ウサギの vocalization 反応に対する morphine の作用におよぼす serotonin depletor の影響

村 井 繁 夫

岩手医科大学・歯学部・薬理学教室*

小 倉 保 己

東北大学・歯学部・薬理学教室**

〔受付: 昭和53年2月24日〕

抄録: 坐骨神経電気刺激により発現する urethane 麻酔ウサギの vocalization の回数を指標として, morphine (M) の鎮痛作用における, 5-hydroxytryptamine (5-HT) の役割を検討した。p-chlorophenylalanine (pCPA) の前処理により, Mの鎮痛作用は効力, 持続時間, levallorphan との拮抗などいずれも影響されなかった。また 5-hydroxytryptophane + Ro 4-4602 の前処理により, Mの鎮痛作用は影響されなかった。一方, tetrabenazine の前処理により, Mの鎮痛効力は有意に増加した ($p < 0.05$)。実験に用いたウサギの vocalization の回数には, 対照群と pCPA 処理群で有意の差がなかった ($p < 0.01$)。以上の結果から, ウサギにおける Mの鎮痛作用の発現機構に, 5-HT はほとんど関与しておらず, また vocalization afterdischarge は中枢神経系の adrenergic mechanism により調節されている可能性が示唆された。

結 言

種々の疼痛刺激により発現する vocalization (cry, squeal) は, 動物における疼痛反応の重要な指標として, 多くの研究者により用いられている¹⁻²⁾。

ウサギの場合, vocalization に関する報告は極めて少ない。ウサギにおいても, ラットやイヌと同様に, bradykinin などの動注により, vocalization が発現するが³⁻⁵⁾, 再現性が確実でないことから⁵⁾, ウサギの疼痛の signal としては, ほとんど利用されていない。

著者らは体性神経の求心的電気刺激により, ウサギにおいて再現性が極めて高い vocalization が発現することを見だし, そしてこの反応が鎮痛量の morphine により抑制されることを報告している⁶⁾。

所で, morphine の鎮痛作用の発現機序に関して, 中枢神経系内の 5-hydroxytryptamine (5-HT) 作働系との関連から説明しようとする多くの試みがある⁷⁻⁹⁾。しかしながら, 結果は実験方法, 動物の種類などの相違により, 必ずしも一致を見ない。

例えば, Tenen⁷⁾はラットで, 辺見ら⁸⁾はマウスで, 5-HT の特異的な depletor である p-chlorophenylalanine (pCPA) の前処理により, morphine の鎮痛作用が減弱することを報告している。一方, ウサギを用いた Saarnivaara⁹⁾は pCPA の前処理により, morphine の鎮痛作用が増加するのを見出ししている。

そこで著者らは morphine の鎮痛作用と 5-HT mechanism との関連性を検討するために, 著者らが見いだしたウサギの vocalization を指標として, morphine の作用におよぼす pCPA および

Influences of serotonin depletors to the effect of morphine on vocalization of rabbits.

Shigeo MURAI (Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical College, Morioka)

Yasumi OGURA (Department of Pharmacology, School of Dentistry, Tohoku University, Sendai)

* 盛岡市内丸 19-1 (〒020)

** 仙台市星陵町 4-1 (〒980)

Jap. J. oral Biol., 20: 480-487, 1978.

tetrabenazine 前処理の効果について検討を加えた。

実験方法および材料

市販の雌ウサギ(体重2~3kg)を用い, urethane (1g/kg S.C.) で麻酔後, 背位に固定した。両側の坐骨神経は 大腿二頭筋と大内転筋の間で露出し, 電気刺激が求心性に行えるようにするため, 末梢側で二重に結紮した。

坐骨神経の電気刺激は 電子管刺激装置(日本光電, MSE-2)を用いて, 坐骨神経に装着した bed 付きプラチナ双極電極にて, 30V, 0.1msec, 10Hz で10秒間通電した。この刺激条件では, 10分間隔の刺激で少くとも4時間にわたって, ほぼ一定回数の vocalization が得られた。vocalization は condenser microphone (ソニー, ECM-16), bio-physical amplifier(日本光電, RB-2), 積分装置¹⁰⁾を介して, ink-writing recorder (日本光電, WI-260) に描記した。

vocalization は Carroll ら¹¹⁾の方法に準じて, 電気刺激継続中の vocalization (Vd; vocalization during stimulation) と刺激停止後の vocalization (Va; vocalization afterdischarge) とに区別されて計測され, Vd および Va の回数が疼痛反応の指標として用いられた。10秒間の刺激あたりの Vd および Va の回数はそれぞれ, 8.9 ± 0.8 回, 12.2 ± 2.7 回 (平均 $\pm$ S.E., n=10) であった。

実験結果は morphine の投与直前の Vd および Va の回数をコントロールとして, 回数の変化率を求め, Student の t 検定により, 対照群と薬物処理群間の有意差が判定された。

5-HT depletor として, pCPA (シグマ) と tetrabenazine (ロッシュ) を用いた。

pCPA は Perez-Cruent¹²⁾の報告に従い, 100mg/kg/day の4日間連続処理もしくは400mg/kg が投与され, 実験は最後の投与から12時間後に開始された。

tetrabenazine は Pletscher の¹³⁾報告に従い, 40mg/kg が投与され, 1時間後に morphine が投与された。

その他に, morphine hydrochloride (武田),

levallorphan (武田), 5-hydroxytryptophan (5-HTP, シグマ), Ro 4-4602(ロッシュ)を用いた。

levallorphan (注射用) はそのまま, morphine は0.9% NaCl 溶液に溶解し, それ以外の薬物は0.5% Tween 80 溶液に懸濁して投与された。

実験結果

1. 対照群における morphine の作用

図1および表1に, 0.9% NaCl 溶液を投与した対照群の Vd および Va に対する morphine 1.25mg/kg および2.5mg/kg の作用を示した。

morphine 1.25mg/kg の投与により, Vd および Va は軽度抑制された。morphine 2.5mg/kg の投与では, Va は Vd より約2倍強く抑制された。

morphine 1.25mg/kg と2.5mg/kg の作用を比較すると, Vd に対してはどちらの抑制も軽度で, 投与量による差は認められなかったが, Va に対しては, 2.5mg/kg の方が, 1.25mg/kg より, 約2倍強く抑制した。

2. pCPA 前処理群における morphine の作用

図2, 3および表1に示したように, pCPA 100mg/kg/day の4日間連続処理群の Vd および Va に対する morphine 1.25mg/kg および2.5mg/kg の作用は対照群と比較して, 差は認められなかった。

また, pCPA 400mg/kg (図3) 前処理により, Vd および Va に対する morphine 1.25mg/kg の作用は対照群と比較して, 差は認められなかった。

図3の Vd にみられるように, pCPA 前処理群に morphine 2.5mg/kg を投与した場合, 半数のウサギ(3/6例)に, Vd の一時的な中断が起り, 測定値は強いばらつきを示した。

3. pCPA 前処理群における morphine と levallorphan との拮抗

pCPA 前処理により, morphine の作用に対する levallorphan の拮抗作用が影響を受けるかどうかを検討した。levallorphan 0.5mg/kg は morphine 2.5mg/kg 投与の2時間後に投与された。

表2に示したように, levallorphan は明らか

図 1 ウサギの vocalization に対する morphine の抑制作用

表 1 対照群および pCPA 処理群の vocalization に対する morphine の抑制作用の比較

morphine, mg/kg, i.v.	Va の抑制率, %	Va の抑制率, %
対 照 群		
1.25	14.0 ± 5.6(5)	26.0 ± 2.5(5)
2.5	23.0 ± 5.0(6)	50.2 ± 3.2(6)
pCPA 処理群 A		
1.25	16.2 ± 8.4(5) N.S.	41.0 ± 7.5(5) N.S.
2.5	51.3 ± 16.5(6) N.S.	56.0 ± 2.5(6) N.S.
pCPA 処理群 B		
2.5	18.5 ± 7.4(4) N.S.	62.3 ± 7.7(4) N.S.

平均 ± S.E. () 内はウサギの数, N.S. は有意の差なし $p < 0.05$

pCPA 処理群 A : 100mg/kg/day × 4 日間投与, i.p.

pCPA 処理群 B : 400mg/kg, i.p.

に, Vd および Va に対する morphine の作用に拮抗を示すが, その拮抗作用は対照群および pCPA 前処理群において, 差は認められなかった。

4. 5-HTP および Ro 4-4602 前処理群における morphine の作用

図 4 に示したように, 5-HT の前駆体である 5-

HTP 40mg/kg および末梢の脱炭酸酵素阻害剤である Ro 4-4602 の 50mg/kg を前処理した群の Vd および Va に対する morphine 2.5mg/kg の作用は, 対照群と比較して差はなかった。

5. tetrabenazine 前処理群における morphine の作用

脳内の 5-HT および catecholamine の双方を減少させた場合, morphine の作用が影響を受けるかどうかを検討した。

表 3 に示したように, tetrabenazine 40mg/kg 前処理により, Va に対する morphine 1.25mg/kg の作用は, 対照群と比較して増加を示した。

考 察

pCPA は 5-HT の特異的な depletor で末梢および脳内の双方で catecholamine 量にはほとんど影響を与えずに, 5-HT 量だけを著しく減少させる作用を示すことが知られている¹⁴⁻¹⁵⁾。

本実験では, pCPA 前処理後の 5-HT 量の低下率について測定していないが, Perez-Cruent¹²⁾ はウサギにおいて, 著者らと同じ投与条件の pCPA

図 2 pCPA 処理ウサギの vocalization に対する morphine の抑制作用

図 3 pCPA 処理ウサギの vocalization に対する morphine の抑制作用

100mg/kg/day の4日間連続処理により、脳内 5-HT 量が正常レベルの10%程度に低下することを報告している。この時、脳内 noradrenaline 量のレベルは、ほとんど変化を示さない。

また、Saarnivaara⁹⁾は同じくウサギを用いて、pCPA 100mg/kg/day の3日間連続処理により、脳内 5-HT 量と noradrenaline 量のレベルが、それぞれ対照レベルの約40%と約80%に低下するこ

表 2 対照群および pCPA 処理群の vocaliyation における morphine の抑制作用に対する levallorphan の効果の比較

drugs, mg/kg, i.v.	Vdの回復率, %	Vaの回復率, %
対 照 群		
morphine, 2.5+ levallorphan, 0.5	13.3±10.2(4)	40.8±10.5(4)
pCPA 処理群		
morphine, 2.5+ levallorphan, 0.5	N.S. 18.8±13.2(5)	N.S. 33.0± 7.1(5)

平均±S.E., () 内はウサギの数, N.S. は有意の差なし (p<0.01).
pCPA : 100 mg/kg/day×4日間投与, i.p.

とを報告している。

一方、5-HT の前駆体である 5-HTP と末梢の脱炭酸酵素阻害剤である Ro 4-4602 の併用投与は、脳内 5-HT 量を正常レベルの 2～3 倍にも増加させることが報告されている¹⁶⁾。

しかしながら、上記の報告と同じ投与条件で行った本実験において、pCPA 前処理あるいは 5-HTP+Ro 4-4602前処理群の vocalization に対す

表 3 対照群および tetrabenazine 処理群の vocalization に対する morphine の抑制作用の比較

morphine, mg/kg, i.v.	Vdの抑制率, %	Vaの抑制率, %
対 照 群		
1.25	14.0±5.6(5)	26.0±2.5 (5)
tetrabenazine 処理, 2.5		
	16.8±6.7(4)	36.5±2.4*(4)

平均±S.E., () 内はウサギの数, N.S. は有意の差なし (p<0.01)

* は有意の差あり (p<0.05)

tetrabenazine 処理, 40 mg/kg, i.p.

図 4 5-HTP+Ro 4-4602処理ウサギの vocalization に対する morphine の抑制作用

る morphine の抑制作用は、抑制率、作用持続時間、levallorphan による拮抗など、いずれも対照群と比較して有意な差はなく、morphine の鎮痛作用が、脳内 5-HT 量の変動により影響されるという証拠は得られなかった。

Saarnivaara⁹⁾はウサギにおいて、pCPA 前処理後、歯髄電気刺激により発現する疼痛反応 (licking) に対する morphine の抑制作用が増加を示すとはいえ、ウサギにおいて morphine の鎮痛作用は脳内 5-HT により中介されていないと推測している。

従って本実験の結果もまた、ウサギにおける morphine の鎮痛作用の発現に脳内 5-HT が、ほとんど関与していないことを示唆するものと考えられる。

著者らのこの見解は、morphine の鎮痛作用が脳内 5-HT を介して発見するという、ラットを用いた Tenen⁷⁾あるいは Görlitz ら¹⁷⁾の主張と相違している。5-HT の役割における、このような見解の相違はおそらく種差によることが考えられる。

morphine の鎮痛作用に対する薬物の効果は、種差で相違することが知られている。例えば、脳内モノアミン量に影響を与える α -methyl-p-tyrosine の投与により、Major ら¹⁸⁾はマウスにおいて、morphine の鎮痛作用が増加することを見ており、一方、ラットを用いた Tenen⁷⁾は逆に低下することを報告している。種差により morphine の作用が相反する例として、Sawa ら¹⁹⁾は、morphine の鎮痛用量の投与がマウスでは hyperactivity を起し、ラットでは hypoactivity を起すことを指摘している。

所で、著者らと Saarnivaara⁹⁾では、morphine の鎮痛作用における 5-HT の役割についての評価は一致しているが、pCPA 前処理における成績は一致していない。すなわち、著者らでは変化が認められなかったのに対し、Saarnivaara では増加が起る。この食い違いは、マウスにおいて pCPA 前処理による脳内 5-HT の減少が morphine の鎮痛作用を減少するという辺見ら⁸⁾の報告 (pressure 法) と変化がないという Fennessy ら²⁰⁾の報告 (hot plate 法と phenylquinone-writhing 法) と似ている。

Görlitz ら¹⁷⁾は morphine の鎮痛作用と脳内 5-HT との相関を検討する場合、種差ばかりでなく、疼痛を引き起こす方法の違いも重要であると示唆している。

Hoffmeister²¹⁾によれば、Saarnivaara⁹⁾が疼痛反応の指標に用いた licking は thalamus により中介される反応であり、一方、著者らが用いた vocalization は、Vd が medulla を介する反応で、Va は licking より更に広範囲の thalamo-hypothalamo-rhinencephalic system により中介される反応である。

このように、著者らと Saarnivaara⁹⁾では、用いた指標の central pathway の相違が指摘されているので、実験結果の不一致の原因の一つとして、疼痛の誘起方法の違いによることも考えられよう。

本研究では、著者らは 5-HT depletor として、pCPA 以外に tetrabenazine を用いた。tetrabenazine の使用の目的は、depletor としての作用がほぼ中枢神経系内に限られることと、5-HT ばかりでなく、noradrenaline 量も減少させる作用を持つことにあった^{13,22)}。

ウサギにおいて、Pletscher¹³⁾は tetrabenazine 40mg/kg (i.p.) により脳内 5-HT 量が正常レベルの約 40% (投与 30 分後) に低下することを報告しており、また Quinn ら²²⁾は 50mg/kg (i.v.) により、脳内 5-HT 量と noradrenaline 量が、ほぼ同程度の約 40% (投与 1 時間後) に低下することを明らかにしている。

表 3 に示したように、本実験において tetrabenazine 前処理は、morphine の鎮痛作用を有意に増加させた ($p < 0.05$)。この結果は、morphine の鎮痛作用の発現機構における 5-HT の関与に否定的な著者らの見解を支持しないようにみえる。しかしながら、tetrabenazine は脳内 5-HT とカテコールアミンの双方を減少させる効果を持つので、morphine の鎮痛作用が後者により中介されると仮定するならば、tetrabenazine のこの成績と著者らの見解は矛盾しないと考えられる。

Hoffmeister²¹⁾は Va の発現に関係する thalamo-hypothalamo-rhinencephalic system がいわゆる情動反応の発生と調節に重要な領域であること

から, Va の意義として疼痛反応における emotional component と対応するものと考えている。Herold ら²³⁾はラットで, Va が抗 5-HT 剤で影響されることから, 中枢神経系において 5-HT が疼痛 impulse の伝達に関与していると結論している。又, Saarnivaara⁹⁾はウサギの中枢神経系において, 5-HT は algesic transmitter の役割を果たしているかも知れないと述べている。上記の諸見解は, ウサギの Va の発現機構に 5-HT mechanism が関与している可能性を示唆するものと考えられる。

しかしながら, 本実験の成績はこの可能性を支持しないものと考えられる。すなわち, 表 4 に示したように, 本実験でコントロールとして用いた

表 4 対照群および pCPA 処理群における control の vocalization の回数の比較

	Vd の回数	Va の回数
対 照 群 (10)	8.9±0.8	12.2±2.7
pCPA 処理群 (6)	9.3±0.8N.S.	10.0±1.4N.S.

平均±S.E., () 内はウサギの数

N.S. は有意の差なし ($p < 0.01$)

pCPA: 100 mg/kg/day×4 日間投与, i.p.

Vd と Va の回数に関して, 対照群と pCPA 前処理群との間に有意 ($p < 0.01$) の差がみられなかった。これは pCPA 前処理により, vocalization の発現頻度が影響されないことを示す結果と考えられる。

この表 4 の結果と tetrabenazine 投与の結果 (表 3) を合せて考察するならば, ウサギの Va は 5-HT ではなく, むしろカテコールアミンにより調節されている可能性が考えられる。

この仮定によれば, vocalization を抑制する morphine の鎮痛作用に脳内 5-HT は関与しないことになり, pCPA 前処理により, morphine の鎮痛効力の変動がみられなかった本実験の結果は妥当なものといえよう。

Va と adrenergic mechanism との関連性については現在検討中である。

謝 辞

稿を終るに臨み, tetrabenazine および Ro 4-4602 を

提供された日本ロッシュ株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) BRODIE, D. C., LEONGWAY, E. and SMITH, Jr. G. E.: A note on a modification of a method for evaluating salicyl-type analgesics. *J. Am. Pharm. Ass.* 41 : 48-49, 1952.
- 2) GUZMAN, F., BRAUN, C., LIM, R. K. S., POTTER, G. D. and RODGERS, D. W.: Narcotic and non-narcotic analgesics which block visceral pain evoked by intra-arterial injection of bradykinin and other algesic agents. *Archs int. Pharmacodyn. Théor.* 149 : 571-588, 1964.
- 3) GRAEFF, F. G., PELÁ, I. R. and ROCHA E SILVA, M.: Behavioural and somatic effects of bradykinin injected into the cerebral ventricles of unanaesthetized rabbits. *Brit. J. Pharmacol.* 37 : 723-732, 1969.
- 4) KANEKO, T., SATOH, M. and TAKAGI, H.: Central actions of bradykinin in rabbit and their modification by analgesics. *Folia Pharmacol. japon.* 65 : 176-181, 1969.
- 5) DOI, T., AKAIKE, A., OHASHI, M., SATOH, M. and TAKAGI, H.: Bradykinin-induced flexor reflex of rabbit hindlimb for comparing analgesics. *Japan. J. Pharmacol.* 26 : 634-637, 1976.
- 6) MURAI, S. and OGURA, Y.: Pharmacological studies of vocalization response induced by afferent stimulation in rabbits. *Japan. J. Pharmacol.* 25, Suppl. 99p, 1975.
- 7) TENEN, S. S.: Antagonism of the analgesic effect of morphine and other drugs by p-chlorophenylalanine, a serotonin depletor. *Psychopharmacologia (Berlin)* 12 : 278-285, 1968.
- 8) HENMI, Z., MITSUSHIMA, T., KAWAZURA, H., KITANO, T., SATO, N. and ENDO, N.: Relationship between brain CA and 5-HT levels and analgesia induced by morphine and other drugs in mice. *Folia Pharmacol. japon.* 66 : 102\$, 1970.
- 9) SAARNIVAARA, L.: Effect of 5-hydroxytryptamine on morphine analgesia in rabbits. *Ann. Med. exp. Fenn.* 47 : 113-123, 1969.
- 10) TAIRA, N., NAKAYAMA, K. and HASHIMOTO, K.: vocalization response of puppies to intra-arterial administration of bradykinin and other algesic agents and mode of actions of blocking agents. *Tohoku J. exp. Med.* 96 : 365-377, 1968.
- 11) CARROLL, M. N. and LIM, R. K. S.: Observations on the neuropharmacology of morphine and morphinelike analgesia. *Archs*

- int. Pharmacodyn. Thér.* 125 : 383-403, 1960.
- 12) PEREZ-CRUENT, J., TAGLIAMONTE, A. and GESSA, G. L. : Differential effect of p-chlorophenylalanine (PCPA) on sexual behavior and on sleep patterns of male rabbits. *Rivista di Farmacologia e Terapia*, 11 : 27-34, 1971.
- 13) PLETSHER, A. : Release of 5-hydroxytryptamine by benzoquinolizine derivatives with sedative action. *Science*, 126 : 507, 1957.
- 14) KOE, B. K. and WEISSMAN, A. : p-Chlorophenylalanine : a specific depletor of brain serotonin. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 154 : 499-516, 1966.
- 15) SOMERVILLE, A. R. and WHITTLE, B. A. : The interrelation of hypothermia and depletion of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine from brain by reserpine, p-chlorophenylalanine and α -methyl-metatyrosine. *Brit. J. Pharmacol.* 31 : 120-131, 1967.
- 16) GROPE, G. and KUSCHINSKY, K. : Stimulation and inhibition of serotonergic mechanisms in rat brain : alterations of morphine effects on striatal dopamine metabolism and on motility. *Neuropharmacol.* 14 : 659-664, 1975.
- 17) GÖRLITZ, B. D. and FREY, H. H. : Central monoamines and antinociceptive drug action. *Europ. J. Pharmacol.* 20 : 171-180, 1972.
- 18) MAJOR, C. T. and PLEUVRY, B. J. : Effects of α -methyl-p-tyrosine, p-chlorophenylalanine, L- β -(3,4-dihydroxyphenyl) alanine, 5-hydroxytryptophan and diethyldithiocardamate on the analgesic activity of morphine and methylamphetamine in the mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 42 : 512-521, 1971.
- 19) SAWA, A. and OKA, T. : Effects of narcotic analgesics on serotonin metabolism in brain of rats and mice. *Japan. J. Pharmacol.* 26 : 599-605, 1976.
- 20) FENNESSY, M. R. and LEE, J. R. : Modification of morphine analgesia by drugs affecting adrenergic and tryptaminergic mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.* 22 : 930-935, 1970.
- 21) HOFFMEISTER, F. : Effects of psychotropic drugs on pain. In Pain, Edited by Soulaire, A., Cahn, J. and Charpentier, J., 309-319, *Academic Press*, New York and London, 1968.
- 22) QUINN, G. P., SHORE, P. A. and BRODIE, B. B. : Biochemical and pharmacological studies of RO 1-9569 (tetrabenazine), a non-indole tranquilizing agent with reserpine-like effects. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 127 : 103-109, 1959.
- 23) HEROLD, M. and CAHN, J. : The possible role of serotonin in affective component of pain behavioural reaction in the rat. In Pharmacology of Pain, Edited by Lim, R. K. S., Armstrong, D. and Pardo, E. G., 87-99, *Academic Press*, New York and London, 1967.