

平成 18 年度セアカゴケグモ毒性試験報告書

大阪府健康福祉部環境衛生課

大阪府立公衆衛生研究所

【目 的】

セアカゴケグモ発見から 10 年が経過した現在、その棲息地域は大阪府内をはじめ近畿全域に拡大しつつあり、また、咬傷事故報告数も増加している。そこで今回は、1) 大阪府内に棲息するセアカゴケグモの毒性が日本で繁殖を繰り返す中で、10 年前と変化しているかどうかを検討することを主目的とし、さらに 2) 老齢および幼齢マウスに対するクモ毒の影響を若年マウスに対するものと比較検討すること、3) 再度クモに咬まれた場合を想定して、毒腺液を再投与された個体の毒性症状を検討することを目的として毒性試験を実施した。

材料と方法

今回の実験における毒腺液の調整およびマウスへの毒腺投与は、1996～97 年に実施したセアカゴケグモ毒性試験の方法に準じて行った。詳細は以下の通りである。

(毒腺の摘出および毒腺液の調整)

大阪府内南部で採取されたクモから摘出した毒腺を滅菌リン酸緩衝液中 (PBS) にストックし、毒性試験直前まで -135°C で冷凍保存した。マウスに投与する毒腺液は、滅菌リン酸緩衝液で毒クモ 0.33 匹分、0.25 匹分、0.125 匹分、0.1 匹分の濃度に希釈して用いた。毒腺液を段階的に希釈して投与する理由としては、一般的に毒を有する昆虫 (クモも含む) では、通常 1 回の咬傷で保有する全毒腺量を注入することは無いことと、また同時に毒腺液の半数致死量値 (LD₅₀ 値)^{注 1}を算出するためである。投与した毒腺液の蛋白量は、市販の蛋白量測定キット (Coomassie Protein Assay Reagent Kit/PIERCE, USA) により測定した。

(使用マウス)

生殖年齢に達した若年マウス (ddy Slc: 8 週齢/雄: 人間の青年に相当)、老齢マウス (ddy Slc: 20 ヶ月齢/雌: 老年に相当) および乳離れ直後の幼齢マウス (ddy Slc: 4 週齢/雄: 幼児に相当) を用いた (なおマウスの平均寿命は 24 ヶ月である)。

(実験方法)

1) 若年マウスを用いた毒性試験

(1) 初回投与実験

毒性試験には各群 10 匹のマウスを用い、独立した 2 回の実験を実施した。毒腺液の接種は、マウス 1 匹あたりそれぞれ毒クモ 0.33 匹分、0.25 匹分、0.125 匹分、0.1 匹分の毒腺液および、陰性対照として滅菌リン酸緩衝液(PBS) を腹腔内投与した。投与後、症状、生死を 6-7 日間観察した。また中毒症状の程度を推定する指標として、期間中の各マウスの体重の増減を測定し、さら毒腺投与群での生存マウスの平均体重減少率^{注2}を算出した。

(2) 再投与実験

初回の毒性試験で生存した個体について、1 ヶ月後に同様の実験を繰り返し同様の観察を行った。なおこの実験については 1 回のみ実施した。

2) 老齢マウスを用いた毒性試験

老齢マウスについては、5 匹および 4 匹の 2 群にそれぞれ毒クモ 0.33 匹分、0.25 匹分の毒腺液を腹腔内投与して、症状、生死および体重を 7 日間観察した。

3) 幼齢マウスを用いた毒性試験

(1) 初回投与実験

各群 10 匹のマウスを用いた。毒腺液の接種は、マウス 1 匹あたりそれぞれ毒クモ 0.33 匹分、0.25 匹分、0.125 匹分、0.1 匹分の毒腺液および、陰性対照として滅菌リン酸緩衝液(PBS) を腹腔内投与した。投与後、症状、生死および体重を 7 日間観察した。独立した 2 回の実験を実施し、死亡率および体重減少率を比較した。

(2) 再投与実験

初回の毒性試験で生存した個体について、1 ヶ月後に同様の実験を繰り返し同様の観察を行った。この実験においても独立した 2 回の実験を実施した。

4) 半数致死量値(LD₅₀ 値)の算定

投与したクモの各希釈毒腺液蛋白量には幅があり、毒腺希釈率とその死亡率の比較だけでは毒性の比較には不十分である。そこで毒性比較の指標として、各試験における毒腺液蛋白質量と死亡率に基づき、Microsoft Excel を用いて 2 次曲線グラフを作成して算定した。

結果

1) 若年マウスを用いた毒性試験

(1) 毒腺液初回投与実験

毒腺液を投与されたマウスは、投与後約 30 分から立毛、痙攣、歩行困難などの中毒症状

を現し、毒液の蛋白質濃度が高いマウス群では、次第に衰弱し死亡する個体が見られた。2回の独立した実験結果を平均した、各投与群の死亡率と体重減少率を表1に示した。投与毒腺液の蛋白量にもとづいたLD₅₀値は0.88mg/kgであった。毒腺投与群の平均体重は投与後1日目から著しく減少を始め、症状が回復する過程で増加した。しかし0.33匹および0.25匹分の毒腺液を投与した群では、観察期間中に投与前の体重に回復することは無かった(図1)。

(2)毒腺液再投与実験

再投与実験に用いた各毒腺希釈液の蛋白量は、初回毒性試験と差は無かった。毒腺液を投与されたマウスは、投与後約30分から初回投与と同様の中毒症状を現したが初回と比較すると回復が早く、投与前より衰弱していた1個体を除き、死亡する個体は無かった(表2)。また平均体重は投与後1日目から減少を始めたが、減少の程度は少なく、また症状が回復する過程で投与前と同程度かまたは増加した(表2・図2)。

(3)若年マウス毒性試験における初回および再投与結果の比較

若年マウスを用いた初回および再投与実験での各毒腺希釈液の蛋白量はほぼ同じであったが、死亡率および投与後の平均体重減少率は、いずれも再投与実験の方が著しく低かった(表1・2)。

2) 老齢マウスを用いた毒性試験

毒腺液を投与されたマウスは、投与後約30分から立毛、痙攣、歩行困難などの中毒症状を現し、0.33匹分、0.25匹分の毒液を投与した両群ともに、高い死亡率および体重減少率であった(表3)。なお使用マウス数の不足からLD₅₀値は算定出来なかった。毒腺投与群の平均体重は投与後1日目から著しく減少を始め、生存した1匹も、観察期間中に投与前の体重に回復することは無かった(図3)。

3) 幼齢マウスを用いた毒性試験

(1)毒腺液初回投与実験

毒腺液を投与されたマウスは、投与後約30分から他の年齢のマウスと同様な中毒症状を現した。各毒腺希釈液投与群で、独立した2回の試験結果の平均死亡率を比較すると、その死亡率にばらつきが見られた。特に0.25匹分の毒腺液投与群に最も高い死亡率が見られた(表4)。これは使用したマウスが未成熟であるため、個体間の抵抗力に差があった事が原因ではないかと推測される。なお今回の実験では死亡率が濃度依存的では無かったために、LD₅₀値は算定出来なかった。両実験において、毒腺投与群の平均体重は投与後1日目から減少を始めたが、生存したマウスは、観察期間中に投与前の体重に回復しさらに増加

した（図 4）。

(2)毒腺液再投与実験

再投与実験に用いた各毒腺希釈液の蛋白量は、初回毒性試験と大きな差は無かったが、2回の独立した実験結果の平均死亡率には、初回投与実験と同様にばらつきが見られた（表 5）。両実験における毒腺投与群の平均体重は投与後 1 日目から減少を始め、生存したマウスの体重は、0.1 匹分の毒腺投与群を除き観察期間中に投与前の体重とほぼ同程度、あるいはそれ以上に回復した（図 5）。

(3)幼齡マウス毒性試験における初回および再投与結果の比較

幼齡マウスを用いた初回および再投与実験での各毒腺希釈液の蛋白量はほぼ同じであり、各投与群の平均死亡率および投与後の平均体重減少率は、初回投与と再投与実験で比較すると 0.33 匹および 0.25 匹分投与群では同程度の値を示した（表 4・5）。

4) 若年、老齡および幼齡マウス毒性試験結果の比較

老齡および幼齡マウスの死亡率は、若年マウスと比較して著しく高かった。また老齡マウスの平均体重減少率は、若年および幼齡マウスと比較して高率であった（表 6）。また若年マウスが毒腺液を再投与されても、その中毒症状が初回投与と比較して著しく軽症であったのと比較して、幼齡マウスでは特に高濃度の毒腺液再投与で重症となった（表 7）。

考察

1) 1996～97 年実施のセアカゴケグモ毒性試験結果との比較

若年マウスを用い 1996 年夏期（国立感染症研究所での結果も含む）、1997 年冬期および夏期に実施した毒性試験結果と今回の試験結果とは、ともに実施した年や季節に関わらずばらつきが見られた。セアカゴケグモが大阪府内で最初に発見された 1996 年から 1997 年にかけての 1 年間でも、クモ 0.33 匹分の毒腺液を投与した場合の死亡率は 30～100%、LD₅₀ 値は 0.21mg～0.91mg/kg と結果に幅が見られている。クモの毒性がこの 1 年間で大きく変化していた事は考えられないので、これらの値のばらつきは、実験に用いた毒腺液中に含まれる α -ラトロトキシンと呼ばれる毒性成分本体の含有率や、被検マウス側の健康状態等によるものでは無いかと推測される。これらの点を考慮にいれ判断すると、2006 年夏期に採集したクモの毒性（0.33 匹分死亡率 30%：LD₅₀ 値 0.88mg/kg）と、1996～97 年に大阪府内で採集されたクモの毒性には、大きな差異は無いものと考えられる。

2) 年齢による中毒症状の比較（初回投与実験結果比較）

今回実施した幼齡および老齡マウスの毒性試験結果は、若年マウスの結果と比較してその死亡率に差が見られた（表 6）。特に老齡マウスの 0.33 匹分および 0.25 匹分の希釈での

死亡率は、若年マウスとほぼ同一の投与蛋白量にもかかわらず著しく高いものであった。また体重減少率も、若年マウスと比較すると高く中毒症状の強さが推測された。また平均体重変動を観察すると、生存個体の回復の程度も若年マウスと比較すると低く、これら老齢マウスの実験結果は、加齢による免疫力を含めた抵抗力の低下によるものであると考えられる。また幼齢マウスにおいても、ほぼ同量の投与蛋白量でその死亡率は若年マウスと比較して高かった。これは幼齢であるため、免疫力を含めた抵抗力が十分に成熟していないからであると思われる。特に0.1匹分の毒腺液での死亡率が5%であったという結果は、幼児が咬まれた場合には少量の毒量でも重篤な症状を引き起こす可能性を示唆するものであった。平均体重減少率および平均体重変動に基づき判断すると、若年および幼齢マウスの中毒症状と生存個体の症状回復の程度は、同程度であると考えられる。

3) 初回および再投与試験結果の比較

セアカゴケグモの毒は α -ラトロトキシンと呼ばれる神経毒であり、ハチ毒のように急性のアレルギー反応を引き起こす事は無いとされている。しかし、2度目に咬まれた場合のアナフィラキシーショックを懸念する一部の識者もある。そこで今回、若年および幼齢マウスを用いて、毒腺液の再投与試験を実施し、マウスのアレルギー反応や中毒反応の程度について検討した。その結果、毒腺液を再投与された若年および幼齢マウスではアナフィラキシーショック等の急性のアレルギー反応は認められなかった。また死亡率および中毒症状については、若年マウスでは何らかの原因で投与前から衰弱していた個体を除き、初回投与時と比較すると著しく軽症であった。これは初回投与時に生存したマウスに α -ラトロトキシンに対する抗体が産生され、中毒症状を軽減しているからであると考えられる。しかし幼齢マウスにおいては、再投与後にも強い中毒症状が現れ、特に高濃度の毒腺液での死亡率に変化は無かった。これは、幼齢であるために免疫機能が未成熟で、 α -ラトロトキシンに対する抗体産生が不十分であるためと推測される。

まとめ

今回の年齢の異なったマウスを用いた一連の毒性試験結果によって、以下の結論が得られた。

- 1) 2006年夏期に採取されたセアカゴケグモの毒性は発見当時(1996-97年)のクモと同程度であり、健康な成人が咬まれた場合には直ちに生命に関わる事はないと推測される。しかし免疫力が弱い幼児や高齢者あるいは成人でも体力の落ちた者が被害にあった場合には、健康な成人と比較して重症となる可能性もある事が示唆された。これらの年齢の人たちへの注意喚起が改めて必要であると考えられる。
- 2) 2度目に咬まれた場合においては、一部に懸念されていたようなアナフィラキシーショ

ク等のアレルギー反応は認められなかった。特に健康な成人の場合、その中毒症状は1度目の咬傷時よりも軽症になることが推測される。しかし免疫機能が未成熟な幼児等では、1度目以上に重篤になることはないが、同様に重症となる可能性が示唆され、この点も含め十分な注意が必要であろう。

注釈

注1) 半数致死量値 (LD₅₀ 値)

毒液等をマウス、モルモットなどの実験動物に投与した場合に、その実験動物の半数が試験期間内に死亡する用量のことで、投与した動物の50%が死亡する用量を体重当たりの量 (mg/kg) としてあらわしたもの。毒液等の毒性の強さをあらわす代表的指標として利用される。動物実験のデータから用量-死亡率のグラフを描き、死亡率50%に相当する用量を求める。値が小さい程、毒性が強い。

注2) 平均体重減少率

中毒症状の程度を推定する指標のひとつとして用いた。用いた実験動物群の実験期間内の平均体重の推移を測定し、平均体重が最も低くなった時点では、もとの平均体重と比較して何%体重が減少したかを算定する。値が大きい程、ダメージが大きいと考える。

例：平均体重 100g の動物群が、毒液投与後数日で 60g まで減少し、その後 90g まで回復した場合、平均体重減少率は 40%となる。

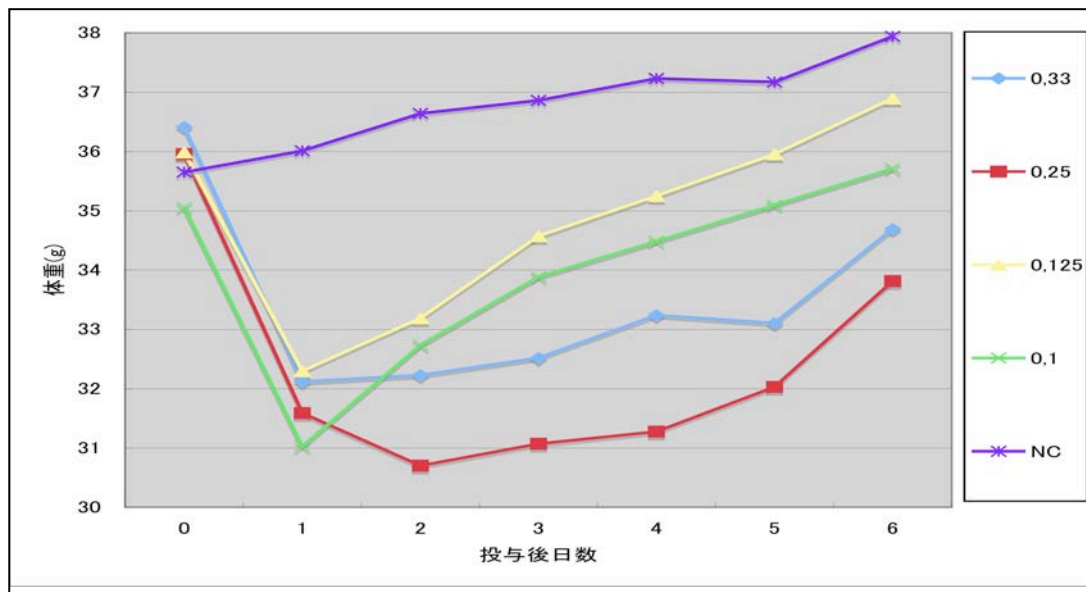


図1 毒腺投与後の平均体重変動(若年マウス初回投与)

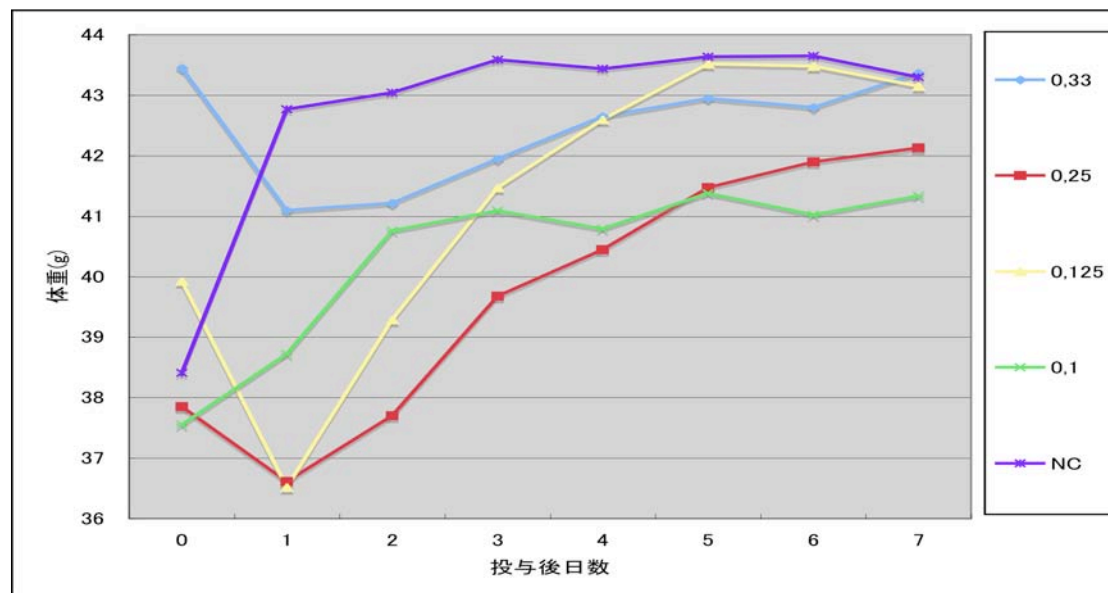


図2 毒腺投与後の平均体重変動(若年マウス再投与)

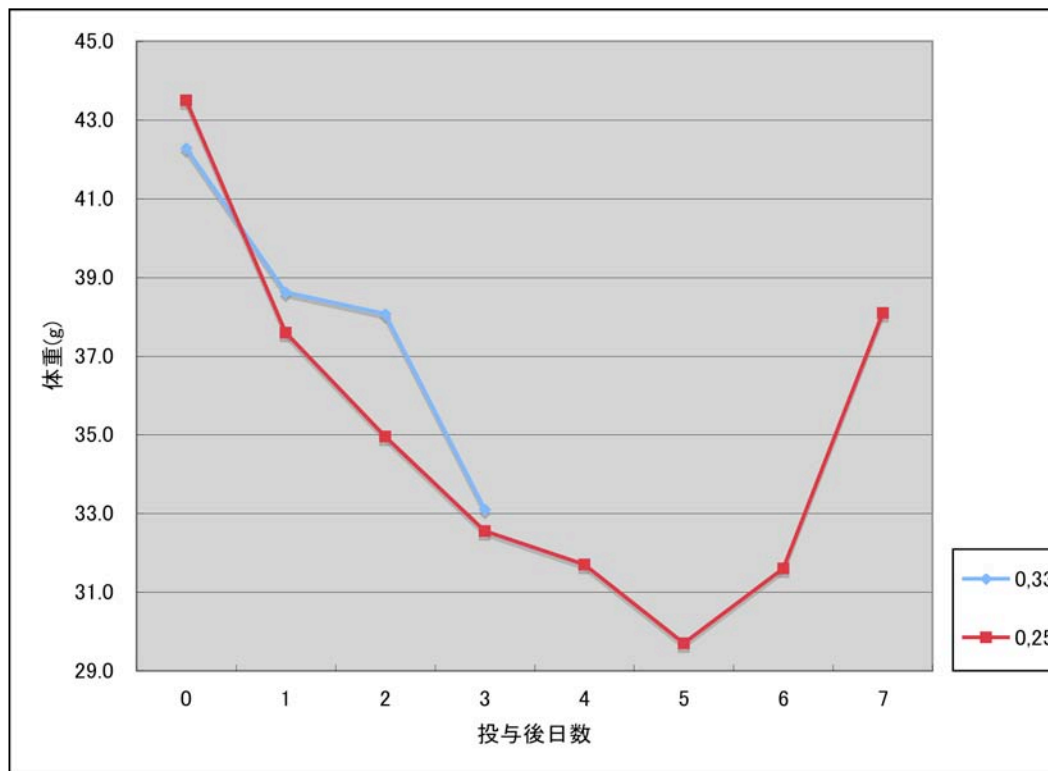


図3 毒腺投与後の平均体重変動(老齢マウス)

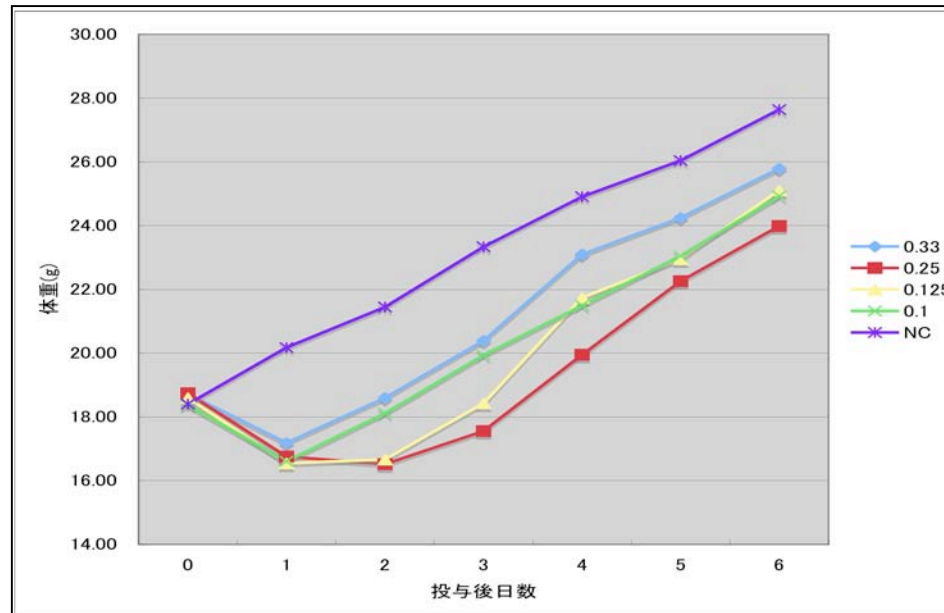


図4 毒腺投与後の平均体重変動(幼齢マウス初回投与)

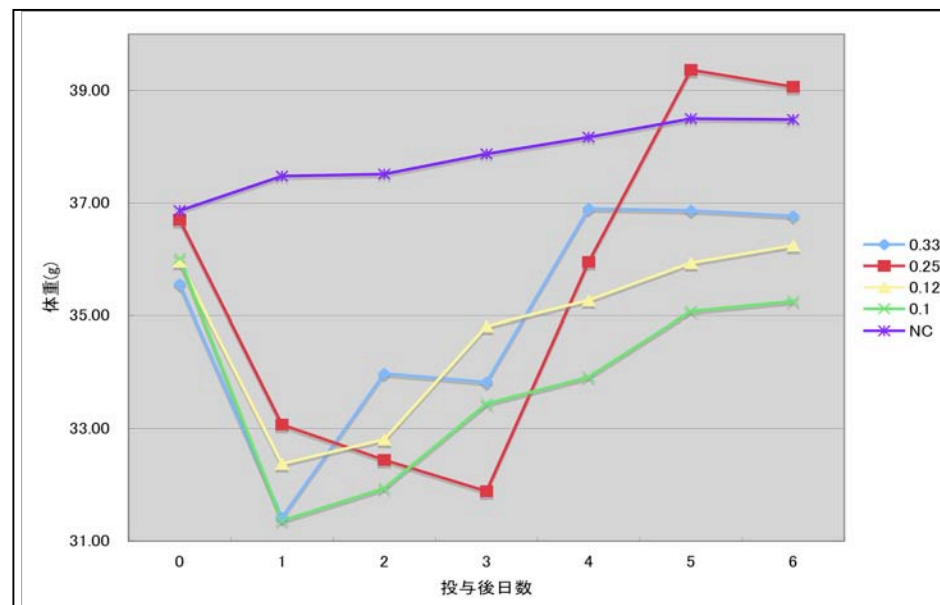


図5 毒腺投与後の平均体重変動(幼齢マウス再投与)

表1 若年マウス初回毒性試験結果

投与毒腺量		
匹分/ (ug/ml)	死亡率(%)	平均体重減少率(%)
0.33匹 (21.7)	30	14
0.25匹 (17.3)	0	13
0.125匹 (11.2)	0	8
0.1匹 (10.4)	0	11
陰性対照 (0)	0	0

注:2回の独立した試験の平均値を記載

表2 若年マウス再投与毒性試験結果

投与毒腺量		
匹分/ (ug/ml)	死亡率(%)	平均体重減少率(%)
0.33匹 (22.2)	0	6
0.25匹 (15.7)	0	3
0.125匹 (12.9)	0	8
0.1匹 (12.9)	(10)*	0
陰性対照 (0)	0	0

*毒腺液投与前より衰弱していた1匹が死亡

表3 老齡マウス毒性試験結果

<u>投与毒腺量</u>		
<u>匹分/ (ug/ml)</u>	<u>死亡率(%)</u>	<u>平均体重減少率(%)</u>
0.33匹 (21.2)	100	22
0.25匹 (19.0)	75	32

表4 幼齡マウス初回毒性試験結果

投与毒腺量		
匹分/ (ug/ml)	死亡率(%)	平均体重減少率(%)
0.33匹 (42.2)	50	8
0.25匹 (33.1)	65	15
0.125匹 (17.2)	40	15
0.1匹 (12.5)	5	11
陰性対照 (0)	0	0

注:2回の独立した試験の平均値を記載

表5 幼齡マウス再投与毒性試験結果

投与毒腺量		
匹分/ (ug/ml)	死亡率(%)	平均体重減少率(%)
0.33匹 (44.2)	70	10
0.25匹 (40.1)	57	14
0.125匹 (25.4)	8	8
0.1匹 (15.0)	0	13
陰性対照 (0)	0	0

注:2回の独立した試験の平均値を記載

表6 若年、幼齡および老齡マウス毒性試験結果比較

若年マウス/幼齡マウス/老齡マウス		
投与毒腺量ug/ml (匹分)	死亡率(%)	平均体重減少率(%)
21.7/42.2/21.1 (0.33匹分)	30/50/100	12/8/ 22
15.7/33.1/19.0 (0.25匹分)	0/65/75	15/15/32
11.2/17.2/- (0.125匹分)	0/40/-	16/15/-
10.4/12.5/- (0.1匹分)	0/5/-	10/11/-

表7 再投与実験における若年、幼齡マウス毒性試験結果比較

若年マウス/幼齡マウス		
投与毒腺量ug/ml (匹分)	死亡率(%)	平均体重減少率(%)
22.2/44.2 (0.33匹分)	0/70	6/ 10
15.7/40.1 (0.25匹分)	0/57	3/14
12.9/25.4 (0.125匹分)	10/8	8/8
12.9/15.0 (0.1匹分)	0/0	11/13

表8 若年マウスを用いた毒性試験結果の比較

	1996年夏期	1996年夏期(感染研)	1997年冬期	1997年夏期	2006年夏期
0.33匹分投与死亡率(%)	100	50	100	30	30
0.1匹分投与死亡率(%)	0	0	0	0	0
LD50値(mg/kg)	0.22	未算定	0.51	0.91	0.88