

## Streptozotocin-糖尿マウスにおける morphine の鎮痛効果について

東京女子医科大学 薬理学教室 (主任: 野本照子教授)

講師 フジイ エミコ ノモト テルコ ツカハラ フジコ  
藤井恵美子・教授 野本 照子・塚原富士子

薬理学セミナー学生 (3学年)

アオキ コウコ タナカ リエ フジイ アツコ  
青木 浩子・田中 理恵・藤井 敦子  
フリヤ ヨシコ マエダニ ヒロコ  
降矢 芳子・前谷 浩子

(受付 昭和58年7月9日)

### Antinociceptive Potency of Morphine in Streptozotocin-Diabetic Mice

Emiko FUJII, Teruko NOMOTO, Fujiko TSUKAHARA, Kohko AOKI, Rie TANAKA,  
Atsuko FUJII, Yoshiko FURIYA and Hiroko MAETANI

Department of Pharmacology (Director: Prof. Teruko NOMOTO)  
Tokyo Women's Medical College

The effects of morphine on the antinociceptive potency were examined in both control and streptozotocin (STZ, 170 mg/kg, i.p.) treated ddY male mice. The antinociceptive potency following morphine were measured by a tail-flick method (morphine 10 mg/kg, s.c.) and acetic acid-writhing method (morphine 2 mg/kg, s.c.).

#### 1) Results of tail-flick test:

Pretreatment of STZ did not show significant alterations of the latencies of their first response of tail flick in mice. Morphine significantly decreased the pain sensitivity in both diabetic and control mice. In diabetic mice, antinociceptive potency was much reduced than that in those which were control by morphine two weeks after STZ and returned to the control level four weeks after STZ.

#### 2) Results of acetic acid-writhing test:

Pretreatment of STZ increased frequency of acetic acid writhing syndromes in mice. Morphine significantly reduced the frequency of writhings in both diabetic and control mice, and antinociceptive potency in diabetic mice was much reduced than that in those which were control.

These results indicate that a hyperglycemic state such as STZ-diabetes might attenuate in central nervous system response to morphine.

### 緒 言

糖尿病患者にみられる neuropathy は、その本態はなお不明であるが、末梢神経異常と axonal flow との関係が注目されており、結果的に骨格筋障害が認められること、実験糖尿動物においても、軸索内物質の輸送の異常に基因する骨格筋障害が指摘されており<sup>1)</sup>、それに伴う行動の抑制が想

定される。実験的高血糖ラットは、中枢神経作用薬である d-amphetamine に対する反応が減弱すると報告されている<sup>2)</sup>。著者らは前報で、ストレプトゾトシン糖尿マウスの運動機能に及ぼすメタンフェタミン投与の影響を検索し、糖尿発症後2週では、自発運動量の著しい変化がみられなかったが、メタンフェタミン投与により運動量がむしろ

促進するのを認めた<sup>3)</sup>。本実験では、糖尿マウスにおけるモルヒネの鎮痛効果がどのように修飾されるかを明らかにする目的で、2種類の鎮痛効果判定法を用いて検討した。

### 実験材料および方法

#### 1. 実験動物および薬物投与方法

動物は、ddY 雄性マウス、5週齢を用いて恒温恒湿下(22±2℃, 55±5%)、照明条件は14時間明、10時間暗とし、マウス用固型飼料(ラボMRブリーダー・日本農産工業KK)と水を自由に摂取させ、1週間後に実験に供した。ストレプトゾトシン(Sigma, STZと略)は、使用直前にクエン酸緩衝液(pH 4.6)に溶解し、170mg/kgを腹腔内1回投与、対照群にはSTZ溶解用緩衝液を同様に投与した。実験時に、対照群、STZ群の各々を更に生理食塩水投与群とモルヒネ投与群の2群に分けた。

- 1) 対照群
  - a. 生理食塩水投与群
  - b. モルヒネ投与群
- 2) STZ群
  - a. 生理食塩水投与群
  - b. モルヒネ投与群

STZ投与2週(STZ-2W)と4週(STZ-4W)後にモルヒネの鎮痛効果を、物理学的刺激法のtail-flick法および化学的刺激法の酢酸-writhing法を用いて測定した。

#### 2. 測定方法

##### 1) tail-flick 法

マウスは、電子管刺激装置(MSE-3型、日本

光電製)を用い、尾の全長の先端約1/3の部位を電導子で刺激(刺激電圧26V, 刺激回数1秒1回, 1回の刺激時間1/25秒の矩形波<sup>4)</sup>)し、刺激間隔30秒で3回以内の刺激でsqueak(啼鳴)を発するもののみを使用した。tail-flick法は、55℃の恒温槽中に、マウスの尾の全長の1/2を垂直に浸し、尾がはね上がる(tail-flick)、あるいは水中で先端をまげて輪を描くまでの反応時間を疼痛反応時間とし、1/10秒単位まで測定した。薬物投与前に各マウスの熱刺激に対する反応時間を2回測定、反応時間2秒以上のマウスは除外し、その平均を対照値とし、モルヒネ(塩酸モルヒネ, 10mg/kg)または生理食塩水皮下投与後10, 30, 60分における反応時間を測定した。ただし、反応時間が30秒以上となる場合は、30秒で打ちきった。マウスは対照群で44匹、STZ群で47匹を使用した。

##### 2) 酢酸-writhing 法

STZ群(74匹)と対照群(73匹)に各々モルヒネ(2mg/kg)または生理食塩水皮下投与15分後に、1%酢酸0.2ml/10gを腹腔内投与、酢酸投与後から5分間隔で30分間の背腹部の伸展、よじれ(writhing syndrome)の回数を測定した。

##### 3) 血糖測定

STZ-2W, STZ-4Wにおけるtail-flick法または酢酸-writhing法終了3日後に頸部より採血した。血糖は、血清30μlを用いて、0-トルイジン・ハウ酸法により分光光度計(島津製作所製)の635nmで吸光度を測定、結果はmg/dlで表わした。

**Table 1** Effects of morphine(tail-flick test 10mg/kg,s.c., writhing test 2mg/kg,s.c.)on body weight and serum glucose measurements in STZ-diabetic mice at tail-flick test and acetic acid-writhing test. Each value showed the mean±S.E. vehicle: citrate buffer, STZ: streptozotocin(170mg/kg,i.p.)

|                 | Group   | Treatment | Body Weight(g) |            |    |            | Serum Glucose(mg/100ml) |            |    |            |
|-----------------|---------|-----------|----------------|------------|----|------------|-------------------------|------------|----|------------|
|                 |         |           | n              | 2W         | n  | 4W         | n                       | 2W         | n  | 4W         |
| Tail-Flick Test | VEHICLE | saline    | 16             | 30.69±0.73 | 10 | 35.00±0.55 | 15                      | 181.3±5.3  | 10 | 199.5±12.1 |
|                 |         | morphine  | 9              | 31.11±0.42 | 9  | 35.60±0.77 | 8                       | 180.9±7.6  | 8  | 199.2±11.6 |
|                 | STZ     | saline    | 14             | 25.49±0.64 | 10 | 29.30±1.15 | 14                      | 617.4±30.8 | 10 | 668.2±35.6 |
|                 |         | morphine  | 13             | 25.33±0.84 | 10 | 29.20±0.73 | 12                      | 593.8±32.8 | 10 | 660.1±30.9 |
| Writhing Test   | VEHICLE | saline    | 21             | 31.21±0.44 | 16 | 35.14±0.55 | 12                      | 141.1±8.1  | 6  | 142.3±9.8  |
|                 |         | morphine  | 21             | 31.44±0.30 | 15 | 35.51±0.77 | 13                      | 128.3±10.8 | 9  | 145.2±10.4 |
|                 | STZ     | saline    | 19             | 23.87±0.58 | 18 | 27.97±0.81 | 13                      | 500.0±32.1 | 8  | 623.3±38.9 |
|                 |         | morphine  | 22             | 22.59±0.51 | 15 | 27.69±0.71 | 15                      | 491.4±23.8 | 10 | 610.1±54.7 |

実験結果は、Student's t-test を用いて検定した。

### 実験成績

#### 1. STZ 処置後の体重の変化 (Table 1)

STZ-2W では、対照群 (28~30g) に対し18%の体重減少を示したが、STZ-4W では対照群、STZ群共に、同等の体重増加を示した。モルヒネ投与による体重への影響は、両群共にみられなかった。

#### 2. STZ 処置後の血糖値の変化 (Table 1)

STZ-2W の血糖値は500mg/dl 以上を示し、STZ-4W では更に高値で最高670mg/dl となった。対照群においては、血糖値は200mg/dl 以下であり、2W, 4W ではほぼ同値を示していた。モルヒネ投与では、体重への影響がみられなかったと同様に、血糖値に対しても影響を及ぼさなかった。

#### 3. tail-flick 法によるモルヒネの鎮痛効果 (Fig. 1)

STZ 群、対照群共に、モルヒネ投与10分後より疼痛反応時間の延長が著しく、60分後まで経時的に延長した。STZ-2W 群では対照群に比し、モルヒネによる疼痛反応時間が短縮したことから、鎮

痛効果の減弱が考えられた。しかし、STZ-4W 群では、モルヒネ投与30分以後の疼痛反応時間に STZ 群と対照群の間に差はみられず、STZ-2W 群の成績と一致しなかった。

#### 4. 酢酸-writhing 法によるモルヒネの鎮痛効果

##### 1) 経時的变化 (Fig. 2)

STZ-2W 群の生理食塩水投与では、対照群に比し酢酸投与後最初の5分以内に既に writhing response が増加、5~10分に peak を示し、20~25分に対照群と同値になった。モルヒネ投与後は、5~10分で writhing 回数の著しい減少がみられた。STZ-4W 群においても、生理食塩水投与、モルヒネ投与15分後の酢酸による writhing response は、STZ-2W 群とほぼ同様の経時的パターンを示した。Fig. 2の結果を更に Fig. 4A に示す方法でモルヒネによる酢酸 writhing の抑制率をみると、STZ 群では、対照群に比し抑制率は低かったが(抑制率 2W: 対照群73~100%, STZ 群56~86%, 4W: 対照群90~100%, STZ 群77~100%), 対照群、STZ 群共に 2 W に比し4W

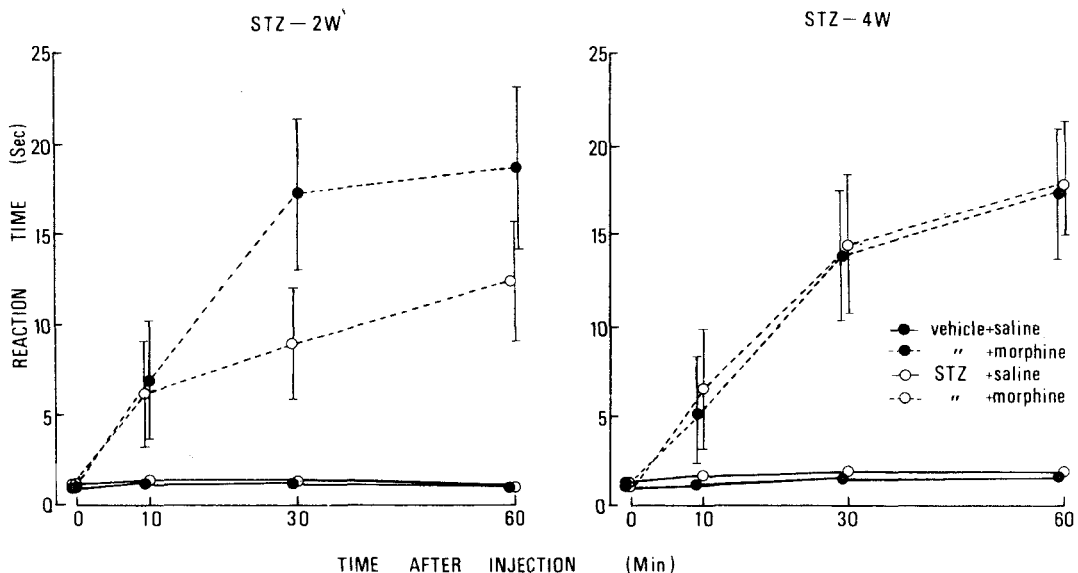
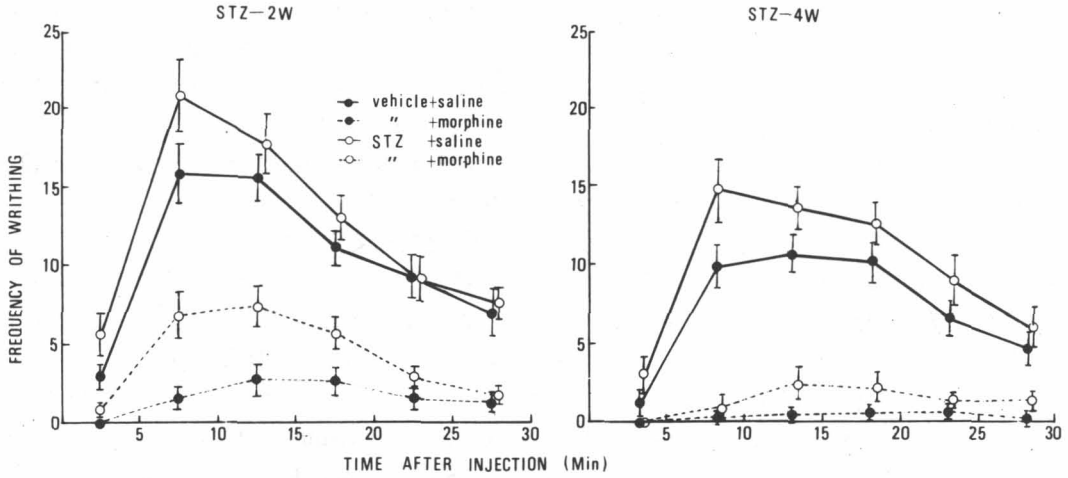
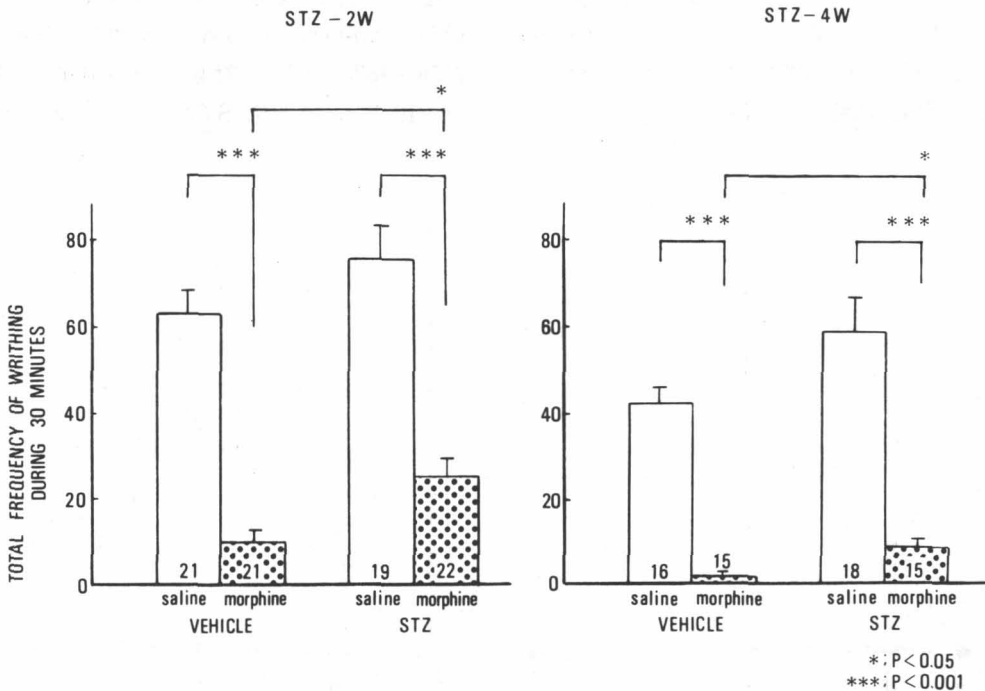


Fig. 1 Time course of the effect of morphine (10mg/kg, s.c.) on tail-flick test in STZ-diabetic mice. Each value showed the mean  $\pm$  S.E. of 9-16 animals. vehicle: citrate buffer, STZ: streptozotocin (170mg/kg, i.p.), STZ-2W: the group with two weeks after STZ, STZ-4W: the group with four weeks after STZ.



**Fig. 2** Time course of the effect of morphine (2mg/kg, s.c.) on acetic acid (1%, i.p.)-writhing response in STZ-diabetic mice. Each value showed the mean  $\pm$  S.E. of 15-22 animals. vehicle : citrate buffer, STZ : streptozotocin (170mg/kg, i. p.), STZ-2W : the group with two weeks after STZ, STZ-4W : the group with four weeks after STZ.



**Fig. 3** Effects of morphine (2mg/kg, s.c.) on total frequency of acetic acid (1%, i.p.)-writhing response during thirty minutes in STZ-diabetic mice. Each value showed the mean  $\pm$  S.E. Numbers per group are indicated at the base of each column. vehicle : citrate buffer, STZ : streptozotocin(170mg/kg, i.p.), STZ-2W : the group with two weeks after STZ, STZ-4W : the group with four weeks after STZ, P values were calculated by the Student's t-test. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

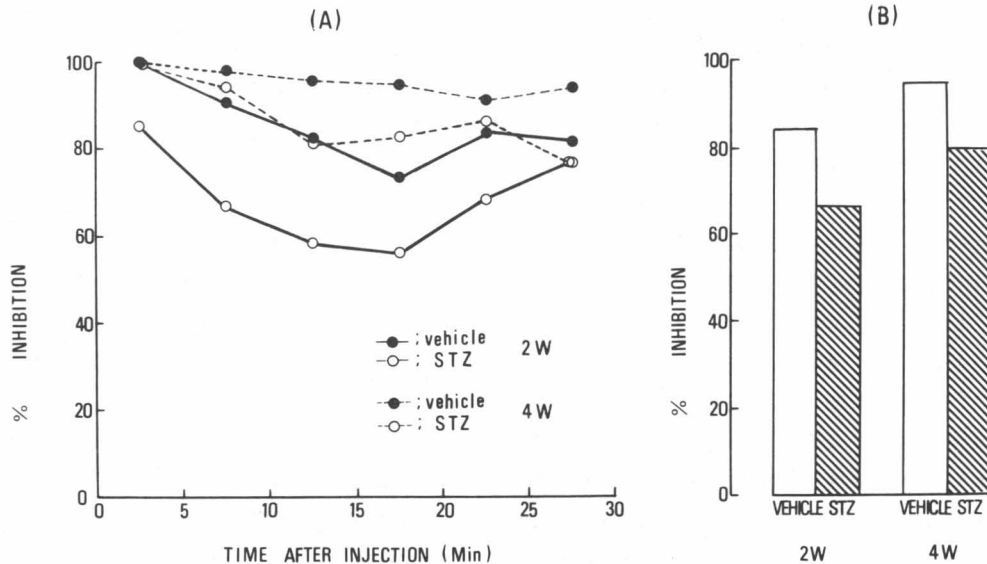


Fig. 4 Effects of morphine (2mg/kg, s.c.) on the inhibition rate of acetic acid (1%, i.p.)-writhing response in STZ-diabetic mice. A: time course, B: total frequency of writhing during thirty minutes. vehicle: citrate buffer, STZ: streptozotocin (170mg/kg, i.p.), STZ-2W: the group with two weeks after STZ, STZ-4W: the group with four weeks after STZ.

ordinate: Inhibition ratio (%) =

$$\frac{[\text{vehicle (or STZ)+saline}] - [\text{vehicle (or STZ)+morphine}]}{\text{vehicle (or STZ)+saline}} \times 100$$

の抑制率が大きであった。

## 2) writhing の総回数に及ぼすモルヒネの影響 (Fig. 3)

STZ-2W の酢酸による writhing の総回数は、STZ 群では増加した。STZ-4W においても STZ-2W と同傾向を示したが、STZ 群、対照群共に総回数は減少した。モルヒネ投与後、STZ-2W, 4W 共に両群で総回数の有意な減少を示したが、STZ 群での writhing の総回数は対照群に比し多かった。STZ 群での生理食塩水投与後の増加が、対照群におけるよりも大のため、Fig. 4B の抑制率が示すように STZ-2W, 4W 共に STZ 群ではモルヒネによる鎮痛効果の減弱がみられた。

## 考 察

ICR マウスにおけるモルヒネの鎮痛効果を tail-flick 法およびフェニールキノン-writhing 法で検索した Simon ら<sup>5)</sup>は、STZ 糖尿および dextrose 腹腔内投与では、対照群に比し鎮痛効果が減弱するが、絶食+インスリンのような低血糖状

態では鎮痛効果が増強され、このような血糖異常時におけるモルヒネ効果の相異は、モルヒネに対する感受性の差によるが、糖尿病により誘発される高血糖では、他の誘因による高血糖状態とは異なり、選択的にモルヒネの鎮痛効果に影響することを示唆している。しかし、どのような機序によるかはなお明らかでない。

モルヒネの作用は多様であり、個人差、性差、種差が著しく影響し、鎮痛用量を投与した場合、ヒトやラットでは鎮痛作用を示すが、マウスでは中枢興奮作用が現われる。このモルヒネの作用機序については、電気生理学および生化学的方法により多くの研究がなされ、中枢神経のシナプスが作用点であることを疑いないところであるが、末梢における作用点も無視できないといわれている。高木ら<sup>6)</sup>は、大縫線核の傍巨大細胞網様核 nucleus reticularis paragigantocellularis (NRGC) がオピオイドの最も鋭敏な鎮痛作用点であるとしている。

実験動物を用いての鎮痛薬の効果判定には困難が伴うが、化学的、物理的疼痛刺激を与え、その刺激に対する反応の変化で評価する方法が一般的である。モルヒネでは化学的刺激に対し敏感で、物理的刺激に要する用量の1/10量で同効果を示すことが知られているが、本実験でのモルヒネの用量は、化学的刺激法で2mg/kg、物理的刺激法では10mg/kgを用いた。化学的刺激法の酢酸などを腹腔内投与して生ずる writhing syndrome (苦悶症状) を指標としての鎮痛効力検定は、強力な鎮痛薬のみならず非常に弱い鎮痛薬も検定可能である反面、鎮痛薬以外の薬物でも陽性に出るため非特異的方法であり、薬理学的に類似した鎮痛薬間でないヒトとの対応性が良くないことが知られている。この方法も麻薬性鎮痛薬の検定に使用されるが、一方、tail-flick 法などの熱刺激法は、麻薬性鎮痛薬の検定に最適といわれる<sup>7)</sup>。本実験で、マウスへの STZ 前処置のみでは、物理的刺激による疼痛反応時間への影響はみられなかった。しかし、酢酸による writhing response の頻度は増加した。即ち、化学的刺激による疼痛発現の促進が考えられた。

痛みは炎症に随伴する重要な徴候であり、発痛物質は炎症の chemical mediator でもある。その主たるものに histamine, serotonin, Ach, bradykinin, prostaglandin 類,  $K^+$ ,  $H^+$  などがあり、自由神経終末の発痛物質による興奮は、化学受容であることが証明されている。侵害受容は、多くの分化した特殊受容器と異なり種々の機械的、化学的刺激に反応する。生体に対する侵害刺激は、発痛物質の遊離—疼痛—鎮痛を示す内因性オピオイドペプチドに至る多数の生理活性物質を動員することとなる<sup>8)</sup>。本実験結果から、STZ マウスでは侵害受容が大となったといえるが、物理的刺激よりも化学的刺激に対する反応性が明らかに増大していることが明らかとなった(酢酸の用量は0.6%前後が常用されるので、本実験で用いた1%はやや高濃度だったといえよう)。

一方、ラットの中脳中心灰白質の電気刺激により鎮痛効果が得られ<sup>9)</sup>、中脳中心灰白質のうち鎮痛効果をもつのは背側縫線核をとりまく腹側中心

灰白質のより広い部分といわれ、この刺激による鎮痛効果の判定には、tail-flick 法が好んで用いられている<sup>10)</sup>。中脳中心灰白質や延髄腹内側部にはオピオイドレセプターがあり、これらの部位に微量のモルヒネを注入すると鎮痛効果が得られる<sup>11)</sup>。全身投与によるモルヒネの鎮痛効果の一部は、これらの部位のオピオイドレセプターと結合して下行性疼痛抑制系を賦活するためと考えられる。また、脊髄後角の第一次求心性線維の終末部のオピオイドレセプターも確認されたので、脊髄後角への直接作用も否定できない<sup>12)</sup>。糖尿病患者では、知覚神経の変化が運動神経の変化よりも強く<sup>13)</sup>、糖尿病性神経障害として脊髄では後索の変性、前角細胞の変性と萎縮、索性脊髄症様の変化などが報告されている<sup>14)</sup>。実験的糖尿病動物の脳、脊髄、末梢神経、脊髄液、水晶体などでは、血糖値にはほぼ平行し、ソルビトールおよび果糖の濃度が高く、組織におけるこれらの蓄積は、組織の変性をきたす<sup>15)</sup>。糖尿病 neuropathy の本態はなお明らかでないが、STZ 糖尿ラットではこれら病態が、軸索流の異常と密接に関係しているようである<sup>16)17)</sup>。

STZ 糖尿マウスへのモルヒネ投与後は、2種類の鎮痛効果判定法いずれも、モルヒネによる鎮痛効果は減弱し、方法による相異はみられなかった。従って、STZ 糖尿マウスにおけるモルヒネの鎮痛効果の減弱は、糖尿病による神経組織の変性等による侵害受容の反応性の低下も一因と考えられる。

モルヒネの鎮痛効果に脳内モノアミン系の関与も示唆されているので<sup>18)~20)</sup>、STZ 糖尿動物における疼痛の発現、抑制との関連について今後の研究が望まれる。

## 結 語

ddY 雄性マウスを使用し、STZ (170mg/kg, i. p.) 投与 2, 4 週後の実験糖尿状態におけるモルヒネの鎮痛効果に対する反応性を明らかにする目的で、tail-flick 法 (10mg/kg, s.c.) および酢酸-writhing 法 (2mg/kg, s.c.) を用いて比較検討した。

### 1) tail-flick 法による結果

STZ 前処置は、疼痛刺激に対する反応時間に影響を及ぼさなかった。STZ 群、対照群共にモルヒネ投与後疼痛に対する反応時間は著しく延長した。STZ 2 週後では、対照群に比し鎮痛効果が減弱したが、4 週後には対照群と同等の鎮痛効果を示した。

## 2) 酢酸-writhing 法による結果

STZ 前処置は、酢酸による writhing 反応の出現回数を増加した。モルヒネ投与後 STZ 群、対照群共に writhing の回数の有意な減少を認めたが、STZ 群では対照群に比し、鎮痛効果の減弱がみられた。

以上の結果から、STZ 糖尿マウスでは、モルヒネの鎮痛効果が減弱することが認められた。

本論文の要旨は、東京女子医科大学学会第49回総会(1983年9月)において発表した。

## 文 献

- 1) 山村安弘・鬼頭昭三：糖尿病性神経症。医学のあゆみ 113(9) 696~701 (1980)
- 2) **Marshall, J.F.**: Resistance of alloxan-diabetic rats to the behavioral activation induced by d-amphetamine: Partial restoration with a high fat/protein diet. *Physiol Behav* 20 319~322 (1978)
- 3) 藤井恵美子・塚原富士子・野本照子：Streptozotocin 糖尿マウスの自発運動量に対する Methamphetamine 反復投与の影響—C57BL/6 および ddY 系マウスにおける系統差— 東女医大誌 52(9) 1264~1271 (1982)
- 4) 小沢 光・松本 滋・佐藤七平：電気刺戟法による鎮痛効果検定装置の考案とその応用。薬誌 73(3) 212~216 (1953)
- 5) **Simon, G.S. and W.L. Dewey**: Narcotics and Diabetes 1. The effects of streptozotocin-induced diabetes on the antinociceptive potency of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 218(2) 318~323 (1981)
- 6) **Takagi, H., M. Satoh, A. Akaike et al.**: The nucleus reticularis gigantocellularis of the medulla oblongata is a highly sensitive site in

- the production of morphine analgesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 45(1) 91~92 (1977)
- 7) 柳浦才三・鈴木 勉：鎮痛薬の前臨床試験。神精薬理 4(10) 685~693 (1982)
  - 8) 猪木令三：痛みと生理活性物質。神精薬理 4(9) 589~604 (1982)
  - 9) **Reynolds, D.V.**: Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164 444~445 (1969)
  - 10) 横田敏勝：痛みの生理。神精薬理 4(10) 669~678 (1982)
  - 11) 佐藤公道：Opioid peptide の鎮痛作用機序。日医師会誌 86(8) 999~1008 (1981)
  - 12) **Yaksh, T.L.**: Spinal opiate analgesia: Characteristics and principles of action. *Pain* 11 293~346 (1981)
  - 13) **Dolman, C.L.**: The morbid anatomy of diabetic neuropathy. *Neurology* 13(2) 135 (1963)
  - 14) **Bischoff, A.**: Die Diabetische Neuropathie. p122 George Thieme Stuttgart (1963)
  - 15) 小坂樹徳・垂井清一郎・井出建彦編：糖尿病。基礎と臨床。第1版 朝倉書店 東京 (1978) 20頁
  - 16) **Holmes, P.R., J.H. Mayer and D.R. Tomlinson**: The effect of aldose reductase inhibition on axonal transport and nerve conduction velocity in streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* 77 Supp. 331p (1982)
  - 17) **Schmidt, R.E., F.M. Matschinsky, D.A. Godfrey, A.D. Williams and D.B. McDougal**: Fast and slow axoplasmic flow in sciatic nerve of diabetic rats. *Diabetes* 24(12) 1081~1085 (1975)
  - 18) **Takagi, H., T. Takashima and K. Kimura**: Antagonism of the analgesic effect of morphine in mice by tetrabenazine and reserpine. *Arch Int Pharmacodyn* 149(3-4) 484~492 (1964)
  - 19) **Tenen, S.S.**: Antagonism of the analgesic effect of morphine and other drugs by p-chlorophenylalanine, a serotonin depletor. *Psychopharmacologia* 12 278~285 (1968)
  - 20) **Haubrich, D.R. and D.E. Blake**: Modification of serotonin metabolism in rat brain after acute or chronic administration of morphine. *Biochem Pharmacol* 22(21) 2753~2759 (1973)