

票のデータ利用, ②妊娠結果調査データ利用, ③妊娠結果に関する不明な点があるときの主治医への問い合わせ, の3つである。

まず, 問診票の最後に①②③のすべてに対する説明および同意の欄を設けた。ただし, 同意されない場合にも, それだけでは個人を特定しえない情報の一部(年齢, 在住都道府県名, 服薬状況)について, 事業統計として集計することを明記した。また, 同意の撤回は随時できるようなシステムにしている。

### (3) 問診票および妊娠結果調査ハガキに記入された情報の保存

データは独自に開発されたシステム内に厳重に保管される。データ利用の同意を得られたケースについても2年間経過したら匿名化し, IDで管理する。さらに, 5年間経過した時点で別のIDをランダムに付け替えることにより, いわゆる「二重ロック」をした状態にし, 非常事態以外では個人が特定できない状態にすることになっている。

## 今後の展望

20年の歴史のあるMRPでは電話相談で5万件/年に対応しているという。電話で問診をし, 薬について説明をするため1件当たり15分はかかり, 少なくとも5本の電話回線がフルに稼働している。このように電話で手軽に相談できる一方で, リスクのある薬剤や本人の不安が強い場合は, や

はり外来で医師から説明をしているとのことで, 相談内容がナীবなだけにきめ細かな対応を必要とされていることがわかる。われわれは検討会の結果を受けて対面相談, 主治医紹介を原則としており, マンパワーの問題もあって限定した地域を対象に始めたところ(2006年2月時点で東京都および神奈川県, 順次拡大していく予定)であるが, 国のプロジェクトである以上, 全国どこにいても相談が受けられる体制を作らなければならない。そのため, 全国各地の病院とネットワークを構築し, データを共有しながら相談業務を分担することも考えており, 現在その準備を始めている。

また, 慢性疾患に使用されている薬剤は主治医の判断のもとに投与されており, 当センターへ相談してくる例は限られてくると思われる。このような薬剤のなかにも日本独自の症例データベースが必要なものがあるので, これらについては当センターをレジストリーシステムとして利用してもらって能動的なデータベース作りを行っていかなくてはならないと考えており, 関係各学会等への働きかけもしていく予定である。

さらに, カナダのMRPをはじめ世界的なネットワークを用いた疫学研究への参画も行っていきたいと考えている。

### 【妊娠と薬情報センターの問い合わせ】

TEL: 03-5494-7845

受付時間 平日 (10:00~12:00, 13:00~16:00)

URL = <http://www.ncchd.go.jp/kusuri/index.html>

### 外来カウンセリングの実際

# 虎の門病院「妊娠と薬相談外来」

林 昌洋  
HAYASHI Masahiro

虎の門病院薬剤部長

## はじめに

1960年代のサリドマイド事件が教訓となり、医療従事者はもとより国民全体に薬物の催奇形性に対する認識が浸透し、妊婦はむしろ過剰な不安を抱く傾向がある。

虎の門病院（以下、当院）では、妊婦の服薬に対する不安を解消する目的で1988年に産婦人科と薬剤部が共同で「妊娠と薬相談外来」を開設し、催奇形情報の提供やカウンセリングを行っている。

この外来で薬剤師は、薬物の催奇形情報を収集・評価するとともに妊婦への催奇形情報の提供、危険度有無の解説、服薬指導を行い、産婦人科医とともにカウンセリングを行っている。また、この外来では、相談後の妊婦から出産結果の連絡を受け、妊婦服薬による胎児への影響に関して医療現場からの情報構築を行い、次世代妊婦への情報提供に活用している。

## 「妊娠と薬相談外来」の開設

当院では、1988年4月に産婦人科と薬剤部の共同で「妊娠と薬相談外来」を開設し、2005年9月末までに8,307人の妊婦の相談に応じており国内

最大規模の相談実績となっている。

胎児が薬物の影響を最も受けやすく催奇形性の観点から絶対過敏期とよばれる時期は、妊娠4週はじめから7週までの器官形成期である。この時期の胎児は極めて小さく、妊娠4～5週の段階では解像度の良い超音波検査機器を用いても胎児を確認することは難しい。超音波検査で胎嚢内の胎児像が確認されるのは妊娠6週からとされている。器官形成期の胎児の大きさ（胎児頭殿長、crown rump length : CRL）は、5～10mm程度とされており、服薬した妊婦の胎児に形態異常が生じているか否かすべてを画像で診断することは困難である。

したがって、妊娠初期の絶対過敏期に服薬した妊婦の不安に応じてカウンセリングを行うためには、薬物自体に催奇形性があるのか網羅的な医薬品情報調査を行い、これに基づいて危険度を評価するという科学的手法が必要になる。

外来開設前の1987年当時は、外来中の産婦人科医から薬物の催奇形に関する問い合わせが薬剤部医薬情報科に毎週のように寄せられていた。医薬情報科の薬剤師は、動物の生殖試験、妊婦使用薬剤と胎児異常に関する疫学調査、製薬企業の市販後調査の妊婦症例等を丹念に調査し情報提供していた。当時産婦人科の責任者であった佐藤孝道部長（現 聖路加国際病院女性総合診療部部长）から調査内容に対して高い評価をいただき、1988年

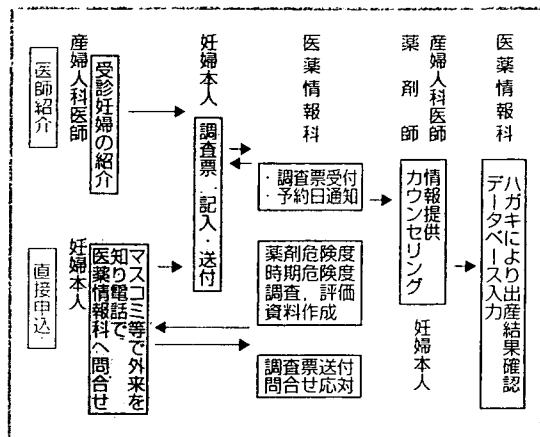


図1 「妊娠と薬相談外来」のシステム

1月に産婦人科と薬剤部の共同で運営する外来の開設に関する提案をいただいた。ただちに、薬物危険度の調査手順、危険度評価基準、記録様式を整えて、妊婦申し込み受付、予約管理、危険度情報に関する産婦人科医と薬剤師の協議方法等を整備して、3月には4月からの予約を受け付けた。

### 「妊娠と薬相談外来」の受診システム

当院の「妊娠と薬相談外来」を受診する妊婦は、99%が他施設で投薬を受け、出産を予定している妊婦である。妊娠中の服薬に関する胎児危険度に関する正しい情報を得る目的で来院される。

本相談外来を受診する妊婦の受診パターンは2通りある(図1)。一つは東京近郊の産婦人科クリニックや病院の産婦人科の医師からの紹介で受診するパターンである。もう一つはマスコミや妊婦向け雑誌、インターネット等で当院の「妊娠と薬相談外来」の存在を知り、妊婦本人が直接受診申し込みをするパターンである。

いずれにしても、薬剤部医薬情報科が窓口となり、受診手順・予約管理から、薬剤の催奇形性情報の調査・評価、産婦人科との事前打ち合わせを



図2 カウセリングの様子

行っている。

調査の出発点となる服薬状況の確認は、申込用紙にあたる「調査票」へ妊婦自身に記入してもらう方式としている。医薬情報科では、記載内容を確認し調査に必要な日数を見積もって予約日を伝えている。この後の、薬物の催奇形性情報の網羅的調査は、本相談外来の薬剤師が担う重要な役割の1点目といえる。

外来当日は産婦人科の診察室で産婦人科医と薬剤師が同席して(図2)カウンセリングを行っている。薬剤師は、使用した薬剤が胎児に及ぼす影響に関する情報と、その情報のもつ臨床的意味の評価に関する考え方を説明している。産婦人科医は、一人ひとりの妊娠の経過にあわせて、服薬した時期の危険度、自然の奇形発生率に関する説明を行っている。

この外来の目的は、妊娠中に服薬した薬物の胎児毒性(催奇形性)を心配し、無用な命の中断が発生することを防止することである。その意味で、胎児に有害作用や催奇形性がないと考えられる根拠をいかに平易で明快に情報提供し解説するかというリスクコミュニケーションは、本相談外来の薬剤師が担う重要な役割の2点目である。

また、本相談外来の特徴として、自由意思で協力が得られる妊婦から出産結果に関する情報を郵送形式で受け、妊婦服薬による胎児への影響に関する独自のデータベースを構築している。妊婦を

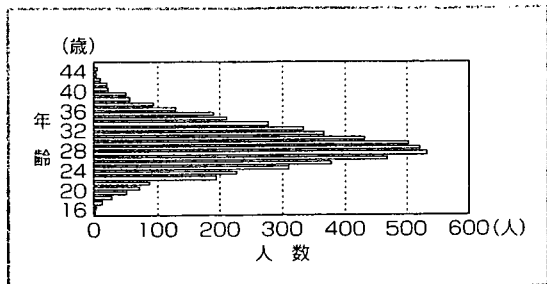


図3 受診妊婦の年齢分布

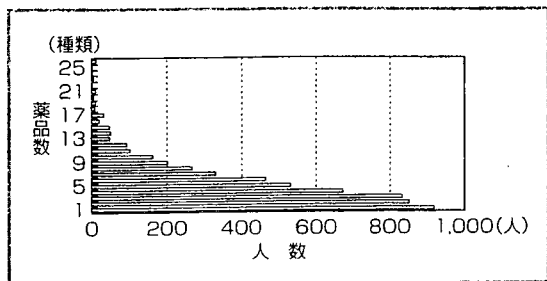


図4 妊婦が服用していた薬品数

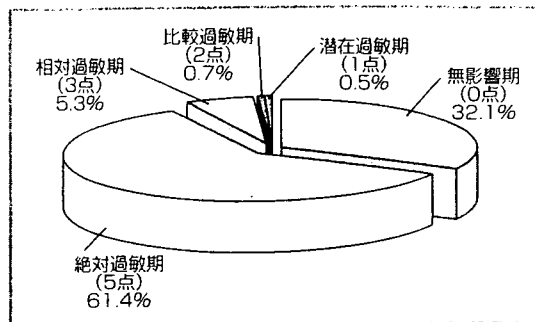


図5 薬剤の服用時期（妊娠中の相談例）

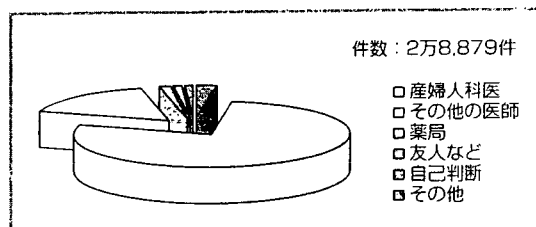


図6 妊婦服用薬剤の処方者

対象とした臨床試験は倫理的問題から行われなため、妊娠中の服薬と胎児への影響に関する医薬品情報は極めて少ない現状がある。相談外来の実践という胎児の命を救う取り組みが、次世代の服薬妊婦の胎児の命を救う情報構築にもなるという、本相談外来ならではの利点を生み出している。

この出産結果情報を、次回以降の相談妊婦に還元できるように、情報受理、整理、データ入力を薬剤師が行っており、本相談外来で担う重要な役割の3点目となっている。

### 「妊娠と薬相談外来」の現状

1988年4月～2001年3月の相談者の概要を紹介する。相談者の年齢は16～48歳で幅広く分布(図3)しているが、28～30歳が最も多い。妊婦が服用していた薬品数は、5種類以内が最も多い(図4)が最多は40種類であった。薬物療法は単

剤が基本だが、併用療法が少なくない現実を反映しているものと考えられた。また、薬局で購入する市販薬は1種であっても5～10種の成分を含有しており、これも服用薬品数増加の一因と考えられた。相談者が薬品を服用していた時期は、絶対過敏期が61.4%と多いが無影響期の服用薬も32.1%(図5)ある。胎児が薬物の影響を最も受けやすく催奇形性の観点から絶対過敏期とよばれる器官形成期は、妊娠4週はじめからの時期で次の月経が始まる時期に相当する。月経の周期は必ずしも一定でないことがあり妊娠に気付きにくいという問題があり、危険度の高い時期の服薬が多い原因と考えられた。妊婦が服用していた薬剤の処方者は、内科、耳鼻咽喉科等の産婦人科以外の医師が最も多く、薬局で購入した薬剤を服用していた妊婦がこれに次いで多かった(図6)。産婦人科医は妊娠可能な年齢の女性に処方する際は妊娠の有無を確認することが常識になっているが、薬局で医薬品を販売する際にも同様の注意が必要

表 1 相談頻度の高い薬剤

順位	薬効名称	使用件数	順位	薬効名称	使用件数
1位	解熱消炎鎮痛剤	3,392	11位	酵素製剤	842
2位	総合感冒剤	2,106	12位	気管支拡張剤	802
3位	消化性潰瘍用剤	1,906	13位	その他の消化器用剤	796
4位	抗生物質 (CS, PC系)	1,894	14位	ビタミン剤	770
5位	催眠鎮静剤, 抗不安剤	1,067	15位	健胃消化剤	767
6位	精神神経用剤	953	16位	ニューキノロン系抗菌薬	705
7位	その他のアレルギー用薬	938	17位	止しゃ剤, 整腸剤	675
8位	漢方製剤	913	18位	鎮咳去痰剤	630
9位	鎮咳剤	873	19位	去痰剤	580
9位	抗ヒスタミン剤	873	20位	副腎ホルモン剤	513

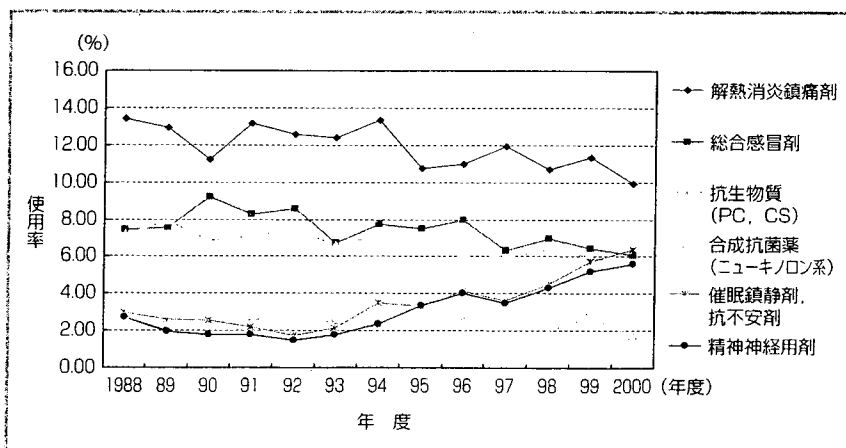


図 7 薬効群別の相談頻度の推移

なことを示唆している。

相談の多い医薬品を薬効で分類し、表 1 にまとめた。妊婦が服用した医薬品として、頭痛、発熱等で用いる解熱消炎鎮痛薬や感冒用薬、花粉症等で処方される抗ヒスタミン薬、抗アレルギー薬等が上位品目としてなっている。また、ストレス社会を反映してか精神神経用薬、SSRIやベンゾジアゼピン系の抗不安薬が上位品目となっている。一方、制吐剤、H<sub>2</sub>受容体拮抗薬、プロトンポンプ阻害薬等の消化器系薬が多いことは、妊娠に気付かず処方される例を含めて注意が必要と考えられる。また、年度推移として主な薬効群の相談頻度

推移をみると、解熱消炎鎮痛薬が減少傾向を示し、精神神経用薬、SSRIやベンゾジアゼピン系の抗不安薬が増加しており(図7)、注意が必要と考えられる。

### 「妊娠と薬相談外来」における危険度評価<sup>1)</sup>

#### 1. 薬物自体の危険度評価

わが国では、妊娠期の薬物投与に関する危険度の公的評価として、厚生省薬務局長通知(薬発第607号)に基づく医療用医薬品添付文書の使用上

表 2 薬物催奇形危険度評価点

5点	・疫学調査で催奇形があると確定的に考えられている。 ・または、生殖試験の結果、ヒトにも催奇形があると確定的に考えられている。
4点	・疫学調査で催奇形を示唆する報告がある、または否定と肯定報告があり、どちらかといえば肯定的。 ・または、疫学調査は行われていない、および催奇形に関する信頼性の高い症例報告が複数ある。
3点	・疫学調査で催奇形を示唆する報告と否定的報告があり、どちらかといえば否定的。 ・または、疫学調査は行われていないが、催奇形の症例報告がある、または否定と肯定の報告があり優劣がつけがたい。
2点	・疫学調査は行われていない、およびヒトでの催奇形を肯定する症例報告はない。 しかし、生殖試験で催奇形の報告がある、または否定と肯定の報告があり優劣がつけがたい。
1点	・疫学調査は行われていない、および催奇形を肯定する症例報告はない。 および生殖試験は行われていないか、または催奇形は認められていない。 ・または、局所に使用するものおよび漢方薬。
0点	・疫学調査で催奇形の傾向はない、および催奇形を肯定する症例報告はない。 および生殖試験は行われていないか、催奇形は認められていない。 ・または、食品としても使用されているもの。

の注意、妊婦、産婦、授乳婦への投与の項の記載がある。

妊婦、産婦、授乳婦に注意する必要がある場合や、適正使用に関する情報がある場合に、必要な注意を記載することとなっている。また、動物実験、臨床使用経験、疫学的調査等で得られている情報に基づき必要な事項を記載するよう定められている。

添付文書の措置に「投与しないこと」、「投与しないことが望ましい」と記載された薬剤は、妊婦には処方しないことが原則である。したがって、合併症を有する女性が妊娠を希望する際のカウンセリングでは、妊婦禁忌であること、ならびにその理由を説明しあらかじめ主治医と協議するよう指導する。

一方、妊娠に気付かず投与してしまい催奇形の危険度や妊娠継続の可否を問われた場合には、この記載は必ずしも参考にはならない。これは、対応する理由が「催奇形性を疑う症例のある」ものから「妊娠中の投与に関する安全性が確立していない」ものまで含まれており「投与しないこと」と記載された薬剤のすべてに催奇形性があるわけ

ではないためである。

この他、米国ではFDAによって胎児に対する薬剤の危険度を分類する基準が示されている。この「FDA Pregnancy Category：薬剤胎児危険度分類基準」は、カテゴリ-A, B, C, D, Xの5段階で「ほぼ安全」なAから「禁忌」に相当するXまで、順次危険度が増大する評価基準となっている。動物の生殖試験、ヒトの催奇形情報をもとに、薬剤の危険度をランク付けする条件が具体的に示されており、臨床の薬物治療においても参考になる。ただし、分類基準はFDAのものであっても、その割り付けが製薬企業の立場を反映して行われている以上、わが国の添付文書と同様なばらつきがみられることがあり注意が必要となる。

そこで、本院の「妊娠と薬相談外来」では、薬剤の危険度を標準化して評価するために表2に示した「薬物催奇形危険度評価点」を定めて、疫学調査、症例報告、生殖試験の順で情報に重み付けした危険度評価をしている。

## 2. 服薬時期の危険度評価

妊娠期間中の薬剤の服用が胎児に影響を及ぼす

表3 服薬時期の催奇形危険度評価点

最終月経開始日からの日数		評価点
0日～ 27日	無影響期	0点
28日～ 50日	絶対過敏期	5点
51日～ 84日	相対過敏期	3点
85日～112日	比較過敏期	2点
113日～ 出産日まで	潜在過敏期	1点

かどうかは、前述の薬物の危険度とともに服薬時期が大きな要因となる。

催奇形の観点から最も危険な時期は、胎児の中枢神経や、心臓、消化器、四肢等の臓器や器官が発生、分化する時期にあたる妊娠4週目～7週目までの期間と評価している。当院では、この期間を、催奇形性に関して薬剤に最も敏感な「絶対過敏期」として服用時期の危険度を5点とし、以下「服薬時期の催奇形危険度評価点」(表3)にしたがって、相対過敏期3点、比較過敏期2点、潜在過敏期1点、無影響期0点と5段階に分類している。

### 3. 催奇形危険度の総合評価

妊娠中に使用した薬物が胎児に及ぼす影響は、薬物自体の危険度と服薬時期の危険度によって左右される。最も危険な5点に位置付けられる薬物でも、無影響期である最終月経開始日の0～27日目の間に服薬したのであれば、影響があったとすれば妊娠が成立しない。一方、妊娠が成立していれば胎児に影響はなかったものと考えられる。逆に、最も危険な絶対過敏期であっても、服用した薬物が食物やお茶等に含まれている程度の量のビタミンや乳酸菌等であれば、その危険度は考慮する必要はないものと評価できる。

当院では、下記の式によって薬物の危険度点数と服薬時期の危険度点数を乗じた点数を算出し、それを胎児危険度点数として、0～6点は「影響なし」、7～11点は「注意」、12～19点は「警戒」、20～25点は「危険」の4段階に分け評価している。

表4 総合判定別出産結果

(全相談人数5,694人中結果連絡者4,507人)

総合判定*	影響なし (無影響)	ますなし (注意)	可能性あり (警戒)	危険	その他	計
相談人数	4,475	1,024	166	12	17	5,694
結果連絡	3,687	737	74	5	4	4,507
奇形なし	3,442	679	62	4	3	4,190
奇形あり	83	13	1	0	1	98
死産・流産・その他	162	45	11	1	0	219

\*：総合得点判定と患者への説明

総合得点	判定	患者への説明
0～6	無影響	薬剤による胎児への催奇形性は、まったく考えられない。胎児に奇形が起こる確率は薬剤を服用しなかった人とまったく同じである。
7～11	注意	薬剤による胎児への催奇形性は、皆無とはいえない。しかし、胎児に奇形がある確率は薬剤を服用しなかった人と同じかそれとほとんど差はない。薬剤が市販後間もない新薬であったり、ヒトでは否定的であるが一部の動物実験で催奇形作用が報告されているために安全といいきれないだけで、まず安全と考えられる。
12～19	警戒	胎児への催奇形性の可能性はあるが危険性は低い。薬剤を服用していない場合に胎児に奇形がある確率を1%とすると、この危険性が2～3%程度になるかもしれない。専門家は人工妊娠中絶を考慮する対象になるとは考えない。
20～25	危険	薬剤の服用によって胎児に奇形がある可能性は服用しなかった場合と比較して明らかに増加する。これを理由に人工妊娠中絶が行われたとしても、一部の専門家はその判断が根拠のないものとは考えない。

【胎児危険度算出式】

$$\text{胎児危険度点数} = \text{薬物自体の危険度点数} \times \text{服薬時期の危険度点数}$$

この総合点は、複数の職種間、複数のスタッフ間で胎児危険度を標準化して共有する際に有用だが、薬物危険度を規定する疫学調査、ヒト症例報告の情報量、催奇形確率の増加度、疫学調査の種別による信頼度を厳密に反映したものではない。実際に妊婦カウンセリングや催奇形情報の提供を行う際には、根拠情報一つひとつを薬剤師、医師が確認して対処する必要がある点に十分ご留意いただきたい。

### 妊婦服薬カウンセリングの留意点

「妊娠と薬相談外来」では、薬物の催奇形情報に関する情報提供を行ったうえで、危険度の評価を共有できるようにカウンセリングを行っている。

日本産婦人科医会の統計によれば、薬物を服用していない健常妊婦であっても、およそ1%の出生児に何らかの外表奇形が生じていたことが報告されている。その後わかる内臓の奇形等も含めると、少なくとも2~3%の出生児に何らかの先天的な異常が生じていると考えられている。このことは、薬物自体に催奇形性がなかったとしても、妊婦への投薬を行うかぎり、処方例の出生児に偶発的な異常が生じうることを意味している。実際に本相談外来の出産結果の集計でも、全体で23%に奇形が認められており、無影響と判定した妊婦であっても2.4%に奇形が生じている(表4)。したがって、妊婦が自然の奇形発生率を正しく理解したうえで服薬していないと、薬物や医療機関への不信任を生じるおそれがある。一方、先天異常

の自然発生を強調しすぎると、薬物に危険性がない場合であっても、催奇形性に対する不安を解消することができなくなる。このため、妊婦に胎児への危険度を説明する際には、まず自然の奇形発生率について理解できるよう指導し、この奇形発生率を薬物が増加させるか否かという観点から、客観的な指導を行うよう心がけている。

### 相談事例の解析

わが国では、妊婦の薬物曝露情報やその出産結果は、製薬企業の市販後調査等の形で調査されているが、海外のように曝露例を登録する大規模なシステムはない。

冒頭で紹介したように、本相談外来では出産結果を郵送で確認する方式をとっており、8,000例を超える妊婦服薬例とその出産結果に関する情報が蓄積している。相談外来を受診する妊婦へ情報として提供し還元することはもとより、医学・薬学情報としても適正使用に必要な情報を社会にフィードバックする必要があると考えている。昨年度、厚生労働科学研究の一部として解析した結果から相談事例の多い2薬剤について概要を紹介する。

国内で繁用されており、妊娠と気付かずに服薬する妊婦が少なくない解熱消炎鎮痛薬のロキソプロフェンナトリウムは、欧米では発売されている国が少なく妊婦使用に関する薬剤疫学データは極めて少ない。ベンゾジアゼピン系の抗不安薬エチゾラムも国内で繁用されており、妊娠と気付かずに服用する妊婦が少なくないが、国際的な調査を行っても妊婦服薬例の児に関する情報は極めて少ない。

#### 1. ロキソプロフェンナトリウム

絶対過敏期にロキソプロフェンナトリウムを服



用し、出産結果の確認できた相談事例は226人であった。

#### (1) 服用妊婦の年齢分布

相談者の年齢は、19～44歳の範囲で、24～34歳を中心として分布していた。

#### (2) 服用目的

服用目的は、感冒が86人と最も多く、歯痛が13人、抜歯痛13人、外傷痛12人、腰痛12人、頭痛11人、インフルエンザ10人がこれに次いでいた。

#### (3) 絶対過敏期の服用日数

絶対過敏期の服用日数は、1～6日間が多く、1日が43人、2日間が29人、3日間が39人、4日間が20人、5日間が19人、6日間が15人であった。

一方、1週間以上の服用例が61人いた。

#### (4) 併用薬剤数

単剤で服用していたのは1人のみで、併用薬を1剤使用が9人、2剤が21人、3剤が30人、4剤が17人、5剤が28人、6剤が20人、7剤が21人、8剤が18人、9剤が16人であった。10剤以上を併用していた者が45人いた。

#### (5) 奇形の発現数

226人中奇形の認められた新生児は6人でわが国における一般的な自然奇形発生率と大きな違いは認められなかった。また、6人に認められた奇形に一定の傾向は認められなかった。

## 2. エチゾラム

絶対過敏期にエチゾラムを服用し、出産結果の確認できた相談事例は130人であった。

#### (1) 服用妊婦の年齢分布

相談者の年齢は、21～43歳の範囲で、24～36歳を中心として分布していた。

#### (2) 服用目的

服用目的は、不安神経症が35人と最も多く、うつ病23人、不眠18人、パニック障害11人、頭痛5人がこれに次いでいた。

#### (3) 絶対過敏期の服用日数

妊娠前より服用しており妊娠確認後も継続服薬例が39人と多かった。

一方、妊娠が判明して休薬する者もあり、絶対過敏期の服用日数は、1日が12人、2日間が4人、3日間が4人、4日間が6人、5日間が5人、6日間が3人、7日間が6人、8日間が7人、9日間が5人であった。10～22日間の服用例は39人いた。

#### (4) 併用薬剤数

単剤で服用していたのは11人のみで、併用薬を1剤使用が15人、2剤が18人、3剤が20人、4剤が13人、5剤が16人、6剤が9人、7剤が5人、8剤が6人、9剤が5人であった。

#### (5) 奇形の発現数

130人中奇形の認められた新生児は2人で、わが国における一般的な自然奇形発生率と大きな違いは認められなかった。また、2人に認められた奇形に共通性は認められなかった。

## おわりに

妊娠中の薬物療法では、母体を治療するうえでの必要性を満たし胎児への影響の少ない薬剤の選択が原則となる。医療者側が十分に配慮した薬物療法を行っていても、薬物の催奇形性に対する認識は一般の妊婦にも浸透しており、むしろ過剰な不安を抱く傾向がある。このため、妊娠中の薬物療法では、妊婦自身が薬物の必要性和安全性を理解できるよう情報提供するとともに、リスク評価を平易に解説し不必要な不安を取り除く必要がある。治療を成功に導くには妊婦自身の理解が必要であり、積極的に治療に参加できるよう指導する必要がある。

妊婦を対象とした臨床試験は倫理的な問題から現実的ではないため、妊婦と胎児に関する投薬の

安全性情報は、医薬品情報のなかでも最も得にくい情報となっている。これはEBMの時代になっても、にわかには変わるとは考えにくい。したがって、徹底的に情報を調査し、得られた情報を科学的に吟味したうえで総合的に評価する手法が重要になる。

今後、わが国における妊婦、胎児安全性情報の収集、評価、提供システムの整備が期待されており、昨年10月、成育医療センターに「妊娠と薬情報センター」が開設された。欧米では催奇形性情

報の提供と出産結果の解析を多施設共同で行う、OTIS (Organisation of Teratology Information Specialists) やENTIS (European Network of Teratology Information Services) 等の組織がある。わが国においても拠点病院の連携による妊婦服薬相談体制と出産結果収集システムの構築が必要であり、こうした時代の要請に当院の「妊娠と薬相談外来」としても取り組んでいく必要があると考えている。

---

#### 引用文献

- 1) 佐藤孝道, 他・編著: 妊娠と薬, じほう, 1992

## 特集

# ねらい 妊娠とくすり

サリドマイドをはじめとして、妊娠中に使用した場合に胎児奇形を起こす薬剤がある。また、ソルフェリンのように奇形を起こすというよりもその毒性が問題になる薬剤もある。DESのように出生した児が15～25歳になって、膣や子宮頸部に明細胞癌を起こすようなきわめて遅延性のものもある。妊娠とくすりは、産婦人科医にとって重要な知識であり、初期研修で他科に進む医師に産婦人科医が責任を持って教育すべき事項である。

妊娠中や授乳期にできるだけ薬剤を使用しないことは一般には正しい。しかし、内科合併症のために用いられる薬剤には妊娠継続のために必須な薬剤も少なくない。また、妊娠を希望しているという理由で、必要な薬剤の処方を受けられない女性も存在する。内科医などに無影響期や絶対過敏期などの知識がないために、必要以上に性成熟期の女性に対して処方が避けられる実態がある。また、一方で、妊娠初期の絶対過敏期に本来禁忌の薬剤が、妊娠と知らずに（医師が妊娠と診断できずに）処方されることも決して少なくはない（幸い、産婦人科医には少ないようであるが）。

われわれ産婦人科医は「他科で処方された薬剤や市販薬を妊娠初期に服用したが大丈夫か」という質問をよく受ける。場合によっては、それを理由に妊娠中絶まで考える女性もいる。容易に回答できる場合もあるが、そうでない例もある。その場合には「妊娠と薬相談室」などという専門外来を開いている病院が近くにあると助かるものである。首都圏では虎の門病院や聖路加国際病院がその役割を担ってくれていたが、平成17年度からはナショナルセンターである国立成育医療センターがこの事業に本格的に取り組み始めた。モデルはカナダのトロント病院である。

わが国の薬剤添付文書では、FDA分類やオーストラリア分類に比べ、禁忌が多い傾向にあり、妊娠中の薬剤の使用制限は厳しすぎるといわれている。また、わが国でのみ販売されている薬剤も少なくない。そこで、添付文書をより適正なものにする試みも始まっている。FDA分類、オーストラリア分類、BriggsのDrugs in Pregnancy & Lactationが比較的によく利用されているようだが、やはり、わが国で最新データに基づくデータベースを作成し、適正な対応ができるシステムをつくることが求められ、国立成育医療センターを中心とした事業が始まっている。本稿では、この事業とわが国でのリスク分類の作成に努力しているメンバーを中心に、妊娠とくすりの基本的知識の整理と新たな事業の紹介をしようことにした。

（筑波大学臨床医学系産科婦人科 吉川裕之）

# Early Pregnancy Failure Induced by Dibutyltin Dichloride in Mice

Makoto Ema,<sup>1</sup> Sakiko Fujii,<sup>2</sup> Tsuguo Ikka,<sup>2</sup> Mariko Matsumoto,<sup>1</sup> Akihiko Hirose,<sup>1</sup> Eiichi Kamata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Risk Assessment, Biological Safety Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo 185-8501, Japan

<sup>2</sup>Safety Research Institute for Chemical Compounds, Co., Ltd., Sapporo 004-0839, Japan

Received 27 June 2006; revised 14 August 2006; accepted 1 September 2006

**ABSTRACT:** In this study, we examined the adverse effects of dibutyltin on initiation and maintenance of pregnancy after maternal administration during early pregnancy in mice. Following successful mating, female ICR mice were given dibutyltin dichloride (DBTCl) at 0, 7.6, 15.2, or 30.4 mg/kg bw/day by gastric intubation on days 0–3 or days 4–7 of pregnancy. Female mice were sacrificed on day 18 of pregnancy, and the pregnancy outcome was determined. After administration of DBTCl on days 0–3, the rate of non-pregnant females and the incidence of preimplantation embryonic loss were significantly increased at 30.4 mg/kg bw/day. The incidences of postimplantation embryonic loss in females given DBTCl on days 0–3 at 15.2 mg/kg and higher and on days 4–7 at 7.6 mg/kg bw/day and higher were increased. No increase in the incidence of fetuses with external malformations was observed after the administration of DBTCl on days 0–3 or days 4–7. A decline in the serum progesterone levels was detected in mice given DBTCl at 30.4 mg/kg bw/day on days 0–3 or days 4–7 of pregnancy. The data show that DBTCl adversely affects the initiation and maintenance of pregnancy when administered during early pregnancy in mice and suggest that the decline in serum progesterone levels is responsible for pregnancy failure. © 2007 Wiley Periodicals, Inc. *Environ Toxicol* 22: 44–52, 2007.

**Keywords:** dibutyltin dichloride; organotin; pregnancy failure; early embryonic loss; progesterone

## INTRODUCTION

Organotin compounds are chemicals widely used in agriculture and industry. Disubstituted organotin compounds are commercially the most important derivatives, being used as heat and light stabilizers for polyvinyl chloride (PVC) plastics to prevent degradation of the polymer during the melting and forming of the resin into its final products, as catalysts in the production of polyurethane foams, and as vulcanizing agents for silicone rubbers (Piver, 1973; WHO, 1980). Wide-spread use of organotin compounds has caused increasing amounts to be released into environment.

Correspondence to: M. Ema; e-mail: ema@nihs.go.jp

Contract grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/tox.20232

© 2007 Wiley Periodicals, Inc.

44

The most important route of entry of organotin compounds as nonpesticides into the environment is through the leaching of organotin-stabilized PVC by water (Quevauviller et al., 1991), and its use in antifouling agents resulting in the entry of organotin into the aquatic environment (Maguire, 1991). The identification of dibutyltin (DBT) and tributyltin (TBT) in aquatic marine organisms (Sasaki et al., 1988; Lau, 1991) and marine products (Suzuki et al., 1992) has been reported. TBT is degraded spontaneously and biochemically via a debutylation pathway to DBT in the environment (Seligman et al., 1988; Stewart and de Mora, 1990). Food chain bioaccumulation of butyltin in oysters (Waldock and Thain, 1983), mud crabs (Evans and Laughlin, 1984), marine mussels (Laughlin et al., 1986), Chinook salmon (Short and Thrower, 1986), and dolphin, tuna, and shark (Kannan et al., 1996) has been reported. These findings indicate that butyltins accumulate in the

WILEY  
InterScience

food chain and are bioconcentrated, and that humans can be exposed to butyltins via food.

Organotins possess toxic effects on reproduction and development in experimental animals (Ema and Hirose, 2006). We previously reported that dibutyltin dichloride (DBTCl) by gavage throughout the period of organogenesis resulted in a significant increase in the incidence of fetal malformations in rats (Ema et al., 1991) and that rat embryos were highly susceptible to the teratogenic effects of DBTCl when administered on day 7 and day 8 of pregnancy (Ema et al., 1992). Tetrabutyltin (TeBT) is metabolized to TBT, DBT, and monobutyltin (MBT) derivatives (Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977). The TBT compound is metabolized to DBT and MBT derivatives and DBT is metabolized to MBT derivatives (Iwai et al., 1981). The developmental toxicity studies on butyltins suggest that the teratogenicity of DBT is different from those of TeBT, TBT, and MBT in its mode of action, because the susceptible period for teratogenicity and types of malformations induced by DBT are different from those induced by TeBT, TBT, and MBT (Ema et al., 1995, 1996). Tributyltin chloride (TBTCl) (Harazono et al., 1996, 1998ab) and DBTCl (Ema and Harazono, 2000ab) during early pregnancy produced pregnancy failure in rats. In rats, the predominant adverse effects on reproduction and development of TBTCl and DBTCl on days 0–3 of pregnancy were a decrease in the pregnancy rate and an increase in the incidence of preimplantation embryonic loss, and TBTCl and DBTCl on days 4–7 of pregnancy mainly caused postimplantation embryonic loss (Harazono et al., 1998b; Ema and Harazono, 2000ab). The doses of DBTCl that caused early embryonic loss were lower than those of TBTCl (Ema and Harazono, 2000b). Thus, the possibility exists that DBTCl and/or metabolites participate in the induction of early embryonic loss due to TBTCl.

The reproductive and developmental effects of organotin compounds, including DBT, were extensively investigated in rats (Ema and Hirose, 2006). We are unaware of any studies in which the adverse effects of DBT on initiation and maintenance of pregnancy have been assessed in mice. Studies in mice would be of great value in evaluating the reproductive and developmental toxicity of DBT. The present study was therefore conducted to determine the adverse effects on the initiation and maintenance of pregnancy of maternal exposure to DBTCl during early pregnancy in mice.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal Husbandry and Maintenance

Male and female Crlj:CD1(ICR) mice at 8 weeks of age were purchased from Atsugi Breeding Center, Charles River Japan, (Yokohama, Japan). The mice were acclimat-

ized to the laboratory for 11 days prior to the start of the experiment. Male and female mice found to be in good health were selected for use. Female mice were caged with male mice and checked the following morning for signs of successful mating by examining vaginal plugs. The day when vaginal plugs were detected was considered to be day 0 of pregnancy. Successfully mated females were distributed into eight groups of 12 mice each and housed individually. Animals were reared on a  $\gamma$ -irradiated basal diet (CRF-1; Oriental Yeast, Tokyo, Japan) and filtered tap water *ad libitum*, and maintained in an air-conditioned room at  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , with a relative humidity of  $50\% \pm 20\%$ , under a controlled 12 h light/dark cycle, and ventilation with 10–15 air changes/hour. This study was performed in 2005 at the Safety Research Institute for Chemical Compounds. (Sapporo, Japan) in compliance with the "Law for the Humane Treatment and Management of Animals" (Ministry of the Environment, Japan, 1973), "Standards Relating to the Care and Management, etc. of Experimental Animals" (Prime Minister's Office, Japan, 1980) and "Guidance for Animal Care and Use of the Safety Research Institute for Chemical Compounds, Co."

### Chemicals and Dosing

DBTCl was purchased from Tokyo Kasei Kogyo (Tokyo, Japan). The DBTCl used in this study was 99.5% pure, and it was kept in a dark and cool place. DBTCl was dissolved in olive oil (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). The female mice were dosed once daily by gastric intubation with DBTCl at a dose of 7.6, 15.2, or 30.4 mg/kg bw (25, 50 or 100  $\mu\text{mol/kg}$  bw) on days 0–3 of pregnancy or on days 4–7 of pregnancy. The dosage levels were determined based on the results of our previous studies, in which increases in the incidence of pre- and postimplantation embryonic loss were caused in female rats gavaged with DBTCl at 7.6 mg/kg bw/day and higher on days 0–3 and days 4–7 of pregnancy, respectively (Ema and Harazono, 2000ab) and our dose-finding study in which no adverse effects on embryonic survival at 15.2 mg/kg bw/day and lower, increased embryonic loss at 30.4 mg/kg bw/day, and one death and three pregnancy failure in four females at 60.8 mg/kg bw/day were found in mice gavaged with DBTCl on days 0–3 of pregnancy. The volume of each dose was adjusted to 5 mL/kg of body weight based on the daily body weight. The control mice received olive oil only on days 0–3 or days 4–7 of pregnancy. All DBTCl solutions were prepared fresh daily.

### Observations

All mice were observed for clinical signs of toxicity twice a day during the administration period and daily during the nonadministration period. Females showing a moribund condition were euthanized under ether anesthesia. Maternal

**TABLE I. Maternal findings in mice given DBTCI by gastric intubation on days 0–3 of pregnancy**

DBTCI (mg/kg)	0 (control)	7.6	15.2	30.4
No. of females successfully mated	12	12	12	12
No. of females showing clinical signs				
Dead	0	1	0	0
Moribund condition (euthanized)	0	1	1	1
Vaginal discharge	0	1	0	0
Jaundice	0	2	7*	10*
Decreased locomotor activity	0	2	1	1
Hypothermia	0	1	1	1
Soil of perigenital fur	0	0	1	0
Initial body weight (g) <sup>a</sup>	27.4 ± 2.0	27.2 ± 2.1	27.2 ± 2.4	27.2 ± 2.1
Body weight gain (g) <sup>a</sup>				
Days 0–4	1.7 ± 1.1	0.6 ± 1.2	1.2 ± 1.6	0.3 ± 0.9*
Days 4–8	2.9 ± 1.5	2.5 ± 2.6	2.1 ± 2.0	1.6 ± 1.5
Days 8–18	20.1 ± 9.1	21.3 ± 12.4	13.6 ± 12.2	8.6 ± 12.2
Adjusted weight gain <sup>b</sup>	8.9 ± 3.4	9.9 ± 3.8	7.9 ± 4.8	5.3 ± 5.0
Food consumption (g) <sup>a</sup>				
Days 0–4	18.2 ± 1.8	15.0 ± 1.9*	16.7 ± 3.2	14.8 ± 2.3*
Days 4–8	22.9 ± 4.9	22.0 ± 2.7	21.7 ± 3.5	20.9 ± 3.5
Days 8–18	71.7 ± 10.1	71.0 ± 12.5	64.6 ± 13.3	57.8 ± 13.4*

<sup>a</sup> Values are given as mean ± SD.

<sup>b</sup> Adjusted weight gain refers to body weight gain excluding the uterus.

\* Significantly different from the control,  $P < 0.05$ .

body weight was recorded daily, and food consumption was recorded on days 0, 4, 8, 12, and 18 of pregnancy. The females were euthanized by exsanguination under ether anesthesia on day 18 of pregnancy. The uterus was weighed and the number of corpora lutea was recorded. The numbers of implantations, live and dead fetuses, and of resorptions were counted. The uteri were placed in 10% ammonium sulfide for confirmation of the dam's pregnancy status (Salewski, 1964). The live fetuses removed from the uterus were sexed, weighed, and inspected for external malformations and malformations within the oral cavity. The placental weight was also measured.

### Analysis of Serum Steroids Hormone Levels

Blood samples were collected from the abdominal aorta under ether anesthesia on day 4 or day 8 of pregnancy, 24 h after the last administration of DBTCI at 0 or 30.4 mg/kg bw/day on days 0–3 or days 4–7 of pregnancy. The serum was separated and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later assay of steroid hormones. Serum progesterone and  $17\beta$ -estradiol were measured by Teizo Medical (Kawasaki, Japan) using the liquid chromatography-electrospray ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS, Applied Biosystems/MDS SCIEX). The detection limits of serum progesterone and  $17\beta$ -estradiol were 10.0 and 0.25 pg/mL, respectively. The intra- and interassay coefficients of variation for  $17\beta$ -estradiol were below 6.4% and 8.9%, respectively. The intra- and interas-

say coefficients of variation for progesterone were below 9.0% and 7.9%, respectively.

### Statistical Analysis

The statistical analysis of fetuses was carried out using the litter as the experimental unit. Maternal body weight, body weight gain, adjusted weight gain, food consumption, numbers of corpora lutea, implantations, embryonic/fetal loss and live fetuses, fetal weight, and placental weight were analyzed for statistical significance as follows. Bartlett's test of homogeneity of variance was used to determine if the groups had equivalent variances at the 5% level of significance. If the variances were equivalent, the groups were compared by one-way analysis of variance. If significant differences were found, Dunnett's multiple comparison test was performed. If the groups were not equivalent, the Kruskal-Wallis test was used to assess the overall effects. Whenever significant differences were noted, pair-wise comparisons were made using the Mann-Whitney U test. The incidences of pre- and postimplantation embryonic loss and fetuses with external malformations were analyzed using Wilcoxon's rank sum test. The incidence of clinical signs in dams, pregnancy, nonpregnancy, and litters with fetal malformations, and the sex ratio of live fetuses were analyzed using Fisher's exact test. The levels of serum progesterone and  $17\beta$ -estradiol were analyzed by Student's  $t$ -test. The 0.05 level of probability was used as the criterion for significance.

**TABLE II. Reproductive and developmental findings in mice given DBTCl by gastric intubation on days 0–3 of pregnancy**

DBTCl (mg/kg)	0 (control)	7.6	15.2	30.4
No. of females successfully mated	12	12	12	12
No. of nonpregnant females	1	3	4	7*
No. of pregnant females	11	9	8	5*
No. of implantations per female <sup>a,b</sup>	9.5 ± 5.1	9.8 ± 7.1	8.3 ± 7.0	5.4 ± 6.7
Pre-implantation loss per female (%) <sup>a,b</sup>	9.7	29.7 <sup>c</sup>	34.0	58.3*
No. of pregnant females surviving until scheduled sacrifice	11	8	7	4
No. of litters totally resorbed	0	0	1	1
No. of corpora lutea per litter <sup>a,d</sup>	10.5 ± 4.3	13.1 ± 4.9	12.4 ± 4.4	13.3 ± 1.3
No. of implantations per litter <sup>a,d</sup>	10.4 ± 4.3	12.6 ± 4.9	12.3 ± 4.4	13.3 ± 1.3
Pre-implantation loss per litter (%) <sup>d,e</sup>	1.5	3.3	1.1	0
No. of post-implantation loss per litter <sup>a,d</sup>	1.0 ± 1.0	1.1 ± 1.5	4.1 ± 3.2	4.0 ± 5.4
Post-implantation loss per litter (%) <sup>d,f</sup>	10.1	14.1	41.3*	32.2
No. of live fetuses per litter <sup>a,d</sup>	9.4 ± 4.2	11.5 ± 5.3	8.1 ± 5.0	9.3 ± 6.2
Sex ratio of live fetuses (male / female)	50/53	47/45	30/27	21/16
Body weight of live fetuses (g) <sup>a</sup>				
Male	1.54 ± 0.19	1.30 ± 0.12*	1.14 ± 0.22*	1.12 ± 0.10*
Female	1.42 ± 0.15	1.28 ± 0.20	1.08 ± 0.26*	1.01 ± 0.11*
External examinations of fetuses				
No. of fetuses (litters) examined	103 (11)	92 (8)	57 (6)	37 (3)
No. of fetuses (litters) with anomalies	1 (1)	0	1 (1)	0
Cleft palate	1	0	1	0
Kinked tail	0	0	1	0
Placental weight (mg) <sup>a</sup>	125 ± 56	116 ± 15	120 ± 17	119 ± 16

<sup>a</sup> Values are given as mean ± SD.

<sup>b</sup> Values obtained from females successfully mated.

<sup>c</sup> Value obtained from 11 females, because corpora lutea were indistinguishable in one female.

<sup>d</sup> Values obtained from pregnant females surviving until scheduled sacrifice.

<sup>e</sup> [(No. of corpora lutea—no. of implantations)/no. of corpora lutea] × 100.

<sup>f</sup> [(No. of resorptions and dead fetuses/no. of implantations) × 100.

\* Significantly different from the control,  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Administration of DBTCl on Days 0–3 of Pregnancy

Table I shows the maternal findings in mice given DBTCl on days 0–3 of pregnancy. One death was observed at 7.6 mg/kg bw/day, and one female each showed a moribund condition at 7.6, 15.2, and 30.4 mg/kg bw/day, and was euthanized. The female mice in the DBTCl-treated groups showed vagina discharge, jaundice, decreased locomotor activity, hypothermia and/or soiled perigenital fur, and the incidence of females showing jaundice was significantly increased at 15.2 mg/kg bw/day and higher. A significantly decreased body weight gain on days 0–4 was noted at 30.4 mg/kg bw/day. Food consumption on days 0–4, days 4–8, and days 8–18 in the DBTCl-treated groups were reduced, and significantly decreased food consumptions on days 0–4 at 7.6 and 30.4 mg/kg bw/day and on days 8–18 at 30.4 mg/kg bw/day were observed.

The reproductive and developmental findings in mice given DBTCl on days 0–3 of pregnancy are shown in

Table II. The total absence of any implantation site, i.e., nonpregnancy, was found in one, three, four, and seven of the 12 females in the control, 7.6, 15.2, and 30.4 mg/kg bw/day groups, respectively. In the successfully mated females, the pregnancy rate was significantly decreased, and the incidence of preimplantation embryonic loss per females was significantly increased at 30.4 mg/kg bw/day. In the pregnant females that survived until the scheduled sacrifice, the number of corpora lutea per litter, implantations per litter, live fetuses per litter, the incidence of litters totally resorbed and of preimplantation loss per litter, and the sex ratio of live fetuses were not significantly different between the control and DBTCl-treated groups. The incidence of postimplantation loss per litter was increased in the DBTCl-treated groups, and a significant increase was observed at 15.2 mg/kg bw/day. A significantly lower fetal weight was found in males at 7.6 mg/kg bw/day and in both sexes at 15.2 and 30.4 mg/kg bw/day. One fetus with cleft palate in the control group and one fetus with a cleft palate and kinked tail in the 15.2 mg/kg bw/day group were observed. The placental weight in the DBTCl-treated

**TABLE III. Maternal findings in mice given DBTCl by gastric intubation on days 4–7 of pregnancy**

DBTCl (mg/kg)	0 (control)	7.6	15.2	30.4
No. of females successfully mated	12	12	12	12
No. of females showing clinical signs				
Dead	0	0	1	0
Moribund condition (euthanized)	0	0	0	1
Vaginal discharge	0	0	4	4
Jaundice	0	0	2	6*
Decreased locomotor activity	0	0	0	1
Hypothermia	0	0	0	1
Initial body weight (g) <sup>a</sup>	28.1 ± 1.8	28.1 ± 1.8	28.1 ± 1.8	28.2 ± 1.7
Body weight gain (g) <sup>a</sup>				
Days 0–4	1.6 ± 1.0	1.9 ± 0.8	1.2 ± 1.2	1.6 ± 0.9
Days 4–8	3.1 ± 1.1	1.9 ± 1.6	0.5 ± 1.8*	-0.3 ± 2.1*
Days 8–18	24.9 ± 9.1	14.9 ± 8.9*	2.9 ± 6.3*	2.4 ± 2.4*
Adjusted weight gain <sup>b</sup>	8.3 ± 3.5	8.1 ± 4.3	3.2 ± 5.3*	3.8 ± 3.2*
Food consumption (g) <sup>a</sup>				
Days 0–4	18.5 ± 1.9	18.9 ± 2.4	18.4 ± 2.7	18.8 ± 1.3
Days 4–8	21.8 ± 1.9	19.2 ± 2.6	16.4 ± 3.3*	15.6 ± 3.5*
Days 8–18	74.5 ± 12.1	67.7 ± 9.9	55.2 ± 12.6*	57.2 ± 6.2*

<sup>a</sup> Values are given as mean ± SD.

<sup>b</sup> Adjusted weight gain refers to body weight gain excluding the uterus.

\* Significantly different from the control,  $P < 0.05$ .

groups was not significantly different from that in the control group.

### Administration of DBTCl on Days 4–7 of Pregnancy

Table III shows the maternal findings in mice given DBTCl on days 4–7 of pregnancy. One death was observed at 15.2 mg/kg bw/day, and one female that showed a moribund condition at 30.4 mg/kg bw/day was euthanized. The female mice in the DBTCl-treated groups showed vaginal discharge, jaundice, decreased locomotor activity, and/or hypothermia, and the incidence of females with jaundice was significantly increased at 30.4 mg/kg bw/day. The body weight gain on days 4–8 and adjusted weight gain, which indicates the net weight gain of female mice, at 15.2 mg/kg bw/day and higher, and on days 8–18 at 7.6 mg/kg bw/day and higher were significantly decreased. Food consumption on days 4–8 and days 8–18 was significantly lowered at 15.2 mg/kg bw/day and higher.

The reproductive and developmental findings in mice given DBTCl on days 4–7 of pregnancy are presented in Table IV. Although nonpregnancy was found in one, two, and one of the 12 females in the control, 7.6, 15.2, and 30.4 mg/kg bw/day groups, respectively, no significant decrease in the pregnancy rate was noted in the DBTCl-treated groups. In the successfully mated females, the number of implantations per female was significantly decreased at 15.2 mg/kg bw/day. In the pregnant females that survived until the scheduled sacrifice, totally resorbed litters were found in 2 of the 11 females at 7.6 mg/kg bw/day, 8 of the 9 females at 15.2 mg/kg bw/day,

and 10 of the 10 females at 30.4 mg/kg bw/day. At 30.4 mg/kg bw/day, no live fetuses were obtained. The numbers of corpora lutea per litter, implantations per litter, and preimplantation loss per litter, and the sex ratio of live fetuses in the DBTCl-treated groups were not significantly different from those in the control group. A significant increase in the number and incidence of postimplantation loss per litter, and a decrease in the number of live fetuses were found in the DBTCl-treated groups. The weights of male and female fetuses were significantly lowered at 7.6 mg/kg bw/day. One fetus with omphalocele, and one fetus with exencephaly and open eyelids were observed at 7.6 mg/kg bw/day. The placental weight was not significantly different between the control and the DBTCl-treated groups.

### Serum Progesterone and 17 $\beta$ -Estradiol Levels

The serum progesterone and 17 $\beta$ -estradiol levels are shown in Figure 1. A significant reduction in the serum progesterone levels was noted in female mice given DBTCl on days 0–3 or days 4–7 of pregnancy. Although higher levels of serum 17 $\beta$ -estradiol were observed after the administration of DBTCl on days 4–7 of pregnancy, no statistically significant difference in 17 $\beta$ -estradiol levels were detected between the control and DBTCl-treated groups.

### DISCUSSION

The present study was designed to evaluate the adverse effects of DBTCl on the initiation and maintenance of



**TABLE IV. Reproductive and developmental findings in mice given DBTCl by gastric intubation on days 4–7 of pregnancy**

DBTCl (mg/kg)	0 (control)	7.6	15.2	30.4
No. of females successfully mated	12	12	12	12
No. of nonpregnant females	1	1	2	1
No. of pregnant females	11	11	10	11
No. of implantations per female <sup>a,b</sup>	12.6 ± 4.4	13.2 ± 4.6	7.5 ± 5.7*	11.1 ± 5.4
Pre-implantation loss per female (%) <sup>a,b</sup>	8.9	8.9	24.7	18.3 <sup>c</sup>
No. of pregnant females surviving until scheduled sacrifice	11	11	9	10
No. of litters totally resorbed	0	2	8*	10*
No. of corpora lutea per litter <sup>a,d</sup>	13.8 ± 2.1	14.5 ± 2.3	10.6 ± 5.2	13.9 ± 2.8
No. of implantations per litter <sup>a,d</sup>	13.7 ± 2.1	14.4 ± 2.2	9.4 ± 5.1	12.7 ± 4.1
Pre-implantation loss per litter (%) <sup>d,e</sup>	0.6	0.6	10.7	10.2
No. of postimplantation loss per litter <sup>a,d</sup>	0.6 ± 1.0	7.2 ± 6.1*	8.7 ± 4.8*	12.7 ± 4.1*
Post-implantation loss per litter (%) <sup>d,f</sup>	4.3	48.3*	94.4*	100*
No. of live fetuses per litter <sup>a,d</sup>	13.1 ± 2.0	7.2 ± 5.6*	0.8 ± 2.3*	0
Sex ratio of live fetuses (male/female)	82/62	50/29	4/3	
Body weight of live fetuses (g) <sup>a</sup>				
Male	1.45 ± 0.10	1.23 ± 0.10*	1.27	
Female	1.39 ± 0.10	1.18 ± 0.14*	1.18	
External examinations of fetuses				
No. of fetuses (litters) examined	144 (11)	79 (9)	7 (1)	
No. of fetuses (litters) with anomalies	0	2 (2)	0	
Omphalocele	0	1	0	
Exencephaly and open eyelids	0	1	0	
Placental weight (mg) <sup>a</sup>	102 ± 10	99 ± 12	114	

<sup>a</sup> Values are given as mean ± SD.

<sup>b</sup> Values obtained from females successfully mated.

<sup>c</sup> Value obtained from 11 females, because corpora lutea were indistinguishable in one female.

<sup>d</sup> Values obtained from pregnant females surviving until scheduled sacrifice.

<sup>e</sup> [(No. of corpora lutea—no. of implantations)/no. of corpora lutea] × 100.

<sup>f</sup> (No. of resorptions and dead fetuses/no. of implantations) × 100.

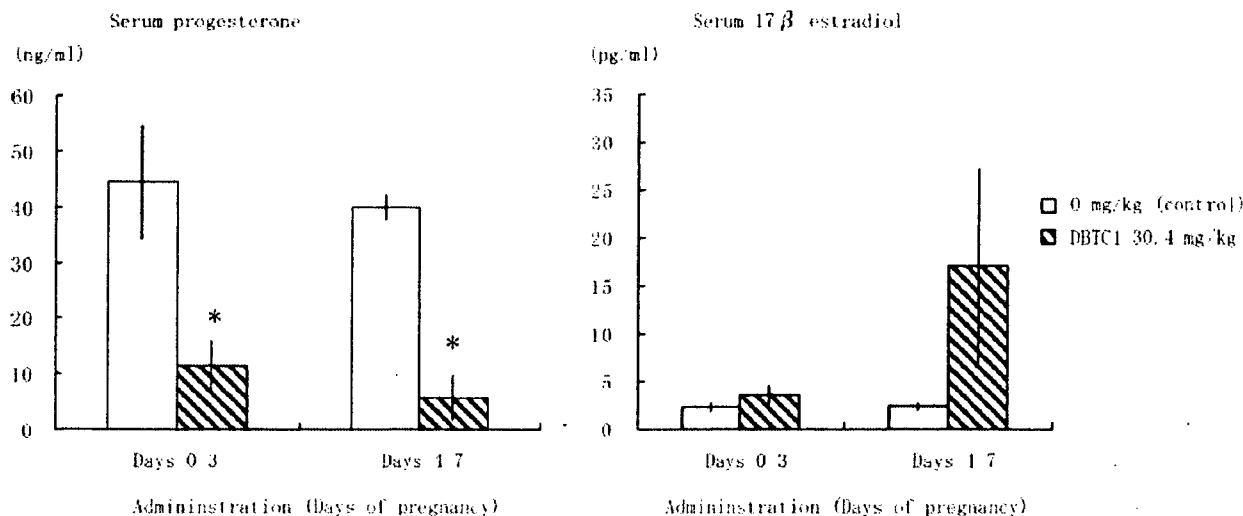
\* Significantly different from the control,  $P < 0.05$ .

pregnancy following maternal exposure during early pregnancy in mice. The most striking finding in the present study is pregnancy failure, decrease in the pregnancy rate, and litters totally resorbed, in females given DBTCl during early pregnancy.

Death and/or moribund condition were observed after the administration of DBTCl at 7.6 mg/kg bw/day and higher on days 0–3 of pregnancy and at 15.2 mg/kg bw/day and higher on days 4–7 of pregnancy, and significant increased incidence of females showing clinical signs of toxicity were found after the administration of DBTCl at 15.2 mg/kg bw/day and higher on days 0–3 of pregnancy and at 30.4 mg/kg bw/day on days 4–7 of pregnancy. These findings indicate that more severe general toxicity was induced by DBTCl on days 0–3 of pregnancy than that on days 4–7 of pregnancy. However, adverse effects on body weight gain were detected after the administration of DBTCl at 30.4 mg/kg bw/day on days 0–3 of pregnancy and at 7.6 mg/kg bw/day and higher on days 4–7 of pregnancy. Although the recovery of body weight gain was observed after the administration of DBTCl on days 0–3 of

pregnancy, recovery by the end of the study was not found in females given DBTCl at 7.6 mg/kg bw/day and higher after the administration on days 4–7 of pregnancy. Following the administration on days 4–7 of pregnancy, a significantly lower adjusted weight gain was also noted in females given DBTCl at 15.2 mg/kg/day and higher. These findings indicate that more severe adverse effects on body weight gain were induced by DBTCl on days 4–7 of pregnancy than that on days 0–3 of pregnancy. More severe effects of DBTCl on body weight gain following the administration on days 4–7 may be attributable to the significant decrease in the number of live fetuses.

The earlier administration period, days 0–3 of pregnancy, corresponds to the period before implantation, and the later administration period, days 4–7 of pregnancy, corresponds to the period when implantation is in progress and the period shortly after implantation in mice (Rugh, 1968). We expected that DBTCl insult on days 0–3 of pregnancy might result in preimplantation loss of embryos; i.e., the absence or decrease of implantation sites, and DBTCl insult on days 4–7 of pregnancy might result in postimplantation loss of embryos; i.e.,



**Fig. 1.** Serum progesterone and 17 $\beta$ -estradiol levels in female mice given DBTCI on days 0–3 or days 4–7 of pregnancy. Blood samples were collected on day 4 or day 8 of pregnancy, 24 h after the last administration of DBTCI. Values are given as the mean  $\pm$  SEM of seven or eight mice. \*Significantly different from the control group,  $P < 0.05$ .

the resorption of implantation sites. The most striking adverse effects of DBTCI on reproduction and development were a decrease in pregnancy rate, complete implantation failure, when DBTCI was given to mice on days 0–3 of pregnancy. The findings of an increased incidence of preimplantation embryonic loss in successfully mated females, and an increased incidence of postimplantation embryonic loss and low fetal weight in pregnant females survived until scheduled sacrifice after the administration of DBTCI on days 0–3 of pregnancy may suggest that DBTCI adversely affects preimplantation embryos and also the later survival and growth of embryos/fetuses when administered during the preimplantation period. On the other hand, the predominant adverse effects of DBTCI on reproduction and development were postimplantation loss, complete litter loss, when DBTCI was given to mice on days 4–7 of pregnancy. The findings of an increase in the incidence of postimplantation embryonic loss and a decrease in the fetal weight after administration of DBTCI on days 4–7 of pregnancy may suggest that DBTCI has effects on the later survival and growth of embryos/fetuses when administered during the peri-implantation period. Considered collectively, these findings indicate that the manifestation of adverse effects of DBTCI on reproduction and development varies with the stages of pregnancy at the time of maternal exposure.

The corpora lutea are essential up to the end of pregnancy in mice (Deansely, 1966). The embryo transport process in mice is triggered by progesterone and requires progesterone activity for its maintenance (Kendle and Lee, 1980). In mice, 24 h of progesterone priming is not only adequate for implantation, but this priming has a long-term effect on implantation

(Huet-Hudson and Dey, 1990). In our previous studies in rats, increases in the incidences of early embryonic loss were observed after the administration of DBTCI during early pregnancy (Ema and Harazono, 2000ab). The suppression of uterine decidualization and reduced levels of serum progesterone were found in female rats given DBTCI on days 0–3 or days 4–7 of pseudopregnancy (Harazono and Ema, 2003), and lowered reproductive parameters in female rats given DBTCI were recovered by the administration of progesterone (Ema et al., 2003). Based on these findings, we hypothesized that the decline in serum progesterone levels in pregnant animals was a primary mechanism for the implantation failure due to DBTCI in rats. In the present study in mice, a decline in serum progesterone levels was detected after the administration of DBTCI during early pregnancy. These findings are in good agreement with previous findings that DBTCI induced early embryonic loss and decreased serum progesterone levels in pregnant rats. There is a similarity in the effects of DBTCI on progesterone levels in early pregnancy in rats and mice, and these suggest that the decline in the serum progesterone levels is also the factor responsible for the DBTCI-induced pregnancy failure in mice. Early pregnancy failure was also caused by systemic activation of the CD-40 immune costimulatory pathway in mice (Erlebacher et al., 2004). They noted that pregnancy failure resulted from impaired progesterone synthesis by the corpus luteum of the ovary, an endocrine defect in turn associated with ovarian resistance to the gonadotropic effects of prolactin and that pregnancy failure also required the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and correlated with the luteal induction of the prolactin receptor signaling inhibitors suppressor of cytokine signaling 1

(Socs1) and Socs3. Our results of the present study may support their argument. To further evaluate the adverse effects of DBTCl during early pregnancy, determination of the gene expression profile in the uterus of mice and rats is currently in progress.

In conclusion, DBTCl adversely affects the initiation and maintenance of pregnancy when administered during early pregnancy in mice, and the present data suggest that the decline in progesterone is the responsible factor for the early pregnancy failure in mice.

## REFERENCES

- Deansely R. 1966. The endocrinology of pregnancy and foetal life. In: Parks AS, editor. *Marshall's Physiology of Reproduction*, Vol. 3. Boston: Little Brown. pp 891–1063.
- Ema M, Harazono A. 2000a. Adverse effects of dibutyltin dichloride on initiation and maintenance of rat pregnancy. *Reprod Toxicol* 14:451–456.
- Ema M, Harazono A. 2000b. Developmental and reproductive toxicity of tributyltin and its metabolite, dibutyltin, in rats. *Congenit Anom (Kyoto)* 40:108–120.
- Ema M, Hirose A. 2006. Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. In: Golub MS, editor. *Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity*. New York: CRC Press (Taylor & Francis Group). pp 23–64.
- Ema M, Itami T, Kawasaki H. 1991. Teratogenicity of di-*n*-butyltin dichloride in rats. *Toxicol Lett* 58:347–356.
- Ema M, Itami T, Kawasaki H. 1992. Susceptible period for the teratogenicity of di-*n*-butyltin dichloride in rats. *Toxicology* 73: 81–92.
- Ema M, Kurosaka R, Amano H, Ogasawa Y. 1995. Comparative developmental toxicity of butyltin trichloride, dibutyltin dichloride and tributyltin chloride in rats. *J Appl Toxicol* 15:297–302.
- Ema M, Kurosaka R, Amano H, Ogawa Y. 1996. Comparative developmental toxicity of di-, tri-, and tetrabutyltin compounds after administration during late organogenesis in rats. *J Appl Toxicol* 16:71–76.
- Ema M, Harazono A, Hirose A, Kamata E. 2003. Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats. *Toxicol Lett* 143:233–238.
- Erlebacher A, Zhang D, Parlow AF, Glimcher LH. 2004. Ovarian insufficiency and early pregnancy loss induced by activation of the innate immune system. *J Clin Invest* 114:39–48.
- Evans DW, Laughlin RB Jr. 1984. Accumulation of bis(tributyltin)oxide by the mud crab, *Rhithropanopeus harrisi*. *Chemosphere* 13:213–219.
- Fish RH, Kimmel EC, Casida JE. 1976. Bioorganotin chemistry: Reactions of tributyltin derivatives with a cytochrome P-450 dependent monooxygenase enzyme system. *J Organomet Chem* 118:41–54.
- Harazono A, Ema M. 2003. Suppression of decidual cell response induced by dibutyltin dichloride in pseudopregnant rats: As a cause of early embryonic loss. *Reprod Toxicol* 17:393–399.
- Harazono A, Ema M, Ogawa Y. 1996. Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. *Toxicol Lett* 89:185–190.
- Harazono A, Ema M, Kawashima K. 1998a. Evaluation of malnutrition as a cause of tributyltin-induced pregnancy failure in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 61:224–230.
- Harazono A, Ema M, Ogawa Y. 1998b. Evaluation of early embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats: Phase- and dose dependent antifertility effects. *Arch Environ Contam Toxicol* 34:94–99.
- Huet-Hudson YM, Dey SK. 1990. Requirement for progesterone priming and its long-term effects on implantation in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 193:259–263.
- Iwai H, Wada O, Arakawa Y. 1981. Determination of tri-, di-, and monobutyltin and inorganic tin in biological materials and some aspects of their metabolism in rats. *J Anal Toxicol* 5: 300–306.
- Kannan K, Corsolini S, Focardi S, Tanabe S, Tatsukawa R. 1996. Accumulation pattern of butyltin compounds in dolphin, tuna, and shark collected from Italian coastal waters. *Arch Environ Contam Toxicol* 31:19–23.
- Kendle KE, Lee B. 1980. Investigation of the influence of progesterone on mouse embryo transport by using antiprogesterone steroids. *J Reprod Fertil* 58:253–258.
- Kimmel EC, Fish RH, Casida JE. 1977. Bioorganotin chemistry. Metabolism of organotin compounds in microsomal monooxygenase system and in mammals. *J Agric Food Chem* 25:1–9.
- Lau MM. 1991. Tributyltin antifoulings: A threat to the Hong Kong marine environment. *Arch Environ Contam Toxicol* 20: 299–304.
- Laughlin RB Jr, French W, Guard HE. 1986. Accumulation of bis(tributyltin) oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Environ Sci Technol* 20:884–890.
- Maguire RJ. 1991. Aquatic environmental aspects of nonpesticidal organotin compounds. *Water Pollut Res J Can* 26:243–260.
- Ministry of the Environment. 1973. Law for the Humane Treatment and Management of Animals, Law No. 105, October 1, 1973, revised June 15, 2005. Japan: Ministry of the Environment.
- Piver WT. 1973. Organotin compounds: Industrial applications and biological investigation. *Environ Health Perspect* 4:61–79.
- Prime Minister's Office. 1980. Standards Relating to the Care and Management, etc. of Experimental Animals, Notification No. 6, March 27, 1980 of the Prime Minister's Office. Japan: Prime Minister's Office.
- Quevauviller P, Bruchet A, Donard OFX. 1991. Leaching of organotin compounds from poly (vinyl chloride) (PVC) materials. *Appl Organomet Chem* 5:125–129.
- Rugh R. 1968. *The Mouse: Its Reproduction and Development*. Minneapolis: Burgess Publishing. 85p.
- Salewski E. 1964. Färbemethode zum makroskopischen nachweis von implantationssetellen am uterus der ratte. *Naunyn-Schm Arch Exp Pathol Pharmacol* 247:367–372.
- Sasaki K, Ishizaka T, Suzuki T, Saito Y. 1988. Determination of tri-*n*-butyltin and di-*n*-butyltin compounds in fish by gas chromatography with flame photometric detection. *J Assoc Off Anal Chem* 71:360–366.

- Seligman PF, Valkirs AO, Stang PM, Lee RF. 1988. Evidence for rapid degradation of tributyltin in a marina. *Mar Pollut Bull* 19:531-534.
- Short JW, Thrower FP. 1986. Accumulation of butyltins in muscle tissue of Chinook salmon reared in sea pens treated with tri-*n*-butyltin. *Mar Pollut Bull* 17:542-545.
- Stewart C, de Mora SJ. 1990. A review of the degradation of tri (*n*-butyl) tin in the marine environment. *Environ Technol* 11:565-570.
- Suzuki T, Matsuda R, Saito Y. 1992. Molecular species of tri-*n*-butyltin compounds in marine products. *J Agric Food Chem* 40:1437-1443.
- Waldock MJ, Thain JE. 1983. Shell thickening in *Crassostea gigas*: Organotin antifouling or sediment induced? *Mar Pollut Bull* 14:411-415.
- WHO. 1980. Environmental Health Criteria 15 Tin and Organotin Compounds: A Preliminary Review. Geneva: World Health Organization.