

肉芽腫囊法(“Granuloma pouch” technic)을 이용한 Steroid 化合物의 消炎作用 比較

가톨릭大學 醫學部 藥理學敎室

(指導 魯 炳 林 副敎授)

李 相 護

=Abstract=

A Comparative Study of Anti-inflammatory Activities of the Steroid Compounds Utilizing the “Granuloma Pouch” Technic

Sang-Bok Lee

Department of Pharmacology, Catholic Medical College

(Director: Assoc. Prof. Byung-Lim Roh)

There are several methods used for screening and evaluating anti-inflammatory agents. Among these, “Granuloma pouch” technic introduced by Hans Selye is considered as a simple and reliable method. The procedure of “Granuloma pouch” technic is as follows: Rats were used as experimental animals. An air pocket was produced in the subcutaneous tissue of the mid-dorsal portion between the shoulders by the injection of 25ml of the air which was immediately followed by injection of 1 ml of 1% croton oil as irritant. Inflammatory exudate accumulated in the pouch during the succeeding 14 days. After sacrificing the rats on the last day of the experiment, the amount of the exudate in the pouch and the weight of the granuloma tissue was measured.

The author observed and compared the anti-inflammatory activities of the several steroid compounds when they are given by different methods.

1. In the control rats, the amount of inflammatory fluid and the weight of the granuloma tissue after 14 days were 9ml and 3gm respectively.
2. Injection of hydrocortisone 1.5mg subcutaneously, 24 hours prior to pouch formation into the area where the pouch is to be formed, successfully prevented the inflammatory processes.
3. Injection of hydrocortisone 1.5mg in the air pocket formed 24 hours prior to croton oil injection was ineffective.
4. Injection of hydrocortisone into the pouch at a distance of 5mm apart from the pouch formation did not prevent the development of inflammation.
5. Anti-inflammatory activities of hydrocortisone administered systematically (injected intramuscularly into the area which is not related to the area of pouch formation) for 10 days were proportional to the doses of hydrocortisone administered.
6. DOCA, testosterone, and progesterone did not show the anti-inflammatory activity.

緒 論

消炎性藥物の消炎作用에 對한 效果를 評價할 目的으로 使用되는 方法에는 여러가지가 있다. 肉芽腫囊法 "Granuloma pouch"technic⁽⁵⁾ 或은 綿球移植(implanted cotten pellet)에 對한 反應等이 있으며 이러한 實驗方法들은 보다 새로운 消炎劑의 發展뿐 아니라 炎症 自體의 研究에도 奇與하여 왔다. 그 中 Hans Seyle 에 依한 肉芽腫囊法은 簡便하고 信賴할 수 있는 方法이라 하겠다. 이 方法은 炎症과 創傷治癒를 調節하는 要因을 分析하기 위하여 考察되던 것이다. Hans Seyle 는 이 方法을 利用하여 數種의 副腎皮質호르몬의 消炎效果를 觀察하였다. (1953)⁽⁵⁾ 著者는 肉芽腫囊法으로서 藥物의 投與方法을 달리할 때의 消炎 效果를 比較 觀察하였다.

實驗材料 및 實驗方法

使用한 動物은 體重 110~180gm의 雌性白鼠이고 比較 觀察한 steroid 化合物은 hydrocortisone acetate (Allied pharmaceu. Co.), prednisolone (Allied pharmaceu. Co.) DOCA (Descort, Tutcur chemical Inc.), progesterone (Valliant pharmaceu. Co.) 및 testosterone (Mac-Mirror Italiane pharmaceu. Co.)이다.

白鼠를 Ether 麻醉下에 27guage의 注射針을 通하여 空氣 25ml를 肩胛間部 皮下에 注入하여 空氣囊을 만들고 이어서 注射針을 挿入한대로 두고 다시 그 注射針을 通하여 1% croton 油 1ml을 注入하였다. 注入한 croton 油는 Magnus, Marbee & Reyard 製이며 落花生油로 稀釋하여 1%가 되도록 한 것이다. Croton 油를 注射한 다음 14日 經過後 이 操作으로 因하여 空氣囊에 生진 囊內에 滲出한 滲出液量, 囊壁의 重量, 그리고 囊壁의 組織學的所見을 觀察하였으며 上記 藥物들의 投與가 이와 같이 하여 形成되는 肉芽腫囊에 미치는 影響을 比較 觀察하였다.

實驗成績

其 1. 肉芽腫囊法에 對한 基礎的 實驗

于先 steroid 化合物의 投與方法과 投與部位에 依한 消炎作用의 差異를 觀察하고자 白鼠 各 5首를 1群으로 하고 對照群을 合하여 4群으로 나누어 觀察하였다.

第 1 群은 對照群으로 空氣囊을 만드려 여기에 croton 油를 注入한 것이다.

第 2 群은 空氣囊을 作成하기 前에 미리 hydrocortisone 1.5mg을 食鹽水에 稀釋하여 0.15ml 容量에 包含되도록하여 白鼠의 背面皮下에 注射하였다. 24時間後 同

一部位에 空氣囊을 만들고 여기에 croton 油를 注入한 것이다.

第 3 群은 空氣囊을 만들고 이 囊內에 hydrocortisone 1.5mg(0.15ml)를 注入한 다음 24時間後에 이 囊內에 1% croton 油 1ml를 注入하였다.

第 4 群은 第 2 群과 같은 方法으로 하되 hydrocortisone을 囊에서 5mm 떨어진 部位에 注射한 것이다. 空氣囊內에 croton 油를 注射한 後 2~4日까지는 hydrocortisone 處置群과 對照群의 皮下 空氣囊은 서로 類似한 모양을 하고 있었다. 그러나 6~7日부터는 對照群에서는 空氣囊內의 滲出液이 外部로부터 認知되고 空氣囊의 壁이 肥厚되기 시작하였다. 10日頃에 이르러 多量의 液體가 되어 있었으나 第 2 群은 이 壁이 그대로 얇은 채로 있었다. 漸次로 空氣囊內의 空氣가 吸收됨에 따라 囊이 萎縮되기 시작하여 14日에는 뚜렷한 差異를 볼 수 있었다(Fig. 1).

다음 囊內에 된인 液體를 보면 赤褐色 血性 滲出液으로 對照群에서는 그 量은 7 ± 1.12 ml이고 囊壁의 重量은 이것을 蒸溜水로 씻은 다음 秤量한 結果 2.9 ± 0.49 gm이었다. hydrocortisone을 前處置한 第 2 群에서는 거의 滲出液이 없었고 注射한 1ml 程度의 油를 볼 수 있었을 뿐이었으며 囊壁도 囊을 剝離할 수 없을 程度로 얇게 되어 있었다. 그러나 空氣囊에 hydrocortisone을 直接 注入한 第 3 群과 5mm 떨어진 部位에 注射한 第 4 群은 그 效果를 전혀 보지 못하고 滲出液의 量이나 囊壁이 對照群과 거의 같이 되어 있었다(Table. 1).

(Table 1) Comparison of anti-inflammatory activities of hydrocortisone by different methods of administration.

No. of rats treated	Controls	Hydrocortisone (in the wall)
Initial body weight (gm)	141±11.3	124.6±9.58
Final body weight (gm)	161±9.2	131.3±14.45
Fluid in pouch wall (ml)	7±1.12	—
Weight of pouch wall (gm)	2.9±0.49	0.75±0.55

No. of rats treated	Hydrocortisone (in air space)	Hydrocortisone (at a distance)
Initial body weight (gm)	135.8±19.45	137.2±13.3
Final body weight (gm)	152.8±8.64	144.4±13.7
Fluid in pouch wall (ml)	6.5±3.12	6.5±1.8
Weight of pouch wall (gm)	3.3±0.98	3.1±0.75

其 2. Hydrocortisone, prednisolone, DOCA, progesterone 과 testosterone 의 消炎作用 比較

白鼠 6首를 1群으로 하고 對照群을 合하여 6群에서

比較 觀察하였다. 이 實驗에서의 steroid 化合物의 投與量은 hydrocortisone 1.5mg, prednisolone 1.5mg, DOCA 1.0mg, progesterone 5mg, testosterone 10mg 이었다. 投與量은 saline 이나 落花生油로 稀釋하여 0.15ml 에 含有되도록 하였다. 本實驗에서 hydrocortisone 과 prednisolone 各 1.5mg 投與로 囊內에는 滲出液이 거의 없었고 囊壁의 重量은 各各 0.75±0.62gm, 0.86±0.24 gm 으로 對照群과 뚜렷한 差異를 보였다. DOCA 1mg 投與에서는 滲出液量은 9.1±2.86ml 이었고 囊壁의 重量은 3.5±0.721gm 으로 對照群과 有意義한 差가 없었다.

progesterone 과 testosterone 은 各各 5mg 과 10mg 을 投與하였는데 이와같은 大量으로서도 滲出液量은 6.9±3.72ml, 6.2±2.06ml 로 對照群에 比하여 若干의 減少를 招來하였을뿐 有意義한 差는 아니었다(Table 2).

(Table 2) Comparison of the effects of hydrocortisone, prednisolone, DOCA, progesterone and testosterone (2nd experiment)

No. of rats treated	Control	Hydrocortisone
Initial body weight(gm)	156.6±23.9	131.7±15.4
Final body weight(gm)	176.3±24.7	134.0±17.7
Fluid in pouch(ml)	9.0±2.82	—
Weight of pouch wall(gm)	3.0±0.30	0.75±0.62

No. of rats treated	Prednisolone	DOCA
Initial body Weight(gm)	140.3±10.5	135.3±19.4
Final body weight(gm)	142.5±18.0	155.1±14.1
Fluid in pouch(ml)	—	9.1±2.82
Weight of pouch wall(gm)	0.86±0.24	3.5±0.92

No. of rats treated	Progesterone	Testosterone
Initial body weight(gm)	148.5±26.9	143.8±2.86
Final body weight(gm)	151.6±26.8	151.0±34.4
Fluid in pouch(ml)	6.9±3.72	6.2±2.06
Weight of pouch wall(gm)	2.8±0.75	2.6±0.57

(Table 4) Anti-inflammatory activity of hydrocortisone administered systemically (I.M.)

Doses of hydrocortisone	0.5mg/100gm				1mg/100gm				1.5mg/100gm			
	1	2	3	Avg.	1	2	3	Avg.	1	2	3	Avg.
No. of rats treated												
Fluid in pouch (ml)	2.0	2.5	1.5	2.0	0.4	0.5	0	0.4	0	0	0	0
Weight of pouch wall (gm)	1.0	2.0	1.0	1.3	1.5	1.5	0.6	1.0	1.0	0.5	1.0	0.8

서는 滲出液은 平均 2ml, 肉芽性組織의 重量은 1.3gm, 1.0mg/100gm 에서는 0.4ml, 1.0gm, 그리고 1.5mg/

其 3. Hydrocortisone 投與經路 및 投與量의 變動에 따른 作用 比較

白鼠에 있어서 hydrocortisone 을 囊을 作成할 局所에 直接 皮下注射하였을때 또는 筋肉內에 注射하였을때 hydrocortisone 의 投與量의 變動에 따른 消炎作用을 比較하여 보았다. hydrocortisone 을 局所의 囊을 만들 同一 部位에 皮下로 미리 注射한 다음 위에서와 같은 方法으로 空氣囊을 만들고 거기에 croton 油를 注射하였다. 이때 投與한 hydrocortisone 量은 1mg 과 1.5 mg 으로서 白鼠 5 首씩 2 群이다. 筋肉注射에 의한 全身의 投與群에서는 hydrocortisone 을 0.5mg/100gm, 1.0 mg/100gm 과 1.5mg/100gm 으로 每日 一回씩 10 日間 大腿筋에 注射하였으며 1 群은 3 首씩으로 하였다. 이때 Table 3에서 보는 바와 같이 hydrocortisone 의 1mg 의 局所投與에서는 뚜렷한 效果를 나타내지 않았고 1.5mg 投與에서는 強한 消炎作用을 나타내었다. 即 滲出液은 거의 滲出되지 않았고 囊壁의 重量은 平均 0.86gm 이었다. 한편 筋肉注射 投與群에서는 投與量에 比例하여 消炎作用을 볼 수 있었다(Table 4). 即 0.5mg/100mg 에

(Table 3) Comparison of anti-inflammatory activities of hydrocortisone and prednisolone with various doses administered topically.

	Control	Hydrocortisone (1.0mg)	Prednisolone (1.0mg)
Fluid in pouch (ml)	8±1.8	3.5±0.4	3.2±1.2
Weight of granuloma tissue (gm)	2.6±0.53	1.9±0.5	1.8±0.5

	control	Hydrocortisone (1.5mg)	Prednisolone (1.5mg)
Fluid in pouch (ml)	9.0±2.82	—	—
Weight of Granuloma tissue (gm)	3.0±0.30	0.75±0.65	0.86±0.24

— : No exudation was detected mostly.

100mg 投與群에서는 滲出液은 없었고 肉芽組織의 重量은 0.8gm 이었다.

考 案

消炎作用을 評價하기 위한 方法에는 綿球移植法 또는 白鼠 足趾皮下에 刺戟劑를 注射하여 浮腫을 일으키고 크기를 測定하는 方法⁽¹¹⁾ 또는 肉芽腫 囊法⁽⁵⁾ 등이 있다. 本實驗에서는 後者를 擇하였으며 刺戟劑로는 croton 油를 使用했는데 이 物質은 難水溶性이므로 吸收되지 않고 注射部位에 局所의으로 머물러 全身의인 影響이 없다는 點, 無菌的 炎症을 일으킬수 있으며, 落花生油로 稀釋함으로써 croton 油의 濃度를 調節하여 炎症의 程度를 調節할 수 있다는 등의 有利한 點이 있으므로⁽³⁾ croton 油를 刺戟劑로 利用한 것이다. croton 油를 注射하면 約 2日後에 granulomatous membrane을 形成하기 시작하였으며 3~4日後부터는 外部로부터 滲出液을 認知할 수 있었고 14日째 白鼠를 죽인 다음 肉芽性囊內에 蓄積된 液體를 觀察하면 赤褐色血性 滲出液으로 그 量은 約 7ml 이었고 肉芽性組織의 重量은 約 3gm 이었다.

消炎作用의 機轉에 對하여 아직까지 定說은 없으나 Osphal (1949)⁽¹⁰⁾은 組織의 透過性이 높아진 狀態에서 cortisone, ACTH를 投與함으로써 antihyaluronidase의 活性을 亢進시켜 透過性을 抑制한다고 하였다. Menkin (1955)⁽¹¹⁾은 hydrocortisone이 損傷받은 細胞에서 炎症의 化學的 因子를 生産하는 能力을 減少시킴으로써 hydrocortisone이 leukotaxine의 活性과 leukocytosis-promoting-factor의 生産을 抑制시킨다고 하였다.

Adrenocortical steroid의 抽出에 關한 研究가 시작된 以來 Kendal⁽⁷⁾은 cortisone을 처음 結晶으로 分離하였고 現在 30餘種의 副腎皮質 steroid가 알려졌으며 그중 有效成分으로는 compound A.B.E. (cortisone), F(hydrocortisone) 그리고 aldosterone이 있다⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾. 이中 glucocorticoid에 屬하는것은 cortisone, hydrocortisone, corticosterone 등이다. steroid核의 17 position에 Hydroxyl基가 없는 corticosterone은 消炎作用이 없다.⁽²⁾ 또 17 position은 消炎作用有無에 重要한 位置인 것으로 알려져 있다.⁽²⁾

本實驗의 hydrocortisone(囊壁에 注射) 處置群에서는 刺戟劑로 注射한 1ml 程度의 油性 液體를 認知하였을뿐 滲出液은 全然 볼 수 없는 狀態였고 肉芽性組織의 重量도 뚜렷한 差異를 나타내었다. 이것은 hydrocortisone이 뚜렷한 消炎作用을 가지고 있음을 意味한다. hematoxylin-eosin 染色의 組織標本에서도 對照群에선 壁이 肥厚되었고 結締組織의 纖維母細胞와 纖維가 顯著히 發達되었으며 毛細血管이 擴張되었고 多數의 空胞(油의 浸透로 因한)가 散在하여 있었다. hydrocortisone 處置群에서는 囊壁이 얇고 結締組織이 萎縮되었으며 空胞도

없었다(Fig. 3).

hydrocortisone은 生體內에 存在하는 steroid 中가 強 強한 消炎性 steroid로서 本實驗에서는 小量 1.5mg의 局所處置로 뚜렷한 消炎作用을 나타내었다.

hydrocortisone은 注射部位로부터 容易하게 吸收되지 않으므로 特히 局所處置에 價値가 있으며 더욱이 hydrocortisone의 全身의 副作用을 度外視하고 局所에서의 目的을 達成할 수 있어 그 局所의 應用이 有效하다는 것을 意味한다.⁽⁷⁾ 實驗 3의 結果를 보면 hydrocortisone, prednisolone 各 1ml의 局所處置에서 prednisolone의 消炎作用은 hydrocortisone과 比等한 結果를 나타내었는데 이것은 prednisolone보다 hydrocortisone이 吸收가 느리고 局所에 長期間 머물러 있는데 原因이 있지 않거나 思料된다. mineralocorticoid에 屬하는 aldosterone과 DOCA는 主로 無機物代謝와 水分平衡에 關係한다는 것은 周知의 事實이다. DOCA는 消炎作用이 전혀 없으며 aldosterone도 거의 없는 것으로 알려져 있다.⁽⁸⁾ 本實驗에서도 DOCA는 囊內의 滲出液量이 平均 9.1ml이고 囊壁의 重量은 3.5mg으로 對照群에 比하여 差異가 없었다. 肉芽性組織에서 纖維母細胞가 顯著히 發達되었으며 囊壁은 甚히 肥厚되어 있었고 油로 因한 空胞가 많았다. 性激素中 progesterone과 testosterone 各 5mg, 10mg씩의 大量 投與로서 囊內의 滲出液이 減少되었으나 對照에 比하여 有意義한 差는 없었다.

結 論

著者는 肉芽腫囊法("Granuloma pouch" technic)에 依하여 各種 steroid化合物의 消炎作用을 比較 觀察하고 肉芽性組織의 組織學的 檢索을 實施하였다. 實驗結果를 綜合하면 아래와 같다.

1. 對照群에서는 空氣囊을 作成한 다음 14日 經過後의 觀察에서 肉芽腫囊內에는 炎症性 滲出液이 蓄積되었고 肉芽性組織이 形成되었다. 囊內에 도인 赤褐色 血性 滲出液의 量은 平均 9ml이고 肉芽性組織의 平均 重量은 3gm 이었다.
2. Hydrocortisone 1.5mg을 空氣囊을 形成할 部位에 24時間前에 미리 皮下注射한 白鼠에서는 炎症의 進行이 完全히 抑制되었다.
3. Croton 油를 注入하기 24時間前에 미리 空氣囊을 作成하고 이 囊內에 注入한 hydrocortisone 1.5mg은 消炎作用을 나타내지 못했다.
4. Hydrocortisone 1.5mg을 空氣囊을 形成시킬 部位에서 5mm 떨어진 곳에 皮下注射하였을 때에도 亦是 消炎作用을 나타내지 못하였다.
5. Hydrocortisone을 囊에서 떠러진 筋肉內에 每日 1

回색 10日間注射하였을 경우에는 그 消炎作用의 程度는 그 投與量의 多少에 比例하였다. 即 0.5mg/100gm 投與群에서는 若干의 消炎作用을, 1.0mg/100gm 投與群에서는 보다 강한 作用을 그리고 1.5mg/100gm 群에서는 完全한 消炎作用을 나타내었다.

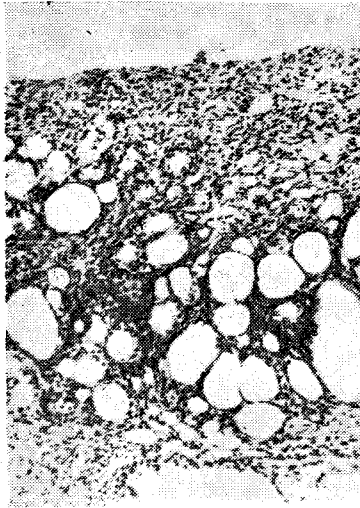
6. DOCA(1mg), testosterone(10mg), progesterone(5mg)은 有意義한 消炎作用을 나타내지 않았다.

References

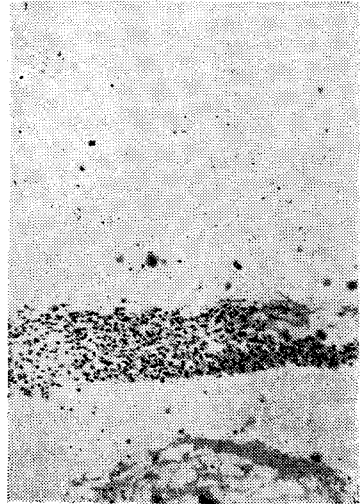
1. Leonard J.Lerner, Albert Bianchi, A. Robert Turkheimer : 1964, Anti-inflammatory steroids : potency, duration & modification of activities, Ann. N.Y. Acad. Sci. **116** : 1071
2. David L. Berniler : 1964, Biotransformation of corticosteroids as related to inflammation, Ann. N.Y. Acad. **116** : 1078
3. J.C. Houck. 1964, Chemistry of inflammation, Ann. N.Y. Acad. Sci. **105** : 765~812
4. Guyton : 1956 Textbook of Medical Physiology, W.B. Saunders Company Philadelphia, p.132
5. Hans Seyle : 1953, Use of "Granuloma pouch" technic the study of Antiphlogistic corticoids, Proc. Soc. Exp. Bio. & Med. **82** : 328~333
6. Hans Seyle : 1955, On the mechanism through which Hydrocortisone affects the resistance of tissues to injury, J. A.M.A. **152** : 1207
7. John C. Krantz, Jr. and C. Jelleff Carr : 1961, The Pharmacologic Principles of Medical Practice, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, p.1281
8. Ruch & Fulton : 1961, Medical Physiology and Biophysics, 8th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, p.1092
9. Fieser & Fieser : Steroid, Wiley Company, p.312
10. G.S. Oh : 1964, Pharmacology, Dong Myung Sa, Seoul, p.411
11. Charles A. Winter, Edwin A. Ristley and George W. Nuss : 1962, Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs, Proc. Soc. Exp. Bio. & Med. **111** : 554~547



(Fig. 1) The external views of a control rat (left) and a hydrocortisone treated rat (right) on the 14th day after croton oil injection.



A. Control.



B. Hydrocortisone 1.5mg injected.

(Fig. 2) Microscopic appearances of "granuloma pouch" walls obtained from control rat and from the rats pretreated with hydrocortisone, subcutaneously in the area where the pouch is to be formed 24 hours prior to pouch formation. The tissues were dissected from the wall of granuloma pouch attached to the skin.
(H.E. stain, $\times 100$)