

健常犬における GLP-1 受容体作動薬投与が  
消化管通過時間におよぼす影響の検討  
(Effect of glucagon like peptide-1 receptor agonists  
on gastrointestinal transit in healthy dogs)

生野 佐織

健常犬における GLP-1 受容体作動薬投与が  
消化管通過時間におよぼす影響  
(Effect of glucagon like peptide-1 receptor agonists  
on gastrointestinal transit in healthy dogs)

生野 佐織

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科  
獣医保健看護学専攻博士後期課程平成 27 年入学

(指導教員：左向 敏紀)

平成 30 年 3 月

## 目次

序論	1
第1章 イヌにおける血清アセトアミノフェン濃度および血清スルファピリジン濃度測定法の基礎的研究	7
緒言	8
第1節 イヌにおけるアセトアミノフェン検出キット測定法およびアセトアミノフェン投与量の検討	
材料および方法	10
試験1 精度・妥当性試験	
供試動物	
供試フード	
供試薬剤	
方法	
サンプル採取およびサンプル処理	
測定キットおよび測定方法	
試験2 イヌにおける安全で定量可能な APAP 投与量の検討	
供試動物	
供試フード	
供試薬剤	
方法	
サンプル採取およびサンプル処理	
測定キットおよび測定方法	

統計解析

承認番号 .....15  
結果 .....16  
考察 .....17

第 2 節 HPLC を用いた血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度測定

法の精度および信頼性の検討

材料および方法 .....19

信頼性試験

供試動物

HPLC 測定条件

HPLC 測定方法

精度および妥当性試験

供試動物

供試フード

供試薬剤

方法

HPLC 測定条件および測定方法

統計解析

承認番号 .....23  
結果 .....24  
考察 .....25

小括 .....26

図および表 .....27

第 2 章	イヌにおけるアセトアミノフェン法およびサラゾスルファピリジン法の消化管通過時間の正確性の検討	36
	緒言	37
第 1 節	アセトアミノフェン法およびサラゾスルファピリジン法とバリウム含浸ポリエチレン球の比較	
	材料および方法	38
	供試動物	
	供試フード	
	供試薬剤	
	供試放射線マーカー	
	方法	
	レントゲン撮影、サンプル採取およびサンプル処理	
	測定項目および測定方法	
	承認番号	40
	結果	41
	考察	42
第 2 節	アセトアミノフェン法およびサラゾスルファピリジン法と液体造影剤の比較	
	材料および方法	44
	供試動物	
	供試フード	
	供試薬剤	
	供試放射線マーカー	
	方法	

レントゲン撮影、サンプル採取およびサンプル処理  
測定項目および測定方法

承認番号	46
結果	47
考察	49
小括	52
図および表	53

第3章 健常犬における GLP-1 受容体作動薬投与が消化管通過時間に与える  
影響の検討

緒言	64
材料および方法	66
供試動物	
供試フード	
供試薬剤	
方法	
サンプル採取およびサンプル処理	
測定項目、測定キットおよび測定方法	
統計解析	
承認番号	69
結果	70
考察	72
小括	76
図および表	77

総括	87
謝辞	92
参考文献	93

## 序論

胃および小腸は、食物の消化および栄養分の吸収に関わる重要な器官であり、生命を維持する重要な役割を担っている。食物は、口腔内で咀嚼され、唾液と混和された後、嚥下運動によって胃に送られる。食物は胃、十二指腸などの上部消化管内を輸送される間に、粉碎・輸送・混和され、酵素によって栄養素を吸収可能な形に加水分解され吸収される（岩崎 ほか, 2014）。吸収された糖、脂質および蛋白質は、ホルモンなどにより調節され、体内のエネルギー源として利用される。特に糖は身体にとって最も重要なエネルギー源であり、血中の糖を調整する唯一のホルモンであるインスリンにより、体内で厳密に調整される。インスリンは、膵臓で分泌されるホルモンであり、食後など小腸から糖が吸収され、血中の糖（血糖値）が上昇すると、副交感神経が膵臓を刺激し、インスリンを分泌することで血糖値を下げる。さらに近年、ヒトでは、このインスリン分泌の調整に関わる重要なホルモンとしてインクレチンが発見された。インクレチンとは、消化管から分泌されるホルモンの総称であり、食物摂取に伴いインクレチンの血中濃度が上昇し、血糖依存的にインスリン分泌を促す（Drucker *et al.*, 1987; Kreymann *et al.*, 1987; Drucker, 2006）。インクレチンには、glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) および glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の2つが存在する。ヒトでは、GIP は十二指腸に存在する K 細胞から、GLP-1 は小腸下部および結腸に存在する L 細胞から分泌される。イヌでは、GIP は主に小腸上部から、GLP-1 は主に小腸下部から分泌される。GIP および GLP-1 は活性型として分泌されるが、dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) という酵素により数分で不活性化される（Hansen *et al.*, 1999; Mentlein, 1999）。インクレチンは、インスリン分泌を促進させるだけでなく、グルカゴン分泌抑制、消化管運動抑制、食欲抑制、体重減少、栄養素の脂肪細胞蓄積、骨へのカルシウム蓄積などの生理作用を持つ。これらの作用を糖代謝の



異常な糖尿病の治療に利用できるとして、インクレチンを人工的に作成した治療薬が多く開発されている。ヒトの糖尿病患者で利用されているインクレチン関連薬には、GLP-1 受容体作動薬および DPP-4 阻害薬がある。特に GLP-1 受容体作動薬は、胃および小腸運動に関与することで、インスリン分泌が枯渇した 1 型糖尿病およびインスリン分泌が減弱した 2 型糖尿病患者に利用できるといわれている。GLP-1 受容体作動薬は、ヒト内因性 GLP-1 にアミノ酸配列・塩基配列の相同性が高く、GLP-1 分解タンパクである DPP-4 に抵抗性を持ち、血中 GLP-1 濃度を保つことができる薬剤である。GLP-1 受容体作動薬は、インスリン分泌促進作用が主であり、血糖依存的にインスリン分泌を促進するため低血糖が生じる可能性が低く、2 型糖尿病患者に推奨される。インスリン分泌がほとんど消失した 1 型糖尿病患者には、インスリン分泌促進による血糖降下作用は期待できない。しかし、1 型糖尿病のマウスやラットにおいて、膵β細胞の増殖能増加およびアポトーシスの阻害が認められ (Tourrel *et al.*, 2001; Farilla *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007)、ヒトでは、ヒト膵島を用いた *in vitro* 実験で同様の作用が報告されている (Farilla *et al.*, 2003)。また、1 型糖尿病患者において食後の血糖値上昇を抑制することも示されており (Kielgast *et al.*, 2011)、1 型糖尿病患者にも GLP-1 受容体作動薬の有効性が期待されている。また、GLP-1 受容体作動薬は、インスリン分泌促進作用や膵β細胞に働きかけるだけでなく、グルカゴン分泌抑制 (Nauck, *et al.*, 2002; Degn, *et al.*, 2004)、胃内容排出抑制 (Meier *et al.*, 2005; Deane *et al.*, 2010) が深く関係している。特に膵臓からインスリンがほとんど分泌されないヒトの 1 型糖尿病患者においても、グルカゴン分泌抑制および消化管運動抑制 (特に胃内容排出抑制) 作用は、血糖値、インスリン投与量および長期血糖コントロールマーカーである Hemoglobin A1c (HbA1c) を低下させる作用があると考えられている (Creutzfeldt *et al.*, 1996; Dupré *et al.*, 2004; Kielgast *et al.*, 2011; Ghazi *et al.*, 2014)。さらに、イヌにおいても、糖尿病犬にインスリン製剤と共に

GLP-1 受容体作動薬を投与すると、血糖値が低下することが報告され (Oda *et al.*, 2013)、インスリン分泌作用以外の GLP-1 受容体作動薬の作用が、糖尿病犬の血糖改善の治療の一つとなると考えられる。しかし、これらの血糖値低下作用が消化管運動抑制やグルカゴン分泌抑制などの作用によるものかは、明らかとなっていない。本研究では、消化管運動抑制作用に着目し、GLP-1 受容体作動薬投与が健常犬の消化管運動にどのような影響をおよぼすか調査することとした。

消化管運動は、胃で消化された食物が十二指腸へ、さらに大腸へ送られる機能のことである。この機能を測定する方法が消化管通過時間測定法であり、食事の消化吸收動態を捉えることができ、胃および小腸運動の臨床上的様々な評価をすることができる。消化管通過時間測定法は、胃内容排出時間測定法および小腸通過時間測定法に分けられる。胃内容排出時間測定法は、食物が胃を通過し、十二指腸に排出される時間を測定する方法であり、胃内容排出能を評価することができる。胃内容排出時間測定法は、放射線不透過マーカー法、シンチグラフィ法、<sup>13</sup>C 呼気試験法、アセトアミノフェン法などがある。放射線不透過マーカー法は、造影剤を摂取し、その後レントゲン撮影を経時的に行うことで胃内容排出時間を視覚で容易に判断することができる。造影剤には、液体硫酸バリウム（単独または食事との混合）または放射線不透過性粒子を用い評価し、小動物でも昔から広く使用され、確立されている方法の一つである (Hinton *et al.*, 1969; Miyabayashi *et al.*, 1984; Burns *et al.*, 1986; Allan *et al.*, 1996; Chandler *et al.*, 1997; Hinder *et al.*, 1997; Sparkes *et al.*, 1997; Lester *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2001; Wyse *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2017)。シンチグラフィ法は、非吸収性放射性医薬品（ラジオアイソトープ）を含む試験食を摂取後、胃内に残存する放射能標識された食事の量をガンマカメラで体外から撮影、特別なコンピューターシステムで評価し、胃内容排出時間を測定する方法で、様々な消化管通過時間測定法と比較検討されている (Heading *et al.*, 1976; Goggin *et al.*, 1999;

Lester *et al.*, 1999; Wyse *et al.*, 2003)。 $^{13}\text{C}$  呼気試験法は、炭素安定同位体である  $^{13}\text{C}$  標識化合物摂取し、十二指腸で吸収、肝臓で代謝された  $^{13}\text{CO}_2$  を経時的に測定する方法で、呼気を採取する専用のマスク着用のみで非侵襲的に測定できるとして、近年ヒトで注目されている胃内容排出時間測定法である (Ghoos *et al.*, 1993; Mossi *et al.*, 1994; Wyse *et al.*, 2003; Schmitz *et al.*, 2016)。アセトアミノフェン (N-acetyl-p-aminophenol; APAP) 法は、経口投与した APAP が胃ではほとんど吸収されず、十二指腸で急速に吸収される性質を利用した方法で、血中の APAP 濃度変動から胃内容排出時間を推測できるとされている (Heading *et al.*, 1973; Harasawa *et al.*, 1979; Wyse *et al.*, 2003)。

小腸通過時間測定法とは、食物が小腸を通過し、盲腸または結腸に排出するまでの時間を測定する方法であり、小腸排出能を評価することができる。小腸通過時間測定法は、放射線不透過マーカー法、シンチグラフィ法、呼気中水素ガス測定法、サラゾスルファピリジン法などがある。放射線不透過マーカー法およびシンチグラフィ法は、胃内容排出時間と同様の方法で行う (Hinton *et al.*, 1969; Miyabayashi *et al.*, 1986; Chandler *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2017)。呼気中水素ガス測定法は、消化酵素による分解・吸収されないラクツロースを摂取後、大腸の腸内細菌によりラクツロースが代謝を受け発生する呼気の水素ガス濃度を、経時的に採取し測定することで、間接的に小腸通過時間を測定する方法である (Bound *et al.*, 1975; Hirakawa *et al.*, 1988; 緒方 ほか, 1992)。サラゾスルファピリジン (Salazosulfapyridin; SASP) 法は、経口投与した SASP が小腸でほとんど吸収分解されず、大腸の腸内細菌によりアゾ結合が解裂し、スルファピリジン (sulfapyridine; SP) に分解され、分解された SP が速やかに吸収され血中に出現する性質を利用した方法であり、血中の SP 濃度変動から小腸通過時間を推測できるとされている (Kennedy *et al.*, 1979; Mizuta *et al.*, 1989; Mizuta *et al.*, 1990; Weber *et al.*, 2003; Hernot

*et al.*, 2006)。

上記で記した放射線不透過マーカー法、シンチグラフィ法、<sup>13</sup>C 呼気試験法、呼気中水素ガス測定法は、液体および固体の食事の消化管動態を評価する一方、高価で大型の機械を必要とし、イヌへの身体的および心理的負荷が大きいこと、マスクなどの着用が困難であることから、イヌの消化管通過時間を測定することは難しいとされる。しかし、これらを同時に、簡便にイヌの負担を最小限に抑え測定できる方法として、APAP 法および SASP 法が挙げられる。イヌでは、APAP 法および SASP 法を単体もしくは両方同時に測定した研究は少数であるが報告されている (小泉 ほか, 1989; Mizuta *et al.*, 1990; Ionut *et al.*, 2008; Sjödin *et al.*, 2011)。しかし、イヌにおいてこれらの測定法が、胃内容排出時間および小腸通過時間を正確に捉えているかは明らかにされていない。そこで、本論文では、健常犬における APAP 法および SASP 法の同時測定を確立し、さらにこれらを用い、GLP-1 受容体作動薬がイヌの胃内容排出時間および小腸通過時間におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

本研究目的を達成するために、本論文では以下の構成で研究を実施した。

第1章は、イヌにおける血清 APAP および血清 SP 濃度測定法の基礎的研究として、第1節でイヌにおけるアセトアミノフェン検出キット測定法およびアセトアミノフェン投与量の検討を行った。第2節では、第1節でアセトアミノフェン検出キットでは、詳細な血清 APAP 濃度を測定できなかったため、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度を同時に測定できる HPLC を用いた、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度測定法の信頼性、精度および妥当性を検討した。

第2章は、イヌにおける APAP 法および SASP 法の消化管通過時間の正確性を検討するために、小動物医療で使用される放射線不透過マーカー法を用い、第1節では、APAP 法および SASP 法とバリウム含浸ポリエチレン球を比較し、第2節では、液体造影剤との比較を行った。

第3章は、消化管運動抑制作用があるといわれている GLP-1 受容体作動薬投与が健常犬の消化管通過時間に与える影響および血中代謝マーカーに与える影響を検討した。

## 第 1 章

イヌにおける血清アセトアミノフェン濃度および  
血清スルファピリジン濃度測定法の基礎的研究

## 緒言

APAP 法および SASP 法は、血中の APAP および SP 濃度の変動が食物と類似した変動を見せることから、間接的に消化管通過時間を測定できると言われている。したがって、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の測定は、非常に重要である。

血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の測定には、蛍光偏光免疫測定法 (fluorescence polarization immuno assay; FPIA) や高速液体クロマトグラフィ (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) が用いられてきた。FIPA は、蛍光標識されたトレーサー (標準薬物)、サンプルの抗原および規定の抗体を混合し蛍光偏光の変化で薬物濃度を定量する方法である。既知濃度のトレーサーで検量線を作成することで、サンプル薬物濃度の定量が可能となる (Koizumi *et al.*, 1988)。HPLC は、サンプルに含まれる目的薬物を分離し定量分析を行う方法である。前処理を行ったサンプルを移動相と共に流し、固定相を通過させ、通過の速度の違いにより成分を分離する。分離した薬物成分を検出器で検出し、クロマトグラムを得る。FIPA と同様、標準試薬で検量線を作成し、溶出時間の高さ (ピーク) または面積から成分の定量を行う (Marsh *et al.*, 1984; Maddern *et al.*, 1985)。血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の測定には、低濃度まで測定できる上記 2 つの方法が一般的であるが、高価で非常に大型の専用機器を必要とし、さらに手順が多く煩雑である。一方、簡易的に測定できる方法も報告されていることから、本章では、正確かつ簡易に両血清濃度を測定できる方法を検討することとした。第 1 節では、まず血清 APAP 濃度の測定を検討するために、ヒトの臨床現場で用いられており、大型の機器を設置できない環境や、緊急を要する場合などに使用される、アセトアミノフェン検出キット (関東化学株式会社、東京、日本) を用いて血清 APAP 濃度の測定を行い、同時に、イヌにおける安全で測定可能な APAP 投与量の検討を行った。第 2 節では、血清

APAP 濃度および血清 SP 濃度を同時に測定できる HPLC を用いた測定法の  
正確性、精度および妥当性の検討を行った。



## 第 1 節

### イヌにおけるアセトアミノフェン検出キット測定法 およびアセトアミノフェン投与量の検討

#### 材料および方法

##### [試験 1] 精度および妥当性試験

###### 供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門において、温度・湿度および調光を一定に管理された施設内で、ケージにて飼育されている健常ビーグル犬 1 頭 (Dog 1) を使用した。この犬はあらかじめ消化器症状、食欲不振等の臨床症状がなく、一般身体検査、血液一般検査および血液生化学検査にて、異常が認められなかった個体を使用した。犬のプロフィールを<Table 1>に示す。

###### 供試フード

供試フードは、総合栄養食のウェットフードである SCIENCE DIET アダルト 1 - 6 歳成犬用ビーフ&チキン (日本ヒルズコルゲート株式会社、東京、日本) を使用した。フードの成分は、総エネルギー 104 kcal/100 g、たんぱく質 25.2%、脂肪 16.4%、炭水化物 52.4%であった。フード給与量は、胃内容排出速度が食事量に影響するという過去の報告 (Mizuta *et al.*, 1990) から、体重に関係なく 100 g とした。

###### 供試薬剤

APAP は、カロナール®原末 (昭和薬品化工株式会社、東京、日本) を体重 1 kg あたり 30 mg 投与した。APAP 投与量は、過去のイヌでの投与量を

参考に投与量を決定した（小泉 ほか, 1989）。

## 方法

試験開始直前に身体検査、CBC および血液化学検査を行い、異常が認められないことを確認した。健常犬 1 頭（Dog 1）に、100 g フードと共に 30 mg/kg の APAP 粉末を混ぜ給与した。食事は 5 分以内に完食させ、完食後から試験終了まで、ケージ内で安静状態とし、サンプル採取を行った。

## サンプル採取およびサンプル処理

血液サンプルは、APAP 投与後 90、105、120、180、240 分の計 5 ポイント、頸静脈より血液を採取した。血液サンプルは、直ちにベノジェクト®II 真空採血管（プレイン、凝固促進フィルム、滅菌品）（テルモ株式会社、東京、日本）に分注したのち、30 分室温で凝固させ、3,500 rpm、10 分間遠心した後、血清を保存用チューブに分注した。さらに、血球成分をできる限り取り除くために、8,000 rpm、3 分間遠心を行った。血液サンプルは測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

## 測定キットおよび測定方法

血清 APAP 濃度は、APAP 検出キットを用い、以下の手順で測定した。APAP 検出キットには、陽性コントロール、試薬 A および試薬 B が梱包されており、陽性コントロールは 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の APAP を含有する。試薬 A は、2,6 キシレノール 約 5%、過塩素酸 約 21.5%、エタノール 約 26%、および水 約 47.5%を含有する無機酸および呈色性物質を含む溶液である。試薬 B は、水酸化ナトリウム約 10%および緩衝剤（成分非公表）を約 10%含有する塩基性の水溶液である。

まず始めに、血液サンプル、陽性コントロール、試薬 A および試薬 B を室温に戻した。次に、APAP 標準曲線用溶液を作成するため、陽性コントロ

ール (0.1 mg/ml) 50  $\mu$ l に 50  $\mu$ l の蒸留水を加え、50  $\mu$ g/ml の APAP 標準溶液を調整した。同様に、陽性コントロール 20  $\mu$ l に蒸留水 80  $\mu$ l を、陽性コントロール 10  $\mu$ l に蒸留水 90  $\mu$ l を、陽性コントロール 5  $\mu$ l に蒸留水 95  $\mu$ l を加え、20  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml の希釈溶液を調整した<Table 2>。

各サンプルは 1.5 ml チューブに、標準希釈溶液は、耐熱チューブに 50  $\mu$ l ずつ入れた。無機酸で検体中のタンパク質を取り除き、かつ APAP を加水分解し、*p*-アミノフェノールを生成するために、各チューブに試薬 A を 290  $\mu$ l 加え、攪拌した。その後、沈殿物質を取り除くため、サンプルの入った 1.5 ml チューブのみを 3000 rpm、2 分間で遠心し、上清を別の 1.5 ml チューブに分注した。再び 3000 rpm、2 分間で遠心を行い、上清 200  $\mu$ l を耐熱チューブに移した。各サンプルおよび標準希釈溶液の耐熱チューブの蓋を緩め、アルミブロック恒温槽 100°C で 10 分間加熱した。加熱後 10 分間放冷し、*o*-クレゾールを反応させ、インドフェノール (青色) を生成させるため、各耐熱チューブに試薬 B を 490  $\mu$ l 加え、攪拌した。その後、96 ウェルプレートにサンプルおよび標準希釈溶液を 200  $\mu$ l ずつ入れ、プレートリーダー (Model680 Micro plate Reader、バイオ・ラットラボラトリーズ株式会社、東京、日本) にて波長 600nm 条件で吸光度を測定し、スタンダード曲線から、各サンプルの血清 APAP 濃度を算出した。

血清サンプルは、まず APAP 投与後 90、105、120、180、240 分の計 5 サンプルを測定し、その中で最も高値を示した時間の血清サンプルを、同時再現性試験、日差再現性試験および希釈直線性試験のサンプルとして用いた。同時再現性試験は、血清サンプルを同一 APAP 検出キット、同一 96 ウェルプレートを用い、同一手技者、方法、場所、装置で連続 10 回測定した。日差再現性試験は、血清サンプルを -80°C で凍結保存し、試験日の 3、7、14、21、28、42、56 日後に測定を行った。希釈直線性は、得られた血清から 0.6 ml 分注し、2、4、8、16 倍に希釈した。希釈したサンプルを APAP 検出キットにて同時に測定した。

## [試験 2] イヌにおける安全で定量可能な APAP 投与量の検討

### 供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門において、温度・湿度および調光を一定に管理された施設内で、ケージにて飼育されている健常ビーグル犬 6 頭 (Dog 1 - Dog 6) を使用した。これらの犬はあらかじめ消化器症状、食欲不振等の臨床症状がなく、一般身体検査、血液一般検査および血液化学検査にて、異常が認められなかった個体を使用した。各犬のプロフィールは〈Table 1〉に示す。

### 供試フード

供試フードは、試験 1 と同様、総合栄養食のウェットフードを体重に関係なく 100 g 使用した。

### 供試薬剤

APAP は、カロナール®原末を 10 mg/kg または 20 mg/kg をフードに混ぜ投与した。APAP 投与量は、過去の報告から 10 - 30 mg/kg では副作用が起こっていないことから、最小投与量として、10 mg/kg および 20 mg/kg を投与した。

### 方法

試験開始直前に身体検査、CBC および血液化学検査を行い、異常が認められないことを確認した。健常犬にフードと共に、各投与量の APAP を混ぜ給与した。食事は 5 分以内に完食させ、完食後から試験終了まで、ケージ内で安静状態とし、サンプル採取を行った。1 日 1 試験とし、①フード 100 g + APAP 0 mg/kg のコントロール試験 (以降 CR 試験)、②フード 100 g + APAP 10 mg/kg 投与試験 (以降 10 mg/kg 投与試験)、③フード 100 g +

APAP 20 mg/kg 投与試験（以降 20 mg/kg 投与試験）の 3 試験をランダムイズドクロスオーバー法で行った。試験と試験の間は APAP の肝臓への影響を考慮し、1 週間の wash out 期間を設けた。

#### サンプル採取およびサンプル処理

血液サンプルは、食事および APAP 給与前（空腹時）を pre とし、APAP 投与後 10、20、30、45、60、75、90、105、120、150、180、210、240 分まで計 14 ポイント、頸静脈より血液を採取した。得られた血液サンプルは、直ちにベノJECT® II 真空採血管（プレイン、凝固促進フィルム、滅菌品）（テルモ株式会社、東京、日本）に分注したのち、30 分室温で凝固させ、3,500 rpm、10 分間遠心した後、血清を保存用チューブに分注した。さらに、血球成分をできる限り取り除くために、8,000 rpm、3 分間遠心を行った。血液サンプルは測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 測定キットおよび測定方法

血清 APAP 濃度は、試験 1 と同様、APAP 検出キットを用い測定した。なお、測定は試験後 3 日以内に行った。

#### 統計解析

各 APAP 投与量の変動曲線は、平均値 (Mean)  $\pm$  標準偏差 (SD) で示し、統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。また、有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた場合は、Post hoc test として Bonferroni's multiple comparison test を行った。同時再現性試験および日差再現性試験では、変動係数(CV)を算出し、米国の FDA の基準 (U.S.DHHS. FDA. CDER. CVM., 2001) を参考に、 $CV < 20\%$  で再現性が高いと評価した。統計処理には、Graph Pad Prism5 (Graph PAD Software) を用いた。

## 承認番号

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号：27S-59）。

## 結果

### [試験 1]

同時再現性試験を検討した結果、平均値±標準偏差 (SD) は、20.68  $\mu\text{g/ml}$ ±1.58  $\mu\text{g/ml}$  であり、変動係数 (CV) は 7.64%であった<Table 3>。

日差再現性試験では、3 - 14 日目の CV は 18.48%、3 - 21 日目の CV 値は 26.13%、3 - 28 日目の CV 値は 22.58%、3 - 42 日目の CV 値は 20.59%、3 - 56 日目の CV は 19.43%であった<Table 4>。

希釈直線性試験では、決定係数  $r^2$  は  $r^2=0.9833$  であり、有意確率  $P$  値は  $P=0.0009$  であったが、原点は通過しなかった<Fig. 1>。

### [試験 2]

0 mg/kg 投与試験においては血清 APAP 濃度の上昇は認められなかった。10 mg/kg 投与試験では、投与 10 分後から緩やかに上昇し、120 分と 180 分で最大濃度 ( $7.56\pm 3.24$  および  $7.73\pm 4.12$   $\mu\text{g/ml}$ ) に達した。また、10 mg/kg 投与試験は 0 mg/kg 投与試験と比較して、APAP 投与 105 分後で有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。20 mg/kg 投与試験においても、投与 10 分後から上昇し始め、150 分で最大濃度 ( $11.92\pm 5.11$   $\mu\text{g/ml}$ ) に達した。また、APAP 投与後 90、105、120、150、180、210 および 240 分では、0 mg/kg 投与試験よりも有意に高値を示し (90、105、120、150、180、210 分 :  $P < 0.001$ 、240 分 :  $P < 0.01$ )、さらに、10 mg/kg 投与試験と比較し、150 および 210 分で有意に高値を示した ( $P < 0.05$ ) <Fig. 2>。

## 考察

本キットは、APAP 濃度の検出まで 15 分と迅速かつ簡便な操作で、血漿、血清および尿中の APAP 濃度の検出が可能であり、APAP 中毒の診断に利用されている。比較的安価で購入しやすい分光光度計を用いた測定が可能であることが報告されている (Takayama *et al.*, 2008)。これはヒトにのみ用いられておりイヌにおける報告がないことから、イヌにおける APAP 検出キットの血清 APAP 濃度簡易測定法を検討し[試験 1]、また、イヌにおける安全で定量可能な APAP 投与量を検討すること[試験 2]を目的とした。

### [試験 1]

血清サンプルを 10 回測定し、同時再現性試験を検討した結果、血清 APAP 濃度の CV が 7.64%であり、良好な再現性が得られた。日差再現性試験では、56 日目までの CV が 19.43%であり、再現性は認められた。薬物検査においては、薬物の分離剤への吸着により測定値に影響をおよぼす可能性があるため、血清分離剤入り容器の使用は避けることが推奨されている (Quattrocchi, 1983; Landt *et al.*, 1993; Dasgupta, 1994; Yamasaki, 2005)。本研究では、血清分離剤の含まれていない真空採血管を使用したため、採血管における影響は除外できたが、FDA 基準の 20%に近い値となったことから、血中に含まれる何らかの物質によって APAP が代謝もしくは変換を受けている可能性、または APAP 検出キットの影響を考慮すべきであると考えられた。希釈直線性試験では、希釈期待値と APAP 検出キットによる実測値は直線性を示したが、原点は通過せず、さらに、5  $\mu\text{g/ml}$  未満の血清濃度は正確に評価することができなかった。したがって、血清 APAP 濃度が 5  $\mu\text{g/ml}$  以下の低濃度の場合の測定には不向きなことが示唆された。



以上のことから、本研究で使用した APAP 検出キットは、イヌにおける血清 APAP 濃度の測定は可能だが、低濃度の測定には適しておらず、また測定は検体採取直後に行う必要があると考えられた。

## [試験 2]

本試験では、10 mg/kg および 20 mg/kg 投与試験で APAP 濃度の有意な上昇が認められた。また、20 mg/kg 投与試験は 10 mg/kg 投与試験と比較し、APAP 投与後 150 分（最大濃度に達した時間）および 210 分で有意に高値を示した。試験 1 より本キットは低濃度を正確に測定することができないため、胃内容排出時間を評価するためには、20 mg/kg の APAP 投与が優れている可能性が考えられた。さらに、本研究で投与した APAP の用量では 6 頭の健常犬に副作用は認められなかった。過去の報告より、イヌの APAP 投与量は、100 mg/kg で副作用および毒性の臨床徴候が観察されなかったことが示されている (Richardson, 2000; MacNaughton, 2003)。したがって、20 mg/kg の APAP 投与量は安全な用量であり、イヌの胃内容排出時間を正確に評価するために適していると考えられた。

APAP 法および SASP 法を消化管通過時間測定に用いるためには、正確で精密な血清濃度の測定が必要となる。しかし、本節で用いた APAP 検出キットは、簡便であるが低濃度の測定には不向きであった。したがって、次節では、低濃度まで正確に測定でき、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度を同時に測定できる HPLC の信頼性、精度および妥当性試験を検討した。

## 第 2 節

### HPLC を用いた血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度測定法の 精度および信頼性の検討

#### 材料および方法

##### [信頼性試験]

信頼性試験として添加回収試験を行った。

##### 供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門において、温度・湿度および調光を一定に管理された施設内で、ケージにて飼育されている健常ビーグル犬 5 頭 (Dog 1 - 5) を使用した。これらの犬はあらかじめ消化器症状、食欲不振等の臨床症状がなく、一般身体検査、血液一般検査および血液化学検査にて、異常が認められなかった個体を使用した。各犬のプロフィールを<Table 5>に示す。

##### 方法

試験開始直前に身体検査、CBC および血液化学検査を行い、異常が認められないことを確認した。健常犬 5 頭から 12 時間以上の絶食下で採血し、血液サンプルを直ちにベノジェクト®II 真空採血管 (プレイン、凝固促進フィルム、滅菌品) (テルモ株式会社、東京、日本) に 3.0 mL 分注したのち、30 分室温で凝固させ、3,500 rpm、10 分間遠心した後、血清を保存用チューブに分注した。さらに、血球成分をできる限り取り除くために、8,000 rpm、3 分間遠心を行った。血液サンプルは測定まで -80°C で保存した。得られた各犬の血清を合わせ、プール血清を作成した。回収率を算出するために、0.9%生理食塩水に、APAP の標準試薬 [4'Hydroxyacetanilide (東京化

成工業株式会社、東京、日本) および SP の標準試薬 [Sulfapyridine (東京化成工業株式会社、東京、日本)] をそれぞれ添加し、100 µg/ml 溶液を調整した。各 100 µg/ml 溶液をそれぞれプール血清に添加し、10 µg/ml、1 µg/ml、0.1 µg/ml および 0 µg/ml (添加なし) のプール血清 APAP 希釈溶液およびプール血清 SP 希釈溶液を調整した。また、超純水に各 100 µg/ml 溶液をそれぞれ添加し、10 µg/ml、1 µg/ml、0.1 µg/ml および 0 µg/ml (添加なし) の超純水 APAP 希釈溶液および超純水 SP 希釈溶液を調整した。

回収率 (%) は、[血清に標準試薬を添加した測定値 - 血清 0 µg/ml (添加なし) の測定値] / 添加した標準試薬の量 (超純水に標準試薬を添加した濃度) × 100 で各濃度 (0.1 µg/ml、1 µg/ml および 10 µg/ml) を用い算出した。

#### HPLC 測定条件

装置は、高速液体クロマトグラフ Prominence システム (株式会社 島津製作所、京都、日本) を使用し、送液ユニット LC-20AB [流速 0.7 ml/min]、脱気装置 DGU-20A3、カラムオーブン CTO-20A [40°C]、UV 検出器 SPD-20AV [254 nm]、オートサンプラー SIL-20AC [サンプル注入量 10 µl] で構成した。カラムは、SHIM-PACK FC-ODS 75 mm × 4.6 mm i.d、粒子径 3 µm (株式会社島津ジーエルシー、東京、日本) を、移動相には A 液 : 0.1%ギ酸水および B 液 : 0.1%ギ酸アセトニトリルを用い、A 液 : 70%、B 液 : 30%で、上記 [ ] 内の条件で溶出した。

#### HPLC 測定方法

各サンプル 0.1 ml に、4-Methoxybenzamide (東京化成工業株式会社、東京、日本) を 0.9%生理食塩水で調整した内部標準 (以下 I.S) (0.5 µg/ml) を 0.2 ml、0.5 mol/l リン酸緩衝液 (pH7.4) 1 ml および酢酸エチル (和光純薬株式会社、大阪、日本) 2 ml を添加し、10 分、27°C、150 rpm で振盪抽出後、有機層 1 ml をとり、窒素乾固した。その残渣に移動相である 0.1%ギ酸

水および 0.1%ギ酸アセトニトリルを各 0.1 ml ずつ加え再溶解し、0.2 ml をサンプルとし、高速液体クロマトグラフに注入した。血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度は、I.S とのピーク面積比より算出した。各濃度 3 重測定を行い、測定した 3 回の平均値を算出した。

#### [精度および妥当性試験]

精度および妥当性を検討するため、同時再現性、日差再現性および希釈直線性試験を行った。

#### 供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門において、温度・湿度および調光を一定に管理された施設内で、ケージにて飼育されている健常ビーグル犬 1 頭 (Dog 2) を使用した。この犬はあらかじめ消化器症状、食欲不振等の臨床症状がなく、一般身体検査、血液一般検査および血液化学検査にて、異常が認められなかった個体を使用した。犬のプロフィールを<Table 5>に示す。

#### 供試フード

供試フードは、第 1 章と同様、総合栄養食のウェットフードである SCIENCE DIET アダルト 1 - 6 歳成犬用ビーフ&チキンを 100 g 使用した。

#### 供試薬剤

APAP は、カロナール®原末を体重 1 kg あたり 30 mg 投与した。APAP 投与量は、第 2 章第 1 節の投与量を参考に決定した。また、SASP は、サラゾピリン®錠 500 mg を体重 1 kg あたり 30 mg/kg 投与した。SASP 投与量は、イヌの治療薬として用いられる最大投与量を投与した。薬剤は、サラゾピリン錠をすりつぶし、30 mg/kg 秤量後、カロナール粉末およびすりつぶ

したサラゾピリンを 10 ml の蒸留水と混ぜ、APAP および SASP 懸濁液を作成した。

## 方法

試験開始直前に身体検査、CBC および血液化学検査を行い、異常が認められないことを確認した。健常犬 1 頭 (Dog 2) に、100 g のウェットフード完食後、APAP および SASP 懸濁液を経口投与した。食事および薬剤投与は 5 分以内に完食、投与させ、完食後から試験終了まで、ケージ内で安静状態とし、サンプル採取を行った。

## サンプル採取およびサンプル処理

血液サンプルは、APAP および SASP 投与後 20、90、150 分、6、8、10 時間の計 6 ポイント、頸静脈より血液を採取した。血液サンプルは、直ちにベノジェクト®II 真空採血管 (プレイン、凝固促進フィルム、滅菌品) (テルモ株式会社、東京、日本) に 7.5 ml 分注したのち、30 分室温で凝固させ、3,500 rpm、10 分間遠心した後、血清を保存用チューブに分注した。さらに、血球成分をできる限り取り除くために、8,000 rpm、3 分間遠心を行った。血液サンプルは測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

## HPLC 測定条件および測定方法

サンプルの測定は、信頼性試験と同様の測定条件および測定法にて実施した。同時再現性試験は、血清 APAP 濃度の低濃度 (150 分サンプル)、中濃度 (90 分サンプル)、高濃度 (20 分サンプル)、血清 SP 濃度の低濃度 (6 時間サンプル)、中濃度 (8 時間サンプル)、高濃度 (10 時間サンプル) を同一手技者、方法、場所、装置で連続 10 回測定し、日差再現性試験では、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した各サンプルを試験当日、1、3、7、10、14、21、28、42、56 日後に測定した。サンプルは凍結融解を繰り返さず、測定回数に合わせて保存用

チューブに分けて保存したものを使用した。希釈直線性試験では、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の各高濃度サンプルを 2、4、8、16 倍に希釈し測定を行った。

#### 統計解析

添加回収試験では、回収率を算出し、米国の FDA の基準を参考に許容範囲を 80 - 120%とした。同時再現性試験および日差再現性試験では、変動係数 (CV) を算出し、米国の FDA の基準を参考に、 $CV < 20\%$ で再現性が高いと評価した。統計処理には、Graph Pad Prism5 (Graph PAD Software) を用いた。

#### 承認番号

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会および生命倫理委員会の承諾を得て実施した (承認番号 : 28S-46)。

## 結果

### [添加回収試験]

血清 APAP 濃度では、0.1 µg/ml 試料は定量限界値以下のため、算出できなかった。1 µg/ml 試料では 101.45%、10 µg/ml 試料は 94.32%であった。血清 SP 濃度では、0.1 µg/ml 試料は 121.43%、1 µg/ml 試料は 110.46%、10 µg/ml 試料は 104.66%であった <Table 6-A,B>。

### [同時再現性、日差再現性および希釈直線性試験]

同時再現性試験では、血清 APAP 濃度の低濃度は 9.24%、中濃度は 8.56%、高濃度は 9.61%、血清 SP 濃度の低濃度は 19.35%、中濃度は 9.02%、高濃度は 6.96%であった<Table 7-A,B>。日差再現性試験 (0 - 56 日間) では、血清 APAP 濃度の低濃度は 14.86%、中濃度は 17.76%、高濃度は 35.59%、血清 SP 濃度の低濃度は 17.54%、中濃度は 6.67%、高濃度は 10.09%であった<Table 8-A,B,C>。希釈直線性試験では、決定係数  $r^2$  は血清 APAP 濃度で  $r^2=0.997$ 、血清 SP 濃度で  $r^2=0.995$  であり、有意確率  $P$  値は、血清 APAP 濃度で  $P=0.0002$ 、血清 SP 濃度で  $P=0.0004$  であった<Fig. 3-A,B>。

## 考察

添加回収試験は、血清 SP 濃度 0.1 µg/ml 試料で 121.43%と許容範囲をわずかに上回ったが、それ以外の血清 APAP 濃度 1 µg/ml 試料、10 µg/ml 試料および血清 SP 濃度 1 µg/ml 試料、10 µg/ml 試料では、許容範囲である 80 - 120%内であり、サンプル、試薬および検出反応に干渉する物質が存在しないことが示された。

同時再現性試験では、血清 APAP 濃度では、全ての濃度で CV が 10%以下であり非常に良好な結果を示した。血清 SP 濃度では、高濃度および中濃度では、CV が 10%以下と良好な結果を示した。低濃度では、CV は 19.35%とやや大きいが、濃度自体が低いため SASP 法で十分利用できると考えられた。日差再現性試験は、血清 APAP 濃度の低濃度、中濃度および血清 SP 濃度の全ての濃度は CV が 20%以下と良好な値を示した。しかし、血清 APAP 濃度の高濃度では、サンプル採取後 56 日目までの CV が 30%を越えていた。詳細な日数では、10 日目以降から CV が 20%を超えていたことから< Table 8-B>、血清 APAP 濃度の高濃度測定は、サンプル採取 7 日目以内に測定する必要があると考えられた。希釈直線性試験では、両濃度とも、決定係数  $r^2$  および有意確率  $P$  値は良好な直線性を示し、希釈可能であることを示した。



## 小活

第1節では、簡易的に測定できる APAP 検出キットを用いて血清 APAP 濃度の測定法を検討した。APAP 検出キットは、イヌの血清 APAP 濃度を測定することができ、HPLC などが設置できない場合の大まかな測定に用いることはできると考えられた。しかし、5 µg/ml 未満の低濃度の場合、正確に評価することができず、さらに血清 SP 濃度を同時に測定することができなかった。

第2章では、HPLC を用いて血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の同時測定を試みた。両濃度とも、血清濃度が非常に低い場合には測定確度が落ちる可能性があるが、サンプルに含まれる成分による干渉はなく、測定精度および妥当性も良好な結果が得られ、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度を同時測定できる測定法であることが分かった。ただし、血清 APAP 濃度測定は、検体採取 7 日以内に実施することで、測定の信頼性が高くなることが示された。したがって、第2章以降、HPLC を用いて血清 APAP および血清 SP 濃度を測定することとした。

## 図および表

<Table 1> 第 1 節で使用した供試動物のプロフィール

	犬種	雌雄	年齢 (歳)	体重 (kg)	BCS (/5)
Dog 1	ビーグル	避妊雌	9	9.6	3
Dog 2	ビーグル	避妊雌	9	7.7	3
Dog 3	ビーグル	避妊雌	9	8.2	3
Dog 4	ビーグル	去勢雄	8	10.9	3
Dog 5	ビーグル	去勢雄	6	11.5	3
Dog 6	ビーグル	去勢雄	6	11.2	3

<Table 2> APAP 標準曲線用希釈溶液濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )

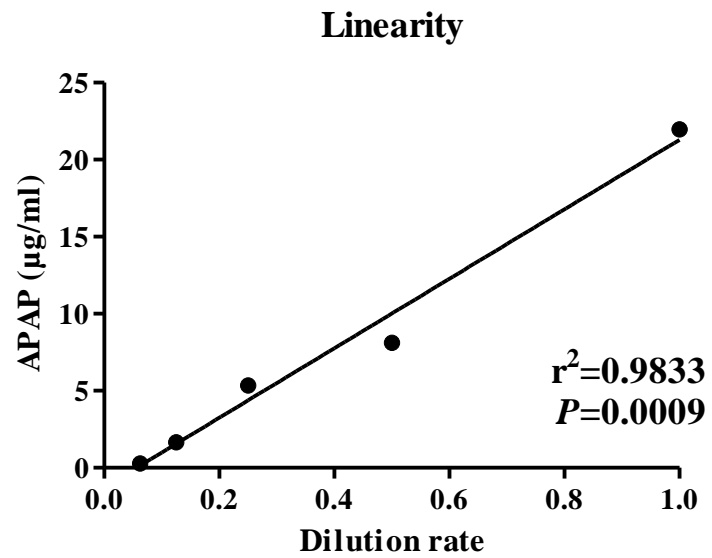
最終 APAP 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	100	50	20	10	0
標準溶液 (ml)	100	50	20	10	0
蒸留水 (ml)	0	50	80	90	100
総液量 (ml)	100	100	100	100	100

<Table 3> 健常犬の血清を用いた APAP 検出キットにおける同時再現性試験

	n	平均 (μg/ml)	SD	CV (%)
血清 APAP 濃度	1	20.68	1.58	7.64

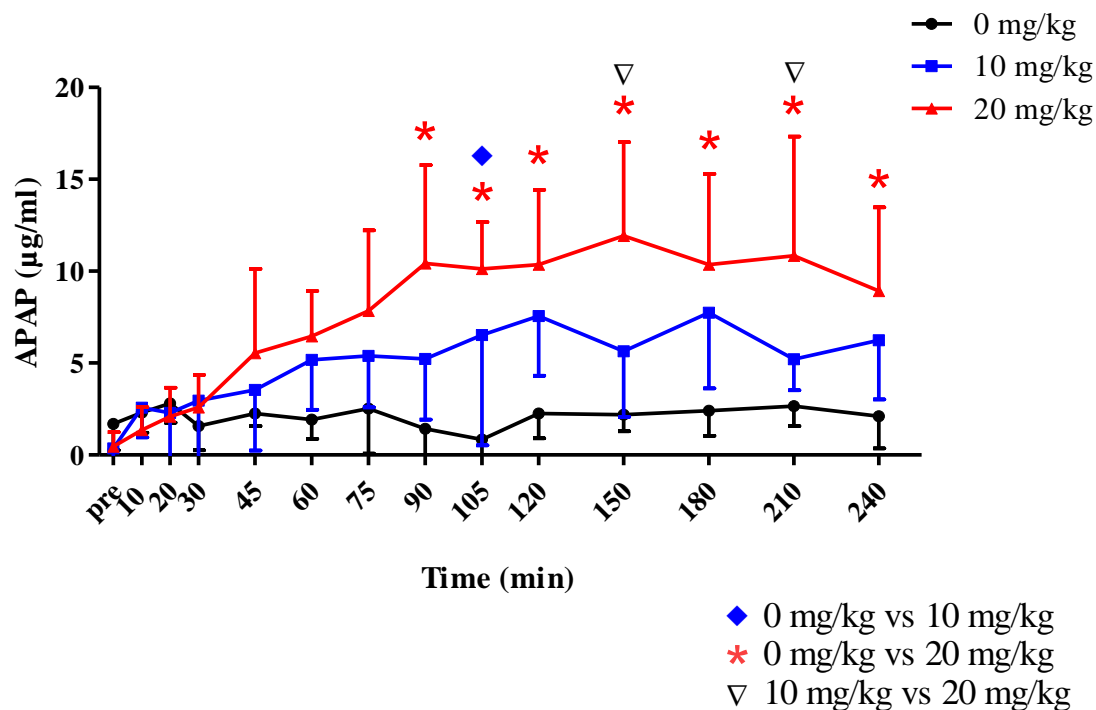
<Table 4> 健常犬の血清を用いた APAP 検出キットにおける日差再現性試験

	n	平均 (μg/ml)	SD	CV (%)
3 - 14 日目	3	18.83	3.48	18.48
3 - 21 日目	4	17.11	4.47	26.13
3 - 28 日目	5	17.14	3.87	22.58
3 - 42 日目	6	16.95	3.49	20.59
3 - 56 日目	7	16.73	3.25	19.43



<Fig. 1> 健常犬の血清を用いた APAP 検出キットにおける希釈直線性試験

健常犬の血清を 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に希釈し測定を行った。Y 軸に血清 APAP 濃度の測定値 (μg/ml) を、X 軸に希釈倍率を示した。



< Fig. 2 > 各試験の血清 APAP 濃度の変動曲線 (n=6)

0 mg/kg 投与試験、10 mg/kg 投与試験および 20 mg/kg 投与試験の 3 試験での血清 APAP 濃度の変動曲線を示す。変動曲線は、平均値 (Mean)±標準偏差 (SD) で示し、Y 軸は血清 APAP 濃度 (µg/ml)、X 軸は採血時間 (min) を表す。統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA (Graphpad Prism software) を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなし、グラフ上にてアスタリスク (\*) で示した。また、有意な差 ( $P < 0.05$ ) が認められた場合は、Post hoc test として Bonferroni's multiple comparison test を行った。

<Table 5> 第2節で使用した供試動物のプロフィール

	犬種	雌雄	年齢 (歳)	体重 (kg)	BCS (/5)
Dog 1	ビーグル	避妊雌	8	10.4	3
Dog 2	ビーグル	去勢雄	6	10.6	3
Dog 3	ビーグル	去勢雄	4	13.5	3
Dog 4	ビーグル	去勢雄	4	12.9	3
Dog 5	ビーグル	去勢雄	4	12.4	3

<Table 6> 健常犬の血清を用いた HPLC における添加回収試験

A

添加 APAP 濃度	0 µg/ml	0.1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml
平均濃度 (µg/ml)	0	0	1.09	9.00
回収率 (%)	—	—	101.45	94.32

B

添加 SP 濃度	0 µg/ml	0.1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml
平均濃度 (µg/ml)	0	0.06	0.88	9.59
回収率 (%)	—	121.43	110.46	104.66

<Table 7> 健常犬の血清を用いた HPLC における同時再現性試験

A

血清 APAP 濃度	n	平均 (µg/ml)	SD	CV (%)
高濃度	10	10.20	0.98	9.61
中濃度	10	5.26	0.45	8.56
低濃度	10	1.84	0.17	9.24

B

血清 SP 濃度	n	平均 (µg/ml)	SD	CV (%)
高濃度	10	2.3	0.16	6.96
中濃度	10	1.33	0.12	9.02
低濃度	10	0.62	0.12	19.35



<Table 8> 健常犬の血清を用いた HPLC における日差再現性試験

A

血清 APAP 濃度	n	平均	SD	CV (%)
高濃度	10	7.25	2.58	35.59
中濃度	10	4.90	0.87	17.76
低濃度	10	1.75	0.26	14.86

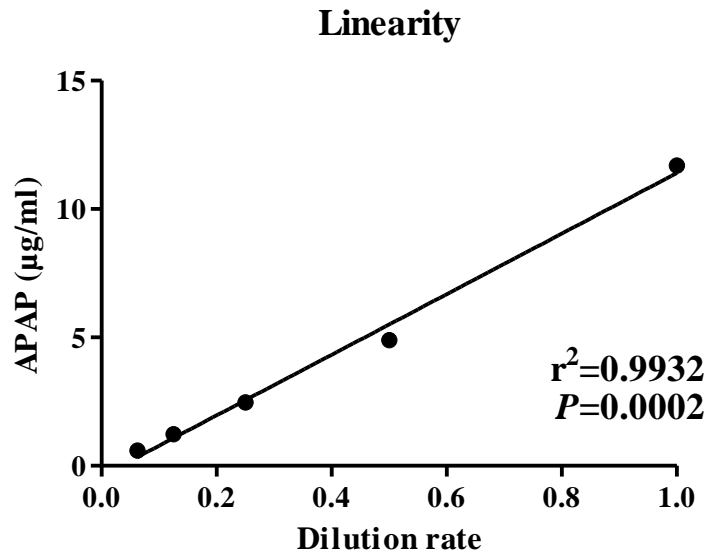
B 血清 APAP 高濃度

Days	3	7	10	14	21	28	42	56
CV (%)	5.31	7.16	86.06	41.73	41.71	38.32	36.36	35.59

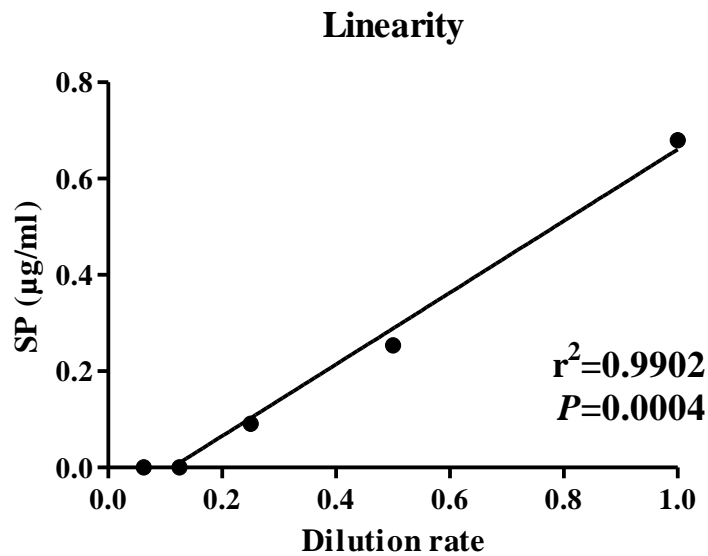
C

血清 SP 濃度	n	平均	SD	CV (%)
高濃度	10	2.18	0.22	10.09
中濃度	10	1.35	0.09	6.67
低濃度	10	0.57	0.10	17.54

A



B



<Fig. 3> 健常犬の血清を用いた HPLC における希釈直線性試験

健常犬の血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の各高濃度サンプルを 2、4、8、16 倍に希釈し測定を行った。Y 軸に血清 APAP 濃度の測定値 (µg/ml) を、X 軸に希釈倍率を示した。A は血清 APAP 濃度を、B は血清 SP 濃度の結果を示す。

## 第 2 章

イヌにおけるアセトアミノフェン法および  
サラゾスルファピリジン法の消化管通過時間の正確性の検討

## 緒言

胃内容排出時間測定法は、食物が胃を通過し、十二指腸に排出されるまでの時間を測定する方法である。また、小腸通過時間測定法とは、食物を摂取してから盲腸に達するまでの時間を測定する方法である。これらを同時に測定できる方法として、APAP および SASP を経口投与し、経時的に採血を行うことで、消化管通過時間を測定できる APAP 法および SASP 法がある。これらは安価で簡便に測定でき、イヌの身体への負担を最小限に抑え測定できる。しかし、APAP 法および SASP 法が胃内容排出時間および小腸通過時間を正確に捉えているかは明らかにされていない。

そこで、本章では、造影剤を摂取しレントゲン撮影を行うことで、胃内容排出時間および小腸通過時間を視覚で容易に判断することができる、放射線不透過マーカー法と APAP 法および SASP 法を比較することを目的とした。第 1 節では、安価で食事と共に簡易的に摂取可能である小動物専用のバリウム含浸ポリエチレン球と比較することで、APAP 法および SASP 法の正確性を検討することとした。第 2 節では、小動物医療で広く利用されている液体状の放射線不透過マーカー（硫酸バリウム）を用いて、APAP 法および SASP 法の正確性を検討することとした。さらに、Glucose などの血中代謝マーカーと APAP 法および SASP 法を比較検討した。

## 第 1 節

### アセトアミノフェン法およびサラゾスルファピリジン法と バリウム含浸ポリエチレン球の比較

#### 材料および方法

##### 供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門において、温度・湿度および調光を一定に管理された施設内で、ケージにて飼育されている健常ビーグル犬 4 頭 (Dog 1 - 4) を使用した。これらの犬はあらかじめ消化器症状、食欲不振等の臨床症状がなく、一般身体検査、血液一般検査および血液化学検査にて、異常が認められなかった個体を使用した。各犬のプロフィールを<Table 9>に示す。

##### 供試フード

供試フードは、第 1 章と同様、総合栄養食のウェットフードである SCIENCE DIET アダルト 1 - 6 歳成犬用ビーフ&チキンを 100 g 使用した。

##### 供試薬剤

APAP は第 1 章第 1 節の試験 2 の結果を参考に、カロナール®原末を体重 1 kg あたり 20 mg 投与した。また SASP は、サラゾピリン®錠 500 mg を体重 1 kg あたり 25 mg/kg 投与した。薬剤は、サラゾピリン錠をすりつぶし、25 mg/kg 秤量後、カロナール粉末およびすりつぶしたサラゾピリンを 10 ml の蒸留水と混ぜ、APAP および SASP 懸濁液を作成した。

##### 供試放射線マーカー

放射線不透過マーカーは、バリウム含浸ポリエチレン球 (商品名 :

BIPS、Medical I.D. Systems Inc.、Grand Rapids、USA) を用いた。BIPS の形状は、2 つのサイズ (5 mm および 1.5 mm) があり、大きいカプセルの中に小球体 (1.5 mm) が 30 個および大球体 (5 mm) が 10 個入っているものと、小さいカプセルの中に小球体が 30 個および大球体が 1 個、また別の小さいカプセルに大球体 3 個ずつ入っているものがある。販売会社によると、小球体はフードの通過に類似しており、さらに消化管通過時間の正確な推定値を示すとされている。したがって、本研究では、小球体 (直径 1.5 mm) の BIPS を 30 個用いた。

## 方法

前日の食事の影響を考慮し、12 時間以上絶食させた。試験開始直前に、CBC および血液化学検査を行い、異常が見られないことを確認した。直径 1.5 mm の BIPS30 個をフードに混ぜ給与し、その後、APAP および SASP を水で溶かした懸濁液を経口投与した。食事給与および薬剤投与は 5 分以内に終わらせ、完食後から試験終了までケージ内で安静状態とし、レントゲン撮影およびサンプル採取を行った。水は自由飲水とした。

## レントゲン撮影、サンプル採取およびサンプル処理

レントゲン撮影は、事前に全ての供試動物で放射線撮影姿勢に順応させ、同じ保定者で評価した。レントゲン撮影時は、仰または伏臥位および右下横臥位で行い、撮影後すぐに採血を行った。サンプルは、造影剤、APAP および SASP 投与した時点を投与開始とし、BIPS、APAP および SASP 投与前、および投与後 0.5、1、1.5、2、4、6、8、10 時間の計 9 ポイント、頸静脈より血液を採取した。得られた血液サンプルは、直ちにベノジェクト® II 真空採血管 (プレイン、凝固促進フィルム、滅菌品) (テルモ株式会社、東京、日本) に分注したのち、30 分室温で凝固させ、3,500 rpm、10 分間遠心した後、血清を保存用チューブに分注した。さらに、血球成分をできる限り

取り除くために、8,000 rpm、3 分間遠心を行った。血液サンプルは測定まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 測定項目および測定方法

測定項目は、血清アセトアミノフェン濃度（以降 血清 APAP 濃度）、血清スルファピリジン濃度（以降 血清 SP 濃度）を測定した。これらは、第 1 章第 2 節と同様、HPLC の測定条件および方法にてサンプルの測定を実施した。試験で得られた測定項目は、各採血ポイントの経時的変化（以降 変動曲線）を用いて比較検討した。また、レントゲン画像での BIPS の個数の判定は、獣医師および動物看護師の 3 人で行い、胃および小腸に残存した BIPS、および胃および小腸から排出された BIPS の個数をカウントした。胃内容排出割合の算出方法は、胃から排出された BIPS の個数 / (胃から排出された BIPS の個数 + 胃内に残存した BIPS の個数)  $\times 100$  (%) を用い、小腸排出割合の算出方法は、小腸から排出された BIPS の個数 / (小腸から排出された BIPS の個数 + 胃および小腸内に残存した BIPS の個数)  $\times 100$  (%) を用いて計算した (Nelson *et al.*, 2001)。

#### 承認番号

本研究は、日本獣医生命科学大学動物実験委員会および生命倫理委員会の承諾を得て実施した（承認場号：28S-46）。

## 結果

BIPS 投与後の各項目は、変動曲線を作成し、平均値 (Mean) ±標準偏差 (SD) で示した。

血清 APAP 濃度は、APAP 投与後 0.5 時間でピークとなり、ピーク濃度は、 $7.57 \pm 2.10 \mu\text{g/ml}$  であった。投与後 1 時間以降は緩やかに減少し、投与後 4 時間以降は  $0 \mu\text{g/ml}$  であり、4 時間以降血清 APAP 濃度は検出されなかった<Fig. 4-A>。

血清 SP 濃度は、SASP 投与後 4 時間までは検出されなかった。しかし、投与後 4 時間以降は緩やかに上昇し、投与後 10 時間で最高値を示した。最高値は  $0.61 \pm 0.45 \mu\text{g/ml}$  であった<Fig. 4-B>。

BIPS は、胃内容排出割合は、投与後 0.5 時間で  $0.89 \pm 1.79\%$ 、1 時間で  $3.48 \pm 2.82\%$ 、1.5 時間で  $8.81 \pm 9.45\%$ 、2 時間で  $10.56 \pm 11.27\%$ 、4 時間で  $13.1 \pm 13.44\%$ 、6 時間で  $13.35 \pm 13.40\%$ 、8 時間で  $20.84 \pm 23.51\%$ 、10 時間で  $23.10 \pm 22.74\%$  であり、投与後 10 時間経過しても 50%以上が胃内に滞留した<Fig. 4-C>。また、小腸排出割合に関しては、レントゲン画像における小腸および大腸の詳細な判別が困難であったため、算出することができなかった。レントゲン画像は、<Fig. 5>に代表的なものを示した。



## 考察

本研究では、APAP 法および SASP 法を用いて消化管通過時間を測定する上で、胃内容排出時間の指標である血清 APAP 濃度および小腸通過時間の指標である血清 SP 濃度動態が、バリウム含浸ポリエチレン球 (BIPS) 投与後のレントゲン画像におけるイヌの消化管通過動態と一致するか検討した。

APAP は、経口投与すると胃粘膜からほとんど吸収されず、十二指腸以降の小腸の腸管粘膜から急速に吸収されることから、食事の吸収率は胃内容排出率に反映することが報告されている (Heading *et al.*, 1973)。また、SASP は経口投与すると、胃および小腸での分解はほとんどなく、大腸で腸内細菌により 5-アミノサリチル酸と SP に分解され速やかに吸収されることから、小腸通過時間を測定できると報告されている (Kennedy *et al.*, 1979)。本研究では、APAP 投与後、血清 APAP 濃度は 0.5 時間でピークに達していることから、0.5 時間では食物はすでに胃から排出され小腸に到達していたと考えられる。また、4 時間以降で血清 APAP 濃度は検出されていないことから、APAP 法では、胃内の食物の排出は 4 時間で終息したことが考えられた。一方、血清 SP 濃度は 4 時間以降で上昇し始めたことから、食物が小腸を通過し大腸に到達した時間は 4 時間以降であることが示唆された。

BIPS は、投与後 10 時間で  $23.10 \pm 22.74\%$  と、10 時間経過しても小腸および大腸に到達している BIPS は 50% にも満たず、大多数が収縮した胃内に残っているのが確認された。放射性不透過マーカー法は、消化管通過時間の測定法として獣医学領域で広く使用されている。その中でも、BIPS はプラスチックに熱を加えて液状にし、これと硫酸バリウムと混合することによって作成された固体の非溶解性球体であり、食品と類似した密度を有するが、腹部の放射線写真ではっきりと示されるほど十分に放射線感受性があるとされており、消化管疾患の診断にも用いられている。BIPS には、2 つのサイズがあり、大球体 (5.0 mm) は胃内容排出時間のばらつきが認められるため

使用には適さないとされ、腸での閉塞などの診断に利用される。一方、小球体はフードの消化管通過速度と類似するため、消化管通過時間を正確に推定できるとされ (Lester *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2001)、健常犬では、50-75%の BIPS (1.5 mm) が平均 7-8 時間で排出されると報告されている (Lester *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2017)。しかし、本節の結果では、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度変動と大きく異なる結果となり、さらに BIPS の結果のみでは胃内容排出時間の大幅な延長が示唆され、過去の報告とは異なる結果となったが、胃内に BIPS が滞留した原因は不明である。本節の結果より、BIPS の小腸通過時間に関しては、レントゲン画像における小腸および大腸の詳細な判別が困難であったため、割合を算出することができなかった。よって、BIPS は小腸通過時間測定には不向きであることが分かった。

## 第2節

### アセトアミノフェン法およびサラゾスルファピリジン法と液体造影剤の比較

#### 材料および方法

##### 供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門において、温度・湿度および調光を一定に管理された施設内で、ケージにて飼育されている健常ビーグル犬4頭 (Dog1 - 4) を使用した。これらの犬はあらかじめ消化器症状、食欲不振等の臨床症状がなく、一般身体検査、血液一般検査および血液生化学検査にて、異常が認められなかった個体を使用した。各犬のプロフィールを<Table 10>に示す。

##### 供試フード

供試フードは、第1章と同様、総合栄養食のウェットフードである SCIENCE DIET アダルト 1 - 6 歳成犬用ビーフ&チキンを 100 g 使用した。

##### 供試薬剤

APAP および SASP は第2章第1節と同様の投与量で行い、APAP および SASP 懸濁液を作成した。

##### 供試放射線マーカー

放射線不透過マーカーは、硫酸バリウム散 97.5% 「ホリイ」 (堀井薬品工業株式会社、大阪、日本) (以降、液体造影剤) を用いた。これは粉末状であるため、下記略式濃度計算式により、蒸留水で 100 w/v% に調整し、小動物医療で推奨されている投与範囲内である 4 ml/kg を投与した。

$w/v\% = \{ \text{硫酸バリウム散 97.5\% 「ホリイ」 (g)} \times 0.975 / (\text{硫酸バリウム散}$

$97.5\% \{ \text{「ホリイ」 (g)} / 4 + \text{水の量(ml)} \} \times 100$

## 方法

前日の食事の影響を考慮し、12時間以上絶食させた。試験開始直前に、CBC および血液化学検査を行い、異常が見られないことを確認した。液状造影剤をフードに混ぜ給与し、その後、APAP および SASP を水で溶かした懸濁液を経口投与した。食事給与および薬剤投与は5分以内に終わらせ、完食後から試験終了後までケージ内で安静状態とし、レントゲン撮影およびサンプル採取を行った。水は自由飲水とした。

## レントゲン撮影、サンプル採取およびサンプル処理

レントゲン撮影、サンプル採取およびサンプル処理は第2章第1節と同様に行った。サンプル採血時間も同様、液体造影剤、APAP および SASP 投与した時点を投与開始とし、液体造影剤、APAP および SASP 投与前 (0時間)、および投与後 0.5、1、1.5、2、4、6、8、10 時間の計 9 ポイント、頸静脈より血液を採取した。得られた血液サンプルは、直ちにベノジェクト® II 真空採血管 (プレイン、凝固促進フィルム、滅菌品) (テルモ株式会社、東京、日本) に分注したのち、30分室温で凝固させ、3,500 rpm、10分間遠心した後、血清を保存用チューブに分注した。さらに、血球成分をできる限り取り除くために、8,000 rpm、3分間遠心を行った。血液サンプルは測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 測定項目および測定方法

測定項目は、血清アセトアミノフェン濃度 (以降 血清 APAP 濃度) および血清スルファピリジン濃度 (以降 血清 SP 濃度) を測定した。これらは、第1章第2節と同様、HPLC の測定条件および方法にてサンプルの測定を実施した。試験で得られた測定項目は、各採血ポイントの経時的変化 (以降

変動曲線)を用いて比較検討した。さらに、第1節では、レントゲン不透過マーカー法と APAP 法および SASP 法がどちらの正確性も判断できなかったため、これらに加え、本節では、胃内容排出時間および小腸通過時間と深く関係していると考えられ食事の吸収動態を表す血中代謝マーカーを同時に測定し、APAP 法および SASP 法と比較検討した。血中代謝マーカーは、血清グルコース濃度 (以降 Glucose)、血清インスリン濃度 (以降 Insulin)、血清遊離脂肪酸濃度 (以降 NEFA)、血清トリグリセリド濃度 (以降 TG) を測定した。Glucose は、ヘキソキナーゼ法であるグルコース CII-テスト (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を用いて、分光光度計 (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences、東京、日本) にて Glucose の測定を行った。Insulin は、ELISA 法である市販の Canine Insulin ELISA Kit (Merckodia AB、Uppsala、Sweden) を用いた。NEFA は、酵素法であるシカリキッド NEFA (関東化学株式会社、東京、日本) を用い、多機能小型自動分析装置 ビオリス 12i (東京貿易メディカルシステム株式会社、東京、日本) にて NEFA の測定を行った。TG は、富士ドライケムスライド トリグリセライドキット (富士フィルム株式会社、神奈川、日本) を用い、富士ドライケム (富士フィルム株式会社、神奈川、日本) にて測定を行った。また、レントゲン画像での液体造影剤の確認は、胃または小腸から造影剤が排出された時間を、獣医師および動物看護師の 3 人で判定した。

### 承認番号

本研究は、日本獣医生命科学大学動物実験委員会および生命倫理委員会の承諾を得て実施した (承認場号 : 29S-39)。

## 結果

レントゲン画像で液体造影剤が十二指腸に到達した時間および結腸に到達した時間と、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度が上昇し始めた時間を各犬で比較した。さらに液体造影剤投与後の各項目の変動曲線を作成し、平均値 (Mean) ±標準偏差 (SD) で示し、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度と血中代謝マーカーを比較した。

Dog 1 では、血清 APAP 濃度は、造影剤投与後 0.5 時間で濃度が上昇し、1 時間でピークとなった (3.11 µg/ml) <Fig. 6-A>。その後緩やかに低下し、投与 8 時間以降血清 APAP 濃度は検出されなかった。血清 SP 濃度は、投与 4 時間以降に上昇し始め、試験終了まで上昇し続けた<Fig. 6-B>。レントゲン画像では、投与 0.5 時間で胃と十二指腸に液体造影剤が確認され、投与後 4 時間で結腸に確認された<Fig. 6-C, D, E, F>。

Dog 2 では、血清 APAP 濃度は、造影剤投与後 0.5 時間でピーク (5.67 µg/ml) となり、その後急激に低下し、4 および 6 時間ではわずかに検出され、投与 8 時間以降血清 APAP 濃度は検出されなかった<Fig. 7-A>。血清 SP 濃度は、投与 4 時間以降に上昇し始め、試験終了まで上昇し続けた<Fig. 7-B>。レントゲン画像では、投与 0.5 時間で胃と小腸に液体造影剤が確認され、投与後 6 時間で結腸に確認された<Fig. 7-C, D, E, F>。

Dog 3 では、血清 APAP 濃度は、造影剤投与後 0.5 および 1 時間でピーク (4.35 および 4.32 µg/ml) となり、その後急激に低下し、投与 6 時間以降血清 APAP 濃度は検出されなかった<Fig. 9-A>。血清 SP 濃度は、投与 6 時間以降に上昇し始め、試験終了まで上昇し続けた<Fig. 9-B>。レントゲン画像では、投与 0.5 時間で胃と小腸に液体造影剤が確認され、投与後 6 時間で結腸に確認された<Fig. 9-C, D, E, F>。

Dog 4 では、血清 APAP 濃度は、造影剤投与後 0.5 時間で濃度が上昇し、1.5 時間でピーク (5.38 µg/ml) となった。その後急激に低下し、4 および 6

時間ではわずかに検出され、投与 8 時間以降血清 APAP 濃度は検出されなかった<Fig. 8-A>。血清 SP 濃度は、投与 4 時間以降に上昇し始め、試験終了まで上昇し続けた<Fig. 8-B>。レントゲン画像では、投与 0.5 時間で胃と小腸に液体造影剤が確認され、投与後 6 時間で結腸に確認された<Fig. 8-C, D, E, F>。

APAP 法および SASP 法と血中代謝マーカーの比較を比較した。血清 APAP 濃度と Glucose および Insulin の比較では、Glucose および Insulin に変動がなかったため比較することができなかった<Fig. 10-A, C, D>。NEFA との比較では、血清 APAP 濃度が投与後 0.5 時間で上昇したのに対し、NEFA は 0.5 時間で減少した。また、血清 APAP 濃度は投与後 4 時間でほとんど消失したが、NEFA は、4 時間で 0 時間の値まで上昇した<Fig. 10-E>。TG との比較では、血清 APAP 濃度は投与後 4 時間でほとんど消失したのに対し、TG は 0.5 時間から 4 時間にかけてわずかに上昇し、4 時間以降低下し、6 時間で 0 時間の値まで低下した<Fig. 10-F>。血清 SP 濃度との比較では、血清 APAP 濃度と同様、Glucose および Insulin に変動がなかったため比較することができなかった<Fig. 10-B, C, D>。NEFA との比較では、血清 SP 濃度は投与後 4 時間以降に上昇したのに対し、NEFA は 2 時間以降で上昇した<Fig. 10-E>。TG との比較では、血清 SP 濃度が 4 時間以降に上昇したのに対し、投与後わずかに上昇した TG が、4 時間以降低下し、6 時間で 0 時間の値まで低下した<Fig. 10-F>。

## 考察

本研究では、APAP 法および SASP 法を用いて消化管通過時間を測定する上で、胃内容排出時間の指標である血清 APAP 濃度および小腸通過時間の指標である血清 SP 濃度変動が、液体造影剤投与後の画像におけるイヌの消化管通過動態と一致するか検討し、さらに血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度変動と血中代謝マーカーと一致するか検討した。

血清 APAP 濃度は、すべてのイヌで、APAP 投与後 0.5 時間で濃度が上昇していたことから、0.5 時間で食物はすでに胃から排出され小腸に到達していたことが示唆された。また、レントゲン画像でもすべてのイヌで 0.5 時間に小腸で液体造影剤が確認されたことから、血清 APAP 濃度が上昇し始める時間と液体造影剤の胃から排出される時間は一致しており、APAP 法の胃内容排出時間は正確である可能性が高いことが示唆された。

一方、血清 SP 濃度では、Dog 2 および Dog 4 では、血清 SP 濃度の上昇時間とレントゲン画像での小腸通過時間が一致した。しかし、Dog 1 では、血清 SP 濃度は投与 6 時間で検出されたのに対し、レントゲン画像では投与 4 時間で結腸に液体造影剤が確認された。Dog 3 では、血清 SP 濃度は、投与 8 時間で検出されたのに対し、レントゲン画像では投与 6 時間に結腸に造影剤が確認され、Dog 1 および Dog 3 に関しては、血清 SP 濃度よりも液体造影剤の方が、小腸通過時間が早く現れる傾向にあった。液体造影剤と食事の混合は、食事の形状、液体造影剤の粘度および量により、消化管通過時間が異なる (Miyabayashi *et al.*, 1984)。今回のレントゲン画像の結果は、過去に報告された結腸に現れる液体造影剤の結果と類似した (Burns *et al.*, 1986)。したがって、レントゲンでの小腸通過時間は正確である可能性が高い。一方、血清 SP 濃度は、SASP の大部分が大腸内の腸内細菌により分解されるため、SP 生成速度に個体差が生じる可能性があり、さらに、麻酔下などで腸管運動が抑制され、SASP の分解速度や腸内細菌との接触効率が低



下すると、SASP の吸収速度が遅延するといわれているが (Mizuta *et al.*, 1989)、今回同時投与したバリウムが SASP の分解や腸内細菌にどのような影響をおよぼすかは明らかとなっていない。したがって、血中に SP が出現する時間と液体造影剤が大腸に到達する時間に 2 頭において約 2 時間のタイムラグがあったものの大きな差異はなく、その他の 2 頭では SASP 法と液体造影剤で小腸通過時間が一致したため、SASP 法は毎回のレントゲンを撮影することなく小腸通過時間が反映できる鋭敏なマーカーであると考えられる。

次に、APAP 法および SASP 法と血中代謝マーカーを比較した。まず、Glucose および Insulin では、大きな変動がなかったため、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度と比較することができなかった。

NEFA は 0.5 時間で減少し、投与後 4 時間で 0 時間の値まで上昇した。TG では食後 4 時間までわずかに上昇したが、食後 6 時間で 0 時間の値まで低下した。NEFA は、脂肪組織内に貯蔵されている TG が、ホルモン感受性リパーゼ (Hormone-sensitive lipase; HSL) によりグリセロールと分解されることにより産生され、筋肉などの各臓器へ運ばれエネルギーとして利用される。HSL は、Insulin により活性が抑制されるといわれており、食後など、胃から排出された食物に含まれる糖や脂質が小腸で吸収されると、すぐに Insulin が分泌され、HSL 活性が抑制されるため、食事直後は血中の NEFA が減少する。一方、食後血糖値が低下すると、Insulin 分泌の低下および HSL 活性を促進するグルカゴンが分泌されることにより、脂肪組織内に貯蔵されている TG が分解されるため、食事からの吸収が終了すると血中の NEFA が増加する。TG は、食事から摂取された脂肪が小腸で吸収されカイロミクロンとなり、リンパ管を経由して血液中に分泌されるため、食後食物が小腸から吸収されると血中の TG が上昇し、食事の吸収が終わると上昇した血中の TG が低下する (伏木 ほか, 2011; 日本栄養・食糧学会, 2005)。つまり、本研究の NEFA および TG の結果から、造影剤投与後 (食後) 0.5

時間では、食物が胃から十二指腸に到達し吸収され、食後 4 時間以降に小腸からの糖や脂肪の吸収が少なくなり、栄養素が吸収された食物が小腸から大腸へ移動し始めたことが示唆された。血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の結果では、胃から排出され始めた時間は 0.5 時間であり、小腸から排出され始めた時間は 4 時間以降であったことから、APAP 法および SASP 法は NEFA および TG の変動とほぼ一致することが分かった。

## 小活

第1節では、目視で個数を数えることで消化管動態を確認できる BIPS を用いたが、血清 APAP 濃度変動と大きく異なり、また、小腸および大腸の判別が困難であったため、血清 SP 濃度と比較することが困難であった。したがって、イヌにおける APAP 法および SASP 法が正確な測定法であるかは、明らかにすることができなかった。

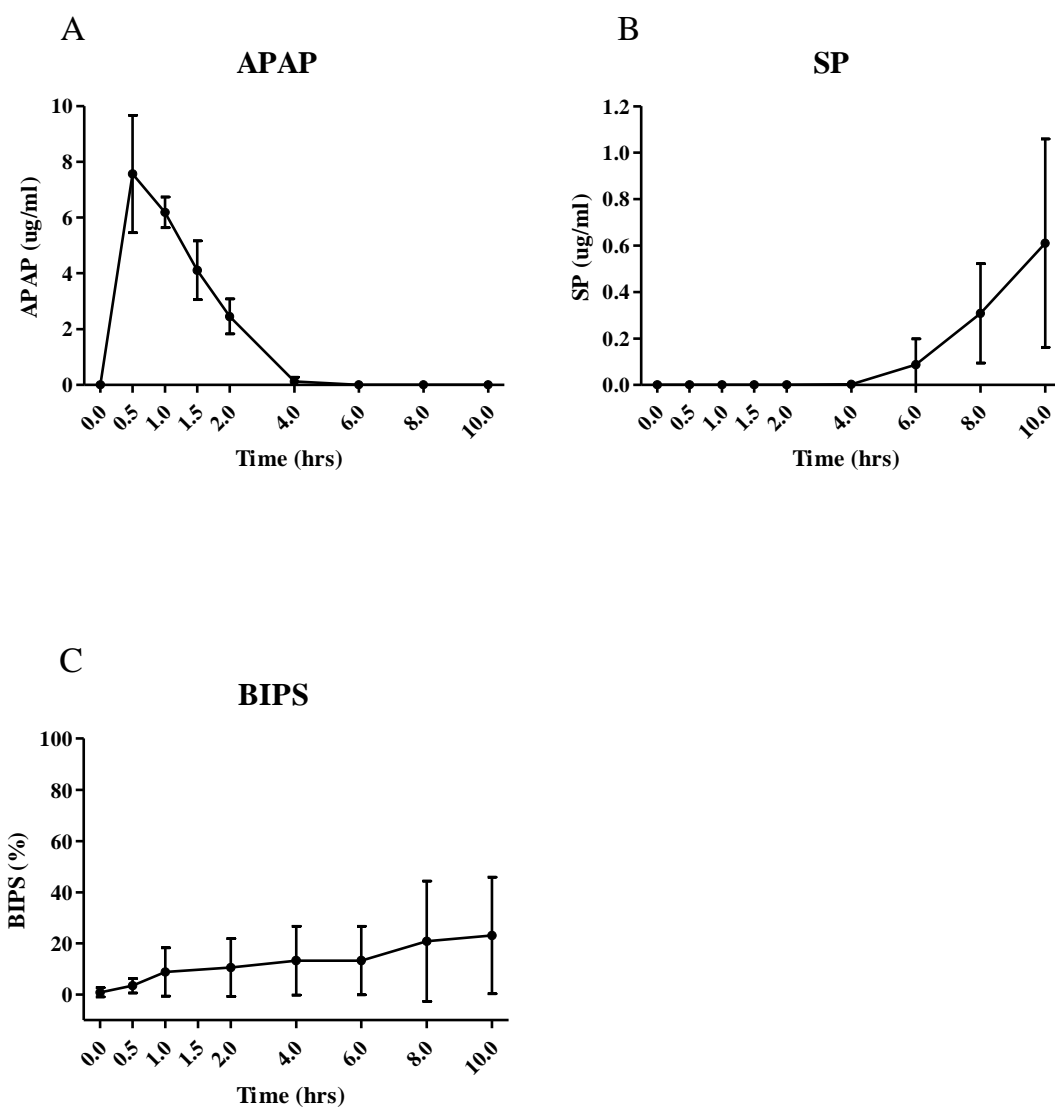
第2節では、目視で消化管動態を確認できる液体造影剤および血中代謝マーカーを測定し、APAP 法および SASP 法の正確性を検討した。APAP 法と液体造影剤の比較では、胃内容排出時間は一致し、血清 APAP 濃度は胃内容排出時間を表していると示唆された。また、SASP 法と液体造影剤の比較では、4頭中2頭で液体造影剤の小腸通過時間が早い個体が観察されたが、その他の2頭で血清 SP 濃度動態と液体造影剤の小腸通過時間が一致し、個体差はあるものの、血清 SP 濃度は小腸通過時間を表していると考えられた。さらに、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度は、血中代謝マーカーである NEFA および TG の血中動態とほぼ類似した変動であったことから、APAP 法および SASP 法は、レントゲンを撮影することなく、胃内容排出時間および小腸通過時間を正確に捉えている可能性が高いことが考えられた。

以上のことより、次章では、客観的に評価のできる APAP 法および SASP 法を使用し、GLP-1 受容体作動薬の消化管通過時間について検討した。

## 図および表

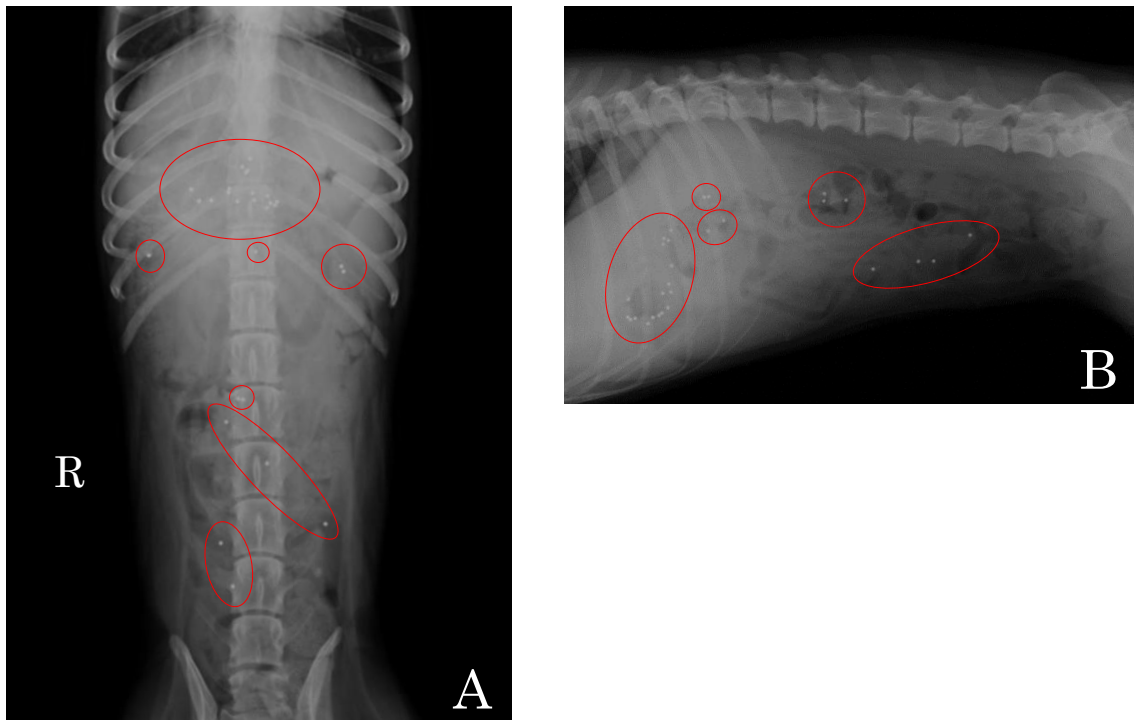
<Table 9> 第1節で使用した供試動物のプロフィール

	犬種	性別	年齢(歳)	体重(kg)	BCS(/5)
Dog 1	ビーグル	避妊雌	10	7.7	3
Dog 2	ビーグル	避妊雌	10	7.6	3
Dog 3	ビーグル	去勢雄	9	11.9	3
Dog 4	ビーグル	去勢雄	7	11.5	3



<Fig. 4> BIPS 投与後の各測定項目の血清濃度変動曲線および BIPS 排出割合

BIPS 投与後の各測定項目の血清濃度変動曲線を示す。各項目は、(A) 血清 APAP 濃度、(B) 血清 SP 濃度、(C) BIPS 排出割合を示す。変動曲線および排出割合は、平均値 (Mean) ±標準偏差 (SD) で示し、各血清濃度の Y 軸は血清濃度 (μg/ml)、BIPS の Y 軸は割合 (%)、また X 軸は採血時間 (hrs) を表す。



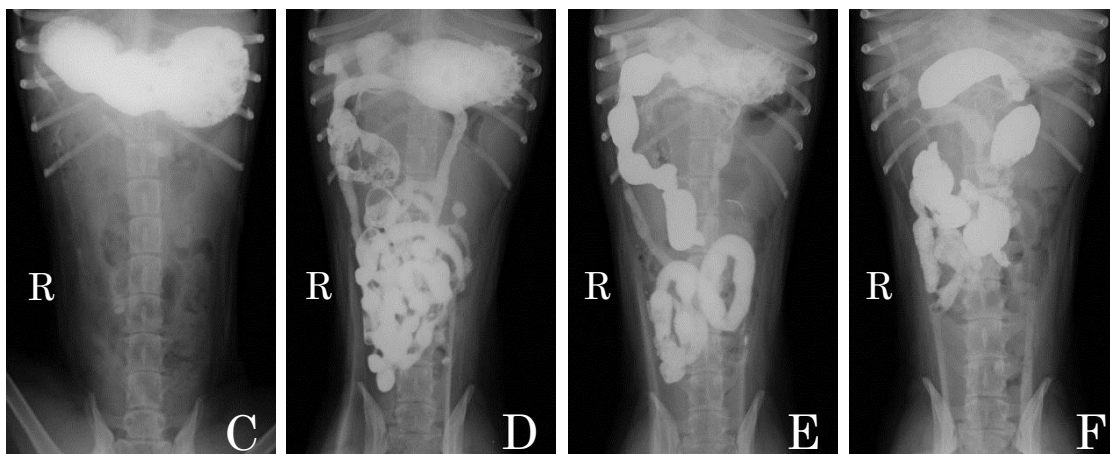
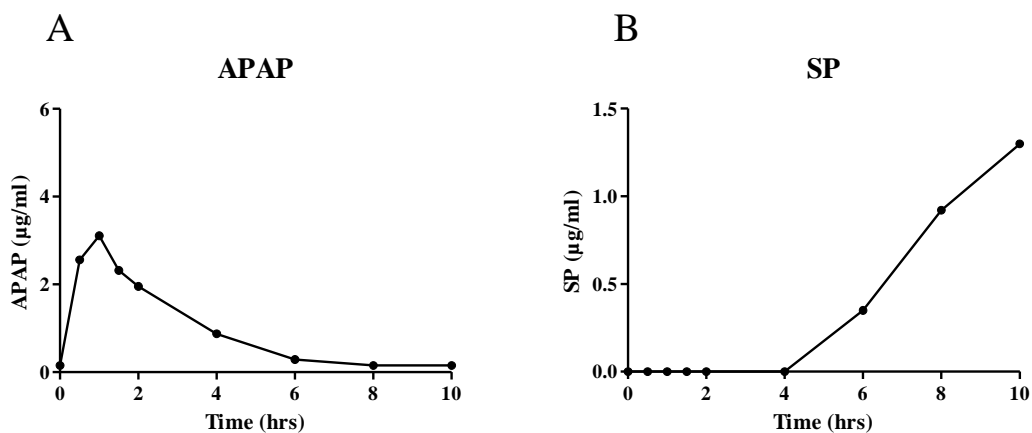
<Fig. 5> BIPS 投与後の健常犬の腹部レントゲン画像

Dog 2 の 10 時間の仰臥位 (A) および右下横臥位 (B) の腹部レントゲン画像を示す。レントゲン画像での BIPS の個数の判定は、獣医師および動物看護師の 3 人で行い、胃内容排出割合の算出方法は、胃から排出された BIPS の個数 / (胃から排出された BIPS の個数 + 胃内に残存した BIPS の個数)  $\times 100$  (%) を用い、小腸排出割合の算出方法は、小腸から排出された BIPS の個数 / (小腸から排出された BIPS の個数 + 胃および小腸内に残存した BIPS の個数)  $\times 100$  (%) を用いて計算した。 R: 右

<Table 10> 第2節で使用した供試動物のプロフィール

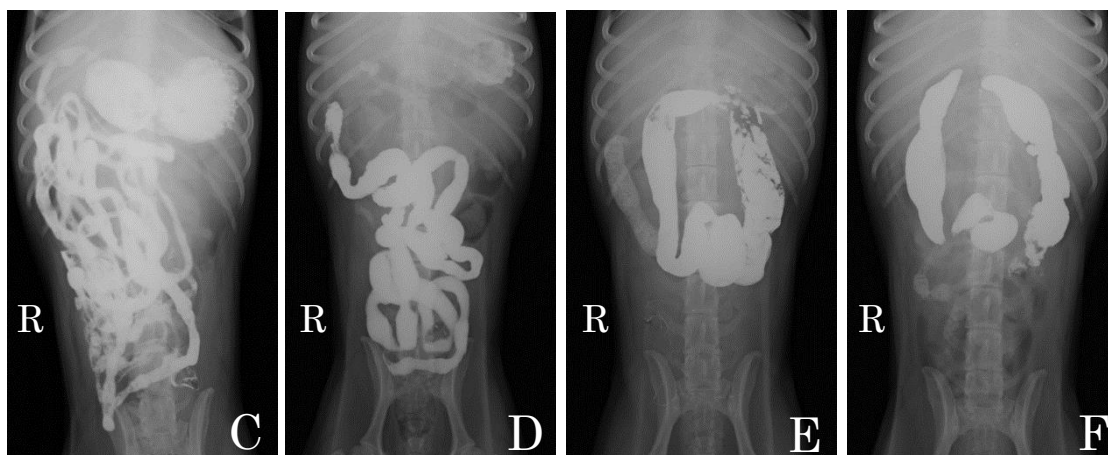
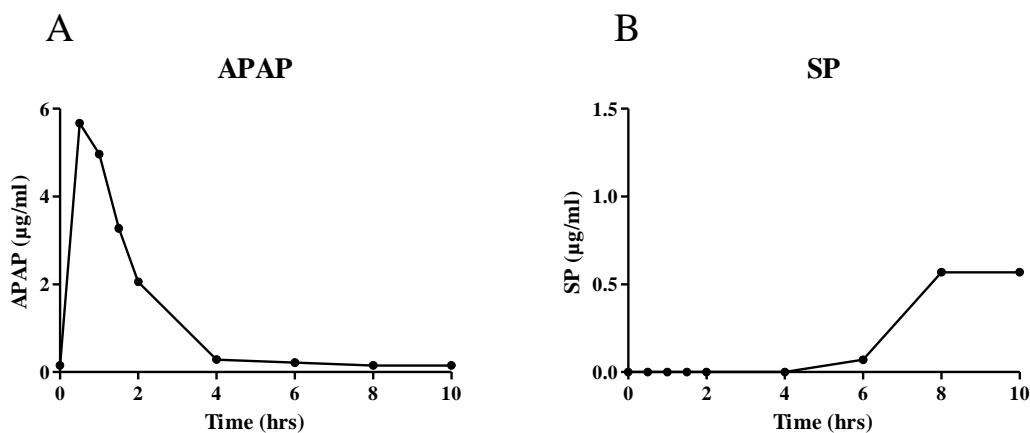
	犬種	性別	年齢(歳)	体重(kg)	BCS(/5)
Dog 1	ビーグル	避妊雌	11	8.3	3
Dog 2	ビーグル	避妊雌	10	8.4	3
Dog 3	ビーグル	去勢雄	7	11.5	3
Dog 4	ビーグル	去勢雄	5	12.7	3





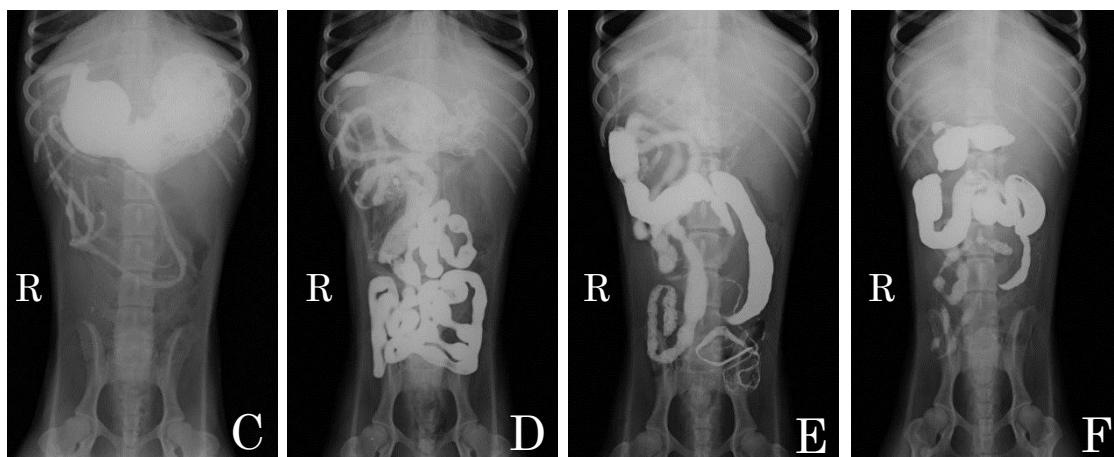
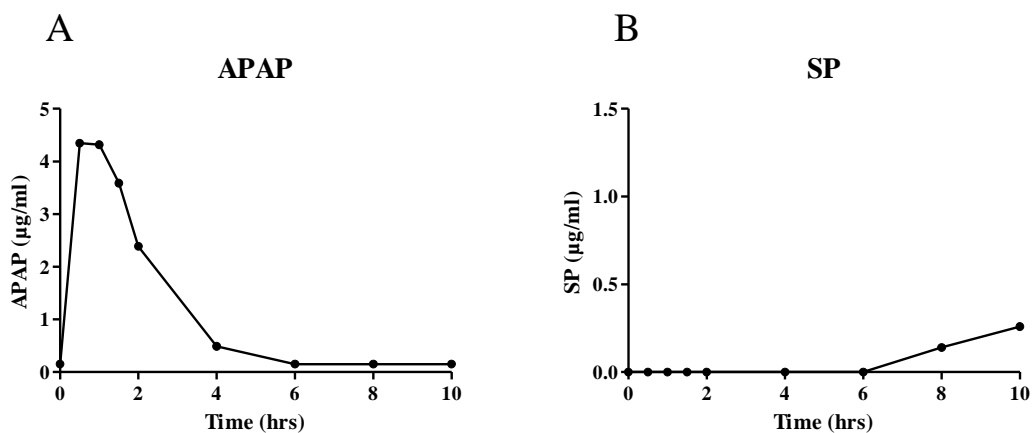
<Fig. 6> Dog 1 : 液体造影剤投与後の各測定項目の血清濃度変動曲線および腹部レントゲン画像

Dog 1 の液体造影剤投与の各測定項目の血清濃度変動曲線およびレントゲン画像を示す。各項目は、(A) 血清 APAP 濃度、(B) 血清 SP 濃度を示す。変動曲線は、平均値 (Mean) ± 標準偏差 (SD) で示し、Y 軸は血清濃度 (μg/ml)、X 軸は採血時間 (hrs) を表す。レントゲン画像は、Dog 1 の仰臥位の腹部レントゲン画像を示す。レントゲン画像での確認は、胃または小腸から造影剤が排出された時間を、獣医師および動物看護師の 3 人で判定した。レントゲン画像は、(C) 0.5 時間、(D) 4 時間、(E) 6 時間、(F) 8 時間を示す。R : 右



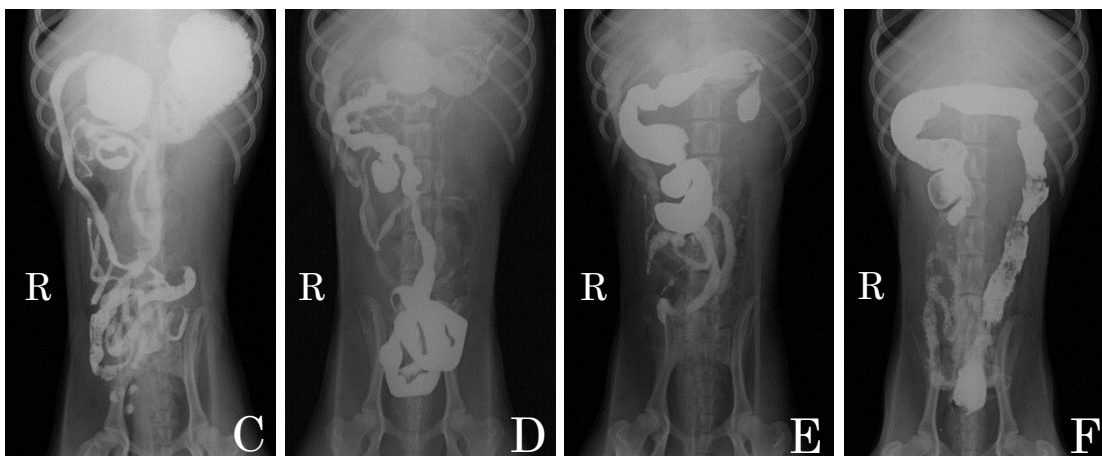
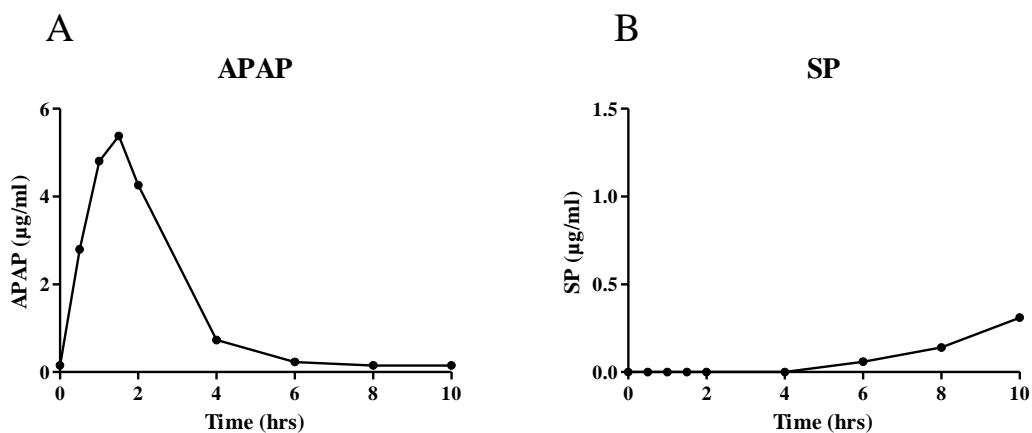
<Fig. 7> Dog 2 : 液体造影剤投与後の各測定項目の血清濃度変動および腹部レントゲン画像

Dog 2 の液体造影剤投与の各測定項目の血清濃度変動曲線およびレントゲン画像を示す。各項目は、(A) 血清 APAP 濃度、(B) 血清 SP 濃度を示す。変動曲線は、平均値 (Mean) ± 標準偏差 (SD) で示し、Y 軸は血清濃度 (μg/ml)、X 軸は採血時間 (hrs) を表す。レントゲン画像は、Dog 2 の仰臥位の腹部レントゲン画像を示す。レントゲン画像での確認は、胃または小腸から造影剤が排出された時間を、獣医師および動物看護師の 3 人で判定した。レントゲン画像は、(C) 0.5 時間、(D) 4 時間、(E) 6 時間、(F) 8 時間を示す。R : 右



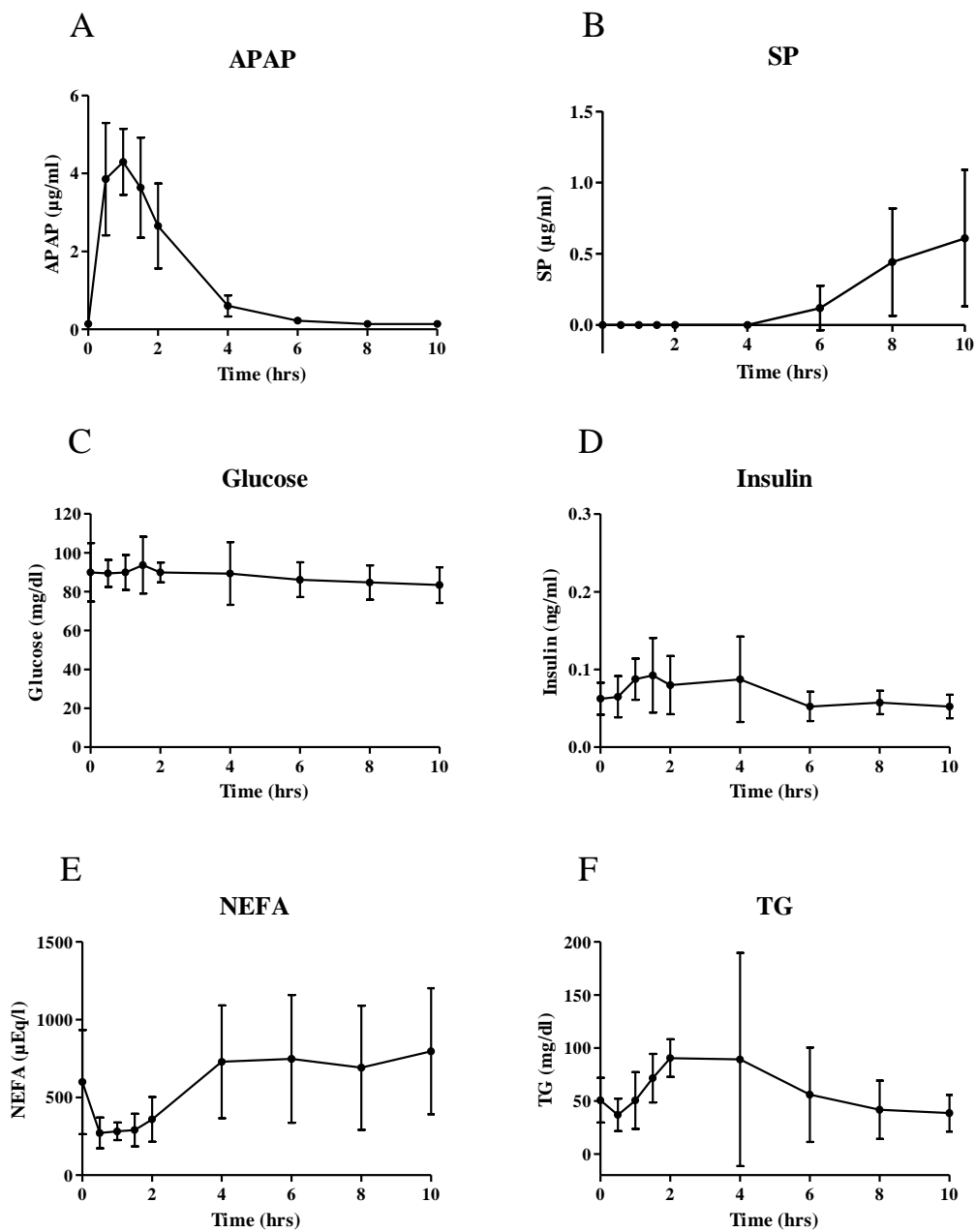
<Fig. 9> Dog 3 : 液体造影剤投与後の各測定項目の血清濃度変動および腹部レントゲン画像

Dog 3 の液体造影剤投与の各項目の血清濃度変動曲線およびレントゲン画像を示す。各項目は、(A) 血清 APAP 濃度、(B) 血清 SP 濃度を示す。変動曲線は、平均値 (Mean) ± 標準偏差 (SD) で示し、Y 軸は血清濃度 (µg/ml)、X 軸は採血時間 (hrs) を表す。レントゲン画像は、Dog 3 の仰臥位の腹部レントゲン画像を示す。レントゲン画像での確認は、胃または小腸から造影剤が排出された時間を、獣医師および動物看護師の 3 人で判定した。レントゲン画像は、(C) 0.5 時間、(D) 4 時間、(E) 6 時間、(F) 8 時間を示す。R : 右



<Fig. 8> Dog 4 : 液体造影剤投与後の各測定項目の血清濃度変動および腹部レントゲン画像

Dog 4 の液体造影剤投与の各項目の血清濃度変動曲線およびレントゲン画像を示す。各項目は、(A) 血清 APAP 濃度、(B) 血清 SP 濃度を示す。変動曲線は、平均値 (Mean) ± 標準偏差 (SD) で示し、Y 軸は血清濃度 (µg/ml)、X 軸は採血時間 (hrs) を表す。レントゲン画像は、Dog 4 の仰臥位の腹部レントゲン画像を示す。レントゲン画像での確認は、胃または小腸から造影剤が排出された時間を、獣医師および動物看護師の 3 人で判定した。レントゲン画像は、(C) 0.5 時間、(D) 4 時間、(E) 6 時間、(F) 8 時間を示す。R : 右



<Fig. 10> 血清 APAP 濃度変動曲線と血中代謝マーカー変動曲線との比較 (n=5)

血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度変動と血中代謝マーカー変動との比較したものを示す (n=4)。(A) 血清 APAP 濃度、(B) 血清 SP 濃度、(C) Glucose、(D) Insulin、(E) NEFA、(F) TG を示す。変動曲線は、平均値 (Mean) ± 標準偏差 (SD) で示し、Y 軸は血清濃度 (μg/ml)、X 軸は採血時間 (hrs) を表す。

### 第 3 章

## 健常犬における GLP-1 受容体作動薬投与が 消化管通過時間に与える影響の検討

## 緒言

GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) 受容体作動薬は、ヒトの 2 型糖尿病の治療薬として使用されており、生体内で産生されるヒトの内因性 GLP-1 とアミノ酸配列の相同性が高く、インスリン分泌を促すなど、内因性 GLP-1 と類似した作用を発揮する。さらに、ヒト内因性 GLP-1 とは異なり、GLP-1 蛋白分解酵素である DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) に対し抵抗性をもつため、分解されにくく、血中の GLP-1 濃度を維持することができる。効果としては、インスリン分泌促進、グルカゴン分泌抑制、摂食抑制、胃内容排出抑制、肝臓に対するグルコース取り込みおよびグリコーゲン合成など、様々な臓器に作用し血糖改善を促す (Nauck, *et al.*, 2002; Degn, *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2005; Drucker *et al.*, 2006; Deane *et al.*, 2010)。これらの薬理作用の中でも、食後の血糖変動に大きく関与するのが胃内容排出抑制作用であり、食後の血糖値上昇を是正に大きく関与するとされている (Horowitz *et al.*, 1993; Horowitz *et al.*, 2002; Meier *et al.*, 2005; Deane *et al.*, 2010)。

GLP-1 受容体作動薬は、Exendin-4 と GLP-1 誘導体に分類され、各代表的なものとして、エキセナチドおよびリラグルチドが挙げられる。エキセナチドは、アメリカオオトカゲの唾液から分離された Exendin-4 と同じ構造を有し、ヒト内因性 GLP-1 のアミノ酸配列と 53% の相同性があり、GLP-1 受容体に結合し作用する。生体内での効果は 5 - 7 時間であり、1 日 2 回の投与を必要とする短時間作用型である。リラグルチドは、活性型 GLP-1 の 34 をアルギニンに置換し、脂肪酸を付加することで、DPP-4 に耐性を持つ。作用時間が長いことから、1 日 1 回の投与で十分効果が期待でき、長時間作用型 GLP-1 受容体作動薬と呼ばれる。ヒトでは、エキセナチド、リラグルチド共に胃内容排出抑制効果を示した報告が長年に渡り、数多く報告されている (Juhl *et al.*, 2002; Blasé *et al.*, 2005; DeFronzo *et al.*, 2008; Linnebjerg

*et al.*, 2008; Wajcberg *et al.*, 2010; Horowitz *et al.*, 2012; van Can *et al.*, 2014; Werner, 2014)。イヌでは、短時間作用型であるエキセナチド投与が胃内容排出を遅延させたという報告はあるが (Ionut *et al.*, 2008)、リラグルチドの胃内容排出抑制作用に関する報告はなく、また、この 2 種類を比較検討した報告はない。また、GLP-1 受容体作動薬が小腸通過時間におよぼす影響を検討した報告もない。そのため本章では、胃内容排出時間および小腸通過時間を同時に測定することで、GLP-1 受容体作動薬が健常犬の消化管通過時間におよぼす影響を検討した。さらに、消化管通過時間が Glucose や Insulin などの血中代謝マーカーおよび、インクレチンホルモンである GIP および GLP-1 におよぼす影響を調査した。



## 材料および方法

### 供試動物

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門において、温度・湿度および調光を一定に管理された施設内で、ケージにて飼育されている健常ビーグル犬 5 頭 (Dog1 - 5) を使用した。これらの犬はあらかじめ消化器症状、食欲不振等の臨床症状がなく、一般身体検査、血液一般検査および血液化学検査にて、異常が認められなかった個体を使用した。各犬のプロフィールを<Table 11>に示す。

### 供試フード

供試フードは、第 1 章と同様、総合栄養食のウェットフードである SCIENCE DIET アダルト 1 - 6 歳成犬用ビーフ&チキンを 100 g 使用した。

### 供試薬剤

APAP および SASP は第 2 章と同様の投与量で行い、APAP および SASP 懸濁液を作成した。

GLP-1 受容体作動薬は、短時間作用型であるエキセナチド (商品名: バイエッタ、アストラゼネカ株式会社、大阪、日本) を Ionut らの報告を参考に 10  $\mu\text{g}/\text{head}$  を試験に用いた。さらに、長時間作用型であるリラグルチド (商品名: ビクトーザ、ノボノルディスクファーマ株式会社、東京、日本) を Oda らの報告を参考に 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を用いた。

### 方法

前日の食事の影響を考慮し、12 時間以上絶食させた。実験開始直前に、CBC および血液化学検査を行い、異常が見られないことを確認した。試験は、エキセナチドを投与した群 (以降、Ex 群)、リラグルチドを投与した群

(以降、Li 群) およびコントロールとして 0.9%生理食塩水を投与した群 (以降、CR 群) の 3 群で行った。絶食下で採血を行い、GLP-1 受容体作動薬または生理食塩水を皮下注射した。GLP-1 受容体作動薬の効果を十分に発揮させるため皮下注射後、安静状態にし、注射 1 時間後にフードを給与し、APAP および SASP 懸濁液を経口投与した。食事給与および薬剤投与は 5 分以内に終わらせ、完食後から試験終了までケージ内で安静状態とし、水は自由飲水とした。試験は 1 日 1 回とし、Randomized crossover 法で行った。試験と試験の間には、2 週間の wash out 期間を設けた。

#### サンプル採取およびサンプル処理

血液サンプルは、GLP-1 受容体作動薬または生理食塩水投与前を 0 分とし、フード、APAP および SASP 懸濁液投与後から、5、10、20、30、45 分、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8 時間の計 15 ポイント、血漿 GLP-1 濃度測定用には、0、30 分、1、2、3、4、6 時間の 7 ポイント、頸静脈より血液を採取した。得られた血液は直ちにベノジェクト®II 真空採血管 (プレイン、凝固促進フィルム、滅菌品) に 1.5 ml、EDTA 加採血管 (富士チューブ EDTA-2K、FUJIFILM、東京、日本) に 0.5 ml ずつ 2 本に分注した。2 本の EDTA 加採血管のうち、1 本は GIP 測定用に、残りの 1 本には活性型 GLP-1 を測定するために、GLP-1 の分解を阻害する DPP-4 阻害剤を添加した。DPP-4 阻害剤は血液 1 ml に対して 10  $\mu$ l であるため、本研究では 5  $\mu$ l 添加した。ベノジェクト®II 真空採血管に分注した血液は 30 分室温で凝固させ、3,500 rpm、10 分間遠心した後、血清を保存用チューブに分注した。さらに、血球成分をできる限り取り除くために、8,000 rpm、3 分間遠心を行った。遠心後、血清を分離して血液サンプルとした。EDTA 加採血管に移した血液は 12,000 rpm、5 分間遠心した後、血漿を分離して血液サンプルとした。血液サンプルはすべて検体測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

## 測定項目、測定キットおよび測定方法

測定項目は、血清アセトアミノフェン濃度（以降 血清 APAP 濃度）、血清スルファピリジン濃度（以降 血清 SP 濃度）、血清グルコース濃度（以降 Glucose）、血清インスリン濃度（以降 Insulin）、血清遊離脂肪酸濃度（以降 NEFA）、血清トリグリセリド濃度（以降 TG）、血漿 GIP 濃度（以降 GIP）および血漿 GLP-1 濃度（以降 GLP-1）を測定した。血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度は、第 1 章第 2 節と同様の測定方法で、Glucose、Insulin、NEFA および TG は、第 2 章第 2 節と同様の測定方法で測定を行った。GIP は、ELISA 法にて、市販の Rat/Mouse GIP (Total) 96-Well Plate (Cat. #EZRMGIP-55) ELISA Kit (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を用いて測定した。GLP-1 は、ELISA 法にて、市販の Glucagon-Like Peptide-1 (Active) 96-Well Plate (Cat.# EGLP-35K) ELISA Kit (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を用いて測定した。

## 統計解析

試験で得られた GLP-1 以外の測定項目は、各採血ポイントの血中濃度経時的变化（変動曲線）、全体の血中濃度曲線下面積（AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub>）および 2 時間毎の血中濃度曲線下面積（AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>）を用いて比較検討した。GLP-1 は、各採血ポイントの血中濃度経時的变化（変動曲線）、全体の血中濃度曲線下面積（AUC<sub>0-6hrs (360min)</sub>）および 2 時間毎の血中濃度曲線下面積（AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>）を用いて比較検討した。それぞれの測定項目の変動曲線および AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> は平均値（Mean±SD）で示し、統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。また、AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> および（AUC<sub>0-6hrs (360min)</sub>）は平均値±標準偏差（Mean±SD）で示し、統計解析には One-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなし、グラフ上にてアスタリスク（\*）で示した。さらに、Two-Way Repeated Measures

ANOVA および One-Way Repeated Measures ANOVA で有意な差が認められた場合、Post hoc test として、Bonferroni post test を行った。なお、すべての統計解析は Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software、La Jolla、CA、USA) を用いた。

#### 承認番号

本研究は、日本獣医生命科学大学動物実験委員会および生命倫理委員会の承諾を得て実施した（承認場号：29S-38）。

## 結果

血清 APAP 濃度変動曲線は、CR 群では、食事給与後すぐに上昇し、45 分および 1 時間でピークに達した ( $4.33 \pm 2.10 \mu\text{g/ml}$  および  $4.37 \pm 1.23 \mu\text{g/ml}$ )。一方、Ex 群では、30 分、45 分および 1 時間でピークに達し ( $1.76 \pm 2.03 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.76 \pm 1.49 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.80 \pm 1.16 \mu\text{g/ml}$ )、CR 群と比較し、食後 45 分および 1 時間で有意に低値を示した ( $P < 0.01$ )。さらに、Ex 群と Li 群では有意差は認められなかったが、Ex 群は、食後 30 分から 3 時間にかけて Li 群よりも低値を示した。Li 群は 1 時間でピークに達したが ( $3.33 \pm 0.76 \mu\text{g/ml}$ )、CR 群との有意差は認められなかった< Fig. 11-A >。血清 APAP 濃度 AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、全ての群で有意差は認められなかった< Fig. 11-B >。血清 APAP 濃度 AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> では、CR 群と比較し、Ex 群の AUC<sub>0-2hrs</sub> で有意に低値を示したが、CR 群と Li 群、および Li 群と Ex 群では有意差は認められなかった< Fig. 11-C >。

血清 SP 濃度変動曲線は、全ての群で有意差は認められなかったが、CR 群が食後 3 時間以降に急激に上昇したのに対し、Ex 群は食後 5 時間以降に急激に上昇、Li 群は急激な上昇を認めず、食後 1.5 時間から 8 時間にかけて低値を推移した< Fig. 12-A >。血清 SP 濃度 AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、全ての群で有意差は認められなかったが、CR 群と比較し Ex 群および Li 群は低値を示した< Fig. 12-B >。血清 SP 濃度 AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> では、全ての群で有意差は認められなかった< Fig. 12-C >。

Glucose 変動曲線は、全ての群で有意差は認められなかったが、CR 群が食後わずかに上昇したのに対し、Ex 群および Li 群は食後の変動がなかった< Fig. 13-A >。Glucose AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、全ての群で有意差は認められなかった< Fig. 13-B >。Glucose AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> では、全体に有意差が認められたが ( $P < 0.05$ )、各群間での有意差は認められなかった< Fig. 13-C >。

Insulin 変動曲線は、全ての群で有意差は認められなかったが、Glucose

と同様、CR 群は食後わずかに上昇したのに対し、Ex 群および Li 群は食後の変動を認めなかった<Fig. 14-A>。Insulin AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> および Insulin AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> は、全ての群で有意差は認められなかった<Fig. 14-B, C>。

NEFA 変動曲線は、全体に有意差が認められたが、全ての群で各時間の有意差は認められなかった。Ex 群では CR 群と比較し、食後の急激な NEFA の低下を認めず、食後 8 時間まで一定の値を示した。一方、Li 群では食後 1 時間まで CR 群と同様の変動を示したが、食後 1 時間以降、CR 群よりも高値を示した<Fig. 15-A>。NEFA AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、全ての群で有意差は認められなかった<Fig. 15-B>。NEFA AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> では、CR 群と比較し、Ex 群および Li 群は有意差が認められなかった。一方、Ex 群と比較し、Li 群は AUC<sub>6-8hrs</sub> で有意に高値を示した<Fig. 15-C>。

TG 変動曲線は、全ての群で有意差は認められなかったが、CR 群は食後 2 時間でピークに達したのに対し、Ex 群および Li 群は、食後から 8 時間まで変動はなかった<Fig. 16-A>。TG AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> および TG AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> では、全ての群で有意差は認められなかった<Fig. 16-B, C>。

GIP 変動曲線は、全ての群で有意差は認められなかった。CR 群は、食後 1.5 時間でピークに達し、その後緩やかに減少したが、Ex 群および Li 群では、食後緩やかに上昇したが、顕著なピークを示さなかった。<Fig. 17-A>。GIP AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> および GIP AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> では、全ての群で有意差は認められなかった<Fig. 17-B, C>。

GLP-1 変動曲線では、CR 群および Ex 群では、食後 6 時間まで GLP-1 の変動は認められなかったが、Li 群のみ食後上昇し、CR 群および Ex 群と比較し、すべての時間で有意に高値を示した<Fig. 18-A>。GLP-1 AUC<sub>0-6hrs (360min)</sub> では、Li 群は CR 群および Ex 群と比較し、有意に高値を示した<Fig. 18-B>。GLP-1 AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> では、Li 群は CR 群および Ex 群と比較し、すべての時間で有意に高値を示した<Fig. 18-C>。

## 考察

本研究では、ヒトの糖尿病の治療薬として用いられ、消化管運動抑制作用を持つ GLP-1 受容体作動薬が、健常犬の消化管通過時間および血中代謝マーカーにおよぼす影響を検討した。

まず、GLP-1 受容体作動薬が胃内容排出時間におよぼす影響を検討した。APAP 法は、胃内容排出時間が促進した場合、血清 APAP 濃度のピーク値は高値を示す。胃内容排出時間が遅延した場合、血清 APAP 濃度のピーク値は低値を示す (Heading *et al.*, 1973)。本試験の結果より、Ex 群は、GLP-1 受容体作動薬を投与していない CR 群と比較し、血清 APAP 濃度のピーク値が低く、さらに有意差は認められなかったが、Li 群も CR 群のピーク値よりも低いピーク値を示したことから、Ex および Li が胃内容排出時間を遅延させたことが考えられた。ヒトでは、小腸下部 L 細胞から分泌された GLP-1 は、末梢における直接作用はほとんどなく、血液脳関門を通過し、迷走神経求心路を入力系として延髄孤束核にシグナルを送り、迷走神経遠心路を出力系とする中枢神経系を介する機構により、胃の運動を抑制し、胃内容排出時間を遅延させると考えられている (Wettergren *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2013)。実際、実験動物およびヒトにおいて迷走神経を遮断すると GLP-1 の胃内容排出抑制作用が減弱したことが報告された (Imeryüz *et al.*, 1997; Plamboeck *et al.*, 2013)。しかし、GLP-1 受容体作動薬は、内因性 GLP-1 の分子量よりも大きいため、血液脳関門を通過する可能性は低いが、本研究では、胃内容排出抑制が顕著に現れたことから、血液脳関門を通らず、迷走神経求心路から血液脳関門のない直接情報を受け取る脳部位、視床下部室傍核や延髄孤束核を介して胃内容排出抑制作用を発揮した可能性が考えられた。一方、Ex 群および Li 群を比較すると、Ex 群の血清 APAP 濃度のピーク値は Li 群より低い結果となり、Ex 群におけるより強い胃内容排出遅延作用を示した。プラセボ、低用量および高用量の Li を投与し胃内容排出抑制

作用を比較した報告では、低用量および高用量とも胃内容排出は抑制されるものの、低用量はより顕著に胃内容排出を抑制させることが分かっている (van Can *et al.*, 2014)。したがって、本研究でのリラグルチドの投与量は、エキセナチドと同程度の胃内容排出遅延作用を発揮するほどの用量ではなかった可能性も考えられた。

次に、小腸通過時間におよぼす影響を検討した。SASP 法は、小腸通過時間が促進した場合、血清 SP 濃度の立ち上がりが早く、小腸通過時間が遅延した場合、血清 SP 濃度の立ち上がりが遅延する (Mizuta *et al.*, 1989)。本研究の結果より、GLP-1 受容体作動薬を投与した Ex 群および Li 群は、有意差は認められなかったものの、CR 群よりも立ち上がりが遅延し、小腸通過時間が遅延傾向を示した。Ex 群および Li 群は、胃内容排出時間が遅延したため、小腸通過時間も遅延したことが考えられた。ヒトでは、GLP-1 受容体作動薬の血糖降下作用として、胃内容排出抑制が主として注目されており、小腸運動に関する研究はほとんどなされていない。しかし、小腸運動に関しても中枢神経系を介し、小腸運動を抑制することで糖尿病における血糖コントロールに影響を与える可能性がある (Marathe *et al.*, 2011)。実際、ラットおよびヒトにおいて、外因性の GLP-1 静脈注射による絶食状態での小腸運動が抑制されていることから (Giralt *et al.*, 1999; Bozkurt *et al.*, 2002; Hellström *et al.*, 2008)、イヌでは、小腸でも GLP-1 受容体作動薬は胃内容排出と同じ中枢神経系を介する機構が関与している可能性も示唆された。しかし、ヒトでの GLP-1 受容体作動薬を用いた小腸運動抑制に関する臨床試験は行われておらず、本研究ではこれを証明するための明確な証拠が不足しているため、今後さらなる研究が必要である。

血中代謝マーカーへの影響では、Glucose および Insulin は CR 群と比較し、GLP-1 受容体作動薬投与群では、食後の上昇を認めなかった。過去のヒトや健常犬における報告によると、本研究結果と同様、インスリンの有意な上昇が認められない場合の食後の血糖値上昇抑制は、グルカゴン分泌抑制作



用または胃内容排出遅延作用によるものであると推測されていることから (Edwards *et al.*, 2001; Kolterman *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2013)、イヌにおける GLP-1 受容体作動薬における食後の Glucose 上昇抑制は、胃内容排出時間を遅延させる作用が大きく関与していることが示唆された。しかし、本研究では、イヌのグルカゴンの測定を行っていないため、胃内容排出遅延と共にグルカゴン分泌も抑制された可能性もある。

NEFA は Ex 群では、大きな変動はなかった。第 2 章第 2 節でも述べたように、食後血中の NEFA は減少し、空腹時に増加する。Ex 群は、CR 群と比較し、有意に胃内容排出時間が遅延したことで、栄養素の吸収が長時間一定に保たれ、NEFA に顕著な変動がなかったと考えられる。しかし、Li 群は、Ex 群と比較し、6 - 8 時間の AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> で有意に高値を示した。GLP-1 受容体作動薬は、副作用として胃腸副作用（主に悪心、嘔吐、下痢）がある (Drucker *et al.*, 2006)。この副作用は、短時間作用型である Ex は、胃内容排出抑制作用が強く現れることから悪心が起こりやすく、長時間作用型である Li では、自律神経叢を介する経路または平滑筋運動に直接影響を与える可能性から、下痢が起こりやすいとされている (Hellström *et al.*, 2008; Bettge *et al.*, 2017)。本研究でも、Ex 群には副作用は認められなかったが、Li を投与した 5 頭中 2 頭は試験終了後および翌日に軟便が生じた。血清 SP 濃度の考察でも述べたように、GLP-1 受容体作動薬は、小腸運動を抑制させることから、小腸運動抑制作用が強く働いた、または消化不良が生じ、食事からの栄養素の吸収が低下した可能性も考えられることから、軟便など消化器症状が起こり、Li 群において NEFA が上昇したと推察した。

TG では、CR 群と比較し、Ex 群および Li 群は食後の上昇が認められなかった。TG は食事からの脂肪吸収により食後 TG が上昇し、食事からの吸収が終了すると血中に出現する TG が減少する。Ex 群および Li 群ともに胃内容排出時間の遅延が認められたことから、小腸での食事からの脂肪の吸収

が緩慢となり食後の TG 上昇が認められなかったと考えられた。

GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide) は、インクレチンホルモンの一つであり、GLP-1 同様、血糖依存的にインスリン分泌が調整される。GIP 分泌細胞はイヌでは、小腸上部に最も多く分布し食事刺激により分泌される。しかし、分泌数分後にタンパク分解酵素である DPP-4 により不活化され、腎臓から排出される。健常犬の過去の報告によると、食事の組成にもよるが GIP の変動は、食後 1-4 時間でピークとなり、その後緩やかに下降する (Akiyama *et al.*, 2015)。本研究の CR 群は、この報告と同様の変動を示した。Ex 群および Li 群では、食後緩やかに上昇したが、顕著なピークを示さなかった。これは、GIP が食事刺激により小腸上部の GIP 分泌細胞を刺激し、分泌されることから、胃内容排出時間が遅延したことにより小腸への食物の流入が緩慢になり、GIP 分泌細胞への刺激が長時間持続していたことが示唆された。

GLP-1 は、Li 群が有意に高値を示した。本研究で用いた ELISA キットは、ヒト内因性 GLP-1 (活性型) [GLP-1 (7-36amide) および GLP-1 (7-37)] を測定するキットであるが、Li は 97%の相同性があるとされており、本研究の結果でも Li 群は CR 群よりも有意に高値を示し、Li 群の投与が適切に行われたことを示すと考えられる。一方、Ex に対しての相同性は 53%と低く、使用した ELISA キットでは、投与した GLP-1 受容体作動薬由来の GLP-1 を測定できず、CR 群と同様、内因性の GLP-1 のみ測定されていたと考えられた。

## 小括

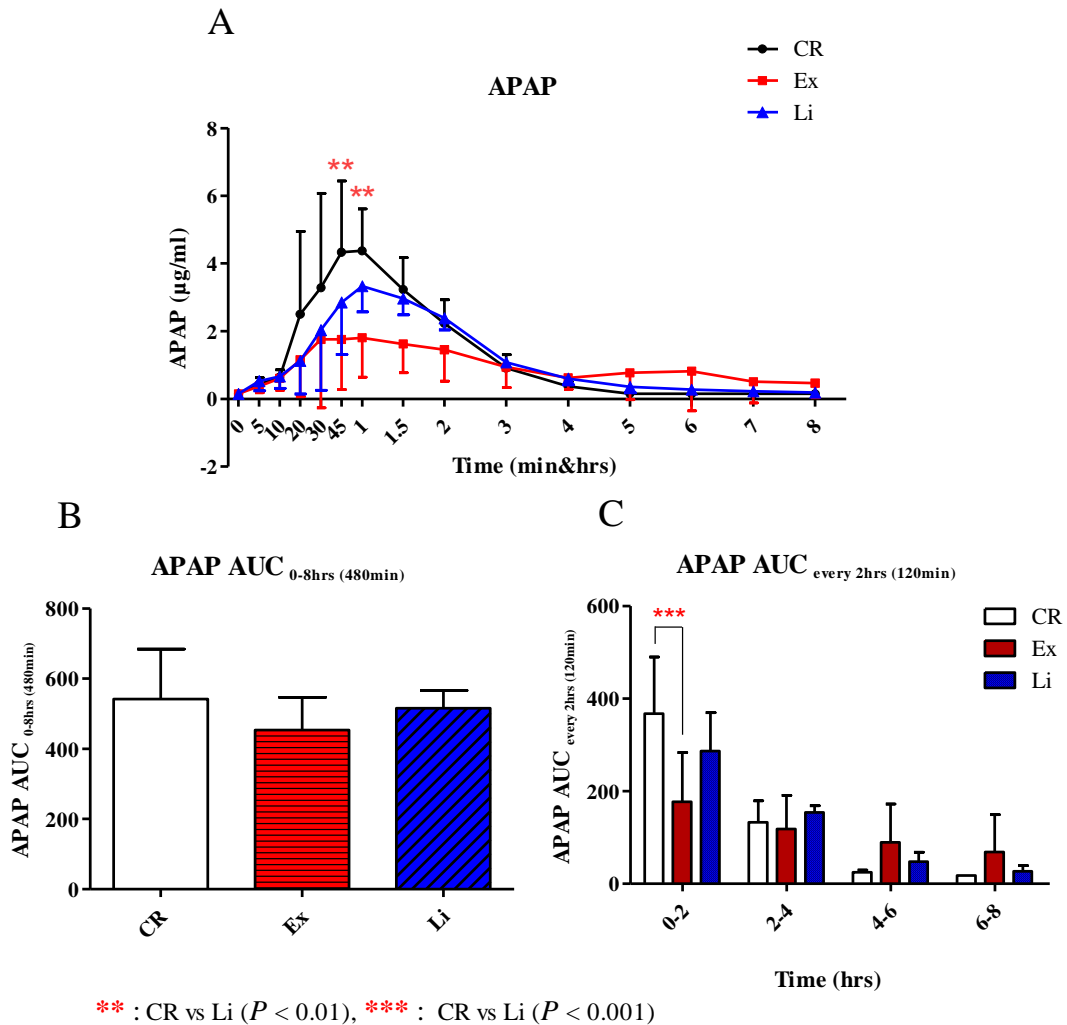
本章では、種類の異なる GLP-1 受容体作動薬投与により、健常犬の胃内容排出時間および小腸通過時間に与える影響と血中代謝マーカールによぼす影響を検討した。

短時間作用型 GLP-1 受容体作動薬であるエキセナチドおよび長時間作用型 GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドは、胃内容排出時間を遅延させ、ヒトと同様胃内容排出抑制作用を示したが、エキセナチドの方が胃内容排出時間の遅延が顕著であった。さらに、この胃内容排出抑制作用が食後の Glucose、Insulin、TG および GIP 上昇抑制に強く関与した可能性を示唆した。また、どちらも小腸通過時間を遅延するが、リラグルチドの方が小腸通過時間の遅延が顕著であり、小腸での栄養吸収に影響をおよぼし、消化器症状を起こしやすい可能性も示唆された。

## 図および表

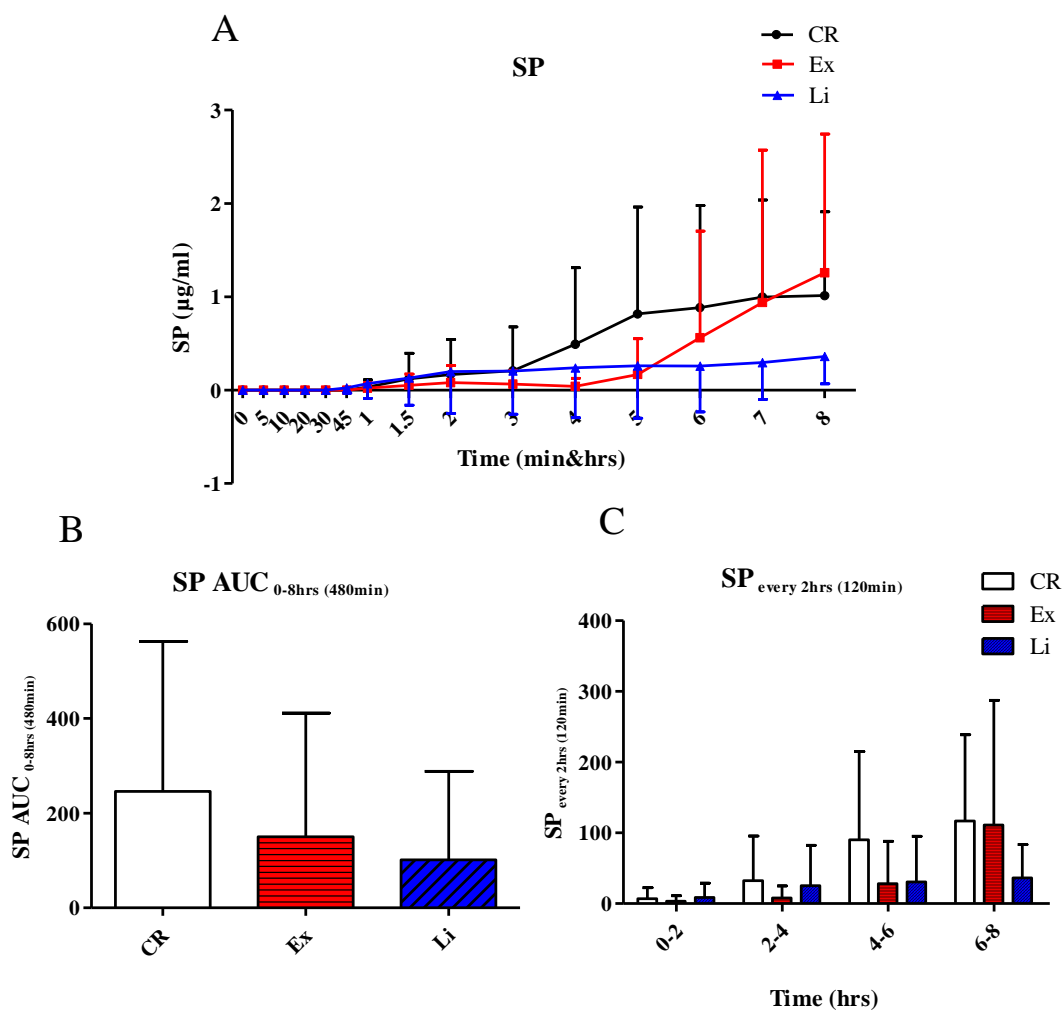
<Table 11> 供試動物プロフィール

	犬種	性別	年齢(歳)	体重(kg)	BCS(/5)
Dog 1	ビーグル	避妊雌	10	7.8	3
Dog 2	ビーグル	避妊雌	9	10.5	3
Dog 3	ビーグル	去勢雄	7	11.5	3
Dog 4	ビーグル	去勢雄	7	10.1	3
Dog 5	ビーグル	去勢雄	7	9.8	3



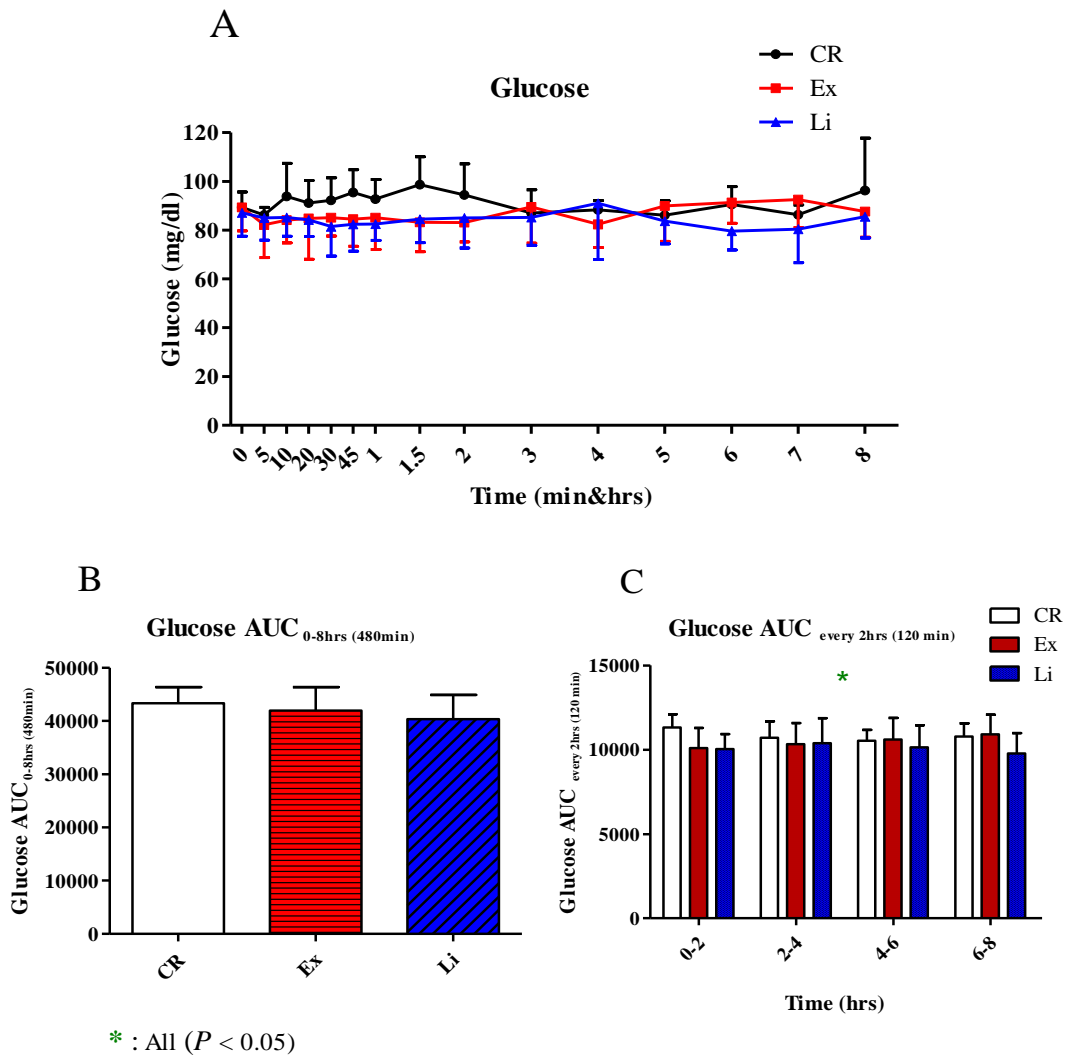
<Fig. 11> 血清 APAP 濃度の変動曲線および AUC (n=5)

CR 群、Ex 群および Li 群の血清 APAP 濃度測定結果を示す (n=5)。(A) 変動曲線、(B) 全体の血清濃度曲線下面積 (AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub>)、(C) 2 時間毎の血清濃度下面積 (AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>) を示す。すべてのグラフにおいて、平均値 (Mean±SD) で示し、変動曲線および AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> の統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を用い、また、AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、One-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなし、グラフ上にアスタリスク (\*) で示した。有意な差が認められたため、Post hoc test として、Bonferroni post test を行った。



<Fig. 12> 血清 SP 濃度の変動曲線および AUC (n=5)

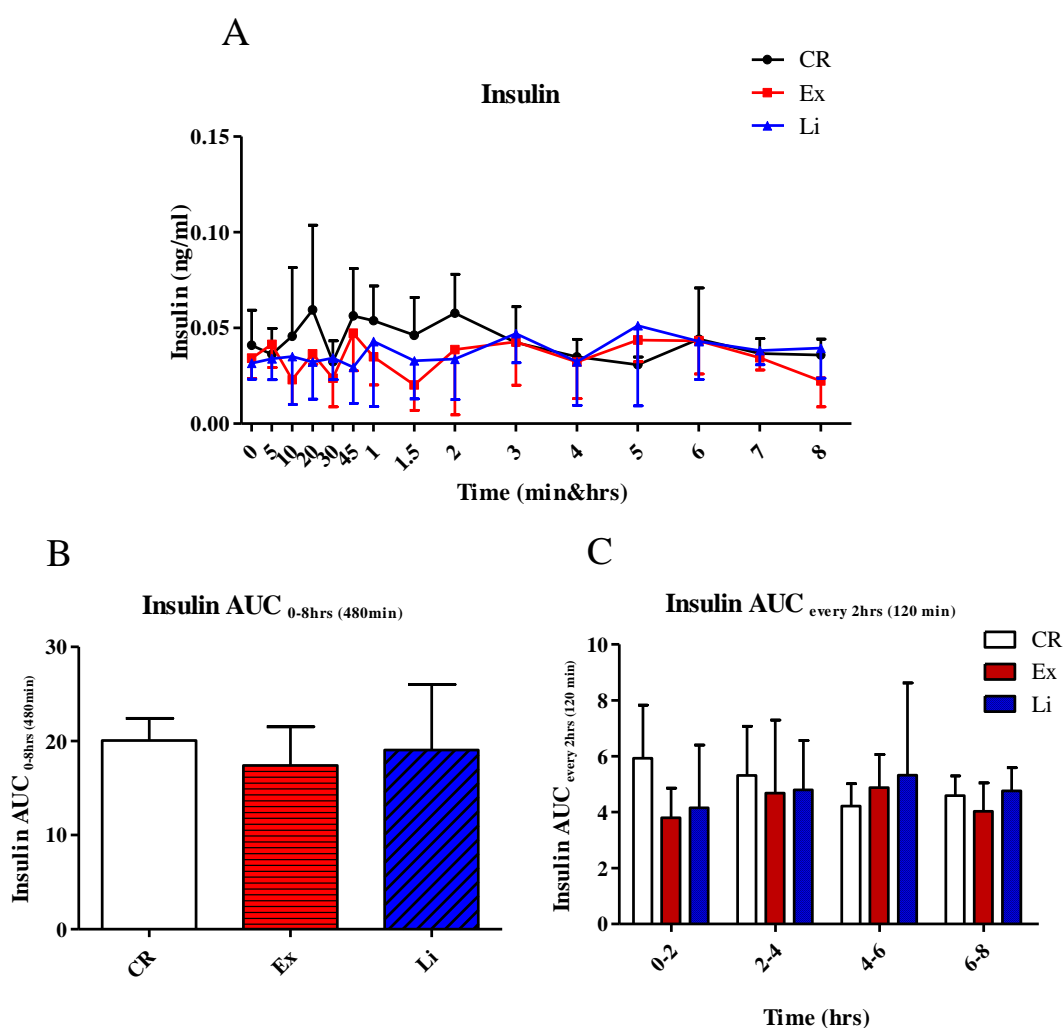
CR 群、Ex 群および Li 群の血清 SP 濃度測定結果を示す (n=5)。(A) 変動曲線、(B) 全体の血清濃度曲線下面積 (AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub>)、(C) 2 時間毎の血清濃度下面積 (AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>) を示す。すべてのグラフにおいて、平均値 (Mean±SD) で示し、変動曲線および AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> の統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を用い、また、AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、One-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなした。



< Fig. 13 > Glucose の変動曲線および AUC (n=5)

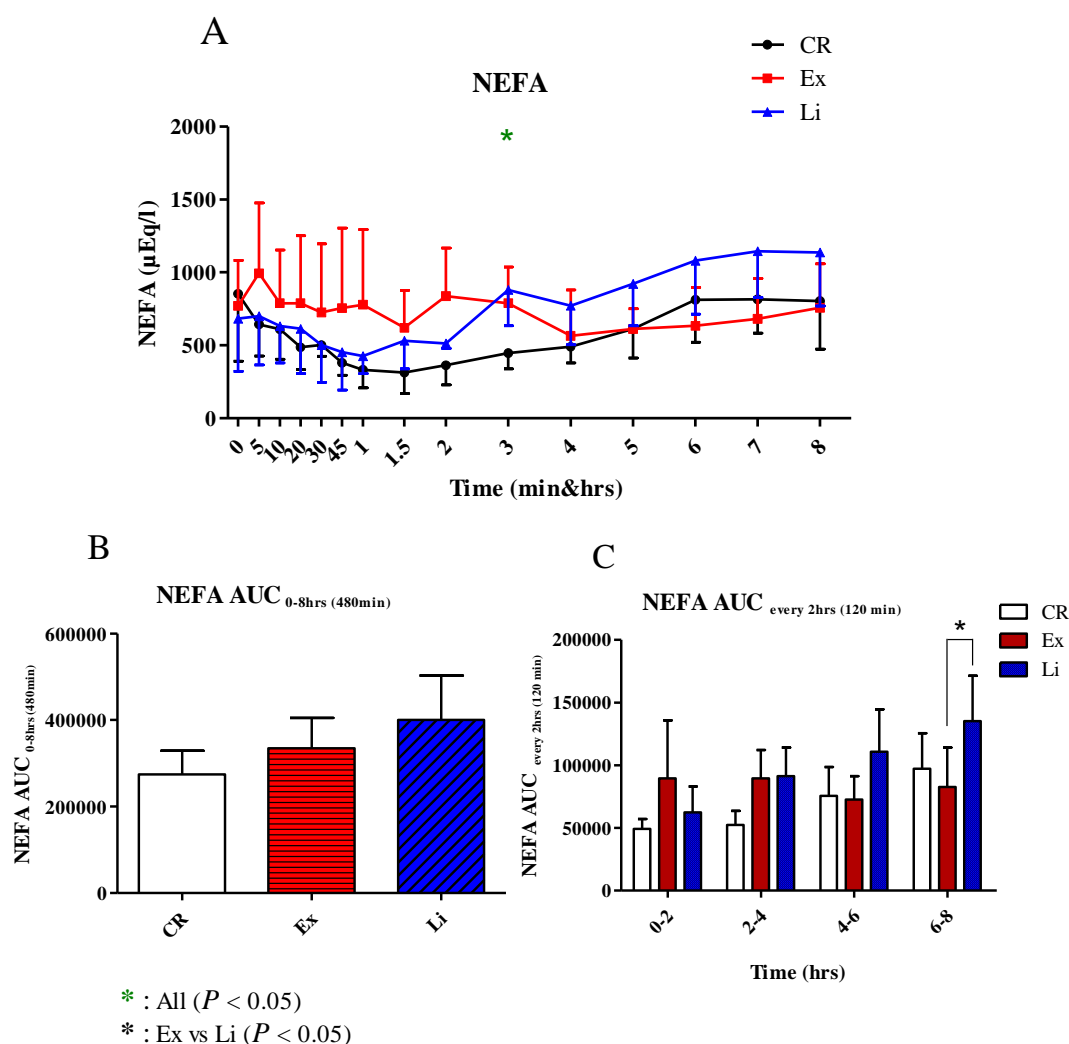
CR 群、Ex 群および Li 群の Glucose 測定結果を示す (n=5)。(A) 変動曲線、(B) 全体の血清濃度曲線下面積 (AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub>)、(C) 2 時間毎の血清濃度下面積 (AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>) を示す。すべてのグラフにおいて、平均値 (Mean ± SD) で示し、変動曲線および AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> の統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を使い、また、AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、One-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなし、グラフ上にてアスタリスク (\*) で示した。有意な差が認められたため、Post hoc test として、Bonferroni post test を行った。





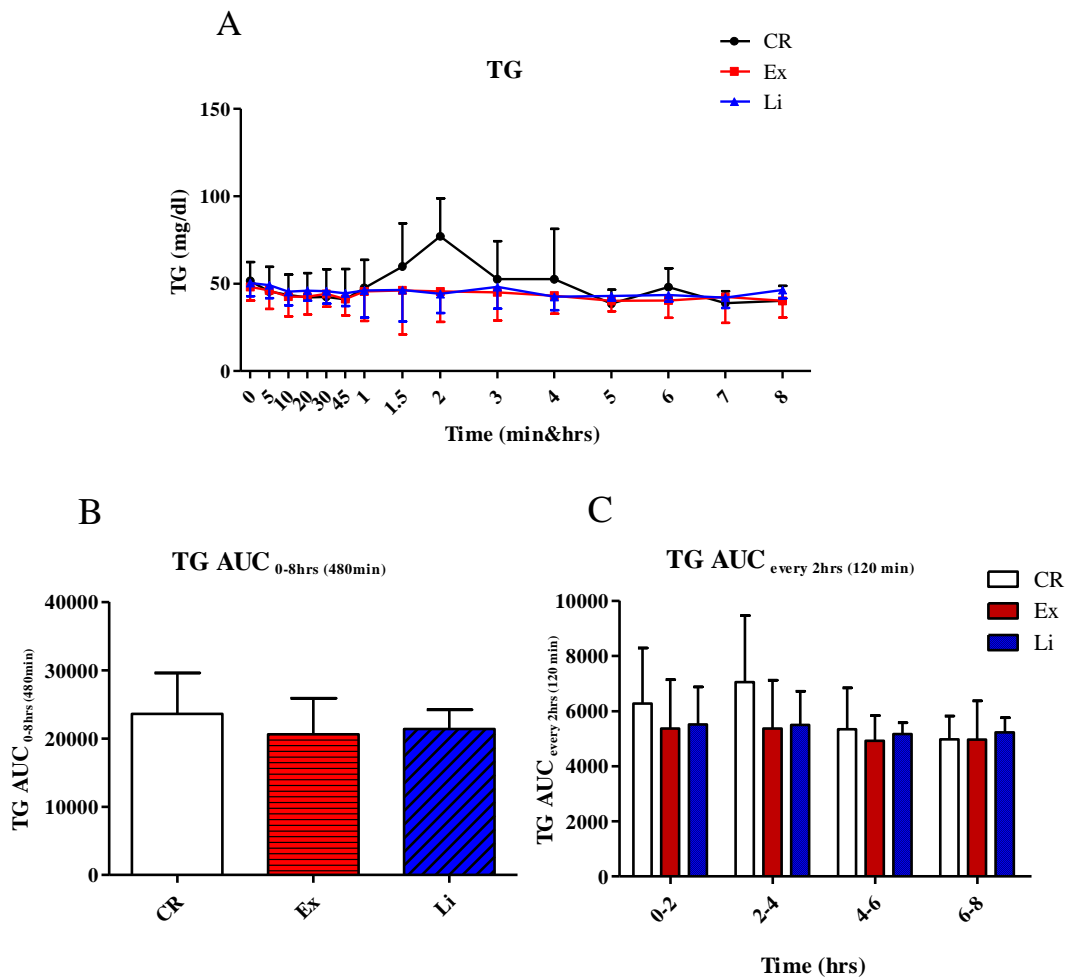
< Fig. 14 > Insulin の変動曲線および AUC (n=5)

CR 群、Ex 群および Li 群の Insulin 測定結果を示す (n=5)。(A) 変動曲線、(B) 全体の血清濃度曲線下面積 (AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub>)、(C) 2 時間毎の血清濃度下面積 (AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>) を示す。すべてのグラフにおいて、平均値 (Mean ± SD) で示し、変動曲線および AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> の統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を使い、また、AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、One-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなした。



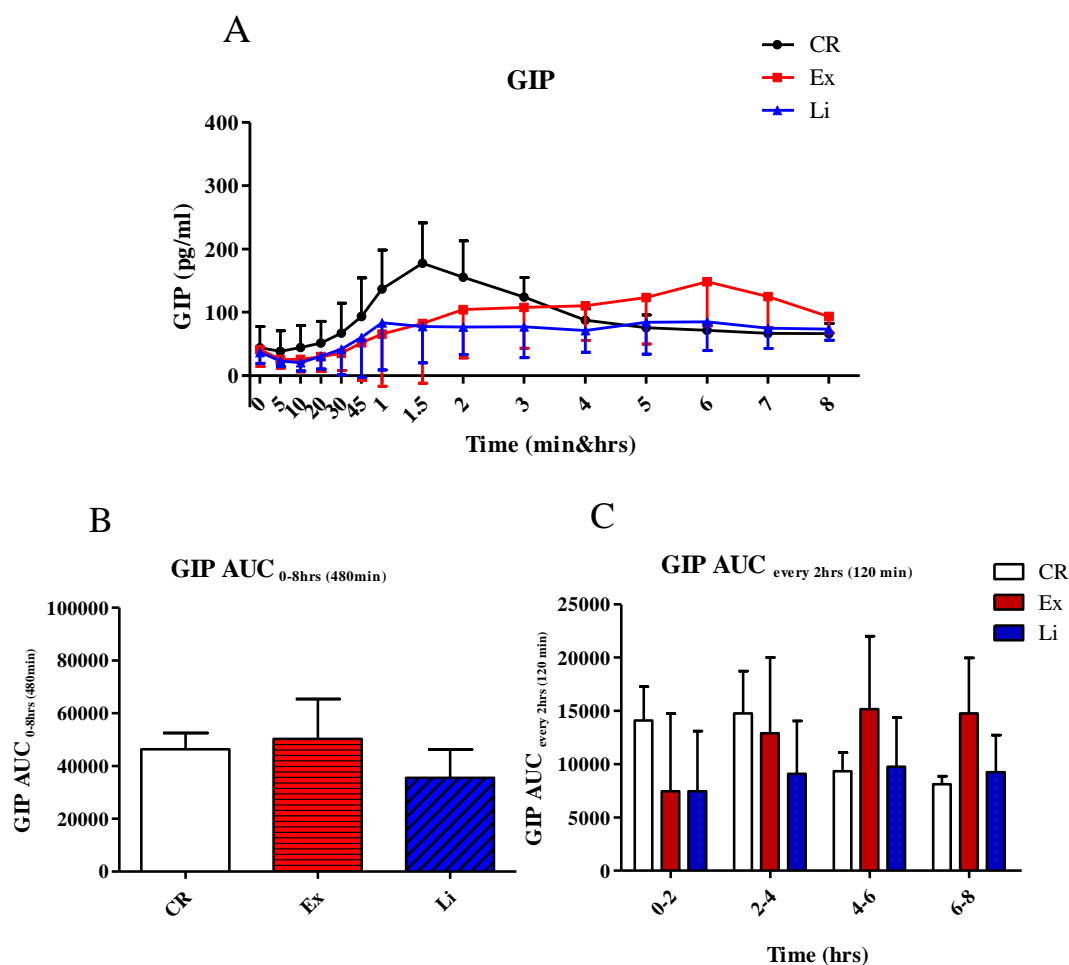
< Fig. 15 > NEFAの変動曲線およびAUC (n=5)

CR群、Ex群およびLi群のNEFA測定結果を示す (n=5)。(A) 変動曲線、(B) 全体の血清濃度曲線下面積 (AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub>)、(C) 2時間毎の血清濃度下面積 (AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>) を示す。すべてのグラフにおいて、平均値 (Mean ± SD) で示し、変動曲線および AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> の統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を用い、また、AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、One-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなし、グラフ上にてアスタリスク (\*) で示した。有意な差が認められたため、Post hoc test として、Bonferroni post test を行った。



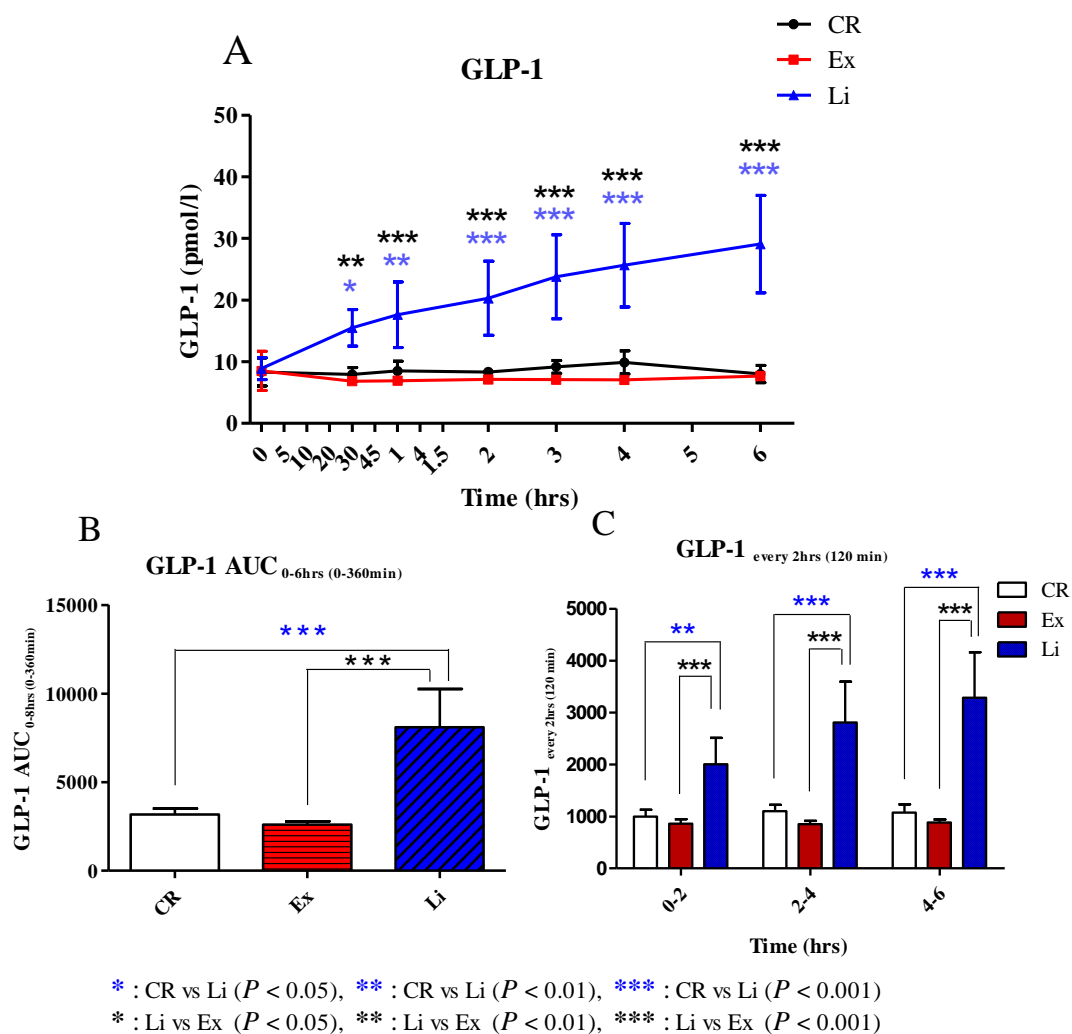
<Fig. 16> TGの変動曲線およびAUC (n=5)

CR群、Ex群およびLi群のTG測定結果を示す (n=5)。(A) 変動曲線、(B) 全体の血清濃度曲線下面積 (AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub>)、(C) 2時間毎の血清濃度下面積 (AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>) を示す。すべてのグラフにおいて、平均値 (Mean ± SD) で示し、変動曲線および AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> の統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を用い、また、AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、One-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなした。



<Fig. 17> GIPの変動曲線およびAUC (n=5)

CR群、Ex群およびLi群のGIP測定結果を示す (n=5)。(A) 変動曲線、(B) 全体の血漿濃度曲線下面積 (AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub>)、(C) 2時間毎の血漿濃度下面積 (AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>) を示す。すべてのグラフにおいて、平均値 (Mean±SD) で示し、変動曲線およびAUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> の統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を用い、また、AUC<sub>0-8hrs (480min)</sub> では、One-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなした。



<Fig. 18> GLP-1 の変動曲線および AUC (n=5)

CR 群、Ex 群および Li 群の GLP-1 測定結果を示す (n=5)。(A) 変動曲線、(B) 全体の血漿濃度曲線下面積 (AUC<sub>0-6hrs (360min)</sub>)、(C) 2 時間毎の血漿濃度下面積 (AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub>) を示す。すべてのグラフにおいて、平均値 (Mean ± SD) で示し、変動曲線および AUC<sub>every 2hrs (120min)</sub> の統計解析には Two-Way Repeated Measures ANOVA を使い、また、AUC<sub>0-6hrs (360min)</sub> では、One-Way Repeated Measures ANOVA を用いた。それぞれの統計において、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとみなし、グラフ上にてアスタリスク (\*) で示した。有意な差が認められたため、Post hoc test として、Bonferroni post test を行った。

## 総括

GLP-1 受容体作動薬は、糖尿病の治療薬であり、血糖依存的にインスリン分泌を促す作用だけでなく、グルカゴン分泌抑制、消化管通過時間遅延などの作用により血糖コントロールを改善する薬剤である。上記作用の中でも食後の血糖値上昇抑制を促す消化管通過時間遅延が重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、イヌにおいては、GLP-1 受容体作動薬における消化管通過時間（胃内容排出時間および小腸通過時間）の遅延に関する報告はなされていない。また、胃内容排出時間および小腸通過時間を簡便に測定する方法として、APAP 法および SASP 法がある。APAP 法は、経口投与した APAP が胃ではほとんど吸収されず、十二指腸で急速に吸収される性質を利用した方法で、血中の APAP 濃度変動から胃内容排出時間を推測できるとされている。SASP 法は、経口投与した SASP が小腸でほとんど吸収分解されず、大腸で分解され、分解された SP が速やかに吸収され血中に出現する性質を利用した方法であり、血中の SP 濃度変動から小腸通過時間を推測できるとされている。しかし、イヌの胃内容排出時間および小腸通過時間を正確に捉えているか明らかにされていない。そこで、本論文では、APAP 法および SASP 法がイヌにおいて正確に測定できるかを検討し、さらにこれらを用い、GLP-1 受容体作動薬がイヌの胃内容排出時間および小腸通過時間におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 第 1 章 イヌにおける血清アセトアミノフェン濃度および血清スルファピリジン濃度測定法の基礎的研究

はじめに、ヒトで簡易に測定できる APAP 検出キットを用いて、健常犬の血清 APAP 濃度の精度・妥当性を調査した。さらに、イヌにおける APAP 投与量を検討した。健常犬 1 頭に APAP を投与し採血した血清サンプルを用いて、同時再現性試験および日差再現性試験を行ったところ、両試験の変動係

数 (CV) は、基準とする 20%以内の良好な再現性が得られた。しかし、希釈直線性試験では、血清サンプルを 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に段階希釈した結果、良好な直線性が得られたが、原点を通過せず、5 µg/ml 未満の血清濃度は正確に評価することができなかった。したがって、APAP 検出キットではイヌの血清 APAP 濃度は測定できるものの、低濃度の測定には適さないことが示された。また、イヌにおける安全で定量可能な APAP 投与量を、健常犬 6 頭に APAP を 10 mg/kg および 20 mg/kg 投与し比較検討したところ、20 mg/kg 投与量で有意な上昇が見られ、さらに副作用が認められなかった。

次に、HPLC を用いて血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の信頼性、精度および妥当性を検討した。信頼性では、健常犬 5 頭のプール血清を用い添加回収試験を行った結果、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の両方で米国の FDA の基準の 80 - 120%内であり、サンプル、試薬および検出反応に干渉する物質が存在しないことが示された。また、精度および妥当性試験では、健常犬 1 頭に APAP および SASP を投与し採血し、高濃度、中濃度および低濃度の各血清サンプルを用いて、同時再現性試験、日差再現性試験を行った。同時再現性試験では、すべての濃度で良好な結果を示した。日差再現性試験では、血清 APAP 濃度の高濃度サンプルのみ CV が、サンプル採取後 10 日で基準とする 20%を超えたため、血清 APAP 濃度測定は、検体採取 7 日以内に実施することで、測定の信頼性が高くなることが示された。希釈直線性試験は、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の高濃度サンプルを用いた結果、良好な直線性を示し、希釈可能であることを示した。

以上のことから、血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の測定には、APAP 検出キットでは難しいが、HPLC を用いて同時に測定できることが分かった。ただし、検体採取 7 日以内に実施する必要がある。また、20 mg/kg の APAP 投与量は安全な用量であり、イヌの胃内容排出時間を正確に評価するために適していると考えられた。

## 第2章 イヌにおけるアセトアミノフェン法およびサラゾスルファピリジン法の消化管通過時間の正確性の検討

まず、小動物に使用される硫酸バリウム含侵ポリエチレン球（以降 BIPS）と、APAP 法および SASP 法を比較検討した。健常犬 4 頭に、ウェットフードに混ぜた BIPS と共に APAP および SASP を投与し、経時的にレントゲン撮影および採血を同時に行った結果、APAP 法では、投与後 0.5 時間で食物はすでに胃から排出され、SASP 法では投与後 4 時間以降で食物が小腸を通過し大腸に到達した結果となった。一方、BIPS の胃内容排出割合は、投与後 10 時間で  $23.10 \pm 22.74\%$  と、10 時間経過しても大部分が胃内に残っており、さらに小腸および大腸の詳細な判別が困難であったため、小腸排出割合を算出することができなかった。したがって、イヌにおける APAP 法および SASP 法が正確な測定法であるかは、BIPS では明らかにすることができなかった。

次に、液体造影剤を用いて、APAP 法および SASP 法の正確性を検討した。さらに、食事の吸収動態を表す血中代謝マーカー（Glucose、Insulin、NEFA および TG）も同時に比較検討した。健常犬 4 頭に、ウェットフードに混ぜた液体造影剤と共に APAP および SASP を投与し、経時的にレントゲン撮影および採血を同時に行った結果、APAP 法では投与後 0.5 時間で食物はすでに胃から排出され、さらにレントゲン画像ではすべてのイヌで 0.5 時間に小腸で液体造影剤が確認されたことから、APAP 法の胃内容排出時間は正確である可能性が高いことが示唆された。一方、SASP 法では、4 頭中 2 頭で SASP 法よりも液体造影剤の方が、小腸通過時間が 2 時間早く現れる傾向にあったが、他の 2 頭では、レントゲン画像と一致したため、約 2 時間のタイムラグがあったものの大きな差異はなく、SASP 法は毎回のレントゲンを撮影することなく小腸通過時間が反映できる鋭敏なマーカーであると考えられた。さらに、血中代謝マーカーでは、Glucose および Insulin では、大きな変動がなかったため比較することができなかった。NEFA および TG の血中動態は、投与後 0.5 時間では、食物が胃から十二指腸に到達し吸収され、食後 4 時間



以降に小腸からの糖や脂肪の吸収が少なくなり、栄養素が吸収された食物が小腸から大腸へ移動し始めたことが示唆され、APAP 法および SASP 法と一致した。

以上のことから、APAP 法および SASP 法は、レントゲンを撮影することなく胃内容排出時間および小腸通過時間を正確に捉えている可能性が高く、さらに NEFA および TG の血中動態とほぼ類似した変動を取ることが考えられた。

### 第 3 章 健常犬における GLP-1 受容体作動薬投与が消化管通過時間に与える影響の検討

GLP-1 受容体作動薬の消化管通過時間を遅延させる作用は、食後の血糖値上昇を抑制する主要なメカニズムであるとされているが、イヌにおいてはそのような報告はなされていない。そこで、本章では、GLP-1 受容体作動薬が、健常犬の消化管通過時間および血中代謝マーカーにおよぼす影響を APAP 法および SASP 法を用い検討した。

本試験では、健常犬 5 頭を用い、GLP-1 受容体作動薬であるエキセナチドまたはリラグルチド、さらにコントロールとして生理食塩水を用いた 3 群で、クロスオーバー法で行った。エキセナチド、リラグルチドまたは生理食塩水を皮下注射し、1 時間後にフード、APAP および SASP を投与し、経時的に採血を行い、血清 APAP 濃度、血清 SP 濃度、Glucose、Insulin、NEFA、TG、GIP および GLP-1 を測定した。本研究の結果では、エキセナチドおよびリラグルチドのどちらも胃内容排出時間の遅延が認められたが、エキセナチドの方が胃内容排出時間の遅延が顕著であった。また、この胃内容排出抑制作用が食後の Glucose、Insulin、TG および GIP 上昇抑制に強く関与した可能性を示唆した。さらに、どちらも小腸通過時間が遅延したが、リラグルチドの方が小腸通過時間の遅延が顕著であり、副作用である軟便も認められたため、小腸での栄養吸収に影響をおよぼし消化器症状を起こしやすい可能性も示唆

された。

本論文では、イヌの血清 APAP 濃度および血清 SP 濃度の HPLC を用いた同時測定法を確立し、APAP 法および SASP 法が健常犬の胃内容排出時間および小腸通過時間を正確に測定していることを確認した。さらに、GLP-1 受容体作動薬が消化管通過時間におよぼす影響を APAP 法および SASP 法を用いて検討した結果、GLP-1 受容体は健常犬の胃内容排出時間および小腸通過時間を遅延させることが分かった。これらの結果は、APAP 法および SASP 法がイヌにおける消化管運動のモニタリングに有用な方法であり、さらに、GLP-1 受容体作動薬は糖尿病犬における新たな治療として血糖コントロールの改善および QOL の向上をもたらす可能性を示した。

## 謝辞

稿を読み終わるに臨み、本研究に際し終始御指導御助言賜りました日本獣医生命科学大学獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門 左向敏紀教授に心から感謝の意を表します。

また、終始御指導御教授を頂いた日本獣医生命科学大学獣医保健看護学臨床部門 石岡克己教授、皆上大吾准教授、水越美奈准教授、百田豊准教授、森昭博講師、小田民美講師、小野沢栄里助教に深謝致します。

さらに、研究の遂行に際して御協力頂いた日本獣医生命科学大学獣医学科生体分子学研究室 田崎弘之教授、佐藤稲子講師、当時同研究室室員だった野澤聡司博士に心より深謝致します。

最後に、本研究の実施に際して多大なる御協力を頂きました、日本獣医生命科学大学獣医保健看護学科獣医保健看護学臨床部門在籍（当時）室員の皆様に心より深謝致します。

結びに、これまで長きに亘り御支援と暖かい励ましにより支えて頂いた家族に心より感謝致します。

## 参考文献

Akiyama, R., Shono, S., Maruyama, N., Ueda, K., Saeki, K., Oda, H., Mori, A. and Sako, T. 2015. Evaluation of different sources of dietary carbohydrate on glucose metabolism parameter in healthy dogs. *J. Pet Anim. Nutr.*, 18(1): 12-17.

Allan, F.J., Guilford, G.W. and Robertson, I.D. 1996. Gastric emptying of solid radiopaque markers in healthy dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound.*, 37(5): 336-344.

Bettge, K., Kahle, M., Abd El Aziz, M.S., Meier, J.J. and Nauck, M.A. 2017. Occurrence of nausea, vomiting and diarrhoea reported as adverse events in clinical trials studying glucagon-like peptide-1 receptor agonists: A systematic analysis of published clinical trials. *Diabetes Obes. Metab.*, 19(3): 336-347.

Blase, E., Taylor, K., Gao, H.Y., Wintle, M. and Fineman, M. 2005. Pharmacokinetics of an oral drug (acetaminophen) administered at various times in relation to subcutaneous injection of exenatide (exendin-4) in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.*, 45(5): 570-577.

Bond, J.H.Jr., Levitt, M.D. and Prentiss, R. 1975. Investigation of small bowel transit time in man utilizing pulmonary hydrogen (H<sub>2</sub>) measurements. *J. Lab. Clin. Med.*, 85(4): 546-555.

Bozkurt, A., Naslund, E., Holst, J.J. and Hellstrom, P.M. 2002. GLP-1 and

GLP-2 act in concert to inhibit fasted, but not fed, small bowel motility in the rat. *Regulatory. Peptides.*, 107(1-3): 129-135.

Burns, J. and Fox, SM. 1986. The use of a barium meal to evaluate total gastric emptying time in the dog. *Vet. Radiol.*, 27(6): 169-172.

Campbell, J.E. and Drucker, D.J. 2013. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell. Metab.*, 17(6): 819-837.

Chandler, M.L., Guilford, G. and Lawoko, C.R. 1997. Radiopaque markers to evaluate gastric emptying and small intestinal transit time in healthy cats. *J. Vet. Intern. Med.*, 11: 361-364.

Creutzfeldt, W.O., Kleine, N., Willms, B., Orskov, C., Holst, J.J. and Nauck, M.A. 1996. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care.*, 19(6): 580-586.

Dasgupta, A., Dean, R., Saldana, S., Kinnaman, G. and McLawhon, R. W. 1994. Absorption of therapeutic drugs by barrier gels in serum separator blood collection tubes. Volume- and time-dependent reduction in total and free drug concentrations. *Am. J. Clin. Pathol.*, 101: 456-461.

Deane, A.M., Chapman, M.J., Fraser, R.J., Summers, M.J., Zaknic, A.V., Storey, J.P., Jones, K.L., Rayner, C.K. and Horowitz, M. 2010. Effects of exogenous glucagonlike peptide-1 on gastric emptying and glucose absorption in the critically ill: relationship to glycemia. *Crit. Care. Med.*,

38(5): 1261-1269.

DeFronzo, R.A., Okerson, T., Viswanathan, P., Guan, X., Holcombe, J.H. and MacConell, L. 2008. Effects of exenatide versus sitagliptin on postprandial glucose, insulin and glucagon secretion, gastric emptying, and caloric intake: a randomized, cross-over study. *Curr. Med. Res. Opin.*, 24(10): 2943-2952.

Degn, K.B., Brock, B., Juhl, C.B., Djurhuus, C.B., Grubert, J., Kim, D., Han, J., Taylor, K., Fineman, M. and Schmitz, O. 2004. Effect of intravenous infusion of exenatide (synthetic exendin-4) on glucose-dependent insulin secretion and counterregulation during hypoglycemia. *Diabetes.*, 53(9): 2397-2403.

Drucker, D.J. 2006. The biology of incretin hormones. *Cell. Metab.*, 3(3): 153-165.

Drucker, D.J. and Nauck, M.A. 2006. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.*, 368(9548): 1696-1705.

Drucker, D.J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W.L. and Habener, J.F. 1987. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84(10): 3434-3438.

Dupré, J., Behme, M.T. and McDonald, T.J. 2004. Exendin-4 normalized

postcibal glycemic excursions in type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89(7): 3469-3473.

Edwards, C.M., Stanley, S.A, Davis, R., Brynes, A.E., Frost, G.S., Seal, L.J., Ghatei, M.A. and Bloom, S.R..2001. Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 281: 155-161.

Farilla, L., Bulotta, A., Hirshberg, B., Li Calzi, S., Khoury, N., Noushmehr, H., Bertolotto, C., Di Mario, U., Harlan, D.M. and Perfetti, R. 2003. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinol*, 144(12): 5149-5158.

Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A., Di Mario, U. and Perfetti, R. 2002. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinol*, 143(11): 4397-4408.

Ghazi, T., Rink, L., Sherr, J.L and Herold, K.C. 2014. Acute metabolic effects of exenatide in patients with type 1 diabetes with and without residual insulin to oral and intravenous glucose challenges. *Diabetes Care.*, 37(1): 210-216.

Ghoos, Y.F., Maes, B.D., Geypens, B.J., Mys, G., Hiele, M.I., Rutgeerts, P.J. and Vantrappen, G. 1993. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon labeled octanoic acid beath test. *Gastroenterol.*, 104: 1640-1647.

Giralt, M. and Vergara, P. 1999. Glucagon like peptide-1 (GLP-1) participation in ileal brake induced by intraluminal peptones in rat. *Dig. Dis. Sci.*, 44(2): 322-329.

Goggin, J.M., Hoskinson, J.J., Kirk, C.A., Jewell, D. and Butine, M.D. 1999. Comparison of gastric emptying times in healthy cats simultaneously evaluated with radiopaque markers and nuclear scintigraphy. *Vet. Radiol. Ultrasound.*, 40(1): 89-95.

Hansen, L., Deacon, C.F., Orskov, C. and Holst, J.J. 1999. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinol.*, 140: 5356-5363.

Harasawa, S., Tani, N., Suzuki, S., Miwa, M., Sakita, R., Nomiyama, T. and Miwa T. 1979. Gastric emptying in normal subjects and patients with peptic ulcer: a study using the acetaminophen method. *Gastroenterol. Jpn.*, 14: 1-10.

Heading, R.C., Nimmo, J., Prescott, L.F. and Tothill, P. 1973. The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. *Br. J. Pharmacol.*, 47: 415-421.

Heading, R.C., Tothill, P., McLoughlin, G.P. and Shearman, D.J. 1976. Gastric emptying rate measurement in man. A double isotope scanning technique for simultaneous study of liquid and solid components of a meal.



*Gastroenterol.*, 71: 45-50.

Hellström, P.M., Näslund, E., Edholm, T., Schmid, P.T., Kristensen, J., Theodorsson, E., Holst, J.J. and Efendic, S. 2008. GLP-1 suppresses gastrointestinal motility and inhibits the migrating motor complex in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.*, 20(6): 649-659.

Hernot, D.C., Dumon, H.J., Biourge, V.C., Martin, L.J. and Nguyen, P.G. 2006. Evaluation of association between body size and large intestinal transit time in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 67(2): 342-347.

Hinder, R.A. and Kelly, K.A. 1977. Canine gastric emptying of solids and liquids. *Am. J. Physiol.*, 233(4): 335-340.

Hinton, J.M., Lennard-Jones, J.E. and Young, A.C. 1969. A new method for studying gut transit times using radioopaque markers. *Gut.*, 10: 842-847.

Hirakawa, M., Iida, M., Kohrogi, N. and Fujishima, M. 1998. Hydrogen breath test assessment of orocecal transit time: comparison with barium meal study. *Am. J. Gastroenterol.*, 83:1361-1363.

Horowitz, M., Flint, A., Jones, K.L., Hindsberger, C., Rasmussen, M.F., Kapitza, C., Doran, S., Jax, T., Zdravkovic, M. and Chapman, I.M. 2012. Effect of the once-daily human GLP-1 analogue liraglutide on appetite, energy intake, energy expenditure and gastric emptying in type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 97(2): 258-266.

Imeryüz, N., Yeğen, B.C., Bozkurt, A., Coşkun, T., Villanueva-Peñacarrillo, M.L. and Ulusoy, N.B. 1997. Gucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 273: 920-927.

Ionut, V., Zheng, D., Stefanovski, D. and Bergman, R.N. 2008. Exenatide can reduce glucose independent of islet hormones or gastric emptying. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 295(2): 269-277.

Johnson, R.A., Kierski, K.R. and Jones, B.G. 2017. Evaluation of gastric emptying time, gastrointestinal transit time, sedation score, and nausea score associated with intravenous constant rate infusion of lidocaine hydrochloride in clinically normal dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 78(5): 550-557.

Juhl, C.B., Hollingdal, M., Sturis, J., Jakobsen, G., Agersø, H., Veldhuis, J., Pørksen, N. and Schmitz, O. 2002. Bedtime administration of NN2211, a long-acting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(2): 424-429.

Kennedy, M., Chinwah, P. and Wade, D.N. 1979. A pharmacological method of measuring mouth to caecal transit time in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 8: 372-373.

Kielgast, U., Holst, J.J. and Madsbad, S. 2011. Antidiabetic actions of endogenous and exogenous GLP-1 in type 1 diabetic patients with and without residual  $\beta$ -cell function. *Diabetes*, 60(5): 1599-1607.

Kielgast, U., Krarup, T., Holst, J.J. and Madsbad, S. 2011. Four weeks of treatment with liraglutide reduces insulin dose without loss of glycemic control in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. *Diabetes Care.*, 34(7): 1463-1468.

Koizumi, F., Kawamura, T., Ishimori, A., Ebina, H. and Satoh, M. 1988. Plasma paracetamol concentrations measured by fluorescence polarization immunoassay and gastric emptying time. *Tohoku J. Exp. Med.*, 155: 159-164.

Kolterman, O.G., Buse, J.B., Fineman, M.S., Gaines, E., Heintz, S., Bicsak, T.A., Taylor, K., Kim, D., Aisporna, M., Wang, Y. and Baron, A.D. 2003. Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88: 3082-3089.

Kreymann, B., Williams, G., Ghatei, M.A. and Bloom, S.R. 1987. Glucagon-like peptide-17-36: a physiological incretin in man. *Lancet.*, 330(8571): 1300-1304.

Landt, M. Smith, C.H. and Hortin, G.L. 1993. Evaluation of evacuated blood-collection tubes: effects of three types of polymeric separators on therapeutic drug-monitoring specimens. *Clin. Chem.*, 39(8): 1712-1717.

Lester, N.V., Roberts, G.D., Newell, S.M., Graham, J.P. and Hartless, C.S. 1999. Assessment of barium impregnated polyethylene spheres (BIPS®) as

a measure of solid-phase gastric emptying in normal dogs-comparison to scintigraphy. *Vet. Radiol. Ultrasound.*, 40(5): 465-471.

Linnebjerg, H., Park, S., Kothare, P.A., Trautmann, M.E., Mace, K., Fineman, M., Wilding, I., Nauck, M. and Horowitz, M. 2008. Effect of exenatide on gastric emptying and relationship to postprandial glycemia in type 2 diabetes. *Regul. Pept.*, 151(1-3): 123-129.

MacNaughton, S. M. 2003. Acetaminophen toxicosis in a Dalmatian. *Can. Vet. J.*, 44: 142-144.

Maddern, G., Miners, J., Collins, P.J. and Jamieson, G.G. 1985. Liquid gastric emptying assessed by direct and indirect techniques : Radionuclide labelled liquid emptying compared with a simple paracetamol marker method. *Aust. N.Z.J. Surg.*, 55: 203-206.

Marathe, C.S., Rayner, C.K., Jones, K.L. and Horowitz, M. 2011. Effects of GLP-1 and incretin-based therapies on gastrointestinal motor function. *Exp. Diabetes Res.*, 2011: 279530.

Marsh, R.H.K., Spencer, R. and Nimmo, W.S. 1984. Gastric emptying and drug absorption before surgery. *Brit. J. Anaesth.*, 56: 161-164.

Meier, J.J., Kemmeries, G., Holst, J.J. and Nauck, M.A. 2005. Erythromycin antagonizes the deceleration of gastric emptying by glucagon-like peptide 1 and unmasks its insulinotropic effect in healthy subjects. *Diabetes*, 54(7): 2212-2218.

Meier, J.J. and Nauck, M.A. 2005. Glucagon-like peptide 1(GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 21(2): 91-117.

Mentlein, R. 1999. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.*, 85(1): 9-24.

Miyabayashi, T. and Morgan, J.P. 1984. Gastric emptying in the normal dog. *Vet. Radiol.*, 25(4): 187-191.

Miyabayashi, T., Morgan, J.P., Atilola, M.A.O. and Muhumuza, L. 1986. Small intestinal emptying time in normal beagle dogs. *Vet. Radiol.*, 27(6): 164-168.

Mizuta, H., Kawazoe, Y., Haga, K. and Ogawa, K. 1990. Effects of meals on gastric emptying and small intestinal transit times of a suspension in the beagle dog assessed using acetaminophen and salicylazosulfapyridine as markers. *Chem. Pharm. Bull.*, 38(8): 2224-2227.

Mizuta, H., Kawazoe, Y., Haga, K., Ogawa, K. and Yokobe, T. 1989. Determination of small intestinal transit time in beagle dogs using salicylazosulfapyridine. *Yakugaku zasshi*, 109(10): 760-765.

Mossi, S., Meyer-Wyss, B., Beglinger, C., Schwizer, W., Fried, M., Ajami, A. and Brignoli, R. 1994. Gastric emptying of liquid meals measured noninvasively in humans with [<sup>13</sup>C] acetate breath test. *Dig. Dis. Sci.*, 39: 107-109.

Nauck, M.A., Heimesaat, M.M., Behle, K., Holst, J.J., Nauck, M.S., Ritzel, R., Hübner, M. and Schmiegel, W.H. 2002. Effects of Glucagon-Like Peptide 1 on Counterregulatory Hormone Responses, Cognitive Functions, and Insulin Secretion during Hyperinsulinemic, Stepped Hypoglycemic Clamp Experiments in Healthy Volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(3): 1239-1246.

Nauck, M.A., Kemmeries, G., Holst, J.J. and Meier, J.J. 2011. Rapid tachyphylaxis of the glucagon-like peptide 1-induced deceleration of gastric emptying in humans. *Diabetes*, 60(5): 1561-1565.

Nelson, O.L., Jergens, A.E., Miles, K.G. and Christensen, W.F. 2001. Gastric emptying as assessed by barium-impregnated polyethylene spheres in healthy dogs consuming a commercial kibble ration. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 37(5): 444-452.

Oda, H., Mori, A., Lee, P., Saeki, K., Ishioka, K., Arai, T. and Sako, T. 2013. Characterization of the use of liraglutide for glycemic control in healthy and Type 1 diabetes mellitus suffering dogs. *Res. Vet. Sci.*, 95(2): 981-988.

Plamboeck, A., Veedfald, S., Deacon, C.F., Hartmann, B., Wettergren, A., Svendsen, L.B., Meisner, S., Hovendal, C., Vilsbøll, T., Knop, F.K. and Holst, J.J. 2013. The effect of exogenous GLP-1 on food intake is lost in male truncally vagotomized subjects with pyloroplasty. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 304(12): 1117-2117.

Quattrocchi, F., Karnes, H.T., Robinson, J.D. and Hendeles, L. 1983. Effect of serum separator blood collection tubes on drug concentrations. *The Drug Monit.*, 5(3): 359-362.

Rao, S.S., Camilleri, M., Hasler, W.L., Maurer, A.H., Parkman, H.P., Saad, R., Scott, M.S., Simren, M., Soffer, E. and Szarka, L. 2011. Evaluation of gastrointestinal transit in clinical practice: position paper of the American and European Neurogastroenterology and Motility Societies. *Neurogastroenterol Motil.*, 23(1): 8-23.

Richardson, A. J. 2000. Management of acetaminophen and ibuprofen toxicoses in dogs and cats. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 10: 285-291.

Schmitz, S., Fink, T., Failing, K., Borsch, C., Kunz, C., Clemence, R., Savary-Bataille, K. and Neiger, R. 2016. Effects of the neurokinin-1 antagonist maropitant on canine gastric emptying assessed by radioscintigraphy and breath test. *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere. Heimtiere.*, 44(3): 163-169.

Sjödin, L., Visser, S. and Al-Saffar, A. 2011. Using pharmacokinetic modeling to determine the effect of drug and food on gastrointestinal transit in dogs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 64(1): 42-52.

Sparkes, A.H., Papasouliotis, K., Barr, F.J. and Gruffydd-Jones, T.J. 1997. Reference ranges for gastrointestinal transit of barium-impregnated polyethylene spheres in healthy cats. *J. Small. Anim. Pract.*, 38(8): 340-343.

Takayama, M., Fujisawa, M., Hori, Y., Oda, A., Katsuyama, S., Hirose, Y., Yamazaki, K. and Wakabayashi, H. 2008. Clinical usefulness of the Acetaminophen Detection Kit ® in treating acute poisoning –Data from a survey of 28 cases treated at Niigata city general hospital. *Yakugaku Zasshi*, 128: 159-163.

Tourrel, C., Bailbé, D., Meile, M.J., Kergoat, M. and Portha, B. 2001. Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes*, 50(7): 1562-1570.

van Can, J, Sloth, B., Jensen, C.B., Flint, A., Blaak, E.E. and Saris, W.H. 2014. Effects of the once-daily GLP-1 analog liraglutide on gastric emptying, glycemic parameters, appetite and energy metabolism in obese, non-diabetic adults. *Int. J. Obes. (Lond)*., 38(6): 784-793.

Wajcberg, E. and Amarah, A. 2010. Liraglutide in the management of type 2 diabetes. *Drug Des. Devel. Ther.*, 4: 279-290.

Weber, M.P., Martin, L.J., Biourge, V.C., Nguyen, P.G. and Dumon, H.J. 2003. Influence of age and body size on orocecal transit time as assessed by use of the sulfasalazine method in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 64(9): 1105-1109.

Weber, M.P., Stambouli, F., Martin, L.J., Dumon, H.J., Biourge, V.C. and Nguyen, P.G. 2002. Influence of age and body size on gastrointestinal



transit time of radiopaque markers in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 63(5): 677-682.

Werner, U. 2014. Effects of the GLP-1 receptor agonist lixisenatide on postprandial glucose and gastric emptying--preclinical evidence. *J. Diabetes Complications*, 28(1): 110-114.

Wettergren, A., Wøjdemann, M. and Holst, J.J. 1998. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastropancreatic function by inhibiting central parasympathetic outflow. *Am. J. Physiol.*, 275(5): 984-992.

Wyse, C.A., McLellan, J., Dickie, A.M., Sutton, D.G., Preston, T. and Yam, P.S. 2003. A review of methods for assessment of the rate of gastric emptying in the dog and cat: 1898-2002. *J. Vet. Intern. Med.*, 17(5): 609-621.

Yamasaki, K., Furuya, Y., Setoguchi, N., Hidaka, M., Iwakiri, T., Okumura, M., Kodama, H. and Arimori, K. 2005. Change in drug concentration in serum stored in sterilized vacuum tubes for serum separation. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, 31: 537-543.

Zhang, J., Tokui, Y., Yamagata, K., Kozawa, J., Sayama, K., Iwahashi, H., Okita, K., Miuchi, M., Konya, H., Hamaguchi, T., Namba, M., Shimomura, I. and Miyagawa, J.I. 2007. Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia.*, 50(9): 1900-1909.

泉文 明, 川村 武石, 森 章. 1989. ストレプトゾトシン糖尿病犬における胃排出時間と血中ガストリンならびに膵ポリペプチド動態. 日消誌, 86(5): 1037-1043.

緒方 正信, 八尾 亘良. 1992. 日本人の Crohn 病における乳糖吸収不良に関する研究. 日消誌, 89 (11): 2655-2663.

岩崎利郎, 辻本元. 小動物の臨床栄養学第 5 版. 学窓社株式会社, 2014: 1023.

伏木亭, 吉田宗弘. 改訂 基礎栄養学. 株式会社光生館, 2011: 57-77.

U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). 2001. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation

日本栄養・食糧学会. 脂質栄養と健康. 株式会社建帛社, 2005: 123-132.