

マウスを用いたフィチン酸の催奇形性試験

小 縣 昭 夫*, 安 藤 弘*, 久 保 喜 一*, 佐々木 美枝子*,
細 川 奈津子**

Teratological Studies of Phytic Acid in ICR Mice

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*, MIEKO SASAKI*
and NATSUKO HOSOKAWA**

Phytic acid (PA) used as an antioxidant of food additives was tested for teratogenicity in Jcl: ICR mice. Pregnant Jcl: ICR mice were given orally, 0, 1.6, 3.1 or 6.3% PA aqueous solution 10ml/kg/day on day 7 through day 15 of gestation. All fetuses were removed from the uterus on day 18 of gestation, and were examined for external and skeletal anomalies.

Although no clear teratogenic effect of PA was observed with external and skeletal malformations, the incidence of late resorbed fetuses increased by the repeated treatments with PA during days 7-15 of gestation, and the foetal body weight decreased significantly in a dose-dependent manner. These effects were considered as toxicities of large quantities of PA on dams. In our preliminary result, however, skeletal malformations (fusion of lumbar vertebrae) were observed in five fetuses from one dam which had been given a single oral administration of 12.5% PA aqueous solution on day 9 of gestation.

A further experiment would be necessary for the assay of teratogenicity of PA, such as a single administration of large quantities (over 12.5%) of PA during the stage of organogenesis.

Keywords : phytic acid, teratogenicity, ICR mice

はじめに

フィチン酸はミオイノシトールのヘキサリン酸エステルで、広く植物界に存在する有機リン酸化合物である。植物中では、種子・穀類・胚芽・ぬかに多く含まれている。フィチン酸の性状のひとつに金属封鎖作用があり、この作用を利用して食品の変退色防止・酸化防止・ビタミンCの安定化などの目的に用いられている¹⁾。

フィチン酸の催奇形性に関する報告はないが、本物質は体内でミオイノシトールとリン酸となることから、いくつかのリン酸化合物については催奇形性試験が行われており何れも陰性の結果を示している²⁻⁴⁾。

しかしながら、最近、当部吉田らの行ったフィチン酸を用いた染色体試験では、in vitro, in vivo の何れにおいても陽性の結果が示されている（未発表）。

本試験は、染色体異常誘発物質と催奇形物質とは重なり合う部分が多いことを考慮し、妊娠マウスを用いフィチン酸の催奇形性について検討した。

試験材料ならびに方法

1. 実験動物 Jcl: ICR マウス雌雄を日本クレア(株)より4週齢時に購入、8-13週齢（体重28.0-37.0g）に達した発育良好なものを選び試験に供した。

2. 飼育条件 温度24-26℃、湿度45-55%、照明午前6時-午後6時、換気毎時10回の飼育室にて日本クレア製固型飼料 CE-2および水道水を自由に与え、試験開始（交配）時までアルミケージに10匹、交配後はプラスチックケージにて1匹飼いとしたり、ただし雄マウスは受配前1週間より1匹飼いとしたり。

3. 交配方法 1:1 終夜同居により、翌朝陰栓の確

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 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

**現同環境保健部水質研究科

認められたものを妊娠動物とみなし、その日を妊娠0日とした。

4. 試料 フィチン酸 (Phytic Acid (PA)), 50%水溶液, Lot No. 840710は三井東圧化学(株)より供与されたものを用い, 溶媒には蒸留水を使用した。

5. 試料投与量および投与方法 妊娠7日より15までの9日間毎日1回経口投与を行った。妊娠マウスを4群(1群21-24匹)に無作為に割当, 高濃度群はフィチン酸6.3%水溶液10ml/kg投与, 中濃度群3.1%液投与, 低濃度群1.6%液投与, 対照群は蒸留水10ml/kg投与とした。

6. 観察方法 体重測定および一般状態の観察を毎日行い, 妊娠18日にエーテルにより麻酔屠殺し, 次の検索を行った。屠殺後直ちに開腹, 子宮を開き着床痕, 早・後期死亡胎児, 生児数を数え, 生児は体重測定, 性の判別を行い外表の異常を点検, 次に母体の卵巣の黄体数を数え, 主要器官の重量測定と肉眼的異常の有無を検索した。生児は, 95%エチルアルコールで固定後アリザリンレッドSで骨格染色⁵⁾を行い骨格異常の有無を調べた。

7. 結果のまとめ方 西村の報告⁶⁾に準拠して行った。

結果および考察

1. 母体の所見

1) 体重および一般状態: 妊娠0日の体重を100とした体重増加率の推移は図1に示す通りで, フィチン酸投与群と対照(蒸留水のみ投与)群との間に推計学的有差は認められなかった。しかし6.3%投与群では投与初期(妊娠8・9・10日)に体重の増加抑制傾向が認められ, その後回復する様子を呈したが, 投与終了後の体重増加の伸びは対照群に較べ鈍かった。その傾向は3.1%投与群にも見受けられた。妊娠18日迄に死亡した母体は6.3%投与群15例, 3.1%投与群2例で, 6.3%群は妊娠9日1例, 10日2例, 11日3例, 12日4例, 13日2例, 15日1例, 16日2例が死亡, 3.1%群は妊娠13日, 15日に各々1例が死亡した。生存した母体の一般状態では, 6.3%群に投与期間中立毛を呈する動物がみられ, 行動にも活発な動きはみられなかった。

2) 剖検所見および臓器重量: 妊娠18日に屠殺開腹した剖検所見では, いずれの投与群にも特記する変化を認めなかった。主要臓器重量は表1に示す通りで, 対照群と較べ6.3%投与群の心臓が絶対重量で軽, 副腎(右)が相対重量で重, 3.1%群副腎(右)が絶対・相対重量とも重, 1.6%群心臓が絶対重量で軽の推計学的に有意な値を示したが, いずれの臓器においても投与との関連を明確に示す変動はみられなかった。

2. 胎児に係わる所見

1) 妊娠の成立: 妊娠(着床)成立を確認した母体は6.3%投与群9/9(100%), 3.1%群18/20(90%), 1.6%群21/22(95.5%), 対照群17/21(81%)で, 妊娠成立した母体は6.3%群の1例(全胎児の早期死亡)を除いて総てに生児を認めた(表2)。

2) 妊娠黄体数, 着床数, 生児数, 死亡児頻度(早・後期)および性比: 各投与群において妊娠黄体数, 着床数, 生児数および性比に推計学的有意差を示すものではなく, また用量に伴う変動傾向も認められなかった。死亡児頻度では, 1.6%投与群の後期死亡児頻度が対照群に較べ推計学的に有意に高かった。また3.1%群, 6.3%群でも有意ではないが, 当部でのこれまでの自然発生の後期死亡児発生率(2%以下)と較べてやや高い値を示していた。

3) 生児体重: フィチン酸投与群の雄生児体重では処置群すべて推計学的に有意なまた用量に関連した体重の低下が認められた。雌では3.1%投与群のみが推計学的に有意な低下であったが, 他の投与群も小さい傾向を示した。

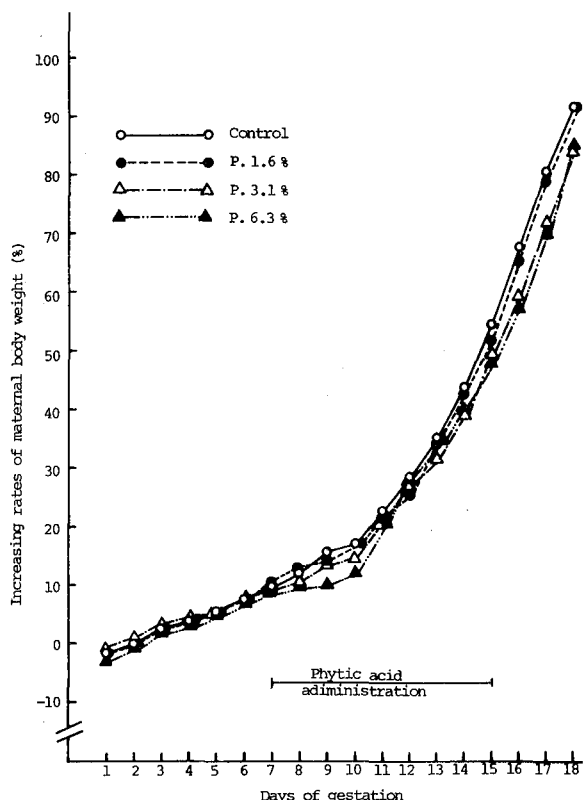


Fig. 1. Increasing Rate of Maternal Body Weight

Table 1. Organ weight of mother mice given 1.6-6.3%
Phytic acid/kg/day orally on days 7-15 of gestation

Concentration	No. of dam	Liver g g/100g	Heart mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Kidney(L) mg mg/100g	Kidney(R) mg mg/100g
Control	17	2.9±0.3 ¹⁾ 8.8±0.8 ²⁾	144.4±11.9 435.9±30.3	124.3±18.1 376.6±61.2	234.7±25.3 709.0±74.3	246.1±28.4 742.9±79.3
P.A. 1.6 %	21	2.9±0.2 8.9±0.9	136.7±10.8* 417.2±45.2	117.9±24.7 361.1±87.8	227.6±20.0 692.6±61.5	236.8±19.8 720.6±59.0
P.A. 3.1 %	18	2.9±0.4 8.7±1.1	142.8±15.4 432.3±39.7	117.1±32.2 354.8±97.0	231.7±19.9 703.7±73.2	247.9±21.5 751.9±68.7
P.A. 6.3 %	8	2.7±0.4 8.5±0.9	130.6±13.2* 410.1±39.9	121.4±48.9 372.1±123.4	229.1±28.9 719.8±90.7	236.6±20.6 743.2±63.9
Concentration	No. of dam	Lung mg mg/100g	Adrenal (L) mg mg/100g	Adrenal (R) mg mg/100g	Ovary (L) mg mg/100g	Ovary (R) mg mg/100g
Control	17	187.9±16.6 567.0±37.6	3.9±0.7 11.8±2.0	3.4±0.6 10.1±1.5	11.1±1.8 33.7±5.5	12.3±2.7 37.1±7.6
P.A. 1.6 %	21	189.9±18.4 577.7±54.5	3.9±0.5 12.0±1.8	3.7±0.6 11.1±2.0	11.1±2.1 34.1±8.0	13.3±5.2 41.3±19.2
P.A. 3.1 %	18	190.2±15.0 576.0±30.3	3.9±0.6 11.9±1.7	3.9±0.7* 11.9±2.1**	11.0±2.4 33.3±7.4	11.8±1.6 35.9±4.8
P.A. 6.3 %	8	186.3±19.4 586.3±69.9	3.7±0.7 11.7±2.9	3.8±0.7 12.1±2.2*	11.3±1.7 35.3±5.5	11.1±2.4 34.8±7.0

1) Mean(absolute)±SD

2) Mean(relative)±SD

*p < 0.05 **p < 0.01

Table 2. Effect of 1.6-6.3% Phytic acid (P. A.) /kg/day given orally to pregnant ICR mice on days 7-15 of gestation

Reproductive parameter	P.A. concentration(%)	Number, percentage or weight observed			
		0	1.6	3.1	6.3
Females mated [†]		21	22	22	24
Females died [†]		0	0	2	15
Females gestated [§]		17	21	18	9
Females with > 1 live foetus		17	21	18	8
Corpora lutea/litter #		16.7±2.1	16.9±2.6	16.2±1.9	16.0±1.1
Implantations/litter #		15.5±2.6	15.3±2.5	15.3±2.2	15.6±1.3
Resorption of foetuses (%) # [¶]					
Early		6.0±7.1	2.4±4.2	3.7±5.9	4.9±4.5
Late		0.8±2.3	3.8±4.2*	4.2±7.5	3.5±6.7
Live foetuses/litter #		14.5±3.1	14.3±2.5	14.2±2.4	14.4±1.8
Body wt of live foetuses (g) #					
Male		14.4±0.08	1.37±0.07**	1.32±0.14**	1.27±0.22**
Female		1.37±0.11	1.33±0.07	1.27±0.13*	1.24±0.23

[†] No. with vaginal plug.

[†] No. that died before scheduled kill on day 18.

[§] No. with implantation sites.

Values given as mean ± 1 SD for litter having one or more live foetuses.

[¶] 'Early' defined as cases showing implanted sites and amorphous germinal mass, late defined as cases showing the head and limbs. Values for per cent resorption and foetal body weight were obtained by averaging the value for each litter. Values marked with asterisks are significantly different from the corresponding control value (*P < 0.05; **P < 0.01) as determined by the following statistical tests: chi-square test (females mated, died, gestated or having > 1 live foetus); t test (corpora lutea, implantations, live foetuses and foetal body weight); rank sum test (resorption).

Table 3. Incidence of external malformation or anomaly in fetuses of ICR mice given 1.6-6.3% Phytic acid (P. A)/kg body weight/day orally on days 7-15 of gestation

Observation	P.A. concentration(%)	Incidence of malformation or anomaly			
		0	1.6	3.1	6.3
External malformations					
No. litters with malformed fetuses/no.examined -(%)		2/17 (11.8)	2/21 (9.5)	1/18 (5.6)	2/8 (25.0)
Malformations (%) †		1.0±2.8	0.6±2.0	0.3±1.3	4.6±9.2
No. malformed fetuses/no.examined		3/247	2/301	1/255	6/115
No. of fetuses with:					
Cleft palate		0	1	0	5
Exencephalia		0	0	1	1
Open eyelids		3	1	0	0
External anomalies					
No. litters with anomalous fetuses/no.examined -(%)		1/17 (5.9)	0/21 (0)	0/18 (0)	1/8 (12.5)
Anomalies (%) †		0.4±1.4	0	0	0.9±2.5
No. anomalous fetuses/no.examined		1/247	0/301	0/255	1/115
No. of fetuses with:					
Crab foot		1	0	0	1

† Calculated by averaging the percentage in each litter (i.e. no. of malformation/no. of fetuses), and shown as mean ± 1 SD.

Table 4. Incidence of skeletal malformation, variation or ossification in fetuses of ICR mice given 1.6-6.3% Phytic acid (P. A.) /kg body weight/day orally on days 7-15 of gestation

Observation	P.A. concentration(%)	Incidence of malformation, variation or ossification			
		0	1.6	3.1	6.3
No. litters with malformed fetuses/no. examined - (%)		0/17 (0)	1/21 (4.8)	1/18 (5.6)	0/8 (0)
Malformations (%)		0	0.3±1.4	0.4±1.5	0
No. malformed fetuses/no. examined		0/247	1/300	1/255	0/115
No. of fetuses with:					
Fusion of vertebral arches		0	1	1	0
Variation					
Type & percent variation ± SD					
Asymmetry of sternbrae		7.7±7.6	10.4±9.2	8.4±7.7	13.8±11.6
Accessory of sternbrae		15.0±26.6	11.6±13.1	3.0±5.5	5.9±7.7
Cervical rib		22.0±24.3	18.1±22.0	25.0±22.8	19.2±28.5
14th rib		36.3±32.9	37.3±27.8	19.7±24.1	24.9±23.9
Splitting & branching of atlas & axis		30.4±23.4	19.8±14.9	28.6±28.3	25.3±16.2
Abnormalities in number of pre-sacral vertebrae		0.4±1.5	0	1.2±2.9	6.0±11.6
Separation or defective development of sternbrae		7.7±17.5	1.1±3.5	3.1±3.6	19.2±33.7
Ossification					
Mean number of ossified fore limb phalanx ± SD [(Pro. Mid.)/2]					
L		3.0±0.7	2.9±0.7	2.8±0.6	2.4±1.1
R		3.1±0.7	3.0±0.6	2.8±0.6	2.4±1.2
Mean number of ossified hind limb phalanx ± SD [(Pro. Mid.)/2]					
L		2.8±0.8	2.7±0.5	2.4±0.6	2.1±1.2
R		2.9±0.7	2.7±0.5	2.5±0.6	2.1±1.3
Mean number of ossified post lumbar vertebrae ± SD		12.9±1.4	12.8±1.5	12.1±1.8	11.2±2.4

4) 生児外表奇形・異常：結果は表3に示した。発現した奇形・異常の型はどれも自然発生奇形・異常としてよくみられるものであった。6.3%投与群でみられた口蓋裂奇形児5例は4例までが1匹の母体で発現していた。

5) 骨格奇形・変異・化骨進行度：奇形の発現は、1.6%群、3.1%群に腰椎弓の癒合が各々1例であった。変異を有するものの発現頻度では、各投与群において対照群と較べ推計学的有意差を示すものなく、用量に関連した変動もみられなかった。化骨進行度では有意差は認められなかったが、何れの指標においても用量に依存した化骨遅延の傾向がみられた(表4)。

妊娠マウスのフィチン酸6.3%水溶液経口投与(10ml/kg)の致死毒性については、予備試験での1回投与では母体を死に至らしめる毒性効果はみられなかったが、本試験の9回連続投与では投与3回目から死亡がみられるようになり、結果として24例中15例(62.5%)が死亡した。Probit法により求めた本試験(9回投与)でのフィチン酸のLD50は、5.5%, LD1は2.1%水溶液10ml/kgであり、その回帰式は $Y(\text{Probit}) = 5.5X(\text{Log dose}) + 0.9$ となった。この式からもわかるように勾配が大きく、フィチン酸は量-作用関係の幅が非常に狭いといえる。

本実験では、フィチン酸6.3%(LD50値以上の量)を与えた群を設けまだ報告のないフィチン酸の催奇形性について、妊娠マウスを用い臨界期連続経口投与により胎児に対する影響を調べたが、外表・骨格奇形共にフィチン酸投与によると思われる明確な結果は得られなかった。今回みられた後期死亡児の処置群における増加傾向および胎児体重の低下はおそらくフィチン酸大量連続投与による母体への毒性効果の結果と考えられる。

通常考えられている催奇形性試験では、本試験のごとく妊娠動物の器官形成期を十分に包含する期間を設けて化学物質を連続的に投与するが、一般的には、発生中の胎芽にとって慢性投与よりも急性投与計画のほうが強い

催奇形の浸襲であると言われており、また連続では投与できない大量を投与できる。そこで単一投与の予備試験としてフィチン酸12.5%、および6.3%水溶液10ml/kgを各群5匹の妊娠マウスに、妊娠9日1回経口投与を行い外表および骨格奇形の発現の有無を調べた。各投与群共にこの投与時期に依存した外表奇形はみられなかったが、骨格奇形では12.5%投与群に5例中1例の母体で腰椎弓の癒合を持った5匹の胎児が発現した。この腰部の骨癒合は投与時期と相関があることまた、骨格癒合奇形の発現は外表奇形よりも薬物に対する感受性が高いとされている。吉田らの実験によれば、フィチン酸はin vivoでの投与でチャイニーズ・ハムスター骨髓細胞に染色体異常を誘発するが(私信)、この投与量は、上記1回投与予備試験で用いた量よりも大量であることを考慮すると、動物種差の問題はあるとしてもフィチン酸の妊娠マウスの催奇形性の可能性については今回の連続投与試験の結果からだけでは否定出来ない。

フィチン酸の催奇形性の有無については、1回大量投与法による催奇形性試験での確認が必要と考えられる。

文 献

- 1) 東京都生活文化局：食品添加物の安全性に関する文献調査(その7), 118-120, 1985
- 2) FDA : Teratologic Evaluation of FDA 71-46 (Sodium Tripolyphosphate, Anhydrous), NTIS, PB-221, 808, 1973
- 3) FDA : Teratologic Evaluation of FDA 71-61 (Sodium Acid Pyrophosphate), NTIS, PB-223, 831, 1973.
- 4) FDA : Teratologic Evaluation of FDA 73-3, Sodium Hexametaphosphate in Mice and Rats, NTIS, PB-245, 535, 1974
- 5) Dawson, A.B.: Stain Tech., 1, 123-124, 1927
- 6) 西村秀雄：先天異常, 16, 175-185, 1976