

表 1 各系統マウスの致死率と生存時間中央値(実験 1)

系統	致死率	生存数	死亡数	生存時間中央値 (h)
C3H/He	70%	3	7	13.00
C57BL/6	80%	2	8	3.17
DBA/2	40%	6	4	Inf
ICR	100%	0	10	3.50

Fisher's exact test (extended): p=0.026

表 2 各系統マウスの致死率と生存時間中央値(実験 2)

系統	致死率	生存数	死亡数	生存時間中央値 (h)
A/J	100%	0	10	7.08
BALB/c	100%	0	10	4.17
ddY	100%	0	10	2.83
ICR	90%	1	9	2.92

Fisher's exact test (extended): p=1.000

表 3 生存分析の結果(実験 1)

系統		系統	Gehan-Wilcoxon test	Log-Rank test
全体の有意差			***	***
C3H/He	vs	C57BL/6	*	NS
C3H/He	vs	DBA/2	NS	NS
C3H/He	vs	ICR	***	***
C57BL/6	vs	DBA/2	**	*
C57BL/6	vs	ICR	NS	NS
DBA/2	vs	ICR	***	***

*:p<0.05

** :p<0.01

***:p<0.001

NS:有意差なし

表 4 生存分析の結果(実験 2)

系統		系統	Gehan-Wilcoxon test	Log-Rank test
全体の有意差			***	NS
A/J	vs	BALB/c	**	*
A/J	vs	ddY	**	*
A/J	vs	ICR	**	*
BALB/c	vs	ddY	*	NS
BALB/c	vs	ICR	**	NS
ddY	vs	ICR	NS	NS

*:p<0.05

** :p<0.01

***:p<0.001

NS:有意差なし

表 5 実験 1 と実験 2 の ICR 系統マウスの致死率と生存時間中央値

系統	致死率	生存数	死亡数	生存時間中央値 (h)
ICR (実験 1)	100%	10	0	3.50
ICR (実験 2)	90%	9	1	2.92

Fisher's exact test (extended): p=1.000

表 6 生存分析の結果(実験 1 と実験 2 の ICR 系統の比較)

系統		系統	Gehan-Wilcoxon test	Log-Rank test
ICR (実験 1)	vs	ICR (実験 2)	NS	NS

NS: 有意差なし

図1 オカダ酸投与後のマウスの生存曲線(実験1)

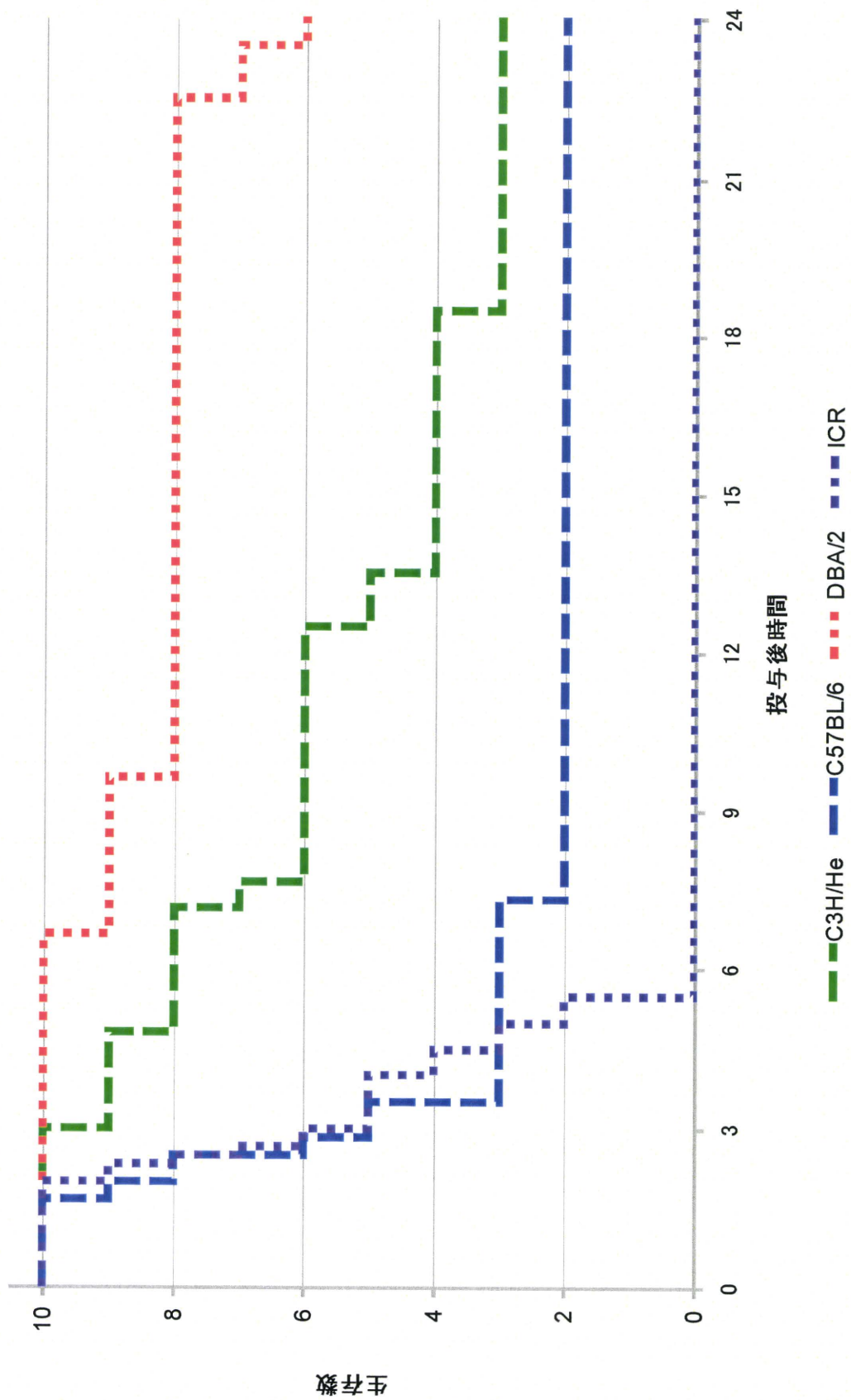


図2 オカダ酸投与後のマウスの生存曲線(実験2)

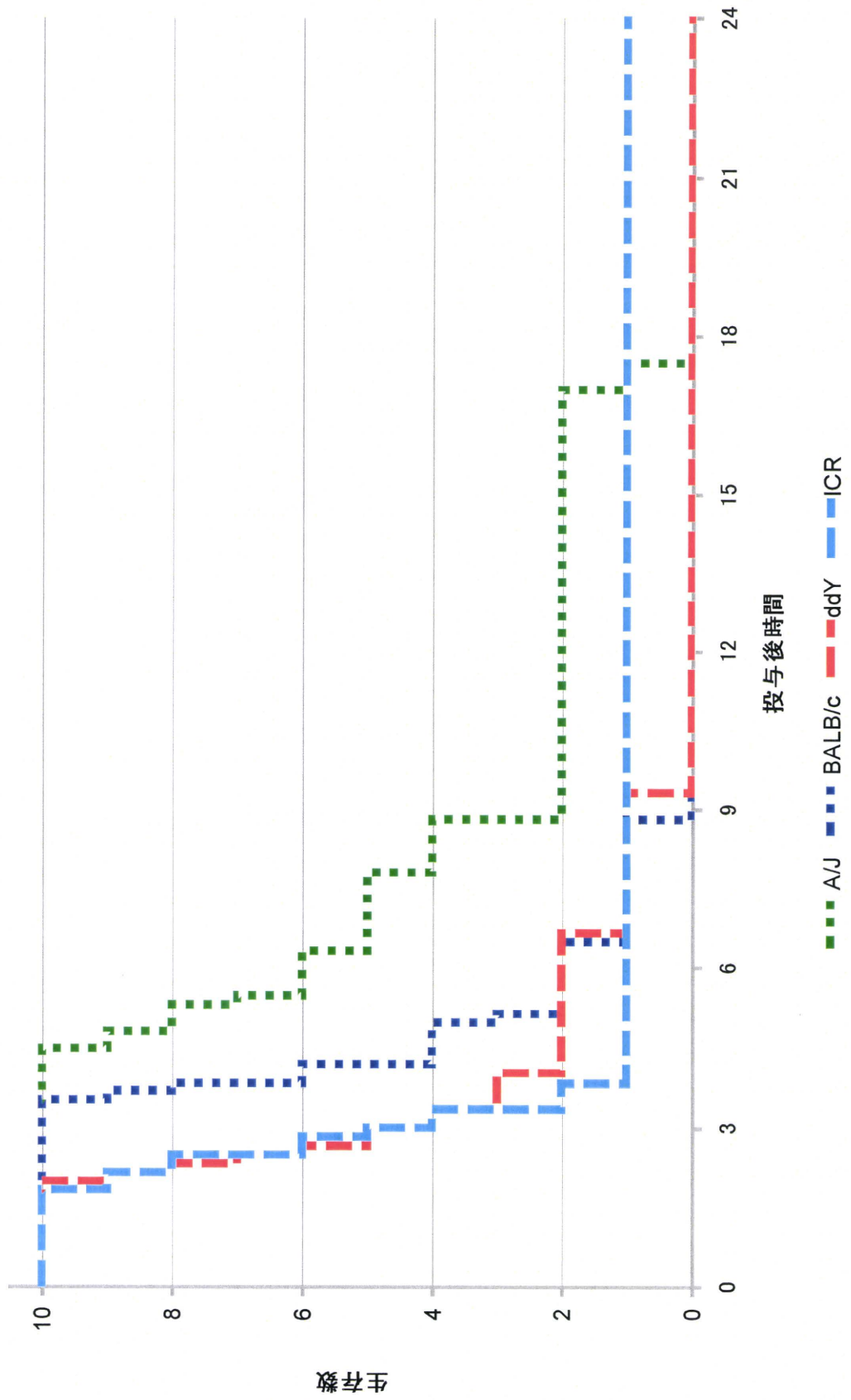
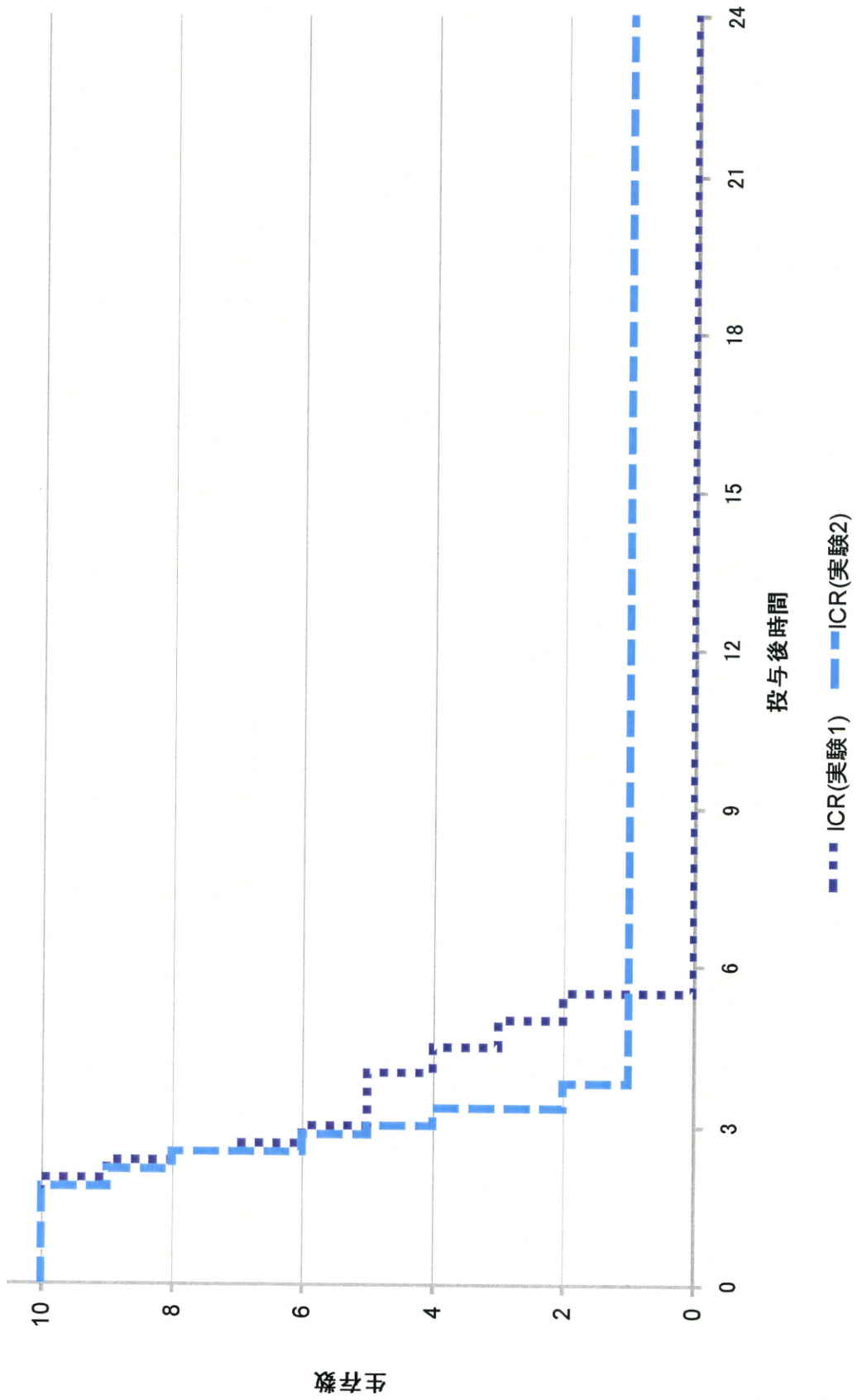


図3 実験1と実験2のICRシステムの生存曲線の比較



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：2. オカダ酸投与後のマウスの血流量低下に関する研究

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

昨年度の「オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究」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に着目して研究を行った。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こっていると考えるのが妥当であると考えられた。この血流量の低下は肉眼的に見られる鬱血傾向や体温の低下ともよく符合している。

A. 研究目的

昨年度の本研究において、オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関し、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。

本研究は昨年採血の際に(定性的に)

認められたオカダ酸投与後のマウスの血流量低下に着目し、定量的に調べることを目的とした。

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 2 時間後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、採血量の測定とヘマトクリット値の測定を行った。各群 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。

C. 研究結果

図 1 にオカダ酸投与 2 時間後のマウスから採血したシリンジの写真を示した。対照群は通常、0.7~0.8ml 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った。

採血量の重量を測定した結果を図 2 に示した。オカダ酸投与群では 0.38 ± 0.04 g であり、対照群では 0.86 ± 0.04 g と両群の採血量には著しい有意差 ($p < 0.001$) が見られた。

また、採血した血液のヘマトクリット値を図 3 に示した。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 ($p < 0.001$) が見られた。この結果は昨年度に得られたヘマトクリット値のデータと一致していた。

D. 考察

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く、厳密な意味で科学的な数値とは言えない。しかし、今回の 1 群 3 匹の結果はバラツキも少なく、再現性の高い結果であった。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るのが妥当だと考えられた。この血流量の減少は肉眼的に見られる鬱血傾向や体温の低下とも符合する。

E. 結論

昨年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明らかとなった。

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

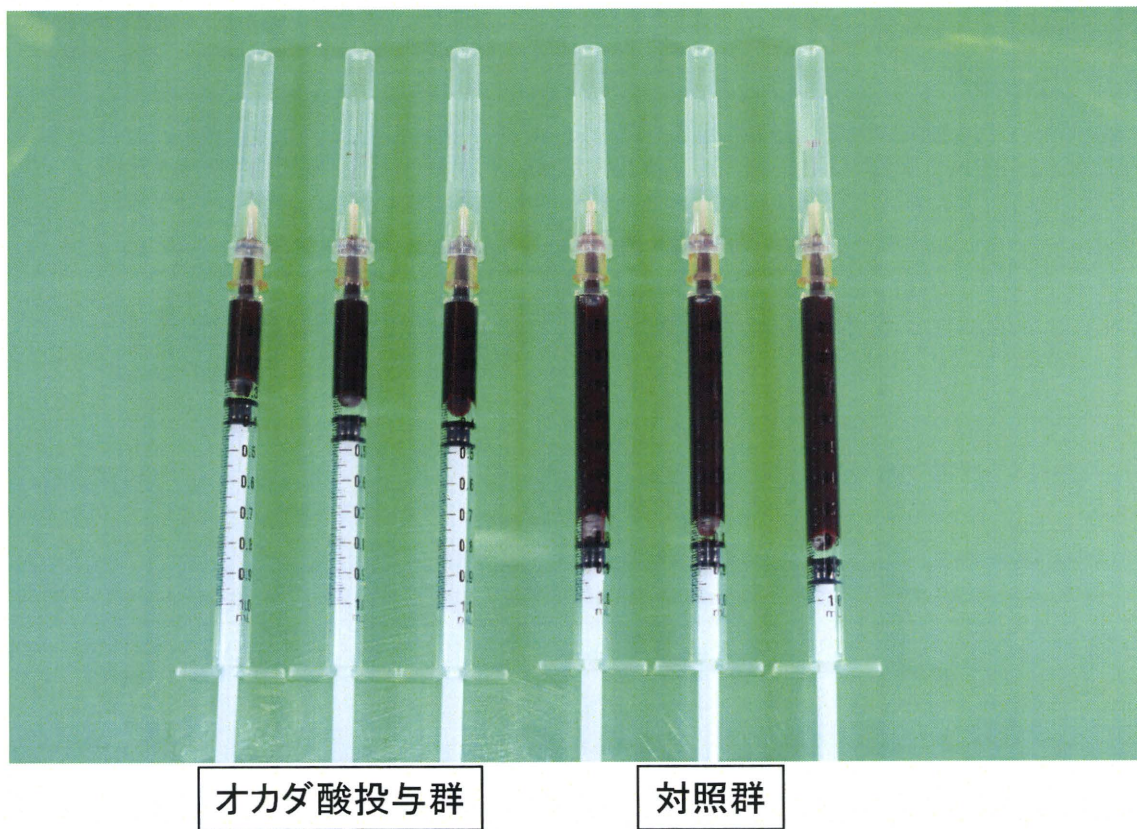
鈴木穂高、町井研士

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

図1 オカダ酸投与後のマウスの採血量の変化



オカダ酸投与後、採血量は明らかに減少する。

図2 オカダ酸投与後の採血量

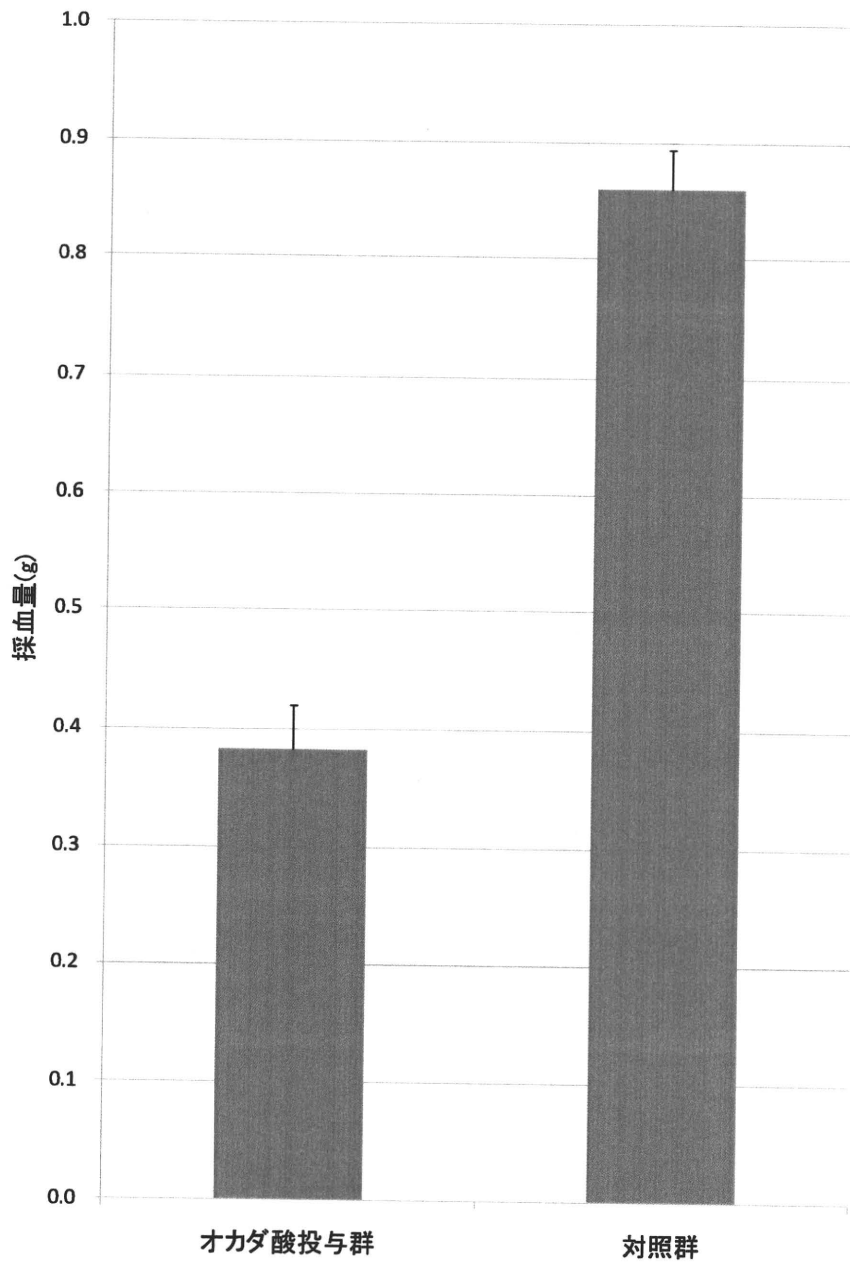
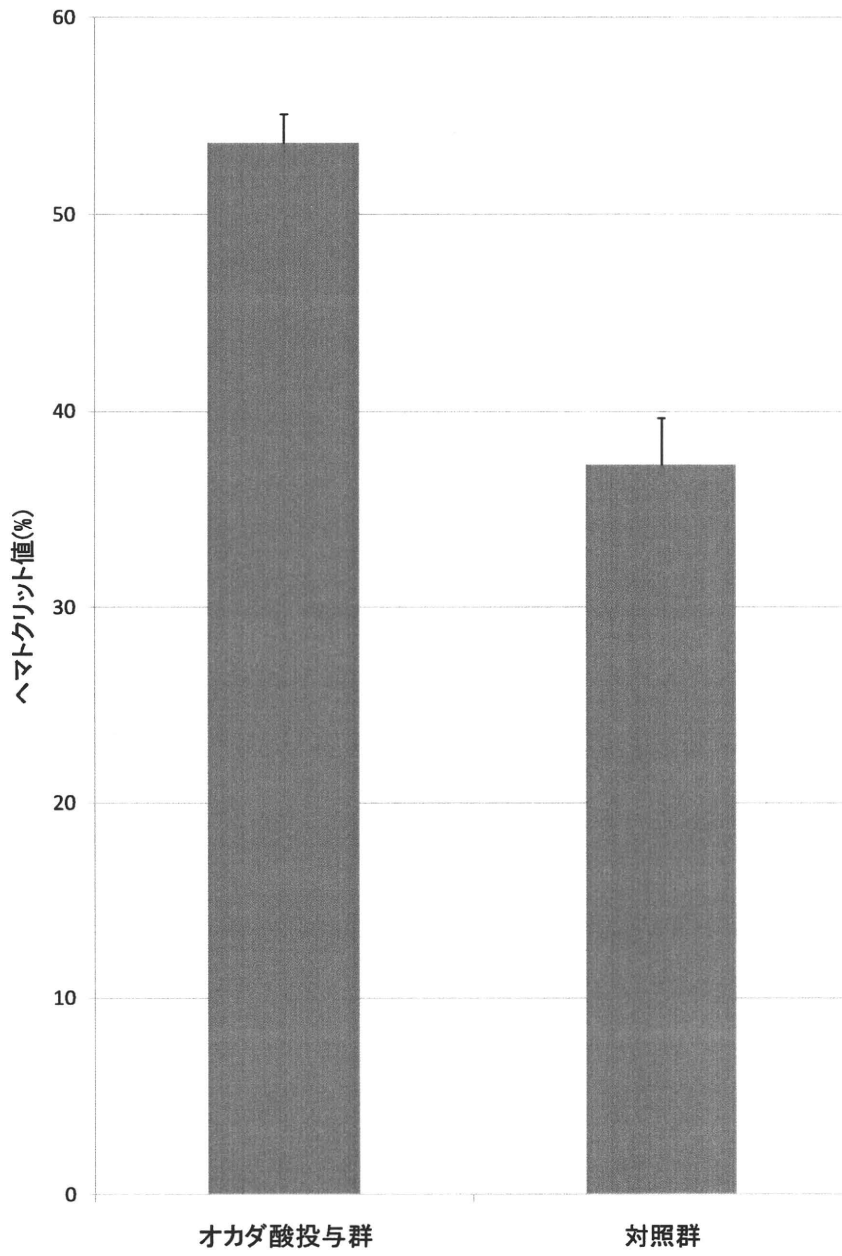


図3 オカダ酸投与後のヘマトクリット値



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：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

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

昨年度に行った「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ることを目的とした。

致死量以下の下痢性貝毒(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。これらのことから、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。

A. 研究目的

昨年度に行った「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

与した場合にも体温低下が認められるか調べ、用量依存性があるかどうか明らかにすることを目的とした。

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5匹(日本エスエルシーから購入)

に $2\mu\text{g/ml}$ 、あるいは $1\mu\text{g/ml}$ のオカダ酸を 1ml 腹腔内投与した。対照群には、大豆油を 1% Tween 60 加生理食塩水で懸濁した溶媒のみを 5 匹のマウスに 1ml 腹腔内投与した。 $2\mu\text{g/ml}$ /匹のオカダ酸を投与した群では投与前と投与 10 時間後までの 1 時間ごと、そして投与 24 時間後に、マウスの直腸温を測定した。 $1\mu\text{g/ml}$ /匹のオカダ酸を投与した群では投与前と投与 8 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。

C. 研究結果

$2\mu\text{g/ml}$ /匹のオカダ酸を投与したマウスの結果を図 1、 $1\mu\text{g/ml}$ /匹のオカダ酸を投与したマウスの結果を図 2 に示した。また、昨年度の結果ではあるが、 $4\mu\text{g/ml}$ /匹のオカダ酸を投与したマウスの結果を参考として図 3 と図 4 に示した。

図 3、4 に示したように、致死量 ($4\mu\text{g/ml}$ /匹) のオカダ酸を腹腔内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°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°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。致死量以下である $2\mu\text{g/ml}$ /匹のオカダ酸を投与したマウスでは(図 1)、5 匹中 4 匹で投与 2 時間後に 35°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った。また、同じく致死量以下である $1\mu\text{g/ml}$ /匹のオカダ酸を投与したマウスでは(図 2)、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°C を下回る個体は見られず、斃死する個体も見られなかった。

上記すべての実験において、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°C 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。

以上のすべての結果を、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結果を図 5 に示した。 $2\mu\text{g/ml}$ /匹、 $4\mu\text{g/ml}$ /匹のオカダ酸投与群で若干ばらつきが認められるが、オカダ酸投与量とマウスの体温低下の相関係数は $R^2=0.9068$ と高く、高い相関を示していた。

D. 考察

昨年度に行った「オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究」では、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、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示した。今年度は、致死量以下のオカダ酸をマウスに投与し、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示した。

相関を見るのに投与2時間後を選んだのは、昨年度に行った実験(図3)のOA投与マウスNo.4が投与3時間後よりも前に斃死しているためであるが、多くの個体では投与3時間後以降に体温の最低値を示すことから、投与3時間後のデータを用いた方がより高い相関が得られる可能性はある。

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、昨年度の考察で示した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、迅速な判定が可能となる。また、一定以上の体温低下が認められた個体についてはその後、従来通り、投与24時間後の生死で判定を行うこととすれば、現行の下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの手法的な枠組みをほとんど変更することなく、下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの判定を20時間以上も大幅に短縮することが可能となる。

E. 結論

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すると、急激かつ著しい体温低下を示し、マウスは低体温状態を呈して斃死することが示されていたが、今年度、致死量以下のオカダ酸をマウスに投与した場合にも、体温の低下は認められること、および体温の低下の程度は投与量と高い相関関係を示すことが示された。ただし、低用量の場合には体温低下の程度は小さく、また、その後すぐに体温は上昇、回復することが確認された。

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高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とから、昨年度の考察で示した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。

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

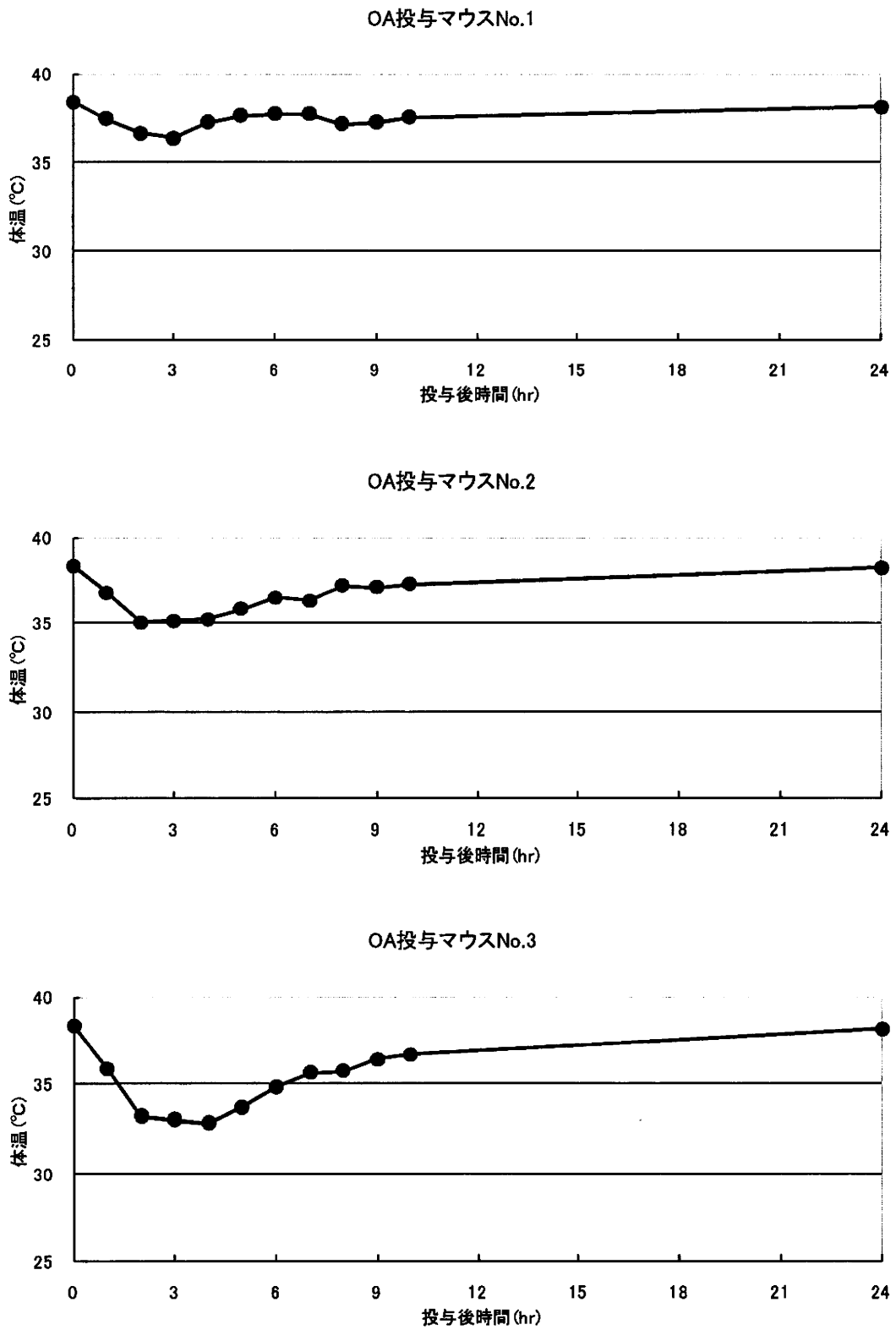
(府中市)

2010 年 3 月

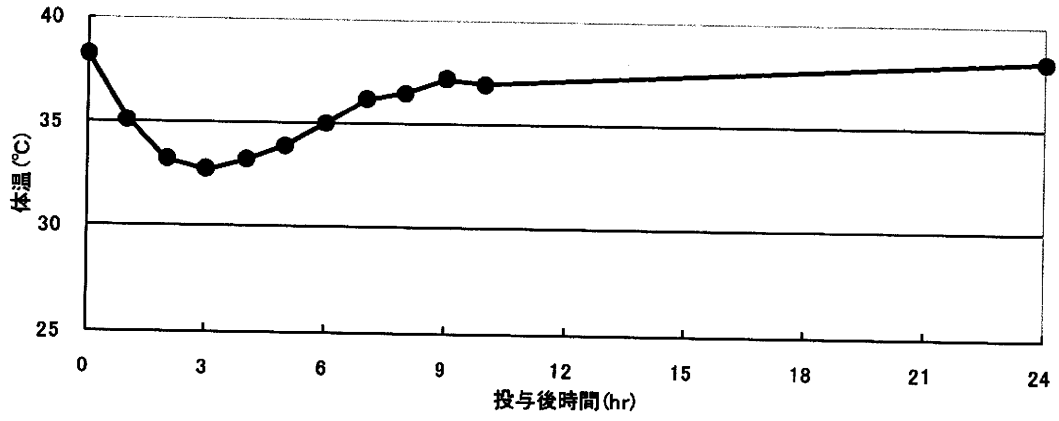
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

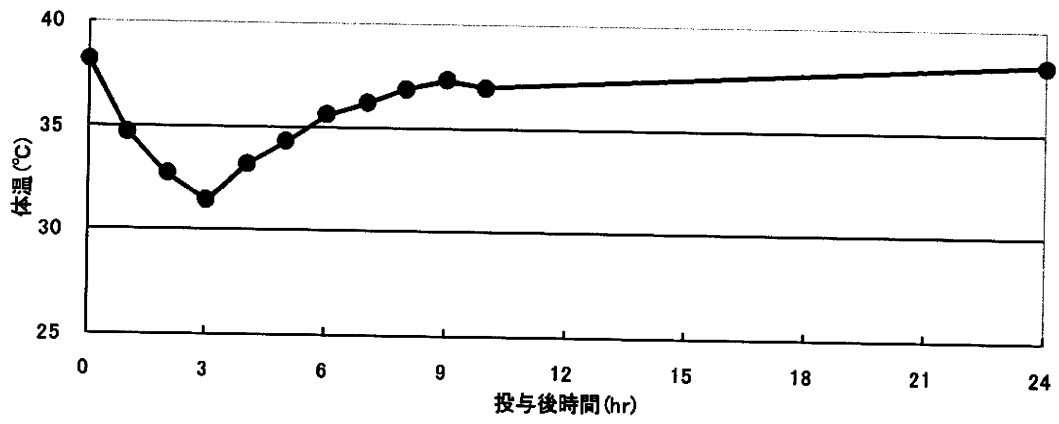
図1 オカダ酸投与後のマウスの体温変化(2 μ g/ml OA 投与)



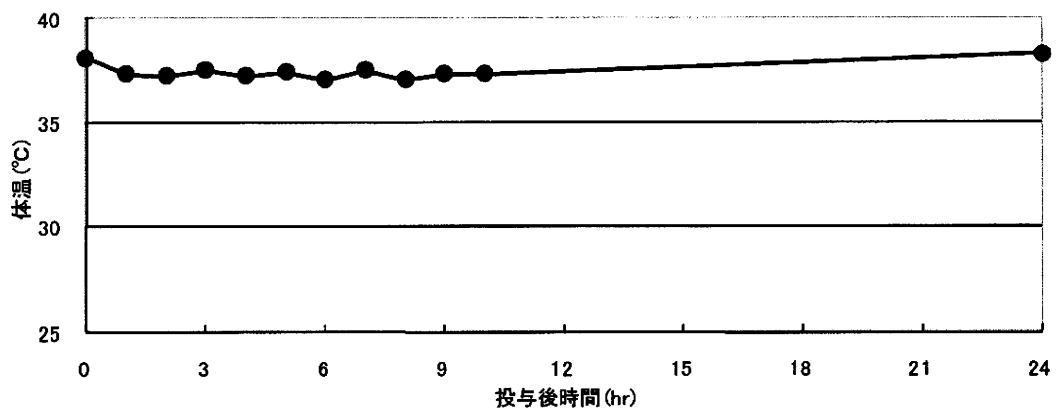
OA投与マウスNo.4



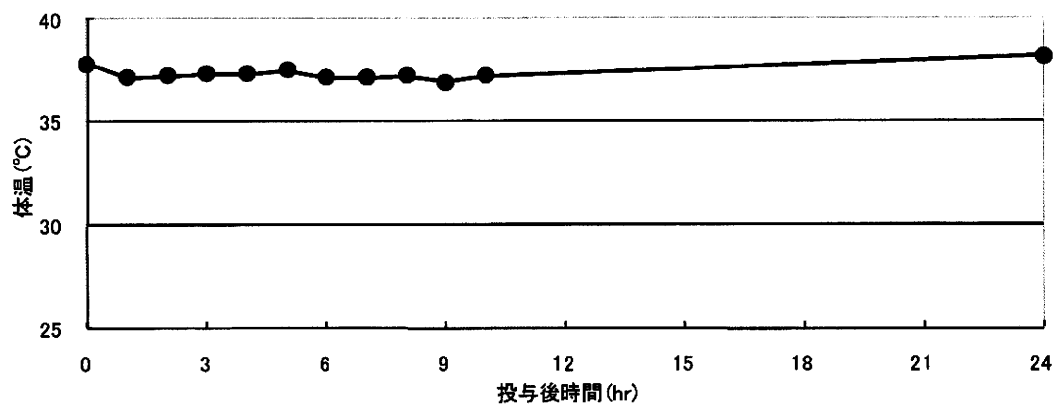
OA投与マウスNo.5



対照マウスNo.1



対照マウスNo.2



対照マウスNo.3

