

201033048A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 穂高

平成 23(2011)年 3 月

平成 22 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. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究 … 1
鈴木 穂高
町井 研士
2. オカダ酸投与後のマウスの血流量低下に関する研究 … 12
鈴木 穂高
3. オカダ酸投与によるマウスの体温変化の用量依存性に関する研究 … 18
鈴木 穂高
4. サーモグラフィー・カメラを用いた、低用量のオカダ酸投与による
マウスの体温変化の検出に関する研究 … 40
鈴木 穂高
5. オカダ酸投与によるマウスの体温変化 マウス系統差に関する研究 … 50
鈴木 穂高

I. 総括研究報告

平成 22 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、昨年度は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ため、研究を行った。マウス・バイオアッセイは検体の処理・抽出に 1~2 日、マウスに投与後 1 日、計 2~3 日と時間がかかり、また、マウスの生死で判定を行うため、感度が高くないという問題がある。本年度の研究においては、昨年度の研究で明らかにしたバイオアッセイの機序・原理に基づいて検査を迅速化、高感度化することを目的として研究を進めた。

1. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究

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おり、体重 16~20g の ddY 系又は ICR 系雄のマウスを用いることとなっている。しかし、調べた限りにおいて、下痢性貝毒に対する感受性のマウス系統差については報告がなく、また、公定法の制定にあたってマウスの系統について検討したという情報も得られなかった。そこで、A/J、BALB/c、C3H/He、C57BL/6、DBA/2 の近交系 5 系統と、ddY、ICR の非近交系 2 系統、計 7 系統のマウスについて、オカダ酸に対する感受性を調べた。その結果、致死率は他の系統が 70~100%であったのに対し、DBA/2 系統は 40%と低かった。また、生存分析では BALB/c、C57BL/6、ddY、ICR の 4 系統は生存時間が短く、下痢性貝毒感受性と考えられ、一方、A/J、C3H/He、DBA/2 の 3 系統は生存時間が長く、下痢性貝毒抵抗性であると考えられた。

2. オカダ酸投与後のマウスの血流量低下に関する研究

昨年度の研究において、致死量のオカダ酸を腹腔内投与したマウスの血液では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ることを報告した。本研究はその際に認められた血液量の減少を確認するために行った。対照群のマウスからは心臓全採血で0.7~0.8mlの採血が可能だったのに対し、オカダ酸投与群のマウスからは半分以下の0.3mlほどしか採血できなかった。マウスの心臓からの全採血量は手技に依存するところが大きく、厳密な意味で科学的な数値とは言えないが、昨年度に得られた著しいヘマトクリット値の上昇等と合わせて考えると、血漿成分の漏出による血液量の減少が起きていると考えられた。

3. オカダ酸投与によるマウスの体温変化の用量依存性に関する研究

昨年度の研究において、致死量のオカダ酸をマウスに腹腔内投与したところ、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。本研究では、致死量以下のオカダ酸を投与した場合にも用量依存性に体温低下が認められるかについて調べた。致死量以下のオカダ酸を腹腔内投与したマウスでも、その投与量に応じた体温低下が認められ、投与量と体温低下の程度には非常に高い相関が認められた。マウスの体温低下を指標として、下痢性貝毒検査の迅速化・高感度化ができる可能性が示唆された。

4. サーモグラフィー・カメラを用いた、低用量のオカダ酸投与によるマウスの体温変化の検出に関する研究

昨年度、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・カメラを用いた体表温の簡便な測定で容易に判別が可能なほどの体温低下が起きていることが示された。本研究では、致死量以下のオカダ酸を投与した場合のマウス体表温の変化がサーモグラフィー・カメラによってどのように検出されるかを調べた。サーモグラフィー・カメラを用いた観察により、オカダ酸の投与量と体温低下の程度、体温低下の持続する時間の間には正の相関が、オカダ酸の投与量と体温低下が誘導されるまでの時間の間には負の相関が認められた。マウスの体温低下を指標とした下痢性貝毒検査の判定に、サーモグラフィー・カメラ

を用いた簡便な体温測定が使用できる可能性が示された。

5. オカダ酸投与によるマウスの体温変化 マウス系統差に関する研究

本年度の先行研究で、下痢性貝毒、オカダ酸に対する感受性にはマウスの系統により大きな差が認められることを報告した。本研究では、系統によるマウスの感受性の差についてさらに調べるため、体温低下に着目し、各系統マウスの比較を行った。下痢性貝毒に対する感受性(生存時間)の系統差については、先行の研究と同様の結果が得られた。体温低下に関しては、すべての系統のマウスで対照群に比べて投与群では著しい体温低下が投与1時間後から認められ、下痢性貝毒投与による体温低下が普遍的な現象であることが示された。系統間の比較から、下痢性貝毒に対する感受性は下痢性貝毒によって引き起こされる体温低下の程度では説明できず、循環不全・低体温に対する感受性がマウスの系統によって異なっていることが原因ではないかと推測された。

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、この方法は検体の処理・抽出に1~2日、マウスに投与後1日、計2~3日と時間がかかり、また、マウスの生死で判定を行うため、感度が低いという問題がある。昨年度の研究において、下痢性貝毒を投与されたマウスでは著しい体温低下を示すことが明らかとなったため、本年度、この「体温低下」を指標としたマウス・バイオアッセイの迅速化・高感度化の可能性について研究を進めた。また、現在の公定法では、非近交系の ddY 系統、もしくは ICR 系統のマウスを用いることと定められているが、下痢性貝毒に対する感受性のマウス系統差については報告がなく、公定法の制定にあたってマウスの系統について検討したという情報も得られなかったこと、一般に近交系マウスの方がばらつきの少ない結果が得られることから、マウスの系統差についても検討した。

B. 研究方法

1. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究

致死量のオカダ酸を A/J、BALB/c、C3H/He、C57BL/6、DBA/2 の近交系 5 系統と、ddY、ICR の非近交系 2 系統、計 7 系統のマウス、各系統 10 匹に腹腔内投与した後、投与 24 時間後までの致死率と生存時間を観察した。

2. オカダ酸投与後のマウスの血流量低下に関する研究

ICR マウスに致死量のオカダ酸を腹腔内投与し、投与 2 時間後に心臓から全採血し、採血量の測定とヘマトクリット値の測定を行った。

3. オカダ酸投与によるマウスの体温変化の用量依存性に関する研究

ICR マウス 5 匹に致死量以下 ($2 \mu\text{g/ml}$ 、あるいは $1 \mu\text{g/ml}$) のオカダ酸を腹腔内投与し、投与前と投与 8~10 時間後までの 1 時間ごと、投与 24 時間後に直腸温を測定した。昨年度に行った致死量のオカダ酸を投与した後の直腸温のデータと合わせて、用量依存性について解析した。

4. サーモグラフィー・カメラを用いた、低用量のオカダ酸投与によるマウスの体温変化の検出に関する研究

ICR マウス各 5 匹に致死量 ($4 \mu\text{g/ml}$ /匹)、致死量以下 ($2 \mu\text{g/ml}$ 、または $1 \mu\text{g/ml}$) のオカダ酸、あるいは溶媒のみを

1ml 腹腔内投与した。投与前、および投与30分、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間、10時間、24時間後にサーモグラフィ・カメラ (FLIR) を用いてマウスの体表温を測定した。1群の5匹のマウスを一度に測定した。

5. オカダ酸投与によるマウスの体温変化 マウス系統差に関する研究

C3H/He、C57BL/6、DBA/2、ICRの各系統4匹のマウスに4 μ g/ml/匹のオカダ酸を腹腔内投与した。投与前と投与10時間後までの1時間ごと、そして投与24時間後に直腸温を測定した。

C. 研究結果

1. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究

オカダ酸投与24時間後のマウスの致死率は、ddY、ICR、A/J、BALB/c系統では100% (10/10) (ICRは2回の実験で100% (10/10)と90% (9/10))、C57BL/6では80% (8/10)、C3H/Heでは70% (7/10)、DBA/2では40% (4/10)であった。また、生存時間の分析でも系統間で有意な差が認められた。

2. オカダ酸投与後のマウスの血流量低下に関する研究

対照群は0.7~0.8mlの採血が可能であったが、オカダ酸投与群では半分以下の0.3ml程度しか採血できなかつた。採血量

の重量は、オカダ酸投与群では0.38 \pm 0.04gであり、対照群では0.86 \pm 0.04gと両群の採血量には著しい有意差が見られた。採血した血液のヘマトクリット値は、オカダ酸投与群では53.7 \pm 1.5%、対照群では37.3 \pm 2.3%と両群のヘマトクリット値には著しい有意差が見られた。

3. オカダ酸投与によるマウスの体温変化 の用量依存性に関する研究

昨年度の研究において、致死量(4 μ g/ml/匹)のオカダ酸を投与したマウスでは、すべての個体で投与1時間以内に35 $^{\circ}$ C以下となるような急激な体温低下を示しており、多くの個体で3時間後以降に30 $^{\circ}$ Cを下回るような低体温状態となっていた。最も早い個体は投与3時間後よりも前に斃死していた。致死量以下の2 μ g/ml/匹のオカダ酸を投与したマウスでは、5匹中4匹で投与2時間後に35 $^{\circ}$ Cを下回るような体温の低下を示した。しかし、体温の低下は投与2~5時間後に最低値を示すが、その後は徐々に回復し、斃死する個体も見られなかつた。同じく致死量以下の1 μ g/ml/匹のオカダ酸を投与したマウスでは、体温の低下は認められるものの、投与2~3時間後の最低値が35 $^{\circ}$ Cを下回る個体は見られず、斃死する個体も見られなかつた。以上の結果を、横軸に投与量、縦軸に2時間後の体温を取ったグラフ上にプロットしたところ、

オカダ酸投与量とマウスの体温低下は、高い相関($R^2=0.9068$)を示していた。

4. サーモグラフィー・カメラを用いた、低用量のオカダ酸投与によるマウスの体温変化の検出に関する研究

サーモグラフィー・カメラでは、致死量($4\mu\text{g/ml/匹}$)のオカダ酸を投与したマウスでは、投与30分～1時間後には赤～白の 33°C 以上から、黄～赤を主体とした $30\sim 32^\circ\text{C}$ 前後まで体表温が急激に低下し、その後、2時間後には黄(30°C 前後)、3時間後以降は黄緑($28\sim 29^\circ\text{C}$)と体温が低下している様子が観察された。致死量以下の $2\mu\text{g/ml/匹}$ のオカダ酸では、投与1～3時間後には半数以上で、黄～赤を主体とした $30\sim 32^\circ\text{C}$ 前後まで体温が若干低下していたが、その後、体温は上昇し、投与6～8時間後には体温は投与前と同程度に回復していた。致死量以下の $1\mu\text{g/ml/匹}$ のオカダ酸では、投与2～3時間後に黄～赤を主体とした $30\sim 32^\circ\text{C}$ 前後まで体温が若干低下していた。その後、体温は上昇し、投与4～8時間後には体温は投与前と同程度に回復していた。

5. オカダ酸投与によるマウスの体温変化マウス系統差に関する研究

本研究では4系統ともに、投与24時間以内にすべてのマウスが斃死した。ICRマウスでは4匹中2匹が投与3時間以内に斃死し、投与7時間以内に4匹全てが

斃死した。C57BL/6マウスでは4匹中3匹が投与3時間以内に斃死し、投与5時間以内に4匹全てが斃死した。一方、C3H/Heマウスでは4匹中1匹が投与5時間以内、1匹が8時間以内に斃死したが、残りの2匹は投与10時間以降まで生存していた。また、DBA/2マウスでは4匹中1匹が投与6時間以内、1匹が8時間以内、1匹は10時間以内に斃死し、残りの1匹は投与10時間以降まで生存していた。この生存時間の傾向は、本年度の「1. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究」の結果と一致しており、再現性が示された。体温に関しては、各系統マウスともに、オカダ酸投与群では対照群に比べ、投与1時間後から有意に低下していた。体温の低下率は、抵抗性のC3H/Heマウスで他の3系統に比べて若干緩やかであった。

D. 考察

1. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究

BALB/c、C57BL/6、ddY、ICRの4系統は下痢性貝毒高感受性の系統であり、A/J、C3H/He、DBA/2の3系統は下痢性貝毒低感受性の系統であると考えられた。公定法ではddY、ICR系統を用いることが定められているが、これらの系統を下痢性貝毒の検出に用いることの妥当性が示された。

2. オカダ酸投与後のマウスの血流量低下に関する研究

マウスの心臓からの全採血量は術者の手技に依存するところが大きいですが、今回の結果はバラツキも少なく、再現性の高い結果であり、血液量の減少は示されたと考えられる。ヘマトクリット値の著しい上昇と合わせて考えると、血漿成分の漏出とそれに伴う血流量の低下が起こっていると考えられた。

3. オカダ酸投与によるマウスの体温変化の用量依存性に関する研究

昨年度の研究では、致死量のオカダ酸をマウスに腹腔内投与すると、すべてのマウスで急激、かつ著しい体温低下を示し、その多くは投与 24 時間後までに斃死するという経過を辿ることを明らかにした。今年度の研究では、致死量以下のオカダ酸投与によっても体温の低下は認められること、および体温低下の程度は投与量と高い相関関係があること、すなわち用量依存性があることを明らかにした。投与されたオカダ酸の量とマウスの体温低下の程度の間には用量依存性が示されたことから、マウスの体温低下を指標として、現行の下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイを迅速化、高感度化できる可能性は高いと考えられた。少なくとも、ほとんど体温低下が認められないマウスが斃死することはないため、投与 2~3 時間

後の体温を測定し、例えば、35℃というような一定の体温を下回っていない個体に関しては、陰性として取り扱ってもよいというような運用が可能であるとすれば、年間の検査の大部分を占めている陰性検体において、検査時間を 20 時間以上も大幅に短縮することが可能となる。

4. サーモグラフィー・カメラを用いた、低用量のオカダ酸投与によるマウスの体温変化の検出に関する研究

オカダ酸投与量に従って、体表温の低下の程度が大きく、体表温の低下が顕著になるまでの時間が短く、そして体表温の低下の持続時間が長くなる傾向が認められた。このような傾向は、本年度の「3. オカダ酸投与によるマウスの体温変化の用量依存性に関する研究」のオカダ酸投与量と体温(直腸温)低下の程度が用量依存性を示すという結果と非常によく一致しており、体温低下を指標とした下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの判定を行う際に、サーモグラフィー・カメラ(を用いたマウスの体表温の測定)が使用可能であることが示された。昨年度からの結果を踏まえると、体表温が 28~29℃の黄緑色になったマウスはほぼ回復することがなく、大半は投与 24 時間後までに斃死すること、投与 24 時間後まで生存していたとしても、その後数時間以内にほとんどが斃死することが明らかとなった。

5. オカダ酸投与によるマウスの体温変化 マウス系統差に関する研究

本年度の「1. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究」において、DBA/2 系統、C3H/He 系統は下痢性貝毒抵抗性、C57BL/6 系統、ICR 系統は下痢性貝毒感受性と結論づけたが、本研究においても同様の結果が得られ、再現性が認められた。いずれの系統のマウスにおいても、オカダ酸投与後の体温低下は著明であったが、C3H/He 系統では体温低下の進行が若干遅い傾向が認められた。しかし、同じく下痢性貝毒に抵抗性を示す DBA/2 系統では体温の低下率は感受性の C57BL/6 系統、ICR 系統と同程度であり、体温低下の低下が遅いことだけでは下痢性貝毒に対する感受性・抵抗性を説明できない。下痢性貝毒に対して抵抗性系統のマウスは循環不全、低体温に対して抵抗性が強く、感受性系統のマウスは循環不全、低体温に対して抵抗性が弱いということが考えられた。

E. 結論

1. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究

BALB/c、C57BL/6、ddY、ICR の 4 系統は下痢性貝毒高感受性の系統であり、A/J、C3H/He、DBA/2 の 3 系統は下痢性貝毒低感受性の系統であると考えられた。現在の

公定法に定められている ddY、ICR 系統を下痢性貝毒の検出に用いることは妥当であると考えられた。

2. オカダ酸投与後のマウスの血流量低下に関する研究

昨年度行ったオカダ酸投与後のマウスの血液学的変化(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)から、腸管内への血漿成分の漏出が示唆されていたが、血漿成分の漏出に伴い、血流量の減少が起こっていることが示された。

3. オカダ酸投与によるマウスの体温変化の用量依存性に関する研究

投与されたオカダ酸の量とマウスの体温低下の程度の高低い相関関係が認められ、用量依存性があることが示された。このことから、マウスの体温低下を指標とした判定により、現行の下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイを迅速化、高感度化できる可能性は高いと考えられた。

4. サーモグラフィー・カメラを用いた、低用量のオカダ酸投与によるマウスの体温変化の検出に関する研究

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、オカダ酸投与量と体温低下の間に用量依存性が見られることが確認された。これらのことより、マウスの体温低下を指標とした判定により、現行の下痢性貝毒のマウス・バ

イオアッセイを迅速化、高感度化した場合に、サーモグラフィー・カメラを用いた簡便な体温測定を利用できる可能性が示された。

5. オカダ酸投与によるマウスの体温変化 マウス系統差に関する研究

下痢性貝毒投与後に著しい変動を示し、簡便に測定できる指標として、マウスの体温低下に着目して調べてきたが、本研究で用いた4系統すべてのマウスで、対照群に比べて投与群では著しい体温低下が投与1時間後から認められ、下痢性貝毒投与によるマウスの体温低下が普遍的な現象であることが示された。系統間の比較では、抵抗性のC3H/He系統で体温低下が緩やかであるという結果が得られたが、同じく抵抗性のDBA/2系統では体温低下は感受性系統と同程度であり、下痢性貝毒に対する感受性の違いを体温低下の程度で説明することはできなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

H. Suzuki, K. Machii
Mouse Strain Differences in Mouse
Bioassay for Diarrhetic Shellfish
Poisoning Toxins

Scientific Proceedings, 16th FAVA
Congress 2011 and 78th PVMA Annual
Convention & Scientific Conference,
p260, (2011)

学会発表

鈴木穂高

下痢性貝毒オカダ酸投与後に見られるマ
ウスの急激な体温低下

第150回日本獣医学会

(帯広市)

2010年9月

Hodaka Suzuki

Rapid and Drastic Decrease of Body
Temperature in Mice Intraperitoneally
Injected with Okadaic Acid

The 14th International Conferences on
Harmful Algae

(ヘルソニソス、ギリシャ)

2010年11月

Kenji Machii, Hodaka Suzuki

Study on the Mechanisms of Mice Death
in Intraperitoneal Injection of
Okadaic Acid

The 14th International Conferences on
Harmful Algae

(ヘルソニソス、ギリシャ)

2010年11月

H. Suzuki, K. Machii
Mouse Strain Differences in Mouse
Bioassay for Diarrhetic Shellfish
Poisoning Toxins
16th Federation of Asian Veterinary
Associations Congress 2011
(セブ・シティー、フィリピン)
2011年2月

鈴木穂高、町井研士
下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイに
おけるマウスの系統差
第151回日本獣医学会
(府中市)
2010年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究報告

平成 22 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. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究

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、下痢性貝毒に対する感受性のマウス系統差については報告がなく、また、公定法の制定にあたって検討したという情報も得られなかった。そこで、A/J、BALB/c、C3H/He、C57BL/6、DBA/2 の近交系 5 系統と、ddY、ICR の非近交系 2 系統、計 7 系統のマウスについて、代表的な下痢性貝毒であるオカダ酸に対する感受性を調べた。その結果、致死率は他の系統が 70～100%であったのに対し、DBA/2 系統は 40%と低く、一部で有意差が見られた。また、生存分析では BALB/c、C57BL/6、ddY、ICR の 4 系統は生存時間が短く、下痢性貝毒感受性が高いと考えられ、一方、A/J、C3H/He、DBA/2 の 3 系統は生存時間が長く、下痢性貝毒感受性が低いと考えられた。これらのことから、現在の公定法に定められている ddY、ICR 系統を下痢性貝毒の検出に用いることの妥当性が示された。

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「体重 16～20g の ddY 系又は ICR 系雄のマウス」に腹腔内投与し、24 時間後のマウス

の生死で判定を行うこととなっている。

諸外国においてもマウス・バイオアッセイは広く用いられているが、用いたマウスの系統について記載のない報告や論文も多く見られる。下痢性貝毒に対する感受性のマウス系統差については現在まで報告がなく、また、公定法の制定にあ

たつて検討したという情報も得られなかった。ddY系、ICR系はいずれも非近交系マウスであるが、一般に遺伝的背景の均一な近交系マウスを用いた方がデータのばらつきが少ないことが知られている。また、ddY系、ICR系統に比べて、下痢性貝毒に高い感受性を示す近交系マウスが存在する可能性もあることから、本研究において、下痢性貝毒の感受性のマウスの系統差について調べることにした。

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。オカダ酸の半数致死量 (LD_{50}) は $4\mu\text{g}/\text{匹}$ と報告されているため、本研究でも投与量を $4\mu\text{g}/\text{匹}$ に設定した (オカダ酸 $4\mu\text{g}$ は公定法でマウス・バイオアッセイにおいて1マウス・ユニット (致死量) と規定されている)。

実験は2回に分けて行った。1回目の実験 (実験1) では、4~5週齢、体重16~20g、雄のC3H/He、C57BL/6、DBA/2、ICRの4系統のマウスを比較し、2回目の実験 (実験2) ではA/J、BALB/c、ddY、ICRの4系統のマウスを比較した。1群10匹の各系

統マウスの腹腔内にオカダ酸 $4\mu\text{g}$ を投与し、投与12時間後までは10分おき、その後、投与24時間後までは30分おきにマウスの生死を観察した。致死率の統計と生存分析によりマウス系統間の比較を行った。

ICR系統のマウスは、1種のコントロール群として実験1、実験2の両方の実験で用いた。

C. 研究結果

表1、表2に実験1、2における各系統マウスの致死率と生存時間中央値等を示した。投与24時間後のマウスの致死率は、ddY、ICR、A/J、BALB/c系統では100% ($10/10$) (ICRは2回の実験で100% ($10/10$) と90% ($9/10$)) であった。C57BL/6では80% ($8/10$)、C3H/Heでは70% ($7/10$)、DBA/2では40% ($4/10$) であった。Fisherの正確確率検定によれば、実験1では各系統マウスの致死率に全体として $p=0.026$ と有意差が見られたが、実験2では $p=1.000$ と有意差は見られなかった。実験1でさらにFisherの正確確率検定による各系統マウスの致死率の多重比較を行ったところ、有意差はDBA/2系統とICR系統の間にのみ認められた ($p=0.011$)。

図1、図2に実験1、2における各系統マウスの生存曲線を示した。また、生存分析の結果を表3、表4に示した。生存分

析にはいくつかの統計手法があるが、本研究では Gehan-Wilcoxon test と

Log-Rank test の 2 つの方法で行った。

実験 1 では、全体として明らかに有意な差が認められ、個別の比較では DBA/2 系統と ICR 系統、DBA/2 系統と C57BL/6 系統、C3H/He 系統と ICR 系統の間で有意差が見られた。C3H/He 系統と C57BL/6 系統の間では Gehan-Wilcoxon test でのみ有意差が見られ、Log-Rank test では有意差はなかった。一方、実験 2 では全体として Gehan-Wilcoxon test では有意差が見られたが、Log-Rank test では有意差は見られなかった。個別の比較では A/J 系統と BALB/c 系統、A/J 系統と ddY 系統、A/J 系統と ICR 系統の間で有意差が見られ、BALB/c 系統と ddY 系統、BALB/c 系統と ICR 系統の間では Gehan-Wilcoxon test でのみ有意差が見られ、Log-Rank test では有意差はなかった。

実験 1 と実験 2 の両方の実験で用いた ICR 系統の結果を比較するため、表 5 に致死率と生存時間中央値等を示した。致死率は、実験 1 で 100% (10/10) と実験 2 で 90% (9/10) であり、Fisher の正確確率検定では $p=1.000$ と有意差は見られなかった。図 3 に実験 1、2 の ICR 系統マウスの生存曲線を示し、生存分析の結果を表 6 に示した。生存分析の結果、Gehan-Wilcoxon test でも Log-Rank test

でも実験 1 と実験 2 の間に有意差は見られなかった。

D. 考察

実験 1 の結果、DBA/2 系統と ICR 系統の間に有意差が認められ、DBA/2 系統は ICR 系統に比べて有意に致死率が低いことが確認された。実験 1 と実験 2 の他の系統間では致死率に有意な差は見られなかった。一方、生存分析では、実験 1 の C57BL/6、ICR 系統と C3H/He、DBA/2 系統の間、実験 2 では A/J 系統と他の BALB/c、ddY、ICR 系統の間で有意差が認められた。つまり、BALB/c、C57BL/6、ddY、ICR の 4 系統は生存時間が短く、下痢性貝毒感受性が高いと考えられるが、A/J、C3H/He、DBA/2 の 3 系統は生存時間が長く、下痢性貝毒感受性が低いと考えられる。特に DBA/2 系統は致死率も有意に低いことから、特に抵抗性が強いと考えられる。

実験は 2 回に分けて行ったが、実験 1 と実験 2 の ICR 系統マウスの結果はほぼ同様で有意差もなかったことから、感受性、抵抗性の違いは実験間の誤差によって生じたものではなく、2 つの実験結果は同等に考えてもよいと考えられる。

以上の結果より、BALB/c、C57BL/6、ddY、ICR の 4 系統は下痢性貝毒に対して感受性が高いことが示され、公定法に定められた ddY、ICR 系統を下痢性貝毒の検出に

用いることの妥当性が示された。

(帯広市)

2010年9月

E. 結論

BALB/c、C57BL/6、ddY、ICRの4系統は下痢性貝毒高感受性の系統であり、A/J、C3H/He、DBA/2の3系統は下痢性貝毒低感受性の系統であると考えられた。現在の公定法に定められているddY、ICR系統を下痢性貝毒の検出に用いることは妥当性があると考えられた。

Hodaka Suzuki

Rapid and Drastic Decrease of Body Temperature in Mice Intraperitoneally Injected with Okadaic Acid

The 14th International Conferences on Harmful Algae

(ヘルソニソス、ギリシャ)

2010年11月

F. 健康危険情報

なし

Kenji Machii, Hodaka Suzuki

Study on the Mechanisms of Mice Death in Intraperitoneal Injection of Okadaic Acid

The 14th International Conferences on Harmful Algae

(ヘルソニソス、ギリシャ)

2010年11月

G. 研究発表

論文発表

H. Suzuki, K. Machii

Mouse Strain Differences in Mouse Bioassay for Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins

Scientific Proceedings, 16th FAVA

Congress 2011 and 78th PVMA Annual Convention & Scientific Conference, p260, (2011)

H. Suzuki, K. Machii

Mouse Strain Differences in Mouse Bioassay for Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins

16th Federation of Asian Veterinary Associations Congress 2011

(セブ・シティー、フィリピン)

2011年2月

学会発表

鈴木穂高

下痢性貝毒オカダ酸投与後に見られるマウスの急激な体温低下

第150回日本獣医学会

鈴木穂高、町井研士

2010年3月

下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイに

おけるマウスの系統差

H. 知的財産権の出願・登録状況

第151回日本獣医学会

なし

(府中市)