いちじるしく局所貯留性のある合成ステロイド F-2 の薬理作用

三宅秀和・藤原耕介・小野尚彦・中村芳正・中井一裕*, 水島 裕**

Pharmacological effects of a synthetic corticosteroid F-2, having a marked locally residual activity The local anti-inflammatory effects and the systemic effects, including the reduction of the thymus weight, of 17 α ,21-diacetoxy-2-bromo-6 β ,9 α -difluoro-11 β -hydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione (F-2) were compared with those of fluocinolone acetonide and hydrocortisone acetate by granuloma and granuloma pouch methods. Fluocinolone acetonide and hydrocortisone acetate reduced the thymus and adrenal weights and inhibited the body weight gain at the same doses as they inhibited the formation of granuloma or the accumulation of pouch fluid. F-2 showed an intensive local anti-inflammatory activity with negligible systemic effects at 25~125 times the minimal effective dose.

After the injection of F-2 into the N₂-gas pouch formed on the dorsum of rats, the residual level of F-2 at the injection site was measured. F-2 showed a marked locally residual property and its residual per cent was about 75% on the 7th day and 50% on the 30th day.

Hidekazu Miyake・Kohsuke Fujiwara・Naohiko Ono・Yoshimasa Nakamura・

Kazuhiro Nakai*

Yutaka Mizushima**

* Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.

** Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine

17 α , 21-diacetoxy-2-bromo-6 β , 9 α -difluoro-11 β -hydroxy-1, 4-pregnadiene-3, 20-dione (以下 F-2) は, Toscano ら¹⁾ によって合成された抗炎症ステロイドであり, 右図に示す化学構造を有する. Mizushima ら²⁾ は, F-2 が全身作用をほとんど示すことなく, 強い局所抗炎症作用を示すことを報告している.

本報では, F-2 の局所抗炎症作用と胸腺萎縮などの全身作用を fluocinolone acetonide (以下 FA) および hydrocortisone acetate (以下 HA) と比較検討するとともに局所投与部位における貯留性を検討した.

材 料

F-2 は白色無臭の結晶性粉末で, 使用に当っては, めのう乳鉢で細かくすりつぶしたうえで 1% croton oil (綿実油に溶解), 0.25 または 0.5% sodium carboxymethyl cellulose 液 (以下 CMC 液) に, 溶解あるいは懸濁して用いた. また対照薬として, 抗炎症試験では, FA (Byron chem, USA), HA (Shering, Germany) を, 貯留性試験では HA (日本メルク万有), triamcinolone diacetate (以下 TD, 日本レダリー), methylpredni-

solone acetate (以下 MPA, 日本アップジョン) を使用した.

実験に用いた動物は, 徳島実験動物研究所の Wistar 系雄性ラットである.

17 α , 21-diacetoxy-2-bromo-6 β , 9 α -difluoro-11 β -hydroxy-1, 4-pregnadiene-3, 20-dione (F-2)

方 法

(1) Formalin 濾紙肉芽腫法による肉芽形成抑制作用 Tanaka ら³⁾の方法を一部改変して行った. 体重 170~190 g のラットを使用した. エーテル麻酔下に背部正中線に沿って皮膚を切開し, 両側肩甲部皮下に, 0.25% CMC 液に懸濁した被検薬物液 0.02 ml を浸した濾紙片

* 大鵬薬品研究部

** 聖マリアンナ医科大学第一内科学教室

表 1 inhibitory effects of topically applied F-2 and reference steroids on the formalin paper disk granuloma in rats

drugs	dose (μ g/paper disk)	No. of rats	granulation tissue		body weight gain (g)	organ weight	
			dry weight (mg)	inhibition (%)		thymus (mg)	adrenals (R+L, mg)
control		10	29 $\pm$ 5.8		61 $\pm$ 5.4	690 $\pm$ 140	47 $\pm$ 7
F-2	3.2	10	32 $\pm$ 8.4		66 $\pm$ 3.0	670 $\pm$ 80	44 $\pm$ 7
	16	10	11 $\pm$ 5.9**	62	60 $\pm$ 5.4	650 $\pm$ 100	48 $\pm$ 2
	80	10	8 $\pm$ 5.0**	72	64 $\pm$ 4.9	630 $\pm$ 100	47 $\pm$ 6
	400	10	6 $\pm$ 3.9**	79	59 $\pm$ 12.0	750 $\pm$ 160	44 $\pm$ 7
	2,000	10	8 $\pm$ 4.9**	72	57 $\pm$ 5.9	580 $\pm$ 150	40 $\pm$ 8
fluocinolone acetoneide	3.2	10	33 $\pm$ 9.5		55 $\pm$ 6.5	480 $\pm$ 120**	41 $\pm$ 9
	16	10	23 $\pm$ 8.4	21	49 $\pm$ 5.1	410 $\pm$ 80**	42 $\pm$ 7
	80	10	19 $\pm$ 7.9**	34	40 $\pm$ 5.0	250 $\pm$ 100**	39 $\pm$ 5*
hydrocortisone acetate	400	10	38 $\pm$ 10.7		59 $\pm$ 6.6	690 $\pm$ 130	39 $\pm$ 5
	2,000	10	21 $\pm$ 14.7	28	58 $\pm$ 8.3	620 $\pm$ 80	35 $\pm$ 4**
	10,000	10	13 $\pm$ 5.6**	55	34 $\pm$ 7.6	250 $\pm$ 80**	26 $\pm$ 5**

mean $\pm$ SD *P<0.05 **P<0.01

(重量 3.7 mg, 直径 6.5 mm) 2枚を乾燥させた後, 6% formalin 液に浸した濾紙片ではさみ込み挿入した. 8日目に濾紙片をとりまいて増殖した肉芽組織を摘出し, その乾燥重量を測定した. 左右の肉芽組織の重量を平均し, さらに濾紙片の重量を減じたものを1四分の値とした. 同時に胸腺および副腎重量を測定した.

(2) croton oil 肉芽嚢法による滲出液貯留抑制作用

糸賀ら⁴⁾の方法に従って行った. 体重 170~190 g のラットを使用した. エーテル麻酔下に, 背部皮下に 20 ml の窒素ガスを注入してガス嚢を作成し, その嚢中に 1% croton oil 1 ml を注入した. 3日目に窒素ガスを抜きとり, 10日目に動物を屠殺して形成された肉芽嚢を剝離し貯留した滲出液量を測定した. 同時に胸腺および副腎重量を測定した. 被検薬は 1% croton oil に溶解して嚢中に同時投与した.

また体重 180~190 g のラットを使用し, 同様の処置により croton oil 肉芽嚢を作製し, 6日目に形成された嚢中に 0.25% CMC 液に懸濁した被検薬物液 0.5 ml を注入した. 薬物投与 7日目に動物を屠殺して形成された肉芽嚢を剝離し, 肉芽重量と滲出液量を測定した. 同時に胸腺および副腎重量を測定した.

(3) carrageenin 肉芽嚢法による滲出液貯留抑制作用

Fukuhara ら⁵⁾の方法に従って行った. 体重 150~170 g のラットを使用した. エーテル麻酔下に背部皮下に 8 ml の空気を注入して空気嚢を作製し, 24時間後に 2% carrageenin 液 (生理食塩水に溶解) 4 ml を注入し, 同時に 0.5% CMC 液に懸濁した被検薬物液 0.1 ml を注入した. 起炎物質注入 9日目に動物を屠殺して, 形成され

た肉芽嚢を剝離し, 貯留した滲出液量を測定した. 同時に胸腺および副腎重量を測定した.

また, 体重 120~140 g のラットを使用し, 同様の処置により, carrageenin 肉芽嚢を作製し, 5日目に形成された嚢中に 0.5% CMC 液に懸濁した被検薬物液 0.1 ml を注入した. 薬物投与の 3日目に動物を屠殺し, 形成された肉芽嚢を剝離し貯留した滲出液量を測定した. 同時に, 胸腺および副腎重量を測定した.

(4) 局所投与部位における貯留作用

体重 160~190 g のラットを使用した. エーテル麻酔下に背部皮下に 8 ml の窒素ガスを注入してガス嚢を作製し, その嚢中に被検薬物懸濁液 0.2 ml を注入した. 薬物投与 4, 7, 15 および 30日目に動物を屠殺し, 薬物注入部位の周辺組織を摘出した. この組織片を細切したのち chloroform : methylalcohol (1:1) 20 ml で 2回抽出を行い, エバポレート後一定量の chloroform : methylalcohol (1:1) に溶解し, 薄層クロマトグラフィー (TLC) にスポットした.

TLC は, chloroform : acetone : acetic acid (70:30:1) で展開し, 各被検薬物のスポットを TLC デンシトメータジグザグスキャンニング法により測定波長 254 nm, 対照波長 380 nm で測定した. また薬物投与 7日目の動物の胸腺および副腎重量を測定した.

成績

(1) formalin 濾紙肉芽腫法による肉芽形成抑制作用
被検薬を濾紙片に浸み込ませ, 皮下に植え込んだときの肉芽形成抑制作用と全身作用を表 1 に示した. F-2 は

表 2 inhibitory effects of topically applied F-2 and reference steroids on the granuloma pouch in rats

drugs	dose ($\mu\text{g/pouch}$)	No. of rats	exudate		body weight gain (g)	organ weight	
			volume (ml)	inhibition (%)		thymus (mg)	adrenals (R+L,mg)
control		9	14.0 $\pm$ 3.6		61 $\pm$ 15	590 $\pm$ 120	40 $\pm$ 8
F-2	16	9	11.5 $\pm$ 4.2	18	67 $\pm$ 23	660 $\pm$ 130	40 $\pm$ 4
	80	9	9.1 $\pm$ 2.8**	35	71 $\pm$ 11	610 $\pm$ 100	46 $\pm$ 7
	400	9	7.4 $\pm$ 6.1**	47	58 $\pm$ 18	570 $\pm$ 180	43 $\pm$ 4
	2,000	9	2.1 $\pm$ 2.2**	85	61 $\pm$ 18	520 $\pm$ 70	42 $\pm$ 10
fluocinolone acetonide	3.2	10	10.5 $\pm$ 4.2	25	58 $\pm$ 40	500 $\pm$ 190	45 $\pm$ 4
	16	9	8.7 $\pm$ 4.2**	38	63 $\pm$ 10	470 $\pm$ 110**	40 $\pm$ 8
	80	9	7.5 $\pm$ 3.0**	46	59 $\pm$ 17	360 $\pm$ 110**	39 $\pm$ 10
hydrocortisone acetate	80	9	12.7 $\pm$ 4.4	9	66 $\pm$ 16	620 $\pm$ 120	44 $\pm$ 7
	400	9	11.1 $\pm$ 3.9	21	73 $\pm$ 15	610 $\pm$ 90	41 $\pm$ 5
	2,000	9	7.0 $\pm$ 3.3**	50	53 $\pm$ 24	540 $\pm$ 160	44 $\pm$ 6
	10,000	10	0.1 $\pm$ 0.2**	99	44 $\pm$ 11	270 $\pm$ 170**	31 $\pm$ 4*

N₂-gas: 20 ml, 1 %-croton oil in cotton seed oil: 1 ml/rat
mean $\pm$ SD *P<0.05 **P<0.01

表 3 inhibitory effects of topically applied F-2 on the granuloma pouch in rats

drugs	dose ($\mu\text{g/pouch}$)	No. of rats	exudate		granulation tissue		body weight gain (g)	organ weight	
			volume (ml)	inhibition (%)	wet weight (g)	inhibition (%)		thymus (mg)	adrenals (R+L, mg)
control		12	15.2 $\pm$ 5.0		3.6 $\pm$ 1.34		34 $\pm$ 11.9	602 $\pm$ 109	55 $\pm$ 8
F-2	400	12	13.8 $\pm$ 3.4	9	2.5 $\pm$ 0.54*	31	42 $\pm$ 9.9	503 $\pm$ 150	56 $\pm$ 6
	2,000	12	11.6 $\pm$ 3.4	24	2.3 $\pm$ 0.62**	36	41 $\pm$ 10.0	454 $\pm$ 125**	52 $\pm$ 6

N₂-gas: 20ml, 1 %-croton oil in cotton seed oil: 1 ml/rat. Drug was administered at 6th day in pouch.
*P<0.05 **P<0.01 mean $\pm$ SD

濾紙当り 16 μg の用量から肉芽の形成を強度に抑制し、また 2,000 μg の用量においても胸腺および副腎重量に影響しなかった。

一方、FA は 16 および 80 μg の用量で、HA は 2,000 および 10,000 μg の用量で肉芽の形成を軽度あるいは中等度に抑制したが、同時に胸腺および副腎重量の有意な減少が認められた。また、FA は 3.2 μg の低用量においても胸腺重量が有意に減少した。

(2) croton oil 肉芽嚢法による滲出液貯留抑制作用

被検薬を起炎物質と同時に投与したときの滲出液貯留抑制作用と全身作用を表 2 に示した。F-2 は 80 および 400 μg の用量で中等度に、2,000 μg の用量で強度に滲出液の貯留を抑制したが、このとき、胸腺および副腎に対する影響は認められなかった。FA は 16 および 80 μg の用量で中等度に滲出液の貯留を抑制したが、同時に胸腺重量の減少が認められた。HA は滲出液の貯留を強度に抑制する用量で、胸腺および副腎重量の減少が認められた。

起炎物質注入 6 日目に、あらかじめ形成された肉芽嚢中に F-2 を注入したときの局所抗炎症作用と全身作用を表 3 に示した。F-2 は、400 および 2,000 μg の用量で滲出液の貯留に対して 9 および 24% の抑制作用を、肉芽形成に対して 31 および 36% の抑制作用を示した。また、400 μg では全身作用を認めなかったが、2,000 μg の高用量においては、胸腺重量の減少が認められた。

(3) carrageenin 肉芽嚢法による滲出液貯留抑制作用 被検薬を起炎物質と同時に投与したときの滲出液貯留抑制作用と全身作用を表 4 に示した。F-2 は 80 μg の用量で軽度に 400 および 2,000 μg の用量で強度に滲出液の貯留を抑制したが、このとき、2,000 μg の用量で軽度な体重増加の抑制が認められた。FA は 16 μg の用量で、HA は 2,000 μg の用量で中等度に滲出液の貯留を抑制したが、同時に著明な胸腺重量の減少と体重増加の抑制が認められた。

起炎物質注入 5 日目に、あらかじめ形成された肉芽嚢

表 4 inhibitory effects of topically applied F-2 and reference steroids on the carrageenin pouch in rats

drugs	dose (μ g/pouch)	No. of rats	exudate		body weight gain (g)	organ weight	
			volume (ml)	inhibition (%)		thymus (mg)	adrenals (R+L, mg)
control		10	32.8 $\pm$ 7.2		47 $\pm$ 14	469 $\pm$ 64	50 $\pm$ 7
F-2	80	10	23.6 $\pm$ 4.9**	28	34 $\pm$ 14	469 $\pm$ 171	49 $\pm$ 7
	400	10	12.3 $\pm$ 6.9**	63	37 $\pm$ 10	501 $\pm$ 77	45 $\pm$ 5
	2,000	10	4.4 $\pm$ 4.8**	87	33 $\pm$ 11*	416 $\pm$ 94	49 $\pm$ 5
fluocinolone acetonide	16	10	17.6 $\pm$ 7.1**	46	28 $\pm$ 25*	291 $\pm$ 81**	51 $\pm$ 7
hydrocortisone acetate	400	9	25.3 $\pm$ 7.8	23	38 $\pm$ 17	453 $\pm$ 70	49 $\pm$ 6
	2,000	10	18.4 $\pm$ 9.5**	44	25 $\pm$ 16**	371 $\pm$ 78**	55 $\pm$ 6

air: 8 ml. 2% carrageenin: 4 ml/rat
 mean $\pm$ SD * P<0.05 ** P<0.01

表 5 inhibitory effects of topically applied F-2 and reference steroids on the pre-formed carrageenin pouch in rats

drugs	dose (μ g/pouch)	No. of rats	exudate		body weight gain (g)	organ weight	
			volume (ml)	inhibition (%)		thymus (mg)	adrenals (R+L, mg)
control		10	36.3 $\pm$ 10.5		26 $\pm$ 9	329 $\pm$ 73	45 $\pm$ 7
F-2	80	8	24.7 $\pm$ 8.6*	32	29 $\pm$ 12	362 $\pm$ 104	46 $\pm$ 6
	400	8	11.0 $\pm$ 5.5**	70	19 $\pm$ 12	278 $\pm$ 68	42 $\pm$ 5
	2,000	10	7.3 $\pm$ 7.5**	80	25 $\pm$ 13	309 $\pm$ 89	42 $\pm$ 5
fluocinolone acetonide	16	10	18.3 $\pm$ 6.1**	50	10 $\pm$ 12**	84 $\pm$ 31**	42 $\pm$ 5
	80	8	11.5 $\pm$ 3.2**	68	0 $\pm$ 11**	42 $\pm$ 22**	45 $\pm$ 6
hydrocortisone acetate	400	86	23.2 $\pm$ 12.5*	36	29 $\pm$ 13	358 $\pm$ 105	48 $\pm$ 9
	2,000	38	23.3 $\pm$ 9.3*	36	14 $\pm$ 14	235 $\pm$ 78*	43 $\pm$ 4

air: 8 ml. 2% Carrageenin: 4 ml/rat. Drugs were administered at 5 th day in pouch
 mean $\pm$ SD *P<0.05 **P<0.01

中に被検薬を注入したときの、局所抗炎症作用と全身作用を表5に示した。F-2は80 μ gの用量で軽度に、400および2,000 μ gの用量で強度に滲出液の貯留を抑制し、このとき、有意な全身作用は認められなかった。FAは16および80 μ gの用量で中等度に滲出液の貯留を抑制したが、同時にいちじるしい胸腺重量の減少および体重増加の抑制が認められた。HAは2,000 μ gの用量で滲出液の貯留を軽度に抑制したが、同時に胸腺重量の減少が認められた。

(4) 局所投与部位における貯留作用

被検薬懸濁液をラット背部皮下に作製した窒素ガス囊中に注入したときの、投与部位における貯留率の経時的変化を図1に示した。

HA, TD, および MPA は、局所投与部位より急速に消失し、7日目の貯留率はそれぞれ12, 2, および17%であった。一方、F-2は投与7日目では投与量の75%の、

また30日目においても投与量の50%の貯留が認められた。

また、被検薬投与7日目における全身作用を表6に示した。HA, TD, および MPA 投与群では体重増加の抑制あるいは体重の減少および胸腺重量の減少が認められた。一方、F-2投与群では、これらの全身作用は認められなかった。

考 察

ステロイド剤の局所投与の目的は、局所効果の増強と全身的な副作用の防止である⁶⁾。筆者らは、肉芽腫法と肉芽囊法を用いて、F-2の局所抗炎症作用と胸腺萎縮などの全身作用をFAおよびHAと比較検討した。

肉芽腫試験では、FAおよびHAは肉芽の形成を抑制する用量で、同時に胸腺および副腎重量が有意に減少し、局所投与された薬物の一部が全身循環に移行し、全

表 6 body weight gain and organ weight of rats on the 7th day after injection of F-2 and reference steroids

drugs	dose (mg/pouch)	No. of rats	body weight gain (g)	organ weight			
				tymus (mg)	tymus (mg/100g b.w.)	adrenals (R+L) (mg)	adrenals (R+L) (mg/100g b.w.)
control		5	51 ± 4	606 ± 88	261 ± 30	37 ± 5	16 ± 2
F-2	5	7	57 ± 6	562 ± 94	247 ± 45	36 ± 6	16 ± 2
hydrocortisone acetate	5	7	35 ± 18	381 ± 77**	188 ± 30**	33 ± 6	17 ± 2
triamcinolone diacetate	5	6	-22 ± 27**	52 ± 34**	32 ± 16**	34 ± 8	27 ± 10
methylprednisolone acetate	8	6	-53 ± 12**	16 ± 14**	14 ± 12**	33 ± 12	31 ± 13

mean ± SD *P < 0.05 **P < 0.01

図 2 residual percent of F-2 and reference steroids after injection into the pouch

身作用を示したと考えられる。一方、F-2を16 μ g処置した濾紙片は、植え込み8日目においても肉芽の形成が強度に抑制され、また2,000 μ gの高用量処置によっても全身作用は認められなかった。このことからF-2の全身循環への移行がきわめて起こりにくいことが示唆され、局所投与部位に存在するF-2により持続的な抗炎症作用が示されたと考えられる。

croton oil と carrageenin を用いた2種の肉芽嚢試験でも同様の結果が得られた。すなわち、FA および HA は濾出液の貯留を抑制する用量で同時に全身作用が認められたが、F-2は、効果発現用量の25倍の用量においても全身作用はほとんど認められなかった。

また、carrageenin 肉芽嚢試験で、FAを起炎物質と同時に投与したときと比較して、あらかじめ形成された肉芽嚢中に投与したときにより顕著な胸腺萎縮が認められた。このことから、局所投与されたステロイドの全身循環への移行は、正常組織よりも炎症の発症部位に投与さ

れたときにより強く起こると考えられる。しかしF-2をあらかじめ形成された carrageenin 肉芽嚢中に注入しても、全身作用をほとんど示すことなく用量依存的な抗炎症作用を示した。ここでもF-2の全身循環への移行がきわめて弱いことが示唆される。

そこでラット背部皮下に作製した窒素ガス嚢中にF-2を注入し、その局所貯留性をHA、TD および MPA と比較検討した。HA、TD および MPA の貯留性は弱く、7日目以降には投与量の大部分が注入部位より消失し、同時に著明な全身作用が認められた。一方、F-2の局所貯留性はいちじるしく、投与30日目においても投与量の50%の貯留を認め、また7日目では有意な全身作用は認められなかった。

以上のことから、F-2は他の合成ステロイド剤と比較して、いちじるしい局所貯留性を有することにより、全身作用をほとんど示すことなく、強力かつ持続的な局所抗炎症作用を示すと考えられる。

文 献

- 1) Toscano, L. et al.: J. Med. Chem. 20: 213-220, 1977.
- 2) Mizushima, Y. et al: Arzneim.-Forsch. 30: 274-275, 1980.
- 3) Tanaka, A. et al.: Endocr. Jap. 7: 375-364, 1960.
- 4) 糸賀鋭治・他：日薬理誌 66: 316-325, 1970.
- 5) Fukuhara, M. et al.: Biochem. Pharmacol. 18: 475-484, 1969.
- 6) 水島 裕：炎症・アレルギーと治療薬。南江堂，1974，p 263-265.