

モルホリン脂肪酸塩の ラットを用いた経口投与による催奇形性試験

酒見和枝[#], 宇佐見 誠, 紅林秀雄, 大野泰雄

Teratogenicity study of morpholine salts of fatty acids (oleic acid, 50% water solution) in rats by oral administration

Kazue Sakemi[#], Makoto Usami, Hideo Kurebayashi and Yasuo Ohno

Teratogenicity of morpholine salts of fatty acids was examined in Wistar rats (Crj : Wistar). Morpholine salts of fatty acids (oleic acid, 50% water solution) was given to pregnant rats by gavage once a day from day 6 through day 15 of pregnancy at doses of 0, 234, 468 and 936 mg/kg/day. The pregnant rats were sacrificed on day 20 of pregnancy and their fetuses were examined for malformation. Morpholine salts of fatty acids caused nasal discharge, dirty nose and salivation in pregnant rats at doses from 234 mg/kg/day. However, fetal effects, such as malformation and growth retardation, were not observed even at 936 mg/kg. It was concluded that morpholine salts of fatty acids has no teratogenicity in rats when given by oral administration. The no-observed-adverse-effect level was 936 mg/kg/day for rat fetuses and less than 234 mg/kg/day for pregnant rats.

Keywords: morpholine salts of fatty acids, food additive, Wistar rat, teratogenicity, developmental toxicity

緒 言

モルホリン脂肪酸塩は、果実、果菜の被膜剤として使用される。被膜剤は、果実および果菜の呼吸および水分の蒸発を抑制することを目的として、果実および果菜に対する噴霧又は浸漬処理により使用される。また、外傷、汚染、菌の進入の防止、鮮度の保持および貯蔵性の向上等に役立つ。食品添加物としては、被膜剤以外の用途に用いることは出来ない。安全性に関しては、構造の一部であるモルホリンについて変異原性および発がん性が調べられている²⁻⁸⁾。モルホリンは第二級アミンであるため、発がん性ニトロ化合物の体内生成が疑われたが、変異原性および発癌性試験の結果は陰性であった^{3, 5)}。しかし、モルホリン脂肪酸塩またはモルホリンの催奇形性に関する情報は見当たらないことから、本研究ではモルホリン脂肪酸塩の催奇形性をラットへ経口投与して調べた。

材料および方法

1. 被験物質

モルホリン脂肪酸塩 50% 水溶液 (オレイン酸) は株式会社リレイより入手した。性状は橙黄色粘稠液体で、粘度は 2430 mPa.s (25℃), 比重は 0.936 (25℃), pH は 8.70 である。

2. 動物及び飼育条件

ウイスター系ラット (日本チャールスリバー) の雌 (10 週齢) および雄 (11 週齢) を用いた。未経産の雌を雄と終夜同居させ、翌朝腔垢中に精子が認められたものを試験に供した。妊娠日の起算は精子確認日を妊娠 0 日とした。1 群の妊娠動物数は 21 匹とした。

妊娠動物は、試験期間をとおしてアルミ製ケージで個別飼いし、固形飼料 (オリエンタル酵母, MF) および水道水を自由に摂取させた。動物飼育室内の環境は、温度 25 ± 2℃, 相対湿度 55 ± 5%, 換気回数 15 回/時間, 明暗交代 12 時間 (明期 5:00 ~ 17:00) とした。

3. 用量および投与

モルホリン脂肪酸塩投与群として 234, 468 および 936 mg/kg/day の 3 用量を設定し、対照群を加えて計 4 群とした。

被験物質を、妊娠 6 日の体重に基づいて妊娠 6 ~ 15 日の 10 日間、毎日 1 回、胃ゾンデを用いて妊娠動物に強制

[#] To whom correspondence should be addressed:

Kazue Sakemi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3707-6950; E-mail: sakemi@nihs.go.jp

経口投与した。モルホリン脂肪酸塩投与群には、原液である 50% 水溶液をそのまま投与した。投与液量は、234, 468 および 936 mg/kg/day の各投与群について、それぞれ 0.5, 1 および 2 ml/kg である。対照群には蒸留水 2 ml/kg を同様に経口投与した。

4. 観察方法

妊娠動物の体重および餌重量を妊娠 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 17 および 20 日に測定した。また、一般状態を毎日観察した。妊娠 20 日に妊娠動物を屠殺し、黄体数、着床数および胚・胎児死亡を調べた。生存胎児については、外表の異常および性別を調べ、体重を測定した。各妊娠動物の約 2 分の 1 の生存胎児について Alizarin red S 染色骨格標本を作成し骨格を観察した⁹⁾。残り約 2 分の 1 の生存胎児については内部器官を観察した。内部器官の観察には、頭部および腹部については粗大切片法¹⁰⁾を、胸部については顕微解剖法¹¹⁾を用いた。

5. 統計学的方法

妊娠動物または一腹を標本の単位とした。対照群とモルホリン脂肪酸塩投与群との差の有意性の検定には、度数データについては Fisher の直接確立法を用いた。計量データについては、Bartlett の等分散検定により群間で分散に差がないことを調べた後、分散分析および Scheffé 法を用いた。群間で分散に差が認められた計量データおよび計数データについては、Kruskal-Wallis の H 検定および Scheffé 法を用いた。

結 果

1. 妊娠動物に及ぼす影響

1.1. 一般状態

モルホリン脂肪酸塩投与群において投与 1 日目（妊娠 6 日）から投与 1 時間後および 3 時間後の観察時に、鼻汁お

よび鼻汁によると思われる鼻周囲の汚れが認められた。また、投与 7 日目（妊娠 12 日）からは、流涎がモルホリン脂肪酸塩投与群において認められた。これらの症状は何れも翌日までに回復した。死亡動物は認められなかった (Table 1)。

1.2. 体重および摂餌量

体重には、対照群とモルホリン脂肪酸塩投与群との間に有意差は認められなかった (Fig.1)。

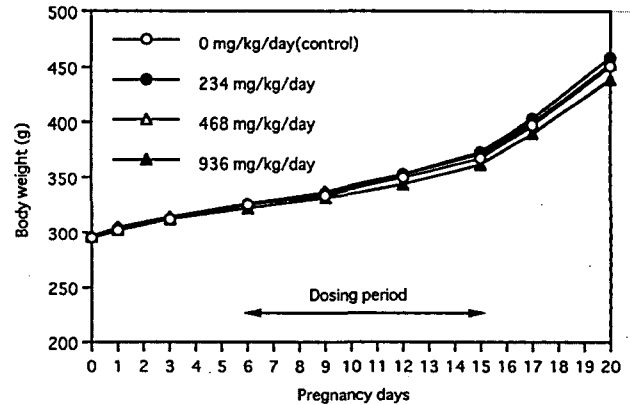


Fig 1. Body weight of pregnant rats treated with morpholine salts of fatty acids

摂餌量には、投与前から他の群に比べて低い傾向が認められていた 936 mg/kg/day 投与群において、投与 4 日（妊娠 9 日）および 7 日（妊娠 12 日）にモルホリン脂肪酸塩投与によると考えられる有意な減少が認められた (Fig.2)。

2. 胎児に及ぼす影響

2.1. 生存胎児数、性比、胎児体重および胚・胎児死亡
黄体数、着床数、着床率、生存胎児数、性比、胎児体重および胚・胎児死亡率には、対照群とモルホリン脂肪酸塩投与群との間に、有意差は認められなかった (Table 2)。

Table 1. Clinical signs in pregnant rats treated with morpholine salts of fatty acids

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	234	468	936
No. of pregnant rats	21	21	21	21
No. of dead pregnant rats	0	0	0	0
No. of pregnant rats with toxic signs	0 (0.0%)	7 (33.3%)**	20 (95.2%)**	21 (100%)**
Nasal discharge or dirty nose	0 (0.0%)	5 (23.8%)*	13 (61.9%)**	15 (71.4%)**
Salivation	0 (0.0%)	2 (9.5%)	18 (85.7%)**	20 (95.2%)**

*, **: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

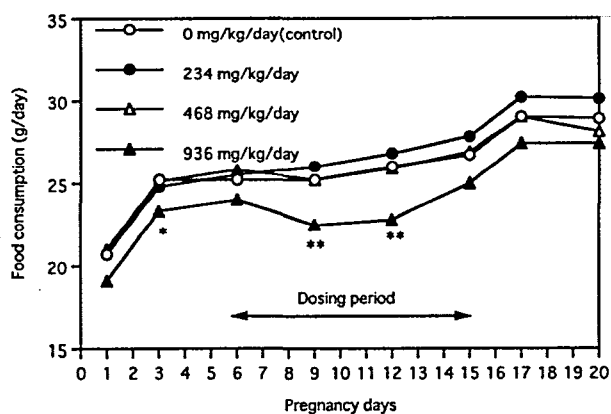


Fig 2. Food consumption of pregnant rats treated with morpholine salts of fatty acids

*, **: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

Table 2. Fetal growth in pregnant rats treated with morpholine salts of fatty acids

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	234	468	936
No. of litters	21	21	21	21
No. of corpora lutea ^a	17.6 ± 1.2	17.4 ± 1.9	17.6 ± 2.6	16.7 ± 1.6
No. of implants ^a	16.9 ± 1.9	16.2 ± 2.1	16.2 ± 1.8	15.8 ± 2.1
Implantation rate (%)	96.0 ± 9.1	93.3 ± 7.7	93.1 ± 10.6	94.3 ± 8.2
No. of live fetuses ^a	15.7 ± 2.5	15.0 ± 2.4	14.9 ± 2.1	14.8 ± 2.4
Sex ratio (male/female)	1.45	1.29	1.28	1.29
Fetal weight (g) ^a				
Male	4.04 ± 0.20	4.11 ± 0.16	4.06 ± 0.23	4.01 ± 0.21
Female	3.79 ± 0.23	3.92 ± 0.15	3.84 ± 0.19	3.80 ± 0.20
No. of dead implants	24	27	28	21
Early death	24	26	28	21
Late death	0	1	0	0
Mortality (%) ^a	7.2 ± 8.4	7.9 ± 8.7	7.8 ± 12.1	6.4 ± 8.0

a : Mean ± S.D. is shown.

Table 3. Gross malformations in the fetuses from pregnant rats treated with morpholine salts of fatty acids

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	234	468	936
No. of litters	21	21	21	21
No. of litters with malformed fetus	0 (0.00%)	2 (9.52%)	0 (0.00%)	1 (4.76%)
No. of examined fetuses	330	314	312	310
No. of fetus with malformation ^a	0 (0.00%)	2 (0.62%)	0 (0.00%)	1 (0.34%)
Polydactyly	0 (0.00%)	1 (0.30%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Club foot	0 (0.00%)	1 (0.30%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Dwarf	0 (0.00%)	1 (0.32%)	0 (0.00%)	1 (0.34%)

a : Mean ± S.D. is shown.

2.2 胎児外表

234 mg/kg/day 投与群において矮小が1例, 内反足および多指が1例, 936 mg/kg/day 投与群において矮小が1例観察されたが, 対照群とモルホリン脂肪酸塩投与群との間に発生率には有意差は認められなかった (Table 3).

2.3 胎児骨格

骨格奇形はいずれの群においても認められなかった (Table 4). 骨格変異の発生率には, 対照群とモルホリン脂肪酸塩投与群との間に有意差は認められなかった. 腰肋および過剰肋骨を有する胎児の発生率においても有意な変化はなかった. また, 骨化の進行度の指標として調べた仙尾椎骨, 中手骨および中足骨の骨化核数にも有意な変化は認められなかった.

Table 4. Skeletal variations in the fetuses from pregnant rats treated with morpholine salts of fatty acids

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	234	438	936
No. of litters	21	21	21	21
No. of fetuses examined	171	162	163	160
No. of fetuses with malformations ^a	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
No. of fetuses with variations ^a	62 (36.4%)	76 (47.4%)	75 (46.5%)	63 (40.7%)
Hypoplastic supraoccipital	26 (15.5%)	21 (13.3%)	20 (12.3%)	18 (12.1%)
Cervical rib	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (2.43%)
Fused cervical vertebral arch	0 (0.00%)	1 (0.53%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Deformed cervical vertebral arch	16 (8.83%)	7 (4.75%)	9 (5.42%)	9 (5.56%)
Deformed sternbrae	8 (4.12%)	8 (4.78%)	5 (2.93%)	8 (4.99%)
Deformed thoracic vertebral body	14 (7.96%)	31 (20.1%)	25 (17.0%)	13 (8.84%)
Wavy rib	4 (2.40%)	6 (4.30%)	14 (8.73%)	10 (6.29%)
Lumbar rib	19 (11.4%)	25 (14.7%)	32 (19.0%)	20 (12.9%)
Extra	0 (0.00%)	2 (1.12%)	4 (2.40%)	0 (0.00%)
Rudimentary	19 (11.4%)	23 (13.6%)	30 (17.9%)	20 (12.9%)
Others	1 (0.60%)	1 (0.95%)	2 (1.19%)	1 (0.43%)
No. of sacro-caudal vertebrae ^b	8.32 ± 0.51	8.41 ± 0.46	8.50 ± 0.56	8.50 ± 0.31
No. of metacarpus ^b	7.75 ± 0.30	7.84 ± 0.18	7.86 ± 0.30	7.90 ± 0.23
No. of metatarsus ^b	8.09 ± 0.17	8.22 ± 0.34	8.25 ± 0.39	8.23 ± 0.37

a : Total number and mean incidence are shown.

b : Mean ± S.D. is shown.

2.4 胎児内部器官

化学物質等の催奇形性試験で多く採用されている試験限界量である 1000 mg/kg/day に近い 936 mg/kg/day 投与群においても、上記の胎児検査項目にモルホリン脂肪酸塩による毒性徴候が認められなかったため、対照群および 936 mg/kg/day 投与群について検査を実施した。その結果、対照群と 936 mg/kg/day 投与群のいずれの胎児にも小奇形が認められたが、発生率には群間で有意差は認められなかった (Table 5)。

Table 5. Visceral malformations in the fetuses from pregnant rats treated with morpholine salts of fatty acids

	Dose (mg/kg/day)	
	0 (control)	936
No. of litters	21	21
No. of fetuses examined	159	150
No. of litters with malformed fetus	8 (38.1%)	11 (52.4%)
No. of fetuses with malformations ^a	11 (6.72%)	17 (10.8%)
Thymic remnant in neck	8 (4.85%)	12 (7.45%)
Dilatation of cerebral ventricle	0 (0.00%)	1 (0.68%)
Diaphragmatic hernia	0 (0.00%)	2 (1.28%)
Hypoplasia of spleen	0 (0.00%)	1 (0.68%)
Dilatation of ureter	2 (1.19%)	1 (0.60%)
Left-sided umbilical artery	2 (1.28%)	2 (1.47%)

a : Total number and mean incidence are shown.

考 察

本試験においては、モルホリン脂肪酸塩の妊娠ラットへの経口投与により、妊娠動物に鼻汁および流涎等の毒性徴候が認められる投与量においても、胚・胎児には影響が認められなかった。この結果から、モルホリン脂肪酸塩には、経口投与においてはラットに対する催奇形性はないと考えられる。

本試験条件下ではモルホリン脂肪酸塩の妊娠ラットに対する無毒性量 (NOAEL) は 234 mg/kg/day 未満であると考えられる。これは低用量においても、妊娠ラットに鼻汁または鼻周囲の汚れが有意に観察され、モルホリン脂肪酸塩投与の影響が認められたからである。

モルホリン脂肪酸塩投与群で、外表または骨格または内部器官に異常のある胎児が認められたが、対照群と比較して発生頻度に有意な差は認められず、また用量依存的な影響もみられなかった。高用量においても被験物質投与による有意なこれらの変化が認められなかったことから、ラット胎児に対する無毒性量 (NOAEL) は 936 mg/kg/day であると考えられる。

文 献

- 1) 石館守三, 谷村顕雄監修: “第7版食品添加物公定書解説書”, 広川書店, 東京 (1999)
- 2) Lijinsky, W.: *Oncology*, **37**, 223-226 (1980)
- 3) 大西孝司: 日衛誌, **39**, 729-748 (1984)
- 4) Surjan, A., Kocsis, Z., Csik, M., Pinter, A., Torok, G., Borzsonyi, M. and Szabad, J.: *Mutat. Res.*, **144**, 177-181 (1985)
- 5) Shibata, M.A., Kurata, Y., Ogiso, T., Tamano, S., Fukushima, S. and Ito, N.: *Fd. Chem. Toxicol.*, **25**, 569-574 (1987)
- 6) Harbison, R. D., Marino, D. J., Conaway, C. C., Rubin, L. F. and Gandy, J.: *Fundam. Appl. Toxicol.*, **12**, 491-507 (1989)
- 7) Perez, A., Fernandez, S. I., Garcia, Roche, M. O., de las Cagigas, A., Castillo, A., Fonseca, G. and Herrera, M.: *Nahrung.*, **34**, 661-664 (1990)
- 8) Kitano, M., Takada, N., Chen, T., Ito, H., Nomura, T., Tsuda, H., Wild, C. P. and Fukushima, S.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 797-806 (1997)
- 9) Dawson, A. B.: *Stain Technol.*, **1**, 123 (1926)
- 10) Wilson, J. G.: "Teratology principles and techniques" (eds. Wilson, J. G. and Warkany, J.) pp.262, The University of Chicago Press, Chicago (1965)
- 11) 西村耕一: 先天異常, **14**, 2-40 (1974)