非ステロイド性抗炎症剤による消化管障害の、ラットにおける比較検討

尾藤龍哉, 工藤正典, 奥村 誠

科研薬化工株式会社京都研究所¹⁾

Comparative Studies on Gastrointestinal Damage induced by Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs in Rats

TATSUYA OFUJI, MASANORI KUDO and MAKOTO OKUMURA

Research Laboratory, Kakenyaku-kako Co., Ltd.¹⁾

(Received November 10, 1978)

Gastrointestinal damage induced by oral administration of non-steroidal anti-inflammatory agents (flurbiprofen, phenylbutazone, indomethacin and acetylsalicylic acid) was examined. Wistar male rats in the fasting state for 16 hr received the agent orally. The dose was determined from the equation: $D = ED_{50} \times K_t$, where ED_{50} is the median inhibitory dose on carrageenin edema in the rat paw and K_t is the coefficient. Rats were sacrificed without anesthesia by cutting both common carotid arteries at 6 hr after drug administration and gastrointestinal specimens were visually examined. Cumulative method was applied for statistical analysis of the number of rats in each grade of the damage. On the basis of the statistical data, availability (balance between effect and hazard) of the tested drugs was discussed, and safety margins and their confidence limits at ED_{50} of the drugs were estimated. In further study, median ulcerogenic dose (UD_{50}) and UD_{50}/ED_{50} ratio of each tested drug were calculated. Availability evaluated on statistical consideration decreased in the order of flurbiprofen, phenylbutazone, indomethacin, and acetylsalicylic acid.

Keywords—flurbiprofen; phenylbutazone; indomethacin; acetylsalicylic acid; gastrointestinal damage; statistical analysis by cumulative method.

非ステロイド性抗炎症剤がもつ共通の副作用の一つとして胃腸管障害がしばしば問題になり、潰瘍形成作用に関する動物実験が広く行なわれている。また、その大部分が薬物単独による消化管障害（たとえば 50% 潰瘍発現用量: UD_{50} ）あるいは実験潰瘍に対する増悪作用について検討されている。

いく種類かの薬物についてその有用性を比較する場合、薬効量 (ED_{50}) と UD_{50} の比がその指標として用いられることが多い。しかし、薬物間にみられるその比の差が、果して有意なものであるか否かについてはしばしば判断に迷うことがある。しかも、用量・反応曲線が薬物間で非平行性である場合には、有用性の比較がなお一層複雑となる。

著者らは、同一の場で試験されて算出された flurbiprofen, phenylbutazone, indomethacin, acetylsalicylic acid の各 ED_{50} ²⁾（ラットカラゲニン足浮腫を 50% に抑制するに必要な用量）の値を基準として、それに共通の係数をかけることによって決められる各薬物投与量でのラットにおける消化管障害試験を行なった。得られたデータを、実施された投与量全体にわたって総合的に解析する手段として累積法³⁾を用い、これら各薬物の有用性を比較検討した。その結果、flurbiprofen による消化管障害は indomethacin および acetylsalicylic acid よりも、また phenylbutazone は acetylsalicylic acid よりもそれぞれ有意 ($p \leq 0.05$) に弱く、同程度の薬効発現が期待できる各薬物用量における消化管障害の推定出現率は flurbiprofen が最も低く、phenylbutazone, indomethacin, acetylsalicylic acid の順に高くなることがわかった。また、念のため各薬物の UD_{50} 値を実験的に求め、 ED_{50} 値に対する比を算出し参考に供した。

1) Location: Shinomiya Minamikawara-cho, Yamashina-ku, Kyoto.

2) 高瀬健一郎, 舛本省三, 奥村 誠, 日薬理誌, 71, 573 (1975).

3) 田口玄一, 最新医学, 29, 1000 (1974).

実 験 の 部

Flurbiprofen, phenylbutazone, indomethacin および acetylsalicylic acid を、それぞれ 10% アラビアゴム水溶液に懸濁して被検薬液とした。試験前日の午後 5 時より 16 hr 絶食した Slc-Wistar 系雄性ラット (8—9 週令, 体重 150—170 g) に被検薬液を 10 ml/kg 宛経口投与した。その後絶水し, 6 hr 後に放血致死させ, 胃腸管全域を肉眼的に観察した。その際必要に応じてルーペを使用した。

実 験 成 績

判定基準の作成

16 hr 絶食させたラットに 10% アラビアゴム水溶液を経口投与した対照群の消化管においても点状出血斑が認められた。各個体での出血斑数をしらべその 99.9% 信頼限界を算出したところ 2.83 ± 5.97 となったので, 点状出血斑数が 9 以下のものは障害作用陰性とし, 胃腸管粘膜面にみられる障害 (点状出血斑, 出血, びらん, 潰瘍) の度合を次のように grade 分けした。

(-) : 9 個以内の点状出血斑が認められる。

(+) : 出血または 10 個以上の点状出血斑があるか erosion の各長径の総和が 2 mm 以下である。

(++) : 20 個以上の点状出血斑または長径の総和が 10 mm 以下の erosion を有する。

(+++): 潰瘍または長径の総和が 10 mm をこえる erosion を有する。

累積法による解析試験

Table I に示される投与量で flurbiprofen, phenylbutazone, indomethacin および acetylsalicylic acid をそれぞれ 1 群 4 匹のラットに投与し, 投薬 6 hr のちに各段階の胃腸管障害が検出された例数を Table II にま

TABLE I. Oral Dose of Drugs

Drug and abbreviation	Dose = $ED_{50}^a) \times K_t$ (mg/kg)		
	$K_1=0.5$	$K_2=1$	$K_3=2$
Flurbiprofen (A_1)	0.24	0.48	0.96
Phenylbutazone (A_2)	27	54	108
Indomethacin (A_3)	3.4	6.8	13.6
Acetylsalicylic Acid (A_4)	61	122	244

$a)$ Ref. to reference 2).

Drug was administered to Wistar male rats in the fasting state for 16 hr.

TABLE II. Number of Animals in Various Grade of Ulcerogenic Damage

Drug	Coeff. of dose	Grade of damage				Total	Cumulative distribution ^{a)}			
		—	+	++	+++		I	II	III	IV
Flurbiprofen (A_1)	K_1	4	0	0	0	4	4	4	4	4
	K_2	4	0	0	0	4	4	4	4	4
	K_3	2	1	0	1	4	2	3	3	4
Phenylbutazone (A_2)	K_1	4	0	0	0	4	4	4	4	4
	K_2	2	2	0	0	4	2	4	4	4
	K_3	1	1	2	0	4	1	2	4	4
Indomethacin (A_3)	K_1	3	1	0	0	4	3	4	4	4
	K_2	1	3	0	0	4	1	4	4	4
	K_3	0	0	2	2	4	0	0	2	4
Acetylsalicylic acid (A_4)	K_1	1	3	0	0	4	1	4	4	4
	K_2	0	4	0	0	4	0	4	4	4
	K_3	0	3	0	1	4	0	3	3	4

$a)$ I: sum of numbers in (—), II: sum of numbers in (—) and (+), III: sum of numbers in (—), (+) and (++) , IV: sum of numbers in (—), (+), (++) and (+++).

TABLE III. Supplemental Table from Table II

(a)

Drug ^{a)}	I	II	III	IV
A ₁	10	11	11	12
A ₂	7	10	12	12
A ₃	4	8	10	12
A ₄	1	11	11	12
Total	22	40	44	48

(b)

Coeff. of dose ^{a)}	I	II	III	IV
K ₁	12	16	16	16
K ₂	7	16	16	16
K ₃	3	8	12	16
Total	22	40	44	48

a) Ref. to Table I.

Fig. 1. Estimation of Means of Each Factor

定 (I 組における A₂K₂ の推定値を計算) すると Table VI に示される値が算出され, ラットから得られた成績で判断される safety margin は, acetylsalicylic acid, indomethacin, phenylbutazone, flurbiprofen の順で大きくなることがわかった。

UD₅₀ 値

改めて 1 群 6 匹のラットに 4—6 段階の用量で各薬物を投与し, 胃腸管の病変を観察した。各薬物群とも主

とめた。それを基にして累積度数 (cumulative distribution) を求めさらに補助表 (Table III) を作成し, 累積法³⁾によって統計的に解析した結果, Table IV に示される分散分析が得られた。投与量を左右する 3 水準の係数間および 4 種の薬物間に高度な有意差がみられたので各要因ごとに推定値を算出し Fig. 1 に図示した。当然のことながら, 係数値が小さい低投与量においては障害の発生率が低く, 投与量が大きくなるに従って障害の重症度が高くなっている。他方, 薬物の種類によって障害の程度およびその出現率は大きく異なるが, 最小有意差法⁴⁾ ($p \leq 0.05$) で検定したところ (Table V), (—) の出現率は flurbiprofen が最も高く indomethacin あるいは acetylsalicylic acid との間には有意差がみられ, phenylbutazone も acetylsalicylic acid より有意に高かった。さらに (—) と (+) をこみにしての出現率は, flurbiprofen, phenylbutazone および acetylsalicylic acid においては同程度であり indomethacin のみが有意に低かった。

各薬物の ED₅₀ に相当する量を経口投与したとき, 消化管に障害をうけない個体の出現率すなわち安全率を推

4) 鷺尾泰俊, “新薬品質管理便覧,” 日本規格協会編, 日本規格協会, 東京, 1977, pp. 401—423.

TABLE IV. Analysis of Variance

Factor	Sum of squares	Number of degrees of freedom	Mean square	F-Ratio
A (Drug)	20.89	9	2.321	3.53 ^{a)}
K (Coefficient)	38.17	6	6.362	9.70 ^{a)}
A × K	14.09	18	0.783	1.19
Error	70.87	108	0.656	
Total	144.02	141		

^{a)} $p \leq 0.01$.

TABLE V. Difference of Mean between the Drugs

(a) I-class ($LSD^a = 0.33$)(b) II-class ($LSD^a = 0.24$)

	A ₄	A ₃	A ₂		A ₄	A ₃	A ₂
A ₁	0.75 ^{a)}	0.50 ^{a)}	0.25	A ₁	0	0.25 ^{a)}	0.09
A ₂	0.50 ^{a)}	0.25		A ₂	-0.09	0.16	
A ₃	0.25			A ₃	-0.25 ^{a)}		

^{a)} Least significance difference = $\sqrt{F_{\phi E}^1(0.05) \times V_E \times \bar{P}(1-\bar{P}) \times \frac{2}{n_o}}$

Abbreviation

$F_{\phi E}^1(0.05)$: 5% critical value of the F-distribution.

V_E : error variance.

$\bar{P}$: relative frequency in I-class or II-class.

n_o : effective number of replication.

TABLE VI. Estimated Safety Margins and Their 95% Confidence Limits at ED₅₀

Flurbiprofen (A ₁)	82 ± 18%
Phenylbutazone (A ₂)	56 ± 23
Indomethacin (A ₃)	31 ± 21
Acetylsalicylic Acid (A ₄)	7 ± 12

Safety margin is expressed by the value ($\hat{\mu}_i$) estimated from the data of I-class shown in Table III.

Calculation

$$\Omega_i = \frac{\left(\frac{1}{A_i} - 1\right)\left(\frac{1}{K_2} - 1\right)}{\left(\frac{1}{T_m} - 1\right)}$$

$$\hat{\mu}_i = \frac{1}{1 + \Omega_i} \pm \sqrt{F_{\phi E}^1(0.05) \times V_E \times \hat{\mu}_i(1 - \hat{\mu}_i) \times \frac{1}{n_o}}$$

Abbreviation

A_i: mean frequency of A_i (i=1,2,3,4) in I-class.

K₂: mean frequency of K₂ in I-class.

T_m: mean frequency of total in I-class.

$F_{\phi E}^1(0.05)$: 5% critical value of the F-distribution.

V_E : error variance.

n_o : effective number of replication.

たる病変は胃における出血ないし出血斑であり, phenylbutazone および acetylsalicylic acid 投与群では腸管における病変はみられなかった. Phenylbutazone 108 mg/kg 以上および acetylsalicylic acid 45.8 mg/kg 以上の用量群で erosion がみられたが, その例数は, 後者では散見される程度であったのに対し前者では用量とともに増加した. Flurbiprofen 投与群では 0.96 mg/kg 以上の用量において erosion を有する個体が散見され, とくに 1.92 あるいは 3.84 mg/kg の高用量では 6 例中 1—2 例の空腸あるいは回腸に潰瘍を認めた. Indo-

TABLE VII. Ulcerogenic and Effective Dose

Drug	UD ₅₀ (95% C.L.) mg/kg	ED ₅₀ ^{a)} mg/kg	UD ₅₀ /ED ₅₀
Flurbiprofen	0.82 (0.41—1.62)	0.48	1.7
Phenylbutazone	65 (50—85)	54	1.2
Indomethacin	6.8 (5.2—9.0)	6.8	1.0
Acetylsalicylic acid	35 (18—70)	122	0.29

a) Ref. to reference 2).

methacin 投与群でも 5.1 mg/kg 以上で erosion が出現し, 6.8 および 10.2 mg/kg 用量群の各 1 例に回腸部のリンパ節内出血がみられた。

50% の個体例数において (+) 以上の胃腸管障害を発生する薬用量 (UD₅₀) を Litchfield-Wilcoxon 法によって算出し, その値を ED₅₀²⁾ とともに Table VII にまとめた。UD₅₀/ED₅₀ は acetylsalicylic acid が最も低い値となり indomethacin, phenylbutazone, flurbiprofen の順にその値は高くなって, 累積法による解析結果と同じ傾向を示した。

考 察

鎮痛, 解熱あるいは消炎作用の強い非ステロイド性抗炎症剤が臨床的にもたらす副作用は主として胃腸障害である。かような副作用は動物試験によっても予知ないし確認されており, 文献にみられる UD₅₀ 値 (ラット, *カ.*) は, acetylsalicylic acid 24×2 ,⁵⁾ 37.5,⁶⁾ 43,⁷⁾ 45⁹⁾ mg/kg, indomethacin 2×2 ,⁵⁾ 10.8,⁶⁾ 9.5,⁷⁾ 6.0,⁸⁾ 6.2,¹⁰⁾ 7.5,¹¹⁾ mg/kg, phenylbutazone 31.5×2 ,⁵⁾ 97,⁶⁾ 62,^{8,10)} 70¹²⁾ mg/kg で著者らが得た値 (Table VII) と近似している。

薬物の有用性を判断する指標として, 一般に安全域値 (例えば UD₅₀/ED₅₀) が用いられるが, その値を薬物間で比較する場合その有意性は非常にあいまいである。著者らはそのあいまいさを克服するため, 用量設定の基準を ED₅₀ 値におき, $\text{Dose} = \text{ED}_{50} \times K_i$ で示されるごとく薬物に共通した係数 K_i を共通要因として累積法の応用を試みた。それによって, 3 段階の用量で薬物を投与されたラットから得られた成績を総合的に解析し, 各薬物の有用性を積極的に論ずることが可能となった。

謝辞 データの解析にあたり, 当社の寺崎康世氏より有益な助言を賜ったことを付記する。

5) G. Wilhelmi, R. Ménassé-Gdynia, *Pharmacology*, **8**, 321 (1972).6) J.T. Hitchens, S. Goldstein, A. Sambuca, I. Shemano, *Pharmacologist*, **9**, 242 (1967).7) 鶴見介登, 平松保造, 山口 東, 林 元英, 澁谷具久, 藤村一, *日薬理誌*, **69**, 319 (1973).8) 藤村 一, 鶴見介登, 平松保造, 呉晃一郎, 中野万正, 澁谷具久, *日薬理誌*, **70**, 543 (1974).9) 鶴見介登, 森井 勇, 野崎正勝, 藤村 一, *日薬理誌*, **71**, 843 (1975).10) 藤村 一, 鶴見介登, 小島勝彦, 山口 東, 中野万正, 呉晃一郎, *応用薬理*, **9**, 267 (1975).11) 藤村 一, 鶴見介登, 平松保造, 田村洋平, 國場節子, 柳原雅良, *応用薬理*, **9**, 715 (1975).12) K. Tsurumi, Y. Hiramatsu, M. Nozaki, M. Hayashi, H. Fujimura, *Arzneim.-Forsch.*, **22**, 724 (1972).