薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107(2) 170-174 (1987)

非ステロイド性抗炎症剤 EB-382 の抗アレルギー作用

藤吉俊夫,* 村上元哉, 飯田博之, 植松利男

富士レビオ株式会社 中央研究所

The Anti-allergic Effects of EB-382, a Non-steroidal Antiinflammatory Agent

TOSHIO FUJIYOSHI,* MOTOYA MURAKAMI, HIROYUKI IIDA
and TOSHIO UEMATSU

Research Laboratories, Fujirebio Inc., 51, Komiya-cho,
Hachioji, Tokyo, 192, Japan

(Received September 8, 1986)

The anti-allergic effects of EB-382, a non-steroidal antiinflammatory agent, were examined on the experimental animal models of allergic reactions. EB-382 showed no inhibition against the heterologous passive cutaneous anaphylaxis reaction in guinea-pigs (type I). EB-382 suppressed significantly the active Arthus reaction in rabbits at doses of 3 and 10 mg/kg, *p.o.* and the reversed passive Arthus reaction in guinea-pigs at a dose of 3 mg/kg, *p.o.* (type III), respectively. EB-382 showed no inhibition on the complement fixation reaction of sheep erythrocytes *in vitro* (type II) and the tuberculin-induced delayed type allergic reaction in guinea-pigs (type IV). It is suggested that EB-382 is a new type of non-steroidal antiinflammatory agent with a precedent pharmacological action, since it shows an inhibitory effect on the experimental model of type III of allergic reaction.

Keywords—EB-382; non-steroidal antiinflammatory agent; allergy; anti-allergic reaction; Arthus reaction; type III allergic reaction

緒 言

EB-382 は Bouchara 社 (France) で開発された新しい非ステロイド性抗炎症剤で,¹⁾ 塩基性基が導入された ibuprofen に類似の化学構造を有している。塩基性基の導入により, 従来の酸性非ステロイド性抗炎症剤にはみられない特色ある薬理作用が期待された。実際に EB-382 は, 優れた抗炎症, 鎮痛, 解熱作用を有し, 特に kinin 系や補体系の関与する実験系に対して強力な薬理作用を示していた。^{2,3)} 抗炎症作用との関係は明らかではないが, salicylic acid や phenylbutazone など, ある種の非ステロイド性抗炎症剤が抗アレルギー作用を有し, その作用には補体系の関与が示唆されている。^{4,5)} EB-382 は, 補体系の関与する実験系に対して著効を示していたことから, 少なくともある種の抗アレルギー作用を有することは充分に考えられた。そこで今回, 著者らは EB-382 の各種アレルギー反応に対する作用を検討したので報告する。

実 験 材 料

1. 使用動物 Hartley 系雄性モルモット及び日本白色種雄性ウサギを使用した。動物はすべて静岡実験動物より購入し, 室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 午前 7 時から午後 7 時までの 12 時間照明の条件で飼育した。

2. 使用薬剤 EB-382 は化学名が (±)-2-[*p*-(2-methylallyl)amino]phenyl]propionic acid であり, 分子量 219.28, 分子式 $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}$, 融点 $106-108^\circ\text{C}$ の白色ないし微黄白色の結晶性粉末で水にほとんど溶けない。本剤以外に対照薬剤として ibuprofen (Sigma), indomethacin (Sigma), phenylbutazone (Sigma) を使用した。その他に, ovalbumin (OA, 生化学工業), 抗 OA ウサギ血清 (1.7 mg antibody/ml, -20°C 保存, Miles), Evans' blue (Merck), complete Freund's adjuvant (CFA, 和光純薬), モルモット乾燥補体 (日本バイオテスト), ヒツジ赤血球 (日本凍結乾燥), 溶血素 (日本凍結乾燥), 精製ツベルクリン (日本ビーシージー) 等を使用した。

実 験 方 法

1. Heterologous Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 反応に対する作用 Hartley 系雄性モルモット (200—250 g) を用い、1 群 4 匹とした。モルモットの背部を除毛し、正中線をはさんで 1 側の皮内 2 ケ所に生理食塩水で 50 倍に希釈した抗 OA ウサギ血清 0.05 ml を、他側の 2 ケ所に同量の生理食塩水をそれぞれ皮内注射した。1 時間後、被検薬物を経口投与し、更に 2 時間後、OA 5 mg 及び Evans' blue 10 mg を含む生理食塩水 1 ml を静脈注射して PCA 反応を惹起した。30 分後、動物を放血致死させ、皮膚を剥離して PCA による色素漏出面積を測定した。

2. Arthus 反応に対する作用 1) Active Arthus 反応——日本白色種雄性ウサギ (2.5—3.5 kg) を用い、1 群 3—4 匹とした。1% OA 生理食塩水溶液と CFA との等量乳化液 2 ml をウサギの左右腎筋に分割注射し、更に 1 週間間隔で 2 回皮下注射することによりウサギを感作した。最終感作の 10 日後に、0.03% OA 生理食塩水溶液 0.1 ml を剪毛したウサギの左右背部に皮内注射して、それぞれ Arthus 反応を惹起した。被検薬物は惹起前 30 分に経口投与した。なお効果の判定は惹起後経時的に次の基準に従って行った。0: 変化なし、1: 水腫を示すものあるいは軽度の充血を伴うもの、2: 充血の強く加わったもの、3: 明らかに出血を示すもの、4: 変化の中心部が黒紫色を帯び、壊死的外観を呈したもの。

2) Reversed Passive Arthus 反応——Hartley 系雄性モルモット (250—300 g) を用い、1 群 4—7 匹とした。0.1% OA 生理食塩水溶液 1 ml を静脈内注射し、30 分後に抗 OA ウサギ血清 0.2 ml を剪毛したモルモット背部の 2 ケ所に皮内注射して反応を惹起した。被検薬物は OA 生理食塩水溶液静脈注射の 30 分前に経口投与した。効力の判定は惹起後 5 時間目に、active Arthus 反応の場合と同様の基準に従って行った。

3. Tuberculin 反応に対する作用 Hartley 系雄性モルモット (250—350 g) を用い、1 群 4—6 匹とした。モルモットの背部と腎筋に CFA 0.5 ml をそれぞれ 3 日間隔で 3 回投与してモルモットを感作した。最終感作から 5 週間後に、剪毛した背部の 2 ケ所に 0.2 µg/ml の tuberculin 生理食塩水溶液 0.1 ml を皮内注射して反応を惹起して 24 及び 48 時間後に生ずる発赤及び壊死部位の径を測定し、面積を算出した。被検薬物は惹起直前、惹起 3 及び 6 時間後の計 3 回経口投与した。

4. 補体溶血反応に対する作用 西岡らの方法⁶⁾ に準じて行った。2% ヒツジ赤血球に 800 倍希釈の溶血素血清を加えて混和し、37°C、15 分間 incubate して作成した 5 単位感作の溶血系 1.35 ml に同量の 41.7 倍希釈したモルモット補体 (2 単位/0.25 ml) と各希釈薬物 0.3 ml を同時に添加し、溶血反応を惹起させた。反応液を十分に混和した後、37°C で 15 分間振盪保温した。2000 rpm 3 分間遠心して上澄をとり、541 nm における吸光度を分光光度計 (日立 100-60) を用いて測定した。

5. 統計学的処理 群間比較による薬物投与群の有意差の検定は Student's *t*-test により行った。

結 果

1. Heterologous PCA 反応

EB-382 (200 mg/kg) はモルモット heterologous PCA 反応に対してほとんど抑制作用を示さなかった (Table I)。

TABLE I. Effect of EB-382 on Heterologous PCA in Guinea-pigs

Compounds	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	N	Blue spot area (mm ²)	Inhibition (%)
Control		4	195.4 ± 9.78	
EB-382	2	4	197.2 ± 10.97	-0.9
	10	4	197.1 ± 6.26	-0.9
	50	4	194.9 ± 3.50	0.3
	200	4	179.9 ± 8.23	7.9

Each value represents the mean ± S.E. of 4 guinea-pigs.

2. Arthus 反応に対する作用

1) Active Arthus 反応 EB-382 (3 及び 10 mg/kg) は 0.03% OA 生理食塩水溶液 0.1 ml i.d. による感作ウサギの active Arthus 反応に対し、惹起 5 時間及び 7 時間後に著明な抑制作用を示した。Ibuprofen は 100 mg/kg の高用量において有意な抑制作用を示し、indomethacin (10 mg/kg) は有意な抑制作用を示さなかった (Table II)。

TABLE II. Effects of EB-382 and Reference Compounds on Active Arthus Reaction in Rabbits

Compounds	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	N	Index			
			3 h	2 h	7 h	24 h
Control		6	1.36±0.20	2.48±0.10	2.56±0.12	2.71±0.10
EB-382	1	4	1.54±0.06	2.10±0.25	2.19±0.26	2.44±0.20
	3	4	1.22±0.18	1.56±0.21 ^{b)}	1.75±0.10 ^{b)}	2.13±0.07 ^{b)}
	10	3	1.08±0.08	1.42±0.17 ^{b)}	1.46±0.34 ^{b)}	2.33±0.08 ^{a)}
Ibuprofen	10	4	1.85±0.12	2.31±0.16	2.31±0.16	2.50±0.20
	30	4	2.63±0.24 ^{a)}	2.56±0.26	2.69±0.24	2.81±0.12
	100	3	1.54±0.04	1.83±0.17 ^{a)}	1.92±0.22 ^{a)}	2.50±0.29
Indomethacin	10	3	1.75±0.14	2.17±0.08	2.25±0.14	2.42±0.08

Each value represents the mean±S.E. of 3—6 rabbits. *a)* and *b)* indicate significant differences from the control at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

2) **Reversed Passive Arthus 反応** EB-382 (3 mg/kg) は抗 OA ウサギ血清 0.2 ml による感作モルモットの reversed passive Arthus 反応に対し、有意な抑制作用を示した。Ibuprofen (100 mg/kg) 及び indomethacin (10 mg/kg) はほとんど抑制作用を示さなかった (Table III).

TABLE III. Effects of EB-382 and Reference Compounds on Reversed Passive Arthus Reaction in Guinea-pigs

Compounds	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	N	Index	Inhibition (%)
Control		7	3.14±0.26	
EB-382	0.3	4	3.00±0.41	4.5
	1	6	2.50±0.34	20.4
	3	6	1.67±0.33 ^{a)}	46.8
	10	5	2.00±0.45	36.3
	30	5	2.00±0.45	36.3
Ibuprofen	3	4	3.25±0.25	-3.5
	10	5	3.00±0.32	4.5
	30	5	3.20±0.20	-1.9
	100	4	2.75±0.25	12.4
Indomethacin	10	4	3.00±0.41	4.5

Each value represents the mean±S.E. of 4—7 guinea-pigs. *a)* indicates significant difference from the control at $p<0.01$.

TABLE IV. Effects of EB-382 and Reference Compounds on Delayed-type Hypersensitivity Induced by Tuberculin in Guinea-pigs

Compounds	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	N	Erythema (mm ²)	
			24 h	48 h
Control		6	87.6±11.7	65.7± 9.7
ED-382	10	4	94.5±26.1	16.5±15.0
	30	5	80.9± 8.7	62.0±13.5
	100	4	65.7± 2.4	54.6± 8.8
	100	4	65.7± 2.4	54.6± 8.8
Ibuprofen	10	3	89.7±29.5	60.0±10.0
	100	4	121.6±19.7	107.9±27.5
Indomethacin	10	4	88.2±35.3	85.8± 9.5

Each value represents the mean±S.E. of 3—6 guinea-pigs.

3. Tuberculin 反応に対する作用

EB-382 (100 mg/kg) は、0.2 μ g/ml の tuberculin 0.1 ml i.d. による感作モルモットの遅延型アレルギーに対し、ほとんど抑制作用を示さなかった。また、他の被検薬物もほとんど抑制作用を示さなかった (Table IV)。

4. 補体溶血反応に対する作用

EB-382 及び ibuprofen, phenylbutazone, indomethacin は、モルモット補体によるヒツジ赤血球溶血反応に対し、 10^{-8} M の高濃度においても何ら抑制作用を示さなかった (data not shown)。

考 察

EB-382 の抗アレルギー作用について検討した。モルモット PCA 反応は即時型アレルギー反応 (I 型) のモデルとして良く用いられている。PCA 反応は受身に感作された抗体が組織中の肥満細胞表面上のレセプターに結合し、つぎに投与された抗原との反応により、histamine などの chemical mediator が遊離することによって引き起こされる現象であり、一般的な非ステロイド性抗炎症剤は、この反応に対しては、抑制作用を示さないとされている。EB-382 は、モルモット PCA 反応に対し、ほとんど抑制作用を示さなかったことから、他の一般的な非ステロイド性抗炎症剤と同様に I 型アレルギー反応には作用しないものと考えられた。

Arthus 反応は免疫複合型 (III 型) に属したアレルギー反応で、可溶性の抗原と抗体による免疫複合体の形成が、補体あるいは Hageman 因子を活性化し、更に kinin 系、凝固系も活性化されることによるとされ、中でも補体系の関与は重要であることが知られている。⁷⁾ EB-382 は、ウサギ active Arthus 及びモルモット reversed passive Arthus 反応に対し、低用量で有意な抑制作用を示したことから、EB-382 は他の一般的な非ステロイド性抗炎症剤と異なり、免疫複合型 (III 型) のアレルギーに対して抗アレルギー作用を持つことが示された。又、EB-382 は kinin 系や補体系の関与する炎症反応に対して抑制作用を有することが前報²⁾ において示唆されていることから、これらの作用は、EB-382 の特徴的な薬理的性質が共通して反映されているものと考えられた。

Tuberculin 反応は遅延型アレルギー (IV 型) に属する反応で、抗原に感作された T 細胞から放出される lymphokine が引き起こすとされている。EB-382 は対照に用いた他の一般的な非ステロイド性抗炎症剤と同様に、tuberculin 反応に対してほとんど抑制作用を示さなかったことから、遅延型アレルギー反応には関与しないものと考えられた。また、EB-382 は、他の被検薬物と同様に、モルモット補体によるヒツジ赤血球の溶血反応に対して抑制作用を示さなかったことから、細胞融解型 (II 型) のアレルギー反応には関与しないものと考えられた。

一般に非ステロイド性抗炎症剤は、一連のアレルギー反応に対し、通常の薬効量ではほとんど抑制作用を示さないとされている。⁵⁾ III 型のアレルギー反応に対しても salicylic acid や phenylbutazone などの非ステロイド性抗炎症剤が抑制作用を示したという報告もあるが、⁸⁻¹⁰⁾ いずれもかなりの高用量での作用であり、これらの一般的な非ステロイド性抗炎症剤の通常薬効量における抗アレルギー作用については否定的である。⁵⁾ 最近、薬効量において III 型アレルギーに対して著明な抑制作用を持つ非ステロイド性抗炎症剤の報告もされている¹¹⁾ が、その数は極めて少ない。EB-382 は、一般的な非ステロイド性抗炎症剤と同様に、I, II, IV 型のアレルギー反応にはほとんど抑制作用を示さなかったが、免疫複合型 (III 型) アレルギー反応に対しては、有意な抑制作用を示していた点が、他の非ステロイド性抗炎症剤と大きく異なった点であった。EB-382 は臨床においてすでに慢性関節リウマチに優れた効果を持つことが報告されている¹²⁾ が、慢性関節リウマチには III 型の免疫反応が関与していることが知られている¹³⁻¹⁷⁾ ことから、この EB-382 の III 型アレルギー反応に対する抑制作用が、臨床における慢性関節リウマチに対する優れた効果に何らかの形で反映されていることも十分に考えられる。しかし、EB-382 がこれらの炎症モデルにおける III 型のアレルギー反応の過程において、免疫複合体の形成あるいは補体系の活性化等のどの部分に対して関与しているのかは、今後の詳細な検討を待たねばならない。

以上、EB-382 は免疫複合型 (III 型) のアレルギー反応に抑制作用を示すことから、従来の非ステロイド性抗炎症剤にはほとんどみられない薬理的性質を示す新しいタイプの非ステロイド性抗炎症剤であることが示唆された。

文 献

- 1) B. Dumaitre, A. Fouquet, C. Perrin, P. Cornu, A. Boucherle, C. Portka, G. Domage, G. Streichenberger, *Eur. J. Med. Chem.*, **14**, 207 (1979).
- 2) 藤吉俊夫, 池田賢朗, 斉藤真寿美, 山浦哲明, 飯田博之, 前田悦子, 加瀬則子, 植松利男, *日薬理*, **87**, 379 (1986).
- 3) 藤吉俊夫, 飯田博之, 斉藤真寿美, 池田賢朗, 山浦哲明, 植松利男, *日薬理*, **87**, 527 (1986).
- 4) M. Cîrster, G. Suhaciu, *Int. Arch. Allergy*, **21**, 51 (1962).
- 5) Y. Mizushima, R. Kasukawa, *Int. Arch. Allergy*, **24**, 100 (1964).
- 6) 西岡久寿弥, 岡田英規, “免疫の生化学”, 蛋白質・核酸・酵素編, 共立出版, 東京, 1974, p. 103.
- 7) 稲井真弥, “アレルギーと補体,” 免疫学 3, 山村雄一編, 中山書店, 東京, 1982.
- 8) W. Smith, J. H. Humphrey, *Br. J. Exp. Path.*, **30**, 560 (1949).
- 9) P. A. Ward, *J. Exp. Med.*, **124**, 209 (1966).
- 10) P. F. Kohler, J. S. Martinez, *Fed. Proc.*, **30**, 472 abs. (1971).
- 11) 小林 和, 安倍千之, 塩川優一, *炎症*, **3**, 317 (1983).
- 12) 西岡久寿樹, 田中恒男, 延永 正, *リウマチ*, **26**, 210 (1986).
- 13) R. Goombs, P. Gell, “Clinical Aspects of Immunology,” 3rd ed. by P. Gell, R. Goombs, P. Lachman, Black-Well Scientific Publication, Oxford, 1975, p. 761.
- 14) N. J. Zvaifler, *Adv. Immunol.*, **16**, 265 (1973).
- 15) P. A. Ward, C. G. Cochrane, *J. Exp. Med.*, **121**, 215 (1965).
- 16) P. A. Ward, J. H. Hill, *J. Immunol.*, **108**, 1137 (1972).
- 17) M. B. Goldlust, W. F. Schreiber, *Agents Actions*, **5**, 39 (1975).