ジプロピオン酸ベクロメタゾン注腸液の炎症性腸疾患
モデルラットを用いた結腸障害に対する効果の検討¹⁾

嶋田修治,*^a 青山隆夫,^a 渋谷文則,^a 中島克佳,^a

小瀧 一,^b 澤田康文,^c 伊賀立二^a

東京大学医学部附属病院薬剤部,^a 東京大学医科学研究所附属病院薬剤部,^b

九州大学薬学部^c

**Therapeutic Effects of Beclomethasone Dipropionate Enemas on
Colon Damage of Inflammatory Bowel Disease Model Rats**

Shuji SHIMADA,*^a Takao AOYAMA,^a Fuminori SHIBUYA,^a

Katsuyoshi NAKAJIMA,^a Hajime KOTAKI,^b

Yasufumi SAWADA,^c and Tatsuji IGA^a

*Department of Pharmacy, University of Tokyo Hospital, Faculty of Medicine, University
of Tokyo,^a 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan, Department of Pharmacy,*

Research Hospital, Institute of Medical Science, University of Tokyo,^b

4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan and Faculty of

Pharmaceutical Science, University of Kyusyu,^c 3-1-1

Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 999, Japan

(Received September 25, 1997)

The effects of beclomethasone dipropionate (BDP) enemas on ulcerative colitis were investigated by administering BDP enemas to Fischer male rats with an inflammatory bowel disease induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNB). After administration of a TNB ethanol solution to rats, diarrhea and melena were found in all rats, and the wet tissue weights of the colons in the rats increased by erosion and thickness of epithelial mucous membranes with edema. BDP enemas were administered to the rats one time a day at a dose of 20 or 50 μg of BDP for 4 or 11 days from the day 3 after TNB treatment, respectively. After dosing of BDP, the rate of rats developing diarrhea and melena decreased more with time in comparison with that of BDP-free rats, and the symptoms of all rats developing the diseases were improved on the day 4 after administration of a dose of 50 μg of BDP. A dose dependent recovery in the wet tissue weights and scores of damages, and the myeloperoxidase (MPO) activity in the tissue were found at the early days (until the day 4). However, their measurements on the day 11 at each dose of BDP were not different from those of control rats significantly, as the damages in the colons of the control rats were recovered naturally with time.

In conclusion, the clinical usefulness of BDP enemas was supported by elucidating the dose dependent effect of BDP at the early days in the model rats with an inflammatory bowel disease induced by TNB.

Key words—beclomethasone dipropionate; enema; inflammatory bowel dis-

ease; model rat; 2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid

緒 言

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) は、主として大腸粘膜が侵されて、びらんや潰瘍を形成する原因不明のびまん性非特異性炎症性腸疾患であり、臨床的には、緩解と再燃を繰り返し、慢性的に経過する難治性疾患である。薬物療法としては、副腎皮質ホルモン (corticosteroid: CS) やアミノサリチル酸化合物が主に使用され、最近では免疫抑制剤の使用も試みられている。²⁾ この中で CS は活動性 UC の治療に最も有効な薬剤であり、経口、静脈内及び局所投与 (注腸、坐薬) される。³⁾ 特にプレドニゾロンやベタメタゾンなどの CS の局所投与は、軽症・中等症の UC に対する第一選択として位置づけられている。しかし、局所投与された CS の体循環への移行による副腎機能抑制などの全身性副作用発現が報告されており、⁴⁻⁶⁾ 副作用発現の少ない CS 製剤の開発が望まれている。

プロピオン酸ベクロメタゾン (beclomethasone dipropionate: BDP) は、血液中のエステラーゼによって速やかに代謝されて不活性化されるため、強い局所作用を有するにもかかわらず、全身性副作用が少ないことが知られている CS であり、喘息治療薬として吸入剤などに使用されている。^{7,8)} Kumana らは BDP を注腸剤として UC 患者に投与し、その有効性と副作用発現が少ないことを報告している。⁹⁾ 我々も BDP 注腸液を調製し、その薬剤学的検討と UC に対する有効性について若干の知見を得ているが、¹⁰⁾ BDP 注腸液の UC に対する効果についての情報は少ない。

本研究では、BDP 注腸液の UC に対する有効性に関する基礎的情報を得ることを目的として、2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid (TNB) の注腸投与によって作成した炎症性腸疾患モデルラットを用いて、結腸潰瘍に対する BDP 注腸液の効果を検討した。

実 験 の 部

実験動物 フィッシャー系 (F334) 雄性ラット (日本医科学動物資材研究所、東京) を、検疫・馴化後、発育順調なものを 9 週齢 (140—160 g) で使用した。ラットは温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、1 日 12 時間照明 (7:00—19:00) の飼育室内で、固形飼料 (オリエンタル酵母工業、東京) と水を自由に摂取させて飼育した。

使用薬物 BDP 注腸液は、beclomethasone dipropionate (Sigma Chemical Co. Lot No. 74H 0455) とメチルセルロース (東京化成工業、Lot No. GA01, 350—550 cps; 2% in water, at 20°C) を用いて調製した。炎症性腸疾患モデルラットの作製には、2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid (TNB, 東京化成工業) を用いた。結腸組織中の myeloperoxidase (MPO) 活性の測定には、リン酸二カリウム (和光純薬工業)、リン酸二水素カリウム (和光純薬工業)、hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB, Sigma Chemical Co.), *o*-dianisidine (Sigma Chemical Co.) 及び過酸化水素 (和光純薬工業) を使用した。

BDP 注腸液の調製 BDP 注腸液は、前報¹⁰⁾ の方法に準じて、1% メチルセルロース水溶液に BDP エタノール溶液を添加して調製した。BDP の 1 回の投与量は 20 と $50 \mu\text{g}/\text{rat}$ 、投与量は 0.25 ml に設定した。なお、注腸液には保存剤は添加せず、投与直前に調製した。

炎症性腸疾患モデルラットの作製 炎症性腸疾患モデルラットは、Morris らの方法¹¹⁾ に準じて作製した。自由摂水下 2 日間絶食させた 9 週齢フィッシャー系雄性ラットにエーテル麻酔を施し、ディスポーザブルゾンデ (長さ 8 cm) を用いて、TNB/50% エタノール溶液 (120

Fig. 1. Protocol of Administrations of BDP Enemas to Model Rats with Inflammatory Bowel Disease Induced by TNB

mg/ml) の 0.25 ml (TNB として 30 mg) を、肛門より数秒で注入した。注入後、直ちにクレンメで肛門を約 10 分間閉じて、薬液の肛門からの漏出を防止した。

TNB 誘発炎症性腸疾患モデルに対する BDP 注腸液の投与 TNB 誘発炎症性腸疾患モデルに対する BDP 注腸液の投与スケジュールを Fig. 1 に示した。TNB をラット ($n=10$) に注腸してから 4 日後に、平均体重がほぼ同じになるように BDP 投与群と対照群の 2 群に分け、BDP 投与群には注腸液 0.25 ml、対照群には 1% メチルセルロース水溶液 0.25 ml を 1 日 1 回連日投与した。両群とも、注入後直ちに肛門をクレンメで 30 分間程閉じた。なお、TNB 処理によって衰弱をきたしたラットは実験対象から外した。

注腸液を投与開始してから、4 日目と 11 日目に各群のラットを放血致死させ、摘出した結腸の湿重量、障害のスコア、及び結腸組織の MPO 活性を測定して BDP 注腸液の炎症性腸疾患に対する効果を判定した。なお、入舎日より、連日、ラットの体重を測定するとともに便の状態を観察した。

結腸障害の評価法 肛門側から約 8 cm までの結腸を摘出し、縦に切開して腸管内の便の状態を観察した。次に、摘出結腸を氷冷した生理食塩液で洗浄した後、ろ紙で水分を軽く吸い取り、湿重量を微量天秤を用いて秤量した。さらに、結腸内面の障害を Morris らの障害評価法¹¹⁾ (Table 1) により 6 段階にスコア化し、最後に、摘出結腸をホモジナイズして、炎症物質である MPO の結腸組織中活性を測定した。

結腸組織中の MPO 活性の測定 結腸組織中の MPO 活性の測定は Krawisz らの方法¹²⁾ に準じて行った。50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を摘出結腸 400 mg wet wt. (湿重量) あたり 1 ml の割合で添加してホモジナイズした。次に

Table 1. Scores for Gross Morphologic Evaluation of Colon Damage¹¹⁾

Score	Gross morphology
0	No damage
1	Localized hyperemia, but no ulcers.
2	Linear ulcers with no significant inflammation.
3	Linear ulcer with inflammation at one site.
4	Two or more sites of ulceration and/or inflammation.
5	Two or more major sites of inflammation and ulceration or one major site of inflammation and ulceration extending >1 cm along the length of the colon.

"Inflammation" was defined as regions of hyperemia and bowel wall thickening.

0.5% HTAB を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を 50 mg wet wt./ml の割合で添加した後、氷水下で冷却しながら、超音波処理して結腸組織を破碎した。3000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を MPO 活性測定用のサンプルとした。上清 50 μ l を反応液 2.95 ml (過酸化水素 0.0005% と *o*-dianicidine 0.167 mg/ml を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)) に添加して、室温で 30 秒毎に 460 nm における吸光度を分光光度計 (Shimadzu, UV-3000) を用いて測定した。MPO の 1 Unit は過酸化水素が 1 分間に 1 μ mol 減少する活性として算出した。

結 果

炎症性腸疾患ラットの作製 ラットに TNB (30 mg/rat) を注腸した翌日より、全例に下血、粘血便及び下痢が認められた。体重は、TNB 未処理の場合は増加傾向を示したが、TNB 処理後 6 日間投与前とほぼ同じ減少傾向にあった (Fig. 2(a))。結腸湿重量は、TNB 未処理群では試験期間を通じて大きくは変化せず、平均 0.4 g であったことから、この値 (0.4 g) を他投与試験の結果に対する基準値とした。TNB 処理後、湿重量は結腸粘膜筋板の肥厚と粘膜下組織の肥厚のため 3 日目は 0.8 g、7 日目は 1.0 g へと顕著に増加した (Fig. 2(b))。TNB 処理後の結腸の肉眼所見では、3 日後に全例で直腸から盲腸に到るまで連続性の浮腫が認められたため、結腸障害スコアは、すべてのラットで最高スコアの 5 を示した。その後、経時的に低下して自然治癒傾向が示唆されたが、14 日目においても平均 2.3 で投与前の値には回復せず、慢性炎症の病変を呈していることが示された (Fig. 2(c))。組織 MPO 活性は、処理前の 1.6 U/g/min から

Fig. 2. Time Courses of Colon Damage in Model Rats with Inflammatory Bowel Disease Induced TNB

(a) Body weight of rats, (b) wet weight of colon tissue, (c) damage score of colon tissue, (d) MPO activity in colon tissue. Each bar and vertical line represent the mean $\pm$ S.E. ($n=3-10$).

Fig. 3. The Effects of BDP Enemas Administration (20 and 50 µg/Rats) to Model Rats with Inflammatory Bowel Disease Induced by TNB on the Rate of Rats with Diarrhea or Melena ($n = 3-10$)

3日後の平均 9 U/g/min, 7日後の 10 U/g/min へと増大し, 組織が激しく炎症を起こしていることが示された (Fig. 2(d)).

BDP 注腸液の消化器症状 (下痢又は下血) に対する効果 TNB によって誘発された炎症性腸疾患モデルラットに BDP 注腸液を連日投与した場合のラット体重の変化は, 両投与量 (20, 50 µg/rat/d) とともに, 対照群に比べて大きな変化はなかったが, 消化器症状 (下痢又は下血) を呈するラットの割合 (Fig. 3) は, 20 µg 投与では BDP 投与開始後 4 日目では 40%, 11 日目では 20% に減少し, 50 µg 投与では 4 日目ですべてのラットにおいて認められず, BDP の投与量依存的に回復していることが示された。

BDP 注腸液の結腸湿重量変化に対する効果 TNB 処理による結腸湿重量変化に対する BDP 注腸液の 20 µg 及び 50 µg/rat/d 投与の効果を Fig. 4 に示した. BDP 投与開始後 4 日目では, 投与量依存的の減少傾向が認められた. 50 µg 投与では対照群に比べて有意に ($p < 0.05$) 低

Fig. 4. The Effects of BDP Enemas Administration (20 and 50 µg/Rats) to Model Rats with Inflammatory Bowel Disease Induced by TNB on Wet Weight of Colon Tissues

Each bar and vertical line represent the mean $\pm$ S.E. ($n = 3-10$). Significantly different between both data ($*p < 0.05$) as assessed by Student's t -test.

Score 1

Score 2

Score 3

下して基準値に近い値を示し、浮腫が改善していることが示唆された。11日目では、対照群の湿重量も自然治癒により減少したため、BDP投与による結腸湿重量に対する顕著な効果は認められなかった。

BDP注腸液の結腸障害スコアにおける効果 Morrisらの結腸障害スコア¹¹⁾ (Table 1)の代表的な写真をFig. 5-1とFig. 5-2に示した。スコア1は結腸の粘膜ひだが残っており、出血が局在しているが炎症所見がない。スコア2はスコア1と同様に粘膜が残っており炎症所見はないが、中央部に潰瘍が認められる。スコア3は、中央部に潰瘍が認められ、かつ結腸組織全

Score 4

Score 5

Fig. 5-1, 5-2. Photographs of Colon Tissues of the Typical Damage Score (1—5)

体にわたり肥厚が見られる。スコア 4 は、結腸組織の肥厚とその中に潰瘍が 3 カ所認められる。スコア 5 は結腸組織の肥厚と中央の潰瘍部の範囲が 1 cm 以上にわたっている。

結腸の障害スコアは BDP を投与開始してから 4 日目で対照群の平均 3.9 に対し、20 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 投与では 2.7, 50 $\mu\text{g}/\text{rat}$ では 1.0 を示し、投与量依存的な障害スコアの有意な低下が認められた (Fig. 6)。BDP 投与 11 日目では、自然治癒により対照群の障害スコアも低下したため、対照群と BDP 投与群との間に有意な差は認められなかった。

結腸組織中の MPO 活性に対する BDP 注腸液の効果 結腸組織の MPO 活性は、BDP 投与開始してから 4 日目では、20 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 投与で 10 U/g/min を示し、ほぼ対照群と変わらなかったが、50 $\mu\text{g}/\text{rat}$ 投与群においては、約 3 U/g/min で、MPO 活性の顕著な減少が認められた (Fig. 6)。BDP 投与 11 日後では、対照群に対して活性の低下は認められなかった。

考 察

UC の代表的な治療法として CS の注腸療法が確立されている。¹³⁾ 我々は、局所作用が強かつ全身作用が少ないことが報告されている CS である BDP を用いて注腸液を調製し、プレドニゾロンの注腸及び内服投与で満月様顔貌などの全身性副作用の発現している UC 患者に投与した結果、効果と副作用の面から有効であることを報告した。¹⁰⁾ 今回は、BDP 注腸液の UC に

対する有効性を炎症性腸疾患モデルラットを用いて検討した。

モデル動物の作製方法は種々報告されているが,¹⁴⁻¹⁷⁾ 実験動物に TNB を注腸することより、ヒト UC に類似した大腸炎モデルの作製が可能であることが知られていることから,¹¹⁾ フィッシャー系ラットに TNB を注腸して検討した。この方法により、結腸粘膜上皮のびらんや、粘膜筋板の肥厚及び粘膜下組織の浮腫などによる湿重量の増加が引き起こされるが、経時的に自然治癒する傾向も認められるため (Fig. 2), BDP 注腸液の効果は、治癒に要する期間、すなわち回復の早さから判定した。

BDP 注腸液の効果は、下痢などの消化器症状を示すラットの割合、各炎症の指標 (結腸の湿重量、障害のスコア及び組織中 MPO 活性) の経時変化から検討した。BDP の投与は、結腸障害が最も激しかった TNB 処理後 3 日目から開始して、臨床における投与と同様に 1 日 1 回とした。消化器症状が発現しているラットの割合は、対照群に比して BDP 投与の経過とともに低下し、また投与量の高い方が効果が高い結果が得られた (Fig. 3)。このことは、UC 患者における BDP 注腸液の投与量依存的な有効性を裏付けるものと考えられる。結腸の炎症 (結腸湿重量 (Fig. 4), 障害スコア (Fig. 6), MPO 活性 (Fig. 7)) は、BDP 投与後初期 (4 日目) において投与量依存的な改善傾向が認められたが、投与 11 日目で、消化器症状と炎症の各指標が対応しなかったことは、大腸の機能がある程度回復しても炎症はまだ残っていることを示しており、臨床において、症状が改善しても引き続き

Fig. 6. The Effects of BDP Enemas Administration (20 and 50 µg/Rats) to Model Rats with Inflammatory Bowel Disease Induced by TNB on Damage Score of Colon Tissues

Each bar and vertical line represent the mean $\pm$ S.E. ($n=3-10$). Significantly different between both data (* $p<0.05$, ** $p<0.01$) as assessed by Student's t -test.

Fig. 7. The Effects of BDP Enemas Administration (20 and 50 µg/Rats) to Model Rats with Inflammatory Bowel Disease Induced by TNB on MPO Activity in Colon Tissues

Each bar and vertical line represent the mean $\pm$ S.E. ($n=3-10$). Significantly different between both data (* $p<0.05$, ** $p<0.01$) as assessed by Student's t -test.

治療を続ける必要性があることを示唆している。11日目の炎症の指標において対照群と差がなかった理由としては、ラットにおいてTNBで誘発された病態では自然治癒の速度が速く、薬物投与の影響が見られなかったものと考えられる。Rachmilewitz¹⁸⁾らは、同じCSであるdexamethasone注腸液のTNB誘発性結腸障害モデルラットに対する効果を検討しており、1及び3週間の投与においても結腸湿重量及びMPO活性とも対照群と比較して改善を認めなかったことを報告しているが、本研究では、BDP投与4日目の投与初期において改善が見られ、これが結腸の急性炎症に対するBDP注腸液の臨床での有用性を示唆していると考えられる。

最近では、interleukin 2 knockout,¹⁹⁾ interleukin 10 knockout,²⁰⁾ T-cell receptor knockout,²¹⁾ CD45RB transfer model²²⁾ 及び Gai_2 knockout²³⁾ などの薬物誘発性病態モデル動物とは異なる mutant mice が開発されており、今後、ヒトのUCにより近いこれらの自然発生慢性炎症性腸疾患モデル動物を使用して薬物の効果を比較検討することが必要であると思われる。

以上のことから、BDP注腸液は、TNB誘発性炎症性腸疾患モデルラットにおいて、投与初期において投与量依存的な効果が認められ、臨床における有用性を裏付けることができたと考えられる。

謝辞 本研究にあたり、結腸組織標本の写真撮影にご協力いただいた東京大学医学部附属病院検査部宮沢六郎技術官に感謝いたします。

引用文献及び注

- 1) 本論文の一部は日本薬学会第116年会(金沢, 1996年3月)で発表。
- 2) Hanauer S. B., *N. Eng. J. Med.*, **334**, 841—848 (1996).
- 3) Margolin M. L., Krumholz M. P., Fochios S. E., Korelitz B. I., *Am. J. Gastroenterol.*, **83**, 227—243 (1988).
- 4) Lee D. A. H., Taylor G. M., James V. H. T., Walker G., *Gut*, **20**, 349—355 (1979).
- 5) McIntyre P. B., Macrae F. A., Berghouse L., English J., Lennard-Jones J. E., *Gut*, **26**, 822—824 (1985).
- 6) Flavell Matts S. G., Kelleher J., Wharton B. A., Walters G., *Br. Med. J.*, **2**, 24—26 (1963).
- 7) Brogden R. N., Heel R. C., Speight T. M., Avery G. S., *Drugs*, **28**, 99—126 (1984).
- 8) Martin L. E., Tanner R. J., Clark T. J., Cochrane G. M., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **15**, 267—275 (1974).
- 9) Kumana C. R., Seaton T., Meghji M., Castelli M., Benson R., Sivakumaran T., *Lancet*, **1**, 579—583 (1982).
- 10) 嶋田修治, 青山隆夫, 中島克佳, 渋谷文則, 小滝 一, 澤田康文, 篠崎 大, 澤田俊夫, 武藤徹一郎, 伊賀立二, 第5回日本病院薬学会年会(東京)講演要旨集, 1995年7月, pp. 274—275.
- 11) Morris G. P., Beck P. L., Herridge M. S., Depew W. T., Szewczuk M. R., Wallace J. L., *Gastroenterology*, **96**, 795—803 (1989).
- 12) Krawisz J. E., Sharon P., Stenson W. F., *Gastroenterology*, **87**, 1344—1350 (1984).
- 13) 井上幹夫, 潰瘍性大腸炎の治療指針案, 厚生省特定疾患・難治性炎症性腸管障害調査研究班・昭和63年度業績集, (1989) p. 38.
- 14) MacPherson B. R., Pfeiffer C. J., *Digestion*, **17**, 135—150 (1978).

- 15) Yamada T., Deitch E., Specian R. D., Perry M. A., Sartor R. B., Grishami M. B., *Inflammation*, **17**, 641—662 (1993).
- 16) Watt J., Marcus R., *J. Pharmacol.*, **21**, 1877—1885 (1969).
- 17) Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R., *Gastroenterology*, **98**, 694—702 (1990).
- 18) Rachmilewitz D., Simon P. L., Schwartz L. W., Griswold D. E., Fondacaro J. D., Wasserman M. A., *Gastroenterology*, **97**, 326—337 (1989).
- 19) Sadlack B., Merz H., Schorle H., Schimpl A., Feller A. C., Horak I., *Cell*, **75**, 253—261 (1993).
- 20) Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W., *Cell*, **75**, 263—274 (1993).
- 21) Mombaerts P., Mizoguchi E., Grusby M. J., Glimcher L. H., Bhan A. K., Tonegawa S., *Cell*, **75**, 274—282 (1993).
- 22) Morrissey P. J., Charrier K., Braddy S., Liggitt D., Watson J. D., *J. Exp. Med.*, **178**, 237—244 (1993).
- 23) Rudolph U., Finegold M. J., Rich S. S., Harriman G. R., Srinivasan Y., Brabet P., Boulay G., Bradley A., Birnbauer L., *Nature Genet.*, **10**, 141—148 (1995).