

# 新熱板實驗方法에 의한 Naloxone 과 Diazepam 이 Morphine 鎮痛效果에 미치는 影響에 關한 檢索

高麗大學校 醫科大學 藥理學教室

文 永 煥 · 全 普 權

= Abstract =

## A New Hot-Plate Method using Threshold Temperature; its Application on the Study of the Interaction between Naloxone or Diazepam and Morphine

Young-Hwan Moon and Boe-Gwun Chun

*Department of Pharmacology, College of Medicine, Korea University*

Yeum et al. formulated a new hot-plate method using the threshold temperature, and there are some controversies on the effects of naloxone and diazepam on the antinociceptive action.

In this paper, the comparison of three methods registering analgesic activity and the application of the new hot-plate method formulated by Yeum et al. on the study of the influences of naloxone and diazepam on the analgesic effect of morphine were tried in male mice.

The results obtained were summarized as follows;

1) The least-square regression lines of the morphine analgesia plotted against log-dose showed the correlation coefficient of above 0.90, but the competitive antagonism produced by naloxone (0.1 mg/kg) against the analgesia was more prominently demonstrated by the new hot-plate method than the other methods: original hot-plate method and electrical stimulation method.

2) In the experiment using the new hot-plate method, the log dose-response curve of morphine ( $y=7.30x+49.80$ ,  $r=0.998$ ) was shifted to the right by the pretreatment of naloxone (0.1 mg/kg), but was slightly shifted to the left by the pretreatment of diazepam (2.5 mg/kg).

This study suggests that for the analgesia experiment, the new hot-plate method is superior to the original hot-plate method or the electrical stimulation method, and that the potentiative effect of diazepam on the morphine analgesia is not significant.

### I. 緒 論

鎮痛作用에 對한 熱板法實驗에서 발바닥할기보다 跳

躍反應을 指標로 하였을때 morphine의 鎮痛效果<sup>1)</sup> 및 그에 對한 naloxone의 影響<sup>2)</sup>을 보다 잘 觀察할 수 있다고 한다. 그런데 學者들에 따라서 naloxone에 鎮痛效果<sup>3)</sup> 또는 그와 反對로 疼痛誘發效果<sup>4,5)</sup>가 있다고

하거, 또한 diazepam의 鎮痛效果를 認定하는 이틀<sup>6,7)</sup>이 있는가 하면 認定하지 않거나<sup>8)</sup> 오히려 diazepam이 morphine의 鎮痛效果를 抑制한다고 하는 이<sup>9)</sup>도 있다. 이같은 事實은 鎮痛作用에 對한 實驗方法의 差異에 따라서 일어날 수 있는 것으로 思料되어 著者는 本教室의 廉等<sup>10)</sup>이 考案한 新熱板方法을 在來의 熱板方法 및 電氣刺激法等과 比較 檢討하고, 아울러 廉等<sup>11)</sup>의 方法으로 morphine의 鎮痛效果에 미치는 naloxone 및 diazepam의 影響을 觀察하여 興味로운 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1) 實驗動物 및 實驗群

同一場所에서 一定한 飼料로 一週日 以上 飼育한 體重 20 g 內외의 雄性 mouse-6首를 一群으로 하여 實驗하였으며 各 實驗群은 다음과 같다.

- (1) 生理食鹽水注射群
- (2) ① Naloxone 0.1 mg/kg 注射群  
② Diazepam 2.5 mg/kg 注射群
- (3) ① Morphine 1.0 mg/kg, 3.16 mg/kg, 10 mg/kg 또는 31.6 mg/kg 各各 注射群  
② Naloxone 0.1 mg/kg—前處置 5分後에 위와 같은 各量의 morphine 注射群  
③ Diazepam 2.5 mg/kg—前處置 1時間後에 위와 같은 各量의 morphine 注射群

\* 上記 모든 藥物은 腹腔內注射하였다.

### 2) 實驗方法

Morphine을 注射하고 15~20分사이에 morphine 鎮痛效果를 다음 各 方法에 따라서 測定하였다.

(a) 熱板方法: 가장 빈번히 利用되어 오고 있는 方法<sup>10)</sup>中的의 하나로 動物(rat 또는 mouse)을 一定溫度(50~70°C)의 熱板에 떨어뜨린 後 앞 또는 뒷발바닥을 핏거나 跳躍反應을 보일때까지의 時間( $T_1$ )을 測定하고, 熱에 오랜 時間 露出되므로 動物의 발바닥 등에 일어날 수 있는 質的 變化를 피하기 위하여 定한 最長反應實驗時間( $T_0$ )에 對한  $T_1$ 의 百分率로 鎮痛效果를 나타내는 方法이다. 이 方法을 利用한 mouse 實驗에서 熱板의 溫度를 Eddy等<sup>12)</sup>은  $56.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 로 하였고 Jacob等<sup>13)</sup>은  $64.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 하였으며 또한 Jacob等<sup>13)</sup>은 mouse가 熱板上에 있는 지름 13 cm×높이 17 cm의 圓筒위까지 뛰어오르는 것을 痛覺의 指標로 삼았는데 本 實驗에서는  $60^\circ\text{C}$ 의 銅板위에 지름 20 cm×높이

15 cm의 圓筒을 두어 mouse를 熱板에 떨어뜨린 後 mouse가 5秒內에 3回以上의 反復跳躍反應을 보이거나 圓筒위까지 뛰어오를때까지의 時間( $T_1$ )을 計測하여 痛覺反應抑制率( $R = T_1/T_0 \times 100(\%)$ ):  $T_0$ 는 熱板에 mouse를 떨어뜨린 後 跳躍反應을 보이지 않을때 最長實驗時間으로 利用한 80秒]을 求하였다.

(b) 新熱板方法: 本教室의 廉等<sup>13)</sup>이 考案한 方法으로써 1L beaker를 水槽에 약 2~2.5 cm 정도 깊이 잠기도록 두고 mouse를 各 beaker에 한마리씩 넣은 後 水槽의 溫度를  $35^\circ\text{C}$ 에서부터  $2 \pm 0.2^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 上昇시키며 mouse가 約 5秒內에 3回以上 反復跳躍反應을 보이거나 beaker로부터 튀어나오는 때의 水槽溫度를 읽어 疼痛誘發문턱값(threshold temperature of pain-induction: TTPI)으로 하였다.

(c) 電氣刺戟方法: Paalzow<sup>14)</sup>等<sup>15)</sup>의 方法을 修正한 方法으로써 mouse를 固定틀에 固定시키고 꼬리의 上端으로부터 약 1 cm와 3 cm 떨어진 點에 꼬리 正中線을 따라서 陽極 및 陰極의 電極을 各各 各은 後 30分에 矩形의 直流電流(frequency: 2/sec., pulse width: 200 msec., duration: 2 sec.)를 0.5 volt에서부터 每 2秒마다 0.5 volt씩 높아가면서 怪聲을 지를때의 voltage를 結定하여 이를 怪聲誘發문턱값(vocalization threshold voltage: VTV)으로 하였다.

### 3) 實驗成績의 處理

Tallarida等<sup>16)</sup>의 주장에 따라서 最少自乘回歸直線法에 의한 鎮痛藥의 指數的 用量—反應直線 方程式을 求하여 比較하였다.

\* 本 實驗에 使用된 藥物은 다음과 같다.

Naloxone hydrochloride(Endo Laboratories, Inc)

Diazepam(鍾根堂製藥株式會社)

Morphine hydrochloride(大元製藥株式會社)

## III. 實驗成績

### A) 實驗方法의 比較

(a) 熱板實驗方法으로 計測한 正常群의 痛覺反應抑制率(R)은  $55.40 \pm 6.81\%$ 이었고, morphine 1 mg/kg, 3.16 mg/kg 및 10 mg/kg 腹腔內注射後 나타난 R의 回歸直線方程式은  $y = 37.07x + 61.68$  ( $r = 0.993$ )이었으며 이 直線은 naloxone 0.1 mg/kg 前處置에 依하여  $y = 48.72x + 49.84$  ( $r = 0.937$ )로 左方—移動을 보였다(Fig. 1-A).

(b) 新熱板方法으로 計測한 正常群의 TTPI(疼痛誘

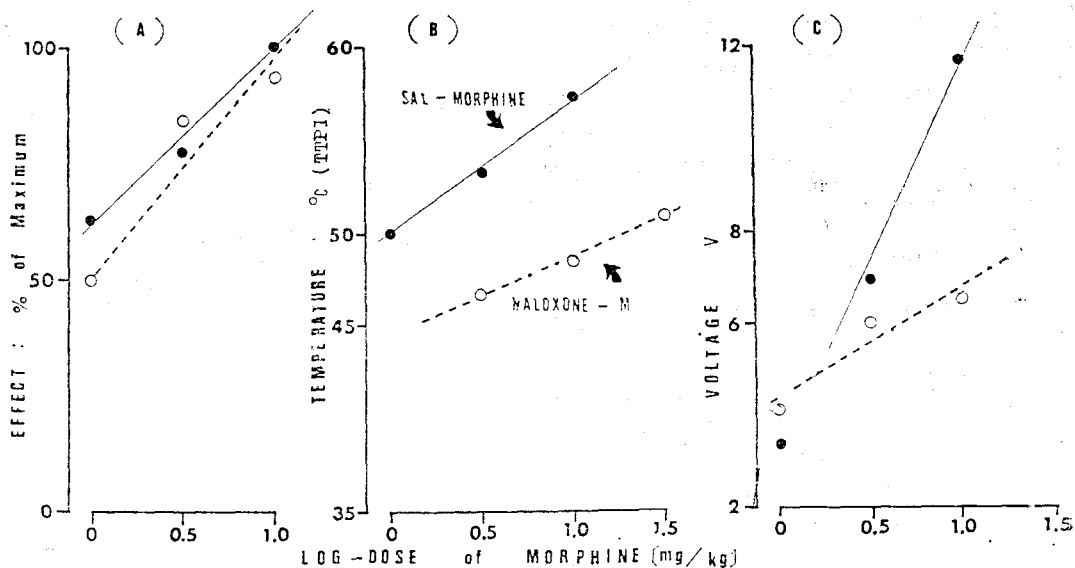


Fig. 1. Comparison of three methods registering analgesic activity: (A) Hot-plate method, (B) modified Hot-plate method and, (C) Electrical stimulation method.  
 \* Each point represents the mean of 4 or 5 data.

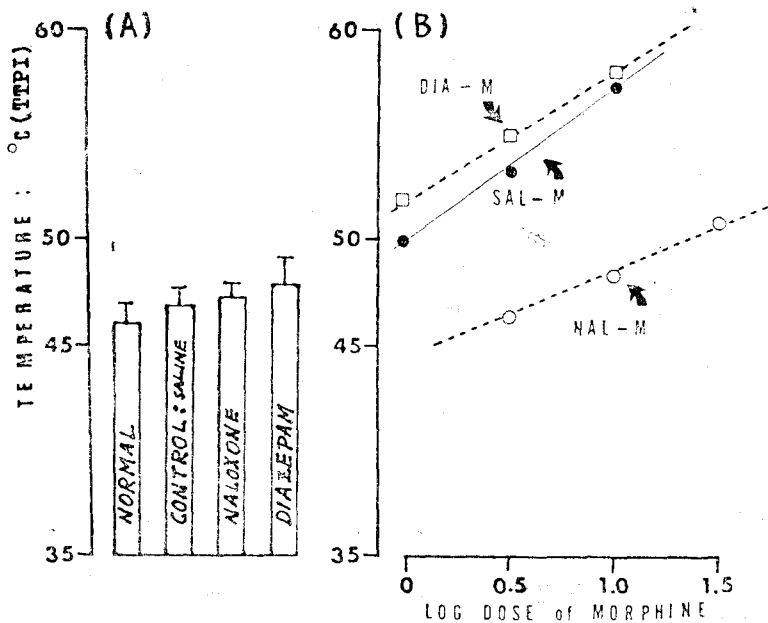


Fig. 2. (A): Effect of naloxone(0.1 mg/kg) and diazepam(2.5 mg/kg) on the nociception. (B): Influences of naloxone(0.1 mg/kg) and diazepam (2.5 mg/kg) on the antinociceptive action of morphine.

發문턱값)는  $46.1 \pm 0.85^{\circ}\text{C}$  이었고, morphine 1mg/kg 3.16 mg/kg 3.16 mg/kg 및 10 mg/kg 腹腔內注射後 나타난 TTPI의 回歸直線方程式은  $y = 7.3x + 49.80$

( $r = 0.998$ ) 이었으며 이 直線은 naloxone 0.1 mg/kg 前處置에 依하여  $y = 4.84x + 47.54$  ( $r = 0.999$ ) 으로 顯著한 右方一移動을 보였다 (Fig. 1-B).

(c) 電氣刺戟方法으로 計測한 正常群의 VTV(怪聲誘發문턱값)은  $4.12 \pm 1.05$  volt 이었고 morphine 3.16 mg/kg, 10 mg/kg 및 31.6 mg/kg 腹腔內注射後 나타난 VTV의 回歸直線方程式은  $y = 8.33x - 1.03$  ( $r = 0.996$ )이었으며 이 直線은 naloxone 0.1 mg/kg 前處置에 依하여  $y = 2.37x + 3.17$  ( $r = 0.948$ )로 右方—移動을 보였다(Fig. 1-C).

#### B) 新熱板方法의 適用

Morphine 鎮痛作用에 미치는 naloxone 및 diazepam의 影響

(a) 生理食鹽水 또는 naloxone 0.1 mg/kg 을 注射하고 20分後에 測定한 TTPI는 各各  $46.9 \pm 0.85^\circ\text{C}$  및  $47.3 \pm 0.68^\circ\text{C}$  이었고 diazepam 2.5 mg/kg 을 注射하고 1時間後에 測定한 TTPI는  $48.0 \pm 1.27^\circ\text{C}$  로써 이들 間에 有意한 差는 볼 수 없었다(Fig. 2-A).

(b) Morphine 1.0 mg/kg, 3.16 mg/kg 및 10 mg/kg 注射後의 各 TTPI는  $49.9 \pm 0.97$ ,  $53.25 \pm 0.89$  및  $57.02 \pm 1.35^\circ\text{C}$  로써 이들의 回歸直線方程式은  $y = 7.3x + 49.8$  ( $r = 0.998$ )이었으며 이 直線은 naloxone 0.1 mg/kg 前處置에 依하여  $y = 4.84x + 47.54$  ( $r = 0.999$ )로 顯著한 右方—移動을 보였으나, diazepam 2.5mg/kg 前處置에 依하여는  $y = 5.67x + 52.05$  ( $r = 0.998$ )으로 左方—移動을 보였다(Fig. 2-B).

#### IV. 考 察

Naloxone은 麻藥性 鎮痛劑의 鎮痛效果 및 中樞神經系鈍麻作用에 拮抗的으로 作用하며 麻藥性 鎮痛劑에 對한 禁斷症狀를 誘發시킬 수 있는 純粹한 相競的 麻藥性 拮抗劑<sup>17)</sup>로써 內因性 opioid polypeptide에 拮抗하여 痛覺現象을 促進시킨다고 하는데 이 같은 作用은 認定하지 않는 이들도<sup>18)</sup> 있으며, Jacob等<sup>20)</sup>은 naloxone이 少量에서는 오히려 鎮痛效果를 나타냄을 主張하였다.

그런데 痛覺現象에 情緒의 不安이 크게 關聯된 周知의 事實<sup>19)</sup>로써 抗不安藥인 diazepam이 他 benzodiazepine系 藥物보다 選擇的인 鎮痛效果를 가지고 있다<sup>20)</sup>고 하지만 Hall等<sup>21)</sup>은 diazepam이 鎮痛效果가 없다고 하였으며 最近에 Mantegazza等<sup>22)</sup>은 morphine의 鎮痛作用이 diazepam에 依하여 抑制되었음을 報告하였다.

本 敎室의 廉等<sup>11)</sup>은 그들이 考案한 熱板方法에 依한 實驗에서 diazepam이 pentazocine의 鎮痛效果를 上

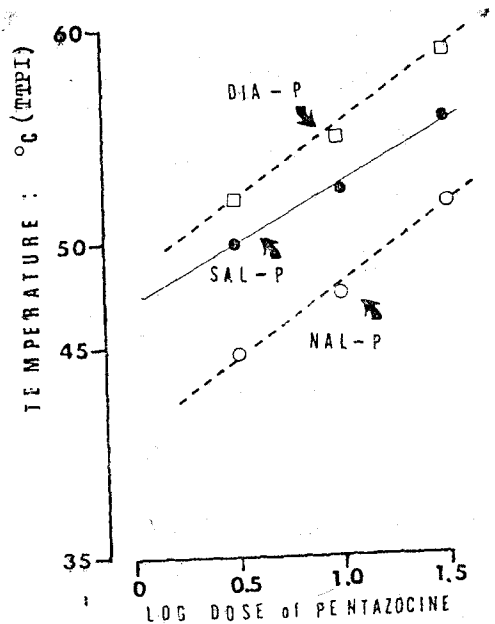


Fig. 3. Influences of naloxone(1.0 mg/kg) and diazepam(2.5 mg/kg) on the antinociceptive action of pentazocine in mice.

昇시켰음을 報告하였는데(Fig. 3) 著者는 그들의 方法을 在來의 熱板方法 및 電氣刺戟方法等과 比較함과 아울러 廉等<sup>11)</sup>의 方法에 따라서 morphine의 鎮痛作用에 미치는 naloxone과 diazepam의 影響을 觀察하였다.

(A) 鎮痛作用—實驗方法의 比較: Fig. 1-A,B,C에서 보는바와 같이 모든 方法이 morphine의 鎮痛效果에 對하여 뚜렷한 指數的 用量—反應關係性(相關係數,  $r > 0.90$ )을 나타내었으나 廉等<sup>11)</sup>의 方法이 morphine의 鎮痛效果에 對한 naloxone의 相競的 拮抗作用을 가장 뚜렷하게 나타내었으며 보다 나은 方法임을 示唆하는 것으로 思料된다.

本 實驗에서 適用된 刺戟들이 體性疼痛(主로 表皮性疼痛)에 關聯되는 것으로써 表皮性疼痛은 'fast' pain과 'slow' pain으로 區分되는데<sup>20)</sup> 麻藥性 鎮痛效果는 後者와 關聯되어 나타난다고 하는데<sup>21)</sup> 麻藥性 鎮痛劑를 服用하는 患者들이 疼痛性 刺戟은 느끼고 있으나 그로 因한 苦痛은 呼訴하지 않는다고<sup>22)</sup> 한다. 따라서 生理的으로 疼痛을 誘發하는 溫度인  $45^\circ\text{C}$ <sup>20)</sup>보다 越等히 높은  $60^\circ\text{C}$ 의 熱板에 實驗動物을 瞬間的으로 露出시키는 在來의 熱板方法보다 生理的으로 安慰感을 주는 皮膚溫度의 가장 安穩한 溫度인  $34^\circ\text{C}$  前後<sup>20)</sup>에 該當하는  $35^\circ\text{C}$ 의 熱板에 mouse를 適應시키어 體溫感覺의 異常을 招來하지 않는 分當  $2.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 의 速度<sup>20)</sup>

로 熱板의 溫度를 上昇시키는 廉等의 方法<sup>11)</sup>이 보다 나은 成績을 나타낸 것으로 思料된다.

그런데 Paalzow<sup>14)</sup>等<sup>15)</sup>의 電氣刺戟方法에 依한 morphine의 指數의 用量—反應直線이 naloxone 前處置群의 그것과 交叉하였음은 疼痛誘發刺戟으로써 熱板刺戟과 꼬리皮下에 對한 電氣刺戟의 效果에 큰 差가 있기 때문이거나 Paalzow 方法<sup>14)</sup>,<sup>15)</sup>에서 痛覺發現의 指標로 利用되는 怪聲反應이 大腦皮質除去後에도 나타나는 反應이라는 Lim 等<sup>23)</sup>의 報告에 關聯되지 않나 생각된다.

(B) Morphine의 鎮痛作用에 미치는 naloxone과 diazepam의 影響: 앞서 敘述한 바와 같이 naloxone 및 diazepam의 鎮痛效果 및 그들이 morphine의 鎮痛作用에 미치는 影響에 關한 相異한 여러 報告들이 있는데 이는 鎮痛作用—實驗方法에 따라서 다른 結果를 나타낼 수 있음을 示唆하는 것으로써 本 敎室의 廉等<sup>11)</sup>은 그들의 方法에 依한 實驗에서 最少自乘回歸直線方法에 依據한 pentazocine의 指數의 用量—反應曲線이 naloxone 1.0 mg/kg 前處置로 顯著한 右方—移動을 보였으나 diazepam 2.5 mg/kg 前處置로는 顯著한 左方—移動을 보였음을 報告하였는데 (Fig. 3) 本實驗에서도 morphine 1.0 mg/kg, 3.16 mg/kg 및 10 mg/kg 으로 나타나는 TTPI(疼痛誘發 문턱값) 역시 뚜렷한 直線의 指數의 用量—反應直線:  $y = 7.3x + 49.8$  ( $r = 0.998$ )을 나타내었고 이는 naloxone 0.1 mg/kg 前處置로 顯著히 右方—移動되었으며 diazepam 2.5 mg/kg 前處置로는 左方—移動되었으나 pentazocine의 鎮痛效果에 미치는 diazepam의 上昇作用(Fig. 3)에 比하여 morphine의 鎮痛效果에 대한 diazepam의 上昇作用은 매우 微弱한 것으로써 이는 Yang 等<sup>24)</sup>의 報告와 一致하는 것으로 思料된다.

## V. 結 論

鎮痛作用實驗을 위하여 本 敎室의 廉等<sup>11)</sup>이 考案한 新熱板方法을 在來의 熱板方法 및 電氣刺戟方法과 比較하기 위하여 各 方法에 따라서 morphine 鎮痛作用에 미치는 naloxone의 影響을 比較觀察하였으며, 아울러 新熱板方法에 따라서 morphine 鎮痛作用에 미치는 naloxone과 diazepam의 影響을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) Morphine의 鎮痛作用에 對한 實驗에 있어서 在來의 熱板方法, 新熱板方法 및 電氣刺戟方法은 모두 最少自乘回歸直線方法에 依한 相關係數,  $r > 0.90$  이상의 指數의 用量—反應方程式을 나타내었으나, 在來의

熱板方法 및 電氣刺戟方法에 比하여 新熱板方法은 morphine의 鎮痛效果에 對한 naloxone의 相競的 拮抗作用性を 가장 잘 나타내었다.

2) 新熱板方法에 依한 實驗에서, morphine의 指數의 用量—反應直線인  $y = 7.30x + 49.80$  ( $r = 0.998$ ) 이; ◎ naloxone 0.1 mg/kg 前處置에 依하여  $y = 4.84x + 47.54$  ( $r = 0.999$ )로 右方—移動을 보여 naloxone이 morphine의 鎮痛作用에 對하여 相競的으로 拮抗함을 뚜렷이 볼 수 있었으나

◎ diazepam 2.5 mg/kg 前處置에 依하여는  $y = 5.67x + 52.05$  ( $r = 0.998$ )로 左方—移動되는 傾向만을 보여 diazepam이 morphine의 鎮痛作用에 큰 影響을 미치지 못함을 나타내었다.

以上的 成績으로 미루어 볼때 鎮痛藥의 實驗方法으로써 廉等<sup>11)</sup>이 考案한 新熱板方法은 優秀한 것으로 생각되며 diazepam은 morphine의 鎮痛作用에 큰 影響을 미치지 못하는 것으로 思料된다.

## REFERENCES

- 1) Jacob, J. and Blozovski, M.: *Actions de divers analgésiques sur le comportement de souris exposées à un stimulus thermoanalgésique(III): Apprentissage nociceptive d'urgence. Actions différentielles de substances analgésiques et psychoréactives sur le reactions de léchement et le bond. Arch. Int. Pharmacodyn., 193:296-309, 1961.*
- 2) Grevert, P. and Goldstein, A.: *Some effects of naloxone on behavior in the mouse. Psychopharmacologia(Berl.), 53:111-113, 1977.*
- 3) Jacob, J.J. and Michaud, G.M.: *Production par la naloxone de défauts inverses de ceux de la morphine chez le chien éveillé. Arch. Int. Pharmacodyn., 222:332-340, 1976.*
- 4) Jacob, J.J.C. and Ramabadran, K.: *Enhancement of nociceptive reaction by opioid antagonists in mice. Br. J. Pharmac., 64:91-98, 1978,*
- 5) King, C.D., Hughey, L.J., Massareno, M., Codd, E.E. and Byrne, W.L.: *Endorphin and naloxone: Insomnia and seizures in cats and hyperalgesia in rats. Fed. Proc., 36:965, 1977.*
- 6) Harvey, S.C.: *The Pharmacological Basis of*

- Therapeutics* (ed. by A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman), 6th Ed., pp. 339-375, 1980.
- 7) Chapman, C.R.: Some pitfalls in the psychophysical assessment of drug effects. Another look at the effects of diazepam on pain thresholds. *Br. J. Anaesth.*, 47:640-642, 1975.
- 8) Hall, G.M., Whitman, J.G. and Morgan, M.: Effects of diazepam on experimentally induced pain thresholds. *Br. J. Anaesth.*, 46:50-53, 1974.
- 9) Mantegazza, P., Parenti, M., Tammiso, R., Vita, P., Zambotti, F. and Zonta, N.: Modification of the antinociceptive effect of morphine by centrally administered diazepam and midazolam. *Br. J. Pharmacol.*, 75:569-572, 1982.
- 10) 高木敬次郎, 小澤光: 藥物學實驗, pp.54-58, 南山堂(日本, 東京)의 1970.
- 11) 廉英鶴, 全普權, 申萬鍊: Pentazocine의 鎮痛效果에 미치는 diazepam과 naloxone의 影響. 高醫大論集, 19:545-550, 1982.
- 12) Eddy, N.B., Fuhrmeister-Touchberry, C. and Lieberman, J.E.: Synthetic analgesics, I. Methadone isomers and derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 98:121-137, 1950
- 13) Jacob, J.J., Tremblay, E.C. and Colombel, M.C.: Facilitation de reactions nociceptives par le naloxone chez la souris et chez le rat. *Psychopharmacologia(Berl.)*, 37:217-223, 1974.
- 14) Paalzow, L.: Analgesia produced by clonidine in mice and rats. *J. Pharma. Pharmacol.*, 26:361-363, 1974.
- 15) Paalzow, G. and Paalzow, L. Clonidine antinociceptive activity: Effects of Drugs influencing central monoaminergic and cholinergic mechanisms in the rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 292:119-126, 1976.
- 16) Tallarida, R.J. and Jacob, L.S.: The Dose-Response relation in Pharmacology(ed. by R.J. Tallarida and L.S. Jacob), pp. 85-111, Springer-Verlag(N.Y.), Inc., 1979.
- 17) Jaffe, J.H. and Martin, W.R.: The Pharmacological Basis of Therapeutics (ed. by A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman) 6th Ed., pp.494-534, 1980.
- 18) Bertson, G.G. and Walker, J.M.: Effect of opiate receptor blockade on pain sensitivity in the rat, *Brain Res. Bull.*, 2:157-159, 1977.
- 19) Melzack, R.: Psychologic aspects of pain, in: *Pain* (ed. by J.J. Bonica), pp.143-154, 1980.
- 20) Schmidt, R.F.: Somatovisceral sensibility, in: *Fundamentals of Sensory Physiology* (ed. by R.F. Schmidt), pp.81-125, Springer-Verlag (N.Y.), Inc., 1978.
- 21) Libet, B.: Delay pain as a peripheral sensory pathway. *Science*, 126:256-258, 1957.
- 22) Mansky, P.A.: Opiates: Human psychopharmacology, in: *Handbook of Psychopharmacology*, vol. 12 (ed. by L.L. Iversen, S.D. Iversen and S.H. Snyder), pp. 95-185, Plenum Press, 1978.
- 23) Lim, R.K.S. and Guzman, F.: Manifestations of pain in analgesic evaluation in animals and man, in: *Pain*(ed. by A. Soulaïrac, J. Cahn, and J. Charpentier), pp.119-119-152, Academic Press, 1968.
- 24) Yang, J.C., Clark, W.C., Ngai, S.H., Berkowitz, B.A. and Spector, S.: Analgesic action and pharmacokinetics of morphine and diazepam in man: A evaluation by sensory decision theory. *Anesthesiology*, 51:495-502, 1972.