

## 木クレオソートの止瀉作用についての新しい知見

安宅弘司,\* 伊藤雅文, 柴田 高

**New Views on Antidiarrheal Effect of Wood Creosote: Is Wood Creosote Really a Gastrointestinal Antiseptic?**

Koji ATAKA,\* Masafumi ITO, and Takashi SHIBATA

Research Institute, Taiko Pharmaceutical Co., Ltd., 3-34-14 Uchihonmachi, Suita City 564-0032, Japan

(Received April 25, 2005; Accepted September 9, 2005)

Wood creosote, the principal ingredient in Seirogan, has a long history as a known gastrointestinal microbicidal agent. When administered orally, the intraluminal concentration of wood creosote is not sufficiently high to achieve this microbicidal effect. Through further animal tests, we have shown that antimotility and antisecretory actions are the principal antidiarrheal effects of wood creosote. Wood creosote inhibits intestinal secretion induced by enterotoxins by blocking the  $\text{Cl}^-$  channel on the intestinal epithelium. Wood creosote also decreases intestinal motility accelerated by mechanical, chemical, or electrical stimulus by the inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the smooth muscle cells. In this overview, the antimotility and antisecretory effects of wood creosote are compared with those of loperamide. Wood creosote was observed to inhibit stimulated colonic motility, but not normal jejunal motility. Loperamide inhibits normal jejunal motility, but not stimulated colonic motility. Both wood creosote and loperamide inhibit intestinal secretion accelerated by acetylcholine. Wood creosote was found to have greater antisecretory effects in the colon than loperamide. Based upon these findings, we conclude that the antidiarrheal effects of wood creosote are due to both antisecretory activity in the intestine and antimotility in the colon, but not due to the microbicidal activity as previously thought. Wood creosote was found to have no effects on normal intestinal activity. These conclusions are supported by the results of a recent clinical study comparing wood creosote and loperamide, which concluded that wood creosote was more efficacious in relieving abdominal pain and comparable to loperamide in relieving diarrhea.

**Key words**—wood creosote; antimotility; antisecretory; diarrhea

**1. はじめに**

木クレオソートは日本のみならず東南アジアにおいて下痢の治療薬として、100年以上に渡って使われ続けている正露丸®の主成分である。広葉樹から精製される木クレオソート (CAS No. 8021-39-4) は、コールタールから生成され一般的にクレオソートと呼ばれている石炭クレオソート (CAS No. 8001-58-9) とは全く別の物質である。われわれは両者の混同を避けるため、この医薬品であるクレオソートのことを木クレオソートと表記している。木クレオソートは厚生労働省が定める胃腸薬承認基準や日本薬局方では止瀉薬の項目の殺菌剤として分類されていることから、食あたりや水あたりと言った感染性下痢に対する治療薬として認知されてきた。

しかしながら、われわれの研究グループの10年以上に渡る様々な研究の結果、臨床用量を服用した場合の木クレオソートの止瀉作用の本態は殺菌作用による食中毒原因菌の破壊ではなく、消化管内の水分異常分泌抑制並びに消化管の異常運動抑制の2つの抑制効果であることが解明された。そこで今回の総説では、われわれの研究グループの今までの研究から分かってきた木クレオソートの2つの新しい薬理効果についてロペラミドとの比較も含めて述べるとともに、木クレオソートの最新の臨床試験結果についても紹介する。

**2. 木クレオソートの消化管内水分分泌に対する抑制効果**

**2-1. 毒素原生大腸菌毒素による消化管内水分分泌に対する木クレオソートの抑制効果** 正常な消化管は摂取した食物や飲料水から水分吸収を行う一方、唾液、胃液、胆汁などの水分分泌を行って

大幸薬品株式会社研究所 (〒564-0032 吹田市市本町 3-34-14)

e-mail: se-ro.4-25@k6.dion.ne.jp

る。正常な消化管はこの水分吸収と水分分泌のバランスを水分吸収が優位になるように保っている。<sup>1)</sup> 下痢症状とはこの消化管の水分吸収と分泌のバランスが大きく水分分泌に傾いた状態のことである。消化管の水分分泌が亢進する原因の1つに、毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC) の消化管内への感染がある。この毒素原性大腸菌の感染による下痢は“旅行者下痢症”と呼ばれ、海外に旅行したときなどにしばしば発症する一般的な急性下痢である。<sup>2)</sup> 毒素原性大腸菌に感染すると、この大腸菌が産生する毒素が消化管上皮細胞の特定の受容体に結合し、消化管上皮細胞の信号伝達系を刺激し細胞内の adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) 又は guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) を上昇させる。その結果、消化管上皮細胞の管腔側刷子縁 (頂側) 膜上の塩素イオンチャンネル (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) が開き塩素イオンの分泌とともに浸透圧の変化に伴う水分分泌が起こることが知られている。<sup>3,4)</sup> そこで、毒素原性大腸菌が産生する毒素、易熱性毒素 (heat-labile enterotoxin, LT) 並びに耐熱性毒素 (heat-stable enterotoxin, STa) が引き起こす消化管内水分分泌亢進に対する木クレオソートの抑制効果を評価した。麻酔下のウサギの空腸部分に腸管の両端を結紮したループ (5 cm) を作りその

中に LT 又は STa を注入し数時間経過すると、ループ内の腸液量が有意に増加した。この実験系で各毒素と木クレオソートを同時に注入すると腸液量は有意に減少した (Fig. 1).<sup>5,6)</sup> また、木クレオソートは LT が引き起こす情報伝達物質 cAMP の上昇を抑制することではなく、<sup>5)</sup> また STa が引き起こす cGMP の細胞内濃度の上昇を抑えることもなかった (未発表データ)。このことから、木クレオソートは毒素原性大腸菌感染による分泌性下痢に対して水分分泌を抑制することで下痢症状を改善する可能性があり、その作用機構は毒素の受容体への結合やそれによる細胞内の情報伝達物質濃度の上昇を抑えるのではなく、それら以降の段階、例えば CFTR からの塩素イオンの細胞外への流出を抑制することが考えられた。

**2-2. 塩素イオンチャンネルからの塩素イオン流出に対する木クレオソートの抑制効果** 消化管上皮細胞の刷子縁膜上にある CFTR は消化管の水分分泌にとって重要な役割を持つ膜タンパクである。毒素原性大腸菌毒素などにより細胞内の情報伝達物質である cAMP の濃度が上昇すると、細胞内の protein kinase A (PKA) が活性化し CFTR の特定部位である R 領域をリン酸化する。このことにより CFTR が開き、塩素イオンが細胞外へ流出することで分泌性下痢が起こる。<sup>7)</sup> 先の毒素原性大腸菌

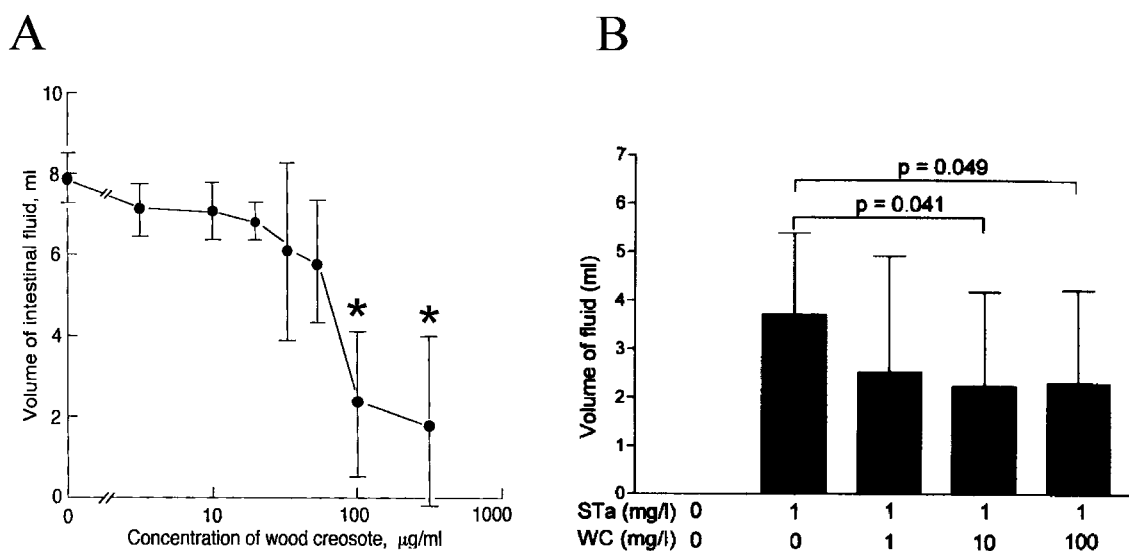


Fig. 1. The Inhibitory Effect of Wood Creosote on Intestinal Fluid Induced by LT (A) or STa (B) in Rabbit Jejunum Loops

A solution (1.5 ml) containing 33-ng/ml LT, 1-μg/ml STa, or mixture of each enterotoxin and wood creosote was injected into loops. The fluid volume in loops was measured 18h (A) or 9h (B) later. Each value is a mean ± S.E. (A) of 5 samples or a mean ± S.D. (B) of 14 samples. \* $p < 0.01$  versus vehicle (two-tailed unpaired Student's *t* test).

毒素 (LT, STa) による水分分泌を抑制した実験結果より、木クレオソートがこの CFTR からの塩素イオンの細胞外への流出を抑制する可能性が認められたため、CFTR を膜上に発現させた培養細胞からの塩素イオン流出に対する木クレオソートの抑制効果を評価した。この実験で使った細胞は、Mike R. 博士 (West of Glaxo Wellcome Medicines Research Centre, Hertfordshire, UK) より寄贈していただいた細胞で、CFTR が遺伝的に欠損している嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis) 患者から樹立した細胞株 CFPAC-1<sup>8,9)</sup> に CFTR の cDNA を遺伝子導入しその細胞膜上に CFTR を発現させたものである。<sup>10)</sup> この CFTR (+) 細胞に塩素イオン蛍光指示薬である 1-(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxy-quinolinium bromide (MQAE) を導入し細胞膜透過型 cAMP である 8-(4-Chlorophenyl-thio)-adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (CPT-cAMP) を加えると、MQAE による細胞内の蛍光強度が増加した。<sup>11)</sup> MQAE は塩素イオンにより消光するため、塩素イオンが細胞外へ流出すると蛍光強度は逆に増加する。次に、木クレオソートを添加後、CPT-cAMP を添加すると MQAE による細胞内の蛍光強度の増加が抑制された (Fig. 2)。<sup>11)</sup> また、MQAE の代わりに放射性同位元素の <sup>36</sup>Cl を CFTR (+) 細

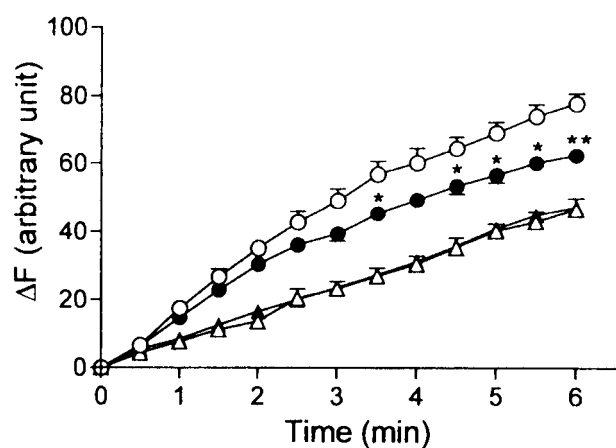


Fig. 2. The Inhibitory Effect of Wood Creosote on Cl<sup>-</sup> Efflux through CFTR Cl<sup>-</sup> Channels Induced by a Cell-permeable cAMP

Time course of the increase in MQAE fluorescence in CFTR (+) cells (○, ●) and CFTR (-) cells (△, ▲) loaded with MQAE after addition of 25 μmol/ml CPT-cAMP in the presence (●, ▲) or absence (○, △) of 30 μg/ml wood creosote. As MQAE fluorescence is quenched by Cl<sup>-</sup>, its intensity is inversely related to intracellular Cl<sup>-</sup> concentration. Time course intensity above the basal level (mF) after the addition of CPT-cAMP is shown. Each point represents the mean ± S.E. of five samples. \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 versus vehicle (two-tailed unpaired Student's *t* test).

胞に導入し同様の実験を行ったところ、木クレオソートは CPT-cAMP 誘発の <sup>36</sup>Cl 流出を抑制した。一方、細胞内 PKA による CFTR のリン酸化に対する木クレオソートの抑制効果について評価したところ、木クレオソートは PKA による CFTR のリン酸化を阻害することはなかった (未発表データ)。以上のことから、木クレオソートは CFTR に直接作用し、例えばその構造に変化を与えることにより CFTR からの塩素イオン流出を抑制し、その結果、消化管内への水分異常分泌を抑制すると考えられた。

### 3. 木クレオソートの消化管運動に対する効果

**3-1. 結腸蠕動運動の異常亢進に対する木クレオソートの抑制効果** 下痢症状につながる消化管の水分分泌と水分吸収のバランスと消化管運動は密接に関係している。<sup>1)</sup> 消化管運動が異常に亢進すると消化管内容物の移動速度が増加し、消化管内の滞留時間が短くなる。その結果、内容物からの水分吸収が低下し下痢症状になる。特に、結腸の蠕動運動が亢進すると消化管内容物からの水分吸収が追いつかなくなり、ある一定の粘度を持った正常な糞便が排泄されず軟便や水様性便を排泄することになる。<sup>12)</sup> そこで、結腸蠕動運動の異常亢進に対する木クレオソートの効果を評価した。マウスの結腸管腔内にガラスビーズ (直径 3 mm) を挿入すると、ガラスビーズ挿入刺激により排便につながる結腸蠕動運動が亢進しガラスビーズは体外へ排出されることが知られており、ガラスビーズを挿入してから排泄されるまでの時間を指標として結腸運動に対する薬物の効果について評価するための動物モデルの 1 つである。<sup>13-16)</sup> ラットに臨床用量の木クレオソートを臨床と同じ経口投与し 20 分後にガラスビーズを挿入したところ、ガラスビーズが排泄される時間は木クレオソート非投与ラットに比べて有意に延長した (Fig. 3)。<sup>17)</sup> このことから、木クレオソートはガラスビーズ挿入による結腸蠕動運動の亢進を抑制することが示された。

**3-2. 回腸平滑筋の異常収縮に対する木クレオソートの抑制効果** 木クレオソートの消化管運動抑制作用の作用機構を探る目的で、モルモットの摘出回腸を用いて、様々な平滑筋収縮促進物質による回腸縦走平滑筋の収縮に対する木クレオソートの抑制効果を評価した。マグナス装置の栄養液中に摘出回腸を縦走筋方向に吊るしキモグラフィで平滑筋

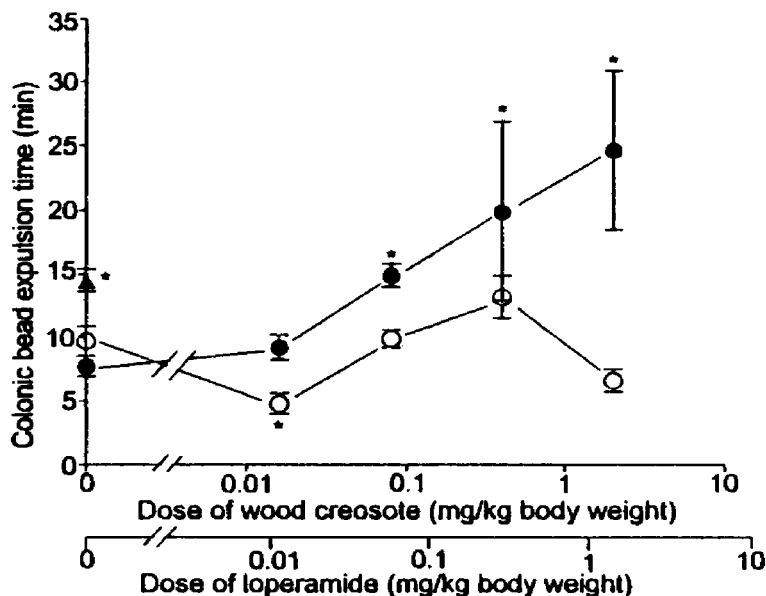


Fig. 3. The Inhibitory Effect of Wood Creosote on Colonic Excretory Motility Accelerated by the Insertion of a Glass Bead in Mice

Various doses of wood creosote (●), loperamide (○), or 20 µg/kg clonidine (▲, positive control) were administered orally 30 min before the insertion of a bead into mice colon. Each point represents the mean ± S.E. of 10 samples. \**p* < 0.05 versus respective vehicle (two-tailed unpaired Student's *t* test).

の運動を記録する実験系で、アセチルコリン、ブラジキニン、セロトニン、又は塩化バリウムと言った平滑筋収縮促進物質を添加すると平滑筋の収縮が観測できた。そこで、木クレオソートをあらかじめ添加した後、それら刺激促進物質を添加したところ、木クレオソートは各刺激物質による平滑筋収縮を抑制した (Fig. 4).<sup>18)</sup> また、電気刺激により誘発した回腸平滑筋収縮も抑制することが分かった (Fig. 5).<sup>18)</sup>

**3-3. 平滑筋細胞内カルシウム濃度上昇に対する木クレオソートの抑制効果** 平滑筋が収縮する第1段階としてアセチルコリンなどの情報伝達物質が引き金となって、筋小胞体からの細胞内の貯蔵カルシウムイオンの放出又はL型カルシウムチャンネル (電気刺激などによる平滑筋の脱分極では電位依存性カルシウムチャンネル) を介する細胞外カルシウムイオンの流入が起こる。<sup>19)</sup> 次に細胞質内のカルシウムイオンはカルモジュリンと結合してカルシウム・カルモジュリン複合体を形成し、この複合体はミオシン軽鎖リン酸化酵素 (myosin light chain kinase, MLCK) を活性化することによりミオシン軽鎖の19番目のセリンをリン酸化する。<sup>20,21)</sup> このミオシン軽鎖のリン酸化はミオシン頭部の構造を変化させミオシンATPase活性が上昇し、結果的に平滑筋の収縮が起こるとされている。<sup>22)</sup> また、細胞内

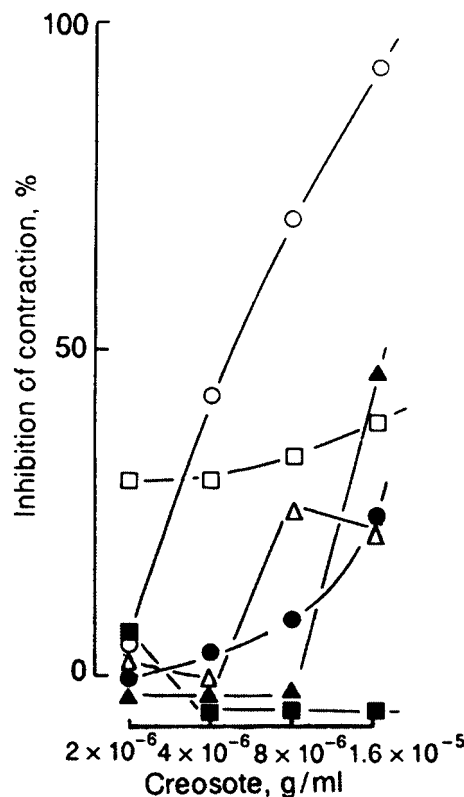


Fig. 4. The Inhibitory Effect of Wood Creosote on Longitudinal Contractions Induced by Various Drugs in Guinea Pig Ileum Segments

Various concentrations of wood creosote were added in the bath hanging ileum segments 3 min before the addition of various drugs: 5.4 µM nicotine (▲), 0.027 µM acetylcholine (●), 0.054 µM histamine (■), 0.017 µM bradykinin (○), 0.52 µM serotonin (□), or 33 µM BaCl<sub>2</sub> (△).

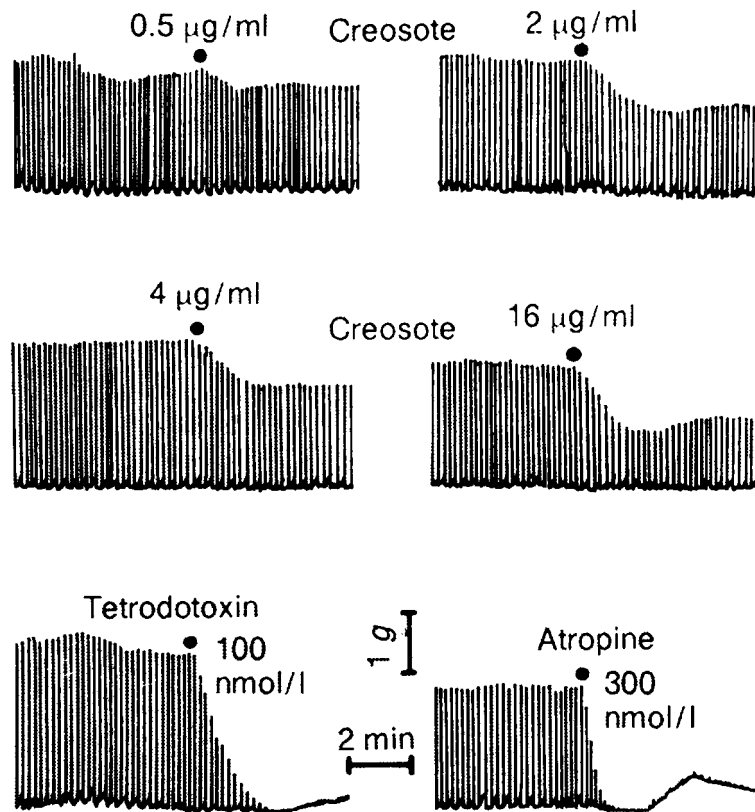


Fig. 5. The Inhibitory Effect of Wood Creosote on Electrically Stimulated Longitudinal Contraction in Guinea Pig Ileum Segments

The ileum segments hung in bath were stimulated with a train of 20 volt rectangular pulses (0.1 ms, 6 cycles/min). Various concentrations of wood creosote were added into the bath at the point as shown by dot.

カルシウムイオン濃度がおよそ 100 nM 以下になると、カルシウム・カルモジュリン複合体が分離しミオシン短鎖リン酸化酵素は不活性化し、合わせてミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (myosin light chain phosphatase, MLCP) 活性が優位になり、ミオシンは脱リン酸化されて、結果として弛緩が起こる。<sup>23)</sup> 木クレオソートは様々な刺激による平滑筋収縮を抑制したことから、平滑筋収縮において必須となる平滑筋細胞内カルシウムイオン濃度の上昇について木クレオソートが影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで、アセチルコリン誘発の平滑筋細胞内カルシウム濃度上昇に対する木クレオソートの抑制効果の評価した。縦走筋、輪状筋を含むモルモットの結腸組織片に膜透過型のカルシウム蛍光指示薬 Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2 AM) を導入した後、アセチルコリンを添加したところ組織片の蛍光強度が上昇した。そこで、アセチルコリン添加後に木クレオソートを添加したところアセチルコリンによる蛍光強度の増加は有意に抑制された (Fig. 6).<sup>24)</sup> 念のため、平滑筋収縮機構に関与する、カル

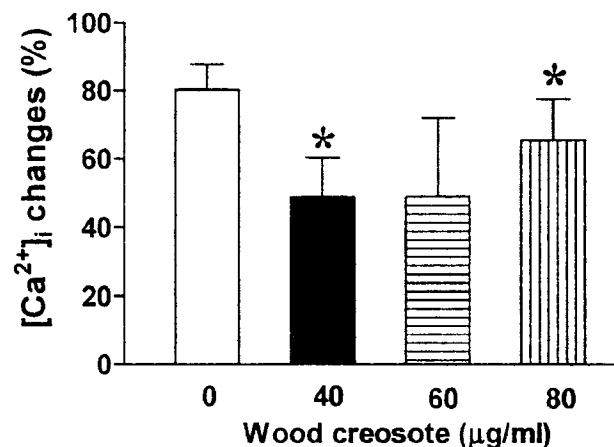


Fig. 6. The Inhibitory Effect of Wood Creosote on Increase in Intracellular Calcium Ion Induced by Acetylcholine in Guinea Pig Colonic Smooth Muscle Sheets

Various concentrations of wood creosote or vehicle were added into the recording chambers attaching colonic smooth muscle sheets 6 min after the addition of  $10^{-6}$  M acetylcholine (ACh). Each point represents a mean  $\pm$  S.E. of 5–8 samples. \* $p < 0.05$  versus vehicle (Student's *t* test).

シウム・カルモジュリン複合体の生成、カルシウム・カルモジュリン複合体の MLCK の活性化、そして MLCK のミオシン軽鎖のリン酸化過程に対す

る木クレオソートの抑制効果, 及び MLCP のリン酸化ミオシン軽鎖の脱リン酸化過程に対する木クレオソートの促進効果を評価したが, それぞれの過程に対して薬理効果は示さなかった(未発表データ). 以上のことから, 木クレオソートは平滑筋細胞内のカルシウムイオン濃度上昇を下げることで, 例えば L 型カルシウムチャンネルによる細胞内へのカルシウムイオン流入を抑えることにより平滑筋の収縮を抑制し, 消化管の異常運動を抑えることが示唆された.

#### 4. 木クレオソートの殺菌効果

木クレオソートは胃腸薬承認基準に止瀉薬の中の殺菌剤に分類されていることから分かるように, 長年に渡って消化管内に繁殖した食中毒原因菌の殺菌効果を期待して使われてきた. そこで, 木クレオソートの殺菌効果について評価することとした. 特定微生物を含む 7 種類の菌体 (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus subtilis BN*, *Enterococcus faecium*) について木クレオソートの最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) と最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration, MBC) を求めることとした.  $10^8$  CFU (colony forming unit) の各菌株を木クレオソート含有の各菌株での最適培地に塗布し一定時間培養後, 5 CFU 以下となった培地中の木クレオソートの濃度を MIC とした. 一方,  $10^6$  CFU/ml の各菌株を木クレオソート・生理食塩溶液に添加し 2 時間攪拌後,  $10^2$  CFU を最適培地で一定時間培養する. そして, 生理食塩水のみで処理した場合のコロニー数の 1/1000 以下となる木クレオソートの濃度を MBC とした. なお, この評価方法は日本化学療法学会が設定したカンテン培地希釈法の標準法に準拠している. この結果, MIC, MBC とともに 2—4 mg/ml の範囲であった (Table 1). そこで, 木クレオソート服用後に消化管内でこの濃度に到達するかどうか問題となる. ブタにヒトの臨床用量である 2 mg/kg の木クレオソートを経口投与し 1 時間後に胃, 十二指腸, 上部空腸内の木クレオソートの濃度を測定したところ, それぞれの部位で 114, 39,  $< 8 \mu\text{g/ml}$  であった (未発表データ). 動物種の違いはあるかもしれないが, 木クレオソートを臨床用量服用しても消化管内の食中毒菌を殺菌できる濃度に到達しないことが強く示唆され

Table 1. Antibacterial Activity of Wood Creosote

Microorganisms	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	2	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	4
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	2
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	4	4
<i>Bacillus subtilis BN</i>	2	2
<i>Enterococcus faecium</i>	4	4

た. また, このブタの消化管内濃度付近での木クレオソート (128 ng/ml) における細菌の発育抑制効果について評価したところ, 赤痢菌, ピロリ菌, 乳酸菌を始め 70 種類の細菌について発育抑制効果は認められなかったことからこのことは支持された (未発表データ).

#### 5. 木クレオソートとロペラミドの薬理効果の比較

ロペラミド<sup>25)</sup>は消化管の異常運動改善薬として消化器病の分野ではよく知られた薬である. そこで, 木クレオソートとロペラミドとの薬理効果について比較評価を行った.

**5-1. 消化管内イオン分泌亢進に対する木クレオソートとロペラミドの抑制効果比較** アセチルコリンは分泌促進物質の 1 つであり消化管上皮細胞の塩素イオン分泌を亢進することが分かっている.<sup>26)</sup> ラットの摘出空腸と結腸をウッシングチャンバーに装着しアセチルコリンを漿膜側に添加すると, 空腸と結腸の両方において短絡電流値 (short circuit current, I<sub>sc</sub>) が上昇した. そこで, 木クレオソート又はロペラミドを漿膜側に添加した後, アセチルコリンを同じく漿膜側に添加すると, アセチルコリンによる I<sub>sc</sub> 値の上昇は両方の組織片において抑えられたが, 空腸ではロペラミドが, 結腸では木クレオソートの方が抑制効果は高かった (Fig. 7).<sup>27)</sup> このことから, 木クレオソートは空腸と結腸において水分異常亢進を抑制するが, その抑制効果は結腸で優位であり, その効果はロペラミドよりも有効であることが示唆された.

**5-2. 結腸蠕動運動の異常亢進に対する木クレオソートとロペラミドの抑制効果比較** 前述のマウスの結腸にガラスビーズを挿入し結腸運動を亢進させる実験系<sup>17)</sup>で臨床用量の経口投与における抑制効

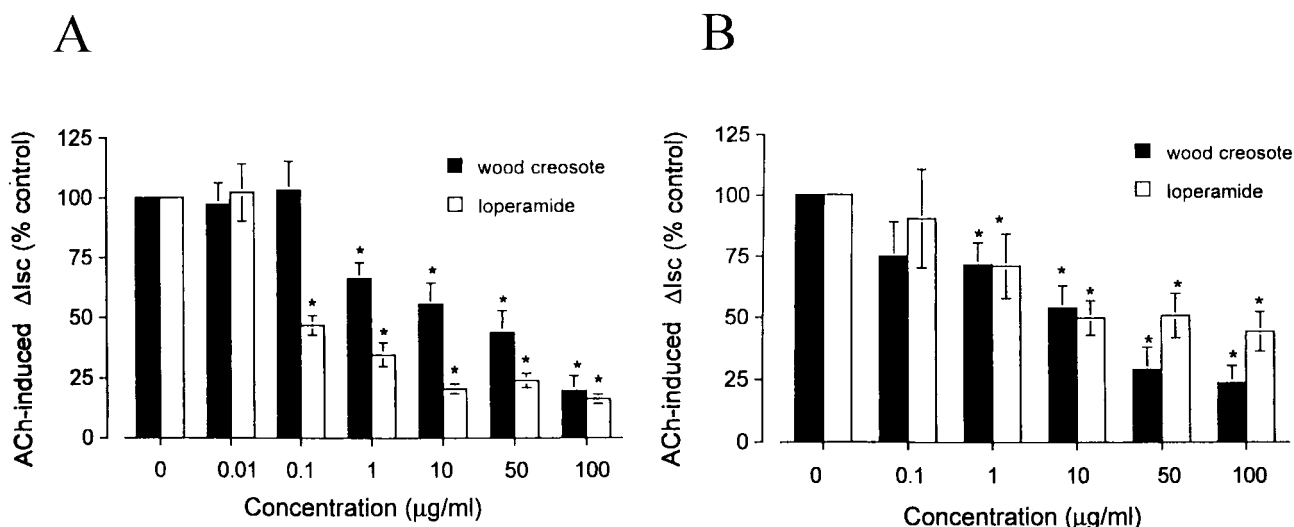


Fig. 7. Comparison of Inhibitory Effects of Wood Creosote and Loperamide on Mucosal Ion Secretion in Rat Jejunum (A) and Colon (B)

Various concentrations of wood creosote or loperamide were applied to the serosal bathing solution 10 min before application of 100  $\mu$ M acetylcholine (ACh) to serosal bathing solution. Each point represents a mean  $\pm$  S.E. of 6 samples. \* $p < 0.05$  versus vehicle (unpaired Student's  $t$  test).

果を比較したところ、木クレオソートの方がロペラミドよりガラスビーズ排出時間が有意に延長した (Fig. 3).<sup>17)</sup> なお、木クレオソートとロペラミドの臨床用量が異なることから、この図の横軸は各薬物の臨床用量を比較できるように各薬物で別のものとした。このことから結腸蠕動運動の異常亢進に対する抑制効果では木クレオソートの方がロペラミドよりも有効であることが示唆された。

**5-3. 空腸蠕動運動に対する木クレオソートとロペラミドの抑制効果比較** 消化管蠕動運動を測定する一般的な動物実験の1つとしてチャーコールミール (炭懸濁液) を経口投与しその消化管内の移動距離を指標とする方法がある。<sup>28,29)</sup> 木クレオソート又はロペラミドを経口投与した後、チャーコールミールを経口投与し、一定時間後のチャーコールミールの小腸内移動距離を測定したところ、ロペラミドは移動距離を短縮したのに比べて、木クレオソートは一部の濃度でわずかに移動距離を短縮した以外は移動距離に影響を及ぼさなかった (Fig. 8).<sup>18)</sup> このことから、木クレオソートは小腸部分の正常な蠕動運動を抑制することはなく、むしろロペラミドの方が正常な蠕動運動を抑制することが示唆された。これは、ロペラミドが強力な蠕動運動抑制剤であることを示しているが、正常蠕動運動にまで影響を及ぼしていることからその服用には注意が必要であると考えられる。

## 6. ヒトでの非特異的急性下痢症状に対する木クレオソートの効果

以上のことから、木クレオソートの薬理効果の本態は消化管の蠕動運動異常並びに水分異常分泌の抑制効果であることが分かった。一方、木クレオソートは胃腸薬承認基準収載の薬であることから、最新の医薬品の臨床試験の実施基準 (good clinical practice, GCP) での臨床試験は実施されていなかった。消化管の蠕動運動異常亢進や水分分泌異常亢進は下痢を誘発することが知られている。<sup>12)</sup> そこで、非特異的急性下痢患者での臨床治験 (二重盲検法) を行い、その臨床効果をロペラミドと比較評価した。臨床治験は米国とメキシコの12施設でインフォームドコンセントした18歳以上45歳以下の男女について実施した。この結果、木クレオソートの服用による下痢症状改善率 (improved diarrhea) はロペラミド服用での症状改善率と比較して統計的に有意差は認められなかった。腹痛症状の改善率 (improved or resolved abdominal cramping) については木クレオソートの方が有効であり、排便頻度の改善率 (overall stool frequency) についてはロペラミドの方が有効であった (Fig. 9).<sup>30)</sup> 腹痛改善効果は木クレオソートの方がロペラミドよりも有効であったが、これは、結腸の異常運動が腹痛に関連していることが健常人と過敏性腸症候群との比較で報告されていることから、<sup>31)</sup> 薬理的動物実験において

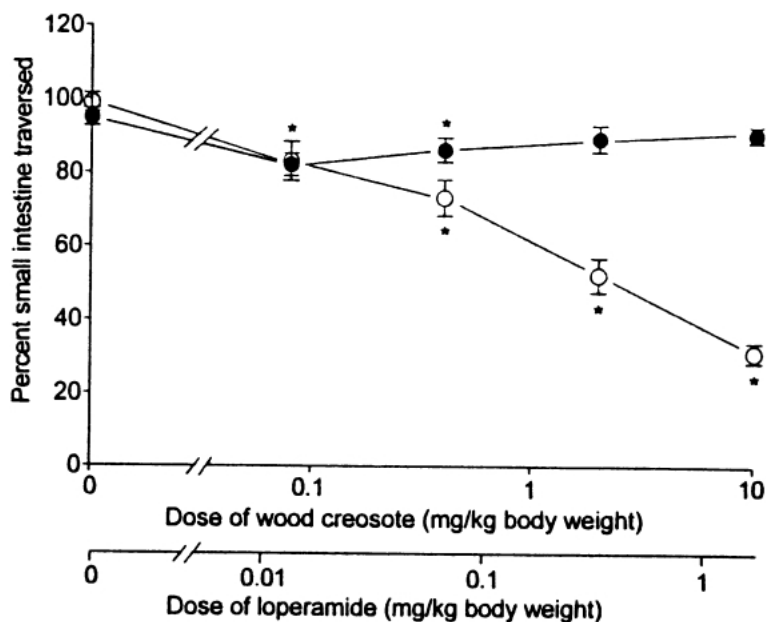


Fig. 8. Comparison of Effects of Wood Creosote and Loperamide on Small Intestinal Motility in Mice

Various doses of wood creosote (●) or loperamide (○) were administered orally 30 min before oral administration of 50 g/l charcoal meal. The moving distance of charcoal meal from the pylorus was measured 1 h after the administration of charcoal meal in mice. Each point represents a mean ± S.E. of 10 samples. \* $p < 0.05$  versus vehicle (two-tailed unpaired Student's  $t$  test).

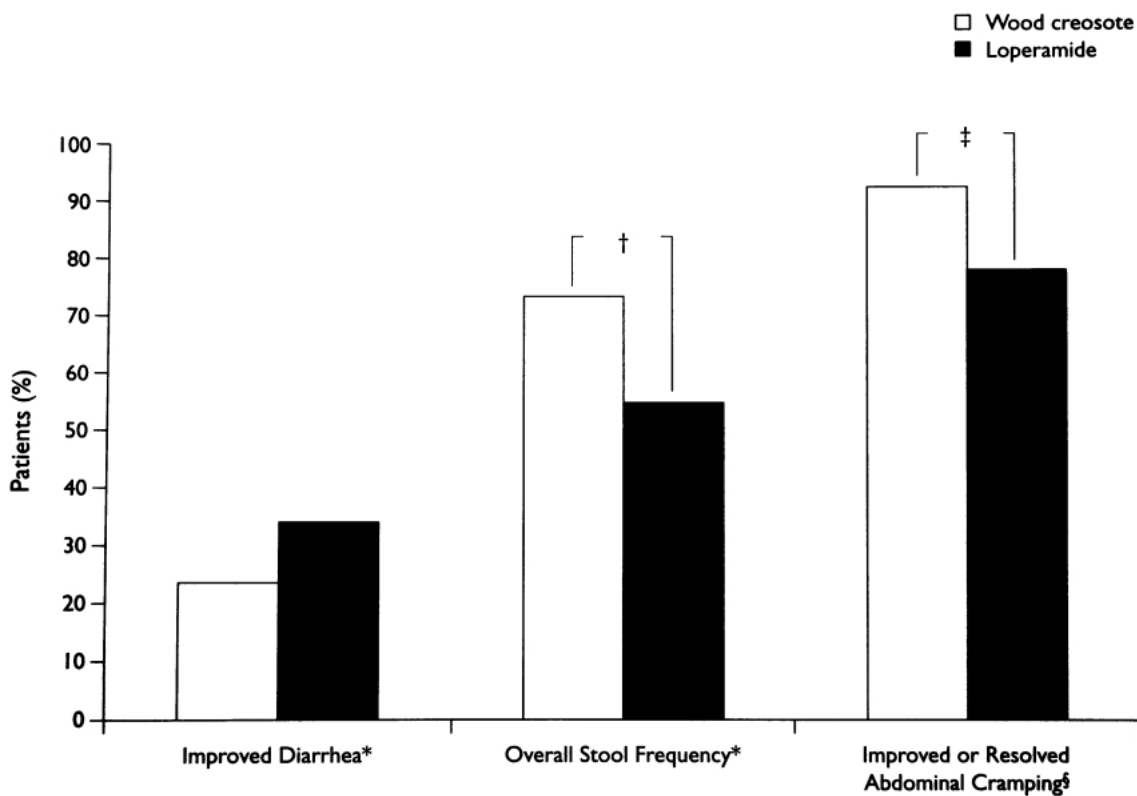


Fig. 9. Comparison of Antidiarrheal Medication of Wood Creosote or Loperamide in Patients with Acute Nonspecific Diarrhea

\*Number of patients in this analysis: 60 and 62 in wood creosote and loperamide groups, respectively; \* $p < 0.04$  between groups (Fisher exact test), † $p < 0.038$  between groups (Fisher exact test), ‡ number of patients in this analysis: 53 and 59 in the wood creosote and loperamide groups respectively.



結腸蠕動運動の異常亢進に対する抑制効果がロペラミドに比べて強かった木クレオソートが、結腸部分の異常運動由来の腹痛をより改善したと推測できる。木クレオソートの下痢症状改善効果は、薬理的動物実験で示してきたように、下痢の原因となる消化管の異常運動の抑制並びに水分分泌亢進の抑制効果によるものと考えられる。木クレオソートの排便回数改善効果についてはロペラミドのそれよりも劣っているが、先の動物実験においてロペラミドは小腸の正常な消化管運動をも抑制し内容物の移動を遅らせる強い効果を有していたため、排便回数が普段の生活での正常回数より低下している患者が含まれているのかもしれない。ロペラミドの副作用に便秘があることはよく知られている。この臨床試験において、木クレオソートの下痢症状の改善効果はロペラミドと統計的な差は認められず腹痛改善効果はロペラミドより優れていることから、木クレオソートを治療薬として使用することは有効であると考えられる。

#### 7. ストレス性下痢に対する抑制効果

衛生状態の悪い地域（災害発生地域や紛争地域）では、感染性下痢などの急性下痢が問題<sup>32)</sup>となっているが、ストレス社会と言われる現代社会においては過敏性腸症候群（IBS）などの慢性下痢が注目を集めるようになってきた。IBSはストレスと密接に関係していることが報告されており<sup>33,34)</sup> ストレスによってその症状が悪化することが知られている。<sup>35)</sup> ヒトはストレスを感じると様々な生体反応を起こし、消化器に関係した反応においては、摂食障害（拒食症や過食症）、水分分泌亢進による下痢、それに下部消化管運動の異常亢進による腹痛や下痢がある。<sup>34)</sup> すなわち、ストレスは消化管において水分分泌と消化管運動の両方を異常亢進することが分かっている。また、動物でのストレス性下痢モデルは、ストレス性下痢治療薬だけでなく下痢型IBS治療薬の基礎的な薬効評価にも使われている。<sup>36,37)</sup> そこで、ラットにおけるストレス誘発の水分分泌と下部消化管の運動亢進に対する木クレオソートの抑制効果について評価した。

**7-1. ストレス誘発の消化管内イオン分泌亢進に対する木クレオソートの抑制効果** まずストレス誘発の消化管内水分異常分泌に対する木クレオソートの抑制効果を評価した。ラットにストレスを負荷

すると消化管内に塩素イオン分泌を伴う水分分泌を起こすことが報告されている。<sup>38)</sup> そこで、ストレス感受性の高いラットに冷却拘束ストレス（cold restraint stress, CRS）<sup>38)</sup>を負荷したのちに空腸又は結腸を摘出し、その筋層を除去した切片をウッシングチャンバーに装着して消化管上皮細胞の漿膜側と粘膜側の電位差をゼロにした状態（voltage clamp）でイオンの動きを電氣的に測定した。この電氣的な指標は短絡電流（short circuit current, I<sub>sc</sub>）と呼ばれ、消化管管腔内への陰イオン流出（消化管の場合は主に塩素イオンがそれにあたる）が起こると短絡電流は上昇するように設定されている。<sup>39)</sup> 冷却拘束ストレスを負荷されたラットの空腸及び結腸の短絡電流値はストレスを負荷していないラットのそれに比べて優位に大きくなっていった。そこに木クレオソートを漿膜側又は粘膜側に累加的に添加していくと、空腸及び結腸の短絡電流値は濃度依存的に減少した（Fig. 10）。<sup>40)</sup> このことから、木クレオソートはストレス誘発の消化管内水分分泌異常亢進を抑制する可能性が示唆された。また、木クレオソートは粘膜側添加よりも漿膜側添加での抑制効果を示す濃度が低いことから、漿膜側からの抑制作用が優位であると考えられ、臨床において経口投与される木クレオソートは、胃などの上部消化管から血中に移行し、血中を介して薬理効果を発現することが推測できた。

**7-2. ストレス情報伝達ペプチド誘発の結腸運動亢進に対する木クレオソートの抑制効果** 続いて、ストレス誘発の消化管運動亢進について実験を行うこととした。ラットにストレスを負荷すると糞便排泄が促進することが知られている。<sup>36,41)</sup> このストレス誘発の糞便排泄亢進は、副腎皮質ホルモン遊離因子（corticotropin-releasing factor, CRF）の受容体拮抗剤の脳室内投与によって抑えられることから、<sup>42)</sup> CRFはストレス誘発の糞便排泄すなわちストレス誘発の結腸運動異常亢進に関する脳内情報伝達物質の1つとして重要視されている。そこで、CRF脳室内投与による大腸運動亢進に対する木クレオソートの抑制効果を無麻酔非拘束状態のラットにおける内圧測定法<sup>43)</sup>により観測できる空腹期運動様収縮の頻度（Frequency）を指標として評価した。木クレオソートを静脈内投与した後CRFを脳室内投与したところ、空腹期運動様収縮の頻度（Fig.

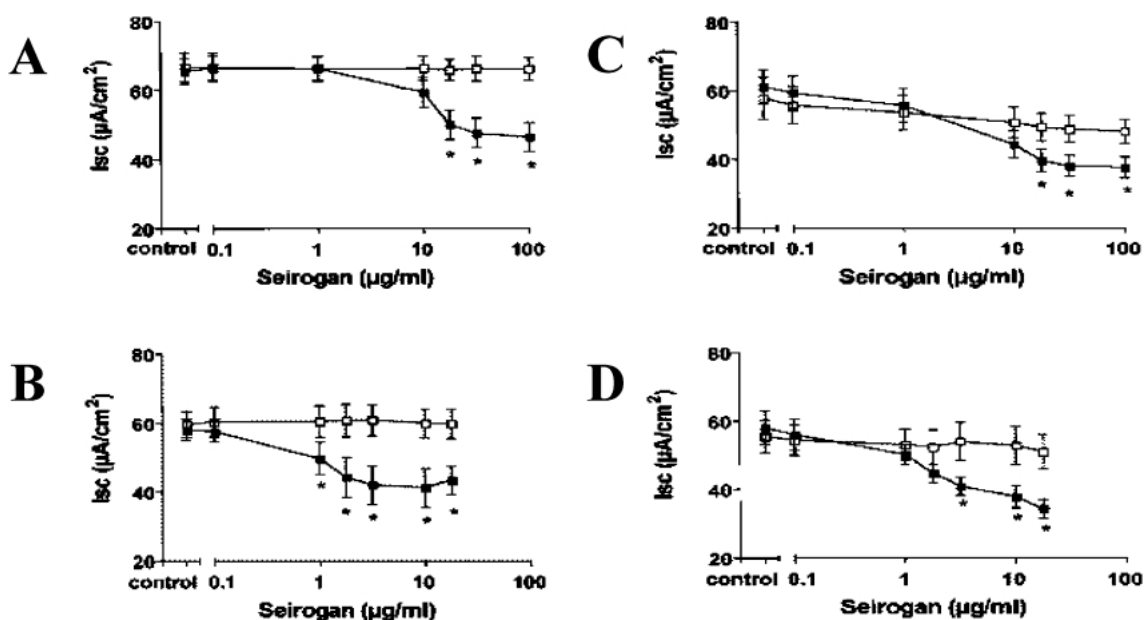


Fig. 10. The Inhibitory Effect of Wood Creosote on Intestinal Mucosal Ion Secretion in Cold Restraint Stressed Rats

Various concentrations of wood creosote (■) or vehicle (□) were applied to the mucosal (A and C) or serosal (B and D) bathing solution clamping rat jejunal (A and B) or colonic (C and D) mucosal sheet. Each point represents a mean  $\pm$  S.E. of 6 samples. \* $p$  < 0.05 versus vehicle (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

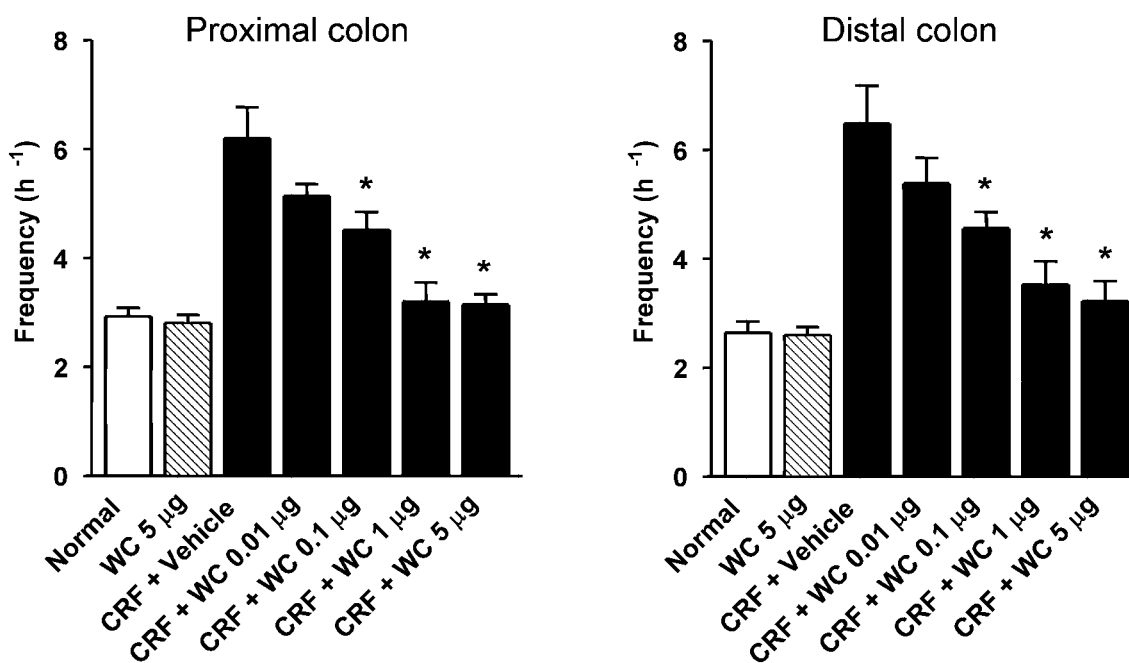


Fig. 11. The Inhibitory Effect of Wood Creosote on Colonic Motor Activity Stimulated by Intracerebroventricular Injection of CRF in Conscious Rats

Various concentrations of wood creosote or vehicle were administered intravenously (*i.v.*) 5 min before intracerebroventricular injection (*i.c.v.*) of 0.25 nmol CRF in rats. 5  $\mu$ g wood creosote alone was administered intravenously in rats. Normal rats were given no drugs. Each point represents a mean  $\pm$  S.E. of 8–12 samples. \* $p$  < 0.05 versus CRF *i.c.v.* plus vehicle *i.v.* (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple-range test).

11) は近位並びに遠位結腸の両方で抑制され、排泄糞便個数も減少した。<sup>44)</sup> この実験において抑制効果を示した木クレオソートの血中濃度は、ラットの体

循環血液量から推定すると 0.1  $\mu$ g/ml と考えられ、これはヒトが臨床用量を経口で服用した際の血中濃度<sup>45)</sup> とほぼ同じである。すなわち、経口投与された

木クレオソートは、消化管で吸収され血中に移行し大腸異常運動に対する抑制効果を発現することが分かった。今回の実験において、臨床用量の約5倍量の木クレオソートのみを静脈内投与しても正常な結腸運動を抑制することはなかった。<sup>44)</sup> マグヌス装置での空腸、回腸並びに結腸の縦走筋を使った *in vitro* 実験において、木クレオソートは消化管の自発運動に対して抑制効果を示した。この結果は今回の実験結果と食い違っているが、自発運動を抑制した木クレオソートの50%抑制濃度は13—28  $\mu\text{g/ml}$  の範囲であり、<sup>46)</sup> 今回の薬理活性を示した濃度よりも100倍高い濃度であることがその原因であると考えられる。

これらのことから、木クレオソートはストレス誘発の結腸運動異常亢進を正常運動のレベルまで抑制することが示唆された。また、結腸運動を正常化するという事は、ストレスによる結腸異常運動由来の腹痛を改善する可能性も期待できる。以上のストレス実験の結果から、木クレオソートはストレス性下痢の治療薬として期待でき、下痢型過敏性腸症候群の治療薬としての可能性も示唆された。今までの薬理効果試験において示されてきた消化管運動や水分分泌に対する木クレオソートの抑制効果濃度に比較して、今回のCRF誘発の大腸運動亢進に対する抑制濃度は約10倍低くなっている。これは、平滑筋細胞内のカルシウムイオン濃度上昇を下げることで以外の作用機序が、CRF誘発の大腸運動亢進に対する抑制効果に関しては存在すると考えられる。木クレオソートを静脈内投与した非拘束意識下ラットから得られた脳脊髄液から木クレオソートの主要成分の増加は認められなかった（未発表データ）。脳内CRFによる大腸運動亢進に関する情報伝達経路のうち抹消部位での情報伝達物質はいまだ解明されていないが、セロトニン受容体の関連が指摘されている。<sup>47)</sup> 木クレオソートがこのセロトニン受容体に作用している可能性はある。しかしながら、木クレオソートの作用機序解明のために更なる実験を行っていく必要はある。

#### 8. 木クレオソートの安全性に関する知見

木クレオソートは石炭クレオソートとよく混同され、最近でも発がん性の疑いがあると誤解されてきた。そこで、現代の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（good laboratory practice, GLP）

に従って発がん性の評価を行った。ラットに木クレオソートを20, 50, 200 mg/kg 体重を毎日、96—103週間連続投与した結果、腫瘍形成は認められなかった。<sup>48)</sup> 次に最新のGCPに従って、ヒトにおける安全性について評価した。米国において健常人（18—45歳）に木クレオソート含有錠剤（1錠当たり45 mg）を1—5錠（45—225 mg, 各群6名）又はプラセボ錠、1—5錠（各群2名）を1回服用させたところ、血圧、心拍数、心電図に異常は認められなかった。<sup>49)</sup> また、血液性化学検査の結果、2錠服用の1名のみ代謝関連の酵素量の増加が認められ、頭痛やめまいの軽い穏やかな有害事象がわずかに認められたが（Table 2）、いずれも重度な副作用ではなく、<sup>49)</sup> 木クレオソートは非常に安全な薬であると判断できた。続いて米国において、健常人（18—45歳）に木クレオソート含有錠剤（1錠当たり45 mg）を1—5錠（45—225 mg, 各群9名）又はプラセボ錠、1—5錠（各群3名）を2時間おきに5回服用させたところ、味覚異常や眠気などの軽い有害事象が認められたが、木クレオソートの臨床用量の範囲（45—135 mg）においては頭痛の2名のみであった（Table 3）。<sup>50)</sup> このことから、木クレオソートを連続投与した場合でも安全な薬であると判断できた。なお、臨床試験においては、ヘルシンキ宣言に準拠し、またインフォームドコンセントを実施している。

#### 9. おわりに

われわれの10年以上に渡る様々な研究により、木クレオソートは消化管運動抑制効果及び消化管内水分分泌抑制効果を有することが分かった。一方、臨床用量を服用した場合、下痢を引き起こす外来性細菌を殺菌するのに必要な消化管内有効濃度に到達しないことが分かった。このことから、木クレオソートの止瀉効果は消化管内の殺菌効果によるものではなく、消化管運動異常亢進に対する抑制効果と水分分泌異常亢進に対する抑制効果の2つの抑制効果によって成り立っていると結論付けることができる。これは、木クレオソートの止瀉作用に対する新しい知見であり、木クレオソートは殺菌効果による止瀉薬であると言うこれまでの定説を覆すものである。臨床試験において、木クレオソートの腹痛改善効果は、消化管運動抑制薬として著名であるロペラミドよりも有効であることが示され、それは、消化管運動抑制効果に基づく臨床効果であると考えられ

Table 2. Adverse Events for Wood Creosote by Dose Level and Sex and for Placebo

Adverse event by body system	Wood creosote dose (mg)					Men only (n=22)	Women only (n=8)	All subjects (n=30)	Placebo (n=10)
	45 (n=6)	90 (n=6)	135 (n=6)	180 (n=6)	225 (n=6)				
Body as a whole									
Asthenia	0	0	1	0	1	1	1	2	0
Headache	1	0	0	1	2	4	0	4	1
Infection	0	0	1	0	0	0	1	1	0
Back pain	1	0	0	0	0	1	0	1	0
Digestive									
Diarrhea	0	0	0	1	0	1	0	1	0
Nausea	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Vomiting	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Hematologic and lymphatic ecchymosis (bruising)									
	1	0	0	0	0	1	0	1	0
Metabolic and nutritional									
Total bilitubin uncreased	0	0	0	0	0	0	0	0	1
CK increased	0	1	0	0	0	0	1	1	0
AST increased	0	1	0	0	0	0	1	1	0
ALT increased	0	1	0	0	0	0	1	1	0
Nervous									
Dizziness	0	0	2	0	2	1	3	4	0
Somnolence	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Respiratory									
Rhinitis	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Urogenital									
Urinary tract infection	0	0	1	0	0	0	1	1	0
No. of adverse events	3	3	5	2	8	12	9	21	3
No. of subjects with adverse events	2	1	2	2	4	7	4	11	3

CK: creatine kinase, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase. Column numbers may not add up to total number of subjects, as individual subjects may have reported more than one adverse event. Placebo group considered of all men.

Table 3. Adverse Events by Treatment Group

Adverse event	Wood creosote dose (mg)					Placebo group (n=15)
	45 (n=9)	90 (n=9)	135 (n=9)	180 (n=9)	225 (n=9)	
Body as a whole						
Headache	1	1	0	0	1	3
Digestive system						
Taste perversion	0	0	0	7	5	0
Dyspepsia	0	0	0	1	1	0
Metabolic and nutritional						
Bilirubin total increased	0	0	0	0	1	0
Nervous system						
Dizziness	0	0	0	1	0	1
Somnolence	0	0	0	6	1	1
Number of adverse events	1	1	0	15	8	5
Number of subjects with adverse events	1	1	0	7	3	4

ることから、今後、木クレオソートの止瀉薬での分類を新たにすることがある。さらにストレス性下痢の治療効果を期待できる動物実験の結果が得られてきていることから、新しい効能としてストレス性下痢を追加できる臨床的見解が得られるかもしれない。また将来的には、下痢型 IBS に対する治療効果について評価できるかもしれない。

## REFERENCES

- 1) DuPont H. L., "Bockus Gastroenterology," ed. by Berk J. E., Saunders, Philadelphia, 1985, pp. 1983-1995.
- 2) Gorbach S. L., Kean B. H., Evans D. G., Bes-sudo D., *N. Engl. J. Med.*, **292**, 933-936 (1975).
- 3) Moss J., Vaughan M., *Mol. Cell. Biochem.*, **37**, 75-90 (1981).
- 4) Forte L. R., Thorne P. K., Eber S. L., Krause W. J., Freeman R. H., Francis S. H., Corbin J. D., *Am. J. Physiol.*, **263**, C607-615 (1992).
- 5) Ataka K., Ogata N., Kuge T., Shibata T., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **93**, 219-224 (1996).
- 6) Ogata N., Shibata T., *Pharmacology*, **62**, 181-187 (2000).
- 7) Dahan D., Evagelidis A., Hanrahan J. W., Hinkson D. A., Jia Y., Luo J., Zhu T., *Pflugers Arch.*, **443**, S92-96 (2001).
- 8) McIntosh J. C., Schoumacher R. A., Tiller R. E., *Am. J. Med.*, **85**, 592 (1988).
- 9) Schoumacher R. A., Ram J., Iannuzzi M. C., Bradbury N. A., Wallace R. W., Hon C. T., Kelly D. R., Schmid S. M., Gelder F. B., Rado T. A., Frizzell R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 4012-4016 (1996).
- 10) West M. R., Molloy C. R., *Anal. Biochem.*, **241**, 51-58 (1996).
- 11) Ogata N., Shibata T., *Pharmacology*, **72**, 247-253 (2004).
- 12) Sushil K., Sarna A., *Dig. Dis. Sci.*, **36**, 998-1018 (1991).
- 13) Koslo R. J., Burks T. F., Porreca F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 62-67 (1986).
- 14) Yamada K., Onoda Y., *J. Smooth Muscle Res.*, **29**, 47-53 (1993).
- 15) Jacoby H. I., Lopez I., *Dig. Dis. Sci.*, **29**, 551 (1984).
- 16) Raffa R. B., Mathiasen J. R., Jacoby H. I., *Life Sci.*, **41**, 2229-2234 (1987).
- 17) Ogata N., Ataka K., Morino H., Shibata T., *Pharmacology*, **59**, 212-220 (1999).
- 18) Ogata N., Baba T., Shibata T., *Pharmacology*, **46**, 173-180 (1993).
- 19) Makhlof G. M., "Textbook of Gastroenterology," ed. by Yamada T., Lippincott, Philadelphia, 1999, pp. 82-105.
- 20) Stull J. T., Lin P. J., Krueger J. K., Trehella J., Zhi G., *Acta Physiol. Scand.*, **164**, 471-482 (1998).
- 21) Aksoy M. O., Murphy R. A., Kamm K. E., *Am. J. Physiol.*, **242**, C109-C116 (1982).
- 22) Dillon P. F., Aksoy M. O., Driska S. P., Murphy R. A., *Science*, **221**, 495-497 (1981).
- 23) Pfitzer G., *J. Appl. Physiol.*, **91**, 497-503 (2001).
- 24) Morino H., Ataka K., Ito M., Kuge T., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1046-1051 (2004).
- 25) Awouters F., Megens A., Verlinden M., Schuurkes J., Niemegeers C., Janssen P. A., *Dig. Dis. Sci.*, **38**, 977-995 (1993).
- 26) Javed N. H., Cooke H. J., *Am. J. Physiol.*, **262**, G131-136 (1992).
- 27) Greenwood-Van Meerveld B., Tyler K. R., Venkova K., Kuge T., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 952-956 (2000).
- 28) Goldenberg M. M., Honkomp L. J., Castellion A. W., *Am. J. Dig. Dis.*, **20**, 955-960 (1975).
- 29) Ramaswamy S., Srinivasan D., Bapna J. S., *Eur. J. Pharmacol.*, **220**, 147-149 (1992).
- 30) Kuge T., Shibata T., Willett M. S., *Clin. Ther.*, **26**, 1644-1651 (2004).
- 31) Bassotti G., Sietchiping-Nzepa F., De Roberto G., Chistolini F., Morelli A., *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 613-617 (2004).
- 32) Lim M. L., Wallace M. R., *Infect. Dis. Clin. North Am.*, **18**, 261-274 (2004).
- 33) Murray C. D., Flynn J., Ratcliffe L., Jacyna M. R., Kamm M. A., Emmanuel A. V., *Gastroenterology*, **127**, 1695-1703 (2004).
- 34) Monnikes H., Tebbe J. J., Hildebrandt M., Arck P., Osmanoglou E., Rose M., Klapp B., Wiedenmann B., Heymann-Monnikes I., *Dig. Dis.*, **19**, 201-211 (2001).
- 35) Mayer E. A., Naliboff B. D., Chang L., Coutinho S. V., *Am. J. Physiol. Gastrointest.*

- Liver Physiol.*, **280**, G519–G524 (2001).
- 36) Kishibayashi N., Miwa Y., Hayashi H., Ishii A., Ichikawa S., Nonaka H., Yokoyama T., Suzuki F., *J. Med. Chem.*, **36**, 3286–3292 (1993).
- 37) Kobayashi S., Ikeda K., Suzuki M., Yamada T., Miyata K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **86**, 281–288 (2001).
- 38) Saunders P. R., Kosecka U., McKay D. M., Perdue M. H., *Am. J. Physiol.*, **267**, G794–799 (1994).
- 39) Ussing H. H., Zerahn K., *Acta Physiol. Scand.*, **23**, 110–127 (1950).
- 40) Ataka K., Kuge T., Venkova K., Greenwood-Van Meerveld B., *Dig. Dis. Sci.*, **48**, 1303–1309 (2003).
- 41) Martinez V., Rivier J., Wang L., Tache Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 754–760 (1997).
- 42) Martínez V., Taché Y., *Brain Res.*, **893**, 29–35 (2001).
- 43) Fujimiya M., Itoh E., Kihara N., Yamamoto I., Fujimura M., Inui A., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **278**, G32–G38 (2000).
- 44) Ataka K., Kuge T., Fujimiya M., “Digestive Disease Week,” Brain Gut Axis II, May 18, 2005.
- 45) Ogata N., Matsushima N., Shibata T., *Pharmacology*, **51**, 195–204 (1995).
- 46) Ogata N., Baba T., Shibata T., *Pharmacology*, **46**, 173–180 (1993).
- 47) Monnikes H., Tebbe J. J., Hildebrandt M., Arck P., Osmanoglou E., Rose M., Klapp B., Wiedenmann B., Heymann-Monnikes I., *Dig. Dis.*, **19**, 201–211 (2001).
- 48) Kuge T., Shibata T., Willett M. S., Turck P., Traul K. A., *Int. J. Toxicol.*, **20**, 297–305 (2001).
- 49) Kuge T., Shibata T., Willett M. S., *Pharmacotherapy*, **23**, 1391–1400 (2003).
- 50) Kuge T., Shibata T., Willett M. S., *J. Clin. Pharmacol.*, **43**, 284–290 (2003).