非ステロイド抗炎症薬 pranoprofen の消化管に及ぼす影響

今吉朋憲・寺澤道夫・三ヶ島 浩・後藤一洋・丸山 裕*

Influence of a new anti-inflammatory agent, pranoprofen, on gastro-intestinal organ in mice
The effect of pranoprofen (PPF), indomethacin (IM) and acetylsalicylic acid (ASA) on acute and chronic inflammation, inflammatory pain and gastro-intestinal organ in mice was investigated. The inhibitory effect of PPF on carrageenin- or concanavalin A-induced paw edema, phenylquinone writhing and cotton pellet granuloma formation was as potent as that of IM and more active than that of ASA. In contrast, PPF was about 15 times less active than IM in the production of gastric ulcers in mice. Furthermore, PPF was less active than IM in the inhibition of stomach prostaglandins synthesis and arachidonic acid-induced diarrhea in mice. These results suggest that the less potent activity in inhibiting the gastro-intestinal prostaglandins synthesis of PPF with the potent anti-inflammatory activity contributes to its weak ulcerative effect in mice.

Tomonori Imayoshi・Michio Terasawa・Hiroshi Mikashima・Kazuhiro Goto・Yutaka Maruyama
Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.

新しい抗炎症、解熱、鎮痛薬 pranoprofen (PPF, ニフラン®) は、ラットおよびモルモットを用いた急性および慢性炎症の実験系で、血管透過性の亢進、浮腫、結合繊維増殖などの炎症反応を indomethacin (IM) より強く抑制し、さらに TTG 発熱ウサギでの解熱作用、および各種動物での炎症性疼痛に対する鎮痛作用も IM と同程度か、それ以上の活性を示すことが明らかにされている¹⁾。PPF は、臨床においても、すでにその有用性が確認されており²⁾、抗炎症薬で特に多くみられる消化管障害などの副作用が従来の抗炎症薬にくらべ、少ないことを特徴としている²⁾。

本報では、PPF の臨床における忍容性のよさを、動物実験で明らかにする目的で、その血中動態および排泄経路がヒトと類似しているマウス³⁾を用いて、効力薬理および潰瘍惹起作用について検討し、若干の知見が得られたので報告する。

材料と方法

(1) 実験動物

体重20~25 g の雄性 dd マウス (九州実験動物センター供給)、体重25~30 g の雌性 ICR マウス (日本クレア供給) および体重350~400 g の雌性 Sprague Dawley ラット (チャールス・リバー供給) を用いた。

(2) 被検化合物と被検液調製法

被検化合物として PPF, IM (メルク万有) および acetylsalicylic acid (ASA, バイエル社) を用い、すべて 0.5% methylcellulose 溶液に懸濁し、被検液とした。

(3) 実験方法

① マウス足浮腫に対する作用……Winter らの方法⁴⁾に準じ dd 系マウスを用い検討した。被検液を1群 8~10匹のマウスに経口投与した。1時間後に起炎物質として、1% carrageenin (CA, picnin-A® 還元化学) または 0.02% concanavalin A (Con A, Boehringer Mannheim Gmb H) を左後肢足趾皮下に 0.025 ml 注射し、それぞれ5時間および8時間後に Baba らの測定方法⁵⁾により、足の厚さ (mm) を実体顕微鏡下で10倍に拡大して測定した。結果は、起炎物質投与前後の足の厚さの増加値を求め、対照群に対する抑制率で示した。

② 炎症性疼痛に対する作用……Hendershot らの方法⁶⁾によった。1群6匹の dd マウスに被検液を経口投与し、1時間後に0.02% phenylquinone 溶液10 ml/kg を腹腔内投与した。その後生じる stretch 症状の回数を20分間計測し、対照群と比較して抑制率を求めた。なお、抑制率は2~3回の繰り返し実験の平均値で示した。

③ 慢性炎症に対する作用……Meier ら⁷⁾ および Winter ら⁸⁾の変法によった。オートクレーブで滅菌した 15±1 mg の綿球に0.02% Con A 0.1 ml を浸漬し、1群10匹の dd マウスにネブタール麻酔下で肩胛骨部位の皮下に挿入した。5日目に綿球を取りまいて増殖した

* 吉富製薬株式会社中央研究所

肉芽組織を取りだし、60～70℃で24時間乾燥し、その重量を対照群と比較して抑制率を求めた。なお、被検液は綿球挿入日から1日1回、5日間経口投与した。

④ 消化管におよぼす作用………1群5～10匹の dd マウスに被検液を経口投与した (10 ml/kg)。24 時間後に放血屠殺し、胃および腸管内に50%エタノールを注入して粘膜組織を固定した。1 時間後に胃および腸管を切開し、出血斑および潰瘍が認められるものを陽性とし、潰瘍惹起作用を検討した。

⑤ 胃での prostaglandin (PG) 合成阻害作用………1 群 4～6 匹の dd マウスに被検液を経口投与し、2 時間後に放血屠殺した。ただちに胃を摘出後切開し氷冷した 0.05 M tris buffer (pH 7.4) で内容物を洗い落した。濾紙で水分を除去したのち、1 mm 幅に切断し、胃 100 mg 当り 1 ml の 0.05 M tris buffer を加え 37℃ 1 分間加温振盪した。この上清 0.1 ml 中の PGE₂ 様活性を Vane の方法⁹⁾により測定した。すなわち、摘出したラット胃の粘膜を剝離したのち、幅 2 mm、長さ 3 mm の胃底標本を作成した。

標本は 10 ml の krebs bicarbonate 栄養液を入れた標本槽に 1 g の負荷をかけて懸垂した。標本の下端は固定し、上端を isotonic transducer に連結して等張性にその収縮を記録計に記録し、PGE₂ 様活性を測定した。産生量は標準 PGE₂ の用量反応曲線から算出した。なお、栄養液には薬理学的拮抗薬 (hyoscine 0.1 ml/l, mepyramine 0.1 ml/l, propranolol 2 mg/l, phenoxybenzamine 0.1 mg/l, indomethacin 1 mg/l および methysergide 0.2 mg/l) を加え、37℃ に保持し、絶えず 95% O₂, 5% CO₂ 混合ガスで飽和した。

⑥ arachidonic acid (AA) 誘発下痢に対する作用………Randal & Baruth の方法¹⁰⁾ によった。1 群 8 匹の ICR マウスに被検液を経口投与した。1 時間後に AA 16 mg/kg (アカシアゴムに懸濁) を腹腔内投与し、直後から 20 分間排泄される糞便の状態を肉眼的に観察した。糞便の状態から固い便 = 0, わずかに軟い便 = 1, 定形ではあるが非常に軟い便 = 2, 明らかに無定形の水様便 = 3 と評点し下痢の指標とした。薬物投与群の平均点数と対照群の平均点数から抑制率を求めた。

結 果

(1) マウス足浮腫に対する作用

CA 接種により 5 時間後に peak を示す足浮腫反応を生じ、その程度は 1.00 ± 0.05 mm であった。この浮腫に対し、PPF は 5～25 mg/kg, p.o. で用量に依存した抑制作用を示した。同様に IM および ASA もそれぞれ 5 mg/kg, p.o. および 250 mg/kg p.o. 以上で有意な抑制作用を示した (図 1)。一方、CA 足浮腫よりも持続性の長い Con A 足浮腫 (peak 8 hr, 0.88 ± 0.07 mm)

図 1 effect of pranoprofen and standard compounds on the paw edema and inflammatory pain in mice

PPF (□), IM (■) and ASA (▨) were given orally 1 hr before the irritant injection.

* significant from the control at $p < 0.05$

** significant from the control at $p < 0.01$

に対しても PPF, IM および ASA は用量に依存した抑制作用を示し、その効力順位は $PPF \geq IM > ASA$ であった (図 1)。

(2) 炎症性疼痛に対する作用

phenylquinone の腹腔内投与により対照群では 18.8 ± 2.5 回の stretch 症状を示した。PPF, IM および ASA は、この反応を用量に依って抑制し、それぞれの 50% 抑制用量 (ED_{50} 値) は 2.0, 2.5 および 191 mg/kg, p.o. であった (図 1)。

(3) 慢性炎症に対する作用

綿球挿入後 5 日目の対照群の肉芽腫重量は 59.6 ± 3.0 mg であった。この肉芽腫形成を PPF および IM は 1 mg/kg, p.o. 以上の用量で、ASA は 50 mg/kg, p.o. 以上の用量で有意に抑制した (表 1)。しかし、IM 5 mg/kg, p.o. の 5 日間投与では 8 例中 3 例が死亡した。

(4) 消化管におよぼす影響

表 1 effect of pranoprofen and standard compounds on the cotton pellet granuloma formation in mice

compound	dose mg/kg p.o	No. of mice	mean dry granuloma wt(mg±SE)	inhibition (%)
control	0	22	59.6±3.0	0
pranoprofen	1.0	15	41.6±2.6**	30
	2.5	23	43.2±3.3**	28
	5.0	22	38.2±2.2**	36
	10.0	15	35.9±2.8**	40
indomethacin	1.0	14	46.6±3.5**	22
	2.5	8	33.8±4.0**	43
	5.0	5(3)	18.6±3.7**	69
acetylsalicylic acid	50	14	39.2±2.7**	34
	100	6	45.7±3.8*	23
	200	16	38.4±2.1**	36

* significant from the control at $p<0.05$ ** significant from the control at $p<0.01$

() death

表 2 effect of pranoprofen and standard compounds on the gastro-intestinal damage in mice

compound	dose mg/kg p.o	stomach damage		intestine damage	
		No.* No.	UD ₅₀ mg/kg p.o	No.* No.	UD ₅₀ mg/kg p.o
pranoprofen	5	0/5	60.9	0/5	15.9
	10	1/5		1/5	
	25	1/5		4/5	
	50	3/5		5/5	
	100	6/10		9/10	
	250	9/10		10/10	
indomethacin	2.5	3/10	4.8	3/10	3.0
	5	6/10		10/10	
	10	7/10		9/10	
	25	3/5		5/5	
acetylsalicylic acid	50	2/7	99.2	0/7	>500
	100	3/7		0/7	
	250	7/7		2/7	
	500	7/7		2/7	

* number of animals damaged/number of animals treated

PPF, IM および ASA 投与24時間後の胃における50%潰瘍発現用量(UD₅₀値)は,それぞれ60.9, 4.8および99.2 mg/kg, p.o であった. 腸管における潰瘍惹起作用も胃と同様の傾向にあり, その強度は IM>PPF>ASA の順であった(表2).

(5) 胃における PG 産生系に対する作用

マウス胃は37°C 1分間加温するとラット摘出胃底標

本を収縮させる物質を medium 中に放出した. 対照群では PGE₂ に換算すると 3.2±0.2 ng/10 mg・stomach の PGE₂ 様物質を放出した. この PGE₂ 様物質産生放出を PPF, IM および ASA は用量に依存して抑制し, その作用強度は IM>PPF≧ASA の順で, PPF は IM の約1/16の活性を示した(図2).

(6) arachidonic acid (AA) 誘発下痢に対する作用

図2 effect of pranopfen and standard compounds on the gastric generation of PGE₂-like substance in mice

Two hours after the oral administration of drugs, mice were killed and the stomach was dissected. One hundred milligram of stomach in 1 ml of 0.05 M tris buffer (pH 7.4) was incubated at 37°C for 1 min. a): ID₅₀ (mg/kg, p.o)

図3 effect of pranopfen and standard compounds on the arachidonic acid-induced diarrhea in mice

Drugs was given orally 1 hr before the intraperitoneal injection of arachidonic acid.

* significant from the control at $p < 0.05$

** significant from the control at $p < 0.01$

AA 16mg/kg の腹腔内投与により対照群では、 2.07 ± 0.46 (SE) 点の下痢症状を生じた。PPF, IM および ASA はそれぞれ25, 0.5および100 mg/kg, p.o 以上の用量でこの下痢症状を有意に抑制した(図3)。

考 察

PPF の主効果薬理作用と消化管に対する作用を、マウスを用いて検討したところ、PPF は IM と同程度の抗炎症、鎮痛活性を示すが、その潰瘍惹起作用は弱く、消化管での PG 合成阻害作用と相関することが判明し

た。

PPF はマウスの CA 足浮腫, phenylquinone test (図1) および肉芽腫形成を IM と同程度に、また ASA よりも強く抑制し(表1), ラットでの成績¹⁾と同様の結果が得られた。また, serotonin, kinin, および PG の関与¹¹⁾に加えて arthus 型反応¹²⁾, cytotoxicity による lysosome 酵素遊離¹³⁾の関与が考えられている持続型のマウス Con A 足浮腫¹⁴⁾を、PPF は IM よりも強く抑制した(図1)。これらの成績は、PPF がマウスにおいても IM と同程度に急性および慢性炎症を抑制しうることを示唆している。

一方、同様にマウスを用いた胃および腸管での潰瘍惹起試験では、PPF の活性は IM に比し明らかに弱く、特に胃で弱いことが特徴である。Duggan ら¹⁵⁾ および Brodie ら¹⁶⁾は、種々の動物を用いた IM の潰瘍実験から腸肝循環量と腸障害の相関性を明らかにしており、Duggan ら¹⁵⁾は、ヒトの場合、ラット、イスなどにくらべて腸肝循環量はきわめて少なく、臨床上是腸管障害よりも胃障害が重篤であるとしている。毒性試験における PPF による消化管障害の程度はラットよりマウスのほうが弱く¹⁷⁾, さらに吸排実験¹⁸⁾からマウスでの PPF の腸肝循環量はラットよりも少ないことが明らかにされている。

これらの知見は、マウスでの PPF の生体内運命がヒトに類似することを示唆している。さらに本実験で得られた PPF のマウスでの胃潰瘍惹起作用が特に弱いという成績は、PPF が臨床で消化器系の副作用が少ないという事実²⁾と関連していると思われる。

消化管障害が起こる機序として、胃粘膜血液量の減少¹⁹⁾, H⁺の胃粘膜逆拡散による毛細血管からの出血²⁰⁾, 粘液の合成および分泌の減少²¹⁾などがあげられている。さらに胃における PG の役割について種々の仮説が述べられているが、Robert ら²²⁾は、PG の cytoprotection 説を提唱し、その機序について、さらに Dousa ら²³⁾が詳細に検討を行っている。一方、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)の PG 合成阻害と消化管障害の相関が推定されている^{22, 24~26)}。その機作として PG 合成阻害による cytoprotection 作用の除去、肉芽増殖抑制作用に伴う粘膜再生の抑制、直接的粘膜刺激作用などが考えられている。

PPF はすでに *in vitro* でウシ精囊腺(未発表)や血小板²⁷⁾での PG 生合成を阻害し、*in vivo* でも AA によるモルモット気管支収縮反応を IM より強く抑制することが明らかにされている²⁷⁾。このような性質は PPF の強力な鎮痛、抗炎症、および解熱作用の発現に寄与するとともに、PPF の胃腸管障害惹起作用とも関連するものと推定される。しかし、上述のように PPF は従来の NSAID と異なり、強力な抗炎症作用を有する反面その

胃障害惹起作用は弱いことから、胃での PG 合成系に及ぼす PPF の影響を検討することとした。すでに荒川ら²⁸⁾は、NSAID の胃粘膜 PGE₂ 産生に及ぼす影響を検討し、IM 投与により PGE₂ が有意に低下することを報告している。

筆者らも IM をマウスに経口投与すると胃壁全層での PGE₂ 産生が著明に抑制されることを確認した (図2)。この条件下での PPF の活性は IM の約1/16で ASA と同程度であり、前述の胃での潰瘍惹起作用と明らかな相関が認められた。この知見は、PPF の PG 合成阻害作用に臓器または細胞特異性があることを示唆している。

上記知見をさらに確認する目的で、*in vivo* で消化管の PG 系が関与する実験系として、筆者らは Randal & Baruth 法¹⁰⁾によるマウス AA 誘発下痢に対する作用を検討したところ (図3)、PPF の抑制作用は IM にくらべ著明に弱いことが確認された。この成績は、PPF の消化管での PG 生合成阻害作用が他の臓器に比べ、弱いことをさらに裏づけている。

Vane ら²⁸⁾は、NSAID の PG 生合成阻害の程度が用いる標本によって異なり、組織選択性があること、また Rainsford ら²⁹⁾は、種差により消化管障害に関与する PG 群やその合成に及ぼす薬物の反応性が異なることをすでに明らかにしている。PPF の PG 生合成阻害作用は、おそらくヒトの消化管においてもマウスの場合と同様に弱いことが推定され、PPF の臨床での有用性と相関しているものと考えられる。

以上の成績から、PPF は胃および腸管での PG 生合成阻害作用が弱く、このことが消化器系副作用の軽減化に寄与しているものと考えられる。

文 献

- 丸山 裕, 寺澤道夫, 阿南惟毅, 角部行信: 2-(5H-[1] benzopyrano [2, 3-b] pyridin-7-yl) propionic acid (Y-8004) の薬理学的研究 (第1報). 日薬理誌 71: 857-873, 1975.
- 七川敏次, 五十嵐三都男, 小川暢也: Pranoprofen の慢性関節リウマチに対する薬効検定. リウマチ 19: 379-395, 1979.
- 未発表
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W.: Carrageenin-induced edema in hind-paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 111: 544-550, 1962.
- Baba, M., Harada, T., Morikawa, S.: Studies on delayed hypersensitivity in mice. Acta Path. Jap. 27: 165-183, 1977.
- Hendershot, L.C., Fosaith, J.: Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. J. Pharmacol. exp. Ther. 125: 237-240, 1959.
- Meier, R., Shuler, E., Desaulles, P.: Zur Frage des Mechanismus der Hemmung des Bindegewebswachstums durch Cortisone. Experientia 6: 469-471, 1950.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W.: Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indole-3-acetic acid. J. Pharmacol. exp. Ther. 141: 369-376, 1963.
- Vane, J.R.: A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. Brit. J. Pharmacol. 12: 344-349, 1957.
- Randal, L.O., Baruth, H. Analgesic and anti-inflammatory activity of 6-chloro-alpha-carbazole-2-acetic acid (C-5720). Arch. int. Pharmacodyn. 220: 94-114, 1976.
- J. Cotteney and J. Lewis: Mechanisms of concanavalin A-induced inflammation in the rats. Brit. J. Pharmacol. 53: 445, 1975.
- Kind, L.S. and Peterson, W.A.: Concanavalin A *in vivo*: Induction of hemorrhagic skin lesions (Arthus-like reactions) in mice. Science 160: 312-313, 1968.
- Shoham, J., Inbar, M., Sachs, L.: Differential toxicity on normal and transformed cells *in vitro* and inhibition of tumour development *in vivo* by concanavalin A. Nature 227: 1244-1246, 1970.
- Thomas, Shier, W., Joseph, T. Thomas III., Christopher L. Reading: Inflammation induced by concanavalin A and other lectins. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 146: 590-593, 1974.
- Duggan, D.E., Hooke, K.F., Noll, R.M., Kwan, K.C.: Enterohepatic circulation of indomethacin and its role in intestinal irritation. Biochem. Pharmacol. 25: 1749-1754, 1975.
- Brodie, D.A., Cook, P.G., Bauer, B.J., Dagle, G.C.: Indomethacin-induced intestinal lesions in the rat. Toxic appl. Pharmac. 17: 615-624, 1970.
- 枝長正修, 堀添 宏, 今村 博: 抗炎症薬に関する研究 (第37報) Y-8004 の急性, 亜急性および慢性毒性試験. 医薬品研究 7: 211-232, 1976.
- 加藤安之, 有馬徳行, 西峯秀夫: 抗炎症薬に関する研究 (第32報) 2-(5H-[1]benzopyrano[2, 3-b] pyridin-7-yl)propionic acid (Y-8004) のラット, マウスにおける吸収, 排泄, 分布, および代謝. 薬学雑誌, 96: 819-826, 1976.
- Guth, P.H., Paulsen, G., Forozan, P.: Experimental chronic gastric ulcer due to ischemic in rats. Am. J. dig. Dis. 20: 824-834, 1975.
- Davenport, H.W.: Gastric mucosal hemorrhage in dogs. Effects of acid aspirin and alcohol. Gastroenterology 56: 439-449, 1969.
- Menguy, R., Desbaillets, L.: Role of inhibition of gastric mucous secretion in the phenomenon of gastric mucosal injury by indomethacin. Am. J. dig. Dis. 12: 862-866, 1967.
- Roberts, A.: Antisecretory, antiulcer, cytoprotective and diarrheogenic properties of prostaglan-

- dins. *Advances in prostaglandin and thromboxane research* vol. 2: 507-520, 1976.
- 23) Dousa, T.P., Dozois, R.R.: Interrelationships between histamine, prostaglandins and cyclic AMP in gastric secretion: A hypothesis. *Gastroenterology*. 73: 904-912, 1977.
 - 24) Main, I.H.M., Whittle, B.J.R.: Investigation of the vasodilator and antiseecretory role of prostaglandins in the rat gastric mucosa by use of non-steroid anti-inflammatory drugs. *Brit. J. Pharmacol.* 53: 217-224, 1975.
 - 25) Whittle, B.J.R.: Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology* 80: 94-98. 1981.
 - 26) 荒川哲男, 中村 肇, 蝶野慎治, 山田博明, 小林 絢三: ラット胃粘膜 prostaglandin E_2 に関する研究(第1報)—測定法の確立と非ステロイド系抗炎症剤による影響について—, *日消会誌* 77: 1052-1059, 1980.
 - 27) 後藤一洋, 三ヶ島 浩, 寺澤道夫, 丸山 裕: 非ステロイド抗炎症薬 2-(5H-[1]benzopyrano[2,3-b]pyridin-7-yl)propionic acid(Pranoprofen)の血小板凝集に対する抑制作用, *薬学雑誌* 97:1211-1215, 1977.
 - 28) Vane, J.R.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Adv. Biosci.* 9: 395-411, 1973.
 - 29) Rainsford, K.D., Peskar, B.M., Brune, K.: Relationship between inhibition of prostaglandin production and gastric mucosal damage induced by anti-inflammatory drugs may depend on type of drugs and species. *J. Pharm. Pharmacol.* 33: 127-128, 1981.