0.05) をTable 3-2 に示す。

Table 3-2 LD50 values of isoaminile citrate and isoaminile cyclamate

Drug	Route	Mice (mg/kg)			rats (mg/kg)		
		Male	Female	Sex.	Male	Female	Sex
Isoaminile citrate	S.C.	157 (146.7-167.0)	172 (161.9-181.9)	N.S.	234 (218.9-250.6)	254 (229.5-280.3)	N.S.
	I.V.	110 (96.2-125.5)	121 (103.7-140.7)	N.S.	112 (103.9-121.2)	119 (106.4-133.7)	N.S.
	P.O.	434 (377.0-498.5)	410 (353.6-475.8)	N.S.	514 (435.6-606.5)	486 (415.0-568.2)	N.S.
Isoaminile cyclamate	S.C.	177 (185-189)	181 (163-200)	N.S.	150 (127-177)	238 (120-159)	N.S.
	I.V.	79 (65.5-92.5)	89 (71.0-111.0)	N.S.	105 (81-136)	110 (96-126)	N.S.
	P.O.	500 (393-636)	510 (403-638)	N.S.	365 (309-430)	370 (320-415)	N.S.

Sex: Sex difference N.S.: No significant (P=0.05)
(): Confidence limites (95%)

Ⅱ 亜急性毒性試験

1 一般症状観察

Isoaminile citrate および cyclamate 投与時の中毒症状は、雌雄ラットとも、頭部または全身性の弱い振せんがみられ、300mg/kg 投与群の一部に激しい自発運動の亢進、全身性の振せん、疾走、跳躍間代性痙攣が認められた以外、特記すべき中毒症状をみとめなかった。

2 死亡数

投与期間中の死亡数は、明らかに投与時の事故死と思われるもの（図中E）を含めFig. 3-32, Fig. 3-33, Fig. 3-34, Fig. 3-35 に示す。

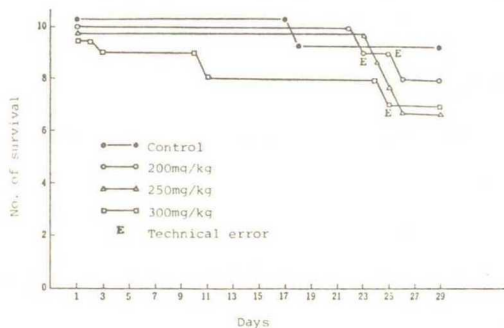


Fig. 3-32 Lethal number of male rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

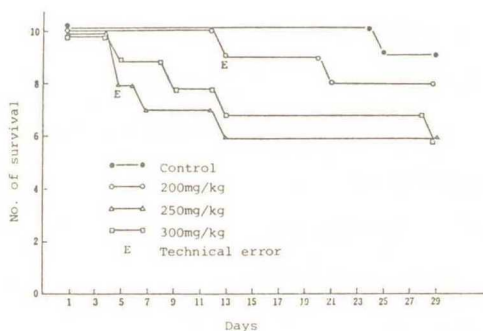


Fig. 3-33 Lethal number of female rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

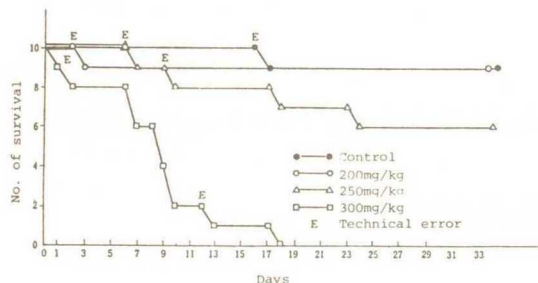


Fig. 3-34 Lethal number of male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 33 days.

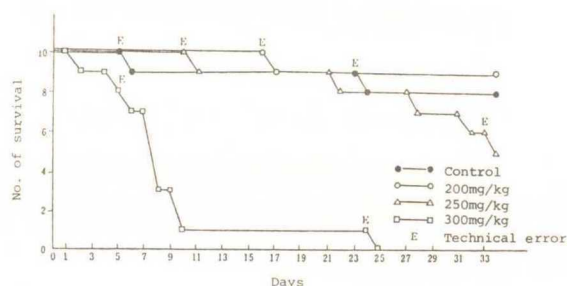


Fig. 3-35 Lethal number of female rats administered orally with isoaminile cyclamate for 33 days.

3 体重変化

Isoaminile citrate 連続投与群の体重変化を Fig.3-36 および Fig.3-37 に、isoaminile cyclamate 投与群の場合を Fig.3-38 および Fig. 3-39 に示す。

Isoaminile citrate 投与群の場合、雄性ラットでは各投与群とも体重増加が抑制され、投与3日目より対照群との間に有意差を生じた。一方、雌性ラットでは、200mg/kg、300mg/kg 投与群で投与3～9日目に対照群との間に有意差をみとめたが、その後は著明な差を認めなかった。

Isoaminile cyclamate 群の場合、雄性ラットでは、250mg/kg 投与4日目より、また300mg/kg 投与群で投与2日目より対照群との間に有意な体重減少を認めた。一方、雌性ラットでは、200mg/kg 投与22日目より、また250mg/kg 投与群で投与10日目より、300mg/kg 投与群で投与4日目より対照群に比べて有意な体重減少をみとめた。

4 飼料摂取量

Isoaminile citrate 投与群および cyclamate 投与群において、雌雄ラットともに投与開始初期に、飼料および水の摂取量が著明に減少し、その後徐々に回復の傾向を示したが、対照群と比較して少なかった。

5 血液検査

Isoaminile citrate 投与群では薬物投与終了時、尾より採取した血液につき赤血球、白血球、ヘモ

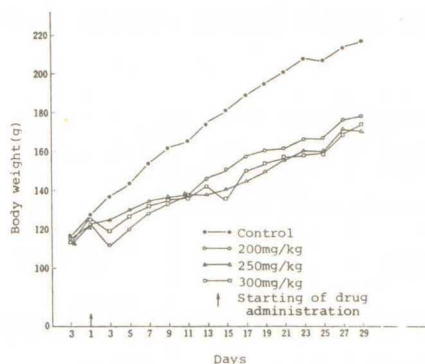


Fig. 3-36 Changes in mean body weight of male rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

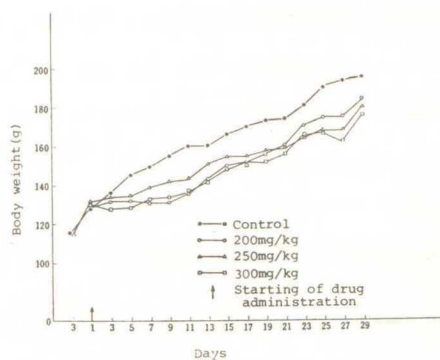


Fig. 3-37 Changes in mean body weight of female rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

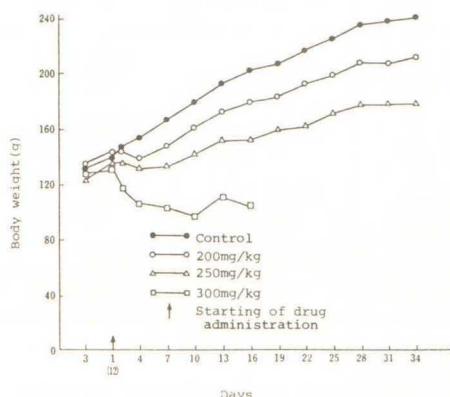


Fig. 3-38 Changes in mean body weight of male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 33 days.

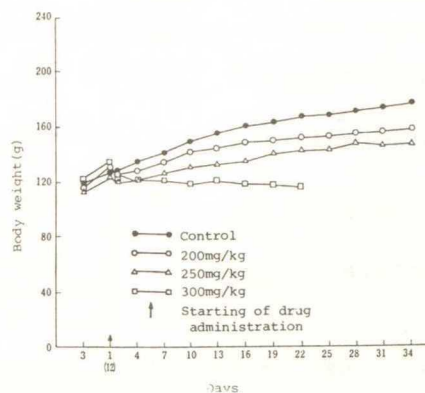


Fig. 3-39 Changes in mean body weight of female rats administered orally with isoaminile cyclamate for 33 days.

グロビン量、ヘマトクリット値および好酸球、好中球、リンパ球、単球の出現率を測定し、またエーテル麻醉下にて開腹し、後大静脈より採取した血液について血清総蛋白、コレステロール、血糖、尿素窒素、クレアチニン量、A/G比、GOT活性、GPT活性、アルカリホスファターゼ活性等の測定を行なった。各検査結果の平均値をTable 3-3~Table 3-6に示す。

雄性の各薬物投与群でヘマトクリット値がわずかに増加し、250および300mg/kg投与群で白血球の増数、250mg/kg投与群で好中球の増加、好酸球およびリンパ球の減少をみとめた。また臨床化学的検査では雄性300mg/kg投与群でGPT活性の増大およびアルカリホスファターゼ活性値の上昇がみられた。また雌性300mg/kg投与群で血糖値の上昇がみられたほかは、対照群と比べて著明な差を認めなかった。

Isoaminile cyclamate投与群については赤血球、白血球数および血球像について検査を行ないTable 3-7, Table 3-8の成績を得た。

すなわち、雄性の場合、血球数および血球像について対照群と比較して有意差は認められなかった。雌性の場合、200mg/kg、250mg/kg投与群とも分葉球が有意に減少し、リンパ球が有意に増加した以外は血球数、血球像のいずれの項目についても対照群と比較して有意差はみられなかった。

以上のことから、血球数、血球像に関しては雌性ラットのリンパ球が有意に増加し、分葉球が有意に減少すること以外は著明な変化を示さないことが判った。

6 解剖所見および臓器重量

各投与群について剖検した結果、一部に誤嚥によると思われる肺炎をみたほか、肉眼的異常はなかった。また脳、肺臓、心臓、肝臓、脾臓、胃、腎臓、副腎、精巣および卵巣の重量を測定した結果、投与群と対照群間に差を認めなかった。Isoaminile citrate投与群の平均値をTable 3-9およびTable 3-10にisoaminile cyclamate投与群の平均値をTable 3-12に示す。

Table 3-3 Hematological values in male rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

Test item	Control n=9	200mg/kg n=8	250mg/kg n=7	300mg/kg n=7
Hemoglobin (g/100ml)	14.612 ± 0.164	14.347 ± 0.32	14.378 ± 0.240	14.875 ± 0.497
Hematocrit (%)	45.111 ± 0.511	47.625 ± 0.752*	47.428 ± 0.297**	49.714 ± 0.680**
Erythrocyte (10 ⁴ /mm ³)	851.00 ±26.63	822.00 ±20.75	848.86 ±17.35	886.43 ±12.78
Leucocyte (10 ² /mm ³)	92.11 ± 2.87	100.38 ± 4.02	147.71 ± 9.22**	127.14 ± 8.89**
Eosinophil (%)	1.29 ± 0.29	1.00 ± 0.45	0.17 ± 0.18**	0.71 ± 0.29
Neutrophil (%)	14.22 ± 1.50	19.63 ± 2.31	22.14 ± 2.20**	17.43 ± 2.36
Lymphocyte (%)	79.22 ± 1.51	74.13 ± 2.30	71.57 ± 2.91*	76.57 ± 3.00
Monocyte (%)	5.56 ± 0.78	5.63 ± 1.13	6.14 ± 0.80	5.57 ± 0.78

Mean ± SE * Significant difference(p<0.05)

** Significant difference(p<0.01)

Table 3-4 Hematological values in female rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

Test item	Control n=9	200mg/kg n=8	250mg/kg n=7	300mg/kg n=7
Hemoglobin (g/100ml)	14.006 ± 0.421	15.147 ± 0.421	12.415 ± 0.438*	13.313 ± 0.769
Hematocrit (%)	44.250 ± 0.921	45.500 ± 0.945	44.167 ± 0.872	44.833 ± 1.195
Erythrocyte (10 ⁴ /mm ³)	804.11 ±26.97	811.00 ±27.23	759.17 ±41.56	725.00 ±50.60
Leucocyte (10 ² /mm ³)	133.33 ± 9.30	136.13 ±10.37	158.67 ±14.87	144.00 ±23.53
Eosinophil (%)	0.63 ± 0.26	1.00 ± 0.27	0.43 ± 0.30	0.25 ± 0.25
Neutrophil (%)	21.88 ± 5.51	24.50 ± 1.24	29.43 ± 4.04	23.00 ± 6.58
Lymphocyte (%)	68.63 ± 5.35	67.25 ± 1.45	64.14 ± 4.27	70.00 ± 6.60
Monocyte (%)	8.88 ± 0.89	7.25 ± 0.77	6.00 ± 0.76*	6.75 ± 1.49

Mean ± SE * Significant difference(p<0.05)

Table 3-5 Serum analysis of male rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

Test item		Control n=9	200mg/kg n=8	250mg/kg n=7	300mg/kg n=7
BUN	(mg/100ml)	20.532 ± 0.518	20.848 ± 0.597	18.908 ± 0.910	22.391 ± 0.707*
Creatine	(mg/100ml)	0.428 ± 0.009	0.406 ± 0.006	0.421 ± 0.100	0.471 ± 0.021
Total cholesterol	(mg/100ml)	79.630 ± 5.241	73.375 ± 1.721*	69.714 ± 6.498	78.190 ± 3.876
Glucose	(mg/100ml)	152.978 ± 6.412	145.100 ± 8.954	172.343 ± 10.707	146.414 ± 3.715
AL-phosphatase	(U/K-A)	36.436 ± 0.933	37.835 ± 2.108	34.477 ± 1.617	41.568 ± 1.803*
A/G		2.266 ± 0.238	2.135 ± 0.280	1.950 ± 0.113	1.834 ± 0.071
Total protein	(g/100ml)	6.522 ± 0.187	6.687 ± 0.140	6.959 ± 0.089	6.591 ± 0.185
GPT	(K.U.)	24.334 ± 0.826	26.278 ± 1.749	23.380 ± 2.832	30.097 ± 2.221*
GOT	(K.U.)	80.883 ± 9.094	85.436 ± 5.681	96.987 ± 5.630	90.451 ± 6.422
K	(mEq/l)	5.181 ± 0.122	5.205 ± 0.071	4.906 ± 0.096	4.830 ± 0.185
Na	(mEq/l)	146.422 ± 3.386	148.413 ± 2.831	149.943 ± 3.290	142.371 ± 2.557
Ca	(mg/100ml)	10.451 ± 0.712	14.286 ± 1.810	13.535 ± 1.677	14.857 ± 1.682*

Mean ± SE *Significant difference (p<0.05)

Table 3-6 Serum analysis of female rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

Test item		Control n=9	200mg/kg n=8	250mg/kg n=7	300mg/kg n=7
BUN	(mg/100ml)	19.382 ± 1.133	23.750 ± 0.518**	21.615 ± 1.260	19.763 ± 1.203
Creatine	(mg/100ml)	0.407 ± 0.007	0.386 ± 0.028	0.350 ± 0.013**	0.370 ± 0.020*
Total cholesterol	(mg/100ml)	98.457 ± 6.454	110.139 ± 7.976	109.445 ± 7.604	98.222 ± 7.236
Glucose	(mg/100ml)	133.833 ± 10.837	152.188 ± 8.759	165.267 ± 15.698	193.300 ± 10.453**
AL-phosphatase	(U/K-A)	22.183 ± 2.704	18.910 ± 2.233	25.717 ± 3.612	25.837 ± 3.033
A/G		0.936 ± 0.163	1.080 ± 0.193	0.608 ± 0.073	0.494 ± 0.075
Total protein	(g/100ml)	7.863 ± 0.190	8.029 ± 0.312	7.350 ± 0.256	7.410 ± 0.209
GPT	(K.U.)	27.902 ± 4.934	27.756 ± 4.956	27.660 ± 2.310	30.776 ± 3.912
GOT	(K.U.)	148.613 ± 11.756	117.300 ± 7.643*	110.860 ± 1.771*	90.540 ± 11.976**
K	(mEq/l)	4.326 ± 0.203	4.009 ± 0.068	4.510 ± 0.112	4.848 ± 0.244
Na	(mEq/l)	132.456 ± 3.582	132.943 ± 2.634	118.700 ± 3.530*	115.800 ± 4.420*
Ca	(mg/100ml)	9.331 ± 0.404	9.536 ± 0.238	10.800 ± 0.592*	8.959 ± 0.582

Mean ± SE, * Significant difference (p<0.05)
 ** Significant difference (p<0.01)

Table 3-7 Hematological values in male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 33 days.

Test item	Control n=9	200mg/kg n=9	250mg/kg n=6
Erythrocyte ($10^4/\text{mm}^3$)	731.77±63.76	719.78±72.36	723.67±143.00
Leucocyte ($10^2/\text{mm}^3$)	70.40±2.87	68.20±5.65	69.00±4.10
Basophil (%)	0.55±0.68	0.33±0.54	0.0±0
Eosinophil (%)	1.33±1.39	1.67±0.94	0.84±0.95
Metamyelocyte (%)	1.33±1.39	0.66±0.86	1.43±2.21
Stab form leuco.(%)	4.22±1.71	2.89±1.12	1.67±1.77
Segmented leuco.(%)	23.41±7.47	22.40±7.52	23.70±8.36
Lymphocyte (%)	67.40±6.52	70.90±6.93	70.50±9.71
Monocyte (%)	1.78±1.00	1.17±1.18	1.50±1.64

Mean ± SE

Table 3-8 Hematological values in female rats administered orally cyclamate for 33 days.

Test item	Control n=8	200mg/kg n=9	250mg/kg n=5
Erythrocyte ($10^4/\text{mm}^3$)	681.00±69.36	697.89±31.31	660.80±124.1
Leucocyte ($10^2/\text{mm}^3$)	62.25±3.35	63.55±4.66	60.20±14.36
Basophil (%)	0.37±0.63	0.11±0.23	0.20±0.58
Eosinophil (%)	1.25±1.54	1.35±1.02	1.00±1.38
Metamyelocyte (%)	0.12±0.31	0.22±0.34	0.0±0
Stab form leuco.(%)	6.44±3.60	4.44±1.32	4.80±3.61
Segmented leuco.(%)	31.60±8.54	20.60±9.73*	18.40±9.77*
Lymphocyte (%)	58.50±10.11	71.00±10.97*	74.90±12.54*
Monocyte (%)	0.87±0.85	0.55±0.56	0.80±1.60

Mean ± SE,

* Significance difference ($p<0.05$)

Table 3-9 Absolute organ weights of male rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

Organ	Control n=3			200mg/kg n=9			250mg/kg n=7			300mg/kg n=7		
	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%
Brain	1.61	±0.054	0.74	1.47	±0.088	0.82	1.53	±0.081	0.89	1.43	±0.102	0.82
Lungs	0.99	±0.076	0.46	0.93	±0.062	0.52	0.89	±0.033	0.52	0.85	±0.027	0.49
Heart	0.64	±0.016	0.44	0.54	±0.009**	0.30	0.52	±0.021*	0.30	0.51	±0.013*	0.29
Liver	8.85	±0.306	4.08	9.69	±0.277*	5.42	9.66	±0.335	5.65	8.86	±0.660	5.10
Spleen	0.41	±0.020	0.20	0.43	±0.021	0.24	0.39	±0.016	0.23	0.38	±0.017	0.22
Stomach	1.03	±0.076	0.47	0.94	±0.022	0.53	1.02	±0.062	0.60	1.07	±0.087	0.62
Kidney	0.79	±0.022	0.36	0.73	±0.014	0.41	0.70	±0.020*	0.41	0.67	±0.017*	0.39
Adrenal(mg)	20.53	±4.216	0.01	18.33	±1.290	0.01	19.50	±1.290	0.01	19.29	±1.603	0.01
Testis	1.55	±0.087	0.71	1.56	±0.064	0.87	1.54	±0.061	0.90	1.51	±0.062	0.87

* Significant difference ($p<0.05$), ** Significant difference ($p<0.01$),

% Percentage to body weight

Table 3-10 Absolute organ weight of female rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

Organ	Control n=10			200mg/kg n=8			250mg/kg n=7			300mg/kg n=9		
	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%
Brain	1.54	±0.049	0.96	1.55	±0.083	0.84	1.52	±0.065	0.85	1.50	±0.054	0.86
Lungs	1.82	±0.330	1.14	1.11	±0.156	0.61	1.34	±0.164	0.74	1.34	±0.107	0.76
Heart	0.63	±0.048	0.40	0.61	±0.048	0.33	0.63	±0.040	0.35	0.62	±0.046	0.36
Liver	7.87	±0.738	4.92	7.54	±0.477	4.10	10.24	±0.963	5.70	9.90	±0.616	5.52
Spleen	0.44	±0.045	0.28	0.38	±0.039	0.20	0.47	±0.061	0.26	0.39	±0.028	0.22
Stomach	1.13	±0.098	0.71	1.11	±0.079	0.60	1.39	±0.198	0.78	1.16	±0.079	0.66
Kidney	0.70	±0.033	0.44	0.67	±0.033	0.36	0.69	±0.038	0.38	0.68	±0.036	0.39
Adrenal (mg)	30.52	±2.867	0.02	33.13	±3.220	0.02	31.43	±2.699	0.02	30.44	±3.231	0.02
Uterus	0.31	±0.032	0.19	0.39	±0.053	0.21	0.26	±0.024	0.15	0.31	±0.073	0.18
Ovary (mg)	52.60	±6.906	0.03	45.50	±3.984	0.03	36.71	±3.945	0.02	44.50	±4.623	0.03

% Percentage to body weight

Table 3-11 Absolute organ weight of male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 33 days.

Organ	Control n=9			200mg/kg n=9			250mg/kg n=6		
	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%
Lungs	1.54	±0.732	0.64	1.41	±0.070	0.66	1.44	±0.260	0.8
Heart	0.91	±0.080	0.38	0.93	±0.116	0.45	0.84	±0.083	0.47
Liver	11.00	±1.452	4.54	12.66	±1.653	5.95	12.05	±1.150	6.69
Spleen	0.58	±0.066	0.24	0.59	±0.037	0.28	0.60	±1.083	0.33
Kidney	1.14	±0.143	0.47	1.20	±0.129	0.56	1.11	±0.157	0.62
Adrenal	0.03	±0.013	0.01	0.03	±0.006	0.01	0.04	±0.014	0.02
Testis	1.36	±0.076	0.56	1.34	±0.060	0.63	1.31	±0.081	0.73

Percentage to body weight

Table 3-12 Absolute organ weight of female rats administered orally with isoaminile cyclamate for 33 days.

Organ	Control n=8			200mg/kg n=9			250mg/kg n=5		
	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%
Lungs	1.16	±0.110	0.64	1.20	±0.176	0.75	1.18	±0.209	0.78
Heart	0.82	±0.080	0.45	0.80	±0.050	0.5	0.79	±0.100	0.52
Liver	11.10	±1.520	6.14	10.98	±1.347	6.85	11.45	±2.641	7.55
Spleen	0.64	±0.029	0.35	0.63	±0.090	0.39	0.61	±0.119	0.4
Kidney	1.10	±0.115	0.61	1.08	±0.109	0.67	1.10	±0.141	0.73
Adrenal	0.04	±0.008	0.02	0.03	±0.007	0.02	0.04	±0.017	0.03
Uterus	0.57	±0.073	0.32	0.48	±0.062	0.3	0.46	±0.003	0.3
Ovary	0.073	±0.058	0.04	0.072	±0.046	0.04	0.073	±0.007	0.05

% Percentage to body weight

7 病理組織所見

Isoaminile citrateおよびisoaminile cyclamate投与群の病理組織所見をTable 3-13~Table. 3-16に要約する。すなわち、これら主要臓器においては、薬剤投与によってもたらされたと思われる定常的かつ明瞭な中毒性病変は、通常のヘマトキシリン-エオジン染色組織標本では見出すことができなかった。ただ、isoaminile citrate投与群の場合、副腎皮質に比較的強い機能亢進の組織像 (Fig. 3-40) が認められた。これは動物飼育条件について再考の余地があるものと思われる。また、isoaminile cyclamate投与群の場合、200mg/kg以上の投与群において腎、副腎、肝に軽度の出血あるいはうっ血 (Fig. 3-41) をみとめた例があった。

Ⅱ 慢性毒性試験

1 ラットの場合

a) 一般症状観察

全投与期間を通じ、各投与群とも著明な中毒症状はみとめられなかった。ただし120mg/kg投与群では時々鎮静または軽度の自発運動の抑制をみとめたが、これらの症状は連続投与により減弱あるいは増強するようにはなかった。

b) 死亡数

亜急性毒性試験と同様、各群の死亡数と死亡日をFig. 3-42に示す。事故死亡例を除くと、isoaminile cyclamate 80mg/kg以下では136日間 (約4.5ヵ月) 連続投与しても死亡例は認められないが、120mg/kg以上では80日目前後より死亡例が認められた。

Table 3-13 Histopathological findings in male rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

Organ	Control	200mg/kg	250mg/kg	300mg/kg
Heart	N.C.	Mild edema of interstitial cells(1/5)	N.C.	N.C.
Lungs	Mild pneumonia (1/5)	Mild pneumonia (1/5)	N.C.	N.C.
Stomach	Mild catarrh (1/5)	Mild catarrh (1/5)	N.C.	N.C.
Kidneys	N.C.	Mild edema of the epithelial cells of the uriniferous tubules(1/5) Mild edema of the interstitial cells(1/5)	N.C.	N.C.
Spleen	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Liver	Mild modular edema (1/5)	N.C.	Congestion (1/5)	N.C.
Testes	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Adrenal glands	Widening of the sona and hypertrophy of the cells in the fasciculata	Widening of the sona and hypertrophy of the cells in the fasciculata	Widening of the sona and hypertrophy of the cells in the fasciculata	Sidening of the sona and hypertrophy of the cells in the fasciculate
Brain	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.

N.C.: No change

Table 3-14 Histopathological findings in femal rats administered orally with isoaminile citrate for 28 days.

Organ	Control	200mg/kg	250mg/kg	300mg/kg
Heart	Mild edema of the interstitial cells (1/5)	N.C.	N.C.	N.C.
Lungs	N.S.	Mild pneumonia (1/5)	N.C.	Mild pneumonia (1/5)
Stomach	Mild catarrh (1/5)	N.C.	Mild catarrh (2/5)	N.C.
Kidneys	N.C.	N.C.	N.C.	Atrophy of the proximal uriniferous tubules (2/5)
Spleen	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Liver	N.C.	Mild nodular edema (1/5)	N.C.	Mild nodular edema (1/5)
Adrenal glands	Widening of the sona and hypertrophy of the cells in the fasciculata	Widening of the sona and hypertrophy of the cells in the fasciculata	Widening of the sona and hypertrophy of the cells in the fasciculata	Widening of the sona and hypertrophy of the cells in the fasciculata
Ovaries	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Uterus	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Brain	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.

N.C.: No change

c) 体重変化

Isoaminile cyclamate 20~120mg/kgを136日間連続経口投与した際の体重変化をFig.3-43に示す。

Isoaminile cyclamate 40mg/kg以下の連続投与では全期間を通じ対照群に比べ有意差は認められなかった。しかし、80mg/kg投与群では投与137日目、120mg/kg投与群では投与77日目以降対照群に比べ有意な減少を認めた。

d) 飼料摂取量

Isoaminile cyclamate 20~120mg/kgを136日間投与した際の食餌摂取量をFig.3-44に示す。各群とも投与開始と同時に飼料摂取量が著明に減少した。その後直ちに回復傾向を示すが、120mg/kg投与群では対照群に比べなお少ないことが判った。

Table 3-15 Histopathological findings in male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 33 days.

Organ	Control	200mg/kg	250mg/kg
Heart	N.C.	N.C.	N.C.
Lungs	Mild pneumonia	Mild pneumonia	Mild pneumonia
Alimentary canal	N.C.	N.C.	N.C.
Kidneys	N.C.	Hemorrhage and congestion of the interstitial cells of the proximal uriniferous tubules	Hemorrhage and congestion of the interstitial cells of the proximal uriniferous tubules, Protein columna
Spleen	N.C.	Deposition of the brown coloring-matter	Deposition of the brown coloring-matter
Liver	N.C.	Mild congestion	Mild congestion, Hydro-cavitating degeneration, Narrowness of Glisson's capsule
Testes	N.C.	N.C.	Deposition of granule in the follicle
Adrenal glands	N.C.	Mild hemorrhage in the medulla	Mild hemorrhage in the medulla
Thymus	N.C.	N.C.	N.C.
Pancreas	N.C.	N.C.	N.C.
Mesenteric lymph node	N.C.	N.C.	N.C.
Bone marrow	N.C.	N.C.	N.C.

N.C.: No change

Table 3-16 Histopathological findings in female rats administered orally with isoaminile cyclamate for 33 days.

Organ	Control	200mg/kg	250mg/kg
Heart	N.C.	N.C.	N.C.
Lungs	Mild pneumonia	Mild pneumonia	Mild pneumonia
Alimentary canal	N.C.	N.C.	N.C.
Kidneys	N.C.	Mild hemorrhage in the interstitial cells of the uriniferous tubules	Mild hemorrhage in the interstitial cells of the uriniferous tubules
Spleen	N.C.	N.C.	Deposition of the brown coloring-matter
Liver	N.C.	N.C.	Mild congestion
Adrenal glands	N.C.	Mild hemorrhage in the medulla	Mild hemorrhage in the medulla
Ovaries	N.C.	N.C.	N.C.
Uterus	N.C.	N.C.	N.C.
Thymus	N.C.	N.C.	N.C.
Pancreas	N.C.	N.C.	N.C.
Mesenteric lymph node	N.C.	N.C.	N.C.
Bone marrow	N.C.	N.C.	N.C.

N.C.: No change

e) 血球数および血球像

Isoaminile cyclamate 20~120mg/kg を136日間連続投与した後の赤血球数および白血球数, また好塩基球, 好酸球, 後骨髓球, 桿状核球, 分葉球, リンパ球, 単球の出現率を Table 3-17に示す。



Fig. 3-40 Histopathological photograph of adrenal gland in male rat administered orally with isoaminile citrate (300mg/kg/day) for 28 days (x 100)

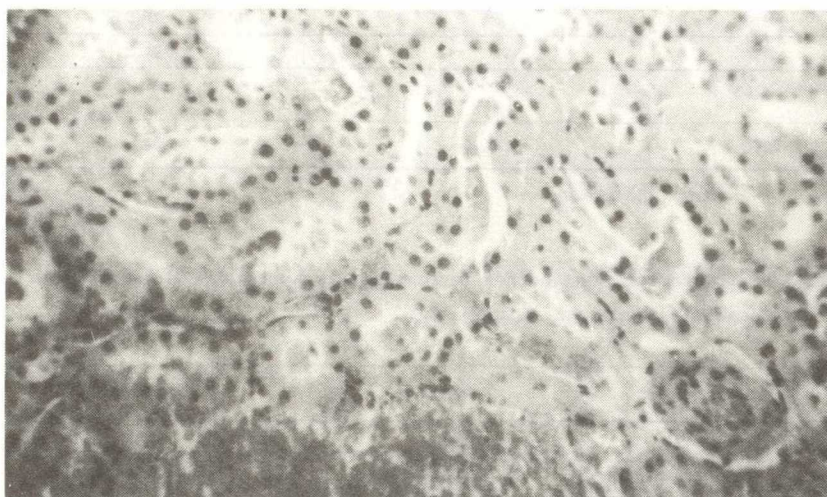


Fig. 3-41 Histopathological photograph of adrenal gland in male rat administered orally with isoaminile cyclamate (200 mg/kg/day) for 33 days (congestion, x 400)

Table 3-17 Hematological values in male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 136 days.

Test item	Control n=8	20mg/kg n=9	40mg/kg n=8	80mg/kg n=9	120mg/kg n=7
Erythrocyte (10 ⁴ /mm ³)	743.50±81.27	672.33±80.31	758.88±80.31	670.20±26.95	666.57±41.2
Leucocyte (10 ² /mm ³)	57.71±3.14	63.48±2.77	58.08±2.78	55.57±5.28	61.73±6.62
Basophil (%)	0.0 ± 0	0.25±0.15	0.50±0.65	0.43±0.56	0.0 ± 0
Eosinophil (%)	1.13±0.61	0.50±0.65	1.00±0.91	1.00±0.54	0.71±0.73
Metamyelocyte (%)	0.0 ± 0	1.00±1.37	0.25±0.39	0.33±0.38	0.14±0.36
Stab from leucocyte (%)	7.75±4.41	7.24±3.57	6.75±4.77	1.07±4.56	0.87±6.00
Segmented leucocyte (%)	19.65±10.56	19.85±6.94	25.30±9.01	16.90±5.45	18.15±19.09
Lymphocyte (%)	58.0 ±10.23	70.50±7.50	66.0 ±8.15	69.90±6.51	71.10±15.93
Monocyte (%)	1.0 ± 1.41	1.25±1.05	0.25±0.12	0.89±0.90	1.24±1.03

Mean ± SE

血球数および血球像のいずれにおいても対照群に比べ差異をみとめなかった (P=0.05)。

f) 解剖所見

各投与群について剖検した結果、心、肝、脾、腎、副腎、精巣にはいずれも肉眼的異常をみとめなかった。

ただし肺については少数例において誤嚥によると思われる肺炎およびその痕跡のあるものをみとめた。

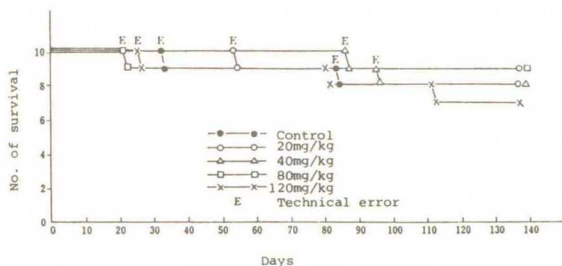


Fig. 3-42 Lethal number of male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 136 days.

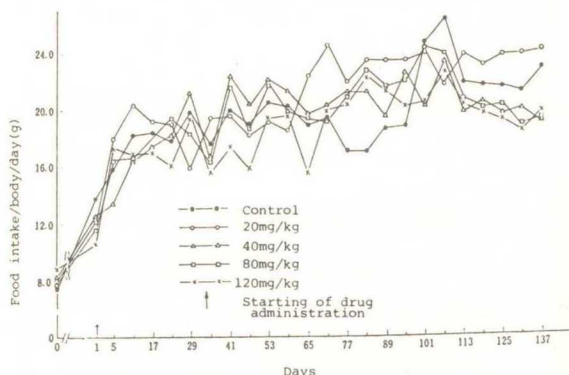


Fig. 3-44 Changes in mean food intake of male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 136 days.

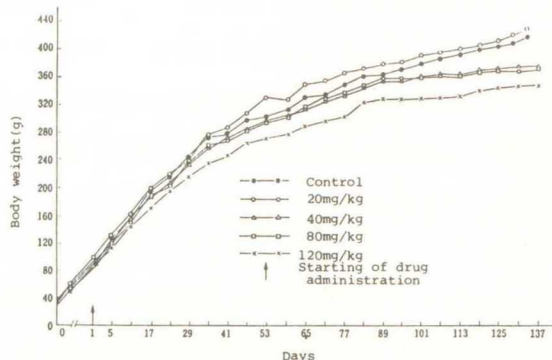


Fig. 3-43 Changes in mean body weight of male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 136 days.

g) 臓器重量

Isoaminile cyclamate 20~120 mg/kgを136日間連続投与した後の肺, 心, 肝, 脾, 腎(左, 右) 副腎(左, 右), 精巣(左, 右)の重量(平均値)をTable 3-18に示す。

80 mg/kg投与群の肝臓重量が対照群に比較して有意に大であった。しかし, 他のすべての臓器重量は対照群に比して有意な差は認められなかった。

Table 3-18 Absolute organ weight of male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 136 days.

Organ	Control n=8			20mg/kg n=9			40mg/kg n=8			80mg/kg n=9			120mg/kg n=7		
	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%	mean(g)	SE	%
Lungs	1.865	±0.272	0.44	1.710	±0.149	0.40	1.710	±0.194	0.45	1.681	±0.209	0.45	1.671	±0.315	0.48
Heart	1.138	±0.095	0.27	1.196	±0.111	0.28	1.151	±0.191	0.31	1.204	±0.106	0.32	1.111	±0.133	0.32
Liver	14.363	±2.420	3.43	14.959	±1.925	3.51	15.814	±1.164	4.2	17.902*	±2.142	4.83	16.140	±1.069	4.63
Spleen	0.729	±0.057	0.17	0.739	±0.100	0.17	0.786	±0.066	0.21	0.782	±0.068	0.21	0.740	±0.093	0.21
Kidney (L)	1.413	±0.134	0.34	1.472	±0.105	0.35	1.478	±0.139	0.39	1.509	±0.135	0.41	1.317	±0.154	0.38
" (R)	1.416	±0.179	0.34	1.458	±0.133	0.34	1.466	±0.137	0.39	1.451	±0.148	0.39	1.294	±0.161	0.37
Adrenal (L)	0.030	±0.028	0.07	0.031	±0.008	0.01	0.024	±0.006	0.01	0.028	±0.011	0.01	0.027	±0.012	0.01
" (R)	0.027	±0.024	0.01	0.033	±0.006	0.01	0.026	±0.004	0.01	0.026	±0.005	0.01	0.030	±0.025	0.01
Testis (L)	1.564	±0.083	0.37	1.559	±0.098	0.37	1.564	±0.136	0.42	1.543	±0.132	0.42	1.553	±0.104	0.45
" (R)	1.565	±0.079	0.37	1.546	±0.099	0.36	1.565	±0.125	0.42	1.561	±0.105	0.42	1.530	±0.024	0.44

* Significant difference ($p<0.05$)

% Percentage to body weight

h) 病理組織所見

対照群, isoaminile cyclamate 20mg/kg, 40mg/kg, 80mg/kg, 120mg/kg それぞれ連続投与群についての病理組織所見をTable 3-19に要約する。20mg/kg, 40mg/kg 投与群では, ほとんど対照群と変化ないが, 80mg/kg 投与群では一部に細尿管内出血, 肝中心帯に軽い充血およびうっ血を認め, 120mg/kg 投与群では, 心筋層内小出血斑, 細尿管内出血, 脾中心動脈内色素顆粒, 肝中心帯に軽度の充血およびうっ血, 副腎皮質内側部の出血等をみとめた。副腎, 腎, 肝のそれぞれ顕著な病理像をFig. 3-45~Fig. 3-47に示す。

2 イヌの場合

a) 一般症状観察

各投与量ともに急性毒性試験において観察された症状よりもやや弱く, 15 mg/kg 投与群では中毒症状の発現や食欲減退等はまったくみられなかった。30 mg/kg 投与群では中毒症状の発現は認められないが, 食欲がやや減退し, 投与後2時間以上経過後, 正常に回復した。45 mg/kg 投与群では軽度の鎮静および流涎をみと

め、ときどき嘔吐する例もみとめられた。また食欲は投与後2時間を過ぎても発現せず、4時間後より徐々に食餌を始めた。60mg/kg投与群では投与15分後より挙動不穏となり自発運動の亢進がみられた。

このような中毒症状は投与開始後毎日認められ、1週間を過ぎてもほとんど変わらなかったため、それ以後は週に一度観察することにした。その結果、各群とも多少の変動はあったが、著明に減弱したり、増強することはみられなかった。

b) 死亡数

投与開始3~4カ月後、30および60mg/kg投与群の一部に元気がなくなり、危険と思われる例もみられたが、その後回復したため各投与群とも死亡例をみなかった。

c) 体重変化

Isoaminile cyclamate 15~60mg/kgを6カ月間連続経口投与した際の体重変化をFig. 3-48に示す。



Fig. 3-45 Histopathological photograph of adrenal gland (Hemorrhage, x 400) in male rat administered orally with isoaminile cyclamate (120mg/kg/day) for 136 days.

すなわち、isoaminile cyclamate 15~60mg/kgの連続投与は、イヌの体重に著しい影響をおよぼさなかった。

d) 血球数

Isoaminile cyclamate 15~60mg/kgを6カ月間連続経口投与した際の赤血球、白血球および栓球数の経時変化をTable 3-20に示す。

すなわち、イヌの赤血球数、白血球数および栓球数などはisoaminile cyclamate 15~60mg/kg投与により著明な変動を示さなかった。

e) 血球像

Isoaminile cyclamate 15~60mg/kgを6カ月間連続経口投与

した際の血球像の経時変化をTable 3-21に示す。

すなわち高用量になるにしたがってリンパ球の増加する傾向がみられたが、その他は対照群と比較して大差なかった。

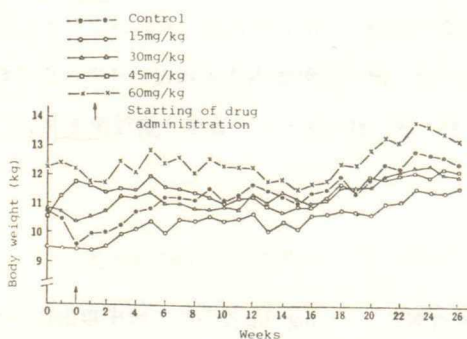


Fig. 3-48 Changes in mean body weight of male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 180 days.

f) 血液性状

Isoaminile cyclamate 15~60mg/kgを6カ月間連続経口投与した際の血色素量、ヘマトクリット、血清総蛋白量および血糖量の経時変化をTable 3-22に示す。

すなわちイヌの血色素量、血球容積、血清総蛋白および血糖は、isoaminile cyclamate 15~60mg/kg連続投与により著しい変動を示さなかった。

Table 3-19 Histopathological findings in male rats administered orally with isoaminile cyclamate for 136 days.

Organ	Control	20,40mg/kg	80mg/kg	120mg/kg
Heart	N.C.	N.C.	N.C.	Mild hemorrhage
Lungs	Widening of the pulmonary wall(2/5)	Widening of the pulmonary wall(2/5)	Widening of the pulmonary wall(2/5)	Widening of the pulmonary wall(2/5)
Thymus	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Alimentary canal	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Kidneys	N.C.	N.C.	Hemorrhage in the uriniferous tubules(2/5)	Hemorrhage in the uriniferous tubules(5/5) Widening of the cortex (1/5)
Spleen	N.C.	N.C.	N.C.	Deposition of the brown coloring-matter(5/5)
Mesenteric lymph node	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Liver	N.C.	N.C.	Mild congestion (3/5) Narrowness of Glisson's capsule (1/5)	Mild congestion (3/5) Nuclei are decreased in number (1/5) Narrowness of Glisson's capsule (5/5)
Testes	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Adrenal glands	N.C.	N.C.	N.C.	Hemorrhage in the medulla (5/5)
Bone marrow	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Pancreas	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.

N.C.: No change

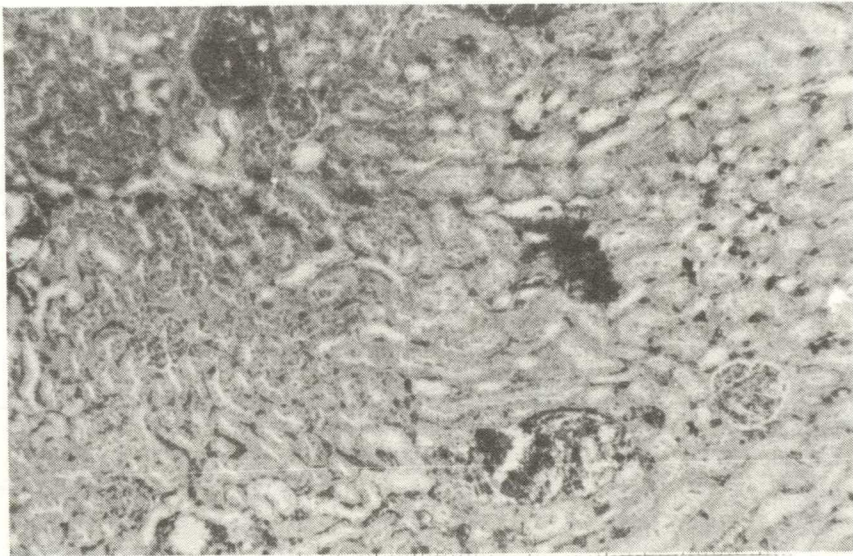


Fig. 3-46 Histopathological photograph of kidney (Hemorrhage and congestion, x 100) in male rat administered orally with isoaminile cyclamate (120mg/kg/day) for 136 days.

g) 肝機能

Isoaminile cyclamate 15~16mg/kgを6カ月間連続投与した際のBSP排泄能，血清総コレステロール，血清ビリルビン，血清アルカリホスファターゼ活性，血清GOTおよびGPT活性の経時変化をTable 3-23に示す。

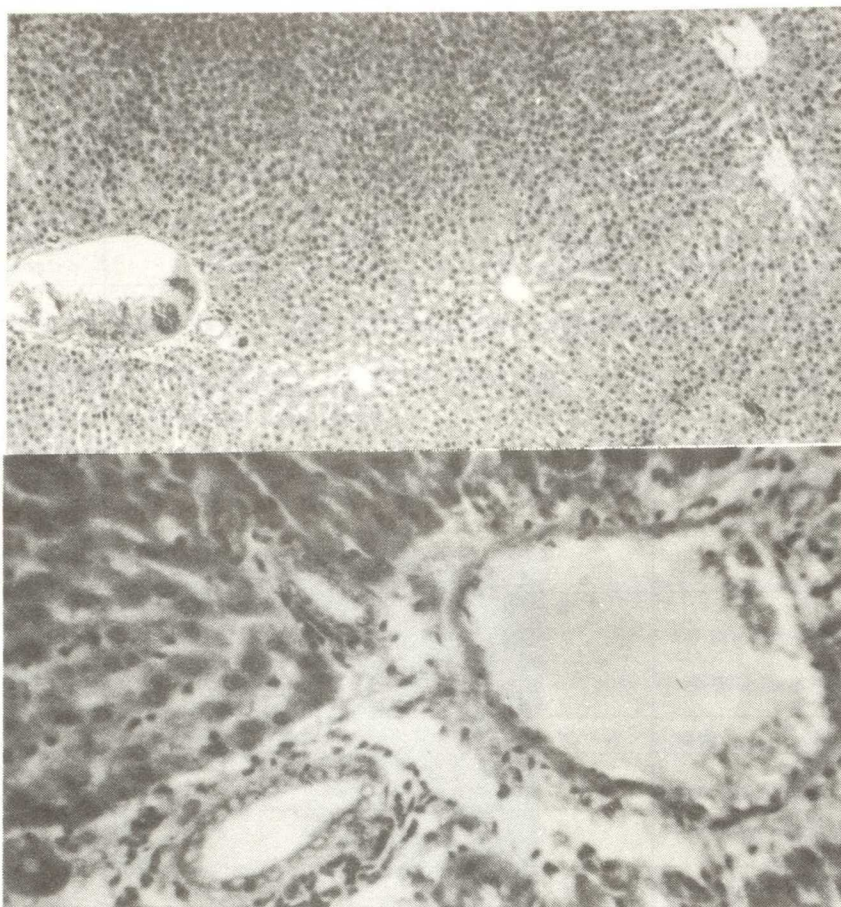


Fig. 3-47 Histopathological photograph of liver (Hemorrhage, upper x 100, lower x 400) in male rat administered orally with isoaminile cyclamate (120mg/kg/day) for 136 days.

Table 3-20 Hematological values in male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 1,2,3,4.5 and 6 months.

Months	Test item	Control n=4		15mg/kg n=4		30mg/kg n=4		45mg/kg n=4		60mg/kg n=4	
		mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE
Before control 0	ER	455.75	53.467	516.50	89.750	456.25	49.089	532.25	44.070	488.25	41.734
	LE	64.00	14.14	89.64	8.30	59.75	8.95	70.50	6.22	101.00	30.21
	TH	43.0	1.6	43.5	1.8	41.1	1.0	42.5	0.8	44.0	1.9
1	ER	503.50	63.791	509.75	84.901	517.25	69.186	534.25	90.809	564.50	60.301
	LE	104.50	19.41	114.00	36.52	105.00	35.95	116.00	21.44	112.00	29.83
	TH	40.7	1.35	42.6	7.35	40.5	10.70	42.8	0.90	43.8	0.96
2	ER	460.75	—	486.00	—	504.25	—	472.50	—	492.25	—
	LE	79.75	—	72.50	—	67.00	—	84.50	—	92.50	—
	TH	45.2	0.56	56.3	1.44	58.5	2.54	42.0	1.22	42.3	1.66
3	ER	634.75	60.819	515.25	52.666	512.50	26.725	649.25	86.364	517.75	169.880
	LE	79.25	24.42	86.00	31.99	83.50	39.66	78.00	11.59	77.75	14.97
	TH	48.02	2.63	41.7	1.16	41.7	1.03	57.9	3.50	41.4	0.79
4.5	ER	476.50	—	449.75	—	383.00	—	446.75	—	494.25	—
	LE	76.75	—	93.25	—	75.25	—	83.50	—	76.25	—
	TH	40.18	2.01	38.0	1.9	44.1	1.01	47.15	3.50	41.83	1.08
6	ER	517.00	15.050	459.0	48.582	461.75	48.582	500.25	71.466	516.50	51.680
	LE	71.75	9.60	75.00	5.74	70.50	5.36	64.00	10.77	77.50	18.88
	TH	41.8	0.80	56.83	10.13	33.2	3.41	28.17	7.8	39.23	4.2

ER: Erythrocyte($\times 10^4/\text{mm}^3$) LE: Leucocyte ($\times 10^2/\text{mm}^3$) TH: Thrombocyte ($\times 10^4/\text{mm}^3$)

Table 3-21-1 Hematological values in male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 1,2,3,4.5 and 6 months.

No. 1

Months	Test item	Control n=4		15mg/kg n=4		30mg/kg n=4		45mg/kg n=4		60mg/kg n=4	
		mean(%)	SE	mean(%)	SE	mean(%)	SE	mean(%)	SE	mean(%)	SE
Before control	Basophil	0	0	0	0	0	0	1.0	0	0	0
	Eosinophil	12.0	2.86	15.0	3.30	12.0	0.62	7.0	0.31	5.0	0.43
	Metamyelocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stab form leucocyte	8	0.67	11.0	1.25	10.0	2.22	3.0	1.00	7.0	2.10
	Segmented (II) leuco.	14.0	1.85	6.0	0.85	0	0	8.0	0.65	10.0	2.03
	Segmented(III) leuco.	41.0	0.59	32.0	1.30	35.0	0.40	36.0	2.90	24.0	1.98
	Segmented (IV) leuco.	4.0	0.31	26.0	2.01	20.0	0.52	18.0	2.62	14.0	0.62
	Segmented (V) leuco.	1.0	0.18	2.0	1.37	1.0	0.31	4.0	0.12	8.0	0.46
	Lymphocyte	20.0	1.63	18.0	3.01	21.0	1.62	15.0	1.34	32.0	0.82
	Monocyte	0	0	0	0	2.0	0.59	0	0	—	0
1	Basophil	0.5	0.06	0	0	0	0	0.3	0.016	0.3	0.016
	Eosinophil	9.8	0.73	8.3	0.50	7.8	0.13	8.0	0.87	8.0	1.20
	Metamyelocyte	0.3	0.016	0	0	0	0	0	0	0.3	0.016
	Stab form leucocyte	4.0	0.46	5.3	1.20	3.5	0.87	4.3	0.469	4.8	1.10
	Segmented (II) leuco.	11.0	3.23	5.5	1.00	4.8	0.56	11.5	1.80	17.0	0.46
	Segmented(III) leuco.	28.5	1.73	30.3	1.20	32.6	4.68	27.9	1.50	27.8	1.50
	Segmented (IV) leuco.	18.7	5.95	21.2	2.00	23.0	0.10	19.5	3.13	20.0	2.90
	Segmented (V) leuco.	9.5	0.03	10.5	1.36	11.5	2.18	3.3	0.26	7.8	0.57
	Lymphocyte	17.7	1.90	18.9	3.03	24.5	3.17	24.0	1.13	14.2	1.23
	Monocyte	0.5	0.66	0	0	0	0	0.3	0.016	0	0

Table 3-21-2 Hematological values in male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 1,2,3,4.5 and 6 months.

No. 2

Months	Test item	control n=4		15mg/kg n=4		30mg/kg n=4		45mg/kg n=4		60mg/kg n=4	
		mean(%)	SE	mean(%)	SE	mean(%)	SE	mean(%)	SE	mean(%)	SE
2	Basophil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Eosinophil	11.3	2.13	12.7	2.33	12.0	2.10	10.3	1.97	8.8	0.56
	Metamyelocyte	0.3	0.067	0.3	0.03	0.3	0.026	0	0	0	0
	Stab form leucocyte	11.5	0.5	9.0	0.53	8.0	0.20	7.7	0.10	11.6	2.03
	Segmented (II) leuco.	28.7	2.40	29.0	1.77	23.3	1.26	31.0	1.00	17.3	1.76
	Segmented(III) leuco.	20.2	3.23	12.3	3.26	13.6	2.50	18.3	1.53	24.6	1.38
	Segmented (IV) leuco.	6.2	1.73	12.3	2.26	12.3	2.20	14.0	1.33	14.6	2.56
	Segmented (V) leuco.	0.5	0.067	0	0	3.0	0.43	1.0	0.67	0	0
	Lymphocyte	24.7	1.3	23.6	4.30	28.3	4.80	17.0	3.57	25.3	2.10
	Monocyte	0	0	0.7	0.30	0	0	0	0	0	0
3	Basophil	0.25	0.016	0.5	0.33	0	0	0	0	0	0
	Eosinophil	11.5	2.00	13.5	2.27	6.7	1.33	16.0	0.86	16.0	1.83
	Metamyelocyte	0.8	0.16	1.5	0.30	0	0	1.0	0	0.3	0.16
	Stab form leucocyte	14.0	1.30	12.5	1.07	18.3	3.20	16.5	4.10	10.3	0.80
	Segmented (II) leuco.	20.3	3.17	3.0	0	29.3	2.63	32.0	3.67	35.0	0.70
	Segmented(III) leuco.	17.3	1.67	14.3	1.026	16.3	3.20	16.0	4.94	15.7	0.83
	Segmented (IV) leuco.	10.5	1.77	6.8	1.80	4.3	0.80	5.0	0.46	5.3	0.14
	Segmented (V) leuco.	0.5	0.33	1.3	0.13	0.3	0.26	1.0	0.46	2.0	0.33
	Lymphocyte	26.1	2.66	32.3	4.78	25.0	1.87	27.5	2.23	19.3	0.66
	Monocyte	0	0	1.3	0.97	0	0	0	0	0	0

Isoaminile cyclamate 15~60 mg/kg 連続投与はイヌのBSP排泄能，血清総コレステロール，血清ビリルビン，血清GOTおよびGPT活性等に著しい影響をおよぼさなかった。しかし血清アルカリホスファターゼ活性は投与1カ月後より上昇し始め，3カ月後に最高に達し，4.5，6カ月にやや減少したがなお高い値（中等度障害時の値）を示した。

Table 3-21-3 Hematological values in male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 1,2,3,4.5 and 6 months.

No. 3

Months	Test item	Control n=4		15mg/kg n=4		30mg/kg n=4		35mg/kg n=4		60mg/kg n=4	
		mean (%)	SE	mean (%)	SE	mean (%)	SE	mean (%)	SE	mean (%)	SE
4.5	Eosophil	0.3	0.016	0	0	0	0	0	0	0	0
	Eosinophil	14.8	2.33	7.5	2.33	12.5	0.56	0	0	35.8	1.46
	Metamyelocyte	1.5	0.43	2.8	0.33	2.8	0.73	2.5	0.43	2.0	1.33
	Stab form leucocyte	4.0	1.20	7.3	0.56	2.3	0.50	1.3	0.16	1.3	1.66
	Segmented (II) leuco.	33.0	2.06	27.3	2.26	18.5	3.13	23.5	0.80	17.3	3.37
	Segmented (III) leuco.	13.3	0.56	16.0	2.86	17.8	1.10	4.8	1.47	5.0	0.36
	Segmented (IV) leuco.	5.8	1.33	5.3	0.63	8.8	0.66	1.3	0.43	1.8	0.30
	Segmented (V) leuco.	0	0	0	0	0	0.30	0	0	0.8	0.16
	Lymphocyte	27.3	1.90	33.8	3.14	41.0	2.20	44.0	1.30	39.8	1.73
	Monocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Eosophil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Eosinophil	11.3	1.20	12.0	1.2	15.7	2.10	15.7	1.93	27.3	2.50
	Metamyelocyte	0	0	0.3	0.03	0	0	0	0	0	0
	Stab form leucocyte	2.3	0.33	6.0	0.90	4.3	0.80	5.0	0.90	5.3	0.93
	Segmented (II) leuco.	28.0	0.80	25.7	0.10	25.3	0.80	20.3	0.90	27.5	2.66
	Segmented (III) leuco.	20.0	2.03	12.3	0.70	15.3	1.53	8.7	1.36	5.0	1.13
	Segmented (IV) leuco.	10.5	0.80	4.7	0.70	1.0	0.33	1.0	0	2.3	0.30
	Segmented (V) leuco.	1.5	0.43	0.7	0.03	2.0	0.23	1.0	0.46	0	0
	Lymphocyte	29.0	2.96	33.3	6.55	36.3	4.64	48.3	4.10	24.5	3.10
	Monocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3-22 Hematological values in male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 1,2,3,4.5 and 6 months.

Months	Test item	Control n=4		15mg/kg n=4		30mg/kg n=4		45mg/kg n=4		60mg/kg n=4	
		mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE
Before control	Hemoglobin	10.02	0.661	9.97	0.476	10.62	1.014	10.35	0.415	10.65	0.206
	Hematocrit	34.00	3.000	40.75	2.947	41.50	2.062	37.75	2.487	41.75	4.146
	Total protein	10.60	0.514	11.69	1.199	12.35	0.483	11.87	1.272	11.99	0.835
	Glucose	0.99	0.112	1.07	0.157	0.96	0.199	1.07	0.128	1.03	0.088
0	Hemoglobin	11.05	0.638	10.22	0.824	11.32	1.386	11.32	0.633	11.07	0.656
	Hematocrit	34.00	1.239	35.92	7.192	37.70	1.202	37.27	13.393	36.87	1.103
	Total protein	10.31	0.568	11.17	1.199	10.34	0.900	10.34	0.749	10.55	0.676
	Glucose	1.32	0.133	1.17	0.042	1.09	0.208	1.27	0.200	1.28	0.594
1	Hemoglobin	10.57	—	10.92	—	11.25	—	11.00	—	10.75	—
	Hematocrit	36.42	—	35.02	—	34.70	—	40.07	—	38.67	—
	Total protein	10.50	—	11.13	—	10.17	—	10.60	—	9.72	—
	Glucose	0.84	—	0.90	—	1.04	—	1.20	—	0.89	—
2	Hemoglobin	10.52	0.716	10.50	0.324	9.82	1.253	11.27	1.056	9.95	1.467
	Hematocrit	37.22	1.875	37.10	1.867	34.52	1.479	46.25	15.909	37.37	1.934
	Total protein	11.87	0.948	12.07	0.625	10.76	0.896	11.12	0.630	10.66	0.593
	Glucose	0.90	0.642	0.97	0.131	1.06	0.120	1.16	0.214	0.98	0.071
3	Hemoglobin	10.92	—	10.55	—	10.75	—	10.80	—	10.72	—
	Hematocrit	42.80	—	40.67	—	38.57	—	45.57	—	30.20	—
	Total protein	12.26	—	12.58	—	11.49	—	11.50	—	11.72	—
	Glucose	1.05	—	1.00	—	1.08	—	0.99	—	1.03	—
4.5	Hemoglobin	11.70	1.170	11.50	1.118	11.37	0.813	12.62	1.244	11.40	0.696
	Hematocrit	40.27	11.006	42.92	6.077	39.19	2.709	45.95	5.814	45.70	2.413
	Total protein	11.51	0.244	12.03	0.610	10.67	0.474	10.94	0.418	10.82	0.516
	Glucose	1.00	0.120	1.15	0.088	1.08	0.117	1.04	0.153	1.04	1.888
6	Hemoglobin	11.02	0.661	9.97	0.476	10.62	1.014	10.35	0.415	10.65	0.206
	Hematocrit	34.00	3.000	40.75	2.947	41.50	2.062	37.75	2.487	41.75	4.146
	Total protein	10.60	0.514	11.69	1.199	12.35	0.483	11.87	1.272	11.99	0.835
	Glucose	0.99	0.112	1.07	0.157	0.96	0.199	1.07	0.128	1.03	0.088

Hemoglobin: g/dl Hematocrit: % Total protein: mg/ml Glucose: mg/ml

h) 腎機能

Isoaminile cyclamate 15~60mg/kgを6カ月間連続投与した際のPSP排泄能, 血清クレアチニン量, 尿蛋白の経時変化をTable 3-24に示す。

Table 3-23-1 Liver function-test of male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 1,2,3,4.5 and 6 months.

		No. 1									
Months	Test item	Control n=4		15mg/kg n=4		30mg/kg n=4		45mg/kg n=4		60mg/kg n=4	
		mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE
Before control	BSP-test	2.47	1.827	1.90	1.859	1.00	0.707	0.50	0.866	1.12	1.951
	Total cholesterol	141.0	9.110	147.5	35.39	129.0	12.53	132.0	31.46	122.5	26.73
	Bilirubin	4.25	0.433	4.00	0.707	4.25	0.829	4.50	1.118	4.75	1.300
	AL-phosphatase	3.75	0.83	4.25	1.30	4.25	1.30	4.00	1.00	4.00	1.22
	GOT	16.5	5.21	23.3	6.83	17.0	8.86	18.3	3.77	13.8	0.85
	GPT	11.0	3.91	7.8	4.66	14.0	7.78	12.3	3.34	10.5	4.82
1	BSP-test	0.72	0.429	0.55	0.811	0.32	0.317	0.00	0	1.12	0.899
	Total cholesterol	120.5	3.29	121.5	16.15	125.5	12.20	136.5	12.20	105.0	16.58
	Bilirubin	3.00	0.707	4.25	0.433	3.50	0.50	4.00	0.707	4.00	0.0
	AL-phosphatase	3.75	1.30	3.50	0.87	4.75	1.09	6.50	1.66	4.50	1.50
	GOT	9.0	1.12	8.0	1.22	9.8	2.02	8.8	2.28	5.3	2.17
	GPT	5.3	1.92	9.8	3.96	8.3	3.63	8.5	3.20	13.3	8.23
2	BSP-test	1.12	—	0	—	1.00	—	0.25	—	0.50	—
	Total cholesterol	112.5	—	107.0	—	97.5	—	105.0	—	101.5	—
	Bilirubin	2.75	—	2.75	—	2.25	—	2.50	—	3.25	—
	AL-phosphatase	3.25	—	3.75	—	8.50	—	9.50	—	7.00	—
	GOT	12.5	—	12.0	—	13.0	—	11.0	—	16.3	—
	GPT	6.3	—	9.0	—	6.8	—	9.2	—	7.8	—

BSP-test: 30min values(%) Total cholesterol: mg/dl Bilirubin: M.index
AL-phosphatase: B.U. GOT: K.U. GPT: KU

Table 3-23-2 Liver function-test of male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 1,2,3,4.5 and 6 months.

		No. 2									
Months	Test item	Control n=4		15mg/kg n=4		30mg/kg n=4		45mg/kg n=4		60mg/kg n=4	
		mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE
3	BSP-test	0	0	0	0	2.00	0.346	0.75	1.300	1.50	0.25
	Total cholesterol	79.0	21.79	103.5	21.79	114.3	28.34	105.7	22.72	79.5	16.46
	Bilirubin	2.00	0.43	2.75	0.43	2.25	0.43	2.75	0.83	2.75	0.83
	AL-phosphatase	3.00	1.80	5.50	1.80	0.25	3.34	15.25	5.07	15.50	6.84
	GOT	11.5	3.42	10.3	3.42	13.0	3.08	14.5	4.15	19.8	2.68
	GPT	7.0	3.24	7.0	3.24	10.8	8.87	11.0	4.06	21.3	4.55
4.5	BSP-test	0	—	0	—	1.00	—	0	—	0	—
	Total cholesterol	124.0	—	124.5	—	130.0	—	146.0	—	131.0	—
	Bilirubin	2.25	—	3.25	—	3.00	—	3.25	—	2.50	—
	AL-phosphatase	3.00	—	4.50	—	8.00	—	8.25	—	9.25	—
	GOT	9.0	—	17.5	—	19.8	—	21.0	—	14.8	—
	GPT	9.3	—	1.5	—	15.8	—	11.8	—	11.0	—
6	BSP-test	0	0	0	0	0	0	1.00	1.732	1.50	0.59
	Total cholesterol	122.0	15.96	127.5	15.96	135.7	7.63	131.0	19.62	131.0	26.55
	Bilirubin	2.00	0.43	2.50	0.43	2.50	0.43	2.25	0.43	2.00	0.0
	AL-phosphatase	3.25	2.12	6.00	2.12	9.25	1.48	8.50	2.50	8.25	2.28
	GOT	15.0	1.92	12.8	1.92	17.0	7.84	17.5	4.26	14.8	5.07
	GPT	11.0	3.77	7.3	3.77	16.3	10.50	12.5	3.84	12.3	8.29

BSP-test: 30min values(%) Total cholesterol: mg/dl Bilirubin: M.index
AL-phosphatase: B.U. GOT: K.U. GPT: KU

すなわち、Isoaminile cyclamate 15~60 mg/kg連続投与はイヌのPSP排泄能、血清クレアチン量、尿蛋白のいずれにも著しい影響をおよぼさなかった。

Table 3-24 Kidneys function-test of male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 1,2,3,4.5 and 6 months.

Months	Test item	Control n=4		15mg/kg n=4		30mg/kg n=4		45mg/kg n=4		60mg/kg n=4	
		mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE
Before control 0	PSP-test	41.5	5.16	48.0	9.37	46.1	14.67	58.4	5.49	51.1	12.73
	Creatinine	0.82	0.27	0.75	0.33	0.65	0.38	0.85	0.17	0.97	0.36
	Protein	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
1	PSP-test	45.0	6.45	38.4	1.96	47.8	10.10	41.9	10.70	50.3	11.07
	Creatinine	0.90	0.22	1.00	0.12	0.75	0.22	0.87	0.50	1.02	0.43
	Protein	0	—	1	—	0	—	1	—	0	—
2	PSP-test	66.4	—	50.3	—	54.3	—	55.8	—	67.3	—
	Creatinine	1.90	—	1.05	—	1.40	—	1.50	—	1.75	—
	Protein	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
3	PSP-test	49.8	11.97	49.0	7.00	54.3	8.90	45.5	4.97	52.2	7.50
	Creatinine	1.12	0.23	1.37	0.34	1.40	0	1.80	0.28	0.97	0.31
	Protein	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
4.5	PSP-test	52.3	—	61.3	—	60.5	—	59.8	—	48.8	—
	Creatinine	2.15	—	2.87	—	1.80	—	2.40	—	1.80	—
	Protein	0	—	0	—	0	—	1	—	0	—
6	PSP-test	51.5	8.99	73.6	14.29	55.0	15.00	59.5	7.09	70.3	14.62
	Creatinine	1.15	0.21	1.10	0.44	0.85	0.23	1.17	0.40	0.92	0.16
	Protein	0	—	0	—	1	—	1	—	0	—

PSP-test: 30min values(%) Creatinine(serum): mg/dl Protein(urine): Positive number

i) 解剖所見

Isoaminile cyclamate 15~60mg/kgを6カ月間連続経口投与した後、各群の主要臓器について外形、大きさ、漿膜、硬さ、断面、粘膜色などについて検査したが、各群とも肺、心、肝、脾、腎、副腎、胃粘膜、腸粘膜のいずれにもとくに異常をみとめなかった。

j) 病理組織所見

Table 3-25 に示すように、isoaminile cyclamate 15mg/kg, 30mg/kg 投与群においては、主要臓器の組織学的所見は、ほとんど対照群と大差なかった。しかし45mg/kg 投与群では、肝中心帯に軽度の充血およびうっ血がみられ、副腎皮質内側部に出血がみられた。また60mg/kg 投与群では腎細尿管内出血、脾中心動脈内色素顆粒、肝中心帯に軽度の充血およびうっ血、副腎皮質内側部出血、肝細胞核の部分的消失等をみとめた。顕著な病理組織像をFig. 3-49, Fig. 3-50 に示す。

第3節 小括ならびに考察

Isoaminile citrate および cyclamate の中毒症状は投与法や性別に関係なく、低用量では鎮静がみられ、増量するにつれて自発運動の亢進、挙尾、振せん、疾走、間代性および強直性痙攣に移行し、痙攣発作中あるいはその後の呼吸停止により死亡した。これらの中毒症状は、Krause [79] によって報告された中毒症状および第3部第1章において観察された中毒症状と同じであった。中毒死する動物の死亡時間は投与法および投与量によりかなり差がみられた。再び、マウスおよびラットの LD₅₀ 値が性差により異なるか否かを Litchfield-Wilcoxon 法により検討した結果、前回と同様有意差はなかった。また、両薬物の急性毒性を LD₅₀ 値で比較すると、マウスにおいては isoaminile cyclamate, ラットにおいては isoaminile citrate がそれぞれ幾分弱い傾向がみられた。

亜急性毒性に関して、isoaminile citrate および cyclamate を Wistar 系雌雄ラットに 200mg/kg, 250mg/kg, 300mg/kg あて28日間ないし33日間連続経口投与した結果、

1) 投与群の体重は、雄性ラットでは投与3日目以增加が抑制され、それ以後の増加もやや抑制されたが、雌性

Table 3-25 Histopathological findings in male dogs administered orally with isoaminile cyclamate for 6 months

Organ	Control	15, 30mg/kg	45mg/kg	60mg/kg
Heart	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Lungs	N.C.	Widening of the pulmonary wall(3/4)	Widening of the pulmonary wall(2/4)	Widening of the pulmonary wall(2/4)
Thymus	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Alimentary canal	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Kidneys	N.C.	N.C.	N.C.	Hemorrhage in the uriniferous tubules(2/4)
Spleen	N.C.	N.C.	N.C.	Deposition of the brown coloring-matter (4/4)
Mesenteric lymph node	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Liver	N.C.	N.C.	Mild congestion(3/4)	Mild congestion(4/4) Nuclei are decreased in number (2/4)
Testes	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Adrenal glands	N.C.	N.C.	Hemorrhage in the cortex (4/4)	Hemorrhage in the cortex (4/4)
Bone marrow	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Pancreas	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.

N.C.: No change

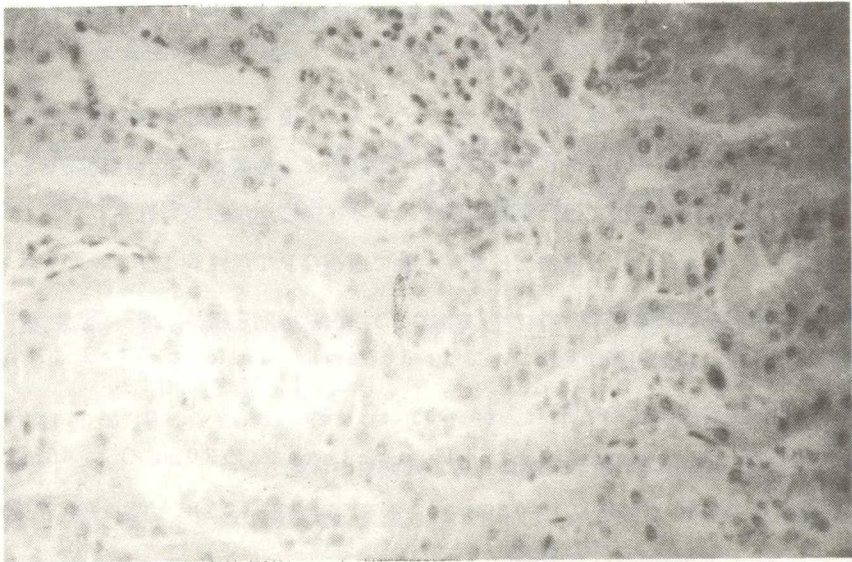


Fig. 3-49 Histopathological photograph of kidney (Hemorrhage, x 400) in male dog administered orally with isoaminile cyclamate (60mg/kg/day) for 6 months.

ラットでは有意な抑制はみられなかった。これは isoaminile cyclamate でも同様の傾向がみとめられた。

2) 飼料摂取量, 摂水量いずれも雄性ラットでは投与後3日目まで著明な減少がみられた。しかし, dose-responseは示さなかった。一方, 雌性ラットでは飼料摂取量, 摂水量いずれも投与初期に減少したが, 10日目以後は対照群に比べ大差なかった。この原因については, 高濃度の isoaminile は非常に苦味を呈すること, また, procaineにほぼ匹敵する局所麻酔作用を有すること等が, 投与初期にはラットの嗜好を害することが原因の1つと考えられるがあくまで推論の域をでない。

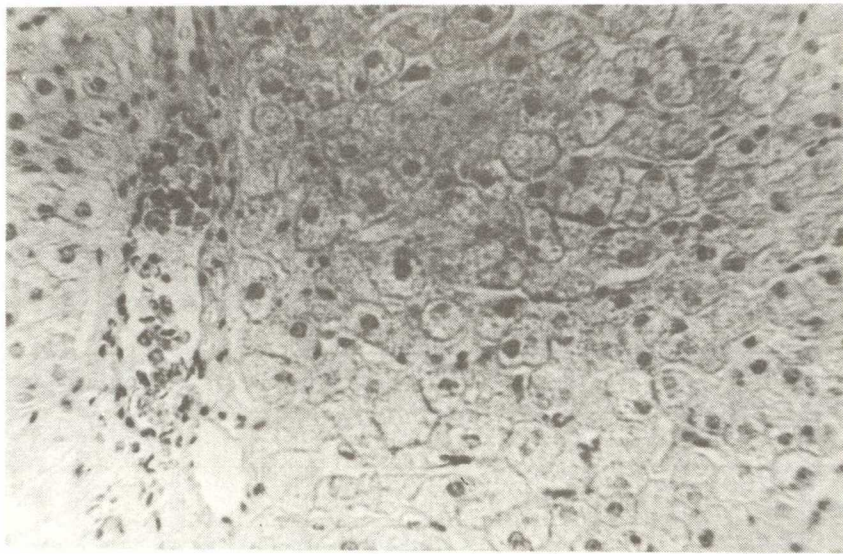


Fig. 3-50 Histopathological photograph of liver (Mild hemorrhage and congestion, x 400) in male dog administered orally with isoaminile cyclamate (60mg/kg/day) for 6 months.

- 3) Isoaminile citrate 投与群では、各投与群とも事故死を含め各2～4匹死亡した。これに対し isoaminile cyclamate 300mg/kg 投与群では体重減少が著しく、投与18～25日目に全例死亡した。
- 4) Isoaminile citrate 投与群では、ヘマトクリット値および好中球の軽度増加、好酸球の減少を示す群がみられた。しかしこれは用量的に不定であり、薬物による影響かどうかは疑問である。一方、isoaminile cyclamate 投与群では分葉球の減少、リンパ球の増加がみられた。
- 5) Isoaminile citrate 投与群では最高用量で血清GPT活性およびアルカリホスファターゼ活性、血糖値の軽度上昇をみとめた。
- 6) 剖検所見、臓器重量、病理組織所見については、isoaminile citrate および cyclamate のいずれも対照群と差異をみとめなかった。

慢性毒性に関して、ラットには isoaminile cyclamate の20mg/kg, 40mg/kg, 80mg/kg, 120mg/kg を136日間、イヌには isoaminile cyclamate の15mg/kg, 30mg/kg, 45mg/kg, 60mg/kg を180日間連続投与した結果、

ラットの場合には、

- 1) 80mg/kg 以下の連続投与では中毒症状を発現せず、120mg/kg 以上でときどき鎮静または軽度の自発運動の促進をみとめた。しかし、これは連続投与により減弱あるいは増強されることはなかった。
- 2) 80mg/kg 以下の連続投与では死亡例をみとめないが、120mg/kg 以上では死亡例をみとめた。
- 3) 20～80mg/kg の連続投与により、飼料摂取量は投与初期にやや減少したが、その後はほとんど対照群と大差なかった。しかし、120mg/kg 投与群ではやや減少する傾向にあった。
- 4) 20～120mg/kg の連続投与により血球数、血球像、および各主要臓器の肉眼所見やその重量は対照群に比べほとんど大差なかった。
- 5) 80mg/kg 以下の連続投与により、主要臓器は腎、肝の一部を除いて、ほとんど異常をみとめなかったが、120mg/kg では、心、腎、脾、肝、副腎に異常をみとめた。

イヌの場合には、

- 1) 15～30 mg/kg の連続投与では、ほとんど中毒症状をみとめず、45～60 mg/kg 投与群では舌なめずり、流涎、挙動不穏、嘔吐、振せん、後肢の運動障害等をみとめた。しかしこれらの中毒症状は、連続投与により減弱もしくは増強することはなくほとんど一定していた。また死亡例もみとめなかった。
- 2) 15～60 mg/kg の連続投与により体重、血球数、血球像、血液性状、肝機能、腎機能等について、いずれも著明な変動はみられなかった。
- 3) 30 mg/kg 以下の連続投与では肺、心、肝、脾、腎、副腎、精巣のいずれにも組織学的異常をみとめなかった。しかし、45 mg/kg 投与群では肝および副腎に、60 mg/kg 投与群では腎、脾、肝、副腎に異常をみとめた。

第4節 結 論

以上の成績から以下の結論を得た。

- 1 Isoaminile の急性毒性は使用動物の種属の相違による差異 (species difference) を示さない。
- 2 Isoaminile をラットに亜急性的投与 (連続28～33日間) した際の最大安全量は推定常用量の50～75倍である。
- 3 Isoaminile をラットに慢性的投与 (連続136日間) した際の最大安全量は推定常用量の10～20倍である。
- 4 Isoaminile をイヌに慢性的投与 (連続180日間) した際の最大安全量は推定常用量の7.5～11.3倍である。

以上要するに、本章では isoaminile の潜在的有害作用について毒性学的側面より、その使用期間、安全域など総合的に判断し、鎮咳作用を目的として臨床使用する限り、安全性は十分確保出来るであろうという結論に達した。

第3章 新規鎮咳活性物質 isoaminile の麻薬性に関する検索

鎮咳作用は麻薬性鎮痛剤の副作用の産物として扱われていた時代があったことから明らかな様に、鎮咳作用と鎮痛作用は密接な関係を有している。すなわち、強力な鎮痛薬は痛みの感受閾値を上昇させ鎮痛作用や鎮咳作用を発現すると同時に、痛みを感じても苦痛とも思わぬ様な陶酔状態 (euphoria) を生じ、これが麻薬の最も有害な作用である耽溺性 (addiction) を形成させる一つの原因と考えられている。^[63] 耽溺性は、一個人の健康上の問題にとどまらず、さらに薬物乱用、凶悪犯罪等の反社会的行為を引き起す可能性が大きく、社会、国家の問題へと発展してきている。この様な理由に基き、古くから多くの研究者達により強力な鎮咳作用を保持しているが鎮痛作用や耽溺性を欠く、すなわち鎮咳作用と鎮痛作用を分離した合成鎮咳剤の開発研究が広範に行なわれてきた。^[63] しかし現在も失望の繰り返しであり未だ充分満足する段階に至っていない。

ところで isoaminile は、化学構造上麻薬性鎮痛剤である methadone に類似点を有しているが、麻薬性鎮痛剤である morphine, codeine, pethidine とは全く異なり鎮痛作用をもたないことを第2部において実験的に実証した。本章ではさらに鎮咳剤と密接に関連し最も厄介な有害作用である麻薬性について動物を用い検討した。

第1節 実験材料ならびに実験方法

実験には isoaminile cyclamate および isoaminile citrate (Kali-chemie), morph-

ine hydrochloride (塩野義), codeine phosphate (塩野義), pethidine hydrochloride (Opystan[®], 田辺), dimethylthiambutene hydrochloride (Ohton[®], 小野薬品), levallorphan bitartrate (Lorphan[®], 武田)を用いた。

I Lavallorphan による拮抗実験

5頭の「咳嗽犬」に isoaminile cyclamate 8.92mg/kg を静注し、咳の抑制程度およびその効力の持続時間をあらかじめ測定しておき、5日後再び、同一イヌに isoaminile の同一量を投与し、5分後における咳の抑制が前回と同程度であることを確認した後、被験薬投与量の $\frac{1}{10}$ 量、次に増量して $\frac{1}{5}$ 量に相当する levallorphan を静注し、鎮咳効果が減弱あるいは消失するかどうかを検した。対照として codeine morphine pethidine, Ohton[®] を用い比較した。

II 耐性形成に関する実験

5頭の「咳嗽犬」に, isoaminile cyclamate 8.92mg/kg を1日2回, 定刻に, 40日間連日静注し, 鎮咳作用, 体重, その他の主要な一般症状について観察した。鎮咳作用は隔週毎に測定し, 鎮咳効果および一般症状がどのように変化するかを検した。

対照として, 他の「咳嗽犬」5頭を用い, codeine phosphate 10mg/kg (AtD₅₀ 値の4倍に相当する量) を1日2回, 定刻に連日静注し, 耐性が形成されることを確かめた。

III Codeine との交叉耐性に関する実験

あらかじめ codeine 3.58 mg/kg (又は10mg/kg) を静注し, 鎮咳効果を測定しておいた5頭の「咳嗽犬」に, isoaminile cyclamate 8.92mg/kg を1日2回, 定刻に30~34日間連日静注した。その後, 前回と同一量の codeine 3.58 mg/kg (又は10mg/kg) を静注し, isoaminile の30~34日間連続投与によって, codeine の鎮咳効果が変化するか否かを検した。また, あらかじめ isoaminile cyclamate 8.92mg/kg を静注し, 鎮咳効果を測定しておいた他の5頭の「咳嗽犬」に, codeine の10mg/kg を1日2回, 定刻に16~19日間, 連日静注し, 鎮咳効果において完全な耐性が形成することを確めた後, さらに念のため3日間投与を続けた。その後, 前回と同一量の isoaminile 8.92 mg/kg を静注し, codeine 耐性成立後, isoaminile の鎮咳効果が codeine 耐性形成前の鎮咳効果に比べ変化するか否かを検した。すなわち isoaminile が codeine との間に交叉耐性を形成するか否かについて検した。

IV 身体依存性形成に関する実験

1 イヌにおける禁断症状の観察

実験IIに用いた isoaminile 投与群(5頭)および codeine 投与群(5頭)をそのままこの目的に用いた。すなわち, 最終投与日の翌日は isoaminile を全然投与せず, 禁断症状が出現するか否かを終日観察した。観察終了後, 5例中3例は当日分の isoaminile を投与し, 投薬を中絶しないよう注意した。他の2例は投与せず3日間行動を観察した。投薬を続けた3例はその翌日, isoaminile の代りに isoaminile の投与量の $\frac{1}{5}$ 量に相当する levallorphan 1.8mg/kg を静注し, 禁断症状を誘起しようと試みた。また, 対照の codeine 連続投与群には, 鎮咳作用において, 完全な耐性が形成されたことを確かめた後, さらに10~12日間投与を続け, isoaminile 投与群と同様に操作し禁断症状の誘発を試みた。

2 ラットにおける禁断症状の観察

^[44] 細谷ら(1958), ^[111] 乙部ら(1959), ^[151] 高木ら(1965)の方法に準じた。

飼育条件: 体重35~40gのラットを飼育室(室温23±1℃, 湿度50~60%, 換気回数15~20回/分)で飼育し, 体重が順調に増加し約70gに達したもののみを選び, 1群15匹, 4群とした。飼料は固型飼料(日本クレア製CE-2)を用い, 水は自由に摂取させた。各群の平均体重が約110gになった日から,

isoaminile cyclamate (TAT-1) および morphine, 生理食塩液を下記の要領で投与した。

投与方法: 被検薬の1日量を毎日午前8~9時, 午後8~9時の2回にわけて背部皮下に投与, 77日間継続した。被検薬は生理食塩液に溶解し, 各用量が2.0 ml/kg となるよう調整した。

〔第Ⅰ群〕 isoaminile 40mg/day (すなわち20mg/kg ずつ2回)を投与。ただし31日, 56日は投与中断。36日は isoaminile の代りに生理食塩液4.0 ml/kg/day を投与。46日, 73日には levallorphan 20mg/kg/day を, 62日には10mg/kg/day 投与。

〔第Ⅱ群〕 isoaminile 80mg/kg/day。投与中断, 生理食塩液および levallorphan の投与量, 方法および時期については第Ⅰ群とまったく同様。

〔第Ⅲ群〕 morphine 投与群で, 投与量, 方法および時期はつぎのとおりである。

1~6日, morphine 20mg/kg/day
7~12日, morphine 40mg/kg/day
13~18日, morphine 60mg/kg/day
19~26日, morphine 80mg/kg/day
27~30日, morphine 100mg/kg/day
31日, morphine 投与中断
32~35日, morphine 100mg/kg/day
36日, morphine の代りに isoaminile 80mg/kg/day
37~45日, morphine 100mg/kg/day
46日, levallorphan 10mg/kg/day (1回)
47~55日, morphine 100mg/kg/day
56日, morphine 投与中断
57~61日, morphine 100mg/kg/day
62日, levallorphan 10mg/kg/day (1回)
63~72日, morphine 100mg/kg/day
73日, levallorphan 20mg/kg/day (1回)
74~77日, morphine 100mg/kg/day

〔第Ⅳ群〕 生理食塩液4.0 ml/kg/day。投与中断, levallorphan の投与量, 方法および時期については第Ⅰ群の場合とまったく同様。

以上, 全群について, 毎日被検薬投与前に体重を測定し, また投与後の一般状態を観察した。

第2節 実験成績

I Lavallorphan による拮抗実験

5例の「咳嗽犬」にそれぞれ isoaminile cyclamate 8.92mg/kg を静注し, 5分後における咳の抑制が投与前対照に比べ, 振巾において50~80%, 頻度において20~50%抑制され, 5日前にあらかじめ測定したときと同程度の効果を示すことを確めた後に, isoaminile 投与量の $\frac{1}{10}$ 量, 次に増量して $\frac{1}{5}$ 量に相当する levallorphan を静注した。 $\frac{1}{10}$ 量投与の5例全例と, $\frac{1}{5}$ 量投与の5例中4例は, levallorphan 投与後の鎮咳効果になんら変化を示さず, isoaminile 単独投与時とまったく同様, 75~90分後に回復した (Fig. 3-51)。 $\frac{1}{5}$ 量投与群の5例中1例は咳の抑制効果にはまったく変化はみられなかったが, 持続時間がやや短縮されたように思えたが, 著明な差ではなかった。また isoaminile citrate 3.58~

8.92mg/kgを静注し、levallorphan 0.75~1.78mg/kgを後処理した場合にも5例全例 isoaminile citrate 単独投与時と殆んど変化なかった (Fig. 3-52)。

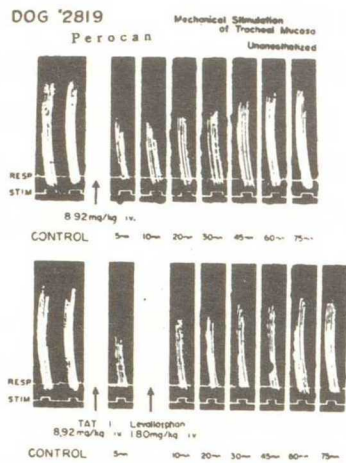


Fig. 3-51 Levallorphan antagonism of antitussive effect of isoaminile cyclamate (Perocan)
Tested by "coughing dog" method.
The effect of isoaminile cyclamate 8.92mg/kg,i.v. was not influenced by levallorphan bitartrate 1.8mg/kg,i.v.

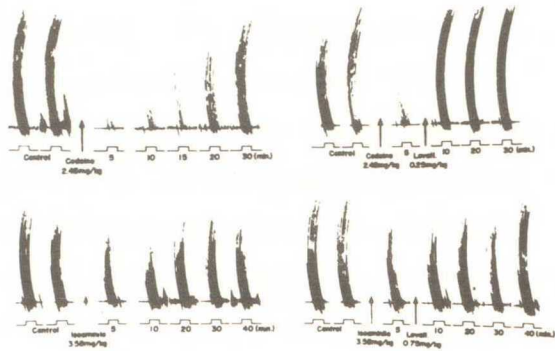


Fig. 3-52 Levallorphan antagonism of antitussive effect of codeine phosphate and isoaminile citrate.
Tested by "coughing dog" method.
The effect of isoaminile citrate 3.58mg/kg,i.v. was not influenced by levallorphan bitartrate 0.75mg/kg,i.v.
In contrast to this, antitussive effect of codeine phosphate 2.48mg/kg,i.v. was immediately abolished by levallorphan bitartrate 0.25mg/kg,i.v.

一方、他の5例の「咳嗽犬」にそれぞれcodeineの10mg/kg(又は2.48mg/kg)を静注し、5分後における咳の抑制が投与前対照に比べ、振巾において70~100%(30%~70%)、頻度において40~70%(30%~60%)抑制され、5日前にあらかじめ測定した時と同程度の効果を示すことを確めた後、codeine投与量の $\frac{1}{10}$ 量に相当するlevallorphanを静注し鎮咳作用を検した。その結果、5例ともlevallorphan投与により、直ちにかつ完全に拮抗され鎮咳作用は消失した (Fig. 3-52)。これと同様にmorphine,pethidine,Ohton[®]の鎮咳作用も被験薬投与量の $\frac{1}{10}$ 量に相当するlevallorphanの静注により完全に消失した。

II 耐性形成に関する実験

1 Isoaminile cyclamate 投与群

5例の「咳嗽犬」にそれぞれisoaminile cyclamate 8.92mg/kg静注すると、鎮咳効果はそれぞ

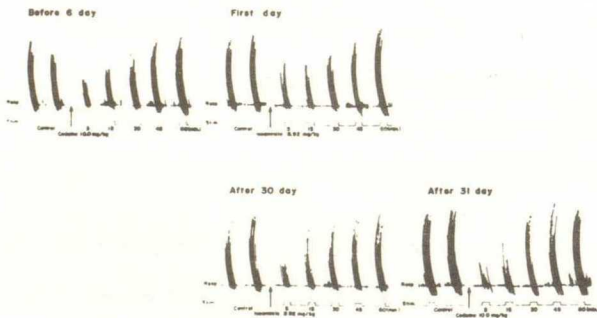


Fig. 3-53 Development of tolerance in antitussive activity
Tested by the "coughing dog" method
No significant difference was observed in antitussive effect of isoaminile cyclamate 8.92mg/kg,i.v. between the first day and 30th day.

れ振巾において40~80%、頻度は30~60%抑制され、その効力は60~90分間持続した。その後1日2回、連日isoaminileを投与して隔週毎に鎮咳作用を測定した。この間耐性形成の傾向はみとめられず、投与第40日(30日)目においても、依然投与第1日目と同程度の鎮咳効果を示し、耐性形成は全くみとめられなかった (Fig. 5-53)。一方、第1回投与時にみられた舌なめずりおよび流涎などの一般症状も鎮咳作用と同様、日によって多少の変動はまぬがれなかったが、長期間の連続投与により消失したり、またはかえって増強することなく、大体第1日目の状態と同程度であった。また体重は実験終了時に0.5~1.5kg増加した。

2 Codeine phosphate 投与群

全例(5例)ともに投与開始後日が経つにつれて効果は減少し、5例中3例は13日目、2例は15日目にまったく鎮咳効果を消失した。すなわち耐性を形成した。また、codeine 初回投与時にみとめられた鎮静、激しい流涎、食欲不振、便秘、時には嘔吐などの症状も日が経つにつれて軽減され、鎮咳作用における耐性が完全に形成された13～15日目では、鎮静、嘔吐、食欲不振は消失し、流涎もその程度を減少した。すなわち、一般症状においても耐性形成がみとめられた。また、体重は実験開始直後より全例減少しはじめ、6～9日目には1～2kgの体重減少をみとめた。その後回復しはじめたが、13～15日目においては完全に回復しなかった。

Ⅱ Codeine との交叉耐性形成に関する実験

5例の「咳嗽犬」に codeine 3.58mg/kg (又は10mg/kg)を静注し、咳嗽曲線において振巾は30～50%, 頻度は10～30%抑制され、その効力は25～40分持続することをみとめた後、同じ「咳嗽犬」に8.92mg/kgの isoaminile cyclamate を1日2回、定刻に、30～34日間連日静注した。その後、再び前回と同一量の codeine を静注し鎮咳作用を測定した結果、codeine の鎮咳効果は isoaminile の連続投与には全く関係なく、前回と同様振巾は40～50%, 頻度は20～30%抑制され、その効力は25～45分間持続することをみとめた。また、あらかじめ isoaminile cyclamate の8.92mg/kgを静注し、咳嗽曲線において振巾は50～80%, 頻度は30～60%抑制され、その効力は75～105分間持続することをみとめておいた「咳嗽犬」に10mg/kgの codeine を1日2回、定刻に、連日静注した。codeine の鎮咳作用は日が経つにつれ減弱し、5例中3例は16日目、1例は17日目、1例は19日目にその効力を全く消失し、完全な耐性を形成した。念のためさらに3日間 codeine の投与を続けた後、isoaminile cyclamate の8.92mg/kgを静注し鎮咳効果を測定した。Isoaminile の鎮咳効果は、codeine の耐性形成には全く関係なく、前回と同程度であることをみとめた(Fig. 3-54)。すなわち、isoaminile は codeine との間に交叉耐性を形成しないことが判明した。

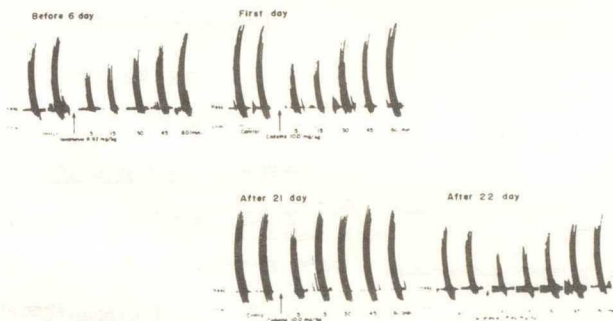


Fig. 3-54 Development of tolerance in antitussive activity.
Tested by the "coughing dog" method.
The definite antitussive effect of codeine phosphate 10mg/kg, i.v. was gradually decreased by continued daily administration and disappeared ultimately 21th day. On the 22th day, no significant difference was observed in antitussive effect of isoaminile cyclamate 8.92mg/kg, i.v. after the continued daily administration of the drug.

Ⅳ 身体依存性形成に関する実験

1 イヌにおける禁断症状の観察

実験Ⅱに引き続き isoaminile cyclamate 投与群(5例)において、最終投与日の翌日(41日目)は isoaminile を全例に投与せず禁断症状が出現するか否かを終日観察したが、平常とまったく変わらず禁断症状とみられる現象は発現しなかった。5例中2例は引き続き3日間投薬を中止し症状を観察したが、禁断症状はあらわれなかった。他の3例は症状観察後、当日分の isoaminile を投薬し、その翌日(42日目) isoaminile の代わりにその $\frac{1}{6}$ 量に相当する1.8mg/kgの levallorphan を静注し症状を観察

したが、3例とも禁断症状はまったくあらわれなかった。

一方、codeine 投与群(5例)は13～15日間でまったく鎮咳効果を消失したが、さらに10～12日間 codeine の投与を続け(第25日目まで)、第26日目はその日の投薬を中止し終日一般症状を観察した。

しかし、食欲不振がみられた以外には明らかな禁断症状はみとめられなかった。さらに5例中2例は引き続き第28日目まで投薬を中止して、症状を観察したが著明な変化はみられなかった。他の3例は症状観察後当日分のcodeineを投与し、翌日(第27日目)codeine投与量の $\frac{1}{10}$ に相当する量、すなわち1mg/kgのlevallorphanを静注した。3例とも注射後2~5分頃より、不穏、著明な流涎、軽度の全身性振せん、排尿、排便がみられ、また著明な食欲不振がみられた。すなわち、morphineのように激しい嘔吐の連続、咳、くさめ様呼吸の頻発、また重篤な場合は間代性痙攣をきたすのに比べると程度は弱いことが明らかに禁断症状がみられた。

以上の成績から、isoaminileは長期間連続投与した後、投薬を中止した場合、またlevallorphanを投与した場合、いずれも禁断症状はあらわれない。しかしcodeine連続投与群では投薬を中止しただけでは禁断症状はあらわれないが、levallorphan投与により明らかに弱いながら禁断症状があらわれることが判った。

2 ラットにおける禁断症状の観察

[44][111]

細谷ら(1958, 1959)によるとラットにmorphineを長期間投与し、突然禁断すると、サル、イヌのよ
うな典型的な禁断症状はみられないが、24時間後に体重の一過性の減少および運動量の減少がおこる。また
morphineの代りにnalorphine, levallorphanを投与しても同様の症状があらわれ、その程度は
単なる禁断の場合より強く出る。特に体重減少が禁断症状のわかりやすい指標として使用されている。この方法
を用いmorphineを対照としてしらべた。Fig. 3-55に各投与群ごとの77日間の平均体重の経日的変動と
その間にとられた種々の処置を示してあり、またTable 3-26にはFig. 3-55に示した体重変動のうち主要
な観察日における各種の処置の前後における体重変化(差)の平均値とその標準誤差およびその有意性($P=0.05$)
を示してある。

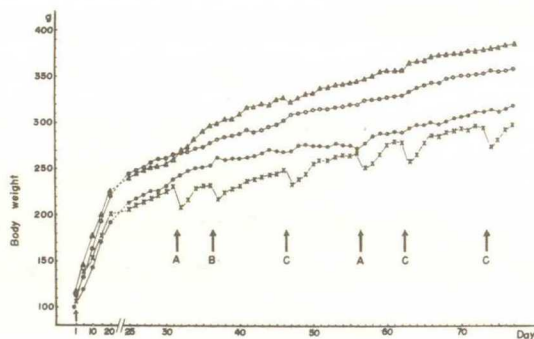


Fig. 3-55 Effect of Repeated administration of isoaminile cyclamate and morphine hydrochloride on body weight of the rat.

isoaminile 40mg/kg/day (group I)

isoaminile 80mg/kg/day (group II)

Morphine 20-100mg/kg/day (group III) Twenty mg/kg/day was given as an initial dose and then dose was progressively increased up to 100mg/kg/day.

physiological saline 4.0ml/kg/day (group IV)

The first arrow shows the beginning of daily administration of drugs (or saline), the succeeding arrows indicate the following treatments.
A. Withdrawal of drugs (or saline) in all the groups. B. Isoaminile (80mg/kg/day) was given to the morphine group (III) instead of morphine, saline was given to the groups I and II instead of isoaminile.
C. Levallorphan was given to all the groups.

Note that body weight was apparently decreased in the morphine group (III) by an abrupt withdrawal of morphine (see A) or by administration of levallorphan (see C) instead of morphine and, furthermore, isoaminile could not prevent the decrease in body weight of the morphine group (III) caused by the withdrawal of morphine (see B). On the contrary to this, no significant decrease in body weight occurred in the isoaminile groups (I & II) under the same experimental conditions described above (withdrawal of levallorphan substitution).

1 Isoaminile cyclamate 群 (group I および II)

Isoaminile 40mg/kg/day および 80mg/kg/day の投与によって体重増加の程度は生理食塩液群に比べると減少したが (Fig. 3-55), 全期間中、中毒症状はほとんど観察されなかった。特に投与中断、levallorphan 代替投与によっても一般状態に変化はなく、体重減少もまったくみとめられなかった。

2 Morphine hydrochloride 群 (group III)

投与1日目は 20mg/kg/day のmorphineによって、投与後10分頃より鎮静状態となり、1~2時間持続した。またHaffner法によつて強い鎮痛作用が認められ、3~4時間持続した。体重増加の程度は2日

目よりやや減少し始め、以後全期間を通じ他の3群よりも著明な減少を示した (Fig. 3-55)。6日目には鎮静作用は若干減弱したが、鎮痛作用にはほとんど変化がみられなかった。7日目に40mg/kg/dayに増量すると、鎮静作用はさらに増強し、3~4時間持続し、鎮痛作用は3~5時間持続した。12日目になると鎮静作用はほとんど消失したが、鎮痛作用は2時間以上持続した。13日目に60mg/kg/dayに増量すると、再び鎮静がみられ、0.5~1時間持続し、鎮痛作用は2~3時間持続した。鎮静作用は15日目には消失したが、鎮痛作用は18日目になっても依然2時間以上持続した。しかし19日目に80mg/kg/day、27日目に100mg/kg/dayに増量した際には鎮静作用はほとんどみられず、鎮痛作用のみがやや増強されたにすぎなかった。

Morphine 投与を中断した31日目および56日目 (Fig. 3-55のA)、さらにmorphineの代りにisoaminile 80mg/kgを投与した36日目 (Fig. 3-55のB)には、一般症状に特記すべき変化はみられなかったが、24時間後の体重は前日 (処置前)の体重に比べて明らかに減少し、この差は有意であった。

Table 3-26 Changes in body weight of isoaminile cyclamate (TAT-1) in rats by vavious treatments

Group Dosis		TAT-1		Morphine	Physiological saline
		40mg/kg/day s. c. (I)	80mg/kg/day s. c. (II)	20→100mg/kg/ day s. c. (III)	4.0ml/kg/day s. c. (IV)
Body weight		Balance ¹⁾	Balance	Balance	Balance
Day	Treatment	mean ± S. E. (g)	mean ± S. E. (g)	mean ± S. E. (g)	mean±S. E. (g)
31	Withdrawal of drugs				
32	in all the groups	+1.3±1.9	+5.0±0.8***	-20.3±1.3***	+0.8±1.0
36	TAT-1 was given to the group III;				
37	saline was given to groups I & II	+3.5±1.1**	+4.3±0.9***	-14.9±1.3***	+2.2±1.1
46	Levallorphan was given				
47	to all the groups	+7.1±1.2***	+1.8±0.9	-16.6±1.6***	-1.2±1.3
56	Withdrawal of drugs				
57	in all the groups	+6.1±1.0***	+8.9±1.2***	-16.6±1.4***	+2.0±0.8*
62	Levallorphan was given				
63	to all the groups	+4.0±0.8***	+3.5±1.3*	-19.7±1.2***	+5.5±1.7**
73	Ditto				
74		+4.3±1.2**	+4.9±1.2*	-21.6±1.7***	+2.0±1.2

1) A balance between body weights before and after the treatment (see Fig. 1 also), shown as mean ± standard error.

+ Increase in body weight

- Decrease in body weight

* Significant (p=0.05)

** Significant (p=0.01)

*** Significant (p=0.001)

Morphineの代りにlevallorphanを投与した46日目、62日目、73日目 (Fig. 3-55のc)には、投与後10~20分後より著明な流涎と自発運動の抑制、軟便排泄がみとめられ、鎮痛作用も消失し、このような状態が1~1.5時間持続した。さらに24時間後の体重も前日 (処置前)に比べて著明に減少し、その差は有意であった (Table 3-26, morphine群)。

3 生理食塩液群 (group IV)

一般状態はまったく変化なく、順調な発育を示した (Fig. 3-55)。投与中断およびlevallorphan代替投与によってもなんらの変化もなく、体重にも変化はなかった。Table 3-26とFig. 3-55の成績からわかるように、isoaminile群および生理食塩液群においては、投与中断、levallorphan代替投与によって一般症状の変化、体重減少はまったくみとめられなかった。しかし、morphine群では投与中断、levallorphanの代替投与によって有意な体重減少がみられ、特にlevallorphan代替投与時には著明な症状の変化もみとめられた。さらにまた、morphineの代りにisoaminileを代替投与しても体重減少を防ぐ

ことはできなかった。この成績は、ラットにisoaminileを連用した場合にも、イヌにおける場合と同様に身体依存性を形成しないことを示唆している。

第3節 小括ならびに考察

isoaminileの鎮咳作用がmorphine, codeineのようなアヘンアルカロイド、あるいはそれから誘導された麻薬性の化合物、すなわちmethadone, pethidine, dimethylthiambuteneなど同様の作用機序で鎮咳作用をあらわすか否か、又鎮咳薬として連用した場合、麻薬と同様の副作用を生ずるか否かを判定するため次の実験を行なった。

- 1) levallorphanによりisoaminileの鎮咳効果が拮抗されるか否か。
 - 2) isoaminileの鎮咳作用が連日投与により耐性を形成するか否か。
 - 3) さらに麻薬性鎮咳薬であるcodeineとの間に交叉耐性が成立するか否か。
 - 4) 身体依存性を形成するか否か、すなわちイヌにisoaminileを連続投与した後、投薬を突然中止した場合、あるいはlevallorphanを投与した場合に禁断症状を出現するか否か、さらにラットにisoaminileを連続投与した後、投薬を突然中止した場合、あるいはlevallorphanを投与した場合に行動上の異常や24時間後の一過性の体重減少を発現するか否か、さらにmorphine依存ラットにisoaminileを代替投与した場合に、morphine投与中断あるいはlevallorphan代替投与時にみとられる様な体重減少が発現するか否か。以上の実験結果を総合して、耽溺性獲得の可能性があるか否かを検討した。
- 1 Isoaminileの鎮咳作用はcodeine, morphine, pethidine, dimethylthiambuteneとは異なり、levallorphanの用量をisoaminileの1/10量あるいは1/5量に増量した場合にも何ら影響されず、levallorphanにより拮抗されない事が判明した。
 - 2 Isoaminileは1日2回、連続40日間静注した場合にも、鎮咳作用および附随する一般症状において耐性形成はみられなかった。これに反し、codeineは1日2回、13~15日間の連続投与により、鎮咳作用および一般症状においても容易に耐性を形成した。すなわちisoaminileは長期間連続投与した場合にも耐性を形成しないことが判明した。
 - 3 Isoaminileはcodeine耐性のイヌにおいても非耐性のイヌの場合と同様明らかな鎮咳作用を発現した。又codeineはisoaminileを1日2回連続30~34日間静注したイヌにおいても、isoaminile非投与のイヌの場合と同様、明らかな鎮咳作用を発現した。すなわち、isoaminileはcodeineとの間に交叉耐性を形成しないことが判明した。
 - 4 Isoaminileを長期間連続投与しているイヌにおいて、isoaminileの投与を突然中断した場合、あるいはlevallorphanを代替投与した場合、いずれの場合にも禁断症状はあらわれなかった。これに反し、codeineを連続投与したイヌでは、levallorphanの代替投与により軽度であるが明らかな禁断症状がみられた。
 - 5 Isoaminileを長期間連続投与しているラットにおいて、isoaminileの投与中断、levallorphanの代替投与をおこなっても、morphineを連日投与した動物群に同様の処置をした際にみられる禁断症状、すなわち行動上の異常や24時間後の一過性の体重減少はみとめられなかった。
 - 6 Morphineを連日投与したラットにおいて、morphine投与中断により24時間後にみられる体重減少は、isoaminileの代替投与によって防止することはできなかった。

第4節 結 論

以上の結果から総体的に判断して以下の結論を得た。

Isoaminile の鎮咳作用はmorphine, codeine の様なアヘンアルカロイドあるいはそれから誘導された麻薬性薬物である pethidine, dimethylthiambutene などとは本質的に作用機序を異にする。しかるに isoaminile を鎮咳薬として連用した場合にも、麻薬が随伴する厄介な有害作用すなわち耐性形成、身体依存性あるいは耽溺性獲得などの可能性はおそらく無いであろうという結論に達した。

第4部 新規合成非麻薬性鎮咳薬 isoaminile の作用機作に関する研究

結 言

第2部～第3部において、isoaminileはcodeineに匹敵する強力な鎮咳作用を有すること、また薬理学的、毒性学的にも詳細に検討され選択性、安全性ともに優れている事が判明した。さらに isoaminile の鎮咳作用は levallorphan により何ら影響されず、また長期間連続投与した場合にも耐性、codeine との交叉耐性、身体依存性等を形成せず非麻薬性であり、有用性の高い事が示された。しかし、isoaminile の鎮咳作用発現の作用機作に関しては、第2部第1章において大まかな推定を試みたがその詳細については全く実証されていない。本研究ではこの点を解明する為、咳反射弓(経路)に対する作用を順次詳細に検討した(Fig. 4-1)。

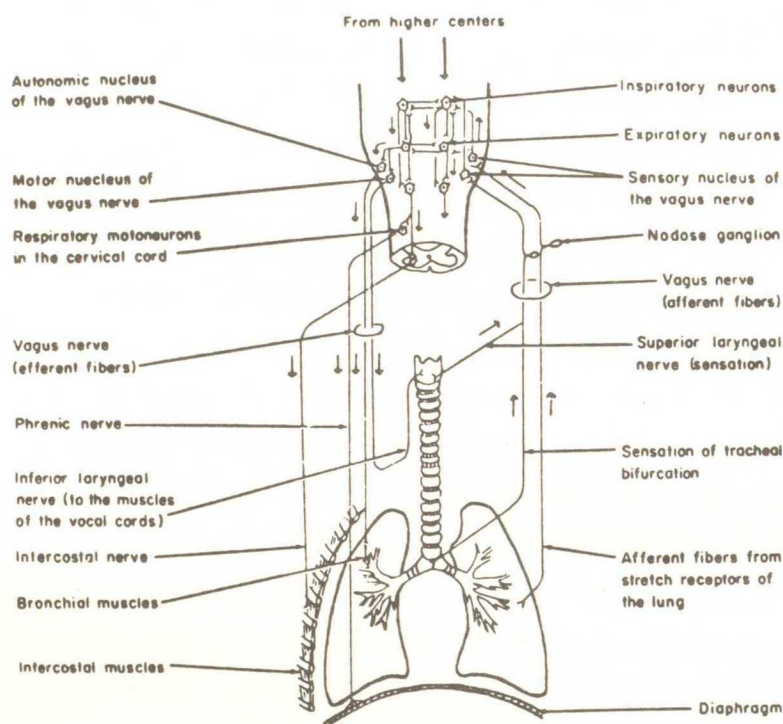


Fig. 4-1

Cough reflex arc

Afferent pathway at one side, efferent pathway at the other side

第1節 実験材料ならびに実験方法

実験には isoaminile citrate (Kali-Chemie), codeine phosphate (塩野義), benzonatate (Ciba), diphenhydramine hydrochloride (興和), pentobarbital sodium (Somnopen-tyl[®], Pitman.Moore), gallamine triethiodide (長瀬産業), ether (昭和エーテル), halothane (Fluothane[®], 武田)を用いた。

I 薬物投与経路の相違による有効量の比較

中枢性に鎮咳作用を発現する薬物は、それを脳幹のいわゆる「咳中枢」に直接到達するような経路に投与した場合には、他の経路に比べてより少量で同程度の効果を発揮することが知られている。故にいろいろの投与経路を経て被検薬を投与し、同一程度の鎮咳効果をあらわす用量を比較した。

体重7～10kgのpentobarbital軽麻酔(Na塩30mg/kg、腹腔内)イヌ7頭を使用した。大腿静脈、総頸動脈、椎骨動脈および小脳延髄槽内にあらかじめ挿入しておいたポリエチレン細管を介して被検薬を投与し、大腿静脈内投与時の効果と同程度の鎮咳効果をあらわすに要する量を求めた。咳は気管分岐部粘膜を刺激毛で機械的に刺激して誘発した。

II 気管粘膜内の知覚受容器に対する作用

気管粘膜を機械的、化学的、電氣的に刺激した場合、それらは知覚受容器で一次インパルス群に変換され、咳反射のための入力源となる。この知覚受容器が被検薬により麻酔されるならば咳反射の入力が減少するため咳の発生は減少する筈である。被検薬の鎮咳作用にこのような機序が関与しているか否かを検討した。

体重2～3.5kgのpentobarbital軽麻酔(Na塩20mg/kg腹腔内)ネコ4匹を使用した。喉頭粘膜を双極

銀球電極を用い、短形波で電気刺激（1mec, 20cps, 0.1～0.5v, 5sec間）した際、上喉頭神経内枝に誘発される電位をブラウン管オシロスコープにて観察し、記録した。

Ⅲ 知覚インパルスの求心性経路に対する作用

一次インパルス群は迷走神経知覚枝を通して孤束核に達し、ここからさらにいわゆる「咳中枢」に伝達される。この求心性経路が薬物によって遮断されるならば咳発生は抑制される。isoaminile の鎮咳作用にこのような機序が関与しているか否かを検討した。

体重2～3kgのpentobarbital麻酔（Na塩30mg/kg, 腹腔内）ネコ4匹およびgallamine 不動化（最初20mg/kg腹腔内、以後適時追加）ネコ4匹を使用した。脳定位固定装置に固定し、上喉頭神経を露出し、切断後、中枢端を電気刺激（単発刺激の場合は0.1msec, 0.1～1.0v；頻数刺激の場合は0.1msec, 10～200cps, 0.1～1.0v, 5sec間）した際、孤束核に誘発される活動電位（Portor, 1962, 1963）をオシロスコープ上に観察し、記録した。孤束核の位置は門（obex）レベルで正中線より外側へ0.8～2.0mm, 延髄表面からの深さ0.8～1.8mmの範囲を目標とした。

誘導電極は先端を約50μに電解研磨したタングステン線2本をAronalpa[®]で接着したもの（極間距離約50μ）を用いた。電極の挿入部位は実験終了後組織学的に確認した。

Ⅳ 末梢性および中枢性に誘発した咳に対する作用

鎮咳薬がいわゆる「咳中枢」に働いて作用をあらわすならば、中枢といわれている部位を刺激して起した咳（中枢性咳）を、末梢の知覚受容器の刺激で反射性に起した咳（末梢性咳）を抑制するのと同様に抑制すべきである。この二種の咳に対する被検薬の作用を比較した。

体重2～3kgのネコ8匹を用いether麻酔下に脳定位固定装置に固定、小脳を露出し、その尾側端をすこし除去して延髄表面を露出した。この後はether麻酔を中止し、pentobarbital軽麻酔下（Na塩20mg/kg, 腹腔内）で実験した。延髄内のいわゆるexpiratory pacemaker area（Borison, 1948；Charkravarty et al. 1956^[129]；Brodie et al. 1957^[13]）すなわちオリブ核のレベルで背外側表層の一定部位（座標；門から3～6mm吻側、正中線から3mm外側、延髄表面からの深さ1mm以下）に、あるいはKasse' et al. (1970)^[72]により報告されている中枢性咳の発生部位すなわち門レベルの外側の一定部位（座標；門から0.7～2.0mm外側、延髄表面からの深さ0.3～1.2mm）に双極電極を挿入し、電気刺激（1msec, 20cps, 0.5～0.3v, 10sec間）により中枢性の咳を惹起した。末梢性の咳は気管分岐部粘膜の機械刺激および上喉頭神経の電気刺激（1msec, 20cps, 0.2～0.3v, 10sec間）により起した。^[25]

V 上喉頭神経刺激で誘発される反回神経の evoked potential および burst 状 discharge への影響

上喉頭神経に単発刺激を加えると同側の反回神経から多相性の evoked potential が得られる。次に頻数刺激を加えた場合はburst状dischargeが得られる（Eyzaguirre et al. 1963^[34]；森ら, 1971^[96]；Mori et al. 1975^[101]）。Isoaminileがこれら evoked potentialあるいはburst状dischargeに対してどのような影響を与えるかを調べた。

体重2～3kgのネコ5匹を使用した。Halothane麻酔下に脳定位固定装置に固定し、上喉頭神経、反回神経を露出し切断した。Halothane麻酔を中止し、gallamineを投与して不動化し、人工呼吸下に実験した。上喉頭神経の中枢側断端を双極白金電極上に置き、単発刺激（1msec, 20cps, 0.1～0.5v, 5sec間）を加え、反回神経に誘発される evoked potentialまたはburst状dischargeを同神経の中枢側断端から白金双極電極で誘導し、ブラウン管オシロスコープにて観察し、記録した。

Ⅵ 呼吸中枢に対する影響

Codeine などの麻薬性鎮咳薬は、鎮咳効果とともに呼吸抑制もあらわれる。これは呼吸中枢抑制作用の一部として、あるいはより少量で「咳中枢」を抑制する。Isoaminile の鎮咳有効量で呼吸中枢にどのような影響を与えるかを検討した。

体重 2.5~3.0kg のネコ 4 匹を使用した。Halothane 麻酔下に脳定位固定装置に固定し、呼吸中枢活動に影響を与える求心性インパルスを遮断 (deafferentation) するために、両側の洞神経をまた両側迷走神経を中頸部で切断した。頸動脈洞とその周辺には、念のため局所麻酔薬を適用した。さらに丘間切断 (mid-collicular transection) 後、上丘を含む上位脳を悉く除去して上位脳からの影響を除いた。横隔神経を頸部で露出し、なるべく末梢側で切断、中枢側断端を双極白金電極上に置き自発放電を誘導し、ブラウン管オシロスコープにて観察し、連続記録した。この横隔神経自発放電を呼吸中枢ニューロンの活動の指標として、isoaminile の鎮咳有効量を静注した際の呼吸中枢への影響をしらべた。

一方、実験Ⅳと同時に Pitts et al. (1939)^[114] のいわゆる吸息中枢 (座標; 門から 2~3 mm 外側、延髄表面からの深さ 3~4 mm) を電気刺激 (1 msec, 50 cps, 3~6 V, 10 sec.) し持続性吸息反応 (sustained inspiration) を誘発した。末梢性咳 (気管粘膜の機械的刺激および上喉頭神経電気刺激) および中枢性咳 (expiratory pacemaker area の電気刺激) が抑制されている際この持続性吸息反応がどのような影響をうけるかを検討した (3 例)。

VII 遠心性経路への作用

鎮咳薬の作用点がいわゆる「咳中枢」そのものであることを決定するには、求心性経路のみならず遠心性経路の抑制が関与していないことを証明しなければならない。このため頸髄前側索の遠心性経路 (呼吸の遠心路として下行すると推定される) を電氣的に刺激して起る呼吸筋の収縮を指標として検討した。

体重 1.8~2.5kg の pentobarbital 軽麻酔 (Na 塩 20 mg/kg, 腹腔内) ネコ 4 匹を使用した。脳定位固定装置に固定し、laminectomy により第Ⅰ~第Ⅲ頸髄を露出した。第Ⅱ頸髄側索に刺激用浮遊電極を刺入して、電気刺激 (1 msec, 50 cps, 0.1~0.2 V, 10 sec 間) を加え呼吸筋の収縮を起こさせ、この収縮を胸壁および腹壁の pneumograph によって煤紙上に描記した。

VIII 除脳の影響

脳幹のいわゆる「咳中枢」は上位中枢の支配をうけており、この影響で咳の強さが増強あるいは減弱されることがある。そこで上位中枢の影響を除去するために四丘体の上丘・下丘間を切断後、除脳した。その前後における鎮咳効果に差異があるか否かを検討した。

体重 3~4 kg の pentobarbital 軽麻酔 (Na 塩 20 mg/kg, 腹腔内) ネコ 7 匹を使用した。あらかじめ a) 気管分岐部の機械的刺激^[59] (3 例)、あるいは b) expiratory pacemaker area の電気刺激^[11] (4 例) により誘発した咳に対する isoaminile の作用をしらべた。次いで丘間を切断し、上丘を含めて上位の脳を悉く掻き出した。2~3 hr 経過し手術の影響が去った後、前と同量の isoaminile を投与し、除脳により鎮咳効果がどのように影響を受けるかを検討した。

IX Stretch receptor への影響

咳反射に影響する末梢性因子として終末細気管支壁にある stretch receptor の作用が考えられる (Bucher, 1956, 1958)^{[14][16]}。その求心性インパルスは迷走神経を介して脳幹の呼吸中枢に働き、正常呼吸の深さを調節する (Hering-Breuer 反射) のみならず、咳の強さにも関係する。Bucher (1956, 1958)^{[14][16]} によれば、咳の強さつまり呼吸の強さは先行する吸息の大きさによって左右され、吸息が大きくなればある程度呼吸は強くなる。したがって stretch receptor を選択的に麻酔するような薬物は、当然求心性インパルスの発生を抑制し、鎮咳効果を発揮する。Isoaminile の鎮咳作用にこのような機序が関与しているかどうかを検討した。

体重 2～3kg の pentobarbital 軽麻酔 (Na 塩 20mg/kg, 腹腔内) ネコ 4 匹を使用した。人工呼吸下に開胸し, 両側横隔神経を切断した。迷走神経幹をできるだけ上頸部で切断し, 末梢側の神経を数本の束に分け, そのうちの一本を Ag-AgCl 電極上に置き, 肺拡張によって生じる stretch receptor からのインパルスを誘導し, ブラウン管オシロスコープにて観察し, 連続記録した。同時に第Ⅱ誘導による心電図も観察記録した。人工呼吸による呼息, 吸息を stretch recetor インパルスと同期するため, 気管カニューレ側管に連結した低圧用 transducer により気管内圧の変化を電気変換し, 同一ブラウン管オシロスコープにて観察し, 記録した。

X 気管支筋に対する作用

咳発作時には気管支筋は収縮して気道内腔をせばめ, 気流を加速し咳の強さを増す。また, Salem and Aviado^[123] (1964) によれば気管支筋収縮は咳反射の効果器管の反応としてではなく, 咳を起す trigger としての役割を果たしているという。いずれにせよ気管支筋緊張を緩解させる薬物は咳に対して抑制的に作用する。Isoaminile の鎮咳作用にこの機序が関与しているか否かを検討した。

Urethane 麻酔 (1.2 g/kg, 腹腔内) ウサギ 6 羽を使用し, Jackson 法^[49] (1917) によって生体気管支筋の緊張状態を記録し, isoaminile の単独作用および histamine・HCl (5～15 μg/kg, 静脈内) により惹起した気管支筋収縮に対する作用を検討した。

第 2 節 実験成績

I 薬物投与経路の相違による有効量の比較

成績を Table 4-1 に示す。ほぼ同程度の効力をあらわす量の比は, [投与経路] 大腿静脈: 総頸動脈: 椎骨動脈: 小脳延髄槽 = [用量 mg/kg] 4.8 : 2.4 : 1.2 : 0.06 であった。静注時の用量を 1 とした場合, 上記投与量の比率を求めると, 1 : 1/2 : 1/4 : 1/80 となった。すなわち, 中枢に直接到達する経路に投与した場合, 静注よりはるかに少い量で同一効果をあらわし得る。一方, 中枢性鎮咳薬である codeine・H₃PO₄ について求めた比率は 1 : 1/4 ~ 1/8 : 1/8 ~ 1/12 : 1/60 ~ 1/80 であった。Isoaminile のそれは codeine に近いといえる。

Table 4-1 Comparison of equi-active doses in antitussive effect of isoaminile administered via four different routes.

Route Dog No.	Femoral vein				Common carotid artery				Vertebral artery				Cisterna cerebelli medullaris			
	Dose mg/kg	Antitussive effect			Dose mg/kg	Antitussive effect			Dose mg/kg	Antitussive effect			Dose mg/kg	Antitussive effect		
		D1)	A2)	F3)		D	A	F		D	A	F		D	A	F
1	8.0	65	90	75	4.0	30	75	65	2.0	20	95	75	0.16	80	100	100
2	4.0	25	90	65	2.0	25	55	55	1.0	20	35	40	0.04	40	100	100
3	4.0	25	40	80	2.0	25	30	50	1.0	25	40	50	0.04	30	20	50
4	4.0	25	20	50	2.0	25	90	70	1.0	20	40	40	0.04	45	70	70
5	3.0	40	65	30	1.5	30	35	50	0.75	20	40	55	0.06	50	85	70
6	5.0	25	65	65	2.5	25	50	40	1.25	25	80	80	0.05	40	75	45
7	6.0	15	20	45	3.0	25	90	75	1.5	25	70	80	0.06	30	70	75
Mean	4.8	31.4	55.7	58.7	2.4	26.4	60.7	57.8	1.21	22.1	57.1	60.0	0.064	45.0	74.2	72.8
±S.E.	±0.58	±5.77	±10.42	±6.20	±0.29	±0.85	±8.65	±4.38	±0.14	±0.93	±8.44	±6.30	±0.015	±5.97	±9.49	±7.54

Ratio of equi-active dose(mg/kg) Vein : Common carotid artery : Vertebral artery : Cistern = 4.8 : 2.4 : 1.21 : 0.06

Tested by coughing dog method (pentobarbitalized)

- 1) Duration of antitussive effect (min)
- 2) Decrease in amplitude of coughs (%)
- 3) Decrease in frequency of coughs (%)

II 気管粘膜内の知覚受容器に対する作用

咳嗽猫法における isoaminile の 50% 鎮咳量 AtD₅₀ 値 (静注) は 1.1 mg/kg である。この量の約 4.6 倍に相当する 5.15mg/kg を静脈内に投与しても, 上喉頭神経の誘発電位は全く影響をうけなかった (Fig. 4-2)。

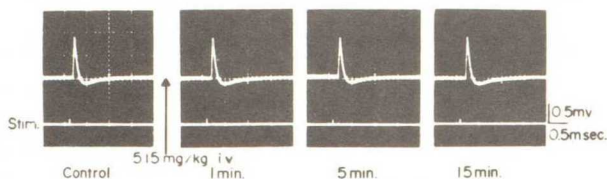


Fig. 4-2 Effect of isoaminile citrate on the sensory receptor in the tracheal mucosa
The mucosa of the tracheal wall in pentobarbitalized cat was stimulated electrically and the evoked action potential from the peripheral stump of the cut superior laryngeal nerve was recorded.
The action potential of the superior laryngeal nerve was not influenced by isoaminile citrate 5.15mg/kg, i.v.

kg)まで増量して静注したがほとんど影響を与えなかった (Fig. 4-3)。実験終了後電極の尖端の位置を確認したところ、すべて孤束核内にあった。

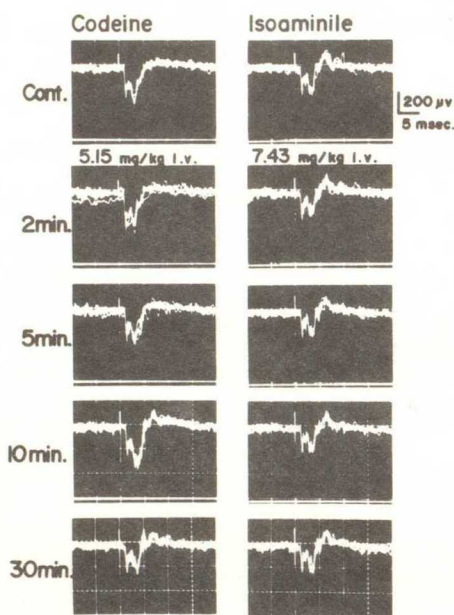


Fig. 4-3 Actions of isoaminile and codeine on the evoked potentials in the solitary tract nucleus by stimulation of the ipsilateral superior laryngeal nerve in a cat. Neither isoaminile nor codeine caused significant changes in the potentials even if much larger doses than those showing a definite antitussive effect were administered.

burst 状放電に対しては、isoaminile 2mg/kg は 5 例中 2 例において 5 min 後に放電を軽度抑制し、15~20 min 後に回復した。5 mg/kg では 5 例全例において放電頻度、電位を著明に減少させ、作用は 40~60 min 間持続した (Fig. 4-5A)。Codeine, H₃PO₄ では 2mg/kg で 5 例中 3 例に軽度の抑制、5 mg/kg では 5 例全例に強い抑制がみられ (Fig. 4-5B), isoaminile と質的量的にほとんど同じ抑制作用を示した。

VI 呼吸中枢に対する影響

Isoaminile 5mg/kg までの量を静注したが、4 例全例において横隔神経の自発放電に全く影響を与えなかった (Fig. 4-6A)。また、対照薬 codeine, H₃PO₄ は AtD₅₀ 値に達しない 2 mg/kg で、すでに 4 例中 3 例

III 知覚インパルスの求心性経路に対する作用

麻酔下、不動化のいずれの場合においても、単発刺激後 1~1.2 msec に第 1 相の negative deflexion, 次いで 2~5 msec 後に第 2 相の negative deflexion が記録された。第 1 相の deflexion は 200 cps の高頻度刺激にも応答したが、第 2 相の deflexion は 50 cps 以上の高頻度刺激では電位は減少し、100 cps ではほとんど消失した。この両電位に対し、isoaminile は 7.43 mg/kg, codeine.

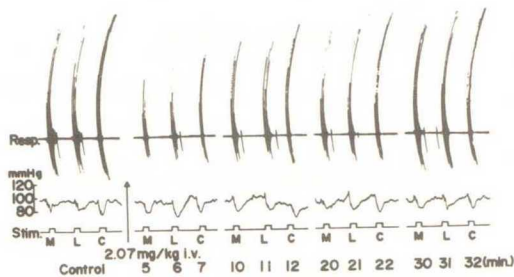
H₃PO₄ は 5.15 mg/kg (AtD₅₀ 値は 2.4 mg/

IV 末梢性および中枢性に誘発した咳に対する作用

機械的刺激あるいは上喉頭神経電気刺激によって起した末梢性の咳は isoaminile 2.07 mg/kg 静注で 8 例全例において抑制された。すなわち、咳曲線の振巾は 20~50%, 頻度は 15~50% 減少し、この変化は 20~50 min 後に回復した。一方、中枢性の咳も末梢性の咳とほぼ同程度に抑制され、回復の経過もほとんど一致していた。すなわち isoaminile は中枢性に惹起した咳を末梢性に起した咳と同様に抑制した (Fig. 4-4)。

V 上喉頭神経刺激で誘発される反回神経の evoked potential および burst 状 discharge への影響

単発刺激で惹起された evoked potential に対して isoaminile 2~5 mg/kg 静注は全く影響しなかった。これは対照薬 codeine の 2~5 mg/kg 静注の場合も同様で全く作用が認められなかった。これに反し頻数刺激による



ig. 4-4 Actions of isoaminile on peripherally- or centrally-induced cough responses in a cat
The coughs were peripherally induced by mechanical stimulation of the tracheal mucosa (M) and by electric stimulation of the superior laryngeal nerve (L), whereas the coughs were centrally induced by electric stimulation of the region just adjacent to the obex of the medulla (C) Isoaminile (2.07mg/kg, i.v.) effectively depressed the central as well as peripheral coughs
Resp.: Intra-tracheal pressure (expiration recorded upwards). Blood pressure in mmHg
Stim.: Stimulation
Numerals at the bottom show the time in minutes after drug administration

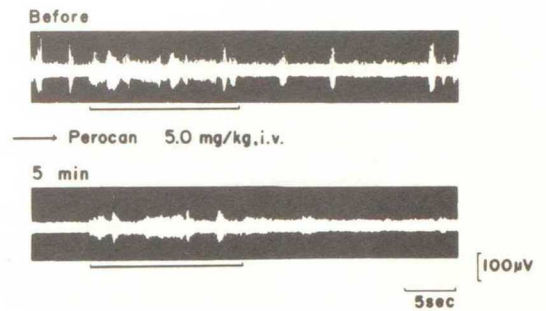


Fig. 4-5A Action of isoaminile on the burst discharge of the recurrent nerve induced by electric stimulation of the superior laryngeal nerve in a cat. Isoaminile (5mg/kg, i.v.) significantly diminished the discharge and the action was almost as potent as that of codeine. The bars show the duration of stimulation (1 msec, 20cps, 0.2V).

において自発放電の頻度をわずかに減少させ、5mg/kg (A tD₅₀ 値の2倍)では4例全例において自発放電の頻度、電位ともに著明に減少させた。この作用は20~30min

間持続し、45min後には投与前の状態に回復した(Fig. 4-6B)。

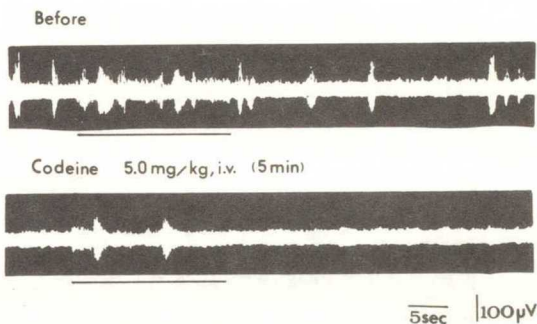


Fig. 4-5B Action of codeine on the burst discharge of the recurrent nerve.
The same cat as shown in Fig. 4-4A. Codeine (5mg/kg, i.v.) remarkably inhibited the discharge.

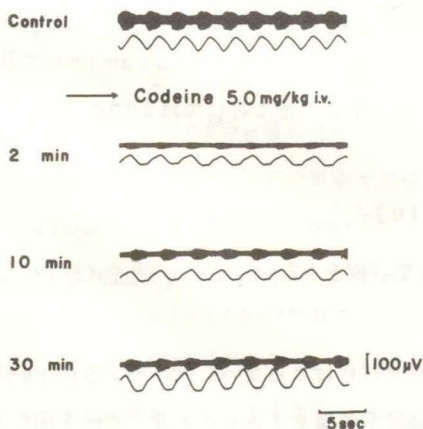


Fig. 4-6B Action of codeine on the spontaneous discharge of the phrenic nerve.
Codeine (5mg/kg, i.v.) showed a clear-cut suppression of the discharge lasting for 30 minutes.

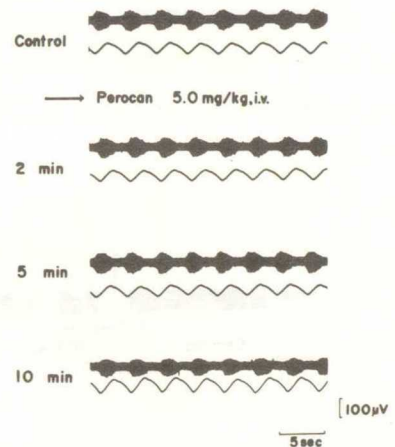


Fig. 4-6A Action of isoaminile on the spontaneous discharge of the phrenic nerve in a deafferented cat. Isoaminile (5mg/kg, i.v.) did not influence the discharge.
Upper record: Spontaneous discharge of the phrenic nerve.
Lower record: Intra-tracheal pressure (expiration recorded upwards).

一方, isoaminile 2.07mg/kgを静注した場合, 実験成績IV.で記載したごとく, 末梢性および中枢性に惹起した咳はいずれも著明に抑制されるにもかかわらず, 持続性吸息反応は全例(3例)殆んど影響をうけなかった(Fig. 4-6C)。

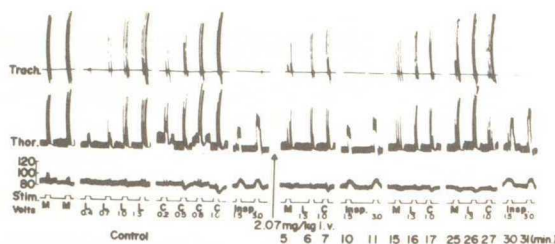


Fig. 4-6C Effects on the peripherally and, centrally induced cough responses, and on the centrally evoked sustained inspiratory response.

Cough responses were induced either by mechanical stimulation of tracheal mucosa (M), electrical stimulation of the superior laryngeal nerve (L) or electrical stimulation of the expiratory pace-maker area at the dorso-lateral part of the medulla (C). The sustained inspiratory responses (Insp.) were induced by electric stimulation of the inspiratory center (Pitts). The caudal part of the cerebellum was removed. Trach.: intratracheal pressure (expiration recorded upwards), Thor.: respiration recorded by a thoracic pneumograph (inspiration recorded upwards), Stim.: stimulation. At the arrow, 2.07mg/kg of isoaminile citrate was given intravenously. Cough responses induced by peripherally and centrally were markedly depressed and returned to the pretreatment state 25-27 min after medication. In contrast to this, no change occurred in sustained inspiratory response. The results show that isoaminile was able to depress both types of peripherally and, centrally induced cough responses with the same dose level, however, it seems not to exert marked effect on normal respiratory activity, in other words, the antitussive action of isoaminile may be due mainly to a selective suppression of the cough center *per se*.

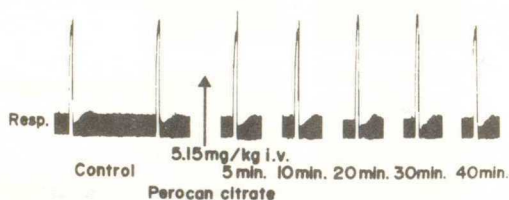


Fig. 4-7 Effect of isoaminile citrate on the descending respiratory pathways in the spinal cord

The magnitude of contraction of respiratory muscles induced by stimulation of the descending respiratory tract in the upper cervical cord was not influenced by isoaminile citrate 5.15mg/kg, i.v.

作用がみられ、5mg/kgでは6例中4例、

8mg/kgでは6例全例において完全な緩解作用を示した (Fig. 4-10)。

対照薬の diphenhydramine・HCl は histamine による筋収縮を 0.2mg/kg で完全に防禦し得た。

第3節 小括ならびに考察

作用機序を追求する場合まず中枢性か、末梢性かの大体の見当をつけなければならない。既述のように isoaminile の投与経路の相違による鎮咳効果を比較してみると静注時の鎮咳有効量を1としたとき、これと同程度の効果をあらわすためには、総頸動脈内投与で $\frac{1}{2}$ ，椎骨動脈内で $\frac{1}{4}$ ，特に小脳髄槽内投与では $\frac{1}{80}$ で充分であった。この用量比は codeine のそれとほぼ同じで、これで一応 isoaminile の鎮咳作用は codeine と同様に中枢性と見てよい。さらにこの推定を確証するために、咳反射の経路に対する作用を順次しらべてみた。

VII 遠心性経路への作用

Isoaminile 5.15mg/kgまでの量を静注したが、4例全例刺激閾値、呼吸筋収縮高のいずれにも全く影響はみられなかった (Fig. 4-7)。

VIII 除脳の影響

Isoaminile 2.07~2.48 mg/kg 静注の鎮咳作用は、除脳前後ではほとんど相違がみられず、除脳による影響はなかった (Fig. 4-8)。

IX Stretch receptor への影響

Isoaminile 5.15mg/kgまでの量を静注したが、stretch receptor インパルスにはほとんど変化がなかった (Fig. 4-9)。

また、心電図にも変化がみられなかった。一方、stretch receptor を選択的に麻酔し、求心性インパルスの発生を抑制することにより鎮咳効果をあらわすと考えられている benzonatate (Tessalon[®])^[14] は、3.0mg/kg (=AtD₅₀値)の静注により、投与3~10min間 stretch receptor インパルスを消失させるか、あるいはその振幅を減少させた (Fig. 4-9)。また心電図にも一過性的変化、すなわち、PQおよびQRSの延長があらわれ、心拍数減少がみられた。

X 気管支筋に対する作用

Isoaminile 8.0mg/kgまでの量を単独静注したが気管支筋の緊張状態には何らの影響もなかった。一方、histamineで惹起した気管支筋収縮に対しては2.0mg/kgから緩解

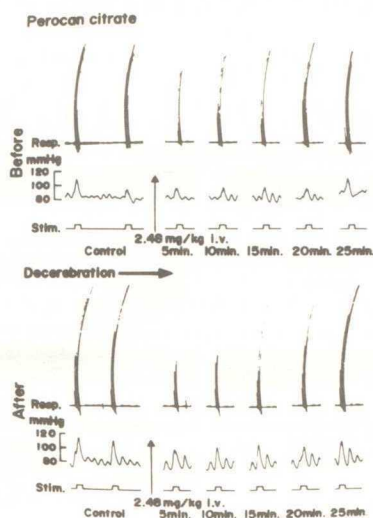


Fig. 4-8 Influence of decerebration

Antitussive effect of isoaminile citrate was determined using mechanical stimulation of the tracheal mucosa. The antitussive effects before and after the decerebration were compared, but no discernible changes in the effect or in duration of the effect were observed.

1) 気道粘膜内に存在する咳反射の receptor に対する作用は、isoaminile には procaine·HCl に匹敵する局所麻酔作用があるため、気道粘膜に局所的に適用する場合には当然 receptor は麻酔されるであろうが、静注ではネコの 50% 鎮咳量の 5 倍近くの量を投与しても全く影響はあらわれないので、receptor が作用点である可能性はない。

2) 上喉頭神経を刺激し、延髄孤束核にみられる電位変化を指標として、isoaminile が求心路に働いて鎮咳効果をあらわすか否かをしらべてみた。周知のように、咳の求心路である上喉頭神経は孤束核において、次のニューロンに接続する。本実験にみられた 2 つの相の電位変動は、実験成績に記載した性質からみて、Porter (1962, 1963) の推論のよ

うに第 1 相は presynaptic potential, 第 2 相は postsynaptic potential と考えられる。つまり、本実験の場合、上喉頭神経が孤束核内で 1 ケのシナプスをつくるためにあらわれる電位変化をあらわしていると考えられるが、このシナプスに対して isoaminile は AtD_{50} 値の約 7 倍量、codeine も 2 倍量を投与しても全く変化なかったので作用点は孤束核よりさらに中枢に近い部位と推測される。

3) 意志による咳の発生および抑制を支配する脳幹より上位の中枢、また肺 stretch receptor インパルスによって咳の強化を来す機構が、isoaminile の鎮咳作用機序と何らの関係もないことは、実験 8 および 9 より明らかである。すなわち、四丘体上丘を含めて上位の脳を悉く除去した前後におけるネコの鎮咳効果にほとんど差がないこと、また stretch receptor を選択的に麻酔することにより鎮咳効果をあらわす benzonatate が確実に stretch receptor インパルスを抑制するにもかかわらず、同一動物において isoaminile は全く抑制しなかったことから実証された。

4) 咳反射の遠心路は、正常呼吸筋支配の前角 motoneuron に伝えられるものと推定される。この遠心路および骨格筋に至るまでの経路が抑制されると咳はもちろん、正常呼吸も抑制される恐れがあり、このような作用をもつものは勿論好ましくない。ところで、頸髄側索内呼吸経路の電気刺激によって起こる呼吸筋の収縮の閾値も、収縮高も isoaminile の AtD_{50} 値の 4.6 倍に相当する量を投与しても全く影響はなかった (実験 7)。

他の遠心路の効果器管としての気管支筋はその収縮によって気道内腔の狭搾を来し、気流を加速し咳を強化する。Salem and Aviado (1964) によると、気管支筋収縮は咳反射の結果として起るのではなく、咳発生の trigger として働くというが、いずれにせよ気管支筋収縮を阻止することが鎮咳的に作用することは疑う余地はない。isoaminile の単独投与では気管支筋に対しては全く作用しない。しかし histamine で起した収縮に対しては緩解作用があるが、diphenhydramine の 0.2 mg/kg に比べて、5 mg/kg を要するところから、たいした効果は期待できない (実験 10)。

以上から、isoaminile は咳反射の求心路、遠心路、調節系のいずれに対しても、鎮咳効果を明確に説明し得る成績は得られず、結局、作用点は延髄の「咳中枢」でなければという推論に達した。さて、最後に「咳中枢」に対する作用を実証しなければならない。ところで「咳中枢」が延髄に存在することについては疑う余地はないが、

その詳細な局在, 中枢ニューロンの性質, 呼吸中枢との関連などについてはほとんど判っていないので, 間接的に証明するより仕方がない。

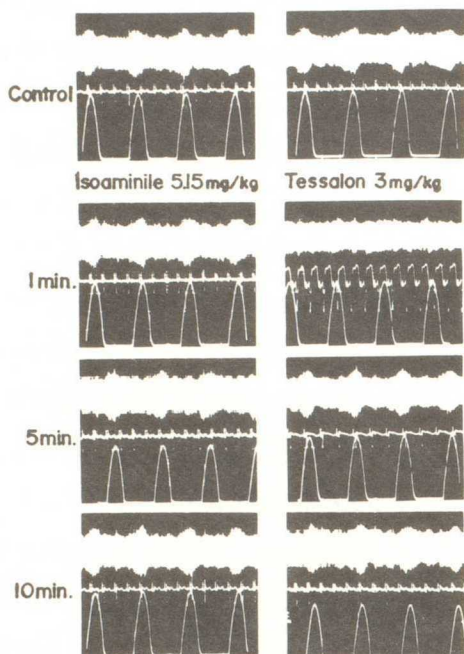


Fig. 4-9 Actions of isoaminile and benzonatate on the stretch receptor impulses recorded from the vagus in a cat. Isoaminile (51.5mg/kg, i.v.) little affected either the impulses or ECG, whereas benzonatate (Tessalon®) (3.0mg/kg, i.v.) apparently diminished the impulses and also significantly influenced ECG. Upper record: Stretch receptor impulses. Middle record: ECG. Lower record: Changes in intra-tracheal pressure produced by artificial ventilation (inspiration recorded upwards).

[11] 1948; chakravarty et al. [18] 1956; Brodie et al. [13] 1957) は Mori et al. [97] (1972), 森ら [99] (1973a) によれば延髄内を通過する迷走神経線維を刺激している可能性が大きく, また Kasé et al. [72] (1970) のいう obex レベルで直外側の刺激部位も, 解剖学的には孤束核にはほぼ一致しており, 恐らく核内で作られるシナプス後線維を刺激しているものと推定され, Borison の場合よりさらに「咳中枢」のニューロンに近いが, 中枢ニューロンそのものを刺激したとは言えないので, 本実験もまた「咳中枢」を作用点とするための決め手とはなり得ない。

ここで, 従来の咳中枢ニューロンについての研究を願ってみよう。Engelhorn and Weller [30] (1965) は, 疑核尾側近傍の網様体呼吸ニューロン群のなかで, 正常呼吸時には全く silent であるが, 上喉頭神経刺激時のみ放電するニューロンを見出し, Eβ と命名した。Codeine, dextromethorphan, noscapine, fominoben はこのニューロンのスパイク数を減少させた (Engelhorn et al. [31] [32] 1966, 1973)。Engelhorn et al. [30] [31] [32] はこれが中枢ニューロンであろうと考えている。森ら [98] (1972, 1973b) は疑核尾側に局在する呼吸ニューロン内に, 同じく上喉頭神経刺激に応答する介在ニューロンを見つけ, Aニューロン (A-neuron) と命名した。Codeine, oxymetebanol は上喉頭神経刺激によって誘発されるこのニューロンの burst 放電を抑制することを報告している。

これらのニューロンを果して「咳中枢」のニューロンとみるべきであるか否かについては, 今後の検討をまたね

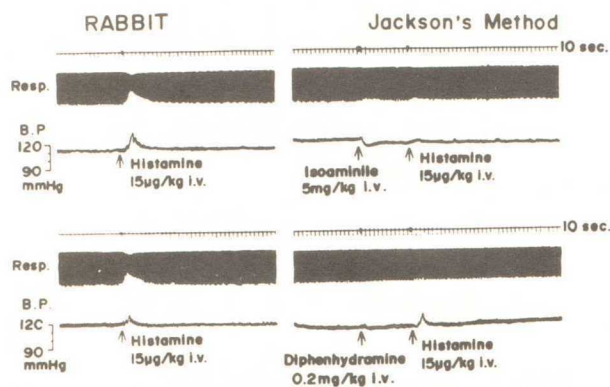


Fig. 4-10 Actions of isoaminile and diphenhydramine on histamine-induced constriction of the bronchial muscle in a rabbit. Pretreatments with isoaminile (5mg/kg, i.v.) as well as diphenhydramine (0.2mg/kg, i.v.) could inhibit the constriction of the muscle induced by histamine (15 µg/kg, i.v.). Resp.: Changes in intra-tracheal pressure produced by negative pressure artificial ventilation (expiration recorded upwards). B.P.: Blood pressure in mmHg

実験 4 は, 延髄の一定部位の電気刺激によって起こした中枢性の咳, 末梢刺激で起こした咳の両者に対して isoaminile が同量で同程度に抑制することから, 「咳中枢」の抑制を推定している。しかし延髄の刺激部位として用いた Borison の expiratory pacemaker area (Borison,

ばらないので、実験4と同じく、間接的証明の域を出ないが、上喉頭神経刺激によって誘発される反回神経の放電に対する isoaminile の作用をみることにより作用点を推測することにした。

上喉頭神経に単発刺激を加えると、同側の反回神経に6～9msecの潜時をもつ多相性の電位が発生した。これは上喉頭神経→孤束核→反回神経の経路で形成される。isoaminileは50%鎮咳量の約5倍に相当する量の5mg/kgでこの誘発電位に全く影響を与えなかった。すなわち、これだけの量によってもこの経路には作用しないことを示している。つぎに、頻数刺激を加えるとburst状放電が誘発されたが、これは上述の孤束核→疑核間に介在する統合回路を経て形成されると考えられるが、codeineによって放電は減少し、isoaminile 2～5mg/kgでも、質的量的に全く同様な抑制作用をあらわした。恐らくcodeineもisoaminileもこの統合回路を作用点とし、これが「咳中枢」と呼ぶべき部位であろう。

このようにisoaminileの咳抑制の作用点はcodeineと同じと思われるが、作用機序が異なることは明らかである。何故なら、codeineの鎮咳作用はlevallorphanによって拮抗されるが、isoaminileはされないからである。さらに重要な相違点は呼吸中枢に対する態度である。Deafferentateしたネコの横隔神経の自發放電を呼吸中枢活動の指標とした場合、codeineはAtD₅₀値以下の量ですでに放電頻度を軽度ながら減少させ、AtD₅₀値の2倍量の5mg/kgでは著明に放電の頻度、電位をともに減少させ、この作用は45min後に消失した。これに反して、isoaminileはAtD₅₀の約5倍量の5mg/kgまでを静注したが、全く影響しなかった。また、Pitts et al.(1939)^[114]が指摘した吸息中枢を電気刺激した際惹起される持続性吸息反応は、末梢性咳、中枢性咳が著明に抑制された同一動物において殆んど影響されなかった。

この事実から、isoaminileはcodeine,morphineのように呼吸中枢と「咳中枢」の抑制が平行するのではなく、呼吸中枢とは関係なく、咳の中枢機構のみを抑制するものと推定される。

第4節 結 論

新規鎮咳薬 isoaminile citrate (Perocan[®])の鎮咳作用の作用点を追究して次の結論に達した。

- 1 中枢、特に脳幹に直接到達するような経路に投与すると、静注量よりはるかに少量で同程度の鎮咳効果をあらわし得た。この成績より作用点が中枢であることが推定される。
- 2 Procaineに匹敵する局所麻酔作用を有しているが、局所適用以外の投与方法ではa)気道粘膜内の咳のreceptorを、またb)肺のstretch receptorをも麻酔する作用はなかった。
- 3 上喉頭神経刺激で孤束核に誘発され、シナプス後電位と推定される電位はisoaminileによって影響されなかった。この所見と2のa)の所見により、isoaminileは求心路には作用しないことがわかる。
- 4 丘間切断による除脳の前後においてisoaminileの効果は不変であった。故にisoaminileの作用は上位中枢の影響をうけない。さらに、2のb)の知見より肺のstretch receptorによる調節もうけない。これらの知見はisoaminileが調節系を介して作用をあらわすものではないことを示す。
- 5 咳の遠心路、すなわち、脊髄から呼吸筋に達する経路には全く作用しない。
- 6 in vivoの実験で、気管支筋の正常時の緊張には影響しないが、histamineによる収縮をやや多量投与で緩解し得る。

以上の知見を総合すると、isoaminileの作用点は「咳中枢」以外ではあり得ない。さらに2つの所見から、「咳中枢」そのものに作用することを間接的に証明した。

- 7 延髄の一定部位を電気刺激して起こした所謂中枢性の咳を、末梢刺激で起こした咳と同様に抑制する。
- 8 上喉頭神経頻数刺激によって誘発される反回神経のburst状放電を抑制する。すなわち、孤束核一疑核間の統合回路(この中に咳中枢ニューロンがあると推定される)をcodeineと同様に抑制する。

9 Isoaminile が麻薬性鎮咳薬 codeine と異なる点は、麻薬拮抗薬によって拮抗されないこと（第3部・第3章）、呼吸中枢には作用しないことである。

結論として、isoaminile の鎮咳作用は「咳中枢」の抑制によるもので、気管支筋拡張による補助的效果はそれ程大きいとは思えない。

第5部 総括ならびに考察

咳嗽反射（咳発作）は日常最も多く遭遇する病症であり、これを軽減する鎮咳剤は臨床医学、臨床獣医学のみならず畜産学上においても極めて有用である事は周知の事実である。またこれらの領域において確実な臨床効果を発現するものは codeine に代表される麻薬性鎮咳剤であり、その他多くの鎮咳剤の効果は不確実である事もよく知られている。しかし麻薬性薬剤の使用は麻薬取締法に基く取扱上の不便のみならずそれ以上に耐性形成、依存性（身体的、精神的）形成など医用上の厄介な有害作用を随伴すると同時に、薬物乱用、凶悪犯罪等社会的あるいは国家的問題を引起す可能性を有している。

このため、鎮痛薬のみならず鎮咳薬についても非麻薬性で確実に奏効する新薬の開発が古くから社会的にも要求されて来た。今度、著者は Stühmer and Funke (1959)^[147] により新規に合成された α -(isopropyl)- α -(β -dimethylaminopropyl) phenylacetonitril, isoaminile について薬理学的および毒性学的に詳細に検討し、古くからの社会的要求をほぼ満足する、また薬理学的にも興味あるいくつかの新知見を発見した。以下これらの要点について論述する。

鎮咳薬の開発研究上最も重要な事は鎮咳作用を動物を用いて評価する方法を確立する事である。先ずこの点について検討した。評価法の必要条件としては、1) 必要な時にはいつでも容易にかつ確実に咳を起こし得る。2) 刺激の強さを定量的に調節でき、起した咳の強さとその数が実験期間中ほぼ一定で動揺が少ない。3) 得られた実験結果が臨床成績と平行する。4) 操作が簡単で実験経過が記録出来る。5) 麻酔の影響をさける為、無麻酔で実験が可能である。^{[62][75]} 6) 使用動物の個体差を少なくするため、同一動物を繰返し使用できる等を挙げることが出来る。一方、鎮咳作用の評価法については1950年以来非常に数多くの報告があり、現在もおつきつぎと発表されつつある。この事は未だ決定的な方法が確立されていない事を裏付けしているものと思われる。

第1部第1章ではこれらの中から上記必要条件を比較的満していると思われる 1. Kase^{[54][55][56]} により発表された咳嗽犬法（機械的刺激）^[59] 2. 加瀬、由井園 (1959) により発表された咳嗽猫法、（機械的刺激）^[25] 3. Domenjoz (1952) により発表された猫上喉頭神経電気刺激法（電気的刺激）、^[159] 4. Winter and Flataker (1954) により発表されたモルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法（化学的刺激）を選択し、その有用性について比較検討し、以下の結果を得た。

- 1 咳嗽犬法は上記必要条件 1), 2), 4), 5), 6) をほぼ満足する。^{[54][55][56]}
- 2 咳嗽猫法は必要条件 1), 2), 4), 6) をほぼ満足する。^[59]
- 3 猫上喉頭神経電気刺激法は必要条件 1), 2) をほぼ満足する。^[25]
- 4 モルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法は必要条件 5) を満足するが他のいずれの条件も満足しない。すなわち、効力検定法としては咳嗽犬法が最も適当であり、次いで咳嗽猫法、猫上喉頭神経電気刺激法に実用性を認め、モルモット・アンモニア水エアロゾル法は今回実施した条件下では不適当であるという結論に達した。^[159]

第1部第2章では、前章において咳嗽犬法および咳嗽猫法が比較的有用であることが判明したので、はたしてこれらの方法で得られる結果が臨床効果と一致するか否か、すなわち上記必要条件 3) を満足するか否かについて鎮咳剤の基準薬である codeine phosphate, また臨床効果が判明している 2, 3 の麻薬性鎮痛剤や非麻薬性合成鎮咳剤を可能な限り多く評価し、得られた結果と臨床効果の相関性について検討し、以下の結果を得た。

- 1 麻薬性鎮痛剤は臨床使用時に強力な鎮咳作用を有する事はよく知られているが、咳嗽犬法および咳嗽猫法で得られた morphine hydrochloride, dimethylthiambutene hydrochloride, pethidine hydrochloride の 50% 鎮咳有効量 (AtD₅₀ 値) は標準的臨床用量の比率とおおよそ一致する。^{[54][55][56]} ^[59]
- 2 麻薬性鎮咳剤である codeine phosphate, oxymethebanol hydrochloride の本法における AtD₅₀ 値 ^{[54][55][56][59]}

は標準的臨床用量の比率と非常によく一致する。

- 3 非麻薬性鎮咳剤である dextromethorphan hydrobromide, noscapine hydrochloride, tipepidine citrate, picoperidamine hydrochloride, chloperastine hydrochloride, alloclamide hydrochloride, benproperine phosphate の本法における AtD_{50} 値と標準的臨床用量の比率は dextromethorphan (咳嗽犬法) および noscapine (咳嗽猫法) を除き大体一致する。すなわち第1部では、1) 咳嗽犬法は上記必要条件の1)~6)のすべてをほぼ満足し、さらに被検薬の中毒症状を同時に観察出来、ある程度急性毒性、副作用の推測が可能であるなど、鎮咳活性物質の primary screening法および効力検定法として最も優れている。2) 被検体によっては動物種属差を発現する場合も予想される為、咳嗽猫法を併用すれば一層正確な評価が可能であるという結論に達した。

第2部第1章では、以上の結果にもとずき isoaminile の鎮咳作用について詳細に検討した。すなわち、咳嗽犬法では静脈内投与時と経口投与時の AtD_{50} 値を、咳嗽猫法では静脈内投与時の AtD_{50} 値を求め、codeine phosphate, dextromethorphan hydrobromide, noscapine hydrochloride と比較した。さらに猫上喉頭神経電気刺激法、猫延髄電気刺激法においても検討した。また咳嗽犬法では oxeladin citrate, carbetapentane citrate, oxolamine citrate, clobutinol hydrochloride, benzonatate, sodium dibunate, eprazinon dihydrochloride, eprozinol dihydrochloride, 898-CE(hydrochloride), diphenhydramine hydrochloride, tripeleminamine hydrochloride, promethazine hydrochloride, d,l-methylephedrine hydrochloride, d,l-ephedrine hydrochloride, methoxyphenamine hydrochloride, guaiacolglycerol ether を静脈内投与し、 AtD_{50} 値またはその近似値を求め、比較検討し、以下の結果を得た。

- 1 Isoaminile の鎮咳効果はクエン酸塩、シクラミン酸塩のいずれの場合にも大差なく、塩基に換算した AtD_{50} 値で比較すると、咳嗽犬法では codeine の 39~58%, 咳嗽猫法では 216~271%, 猫上喉頭神経電気刺激法では 249~263% に相当し、codeine にほぼ匹敵する。
- 2 既存の鎮咳剤あるいは鎮咳活性物質の多くは、鎮咳用量において明らかな中毒症状を随伴するのに反し、isoaminile はクエン酸塩、シクラミン酸塩のいずれの場合も経口投与時の最高用量 (AtD_{100} 値) においてのみ軽度の振せんを認めたにすぎず、選択性の高い鎮咳活性物質である。
- 3 Isoaminile の鎮咳作用発現機序(作用部位)は以下の理由から「咳中枢」そのものの抑制であろうと推定される。
 - 1) 気道粘膜や上喉頭神経の刺激により惹起した末梢性咳嗽反射と同様、延髄の電気刺激により惹起した中枢性咳嗽反射をも抑制する。
 - 2) 麻酔動物(ネコ)における鎮咳効果が無麻酔動物(イヌ)に比べはるかに強力である。
 - 3) 咳嗽猫法と猫上喉頭神経電気刺激法における AtD_{50} 値が殆んど等しい。
 - 4) 鎮咳用量において呼吸抑制作用を発現しない。

以上、isoaminile は codeine に匹敵する強力な鎮咳作用を有し、しかも選択性の高い安全な鎮咳活性物質であるという結論に達した。

第2部第2章では、前章において isoaminile は中枢性鎮咳活性物質である可能性が示唆された。また多くの鎮咳剤は中枢抑制作用を有することが知られていること等から中枢神経系に対する作用を詳細に検討した。

鎮咳作用と鎮痛作用は密接に関連する事は前述したが、特に isoaminile は麻薬性鎮痛薬 methadone と化学構造上類似性を有しており、この点が本化合物の有用性を判断する上で最も重要な問題である。先ず、d'Amour-Smith 法および Haffner 法により鎮痛作用を有するか否かについて検討した。Isoaminile は morphine 投与時に著

明にみられる挙尾反応を発現し、また50%鎮痛有効量(AD₅₀値)はクエン酸塩の場合120~148mg/kg, s.c., シクラミン酸塩の場合96~105mg/kg, s.c. と算出された。しかし、この作用はmorphine, codeine, pethidine等の麻薬性鎮痛薬の作用機序とは本質的に異なり、脊髓反射の抑制作用に起因する見かけ上の作用である事が以下^{[23][41]}の実験結果からほぼ判明した。1) 本法で有効例が発現する用量では著明な中毒症状(自発運動亢進、後肢の運動麻痺、全身性の振顫、後肢の強直性伸展、間代性および強直性痙攣)や死亡例をみとめる。2) 本作用は麻薬拮抗作用を有するlevallorphanにより何ら影響されない。3) マウスの脊髓反射抑制作用と本作用は用量的にほぼ一致する。4) 脊髓の前根を電気刺激した際後根に誘発される脊髓反射活動電位を指標とした場合、ネコでは10~15mg/kg, i.v. 以上の用量で、イヌでは20mg/kg, i.v. 以上の用量でmonosynaptic action potential, polysynaptic action potentialの双方を減弱する。

次に中枢抑制作用について検討した。isoaminileは大量投与した場合にもマウス、イヌの症状変化を指標とするかぎり、中枢抑制作用を類推させる成績は何ら得られない。しかし中枢抑制薬の代表である麻酔薬hexobarbital sodiumとの併用、すなわちhexobarbitalの催眠効果がisoaminileにより影響されるか否かについて検討したところ、isoaminileは50mg/kg, s.c. 以上の用量ではhexobarbitalによる麻酔時間を著明に延長し、codeineよりも強い麻酔増強作用を有することが判明した。さらに、ウサギを用いた急性脳波実験と慢性脳波実験およびネコを用いた急性脳波実験を企だて、意識水準に対する作用を詳細に検討し、以下の結果を得た。

1) ネコにおいて、isoaminileはAtD₅₀値(1.1~1.3mg/kg, i.v.)よりもはるかに多い5~10mg/kg, i.v. 以上の用量では、「咳中枢」の高位中枢である新皮質、旧皮質、古皮質の自発脳波および中脳網様体高頻度電気刺激により誘発される脳波覚醒反応に影響をおよぼし、意識レベルを低下させる。2) 本作用は、ウサギにおいても10~15mg/kg, i.v. 以上の用量でみとめられる。すなわち、第2部第2章では、isoaminileは鎮咳用量の5~10倍あるいはそれ以上投与した場合に、はじめて中枢神経系に対し抑制的作用を発現する安全性の高い鎮咳活性物質であるという結論に達した。

第3部では、isoaminileが仮に医薬品(鎮咳剤)として使用された場合の有用性ならびに安全性、特に潜在的有害作用について、第1章では薬理学的側面より、第2章では毒性学的側面より、第3章では麻薬性に関して詳細に検討した。

第1章では1) 急性毒性(マウス、イヌ)、2) 中枢作用(抗最大電撃痙攣作用、抗pentetrazol作用、抗tremorine作用)、3) 気管支筋作用(ウサギ、モルモット)、4) 呼吸・血圧作用(ウサギ、イヌ)、5) 上頸神経節と瞬膜に対する作用(ネコ)、6) 心臓作用(カエル・ウサギ)、7) 腸管作用(マウス、ウサギ、モルモット)、8) 子宮筋作用(ラット)、9) 抗アナフィラキシーショック作用(モルモット)、10) 局所麻酔作用(モルモット)について検討し、以下の結果を得た。

- 1 Isoaminileのマウスにおける中毒症状は自発運動亢進、挙尾反応、後肢の運動失調、振せん、間代性および強直性痙攣を主とし、強直性痙攣発作中の呼吸麻痺により死亡する。
- 2 Isoaminileのイヌにおける中毒症状はマウスの場合と類似し、呼吸興奮、振せん、後肢の運動失調、間代性および強直性痙攣を主とし、強直性痙攣発現中あるいはその後の呼吸麻痺により死亡する。
- 3 IsoaminileのマウスにおけるLD₅₀値は、クエン酸塩の場合は静脈内投与：92(♂)~94(♀)mg/kg, 皮下投与：172(♂)~177(♀)mg/kg, 経口投与：425(♀)~450(♂)mg/kgであり、性差を示さない。又シクラミン酸塩の場合は静脈内投与：86(♂)~96(♀)mg/kg, 皮下投与：175(♂)~200(♀)mg/kg, 経口投与：380(♀)~410(♂)mg/kgであり、性差を示さない。又いずれの投与法においても「塩」の相異による差を示さない。
- 4 IsoaminileのイヌにおけるLD₅₀値は静脈内投与法で、クエン酸塩の場合は80mg/kg, シクラミン酸塩の場合は84mg/kgとなり、「塩」の相異による差を示さない。

- 5 Isoaminile のイヌにおける鎮咳作用の安性域は静脈内投与法で、クエン酸塩の場合は $80/80=10.0$ 、シクラミン酸塩の場合は $84/7.7=10.9$ となり、dextromethorphan hydrobromide や noscapine hydrochloride に比較し、はるかに安全である。
- 6 Isoaminile は高用量において明らかな抗痙攣作用ならびに抗振せん (tremor) 作用を示す。
- 7 Isoaminile の呼吸、血圧に対する作用は codeine phosphate に比較しはるかに軽微である。
- 8 Isoaminile は上頸交感神経節および瞬膜収縮に対し影響をおよぼさない。
- 9 Isoaminile は摘出カエル心臓、摘出ウサギ心臓の運動機能に対し、 $1 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ 以下の濃度では殆んど影響をおよぼさない。
- 10 Isoaminile は最少致死量 (MLD) 以下の用量では生体腸管内容輸送能に対し殆んど影響をおよぼさず、また摘出ウサギ腸管の自動運動能に対しても、 $1 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ 以下の濃度では殆んど影響をおよぼさない。このことは codeine phosphate の消化器系、特にその運動機能に対する作用とは全く異っている。
- 11 Isoaminile は摘出ラット子宮の自動運動能に対し、 $1 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$ 以下の濃度では殆んど影響をおよぼさない。
- 12 Isoaminile citrate は in vitro では軽微な抗 histamine 作用 (diphenhydramine の $\frac{1}{50} \sim \frac{1}{100}$)、抗 acetylcholine 作用 (atropine の $\frac{1}{500} \sim \frac{1}{800}$)、抗 barium 作用 (papaverine の約 $\frac{1}{10}$) を有する。
- 13 Isoaminile は、アナフィラキシーショック (IgG 関与) 症状に対し、殆んど影響をおよぼさない。
- 14 Isoaminile は、procaine hydrochloride に匹敵する表面麻酔作用ならびに浸潤麻酔作用を有する。

すなわち、第3部第1章では、isoaminile の薬理学的性質を広範に検討し総合的に判断した結果、鎮咳剤として不都合と思われる作用は何ら得られなかった。むしろ有役な作用 (腸管内容輸送能に対する作用) や好都合と思われる作用 (生体気管支筋の緩解作用、適度な局所麻酔作用) が判明し、既存の鎮咳剤に比較しその有用性をさらに実証した結果となった。

第3部第2章では1) マウス、ラットにおける急性毒性試験、2) ラットに isoaminile を連続28日間 (クエン酸塩) ~ 33日間 (シクラミン酸塩) 経口投与した亜急性毒性試験、3) Isoaminile をラットに138日間およびイヌに180日間連続経口投与した慢性毒性試験を実施し、毒性学的側面より潜在的有害作用ならびに安全性について検討し、以下の結果を得た。

- 1 Isoaminile のマウス・ラット・イヌにおける急性中毒症状は共通性が多く、その主なものは自発運動亢進、振せん、後肢の運動失調、間代性および強直性痙攣である。
- 2 マウスにおける LD_{50} 値は前章における実験結果と大差ない。
- 3 ラットにおける LD_{50} 値は、クエン酸塩の場合は静脈内投与：112 (♂) ~ 119 (♀) mg/kg、皮下投与 234 (♂) ~ 254 (♀) mg/kg、経口投与：486 (♀) ~ 514 (♂) mg/kg であり性差を示さない。一方シクラミン酸塩の場合は静脈内投与：79 (♂) ~ 89 (♀) mg/kg、皮下投与：177 (♂) ~ 181 (♀) mg/kg、経口投与：500 (♂) ~ 510 (♀) mg/kg であり性差を示さない。又いずれの投与法においても「塩」の相異による差を示さない。
- 4 推定常用量の約6.25~7.5倍量に相当する isoaminile をラットに亜急性的投与 (連続28~33日間) した際、a) 飼料摂取量の減少と一致した体重増量の減少、b) 血液検査および血清検査結果の部分的変動等をみとめたものの、剖検所見、病理組織所見には何ら定常的变化を認めない。c) 推定常用量の約50倍量以下の用量を亜急性的連続投与した際には特記すべき変化をみとめない。
- 5 推定常用量の約20~30倍量に相当する isoaminile をラットに慢性的投与 (連続136日間) した際、a) 投与開始後一時的に飼料摂取量の減少と一致した体重増加の減少をみとめたものの血液・血清検査結果、臓器重量、剖検所見には薬物による定常的变化をみとめない。b) しかし病理組織所見では一部に細尿管内出血、肝中心帯の軽

い充血およびうっ血，筋層内小出血，副腎皮質内側部出血等をもとめる。c) 推定常用量の約10倍量以下の用量を連続投与した際には特記すべき変化をみとめない。

6 推定常用量の約1.3～1.5倍量に相当する isoaminile をイヌに慢性的投与（連続180日間）した際、

a) 体重増加，血液および血清検査結果，剖検所見には薬物による定常的变化をみとめない。b) しかし病理組織所見ではラットにおける場合と同様，一部に肝中心帯の軽い充血およびうっ血，肝細胞核の部分的消失，副腎皮質内側部出血，細尿管内出血，脾中心動脈内色素顆粒沈着等をもとめる。c) 推定常用量の約7.5倍以下の用量を慢性的連続投与した際には特記すべき変化をみとめない。

以上要約すると、

1 Isoaminile の急性毒性は使用動物の種属の相違による差異 (species difference) を示さない。

2 Isoaminile をラットに亜急性的投与（連続28～33日間）した際の最大安全量は推定常用量の50～75倍である。

3 Isoaminile をラットに慢性的投与（連続136日間）した際の最大安全量は推定常用量の10～20倍である。

4 Isoaminile をイヌに慢性的投与（連続180日間）した際の最大安全量は推定常用量の7.5～11.3倍である。

5 Isoaminile を長期間連用した際の潜在的有害作用として，食欲不振，体重減少，肝障害，腎障害等が推定される。

すなわち第3部第2章では，isoaminile の潜在的有害作用および安全性について，毒性学的側面より，その使用期間，安全域等総合的に判断し，鎮咳作用を目的として臨床使用する限り，安全性は十分確保出来るであろうという結論に達した。

第3部第3章では，鎮咳剤と密接に関連し，最も厄介な有害作用である麻薬性について動物を用い検討した。すなわち isoaminile の鎮咳作用が codeine, morphine の様なアヘンアルカロイド，あるいはそれから誘導された麻薬性化合物（例えば methadone, pethidine, dimethylthiambutene）と同様の作用機序で鎮咳作用を発現するかどうか，また鎮咳剤として連用した場合，麻薬と同様の副作用を発現するかどうかについて検討し，以下の結果を得た。

1 Isoaminile の鎮咳作用は麻薬拮抗薬 levallorphan により何ら影響されない。

2 Isoaminile の鎮咳作用は長期間連続投与（40日間）した場合にも codeine とは異り耐性を形成しない。

3 Isoaminile の鎮咳作用は codeine 耐性イヌにおいても非耐性イヌと同様に発現し，また，codeine の鎮咳作用は isoaminile を長期間連続投与（30～34日間）したイヌにおいても非投与イヌと同様に発現する。すなわち，isoaminile は codeine との間に交叉耐性を形成しない。

4 イヌに isoaminile を長期間連続投与（40日間）後，isoaminile の投薬を突然中止した場合，isoaminile の代りに levallorphan を代替投与した場合，いずれも禁断症状は誘発されない。

5 ラットに isoaminile を長期間連続投与（77日間）中に，isoaminile の投薬を突然中止した場合，isoaminile の代りに levallorphan を代替投与した場合，いずれも禁断症状（体重減少）は誘発されない。また morphine 依存ラットにおいて，morphine の投薬を突然中止した際誘発される禁断症状は isoaminile の代替投与により全く防止されない。すなわち isoaminile は長期間反復投与した場合にも身体依存性を形成しない。

以上の成績は isoaminile が codeine, morphine 等の麻薬性薬剤とは異った機序により鎮咳作用を発現し，また長期間連用した場合にも耐性や身体依存性を形成する危険性がない事を示唆する。

以上，isoaminile は codeine に匹敵する強力な鎮咳作用を有し，また，薬理学的には選択性が高く，毒性学的には安全性に優れている事が判明した。さらに，codeine や morphine とは作用機序を異にし，非麻薬性であり，有用性の高い新規鎮咳活性物質であることが示唆された。しかし，isoaminile の鎮咳作用発現の作用機作に関しては未だ全く解明されていない。

第4部では、本化合物の作用機作（作用部位）の解明を企だて以下の結果を得た。

- 1 中枢、特に脳幹に直接到達するような経路に投与すると、静注量よりはるかに少量で、同程度の鎮咳効果をあらわし得た。この成績より作用点が中枢であることが推定される。
- 2 Procaine に匹敵する局所麻酔作用を有しているが、局所適用以外の投与方法では a) 気道粘膜内の咳の receptor を、また b) 肺の stretch receptor をも麻酔する作用はなかった。
- 3 上喉頭神経刺激で孤束核に誘発され、シナプス後電位と推定される電位は isoaminile によって影響されなかった。この所見と2の a) の所見より、isoaminile は求心路には作用しないことが判る。
- 4 丘間切断による除脳の前後において isoaminile の効果は不変であった。故に isoaminile の作用は上位中枢の影響を受けない。さらに2の b) の知見により肺の stretch receptor による調節も受けない。これらの知見は isoaminile が調節系を介して作用をあらわすものではないことを示す。
- 5 咳の速心路、脊髄から呼吸筋に達する経路には全く作用しない。
- 6 in vivo の実験で、気管支筋の正常時の緊張には影響しないが、histamine による収縮をやや多量投与で緩解し得る。

以上の知見を総合すると、isoaminile の作用点は「咳中枢」以外ではあり得ない。さらに次の二つの所見から「咳中枢」そのものに作用することを間接的に証明した。

- 7 延髄の一定部位を電気刺激して起こした所謂中枢性の咳を、末梢刺激で起こした咳と同様に抑制する。
- 8 上喉頭神経頻数刺激によって誘発される反回神経の burst 状放電を抑制する。すなわち、孤束核一疑核間の統合回路（この中に咳中枢ニューロンがあると推定される）を codeine と同様に抑制する。
- 9 Isoaminile が麻薬性鎮咳薬 codeine と異なる点は、麻薬拮抗薬によって拮抗されないこと、呼吸中枢には作用しないことである。

以上、isoaminile の鎮咳作用発現の作用機序としては、「咳中枢」の選択的な抑制によるものであり、気管支筋の緩解作用はそれ程寄与していないであろうという結論に達した。すなわち、isoaminile の鎮咳作用が「咳中枢」そのものの選択的抑制に起因するとすれば、逆にいままで述べてきた codeine にも匹敵する強力な鎮咳作用およびその他の薬理的ならびに毒性学的諸作用を容易に理解出来る。またこの事は咳発作の発生原因が末梢、中枢のいずれであろうとも鎮咳効果を發揮出来ることを示唆し、さらに臨床使用時においても codeine と同様あらゆる咳発作に確実に奏効する事を期待させる。

第6部 結 論

本研究を総合し以下の結論を得た。

- 1 咳嗽犬法は、^{[54][55][56]}鎮咳作用評価法としての必須条件をほとんど満し最も優れている。次いで咳嗽猫法、^[59]猫上喉頭神経電気刺激法の順に実用性をみとめ、モルモット・アンモニア水エアロゾル吸入法は今回実施した条件下では不適當である。^[159]
- 2 咳嗽犬法、^{[54][55][56]}咳嗽猫法、^[59]猫上喉頭神経電気刺激法、^[25]猫延髄電気刺激法^[11]における isoaminile の鎮咳作用は、クエン酸塩、シクラミン酸塩いずれも大差なく codeine phosphate にほぼ匹敵し、dextromethorphan hydrobromide, noscapine hydrochloride に比べるとはるかに強力である。
- 3 Isoaminile の鎮咳作用における安全域（イヌの LD₅₀ 値/イヌの AtD₅₀ 値）はクエン酸塩、シクラミン酸塩いずれも10以上であり、codeine に比し小さいが、dextromethorphan, noscapine に比較するとはるかに大きく、選択性および安全性に優れている。
- 4 Isoaminile の鎮咳作用は、a) 麻薬拮抗薬 levallorphan bitartrate により何ら影響されない。b) イ

- ヌに長期間連続投与(40日間)した場合にも耐性を形成しない。c) codeine との間に交叉耐性を形成しない。
- 5 Isoaminile は、a) イヌに長期間連続投与(40日間)後 isoaminile の投薬を突然中止した場合、また isoaminile の代りに levallorphan を代替投与した場合、いずれも禁断症状を発現しない。b) ラットに長期間連続投与(77日間)中に、isoaminile の投薬を突然中止した場合、また isoaminile の代りに levallorphan を代替投与した場合、いずれも禁断症状(体重減少)を発現しない。c) morphine 依存ラットにおいて、morphine の投薬を突然中止した際誘発される禁断症状を全く防止しない。
- 6 Isoaminile のマウス、ラット、イヌにおける主な中毒症状は自発運動亢進、振せん、後肢の運動失調、間代性および強直性痙攣であり共通性が多く、そのLD₅₀値は「塩」の相違による差異、動物の種属の相違による差異(species difference)を示さない。またマウスのLD₅₀値で比較すると、isoaminile の急性毒性は皮下投与法では codeine とほぼ等しいが、静脈内投与法、経口投与法では codeine に比し弱い。
- 7 Isoaminile は高用量(中毒症状発現用量)において鎮痛作用(d'Amour-Smith^[23]法、Haffner^[41]法)を発現する。しかし本作用は codeine, morphine の場合とはまったく異り levallorphan により何ら影響されない。
- 8 Isoaminile は高用量(中毒症状発現用量)において、a) 脊髓マウスの後肢を温水に浸漬した際誘発される後肢の反射性屈曲上反応、b) 脊髓ネコの後根を電気刺激した際、前根に誘発される脊髓反射活動電位(monosynaptic action potential, polysynaptic action potential)を明らかに抑制する。
- 9 Isoaminile は高用量(鎮咳有効量の5~10倍あるいはそれ以上)において、意識レベル低下作用、麻酔増強作用、抗痙攣作用、抗振せん作用など中枢神経系全体に対し抑制的に作用する。
- 10 Isoaminile は生体気管支筋の緊張に影響しないが、histamine dihydrochloride により惹起した気管支筋痙攣に対しては緩解作用を示す。
- 11 Isoaminile は procaine hydrochloride に匹敵する局所麻酔作用を有する。
- 12 Isoaminile の呼吸器系、循環器系、消化器系、自律神経系に対する作用は codeine に比し極めて軽微である。
- 13 Isoaminile の鎮咳作用発現の作用機作(作用部位)は「咳中枢」そのものの選択的抑制であり、気管支筋拡張による補助的効果はそれ程貢献しない。
- 14 Isoaminile をラットに亜急性的投与(連続28~33日間)した際の最大安全量は推定常用量の50~75倍である。
- 15 Isoaminile をラットに慢性的投与(連続136日間)した際の最大安全量は推定常用量の10~20倍である。
- 16 Isoaminile をイヌに慢性的投与(連続180日間)した際の最大安全量は推定常用量の7.5~11.3倍である。
- 以上、本研究の成果は、古くから社会的に要求されていた強力で安全性に優れた非麻薬性新規鎮咳薬 isoaminile (Perocan[®], シクラミン酸塩製剤:昭和44年9月3日許可, クエン酸塩製剤:昭和49年1月12日許可)を開発し、さらに本化合物の作用機作を解明したことである。このことは臨床医学、臨床獣医学、畜産学において貢献するのみならず、1) 麻薬性化合物(基本的化学構造)より新規非麻薬性鎮咳薬(鎮痛薬)の誘導開発、2) 鎮咳作用と鎮痛作用の分離、3) 呼吸中枢と「咳中枢」の分離、4) 「咳中枢」の解明、などの諸観点より生理学、薬理学、毒性学、薬物学および獣医学的にも興味深い新事実を提供し、本領域の今後の発展に寄与するところが少なくないものと思える。

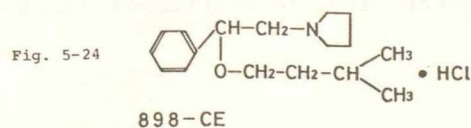
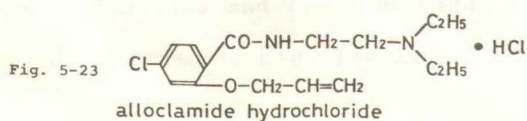
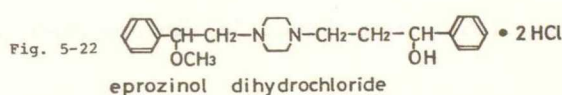
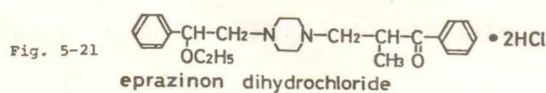
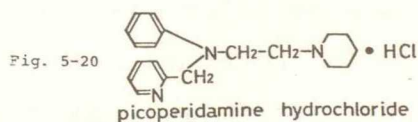
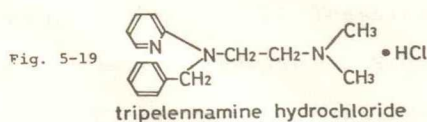
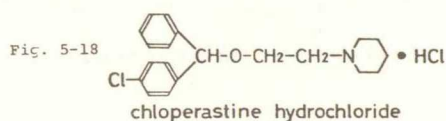
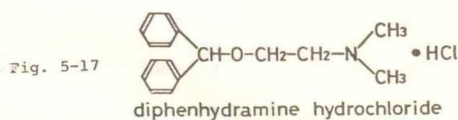
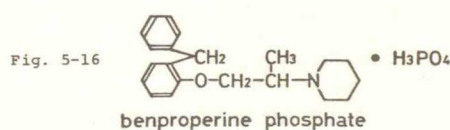
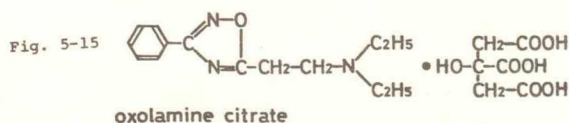
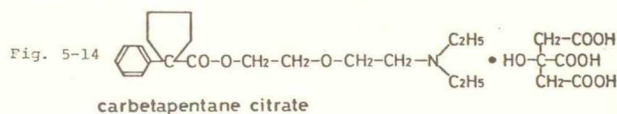
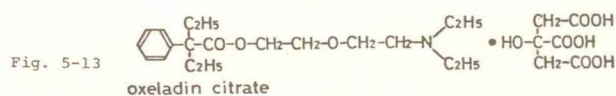
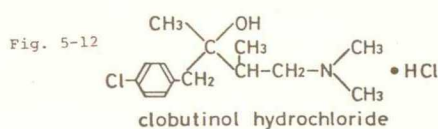
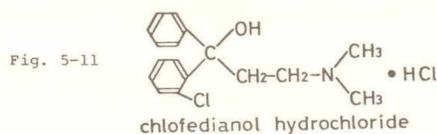
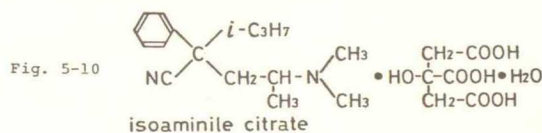
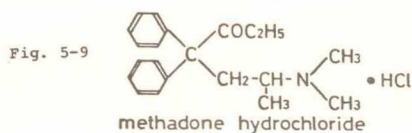
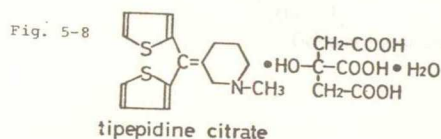
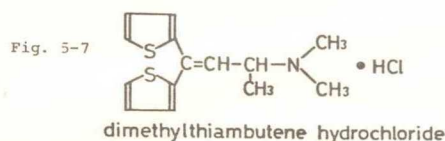
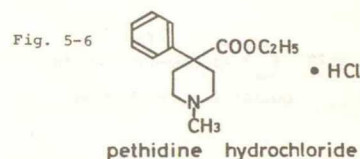
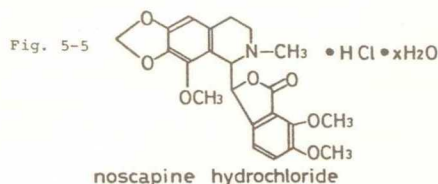
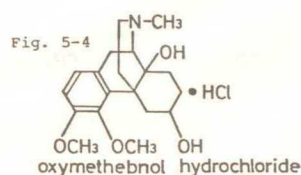
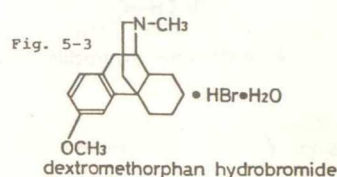
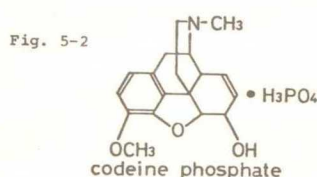
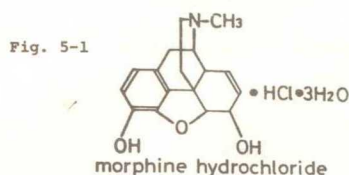
謝 辞

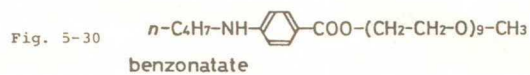
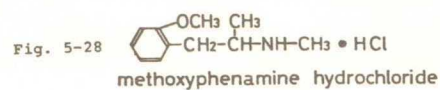
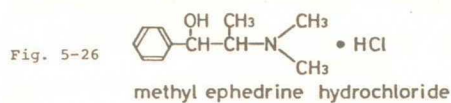
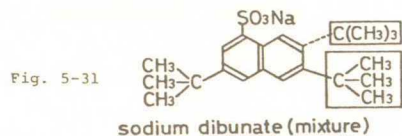
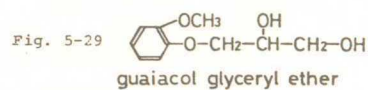
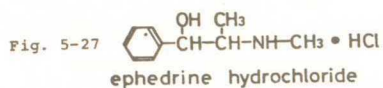
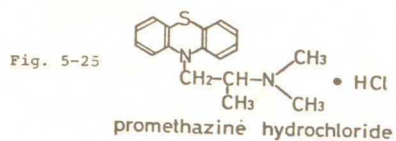
終りに臨み、本論文の作成に関して終始御指導、御校閲を賜った麻布獣医科大学・家畜内科学教授 杉浦邦紀博士に衷心より感謝の意を申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり終始御指導、御鞭撻を賜った熊本大学薬学部・薬物学教授 加瀬佳年博士、同助教授 宮田健博士、同元助教授 由井園倫一博士、および東京医科大学・薬理学教授 渋谷健博士、同助教授 堀部真広博士、ならびに各教室の皆様に衷心より感謝の意を申し上げます。

最後に本研究の機会を賜った東洋醸造(株)・常務取締役研究開発本部長 阿部仁之助博士、同常務取締役研究所長 松田哲郎博士、同取締役研究開発本部次長 渡辺哲夫博士、同研究所次長 早野和夫博士、ならびに実験に協力された同研究所薬理研究室の諸氏に心から謝意を表します。

本研究に使用した鎮咳活性物質の化学構造





参 考 文 献

- [1] D.W. Adamson (1950). Aminoalkyl tertiary carbinols and derived products. Part II 3-amino-1: 1-di-2-thienyl-alkan-1-ols and -alk-1-enes. J. Chem. Soc. 885-890.
- [2] 赤松金芳, 武部虎一, 辰濃尙次郎, 山田澄 (1960). 実験データの推計学的処理. “薬物学実験書”. 広川書店, 東京, P. 65~109.
- [3] R. Baumann (1959). Zur Therapie des Hustens. Arztliche Praxis. 11, 565-566.
- [4] H.J. Bein und K. Bucher (1957). Anästhetische Wirkung an Lungendehungsrezeptoren und anderen nervösen Substraten (Zur Pharmakologie des Tessalon). Helv. Physiol. Acta. 15, 55-62.
- [5] W.H. Benson, P.L. Stefko and D.L. Randall (1953). Comparative pharmacology of levorphan, racemorphan and dextrophan and related methyl ethers. J. Pharmacol. Exp. Therap. 109, 189-200.
- [6] H.A. Bickerman and A.L. Barach (1954). The experimental production of cough in human subjects induced by citric acid aerosol. Am. J. Med. Sci. 228, 156-163.
- [7] H.A. Bickerman (1957). The choice of antitussive agents. “Drugs of Choice 1958-1959”. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 547-571.
- [8] H.A. Bickerman (1967). Antitussive agents. “Drugs of choice 1968-1969”. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 411-424.
- [9] H.A. Bickerman (1974). Antitussive drugs. “Drugs of Choice 1974-1975”. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 399-412.
- [10] J.R.R. Bobb and S. Ellis (1951). Production of cough and its suppression in unanesthetized dog. Am. J. Physiol. 167, 768-764.
- [11] H.L. Borison (1948). Electrical stimulation of the nural mechanism regulating spasmodic respiratory acts in the cat. Am. J. Physiol. 154, 55-62.
- [12] L. Brenner-Gödderz (1959). Peracon in der Praxis Erfahrungen mit einer neuartigen substanz zur Hustenstillung. Medizinische Klinik. 54, 2004-2006.
- [13] D.A. Brodie and H.L. Borison (1957). Evidence for a medullary inspiratory pacemaker Functional concept of central regulation of respiration. Am. J. Physiol. 188, 347-354.
- [14] K. Bucher (1956). Tessalon, ein hustenstillendes Mittel von neuartigem Wirkungsmechanismus. Schweiz. Med. Wochschr. 86, 94-96.
- [15] K. Bucher (1957). Möglichkeiten der Hustenstillung. Schweiz Med. Wochschr. 87, 1087-1089.
- [16] K. Bucher (1958). Pathophysiology and pharmacology of cough. Pharmacol. Rev. 10, 43-58.
- [17] E. Bülbring and I. Wajda (1945). Biological comparison of local anaesthetics. J. Pharmacol. Exp. Therap. 85, 78-84.

- [18] N.K. Chakravarty, A. Matallana, R. Jensen and H.L. Borison (1956). Central effects of antitussive drugs on cough and respiration. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 117, 127-135.
- [19] R. Charlier, M. Prost, F. Binon et G. Deltour (1961). Étude pharmacologique d'un antitussif, le fumarate acide de phénéthyl-1 (propynezyl)-4-propionoxy-4 pipéridine. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 134, 306-327.
- [20] J.Y.P. Chen, H.F. Biller and E.G. Montgomery (1960). Pharmacologic studies of a new antitussive, ALPHA (dimethylaminoethyl)-ORTHO chlorobenzhydrol hydrochloride. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 128, 384-391.
- [21] P. Christoffel und H. Kolberg (1958). Die antitussive Wirkung eines Aminonitrils. *Medizinische Klinik Berl.* 53, 1507-1509.
- [22] P.W. Collins (1970). Antitussives. "Medicinal Chemistry". 3rd ed. Part II. Wiley-Interscience, New York, 1351-1364.
- [23] F.E. D'Amour and D.L. Smith (1941). A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 72, 74-79.
- [24] G.R. De Vleeschhouwer (1954). Contribution a L'Étude pharmacologique et toxicologique du di-terbutyl-naphtalène sulfonate sodique. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 97, 34-53.
- [25] R. Domenjoz (1952). Zur Auswertung hustenstillender Arzneimittel. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 215, 19-24.
- [26] F.P. Doyle and M.D. Mehta (1964). Antitussives. "Advance in drug research". vol. 1. Academic Press, London, 107-159.
- [27] O. Eichler und A. Smiatek (1940). Versuche zur Auswertung von Mitteln zur Bekämpfung des Reizhustens. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 194, 621-628.
- [28] W. Eidmann (1959). Klinische Erfahrungen mit neuen chemischen Substanz auf dem Gebiet der Hustenstillung [α -(isopropyl)- α -(β -dimethylaminopropyl) phenylacetoneitril citrate. *Münch. med. Wschr.* 101, 676-677.
- [29] G.P. Ellis, L. Goldberg, J. Kimg and P. Sheard (1963). The synthesis and antitussive properties of some cyclopentane derivatives. *J. Med. Chem.* 6, 111-117.
- [30] R. Engelhorn und E. Weller (1965). Zentral Repräsentation hustenwirksamer Afferenzen in der Medulla oblongata der Katze. *Pflügers Archiv.* 284, 224-239.
- [31] R. Engelhorn und E. Weller (1966). Der Einfluss von Codeine, Dextromethorphan und Narkotin auf expiratorisch entladende Neurone der Medulla oblongata der Katze. *Arch. Pharmac. Exp. Path.* 254, 170-193.
- [32] R. Engelhorn, G. Trie und E. Weller (1973). Einfluss einer neuen antitussiv und atmungsanregend wirkenden Verbindung auf die Aktivität respiratorischer E β -Neurone in der Medulla oblongata der Katze. *Arzneim.-Forsch.* 23, 305-310.

- [33] A.M. Ernst (1938). Pharmakologische Untersuchungen von hustenstillenden Mitteln. Acta. Brev. Neerl. Physiol. 8, 34-37.
- [34] C. Eyzaguirre and J.R. Taylor (1963). Respiratory discharge of some motoneurons. J. Neurophysiol. 26, 61-78.
- [35] 福田英臣 (1959). 鎮咳薬. 10, 71~75.
- [36] G.L. Floersheim (1959). Über die Rolle der Glottis beim Husten. Helv. Physiol. Acta. 17, 153-165.
- [37] H. Friebel und C. Reichle (1955). Zur Prüfung von zentral hustenstillenden Arzneimitteln. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 225, 85-87.
- [38] L.S. Goodman and A. Gilman (1970). Nonnarcotic antitussives. "The Pharmacological Basis of Therapeutics". 4th ed. The Macmillan Company, London, 271-272.
- [39] A.F. Green and N.B. Ward (1955). The action of analgesics and nalorphine on the cough reflex. Brit. J. Pharmacol. 10, 418-423.
- [40] A. Grollman (1962). The opium alkaloids and other addicting narcotic drugs. "Pharmacology and Therapeutics", 5th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 117-152.
- [41] F. Haffner (1929). Experimentelle Prüfung schmerzstillender Mittel. Deutsche Med. Wochenschr. 55, 731-733.
- [42] S. Hara and S. Yanaura (1959). A method of inducing and recording cough and examination of the action of some drugs with this method. Japan. J. Pharmacol. 9, 46-54.
- [43] H. Hass (1955). Vergleichende Untersuchungen über Analgetica. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 225, 442-452.
- [44] 細谷英吉, 乙部正治 (1958). 白ネズミにおいて薬物に対する addiction に関する研究 (第1報).. Morohine 反復投与白ネズミにおける禁断症状について. 日薬理誌. 54, 120§.
- [45] 細谷英吉 (1974). 麻薬とは何か. "麻薬と人間". 時事通信社, 東京, 3~17.
- [46] H. Isbell and H.F. Fraser (1952). Effects and addiction liabilities of the isomers of the 3-methyl ether of Dromoran. J. Pharm. Exp. Therap. 106, 397-398.
- [47] H. Isbell and H.F. Fraser (1953). Actions and addiction liabilities of Dromoran derivatives in man. J. Pharm. Exp. Therap. 107, 524-530.
- [48] 板垣四郎 (1958). 呼吸器病. "家畜新内科学". 第5刷. 実業図書, 東京, 15~48.
- [49] C. Jackson (1917). "Experimental Pharmacology". C.V. Mosby Co., St. Louis, p.287.
- [50] P.A.J. Janssen and A.H. Jageneu (1957). A new series of potent analgesics (part I). J. Pharm. Pharmacol. 9, 381-400.
- [51] H.H. Jasper and C. Ajmone-Marsan (1956). "A stereotaxic Atlas of the Diencephalon of the Cat". The National Research Council of Canada, Ottawa.
- [52] S.H.J. Johansen, M. Jørgensen and V. Dyrberg (1963). The effect of Pirexyl[®] on normal and depressed respiration. Acta. Pharmacol. et Toxicol. 20, 181-185.
- [53] 上島孝治 (1954). 薬物の鎮痛効果検定に関する研究. 日薬理誌. 50, 550-564.

- [54] Y. Kasé (1952). New methods of estimating cough depressing action. Jap. J. Pharmacol. 2, 7-13.
- [55] Y. Kasé (1954). The "coughing dog" and improved method for the evaluation of an antitussive. Pharm. Bull. 2, 298-299.
- [56] Y. Kasé (1955). Pharmacological studies on cough reflex Part 3 "coughing dog" and its application. Jap. J. Pharmacol. 4, 130-135.
- [57] Y. Kasé, T. Kaku, Y. Yamamoto, M. Tanaka, Y. Takasaki and K. Nagao (1955). 3-piperidyl-1, 1-di(2'-thenyl)-but-1-ene as a potent antitussive. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 3, 394-395.
- [58] Y. Kasé Y. Yuizono, H. Serikawa, S. Yamamoto, T. Yamazaki, T. Fushimizu, N. Katayama, T. Moriya and T. Nozuhara (1958). d-3-dimethylamino-1,1-diphenyl-butyl ethylsulfone as a long-acting antitussive. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 6, 109-111.
- [59] 加瀬佳年, 由井園倫一 (1959). 咳嗽反射の薬理 (第12報), 動物の種類, 麻酔, 実験方法による鎮咳効果の差違について. 日薬理誌. 55, 99§.
- [60] Y. Kasé, T. Yuizono, T. Yamazaki, T. Yamada, S. Io, M. Tamiya and I. Kondo (1959). A new potent non-narcotic antitussive, 1-methyl-3-di(2-thienyl) methylenepiperidine. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 7, 372-377.
- [61] Y. Kasé and T. Yuizono (1959). A contribution of piperidino group to manifestation of antitussive activity. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 7, 378-382.
- [62] 加瀬佳年 (1961). 咳嗽反射の薬理(1). 薬局. 12, 151~156.
- [63] 加瀬佳年 (1961). 咳嗽反射の薬理(2). 薬局. 12, 325~331.
- [64] 加瀬佳年, 由井園倫一 (1961). 鎮咳薬の化学的薬理学的研究 (第1報) 持続性鎮咳薬 d-N.N. 1-trimethyl-3-(ethylsulfonyl)-3, 3-diphenylpropylamine hydrochloride の薬理. 薬学雑誌. 81, 740~747.
- [65] 加瀬佳年 (1963). 咳の薬理. 呼吸と循環. 11, 425~435.
- [66] Y. Kasé, A. Kawasaki, T. Miyata, T. Tsumagari, T. Yuizono and K. Katsukawa (1966). Antitussive activity and other related pharmacological properties of 2-allyloxy-4-chloro-N-(2-diethylaminoethyl) benzamide. Jap. J. Pharmacol. 16, 342-352.
- [67] Y. Kasé, T. Miyata and T. Yuizono (1967). On the site of antitussive action of 1-(2-benzylphenoxy)-2-piperidinopropane phosphate (Pirexyl). Jap. J. Pharmacol. 17, 538-549.
- [68] Y. Kasé (1968) Evaluation of antitussive agents. "Selected Pharmacology Testing Method", Vol. 3. Marcel Dekker, New York, 363-419.
- [69] Y. Kasé, T. Yuizono and G. Kito (1969). The influence of anesthesia on the evaluation of antitussive effect. Jap. J. Pharmacol. 19, 115-124.
- [70] Y. Kasé, T. Yuizono, K. Tachibana, T. Miyata, G. Kito and S. Miyano (1969). Pharmacology of N-(2-picolyl)-N-phenyl-N-(2-piperidinoethyl) amine (TAT-3), a new antitussive agent. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.). 19, 1916-1927.

- [71] 加瀬佳年 (1970). 新しい鎮咳薬. フェルマシア. 6, 505~509.
- [72] Y. Kasé Y. Wakita, G. Kito, T. Miyata, T. Yuizono and M. Kataoka (1970). Centrally-induced coughs in the cat. Life Sciences (Oxford). 9, 49-59.
- [73] Y. Kasé Y. Wakita, T. Yuizono, G. Kito and K. Kikuchi (1970). On the sites of antitussive action of N-(2-picolyl)-N-phenyl-N-(2-piperidinoethyl) amine (TAT-3). Arzneimittel.-Forsch. (Drug Res.). 20, 37-43.
- [74] 加瀬佳年, 由井園倫一, 橘岡臣, 宮田健, 鬼頭剛, 片岡美紀子, 宮野成二 (1970). 新しい鎮咳薬 N-(2-picolyl)-N-phenyl-N-2-piperidinoethylamine hydrochloride (TAT-3) の薬理. 応用薬理. 4, 151~169.
- [75] 加瀬佳年 (1971). 鎮咳薬. “医薬品開発基礎講座 (V), 薬理試験法 (上)”. 地人書館, 東京, 313~360.
- [76] 岸本吉紘, 黒田喜代志, 星野保夫, 長谷川大四郎, 早野和夫, 杉本治良 (1971). Isoaminile citrate ならびに Isoaminile cyclamate 毒性試験. 基礎と臨床. 5, 2212~2247.
- [77] S. Kobayashi, K. Hasegawa, M. Mori and H. Takagi (1970). Pharmacological studies on a new specifically potent antitussive agent, 14-hydroxydihydro-6 β -thebainol-4-methyl ether (Oxymethebanol). Arzneimittel.-Forsch. (Drug Res.). 20, 43-46.
- [78] H. Konzett and E. Rothlin (1954). Effect of narcotine on cough reflex and bronchial musculature. Experientia. 10, 472-473.
- [79] D. Krause (1958). Pharmakologie des α -(isopropyl)- α -(β -dimethylaminopropyl) phenylacetoneitril citrat. Arzneimittel.-Forsch. (Drug Res.). 8, 553-556.
- [80] P. Kroepfli (1950). Über das Verhalten einiger Atmungsgrößen beim Husten (I) Mitteilung über den Hustenmechanismus. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta. 9, 33-43.
- [81] 黒田喜代志, 加瀬佳年, 由井園倫一, 宮田健 (1968). α -(isopropyl)- α -(β -dimethylaminopropyl) phenylacetoneitril cyclamate の鎮咳作用およびそれに関連した薬理作用. 応用薬理. 2, 323~331.
- [82] 黒田喜代志, 加瀬佳年, 由井園倫一, 宮田健, 実淵豊 (1968). α -(isopropyl)- α -(β -dimethylaminopropyl) phenylacetoneitril cyclamate の身体依存性について. 応用薬理. 2, 371~375.
- [83] K. Kuroda, T. Shimizu and K. Hayano (1971). Antitussive activity and other related pharmacological properties of isoaminile citrate; α -(isopropyl)- α -(β -dimethylaminopropyl) phenylacetoneitril citrate (Perocan citrate). Clinical Report. 5, 1787-1799.
- [84] K. Kuroda, T. Shimizu and K. Hayano (1971). General pharmacological studies of a new antitussive isoaminile citrate; α -(isopropyl)- α -(β -dimethylaminopropyl) phenylacetoneitril citrate (Perocan citrate). Clinical Report. 5, 1800-1819.
- [85] 黒田喜代志, 加瀬佳年, 宮田健, 清水武 (1977). Isoaminile の鎮咳作用点について. 応用薬理. 10, 395~406.
- [86] G. Kuschinsky and H. Lüllmann (1973). Opiates. “Textbook of Pharmacology”. Academic Press, New York, 146-156.

- [87] O. Larsell and G.E. Burget (1924). The effects of mechanical and chemical stimulation of the tracheo-bronchial mucous membrane. *Am. J. Physiol.* 70, 311-321.
- [88] S. Levis, S. Preat and F. Moyersoons (1955). Evaluation of the antitussive activity of some esters of Phenyl-cycloalkanecarboxylic acids and study of different pharmacological properties of the most effective among them. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 103, 200-211.
- [89] J.T. Litchfield and F. Wilcoxon (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 96, 99-113.
- [90] A. Matalana and H.L. Borison (1955). Antitussive agents and centrally induced cough. *Federation Proc.* 14, 367-368.
- [91] C.E.R. Mauvernay (1964). Method of producing antitussive action with 2-allyloxybenzoic acid derivatives. U.S. Pat. 3160557.
- [92] A.J. May and J.G. Widdicombe (1954). Depression of the cough reflex by pentobarbitone and some opium derivatives. *Brit. J. Pharmacol.* 9, 335-340.
- [93] F. Meyer, H. Bauer und H.G. Mayer (1952). Beitrag zur Messung Zentralanalgetischer Wirkungen. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 89, 415-425.
- [94] S. Miyano, A. Abe, Y. Kasé, T. Yuizono, K. Tachibana, T. Miyata and G. Kito (1970). Synthesis and pharmacological evaluation of some pyridylmethyl substituted ethylenediamines. *J. Med. Chem. (New York)*. 13, 704-708.
- [95] M. Monnier and H. Gangloff (1961). "Atlas for stereotaxic brain research". Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 44-65.
- [96] 森昌弘, 原隆夫, 酒井豊 (1971). 反回神経放電へおよぼす鎮咳剤の影響. *日薬理誌*. 67, 141p.
- [97] M. Mori and Y. Sakai (1972). Re-examination of centrally-induced cough in cats using a micro-stimulation technique. *Jap. J. Pharmacol.* 22, 635-643.
- [98] 森昌弘, 原隆夫, 酒井豊 (1972). 咳様反射下における疑核ニューロンの活動. *日薬理誌*. 68, 197p.
- [99] 森昌弘, 酒井豊, 原隆夫 (1973a). 鎮咳薬の作用点に関する電気生理学的研究 — 新鎮咳薬 Oxymetebanol を中心として. *日薬理誌*. 69, 163~175.
- [100] 森昌弘, 酒井豊, 出口健彦, 原隆夫 (1973b). 発咳時に活動する疑核ニューロンの鎮咳剤の抑制作用. *日薬理誌*. 69, 187p.
- [101] M. Mori and Y. Sakai (1975). Effects of antitussive drugs on the activity of the recurrent laryngeal nerve in cat. *Jap. J. Pharmacol.* 25, 671-680.
- [102] G. Moruzzi and H.W. Magoun (1949). Brainstem reticular function and activation of the EEG. *E E G Clin. Neurophysiol.* 1, 455-473.
- [103] 村野匡 (1974). 依存の成因と乱用の原因. "麻薬と人間". 時事通信社, 東京, 125~167.
- [104] 中島或郎 (1955). 静脈麻酔と脳波. *日本生理学雑誌*. 17, 607~618.
- [105] F.B. Nicolis (1966). Evaluation of antitussive agents. "Clinical Pharmacology". Pergamon Press, London, 237-265.
- [106] 日本公定書協会 (1971). 塩酸ノスカピン (解説). "日本薬局方第一部解説書 (第八改正)".

- 広川書店, 東京, C-415.
- [107] 日本公定書協会 (1971). 塩酸ベチジン (解説). “日本薬局方第一部解説書 (第八改正)”.
広川書店, 東京, C-468.
- [108] 日本公定書協会 (1971). 塩酸モルヒネ (解説). “日本薬局方第一部解説書 (第八改正)”.
広川書店, 東京, C-485.
- [109] 日本公定書協会 (1971). リン酸コデイン (解説). “日本薬局方第一部解説書 (第八改正)”.
広川書店, 東京, C-1851.
- [110] K. Okumura, T. Tanaka, S. Saito, H. Kugita and N. Sugimoto (1958). Synthesis of 3-(1-methylpiperidyl) di-(2-thienyl)methane. Tanabe Seiyaku Kenkyu Nempo. 3, 30-33.
- [111] 乙部正治, 小栗昭, 細谷英吉 (1959). 白ネズミにおいて薬物に対する addiction に関する研究 (第2報) Morphine の反復投与による白ネズミの体重変化について. 日薬理誌. 55, 118§.
- [112] B. Pellmont and H. Bächtold (1954). Pharmakologie des “Romilar” Roche, einer hustenhemmenden. Substanz mit zentralem Angriffspunkt. Schweiz. Med. Wochschr. 84, 1368-1372.
- [113] M.T. Petersen (1960). Zweijährige Erfahrungen mit Peracon in der Allgemeinpraxis. Deutsches med. Jour. 8, 235-236.
- [114] R.E. Pitts, H.W. Magoun and S.W. Ranson (1939). Localization of the medullary respiratory centers in the cat. Am. J. Physiol. 126, 673-688.
- [115] H. Plisnier (1954). Etude comparative de l'action antitussigene des différents dérivés opiacés et synthétiques par rapport à celle du phosphate de codeine, Thérapie. 9, 737-751.
- [116] R. Porter (1962). Unit response evoked in the medullary nuclei of the vagus nerves. J. Physiol. 163, p.26-27.
- [117] R. Porter (1963). Unit responses evoked in the medulla oblongata by vagus nerve stimulation. J. Physiol. 168, 717-735.
- [118] F.J. Prime (1965). Report on the antitussive action of Isoaminile (Dimiryl). Clinical Trials Journal, (London). 2, 121-125.
- [119] A.O. Ramos, P.A.P. Saraiva, L. Ramos and A.M. Cunha (1965). Parasympathetic inhibition produced by α isopropyl- β -dimethylaminopropyl phenylacetoneitril (Peracon). Arch. Int. Pharmacodyn. 157, 379-384.
- [120] A.O. Ramos, T. Adachi, B.B. Vargaftig, L. Ramos and O. Slemer (1965). Antiarrhythmic action of α -isopropyl- β -dimethylaminopropylphenylacetoneitril (Peracon). Arch. Int. Pharmacodyn. 157, 454-461.
- [121] C.E. Rosiere and C.V. Winder (1955). Tussal studies with ammonia in unanesthetized dogs with chronic tracheal side-tubes. J. Pharmacol. Exp. Therap. 113, p.46.
- [122] C.E. Rosier, C.V. Winder and J. Wax (1956). Ammonia cough elicited through a tracheal side tube in unanesthetized dogs. J. Pharmacol. Exp. Therap. 116, 296-316.

- [123] H. Salem and D.M. Aviado (1964). Antitussive drugs with special reference to a new theory for the initiation of the cough reflex and the influence of bronchodilators. *Am. J. Med. Sci.* 247, 585-600.
- [124] N.P. Sanzari, F.B. Fainmam and J.F. Emele (1968). Cough induced by 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide: A new antitussive method. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 162, 190-195.
- [125] N.P. Sanzari, J.F. Emele and F.B. Fainman (1969). Mechanism studies on the tussive action of 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide. *Europe. J. Pharmacol.* 8, 185-191.
- [126] C.H. Sawyer, J.W. Everett and J.D. Green (1954). The Rabbit diencephalon in stereotaxic coordinates. *J. Comp. Neur.* 101, 801-824.
- [127] R. Schmiedel (1959). Klinischer Vergleich einer neuen hustenstillenden Substanz (Peracon) mit Codeine und Dicodid. *Therapie Gegenwart.* 98, 239-240.
- [128] O. Schnider und J. Hellerbach (1950). Synthese von Morphinanen. *Helv. Chem. Acta.* 33, 1437-1448.
- [129] W. Schroeder (1951). Die Verwendung des Vagusschlingenhundes für die Wertbestimmung hustenstillender Substanzen. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 212, 433-439.
- [130] G. Schumacher (1959). Zur Behandlung des Hustens Beitrag. *Therapie Gegenwart.* 98, 581-582.
- [131] M.S. Segal (1950). "The management of the patient with severe bronchial asthma". C.C. Thomas, Springfield, p.59.
- [132] 関 功(1963). モルフィンアルカロイドに関する研究(第6報) dihydrothebainone の還元について. *薬学雑誌.* 83, 389~393.
- [133] T. Shibuya and E.G. Anderson (1968). The influence of chronic cord transection on the effects of 5-hydroxy tryptophan, 1-tryptophan and pargyline on spinal neuronal activity. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 164, 185-190.
- [134] 渋谷健, 黒田喜代志(1969). α -(isopropyl)- α -(β -dimethylaminopropyl) phenyl-acetonitril cyclamate [Perocan] の中枢神経に及ぼす影響の検索. *東京医科大学雑誌.* 27, 715~729.
- [135] 島本暉郎, 高木博司, 猪木令三(1960). "薬理学実習". 南山堂, 東京, p93.
島本暉郎, 高木博司, 猪木令三(1960). "薬理学実習". 南山堂, 東京, p111.
島本暉郎, 高木博司, 猪木令三(1960). "薬理学実習". 南山堂, 東京, p117.
- [138] B. Silvestrini and G. Maffii (1959). Action of antitussive substances in laboratory animals and relation between antitussive activity and other pharmacological properties. *Farmaco. Sci.* 14, 440-460.
- [139] B. Silvestrini and C. Pozzatti (1960). Antitussive activity and other pharmacological properties of six oxadiazoles. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 129, 249-263.
- [140] B. Silvestrini and C. Pozzatti (1961). Pharmacological properties of 3-phenyl-5 β diethylaminoethyl-1,2,4. oxidiazole. *Brit. J. Pharmacol.* 16, 209-217.

- [141] B. Silvestrini and C. Pozzatti (1963). Pharmacological properties of 3- α -phenyl-5- β -diethylaminoethyl-1,2,4-oxadiazole citrate. *Arzneim-Forsch.* 13, 798-802.
- [142] R.S. Snider and W.T. Niemer (1961). "A Stereotaxic Atlas of the Cat Brain". The University of Chicago Press, Shicago.
- [143] P.L. Stefko and W.M. Benson (1953). A method for the evaluation of antitussive agents in the unanesthetized dog. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 108, 217-223.
- [144] P.L. Stefko, J. Denzel, I. Hickey (1961). Experimental investigation of nine antitussive drugs. *J. Pharm. Sci.* 50, 216-227.
- [145] W. Straub (1901). Ueber die Wirkung des Antiarins am ausgeschnittenen, suspendierten Froschherzen. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 45, 346-379.
- [146] W. Stühmer und S. Funke (1957). Verfahren zur Herstellung von therapeutisch wirksamen Aminonitrilen. Deutsches Patentamt 964499.
- [147] W. Stühmer und S. Funke (1959). Verfahren zur Herstellung eines antitussiv wirksamen α -isoprnyl- α -(β -dimethylaminopropyl) phenylacetonitrils. Deutsches Patentamt 1036860.
- [148] 高木敬次郎, 福田英臣, 矢野剋二 (1960). 鎮咳薬に関する研究 (第一報) 鎮咳薬の生物試験法について. 薬学雑誌. 80, 1497~1501.
- [149] 高木敬次郎, 福田英臣, 藤江恭, 松井賢一郎, 佐藤道子 (1961). 鎮咳薬に関する研究 (第4報) 各種薬物および ω -(diphenylmethoxy) alkylamine 型化合物. 薬学雑誌. 81, 261~265.
- [150] H. Takagi and R. Ishida (1964). Effect of tetrabenazine on the afferent pathways of the central nervous system. *Jap. J. Pharmacol.* 14, 94-104.
- [151] 高木敬次郎, 高柳一成, 今村博 (1965). 1-[2-{ α -(p-chlorophenyl) benzyloxy}ethyl] piperidine の身体依存性の発現に関する検討. 薬学雑誌. 85, 550~552.
- [152] 高木敬次郎, 由井園倫一, 加瀬佳年 (1967). 1-[2-{ α -(p-chlorophenyl)-benzyloxy}ethyl] piperidine (HT-11) の鎮咳効果の作用点の追求. 薬学雑誌. 87, 907~914.
- [153] 高木弘, 小林晋作, 熊倉清次, 森昌弘, 小池博之, 上岡利春, 長谷川和雄, 大島武史 (1969). 強力な鎮咳薬, 14-Hydroxydihydro-6 β -thebanol-4-methyl ether (Oxymethebanol) の薬理学的研究. 日薬理誌. 65, 120~145.
- [154] 田中千賀子 (1961). Narcotine の薬理学的研究 (第一報). 日薬理誌. 57, 538~548.
- [155] R.E. Tedeschi, D.H. Tedeschi, J.T. Hitchens, L. Cook, P.A. Mattis and E.J. Fellows (1959). A new antitussive method involving mechanical stimulation in unanesthetized dogs. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 126, 338-344.
- [156] 時夷利彦, 川村浩, 今村護郎, 熊谷洋, 福原武彦 (1958). 諸種麻酔薬の新, 旧, 古皮質の電気的活動に及ぼす影響. 日薬理誌. 54, 12§.
- [157] J.J. Toner and E. Macko (1952). Pharmacology studies on bis-(1-carbo- $\alpha\alpha$ -diethyl-aminoethoxy)-1-phenyl cyclopentane-ethane disulfonate. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 106, 246-251.
- [158] C.A. Winter and L. Flataker (1952). Antitussive action of d-isomethadone and α -methadone in dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 81, 463-465.

- [159] C.A. Winter and Flataker (1954). Antitussive compounds : testing method and result. J. Pharmacol. Exp. Therap. 112, 99-108.
- [160] C.V. Winder and C.E. Rosiere (1955). Comparative antitussive bioassay of four morphine derivatives and methadone, employing ammonia in unanesthetized dogs with tracheal side-tubes. J. Pharmacol. Exp. Therap. 113, p. 55.
- [161] C.R. Woolf and A. Rosenberg (1964). Objective assessment of cough suppressant under clinical conditions using a tope recording system. Thorax. 19, 125-130.
- [162] 山本研一 (1959). 猫の基本脳波に関する研究. 塩野義研究所年報. 9, 1125~1164.
- [163] 柳浦才三 (1958). 諸種薬物の鎮咳作用に関する薬理学的研究 第1篇 発咳方法並びに鎮咳効果測定方法についての検討及び考案. 日薬理誌. 54, 677~687.
- [164] I. Zehbe (1958). Erfahrung mit dem Hustenmedicament Peracon. Die Medizinisch. 36, 1401-1402.