

A : 調査前
 B : IF錠摂取後
 C : Placebo錠摂取後

図3 グループ別血液検査結果の表面マーカーとNK活性の比較

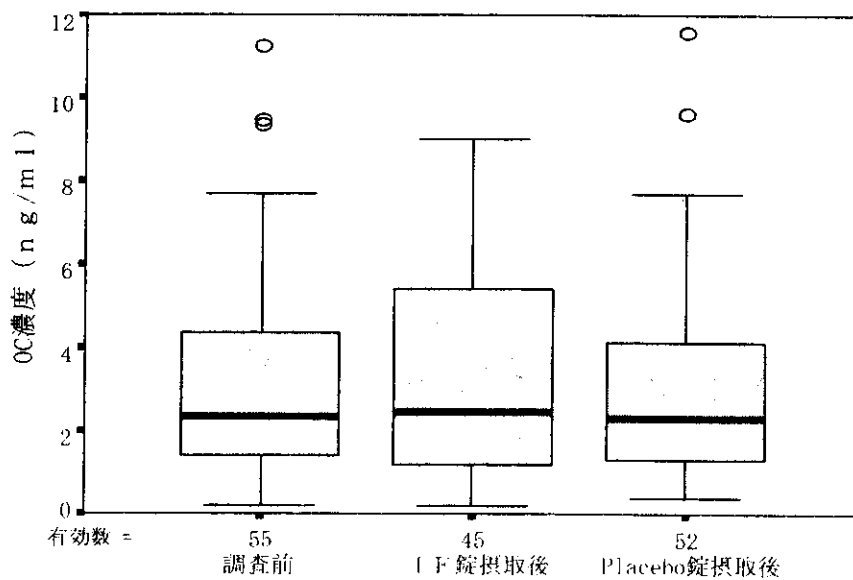
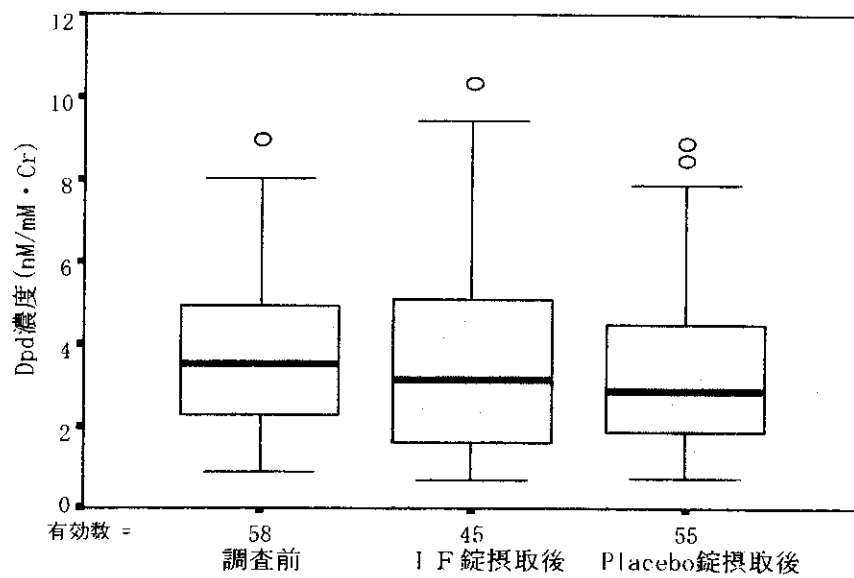
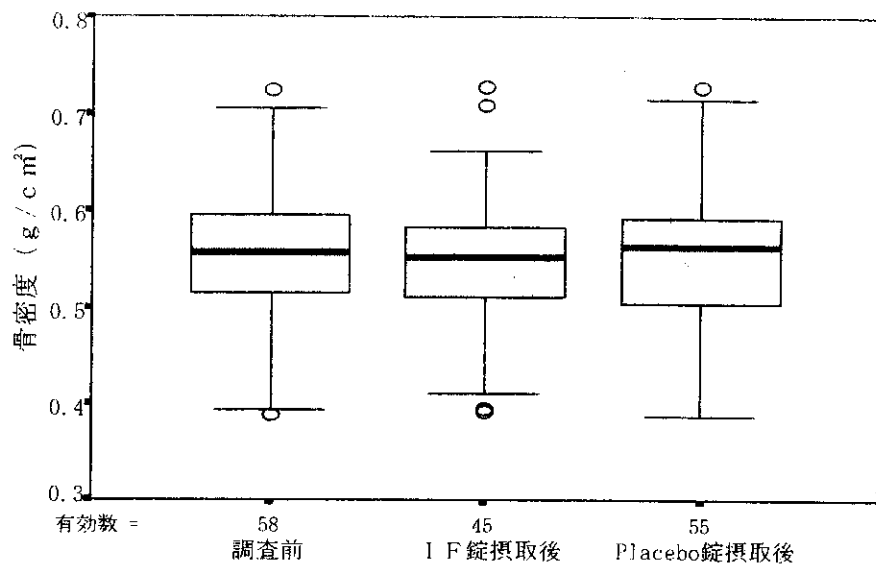


図4 骨密度・Dpd・OCのグループ別比較

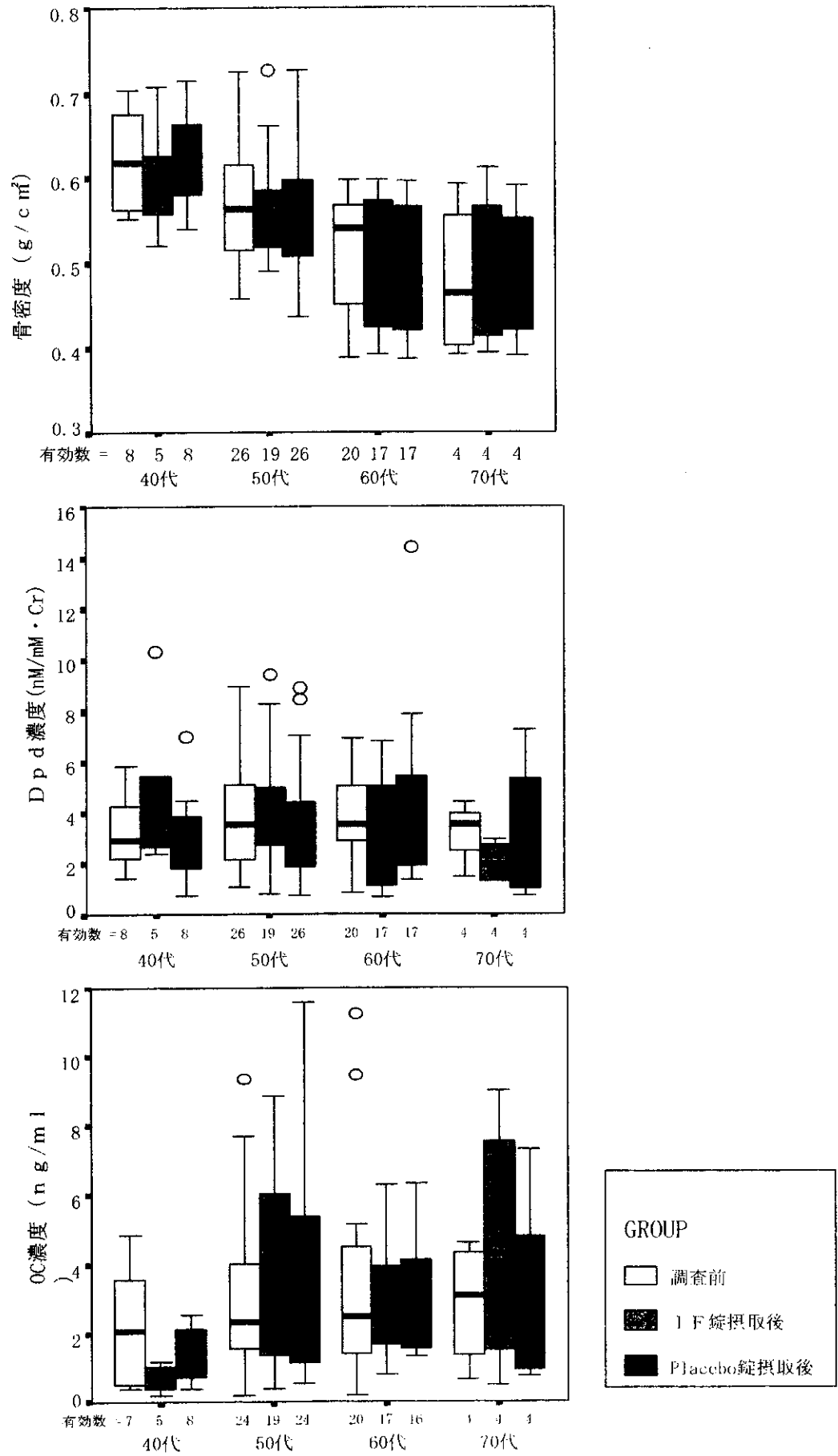


図5 年代別骨密度・Dpd濃度・OC濃度の比較

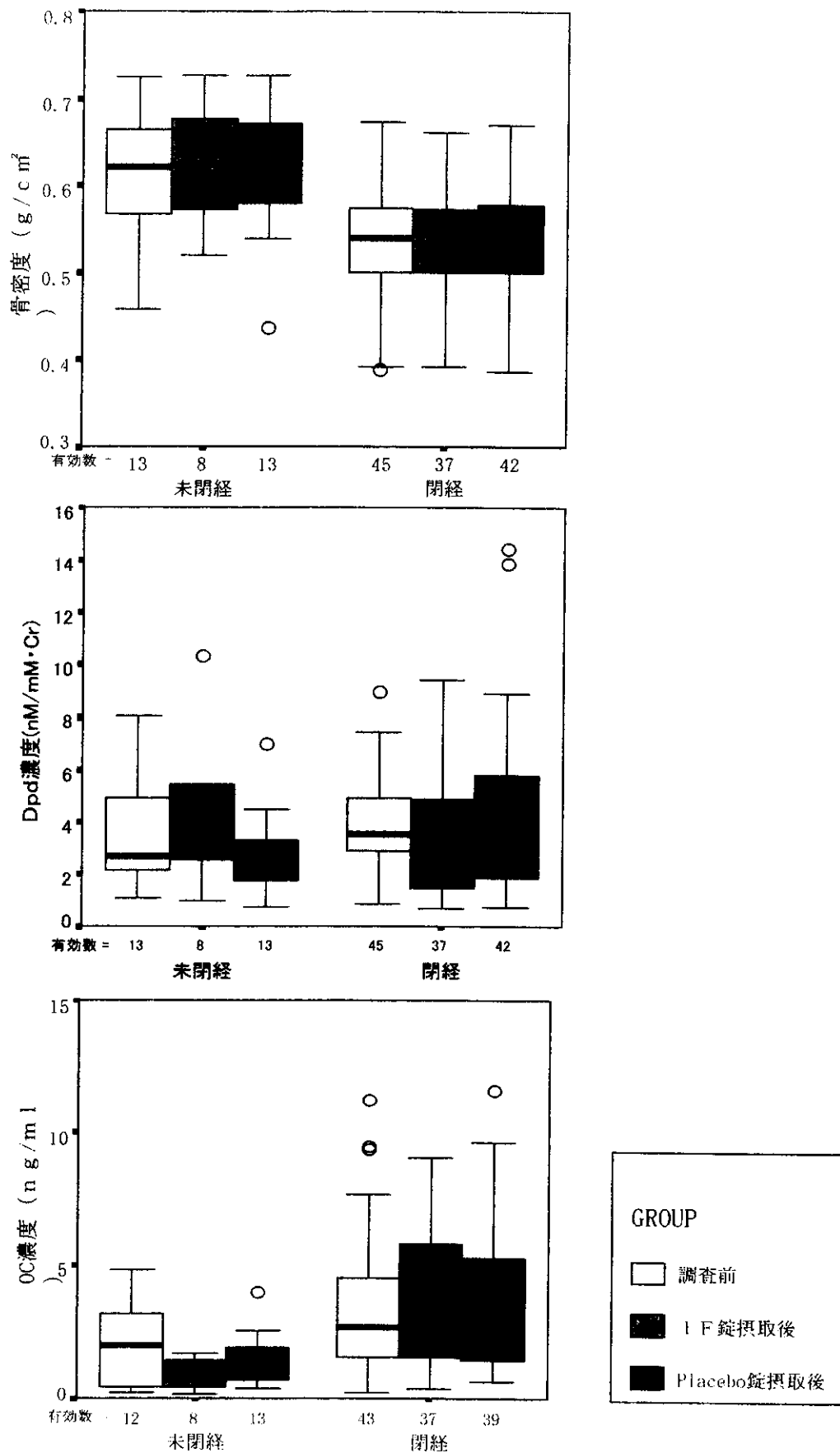


図6 閉経の有無と骨密度・Dpd・OC濃度の比較

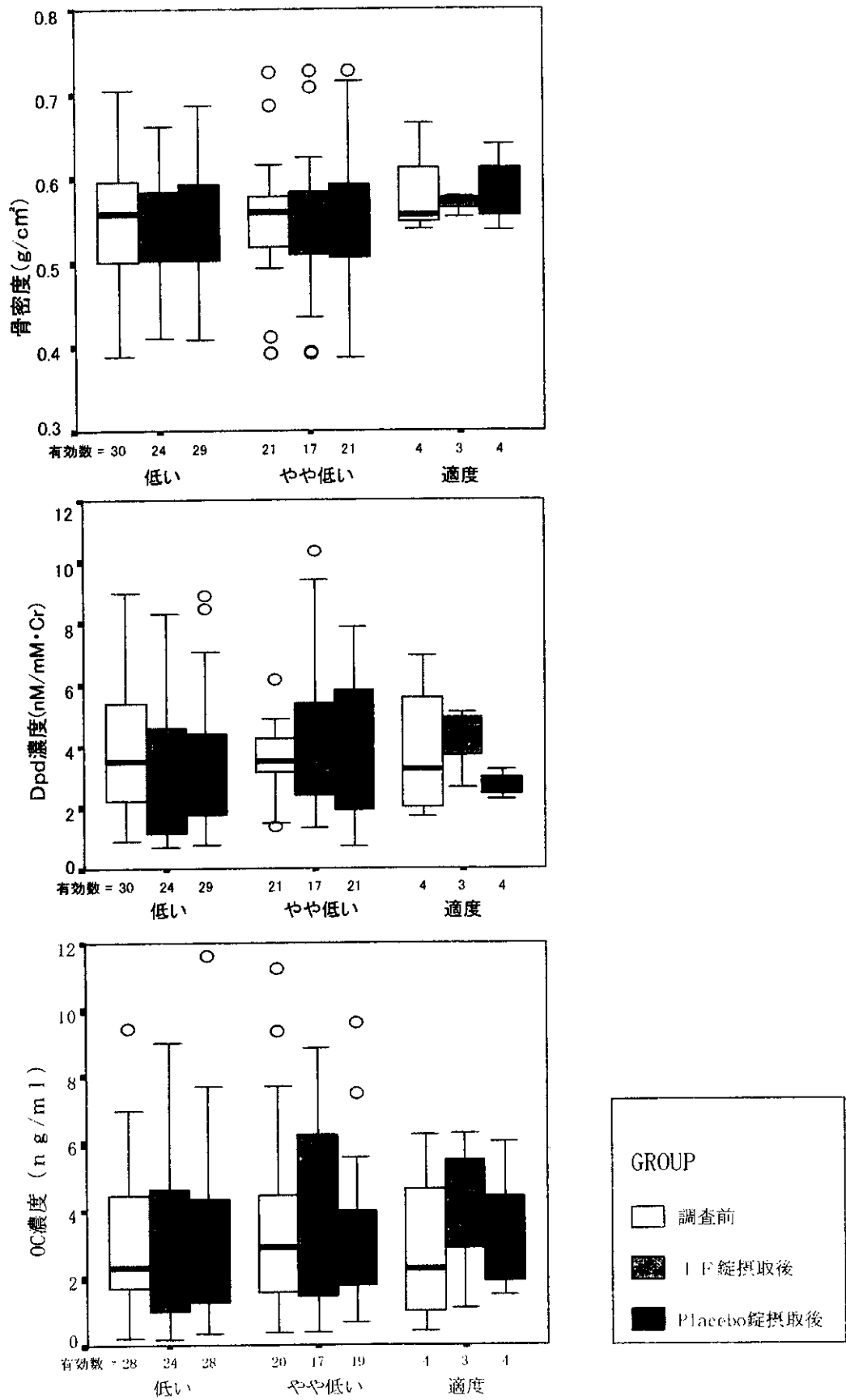


図7 生活活動強度別骨密度・Dpd・OC濃度の比較

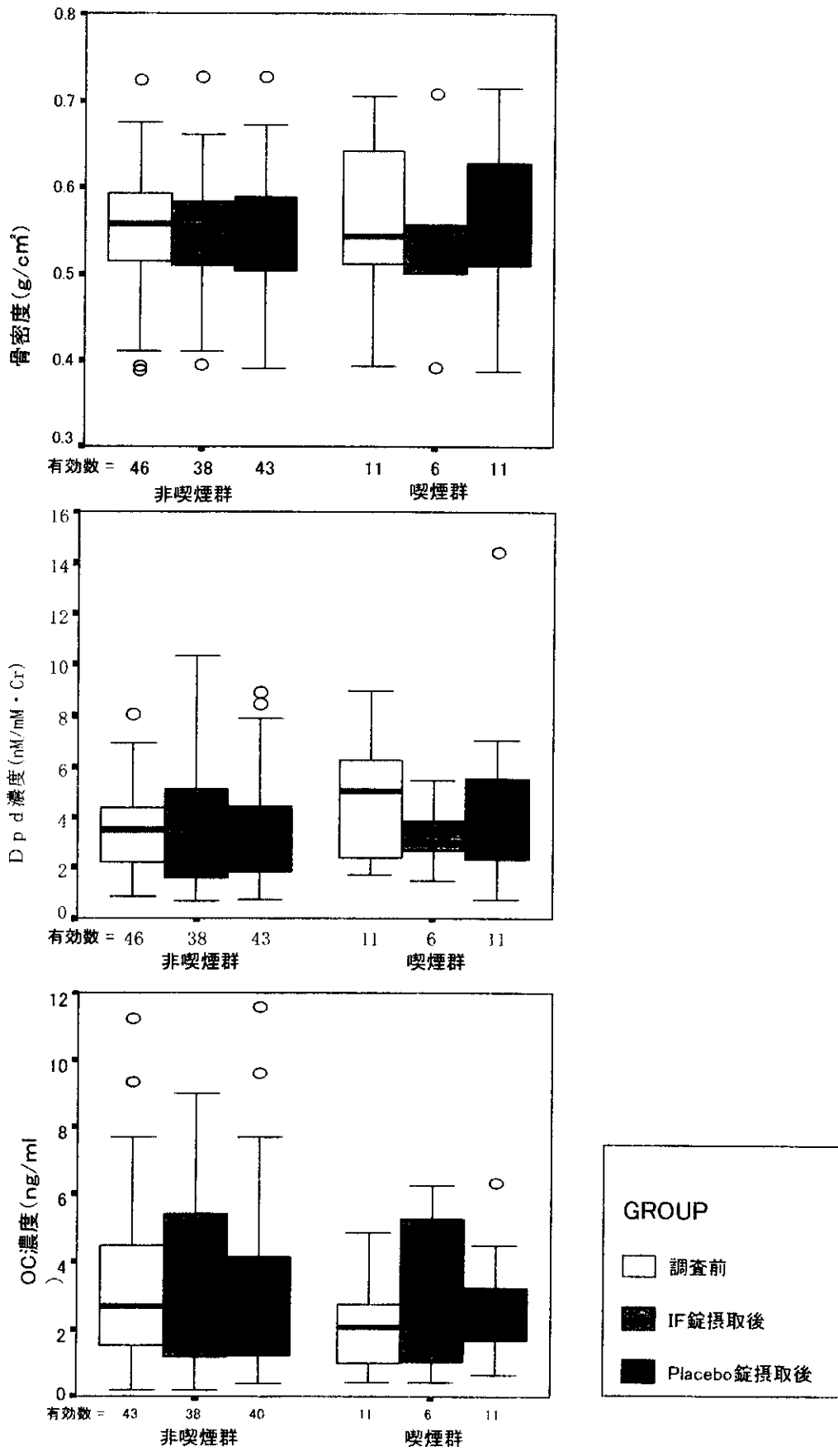


図8 喫煙の有無と骨密度・Dpd濃度・OC濃度の比較

「フタル酸ジブチルの食品経路曝露によるリスクの不確実性分析」

分担研究者 関沢 純 国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部情報第一室長
江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部室長

研究要旨： フタル酸エステル類は、そのプラスチック可塑剤ほかなど使用範囲の広さと、製品中の使用濃度の高さから考えて、人の曝露の可能性が大である。他方ラットにおける肝腫瘍、高濃度曝露時の生殖・発生毒性の観察は人におけるリスクについて作用メカニズムを基に定量的に評価しておく必要性を示している。文献調査の結果を総合していくつかのフタル酸エステル類についてリスク評価を試みるとともに、評価における不確実性要因の検討を行った。

フタル酸ジブチルとフタル酸ブチルベンジルは共通の代謝物としてフタル酸モノブチルを有し、このものが影響における近似活性体と考えられており、その作用においてはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体を經由しないで抗アンドロゲニックな作用（雄の肛門生殖器間距離の短縮、停留睾丸など）を示す。他方、一般市民ではフタル酸ジブチルへの曝露の98%以上が食品経路摂取によることが知られている。毒性試験においては、母獣の体重への影響のない条件下で生殖・発生毒性（生存同腹仔の減少 同腹仔体重の減少：最小毒性発現量 66 mg/kg体重/日）が見られ、Mylchreestら（2000）の試験では生殖・発生毒性の無毒性量が50 mg/kg体重であったことから一日許容摂取量 500 μ g/kg体重/日が算出された。この場合、肝肥大とペルオキシゾーム増加は補償的反応と考えられた。さらにわが国での最近の調査によるとフタル酸ジブチルの食品経路摂取量として14.3 μ g/人(0.286 μ g/kg bw/day)という推計値があり、この量は一日許容摂取量の 5.7×10^{-4} に相当した。同様にフタル酸ブチルベンジルの摂取量として4.7 μ g/人(0.094 μ g/kg bw/day)が推定され、この値はフタル酸ブチルベンジルの一日許容摂取量1300 μ g/kg bw/dayの 7.2×10^{-5} に相当した。同じ代謝物を經由すると推定される2種のフタル酸エステルについて両者の複合曝露があったとしても一日許容摂取量に対する安全余地は十分と考えられた。この2種のフタル酸エステルのリスク評価で、共通の代謝物であるフタル酸モノブチルの人の体内での生成速度とレベルのデータ、および許容摂取量のベースとなった病変について人での発症の蓋然性に関する知見を入手することにより、より精密なリスク評価がなされうると考えられた。

A. 研究目的

共通の代謝物としてフタル酸モノブチルを有するフタル酸ジブチルとフタル酸ブチルベンジルの事例をとおして内分泌かく乱化学物質によるリスクの意味と、リスクを評価する際に留意すべき事項について検討する。

B. 研究方法

入手した文献から、フタル酸ジブチルとフタル酸ブチルベンジルの定量的な影響評価、作用メカニズムの検討と曝露レベルの推定によりリスクを評価し、評価における不確実性要因を検討した。

B. 研究結果

(1) フタル酸ジブチル

図1にフタル酸ジブチルの一般毒性の評価結果をまとめた。

フタル酸ジブチルは遺伝毒性を示さず、より強力な Peroxisome proliferator のフタル酸ジエチルヘキシルと異なり、ラットに肝腫瘍を誘起しない(CERHR, 2000)。投与量 279 mg/kg 体重におけるラットの肝肥大と Peroxisome 増加は補償的な反応と考えられ、一般毒性における無毒性量は 138 mg/kg 体重と推定された(NTP, 1995)。

次にフタル酸ジブチルの生殖・発生毒性影響について図2に要約して示した。すなわちラットにおける毒性影響のクリティカルな時期については以下の順での感受性が高いことが見られている。

胚～胎児>新生仔～思春期>成獣

Ema ら (1997a, 2000a) は、さらにフタル酸ジブチルを妊娠初期 (0-11 日) にラットに投与すると子宮機能の低下 (脱落膜反応の抑制) により着床後の胚致死率が増加し、妊娠中期の投与では 8-9 日の場合には頸椎および胸椎の奇形、妊娠 15 日後投与では口蓋裂と胸骨分節融合の増加(Ema ら

1997b)、そして妊娠後期(15-17 日)の投与では、胎児の体重低下のほかに雄胎児の精巣下降不全と肛門生殖器間距離の短縮(Ema ら, 1998; 2000b) が見られ、次世代雄の持続的な生殖器重量の低下も報告されている (Gray 1999)。

これらの影響のうち妊娠期間中の投与との関係では、ラットの場合妊娠の 15-17 日目の方が、12-14 日目あるいは 18-20 日目よりも毒性影響への感受性が高いことが見いだされた (Ema ら, 2000b)。

NTP の試験によれば、66mg/kg 体重(母獣)への子宮内曝露で、ラットの睾丸と辜上体の発生異常および、第 2 世代の仔の体重低下が見られた(NTP, 1995)。この結果と自分たちの試験結果を踏まえて、Mylchreest ら(2000)は、生殖・発生毒性の無毒性量を 50 mg/kg 体重と推定した。

Mylchreest ら(1999)は、観察された影響の内容 (包皮分離の遅れ、睾丸萎縮、停留睾丸、前立腺不形成など) から、作用メカニズムはエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体を介さない抗アンドロゲン作用と推定している。

フタル酸ジブチルへの曝露評価の結果を表 1-4 にまとめた。カナダの調査結果から一般市民は、食品、室内空気、環境大気、飲料水経路によるフタル酸ジブチルへの曝露はそれぞれ 7, 0.12, 0.00026-0.00036, <0.02 μ g/kg bw/day と見つめられた(表 1, IPCS, 1997)。米国 ATSDR の調査結果では環境大気、飲料水経路によるフタル酸ジブチルへの曝露はそれぞれ 0.0005-0.0009, 0.005 μ g/kg bw/day であり、これら経路による曝露レベルはほぼ同様であって食品に比較して無視しうるレベルであった(表 1, IPCS, 1997)。

さらに年齢別の曝露の違いについてカナダの推計値を表 2 に示した(IPCS, 1997)。この結果から曝露はむしろ 4 歳以下の子供(5 μ g/kg bw/day)がもっとも大きく、ついで 11

歳以下の子供(4.3 μ g/kg bw/day)、0-0.5歳と 5-11歳(2.4, 2.3 μ g/kg bw/day)、12-19歳(4.3 μ g/kg bw/day)、20-70歳(1.9 μ g/kg bw/day)の順であり、子供が相対的により大きく曝露されておりそれは食品経由の曝露によるという実状が推測された。

わが国における食品経由のフタル酸エステル曝露について、国内3地域の1週間の病院食からの陰膳法による推計値が報告されている(表3、IPCS;1997)。この結果からはフタル酸ジエチルヘキシルへの曝露は約10.4 μ g/kg bw/dayであったが、フタル酸ジブチルの摂取量は0.286 μ g/kg bw/dayと推計され、カナダの推計値よりかなり低かった。

英国 MAFF(1996)の食品経由摂取量評価報告ではフタル酸ジブチルについて、13 μ g/day(高レベル曝露=97.5パーセントイルの場合は31 μ g/day)であり、これは体重65kgの成人の場合には0.2 μ g/kg bw/dayとなり、ほぼ日本の場合と同じレベルであった(表4、MAFF;1996)。

日本の食品経由摂取量と、生殖・発生毒性の無毒性量(NOEL) 50 mg/kg 体重から導かれる仮の一日耐容摂取量(TDI) 500 μ g/kg bw/day とを比較すると、その比は 5.7×10^{-1} であった。

英国の摂取レベルは同様にして仮の一日耐容摂取量(TDI)の 4×10^{-1} と推計された。

(2)フタル酸ブチルベンジル

フタル酸ブチルベンジルは腸管また肝臓で速やかにモノエステル(フタル酸モノブチルおよび、フタル酸モノルベンジル)に加水分解される。妊娠中または授乳中の母獣曝露によりフタル酸ブチルベンジルは仔に腎臓あるいは肝臓に体重増加減少に伴う相対臓器重量の増加を引き起こすが、この濃度より高い濃度で睾丸萎縮あるいは精子数減少を起こす。フタル酸モノブチルある

いはフタル酸モノルベンジルを投与した際にもフタル酸ブチルベンジルとほぼ同じレベルで着床阻害や骨形成の以上などの奇形が生じた。120-300 mg/kg/dayの範囲で腎臓および肝臓の相対重量増加、腎症、ペルオキシゾーム増加、副睾丸精子数の減少(睾丸における病理変化はない)が見られたことから、132 mg/kg/dayがNOELとされ、この値から1.3 mg/kg/dayがTDIとして算出された(IPCS, 1999)。

他方欧州連合の(Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment: CSTE, 1998)はNTP(1997)による改変10週交配試験における副睾丸精子数減少を基に20 mg/kg/dayをNOELとしている。

Tsumuraら(2001)の病院食を基にした調査によるとフタル酸ブチルベンジルの摂取量は0.094 μ g/kg/day(4.7 μ g/人/day)であり、英国 MAFF(1996)の評価では8 μ g/人/day(高レベル曝露の場合は20 μ g/人/day)であった。

Tsumuraら(2001)による摂取量推定値とIPCS(1999)のTDIを比較すると、日本人の食品経由フタル酸ブチルベンジルの摂取は、 7.2×10^{-5} のレベルであった。

他方、英国の摂取レベルは同様にして仮の一日耐容摂取量(TDI)の 9.5×10^{-5} と推計された。

D. 考察

カナダの推計値(表5、IPCS;1997; Personal Communication)ではシリアル、澱粉性根菜、バターなど脂肪、野菜と果物の寄与が大きく、日本人の食パターンとの違いによる差もあることをうかがわせた。

欧州連合 CSTE は、塩化ビニル製のおもちゃから溶出する可能性のあるフタル酸エステルへの乳児の曝露について、最悪シナリオの仮定によるフタル酸ジブチル、フタル酸ブチルベンジルそれぞれの溶出量推定値、0.40

$\mu\text{g/kg bw/day}$ と $0.95\ \mu\text{g/kg bw/day}$ を、それぞれの NOAEL 推定値 $52\ \text{mg/kg/day}$ (余分の不確実性係数 5 をかけてある)、 $20\ \text{mg/kg/day}$ と比較して、Margin of Safety を 26,000 と 20,000 とした (CSTEE 1998)。

英国 MAFF (1998) は、幼児向け食品中の 7 種のフタル酸エステルの分析結果から、出生時と 6 ヶ月の乳児の体重当たりの摂取量を推定した (表 6)。

また米国の国家毒性計画 (NTP) の「人の生殖リスクの評価センター (Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction : CERHR)」の「フタル酸エステル専門パネル (Expert Panel Review of Phthalates)」は、フタル酸エステルの安全性評価の結果、次のような見解を公表している (CERHR, 2000)。すなわち、フタル酸ジブチルを含む 5 つのフタル酸エステル (ジ-n-ブチル、ジイソデシル、ブチルベンジル、ジ-n-オクチル、ジ-n-ヘキシル) については、「低い」、「最小限度の」、あるいは「無視できる程度の懸念」(ジ-n-ブチルについては「最小限度の懸念」) を、しかしほかには比べてもっとも曝露レベルが高く、かつ毒性影響も強いと思われるフタル酸ジエチルヘキシルについては「より強い懸念」があったとした。

フタル酸ジエチルヘキシルについては重病の幼児の集中治療において曝露される可能性のある高濃度レベルでは、男の子に発生段階の生殖臓器に影響が及ぶ「懸念が大きい」が、治療による救済のメリットが認められる。現状の成人曝露レベルに妊婦が曝露された場合に、胎児の発生に影響が及ぶ「懸念があり」、また乳児や幼児が現在の成人曝露レベルよりかなり高く曝露された時には男児の発生段階の生殖臓器に影響が及ぶ「懸念がある」が、成人の曝露については「最小限度の懸念」のレベルであるとした。

フタル酸ジブチルとフタル酸ブチルベンジルは近似活性体と考えられる共通の代謝物フタル酸モノブチルを生成し、エストロゲン受

容体やアンドロゲン受容体を經由しないで抗アンドロゲニックな作用を示す。

フタル酸エステル類の生殖・発生毒性の作用メカニズムについての最近の研究によれば、精巣ライディッヒ細胞の微細構造の変化と間質組織の繊維化が報告されており、このことがライディッヒ細胞の黄体ホルモン刺激による testosterone 合成また分泌を低下させることにつながっているという (Jones ら 1993; Agarwal ら 1989)。

またフタル酸モノエチルヘキシルがラット培養細胞における卵胞刺激ホルモンの受容体結合による c AMP 蓄積を阻害し、その作用点は G 蛋白レベルではないかと推定される (Heindel & Chapin, 1989; Grasso ら 1993)、さらにセルトリ細胞中のビメチンフィラメント崩壊による生殖細胞のセルトリ細胞からの分離による Fas シグナル伝達の阻害および可溶性の Fas リガンド生成と生殖細胞側における膜受容体の増加が生殖細胞のアポトーシスを結果的に促進させているのではないかと推定されている (Richburg & Boekelheide, 1996; Richburg ら 1999)。しかしこのようなメカニズムがフタル酸ジブチルやフタル酸ブチルベンジルにおいて、どの程度作用する可能性があるかは不明である。

母獣の体重への影響のない条件下で生殖発生毒性が見られるが、フタル酸ジブチルとフタル酸ブチルベンジル両者の複合曝露があったとしても一日許容摂取量に対する安全余地は十分と考えられた。しかし、共通の代謝物であるフタル酸モノブチルの人の体内での生成速度と量データ、および許容摂取量のベースとなった病変について人での発症の蓋然性に関する知見を入手することで、より精密なリスク評価がなされうと考えられる。

E. 結論

フタル酸ジブチルとフタル酸ブチルベンジルは近似活性体と考えられる共通の代謝物フ

タル酸モノブチルを生成し、エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体を經由しないで抗アンドロゲニックな作用を示す。毒性試験における肝肥大とペルオキシゾーム増加は補償的反応と考えられたが母獣の体重への影響のない条件下で生殖発生毒性が見られ、一日許容摂取量 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日が算出された。

フタル酸ジブチルへの曝露の98%以上は食品経由摂取だが、最近の調査結果ではフタル酸ジブチルの食品経由摂取量は $14.3 \mu\text{g}/\text{人}$ ($0.286 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day)であり、この量は一日許容摂取量の 5.7×10^{-4} に相当した。同様にフタル酸ブチルベンジルの摂取量は $4.7 \mu\text{g}/\text{人}$ ($0.286 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day)でありフタル酸ブチルベンジルの一日許容摂取量 $1300 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw/dayの 7.2×10^{-5} に相当した。フタル酸ジブチルとフタル酸ブチルベンジル両者の複合曝露があったとしても一日許容摂取量に対する安全余地は十分と考えられたが、共通の代謝物であるフタル酸モノブチルの人の体内での生成速度と量データ、および許容摂取量のベースとなった病変について人での発症の蓋然性に関する知見を入手することで、より精密なリスク評価がなされうると考えられた。

引用文献

CERHR (2001) CERHR news, Final phthalate expert panel reports, <http://cerhr.niehs.nih.gov/news/index.html>
CSTEE (1998) Opinion on phthalate migration from soft PVC toys and child-care articles - data made available since the 16th of June 1998, opinion expressed at the 6th CSTEE plenary meeting, Brussels, 26/27 November 1998, http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/sct/out19_en.html
IPCS (1997) Environmental Health Criteria 189, Di n-butyl phthalate, World Health Organization, Geneva pp.205

IPCS (1999) Concise International Chemical Assessment Document No.17, Butyl benzyl phthalate, World Health Organization, Geneva pp.41

MAFF (1996) Food surveillance information sheet, Number 82, March 1996, Phthalates in food, <http://www.foodstandards.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1996/no82/table1.htm>

MAFF (1998) Food surveillance information sheet, Number 168, December 1998, Phthalates in infant formulae - follow-up survey, <http://www.foodstandards.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1998/no168/168phtha.htm>

Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC & Foster MD (2000) Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation, Toxicol. Sci., 55, 143-151

NTP (1995) NTP Technical report on toxicity studies of dibutyl phthalate (CAS 84-74-2) administered in feed to F344/rats and B6C3F1 mice, National Toxicology Program, Research Triangle Park, NTP Toxicity series No.30, pp.107

NTP (1997) Toxicology and carcinogenicity studies of butyl benzyl phthalate (CAS No.85-68-7) in F344/N rats (feed studies), National Toxicology Program, Research Triangle Park, NTP Technical Report No.458, pp.92

Personal communication from M.E. Meek of Environmental Health Directorate, Health Canada

Tsumura Y, Ishimitsu S, Saito I, Sakai H, Kobayashi Y & Tonogai Y (2001) Eleven phthalate esters and di(2-ethyl hexyl)adipate in one-week duplicate diet samples obtained

from hospitals and their estimation of daily intake, Food Addit. Contam., 18(5) 449-460

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

関澤 純、江馬 真(2000)環境ホルモン物質としてのリスク評価の検討、日本環境ホルモン学会第3回研究発表会、2000年12月、横浜

G. 知的所有権の取得状況

1.特許 なし

2.実用新案登録 なし

3.その他 なし

表1 フタル酸ジブチルへの成人曝露レベルの推定値

(カナダと米国の値)

	大気	室内空気	飲料水	食品
フタル酸 ジブチル濃度	0.0045-0.0062 μg/m ³	0.420 μg/m ³	<1.0 μg/L	マーケット バスケット評価 (カナダ)
前提	吸入量 22 m ³ ; 体重 64kg; 屋外に1日4時間	吸入量 22 m ³ ; 体重 64kg; 室内に1日20時間	1日1.4 L 消費	食品毎の摂取量
推定曝露量 μg/kg 体重/日 (*米国)	0.00026-0.00036 (* 0.0005-0.0009)	0.12	<0.02 (* 0.005)	7.09

表2 Health Canada DBP Exposure Estimates

Chan & Meek (1994)

Media	Estimated DBP Exposure (μg/kg bw/day)				
	0.0 - 0.5 yr.	0.5 - 4 yr.	5 - 11 yr.	12 - 19 yr.	20 - 70 yr.
Ambient Air*	0.0003	0.0004	0.00041	0.00038	0.00034
Indoor Air	0.68	0.91	0.1	0.87	0.78
Drinking Water	0.11	0.062	0.033	0.022	0.021
Food	1.6	4.1	3.2	1.4	1.1
Soil*	0.007	0.0054	0.0018	0.00049	0.0004
Total Estimated Exposure.	2.4	5	4.3	2.3	1.9

* Value represents the upper range of the estimates.

表 3

食事中に検出されたフタル酸エステルの摂取量

: 3病院における一週間の食事についての平均

(Tsumura et al. 印刷中)

DEP	DBP	BBP	DEHA	DEHP	DOP	DINP	
0.35	14.3	4.7	86.4	519	0.23	64.6	µg/人/日
0.007	0.286	0.094	1.728	10.38	0.0046	1.292	µg/体重/日 *

* 体重= 50kg と仮定

表 4

Joint Food Safety and Standards Group

food surveillance
INFORMATION SHEET

Back to Food Surveillance Sheet No 82.

Table 2: Estimated mean and high level (97.5th percentile) intakes of individual phthalates from carcass meat, poultry, eggs and milk, based on the analysis of 1993 Total Diet Study samples		
Phthalate	Estimated intakes (mg/person/day)	
	Mean	High level
Dipropyl phthalate	0.004	0.009
Di-iso-butyl phthalate	0.008	0.018
Dibutyl phthalate	0.013	0.031
Benzylbutyl phthalate	0.008	0.020
Di-(2-ethylhexyl) phthalate	0.15	0.30

表 5

Estimation of total daily intake in Canada (DBP) (IPCS, 1997)

Food	Concentration of DBP in food (μ g/kg)	Amount (kg) of food consumed per day	Average adult body weight (kg)	Intake (μ g/kg b.w./day)
Cereal	620	0.323		3.13
Starchy roots	630	0.225		2.21
Sugar	200	0.072		0.23
Vegetables and fruits	120	0.325	64	0.61
Fish	500	0.023		0.18
Fat, oil, butter	1500	0.031		0.73
Total daily intake				7.09

表 6

Table 2: Concentrations and Estimated Average Exposure to Individual and Total Phthalates of Infants at Birth and Six Months of Age from Retail Infant Formulae

Phthalate	Concentrations (mg/kg)		Range or average exposures from formula at birth and at 6 months (micrograms/kg bodyweight/day)				Tolerable Daily Intake (micrograms/kg bodyweight/day)
	1998	1996	1998		1996		
			At Birth	At 6 months	At Birth	At 6 months	
Total*	less than 0.1 - 0.6	1.2 - 10.2	15.6	9	230	190	None set †
DIPP	less than 0.01	**	0.9	0.6	-	-	None set
DPP	less than 0.005	less than 0.001 - 0.05	0.3	0.2	1.3	1	None set
DIBP	less than 0.02	0.06 - 0.18	1.7	1.2	6.7	5.1	None set
DBP	less than 0.05 -	0.08 - 0.4	2.4	1.4	14	9.3	50 ‡
BBP	less than 0.003 - 0.015	less than 0.004 - 0.24	0.2	0.1	8.7	5.6	100 ‡
DEHP	less than 0.05 -	0.33 - 0.98	13.8	7.7	35	23	50 ‡
DIDP	less than 0.1	#	5.1	3.6	-	-	50

* Total phthalate is measured separately and is not equal to the sum of the individual phthalates listed in the first column.

図1 フタル酸ジブチルの一般毒性の評価

ラット肝腫瘍
の可能性

遺伝毒性なく、より強力な Peroxisome proliferator のフタル酸ジエチルヘキシルと異なり、ラットに肝腫瘍を誘発しない
(NTP-CERHR, 2000)

一般毒性の無毒性量
138 mg/kg 体重
(NTP, 1995)

279 mg/kg 体重におけるラットの肝肥大と Peroxisome 増加＝補償的な反応
(NTP, 1995)

図2 フタル酸ジブチルの生殖・発生毒性評価

生殖・発生毒性の無毒性量
50 mg/kg 体重
(Mylchreestら, 2000)

66mg/kg 体重（母獣）への子宮内曝露で、ラットの睪丸と睪上体の発生異常および、第2世代の仔の体重低下 (NTP, 1995)

クリティカルな曝露時期
(Emaら, 2000)

ラットにおける曝露時期による感受性の順：
胚～胎児>新生仔～思春期>成獣
妊娠期間中(19-22日)：15-17日目>12-14 或いは 18-20日目

作用メカニズムの推定

エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体を介さない抗アンドロゲン作用 (Mylchreestら, 1999)

「ジブチルスズのラットにおける妊娠および妊娠維持に対する影響に関する研究」

分担研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 生物試験部

研究要旨： 塩化ジブチルスズ（DBTCI）をラットの妊娠初期に投与して妊娠の開始及び維持に与える影響について検討した。ラットの妊娠0-3日または妊娠4-7日に3.8, 7.6または15.2 mg/kgのDBTCIを強制経口投与し、妊娠20日に妊娠ラットを開腹し、胚—胎児に対する影響について検討した。妊娠0-3日のDBTCI投与により、不妊娠のラット数およびラット当たりの着床前胚死亡率が、7.6 mg/kg以上で対照群と比して有意に上昇し、また15.2 mg/kgでは対照群及び飼料制限群と較べても有意に上昇した。妊娠の成立した雌ラットでは、着床数、生存胎児数、着床後胚死亡率に有意な変化は見られなかった。妊娠4-7日の投与では対照群及び飼料制限群と比べて7.6 mg/kg以上で着床後胚死亡率の上昇がみられた。これらの結果から、DBTCIは妊娠初期に投与したとき妊娠の成立および維持に悪影響を及ぼし、その作用は投与時期によって異なることが明らかになった。

A. 研究目的

有機スズ化合物は農業や工業で広く使われている化合物である。二置換の有機スズ化合物は商業的に最も重要な誘導体で、ポリ塩化ビニールの熱および光に対する安定化剤やポリウレタンフォームの生産の為の触媒、シリコンラバーの硬化剤として使われている。環境中に放出される有機スズ化合物の量はその広い使用法とともに増加してきた。環境中への有機スズ化合物の放出ルートのうち殺虫剤以外で最も重要なのは安定化剤として有機スズ化合物を用いているポリ塩化ビニールからの溶出と、防汚剤としての使用である。

海生生物や海産物中のジブチルスズ（DBT）とトリブチルスズ（TBT）の同定についていくつかデータがある。環境中において、TBTは自然にまたは生物学的に脱ブチル化によりDBTに分解する。有機スズ化合物は食物中に取り込まれ、人によるスズの1日摂取量は200 µgから17 mgと見積もられている。

有機スズの毒性のうち、生殖発生毒性については余りよく理解されていない。我々は以

前5 mg/kgの塩化ジブチルスズ（DBTCI）を器官形成期に投与したとき、奇形を有する胎児数が増加することを報告した。ラット胚は妊娠7日及び8日にDBTCIの催奇形性に対する高い感受性を有することが明らかになった。我々はまた、全胚培養系においてもDBTCIがラット胚に異形成作用を示すことを報告した。

最近、我々はラットにおいて塩化トリブチルスズ（TBT）を妊娠初期に投与したとき、不妊娠、着床前胚死亡および着床後胚死亡を引き起こすことを報告した。ラットやマウスで、TBTの経口投与後、代謝変換によりDBTが生成することが知られている。本研究においては、妊娠初期に投与したDBTCIが妊娠の成立および維持に与える影響を評価し、TBTの生殖毒性におけるDBTの役割について検討した。

B. 研究方法

Wistar ラットを使用した。ラットは室温 24 ±1°C、湿度 5±5%、12:12 時間 明暗の動物室にて、水道水と飼料を自由に与えて飼育し

た。膈垢を毎朝観察し、発情前期の夕方、同系統の雄ラットと同居させ、翌朝膈垢内に精子を認めたものを妊娠とした。精子発見日を妊娠 0 日とした。妊娠ラットを無作為に 10 群に分け、個別ゲージにて飼育した。

ラットの妊娠 0-3 日または 4-7 日に DBTCI を 3.8, 7.6 または 15.2 mg/kg 強制経口投与した。DBTCI はオリーブ油に溶解し、投与日の体重に基づいて 5 ml/kg 投与した。対照群、ペアフェッド群のラットにはオリーブ油だけを投与した。ペアフェッド群のラットには、妊娠 0-3 日または妊娠 4-7 日に 15.2 mg/kg の DBTCI 投与したラットの摂取量と同量の飼料を与えた。ラットは妊娠 20 日に開腹し、着床数、吸収胚数、生存および死亡胎児数を記録した。生存胎児については、体重、性別、外部奇形、および口腔内の奇形を調べた。胎児に対する成績は一腹を単位として統計処理を行った。0.05% を有意の基準とした。

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

1. 妊娠 0-3 日に DBTCI 投与したときの影響

いずれのグループにも妊娠ラットの死亡は観察されなかった。DBTCI 投与群において、顔毛の赤化、立毛、下痢が観察され、その発生率は容量の増加とともに増加した。妊娠 0-4 日及び妊娠 4-20 日の体重増加量、純体重増加量は、7.6 及び 15.2 mg/kg の用量で対照群より有意に低かった (Table 1)。全ての用量で妊娠 0-4 日の飼料摂取量が、7.6 及び 15.2 mg/kg の用量で妊娠 4-20 日の飼料摂取量が対照群より有意に少なかった。ペアフェッド群の雌ラットは与えられた餌を全て摂取した。

対照群および 3.8 mg/kg 投与群のラットは全て妊娠していた (Table 2)。不妊娠つまり着床痕が見られないラットは、7.6、15.2 およびペアフェッド群においてそれぞれ 5 匹 (16 匹中)、

14 匹 (16 匹中)、1 匹 (17 匹中) 見られた。妊娠率および動物数あたりの着床数は 7.6 mg/kg の投与量で対照群と、15.2 mg/kg の投与量で対照群およびペアフェッド群より有意に減少した。動物数あたりの着床前胚死亡数は 7.6 mg/kg の投与量で対照群と、15.2 mg/kg の投与量で対照群及びペアフェッド群より有意に増加した。

着床した雌ラットにおいて、母動物当たりの黄体数、着床数、吸収胚数、死および生存胎児数、着床前および着床後胚死亡数、全胚吸収の妊娠ラット数、生存胎児の性比、雄及び雌胎児体重は対照群比べて有意の差はなかった。ペアフェッド群において、母動物当たりの吸収及び死亡胎児数、着床後胚死亡数は対照群と比べて有意に増加し、生存胎児数及び胎児体重は有意に減少した。外表奇形はいずれの群にも観察されなかった。

2. 妊娠 4-7 日に DBTCI 投与したときの影響

いずれのグループにも死亡は観察されなかった。DBTCI 投与群において、顔毛の赤化、立毛、下痢が観察され、その発生率は用量の増加とともに増加した。妊娠 4-8 日及び妊娠 8-20 日の体重増加量は、7.6 及び 15.2 mg/kg の用量で、純体重増加量は 15.2 mg/kg の用量で対照群より有意に低かった (Table 3)。全ての用量で妊娠 4-8 日の飼料摂取量が、15.2 mg/kg の用量で妊娠 8-20 日の飼料摂取量が対照群に比べて有意に少なかった。ペアフェッド群の雌ラットは与えられた餌を全て摂取した。

対照群、ペアフェッド群、3.8 および 7.6 mg/kg 投与群の全てのラットは妊娠していた (Table 4)。不妊娠のラットは、15.2 mg/kg 投与群において 1 匹 (17 匹中) 見られた。妊娠率及び動物数当たりの着床数及び着床前胚死亡数は DBTCI 処置群と対照群及びペアフェッド群で有意な差は見られなかった。動物数当たりの着床前胚死亡数は 7.6 mg/kg の投与量で

対照群と、15.2 mg/kg の投与量で対照群及びペアフェッド群に比べて有意に高かった。

着床をしていた雌ラットにおいて、母動物当たりの黄体数、着床数、着床前及び着床後胚死亡数、生存胎児の性比は対照群と比べて有意の差はなかった。全胚吸収は 15.2 mg/kg 投与群において対照群及びペアフェッド群と比べて有意に増加した。母動物当たりの吸収及び死亡胎児数は 7.6 及び 15.2 mg/kg 投与群において対照群及びペアフェッド群と比べて有意に増加した。外表奇形はいずれの群にも観察されなかった。

着床後胚死亡率は、3.8 mg/kg 投与群において対照群と比べて有意な上昇が、7.6 及び 15.2 mg/kg 投与群において対照群及びペアフェッド群と比べて有意な増加が見られた。生存胎児数は 7.6 mg/kg 投与群において対照群より有意な減少が、7.6 及び 15.2 mg/kg 投与群において対照群及びペアフェッド群と比べて有意な減少が見られた。7.6 及び 15.2 mg/kg 投与群において対照群と比べて雄及び雌胎児の体重の減少が見られたが、ペアフェッド群とは有意な差はなかった。外表奇形はいずれの群も観察されなかった。

D. 考察

本実験の目的は DBTCI のを妊娠初期に投与したときの妊娠および妊娠維持に対する影響を明らかにすることである。最も著しい所見は不妊娠と妊娠率の低下であった。

DBTCI を投与した日にかかわらず、7.6 mg/kg 以上の投与量で体重増加量の減少が、3.8 mg/kg 以上の投与量で飼料摂取量の減少が見られた。雌ラットは妊娠 0-3 日に投与したときには 7.6 mg/kg 以上で、妊娠 4-7 日に投与したときには 15.2 mg/kg の用量では実験終了時までには体重は回復しなかった。

本実験において、ペアフェッド群のラットは妊娠 0-3 または 4-7 日に投与したときの最高用量群のラットの飼料摂取量と同量の飼料を与

えた。飼料制限は妊娠率の有意な減少は起こさなかった。妊娠 0 日からの飼料制限は着床後胚死亡の増加と胎児体重の有意な減少を引き起こした。また、妊娠 4 日からの飼料制限は胎児体重の減少のみを引き起こした。妊娠 0-3 日または妊娠 4-7 日に DBTCI 7.6 mg/kg の投与は、対照群、飼料制限群と比べて、それぞれ着床前胚死亡、着床後胚死亡を有意に増加させた。妊娠 4-7 日に DBTCI 3.8 mg/kg の投与は対照群と比べると着床後胚死亡を有意に増加させたが、飼料制限群と比べると有意に低かった。この群の投与期間中の飼料摂取量は対照群より 19% 減少したが、飼料制限群ほど少なくはない。このレベルの飼料摂取量の減少が着床後胚死亡の増加を引き起こすかどうかさらなる研究が必要である。これらの結果から、初期の胚死亡は DBTCI の作用によるものであり、飼料摂取量の減少による母体の栄養不良による作用ではないと考えられる。

妊娠 0-3 日の投与期間は着床前の期間に相当し、妊娠 4-7 日の期間は着床が進行して着床後の短い期間を含んでいる。妊娠 0-3 日、妊娠 4-7 日の DBTCI による障害は、それぞれ着床前及び着床後胚死亡率の上昇を引き起こすと考えられた。妊娠 0-3 日に DBTCI を投与後、着床していた雌ラットにおいて母動物当たりの着床数、吸収及び死亡胎児数、生存胎児数及び着床前及び着床後胚死亡数に有意な差が見られなかったことから、DBTCI の毒性作用はその後の生存や成長に影響を与えないものと考えられた。しかし、妊娠 4-7 日に DBTCI を投与後、母動物の着床後胚死亡数の有意な上昇がみられたことから、着床中及び着床直後に投与した DBTCI は胎児の生存、成長に悪影響を及ぼすことを示している。これらの結果は、DBTCI の生殖発生に与える影響の発現が投与時期により変化する事を示している。

我々の以前の研究で、DBTCI の親化合物である TBTCI 化合物を妊娠 0-3 日または妊娠 4-7

日に投与したとき、16.3mg/kg以上の投与量で着床前及び着床後胚死亡率の上昇が観察された。TBTCI 16.3mg/kgは50µmol/kgに相当する。本研究では、妊娠0-3日にDBTCI 7.6mg/kg以上で、妊娠4-7日に3.8mg/kg以上の投与量でそれぞれ着床前及び着床後胚死亡率の上昇が観察された。DBTCI 3.8及び7.6mg/kgはそれぞれ12.5及び25µmol/kgに相当する。初期の胚死亡を引き起こすDBTCIの用量はTBTCIよりも低い。DBTはTBTの主な代謝物として同定されている。代謝物と親化合物をモル単位で比べたとき、作用が同じまたはより強いとき、代謝物は第一の毒物または中間体であると考えられる。したがって、DBTCIまたはその代謝物がTBTCIによる早期の胚死亡に関与している可能性もある。この仮定を確かめるために、TBTとDBTの生殖毒性の違いを明らかにするための更なる研究が必要である。

化合物による胚死亡は様々なメカニズムにより引き起こされる。胚死亡は化学物質の胚に対する直接的な作用や母体の恒常性を害することによる間接的な作用両方またはいずれか一方により引き起こされる。雌の正常の生殖機能には適切な中枢神経系と卵巣、子宮の相互作用が含まれ、これらに対する毒作用は胚の生存に影響を与える。子宮内膜の機能は胚の生存にかかわる重要な要因である。現在、偽妊娠ラットを用いて子宮機能に対するDBTCIの影響について検討を行っている。

E 結論

着床前期間のDBTCIは7.6mg/kg以上の投与量で着床前胚死亡の増加を引き起こすが、着床後の胚/胎児には有意な作用を示さなかった。さらに、周着床期の処置は7.6mg/kg以上の投与量で着床後胚死亡の上昇と胎児体重の減少を引き起こすことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. Erma, M. and Miyawaki, E. *Reprod. Toxicol.*, in press.

Effects of 4-tert octylphenol on initiation and maintenance of pregnancy following oral administration during early pregnancy in rats. Harazono, A. and Erma, M. (2001) *Toxicol. Lett.*, 119, 79-84.

Adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. Erma, M. and Miyawaki, E. (2001) *Reprod. Toxicol.*, 15, 189-194.

Developmental and reproductive toxicity of tributyltin and its metabolite, dibutyltin, in rats. Erma, M. and Harazono, A. (2000) *Cong. Anom.*, 40, S108-S120.

Suppression of decidual cell response induced by tributyltin chloride in pseudopregnant rats: As a cause of early embryonic loss. Harazono, A. and Erma, M. (2000) *Arch. Toxicol.*, 74, 632-637.

Adverse effects of dibutyltin dichloride on initiation and maintenance of rat pregnancy. Erma, M. and Harazono, A. (2000) *Reprod. Toxicol.*, 14, 451-456.

フタル酸エステルの生殖および発生に対する毒性影響についての最近の研究: 主としてDi(2-ethylhexyl)phthalateおよびDi-n-butyl phthalateについて、小泉睦子、江馬 眞、広瀬明雄、長谷川隆一 (2000) *食品化学学会誌*, 7, 65-71.

Reproductive and developmental toxicity of triphenyltin chloride in rats. Erma, M. (2000) *Cong. Anom.*, 40, 8-13.

1. 学会発表

Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBP) during pregnancy. Erma, M. and Miyawaki, E. 40th Annual Meeting, Society of Toxicology

ビスフェノールAのラットにおける2世代繁殖試験、江馬 眞 第3回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム

環境ホルモン物質としてのリスク評価の検討、