

## 塩化マグネシウム六水和物のラットを用いた催奇形性試験

宇佐見 誠・酒見 和枝・津田 充宥・大野 泰雄

## Teratogenicity Study of Magnesium Chloride Hexahydrate in Rats

Makoto Usami, Kazue Sakemi, Mitsuhiro Tsuda and Yasuo Ohno

Teratogenicity of magnesium chloride hexahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) was examined in rats. Magnesium chloride hexahydrate dissolved in distilled water was given to pregnant Wistar rats by gavage once a day from day 6 through 15 of pregnancy at doses of 0, 200, 400 and 800 mg/kg/day. The pregnant rats were sacrificed on day 20 of pregnancy and their fetuses were examined for malformation. Magnesium chloride hexahydrate caused no increased incidences of fetal malformation, and no toxic signs in the pregnant rats and the fetuses. It was concluded that magnesium chloride hexahydrate has no teratogenicity in rats when given by gavage. The no observed adverse effect level was estimated to be over 800 mg/kg/day for both pregnant rats and rat fetuses.

**Keywords** : magnesium chloride hexahydrate, Wistar rat, teratogenicity, malformation, developmental toxicity

(Received May 31, 1996)

## 緒 言

塩化マグネシウムは、豆腐の凝固剤として使用が認められている食品添加物である。使用基準はない<sup>1)</sup>。塩化マグネシウムは難吸収性であり、経口摂取された場合の毒性症状としては瀉下作用が知られている。ラットにおける経口投与時の最小致死量は 2800 mg/kg である。しかし、塩化マグネシウムの催奇形性に関しては、報告は見当たらない。本試験では、塩化マグネシウム六水和物の催奇形性についてラットへの経口投与により調べた。

## 材料および方法

## 1. 被験物質

食品添加物用の塩化マグネシウム六水和物 ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 食品添加物塩化マグネシウム S, 富田製薬株) を用いた。性状は無～白色の結晶で、添付資料による純度は 95% 以上であった。CAS 登録番号は 7791-18-6 で、式量は 203.30 である。

## 2. 試験系

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、翌朝膣垢中に精子が認められたものを妊娠動物として試験に供した。妊娠日の起算は精子確認日を妊娠 0 日とした。

## 3. 飼育条件

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  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 15 回/時間、明暗交代 12 時間 (明期 6:00~18:00) とした。

## 4. 用量および群構成

用量の設定にあたって、0, 250, 500 および 1000 mg/kg/day の 3 用量を用いて、1 群 4 匹にて予備試験を実施した (Table 1)。その結果、1000 mg/kg/day で鎮静、体温低下、流涎、水様便が観察され、2 匹が死亡した。生存動物の生殖に関する成績には塩化マグネシウム六水和物の影響は認められなかった。これらの結果を考慮して、本試験における群構成は、塩化マグネシウム六水和物投与群として 200, 400 および 800 mg/kg/day の 3 用量を設定し、対照群を加えて計 4 群とした。1 群の妊娠動物数は 22 匹とした。

## 5. 投与方法

蒸留水に溶解した被験物質を、妊娠 6 日の体重に基づいて妊娠 6~15 日の 10 日間、1 日 1 回、胃ゾンデを用いて妊娠動物に強制経口投与した。被験物質溶液の濃度は、投与液量がいずれの用量においても 5 ml/kg/day とするにした。対照群には蒸留水 5 ml/kg/day を同様に経口投与した。

## 6. 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

Table 1. Preliminary teratogenicity test of magnesium chloride hexahydrate in rats

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	250	500	1000
No. of pregnant rats	4	4	4	4
No. of dead pregnant rats	0	0	0	2
No. of litters	4	4	4	2
No. of corpora lutea <sup>a)</sup>	14.5 ± 0.6	17.8 ± 2.1	16.5 ± 1.0	16.0 ± 2.8
No. of implants <sup>a)</sup>	14.0 ± 0.8	14.5 ± 1.3	15.0 ± 0.8	14.0 ± 4.2
No. of live fetuses <sup>a)</sup>	14.0 ± 0.8	14.5 ± 1.3	15.0 ± 0.8	14.0 ± 4.2
Sex ratio (male/female)	1.24	1.26	0.92	1.32
Fetal weight (g) <sup>a)</sup>				
Male	3.84 ± 0.09	3.75 ± 0.33	3.93 ± 0.15	3.82 ± 0.22
Female	3.73 ± 0.18	3.58 ± 0.22	3.73 ± 0.26	3.68 ± 0.22
Mortality of implants (%) <sup>a)</sup>	1.8	5.0	7.4	6.9
No. of fetuses with gross malformation	0	0	1	1

a) Mean ± S.D. is shown.

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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>を、胸部については顕微解剖法<sup>4)</sup>を用いた。

7. 統計学的方法

妊娠動物または一腹を標本の単位とした。対照群と塩化マグネシウム六水和物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

いずれの群においても、一般状態の変化および死亡動物は認められなかった。体重には、対照群と塩化マグネシウム六水和物投与群との間に有意差は認められなかった (Fig. 1)。摂餌量にも、対照群と塩化マグネシウム六水和物投与群との間に有意差は認められなかった (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、対照群と塩化マグネシウム六水和物投与群との間に有意差は認められなかった (Table 2)。

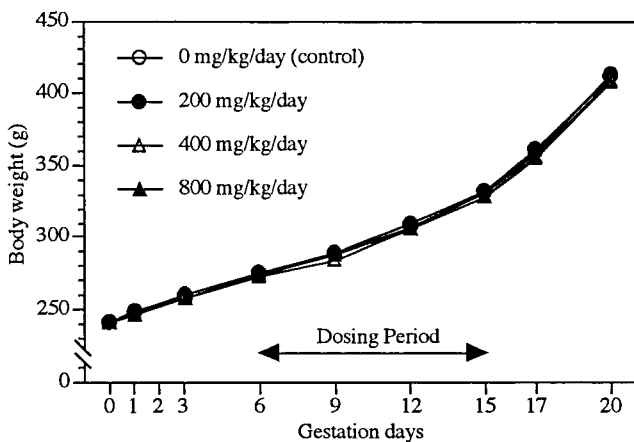


Fig. 1. Body weight of pregnant rats treated with magnesium chloride hexahydrate

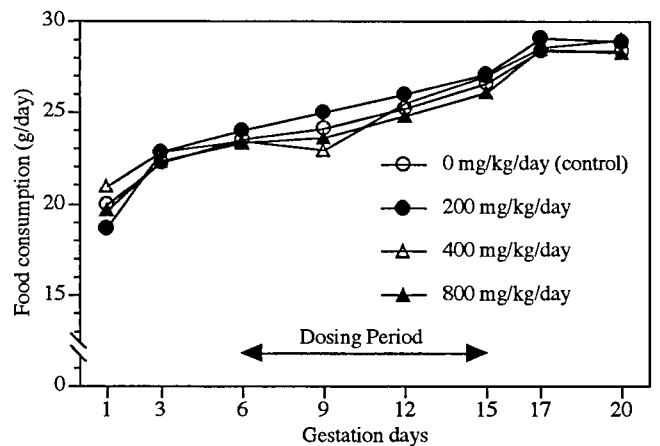


Fig. 2. Food consumption of pregnant rats treated with magnesium chloride hexahydrate

Table 2. Fetal growth in pregnant rats treated with magnesium chloride hexahydrate

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	200	400	800
No. of litters	22	22	22	22
No. of corpora lutea	373	370	361	362
Mean $\pm$ S.D.	17.0 $\pm$ 1.6	16.8 $\pm$ 2.2	16.4 $\pm$ 2.1	16.5 $\pm$ 1.5
No. of implants	364	340	345	345
Mean $\pm$ S.D.	16.5 $\pm$ 1.7	15.5 $\pm$ 3.2	15.7 $\pm$ 1.9	15.7 $\pm$ 1.8
Implantation rate (%) <sup>a)</sup>	97.7 $\pm$ 4.5	91.4 $\pm$ 12.2	95.9 $\pm$ 6.6	95.4 $\pm$ 8.3
No. of live fetuses	346	326	324	332
Mean $\pm$ S.D.	15.7 $\pm$ 1.5	14.8 $\pm$ 3.5	14.7 $\pm$ 1.8	15.1 $\pm$ 1.8
Sex ratio (male/female)	1.28	1.15	1.23	1.38
Fetal weight (g) <sup>a)</sup>				
Male	3.95 $\pm$ 0.22	3.98 $\pm$ 0.29	3.87 $\pm$ 0.21	3.98 $\pm$ 0.22
Female	3.73 $\pm$ 0.25	3.75 $\pm$ 0.23	3.72 $\pm$ 0.20	3.81 $\pm$ 0.17
No. of dead implants	18	14	21	13
Early death	18	14	21	13
Late death	0	0	0	0
Mortality (%) <sup>a)</sup>	4.8 $\pm$ 4.6	4.8 $\pm$ 5.8	5.9 $\pm$ 6.1	3.6 $\pm$ 5.7

a) Mean  $\pm$  S.D. is shown.

Table 3. Gross malformations in the fetuses from pregnant rats treated with magnesium chloride hexahydrate

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	200	400	800
No. of litters	22	22	22	22
No. of fetuses examined	346	326	324	332
No. of litters with malformed fetuses	3 (13.6%)	1 (4.55%)	3 (13.6%)	1 (4.55%)
No. of fetuses with malformation <sup>a)</sup>	3 (0.88%)	1 (0.32%)	4 (1.18%)	1 (0.25%)
Anal atresia	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.30%)	1 (0.25%)
Dwarf	3 (0.88%)	1 (0.32%)	2 (0.61%)	0 (0.00%)
Kinky tail	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.27%)	0 (0.00%)
Pes varus	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.30%)	0 (0.00%)
Rudimentary tail	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.30%)	1 (0.25%)

a) Total number and mean incidence are shown.

## 2.2. 胎児外表

各群において1~4匹の胎児に外表奇形が認められたが、対照群と塩化マグネシウム六水和物投与群との間には、発生率に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800 mg/kg/dayにおいて1匹の胎児に認められたが、対照群との間には発生率に有意差は認められなかった (Table 4)。骨格変異の発生率には、対照群と塩化マグネシウム六水和物投与群との間には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。

## 2.4. 胎児内部器官

各群において4~6匹の胎児に奇形が認められたが、対照群と塩化マグネシウム六水和物投与群との間には発生率に有意差は認められなかった (Table 5)。

## 考 察

本試験の結果から、塩化マグネシウム六水和物にはラットにおける経口投与では催奇形性は認められないと考えられる。塩化マグネシウム六水和物は妊娠ラットを死亡させない最大投与量であると考えられる800 mg/kg/dayにおいても、胎児の奇形発生率を増加させなかった。また、胎児骨格検査において、低用量での催奇形性の指標となりうると考えられている過剰肋骨<sup>5)</sup>の発生率にも変化が認められないので、より高用量においても胎児奇形発生率が増加

Table 4. Skeletal variations in the fetuses from pregnant rats treated with magnesium chloride hexahydrate

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	200	400	800
No. of litters	22	22	22	22
No. of fetuses examined	174	168	165	165
No. of fetuses with malformation <sup>a)</sup>	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.51%)
Vertebral agenesis	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.51%)
No. of fetuses with variation <sup>a)</sup>	76 (43.1%)	71 (42.6%)	89 (54.0%)	84 (51.5%)
Hypoplastic supraoccipital	27 (15.2%)	21 (12.2%)	28 (16.9%)	27 (16.5%)
Cervical rib	1 (0.57%)	2 (1.22%)	0 (0.00%)	2 (1.41%)
Wavy rib	5 (2.66%)	6 (3.52%)	10 (6.85%)	10 (6.25%)
Shortened rib	2 (1.14%)	1 (0.76%)	3 (1.52%)	1 (0.51%)
Deformed cervical vertebral arch	22 (11.8%)	8 (4.44%)	18 (10.9%)	6 (3.92%)
Deformed sternbrae	8 (4.53%)	9 (5.57%)	12 (7.45%)	13 (7.82%)
Deformed thoracic vertebral body	33 (18.8%)	39 (23.0%)	39 (23.8%)	37 (23.6%)
25 or 27 presacral vertebrae	2 (1.14%)	2 (1.33%)	7 (3.74%)	1 (0.57%)
Lumbar rib	14 (8.10%)	13 (7.27%)	18 (11.6%)	16 (9.77%)
Extra rib	0 (0.00%)	6 (3.41%)	3 (1.80%)	2 (1.41%)
Rudimentary rib	14 (8.10%)	11 (6.14%)	15 (9.81%)	16 (9.77%)
Others	2 (1.14%)	1 (0.57%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
No. of sacro-caudal vertebrae <sup>b)</sup>	8.19 ± 0.55	8.22 ± 0.54	8.12 ± 0.45	8.13 ± 0.47
No. of metacarpus <sup>b)</sup>	7.70 ± 0.39	7.70 ± 0.49	7.62 ± 0.48	7.68 ± 0.45
No. of metatarsus <sup>b)</sup>	8.05 ± 0.22	8.12 ± 0.26	8.06 ± 0.15	8.09 ± 0.24

a) Total number and mean incidence are shown.

b) Mean ± S.D. is shown.

Table 5. Visceral malformations in the fetuses from pregnant rats treated with magnesium chloride hexahydrate

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	200	400	800
No. of litters	22	22	22	22
No. of fetuses examined	170	157	159	166
No. of litters with malformed fetus	4 (18.2%)	4 (18.2%)	5 (22.7%)	4 (18.2%)
No. of fetuses with malformation <sup>a)</sup>	5 (2.80%)	4 (2.45%)	6 (3.49%)	5 (3.24%)
Abnormal lung lobulation	1 (0.65%)	1 (0.65%)	1 (0.76%)	0 (0.00%)
Pulmonary hypoplasia	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.57%)	0 (0.00%)
Diaphragmatic hernia	1 (0.51%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Unilateral adrenal agenesis	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.65%)	0 (0.00%)
Ectopic kidney	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (1.14%)	1 (0.51%)
Dilatated renal pelvis	1 (0.57%)	0 (0.00%)	1 (0.57%)	0 (0.00%)
Horseshoe kidney	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.65%)	0 (0.00%)
Ectopic ovary	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.65%)	0 (0.00%)
Left-sided umbilical artery	2 (1.07%)	3 (1.80%)	2 (1.22%)	5 (3.24%)

a) Total number and mean incidence are shown.

することはないと推定される。

本試験条件下での塩化マグネシウム六水和物の妊娠ラットに対する無影響量は 800 mg/kg/day であると考えられる。これは、800 mg/kg/day では母動物に塩化マグネシウム六水和物投与の影響は認められないが、予備試験にお

いて 1000 mg/kg/day では鎮静、体温低下、流涎、水様便および死亡が認められたからである。

ラット胎児に対する無影響量は 800 mg/kg/day であると考えられる。これは、800 mg/kg/day 投与においても対照群と比較して、胎児に被験物質投与による有意な変化

が認められないからである。

文 献

- 1) 石館守三, 谷村顕雄監修: “第5版食品添加物公定書解説書”, 廣川書店, 東京 (1987)
- 2) Dawson. A. B.: *Stain Technol.*, **1**, 123 (1926)
- 3) Wilson. J. G.: “Teratology principles and techniques” (eds. Wilson. J. G. and Warkany, J.) pp. 262. The University of Chicago Press. Chicago (1965)
- 4) 西村耕一: 先天異常, **14**, 23 (1974)
- 5) 安田峰生, 前田広由: 先天異常, **13**, 25 (1973)