

－ 実 習 予 定 －

1 班当たり動物数

1 日目：全身麻酔・催眠作用～併用による作用増強 <マウス> ♂
＊ether の麻酔作用 3
＊chlorpromazine の作用 3
＊ether に対する chlorpromazine の増強作用 3
＊pentobarbital の催眠作用 3
＊nitrazepam または diazepam の作用 3
＊pentobarbital に対する nitrazepam または diazepam の増強作用 3
：未知薬物の推定 1 <マウス> 5

2 日目：知覚神経系に対する作用 <モルモット> 1
＊局所麻酔薬の角膜に対する表面麻酔作用
＊局所麻酔薬の浸潤麻酔作用 (モルモット丘疹法)
：運動神経系に対する作用～末梢性骨格筋弛緩薬
＊Claude Bernardの実験 <トノサマガエル> 1
：循環器系に対する作用～交感神経系と副交感神経系の支配
＊八木式心臓灌流法による実験 <ウシガエル> なし
＊麻酔下のラット動脈血圧の測定 <ラット> なし

3 日目：中枢神経興奮作用～併用による拮抗 <マウス>
＊picrotoxin の興奮作用 3
＊phenobarbital の作用 3
＊picrotoxin に対する phenobarbital の拮抗作用 3
＊strychnine の興奮作用 3
＊mephenesin の作用 3
＊strychnine に対する mephenesin の拮抗作用 3
：未知薬物の推定 2 <マウス> 5

4 日目：鎮痛作用～統計的処理法の実習 (2 班協同) <マウス> 30/2
＊酢酸writhing法, Haffner 法, またはhot plate 法による
鎮痛作用の比較とデータの統計学的処理
：未知薬物の推定 3 <マウス> 5
3～4 日目：学習・記憶行動実験～抗健忘作用の検出法 (4 班協同) 25/4
：未知薬物の推定 4 <マウス> 2匹 x 3～4班

－ 薬 効 の 評 価 －

実習の手引き (平成12年度)

薬 学 科 (d, e, f) 2000. 10. 3～10. 6
医療薬学科 (a, b, c) 2000. 10.10～10.13

(但し、実習日程、内容は若干変更することがある)

クラス _____

学籍番号 _____

氏 名 _____

薬品作用学教室

－ 注 意 事 項 －

＊実習者の自戒

実習者は実習材料である動物を強制的に自己の実習のために犠牲にする。およそ生物で生を欲しないものはないはずである。したがって実習者は自己の実習のために犠牲となった動物に対して決してこれを粗略に取り扱うことなく、誠心感謝の意を表し、その犠牲を無に帰することなく、実習を有効ならしめるよう常に心がけることが肝要である。

＊動物を取り扱う時は、準備室の前に用意してある専用のマスク、手術用ビニール手袋、帽子を着用すること。

＊実験終了後は使用器具を洗浄し、プラッテ（実験台）の端にまとめて置くこと。

＊動物の死骸は準備室の前の黒ビニール袋に入れること。

＊手の洗浄は、先ず充分に汚れを落としたのち、入口に用意してある0.1%塩化ベンザルコニウム液で、数秒手をつけて消毒した後、水道水で洗浄すること。

＊実習室に入る前に、白衣を入口に用意してある70%消毒用エタノールでスプレーして消毒し、出る時にも同様に消毒すること。

－各実験台貸出器具－

		実習前	実習後
＊1 ml 注射器（3/4 または 1/2 針付）	4 本	_____	_____
＊マウス用経口ゾンデ	1 本	_____	_____
＊マウス体重測定用天秤	1 台	_____	_____
＊観察用グローケ（プラスチック小ケージ）	5 個	_____	_____
＊マウスケージ	2 個	_____	_____
＊鉗子	1 個	_____	_____
＊角膜刺激用毛付き割箸	1 本	_____	_____

－各自又は各班で用意するもの－

＊雑巾	＊名札
＊軍手	＊方眼紙
＊マジック（黒、青など）	＊計算機
＊バンドエイド	＊ストップウォッチまたはタイマー付き時計
＊ <u>手術用手袋（購買にて購入しておくこと）</u>	

薬品作用学実習（中枢神経系および体性神経系を中心として）

- 薬理学実習の一般的注意事項 (p. 1～5)
 - 薬理学実習の目的
 - 実験の計画と準備
 - 観察
 - 記録
 - レポートの書き方 (A 4 サイズのレポート用紙を使用) (p. 3)
 - 実験の題目
 - 要旨
 - 緒言（目的）
 - 実験材料および実験方法
 - 結果（可能な限り図表を作成）
 - 考察 **（＊ポイントの解答を含む）**
 - 引用文献
 - 図表の説明
 - 実験終了時の後かたづけ
- 実験動物とその取り扱い方 (p. 7～17)
 - 動物の取り扱い方
 - 個体の識別法
 - 薬物の投与方法
- 実験器具 (p.19～28)
- 溶液調製法 (p.29～30)
- 実験動物の観察と形態解剖 (p.31～39)
 - ddY系マウス（♂）
正常マウスについて雌雄を確かめ、体重を測定した後、次の諸行動および生理機能を観察する。
 - 眼、鼻、足などの色
 - 自発運動 (locomotor activity)
 - 跳躍 (jumping)
 - 呼吸 (respiration) 運動
 - 正向反射 (righting reflex)
 - Hartley 系モルモット（♀）
 - トノサマガエル、ウシガエル
 - Wistar 系ラット（♂）

- ・実験項目をあらかじめ調べ、教科書や参考書によって実験の内容を十分理解しておくこと。
- ・なお、レポートは翌週火曜日の夕方 5 時までにまとめて提出すること。

〔1日目〕

*ポイント ―総論―

A―1. なぜ薬理学実験を行うのか.

―2. 対照実験はなぜ必要か.

―3. 薬物投与ルートはどのように選択するか.

―4. 生理的溶液にはどのようなものがあるか.

―5. 水に難溶性の薬物はどのようにして適用するか.

―6. LD50, ED50および安全域について説明せよ.

―7. 薬物の調製の仕方を述べよ.

(例題1) Pentobarbital の45 mg/kgを腹腔内投与 (i.p.) したい. マウスに0.1 ml / 10 g の割合で投与するとしたら, pentobarbital 45 mgを何 ml の生理食塩水に溶かしたらよいか.

(例題2) 0.05% chlorpromazine 溶液がある. マウスに0.1 ml/10 g の割合で皮下投与 (s.c.) する場合, 25 gのマウスに何 mg の chlorpromazine を投与することになるか.

(例題3) 35 g のマウスに0.02% diazepam 溶液を0.2 ml の割合で皮下投与したら, diazepam を何 mg/kg 投与したことになるか.

1. 中枢神経系に作用する薬物

1-1. マウスによる中枢神経作用薬の多次元観察法 (p.41~44)

1-2. 中枢神経系における薬物の協力作用についての実験 ―中枢神経抑制薬― (p.52)

A) ether による全身麻酔作用

B) chlorpromazine の単独作用

C) chlorpromazine と ether の相互作用

< 薬物 >

ether (準備室前まで取りにくること)

chlorpromazine (5 mg/kg, s.c.)

< 方法 >

1) 無処置マウス3匹を観察用グロッケに1匹ずつ入れ, 呼吸, 自発運動, 正向反射, 眼, 鼻, 足などの色を観察する.

2) 観察後, ether を浸ませた綿塊をグロッケに投入し, マウスの症状を経時的に観察する.

3) 麻酔が進行し, 第III期に入ったら, マウスをグロッケから取り出し, 麻酔から覚醒する状態を経時的に調べる.

4) 別のマウス3匹に chlorpromazine を投与し, その症状を経時的に観察する.

5) 別のマウス3匹に chlorpromazine の投与から50分後に観察用グロッケに入れ, 2)および3)と同様の方法で, ether による麻酔および覚醒の状態を経時的に観察する.

(注) **chlorpromazineの前処置は, 実習講義終了後直ちに行うこと.**

※ Ether と chlorpromazine+ether の麻酔導入時間, 持続時間などを比較する.

C) pentobarbital-Na による催眠作用 (p. 52 ~53)

D) pentobarbital-Na と nitrazepam または diazepam との相互作用 (p. 53)

< 薬物 >

pentobarbital-Na (45 mg/kg, i.p.)

nitrazepam (奇数班) または diazepam (偶数班) (2 mg/kg, s.c.)

< 方法 >

1) マウス3匹に pentobarbital-Na を投与し, マウスの症状を経時的に観察する.

2) 別のマウス3匹に nitrazepam または diazepam を投与し, マウスの症状を経時的に観察する.

3) 別のマウス3匹に nitrazepam または diazepam を投与し, その20分後に pentobarbital-Na を投与し, その症状を経時的に観察する.

※ 睡眠導入時間, 睡眠持続時間などを測定し, マウスに現れる症状を経時的に観察する (睡眠時間は正向反射の消失から回復までの時間とし, その持続時間を測定する). さらに, 単独投与の場合と薬物併用の場合を比較する.

(!) p.53 の観察のポイント (a~g) を参考に実験を行うこと .

E) 未知薬物の推定 (# 1)

< 薬物 >

未知薬物 (1 mg/kg, s.c.)

< 方法 >

1) マウス1匹に未知薬物を投与し, マウスの症状を経時的に観察する.

2) 今回用いた薬物との併用投与を行い, その作用を経時的に観察する.

実験上の注意事項

*投与量と注射液量について

$x \text{ mg/kg, s.c. (皮下注射) or i.p. (腹腔内注射)}$

体重1 kgに対して $x \text{ mg}$ の薬物を皮下または腹腔内注射する。液量は、**体重10 gあたり0.1ml注射**すれば、表記の薬物投与量になるように薬液を調製してある。

*データのまとめ方

14ページの計算式を用いて計算し、3匹の結果（麻酔／睡眠導入時間と持続時間）

の**平均値 (mean) ± 標準誤差 (Standard Error of Mean) (n = 3)**

で表す。ただし、併用時の持続時間は**単独投与群の平均値の2倍**を上限として観察を打ち切ることとするので、この場合は標準誤差は求められない。

*未知薬物について

この実習プリントの20ページを参照すること。

*ポイント

全身麻酔・睡眠

- B－1. Righting reflex とは何か。
- －2. Barbiturates 中毒の解毒はどうしたらよいか。
- －3. 麻酔の経過について述べよ。
- －4. 代表的な麻酔薬を挙げよ。
- －5. 麻酔前投薬にはどのような薬物が用いられ、なぜ行われるのか。

向精神薬

- C－1. Chlorpromazine 以外の抗精神病薬を挙げよ。
- －2. 抗不安薬にはどんなものがあり、その作用点はどこが考えられるか。
- －3. 向精神薬と神経伝達物質との関係について調べよ。

〔3日目〕

1-3. 中枢神経系における薬物の拮抗作用についての実験 — 中枢神経興奮薬— (p.45)

A) picrotoxin による痙攣作用 (p.47)

B) phenobarbital-Na と picrotoxin の相互作用 (p.47～48)

< 薬物 >

picrotoxin (5 mg/kg, s.c.)

phenobarbital-Na (70 mg/kg, i.p.)

< 方法 >

- 1) マウス3匹に picrotoxin を投与し、マウスの症状を**経時的**に観察する。
- 2) 別のマウス3匹に phenobarbital-Na を投与し、その症状を**経時的**に観察する。
- 3) 別のマウス3匹に phenobarbital-Na を投与し、その25分後に picrotoxin を投与し、その症状を**経時的**に観察する。

C) strychnine による痙攣作用 (p.47)

D) mephenesin と strychnine の相互作用 (p.47～48)

< 薬物 >

strychnine-H₂SO₄ (1.25 mg/kg, s.c.)

mephenesin (240 mg/kg, i.p.)

< 方法 >

- 1) マウス3匹に strychnine-H₂SO₄ を投与、マウスの症状を**経時的**に観察する。
- 2) 別のマウス3匹に mephenesin を投与し、その症状を**経時的**に観察する。
- 3) 別のマウス3匹に strychnine-H₂SO₄ を投与し、同時に mephenesin を投与し、その症状を**経時的**に観察する。

※ A, B)およびC, D)群の症状を**経時的**に観察し、それぞれ比較する。
(!) p.47～48の観察のポイント(1～12)を参考に実験を行うこと。

E) 未知薬物の推定（#2）

1日目と同様に、未知薬物の作用を推定するための実験を行う。

実験上の注意事項

*痙攣作用のデータのまとめ方

- 1) 3匹中の**死んだ数**を表にする（例：0／3, 1／3, 2／3, 3／3）
- 2) 最初の痙攣発現までの時間は、**平均値 ± 標準誤差**
- 3) 痙攣持続時間は、**生存した動物の平均値**

**注）最初の痙攣発現から、最後の痙攣終了までの時間で現すか、痙攣をして
いた時間の合計時間で現すかなどは、各班で実験データを見て、どの現し方が
もっとも結果を適切に伝えることが出来るかという観点で考えてまとめること。**

*痙攣終了の判定

- 1) Strychnineの場合は、同じ音刺激で誘発されなくなった時点。刺激を強くした場合の
ものや、ただビクッとするだけのもの、尾を持ったときにもがくようなものは
入れない。
- 2) Picrotoxinの場合は、間代性痙攣の間隔が充分（15～30分）あいていて、横にして
も誘発されない時に前回終了時を痙攣終了とする。

*Mephenesinの単独作用

- 1) **30分間** 観察する。
- 2) その後は併用実験が終了するまで、**15分ごと** に観察。

*ポイント

中枢興奮薬

- E－1. Strychnine と picrotoxin の痙攣のパターンの違いは何に由来するか。
－2. Mephenesin はなぜ strychnine に拮抗するのか。
－3. Mephenesin 以外に strychnine 痙攣を抑制する薬物を挙げよ。
－4. Phenobarbital はなぜ picrotoxin 痙攣に拮抗するのか。

2. 学習・記憶行動実験～抗健忘作用の検出法

< 薬物 >

scopolamine-HBr (0.25 mg/kg, s.c.)
tacrine-HCl (1.0 mg/kg, s.c.) または physostigmine-H₂SO₄ (0.25 mg/kg, s.c.)

< 方法 >

- 1) マウスを一定方向に向けプラットホーム上に静かにのせる。
- 2) マウスが床グリッド上におりる (step-down) までの時間を測定する。〔3秒以
内に step-down した場合、もう1度 1) を繰り返す〕
- 3) 訓練試行として、グリッド上に step-down (四肢がプラットホームより離れるの
を指標とする) した直後より、床グリッドから電気ショック (1 Hz, 80 V, 500
msec) を15秒間与える。
- 4) 翌日に、前日と同様にマウスをプラットホーム上にのせ、プラットホームから
床グリッドに step-down するまでの時間 (最大 300秒) を測定することで保持試
行を行う。
- 5) Scopolamine-HBr は訓練試行の**30分前**に皮下投与し、tacrine-HCl または
physostigmine-H₂SO₄ は訓練試行**15分前**に皮下投与する。
- 6) Scopolamine-HBr は訓練試行の**30分前**に皮下投与し、未知薬物は訓練試行**15
分前**に皮下投与する。

第1群	生理食塩水	＋	生理食塩水	＋	非電気ショック
第2群	生理食塩水	＋	生理食塩水	＋	電気ショック
第3群	scopolamine-HBr	＋	生理食塩水	＋	電気ショック
第4群	scopolamine-HBr	＋	tacrine-HCl または physostigmine-H ₂ SO ₄	＋	電気ショック
第5群	scopolamine-HBr	＋	未知薬物	＋	電気ショック

（未知薬物は各班あたり2匹とし、残りのデータは他の班からもらう）

*ポイント

新薬のスクリーニング法

- D－1. 中枢作用薬のスクリーニング法にはどのようなものがあるか。
－2. 学習・記憶能力の判定法にはどのようなものがあるか。
－3. Passive avoidance test とはどのような試験法で、何を調べるためのものか。

3. 鎮痛作用～統計的処理法の実習

2 班合同 (p.55～64)

以下のA), または B)のいずれかの鎮痛測定法を行う。また、他の班のデータおよび C)の熱板法のデータをもらい、各薬物のED50および各鎮痛測定法によるED50を比較する。

A) 酢酸writhing法 (p.58～60)

< 薬物 >

a) morphine-HCl	(0.2 mg/kg)	c) acetylsalicylic acid	(30 mg/kg)
	(0.4 mg/kg)		(60 mg/kg)
	(0.8 mg/kg)		(120 mg/kg)
	(1.6 mg/kg)		(240 mg/kg)
b) pentazocine	(0.5 mg/kg)	d) Ibuprofen-Na	(xx mg/kg)
	(1.0 mg/kg)		(xx mg/kg)
	(2.0 mg/kg)		(xx mg/kg)
	(4.0 mg/kg)		(xx mg/kg)

上記 a, b, c), d) のいずれかの薬物で実験する。

< 方法 > 注) 1) の対照実験を行ないデータを見せしてから 2) 以降の実験をすること。

- 1) 対照実験として、マウス 3 匹に saline を皮下投与し、その**20分後**に、0.7 % 酢酸溶液を腹腔内投与し、writhing (stretching) 反応が出現するまでの時間と、投与**10分後から 10分間**に現れる反応回数を 1 匹ずつ記録する (対照群)。
- 2) 別の一群 3 匹のマウスに薬物の各用量を皮下投与し、その**20分後**、0.7 % 酢酸溶液を腹腔内投与する。
- 3) writhing 反応が出現するまでの時間と、酢酸溶液投与**10分後から 10分間**に現れる反応回数を 1 匹ずつケージに入れ 3 匹同時に観察する。
- 4) 隣の班のデータと合わせ、1 群 6 匹として以下の式から抑制率を計算する。

※各群の平均値より、以下のように writhing の抑制率 (% of inhibition) を計算する。

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{対照群の平均writhing数}) - (\text{薬物群の平均writhing数})}{(\text{対照群の平均writhing数})} \times 100$$

※ 各用量の writhing 抑制率より、各薬物の 50% 有効量 (ED50) を、Litchfield-Wilcoxon 法により算出する。 (p.113～118)

B) Haffner 法 (p.55～56)

< 薬物 >

a) morphine-HCl	(2.5 mg/kg)	c) acetylsalicylic acid	(60 mg/kg)
	(5.0 mg/kg)		(120 mg/kg)
	(7.5 mg/kg)		(240 mg/kg)
	(10.0 mg/kg)		(480 mg/kg)
b) pentazocine	(10.0 mg/kg)	d) Ibuprofen-Na	(xx mg/kg)
	(20.0 mg/kg)		(xx mg/kg)
	(30.0 mg/kg)		(xx mg/kg)
	(40.0 mg/kg)		(xx mg/kg)

上記 a, b, c), d) のいずれかの薬物で実験する。

< 方法 >

- 1) 細いゴム管を付けたコッヘル鉗子でマウスの尾根部を一定の強度ではさむみ、対照群において約 5 秒で取り去ろうとする行動、即ち逃避行動または発声などの防御反応を示す強さを確認しておく。
- 2) 薬物および saline を皮下投与した後、**15分間隔** で **3回**、コッヘル鉗子で **5秒間ずつ各3回** 尾根部をはさみ、これに対する防御反応の数を **1匹ずつ** 数える。

※ **最も鎮痛効果の現われた時間における防御反応の抑制率を計算する。**

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{対照群の平均防御反応数}) - (\text{薬物群の平均防御反応数})}{(\text{対照群の平均防御反応数})} \times 100$$

※ 各用量の 防御反応抑制率より、Litchfield-Wilcoxon 法を用いて ED50 を算出し、鎮痛効果の強弱を比較する。

C) 未知薬物の推定 (# 3)

1 日目と同様に、未知薬物の作用を推定するための実験を行う。

D) 熱板 (Hot plate) 法 (デモンストレーション (ビデオ) による) (p.57～58)

< 方法 >

- 1) マウスを円筒内に静かに入れ、底の熱板 (55±1 °C) 上に置き、同時にタイマーを始動させて熱刺激によるマウスの後肢の異常反応 (足の振戦および後肢の足底をなめる動作または跳躍) を示すまでの時間 (反応時間) を測定する。

- 2) 前試験として、薬物を投与する前にマウスの熱刺激に対する反応時間を求め（通常5秒以内）、**15分間隔で2回**実験をくり返して**2回目の反応時間**をもって、それぞれのマウスの正常反応時間とする。
- 3) 反応発現後は、ただちにマウスを熱板上より取り出し、不必要な刺激を与えないようにする（反応出現は最初は遅いが、何回も繰り返し訓練することによって反応時間は短縮され、かつほぼ一定となる）。
- 4) 各群に被検薬物およびsalineを皮下投与し、**15分間隔で3回**測定し、最も鎮痛効果が強く現われた経過時間における有効動物数を求める。
(火傷を防止するため 15秒以上の刺激は避ける)。

※ 薬物処置により、反応閾値が正常反応時間の**2倍以上**となった動物を鎮痛効果陽性と判定し、Litchfield-Wilcoxon法を用いてED50を算出し鎮痛効果の強弱を比較せよ。

※参考：Tail flick (D'Amour-Smith)法

<方法>

- 1) マウスの尾根部から2～3 cmのところをマジックで黒く塗る。
- 2) Tail flick装置の照射部位にマウスの尾(黒く塗った部分)を置き、尾を動かす(tail flick)までの時間を秒単位で測定する(正常マウスの反応時間は通例1.5～4秒)。
- 3) 反応時間が正常動物の**3倍以上**に延長した場合を鎮痛効果陽性として判定する。(尾の火傷を防止するため、15秒以上の照射は避ける)。
- 4) マウス5匹を1群とし、各薬物(各々4用量)およびsalineを背部皮下に投与した5群について、**15分間隔で投与 45分後まで**反応の有無を観察する。

＊ポイント

鎮痛薬・統計的処理法

- E－1. Writhing とは何か。
- －2. 痛覚伝導路について説明せよ。
- －3. 麻薬性鎮痛薬と解熱性鎮痛薬の代表的なものを挙げ、作用点の違いを述べよ。
- －4. 身体的依存性と精神的依存性の違いについて薬物を挙げて説明せよ。
- －5. 禁断症状（退薬症状）とは何か。
- －6. Morphineの構造活性相関について述べよ。
- －7. ED50の算出にはこのほかにどのような方法があるか。
- －8. ED50値を比較する統計学的手法にはどのような方法があるか。

<ED50>	酢酸writhing法	Haffner 法	Hot plate 法
morphine (平均値) (標準誤差)			
pentazocine (平均値) (標準誤差)			
acetylsalicylic acid (平均値) (標準誤差)			
Ibuprofen Na (平均値) (標準誤差)			

※ 各自でED50値を算出せよ。黒板の集計表には各班の代表者の値を記入すること。

※ 他の班のデータをもらい各薬物のED50および各鎮痛測定法によるED50を比較せよ。可能な場合は、平均値、標準偏差(S.D.)、標準誤差(S.E.)を算出せよ。

※

$$\begin{aligned} \text{標準偏差 (S.D.)} &= \sqrt{\frac{\sum x^2 - n(\bar{x})^2}{n-1}} \\ &= \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}} \end{aligned}$$

ただし、xは各データ値、 $\bar{x}$ は平均値、nはデータ数

$$\text{標準誤差 (S.E.)} = \frac{\text{S.D.}}{\sqrt{n}}$$

〔2日目〕

4. 体性神経系に作用する薬物

4-1. 知覚神経系に対する作用

A) 局所麻酔薬のモルモット角膜における表面麻酔作用 (p.69)

< 薬物 >

dibucaine-HCl (2.5 mg/ml)

procaine-HCl (10 mg/ml)

< 方法 >

- 1) まつ毛を切り、実験しやすくする。
- 2) 刺激毛 (わりばしの先に毛のついたもの) を背後から軽く角膜の中心部にできるだけ直角に当てて (刺激毛がスリップしないように)、**あらかじめ角膜反射が起きることを確かめておく。**
- 3) 被検薬物を片側の下瞼をつまんでポケット状 (眼瞼結膜嚢) にして **3滴** 点眼し、軽くマッサージする (0分)。 **45秒後** に滴下した薬液を拭い去る。
- 4) **1分ごと** に刺激毛で角膜反射の有無を観察する。作用発現後は、**5分ごと** に **60分間** 行なう。

※ 2つの局所麻酔薬の作用を観察し、知覚麻酔の発現時間と持続時間とを測定し、各薬物の麻酔作用を比較する。

(注) **実験を始める前に、対照として生理食塩水を点眼したときの角膜反射を測定しておくこと！**
左右の角膜をそれぞれ片方ずつ使用して2つの局所麻酔薬の作用を調べること！
薬液を滴下する注射筒は、注射針をはずして使用すること！

< 判定基準 >

- +++ : 刺激により直ちに閉眼する。対照と同じ。
++ : 完全に閉眼するが反応出現は遅い。
+ : 反応出現が遅く完全に閉眼しない。
- : 全く閉眼せず眼瞼も動かない。

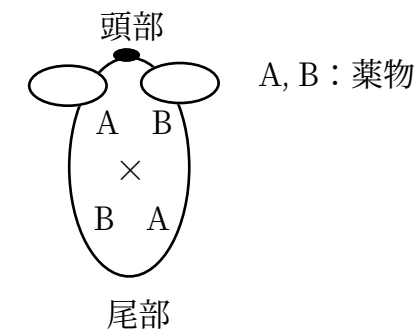
B) モルモットの皮膚反射に対する浸潤麻酔作用 (p.70)

< 薬物 >

procaine-HCl (10 mg/ml) と

奇数班は dibucaine-HCl (2.5 mg/ml)

偶数班は cocaine-HCl (10 mg/ml)



< 方法 >

- 1) 実験の前日にモルモット背部の毛をそり、さらに脱毛剤 (硫化バリウム) で完全に脱毛しておく (皮膚を傷つけないように注意する)。
- 2) 脱毛した背部中心部 (正中線) に近い部分の頭側と尾側のそれぞれ **2ヶ所ずつ** (合計4ヶ所) をあらかじめマジックなどで囲み、目印をつけておく (図参照)。 注) 頭側と尾側に投与する時は、距離をあけて投与しておくこと。
- 3) 3～5秒間隔で **6回** 刺激を加え、表皮に収縮反応が起こるのを確かめる (対照値とする) [刺激は針で目印の中心部とその周囲5ヶ所 (合計6回) の刺激を与え、皮膚反射 (すなわち表皮のけい縮反応) を起こさなかった回数を記録する]。
- 4) 被検薬液 **0.25 ml** を頭側と尾側の対照部位に **皮内投与** する。投与後 **5分間ごと** に刺激し、皮膚反射をしなかった回数を記録し、麻酔作用の強さを判定する。

(注) **皮膚反射が戻るまで測定を行なう！**

※ 2つの局所麻酔薬の作用を比較する。

4-2. 運動神経系に対する作用

A) Claude Bernardの実験 (方法の3)までは準備してある (p.73)

< 薬物 >

d-tubocurarine-HCl (3.0 mg/ml)

< 方法 >

- 1) トノサマガエルを腹位に固定し両側の大腿の坐骨神経を傷つけないように露出する。

- 2) 一側の大腿全部を坐骨神経を残して結紮糸で**固く縛り**，末梢への血行を完全に止める．
- 3) 神経の下にセルロイド板を置き，下腿部の皮膚を剥離して筋を露出させる．
- 4) 単一刺激（矩形波, 15 V, 幅 2 msec）を与えて両肢の攣縮を確かめる（直接刺激）．
- 5) セルロイド板上の坐骨神経を神経以外を刺激せぬように注意して単一刺激を与え，坐骨神経支配下の両肢の攣縮を確かめる（間接刺激）．
- 5) *d*-tubocurarine-HCl (**1.5 mg/frog**) をリンパ腔内に投与し，**5分ごと**に上記 3～4 の刺激を与えて，攣縮の有無を確かめる．

*ポイント

局所麻酔薬・末梢性骨格筋弛緩薬

- F－1．局所麻酔薬の種類と薬物を挙げよ．
- － 2．Epinephrine はなぜ局所麻酔薬と併用されるか．
 - － 3．局所麻酔薬の構造活性相関について調べよ．
 - － 4．*d*-tubocurarine の作用点について，この実験から考えられることを述べよ．

5. 循環器系に対する作用（交感神経系と副交感神経系の支配）

5-1．八木式心臓灌流法による実験（標本は準備してある）

< 薬物 >

acetylcholine-HCl	(10^{-6} g/ml)
atropine-H ₂ SO ₄	(10^{-5} g/ml)
epinephrine	(10^{-6} g/ml)

< 方法・実験のポイント >

- 1) acetylcholine-HCl をリンゲル液に**0.2 ml**加え，観察する．
- 2) 1)の反応を確認後，atropine-H₂SO₄ を投与し観察する．
- 3) リンゲル液で**十分に洗淨する**．
- 4) atropine-H₂SO₄ を与え 2) の反応と比較する．
- 5) リンゲル液で**十分に洗淨する**．
- 6) epinephrine を与え観察する．1) および 4) の反応と比較する．
- 7) 6)の反応を確認後，atropine-H₂SO₄ を与え観察する．変化が見られるか．
- 8) リンゲル液で**十分に洗淨する**．

*ポイント

心臓機能の調節

- G－1．各薬物の作用機序を考察し，併用投与により明らかになったことについて述べよ．

5-2．麻酔下のラット動脈血圧の測定（標本は準備してある）

< 薬物 >

薬液は，方法2)の液量を注射すると，以下の用量になるように予め調整してある．

acetylcholine-HCl	(5×10^{-6} g/ml/kg)
atropine-H ₂ SO ₄	(10^{-4} g/ml/kg)
epinephrine	(5×10^{-6} g/ml/kg)
isoprenaline-HCl	(10^{-6} g/ml/kg)
phentolamine mesylate	(5×10^{-3} g/ml/kg)
propranolol-HCl	(10^{-3} g/ml/kg)

< 方法・実験のポイント >

- 1) 大腿静脈に挿入してあるカニューレを介して薬液を静注し，動脈血圧，心拍数に対する作用を観察記録する．

- 2) ラットの**体重100 g当り0.1ml (phentolamine のみ 0.05ml)** の薬液を注入する。
- 3) カニユーレについている生理食塩液用注射筒をはずし、生理食塩液をカニユーレ先端に充たした後、使用薬液用注射筒をはめ込む。注入終了後、素早く注射筒をはずし、生理食塩液をカニユーレ先端に充たした後、生理食塩液用注射筒をつけて少量の生理食塩液を注入し、静脈カニユーレに残留している薬液を血管内に流し込ませる。**薬液注入にあたっては気泡が入らないように注意する。とくに、注射筒を交換する際に気を付けること。また、注入速度にも気を付けショック症状を起こさないようゆっくり注入すること。**
- 4) まず、acetylcholine-HCl または epinephrine 単独の作用を観察する。血圧等の変化がもとに戻った後、各々の拮抗薬を以下のように投与する。拮抗薬の作用が一定になっている間に前出の作動薬を投与し、単独投与の場合と比較する。

<薬物投与順序>

(ラット A)

[Agonists]

1. acetylcholine-HCl (5×10^{-6} g/ml/kg)
2. epinephrine (5×10^{-6} g/ml/kg)
3. isoprenaline-HCl (10^{-6} g/ml/kg)

[Muscarinic blocker]

4. atropine-H₂SO₄ (10^{-4} g/ml/kg)
5. acetylcholine-HCl (5×10^{-6} g/ml/kg)
6. acetylcholine-HCl (10^{-4} g/ml/kg)

[β -blocker]

7. propranolol-HCl (10^{-3} g/ml/kg)
8. epinephrine (5×10^{-6} g/ml/kg)
9. isoprenaline-HCl (10^{-6} g/ml/kg)

(ラット B)

[Agonists]

10. epinephrine (5×10^{-6} g/ml/kg)
11. isoprenaline-HCl (10^{-6} g/ml/kg)

[α -blocker]

12. phentolamine mesylate (5×10^{-3} g/ml/kg)
13. epinephrine (5×10^{-6} g/ml/kg)
14. isoprenaline-HCl (10^{-6} g/ml/kg)

*ポイント

血圧の調節

H-1. 各薬物の作用機序を考察し、併用により明らかになったことについて述べよ。

H-2. 血圧を左右する主な要因には、何が考えられるか述べよ。

未知薬物の推定

*未知薬物について

今回の実習では、各班に異なった未知薬物 (A, B, C, D, E 用量は全て 1 mg/kg) を配付する。各班に配付する未知薬物は、3日間を通して同じものとする。その日の実習内容を理解し、未知薬物の単独の作用、他の薬物との併用による作用の変化などから、3日間の結果をもとに総合的に未知薬物の作用の推定を試みる。

今回用いる未知薬物 (A, B, C, D, E) のリスト：

Picrotoxin, Nitrazepam, Tacrine, Morphine, Scopolamine の何れか。

今回の実習結果からだけではその作用を確定することは困難であるが、ここでは未知薬物の作用のスクリーニングの概念を習得することを目的としている。従って、推定結果が重要なのではなく、実験計画の立て方、推論の導き方がポイントとなる。これらの点をふまえ、どのように実験計画を立てたのか、また、どのように結論に導いたかをレポートにすること。

なお、実習が始まる前までに、上記薬物の薬理作用について、調べておくこと！