

成分名	亜硝酸ナトリウム
英 名	Sodium Nitrite
CAS No.	7632-00-0
収載公定書	食添 EP
A TOXNET DATABASE	https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/7632-00-0

投与経路	用途
殺中剤	抗酸化剤

JECFA の評価

ADI 0-0.07 mg/kg bw/日 (亜硝酸イオンとして) (2002 年、第 59 回) (ADI には、自然界から由来するすべての亜硝酸イオンを含む。但し、3 ヶ月以下の乳幼児を除く。) 亜硝酸ナトリウムは、1961 年に開かれた JECFA で評価され、ADI 0-0.4mg/kg bw (亜硝酸ナトリウムとして) (条件付 ADI: 0.4-0.8) が設定された。その後、第 17 回 JECFA (1973 年) において、ADI 0-0.2mg/kg bw (暫定、亜硝酸ナトリウムとして) に引き下げられ、第 20 回 (1976) 年には「6 ヶ月以下の乳幼児用食品へは使用すべきではない。」という条件が付された。1995 年、第 44 回で再評価され、ADI 0-0.06 mg/kg bw (亜硝酸イオンとして、自然界から由来するすべての亜硝酸塩を含む。) とされ、更に「3 ヶ月以下の乳幼児食には使用すべきでない。」と変更された。¹⁾ その後、2002 年第 59 回において硝酸塩、亜硝酸塩について再評価され、ADI 0-0.07 mg/kg bw/日に変更された。

2)

無作用量 (NOEL): ラット (100ml/L、飲料水で投与、10mg/kg bw/day に相当)²⁾

■ 単回投与毒性¹⁾

動物種	投与経路	LD50	文献
ラット	経口	85 mg/kg bw	Lehman, 1958
マウス	経口	175-220 mg/kg bw	Greenberg, 1945; Lehman, 1958

これらのげっ歯類における急性症状として、血管拡張、血圧低下、肝臓中のビタミン A 濃度の低下、甲状腺機能障害が認められた。

ラット¹⁾

単回投与した場合と同量の亜硝酸ナトリウムを数回に分け投与した場合の影響について、雌ラットを用いて比較した。メトヘモグロビン血症を指標とし、亜硝酸ナトリウム 160 mg/kg bw 又は 320 mg/kg bw を少量に分け (15 分毎に 3 回、続いて 30 分毎に 4 回) 投与した結果、40 mg/kg 又は 80 mg/kg bw をそれぞれ単回投与した場合に比較し、毒性の発現は低かった (De Vries, 1938) 同様の実験で、亜硝酸ナトリウム 100 mg/kg bw をラットに投与し、2 時間後に同量を再投与したところ、高い死亡率を示したが、4 時間後に同量投与した場合はすべての動物が生存していた。ラットにおけるメトヘモグロビンの半減期は 90 分と報告されており、この毒性発現結果の差異は、メトヘモグロビンの体内半減期に起因するものと推測される (Shuval & Gruener, 1972) 18-24 匹からなる生後 45-55 日齢の Long-Evans Hooded 雄ラットに 0、50、75、100 mg/kg bw の亜硝酸ナトリウムを投与し、行動、血液学的検査、脳の病理組織学的検査を行った。行動変化については、亜硝酸ナトリウムを 75 mg/kg の割合で投与した後、25 分後に観察し、脳の病理組織学的検査については投与 24 時間後に検査した。

検査前に 10 分間動物を水に浸漬すると、重篤な運動失調を生じたが、検査前 10 分に、脚に軽度のショツクを与えた場合は発現しなかった。

亜硝酸塩投与によるメトヘモグロビンの変化は認められなかった。虚血における変化と同様に、海馬形成細胞の延命作用が示唆された。(Isaacson & Fahey, 1987)¹⁾

1-2 イヌ¹⁾

イヌに亜硝酸ナトリウム 1-2g/kg をソーセージと共に投与したところ、投与後 1-2 時間内に、呼吸数及び心拍数が増加し、ECG も変化、メトヘモグロビン血症も認められ、血清中のナトリウムが増加しカリウムが減少、ASAT 活性も上昇した (Isaacson & Fahey, 1987)

■ 2. 反復投与毒性

マウス

① 1 群 5 匹のマウスからなる生後 6 又は 55 週齢のマウスに、亜硝酸ナトリウム 0、110 mg/kg bw を 7 日間強制経口投与した。亜硝酸ナトリウム投与群では強制走行距離の減少、ECG (心電図) の異常、限外顕微鏡下で心筋の変化が観察された (Kinoshita et al., 1985)¹⁾

② 亜硝酸ナトリウム、0、100、1000、1500 又は 2000 mg/L を飲料水に添加 (0、10、100、150 又は 200 mg/kg bw/日に相当する。)し 2 週間投与した結果、マウスの自発運動量が低下した (Gruener & Shuval, 1971)¹⁾

③ 1 群 10 匹の雄マウスからなる 5 群に、0、100、1000、1500 又は 2000 mg/L の亜硝酸ナトリウムを含む飲料水 (0、10、100、150 又は 200 mg/kg bw/日に相当する。)を投与した。

亜硝酸ナトリウム投与群の自発運動量は低下したが、特に最高投与群でその影響が大きかった。メトヘモグロビン血症も同様に観察された。実験者によると、投与群の鎮静効果はメトヘモグロビン血症に起因するものとは思われないとしている (Behroozi et al., 1971)¹⁾

④ 1 群雌雄 10 匹の B6C3F1 マウスに亜硝酸ナトリウムを 0、375、750、1500、3000 又は 5000 mg/L 含有する飲料水を 14 週間投与した。

この量は 1 日平均雄では 90、190、340、750、990 mg./kg bw、雌では 120、240、440、840 mg./kg bw に相当する。投与後 13 週で、亜硝酸ナトリウム最高投与群の雄ラットでは、対照群に比較し有意に体重増加率が減少した。

対照群と比較して、雄マウスの脾臓の相対重量、雌マウスの心臓、腎臓、肝臓及び脾臓の相対及び絶対重量の増加がみられた。最高投与群の雄では精子運動能力が低下し、3 高投与群の雌ラットでは対照群に比較し発情周期が有意に延長した。2 高投与群の雌雄のマウスでは前胃に扁平上皮過形成が認められ、2 高投与群の雄マウス及び 3 高投与群の雌マウスにおいては脾臓の髄外造血が観察された。又、2 高投与群の雄マウスでは精巣に変性も認められた。無作用量は 190mg/kg であった。(National Toxicology Program, 2001)²⁾

2-2 ラット

① 1 群雌雄 10 匹からなるラットに、亜硝酸ナトリウム 0、0.06、0.125、0.25、0.5 又は 1% 濃度含有する飲料水を 6 週間与えた。これらの濃度は、亜硝酸ナトリウムとして 0、60、125、250、500 又は 1000 mg/kg bw/日に相当する。1000 mg/kg bw/日投与群では中等度の体重増加の抑制が認められた。剖検の結果、高投与量の 2 群で血液、脾臓にメトヘモグロビン血症による著明な色調の変化 (褐色化) が認められた。飲料水で投与する場合の最大耐量は 0.25% であった (Maekawa et al., 1982)¹⁾

② 1 群雄ラット 8 匹からなる 4 群に、亜硝酸ナトリウム 0、100、300、2000 mg/L 含有する飲料水を 2 ヶ月

間与えた。これらの濃度は、亜硝酸ナトリウムとして 0、10、30 又は 200mg/kg bw/日に相当する。最高投与群において EEG の異常が認められたが、その他の投与群ではみられなかった。(Shuval & Gruener, 1972)¹⁾

③ 1群 8 匹の生後 1 ヶ月齢の雄ラットからなる 2 群に、亜硝酸ナトリウムを 0 又は 200mg/L を含む飲料水を 16 週間投与した。(亜硝酸ナトリウムとして 0 又は 20mg/kg bw/日に相当する。) メトヘモグロビン濃度は対照群で 0-1.2%であったのに対し、亜硝酸ナトリウム投与群では 0.5-3.1%であった。同時に、亜硝酸ナトリウム投与群では肺病変が高頻度に認められた。

同様の実験で、2 ヶ月齢のラット(亜硝酸ナトリウム投与群 12 匹、対照群 9 匹)に、亜硝酸ナトリウムを飲料水に 0、2000 mg/L 添加し、14 ヶ月間投与した。

メトヘモグロビン濃度は対照群が 0-1%であったのに対し、亜硝酸ナトリウム投与群では 1-35%とばらついていった。亜硝酸塩を摂取した動物は体重及び肝重量も小さく、血清ビタミン E 濃度も減少し、グルタチオン濃度の低い赤血球も増加し、すべての動物で重症な肺病変が認められた (Chow et al., 1980)¹⁾

④ 1群雌雄各 10 匹のラットに、亜硝酸ナトリウム 0、380、750、1500、3000 又は 5000mg/L を含む飲料水を 14 週間投与した。この量は雄ラットでは 30、55、120、200、310 mg/kg bw/日、雌ラットでは 40、80、130、220 及び 340 mg/kg bw/日に相当する。更に、1群雌雄 15 匹のラットを追加し、同濃度を含有する飲料水を 70-71 日間投与した。220 mg/kg bw/日を投与した群の雌 1 匹が試験終了前に死亡した。310 mg/kg bw/日を投与した雄ラットは対照群に比較し明らかに体重が少なかった。又、310 mg/kg bw/日投与群の雄及び 2 高投与群の雌ラットにおいては、対照群に比較し 2、14 週に摂水量の低下がみられた。一般状態の変化として、雄で亜硝酸ナトリウムを 200、310 mg/kg bw/日投与した群、雌では 3 高投与群の目の褐色化、口、舌、耳、足にチアノーゼが観察された。網赤血球数は雌雄とも 2 高投与群で増加した。エリトロンは雌雄最高投与群で、投与後 19 日目に低減したが、14 週までに再び増加した。全ての投与群でメトヘモグロビン量は増加し、総ヘモグロビン量に対する割合は雄の対照群で 0.002%、200mg/kg bw/日投与群の雄で 4.4%、310 mg/kg bw/日投与群の雄で 17%、雌の対照群で 0.37%、220 mg/kg bw/日投与群で 5.8%、340 mg/kg bw/日投与群で 11%であった。

実験者はこれらの影響に対する NOEL を算定できなかったと報告している。2 高投与群の雌雄における腎臓において網赤血球数の増加がみられ、赤血球生成能の亢進が示唆された。最高投与群の雌雄ラットでは前胃の扁平上皮細胞の過形成が有意に認められた。メトヘモグロビンが 3%以下の場合には悪影響及ぼすものではないと判断し、120 mg/kg bw/日投与群の精子運動能の低下を基に NOEL は 55 mg/kg bw/日とした (National Toxicology Program, 2001)²⁾

⑤ 1群 8 匹の雄ラットに、亜硝酸ナトリウムを 0、100、1000、2000 又は 3000 mg/L を含む飲料水を 2 年間投与した。成長、発育、死亡率、総ヘモグロビン量については亜硝酸ナトリウム投与群と対照群の間に有意な差異は見られなかった。

しかし、亜硝酸ナトリウムを 1000、2000 又は 3000 mg/L 摂取した群では総メトヘモグロビン量は試験中有意に高く、対照群に比較し、それぞれ 5%、12%、22%高かった。主要な病理組織学的変化は最高投与群において肺、心臓にみられ、心筋に小さな変性と線維化が観察された。冠動脈は、通常この年齢でみられるような厚く狭くなる代わりに、薄く拡張していた。肺における変化はリンパ球が浸潤した気管支拡張、肺胞の極度の膨張が認められ、亜硝酸ナトリウムを 1000、2000 又は 3000 mg/L 摂取した群でこのような現象が認められた。

この試験における NOEL は亜硝酸ナトリウムとして 100 mg/L であり、10 mg/kg bw /日に相当し、亜硝酸イオンとして 6.7mg /kg bw /日となる (Shuval & Gruener, 1972)¹⁾

2-3 ウサギ¹⁾

ラットで見られた副腎皮質球状帯の変化を裏つける現象として、亜硝酸ナトリウム 10 mg/kg bw/日を非経

口投与により 18 日間投与し、尿中ステロイドの排泄の変化をみた (Violante et al., 1973) 結果、時間の経過と共に、尿中の 17-ヒドロキシー、17-ケトン、17-ケトンの形をしたステロイド類の排泄量が減少した。NaNO₂ 20 mg/kg bw/日を 14 日間投与した場合でも 17-ヒドロキシー及び 17-ケトステロイドの排泄量が減少した。

3. 遺伝毒性

① 亜硝酸ナトリウムは *Salmonella typhimurium* による Ames テストで、復帰突然変異性を示したが、市販の SOS-chromotest では他の変異原性物質と同様陰性であった (Brams et al., 1987)。

しかし、Nakamura らによると、SOS-chromotest を用いたテストでは弱い遺伝毒性を示した (1987)¹⁾。

② マウス細胞によるテストで、亜硝酸ナトリウムは代謝活性化系非存在下では single strand breaks の増加を認めなかったが、比較的高濃度では投与量に比例し遺伝子突然変異、染色体異常がそれぞれ増加した。この変異原性はおそらく DNA の脱アミノ化によるもので、ニトロ素アミンの生成に起因するものではないと推定される (Kodama et al., 1976)¹⁾

③ V79 ハムスター細胞に亜硝酸ナトリウムを約 pH5 の酸性下で投与すると、6-TG mutant の増加が認められた (Budayoba, 1985)¹⁾

ハムスター培養細胞による試験では明らかに染色体異常が増加した (Tuda et al., 1976)。End-duplication も同様に報告されている。 (Tuda & Kato, 1977)

④ 亜硝酸ナトリウムは人胚肺組織から得た異常細胞を急激に誘導した (Stanford Research Institute, 1972-報告書なし)。マウスリンパ腫 L5178Y による thymidine kinase locus assay では、亜硝酸ナトリウムは 0.02-1mmol/L 濃度で陽性であり、既知の変異原物質、発がん物質に比較し弱い変異原性を示す (Wangenheim & Bolcsfoldi, 1988)¹⁾

⑤ Syrian ハムスターの妊娠 11 又は 12 日目に、亜硝酸ナトリウムを経口投与した。ハムスター胚細胞の培養細胞で薬剤抵抗性を示す変異 (8-AG、オウバイン)が増加した。同時に、用量依存性の小核形成の増加が認められたが、染色体異常発現細胞の増加は認められなかった。(Inui et al., 1979)¹⁾

⑥ In vitro で、亜硝酸ナトリウム添加によるハムスター細胞の形態の変異が報告されている (Tsuda et al., 1973)。In vitro では胚細胞の変異が生じるが、in-vivo でこの変異した細胞を移植すると、腫瘍細胞へ変化した (Inui et al., 1979)¹⁾

⑦ ショウジョウバエ翅毛スポットテスト (wing spot test) で、Graf et al. (1989) は翅体細胞に大小のシングルスポットの出現頻度の変化による突然変異性を観察した。

⑧ *E. coli* K 12 uvr B/rec A DNA repair を用いた宿主経路試験、及びマウス小核試験の 2 種の in vivo テストで変異原性は認められなかった (Couchell & Friedman, 1975; Hayashi et al., 1981, 1988; Hellmer & Bolcsfoldi, 1992)¹⁾。しかしながら、約 210 mg/kg bw になるように亜硝酸ナトリウムを飲料水に溶かし、妊娠ラットの妊娠 5-18 日及び非妊娠ラットにそれぞれ投与したところ、両群共骨髓細胞に染色体異常を誘発し、同様に胎児の肝細胞にも染色体異常が認められた。対照群及び被験物質投与群において、この分裂中期 (metaphase) の染色体異常を有する細胞数の割合は成熟ラットの骨髓に比較し、胎児の肝細胞の方が高かった (El Nahas et al., 1984; Luca et al., 1987)¹⁾。

⑨ Zimmermann (1977) によると、亜硝酸塩は次の三段階によって突然変異を誘発するとしている。

(1) DNA 鎖中の DNA 塩基から脱アミノする。しかしながら、脱アミノはしばしば自然発生的に生じ、これらの損傷に対する DNA 修復システムはバクテリアに存在することが知られており、おそらく哺乳類の細胞にも存在すると考えられている。

(2) DNA 鎖のプリン残基同士のクロスリンクの形成が 2 重鎖 DNA の場合にヘリクスの歪が生じる。このタイプの損傷の誘発は DNA の近くにポリアミン、グリコール、アルコール、フェノール等の分子が存在する場合に増強される (Thomas et al., 1979)。

(3) 亜硝酸塩はニトロ化され易い物質と反応し、N-ニトロ化合物をつくり、間接的に変異原性をあらわす。

1)

⑩ Alavantic et al.(1988)は、雄マウスの生殖細胞を用いて、in vivo テストで亜硝酸塩及び硝酸塩の影響を調査した。亜硝酸ナトリウム 60 もしくは 120 mg/kg bw/日を 17 日間投与後、UDS(処理後 17 日)及び精子細胞における精子形態異常(処理後 11 日又は 17 日)を調査した。硝酸塩は 600 又は 1200 mg/kg bw/日を 3 日間投与した。この結果、亜硝酸塩(硝酸塩も)は UDS 反応を誘発しなかった。精子頭部形態異常試験において亜硝酸ナトリウム 120 mg/kg bw/日を投与した群では投与 11 及び 17 日の検査で陽性が認められた。¹⁾

⑪ 亜硝酸ナトリウムは Salmonella typhimurium TA100 に対して、Aroclor 1254 で誘導したハムスター及びラットの肝臓酵素による代謝活性化の有無に係わらず、変異原性を示したが、TA98 に対しては陰性であった。雄ラット及びマウスに亜硝酸ナトリウムを腹腔内投与し小核試験を行ったが、骨髓の小核形成は認められず、マウスの末梢血液を用いた 14 週にわたる小核試験でも陰性の結果が得られている(National Toxicology Program, 2001)。²⁾

■ 癌原性

マウス

① 1 群雌雄 50 匹のマウスからなる 4 群に、亜硝酸ナトリウムをそれぞれ 0、1000、2500 又は 5000 mg/L 含有する飲料水を 18 ヶ月間投与(0、200、500、1000 mg/kg bw/日にそれぞれ相当する。)した。腫瘍の発生は認められなかった(Inai et al., 1964)¹⁾。

② 1 群 200 匹からなる近交系のマウスに、0 又は 0.2%/L 亜硝酸ナトリウム を含有する飲料水を投与した。その内、100 匹は 0.2%/L 亜硝酸ナトリウムに子宮内暴露(妊娠中、授乳中)し、離乳後は 0.2%/L 亜硝酸ナトリウム飲料水を投与した。病理組織学的検査では、亜硝酸ナトリウムは暴露期間に関係なく中枢神経系の腫瘍発生に影響を及ぼさないことが示唆された。この結果は亜硝酸ナトリウムが VM マウスで大脳グリオーマの原因の可能性が高いことを示唆する先の実験結果と矛盾するものであった(Hawkes et al., 1992)¹⁾。

③ 1 群雌雄各 50 匹の B6C3F1 マウスに亜硝酸ナトリウムを 0、750、1500 又は 3000 mg/L を含む飲料水を 2 年間投与した。これらの投与量はそれぞれ雄では 60、120、220 mg/kg bw/日、雌では 45、90、160 mg/kg bw/日に相当する。投与群の生存率は対照群と変わらなかった。最高投与群の雌では実験終了まで対照群に比較し体重が小さく、投与群の摂水量も対照群に比較し少なかった。雌マウスの前胃の扁平上皮乳頭腫及び扁平上皮癌の発生頻度の増加が認められた。最高投与群の雄では対照群に比較し、前胃の腺上皮の過形成の発生頻度の増加がみられた。しかし、前胃の扁平上皮乳頭腫及び扁平上皮癌の発生頻度の増加傾向のみでがん原性を判断することはできなかった(National Toxicology Program, 2001)²⁾。

4-2 ラット

① 米国 FDA による大規模試験(Newbern, 1978, 1979)で、対照群ラット 573 匹、亜硝酸塩投与群では 1383 匹のラットにそれぞれ 0、25、50、100、200 mg/kg bw を餌又は飲料水に添加し投与した。亜硝酸塩投与群の一部は出生 5 日前から、その他は離乳生涯投与を開始した。餌は、通常用いる動物飼料及び寒天をベースにした半合成飼料の2種類を用いた。Newbern(1978, 1979)は全ての亜硝酸塩投与群でリンパ腫の発生が増加したと報告した(投与群の発生率が 10.2%に対し、対照群では 5.4%であった。)。しかしながら、政府の Interagency Working Group は同一組織プレパラートを精査し異なる結論、即ち、亜硝酸塩処理群及び対照群とも、リンパ腫の発生率は少数(約 1%)であると結論した。この不一致は Newbern がリンパ腫と診断したものを、Interagency Working Group は髄外造血、形質細胞増多症又は組織球肉腫と診断し、リンパ腫としては極少数でしかなかったことによる。その他の腫瘍の発生は認められなかった (FDA, 1980a,b)¹⁾。

② 1群雌雄 50 匹の F344 ラット 3 群に、亜硝酸ナトリウムを 0、0.125 又は 0.25%濃度になるよう飲料水に加え、2 年間投与した。発癌の所見は認められなかった。対照群に比較し、高投与群の雌ラットにおいて有意に腫瘍発生率の低下が観察された。この低下の理由の一つとして、この種のラットで自然発生的にみられる(約 25%)単核細胞白血病(mononuclear cell leukaemia)に起因するものと思われる (Mekawa et al., 1982)¹⁾。

③ 1群雌雄 24 匹からなる F344 ラットに、亜硝酸ナトリウムを 2000 mg/kg 添加した餌(100 mg/kg bw/日に相当する。)或いは 200 mg/kg bw/日に相当する亜硝酸ナトリウムを添加した飲料水を投与した。この結果、癌原性は認められず、亜硝酸塩処理群で雌雄ともに F344 系ラットに高頻度に自然発生する単球性白血病の発現頻度の低下が認められた。亜硝酸塩投与群において、その他の腫瘍発生増加は認められなかった(Lijinsky et al, 1983)¹⁾。

④ 1群 50 匹からなる生後 6 週齢の F344 雄ラットを用いて長期投与試験を行った。亜硝酸ナトリウムの 0.2 又は 0.5%を低たん白飼料に混合し 115 週間投与した。雄 20 匹からなる対照群は低たん白飼料のみを投与した。亜硝酸ナトリウム投与群では体重増加率が減少し、投与開始 1 週間後の RBC、PCV 及びヘモグロビン量は減少した。RBC は 8 週後も引き続き減少したが、徐々に回復し 52 週には正常に戻った。投与量に依存して、リンパ腫、白血病、精巣間質細胞腫の発生時期、発生頻度の低下が認められた。白血病はリンパ腫を持つ動物のみに認められ、この 2 つの腫瘍には関連性のあることが示唆された。この実験条件では亜硝酸ナトリウムのラットにおける発癌性は認められず、むしろ、投与量に依存して腫瘍発生率が低減する傾向が見られた(Grant & Butler, 1989)¹⁾。

⑤ 1群雌雄各 50 匹の Fisher344/N ラットに、亜硝酸ナトリウム 0、750、1500、3000 mg/L を飲料水に添加し、2 年間投与した。この量は雄では 35、70、130 mg/kg bw、雌では 40、80、150 mg/kg bw に相当する。血漿亜硝酸及び血中ヘモグロビンのトキシコキネティクス検査を目的として、雌雄各 10 匹に同量の亜硝酸ナトリウムを 12 ヶ月間投与した。生存率に対照群との差は認められなかった。最高投与群においては対照群に比べ、試験期間を通して平均体重が低く、摂水量も低かった。又、その他の投与群における摂水量は 14 週以降で低かった。最高投与群の雌雄ラットにおいて、前胃の上皮に過形成が認められ、その発生頻度は対照群に比較し有意に高かった。雌ラットにおいて乳腺線維腺腫の発生は中間投与群で有意に高く、低投与の 2 群においても多発性の線維腺腫の増加が認められたものの、これらの腫瘍の背景値は高頻度であり、最高投与群では発生頻度の増加は認められなかった。単核細胞白血病の発生は 80、150 mg/kg bw/日投与群の雌雄で有意に減少した。本試験条件下においてがん原性を示唆する結果は認められなかった(National Toxicology Program, 2001)²⁾。

■ 生殖発生毒性

マウス

① 1群約 15 匹からなる妊娠 ICR マウスに、亜硝酸ナトリウムを 0、100 又は 1000 mg/L 濃度で含有する飲料水を妊娠 7-18 日間投与した。亜硝酸ナトリウム投与群と対照群を比較し、胎児数、胎児の体重、死亡胎児数に、亜硝酸ナトリウムの毒性を示唆する影響は認められなかった。

亜硝酸ナトリウム投与群の胎児の外表異常、骨格異常も対照群と比較し差は認められなかった。亜硝酸ナトリウムにより子宮内で暴露された胎児の肝細胞の染色体について観察した結果、染色体切断及びギャップの発現頻度に差は認められなかった。以上のとおり、この実験条件において亜硝酸ナトリウムの催奇形性、変異原性は認められなかった(Shimaria et al., 1989)¹⁾。

② Swiss CD-1 マウスを用い、亜硝酸ナトリウムの繁殖に及ぼす影響を見た。投与量を設定する目的で、同居期間中 0.06%、0.12%、0.24%(W/V)濃度の亜硝酸ナトリウムを含有する飲料水を投与した。同居期間

の高投与群における F0 の体重は減少しなかったものの、摂水量は 10-17%減少した。亜硝酸ナトリウムの摂取量はそれぞれ 120、260、420 mg/kg bwであった。この段階で、9 匹のマウスが死亡したが、0.06%投与群で 3 匹、0.12%投与群で 4 匹、0.24%投与群は 0、対照群で 1 匹であった。1 対当りの平均産児数、同腹児数、生存児数及び体重には、投与による影響は認められなかった。妊娠期間にも影響はなかった。各母動物は同居から離乳迄、出生児を哺育させた。哺育中の死亡率には亜硝酸塩処理による影響は認められなかったが、F1 動物の体重増加率は、最高投与群で生後 7-21 日にかけ 12-17%減少した。この原因は母動物の摂水量が減少したため、結果として乳の生成が減少したことによると思われる。

この段階において、繁殖に何ら影響が認められなかったため、対照群及び最高投与群のマウスのみについて生殖能に対する影響について検査した。この試験期間中、摂水量は 8%低減した。F1 の交配期の初期体重は全ての群で差がなかった。

F1 マウスの妊娠率、交尾率には投与による影響は認められず、生殖能も変わらなかった。産児数、生存児数、F2 動物の体重は投与による減少は認められなかった。分娩後、F2 動物、F1 動物をと殺し検査した。最終体重は投与による影響は認められず、各臓器重量にも変化は認められなかった。発情周期も変わらず、精巣上体の精子において活動性、濃度、形態に変化は認められなかった。病理組織学的検査では、0.24%投与群のマウスの肝臓、腎臓とも対照群と変わらなかった。このように、亜硝酸ナトリウムはマウスに対し 420 mg/kg 体重迄は生殖能への影響は認められず、この値が繁殖毒性の NOEL と考えられる(Chapin et al., 1997)²⁾

③ 1 群 12 匹の妊娠ラットに亜硝酸ナトリウムを飲料水に 0、2000 又は 3000 mg/L 添加し投与した。この濃度は亜硝酸ナトリウムとして 0、200、300 mg/kg bw/日に相当する。非妊娠ラットにも同様の処理を行った。亜硝酸ナトリウムを投与した妊娠ラットには貧血症症状が現れ、同様の処理を行った非妊娠ラットに比較し血中メトヘモグロビン含量も高かった。又、亜硝酸ナトリウムを投与した母ラットにおける新生児の死亡率は対照群に比較し明らかに高く、特に、離乳前 3 週間において顕著であった。児ラットの死亡率は対照群で 6%であったが、2000 mg 投与群では 30%、3000 mg 投与群では 53%であった。出生時体重は全ての群で同等であったが、親動物に亜硝酸ナトリウムを投与した群の児ラットの体重増加率は顕著に低かった(Shuval & Gruener, 1972)。

④ 亜硝酸ナトリウムを 2.5-50 mg/kg bw を妊娠ラットに投与した結果、胎児にメトヘモグロビンの産生がみられ、化合物の胎盤移行が示唆された(Shuval & Gruener, 1972)

⑤ 2 世代繁殖試験において、亜硝酸ナトリウムを 0、240 又は 460 mg 含有する餌で妊娠時から 28 ヶ月間飼育したが、出生児数、死亡数、生涯成長率等に変化は認められなかった。この投与量は、それぞれ 0、12、23 mg/kg bw/日に相当する。(Shank & Newberne, 1976)

⑥ 妊娠 Long-Evans ラットに妊娠期間を通じ、亜硝酸ナトリウムを 0.5、1、2 又は 3g/L 添加した飲料水を投与した。投与群及び対照群の出産児には有意な差異は観察されなかった。その後、母動物に亜硝酸ナトリウムを 2 又は 3g/L 投与した群の F1 動物は体重増加率が低下し、著しい貧血症を呈し、出生後 3 週間で死亡する子ラットも出た。出生後 2 週間で、子ラットの血中 Hb、RBC、MCV(Mean corpuscular volume)は、対照群に比較し顕著に低下した。又、脂肪肝が観察され、血液塗末標本では顕著な不同血球、難染色性、乳糜様脂肪血が観察された。病理組織検査では中心小葉肝細胞の細胞質空胞化、骨髓・脾臓における血液形成の低下が認められた。1g/L 投与群においては、血液学的変化も認められたが、成長及び死亡率への影響は認められなかった。以上の結果から、0.5g 投与群が NOEL か又はそれに近い値であった。亜硝酸塩処理による影響をみるには、妊娠中よりも授乳期間中の方がより観察しやすい。(Roth et al., 1987)。

⑦ 妊娠及び授乳期間中、亜硝酸ナトリウムを 2 又は 3g/L 添加した飲料水を投与した Long-Evans ラットの

親動物から出生した新生児及び授乳児は重篤な小球性貧血及び発育遅延、高死亡率が認められ、更に、脂肪血症、脂肪肝損傷、骨髄・脾臓における血液形成低下、血清及び組織中の鉄濃度の低下が観察された。これらは全て鉄欠乏症に係わる特徴と一致する。母動物に亜硝酸ナトリウムを投与した新生児ラットに鉄補助剤を与えると新生児の貧血は消失し、他の亜硝酸塩によって生じた悪影響も消失した(Shuval & Gruener, 1972; Roth et al., 1987)。亜硝酸塩投与をした母ラットの母乳中の鉄含量は低減し、胎児又は授乳児で顕著な鉄欠乏症が観察された。このように、亜硝酸塩投与を行った母ラットでは胎児及び新生児に対する鉄供給能力が減少することにより、新生児において重篤な鉄欠乏症を引き起こす(Roth & Smith, 1988)。

⑧ 妊娠ラット 10 匹及び 15 匹からなる 2 群に、それぞれ妊娠 9 日、10 日目に亜硝酸ナトリウム 3g 又は 10g を混餌投与した。この量は 150 及び 500mg/kg bw/日の相当する。この結果は、何ら胎児毒性、催奇形性は認められなかった (Alexandrov et al., 1990)。

5-2 モルモット¹⁾

① 1 群 4 匹の妊娠モルモットに、亜硝酸ナトリウム 0、50 又は 60 mg/kg bw/日を出産前 15 日間、皮下投与した。50 mg/kg bw/日投与群では出産は正常であったが、60 mg/kg bw/日投与群では、投与 1 時間後に流産が 3 例発生し、続いて胎児死亡が観察された。死亡時、母動物及び胎児の血中メトヘモグロビン濃度は最高濃度に達し、胎児の血中酸素圧は対照群に比較し低かった。60 mg/kg bw/日投与群の母動物は 1 時間後に死亡した (Sinha & Sleight, 1971)。

② 次に、1 群 9 匹の妊娠モルモットに亜硝酸ナトリウムを 0、60 mg/kg bw/日を妊娠最後に皮下注射により単回投与した。親動物は亜硝酸塩投与後 0.25-56 時間の間隔でと殺し検査した。投与後 3 時間以上経過した段階で、胎児の 96%が死亡した。繁殖に影響を及ぼさない亜硝酸ナトリウムの投与量と母動物及び胎児で死亡がみられた投与量の差が小さいことが判明した (Sinha & Sleight, 1971)。

5-3 ウシ¹⁾

妊娠ウシに 7、9.5 及び 12 mg NO₂⁻/kg bw を 30 分間点滴静注した。亜硝酸塩を投与した母ウシの用量に依存した血中のヘモグロビンからメトヘモグロビンへの転換、平均動脈血圧の 30-50%の低下、用量に依存した回復期間を伴う心拍数の増加、部分的酸素張力(pO₂)の減少が認められた。胎児における変化はメトヘモグロビン量の僅かな上昇、心拍数の変化(瀕脈及び徐脈)、胎児 pO₂ の低下が認められたが、動物間でかなり数値にばらつきが認められた。全ての胎児は生存して生まれたが、亜硝酸塩の最高投与群では、投与後 2-3 日後に 3 頭のウシが早産した。

血液学的検査データ及び心血管に関するデータから、3 頭の胎児は他の胎児より更に重大な低酸素血状態であったことが示唆された (Van't Klooster et al., 1990)。

■ 局所刺激性

報告なし

■ その他の毒性

悪性腫瘍への形質転換に関する試験¹⁾

マウス BALB/c3T3 細胞に亜硝酸ナトリウム(5-20mM)を添加し、72 時間培養すると、用量依存的な転座(タイプⅢ)が認められた。この細胞を取り出し、ヌードマウス(免疫不全)に皮下注射したところ(1×10⁶個/スポット)、腫瘍の進行性増殖が認められた。一方、亜硝酸塩未処理の細胞では腫瘍の増殖は認められなかった。亜硝酸ナトリウムが細胞内成分と反応し発がん物質の N-nitroso 化合物を生成することにより腫瘍が発現するのではなく、亜硝酸ナトリウム自身が細胞形質転換作用を持つことが判明した。哺乳動物の活性

化されたマクロファージが NO₂-を生産することが示唆される (Tsuda & Hasegawa, 1990)。

抗酸化剤との相互作用に関する試験¹⁾

Fisher 雄ラットを用いた 4 週間投与試験により、前胃の細胞増殖に対する亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤であるアスコルビン酸ナトリウムの相互作用について検討した。1 群 5 匹の 6 週齢ラットに、カテコール 0.8%、ハイドロキノン 0.8%、TBHQ (tert-butylhydroquinone) 1%、gallic acid 2% 又はピロガロール 2% を単独或いは 0.3% 亜硝酸ナトリウムとともに飲料水に添加し、或いはアスコルビン酸ナトリウム 1% を混餌投与した。前胃粘膜は抗酸化剤単独投与に比較して抗酸化剤と NaNO₂ との併用により肥厚し、アスコルビン酸ナトリウムの追加投与により更にその肥厚を高めた (Yoshida et al., 1994)。

循環器系に及ぼす影響²⁾

亜硝酸塩及び有機硝酸塩は血管拡張作用があり (Nickerson, 1975)、亜硝酸ナトリウム 100–300mg/L を飲料水で 2 年間投与したラットで筋肉内冠状血管の拡張及び菲薄化が認められた (Shuval & Gruener, 1972)。亜硝酸塩を長期間摂取することにより、自然発生高血圧ラットの血圧を低下させ高血圧による二次病変の予防の有無について検討するため、96 匹のラットに亜硝酸ナトリウム又は重炭酸塩 50–75mmol/L を 4、8 又は 12 ヶ月投与した。各測定時点における動脈血圧 (tail-cuff 法で測定) は亜硝酸ナトリウム投与群が有意に低く、亜硝酸塩に対する耐性も認められなかった。同時に、心臓肥大、及び腎臓萎縮の発現頻度の低下傾向もみられた。亜硝酸ナトリウム 75mmol/L の投与は若齢ラットでは十分耐えうる量ではなかった (Haas et al., 1999)。

腫瘍誘発に対する影響²⁾

良く知られた発がん物質 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, phenolic compounds, catechol, 3-methoxycatechol and butylated hydroxyanisole) に、0.2–0.3% の亜硝酸ナトリウム投与 (200–300mg/kg に相当) を併用投与すると、前胃における腫瘍発生が増強されることが多数報告されている。しかし、この濃度より低濃度での研究は見当たらない。前胃の腫瘍はヒトに対し限定的な影響でしかないため、これらの結果が食品中の亜硝酸塩の安全性評価に意味を持つものとは考えられない (Hirose et al., 1993; Kawabe et al., 1994; Yoshida et al., 1994; Miyauchi et al., 2002)。最近の研究では、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-b]pyridine で発生したラットにおける乳腺腫瘍の発生率及びその大きさに及ぼす 0.2% 亜硝酸ナトリウム (200mg/kg bw に相当) 投与の影響を調べた結果、亜硝酸塩は腫瘍発生率に影響を及ぼさず、又、その大きさを縮小させる傾向が認められた。これは比較的高濃度の投与量における結果であり、食品中の亜硝酸塩の安全性評価に影響するものではない (Hirose et al., 2002)。

■ ヒトにおける知見

メトヘモグロビン形成¹⁾

- ① 食品中の亜硝酸塩による食中毒事故が報告されている。人の経口投与による致死量は 33–250 mg NO₂-/kg bw とされ、子供及び高齢者では低用量が適用される (Corre & Breimer, 1979)。メトヘモグロビン血症を誘発する毒性量は 1–8.3 mg/kg bw の範囲である (Winton et al., 1971; Simon, 1970)。
- ② 亜硝酸塩の高濃度暴露による中毒については種々報告されている (Machabert et al., 1994; Dudley & Salomon, 1993; Bradberry et al., 1994; Kaplan et al., 1990; Walley & Flanagan, 1987)。亜硝酸塩の毒性は吸入によっても、経口によっても誘発される。亜硝酸イオンとして、0.4–>200 mg/kg bw の範囲で、摂取後に亜硝酸塩による中毒症状及びメトヘモグロビン血症が現れる。メトヘモグロビン血症の症状は亜硝酸塩

の暴露量に応じ、呼吸困難、頻脈に続いて、チアノーゼ、多幸症、顔面紅潮、頭痛、めまい、失調症等の症状がでる。メトヘモグロビン血症の患者は酸素及び又はビタミンCとメチレンブルーの併用投与で回復するが、重症の場合には交換輸血を行う(Kalpan et al., 1990; Walley & Flanagan, 1987; Bradberry et al., 1994)。人における亜硝酸塩の毒性に関する他の亜硝酸ナトリウムの情報として、血管拡張剤としての使用或いはシアン中毒の解毒剤としての利用がある。30-300 mg/人(0.5-5 mg/kg bw に相当する。)では毒性効果を示さなかった(NAS, 1981)。

③ 生後3ヶ月以下の乳児は別として、他の遺伝的或いは疾病の影響で生体に異常を来しているグループの人が、硝酸塩や亜硝酸塩によるメトヘモグロビン血症に罹患することがある。この例としては、妊婦(Metcalf, 1961)、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠乏症(Kohl, 1973)、胃酸分泌が低減している成人、遺伝的に赤血球中のNADH又はメトヘモグロビンレダクターゼ欠損患者(Scott, 1960)、高齢者(Spiegelhalter)で報告されている。同様に、ヘモグロビンが遺伝的に構造異常の人も、食事による亜硝酸塩や硝酸塩のリスクが高まる(Jaffe & Heller, 1964, cited in NAS, 1981)。

④ 亜硝酸ナトリウムを0.5 mg/kg bw/日、調理した野菜に添加し9日間投与したところ、人の尿中の17-ヒドロキシ及び17-ケステロイドの排泄が減少した。この結果は副腎におけるステロイドの生産が低減したことを示唆し、ウサギにおける報告と一致している(Violante et al., 1973)。このことは、亜硝酸塩を投与したラットにおいて副腎の球状帯細胞の肥大が認められることから支持される(Til et al., 1988, 1990; Boink et al. in press)。

引用文献

1) WHO Food Additive Series 35 (NITRITE and potential endogenous formation Of N-nitroso compounds) (1995)

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je13.htm>

2) WHO Food Additive Series 50 (NITRITE and potential endogenous formation Of N-nitroso compounds) (2002)

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je05.htm>

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je07.htm>