

はじめに

潰瘍性大腸炎は若年～青年層に好発し、再燃を繰り返す原因不明の難病で、1975年より特定疾患治療研究対象疾患に指定され、2015年1月からは指定難病となり、医療費補助対象疾患となっています。本邦においても患者数は増加傾向にあり、現在16万人を超えています。原因が不明で根治療法がない現状では、病勢をコントロールし、正常の社会生活を継続できる事が本疾患の治療目標となっています。しかし、種々の薬剤に治療抵抗性を示す症例も多く、新たな治療薬の開発が切に望まれています。

アドレノメデュリンは、全身炎症性反応症候群動物モデルの臓器障害を軽減させることが判明し、抗炎症作用を発揮することが明らかになっています。また、大腸潰瘍モデルラットおよび大腸炎モデルマウスにおいて、アドレノメデュリンが炎症改善作用を有することが判明しています。さらに、アドレノメデュリンはステロイド抵抗性の潰瘍性大腸炎患者の臨床症状、内視鏡所見を改善し、顕著な粘膜修復作用を有することが明らかとなっています。

以上の結果を踏まえ、本治験は日本で発見されたアドレノメデュリンの申請承認を目的とし、皆様方のご協力をお願いしたいと考えております。

これから、詳しい内容をご説明しますので、分からない言葉や表現、疑問点等があればどんなことでも遠慮せずに担当医師に聞いて下さい。分からないことは何度でも質問していただいて構いません。

目次

1. 治験とは.....	2
2. 治験が研究を伴うこと.....	3
3. 今回の治験の目的.....	3
4. 今回の治験の方法.....	3
5. 予測される治験上の利益および不利益.....	6
6. 健康被害が起きた際の処置および補償.....	6
7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること.....	6
8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合.....	7
9. 治験への参加が中止となる場合.....	7
10. あなたに関わるプライバシーが守られていること.....	7
11. 治験中の費用について.....	8
12. あなたへの金銭等の支払い.....	8
13. 今回の治験を担当する医師.....	8
14. 治験に関する相談窓口.....	9

1. 治験とは

「治験」とは、新しいお薬が病気に対して本当に効果があるのかどうか、また、どんな副作用がどのくらいあるのかなどについて、多くの方に協力してもらい調べることです。

薬が誕生するまでには、次のような過程をたどります。

薬の誕生まで

第1相試験

新薬の開発において、動物実験で有効性・安全性が確認されると、次のステップとしてヒトを対象とした臨床試験をおこないます。その最初に実施されるのが第1相試験であり、安全性の確認を目的としています。原則として健康な成人男性が対象となります。

今回の治験はこの段階になります。

第2相試験

第2相試験とは、第1相試験で治験薬の安全性（耐容性）と薬物動態を明らかにした後、その有効性が期待される患者を対象に、用法・用量などを検討する試験です。

第3相試験

第3相試験とは、第2相試験で治験薬の有効性が期待された後、さらに有効性・安全性を確認するために、多数の患者を対象に多数の施設で行われる試験のことです。最近では国際的に何万人、何十万人規模の患者を対象に行われることも多くなってきました。

第4相試験

第4相試験とは、医薬品承認後に行われる治療的使用で承認前以上の知見を得るために行われる全ての臨床試験（市販後調査を除く）を指します。第3相試験までの治験では申請-認可に必要な最小限の情報が得られたわけであり、市販後に思わぬ有害性が明らかとなったり、有効性に疑問を生じたりすることも十分予想されます。

治験で調べるお薬のことを「治験薬」といいます。患者さんに使用する前には、いろいろな動物を使って、治験薬の効果や安全性を確かめますが、人に用いるお薬である以上、人における効果や副作用を調べなければなりません。

治験は、国（厚生労働省）に届け出をした後、国が定めたルールに従って行われます。現在、病院や薬局で処方・調剤されているお薬は、治験で効果や副作用を調べたのち、国から承認されたものです。

「治験」にはこれまでも多くの方が参加されています。治験は、参加される方の善意に基づくボランティアです。治験にご協力頂ける方がいない限り、薬は誕生しません。つまり、治験に参加するという事は、結果的に、病気で苦しんでいる人の為にもなり、「創薬ボランティア」として社会に貢献する事に繋がります。この治験はあらかじめ厚生労働省に届け出をし、治験に参加される方の権利を守るために、治験実施機関の治験審査委員会において、倫理的かつ科学的に問題ないことが調査、審議されたうえで、病院長の了承のもとで実施されています。

倫理委員会名称等：宮崎大学医学部附属病院治験審査委員会

宮崎市清武町木原 5200

設置者：宮崎大学医学部附属病院長 吉原 博幸

2. 治験が研究を伴うこと

治験は、治験薬の効果や安全性を詳しく調べることを目的としています。必要なデータを得るために、あなたの症状を把握するための採血、尿検査などをお願いすることになります。

3. 今回の治験の目的

今回の治験の目的は、治験薬（アドレノメデュリン）の安全性の確認です。アドレノメデュリンは元々生体内にある生理活性物質で、血管を拡張して血圧を低下させる作用があります。そこで、今回の治験では、血圧、心拍数、体温、呼吸数、といった理学的検査や、血液検査、心電図検査により、安全性を確認します。また、治験薬の血液中の濃度も測定します。

4. 今回の治験の方法

最初に、あなたがこの治験への参加を希望されるかどうか確認させていただきます。

本説明文書を最後まで読み、説明を受けた後、治験への参加に同意される場合は、添付の同意文書に署名して下さい。その後、治験の参加に適しているかどうかを確認する為、診察・検査を受けて頂きます。治験対象者は健康な成人男性（20歳～65歳）で、何らかの治療を受けていない方ですが、事前の診察・検査にて治験に参加する基準を満たしていない場合は、参加頂くことができません。

治験に参加頂く方には、プラセボ（アドレノメデュリンの有効成分を含有しない）または低、中、高用量のいずれかのアドレノメデュリン（実薬）を静脈内に12時間持続点滴して頂きます。試験の公平性を確保するため、プラセボと実薬の外観は等しく、治験を実施する医師にもどの薬剤が投与されるか事前にはわからないようになっています。

4-1 治験への参加予定期間

参加予定期間は、2泊3日の入院です。なお、入院2日前から投与終了24時間後までは、アルコール、カフェイン含有飲食物およびグレープフルーツの摂取及び喫煙を禁止いたします。

4-2 治験のスケジュール

◆同意いただいた日から治験薬の最初の使用まで

あなたがこの治験の参加に適しているかどうかを確認するために検査を行います。検査では、治験を行っても安全かどうかを確認する検査（問診、診察、血液検査、心電図検査など）を行います。この検査で、今回の治験に参加する基準を満たしていないことが分かった場合は、この治験に参加頂くことができません。

◆治験薬の投与

上記の検査が終了した後、参加いただけることが確認されましたら、治験薬の投与を行います。投与試験前日夕方17時より投与試験翌日午前10時まで入院していただきます。

(1) 治験薬の使用について

試験開始日より、プラセボ（アドレノメデュリンの有効成分を含有せず）又は低用量（3 ng/kg/min）、中用量（9 ng/kg/min）、高用量（15 ng/kg/min）のいずれかのアドレノメデュリンを静脈内に12時間持続点滴して頂きます。担当医師もあなたもどの薬剤が投与されるか事前にはわからないようになっています。

(2) 検査、採血について

治験薬の効果や副作用等の有無を評価するために、自・他覚症状の検査、理学的検査、心電図、臨床検査を行います。

- ①医師の問診は、治験薬投与前、投与開始30分、1、4、8、12時間後、そして投与終了1時間後、及び翌日に受けて下さい。
- ②血圧、心拍数の検査は、治験薬投与前、投与開始30分、1、2、4、6、8、10、12時間後、そして投与終了1、2時間後、及び翌日に受けて下さい。
- ③体温、呼吸数の検査は、治験薬投与前、投与開始1、4、8、12時間後、投与終了1時間後、及び翌日に受けて下さい。
- ④12誘導心電図は、治験薬投与前、投与中（10～12時間後）、投与終了12時間後に受けてください。加えて、モニター心電図は、治験薬投与前よ

り試験終了まで観察します。

⑤臨床検査のための採血は、治験薬投与前、投与前（10時間後）、並びに投与終了後（投与開始より12時間20分後、及び翌朝）に行います。採血量は各々17.5mLです。検査項目は末梢血液検査、血液生化学検査およびホルモン検査を含みます。

その他、アドレノメデュリンの血中濃度測定のため、治験薬投与前、投与前開始後、5分、10分、20分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、投与終了後は、2分、5分、10分、20分、30分、1時間、2時間、及び12時間後に採血を行います。採血量は各々2mLです。

また、尿検査を治験薬投与前、投与終了後（翌日）に行います。

スケジュール表

	同意日	スクリーニング検査	入院日	治験薬投薬日																24 hr	退院日			
				投与前	0 min	5 min	10 min	20 min	30 min	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr	10 hr	12 hr	12 hr 2 min	12 hr 5 min	12 hr 10 min			12 hr 20 min	12 hr 30 min	13 hr
文書同意取得	●																							
適格性確認		●		●																				
治験薬投薬					←																			→
食事			●								●													
診察		●	●	●				●	●		●		●								●			●
自覚症状			←																					→
血圧・脈拍数	●		●	●				●	●	●	●	●	●	●							●	●		●
体温・呼吸数	●		●	●				●		●		●		●							●			●
身長・体重	●	●#																						
EOG(12誘導)	●		●										●											●
EOG(モニター)			←																					→
臨床検査	●		●										●								●*			●
免疫検査	●																							
採尿	●		●																					●
薬物動態用採血			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

4-3 治験を中止する場合および治験が終了した後の診察・検査

治験の途中で、あなたから治験への参加を取りやめたい旨の申し出があった場合や、何らかの理由により治験を中止したときは、その時点で診察や検査をします。その他にも、あなたの調子が悪くなった場合には診察や検査をすることがあります。また、副作用が認められた場合などでは、治験が終了した後や治験を中止した後、担当医師の判断により、必要に応じて診察や検査を継続することがあります。その場合は担当医師から説明があります。

4-4 治験に参加する予定の人数

今回の治験には、24名の方に参加頂く予定です。

5. 予測される治験上の利益および不利益

5-1 この治験薬（アドレノメデュリン）の使用によって期待される効果

この治験薬は、潰瘍性大腸炎の患者さんのためのお薬です。潰瘍性大腸炎の患者さんにとっては、粘膜病変改善作用が期待されます。しかし、今回は第1相試験であり、健康な成人男子を対象とした安全性を確認する試験ですので、あなたにはこれらの効果は期待できず、治験参加による利益はないと思われます。

5-2 予想される治験上の不利益

この治験薬は、血管を拡張する作用があります。血管拡張により、①血圧低下 ②心拍数増加 ③頭痛 ④顔のほてり が現れる可能性があります。

6. 健康被害が起きた際の処置および補償

この治験に関連して、治験期間中にあなたに何らかの健康被害（副作用等の体の異常）が起きた際には、適切な治療が受けられます。さらに、必要に応じ補償の請求ができ、健康被害の内容に応じた補償が受けられます。

ただし、健康被害と治験との因果関係が明らかに否定できる場合、治験中であっても発生したと考えられる事故による場合、あなたの故意または重大な過失によって生じた場合などは、補償の対象とならない、または補償が制限されることがあります。

7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること

あなたがこの治験に参加するかどうかは、ご自身の自由な意思で決めて下さい。たとえ参加に同意されない場合でも、あなたは一切不利益を受けません。医師と気まずくなるのではないかと心配されるかも知れませんが、決してそのようなことはありません。

また、あなたが治験の参加に同意した場合であっても、いつでも治験への参加をとりやめることができます。その場合も、あなたが不利益を受けることはありません。

8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合

この治験に参加している間に、あなたの安全性や参加の意思に影響を与えるような新しい情報（特に副作用に関連するもの）を得た場合には、担当医師が速やかにそのことをあなたに連絡し、説明します。その際、今後もこの治験に継続

して参加するかどうかを、再び文書にて確認します。

9. 治験への参加が中止となる場合

あなたが自分の意思で治験への参加をやめることができることは説明しましたが、それ以外にも次のような場合には治験への参加を中止頂くことがあります。

- (1) あなたにとってこのましくない症状（副作用等）がみられ、担当医師がこの治験を続けることが難しいと判断した場合
- (2) あなたが今回の治験に参加する基準を満たしていないことが明らかとなった場合
- (3) あなたが今回の治験について、担当医師から守るように指示されたことを守らず、担当医師がこの治験を続けることが難しいと判断した場合
- (4) この治験薬に関する新しい情報により、治験責任医師がこの治験を続けることが難しいと判断した場合

治験への参加を中止する場合は、担当医師があなたの健康状態を確認します。

10. あなたに関わるプライバシーが守られていること

治験では適切な識別コード（文字や数字を組み合わせたもの）を使用することにより、あなたのプライバシーは厳格に守られ、あなたの名前や個人を特定できる情報は公表されることはありません。

あなたが今回の治験に参加された場合、治験で得られたあなたに関する情報は、治験依頼者や厚生労働省、医薬品医療機器総合機構に報告されます。治験の結果が学会や医学論文などで公表される場合もあります。この場合も、被験者の秘密は厳守されます。

また、治験が正しく行われたかどうか、治験依頼者に報告した情報に誤りがないかどうかを確認するために、この病院が保管しているカルテ（同時に受診している他の診療科のものを含む）など、あなたに関する情報が記録されている資料を、治験依頼者や、この病院の治験審査委員会、場合によっては厚生労働省や医薬品医療機器総合機構の調査員が見ることがあります（「閲覧」といいます）。この際、カルテに記載されているあなたの情報を書き写したり、コピーする場合があります。

この治験の参加に同意された場合は、あなたのプライバシーを保護した上で、治験結果の利用とカルテなどの記録の閲覧をさせていただきますのでご了承下さい。

なお、治験に参加された後に参加を取りやめたり、治験への参加が中止となった場合でも、治験中の検査結果や治験終了後の経過については、今回の治験に関

する情報として貴重な資料として使用させて頂くこととします。

11. 治験中の費用について

今回の治験で使用される治験薬、および検査（血液検査・尿検査・心電図など）の費用は、治験を依頼している宮崎大学が負担します。また、入院に係るすべての経費も宮崎大学が負担しますので、あなたの負担になることはありません。

12. あなたへの金銭等の支払い

あなたが治験に参加することによって生じる交通費等の負担を軽くするため、この治験に参加される場合に以下の金額をお支払します。治験の参加に同意された後に、治験で定められた診察・検査などのために来院された場合 10,000 円、治験参加のために入院した場合、入院 1 日につき 30,000 円、退院後検査のための来院時に 10,000 円を、あなたが指定する銀行または信用金庫の口座に、原則として治験参加の翌月以降に当大学から振込みます。

13. 今回の治験を担当する医師

今回の治験を担当する医師の氏名と連絡先は以下のとおりです。

治験責任医師：北村 和雄

治験分担医師：稲津 東彦、芦塚 伸也

連絡先：宮崎大学医学部附属病院 第一内科

住所 〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原 5200

TEL. (昼間) 0985-85-0872 FAX 0985-85-6596

(夜間) 0985-85-1747

なお、この治験やお薬に関してわからないことや疑問な点がありましたら、遠慮せずに担当医師にお聞き下さい。

14. 治験に関する相談窓口

治験の内容やお薬に関してわからないこと、疑問に感じる場合は、遠慮せずに相談窓口にお問い合わせ下さい。相談窓口の連絡先は以下のとおりです。

宮崎大学医学部内科学講座循環体液制御学分野 治験事務局

担当：北 俊弘

住所：〒 889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原 5200

連絡先：(昼間) TEL.0985-85-0872 FAX 0985-85-6596

(夜間) TEL.0985-85-9227

15. あなたに守って頂きたいこと

もし、この治験に参加頂けた場合、この治験が終了するまで次の内容を守るよう心がけて下さい。ご協力をお願いします。

- ① 担当医師から指定された日に、診察・検査を受けるようにして下さい。もし、指定された日に受けられない場合は担当医師に連絡し、指示に従って下さい。
- ② 治験薬の投与1週間前から治験薬以外のお薬の服用はしないで下さい。もし、お薬を服用した場合は、担当医師に連絡し、指示に従って下さい。
- ③ 入院中は指示された飲食物のみを飲食し、その他のものは飲食しないで下さい。なお、試験薬投与前日22時から投与開始後4時間までは絶食となります。試験薬投与の前後1時間の間、飲水はしないでください。
- ④ 入院2日前から投与終了24時間後までは、アルコール、カフェインおよびグレープフルーツを含む飲食物は摂らないで下さい。
- ⑤ 治験期間中、喫煙はしないでください。

また、上記以外にも、担当医師に指示されたことは必ず守って下さい。

同意文書

私は、今回の治験について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容を十分に理解した上で、治験に参加することに同意します。

記

1. 治験とは
2. 治験が研究を伴うこと
3. 今回の治験の目的
4. 今回の治験の方法
5. 予測される治験上の利益および不利益
6. 健康被害が起きた際の処置および補償
7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること
8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合
9. 治験への参加が中止となる場合
10. あなたに関わるプライバシーが守られること
11. 治験中の医療費について
12. あなたへの金銭等の支払い
13. 今回の治験を担当する医師
14. 治験に関する相談口
15. あなたに守って頂きたいこと

説明日：西暦____年____月____日 医療機関名/診療科 宮崎大学医学部附属病院/第一内科

治験責任（分担）医師 _____

（治験協力者が補足的な説明を行った場合は下記に記入のこと）

説明日：西暦____年____月____日 説明者 _____

同意日：西暦____年____月____日 患者署名 _____

同意文書

私は、今回の治験について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容を十分に理解した上で、治験に参加することに同意します。

記

1. 治験とは
2. 治験が研究を伴うこと
3. 今回の治験の目的
4. 今回の治験の方法
5. 予測される治験上の利益および不利益
6. 健康被害が起きた際の処置および補償
7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること
8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合
9. 治験への参加が中止となる場合
10. あなたに関わるプライバシーが守られること
11. 治験中の医療費について
12. あなたへの金銭等の支払い
13. 今回の治験を担当する医師
14. 治験に関する相談口
15. あなたに守って頂きたいこと

説明日：西暦____年____月____日 医療機関名/診療科 宮崎大学医学部附属病院/第一内科

治験責任（分担）医師_____

（治験協力者が補足的な説明を行った場合は下記に記入のこと）

説明日：西暦____年____月____日 説明者_____

同意日：西暦____年____月____日 患者署名_____

同意文書

私は、今回の治験について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容を十分に理解した上で、治験に参加することに同意します。

記

1. 治験とは
2. 治験が研究を伴うこと
3. 今回の治験の目的
4. 今回の治験の方法
5. 予測される治験上の利益および不利益
6. 健康被害が起きた際の処置および補償
7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること
8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合
9. 治験への参加が中止となる場合
10. あなたに関わるプライバシーが守られること
11. 治験中の医療費について
12. あなたへの金銭等の支払い
13. 今回の治験を担当する医師
14. 治験に関する相談口
15. あなたに守って頂きたいこと

説明日：西暦____年__月__日 医療機関名/診療科 宮崎大学医学部附属病院/第一内科

治験責任（分担）医師_____

（治験協力者が補足的な説明を行った場合は下記に記入のこと）

説明日：西暦____年__月__日 説明者_____

同意日：西暦____年__月__日 患者署名_____

同意文書

私は、今回の治験について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容を十分に理解した上で、治験に参加することに同意します。

記

1. 治験とは
2. 治験が研究を伴うこと
3. 今回の治験の目的
4. 今回の治験の方法
5. 予測される治験上の利益および不利益
6. 健康被害が起きた際の処置および補償
7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること
8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合
9. 治験への参加が中止となる場合
10. あなたに関わるプライバシーが守られること
11. 治験中の医療費について
12. あなたへの金銭等の支払い
13. 今回の治験を担当する医師
14. 治験に関する相談口
15. あなたに守って頂きたいこと

説明日：西暦____年____月____日 医療機関名/診療科 宮崎大学医学部附属病院/第一内科

治験責任（分担）医師_____

（治験協力者が補足的な説明を行った場合は下記に記入のこと）

説明日：西暦____年____月____日 説明者_____

同意日：西暦____年____月____日 患者署名_____

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Nagata, T. Hikosaka, K. <u>Kitamura.</u>	Effect of Adrenomedullin Administration in Two Rat Models of Experimental Inflammatory Bowel Disease.	Am J Life Sci.	3	39-42	2015
S. Kawano, Y. Kawagoe, K. Kuwasako, S. Shimamoto, K. Igarashi, M. Tokashiki, K. <u>Kitamura, J. Kato.</u>	Gender-related alterations in plasma adrenomedullin level and its correlation with body weight gain.	Endocr Connect.	4	43-49	2015
K. Kubo, M. Tokashiki, K. Kuwasako, M. Tamura, S. Tsuda, S. Kubo, K. Yoshizawa-Kumag aye, J. Kato, <u>K. Kitamura.</u>	Biological properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol.	Peptides	57	118-121	2014



Effect of Adrenomedullin Administration in Two Rat Models of Experimental Inflammatory Bowel Disease

Sayaka Nagata*, Tomomi Hikosaka, Kazuo Kitamura

Division of Circulatory and Body Fluid Regulation, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

Email address:

sayaka_nagata@med.miyazaki-u.ac.jp (S. Nagata), tomomi_hikosaka@med.miyazaki-u.ac.jp (T. Hikosaka),

kazuokit@med.miyazaki-u.ac.jp (K. Kitamura)

To cite this article:

Sayaka Nagata, Tomomi Hikosaka, Kazuo Kitamura. Effect of Adrenomedullin Administration in Two Rat Models of Experimental Inflammatory Bowel Disease. *American Journal of Life Sciences*. Special Issue: Biology and Medicine of Peptide and Steroid Hormones. Vol. 3, No. 3-2, 2015, pp. 39-42. doi: 10.11648/j.ajls.s.2015030302.17

Abstract: Adrenomedullin (AM) is a novel hypotensive peptide that also exerts powerful anti-inflammatory effects. We recently showed that AM significantly reduces the clinical severity of acetic acid-induced colitis, an experimental model of inflammatory bowel disease (IBD) in rats. In the present study, we examined the effect of AM in two alternative rat models of IBD. We found that 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) induced megacolon development in the saline-treated group, but AM treatment reduced the macroscopic damage caused by TNBS. In the dextran sulfate sodium (DSS) model, treatment with AM reduced diarrhea and bloody stool scores, but did not reduce body weight. Histological analysis revealed that in both the TNBS and DSS models, colon inflammation was much more severe in the saline-treated group than in the AM-treated group. These findings indicate that the anti-inflammatory properties of AM make it an effective therapeutic agent for the treatment of IBD in rats.

Keywords: Adrenomedullin, Inflammatory Bowel Disease, TNBS, DSS

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) comprises a group of immune-mediated chronic intestinal disorders that include ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD)^{1,2}. IBD patient numbers are increasing yearly. The pathogenesis of IBD is generally accepted involving infiltration of neutrophils and overexpression of pro-inflammatory mediators, such as reactive oxygen metabolites and cytokines³. Although the exact nature of its mechanism of action is still uncertain.

Adrenomedullin (AM) is a pluripotent bioactive peptide, which was initially isolated from human pheochromocytoma in 1993⁴. Since its isolation, AM has been shown to be widely distributed among various organs and tissues, including the human digestive system, and to be involved in a variety of physiological functions such as vasodilatation, hormone secretion, neurotransmission, embryogenesis, wound healing, and immunoregulation⁵.

In our previous study, we report that AM reduces the severity of acetic acid-induced colitis in rats⁶. Experimental animal models are important tools that provide various

results us to research the pathogenesis of diseases and to test emerging therapeutic strategies. Two colitis models, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) and dextran sodium sulfate (DSS), are canonical IBD models whereby the onset of inflammation is immediate and the procedure is relatively. Therefore, these two models have been frequently used⁷⁻⁹.

The aim of this study was to examine the effect of AM administered in these two alternative IBD models.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats at 7 weeks of age were purchased from Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan) and maintained under a 12 h light/12 h dark cycle in specific pathogen-free conditions with a normal diet. The present study was performed in accordance with the Animal Welfare Act and with the approval of the University of Miyazaki Institutional Animal Care and Use Committee (2008-501-2).

2.2. Peptide and Chemicals

The recombinant human AM used in this study was provided by Sionogi (Osaka, Japan). TNBS and DSS were purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) and Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), respectively.

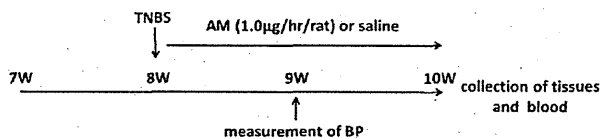
2.3. Induction of TNBS Colitis and Treatment with AM

Rats were fasted for 24 h prior to the induction of colitis, but were freely allowed tap water throughout. TNBS colitis was induced by rectal administration of TNBS (30 mg in 50% ethanol, 0.5 mL total volume) via a polyethylene catheter inserted 8 cm from the anus. Following instillation, the animals were maintained in a head-down position for 30 seconds to prevent leakage. AM (1.0 µg/hr/rat) or saline (control) were given to rats on the start day of TNBS application via the intravenous route using osmotic mini pumps (ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, CA, USA) and continued until day 14. Rats were sacrificed on day 14 after induction of colitis. In case of died before sacrifice, we performed an autopsy (Fig. 2). An overview of the experimental design is shown in Fig. 1.

2.4. Induction of DSS Colitis and Treatment with AM

DSS colitis was induced by an intake of 5% (w/v) DSS (5,000 MW) dissolved in drinking water for 3 consecutive days, which was then replaced with 1% DSS water for 11 days. AM (5.0 µg/hr/rat) or saline (control) were given to rats on the start day of DSS application via the intravenous route using osmotic mini pumps and continued until day 14. Rats were sacrificed on day 14 after induction of colitis. An overview of the experimental design is shown in Fig. 1.

A. TNBS colitis



B. DSS colitis

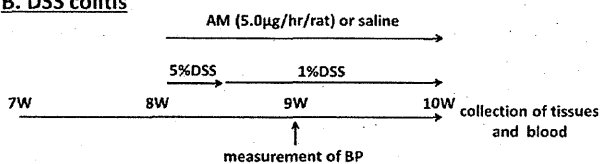


Figure 1. Overview of experimental design. (A) TNBS colitis model. (B) DSS colitis model.

2.5. Score of Diarrhea and Bloody Stool

Rats were checked daily for body weight, diarrhea and stool condition. Scores of diarrhea and bloody stool are shown table1.

2.6. Histological Analysis

Samples of colonic tissue were fixed in buffered 10% formaldehyde. Sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin, then processed for histological examination using standard techniques ⁶.

2.7. Statistical Analysis

Comparisons of all data were made employing analysis of student T-tests. Values are presented as means ± S.E., and significance was set at P < 0.05.

Table 1. Score of Diarrhea and Bloody Stool

Score	Diarrhea	Bloody stool
1	Normal	No blood
2	Soft with well-formed pellets	Feces spotted with blood
3	Soft without pellets	Feces stained with blood
4	Diarrhea	Gross bleeding

3. Results

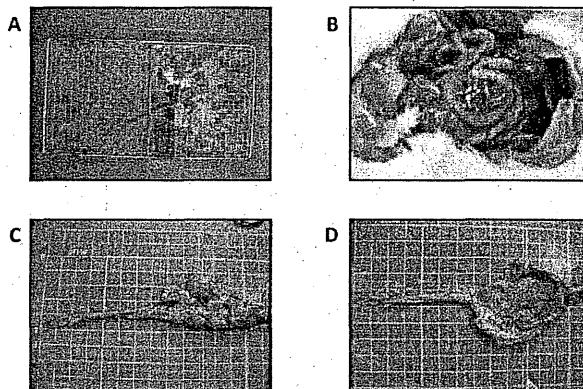


Figure 2. (A) The rat cage in which ileus was caused by TNBS treatment. There was no trace of emptied bowels for seven days. (B) Small amount of abdominal dropsy and the intestinal tracts stuck together. (C) The large intestine was removed and is shown to have formed a megacolon. (D) Mucosal membranes were tattered following colitis induction.

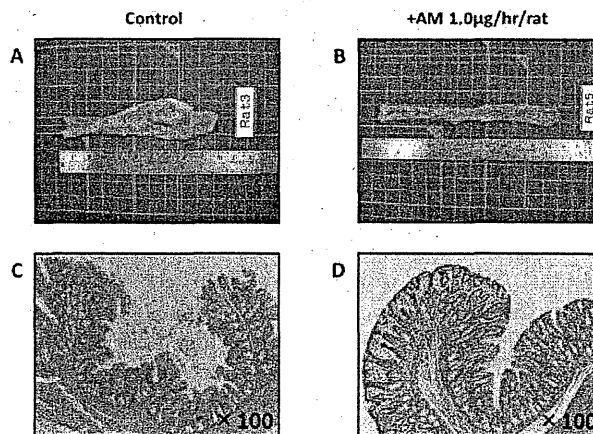


Figure 3. Representative colon appearance in the (A) saline and (B) AM-treated groups of TNBS colitis model. Representative histological appearance of rat colonic mucosa in the (C) saline and (D) AM-treated groups.

We performed two experiments as shown Fig. 1. In the TNBS colitis model (Fig. 1A), body weight and colon length did not differ between both groups (data not shown). In addition, no significant differences were noted in systolic and diastolic blood pressures (SBP and DBP, respectively) between both groups (data not shown). TNBS treatment induced megacolon and ileus development prior to death in the saline-treated group (Fig. 2A-D). In the AM treated group, megacolon and ileus development were not observed. Histological analysis revealed that in the TNBS model, colon inflammation was much more severe in the saline-treated group than in the AM-treated group (Fig. 3A-D).

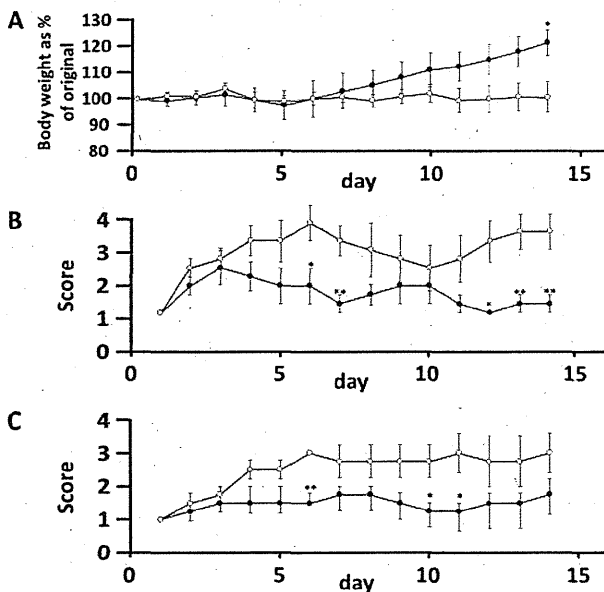


Figure 4. Daily changes of body weight (A), score of diarrhea (B) and score of bloody stool (C) in DSS colitis model: closed circles, AM-treated groups; open circles, saline groups. The results are shown as means \pm S.E. (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ vs. control.

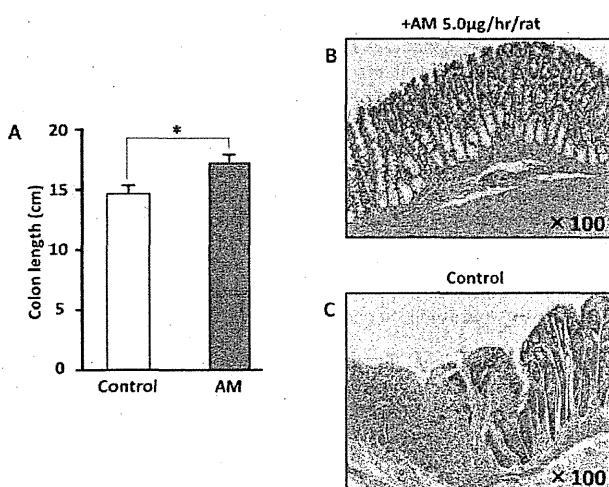


Figure 5. Comparison of (A) colon length (cm) and (B-C) histology in DSS colitis model. The results are shown as mean \pm S.E. (n=4). * $p < 0.05$ vs. control.

In the DSS colitis model (Fig. 1B), treatment with AM increased body weight (Fig. 4A) and reduced diarrhea (Fig. 4B) and bloody stool scores (Fig. 4C). No significant differences were noted in SBP and DBP (data not shown). Furthermore, colon length in the AM-treated group was longer than in the saline-treated group (Fig. 5A). Histological analysis revealed that in the DSS model, colon inflammation was much more severe in the saline-treated group than in the AM-treated group (Fig. 5B, C).

4. Discussion

In this report, we describe the effect of AM treatment in two alternative rat models of IBD. AM, isolated from human pheochromocytoma tissues arising from the adrenal medulla, is a biologically active peptide with multiple effects, including powerful vasodilating action, and is now known to exert a wide range of physiological effects, including cardiovascular protection, neovascularization and apoptosis suppression^{4,5,10}. In this study, no significant differences were noted in SBP and DBP in both models. Therefore AM did not have an adverse effect on blood pressure and could be a suitable candidate IBD therapeutic.

AM, amylin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) show close sequence homology and present overlapping spectra of biological activity. The CGRP superfamily can influence gastrointestinal activities through the autonomic nervous system^{11,12}. In addition, some evidence shows that AM can elicit a gastroprotective effect on acetic acid-⁶, ethanol-¹² and reserpine-induced gastric lesions models¹³. In the present study, we demonstrated that AM can also elicit a gastroprotective effect on two alternative models. Our findings coincide with these reports.

TNBS treatment induced megacolon development in the saline-treated group, while AM treatment reduced the macroscopic damage caused by TNBS. In addition, histological analysis revealed that in the TNBS model, colon tissue inflammation was much more severe in the saline-treated group. The TNBS colitis model results in a more severe condition compared with the DSS colitis model. However, we were unable to find differences in body weight and colon length in the TNBS model. Because TNBS is injected only once to make this model, no difference in gross appearance was observed between the saline and AM-treated groups.

Conversely, in the DSS colitis model treated with AM, an increased body weight and colon length were observed, with reduced diarrhea and bloody stool scores. Furthermore, colon tissue inflammation was much more severe in the saline-treated group as observed by histological analysis.

In IBD and experimental colitis, blood monocytes are recruited to the mucosa where they differentiate into activated macrophages that produce pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin (IL)-1 and IL-6^{14,15}. It can therefore be deduced that AM treatment inhibits production of TNF α , IL-1 and IL-6 via suppression of activated macrophages. However,

further investigations are needed to confirm these findings.

AM has been shown to be widely distributed in gastrointestinal tissues including the stomach, duodenum, jejunum, ileum, colon, and rectum^{16,17}. AM receptor expression has also been shown to be widely distributed in many of these organs and tissues^{18,19}. It is therefore believed that AM can act directly on these tissues.

Indeed, we are currently working on clarifying the mechanisms by which AM protects from colitis. In the present study, we demonstrated a protective effect of AM treatment against colitis induced by TNBS and DSS in rats. These findings indicate that the anti-inflammatory properties of AM make it an effective candidate therapeutic agent for the treatment of IBD. Further studies of AM treatment will expand on these findings.

Acknowledgements

This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and Health and Labor Science Research Grants for Translational Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

References

- [1] Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115, 182-205 (1998).
- [2] Binion, D. G., West, G. A., Volk, E. E., Drazba, J. A., Ziats, N. P., Petras, R. E. Fiocchi, C. Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease. *Lancet* 352, 1742-1746, doi:10.1016/S0140-6736(98)05050-8 (1998).
- [3] Salim, S. Y. Soderholm, J. D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases* 17, 362-381, doi:10.1002/ibd.21403 (2011).
- [4] Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H. Eto, T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochemical and biophysical research communications* 192, 553-560, doi:10.1006/bbrc.1993.1451 (1993).
- [5] Kitamura, K., Kangawa, K. Eto, T. Adrenomedullin and PAMP: discovery, structures, and cardiovascular functions. *Microscopy research and technique* 57, 3-13, doi:10.1002/jemt.10052 (2002).
- [6] Ashizuka, S., Ishikawa, N., Kato, J., Yamaga, J., Inatsu, H., Eto, T. Kitamura, K. Effect of adrenomedullin administration on acetic acid-induced colitis in rats. *Peptides* 26, 2610-2615, doi:10.1016/j.peptides.2005.05.007 (2005).
- [7] Du, C., Wang, P., Yu, Y., Chen, F., Liu, J. Li, Y. Gadolinium chloride improves the course of TNBS and DSS-induced colitis through protecting against colonic mucosal inflammation. *Scientific reports* 4, 6096, doi:10.1038/srep06096 (2014).
- [8] Jakobsson, T., Vedin, L. L., Hassan, T., Venteclef, N., Greco, D., D'Amato, M., Treuter, E., Gustafsson, J. A. Steffensen, K. R. The oxysterol receptor LXRbeta protects against DSS- and TNBS-induced colitis in mice. *Mucosal immunology* 7, 1416-1428, doi:10.1038/mi.2014.31 (2014).
- [9] Alkahtani, R., Mahavadi, S., Al-Shboul, O., Alsharari, S., Grider, J. R. Murthy, K. S. Changes in the expression of smooth muscle contractile proteins in TNBS- and DSS-induced colitis in mice. *Inflammation* 36, 1304-1315, doi:10.1007/s10753-013-9669-0 (2013).
- [10] Beltowski, J. Jamroz, A. Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Polish journal of pharmacology* 56, 5-27 (2004).
- [11] Tache, Y. Inhibition of gastric acid secretion and ulcers by calcitonin [correction of calcitonin] gene-related peptide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 657, 240-247 (1992).
- [12] Kaneko, H., Mitsuma, T., Nagai, H., Mori, S., Iyo, T., Kusugami, K. Tache, Y. Central action of adrenomedullin to prevent ethanol-induced gastric injury through vagal pathways in rats. *The American journal of physiology* 274, R1783-1788 (1998).
- [13] Clementi, G., Caruso, A., Cutuli, V. M., Mangano, N. G., Salomone, S., Lempereur, L., Prato, A., Matera, M. Amico-Roxas, M. Gastroprotective effect of adrenomedullin administered subcutaneously in the rat. *Peptides* 23, 1149-1153 (2002).
- [14] Maloy, K. J. Powrie, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 298-306, doi:10.1038/nature10208 (2011).
- [15] Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W. W. Mowat, A. M. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal immunology* 6, 498-510, doi:10.1038/mi.2012.89 (2013).
- [16] Sakata, J., Asada, Y., Shimokubo, T., Kitani, M., Inatsu, H., Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H., Sumiyoshi, A. Eto, T. Adrenomedullin in the gastrointestinal tract. Distribution and gene expression in rat and augmented gastric adrenomedullin after fasting. *Journal of gastroenterology* 33, 828-834 (1998).
- [17] Kitani, M., Sakata, J., Asada, Y., Kitamura, K. Eto, T. Distribution and expression of adrenomedullin in human gastrointestinal tissue. *Annals of clinical biochemistry* 35 (Pt 5), 643-648 (1998).
- [18] Hay, D. L. Smith, D. M. Adrenomedullin receptors: molecular identity and function. *Peptides* 22, 1753-1763 (2001).
- [19] McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G. Foord, S. M. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393, 333-339, doi:10.1038/30666 (1998).



Gender-related alterations in plasma adrenomedullin level and its correlation with body weight gain

Sayaka Kawano^{1,2}, Yukiko Kawagoe¹, Kenji Kuwasako¹, Satoshi Shimamoto³, Koji Igarashi³, Mariko Tokashiki², Kazuo Kitamura² and Johji Kato¹

¹Frontier Science Research Center, and ²Circulatory and Body Fluid Regulation, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan

³AIA Research Group, Bioscience Division, Reagent Development Department, TOSOH Corporation, Kanagawa 252-1123, Japan

Correspondence should be addressed to J Kato
Email
 jkjp@med.miyazaki-u.ac.jp

Abstract

Plasma levels of adrenomedullin (AM), a bioactive peptide produced in adipose tissue, have been shown to be higher in obese patients than in non-obese patients, but little is known about gender differences in plasma AM levels. The aims of this study were to clarify gender-related alterations in plasma AM levels and to examine the body weight (BW) gain–plasma AM relationship in the general population. We measured plasma AM levels of 346 local residents (62.0 ± 8.9 years, mean \pm s.d.) in the Kiyotake area, Japan, who underwent a regular health check-up, by a specific fluorescence immunoassay. Plasma AM levels in the female residents were lower than that in the males, and multiple regression analysis revealed a possible gender difference in plasma AM. The AM levels were significantly correlated with BMI or waist circumference in women, but such a relationship was not seen in men. When the subjects were divided into two groups by results of a questionnaire about BW gain of 10 kg or more since the age of 20 years, the plasma AM level of women with BW gain ≥ 10 kg was significantly higher than that in those without BW gain, although no difference was noted between the men with and without BW gain. In conclusion, possible gender differences were noted in the plasma AM levels and in the BW gain–plasma AM relationship in the general population. The plasma AM levels in the female residents without BW gain seem partly attributable to the lower AM of women.

Key Words

- ▶ adrenomedullin
- ▶ plasma level
- ▶ gender difference
- ▶ body weight gain

Endocrine Connections
 (2015) 4, 43–49

Introduction

Adrenomedullin (AM) is a potent vasodilator peptide first isolated from human pheochromocytoma tissue, although this peptide has also been shown to be present in a wide range of human tissues or organs: the adrenal medulla, heart, blood vessels, kidneys, and adipose tissues (1, 2, 3). A number of functional analysis studies have been carried out since its discovery, revealing that AM has pleiotropic actions, including blood pressure-lowering

effects, natriuresis, cardiovascular protection, and alleviation of insulin resistance (4, 5, 6, 7). On the other hand, AM was shown to circulate in human blood, and its plasma levels are elevated in diseases such as hypertension, heart failure, and sepsis (2, 8). Plasma AM levels have also been found to be higher in patients with obesity than in control subjects, suggesting the active production and secretion of AM from human adipose tissue (6, 9).



Consistent with this, Nambu *et al.* (10) reported that mice fed a high-fat diet showed augmented AM expression in the fat tissues and elevated plasma levels concomitant with increased body weight (BW). As inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 1 beta (IL1 β), were reported to increase AM production, low-grade inflammation in fat tissues associated with obesity is assumed to be involved in the increased expression of AM (6, 8, 11). When evaluating plasma levels of endogenous bioactive substances, we sometimes need to take gender-related alterations into account. For instance, plasma levels of brain natriuretic peptide (BNP), a bioactive peptide exerting vasodilatory and blood pressure-lowering effects, are higher in women than in men (12). Another example is the renin-angiotensin-aldosterone system: estrogen, a sex steroid hormone, has been shown to modulate this system in various manners (13). Meanwhile, as indicated by a search of the literature, little is known about gender-related alterations in plasma AM levels or AM production. The aims of this study are thus to clarify whether there are gender-related alterations in plasma AM level and to determine the relationship between BW gain and plasma AM levels in human subjects by examining local residents in a Japanese community using a newly developed, automated, AM-specific fluorescence immunoassay. In addition to AM, we measured plasma levels of BNP and an N-terminal fragment of the BNP precursor (NT-proBNP) in order to compare gender- or BW gain-related alterations in AM with those of the BNP peptides.

Materials and methods

Study subjects and protocol

Local residents of the Kiyotake area, Miyazaki, Japan, who underwent an annual regular health check-up as part of a specific health program of the Japanese government from 2008 to 2013, were randomly selected for this study (172 males and 174 females; 62.0 ± 8.9 years, mean \pm s.d.). Upon visiting the community center of Kiyotake Town, the medical history of the residents, which included the questionnaire of whether or not they have had BW gain of 10 kg or more since 20 years of age, was taken by nurses, and blood pressure was measured with an oscillometric automatic device (BP-103iII, Colin, Nagoya, Japan) in a sitting position. The history taken was confirmed by physicians, who then carried out physical examination including auscultation. Exclusion criteria were as follows: first, residents with medical history, symptoms, or signs

indicative of any heart disease were excluded because the plasma levels of AM, BNP, and NT-proBNP were shown to be elevated in patients with ischemic heart disease or heart failure (8, 14). Second, renal function is an important determinant of those peptide levels (14, 15), therefore we excluded residents with estimated glomerular filtration rate (eGFR) of 30 ml/min per 1.73 m² or lower. eGFR was calculated with the following formula of the Japanese Society of Nephrology (16): $194 \times \text{serum creatinine}^{-1.094} \times \text{age}^{-0.287}$ ml/min per 1.73 m², further multiplied by 0.739 for women. Lastly, because elevated blood glucose was shown to increase plasma AM levels (17, 18), we excluded residents whose HbA1c was 6.5% or higher, so as not to select those with uncontrolled diabetes mellitus.

This study was approved by the Review Committee for Cooperative and Commissioned Research and the Ethics Committee of the University of Miyazaki Faculty of Medicine. All subjects examined gave their written informed consent before participating in this study.

Measurements of bioactive peptides in plasma

To measure the plasma levels of AM, BNP and NT-proBNP after overnight fasting, blood from an antecubital vein was collected into tubes with 1.0 mg/ml EDTA-2Na and 500 kallikrein inhibitory units (KIU)/ml of aprotinin. Plasma was obtained by centrifugation at 1710 g for 10 min at 4 °C and stored at -30 °C until the assay. Plasma levels of AM were measured by a specific fluorescence immunoassay (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) with two independent antibodies: one binds to the ringed structure and the other to the middle region between the ring and C-terminal portions of the peptide, as previously described (9, 19). The AM assay reagent prepared by an immediate freeze-dry procedure was composed of in-house magnetic beads coated with the anti-ringed structure antibody and alkaline phosphatase-labeled anti-C-terminal portion antibody. This assay reagent can be used with a commercially available, automated immunoassay analyzer (AIA-System, Tosoh Corporation). The limits of detection and quantitation of this assay were determined to be 0.133 and 0.085 pmol/l, respectively, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocols. Intra- and inter-assay coefficients of variation of this assay were 1.8% ($n=10$) and 5.1% ($n=11$) respectively. BNP and NT-proBNP levels were determined by chemiluminescent immunoassay (Shionogi & Co. Ltd, Osaka, Japan) and electro-chemiluminescence assay (Roche Diagnostics) respectively (20, 21).

