



〈原著〉

大腸炎モデルラット作製法2種類の病態比較

岡田 光貴¹⁾、松尾 佳乃²⁾、天田 実玖¹⁾、柏原 紗季¹⁾、
葛城 古都¹⁾、堂前 美晴¹⁾、森脇 柁¹⁾、山内 涼平¹⁾、吉田 純¹⁾

Comparison of pathological conditions in two methods for preparing experimental colitis model rats

Kohki Okada¹⁾, Kano Matsu²⁾, Miku Amada¹⁾, Saki Kashihara¹⁾, Koto Katsuragi¹⁾,
Miharu Doumae¹⁾, Masaki Moriwaki¹⁾, Ryouhei Yamauchi¹⁾, Jun Yoshida¹⁾

Summary Inflammatory bowel disease (IBD) is an intractable disease characterized by persistent inflammation in the colon. Animal experiments have been conducted to analyze the pathogenesis of IBD. The effectiveness of two methods that induced IBD in rats treated with dextran sulfate sodium (DSS) or 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) were compared. A peak disease severity index (DAI) score of IBD was noted for DSS-treated rats on the final day of the experiment (2 weeks after initiation). Meanwhile, the DAI scores of TNBS-treated rats peaked a few days after the experiment was initiated and then gradually decreased. Microscopic examination of colon tissues revealed severe mucosa dehiscence and immune cell infiltration in DSS-treated rats, whereas these findings were mild in TNBS-treated rats. The serum concentrations of three inflammatory cytokines were higher in DSS-treated rats than in TNBS-treated rats. The TNBS and DSS animal models would be preferable for short-term (<1 week) and long-term (>1 week) colitis studies, respectively. Because each IBD animal model has different pathological conditions, the appropriate method should be selected for the experiment.

Key words: Animal experiment, Dextran sulfate sodium, Inflammatory bowel disease, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid

¹⁾ 京都橘大学 健康科学部 臨床検査学科
〒607-8175 京都府京都市山科区大宅山田町34

²⁾ 京都橘大学大学院 健康科学研究科
〒607-8175 京都府京都市山科区大宅山田町34

連絡先：岡田 光貴
京都橘大学健康科学部臨床検査学科
Tel: +81-755-74-4486 (ex.4942)

E-mail: okada-ko@tachibana-u.ac.jp

¹⁾ Department of Medical Technology and Sciences,
Faculty of Health Sciences, Kyoto Tachibana University,
34 Yamada-cho Oyake, Yamashina-ku, Kyoto-shi,
Kyoto, 607-8175, Japan

²⁾ Graduate School of Health Sciences, Kyoto Tachibana
University, 34 Yamada-cho Oyake, Yamashina-ku,
Kyoto-shi, Kyoto, 607-8175, Japan

受付日：2023年8月31日

採択日：2023年11月17日

I. 緒言

炎症性腸疾患 (IBD) は潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) の総称である。UCは直腸部から大腸全域にかけて連続的に炎症が生じ、CDは小腸や大腸に非連続的な炎症や潰瘍が生じる¹⁾。日本のIBD患者数は右肩上がりに増加しており、近年はUC患者数が20万人、CD患者数が6万人を超えている²⁾。IBDの主な症状は腹痛、下痢、下血であるが、これら症状の再燃と寛解を繰り返すため、患者の精神的・身体的負担が大きい。IBDを完治するための手段は現状存在せず、基礎研究および臨床研究における新たなエビデンスの創出が常に望まれている。

IBDの基礎研究には古くから動物モデルが活用されている。そして、実験動物にIBDを発症させる手法は複数報告されている。1つは硫酸化デキストラン (DSS) を実験動物の飲用水に溶解し、それを経口的に常飲させる方法である。これにより、大腸粘膜が機能異常を引き起こし、上皮細胞によるバリア機能が低下することで自然免疫系の異常活性が引き起こされ、炎症が惹起される³⁾。この方法はDSSの濃度や投与期間を調整することで腸炎の重症度をコントロールすることが可能であり、簡便かつ汎用性が高い。また、DSS腸炎モデル動物にアゾキシメタンを投与することで、大腸癌モデルの作製も可能である³⁾。他には、ハプテンとして機能する2物質、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) あるいはオキサゾロンを直腸肛門部から投与する方法がある。これら大腸内に投与することでハプテン依存性のヘルパー T細胞が活性化され、大腸炎が惹起される^{4,5)}。これらの手法は薬液が肛門から漏れ出ることによって上手く入らないことや、逆に急激な炎症反応に伴う大腸の穿孔により動物が死亡する懸念があるが、DSSに比べると試薬が安価で重宝される。ただし、オキサゾロンは皮膚炎モデル動物の作製にも用いられることから大腸以外への障害も考えられ、詳細な大腸炎発症メカニズムも不明であるため、TNBSに比べると今のところは広く活用されていない^{6,7)}。遺伝子変異による手法も存在し、インターロイキン (IL) -10ノックアウト動物では成長過程で自然と大腸炎が発症することが示されている⁸⁾。この遺伝子変異に取り組むことや、

変異モデル動物を購入することには多大なコストを要すると共に、その後の飼育維持も困難である。ナイーブT細胞を注射にて移植することで腸炎を発症させる手法もあるが、T細胞のみをソートして回収する作業が複雑である⁹⁾。

以上の背景を踏まえると、DSSあるいはTNBSによる大腸炎モデル動物が有用と思われる。一方で、この2手法における大腸炎の病態を詳細に比較する報告は希少である。我々も過去にDSS大腸炎モデルラットを用いた研究成果はあるが^{10,11)}、TNBS大腸炎モデルラットを研究に用いたことはなかった。今後もIBDに関する基礎研究を継続する過程で、大腸炎モデル動物の各種作製法の違いを知ることは重要である。各手法における病態の差異や重症度の変動を理解することで、今後の動物実験プロトコルの立案に活かせると共に、成果を得るための最適な方法を選択できるようになる。そこで本研究では、DSSとTNBSそれぞれをラットに投与することで大腸炎を発症させ、2手法における病態変化の違いを精査、各種法の特徴や有用性を明らかにする。

II. 材料と方法

1. 対象動物

本研究は京都橘大学動物実験委員会に承認を受け実施した (承認番号: 22-07)。野生型Slc: Wistarラット (WT、オス、9週齢、220-250 g) は、清水実験材料株式会社 (京都) から入手した。実験に先立ち飼料 (MF、オリエンタル酵母工業株式会社、東京) と蒸留水を自由に摂取できるようにして、1週間飼育した。実験期間中は温度 (22℃) と湿度 (60%) を制御し、昼夜のサイクルが12時間おきに切り換わるよう人工光で調整した。ラットは金網を敷いたプラスチックケージで飼育した。

2. 材料

DSS塩 (分子量: 36,000-50,000) とTNBS二水和物は、富士フィルム和光純薬工業株式会社 (東京) から購入した。マイヤーヘマトキシリン液とピュア・エオシン液は武藤化学株式会社 (東京) から入手した。IL-6、IL-1β、およびTumor necrosis factor-α (TNF-α) の酵素結合免疫吸着

Table 1 List of primers used.

Gene	Forward	Reverse	Size (bp)
β-Actin	5'-TGTTGTTGTCCTGTATGCCTCTG-3'	5'-ATAGATGGGCACAGTGTGGGTG-3'	85
IL-1β	5'-CACCTCTCAAGGAGACACAGA-3'	5'-ACGGGTTCATGGTGAAGTC-3'	81
IL-6	5'-ATATGTTCTCAGGGAGATCTTGAA-3'	5'-GTGCATCATCGTGTTCATACA-3'	80
IL-10	5'-GCCAAGCCTTGTCAGAAATGA-3'	5'-TTTCTGGGCCATGGTTCCTCT-3'	75
TNF-α	5'-GTGATCGGTCCCAACAAGGA-3'	5'-AGGGTCTGGGCCATGGAA-3'	71
TGF-β	5'-ACCTGCAAGACCATCGACATG-3'	5'-CGAGCCTTAGTTTGGACAGGAT-3'	85

法 (ELISA) 測定キット、Anti-Neutrophil Elastase (NE) IgG、タンパク抽出液PRO-PREP™はコスモバイオ株式会社 (東京) から入手した。遺伝子抽出液TRIzol™ reagent、SuperScript™ II Reverse Transcriptase、PowerUp SYBR Green Master Mix、およびIL-6、IL-1β、TNF-α、IL-10、Transforming growth factor-β (TGF-β) のプライマーはThermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) から入手した。設計したプライマーの配列は過去に使用したものと同様で、Table 1の通りである¹²⁾。Horseradish peroxidase (HRP) -labeled anti-rabbit IgG (H+L) goat-poly IgGはフナコシ株式会社 (東京) から入手した。その他の試薬は全て和研薬株式会社 (京都) あるいはナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。

3. 方法

1) 動物実験のプロトコル

動物実験に先立ち、DSS塩を蒸留水に3%の割合で溶解した。また、TNBS二水和物を100 mg/mLの濃度になるよう50%エタノールに溶解した。WTをN=6ずつ以下の①-④のグループに分類した。① Normal群 - 実験期間の14日間、通常通りに飼育した正常ラット群、② DSS群 - 実験期間14日間で、蒸留水の代わりに3%DSSを常飲した群、③ TNBS 50群 - 初日 (0日目) に3種混合麻酔 (塩酸メドミジン0.15 mg/kg + ミダゾラム 2 mg/kg + 石炭酸ブトルフェノール2.5 mg/kg) を腹腔内注射し、深麻酔下で50 mg/kgのTNBSを外径1cmのテフロン製動物用経口投与チューブで肛門部から大腸内へ投与、深麻酔が切れるまで数時間は肛門部を上向きにして飼育ケージに静置し、大腸内にTNBS成分を浸透させた後で14日間飼育した群、④ TNBS100群 - TNBS 50群と同様の操作で投与量を100 mg/kgに変更した群とした。なお、DSSとTNBSは過去の文献で採用が多い投与量に設定した¹³⁻¹⁵⁾。特にTNBSは報告によ

り様々であるため、本研究では投与量を変えて2群を設定した。実験期間中、各ラットの体重を毎朝測定し、臨床的重症度 (DAI) スコアをTable 2に示す基準に基づいて0-4の数値で評価した¹⁶⁾。実験の14日目に深麻酔下で解剖を実施し、心臓からの採血を実施した。さらに、大腸をすばやく摘出し、その長さを測定した。

Table 2 Criteria used for disease activity index (DAI) scoring.

Scores	Weight loss (%)	DAI scores	
		Stool consistency	Occult/gross bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1-5	Loose stool	Occult bleeding
2	6-10		
3	11-20	Diarrhea	Gross bleeding
4	>20		

2) 検体の採取と調製

血液検体 (3 mL/ラット) は凝固を確認した後で遠心分離 (3,500 rpm、10分) し、得られた血清をチューブに移し、使用するまで-80℃で保存した。

大腸検体は摘出した後で均等に3分割し、直腸に近い側から直腸部、中間部、近位部と名付けた。組織学的評価のために大腸各部位を10%ホルマリン/0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で固定し、その後パラフィンに包埋した。未固定の残存組織中のmRNAは以下の要領で抽出した。

大腸各部位 (直腸部、中間部、近位部) 300 mgをそれぞれ1.0 mLのTRIzol™ 試薬中で10分間インキュベートし、本試薬のプロトコルに従って大腸組織のmRNAを抽出した。DSSはmRNAからcDNAへの逆転写反応を阻害するため、8M塩化リチウムで処理して、その影響を取り除いた¹³⁾。

SuperScript™ II Reverse Transcriptaseを用いて本試薬のプロトコルに従いmRNAからcDNAを合成、それらをチューブ内にて-20℃で保存した。

3) 大腸組織の病理組織学的解析

IBDモデルラットの大腸組織を顕微鏡で観察した。全ラットの大腸組織から3 μ m厚の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を実施した。ラットの大腸各部位 (直腸部、中間部、近位部) 全てを鏡検し、最も炎症所見を強く認めた直腸部の写真を、本論文に掲載した。H&E染色に基づいて、大腸組織におけるIBDの組織学的重症度 (HIS) スコアを、Table 3 に示す基準に基づき複数名で確認し、0-7の数値で評価した¹⁷⁾。なお、ラットの大腸各部位の全てを鏡検し、最も重症部位であった直腸部のスコアを採用している。さらに、Anti-NE IgGを用いて、直腸部における好中球浸潤の程度 (NEの発現) を、ジアミノベンチジン (DAB) を用いた免疫染色により確認した¹⁸⁾。画像はBIOREVO BZ-9000顕微鏡 (株式会社キーエンス、大阪) を用いて撮影した。

Table 3 Criteria used for Histological severity (HIS) scoring.

HIS Scores	
No activity (no extravascular neutrophils)	
Normal biopsy or inactive colitis	0
Mild activity (lamina propria neutrophils only)	
Scattered individual neutrophils	1
Patchy collections of neutrophils	2
Diffuse neutrophilic infiltrate	3
Moderate activity (cryptitis/crypt abscesses)	
25% of crypts involved	4
25%–74% of crypts involved	5
75% of crypts involved	6
Severe activity	

4) ELISA

血清中の炎症性サイトカイン濃度をELISAにて測定した。IL-6、IL-1 β 、およびTNF- α 濃度を、それぞれのELISAキットを用いて、製品プロトコルに従って測定した。発色反応の吸光度はBio-Rad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA) のiMark™ マイクロプレートリーダーを用いて波長450 nmで測定した。

5) Real-Time PCR

Real-Time PCRは、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、過去の報告と同様の手法でサイトカイン5種類 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、TGF- β) を測定

した¹⁰⁻¹³⁾。分析試料には、各ラット群の直腸部から抽出したmRNAに由来するcDNAを採用した。リファレンス遺伝子は β -actinとし、Normal群の直腸部における各種サイトカインmRNA発現量を「1」とした相対定量値を算出した ($\Delta\Delta$ CT法)。

6) ラット血清に対する生化学検査

オリエンタル酵母工業株式会社、長浜工場、長浜ライフサイエンスラボラトリー (滋賀) に外注し、ラット血清の生化学検査20項目を分析した。試料として、各群N=6のラット血清を等量混合し、試料間の個体差を平均化した。測定機器はJCA-BM6050 (日本電子株式会社、東京) であり、測定項目は次の通りである。総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、グルコース (GLU)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、尿酸 (UA)、鉄 (Fe)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、アミラーゼ (AMY)、クレアチンキナーゼ (CK)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GT)、コリンエステラーゼ (ChE)、リパーゼ (Lip)、総コレステロール (T-CHO)、中性脂肪 (TG)、LDL-コレステロール (LDL-C)、HDL-コレステロール (HDL-C)。

7) 統計解析

各群間の有意差は統計解析ソフトウェアEasy R 4.3.1を用いて、Mann-Whitney U検定により評価した¹⁸⁾。全ての数値データはグラフ内に平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。P値<0.05を統計的に有意とした。

Ⅲ. 結果

1. 体重とDAIスコアの変動

TNBS 50群は1-2日目に体重を減少させたものの、3日目以降は徐々に増加した (Fig. 1A)。TNBS 100群は2-6日目に体重が低い傾向にあったが、7日目以降は徐々に回復した (Fig. 1A)。DSS群では3日目までは体重が増加した後、徐々に減少していった (Fig. 1A)。なお、解剖の際、消化管に食物残渣が出来るだけ残っていないよう、最終日前日に飼料を減らしているため14日目には概ね全群で体重が急激に減少した。DAI

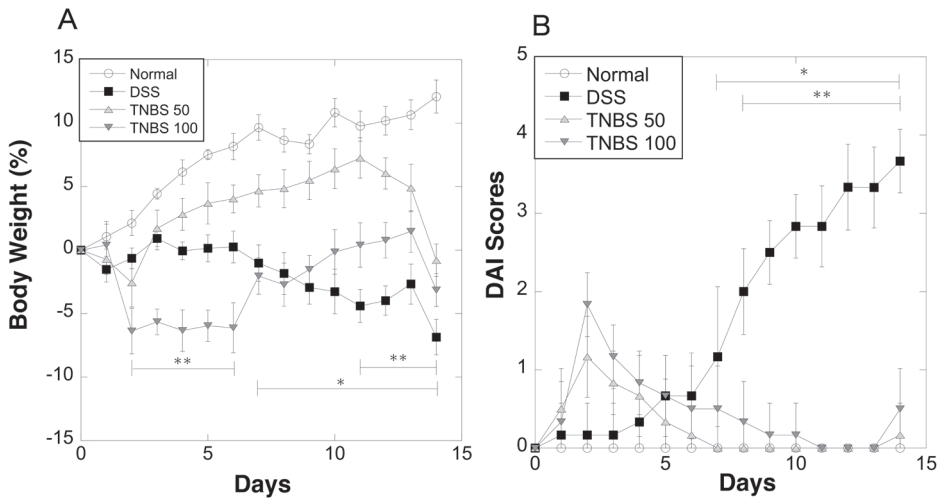


Fig. 1 Changes in the body weight and DAI scores of rats. (A) The y-axis represents the percentage fluctuation in the body weight of Normal (white circle), DSS (black square), TNBS 50 (light gray triangle), and TNBS 100 (dark gray inverted triangle) rat groups. The x-axis shows the days after initiating the experiment. (B) DAI scores were assessed based on the established criteria⁶⁾. The y-axis represents the fluctuations in DAI scores for Normal (white circle), DSS (black square), TNBS 50 (gray triangle), and TNBS 100 (gray inverted triangle) rat groups. The x-axis shows the days after initiating the experiment. All data values are presented as the mean \pm standard deviation (\pm SD). * $P < 0.05$ (TNBS 50 vs DSS), ** $P < 0.05$ (TNBS 100 vs DSS); $N=6$.

スコアはTNBS 50群とTNBS 100群で2日目にピークを迎えた後は徐々に減少したが、DSS群では4日目以降は徐々に増加した (Fig. 1B)。

2. 大腸の長さの違い

大腸の長さはNormal群に比べ、DSS群でやや短縮していた (Fig. 2A)。一方、DSS群よりもTNBS 50群およびTNBS 100群でさらに萎縮する傾向にあった (Fig. 2A)。大腸の長さの平均値を算出したところ、DSS群 (16.2 ± 1.4) よりもTNBS 50群 (15.2 ± 1.7) およびTNBS 100群 (13.7 ± 1.1) で短縮する傾向を認めたが、有意差はなかった (Fig. 2B)。

3. 大腸組織の病理組織解析

Normal群の大腸では粘膜上皮が均等に並び杯細胞が認められたが、DSS群では粘膜上皮や杯細胞の脱落が顕著であり、大腸全体的に免疫細胞の浸潤が高度であった (Fig. 3A)。一方、DSS群と比較すると、TNBS 50およびTNBS 100群では粘膜上皮や杯細胞の脱落は軽度であり、TNBS 100群で多少の免疫細胞浸潤を認めた (Fig. 3A)。

免疫細胞により好中球の浸潤を確認したところ、やはりDSS群で多くの陽性部位を確認した (Fig. 3B)。

4. HIS スコアの評価と血清中炎症性サイトカインの測定結果

HISスコアはTNBS 50群 (1.67 ± 1.63 , $P=0.048$) およびTNBS 100群 (2.50 ± 1.05 , $P=0.041$) にて増加したが、それらに比べさらにDSS群 (6.00 ± 0.89) で上昇した (Fig. 4A)。血清中のIL-1 β はDSS群 (19.4 ± 5.67) とTNBS 50群 (13.8 ± 6.12) で同等の数値となったが、TNBS 100群 (4.59 ± 0.46 , $P=0.012$) よりも明らかに上昇した (Fig. 4B)。血清中IL-6に関しても同様に、TNBS 100群 (6.51 ± 2.24 , $P=0.018$) よりも有意にDSS群 (28.4 ± 4.29) で増加していた (Fig. 4C)。血清中TNF- α に関してはDSS群 (41.9 ± 4.79) でTNBS50群 (7.66 ± 2.05 , $P=0.010$) およびTNBS100群 (16.6 ± 5.51 , $P=0.022$) よりも有意に増加していた (Fig. 4D)。

5. 大腸組織におけるサイトカイン5種類のmRA発現結果

炎症性サイトカイン3種類の内、IL-1 β に関しては、TNBS50群 (1.79 ± 0.78 , $P=0.020$) よりもDSS群 (6.37 ± 1.37) でmRNAの発現量が有意に上昇した (Fig. 5)。また、IL-6に関しては、TNBS100群 (2.27 ± 0.56 , $P=0.018$) よりもDSS群 (7.07 ± 2.17) でmRNAの発現量が有意に上昇した (Fig. 5) TNF- α に関しては3群間に有意差は認められなかった (Fig. 5)。抗炎症性サイトカインであるIL-10は、TNBS 50群 (1.72 ± 0.69 , $P=0.019$) よりもDSS群 (6.28 ± 1.21) で有意に上昇していた (Fig. 5)。TGF- β も同様にTNBS 50群 (2.17 ± 0.51 , $P=0.029$) よりもDSS群 (5.01 ± 1.09) で有意に上昇していた (Fig. 5)

6. 生化学項目の測定結果

ラット血清に対して、生化学検査20項目を測定した。血清TPおよびALBはTNBS群よりもDSS群で低値を示した (Table 4)。肝機能 (AST、

Table 4 Measurement results of clinical chemistry parameters in rats.

	Normal	DSS	TNBS 50	TNBS 100
TP (g/dL)	7.1	5.6	6.7	6.7
ALB (g/dL)	5.1	4.2	4.8	4.6
GLU (mg/dL)	208	163	244	232
BUN (mg/dL)	23.9	28.0	22.7	18.6
CRE (mg/dL)	0.34	0.33	0.33	0.36
UA (mg/dL)	2.0	1.3	1.3	1.7
Fe (μ g/dL)	117	163	118	144
AST (IU/L)	191	164	173	107
ALT (IU/L)	39	37	43	33
ALP (IU/L)	189	85	148	162
LDH (IU/L)	3291	2120	2258	977
AMY (IU/L)	1269	1384	1306	1227
CK (IU/L)	1681	1926	1482	598
r-GT (IU/L)	< 3	< 3	< 3	< 3
ChE (IU/L)	9	8	11	6
Lip (U/L)	10	9	11	11
T-CHO (mg/dL)	70	96	58	73
TG (mg/dL)	114	85	137	55
LDL-C (mg/dL)	5	8	3	5
HDL-C (mg/dL)	27	33	23	26

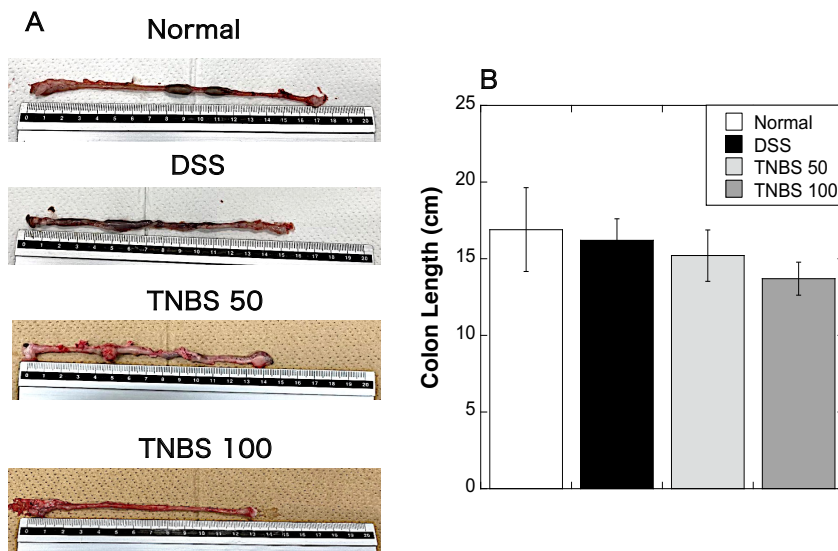


Fig. 2 Changes in the colon length of rats. (A) Images of the representative colon tissues in the Normal, DSS, TNBS 50, and TNBS 100 rat groups from top to bottom. (B) The y-axis represents the colon length (in cm) of the Normal (white), DSS (black), TNBS 50 (light gray), and TNBS 100 (dark gray) rat groups. Values are presented as the mean \pm standard deviation (\pm SD); N=6.

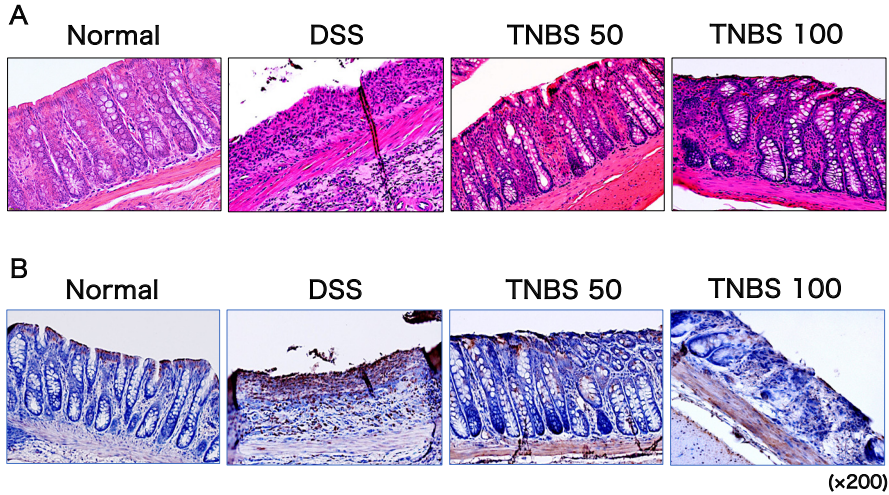


Fig. 3 Evaluation of histological severity in colonic tissues of rats. (A) Microscopic H&E staining images of colon tissues of the Normal, DSS, TNBS 50, and TNBS 100 rat groups. (B) Results of immunohistochemistry staining with DAB to visualize neutrophil elastase (dark brown) in the colon tissues of the Normal, DSS, TNBS 50, and TNBS 100 rat groups. Nuclei were stained blue with hematoxylin. All microscopic images were observed using a BIOREVO BZ-9000 microscope (Keyence Co. Ltd., Osaka, Japan). High power magnification was used for all panels ($\times 200$).

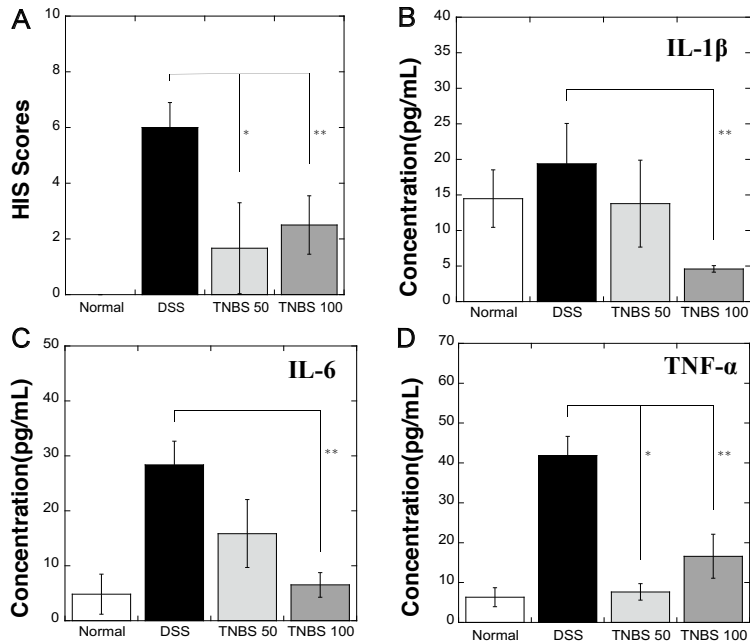


Fig. 4 Analysis of HIS scores and serum inflammatory cytokines. HIS scores on day 14 after initiating the experiment were assessed based on established criteria⁷. The y-axis shows the HIS scores in Normal (white), DSS (black), TNBS 50 (light gray), and TNBS 100 (dark gray) rat groups. (B–D) The y-axis indicates the IL-1 β (B), IL-6 (C), and TNF- α (D) concentrations (pg/mL) in the sera of Normal (white), DSS (black), TNBS 50 (light gray), and TNBS 100 (dark gray) rat groups. Values are presented as the mean \pm standard deviation (\pm SD). * $P < 0.05$ (TNBS 50 vs DSS), ** $P < 0.05$ (TNBS 100 vs DSS); $N=6$.

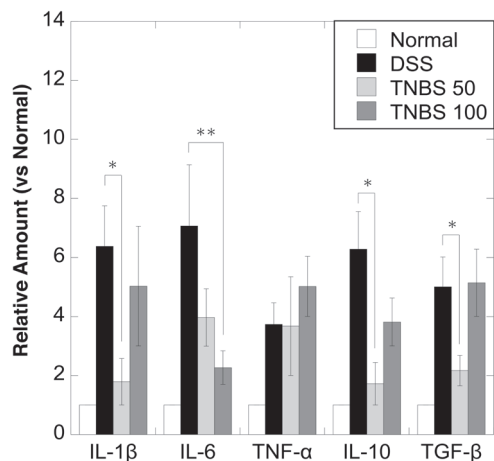


Fig. 5 Alterations in colonic mRNA levels of rat cytokines. The y-axis represents the mRNA expression levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, and TGF- β in the colon tissues of Normal (white), DSS (black), TNBS 50 (light gray), and TNBS 100 (dark gray) rat groups, relative to the Normal rat group. Values are presented as the mean \pm standard deviation (\pm SD). *P < 0.05 (TNBS 50 vs DSS), **P < 0.05 (TNBS 100 vs DSS); N=6.

ALT、ALP、LDH) や腎機能 (BUN、CRE) の指標に関しては大腸炎発症の影響をほとんど認めなかった (Table 4)。

IV. 考察

本研究では複数存在するIBDモデル動物の作成法の中でも、DSS投与とTNBS投与の2手法を比較した。本研究の結果をまとめると、大腸の長さを除きほぼ全ての検討項目で、DSS投与がTNBS投与に比べてラットの大腸炎を重症化することが示された。体重とDAIスコアの推移から、DSS投与では大腸炎が徐々に悪化している様子が確認できる。これは飲み水に含まれるDSSを毎日経口的に摂取することから、それが大腸粘膜を徐々に侵していくことが理由と思われる。一方、同データを参照すると、TNBS投与による腸炎は実験初期に悪化した後は徐々に寛解していく様子が伺える。これは、初日にTNBSを直腸肛門部から投与するのみで、その後の追加投与はないことから、解剖日には自然寛解が進んでいたと考えられた。TNBSの複数

回投与を実施する研究は乏しいが、DSSはインターバルを空けた後で複数回の投与を行う研究プロトコルが多く報告されている^{19,20}。このことは、TNBSよりもDSSの汎用性が高く、慢性の大腸炎モデル作製にも効果的であることを示している。TNBSの方が大腸の長さの短縮を認める原因は不明であるが、TNBSの溶媒に使用されるエタノールは腸粘膜上皮におけるタイトジャンクションの損傷を引き起こすため、この影響が大きいのではないかと推測する²¹。また、TNBSの投与量は多い方が、重症の大腸炎を誘導すると思われた。ただし、TNBSの多量投与は急激な免疫活性を誘引し実験動物の急死に繋がるため、研究内容に沿った投与量の見極めが必要である。

諸説あるが、DSS投与はUCの病態に類似し、TNBS投与ではCDの病態に類似することが報告されている⁶⁷。しかし、本研究のTNBSモデルではCDの病態は再現できていないと思われた。CDの病理組織学的な特徴として、潰瘍性病変が大腸の粘膜下層にも及ぶことが知られている。少なくとも我々の研究では、TNBS投与ラットで粘膜上皮の炎症も高度ではなく、まして粘膜下層にほとんど問題は確認できなかった。ただし、TNBSが直腸肛門部から漏れ出て投与量すべてが大腸組織に到達していない可能性も考えられ、その場合は想定されるよりも軽症となりうる。これを解消する方法として実験動物の肛門部をクリップで30分ほど閉じる方法も提案されているが²²、この方法も主流とはいえ今回は採用しなかった。むしろ、UCの病態に類似されるといわれるDSS投与ラットにおいて、粘膜下層にも炎症細胞の高度な浸潤が観察され、極めて重症の大腸炎が誘導されていることが判る。したがって、DSSとTNBSのいずれがUCあるいはCDの病態を再現するというものではなく、大腸炎の病態は投与物質の摂取期間や摂取量に依存する可能性が高い。NEは活性化した好中球において産生と分泌が高まる酵素であり、IBDのバイオマーカーとしても期待されている²³。NE免疫染色の結果を考慮しても、好中球が高度に浸潤し、まさに炎症が進行中である様子が伺えるのはDSS投与ラットの大腸組織であり、TNBS投与ラットでは陽性部位が少なかった。一方、DSSは毎日の経口摂取にも関わらず自然免疫系の活性は衰

えることなく、少なくとも実験期間の2週間は炎症の悪化が続く可能性が示唆された。

血清および大腸におけるサイトカインの測定結果を見ても、TNBS 50群とTNBS 100群で大きな差はなく、大腸炎が寛解状態にあるか軽度のまま症状が安定していると思われる。一方で、DSS群ではほぼ全てのサイトカインでTNBS群を上回る濃度を示す傾向があり、活発な炎症反応が生体内で進行中であることが判る。DSS群では抗炎症性サイトカインの発現も一定は認められるが、それ以上に大腸組織で炎症の悪化に寄与する要素（DSSの持続的な摂取や炎症性サイトカインの産生）が多く、この状態では炎症は抑制されないとと思われる。DSSの投与ではサイトカインの分泌亢進が更なる炎症反応を誘起する、いわゆるサイトカインストームを引き起こす可能性が高いと思われ、投与期間や飲み水への希釈濃度には注意が必要と考えられた。生化学検査項目の測定結果ではDSS群で特に血清中のTPおよびALBが低下しており、大腸炎の悪化が栄養不良を引き起こすことを示している。これは頻繁な下痢に伴う栄養成分の吸収不良が原因であろうと予測する。一方で、肝臓や腎臓の障害を反映する項目や、その他の疾患を示唆する項目には、Normal群と比べてDSSやTNBS投与の明らかな影響を認めず、これら薬剤が大腸特異的に効果を発揮していることが判る。なお、ヒトと異なりラットでは各項目の明確な基準値が存在せず、測定結果の妥当性の判断が難しい。過去に実施された正常ラット血清の大規模サーベイの結果を参照すると²⁴⁾、本研究の各ラット群の血清でAST、LDH、CKがサーベイにおける正常ラット血清の約10倍を示している。ASTやLDHが上昇した原因は、ラット血清における溶血が考えられた。尾静脈は細く採血が困難であるため、本研究では採取の簡便さと血流量を重視し、心臓からの採血を採用した。しかし、肉眼的に溶血を認める血清も一定数は存在したため、今後は採血法も再考する必要があると感じた。また、サーベイでは様々な週齢のラット血清を測定し平均化していたが²⁴⁾、本研究は9週齢と比較的若いラットを採用しており、これらが活発に動き回ることによって筋肉由来のCKが血清中で高値になったと予想する。以上より、本研究におけるAST、LDH、CKなどの数値は、DSSやTNBS

といった介入の有無とは関係性が乏しいと考える。一方で、溶血や運動の影響を受けにくい検査項目に関しては、サーベイで示されたラット血清の数値を大きく逸脱するものでなく、妥当と思われた。

過去の報告を確認しても、TNBSは10-100 mg/kgの投与量で、その後は1週間程度や1週間以内の病態変動を追跡する実験プロトコルが多く、やはり急性の大腸炎モデルといえる^{25,26)}。一方で、DSSは5%程度の濃度では早期に大腸炎が重症化し、1-3%の濃度では1週間以上の長期的な投与も可能で、ある程度は病態のコントロールが可能である。すなわち、短期的に大腸炎を検証する場合にはTNBS投与モデルが有用であり、長期的に大腸炎を検証する場合にはDSS投与モデルが望ましいといえる。検証内容や実験期間に合わせて、大腸炎モデル動物を使い分けるのが良いと思われる。ただし、総合的に考察するとDSSの使い勝手がよく、世界的にもDSSの方が腸炎モデル動物の作製に使用されている印象を受ける。PubMedで「DSS colitis」との検索ワードで30年間の論文を検索すると現時点（2023年8月29日）では「7,077件」がヒットするが、「TNBS colitis」と検索した場合は「2,171件」であった。以上の結果からも、古くから現在に至るまでDSS投与モデルの信頼性が高い印象を受ける。以上を踏まえ、本研究が、各施設における腸炎モデル動物を使用した研究計画立案の参考になれば幸いである。

V. 結語

短期的（1週間程度）な急性大腸炎の検証にはTNBS投与モデル動物が有用である。長期的（1週間以上）かつ急性～慢性の大腸炎の検証にはDSS投与モデル動物が望ましい。検証内容や実験期間に合わせて使い分けが推奨される。

VI. 謝辞

ラット血清の生化学検査を実施いただきましたオリエンタル酵母工業株式会社 長浜工場 長浜ライフサイエンスラボラトリー（滋賀）には心より御礼申し上げます。本研究は文部科学省科学研究費補助金若手研究21K15422の助成を受

けたものです。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

文 献

- 1) 久松理一: 炎症性腸疾患-診断と治療の最前線-. 日本消化器内視鏡学会雑誌, 61: 1523-1537, 2019.
- 2) Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS: A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*, 18: 279-88, 2014.
- 3) Snider AJ, Bialkowska AB, Ghaleb AM, Yang VW, Obeid LM, Hannun YA: Murine Model for Colitis-Associated Cancer of the Colon. *Methods Mol Biol*, 1438: 245-54, 2016.
- 4) Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W: Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol*, 11: 648-656, 1999.
- 5) Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF: Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*, 2: 541-546, 2007.
- 6) 和田孝一郎, 臼田春樹: 難治性消化器疾患の治療と創薬—基礎研究のための疾患モデルと薬効評価の問題点—。日薬理誌, 150: 183-187, 2017.
- 7) 東泰孝, 竹内正吉: 下部消化管炎症における消化管ペプチドの役割。日薬理誌, 133: 199-202, 2009.
- 8) Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75: 263-274, 1993.
- 9) Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL: Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol*, 5: 1461-1471, 1993.
- 10) Okada K, Itoh H, Kamikubo Y, Adachi S, Ikemoto M: Establishment of S100A8 transgenic rats to understand innate property of S100A8 and its immunological role. *Inflammation*, 41: 59-72, 2018.
- 11) Okada K, Ikemoto M: A new hybrid protein is a novel regulator for experimental colitis in rats. *Inflammation*, 45: 180-195, 2022.
- 12) Okada K, Arai S, Nakase H, Kohno H, Nakamura F, Takeda M, Toda Y, Itoh H, Adachi S, Ikemoto M: Autocrine pathways involving S100A8 and/or S100A9 that are postulated to regulate the immunological functions of macrophages in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 456: 415-20, 2015.
- 13) Okada K, Matsuo K: Nicotine exerts a stronger immunosuppressive effect than its structural analogs and regulates experimental colitis in rats. *Biomedicines*, 11: 922, 2023.
- 14) Motavallian A, Minaiyan M, Rabbani M, Mahzouni P, Andalib S: Anti-inflammatory effects of alosetron mediated through 5-HT3 receptors on experimental colitis. *Res Pharm Sci*, 14: 228-236, 2019.
- 15) Mohammad Jafari R, Shayesteh S, Ala M, Yousefi-Manesh H, Rashidian A, Hashemian SM, Sorouri M, Dehpour AR: Dapsone Ameliorates Colitis through TLR4/NF- κ B Pathway in TNBS Induced Colitis Model in Rat. *Arch Med Res*, 52: 595-602, 2021.
- 16) Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ: Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, 69: 238-49, 1993.
- 17) Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, Fedorak RN, Paré P, McDonald JW, Dubé R, Cohen A, Steinhart AH, Landau S, Aguzzi RA, Fox IH, Vandervoort MK: Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N Engl J Med*, 352: 2499-2507, 2005.
- 18) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, 48: 452-458, 2013.
- 19) Cho J, Kim D, Kang H: Exercise Preconditioning Attenuates the Response to Experimental Colitis and Modifies Composition of Gut Microbiota in Wild-Type Mice. *Life (Basel)*, 10: 200, 2020.
- 20) Hales D, Muntean DM, Neag MA, Kiss B, Ștefan MG, Tefas LR, Tomuța I, Sesărman A, Rațiu IA, Porfire A: Curcumin-Loaded Microspheres Are Effective in Preventing Oxidative Stress and Intestinal Inflammatory Abnormalities in Experimental Ulcerative Colitis in Rats. *Molecules*, 27: 5680, 2022.
- 21) Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N. Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier *Am J Physiol*. 276: G965-974, 1999.
- 22) 高橋良樹, 福田能啓, 野口敬康, 三野幸治, 奥田真珠美: トリニトロベンゼン・スルホン酸 (TNBS) 惹起ラット大腸炎に対するプロバイオティクス麹 (麹菌醗酵産物) の効果。静脈経腸栄養, 29: 741-747, 2014.
- 23) Gouni-Berthold I, Baumeister B, Wegel E, Berthold HK, Vetter H, Schmidt C: Neutrophil-elasticase in chronic inflammatory bowel disease: a marker of disease activity?. *Hepatogastroenterology*, 46: 2315-2320, 1999.
- 24) 松澤利明, 山田雅之: ラットにおける臨床化学検査値データベースの構築およびその値に影響を与える要因。臨床化学, 30: 131-141, 2001.
- 25) Zhang Y, Zha Z, Shen W, Li D, Kang N, Chen Z, Liu Y, Xu G, Xu Q: Anemoside B4 ameliorates TNBS-induced colitis through S100A9/MAPK/NF- κ B signaling pathway. *Chin Med*, 16: 11, 2021.

- 26) Huang Y, Su Y, Qin R, Wang L, Zhang Z, Huang W, Fan X, Yao Y, Wang H: Mechanism by which oleracein E alleviates TNBS-induced ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 35: 854-864, 2023.