

原著論文

# 潰瘍性大腸炎モデルにおけるデキストラン硫酸 ナトリウムによる大腸特異的炎症発現機構について

吉川 弥里, 杉原 秀, 阿蘇 寛明, 渡辺 雅彦, 末丸 克矢\*  
就実大学薬学部公衆衛生学研究室

## Mechanism for colitis-specific inflammation induced by dextran sulfate sodium in ulcerative colitis model

Misato Yoshikawa, Shu Sugihara, Hiroaki Aso, Masahiko Watanabe, Katsuya Suemaru\*  
*Department of Public Health, School of Pharmacy, Shujitsu University*  
(Received 19 October 2018; accepted 26 November 2018)

**Abstract:** Ulcerative colitis (US) is a major inflammatory bowel disease, characterized by inflammation in the colon. The dextran sulfate sodium (DSS) -induced colitis model has been widely used in order to investigate the pathogenesis of US. In the present study, we assessed the mechanism of DSS caused by localized inflammation in the colon. Mice were given water or 5% DSS solution for 7 days and the concentrations of DSS in their contents of small intestine and colon were measured indirectly using the anthrone-sulphuric acid method. In the 5% DSS group, the estimated DSS concentration of the intestinal contents was higher in the colon than that in the small intestine. Next, we evaluated the epithelial damage induced by DSS using an in situ closed-loop method. Four hours after the 0.3% DSS injection to loops of colon or small intestine, intestinal epithelium was injured in both the colon and small intestine loops. These results indicate that higher DSS concentration of the colorectal content can be attributed to localized inflammation in the colon.

Keywords: ulcerative colitis; dextran sulfate sodium; colitis model

### 緒言

潰瘍性大腸炎は、大腸に炎症が生じることによって、びらんや潰瘍を形成し、腹痛や下痢、血便等を引き起こす慢性の炎症性疾患で、難病に指定されている。国内患者数は、炎症性腸疾患の中で

も近年急激に増加している。潰瘍性大腸炎の発症原因には、遺伝的因子、腸粘膜上皮のバリア欠損、異常な免疫反応および環境因子と複数の因子が関与すると考えられている<sup>1-3)</sup>。これまでに、病態解明のため、様々な動物モデルが作製されてい

る<sup>4,5)</sup>。現在、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の飲水による大腸炎モデル動物が汎用され、多くの治療薬のスクリーニングまたは病態モデルの解明に用いられている。本モデルでは、DSSの飲水により、大腸に限局した炎症病態が発現し、潰瘍性大腸炎と類似した症状が引き起こされる。この病態形成機構には、DSSによる腸粘膜上皮細胞の障害や消化管粘膜のマクロファージなどの自然免疫細胞、腸内細菌および病原体を認識するToll-like receptorなどが関与していると考えられている<sup>6)</sup>。

しかしながら、大腸特異的に炎症が引き起こされるメカニズムは明らかとなっていない。そこで、本研究では、糞便中のDSS濃度の違いが部位特異的な炎症病態を引き起こすのではないかとの仮説を立て、実験を行った。さらに、*in situ* closed-loop法を用いて、腸に対するDSSの直接的な影響について検討した。

## 方法

### ・動物実験

動物は、ICR雄性マウス(日本エスエルシー株式会社)を用いた。室温23±2℃の動物飼育室内にて、紙製床敷を敷いたプラスチックケージ内で5~6匹ずつ飼育した。餌および水は自由に摂取させた。Control群には水道水を、DSS群には5% DSS溶液を7日間、自由飲水させた<sup>6-8)</sup>。本実験は、就実大学動物実験委員会の承諾を得て行った。

### ・実験試薬

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS, MW:5000, 和光純薬)は水道水で5%に溶解した。

### ・Disease Activity Index (DAI)

腸炎の程度は、下痢と血便の程度を段階的に分類し評価した。下痢は、普通便: Score0, 柔らかい便: Score1, ピンセットで摘むと便が崩れてしまう下痢便: Score2, ピンセットで摘むことができない激しい下痢便: Score3, 尻が汚れる水様便: Score4とした。血便は、出血の全くない普通便: Score0, 便の表面のみに出血が見られる出血便:

Score1, 便の表面と内部の両方に出血が見られる出血便: Score2とした。DAIは、下痢と血便の合計Score(0~6)とした。

### ・Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

飲水開始日を0日目とし、実験7日目(Day7)に、頸椎脱臼後、小腸および大腸を摘出し、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で腸管内を洗浄した。小腸には回腸部分を、大腸には直腸部分を組織サンプルとして用いた。各組織サンプル50 mg 当たり1 mLの0.5% Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (Sigma-Aldrich)含有50 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液(pH 6.0)を加えホモジナイズした。その後、凍結融解を3回行った後、4℃、2000 gで5分間遠心分離し、回収した上清を測定サンプルとした。この測定サンプル5 μlに、5 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶液(pH 6.0)90 μl、0.167 mg/ml *o*-dianisidine dihydrochloride (Sigma-Aldrich)含有0.0005% 過酸化水素水(ナカライテスク)50 μlを添加し、各サンプルの450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。MPO標準品(Sigma-Aldrich)を用いた検量線により、MPO活性を算出した。

### ・アントロン硫酸法<sup>9,10)</sup>を用いたDSS濃度の測定

実験1, 4, 7日目の小腸(回腸)と大腸(結腸, 直腸)の内容物を採取した。凍結乾燥させた試料1 g 当たり100 mLの10% トリクロロ酢酸を加え、蛋白質を除去した。除蛋白した溶液を1400 gで10分間遠心し、上清を回収した。その上清を蒸留水で希釈し試験溶液とした。試験溶液に0.2% アントロン硫酸溶液を加え混和した。その溶液を沸騰湯浴中にて、10分間加熱した。冷却後、各サンプルの620 nmの吸光度を測定した。各腸内容物中のDSSおよびDSS分解物を含む全糖の濃度を定量し、グルコースを用いた検量線により、グルコース濃度として算出した。

### ・*In situ* closed-loop法によるDSSの局所注入

三種混合麻酔薬(塩酸メドミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルファノール, s.c.)<sup>11)</sup>の麻酔下で

開腹し、盲腸より 2 cm 上部の回腸に 2~3 cm の loop (小腸 loop) を、盲腸より 1 cm 下部の結腸に 2~3 cm の loop (大腸 loop) を作製した。作製した loop に saline または 0.3% DSS 溶液を 100  $\mu$ l 注入した後、loop を体内に戻し閉腹した。術後は、マウスの体温低下を防ぐため、体温を管理した。Loop に saline または DSS 溶液を注入してから 4 時間後、頸椎脱臼し、loop を摘出した。Loop の長さ重量を測定し、この重量比 (mg/cm) を指標に腸炎を評価した。

・ Hematoxylin Eosin (HE) 染色による組織学的評価

*In situ* closed-loop 法において、saline または DSS 溶液を注入した 4 時間後に採集した loop を、マイルドホルム 10N (和光純薬) に浸漬固定した。固定した組織をパラフィン包埋切片とした後、HE 染色組織標本作製し、光学顕微鏡下にて観察した。

・ 統計学的検討

測定値は、DAI の経時変化のみ、平均値 $\pm$ 標準偏差で示し、他はいずれも平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。経時的腸内容物のグルコース濃度変化の比較には、Tukey-Kramer 法により統計解析を行った。二群間の比較には、Student's t-検定または Welch の t-検定を用い解析した。*In situ* closed-loop 法の DSS 注入による組織傷害性 (出血割合) の比較には、Fisher の正確確率検定により解析を行った。有意水準 (p 値) は、 $p < 0.05$  とした。

結果・考察

DSS 誘発性大腸炎モデルの大腸に局限した炎症の発現機序について、腸内容物の DSS 濃度の関連性および DSS の腸に対する直接的な障害性の違いの有無について検討した。

始めに、大腸炎モデルマウスを作製するため、5% DSS 溶液をマウスに自由飲水させ、腸炎の状態を DAI および各腸組織の MPO 活性を測定することにより確認した。DAI は、経時的な DSS 溶液の飲水により悪化した。Day4 以降では、score

1 程度の下痢が多くのマウスで、day5 以降ではすべてのマウスで score 1 の出血が観察された (図 1)。同じ条件で水道水を摂取した Control 群において、DAI スコアの悪化はなかった (未記載データ)。

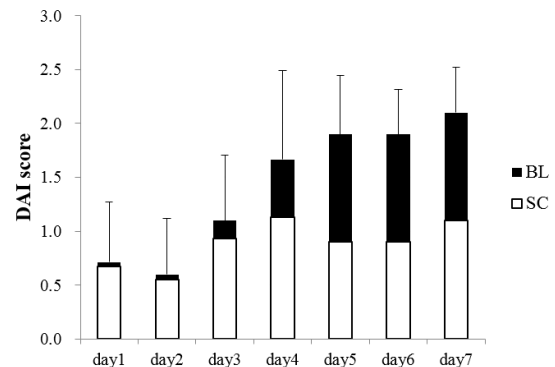


図 1. 5% DSS 飲水による DAI の経時変化 (day1 : n=20, day2-3 : n=10, day4 : n=15, day5-7 : n=5 ). SC : stool-consistency (下痢スコア), BL : bleeding (出血スコア)。

次に、DSS により腸管上皮粘膜が障害され、その傷害された部位に好中球が浸潤することによって炎症が生じ、MPO 活性が上昇するとされているため、実験 7 日目に小腸および大腸の MPO 活性を測定して炎症状態を評価した。その結果、小腸では、control 群と DSS 群の MPO 活性に違いは認められなかった。しかし、大腸では、DSS 群の MPO 活性は control 群と比較して有意に増加していた ( $p=0.006$ ) (図 2)。これにより、当研究室の実験環境およびプロトコールにおいて、5% DSS 溶液の自由飲水によって大腸に局限した炎症が引き起こされることを確認した。

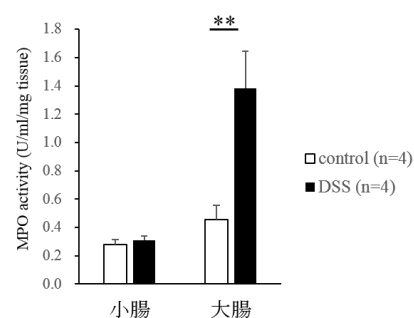


図 2. DSS 飲水による MPO 活性の変化 \*\* $p < 0.01$  versus control (Student's t-test)

腸内容物の全糖を測定できるアントロン硫酸法を用いて、乾燥させた各腸部位（回腸、結腸、直腸）の内容物中の DSS 量を測定した。DSS はデキストランを硫酸化した化合物で、デキストランはグルコースのみが重合したものである。腸内容物には食餌由来のさまざまな糖類が存在するが、本研究では DSS の濃度をグルコース濃度に換算して推定した。水道水を自由飲水させた control 群の腸内容物のグルコース量は、回腸で最も高く、下部消化管ほど低下した。一方、DSS 群の腸内容物のグルコース濃度は、全ての腸部位で day1 から day7 へと経時的に増加した（図 3）。

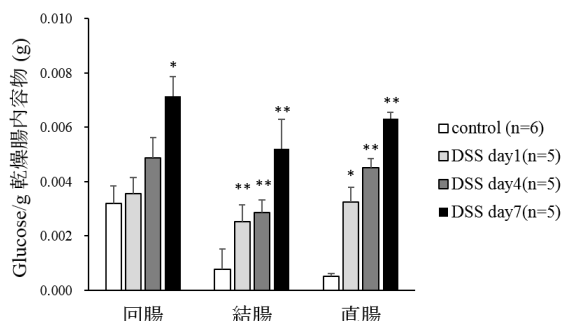


図 3. 各腸部位における腸内容物中のグルコース濃度の経時的変化

\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus control (Turkey-Kramer test)

DSS 群の腸内容物の DSS 濃度は、以下のように推定した。図 2 の結果より、小腸には DSS による炎症が認められなかったことから、糖の吸収は正常に行われていると考えられ、腸内容物の推定 DSS 濃度は、「DSS 群のグルコース量から control 群のグルコース量を差し引いた値」とした。各腸部位の推定 DSS 濃度は、小腸（回腸）よりも大腸、特に直腸で増加していた（図 4）。

図 3 の control 群の結果は、食餌中の糖類の大部分が小腸で吸収されていることを示している。しかし、高分子のデキストランを含む DSS は小腸では吸収されず、大腸内容物中に高濃度で含有されていた。本研究では、乾燥させた腸内容物 1g 中の DSS 量を測定した。腸内容物の水分含有量は、小腸よりも大腸の方が低いいため、実際の小腸

内容物の湿重量中の DSS 量は減少し、大腸と小腸の内容物中の DSS 量の差はこれ以上大きくなる。

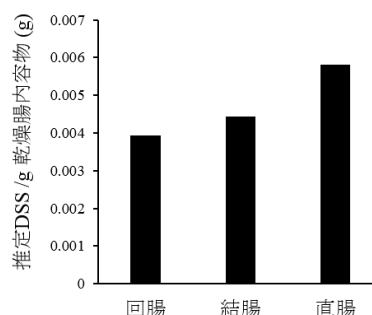


図 4. 実験 7 日目の各腸部位における内容物中の推定 DSS 濃度

*In situ* closed-loop 法を用いて、小腸あるいは大腸に saline または 0.3% DSS 溶液を注入した 4 時間後、各腸組織に対する DSS の影響について評価を行った。なお、DSS の注入濃度には、大腸 loop に DSS 溶液 (0.03-3.0%) を注入し、loop の重量比がプラトーに達した最低濃度の 0.3% を用いた。Saline を注入した群では、小腸および大腸の両方で出血および組織の異常は認められなかった（表 1, 図 5）。一方、0.3% DSS 溶液を注入した群では、小腸で 8/11 匹、大腸で 10/16 匹で、loop 内の出血が認められた（表 1）。統計解析の結果、DSS による出血の割合において、小腸と大腸に差は認められなかった。

表 1. *In situ* closed-loop 法の DSS 注入による組織傷害性（出血割合）

出血割合（匹）	小腸	大腸
Saline 群	0/5	0/12
DSS 群	8/11	10/16

HE 染色による各腸 loop の組織標本を観察したところ、0.3% DSS 溶液を注入した群の小腸において、部分的に腸管上皮細胞間の接着が切断され、細胞はバラバラとなり、腸絨毛が消失した異常な粘膜構造が観察された。小腸と同様に、0.3% DSS

溶液の注入により大腸でも粘膜構造の異常が観察された。これらの出血および組織傷害像の結果から、DSS は小腸および大腸の両方に直接損傷を与えることが明らかとなった。

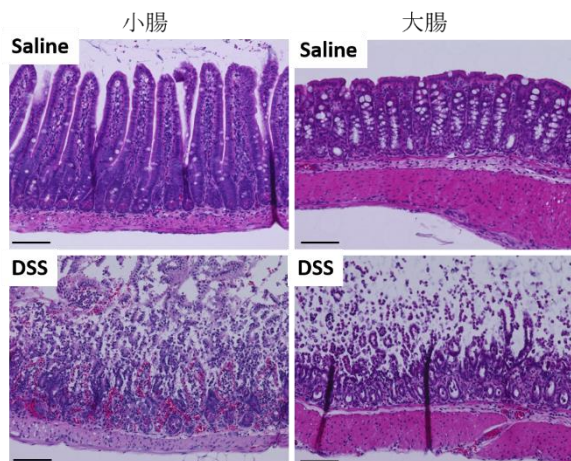


図 5. HE 染色による小腸および大腸 loop の組織学的評価

Scale bar: 100  $\mu$ m.

各腸 loop 内に saline または DSS 溶液を注入した 4 時間後の重量比は、saline 群と比較して DSS 群は、小腸および大腸の両方で有意に重量比が増加していた (図 6)。小腸と比較して、大腸で重量比が増加した理由として、大腸には粘液を分泌する杯細胞が多いため<sup>12)</sup>、loop 内の分泌液が増加したことが考えられた。このように、大腸と小腸で分泌能が異なるため、重量比においては、大腸と小腸の DSS に対する影響を直接比較することはできなかった。

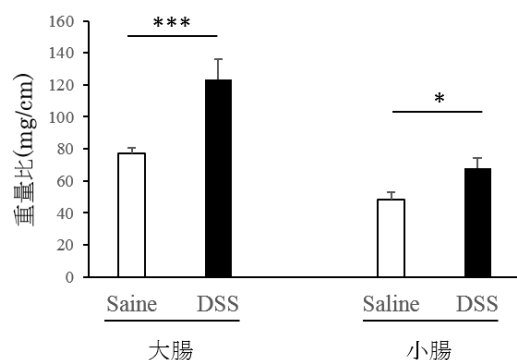


図 6. DSS による小腸および大腸 loop の重量比  
\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus saline (Student's t-test)

本研究により、自由飲水による DSS は、消化管下部で高濃度となり組織障害性を示すと考えられた。すなわち、大腸において DSS が高濃度となり、大腸に限局した障害が惹起されたと考えられる。In situ closed-loop 法および HE 染色により、小腸においても DSS による障害は認められたが、小腸は蠕動運動による内容物の移動が大腸よりも早く<sup>13-15)</sup>、腸管の粘膜上皮に対する曝露時間が短かったため、細胞障害性のあるものが摂取されたとしても、DSS 誘発大腸炎モデルマウスでの障害性は大腸と比較し軽度となったと考えられる。そして、大腸、特に直腸においては、体外へ排出されるには一定の容量が必要とされるため<sup>16)</sup>、内容物の滞留時間は長くなる。本研究で用いた飲水による DSS 誘発大腸炎モデルは、下痢および出血において、固形の柔らかい便で、便の表面にのみ出血が見られる軽症であったため、DSS 飲水による小腸の炎症がほとんど観察されなかったと考えられる。さらに高濃度の DSS を摂取させた場合、小腸にも炎症が発現することが推測される。

したがって、高濃度となった組織障害性物質の DSS に曝露されることで、大腸粘膜が障害され、最終的に炎症を引き起こされることが、DSS 誘発大腸炎の発症要因となることが示唆された。

### 利益相反

本研究に開示すべき利益相反はない。

### 謝辞

本研究は特別電源所在県科学技術振興事業研究委託の助成を受けた。

### 引用文献

- 1) Danese S. & Fiocchi C.: Ulcerative colitis., *N Engl J Med.*, 365, 1713-1725 (2011).
- 2) Ungaro R., Mehandru S., Allen P.B., Peyrin-Biroulet L., Colombel J.F.: Ulcerative colitis.,

- Lancet*, 389, 1756–1770 (2017).
- 3) Maloy, K. J. & Powrie, F.: Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease., *Nature*, 474, 298–306 (2011).
- 4) Randhawa P.K., Singh K., Singh N, Jaggi A.S.: A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents., *Korean J Physiol Pharmacol*, 18, 279-288 (2014).
- 5) Wirtz S., Popp V., Kindermann M., Gerlach K., Weigmann B., Fichtner-Feigl S., Neurath M.F. : Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation., *Nat Protoc.*, 12, 1295-1309 (2017).
- 6) Eichele D.D. & Kharbanda K.K.: Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis., *World J Gastroenterol*, 23, 6016-6029 (2017).
- 7) Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R.: A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice., *Gastroenterology*., 98, 694-702 (1990).
- 8) Chassaing B., Aitken J.D., Malleshappa M., Vijay-Kumar M.: Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice., *Curr Protoc Immunol.*, 104, Unit 15.25. (2014).
- 9) 日本薬学会編:衛生試験法・要説 2005年版, 金原出版, (2005).
- 10) 田村太郎:アンスロン反応を中心とした炭水化物の比色定量法. 分析化学, 10, 64-71 (1961).
- 11) Kawai S., Takagi Y., Kaneko S. and Kurosawa T.: Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice., *Exp. Anim.*, 60, 481-487 (2011).
- 12) Rodriguez-Pineiro A. M., Bergstrom J.H., Ermund A., Gustafsson J.K., Schutte A., Johansson M.E., & Hansson G.C.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 305, G348-G356 (2013).
- 13) Stevens C.E., Hume I.D.: “Comparative physiology of the vertebrate digestive system”, Cambridge University Press (Cambridge) 1995.
- 14) Takahashi T., Sakata T.: Flow behavior of digesta and the absorption of nutrients in the gastrointestinal tract., *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 57, 265-273 (2005).
- 15) 高橋徹, 坂田隆:消化管内容物の流れと栄養素の吸収機序, 日本静脈経腸栄養学会雑誌 33, 602-610 (2018).
- 16) 神山剛一:第6章 直腸機能障害, NPO 法人日本せきずい基金, pp. 67-76.