

### 3) 代謝

Hong らは、ヒトおよびラットの腸内容物による  $^{15}\text{N}$  標識亜酸化窒素の代謝を、*in vitro* において検討した (61)。*In vivo* での腸内環境と同じ 5 %酸素分圧下で試験を行った。市販の  $^{15}$  亜酸化窒素を濃縮、蒸留の数段階を経て精製し、 $^{15}\text{N}$  不純物を除去した。雌雄 SD 系ラットを用い、うち 2 匹については、代謝実験開始前 3 日間は 1 日 2 回塩酸テトラサイクリン、硫酸ネオマイシンおよびバシトラシンを強制経口投与した。腸内容物の調整は、ヒトでは 1 人の異なる 3 日間の糞便から調整し、ラットは内容物を除いた大腸および小腸をバッファーで十分に洗い、腸を 3 部位に分けてホモジナイズを調整し、大腸および小腸内にあった内容物 (糞便) はホモジナイズして適当な濃度に調整した。調整液を試験容器に入れ、内容物は 16 時間、腸管壁は 3 時間、 $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。試験容器を真空内に置き、液体窒素では濃縮できないヘッドスペースガスを、液体窒素温度で活性化木炭トラップにより蒸留して除去した。このヘッドスペースガス中の残存基質および他の酸素、水等窒素以外のものを除去して、内部標準法により質料分析計によって [ $^{15}\text{N}$ ] 窒素 ( $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ ) を定量した。また、3 匹のラットの大腸内腔から注射筒によって 2 ml の気体を採取し、この酸素分圧を測定した。

ヒト大腸内容物、ラット腸内容物、ラット腸管壁から調整したホモジネート 20 ml から産生された [ $^{15}\text{N}$ ] 窒素量から、ラットおよびヒトの腸内容物が亜酸化窒素を活発に代謝したことが示された (表 20)。この代謝は、酸素濃度を 10 %および 20 %にした時に強く抑制され、5 %の低濃度でもわずかに抑制された。この結果は、亜酸化窒素の還元代謝経路のこれまでの研究の知見と一致する。洗浄腸管壁による代謝は非常にわずかであったことから、腸内容物による代謝が、腸の酵素活性によるものではないことが示された。また同様に、抗生物質処理によっても代謝阻害がみられたことから、この亜酸化窒素代謝が腸管内の微生物叢によることが示された。大腸内の平均酸素濃度は約 4 %であった。

表 20 [ $^{15}\text{N}$ ] 亜酸化窒素曝露後の腸内容物および腸管壁による [ $^{15}\text{N}$ ] 窒素産生\*

インキュベーション条件	ヒト大腸内容物 16時間	ラット腸内容物 16時間	ラット腸管壁 3時間
酸素濃度 (%)			
0	561 ± 35 (5)**	118 ± 14 (8)	0.0 ± 1.0 (4)
5	103 ± 17 (4)	47 ± 13 (6)	—
10	—	6 ± 4 (3)	—
20	—	6 ± 5 (3)	—
抗生物質	—	0.1 ± 0 (3)	—
煮沸	0.3 ± 0.2 (3)	0.0 ± 0 (3)	—

\* g湿重量試料当たりの nmol [ $^{15}\text{N}$ ] 窒素産生

5 nmol/g相当がバックグラウンド値として空実験から得られたので、この値を各実験値から引いて示した

\*\* ( )内は試料数

以上より、ヒトおよびラットの腸内容物には、嫌気性条件下においては高い還元酵素活性があり、通常の腸内に存在する低酸素分圧条件下においても、穏やかな還元活性を示した。

本試験で得られたデータから、以下が述べられる。5%酸素分圧下での代謝が *in vivo* と *in vitro* で同等であり、ラットとヒトの亜酸化窒素の取りこみが同等で、体重当たりの腸内容物の平均量が体重の3.3%と仮定する。この条件下で、体重70kgのヒトが75%の亜酸化窒素を4L/分の流量で3時間曝露された時、540Lを取り込み、26.3Lの亜酸化窒素を吸収する。本試験の結果から算出すると、約1.0mlまたは1.3mgの窒素が生成し、吸収した亜酸化窒素の0.004%が代謝されることになる。

#### 4) 排泄

一般的な薬理書において、以下のように記載されている(10)。亜酸化窒素を60分間吸入し、次に45分間洗浄した組織の濃度の例を図24に示した。排泄が始まるとすぐに、肺と血液の分圧は非常に低い(非麻酔の)レベルに下がっている。脳への血流量は多いので麻酔ガスの脳における分圧は急激に下がり、亜酸化窒素のような比較的不溶性の薬物では麻酔から急速な覚醒をもたらすと説明することができる。薬物は筋肉のような低血流の組織ではかなり長く残り、血流が非常に少ない脂肪ではさらに長時間残り、そのために薬物はこれらの組織から非常にゆるやかに移動する。

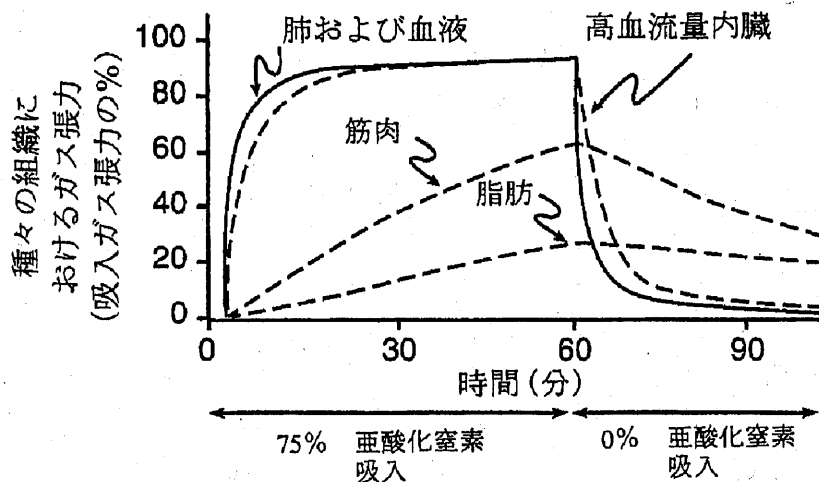


図24 取り込みと排泄の間の亜酸化窒素の組織分圧

曲線は亜酸化窒素の組織分圧が、60分間の麻酔段階とそれに続く45分間の排泄段階の間、いかに吸入ガス分圧に近づくかということを示している。高血流量の内臓は脳、心臓、腎臓を含む。肝臓と腸は低血流であり、それらの分圧は高血流量の内臓の分圧と筋肉の分圧の間にある。

### (3) 吸入曝露における毒性試験結果に基づく経口投与時の安全性に関する考察

#### 1) 曝露量について

吸入における曝露量が上久保らによって報告されている (57)。各試験の亜酸化窒素吸入における曝露量を経口投与量と比較するため、本データからラットの吸入試験における吸入量を、ヒト体重を 50 kg、ラット体重を 400 g として体重換算し、曝露量を算出した。ヒトで麻酔効果が得られる吸入量 (使用された実験系での実際の亜酸化窒素濃度は 70 % であり、20 分間曝露時で 14.6 L) では、投与量は 585.5 mg/kg 体重と算出された (計算方法は脚注\*参照)。

「体内動態に関する資料」の図 20 (p.78)、図 22~23 (p.79) に示されるように、亜酸化窒素吸入後速やかに血中亜酸化窒素濃度は飽和に達し始める。亜酸化窒素の血液から肺への排泄は取り込みと同じ速度で進行するため、吸入量換算に用いた上久保らの報告においても、吸入 20~30 分以内で飽和量の 90 % が吸収されている。飽和以降に投与された亜酸化窒素は呼気中に排泄されることから、吸入 (曝露) 時間を 20 分として比較することを妥当とみなした。種差はないと仮定して、臨床試験で得られた 585.5 mg/kg 体重で換算した結果を次表に示した。

---

\* 20 分間の吸入量 14.6 L を、理想気体の状態方程式 ( $PV = nRT$ ) へ代入  
 $P = 1$ 、 $V = 14.6$ 、 $R = 0.082$ 、 $T = 298$  (25°C)、 $n = w/M = w/44.1$  より  
 $w = 14.6/0.082/298 \times 44.1 = 26.35$  g/45kg 体重  
よって、kg 体重当たりの 20 分間吸入時の吸入重量は 585.5 mg/kg 体重 となる。

安全性に関する試験結果

試験の種類	投与期間	供試動物	投与方法 (投与濃度)	換算吸入量*	試験結果	資料番号
反復投与毒性 (亜急性)	28日間	ラット	経口	26.8 mg/匹/日 (最高用量)	摂餌量、摂水量、尿検査および血液生化学的検査において変化がみられたが、クリームの影響と判断され、N <sub>2</sub> Oに起因しないと結論した その他の所見でN <sub>2</sub> Oの影響なし <NOAEL : 67.1 mg/kg>	38
	14日間 (1、2週間)	ラット 性不分別	吸入 (25%、 60%)	200.8 mg/匹 (60%時) [=502.0 mg/kg]	N <sub>2</sub> O曝露により、用量に相関して白血球数が有意に減少	40
繁殖試験	最長35日間	ラット 雄性	吸入 (20%)	66.9 mg/匹 [=167.3 mg/kg]	精細管の精子形成細胞障害による精細胞の減少	44
催奇形性試験	妊娠中 2-6日間	ラット 雌性	吸入 (50%)	167.3 mg/匹 [=418.3 mg/kg]	妊娠中のラットへのN <sub>2</sub> O曝露により、胎仔死亡、内蔵・骨格の異常	46
	妊娠5-11日 目のうち 1日(24時間)		吸入 (70%)	234.2 mg/匹 [=585.5 mg/kg]	妊娠9日目の投与で、生存児108例中54例に何らかの異常があり、この54例中51例は椎骨中心の完全分離であった	

一般薬理試験に関する試験結果

試験の種類	投与期間	供試動物	投与方法 (投与濃度)	換算吸入量*	試験結果	資料番号
一般薬理試験	8日間	ラット (SD系、 Long-Evans 系、)	吸入 (70%)	234.2 mg/匹 [=585.5 mg/kg]	Long-Evans系のみで著しい白血球数の減少とリンパ球の割合のわずかな増加、SD系ではRNA、DNA量ともに変化はわずかで、Long-Evans系ではRNA量の上昇がみられ、RNA/DNA比が著しく変化	51
	2、4、6日間	ラット	吸入 (80%)	234.2 mg/匹 [=585.5 mg/kg]	総白血球数が投与2日目から減少し、投与6日目には、投与群では多形核球が全くみられなかった 大腿骨髄標本では、投与群で進行性の形成不全がみられた	52
	21-28日間 (30分間吸入)	健常成人	吸入 (40%)	16.73 g/人 [=334.6 mg/kg]	白血球数減少・心拍出量減少・前腕血流低下 心筋排出量低下・末梢血管収縮・前腕血流量低下・中心静脈血流のわずかな低下	55

体内動態に関する試験結果

試験の種類	投与期間	供試動物	投与方法 (投与濃度)	換算吸入量*	試験結果	資料番号
吸収	20-45分間	ヒト (健常人)	吸入 (70%)	26.35 g/人 [=585.5 mg/kg]	吸入直後は、大量に吸収され、個体飽和量の50%は吸入開始後5分以内に吸収 吸収量に個体差が大きい	57

\* 亜酸化窒素濃度70~80%については、ヒトの算出値;585.5 mg/kg体重(57)をそのまま引用し、それ未満の濃度については、比例計算によって算出した。

表より、ラット体重を400gとして算出した経口投与試験の1日摂取量は26.8 mg/匹/日(67.1 mg/kg 体重/日)で、ラット吸入試験の20分間曝露における亜酸化窒素吸入量は、66.9~234.2 mg/匹/20分(167.3~585.5 mg/kg 体重/20分)であった。白血球数への影響がみられたラットの試験における換算吸入量は、200.8(60%N<sub>2</sub>O) mg/匹(502.0 mg/kg 体重)、234.2

(70%および80% N<sub>2</sub>O) mg/匹 (585.5 mg/kg 体重) であり、特段の影響がみられない経口投与試験の 26.8 mg/匹/日 (67.1 mg/kg 体重/日) に対してそれぞれ、7.5 倍、8.7 倍となる。胎児への影響がみられた試験および精子形成障害がみられた試験における換算吸入量は 167.3 (50% N<sub>2</sub>O) mg/匹/20 分 (418.3 mg/kg 体重/20 分)、234.2 (50 または 70% N<sub>2</sub>O) mg/匹/20 分 (585.5 mg/kg 体重/20 分) および 66.9 mg/匹 (167.3 mg/kg 体重) であり、経口投与試験の 6.2、8.7 および 2.5 倍となる。従って、吸入試験では経口試験に比べて曝露量が非常に高いと考えられる。

## 2) 亜酸化窒素添加ホイップクリーム摂取のヒトへの影響について

ラット経口投与試験では、ホイップクリームを缶から直接注射筒に吐出して充填しているため、吐出時に大気中に拡散される亜酸化窒素も一部含まれている。

実際の喫食では吐出時総量の約 21%<sup>\*</sup>を摂食すると推定され、ラット経口投与試験時の投与量よりも少ない。

従って、上述の吸入投与での曝露量の比較結果を考え合わせ、ヒトでの実際の摂取量が少ないことから、ヒトにおいて亜酸化窒素添加のホイップクリーム摂取による白血球数、生殖器及び胎児への影響は極めて少ないと考えられる。

なお、安全性に関する資料において示したように、15 年間の調査では、ヒトの鎮痛薬としての吸入使用において合併症の報告はない (42)。

---

\* 計算式：(吐出されたクリーム中の N<sub>2</sub>O 含量 (泡中 N<sub>2</sub>O+溶解 N<sub>2</sub>O) : 3.06 mg/g クリーム) ÷ (吐出時総 N<sub>2</sub>O 量 : 14.76 mg/g クリーム) × 100% = 20.7% (p.24)

(4) 食品添加物の 1 日摂取量に関する資料

1) 1 日摂取許容量 (ADI) の設定

JECFA においては、第 29 回会議で “Acceptable as propellant” と結論され、食品用噴射剤としての使用においては毒性学的に問題はないと評価された (p.2)。

米国においては、FDA が亜酸化窒素に関して、Selected Committee の下記のような結論に同意し、GRAS 指定に変更がないと結論づけている (62)。

Selected Committee が得ている毒性試験は吸入投与によって実施されたものだけである。これらの試験に用いられた曝露はヒトの食物を介する摂取とはほど遠く、経口ではなく吸入投与であるので、食物に添加した亜酸化窒素曝露を外挿することは困難である。吸入亜酸化窒素の毒性所見はあるが、用量が曝露食物の摂取から期待される用量に比べはるかに大きい。

ほとんどの気体は食品として噴射調理される間、又は噴射後、恐らく拡散する。歯科医や口腔外科医を対象とした疫学調査では、週 3 時間以上、麻酔を伴う有害作用を示したが、特異な作用は亜酸化窒素の使用に起因しなかった。

Selected Committee は、亜酸化窒素が現在使用している含量又は将来予測される含量で加圧容器中に乳及び野菜・脂肪トッピングの噴射剤として使用される場合、消費者への危険を疑わせる合理的な根拠又は示唆する入手可能な情報の証明はないと結論づけた。

これら JECFA 及び FDA の見解に従い、本要請では ADI を設定しない。なお、本要請では、米国で市販されているホイップクリーム缶製品を用いて投与可能な用量で 28 日間反復経口投与試験を実施し、安全性を確認した。