

201033048B

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 21-22 年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 穂高

平成 23(2011)年 3 月

## 平成 21-22 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.	総合研究報告	
	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	… 1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	… 23
III.	研究成果の刊行物・別刷	… 24

## I. 総合研究報告

平成 21-22 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」

総合研究報告書

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。この方法は 1981 年、世界に先駆けて我が国で公定法として定められ、その後、世界の多くの国で公定法、あるいは公定法に準じる方法として広く用いられてきた。しかし、調べた限りにおいて、その基本的な機序や原理については報告がなかった。そこで、初年度(平成 21 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。次年度(平成 22 年度)は、初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。

### 1-1. オカダ酸投与後のマウスの致死時間に関する研究

公定法では、検体投与 24 時間後のマウスの生死で判定することとなっているが、本研究は経時的な状況を確認するため、ならびに 1 マウス・ユニット=オカダ酸 4 $\mu$ g という投与量の妥当性を検証するために行った。致死量のオカダ酸を ICR 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ピンを除去しても、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。

#### 1-2. 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

本研究では1-1.の研究において認められた解剖学的所見について精査した。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。

#### 1-3. オカダ酸投与後のマウスの体温変化に関する研究

1-1.、1-2.の研究において認められたマウスの体温低下について、直腸温の測定により確認した。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。

#### 1-4. 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)

1-2.の研究においてマウスに著しい鬱血が認められたことから、血液学的解析を行った。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。

#### 1-5. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究

1-4.の研究において予備的に行った血液学的解析をより詳細に行った。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。

## 1-6. 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

1-3. の研究で認められたマウスの体温低下について、サーモグラフィー・カメラを用いて、より簡便にモニターすることを試みた。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が確認され、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。

## 2-1. オカダ酸に対するマウスの系統差に関する研究

公定法では、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。

## 2-2. オカダ酸投与後のマウスの血流量低下に関する研究

1-4.、1-5. 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、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られた。

### 2-3. 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

1-3.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。

### 2-4. 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

1-6.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可能なほどの体温低下が起こっ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。

### 2-5. 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

2-1.の研究において、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共通の反応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。この方法は1981年、世界に先駆けて我が国で公定法として定められ、その後、世界の多くの国で公定法、あるいは公定法に準じる方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、その基本的な機序や原理については報告がなかった。そこで、初年度(平成21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ことを目的とした。

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。次年度(平成22年度)は、初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た。初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、特に「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

### 1-1. 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。斃死した個体の解剖により、腸管内に著しい液体の貯留が認められたことから、オカダ酸投与後、飲水を除去した条件での実験も行った。

### 1-2. 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。

### 1-3. 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ICRマウスを用いた。

#### 1-4. 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ICRマウスを用いた。

#### 1-5. オカダ酸投与後のマウスの血液学的変化に関する研究

1-4.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ICRマウスを用いた。

#### 1-6. 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、サーモグラフィー・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ICRマウスを用いた。

#### 2-1. 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。

#### 2-2. 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。溶媒のみを投与した対照群と比較した。

#### 2-3. 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 $\mu$ g/ml、あるいは1 $\mu$ 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。1-3.の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。

#### 2-4. 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  $1\text{ml}$  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。

## 2-5. 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  $4\mu\text{g/ml}$ /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。各系統とも、致死量のオカダ酸を投与した投与群と、溶媒のみを投与した対照群の 2 群で比較した。

## C. 研究結果

### 1-1. 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 (飲水あり) では、マウス 10 匹中 6 匹、2 回目の実験 (飲水なし) 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。

### 1-2. 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。

### 1-3. 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  $35^{\circ}\text{C}$  以下となるような急激な体温低下を示しており、多くのマウスでは 3 時間後以降に  $30^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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。

### 1-4. 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。

#### 1-5. 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。

#### 1-6. 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

投与前はオカダ酸投与群、対照群ともに 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。

#### 2-1. 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マウスの系統間で有意な差が認められた。

#### 2-2. 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った。採血量の重量は、オカダ酸投与群では  $0.38 \pm 0.04$ g であり、対照群では  $0.86 \pm 0.04$ g 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。

#### 2-3. 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

1-3. の研究において、致死量 ( $4 \mu\text{g/ml}$ /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°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℃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 $\mu$ 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℃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。同じく致死量以下の1 $\mu$ 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℃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。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。

#### 2-4. 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 $\mu$ g/ml/匹)のオカダ酸を投与したマウスは、投与30分~1時間後には赤~白の33℃以上から黄~赤を主体とした30~32℃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℃前後)、3時間後以降は黄緑(28~29℃)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

$\mu$ 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30~32℃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 $\mu$ 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30~32℃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。

#### 2-5. 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、2-1.の研究結果と一致しており、再現性が示された。体温に関しては全ての系統で、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

##### 1-1. 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に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らうと考えられた。

##### 1-2. 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

本研究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下痢は見られないものの腸管内に著しい液体の貯留が見られたことから、経口と腹腔内という投与経路の違いによらず、ほぼ同様の病態が引き起こされている可能性が考えられた。

##### 1-3. 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。

##### 1-4. 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。

#### 1-5. 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。

#### 1-6. 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。

1-3. の研究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。

#### 2-1. 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。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、公定法に定められたddY、ICR系統よりも下痢性貝毒に感受性の高い系統が存在すれば、検査を高感度化できること等の点から検討を行ったが、ddY、ICR系統は他の近交系マウスに比べても下痢性貝毒感受性が高く、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。

#### 2-2. 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。

#### 2-3. 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



1-3.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。本研究では、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に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。

#### 2-4. 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、2-3.の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り、これが1つの基準となると考えている。

#### 2-5. 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

2-1.の研究において、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かった。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

### 1-1. 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。

### 1-2. 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。

### 1-3. 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。

### 1-4. 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。

#### 1-5. 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。

#### 1-6. 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。先行の研究において、現在のマウス・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。

#### 2-1. 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。

#### 2-2. オカダ酸投与後のマウスの血流量低下に関する研究

1-3.、1-4.で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。

#### 2-3. 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。

#### 2-4. 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。

#### 2-5. 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共通の反応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