

## 藥物の神經藥理學的檢索法에 관한 研究

李 殷 芳 · 尹 惠 淑

(서울대학교 生藥研究所)

(Received January 30, 1978)

Eun Bang Lee and Hye Sook Yun

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110

A Study on the Neuropharmacological Screening Procedure of Drugs

**Abstract**—A neuropharmacological screening method for the activity-unknown materials was reported. The activities included mainly in this method are those of central and autonomic system. The proposed standard work sheets were tabulated.

새로운 醫藥品을 開發하기 위하여 많은 化合物이 合成되고 또한 많은 有效成分이 天然物에서 分離되고 있다. 이들 物質의 有効性を 檢索하기 위하여 여러가지 藥理學的 評價方法이 適用되고 있지만 대부분이 어느 特定한 作用에 대한 專門的 screening에 局限하여 施行되고 있으므로 作用이 強力한 物質을 檢索하였을 경우에도 다른 副作用 특히 神經系統의 副作用이 隨伴되어 專門 screening 結果의 有效한 作用을 포기하게 된다. 그러므로 作用 未知의 物質은 우선적으로 whole animal을 利用한 神經藥理學的 檢索의 必要性을 강조하고자 한다.

現在까지 알려진 上記의 檢索法으로서 Smith法<sup>1)</sup>, Irwin法<sup>2)</sup>, Malone의 Hippocratic screen法<sup>3)</sup> 등이 報告되어 있지만 이들은 그 實施方法이 너무 複雜하고 反應에 대한 判斷이 매우 難解하므로 그의 改變法으로써 Takagi<sup>4)</sup> 伊藤<sup>5)</sup> 및 高木<sup>6)</sup> 등의 方法이 발표되었으나, 이들 역시 難解한 點이 있거나 혹은 너무 簡略法으로 되어 있어서 그 評價에 困難點이 있다.

이에 著者들은 作用既知의 物質을 標準으로 사용하여 上記의 方法들에 대한 再檢討를 實施하고 새로운 方法을 提示하였으며 作用 未知物質에 대하여 應用을 試圖하였다.

### 實 驗

**實驗 器具 및 藥物**—動物觀察用 cage는 넓이 30×30 cm, 높이 15 cm의 不透明 plastic製를 사용하였고 底面에는 白色 絨지를 깔았다. stop watch는 운동기록용을 사용하였으며 瞳孔測定用 擴大鏡은 10倍 擴大率로서 0.1 mm 눈금이 있는 것을 사용하였다. 使用한 藥物은 Merck 혹은 和光 試藥의 1級品이었다.

作用 未知 物質로서는 1-methyl-4-(1-naphthylethenyl)pyridine iodide(MNP), m.p. 284~286° 및 1-methyl-2-imino-4-(1-naphthyl)-1,2-dihydropyridine hydroiodide(MIN), m.p. 278~281°를 選擇하였으며 이들 物質들은 Cavallito 等<sup>7,8)</sup>의 方法에 準하여 合成하여 使用하였으며 性狀은 모두 黃色結晶이었다.

**實驗 動物**—本 實驗에 使用한 마우스는 體重 19~23 g의 dd系 雄性이었고 흰쥐는 體重 120~150 g의 Sprague-Dawley系로서 역시 雄性이었다.

**藥物 投與**—모든 藥物은 動物의 腹腔內에 投與하였다. 水溶性인 藥物인 경우 生理食鹽水에 녹였으며 水不溶性인 경우에는 0.5% CMC-saline으로 현탁하여 投與하였다. 投與量은 아무 作用을 나타내지 않는 最高量을 結定하고 이로부터 약 3배씩 增量한 用量을 擇하였으며 投與後 10分內에 死亡하는 用量까지 投與하였다.

**動物의 行動 및 症狀 觀察**—實驗用 觀察 cage에 各各 對照群 7匹 또는 實驗群 7~10匹을 넣고 對照群에는 生理食鹽水 혹은 CMC-saline 溶液을 투여하고 實驗群에는 藥物의 各 用量을 一匹씩에 投與하였다. 같은 藥物에 대하여 이 實驗群을 5群으로 함으로서 對照群 1群을 포함한 6個群, 即 6cage를 同時에 使用하여 觀察하였다. 觀察方法은 主로 Irwin의 方法<sup>9)</sup>에 準하였으며 그 score는 正常을 0으로 나타내고 4~4의 數置로서 그 反應의 強弱을 나타내었다<sup>9)</sup>. 그 試驗範圍는 標準試驗 sheet에 나타난 項目들이다.

## 結 果

**標準 Work Sheet에 의한 Pentetrazole의 觀察實驗**—標準 work sheet 및 pentetrazole에 대한 實驗結果는 Table I에 表示하였다. 中樞神經에 作用하는 藥物의 試驗項目은 警戒性, 受動性, 接觸反應, 痛反應, 下熱反應, 舉尾反應等이고 運動協同性에 作用하는 藥物에 대한 項目은 몸 姿勢, 肢位置, 異狀步行, 正向反射로서 筋肉弛緩劑, 中樞抑制劑에 나타나는 反應이다. 筋肉緊張性은 四肢緊張, 握力, 軀幹筋緊張度로서 관찰하였으며, 筋弛緩劑, 脊髓抑制 神經筋接合部遮斷劑 등에서 나타난다. 知覺反射로서는 耳介反射 및 角膜反射를 觀察하였으며 麻醉劑에서 나타난다. 또한 自律神經에 作用하는 藥物에 대하여 瞳孔反應, 眼瞼開裂, 眼球突出, 唾液分泌, 頻尿등을 시험하였다. 其他 시험항목으로서 自發運動, 立毛, 皮膚의 色, 心搏數, 呼吸數, writhing, 洗眼動作 등을 포함시켰다.

이러한 sheet에 대한 pentetrazole의 實驗 結果, 0.3 mg/kg의 投與로서 警戒性, 自發運動의 亢進이 score 1로서 나타나고 1 mg/kg의 投與로서 警戒性, 接觸反應, 舉尾反應 및 自發運動이 score 2로서 나타났다. 이들 反應은 投與量의 增加에 따라 強度가 크게 나타났으며 100 mg/kg의 投與時에는 여러 反應이 오히려 負符號로 나타났는데 이것은 中毒으로 인하여 死亡하게 되는 用量인 것으로 考慮된다. 또한 10 mg/kg의 投與에도 異狀步行을 나타내는 것은 中毒性 現象으로 볼 수 있는데 이것은 最低 反應 用量의 30배에서 나타난 것이다. 100 mg/kg의 投與로서 6시간내에 死亡하였는데 典型的인 強直性 痙攣을 나타냈다.

**Promazine에 대한 實驗**—本 結果는 Table II에 表示하였다. 全體적으로 負符號로 나타나므로 神經에 抑制的으로 작용함을 알수 있다. 反應을 1 mg/kg의 投與로서 처음 反應을 나타내었으며 警戒性, 受動性 및 自發運動의 抑制등 中樞에 抑制的으로 作用하였다.

**數種의 作用 既知藥物 및 未知藥物의 實驗**—作用 既知 藥物로서 atropine, reserpine, bethanidine 및 eserine을 擇하였고 未知藥物로서 1-methyl-4-(1-naphthylethenyl)pyridine iodide(MNP)

Table I--Neuropharmacological work sheet

Sample Name : <i>Pentetrazole</i>	Vehicle: <i>0.9% Saline</i>						
Animal Name : <i>mouse</i>	Body weight: <i>18~23g</i>					Sex: <i>male</i> ,	
Administration Route : <i>intraperitoneal</i>	Volume: <i>0.2ml/20g b.w.</i>					Strain: <i>dd</i>	
Investigation Date : <i>20 November, 1977</i>	Experimenter: <i>E.B. Lee</i>						
Dose(mg/kg, ip)	0.1	0.3	1	3	10	30	100
CNS activity							
Alertness (4~-4)*	0	1	2	2	4	4	
Passivity (0~-4)							
Touch response (4~-4)		0	2	2	4	4	
Pain response (0~-4)							-2
Hypothermia (0~-2)						-1	-2
Straub's tail (4~0)		0	2	2	3	3	4
Motor incoordination							
Body posture (0~-4)							-2
Limb position (0~-4)							-2
Abnormal gait (0~-4)				0	-1	-2	-3
Righting reflex (0~-4)							-2
Muscle tone							
Limb tone (2~-4)							
Grip strength (2~-4)							
Body tone (2~-4)							
Reflex							
Pinna (0~-2)							
Corneal (0~-2)							
Autonomic activity							
Pupil size (2~-2)							
Palpebral opening (2~-2)		0	1	1			
Exophthalmos (2~0)							
Salivation (2~0)							
Urination (2~0)							
Miscellaneous activity							
Spontaneous movement (4~-4)	0	1	2	4	4	4	2
Piloerection (2~-4)							
Skin color (2~-2)							
Heart rate (2~-2)							
Respiratory rate (2~-2)							
Writhing (2~0)							
Grooming (2~0)							
Dead**							
Within 6 hrs							+
Within 24 hrs							
Within 72 hrs						+	

\* Number in parenthesis is a score range of reaction.

\*\* Tonic convulsion was observed at the time of death.

Table—II Neuropharmacological work sheet

Dose (mg/kg, ip)	0.3	1	3	10	30	100
<b>Sample Name : promazine</b>						
<b>Vehicle: 0.9% saline</b>						
<b>Animal Name : mouse</b>						
<b>Body weight: 20g, Sex :male</b>						
<b>Administration Route : intraperitoneal</b>						
<b>Volume: 0.2ml/20g b.w. Strain :dd</b>						
<b>Investigation Date 3 : November, 1977</b>						
<b>Experimenter: E.B. Lee</b>						
<b>CNS activity</b>						
Alertness (4~-4)*	0	-2	-2	-3	-4	-4
Passivity (0~-4)	0	-2	-2	-4	-4	-4
Touch response (4~-4)		0	-2	-2	-3	-4
Pain response (0~-4)			0	-1	-3	-4
Hypothermia (0~-2)			0	-1	-2	-2
Straub's tail (4~0)						
<b>Motor incoordination</b>						
Body-posture (0~-4)			0	-1	-3	-4
Limb position (0~-4)			0	-1	-3	-3
Abnormal gait (0~-4)			0	-1	-4	-4
Righting reflex (0~-4)				0	-2	-4
<b>Muscle tone</b>						
Limb tone (2~-4)			0	-1	-3	-4
Grip strength (2~-4)			0	-1	-3	-4
Body tone (2~-4)			0	-1	-3	-4
<b>Reflex</b>						
Pinna (0~-2)						
Corneal (0~-2)						
<b>Autonomic activity</b>						
Pupil size (2~-2)						
Palpebral opening (2~-2)				0	-1	-2
Exophthalmos (2~0)						
Salivation (2~0)						
Urination (2~0)						
<b>Miscellaneous activity</b>						
Spontaneous movement (4~-4)	0	-2	-4	-4	-4	-4
Piloerection (2~-4)				0	-2	-4
Skin color (2~-2)				0	-1	-1
Heart rate (2~-2)				0	-1	-2
Respiratory rate (2~-2)					0	-1
Writhing (2~0)						
Grooming(2~0)						
<b>Dead**</b>						
Within 6 hrs						+
Within 24 hrs						
Within 72 hrs					+	

\* Number in parenthesis is a score range of reaction.

\*\* Tonic convulsion was observed at the time of death.

Table III—Neuropharmacological evaluation of some drugs

Material	Dose (mg/kg) i.p	CNS activity		Autonomic activity		Miscellaneous symptom or activity	
		Reaction	Score	Reaction	Score	Reaction	Score
Atropine	1	Alertness	-1	Pupil size	2		
		Passivity	-1	Salivation	1		
	3	Alertness	-1	Pupil size	2	Spontaneous movement	-2
		Passivity	-1	Salivation	1	Respiratory rate	-2
	10	Alertness	-1	Pupil size	3	Piloerection	-2
		Passivity	-1	Salivation	2	Spontaneous movement	-2
					Respiratory rate	-2	
Reserpine	0.3	Passivity	-1				
	1	Passivity	-2	Palpebral opening	-2	Spontaneous movement	-1
						Respiratory rate	-2
						Writhing	-2
	3	Passivity	-2	Palpebral opening	-3	Spontaneous movement	-2
						Respiratory rate	-2
					Writhing	-2	
Bethanidine	2.4					Spontaneous movement	-1
						Grip Strength	-1
	7.1	Passivity	-1	Palpebral opening	-2	Spontaneous movement	-2
						Grip strength	-2
	22.0	Passivity	-2	Palpebral opening	-2	Spontaneous movement	-2
						Grip strength	-2
Eserine	0.01						
	0.03			Pupil size	-1	Spontaneous movement	2
	0.1			Pupil size	-1	Spontaneous movement	2
					Skin color	2	
MNP	3						
	10					Skin color	2
	20			Pupil size	1	Skin color	4
MIN	3						
	10						
	30			Pupil size	1	Skin color	4

및 1-methyl-2-imino-4-(1-naphthyl)-1,2-dihydropyridine hydroiodide(MIN)을 擇하였다.

atropine 은 1 mg/kg 의 投與量으로서 警戒性, 受動性을 약하게 나타내고 瞳孔散大가 현저하였으며 唾液分泌가 있었다. 3 mg/kg 의 투여로서 그 程度가 심하여졌으며 自發運動의 억제, 呼吸數의 增加가 추가로 나타났다. reserpine 은 1 mg/kg 의 投與量에서 眼瞼閉鎖를 나타내고 自發運動의 감소, 呼吸數의 減少를 나타냈다. bethanidine 은 受動性을 나타내고 眼瞼閉鎖, 自發運動의 감소, 握力의 감소를 나타냈다. eserine 의 경우에는 0.3 mg/kg 投與로 瞳孔縮小와 自發

運動의 亢進이 나타났으며 大量에서는 皮膚色の 赤變을 볼 수 있었다. MNP 및 MIN 은 中樞神經에 대하여 특별한 作用을 나타내지 않고 다만 30 mg/kg 의 大量에서 瞳孔散大를 약하게 나타내고 皮膚色の 赤變의 現저함을 觀察할 수 있었으며 死亡時에는 攣縮現象이 나타났다.

### 考察 및 結論

이 實驗은 藥物에 의한 毒性現象을 基礎로 하여 作用을 追求코자한 Irwin 의 方法<sup>2)</sup>을 대폭 變更시킨 것이다. 大部分의 有用한 藥物은 中毒量보다 매우 적은 用量에서 利用되고 있으므로 著者들은 死亡時의 症狀인 各樣의 攣縮症狀을 本 sheet 에서 삭제하였고 實際적으로 mouse 에서 觀察할 수 없거나 中毒現象으로 나타나는 項目을 삭제하였다. 즉 發聲現象, 同一한 反應을 反復하는 searching, circling, walking backward, licking the lips 등의 動作反應 그리고 restlessness, aggressiveness, fearfulness 등은 삭제하였다. 이들의 觀察困難性은 이미 認識된바 있다<sup>10, 11)</sup>.

이 實驗 結果에서 中樞興奮劑는 score 가 陽符號로 나타나고 抑制劑는 陰符號로 나타남은 Table 을 一見하여 쉽게 알 수 있다. 交感神經 興奮이나 抑制에도 같은 樣相으로 나타난다.

atropine 은 瞳孔反應에 제일 예민하게 나타났고 bethanidine 은 自發運動의 抑制와 握力の 弱화를 나타냈는데 이는 neuron 遮斷作用과 관계되는 것으로 사료된다. reserpine 의 眼瞼閉鎖는 典型的인 reserpine 의 反應이다. 未知物質로 擇한 MNP 와 MIN 은 in vitro 에서 強力한 choline acetyltransferase 의 억제작용이 보고<sup>7, 8)</sup> 되었으나 whole animal 을 사용한 藥理실험은 全無함으로 여기서 未知物質로 擇한 것이다. 이들은 약간의 瞳孔散大 作用을 나타내었고 中樞에 대한 아무런 作用을 관찰할 수 없었다. 이러한 結果는 MNP 와 MIN 이 choline acetyltransferase 抑制作用 以外에 特記할 全身의 作用이 거의 없음을 豫想할 수 있다. 特異한 것은 中毒量에서 全身 皮膚의 發赤이 뚜렷하였는데 eserine 投與로 因한 死亡時의 弱한 發赤과 어떤 相關性이 있는지에 대하여 더 追窮할 흥미있는 點이라고 思料된다.

以上の 實驗結果로서 中毒症狀를 排除하고 마우스에 나타나는 症狀 및 行動으로서 未知 藥物의 作用을 큰 category 에서 分類 豫測할 수 있는 하나의 screening 方法으로서 이 實驗 方法이 利用될 수 있다고 思料된다.

### 文 獻

1. W.G. Smith, Progress in Medicinal Chemistry, Vol. 1, Butterworths, 1961, p-1.
2. S. Irwin, Animal and Clinical Pharmacological Techniques in Drug Evaluation. Year Book (Publ., 1964, p-36.
3. M.H. Malone and R.C. Robinchaud, *Lloydia*, 25, 322(1962).
4. K. Takagi, H. Saito, H. Higuchi and A. Yamaguchi, *Pharmacometrics*, 5, 5(1971).
5. 伊藤隆大, 醫藥品開發概論, 知人書店, 東京, 1970, p-94.
6. 高木博司, 醫藥品研究法, 朝倉書店, 東京, 1970, p-94.
7. C.J. Cavallito, H.S. Yun, J.C. Smith and F.F. Foldes, *J. Med. Chem.* 12, 134(1969).
8. C.J. Cavallito, H.S. Yun, M.L. Edwards and F.F. Foldes, *J. Med. Chem.* 14, 130(1971).
9. 李殷芳, 藥學會誌, 19, 53 (1975).
10. W.S. Woo, E.B. Lee, H.J. Chi and A. Jado, *J. Pharm. Soc. Korea*, 21, 141(1977).
11. W.S. Woo, E.B. Lee and I. Chang, *ibid*, 21, 177(1977).