

# Punch 法による抗炎症薬の効力検定法とその応用

岡山大学医学部薬理学教室 (主任：山崎英正教授)

正 田 昭 夫

〔昭和42年9月12日受稿〕

## 緒 言

リウマチその他の疾患に用いられる抗炎症薬の需要の増加とそのような性質をもった新しい薬物をもとめる研究の拡大につれて薬物の抗炎症作用の実験的評価の方法については大きな関心もたれている。

炎症は固定された一つの病態現象ではなくて、連続する組織反応の経過よりなりたつものであって、個々の薬物はその経過のどの相をも同じように抑制しうるものではない。炎症をおこす刺激や傷害の種類や強度によつてその程度は一樣ではないが、基本的な経過は、細血管の拡張と血漿蛋白にたいする血管透過性の亢進、細静脈および毛細血管からの白血球の遊走およびそれにつづく傷害組織の細胞浸潤と結合織の増殖がその順序にしたがっておきる。普通抗炎症薬の効力検定法の対象となっているものは、このうち血管透過性の増加と結合織の増殖反応である。前者の反応は通常起炎刺激の加えられた局所の浮腫性腫脹または蛋白と結合した循環色素の漏出 (Menkin, 1929; Miles & Miles, 1952) を指標としており、後者はいわゆる Granuloma pouch (Selye, 1953) および Cotton wool pellets (Meier *et al.* 1950) による肉芽増殖を指標としている。

細血管透過性の亢進はすべての種類の炎症に共通する初期相および遅延相の反応形態であつて、後期の諸反応にも因果的なつながりをもつために抗炎症薬の作用としては頗る重要であり、これを対象とする試験法は種々考案されている。それらのうち、現在もっとも広くおこなわれているのはラットの後足の浮腫測定法である。この方法は起炎物質を足底、足背または足首の皮下に注射し、生じた足の腫脹を容積または足の厚み、あるいは重量の増加によって表現するものであつて、簡易である。しかし、いずれの場合も1実験条件につき1匹の動物から1つの測定値しかえられず、個体的な値の動揺をさけるためにはかなり多数の動物を使用しなければならない

点に欠点がある。また足におこした浮腫が、他の部位におこした浮腫と同じように薬物に反応するかどうかについてもまだ実証がない。

Ungar, Kobrin & Sezesny (1959) の方法 (私はこれを以下 Punch 法とよぶことにする) は原理的には類似しているが、足でなくて背部の皮膚に限局性の炎症浮腫をおこさせることと、1匹の動物から同時に4つの測定値がえられる点に特徴があり、本法を追試してみた結果、足浮腫法にくらべて個体差の動揺をかなり避けることができ、したがって、使用動物数が少なくてすむため、実験能率がよい利点のあることが知られた。しかし、この実験には若干原著者の記載していない条件および操作上の注意すべき点のあることが経験された。私は本法を実施再検討した結果をここに報告し、また本法を用いた若干の応用例についてもものべておく。

この研究の1部はすでに別に報告した (山崎, 正田, 1964; 山崎, 才川, 正田, 1964)。

## 実験材料および方法

動物 Wistar 系の雄ラット体重  $150 \pm 10$  g のものと、モルモット雄体重  $230 \pm 10$  g を用い、前者は固形飼料 Oriental MF、後者は同 GC-5 と水で  $22-25^{\circ}\text{C}$  の室温にて飼育中のものである。実験のための絶食はおこなわず、麻酔剤の使用はさけた。

起炎物質 抗血清はラットまたはモルモットの血清を隔日に 1 ml づつ 9 回 静注したウサギから最終注射10日ないし2週間後に採血分離した血清を凍結乾燥したものをを用いた。 $-15^{\circ}\text{C}$  の保存で2カ月以上力価に変化はない。

起炎物質としては Dextran (平均分子量 54,400, 名糖の好意による), Serotonin creatinine sulfate (Sigma), Histamine dihydrochloride (和光), Bradykinin (阪大蛋白研), Carrageenin (Genu carrageenan, Copenhagen Pectin Factory) を用いた。

その他の使用薬物 Phenylbutazone および Oxyphenbutazone は 1 N NaOH を加えて、溶解したのち

HCL 溶液で pH 7.8 に中和し、同じ pH に修正した 0.9%食塩水で稀釈して投与全量を 1 ml とし、筋注の場合は左右大腿筋に分注した。他の薬物は難溶性のものは 1%アラビヤゴム懸濁液とし、筋注の場合は 0.9%食塩水、経口投与の場合は蒸留水に懸濁または溶解した。

**Punch 法による炎症強度の測定法** 試験動物は腹位に固定して背をひろく電気 hair clipper (0.1 mm 刃) で短かく剪毛し、脊椎をはさんで 1 側に縦に 4 カ所 0.9%食塩水の 0.05 ml、対側にそれに対応するように 4 カ所に起炎物質の一定量を含む同じ液量の食塩水を 27-gauge 注射針で皮内注射する。後述のように起炎物質の種類によってきめた一定の時間後に動物を後頭部打撲と頸動脈切断によって殺し、腹位固定後、先のまるい鋏で皮下組織をはなしながら皮膚を注意深く剥ぎとり、皮下脂肪および不均等に皮膚に附着した皮下組織を小鋏でのぞく。

剥ぎとった皮膚は毛の側を下に朴の木板上にひろげてピンで止め、鋼鉄製の皮革用の Punch (直径 12 mm, 面積 112mm<sup>2</sup>) でもって皮膚のうら側から腫脹の中心をまん中にして打抜く。食塩水注射部位の腫脹中心部位は皮膚をうら返した場合には見えにくいので、皮内注射の場合針の先端がとどく皮膚部位に黒マジックインキで目印をつけておくがよい。打抜いた皮膚片は直ちに Torsion balance で mg 単位の秤量をする。

起炎物質による炎症浮腫の強度は  $I_c = (W_i - W_s) 100 / W_s$  であらわされる。 $W_i$  は起炎物質を注射した皮膚部位の重量、 $W_s$  は対応側の食塩水のみを注射した部位の皮膚重量である。1つの実験値 (1つのプロット) に通常 3 頭からえられる各 12 の  $I_c$  の平均値を用いた。 $I_c$  の平均値は起炎物質の log 用量に関して直線的関係を示す (第 2 図)。

第 1 表 Punch 法による抗炎症効果計算式

$$I_c = (W_i - W_s) 100 / W_s$$

$I_c$ : Intensity of inflammation in the control animal, (% weight increase of the inflamed site of skin)

$W_i$ : Weight of the inflamed site,

$W_s$ : Weight of the saline-injected site.

$$E = (I_c - I_f) 100 / I_c$$

$E$ : % inhibition of inflammation,

$I_f$ : Intensity of inflammation in the animal treated with the drug under test.

薬物の抗炎症効果をみるには一定時間までに薬物を投与した動物について同じ起炎物質による炎症強度  $I_f$  を測定すればよい。この値は薬物の 1 用量について通常 2 頭からえられる 8 つの値の平均値で示された。抗炎症効果、すなわち薬物の投与が起炎物質によっておきる皮膚重量の増加を減少させる度合の百分率 (% reduction of weight increase) は  $E = (I_c - I_f) 100 / I_c$  で表わされる (第 1 表)。この値は薬物の log 用量に関してやはり直線的関係を示す (第 4 図, 第 6 図)。

#### 実施上注意すべき点

1) 体重および性別: ラットについては体重 150 g 附近がもっともよい。この附近の体重のものは、第 2 表に示したように、起炎物質による皮膚重量の増加が体重 95 g 以下のものおよび 230 g 以上のものよりやや大きい。皮膚の厚さ (単位面積の重量) は体重に比例するが、浮腫による重量増加率の大小はそれと必ずしも平行しないこともこの表からわかる。しかし、皮膚の厚さが、浮腫の強度 (皮膚重量増加率) に全く関係がないわけではないので、頭側に近い方が尾側に近い方より厚さがやや大きい点を考慮し、1つの測定値には頭側から尾側にかけて 4 sites が均等に含まれるようにした方がよい。第 2 表に示したように、雌雄差による皮膚重量増加率の差は認められないが、ラットの雌は薬物の代謝や抵抗力の点で雄と相違するところが大きく、また妊娠中のものに遭遇することがあるので、雄に統一した方が安全である。モルモットについても体重、性別の統一が望ましい。私はモルモットは 230 ± 10g 範囲の雄のみを用いることにした。

2) 注射液の pH: 0.9%食塩水単独による腫脹は本法では pH 7.2 附近がもっとも低いことをみとめたので、起炎物質を含む食塩水もすべてこの pH に調整した。

3) Punch 口径: 大きすぎても小さすぎても皮膚重量増加率が少くなる。直径 12 mm (面積 112 mm<sup>2</sup>) 附近がよい。

4) 手技上の注意: 起炎物質の皮内注射には常に鋭利な注射針を用い、真皮層のまん中の深さに正確に 5 mm だけ針をいれ、液の注入により同じ大きさのふくらみを生ずるようにする。皮膚の剝離は 1 方向のみの力が強く加わらないよう均等におこなわれること。皮膚の板上へのピン止めは皮膚の伸展度が不均等にならぬように注意すること。これらの諸点は成績の再現性に関係する。

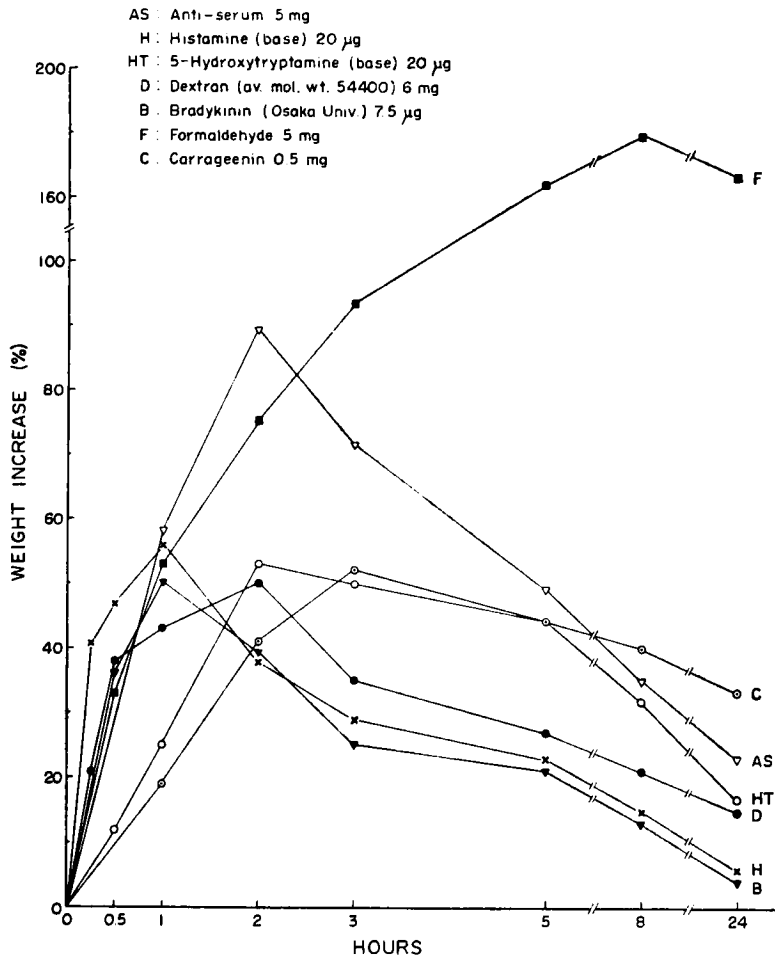
第 2 表 ラットにおける皮膚の炎症浮腫と体重の関係

体 重 (g)	性 別	正常皮膚重量 (mg/112mm <sup>2</sup> , 平均±S. E.)	炎 症 皮 膚 の 重 量 増 加 率 (% 平均 ± S. E.)	
			Dextran*	抗 血 清*
80 — 95	雄	87 ± 2.65 (6)**	37 ± 3.1 (8)†	83 ± 3.5 (12)†
	雌	89 ± 1.00 (6)	35 ± 1.0 (8)	81 ± 4.0 (12)
150 — 160	雄	129 ± 2.18 (6)	50 ± 2.4 (8)	89 ± 1.7 (12)
	雌	132 ± 1.49 (6)	49 ± 4.3 (8)	89 ± 2.6 (12)
230 — 250	雑	147 ± 4.72 (6)	41 ± 2.4 (8)	84 ± 2.3 (12)
	雌	150 ± 1.22 (6)	39 ± 2.1 (8)	83 ± 3.2 (12)

\* Dextran 6 mg, 抗血清 5 mg per site.

\*\* 正中線腎臓中心の高さの背部皮膚, カッコ内は測定例数.

† カッコ内は試験 site の数.



第 1 図 起炎物質の皮内注射による皮膚重量の増加の時間的経過.

横軸: 注射後の時間; 縦軸: 皮膚重量増加(%).

各点は 3 頭の動物よりえた 12 テストの平均値. Histamine (モルモット) 以外はすべてラットを使用.

実 験 成 績

1. 諸種起炎物質による炎症浮腫の時間的経過と Dose-response curves

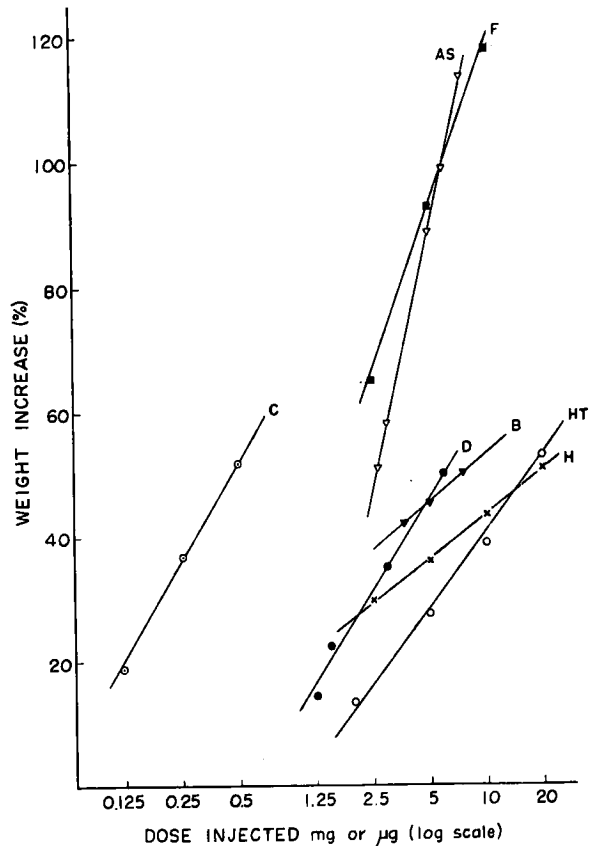
諸種起炎物質の各一定量をラット (Histamine のみモルモット) の皮内に注射して、種々の時間間隔後に注射部位の皮膚重量増加率をしらべた成績が第1図である。皮膚重量の最大に達する時間は、Histamine および Bradykinin は1時間、抗ラット血清 (以下 AS), Serotonin (以下 5-HT) および Dextran は2時間、Carrageenin は3時間、Formaldehyde は8時間前後である。

これらの各々の起炎物質について炎症浮腫の最大になる上記時間を判定時間とし (ただし Formaldehyde のみは3時間を判定に用う), Dose-response curves をもとめたのが第2図である。この成績から各起炎物質の、実験に使用する適当な用量が選定できるが、私のこの報告での実験に用いた標準用量とその皮膚重量増加率は第3表の如くである。

2. Phenylbutazone および Oxyphenbutazone の抗炎症作用

a. 抗炎症効果の時間経過

Phenylbutazone および Oxyphenbutazone の 30mg/kg 用量を経口または筋注後種々の時間間隔で抗血清の標準用量を皮内注射し、上記の方法で皮膚重量増加率の減少率を測定した結果、第3図の如き結果をえた。この成績からみると、経口、筋注とも Phenylbutazone の効果は投与後2時間附



第2図 起炎物質の用量と皮膚重量増加(浮腫強度)との関係。横軸：1カ所に注射した起炎物質の用量。

縦軸：皮膚重量の増加(%)。

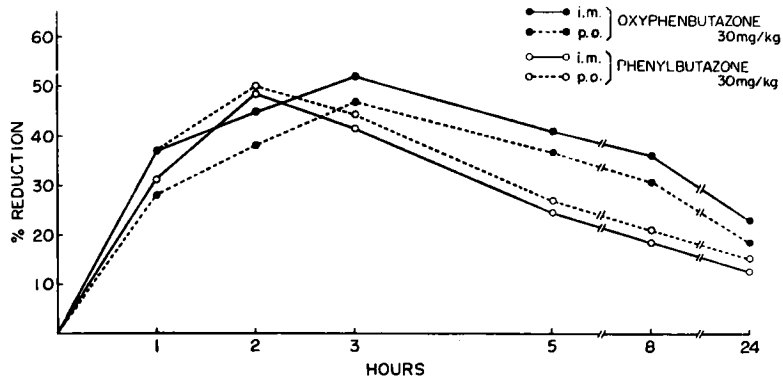
AS, 抗ラット・ウサギ血清 (mg); H, Histamine (µg base); HT, Serotonin (µg base); B, Bradykinin (µg); D, Dextran (mg); F, Formaldehyde (mg); C, Carrageenin (mg).

第3表 使用した起炎物質の用量とそれらの浮腫発現強度

起 炎 物 質	用 量	皮 膚 重 量 増 加 (%)	測 定 時 間 (h)
抗ラット血清	5 mg	89 ± 0.68 (64)*	2
Dextran	6 mg	50 ± 0.49 (26)	2
Histamine**	20 µg (base)	56 ± 0.80 (16)	1
Serotonin	20 µg (base)	53 ± 0.67 (16)	2
Bradykinin	7.5 µg	50 ± 0.64 (24)	1
Carrageenin	0.5 mg	52 ± 1.32 (24)	3
Formaldehyde	5 mg	93 ± 1.48 (12)	3

\* test site の数,

\*\* モルモット, 他はラット。



第3図 抗血清によるラット皮膚のアレルギー炎症浮腫にたいする Oxyphenbutazone および Phenylbutazone (各 30 mg/kg) の抑制効果の時間的消長。  
横軸：薬物投与と炎症惹起注射との間隔 (時間)  
縦軸：皮膚重量増加にたいする百分率減少効果。

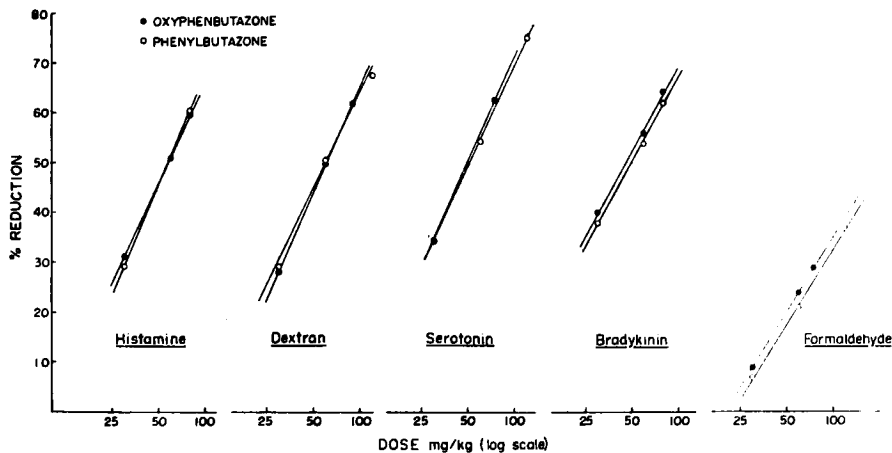
近, Oxyphenbutazone の方は3時間附近で最大になり, 効果の半減期は前者の5—8時間であるのにたいし, 後者では8—24時間の中間である, ピークの時期における効果の大きさには両化合物の間に著差はないが, 後者の方が効果に持続性が大きいことを判断できる。

b. 諸種の起炎物質による炎症浮腫にたいする効果

Phenylbutazone では2時間後, Oxyphenbutazone では3時間後, すなわち, それぞれ効果のピークに達する時間に, 種々の起炎物質を皮内注射して浮腫を発生させた。両薬物の投与用量 (筋注) と抗炎症

効果との関係は第4図に示してある。抗血清炎症に対する Dose-effect の関係は第6図の中に示してある。

これらの成績からみると抗血清, Histamine, Dextran, Serotonin, Bradykinin および Formaldehyde による炎症のいずれにたいしても, 両薬物の作用ピーク時間における抗炎症効果の間には差異がみとめられない。Formaldehyde 炎症への効果は両薬物とも微弱である。ラットの後足浮腫法で Domenjoz と共同研究者 (Domenjoz, 1960; Wilhelmi, 1960) は両薬物が Histamine, Dextran および 5-HT 浮腫には効果がないか, 微効であるとのべているが, 現在



第4図 Histamine, Dextran, Serotonin, Bradykinin および Formaldehyde による浮腫にたいする Oxyphenbutazone および Phenylbutazone の抑制効果。  
Histamine 浮腫はモルモット, 他はラット。Phenylbutazone の投与は起炎注射の2時間まえ, Oxyphenbutazone 投与は3時間まえ, すべて筋注。

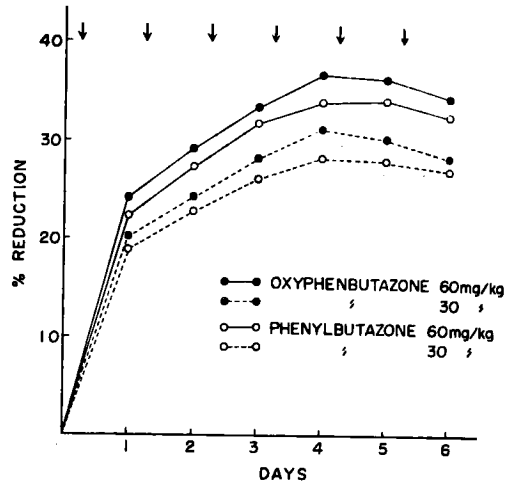
の方法ではかなりの効果が認められる。

c. 24 時間毎の投与による効果の蓄積

両薬物 30 mg/kg 投与により 24 時間後にもなお軽度の効果がみとめられた (第 3 図) ので, 毎日 1 回 30 または 60 mg/kg をラットに経口投与し, それぞれの回数の注射の 20 時間後毎に抗血清の標準用量を皮内注射して炎症皮膚重量増加の減少度をしらべてみた。第 5 図に示したように, 両薬物の各用量投与とも最初の 4 日間まで効果は累積的に増加した。しかし, その後の投与ではそれ以上の効果の増加はみられず, むしろ僅かに減少の傾向がみられた。

3. 既知抗炎症薬の抗ラット血清炎症にたいする効果

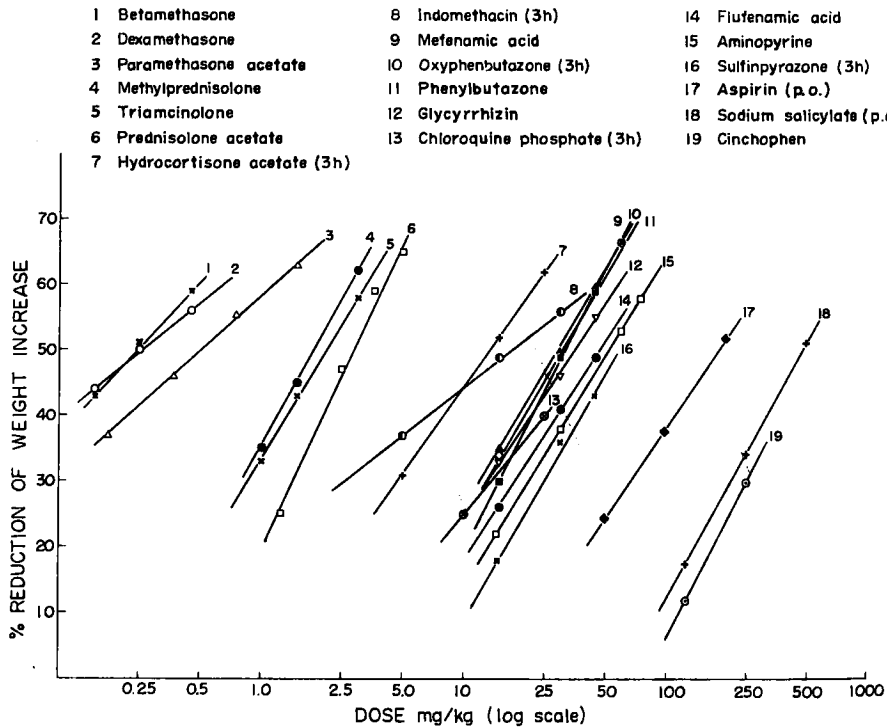
ステロイド剤を含む既知の抗炎症薬の本法による効果を抗ラット血清炎症浮腫についてしらべた結果が, 第 6 図に Dose-effect の直線関係で示されている。各々の薬物の効果は予めしらべたピークの時期を判定時間を選んである。図中に 3h と記載してあるもの以外は 2 時間が効果のピークである。経口投与 (p.o.) とことわったもの以外は筋注である。こ



第 5 図 24 時間毎に経口投与した Oxyphenbutazone および Phenylbutazone の効果の蓄積。

横軸: 効果測定日, 矢印はその測定のおこなわれる 20 時間まえに薬物の投与せられたことを示す。

縦軸: 皮膚重量増加の百分率減少効果。



第 6 図 糖質 Steroid 剤および主要非 Steroid 抗炎症薬の抗血清アレルギー性炎症浮腫にたいする抑制効果の比較。

縦軸および横軸, 第 4 図に同じ, 薬物投与方法は Nos. 17, 18 経口, 他は筋注。

(3h) は起炎注射の 3 時間まえに薬物投与を示す。他のものはすべて 2 時間まえ薬物投与。

これらの薬物の Dose-effect curves が示す効果の rank は臨床用量からみた効果のそれとおおよそ一致している。

#### 4. 抗炎症薬の効果と起炎物質の種類との関係

被検薬物の抗炎症効果が起炎物質の相違によって著しく差異を生ずる場合があると、抗炎症薬の評価がむつかしくなってくる。従来の検定法による報告ではそのような例が屢々のべられている。そこで、本法を用い既に臨床的に効果の充分認められている7種類の抗炎症薬 (Dexamethasone, Prednisolone, Hydrocortisone, Phenylbutazone, Chloroquine, Aminopyrine および Aspirin) について、抗血清, Histamine, 5-HT および Dextran 炎症浮腫にたいする効果をしらべた結果、第7図の如くで、これらの抗炎症薬は上記いずれの起炎物質による炎症浮腫にも奏効しており、かつ個々の薬物の50%抑制用量は起炎物質の相違によって概して格段の差を示していない。

#### 5. 抗炎症薬スクリーニングへの応用

上述のいくつかの実験から、本法は臨床効果をかなり予想しうる検定法としての利用価値のあることが示唆される。抗炎症薬としての臨床利用の条件としては、(1) なるべく経口的に用いること、(2) 効果になるべく持続性のあることが望ましい、(3) 特定のアミンの如き起炎物質との薬理学的拮抗によるものでなくして、臨床的に縁の近い型の炎症に奏効

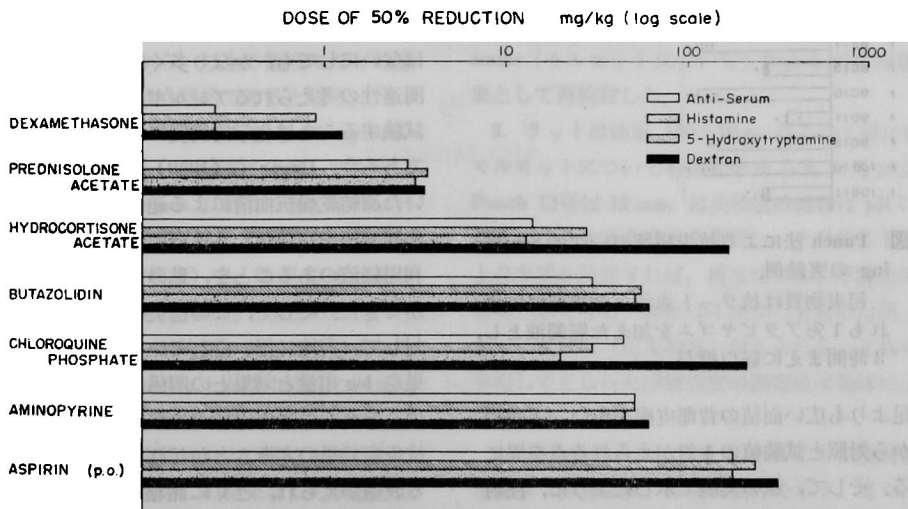
すること等がある。

これらの諸点を、本法による一次的なスクリーニングについて満足させるためには、薬物は経口投与、判定時間3時間 (多くの抗炎症薬の効果のピークは上述の成績のように2時間または3時間である)、起炎物質は抗血清を選ぶという方法でよくはないかと思う。

この方式によって試験された実験例を第8図に示した (この実験で試験された薬物の詳細については別に報告される予定)。このようなスクリーニングの結果有望な化合物について、効果の時間経過、Dose-effect curve, 起炎物質の種類との関係、投与方法との関係等が要求にしたがって試験される順序になる。

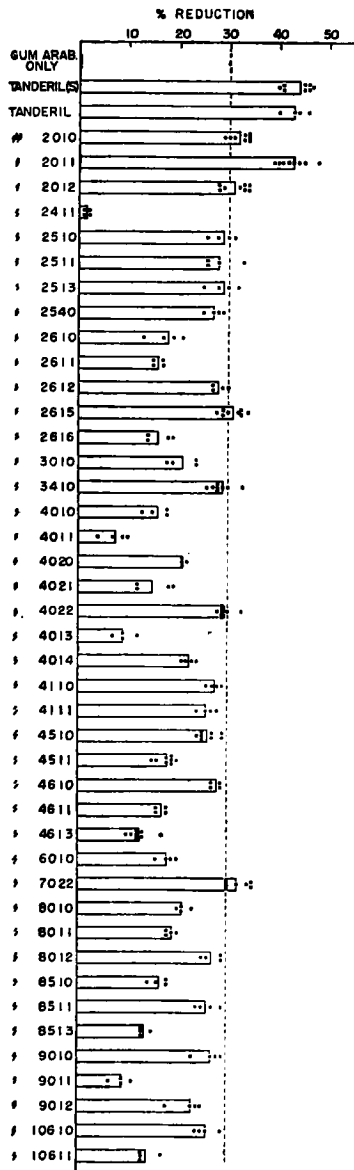
### 考 察

典型的な炎症過程の段階を第9図に示した。この図式にみるように、炎症の基本的な反応はあくまでも血管を中心として発現するもので、血管の存在なしに典型的な炎症はおこりえない。抗炎症薬の検定のうち、血管透過性の抑制を目標とするものが極めて重要な位置を占めている所以である。Ungar ら (1959) の Punch 法は炎症局所の血管透過性増加による血漿の液成分の漏出による浮腫を測定する点において、現在同じ目的に広く用いられているラット足の化学的物質による炎症浮腫測定法とかわりはない。



第7図 抗血清, Histamine, Serotonin および Dextran の皮内注射による浮腫にたいする諸種抗炎症性薬物の50%抑制用量。

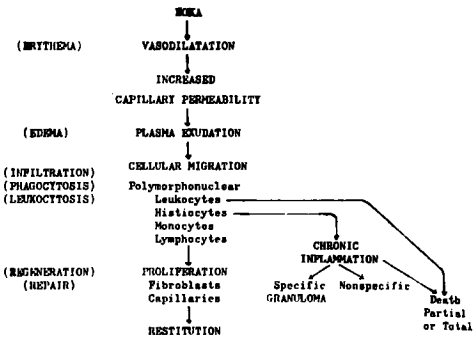
Hydrocortisone, Chloroquine は起炎注射の3時間まえ, 他は2時間まえに筋注。ただし Aspirin のみ経口。



第8図 Punch 法による抗炎症薬の一次的 Screening の実験例。

起炎物質は抗ラット血清。被検薬はいずれも1%アラビヤゴムを加えた懸濁液とし、3時間まえに経口投与。

いが、足よりも広い面積の背部皮膚を用い、1頭のラットから対照と試験値の4対がえられる点を異にしている。そして、私の実験で示したように、注射液のpHを7.2に統一し、Punch口径を12mm、雄ラットを用い体重を150±10gに統一する場合、個体差による実験値のパラツキは甚だしく、1測定値を求めるために僅か2-3頭を使用するだけで、



第9図 炎症の段階

起炎物質の log 用量と浮腫強度（皮膚重量の増加）の関係がかなり精度のよい linear regression を示すことが、諸種の起炎物質について認められた。また一定の投与条件については、薬物の効果とその log 用量の関係もまた、かなり精度のよい直線的関係で表示でき、したがって、比較的少量の薬物の効果をも判定できる利点がある。

炎症反応に直接関与するものが、起炎性刺激によって遊離または生成される chemical mediators を含んでいることは一般に考えられていることであるが、それらの内因性因子の種類や関与の程度は個々の炎症についてさえ充分にわかっていない。したがって、単に炎症性変化をおこしうる物質というだけの意味で用いられている起炎性物質による炎症浮腫を臨床的な炎症に代用させて考えることには困難がある。こういった観点から、臨床的炎症のすべてがそうではないにしても、かなり多くの場合に成因のうえで関連性の考えられるアレルギー性炎症を対象として試験することは化学的物質によるものよりは合理的であろう。Ungar ら (1959) が起炎刺激として用いた凍結乾燥抗血清による逆 Arthus 型の炎症は、浮腫強度を定量化しうる点においてこの目的に高い利用価値のあることを、私の実験でも実証することができた。そして、この起炎刺激による炎症浮腫に対して、実地に用いられている多数の抗炎症薬の効果を log 用量と効果との関係についてもとめた結果は、それらの臨床用量の比率から判断される臨床的抗炎症効果の大きさとかなりよく平行すると思われる成績がえられ、とくに諸種糖質 Steroid 剤の効力比較においてこのことが明瞭であった。この結果は、この試験法が抗炎症薬の検定法として利用性の高いものであることを示している。

抗炎症薬の実験的炎症にたいする効果が、起炎物



質の種類によって差異を生ずることはありうることである。Histamine, Serotonin および Bradykinin による炎症浮腫は、それらの作用に特異的に拮抗する薬物によって抑制される筈だし、またそれらの mediators の生成をきたす起炎刺激による炎症浮腫は、その生成過程を阻止する薬物によって抑制をうけるであろう。炎症浮腫の抑制がそのような作用のみによる場合は、抗炎症薬としての一般性に乏しいとみななければならない。しかし、そのような作用であっても広い範囲の起炎性 mediators にわたる場合には意味をもって来る。何故なら、炎症反応には複数の mediators やそれらの遊離が関与することが考えられるし、また一面、その薬物の作用が mediators の種類にかかわりなく、血管内皮自体の反応性に関係している可能性がかなり濃くなって来るからである。今回の実験において Phenylbutazone と Oxyphenbutazone について、それらが抗血清, Histamine, Serotonin, Dextran および Bradykinin 炎症浮腫にたいして、また Dexamethasone, Prednisolone, Hydrocortisone, Chloroquine, Aminopyrine および Aspirin について、それらが抗血清, Histamine, Serotonin および Dextran の各炎症浮腫にたいして、起炎物質のちがいににかかわらず抑制効果のうえで格段の差を示さなかったことは、このような意味で、これらの抗炎症薬の効果が非特異的な性格のものであることを示している。実験動物において人体における種々の臨床的炎症を再現させることの困難である限り、このような諸種の起炎刺激による炎症反応についての効果の観察から、以上の観点にたつて臨床効果を推定することは合理的であると思う。

私は今回の実験において Punch 法を Phenylbutazone と Oxyphenbutazone の試験に応用してみた。その結果、Oxyphenbutazone の効果の強さは Phenylbutazone と著明な差はないが、作用時間が長く、30 mg/kg 投与（経口、筋注）で、効果の半減期が Phenylbutazone は 5—8 時間の間であるのにたいし Oxyphenbutazone は 8—24 時間の間という結果をえた。Hermann (1959) はラット血漿中濃度の半減期は Phenylbutazone が 3 時間であるのにたいし、Oxyphenbutazone は 10 時間におよび明らかに長いことをべているので、私のこの結果はこの成績とよく一致する。また、私の実験では Phenylbutazone の経口投与は筋注にくらべて全経過においてわずかに高い効果を示した。Phenylbutazone 投与後のヒトの血中濃度をしらべた Burns ら (1953) はこの化

合物が消化管からは急速に吸収されるのにたいし、筋肉内からの吸収はそれほどよくないことを示している成績とも一致する。このように、私の Punch 法でえた実験成績が Phenylbutazone と Oxyphenbutazone の血中濃度の変化の関係をよく反映していることは、この方法による試験成績が、両薬物の抗炎症効果の差異を正しく表明していることを示しており、検定法としての信頼性を高く評価できると考えられる。

Domenjoz (1960) と Wilhelmi (1960) によるとラット足を用いた試験法では、Phenylbutazone も Oxyphenbutazone も、Serotonin と Dextran 炎症浮腫にはほとんど無効かまたは甚だ弱効であったという。私の Punch 法では両薬物ともこれらの起炎物質による浮腫を、彼らが用いたよりも少い用量でもって明らかに抑制した。これらの違った方法による試験の結果のこのような差異が如何なる理由によるのか、説明しがたいが、特定の起炎物質については背の皮内注射と足趾の皮下注射による炎症浮腫の間に発生過程のうえで、薬物の効果に異った反応を示すようなちがいがあっても知れない。このような問題は、抗炎症薬検定に当つて、一応念頭におくべきであろう。

## 総 括

1. Ungar らの Punch 法を抗ラット・ウサギ血清, Serotonin, Bradykinin, Dextran, Carrageenin, Formaldehyde, (以上ラットについて) および Histamine (モルモットについて) による炎症浮腫を対象として再検討した。

2. ラットは体重 150 以上 10 g, なるべく雄に統一、モルモットについても体重をそろえた方がよい。Punch 口径は 12 mm, 起炎物質の溶媒は pH 7.2 に調整した 0.9% 食塩水を使用し、その他若干の操作上の事項を注意すれば、再現性のよい浮腫強度をうるることができる。本法は 1 頭から 4 対の対照（食塩水）と試験値（起炎物質）がえられる。それらから平均してえられた浮腫強度の測定値は個体による動揺が少い。

3. 起炎物質の log 用量とそれによる皮膚重量の増加率（浮腫強度）は直線関係を示す。また、一定時間まえに投与した抗炎症薬の用量とそれらが起炎物質による皮膚重量の増加を減少させる百分率効果（抗炎症効果）との間にも直線関係が成立する。

4. 本法を用いて、Phenylbutazone と Oxyphen-

butazone の効果を比較した結果、前者よりも後者の効果がより持続的であること、前者の効果は筋注よりも経口投与の方が僅かにすぐれていることを認めた。この結果はラットまたはヒトについて報告されている両薬物投与後の血液内濃度の消長をよく反映した。

5. 抗ラット血清による炎症浮腫を対象として、7種の糖質 Steroid 剤と12種の非 Steroid 抗炎症薬の log 用量-効果直線をもとめた。それらの効果は臨床用量からみた抗炎症効果の序列とかなり一致し

た。

6. Phenylbutazone, Oxyphenbutazone, Hydrocortisone, Prednisolone, Dexamethasone, Chloroquine, Aminopyrine および Aspirin の抗炎症効果は、抗血清, Histamine, Serotonin, Bradykinin および Dextran のいずれによる炎症浮腫にたいしてもみとめられた。

7. 本法を用いた簡易な抗炎症薬のスクリーニングの方法をのべた。

### 文 献

- 1) Burns, J. J., Rose, R. K., Chenkin, T., Goldman, A., Schulert, A. and Brodie, B. B.: *J. Pharmac. exp. Ther.* **109**, 346 (1953).
- 2) Domenjoz, R.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **86**, 263 (1960).
- 3) Hermann, B.: *Meb. exp.* **1**, 170 (1959).
- 4) Meier, R., Schuler, W. and Desaulles, R.: *Experientia*, **6**, 469 (1950).
- 5) Menkin, V.: *J. exp. Med.* **50**, 171 (1929).
- 6) Miles, A. A. and Miles, E. M.: *J. Physiol.* **118**, 228 (1952).
- 7) Selye, H.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **82**, 328 (1953).
- 8) Ungar, G., Kobrin, S. and Sezesny, B. R.: *Archs int. Pharmacodyn. Théor.*, **123**, 71 (1959).
- 9) Wilhelmi, G.: *Arzneim.-Forsch.*, **10**, 129 (1960).
- 10) 山崎英正, 才川秀男, 正田昭夫: *アレルギー* **13**, 100 (1964).
- 11) 山崎英正, 正田昭夫: *日薬理誌* **60**, 65§(1964).

## Re-examination of the Punch Method for Anti-inflammatory Assay with Practical Applications

By

Akio MASADA

Department of Pharmacology, Okayama University Medical School, Okayama  
(Director: Prof. Hidemasa Yamasaki)

Ungar, Kobrin and Sezesny (1959) devised an anti-inflammatory assay method the principle of which is to punch out the skin pieces from the inflamed and control sites and weigh them to obtain the net weight increase of the skin produced by phlogogenic substances. The present author carefully re-examined this method with special consideration on the experimental conditions and the reproducibility of the results. The inflammatory edema was induced in animals by the intracutaneous injection of anti-rat rabbit serum, serotonin, bradykinin, dextran, carrageenin, formalin (in rats) and histamine (in guinea pigs).

It was found that the weight increase (edema intensity) of the skin induced by phlogogenic substances is related with the body weight of animals, the caliber of the punch and the pH of the vehicle in which irritants are dissolved. Satisfactory results were obtained with the use of male rats weighing  $150 \pm 10$  g, the punch of 12 mm caliber, and 0.9% physiological saline adjusted to pH 7.2 as the vehicle. As the skin could be punched out from 4 test

sites and 4 control sites of one animal, it was possible to estimate the edema intensity with good reproducibility of the results using a relatively small number of animals. There was found a linear correlation between log doses of the phlogogenic substance and the weight increase of skin. A linear correlation was also obtained between the log doses of the anti-inflammatory agents tested and the percentage inhibition of weight increase of inflamed skin.

With respect to anti-rat rabbit serum edema, the anti-inflammatory effect of oxyphenbutazone was somewhat longer lasting than that of phenylbutazone. Peroral phenylbutazone was slightly more effective than intramuscular. These results reflect well the course of blood level of these agents reported in rats as well as in man. The author depicted log dose-effect curves of 7 kinds of glucocorticoids and of 12 non-steroid anti-inflammatory agents of current clinical use. The order of the anti-inflammatory potency of these compounds coincided with the order of the clinical effect surmised on the basis of doses. Phenylbutazone, oxyphenbutazone, hydrocortizone, prednisolone, dexamethazone, chloroquine, aminopyrine and aspirin also showed clear inhibitory effects on the inflammatory edema induced by histamine, serotonin, bradykinin, and dextran. Discussion was made on the simplified experimental design with this method, for the anti-inflammatory screening of newly synthesized compounds, with some concrete examples.

Author

---