

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：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)

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」、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、致死量の下痢性貝毒を腹腔内投与したマウスでは、腸管内に著しい液体の貯留が認められ、腸管が拡張していることが示された。この変化は、飲水ビンを除去しても同様に起こることからマウスの体内から水分が腸管内に漏出しているものと考えられた。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血液学的数値について経時的に調べた。

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に符合するものであろうと考えられた。

A. 研究目的

先行の実験において、致死量の下痢性貝毒をマウスに腹腔内投与したところ、マウスの腸管内に著明な液体の貯留が認められ、腸管が拡張しているのが観察された。この変化は、飲水ビンを除去しても同様に起こることから飲水の吸収不全

によって起こるものではなく、マウスの体内から水分が漏出している結果であろうと考えられた。そこで、本研究では下痢性貝毒投与後のマウスの血液学的数値、特にヘマトクリット値や赤血球数等について、経時的に調べた。

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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マウスに 1ml 腹腔内投与した。投与前と投与 4 時間後までの 1 時間ごとにヘパリン処理したシリンジを用いて、麻酔下で心臓から全採血し、ヘマトクリット値の測定、ヘモグロビン濃度の測定、赤血球数、白血球数の測定を行った。1 時点ごとに 3 匹のマウスを用いた。ヘマトクリット値の測定には、ヘマトクリット遠心機 H-1200C(株式会社コクサン)を用いた。また、ヘモグロビン値の測定にはヘモグロビン B-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いた。白血球数の測定にはチュルク液(メルク株式会社)を用いた。赤血球、白血球のカウントは血球計算板を用い、顕微鏡下で行った。

食餌と飲水の影響を排除するため、オカダ酸投与後、マウスのケージから餌と水を除去し、絶飲絶食の状態にした。

C. 研究結果

オカダ酸投与後のマウスのヘマトクリット値の変化について、図 1 に示した。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。また、赤血球数も投与前は 500 万個/ μl 程度のところが、800 万個/ μl 以上と有意に増加していた(図 2)。白血球数については、投与前は 2000 個/ μl 程度だったが、オカダ酸投与の 1 時間後には 2 倍の 4000 個/ μl となり、さらに時間を経るにしたがって増加していく傾向が見られた(図 3)。血中ヘモグロビン濃度については、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(図 4)。

D. 考察

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る。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に符合するものであろうと考えられるが、今後、その証明が必要であらうと考えている。

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、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。

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ヘマトクリット値の変化 (%)

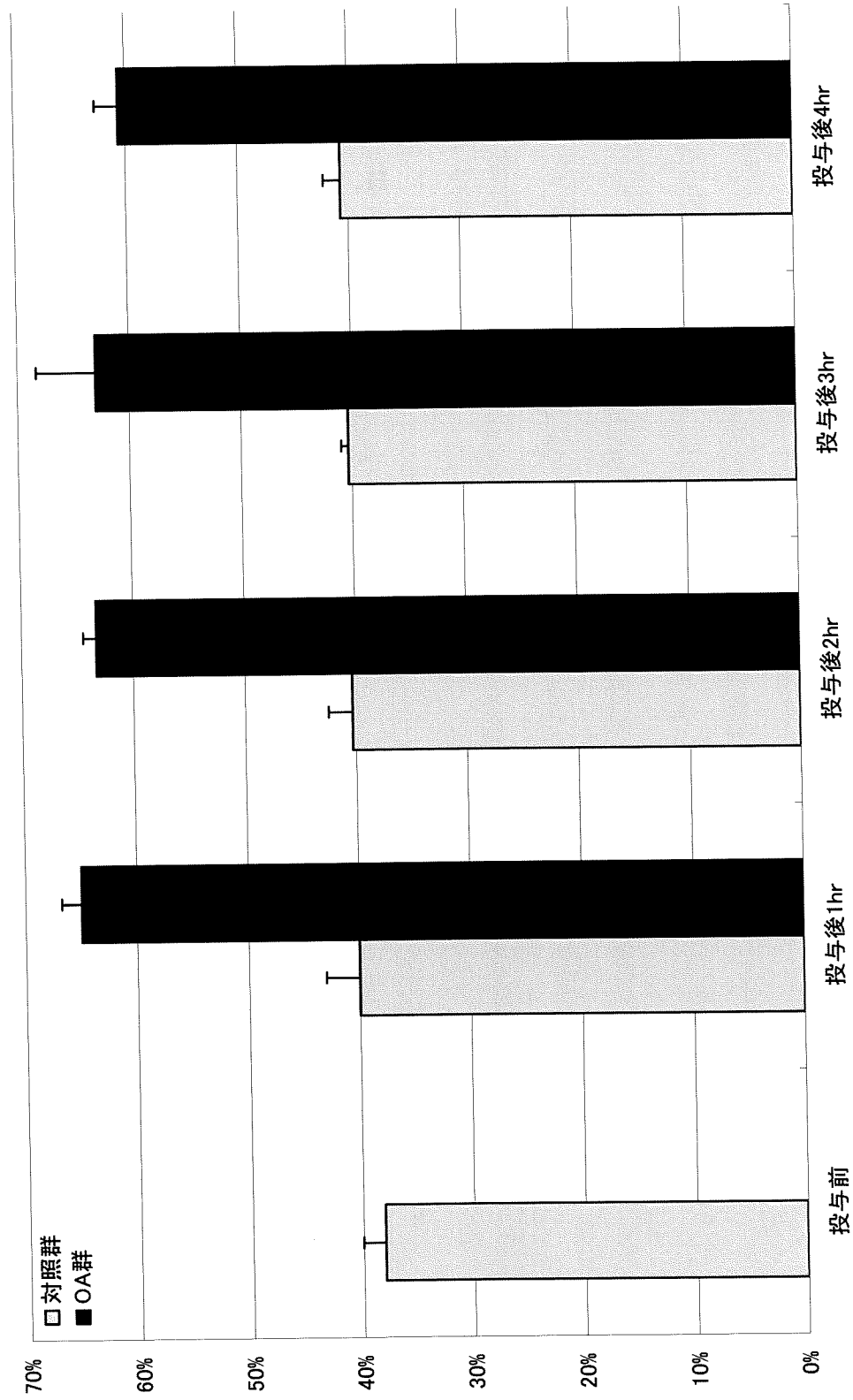


図2 オカダ酸投与後のマウスの赤血球数の変化 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)

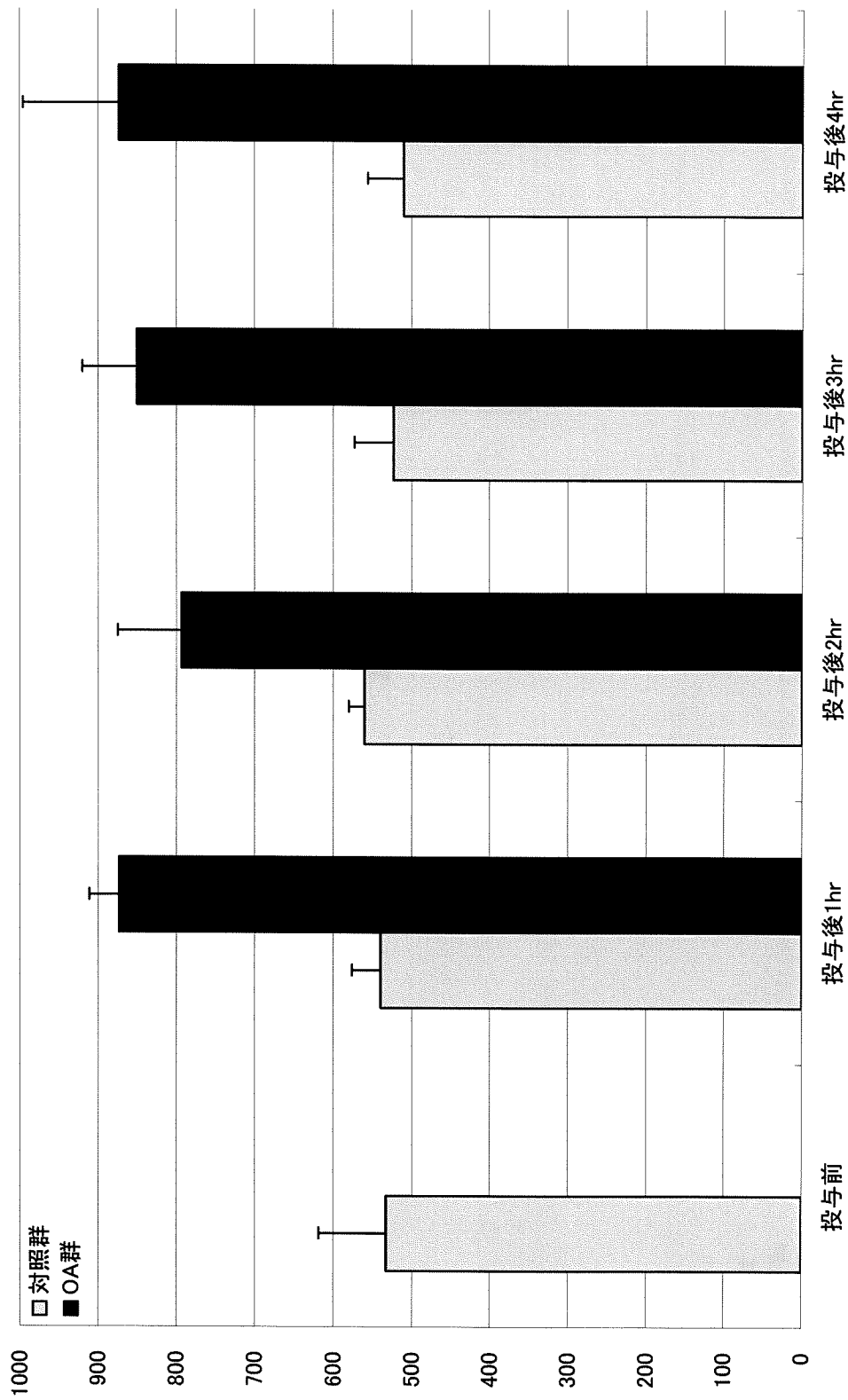


図3 オカダ酸投与後のマウスの白血球数の変化 ($\times 10^2/\mu\text{l}$)

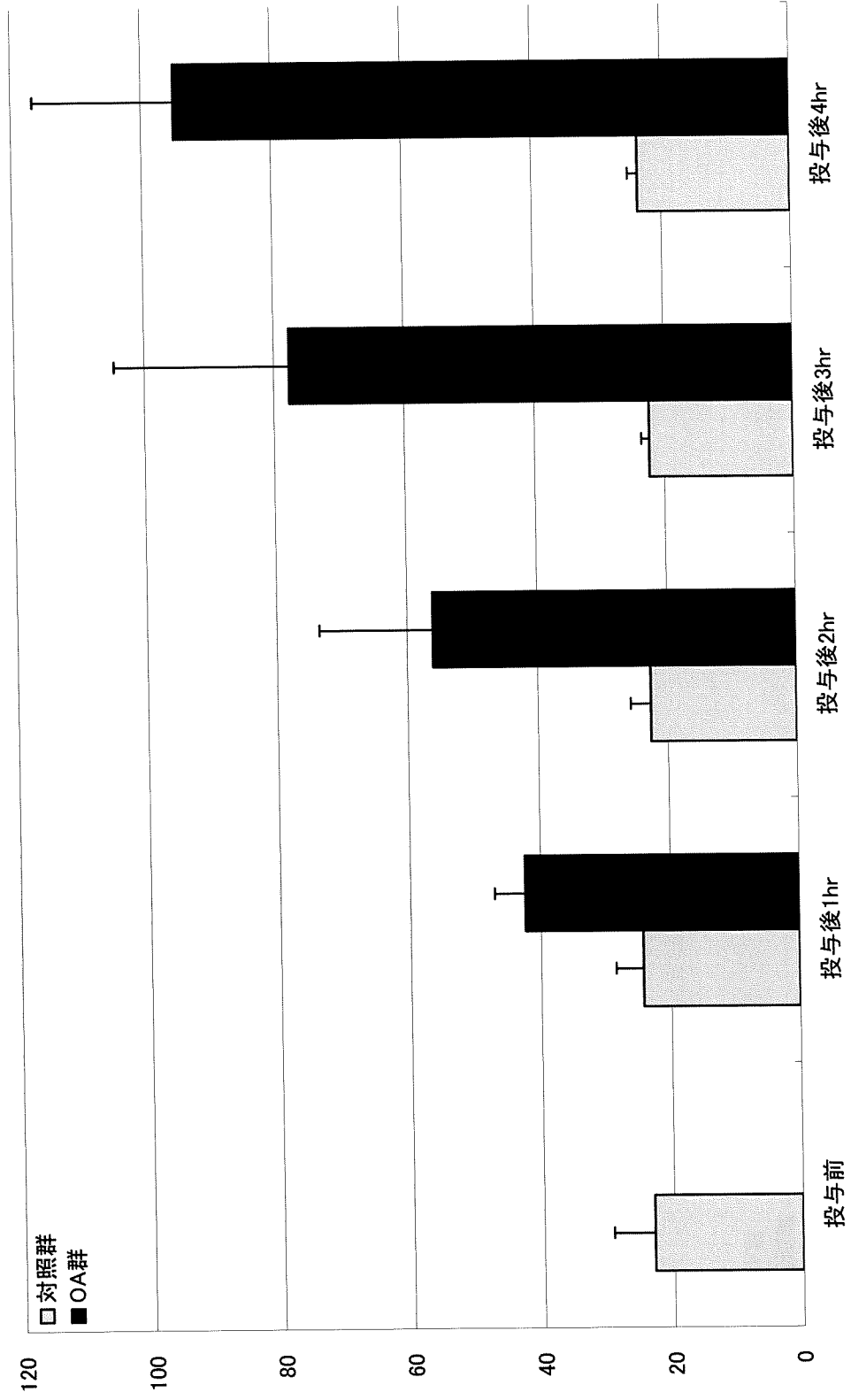
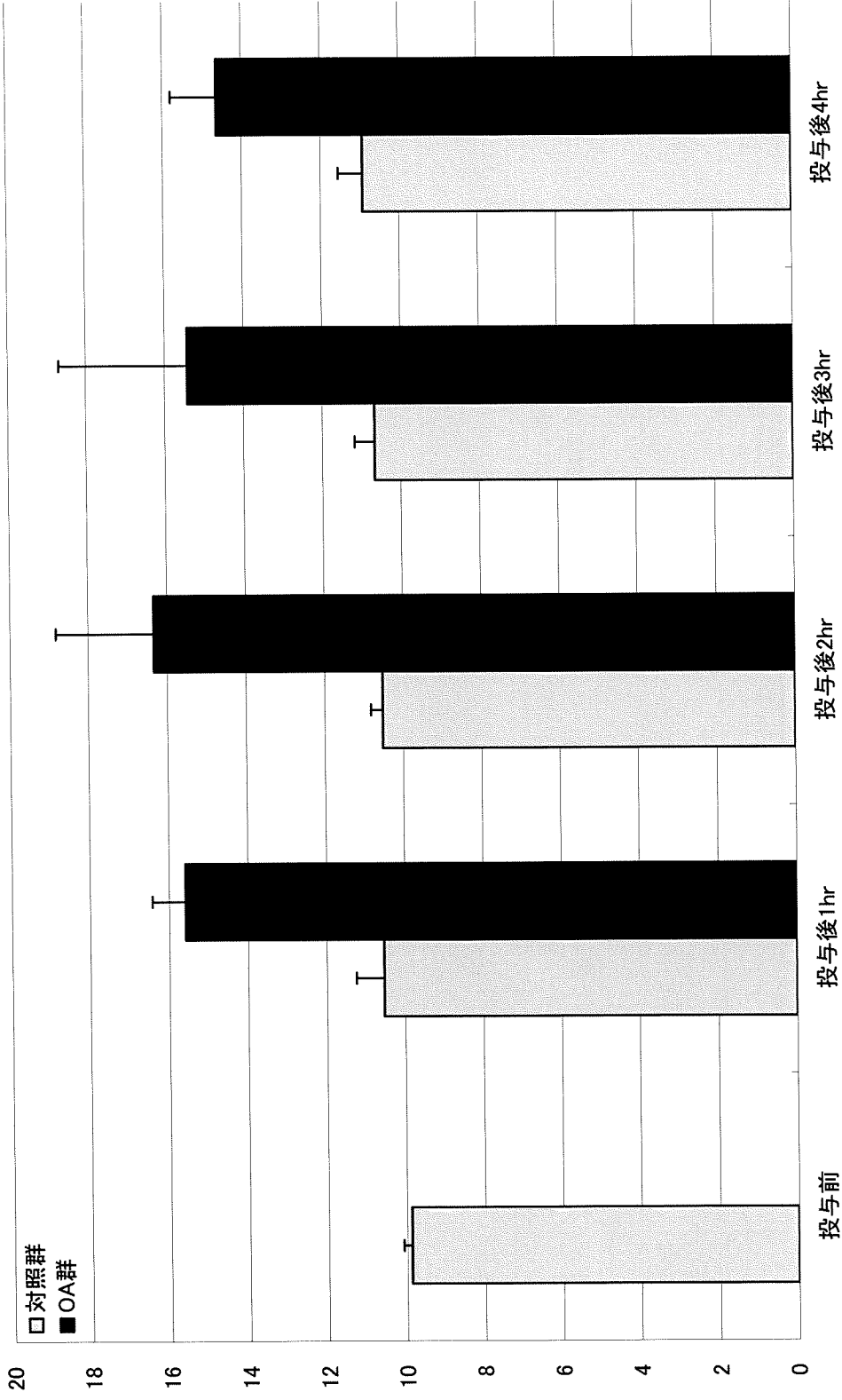


図4 オカダ酸投与後のマウスの血中ヘモグロビン濃度の変化 (g/dl)



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 Maus・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：5. オカダ酸投与後の Maus の血液学的変化に関する研究

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

4. の「オカダ酸投与後の Maus の血液学的変化に関する研究(予備検討)」においては、致死量の下痢性貝毒を腹腔内投与した Maus の血液学的数値について経時的に調べ、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が認められることを示した。本実験では、4. と同様の実験を Maus の匹数を 1 時点ごとに 3 匹から 4 匹に増やし、再検討した。

致死量の下痢性貝毒(オカダ酸)を腹腔内投与した Maus 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、先行して行った 4. の実験結果が再確認された。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。

A. 研究目的

先行の実験において、致死量の下痢性貝毒を Maus に腹腔内投与したところ、Maus の腸管内に著明な液体の貯留が認められ、腸管が拡張しているのが観察された。この変化は、飲水ビンを除去しても同様に起こることから飲水の吸収不全によって起こるものではなく、Maus の体内から水分が漏出している結果である

うと考えられた。先行して行った呼び検討において、オカダ酸を投与した Maus 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とから、本研究では Maus の匹数を 1 時点ごとに 3 匹から 4 匹に増やし、同様に検討した。

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 μ g/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マウスに 1ml 腹腔内投与した。投与前と投与 4 時間後までの 1 時間ごとにヘパリン処理したシリンジを用いて、麻酔下で心臓から全採血し、ヘマトクリット値の測定、ヘモグロビン濃度の測定、赤血球数、白血球数の測定を行った。1 時点ごとに 4 匹のマウスを用いた。ヘマトクリット値の測定には、ヘマトクリット遠心機 H-1200C(株式会社コクサン)を用いた。また、ヘモグロビン値の測定にはヘモグロビン B-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いた。白血球数の測定にはチュルク液(メルク株式会社)を用いた。赤血球、白血球のカウントはカウンテス自動セルカウンター(ライフテクノロジーズ)を用いた。

食餌と飲水の影響を排除するため、オカダ酸投与後、マウスのケージから餌と水を除去し、絶飲絶食の状態にした。

C. 研究結果

オカダ酸投与後のマウスのヘマトクリット値の変化について、図 1 に示した。

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。赤血球数は投与前には 600 万個/ μ l 程度のところ、オカダ酸投与群では微増しており、一方、対照群では 400 万個/ μ l 程度まで減少していた(図 2)。白血球数については、投与前は 4000 個/ μ l 程度だったが、オカダ酸投与群では 6000 個/ μ l 以上となっていた一方、対照群では 2000 個/ μ l 程度まで減少していた(図 3)。血中ヘモグロビン濃度については、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(図 4)。

D. 考察

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。赤血球数は対照群に対しては高い値を示していたが、投与前と同程度の値であり、また、白血球数は上昇が認められたもののばらつきが大きい等、予備検討の結果との相違も認められた。

しかし、少なくとも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から、血中の血漿成分の漏出については再現性が示された。今後、血漿成分の腸管内への漏出についてはより直接的な証明を行いたいと考えている。

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、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、先行して行った実験との整合性が得られた。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。

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ヘマトクリット値の変化 (%)

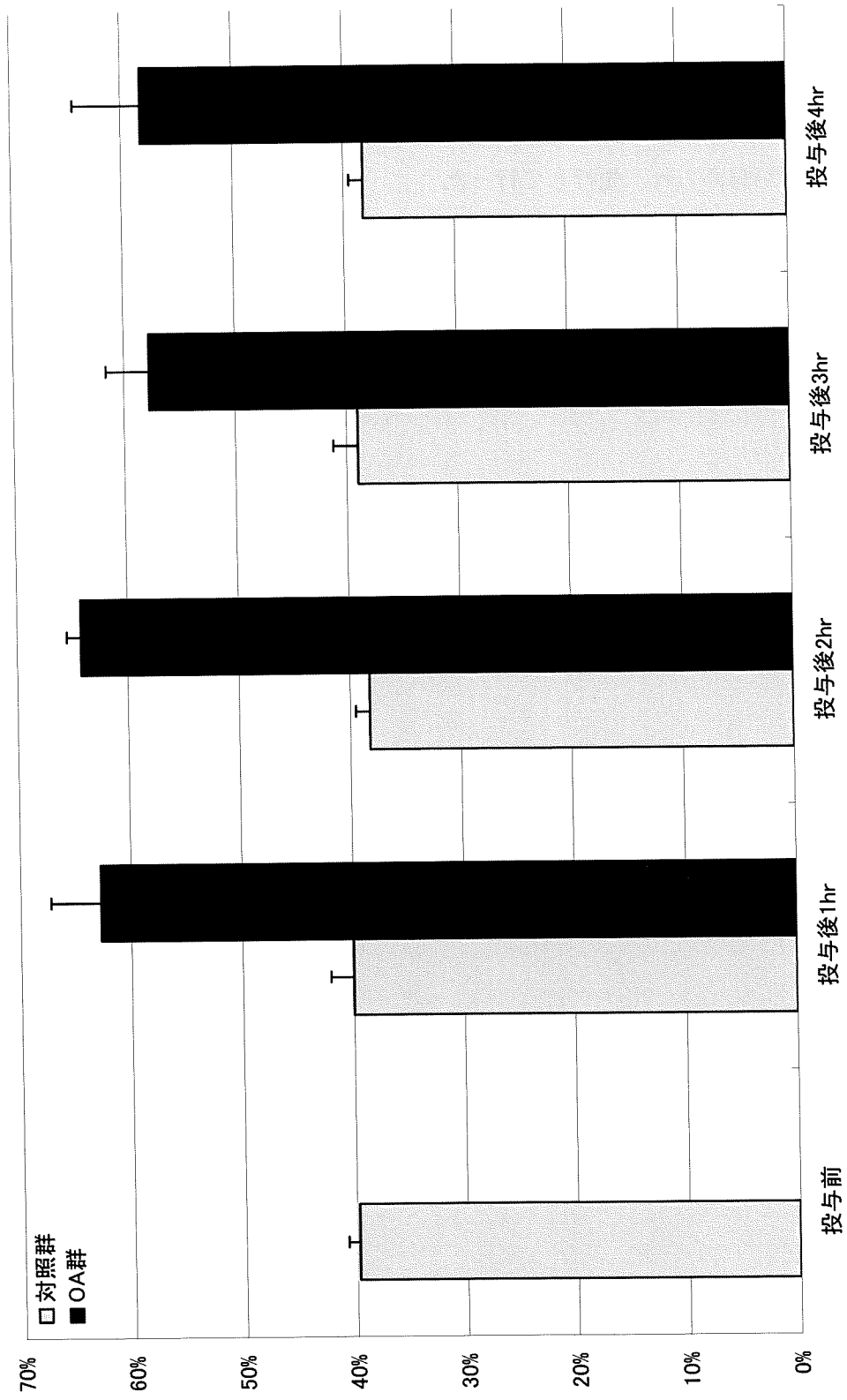


図2 オカダ酸投与後のマウスの赤血球数の変化 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)

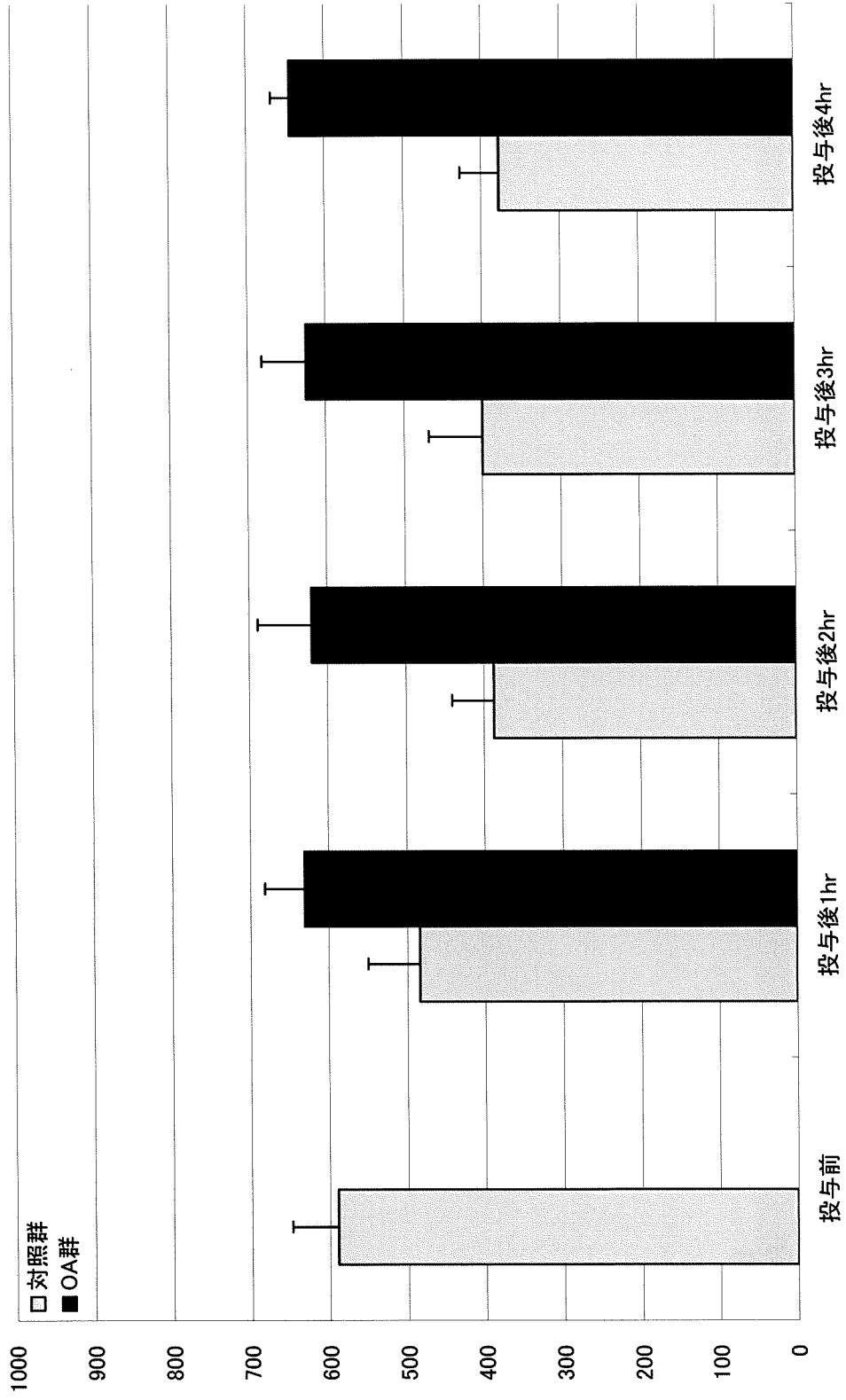


図3 オカダ酸投与後のマウスの白血球数の変化 ($\times 10^2 / \mu\text{l}$)

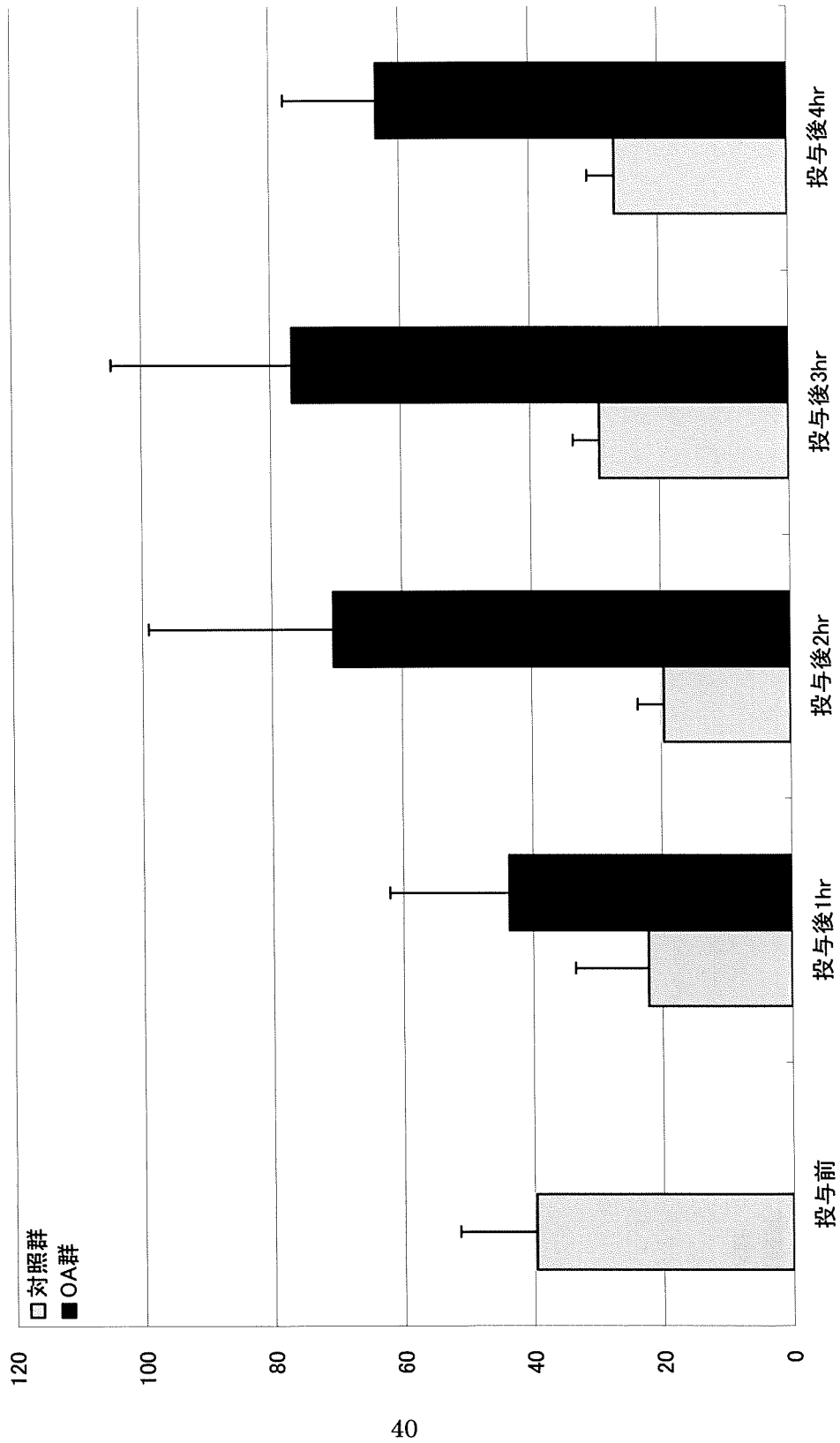
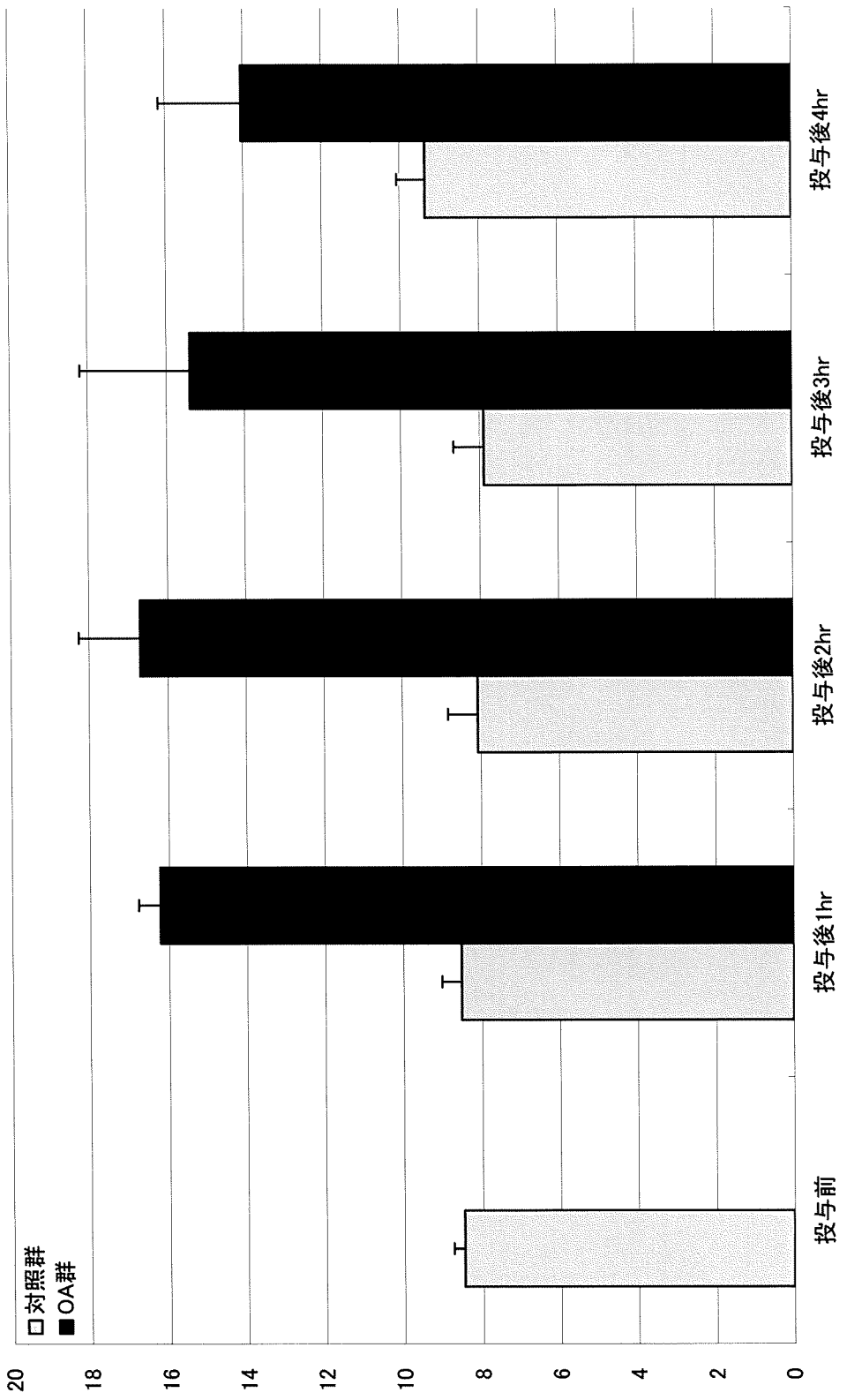


図4 オカダ酸投与後のマウスの血中ヘモグロビン濃度の変化 (g/dl)



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：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

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

3. の「オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究」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る等、急激で著しい体温低下が起こることが示された。3. の実験ではマウスの体温を直腸温で測定したが、マウスの直腸温の測定にはマウスの捕定が必要であり、マウスに拘束ストレスを与えることとなる。そこで、サーモグラフィー・カメラを用いて体表温を測定することで、オカダ酸投与後のマウスの体温変化を明らかにすることが可能かどうか試みた。

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、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。

A. 研究目的

先行の実験において、致死量の下痢性貝毒をマウスに腹腔内投与した後、マウスの直腸音を測定したところ、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る等、急激で著しい体温低下が起こることが示された。

しかし、マウスの直腸温の測定にはマウスの捕定が必要であり、マウスに拘束

ストレスを与えることとなる。また、1人が一度に1匹ずつしか測定できない等、労力もかかる。そこで、本研究では、サーモグラフィー・カメラを用いて非拘束下でマウスの体表温を測定することにより、下痢性貝毒投与後のマウスの体温変化をモニターすることができないか試みた。

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)、5匹に4 μ g/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、サーモグラフィー・カメラ(FLIR)を用いてマウスの体表温を測定した。1群のマウスを一度に測定した後、個体ごとにも測定した。

C. 研究結果

群単位で測定したサーモグラフィー写真を図1に示す。投与前はどちらの群のマウスも約33 $^{\circ}$ C以上の赤の部分ほとんどで、35 $^{\circ}$ C以上の白の部分も認められるが、オカダ酸投与群では投与1時間後にはすでに赤い部分はほとんど見当たらず、

体表全体が30 $^{\circ}$ C程度を表す黄色に変化していた。投与2時間後には5匹中4匹が29 $^{\circ}$ C前後を表す黄緑色~28 $^{\circ}$ C以下を表す青に変化していた。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、24時間後まで生存したのは1匹だった。この生存した1匹については、24時間後にも体温は回復しておらず、結局、投与48時間後までに斃死しているのが確認された。

個体ごとに測定したサーモグラフィー写真の推移を図2に、さらにこのサーモグラフィー写真のデータからマウス個体表の最高温度をグラフ化したものを図3に示す。

D. 考察

先行の実験により、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マウスの直腸温の測定により明らかであったが、本研究により、こ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。前述したように、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く、画像から温度を読み取ることも可能である。

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、先行の実験ではマウスの直腸温の測定により著明な体温低下が観察されたが、今回の実験でサーモグラフィー・カメラを用いたマウス体表温の測定においても、急激かつ著明な体温低下が観察された。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。

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えしたが、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

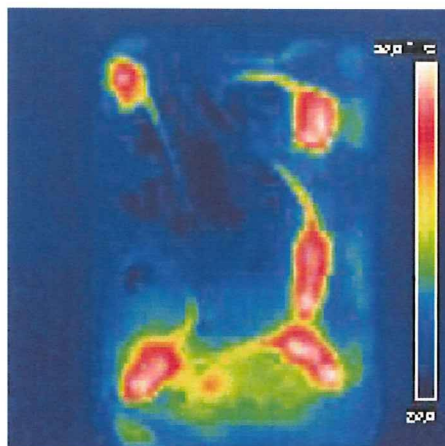
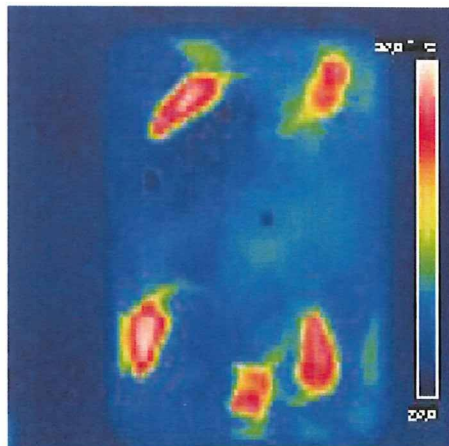
なし

図1 サーモグラフィーによる、オカダ酸投与後のマウスの体温変化 (群)

対照群(5匹)

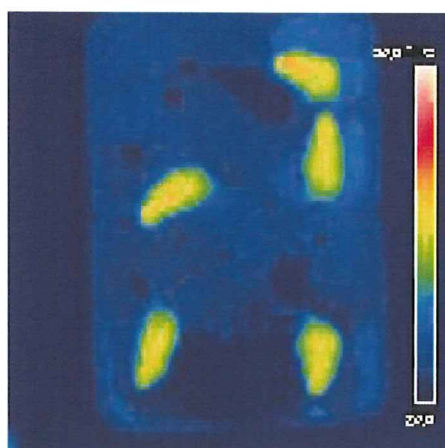
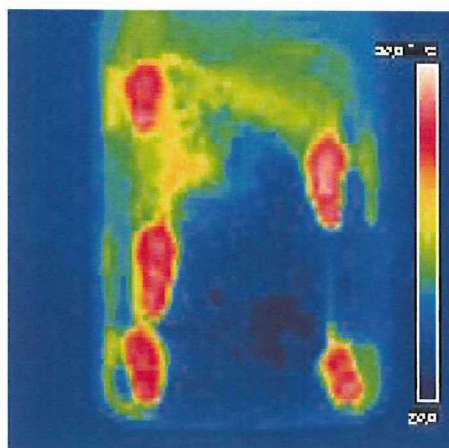
オカダ酸投与群(5匹)

0h



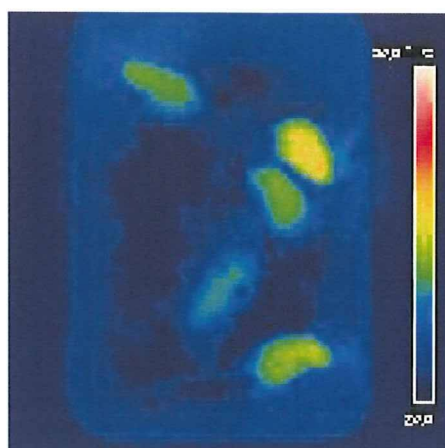
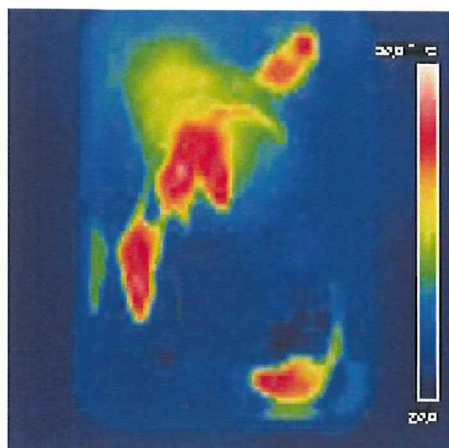
両群に差なし

1h



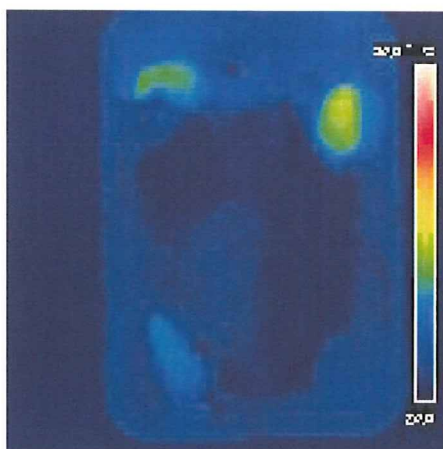
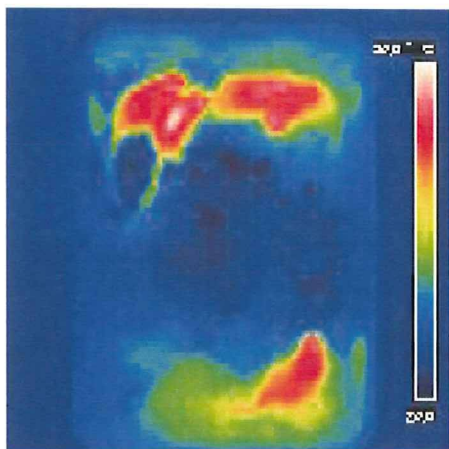
体温低下

2h



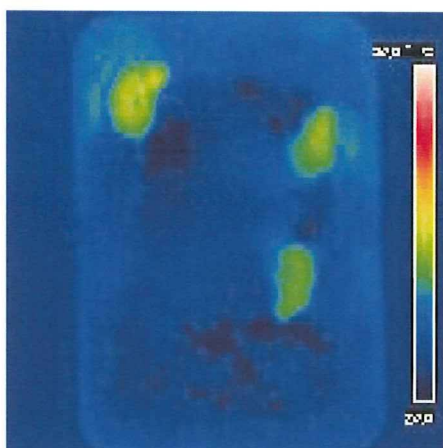
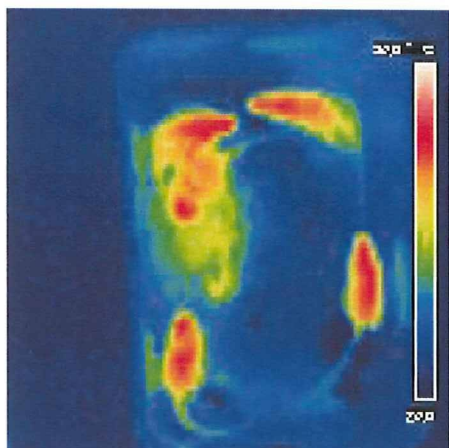
著明な体温低下

3h



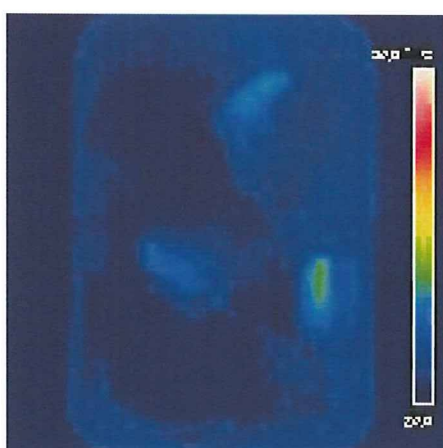
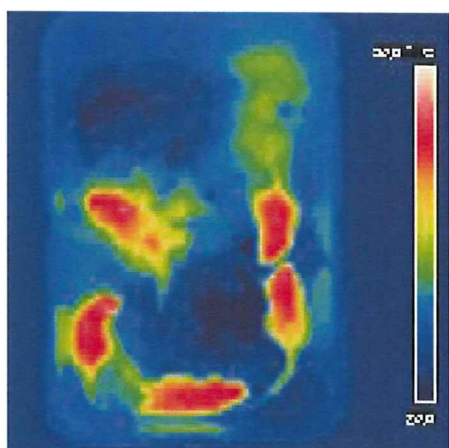
2 匹死、残 3 匹

4h



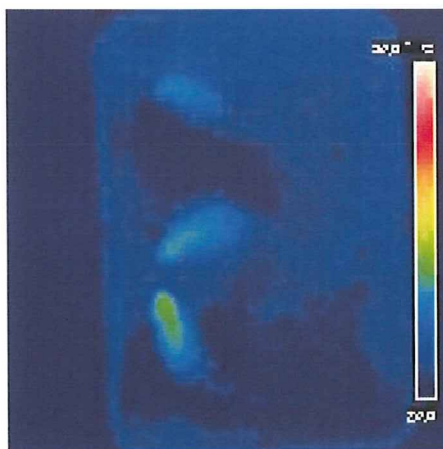
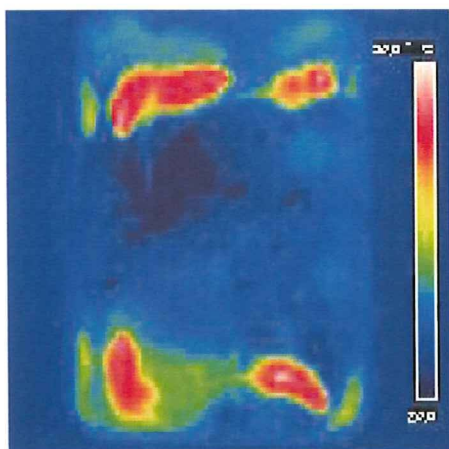
残 3 匹

5h



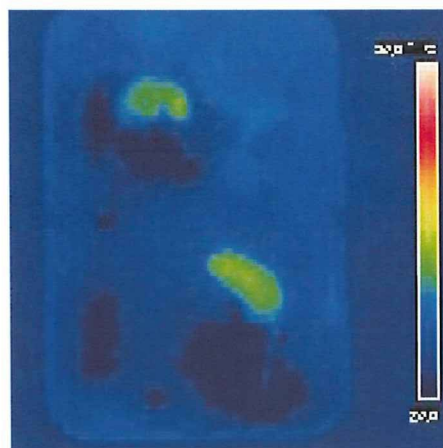
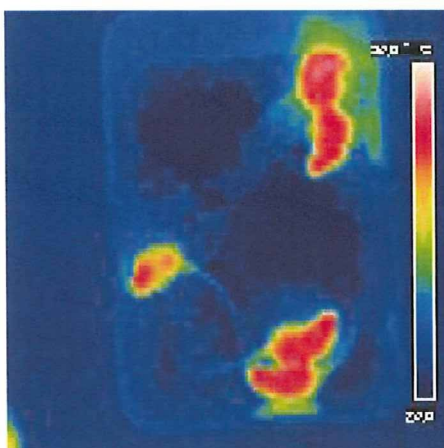
残 3 匹

6h



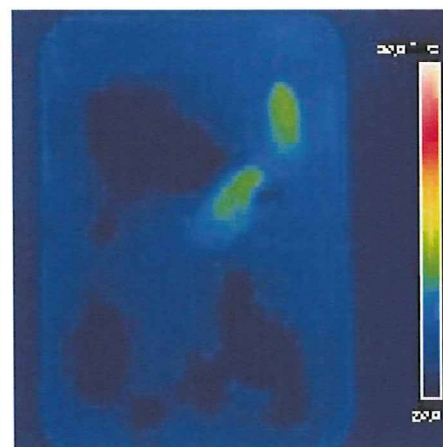
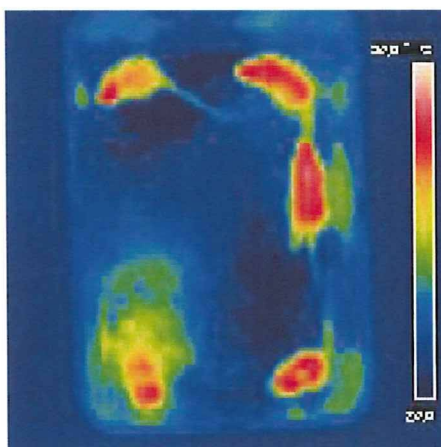
残 3 匹

7h



1 匹死、残 2 匹

8h



残 2 匹