The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Di-n-butyltinの催奇形作用に関する研究
Author(s)	野田, 勉
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3072915
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Di-*n*-butyltinの催奇形作用に関する研究

1993年

野　田　　勉

Di-*n*-butyltinの催奇形作用に関する研究

野　田　　勉

目　　次

緒　言 …… 1
本　論
第 1 章　有機スズ化合物の催奇形作用 …… 4
　第 1 節　催奇形性試験 …… 4
　　実験方法 …… 4
　　実験結果 …… 6
　第 2 節　Di-*n*-butyltinの胎児移行 …… 21
　　実験方法 …… 21
　　実験結果 …… 23
　考察 …… 25
　小括 …… 30
第 2 章　Di-*n*-butyltinの感受日の検索 …… 32
　実験方法 …… 32
　実験結果 …… 33
　考察 …… 38
　小括 …… 40
第 3 章　Butyl(3-hydroxybutyl)tinの催奇形作用 …… 42
　実験方法 …… 42
　実験結果 …… 43
　考察 …… 44
　小括 …… 47
第 4 章　Di-*n*-butyltinの催奇形作用に対する四塩化炭素
　　前処置の影響 …… 48
　実験方法 …… 48
　実験結果 …… 50
　考察 …… 55
　小括 …… 58
第 5 章　総括 …… 59
結論 …… 62
謝　辞 …… 63
参考文献 …… 64

緒　　言

スズは古くから種々の用途に利用されてきた。青銅、はんだ、活字合金などの合金成分だけでなく、食品缶詰用のスズ被覆薄鉄板（ブリキ板）の製造用資材として利用されている。

スズは1970年にラットで必須微量元素と確認された。生体内で酸化還元触媒として機能し、欠乏すると成長阻害、門歯色素不全が見られる。しかし、肉、穀類、野菜などには平均して1 mg/kg程度のスズが含有されていることからヒトでの欠乏症の報告はない（和田　ら、1987）。

一方、スズによる食中毒は缶詰製品によるものが多い。内側を樹脂でコーティングしていない缶詰あるいはコーティングが破損した缶詰では高濃度のスズが検出されることがあり、時に中毒を起こす。特にアスパラガス、トマト、果物、果物ジュース等の缶詰では高濃度のスズを検出する傾向がある。その症状は消化管障害が主で腹痛、鼓腸、下痢、嘔吐などである。動物実験では大量投与で運動失調、四肢痙攣、ヘモグロビン量の低下などが報告されている。無機スズの生殖器および胎児への影響については、大量のスズの経口投与によってラットの精巣に萎縮が見られるものの催奇形作用は認められていない（WHO, 1980；宮澤，1983）。

このように無機スズは自然界に広く存在し食事とともに経口的に摂取されていることから必須微量金属としては通常の食生活では欠乏は考えられない。また、有害金属、例えば砒素や鉛は蓄積性があり、水銀は環境中で容易にメチル化し毒性を発揮するなどの問題があるが、無機スズは経口的に摂取しても腸管からの吸収が比較的悪く、また排泄も比較的速やかなことから経口毒性という点からはあまり注目されていない。

一方、有機スズは人工的な産物で、19世紀半ば頃にdiethyltin化合物やtetraethyltin化合物が初めて合成された。そして1930年代に入ってdi-*n*-butyltin化合物が塩化ビニル樹脂の安定剤として使用されるようになった。塩化ビニル樹脂の安定剤としてはそのほかにdimethyltin、dioctyltin化合物があるがこれらの有機スズ安定剤は塩化ビニル樹脂の透明性や対候性に優れており、特に透明樹脂用安定剤としてきわめて優秀な性質を持っていることから、塩化ビニル樹脂の無色透明板の製造には不可欠のものとされている。なお、dioctyltin化合物は現在も各国で無毒性安定剤として食品用包装製品に使用されている（阿部と須藤，1987）。その後、1950年代にはtri-*n*-butyltinやtriphenyltin化合物が殺菌、殺黴、殺軟体動物作用等を有することが報告され、船底防汚塗料、養殖用漁網や定置網の防汚剤、塗料の防黴剤、木材の防腐剤、製紙工業のスライム生成防止剤、殺軟体動物剤、殺虫・殺ダニ剤あるいは農業用殺菌剤として広く利用されるようになった（Piver, 1973; WHO, 1990）。一般に、船底

防汚塗料はtri-*n*-butyltinやtriphenyltinなどの有機スズ化合物が防汚剤として含まれており、これらの防汚剤が塗膜表面から徐々に海水中に溶出する事によって船底部へのフジツボ、ムラサキイガイ、アオサ、アオノリなどの海生生物の付着を防止するために使用される塗料である（高橋、1992）。これらの有機スズ化合物は塗料中に10％程度含有されているといわれている。ちなみに我が国で1988年に防汚剤として使用された有機スズはtri-*n*-butyltin化合物が1112トン、triphenyltin化合物が267トンであった（高橋、1992）。tri-*n*-butyltinやtriphenyltin化合物は従来の防汚剤である銅化合物よりも防汚効果の持続時間が長く、分解して無機スズとなることから安全性が高いと考えられていた。塗料業界では今世紀最大の発見といわれ、世界中の大型、中型、小型船舶に普及した。以上のように、有機スズ化合物はその用途範囲が広いことや永年にわたって開放環境下で使用されてきた結果、tri-*n*-butyltinやtriphenyltin化合物による海水、河川水、湖水の汚染を引き起こし、生物濃縮による魚介類の汚染によって食品の安全性に問題を投げかけた。さらに、フランスやイギリス沿岸で巻貝や養殖カキの成長阻害や不妊化が問題となった（Gibbs and Bryan, 1986; Thain, 1986; Roberts, 1987; WHO, 1990; Alzieu, 1991）のをはじめとして、世界各地でカキやムラサキイガイ（ムール貝）の養殖事業に大打撃を与えた。tri-*n*-butyltin化合物は0.1 ppbでカキやイガイの幼貝の生育に影響をおよぼし、1 ppbでは成貝の生育に影響を及ぼすとされている（堀口と清水, 1992）。そのような状況の中で世界的に1987年から1989年にかけて25m未満の船舶への使用禁止、魚類養殖資材への使用禁止などの措置が取られた（荒井, 1988）。現在では水中のtri-*n*-butyltin濃度の減少は認められるものの（Cleary, 1991）底質ではそれほど顕著な減少は認められていない（Waite et al., 1991）。

Di-*n*-butyltin、dimethyltinおよびdi-*n*-octyltin化合物などの二置換体の使用量は全有機スズ化合物の70％以上にのぼると推定されている（WHO, 1980）。di-*n*-butyltin化合物は塩化ビニル樹脂の安定剤、エポキシ樹脂の硬化剤やウレタンフォームの製造触媒として現在も大量に使用されているが、塩化ビニル樹脂から比較的容易に溶出する（Wu et al., 1989; Quevauviller et al., 1991）。その結果、都市の下水処理場の流入原水（Fent, 1989）や処理水（Schebek et al., 1991）からdi-*n*-butyltin化合物が検出されるようになった。同時に、di-*n*-butyltin化合物はtri-*n*-butyltin化合物の代謝物あるいは分解物（Kimmel et al., 1977; Seligman et al., 1988; Watanabe et al., 1992; 川合と張野, 1992）であり、河海水、底質さらにはカキ、ムラサキイガイ、巻貝、ヒラメなどの魚介類からtri-*n*-butyltin化合物と同時に検出されている（Han and Weber, 1988; Magure, 1991）。

有機スズの毒性は一般的にtri-体＞di-体＞mono-体の順に毒性が弱くなり、alkyltinの場合は炭素鎖の長いものが短いものより毒性が弱い傾向がある。そ

して、methyl-、ethyl-等のように炭素鎖の短いものはメチル水銀、エチル水銀、テトラエチル鉛等のような有機金属と同様に中枢神経系を中心とした障害を引き起こすが、炭素鎖の長いdi-*n*-butyltinやtri-*n*-butyltin化合物では肝障害、胆管障害、胸腺萎縮など、また、di-*n*-octyltin化合物では胸腺萎縮が主な障害部位となる（和田　ら，1982; Snoeij et al., 1987; Boyer, 1989）。

有機スズ化合物の生殖毒性や催奇形作用に関しては、水生生物ではbis(tri-*n*-butyltin) oxide（ＴＢＴＯ）を初めとしたtri-*n*-butyltin化合物の雌巻貝等のimposex（雄性形質誘導および生殖不全症候群）による不妊化やカキの殻の肥厚（Gibbs and Bryan, 1986; Gibbs et al., 1988; 堀口、清水、1992）、カニの足の奇形（Weis and Kim, 1988）などが知られいる。哺乳類での催奇形作用に関する研究は非常に少なく、ＴＢＴＯ（Davis et al., 1987）およびtriphenyltin（Winek et al., 1978; Giavini et al., 1980）について報告されている程度であった。ＴＢＴＯではマウスの胎児に口蓋裂の発現が報告されているが、口蓋裂が発現する投与量では母獣の一般状態にかなりの影響を及ぼすため、発現した口蓋裂が投与したＴＢＴＯによるものか、あるいは母獣の障害に伴うものかの確認は出来ていない。triphenyltinは胎児の致死毒性は強いものの、催奇形作用は認められていない。

催奇形作用は化学物質の毒性の中でも、その障害が暴露した本人ではなく次の世代に不治の先天性障害として発現するという点で最も重大な毒性の一つである。そこで我々は1988年にラットを用いてdi-*n*-butyltin diacetate（ＤＢＴ）の全妊娠期間投与による催奇形性試験を実施したところ、胎児に下顎裂、下唇裂、舌裂あるいは舌癒着等の外表奇形の発現を認めた（野田　ら，1988）。ここに見られた奇形は自然発生奇形（亀山　ら，1980; Morita et al., 1987）としてはほとんど認められないものであり、di-*n*-butyltin化合物の催奇形作用に関する最初の報告である。一方、有機金属化合物の代表であるメチル水銀による奇形は主として中枢神経系の奇形であり、同じ有機金属でもＤＢＴとメチル水銀では奇形の形が全く異なることが明らかとなった。

そこで、他の一連の有機スズ化合物（tri-, di-, mono-*n*-butyltin, triphenyltin）の催奇形作用の異同、ＤＢＴの催奇形作用の感受日の検索、そしてＤＢＴの催奇形作用の原因物質の検索を実施した。

本　　論

第１章　有機スズ化合物の催奇形作用

第１節　催奇形性試験

一般にtri-*n*-butyltin、di-*n*-butyltinおよびmono-*n*-butyltin（Fig. 1）はこの順に極性が高くなり、逆に毒性は低くなると考えられている。水生生物に対する毒性は確かにtri-*n*-butyltin≫di-*n*-butyltin＞mono-*n*-butyltinであるが、哺乳類に対する毒性はtri-*n*-butyltin≧di-*n*-butyltin≫mono-*n*-butyltinと考えられる。tri-*n*-butyltinとdi-*n*-butyltinのラット経口投与でのＬＤ$_{50}$はいずれも100 mg/kg前後と同程度であり（後藤　ら，1977）、両者とも胸腺萎縮作用や肝障害作用を有することなどtri-*n*-butyltinとdi-*n*-butyltinは似かよった中毒症状を示す（和田　ら，1982）。また、これらの*n*-butyltin化合物は動物体内や環境中で代謝あるいは分解されるとき脱ブチル化反応が起こりtri-*n*-butyltin→di-*n*-butyltin→mono-*n*-butyltin→無機スズへと代謝あるいは分解される（Iwai et al., 1981）。

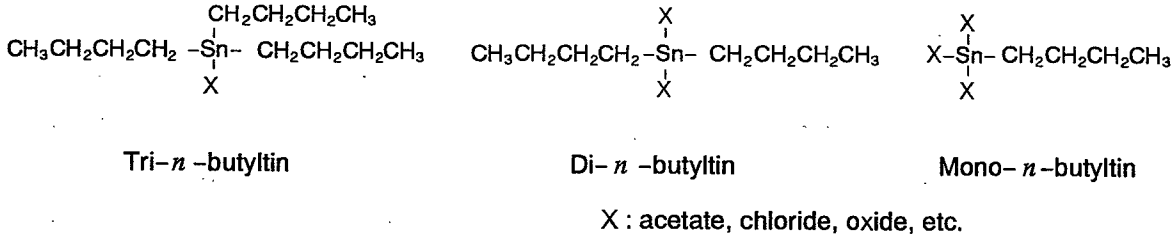

Fig. 1. Structures of *n*-butyltin compounds

そこでtri-*n*-butyltin、di-*n*-butyltinおよびmono-*n*-butyltin化合物の催奇形作用を検討するとともに、tri-*n*-butyltinと同様の目的で使用されるtriphenyltinの催奇形作用も同時に検討した。

実　験　方　法

１．試験薬物

Tri-*n*-butyltin acetate（ＴＢＴ）　東京化成工業株式会社製
Di-*n*-butyltin diacetate（ＤＢＴ）　東京化成工業株式会社製
Mono-*n*-butyltin trichloride（ＭＢＴ）　東京ファインケミカル株式会社製
Triphenyltin acetate（ＴＰＴ）　和光純薬工業株式会社製

2．　使用動物

生後４週齢の雌雄のJcl:Wistar系ラットを予備飼育ののち生後３ヵ月齢から試験に供した。妊娠動物を得るために未経産の雌を雄と１：１で同居させた。その後、毎朝膣垢を検鏡し、その中に精子の確認された雌を妊娠動物とし、その日を妊娠０日と起算した。精子の確認されなかった雌は翌日も雄と同居させた。

１群の妊娠動物数をＴＢＴは10～14匹として６群で、ＤＢＴは13～16匹として５群で、ＭＢＴは13～14匹として５群で、ＴＰＴは12～14匹として６群で行った。動物は温度23±2 ℃、湿度60±10％、点燈12時間（朝７時～夜７時）の環境下で飼育し、予備飼育および試験期間中はオリエンタル固形試料ＮＭＦを与えた。飲料水としては水道水を自由に摂取させた。

3．投与量

各有機スズ化合物の投与量は以下の通りとした。

ＴＢＴ：０、１、２、４、８、16 mg/kg。

ＤＢＴ：０、1.7、５、10、15 mg/kg。

ＭＢＴ：０、50、100、200、400 mg/kg。

ＴＰＴ：０、1.5、３、６、９、12 mg/kg。

なお、最高投与量をモルで表すとＴＢＴは45.8 μmol/kg、ＤＢＴは 42.7μmol/kg、ＭＢＴは1420 μmol/kgそしてＴＰＴは 29.3 μmol/kgとなる。

4．投与方法

各有機スズ化合物を所定の投与量となるように局方オリーブ油に溶解し、１日１回経口ゾンデを用いて強制経口投与した。ただし、ＴＰＴの９および12 mg/kg群用の投与液は懸濁状態であった。なお、投与液量は2 ml/kgの定容とした。投与期間はラット胎児の器官形成期とされている妊娠７日～妊娠17日までの11日間とした。また、対照群には同様の方法で局方オリーブ油 2 ml/kgを投与した。

5．観察

妊娠動物の体重および摂餌量を毎日測定するとともに一般状態を観察した。妊娠20日に動物をether麻酔により致死せしめ、ただちに開腹して主要臓器を肉眼的に観察するとともに、黄体数、着床数、生存胎児数、早期死亡胎児数（着床痕と胎盤遺残）および後期死亡胎児数（浸軟胎児と死亡胎児）を調べた。生存胎児については体重測定を行い、外表異常の有無および性別を調べた。なお、肉眼的に着床痕の認められない子宮については10％硫化アンモニウム水溶液で染色して着床痕の有無を確認した。生存胎児を半分に分けてそれぞれを胎

児の骨格および内臓の検査に当てた。骨格検査用の胎児は90%ethanolで固定したのちDawson法（Dawson, 1926）に従ってalizarin red Sによる骨格染色を行い骨格奇形および骨格変異の有無を調べた。内臓検査用の胎児はBuin液で固定後、Wilson法（Wilson, 1965）に従って内臓異常の有無を調べた。

6．統計処理

体重、胸腺重量、黄体数、着床数、生存胎児数、胎児体重などのように平均値±標準偏差で表すものについては1腹を標本単位として計算し（高野　ら, 1975）、Bartlettの検定で等分散の場合はDunnett法（Dunnett, 1964）あるいはScheffé（Scheffé, 1953）法によって、不等分散の場合は順位によるDunnett法あるいはScheffé法（佐久間, 1981）によって各有機スズ化合物投与群と対照群の間の有意差を検定した。死亡・吸収胎児頻度、性比、奇形児頻度などのように比または頻度で表すものについては1腹を標本単位として計算し、順位によるDunnett法あるいはScheffé法によって各有機スズ化合物投与群と対照群の間の有意差を検定した。また、妊娠成立雌数、生存胎児を有する雌数、死亡雌数など整数で表すものについては対照群との個別比較をFisherの直接確率計算法によって行った。

実　験　結　果

1．ＴＢＴ

1. 妊娠動物に及ぼす影響

ＴＢＴ 16 mg/kg群の体重増加量は妊娠11日頃から抑制傾向が認められ、妊娠17日のＴＢＴの最終投与後も回復することなく妊娠20日まで続いた。なお、16 mg/kg群の体重増加量の推移は妊娠20日の帝王切開時に生存胎児の認められた5例の妊娠動物について示した。その他の群の体重増加量は対照群と同様に順調に増加した（Fig. 2）。16 mg/kg群の摂餌量は妊娠10日から顕著に低下したが、ＴＢＴの投与終了とともに回復した。8 mg/kg群の摂餌量はＴＢＴの投与期間中軽度の低下が見られたが、その他の群にはＴＢＴ投与による影響は見られなかった。

一般状態について、16 mg/kg群の半数の動物に妊娠13日頃から鎮静、るい痩および流涎が見られた。8 mg/kg群にも2例の流涎が認められたが、その他の群には特に異常は認められなかった。

妊娠20日に屠殺した妊娠動物の肉眼的所見として明瞭な用量相関性を持った胸腺萎縮が見られた。そして、16 mg/kg群の胸腺重量は対照群の28%であった（Table 1）。その他の臓器には特に影響はなかった。

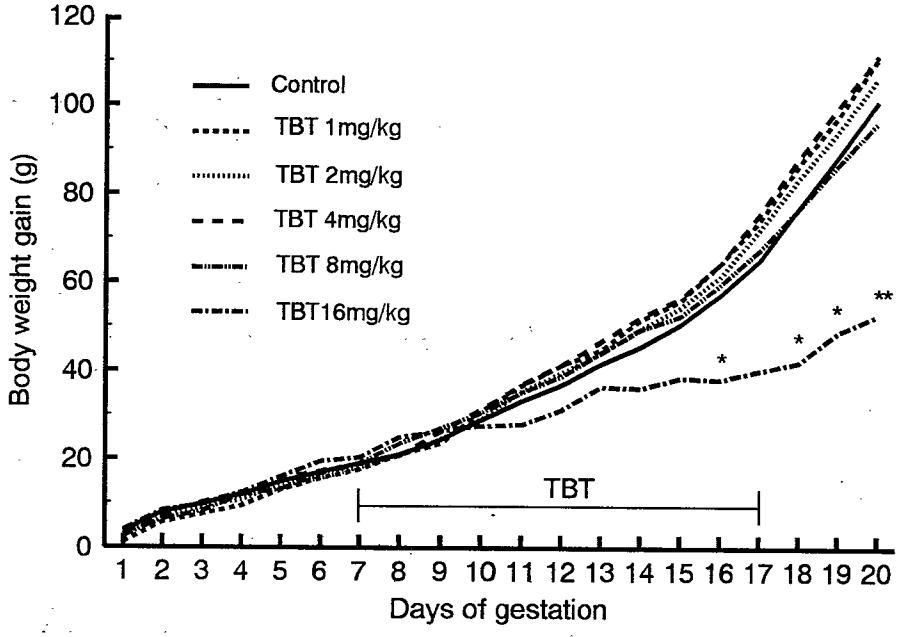

Fig. 2. Body weight gain of pregnant rats treated orally with TBT.

* Significantly different from control, $p<0.05$.

** Significantly different from control, $p<0.01$.

2. 妊娠および胎児に及ぼす影響

妊娠動物に死亡例は見られなかった。妊娠中に１腹中の全例の胚あるいは胎児が死亡し、妊娠20日の帝王切開時に生存胎児の存在しなかった妊娠動物が16 mg/kg群に５例あり、有意に増加した。その他の群の妊娠動物は全例に生存胎児が認められた。16 mg/kg群の吸収・死亡胎児頻度は有意に増加し、妊娠20日における生存胎児数と生存胎児の体重は有意に低下した(Table 2)。8 mg/kg以下の投与群にはＴＢＴ投与の影響は認められなかった。

生存胎児の外表観察について、4 mg/kg群に皮下出血を伴った痕跡尾が１例、16 mg/kg群に３例の妊娠動物から口蓋裂が６例見られ、その内１例は臍帯ヘルニアを合併していた。16 mg/kg群の外表奇形発現率は有意に増加した（Table 3）。

内臓奇形は１例も見られなかった（Table 3）。

骨格奇形は4 mg/kg群に尾椎欠損が１例見られたが、有意差はなかった。その他の群に骨格奇形は認められなかった。骨格変異は頸肋と腰肋痕（第13肋骨の長さの半分未満の腰肋）の発現率がＴＢＴの投与量の増加に応じて増加し、16 mg/kg群に有意差が見られた（Table 3）。

２．ＤＢＴ

1. 妊娠動物に及ぼす影響

ＤＢＴ 15 mg/kg群の体重増加量は妊娠15日から有意な抑制が認められ、妊

Table 1. Effects of tri-*n*-butyltin acetate on maternal thymus weights on day 20 of gestation.

	Olive oil 2 ml/kg	TBT (mg/kg)				
		1	2	4	8	16
Body wt. (g)	292±10.1	305±16.8	301±18.5	303±17.7	292±19.8	234±25.2**
Thymus wt. (mg)	197±30.6	205±23.1	170±33.5	150±30.3**	93±21.7**	56±16.4**

Pregnant rats were treated orally with TBT on days 7-17 of gestation. Values are the mean±SD of 5-10 animals per group. ** Significantly different from control, $p<0.01$.

Table 2. Effects of tri-*n*-butyltin acetate on pregnant rats and fetuses.

	Olive oil 2 ml/kg	TBT (mg/kg)				
		1	2	4	8	16
No. of females inseminated	10	11	10	10	10	14
No. of pregnant females	10	10	10	10	10	10
No. of dams with living fetuses	10	10	10	10	10	5*
No. of dams with total resorption	0	0	0	0	0	5*
No. of dead dams	0	0	0	0	0	0
No. of implants[a)]	13.4±0.84	13.8±1.23	13.5±0.97	14.2±1.62	13.5±2.27	13.6±1.17
Incidence of dead or resorbed fetuses, %	3.7	5.2	8.3	6.6	9.1	81.2**
Early stage	3.7	5.2	8.3	5.3	7.6	70.2**
Late stage	0	0	0	1.3	1.5	10.8**
No. of living fetuses[a)]	12.9±1.10	13.0±1.62	12.4±1.71	13.2±1.23	12.1±1.66	2.6±3.57**
Body weight of living fetuses[a)], g						
Male	3.1±0.23	3.1±0.28	3.1±0.10	3.2±0.20	3.0±0.18	2.0±0.31**
Female	2.9±0.23	2.9±0.24	2.9±0.13	3.0±0.18	2.8±0.14	2.1±0.13**

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group. [a)] Values are the mean±SD. * Significantly different from control, $p<0.05$. ** Significantly different from control, $p<0.01$.

Table 3. External, visceral and skeletal observations of fetuses from dams treated orally with tri-*n*-butyltin acetate during days 7-17 of gestation.

	Olive oil 2 ml/kg	TBT (mg/kg) 1	2	4	8	16
External observations						
No. of fetuses examined	129	130	124	131	121	27
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	0	0.8(1)	0	22.7(3)**
No. of fetuses with malformation	0	0	0	1(1)	0	6(3)**
Cleft palate	0	0	0	0	0	6(3)**
Omphalocele	0	0	0	0	0	1(1)
Vestigial tail	0	0	0	1(1)	0	0
Visceral observations						
No. of fetuses examined	60	60	58	61	55	12
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	0	0	0	0
Skeletal observations						
No. of fetuses examined	69	70	66	70	66	15
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	0	1.4(1)	0	0
No. of fetuses with malformation	0	0	0	1(1)	0	0
Agenesis of coccygeal vertebrae	0	0	0	1(1)	0	0
Incidence of fetuses with variation, %	2.9(2)	3.1(2)	1.4(1)	7.2(4)	33.1(6)	85.0(5)**
No. of fetuses with variation						
Cervical rib	1(1)	2(2)	1(1)	3(3)	6(3)	8(4)**
Lumbar rib	0	0	0	0	1(1)	1(1)
Rudimentary lumbar rib[a)]	1(1)	0	0	2(2)	16(4)	9(4)**
Excess of lumbar vertebrae	0	0	0	0	1(1)	0

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group. [a)] The length of rudimentary lumber rib is less than half the length of the 13 rib. ( ): No. of dams with the corresponding abnormal fetuses. ** Significantly different from control, $p<0.01$.

娠17日のＤＢＴの最終投与後も回復することなく妊娠20日まで続いた。なお、15 mg/kg群の体重増加量の推移は妊娠20日の帝王切開時に生存胎児の認められた７例の妊娠動物について示した。その他の群の体重増加量は対照群と同様に順調に増加した（Fig. 3）。摂餌量について、ＤＢＴの投与期間中はＤＢＴ投与群に軽度の減少が見られたが、有意差はなくＤＢＴの投与終了とともに回復した。

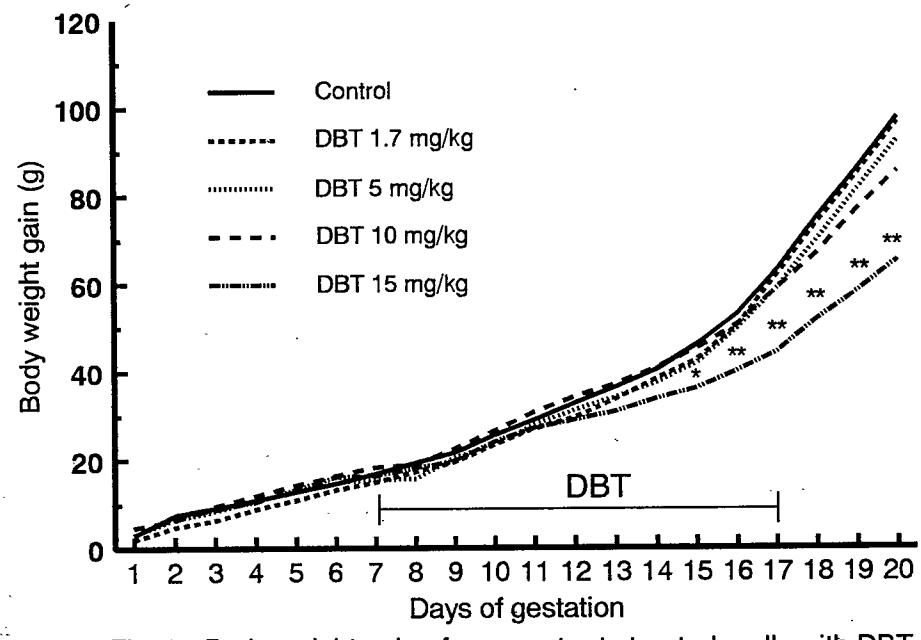

Fig. 3. Body weight gain of pregnant rats treated orally with DBT.

* Significantly different from control, p<0.05.
** Significantly different from control, p<0.01.

一般状態について、15 mg/kg群の半数の動物に妊娠14日頃から立毛が見られ、２例に膣口からの出血が見られた。その他の群には特に異常は認められなかった。

妊娠20日に屠殺した妊娠動物の肉眼的所見として明瞭な用量相関性を持った胸腺萎縮が見られた。そして、15 mg/kg群の胸腺重量は対照群の36％であった（Table 4）。その他の臓器には特に影響は見られなかった。

2. 妊娠および胎児に及ぼす影響

妊娠動物に死亡例は見られなかった。妊娠中に１腹中の全例の胚あるいは胎児が死亡し、妊娠20日の帝王切開時に生存胎児の存在しなかった妊娠動物が15 mg/kg群に９例あり、有意に増加した。その他の群の妊娠動物は全例に生存胎児が認められた。15 mg/kg群の吸収・死亡胎児頻度は有意に増加し、妊娠20日

Table 4. Effects of di-*n*-butyltin diacetate on maternal thymus weights on day 20 of gestation.

	Olive oil 2 ml/kg	DBT (mg/kg) 1.7	5	10	15
Body wt. (g)	314±12.1	312±18.6	309±17.6	298±14.5	254±40.7**
Thymus wt. (mg)	174±15.7	124±18.3	81±32.4**	57±13.4**	63±16.0**

Pregnant rats were treated orally with DBT on days 7-17 of gestation. Values are the mean±SD of 12-16 animals per group. ** Significantly different from control, $p<0.01$.

Table 5. Effects of di-*n*-butyltin diaceate on pregnant rats and fetuses.

	Olive oil 2 ml/kg	DBT (mg/kg) 1.7	5	10	15
No. of females inseminated	14	13	14	14	16
No. of pregnant females	14	12	14	14	16
No. of dams with living fetuses	14	12	14	14	7**
No. of dams with total resorption	0	0	0	0	9**
No. of dead dams	0	0	0	0	0
No. of implants[a)]	13.6±0.93	13.8±1.34	14.3±1.20	14.3±1.10	13.7±1.71
Incidence of dead or resorbed fetuses, %	5.9	4.6	2.9	10.7	69.5**
Early stage	5.9	4.6	2.4	8.5	64.1*
Late stage	0	0	0.4	2.1	4.9
No. of living fetuses[a)]	12.9±1.23	13.3±1.15	14.0±1.11	12.8±1.97	4.3±5.84
Body weight of living fetuses[a)], g					
Male	3.2±0.27	3.2±0.19	3.0±0.17	2.6±0.41**	2.3±0.37**
Female	3.0±0.17	2.9±0.22	2.8±0.20	2.5±0.33**	2.3±0.30**

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group. [a)] Values are the mean±SD. * Significantly different from control, $p<0.05$. ** Significantly different from control, $p<0.01$.

Table 6. External and visceral observations of fetuses from dams treated orally with di-*n*-butyltin diacetate on days 7-17 of gestation.

	Olive oil 2 ml/kg	DBT (mg/kg) 1.7	5	10	15
External observations					
No. of fetuses examined	180	160	196	179	68
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	1.0(2)	25.1(10)**	38.9(7)**
No. of fetuses with malformation	0	0	2(2)	43(10)**	19(7)**
Cleft mandible, cleft lower lip, ankyloglossia or schistoglossia	0	0	1(1)	32(9)**	14(4)**
Anury or vestigial tail	0	0	1(1)	7(4)*	4(3)*
Omphalocele	0	0	0	0	2(2)
Cleft palate	0	0	0	2(1)	2(2)
Cleft upper lip	0	0	0	1(1)	1(1)
General edema	0	0	0	1(1)	1(1)
Exencephaly	0	0	0	7(3)*	1(1)
Peaked mandible	0	0	0	1(1)	0
Visceral observations					
No. of fetuses examined	83	74	92	85	29
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	0	0	0

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group. ( ): No. of dams with the corresponding abnormal fetuses. * Significantly different from control, $p<0.05$. ** Significantly different from control, $p<0.01$.

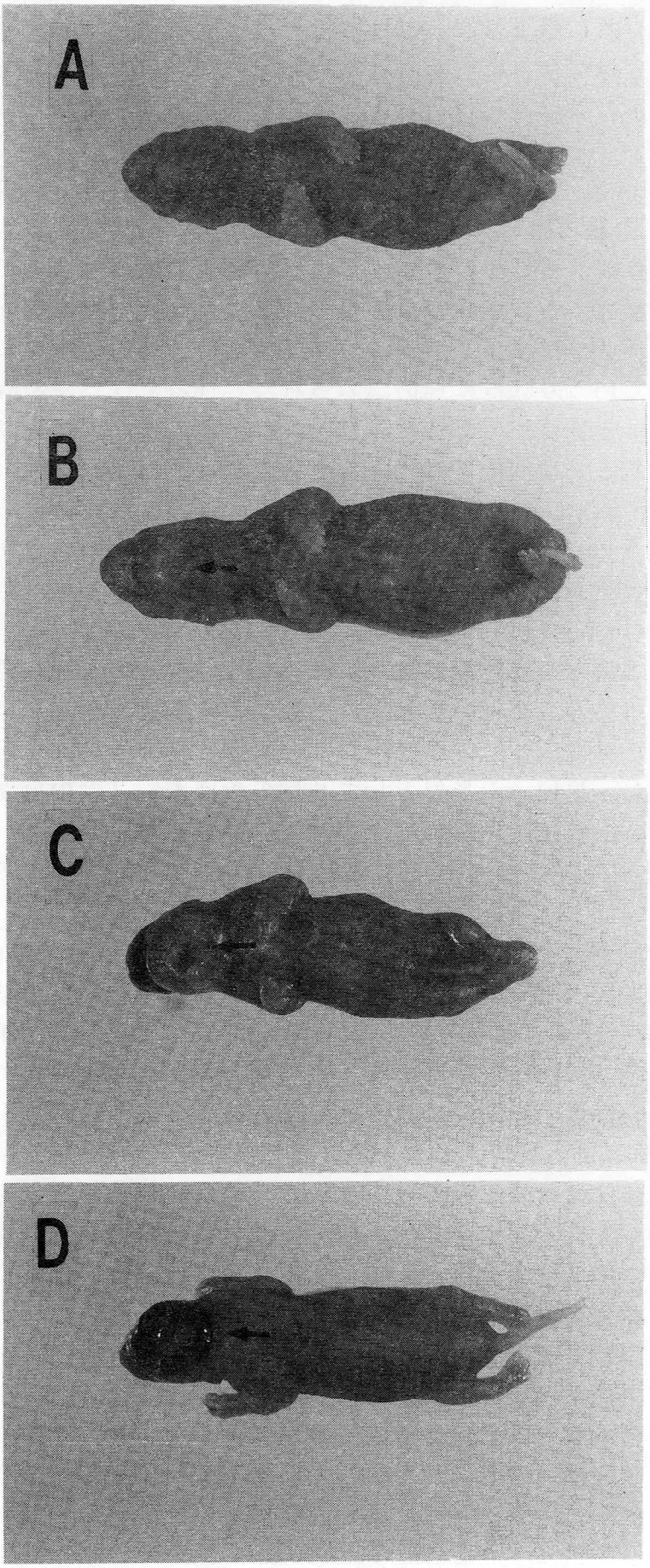

Photo. 1.
Typical malformed fetuses after maternal exposure to DBT at 10 mg/kg on days 7-17 of gestation.
(A) normal fetus,
(B) cleft lower lip associated with ankyloglossia,
(C) cleft mandilbe associated with ankyloglossia, schistoglossia and exencephaly,
(D) exencephaly.

における生存胎児の体重も有意に低下した。10 mg/kg群は、吸収・死亡胎児頻度は軽度に増加したが有意差はなかった。しかし生存胎児の体重は雌雄とも有意に減少した。5 mg/kg以下の投与群にはＤＢＴ投与の影響は認められなかった(Table 5)。

生存胎児の外表観察について、外表奇形児の発現頻度が10および15 mg/kg群で有意に増加した。一方、内臓奇形は１例も認められなかった（Table 6）。多発した奇形は下顎裂、下唇裂、舌裂、舌癒着、無尾、痕跡尾および外脳であった。その内、下顎裂、下唇裂、舌裂、舌癒着の単独あるいは合併奇形を有する奇形児（以下、下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着）が特に多く、5 mg/kg群に１例、10 mg/kgに32例そして15 mg/kg群に14例認められた。10および15 mg/kg群ではこれらの奇形の多くは合併奇形であった。10 mg/kg群の43例の奇形児について見ると以下の通りである。18例の下唇裂と舌癒着の合併奇形児（Photo. 1B）の内の１例には外脳が合併していた。６例の下顎裂、舌裂と舌癒着の合併奇形児の内の４例に外脳（Photo. 1C）、口蓋裂、上唇裂、痕跡尾のいずれかが合併していた。１例の舌癒着と外脳の合併奇形児が見られた。単独の奇形児として７例の舌癒着、４例の痕跡尾、２例の無尾、３例の外脳（Photo. 1D）、１例の下顎先端鋭角そして１例の全身浮腫が見られた。15 mg/kg群の19例の奇形児については以下の通りである。２例の下顎裂、舌裂、舌癒着と口蓋裂の合併奇形児の内１例には外脳と臍帯ヘルニアが合併していた。６例の下唇裂と舌癒着の合併奇形児が見られた。単独の奇形児として６例の舌癒着、３例の痕跡尾、１例の無尾そして１例の上唇裂が見られた。なお対照群の正常胎児をPhoto. 1Aに示した。また、これらの外表奇形を有する胎児は雄が雌の約２倍にのぼり、性差が見られた。

骨格観察（Table 7）について、骨格奇形児の発現頻度が10および15 mg/kg群で有意に増加した。多発した骨格奇形は下顎骨固定不全（Photo. 2A）、肋骨癒合（Photo. 2B）、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合（Photo. 2B）および仙・尾椎欠損であった。特に10および15 mg/kg群ではこれらの奇形の多くは合併奇形であった。10 mg/kg群の20例の奇形児について見ると以下の通りである。10例の下顎骨固定不全児の内の５例に肋骨癒合、肋骨欠損、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合、胸椎弓欠損、尾椎欠損あるいは頭蓋骨形成不全が合併していた。４例の肋骨癒合児には頸椎弓癒合、胸椎弓癒合、胸椎弓欠損、仙・尾椎欠損あるは頭蓋骨形成不全が合併していた。さらに単独の奇形として、２例の頸椎弓癒合、１例の胸椎弓癒合、２例の仙・尾椎欠損および１例の下顎骨癒合が見られた。15 mg/kg群の18例の骨格奇形児については以下の通りである。８例の下顎骨固定不全児の内の６例に肋骨癒合、肋骨欠損、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合、頸椎弓欠損、胸椎弓欠損、頭蓋骨形成不全あるいは上顎骨形成不全が合併していた。４例の肋骨癒合児に頸椎弓あるいは胸椎弓の癒合が合併していた。２例の胸椎弓癒合児の内１例に頸椎癒合が合併していた。さらに単独の奇形として、３例の仙・

Table 7. Skeletal observations of fetuses from dams treated orally with di-*n*-butyltin diacetate on days 7-17 of gestation.

	Olive oil 2 ml/kg	DBT (mg/kg) 1.7	5	10	15
No. of fetuses examined	97	86	104	94	39
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	0	22.7(9)**	54.7(7)**
No. of fetuses with malformation	0	0	0	20(9)**	18(7)**
Anomaly of mandibular fixation	0	0	0	10(5)**	8(3)**
Fused ribs	0	0	0	6(3)*	7(4)**
Absence of rib	0	0	0	1(1)	1(1)
Fused cervical vertebral arches	0	0	0	4(4)	6(3)**
Fused thoracic vertebral arches	0	0	0	5(3)*	8(3)**
Agenesis of the sacro-coccygeal or coccygeal vertebrae	0	0	0	4(3)	3(3)*
Cranial hypoplasia	0	0	0	2(2)	1(1)
Maxillary hypoplasia	0	0	0	0	1(1)
Fused mandibula	0	0	0	1(1)	1(1)
Incidence of fetuses with variation, %	7.2(5)	6.7(5)	27.2(10)	83.4(13)**	91.4(7)**
No. of fetuses with variation	7(5)	6(5)	28(10)*	78(13)**	36(7)**
Cervical rib	6(5)	6(5)	28(10)**	74(13)**	34(7)**
Lumbar rib	0	0	0	1(1)	1(1)
Rudimentary lumbar rib	0	0	0	5(3)*	4(2)**
Splitting of 1st cervical vertebral arch	1(1)	0	1(1)	2(2)	4(2)**
Splitting of ossification centers of thoracic vertebral body	0	0	0	10(5)**	6(3)**
Occipital hypoplasia	0	0	0	1(1)	4(3)**

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group. ( ): No. of dams with the corresponding abnormal fetuses. * Significantly different from control, $p<0.05$. ** Significantly different from control, $p<0.01$.

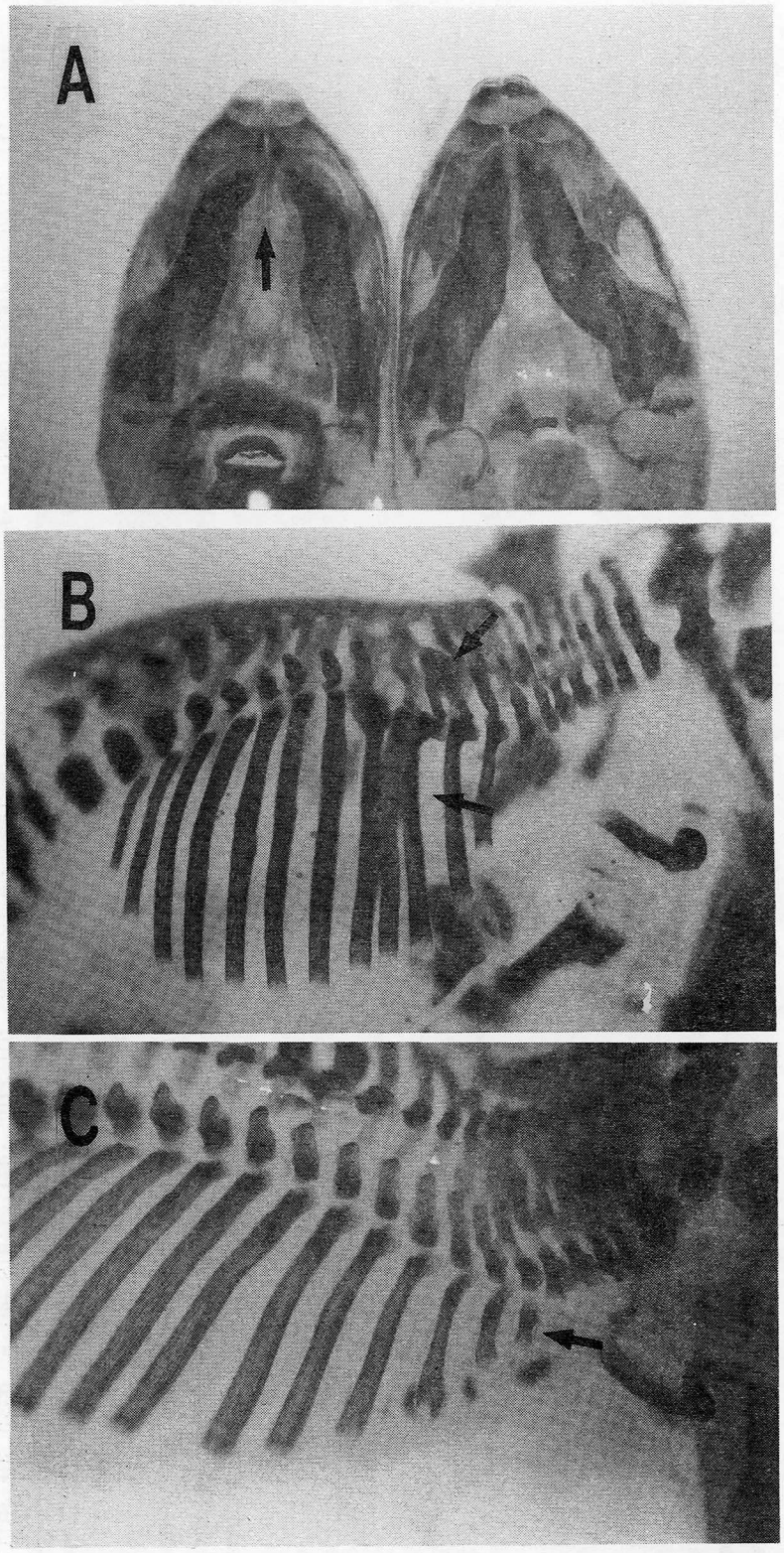

Photo. 2. Alizarin red S-stained skeletal perparations of fetuses with a normal preparation of fetus from a control dam (A: right), anomaly of mandibular fixation (A: left), fused ribs and fused thoracic vertebral arches (B) and cervical rib (C) of fetuses from dams , after maternal exposure to DBT at 15 mg/kg on days 7-17 of gestation.

尾椎欠損および１例の下顎骨癒合が見られた。

骨格変異を有する胎児がＤＢＴの投与量の増加に従って増加した。多発した骨格変異は頸肋（Photo. 2C）、腰肋痕、第１頸椎弓分裂、椎体分裂、後頭骨化骨不全であった。その内、特に頸肋が多発し、5 mg/kg群の観察した104例の胎児中28例に、10 mg/kg群の94例中74例に、15 mg/kg群の39例中34例の胎児に認められた（Table 7）。

３．ＭＢＴ

1. 妊娠動物に及ぼす影響

体重増加量はいずれの群も対照群と同様に順調に増加した（Fig. 4.）。摂餌量にＭＢＴ投与による影響は見られなかった。

一般状態に特に異常は認められなかった。

妊娠20日に屠殺した妊娠動物の肉眼的所見に特に異常は認められなかった。ＴＢＴおよびＤＢＴ投与群に認められた胸腺萎縮はＭＢＴ投与群には認められなかった。

2. 妊娠および胎児に及ぼす影響

妊娠動物に死亡例はなく、妊娠20日の帝王切開時に全ての妊娠動物に生存胎児が認められた。また、吸収・死亡胎児頻度、生存胎児数、生存胎児体重にＭＢＴ投与の影響は認められなかった。

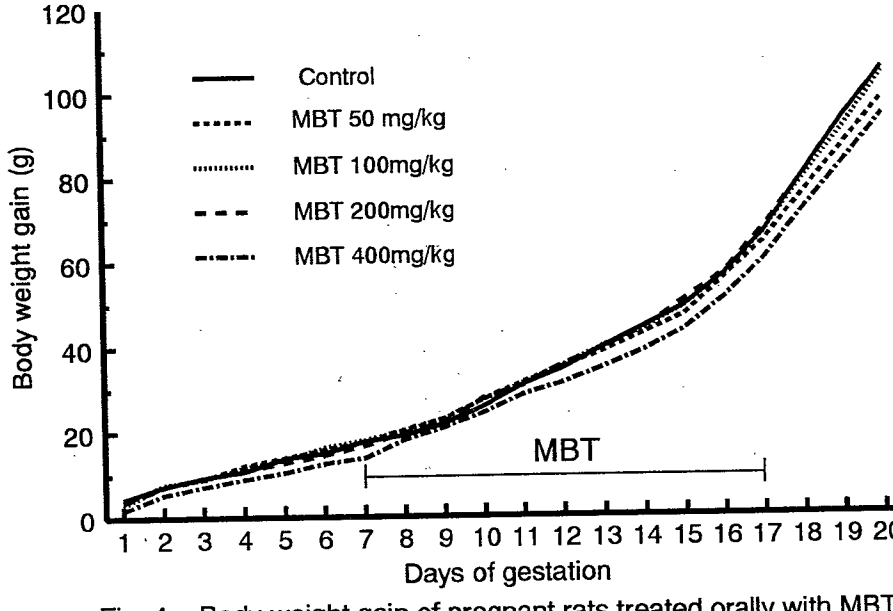

Fig. 4. Body weight gain of pregnant rats treated orally with MBT.

Table 8. External, visceral and skeletal observations of fetuses from dams treated orally with mono-*n*-butyltin trichloride on days 7-17 of gestation.

	Olive oil 2 ml/kg	MBT (mg/kg) 50	100	200	400
No. of dams with living fetuses	14	13	13	14	13
External observations					
No. of fetuses examined	188	172	179	194	180
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	0	0	0.5(1)
No. of fetuses with malformation					
Anury	0	0	0	0	1(1)
Visceral observations					
No. of fetuses examined	87	80	84	91	84
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	0	0	0
Skeletal observations					
No. of fetuses examined	101	92	95	103	96
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	0	0	0
Incidence of fetuses with variation, %	0	8.0(6)	2.9(2)	2.9(2)	6.3(3)
No. of fetuses with variation					
Cervical rib	0	7(5)**	3(2)	1(1)	6(3)*
Occipital hypoplasia	0	0	0	1(1)	0
Splitting of 1st cervical vertebral arch	0	1(1)	0	0	0
Splitting of ossification centers of thoracic vertebral body	0	0	0	1(1)	0

Pregnant rats were treated orally with MBT on days 7-17 of gestation. The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent the means of litter means within each group.
( ): No. of dams with the corresponding abnormal fetuses. * Significantly different from control, $p<0.05$.
** Significantly different from control, $p<0.01$.

生存胎児の外表観察で400 mg/kg群に１例の無尾が見られたが、その発現率に有意差はなかった（Table 8）。

内臓奇形および骨格奇形は１例も見られなかった（Table 8）。骨格変異は頸肋が散見されたが、ＭＢＴの投与量との間に相関性は認められなかった。

４．ＴＰＴ

体重増加量と摂餌量は６ mg/kg群に妊娠後期に軽度の抑制が見られ、９および12 mg/kg群に顕著な減少が見られた。

一般状態は、６ mg/kg群に立毛、９ mg/kg群の約半数の動物と12 mg/kg群の全例に立毛、膣からの出血、傾眠、口と鼻の周囲に血液様汚れが見られた。その他の群には特に異常は認められなかった。

妊娠20日に屠殺した妊娠動物の肉眼的所見としては９および12 mg/kg群の子宮内の出血を除いて特に異常は見られなかった。９および12 mg/kg群の胸腺重量に減少傾向が見られたが有意差はなかった。

妊娠動物のうち９および12 mg/kg群のそれぞれ２例が死亡した。妊娠中に１腹中の全例の胚あるいは胎児が死亡し、妊娠20日の帝王切開時に生存胎児の存在しなかった妊娠動物が６ mg/kg群に２例、９ mg/kg群に６例そして12 mg/kg群に９例あり９および12 mg/kg群で有意に増加した（Table 9）。しかし、胎児の死亡率が高いにもかかわらず胎児の外表、内臓および骨格にＴＰＴの投与によると考えられる奇形は認められなかった。また、ＴＢＴおよびＤＢＴ投与群に高頻度で観察された頸肋も増加しなかった。

Table 9 Effects of triphenyltin acetate on pregnant rats and fetuses.

	Olive oil 2 ml/kg	TPT(mg/kg) 1.5	3	6	9	12
No. of pregnant females	14	13	12	13	13	12
No. of dams with living fetuses	14	13	12	11	5**	1**
No. of dams with total resorption	0	0	0	2	6**	9**
No. of dead dams	0	0	0	0	2	2
No. of implants[a)]	13.6±0.93	14.2±0.99	13.5±2.15	14.1±2.01	15.0±1.33	14.1±2.13
Incidence of dead or resorbed fetuses, %	5.9	4.8	8.2	23.0	72.8	98.7**
Early stage	5.9	4.3	7.5	21.4	60.8	97.3**
Late stage	0	0.5	0.8	1.6	11.9	1.3
No. of living fetuses[a)]	12.9±1.23	13.5±1.27	12.4±2.47	10.4±4.84	4.2±5.74	0.2±0.63**
Body weight of living fetuses[a)], g						
Male	3.2±0.27	3.3±0.18	3.4±0.49	3.2±0.11	2.3±0.47	1.5
Female	3.0±0.17	3.1±0.14	3.2±0.52	3.0±0.16	2.1±0.52	1.9
External observations						
No. of fetuses examined	180	176	149	135	46	2
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0.5(1)	0	0	0	0
Vestigial tail[b)]	0	1(1)	0	0	0	0
Visceral observations						
No. of fetuses examined	83	81	68	62	22	0
Incidence of fetuses with malformation, %	0	0	0	0	0	0
Skeletal observations						
No. of fetuses examined	97	95	81	73	24	2
Incidence of fetuses with malformation, %	0	1.0(1)	0	0	0	0
Agenesis of coccygeal vertebrae[b)]	0	1(1)	0	0	0	0

Pregnant rats were treated orally with TPT on days 7-17 of gestation. The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group.
[a)] Values are the mean±SD. [b)] No. of fetuses with the malformation. ( ):No. of dams with the corresponding abnormal fetuses. * Significantly different from control, $p<0.05$. ** Significantly different from control, $p<0.01$.

第２節　Di-*n*-butyltinの胎児移行

有機スズの胎児移行に関しては、dimethyltin（Noland et al., 1983）とＴＢＴＯ（Davis et al., 1987）について報告されているが、これらの報告はいずれも胎児への移行量を無機スズ量の増加として測定していることから、投与した有機スズがどのような形で胎児へ移行しているのかは明らかにされていない。そこで、ＤＢＴの催奇形作用に関する研究の一環として、妊娠動物の器官形成期（妊娠７－17日）にＤＢＴを経口投与し、最終投与24時間後（妊娠18日）のＤＢＴおよびその代謝物のＭＢＴの胎児移行の有無および妊娠動物の臓器中の濃度を明らかにすることを試みた。

ＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの測定法については数多くの測定法（和田　ら、1982：Maguire, 1991; Harino et al., 1992）が発表されているが、哺乳動物の組織中の*n*-butyltin化合物の測定法に関する報告はわずかである（Ishizaka et al., 1989）。著者らはラットの組織中の三種の*n*-butyltin化合物（mono-、di-およびtri-体）の同時定量法について検討し、その方法を用いてＤＢＴを投与したときの胎児および妊娠動物の臓器中の*n*-butyltin化合物の定量を行なった。

実　験　方　法

１．試薬

ＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴは第１節と同一製品を使用した。tropoloneはAldrich Chem. Co. 製、*n*-propylmagnesium bromide（THF中２mol／L 含有）は東京化成（株）製を用いた。methanol、benzene、hexane等の溶剤と無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を用いた。塩酸および硫酸は有害金属測定用そして食塩は試薬特級を用いた。

10％含水シリカゲルカラムの調製は以下の通りである。カラムクロマトグラフィー用シリカゲル（Davison Chem. Co. F. C.）を130℃で３時間活性化し、冷却後、シリカゲルに対して10％(V/W)になるよう蒸留水を加え、時々振り混ぜながら一昼夜放置した。用時、この10％含水シリカゲル３ｇをhexane 20mlに懸濁させ、内径10mmのテフロンコック付カラムに充填した。カラム上層に無水硫酸ナトリウム１ｇを積層しヘキサン20mlを流した。

２．ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）用標準液の調製

ＴＢＴ，ＤＢＴおよびＭＢＴの100 μg/ml混合benzene溶液を調製後、希釈して種々の濃度（0.1μg/ml～5μg/ml）の標準液を調製した。これらの標準液の各１mlに*n*-propylmagnesium bromide ３mlを加え、30分間室温で反応させた。

そして、1N硫酸10mlを加えて反応を停止させた後、hexane 5mlで2回抽出し10%食塩水10mlで2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。この溶液をロータリーエバポレーターで約3mlまで濃縮し、hexaneを加えて10.0mlとしたものをGC用標準液とした。

3．胎児、胎盤および妊娠動物の臓器の採取

妊娠18日の胎児および胎盤と妊娠動物の肝臓、腎臓、脾臓および胸腺を試料とした。これらの試料を得るために以下の処置を行なった。雌雄とも生後4週齢のJcl: Wistar系ラットを購入し、第1節と同様の条件で妊娠動物を作成し飼育した。1群の妊娠動物数を6匹として4群で行なった。

DBTの投与量は0、1.7、5、15 mg/kgとした。投与に際してはDBTを所定の投与量となるように局方オリーブ油に溶解し、1日1回強制経口投与した。投与液量は2 ml/kgの定容とした。投与期間は胎児の器官形成期とされている妊娠7日から17日までの11日間とした。また、対照群には同様の方法で局方オリーブ油 2 ml/kgを投与した。妊娠18日（最終投与24時間後）に動物をエーテル麻酔により致死させた後、胎児および胎盤と妊娠動物の肝臓、腎臓、脾臓および胸腺を摘出して重量を測定後分析用試料として冷凍保存し

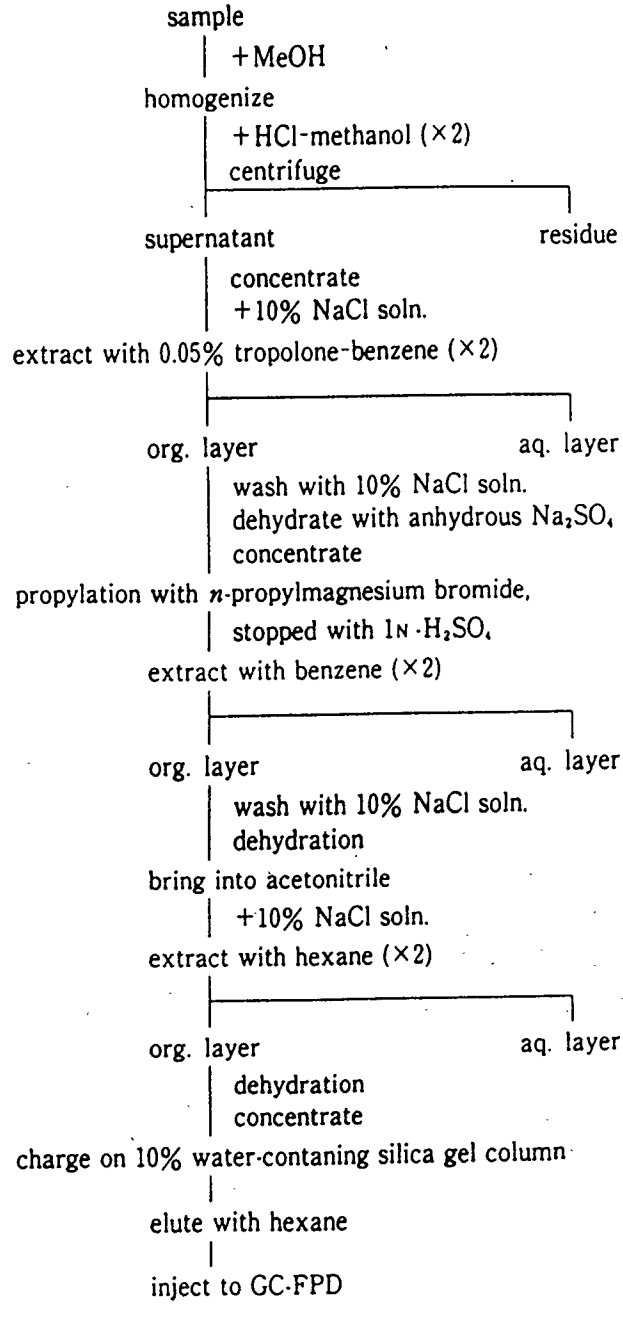

Chart 1. Schematic diagram for the analysis of mono-, di- and tri-*n*-butyltin compounds in rat tissues.

た。胎児については外表異常の有無および性別を調べた。なお、添加回収実験のための組織は無処置の胎児および肝臓を用いた。

4．試料の処理法

試料はChart 1に示した方法によって処理した。すなわち、胎児および胎盤と妊娠動物の腎臓、脾臓および胸腺は全量を、肝臓は約2gを精秤した。これらの組織にmethanol 10mlを加えてホモジナイズし、さらにmethanol 20mlおよび濃塩酸9mlを加えて15分間振とうした後、3000rpmで5分間遠心分離した。上澄液を分取し、沈澱物について再度この操作を繰り返した後、先の上澄液と合わせて約40mlまで濃縮した。濃縮液に10%食塩水100mlを加え、0.05%tropolone含有ベンゼン50mlで2回抽出した。抽出液を10%食塩水50mlで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水後濃縮し、*n*-propylmagnesium bromide 3mlを加え、室温で30分間放置し有機スズ化合物をpropyl化した。その後、1N 硫酸30mlを加えて反応を停止させ、benzene 20mlで抽出した後、脱水し、acetonitrileに転溶させた。acetonitrile溶液に10%食塩水50mlを加え、hexane 50mlで2回抽出後、脱水し、5mlまで濃縮した。この濃縮液を10%含水シリカゲルカラムに導入した後、hexane 20mlで溶出させ、約3mlまで濃縮しhexaneを加え10.0mlとしてGC用試験溶液とした。

5．装置および測定条件

装置：HP－5890A（Hewlett Packard）、カラム：DB－1（0.53mm×15m、膜厚1.5 μm）、カラム温度：80℃（1 min）から250℃（7.5 min）まで20℃/minで昇温分析、検出器温度：270℃、注入モード：オンカラム、注入量：2μl、検出器：炎光光度検出器（FPD）、スズフィルター（610nm）使用、キャリアーガスおよび助燃ガス：He 10 ml/min、H_2 75 ml/min、air 100 ml/min、make up gas（N_2）40 ml/min。

実　験　結　果

1．分析法の検討

有機スズ化合物の分析にはキャピラリーGC－FPDを用いる方法が主流となっている。今回、生体試料中のmono-、di-およびtri-*n*-butyltin化合物の同時微量分析法を検討した。この方法はtropolone-benzeneでMBT、DBTおよびTBTを抽出し、Grignard試薬でpropyl化した後、10%含水シリカゲルで精製するもので、生体成分とGrignard試薬由来の夾雑物を同時に除くことが可能であった。

ＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの標準品をGrignard試薬でpropyl化したときのガスクロマトグラムをFig. 5に示した。それぞれの保持時間は7.10分、7.64分、8.15分で分離良好なピークが得られた。検量線は各*n*-butyltin化合物の量とクロマトグラムのピーク高の間に0.01μg/ml～0.5μg/mlの範囲で原点を通る良好な直線性が認められた。検出限界はいずれも酢酸塩としてＤＢＴおよびＴＢＴは9.2pg、ＭＢＴは11.5pg(Snとして3.1－3.9pg)であった。

胎児および妊娠動物の肝臓を用いたＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの添加回収実験の結果をTable 10に示した。試料をホモジナイズした後にＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴをそれぞれ0.46μg添加し、その後の処理はChart 1に従って行なった。得られたガスクロマトグラムはFig. 5の標準品の場合と同様に分離良好なピークが得られ、妨害ピークも認められなかった。胎児からの回収率はＴＢＴ90.0%、ＤＢＴ95.7%、ＭＢＴ94.8%であり、肝臓からの回収率はＴＢＴ70.4%、ＤＢＴ87.9%、ＭＢＴ73.6%であった。

ＤＢＴを投与した妊娠動物の胎児および妊娠動物の肝臓をChart 1に従って処理し、ＤＢＴおよびＭＢＴの濃度を

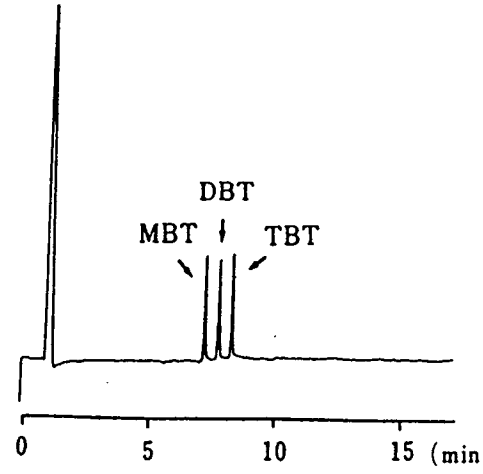

Fig. 5. Typical gas chromatogram of propylated *n*-butyltin compounds (0.046 μg/ml) for standard.

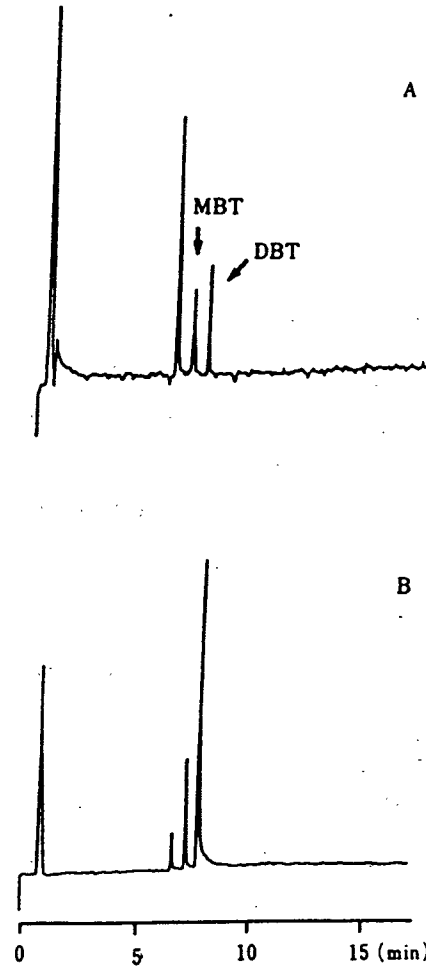

Fig. 6. Typical gas chromatogram of propylated *n*-butyltin compounds in fetus (A) and maternal liver (B) from a pregnant rat treated orally with DBT (15 mg/kg) on days 7-17 of gestation.

測定した時のガスクロマトグラムをFig. 6に示した。ＭＢＴおよびＤＢＴのピークが保持時間7.10分および7.64分に得られた。なお、保持時間6.60分のピークは無機スズのピークと推定される。胎児および肝臓でも標準品（Fig. 5.）の場合と同様に妨害ピークのない分離良好なピークが得られた。

2．*n*-butyltin化合物の胎児および妊娠動物臓器への分布

妊娠動物にＤＢＴを妊娠７日から妊娠17日までの11日間にわたって連続経口投与し、最終投与24時間後（妊娠18日）に帝王切開し、胎児および胎盤と妊娠動物の肝臓、腎臓、脾臓および胸腺の重量を測定するとともに生存胎児の外表を観察した。観察された奇形として、5 mg/kg群は１例の妊娠動物から下唇裂および舌癒着の合併奇形が３例、別の１例の妊娠動物から無尾が１例認められた。また15 mg/kg群は２例の妊娠動物から下唇裂および舌癒着の合併奇形が１例、下顎裂、舌裂および舌癒着の合併奇形が１例認められた（Table 11）。

妊娠18日の妊娠動物の体重と臓器重量および胎児、胎盤重量をTable 12に示した。15 mg/kg群に体重の減少が見られた。脾臓および胸腺重量が減少したが、特に強い影響が見られたのは胸腺重量で、1.7 mg/kg投与群でも著明に減少し、さらに投与量の増加に伴って減少した。

妊娠動物にＤＢＴを妊娠７日から妊娠17日まで11日間にわたって連続経口投与したとき、胎児および胎盤中のＤＢＴ濃度は投与量の増加に伴って増加し、その代謝物であるＭＢＴも確認された（Table 13）。胎児中のＤＢＴおよびＭＢＴ濃度を胎盤中の濃度と比較するとＤＢＴでは胎盤中の濃度の約60％、ＭＢＴは約25％であった。また、これらの組織中のＤＢＴとＭＢＴ濃度の相関を見ると、相関係数は胎児は0.179、胎盤は0.570であった（Fig. 7）。

妊娠動物の肝臓、腎臓、脾臓および胸腺からＤＢＴとＭＢＴが検出された。また、いずれの組織においてもＤＢＴの投与量の増加に伴なって、ＤＢＴおよびＭＢＴの検出量が増加した。これらの臓器のＤＢＴとＭＢＴ濃度の相関をみると、相関係数は肝臓は0.945、腎臓は0.873、胸腺は0.820、脾臓は0.904と胎児および胎盤に比べて良い相関が得られた（Fig. 7）。これらの臓器のＤＢＴ濃度は肝臓および腎臓で高く、ＭＢＴ濃度は腎臓および胸腺で高かった。胸腺については他の臓器と異なり、ＤＢＴ 1.7および5.0 mg/kg群にはＤＢＴが検出されず、15.0 mg/kg群にＤＢＴが検出されたもののＭＢＴより低濃度であった（Table 13）。

考　　察

有機スズ化合物の胸腺萎縮作用はtri-*n*-butyltin chloride（Snoeij et al, 1985）、di-*n*-butyltin dichloride（Seinen et al, 1977）そしてtriphenyl

Table 10. Recovery of *n*-butyltin compounds from rat fetus and maternal liver.

Compound	Amount added (μg of *n*-butyltin compound)	Recovery (%)[a]	
		Fetus	Maternal liver
TBT[b]	0.46	90.0±14.96	70.4± 4.14
DBT[c]	0.46	95.7±19.55	87.9± 7.72
MBT[d]	0.46	94.8±18.87	73.6±11.40

[a] Values are the mean ± S.D. of 6 fetuses and 7 maternal livers.
[b] tri-*n*-butyltin compound. [c] di-*n*-butyltin compound.
[d] mono-*n*-butyltin compound.

Table 11. External observations of fetuses from dams treated orally with di-*n*-butyltin diacetate on days 7-17 of gestation.

	Olive oil 2 ml/kg	DBT (mg/kg) 1.7	5	15
No. of fetuses examined	71	69	76	51
Incidence of fetuses with malformation (%)	0	0	5.6(2)	17.9(2)
No. of fetuses with malformation	0	0	4(2)	2(2)
Cleft mandible, cleft lower lip, ankyloglossia or schistoglossia	0	0	3(1)	2(2)
Vestigial tail	0	0	1(1)	0

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group.
( ): No. of dams with the corresponding abnormal fetuses.

Table 12. Effects of DBT on maternal organ weights on day 18 of gestation.

	Olive oil 2 ml/kg	DBT (mg/kg) 1.7	5	15
Body wt. (g)	288 ±19.0	290 ±19.9	281 ±16.2	259 ±17.5*
Liver wt. (g)	11.9 ± 0.50	12.3 ± 1.07	12.1 ± 1.21	10.9 ± 1.01
Kidney wt. (g)	1.69± 0.166	1.63± 0.266	1.71±0.151	1.67± 0.169
Spleen wt. (mg)	691 ±52.6	576 ±64.0**	608 ±57.6*	565 ±48.1**
Thymus wt. (mg)	216 ±29.7	140 ±27.2**	76 ±10.1**	55 ±16.1**

Pregnant rats were treated orally with DBT on days 7-17 of gestation, and were sacrificed on day 18 of gestation. Values are mean±SD of 6 animals per group.
* Significantly different from control, $p<0.05$
** Significantly different from control, $p<0.01$

Table 13. Mono-*n*-butyltin and di-*n*-butyltin concentrations (μg/g) in fetuses and pregnant rat organs.

		Olive oil	DBT (mg/kg) 1.7	5	15
Fetus	MBT	0.011±0.014	0.084±0.057	0.077±0.022	0.100±0.042
	DBT	0.012±0.018	0.093±0.018	0.172±0.019	0.248±0.086
Placenta	MBT	0.044±0.041	0.271±0.054	0.304±0.132	0.621±0.352
	DBT	0.046±0.066	0.200±0.136	0.257±0.011	0.394±0.160
Liver	MBT	0.103±0.042	0.198±0.097	0.390±0.108	0.731±0.215
	DBT	0.029±0.021	0.766±0.245	1.78 ±0.392	3.70 ±1.75
Kidney	MBT	0.142±0.103	0.933±0.174	1.67 ±0.361	1.97 ±0.325
	DBT	ND	1.22 ±0.258	2.43 ±0.737	3.58 ±1.28
Spleen	MBT	0.019±0.037	0.258±0.129	0.345±0.056	0.611±0.158
	DBT	ND	0.184±0.129	0.313±0.045	0.804±0.287
Thymus	MBT	0.195±0.054	0.462±0.170	0.838±0.135	1.84 ±0.715
	DBT	ND	ND	ND	0.864±0.743

Pregnant rats were treated orally with di-*n*-butyltin diacetate during days 7-17 of gestation, and sacrificed on day 18 of gestation.
Values are mean±SD of 4-10 samples.
ND represents "not detected", and detection limit is 0.01 μg/g of organ as acetate.

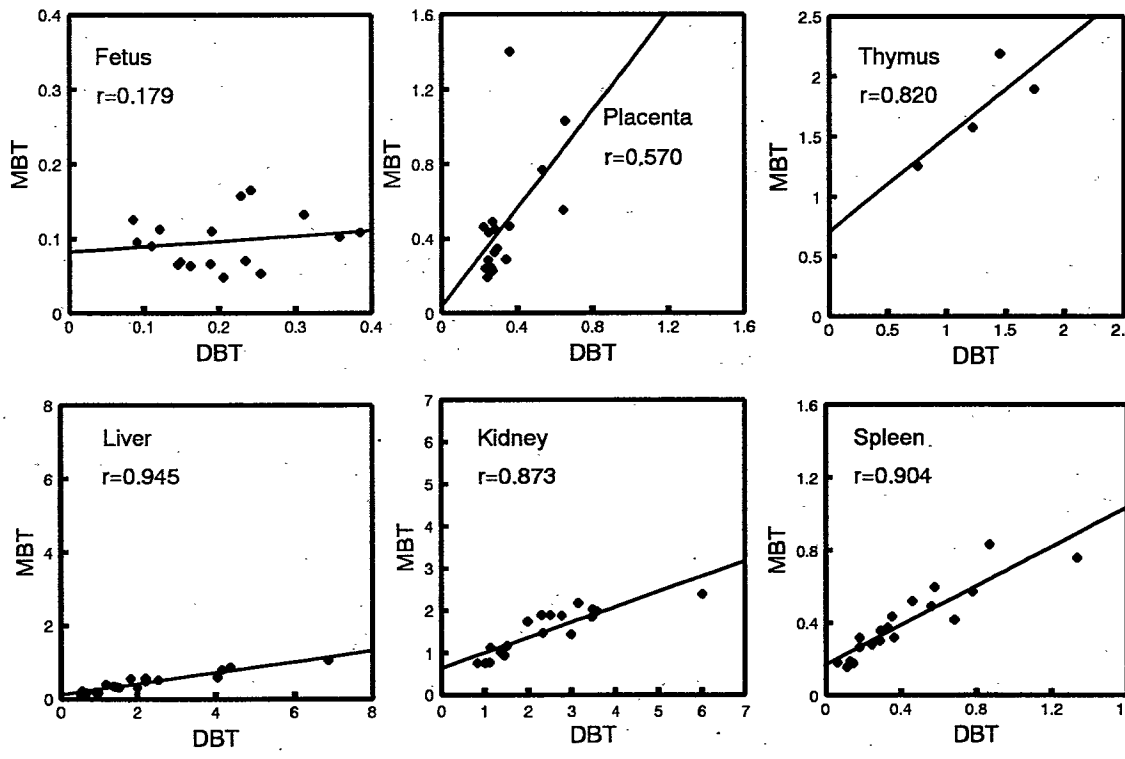

Fig. 7. Scatter diagrams of DBT and MBT in fetus, placenta, and four maternal organs.

tin chloride（Snoeij et al, 1985）などについて報告されている。いずれも食餌中に50-150ppmの有機スズ化合物を添加して２週間飼育している。50ppm添加の食餌を与えたときの有機スズ化合物の投与量を概算すると約６ mg/kg/dayとなる。今回の実験でＴＢＴは４ mg/kg、ＤＢＴは５ mg/kg以上の投与量で有意な胸腺萎縮が認められた。これらのことから、ＴＢＴおよびＤＢＴの胸腺萎縮作用は妊娠動物でも非妊娠動物の場合と同様に最も低い投与量で発現する毒作用の一つだと考えられる。しかし、胸腺中のＤＢＴおよびＭＢＴを測定したところ1.7および５ mg/kg群の胸腺にＤＢＴは検出されず、15 mg/kg群にＤＢＴが検出されたもののＭＢＴよりも低濃度であった。ＭＢＴに胸腺萎縮作用がないことから、胸腺中のＤＢＴ濃度の挙動と胸腺萎縮がどのように関連するかは不明である。一方、ＴＰＴの場合は今回の妊娠動物では胸腺重量の減少傾向が認められたものの有意差はなく、非妊娠動物で報告されている結果と一致しなかった。ＴＰＴは９ mg/kg以上の投与量で妊娠動物に死亡が見られたことが有意差の出なかった一因とも考えられるが、６ mg/kg群で胸腺重量の減少が認められないことからＴＢＴやＤＢＴと比べてＴＰＴの胸腺萎縮作用は弱いものと考えられる。また、ＭＢＴには胸腺萎縮作用はまったく認められなかった。

ＴＢＴの投与によって胎児に口蓋裂が発現したが、口蓋裂の発現する16 mg/kg群では妊娠動物の一般状態の悪化を来たしたため、ここに見られた口蓋裂がＴＢＴの作用によるものかあるいは妊娠動物に対するＴＢＴの毒性の結果として発現したものかは不明であった。ＴＢＴＯはマウス（Davis et al., 1987）およびラット（Crofton et al., 1989）の胎児に口蓋裂を発現させるが、その投与量は今回の結果と同様に妊娠動物に毒性を発現させる量であった。また、tri-*n*-butyltin chloride（Itami et al., 1990）は催奇形作用を持たないとの報告もある。一方、ＴＢＴの投与によって頸肋と腰肋痕の発現率が増加したが、頸肋（Kato and Kitagawa, 1974）および腰肋（安田　ら, 1973; Kimmel and Wilson, 1973; Kato and Kitagawa, 1974）は催奇形作用の検出指標になるとされている。また、巻貝の一種dog-welk, *Nucella lapillus*, の雌貝のimposex（雄性形質誘導および生殖不全症候群：Gibbs and Bryan, 1986;Gibbs et al., 1988）、カニの一種のシオマネキ, *Uca pugilator*, の足の奇形がＴＢＴの暴露によって生じる（Weis and Kim, 1988）ことから、ＴＢＴの哺乳類に対する催奇形作用に関してはさらに検討の必要がある。

ＤＢＴをラットの器官形成期に経口投与すると胎児の外表奇形として主に下顎裂、下唇裂、舌裂、舌癒着の単独あるいは合併奇形と外脳、無尾、痕跡尾が発現した。舌癒着は単独でも発現したが、下顎裂には舌裂と舌癒着が、下唇裂には舌癒着が合併していたことから、舌癒着はＤＢＴによる奇形のうちで最も発現頻度が高く、ＤＢＴに感受性の高い奇形であると考えられた。また、骨格奇形は下顎骨固定不全、肋骨癒合、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合等が観察された。ここに見られた奇形、特に外表奇形の下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着は自然発

生奇形（亀山　ら，1980; Morita et al., 1987）としてはほとんど認められないものであり、ＤＢＴに特徴的な奇形であった。なお、下顎裂および下唇裂を有する胎児には下顎骨固定不全が見られたが、ごく軽度の下唇裂には下顎固定不全は認められなかった。同様に外脳を有する胎児には頭蓋骨形成不全が見られたが、ごく軽度の外脳には頭蓋骨形成不全は認められなかった。無尾／痕跡尾を有する胎児には尾椎欠損と仙椎の全部あるいは一部の欠損が見られた。

下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着の発現率は雄が雌の約２倍であり、性差が認められた。水性生物に対する奇形でも同様に性差が認められている。tri-*n*-butyltin化合物の暴露によって起こるシオマネキ，*Uca pugilator*,の足の奇形の発現頻度は雄が雌よりも高い（Weis and Kim, 1988）。また、巻貝の１種dog-whelk, *Nucella lapillus*,の雌貝のimposexはtri-*n*-butyltin化合物の暴露によって起こる性ホルモンの代謝異常が原因とされている（Gibbs et al., 1991）。これらのことから哺乳類の性ホルモンの代謝に対するtri-*n*-butyltinやdi-*n*-butyltin化合物の影響を検討する必要がある。

ＤＢＴの代謝物であるＭＢＴをラットの器官形成期に経口投与しても妊娠動物や胎児に全く影響をおよぼさなかった。

ＴＰＴをラットの器官形成期に経口投与すると妊娠動物に対して強い毒性が見られ、一部に死亡する動物があった。しかし、そのような投与量であっても胎児に外表奇形は認められなかった。また、ＴＰＴの投与によると推察される骨格奇形は１例も認められなかった。これらの結果はWinek ら（1978）および Giavini ら（1980）の報告とも一致していることから、ＴＰＴは胎児に対する致死毒性は強いものの催奇形作用はないものと考えられた。

以上の結果から、スズ原子に結合する*n*-butyl基の数やスズ原子に結合する置換基の種類によって催奇形作用が異なること、下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着等の外表奇形と下顎骨固定不全、肋骨癒合、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合等の骨格奇形は一連の有機スズ化合物の中ではＤＢＴに特有の奇形であることが明らかとなった。

ラットの組織中のＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの測定法を確立した。この分析法は生体試料からの回収率は魚介類からの回収率（飯島　ら,1991; Ohhira and Matsui, 1991; Uhler et al., 1991）と同程度に良く、抽出液のクロマトグラムに妨害ピークもなく分離良好なピークが得られ、生体中の有機スズ化合物の分析法として満足の行くものであった。

有機スズ化合物を妊娠動物に投与したときのスズの胎児移行はdimethyltin（Noland et al., 1983）およびＴＢＴＯ（Davis et al., 1987）について報告されており、いずれも胎盤を経由して胎児へ移行するとされている。しかし、これらの報告では胎児中のスズの移行量を無機スズ量の増加として測定していることから、胎児中に増加したスズが有機スズなのか無機スズなのかについては明らかでない。本研究によって妊娠動物に投与したＤＢＴが胎児に移行する

こと、そしてその代謝物であるＭＢＴも胎児中に存在することが初めて確認できたことは、ＤＢＴの催奇形作用と合わせて考えたとき興味深い。なお、ＭＢＴに催奇形作用が認められていない（１章１節）ことから催奇形作用との関連からは胎児中のＤＢＴ濃度が問題となると思われる。しかし、今回の実験ではＤＢＴ 15 mg/kg群の２例の外表奇形胎児のＤＢＴ濃度は0.254および0.229μg/gであり、同じ投与群で外表が正常な他の胎児のＤＢＴ濃度（平均0.248μg/g）と比べてほとんど差はなかった。今回の実験では催奇形作用の感受日が判明していなかったのでＤＢＴを器官形成期とされている11日間にわたって連続投与したが、後述のようにＤＢＴの感受日は妊娠８日であるので妊娠９日から17日までのＤＢＴの投与は催奇形作用には寄与していないので明確な差の出なかったものと考えられた。

Ishizaka ら（1989）はＤＢＴの非妊娠動物における代謝を検討し、ＤＢＴを腹腔内に投与すると尿中にＤＢＴおよびその３位の水酸化体の排泄に続いてＭＢＴが高濃度に排泄されることを報告している。腎臓のＭＢＴ濃度が高いことはＭＢＴの極性の高さと関連しているものと推察される。

妊娠動物の臓器中のＤＢＴとＭＢＴ濃度は非常に良い相関を示したが、胎盤では若干相関が悪くなり、胎児では全く相関が認められなかった。Iwaiら（1981）はtri-*n*-butyltinは容易に脳内に移行し、脳内で代謝されてdi-*n*-butyltinおよびmono-*n*-butyltinになるが、脳内のmono-*n*-butyltinは脳から排出されにくく、脳内に蓄積されることを報告している。今回の胎児の結果はＭＢＴの極性がＤＢＴと比較して高いために胎児への移行率および胎児からの排泄率に両者の間で差があるためと推察された。

小　　括

有機スズ化合物の催奇形作用を検討した。ＤＢＴをラットの器官形成期に経口投与することによって胎児の外表に下顎裂、下唇裂、舌裂、舌癒着、外脳の単独あるいは合併奇形が発現し、骨格に下顎骨固定不全、肋骨癒合、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合等の奇形が発現した。ここに見られた奇形はＴＢＴ、ＭＢＴあるいはＴＰＴには認められず、ＤＢＴに特有なものであった。最小中毒量は外表奇形は５ mg/kgそして骨格奇形は10 mg/kgであった。

動物組織中からのＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの同時微量分析法を確立した。その方法を用いてＤＢＴをラットの器官形成期に経口投与したときの胎児および胎盤と妊娠動物の肝臓、腎臓、脾臓および胸腺中のＤＢＴとＭＢＴの濃度を測定した。その結果、胎児中にＤＢＴおよびその代謝産物であるＭＢＴが検出され、ＤＢＴとＭＢＴの胎児への移行が確認できた。また、胎児を含む測定した全ての組織からＤＢＴとＭＢＴが検出され、ＤＢＴの投与量の増加に伴なっ

てＤＢＴおよびＭＢＴの検出量も増加した。しかし、今回の結果からは催奇形作用と胎児中のＤＢＴ濃度の間に明確な関連は認められなかった。

第２章　Di-*n*-butyltinの感受日の検索

ＤＢＴをラットの器官形成期（妊娠７－17日）に経口投与すると胎児の外表および骨格に奇形が発現した。しかし、ラットにおける各種の奇形の成立感受期は外脳、脊髄裂、小眼症は妊娠８～９日、上口唇裂は妊娠11～12日、口蓋裂は妊娠11～14日など（亀山、1992）のように２～３日間程度のことが多い。そこで、ＤＢＴの催奇形作用の感受日の検索を行った。あわせて、妊娠８日投与におけるＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの胚移行を検討した。

実　験　方　法

ＤＢＴの感受日の検索を行い（実験１、２）、さらに単回投与におけるＤＢＴの用量－反応性（実験３）と胎児移行（実験４）を以下のように検討した。

実験１：ラットの器官形成期を４期に分けて感受期を検索した。

実験２：当該感受期をさらに１日単位に分けて感受日を検索した。

実験３：得られた感受日におけるＤＢＴの用量－反応性を検討した。

実験４：ＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの妊娠８日単回投与における胚移行を検討した。

１．使用動物

生後３ヵ月齢の雌雄のJcl:Wistar系ラットを用い１章と同様にして妊娠動物を作成し、飼育した。１群の妊娠動物数を実験１は４～６匹とし４群で、実験２は７～８匹とし６群で、実験３は10匹とし６群で、そして実験４は５匹とし４群で行った。

２．投与量、投与期間および投与方法

投与量および投与期間は以下の通りとした。

実験１：妊娠７－９日、妊娠10－12日、妊娠13－15日そして妊娠16－17日の各期間に15 mg/kgのＤＢＴを強制経口投与した。

実験２：妊娠７、８および９日に15あるいは30 mg/kgのＤＢＴを単回強制経口投与した。

実験３：妊娠８日に０、５、7.2、10.5、15.2および22 mg/kgのＤＢＴを単回強制経口投与した。

実験４：妊娠８日にＴＢＴとＤＢＴは62.7 μmol/kg、ＭＢＴは62.7および1420 μmol/kgを単回経口投与した。なお、ＭＢＴの1420 μmol/kgは400 mg/kgに相当する。

いずれも投与液量を2 ml/kgとした。各*n*-butyltin化合物を所定の投与量と

なるように局方オリーブ油に溶解し、妊娠動物の体重から投与液量を計算して強制経口投与した。また、実験３における対照群には同様の方法で局方オリーブ油 2 ml/kgを投与した。

３．観察

実験１～３について、妊娠動物の体重および摂餌量を毎日測定するとともに一般状態を観察した。妊娠20日に動物をether麻酔により致死せしめ、第１章と同様にして子宮および胎児の観察を行った。ただし、第１章でＤＢＴは胎児に外表と骨格に奇形を発現するが、内臓には奇形を発現しないことが明らかとなったので内臓観察を省略し、全胎児を骨格観察に当てた。

４．胚および妊娠動物の肝臓と血液の採取

実験４に関して、ＴＢＴ、ＤＢＴあるいはＭＢＴを妊娠８日に経口投与して24時間後に動物をether麻酔下で腹部大動脈から採血後、胚および妊娠動物の肝臓を摘出してそれらの重量を測定した後分析用試料として凍結保存した。

５．試料の処理法

実験４に関して、ＴＢＴ、ＤＢＴあるいはＭＢＴの分析には１腹全部の胚（約0.4ｇ）、約２ｇの肝臓と約５mlの血液を精秤して用いた。ＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの抽出法および定量法は１章２節と同様にした。

６．統計処理

第１章と同様に統計処理を行った。

実　験　結　果

１．実験１：ＤＢＴの感受期の検索

ラットの器官形成期を４期に分けて感受期を検索した。妊娠７－９日および妊娠10－12日にＤＢＴを経口投与した群に対照群と比較して軽度の体重増加量の抑制傾向が見られたが、有意差はなかった。その他の期間にＤＢＴを投与した群に体重増加量の変化は見られなかった。妊娠20日に測定した妊娠動物の胸腺重量はいずれの群も有意に減少した。そして、その減少の程度は投与期間が遅くなるほど大きかった。

妊娠７－９日にＤＢＴを投与した群は死亡・吸収胎児頻度が増加し（Fig. 8 A.）、生存胎児の体重が減少した。そして、外表奇形（下顎裂、下唇裂、舌裂、舌癒着、外脳、顔面裂等）と骨格奇形（下顎骨固定不全、肋骨癒合、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合等）が観察されたが、その他の期間にＤＢＴを投与した群に外

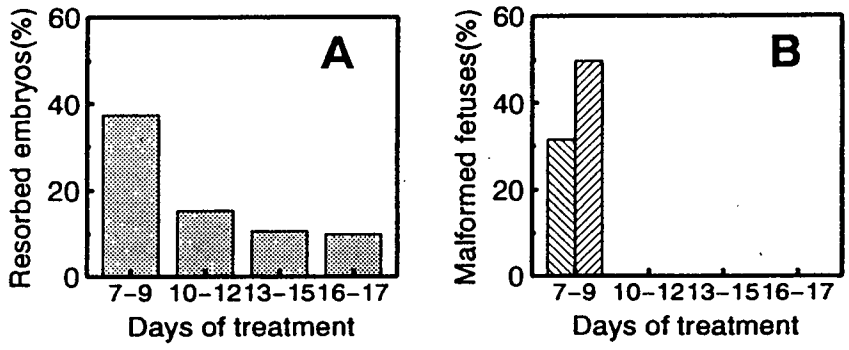

Fig. 8. Incidence of dead or resorbed fetuses (A) and of fetuses with external (▧) and skeletal (▨) malformations (B) from the dams treated orally with DBT (15 mg/kg) at different gestational stages.

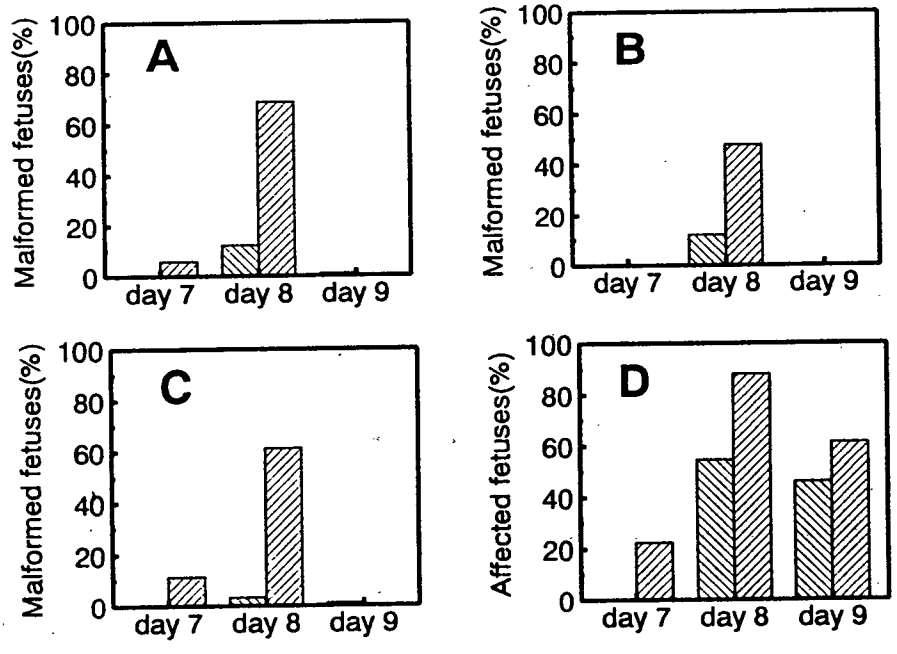

Fig. 9. Incidence of fetuses with external malformations (A), with cleft mandible, cleft lower lip, ankyloglossia or schistoglossia (B), with skeletal malformations (C) and with cervical ribs (D) from the dams treated orally with DBT at 15 (▧) or 30 (▨) mg/kg on three different days of gestation.

表あるいは骨格奇形は認められなかった（Fig. 8B.）。また、骨格変異の一つである頸肋はＤＢＴの投与によって多発するが（１章１節）、妊娠７－９日投与群の46例の胎児中39例に頸肋が認められたが、他の期間に投与した群には頸肋はほとんど見られなかった。

２．実験２：ＤＢＴの感受日の検索

ラットの妊娠７、８あるいは９日にＤＢＴを単回投与したときの催奇形作用を検討し、ＤＢＴの感受日の検索を行った。

妊娠動物の体重増加量と胸腺重量について、いずれの投与群にもＤＢＴ投与による影響は見られなかった。

観察された外表奇形児数は、妊娠７日投与の30 mg/kg群に２例、妊娠８日投与の15 mg/kg群に11例、同30 mg/kg群に30例そして妊娠９日投与の15 mg/kg群に１例認められた（Fig. 9A）。ＤＢＴに特徴的な外表奇形である下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着は妊娠８日投与群にだけ認められた（Fig.9B）。妊娠８日投与群に観察された奇形は以下の通りである。15 mg/kg群に下唇裂と舌癒着の合併奇形が８例、舌癒着が２例および下顎先端鋭角が１例、30 mg/kg群に23例の下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着の合併奇形のうち14例に外脳、顔裂、上唇裂、口蓋裂、臍帯ヘルニアあるいは外反足の１種類あるいは数種類が合併していた。その他の奇形として３例の無顎に外脳、顔裂あるいは臍帯ヘルニアの合併奇形と２例の外脳のうち１例に上唇裂および口蓋裂の合併奇形が認められた。その他の日にＤＢＴを投与した群の奇形としては、妊娠７日投与群に外脳と下顎先端鋭角が各１例、妊娠９日投与群には下顎先端鋭角が１例であった。

骨格奇形児数は妊娠７日投与の30 mg/kg群に４例、妊娠８日投与の15 mg/kg群に３例、同30 mg/kg群に25例そして妊娠９日投与の15 mg/kg群に１例認められた（Fig. 9C）。観察された骨格奇形は以下の通りである。妊娠７日投与の30 mg/kg群は肋骨癒合、椎弓癒合、下顎骨癒合、頭蓋骨形成不全、妊娠８日投与の15 mg/kg群は下顎骨固定不全、下顎骨癒合、同30 mg/kg群は下顎骨固定不全、下顎骨欠損、下顎骨癒合、肋骨癒合、椎弓癒合、頭蓋骨形成不全、妊娠９日投与の15 mg/kg群は下顎骨癒合であった。

ＤＢＴに特徴的な骨格変異である頸肋は妊娠８日投与群に多発したが、妊娠９日投与群にも高頻度に発現した（Fig. 9D）。

３．実験３：ＤＢＴの単回投与による催奇形作用の用量－反応性

いずれの投与群にもＤＢＴの投与によると考えられる体重増加量の減少は見られなかった。摂餌量はＤＢＴ投与翌日の妊娠９日に一時的な抑制傾向がみられたが有意差はなかった。また、妊娠動物の一般状態に異常は認められなかった。

妊娠20日に屠殺した妊娠動物の内部臓器に肉眼的に異常は認められなかった。

Table 14. External and skeletal observations of fetuses from the dams treated orally with DBT on day 8 of gestation.

	Olive oil 2 ml/kg	DBT (mg/kg) 5.0	7.2	10.5	15.2	22.0
Fetuses/dams	115/9	140/10	138/10	120/10	117/10	103/9
External observations						
% of fetuses with malformation	0.9(1)	0	0.6(1)	0	1.9(2)	26.3(7)**
No. of fetuses with malformation	1(1)	0	1(1)	0	2(2)	18(7)**
Cleft mandible, cleft lower lip, ankyloglossia or schistoglossia	0	0	0	0	2(2)	14(7)**
Exencephaly	0	0	0	0	0	8(3)**
Cleft upper lip	0	0	0	0	0	4(1)
Peaked mandible	1(1)	0	0	0	0	0
Agnathia	0	0	0	0	0	1(1)
Microcephaly	0	0	0	0	0	1(1)
Vestigial tail	0	0	1(1)	0	0	0
Club foot	0	0	0	0	0	1(1)
Skeletal observations						
% of fetuses with malformation	0.8(1)	0	1.2(2)	0	0.7(1)	22.4(5)**
No. of fetuses with malformation	1(1)	0	2(2)	0	1(1)	13(5)**
Anomaly of mandibular fixation	0	0	0	0	0	9(5)**
Cranial hypoplasia	0	0	0	0	0	8(3)**
Fused ribs	0	0	0	0	0	6(1)*
Fused cervical or thoracic vertebral arches	0	0	0	0	0	5(1)*
Fused mandibula	1(1)	0	0	0	0	0
Agenesis of sacro-coccygeal or coccygeal vertebrae	0	0	2(2)	0	1(1)	0
No. of fetuses with cervical rib	4(4)	3(2)	8(6)	9(4)	34(8)**	62(9)**

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group. ( ): No. of dams with the corresponding abnormal fetuses. * Significantly different from control, $p<0.05$.
** Significantly different from control, $p<0.01$.

また、胸腺重量の減少も見られなかった。

死亡・吸収胎児頻度（早期死亡胎児頻度＋後期死亡胎児頻度）の増加傾向が15.2 mg/kgおよび22.0 mg/kg群に見られたが、有意差はなかった。妊娠20日の生存胎児数および生存胎児の体重（雄、雌）に有意差は認められなかった。

生存胎児の外表観察の結果、対照群に下顎先端鋭角が１例と7.2 mg/kg群に痕跡尾が１例認められた。15.2 mg/kg 群に舌癒着が１例と下唇裂と舌癒着の合併奇形が１例、合計２例の奇形児が認められた。22 mg/kg群の９例中７例の妊娠動物から合計18例の奇形児が認められた。観察された外表奇形は下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着、外脳、上唇裂、無顎、小頭、内反足であった。以上のようにＤＢＴに特徴的な外表奇形である下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着は15.2および22 mg/kgに認められた（Table 14）。

骨格観察の結果、対照群に下顎骨癒合が１例認められた。仙椎あるいは尾椎欠損が7.2 mg/kg群に２例および15.2mg/kg 群に１例認められた。22 mg/kg 群の９例の妊娠動物のうち５例から合計13例の骨格奇形児が認められた。観察された骨格奇形は下顎骨固定不全、頭蓋骨形成不全、肋骨癒合、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合であった。また、頸肋は15.2および22 mg/kg群で有意に増加した（Table 14）。

４．実験４：ＴＢＴ、ＤＢＴ、ＭＢＴの胚移行

ＴＢＴ（62.7 μmol/kg）を妊娠８日に経口投与して24時間後に胚と妊娠動物の肝臓および血液中のＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴ化合物を測定すると、胚と妊娠動物の肝臓および血液にＴＢＴとその代謝物であるＤＢＴおよびＭＢＴが検出された。妊娠動物の血液中の濃度はいずれも非常に低濃度であった（Fig. 10）。

ＤＢＴ（62.7 μmol/kg）について、胚と妊娠動物の肝臓および血液にＤＢＴとその代謝物であるＭＢＴが検出された。妊娠動物の血液中の濃度はいずれも非常に低濃度であった（Fig. 10）。

ＭＢＴ（62.7 μmol/kg）について、胚と妊娠動物の肝臓および血液にＭＢＴが検出されたがいずれも非常に低濃度であった。そこで投与量を1420 μmol/kgに増加したが、妊娠動物の胚と肝臓および血液のＭＢＴの濃度はわずかな増加に留まった（Fig. 10）。

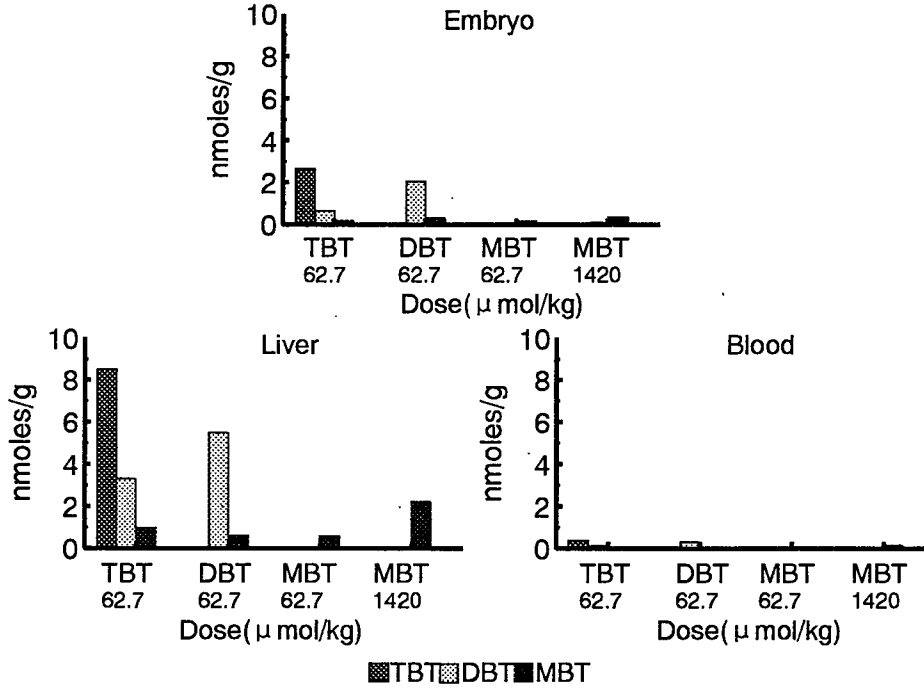

Fig. 10. Concentrations of TBT, DBT and MBT in embryo, maternal liver and blood 24 hr. after oral treatment with those organotins on day 8 of gestation. TBT(62.7μmol/kg), DBT(62.7 μmol/kg), and MBT(62.7 or 1420μmol/kg) were administered to pregnant rats on day 8 of gestation.

考　　察

ＤＢＴの催奇形作用の感受日の検索を行った。

実験１および２の結果、ＤＢＴの外表奇形は妊娠７および８日に発現した。しかし、ＤＢＴに特徴的な外表奇形である下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着は妊娠８日投与群にのみ認められたことから、ＤＢＴの外表奇形の感受日は妊娠８日と推察された。一方、骨格奇形は妊娠７および８日投与群に認められたが、妊娠７日の15 mg/kg群には骨格奇形は１例も見られず、30 mg/kg群に妊娠８日投与群と同種の骨格奇形が観察されたことから、ＤＢＴを大量に投与することによって感受日が拡大するものと考えられた。以上から、ＤＢＴの骨格奇形の感受日は妊娠７および８日であるが、主な感受日は妊娠８日と推察された。

ラットの受精卵は妊娠５～６日で着床が完了し、妊娠７～８日に中胚葉、妊娠９日に原始線条さらに神経板が形成されて胚の前後軸が確定される。さらに妊娠10日になると第１鰓弓、第１体節が形成される。この第１鰓弓から２つの下顎突起と２つの上顎突起が発生し、下顎突起から下顎、下唇および顔面下部が分化、発生する。左右の下顎突起はその後癒合して下顎を形成する（塩田、1992：Moore, 1988）。

ＤＢＴの催奇形作用の主な感受日は妊娠８日であったが、少なくともＤＢＴは左右の下顎突起が癒合する時期に作用するのではなく、それ以前に第１鰓弓の形成、特に将来下顎および下唇を形成する部分に影響を及ぼし、その結果下顎の癒合不全が生じたものと思われるが、詳細は不明である。

ラットの妊娠８日にＤＢＴを単回経口投与したときの用量－反応性を検討した。ＤＢＴの器官形成期投与（１章１節）では最高投与量の15 mg/kgで妊娠後期に体重増加量の有意な減少が認められたが、本実験では10.5 mg/kg以上の群でＤＢＴ投与翌日の妊娠９日以降に体重増加の軽度な抑制傾向がみられた程度で、妊娠動物の体重に対する影響は非常に軽度であった。また、妊娠20日における妊娠動物の胸腺にも萎縮は認められなかった。胸腺萎縮作用はＤＢＴのラットに対する作用の中で最も鋭敏なものの一つであり、器官形成期投与でも5 mg/kg以上の投与群で胸腺の有意な萎縮作用が認められた（１章１節）。今回の実験１では胸腺萎縮作用が認められたが、投与期間が遅くなるほど妊娠20日の胸腺重量の減少程度が大きかった。また、ＤＢＴをラットの全妊娠期間に投与した時の妊娠動物の胸腺萎縮はその後３週間の哺育期間で完全に回復した（野田　ら、1988）。また、実験４ではＴＢＴあるいはＤＢＴの投与24時間後の観察では胸腺萎縮は認められなかった。一方、ＴＢＴによって胸腺細胞のプログラム細胞死が生じるとの報告（Raffray and Cohen, 1991）があることから、胸腺萎縮には数日間の時間経過が必要と考えられるが、仮に妊娠８日にＤＢＴを単回投与したときに胸腺萎縮が惹起されたとしても妊娠20日までに回復したものと考えられる。

妊娠動物の体重増加量、摂餌量、胸腺重量、妊娠の継続および胎児の成長にＤＢＴはほとんど影響をおよぼさなかったが、胎児の外表奇形については下顎裂、下唇裂、舌裂、舌癒着、上唇裂および外脳などの奇形が15.2および22 mg/kg 群に認められた。全妊娠期間投与試験（野田　ら、1988）ではＤＢＴ15 mg/kg投与群に下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着が認められたが、上唇裂、顔裂、外脳は見られなかった。また、器官形成期投与試験（１章１節）では５ mg/kg群に下唇裂と舌癒着の合併奇形が見られ、10および15 mg/kg群に下顎裂、下唇裂、舌裂、舌癒着、上唇裂および外脳が認めれれた。そして、実験２の30 mg/kg群には下顎裂、下唇裂、舌裂、舌癒着、上唇裂、外脳に加えて顔裂が観察された。これらの結果から、ＤＢＴは小量では下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着が発現し、大量では下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着に加えて上唇裂、顔裂、外脳等の発現率が増加すると考えられた。

外表奇形に関する最少中毒量は全妊娠期間投与試験は15 mg/kg、器官形成期投与試験は５ mg/kgそして本実験は15.2 mg/kg であった。これら３種の実験結果には下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着が共通して観察され、基本的には同様の結果を示していると考えられるが、最少中毒量や外表奇形の種類に若干の相違が認められた。di-*n*-butyltin のラットにおける半減期は３～５日と推定

（Ishizaka et al.,1989）されている。また、ＤＢＴの催奇形性の作用日は妊娠８日であるが、全妊娠期間投与では妊娠０日から毎日ＤＢＴを投与し、妊娠８日までにすでに８日間の投与がなされていることから動物はある種の耐性を獲得し、その結果奇形発現頻度が低くなったと推察される。また、器官形成期投与では妊娠７日からＤＢＴを投与しており、感受日の妊娠８日には前日に投与したＤＢＴのかなりの量が残っていることによって奇形発現頻度が増加したものと考えられる。

n-butyltin化合物の胚移行に関して、妊娠８日に経口投与されたＴＢＴとＤＢＴは腸管から吸収され、胚への移行が確認された。ＤＢＴとＴＢＴの胚への移行量はほとんど同程度である（Fig. 10）にもかかわらず、胎児に対する催奇形作用は全く異なっていた。ＤＢＴとＴＢＴの催奇形作用の差はそれらの胚への移行量の差ではなく、それらの分子の持つ催奇形能自体が異なるものと推察された。

ＭＢＴは腸管吸収率と胚への移行率が低かった。ＤＢＴを器官形成期に投与した時の胎児のＭＢＴ濃度はＤＢＴの40％であったが（Table 13）、妊娠８日の単回投与時の胚では15％（Fig. 10）であった。di-*n*-butyltinを非妊娠ラットに投与したときの生体内半減期は３～５日と推定されている、そして、ＤＢＴの代謝物であるmono-*n*-butyltinの尿中への排泄のピークはＤＢＴの投与４日後であり、脾臓中のＭＢＴの濃度のピークはＤＢＴ投与３日後であるが、肝臓と腎臓中のmono-*n*-butyltinの濃度は特にピークは見られず低濃度のままほぼ一定である（Ishizaka et al.,1989）。また、mono-*n*-butyltinは極性が高いため脳内から排泄されにくいとの報告もあり（Iwai et al., 1981）、単回投与におけるＭＢＴの胚中の濃度が低い原因は、ＤＢＴを単回投与して24時間後ではＭＢＴの生体内における絶対量が少ないことに加えてＭＢＴの胚移行率が悪いためと推察された。

小　　括

ＤＢＴの催奇形作用の感受日の検索を行った。ＤＢＴに特徴的な外表奇形である下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着の感受日は妊娠８日であった。骨格奇形として観察された下顎骨固定不全、肋骨癒合、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合等の感受日は主として妊娠８日であったが、下顎骨固定不全を除く骨格奇形は妊娠７日にも低頻度ではあるが認められた。

ＤＢＴを妊娠８日に単回投与したとき、最小中毒量は外表奇形は15.2 mg/kg、骨格奇形は22 mg/kgであった。

ＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの妊娠８日投与における胚移行を検討した結果、ＴＢＴ投与群は胚にＴＢＴとその代謝物であるＤＢＴおよびＭＢＴが、ＤＢＴ

投与群は胚にＤＢＴとその代謝物であるＭＢＴが検出された。ＭＢＴ投与群は胚にＭＢＴが検出されたが、非常に低濃度であり、ＭＢＴは腸管吸収率と胚への移行率が低い。

第３章　Butyl(3-hydroxybutyl)tinの催奇形作用

di-*n*-butyltinは代謝されて２種の水酸化体［butyl(3-hydroxybutyl)tin、butyl(4-hydroxybutyl)tin］とmono-*n*-butyltinになる（Fig. 11）が、このうちbutyl(3-hydroxybutyl)tinとmono-*n*-butyltinが主代謝物である（Ishizaka et al., 1989）。mono-*n*-butyltinには催奇形作用が認められなかったが（１章１節）、butyl(3-hydroxybutyl)tinの催奇形作用に関しては報告がなく不明である。そこで、ＤＢＴの催奇形作用の原因物質検索の一環としてbutyl(3-hydroxybutyl)tinの催奇形作用を検討した。

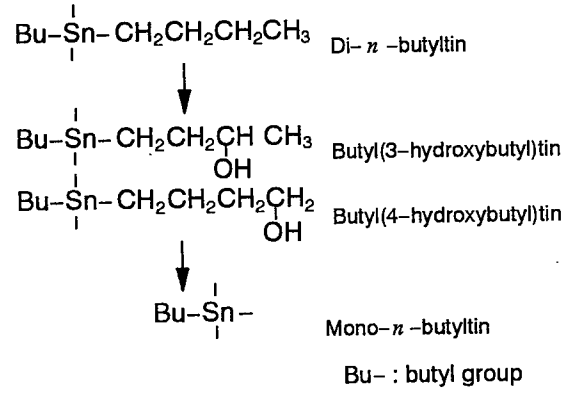

Fig. 11. Metabolic pathway for di-*n*-butyltin

実　験　方　法

１．試験薬物

Butyl(3-hydroxybutyl)tin dilaurate（3-OHＤＢＴＬ）　ソール研究所製
Di-*n*-butyltin dilaurate（ＤＢＴＬ）　和光純薬工業株式会社製
Di-*n*-butyltin diacetate（ＤＢＴ）　東京化成工業株式会社製

２．使用動物

生後３ヵ月齢の雌雄のJcl:Wistar系ラットを用い１章と同様にして妊娠動物を作成し、飼育した。１群の妊娠動物数を10匹とし、５群で行った。

３．投与量

ＤＢＴＬおよびＤＢＴは80 μmol/kg、3-OHＤＢＴＬは80および160 μmol/kgとした。

４．投与日および投与方法

ＤＢＴ、ＤＢＴＬおよび3-OHＤＢＴＬを所定の投与量となるように局方オリーブ油に溶解して妊娠８日に妊娠動物に強制経口投与した。なお、投与液量は２ml/kgとした。

5．観察

第１章と同様にした。ただし、生存胎児の内臓観察を省略し、すべての生存胎児を骨格観察にあてた。

6．統計処理

各有機スズ化合物投与群と対照群の間の有意差検定は以下のように行った。体重、胸腺重量、黄体数、着床数、生存胎児数、胎児体重などのように平均値±標準偏差で表すものについては１腹を標本単位として計算し（高野　ら、1975）、ｔ検定によって行った。死亡・吸収胎児頻度、奇形児頻度などのように頻度で表すものについては１腹を標本単位として計算し、Ｕ検定によって検定した。また、3-OHＤＢＴＬ投与群とＤＢＴＬ投与群の間の有意差検定はパラメトリックあるいはノンパラメトリック型のScheffé（Scheffé, 1953）法によった。妊娠成立雌数、死亡雌数など整数で表すものについては個別比較をFisherの直接確率計算法によって行った。

実　験　結　果

妊娠動物の体重増加量、摂餌量、一般状態および妊娠動物の胸腺重量にＤＢＴ、ＤＢＴＬあるいは3-OHＤＢＴＬ投与の影響は認められなかった。

3-OHＤＢＴＬ 160 μmol/kg群に１腹中の全例の胚あるいは胎児が死亡し、妊娠20日の帝王切開時に生存胎児の存在しなかった妊娠動物が２例認められた。

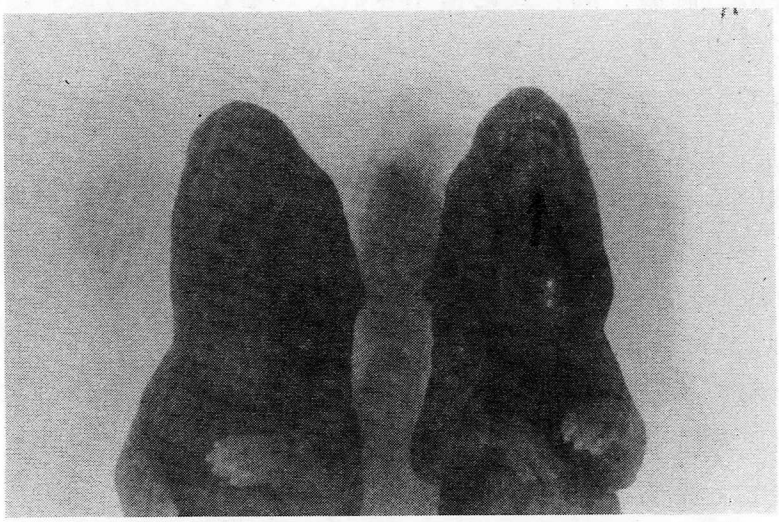

Photo. 3.　A fetus with peaked mandible after maternal exposure to 3-OHDBTL at 160 μmol/kg on day 8 of gestation (right) and a normal fetus from a control dam (left).

また、同群の生存胎児の体重が対照群と比べて有意に減少したが、ＤＢＴＬとの間に有意差はなかった。

外表観察ではＤＢＴＬ投与群とＤＢＴ投与群に下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着、小顎、外脳、上唇裂等の同種の外表奇形が同程度の胎児に観察された。しかし、3-OHＤＢＴＬの80 μmol/kg群に外表奇形は１例も認められず、160 μmol/kg群に下顎先端鋭角（Photo. 3）が８例、小顎が２例、下唇裂と舌癒着の合併奇形が１例そして痕跡尾が１例認められた（Table 15）。

骨格観察ではＤＢＴＬ投与群とＤＢＴ投与群に下顎骨固定不全、頭蓋骨形成不全、肋骨癒合、胸椎弓癒合等の同種の骨格奇形が観察されたが、3-OHＤＢＴＬの80 μmol/kg群に骨格奇形は１例も認められず、160 μmol/kg群に下顎骨癒合が７例、小下顎骨と下顎骨癒合の合併奇形が４例、下顎骨固定不全が１例そして仙・尾椎欠損が２例認められた（Table 16）。

また、ＤＢＴに特徴的な骨格変異である頸肋の発現率は3-OHＤＢＴＬ投与群で低い傾向があり、80 μmol/kg群の頸肋発現率はＤＢＴＬ投与群と比べて有意に低下した。

考　　察

ラットに投与されたＤＢＴはブチル基の一つが水酸化されて２種類の水酸化体［butyl(3-hydroxybutyl)tinおよびbutyl(4-hydroxybutyl)tin］となるが、その水酸化ブチル基が脱ブチル化されてmono-*n*-butyltinとなる。これらの代謝物のうちbutyl(3-hydroxybutyl)tinとmono-*n*-butyltinが主代謝物で、ラットの肝臓、腎臓、脾臓、脳と尿に検出されているが、butyl(4-hydroxybutyl)tinはわずかに尿中にのみ検出された。そして、butyl(3-hydroxybutyl)tinはほとんどの臓器でmono-*n*-butyltinよりも高濃度に検出されている（Ishizaka et al., 1989）。

本実験において、ＤＢＴＬの主代謝物である3-OHＤＢＴＬの催奇形作用を検討したところＤＢＴＬと同一投与量（80 μmol/kg）では奇形は発現せず、２倍量（160 μmol/kg）を投与して初めて胎児に奇形が発現した。3-OHＤＢＴＬ 160 μmol/kg群に胎児の死亡率の増加が見られることから、催奇形試験のための投与量として十分な投与量と考えられる。しかしこの投与量で見られた主な外表奇形は下顎先端鋭角であり、ＤＢＴに特徴的な外表奇形である下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着とは明らかに異なっていた。下顎先端鋭角を有する胎児の骨格を観察すると下顎骨癒合（下顎骨の先端癒合）が見られ、小顎を有する胎児の骨格には下顎骨の短小と下顎骨癒合が見られた。これらの奇形はＤＢＴの器官形成期投与や妊娠８日単回投与でも時に見られるものであるが、ＤＢＴによって発現する主な奇形とは言えない。

Table 15. External observations of fetuses from dams treated orally with butyl(3-hydroxybutyl)tin dilaurate.

	Olive oil 2 ml/kg	Dose (μmoles/kg) DBT 80	DBTL 80	3-OHDBTL 80	3-OHDBTL 160
Fetuses/dams	126/10	133/10	130/10	134/10	106/8
Incidence of fetuses with malformation, %	0	28.3(7)**	30.6(6)*	0+	12.4(5)*
No. of fetuses with malformation	0	37(7)**	37(6)**	0++	12(5)**, ++
Cleft mandible, cleft lower lip, ankyloglossia or schistoglossia	0	32(7)**	33(6)**	0++	1(1)++
Micrognathia	0	2(1)	2(1)	0	2(2)
Peaked mandible	0	0	0	0	8(3)**, ++
Exencephaly	0	18(6)**	16(5)**	0++	0++
Cleft upper lip	0	3(1)	4(3)	0	0
Cleft palate	0	1(1)	2(2)	0	0
Asymmetric face	0	1(1)	0	0	0
Vestigial tail with internal hemorrhage	0	0	0	0	1(1)

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group. ( ):No. of dams with the corresponding abnormal fetuses.
* Significantly different from control, $p<0.05$. ** Significantly different from control, $p<0.01$.
+ Significantly different from DBTL group, $p<0.05$. ++ Significantly different from DBTL group, $p<0.01$.

Table 16. Skeletal observations of fetuses from dams treated orally with butyl(3-hydroxybutyl)tin dilaurate.

	Olive oil	Dose (μmoles/kg)			
		DBT	DBTL	3-OHDBTL	
	2 ml/kg	80	80	80	160
Fetuses/dams	126/10	133/10	130/10	134/10	106/8
Incidence of fetuses with malformation, %	0	21.9(7)**	28.1(6)*	0+	14.5(5)*
No. of fetuses with malformation	0	29(7)**	34(6)**	0++	14(5)**, ++
Anomaly of mandibular fixation	0	17(6)**	25(6)**	0++	1(1)++
Fused mandibula	0	1(1)	1(1)	0	7(2)**, +
Micromandibula and fused mandibula	0	2(1)	2(1)	0	4(3)*
Cranial hypoplasia	0	12(5)**	13(5)**	0++	0++
Fused ribs	0	9(2)**	7(3)*	0++	0+
Absence of ribs	0	2(1)	0	0	0
Fused vertebral arches	0	6(1)*	3(2)	0	0
Fused cervical vertebral arches	0	1(1)	0	0	0
Fused thoracic vertebral arches	0	5(1)	3(2)	0	0
Cleft maxilla	0	3(1)	3(3)	0	0
Agenesis of sacro or coccygeal vertebrae	0	0	0	0	2(2)
Incidence of fetuses with variation, %	1.4(2)	70.2(8)**	65.3(8)**	12.5(8)**, +	54.7(8)**
No. of fetuses with variation	2(2)	93(8)**	82(8)**	15(8)**, ++	55(8)**
Asymmetry or cleft sternebrae	0	19(6)**	11(5)**	0 **, ++	0++
Cervical rib	2(2)	90(8)**	76(8)**	12(8)**, ++	51(7)**
Lumbar rib	0	0	1(1)	0	0
Rudimentary lumbar rib	0	4(2)	7(5)*	1(1)++	5(2)*
Splitting or bifurcation of 1st cervical vertebral arch	0	8(5)**	13(5)**	1(1)++	2(2)+
Splitting of ossification centers of thoracic vertebral body	0	11(2)**	13(4)**	0++	0++
Variation in number of vertebrae	0	3(1)	0	0	1(1)
Occipital hypoplasia	0	1(1)	0	0	0

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values. Thus, these values represent means of litter means within each group. ( ):No. of dams with the corresponding abnormal fetuses.
* Significantly different from control, $p<0.05$. ** Significantly different from control, $p<0.01$.
+ Significantly different from DBTL group, $p<0.05$. ++ Significantly different from DBTL group, $p<0.01$.

小　　括

ＤＢＴによる催奇形作用の原因物質の検索の一環としてdi-*n*-butyltin化合物の主代謝物の一つであるbutyl(3-hydroxybutyl)tin化合物の催奇形作用を検討した。

3-OHＤＢＴＬを妊娠８日に経口投与した時、80 μmol/kg群に奇形は１例も認められなかったが、160 μmol/kg群に下顎先端鋭角および小顎を主とした外表奇形が認められた。一方、ＤＢＴＬによる奇形はＤＢＴと同種の下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着が主な奇形であった。

以上の結果、3-OHＤＢＴＬは催奇形作用を有するが、ＤＢＴやＤＢＴＬと比較するとその作用は弱く、また発現した奇形はＤＢＴあるいはＤＢＴＬに見られた奇形とは明らかに異なるものであり、3-OHＤＢＴＬはＤＢＴあるいはＤＢＴＬの催奇形作用の原因物質とは考えられなかった。

第４章　Di-*n*-butyltinの催奇形作用に対する四塩化炭素前処置の影響

di-*n*-butyltin化合物の主代謝物のうちmono-*n*-butyltin（１章１節）およびbutyl(3-hydroxybutyl)tin（３章）はいずれもdi-*n*-butyltinの催奇形作用の原因物質とは考えられなかった。そこで、本実験ではＤＢＴの代謝物が催奇形作用に関与するか否かを推定するために、妊娠動物の肝臓の薬物代謝酵素活性を低下させることによって妊娠動物体内のＤＢＴの代謝物の濃度を低下させた時のＤＢＴの催奇形作用を検討した。妊娠動物の肝臓の薬物代謝酵素活性を低下させるために四塩化炭素（CCl_4）を前処置した。併せてCCl_4を前処置したときの胚および妊娠動物の肝臓および血液中のＤＢＴ濃度を測定した。

実　験　方　法

１．実験１：ＤＢＴの催奇形作用に対するCCl_4前処置の影響

1. 使用動物

生後３ヵ月齢の雌雄のJcl:Wistar系ラットを用い１章と同様にして妊娠動物を作成し、飼育した。１群の妊娠動物数を10～11匹として８群を設定した。

2. 投与量および投与方法

妊娠動物の処置は以下のように行った。

a)対照群：妊娠６日および７日に局方オリーブ油 2 ml/kgを頸背部皮下に投与し、妊娠８日に局方オリーブ油 2 ml/kgを強制経口投与した。

b)CCl_4群：妊娠６日および７日にCCl_4（0.5 ml/kg）を頸背部皮下に投与し、妊娠８日に局方オリーブ油 2 ml/kgを強制経口投与した。

c)ＤＢＴ群：妊娠６日および７日に局方オリーブ油 2 ml/kgを頸背部皮下に投与し、妊娠８日にＤＢＴ 4.5、10、22 mg/kgをそれぞれ強制経口投与した。

d)CCl_4＋ＤＢＴ群：妊娠６日および７日にCCl_4（0.5 ml/kg）を頸背部皮下に投与し、妊娠８日にＤＢＴ 4.5、10、22 mg/kgをそれぞれ強制経口投与した。

なお、CCl_4およびＤＢＴはいずれも局方オリーブ油溶液とし、投与液量は２ ml/kgとした。

3. 観察

妊娠動物の観察および妊娠20日の子宮と胎児の観察は第１章と同様にした。ただし、生存胎児は外表を観察後、全例を骨格観察にあてた。

2．実験２：胚と妊娠動物の肝臓および血液中のＤＢＴおよびＭＢＴの定量

1. 使用動物

実験１と同様にして妊娠動物を得た。１群の妊娠動物数を５匹として４群を設定した。

2. 投与量および投与方法

妊娠動物の処置は以下のようにした。

a)対照群 ： 妊娠６日および７日に局方オリーブ油 2 ml/kgを頸背部皮下に投与し、妊娠８日に局方オリーブ油 2 ml/kgを強制経口投与した。

b)CCl_4群 ： 妊娠６日および７日にCCl_4（0.5 ml/kg）を頸背部皮下に投与し、妊娠８日に局方オリーブ油 2 ml/kgを強制経口投与した。

c)ＤＢＴ群 ： 妊娠６日および７日に局方オリーブ油 2 ml/kgを頸背部皮下に投与し、妊娠８日にＤＢＴ 22 mg/kgを強制経口投与した。

d)CCl_4＋ＤＢＴ群 ： 妊娠６日および７日にCCl_4（0.5 ml/kg）を頸背部皮下に投与し、妊娠８日にＤＢＴ 22 mg/kgを強制経口投与した。

なお、CCl_4およびＤＢＴはいずれも局方オリーブ油溶液とし、投与液量は２ ml/kgとした。

3. 胚および妊娠動物の肝臓と血液の採取

局方オリーブ油あるいはＤＢＴの経口投与24時間後（妊娠９日）にether麻酔下で腹部大動脈から採血後、胚および妊娠動物の肝臓を摘出し、それらの重量測定を行った後、分析用試料として冷凍保存した。

4. ＤＢＴおよびＭＢＴの定量方法

ＤＢＴおよびＭＢＴの定量は１章２節と同様の方法で行った。なお、冷凍保存した胚は１腹全量、妊娠動物の肝臓は約２ｇそして血液は約５mlを精秤して定量に用いた。

5. 血清中のtarnsaminase活性および尿素窒素量の測定方法

採取した血液から常法によって血清を分離した後、transaminase活性（ＧＯＴおよびＧＰＴ）および尿素窒素（ＢＵＮ）を市販の測定キットを用いて測定した。

6. 肝薬物代謝酵素活性の測定方法

ラットの肝臓重量を測定後、その２ｇをとり７倍容量の1.15%KCl-0.01M Na／K リン酸緩衝液（pH7.4）を加えホモジネート後、9000g上清を分離した。薬

物代謝酵素活性としてaminopyrine demethylase活性およびaniline hydroxylase活性を常法により測定した。タンパク量はLowry法で測定した。

7. 統計処理

生存胎児数、生存胎児体重、奇形発現率、妊娠動物の肝薬物代謝酵素活性、血清中のtransaminase活性、胚、妊娠動物の肝臓、血液中の有機スズ含量などのように平均値±標準偏差で表すものについてはBartlettの検定で等分散の場合は一元配置分散分析法によって、不等分散の場合はKruskal-Wallis法によって各群間の有意差を検定した。一元配置分散分析法あるいはKruskal-Wallis法において有意差がある場合には個別比較をｔ検定あるいはU検定によって行った。また、妊娠動物数、生存胎児を有する雌数、各種奇形児数など整数で表すものについては個別比較をFisherの直接確率計算法によって行った。

実　験　結　果

1．実験１：ＤＢＴの催奇形作用に対するCCl_4前処置の影響

1. 妊娠動物におよぼす影響

体重増加量および摂餌量について、CCl_4群とCCl_4＋ＤＢＴ群は妊娠６～９日にかけて一時的な抑制傾向がみられたがＤＢＴの投与量による差は認められず、妊娠10日以降は順調に増加した。ＤＢＴ群はいずれも全妊娠期間を通して対照群と同様に推移した。一般状態はいずれの群についても特に異常は認められなかった。

妊娠20日に屠殺した妊娠動物の剖検所見は、CCl_4投与群の肝臓の色調異常以外に肉眼的に異常は認められなかった。また、胸腺重量に影響は見られなかった。

2. 妊娠および胎児に対する影響

妊娠動物に死亡例は見られなかったが、妊娠中に１腹中の全例の胚あるいは胎児が死亡し、妊娠20日の帝王切開時に生存胎児の存在しなかった妊娠動物がCCl_4＋ＤＢＴ群の4.5 mg/kgおよび22 mg/kg群にそれぞれ１例見られた。その他の群の妊娠動物には全例に生存胎児が認められた。CCl_4＋ＤＢＴ群の22 mg/kg群は対照群およびＤＢＴ群と比較すると死亡・吸収胎児頻度が増加し、生存胎児体重が減少した（Table 17）。

生存胎児の外表観察（Table 18）について、ＤＢＴ群は、4.5 mg/kg群に10例の妊娠動物中２例から外脳と痕跡尾が各１例、10 mg/kg群に９例の妊娠動物中１例から外脳が１例、22 mg/kg群に10例の妊娠動物中６例から下顎裂／下唇

Table 17. Effects of DBT on pregnant rats treated with DBT after pretreatment with CCl_4 and their fetuses.

Pretreatments[a] / Treatment[b]	Olive oil / Olive oil	CCl_4 / Olive oil	Olive oil / DBT 4.5mg/kg	CCl_4 / DBT 4.5mg/kg	Olive oil / DBT 10mg/kg	CCl_4 / DBT 10mg/kg	Olive oil / DBT 22mg/kg	CCl_4 / DBT 22mg/kg
No. of pregnant females	10	10	10	10	9	10	10	10
No. of dams with living fetuses	10	10	10	9	9	10	10	9
No. of dams with total resorption	0	0	0	1	0	0	0	1
No. of dead dams	0	0	0	0	0	0	0	0
No. of implants[c]	14.7±1.49	15.7±1.49	14.3±1.89	14.8±1.55	14.2±2.68	13.7±1.95	15.8±1.32	14.6±1.17
Incidence of dead or resorbed fetuses, %	5.6	5.5	5.3	15.7	3.1	2.9	5.7	30.2*, ++
Early stage	5.6	5.5	5.3	14.2	3.1	2.9	5.1	23.9*, ++
Late stage	0	0	0	1.4	0	0	0.6	6.2
No. of living fetuses[c]	13.9±1.8	14.8±1.23	13.5±1.58	12.6±4.86	14.0±2.45	13.2±1.87	14.8±1.40	10.3±5.08
Body weight of living fetuses[c], g								
Male	3.4±0.26	3.3±0.17	3.2±0.17	3.2±0.14	3.3±0.28	3.2±0.28	3.0±0.19	2.6±0.53*
Female	3.2±0.17	3.0±0.16	3.0±0.20	3.0±0.19	3.2±0.25	3.1±0.23	2.8±0.20**	2.6±0.32**

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values, thus these values represent means of litter means within each group.
[a] Animals were pretreated subcutaneously with olive oil (2 ml/kg) or CCl_4 (0.5 ml/kg) on gestational days 6 and 7. [b] Animals were treated orally with olive oil (2 ml/kg) or DBT on the gestational day 8. [c] Values are the mean±SD. * Significantly different from control (olive oil/olive oil), $p<0.05$. ** Significantly different from control (olive oil/olive oil), $P<0.01$. ++ Significantly different from corresponding control (olive oil /DBT), $P<0.01$.

Table 18. External observations of fetuses from dams treated with DBT after pretreatment with CCl_4.

Pretreatments[a)] / Treatment[b)]	Olive oil / Olive oil	CCl_4 / Olive oil	Olive oil / DBT 4.5mg/kg	CCl_4 / DBT 4.5mg/kg	Olive oil / DBT 10mg/kg	CCl_4 / DBT 10mg/kg	Olive oil / DBT 22mg/kg	CCl_4 / DBT 22mg/kg
Fetuses/dams	139/10	148/10	135/10	126/9	126/9	132/10	148/10	103/9
Incidence of fetuses with malformation, %	0.7(1)	0	1.6(2)	0	0.7(1)	5.7(3)	7.9(6)	67.0(9)**, ++
No. of fetuses with malformation	1(1)	0	2(2)	0	1(1)	8(3)*, +	12(6)**	65(9)**, ++
Cleft mandible, cleft lower lip, ankyloglossia or schistoglossia	0	0	0	0	0	7(2)*, +	12(6)**	36(7)**, ++
Peaked mandible	0	0	0	0	0	0	0	7(5)**, ++
Agnathia or micrognathia	0	0	0	0	0	0	0	9(3)**, ++
Exencephaly	0	0	1(1)	0	1(1)	0	0	48(7)**, ++
Cleft upper lip	0	0	0	0	0	0	1(1)	18(7)**, ++
Facial cleft	0	0	0	0	0	0	0	4(3)*, +
Omphalocele	0	0	0	0	0	0	0	3(2)
Anury or vestigial tail	1(1)	0	1(1)	0	0	0	0	2(2)
Abnormal tail	0	0	0	0	0	1(1)	0	1(1)
Kinky tail	0	0	0	0	0	0	0	1(1)
Pes varus	0	0	0	0	0	0	0	2(1)
Microcephaly	0	0	0	0	0	0	0	1(1)
Brachymelia	0	0	0	0	0	0	0	1(1)

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values, thus these values represent means of litter means within each group. [a)] Animals were pretreated subcutaneously with olive oil (2 ml/kg) or CCl_4 (0.5 ml/kg) on the gestational days 6 and 7. [b)] Animals were treated orally with olive oil (2 ml/kg) or DBT on the gestational day 8. ( ):No. of dams with the corresponding abnormal fetuses. * Significantly different from control (olive oil/olive oil), $P<0.05$. ** Significantly different from control (olive oil/olive oil), $P<0.01$. + Significantly different from corresponding control (olive oil/DBT), $P<0.05$. ++ Significantly different from corresponding control (olive oil/DBT), $P<0.01$.

Table 19. Skeletal observations of fetuses from dams treated with DBT after pretreatment with CCl_4.

Pretreatments[a)] / Treatment[b)]	Olive oil / Olive oil	CCl_4 / Olive oil	Olive oil / DBT 4.5mg/kg	CCl_4 / DBT 4.5mg/kg	Olive oil / DBT 10mg/kg	CCl_4 / DBT 10mg/kg	Olive oil / DBT 22mg/kg	CCl_4 / DBT 22mg/kg
Fetuses/dams	139/10	148/10	135/10	126/9	126/9	132/10	148/10	103/9
Incidence of fetuses with malformation, %	0.7(1)	0	0.7(1)	0	0.7(1)	2.8(3)	5.4(6)	66.5(8)**, ++
No. of fetuses with malformation	1(1)	0	1(1)	0	1(1)	4(3)	8(6)*	64(8)**, ++
Anomaly of mandibular fixation	0	0	0	0	0	3(2)	8(6)*	10(4)**
Fused mandibula	0	0	0	0	0	0	0	7(5)**, ++
Micromandibula and fuesd mandibula	0	0	0	0	0	0	0	6(3)**, ++
Agenesis of mandibula	0	0	0	0	0	0	0	4(3)*, +
Cranial hypoplasia	0	0	0	0	1(1)	0	0	39(7)**, ++
Cleft premaxilla or nasal	0	0	0	0	0	0	1(1)	26(7)**, ++
Fusion and/or absence of ribs	0	0	0	0	0	0	0	41(6)**, ++
Fusion and/or absence of cervical vertebral arches	0	0	0	0	0	0	0	17(6)**, ++
Fusion and/or absence of thoracic vertebral arches	0	0	0	0	0	0	0	35(6)**, ++
Fusion and/or absence of lumbar vertebral arches	0	0	0	0	0	0	0	1(1)
Nodulated rib	0	0	0	0	0	0	0	4(3)*, +
Cleft scapula	0	0	0	0	0	0	0	2(2)
Agenesis of the sacro or coccygeal vertebrae	1(1)	0	1(1)	0	0	1(1)	0	2(2)
Agenesis of femur and/or fibula	0	0	0	0	0	0	0	2(1)
Cleft occipital condyle	0	0	0	0	0	0	0	1(1)
Incidence of fetuses with variation, %	4.4(5)	1.3(1)	4.4(6)	4.0(5)	3.4(3)	28.7(9)**, ++	34.6(8)*	87.2(9)**, ++
No. of fetuses with variation	6(5)	2(1)	6(6)	5(5)	5(3)	39(9)**, ++	50(8)**	89(9)**, ++
Cervical rib	6(5)	1(1)	5(5)	2(2)	4(2)	29(7)**, ++	46(8)**	72(7)**, ++
Rudimentary lumbar rib	0	0	1(1)	2(2)	0	7(2)**, +	1(1)	29(6)**, ++
Splitting of 1st cervical vertebral arch	0	1(1)	0	0	1(1)	6(4)*	4(2)	18(7)**, ++
Splitting of ossification centers of thoracic or lumber vertebral body	0	0	0	1(1)	0	2(2)	0	49(8)**, ++
Cleft or fused sternum	0	0	0	0	0	1(1)	3(2)	12(6)**, ++
Occipital hypoplasia	0	0	0	0	0	0	1(1)	1(1)

The litter was used as the statistical unit for calculation of fetal values, thus these values represent means of litter means within each group.
( ):No. of dams with the corresponding abnormal fetuses. * Significantly different from control (olive oil/olive oil), $p<0.05$. ** Significantly different from controls (olive oil/olive oil), $p<0.01$. + Significantly different from corresponding control (olive oil/DBT), $P<0.05$.
++ Significantly different from corresponding control (olive oil/DBT), $P<0.01$.

裂／舌裂／舌癒着が11例と下唇裂、舌癒着と上唇裂の合併奇形が１例見られた。ＤＢＴに特徴的な奇形である下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着は22 mg/kg群にのみ観察された。

ＣＣｌ$_4$＋ＤＢＴ群は、4.5 mg/kg群に外表奇形は見られなかったが、10 mg/kg群の10例の妊娠動物中３例から下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着が７例と尾の形態異常（尾の付け根が細くなる）が１例見られ、22 mg/kg群の９例全例の妊娠動物から合計65例の奇形児が認められた。22 mg/kg群に観察された奇形は以下の通りである。８例の下顎裂、舌裂、舌癒着の合併奇形のうち６例に外脳あるいは上唇裂が合併していた。13例の下唇裂および舌癒着の合併奇形のうち８例に外脳あるいは上唇裂が合併していた。15例の舌癒着のうち11例に外脳、上唇裂、顔裂あるいは痕跡尾が合併していた。９例の無顎および外脳の合併奇形のうち４例に顔裂、上唇裂、小頭あるいは臍帯ヘルニアが合併していた。17例の外脳のうち12例に上唇裂、顔裂、下顎先端鋭角、臍帯ヘルニア、痕跡尾、内反足などが合併していた。その他、単独の奇形として、上唇裂が２例と尾の形態異常が１例認められた。

ＣＣｌ$_4$群には外表奇形は認められなかった。

骨格観察（Table 19）について、ＤＢＴ群は4.5 mg/kg群の10例の妊娠動物中１例から仙・尾椎欠損が１例、10 mg/kg群の９例の妊娠動物中１例から頭蓋骨形成不全が１例、22 mg/kg群の10例の妊娠動物中６例から下顎骨固定不全が７例と下顎骨固定不全と顎間骨裂の合併奇形が１例見られた。

ＣＣｌ$_4$＋ＤＢＴ群は4.5 mg/kg群に骨格奇形は見られなかったが、10 mg/kg群の10例の妊娠動物中３例から下顎骨固定不全が３例と仙椎欠損が１例見られ、22 mg/kg群の９例の妊娠動物中８例から下顎骨固定不全、頭蓋骨形成不全、顎間骨および鼻骨の裂、肋骨癒合、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合などの単独あるいは合併奇形が合計64例認められた。

ＣＣｌ$_4$群に骨格奇形は認められなかった。

２．実験　２：胚と妊娠動物の肝臓および血液中のＤＢＴおよびＭＢＴの定量

妊娠９日の血清中のtransaminase活性について、ＣＣｌ$_4$群およびＣＣｌ$_4$＋ＤＢＴ群は対照群と比べて有意に増加したが、ＣＣｌ$_4$群とＣＣｌ$_4$＋ＤＢＴ群の間に有意差は認められなかった。また、ＤＢＴ群は対照群と同程度であった（Fig. 12）。ＢＵＮはいずれの群も対照群とほぼ同程度であった。

妊娠動物の肝薬物代謝酵素活性（aminopyrine demethylase、aniline hydroxylase活性）について、ＣＣｌ$_4$群およびＣＣｌ$_4$＋ＤＢＴ群は対照群と比べて有意に減少したが、ＣＣｌ$_4$群とＣＣｌ$_4$＋ＤＢＴ群の間に有意差は認められなかった。また、ＤＢＴ群は対照群と同程度であった（Fig. 12）。

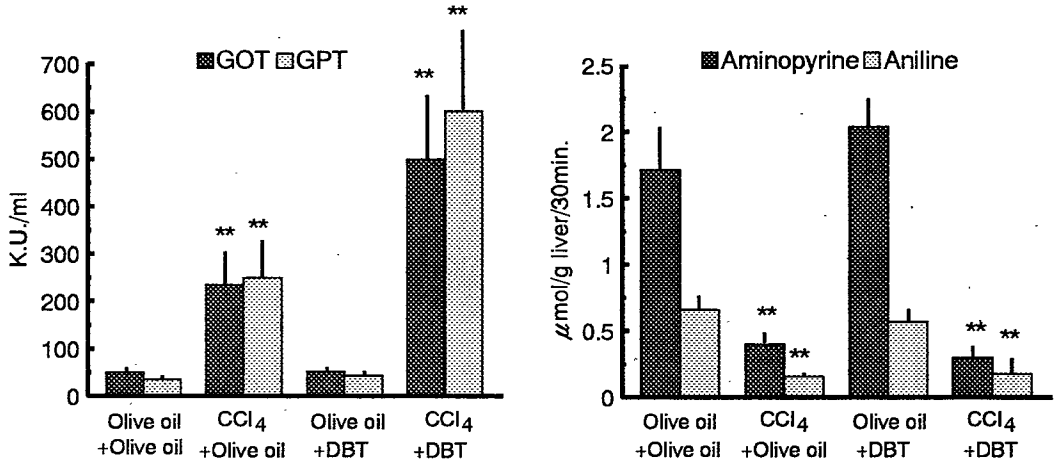

Fig. 12. Activities of serum transaminases and hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes in pregnant rats 24 hr after oral treatment with DBT or olive oil on day 8 of gestation. Pregnant rats were pretreated subcutaneously with carbon tetrachloride or olive oil on days 6 and 7 of gestation.
**Significantly different from control (olive oil/olive oil), $p<0.01$.

妊娠動物の肝臓の9000g上清のProtein量はＣＣｌ$_4$群とＤＢＴ群は減少傾向を示したが有意差はなかった。しかし、ＣＣｌ$_4$＋ＤＢＴ群は対照群と比べて有意に減少した。

胚のＤＢＴ濃度はＣＣｌ$_4$＋ＤＢＴ群がＤＢＴ群の約２倍であった。ＭＢＴの濃度はいずれの群でも同程度であった。妊娠動物の肝臓および血液中のＤＢＴおよびＭＢＴの濃度はそれぞれの濃度に高低はあるが胚と同じ傾向であった（Fig. 13）。

考　　察

ＤＢＴの投与によってラットの胎児に外表および骨格奇形が発現するが、ＤＢＴの２種の代謝物（ＭＢＴおよび3-OHＤＢＴＬ）はその原因物質ではなかった（１章１節および３章）。そこで、ＤＢＴ自体の催奇形作用の有無を確認するために、妊娠動物の肝薬物代謝酵素活性を低下させることによって妊娠動物の体内のＤＢＴの代謝物の量を低下させた。ラットの肝薬物代謝酵素活性を低下させるために今回はＣＣｌ$_4$を用いた。SKF-525A等の薬物代謝酵素阻害剤を使用するのが一般的であるが、今回は妊娠動物を得るために１夜（約18時間）の同居をさせたが、その間に交尾は随時行われていると考えられることから、阻害効果が18時間以上続く必要があった。そのため競合型（SKF-525A等）や非

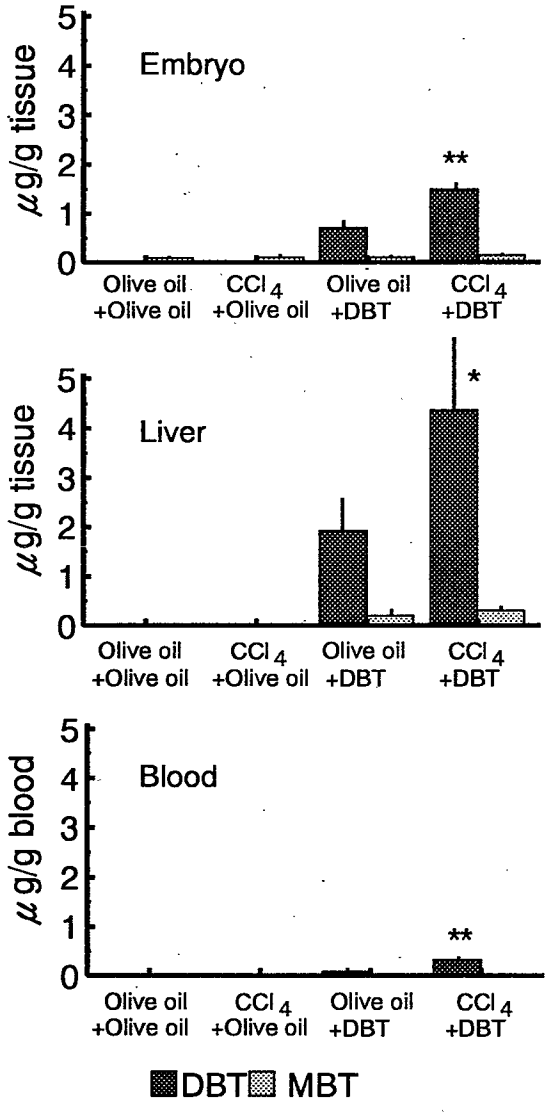

Fig. 13. Concentrations of DBT and MBT in embryo, maternal liver and maternal blood 24 hr after oral treatment with DBT (22 mg/kg) or olive oil (2 ml/kg) on day 8 of gestation. Pregnant rats were pretreated subcutaneously with carbon tetrachloride (0.5 ml/kg) or olive oil (2 ml/kg) on days 6 and 7 of gestation.
*Significantly different from corresponding control (olive oil+DBT), $p<0.05$.
**Significantly different from corresponding control (olive oil+DBT), $p<0.01$.

競合型（piperonyl butoxide等）の阻害剤では明確な結果が得られず、やむおえずＣＣｌ$_4$を用いることとなった。

ＣＣｌ$_4$群について、死亡・吸収胎児頻度や生存胎児体重は対照群と同程度であり、外表および骨格に奇形が認められなかったことから本実験条件下におけるＣＣｌ$_4$処置は胎児にほとんど影響をおよぼさないと考えられた。

Rosenberg ら（1980）はdi-*n*-butyltin dichloride（15 mg/kg）をラットの腹腔内に投与したとき、72時間後に肝臓のcytochromeP-450含量が約半分に減少すると報告しているが、さらにRosenberg と kappas（1989）はdi-*n*-butyltin dichloride（100 μmol/kg）をラットに経口投与して24時間後に小腸、肝臓および腎臓のcytochromeP-450含量を測定したところ、対照群と比較して小腸で70％、肝臓で52％そして腎臓で83％に減少すると報告した。本実験ではＤＢＴ（22 mg/kg）の経口投与 24時間後の肝薬物代謝酵素活性は減少しなかった。di-*n*-butyltin dichlorideの100 μmol/kgはＤＢＴ（di-*n*-butyltin diacetate）に換算すると35 mg/kgに相

当する。今回、ＤＢＴの経口投与によって肝薬物代謝酵素活性の低下が認められなかったが、投与量の差に起因するものと考えられる。

ＤＢＴによるラット胎児の外表奇形の特徴は低投与量では下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着が主な外表奇形であるが、投与量が高くなると前記の奇形に加えて外脳、上唇裂、顔裂などが発現することである。今回のＤＢＴ群（CCl_4非前処置群）は 22 mg/kg群にのみ下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着が12例認められ、その内の１例に上唇裂が合併した。一方、CCl_4＋ＤＢＴ群は、10 mg/kgに下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着奇形が７例認められ、22 mg/kg群では下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着奇形が52例認められ、さらにこれらの奇形に合併するかたちで外脳が48例、上唇裂が18例、顔裂４例などの奇形が認められた。ＤＢＴ群の10 mg/kg群に奇形が見られず、３章においてもＤＢＴ 10.5 mg/kgを妊娠８日に単回投与したとき胎児に奇形は認められなかったことから、ＤＢＴの単回投与による催奇形作用の最大無作用量は10 mg/kg程度と推察されるが、この投与量にCCl_4を前処置すると下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着が見られ、CCl_4を前処置することによってＤＢＴの催奇形作用が増強した。22 mg/kg群でもCCl_4を前処置することによって奇形の発現頻度および種類が著明に増加した。

実験２ではＤＢＴ 22 mg/kgを投与し、24時間後に胚と妊娠動物の肝臓および血液中のＤＢＴおよびＭＢＴを測定した。これらの組織中のＤＢＴの濃度はいずれもCCl_4前処置群が非前処置群の約２倍であったが、ＭＢＴはいずれの組織でも濃度が低く、CCl_4前処置群と非前処置群の間に差は見られなかった。di-*n*-butyltinを腹腔内投与したとき、mono-*n*-butyltinの尿中排泄のピークは投与４日後で、肝臓や腎臓のmono-*n*-butyltin濃度は比較的低く、特にピークは認められていないこと、また、ＤＢＴの投与後はやい時期には代謝物は主としてbutyl(3-hydroxybutyl)tinである（Ishizaka et al., 1989）ことからＤＢＴ投与24時間後ではＭＢＴの体内濃度が全体的に低いためＭＢＴの濃度に差がなかったと考えられる。

今回用いたCCl_4の投与量は0.5 ml/kgであったが、この処置によって妊娠動物の肝臓の9000g上清の薬物代謝酵素活性（aminopyrine demethylase活性とaniline hydroxylase活性）がCCl_4前処置で顕著に低下した。CCl_4前処置にともなう薬物代謝酵素活性の低下はbutyl(3-hydroxybutyl)tinやbutyl(4-hydroxybutyl)tin等のＤＢＴの代謝物の生体内濃度の低下をもたらすと推察され、CCl_4前処置により胚中のＤＢＴ濃度は２倍に増加し、ＤＢＴによる奇形発現率が著明に増加したことから奇形発現にはこれらの代謝物ではなく投与したＤＢＴが関与している可能性が高いと推察された。

小　　括

ＤＢＴ自体の催奇形作用の有無を検討するために、妊娠動物の肝臓の薬物代謝酵素活性を阻害して、ＤＢＴの代謝物の体内濃度を低下させた。その結果、薬物代謝酵素活性を阻害しない群と比較すると、妊娠９日の胚中のＤＢＴ濃度は肝臓の薬物代謝酵素活性を阻害することによって約２倍に増加し、外表奇形発現率は８倍そして骨格奇形発現率は12倍に増加した。

以上の結果から、ＤＢＴの催奇形作用の原因物質はＤＢＴの代謝物ではなく、投与したＤＢＴ自体である可能性が高い。

第5章　総　　括

船底防汚塗料、養殖用漁網や定置網の防汚剤、塗料の防黴剤あるいは塩化ビニル樹脂の安定剤等として解放環境下で使用されてきた一連の有機スズ化合物は、ある意味ではかつて経験した水銀やＰＣＢの環境汚染事例以上に環境中に放出され、海水、河川水あるいは湖水の汚染をもたらした。その結果は有機スズの生物濃縮による魚介類への蓄積と食品の安全性に問題を投げかけているだけでなく、魚介類の成長を阻害し、一部には貝の殻の肥厚、雌貝のimposexの奇形が起こり養殖漁業に打撃を与えた。

奇形は化学物質の暴露を受けた当人ではなく次世代にその影響がおよぶという観点から、化学物質の毒性の中でも最も重大な毒性の一つである。そこでこれらの有機スズ化合物の哺乳類に対する催奇形作用を検討した。今回検討した有機スズはtri-*n*-butyltin acetate（ＴＢＴ）、di-*n*-butyltin diacetate（ＤＢＴ）、mono-*n*-butyltin trichloride（ＭＢＴ）およびtriphenyltin acetate（ＴＰＴ）であるが、ラットの胎児に明確に奇形を認めた有機スズ化合物はＤＢＴであった。有機スズの胎児にたいする致死作用はＴＰＴが最も強く、ＴＢＴとＤＢＴは同程度であったがＭＢＴは胎児にほとんど影響を及ぼさなかった。胎児の死亡率はＴＰＴは22.0 μmol/kg群（9 mg/kg）、ＴＢＴは45.8 μmol/kg群（16 mg/kg）、ＤＢＴは42.7 μmol/kg群（15 mg/kg）で有意に増加したが、ＭＢＴは1420 μmol/kg群（400 mg/kg）でも胎児の死亡率は増加しなかった。

ＤＢＴを妊娠動物の器官形成期（妊娠７－17日）に経口投与すると、胎児の外表に下顎裂、下唇裂、舌裂、舌癒着の単独あるいは合併奇形（下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着）等が発現し、骨格に下顎骨固定不全、肋骨癒合、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合等の奇形が発現した。ここに見られた奇形はＴＢＴ、ＭＢＴあるいはＴＰＴには認められず、ＤＢＴに特有の奇形であった。最小中毒量は外表奇形は５ mg/kgそして骨格奇形は10 mg/kgであった。しかし、内臓奇形は全く認められなかった（１章１節）。

ＤＢＴを妊娠動物に経口投与することによってその胎児に奇形が発現したが、その際、投与されたＤＢＴが胎盤を通過して胎児へ移行することを確認するために、動物組織中の３種の*n*-butyltin化合物（ＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴ）の同時微量分析法を確立した。その方法を用いてＤＢＴをラットの器官形成期に経口投与したときの胎児および胎盤中のＤＢＴおよびＭＢＴの濃度を測定するとともに、妊娠動物の肝臓、腎臓、脾臓および胸腺中のＤＢＴおよびＭＢＴ濃度を測定した。なお、ＤＢＴおよびＭＢＴの定量はＤＢＴの最終投与の24時間後におこなった。その結果、胎児および胎盤中にＤＢＴとその代謝物であるＭＢＴが検出され、これらの有機スズの胎児への移行が確認された。また、妊

娠動物の肝臓、腎臓、脾臓および胸腺中からもＤＢＴとＭＢＴが検出され、ＤＢＴの投与量の増加に伴なってＤＢＴおよびＭＢＴの検出量も増加した。妊娠動物の臓器中のＤＢＴとＭＢＴには良い相関が見られた（肝臓；r=0.945、腎臓；r=0.873、脾臓；r=0.904、胸腺；r=0.820）が、胎児中の両者はほとんど相関しなかった（r=0.179）。ＤＢＴとＭＢＴの極性の違いによって胎児への移行率および胎児からの排泄率に差があるものと推察された（１章２節）。

奇形は胎児発生のある特定の時期に化学物質が作用することによっておこると考えられている。事実、ラットにおける各種の奇形の成立感受日は２～３日間程度のことが多い。そこでＤＢＴの催奇形作用の感受日の検索を行った。その結果、ＤＢＴに特徴的な外表奇形である下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着の感受日は妊娠８日であった。骨格奇形のうち下顎骨固定不全の感受日は妊娠８日であったが、肋骨癒合、頸椎弓癒合、胸椎弓癒合等の感受日は主として妊娠８日であったが、妊娠７日にも低頻度ではあるがこれらの奇形が認められた。

ＤＢＴを妊娠８日に単回投与したときの最小中毒量は外表奇形は15.2 mg/kg、骨格奇形は22 mg/kgであった。器官形成期投与と比べて外表奇形は３倍、骨格奇形は2.2倍であった。非妊娠ラットにおけるＤＢＴの半減期は３～５と推定されていることから、器官形成期投与との差はＤＢＴの体内蓄積によると考えられた。

ＴＢＴ、ＤＢＴおよびＭＢＴの妊娠８日単回投与における胚移行を検討した。なお、各*n*-butyltin化合物の定量はこれらの有機スズの投与24時間後に行った。その結果、ＴＢＴ投与群は胚にＴＢＴとその代謝物であるＤＢＴおよびＭＢＴが、ＤＢＴ投与群は胚にＤＢＴとその代謝物のＭＢＴが検出された。ＴＢＴとＤＢＴの催奇形作用には大きな違いがあったが、その差はこれらの有機スズ化合物の胚への移行量に起因するものではなく、それらの分子自体の持つ催奇形能に違いがあるものと考えられた。

ＭＢＴ投与群は胚にＭＢＴが検出されたが非常に低濃度であり、さらに妊娠動物の肝臓中の濃度もＴＢＴやＤＢＴと比較して低いことから、ＭＢＴは腸管吸収率と胚への移行率が低いと考えられた（２章）。

ＤＢＴによる催奇形作用の原因物質検索の一環としてdi-*n*-butyltin化合物の主代謝物であるのbutyl(3-hydroxybutyl)tin化合物の催奇形作用を検討した。

butyl(3-hydroxybutyl)tin dilaurate（3-OHＤＢＴＬ）を妊娠８日に経口投与した時、80 μmol/kg群（ＤＢＴ 28 mg/kgに相当）に奇形は１例も認められなかったが、160 μmol/kg群に下顎先端鋭角および小顎を主とした外表奇形が認められた。一方、di-*n*-butyltin dilaurate（ＤＢＴＬ）による奇形はＤＢＴと同種の下顎裂／下唇裂／舌裂／舌癒着が主であった。3-OHＤＢＴＬは催奇形作用を有するが、ＤＢＴやＤＢＴＬと比較するとその作用は弱く、また発現した奇形はＤＢＴあるいはＤＢＴＬに見られた奇形とは明らかに異なる種類ものであり、3-OHＤＢＴＬはＤＢＴあるいはＤＢＴＬの催奇形作用の原因物質と

は考えられなかった（３章）。

di-*n*-butyltinからmono-*n*-butyltinにいたる中間代謝物がＤＢＴの催奇形作用に関与するか否かを推定するため、妊娠動物の肝臓の薬物代謝酵素系を四塩化炭素（CCl_4）を前処置することによって阻害して妊娠動物体内のＤＢＴの代謝物の濃度を低下させた時のＤＢＴの催奇形作用を検討した。その結果、妊娠動物の肝臓の薬物代謝酵素活性を阻害すると胚中のＤＢＴ濃度は約２倍に増加し、外表奇形発現率は８倍そして骨格奇形発現率は12倍と著明に増加した。

以上の結果から、ＤＢＴの催奇形作用の原因物質はＤＢＴの代謝物ではなく、投与したＤＢＴ自体が関与しているものと考えられた（４章）。

結　　論

Di-*n*-butyltin diacetate（ＤＢＴ）のラットによる催奇形作用を検討した結果、以下の結論を得た。

1．ＤＢＴを妊娠動物の器官形成期に経口投与すると胎児に下顎裂、下唇裂、舌癒着、舌裂等の外表奇形と下顎骨固定不全、肋骨癒合、胸椎弓癒合等の骨格奇形が発現したが、内臓奇形は認められなかった。

2．上記の外表および骨格奇形はＴＢＴ、ＭＢＴおよびＴＰＴでは認められず、ＤＢＴに特有の奇形であった。

3．ＤＢＴを妊娠動物の器官形成期に経口投与したとき、ＤＢＴとその代謝物であるＭＢＴの胎児への移行が確認された。

4．ＤＢＴによる外表および骨格奇形の主な感受日は妊娠８日であった。

5．ＤＢＴの主代謝物の一つであるbutyl(3-hydroxybutyl)tinはＤＢＴと比較して弱い催奇形作用を有しているが、その形はＤＢＴによる奇形とは明らかに異なった形の奇形（下顎先端鋭角、小顎、下顎骨癒合）であり、ＤＢＴによる催奇形作用の原因物質とは考えられなかった。

6．四塩化炭素を妊娠６および７日に前処置することによって妊娠８日に経口投与したＤＢＴの胚と妊娠動物の肝臓中のＤＢＴ濃度が四塩化炭素非前処置群と比較して約２倍に増加した。その時の奇形発現率が著明に増加したことからＤＢＴによる催奇形作用の原因物質は代謝物ではなく投与したＤＢＴと推察された。

謝　　辞

本論文作成にあたり御指導ならびに御鞭撻を賜りました大阪大学薬学部馬場明道教授に対し深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究遂行の機会を与えて下さり、御指導と御鞭撻を賜りました大阪市立環境科学研究所長長濱萬藏博士、衛生分析課長森田　茂博士、生活衛生課長山田明男博士ならびに衛生分析課研究主任藤田忠雄博士、また、研究途上適切な御助言と御協力を頂きました大阪市立環境科学研究所副主幹斉藤　穣博士、衛生分析課仲村智子氏、清水　充博士、山野哲夫氏、生活衛生課張野宏也氏ならびに衛生分析課の皆様に感謝いたします。

参 考 文 献

阿部嘉長、安定剤、 真版プラスチック配合剤（阿部嘉長、須藤真編）、p.90-95 大成社 1987 東京

Alzieu, C., Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. Marine Environ. Res., **32**, 7-17 (1991)

荒井真一、諸外国におけるトリブチルスズ化合物に関する環境汚染対策. 公害と対策, **24**, 1081-1085 (1988)

Boyer, I.V. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. Toxicology, **55**, 253-298 (1989)

Cleary, J.J. Organotin in the marine surface microlayer and sub-surface waters of south-west England: relation to toxicity thresholds and UK environmental quality standard. Marine Environ. Res., **32**, 213-222 (1991)

Crofton, K.M., Dean, K.F., Boncek, V.M., Rosen, M.B., Sheets, L.P., Chernoff, N. and Reiter, L.W. Prenatal or postnatal exposure to bis(tri-*n*-butyltin)oxide in the rat: Postnatal evaluation of teratology and behavior. Toxicol. Appl. Pharmacol., **97**, 113-123 (1989)

Dunnett, C.W. New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, **20**, 482-491 (1964)

Dawson, A.B. A note on the staining of the skelton of cleared specimen with alizarin red S. Stain Technol., **1**, 123-125 (1926)

Davis, A. Barale, R., Brun, G., Forster, R., Günther, T., Hautefeuille, H., van der Heijden, C. A., Knaap, A. G. A. C., K rowke, R., Kuroki, T., Loprieno, N., Malaveille, C., Merker, H. J., Monaco, M., Mosesso, P., Neubert, D., Norppa, H., Sorsa, M., Vokgel, E., Voogd, C. E., Umeda, M. and Bartsch, H. Evaluation of the genetic and embryotoxic effects of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO), abroad-spectrum pesticide, in multiple in vivo and in vitro short-term tests. Mutation Res., **188**, 65-95 (1987)

Fent K., Organotin speciation in municipal wastewater and sewage sludge: ecotoxicological consequences. Marine Environ. Res., **28**, 477-483 (1989)

Giavini, E., Prati, M. and Vismara, C. Effects of triphenyltin acetate on pregnancy in the rats. Bull. Environ. Cont. Toxicol., **24**, 936-939 (1980)

Gibbs, P.E. and Bryan G.W. Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapllus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. J. Mar. Biol. Ass. U.K., **66**, 767-777 (1986)

Gibbs, P.E., Pascoe, P.L. and Burt, G.R. Sex change in the female dog-Whelk, *Nucella lapllus*, induced by tributyltin from antifouling paints. J. Mar. Biol. Ass. U.K., **68**, 715-731 (1988)

Gibbs, P.E., Pascoe, P.L. and Bryan G.W. Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods: Pathological effects on the female reproductive system. Comp. Biochem. Physiol., **100C**, 231-235 (1991)

後藤　稠、池田正之、原　一郎、産業中毒便覧、p. 298-300、医歯薬出版 1977 東京

Han, J.S. and Weber, J.H. Speciation of methyl- and butyltin compounds and inorganic tin in oysters by hydride generation atomic absorption spectrometry. Anal. Chem., **60**, 316-319 (1988)

Harino, H., Fukushima, M. and Tanaka, M. Simultaneous determination of butyltin and phenyltin compounds in the aquatic environment by gas chromatography. Anal. Chem. Acta, **264**, 91-96 (1992)

堀口敏宏、清水　誠，貝類及び他の水生生物、有機スズ汚染と水生生物影響（里見至弘、清水　誠　編）、p.99-135 恒星社厚生閣 1992 東京

飯島正雄、星野庸二、能勢憲英、トリブチルスズ化合物の淡水魚の汚染に関する研究、衛生化学，**37**，296-299 (1991)

Ishizaka, T. Suzuki, T. and Saito, Y. Metabolism of dibutyltin dichloride in male rats. J. Agric. Food Chem., **37**, 1096-1101 (1989)

Itami, T., Ema, M., Amano, H., Murai, T. and Kawasaki, H. Teratogenic evaluation of tributyltin chloride in rats following oral exposure. Drug Chem. Toxicol., **13**, 283-295 (1990)

Iwai, H., Wada, O. and Arakawa, Y. Determination of tri-, di-, and monobutyltin and inorganic tin in biological materials and some aspects of their matabolism in rats. J. Anal. Toxicol., **5**, 300-306 (1981)

亀山義郎、谷村　孝、安田峯生、実験動物における自然発生奇形．先天異常、

20, 25-106 (1980)
亀山義郎、生殖・発生毒性の医学・生物学的基礎、毒性試験講座 11 発生毒性（谷村 孝編）、p.73-117 地人書館 1992 東京
Kato, T., Kitagawa, S. Effects of a new antibacterial sulfonamide (CS-61) on mouse and rat fetuses. Toxicol. Appl. Pharmacol., **27**, 20-27 (1974)
川合真一郎、張野宏也，微生物分解、有機スズ汚染と水生生物影響（里見至弘、清水 誠 編）、 p.68-85 恒星社厚生閣 1992 東京
Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. Skeletal deviations in rats: Malformations or variations ?, Teratology, **8**, 309-316 (1973)
Kimmel, E.C., Fish, R.H. and Casida, J.E. Bioorganotin chemistry. Metabolism of organotin compounds in microsomal monooxygenase system and in mammals. J. Agric. Food Chem., **25**, 1-9 (1977)
Maguire, R. J. Aquatic environmental aspects of non-pesticidal organotin compounds. Water Poll. Res. J. Canada, **26**, 243-360 (1991)
宮澤壽一郎、錫中毒学、 金属中毒学（土屋健三郎編）、p.447-468 医歯薬出版 1989 東京
Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Hasegawa, Y., Miyamoto, M. and Watanabe, T. Spontaneous malformations in labolatory animals: frequency of external, internal and skeletal malformations in rats and mice. Cong. Anomalies, **27**, 147-206 (1987)
Moore, K. L. 星野一正 訳、受精卵からヒトになるまで、基礎的発生学と先天異常、 p.121-142 医歯薬出版 1988 東京
野田 勉、森田 茂、清水 充、山野哲夫、山田明男、家庭用品に使用される化学物質の安全性試験（Ⅷ） dibutyltin diacetateのラットによる催奇形性に関する研究、大阪市環境科学研報告、**50**, 66-75 (1988)
Noland, E.A., McCauley, P.T. and Bull, R.J. Dimethyltin dichloride: Investigations into its gatrointestinal absorption and trans-placental transfer. J. Toxicol. Environ. Health, **12**, 89-98 (1983)
Ohhira, S. and Matsui, H. Comparison of sulphur-mode and tin-mode flame photometric detectors for the gas chromotographic determination of organotin compounds. J. Chromatogr. **566**, 207-214 (1991)
Piver, W.T. Organotin compounds: Industrial applications and biological investigation. Environ. Health Perspect., **4**, 61-79

(1973)

Quevauviller, Ph., Bruchet, A. and Donald, O.F.X. Leaching of organotin compounds from poly(vinyl chloride)(PVC) material. Appl. Organomet. Chem., **5**, 125-129 (1991)

Raffray, M. and Cohen, G.M. Bis(tri-n-butyltin) oxide induces programmed cell death (apoptosis) in immature rat thymocytes. Arch. Toxicol., **65**, 135-139 (1991)

Roberts, Jr., M.H. Acute toxicity of tributyltin Chloride to embryos and larvae of two bivalve mollisks, ***Crassostrea virginica*** and ***Mercenaria mercenaria***. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **39**, 1012-1019 (1987)

Rosenberg, D.W., Drummond, G.S., Cornish, H.C. and Kappas, A. Prolonged induction of hepatic heam oxygenase and decreases in cytochrome P-450 content by organotin compounds. Biochem. J., **190**, 465-468 (1980)

Rosenberg, D.W. and Kappas, A. Actions of orally administered organotin compounds on heme metabolism and cytochrome P-450 content and function in intestinal epithelium. Biochem. Pharmacol., **38**, 1155-1161 (1989)

佐久間昭、薬効評価－計画と解析Ⅱ，P.23-27 東京大学出版会　1981　東京

Schebek, L., Andreae, M.O. and Tobschall, H.J., Methyl- and butyltin compounds in water and sediments of the Rhine River. Environ. Sci. Technol., **25**, 871-878 (1991)

Scheffé, H. A method for judging all contrasts in the analysis of variance. Biometrika, **40**, 87-104 (1953)

Seinen, W., Vos, J.G., van Spanje, I., Snoek, M., Brands, R. and Hooykaas, H. Toxicity of orgnotin compounds. II. Comparative in Vivo and in Vitro studies with various organotin and organolead compounds in different animal species with special emphasis on lymphocyte cytotoxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol., **42**, 197-212 (1977)

Seligman, P.F., Valkirs, A.O., Stang, P.M. and Lee, R.F. Evidence for rapid degradation of tributyltin in a marina. Marine Poll. Bull., **19**, 531-534 (1988)

塩田浩平、哺乳類の個体発生概説、　毒性試験講座 11　発生毒性（谷村　孝編）、p.15-29　地人書館 1992　東京

Snoeij, N.J., van Iersel, A.A.J., Penninks, A.H. and Seinen, W. Toxicity of triorganotin compounds: Comparative in vivo

studies with a series of trialkyltin compounds and triphenyltin chloride in male rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., **81**, 274-286 (1985)

Snoeij, N.J., Penninks, A.H. and Seinen, W. Biological activity of orgnotin compounds-An overview. Environ. Res., **44**, 335-353 (1987)

高野喜一、菊池康基、飯島貞二、土川清、高木博司監修、薬物の特殊毒性 (1) 胎仔毒性と遺伝毒性、P.34-35, 南江堂 1975 東京

高橋一暢、船底防汚塗料と環境－有機スズ化合物からの考察－、塗料工学、**27**, 107-116 (1992)

Thain, J.E. Toxicity of TBT to bivales: Effects on reproduction, growth and survival. Oceans, **4**, 1306-1316 (1986)

Uhler, A.D., Durell, G.S. and Spellacy, A.M. Extraction procedure for the measurement of butyltin compounds in biological tissues using toluene, HBr, and tropolone. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **47**, 217-221 (1991)

安田峯生、前田広由、催奇形性試験での指標としての腰肋の意義、 先天異常、**13**, 25-29 (1973)

和田 攻、真鍋重夫、北川泰久、石川晋介、長橋 捷、微量元素の欠乏病、微量元素と生体（木村修一、左右田健次 編）、 p.74-93 秀潤社 1987 東京

和田 攻、真鍋重夫、岩井秀明、荒川泰昭、有機スズ化合物の分析法、毒性、代謝および健康影響に関する最近の知見. 産業医学、**24**, 24-54 (1982)

Waite, M.E., Waldock, M.J., Thain, J.E., Smith, D.J. and Milton, S.M. Reductions in TBT concentrations in UK estuaries following legislation in 1986 and 1987. Marine Environ. Res., 32, 89-111 (1991)

Watanabe, N., Sasaki, S. and Takatsuki, H. Examination for degradation paths of butyltin compounds in natural waters. Wat. Sci. Tech., 25, 117-124 (1992)

Weis, J.S. and Kim, K. Tributyltin is a teratogen in producing deformities in limbs of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **17**, 583-587 (1988)

Wilson, J.G., in: Wilson J. G. and Warkany, J. (eds), Teratology - principles and techniques. University of Chicago Press, Chicago, p.251-277, (1965)

Winek, C.L., Marks, Jr. M.J., Shanor, S.P. and Davis, E.R. Acute and

subacute toxicology and safety evaluation of triphenyltin hydroxide (Vancide KS). Clin. Toxicol., **13**, 281-296 (1978)

World Health Organization, Tin and organotin compounds, A preliminary review, Environ. Health Criteria **15** WHO (1980)

World Health Organization, Tributyltin compounds, Environ. Health Criteria **116** WHO (1990)

Wu, W., Roberts, R.S., Yan-Chun, C., Ernst, W.R. and Havlicek, S.C. The extraction of organotin compounds from polyvinyl chloride pipe. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **18**, 839-843 (1989)