ラットにおいてモルヒネにより誘発される筋強直の筋電図法
による定量的評価およびそれに対する薬物の作用

渡辺裕司,* 渡辺和夫, 白崎謙一, 藤田久代

富山医科薬科大学, 和漢薬研究所, 生物試験部門

A Quantitative Evaluation of Morphine Rigidity with an Electromyographic Method and Effects of Drugs on it in the Rat

HIROSHI WATANABE,* KAZUO WATANABE, KENICHI SHIRASAKI and HISAYO FUJITA

Research Institute for Wakan-yaku, Toyama Medical and
Pharmaceutical University, Toyama, 930-01, Japan

(Received February 1, 1983)

In order to examine drug effects on an extrapyramidal symptom the muscular rigidity produced by morphine was evaluated by an electromyographic method in the gastrocnemius muscle of rats and the result was compared with that by a catalepsy method. Morphine hydrochloride at a dose of 2.5 mg/kg *s.c.* produced a significant increase in electromyogram activity. An administration of morphine hydrochloride at doses of 10, 20 and 40 μ g into the spinal subarachnoid space or cerebral ventricle also produced a marked increase in electromyogram activity. These effects of morphine were antagonized by naloxone permoate at doses of 0.5 to 2 mg/kg *i.p.* When morphine rigidity was estimated by the catalepsy method, the identification limit of the dose was more than 5 mg/kg *s.c.* The increase in electromyogram activity after morphine hydrochloride 2.5 mg/kg *s.c.* was suppressed by centrally-acting muscle relaxants, mephenesin, baclofen and carisoprodol. It was also inhibited significantly by dopaminergic agonists, apomorphine and L-dopa.

These results suggest that an electromyographic analysis in the gastrocnemius muscle of lightly-restrained unanesthetized rats is a sensitive method to detect quantitatively the rigidity produced by morphine and to evaluate drug effects on it.

Keywords—muscular rigidity; electromyogram; morphine; catalepsy; naloxone; mephenesin; baclofen; carisoprodol; apomorphine; L-dopa

パーキンソン病の主徴の1つである筋強直の実験的評価には、強直をおこしている筋肉から筋電図を記録する方法,¹⁻⁴⁾ 筋伸展時に発生する張力から筋緊張度を測定する方法,^{5,6)} 実験的な強直状態において、強直筋を支配する α あるいは γ 運動神経から自発性や反射性の神経活動を記録する方法,^{1,4,7)} などが用いられている。これらの方法は実験中に動物を長時間固定したり、麻酔下に手術を施したりする必要がある。また、大量の抗精神病薬を投与した時に生ずるカタレプシー症状の測定方法も筋強直の評価に応用される。⁸⁾

今回、実験動物に大きな侵襲を与えることなく筋緊張度を簡単に測定するために、無麻酔軽拘束下にラット後肢腓腹筋の筋電図を誘導し記録することを試みた。鉛管様のカトニーをおこすことが知られている morphine を皮下および脳脊髄液内に投与して、筋電図の増大が生ずることを確認し、筋電図による強直の検出限界、再現性および定量性について検討し、カタレプシー測定法と比較した。また、morphine により増大した筋電図発射頻度に対する数種薬物の影響についても調べた。

実験方法

1) 筋電図の記録 Wistar 系雄性ラット 250—400 g を無麻酔でボールマン型ケージに軽く拘束し、後肢腓腹筋にステンレス製同心円電極 (直径 250 μ , 長さ 21 mm) を刺入し、筋電図を導出した。筋電図は生体電気増巾器を通してオシロスコープにて観察した。50 μ V 以上の電気活動を短形波に変換して5秒間毎に加算し、DC レコーダ上に発射頻度として記録した。同時に、digital counting printer により毎5秒間の発射総数を記録し

た。

2) カタレプシーの測定 200—300 g の Wistar 系雄性ラットを使用し, Costall and Olley の方法に基づいてカタレプシーの測定を行った。⁹⁾ すなわち, morphine 投与前および投与後 30 分毎にラットの両前肢を高さ 7.5 cm の水平な棒 (直径 10 mm) の上におき, ラットが後肢立ちの姿勢を維持する時間 (秒) を測定した。

3) 脳室内投与 ラットをネンブタール 50 mg/kg *i.p.* 投与により麻酔後, 脳定位固定装置に固定し, Bregma より 1 mm 尾側, 1 mm 外側, 頭蓋骨表面から 3 mm の位置にステンレス製ガイドカニューレ (内径 350 μ m, 長さ 10 mm) を植え込んだ。術後 5 日以上において morphine 溶液を投与した。薬液は微量注入器を用い, 10 μ l/min の速度でガイドカニューレを介して脳室内に投与した。1 回の投与容量は 10 μ l とした。

4) 脊髄クモ膜下腔内投与 ラットをネンブタール麻酔下に脳定位固定装置に固定し, Yaksh and Rudy の方法¹⁰⁾に基づいて, PE 10 のポリエチレンチューブを伸ばして作ったカニューレを, 環椎後頭膜を通して脊髄クモ膜下腔へ, 先端が腰椎膨大部に達するように約 8.5 cm の長さ分だけ挿入した。カニューレの尾端は歯科用セメントで後頭骨に固定した。術後 5 日以上を経て実験に使用した。薬液の投与容量は 5 μ l とし, 0.25 μ l/min の速度でカニューレを介して注入した。

5) 使用薬物 Morphine hydrochloride (三共), Baclofen (第一) および Apomorphine hydrochloride (大日本) は生理食塩水に溶解, Mephenesin (三共), L-Dopa (東京化成) および Carisoprodol (万有) は 0.5% CMC-生理食塩水に懸濁して使用した。

実 験 結 果

1. Morphine の筋電図に及ぼす影響

1-1) 皮下投与 Morphine HCl 0.625 mg/kg を皮下投与したところ筋電図に著しい変化はみられなかった。そこで, 0.625 mg/kg を追加注射し, 総量 1.25 mg/kg としたところ, 発射頻度は著明に増加した。さらに 1.25 mg/kg を追加して総量 2.5 mg/kg とすると, 10 分後から発射頻度はさらに増加し, 30 分後にはほぼピークに達した (Fig. 1)。Morphine HCl 2.5 mg/kg *s.c.* 投与時の筋電図発射頻度を 100% とすると, 0.625 mg/kg 投与時に 34.8%, 1.25 mg/kg 投与後は 51.1% で, morphine の用量と筋電図発射数の間には直線関係が成立した (Fig. 2)。Morphine HCl 2.5 mg/kg *s.c.* 投与により生ずる筋電図の増大は naloxone permoate 0.5 あるいは 1.0 mg/kg *i.p.* 投与により拮抗された (Table I)。

1-2) 脊髄クモ膜下腔内投与 Morphine HCl 10 μ g を脊髄クモ膜下腔内に投与したところ, 注入操作 (数分を要する) 後より筋電発射が増加し, 注入開始から 20 分後にピークに達し, その後減少した。10 μ g を追加すると, 投与直後から徐々に筋電発射頻度が上昇し, 約 10 分後に最大に達した。さらに 20 μ g を追加したが, それ以上発射頻度が増加することはなかった。記録例を Fig. 3A に示す。このような筋電図の増大も naloxone permoate 1—2 mg/kg *i.p.* 投与により抑制された。

1-3) 脳室内投与 Morphine HCl 10 μ g を脳室内へ投与すると, 筋電図発射頻度は著明に増加し, 30 分後

Fig. 1. Effect of Morphine on the EMG Activity of the Gastrocnemius Muscule in the Rat

Morphine hydrochloride was administered to rats cumulatively in doses of 0.625 to 1.25 mg/kg *s.c.*

Fig. 2. Relationship between Doses of Morphine and EMG Activity

Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of four experiments.

Fig. 3. Effect of Morphine Administered into the Spinal Subarachnoid Space (A) and Cerebral Ventricle (B) on the EMG Activity

Morphine hydrochloride was cumulatively administered and naloxone permoate was given to rats intraperitoneally.

Fig. 5. Time Course of the Effect of Mephenesin on the EMG Activity following Morphine Hydrochloride 2.5 mg/kg s.c.

EMG activity was expressed as a percent of integrated activity at 20 min after the injection of morphine. Each point represents the mean of four experiments.

△—△: control, ○—○: 50 mg/kg, ●—●: 100 mg/kg i.p.

Fig. 4. Time Course of the Catalepsy produced by Morphine Hydrochloride in the Rat ($n=5$)

●—●: 5 mg/kg s.c. ○—○: 10 mg/kg s.c. ▲—▲: 20 mg/kg s.c.

Fig. 6. Time Course of the Effect of Carisoprodol on the EMG Activity following Morphine Hydrochloride 2.5 mg/kg s.c.

△—△: control, ○—○: 100 mg/kg, ●—●: 200 mg/kg, i.p.

に $10 \mu\text{g}$ を追加 (総量 $20 \mu\text{g}$) すると発射頻度はさらに増加した。次の 30 分後に $20 \mu\text{g}$ を追加 (総量 $40 \mu\text{g}$) したが、発射頻度はそれ以上には増加しなかった。この morphine の作用は naloxone permoate 1 mg/kg i.p. により拮抗された (Fig. 3B)。

2. カタレプシーの測定

Morphine HCl 5 mg/kg s.c. を投与したラットは弱いカタレプシー症状を示したが、後肢立ちの姿勢保持時間は延びなかった。 10 mg/kg では数分後からカタレプシー症状が現われ、60 分でピークに達し、120 分後には消失した。 20 mg/kg では著明なカタレプシー症状を生じた。投与 60 分後に症状は最も強く、120 分以上続いた (Fig. 4)。

3. Morphine 誘発の筋強直に対する数種薬物の効果

3-1) **Mephenesin, Baclofen および Carisoprodol** Morphine HCl 2.5 mg/kg s.c. により投与 20 分後から 120 分過ぎまで筋電図発射頻度は著しく増加した。そこで, morphine 投与 20 分後発射頻度が一定レベルに達した時に中枢性筋弛緩薬を投与し, 筋電図に対する影響を検討した。Mephenesin の作用は投与後 1 分以内に現われ, 筋電図発射頻度は著明に減少した。投与後約 10 分で作用は最も強く現われた。50 mg/kg *i.p.* では約 20 分, 100 mg/kg *i.p.* では約 30 分続いた。Fig. 5 に mephenesin 50 および 100 mg/kg 投与による抑制作用の経時変化を示す。

Baclofen は 2.5 mg/kg s.c. 投与 20 分過ぎから抑制作用が現われ, 40 分ではほぼピークに達し, morphine による筋強直が持続する時間 (2 時間) 以上続いた。

Carisoprodol による抑制作用は投与後数分で現われ, 20—30 分で最大に達した。100 mg/kg で約 30 分, 200 mg/kg *i.p.* では約 60 分続いた (Fig. 6)。

3-2) **Apomorphine および L-Dopa** Apomorphine HCl 1 および 2 mg/kg s.c. 投与は約 10 分後から筋電図の減少を生じ, 20 分後に抑制は一定となり, morphine の作用が消失するまで続いた (Fig. 7)。L-Dopa 100 mg/kg *i.p.* 投与は筋電図にほとんど影響せず, 200 mg/kg *i.p.* 投与により有意な抑制作用が認められた。Morphine HCl 2.5 mg/kg s.c. 投与後 10 分から 20 分までの 10 分間の発射頻度に対する, 各薬物投与後の最大の抑制が得られた 10 分間の発射頻度の割合から, 個々のラットについて抑制率を算出した (Table I)。

Fig. 7. Time Course of the Effect of Apomorphine Hydrochloride on the EMG Activity following Morphine Hydrochloride 2.5 mg/kg s.c.

△—△: control, ○—○: 1 mg/kg, ●—●: 2 mg/kg *i.p.*

TABLE I. Effects of Various Drugs on EMG Activity following Morphine Hydrochloride 2.5 mg/kg s.c. in the Rat

Drugs	Dose (mg/kg)	Route	Inhibition (%)	
			Treatment	Control
Naloxone	0.5	<i>i.p.</i>	70 ± 13 ^{b)}	13 ± 5
	1.0		66 ± 15 ^{a)}	
Mephenesin	50	<i>i.p.</i>	65 ± 13 ^{b)}	13 ± 5
	100		87 ± 6 ^{b)}	
Baclofen	1.25	<i>s.c.</i>	45 ± 5 ^{b)}	12 ± 6
	2.5		75 ± 8 ^{b)}	
Carisoprodol	100	<i>i.p.</i>	57 ± 10 ^{a)}	—6 ± 14
	200		81 ± 8 ^{a)}	
Apomorphine	1.0	<i>s.c.</i>	65 ± 13 ^{b)}	12 ± 6
	2.0		87 ± 6 ^{b)}	
L-Dopa	100	<i>i.p.</i>	0	13 ± 5
	200		80 ± 7 ^{b)}	

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$ as compared with respective control. Student's t-test. $n = 4$.

考 察

Morphine 投与により誘発される筋強直を筋電図により測定すると, 筋電図発射頻度の増加として検出するに要する morphine HCl の最少用量は 1.25 mg/kg s.c. であった。動物を本法のような軽拘束ではなく, 完全に拘

束状態として四肢を浮かせて腓腹筋筋電図を記録した実験報告によれば, morphine の最少有効量は 7.5 mg/kg s.c. である.¹¹⁾ また, 後肢筋力の測定法による morphine 筋強直の検出限界も 7.5 mg/kg s.c. であった.¹²⁾ 一方今回行ったカタレプシー試験によるそれは 5—10 mg/kg s.c. であった. これらの結果を考え合えると, 今回の無麻酔軽拘束下で筋電図を導出, 記録する方法は morphine により誘発される筋強直を評価するには非常に感度が良い. また, 再現性, 定量性も十分であると考えられる.

Morphine が全身性投与だけでなく, 脳室内投与や脊髄クモ膜下腔内投与によっても筋強直をおこすことは, その作用部位が脳室系や脊髄クモ膜下腔から近い部位に存在することを意味する. ラットの尾状核へ直接注入された morphine は全身性投与の場合と同じく筋強直をおこした.^{13,14)} しかし, 線条体を破壊しても全身性に投与した morphine によるカタレプシーは減弱されなかった.^{15,16)} また, morphine の微量を中脳水道灰白質に注射すると筋強直がおこるという報告¹⁷⁾や, 側座核に注射するとカタレプシーを誘発したという報告がある.¹⁸⁾ これらの成績は, 筋強直をおこす morphine の作用部位が数カ所にわたることを示している.

Kushinsky and Hornykiewicz⁸⁾ は morphine はラットにおいてカタレプシーをおこすと同時に線条体 homovanillic acid 量を増加させることを見出し, 両者の関係を示唆した. Wand ら¹¹⁾によれば, morphine 誘発のラット筋強直は dopamine の前駆物質 L-Dopa や dopamine 受容体刺激薬 apomorphine により抑制されている. しかし, Vander ら¹⁹⁾はマウスにおいて, morphine により生ずるカタレプシーは dopamine 受容体刺激薬では抑制されないと報告している. 我々の結果は前者の成績と一致するが, 後者のそれとは異なる. 実験動物種が異なるため, 結果の違いがいかなる理由によるものか明らかでない. 筋電図により評価される morphine 誘発の筋強直が中枢性筋弛緩薬により緩解されたことは, 他の手段により作製した筋固縮の場合と同様であった.

これらの結果から, 本法によって morphine 筋強直の薬物に対する反応性も感度よく検出することができた. 従って, 筋強直に対する薬物とくに和漢薬処方やエキスの薬効検定に利用可能と思われるので, それらについて検討を続けている.

引用文献

- 1) G. Steg, *Acta Physiol. Scand.*, **61**, suppl. 225, 1 (1964).
- 2) K. Halbhübner, H. Herken, D. Loos, *Arzneim. Forsch.*, **28**, 1743 (1978).
- 3) A.B. Morrison, R.A. Webster, *Neuropharmacol.*, **12**, 715 (1973).
- 4) 福田英臣, 工藤佳久, 戸荻彰史, *応用薬理*, **18**, 1063 (1979).
- 5) A. Togari, Y. Kudo, H. Fukuda, *J. Pharm. Dyn.*, **1**, 332 (1978).
- 6) N.-E. Andén, B. Johnels, *Brain Res.*, **133**, 386 (1977).
- 7) I. Jurna, G. Lanzer, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Path.*, **262**, 309 (1969).
- 8) K. Kushinsky, O. Hornykiewicz, *Eur. J. Pharmacol.*, **19**, 119 (1972).
- 9) B. Costall, R.J. Naylor, *Arzneim. Forsch.*, **23**, 674 (1973).
- 10) T. Yaksh, T.A. Rudy, *Physiol. Behav.*, **17**, 1031 (1976).
- 11) P. Wand, K. Kushinsky, K.H. Sontong, *Eur. J. Pharmacol.*, **24**, 189 (1973).
- 12) P. Slator, D.A. Longman, *Drug Develop. Res.*, suppl. **1**, 153 (1982).
- 13) G. DiChiara, L. Vargin, M.L. Porceddu, R. Looni, A. Mulus, G.L. Gessa, *Ad. Biochem. Pharmacol.*, **16**, 571 (1977).
- 14) U. Havemann, M. Winkler, K. Kushinsky, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **313**, 139 (1980).
- 15) R. Fog, *Acta Neurol. Scand.*, **48**, 50 P (1972).
- 16) B. Costall, R.J. Naylor, *Arzneim. Forsch.*, **23**, 674 (1973).
- 17) A. Pert, L.A. Dewald, H. Liao, C. Siwit, "Endorphins in Mental Health Research," E. Usdin, W.E. Bunney, Jr., N.S. Kline ed, Raven Press, New York, 1979, p. 45.
- 18) B. Costall, D.H. Fortune, R.J. Naylor, *J. Pharm. Pharmacol.*, **30**, 566 (1978).
- 19) C.W. Vander, M.T. Spoerlin, *Neuropharmacol.*, **18**, 633 (1979).