

博士論文

アルギン酸ナトリウムの下部消化器疾患に対する効果  
に関する動物モデルを用いた薬理学的研究

平成 27 年 3 月

山本 篤毅

## 【目次】

序論	1
第1章 インドメタシン誘発消化管傷害モデルに対するアルギン酸ナトリウムの効果の検討	
緒言	3
実験材料ならびに実験方法	5
実験成績	11
考察	23
第2章 炎症性腸疾患モデルに対するアルギン酸ナトリウムの効果の検討	
緒言	26
実験材料ならびに実験方法	28
実験成績	32
考察	42
第3章 メトレキサート誘発消化管粘膜傷害モデルに対するアルギン酸ナトリウムの効果の検討	
緒言	44
実験材料ならびに実験方法	45
実験成績	47
考察	54
総括	56
参考文献	57
謝辞	68

## 序論

アルギン酸ナトリウム (AL-Na) は海藻類から抽出される高分子の多糖類であり [1, 2]、食品製造、医薬品、歯科材料として用いられてきた [3, 4]。この AL-Na は胃・十二指腸潰瘍、糜爛性潰瘍および逆流性食道炎に対する治療薬アルロイドG の有効成分として知られる。AL-Na は直鎖構造をしており、 $\beta$ -D- マンヌロン酸および  $\alpha$ -L- グルロン酸を含む非イオン性のヘテロ多糖類である。AL-Na のユニークな特徴として、酸性下や Ca、Sr、および Ba などの二価イオンや Fe (III) および Al などの三価イオンの存在によってゲルを形成することが知られている [5]。このアルギン酸ゲルは粘膜被覆、止血作用、創傷治癒などの様々な活性を示す。AL-Na が胃内に存在すると、胃酸環境においてゲルを形成する。ゲル化した AL-Na は、胃粘膜を被覆して酸やペプシンなどの攻撃因子から、胃粘膜を防御する [6]。また、アルギン酸は天然の止血材である。AL-Na はフィブリノーゲンを凝集させ、フィブリンポリマーを増加させることによって、止血作用を示すことが報告されている [7]。さらに、AL-Na は血小板凝集促進作用を有することも報告されている [8]。この粘膜被覆作用と止血作用によって、AL-Na は胃潰瘍などの胃粘膜疾患の治療薬として有用である。

加えて、非糜爛性胃食道逆流症 (NERD) にも効果があるという報告がなされている [9]。制酸剤は一時的に胃酸を中和するのに対して、アルギン酸は消化管内において浮遊性のバリアとなり、胃内容物と食道粘膜の接触を最小限にとどめることが可能となる [10]。AL-Na と制酸剤の共投与は胃食道逆流症 (GERD) 患者における逆流性症状を緩和させる [11]。Tytgat および Nio は、GERD におけるAL-Na と制酸剤の共投与は、制酸剤単独投与と比較して治療効果が優れており、特に重度の GERD 患者においても効果があったと報告している [12]。

創傷治癒においてもアルギン酸は有用である [13, 14]。アルギン酸ゲルは創傷した皮膚において、コラーゲン合成を促進させ、創傷治癒過程における細胞増殖に貢献する [15]。アルギン酸のドレッシングは、その止血効果により創傷における出血を改善する [16]。以上より、アルギン酸により形成されたゲルは、外傷を伴うことなくドレッシングを除去できるという利点もあり、AL-Na が創傷治癒に有用であることが報告されている [17]。

これらの背景から、酸性環境下である上部消化管においては、AL-Na はゲルを形成して粘

膜被覆を行い止血作用と創傷治癒作用を発揮するため、種々の粘膜病変の治療薬として有用である。しかし、ゲル化していない AL-Na の作用については未だ不明である。Humphreys らは AL-Na は消化管に入ってもほとんど吸収されず糞便に排泄されることを報告している [18]。このことから、AL-Na は上部消化管を通過した後、下部消化管においても作用を発揮している可能性が考えられる。筆者らは胃酸の影響の少ない下部消化管における AL-Na の作用について検討することにより、ゲル化していない AL-Na の薬理学的作用について評価した。

## 第1章 インドメタシン誘発消化管傷害に対するアルギン酸ナトリウムの効果の検討

### 【緒言】

解熱鎮痛薬として繁用されている non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) は副作用として胃傷害をもたらすことが知られている。胃傷害のみならず、NSAIDs は小腸傷害をも惹起させる。長期間 NSAIDs を服用している患者では小腸において粘膜傷害、出血、糜爛および潰瘍が起きることが報告されている [19-22]。ラットにおいても、最も一般的な NSAIDs であるインドメタシンを投与することにより、胃腸傷害が誘発されることが知られており [23, 24]、これらは腸内細菌の浸潤 [25]、好中球活性化 [26]、酸化ストレス [27] およびムチン減少 [28] が要因と考えられている。

プロトンポンプ阻害薬 (PPI) は NSAIDs 誘発胃傷害の有効な治療薬である[29]。しかし、PPI は胃酸抑制作用を示すため胃潰瘍には著効するが、小腸傷害は胃酸の影響を受けないため、NSAIDs 誘発小腸傷害にはあまり影響がない [30, 31]。それどころか、PPI は胃酸を減少させることにより腸内細菌数が亢進するディスバイオーシス反応により NSAIDs 誘発小腸傷害を悪化させるという報告もある [32]。そのため、NSAIDs による胃傷害および小腸傷害どちらにも有効な治療薬が求められている。粘膜防御薬の1つであるレバミピドは NSAIDs 誘発小腸傷害に対して有効であることが報告されているが効果が不十分なケースもあるため [33, 34]、さらなる治療薬の開発が望まれている。

アルギン酸ナトリウム (AL-Na) は消化管を覆うことにより粘膜保護作用を示すため、胃や食道における潰瘍や出血性疾患に対して非常に有効である [6, 35-37]。近年、AL-Na が非糜爛性胃食道逆流症 (NERD) にも効果があるという報告がなされており [9]、AL-Na は食道および胃などの上部消化管傷害に有効であることが考えられる。Humphreys らは AL-Na は消化管に入ってもほとんど吸収されず糞便に排泄されることを報告している [18]。そのため、AL-Na は上部のみならず下部消化管においても有効作用を発揮することが予測される。

本研究では、NSAIDs の1つであるインドメタシンを用いて小腸傷害モデルを作製した。次いで、AL-Na の小腸傷害への有用性を明らかにすることを目的として、ラットを用いた NSAIDs 誘

発小腸傷害モデルに対する AL-Na の効果を検討した。

## 【実験材料ならびに実験方法】

### 1. 実験動物

実験には、雄性 Sprague-Dawley 系ラット (6 週齢、160-200 g、日本エスエルシー、静岡) を使用した。動物は、室温  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 15\%$  の動物飼育室で、明暗サイクル (照明時間: 7:00-19:00) を一定に保ち、金網ケージの中で飼育した。ラットには実験以外の飼育期間中、飼料および飲料水を自由に摂取させた。動物実験は「堺化学工業(株) 動物実験規則」および「堺化学工業(株) 動物実験委員会要項」に基づいて計画しており、同委員会により承認を受けて実施した。

### 2. 使用薬物

実験に使用した薬物および試薬は、アルギン酸ナトリウム (AL-Na; 共成製薬、北海道)、低分子アルギン酸ナトリウム (カイゲン、大阪)、レバミピド (ムコスタ®; 大塚製薬、徳島)、およびインドメタシン (和光純薬工業、大阪) である。AL-Na、低分子 AL-Na、インドメタシンは蒸留水に溶解して使用した。レバミピドは 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC; 和光純薬工業) 溶液に懸濁して使用した。なお、今回用いた薬物の化学構造式を Fig. 1 に示した。

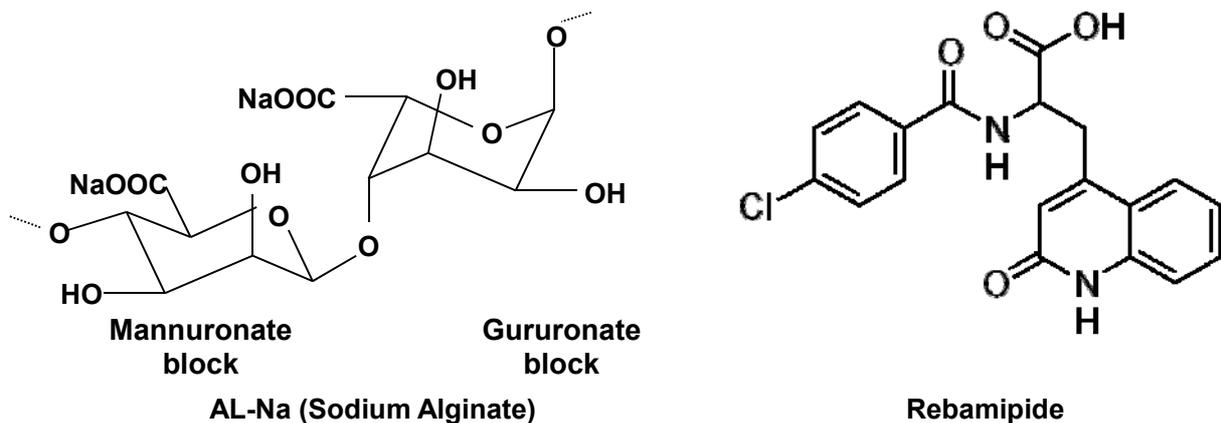


Fig.1 Chemical structures of drugs used in this chapter

### 3. 胃潰瘍モデルの作製

胃潰瘍モデル作製は以下の方法に従って行った。即ち、ラットを絶食下で 18 時間隔離飼育した。インドメタシンを 0.5% CMC 溶液に懸濁し、2.5 mg/mL となるように調製した。その後、ラット用経口ゾンデを使用して 10 mL/kg 経口投与した。なお、対照群には 0.5% CMC 溶液を同様に投

与した。インドメタシン投与 6 時間後エーテルによりラットを到死させ、開腹し胃組織を摘出した。2% ホルマリン溶液をシリンジにて 10 mL 注入し、10 分間浸透させて壁組織を固定した。その後、大湾に沿って切り開き、出血性病変を画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health) にて解析し、面積を測定した。なお、モデル作製プロトコールを Fig. 2 に示した。

#### 4. 小腸傷害モデルの作製

小腸傷害モデル作製は以下の方法に従って行った。即ち、ラットを非絶食下で 18 時間隔離飼育した。インドメタシンを 0.5% CMC 溶液に懸濁し、1 mg/mL となるように調製した。その後、ラット用経口ゾンデを使用して 10 mL/kg 経口投与した。なお、対照群には 0.5% CMC 溶液を同様に投与した。インドメタシン投与 24 時間後エーテルによりラットを到死させた。屠殺 30 分前にエバンスブルー (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) を 1 mL 尾静脈より注射シリンジにて投与した。

開腹し小腸組織を摘出した。その後、腸間膜付着部位に沿って切り開き、青変部位を画像解析ソフト Image J にて解析し、面積を測定した。血液サンプルはエバンスブルー投与前にキャピラリーチューブを用いて眼窩より 0.1 mL 採取し、自動血球計数測定装置 (KX-21NV; シスメックス、神戸) により血球数を測定した。なお、モデル作製プロトコールを Fig. 2 に示した。

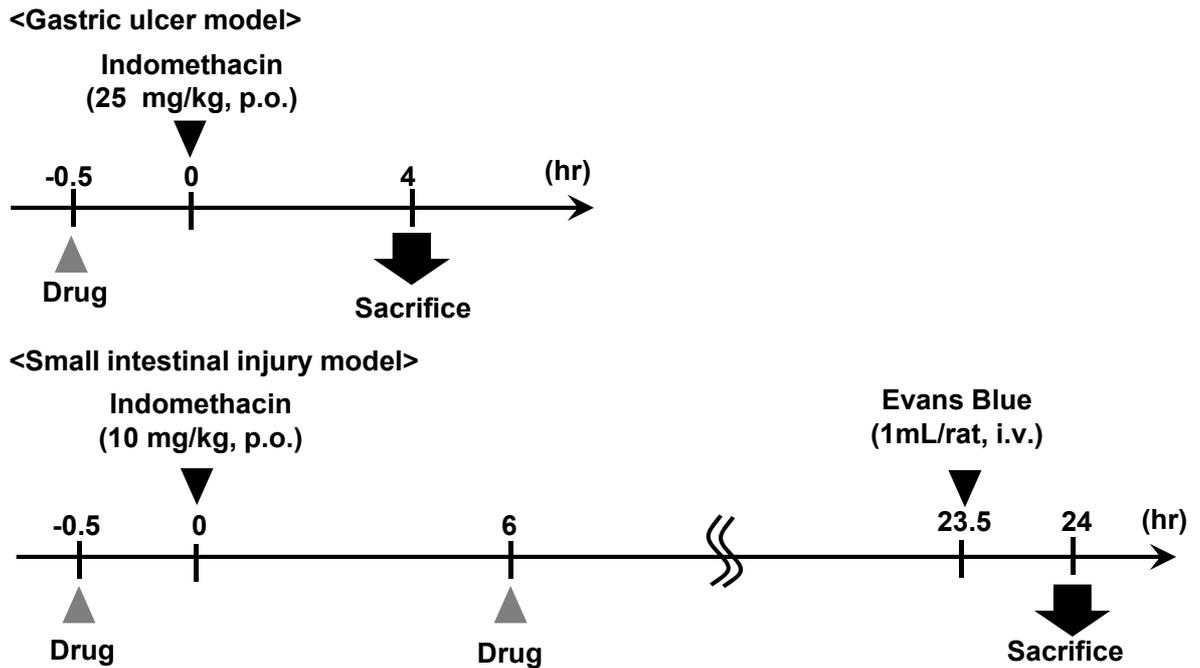


Fig.2 Scheme of animal models used in this chapter

## 5. 被検薬投与

被検薬は体重当たり 5 mL/kg となるように調製した。AL-Na (250 and 500 mg/kg)、低分子 AL-Na (500 mg/kg)、レバミピド (100 mg/kg)、および CMC-Na (250 mg/kg) はインドメタシン投与の 30 分前および 6 時間後にラット用経口ゾンデを使用してそれぞれ経口投与した。なお、対照群には蒸留水を同様に投与した。

## 6. ミエロペルオキシダーゼ活性の測定

採取した胃および小腸組織からミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を測定した。エーテルによりラットを到死させ、胃および小腸組織を採取した。生理食塩液にてリンスした後、粘膜層をスパーテルを用いてかき集め、重量測定後に pH 6.0 に調整した 0.5% ヘキサデシルトリメチル臭化アンモニア (Sigma) 含有 50 mmol/L リン酸緩衝液とともにキュベットに入れ、ホモジナイズした。その後、凍結解凍を 2 度繰り返し、4°C、20 min、8,000 × g で遠心分離した。上清を MPO 蛍光検出キット (Assay Designs, NY, USA) にて測定した。蛍光強度の差をプレートリーダー (ARVOsx; Wallac, MA, USA) を用いて励起 545 nm、発光 590 nm で測定した。

## 7. 血管透過性の測定

採取した回腸組織からエバンスブルーの血管透過性を測定した。回腸組織を 1N KOH (0.7 mL) に 37°C で 24 時間浸漬した。アセトン-リン酸混液を加えて振盪し、組織を濾過してサンプルを調製した。漏出色素量を分光光度計 (V-560; 日本分光、東京) を用いて 620 nm で 30 分間測定した。

## 8. スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼおよびカタラーゼ活性の測定

採取した回腸組織から抗酸化活性を測定した。回腸組織を生理食塩液にてリンスした後、粘膜層をスパーテルを用いてかき集め、重量測定後に pH 7.4 に調整した 5 mmol/L Tris-HCl 緩衝液、5 mmol/L EDTA および 1 mmol/L 2-メルカプトエタノール含有 50 mmol/L リン酸緩衝液とともにキュベットに入れ、ホモジナイズした。4°C、20 min、15,000 × g で遠心分離し、上清の SOD 含有量をスーパーオキシドジスムターゼ ELISA キット (Northwest Life Science Specialties; WA, USA) を用いて測定した。次いで、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性をグルタチオンペルオキシダーゼアッセイキット (Northwest Life Science Specialties) で、カタラーゼ活性をカタラーゼ活性アッセイキット (BioVision, CA, USA) を用いて測定した。吸光度は 450、340 および 570 nm でプレートリーダー (iEMS reader MF; Labsystems, MA, USA) を用いて測定した。

## 9. ムチン量の測定

採取した小腸内容物からムチン量を測定した。エーテルによりラットを到死させ、小腸組織を採取した。小腸内容物は氷で冷やした 0.02 mol/L アジ化ナトリウム含有リン酸緩衝液 15 mL (pH 7.4) および等量の空気でフラッシュして回収し、凍結乾燥させた。凍結乾燥させたサンプルは 0.02 mol/L アジ化ナトリウム含有 0.15 mol/L 塩化ナトリウムに 4°C 下で懸濁し、1 分間ホモジナイズした後、4°C、30 min、10,000 × g で遠心分離し、上清を得た。ムチン MUC2 量は MUC2 Enzyme-linked immunosorbent アッセイキット (USCN life science、

Hubei、China) にて、プレートリーダー (ARVOsx) を用いて吸光度 450 nm で測定した。

#### 10. 腸内細菌数の測定

採取した小腸粘膜から腸内細菌数を測定した。エーテルによりラットを到死させ、小腸組織を採取した。生理食塩液にてリンスした後、粘膜層をスパーテルを用いてかき集め、重量測定後に組織 100 mg あたりに PBS を 1mL 加えてホモジナイズし、血清培地と GAM (Gifu anaerobic medium) 培地に添加した。血清培地は好気下で 37°C、24 時間、GAM 培地はガスパック嫌気システム (Becton Dickinson, NJ, USA) を用いて嫌気下で 37°C、24 時間インキュベートした。両プレートより観察された細菌コロニー数を計測し、log CFU/g tissue として表記した。

#### 11. 病理学的評価

病理学的評価を以下の手法で実施した。エーテルによりラットを到死させ、胃および小腸組織を採取し、即座に 10% 中性ホルマリン緩衝液で固定した。その後、エタノールおよびキシレンで脱水させ、パラフィン包埋処理した。切片は 3 μm でスライスし、hematoxylin-eosin (HE)、periodic acid-Schiff (PAS)、および proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色を施した。

#### 12. 血中インドメタシン量の測定

血中インドメタシン量を以下の手法で実施した。ラット用経口ゾンデを使用してインドメタシンを 10 mg/kg 経口投与した。投与 1 時間後、血漿中のインドメタシン濃度を high-performance liquid chromatography (HPLC) を使用して測定した。HPLC システムは AS-2055 injector、UV-2070 検出器および PU-2080 クロマトグラフポンプ (日本分光) を用いた。カラムは逆相カラム (4.6 mm × 250 mm、3 μm、ODS; Waters、MA、USA)、移動相はアセトニトリル-リン酸 (60:40 v/v)、流動速度は 0.8 mL/min、クロマトグラムは波長 254 nm で測定した。

血液サンプルは 500 g、20 min で遠心分離し、次いで 1,000 g、20 min で遠心分離した。得られた血漿に内部標準として 5 μg/mL アセトニトリル含有メフェナム酸 (和光純薬工業) を 0.15 mL 添加した。脱タンパクは solid-phase extraction cartridge (Waters) を用い

て行った。抽出物は  $N_2$  下  $40^\circ C$  でエバポレートし上清  $100 \mu L$  を移動相にて再蒸留して HPLC カラムに注入した。

### 13. 統計処理

実験データはすべて平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、2 群間の比較には Student の t 検定を用い、3 群間以上の比較には Dunnett 法を用いて解析を行った。対照群との統計的有意差を比較し、危険率 5% 未満の場合を有意差ありと判定した。

## 【実験成績】

### 1. インドメタシン誘発胃潰瘍モデルの胃傷害に対する薬物の効果

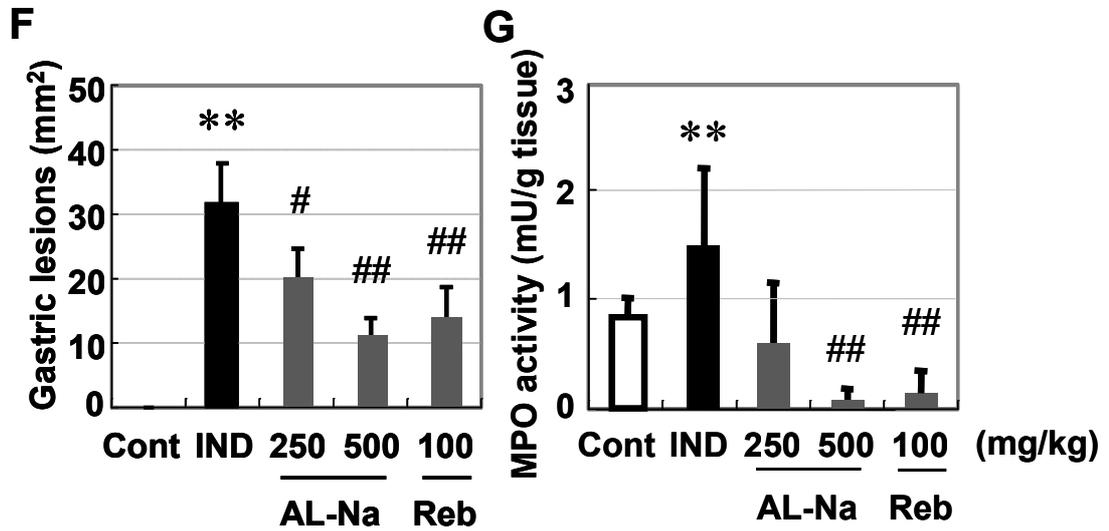
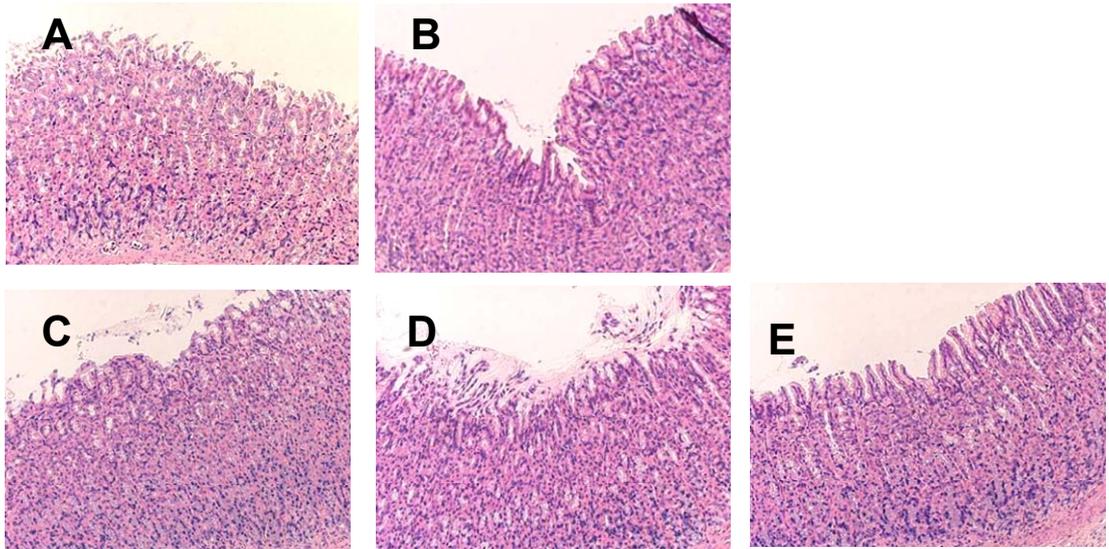
HE 染色による組織学的評価を Fig. 3 A, B, C, D および E に示した。インドメタシン 25 mg/kg を投与することにより、胃組織の胃上皮細胞の剥離および胃粘膜層の脱落が観察された。一方、AL-Na 投与群はインドメタシンによる胃潰瘍が緩和された。また、レバミピドもインドメタシン誘発胃潰瘍を改善した。

胃損傷面積に対する薬物の効果を Fig. 3 F に示した。インドメタシン 25 mg/kg を投与することにより、胃腺全体に出血性損傷が観察された。一方、AL-Na 投与群は 250 mg/kg および 500 mg/kg の用量で損傷面積の有意な減少が観察された。また、レバミピドも 100 mg/kg の用量でインドメタシン誘発胃潰瘍を有意に抑制した。MPO 活性の増加に対する薬物の効果を Fig. 3 G に示した。インドメタシン 25 mg/kg を投与することにより、胃組織の MPO 活性増加が観察された。一方、AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量で MPO 活性の有意な減少が観察された。また、レバミピドも 100 mg/kg の用量で MPO 活性増加を有意に抑制した。

### 2. インドメタシン誘発小腸傷害モデルの小腸傷害に対する薬物の効果

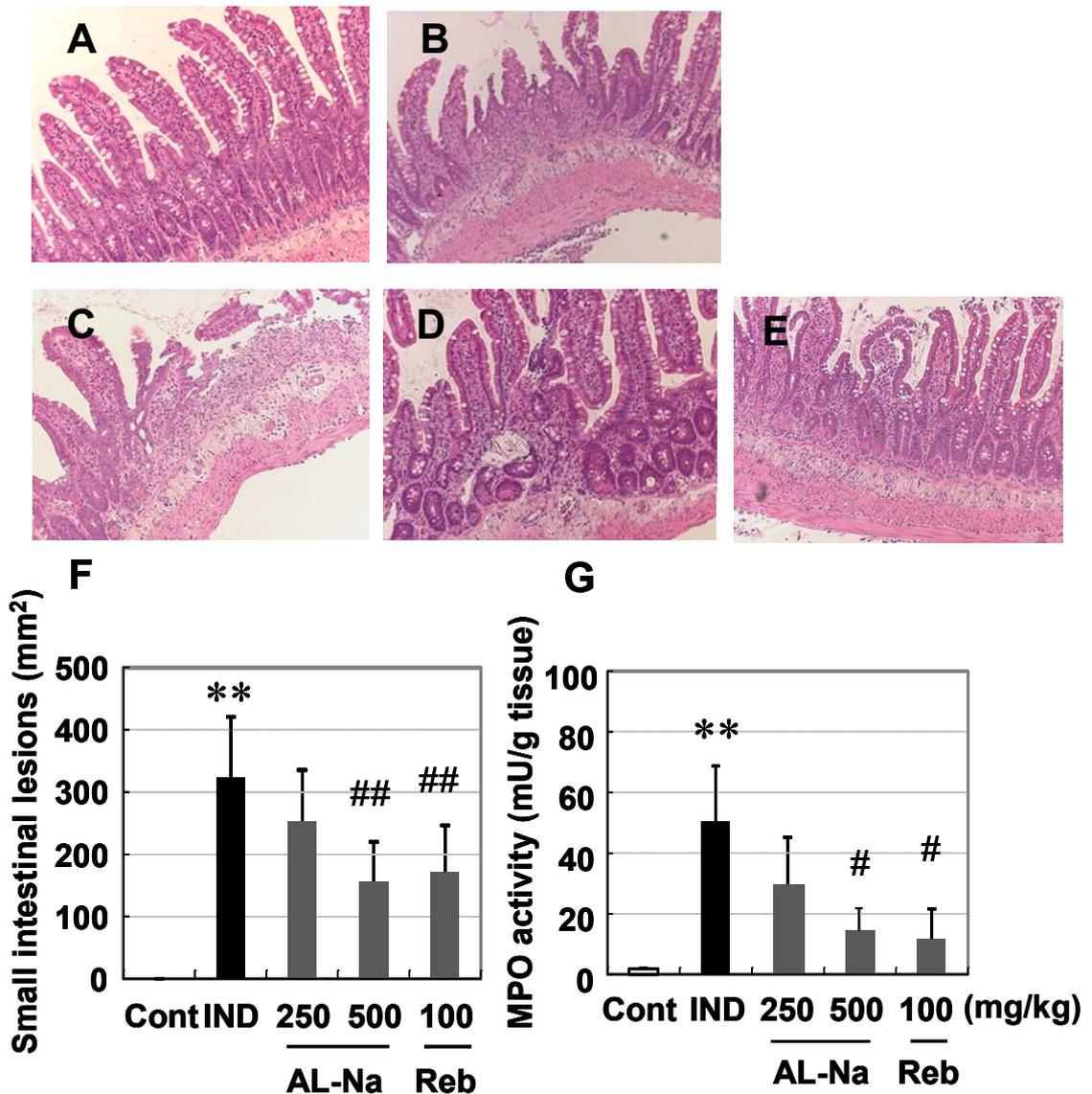
HE 染色による組織学的評価を Fig. 4 A, B, C, D および E に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、小腸上皮細胞の剥離、潰瘍、粘膜固有層、粘膜下層、漿膜への炎症性細胞の浸潤および陰窩の短小化が観察された。一方、AL-Na 投与群はインドメタシンによる小腸傷害が抑制された。また、レバミピドもインドメタシン誘発小腸傷害を改善した。

胃損傷面積に対する薬物の効果を Fig. 4 F に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、主に空腸および回腸に出血性損傷が観察された。一方、AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量で損傷面積の有意な減少が観察された。また、レバミピドも 100 mg/kg の用量でインドメタシン誘発小腸傷害を有意に抑制した。MPO 活性の増加に対する薬物の効果を Fig. 4 G に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、回腸組織の MPO 活性増加が観察された。一方、AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量で MPO 活性の有意な減少が観察された。また、レバミピドも 100 mg/kg の用量で MPO 活性増加を有意に抑制した。



**Fig. 3 Effects of drugs on indomethacin-induced gastric lesions**

Animals were given indomethacin (IND) (25 mg/kg, *po*) and killed 6 h later. AL-Na (250 and 500 mg/kg) or rebamipide (Reb) (100 mg/kg) was given orally at 30 min before administration of IND. (A) HE-stained microscopic observations of the rat gastric mucosa of the control (Cont) group; (B) IND; (C) AL-Na (250 mg/kg); (D) AL-Na (500 mg/kg); and (E) Reb (100 mg/kg). (F) The lesion areas and (G) MPO activity were measured. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different from the Cont group at  $P < 0.01$  (Student's *t*-test). #, ##: Significantly different from the IND group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (Dunnett's test).



**Fig. 4 Effects of drugs on indomethacin-induced small intestinal lesions**

Animals were given indomethacin (IND) (10 mg/kg, *po*) and killed 24 h later. AL-Na (250 and 500 mg/kg) or rebamipide (Reb) (100 mg/kg) was given orally twice at 30 min before and 6 h after administration of IND. (A) HE-stained microscopic observations of the rat small intestinal mucosa of the control (Cont) group; (B) IND; (C) AL-Na (250 mg/kg); (D) AL-Na (500 mg/kg); and (E) Reb (100 mg/kg). (F) The lesion areas and (G) MPO activity were measured. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different from the Cont group at  $P < 0.01$  (Student's t-test). #, ##: Significantly different from the IND group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (Dunnett's test).

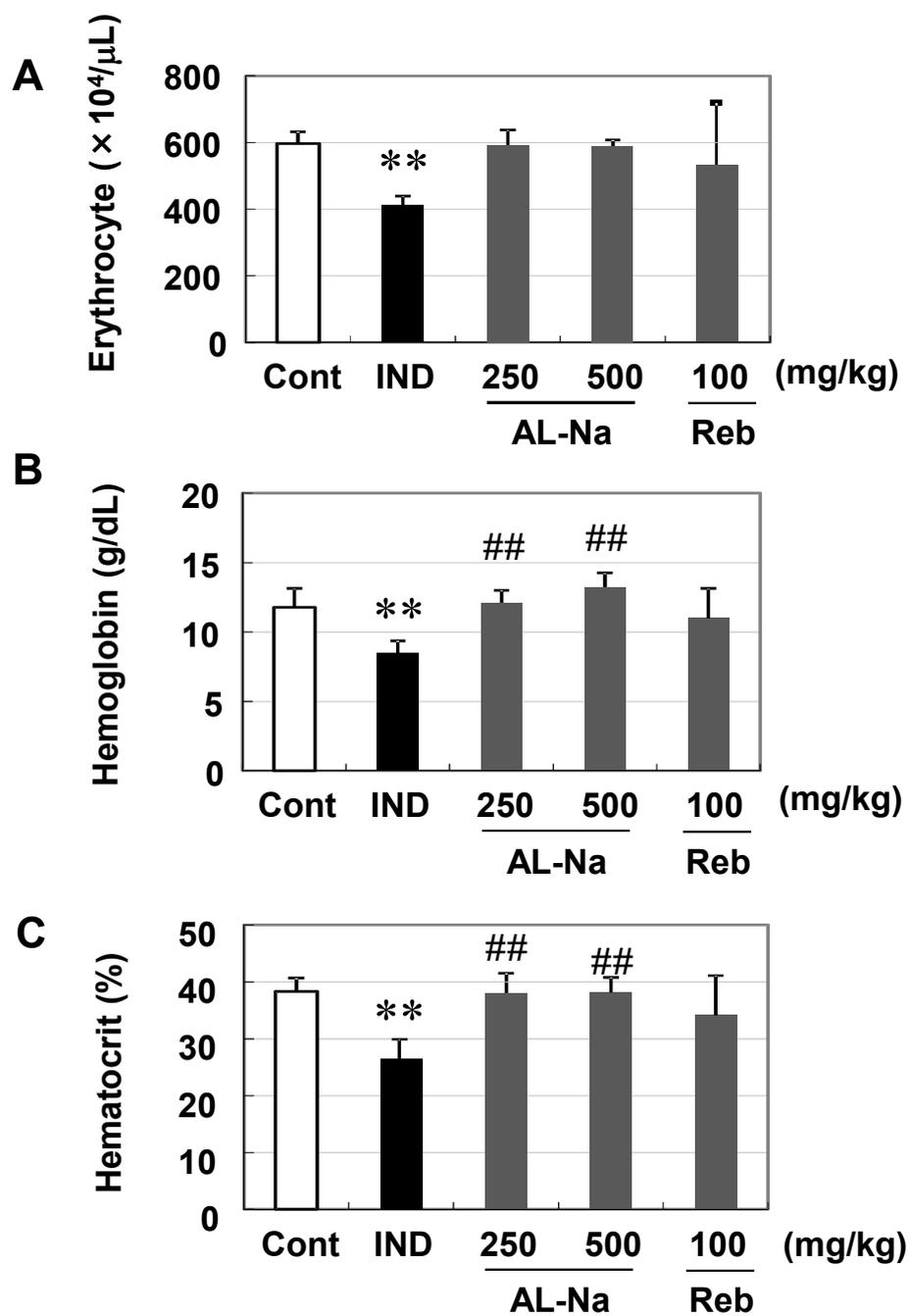
3. インドメタシン誘発小腸傷害モデルの体重、摂餌量および糞便量に対する薬物の効果  
 体重、摂餌量および糞便量に対する薬物の効果を Table. 1 に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、体重、摂餌量および糞便量が減少した。AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量でこれらの症状を有意に抑制した。一方、レバミピド投与群には有意な差はみられなかった。

**Table 1 Effects of drugs on loss of body weight, food intake and feces weight**

	change body weight (g)	change food intake(g/rat)	change feces weight (g/rat)
Control	7.5 ± 2.2	19.7 ± 1.4	6.3 ± 0.7
Indomethacin	-5.2 ± 5.8 **	8.5 ± 2.6 **	3.5 ± 0.6 **
AL- Na (250 mg/kg)	1.8 ± 7.6	15.1 ± 4.2 #	4.7 ± 1.2
AL- Na (500 mg/kg)	7.5 ± 2.8 ##	19.2 ± 2.3 ##	5.8 ± 0.8 ##
Rebamipide (100 mg/kg)	-1.2 ± 4.9	15.0 ± 3.1	5.0 ± 0.7

Differences of weigh change 24 h after indomethacin were measured. Data are presented as the means ± S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different from the control group at P<0.01 (Student's t-test). #,##: Significantly different from the indomethacin group at P<0.05 and P<0.01, respectively (Dunnett's test).

4. インドメタシン誘発小腸傷害モデルの貧血症状に対する薬物の効果  
 貧血症状に対する薬物の効果を Fig. 5 に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、赤血球数、ヘモグロビンおよびヘマトクリット値の有意な減少が観察された。AL-Na 投与群は 250 mg/kg および 500 mg/kg の用量でこれらの症状を有意に抑制した。一方、レバミピド投与群には有意な差はみられなかった。



**Fig. 5 Effects of drugs on indomethacin-induced anaemia**

Animals were given indomethacin (IND) (10 mg/kg, p.o.), and blood samples were obtained 24 h later. AL-Na (250 and 500 mg/kg) or rebamipide (Reb) (100 mg/kg) was given orally twice at 30 min before and 6 h after administration of IND. (A) Erythrocyte, (B) haemoglobin, and (C) haematocrit. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different from the control (Cont) group at  $P < 0.01$  (Student's t-test). ##: Significantly different from the IND group at  $P < 0.01$  (Dunnett's test).

#### 5. インドメタシン誘発小腸傷害モデルの小腸短縮に対する薬物の効果

PCNA 染色による組織学的評価を Fig. 6 A, B, C, D および E に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、陰窩中の PCNA 陽性細胞の減少および陰窩構想の崩壊が観察された。AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量でこれらの症状を緩和させた。一方、レバミピド投与群には差はみられなかった。小腸短縮に対する薬物の効果を Fig. 6 F に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、小腸長の短縮が観察された。AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量で小腸長の短縮を有意に抑制した。一方、レバミピド投与群には有意な差はみられなかった。

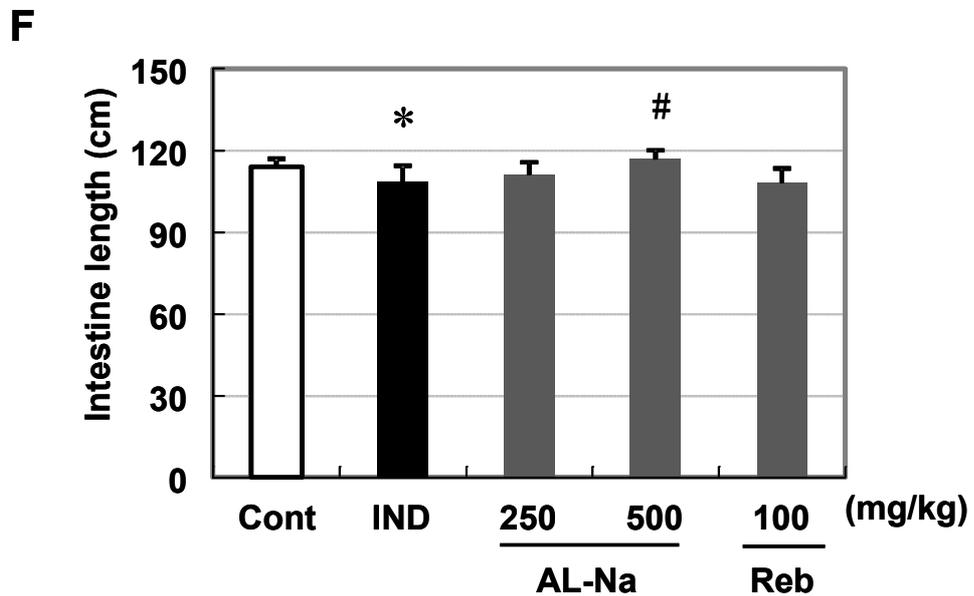
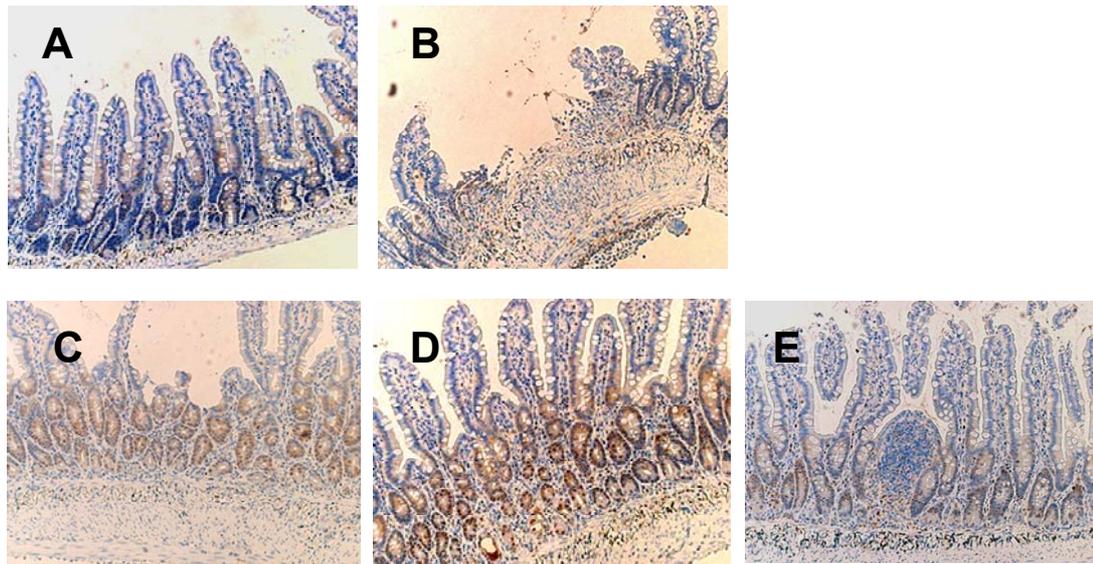
#### 6. インドメタシン誘発小腸傷害モデルの血管透過性および酸化ストレスに対する薬物の効果

血管透過性に対する薬物の効果を Fig. 7 A に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、回腸組織の血管透過性が亢進した。一方、AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量で血管透過性亢進の有意な減少が観察された。また、レバミピドも 100 mg/kg の用量でインドメタシン誘発血管透過性亢進を有意に抑制した。

酸化ストレスに対する薬物の効果を Fig. 7 B, C および D に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、回腸組織の SOD、GPx およびカタラーゼ活性が減少した。一方、AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量で GPx およびカタラーゼ活性減少の有意な抑制が観察された。また、レバミピドも 100 mg/kg の用量で GPx およびカタラーゼ活性減少を有意に抑制した。

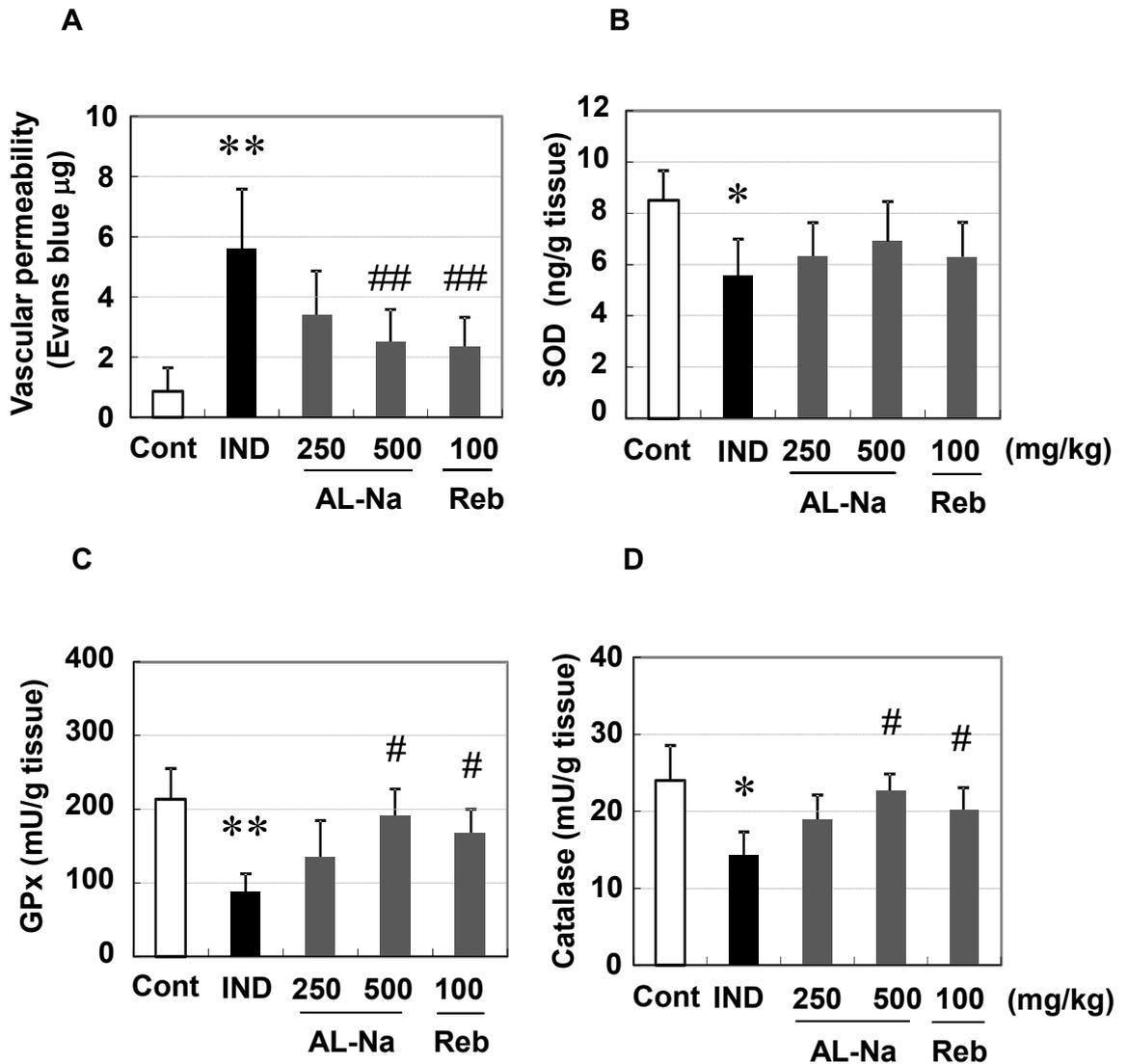
#### 7. インドメタシン誘発小腸傷害モデルのムチン MUC2 量に対する薬物の効果

PAS 染色による組織学的評価を Fig. 8 A, B, C, D および E に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、杯細胞の枯渇が観察された。AL-Na 500 mg/kg 投与群およびレバミピド投与群はこれらの症状を緩和させた。ムチン MUC2 量に対する薬物の効果を Fig. 8 F に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、ムチン MUC2 タンパクの減少が観察された。AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量で MUC2 の減少を有意に抑制した。また、レバミピド投与群は 100 mg/kg の用量で MUC2 の減少を有意に抑制した。



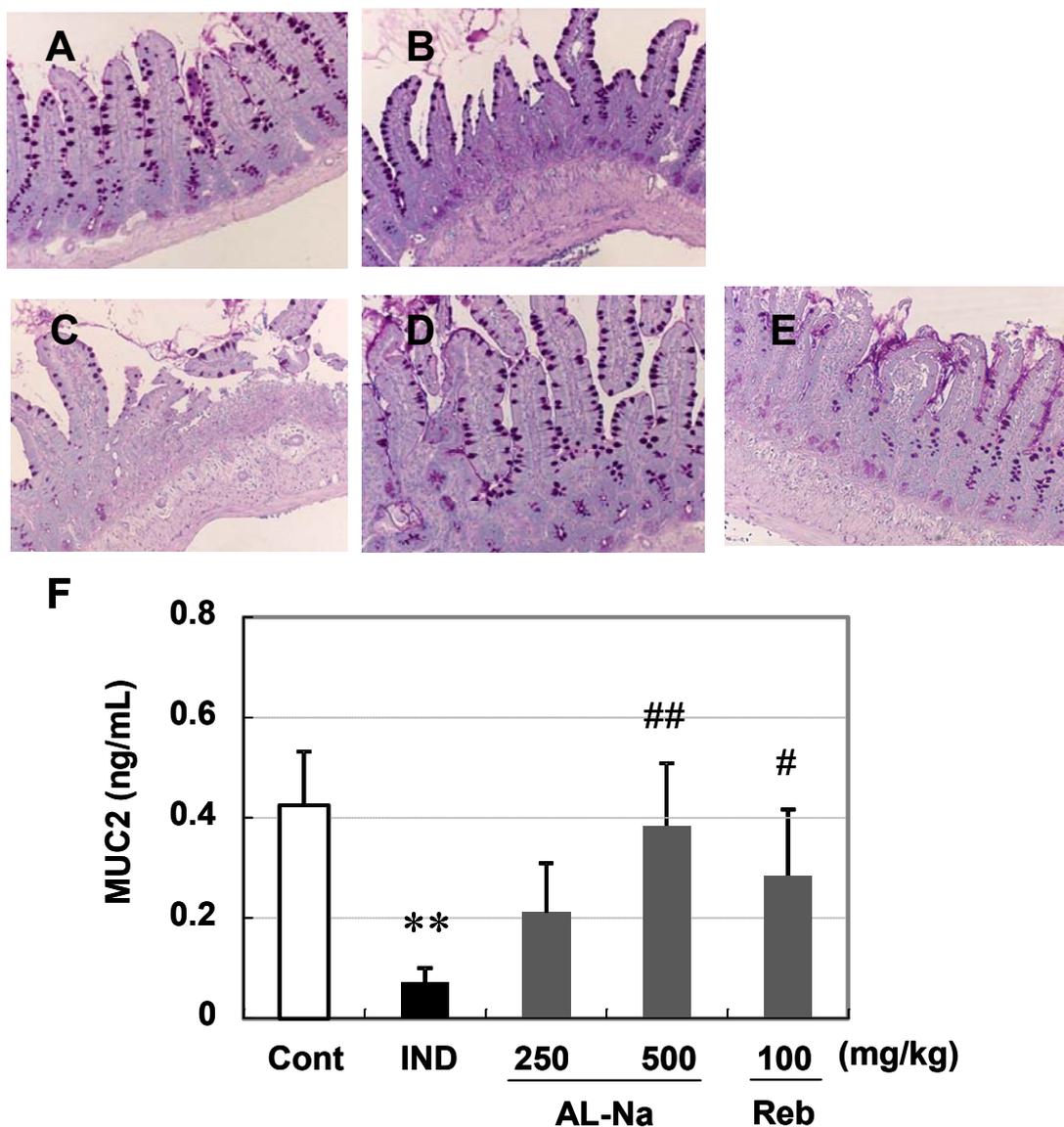
**Fig. 6 Effects of drugs on indomethacin-induced atrophy**

Animals were given indomethacin (IND) (10 mg/kg, p.o.) and killed 24 h later. AL-Na (250 and 500 mg/kg) or rebamipide (Reb) (100 mg/kg) was given orally twice at 30 min before and 6 h after administration of IND. (A) Microscopic observations with PCNA positive cells of the rat ileal mucosa of the control (Cont) group; (B) IND; (C) AL-Na (250 mg/kg); (D) AL-Na (500 mg/kg); and (E) Reb (100 mg/kg). (F) The small intestinal length was measured. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*: Significantly different from the Cont group at  $P < 0.05$  (Student's t-test). #: Significantly different from the IND group at  $P < 0.05$  (Dunnett's test).



**Fig. 7 Effects of drugs on indomethacin-induced vascular permeability and oxidative stress**

Animals were given indomethacin (IND) (10 mg/kg, p.o.) and killed 24 h later. AL-Na (250 and 500 mg/kg) or rebamipide (Reb) (100 mg/kg) was given orally twice at 30 min before and 6 h after administration of IND. (A) vascular permeability, (B) superoxide dismutase content, (C) glutathione peroxidase activity, and (D) catalase activity were measured. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*, \*\*: Significantly different from the Cont group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (Student's t-test). #, ##: Significantly different from the IND group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (Dunnett's test).



**Fig. 8 Effects of drugs on indomethacin-induced mucin depletion in small intestine**

Animals were given indomethacin (IND) (10 mg/kg, p.o.) and killed 24 h later. AL-Na (250 and 500 mg/kg) or rebamipide (Reb) (100 mg/kg) was given orally twice at 30 min before and 6 h after administration of IND. (A) PAS-stained microscopic observations of the rat small intestinal mucosa of the control (Cont) group; (B) IND; (C) AL-Na (250 mg/kg); (D) AL-Na (500 mg/kg); and (E) Reb (100 mg/kg). (F) The mucin of the small intestine was measured. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different from the Cont group at  $P < 0.01$  (Student's t-test). #, ##: Significantly different from the IND group at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively (Dunnett's test).

## 8. インドメタシン誘発小腸傷害モデルの腸内細菌数に対する薬物の効果

腸内細菌数に対する薬物の効果を Table. 2 に示した。インドメタシン 10 mg/kg を投与することにより、腸内細菌の粘膜層への浸潤が観察された。AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量で腸内細菌のコロニー数を有意に抑制した。また、レバミピド投与群は 100 mg/kg の用量で腸内細菌の浸潤を有意に抑制した。

**Table 2 Effects of AL-Na on number of enterobacteria in ileal mucosa**

	number of animals	Total number of enterobacteria	
		log CFU/g tissue	
Control	6	6.84 ± 0.44	
Indomethacin	6	7.82 ± 0.42	**
AL- Na (250 mg/kg)	6	7.26 ± 0.53	
AL- Na (500 mg/kg)	6	6.96 ± 0.83	#

Number of enterobacteria 24 h after indomethacin administration was counted. Data are presented as the means ± S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different from the control group at P<0.01 (Student's t-test). #: Significantly different from the indomethacin group at P<0.05 (Dunnett's test).

## 9. 血中インドメタシン濃度に対する薬物の効果

血中インドメタシン濃度に対する薬物の効果を Table. 3 に示した。いずれの薬物もインドメタシンの吸収に関しては影響を及ぼさなかった。

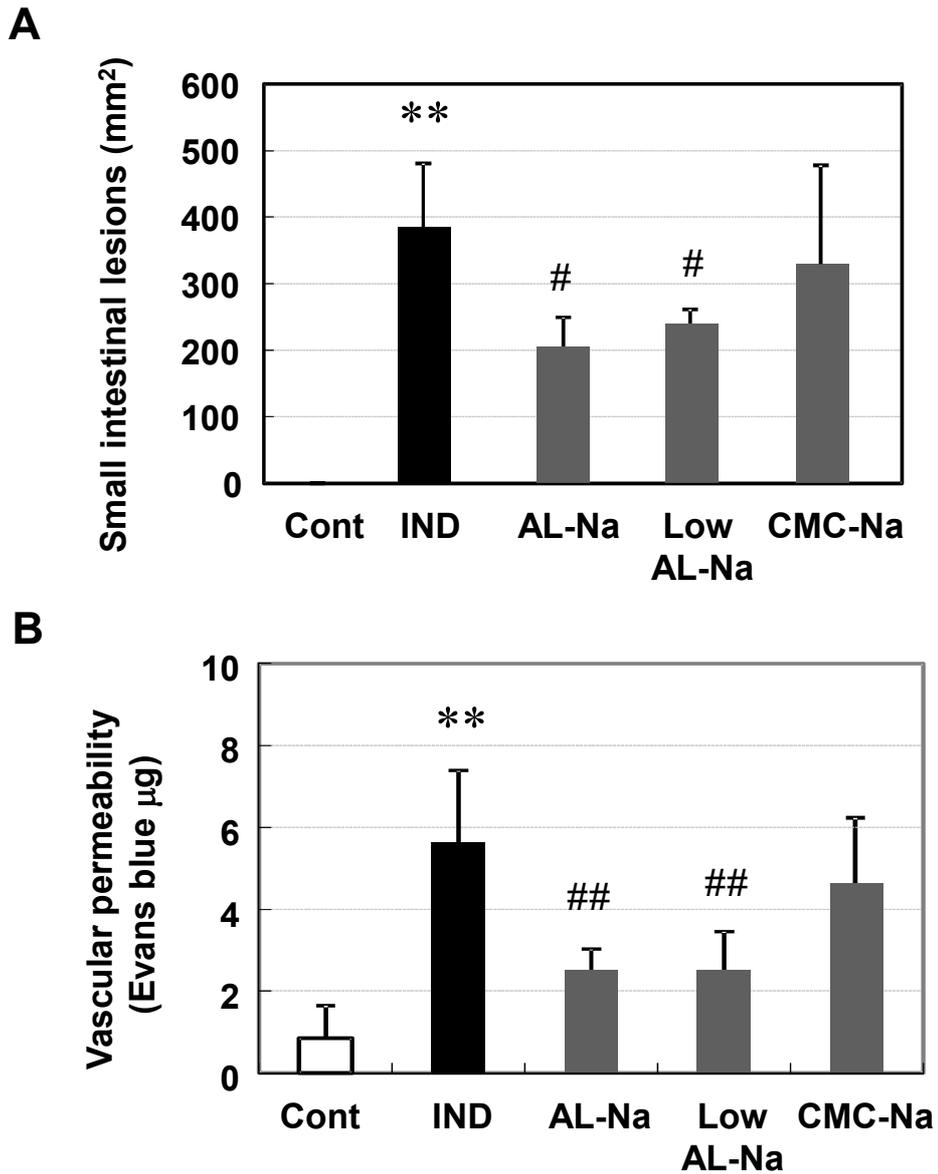
**Table 3 Influence of drugs on absorption of indometacin**

	number of animals	Serum indomethacin absorption mg/mL
Indomethacin	8	30.7 ± 7.3
AL- Na (250 mg/kg)	8	32.5 ± 7.0
AL- Na (500 mg/kg)	8	31.5 ± 5.8
Rebamipide	8	31.5 ± 5.7

Serum indomethacin concentration 1 h after indomethacin administration was counted.  
Data are presented as the means ± S.E.M. (n=8).

10. インドメタシン誘発小腸傷害モデルの小腸傷害に対する低分子 AL-Na の効果

小腸傷害に対する低分子 AL-Na の効果を Fig. 9 に示した。低分子 AL-Na (粘度  $7.26 \pm 0.6$  mPas) は AL-Na ( $360 \pm 4.4$  mPas) と同様に 500 mg/kg の用量でインドメタシン誘発小腸傷害を有意に抑制した。また、血管透過性亢進反応に対しても有意に抑制した。一方、2.5% CMC-Na ( $376 \pm 5.6$  mPas) は有意な差はみとめられなかった。



**Fig. 9 Effects of low molecular AL-Na on indomethacin-induced small intestinal lesions**

Animals were given indomethacin (IND) (10 mg/kg, p.o.) and killed 24 h later. Original AL-Na (500 mg/kg), low AL-Na (500 mg/kg) or CMC-Na (250 mg/kg) was given orally twice at 30 min before and 6 h after administration of IND. (A) The lesion areas were measured. (B) The vascular permeability was measured. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different from the control (Cont) group at  $P < 0.01$  (Student's t-test). #, ##: Significantly different from the indomethacin group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (Dunnett's test).

## 【考察】

AL-Na は粘膜を覆うことによって、ペプシンや塩酸による上部消化管の粘膜損傷を保護する [6]。また、AL-Na は塩酸誘発胃潰瘍ラットにおいて、胃組織中のヘキソサミン含量を増加させる [38]。AL-Na の胃における粘膜保護作用を期待して、まず本実験では AL-Na のインドメタシン誘発胃潰瘍モデルについて検討した。その結果、AL-Na はインドメタシンによる胃粘膜傷害を抑制した。次いで、インドメタシン誘発小腸傷害モデルに対する効果について検討し、AL-Na がインドメタシンによる小腸粘膜損傷、炎症性反応、酸化ストレスを抑制することが示された。また、AL-Na の経口投与はラットのインドメタシンの吸収に影響を及ぼさなかった。そのため、AL-Na の胃腸傷害抑制効果はインドメタシンの吸収阻害によるものではなく、上部消化管のみならず、小腸においても粘膜保護作用を示すことが明らかとなった。胃潰瘍モデルでは AL-Na 250 mg/kg で有効な効果を示したが、本用量では小腸傷害モデルでは効果は得られず、有意な効果を示す用量は 500 mg/kg であった。そのため、小腸において粘膜保護作用を発揮するためには、より高用量が必要であることが考えられる。

インドメタシンを服用することにより腸管出血や慢性的な貧血となることが報告されている [18、39]。さらに、インドメタシンを投与することにより実験動物においてもヘモグロビン値が低下する [40]。本実験において、AL-Na はインドメタシンにより惹起されるヘモグロビン値の低下を抑制した。一方、レバミピドは有意な差は示さなかった。醜翻らは AL-Na はフィブリノーゲンを凝集させ、フィブリンポリマーを増加させることによって、AL-Na は止血作用を示すと報告している [6]。さらに、AL-Na によって血小板凝集が促進されることも報告されており [7]、粘膜保護のみならず止血作用を有することが AL-Na の利点と考えられる。また、小腸傷害モデル群では、小腸出血に由来すると考えられる黒色便がみられたが、AL-Na 投与群では通常の便と同様であった。本実験結果より、AL-Na は胃のみならず、下部消化管においても粘膜保護作用および止血作用を示すことが明らかとなった。

次いで、AL-Na の小腸粘液に対する影響について着目した。インドメタシンをラットに投与することにより小腸内の粘液層が減少することが報告されている [29]。加えて、NSAIDs 誘発小腸炎ラットにおいて、粘液層は治癒頻度に応じて増加していく [41、42]。そのため、粘液産生が NSAIDs 誘発消化管傷害において重要な役割を示すことが考えられる。粘膜層は消化管の物理

的な防御機能を司っていることがよく知られている [43]。ムチンはグリコシル化した巨大な糖タンパクであり、セリンおよびスレオニンが O-結合糖鎖にて結合しており、粘液の主要な構造タンパクである [44]。Barcelo らは、AL-Na はラットの大腸においてムチンの分泌を促進すると報告している [45]。そのため、AL-Na によるムチン分泌誘導が AL-Na の NSAIDs 誘発小腸傷害の抑制作用の主な作用機序であることが考えられる。

ムチンは分泌型と膜型に分類される。MUC2、MUC5AC、MUC5B および MUC6 はゲル状の分泌型ムチンタンパクである。その中でも、MUC2 は腸管の杯細胞から産生されるムチンにおいて主要である [46]。胃潰瘍モデルにおいて、AL-Na は胃粘液を構成する糖タンパクであるヘキシサミンの産生を誘導する [38]。そのため、小腸においても AL-Na が粘液を産生させることが期待される。本実験において、インドメタシン投与によって小腸の MUC2 は減少するが、AL-Na を投与することによって MUC2 産生が増加することが明らかとなった。

ムチンは腸管のバリア機能において重要であり、腸管を腸内細菌の浸潤から防御する [42, 47]。この腸内細菌の浸潤は NSAIDs 誘発腸炎の主な病因として考えられている [24]。本実験において、インドメタシン投与により、小腸組織内の腸内細菌の浸潤が増加したが、AL-Na は細菌浸潤を抑制した。これらの知見から、AL-Na によるムチンの誘導が、小腸において腸内細菌の浸潤から腸管を保護し、回腸組織の浸潤最近数を減弱させたと考えられる。

佐藤らは、不溶性食物繊維はインドメタシン誘発小腸傷害に効果を示さないが、水溶性食物繊維は有効であると報告している [48]。水溶性食物繊維の粘膜保護作用には粘度との高い相関が認められる。AL-Na の NSAIDs 誘発小腸傷害の抑制作用における、粘度の影響を検討することを目的として、これまでの検討に用いた AL-Na と粘度が等しい CMC-Na と、粘度が低い低分子 AL-Na の NSAIDs 誘発小腸傷害に対する効果について検討した。その結果、CMC-Na は効果を示さなかったにも関わらず、低分子 AL-Na は NSAIDs 誘発小腸傷害を抑制した。そのため、AL-Na による小腸の保護作用には粘度に依存せず、AL-Na 独特の構造が要因であることが考えられる。Barcelo らは、ラット大腸において AL-Na はムチン分泌を促進するが、セルロースはムチン分泌には影響を及ぼさないと報告している [45]。グルロン酸およびガラクトuron酸も同様にムチン分泌を増加させていることから、AL-Na のムチン分泌作用には、ウロン酸の構造が重要ではないかと推察している。本知見は、著者らの仮説と合致する。

以上の実験成績より、AL-Na は NSAIDs 誘発小腸傷害を抑制することが明らかとなった。さらに、その作用にはムチン分泌による腸内細菌の浸潤が深く関わりと考えられる。そのため、AL-Na は NSAIDs 誘発小腸傷害の有用な治療薬となりえることが示唆された。

## 第2章 炎症性腸疾患モデルに対するアルギン酸ナトリウムの効果の検討

### 【緒言】

炎症性腸疾患 (IBD) は腸管組織の炎症性疾病であり、潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) からなる。UC は病変が大腸に限定している一方、CD は消化管のどこにでも炎症を惹起させる可能性がある。UC および CD とともに腸管における炎症により、腹痛、下痢、血便、下血、初年、体重減少などの症状が引き起こされる [49]。どちらも、再燃と寛解を繰り返す難病である。IBD の病因は未だ不明であるが [50]、遺伝的要因や、免疫システムの異常、炎症性反応の過剰反応、腸内細菌叢の異常、環境因子、幼少時の感染などが影響していると考えられている [50-55]。

IBD 患者は様々な消化管症状を呈するとともに、巨大結腸症 [56]、腸管穿孔 [57]、外科的合併症 [58] などの多くの合併症によって、QOL が著しく低下する。これらの症状は長期に渡る上、消化管の構造や機能は、時に不可逆的であり改善が難しい。QOL の低下に加えて、IBD 患者は高い確率で大腸癌を伴う可能性がある [59]。

実験動物による様々な IBD モデルが報告されている。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) はヘパリン様の多糖類であり、マウスやラットにおいて大腸の粘膜傷害を惹起する [60-62]。DSS は上皮細胞に対して直接的な細胞毒性を示し、腸管リンパと上皮細胞の間に影響を及ぼし、DSS 誘発腸炎はヒトにおける UC と相似する病態モデルとして知られている [60]。Morris らは 2、4、6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) エタノール溶液を直腸内に投与することによってもう 1 つの IBD 動物モデルを作成した [63]。TNBS モデルにおいて、エタノールが粘膜バリアを破壊することにより、TNBS とタンパク質が結びつくため、大腸細胞が変性するという仮説がある。活性化したマクロファージや T 細胞により細胞の変性はもたらされ、ヒトの CD と同様の症状を呈する [64]。DSS 腸炎は上皮細胞のバリア機能を崩す [65] のに対して、TNBS 腸炎はタンパク質をハプテン化し [66]、遅発性の過敏症を進展させる。

既存の IBD 治療薬としてアミノサリチル酸製造、ステロイド製剤および抗体医薬などが挙げられる。しかし、これらの薬物は効果の差が大きく、副作用や長期毒性が発生する [67]。そのため、

代替となる治療法がもとめられている。

前章において、AL-Na は小腸において粘膜保護作用を有し、その作用はムチン産生による粘液分泌促進作用を介することが示唆された。また、AL-Na は吸収されにくいいため、小腸通過後も大腸において作用する可能性が考えられる。そのため、AL-Na の大腸組織における粘膜保護作用および粘液産生作用が期待される。本研究では、AL-Na の IBD への有用性を明らかにすることを目的として、マウスを用いた DSS 誘発大腸炎および TNBS 誘発大腸モデルに対する AL-Na の効果を検討した。

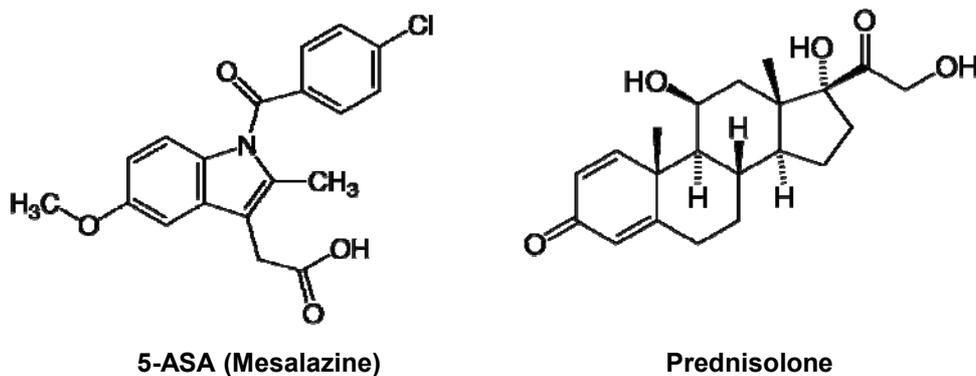
## 【実験材料ならびに実験方法】

### 1. 実験動物

実験には、雄性 BALB/c 系マウス (8 週齢、18–22 g、日本エスエルシー、静岡) および雄性 C57BL/6 系マウス (7 週齢、20–24 g、日本エスエルシー、静岡) を使用した。動物は、室温  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 15\%$  の動物飼育室で、明暗サイクル (照明時間:7:00-19:00) を一定に保ち、金網ケージの中で飼育した。マウスには実験以外の飼育期間中は、飼料および飲料水を自由に摂取させた。動物実験は「堺化学工業(株) 動物実験規則」および「堺化学工業(株) 動物実験委員会要項」に基づいて計画しており、同委員会により承認を受けて実施した。

### 2. 使用薬物

実験に使用した薬物および試薬は、アルギン酸ナトリウム (AL-Na、共成製薬、北海道)、5-アミノサリチル酸 (5-ASA; ペンタサ®; 杏林製薬、東京) およびプレドニゾロン (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) である。AL-Na は蒸留水に溶解して使用した。5-ASA およびプレドニゾロンは 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC、和光純薬工業、大阪) 溶液に懸濁して使用した。なお、今回用いた薬物の化学構造式を Fig. 10 に示した。



**Fig.10 Chemical structures of drugs used in this chapter**

### 3. DSS 誘発大腸炎モデル (予防的効果の検討) の作製

潰瘍性大腸炎モデル作製は以下の方法に従って行った。即ち、DSS (MW 36,000–50,000; 和光純薬工業) を水道水に溶解し、4% (wt/vol) となるように調製した。その後、BALB/c マウスに 7 日間飲水投与した。なお、対照群には水道水を同様に投与した。投与 7 日目に、エーテルにより

マウスを到死させ、開腹し大腸組織を摘出して大腸長を測定した。なお、モデル作製プロトコールを Fig. 11 に示した。

被験薬は体重当たり 5 mL/kg となるように調製した。AL-Na (200 mg/kg および 500 mg/kg) および 5-ASA (100 mg/kg) は 1 日 1 回、Day 0 から Day 6 までマウス用経口ゾンデを使用してそれぞれ経口投与した。なお、対照群には蒸留水を同様に投与した。

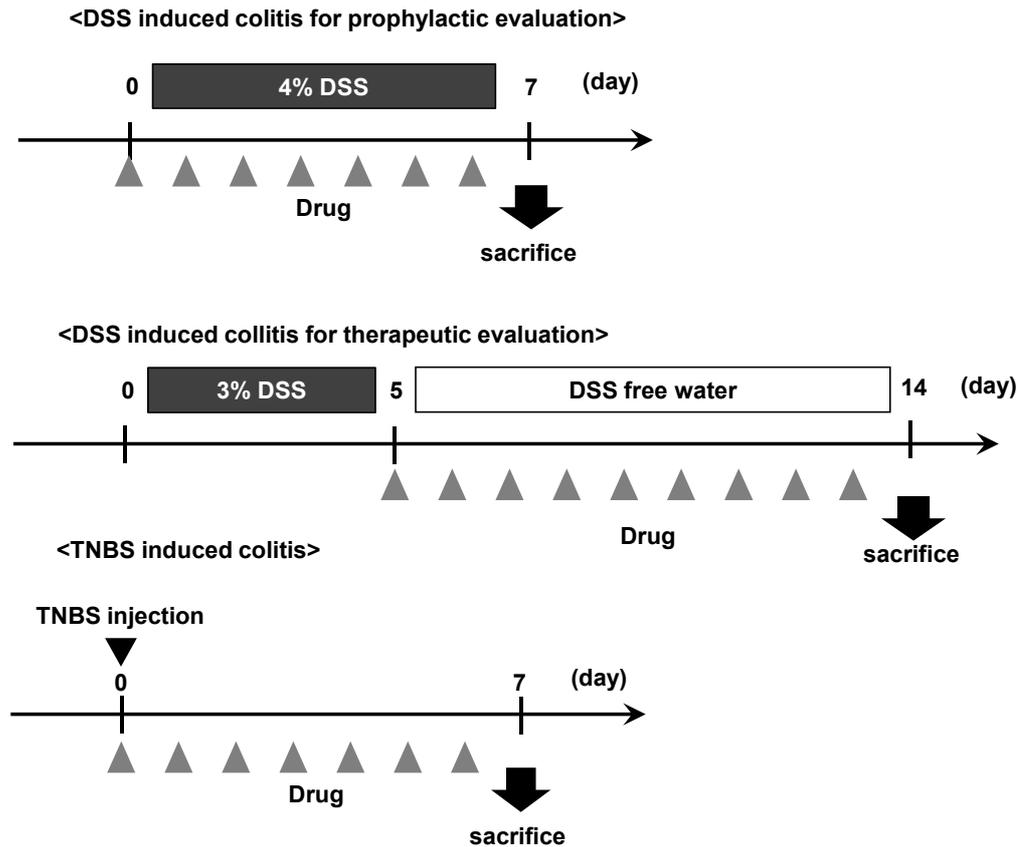


Fig.11 Scheme of animal models used in this chapter

#### 4. DSS 誘発大腸炎モデル (治療的効果の検討) の作製

潰瘍性大腸炎モデル作製は以下の方法に従って行った。即ち、DSS を水道水に溶解し、3% (wt/vol) となるように調製した。その後、C57BL/6 マウスに Day 0 から Day 5 まで飲水投与した。その後、DSS が含まれていない水道水を Day 6 から Day 14 まで飲水させた。なお、対照群には水道水を試験期間中投与した。投与 14 日目に、エーテルによりマウスを到死させ、開腹し大腸組織を摘出して大腸長を測定した。なお、モデル作製プロトコールを Fig. 11 に示した。

被験薬は体重当たり 5 mL/kg となるように調製した。AL-Na (500 mg/kg および 1000 mg/kg) およびプレドニゾロン (10 mg/kg) は 1 日 1 回、Day 6 から Day 13 までマウス用経口ゾンデを

使用してそれぞれ経口投与した。なお、対照群には蒸留水を同様に投与した。

## 5. TNBS 誘発大腸炎モデルの作製

潰瘍性大腸炎モデル作製は以下の方法に従って行った。即ち、1% TNBS (Sigma) 50% エタノール含有生理食塩液を調製した。BALB/c マウスにペントバルビタール (40 mg/kg) を腹腔内投与して麻酔を施した。その後、先端を切除したマウス用経口ゾンデを肛門より 4 cm 挿入し、TNBS 溶液 100  $\mu$ L を直腸内投与した。TNBS 注入後、マウスの尾を持ち上げて 30 秒間懸垂させて、TNBS 溶液が漏れるのを防いだ。コントロール群には 50% エタノール含有生理食塩液を直腸内投与し、同様に 30 秒間懸垂させた。投与 7 日目に、エーテルによりマウスを到死させ、開腹し大腸組織および脾臓組織を摘出して、大腸長、大腸重量および脾臓重量を測定した。なお、モデル作製プロトコールを Fig. 11 に示した。

被験薬は体重当たり 5 mL/kg となるように調製した。AL-Na (500 mg/kg) およびプレドニゾロン (10 mg/kg) は 1 日 1 回、Day 0 から Day 6 までマウス用経口ゾンデを使用してそれぞれ経口投与した。なお、対照群には蒸留水を同様に投与した。

## 6. Disease Activity Index (DAI) の評価

生存率および体重変化は連日評価した。実験期間中、極端に衰弱となるか瀕死となる、もしくは体重が試験開始時より 20% 以上も減少したマウスは安楽死させた。

DAI は Vasina V ら [68] らの方法により行った。即ち、下痢スコア (0, 通常便; 1, やや軟便; 2, 軟便; 3, 水様性便)、血便スコア (0, 通常色便; 1, 血液が付着した便; 2, 肛門にまで血液が付着; 3, 肛門から尾にまで血液が付着)、および体重減少スコア (0, 変化なし; 1, day 0 に比した体重減少が 1%–5%; 2, 6%–10%; 3, 11%–20%) を肉眼的に判別し、その合計値を算出した。

## 7. MPO 活性の測定

採取した大腸組織から MPO 活性を測定した。エーテルによりマウスを到死させ、大腸組織を採取した。生理食塩液にてリンスした後、粘膜層をスパーテルを用いてかき集め、重量測定後に

pH 6.0 に調整した 0.5% ヘキサデシルトリメチル臭化アンモニア (Sigma) 含有 50 mmol/L リン酸緩衝液とともにキュベットに入れ、超音波にて 10 秒間処理した。その後、凍結解凍を行い、4°C、15 min、40,000 × g で遠心分離した。上清を 0.1 mL 採取し、2.9mL の 0.167 mg/ml O-ジアニジン塩酸塩 0.0005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.0) と混合させ MPO 活性を 460 nm の波長で分光光度計 (JASCO; V-560) を用いて測定した。

#### 8. 血清アミロイド A の測定

血清サンプルは屠殺前にキャピラリーチューブを用いて眼窩より 0.1 mL 採取し、血清アミロイド A 含量を測定した。エーテルによりマウスを到死させる前に血液をガラスキャピラリーにて採取した。得た血清から、血清アミロイド A enzyme-linked immunosorbent assay キット (Life Technologies Corporation, CA, USA) にて測定した。プレートリーダー (ARVOsx; Wallac, MA, USA)を用いて 450 nm で 30 分間測定した。

#### 9. 病理学的評価および絨毛長と陰窩長の測定

病理学的評価を以下の手法で実施した。エーテルによりマウスを到死させ大腸を採取し、即座に 10% 中性ホルマリン緩衝液で固定した。その後、エタノールおよびキシレンで脱水させ、パラフィン包埋処理した。切片は 3 μm でスライスし、HE 染色および PAS 染色を施した。病理学的評価はブラインドにて行った。炎症スコア、陰窩スコア、および杯細胞の減少について 0-4 のスコアをつけた。また、評価は以下の指標にて判断した。0, 異常なし; 1, 0%-25%; 2, 25%-50%; 3, 50%-75%; 4, 75%-100%。

#### 10. 統計処理

実験データはすべて平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、2 群間の比較には Student の t 検定を用い、3 群間以上の比較には Dunnett 法を用いて解析を行った。DAI および病理学的評価については Mann-Whitney U 検定を用いて解析を行った。対照群との統計的有意差を比較し、危険率 5% 未満の場合を有意差ありと判定した。

## 【実験成績】

### 1. DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルに対する薬物の予防的効果

体重推移に対する薬物の効果を Fig. 12 A に示した。DSS 投与により死亡個体は出なかった。DSS 投与により、緩やかな体重の減少がみられたものの、有意な差はみられなかった。

DAI に対する薬物の効果を Fig. 12 B に示した。DAI は DSS 投与 4 日目より徐々に増加していき、6 日目および 7 日目にはコントロール群に比し有意な増加が認められた。DAI に対して、AL-Na および 5-ASA 投与群はどちらも有意な影響は及ぼさなかった。

大腸長に対する薬物の効果を Fig. 12 C に示した。DSS 投与 7 日目において、大腸長はコントロール群に比し有意に減少した。一方、AL-Na 投与群 (200 および 500 mg/kg) は大腸長の減少をコントロール群に比し有意に抑制した。また、5-ASA 投与群 (100 mg/kg) も大腸長の減少をコントロール群に比し有意に抑制した。

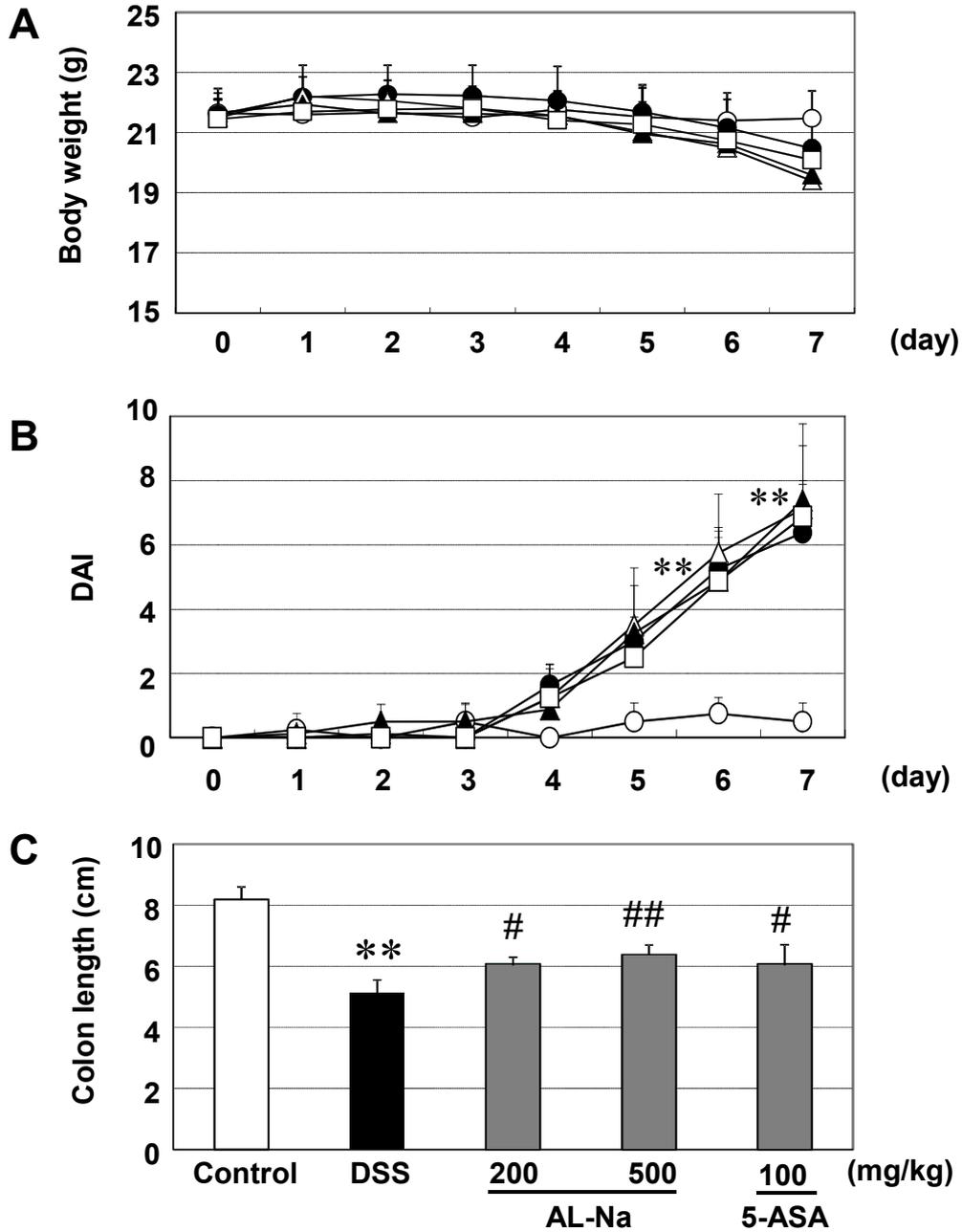
### 2. DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルに対する薬物の治療的効果

体重推移に対する薬物の効果を Fig. 13 A に示した。DSS 投与により死亡個体は出なかった。DSS 投与 5 日目より、コントロール群に比し有意な体重の減少が認められた。AL-Na 投与群は体重減少に対しては有意な影響を及ぼさなかった。プレドニゾロンは 10 mg/kg の用量で DSS 投与 14 日目の体重減少をコントロール群に比し有意に改善した。

DAI に対する薬物の効果を Fig. 13 B に示した。DAI は DSS 投与 5 日目よりコントロール群に比し有意な増加が認められた。AL-Na 投与群は DSS 投与 8 日目および 9 日目において、DAI の増加をコントロール群に比し有意に抑制した。プレドニゾロンは DSS 投与 7 日目から 10 日目にかけて、DAI の増加をコントロール群に比し有意に抑制した。

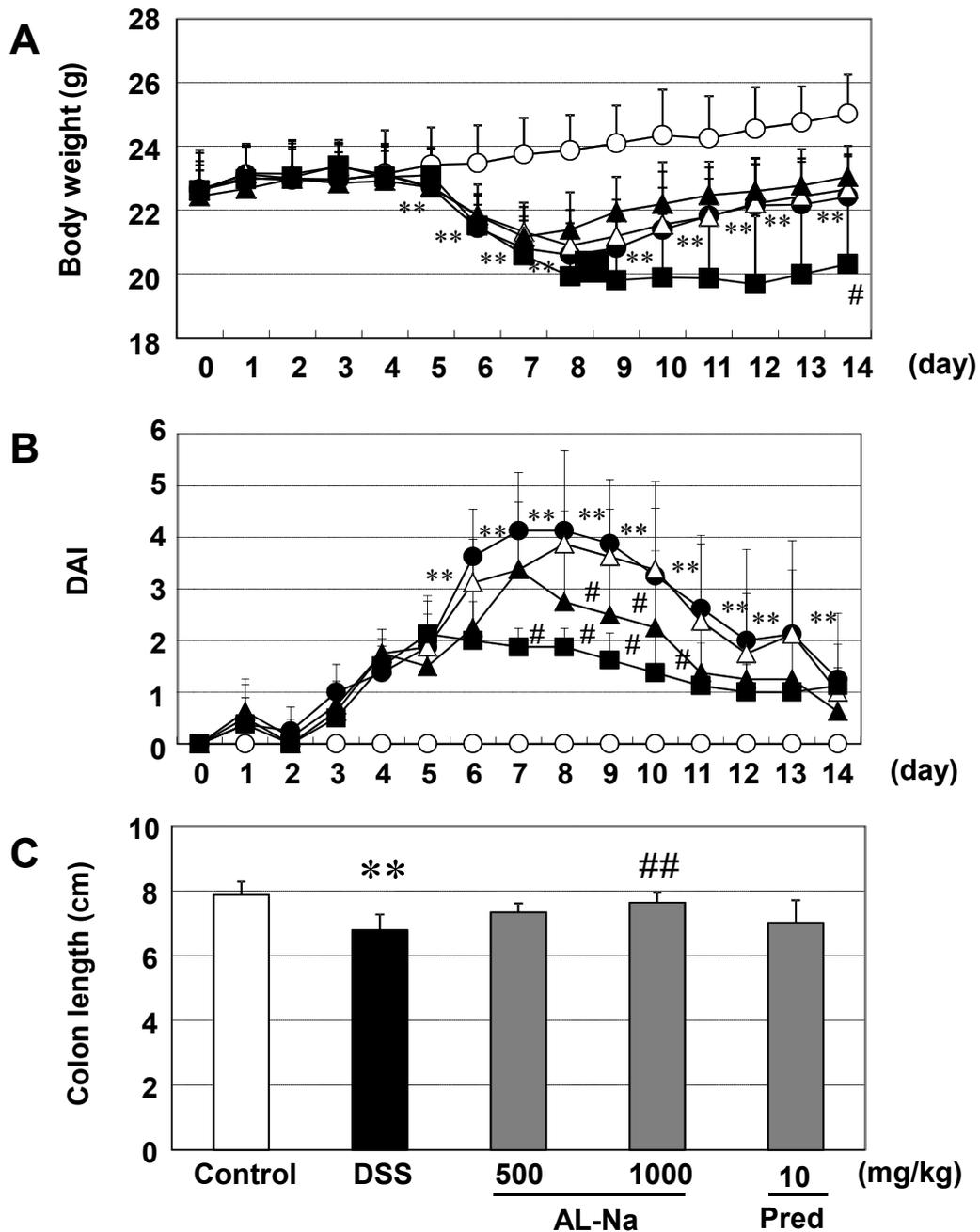
大腸長に対する薬物の効果を Fig. 13 C に示した。DSS 投与 14 日目において、大腸長はコントロール群に比し有意に減少した。DSS による大腸長の減少に対して AL-Na は 1000 mg/kg の用量において、コントロール群に比し有意に抑制した。一方、大腸長の減少に対してプレドニゾロンはコントロール群に比し有意な影響を及ぼさなかった。

5-ASA 投与群 (100 mg/kg) は DSS 投与による体重減少、DAI 増加、大腸長減少に対しては、いずれもコントロール群に比し有意な影響を及ぼさなかった (データ未掲載)。



**Fig. 12 The prophylactic effect of AL-Na on DSS colitis**

Body weight changes (A), DAI (B) and colon length (C) were measured from the mice with DSS drinking for 7 days. AL-Na (200 and 500 mg/kg) and 5-ASA (100 mg/kg) were administrated orally once daily. (○) Control group; (●) DSS group; (△) AL-Na (200 mg/kg); (▲) AL-Na (500 mg/kg); (□) 5-ASA (100 mg/kg). Each point and vertical bar represents the means  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different between the control group at  $P < 0.01$  (Student's t-test). #, ##: Significantly different from the DSS group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (Dunnett's test).



**Fig. 13 The therapeutic effect of AL-Na on DSS colitis**

Body weight changes (A), DAI (B) and colon length (C) were measured from the mice with DSS drinking for 5 days and replacing plain water. AL-Na (500 and 1000 mg/kg) and Prednisolone (Pred) (10 mg/kg) were administrated orally once daily from day 6. (○) Control group; (●) DSS group; (△) AL-Na (500 mg/kg); (▲) AL-Na (1000 mg/kg); (■) Pred (10 mg/kg). Each point and vertical bar represents the means  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different between the control group at  $P < 0.01$  (Student's t-test). #, ##: Significantly different from the DSS group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (Dunnnett's test).

### 3. TNBS 誘発クローン病モデルに対する薬物の治療的効果

生存率に対する薬物の効果を Fig. 14 A に示した。コントロール群では生存率 100% であったのに対して、TNBS 投与により生存率は 40% となった。一方、AL-Na (500 mg/kg) 投与群およびプレドニゾン投与群 (10 mg/kg) では生存率は 80% であった。

体重推移および DAI 活性に対する薬物の効果を Fig. 14 B および C に示した。TNBS 投与により、投与翌日から顕著な体重減少および DAI 増加が認められた。AL-Na は 500 mg/kg の用量において投与 3 日目より体重減少に、投与 4 日目より DAI 増加に対して、コントロール群に比し有意な抑制が認められた。また、プレドニゾンも 10 mg/kg の用量で投与 4 日目以降、体重減少と DAI 増加はコントロール群に比し有意に抑制した。

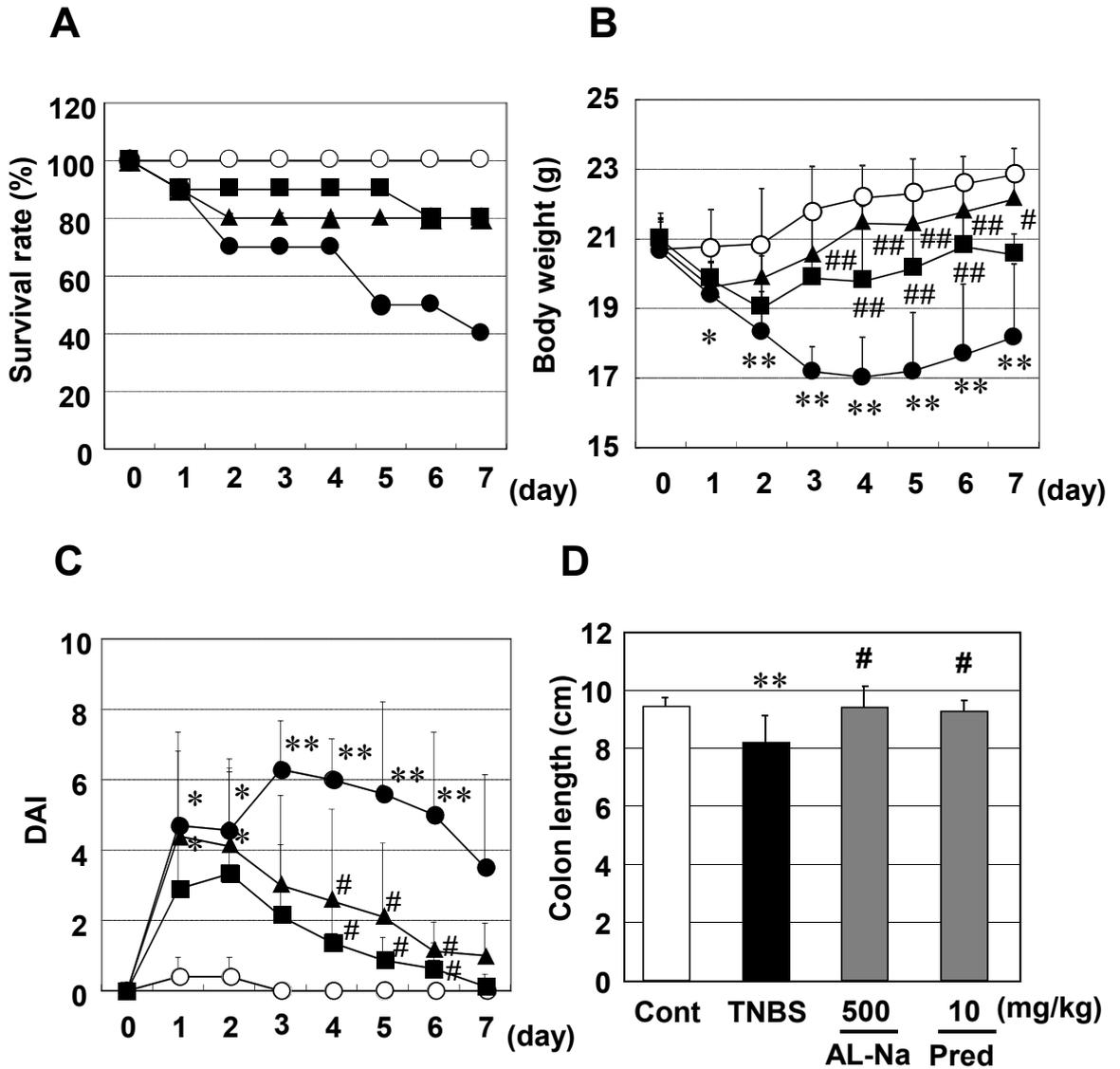
大腸長に対する薬物の効果を Fig. 14 D に示した。TNBS 投与により、大腸長はコントロール群に比し有意に減少した。AL-Na は 500 mg/kg の用量において、TNBS による大腸長減少を有意に改善した。また、プレドニゾンも 10 mg/kg の用量で TNBS による大腸長減少を有意に改善した。

大腸重量に対する薬物の効果を Fig. 15 A に示した。TNBS 投与により、大腸重量はコントロール群に比し有意に増加した。AL-Na は 500 mg/kg の用量において、TNBS による大腸重量増加を有意に改善した。また、プレドニゾンも 10 mg/kg の用量で TNBS による大腸重量増加を有意に改善した。

MPO 活性に対する薬物の効果を Fig. 15 B に示した。TNBS 投与により、MPO 活性はコントロール群に比し有意に増加した。AL-Na は 500 mg/kg の用量において、TNBS による MPO 活性増加を有意に改善した。また、プレドニゾンも 10 mg/kg の用量で TNBS による MPO 活性増加を有意に改善した。

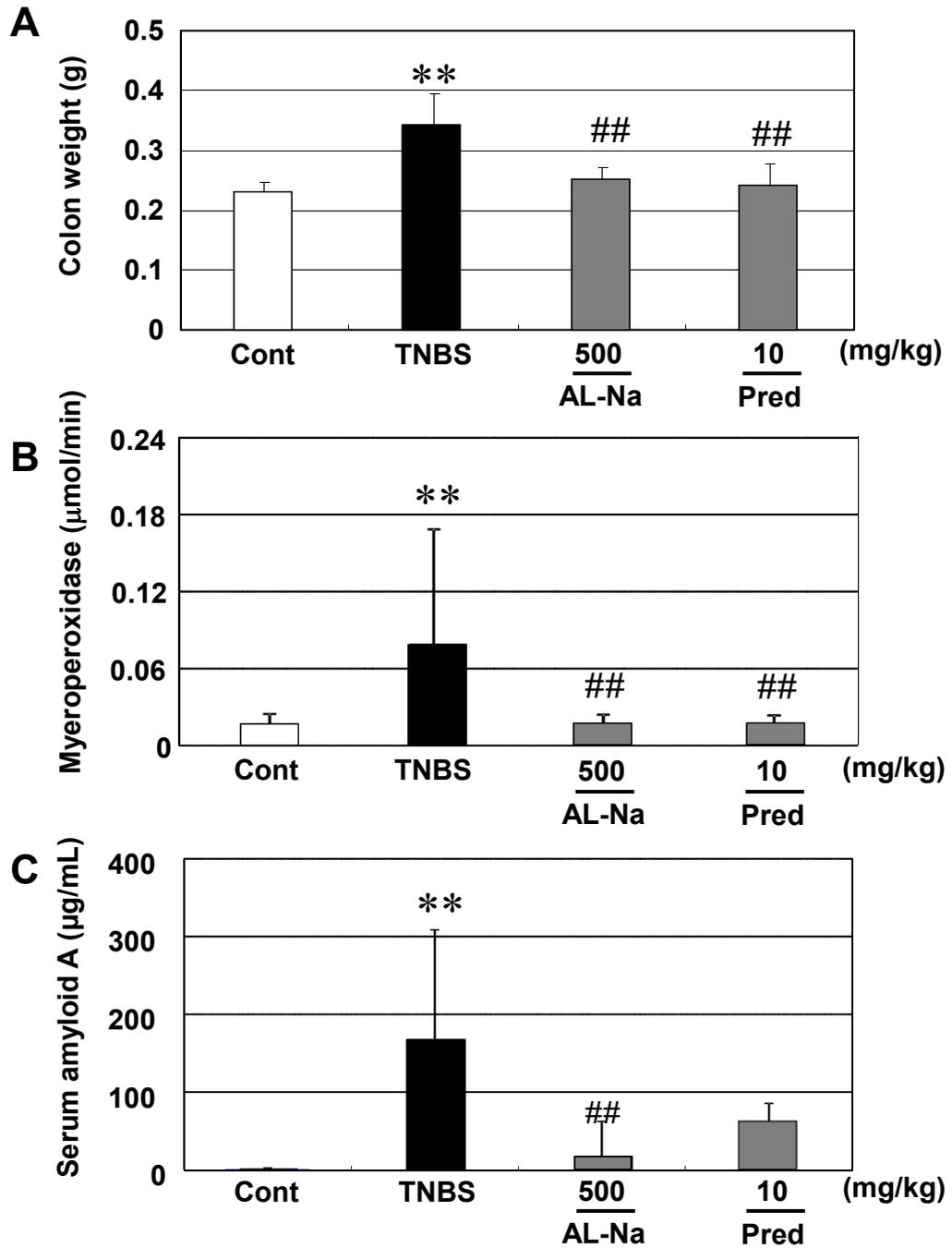
血清アミロイド A 含有量に対する薬物の効果を Fig. 15 C に示した。TNBS 投与により、血清アミロイド A 含有量はコントロール群に比し有意に増加した。AL-Na は 500 mg/kg の用量において、TNBS による血清アミロイド A 増加を有意に改善した。一方、プレドニゾンは 10 mg/kg の用量では有意な影響を及ぼさなかった。

脾臓重量に対しては TNBS を投与しても有意な影響を及ぼさなかった (コントロール群



**Fig. 14 The effect of AL-Na on TNBS colitis and on inflammatory reaction induced by TNBS**

Survival rate (A), body weight changes (B), DAI (C), colon length (D) were measured from the TNBS treated mice. AL-Na (500 mg/kg) and prednisolone (Pred) (10 mg/kg) were administrated orally once daily. (○) control (Cont) group; (●) TNBS group; (▲) AL-Na (500 mg/kg); (■) Pred (10 mg/kg). Each point and vertical bar represents the means  $\pm$  S.E.M. (n=4-8). \*, \*\*: Significantly different between the control group at P<0.05 and P<0.01, respectively (Student's t-test). #, ##: Significantly different from the TNBS group at P<0.05 and P<0.01, respectively (Dunnnett's test).



**Fig. 15 The effect of AL-Na on TNBS colitis and on inflammatory reaction induced by TNBS**

Colon weight (A), myeloperoxidase activity (B) and serum amyloid A content (C) were measured from the TNBS treated mice. AL-Na (500 mg/kg) and prednisolone (Pred) (10 mg/kg) were administered orally once daily. Each column and vertical bar represents the means  $\pm$  S.E.M. (n=4-8). \*\*: Significantly different between the control (Cont) group at P<0.01 (Student's t-test). \*\*: Significantly different from the TNBS group at P<0.01 (Dunnett's test).

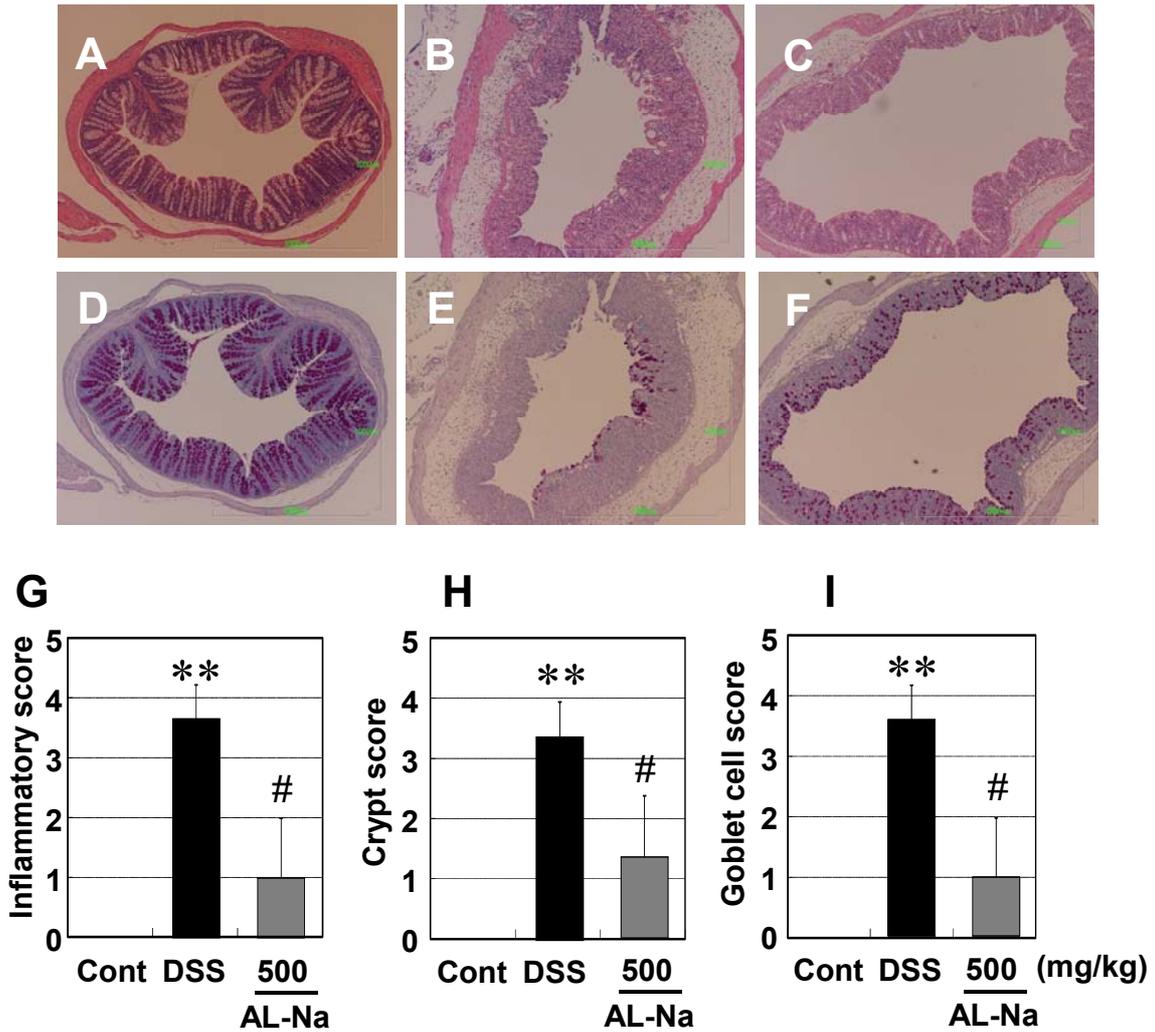
91.7 ± 10 mg、TNBS 群 111.1 ± 31 mg)。AL-Na (104.6 ± 27 mg) およびプレドニゾロン (54.7 ± 7.4 mg) も有意な影響を及ぼさなかった。

#### 4. DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルに対する薬物の組織学的効果

病理組織に対する薬物の効果を Fig. 16 および Fig. 17 に示した。DSS 投与により炎症性細胞の浸潤、陰窩細胞の消失、上皮細胞の短小化、杯細胞の枯渇および粘膜構造の崩壊が観察された。また、炎症性スコア、陰窩スコアおよび杯細胞スコアがコントロール群に比し有意に増加した。一方、AL-Na は予防的投与 (500 mg/kg) および治療的投与 (1000 mg/kg) によりこれらの症状は改善した。炎症性スコア、陰窩スコアおよび杯細胞スコアも有意に抑制した。

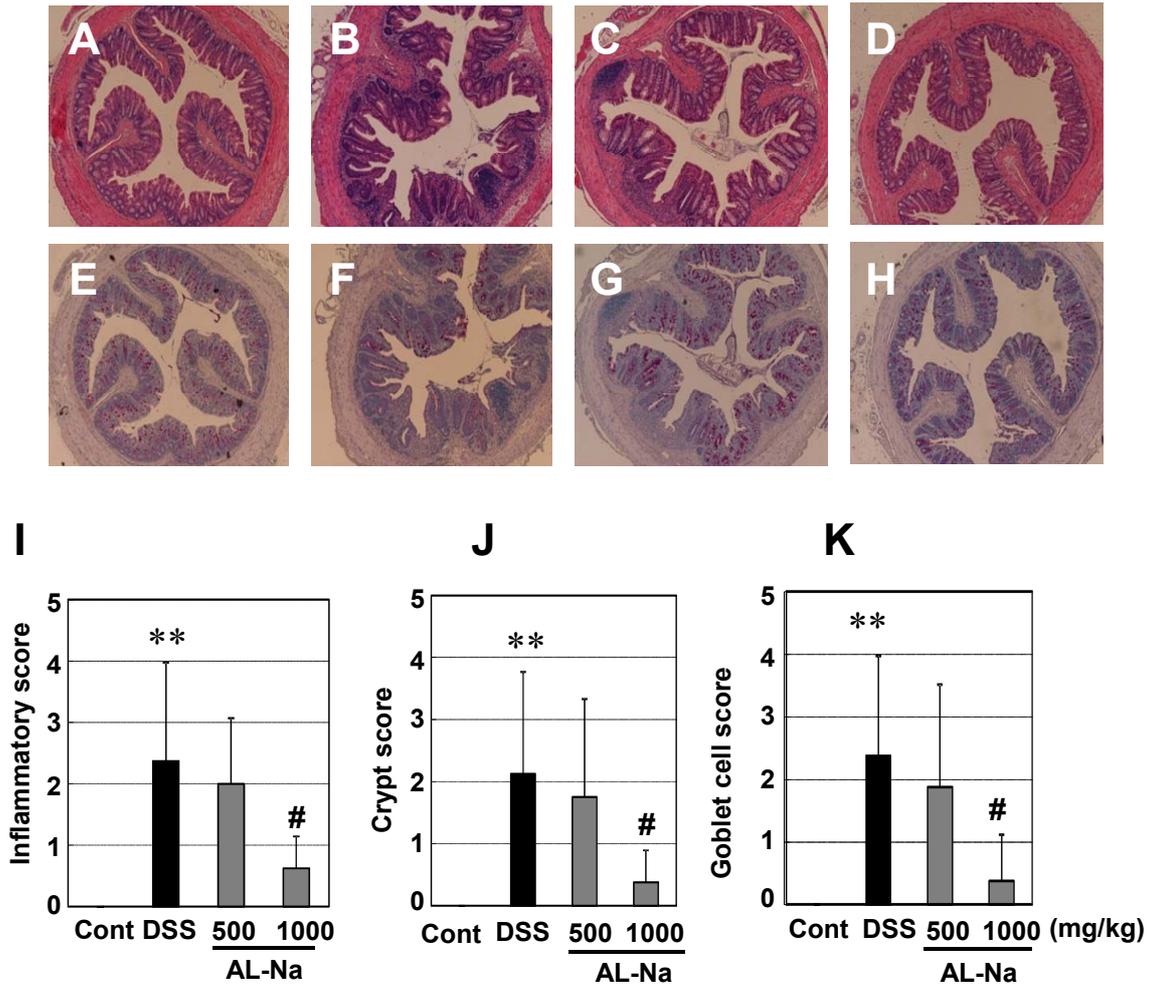
#### 5. TNBS 誘発クローン病モデルに対する薬物の組織学的効果

病理組織に対する薬物の効果を Fig. 18 に示した。TNBS 投与により糜爛性損傷、炎症性細胞の浸潤、陰窩細胞の消失、上皮細胞の短小化、杯細胞の枯渇および粘膜構造の崩壊が観察された。一方、AL-Na は 1000 mg/kg の用量でこれらの症状は改善した。また、炎症性スコア、陰窩スコアおよび杯細胞スコアも有意に抑制した。



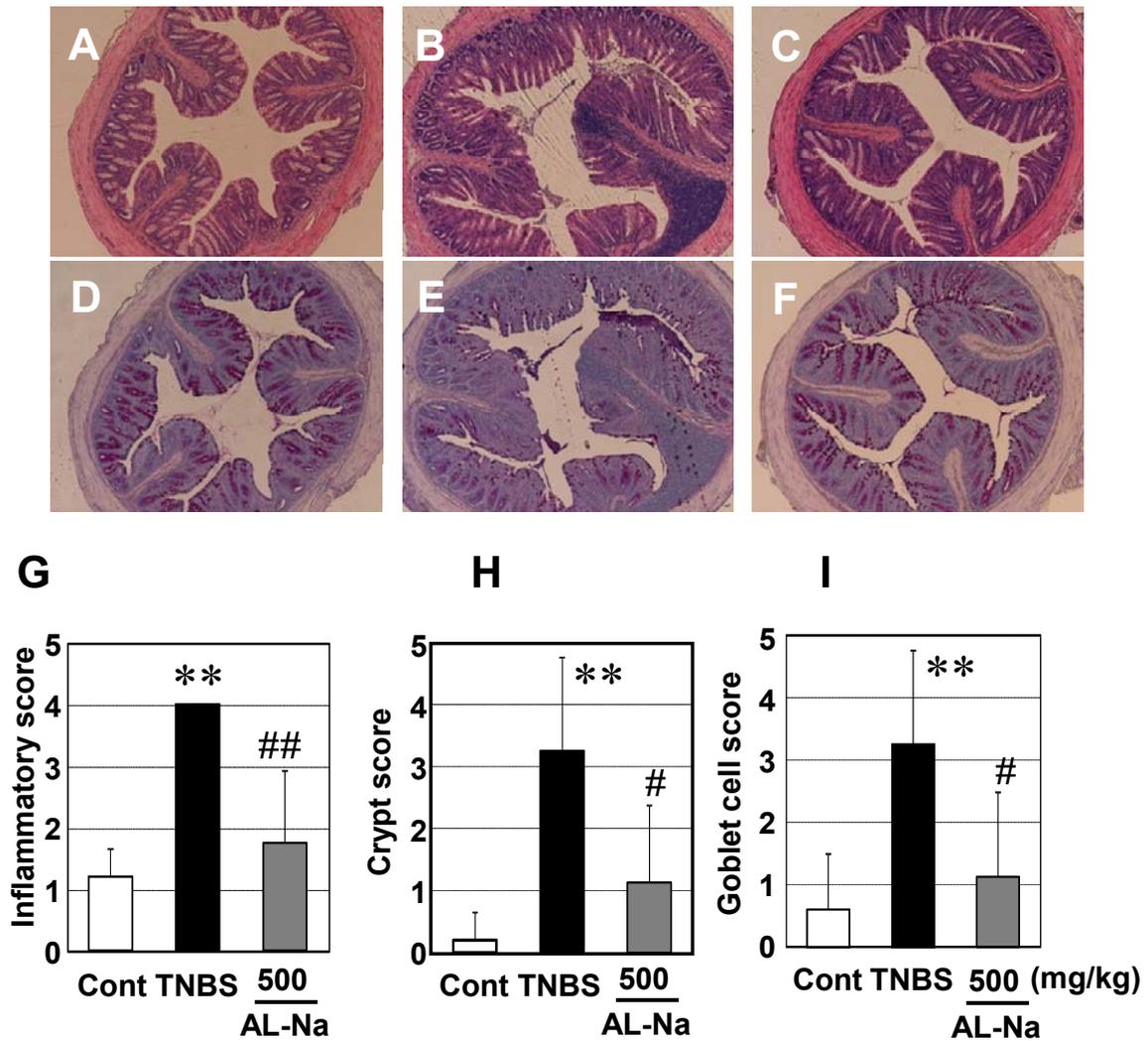
**Fig. 16 The prophylactic effects of AL-Na on histological changes in DSS colitis**

Histological changes were evaluated with HE and PAS stain; Control (Cont) (A and D), DSS (B and E) and AL-Na (500 mg/kg) treated animals (C and F) in DSS induced colitis. Inflammatory score (G), crypt score (H) and goblet cell score (I) were measured. Each column and vertical bar represents the means  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different from the Cont group at P<0.01 (Student's t-test). #: Significantly different from the DSS group at P<0.05 (Student's t-test).



**Fig. 17 The therapeutic effects of AL-Na on histological changes in DSS colitis**

Histological changes were evaluated with HE and PAS stain; control (Cont) (A and E), DSS (B and F), AL-Na at a dose of 500 mg/kg (C and G) and AL-Na at a dose of 1000 mg/kg (D and H) in DSS induced colitis. Inflammatory score (I), crypt score (J) and goblet cell score (K) were measured. Each column and vertical bar represents the means  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*\*: Significantly different from the Cont group at  $P < 0.01$  (Student's t-test). #: Significantly different from the DSS group at  $P < 0.05$  (Dunnett's test).



**Fig. 18 The effects of AL-Na on histological changes in TNBS colitis**

Histological changes were evaluated with HE and PAS stain; control (Cont) (A and D), TNBS (B and E) and AL-Na (500 mg/kg) treated animals (C and F) in TNBS induced colitis. Inflammatory score (G), crypt score (H) and goblet cell score (I) were measured. Each column and vertical bar represents the means  $\pm$  S.E.M. (n=4-8). \*\*: Significantly different from the Cont group at  $P < 0.01$  (Student's t-test). #: Significantly different from the TNBS group at  $P < 0.05$  (Student's t-test).

## 【考察】

本実験ではまず、DSS 誘発 UC モデルに対する AL-Na と 5-ASA の予防的効果について検討した。その結果、両薬物とも DSS 投与による大腸長の減少を抑制した。5-ASA は軽症から中等症の UC に用いられる薬物である [69, 70]。5-ASA と同様の効果を示したことから、AL-Na も DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルに対して治療的効果を示すことが考えられる。次いで、DSS 飲水投与後に通常水に切り替えることにより、大腸炎モデルに対する治療的効果を検討した。DSS 投与により顕著な体重低下、DAI 増加および大腸長の減少が観察された。予防的効果を示した AL-Na (500 mg/kg) および 5-ASA (1000 mg/kg) はどちらも有意な効果を示さなかった。しかしながら、AL-Na は 1000 mg/kg の用量では、DSS 誘発大腸炎モデルの体重低下には有意な効果を示さなかったが、DAI を早期に回復させるとともに大腸の短縮に対して有効であった。第 1 章より、AL-Na は下部消化管においても止血作用を示すことが明らかとなった。そのため、AL-Na の止血作用が DAI 抑制に寄与していることが考えられる。AL-Na の摂食により軟便傾向を示すことが知られているが [1]、本実験においては便の軟化を助長することはなかった。また、AL-Na は DAI の回復を早めるのみならず、粘膜炎症による大腸短縮を抑制した。これらのことにより、AL-Na の投与量を増加させることにより、大腸の被覆面積の増加もしくは被覆時間が延長することにより、AL-Na は粘膜損傷からの修復過程を補助する働きを発揮することが考えられる。一方、5-ASA は本検討においては増量しても効果を示さなかった。

さらに、AL-Na は TNBS 誘発 CD モデルにおいて、大腸炎における炎症性指標として用いられている MPO 活性および血清アミロイド A 値 [70-74] の増加抑制を示した。これらの知見から、AL-Na は大腸粘膜において、炎症後の粘膜治癒を促進していることが示唆される。

コルチコステロイドは IBD 治療の主要薬である。その中で、より好まれているステロイドは経口で用いられる他、緊急時に経腸で用いることができるプレドニゾロンである [74, 75]。しかし、ステロイドの全身投与は様々な副作用を惹起することが広く知られている [75, 76]。そのため、ステロイドは UC や CD において寛解維持には用いられていない。マウスにおいても、ステロイドは副腎への抑制作用が知られている。特に、ステロイドによって体重減少 [76, 77]、脾臓萎縮 [77, 78] が報告されている。さらに、Wexler らは実験動物において、脂質異常症、高血糖症、敗血症および、副腎皮質の萎縮が惹起されると報告している [76, 77]。本実験においても、プレドニゾロンは DSS

大腸炎に有効であったものの、顕著な体重減少を惹起した。組織学的評価においても、DSS モデルおよび TNBS モデルにおいて大腸組織の変化が観察された。AL-Na の投与によって細胞増殖および炎症細胞浸潤と陰窩損傷が改善された。加えて、AL-Na は DSS および TNBS による大腸炎における杯細胞の減少に対して改善作用を示した。AL-Na と同じ水溶性食物繊維であるグアガムやコンニャクマンナンは上皮細胞の分化を促進し、杯細胞を増やすことによりムチンの産生を促進させるという報告がある [79, 30]。前章において、AL-Na はムチン MUC2 産生を増加させることが明らかとなった。ムチン MUC2 は主に杯細胞から分泌される [46]。これらの知見より、AL-Na は腸管の杯細胞を増殖活性化させていることが考えられる。以上より、AL-Na は大腸の杯細胞の活性化を促進させることにより、大腸炎モデルに対して治療効果を示したことが示唆される。

AL-Na は自然免疫の活性化に関与すると報告されている。Yang らは AL-Na がマクロファージを活性化させ、interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-12、IL-6 および tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などのサイトカインの産生を増加させると報告しており、AL-Na が lipopolysaccharide 様の作用があることを示唆している [80]。また、Yoshida らは AL-Na のオリゴ糖がリンパ節細胞において抗原反応による IFN- $\gamma$  および IL-12 の産生を増加させる一方、IL-4 や IgE の産生は抑制すると報告している [81]。従来、IBD の主な原因は獲得免疫の異常と考えられていたが、近年、自然免疫細胞が獲得免疫細胞に結合してその働きを抑制することが明らかとなった [82]。そのため、AL-Na の大腸炎抑制作用には、自然免疫の関与も考えられる。

以上の実験成績より、AL-Na は DSS 誘発 UC モデルおよび TNBS 誘発 CD モデルにおいて有効であり、ステロイドに見られる副作用を示さなかった。また、その治療効果には杯細胞の活性化を介した粘液分泌促進作用が関与していることが示唆された。そのため、AL-Na は IBD の有用な治療薬となりえることが示唆された。

### 第3章 メトトレキサート誘発消化管粘膜傷害に対するアルギン酸ナトリウムの効果の検討

#### 【緒言】

癌疾病に対する化学療法および放射線療法では、しばしば消化管傷害を惹起させることが問題となっている。この消化管傷害はあらゆる化学療法および放射線療法において併発することが報告されており、その数は年々増加していつている [83, 84]。メトトレキサートは葉酸の類似構造を有する薬物であり、白血病などに代表される悪性腫瘍に対して広く用いられる [85]。メトトレキサートはジヒドロ葉酸還元酵素阻害作用を有し、ジヒドロ葉酸を枯渇させることにより、チミジン化および DNA 合成を阻害する [85, 86]。メトトレキサートは細胞増殖頻度の高い胃腸組織や粘膜細胞の正常細胞と腫瘍細胞を識別できない。そのため、メトトレキサートは消化管傷害のような重篤な副作用を発現させる [85, 87-89]。メトトレキサートによる消化管粘膜傷害は栄養分の吸収不全を惹き起こし、下痢を誘発させる [87, 90]。ラットにおいて、メトトレキサート誘発消化管粘膜傷害は病理組織学的には陰窩の消失や細胞萎縮、毛細血管拡張、炎症細胞の浸潤に特徴付けられる [88, 91, 92]。これらの副作用は抗癌治療の用量低減や中止を必要とする上、QOL の著しい低下に直結する。そのため、化学療法に伴う消化管傷害の治療薬の開発がもためられている。

第 1 章において、AL-Na は胃のみならず小腸においても薬理作用を発揮することが明らかとなった。また、粘膜を保護するのみならず、ムチンの産生や細胞増殖に対して有効であることが示唆された。加えて、AL-Na は細胞増殖の指標である PCNA 陽性細胞を増加させた。また、第 2 章において、AL-Na は大腸においても粘膜保護作用を示し、その作用には杯細胞の増殖が関与していることが示唆された。

本章では、AL-Na の粘膜細胞増殖に対する効果を明らかにすることを目的として、ラットを用いたメトトレキサート誘発消化管粘膜傷害モデルに対する AL-Na の効果を検討した。

## 【実験材料ならびに実験方法】

### 1. 実験動物

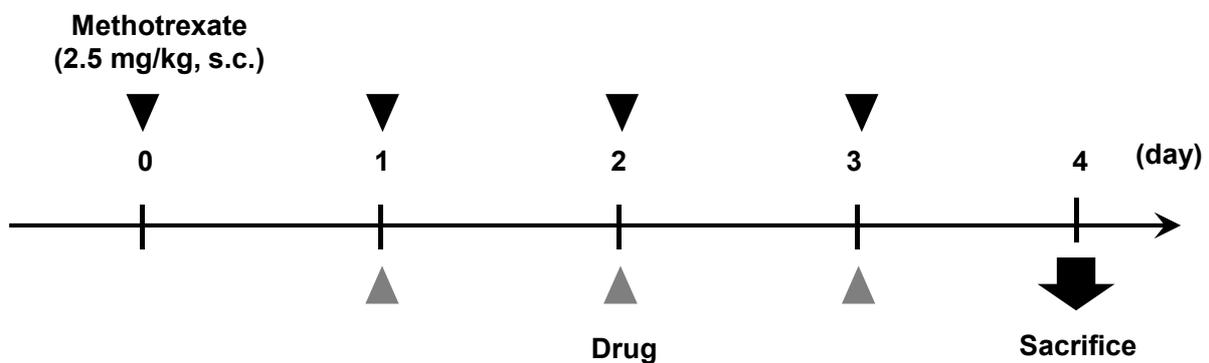
第 1 章に準ずる。動物実験は「堺化学工業(株) 動物実験規則」および「堺化学工業(株) 動物実験委員会要項」に基づいて計画しており、同委員会により承認を受けて実施した。

### 2. 使用薬物

実験に使用した薬物および試薬は、アルギン酸ナトリウム (AL-Na, 共成製薬, 北海道) およびメトトレキサート (和光純薬工業, 大阪) である。AL-Na は蒸留水に溶解して使用した。メトトレキサートは生理食塩液に溶解して使用した。

### 3. 消化管粘膜傷害モデルの作製

消化管粘膜傷害モデル作製は以下の方法に従って行った。即ち、メトトレキサートを生理食塩液に溶解し、0.25 mg/mL となるように調製した。その後、シリンジを使用して 10 mL/kg 皮下投与した。なお、対照群には生理食塩液を同様に投与した。メトトレキサートは 1 日 1 回, 3 日間投与した。投与 4 日目に、エーテルによりラットを到死させ、開腹し胃、小腸および大腸組織を摘出した。血液サンプルはキャピラリーチューブを用いて眼窩より 0.1 mL 採取し、自動血球計数測定装置 (KX-21NV; シスメックス, 神戸) により血球数を測定した。体重および摂餌量は連日測定した。なお、モデル作製プロトコールを Fig. 19 に示した。



**Fig.19 Scheme of animal model used in this chapter**

### 4. 被験薬投与

被験薬は体重当たり 5 mL/kg となるように調製した。AL-Na (500 mg/kg) はメトトレキサート投

与の 30 分前および 6 時間後にラット用経口ゾンデを使用してそれぞれ経口投与した。なお、対照群には蒸留水を同様に投与した。

#### 5. 病理学的評価および絨毛長と陰窩長の測定

病理学的評価を以下の手法で実施した。エーテルによりラットを到死させ空腸および回腸を採取し、即座に 10% 中性ホルマリン緩衝液で固定した。その後、エタノールおよびキシレンで脱水させ、パラフィン包埋処理した。切片は 3  $\mu\text{m}$  でスライスし、HE 染色を施した。絨毛長と陰窩長は同一個体ごとに 3 回測定し、平均値を算出した。

#### 6. 細胞増殖性の測定

細胞増殖性の評価を以下の手法で実施した。Bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) を生理食塩液に溶解させ、解剖の 1 時間前にシリンジを用いて 50 mg/kg の用量で腹腔内投与した。エーテルによりラットを到死させ、空腸および回腸を採取し、即座に 10% 中性ホルマリン緩衝液で固定した。その後、エタノールおよびキシレンで脱水させ、パラフィン包埋処理した。切片は 3  $\mu\text{m}$  でスライスし、氷冷した 0.3% メタノール含有  $\text{H}_2\text{O}_2$  で 20 分浸漬させて脱パラフィンを行った。その後、1M 塩酸で 60°C 8 分間つけて二重鎖 DNA を変性させた。10% ウサギ血清 TBS 溶液にて 40 分浸させ反応を停止させた後、モノクローナル IgG 抗体 (1:100 dilution; Dako, Glostrup, Denmark) で室温にて 1.5 時間インキュベートした。ビオチン標識した抗 IgG 抗体 (Dako) と DAB 基質 (Sigma) で処理した。BrdU 陽性細胞は十分原型を留めた 5 つの陰窩から顕微鏡下にて観察して計測し、平均値を算出した。

#### 7. 統計処理

実験データはすべて平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、2 群間の比較には Student の t 検定を用いた。対照群との統計的有意差を比較し、危険率 5% 未満の場合を有意差ありと判定した。

## 【実験成績】

### 1. メトトレキサート誘発消化管粘膜傷害モデルの体重および摂餌量に対する薬物の効果

体重および摂餌量に対する薬物の効果を Fig. 20 に示した。メトトレキサート 2.5 mg/kg を投与することにより、投与 4 日目にはコントロール群に比し有意な体重の減少がみられた。また、摂餌量は投与翌日からコントロール群に比し有意な減少がみられた。一方、AL-Na 投与群はコントロール群との有意な差はみられなかった。

### 2. メトトレキサート誘発消化管粘膜傷害モデルの臓器重量に対する薬物の効果

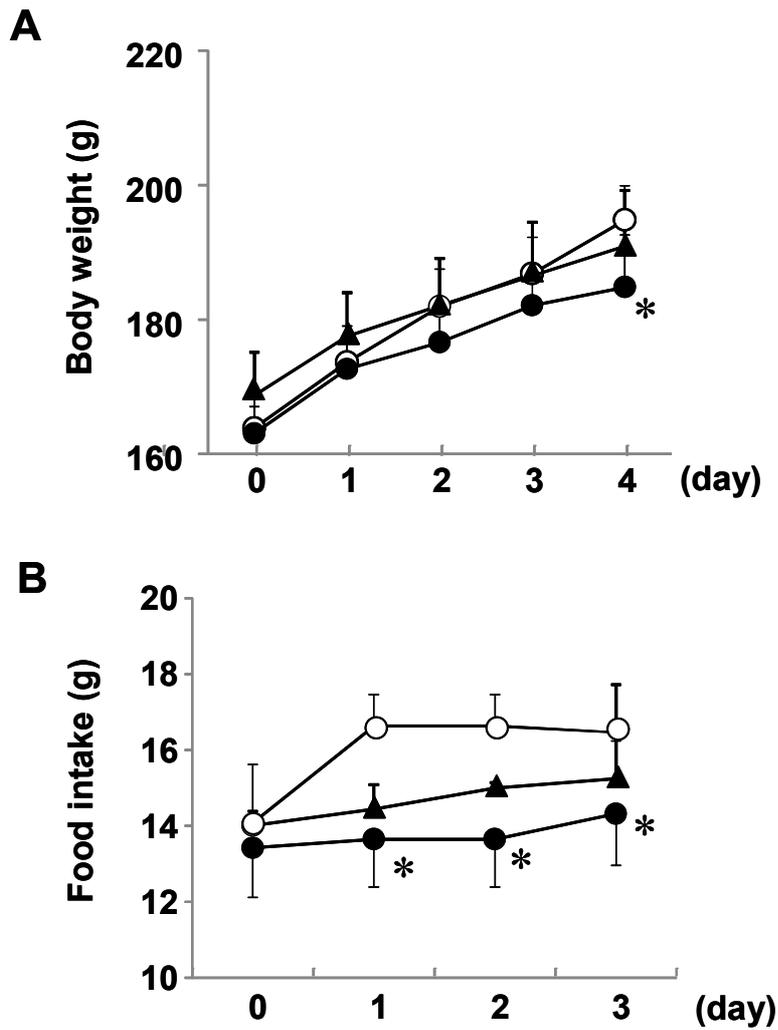
臓器重量に対する薬物の効果を Fig. 21 に示した。メトトレキサート 2.5 mg/kg を投与することにより、投与 4 日目には胃、小腸および大腸の重量がコントロール群に比し有意な減少がみられた。一方、AL-Na を投与することにより小腸重量の減少が有意に改善された。また、胃および大腸重量はコントロール群との有意な差はみられなかった。

### 3. メトトレキサート誘発消化管粘膜傷害モデルの絨毛長および陰窩長に対する薬物の効果

絨毛長および陰窩長に対する薬物の効果を Fig. 22 に示した。メトトレキサート 2.5 mg/kg を投与することにより、空腸および回腸において陰窩細胞の構造崩壊、上皮細胞の消失および細胞萎縮がみられ、空腸および回腸においてコントロール群に比し絨毛長および陰窩長の有意な短縮がみられた。AL-Na 投与群は 500 mg/kg の用量で絨毛長および陰窩長の短縮を有意に抑制した。

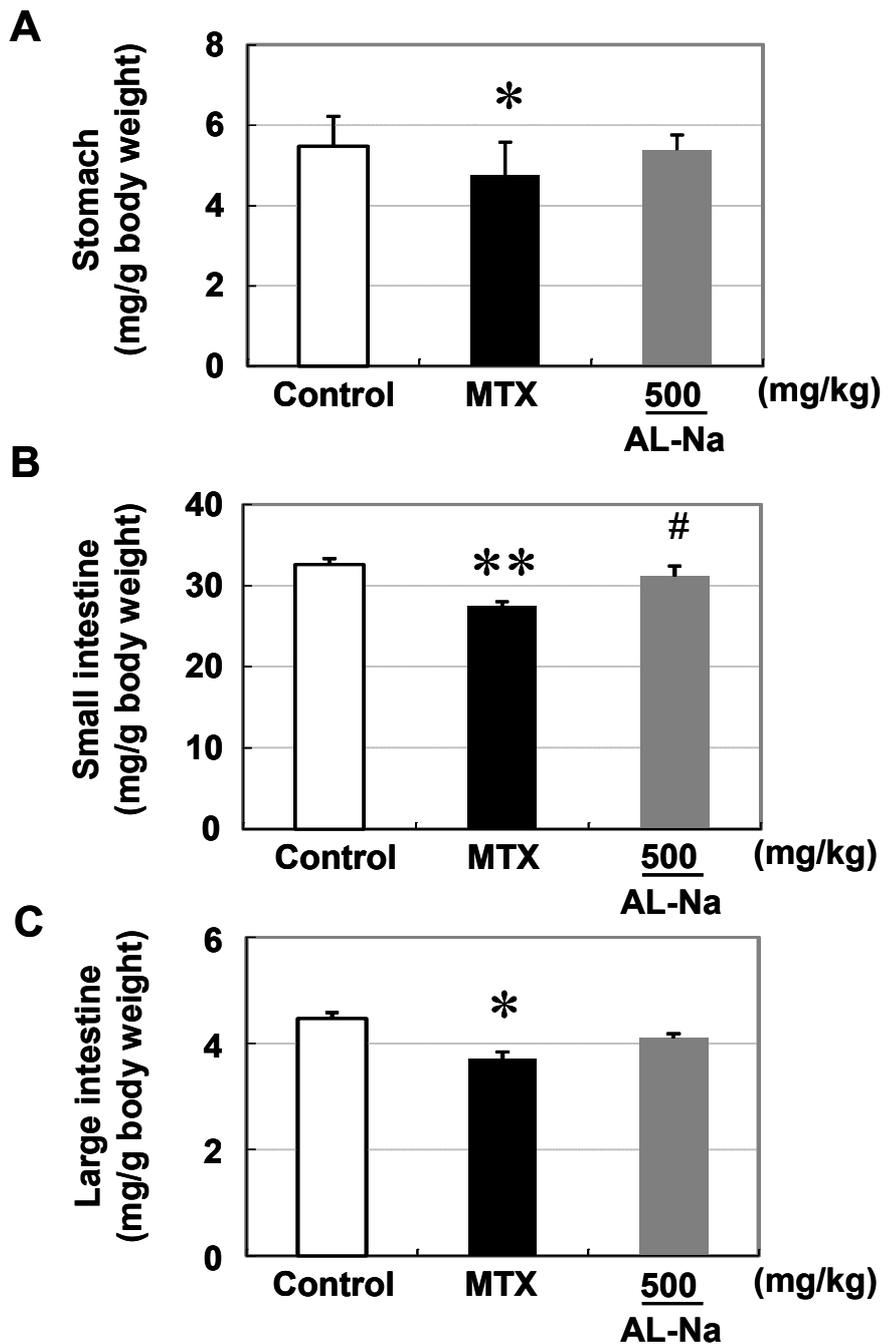
### 4. メトトレキサート誘発消化管粘膜傷害モデルの細胞増殖に対する薬物の効果

細胞増殖性に対する薬物の効果を Fig. 23 に示した。メトトレキサート 2.5 mg/kg を投与することにより、空腸および回腸において BrdU 陽性細胞がコントロール群に比し有意に減少した。一方、AL-Na を投与することにより空腸および回腸の BrdU 陽性細胞は有意に増加した。



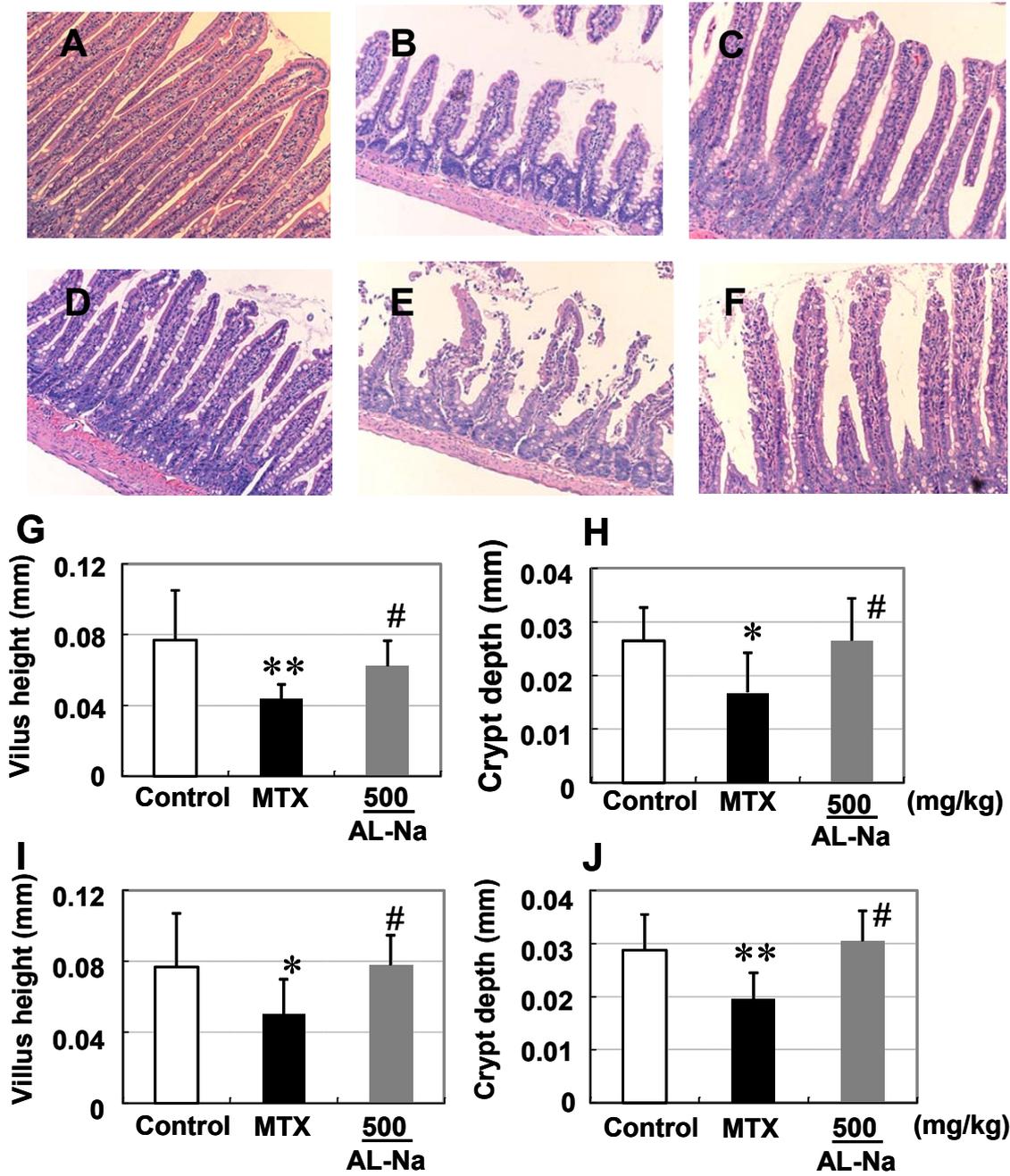
**Fig. 20 Effect of AL-Na on body weight change and food intake**

Daily body weight (A) and food intake (B) were measured. The animals were treated with AL-Na at a dose of 500 mg/kg. (O) control group; (●) methotrexate group; (▲) AL-Na (500 mg/kg). Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*: Significantly different from the control group at  $P < 0.05$  (Student's t-test).



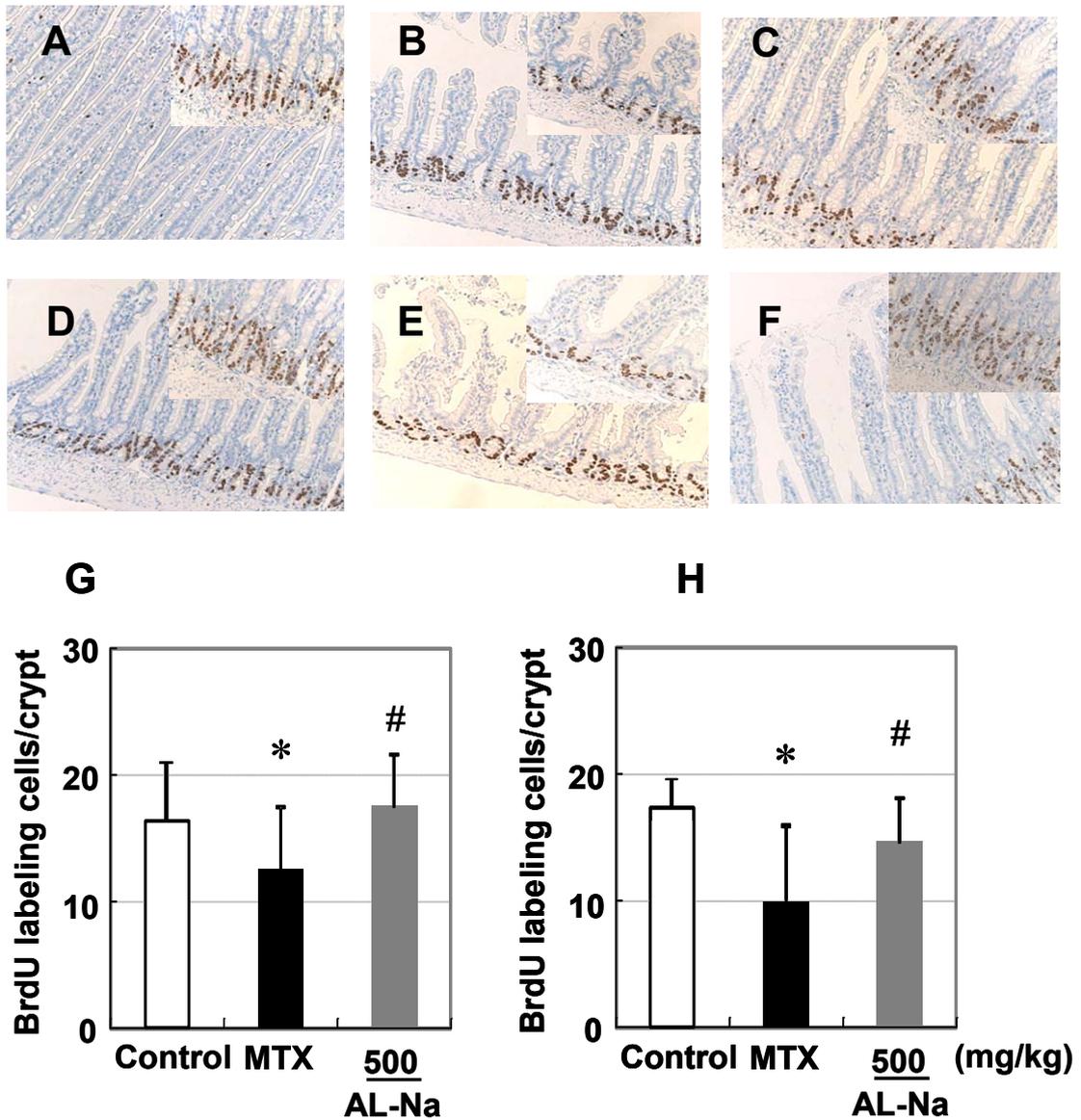
**Fig. 21 Effect of AL-Na on gastrointestinal organ weight**

Stomach (A), small intestine (B) and large intestine (C) weight were measured. The animals were treated with AL-Na at a dose of 500 mg/kg. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*, \*\*: Significantly different from the control group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (Student's t-test). #: Significantly different from the methotrexate (MTX) treated group at  $P < 0.05$  (Student's t-test).



**Fig. 22 Effect of AL-Na on villus height and crypt depth in jejunum**

Small intestinal tissues were stained by HE. Jejunal tissues were obtained from normal rat (A), methotrexate (MTX) treated rat (B) and MTX treated with AL-Na rat (C). Ileal tissues were obtained from normal rat (D), MTX treated rat (E) and MTX treated with AL-Na at 500 mg/kg rat (F). Jejunal villus height (G) and crypt depth (H) and ileal villus height (I) and crypt depth (J) were measured. The animals were treated with AL-Na at a dose of 500 mg/kg. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*, \*\*: Significantly different from the control group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (Student's t-test). #: Significantly different from the MTX treated group at  $P < 0.05$  (Student's t-test).

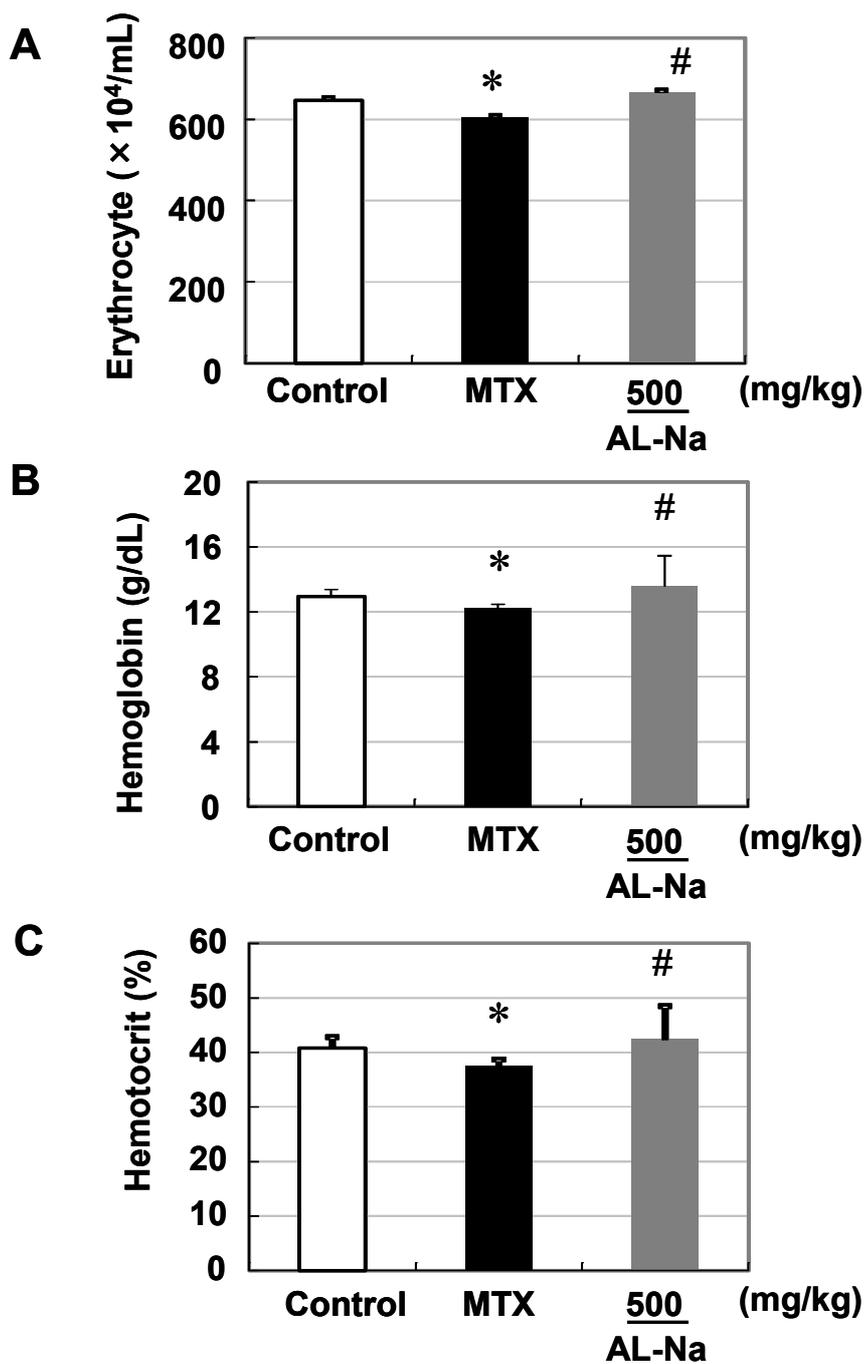


**Fig. 23 Effect of AL-Na on number of BrdU labeling cells**

Small intestinal tissues were stained by BrdU. Jejunal tissues were obtained from normal rat (A), methotrexate (MTX) treated rat (B) and MTX treated with AL-Na at 500 mg/kg rat (C). Ileal tissues were obtained from normal rat (D), MTX treated rat (E) and MTX treated with AL-Na at 500 mg/kg rat (F). The number of BrdU labeling cell was counted in jejunum (G) and ileum (H). The animals were treated with AL-Na at a dose of 500 mg/kg. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \* : Significantly different from the control group at  $P < 0.05$  (Student's t-test). #: Significantly different from the MTX treated group at  $P < 0.05$  (Student's t-test).

#### 5. メトトレキサートと誘発消化管粘膜傷害モデルの貧血症状に対する薬物の効果

貧血症状に対する薬物の効果を Fig. 24 に示した。メトトレキサート 2.5 mg/kg を投与することにより、投与 4 日目には赤血球数、ヘモグロビンおよびヘマトクリット値の有意な減少が観察された。一方、AL-Na を投与することによりこれらの症状を有意に抑制した。



**Fig. 24 Effect of AL-Na on blood cell loss**

The number of erythrocyte (A), the concentration of hemoglobin (B) and hematocrit (C) were measured. The animals were treated with AL-Na at a dose of 500 mg/kg. Each column and vertical bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). \*: Significantly different from the control group at  $P < 0.05$  (Student's t-test). #: Significantly different from the methotrexate (MTX) treated group at  $P < 0.05$  (Student's t-test).

## 【考察】

本実験ではまず、メトトレキサートを用いて消化管粘膜傷害モデルを作製した。メトトレキサートを3日間投与することによって、体重の減少および摂餌量の減少が確認された。さらに、胃、小腸および大腸重量の顕著な減少が惹起された。特に、小腸では細胞萎縮および粘膜細胞の細胞増殖性の低下が認められた。メトトレキサート誘発消化管粘膜傷害モデルに対するAL-Naの効果を検討した結果、小腸重量の減少が抑制された。一方、胃および大腸重量の減少には有意な影響を及ぼさなかったが、これは小腸粘膜細胞の増殖性が特に高いことによるものであると考えられる。次いで、小腸組織のうち空腸部位および回腸部位の組織学的評価を行った。メトトレキサート投与により、空腸および回腸ともに上皮細胞の消失、陰窩構造の崩壊、絨毛長および陰窩長の減少が観察された。一方、AL-Na投与群ではこれらの症状が改善されていた。

細胞増殖の低下は癌疾病における化学療法の代表的な副作用である [87, 88]。BrdU はチミジンの核酸アナログであり、細胞周期の S 期に DNA に組み込まれるため、ラットの細胞増殖性を検討することが可能となる [93, 94]。免疫染色の結果、空腸および回腸において AL-Na はメトトレキサートによる細胞増殖抑制を抑制することが明らかとなった。AL-Na は創傷治癒に用いられ、細胞増殖を促進することが報告されている [12, 13]。AL-Na ベースのゲルマトリックスは創傷した皮膚において、コラーゲン合成を促進させ、transforming growth factor-beta1 (TGFβ1) の分泌を刺激する [95]。TGFβ1 の過発現は創傷治癒過程において細胞増殖に貢献する [14]。これらの知見より、コラーゲン合成において AL-Na のゲルが TGFβ1 を分泌することが主な機序となることが示唆される。なお、データには示していないが *in vitro* の実験系においても、AL-Na が細胞増殖を促進させることが示唆できる結果も得られている。

葉酸は生物学的に重要な物質である。特にヒトにおいては、DNA の合成、修復およびメチル化修飾において必須である [96]。葉酸は細胞の分割および成長に必須であり、正常な赤血球の産生に役立つ [97]。葉酸の欠乏は重度の貧血や出血をもたらす [98, 99]。ラットにおいて、メトトレキサートは血液中の赤血球やヘモグロビン値の低下に加えて、便中のヘモグロビン値が増加すると報告されている [100, 101]。本実験において、ラットにメトトレキサートを投与した結果、赤血球数、ヘモグロビンおよびヘマトクリット値が減少した。このことから、メトトレキサートにより葉酸が枯渇し赤血球合成が傷害されるとともに、消化管から出血する易出血が引き起こされることが考えられる。さ

らには、AL-Na はメトトレキサートによる赤血球の減少を抑制し、止血作用を示した。前章でも述べたように、AL-Na は胃のみならず小腸でも止血作用を発揮することが明らかとなった。

血小板には TGFb, vascular endothelial growth factor (VEGF) および platelet factor-4 などの組織成長因子が含まれている [102]。そのため、血小板の凝集は細胞増殖に寄与する。TGFb は腸管細胞の分化と増殖を刺激するため [103]、粘膜治癒を促進させる TGFb の分布システムに血小板が重要である [104]。そのため、AL-Na の細胞増殖促進作用にこれらの因子が関与していることが示唆される。

AL-Na は生体内ではほとんど吸収されないことが報告されている [18]。<sup>14</sup>C で標識した AL-Na をラットに経口投与し 17 時間経過中の <sup>14</sup>C を測定した結果、糞中 85~91%、尿中 0.11~0.16%、呼気中 (CO<sub>2</sub>) 0.21~0.42%、血漿中 0.002~0.007% であり、アルギン酸ナトリウムの吸収は極めて小さい。そのため、メトトレキサートの抗癌作用にはほとんど影響を及ぼさないことが考えられる。以上の実験成績より、AL-Na は消化管粘膜保護作用および止血作用を示し、メトトレキサートによる細胞萎縮に対して有効であることが明らかとなった。また、その作用には細胞増殖促進作用が関与していることが示唆された。そのため、AL-Na はメトトレキサートによる消化管粘膜傷害の有用な治療薬となりえることが示唆された。

## 総括

本研究では、AL-Na の粘膜保護作用に着目し、その薬理作用を検討するとともに、種々の消化器疾患モデルについて動物モデルを用いた検討を行った。本研究によって以下のことが明らかとなった。

1. AL-Na は NSAIDs 誘発胃潰瘍モデルおよび小腸傷害モデルにおいて抑制作用を示した。このことから、AL-Na は上部消化管のみならず胃酸の影響の少ない小腸においても作用を発揮することが明らかとなった。また、AL-Na の消化管粘膜保護作用にはムチン分泌による粘液産生促進作用が関与し、防御機能を亢進させることによって、腸内細菌の浸潤を抑制して病態進行を抑制することが示唆された。
2. AL-Na は DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルおよび TNBS 誘発クローン病モデルにおいて抑制作用を示した。また、AL-Na は治療的効果を発揮したことから、AL-Na は大腸においても粘膜保護作用を示し、粘膜治癒に寄与することが明らかとなった。AL-Na は腸炎により減少した大腸の杯細胞数を増加させたことより、AL-Na の粘膜治癒効果には腸管での粘液産生を司る杯細胞の増殖が関与することが示唆された。
3. AL-Na はメトトレキサート誘発消化管粘膜傷害モデルにおいて消化管粘膜傷害に対して抑制作用を示した。また、メトトレキサートによる絨毛や陰窩の萎縮を改善した。BrdU を用いて細胞増殖に対する影響について検討した結果、AL-Na は細胞増殖促進作用があることが示唆された。

以上の実験成績より、AL-Na は胃酸の影響の少ない下部消化管においても粘膜保護作用および止血作用を示すのみならず、粘液分泌促進作用や細胞増殖促進作用を有することが明らかとなった。また、AL-Na は種々の消化器疾患に対する治療薬として有用性が高いことが期待できた。

【参考文献】

1. Ertesvag H and Valla S : Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degrad. Stab.*, 59, 85–91 (1998).
2. Ertesvåg H, Valla S, and Skjåk-Bræk, G : Genetics and biosynthesis of alginates. *Carbohydr. Europe.*, 14, 14–18 (1996).
3. Johnson FA, Craig DQM., and Mercer AD : Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49, 639–643 (1997).
4. Steinbüchel A and Rhee SK : Polysaccharide and polyamides in the food Industry. *Weinheim*, 1-30 (2005).
5. Thiele H, Plohnke K, Brandt E, and Moll G : Ordnen von Polyelektrolyten durch Ionendiffusion. *Colloid Polym. Sci.*, 182, 24–35 (1962).
6. Daigo K, Wada Y, Yamada C, Yamaji M, Okuda S, Okada M, and Miyazato T : Pharmacological studies of sodium alginate. I. Protective effect of sodium alginate on mucous membranes of upper-gastrointestinal tract. *Yakugaku Zasshi*, 101, 452-457 (1981).
7. Daigo K, Yamaji M, Yamada C, Wada Y, Okuda S, Okada M, and Miyazato T : Pharmacological studies of sodium alginate. III. Acceleration of fibrin formation by sodium alginate. *Yakugaku Zasshi*, 101, 464-469 (1981).
8. Diago K, Yamada C, Yamaji M, Nakagiri N, Okada M, Komiya H, and Miyazato T : Pharmacological studies of sodium alginate. V. Effect of sodium alginate on platelet aggregation. *Yakugaku Zasshi*, 105, 171-182 (1985).
9. Manabe N, Haruma K, Ito M, Takahashi N, Takasugi H, Wada Y, Nakata H, Katoh T, Miyamoto M, and Tanaka S : Efficacy of adding sodium alginate to omeprazole in patients with nonerosive reflux disease: a randomized clinical trial. *Dis. Esophagus.*, 25, 373-380 (2012).
10. Kitchin LI and Castell DO : Rationale and efficacy of conservative therapy for gastroesophageal reflux disease. *Arch. Intern. Med.*, 151, 448–454 (1991).
11. Klinkenberg-Knol EC, Festen HPM, and Meuwissen SGM : Pharmacological management of

- gastro-oesophageal reflux disease. *Drugs*, 49, 695–710 (1995).
12. Tytgat GNJ and Nio CY : The medical therapy of reflux oesophagitis. *Baillieres. Clin. Gastroenterol.*, 1, 791–807 (1987).
  13. Kim CJ, Kovacs-Nolan JA, Yang C, Archbold T, Fan MZ, and Mine Y : L-Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *J. Nutr. Biochem.*, 21, 468–475 (2010).
  14. Vasina V, Broccoli M, Ursino MG, Canistro D, Valgimigli L, Soleti A, Paolini M, and De Ponti F : Non-peptidyl low molecular weight radical scavenger IAC attenuates DSS-induced colitis in rats. *World J. Gastroenterol.*, 16, 3642-3650 (2010).
  15. Prantera C, Cottone M, and Pallone F : Mesalamine in the treatment of mild to moderate active Crohn's ileitis, results of a randomised multicenter trial. *Gastroenterology*, 116, 521–526 (1999).
  16. Paul W and Sharma CP : Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends Biomater. Artif. Organs.*, 18, 18–23 (2004).
  17. Giovanna G, Mario M, and Paola L : Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches. *Molecules*, 13, 2069-2106 (2008).
  18. Humphreys ER and Triffitt JT : Absorption by the rat of alginate labelled with carbon-14. *Nature*, 14, 1172-1173 (1968).
  19. Hatazawa R, Ohno R, Tanigami M, Tanaka A, and Takeuchi K : Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isozymes in healing of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 318, 691-699 (2006).
  20. Graham DY, Opekun AR, Willingham FF, and Qureshi WA : Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID users. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 3, 55-59 (2005).
  21. Rimbaş M, Marinescu M, Voiosu MR, Băicuș CR, Caraiola S, Nicolau A, Nitescu D. Badea GC, and Parvu MI : NSAID-induced deleterious effects on the proximal and mid small bowel in seronegative spondyloarthropathy patients. *World J. Gastroenterol.*, 17, 1030-1035 (2011).
  22. Higuchi K, Umegaki E, Watanabe T, Yoda Y, Morita E, Murano M, Tokioka S, and Arakawa

- T : Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury. *J. Gastroenterol.*, 44, 879-888 (2009).
23. Anthony A, Pounder RE, Dhillon pAP, and Wakefield AJ : Vascular anatomy defines sites of indomethacin induced jejunal ulceration along the mesenteric margin. *Gut*, 41, 763-770 (1997).
24. Takeuchi K, Miyazawa T, Tanaka A, Kato S, and Kunikata T : Pathogenic importance of intestinal hypermotility in NSAID-induced small intestinal damage in rats. *Digestion*, 66, 30-41 (2002).
25. Porras M, Martín MT, Yang PC, Jury J, Perdue MH, and Vergara P : Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 12, 843-852 (2006).
26. Okayama T, Yoshida N, Uchiyama K, Takagi T, Ichikawa H, and Yoshikawa T. Mast cells are involved in the pathogenesis of indomethacin-induced rat enteritis. *J. Gastroenterol.*, 44 Suppl 19, 35-39 (2009).
27. Omatsu T, Naito Y, Handa O, Mizushima K, Hayashi N, Qin Y, Harusato A, Hirata I, Kishimoto E, Okada H, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, and Yoshikawa T : Reactive oxygen species-quenching and anti-apoptotic effect of polaprezinc on indomethacin-induced small intestinal epithelial cell injury. *J. Gastroenterol.*, 45, 692-702 (2010).
28. Kunikata T, Tanaka A, Miyazawa T, Kato S, and Takeuchi K : 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 inhibits indomethacin-induced small intestinal lesions through EP3 and EP4 receptors. *Dig. Dis. Sci.*, 47, 894-904 (2002).
29. Scheiman JM, Yeomans ND, Talley NJ, Vakil N, Chan FK, Tulassay Z, Rainoldi JL, Szczepanski L, Ung KA, Kleczkowski D, Ahlbom H, Naesdal J, and Hawkey C : Prevention of ulcers by esomeprazole in at-risk patients using non-selective NSAIDs and COX-2 inhibitors. *Am. J. Gastroenterol.*, 101, 701-710 (2006).
30. Maiden L, Thjodleifsson B, Theodors A, Gonzalez J, and Bjarnason I : A quantitative analysis

- of NSAID-induced small bowel pathology by capsule enteroscopy. *Gastroenterology*, 128, 1172-1178 (2005).
31. Goldstein JL, Eisen GM, Lewis B, Gralnek IM, Zlotnick S, and Fort JG : Video capsule endoscopy to prospectively assess small bowel injury with celecoxib, naproxen plus omeprazole, and placebo. Investigators. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 3, 133-141 (2005).
  32. Wallace JL, Syer S, Denou E, de Palma G, Vong L, McKnight W, Jury J, Bolla M, Bercik P, Collins SM, Verdu E, and Ongini E : Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology*, 141, 1314-1322 (2011).
  33. Mizukami K, Murakami K, Abe T, Inoue K, Uchida M, Okimoto T, Kodama M, and Fujioka T : Aspirin-induced small bowel injuries and the preventive effect of rebamipide. *World J. Gastroenterol.*, 17, 5117-5122 (2011).
  34. Diao L, Mei Q, Xu JM, Liu XC, Hu J, Jin J, Yao Q, and Chen ML : Rebamipide suppresses diclofenac-induced intestinal permeability via mitochondrial protection in mice. *World J. Gastroenterol.*, 18, 1059-1066 (2012).
  35. Daigo K, Yamada C, Wada Y, Yamaji M, Okuda S, Okada M, and Miyazato T : Pharmacological studies of sodium alginate. II. Hemostatic effect of sodium alginate on gastrointestinal bleeding. *Yakugaku Zasshi*, 101, 458-463 (1981).
  36. Poynard T, Vernisse B, and Agostini H : Randomized, multicentre comparison of sodium alginate and cisapride in the symptomatic treatment of uncomplicated gastro-oesophageal reflux. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 12, 159-165 (1998).
  37. Dettmar PW, Sykes J, Little SL, and Bryan J : Rapid onset of effect of sodium alginate on gastro-oesophageal reflux compared with ranitidine and omeprazole, and relationship between symptoms and reflux episodes. *Int. J. Clin. Pract.*, 60, 275-283 (2006).
  38. Daigo K, Yamaji M, Yamada C, Matsutani K, Yagi M, and Nakajima Y : Curative effect of sodium alginate on experimental hydrochloric acid and tetra-gastrin induced ulcer, *Japanese Pharmacology and Therapeutics*, 10, 281-289 (1982).
  39. Davies NM, Saleh JY, and Skjodt NM : Detection and prevention of NSAID-induced

- enteropathy. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3, 137-155 (2000).
40. Tugendreich S, Pearson CI, Sagartz J, Jarnagin K, and Kolaja K : NSAID-induced acute phase response is due to increased intestinal permeability and characterized by early and consistent alterations in hepatic gene expression. *Toxicol. Pathol.*, 34, 168-179 (2006).
  41. Iwai T, Ichikawa T, Goso Y, Ikezawa T, Saegusa Y, Okayasu I, Saigenji K, and Ishihara K : Effects of indomethacin on the rat small intestinal mucosa: immunohistochemical and biochemical studies using anti-mucin monoclonal antibodies. *J. Gastroenterol.*, 44, 277-284 (2009).
  42. Iwai T, Ichikawa T, Kida M, Goso Y, Saegusa Y, Okayasu I, Saigenji K, and Ishihara K : Vulnerable sites and changes in mucin in the rat small intestine after non-steroidal anti-inflammatory drugs administration. *Dig. Dis. Sci.*, 55, 3369-3376 (2010).
  43. Allen A and Flemström G : Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288, 1-19 (2005).
  44. Allen A : Structure of gastrointestinal mucus glycoproteins and the viscous and gel-forming properties of mucus. *Br. Med. Bull.*, 34, 28-33 (1978).
  45. Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle JA, Cuber JC, and Plaisancié P : Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut*, 46, 218-224 (2000).
  46. Sharma R, Young C, and Neu J : Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010, 305879 (2010).
  47. Frankel W, Zhang W, Singh A, Bain A, Satchithanandam S, Klurfeld D, and Rombeau J : Fiber: effect on bacterial translocation and intestinal mucin content. *World J. Surg.*, 19, 144-148 (1995).
  48. Satoh H : Role of dietary fiber in formation and prevention of small intestinal ulcers induced by nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Curr. Pharm. Des.*, 16, 1209-1213 (2010).
  49. Molodecky NA and Kaplan GG : Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol.*, 6, 339-346 (2010).

50. Salari P and Abdollahi M : Controversial effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on bone: a review. *Inflamm. Allergy. Drug. Targets.*, 8, 169-175 (2009).
51. Hosseini-Tabatabaei A and Abdollahi M : Potassium channel openers and improvement of toxic stress: Do they have role in the management of inflammatory bowel disease? *Inflamm. Allergy. Drug Targets*, 7, 129-135 (2008).
52. Hanauer SB and Sparrow M : Therapy of ulcerative colitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 20, 345-350 (2004).
53. Seksik P, Dray X, Sokol H, and Marteau P : Is there any place for alimentary probiotics, prebiotics or synbiotics, for patients with inflammatory bowel disease? *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 906-912 (2008).
54. Andus T and Gross V : Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease-environmental factors. *Hepato gastroenterology*, 47, 29-43 (2000).
55. Rezaie A, Parker RD, and Abdollahi M : Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig. Dis. Sci.*, 52, 2015-2021 (2007).
56. Qu Z, Kundu UR, Abadeer RA, and Wanger A : Strongyloides colitis is a lethal mimic of ulcerative colitis: the key morphologic differential diagnosis. *Human Pathology.*, 40, 572-577 (2009).
57. Grassia R, Staiano T, Buffoli F, and Paolo B : Severe esophageal Crohn's disease: Healing of lesions after 1 week therapy with infliximab. *J. Crohns. Colitis.*, 3, 138-139 (2009).
58. Katsanos K, Ignatiadou E, Markouizos G, Doukas M, Siafakas M, Fatouros M, and Tsianos EV : Non-toxic megacolon due to transverse and sigmoid colon volvulus in a patient with ulcerative colitis. *J. Crohns. Colitis.*, 3, 38-41 (2009).
59. Butterworth JR : Chemoprevention of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Dig. Liver Dis.*, 41, 338-339 (2009).
60. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, and Nakaya R : A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98, 694-702 (1990).

61. Singh VP, Patil CS, Jain NK, and Kulkarni SK : Aggravation of inflammatory bowel disease by cyclooxygenase-2 inhibitors in rats. *Pharmacology*, 72, 77-84 (2004).
62. Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Ishii S, Nakamura T, Eguchi H, and Kawano S : The transdifferentiation of bone-marrow-derived cells in colonic mucosal regeneration after dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice. *Pharmacology*, 80, 193-199 (2007).
63. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, and Wallace JL : Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96, 795-803 (1989).
64. Kumin S and Gallily R : Recognition and lysis of altered-self cells by macrophages. Modification of target cells by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid. *Immunology*, 48, 265-272 (1983).
65. Ishioka T, Kuwabara N, Oohashi Y, and Wakabayashi K : Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides. *Crit. Rev. Toxicol.*, 17, 215-244 (1987).
66. Camoglio L, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, and van Deventer SJ : Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, 30, 1486-1495 (2000).
67. Kim CJ, Kovacs-Nolan JA, Yang C, Archbold T, Fan MZ, and Mine Y : L-Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *J. Nutr. Biochem.*, 21, 468-475 (2010).
68. Vasina V, Broccoli M, Ursino MG, Canistro D, Valgimigli L, Soleti A, Paolini M, and De Ponti F: Non-peptidyl low molecular weight radical scavenger IAC attenuates DSS-induced colitis in rats. *World J. Gastroenterol.*, 16, 3642-3650 (2010).
69. Prantera C, Cottone M, and Pallone F : Mesalamine in the treatment of mild to moderate active Crohn's ileitis, results of a randomised multicenter trial. *Gastroenterology*, 116, 521-526 (1999).
70. Ocete MA, Gálvez J, Crespo ME, Cruz T, González M, Torres MI, and Zarzuelo A : Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. *Pharmacology*, 57, 261-270 (1998).

71. Menozzi A, Pozzoli C, Poli E, Lazzaretti M, Cantoni A, Grandi D, Giovannini E, and Coruzzi G : Effect of the macrolide antibacterial drug, tylosin, on TNBS-induced colitis in the rat. *Pharmacology*, 74, 135-142 (2005).
72. Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, Nos P, and Beltrán B : Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochem. Soc. Trans.*, 39, 1102-1106 (2011).
73. Naves JE and Domènech E : Systemic amyloidosis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol.*, 35, 259-265 (2012).
74. Pithadia AB and Jain S : Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol. Rep.*, 63, 629-642 (2011).
75. Vakil N and Sparberg M : Steroid-related osteonecrosis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 96, 62-67 (1989).
76. Wexler BC : Comparative effects of cortisone, dianabol and enovid on isoprenaline-induced myocardial infarction in arteriosclerotic vs nonarteriosclerotic rats. *Br. J. Exp. Pathol.*, 57, 663-685 (1976).
77. Takeuchi M, Kaga M, Tsuga T, Ichinohe M, Okazaki S, Shinpo K, Sudo J, and Tanabe T : Study on toxicity of halopredone acetate. (I) Acute toxicity study in mice and rats. *J. Toxicol. Sci.*, 10, 1-10 (1985).
78. Kim JO, Choi JY, Park JK, Kim JH, Jin SG, Chang SW, Li DX, Hwang MR, Woo JS, Kim JA, Lyoo WS, Yong CS, and Choi HG : Development of clindamycin-loaded wound dressing with polyvinyl alcohol and sodium alginate. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 2277-2282 (2008).
79. Ito H, Satsukawa M, Arai E, Sugiyama K, Sonoyama K, and Kiriya S: Soluble fiber viscosity affects both goblet cell number and small intestine mucin secretion in rats. *J. Nutr.*, 139, 1640-1647 (2009).
80. Yoshida T, Hirano A, Wada H, Takahashi K, and Hattori M : Alginic acid oligosaccharide suppresses Th2 development and IgE production by inducing IL-12 production. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 133, 239-247 (2004).

81. Yang D and Jones KS : Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 90, 411-418 (2009).
82. Kayama H1, Ueda Y, Sawa Y, Jeon SG, Ma JS, Okumura R, Kubo A, Ishii M, Okazaki T, Murakami M, Yamamoto M, Yagita H, and Takeda K : Intestinal CX3C chemokine receptor 1(high) (CX3CR1(high)) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 109, 5010-5015 (2012).
83. Pico JL, Avila-Garavito A, and Naccache P : Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting. *Oncologist*, 3, 446-451 (1998).
84. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, Elting LS, Fox PC, Cooksley C, and Sonis ST : Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer*, 100, 2026-2046 (2004).
85. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, and Chabner BA : The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N. Engl. J. Med.*, 3, 1094-1104 (1983).
86. Margolis S, Philips FS, and Sternberg SS : The cytotoxicity of methotrexate in mouse small intestine in relation to inhibition of folic acid reductase and of DNA synthesis. *Cancer Res.*, 31, 2037-2046 (1971).
87. Altmann GG : Changes in the mucosa of the small intestine following methotrexate administration or abdominal x-irradiation. *Am. J. Anat.*, 140, 263-279 (1974).
88. Taminiau JA, Gall DG, and Hamilton JR : Response of the rat small-intestine epithelium to methotrexate. *Gut*, 21, 486-492 (1980).
89. Alam SS, Hafiz NA, and Abd El-Rahim AH : Protective role of taurine against genotoxic damage in mice treated with methotrexate and tamoxfine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 31, 143-152 (2011).
90. Kimura H, Ogawa S, Katsube T, Jisaka M, and Yokota K : Antiobese effects of novel saponins from edible seeds of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME) after treatment with wood ashes. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 4783-4788 (2008).
91. Howarth GS, Francis GL, Cool JC, Xu X, Byard RW, and Read LC : Milk growth factors

- enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats. *J. Nutr.*, 126, 2519-2530 (1996).
92. Hirotani Y, Yamamoto K, Ikeda K, Arakawa Y, Li J, Kitamura K, Kurokawa N, and Tanaka K : Correlation between plasma glucagon-like peptide 2 levels and proliferative makers in small intestinal injury in rats induced by methotrexate administration. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 2327-2330 (2006).
  93. Potten CS, Kellett M, Roberts SA, Rew DA, and Wilson GD : Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut*, 33, 71-78 (1992).
  94. Wilson MS, and Schofield PF : Markers to study human colonic cell proliferation. *Gut*, 36, 152 (1995).
  95. Peng LH, Chen X, Chen L, Li N, Liang WQ, and Gao JQ : Topical astragaloside IV-releasing hydrogel improves healing of skin wounds in vivo. *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 881-888 (2012).
  96. Weinstein SJ, Hartman TJ, Stolzenberg-Solomon R, Pietinen P, Barrett MJ, Taylor PR, Virtamo J, and Albanes D : Null association between prostate cancer and serum folate, vitamin B(6), vitamin B(12), and homocysteine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 12, 1271-1272 (2003).
  97. Scholl TO and Johnson WG : Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 1295-1303 (2000).
  98. Haidar J : Prevalence of anaemia, deficiencies of iron and folic acid and their determinants in Ethiopian women. *J. Health Popul. Nutr.*, 28, 359-368 (2010).
  99. Easton DJ : Severe thrombocytopenia associated with acute folic acid deficiency and severe hemorrhage in two patients. *Can. Med. Assoc. J.*, 15, 418-420 (1984).
  100. Banji D, Pinnapureddy J, Banji OJ, Kumar AR, and Reddy KN : Evaluation of the concomitant use of methotrexate and curcumin on Freund's complete adjuvant-induced arthritis and hematological indices in rats. *Indian J. Pharmacol.*, 43, 546-550 (2011).
  101. Yáñez JA, Teng XW, Roupe KA, Fariss MW, and Davies NM : Chemotherapy induced gastrointestinal toxicity in rats: involvement of mitochondrial DNA, gastrointestinal

- permeability and cyclooxygenase -2. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 6, 308-314 (2003).
102. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, and Voelkel NF : In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am. J. Physiol.*, 275, 1054-1061 (1998).
103. Walsh MF, Ampasala DR, Hatfield J, Vander Heide R, Suer S, Rishi AK, and Basson MD : Transforming growth factor-beta stimulates intestinal epithelial focal adhesion kinase synthesis via Smad- and p38-dependent mechanisms. *Am. J. Pathol.*, 173, 385-399 (2008).
104. von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, and Weber C : RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*, 103, 1772-1777 (2001).

## 【謝辞】

本稿を終えるに当たり、本研究に終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り、さらに御校閲を戴きました京都薬科大学大学院薬学研究科 薬物治療学分野 加藤伸一 教授に謹んで感謝致します。また、本稿の御校閲、さらに御助言を頂きました京都薬科大学大学院薬学研究科 臨床薬理学分野 中田徹男 教授および薬理学分野 大矢進 教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、的確な御指導と御助言をいただきました京都薬科大学大学院薬学研究科 薬物治療学分野 天ヶ瀬紀久子 講師に深く感謝致します。

本研究を進めるに当たり、御支援を賜りました堺化学工業株式会社 西田隆一 研究開発本部長付およびカイゲンファーマ株式会社(堺化学工業株式会社 医薬事業部医薬研究所) 那須礼史氏、伊藤友一氏および梶原英治氏に心より謝意を表します。

最後に、本研究の機会を与えて下さいました株式会社片山製薬所 中原慎治 取締役社長および笠松尚志 取締役業務部長に心から御礼申し上げます。