

塩素酸ナトリウムによるメトヘモグロビン形成

Methemoglobin Formation by Sodium Chlorate

金島 弘恭 斎藤 富保 中野 道晴

Hiroyasu Kaneshima, Tomio Saito
and Michiharu Nakano

ササ類は北海道の各地域に広く自生しており、林地面積の約70%強(400万ha)を占め、森林造成時の大きな障害となっている。現在ササ類を防除するための除草剤として塩素酸塩製剤が広く使用されており¹⁾、昭和62年度の塩素酸塩製剤の本道における出荷量は73t強²⁾におよんでいる。

一方、塩素酸塩の強い酸化作用に基づく種々の中毒症状が知られており、時にはその安全性が問題にされる。塩素酸塩の主な中毒症状としては、皮膚・粘膜に対して刺激性が強いことから接触性皮膚炎を生じやすいこと、また生体内に吸収されるとメトヘモグロビン(MHb)血症、溶血性貧血、チアノーゼなどを生じる^{3~5)}ことが報告されている。塩素酸塩は *in vivo* ならびに *in vitro* でヘモグロビン(Hb)を酸化し、MHbを形成すること^{6,7)}が知られているが、その作用機構および MHb 形成能の強さについての報告は少ない。

今回これらを明らかにする目的でウサギの全血およびオキシヘモグロビン(HbO₂)溶液を用い、塩素酸(NaClO₃)とその生体内における分解物と考えられる亜塩素酸(NaClO₂)・次亜塩素酸(NaClO)の各ナトリウム塩ならびに対照として亜硝酸ナトリウム(NaNO₂)を用い MHb 形成について検討したので報告する。

試料および試薬

血液：脱纖維血（日本バイオテスト研究所製）および自家生産雄ウサギ(在来種、体重3.3kg)の脱纖維血を用いた。

試料液：NaClO₃(関東化学製特級)・NaClO₂(1級)・NaClO(食品添加物 15%溶液)およびNaNO₂はそれぞれ用時精製水に溶解した。

試薬：特に指定する他は和光純薬製特級を用いた。

等張リン酸緩衝液(等張PB)：NaCl 90.0g, Na₂HPO₄·12H₂O 34.41g および Na₂HPO₄·2H₂O 2.26gを精製水で溶解(pH7.4), 1lとし10%等張PB母液と

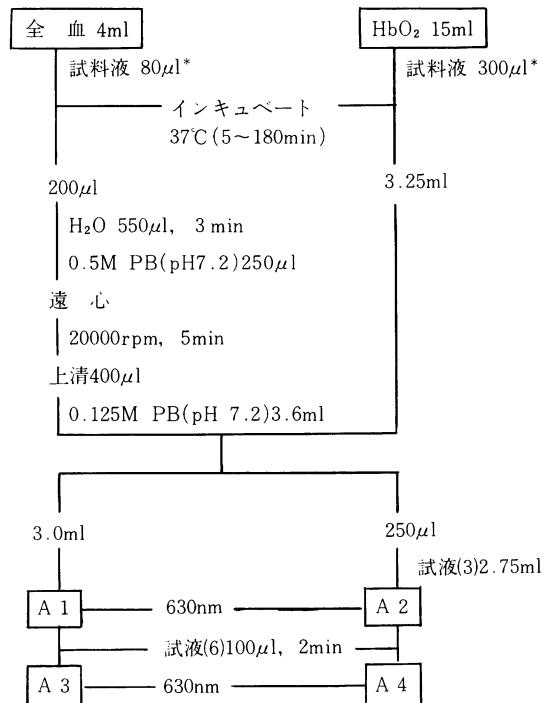


図1 メトヘモグロビンの測定操作

* 試料液：最終濃度

NaClO₃ (全血: 5.4×10^{-3} M, HbO₂: $0.6 \sim 3.8 \times 10^{-4}$ M)

NaClO₂ (全血: 6.6×10^{-3} M, HbO₂: $0.7 \sim 4.4 \times 10^{-4}$ M)

NaClO (全血: 7.2×10^{-3} M, HbO₂: $0.8 \sim 4.8 \times 10^{-4}$ M)

NaNO₂ (全血: 6.0×10^{-3} M, HbO₂: 1.0×10^{-4} M)

試液：本文参照

した。用時これを精製水で0.85%に希釈し、等張PBとした。

0.5M リン酸緩衝液(0.5M PB)：0.5M KH₂PO₄と0.5M Na₂HPO₄を混合し pH7.2とした。

HbO₂溶液：ウサギ脱纖維血100mlを遠心(3000rpm, 15

分間)し沈渣を等張PBで3回洗い赤血球を得た。これに同量の精製水を加え溶血し、0.5M PB 25mlおよび精製水を加え100mlとした。これを10,000rpmで30分間遠心し、上清(63ml)をHbO₂母液とした。このHüfner quotientは1.69~1.74であった。

試液：(1) 5% K₃Fe(CN)₆、(2) 0.125M リン酸緩衝液、(3)用時(1)を(2)で1/50に希釈、(4) 10% NaCN、(5) 12%酢酸、(6)用時(4)1.0mlと(5)0.9mlを混合。

MHbの測定法

MHbの形成は630nmの吸光度の増加として観測される。MHbの定量はHegeshらの方法⁸⁾を一部改変して行なった。全血およびHb溶液を試料として用いた時の測定法の概要を図1に示した。

全血を用いたMHb形成試験：全血4mlに塩素酸塩類試料液および亜硝酸塩液各80μl(最終濃度：NaClO₃:5.4×10⁻³M, NaClO₂:6.0×10⁻³M, NaClO:7.2×10⁻³M, NaNO₂:6.1×10⁻³M)を添加し、37°Cでインキュベートした。経時にサンプリング(200μl)し、溶血後その遠心上清を試液(2)で10倍希釈した。この希釈液3mlをとり日立557分光光度計でMHbの吸収帶である630nmの吸光度(A1)を測定した。ついで試液(6)100μlを加えてシアノメトヘモグロビンとし吸光度(A3)を測定した。一方、新たに同じ希釈液を250μlとり、試液(3)2.75mlを加え吸光度(A2)を測定後、同様に試液(6)を添加し吸光度(A4)を測定した。MHb(%)は前者(A1-A3)の後者(A2-A4)に対する比として次式により算出した。

$$MHb(\%) = (A1 - A3) / 12(A2 - A4) \times 100$$

HbO₂溶液を用いたMHb形成試験：HbO₂母液の1/30希釈溶液(7.5×10⁻³M)15mlに塩素酸塩類試料液および亜硝酸塩液各300μl(最終濃度：NaClO₃:0.6~3.8×10⁻⁴M, NaClO₂:0.7~4.4×10⁻⁴M, NaClO:0.8~4.8×10⁻⁴M, NaNO₂:1.0×10⁻⁴M)を添加し、37°Cでインキュベートした。以下全血試料と同様に(但し試液(3), (6)は1/30希釈)経時に630nmの吸光度の変化を観測しMHb(%)を算出した。

HbO₂溶液を用いたMHbの初期形成試験：HbO₂溶液(7.5×10⁻³M)3mlを予め37°Cに保温し、塩素酸塩類試料液および亜硝酸塩液各60μl(最終濃度：NaClO₃:2.5×10⁻³M, NaClO₂:2.9×10⁻⁴M, NaClO:3.6×10⁻⁴M, NaNO₂:3.9×10⁻⁴M)を添加し、保温しながら630nmにおける吸光度の変化を追跡した。

経口投与によるMHb形成試験：一群2匹の雄ウサギ(在来種、体重3.3kg)にNaClO₃水溶液(48mg/ml)5ml

(LDの1/50量)を胃ゾンデを用いて投与した。また同量を4日間経口投与しMHb量を測定した。

静脈投与によるMHb形成試験：雄ウサギ(在来種、体重3.3kg)にNaClO₃の48mg/ml(0.85%NaCl溶液)5mlを静注し、MHb量を測定した。

結果および考察

1. 塩素酸塩類添加によるMHb形成：全血を用いた添加実験では、図2に示すとおり対照として用いたNaNO₂のMHb形成能が最も強く、添加直後に66.1%と最高値を示し、以後すみやかに還元されて減少し180分後では2%とほぼ正常値に戻った。塩素酸塩類ではNaClO₂が最も強い形成能(最高値17.5%)を示したが、NaClO₃、NaClOではいずれも2%以下の正常値で推移した。しかし5mM NaClO₃の場合には10時間以上のインキュベーションで、はじめて著しいMHb形成が認められた。(図は省略)

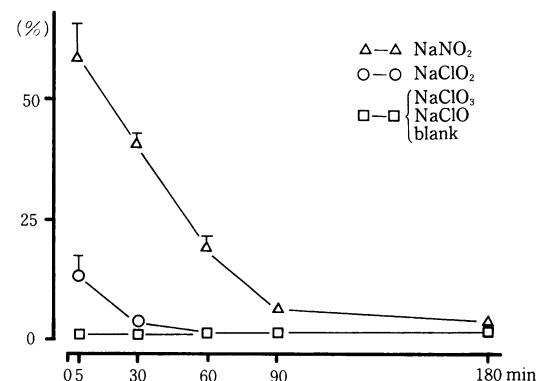


図2 全血を用いた塩素酸塩類によるMHb形成の経時的变化

HbO₂: 2.4×10⁻³M, NaClO₃: 5.4×10⁻³M
NaClO₂: 6.6×10⁻³M, NaClO: 7.2×10⁻³M
NaNO₂: 6.6×10⁻³M

E. Singelmannら⁷⁾はヒト赤血球浮遊液を用いた添加実験で3mMから30mMのNaClO₃はいずれもMHbを形成するが濃度の低下に依存して誘導期が長くなり、5mM以下の濃度では20%以上のMHb形成に数時間を要することを認めている。

HbO₂溶液を用いた実験結果は表1に示した。HbO₂溶液では全血と異なりNaClO₂が最も強いMHb形成能を示し、ついでNaNO₂、NaClOの順でMHbを形成したが、NaClO₃では0.38mMでもMHbの明らかな形成は認められなかった。このことからNaClO₃のMHb形成は、ClO₃⁻→ClO₂⁻→ClO⁻の分解に伴う活性酸素の生成が関与しているものと考えられる。

表1 HbO₂溶液を用いた塩素酸塩類による MHb 形成の経時的变化

塩類／時間(分)		30	60	90
NaClO ₃	0.6×10 ⁻⁴ M	0.49±0.49	0.66±0.66	1.61±0.14
	1.8	0.46±0.46	0.66±0.66	1.73±0.09
	3.8	0.72±0.21	1.79±0.60	1.76±0.56
NaClO ₂	0.7	11.28±3.30	23.57±3.65	25.47±4.67
	2.2	44.69±9.46	48.74±6.33	50.35±5.82
	4.4	61.59±13.72	67.40±13.36	71.14±13.24
NaClO	0.8	1.97±0.68	2.51±0.76	3.37±0.93
	2.4	3.81±0.48	5.11±0.76	6.14±1.27
	4.8	7.82±1.00	9.39±0.67	10.88±0.76
NaNO ₂	1.0	3.65±0.45	7.56±0.18	9.70±0.66
blank		0.95±0.24	1.38±0.32	1.72±0.29

 $\text{HbO}_2 : 7.5 \times 10^{-3} \text{M}, 37^\circ\text{C}$

次に MHb 初期形成における各陰イオンの形成能の強さを観測した。その結果は図3に示したとおり、対照に用いた NaNO₂ならびに NaClO₂による MHb 形成は認められたが、NaClO₃では認められなかった。NaClO ではインキュベート直後に若干の MHb 形成が認められ、そのまま推移した。NaNO₂は MHb 形成までに誘導期が認められ、一旦形成が始まるとすみやかに最高レベルに達した。また NaClO₂では誘導期が短かく比較的すみやかに最高レベル

に達するが、そのレベルは NaNO₂に比べて低く、両者は異なる反応曲線を示した。

渡辺ら⁹は、NaNO₂の MHb 形成には NaNO₂が Hb に作用して生じた過酸化水素とスーパーオキシドラジカルが関与していると推定している。今後塩素酸塩類からいかなる活性酸素種が生成するかを追究し、NaClO₃の作用機構を明らかにしていきたいと考える。

以上の結果から、NaClO₃による MHb 形成には誘導期があること、および血液中で分解生成する NaClO₂、NaClO の酸化能が MHb 形成に大きく関与することが推察された。

2. 塩素酸ナトリウム投与による MHb 形成：ウサギ（2匹）に LD の 1/50量に相当する NaClO₃溶液を 4 日間連続して経口投与し、MHb 量を測定したが 0.3~0.7% と正常値を示した。また同量を一回静脈内投与した場合の 4 時間および 24 時間後の MHb 量は 0.5~0.8% で MHb 血症は認められなかった。今後 NaClO₃の投与量、投与方法、投与期間を変えて *in vivo* における MHb 形成について検討する予定である。

文 献

- 1) 林地除草剤使用実務の手引、北海道営林局、1 (1980)
- 2) 昭和62年度植物防疫事業関係資料、北海道 (1987)
- 3) 吉村正一郎他編：急性中毒情報ファイル、49、広川書店、東京 (1987)
- 4) T. Matsushita *et al.*: Kumamoto Medical J., 28, 164 (1975)
- 5) C. Steffen and R. Seitz: Arch. Toxicol., 48, 281 (1981)

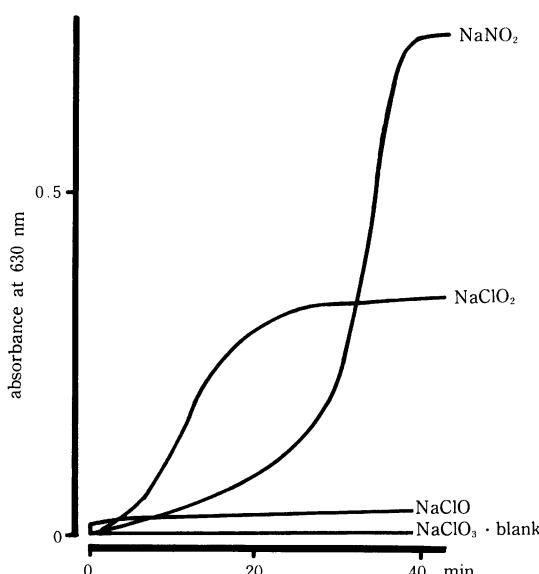


図3 酸素ヘモグロビン溶液を用いた塩素酸塩類によるメトヘモグロビンの初期形成

$\text{HbO}_2 : 7.5 \times 10^{-3} \text{M}, \text{NaClO}_3 : 2.5 \times 10^{-4} \text{M}$
 $\text{NaClO}_2 : 2.9 \times 10^{-4} \text{M}, \text{NaClO} : 3.6 \times 10^{-4} \text{M}$
 $\text{NaNO}_2 : 3.9 \times 10^{-4} \text{M}$

- 6) J.L. Ulrich and V.A. Shternov : *J. Pharm. Exper. Therap.*, **35**, 1 (1928)
- 7) E. Singelmann *et al.* : *Toxicology*, **30**, 135 (1984)
- 8) E. Hegesh *et al.* : *Clin. Chim. Acta*, **30**, 679 (1970)
- 9) 渡辺真策, 緒方正名 : *産業医学*, **23**, 550 (1981)