

博士論文
過敏性腸症候群（IBS）モデル動物における
下痢発症のメカニズムについて

屋嘉比 聖一

目次

	頁
I 要旨	3
II 序文	4
III 方法	
1 動物	1 0
2 化合物	1 0
3 排便と下痢の観察	1 1
4 粘膜下層及び筋層の組織標本について	1 1
5 c-Fos 免疫組織化学について	1 2
6 免疫組織化学的二重染色について	1 2
7 セルカウント	1 4
8 VIP 濃度測定	1 4
9 VIP mRNA 測定	1 5
1 0 実験プロトコール	1 6
1 1 CRF 腹腔内投与により誘発される排便や下痢に対する VIP antagonist の効果について	1 7
1 2 CRF 腹腔内投与により誘発される排便や下痢に対する インドメタシンの効果について	1 8
1 3 CRF の腹腔内投与における腸管粘膜下層及び筋層への c-Fos の発現	1 8
1 4 CRF 腹腔内投与における門脈中及び回腸における VIP タンパク および VIPmRNA の測定	1 9
1 5 統計解析について	1 9
1 6 VIP 構造式	2 0

IV	結果	
1	CRF 腹腔内投与により誘発された排便数の増加及び下痢の誘発は VIP アンタゴニストで抑制され、インドメタシンでは抑制されない	2 1
2	CRF 投与により回腸末端粘膜下層及び近位結腸筋層に c-Fos の発現 が誘導され、その発現は VIP アンタゴニストにより抑制される	2 7
3	CRF 投与下に回腸末端粘膜下層で活性化された VIP 陽性神経は、 CRF-R1 を共発現する	3 2
4	CRF 投与により回腸末端の VIP 蛋白は減少するが、門脈中の VIP 蛋白は変化しない	3 4
V	考察	4 0
VI	謝辞	5 0
VII	引用文献	5 2

I 要旨

今回、我々は過敏性腸症候群（IBS）の下痢発症に消化管分泌が深く関与していると考え、血管作動性腸管ペプチド（VIP）に着目し研究を行った。副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）を投与し下痢を誘発し、回腸粘膜下層のVIP神経の活性化及びCRF-R1の共発現を確認した。また、VIPアンタゴニストを用いる事で神経の活性化は抑制され、同時に下痢の発症も完全に抑制された。また、血中VIPに変化は認めなかったが、回腸のVIPは減少しており、回腸のVIP mRNAに有意な変化は認めなかった。この結果より、回腸においてVIP神経が活性化され局所でVIPが放出され下痢の発症に深く関与している可能性が示唆された。

II 序文

過敏性腸症候群（IBS）の患者は西側諸国の成人人口の 10-20%前後いると報告されており[1, 2]、日本人においても同様に健常人の約 15%の人がこの疾患に罹患していると考えられている[3]。IBS の明らかな原因遺伝子は見つかっていないが、家族性に発生しやすいことが知られており、二卵性双生児に比べ一卵性双生児において疾患の発症により高い相関性を認めるという報告もあり、何らかの遺伝的な素因が関係していると考えられている[4]。過敏性腸症候群においては便秘や下痢を繰り返すことが特徴であり、突然のストレス負荷により急性な下痢を発症することが知られているが[5]、このストレス負荷による下痢発症の機序についてはまだまだ不明な点が多い。

副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）はストレスに関係し、消化管運動や消化管での分泌に深く関与していることが知られている。消化管での運動を抑制するという報告や、反対に消化管運動を亢進するという報告があり、また消化管での分泌を亢進するという報告もある。結果として腹痛や排便や下痢や便秘

などを誘発することが報告されている[5-11]。このストレスにより誘発される IBS 症状は、中枢及び末梢で CRF を投与することにより模倣されることが、人及びラットにて報告されている[12, 13]。

副腎皮質刺激ホルモン (CRH) は 1981 年に Wylie W. Vale 等により報告された 41 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであり、視床下部から分泌され、下垂体門脈を介して、下垂体前葉にて副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を刺激する働きが最もよく知られている[14, 15]。一方、遠位消化管において CRF やウロコルチン 1 を直接末梢投与した場合、脳脊髄液など中枢にこれら薬剤を投与した場合と同等の働きを示し、ラットにおいて、腸管運動亢進や排便や水溶性下痢を誘発することが報告されている[16-18]。

ラットに緩徐な身体抑制をすると、小腸の腸管運動を抑制する一方で、大腸での腸管運動を亢進させ排便を誘発することが報告されており[19]、ストレスの代わりに CRF を投与することにより、ストレスで誘発される現象と同様の現象が再現されることが報告されている[9, 11, 12]。そこで、我々は実際にラットに

ストレスを与える代わりに CRF をラットに投与することにより、「IBS におけるストレス下での下痢発症のモデルラット」とし、下痢の発症のメカニズムについて検討していくこととした。

また、この CRF により誘発される下痢の発症のメカニズムについては、CRF2 ではなく CRF1 が深く関与していると考えられており、CRF1 を選択的に刺激すると下痢の発症を誘発するが、CRF2 を選択的に刺激するとこの CRF1 の作用を抑制する方向に働いたとの報告がある[20, 21]。

元来、IBS におけるストレス下における急激な下痢の発症の機序として腸管運動の亢進やセロトニンとの関係が概念として確立しており[22-26]、それらを抑制する薬剤が治療薬として使用されている。これに加えて、日本で IBS 患者に使用される薬剤の一つとしてポリカルボフィルカルシウム製剤があり、IBS 患者における便通異常に有効性が報告されている[27]。ポリカルボフィルカルシウムは水溶性の繊維であり、腸管内において水分を吸収しゲル状の塊となることにより、腸管内の水分を調整し、下痢型及び便秘型両方に効果があるとされている。

る。また、その他の薬剤として、日本では下痢型 IBS 患者に対して 5-HT3 antagonist 製剤の有効性が報告されており[22, 28]、実際に臨床現場でも使用されている。その他の IBS 治療薬としてオピオイド受容体に作用するマレイン酸トリメプチンや抗コリン薬などの消化管運動改善薬が用いられる[29]。下痢型 IBS の患者においては、塩酸ロペラミドなどの止瀉薬の使用が多いと報告されている[30]。ただし、塩酸ロペラミドを中心とした止瀉薬を使用することにより便秘異常が改善するとの報告がある一方で[31-33]、その他の症状の改善効果は証明されていないとの報告もあり[34]、現在下痢型 IBS に対して十分な効果のエビデンスが確立している薬剤を挙げるのは難しい状況である。

このような背景を踏まえ、我々はストレス下における便の性状が水分を多く含んでいる下痢便であることに着目し、このストレスにより誘発される下痢が消化管運動の亢進だけでなく、消化管における水分分泌の亢進も発症の機序に関係しているのではないかという仮説のもと、研究を進めていくこととした。

今回、我々は消化管での水分分泌に関係する因子として、血管作動性腸管ペ

プチド (VIP) に着目した。VIP は 1970 年に Said と Mutt により 28 個のアミノ酸からなる血管拡張作用を持つペプチドとして小腸粘膜より抽出された[35, 36]。また、VIP は VIPoma の患者さんに大量の水様性下痢を誘発することが知られており、ロタウイルス感染により誘発されたマウスの下痢の持続期間を VIP アンタゴニストを用いる事により短縮できたという報告も存在する[37]。IBS の患者では、血中及び腸管における VIP 濃度に差があるとのいくつかの報告はあるが[38, 39]、実際にストレスにより誘発される下痢の発症の機序との関係を示したものはない。

また、VIP は腸管神経に存在することが知られており、cAMP の増加、囊胞性繊維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) の活性化、Cl⁻ の分泌を介して、消化管での水分分泌に関係していることが知られている[40]。しかしながら、下痢の発症の機序における VIP と CRF との直接の関係について、明確に報告した既報はない。

そこで、今回我々は、IBS 患者のストレス下における下痢の発症の機序解明を

目指し、ストレス負荷の代わりに CRF をラットに投与し下痢を誘発する動物モデルを選択した。下痢の発症と VIP との関係、及び、下痢発症に関係する消化管内部位の特定を第一目標とし、さらに VIP の働きを抑制することにより実際に下痢を抑制出来るかを検討することにより、IBS 患者におけるストレス下の下痢発症機序の解明を目指す方針とした。

また、IBS における下痢発症の機序には CRF2 ではなく、CRF1 が主に関与しているという報告があり[20]、また、IBS の下痢発症の機序にプロスタグランジンが関与しているとの報告もある[12]。この2点を踏まえて、更に二つの実験を行うこととした。一つは、この CRF1 と VIP が直接関係しているかどうかを確認するために、VIP を含有した腸管神経に CRF-R1 が存在するかどうかについて検討することとした。また、もう一つの実験として、インドメタシンを使用することにより、プロスタグランジンが CRF により誘発される下痢の発症の機序に影響を及ぼしているかどうかについても検討することとした。

Ⅲ 方法

1 : 動物

雄の SD ラット(Harlan Laboratories, San Diego, CA)、225-250g を $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の室温で AM6 時から PM6 時までを daytime として、餌(Prolab RMH 2500 LabDiet, PMI Nutritional, Brentwood, MO)や水へは自由にアクセス出来る環境にて飼育した。動物の飼育環境や実験方法に関しては、施設の倫理規程に従い行なった。

2 : 化合物

Rat/human CRF と [4Cl-D-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP[41] は The Clayton Foundation Laboratories for Peptide Biology (The Salk Institute, La Jolla CA, USA)より入手し -80°C の冷凍庫にて保管し、使用直前に生理食塩水にて溶解して使用した。インドメタシン(Sigma-Aldich Co., St.Louis, MO)は1%重炭酸 Na にて溶解した。また、全ての溶液は 1ml/kg にて腹腔内投与した。

3：排便と下痢の観察

ラットを 1 匹ずつ新しいケージにうつし、水や食料は与えず、腹腔内注射直後(VIP antagonist は CRF 投与直前に投与した) より 15 分毎に計 1 時間排便及び下痢の有無について観察した。また、下痢については Bristol Stool Form Scale を参考に便の性状により 0-3 のスコアをつけた。(0=通常便, 1=色調の変化を伴う軟便で形を保持したもの, 2=泥状便。不定形の泥状であり一部に隆起のある完全には水様でないもの, 3=水様性便。隆起がなく水様で固形物を含まないもの。)[42]。

(Bristol Scale の 4 が今回のスコアの 0, 5 が 1, 6 が 2, 7 が 3 相当とした)。

また、排便や下痢については投与群毎に合計して評価した。

4：粘膜下層及び筋層の組織標本について

CRF 投与後 60 分の時点でラットを CO₂ にて安楽死させ、その後断頭した後、十二指腸、空腸、回腸、近位及び遠位結腸を取り出し、腸間膜側で切開し、sylgard-coated Petri dish (Sylgard 184, Dow Corning Midland, MI, USA)にピンで平坦に固定し、4%パラホルムアルデヒドと 14%ピクリン酸の入っている 0.1M リ

ン酸バッファー(PBS, pH 7.4)に 4°Cで一晩浸した。その後、0.01M のリン酸バッ
ファー(PBS, pH 7.4)で数回洗浄した後、標本を粘膜下層及び筋層に切り分けた
[43, 44]。

5 : c-Fos 免疫組織化学について

粘膜下層及び筋層の組織検体を 0.3% Triton X-100 を含んだ 0.01M PBS に rabbit
polyclonal anti-Fos antibody (1:10,000; Ab-5, PC38, EMD Millipore, Billerica, MA)を
加えた状態で 4°C、2 日間反応させ、その後二次抗体としてビオチン標識された
goat anti-rabbit IgG (1:1,000, Jackson ImmunoResearch, NJ, USA)で室温で 1 時間反
応させ、avidin-biotin-peroxidase complex (1:200; Vector, Burlingame, CA, USA)を更
に加えて室温で 1 時間反応させた。色素としては、3,3'-diaminobenzidine
tetrachloride (DAB) (0.025%, Sigma-Aldrich) と hydrogen peroxide (0.01%,
Sigma-Aldrich)を使用した。染色した後には、空気乾燥したのち、エタノールに
て脱水し、ザイレンで洗浄したのち、カバーガラスをかけて標本とした[42-44]。

6 : 免疫組織化学的二重染色について

組織標本として取り出した回腸及び近位結腸の粘膜下層及び筋層を c-Fos/VIP, VIP/CRF-R1 で二重染色した。c-Fos/VIP の二重染色は、二次抗体として biotin 化した goat anti-rabbit IgG Fab fragment (1:1,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories) を使用した事と DAB に 2.5% nickel ammonium sulfate and 0.001% hydrogen peroxide in 0.1 M acetate buffer (pH 6.5) 混じた物を使用した以外は上記の c-Fos の染色方法と同じ方法を用いて行った。その後洗浄した後に、rabbit anti-VIP (1:2000, rabbit polyclonal antiserum, CURE antibody core #7913, UCLA, Los Angeles, CA) を用いて 4°C で 2 日間反応させ、その他は上記と同じ方法を用いて行った。VIP/CRF-R1 の二重染色に関しては goat anti-CRF-R1 (1:200, C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) と rabbit anti-VIP (1:1000, CURE antibody #7913, Digestive Diseases Research Center, UCLA, Los Angeles, CA) を混ぜ 4°C で 2 日間反応させ、二次抗体として donkey anti-goat-RedX and donkey anti-rabbit-FITC (both at 1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories) を加え室温で 2 時間反応させた[43, 45]。

7 : セルカウント

蛍光顕微鏡(Zeiss Axioscope II, Carl Zeiss International, Germany)を用いて各腸管部位から 3,4 領域を無作為に選びその中の神経節 20 個を無作為に選びその中で免疫学的に活性化されている細胞の数をカウントし、腸管の部位毎にその平均の数を算出した。

8 : VIP 濃度測定 :

7.5% エチレンジアミン四酢酸(EDTA) (Sigma-Aldrich)を 20 μ l 含んだシリンジで門脈より 1ml 採血したのち 20 μ l のアプロチニン(0.6 TIU/ml, MP Biomedicals, Solon, OH)と 40 μ l の Pefabloc SC(25 mg/ml) (Sigma-Aldrich)を含んだチューブに移し氷上にて直ぐに冷やした。その後、4°C、1600g で 5 分間遠心分離した後に血漿部分を取り出し、測定まで-80°Cで保存した。また、回腸末端より約 1g の腸管を切除し、10%トリフルオロ酢酸塩 20ml を用いてホモジェナイズした後、4°C、3000g にて 10 分間遠心分離を施行した[46]。その後 SepPak (Waters, Milford, MA)

を 100%アセトニトリル 5ml と 0.1% トリフルオロ酢酸塩 5ml にて平衡した後、上澄み液を SepPak に通し、その後 0.1% トリフルオロ酢酸塩 5ml にて洗浄した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含んだ 20%アセトニトリル 5ml と 0.1%トリフルオロ酢酸を含んだ 70%アセトニトリル 5ml を用いて溶出した。その後、溶出液を真空遠心分離機(Speed-Vac, Thermo Quest Co. Marietta, OH)を用いて凍結乾燥した。血中及び回腸の VIP 濃度測定は VIP ELISA kit (EK -064-16, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA)を用いて、製品プロトコール手順に従って測定した。全ての検体は同時に測定し、検体間のばらつきは 10%以内であった。

9 : VIP mRNA 測定

回腸末端の RNA 抽出は TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、製品指示手順に従って抽出した。単離された RNA は high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて相補的 DNA(cDNA)に逆転写し、その後 TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)と

StepOne Plus Real-time PCR system (Applied Biosystems)を用いて定量的 PCR を施行した。プライマーは Taqman® Gene Expression Assays を使用した。ハウスキーピング遺伝子として GAPDH(assay ID:Rn01775763)、VIP(assayID:Rn01430567) を使用した。又、増幅反応の特異性は PCR 断片の融解曲線を分析することにより決定した。

10 : 実験プロトコール

全てのラットは自由に餌を摂取出来る環境で、複数匹で飼育し、実験の前日午後に新しいケージに 1 匹ずつの状態に移し替えて環境的ストレスを避ける状態で実験を行った。実験当日は午前 8 時から 10 時の間に実験を行い、腹腔内注射をした後、新しい床敷きに変えたケージへ戻して実験を行った。

1 1 :CRF 腹腔内投与により誘発される排便や下痢に対する VIP antagonist の効果について

VIP antagonist, [4Cl-D-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP (250 µg/kg)又は生理食塩水の腹腔内投与は CRF (10 µg/kg)又は生理食塩水の腹腔内投与直前に行い、その後、15 分毎に排便数及び下痢の状態を確認し、CRF 投与 1 時間後まで観察した。CRF の投与量に関しては以前に行った実験のデータを基に一番排便数が多く、下痢をする用量を用いて実験を行い[47]、VIP antagonist の用量に関しては、パイロットスタディとして、1.5, 0.5, 0.25 or 0.1 mg/kg の用量を投与し、その結果より投与量を決した。また、ラットはランダムに各投与群に振り分けた。

1 2 : CRF 腹腔内投与により誘発される排便や下痢に対するインドメタシンの効果について

同様にインドメタシン (5 mg/kg) 又は 1% 重炭酸塩を CRF 又は生理食塩水投与 30 分前に腹腔内投与し、その後 15 分毎に排便数及び下痢の状態を確認し、CRF 投与 1 時間後まで観察した。インドメタシンの投与量及び投与時間は既報を参考に決定した[48][49]。

1 3 : CRF の腹腔内投与における腸管粘膜下層及び筋層への c-Fos の発現

上記と同様の条件で他の実験に一度も使われていないラットに対し、上記と同様に VIP antagonist, [4Cl-D-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP (250 µg/kg)又は生理食塩水の腹腔内投与を CRF (10 µg/kg)又は生理食塩水の投与直前に行い、1 時間後に CO₂ にてラットを安楽死させた後に断頭を加えて腸管を取り出した。その後、十二指腸、空腸、回腸、近位及び遠位結腸の粘膜下層及び筋層を免疫染色し、神経の活性化の指標として c-Fos の発現の有無で評価した。また、回腸末端については、c-Fos/VIP の二重染色及び、VIP/CRF-R1 の免疫蛍光二重染色も行った。

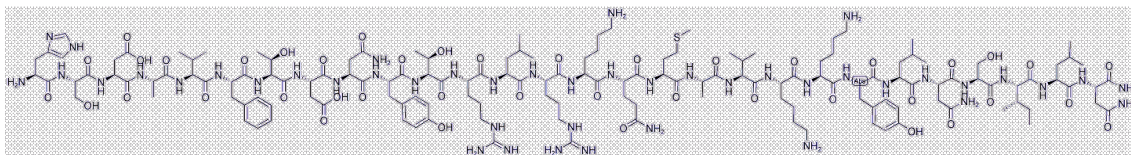
1 4 : CRF 腹腔内投与における門脈中及び回腸における VIP タンパク及び VIP mRNA の測定

CRF 又は生理食塩水を投与した後、15 分後、60 分後にイソフルレンを過量投与し麻酔をかけ、門脈より 1ml 採血したのち断頭し、回腸末端を約 15cm の長さで切り出し、冷水にて取り出した腸管を洗浄した後、ドライアイスにて急速に凍結した。回収した血液及び回腸は、qPCR による mRNA 測定及び ELISA 法による蛋白測定まで -80°C にて保存した。

1 5 : 統計解析について

データは平均値±標準誤差で示し、2 群間比較に関しては、*F*-test を行った後、Student's *t*-test あるいは Welch's *t*-test を用いて行った。多群比較に関しては、Tukey post hoc multiple comparisons を行った後、ANOVA にて行った。また、有意差の基準としては、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありとした。

16 : VIP 構造式



IV 結果

1 : CRF 腹腔内投与により誘発された排便数の増加及び下痢の誘発は

VIP アンタゴニストで抑制され、インドメタシンでは抑制されない

CRF (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ip) 群はコントロール群と比較して排便を有意に強く誘発し (8.5 \pm 1.0 pellets/h vs 3.1 \pm 0.9, n=11/group; $p<0.01$, Fig. 1A)、同様に CRF 群はコントロール群と比較し下痢も有意に強く誘発した (1.7 \pm 0.3 vs 0.0 \pm 0.0 score/h, 10/11 vs 0/11 rats, $p<0.01$: Fig. 1B)。また、CRF の腹腔内投与によって誘発される排便や下痢は 15-30 分後の間にピークを迎えた。一方、VIP アンタゴニスト単独群 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ip) では、排便数に影響を及ぼさず (2.5 \pm 0.8, pellets/h, n=11)、下痢の誘発も認めなかった (0 \pm 0 score/h, n=11) が、VIP アンタゴニストは CRF によって誘発される排便数の増加を抑制 (2.5 \pm 0.8, pellets/h, n=13, $p<0.01$: Fig. 1A) し、同時に下痢の誘発も完全に抑制した (0 \pm 0 diarrhea score/h, n=13, $p<0.01$; Fig. 1B)。また、事前に VIP アンタゴニストの投与量を決定する上でアゴニスト作用の有無を確認するため、VIP アンタゴニストを 1.5, 0.5, 0.25 or 0.1 mg/kg の異なる 4

種類の濃度で投与し、0.5mg/kg で下痢の誘発及び排便数の増加を認めた。

(排便数 0.1 vs. 0.25 vs. 0.5 vs.1.5 mg/kg : 1.3 ± 0.9 vs. 1.0 ± 1.0 vs. 3.0 ± 1.2 vs. 1.3 ± 1.3 , n=3-6 : Fig 1C)、(下痢スコア 0.1 vs. 0.25 vs. 0.5 vs.1.5 mg/kg : 0.0 ± 0.0 vs. 0.0 ± 0.0 vs. 0.7 ± 0.3 vs. 0.0 ± 0.0 , n=3-6 : Fig 1D)。

一方、インドメタシン (5 mg/kg, ip) は、これら CRF 投与によって誘発される排便数の増加や下痢の誘発を抑制しなかった (5.3 ± 1.5 vs. 6.6 ± 2.0 pellets/h, n=3-7 : Fig. 2A、 1.7 ± 0.9 vs. 1.7 ± 0.6 diarrhea score/h, n=3-7 : Fig. 2B)。

これらの結果から、CRF により誘導される排便及び下痢は VIP を介して誘導されていることが示唆された。また、VIP の作用を抑制することにより、排便及び下痢を抑制することが示された。

Fig 1A: 生理食塩水投与群、CRF 投与群、VIP アンタゴニスト投与群及び CRF+VIP アンタゴニスト併用群における 15 分毎の排便数 (60 分まで)

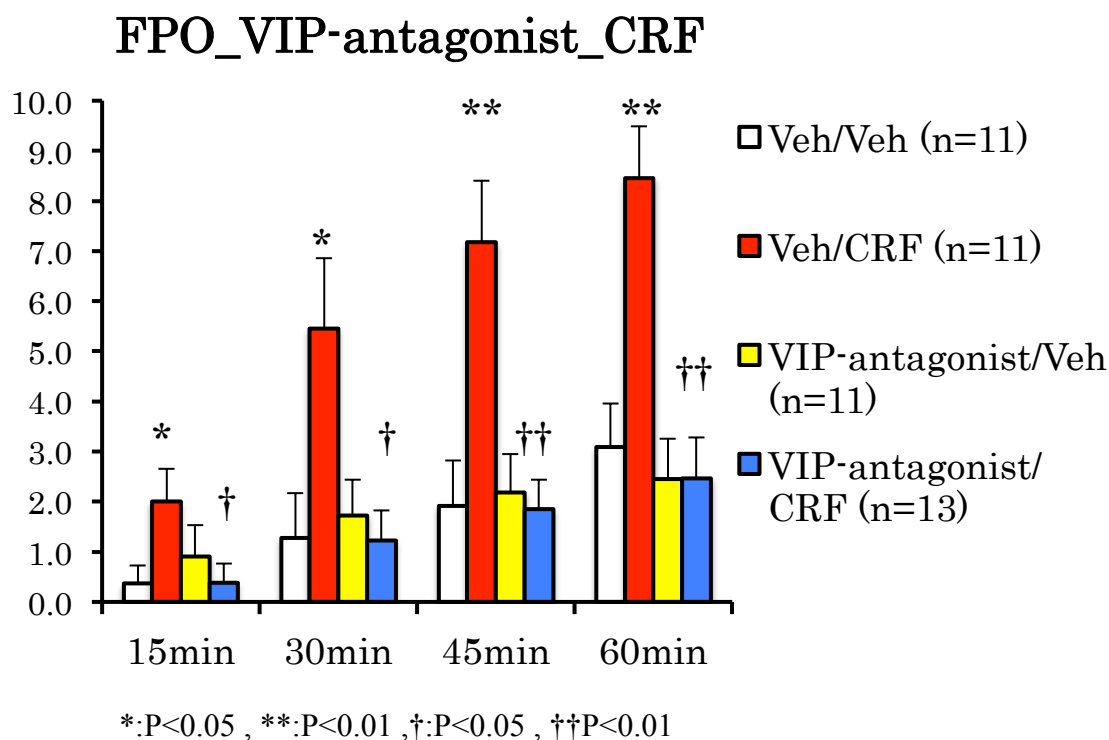


Fig 1A: CRF 群はコントロール群と比較して排便を有意に強く誘発した (Veh/CRF vs Veh/Veh : 8.5 ± 1.0 pellets/h vs 3.1 ± 0.9 , $n=11/\text{group}$; $p<0.01$)。VIP アンタゴニスト単独投与では、排便数に影響は及ぼさなかった (VIP-a/Veh : 2.5 ± 0.8 , pellets/h, $n=11$)。VIP アンタゴニストは CRF 投与による排便数の増加を抑制 (VIP-a / CRF : 2.5 ± 0.8 , pellets/h, $n=13$, $p<0.01$: Fig. 1A) した。

Fig 1B: 生理食塩水投与群、CRF 投与群、VIP アンタゴニスト投与群及び CRF+VIP アンタゴニスト併用群における 15 分毎の下痢スコア (60 分まで)

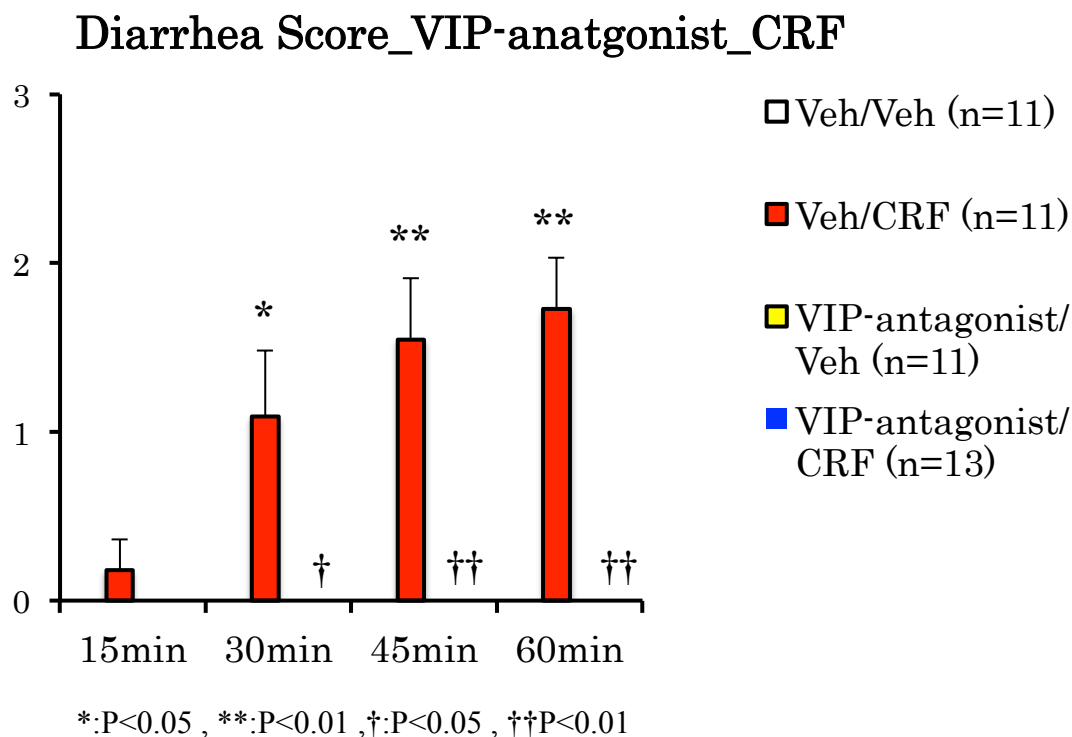


Fig 1B : CRF 群はコントロール群と比較し下痢を有意に強く誘発した (Veh/CRF vs Veh/Veh : 1.7 ± 0.3 vs 0.0 ± 0.0 score/h, 10/11 vs 0/11 rats, $p < 0.01$)。VIP アンタゴニスト単独投与では、下痢の誘発を認めなかった (VIP-a/Veh : 0 ± 0 score/h, n=11)。VIP アンタゴニストは CRF 投与による下痢の誘発を完全に抑制した (VIP-a/CRF : 0 ± 0 diarrhea score/h, n=13, $p < 0.01$)。

Fig 1C: 4 種類の VIP アンタゴニスト投与による 15 分毎の排便数 (計 60 分)

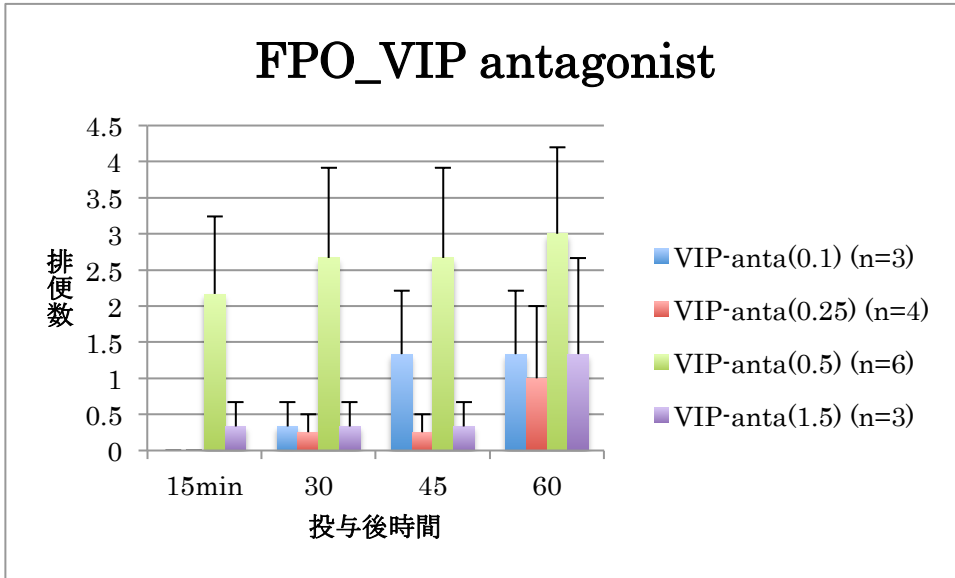


Fig1C: VIP antagonist 0.5mg/kg では排便数がやや増加した。(0.1 vs. 0.25 vs. 0.5 vs.1.5 mg/kg : 1.3 ± 0.9 vs. 1.0 ± 1.0 vs. 3.0 ± 1.2 vs. 1.3 ± 1.3 , n=3-6)

Fig 1D: 4 種類の VIP アンタゴニスト投与による 15 分毎の下痢スコア (計 60 分)

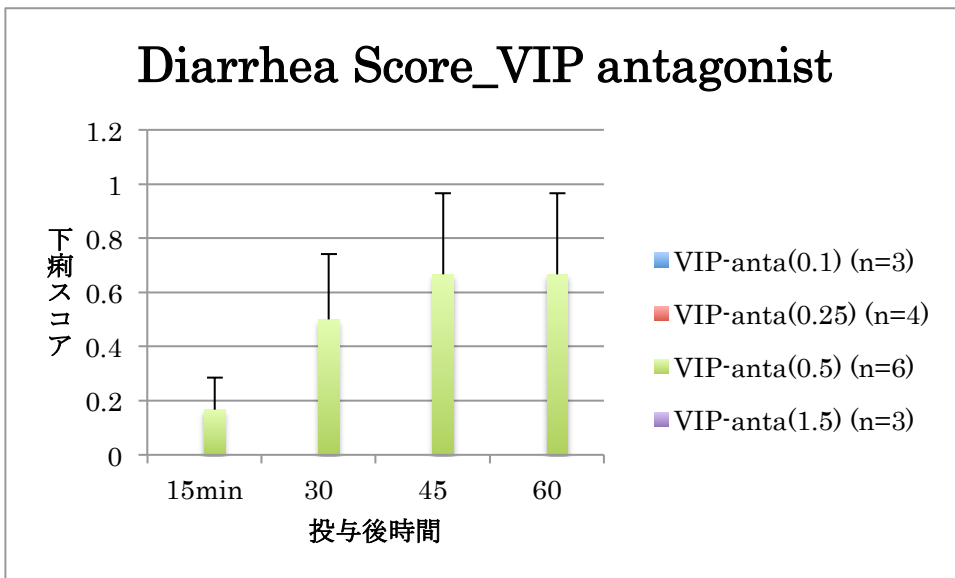


Fig 1D: VIP antagonist 0.5mg/kg では下痢が出現した。(下痢スコア 0.1 vs. 0.25 vs. 0.5 vs.1.5 mg/kg : 0.0 ± 0.0 vs. 0.0 ± 0.0 vs. 0.7 ± 0.3 vs. 0.0 ± 0.0 , n=3-6)

Fig 2A: CRF 投与群及びインドメタシン併用群における 15 分毎の排便数
(60 分まで)

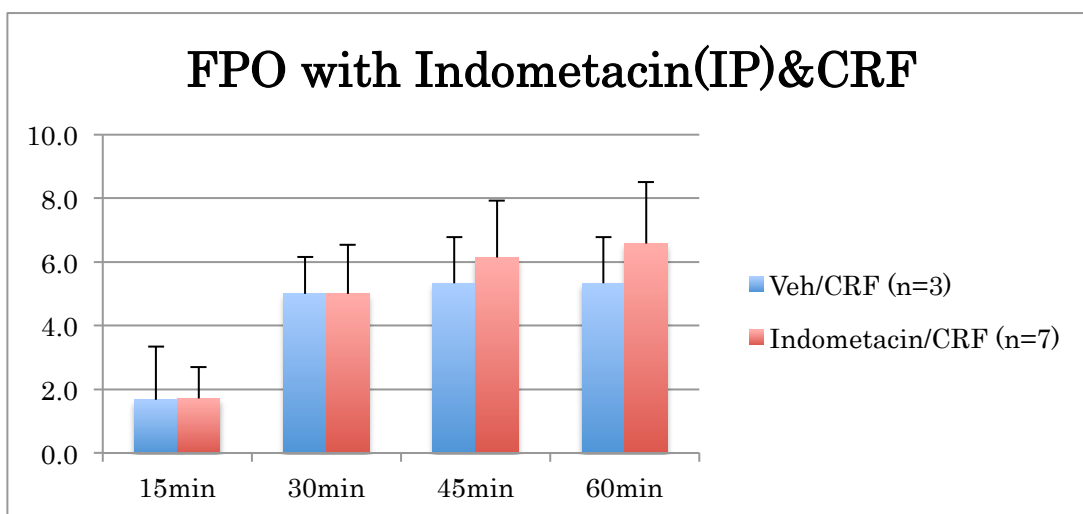


Fig 2A: インドメタシンは CRF 投与によって誘発される排便数の増加を抑制しなかった (Veh/CRF vs Indometacin : 5.3 ± 1.5 vs. 6.6 ± 2.0 pellets/h, n=3-7: Fig. 2A)。

Fig 2B: CRF 投与群及びインドメタシン併用群における 15 分毎の下痢スコア
(60 分まで)

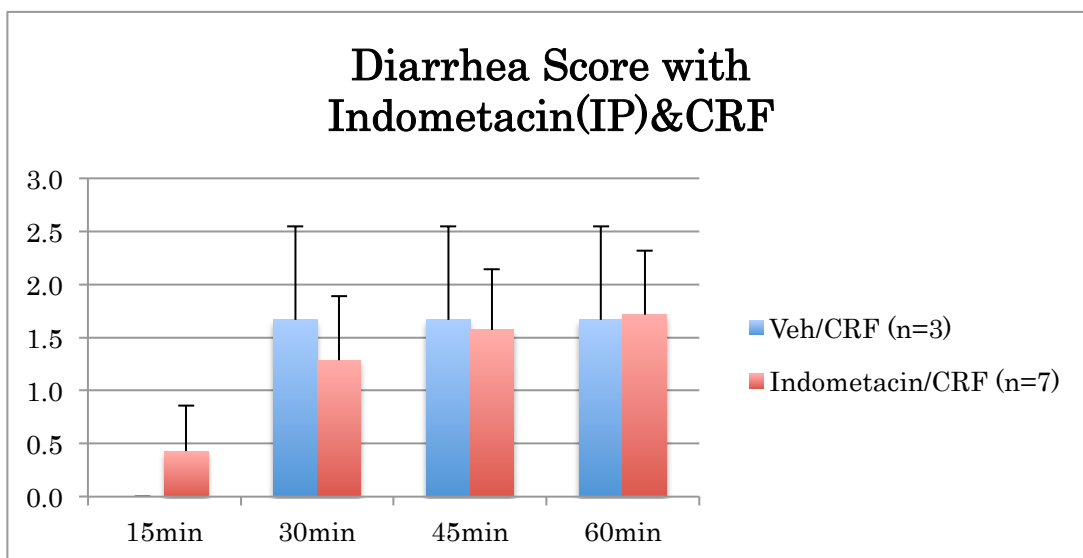


Fig 2B: インドメタシンは CRF 投与によって誘発される下痢の誘発を抑制しなかった (Veh/CRF vs Indometacin/CRF : 1.7 ± 0.9 vs. 1.7 ± 0.6 diarrhea score/h, n=3-7)。

2 : CRF 投与により回腸末端粘膜下層及び近位結腸筋層に c-Fos の発現が

誘導され、その発現は VIP アンタゴニストにより抑制される

生理食塩水の腹腔内投与では、十二指腸、空腸、回腸、近位結腸、遠位結腸の粘膜下層には c-Fos の発現はほとんど認めなかったが (Fig 3)、CRF の腹腔内投与では十二指腸 (0.9 ± 0.1 vs. 0.1 ± 0.1 cells/ganglion, $n=4-5$ /group ; $p<0.01$) 及び空腸 (0.3 ± 0.1 vs. 0.0 ± 0.0 cells/ganglion, $n=4-5$ /group ; $p<0.05$) で有意な c-fos の発現の増加を認め、回腸末端の粘膜下層においてはより顕著に c-Fos の発現を認めた (2.1 ± 0.4 vs. 0.1 ± 0.0 cells/ganglion in vehicle, $n=5-7$, $p<0.01$)。一方、近位結腸 (0.0 ± 0.0 vs. 0.0 ± 0.0 cells/ganglion, $n=5-7$ /group ; Fig. 3)、及び遠位結腸の粘膜下層では、c-Fos の発現は認められなかった。反対に近位結腸の筋層においては CRF 投与群では顕著な c-Fos 発現を認め (18.0 ± 1.9 vs. 0.4 ± 0.2 cells/ganglion, $p<0.001$)、遠位結腸では CRF の投与により c-Fos の発現は認めるものの、近位結腸ほど顕著な発現は認めなかった (3.0 ± 0.5 vs. 1.0 ± 0.3 cells/ganglion, $p<0.05$)。また、回腸

末端の筋層では有意な c-Fos の発現増加は認めなかった (0.3 ± 0.2 vs. 0.2 ± 0.2 cells/ganglion; Fig 4)。

回腸末端における c-Fos の発現は下痢の出現と高い相関性 ($r^2=0.90$, $F_{1,16}=146.3$, $p<0.001$) を示し、排便に関しても同様に高い相関性 ($r^2=0.77$; $F_{1,16}=52.0$, $p<0.001$)

を示した。一方、結腸筋層における c-Fos の発現と下痢や排便との相関は、回腸に比較して関連の強さは小さかったが、有意な相関を示した (下痢 : $r^2=0.74$, $F_{1,16}=44.8$, $p<0.001$ 、排便 : $r^2=0.62$, $F_{1,16}=26.1$, $p<0.001$)。

CRF の投与直前に VIP アンタゴニストを投与すると、回腸末端粘膜下層 (Veh/CRF vs. VIP-a/CRF : 2.1 ± 0.4 vs. 0.4 ± 0.2 cells/ganglion $n=6,7$ $p<0.01$, Fig. 5) と近位結腸筋層 (Veh/CRF vs. VIP-a/CRF : 17.5 ± 2.4 vs. 5.3 ± 3.0 cells/ganglion $n=6,7$ $p<0.01$, Fig. 5) における c-Fos の発現は有意に抑制された。

これらの結果から、CRF を投与することにより回腸末端の粘膜下層及び近位結腸の筋層が刺激されていることが示唆された。またこの現象は VIP の働きを抑制することにより抑制されることが示された。

Fig 3 : CRF 投与による小腸（十二指腸、空腸、回腸）及び大腸（近位結腸、遠位結腸）粘膜下層の免疫染色（茶褐色が c-Fos を示す）

Fig. 3

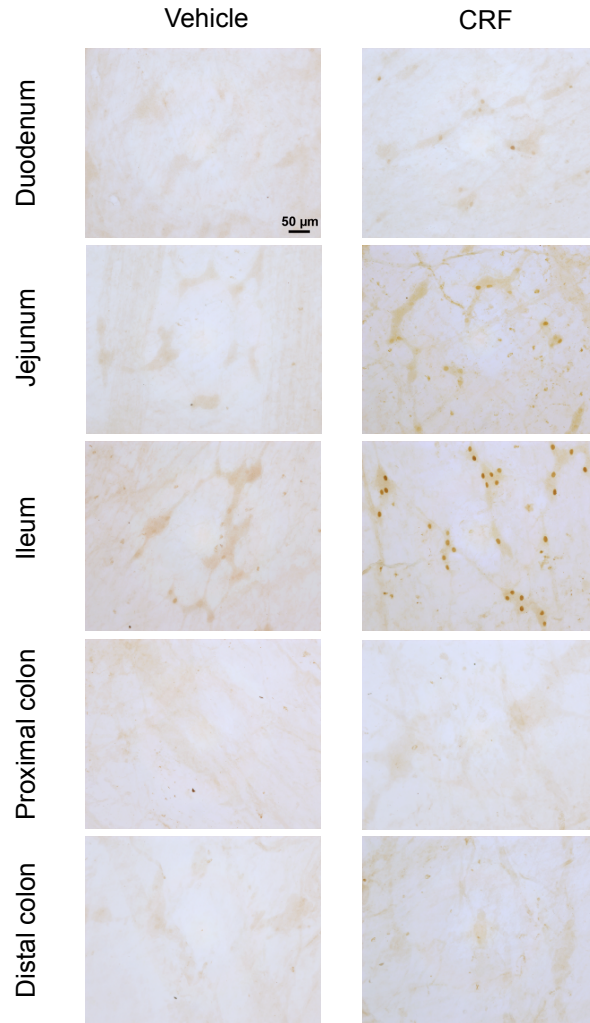


Fig 3 : 生理食塩水投与群では、十二指腸、空腸、回腸、近位結腸、遠位結腸の粘膜下層には c-Fos の発現はほとんど認めなかった。CRF 投与群では十二指腸（CRF vs Veh : 0.9 ± 0.1 vs. 0.1 ± 0.1 cells/ganglion, $n=4-5$ /group ; $p < 0.01$ ）及び空腸（CRF vs Veh : 0.3 ± 0.1 vs. 0.0 ± 0.0 cells/ganglion, $n=4-5$ /group ; $p < 0.05$ ）で有意な c-fos の発現の増加を認めた。回腸末端においてはより顕著に c-Fos の発現を認めた（CRF vs Veh : 2.1 ± 0.4 vs. 0.1 ± 0.0 cells/ganglion in vehicle, $n=5-7$, $p < 0.01$ ）。一方、近位結腸（ 0.0 ± 0.0 vs. 0.0 ± 0.0 cells/ganglion, $n=5-7$ /group）及び遠位結腸では（ 0.0 ± 0.0 vs. 0.0 ± 0.0 cells/ganglion, $n=5-7$ /group）c-Fos の発現は認められなかった。

Fig 4 : CRF 投与による回腸及び大腸（近位結腸、遠位結腸）筋層の免疫染色
 (茶褐色が c-Fos を示す)

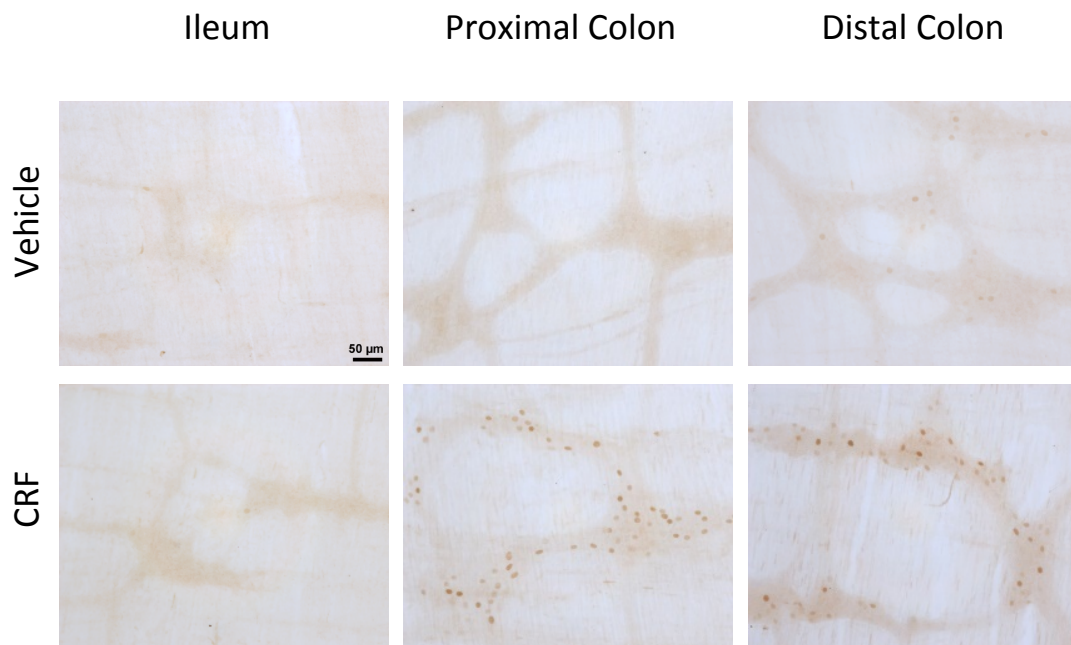


Fig 4 : 近位結腸において CRF 投与群で顕著な c-Fos 発現を認めた (CRF vs Veh : 18.0 ± 1.9 vs. 0.4 ± 0.2 cells/ganglion, $p < 0.001$)。遠位結腸では CRF の投与により c-Fos の発現は認めるものの、近位結腸ほど顕著な発現は認めなかった (CRF vs Veh : 3.0 ± 0.5 vs. 1.0 ± 0.3 cells/ganglion, $p < 0.05$)。回腸末端では有意な c-Fos の発現増加は認めなかった (CRF vs Veh : 0.3 ± 0.2 vs. 0.2 ± 0.2 cells/ganglion)。

Fig 5 : 生理食塩水投与群、CRF 投与群、CRF・VIP アンタゴニスト同時投与群における、回腸粘膜下層及び近位結腸筋層における免疫染色（茶褐色が c-Fos を示す）

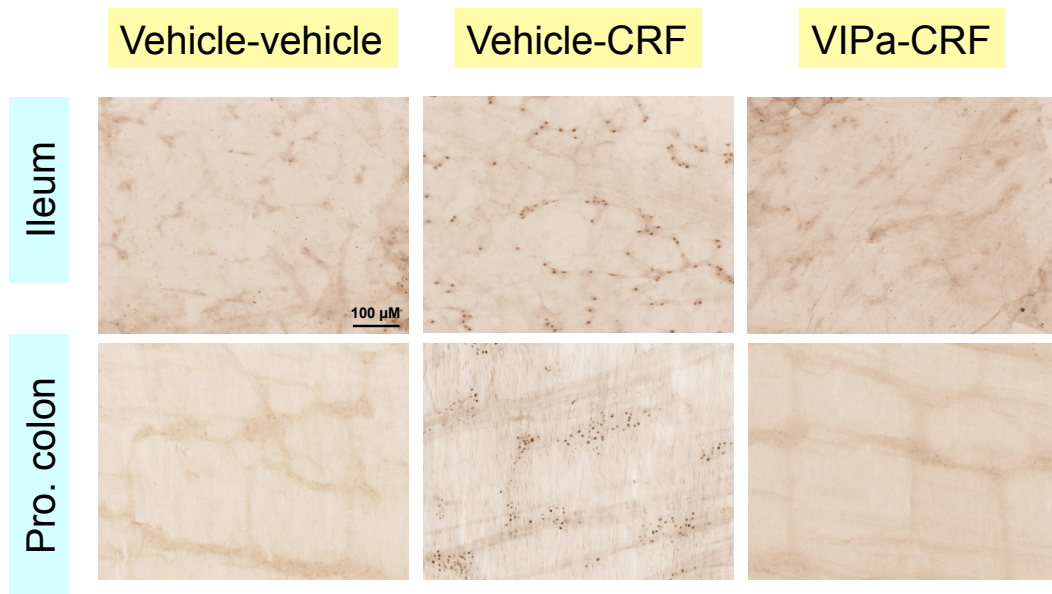


Fig 5 : VIP アンタゴニスト同時投与にて、回腸粘膜下層（Veh/CRF vs. VIP-antagonist/CRF : 2.1 ± 0.4 vs. 0.4 ± 0.2 cells/ganglion n=6,7 p<0.01）と近位結腸筋層（Veh/CRF vs. VIP-antagonist/CRF : 17.5 ± 2.4 vs. 5.3 ± 3.0 cells/ganglion n=6,7 p<0.01）における c-Fos の発現は有意に抑制された。(生理食塩水投与による回腸粘膜下層及び結腸筋層の c-Fos の発現 (0.1 ± 0.0 , 0.4 ± 0.3 , n=5))

3 : CRF 投与下に回腸末端粘膜下層で活性化された VIP 陽性神経は、

CRF-R1 を共発現する

CRF の腹腔内投与下の回腸末端粘膜下層において、VIP 陽性神経節の 96.3%

(c-Fos 陽性+VIP 陽性/VIP 陽性 : 103/107, n=6) に c-Fos の発現誘導が認められ

た (Fig 6)。また、回腸末端粘膜下層の VIP 陽性神経に CRF-R1 が共発現してい

ることが確認された (Fig 7)。

これらの結果から、CRF は回腸末端粘膜下層の CRF-R1 を介して VIP 陽性神

経を直接刺激し、活性化させていることが示唆された。

Fig 6 : 回腸末端粘膜下層における VIP と c-Fos の免疫二重染色。

(黒色が c-Fos、濃い茶色が VIP 蛋白を示す) (n=6)

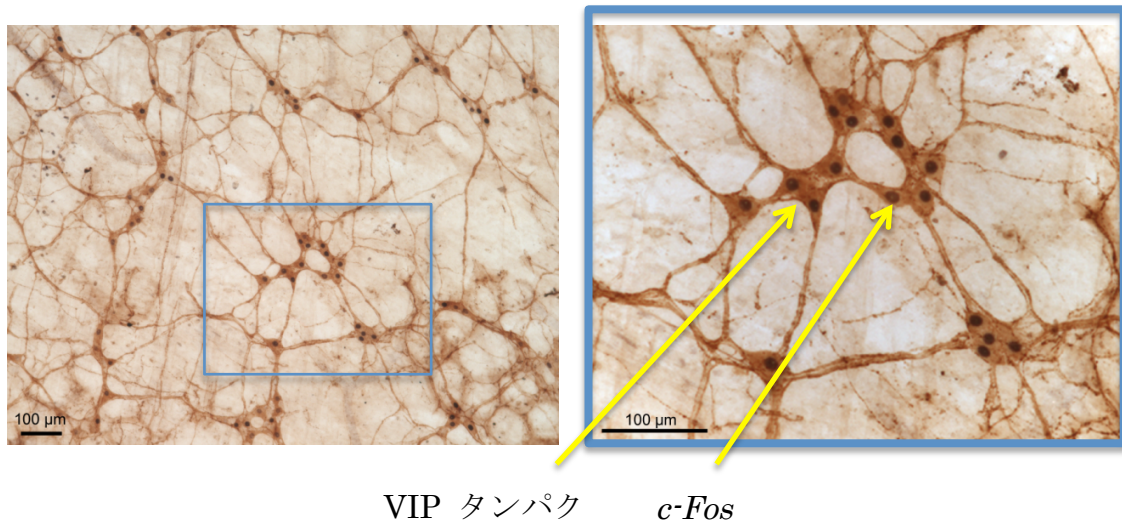


Fig 6 : VIP 陽性神経節の 96.3% (c-Fos+VIP/VIP:103/107) に c-Fos の発現を認めた。

Fig 7 : 回腸末端粘膜下層における VIP と CRF レセプター 1 の蛍光免疫染色

(緑色が VIP、赤色が CRF-R1、黄緑が VIP・CRF-R1 を示す)

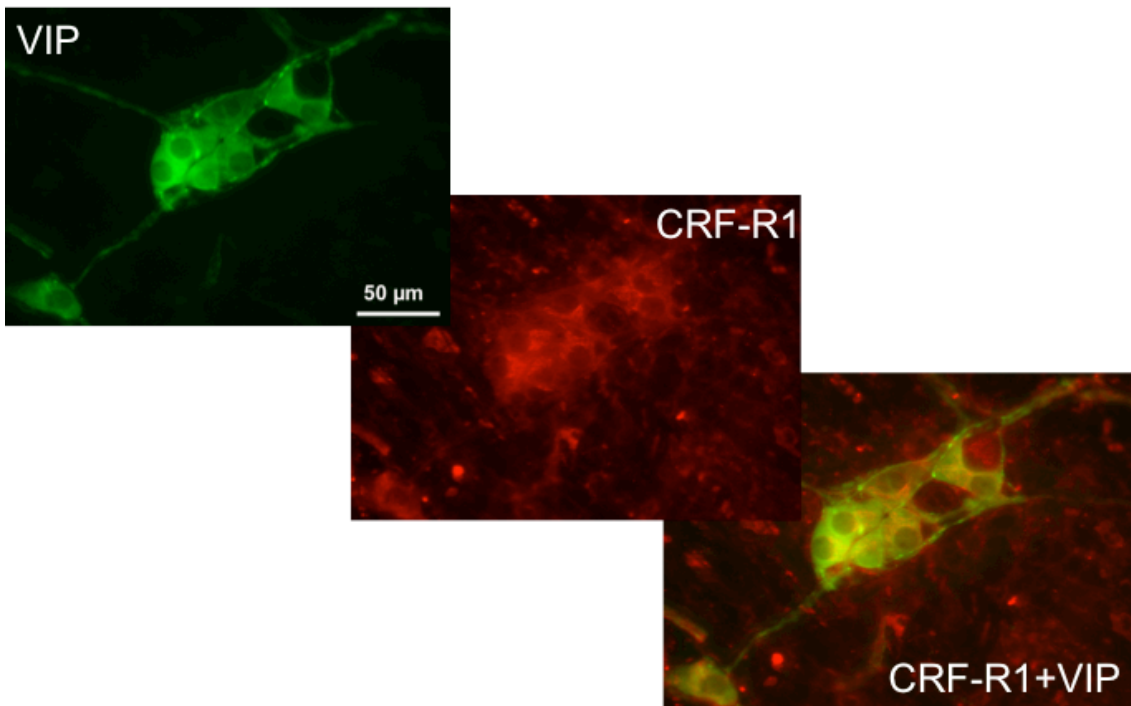


Fig 7 : 回腸粘膜下層の VIP 陽性神経に CRF-R1 が共発現していた。

4 : CRF 投与により回腸末端の VIP 蛋白は減少するが、門脈中の VIP 蛋白は変化しない

CRF 投与 15 分後の門脈中及び回腸末端の VIP 蛋白濃度は、生食投与群と比較して有意差を認めなかった (1.20 ± 0.02 vs. 1.22 ± 0.04 ng/ml, $n=5-7$, Fig. 8A ; 2.11 ± 0.39 vs. 1.64 ± 0.15 ng/g, $n=5-7$, Fig 8B)。同様に CRF 投与 60 分後の門脈中の血中濃度にも有意差は認めなかった (1.07 ± 0.25 vs. 0.94 ± 0.10 ng/ml, $n=7-9$; Fig. 9A) が、CRF 投与 60 分後の回腸末端の VIP 蛋白濃度は、生食群と比較し有意に減少していた (0.83 ± 0.31 , vs 2.46 ± 0.69 ng/g, $n=7-8$, $p<0.05$; Fig. 9B)。また、CRF 投与 60 分後の回腸末端における VIP mRNA 量は、生食-生食群、生食-CRF 群、VIP アンタゴニスト-CRF 群の比較において、有意差を認めなかった (1.00 ± 0.08 vs. 1.10 ± 0.14 vs. 1.08 ± 0.15 , $n=4-5$; Fig 10)。

これらの結果から、CRF 投与下の回腸末端粘膜下層において VIP は新たに合成されるのではなく、局所に存在する VIP を放出することによって排便や下痢を誘発していることが示唆された。

Fig 8A: CRF 投与群と生理食塩水投与群の投与 15 分後における血中における VIP 濃度

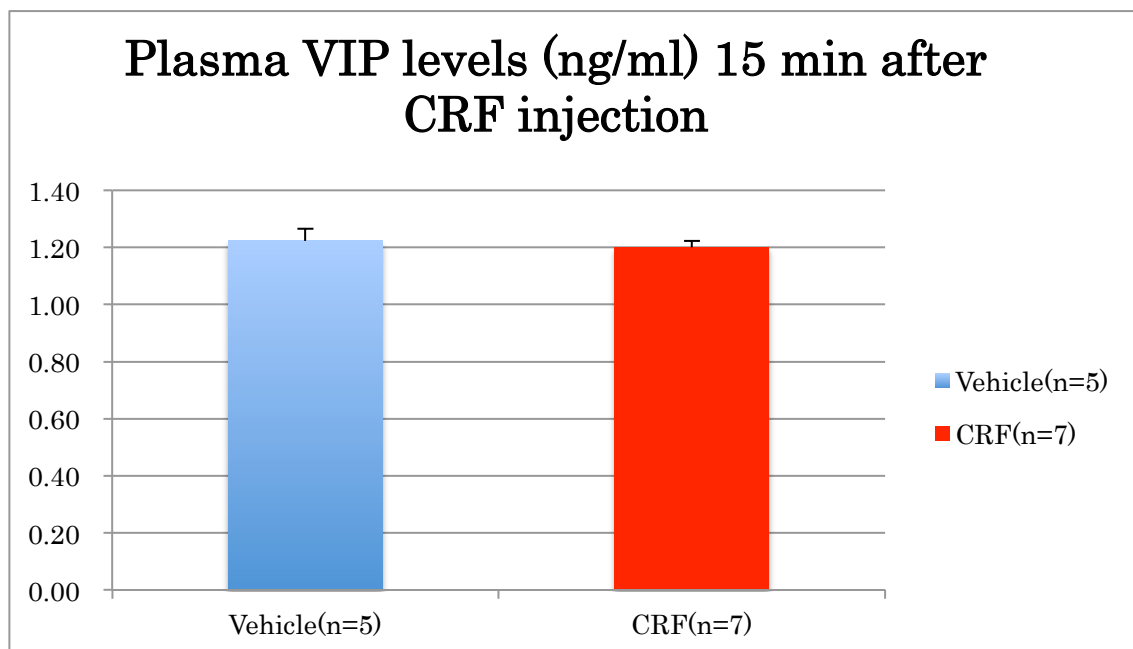


Fig 8A : CRF 投与 15 分後の血中濃度に有意差は認めず
(CRF vs Veh : 1.20 ± 0.02 vs. 1.22 ± 0.04 ng/ml, n=5,7)

Fig 8B : CRF 投与群と生理食塩水投与群の投与 15 分後における回腸末端に
おける VIP 濃度

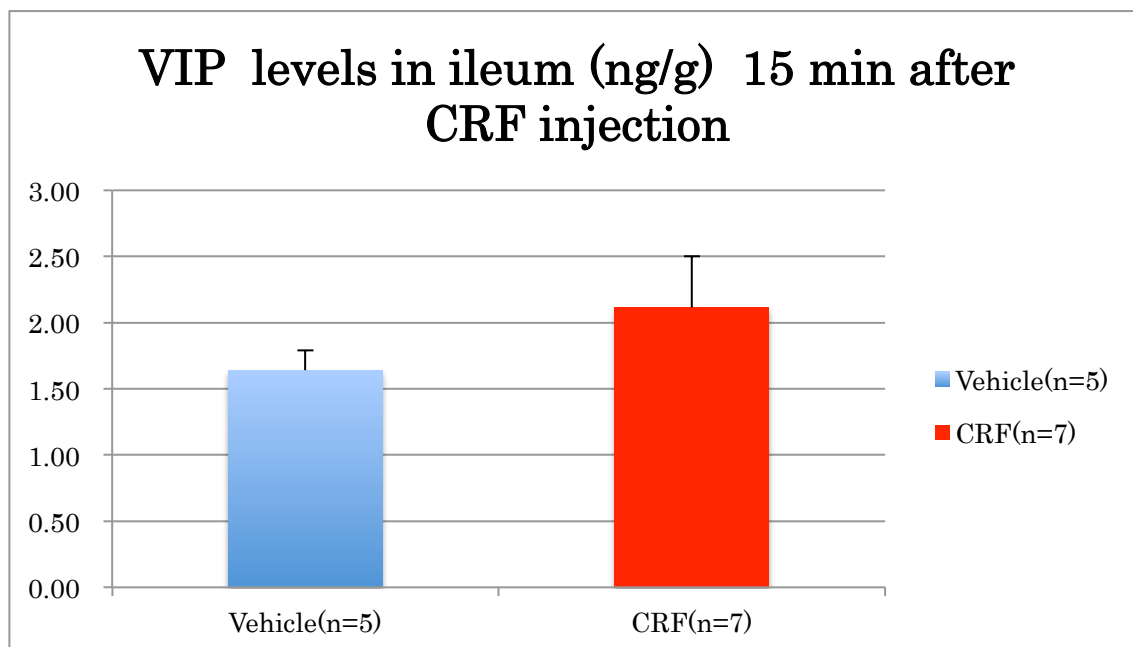


Fig 8B : CRF 投与 15 分後の回腸の VIP に有意差は認めず。
(CRF vs Veh : 2.11 ± 0.39 vs. 1.64 ± 0.15 ng/g, n=5,7)。

Fig 9A : CRF 投与群と生理食塩水投与群の投与 60 分後における血中における VIP 濃度

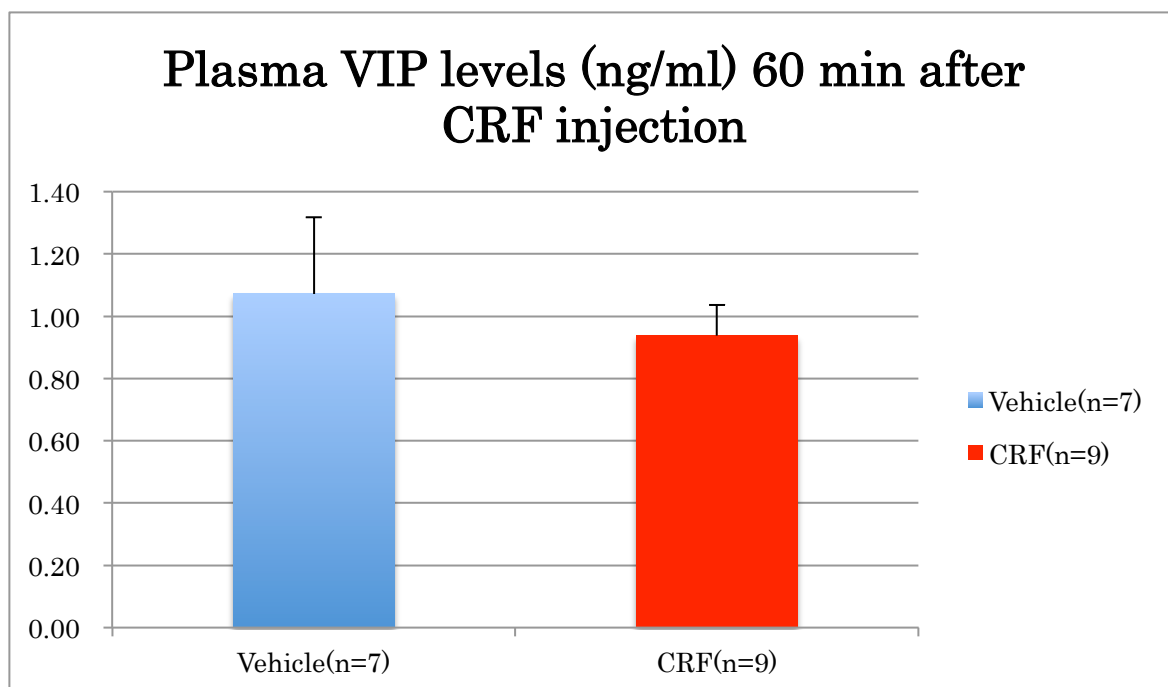


Fig 9A : CRF 投与 60 分後の門脈中の血中濃度にも有意差は認めず。

(Veh vs CRF : 1.07 ± 0.25 vs. 0.94 ± 0.10 ng/ml, n=7,9)

Fig 9B : CRF 投与群と生理食塩水投与群の投与 60 分後における回腸末端における VIP 濃度

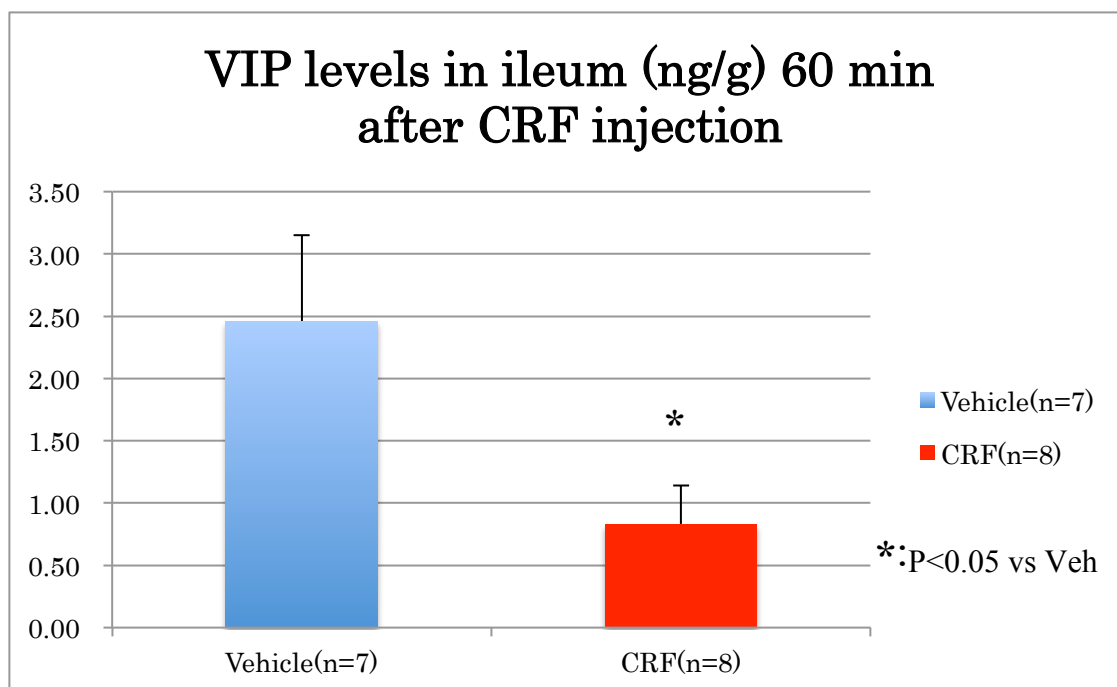


Fig 9B : CRF 投与 60 分後の回腸の VIP 蛋白濃度は、生食群と比較し有意に減少していた (CRF vs Vehicle : 0.83 ± 0.31 , vs 2.46 ± 0.69 ng/g, n=7,8, p<0.05;)

Fig10 : 生理食塩水投与群、CRF 投与群、CRF+VIP アンタゴニスト投与群における投与 60 分後における回腸末端の VIP mRNA 量 (生理食塩水投与群をコントロールとした比率)

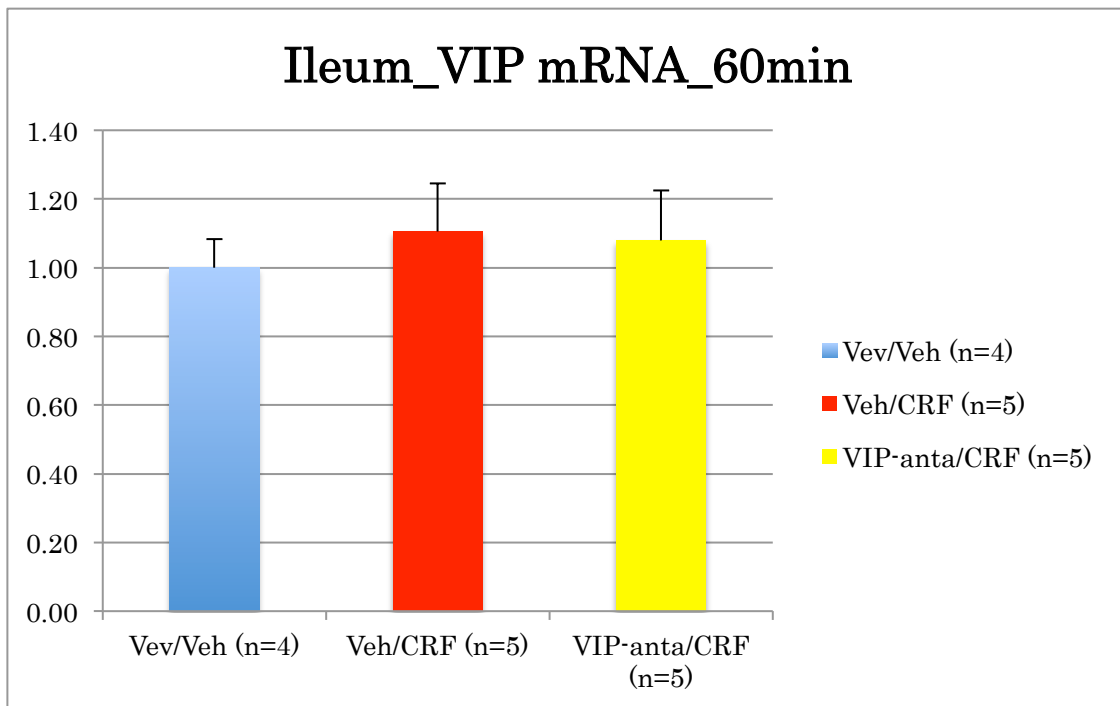


Fig 10 : CRF 投与 60 分後の回腸末端における VIP mRNA 量は、生食-生食群、生食-CRF 群、VIP アンタゴニスト-CRF 群において、有意差を認めなかった (Veh vs CRF vs CRF+VIP antagonist : 1.00 ± 0.08 vs. 1.10 ± 0.14 vs. 1.08 ± 0.15 , n=4-5)。

V : 考察

ストレスは IBS の重要な発症因子や増悪因子の一つとして認識されており [50]、急激なストレスに対する腸の反応は腸における CRF と CRF-R1 の活性化を介して起きていることが良く知られている [51, 52]。ラットやマウスでは、身体抑制や水中などの異なる環境下に晒すことによるストレスによって腸管運動の亢進やムチン、プロスタグランジン E2、肥満細胞分解酵素 II の分泌の増加が誘発されるが、CRF のアンタゴニストである α -helical CRF₉₋₄₁、astressin、astressin-B の腹腔内投与や経静脈的投与が、これらの効果を抑制することが数多く報告されている [18, 53-58]。また、腸管特異的に CRF をノックダウンしたラットでは身体抑制により誘発される排便の増加を認めなかったという報告もある [52]。しかしながら、CRF の下痢の発症への関与についてはまだ十分には解明されておらず、CRF による腸管分泌の促進から下痢を誘発する機序に VIP が介在しているとすれば、IBS における下痢症状に対する新しい治療法につながる可能性がある。ストレスに関連した IBS の下痢発症モデルの 1 つとして「CRF の腹

腔内投与」が確立しており[16, 59]、我々は今回、この IBS モデルラットを用いて CRF と消化管との関連を解析した。CRF-R1 や VIP との関係を含め、既報を交えながら、今回の結果について順に考察していく。

様々な動物や人において CRF とそのレセプターは腸管[21, 45, 60, 61]や腸内の内分泌神経[62]、肥満細胞[45, 55, 63]に存在していることが報告されている。人では、CRF は腸管粘膜に存在し、CRF-R1 mRNA は回腸及び結腸に発現しており、特に粘膜下層や筋層の神経叢に強い免疫活性を示しているとの報告がある[61]。また、健常人に対して CRF を末梢投与すると、実験動物で見られた反応と同様に、腸管運動の亢進や腸管透過性の増加、肥満細胞の活性化が見られる[11, 64, 65]。生体外で腸組織を用いて行った実験では、CRF-R1 を活性化することにより、ストレスによって誘発される腸の運動、分泌の亢進や、コリン作動性神経、クロム親和性細胞、肥満細胞の直接刺激によって生じる腸管の防御機構の変化を模倣していると報告されている[44, 53, 66-68]。内因性の CRF 伝達機構の役割に関しては、ストレスを受けることにより、遠位結腸における CRF の発現

や CRF-R1 の発現が変化するとの報告がある[45, 52, 69-71]。そこで、今回我々はラットに CRF を投与した後に消化管で c-Fos の発現を評価することにより、消化管における活性化部位を評価した。その結果、CRF 投与によって、小腸の粘膜下層及び大腸筋層に c-Fos の発現が誘導され、特に回腸末端において顕著な発現増加を認めた。反対に回腸筋層及び大腸粘膜下層では c-Fos の発現は認めなかった。また、これら c-Fos の発現と排便、下痢の間には強い相関関係を認めた。同様の既報として、末梢での CRF 投与は結腸筋層神経を活性化するが[16, 17, 44]、十二指腸、空腸、回腸の筋層で c-Fos の発現は認めなかったと報告されている[44]。今回の実験結果より、CRF が小腸においては粘膜下層を、結腸では筋層を活性化し、特に回腸粘膜下層及び近位結腸筋層を強く活性化することによって下痢を誘発している可能性が示唆された。

次に我々は CRF による消化管の活性化がどのように誘導されているかを検討した。CRF-R1 を介して起きる腸管筋の活性化が CRF の腸管運動亢進に重要な働きをしていることがラットやモルモットを用いた実験で報告されており[21,

44, 60, 72]、一方で小腸では腸管運動や通過性は抑制されていると報告されてきた[73, 74]。これらの結果から、CRF は小腸ではなく結腸の運動を促進することにより、消化管の活性化に関与していると考えられてきた。しかしながら、今回我々は回腸末端において著明な c-Fos の発現を認め、この c-Fos の発現と下痢 ($r^2=0.90$)や排便($r^2=0.77$)との間に強い相関性があることを確認した。VIP のレセプターである VPAC1 と VPAC2 は齧歯類や人の小腸、結腸に存在することが知られており[75]、今回の我々の実験でもこの回腸末端において VIP 陽性神経の 96.3%に c-Fos の誘導を認めた。また、ラットにおいて回腸粘膜下層に CRF-R1 の免疫活性を認めたとの報告があるが[73]、今回の我々の研究でも回腸末端において VIP 陽性神経に CRF-R1 が共発現していることを確認した。これらの結果は、CRF が回腸粘膜下層において、CRF-R1 を介して直接 VIP 陽性神経を活性化し下痢を誘発している可能性を示唆している。下痢発症のメカニズムとして、結腸における消化管運動亢進だけでなく、回腸粘膜下層における消化管での分泌促進反応が関与していることを示唆しており、その機序に VIP が関与してい

る可能性が示唆された。

VIP は腸の分泌促進機能を刺激し水分や電解質を分泌させることによって下痢を誘発する[76-78]。また、VIP は蠕動反射にも関与しており、腸蠕動に影響することも知られている[77-79]。IBS との関連については、健常者と比較して IBS-D の患者の血中及び腸管の VIP 濃度が高いという報告があり[38, 80-84]、ラットの回腸粘膜を用いた生体外での実験では VIP は回腸粘膜の肥満細胞の VCAP レセプターを介して CRF やストレスにより起きるバクテリアの透過性の亢進と同じような現象を起こすという報告もある[55]。しかしながら、腹腔内投与された CRF が CRF-R1 を介して下痢や排便を起こしている機序に VIP が関与していることを神経系学的及び薬理的に証明した報告はこれまでなく、今回の報告が CRF との関連を明確にした初めての報告である。

そこで、次にこの VIP がどのように分泌され作用しているかについて、検討することにした。既報として、回腸の肥満細胞は VIP を含有し[85]、CRF-R1 を発現している[65]ことが知られており、回腸粘膜下層神経叢に VIP 神経が局在し

ているとの報告もある[86]。このことは今回我々が行った回腸粘膜下層神経叢に VIP 神経が局在し、CRF-R1 が共発現しているとの結果と合致している。これを踏まえて、我々はこの回腸に局在する VIP が CRF により誘発される下痢と関係しているのかを検討した。CRF の腹腔内投与後 15 分より急な排便及び下痢を発症し 30 分をピークとし、投与後 60 分で元の状態に戻ることが、以前より報告されていた[47]。そこで、今回我々は CRF 投与 15 分及び 60 分後の門脈中及び回腸末端における VIP 濃度を測定した。CRF 投与後 15 分では門脈、回腸共に CRF 投与による VIP の変化は認めなかった。しかし 60 分後では、門脈中の VIP 濃度に変化は認めなかったが、回腸末端の VIP 濃度は減少していた。このことは、VIP が回腸局所において分泌され局所で作用している可能性を示唆している。また、CRF 投与 60 分後の回腸における VIP mRNA は CRF 投与群とコントロール群で有意な差は認めなかった。すなわち、VIP は回腸末端において新たに合成されるのではなく、元々存在する VIP が分泌されていることが示唆され、ストレスを受けた際に下痢症状がすぐに出現するという臨床症状とも矛盾せず、こ

の回腸局所における VIP の分泌が IBS 患者におけるストレス下の急激な下痢の発症の機序となっている可能性が示唆された。CRF 投与直前に VIP アンタゴニスト, [4Cl-D-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP を腹腔内投与することによって CRF で誘発される下痢の発現が完全に抑制出来ることや回腸粘膜下層及び結腸筋層における c-Fos の発現も VIP アンタゴニスト投与によって完全に抑制されることは、回腸末端粘膜下層に存在する VIP が CRF により誘発される下痢の発症に関与していることを強く支持する結果であった。

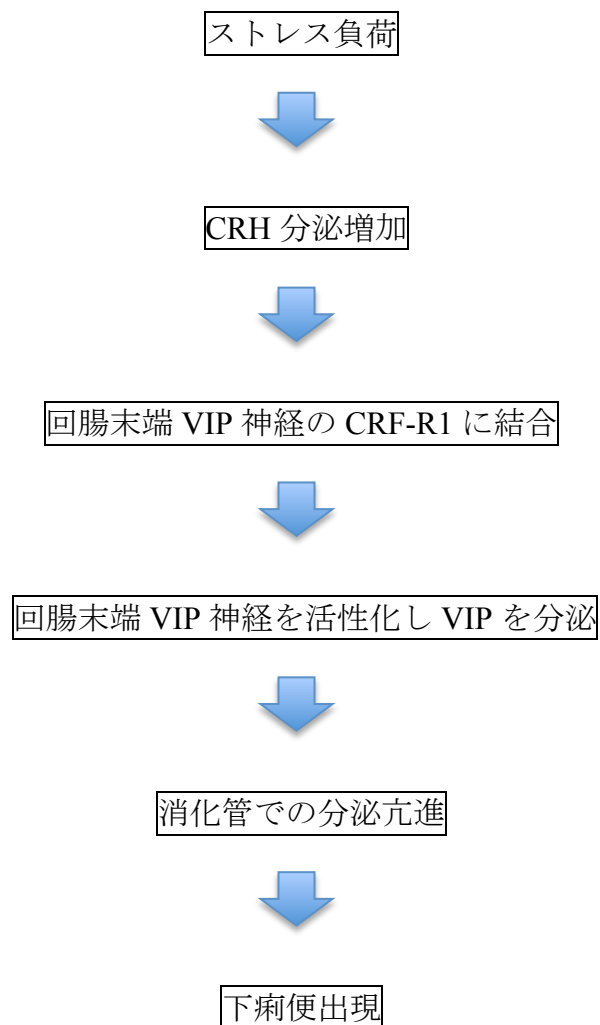
ラットの腸管培養組織片に CRF を加えた際にプロスタグランジン E₂ が分泌され[53]、下痢を誘発するという報告[87]もあるため、今回インドメタシンを投与しプロスタグランジン E₂ の働きを抑制する実験も行ったが、CRF 腹腔内投与による下痢の誘発には効果を示さなかった。このことは抑制ストレスを加え排便の増加を認めたラットにインドメタシンを投与しても排便の抑制は認められず、CRF アンタゴニストを投与することにより排便抑制を認めた[53]との報告とも矛盾しないと考えられる。今回の我々の結果からは、CRF による下痢の誘発に

はプロスタグランジンは関係していないことが示唆された。

今回の我々の実験では、ラットに CRF を腹腔内投与することにより小腸その中でも特に回腸の粘膜下層及び近位結腸の筋層の神経叢を活性化していることが示された。また、この活性化された回腸粘膜下層神経叢の大部分は VIP 陽性神経であり、かつ CRF-R1 を発現していた。また、この神経叢の活性化と下痢や排便との間には強い相関関係を示していた。また、この CRF 投与により回腸末端粘膜下層の VIP の含有量が減少していた。すなわち、これらの結果より CRF は回腸末端粘膜下層の VIP 神経を CRF-R1 を介して直接刺激し回腸末端にある VIP を分泌することにより下痢を誘発している可能性が示唆された。また、実際に今回の実験で VIP レセプターアンタゴニストを投与することにより、CRF の腹腔内投与によって生じた下痢や排便などの現象を抑制することができた。また、同時に回腸粘膜下層や近位結腸筋層で見られた神経叢の活性化は抑制されていた。すなわち、これらのことから VIP を抑制することで CRF により腸管神経の活性化に伴う下痢を抑制出来る可能性が示唆された。すなわち、この結果

から CRF によって誘発される排便や下痢の発症に VIP が重要な役割を果たしており、VIP を抑制することで IBS 患者の突然の下痢の発症を抑制できる可能性が示唆された。現在臨床現場で使用されている VIP アンタゴニストはないが、今回の我々の結果より VIP アンタゴニストは下痢型 IBS 患者の新たな治療薬の一つになる可能性があると考えられる。

Fig 11 : ストレス負荷による下痢の出現は、回腸末端粘膜下層の VIP 陽性神経を CRF-R1 を介して直接刺激し活性化し、VIP を新たに合成するのではなく、局所に存在する VIP を放出することにより下痢を誘導している。



VI：謝辞

今回の研究を遂行する機会及び御指導御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科消化器内科学 小池和彦教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、以下の先生方に特に多大なる御協力および御助言を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

埼玉医科大学総合医療センター消化器肝臓内科

屋嘉比 康治 主任教授

東京大学大学院医学系研究科消化器内科学

山道 信毅 先生

第一三共株式会社 臓器保護ラボラトリー1G

唐澤 博史 先生

David Geffen School of Medicine at University of California Los Angeles

Lixin Wang M.D. Ph.D

Director of CURE , Professor Yvette Tache Ph.D

VII : 引用文献

- [1] Y. Ringel, A. D. Sperber, and D. A. Drossman, "Irritable bowel syndrome," *Annu Rev Med*, vol. 52, pp. 319-38, 2001.

- [2] A. Spinelli, "Irritable bowel syndrome," *Clin Drug Investig*, vol. 27, no. 1, pp. 15-33, 2007.

- [3] M. Kaji, Y. Fujiwara, M. Shiba, Y. Kohata, H. Yamagami, T. Tanigawa, K. Watanabe, T. Watanabe, K. Tominaga, and T. Arakawa, "Prevalence of overlaps between GERD, FD and IBS and impact on health-related quality of life," *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 25, no. 6, pp. 1151-6, Jun, 2010.

- [4] J. Makker, S. Chilimuri, and J. N. Bella, "Genetic epidemiology of irritable bowel syndrome," *World J Gastroenterol*, vol. 21, no. 40, pp. 11353-61, Oct, 2015.

- [5] S. Fukudo, M. Muranaka, T. Nomura, and M. Satake, “[Brain-gut interactions in irritable bowel syndrome: physiological and psychological aspect],” *Nihon Rinsho*, vol. 50, no. 11, pp. 2703-11, Nov, 1992.
- [6] S. Fukudo, “Stress and visceral pain: focusing on irritable bowel syndrome,” *Pain*, vol. 154 Suppl 1, pp. S63-70, Dec, 2013.
- [7] P. Karling, K. F. Norrback, R. Adolfsson, and A. Danielsson, “Gastrointestinal symptoms are associated with hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression in healthy individuals,” *Scand J Gastroenterol*, vol. 42, no. 11, pp. 1294-301, Nov, 2007.
- [8] Y. Sagami, and M. Hongo, “[The gastrointestinal motor function in irritable bowel syndrome (IBS)],” *Nihon Rinsho*, vol. 64, no. 8, pp. 1441-5, Aug, 2006.

- [9] Y. Taché, M. Million, A. G. Nelson, C. Lamy, and L. Wang, “Role of corticotropin-releasing factor pathways in stress-related alterations of colonic motor function and viscerosensibility in female rodents,” *Genet Med*, vol. 2, no. 3, pp. 146-54, Sep, 2005.
- [10] Y. Sagami, Y. Shimada, J. Tayama, T. Nomura, M. Satake, Y. Endo, T. Shoji, K. Karahashi, M. Hongo, and S. Fukudo, “Effect of a corticotropin releasing hormone receptor antagonist on colonic sensory and motor function in patients with irritable bowel syndrome,” *Gut*, vol. 53, no. 7, pp. 958-64, Jul, 2004.
- [11] S. Fukudo, T. Nomura, and M. Hongo, “Impact of corticotropin-releasing hormone on gastrointestinal motility and adrenocorticotrophic hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome,” *Gut*, vol. 42, no. 6, pp. 845-9, Jun, 1998.
- [12] Y. Taché, V. Martinez, M. Million, and C. Maillot, “Role of

- corticotropin releasing factor receptor subtype 1 in stress-related functional colonic alterations: implications in irritable bowel syndrome,” *Eur J Surg Suppl*, no. 587, pp. 16-22, 2002.
- [13] V. Martinez, and Y. Taché, “CRF1 receptors as a therapeutic target for irritable bowel syndrome,” *Curr Pharm Des*, vol. 12, no. 31, pp. 4071-88, 2006.
- [14] M. C. Raux-Demay, and F. Girard, “The physiology of corticotropin-releasing factor (CRF),” *Reprod Nutr Dev*, vol. 25, no. 5, pp. 931-43, 1985.
- [15] W. Vale, J. Spiess, C. Rivier, and J. Rivier, “Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin,” *Science*, vol. 213, no. 4514, pp. 1394-7, Sep, 1981.
- [16] M. Larauche, G. Gourcerol, L. Wang, K. Pambukchian, S. Brunnhuber,

- D. W. Adelson, J. Rivier, M. Million, and Y. Taché, "Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 297, no. 1, pp. G215-27, Jul, 2009.
- [17] M. Miampamba, C. Maillot, M. Million, and Y. Taché, "Peripheral CRF activates myenteric neurons in the proximal colon through CRF(1) receptor in conscious rats," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 282, no. 5, pp. G857-65, May, 2002.
- [18] C. Maillot, M. Million, J. Y. Wei, A. Gauthier, and Y. Taché, "Peripheral corticotropin-releasing factor and stress-stimulated colonic motor activity involve type 1 receptor in rats," *Gastroenterology*, vol. 119, no. 6, pp. 1569-79, Dec, 2000.
- [19] C. L. Williams, R. G. Villar, J. M. Peterson, and T. F. Burks,

- “Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome,” *Gastroenterology*, vol. 94, no. 3, pp. 611-21, Mar, 1988.
- [20] T. Nozu, and T. Okumura, “Corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 interaction in irritable bowel syndrome,” *J Gastroenterol*, vol. 50, no. 8, pp. 819-30, Aug, 2015.
- [21] G. Gourcerol, S. V. Wu, P. Q. Yuan, H. Pham, M. Miampamba, M. Larauche, P. Sanders, T. Amano, A. Mulak, E. Im, C. Pothoulakis, J. Rivier, Y. Taché, and M. Million, “Activation of corticotropin-releasing factor receptor 2 mediates the colonic motor coping response to acute stress in rodents,” *Gastroenterology*, vol. 140, no. 5, pp. 1586-96.e6, May, 2011.
- [22] S. Fukudo, M. Ida, H. Akiho, Y. Nakashima, and K. Matsueda, “Effect of ramosetron on stool consistency in male patients with irritable

bowel syndrome with diarrhea,” *Clin Gastroenterol Hepatol*, vol. 12, no. 6, pp. 953-9.e4, Jun, 2014.

- [23] S. Fukudo, Y. Kinoshita, T. Okumura, M. Ida, H. Akiho, Y. Nakashima, A. Nishida, and K. Haruma, “Ramosetron Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome With Diarrhea and Improves Quality of Life in Women,” *Gastroenterology*, vol. 150, no. 2, pp. 358-66.e8, Feb, 2016.

- [24] T. Hirata, T. Funatsu, Y. Keto, M. Nakata, and M. Sasamata, “Pharmacological profile of ramosetron, a novel therapeutic agent for IBS,” *Inflammopharmacology*, vol. 15, no. 1, pp. 5-9, Feb, 2007.

- [25] H. Mönnikes, J. J. Tebbe, M. Hildebrandt, P. Arck, E. Osmanoglou, M. Rose, B. Klapp, B. Wiedenmann, and I. Heymann-Mönnikes, “Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity,”

- Dig Dis*, vol. 19, no. 3, pp. 201-11, 2001.
- [26] R. Spiller, "Role of motility in chronic diarrhoea," *Neurogastroenterol Motil*, vol. 18, no. 12, pp. 1045-55, Dec, 2006.
- [27] P. P. Toskes, K. L. Connery, and T. W. Ritchey, "Calcium polycarbophil compared with placebo in irritable bowel syndrome," *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 7, no. 1, pp. 87-92, Feb, 1993.
- [28] K. Matsueda, S. Harasawa, M. Hongo, N. Hiwatashi, and D. Sasaki, "A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of the effectiveness of the novel serotonin type 3 receptor antagonist ramosetron in both male and female Japanese patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome," *Scand J Gastroenterol*, vol. 43, no. 10, pp. 1202-11, 2008.
- [29] L. Ruepert, A. O. Quartero, N. J. de Wit, G. J. van der Heijden, G. Rubin, and J. W. Muris, "Bulking agents, antispasmodics and

antidepressants for the treatment of irritable bowel syndrome,”

Cochrane Database Syst Rev, no. 8, pp. CD003460, Aug, 2011.

[30] A. Faresjo, E. Grodzinsky, S. Johansson, M. A. Wallander, T. Faresjo,

and T. Timpka, “Self-reported use of pharmaceuticals among patients

with irritable bowel syndrome in primary care,” *J Manag Care Pharm*,

vol. 14, no. 9, pp. 870-7, 2008 Nov-Dec, 2008.

[31] B. Lavö, M. Stenstam, and A. L. Nielsen, “Loperamide in treatment of

irritable bowel syndrome--a double-blind placebo controlled study,”

Scand J Gastroenterol Suppl, vol. 130, pp. 77-80, 1987.

[32] N. Hovdenak, “Loperamide treatment of the irritable bowel syndrome,”

Scand J Gastroenterol Suppl, vol. 130, pp. 81-4, 1987.

[33] P. S. Efskind, T. Bernklev, and M. H. Vatn, “A double-blind

placebo-controlled trial with loperamide in irritable bowel syndrome,”

Scand J Gastroenterol, vol. 31, no. 5, pp. 463-8, May, 1996.

- [34] J. E. Kellow, "Advances in the management of irritable bowel syndrome," *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 17, no. 4, pp. 503-7, Apr, 2002.
- [35] S. I. Said, and V. Mutt, "Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut," *Nature*, vol. 225, no. 5235, pp. 863-4, Feb, 1970.
- [36] S. I. Said, and V. Mutt, "Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine," *Science*, vol. 169, no. 3951, pp. 1217-8, Sep, 1970.
- [37] S. Kordasti, H. Sjövall, O. Lundgren, and L. Svensson, "Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea," *Gut*, vol. 53, no. 7, pp. 952-7, Jul, 2004.
- [38] H. Zhang, Y. Yan, R. Shi, Z. Lin, M. Wang, and L. Lin, "Correlation of gut hormones with irritable bowel syndrome," *Digestion*, vol. 78, no.

2-3, pp. 72-6, 2008.

- [39] M. Simrén, P. O. Stotzer, H. Sjövall, H. Abrahamsson, and E. S. Björnsson, "Abnormal levels of neuropeptide Y and peptide YY in the colon in irritable bowel syndrome," *Eur J Gastroenterol Hepatol*, vol. 15, no. 1, pp. 55-62, Jan, 2003.
- [40] J. R. Thiagarajah, and A. S. Verkman, "CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion," *Curr Opin Pharmacol*, vol. 3, no. 6, pp. 594-9, Dec, 2003.
- [41] S. J. Pandol, K. Dharmasathaphorn, M. S. Schoeffield, W. Vale, and J. Rivier, "Vasoactive intestinal peptide receptor antagonist [4Cl-D-Phe6, Leu17] VIP," *Am J Physiol*, vol. 250, no. 4 Pt 1, pp. G553-7, Apr, 1986.
- [42] L. Wang, G. Gourcerol, P. Q. Yuan, S. V. Wu, M. Million, M. Larauche, and Y. Taché, "Peripheral peptide YY inhibits propulsive colonic motor function through Y2 receptor in conscious mice," *Am J Physiol*

- Gastrointest Liver Physiol*, vol. 298, no. 1, pp. G45-56, Jan, 2010.
- [43] P. Q. Yuan, H. Kimura, M. Million, J. P. Bellier, L. Wang, G. V. Ohning, and Y. Taché, “Central vagal stimulation activates enteric cholinergic neurons in the stomach and VIP neurons in the duodenum in conscious rats,” *Peptides*, vol. 26, no. 4, pp. 653-64, Apr, 2005.
- [44] P. Q. Yuan, M. Million, S. V. Wu, J. Rivier, and Y. Taché, “Peripheral corticotropin releasing factor (CRF) and a novel CRF1 receptor agonist, stressin1-A activate CRF1 receptor expressing cholinergic and nitrenergic myenteric neurons selectively in the colon of conscious rats,” *Neurogastroenterol Motil*, vol. 19, no. 11, pp. 923-36, Nov, 2007.
- [45] P. Q. Yuan, S. V. Wu, L. Wang, and Y. Taché, “Corticotropin releasing factor in the rat colon: expression, localization and upregulation by endotoxin,” *Peptides*, vol. 31, no. 2, pp. 322-31, Feb, 2010.
- [46] D. A. Keire, J. P. Whitelegge, P. Souda, K. F. Faull, S. Bassilian, R. D.

- Reidelberger, A. C. Haver, and J. R. Reeve, "PYY(1-36) is the major form of PYY in rat distal small intestine: quantification using high-resolution mass spectrometry," *Regul Pept*, vol. 165, no. 2-3, pp. 151-7, Dec, 2010.
- [47] P. R. Saunders, C. Maillot, M. Million, and Y. Taché, "Peripheral corticotropin-releasing factor induces diarrhea in rats: role of CRF1 receptor in fecal watery excretion," *Eur J Pharmacol*, vol. 435, no. 2-3, pp. 231-5, Jan, 2002.
- [48] G. Sütö, A. Király, V. Plourde, and Y. Taché, "Intravenous interleukin-1-beta-induced inhibition of gastric emptying: involvement of central corticotrophin-releasing factor and prostaglandin pathways in rats," *Digestion*, vol. 57, no. 2, pp. 135-40, 1996.
- [49] V. Martinez, L. Wang, and Y. Taché, "Peripheral adrenomedullin

inhibits gastric emptying through CGRP8-37 -sensitive receptors and prostaglandins pathways in rats,” *Peptides*, vol. 27, no. 6, pp. 1376-82, Jun, 2006.

[50] L. Chang, “The role of stress on physiologic responses and clinical symptoms in irritable bowel syndrome,” *Gastroenterology*, vol. 140, no. 3, pp. 761-5, Mar, 2011.

[51] M. Larauche, “Novel insights in the role of peripheral corticotropin-releasing factor and mast cells in stress-induced visceral hypersensitivity,” *Neurogastroenterol Motil*, vol. 24, no. 3, pp. 201-5, Mar, 2012.

[52] S. Liu, J. Chang, N. Long, K. Beckwith, G. Talhouarne, J. J. Brooks, M. H. Qu, W. Ren, J. D. Wood, S. Cooper, and A. Bhargava, “Endogenous CRF in rat large intestine mediates motor and secretory responses to stress,” *Neurogastroenterol Motil*, vol. 28, no. 2, pp. 281-91, Feb, 2016.

- [53] I. Castagliuolo, J. T. Lamont, B. Qiu, S. M. Fleming, K. R. Bhaskar, S. T. Nikulasson, C. Kornetsky, and C. Pothoulakis, "Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells," *Am J Physiol*, vol. 271, no. 5 Pt 1, pp. G884-92, Nov, 1996.
- [54] G. Gourcerol, L. Wang, D. W. Adelson, M. Larauche, Y. Taché, and M. Million, "Cholinergic giant migrating contractions in conscious mouse colon assessed by using a novel noninvasive solid-state manometry method: modulation by stressors," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 296, no. 5, pp. G992-G1002, May, 2009.
- [55] A. V. Keita, J. D. Söderholm, and A. C. Ericson, "Stress-induced barrier disruption of rat follicle-associated epithelium involves corticotropin-releasing hormone, acetylcholine, substance P, and mast cells," *Neurogastroenterol Motil*, vol. 22, no. 7, pp. 770-8, e221-2, Jul, 2010.

- [56] M. Million, D. E. Grigoriadis, S. Sullivan, P. D. Crowe, J. A. McRoberts, H. Zhou, P. R. Saunders, C. Maillot, E. A. Mayer, and Y. Taché, “A novel water-soluble selective CRF1 receptor antagonist, NBI 35965, blunts stress-induced visceral hyperalgesia and colonic motor function in rats,” *Brain Res*, vol. 985, no. 1, pp. 32-42, Sep, 2003.
- [57] K. Miyata, H. Ito, and S. Fukudo, “Involvement of the 5-HT3 receptor in CRH-induced defecation in rats,” *Am J Physiol*, vol. 274, no. 5 Pt 1, pp. G827-31, May, 1998.
- [58] C. L. Williams, J. M. Peterson, R. G. Villar, and T. F. Burks, “Corticotropin-releasing factor directly mediates colonic responses to stress,” *Am J Physiol*, vol. 253, no. 4 Pt 1, pp. G582-6, Oct, 1987.
- [59] M. Larauche, A. Mulak, and Y. Taché, “Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies,” *Exp Neurol*, vol. 233, no. 1, pp. 49-67, Jan, 2012.

- [60] T. Kimura, T. Amano, H. Uehara, H. Ariga, T. Ishida, A. Torii, H. Tajiri, K. Matsueda, and S. Yamato, "Urocortin I is present in the enteric nervous system and exerts an excitatory effect via cholinergic and serotonergic pathways in the rat colon," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 293, no. 4, pp. G903-10, Oct, 2007.
- [61] P. Q. Yuan, S. V. Wu, J. Elliott, P. A. Anton, E. Chatzaki, M. Million, and Y. Taché, "Expression of corticotropin releasing factor receptor type 1 (CRF1) in the human gastrointestinal tract and upregulation in the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis," *Peptides*, vol. 38, no. 1, pp. 62-9, Nov, 2012.
- [62] Y. Kawahito, H. Sano, M. Kawata, K. Yuri, S. Mukai, Y. Yamamura, H. Kato, G. P. Chrousos, R. L. Wilder, and M. Kondo, "Local secretion of corticotropin-releasing hormone by enterochromaffin cells in human colon," *Gastroenterology*, vol. 106, no. 4, pp. 859-65, Apr, 1994.

- [63] D. O'Malley, J. F. Cryan, and T. G. Dinan, "Crosstalk between interleukin-6 and corticotropin-releasing factor modulate submucosal plexus activity and colonic secretion," *Brain Behav Immun*, vol. 30, pp. 115-24, May, 2013.
- [64] T. Vanuytsel, S. van Wanrooy, H. Vanheel, C. Vanormelingen, S. Verschueren, E. Houben, S. Salim Rasoel, J. Tóth, L. Holvoet, R. Farré, L. Van Oudenhove, G. Boeckxstaens, K. Verbeke, and J. Tack, "Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism," *Gut*, vol. 63, no. 8, pp. 1293-9, Aug, 2014.
- [65] C. Wallon, and J. D. Söderholm, "Corticotropin-releasing hormone and mast cells in the regulation of mucosal barrier function in the human colon," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1165, pp. 206-10, May, 2009.
- [66] M. Larauche, C. Kiank, and Y. Tache, "Corticotropin releasing factor

signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications,” *J Physiol Pharmacol*, vol. 60 Suppl 7, pp. 33-46, Dec, 2009.

[67] E. L. Overman, J. E. Rivier, and A. J. Moeser, “CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF- α ,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. e39935, 2012.

[68] Y. Taché, M. Larauche, P. Q. Yuan, and M. Million, “Brain and gut CRF signaling: biological actions and role in the gastrointestinal tract,” *Curr Mol Pharmacol*, 02, 2017.

[69] D. O'Malley, T. G. Dinan, and J. F. Cryan, “Alterations in colonic corticotropin-releasing factor receptors in the maternally separated rat model of irritable bowel syndrome: differential effects of acute psychological and physical stressors,” *Peptides*, vol. 31, no. 4, pp. 662-70, Apr, 2010.

- [70] D. o'malley, M. Julio-Pieper, S. M. Gibney, R. D. Gosselin, T. G. Dinan, and J. F. Cryan, "Differential stress-induced alterations of colonic corticotropin-releasing factor receptors in the Wistar Kyoto rat," *Neurogastroenterol Motil*, vol. 22, no. 3, pp. 301-11, Mar, 2010.
- [71] E. Sand, A. Themner-Persson, and E. Ekblad, "Corticotropin releasing factor-distribution in rat intestine and role in neuroprotection," *Regul Pept*, vol. 166, no. 1-3, pp. 68-75, Jan, 2011.
- [72] S. Liu, W. Ren, M. H. Qu, G. A. Bishop, G. D. Wang, X. Y. Wang, Y. Xia, and J. D. Wood, "Differential actions of urocortins on neurons of the myenteric division of the enteric nervous system in guinea pig distal colon," *Br J Pharmacol*, vol. 159, no. 1, pp. 222-36, Jan, 2010.
- [73] C. Porcher, A. Juhem, A. Peinnequin, V. Sinniger, and B. Bonaz, "Expression and effects of metabotropic CRF1 and CRF2 receptors in rat small intestine," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 288,

no. 5, pp. G1091-103, May, 2005.

- [74] Y. Yin, L. Dong, and D. Yin, "Peripheral and central administration of exogenous urocortin 1 disrupts the fasted motility pattern of the small intestine in rats via the corticotrophin releasing factor receptor 2 and a cholinergic mechanism," *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 23, no. 7 Pt 2, pp. e79-87, Jul, 2008.
- [75] D. Jayawardena, G. Guzman, R. K. Gill, W. A. Alrefai, H. Onyuksel, and P. K. Dudeja, "Expression and localization of VPAC1, the major receptor of vasoactive intestinal peptide along the length of the intestine," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 313, no. 1, pp. G16-G25, Jul, 2017.
- [76] H. J. Cooke, "Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 915, pp. 77-80, 2000.
- [77] C. Fung, P. Unterweger, L. J. Parry, J. C. Bornstein, and J. P. Foong,

“VPAC1 receptors regulate intestinal secretion and muscle contractility by activating cholinergic neurons in guinea pig jejunum,”

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, vol. 306, no. 9, pp. G748-58,

May, 2014.

[78] V. Lelievre, G. Favrais, C. Abad, H. Adle-Biassette, Y. Lu, P. M.

Germano, G. Cheung-Lau, J. R. Pisegna, P. Gressens, G. Lawson, and

J. A. Waschek, “Gastrointestinal dysfunction in mice with a targeted

mutation in the gene encoding vasoactive intestinal polypeptide: a

model for the study of intestinal ileus and Hirschsprung's disease,”

Peptides, vol. 28, no. 9, pp. 1688-99, Sep, 2007.

[79] J. R. Grider, and G. M. Makhlouf, “Colonic peristaltic reflex:

identification of vasoactive intestinal peptide as mediator of

descending relaxation,” *Am J Physiol*, vol. 251, no. 1 Pt 1, pp. G40-5,

Jul, 1986.

- [80] O. Bednarska, S. A. Walter, M. Casado-Bedmar, M. Ström, E. Salvo-Romero, M. Vicario, E. A. Mayer, and Å. Keita, "Vasoactive Intestinal Polypeptide and Mast Cells Regulate Increased Passage of Colonic Bacteria in Patients With Irritable Bowel Syndrome," *Gastroenterology*, vol. 153, no. 4, pp. 948-960.e3, Oct, 2017.
- [81] A. Y. Del Valle-Pinero, L. B. Sherwin, E. M. Anderson, R. M. Caudle, and W. A. Henderson, "Altered vasoactive intestinal peptides expression in irritable bowel syndrome patients and rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis," *World J Gastroenterol*, vol. 21, no. 1, pp. 155-63, Jan, 2015.
- [82] B. Han, "Correlation between gastrointestinal hormones and anxiety-depressive states in irritable bowel syndrome," *Exp Ther Med*, vol. 6, no. 3, pp. 715-720, Sep, 2013.
- [83] O. S. Palsson, O. Morteau, E. M. Bozymski, J. T. Woosley, R. B. Sartor,

M. J. Davies, D. A. Johnson, M. J. Turner, and W. E. Whitehead,
“Elevated vasoactive intestinal peptide concentrations in patients
with irritable bowel syndrome,” *Dig Dis Sci*, vol. 49, no. 7-8, pp.
1236-43, Aug, 2004.

[84] W. Sohn, O. Y. Lee, S. P. Lee, K. N. Lee, D. W. Jun, H. L. Lee, B. C.
Yoon, H. S. Choi, J. Sim, and K. S. Jang, “Mast cell number, substance
P and vasoactive intestinal peptide in irritable bowel syndrome with
diarrhea,” *Scand J Gastroenterol*, vol. 49, no. 1, pp. 43-51, Jan, 2014.

[85] A. V. Keita, A. H. Carlsson, M. Cigéhn, A. C. Ericson, D. M. McKay,
and J. D. Söderholm, “Vasoactive intestinal polypeptide regulates
barrier function via mast cells in human intestinal follicle-associated
epithelium and during stress in rats,” *Neurogastroenterol Motil*, vol.
25, no. 6, pp. e406-17, Jun, 2013.

[86] L. I. Larsson, J. Fahrenkrug, O. Schaffalitzky De Muckadell, F.

Sundler, R. Håkanson, and J. R. Rehfeld, "Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 73, no. 9, pp. 3197-200, Sep, 1976.

- [87] A. Robert, J. E. Nezamis, C. Lancaster, A. J. Hanchar, and M. S. Klepper, "Enteropooling assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins," *Prostaglandins*, vol. 11, no. 5, pp. 809-28, May, 1976.