ラット胎仔に及ぼす解熱鎮痛薬（アスピリン， アセトアミノフェン）の生殖生理学および 細胞遺伝学的影響

The Effects of Aspirin and Acetaminophen during Pregnancy on Chromosomal Structure in Rat Fetuses

新潟大学医学部衛生学教室，北陸製薬株式会社中央研究所

鶴 崎 孝 男

新潟大学医学部衛生学教室

渡 辺 厳 一・山 本 正 治

Takao Tsuruzaki

Department of Hygiene and Preventive Medicine, Niigata University

School of Medicine, Niigata

Central Research Institute, Hokuriku Seiyaku Co., Ltd., Fukui

Gen-ichi Watanabe and Masaharu Yamamoto

Department of Hygiene and Preventive Medicine,

Niigata University School of Medicine, Niigata

The cytogenetic effects of analgesics and antipyretics on Sprague-Dawley rats, aged 8-18 weeks were examined. Aspirin or acetaminophen was administered to female rats for 2 weeks prior to mating. The doses of aspirin were 0 (controls-5% arabic gum sol.), 125 and 250 mg/kg.b.wt. and those of acetaminophen 0 (controls), 500 and 1,000 mg/kg.b.wt.. Treatment was continued until day 11.5 after copulation - copulation was at the 0.5 day - at which time, the animals were sacrificed and the fetuses were recovered. The fetuses were then analyzed cytogenetically by using a direct method for chromosome preparations.

Chromosome anomaly frequencies were 0.9 % (1/115), 5.1 % (5/98) and 4.7 % (4/85) respectively in the aspirin 0, 125 and 250 mg/kg.b.wt. groups, and 7.1 % (7/98) in the acetaminophen 500 mg/kg.b.wt. and 4.8 % (5/104) in the 1,000 mg/kg.b.wt. groups. A significant difference ($p=0.019$) was found only for the control group and the 500 mg/kg.b.wt. acetaminophen group.

When the differences were analyzed as to anomaly type, triploid occurrence was not related to drug treatment. However, aneuploid formation increased significantly after treatment with either drug: controls; 0.0 % (0/115), aspirin 125 mg/kg.b.wt.; 5.1 % (5/98), aspirin 250 mg/kg.b.wt.; 4.7 % (4/85), acetaminophen 500 mg/kg.b.wt.; 6.1 % (6/98) and acetaminophen 1,000 mg/kg.b.wt.; 4.8 % (5/104). The karyotypes were all mosaics, consisting of monosomy/normal or trisomy/normal cells.

The results, therefore, suggest that treatment with aspirin or acetaminophen during pregnancy induces mosaic aneuploidy in F₁ fetuses.

緒 言

われわれの教室では，1973年以来約5カ年にわたり，人工妊娠中絶手術標本（絨毛）を用いて，染色体異常の

成因研究を行ってきた^{1,2)}。

調査方法および結果は，およそつぎのとおりである。
妊娠3カ月以内（最終月経初日から起算して12週以内）
に社会経済的理由で中絶手術を希望した婦人に対して，

手術直前に最終月経初日の前 6 週間と後 3 週間、合計 9 週間、疾病、X 線照射、薬剤服用の有無などについて聴問した。手術でえた標本（絨毛）について細胞遺伝学的検索を行った。

その結果、解熱鎮痛剤（いわゆる風邪薬）を服用した群の染色体異常発生率は 58 例中 8 例（13.8%）であったのに対し、非服用群では 1,192 例中 72 例（6.0%）であった。この間には有意の差を認めた。しかし、この調査では、服用の理由となった疾病自体の役割（たとえばウイルス感染、発熱の有無など）について詳細な情報をえることは出来なかった。さらに、服用した解熱鎮痛剤は、ほぼ同一の薬理作用をもつというものの、それぞれの化学的構造は、多種多様であるため、えた統計的関連性（statistical association）から因果関係（causal association）を導きだすことはできなかった。

そこで、ヒトにおける疫学的研究では、解析の困難なこの間の事情について、動物を用い説明を行った。本論文では、その結果を報告する。

この実験では、解熱鎮痛薬として、最も代表的なサリチル酸誘導体としてアスピリン、アニリン誘導体としてアセトアミノフェンを選び、母獣（ラット）の薬物服用による F₁ 胎仔の染色体異常発生の有無について検索を行った。

実験材料および実験方法

Table 1 Increases in body weight of non-pregnant rats treated with acetaminophen for two weeks

Days Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0 mg/kg	3.6 ±1.65 n=10	2.8 ±4.47 n=10	9.3 ±3.37 n=10	15.7 ±2.63 n=10	17.4 ±3.34 n=10	19.2 ±4.34 n=10	23.5 ±5.70 n=10	27.4 ±5.46 n=10	30.3 ±5.72 n=10	34.2 ±7.39 n=10	38.7 ±6.26 n=10	35.7 ±7.24 n=10	35.7 ±11.28 n=10	37.8 ±10.37 n=10
300 mg/kg	0.6 ⁽¹⁾ ±2.99 n=10	5.9 ±2.69 n=10	10.3 ±2.91 n=10	15.0 ±4.03 n=10	13.9 ±5.38 n=10	18.3 ±5.72 n=10	21.3 ±6.20 n=10	25.2 ±7.30 n=10	26.9 ±8.92 n=10	31.5 ±10.32 n=10	36.1 ±9.95 n=10	31.7 ±9.06 n=10	33.6 ±10.91 n=10	33.5 ±9.79 n=10
500 mg/kg	2.2 ±2.10 n=10	4.0 ±2.31 n=10	7.4 ±2.17 n=10	12.9 ⁽¹⁾ ±2.92 n=10	6.9 ⁽²⁾ ±7.23 n=10	14.9 ⁽¹⁾ ±2.77 n=10	16.2 ⁽¹⁾ ±2.04 n=10	20.8 ⁽²⁾ ±2.57 n=10	24.9 ±6.52 n=10	26.4 ⁽¹⁾ ±8.54 n=10	29.2 ⁽¹⁾ ±10.87 n=10	29.8 ±8.32 n=9	31.4 ±12.02 n=9	31.6 ±15.47 n=9
700 mg/kg	4.5 ±2.84 n=10	7.6 ⁽²⁾ ±2.59 n=10	10.2 ±3.74 n=10	14.8 ±3.39 n=10	15.1 ±4.65 n=10	19.5 ±5.36 n=10	23.3 ±5.87 n=10	25.9 ±6.21 n=10	29.5 ±5.36 n=10	32.2 ±5.81 n=10	31.8 ⁽¹⁾ ±6.68 n=10	25.4 ⁽¹⁾ ±9.79 n=10	28.7 ±9.53 n=10	34.2 ±7.71 n=10
900 mg/kg	3.3 ±3.13 n=10	6.1 ±3.14 n=10	8.3 ±3.92 n=10	12.7 ±5.06 n=10	10.9 ⁽²⁾ ±4.53 n=10	14.4 ⁽¹⁾ ±5.15 n=10	18.1 ±7.77 n=10	17.5 ⁽²⁾ ±6.93 n=10	20.8 ⁽²⁾ ±8.38 n=10	20.2 ⁽²⁾ ±11.50 n=10	22.2 ⁽²⁾ ±10.84 n=10	18.4 ⁽²⁾ ±11.72 n=10	24.8 ⁽¹⁾ ±9.52 n=9	29.0 ⁽¹⁾ ±6.28 n=9

Legend: Body weight increase from day 0

Values=Mean±S.D. (g)

(1) =p<0.05, when compared with the control group

(2) =p<0.01, when compared with the control group

1. 動物

生後 8～18 週齢の JCL-SD 系雌ラット（日本クレア（株））、および同系の成熟雄ラットを用いた。

2. 投与用量の決定

薬剤の投与用量を決定するため、生後 8 週齢の非妊娠雌ラットにアセトアミノフェン（山本化学工業）（以下 ACTAP と略）およびアスピリン（三井東圧化学工業）（以下 ASP と略）を 14 日間毎日 1 回経口投与し、毒性症状を観察するとともに、体重測定を行った。ACTAP 群は 300, 500, 700 および 900 mg/kg, ASP 群は 250, 500, 750 および 1,000 mg/kg の用量を設定した。対照群（0 mg/kg）には 5% アラビアゴム水溶液のみ、薬物投与群と同容量与えた。

ACTAP について、900 mg/kg 群の体重増加量は対照群に較べて有意な抑制を示したが、他の薬物投与群で著変はなかった。また、500 および 900 mg/kg 群とも、それぞれ 1 例の死亡が認められた。しかし、生前体重の変化はなかった（Table 1）。したがって、ACTAP の最大耐量は 900 mg/kg 前後にあると推定し、今回大量を 1,000 mg/kg と決定し、さらに、少量として 500 mg/kg を設定した。また、ASP 群では 250, 500, 750 および 1,000 mg/kg 群のそれぞれに 10%（1/10）、20%（2/10）、70%（7/10）および 100%（9/9）の頻度で死亡が認められた。500 mg/kg 以上の群では、投与初期一過性の体重減少が認められたが、これらは、死亡の途にある動物の

Table 2 Increases in body weight of non-pregnant rats treated with aspirin for two weeks

Days Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0 mg/kg	3.4 ±2.37 n=10	4.6 ±4.74 n=10	7.7 ±5.85 n=10	11.0 ±5.58 n=10	13.1 ±4.48 n=10	11.3 ±5.12 n=10	20.5 ±6.95 n=10	21.2 ±3.61 n=10	20.7 ±8.34 n=10	23.8 ±5.25 n=10	28.4 ±7.81 n=10	26.8 ±8.63 n=10	29.0 ±6.58 n=10	36.2 ±5.96 n=10
250 mg/kg	1.0 ±3.65 n=10	1.8 ±5.20 n=10	5.9 ±5.13 n=10	8.7 ±3.50 n=10	12.5 ±6.10 n=10	11.6 ±3.72 n=10	16.2 ±6.30 n=10	17.7 ±4.08 n=10	20.7 ±5.19 n=10	22.7 ±4.52 n=10	23.3 ±5.98 n=10	22.6 ±5.59 n=9	25.8 ±6.46 n=9	31.4 ±7.55 n=9
500 mg/kg	-8.7 ⁽²⁾ ±7.48 n=10	-13.9 ⁽²⁾ ±11.35 n=10	-5.9 ⁽²⁾ ±8.58 n=8	2.6 ⁽¹⁾ ±8.07 n=8	8.4 ±5.71 n=8	9.3 ±3.77 n=8	15.9 ±4.67 n=8	16.9 ±6.17 n=8	18.8 ±7.48 n=8	20.9 ±7.20 n=8	24.9 ±7.79 n=8	25.8 ±7.48 n=8	26.3 ±7.78 n=8	22.0 ⁽²⁾ ±12.95 n=8
750 mg/kg	-10.5 ⁽²⁾ ±10.32 n=10	-8.6 ⁽¹⁾ ±16.59 n=5	-5.8 ±18.41 n=4	-1.8 ±18.19 n=4	6.5 ±16.90 n=4	10.3 ±16.54 n=4	19.0 ±14.65 n=4	12.8 ±20.71 n=4	25.3 ±15.82 n=3	24.0 ±12.49 n=3	27.0 ±15.52 n=3	30.0 ±17.06 n=3	35.3 ±15.04 n=3	35.7 ±14.47 n=3
1000 mg/kg	-15.0 ⁽²⁾ ±4.39 n=9	-22.0 ⁽²⁾ ±0.00 n=1												

Legend: Body weight increase from day 0

Values=Mean±S.D. (g)

(1) = $p < 0.05$, when compared with body weight at day 0

(2) = $p < 0.01$, when compared with body weight at day 0

体重激減を反映したものであった (Table 2)。250 mg/kg 群で、1 例の死亡を認めたが、ASP 投与による直接の死亡とは考えられず、体重にも変化のないことから、本用量を最大耐量と推定し、大量と決定した。少量として 125 mg/kg を設定した。

3. 投与期間および投与方法

薬剤の投与期間は、雄ラットと同居する 14 日間前、同居期間中 (最長 14 日間まで)、さらに、交尾成立後妊娠 11.5 日目までである。その間、毎日 1 回胃ゾンデを介して連続経口投与をした。なお、毎朝位相差顕微鏡 (オリンパス・システム生物顕微鏡, BH-2 型) で腔垢を観察し、精子の認められた日を妊娠 0.5 日とした。また、両薬物とも水に難溶なため、5% アラビアゴム水溶液に懸濁して投与をした。対照群 (0 mg/kg) には、5% アラビアゴム水溶液のみを薬物投与群と同容量与えた。

4. 検査方法

投与期間中は、毎日 1 回ラットの体重測定を行うとともに、一般症状を観察した。妊娠 11.5 日目の開腹の 2 時間前に、0.1% コルヒチン水溶液の 0.25 ml/100 g 体重を腹腔内投与した。開腹の際、黄体数、着床数および吸収胚数を調べるとともに、胎仔を子宮切開により回収し、頭臀長を 20 倍の実体顕微鏡下で測定した。回収の途中で切断された胎仔については、頭臀長の測定は行わなかった。しかし、それらについても、染色体標本作成は行っ

た。

染色体標本の作成は以下のようにした。完全または破片状態で回収された胎仔を 0.9% クエン酸ソーダ水溶液中で約 30 分間低張処理を行ったのち、カルノア固定液に 60~90 分間固定した。さらに、胎仔をピンセットで細分し、一片ごとに水酢酸、乳酸および蒸留水を、それぞれ 10:1:1 からなる酸の入った時計皿に移した。1~2 分間解離させ、予め冷やしたスライド・ガラス上に資料を展開し、カルノア固定液を数滴下したのち、速やかに火焰固定を行った。これらのうち、中期核板陽性のスライドを一夜放置後、ギムザ染色を行い、検査に供した。

染色体中期核板は、薬物投与群および対照群の別を知ることなく盲検的に胎仔 1 例あたり 10 細胞を調べた。同一胎仔の計数中、異数体をみた細胞数が複数観察された場合、写真撮影を行った。分析の終了後、対照群の染色体数を分類集計した。これに対し、とくにモノソミーまたはトリソミーの対象となる異数体細胞の頻度が 20% 以上あるものについては、対照群のデータとの間で χ^2 検定を行った。そして、有意差の認められた胎仔については、追跡検討を行い Hungerford らの方法³⁾によって、核型を分析した。

実験結果

雌雄同居前の 14 日間の雌の平均体重増加量を Table 3,

Table 3 Average increase in body weight of non-pregnant rats during aspirin or acetaminophen treatment

Group	No. of rats	Average body weight (day 0)	Average body weight (day14)	Average increase ⁽¹⁾
Controls (gum arabic)	11	223.7±27.15	234.8±19.89	11.1±15.10
125mg/kg (aspirin)	11	220.0±22.73	240.9±21.13	20.9±17.52
250mg/kg (aspirin)	10	192.5±27.13 ⁽²⁾⁽³⁾	216.7±23.57 ⁽³⁾	24.2±11.82 ⁽²⁾
500mg/kg (acetaminophen)	9	240.4±18.56	244.8±22.66	4.3±12.26
1000mg/kg (acetaminophen)	10	240.7±18.52	242.6±20.22	1.9±13.66

Legend: (1) = Individual weight at day 14 was subtracted from weight on day 0

(2) = $p < 0.05$, when compared with the respective control group

(3) = $p < 0.05$, when compared with the 125mg/kg aspirin group

Table 4 Mean days between pairing and copulation

Group	No. of rats	Mean±S.D. (days)
Controls (gum arabic)	11	3.0±2.37
125mg/kg (aspirin)	11	3.1±1.76
250mg/kg (aspirin)	10	3.4±1.90
500mg/kg (acetaminophen)	9	3.0±1.66
1000mg/kg (acetaminophen)	10	5.4±4.20

Legend: Pairing refers to the time when the female rats were cohabited with the male rats.

同居後交尾が成立に要する平均日数を Table 4, 妊娠期間中の母獣の平均体重増加量を Table 5 にそれぞれ示した。

同居前 ASP 群では, 対照群に較べてわずかに体重増加を示したが, これは ASP 群が, 他の群に較べ若干若齢のためであったと考えられる (Table 3)。

同居させたラットは, すべて交尾を行った。交尾成立に要する日数に対し, 解熱鎮痛薬の影響は認められなかった (Table 4)。

また, 交尾の成立した動物はすべて妊娠し, 解剖する妊娠11.5日目までの体重増加量は, ASP の 250 mg/kg 群のみに対照群と較べ有意な減少をみたが, 他の群は対照群と較べて差がなかった (Table 5)。

Table 6 は, 妊娠11.5日目に母獣を解剖した結果を示したものである。平均黄体数は, 各群とも差はなかった。しかし, 着床数は ASP の 125 mg/kg 群で有意に減少した。これに伴い, 着床前死亡は有意に増加した。

Table 5 Average increases in body weight of pregnant female rats between days 0.5 and 11.5

Group	No. of pregnant female rats	Day 0.5	Day 11.5	Average increase ⁽¹⁾
Controls (gum arabic)	11	238.4±16.43	281.5±23.29	43.2±12.13
125mg/kg (aspirin)	11	247.5±22.07	279.8±25.94	32.3±12.59
250mg/kg (aspirin)	10	228.4±14.28 ⁽³⁾	261.4±16.32 ⁽²⁾	33.0±7.63 ⁽²⁾
500mg/kg (acetaminophen)	9	248.2±17.73	287.3±19.05	39.1±7.75
1000mg/kg (acetaminophen)	10	252.9±14.11 ⁽²⁾	288.4±18.25	35.5±6.31

Legend: (1) = Individual weights on day 11.5 were subtracted from day 0.5

(2) = $p < 0.05$, when compared with the control group

(3) = $p < 0.05$, when compared with 125mg/kg aspirin group

Table 6 Reproductive performance in pregnant rats treated with aspirin and acetaminophen

Group	Controls (gum arabic)	125mg/kg (aspirin)	250mg/kg (aspirin)	500mg/kg (acetaminophen)	1000mg/kg (acetaminophen)
No. of pregnant rats	11	11	10	9	10
Average no. of corpora lutea (a)	15.3(2.72) <168>	15.7(3.23) <173>	14.6(2.27) <146>	15.2(2.17) <137>	16.1(2.02) <161>
Average no. of preimplantation losses (b)	1.3(2.69) <14>	3.6(2.54) ⁽¹⁾ <40> ⁽²⁾	1.9(2.23) <19>	0.9(0.78) <8>	1.3(1.42) <13>
Average no. of implants (c)	14.0(2.86) <154>	12.1(2.63) <133> ⁽²⁾	12.7(2.63) <127>	14.3(1.66) <129>	14.8(2.20) <148>
Average no. of resorption sites (d)	0.9(0.94) <10>	0.3(0.65) <3>	0.0(0.00) ⁽²⁾ <0> ⁽²⁾	1.7(2.69) <15>	1.5(1.51) <15>
Average no. of live fetuses (e)	13.1(2.51) <144>	11.8(2.89) <130>	12.7(2.63) <127> ⁽²⁾	12.7(3.20) <114>	13.3(1.89) <133>
Implantation rate (%)	92.7	77.2 ⁽²⁾	87.4	94.5	92.1
Average crown rump length (mm)	3.48(0.357)	2.93(0.573) ⁽¹⁾	3.12(0.190) ⁽¹⁾	3.09(0.437) ⁽¹⁾	2.80(0.471) ⁽²⁾
No. of immature fetuses (f)	3 (2.08%)	23 ⁽²⁾ (17.7%)	8 (6.3%)	15 ⁽²⁾ (13.2%)	46 ⁽²⁾ (34.6%)

Legend: () = S.D.

< > = Total

(a) = (b) + (c)

(c) = (d) + (e)

(f) = Fetuses with the body weight which is rejected statistically by Smirnov's method

(1) = $p < 0.05$, when compared with the control group

(2) = $p < 0.01$, when compared with the control group

Table 7 Cytogenetic analysis of rat fetuses on day 11.5 of gestation

Group	Pregnant rats	Fetuses analyzed	Fetuses with chromo- some anomalies	Triploid fetuses	Aneu- ploid fetuses	Females with abnormal fetuses	Crown- rump length of abnormal fetuses	Cells with structural chromo- some ab- normal- ities ^(b)	Sex Ratio (M/F)
Controls (gum arabic)	11	115	1 (0.9%)	1 (0.9%)	0	1 (9.1%)	2.5 (n=1)	5/1209 (0.4%)	55/60 (0.92)
125mg/kg (aspirin)	11	98	5 (5.1%) $p=0.073$	0	5 (5.1%) $p=0.019$	5 (45.5%) $p=0.074$	2.5±0.37 (n=4)	5/1197 (0.4%) $p=0.691$	58/40 (1.45)
250mg/kg (aspirin)	10	85	4 (4.7%) $p=0.104$	0	4 (4.7%) $p=0.031$	4 (40.0%) $p=0.125$	3.4±0.45 (n=3)	4/977 (0.4%) $p=0.673$	29/55 ^{(1)a} (0.52)
500mg/kg (acetaminophen)	9	98	7 (7.1%) $p=0.019$	1 (1.0%) $p=0.789$	2+2 ⁺ +2 ⁺ (6.1%) $p=0.006$	5 (55.6%) $p=0.037$	3.1±0.64 (n=6)	6/1187 (0.5%) $p=0.516$	38/58 ^{(2)a} (0.66)
1000mg/kg (acetaminophen)	10	104	5 (4.8%) $p=0.084$	0	3+2 ⁺ (4.8%) $p=0.022$	4 (40.0%) $p=0.125$	3.3±1.18 (n=4)	1/1290 (0.1%) $p=0.094$	44/59 ^{(1)a} (0.75)

Legend: Mean±S.D. ⁺=Litter mates

(a) =Fetuses unidentified by sex

(b) =Chromosomal gaps and breaks

Statistically significant levels as compared with the controls are shown by the p values.

吸収胚数については、ACTAP の 500 および 1,000 mg/kg 群で対照群と比べ、わずかに増加がみられた。しかし、有意差は認められなかった。ASP の 250 mg/kg 群では、むしろ対照群に比べ有意な高値を示すとともに、回収すべき胎仔数も相対的に高率であった。

胎仔の発育を頭腎長でみると、薬物投与群は、対照群よりも有意に抑制され、ACTAP 群で用量との間に相関がみられた。Smirnoff の棄却検定法⁴⁾を用いて、対照群の胎仔頭腎長の負の棄却域にある胎仔を未熟仔とみなし、その頻度を各群別にみた。対照群は、それが 2.1% (3/144)、ASP の 125 mg/kg 群で 17.7% (23/130)、250 mg/kg 群で 6.3% (8/127) および ACTAP の 500 mg/kg 群で 13.2% (15/114)、1,000 mg/kg 群で 34.6% (46/133) であり、ASP の 250 mg/kg 群以外すべて対照群と比べ有意差が認められた ($P < 0.01$)。ACTAP 群では未熟仔数と用量との間に相関がみられたが、ASP 群ではそれをみなかった。しかし、ASP の 250 mg/kg 群が 125 mg/kg 群に比べ、むしろ未熟仔発生頻度が低かったことは、注目すべきである。

Table 8 に、回収胎仔の体細胞染色体についての分析

結果を示した。染色体の数的異常頻度は、対照群 0.9% (1/115)、ASP の 125 mg/kg 群で 5.1% (5/98)、250 mg/kg 群で 4.7% (4/85) および ACTAP の 500 mg/kg 群で 7.1% (7/98)、1,000 mg/kg 群で 4.8% (5/104) であった。対照群における異常の頻度と比較すると、薬物投与群はいずれも高率であったが、有意の差をみた群は、ACTAP の 500 mg/kg のみであった ($P = 0.019$)。これを倍数性異常と異数性異常に分けてみると、倍数性異常では、対照群 0.9% (1/115) および ACTAP の 500 mg/kg 群で 1.0% (1/98) であり、他の群では全くこの種の異常を認めなかった。なお、倍数性異常は、すべて 3 倍体であった。つぎに、異数性異常の発生頻度は、対照群 0.0% (0/115)、ASP の 125 mg/kg 群で 5.1% (5/98)、250 mg/kg 群で 4.7% (4/85) および ACTAP の 500 mg/kg 群で 6.1% (6/98)、1,000 mg/kg 群で 4.8% (5/104) であり、対照群と薬物投与群と比較するとき、全群に有意差を認めた (それぞれ、 $P = 0.019$, $P = 0.031$, $P = 0.006$ および $P = 0.022$)。異数性異常の内訳は、すべて正常細胞とモノソミーまたはトリソミー細胞のモザイクであり、とくに ACTAP の 500 mg/kg 群、および 1,000 mg/kg 群に、そ

Normal

Monosomy

Legend: The arrow indicates an extra chromosome, which is tentatively put at the right side in the B group of the acetaminophen 500 mg/kg group

Fig. 1 Karyotypic demonstration of chromosome anomalies in rat fetus on day 11.5 of gestation

それぞれ1例のトリソミー・モザイク以外，すべてモノソミー・モザイクであった (Fig. 1)。モザイクの内訳は，ASP の 125 mg/kg 群胎仔 5 例中 3 例は B グループ，残り 2 例はそれぞれ C, D グループ，250 mg/kg 群の 4 例中 1 例は B グループ，残り 3 例は D グループに属する染色体が分析細胞の 20% を越えるモノソミーであった。また，ACTAP の 500 mg/kg 群の 6 例中 2 例は B グループ，残り 4 例は D グループ，さらに 1,000 mg/kg 群の 4 例中 3 例は B グループ，残り 1 例は D グループに属する染色体が分析細胞の 20% 以上を占めるモノソミーであった。因みに，ACTAP の 500 mg/kg 群 6 例の異常仔のうち，各 2 例は同腹仔で 1,000 mg/kg 群 5 例のうち，2 例も同腹仔であった。一方，ASP 群の異常胎仔は，単独に発生した。染色体異常頻度を母獣単位で集計すると，対照群 9.1% (1/11)，ASP の 125 mg/kg 群で 45.5% (5/11)，250 mg/kg 群で 40.0% (4/10) および ACTAP の

500 mg/kg 群で 55.6% (5/9)，1,000 mg/kg 群で 40.0% (4/10) であり，ACTAP の 500 mg/kg 群のみに有意差が認められた ($P=0.037$)。しかし，これら染色体をもつ胎仔の発育を頭臀長でみると，ASP の 250 mg/kg 群 ACTAP の 500 および 1,000 mg/kg 群とも正常胎仔と比較，とくに抑制は認められなかった。

一方，染色体構造異常をみると，ASP の 250 mg/kg 群に 0.10% (1/977) のイソ染色分体ギャップ (isochromatid gap)，(Fig. 2) がみられた。また，対照群で 0.33% (4/1209)，ASP の 125 mg/kg 群で 0.42% (5/1197)，250 mg/kg 群で 0.20% (2/977) および ACTAP の 500 mg/kg 群で 0.51% (6/1187)，1,000 mg/kg 群で 0.08% (1/1290) の染色分体ギャップ (chromatid gap)，(Fig. 2) がみられた。その他の構造異常 (quadriradial configuration)，(Fig. 2) については，対照群に 0.08% (1/1209)，ASP の 250 mg/kg 群に 0.10% (1/977)

1 : Isochromatid gap

2 : Chromatid gap

3 : Quadriradial configuration

Fig. 2 Karyotypic demonstration of structural anomalies observed in rat fetus on day 11.5 of gestation

のみ発生を認めた。

ここで、性比についてみるに、ASP の 125 mg/kg 群で対照群に較べ高値を示し、細胞学的分析を行った胎仔のうち、雄の相対数が高かった。しかし、他の群は低値を示し、分析胎仔の雌の比率が高いことを示したが、対照群と比べて有意差は認められなかった。

考 察

ヒト染色体異常の成因として、今までに数多くの報告がなされている。とくに、トリソミー型異常の代表的疾患であるダウン症候群については、宿主要因および環境要因の両面から研究が行われてきた。宿主要因として、母親の加齢や糖尿病、慢性甲状腺炎などの疾患に原因を求める仮説が出されている。環境要因については、流行性肝炎ウイルス、X 線照射、種々化学物質などへの暴露

が原因となると報ぜられている⁵⁻⁷⁾。しかし、今まで提出された作業仮説のうち、母獣の加齢要因を除いて、必ずしも意見の一致をみていない⁸⁻¹³⁾。

とくに、化学物質の影響については、全く不明であるといっても過言でない。この方面の発表は、大部分症例報告の形式をとるものが多い。今日まで関連を指摘された化学物質として、コルヒチン、フッ化ナトリウム、LSD、経口避妊薬などが挙げられている¹⁴⁾。しかし、これらは必ずしも疫学上の因果関係を証明されたものではない。解熱鎮痛剤については、山本ら²⁾が最初に関連ありと報告したものである。しかし、通常の疫学的調査では、解熱鎮痛剤服用の背景にある内部環境の解析が困難であるため、現在のところ、因果関係については保留されたままである。この研究は、動物モデルを使用し、この間の状況を解析するために実施したものである。

この実験においては、発育に影響をみる薬量（いわゆる最大耐量）を交尾前2週間連日経口投与し、その後も妊娠11.5日目まで投与を継続したものである。したがって、平均投与期間は交尾前投与2週間、その後交尾成立まで平均3日間、交尾後妊娠11.5日間、計平均28日間である。すなわち、この期間、母獣の卵の成熟、排卵、受精および受精後の卵分割（cell cleavage）など、生殖生理の重要な全時期について生物学的影響をみていることになる。

本実験の結果、ASP、ACTAPとも薬物投与群は、対照群に較べ総染色体異常頻度の数値が大きかった。しかし、有意の差をみたのは、ACTAPの500 mg/kg群のみであった。この結果から、ACTAPの500 mg/kg群投与では、染色体異常が増加すると結論して妥当である。

ところで、各群にみられた染色体異常の頻度について、つぎのような統計学的考察を行った¹⁹⁾。第1種の危険率を0.05 (α)、第2種の危険率を0.1 (β)とする。今回、観察された各群の異常頻度を真値とみなし、対照群と薬物投与群との間で片側検定する際の有意差の発現確率（検定力）を90%以上とするに必要な各群の標本数はつぎのようである。ASPの125 mg/kg群(5.1%)、250 mg/kg群(4.7%)およびACTAPの500 mg/kg群(7.1%)、1,000 mg/kg群(4.8%)のそれぞれにおいて280, 320, 168および309例であることがわかる。また、 β を0.2とした場合の各々の薬物投与群における必要な例数は、それぞれ202, 231, 121および223例である。したがって、比較群間の頻度差が小さくなるにつれて、または、検定力を高めるにつれて、さらに多数の標本が必要となるのは必然である。

一方、母獣別異常頻度についても同様なことがいえる。 $\alpha=0.05, \beta=0.1$ の場合、現在の頻度で有意の差を検出するには、ASPの125および250 mg/kg群で、それぞれ22, 30例である。また、ACTAPの500および1,000 mg/kg群で14, 30例となる。すなわち、この種の研究では、例数の取り扱いについては十分配慮しなければならない。

つぎに、生物学的側面から総異常頻度の各群における差について考察を試みる。この研究では、着床後形態形成期胎仔の染色体構成を検索しているものである。染色体異常を倍数性異常（主に3倍体）と異数性異常に分けて、解熱鎮痛薬との関連をみると、異数性異常は薬剤投与との係わりを伺わせる。山本ら¹⁰⁾および足立ら¹⁷⁾の老化マウス、および老化ハムスターを用いた妊娠中期の研究においても、異数体のモザイク異常が有意に増加していた。そして完全なモノソミーまたはトリソミーは極め

て少なかった。モザイク異常胎仔は、完全なモノソミーやトリソミーに較べ、生存能力が良いと考えられる。すなわち、「着床」時に完全なモノソミーまたはトリソミー個体に対して、強力な淘汰が働くものとするべきである。1つの仮説として、ASPおよびACTAP投与が着床時の淘汰機構に選別的に働くとするれば、着床後の胎芽の染色体分析は単に淘汰の結果をみているにすぎないといえよう。

今回、解熱鎮痛薬、とくにACTAP投与(500 mg/kg)で、分析胎仔中の総染色体異常頻度が有意に増加すること、さらにASP投与(250 mg/kg)で、母獣あたりの総染色体異常発生の危険が増加するのをみた。今後、着床前の受精卵分析により、着床時の淘汰の影響を除いて、染色体異常の検索を行うことが、より明らかな因果関係を解析できるであろう。その際、解熱鎮痛剤服用の背景に存在する疾病、発熱など諸要因の役割についても考慮した基礎的研究も不可能でないと考えられる。

結 論

8～18週齢のS.D.系ラットを用いて、解熱鎮痛薬の細胞遺伝学的研究を行った。交尾前の2週間にわたり、アスピリンまたはアセトアミノフェンを経口投与した。アスピリンの投与用量は0（5%アラビアゴム水溶液）、125および250 mg/kg体重、アセトアミノフェンの投与用量は0, 500および1,000 mg/kg体重であった。投与は交尾後11.5日まで継続した（交尾の確認された日を0.5日とした）。妊娠11.5日目に、母獣を解剖し胎仔を摘出し、直接法を用いて細胞遺伝学的に調べた。

染色体異常を有する胎仔の発生頻度はアスピリンの0, 125および250 mg/kgでそれぞれ0.9% (1/115), 5.1% (5/98) および4.7% (4/85) であり、アセトアミノフェンの500および1,000 mg/kgでは、それぞれ7.1% (7/98) および4.8% (5/104) であった。対照群とアセトアミノフェン500 mg/kg群の間のみに発生頻度の有意差が認められた。

染色体異常の型別に分析すると、3倍体発生は薬物投与と関連はなかった。一方、異数体の発生は薬物投与により有意増加がみられ（対照：0.0% (0/115), アスピリン125 mg/kg：5.1% (5/98), アスピリン250 mg/kg：4.7% (4/85), アセトアミノフェン500 mg/kg：6.1% (6/98) およびアセトアミノフェン1,000 mg/kg：4.8% (5/104)）。これらの異常の内訳は、全例ともモノソミー/正常またはトリソミー/正常の細胞からなるモザイクであった。

したがって、アスピリンまたはアセトアミノフェンをラット母獣に投与すると、その胎仔には異数性モザイク異常が誘起されると考えられる。

文 献

- 1) Yamamoto, M. and Watanabe, G.: Epidemiology of chromosome anomalies at the early stage of pregnancy, In "Contribution to epidemiology and biostatistics" (Editor: M. A. Klingberg), pp. 101-106, S. Karger, Basel (1979).
- 2) 山本正治: 染色体異常発生要因の疫学的解析, 遺伝, **33**, 33-37 (1979).
- 3) Hungerford, D.A. and Nowell, P.C.: Sex chromosome polymorphism and the normal karyotype in three strains of the laboratory rat, J. Morphol., **113**, 275-285 (1963).
- 4) 鳥居敏雄, 高橋暁正, 土肥一郎: 医学・生物学のための推計学, pp. 2-19, 東京大学出版会, 東京 (1973).
- 5) Uchida, I. A. and Curtis, E. I.: A possible association between maternal radiation and mongolism, Lancet, **2**, 848-850 (1961).
- 6) Collmann, R. D., Krupinski, J. and Stoller, A.: Incidence of infectious hepatitis compared with the incidence of children with Down's syndrome born nine months later to younger and to older mothers, J. Ment. Defic. Res. **10**, 266-268 (1966).
- 7) Milunsky, A. and Neurath, P. W.: Diabetes Mellitus in Down's Syndrome, Arch. Environ. Health, **17**, 372-376 (1968).
- 8) Schull, W. J. and Neel, J. V.: Maternal radiation and mongolism, Lancet, **1**, 537-538 (1962).
- 9) Leck, I.: Incidence and epidemiology of Down's syndrome, Lancet, **2**, 457-460 (1966).
- 10) Stark, C.R. and Fraumeni, Jr. J. F.: Viral hepatitis and Down's syndrome, Lancet, **1**, 1036-1037 (1966).
- 11) Baird, P.A., and Miller, J. R.: Epidemiological aspects of Down's syndrome in British Columbia, Brit. J. Prev. Soc. Med., **22**, 81-85 (1968).
- 12) 渡辺徹一, 遠藤 晃: 先天奇形の疫学, 臨床婦人科産科, **18**, 11-26 (1964).
- 13) Collmann, R.D., and Stoller, A.: A survey of mongoloid births in Victoria, Am. J. Publ. Health., **52**, 813-829 (1962).
- 14) 山本正治: 薬剤と染色体異常, 周産期医学, **9**, 95-100 (1979).
- 15) 畑村又好, 奥野忠一, 津村善郎共訳: スネデカー, コクラン統計的方法, pp. 212-213, 岩波書店, 東京 (1981).
- 16) Yamamoto, M., Endo, A. and Watanabe, G.: Maternal age dependence of chromosome anomalies, Nature New Biology, **241**, 141-142 (1973).
- 17) Adachi, K. and Yamamoto, M.: Maternal ageing and chromosome anomalies in the hamster embryo, Acta Medica et Biologica, **25**, 159-163 (1978).

(受付 1982年5月6日)