

200939054A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの原理・機序の解明、
および代替法の開発に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 穂高

平成 22(2010)年 3 月

平成 21 年度 研究分担者・研究協力者

研究分担者（五十音順）

町井 研士 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者（五十音順）

なし

目 次

I. 総括研究報告

- 下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの原理・機序の解明、
および代替法の開発に関する研究 … i
鈴木 穂高

II. 分担研究報告

1. オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究 … 1
鈴木 穂高
町井 研士
2. オカダ酸投与後のマウスの肉眼的病理変化に関する研究 … 8
鈴木 穂高
町井 研士
3. オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究 … 17
鈴木 穂高
4. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究(予備検討) … 28
鈴木 穂高
5. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究 … 35
鈴木 穂高
6. サーモグラフィー・カメラを用いたオカダ酸投与後のマウスの
体温変化に関する研究 … 42
鈴木 穂高

I. 総括研究報告

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心安全確保推進研究事業

「下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの原理・機序の解明、

および代替法の開発に関する研究」

総括研究報告書

研究代表者 鈴木穂高 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 主任研究官

研究要旨

我が国の下痢性貝毒の検査は、現在、マウスの生死によって判定するマウス・バイオアッセイが公定法とされている。しかし、調べた限りにおいて、下痢性貝毒の腹腔内投与によりマウスが斃死するメカニズムについては報告がなかった。そこで、本研究ではまず、下痢性貝毒の腹腔内投与によるマウスの死因、すなわち、マウス・バイオアッセイの基本的な機序・原理について明らかにすることを第一の目的として研究を行った。

1. オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究

致死量のオカダ酸をマウスの腹腔内に投与したところ、1 回目の実験では 10 匹中 6 匹、2 回目の実験では 10 匹中 9 匹のマウスが斃死した。斃死する個体のほとんどは投与後 6 時間以内に斃死しており、投与 10 時間後以降に斃死する個体は見られなかった。斃死したマウスでは、解剖により腸管内に著明な液体の貯留が観察された。オカダ酸投与後に飲水ビンを除去しても、腸管内への液体の貯留は認められたことから、腸管内の液体の貯留は摂取された水分の吸収障害によるものではなく、体内から腸管内への水分の漏出によるものと考えられた。

2. オカダ酸投与後のマウスの肉眼的病理変化に関する研究

致死量のオカダ酸を腹腔内投与したマウスでは、投与 2 時間後、胃の膨満、腸管内の液体の貯留とそれによる腸管の拡張、鬱血等の所見が認められた。また、オカダ酸投与マウスの消化管の長さは、対照マウス、無処置マウスに比べて長くなっており、これは腸管が弛緩したためと考えられた。

3. オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

致死量のオカダ酸を腹腔内投与したマウスでは、すべてのマウスで投与 1 時間

以内に 35℃以下となるような急激な体温低下を示しており、多くのマウスでは投与 3 時間後以降に 30℃を下回るような低体温状態となっていた。

4. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究(予備検討)

致死量のオカダ酸を腹腔内投与したマウスの血液では、投与 1 時間後にはすでに、著しいヘマトクリット値の上昇と赤血球数、白血球数の増加、血中ヘモグロビン濃度の上昇等が認められた。これらの著しい値の変化は、血中の血漿成分が漏出したためと考えられた。この血漿成分の漏出については、先行の研究において見られた腸管内の液体の貯留と関連すると考えられた。

5. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究

致死量のオカダ酸を腹腔内投与したマウスの血液では、投与 1 時間後にはすでに、著しいヘマトクリット値の上昇と血中ヘモグロビン濃度の上昇等が認められた。これらの著しい値の変化は、血中の血漿成分が腸管内に漏出したことが原因であると考えられた。

6. サーモグラフィー・カメラを用いたオカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

致死量のオカダ酸を腹腔内投与したマウスでは、サーモグラフィー・カメラによっても急激かつ著明な体温低下を示しており、対照群との違いは明らかであった。サーモグラフィー・カメラを用いた簡便な体温測定でも、下痢性貝毒投与によるマウスの体温低下の判定には十分であることが示された。

研究分担者

町井研士 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

我が国の下痢性貝毒の検査は、現在、マウスの生死によって判定するマウス・バイオアッセイが公定法とされている。欧米諸国においてもマウス・バイオアッセイは公定法、あるいは準公定法として広く用いられている。しかし、調べた限りにおいて、下痢性貝毒の腹腔内投与によりマウスが斃死するメカニズムについては報告がなかった。そこで、本研究ではまず、下痢性貝毒の腹腔内投与によるマウスの死因、すなわち、マウス・バイオアッセイの基本的な機序・原理について明らかにすることを第一の目的とし、さらにその原理に基づいて、検査の迅速化、高感度化、あるいは代替法の開発等を行うことを最終的な目的とした。

B. 研究方法

1. オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究

下痢性貝毒の代表として、オカダ酸を選択し、致死量のオカダ酸を ICR マウス 10 匹に腹腔内投与した後、経過を観察した。

2. オカダ酸投与後のマウスの肉眼的病理変化に関する研究

致死量のオカダ酸を ICR マウスに腹腔内投与した後、投与 2 時間後にマウスの採材を行った。溶媒のみを腹腔内投与したマウスと無処置のマウスと比較した。

3. オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

オカダ酸投与前と投与 12 時間後までの 1 時間ごと、そして投与 24 時間後にマウスの直腸温を測定した。致死量のオカダ酸を投与したマウス群と、溶媒のみを投与したマウス群の 2 群で比較した。各群 4～5 匹のマウスを用いた。

4. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究(予備検討)

オカダ酸投与前と投与 4 時間後までの 1 時間ごとにマウスから全採血し、血液学的検査を行った。致死量のオカダ酸を投与したマウス群と、溶媒のみを投与したマウス群の 2 群で比較した。各群一時点 3 匹のマウスを用いた。

5. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究

4. の研究と同様に、オカダ酸投与前と投与 4 時間後までの 1 時間ごとにマウスから全採血し、血液学的検査を行った。致死量のオカダ酸を投与したマウス群と、溶媒のみを投与したマウス群の 2 群で比較した。各群一時点 4 匹のマウスを用いた。

6. サーモグラフィー・カメラを用いたオ

カダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

投与前と投与10時間後までの1時間ごと、そして投与24時間後に、サーモグラフィ・カメラを用いてマウスの体表温を測定した。致死量のオカダ酸を投与したマウス群と、溶媒のみを投与したマウス群の2群で比較した。各群5匹のマウスを用いた。

C. 研究結果

1. オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究

1回目の実験(飲水ビンあり)では、マウス10匹中6匹、2回目の実験(飲水ビンなし)では、マウス10匹中9匹が斃死した。斃死する個体は投与2~5時間後あたりに集中しており、投与10時間後以降に斃死する個体は見られなかった。

斃死したマウスを解剖したところ、腸管内に著明な液体の貯留が認められた。

2. オカダ酸投与後のマウスの肉眼的病理変化に関する研究

オカダ酸投与2時間後のマウスを解剖したところ、胃が餌で膨満しており、腸管内には液体が貯留して拡張していた。肝臓は暗赤褐色を呈し、顆粒状の肉眼像を示していた。また、オカダ酸投与マウスでは明らかに消化管の長さが長くなっていた。

3. オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

投与群では、すべてのマウスで1時間以内に35℃以下となるような急激な体温低下を示しており、多くのマウスでは3時間後以降に30℃を下回るような低体温状態となっていた。斃死する個体については、そのまま体温が回復することなく死に至るが、生存する個体についてはその後、体温が回復し、投与24時間後にはほぼ平常体温に戻っていた。対照群の体温は概ね37℃以上で推移しており、急激な体温低下は観察されなかった。

4. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究(予備検討)

投与前のマウスのヘマトクリット値は40%前後だが、オカダ酸投与の1時間後にはすでにヘマトクリット値は60%を超えており、有意な上昇を示していた。血中ヘモグロビン濃度についても、投与前は10g/dl程度だったのに対し、オカダ酸投与の1時間後には15g/dlを超えており、その後も高い値を保っていた。赤血球数、白血球数についてもオカダ酸投与群で増加が認められた。

5. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究

投与前のマウスのヘマトクリット値は40%前後だが、オカダ酸投与の1時間後にはすでにヘマトクリット値は60%を超

えており、有意な上昇を示していた。血中ヘモグロビン濃度についても、投与前は8g/dl程度だったのに対し、オカダ酸投与の1時間後には約2倍の16g/dlを超えており、その後も高い値を保っていた。一方、赤血球数、白血球数は増加傾向にはあったが、ばらつきが大きかった。

6. サーモグラフィー・カメラを用いたオカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

投与前はどちらの群のマウスも33°C以上の部分がほとんどだったが、オカダ酸投与群では投与1時間後には体表全体が30°C程度まで低下していた。投与2時間後には5匹中4匹で体表温が29°C以下まで低下していた。オカダ酸投与群のマウスは、投与3時間後までに2匹が斃死し、その後、投与7時間後までにもう1匹、9時間後までにさらに1匹斃死し、投与24時間後まで生存したのは1匹だった。

D. 考察

1. オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究

1回目の実験では10匹中6匹、2回目の実験では10匹中9匹が斃死した。2回の実験の結果はFisherの正確確率検定で $P=0.303$ と有意差はなかった。

1回目の実験において、斃死した個体を解剖したところ、腸管内に著明な液体の

貯留が認められた。そこで、2回目の実験において、飲水ビンを除去して同様の実験を行ったが、やはり斃死した個体では腸管内の液体の貯留が認められた。このことから、腸管内の著明な液体の貯留は、摂取された水分の吸収障害によるものではなく、体内から腸管内への水分の漏出によるものであろうと考えられた。

2. オカダ酸投与後のマウスの肉眼的病理変化に関する研究

本実験ではマウスのケージから餌と水を除去し、オカダ酸投与後2時間は絶飲絶食の状態であったにも関わらず、解剖したマウスの胃は餌で膨満しており、腸管内には液体が貯留して拡張していた。全身の皮膚や肝臓、脳の肉眼所見から強い鬱血状態が示唆された。

下痢性貝毒はヒトが経口的に摂取した場合にはヒトに下痢を起こし、マウスの腹腔内に投与した場合にはマウスに死をもたらすことから、その毒性の機序はまったく異なるものと考えていたが、マウスの腹腔内投与において最も顕著な病理学的変化が消化管に起こっていたことは極めて興味深い。

3. オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

本実験で投与後のマウスの直腸温を経時的に測定したところ、体温の低下が確認された。

1 回目の実験では投与群の 5 匹中 2 匹、2 回目の実験では 5 匹中 4 匹が 24 時間以内に斃死したが、急激な体温の低下はすべてのマウスで投与 1 時間後には顕著であったことから、マウスの体温低下を指標とすることで、24 時間後のマウスの生死で判定するよりも迅速で高感度な判定ができる可能性が示唆された。

4. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究(予備検討)

オカダ酸投与群では、投与 1 時間後から著しいヘマトクリット値の上昇と赤血球数、白血球数の増加、血中ヘモグロビン濃度の上昇が認められた。これらの著しい値の変化は、血中の血漿成分が漏出したためと考えられた。

5. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究

オカダ酸投与群では、投与 1 時間後から著しいヘマトクリット値の上昇と血中ヘモグロビン濃度の上昇が認められた。血中の血漿成分の漏出について再現性が示された。

6. サーモグラフィー・カメラを用いたオカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

オカダ酸投与後のマウスの体温低下は、サーモグラフィー・カメラを用いた体表温の測定でも十分検知できるレベルであることが明らかとなった。体温計を用い

た直腸温の測定に比べ、サーモグラフィー・カメラを用いた体表温の測定には、

1. マウスを拘束する必要がないので、マウスに対するストレスが少ない。
 2. 一度に多くの検体を測定できる。
- という利点がある。それに加え、
3. 視覚的に分かりやすい。
 4. 画像を残しておくことで検査結果を残しておくことができる。
- といった利点も考えられる。

先行の実験でも考察したように、マウスの体温低下を指標とすることで、24 時間後のマウスの生死で判定するよりも迅速で高感度な判定ができる可能性があるが、サーモグラフィー・カメラを使用することでより簡便な検査が可能となると考えられる。

E. 結論

1. オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究

致死量の下痢性貝毒(オカダ酸)をマウスに腹腔内投与したところ、1 回目の実験では 10 匹中 6 匹、2 回目の実験では 10 匹中 9 匹のマウスが斃死した。斃死する個体は投与後 6 時間以内に斃死するものがほとんどで、投与 10 時間後以降に斃死する個体は見られなかった。斃死したマウスを解剖したところ、腸管内に著明な液体の貯留が観察された。オカダ酸投与

後、飲水ビンを除去して飲水の摂取を妨害しても、腸管内の液体の貯留が認められたことから、腸管内の液体の貯留は摂取された水分の吸収障害によるものではなく、体内から腸管内への水分の漏出によるものであろうと考えられた。

2. オカダ酸投与後のマウスの肉眼的病理変化に関する研究

致死量の下痢性貝毒(オカダ酸)をマウスに腹腔内投与したところ、投与2時間後、胃の膨化、腸管内の液体の貯留、鬱血等の所見が認められた。また、投与マウスの消化管の長さは、対照マウス、無処置マウスに比べ、弛緩して長くなっていた。

3. オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

致死量の下痢性貝毒(オカダ酸)を投与したマウスでは24時間後の生死に関係なく、投与1~3時間後には著明な体温の低下が観察されていることから、体温低下は少なくとも生死よりも迅速であり、かつ高感度であると考えられ、マウスの体温低下を指標とすることで、現行のマウス・バイオアッセイの操作等を大きく変更することなく、検査を迅速化、高感度化できる可能性があると考えられた。

4. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究(予備検討)

致死量の下痢性貝毒(オカダ酸)をマウ

スに腹腔内投与したところ、オカダ酸投与群では、投与1時間後から著しいヘマトクリット値の上昇と赤血球数、白血球数の増加、血中ヘモグロビン濃度の上昇が認められた。先行の研究において見られた腸管内の液体の貯留と合わせて考えると、これらの著しい値の変化は、血中の血漿成分が腸管内に漏出したためと考えられた。

5. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究

致死量の下痢性貝毒(オカダ酸)をマウスに腹腔内投与したところ、オカダ酸投与群では、投与1時間後から著しいヘマトクリット値の上昇と血中ヘモグロビン濃度の上昇が認められた。これらの著しい値の変化は、血中の血漿成分が腸管内に漏出したためと考えられた。

6. サーモグラフィー・カメラを用いたオカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

致死量の下痢性貝毒(オカダ酸)を投与したマウスでは24時間後の生死に関係なく、投与1~3時間後には著明な体温の低下が観察されていることから、体温低下は少なくとも生死よりも迅速であり、かつ高感度であると考えられる。前の研究において、現行のマウス・バイオアッセイの操作等を大きく変更することなく、検査を迅速化、高感度化できる可能性が

あると考察したが、サーモグラフィー・カメラを用いることで、さらに簡便に検査が行えるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業

「下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの原理・機序の解明、

および代替法の開発に関する研究」

分担研究報告書

分担研究：1. オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究

研究代表者 鈴木穂高 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 主任研究官

研究分担者 町井研士 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長

研究要旨

我が国の下痢性貝毒の検査は、現在、マウスの生死によって判定するマウス・バイオアッセイが公定法とされている。しかし、調べた限りにおいて、下痢性貝毒の腹腔内投与によりマウスが斃死するメカニズムについては報告がなかった。そこで、まず、致死量の下痢性貝毒をマウスに腹腔内投与し、死に至るまでの経過を追うこととした。下痢性貝毒の代表として、オカダ酸を用い、マウスの腹腔内に投与したところ、1 回目の実験では 10 匹中 6 匹、2 回目の実験では 10 匹中 9 匹のマウスが斃死した。斃死する個体のほとんどは投与後 6 時間以内に斃死しており、投与 10 時間後以降に斃死する個体は見られなかった。斃死したマウスでは、解剖により腸管内に著明な液体の貯留が観察された。オカダ酸投与後に飲水ビンを除去しても、腸管内への液体の貯留は認められたことから、腸管内の液体の貯留は摂取された水分の吸収障害によるものではなく、体内から腸管内への水分の漏出によるものであろうと考えられた。

A. 研究目的

現在、我が国の下痢性貝毒の検査は、マウス・バイオアッセイが公定法とされている。公定法によれば、検体(貝のむき身、もしくは中腸腺)からの抽出物をマウスの腹腔内に投与し、24 時間以内の生死

で判定することとされている。しかし、我々が調べた限り、下痢性貝毒の腹腔内投与によりマウスが斃死するメカニズムについては報告がなかった。そこで、まず、致死量の下痢性貝毒をマウスに腹腔内投与し、死に至るまでの経過を追うこ

ととした。

B. 研究方法

下痢性貝毒の代表として、生理活性物質として研究領域で広く用いられ、商業的に入手が可能なオカダ酸を選択した。オカダ酸の半数致死量(LD₅₀)は4 μ g/匹と報告されているため、本研究でも4 μ g/匹でマウスに投与した。オカダ酸4 μ g/匹は、下痢性貝毒の1マウス・ユニット(MU)に相当するとされる。オカダ酸をアセトンに溶解し、大豆油に混和した後、アセトンを揮発させ、1% Tween 60 加生理食塩水で懸濁したものを投与液とした。4週齢、雄、18~20gのICRマウス(日本エスエルシーから購入)、10匹に4 μ g/mlのオカダ酸を1ml腹腔内投与した後、経過を観察した。経過は10分おきに観察すると同時に、ビデオカメラでも撮影した。

実験は2回行った。1回目の実験で、斃死したマウスに腸管内に著明な液体の貯留が認められたため、2回目の実験では飲水ビンを除去して実験を行った。

C. 研究結果

1回目の実験(飲水ビンあり)では、マウス10匹中6匹が斃死した(図1)。一方、2回目の実験(飲水ビンなし)では、マウス10匹中9匹が斃死した(図2)。斃死する個体は投与2~5時間後あたりに集中して

おり、投与10時間後以降に斃死する個体は見られなかった。

行動の観察では、投与20~30分までは摂餌行動や飲水行動がほとんどの個体で見られたが、それ以降は活動性の低下が著明で、摂餌行動や飲水行動は一部の個体でしか認められなかった。斃死したマウスは体躯を伸長させ、また、後肢を麻痺したように伸長させているのが特徴的であった(図3)。

斃死したマウスを解剖したところ、腸管内に著明な液体の貯留が認められた(図4)。

D. 考察

今回、半数致死量として報告されていた4 μ g/匹のオカダ酸をマウスの腹腔内に投与し、経過を観察したが、1回目の実験では10匹中6匹、2回目の実験では10匹中9匹が斃死した。2回の実験の結果はFisherの正確確率検定でP=0.303と有意差はなかった。

1回目の実験において、斃死した個体を解剖したところ、腸管内に著明な液体の貯留が認められた。そこで、2回目の実験において、飲水ビンを除去して同様の実験を行ったが、やはり斃死した個体では腸管内の液体の貯留が認められた。このことから、腸管内の著明な液体の貯留は、摂取された水分の吸収障害によるもので

はなく、体内から腸管内への水分の漏出によるものであろうと考えられた。

下痢性貝毒検査の公定法によれば、マウスの腹腔内に投与し、24 時間以内の生死で判定することとされているが、今回の研究において、実際には投与 6 時間以内にほとんどの個体が斃死し、投与 10 時間後以降に斃死する個体は見られなかった。このことから、投与後のかなり早期に予後は決定するものと考えられ、今後の実験では投与後数時間以内の解析を重点的に行うことが重要であろうと考えられた。

E. 結論

致死量の下痢性貝毒(オカダ酸)をマウスに腹腔内投与したところ、1 回目の実験では 10 匹中 6 匹、2 回目の実験では 10 匹中 9 匹のマウスが斃死した。斃死する個体は投与後 6 時間以内に斃死するものがほとんどで、投与 10 時間後以降に斃死

する個体は見られなかった。斃死したマウスを解剖したところ、腸管内に著明な液体の貯留が観察された。オカダ酸投与後、飲水ビンを除去して飲水の摂取を妨害しても、腸管内の液体の貯留が認められたことから、腸管内の液体の貯留は摂取された水分の吸収障害によるものではなく、体内から腸管内への水分の漏出によるものであろうと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 オカダ酸投与後のマウスの生存曲線 (飲水ビンあり)

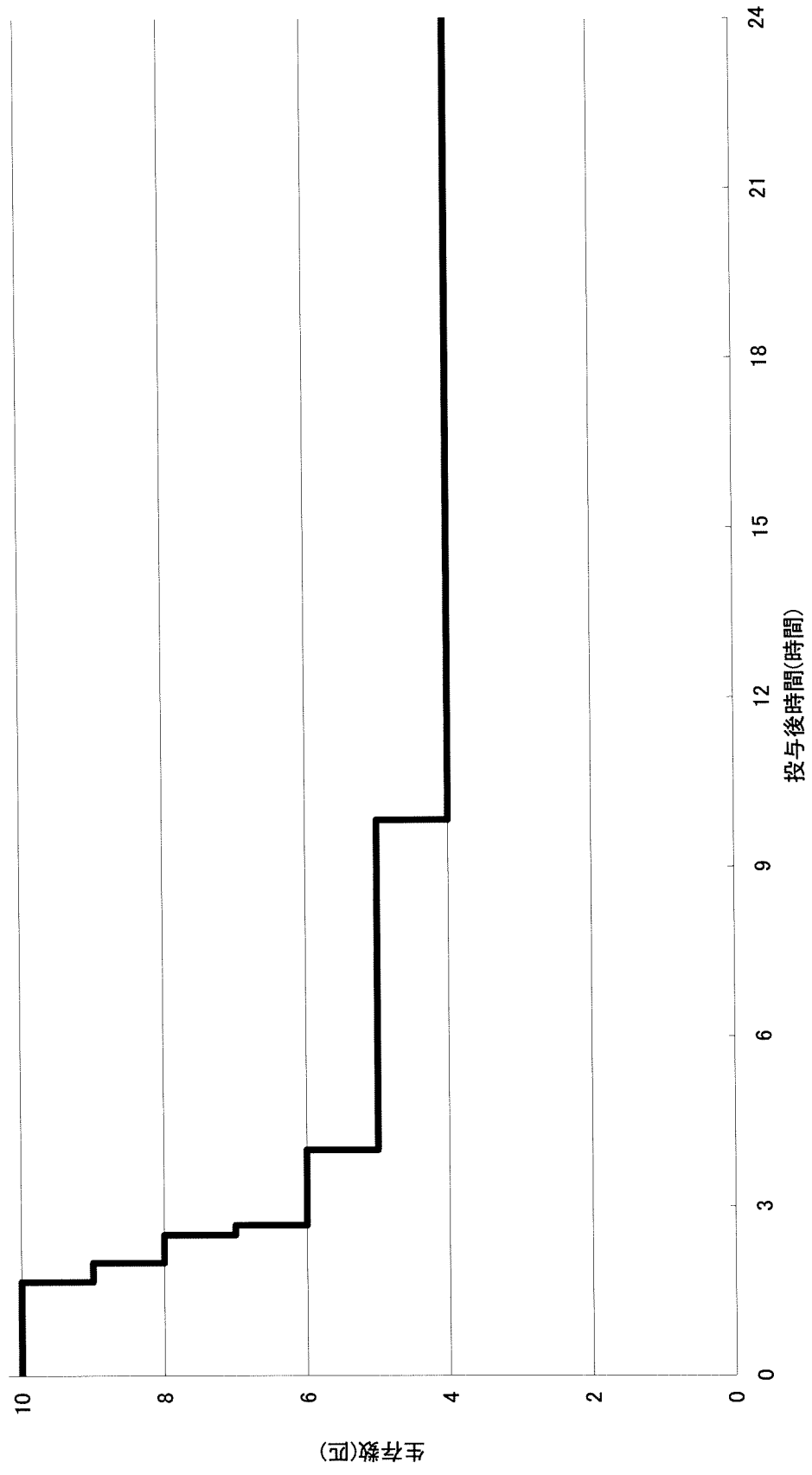


図2 オカダ酸投与後のマウスの生存曲線 (飲水ビンなし)

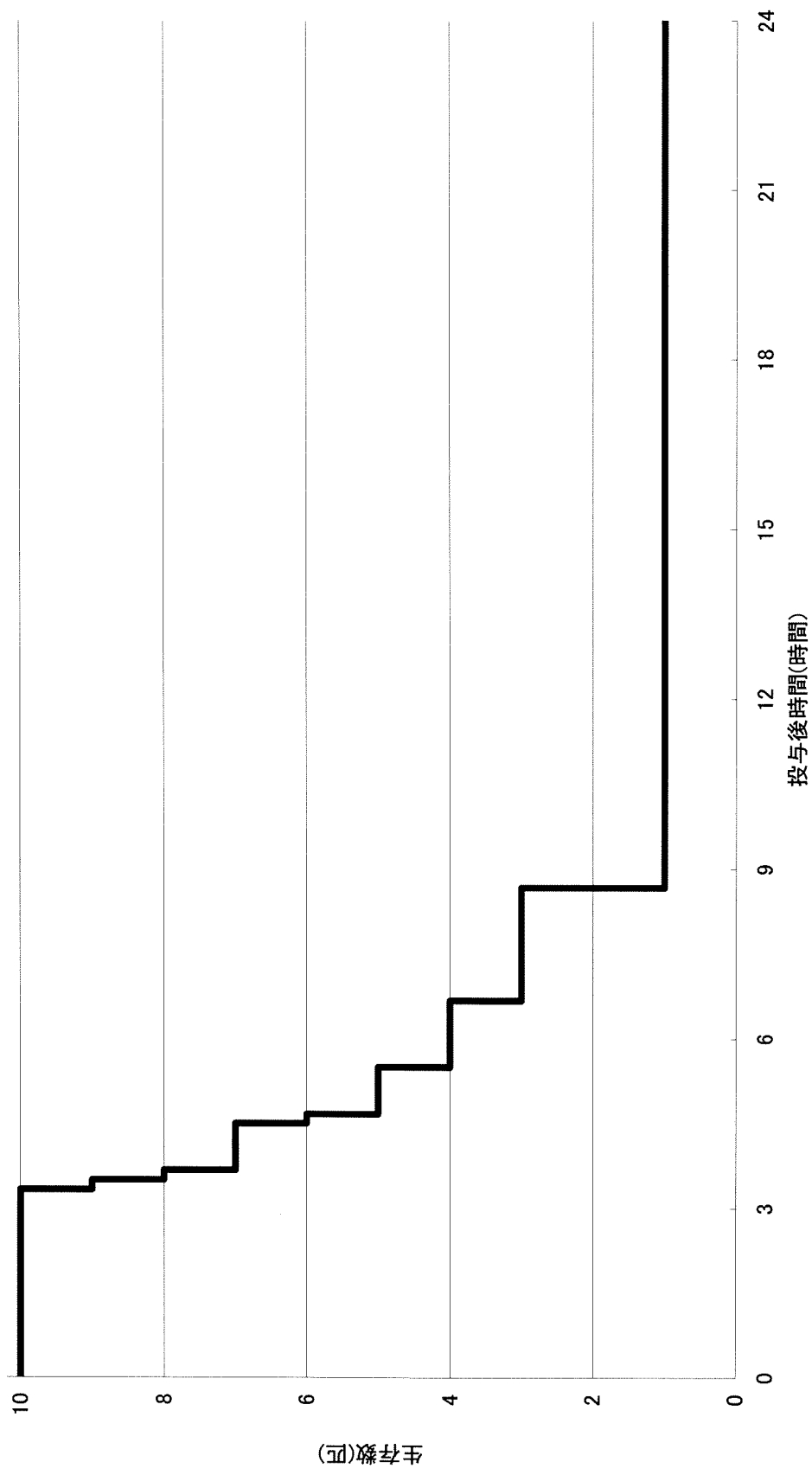


図3 オカダ酸投与後、斃死したマウス



体躯を伸長させ、また、後肢を麻痺したように伸長させているのが特徴的である。

図 4 オカダ酸投与後、斃死したマウスの肉眼的解剖写真



腸管が液体の貯留により膨張している。

腸管の一部が緑色に見えるのは、マウスのマーキングに使用した塗料を舐めたためと思われる。腹腔内に充満している乳白色の液体は、投与したオカダ酸投与液である。