

亜塩素酸ナトリウム (NaClO₂) 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 sodium chlorite in rats by oral administration

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

The teratogenicity of sodium chlorite (NaClO₂) was assessed in Wistar rats (Crj : Wistar). Sodium chlorite 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, 25, 50 and 100 mg/kg/day. The pregnant rats were sacrificed on day 20 of pregnancy, and their fetuses were examined for malformations. Sodium chlorite caused decreased food consumption, anemia, sedation, hematuria, and death in the pregnant rats at 100 mg/kg, but no fetal effects, such as malformations or growth retardation, were observed even at 100 mg/kg. It was concluded that sodium chlorite has no teratogenicity in rats when administered orally. The no-observed-adverse-effect level was 50 mg/kg/day for pregnant rats and 100 mg/kg/day or more for rat fetuses.

Keywords: sodium chlorite, Wistar rat, teratogenicity, malformation, developmental toxicity

緒 言

亜塩素酸ナトリウムは、さくらんぼ、ふき、ぶどうおよびももに限り、食品の漂白剤としての使用が認められている¹⁾。使用に当っては最終食品の完成前に分解または除去することが義務づけられている。

経口摂取された亜塩素酸ナトリウムは、血球系等に毒性を示すことが知られている。100 ppm の亜塩素酸ナトリウムを含む飲水で 30 日間飼育したマウスには赤血球の浸透圧抵抗性の減少、血球容積の増加および血球 G6PD 値の上昇が認められた²⁾。同様の飲水を妊娠マウスに与えた場合には、新生児に体重の減少および体重増加の抑制が認められた²⁾。また、亜塩素酸ナトリウムの経口での 50% 致死量はラット・マウスで 350 mg/kg、モルモットで 300 mg/kg であること並びに、微生物突然変異試験および染色体異常誘発試験において変異原性が認められることが知られている¹⁾。精子毒性については、ラットへの 5 日間曝露において亜塩素酸ナトリウムの毒性は認められていない³⁾。

催奇形性に関しては、妊娠ラットへの亜塩素酸ナトリウムの腹腔内 (10, 20, 50 mg/kg)、又は経口 (200 mg/kg) 又は飲水混入 (0.1, 0.5, 2.0 %) による 8 日間 (妊娠 8 ~ 15 日) の投与又は摂取実験が行われている⁴⁾。その結果、母動

物に対しては、経口投与群で 100%、腹腔内投与 50 mg 群、20 mg 群でそれぞれ 100%、50% が死亡し、0.1% 飲水混入群を除いた全群で体重減少、摂餌量および飲水量の低下が見られた。胎児に対しては、腹腔内投与 20 mg 群、飲水混入 2.0% 群で胎児の早期死亡が増加しているものの、奇形発生率に変化はなく、催奇形性は認められていない。しかしこの実験では、母動物に影響の認められない用量での検討が不十分であり、母動物および胎児に対する無影響量が求められていない。そこで本試験では用量設定を検討した上で、経口投与による催奇形性についてラットを用いて調べた。

材料および方法

1. 被験物質

亜塩素酸ナトリウム (NaClO₂) は和光純薬工業株式会社より入手した。性状は白色の粉末結晶で、純度は 90% である。CAS 登録番号は、7758-19-2 で、式量は 90.44 である。

2. 試験系

Crj : Wistar ラット (日本チャールス・リバー) の雌 (12 週齢) および雄 (13 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育し、固形飼料 (オリエンタル酵母, MF) および水道水

[#] 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

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

用量設定にあたって、亜塩素酸ナトリウム 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 mg/kg の 6 用量を用いて 1 群 3 匹にて予備試験を実施した。その結果、250 mg 以上の投与群で腹臥、呼吸不整、痙攣等が観察され、全例死亡した。生存動物の生殖に関する成績には亜塩素酸ナトリウム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、亜塩素酸ナトリウム投与群として 25, 50 および 100 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 群の動物数は 26 匹とし、解剖時に妊娠が確認された動物のうち、動物番号順に 20 匹のデータを試験成績として用いた。但し、妊娠 20 日以前に死亡した妊娠動物が多かった 100 mg 投与群では、検査胎児数を多くするために、すべての妊娠動物のデータを用いた。

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 となるようにした。対照群には蒸留水 5 ml/kg 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摂餌量を妊娠 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 3 分の 2 の生存胎児について Alizarin red S 染色骨格標本作製し骨格を観察した⁵⁾。残り約 3 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⁶⁾を、胸部については顕微解剖法⁷⁾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。対照群と亜塩素酸ナトリウム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

妊娠動物の一般状態を Table 1 に示した。対照群、25 および 50 mg 投与群では一般状態の変化並びに死亡動物は認められなかった。100 mg 投与群では投与 3 日頃から貧

Table 1. Toxic signs in pregnant rats treated with sodium chlorite

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	25	50	100
No. of pregnant rats examined	20	20	20	24
No. of dead pregnant rats	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	9 (37.5%)**
No. of pregnant rats with toxic signs	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	9 (37.5%)**
Anemia	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (25.0%)*
Cyanosis	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (4.17%)
Cheyne-Stokes' respiration	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (12.5%)
Decrease in locomotor activity	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (12.5%)
Lacrimation	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (16.7%)
Loose stool	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (8.33%)
Piloerection	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (12.5%)
Sedation	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	5 (20.8%)*
Hematuria	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (25.0%)*
Staggering gait	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (4.17%)

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

血、鎮静および血尿等の症状が観察された。これらの症状を示した動物は、殆どが発症後 1 ないし 2 日で死亡した。また、回復したものおよび無症状で死亡したものが各 1 匹認められた。

1.2. 体重および摂餌量

体重には、対照群と亜塩素酸ナトリウム投与群との間に有意差は認められなかった (Fig. 1)。また、体重増加量にも有意差は認められなかった。

摂餌量は、妊娠 9 日に 100 mg 投与群において対照群に比べて有意な減少が認められた (Fig. 2)。

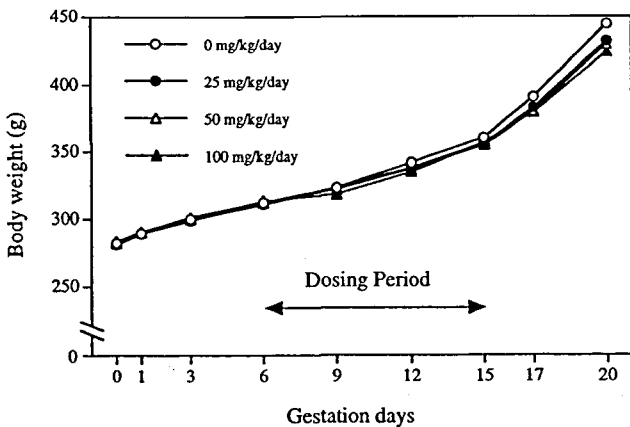


Fig.1. Body weight of pregnant rats treated with sodium chlorite

2. 胎児に及ぼす影響

2.1. 生存胎児数、性比、胎児体重、胚胎児死亡および胎児外表

生存胎児数、性比、胎児体重および胚胎児死亡率には、対照群と亜塩素酸ナトリウム投与群との間に有意差は認められなかった (Table 2)。また、いずれの群においても胎児に外表奇形は認められなかった。

2.2. 胎児骨格

胎児骨格には、いずれの群においても奇形は認められなかった (Table 3)。骨格変異には、対照群と亜塩素酸ナトリ

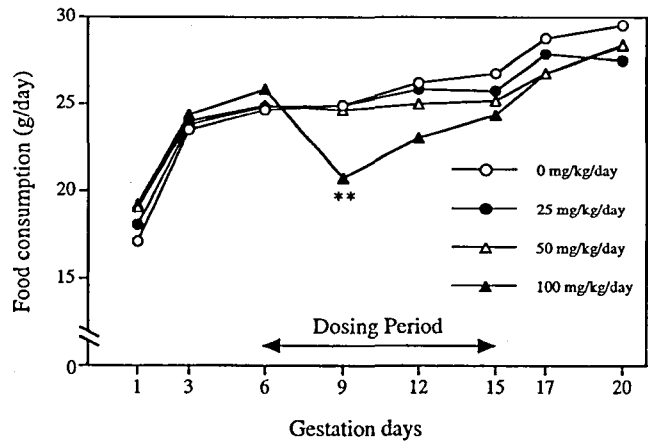


Fig.2. Food consumption of pregnant rats treated with sodium chlorite

** : Significantly different from the control group at $p < 0.01$.

Table 2. Fetal growth in pregnant rats treated with sodium chlorite

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	25	50	100
No. of litters	20	20	20	15
No. of corpora lutea	348	328	336	238
Mean \pm S.D. ^a	17.4 \pm 1.6	16.4 \pm 3.6	16.8 \pm 1.5	15.9 \pm 4.5
No. of implants	317	298	293	197
Mean \pm S.D. ^a	15.9 \pm 2.5	14.9 \pm 4.9	14.7 \pm 3.6	13.1 \pm 4.8
Implantation rate (%)	91.5	90.3	87.0	83.8
No. of live fetuses	306	281	267	187
Mean \pm S.D. ^a	15.3 \pm 2.8	14.1 \pm 4.7	13.4 \pm 3.9	12.5 \pm 4.7
Sex ratio (male/female)	1.10	1.17	1.41	1.51
Fetal weight (g) ^a				
Male	3.93 \pm 0.23	3.94 \pm 0.36	3.99 \pm 0.20	3.90 \pm 0.22
Female	3.69 \pm 0.24	3.66 \pm 0.26	3.76 \pm 0.15	3.67 \pm 0.23
No. of dead implants	11	17	26	10
Early death	11	17	26	10
Late death	0	0	0	0
Mortality (%)	3.8	5.2	9.7	10.7
No. of fetuses with gross malformation	0	0	0	0

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

Table 3. Skeletal variations in the fetuses from pregnant rats treated with sodium chlorite

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	25	50	100
No. of litters	20	20	20	14
No. of fetuses examined	202	187	177	124
No. of fetuses with variation ^a	50 (25.9%)	33 (16.5%)	26 (14.4%)	21 (16.6%)
Hypoplastic supraoccipital	30 (14.5%)	11 (5.69%)	5 (2.46%)	9 (7.07%)
Cervical rib	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (0.97%)	0 (0.00%)
Wavy rib	8 (4.33%)	2 (0.96%)	1 (0.63%)	4 (3.47%)
Deformed rib	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.89%)
Deformed cervical vertebral arch	7 (3.39%)	3 (1.54%)	5 (2.67%)	2 (1.43%)
Deformed sternbrae	5 (2.44%)	6 (4.23%)	5 (3.54%)	2 (1.36%)
Deformed thoracic vertebral body	4 (1.93%)	5 (2.69%)	1 (0.63%)	3 (1.89%)
25 presacral vertebrae	0 (0.00%)	1 (0.50%)	0 (0.00%)	1 (0.71%)
Lumbar rib	24 (10.7%)	13 (6.12%)	12 (6.18%)	4 (3.55%)
Extra rib	1 (0.42%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.71%)
Rudimentary rib	24 (10.7%)	13 (6.12%)	12 (6.18%)	4 (3.55%)
No. of sacro-caudal vertebrae ^b	7.73 ± 0.87	7.90 ± 0.65	7.95 ± 0.53	8.02 ± 0.49
No. of metacarpus ^b	7.84 ± 0.22	7.93 ± 0.17	7.92 ± 0.15	7.90 ± 0.18
No. of metatarsus ^b	8.16 ± 0.35	8.21 ± 0.41	8.13 ± 0.34	8.13 ± 0.26

a) Total number and mean incidence are shown.

b) Mean ± S.D. is shown.

ウム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。

2.3. 胎児内部器官

いずれの群においても2～8匹の胎児に小奇形が認められた (Table 4)。また、50 mg 投与群で、1匹の胎児に心血管系および肺分葉異常の奇形が認められた。しかし、いずれの奇形の発生率においても、対照群と亜塩素酸ナトリウム投与群との間に有意差は認められなかった。

考 察

本試験の結果から、亜塩素酸ナトリウムにはラットにおける経口投与では催奇形性はないと考えられる。すなわち亜塩素酸ナトリウムは、妊娠動物に摂餌量減少、貧血、鎮静および血尿等の毒性徴候並びに死亡を起す用量においても、胎児の奇形発生率を増加させなかった。更に、胎児

骨格検査において、低用量での催奇形性の指標となると考えられている過剰肋骨⁸⁾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することはないと考えられる。また、ラットにおける飲水混入による催奇形性実験⁴⁾では、母動物に影響の認められる用量では胎児の早期死亡が報告されているが、低用量では胎児に異常はなく、本試験の結果と一致した。

本試験条件下での亜塩素酸ナトリウムの妊娠ラットに対する無影響量は50 mg/kg/day であると考えられる。これは、100 mg 投与群では母動物に毒性徴候および死亡が認められたが、50 mg 投与群では対照群と比較して有意な変化が認められないからである。

ラット胎児に対する無影響量は100 mg/kg/day 以上であると考えられる。これは、100 mg 投与群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。このことは亜塩素酸ナトリウムは母動物に影響を与えない用量では胎児に対して影響を及ぼさないことを示している。

Table 4. Visceral malformations in the fetuses from pregnant rats treated with sodium chlorite

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	25	50	100
No. of litters	20	18	20	14
No. of fetuses examined	104	94	90	63
No. of litters with malformed fetus	5 (25.0%)	5 (27.8%)	5 (25.0%)	2 (14.3%)
No. of fetuses with malformation ^a	8 (7.92%)	6 (6.48%)	5 (4.92%)	2 (2.62%)
Thymic remnant in neck	6 (5.42%)	5 (5.56%)	1 (0.84%)	2 (2.62%)
Abnormal heart and great vessels	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (1.25%)	0 (0.00%)
Hypoplasia of lung	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (1.25%)	0 (0.00%)
Dilatation of renal pelvis	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (1.84%)	0 (0.00%)
Persistent left umbilical artery	2 (1.67%)	1 (0.93%)	1 (1.00%)	0 (0.00%)

a) Total number and mean incidence are shown.

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) Moore, G. S. and Calabrese, E. G.: *Environ. Health Perspect.*, **46**, pp. 31-37 (1982).
- 3) Linder, R. E., Strader, L. F., Slott, V. L. and Suarez, J. D.: *Reprod. Toxicol.*, **6**, pp. 491-505 (1992).
- 4) Couri, D., Miller, C. H. Jr., Bull, R. J., Delphia, J. M. and Ammar, E. M.: *Environ. Health Perspect.*, **46**, pp. 25-29 (1982).
- 5) Dawson, A. B.: *Stain Technol.*, **1**, 123 (1926).
- 6) Wilson, J. G.: "Teratology principles and techniques", eds. by Wilson, J. G. and Warkany, J., The University of Chicago Press, Chicago, pp. 262 (1965).
- 7) 西村耕一: 先天異常, **14**, pp. 23-40 (1974).
- 8) 安田峯生, 前田広由: 先天異常, **13**, pp. 25 (1973).