

抗炎症剤に関する研究 受精卵法による抗炎症スクリーニング¹⁾

大塚紘司, 津久井誠, 松岡敏郎, 後藤 実,^{2a)}

藤村 一, 平松保造,^{2b)} 沢田徳之助^{2c)}

武田薬品工業株式会社中央研究所京都試験農園,^{2a)}

岐阜大学医学部,^{2b)} 京都薬科大学^{2c)}

Studies on Anti-inflammatory Agents. Anti-inflammatory Screening by Fertile Egg Method

HIROSHI OTSUKA, MAKOTO TSUKUI, TOSHIRO MATSUOKA, MINORU GOTO,^{2a)}

HAJIME FUJIMURA, YASUZO HIRAMATSU,^{2b)} and TOKUNOSUKE SAWADA^{2c)}

Kyoto Herbal Garden, Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.,^{2a)} Gifu University, School of Medicine,^{2b)} and Kyoto College of Pharmacy^{2c)}

(Received September 28, 1973)

The fertile egg method of D'arcy, *et al.* was found to be suitable for anti-inflammatory screening of extracts of natural sources. The suitable primary incubation period and implantation period were 9 and 4 days, respectively. Certain dose of steroidal anti-inflammatory drugs, *e.g.*, 6.3 µg/disc of dexamethazone, significantly inhibited the granulation tissue formation of chorio-allantoic membrane in the established method. Non-steroidal drugs, such as phenylbutazone, showed inhibitory action at 500 µg/disc. This screening method was applied to aqueous methanolic (1:1) extracts from more than a thousand crude drugs and plants and 62 extracts were found to be active at 800 µg/disc. It was found that berberine-containing plants, *e.g.*, coptis rhizome, were strongly active even in a dose of 400 µg/disc.

従来の抗炎症試験法としては cotton pellet method,³⁾ carrageenin method⁴⁾ などが知られ,⁵⁾ いずれも適確に判定しうる薬理学的試験法として広く用いられている。しかし少量で多数の検体を取り扱うスクリーニング⁶⁾ においては生物試験ができる限り均一性のある条件下で短期間に結果が判定しうることを、ならびにその操作も簡便、迅速であり、かつ従来の薬理試験とも高い相関のあることなどの諸条件が必要と考えられる。こうした意味からでは前記の既知抗炎症試験法とは別に多数の検体を短期間に判定し得るスクリーニング法の存在が望まれる。

著者らはかねてから天然物を対象とした各種生物試験を実施中であるが、なかでも抗炎症効果が期待される漢薬、漢方方剤がすでに本草書、漢方医書などに誌るされているにもかかわらず、これが積極的に証明されていないのに着目し、既知抗炎症試験法の検討とともにこれらに代わる適切なスクリーニング法について各種実験を続けてきた。

- 1) 藤村 一, 沢田徳之助, 後藤 実, 薬誌, **90**, 782 (1970); 日本生薬学会武庫川大会で発表, 兵庫, 1970 年 10 月.
- 2) Location: a) Ichijoji, Sukyo-ku, Kyoto; b) Tsukasa-machi, 40, Gifu; c) Misasagi-Yamashina, Higashiyama-ku, Kyoto.
- 3) R. Meier, W. Schuler, P. Desaulles, *Experientia*, **6**, 469 (1950); C. A. Winter, E.A. Risley, G.W. Nuss, *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **141**, 369 (1963).
- 4) C.A. Winter, E.A. Risley, G.W. Nuss, *Proc. Soc. Exper. Biol.*, N.Y., **111**, 544 (1962); C.A.N. Buttle, P.F. D'arcy, E.M. Howard, D.N. Kellet, *Nature*, **179**, 629 (1957).
- 5) H. Selye, *Br. Med. J.*, **2**, 1129 (1949); M.L. Graeme, E. Fabry, E.B. Sigg, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, **153**, 373 (1966); A. Robert, J.F. Nezamins, *Acta. Endocrinol.*, **25**, 105 (1957); C.M. Pearson, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **91**, 95 (1956).
- 6) S.J. Piliero, C. Colombo, *J. Clin. Pharmacol. Therap.*, **7**, 198 (1967); Y. Mizushima, T. Nakagawa, *Rheumatism*, **22**, 16 (1966).

1967 年に至って D'arcy らは鶏受精卵を用いる抗炎症試験法を報告したが⁷⁾ 本法が天然物を対象としたスクリーニングに応用できないかと考え、諸種条件の検討を行なった。すなわち、植物粗抽出物は成分的にもまた作用性の面からも複雑かつ多様であるため、著者らは試料の調製、用量、活性の判定法、再現性などについて種々な角度から検討を重ね、粗抽出物を用いてスクリーニングしうる知見を得るに至った。

さらにウズラ受精卵を用いて検討し、鶏受精卵の場合とほぼ同様に使用しうることを明らかにした。

実 験 の 部

実験材料 受精卵法の検討には既知の抗炎症剤 (Table I) および植物成分 (Table III) を用いた。生薬は武田薬品工業株式会社所蔵のほか市場品を供試した。薬用植物、一般植物は武田薬品京都試験農園栽培のもの、ならびに一部野生種も加え、特定の科、属にかたよることなく広範囲にわたるよう配慮し、189 科、847 属、1650 種、2200 検体について、いずれも電気乾燥 (60°) したものをを用いた。

受精卵は種鶏用白色レグホン種 (後藤ふ卵場 G203) および日本ウズラを用い産卵 1 日後に入手、供試した。

汙紙ディスクは鶏受精卵用として汙紙 (東洋汙紙 No. 51) を直径 12 mm に打ち抜いたもの、ウズラ受精卵用には抗菌作用検査用汙紙 (東洋汙紙 No. 26, 直径 6 mm) とし、いずれも精秤して用いた。

試料の調製と汙紙ディスク吸着 生薬、植物乾燥品 (細切) に 10—15 倍量の 50% MeOH を加え、室温で 16—20 hr 抽出して自然汙過後、汙液を減圧下に濃縮し、粗抽出物 (50% MeOH ext.) とした。無添加の対照区は 5% アラビアゴム溶液をディスクあたり 25 μ l 吸着 (飽和状態) させたものとし、被検区には薬物または粗抽出物が所定の用量になるようアラビアゴム溶液 (5%) に溶解または懸濁し、対照区と同様ディスクあたり 25 μ l を吸着させた。

鶏受精卵を用いる抗炎症試験法の検討 D'arcy ら⁷⁾ は対照区の肉芽形成量を指標として初期ふ卵期間、ディスク移植期間の適期を検討し、それぞれ 8 日、4 日間が適当とした。しかし鶏種、環境、方法などが異なるほか著者らは粗抽出物を試料としていることから、まず既知抗炎症剤について本試験法を諸種の角度から検討した。

1) 鶏種——白色レグホン種のほか横斑ブリマスロック、肉用鶏 (後藤ふ卵場 G606) などを用いたが、鶏種の均一性、胚の確認の難易などを考慮し、白色レグホン種 (G203) を使用することにした。

2) 操作法——D'arcy らの方法⁷⁾ に準じた。すなわち 10% (w/v) 塩化ベンザルコニウム (武田薬品製) の 100 倍稀釈液で受精卵を殺菌、消毒してふ卵器 (37 $\pm$ 1°) で、5—10 日間ふ卵 (初期ふ卵期間) し、胚の位置を中心に一辺 2 cm の正三角形に卵殻を破る。ついで卵殻膜を切除し、卵黄をさけて漿尿膜上に汙紙ディスクを挿入し、開殻した部分を密閉する。この間の操作はすべて無菌的に処理した。さらに 2—6 日間ふ卵 (ディスク移植期間) したのち開卵し、肉芽付着汙紙ディスクを取り出すとともに胚の状態などについても同時に調査した。肉芽付着汙紙ディスクは約 50° で一夜放置後、デシケーター中で乾燥した。乾燥用肉芽重量は乾燥肉芽付着汙紙ディスクから既知の汙紙ディスク重量を差し引いて算出した。

3) 初期ふ卵期間およびディスク移植期間——無添加の対照と positive control として hydrocortisone を用いた。まず、初期ふ卵期間を明らかにするため 5, 6, 8, 10 日間ふ卵したのち、それぞれに汙紙ディスクを挿入し、ディスク移植期間を一定 (4 日間) にして肉芽組織などを調査した。ついで初期ふ卵期間を一定 (8 日間) にし、ディスク移植期間を 2, 4, 6 日間にわけ、肉芽組織の調査から適期を検討した。

4) 既知抗炎症剤の肉芽形成阻害作用——受精卵法による抗炎症スクリーニングの有意性を確認するため、dexamethasone, ibufenac, flufenamic acid, mefenamic acid も用いたが、ステロイド系抗炎症剤では 0.63—63 μ g/disc, 非ステロイド系では 250—1000 μ g/disc の用量範囲で検討した。

ウズラ受精卵による抗炎症試験の検討 鶏受精卵の場合に準じた方法により、初期ふ卵期間、ディスク移植期間の適期を検討するとともに既知抗炎症剤として hydrocortisone, indomethacin を用いた。

生薬、植物粗抽出物の抗炎症スクリーニングの検討 1) 抗炎症活性判定法——無添加の対照区による肉芽組織形成量の検討を繰り返し、その平均乾燥肉芽組織重量から粗抽出物をスクリーニングするための抗炎症活性判定基準を決定した。

2) 数種の植物成分の肉芽形成阻害作用——粗抽出物のスクリーニングに際しては植物の常成分であるアミノ酸、糖、ビタミンなど 15 種を選び、試験した。

3) 生薬、植物粗抽出物の抗炎症試験——1 検体に 10 個の受精卵を用いたが、用量については原則として 800 μ g/disc とした。すなわち、既知の非ステロイド系抗炎症剤においては 500—1000 μ g/disc で作用の発現を確認していることから、粗抽出物においても本濃度の範囲を中心に検討を進めるとともに低濃度、高濃度の場合も試験を重ね、スクリーニングに適切で均一な懸濁液が得られる最適濃度として本用量を決定した。なお、毒性 (鶏胚死亡) が認められた場合には低濃度による試験も実施した。

7) P.F. D'arcy, E.M. Howard, *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 29, 378 (1967).

結果ならびに考察

生薬、植物成分の抗炎症スクリーニングへの応用

I) 鶏受精卵を用いる抗炎症試験 初期ふ卵期間が5日間の場合には胚生存率が低く、濾紙ディスク上には肉芽のほか卵黄の付着がしばしばみられ、漿尿膜の発達が十分でなかったものと推察される。6日間の場合もほぼ同様で薬物による効果発現も明確ではなかった。10日の場合は6,8日に比べ薬物による効果発現はよいが、漿尿膜の発達が過剰となって出血しやすく、また実験誤差も生じやすいことを認めた (Fig. 1)。8—9日間の場合はこれらの欠点が少なく薬物による効果発現もよいことを認めた。

ディスク移植期間については6日間の場合、肉芽形成量は幾分増加するが、薬物による肉芽形成阻害活性が低下し、試験期間も要する。2日間では対照区の肉芽形成量が少ないため正確な阻害率が算出しがたい。3—4日間の場合はこれらの欠点が少なく、適当な期間と考える (Fig. 2)。

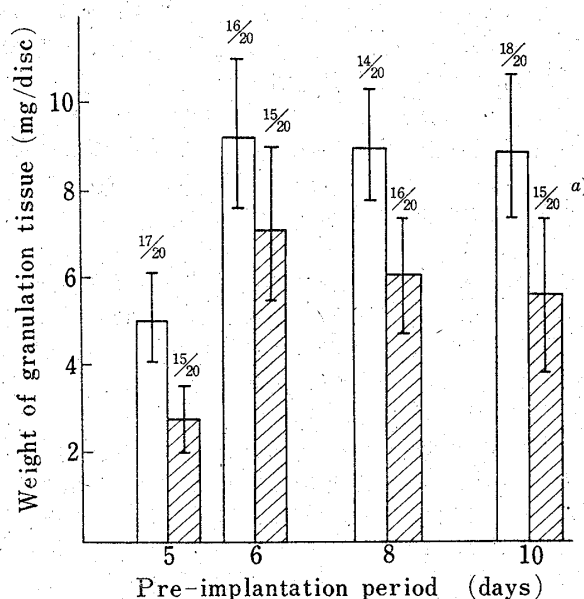


Fig. 1. Relationship between the Weight of Granulation Tissue and Pre-implantation Period

□: control
 ▨: hydrocortisone (dose: 63 µg/disc)
 a): survival ratio of embryo

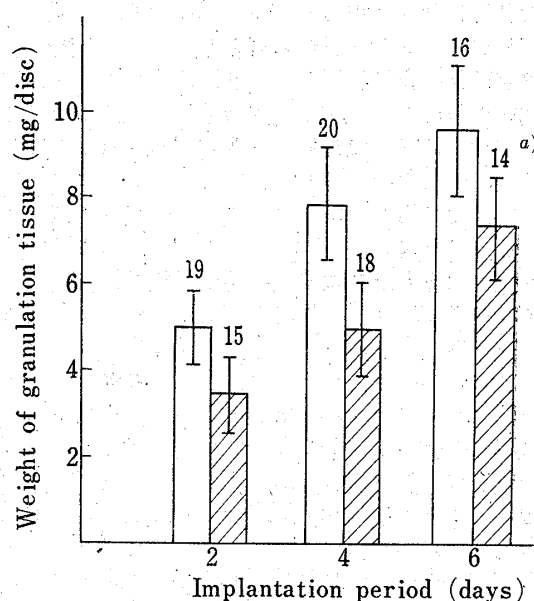


Fig. 2. Relationship between the Weight of Granulation Tissue and Implantation Period

□: control
 ▨: hydrocortisone (dose: 63 µg/disc)
 a): number of eggs used

これらの実験結果は概ね D'arcy らの結論⁷⁾を支持したが、初期ふ卵期間が8日間の場合には実験条件により卵黄が濾紙ディスクに付着する危険性があることなどから以後の実験では初期ふ卵期間を9日間、ディスク移植期間を4日間とすることにした。

ついで現在市販されている抗炎症剤を用い、本試験法の有意性について検討した結果、多くの既知抗炎症剤に作用を認め、既知抗炎症試験法^{3-5,8)}とほぼ平行する成績の得られることを確認した (Table I)。

II) ウズラ受精卵による抗炎症試験 著者らはウズラ受精卵についても鶏受精卵の場合と同様に抗炎症試験を試みた結果、初期ふ卵期間は6日、ディスク移植期間は5日間が好適であること、および hydrocortisone は 0.3 µg/disc の低用量で有意な阻害作用を認めた。なお、ウズラの場合は卵殻膜が厚く硬いため、操作中に漿尿膜を破るなどの難点があり、スクリーニングに際しては熟練を要するものと推察された (Table II)。

以上の実験結果より受精卵法の有用性が確認されたことから、本法により天然物の抗炎症スクリーニングを試みた。

8) 藤村 一, “医薬品研究法,” 朝倉書店, 東京, 1969, pp. 363—372; 水島 裕, “炎症と抗炎症剤,” 第1版, 南江堂, 東京, 1967, pp. 85—108; S.S. Adams, R. Cobb, *Nature*, **181**, 773 (1958).

TABLE I. Sensitivity of Known Anti-inflammatory Drugs by Fertile Egg Method

Drugs	Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Dry weight of granulation tissue (mg/disc)
Control		7.1 ± 1.5
Hydrocortisone	63	$4.2 \pm 1.1^{(a)}$
Prednisolone	63	$4.4 \pm 1.1^{(a)}$
Dexamethasone	6.3	$4.5 \pm 1.2^{(a)}$
Indomethacin	500	5.9 ± 1.4
	1000	$4.8 \pm 1.4^{(b)}$
Phenylbutazone	500	5.5 ± 1.2
Flufenamic acid	500	5.3 ± 1.0
Chloroquine phosphate	250	$4.3 \pm 1.5^{(a)}$
Ibuprofen	500	6.5 ± 1.4
Mefenamic acid	500	6.9 ± 1.5
Sodium salicylate	500	7.4 ± 1.7

^{a)} significant at 1% level in comparison with the control

^{b)} significant at 5% level in comparison with the control

TABLE II. Effect of Anti-inflammatory Drugs by Quail Eggs Method

Drugs	Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Dry weight of granulation tissue (mg/disc)	Survival ratio of embryo
Control		2.27 ± 0.45	17/20
Hydrocortisone	0.1	1.80 ± 0.37	14/20
	0.3	$1.68 \pm 0.26^{(a)}$	16/20
Indomethacin	100	2.20 ± 0.58	18/20
	300	2.14 ± 0.43	13/20

^{a)} significant at 5% level in comparison with the control

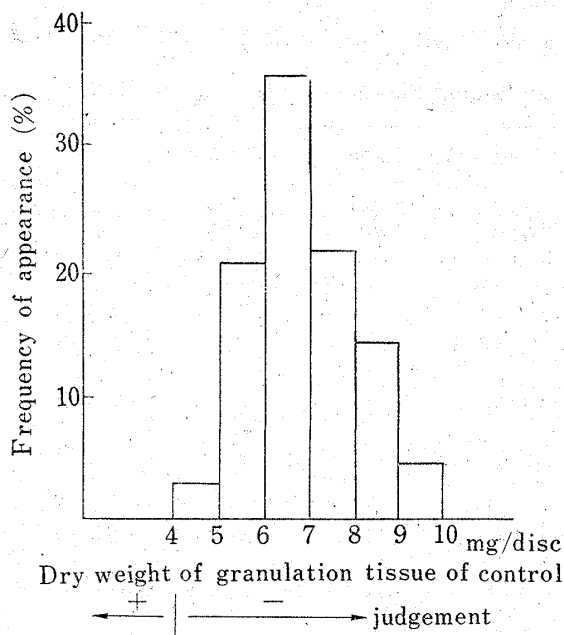


Fig. 3. Index of Judgement for Anti-inflammatory Effect in Fertile Egg Method

III) 生薬、植物粗抽出物の抗炎症スクリーニング

1) 抗炎症活性判定法——5% アラビアゴム溶液のみを添加した対照区による肉芽組織形成量の検討を 100 回繰り返えし、その平均肉芽組織重量について階級別の出現頻度をヒストグラムで示すと、肉芽重量が 6.0—6.9 mg/disc の場合は 36 回で最も多く、4.9 mg 以下は 3 回のみで極めて少なく、4.4 mg 以下を示した場合は 1 回もみられなかった (Fig. 3). したがって本実験から肉芽重量が 4.4 mg 以下の場合は抗炎症活性があるようにも考えられるが、著者らは作用が顕著であること、植物粗抽出物を対象とすることの複雑性ならびに肉芽重量のパラッキなどを考慮し、さらに本試験法の確実性を期するため肉芽重量が 4.0 mg 以下で、かつ 3 回以上作用の再現した場合を以って有効と判定することにした。

2) 数種の植物成分の抗炎症試験——粗抽出物の作用をスクリーニングするに先だち、まず植物の常成分など 15 種により検討した結果、少なくとも 500 $\mu\text{g}/\text{disc}$ では有意な肉芽形成阻害作用は認められなかった (Table III).

TABLE III. Anti-inflammatory Activity of Plant Constituents in Fertile Egg Method

Constituents	Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Dry weight of granulation tissue (mg/disc)	Survival ratio of chick embryo
Control	—	6.8 ± 1.3	27/30
D-Glucose	500	6.5 ± 1.2	28/30
Sucrose	500	6.7 ± 1.5	25/30
L-Arabinose	500	6.4 ± 1.6	29/30
Methionine	500	6.3 ± 1.2	24/30
Thiamine·HCl	500	5.9 ± 1.0	21/30
L-Ascorbic acid	500	6.4 ± 1.5	25/30
Folic acid	500	6.5 ± 1.1	25/30
Choline	500	6.8 ± 1.4	24/30
Adenine	500	7.1 ± 1.3	27/30
Adenosine	500	7.0 ± 1.5	29/30
Lecithin	500	6.2 ± 1.1	22/30
Papaverine·HCl	500	5.8 ± 1.0	23/30
Coumarin	500	6.5 ± 1.1	21/30
Benzoic acid	500	6.2 ± 1.2	25/30
Hesperidin	500	6.3 ± 1.3	29/30
Dioscin	500	7.1 ± 1.4	28/30
β -Stigmasterol	500	6.4 ± 1.5	22/30
Ecdysterone	500	6.6 ± 1.4	29/30
Geniposide	500	6.9 ± 1.4	27/30

3) スクリーニング結果——生薬、植物のうち 62 種 (68 検体) に活性を認め、ベルベリン含有植物,¹⁾ *Dryopteris* 属植物⁹⁾ などは特に強い作用のあることを明らかにした (Table IV). 本法で活性がみられた試料を種々考察すると既知成分としては多くの場合アルカロイド、ポリフェノール類が挙げられ、部位別には根や樹皮が多い。また薬効、作用面については鎮咳、鎮痛、収斂止瀉薬あるいは駆虫、抗菌作用のある植物にしばしば活性がみられた。これらの 1 部はすでに報告したが,¹⁰⁾ 詳細については別の機会に報告する。

すなわち、受精卵法は簡便、かつ cotton pellet method などの抗炎症試験^{3-5,8)} とも高い相関がみられ、また活性成分の分画にも応用しうることを、ならびに毒性の有無なども同時に判定しうることなどから天然物を取り扱

TABLE IV. Anti-inflammatory Activity of Berberine-containing Plants in Fertile Egg Method

Botanical name (Family)	Part ^{a)}	Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Granulation tissue		Chick embryo	
			Dry weight (mg)	Inhibition (%)	Wet weight (g)	Survival ratio
Control	—	—	7.1 ± 1.4	—	5.2	26/30
<i>Berberis thunbergii</i> DC. (Berberidaceae)	R	400	2.9 ± 0.5	59	5.1	21/30
<i>Mahonia japonica</i> THUNB. (Berberidaceae)	B	400	3.5 ± 0.6	51	5.0	23/30
<i>Coptis japonica</i> var. <i>dissecta</i> NAKAI (Ranunculaceae)	Rh	400	2.8 ± 0.4	61	5.3	25/30
<i>Phellodendron amurense</i> RUPR. (Rutaceae)	R	400	4.1 ± 0.9	42	5.2	27/30

a) R: root, B: bark, Rh: rhizome

9) 大塚紘司, 津久井誠, 今井俊司, 松岡敏郎, 藤村 一, 平松保造, 武田研報, **30**, 225 (1971).

10) 大塚紘司, 津久井誠, 豊里友良, 藤岡章二, 松岡敏郎, 藤村 一, 武田研報, **31**, 238 (1972).

う抗炎症スクリーニング法の一つとして適するものと考え

結 論

- 1) 天然物を対象とした抗炎症スクリーニングにあたり、D'arcy らの鶏受精卵による抗炎症試験法について検討し、ほぼ満足すべき結論を得た。
- 2) 本試験法の応用により、植物粗抽出物においてもスクリーニングしうる知見を得た。
- 3) 生薬のほか広く一般植物の粗抽出物について本法による抗炎症スクリーニングを実施し、黄連のほか数種の生薬、植物に活性を見出した。

謝辞 本研究に発表の機会を与えられた武田薬品工業株式会社中央研究所長 立岡末雄博士に深謝致します。