

炎症モデルとしてのエンドトキシン中毒マウス —変動パラメーターの検索—

佐藤 正美¹⁾, 佐二木順子

Endotoxin Intoxicated Mice as Model Animal for Inflammation —Determination of Appropriate Parameters—

Masami SATO, Junko SAJIKI

はじめに

魚油に多く含まれているエイコサペンタエン酸, ドコサヘキサエン酸は, 悪性腫瘍や動脈硬化等の循環器系疾患の予防や治療に有効な多価不飽和脂肪酸であることが知られており^{1),2)}, 健康食品や医薬品として用いられている。この様に食品に含まれている脂肪酸をはじめとする種々の物質が抗炎症作用を示すか否かは, 栄養価値を考える上で重要な指標となる。抗炎症作用をもつ物質をスクリーニングする方法として, 炎症モデル動物を用いる効果判定が広く用いられている。これまで, 炎症モデル動物としては, カラゲニン足浮腫, カラゲニン胸膜炎, アラキドン酸血栓, エピネフリン虚血, エンドトキシン中毒, エタノールや塩酸による胃潰瘍, 腫瘍等多くが考案されている³⁾。その中でも, グラム陰性菌の細胞外皮の主要成分の一つである内毒素を投与されたエンドトキシン中毒動物は, 作成が簡単で短時間で炎症を生じるため, 抗炎症物質のスクリーニングに適しているモデルの一つである。しかし, エンドトキシンの生体への作用は発熱, マウス致死作用, 骨髄反応等多様であるため⁴⁾, エンドトキシン中毒動物を用いるにあたっては, 生物活性にあった投与濃度, 処置時間を選択しなければならない。また, エンドトキシン中毒マウスの指標となる生物学的影響についてもすべては明らかにされていない。今回は, エンドトキシンのマウス腹腔内への投与が腹腔内の遊走細胞数, 血清中の酵素活性値, 血清脂質, 臓器重量等の変化に及ぼす影響を調べ, 投与量, 処置時間との関連を調べた。

材料ならびに測定機器

マウスは, ddy系雄性マウス (日本 SLC 社) の 4 週令を用いた。

エンドトキシンは, *Escherichia coli* Serotype 0111; B 4 由来のリポポリサッカライド (LPS と略称, シグマ社) を用いた。

マウス血清の生化学検査はオートアナライザー (ABBOT-VP) を使用した。

実験方法

① LPS 中毒マウスの作成

LPS は生理食塩水 (Saline) に溶解させ, 0.8mg/ml, 1.6mg/ml となる様に調製し, それぞれ LPS 溶液 1, 2 とした。

4 週令マウス, 40 匹を 5 群 (A~E) に分け, 図 1 に示すような処置を施した。A 群は対照群として, 生食 0.5 ml ずつを腹腔内投与した。B, C 群については, LPS 溶液を 1 を, D, E 群については LPS 溶液 2 をそれぞれ 0.5ml ずつ腹腔内に投与した。B, D は投与後 3 時間, C, E は 6 時間後に以下の処置を施した。

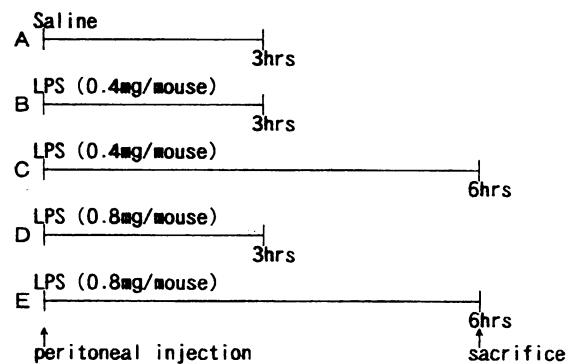


Fig. 1 Design of the experiments using mice

② 腹腔内遊走細胞の採取

エーテル蒸気で満たされたビンにマウスを入れ, 麻酔を施し, 10ml PBS を腹腔内に投与した。腹部を 1 分間, マッサージし, 直ちに腹腔内液を採取した。その後, 3000r.p.m. で 5 分間, 遠心分離により, 細胞を沈殿させた。上清についてはオートアナライザーを用いて乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性値測定を行なった。沈殿した細胞は 1ml の PBS に混釈し, 顕微鏡下で細胞数を測定した。細胞数は腹腔液 1ml 当たりで算出した。

③ 血清生化学検査

腹腔液採取と同時にマウスの心臓から血液を採取し, 3000 r.p.m. で 10 分間, 遠心分離を行なった。得られた血清についてオートアナライザーを用いて, グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT), アルカリホスファターゼ (ALP), LDH, 尿素窒素 (BUN), トリグリセリド (TG), コレステロール (CHOL) の測定を行なった。

④ 平均値の差の検定

差の検定は二元配置の分散分析法を用いた。多重検定は最小有意差法に従って分析した。

実験結果及び考察

リポ多糖 (lipopolysaccharide) と蛋白質の複合体であるエンドトキシンは発熱, 致死をはじめとする種々の生物活性を示す

千葉県衛生研究所

1) イカリ薬品株式会社

(1995年11月20日受理)

ことが知られている⁴⁾。エンドトキシン投与により作成された中毒マウスは短時間で炎症を生ずるため、炎症モデルとして適したものであるが、炎症を示す生物活性の指標についてすべてが明らかにされている訳ではない。ここでは、致死に至らない量で炎症を示す適切な指標を探すことを目的とした。

腹腔内投与により作成されたエンドトキシン中毒マウスの腹腔内遊走細胞数は、0.4mg LPSを投与した群では細胞数が増加傾向にあり、0.8mg LPSを投与したものでは細胞数の減少が起きていた。両投与群とも、6時間放置した群の方がその傾向は顕著に現れていた。特に、0.8mg LPSを投与し、6時間放置した群における細胞数の減少は有意なものであった ($P < 0.05$)。腹腔液のLDHは、LPSを投与したすべての群に増加傾向が見られ、

特に6時間放置した群ではその傾向が大きかった (表1)。

胃腸の重量は0.8mg LPSを投与し、6時間放置したものに減少が見られた。すべてのLPS投与マウスの盲腸の重量は、対照群と比べて減少しており ($P < 0.01$)、投与量の違いによる影響はみられなかった (表2)。

血清中のGOT, GPT値はLPS投与により上昇したが、値は3時間放置の方が6時間放置の群のものより高かった。LPS投与マウスの血清ALP, TG値は、すべての投与群で顕著に減少した。血清ALP値の減少は、3時間より6時間放置のものが大きかった。0.8mg投与、3時間放置マウスの血清LDHは上昇し ($P < 0.01$)、反対にCHOLは低下した ($P < 0.05$)。血清BUN値には、殆ど変化がみられなかった (表3)。

Table 1 Numbers of migration cells in peritoneal cavity and LDH activities in peritoneal fluid of LPS treated mice

LPS treatment ¹⁾		Number of cells ²⁾ ($\times 10^5$ number/ml)	LDH ²⁾ (IU/l)
dose (mg)	period (hr)		
0	3	1.69 \pm 0.88 ^{b,c}	4.65 \pm 4.45
0.4	3	1.74 \pm 1.11 ^{b,c}	8.19 \pm 4.64
0.4	6	2.41 \pm 1.57 ^c	10.39 \pm 7.66
0.8	3	1.06 \pm 1.10 ^{a,b}	6.06 \pm 6.44
0.8	6	0.50 \pm 0.38 ^a	13.36 \pm 15.09

Data are represented as means \pm SD (n = 8)

Values with different letters are statistically different ($P < 0.05$) among treatments in the same items.

1) injected peritoneally

2) peritoneal fluid punctured 60 sec. after the peritoneal injection of 10ml PBS.

Table 2 Changes of weight in digestive tract and caecum in LPS treated mice

LPS treatment ¹⁾		digestive tract ²⁾	caecum ²⁾
dose (mg)	period (hr)		
0	3	2.64 \pm 0.23 ^b	0.58 \pm 0.16 ^b
0.4	6	2.61 \pm 0.10 ^b	0.35 \pm 0.04 ^a
0.8	3	2.47 \pm 0.13 ^b	0.33 \pm 0.05 ^a
0.8	6	2.11 \pm 0.12 ^a	0.36 \pm 0.02 ^a

Data are represented as means \pm SD (n = 8)

Values with different letters are statistically different ($P < 0.01$) among treatments in the same items.

1) injected peritoneally

2) include stomach, small intestine, large intestine and caecum

Table 3 Changes of biochemical parameters in serum of LPS treated mice

LPS treatment ¹⁾		SGOT ²⁾	SGPT ²⁾	ALP ²⁾	LDH ²⁾	BUN	TG ²⁾	CHOL ²⁾
dose (mg)	period (hr)	(IU/l)	(IU/l)	(IU/l)	(IU/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0	3	88.69 \pm 21.04 ^a	34.66 \pm 7.96 ^a	190.49 \pm 28.62 ^a	845 \pm 307.29 ^a	29.24 \pm 5.17	232.89 \pm 45.72 ^a	116.82 \pm 11.97 ^a
0.4	3	135.19 \pm 31.59 ^{b,c}	72.70 \pm 22.59 ^{b,c}	178.49 \pm 29.95 ^{a,c}	921 \pm 140.25 ^{a,b}	26.75 \pm 7.15	159.26 \pm 26.70 ^b	-
0.4	6	120.03 \pm 20.99 ^{a,c}	60.59 \pm 17.80 ^{a,c}	119.58 \pm 23.63 ^b	807 \pm 204.85 ^a	30.23 \pm 5.85	160.16 \pm 27.15 ^b	-
0.8	3	160.91 \pm 36.69 ^b	94.26 \pm 28.65 ^b	144.49 \pm 32.15 ^{b,c}	1200 \pm 248.60 ^b	31.10 \pm 4.36	170.16 \pm 31.55 ^b	89.78 \pm 20.82 ^b
0.8	6	103.00 \pm 11.57 ^a	76.39 \pm 21.02 ^{b,c}	128.72 \pm 23.33 ^b	708 \pm 177.07 ^a	26.61 \pm 4.27	187.38 \pm 53.84 ^{a,b}	113.28 \pm 17.44 ^a

Data are represented as means \pm SD (n = 8)

Values with different letters are statistically different (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$) among treatments in the same items.

1) injected peritoneally

今回の結果の中で、血清TG値、盲腸重量にみられた顕著な変化は、エンドトキシン中毒マウスの示す指標としてこれまで知られていなかったものである。なお、測定項目によっては放置時間による差が現れているため、項目別に放置時間を決定すれば、血清TG値、盲腸重量以外の項目も炎症の良い指標となり得るものと思われる。これまで、動物によってエンドトキシンによる感受性が大きく異なることが知られている⁹⁾。今回の実験は、腹腔内投与マウスで得られたものであり、他の動物でも生ずる変化かどうかについては不明である。

文 献

- 1) M. E. Begin, G. Ells, D. F. Horrobin: *Journal of the National Cancer Institute* Vol. 80, No. 3 (1988)
- 2) J. Dyerberg, H. O. Bang, S. Moncada and J. R. Vane: *Lancet*, ii, 177 (1978)
- 3) 山本尚三, 鹿取信編: プロスタグランジン研究 (下), 東京化学同人, pp. 233-300 (1986)
- 4) 丹羽允, 原田敏枝: 細菌毒素研究 (蛋白質 核酸 酵素別冊 18), 加藤巖編, 共立出版, pp. 188-198 (1976)
- 5) I. Berczi, L. Bertok, T. Bereznoi: *Can. J. Microbiol.*, 12, 1070 (1966)