

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450437

研究課題名(和文) 下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの原理解明、及び動物福祉に配慮したその改良

研究課題名(英文) Studies on the mechanism of mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning toxins and its improvement in consideration of animal welfare

研究代表者

鈴木 穂高 (Suzuki, Hodaka)

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・主任研究官

研究者番号：70342904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：下痢性貝毒を投与したマウスでは、投与1、2時間後には腸管内に水分の貯留が認められるが、これは血中からの血漿成分の漏出によると考えられた。血漿成分の漏出により血流量が減少、循環不全により体温が低下、組織障害や多臓器不全を起こして、最終的に死に致していると考えられた。マウスの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は、従来の投与24時間後のマウスの生死での判定と高い相関を示しており、検査の迅速化と実験動物福祉への配慮を兼ね備えた優れた方法であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The mice inoculated with a lethal dose of okadaic acid, a diarrhetic shellfish poisoning toxin, showed the accumulation of the fluid in the intestine within a few hours after inoculation. The fluid in the intestine is thought to be plasma from the blood. The decrease of blood volume and the circulatory failure might lead to tissue damage and multi organ dysfunction, and finally death. The decrease of the body temperature could be a new, useful, rapid and humane index for judging the results of the mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning toxins, instead of the present index, the death of the animals.

研究分野：食品衛生学、実験動物学、毒性学

キーワード：下痢性貝毒 マウス・バイオアッセイ 実験動物福祉

## 1. 研究開始当初の背景

下痢性貝毒は、1976、77年に東北地方で起きた貝を原因とする食中毒を端緒として発見された。マウス・バイオアッセイは下痢性貝毒検査法として我が国で開発され、1981年、当時の厚生省課長通知により公定法として世界に先駆けて制定された。マウス・バイオアッセイは現在、世界各国において広く用いられている。我が国では公定法の制定以降、市販貝類による貝毒の食中毒はほとんど起こっておらず、マウス・バイオアッセイの検査法としての有用性・信頼性は高い。しかし、マウス・バイオアッセイの原理とも言うべき、下痢性貝毒の腹腔内投与によってマウスが死亡する機序・原理についてはほとんど分かっていない。また、現在の公定法では貝の抽出物を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が、人道的エンドポイントの設定はされておらず、苦痛の軽減等の措置もないことから、実験動物福祉の観点から見て非常に問題が多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、この30年間、原理も明らかでないままに使われていた下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの科学的根拠を明らかにすること、およびマウス・バイオアッセイの原理の根幹を生かしつつ、動物福祉に配慮した上で短時間化、高感度化を図れるよう変更・改良の検討を行うことである。

## 3. 研究の方法

### (1) 下痢性貝毒腹腔内投与後のマウスの血液学・血液生化学的解析

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後、経時的に採血し、網羅的に血液学・血液生化学的な解析を行った。有意差の認められたパラメーターについてはさらに、致死量～致死量未満のオカダ酸を投与したマウスを用いて、用量依存性について調べた。

### (2) パルスオキシメーターを用いた下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの人道的エンドポイントの検討

下痢性貝毒(オカダ酸)を腹腔内投与したマウスにおいて、パルスオキシメーターを用いた脈拍数の減少、あるいは経皮的動脈血酸素飽和度(SpO<sub>2</sub>)の低下を指標とした、マウスの全身状態のモニタリングを行った。

### (3) オカダ酸(OA)とディノフィシストキシン-1(DTX-1)の比毒性

下痢性貝毒の主要な成分であるオカダ酸(OA)とディノフィシストキシン-1(DTX-1)の比毒性について調べた。OAとDTX-1について、

それぞれ報告されている致死量を元に上下5用量を設定し、マウスに腹腔内投与した。投与24時間後の生存率からLD50を算出した。また、24時間の致死経過についても観察した。

### (4) 体温の低下とヘマトクリット値の低下を指標とした下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの早期判定

下痢性貝毒(オカダ酸)をマウスに腹腔内投与し、2時間後に体温の測定と末梢からの採血を行い、体温の変化、ヘマトクリット値の変化と投与24時間後のマウスの生死を比較した。

### (5) 心電図を用いたマウス・バイオアッセイの人道的エンドポイントの検討(予備検討)

予備検討として致死経過の長い下痢性貝毒の代わりに致死経過の短いフグ毒を用いた。麻酔下でフグ毒を腹腔内投与したマウスにおいて、心電図、パルスオキシメーター、聴診器などを用いて、呼吸停止前後のバイタルサインの変化を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 下痢性貝毒腹腔内投与後のマウスの血液学・血液生化学的解析

致死量の下痢性貝毒(オカダ酸)投与の1、2時間後からGOT、GPT等の肝酵素値やLDH、CPK等の組織破壊の指標値、およびヘマトクリット値、赤血球数等に著しい上昇が認められた(表1)。これらのことから、先行研究において明らかにしていたマウスの腸管内の液体の貯留が血中から漏出した血漿成分によるものであること、その結果、血流量が減少し、循環不全によって、体温が低下、組織障害や多臓器不全を引き起こして、マウスは死亡しているのではないかという死亡機序が考えられた。

また、致死量未満～致死量のオカダ酸投与により、これらの値の上昇には明らかな用量依存性が認められた。このうち、ヘマトクリット値は用量との相関がもっとも高く、また、血液生化学検査に比べ検査も簡便であることから、先行の研究で明らかにした体温低下とともに、下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの早期判定、および、実験動物の苦痛軽減のためのエンドポイント設定の指標の候補となると考えられた。

### (2) パルスオキシメーターを用いた下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの人道的エンドポイントの検討

下痢性貝毒(オカダ酸)を腹腔内投与したマウスにおいて、パルスオキシメーターを用いた人道的エンドポイントの設定が可能かどうかを検討した。マウスは心拍が非常に早く、もともと末梢血流の信号が非常に微弱である上、オカダ酸の腹腔内投与により血流量が低下した状態においては、末梢での血流信

号が検出できなくなることが確認された。しかし、そのような状態から直ちに死に致る訳ではなく、回復する個体も見られたことから、パルスオキシメーターをエンドポイント設定に利用することは現時点では難しいと考えられた。

### (3) オカダ酸(OA)とディノフィシストキシン-1(DTX-1)の比毒性

OAとDTX-1について、それぞれ報告されている致死量を元に上下5用量を設定し、マウスに腹腔内投与し、投与24時間後の生存率からLD50を算出したところ、18~20gのマウス1匹あたり、OAは3.57 $\mu$ g/匹、DTX-1は2.89 $\mu$ g/匹となった(表2.1、表2.2)。これを体重kgあたりに換算すると、OAは約186 $\mu$ g/kg B.W.、DTX-1は約150 $\mu$ g/kg B.W.となった。現在、我が国やヨーロッパで用いられているOAとDTX-1の毒性等価係数は1:1とされているが、OAに比べてDTX-1の方が1.2倍以上マウスに対する毒性が強いことが明らかとなった。また、致死経過は明らかに用量依存性を示しており、高用量の群の方が短い時間でマウスが死亡したが、OAとDTX-1では大きな差は認められなかった

### (4) 体温の低下とヘマトクリット値の低下を指標とした下痢性貝毒のマウス・バイオアッセイの早期判定

下痢性貝毒(オカダ酸)を投与したマウスでは、全身状態の悪化と循環不全のために尾静脈、あるいは頸部静脈など末梢からの採血は不可能であり、ヘマトクリット値の低下と24時間後のマウスの生死を比較することはできなかった。一方、体温の低下については、例えば、コントロールマウスの体温から5以上の低下で判断した場合、24時間後のマウスの生死で判定する従来法と比較して、感度約95%、特異度約86%と非常に高い相関を示していた。このことから、マウスの体温低下を指標とする判定はマウスの死亡を待たずに早期に判定が可能であり、動物福祉的にも優れた方法であることが明らかとなった。

### (5) 心電図を用いたマウス・バイオアッセイの人的エンドポイントの検討(予備検討)

フグ毒を投与したマウスにおいて、呼吸停止前後の心電図、パルスオキシメーター、聴診器などを用いてバイタルサインの変化を調べた。その結果、心電図的に正常とほとんど正常と変わらない波形を示していても、聴診器やパルスオキシメーターを用いて確認すると、血流や心音は消失しており、実質的な心停止の状態となっている場合があることが確認された。このことから、心電図を用いた実験動物のエンドポイントの設定は難しいと考えられた。一方、研究(1)の結果より、実験動物用のパルスオキシメーターだけでは結果が安定しないことから、様々なバイタルサインモニターを組み合わせたエンド

ポイントの設定の検討が今後、必要であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

H. Suzuki

Influence of Body Weight of Mice on the Susceptibility to Okadaic Acid, a Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxin  
Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk. Assess., vol.31(4), p719-722, (2014) (査読あり)  
doi: 10.1080/19440049.2014.886133.

H. Suzuki, K. Machii

Comparison of Toxicity between Saxitoxin and Decarbamoyl Saxitoxin in the Mouse Bioassay for Paralytic Shellfish Poisoning Toxins  
J. Vet. Med. Sci., vol.76(11), p1523-1525, (2014) (査読あり)  
doi: 10.1292/jvms.14-0211.

[学会発表](計 7件)

鈴木穂高、岡田由美子

下痢性貝毒オカダ酸投与後のマウスの血液学・血液生化学的变化  
第156回日本獣医学会(岐阜市) 2013年9月20~22日

H. Suzuki

Rapid Decrease of Body Temperature in Mice after Okadaic Acid Injection.  
The 3rd Asia Pacific International Conference on Food Safety (Taipei, Taiwan)  
2013年10月29~11月1日

鈴木穂高、岡田由美子

フグ毒テトロドトキシンに対する感受性のマウス系統差  
第157回日本獣医学会(札幌市) 2014年9月9~12日

H. Suzuki, Y. Okada

Hematological and Biochemical Changes after Inoculation of Okadaic Acid, a Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxin.  
The Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress 2014 (Kuala Lumpur, Malaysia) 2014年11月11~11月12日

H. Suzuki

Mouse Strain Differences in the Susceptibility to Tetrodotoxin.

The 18th Federation of Asian Veterinary Associations Congress (Singapore, Singapore) 2014年11月28~30日

鈴木穂高

マウスの系統によるフグ毒テトロドトキシン(TTX)に対する感受性の違い  
第108回日本食品衛生学会学術講演会(金沢市) 2014年12月3~6日

鈴木穂高

フグ毒のマウス・バイオアッセイのSCAWの苦痛分類  
第158回日本獣医学会(十和田市) 2015年9月7~9日

〔図書〕(計 2件)

H. Suzuki

Shellfish: Human Consumption, Health Implications and Conservation Concerns, Nova Science Publishers, Inc., pp.399-411, (2014)

鈴木穂高

食品衛生検査指針 微生物編 2015, 公益社団法人日本食品衛生協会, pp.94-101 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
鈴木 穂高 (SUZUKI HODAKA)  
国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・主任研究官  
研究者番号: 70342904

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号:

表1 下痢性貝毒腹腔内投与後のマウスの血液学・血液生化学的变化

	0h	Cont1h	Cont2h	Cont4h	OA1h	OA2h	OA4h
Na	148.7 ± 0.6	150.3 ± 0.6	148.7 ± 1.5	149.0 ± 1.0	155.3 ± 4.0	151.7 ± 4.0	152.0 ± 2.6
K	5.33 ± 0.31	4.87 ± 0.31	4.97 ± 0.21	5.13 ± 0.42	3.70 ± 0.30	4.63 ± 0.21	5.77 ± 0.59
Cl	111.3 ± 0.6	115.0 ± 1.0	112.3 ± 1.2	113.0 ± 3.0	118.7 ± 9.9	115.3 ± 5.1	114.7 ± 4.2
Glu	204.3 ± 13.1	208.0 ± 16.7	199.0 ± 7.0	175.3 ± 4.5	228.3 ± 11.8	294.3 ± 34.6	256.0 ± 34.0
NH3	109.7 ± 22.8	114.3 ± 19.6	105.3 ± 7.1	102.7 ± 15.6	201.7 ± 19.7	248.7 ± 36.7	208.3 ± 12.7
GGT	2.0 ± 1.0	1.3 ± 0.6	1.7 ± 0.6	1.7 ± 1.2	13.3 ± 7.6	13.3 ± 6.0	5.3 ± 2.1
GOT	52.3 ± 8.3	90.0 ± 22.6	90.0 ± 10.4	82.0 ± 26.1	338.0 ± 69.6	602.3 ± 117.6	1151.7 ± 367.0
GPT	23.3 ± 9.5	64.7 ± 38.7	63.0 ± 11.8	45.3 ± 28.4	187.0 ± 59.3	435.0 ± 70.4	1351.7 ± 46.5
ALP	507.0 ± 67.5	534.0 ± 121.1	450.3 ± 56.6	450.0 ± 97.8	593.3 ± 51.8	790.7 ± 103.2	864.7 ± 166.8
BUN	13.07 ± 1.76	16.90 ± 1.30	12.50 ± 1.47	8.97 ± 0.86	24.23 ± 1.46	31.40 ± 2.13	43.57 ± 7.61
TG	203.7 ± 10.8	341.7 ± 64.8	308.7 ± 31.2	214.0 ± 33.8	199.0 ± 15.1	291.0 ± 68.8	142.7 ± 18.6
TCHO	98.3 ± 5.0	88.3 ± 7.5	81.7 ± 4.5	82.3 ± 6.5	93.0 ± 7.5	106.3 ± 10.7	81.7 ± 14.6
TP	4.27 ± 0.15	3.80 ± 0.10	3.80 ± 0.10	3.83 ± 0.21	3.97 ± 0.06	3.83 ± 0.32	3.50 ± 0.10
ALB	2.23 ± 0.06	1.90 ± 0.10	1.93 ± 0.06	1.93 ± 0.15	1.93 ± 0.21	1.80 ± 0.17	1.63 ± 0.06
TBIL	0.37 ± 0.12	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.37 ± 0.12	1.33 ± 0.32	1.53 ± 0.23	1.43 ± 0.15
UA	1.50 ± 0.20	1.20 ± 0.30	1.10 ± 0.00	1.30 ± 0.36	1.57 ± 0.06	2.77 ± 1.07	2.00 ± 0.26
CRE	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.10
AMYL	2716.7 ± 83.9	2686.7 ± 230.9	2846.7 ± 415.0	3146.7 ± 436.8	2960.0 ± 377.2	3753.3 ± 365.0	4133.3 ± 149.8
LDH	593.3 ± 76.4	1016.7 ± 197.6	876.7 ± 115.0	833.3 ± 145.7	2273.3 ± 217.8	3710.0 ± 892.7	4040.0 ± 363.9
CPK	458.3 ± 144.9	766.7 ± 75.1	558.3 ± 99.3	503.3 ± 98.3	2051.7 ± 152.2	3120.0 ± 577.1	2888.3 ± 940.8
Hct(%)	40.50 ± 1.00	40.67 ± 0.76	39.67 ± 1.26	38.83 ± 1.61	57.83 ± 1.89	59.33 ± 1.76	53.07 ± 2.61
Hb(g/dL)	12.087 ± 0.817	12.750 ± 1.419	11.560 ± 1.350	12.340 ± 1.153	17.787 ± 2.108	17.837 ± 2.384	16.397 ± 2.524

0hに比べて有意に上昇(p<0.01)  
0hに比べて有意に上昇(p<0.05)

0hに比べて有意に低下(p<0.01)  
0hに比べて有意に低下(p<0.05)

表 2.1 OA の致死曲線

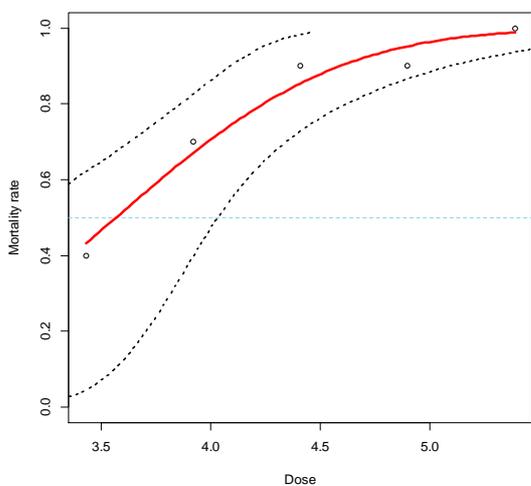


表 2.2 DTX-1 の致死曲線

