

|           |                                                |
|-----------|------------------------------------------------|
| 氏名 (生年月日) | ヤマモトアツキ 山本篤毅 (1981年11月28日)                     |
| 学位の種類     | 博士(薬学)                                         |
| 学位記番号     | 論博 第194号                                       |
| 学位授与の日付   | 2015年3月21日                                     |
| 学位授与の要件   | 学位規則第4条第2項該当                                   |
| 学位論文題目    | 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    |
| 論文審査委員    | (主査) 教授 加藤 伸一<br>(副査) 教授 中田 徹男<br>(副査) 教授 大矢 進 |

## 論文内容の要旨

アルギン酸ナトリウム (AL-Na) は $\beta$ -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 は、酸性下および 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下にゲルを形成する。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ことが知られている。そのため、AL-Na は胃や食道などの酸性環境である上部消化管における防御系抗潰瘍薬として繁用されている。AL-Na は消化管からはほとんど吸収されることなく排泄されるため、上部のみならず下部消化管においても粘膜保護作用を発揮する可能性が考えられるが、下部消化管における AL-Na の効果については未だ明らかになっていない。

本研究では、下部消化管における AL-Na の効果について検討することを目的に、インドメタシン誘発小腸傷害モデル、炎症性腸疾患モデルおよびメトトレキサート誘発小腸粘膜傷害モデルを用いて検討した。

### 1. アルギン酸ナトリウムのインドメタシン誘発消化管傷害モデルに対する効果

インドメタシン誘発小腸傷害モデルは、雄性 SD 系ラットにインドメタシン 10 mg/kg を経口投与することにより作製した。インドメタシン投与 24 時間後に、小腸を摘出し、粘膜損傷、ミエロペルオキシダーゼ活性、血管透過性、抗酸化活性、ムチン MUC2 量および浸潤細菌数を測定した。また、血中の赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値を測定した。さらに、小腸組織の薄切切片を作製し、haematoxylin-eosin (HE)、periodicacid-Schiff (PAS) および proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色を施し、組織学的評価を行った。AL-Na はインドメタシン投与の 30 分前および 6 時間後に、250 mg/kg および 500 mg/kg の用量で経口投与した。

インドメタシンを投与することにより、ミエロペルオキシダーゼ活性、血管透過性および浸潤細菌数の増加、ならびに抗酸化活性の低下を伴う小腸粘膜損傷の発生が観察された。同時に、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値が低下する貧血症状が観察された。AL-Na の投与は、インドメタシン投与により誘起される小腸粘膜損傷および貧血症状を特に 500 mg/kg の用量において有意に抑制した。また、AL-Na の投与は、インドメタシン投与によるミエロペルオキシダーゼ活性、血管透過性および浸潤細菌数の増加、ならびに抗酸化活性の低下をいずれも有意に抑制した。インドメタシンの投与は、小腸ムチン含量および PCNA 陽性細胞数を低下させたが、これらの低下もまた AL-Na の投与によりいずれも有意に改善した。

以上の結果より、AL-Na は上部消化管のみならず胃酸の影響のない小腸においても粘膜保護作用を発揮することが明らかとなった。AL-Na の小腸傷害抑制効果には粘液産生促進作用が関与しており、腸内細菌の浸潤を抑制することで病態進行を抑制することが示唆された。併せて、PCNA 陽性細胞を増加させたことから、AL-Na は細胞の代謝回転を活性化させる可能性が考えられた。

## 2. アルギン酸ナトリウムの炎症性腸疾患モデルに対する効果

炎症性腸疾患モデルにはデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発潰瘍性大腸炎モデルと2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発クローン病モデルを用いた。DSS 誘発大腸炎モデルには2種類のモデルを作製した。まず、雄性 BALB/c 系マウスに DSS を7日間飲水投与した(発生モデル)。もう1つは、雄性 C57BL/6 系マウスに DSS を5日間飲水投与した後、通常水を9日間飲水させた(治癒モデル)。TNBS 誘発大腸炎モデルは雄性 BALB/c 系マウスに直腸より TNBS エタノール溶液を投与することにより作製した。それぞれのモデルにおいて、体重推移、Disease Activity Index (DAI) を連日測定した。また、大腸組織のミエロペルオキシダーゼ活性を測定した。さらに、大腸組織の薄切切片を作製し、HE および PAS 染色を施し、組織学的評価を行った。AL-Na は 200 mg/kg、500 mg/kg および 1000 mg/kg の用量で連日経口投与した。

DSS 誘発大腸炎モデルにおいて、体重減少、DAI の増加、大腸長の短縮、大腸粘膜の損傷、炎症性細胞の浸潤が観察された。AL-Na は 200 mg/kg の用量において、DSS 誘発大腸炎の発生を有意に抑制した。また、AL-Na は 1000 mg/kg の用量において、DSS 誘発大腸炎の治癒を有意に促進した。TNBS 誘発大腸炎モデルにおいて、体重減少、DAI の増加、大腸長の短縮、ミエロペルオキシダーゼ活性の増加、大腸粘膜の損傷、炎症性細胞の浸潤が観察された。AL-Na は 500 mg/kg の用量において、TNBS 誘発大腸炎を有意に抑制した。いずれのモデルにおいても大腸の杯細胞数が減少したが、AL-Na の投与により有意に改善した。

以上の結果より、AL-Na は大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。また、AL-Na は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杯細胞の増殖を促進させ、粘液産生を亢進させることが示唆された。

## 3. アルギン酸ナトリウムのメトトレキサート誘発消化管粘膜傷害モデルに対する効果

メトトレキサート誘発小腸粘膜傷害モデルは雌性 SD 系ラットにメトトレキサート 2.5 mg/kg を3日間、皮下投与することにより作製した。体重および摂餌量は連日測定した。メトトレキサート投与開始4日目に小腸を摘出し、重量測定後、小腸組織の薄切切片を作製し、HE および bromodeoxyuridine (BrdU) 染色を施し、組織学的評価を行った。また、血中の赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値を測定した。AL-Na はメトトレキサート投与の30分前および6時間後に、500 mg/kg の用量で連日経口投与した。

メトトレキサートを投与することにより、体重減少、小腸重量の低下および絨毛長と陰窩長の短縮が観察された。また、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値が低下する貧血症状が観察された。AL-Na は500 mg/kg の用量において、メトトレキサートにより誘発される小腸粘膜傷害および貧血症状を有意に抑制した。また、メトトレキサート投与による小腸重量の低下および絨毛長と陰窩長の短縮をいずれもAL-Na の投与により有意に抑制された。メトトレキサートの投与は、小腸組織の BrdU 陽性細胞数を減少させたが、この減少はAL-Na の投与は有意に改善した。以上の結果より、AL-Na は抗がん剤により誘発される小腸粘膜傷害に対しても抑制効果を発揮することが明らかとなった。AL-Na の抑制効果は、細胞増殖を促進させることによるものと推察される。

本研究では、AL-Na の粘膜保護作用に着目し、特に下部消化管に対する効果を中心に各種実験動物モデルを用いた検討した。その結果、AL-Na はインドメタシン誘発小腸傷害モデル、炎症性腸疾患モデルおよびメトトレキ

サート誘発小腸粘膜傷害モデルに対して有効であることが示された。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。ゆえに、AL-Na は上部消化管疾患のみならず、種々の下部消化管疾患に対しても有用であることが期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

山本篤毅氏は、現在臨床で上部消化管に対する防御系抗潰瘍薬として使用されているアルギン酸ナトリウム（商品名アルロイドG）の更なる適用拡大を目指して、下部消化管に対する有用性について動物モデルを用いた薬理学的研究を行い、アルギン酸ナトリウムが種々の下部消化管傷害に対して有効であることを明らかにした。

第一章では、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）であるインドメタシンにより誘起されるラット小腸傷害に対するアルギン酸ナトリウムの効果について検討した。アルギン酸ナトリウムは、インドメタシンによる小腸傷害の発生、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性の上昇、血管透過性の亢進、腸内細菌の浸潤をいずれも有意に抑制することを見出した。また、インドメタシンによる赤血球数、ヘモグロビン数およびヘマトクリット値の低下などの貧血症状に対しても有意な改善効果を示した。さらに、インドメタシンによる小腸ムチン含量および細胞増殖の低下に対しても有意な改善効果を示した。これらの結果から、アルギン酸ナトリウムは NSAID 誘起小腸傷害に対して保護作用を発揮することが明らかとなり、この効果には粘液産生および細胞増殖の促進作用、ならびに貧血改善作用が関与しているものと考えられる。

第二章では、炎症性腸疾患（IBD）の代表的な動物モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）およびトリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）により誘起されるマウス大腸炎に対するアルギン酸ナトリウムの効果について検討した。アルギン酸ナトリウムは DSS および TNBS により誘起される大腸炎ならびに MPO 活性の上昇に対して有意な抑制効果を発揮した。いずれのモデルにおいても大腸粘膜杯細胞の減少が観察されたが、アルギン酸ナトリウムはこれら杯細胞の減少を有意に抑制した。これらの結果から、アルギン酸ナトリウムは IBD に対しても保護効果を発揮することが明らかとなり、この効果には杯細胞の増加を介した粘液産生の亢進が関与しているものと考えられる。

第三章では、抗がん剤であるメトトレキサートにより誘起されるラット小腸傷害に対するアルギン酸ナトリウムの効果について検討した。アルギン酸ナトリウムはメトトレキサートによる小腸傷害および貧血症状をいずれも有意に抑制した。また、メトトレキサートによる細胞増殖の低下もまたアルギン酸ナトリウムは有意に改善した。これらの結果から、抗がん剤により誘起される小腸傷害に対してもアルギン酸ナトリウムは保護効果を発揮することが明らかとなり、この効果には小腸粘膜における細胞増殖促進作用が関与しているものと考えられる。

以上、本論文は、アルギン酸ナトリウムが下部消化管における種々の疾患に対して有効であることを明らかにしたものであり、今後、本薬剤が種々の下部消化管疾患に対する新たな治療薬として適用拡大に繋がる臨床的にも有益な成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。