

(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

食品の安心・安全確保推進研究事業(若手)

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

国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
鈴木 穂高



2.16.11 厚生科学研究費(若手) 事後評価委員会

研究の背景

- ・下痢性貝毒の公定法はマウス・バイオアッセイと定められているが、マウス・バイオアッセイの科学的根拠(=マウスが死に至る機序)は明らかではない。
- ・マウス・バイオアッセイは検体の抽出に1~2日、投与後の判定に1日、計2~3日かかる。



研究目的1. 下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの原理の解明



研究目的2. 下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの迅速化、高感度化、代替法の開発



下痢性貝毒の検査

厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知 環乳第37号 (昭和56年5月19日付)

検体200g以上(中腸腺の場合は、25g以上)

↓
細切混和の後、3倍量のアセトンを加え最低2分間ホモジナイズする

↓
減圧下でろ過し抽出液を得る(3回)

↓
抽出液を合し減圧濃縮する

↓
ジエチルエーテル層と水層に分け水層を除く(2回)

↓
ジエチルエーテル層を減圧濃縮する

↓
1% Tween 60 生理食塩水に懸濁させ試験溶液とする(適宜希釈してもよい)

↓
試験溶液又は希釈液を16~20gのddY系又はICR系雄マウス3匹に各々0.5ml
又は1.0mlずつ腹腔内投与し、24時間後における生死を観察する(2匹以上死亡で陽性)

抽出 1~2日



マウス 1日

下痢性貝毒によるヒト食中毒と マウス・バイオアッセイの違い

ヒトが食物として摂取した場合

経口 摂取 → 下痢、死亡例なし

マウス・バイオアッセイの場合

腹腔内 投与 → 斃死、下痢なし



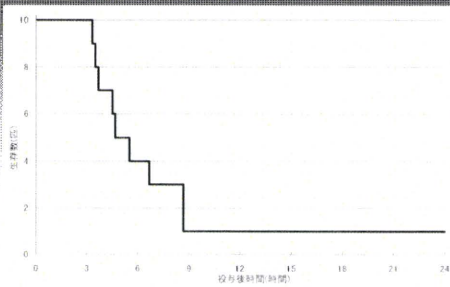
ヒトの下痢とマウスの斃死の間の関係は不明
マウス・バイオアッセイの原理は分かっていない

研究目的1. 下痢性貝毒の Maus・バイオアッセイの原理の解明

方法

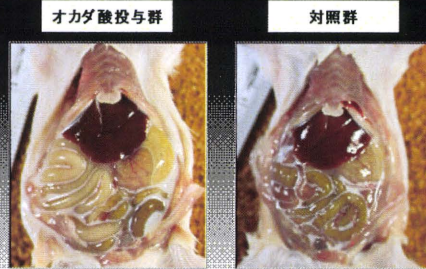
代表的な下痢性貝毒であるオカダ酸を、致死量 ($4 \mu\text{g} = 1$ マウス・ユニット)、マウスに腹腔内投与し、経時的に観察・採材・解析した。

オカダ酸投与後のマウスの生存曲線 (一例)



早期 (投与数時間後) から死が認められる

オカダ酸投与後のマウスの肉眼所見



投与2時間後にはすでに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 (投与2時間後)

無処置群

オカダ酸投与群

対照群



オカダ酸投与群では空腸で液体の著明な貯留
消化管が著しく弛緩し、長くなっている (投与2時間後)

研究目的1. 下痢性貝毒の Maus・バイオアッセイの原理の解明

オカダ酸投与後のマウスの病理所見



オカダ酸投与群では絨毛上部の上皮細胞の剥離や壊死が見られる (投与3~4時間後)

オカダ酸投与後のマウスの血液生化学

	オカダ酸投与群 平均±S.D.	無処置群 平均±S.D.	変化
GOT	1171±392	53±11	↑
GPT	611±514	16±5	↑
CPK	260±199	124±47	↑
LDH	2058±1487	624±389	↑
ALP	917±427	438±126	↑
BUN	38.7±11.4	13.3±3.0	↑
CRE	0.4±0.2	0.1±0.0	↑
TBIL	1.3±0.5	0.5±0.1	↑
TP	2.8±0.3	3.7±0.3	↓
ALB	1.2±0.4	2.0±0.2	↓

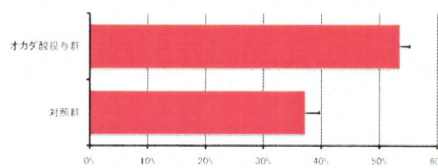
オカダ酸投与群では肝臓、腎臓等の酵素に著しい上昇や下降が見られる (投与3~4時間後)

オカダ酸投与後のマウスの血液量



オカダ酸投与群では血液量が著しく減少 (投与2時間後)
(オカダ酸投与群は0.3ml程度、対照群は0.7~0.8ml)

オカダ酸投与後のマウスのヘマトクリット値の変化



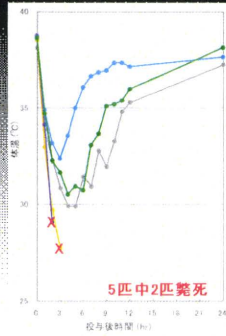
オカダ酸投与群ではヘマトクリット値が著しく上昇 (投与2時間後)
血漿成分が消化管内に漏出していると推測される

研究目的1. 下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの原理の解明

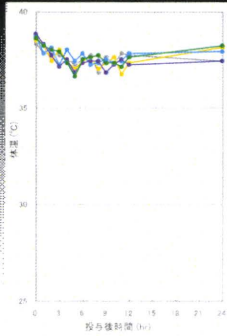
オカダ酸投与後のマウスの体温変化

実験1回目

オカダ酸投与群

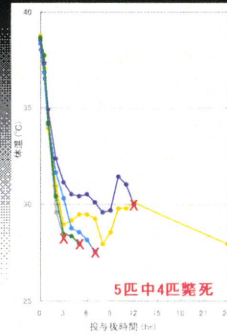


対照群

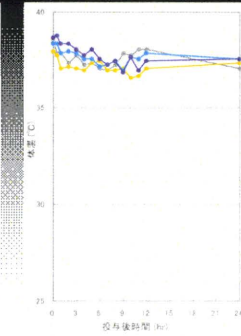


実験2回目

オカダ酸投与群



対照群



オカダ酸投与群では投与1時間後には35°Cを下回り、投与2~3時間後には30°Cを下回るような急激な体温の低下を示す生存するマウスでは体温の回復が見られる個体もあるが、体温が回復せず、24時間以降に斃死する個体もある。

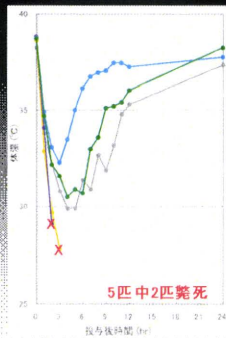
成果1.

消化管内への血漿成分の漏出→血流量低下→循環不全→低体温→斃死
というマウスが死に至る機序を解明

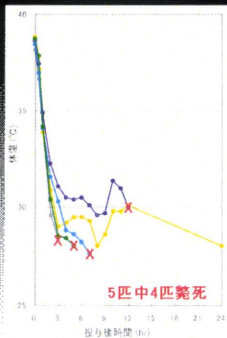
研究目的2. 下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの迅速化、高感度化

オカダ酸投与後のマウスの体温変化の用量依存性

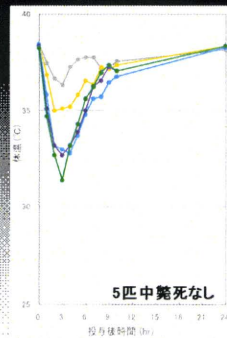
4μg投与群 1回目



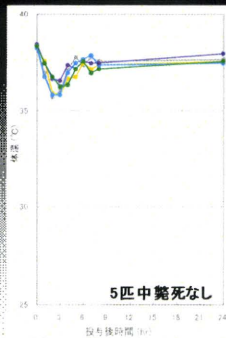
4μg投与群 2回目



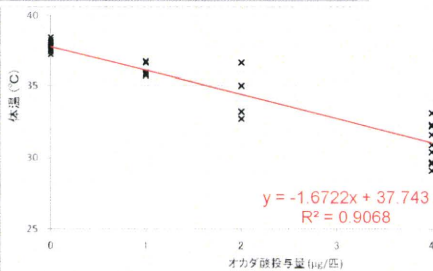
2μg投与群



1μg投与群



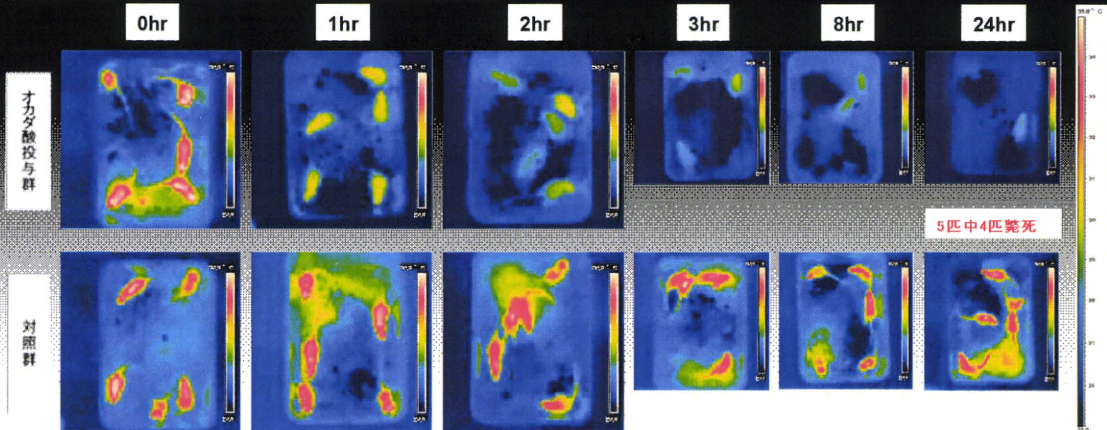
オカダ酸投与量と投与2時間後の体温の相関



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
オカダ酸投与量と体温低下の間には相関が見られる

研究目的2. 下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの迅速化、高感度化

オカダ酸投与後のマウスの体温変化(サーモグラフィー)



オカダ酸投与による体温の低下は、サーモグラフィーによっても明らかである
サーモグラフィーによる体温の測定は非拘束で多検体を同時に測定できる等の利点がある

成果2.

「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の迅速化(と高感度化)の可能性を提示

研究の背景

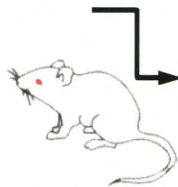
- ・下痢性貝毒の公定法はマウス・バイオアッセイと定められているが、マウス・バイオアッセイの科学的根拠(=マウスが死に至る機序)は明らかではない。
- ・マウス・バイオアッセイは検体の抽出に1~2日、投与後の判定に1日、計2~3日かかる。



研究目的1. 下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの原理の解明

成果1.
消化管内への血漿成分の漏出→血流量低下→循環不全→低体温→斃死
というマウスが死に至る機序を解明

研究目的2. 下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの迅速化、高感度化、代替法の開発



成果2.
「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の迅速化(と高感度化)の可能性を提示

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

1) 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)

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷



Scientific Proceedings

16th Federation of
Asian Veterinary Associations
Congress 2011

and

78th PVMA
Annual Convention
& Scientific Conference

**“Convergence and Cooperation
in Addressing Global Animal Health,
Free Trade and Environmental Issues”**

February 16-18, 2011
Waterfront Cebu City Hotel and Casino
Lahug, Cebu City, Philippines



Mouse Strain Differences in Mouse Bioassay for Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins

H. Suzuki and K. Machii

Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, JAPAN

Introduction

The mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins has been used as the official method in Japan since 1981. This method has also been widely used in many countries of the world. In the Japanese official method, the extract from shellfish sample is injected intraperitoneally into 3 male, ddY or ICR strain mice weighing 16 – 20g, then, if 2 or more mice die by 24 hours after injection, the sample is considered positive. However, there have been no reports about the strain differences in susceptibility to DSP toxins. In this study, we examined the strain differences of mice to DSP toxins.

Materials and Methods

Lethal dose (4µg/ml/mouse) of okadaic acid (OA; LC Laboratories), one of the representative DSP toxins, was injected intraperitoneally into mice. The mice were observed every 10 minutes until 12 hours after injection, and then every 30 minutes until 24 hours after injection. C3H/He, C57BL/6, DBA/2 and ICR strains of mice were compared in the 1st Experiment and A/J, BALB/c, ddY and ICR strains of mice were compared in the 2nd Experiment. ICR strain mice were used as control in both experiments. All the mice were male, weighing 16 – 20g and 4 – 5 weeks old of age (Japan SLC, Inc.).

Results and Discussion

The lethality of the mice were 90 – 100% in A/J, BALB/c, ddY and ICR strains, 70 – 80% in C3H/He and C57BL/6 strains and 40% in DBA/2 strain (Fig.1 & 2). Survival analysis, using Log-Rank test, clarified that C57BL/6, ddY and ICR strains died earlier and A/J, C3H/He and DBA/2 strains survived longer (Table 1 & 2). The results of ICR mice between 1st and 2nd Experiments were not significantly different (data not shown). Significant strain differences were seen in the susceptibility to OA. It is confirmed that ddY and ICR strains of mice, used in the Japanese official method, are susceptible to DSP toxins and are suitable for the examination for detecting DSP toxins, although these strains are non-inbred strains.

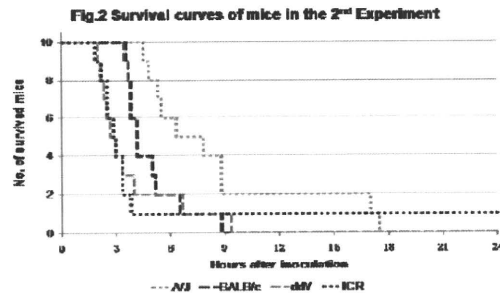
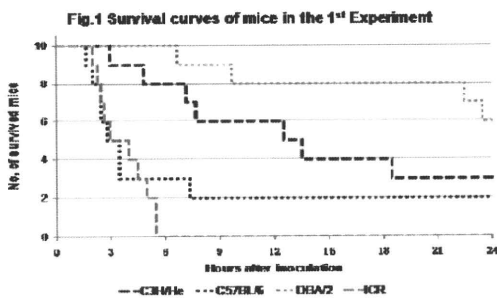


Table 1 Survival analysis of the 1st Experiment

Strain	vs	Strain	Log-Rank test
C3H/He	vs	C57BL/6	NS
C3H/He	vs	DBA/2	NS
C3H/He	vs	ICR	***
C57BL/6	vs	DBA/2	*
C57BL/6	vs	ICR	NS
DBA/2	vs	ICR	***

Table 2 Survival analysis of the 2nd Experiment

Strain	vs	Strain	Log-Rank test
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

