

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：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

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。1. の「オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究」において、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ったところ、斃死する個体のほとんどは投与後 2～6 時間に斃死しており、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。これらのことから、本研究では下痢性貝毒投与後のマウスの肉眼的病理変化に焦点を当て、研究を進めた。

致死量の下痢性貝毒(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、腸管が弛緩したためと考えられた。

### A. 研究目的

致死量の下痢性貝毒をマウスに腹腔内投与し、斃死したマウスを解剖したところ、肉眼的に腸管内に著明な液体の貯留が認められた。そこで、本研究では下痢性貝毒投与後のマウスの肉眼的病理変化について調べた。

### B. 研究方法

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)に 4

$\mu\text{g/ml}$  のオカダ酸を 1ml 腹腔内投与した。対照マウスには大豆油を 1% Tween 60 加生理食塩水で懸濁した溶媒のみを 1ml 腹腔内投与した。また、同時になにも投与していない無処置のマウスの解析も行った。

先行して行ったオカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究において、オカダ酸投与の約 2 時間後からマウスが斃死し始めることから、採材はオカダ酸投与の 2 時間後に行うこととした。貯留した水分が飲水由来でないことは先行して行った実験で明らかなので、オカダ酸投与後、マウスのケージから餌と水を除去し、2 時間絶飲絶食の状態にした。

### C. 研究結果

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(図 1、2)、腸管内には液体が貯留して拡張していた(図 1、3)。肝臓は暗赤褐色を呈し、顆粒状の肉眼像を示していた(図 4)。また、脳も対照マウスや無処置マウスと比べ、赤みが強かった(図 5)。噴門から肛門まで消化管を切除し比較したところ、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(図 6)。胃の膨満については、対照マウスでも認められた(図 1、2)。

### D. 考察

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。胃の膨満に関しては、対照マウスでも認められたことから、オカダ酸の作用でない可能性も考えられた。

オカダ酸の平滑筋に対する作用は、濃度により、収縮にも弛緩にも働くという報告がある。本研究で用いたオカダ酸の量は腸管を弛緩させる方に作用していると考えられた。

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も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く、今後、組織病理学的な研究につなげていきたいと考えている。

### 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、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。

**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**

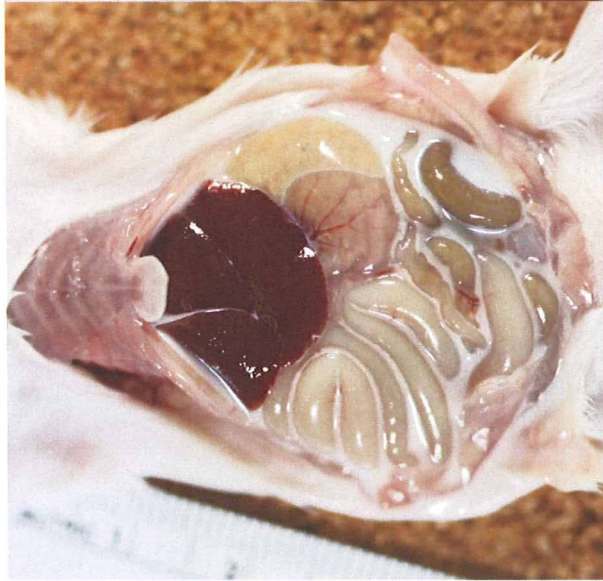
なし

図1 オカダ酸投与後のマウス腹腔の肉眼写真

オカダ酸投与マウス

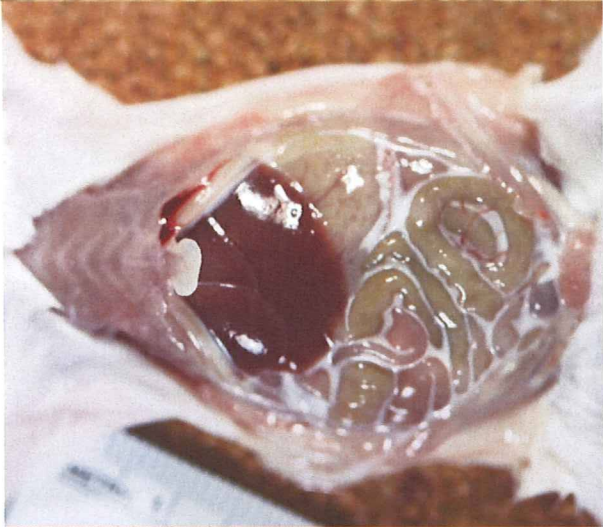
対照マウス

無処置マウス



胃の膨満と腸管内の液体の貯留が著明

腹腔内の白色の液体は投与液

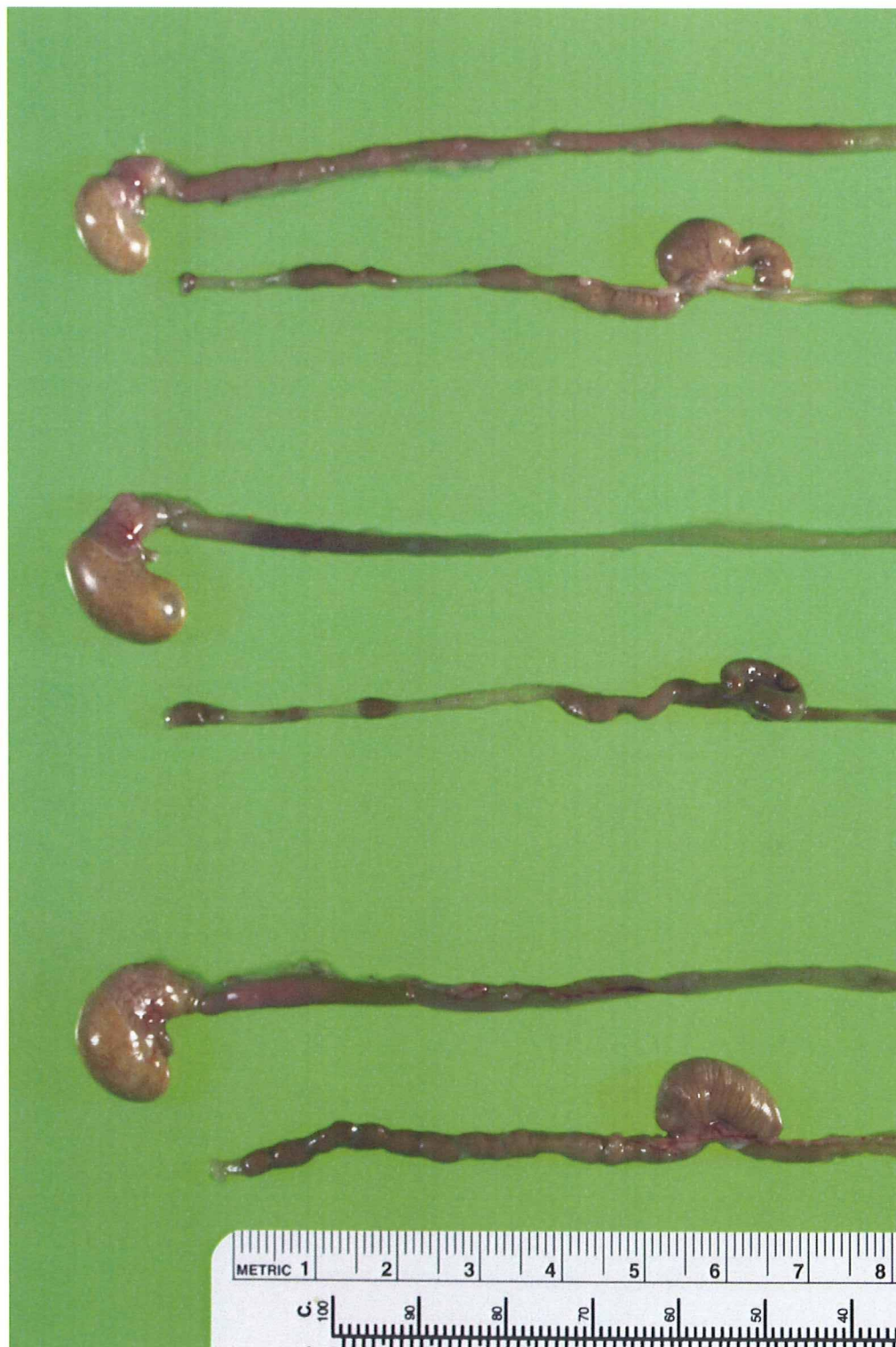


胃の膨満

腹腔内の白色の液体は投与液



図2 オカダ酸投与後のマウス胃の肉眼写真

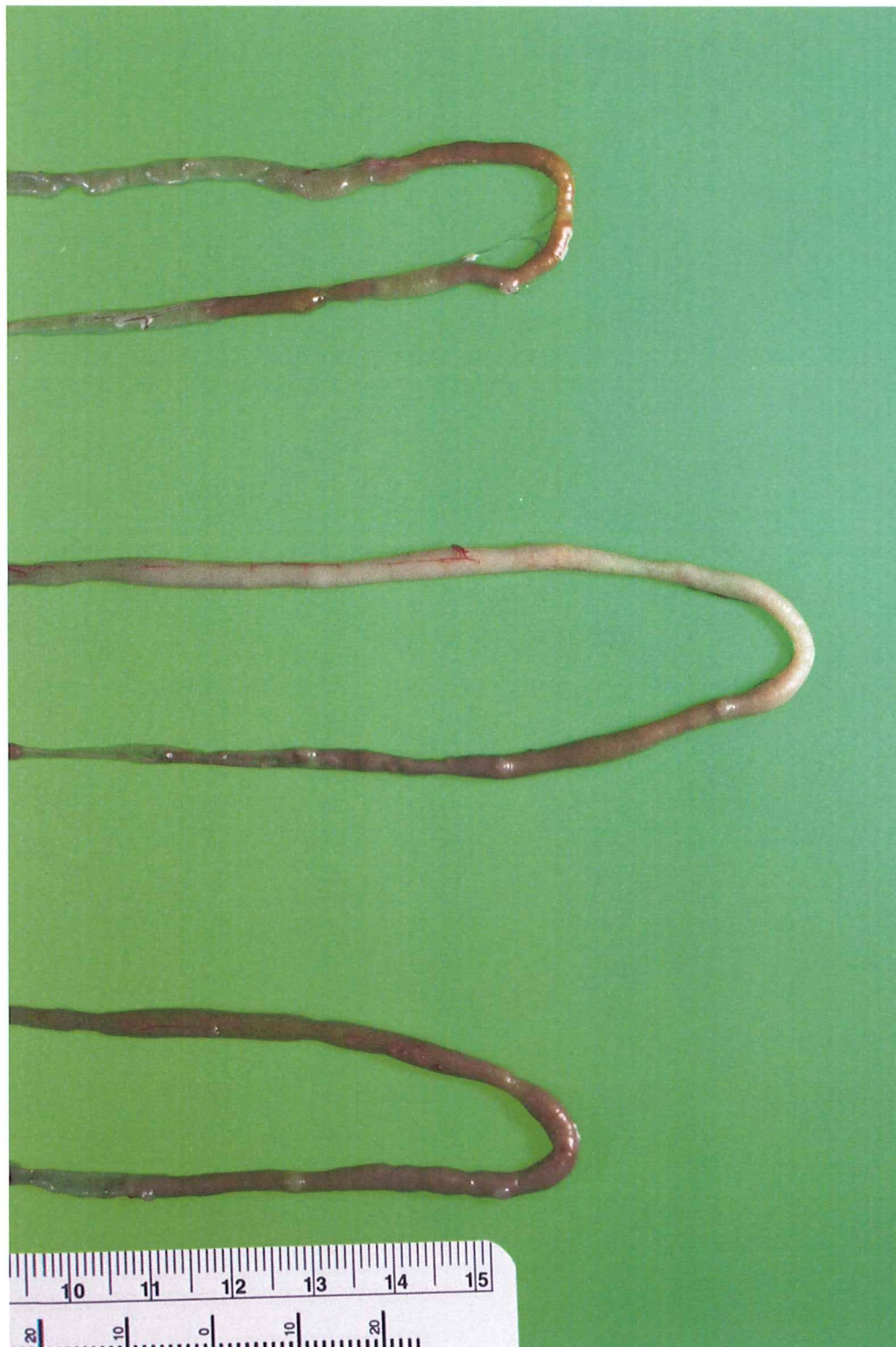


上から、無処置マウス、オカダ酸投与マウス、対照マウスの胃

無処置マウスに比べて、オカダ酸投与マウス、対照マウスでは胃の膨満が見られる。



図3 オカダ酸投与後のマウス腸管の肉眼写真



上から、無処置マウス、オカダ酸投与マウス、対照マウスの腸管  
オカダ酸投与マウスの腸管では液体の貯留が著明である(写真は空～回腸部)。

図4 オカダ酸投与後のマウス肝臓の肉眼写真



左から、無処置マウス、オカダ酸投与マウス、対照マウスの肝臓

オカダ酸投与マウスの肝臓は全体的に暗赤褐色を呈しており、顆粒状に見える。

図5 オカダ酸投与後のマウス脳の肉眼写真



左から、無処置マウス、オカダ酸投与マウス、対照マウスの脳

オカダ酸投与マウスの脳は鬱血が見られ、全体に赤みがかっている。



図6 オカダ酸投与後のマウス消化管の肉眼写真



上から、無処置マウス、オカダ酸投与マウス、対照マウスの消化管  
無処置マウス、対照マウスに比べて、オカダ酸投与マウスの消化管は弛緩して長くなっている。

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：3. オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

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

## 研究要旨

1. の「オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究」において、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ったところ、マウス  
は投与後に著明な活動性の低下と鬱血傾向を示していた。また、2. の「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」において、投与2時間後にマウス  
の解剖を行ったが、マウスはラテックス・グローブ越しでも体感できるくらい、体  
温が著しく低下していた。これらのことから、本研究では、下痢性貝毒投与後のマ  
ウスの体温変化に注目して、研究を進めた。

致死量のオカダ酸(下痢性貝毒)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。

### A. 研究目的

先行の実験において、致死量のオカダ酸  
下痢性貝毒をマウスに腹腔内投与し、死に至る  
までの経過を追ったところ、マウスは著  
明な活動性の低下と鬱血傾向を示し、触  
れてみると、ラテックス・グローブを介  
しても、著しい体温の低下が体感された。  
そこで、本研究では下痢性貝毒投与後の  
マウスの体温の変化について経時的に調

べた。

### B. 研究方法

実験1: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)、5匹に4μg/mlのオカダ酸を1ml腹

腔内投与した。対照群としては、大豆油を1% Tween 60 加生理食塩水で懸濁した溶媒のみを5匹のマウスに1ml 腹腔内投与した。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。直腸温の測定にはテルモファイナー CTM-303 とカテーテル型プローブ(テルモ株式会社)を用い、1匹につき30秒間保持し、数値が安定したところで測定値とした。

実験2:材料と方法は実験1とほぼ同様であるが、投与群がマウス5匹、対照群がマウス4匹であり、また、より早期の体温低下を把握するため、投与30分後にも直腸温の測定をした。

### C. 研究結果

実験1の結果を図1、実験2の結果を図2に示した。実験1では投与群の5匹中2匹、実験2では5匹中4匹が24時間以内に斃死した。

直腸温の変化を見ると、実験1、実験2のいずれの場合も、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。投与24時間後に低体温状態で生存

していた実験2の1個体については、その後数時間以内に斃死しているのが確認された。

対照群では、マウスの体温に多少、日内変動と思われる変動が認められたものの、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。

### D. 考察

前の実験により、オカダ酸投与後、マウスの体温は著しく低下していることが体感されていたが、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、体温低下が実証された。

体温低下は、投与1時間後には35℃以下になるような急激なものであり、24時間以内に斃死する個体でも、24時間後生存している個体でも急激な体温低下は起こっていた。

実験1では投与群の5匹中2匹、実験2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。

### 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、2回の実験のいずれでも、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、体温が回復していた。

致死量の下痢性貝毒を投与されたマウスでは 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、迅速化、高感度化できる可能性があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

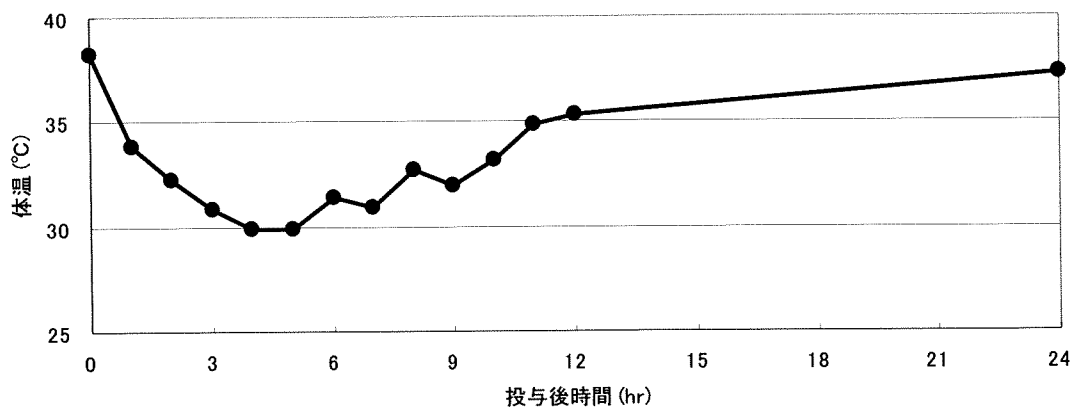
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

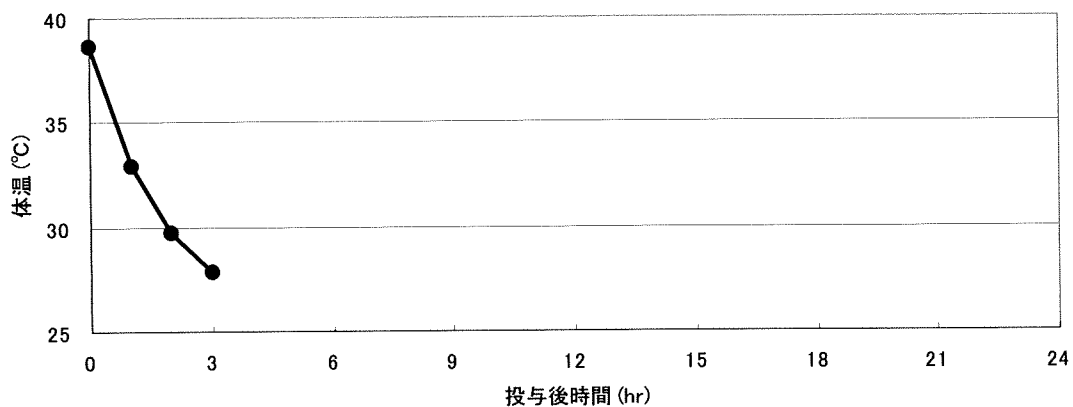


図1 オカダ酸投与後のマウスの体温変化(実験1)

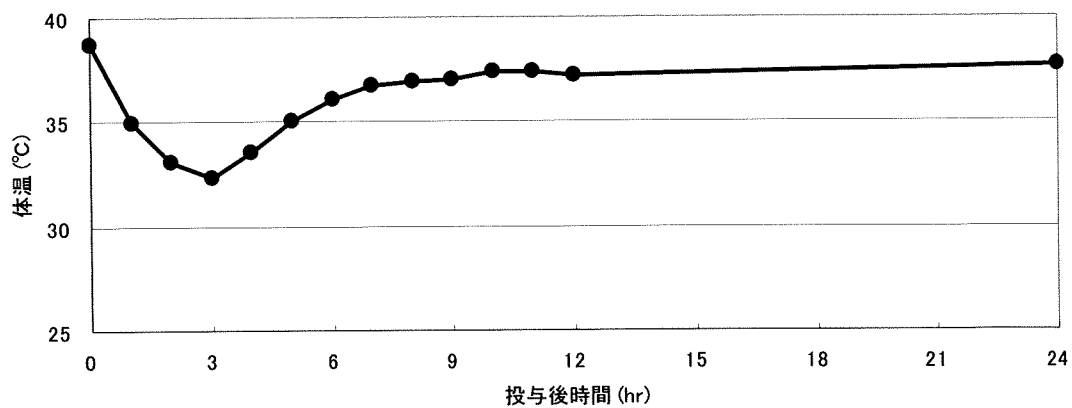
OA投与マウスNo.1



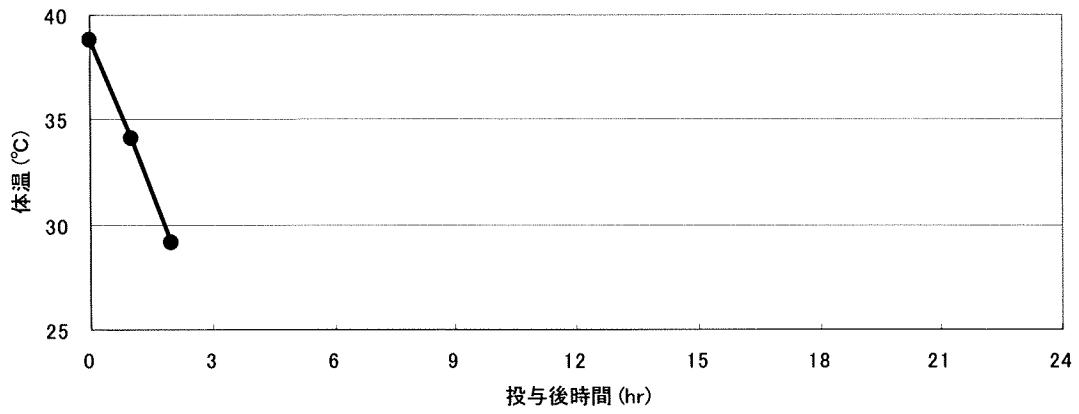
OA投与マウスNo.2



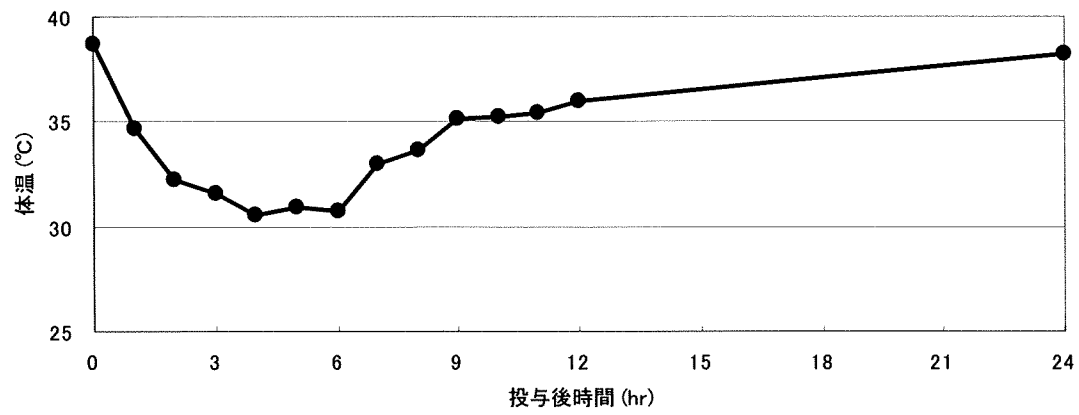
OA投与マウスNo.3



OA投与マウスNo.4

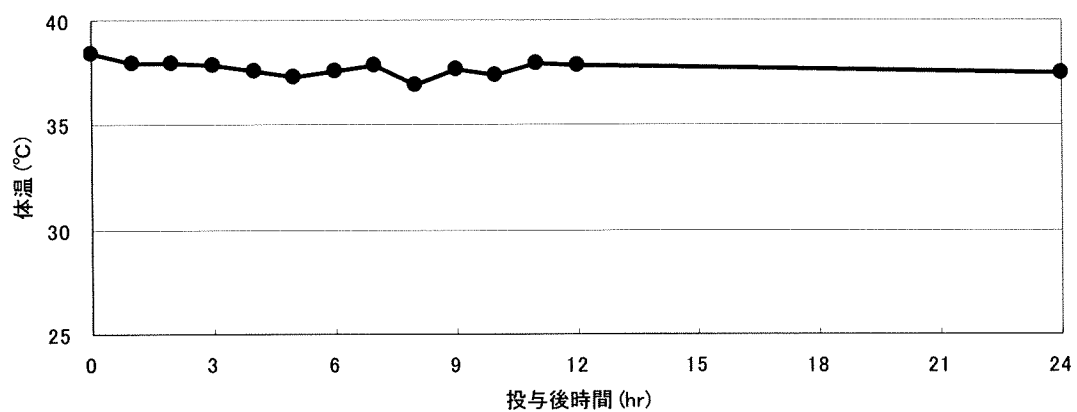


OA投与マウスNo.5

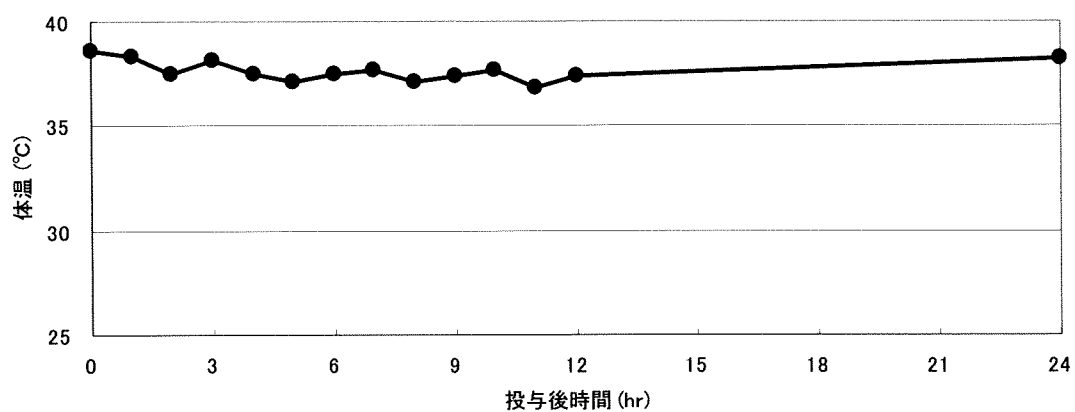


No.2、4は斃死した。No.1、3、5は生存していた。

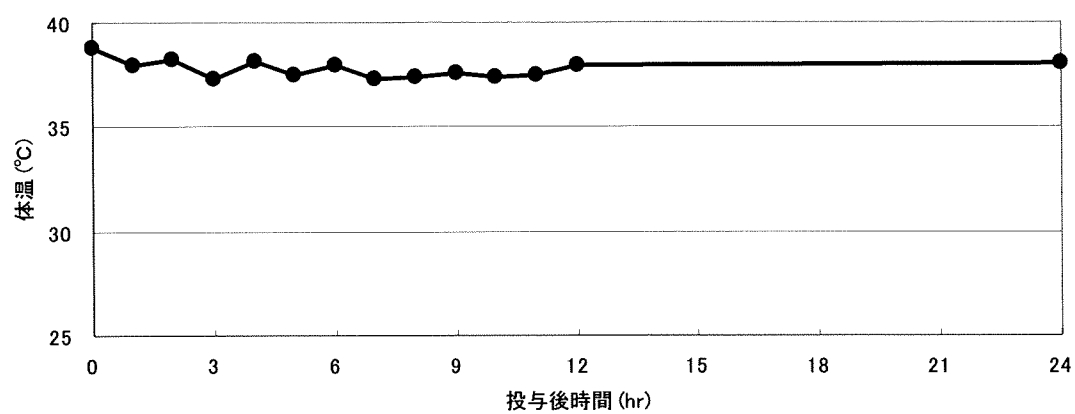
対照マウスNo.1



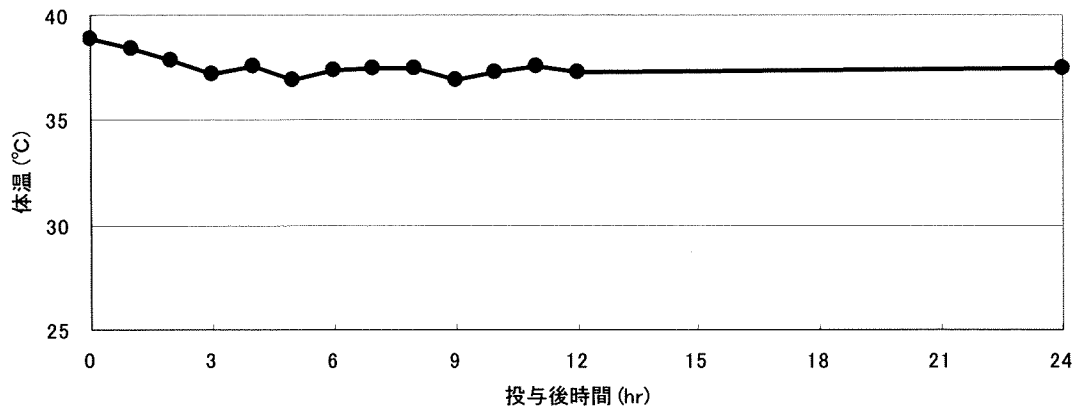
対照マウスNo.2



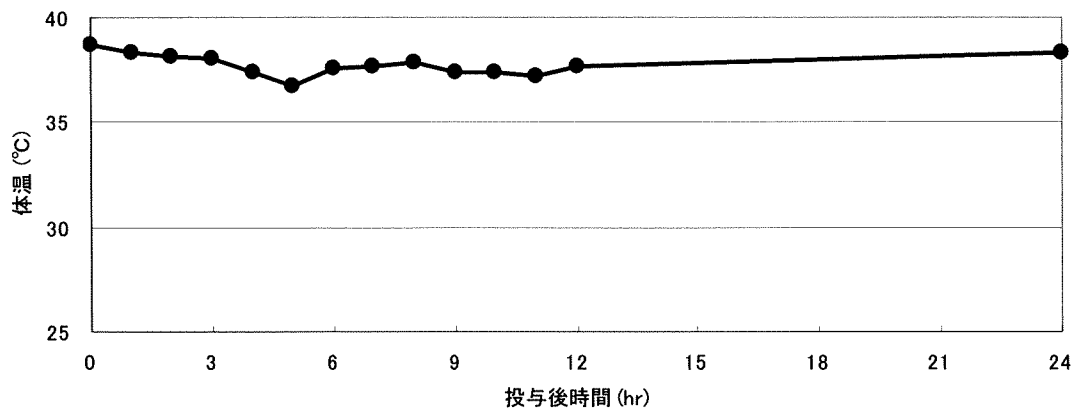
対照マウスNo.3



対照マウスNo.4



対照マウスNo.5

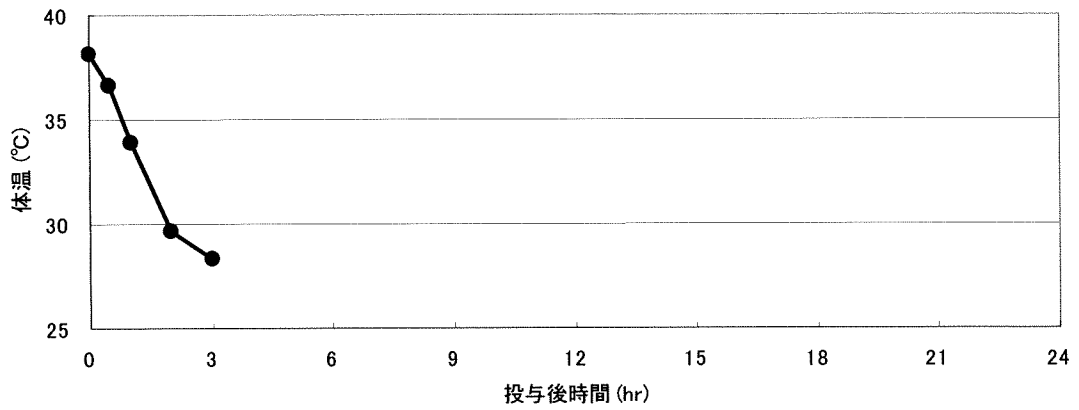


ほとんど体温の低下は認められなかった。

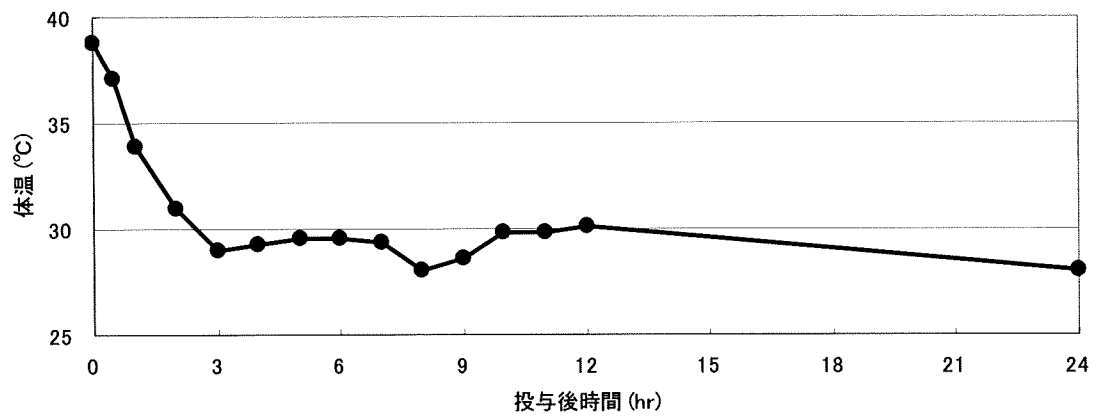


図2 オカダ酸投与後のマウスの体温変化(実験2)

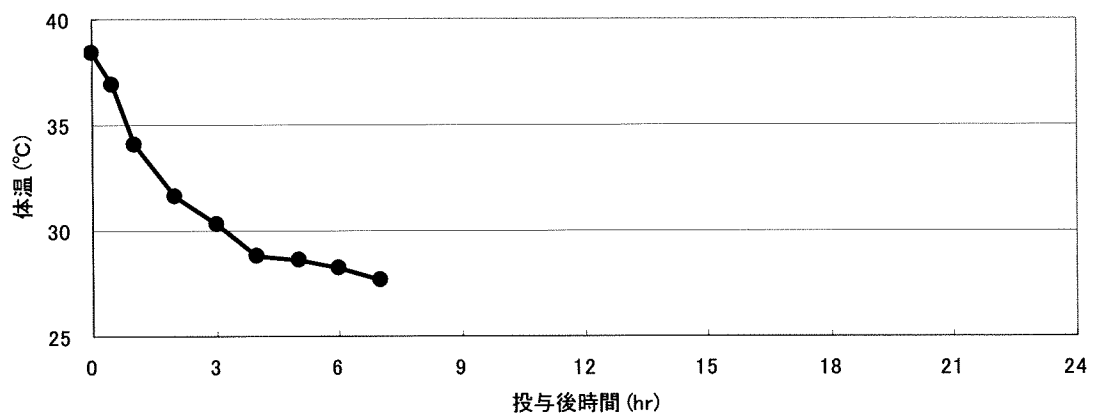
OA投与マウスNo.1



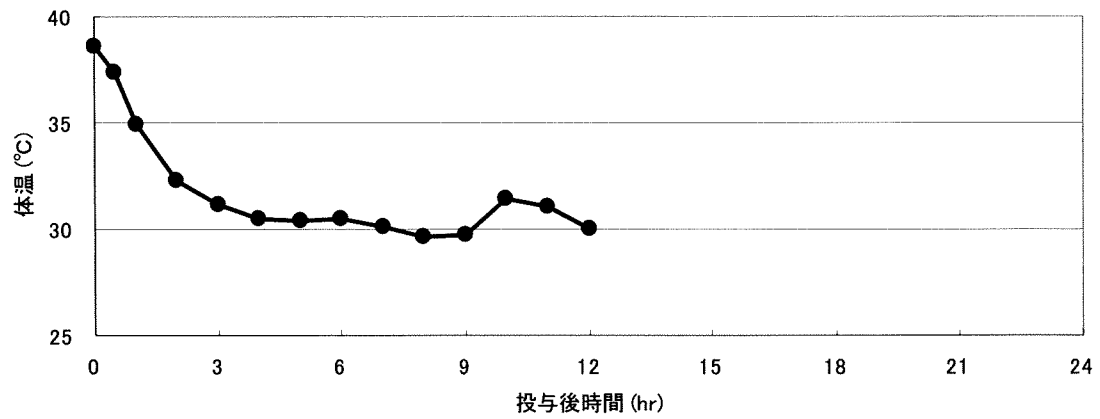
OA投与マウスNo.2



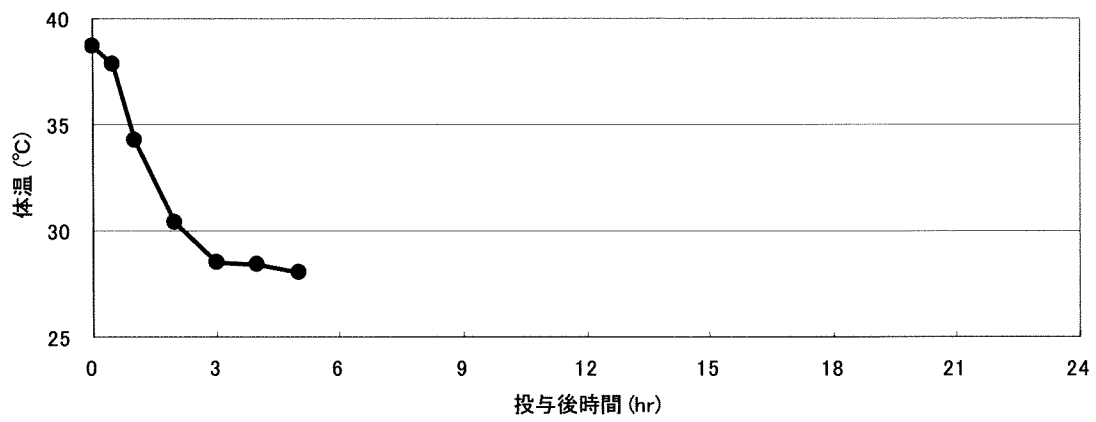
OA投与マウスNo.3



OA投与マウスNo.4

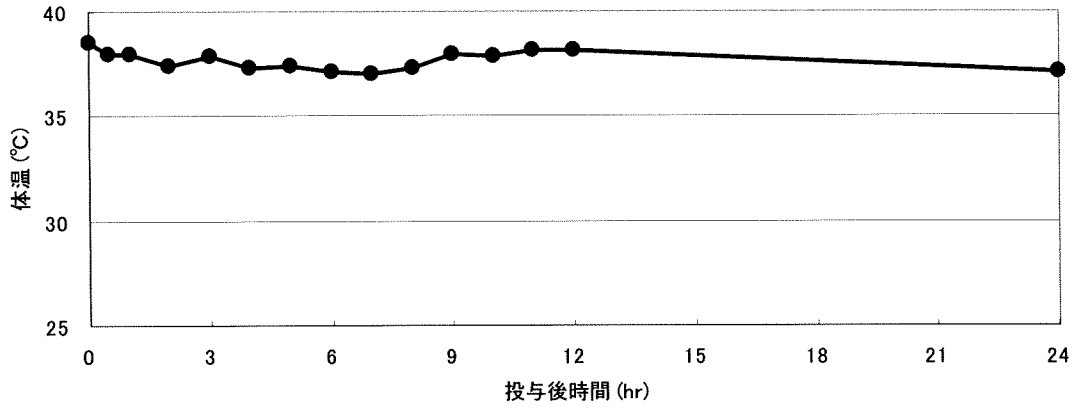


OA投与マウスNo.5

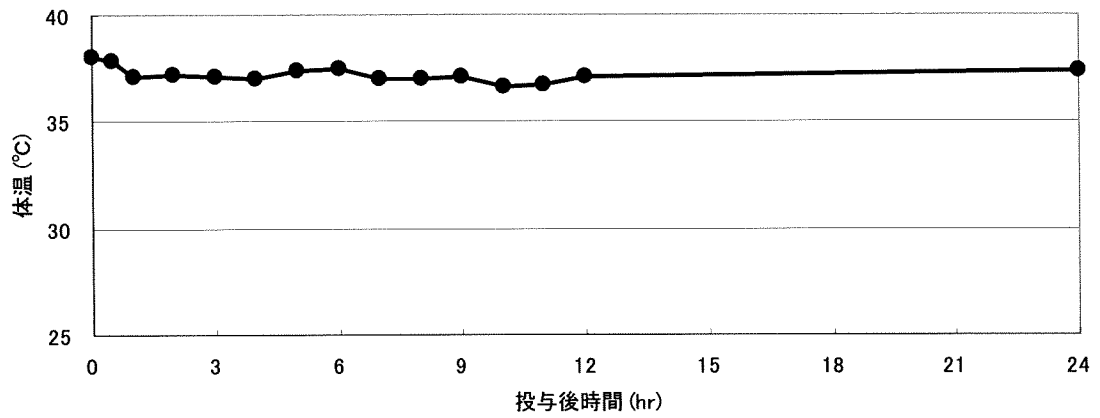


No.1、3、4、5は12時間以内に斃死した。No.2は24時間後には生存していたが、その後数時間で斃死した。

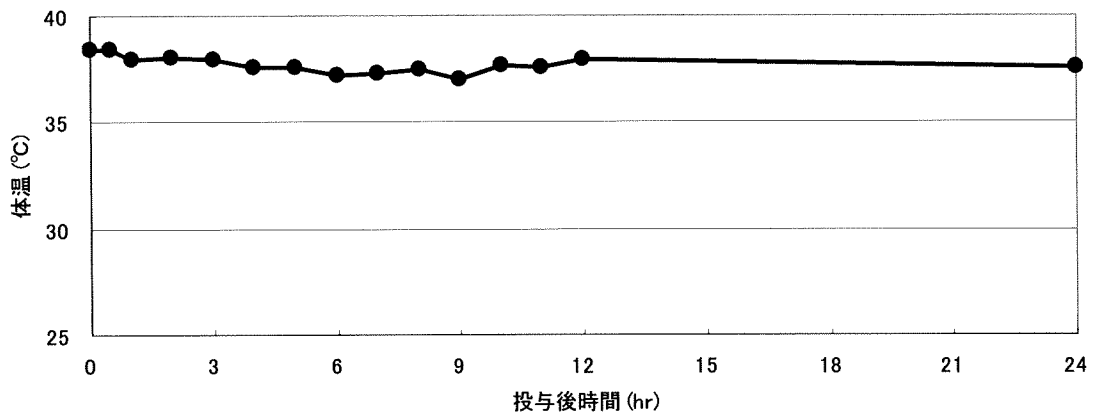
対照マウスNo.1



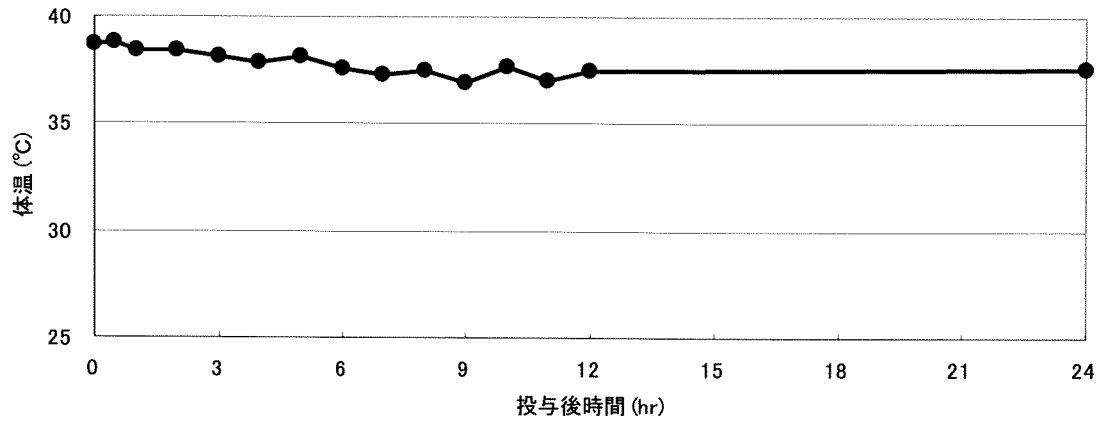
対照マウスNo.2



対照マウスNo.3



対照マウスNo.4



ほとんど体温の低下は認められなかった。