



Title	下痢性貝毒特にオカダ酸に関する研究
Author(s)	濱野, 米一
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37538">https://hdl.handle.net/11094/37538</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【143】

氏名・(本籍)	はまのよねかず 濱野米一
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9 4 9 7 号
学位授与の日付	平成 3 年 2 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	下痢性貝毒特にオカダ酸に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 三輪谷俊夫 (副査) 教授 井上 公蔵 教授 松田 守弘

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

下痢性貝毒は人に下痢，嘔吐等の食中毒を引き起こす自然毒で，プランクトンにより毒化した二枚貝の中腸腺に含まれる。この食中毒は我が国における動物性自然毒による食中毒患者数では最も多い。下痢性貝毒の定量は，成熟マウス腹腔内投与による致死を指標とする公定法が厚生省により定められているが，遊離脂肪酸の影響を強く受け，定量誤差が生じることから改良が望まれていた。選択性，簡便性，迅速性に富む定量法を開発する目的で，乳のみマウス法，Vero 細胞毒性，ウサギ毛細血管透過性亢進活性（P F）を検討するとともにオカダ酸に対するモノクローナル抗体の作製に成功し，このモノクローナル抗体を用いた ELISA 法による定量法を開発した。また，オカダ酸の生物作用機序についても解析した。

### 【方法ならびに成績】

細菌性下痢毒の検出系として用いられている乳のみマウス胃内投与法を下痢性貝毒定量に応用するため至適条件を求めた結果，3～4日齢マウスに試料を投与し，25℃に保温して4時間後，腸管内液体貯溜比（腸管重量／（体重－腸管重量））（F A比）を求める乳のみマウス法を確立した。投与毒素量とF A比の関係性を調べた結果，F A比が0.07～0.12の間で直線性を示しF A比が0.12以上で平坦となった。F A比が0.09～0.11の間の値を示す被検液中に0.1MUの下痢性貝毒が存在するので，F A比が0.12より大きい場合，F A比が0.09～0.11の値になるまで希釈し，その希釈倍数（N）と定数（0.05）の積によって，毒素量を求めることが可能となった。本法は遊離脂肪酸による影響を受けず，判定時間が4時間に短縮されることから，毒化モニタリングおよび食中毒事件の診断に応用し成果をあげることができた。

また，Vero 単層培養細胞にオカダ酸を接種し，光学顕微鏡による経時的観察を行った結果，round-

ing, gathering, 萎縮, 崩壊等の形態的变化が認められ細胞毒性を示すことが明らかになった。走査電顕による観察により, 光学顕微鏡下で認められた rounding に先行して Vero 細胞表面の microvilli の短縮, 肥厚が観察された。オカダ酸接種48時間目における総細胞数および生存細胞数を計測した結果, いずれもオカダ酸の接種濃度が高まるにつれ減少し, オカダ酸は cytotoxic に作用することが判明した。

一方, オカダ酸を投与した乳のみマウス十二指腸組織標本を観察した結果, 粘膜上皮細胞の変性剥離, 粘膜固有層および粘膜下織の水腫を認め, 走査型電顕で絨毛上皮細胞の変性剥離像を観察した。in vivo においても cytotoxic に作用することが認められた。

オカダ酸のウサギ皮膚毛細血管透過性亢進活性 (PF) を調べた結果, 色素漏出面積が 0.025~0.2 $\mu$ g の間で直線性を示し, ウサギ毛細血管透過性を亢進することも明らかになった。

抗オカダ酸モノクローナル抗体を作製するため, オカダ酸-Hydroxysuccinimid ester を合成しヒト IgG のリジン残基に結合させ抗原とし, マウス腹腔に免疫, 9 クローンの抗体産生細胞を得た。こうして得られたモノクローナル抗体 (OA-423-3, IgG 1,  $\kappa$ ) を用いる ELISA 法を開発し検討した結果, オカダ酸 1.0~300 ng の間で直線性を示し, 数 ng/ml のオカダ酸が ELISA 法で測定できることが明らかになった。また, 本モノクローナル抗体 (OA-423-3) の中和活性を調べた結果, オカダ酸の Vero 細胞毒性を中和し, オカダ酸および DTX3 の乳のみマウス法における下痢原性も中和し, 下痢性貝毒の毒発現部位を認識する抗体であることが示唆された。

ELISA 法による標準精製品 DTX1 の定量値は HPLC 法および乳のみマウス法の値とよく一致し, ホタテガイから部分精製した DTX3 も定量することができた。乳のみマウス法で下痢性貝毒を検出できなかった貝類 6 検体が ELISA 法で下痢性貝毒陽性として検出できた。今回開発した ELISA 法により, オカダ酸の他, その誘導体である DTX1 および DTX3 が高感度で定量できることが判明した。

#### 【総括】

- 1) 乳のみマウス腸管内液体貯溜比を指標とする下痢性貝毒定量法 (乳のみマウス法) を開発した。本法は遊離脂肪酸の影響を受けず, 公定法に比べ, 感度, 迅速性に優れていた。
- 2) 抗オカダ酸モノクローナル抗体 (OA-423-3) の作製に成功した。本モノクローナル抗体は下痢性貝毒の Vero 細胞毒性および乳のみマウス法における下痢原性活性を中和した。
- 3) 抗オカダ酸モノクローナル抗体を用いる ELISA 法による下痢性貝毒定量法を開発した。本法により, オカダ酸, DTX1 および DTX3 を感度よく定量でき, 簡便性, 迅速性に富む方法である。
- 4) オカダ酸は培養細胞や乳のみマウス, ウサギ腸管粘膜上皮細胞に対し, cytotoxic に作用することが判明した。
- 5) オカダ酸はウサギ毛細血管透過性を亢進することを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

下痢性貝毒は下痢、嘔吐を主要症状とする食中毒を引き起こす自然毒で、プランクトンにより毒化した二枚貝の中腸腺に含まれる。この食中毒は我が国における動物性自然毒による食中毒患者数では最も多く食品衛生上重要である。下痢性貝毒の定量は、中腸腺抽出液を腹腔内投与によりマウス致死を指標とする検査法が厚生省により公定法として定められているが、定量誤差が大きいこと、遊離脂肪酸の影響を強く受けることから、定量法の開発が望まれていた。

申請者は細菌性下痢毒素の各種生物活性試験法に着眼し、下痢性貝毒の定量に応用可能かどうかを検討し、腸管内液体貯溜比を指標とする乳のみマウス法を開発するとともに、抗オカダ酸単クローン抗体を作製してELISA法による定量法を確立し、疫学的調査やサーベイランスに利用して有効であることを示した。更に、作用機序についても検討を加え、以下の成果を得ている。

- 1) 乳のみマウス腸管内液体貯溜比を指標とする下痢性貝毒定量法(乳のみマウス法)は、遊離脂肪酸の影響を受けず、公定法に比べ、感度、迅速性にも優れている。
  - 2) 抗オカダ酸単クローン抗体の作製に成功したが、得られた単クローン抗体は、下痢性貝毒のVero細胞毒性および乳のみマウス法における下痢原性を中和する。
  - 3) 抗オカダ酸単クローン抗体を用いたELISA法はオカダ酸およびその誘導体であるDTX1およびDTX3を感度良く定量することができ、簡便性、迅速性に富む下痢性貝毒の検出法である。
  - 4) オカダ酸はVero細胞毒性やウサギおよびマウス小腸の病理組織学的観察により、標的細胞に対してcytotoxicに作用することを明らかにした。
  - 5) オカダ酸はウサギ皮膚毛細血管透過性を亢進することを明らかにした。
- 以上の研究内容は、学位を授与されるに値するものとする。