IL-1 産生抑制薬

代田 寛・千葉健一・後藤正樹・山津功・片山幸一*

Pharmacological properties of E5090, an orally active inhibitor of IL-1 generation.

E5090 is a newly synthesized orally active inhibitor of IL-1 generation without cyclooxygenase inhibiting activity form. Orally administered E5090 is rapidly changed to the pharmacologically active, DA-E5090, by deacetylation. On the *in vitro* systems using human monocytes and rats peritoneal macrophages stimulated with LPS, DA-E5090 dose-dependently inhibited the IL-1 generation due to the inhibition of IL-1mRNA expression.

On the *in vivo* systems of IL-1 generation in rat air-pouch models induced by non-allergic or allergic stimuli, orally administered E5090 dose-dependently inhibited the generation of IL-1 activity and the chronic granuloma formation similar to steroidal anti-inflammatory drug, prednisolone. On the other hand, indomethacin had no effects on both IL-1 generation and granuloma formation in spite of the perfect inhibition of prostaglandin E2 generation. The quantitative measurements of other inflammatory cytokines such as TNF and IL-6 suggest that IL-1 may be a main mediator for granuloma formation in these animal models. In adjuvant arthritis, E5090 suppressed not only the paw inflammation but also the increases in ESR and peripheral blood leucocyte numbers, being similar to prednisolone in these respects, but different from indomethacin.

These results suggest that the inhibitor of IL-1 generation may show steroid-like anti-inflammatory effects.

*Hiroshi Shirota • Ken-ichi Chiba • Masaki Goto • Isao Yamatsu • Kouichi Katayama**

key words: IL-1, inhibitor, steroid-like antiinflammatory effects

インターロイキン-1(IL-1)は、主として刺激活性化された単球/マクロファージ(Mφ)から産生・放出されるサイトカインで、免疫および炎症反応における重要なメディエーターとして注目されている。その生物活性については、内因性発熱因子としての作用、滑膜や軟骨細胞からのプロスタグランジン(PGs)やコラゲナーゼの誘導、線維芽細胞の増殖、急性期反応蛋白の誘導、TNF や IL-6 といった他の炎症性サイトカインの誘導、骨髄からの好中球の放出、白血球の遊走性亢進、破骨細胞の活性化などが報告されている¹⁾。これらの活性から、IL-1 は炎症に伴って生体が示す局所および全身性のさまざまな現象を引き起こす中心因子であると考えられている。したがって、IL-1 の産生あるいは活性を抑制する薬剤が開発されれば、炎症反応を制御する有力な手段になるものと推察される。IL-1 活性を抑制する蛋白質については、最近いくつか報告がある²⁾が、ここでは産

生抑制薬に絞って話をすすめる。

ステロイド抗炎症薬は IL-1 産生を抑制することが知られている³⁻⁶⁾。しかし、非特異的にさまざまな炎症メディエーターの産生・放出をも抑制するため、その薬効が IL-1 の抑制に起因するかどうか不明である。また、これまでに、ステロイド以外で、IL-1 の産生あるいは遊離を抑制する薬剤がいくつか報告された⁷⁻¹¹⁾。しかし、それらはいずれも *in vitro* での作用に留まり、*in vivo* において炎症部位 IL-1 の産生を抑制し、かつそれに基づく薬効が示された報告はない。

筆者らは、*in vitro* のみならず、*in vivo* の動物モデルでも IL-1 産生抑制作用を示す化合物を探索し、最終的に、経口投与で炎症部位の IL-1 産生を明確に抑制する化合物 E5090(図1)を見出した。

E5090 およびその薬理的活性体 DA-E5090 は、ともにシクロオキシゲナーゼに対する直接の阻害作用は 300 μ M でも示さず、この点で従来の酸性非ステロイド性炎症薬(NSAIDs)とはまった

* エーザイ株式会社筑波研究所

図1 Chemical structures of E5090 and DA-E5090

図2 Plasma concentration of E5090 and DA-E5090 after oral administration of E5090(50 mg/kg) to rats.

Each point represents mean with SE of 3 animals.

く異なる。

本稿では、IL-1 産生抑制薬 E5090 の抗炎症作用を、ステロイドとしてプレドニソロン(PRED)、NSAIDs としてインドメサシン(IND)を用いて比較検討し、その結果をもとに、E5090 の作用特性を概説したい。

E5090の血中動態

E5090 は、その薬理学的活性体 DA-E5090 の物理化学的安定化を図った化合物である。ラットに経口投与すると速やかに吸収され、脱アセチル化を受けてDA-E5090 となり、主としてこの活性体の型で血中に存在する(図2)。以下に示す *in*

表1 Inhibitory effects of DA-E5090 on IL-1 generation by human monocytes stimulated with LPS

	LAF (units/ml)		ELISA(pg/ml)			
	sup	cell	IL-1 α		IL-1 β	
			sup	cell	sup	cell
medium	4.4	4.2	0	0	0	0
LPS	46.2	44.0	106	1286	1114	241
+DA-E5090 1 μ M	49.0	27.4	72	792	929	147
3 μ M	27.4	29.9	61	620	748	49
10 μ M	13.0	7.1	52	175	377	33

Each value shows mean of triplicate samples.

in vitro の実験には DA-E5090 を用い、また *in vivo* の実験では E5090を経口投与してその薬効を検討した。

in vitro における IL-1 産生抑制作用

リポポリサッカライド(LPS)1 μ g/ml の刺激によるヒト末梢血単球からの IL-1 産生¹²⁾に対する DA-E5090 の抑制作用を表1に示す。IL-1 は LAF アッセイ¹²⁾ および IL-1 α , β おおのの ELISA(大塚製薬)を用い定量した。DA-E5090 の1~10 μ M 添加により、細胞内外の IL-1 活性は用量依存的に低下した。この条件では、細胞内は IL-1 α , 細胞外は IL-1 β が主であったが、DA-E5090 は両者とも抑制した。ヒト末梢血単球での [³⁵S]メチオニンの蛋白への取り込みは、10 μ M の DA-E5090 でまったく抑制されず、このことは本化合物の IL-1 産生抑制作用が非特異的な蛋白合成阻害ではないことを示している。

DA-E5090 の IL-1 産生抑制の作用点を調べるため、ヒト末梢血単球を LPS とともに4時間培養し、IL-1 α , β mRNA をノーザンブロット法で測定した。図3に示すとおり、DA-E5090 は IL-1 α および β mRNA の発現を3および10 μ M で抑制した。したがって、本化合物の IL-1 産生抑制作用は、その mRNA 発現の抑制に基づくことが示唆された。

DA-E5090 は、ラットやマウスの腹腔常在 M ϕ グリコーゲン誘導腹腔浸出 M ϕ などを LPS(1 ng/ml)で刺激した際の IL-1 産生に対しても、ヒト末梢血単球の場合とほぼ同等の抑制を示した。また、ラットの腹腔浸出 M ϕ を LPS のみならず、オプソニン化ザイモサン(1 mg/ml)や抗原抗体複

図3 Effects of DA-E5090 on IL-1 α , IL-1 β , and β -actin m-RNA expression in human monocytes

Human monocytes were cultured for 4 hr with LPS (1 μ g/ml) in the presence or absence of DA-E5090. The cells were lysed with guanidine-isothiocyanate solution. Cellular RNA was extracted, electrophoresed in a formaldehyde agarose gel, and analyzed by northern blot hybridization with [32 P]-radiolabeled IL-1 α probe (A), IL-1 β probe (B), or β -actin probe (C).

化合物(ポリミキシンB存在下)で刺激した際のIL-1産生に対しても、DA-E5090は同等の抑制を示した。なお、IL-1産生抑制作用の報告されている数種の化合物についても検討を行ったが、動物種、細胞種、刺激の種類にかかわらず、明確にIL-1産生を抑制したのは、現在のところステロイドとDA-E5090のみである。

図4 Experimental procedures of non-allergic or allergic air-pouch models in rats.

ABA-AcBSA: azobenzenearsonate-conjugated acetyl bovine serum albumin. Low endotoxin ABA-AcBSA was used for the challenge injection., AGP: serum α 1-acid glycoprotein, GRA: granuloma wet weight

in vivo における IL-1 産生抑制作用と抗炎症効果

炎症部位のIL-1産生を測定できる*in vivo*モデルとしては、ウサギ関節炎モデルが報告¹³⁾されているが、多数の化合物を評価するのは困難である。筆者らは、炎症部位でIL-1を含む各種のメディエーターを定量的に解析する目的で、ラット空気嚢炎症モデル^{14,15)}を検討した。用いる刺激剤の種類と量、刺激の時期、炎症メディエーターの経時変化、炎症反応の指標などを精査し、薬効評価に適する*in vivo* IL-1産生系として、図4に示す非アレルギー性およびアレルギー性空気嚢炎症モデルの実験条件を設定した。

非アレルギー性のCMC-LPSモデルにおいては、LPSの注入から4時間前後をピークとする高単位のIL-1活性(LAFアッセイによる)が、主として浸出細胞内に検出され、12~24時間後にはほとんど消失した。また、本モデルではPGE₂, TNFおよびIL-6もIL-1と同様急性期にのみ主として浸出液の遠沈上清に検出された。炎症症状として、刺激から24時間後には血中に急性期反応蛋白である α ₁-アシッドグロブリン(AGP)が上昇し、さらに慢性期の5日後には空気嚢壁に肉芽が形成され、これらを炎症強度の指標に用いた。一方、アレルギー性空気嚢炎症モデルであるABA-AcBSAモデル¹⁵⁾においても、量的に多少の違いは認められるものの、CMC-LPSモデルとほぼ同様の経時変化で上記の炎症メディエーターが

図 5

Effects of E5090 and reference drugs on IL-1 and PGE₂ generation in CMC-LPS air-pouch model of rats

LPS was injected into the air-pouch 2hr after oral administration of test drugs. IL-1 activity and PGE₂ content in the exudate were measured at 4hr after the LPS injection. Each column represents mean with SE of 4-6 animals.

*P<0.05, **P<0.01: significant difference from control.

検出され、5日後には肉芽形成が認められた。

これらの空気嚢炎症モデルを用いて、E5090、PRED および IND の炎症メディエーター産生に対する作用ならびに抗炎症効果を比較検討した。

まず、CMC-LPS モデルにおける IL-1 および PGE₂ 産生に対する作用を図 5 に示した。E5090 は 25~200 mg/kg、PRED は 5~20 mg/kg、LPS 注入 2 時間前の 1 回経口投与で、炎症部位の IL-1 および PGE₂ を用量依存的に低下させた。一方、IND は 3 mg/kg で PGE₂ の産生をほぼ完全に抑制したが、IL-1 の産生には影響しなかった。炎症の指標として用いた AGP の上昇および肉芽形成に対する作用を図 6 に示した。E5090 および PRED は、24 時間後の AGP の上昇および 5 日後の肉芽重量を抑制した。一方、IND はこれらの炎症指標に対しまったく抑制を示さなかった。

アレルギー性空気嚢炎症モデルにおいても、IL-1、PGE₂ の産生、および肉芽形成に対する E5090 および PRED の作用は、CMC-LPS モデルにおける結果とほぼ同様であった(図 7)。ただし、本モデルにおいて、E5090、PRED とともに抗原刺激 2 時間前の単回投与では、急性期の IL-1 および PGE₂ 産生は抑制するものの、5 日後の肉芽重量に対しては作用が不明確であった。しかし、

両化合物を 1 日 1 回連続投与した場合には、図 7 に示すように肉芽重量を抑制した。このことは、アレルギー性空気嚢炎症においては、起炎刺激の持続あるいは炎症局所でのメディエーターの存在様式などが、CMC-LPS モデルと異なる可能性を示唆している。なお、IND は本モデルにおいても、PGE₂ 産生を完全に抑制したにもかかわらず肉芽重量になんら効果を示さなかった。この結果は、これら空気嚢炎症モデルにおける E5090 および PRED の肉芽形成抑制が PGE₂ 産生抑制に起因するものではないことを示している。なお、E5090 および DA-E5090 は、シクロオキシゲナーゼ阻害作用を持たないにもかかわらず、炎症部位の PGE₂ 産生を抑制した。その理由の一部として、IL-1 産生抑制の結果である可能性が考えられるが、詳細は解明できていない。

これらモデルにおいて、IL-1 以外の炎症性サイトカインである TNF および IL-6 の産生に対する薬剤の作用も検討した。IND は両サイトカインの産生を抑制しなかった。PRED は両サイトカインの産生を強力に抑制し、IL-1 の抑制も含め、炎症性サイトカインの産生を非特異的に抑制した。一方、E5090 は、CMC-LPS モデルでは IL-6 の抑制が、アレルギー性モデルでは TNF の抑制傾向が認められたが、いずれも IL-1 の抑制

図 6

Effects of E5090 and reference drugs on the increase in serum α 1-acid glycoprotein and the granuloma formation in CMC-LPS air-pouch model of rats

LPS was injected into the air-pouch 2hr after oral administration of test drugs. AGP level and granuloma wet weight were measured at 24hr and 5 days after the LPS injection, respectively. Each column represents mean with SE of 4-6 animals.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$: significant difference from control.

図 7 Effects of E5090 and reference drugs on IL-1 and PGE2 generation, and granuloma formation in allergic air-pouch model of rats

The rats were immunized with ABA-AcBSA 12 days before the induction of allergic response. The antigen was challenged into the air-pouch 2 hr after the oral administration of test drugs. IL-1 activity and PGE2 content in the exudate were measured at 6hr after the challenge injection. The drug administration was continued once daily, and the granuloma wet weight was measured at 5 days after the challenge injection. Each column represents mean with SE of 3-8 animals.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$: significant difference from control.

にくらべ弱い作用であった。したがって、PREDと比較すると、E5090は炎症性サイトカインの中でもIL-1産生に対し特異性が高いといえる。また、両モデルでのE5090の肉芽形成抑制作用は、検討した主要な炎症メディエーターのなかでは、IL-1産生抑制ともしっかりとよく対応しており、肉芽形成におけるIL-1の関与が示唆される。

関節炎モデルにおける作用

in vitro のみならず *in vivo* においても IL-1 産生抑制が確認され、かつそれに基づくと考えられる抗炎症効果を示した E5090 が、関節炎モデルにおいてどのような薬効を示すのかを、PRED および IND と比較検討した。

ラットのアジュバント関節炎に対して、図 8 に示すように、E5090 はアジュバント処置足および

図 8 Effects of E5090 and prednisolone on the paw inflammation in adjuvant arthritis of rats

The test drugs were orally administered once daily from the 1st day of the adjuvant-treatment. Each point represents mean with SE of 6-9 animals.

* $P < 0.05$: significant difference from control.

図 9 Effects of E5090 and reference drugs on the enhancements of ESR and number of PBL in adjuvant arthritis of rats

Each value represents mean with SE of 6-9 animals determined at the 18th day (Exp 1) or the 19th day (Exp 2) after adjuvant-treatment.

ESR: erythrocyte sedimentation rate, PBL: peripheral blood leucocytes,

* $P < 0.05$: significant difference from control.

非処置足ともに足蹠炎症を 25 mg/kg 以上で抑制し、その効力は PRED のほぼ 1/10 であった。

本モデルでは、全身性の炎症指標として血沈の亢進および末梢血白血球数の増加が認められる。

図 9 に示すように、足蹠炎症の抑制用量より若

干高用量を要したが、E5090 は PRED と同様にこれら全身性の炎症指標に対して改善を示した。一方、IND は 1 mg/kg で足蹠炎症に対してはいちじるしい抑制を示したが、これら全身症状に対しては無効であった。

図10 Effects of E5090 and reference drugs on the weights of spleen and thymus in adjuvant arthritis of rats

Each value represents mean with SE of 6-9 animals determined at the 18th day(Exp 1)and or the 19th day(Exp 2)after adjuvant-treatment.

* $P < 0.05$: improvement vs control. † $P < 0.05$: aggravation vs control

また、本モデルは脾臓重量の増加および胸腺重量の低下といった免疫系臓器の重量変化が認められる。図10に示すように、脾臓重量に対しては、E5090、PREDともに用量依存的な改善を示したが、胸腺重量に対しては、PREDがそれをさらに悪化したのに対し、E5090はほとんど影響しなかった。

以上のアジュバント関節炎における成績から、IL-1産生抑制薬E5090は、特に全身性の指標に対してNSAIDsと異なり、ステロイド類似の薬効を示すこと、さらにはステロイドとも異なり、胸腺萎縮のような顕著な免疫系臓器への影響は示さないことがわかった。ただし、本モデルにIL-1がどのように関与しているのか不明な点が多く¹⁶⁻¹⁸⁾、今後、特にNSAIDsの無効な全身性の指標と炎症性サイトカインとの関連性について研究の進展が待たれる。

つぎに、ラットのコラーゲン関節炎における結果を述べる。被験薬は、ウシII型コラーゲンを免疫した日から28日間1日1回連日経口投与した。E5090は、25 mg/kgから関節炎を抑制した(図は示さない)。PREDは10 mg/kgで、INDは3 mg/kgで本関節炎の発症をほぼ完全に抑制したが、E5090においては、そのような完全抑制は200 mg/kgでも認められなかった。

本モデルでは、免疫後4週目ごろに踵部位の関節破壊¹⁹⁾の程度をX線像により判定できる。E5090は、この関節破壊に対し25 mg/kgから有意な抑

制を示した(図は示さない)。一方、PREDおよびINDの効果はE5090の効果より顕著で、おのの10および3 mg/kgで完全な抑制を示した。

本モデルでは、INDがきわめて強い作用を示すことから、PGsが中心的役割を果たしていると推察されるものの、シクロオキシゲナーゼ阻害作用を持たないE5090が有効であったことは興味深い。

急性炎症モデルにおける作用および鎮痛・解熱作用

表2に、E5090および対照薬の急性炎症モデルに対する抗炎症作用、炎症性疼痛に対する鎮痛作用、および解熱作用の検討結果をまとめた。急性炎症モデルでは、E5090はラットのカラゲニン足浮腫²⁰⁾を100 mg/kg以上で、アジュバント誘発の局所発熱²¹⁾を10~30 mg/kgで抑制し、その効力はPREDの1/10~1/30であった。炎症性疼痛モデルでは、アジュバント一次炎症ラットの三足跛行²²⁾を50 mg/kg以上で、アジュバント関節炎の関節伸展痛²³⁾を25 mg/kg以上で抑制し、その効力はPREDの1/5~1/10であった。また、全身性の発熱モデルでは、ラットに10 μ g/kgのLPSを静注することによって誘発した発熱に対し50 mg/kg以上で、酵母菌皮下注による持続的発熱²⁴⁾を10~30 mg/kgで抑制し、その効力はPREDの1/5~1/10であった。

これら既存の動物モデルは、いずれもNSAIDs

表 2 Inhibitory effects of E5090 and reference drugs on acute inflammation, inflammatory pain and pyrexia

INFLAMMATORY MODELS	E5090	PRED	IND
acute inflammation			
carrageenin-paw edema	100	5	1
adjuvant-local hyperthermia	10~30	1	0.3
inflammatory pain			
lame walking reaction	50	5	<3
arthritic flecion pain	25	5	1
pyrexia			
LPS-induced pyrexia	50	10	2.5~10
yeast-induced pyrexia	10~30	1~3	<3

Each value shows the minimum effective dose (mg/kg, p.o.).

に高い薬物感受性を示すことから、PGs の関与が重要と考えられる。しかし、シクロオキシゲナーゼ阻害作用を持たない IL-1 産生抑制薬 E5090 が、これらモデルにおいて腫脹、疼痛、局所、および全身性の発熱といったふるくからいわれている炎症の主徴候に有効であったことは、PGs 産生の直接的抑制以外でもこれらの徴候を制御する方法があることを意味し、IL-1 の抑制はその一つの候補であることを示唆している。

おわりに

筆者らは、繁用されている *in vitro* における単球、Mφ からの IL-1 産生系に加え、*in vivo* で IL-1 産生が測定可能な非アレルギー性およびアレルギー性気管支炎症モデルを詳細に検討した。本モデルは IL-1 のみならず、TNF、IL-6 などのサイトカインにも応用可能で有用なモデルと思われる。本モデルを用いて選ばれた IL-1 産生抑制薬 E5090 は、急性期反応蛋白の上昇および肉芽形成を抑制し、これらの作用は NSAIDs にはなく、ステロイド様の作用であることを明らかにした。また、アジュバント関節炎でも本化合物は、ステロイド類似の血沈改善、末梢白血球数増加の抑制、脾臓重量増加の抑制を示す反面、ステロイドにみられる胸腺萎縮がないなど、興味深い作用を示した。今後、E5090 にみられた炎症の指標改善と IL-1 との関連を、より詳細に検討する予定である。

本稿は、第11回日本炎症学会(1990年7月20日、

東京)において発表した3演題(演題番号38, 39, 40)の内容をまとめたものである。

IL-6 の測定に用いた細胞株 MH60, BSF2 をご供与していただきました大阪大学細胞工学センター岸本忠三教授、ならびに大阪大学医学部平野俊夫教授に深謝致します。

文 献

- 1) di Giovine, F.S., Duff, G.W.: Interleukin 1: the first interleukin. *Immunology Today* 11: 13-20, 1990.
- 2) Carter, D.B., Deibel, M.R., Dunn, C.J., Tomich, C-S.C. et al.: Purification, cloning, expression and biological characterization of interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344: 633-638, 1990.
- 3) Snyder, D.S., Uannue, E.R.: Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production. *J. Immunol.* 129: 1803-1805, 1982.
- 4) Stosic-Grujicic, S., Simic, M.M.: Modulation of interleukin 1 production by activated macrophages: *in vitro* action of hydrocortisone, colchicine, and cytochalasin B. *Cell Immunol.* 69: 235-247, 1982.
- 5) Simon, W.L., Ann-Ping, T., Hardy, C., Jan, T., Karen, P., Elsie, M.E., Anthony, C.A.: Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 β gene and decrease the stability of interleukin 1 β mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1204-1208, 1988.
- 6) Lew, W., Oppenheim, J.J., Matsushima, K.: Analysis of the suppression of IL-1 α and IL-1 β production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. *J. Immunol.* 140: 1895-1902, 1988.
- 7) McDonald, B., Loose, L., Rosenwasser, L.J.: The influence of a novel arachidonate inhibitor, CP 66, 248, on the production and activity of human monocyte IL-1 (abstract). *Arthritis Rheum.* 31(suppl. 4): S17, 1988.
- 8) Otterness, I.G., Bliven, M.L., Downs, J.T., Hanson, D.C.: Effects of CP66, 248 on IL-1 synthesis by murine peritoneal macrophages (abstract). *Arthritis. Rheum.* 31: S90, 1988.
- 9) Lee, J.C., Griswold, D.E., Votta, B., Hanna, N.: Inhibition of monocyte IL-1 production by the anti-inflammatory compound, SK & F86002. *Int. J. Immunopharmac.* 10: 835-843, 1988.
- 10) Shirota, H., Goto, M., Hashida, R., Yamatsu, I., Katayama, K.: Inhibitory effects of E5110 on interleukin-1 generation from human monocytes. *Agents Actions.* 27: 322-324, 1989.
- 11) Schnyder, J. Bollinger, P., Payne, T.: Inhibition of interleukin-1 release by IX207-887, *Agents Actions* 30: 350-362, 1990.

- 12) Oppenheim, J.J., Shneyour, A., Kook, A.I.: Enhancement of DNA synthesis and cAMP content of mouse thymocytes by mediator(s) derived from adherent cells. *J. Immunol.* 116: 1466-1472, 1976.
- 13) Henderson, B., Rowe, F.M., Bird, C.R., Gearing, A.J.H.: Production of interleukin 1 in the joint during the development of antigen-induced arthritis in the rabbit. *Clin. Exp. Immunol.* 74: 371-376, 1988.
- 14) Fukuhara, M., Tsurufuji, S.: The effect of locally injected anti-inflammatory drugs on the carrageenin granuloma in rats. *Biochem. Pharmacol.* 18: 475-484, 1969.
- 15) Tsurufuji, S., Yoshino, S., Ohuchi, K.: Induction of an allergic air-pouch inflammation in rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 69: 189-198, 1982.
- 16) Phadke, K., Carlson, D.J., Gitter, B.D., Butler, L.D.: Role of interleukin 1 and interleukin 2 in rat and mouse arthritis models. *J. Immunol.* 136: 4085-4091, 1986.
- 17) Johnson, W.J., DiMartino, M.J., Hanna, N.: Macrophage activation in rat models of inflammation and arthritis: determination of markers of stage of activation. *Cell. Immunol.* 103: 54-64, 1986.
- 18) Lee, J.C., DiMartino, M.J., Votta, B.J., Hanna, N.: Effect of auranofin treatment on aberrant splenic interleukin production in adjuvant arthritic rats. *J. Immunol.* 139: 3268-3274, 1987.
- 19) Terato, K., Hashida, R., Miyamoto, T., Kato, Y., Kobayashi, S., Tajima, T., Otake, S., Hori, H., Nagai, Y.: Histological, immunological and biochemical studies on type II collagen-induced arthritis in rats. *Biomed. Res.*, 3: 495-505, 1982.
- 20) Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W.: Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111: 544-547, 1962.
- 21) Shirota, H., Goto, M., Katayama, K.: Application of adjuvant-induced local hyperthermia for evaluation of anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 1158-1163, 1988.
- 22) Higuchi, S., Osada, Y., Shioiri, Y., Tanaka, N., Ootomo, S., Aihara, H.: Effects of anti-inflammatory drugs on the lame walking reaction in adjuvant-induced edematous rats. *Folia Pharmacol. Japon* 84: 243-249, 1984.
- 23) Kuzuna, S., Kawai, K.: Evaluation of analgesic agents in rats with adjuvant arthritis. *Chem. Pharm. Bull.* 23: 1184-1191, 1975.
- 24) Kaneko, T., Ozaki, S., Okawa, I., Yamatsu, K.: Pharmacological studies on dl-2-(3-(2'-chlorophenoxy)phenyl) propionic acid: (1) analgesic and antipyretic effects. *Folia Pharmacol. Japon* 81: 481-492, 1983.