

#### ④ 催奇形性試験

ヒトとラットのそれぞれが亜酸化窒素により骨髄に影響を受け易いので被験動物としてラットを使用するのが極めて有用である。Shepard らは胚毒性を検討するため、妊娠中のSD系ラットに、亜酸化窒素濃度を変えて曝露した(46)。50%亜酸化窒素で2~6日間曝露したところ、発生後8日目では、胎児の死亡や吸収、また脊椎骨と肋骨の異常を招いた(表13)。

表13 妊娠8日目に50%亜酸化窒素+21%酸素-窒素環境下においた母ラットおよび21%酸素-窒素環境下においた対照群の母ラットから取り出された胎児の体重、身長、性比、および奇形の発生率

N <sub>2</sub> O50% 曝露日数	着床痕	吸収胚	生存児	平均体重 g	平均身長 mm	性比*	骨格奇形の 生存児	その他の 生存児
0(対照群)	77(6)†	1	76	3.7±0.1‡	36.5±0.2‡	39:37	2(46)§	0(29)§
2	36(3)	7(19%)	29(81%)	3.2	34	11:18	15(15)	0(14)
4	88(7)	22(25%)	66(75%)	2.8	31	22:44	42(42)	4(23)
6	23(2)	13(57%)	10(43%)	2.7	33	2:8	(0)	0(10)
実験総数	147(12)	42(28%)	105(72%)	2.9±0.1	31.8±0.3	35:70	57(57)	4(47)

\* 雄:雌比 † カッコ内は1腹の胎児数 ‡ 平均±標準誤差

§ 括弧内は評価された胚の数 || 撮影するのに完全な形を留めた小型のものを含む

50%亜酸化窒素曝露群の生存している胎児105例のうち、57例がアリザリンで染色されたが、残りの胎児は脊椎骨の骨化不全を示した。105匹中15匹は矮小であり、多くのタイプの骨格異常が発見された。47匹の胎児は解剖され、そのうち4匹は水腎症、心臓肥大、あるいは水頭症を含む先天性異常であった。

次の試験では24時間絶食させ、24時間70%亜酸化窒素、30%酸素の混合気体、または48時間10%酸素、90%窒素の混合気体(低酸素)の条件下においた。

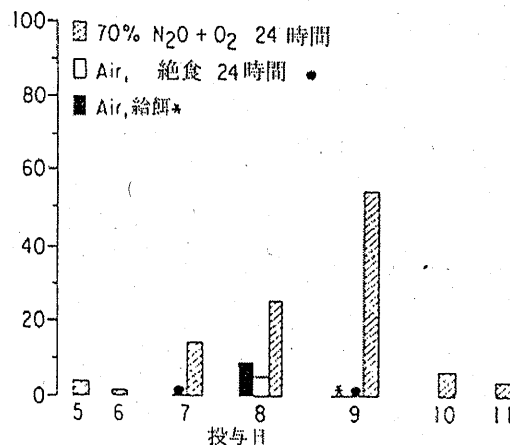


図13 5~11日目の亜酸化窒素曝露後に椎骨奇形がみられた20日生存児の割合(%)

亜酸化窒素の曝露に対して最も感受性の高い胚発生時期を検討するため、雌に5日~11日目のいずれか1日に24時間曝露した。この結果、9日目の曝露後に奇形発現率が最大に

なることが示された(図13)。9日目の投与で、生存児108例中54例に1個以上の異常が生じた。この時期のラット胚はヒト胚の場合の妊娠17~21日と同一の発生段階である。また、この異常が観察された54例中51例は椎骨中心の完全分離で、15例は脊柱側彎を伴う片側の骨化中心欠損を認め、12例は肋骨短縮または欠損、5例は肋骨癒着であった。数匹の同腹仔についてはスライス標本を作成して検査したが、内部臓器の異常は認められなかった。70%の亜酸化窒素投与により母動物の平均体重が24時間で8.0g減少したため、対照動物を7、8、9日目に絶食した。この結果20日目胎児の体重が減少したが、同腹仔数および肋骨と椎骨の異常率は増加しなかった(表14)。また酸素を8、9日目に10%に下げても骨格奇形は生じなかった。

表14 対照群、24時間絶食群、24時間70%亜酸化窒素曝露群および48時間10%酸素曝露群のラット胎児における体重、性比および奇形の発現頻度

投与	同腹仔	吸収胚	妊娠黄体数	生存児				骨格所見			
				生存児数	1腹児数	平均体重 ±標準誤差 g	性比*	検索胎児数	異常胎児		
									肋骨・椎骨異常	過剰肋骨 %	胸骨骨化中心 6個未満
対照群 なし	22	8	288	256	11.6	3.75±0.03	129:127	161	2	14	6
19日目	2	0	22	19	9.5	2.1		19	5	5	100
絶食対照群											
7日目	7	3	94	84	12.0	3.57±0.14	38:46	71	0	15	18†
8日目	12	7	147	128	10.7	3.59±0.10	50:78	80	5	19	9
9日目	9	5	106	94	10.4	3.66±0.09	46:48	94	0	20	7
10%O <sub>2</sub> 低酸素 8日及び9日目	3	1	38	37	12.3	3.47±0.05	21:16	37	8	5	19‡
70%N <sub>2</sub> O											
5日目	2	1	31	29	14.5	3.07±0.10§	15:14	29	3	0	59†
6日目	5	4	83	76	15.2	3.25±0.10§	35:41	76	1	14	26†
7日目	13	2	164	161	12.4	3.05±0.07§	69:92	147	14†	26†	21†
8日目	8	2	95	91	11.4	3.36±0.09§	37:54	91	25†	36†	20†
9日目	8	8	120	108	13.5	3.37±0.12§	60:48	108	54†	7	58†
10日目	8	4	93	101	12.6	3.70±0.20	55:46	78	6†	1	6
11日目	4	4	50	42	10.5		19:23	32	3	0	
50%N <sub>2</sub> O 8日目	8	7	98	77	9.6	3.52±0.05	38:37	76	12†	29	5

\* 雄対雌の比

† 対照群と投与群間の差、有意水準1%未満、 $\chi^2$ 検定。

‡ 対照群と試験群間の差、有意水準5%、 $\chi^2$ 検定。

§ t検定による無投与群との平均体重差、有意水準5%。

表14に示したように、平均体重が70%亜酸化窒素群で有意に低い値を示した。また、肋骨・脊椎骨異常が、70%亜酸化窒素曝露7~10日目群及び50%亜酸化窒素曝露8日目群で、対照群に対して有意に増加した。肋骨本数過剰では、70%亜酸化窒素曝露7、8日目群で有意に増加した。一方低酸素状態は、本実験系では影響を与えなかった。

妊娠中のラットにおける亜酸化窒素の作用機序に関する著者らの評価は、母体の低酸素

飽和状態の可能性を指摘している。骨化中心の発現の遅延および未発達は、胚仔の細胞レベルでの酸素利用を減少させて細胞増殖の減速、細胞死、酵素誘導の障害などの様々な分子機序によると考察している。

#### ⑤ 発がん性試験

250匹の3週齢 Swiss-Webster マウスに、10または40%亜酸化窒素を78週間曝露した(47)。対照群は空気に曝露し、曝露は1日4時間、週5日間行った。78週間の曝露後5週目に剖検した。40以上の組織を検索した後、器官重量を秤量し、肉眼的および病理組織学的検査を行った。

体重増加では、10%亜酸化窒素曝露群は対照群とほぼ同様の増加を示したが、40%亜酸化窒素曝露群では、雄で曝露開始60週間後、雌では40週間後に5%程度の増加抑制がみられた。その他には全体的に毒性作用は観察されなかった。器官重量および体重あたりの相対器官重量においても、有意な差はみられなかった。生存率においては、40%亜酸化窒素投与群で42週目に空調の不調による事故死があったものの、全ての群において試験期間中に同様の生存率を示した。肉眼的および病理組織学的検査では、卵巣嚢腫、胆嚢炎、膀胱結石、精巣萎縮を含む非腫瘍性の病変は観察されたが、これらは投与の影響ではなかった。病理組織学的検査では、細胞傷害や、血液塗抹標本および骨髄においても、巨赤芽球性の変化や骨髄機能低下はみられなかった。最初の腫瘍性病変は投与開始26週目に観察されたが、その他多くの腫瘍も試験期間を通して観察された(表15)。この実験系において、肺腺腫の発生率のバックグラウンドは高かったが、総腫瘍数および腫瘍別の発生数では、全ての群間で有意な差はみられなかった。

表15 肉眼所見によって観察されたマウス腫瘍発生率(%)

腫瘍	対照		10% 亜酸化窒素		40% 亜酸化窒素	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
肺腺腫	37.4	28.4	37.3	31.2	21.1	41.3
肝腫瘍	12.1	4.5	10.6	2.6	7.6	2.7
その他	9.9	21.6	13.3	14.3	10.5	14.6

#### ⑥ 変異原性試験

亜酸化窒素の変異原性および毒性を *in vitro* において検討するために、サルモネラ菌 TA98 および TA100 を用いた復帰突然変異試験が行われた(48)。ラット肝臓から調製した S-9 の存在下および非存在下において、プレート上に懸濁液とした菌を、亜酸化窒素分圧 0.5、1、2、4 または 6 気圧のチャンバーに8時間曝露し、その後40時間インキュベートした。インキュベートは全て37°Cで行った。室内の空気を陰性対照に、2-アミノアントラミン(2.5μg/プレート)を陽性対照とした。この結果、いずれの分圧下においても復帰突然変異体の上昇はみられなかった。また、生存率についても同時に検討したところ、4および6気圧において有意な死亡が確認されたが、この毒性作用の濃度においても、生存

細菌数あたりの復帰突然変異体は対照群に対して増加はしていなかった（表 16）。

チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）を用いて、姉妹染色分体交換（sister chromatid exchange、以下 SCE と略す）試験を行った（49）。亜酸化窒素を含む数種類の吸入麻酔薬に代謝活性化条件下で 1 時間曝露し、染色体あたりの SCE 生成を検討した。曝露濃度は各麻酔薬とも、50 %の被験者が外科切開に対して無反応の用量である 1 MAC（minimum alveolar concentration; 最小肺胞内濃度）としたため、亜酸化窒素においては 75 %に曝露された。インキュベート 1 時間後にはフラスコ内の亜酸化窒素濃度は曝露濃度の 96 %を保っていた。

表16 液体における亜酸化窒素へのインキュベーション後の変異原性および生菌数<sup>a</sup>

系統	濃度 (気圧)	復帰突然変異体	生菌数	復帰突然変異/ 生菌数 (10 <sup>-8</sup> )
TA98	0	27 ± 5	23 ± 3	1.1
	0.5	28 ± 6	20 ± 2	1.4
	1	26 ± 4	21 ± 4	1.2
	2	22 ± 3	15 ± 3	1.5
	4	15 ± 4 <sup>b</sup>	12 ± 2 <sup>b</sup>	1.3
	6	8 ± 3 <sup>b</sup>	8 ± 3 <sup>b</sup>	1
TA100	0	128 ± 17	12 ± 2	11
	0.5	130 ± 19	14 ± 3	9
	1	135 ± 18	12 ± 1	11
	2	120 ± 23	11 ± 2	11
	4	97 ± 14 <sup>b</sup>	8 ± 2 <sup>b</sup>	12
	6	62 ± 15 <sup>b</sup>	7 ± 1 <sup>b</sup>	9

<sup>a</sup> S-9存在下および非存在下の結果を組み合わせ、値を平均±標準誤差で示した。

<sup>b</sup> 対照群に対してp<0.05を有意とした。

被験物質中ではジビニルエーテル、フルオロキセン、エチルビニルエーテル、全てのビニルコーティング化合物において、対照群に対して有意な SCE 生成の増加を示したが、亜酸化窒素は有意な SCE 生成増加を示さなかった。また、曝露 24 時間後においても、亜酸化窒素は SCE 生成を誘導せず、変異原性を示さなかった。

チャイニーズハムスターの V79 系肺線維芽細胞を培地とともにビンに入れ一晩単層培養した後、加湿した 75 %亜酸化窒素と 20 %酸素に 1 L/min の流速で 1 時間曝露し、更に瓶を密閉して 37 °C で 23 時間放置した（50）。その後 8-アザグアニン耐性突然変異コロニー数を計測したが、変異体コロニー数の増加は認められず、変異原性は認められなかった（図 14）。

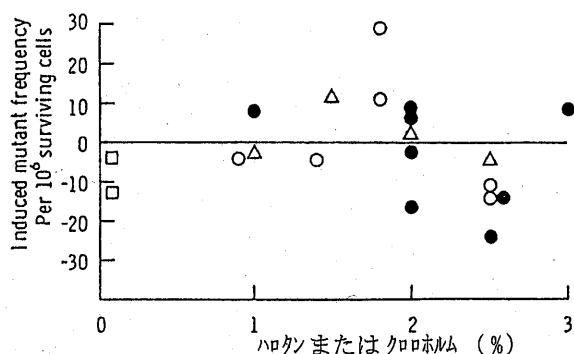


図 14 麻酔薬 24 時間曝露後の細胞  $10^6$  あたりの突然変異誘発率  
 (●ハロタン、○ハロタン+75%  $N_2O$ 、△クロロホルム、□ $N_2O$ )

⑦ 疫学調査

動物を用いた長期反復投与毒性試験の報告はないが、Baden らは、Swiss-Webster マウスを用いた発がん性試験において、10%または40%亜酸化窒素を78週間曝露した。この試験において非腫瘍性病変の検索を行っているが、投与に起因した影響は観察されなかった(47)。また、日本において笑気ガスは昭和36年に日本薬局方に収載されて以来、単独では歯科治療および分娩第1期の鎮痛目的で吸入麻酔薬として使用されている。副作用として、造血機能障害(顆粒球や血小板の減少等)や嘔気・嘔吐および末梢神経障害が挙げられるが、亜酸化窒素が再審査対象外であるため頻度は不明である(41)。

デンマークにおいては15年間にわたり、30~35%の亜酸化窒素を歯科領域において鎮痛薬として吸入してきた約300万例についての調査が実施され、特筆すべき副作用はみられなかったと報告されている(42)。