

表11 ガス静脈内投与中の酸-塩基平衡および血行力学(平均±標準誤差)

	ガス	n	投与前	投与中		投与後	ANOVA (p値)
				15分	30分		
pH	CO <sub>2</sub>	6	7.49 ± 0.01	7.48 ± 0.01	7.48 ± 0.02	7.48 ± 0.01	NS
	N <sub>2</sub> O	6	7.46 ± 0.02	7.45 ± 0.03	7.42 ± 0.05	7.42 ± 0.04	NS
	Ar	4	7.42 ± 0.03	7.33 ± 0.02	7.22 ± 0.05 <sup>a</sup>	7.24 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.0007
	He	4	7.43 ± 0.02	7.30 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.25 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.28 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.0003
	N <sub>2</sub>	4	7.47 ± 0.01	7.29 ± 0.03	N/A <sup>*</sup>	N/A	0.0040 <sup>b</sup>
動脈血二酸化炭素分圧 (mmHg)	CO <sub>2</sub>	6	34.8 ± 0.9	36.7 ± 1.4	36.3 ± 1.2	36.8 ± 1.5	NS
	N <sub>2</sub> O	6	38.1 ± 2.9	39.9 ± 4.6	45.1 ± 7.3	42.8 ± 5.8	NS
	Ar	4	41.9 ± 2.5	54.5 ± 4.0	74.6 ± 10.0 <sup>a</sup>	66.3 ± 7.8 <sup>a</sup>	0.0044
	He	4	39.9 ± 1.5	57.7 ± 2.3 <sup>a</sup>	63.5 ± 6.2	56.3 ± 5.9 <sup>a</sup>	0.0012
	N <sub>2</sub>	4	36.9 ± 1.4	61.2 ± 4.7	N/A	N/A	0.0159 <sup>b</sup>
心拍数 (回/分)	CO <sub>2</sub>	6	99 ± 8	94 ± 7	94 ± 7	94 ± 6	NS
	N <sub>2</sub> O	5	94 ± 6	90 ± 6	96 ± 9	94 ± 7	NS
	Ar	4	98 ± 9	96 ± 8	115 ± 13	110 ± 7	0.0467
	He	4	98 ± 3	127 ± 17	141 ± 24 <sup>a</sup>	130 ± 21	0.0142
	N <sub>2</sub>	4	104 ± 3	118 ± 8 <sup>a</sup>	N/A	N/A	0.0110
動脈圧 (mmHg)	CO <sub>2</sub>	6	53 ± 3	52 ± 3	51 ± 2	50 ± 2	NS
	N <sub>2</sub> O	6	52 ± 3	50 ± 3	52 ± 3	52 ± 3	NS
	Ar	4	47 ± 4	41 ± 1	44 ± 2	46 ± 1	NS
	He	4	60 ± 7	54 ± 8	52 ± 8 <sup>a</sup>	55 ± 7	0.0056
	N <sub>2</sub>	4	56 ± 7	39 ± 2	N/A	N/A	NS

<sup>a</sup> 投与前に対して有意、Dunnettのpost hoc検定。

<sup>b</sup> 対応のあるt検定の結果。

\* N/A;測定せず。

不溶性ガス投与群では、平均肺動脈圧、終末呼気二酸化炭素濃度だけでなく、重篤な酸血症、高炭酸症、頻脈が観察された。

以上の結果より、製造用剤に用いる食品添加物として現在使用されている窒素および二酸化炭素では何らかの変化がみられたのに対し、水溶性ガスである亜酸化窒素では死亡数、血液 pH、血中二酸化炭素分圧、心拍数、平均動脈圧、終末呼気二酸化炭素濃度のいずれの項目においても、有意な変化はみられなかった(表 11)。

## ② 14 日間吸入投与毒性試験

Parbrook らは、Norwegian hooded ラットに対する、数週間にわたる亜酸化窒素環境下における影響を調べた(40)。各群 12 匹からなる 3 群を設け、空気(対照群)、25%亜酸化窒素、21%酸素、54%窒素の混合気体、または 60%亜酸化窒素、21%酸素、19%窒素の混合気体中に曝露した。白血球数測定のため採血したところ、各群 2 匹が尾に炎症を生じた。白血球数変化の結果を図 11 に示す。

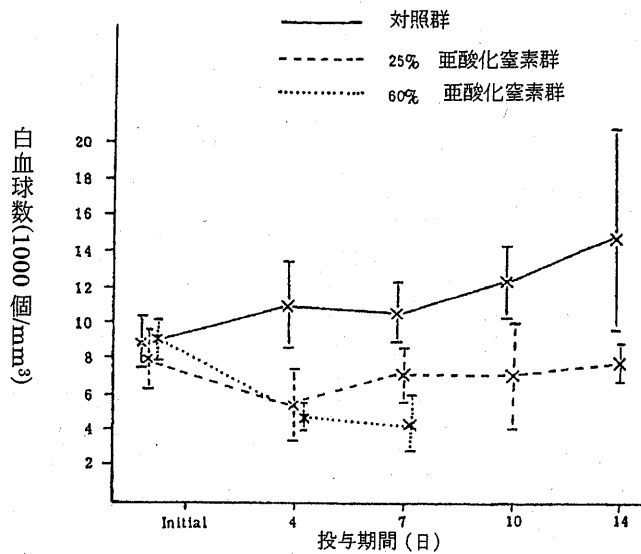


図 11 白血球数 (信頼限界 95%)

各群 10 匹ずつのラットを用いて、空気または 2 種類の異なる亜酸化窒素濃度下においた。対照群における白血球の増加は採血時の尾の外傷によるものと考えられる

60%亜酸化窒素投与ラットの 4 日後における白血球数は対照群に比べて低く、7 日目では、25%亜酸化窒素群および対照群に対して有意に低い値となった。2 匹は白血球減少症を呈し、1 匹は白血球の著減 (1250 細胞/mm<sup>2</sup>) を示して死亡した。従ってこの 60%亜酸化窒素投与群は実験の継続を中止した。

### ③ 繁殖試験

#### A. マウス

亜酸化窒素曝露による、繁殖性および胎児発生、雄の繁殖能に及ぼす影響を Swiss/ICR 系マウスを用いて検討した (43)。

実験 I においては、雌を 1 日 4 時間、妊娠 6~15 日目に、0.5、5.0、50%の亜酸化窒素に曝露した。対照群は、無処置の対照群、チャンバーでの空気曝露対照群、および陽性対照に妊娠 8 日目にレチノイン酸 15 mg/kg 投与群を設定した。レチノイン酸は Swiss/ICR 系マウスで感受性が高く、催奇形性を示す。妊娠 18 日目に母動物を屠殺し、子宮内の胚吸収や胎児の状態などを検討した。

実験 II においては各群 18~21 匹の雄を、雌と同様の時間および濃度の亜酸化窒素に 9 週間曝露した後に、各群雄の 2 倍数の雌と交配させた。

実験 I において、妊娠ラットには投与による影響はみられず、50%亜酸化窒素投与群においても、曝露中を含めて興奮や一般的な麻酔状態は観察されなかった。また、各群間で母動物の体重増加、同腹仔数、胎児 wastage (生殖損失)、胎児の大きさに有意な差はみられなかった (表 12)。レチノイン酸投与群では、口蓋破裂、骨格異常等で有意に高い値を示し、このモデルにおいて陽性対照として催奇形性を持つことが示されたが、亜酸化窒素

投与群では、いずれの用量においても奇形の有意な増加はみられなかった。

実験Ⅱにおいて、雌の妊娠率および同腹仔数、胎児 wastage、胎児の大きさについて、いずれの群間においても有意な差はみられず、値は全般に実験Ⅰと同様であった。

以上の結果より、最高用量の 50 %亜酸化窒素の 4 時間/日の曝露においても、投与による副作用はみられなかった。

表12 実験Ⅰ：妊娠6-15日目に亜酸化窒素を曝露した雌ラットの繁殖率\*

	コロニー対照	曝露対照	亜酸化窒素			陽性対象
			0.5 %	5.0 %	50.0 %	
雌・匹数	32	34	24	26	27	11
着床/母動物	13.2 ± 0.5	12.6 ± 0.5	12.6 ± 0.7	12.6 ± 0.6	13.2 ± 0.7	13.8 ± 0.4
生存胎児数/同腹仔数	11.4 ± 0.6	11.5 ± 0.4	11.2 ± 0.6	11.0 ± 0.6	11.6 ± 0.6	12.8 ± 0.6
生殖損失						
吸収(%)	13.1 ± 2.5	8.1 ± 1.1	10.3 ± 1.4	12.5 ± 2.7	12.6 ± 2.2	6.5 ± 2.8
子宮内死亡(%)	0.5 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.0	0.5 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.7 ± 0.7
平均胎児体重(g)	1.38 ± 0.02	1.36 ± 0.02	1.39 ± 0.04	1.36 ± 0.02	1.35 ± 0.03	1.31 ± 0.03
平均胎児身長(mm)	23.6 ± 0.2	23.4 ± 0.2	23.4 ± 0.2	23.2 ± 0.2	23.0 ± 0.2	22.7 ± 0.4

\* 値は平均±標準誤差で示した。

## B. ラット

Kripke らは、135 匹の LEW/f Mai 系雄性ラットを 20 %亜酸化窒素、20 %酸素、60 %窒素の混合気体に最長 35 日間曝露した (44)。本試験は大きく分けて 2 試験が実施されており、群ⅠからⅢの 3 群に分けて回復性を確認した試験 A と、投与を持続的 (24 時間/日) と間欠的 (8 時間/日) に最長 35 日間した場合の比較を検討した試験 B が実施された。( ) 内にラットの匹数を記載した。

### <試験 A>

群Ⅰ 対照群—空気 28 日 (5)、投与群—N<sub>2</sub>O 28 日 (4)

群Ⅱ 対照群—空気 35 日 (5)、投与群—N<sub>2</sub>O 32 日の後空気 3 日 (5)

群Ⅲ 対照群—空気 35 日 (5)、投与群—N<sub>2</sub>O 32 日の後空気 6 日 (5)

### <試験 B>

対照群—空気 1 (4)、2 (4)、4 (3)、7 (2)、14 (3)、21 (4)、35 (6) 日後屠殺

投与群①—持続的投与、1 (4)、2 (6)、4 (3)、7 (2)、14 (4)、21 (6)、35 (5) 日後屠殺

投与群②—間欠的投与、1 (4)、2 (4)、4 (4)、7 (2)、14 (4)、21 (2) 日後屠殺

試験 A で、精巣乾燥重量への影響とその回復性を確認し (図 12)、試験 B では、内臓の重量測定、肉眼的および病理組織学的検査を行い、唾液腺、骨格筋、骨格、骨髄、甲状腺、脳下垂体についても採取した。また、採血して血清中のテストステロン含量を測定した。

2 日目に両投与群の一部の試験動物で精細管の精子形成細胞に障害が局所的に生じ、14 日目には全ての動物で広範に観察された。この障害は、精細管内の精子形成細胞以外の支持細胞 (セルトリ細胞) および間細胞 (ライディヒ細胞) 等には観察されなかった。分化

前の精原細胞では曝露による障害はみられなかったが、これが有糸分裂、減数分裂によって精母細胞、精子細胞へと分化すると、曝露による障害や破壊が観察された。続いて、精子数が減少した。血清中のテストステロン量は長期曝露中に有意な影響はみられなかった。この所見は、亜酸化窒素曝露によって間細胞（ライディヒ細胞）が組織学的に影響を受けなかった結果を支持している。32日間の持続的曝露を終了した投与群の精巣において、精子形成細胞への障害は3日間では回復しなかったが、6日目には組織学的に構造の回復が観察され、正常の細胞分化、精子がみられた。しかし、その他の標本では曝露による精細管の障害は10日後にも残っており、精子形成の長期にわたる低下が示唆された。精巣においては、対照群と投与群ともに肉眼的観察では正常であったが、乾燥重量において28日間投与後、32日間投与3日後では投与群で有意な低値を示したが、32日間投与後6日では有意差はみられなくなった（図12）。

著者らは、この亜酸化窒素による精子形成への影響が、不純物として ppm レベルで混入している他の窒素酸化物（NO、NO<sub>2</sub>）による可能性を考慮し、二酸化窒素 1 ppm をラットに投与してその影響を検討した（45）。1日7時間を週5日、21日間にわたって投与した結果、投与群の精巣には、肉眼的および光学顕微鏡的検査では異常所見は観察されず、血清ビタミン B<sub>12</sub> レベルも正常であった。

以上の結果より、精子形成能低下に対する影響は亜酸化窒素単独によることが示された。

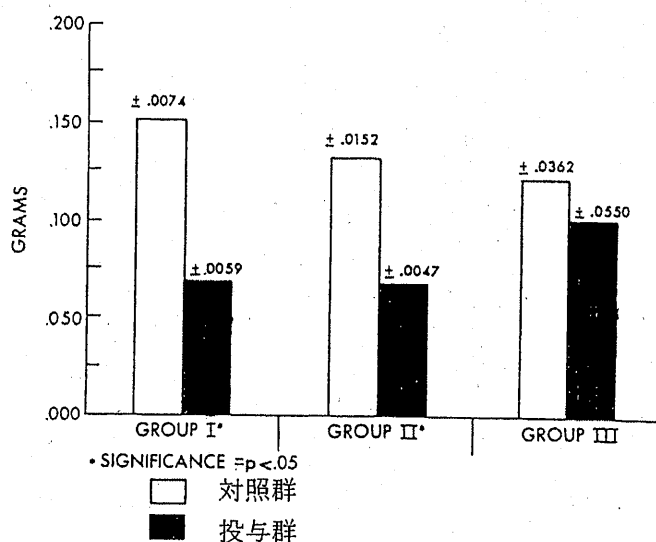


図12 20%亜酸化窒素（N<sub>2</sub>O）長期曝露後の精巣乾燥重量  
大気曝露の対照群と被験物質投与群間で、群I、IIにおいては有意差あり（p<0.05）。群IIIの投与群は精巣重量が高く、また群間では有意差はみられなかった。

群I 対照群—空気28日（5匹）、投与群—N<sub>2</sub>O28日（4匹）

群II 対照群—空気35日（5匹）、投与群—N<sub>2</sub>O32日の後空気3日（5匹）

群III 対照群—空気35日（5匹）、投与群—N<sub>2</sub>O32日の後空気6日（5匹）