

下痢モデルラット腸管組織内及び血漿中 Peptide-YY (PYY) の変動と その治療薬 Loperamide の影響

廣谷芳彦,^{*,a,b} 三河尻恭子,^{b,c} 池田賢二,^{a,b} 名徳倫明,^a 黒川信夫^b

Changes of Intestinal Mucosal and Plasma PYY in a Diarrhea Model Rat and Influences of Loperamide as the Treatment Agent for Diarrhea

Yoshihiko HIROTANI,^{*,a,b} Kyoko MIKAJIRI,^{b,c} Kenji IKEDA,^{a,b}
Michiaki MYOTOKU,^a and Nobuo KUROKAWA^b

^aLaboratory of Clinical Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University, 3-11-1
Nishikiorikita, Tondabayashi-City 584-8540, Japan, ^bDepartment of Pharmacy, Osaka
University Hospital, 2-15 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan, and ^cDepartment
of Hospital Pharmacy, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi,
Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received May 8, 2008; Accepted June 12, 2008)

Peptide YY (PYY) is produced by endocrine cells in the lower gastrointestinal tract. The main functions of PYY are antisecretory effects in the colon and inhibition of gastrointestinal motility. We chose PYY as an index of the intrinsic factor in diarrhea and examined the influence of changes induced in a diarrhea rat model by administration of 4 types of laxative and loperamide hydrochloride (loperamide) as an agent for the treatment of diarrhea. A specific radioimmunoassay was performed to determine plasma and intestinal mucosal PYY concentrations. PYY in the rat intestinal tissue extract was distributed at a high density in the lower intestinal mucosa. In the diarrhea rat model, multiple changes in PYY concentrations in the intestinal mucosa and plasma were observed. In rats administered castor oil and sodium picosulfate, the intestinal mucosal PYY levels significantly decreased in a dose-dependent manner. Plasma PYY levels significantly decreased only in rats administered magnesium citrate. Next, we examined the influence of loperamide administration on the intestinal mucosa and plasma PYY concentrations in these rats. Loperamide administration resulted in multiple changes in plasma and intestinal mucosa PYY concentrations, along with an improvement in the diarrhea. Our research showed that the endocrine hormone PYY is involved in the onset of diarrhea, the course of the condition, and the manifestation of medicinal effects in the lower intestine.

Key words—peptide YY; diarrhea; loperamide; lower intestine; rat

緒 論

PYY は、36 アミノ残基からなるペプチドで、^{1,2)} その 1 次構造は神経ペプチド Neuropeptide Y (NPY) に類似しており、腸管 L 細胞に含まれる内分泌ホルモンの 1 つである。消化管における主な PYY の作用は、消化管運動の抑制、^{3,4)} 消化管分泌の抑制、⁵⁾ 消化管血流量の減少、⁶⁾ 胃内容排出時間の延長、⁷⁾ 結腸での水・電解質の吸収促進、^{8,9)} そして腸管での栄養効果 (trophic action)^{10,11)} などがある。特に、末梢 PYY は、視床下部にシグナルを伝達し

摂食調節ペプチドを駆動させ、摂食を抑制することが報告されている。¹²⁾

しかし、消化管ホルモン PYY は下痢と密接な関係があると考えられるが、臨床に用いられている下剤及び抗下痢薬 (止瀉薬) が消化管及び血中 PYY に及ぼす影響についてはほとんど報告されていない。

本研究では臨床で用いられている代表的な下剤を 4 種用いた。すなわち、機械性下剤の Magnesium citrate (Mg)、小腸刺激性下剤のヒマシ油、大腸刺激性下剤のうち、Diphenyl-methane 系の Sodium picosulfate (SP) 及び Anthraquinone 系の Senno-side を用いた。一方、下痢の治療薬としては収れん剤、吸着剤、殺菌剤、腸運動抑制剤、整腸剤が用いられている。本研究では、臨床で繁用されている

^a大阪大谷大学薬学部臨床薬剤学講座, ^b大阪大学医学部附属病院薬剤部, ^c慶応義塾大学病院薬剤部
e-mail: hirotay@osaka-ohitani.ac.jp

Loperamide hydrochloride (Lopemin[®])を用いた。¹³⁾ Loperamide Hydrochloride (Loperamide)は構造上 Morphine と一部類似性があるが、中枢作用はなく、腸管のぜん動運動抑制と分泌抑制作用により強力な抗下痢(止瀉)作用を示す。また、どの疾患の下痢にも有効で最も有効率の高い止瀉薬と言われている。¹³⁾

本研究ではその治療薬として現在臨床において用いられている下剤及び Loperamide をラットに投与することにより消化管及び血中 PYY の変動を明らかにし、下痢の発症及びその改善に対して PYY の関与について検討した。また、下痢発症時の重症度のパラメータとして、また抗下痢薬の薬効評価の指標としての有用性も検討した。

実 験

1. 実験動物 実験動物は、7週齢の Wistar 系ラット(日本クレア)を使用し、ラット用飼料 MF (オリエンタル酵母)で1週間予備飼育したのちに実験に供した。ラットは23°C、湿度45%、消灯時間 PM8:00-AM8:00 に管理された実験動物施設内で飼育したラットを用いた。なお、実験には、いずれの場合にも1群5匹のラットを用いた。なお、実験動物は大阪大学医学部実験動物使用指針に従って実験に用いた。

2. ヒマシ油, SP, Mg そして Sennoside 投与による投与下痢ラットの作製とその下痢判定 水は制限することなく与え、一夜絶食後、胃ゾンデを用いてヒマシ油(和光純薬)(10 ml/kg, 5 ml/kg そして 2.5 ml/kg)を経口投与した。その後1匹毎に引き出し付きの網ゲージに入れ、1時間毎に糞便の観察を行った。ヒマシ油投与3時間後に心臓採血により致死させたのち、十二指腸より直腸までの腸管を摘出した。他の薬剤では、SP(帝人ファーマ)水溶液(10 mg/5 ml/kg 及び 5 mg/5 ml/kg) [Mg(堀井薬品工業)水溶液(5.6 mg/30 ml/kg), Sennoside(和光純薬)水溶液(75 mg/10 ml/kg)]を経口投与した。なお、下剤投与後は飼料を与えた。糞便の観察はヒマシ油の方法と同様に行った。SP投与5時間後(Mg水溶液では7時間後、Sennoside水溶液では5時間後)に心臓採血により致死させたのち、十二指腸より直腸までの腸管を摘出した。

下痢の程度の判定は Piercey and Ruwart のスコ

ア法に準じて行った。¹⁴⁾ すなわち、下痢の状態を“激しい下痢”(++)、“軽度な下痢”(+)及び“下痢を起こさなかった”(0)の3段階に分け、それぞれ2, 1, 0のスコアを付けた。それぞれのスコアに動物数を乗じ、その総計を総スコアとした。なお、対照群にはヒマシ油の代わりにオリーブ油をヒマシ油と同容量投与し、それ以外の下剤では精製水を同量投与した。他の下痢の程度の判定はヒマシ油の方法と同様に行った。

3. Loperamide の投与方法 Loperamide (Sigma)は、蒸留水で溶解し、超音波装置を用いて均一分散化したものを体重1 kg 当たり 10 ml 量になるように調製した。この Loperamide 水溶液 10 ml (10 mg/kg)を、各下剤投与1時間前に胃ゾンデを用いて経口投与した。対照群には Loperamide 水溶液と同量の蒸留水を投与したのち、各下剤を投与した。

4. ラット腸管の摘出と試料の調製 8週齢 Wistar 系雄性ラットを心臓採血により致死させたのち、回腸から直腸までの腸管を摘出した。腸管は、回腸、盲腸、結腸、直腸に分け、さらに回腸を3等分、結腸を2等分した。各組織は氷冷生理食塩水で洗浄し、ろ紙上で水分を取り除いたのち、重量を測定した。次に、重量の10倍量(V/W)に相当する0.1 M 酢酸を加え、氷冷下でホモジナイズしたのち、沸騰浴中で15分間煮沸した。冷却後、試料に氷酢酸を加えて1 M 酢酸溶液としたのち、4°C、3000 rpm で30分間遠心分離し、その上清を採取、凍結乾燥し試料とした。心臓採血より得た血液を、Heparin(日本ヘキスト)及びAprotinin液(Bayer)500 KIUを添加した氷冷ガラス試験管に入れたのち、4°C、3000 rpm で10分間遠心分離し、その上清を血漿試料とした。

5. ラット腸管組織抽出物中及び血漿中 PYY の特異ラジオイムノアッセイによる測定 PYY の測定では、標準希釈液として、0.14 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% BSA 及び 0.02% Sodium azide を含む 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)を用い、以下の方法で行った。すなわち、各アッセイ用試験管に標準希釈液 0.4 ml, 測定検体又は標準抗原(合成ラット PYY, 矢内原研究所)溶液 0.1 ml, 8000 倍希釈した抗合成ラット PYY 血清 RY32(矢内原研究所)溶液 0.1 ml(最終希釈 56000 倍)及び標識抗原 ¹²⁵I-

合成ラット PYY 溶液 0.1 ml (約 5000 cpm) を順次添加混合したのち、4°C で 22 時間反応させた。ついで、10 倍希釈した山羊抗家兔 γ Globulin 血清 (第 1 ラジオアイソトープ研究所) 50 μ l, 50 倍希釈した正常家兔血清 (第 1 ラジオアイソトープ研究所) 50 μ l 及び 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 5% (w/v) Polyethylene glycol 6,000 (和光純薬) 溶液 0.5 ml を添加したのち、4°C で 4 時間反応させ、4°C, 3000 rpm で 30 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を吸引除去し、得られた沈渣の放射活性を γ カウンターで測定した。

6. 統計処理 測定値は平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) で表した。各対照群との解析は、Student's *t*-検定により統計処理し、危険率 5% 未満を有意差ありとした。また、下痢のスコア法による対照群と各下剤投与群との 2 群間比較では、Wilcoxon's rank sum test 法で統計処理し、危険率 5% 未満を有意差ありとした。

実験結果

1. 各下剤投与後の総スコア 正常ラットに下剤を投与することによる下痢効果を総スコアで表した結果を Tables 1, 2 に示す。ヒマシ油を投与することにより全例に“激しい下痢”若しくは“軽度な下痢”がみられ、総スコアは 8 であった。なお、ヒマシ油投与量を半量及び 4 分の 1 量に減量しても総スコアは同じ値を示した。しかし、対照群であるオリーブ油投与群では下痢は全く起こらず総スコアは 0 であった (Table 1)。

SP, Sennoside 投与群でも、ヒマシ油投与群同様全例に“激しい下痢”若しくは“軽度な下痢”がみられ、総スコアはそれぞれ 9, 10 であった。SP の半量投与では、ヒマシ油投与の場合と異なり総スコアは 2 となった。Mg 投与群では 5 例中 1 例のみ“下痢を起こさなかった”があり、総スコアは 8 であった。一方、対照群ではいずれの場合も下痢は全く起こさず、総スコアは 0 であった (Table 2)。

2. 下痢モデルラットの腸管組織内及び血漿中 PYY 濃度 ヒマシ油の用量とラット腸管組織抽出物並びに血漿中の PYY 濃度の変動との関係調べた結果を Fig.1 に示す。ラット腸管組織抽出物中の PYY 濃度は、下部消化管に多く存在し、特に下

Table 1. Effect of Castor Oil on Diarrhea Score in Rats

Treatment	Diarrhea score			Total score (max=10)
	++	+	0	
Olive oil (n=5)	0	0	5	0
Castor oil (n=5)	3	2	0	8**

** $p < 0.01$ vs. Olive oil.

Table 2. Effect of Laxative Agents on Diarrhea Score in Rats

Treatment	Diarrhea score			Total score (max=10)
	++	+	0	
Normal (n=5)	0	0	5	0
SP (n=5)	4	1	0	9**
Mg (n=5)	4	0	1	8*
Sennoside (n=5)	5	0	0	10**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. purified water.

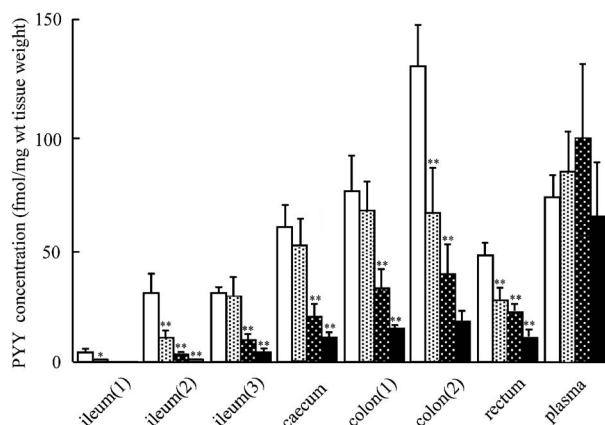


Fig. 1. Effect of Castor Oil on the Intestinal Tract and Plasma PYY Levels in Rats

Data are presented as the mean \pm S.D. of 5 rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control rats

□: control, ▨: castor oil (1/4), ▩: castor oil (1/2), ■: castor oil (1/1).

部結腸で最も多く存在することを確認した。腸管組織抽出物中 PYY 濃度は、ヒマシ油投与後下痢の発症に伴い、すべての部位で下剤の投与量の増加に依存して有意に低下した。次に SP の用量とラット腸管組織抽出物及び血漿中の PYY 濃度の変動との関係調べた結果を Fig. 2 に示す。ヒマシ油の場合と異なり、SP の半量では有意な変動はみられなかったが、SP 全量ではすべての部位で有意な PYY 濃度の減少がみられた。一方、Mg 及び Sennoside 投与群では腸管組織抽出物中 PYY 濃度の有意な変化は認められなかった。血漿中 PYY 濃度の変動を

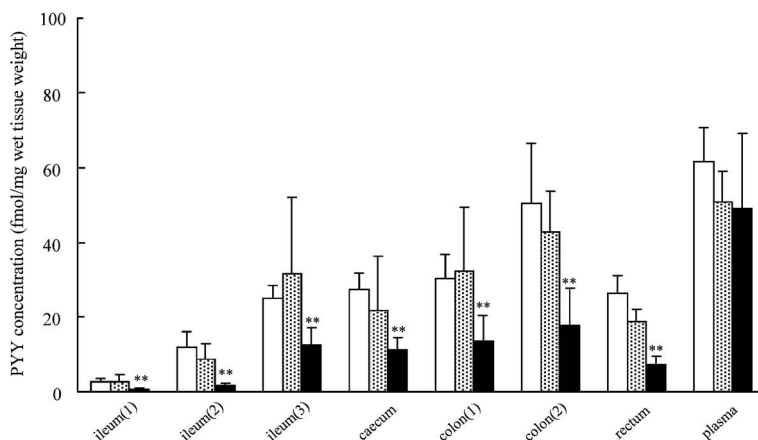


Fig. 2. Effect of Sodium Picosulfate on the Intestinal Tract and Plasma PYY Levels in Rats

Data are presented as the mean \pm S.D. of 5 rats. ** $p < 0.01$ vs. control rats

□: control, ▨: SP (1/2), ■: SP (1/1).

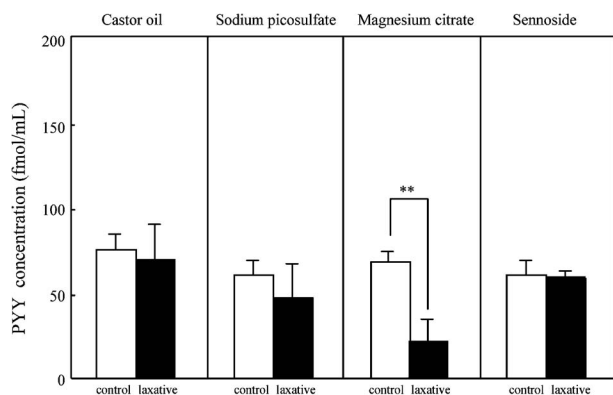


Fig. 3. Effects of Laxative Agents on Plasma PYY Levels in Rats

Data are presented as the mean \pm S.D. of 5 rats. ** $p < 0.01$ vs. laxative agent group.

Fig. 3 に示すが、先の腸管組織抽出物中濃度の場合と異なり Mg 投与群のみに 69.4 ± 7.67 から 23.2 ± 13.7 fmol/ml に有意 ($p < 0.01$) な変動が認められた。

3. 下痢モデルラットの腸管組織内及び血漿中 PYY 濃度に対する治療薬 (Loperamide) 投与による影響 4 種の下剤によって作製した下痢モデルラットに Loperamide を投与したときの下部消化管 (回腸部と結腸・直腸部に 2 分割) 及び血漿中における PYY 濃度の変動を Fig. 4 に示す。Loperamide 投与による PYY 濃度の影響については、ヒマシ油投与群 (回腸: $281 \pm 122\%$, 結腸・直腸: $276 \pm 73.7\%$) 及び SP 投与群 (結腸・直腸: $223 \pm 83.5\%$) の下部消化管で有意 ($p < 0.01$) に上昇した。なお、SP 投与群の回腸では上昇傾向を示したが有意な変

動ではなかった。なお、Loperamide 投与による Mg あるいは Sennoside 投与群では有意な変化は認められなかった。次に 4 種の下痢モデルラットに Loperamide を投与したときの血漿中 PYY 濃度は Loperamide の投与により、Sennoside 投与群においてのみに 58.4 ± 5.51 から 176 ± 28.3 fmol/ml へと有意 ($p < 0.01$) な上昇が認められた。なお Loperamide 投与によりすべての群において下痢はおさえられ、総スコアは 0 であった。

考 察

本研究では、下痢モデルラットにおいて、疾患誘発薬剤並びにその治療薬の生体への影響を下部消化管に高濃度に分布する内因性ホルモン PYY を指標として検討した。小腸運動が亢進し小腸通過時間が著しく短くなった場合や、小腸での分泌亢進、消化吸収障害で大腸の吸収能力を越える大量の液体が大腸内に送られたときに下痢が発症すると言われている。発生機序は様々であるが、病態生理上、浸透圧性下痢、分泌性下痢、腸運動異常性下痢に分類されるが、最終的には、腸管の水・電解質の分泌、吸収、貯留、及び腸管運動の異常が互いに関連すると言われている。¹³⁾ このような腸管の分泌、吸収、浸透圧、運動などの異常により発症する下痢時において、消化管の機能と調節に重要な役割を担っている消化管ホルモンに対する影響に関する報告は多数みられる。^{5,8,15-17)}

下痢については、その原因として種々の機序が考えられるが、薬剤による下痢モデルを作製すること

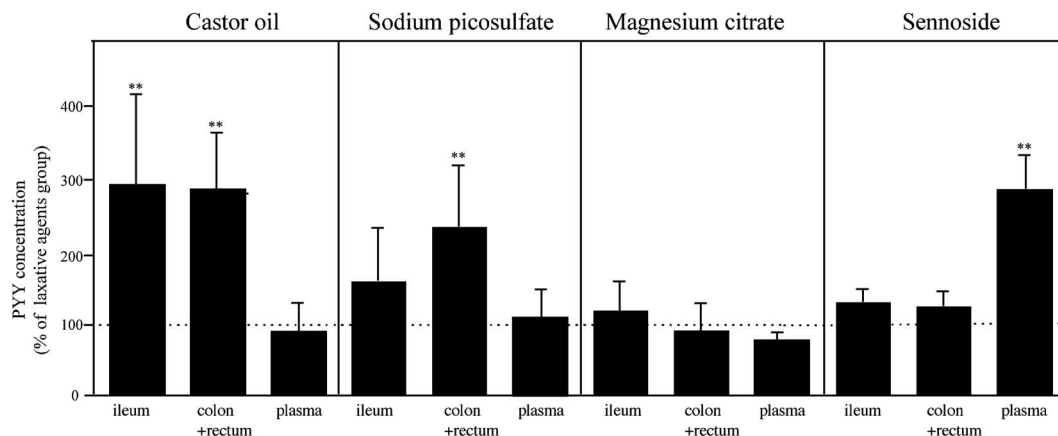


Fig. 4 Effect of Loperamide on the Intestinal Tract and Plasma PYY Levels in Rats Treated Laxative Agents
Data are presented as the mean \pm S.D. of 5 rats. ** $p < 0.01$ vs. laxative agent group.

が可能である。本研究では下剤の中から臨床で用いられている4種の薬剤を選んで下痢モデルラットの作製に用いた。小腸刺激性下剤としてヒマシ油、大腸刺激性下剤でジフェニールメタン系の Sodium picosulfate、同じくアントラキノン系薬剤である Sennoside、及び機械性下剤である塩類下剤の Magnesium citrate である。次に、下痢の治療薬は、腸管の主要な機能に異常をもたらす下痢に対しては、その治療薬として Loperamide が広く用いられている。本剤は、アヘンアルカロイドと一部構造上の類似性があるが中枢性作用はなく、強力な抗下痢作用を示す。またその抗下痢作用は速やかでかつ持続的であると言われており、急性下痢及び慢性下痢のいずれにも用いられている。

ヒマシ油及び SP 投与群において組織内 PYY 濃度の顕著な低下と Loperamide 投与による明らかな上昇がみられた (Figs. 1, 2, 4)。ヒマシ油及び SP は強力な水・電解質の分泌促進作用を持つと言われており、組織内 PYY 濃度の顕著な低下はこの分泌促進作用に対する PYY の急激な放出による抗分泌作用が働いたものと考えられる。このことに関連して、腸管運動が亢進するとその運動を抑制するために PYY の産生が促進され上皮細胞から粘膜固有層に分泌されるが、運動亢進が急であると PYY 産生が追いつかなくなり、一時的に PYY 含有上皮細胞の PYY 量が減少するという報告がある。¹⁸⁾ 一方、Loperamide 投与により明らかな組織内 PYY 濃度の上昇がみられたことから、これら2モデル群において PYY が Loperamide の抗下痢 (止瀉) 作用に

関与していることが推定される。なお、ヒマシ油及び SP 投与後の血漿 PYY 濃度には有意な変動はみられなかったことから、これらの作用はパラクリン的な経路を介するものではないかと考えられる (Fig. 3)。Sennoside 投与群では Loperamide による特異的な血漿 PYY 濃度の顕著な上昇がみられた (Fig. 4)。これは Sennoside が他の下剤と異なり強力な運動促進を促すことから、PYY の腸管運動抑制作用と、内分泌系を介してなんらかの関連があると考えられる。Mg 投与群における血漿 PYY 濃度の顕著な低下は、Loperamide 投与によっても回復しなかった (Figs. 3, 4)。Mg はほとんど吸収されないと言われており、PYY 濃度が血漿中で有意な変動を示したことから、Mg による PYY の関係する内分泌系への直接あるいは間接的な影響が示唆された。

今回の実験結果より、水・電解質分泌促進作用を有するヒマシ油及び SP 投与群で組織中 PYY が低下し、同作用を持たない Mg 及び Sennoside 投与群では変化がみられなかったことから、水・電解質分泌促進時においては組織中 PYY 濃度が変動する可能性が示唆された。同様に Loperamide の投与により組織 PYY 濃度の上昇がみられたので Loperamide 刺激により組織 PYY の代償性反応が起こったものと考えられる。また、ヒマシ油及び SP は、腸管粘膜上皮に存在する L-細胞に直接作用することが推測される。また、水・電解質分泌促進作用及び腸管運動促進作用を持たない高張性塩類下剤 Mg 剤のみに組織中でなく血中 PYY 濃度に影響をみら

れたことから、腸の炎症性疾患(細菌性下痢を含む)にみられる粘膜組織圧の増加によって起こる広範囲な粘膜の透過性の亢進により、全身への影響がみられるため血中 PYY が上昇した可能性が考えられるが詳細な検討は必要である。一方、水・電解質分泌促進作用とともにもう 1 つの主作用である腸管運動抑制作用を有する Loperamide 処置により強力な腸管運動促進作用を有する Sennoside のみに血漿中 PYY の上昇がみられたが、腸管 L-細胞における両薬剤による拮抗作用の結果と考えられるがその機序は不明である。

本研究では、下痢の発症と PYY の変動との関連性を明確にすることができなかったが、PYY が下痢の発現並びにその治療薬 Loperamide の投与による疾患の改善に伴い、腸管組織中及び血漿中において多様な変動を示すことを明らかにした。これらの結果は下痢と PYY の関連の解析のみならず、Loperamide の生体への影響をさらに広く追跡する必要性を示すものであった。

REFERENCES

- 1) Tatemoto K., Mutt V., *Nature*, **285**, 417-418 (1980).
- 2) Tatemoto K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 2514-2518 (1982).
- 3) Adrian T. E., Savage A. P., Sagor G. R., Allen J. M., Bacarese-Hamilton A. J., Tatemoto K., Polak J. M., Bloom S. R., *Gastroenterology*, **89**, 494-499 (1985).
- 4) Savage A. P., Adrian T. E., Carolan G., Chatterjee V. K., Bloom S. R., *Gut*, **28**, 166-170 (1987).
- 5) Whang E. E., Hines O. J., Reeve Jr. J. R., Grandt D., Moser J. A., Bilchik A. J., Zinner M. J., Mcfadden D. W., Ashley S. W., *Dig. Dis. Sci.*, **42**, 1121-1127 (1997).
- 6) Lundberg J. M., Tatemoto K., Terenius L., Hellstron P. M., Mutt V., Hokfelt T., Hamberger B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 4471-4475 (1982).
- 7) Allen J. M., Fitzpartrick M. L., Yeats J. C., Darcy K., Adrian T. E., Bloom S. R., *Digestion*, **30**, 1255-1262 (1984).
- 8) Nakanishi T., Kanayama S., Kiyohara T., Okuno M., Shinomura Y., Matsuzawa Y., *Regul. Pept.*, **61**, 149-154 (1996).
- 9) Bilchik A. J., Hines O. J., Adrian T. E., Mctadden D. W., Berger J. J., Zinner M. J., Ashley S. W., *Gastroenterology*, **105**, 1441-1448 (1993).
- 10) Besterman H. S., Adrian T. E., Mallinson C. N., *Gut*, **23**, 854-861 (1982).
- 11) Savage A. P., Gornacz G. E., Adrian T. E., *Gut*, **26**, 1353-1358 (1985).
- 12) Batterham R. L., Bloom S. R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **994**, 162-168 (2003).
- 13) Hosoda S., *Clin. Gastroenterol.*, **2**, 805-810 (1987).
- 14) Piercey M. F., Ruwart M. J., *Br. J. Pharmacol.*, **66**, 373-375 (1979).
- 15) Kordasti S., Sjövall H., Lundgren O., Svensson L., *Gut*, **53**, 952-957 (2004).
- 16) Kachelholler J., Mendel C., Dauchel J. T., *Am. J. Dig. Dis.*, **21**, 957-962 (1976).
- 17) Adrian T. E., Savage A. P., Bacarese Hamilton A. J., Wolfe K., Besterman H. S., Bloom S. R., *Gastroenterology*, **90**, 379-384 (1986).
- 18) Yoshiyama S., *J. Med. Soc. Toho*, **41**, 41-48 (1994).