

フィチン酸ならびにフィチン酸ナトリウムのラットにおける経口急性毒性

市川久次*, 大石真之*, 高橋省*, 小林博義*,
湯沢勝広**, 細川奈津子***, 橋本常生****

Studies on Acute Oral Toxicities of Phytic Acid and Sodium Phytate in Rat

HISATSUGU ICHIKAWA*, SHINSHI OHISHI*, OSAMU TAKAHASHI*, HIROYOSHI KOBAYASHI*,
KATSUHIRO YUZAWA**, NATSUKO HOSOKAWA*, and TSUNEO HASHIMOTO*

Keywords : フィチン酸 phytic acid, フィチン酸ナトリウム sodium phytate, ラット rat, 急性毒性 acute toxicity

フィチン酸は天然抗酸化剤として、BHA、BHT等の合成抗酸化剤に発癌性等¹⁾の疑いが問題になってから多用されつつあるものの一つである。現在天然に産生するのは食品添加物として使用する場合、その使用基準等は確立されていない。フィチン酸は缶詰のストラバイト防止、缶臭防止、油脂等の酸化防止の目的で近年広く使用されつつある。そこで、フィチン酸の毒性試験の一環として、ラットを用いてフィチン酸を経口投与し、その急性毒性を検討した。また、フィチン酸そのものは酸性が非常に強く、酸としての毒性も推定されるので、その塩であるフィチン酸ナトリウムについても合わせて検討を行った。

実験材料ならびに方法

1. 使用動物

日本チャールス・リバー株式会社生産のSPFラット雌雄(F 344/Ducj系)を4週令で購入し、4週～5週間固型型飼料CF-2(日本クレア製)で予備飼育し、実験に供した。

2. 試料

フィチン酸は東京化成製(ca. 50% in water, Lot No. AO01)をフィチン酸ナトリウムは半井化学製(試薬一級 Lot No. M6H 2435, $C_6H_6(PO_3Na_2)_6 \cdot xH_2O$, 水分含量11%)を使用した。なお投与にあたっては、それぞれ精製水で希釈または溶解し、試料絶対量を体重kg当

りに換算したものを用時調製し使用した。

3. 飼育条件

室温 $25 \pm 1^\circ C$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ に調整された飼育室内にて、ベルト式架台において飼育した。予備飼育および投与後2時間以後は固型飼料CE-2を与え、水は細菌ろ過器を通した水道水を自由に摂取させた。

4. 試験方法

試料の投与用量は公比1.1~1.5の割合で増量し、5~8用量を用いた。投与容量、用量はTable 1に示した如くであり、投与は胃ゾンデにより行った。なお動物は1群5匹とし、実験前日午後5時より除飼し、水のみを与え、午前9時30分より試料の投与を開始した。投与後2時間目より飼料を再び与え7日間にわたって症状を観察するとともに、この間の死亡率にもとづいて、Moving average法²⁾、Lichfield-Wilcoxon法³⁾により50%致死量(LD₅₀)を算定した。また死亡例については直ちに、生存例については7日後屠殺剖検した。

実験結果

1. 症状

フィチン酸ならびにフィチン酸ナトリウムの間に顕著な症状の差は認められず、主症状はゼラチン様物質を混じたはげしい下痢と鎮静状態で、その他流涙、立毛がみられた。鎮静の状態は、じっとしているがケージをたたくとおきあがるという状態であった。

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

**同病理研究科

***現同環境保健部水質研究科

****現同生活科学部乳肉研究科

Table 1. Dosing Schedule for Acute Toxicity Test of Phytic Acid and Sodium Phytate in Rats

Material	Exp. No.	Vehicle	Volume ml/kg B.W.	Sex	Dose g/kg B.W. (No. of Animals)							
Phytic acid	1	pure water	1.0	M	2.50 (5)	1.66 (5)	1.11 (5)	0.74 (5)	0.49 (5)			
				M	0.70 (5)	0.61 (5)	0.53 (5)	0.46 (5)	0.40 (5)	0.35 (5)	0.30 (5)	0.26 (5)
	2		F	0.70 (5)	0.61 (5)	0.53 (5)	0.46 (5)	0.40 (5)	0.35 (5)	0.30 (5)	0.26 (5)	
Sodium phytate	3	pure water	0.8	M	3.04 (5)	2.03 (5)	1.35 (5)	0.91 (5)	0.61 (5)			
				F	3.04 (5)	2.03 (5)	1.35 (5)	0.91 (5)	0.61 (5)			
	4	pure water	0.5	M	1.51 (5)	1.38 (5)	1.25 (5)	1.14 (5)	1.03 (5)	0.94 (5)		
				F	1.51 (5)	1.38 (5)	1.25 (5)	1.14 (5)	1.03 (5)	0.94 (5)		

Table 2. LD₅₀ of Phytic Acid and Sodium Phytate in Rats

Material	Exp. No.	Sex	Death Time (hr.)			Slope Function (Confidence Interval at p = 0.05)	LD ₅₀ (g/kg) (Confidence Interval at p = 0.05)
			Onset	Peak	Last		
Phytic acid	1	M					0.50 ¹⁾ (0.438~0.564) ¹⁾
		M	1	3	63	1.684 (0.098~2.583)	0.405 (0.311~0.527)
	F	2	2,3	21	1.459 (1.112~1.914)	0.480 (0.396~0.581)	
Sodium phytate	3	M				1.241 (0.874~1.762)	1.13 (0.935~1.365)
		F					1.672 ¹⁾ (—)
	4	M	3	7	24	1.119 (1.018~1.230)	1.03 (0.950~1.117)
		F	3	5	46	1.180 (0.594~2.346)	1.20 (0.668~2.156)

Statistically significant : phytic acid M and Sodium phytate M
phytic acid F and Sodium phytate F

1) by Moving Average method

2. LD₅₀

結果は Table 2 に示す通りである。死亡開始時間は、フィチン酸、フィチン酸ナトリウムとも 1~3 時間とわりに早く、最多死亡時間 (peak) は、フィチン酸においては 2~3 時間、フィチン酸ナトリウムにおいては 5~7 時間であった。データは示さなかったがフィチン酸投与の雄において 15 時間に小さい peak が見られた。死亡例

の大多数は 24 時間以内に致死した。LD₅₀ はフィチン酸では雄 (0.405~0.50g/kg B. W.), 雌 (0.480g/kg B. W.), フィチン酸ナトリウムでは雄 (1.03~1.13g/kg B. W.), 雌 (1.672~1.20g/kg B. W.) であり、雌雄の間に著しい差は認められなかったが、フィチン酸とフィチン酸ナトリウムの間には統計学的に有意な差異が認められた (p < 0.05)。今回、dose の選択の関係上 Lich-

Table 3. Organ Weight after 7 days Administered with Phytic Acid in Rats

Sex	Dose mg/kg PO	No. of Rat PO	B. W.(g)	Heart	Liver	Kidney		Spleen	Adrenal		Lung
				mg mg/100g ²⁾	g g/100g	mg(L) mg/100g	mg(R) mg/100g	mg mg/100g	mg(L) mg/100g	mg(R) mg/100g	mg mg/100g
Male	0	5	201.67± 1.53 ¹⁾	643.33±25.17	8.03±0.53	716.67±1.55	730.00±10.00	456.67±25.17	17.66±2.136	15.88±1.313	696.67±41.633
				318.96±10.19	3.98±0.24	355.36± 4.07	361.98± 3.78	226.49±13.57	8.76±1.012	7.87±0.608	345.46±20.637
	460	4	215.75±20.40	632.50±57.95	8.98±0.91	830.00±99.33	820.00±114.02	505.00±78.53	15.54±2.264	17.07±1.529	772.50±20.616*
				294.01±24.88	4.16±0.17	384.04±12.47**	379.32± 23.51	236.60±52.12	7.28±1.387	7.99±1.173	360.33±34.260
	400	2	215.50± 3.54	600.00± 0.00	9.47±0.13*	820.00±14.14**	780.00±28.28	520.00±56.57	17.34±1.612	15.35±2.008	780.00±28.284
				278.64± 4.57	4.40±0.13	380.51± 0.32**	361.89± 7.19	241.55±30.21	8.05±0.880	7.13±1.049	362.11±19.066
	384	2	219.50±21.21	665.00±21.21	8.66±0.11	840.00±14.14**	810.00±14.14**	485.00± 0.07	19.69±0.134	18.67±1.747	755.00±21.213
				303.02±12.59	3.95±0.09	382.74±10.14*	369.01± 2.88	220.98± 5.36	8.97±0.025	8.51±0.878	353.01± 6.252
	303	3	213.33± 4.16	640.00± 0.00	8.73±0.38	738.33±40.42	773.33±23.09	463.33± 5.77	16.35±2.819	17.57±1.013	746.67±40.415
				300.08± 5.51	4.09±0.13	367.35±21.95	362.46± 4.27	217.25± 5.57	7.66±1.346	8.24±0.575	350.18±22.638
	263	5	213.60±10.43	670.00±49.50	8.39±0.61	838.00±69.43*	810.00±74.50	466.00±34.35	15.92±1.384	17.86±0.726*	734.00±45.056
				313.47±11.96	3.91±0.12	391.95±16.97	378.80±23.37	218.07±10.10	7.46±0.584	8.38±0.586	343.55±10.093
Female	0	5	147.00±14.44	492.00±43.24	5.19±0.49	578.00±49.19	550.00±55.68	346.00±15.17	21.69±3.555	21.08±1.840	582.00±50.695
				335.13±12.23	3.50±0.05	393.81±16.50	374.13± 8.57	236.50±15.65	14.70±2.448	14.40±1.332	396.83±25.413
	609	2	135.00± 7.70	490.00±14.14	5.31±0.14	600.00±56.57	590.00±70.71	315.00±21.21*	22.24±4.469	22.20±2.531	620.00±28.284
				363.19± 8.55	3.94±0.31	443.96±18.65	436.26±29.53	233.24± 3.50	16.58±4.179	16.52±2.740	460.44±45.068
	529	2	137.50±10.61	500.00±28.28	5.26±0.54	590.00±42.43	580.00±28.28	325.00± 7.07**	20.71±1.308	19.09±2.036	615.00±106.066
				363.93± 7.50	3.82±0.10	429.18± 2.25	422.28±12.00	236.87±13.13	15.14±2.119	13.97±2.559	445.62±42.764
	460	2	136.50±12.02	470.00±14.14	5.32±0.72	570.00±14.14	525.00±49.50	345.00± 7.07	21.39±0.707	18.52±0.290	600.00±14.142
				345.20±20.04	3.89±0.19	419.69±47.32	387.72±70.41	253.50±17.14	15.71±0.865	13.61±0.986	440.81±28.460
	400	4	132.75± 7.18	457.50±35.00	4.90±0.29	535.00±41.23	540.00±53.54	320.00±18.26*	19.10±2.588	19.08±2.915	632.50±49.917
				344.59±15.07	3.69±0.07	403.09±23.82	406.56±30.72	241.29±13.03	14.44±2.301	14.38±2.102	476.70±31.965
	384	4	136.75± 8.78	487.50 ± 12.58 ± 4.42±0.47*	557.50±49.92	555.00±33.17	335.00±30.00	21.91±2.093	19.77±2.473	702.50±49.917**	
				357.19±15.20	3.22±0.14**	407.25±13.85	406.18±16.46	245.00±16.98	16.02±1.221	14.45±1.499	514.37±33.634**
303	5	136.60±8.11	482.00±19.24	4.38±0.25*	556.00±20.02	556.00±18.17	338.00±21.68	21.96±1.297	20.93±1.280	700.00±77.136*	
			353.91±26.51	3.21±0.12*	408.14±30.30	408.06±24.72	247.39± 3.58	16.16±1.824	15.39±1.657	511.68±36.426**	
263	5	131.60±12.82	468.00±19.24	4.21±0.55*	556.00±44.50	558.00±51.70	334.00±37.82	21.92±3.031	20.79±2.340	674.00±55.498*	
			357.41±23.78	3.19±0.19**	423.25±14.69	424.25± 8.06	261.24± 8.18	16.65±1.440	15.83±1.495	512.96±15.265**	

1) Mean ± S. D. * p < 0.005 ** p < 0.001

2) Body weight

Table 4. Organ Weight after 7 days Administered with Sodium Phytate in Rats

Sex	Dose mg/kg	No. of Rat	B. W.	Heart	Liver	Kidney		Spleen	Testis(Ovary)		Adrenal		Lung	
				mg mg/100g ²⁾	g g/100g	(R)mg mg/100g	(L)	mg mg/100g	(L)mg mg/100g	(R)	(L)mg mg/100g	(R)	mg mg/100g	
Male	0	5	240.0±7.04 ¹⁾	762.40±33.84	9.78±0.30	800.80±37.41	828.80±38.12	518.80±32.11	1384.40±34.68	1229.00±244.24	17.78±1.84	16.06±2.20	812.60±47.36	
				317.62±8.37	4.08±0.15	333.58±8.37	354.30±10.58	216.05±9.02	577.17±20.30	510.93±95.79	7.40±0.69	6.70±0.94	338.37±10.82	
	460	2	208.0±9.90*	646.00±19.80**	9.03±0.58*	749.00±62.23	720.05±85.56*	495.00±43.84	1273.50±3.54**	1217.00±1.41	20.15±0.78	18.00±1.56	747.50±10.61	
				310.70±5.27	4.34±0.07	359.79±12.79*	345.81±24.68	237.75±9.76*	612.99±30.87	585.78±28.56	9.69±0.09*	8.65±0.35**	359.66±12.02	
	400	1	200	681.00	9.05	723	718	484	1155	1220	21.70	19.30	800	
				340.50	4.52	361.50	359.00	242.00	577.50	610.00	10.85	9.65	400.00	
	348	5	230.6±13.94	700.00±47.27	9.55±0.69	809.60±43.38	791.40±81.04	531.00±76.79	1368.40±50.29	1328.40±57.60	18.90±0.59	16.80±0.60	819.60±26.60	
				303.53±8.37*	4.14±0.18	351.50±17.25	342.64±17.25	230.89±37.06	594.23±21.45	576.92±26.85	8.21±0.39*	7.30±0.29	356.27±21.07	
	Female	0	5	151.6±3.85	504.60±13.52	5.47±0.16	549.80±15.40	530.20±11.10	364.40±23.60	24.86±4.01	26.84±2.89	20.98±1.14	18.80±1.35	609.00±18.93
					332.90±7.10	3.61±0.09	362.82±12.54	349.98±13.67	240.24±11.16	16.41±2.78	17.72±2.03	13.78±0.83	12.40±0.87	401.72±7.72
609		1	148.00	527	6.36	560	530	342	22.80	27.20	23.20	21.80	671	
				356.08	4.30	378.38	358.11	231.08	15.41	18.38	15.68	14.73	453.38	
529		2	146.5±13.44	510.00±14.14	5.41±0.27	585.50±43.13	571.50±26.16	352.00±55.15	26.15±3.18	26.85±0.21	20.70±2.26	19.55±4.17	646.00±19.80	
				349.15±22.37	3.70±0.16	399.99±7.24**	390.93±17.99*	239.55±15.68	18.03±3.83	18.41±1.83	14.12±0.25	13.27±1.13	442.20±27.07*	
400		4	144.5±5.20	521.75±10.05	5.62±0.17	594.25±13.23**	579.50±6.95**	399.00±19.36	26.30±4.10	26.58±2.46	21.88±1.55	20.65±0.31**	619.25±31.87	
				349.26±11.94*	3.77±0.22	397.81±14.95**	387.95±13.33**	226.67±7.43	17.62±2.96	17.82±2.19	14.67±1.48	13.83±0.57	414.47±22.89	
348		1	143	490	5.34	582	602	363	26.9	27.8	23.6	22.4	643	
				346.85	3.73	406.99	420.98	253.85	18.81	19.44	16.50	15.66	479.65	

1) Mean ± S. D. * p<0.005 ** p<0.001

2) Body weight

field-Wilcoxon 法では算出できない場合があったが Moving Average 法により算定した。Table 2. に示した如く、Moving Average 法と Lichfield-Wilcoxon 法はほぼ同様な LD₅₀値が算定できることが明らかになった。

3. 剖検所見

フィチン酸、フィチン酸ナトリウムにおいて、剖検所見に大差なく、大体以下の如くであった。

死亡例では、肝臓、脾臓が暗赤色を呈し、胃はパンパンに膨張拡大し、外部から暗赤色の液体が充満しているのがよく観察できた。また、腺胃部よりの出血が認められ、十二指腸、回腸、空腸まで出血ないし血液を含んだ液体で、暗色～黒色をしていた。

生存例の7日後の剖検では、フィチン酸において心臓、脾臓、腎臓の表面が粗面を呈したものが散見され、腺胃部分に出血の跡ならびに潰瘍が散見された。

4. 生存例(投与7日後)の臓器重量

生存例について、投与7日後に屠殺、臓器を摘出し、投与前日に除餌しただけのものを対照とし、臓器重量を秤量し比較検討した。各臓器の絶対重量ならびに体重比重量(体重100g当りの重量)はTable 3, 4に示した如くである。全体を通じて著しい変化はなかったが、フィチン酸投与の雄の腎臓(左, 右)において絶対重量、体重比重量において用量との明らかな関係はないが対照に比し重量増加ないし増加傾向が、フィチン酸ナトリウム投与の雌の心臓において、絶体重量が用量増加により重量減少を生じることが認められた(一部生存例が1例のため統計的に検定できなかったが、値は明らかに減少を示した)。その他の臓器については、一定の変化を示したものはなかった。

考 察

フィチン酸は天然食品添加物(抗酸化剤)の一つとして、今後増々使用量、範囲の増加拡大が予想される。今回、フィチン酸の毒性試験の一環としてラットを用いて経口投与により急性毒性を検討した。また、合せてフィチン酸の塩としてフィチン酸ナトリウムについても行った。

LD₅₀値については、これまでラット経口におけるデータはほとんどなく、比較検討はできないが、フィチン酸においては雄0.405, 0.50g/kg B. W., 雌0.480g/kg B. W., フィチン酸ナトリウムにおいては雄1.03, 1.13g/kg, 雌1.20, 1.672g/kgで、Hodge⁴⁾らのラットにおける経口毒性の程度をLD₅₀値により分類し、ヒトへの推定致死量の算定によれば、その毒性の程度は大むね小(slightly toxic)であるといえる。今回用量の選択が狭

かったために Lichfield-Wilcoxon³⁾法で LD₅₀値が算定できなかったものに対して LD₅₀値のみ Moving Average²⁾法を用いて LD₅₀値を算定したが、両者の間に著しい差はなかった。最近の動物を使用する実験研究に対する批伴等を考えると、LD₅₀値の算定に対しては Moving Average³⁾法により算定することも一つの方法であると考ええる。

死亡時間については、死亡開始時刻はフィチン酸、フィチン酸ナトリウムともに早く、peak はフィチン酸は2, 3時間目、フィチン酸ナトリウムは5~7時間とフィチン酸ナトリウムの方が多少遅かったが大きな差はないものと思われる。また最終死亡時刻はかなりバラツキが見られたが、ほとんどの動物は24時間以内に死亡しており、偶然生き残ったものが生存したものであり、代謝物、腸肝循環による作用の可能性はほとんどないものと思われる。

フィチン酸、フィチン酸ナトリウム投与ラットの死亡例の剖検より死因を明確に特定することはできないが、症状等より双方共通場所の消化管への局所作用としては、刺激作用で下痢、胃腸管の出血、充血、粘膜の変性が見られた。著明ではないが投与直後より数時間にわたってみられた鎮静は中枢性のものかあるいは消化管系に対する作用の結果としての脱力によるものかは不明である。

臓器重量については、全体通して一定変化を示したものはみられなかった。

今回比較の意味でフィチン酸とその酸性を中和したフィチン酸ナトリウムを使用し検討を行ったが、症状、剖検所見等において大きな差はみられなかったが、LD₅₀値について、雄どうし、雌どうし検討したところ、フィチン酸とフィチン酸ナトリウムの間には有意なる差が認められた。すなわちフィチン酸の方がフィチン酸ナトリウムよりも強かった。これはフィチン酸は構造上リン酸基が12ケあり強力な酸性を示すのに対し、フィチン酸ナトリウムは、その酸性が中和されているため毒性が弱くなったものと考えられる。

結 論

フィチン酸ならびにフィチン酸ナトリウムの経口急性毒性をラットを用いて検討し、次の結論を得た。

1. LD₅₀値は、フィチン酸(雄0.405, 0.50g/kg B. W. 雌0.480g/kg B. W.), フィチン酸ナトリウム(雄1.03, 1.13g/kg B. W., 雌1.20, 1.672g/kg B. W.)であった。フィチン酸、フィチン酸ナトリウムそれぞれ雌雄の間には間はなかったが、フィチン酸とフィチン酸ナ

トリウムの間には雌雄とも有意なる差が認められた ($p < 0.05$).

2. 症状はフィチン酸, フィチン酸ナトリウムともに下痢と鎮静状態がみられた.

3. 死亡例の肉眼的変化はフィチン酸, フィチン酸ナトリウムともに胃腸管系に強くみられた (出血, 充血).

4. 以上の結果にもとづいて二三の考察を行い Hodgeらの分類に従いフィチン酸ならびにフィチン酸ナトリウムの経口急性毒性の程度を小 (slightly toxic) と考えた.

文 献

1) Ito, N., Fukushima, S., and Tsuda, H. : CRC Critical

Reviews in Toxicology, Vol. 15, Issue 2, 109-150, 1984.

2) Lichfield, J.T.J.R. and Wilcoxon. F. : *J. pharmacol. Exptl. Therap.*, 96, 99, 1949.

3) Shayne C. Gad and Carrol S. Weil : Principles and Methods of Toxicology, Ed. Hayes A. Wallace, 273-320, 1982, Raven Press, New York.

4) Hodge, H. and Stener J.H. : Deichmann W.B. and Gerace H.W. Toxicology of Drugs and Chemicals, 1969, Academic Press, New York.