p-Toluenesulfonate : sodium *p*-toluenesulfonate と hydrochloride との交換反応を前者に準じて行なう。白色リン片状結晶。m.p. 112~113°. $C_{27}H_{37}O_5N_3S$ Anal. Calcd. : C, 62.88; H, 7.23. Found : C, 62.64; H, 7.20.

Benzoate : hydrochloride と sodium benzoate の交換反応を行なう。生じた油状物質に少量の蒸留水を加えて数回洗浄した後、水浴上で水分を蒸発させデンケータ（塩化カルシウム）中で十分乾燥する。得られた固型アメ状物質をエーテルで再結晶すると白色柱状結晶を得。m.p. 70.5~71°. $C_{27}H_{35}O_4N_3$ Anal. Calcd. : C, 69.66; H, 7.57. Found : C, 69.65; H, 7.65.

Salicylate : benzoate との場合に準じて操作する。白色粒状結晶。m.p. 100~101°. $C_{27}H_{35}O_5N_3$ Anal. Calcd. : C, 67.34; H, 7.31. Found : C, 67.21; H, 7.31.

Phenylacetate : hydrochloride と phenylacetic acid の等モルを 70% EtOH 水溶液に溶解した後、溶媒を留去。残渣をデンケータ（塩化カルシウム）中で十分乾燥した後得られるアメ状物質をエーテル—石油エーテル混液から再結晶する。リン片状結晶。m.p. 59~61°. $C_{28}H_{37}O_4N_3$ Anal. Calcd. : C, 70.12; H, 7.77. Found : C, 70.28; H, 7.74.

2-Phenyl-*n*-butyrate : phenylacetate に準じて調製する。白色粒状結晶。m.p. 82.5°. $C_{30}H_{41}O_4N_3$ Anal. Calcd. : C, 70.97; H, 8.14. Found : C, 70.94; H, 8.10.

大阪大学薬学部

薬 学 雜 誌
[YYKUGAKU ZASSHI]
86 (9) 836 ~ 840 (1966)

UDC 615.781-015 : 547.94.02.04

137. 青木 大, 矢田 登 : ジブカイン塩基の物理化学的性質および作用性に及ぼす
対イオンの影響に関する研究 (第2報^{*1}) 蛙坐骨神経を使用した,
作用時間および作用強度の測定法について

Masaru Aoki and Noboru Yata : Effects of Some Counter Ions on Physico-
chemical Properties and the Local Anesthetic Action of Dibucaine
Base. II. A New Method for Evaluating Local Anesthetic
Action, determined on Frog's Sciatic Nerve Fibers.

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

A new method for evaluating local anesthetic action was devised. The apparatus is equipped with compartment box shown in Fig. 1, which enabled the frog sciatic nerve fibers to be perfused with saline solution with or without anesthetics.

Frog sciatic nerve fibers, following elimination of epineurium, were perfused initially with saline solution followed by an anesthetic solution until the action potential of nerve fibers dropped to one-half the initial potential which had been set at 400 μ V. At this stage perfusion was made with the initial saline solution until the action potential recovered by 100 μ V.

The time required for 50% reduction of the initial action potential was recorded as the "onset time of anesthesia," and the time required for recovery of action potential by 100 μ V as "effective duration of the anesthesia." One-half blocking concentration of anesthetics was determined from the dose-reponse curve thereby obtained.

Three local anesthetics were evaluated in terms of onset time, effective duration, and a half-blocking concentration.

(Received November 22, 1965)

前報¹⁾において著者等は家兎角膜におけるジブカイン塩類の表面麻痺作用時間と水に対する溶解度および油水分配率との相関性について検討し油水分配率の大きいものほど作用時間が長いことを報告した。家兎の瞬目反応を利用する方法は古くから行なわれている方法の1つであるが、刺激に使用される豚毛またはマンドリンは実験

*1 第1報 : 本誌, 86, 832(1966).

*2 Toneyama, Toyonaka, Osaka-fu.

1) 青木, 矢田 : 本誌, 86, 832 (1966).

者によりその太さが異なる上, 同一の太さのものを用いても家兎眼に刺激を与える時の刺激の強さを一定にしたい欠点がある. また, 点眼した薬物が角膜を透過して神経末端に達するほか, 結膜囊をとる経路も無視し得ないと考えられる. したがって瞬目反応の有無による判定は簡便ではあるが, 神経に達するまでの経路が複雑で薬物の物理化学的性質との関連性をみるには必ずしも適当とはいえない. そこで今回著者等は蛙の坐骨神経を使用し, 局所知覚麻痺剤によるその興奮伝導遮断を利用して局所知覚麻痺剤の作用時間ならびに作用強度を測定する一方法を考案した.

この方法の原理は, 神経の興奮の伝導のメカニズムの解明に電気生理学上の実験に使用されているものであるが, 神経と薬物の接触を一定流速の灌流によって, 常に一定の濃度勾配を保つようにした灌流液の交換をコックの切り換えによりすみやかに行なえるようにした装置を自製し, 神経の action potential の変化を指標に判定する方法である.

実験の部

実験方法と結果

(1) 測定装置 装置は Fig. 1 に示すもので, プラスチック板を加工して作製した. 装置は左右の電極部 (刺激電極部と誘導電極部) と中央の灌流部から構成されており, 刺激電極は isolator を通して電子管刺激装置に, 誘導電極はオシロスコープにそれぞれ接続する. 電極は直径 0.6 mm. の白金線を使用しこの電極部には薬物を含まない灌流液を全満し蒸発を防ぐために平板で密閉する. 灌流溶液は灌流部の横から導入し灌流部の上蓋につけた細管より排出するようになっている. 電極部と灌流部の間の溝は神経をセットした後ワセリンで密封し, 灌流部を流れる液が電極部に洩れないようにする. なお, 灌流部に灌流液導入孔の反対側から挿入したアース極は神経表面を流れる滑走電流をできるだけ少なくするためである. 灌流液の切りかえは灌流液貯めごとにつけたコックで行ない, 液の交換は灌流部において 20 sec. 以内に行なえる. また, 灌流部分の長さを 1 cm. としたのは興奮伝導およびその遮断に重要な役割りを果たすとされているランヴィエ絞輪が, 蛙坐骨神経では 1~2 mm. ごとに存在するとされている²⁾ので, 少なくともその数個が灌流部分に存在するようにしたためである.

Fig. 1. The Schematic Diagram of the Compartment Box

- a: perfusion part
- b₁: electrode for stimulation (Pt dia. 0.6 mm.)
- b₂: electrode for recording (Pt dia. 0.6 mm.)
- c: perfusion solutions are led from c, which is set at side of perfusion part
- d: earth terminal in order to minimize a artifact

(2) 測定条件の検討 a) 刺激時間の決定

TABLE I. Composition of Buffered Saline Solution (pH 7.4)

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3.824 g.
KH ₂ PO ₄	0.363
NaCl	6.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.130
KCl	0.075
Distilled water ad	1000.00 ml.

前述の装置に蛙の坐骨神経の神経膜 (epineurium) を木綿針の先をといで作った小刀で除いたものをセットし, 灌流部に Table I に示した組成の saline solution を流速 10 ml./min. で灌流する. なお電極部にはあらかじめ同じ灌流液を満し密閉する. つぎに刺激電極につないだ電子管刺激装置 (日本光電製 MS-3) の通電時間を種々変化させると共に, 矩形波刺激を与えた時に誘導電極部に 100 μV の action potential (gain 100 μV/cm.) を得るに必要な電圧を求め, $i-T$ 曲線に相当する電圧-期間曲線 ($V-T$ 曲線) を描いた. Fig. 2 はこの装置で求めた $V-T$ 曲線と, これから求められるいわゆる $Q-T$ 直線を示したものである.

2) D. V. Davis, F. Davis: Gray's Anatomy (Longmans, London 1962); 田崎一二: 神経生理学序説 (三共出版, 昭 23).

Fig. 2. $V-T$ Curve and $Q-T$ Curve

$$V = \frac{a}{t} + b$$

$$b = \tan \theta = 0.164$$

$$a = 0.01$$

$$t = 0.061$$

に単一神経線維では all or none response を示すが、ここに使用するのは神経線維束であるため局所知覚麻痺剤を作用させた時、細い線維から順次興奮伝導が遮断されるため、action potential はみかけ上徐々に低下する。

Skou³⁾ は蛙坐骨神経の電気刺激によって、脚の筋肉が収縮することを指標に局所知覚麻痺剤の作用強度についての研

$V-T$ 曲線からみられるように、刺激時間が 0.3 msec. 以上では同一の action potential を得るに要する電圧はほとんど変動なく一定である。

すなわち、この電圧は通電時間を無限大としたときの最小感応電圧である。したがってあとに示す局所知覚麻痺剤の作用時間、作用強度などの測定においては常に 0.5 msec. の刺激時間を使用することにした。なお、この装置で求めた蛙坐骨神経のクロナキシーは 0.061 msec. であった。

b) 神経の action potential の時間的变化と腓腹筋の action potential の時間的变化との相関性について 一般

Fig. 3. Electrode for Measuring Action Potential of Frog's Leg Muscle

Fig. 4. Chronological Change of Action Potential of Frog's Sciatic Nerve Fibers and Gastrocnemius Muscle Fibers

In each figure, upper and lower curve represent respectively the action potential of sciatic nerve fibers and gastrocnemius muscle fibers.

- 1: saline perfused (showing initial action potential)
- 2: two minutes after perfusion of 0.13 mM Dib·HCl soln.
- 3: after four minutes
- 4: after five minutes (showing a drop of action potential to half of the initial one)

3) J.C. Skou: Acta Pharmacol. et Toxicol., 10, 281 (1954).

究を行なっているが, この方法では長時間を要する上時間の経過により脚の筋肉の疲労が加味されるため, 反応が鈍くなっても興奮伝導遮断の効果のみによるものかまたは疲労の要素が加味されたものか判別しがたい. 神経を単離して行なう著者等の方法では後にも述べるように, action potential の大きさを指標としているのでその判定はより正確なものとなる. しかし神経の伝導遮断が同時に脚の筋肉の運動の変化に再現されることを確認する必要がありつぎの実験を行なった.

すなわち $\frac{1}{4}$ 注射針にマンドリンをさし, マンドリンと注射針の孔壁を接着剤で絶縁した誘導電極を作製し (Fig. 3), これを神経をつけた蛙の腓腹筋に刺しテープで固定する.

一方神経を前述の装置にセットし, 神経および腓腹筋の誘導電極を2現象オシロスコープ (日本光電製 VC-6) に接続する. 神経の灌流部に Table I の saline solution を灌流し, 神経の action potential を $350 \mu\text{V}$, 腓腹筋のそれを $200 \mu\text{V}$ (いずれも gain $100 \mu\text{V}/\text{cm.}$) になるように刺激電圧を調節する. ついで灌流液を塩酸ジブカイン 0.13 mM 濃度を含む同組成の saline solution に切り換え $1\sim 2 \text{ min.}$ ごとにそれぞれの action potential の変化を撮影した. Fig. 4 にその一部を示したが, 神経の action potential が最初の $\frac{1}{2}$ に低下したとき, 腓腹筋の action potential も $\frac{1}{2}$ に低下する. つぎに灌流液を再び最初の saline solution に切り換えると, 暫時の後それぞれの action potential は同時に回復に向うことが認められた.

(3) 局所知覚麻痺剤の作用強度の測定法 前述のように saline solution 灌流中で $400 \mu\text{V}$ の action potential を得るように設定した後, 局所知覚麻痺剤を含む灌流液に切り換え, $1\sim 2 \text{ min.}$ ごとに action potential を記録し, 10 min. 間同一の action potential を示すに至った時, 用いた局所知覚麻痺剤の, その濃度における平衡の action potential とする. 濃度を種々変化させて得られるその時の平衡 action potential を濃度の対数に対してプロットすると Fig. 5 にみられるような S 字曲線が得られる. この曲線から action potential が $200 \mu\text{V}$ に低下する濃度を求めこれを half blocking concentration として作用強度の指標とした.

この方法により 2, 3 の局所知覚麻痺剤について求めた half blocking concentration を Table II に示した. 塩酸プロカインを1とした relative potency を求めると数値の絶対値は他の文献と正確には一致しないがその順位は変わらず, したがってこの判定方法が作用強度の判定に十分使用できるものと考えられる.

(4) 局所知覚麻痺剤の作用時間の測定法 一定濃度の局所知覚麻痺剤溶液の灌流をはじめてから $1\sim 2 \text{ min.}$ ごとに action potential

Fig. 5. Dose-Response Curve (procaine hydrochloride, pH 7.4, half blocking concn. checked as anesthetic potency)

TABLE II. Half Blocking Concentration of Some Local Anesthetics on Nerve Conduction at pH 7.4

Compound	Half blocking concn. ^{a)} (mM)	Relative potency		
		Author	After Skou ^{b)}	After Mørch ^{c)}
Procaine hydrochloride	1.025	1	1	1
Tetracaine hydrochloride	0.0064	157	14.4	10
Dibucaine hydrochloride	0.0030	341	120	25

a) concentration equilibrium to 50% reduction of action potential

b) J. Chr. Skou: Acta pharmacol. toxicol., 10, 292 (1954)

c) T. Mørch: some physico-chemical factors of importance for the spreading of local anesthetics in organism, Diss. Oslo (1954)

の変化を記録し, action potential が $200 \mu\text{V}$ に低下した時, ただちに灌流液を薬物を含まない saline solution に切り換え action potential が $100 \mu\text{V}$ だけ ($300 \mu\text{V}$ まで) 回復するまでその時間的变化を記録する. Fig. 6 にその一例を示した. ここで使用する濃度は少なくとも action potential を 50% 以上低下させ得る濃度を必要とするが極端に高濃度では action potential の低下が急激におこる他, 神経組織の不可逆的変性をまねくおそれがある. したがって著者等はこうした点を考慮に入れて, 先の作用強度測定時に求めた S 字曲線の変曲点における切線をのばし, 濃度軸と交わる点の前後の調製しやすい濃度を選ぶこととした.

例えば, 塩酸プロカインでは濃度軸から求めた濃度が 2 mM 濃度付近であるので, 2 mM 濃度を, また塩酸テトラカイン, 塩酸ジブカインではそれぞれ 0.05 mM を使用した.

なお, 著者等は action potential が $\frac{1}{2}$ に低下するまでの時間 ($t_{1/2}$) を作用発現時間とし, ここから $100 \mu\text{V}$ だ

Fig. 6. Chronological Change of Action Potential (0.05 mM dibucaine hydrochloride at pH 7.4)

け回復するに要する時間 (t_{100}) を作用持続時間とすることにした。

Table III に 2, 3 の局所知覚麻痺剤の作用発現時間 ($t_{1/2}$) ならびに作用持続時間 (t_{100}) を示した。

考 察

この実験で蛙の坐骨神経を用いることにしたのは材料が比較的廉価であり、かつ、神経の単離が容易であるためである。また蛙の坐骨神経は温度に対する適応性が哺乳類のそれと異なり、この実験で 20~30° の室温で行なった場合、作用強度、作用時間とも個体差以上の変化が認められなかったこともその理由の 1 つである。

また神経膜 (epineurium) を除去したのは、神経

TABLE III. On Set Time and Effective Duration of Some Local Anesthetics on Frog's Sciatic Nerve Fibers

Compound	Concn. used. (mM)	Mean on set time (min.)	Mean effective duration (min.)
Procaine hydrochloride	2.00	2.5	2.6
Tetracaine hydrochloride	0.05	6.3	46.5
Dibucaine hydrochloride	0.05	12.1	53.2

線維束に対する薬物溶液の直接の接触を求め、神経膜透過による因子を除くためである。神経膜を除去しても神経線維にはミエリン鞘が存在し、これが唯一の barrier となるので物理化学的性質との関連性を求める場合の解析が比較的簡単となる。

なお、この測定法は神経線維自体に対する薬物の作用のみで、他の組織あるいは体液の影響を受けないので、薬物の神経に対する作用を適確に判定し得る利点があると考ええる。

終わりに、この実験の実施に当たり、大阪大学歯学部 河村洋二郎教授の御助言を得たことを付記し、感謝の意を表する。

大阪大学薬学部