Induction of murine TNBS colitis is strictly controlled by a modified method using continuous inhalation anesthesia with sevoflurane

著者	寺井 智宏
発行年	2014-03-17
URL	http://hdl.handle.net/10271/2731

doi: 10.1007/s10620-013-3023-0

博士(医学) 寺井 智宏

論文題目

Induction of murine TNBS colitis is strictly controlled by a modified method using continuous inhalation anesthesia with sevoflurane

(マウスの TNBS 誘発腸炎はセボフルランを用いた持続吸入麻酔による変法により厳密に制御される)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ハプテン化作用物質である 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)の投与による腸炎モデルは、腸管粘膜の防御機能を低下させ自然免疫と獲得免疫応答を招くことから、現在最も広く使用される化学物質誘発腸炎モデルの一つである。しかし、汎用されているにも関わらず標準プロトコールが存在せず、遺伝的背景、週齢、投与量、投与回数、投与するエタノール濃度、解剖日など、過去の論文報告で異なる。吸入麻酔薬は、麻酔深度を精密に制御し維持できるという理由から、腹腔内麻酔薬と比較して動物実験においても信頼性を向上させている。本研究では、薬液暴露時間を厳密に制御することにより TNBS 誘発腸炎の均一な重症度と精密性が得られるとの仮説を立て、セボフルランを用いた倒立位での持続吸入麻酔を用いて麻酔深度を制御することにより薬液暴露を制御するというマウス TNBS 誘発腸炎モデルの変法を開発した。この方法の有用性を、アバーチンによる腹腔内麻酔を用いた従来法での TNBS 誘発腸炎モデルと比較し、単回投与と反復投与モデルで検討した。

[材料並びに方法]

本研究に関し、動物実験委員会の承認を得て、9-10 週齢、体重 21-22 g の C57BL/6J 雌マウスを用いた。セボフルランを用いた持続吸入麻酔法の確立のため、マウスを一定時間倒立保持が可能な麻酔装置を作成し、注腸後に薬液が排出されないようセボフルラン濃度を設定した麻酔プロトコールを作成した。TNBS 誘発腸炎モデルの設定は、エタノール濃度 50~60%、TNBS 投与量 2.25 mg~3.375 mg、薬液総量 150 μ l で調整し、3.5 Fr カテーテルをマウスの肛門から 5 cm 挿入して単回または反復 4 回で注腸投与した。実験精度の検証のため比較対象として 2.5% アバーチンを用いた腹腔内麻酔群を設定し、10 μ l/ 20 g・BW の投与量で麻酔を行い、TNBS 誘発腸炎における麻酔時間、体重変動、薬液排出経過をそれぞれ比較した。持続吸入麻酔によるマウス TNBS 誘発腸炎モデルの修正法で得られた最適化条件での病理組織像とサイトカイン産生(大腸組織を用いリアルタイム PCR)を、day 3 と day 7 で評価した。セボフルランによる持続吸入麻酔法を用いて薬液暴露時間を制御したプロトコールに従い、薬液暴露時間を 20 分間、35 分間、50 分間群の 3 群に分けて各群 TNBS 誘発腸炎の実験を行い、各群の体重変動、死亡率、有害合併症を比較・検討した。

[結果]

セボフルランを用いた持続吸入麻酔群は、アバーチンを用いた腹腔内麻酔群と比較して、麻酔時間の分散が有意に小さかった。セボフルランを用いた持続吸入麻酔群ではアバーチンを用いた腹腔内麻酔群と比較して、単回投与の TNBS 誘発腸炎モデルで薬液停滞時間の厳密な制御が得られ、体重変動のばらつきが少なく、体重最下点の分散が有意に小さかった。単回投与の最適化条件はエタノール濃度 55%、TNBS 投与量 2.25 mg、薬液暴露時間 30 分間で得られ、大腸のサイトカイン産生では day 3 で IL-6、TNF- α の上昇、day 7 で TNF- α 、IL-17A、IFN- γ の上昇を確認した。薬液暴露時間を変えた 3 群間での TNBS 誘発腸炎の重症度、合併症の比較では、薬液暴露 20 分間群、35 分間群、50 分間群で TNBS 誘発腸炎の体重変動に有意差がみられ、部分壊死や癒着などの合併症は時間依存性に増加した。セボフルランを用いた持続吸入麻酔群での TNBS 誘発腸炎の反復 4 回投与モデルでは、薬液投与量を最適化し、エタノール濃度 55%、TNBS 初回投与量 2.25 mg、2 回目以降 3.375 mg、暴露時間 30 分間としたところ、死亡率 11% で体重変動の分散が小さい実験系が得られた。

[考察]

セボフルランを用いた持続吸入麻酔による TNBS 誘発腸炎の変法の発案により、麻酔時間の分散が小さく薬液暴露時間の制御が可能となり、腹腔内麻酔と比較して腸炎の重症度が厳密に制御された。薬液暴露時間は時間依存性に TNBS 誘発腸炎の重症度に影響を及ぼした。TNBS 誘発腸炎では一般的に薬液は最低 30 秒間から 60 秒間留め、その後の排出は自然経過にまかせるとされている。ラットの TNBS 誘発腸炎モデルでも、肛門からの薬液の漏れが結果に影響を与えているとの報告がある。これらの報告を考慮すると、本研究の結果である薬液暴露時間の制御は、TNBS 誘発腸炎モデルの実験精度の向上に寄与することが示唆される。マウス TNBS 誘発腸炎モデルでのイソフルランやメキシフルランなどの吸入麻酔薬の使用は、過去の論文報告でみられる。しかし、本研究では薬液暴露時間が固定され、粘膜障害を起こし得る一定の薬液暴露時間を確保している点と、薬液排出が適切になされるように麻酔深度を調節している点が異なる。

[結論]

セボフルランを用いた持続吸入麻酔法による TNBS 誘発腸炎変法により、薬液暴露時間と排出の制御可能となり、単回および複数回投与においてより安定した腸炎誘導が得られた。