

全胚培養を用いた天然添加物のマウス胚子に及ぼす影響 . . . チャ抽出物

小 縣 昭 夫*, 安 藤 弘*, 久 保 喜一*, 青 木 直 人*

Effects of Natural Food Additive on Mouse Embryos with the Use of Whole Embryo Culture Method. IV. Tea Extracts

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO* and NAOTO AOKI*

To study the effects of tea extracts (TE) on mouse embryos, whole embryo culture was carried out. On day 8 of gestation (plac day = day 0), CD-1(ICR) mouse embryos were explanted and cultured for 48 hrs. Twenty-four hrs after the start of culture, the cultured mouse embryos were directly exposed to the medium containing 0 (control), 31.25, 62.5, 125 μ g/ml of TE.

Yolk sac diameter, blood circulation in the yolk sac, crown-rump length of the embryo, number of somites, heart beats and the shape of embryos were used as parameters for the development of conceptus including the embryo. No significant difference was observed between the control and the exposed groups on the mean diameter of the yolk sac, the number of somites and the shape of embryos. However, an increased number of embryos with poor development of blood circulation in the yolk sac and the decreased mean number of heart beats were noticed in the group given 125 μ g/ml TE. An embryo with developmental retardation of the first branchial arch was observed in the group treated with 125 μ g TE/ml. These results suggest that a high dose of TE affects the development of mouse embryos, but has no teratogenic effects.

Keywords : マウス mouse, 全胚培養 whole embryo culture, 天然添加物 natural food additive, チャ抽出物 tea extracts

はじめに

近年, 自然・天然志向を背景に食品添加物についても天然添加物の利用, 開発が進んでいる。しかしながら, その安全性に関しては長い使用経験に基づくものであり, 科学的根拠を有するものは少なく, とりわけ次世代に及ぼす影響についての情報はほとんどないのが現状である。

一方, 化学物質の発生毒性を検索する試験は *in vivo* で行うことが推奨されている。しかしながら, *in vivo* で行う試験は多数の実験動物を必要とするうえに, 多大の労力と時間を要し, かつその毒性発現の機序を確認しにくいことなどから, さらに簡便で能率的な試験法の開発が要請されている。また, 動物愛護の立場からも, 動物個体の使用数を最少に留め, 有効な情報が得られるような試験法の研究が注目されている。現在, 発生毒性検索

のための *in vitro* でのさまざまな試験法が提案されている中で, 哺乳動物の胚子を母体外に取り出し, 生存発生させる全胚培養法は *in vivo* に最も近似した方法として位置づけられる¹⁾。

今回, 天然添加物の次世代に及ぼす影響, 特に催奇形性の有無を検討するにあたり, できるだけ多くの被検物質をとりあげてを前提に, *in vitro* での全胚培養法による試験を行った。

実験材料及び方法

1. 実験動物

妊娠 6 日齢 (膣栓確認日妊娠 0 日) の Crj : CD - 1 (ICR) マウスを日本チャ - ルスリバ - (株)より購入, 実験に供した。動物は解剖直前まで換気毎時 10 回 (HEPA フィルタ - 経由), 温度 23-25 , 湿度 45-55%, 照明 12 時間に制御された飼育室にて, 固型飼料 (CE - 2 : 日本

* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3 - 24 - 1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3 - 24 - 1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

クレア製)と水(滅菌フィルタ-経水道水)を自由に摂取させた。

2. 培養方法

妊娠8日にエ-テル麻酔下で、母動物から胚子および受胎副産物を子宮ごと取り出し、次いで、子宮壁より胚子および受胎副産物を脱落膜に包まれた状態で摘出した。その後胎盤から脱落膜を、羊膜から脱落膜、栄養芽細胞層、ライヘルト膜を順次剥離除去し、胚子および胚子に付随する羊膜、卵黄嚢ならびに胎盤を完全な状態で培養系に移した。培養液は3 mg/mlのグルコ-スを添加したラット IC 血清 (Immediately centrifuged serum) を0.45 μmのミリポアフィルタ-で濾過滅菌したものをを用いた。

培養には回転式胎児培養装置(池本理化株)を用い、1胚子1培養瓶2.5ml血清とし、37℃, 25rpmで回転培養した。気相には、20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂の混合ガスを使用し、培養開始から24時間までは毎分20ml、その後培養終了まで(24時間)は毎分30mlの流量で連続的に培養瓶に供給した。

3. 被検物質および暴露方法

実験に用いたチャ抽出物は日本食品添加物協会より入手し、チャ抽出物100%(総カテキン66.2%を含む)の粉末のものを使用した。チャ抽出物は7.815, 15.625, 31.25mg/mlの割合で滅菌蒸留水に溶解し、その10 μlを

培養瓶に滴下した。したがって培養液1 ml当たりのチャ抽出量は31.25, 62.5, 125 μgとなり、これを培養開始24時間後から終了時までの24時間暴露した。

4. 観察方法

胚子の観察及び測定は全て実体顕微鏡下にて行った。卵黄嚢径と心拍数の測定は培養開始時(妊娠8日), 24時間後(妊娠9日)および48時間後(妊娠10日)に測定した。卵黄嚢血液循環の観察は培養開始24時間と48時間後に、胚子の頭臀長, 体節数の測定および形態観察は培養開始48時間後に行った。

結果及び考察

本実験ではマウスの妊娠8日に培養を開始し、妊娠9日に被検物質を投与、24時間暴露後の妊娠10日に結果を観察した。結果を表1に示した。妊娠10日齢の in vivo で正常に発育した胚子は30-40体節、頭臀長は3-5mmほどの大きさになっており、尾側神経孔は完全に閉鎖している。形態的には胚子は背方に突出する方向で屈曲しており尾端は頭部の右側に横たわる。その形がアルファベットの G に似ていることから通常 G 型と呼ばれる。前肢芽は完全に突出してみられ、後肢芽も明瞭に隆起として認められる。鰓弓は3つまでが明瞭に区別できる。卵黄嚢はよく形成された血管網をそなえており心拍動にあわせた血液循環がみられる。

チャ抽出物を投与した今回の試験では胚子発育の指標

表1. チャ抽出物のマウス胚子に及ぼす影響

投与量 (μg/ml)	0	31.25	62.5	125
観察胚子数	10	11	11	13
培養開始時 (妊娠8日)				
卵黄嚢径 (mm)*	2.0 ± 0.3	2.1 ± 0.3	2.1 ± 0.3	2.2 ± 0.3
心拍数 / 分*	30.8 ± 3.5	31.6 ± 5.4	33.6 ± 6.7	34.9 ± 5.3
開始24時間後 (妊娠9日)				
卵黄嚢径*	3.6 ± 0.5	3.6 ± 0.3	3.9 ± 0.4	4.1 ± 0.4
心拍数*	111.8 ± 21.3	126.0 ± 18.0	104.2 ± 10.2	112.0 ± 12.7
卵黄嚢血液循環	+	+	+	+
開始48時間後 (妊娠10日)				
卵黄嚢径*	5.5 ± 0.5	5.5 ± 0.4	5.5 ± 0.4	5.6 ± 0.3
胚子頭臀長(mm)*	5.1 ± 0.5	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.2
心拍数*	98.4 ± 23.5	103.1 ± 28.8	100.0 ± 29.2	83.3 ± 33.4
体節数*	30.7 ± 1.3	30.7 ± 1.7	30.9 ± 1.0	31.1 ± 1.5
卵黄嚢血液循環	- (1) ± (3) + (6)	- (2) ± (2) + (7)	- (6) ± (2) + (3)	- (10) ± (2) + (1)
胚子型	G	G	G	G
胚子形態異常				
鼻部水泡形成:			(1)	
第一鰓弓形成不全:				(1)

* 平均 ± S.D.

() 内胚子数

となる卵黄囊径，胚子頭臀長，体節数において対照群（蒸留水のみ投与）と比べ何れの投与群にも顕著な遅延は認められなかった。しかしながら，最高濃度の125 µg/ml投与群では推計学的に有意ではなかったが心拍数が対照群に比べやや少なく，また卵黄囊血液循環の不良な個体が増加した。胚子の外表異常では6.25 µg群で鼻部に水胞を認めた胚子および125 µg群に第一鰓弓形成不全の胚子が各々1例ずつ認められた。胚子の生死の判定の基準は，心拍動ならびに胚子の体循環が停止しているものを死亡胚子としたが，対照群も含め，チャ抽出物投与群の何れの群にも死亡胚子を認めなかった。

本試験に入る前に行った投与濃度決定のための予備試験において，500 µg/mlより大量の投与ではチャ抽出物が完全に血清に溶解せず正確な投与量を明確にできず，また250 µg/mlを投与したものでは全例胚子が死亡したため，本試験での最高濃度群を125 µg/mlに設定した。その際，予備試験での大量投与の胚子の形態観察においては外表異常は認められなかった。

岩瀬ら²⁾は催奇形性，非催奇形性物質をふくめた20種類の化合物についてラットを用いた全胚培養を行い，その結果を，in vivo 試験での結果と比較している。その中で，ラット全胚培養における催奇形性の検出感度は100%，特異性は78%と，in vivo と全胚培養法との結果に高い相関性のあることを示し，全胚培養法が化学物質の催奇形性検出方法として有効な手段の一つであると述べている。

今回，われわれはマウスを用いた全胚培養法によりチャ抽出物の催奇形性について検討した。マウス全胚培養法はラットに比べ胚子が小さく取り扱いが困難なため，本法を用いた催奇形性に関する実験報告が少なく，in vivo 試験との相関性をラットでの結果ほど明確にできない。しかしながら，齧歯類を用いた in vivo 催奇形性試験と全胚培養法による結果を推計学的に検討し，その有効性について述べている中島の報告³⁾の中で，マウスを用いた in vivo 試験で陽性のもはマウス全胚培養法での結果も陽性であることが示されている。また，これ

までわれわれがマウスを用いた in vivo 試験で催奇形性を認めた thiabendazole および hinokitiol，既知催奇形性物質である urethan，all-trans retinoic acid でも今回行ったと同様の方法による全胚培養法で催奇形性を示している。

一方，本実験から得られた結果はチャ抽出物の催奇形性を疑わせるものではなく，125 µg群で見られた心拍数の若干の低下と卵黄囊血液循環不良胚子の増加および第一鰓弓形成不全の胚子の発現はチャ抽出物の高濃度投与に起因した若干の発育不全によるものと考えられた。また62.5 µg群に発現した鼻部水胞形成の1例の胚子についてはその一段階上の濃度である125 µg群に発現のないこと，および，これまでの経験から無処置群においても散発的に発現しており，例えばこのボトルだけガスの供給が良くなかった等，培養時の条件の変動に起因したものと考えられた。

今回用いられた被検物質であるチャ抽出物の主な成分はカテキンで，総カテキンとして66.2%含まれており，他に約9%のカフェインを含んでいた。カテキンの催奇形性を含む生殖毒性に関する報告はこれまでないが，カフェイン大量投与では催奇形作用のあることが以前より知られている⁴⁾。しかしながら，今回の実験からは高濃度群に発育遅延傾向は認められたが催奇形作用を疑わせる結果は示されなかった。

以上を考慮すると，今回行ったマウス全胚培養法による結果は実験に用いられたチャ抽出物の妊娠マウスに対する催奇形性の可能性は少ないことを示唆した。

文 献

- 1) 東海林隆次郎：毒性試験講座11，発生毒性，1991，地人書館，東京。
- 2) 岩瀬隆之，水野英子，池田保男：Mitsubishi Kasei R & D Review, 5(1), 92-99, 1991.
- 3) Nakashima, K.: AATEX, vol. 3, 9-16, 1995.
- 4) Nehlig, A. and Debry, G.: Neurotoxicol. Teratol., 16(6), 531-43, 1994.