307. 高木敬次郎, 福田英臣, 矢野剋二: 鎮咳薬に関する研究 (第1報^{*1})

鎮咳薬の生物試験法について

Keijiro Takagi, Hideomi Fukuda, and Kokuji Yano: Studies on
Antitussives. I. Bioassay of Antitussives.(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo^{*2})

Two simple methods were devised for evaluation of the effectiveness of antitussive drugs. A-method: A guinea pig, to which the drug had been administered subcutaneously before 30 min., is placed in a desiccator and allowed to inhale SO₂-containing air for 1 min., the animal is taken out in open air, and the number of coughing observed for 5 min. In this method, the absence of cough response was regarded as effective. B-method: A guinea pig is anesthetized lightly by intraperitoneal injection of 15 mg./kg. of pentobarbital sodium and fixed in a dorsal position. The trachea is exposed and a small hole cut in it. A stimulating hair is introduced through the hole for 3 cm. and a violent cough is evoked. The stimuli were given at 15, 30, 60, 90, and 120 min. after injection of a drug and when no cough occurred even to one stimulus, the drug was regarded as effective. One animal can be used several times repeatedly with an interval of 10 or more days. In both methods ED 50 was calculated by the up-and-down method. The results from these two methods gave following values of ED 50, (mg./kg.): Morphine hydrochloride, 5.90 (A-method), 6.40 (B-method); codeine phosphate, 14.4 (A-method), 18.4 (B-method).

(Received February 10, 1960)

コデインを代表とする鎮咳薬はかなり古くから用いられているが、臨床的な鎮咳効果と完全に平行するような生物試験法は確立されていないのが現状である。合成化学の発達に伴って最近多数の鎮咳薬が登場し、よりよき生物試験法が強く望まれるようになり、その作用機序の解明の前提手段としても鎮咳効果の精密な比較が必要となつて来た。

鎮咳薬の生物試験法としては Ernst¹⁾ (1938) が猫の胸腔にルゴール液を注入して人工的に肋膜炎を起こさせ発咳させて以来、種々の方法が考案されて来たが、これは次のように大別出来る。1) 化学的刺激法、2) 機械的刺激法、3) 電気的刺激法。

現在までに発表された鎮咳薬の生物試験法は Rosiere 等²⁾ によつてまとめて表示されているが、著者等の一人高木³⁾ はかつて Eichler 法⁴⁾ を改良して黒焼成分の鎮咳作用を試験した。

著者等は新しい鎮咳薬を研究するため、先ず生物試験法について、1) 一薬物の効力検定になるべく多数の動物が用いられる、2) 方法が簡便であり、3) 刺激が発咳に必要なかつ十分な強さで、強過ぎず、4) 動物を繰り返し使用できることなどの点を特に考慮し再検討を行なつた。すなわち化学的刺激法としてはモルモットをデンケーターに入れ亜硫酸ガスで刺激発咳させる方法を、また機械的刺激法としてはモルモットの気管に小孔をあけここからカニューレを用いずに刺激毛を挿入し発咳させる方法を採用した。薬物の鎮咳作用は両方法ともに up and down 法⁵⁾ により求めた ED 50 として表わした。

実験方法

化学的刺激法 (A 法)

^{*1} 予報: 本誌 77, 1358(1957).^{*2} Motofuji-cho, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) A. M. Ernst: Arch. intern. pharmacodynamie 58, 363 (1938); 61, 73(1939).

2) C. E. Rosiere, C. V. Winder, J. Wax: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 116, 296(1956).

3) 緒方, 高木, 水谷: 本誌 63, 412(1943); 66, 102(1946).

4) O. Eichler, A. Smiatek: Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 194, 621(1940).

5) K. A. Brownlee, et al.: J. Am. Stat. Assoc. 48, 262(1953).

Fig. 1 において A は 500 cc の三頸コルベンで中に NaHSO_3 の飽和水溶液を入れておく。ビュレット B の栓 a を開き conc H_2SO_4 を滴下し、A に SO_2 を発生させる。あらかじめ A およびガス貯めビン C には SO_2 が入っており、栓 c および b を開くとガス貯めビン C の圧が高まり水マンノメーター D に記録される。b を閉じ d を少し開いて D の水圧が 60 mm になったら閉じる。安全ビン F には NaOH 溶液を入れておく。

使用動物は体重 350~600 g のモルモットを用い、薬液を皮下注射し 30 min 後に 3 L のデシケーター E に入れ蓋を閉じる。f、ついで e を開いて D の水圧が 0 になったら直ちに e、および f を閉じる。ここで一定量の SO_2 (マンノメーターの内径が 8 mm なので 1.5 cc) がデシケーター E に移行したことになる。

Fig. 1.
Apparatus for SO_2 -Stimulus
(A-Method)

- A saturated NaHSO_3 soln. in 500 cc. flask
B conc. H_2SO_4 in biurette
C gas cylinder
D water manometer
E desiccator (3 L)
F NaOH soln. in bottle

ガスを通じてから正確に 1 min 後モルモットをデシケーターから取り出し、ケージに入れてから 5 min 以内の咳の有無を観察記録し、動物が 5 min 間に 1 回も咳をしない場合を有効、1 回でも咳をした場合は無効と判定した。用量は等比級数にとり有効と判定した場合つぎの動物には一段階低い用量を投与し、無効と判定した場合は一段階高い用量を投与した。このように up and down 法によつて ED 50 を求めた。一薬物には原則として 10 匹のモルモットを使用した。

機械的刺激法 (B 法)

体重 400 g 以上のモルモットにペントバルビタールナトリウム 15 mg/kg 腹腔内注射し、軽く麻酔して背位に固定、頸部を正中線に沿つて切開し、組織をできるだけ傷つけないようにして気管を露出させる。鎖骨から 1.5 cm の距離の気管の前面に小孔を開け、ここから刺激毛を約 30 度傾けて 3 cm 挿入し 1 sec 後引き出す。小孔を開けてから 5, 20 min 後に咳をすることを確かめた後、薬液を腹腔内注射する。注射後 15, 30, 60, 90, および 120 min の 5 回にわたり刺激して咳の有無を調べる。5 回の刺激のうち 1 回でも咳のないことがあればその場合は有効、5 回とも咳をした場合を無効とみなした。化学的刺激法の場合と同様にモルモット 10 匹で up and down 法で ED 50 を求めた。試験後はアクリノール液で傷口をよくふいた後皮膚を縫合して普通に飼育する。翌日は体重の減少が見られるが、一週間後には体重も回復し 10 日以上経過してから再びつぎの実験に用いた。

今回は A, B 両法ともに試験薬物として塩酸モルヒネおよび磷酸コデインを用いた。

実験結果

磷酸コデインを A 法によつて求めた実験結果は Table I, Fig. 2 に示す通りである。

Table I. Antitussive Experiment of Codeine Phosphate in Guinea Pig by SO_2 Stimulating Method (A-Method)

Animal No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Body weight (g.)	573	520	581	424	568	463	469	566	368	361
Dose (mg./kg. s. c.)	15.0	22.5	15.0	22.5	15.0	22.5	15.0	10.0	15.0	10.0
Time (min.)										
1	0 ^{a)}	0	0	0	2	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0
3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0~5	1	0	1	0	3	0	0	4	0	0
Response	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Effect	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+

a) No. of cough

10 匹の中初めの用量はつぎの用量を決めるために用いられたものであるから計算に用いない (カッコを付す)。また 10 匹目の動物の咳の有無によりつぎに行なうべき用量 (実際には行なわない) が示され、この用量は計算に用いる。その結果、ED 50=14.4 mg/kg となつた。

$$\oplus \dots \dots \dots \text{when cough occurred} \qquad \ominus \dots \dots \dots \text{when no cough occurred}$$

$$\frac{(0 \times 1) + (1 \times 2) + (2 \times 4) + (3 \times 3)}{10} = 1.9$$

$$\log \text{ ED } 50 = \log 10 + 0.9 \times \log 1.5 = 1.1585$$

$$\text{ED } 50 = 14.4 \text{ (mg./kg.)}$$

Animal No.	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Body weight (g.)	448	498	435	435	460	476	460	408	530	526
Dose (mg./kg. i. p.)	6.67	10.0	6.67	4.44	6.67	10.0	6.67	10.0	6.67	4.44
Time (min.)										
Before injection	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
After injection	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Response	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Effect	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+

(3)

(2)

(1)

(0)

Fig. 3.
Estimation of Antitussive ED 50
of Morphine Hydrochloride in
Guinea Pig by Mechanically
Stimulating Method
(B-Method)

⊕.....when cough occurred throughout on the 5 stimuli

⊖.....when no cough occurred even on the one stimulus

$$\frac{(0 \times 1) + (1 \times 2) + (2 \times 4) + (3 \times 3)}{10} = 1.9$$

$$\log \text{ ED } 50 = \log 4.44 + 0.9 \times \log 1.5 = 0.8059$$

ED 50 = 6.40 (mg./kg.)

Drug	SO ₂ -stimulus (A-Method)	Mechanical stimulus (B-Method)	Friebel, <i>et al.</i> ^{a)}	Kase, <i>et al.</i> ^{b)}
Morphine HCl	5.90	6.40	4.0	0.41
Codeine H ₃ PO ₄	14.4	18.4	8.0	3.67

a) SO₂-stimulus in guinea pig⁶⁾

b) Mechanical stimulus in dog⁷⁾

6) H. Friebel, C. Reichle, V. Graevenitz: Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. **224**, 384(1955).

7) Y. Kasé, *et al.*: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **6**, 109(1958).

つぎに塩酸モルヒネの B 法による実験結果は Table II, Fig. 3 のようになり, ED 50=6.4 mg/kg となった。塩酸モルヒネ, 磷酸コデインの A, B 両法による ED 50 を示すと Table III のようになる。なお Friebel 等⁶⁾ のモルモットの SO₂ 刺激法と加瀬等⁷⁾ の犬の機械的刺激法の ED 50 をも付記した。

考 察

鎮咳薬の生物試験法としては猫(Ernst¹⁾, Domenjoz²⁾, Widdicombe³⁾) および犬(加瀬¹⁰⁾, Stefko 等¹¹⁾, Rosiere 等²⁾) が用いられている。しかしモルモットも Eichler 等⁴⁾, 著者の一人高木等³⁾, および Friebel 等⁶⁾ はすでに用いている。著者等は一薬物の効力を求めるためになるべく多数の動物を用いたいこと, および多数の薬物の検定を行なうことなどの理由により, 充分これを満足させる小動物を求めた。結局, シロネズミ, ハツカネズミは両方法で発咳が明らかでないため, 発咳の容易なモルモットを使用した。

Bucher¹²⁾ は刺激方法の相違により発咳の機構が異なり, また鎮咳薬もその作用点が異なっているために, 発咳方法により薬物の効果が異なってくることを示している。Widdicombe³⁾ は二つの受容体が化学的刺激と機械的刺激によつて別々に反応し, 薬物によつても別々に影響を受けると考えた。また Rosiere 等²⁾ はヒトの咳をゴミのような異物による咳や腫瘍などによる外圧からの咳と, 粘膜の炎症による咳とに二分して, 化学的刺激法は後者に相当するものとした。しかし, どの刺激方法が最もヒトの咳に近似しているかも明らかでなく, また同一薬物について今迄の文献による効力もまちまちである現在, 種々の方法を行なつて見るのが最善と思う。そこで著者等は化学的刺激法と機械的刺激法の両方法をモルモットについて行なつた。

化学的刺激法は本実験で行なつた亜硫酸ガス濃度が発咳に要する必要充分なものと考え。刺激が強過ぎると咳を抑制する薬物量が多量となり検定が困難となり, 一方刺激が弱過ぎると薬物による抑制が刺激が弱いために咳がないのか判定できず検定を誤る。連日 1 日 1 分間動物をこのガスにさらすと 5 日位で死亡するが, 1 週間毎に使用した場合には健康状態, 発咳に変化は見られなかった。体重 350 g 以上の場合, 正常のモルモットでは亜硫酸ガス刺激後 5 分間の発咳数は平均 3 回であるが, そのばらつきは大きい。したがつて, 鎮咳評価は咳の回数の減少によつて行なわず, all or none response として一度も咳をしない場合のみを有効とみなし ED 50 を算出した。また, Friebel⁶⁾ の実験ではガス中にある時動物は咳をするが, 著者等の実験ではデシケーター中では咳をしない。

加瀬¹⁰⁾ は, カニューレを気管に挿入し咳嗽犬を作り, カニューレを通じてナイロンブラシで気管を刺激し, Rosiere 等²⁾ は犬に気管カニューレを通じてアンモニア刺激を行なっている。著者等はモルモットに種々の型のカニューレを挿入し永久瘻を試みたが不成功に終わった。結局, 気管の露出や常にカニューレが挿入されている状態がモルモットに致命的な負担になるものと考えた。そこで実験後には皮膚を縫合し, つぎの実験にふたたび切開する方法を行なつた。

麻酔の有無あるいは麻酔の深度はこの実験でも重要な問題である。無麻酔が理想であるが, 無麻酔で固定し実験を進める場合, 啼鳴やもがきなどで咳の判定に困難を伴う。ペントバルビタールナトリウムには鎮咳効果が認められているが¹³⁾, これは猫で 32 mg/kg を注射して麻酔し, さらにこれに追加した用量について調べている実験である。著者等はできるだけ軽い麻酔をするためにペントバルビタールナトリウム 15 mg/kg 腹腔内注射によつて麻酔を行なつた。

刺激に対して敏感な部位は気管支分岐点であるが¹⁴⁾, この部位の刺激は本実験では強過ぎ, 分岐点から 5 mm 離れた部位に刺激毛の先端が行くようになっている。

従来鎮咳薬の生物試験が行なわれる場合にはモルヒネ, コデインが各研究者によつて試験されて来た。各研究者によつて得られた有効量は使用動物, 刺激方法, 効力の決め方などの相違のため著しい違いがある。さらにモルヒネ, コデイン両薬物の効力も研究者によつて著しく異なり, モルヒネがコデインより約 10 倍強いとするもの

8) R. Domenjoz: Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. **215**, 19(1952).

9) J. G. Widdicombe: J. Physiol. (London) **123**, 55, 71(1954).

10) Y. Kasé: Pharm. Bull. (Japan) **2**, 298(1954).

11) P. L. Stefko, W. Benson: J. Pharmacol. Exptl. Therap. **108**, 217(1953).

12) K. Bucher: Pharmacol. Revs. **10**, 43(1958).

13) A. J. May, J. G. Widdicombe: Brit. J. Pharmacol. **9**, 335(1954).

14) 柳浦: 日薬理誌 **54**, 677(1958).

(Rosiere 等²⁾, 加瀬等⁷⁾, Domenjot 等⁸⁾, Haas¹⁵⁾, 柳浦¹⁴⁾, 2~3 倍の強さを得たもの (Friebel 等^{6,16)}) がある。しかし Winter 等¹⁷⁾ および Stefko 等¹¹⁾ によればコデインの方がむしろモルヒネよりも鎮咳作用が強い。著者等の実験結果では A, B 両方法で塩酸モルヒネは磷酸コデインより約3倍強い。ヒトにおける有効量はモルヒネ (2~5 mg), コデイン (10~30 mg) であるからコデインがモルヒネより効力が強く出る方法は実際的ではない。

結 論

1) 鎮咳薬の効力を簡易かつ正確に求めるために, モルモットを用い亜硫酸ガス刺激法 (A 法) と気道を直接刺激する機械的刺激法 (B 法) を考案し, up and down 法によつて ED 50 を算出できるようにした。

2) A, B 両方法によつて塩酸モルヒネと磷酸コデインの ED 50 を求めた。その結果塩酸モルヒネの鎮咳効力は磷酸コデインの約3倍である。

東京大学薬学部

15) H. Haas : Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. **225**, 442(1955).

16) C. Reichle, H. Friebel : *Ibid.* **226**, 558(1955).

17) C. A. Winter, L. Flataker : J. Pharmacol. Exptl. Therap. **112**, 99(1954).

UDC 615.722-092 : 615.783.1

308. 高木敬次郎, 福田英臣 : 鎮咳薬に関する研究 (第2報^{*1}) 阿片アルカロイド およびその N-オキシドについて

Keihiro Takagi and Hideomi Fukuda : Studies on Antitussives. II.
Opium Alkaloids and their N-Oxides.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo^{*2})

Antitussive activity of several opium alkaloids and their N-oxides was examined and the general pharmacological properties were studied of codeine N-oxide which is the most potent compound among them.

Employing the two methods of assay for antitussive activity^{*1}, it was found that codeine N-oxide possessed greater antitussive activity than codeine phosphate, whereas it was very weak in analgesic activity against pressure pain in mice. Furthermore, it was found that its actions on blood pressure, respiration and heart, and its acute toxicity were definitely weaker than those of codeine phosphate.

The constipating action and inhibition of gastrointestinal propulsion of codeine N-oxide were found to be less than those of codeine phosphate.

(Received February 10, 1960)

鎮咳作用と鎮痛作用とがある用量範囲では平行関係にあるという考えは現在では否定されるに至り, 鎮痛作用を示さないデキストロメトルファン¹⁾ やナルコチン²⁾ が鎮咳作用を示すこともわかってきた。その他, 麻薬性鎮痛薬についてもこれら両作用は必ずしも平行するものでないことが明らかとなった^{3,4)}。

著者等が鎮咳薬の研究を始めた頃, コデイン N-オキシドが亜硫酸ガス刺激法で強い鎮咳作用を示し, かつ鎮痛作用が弱いことを知った⁵⁾。

コデイン以外の各種阿片アルカロイドの N-オキシドも鎮咳作用が強いが, その中コデイン N-オキシドに関し

*1 第1報 : 本誌 **80**, 1497(1960).

*2 Motofuji-cho, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) W. W. Benson, P. L. Stefko, L. O. Randall : J. Pharmacol. Exptl. Therap. **109**, 189(1953).

2) C. A. Winter, L. Flataker : *Ibid.* **112**, 99(1954).

3) H. Friebel, *et al.* : Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. **224**, 384(1955); **225**, 87(1955); **226**, 558(1955).

4) H. Haas : *Ibid.* **225**, 442(1955).

5) 高木, 福田, 矢野 : 本誌 **77**, 1358(1957).