

- Hoppin, J.A., Brock, J.W., Davis, B.J., Baird, D.D., 2002. Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ. Health Perspect.* 110, 515–518.
- Ito, Y., Yokota, H., Wang, R., Yamanoshita, O., Ichihara, G., Wang, H., Kurata, Y., Takagi, K., Nakajima, T., 2005. Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch. Toxicol.* 79, 147–154.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103, 582–587.
- Jonsson, B.A., Richthoff, J., Rylander, L., Giwercman, A., Hagmar, L., 2005. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in young men. *Epidemiology* 16, 487–493.
- Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., Golub, M., Henderson, R., Hinberg, I., Little, R., Seed, J., Shea, K., Tabacova, S., Tyl, R., Williams, P., Zacharewski, T., 2002a. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butyl benzyl phthalate. *Reprod. Toxicol.* 16, 453–487.
- Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., Golub, M., Henderson, R., Hinberg, I., Little, R., Seed, J., Shea, K., Tabacova, S., Tyl, R., Williams, P., Zacharewski, T., 2002b. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reprod. Toxicol.* 16, 489–527.
- Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., Golub, M., Henderson, R., Hinberg, I., Little, R., Seed, J., Shea, K., Tabacova, S., Tyl, R., Williams, P., Zacharewski, T., 2002c. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod. Toxicol.* 16, 529–653.
- Kessler, W., Numtip, W., Grote, K., Csanady, G.A., Chahoud, I., Filser, J.G., 2004. Blood burden of di(2-ethylhexyl) phthalate and its primary metabolite mono(2-ethylhexyl) phthalate in pregnant and nonpregnant rats and marmosets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 142–153.
- Koch, H.M., Angerer, J., 2007. Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 9–19.
- Koch, H.M., Angerer, J., Drexler, H., Eckstein, R., Weisbach, V., 2005a. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure of voluntary plasma and platelet donors. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 208, 489–498.
- Koch, H.M., Bolt, H.M., Angerer, J., 2004a. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 78, 123–130.
- Koch, H.M., Bolt, H.M., Preuss, R., Angerer, J., 2005b. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 79, 367–376.
- Koch, H.M., Bolt, H.M., Preuss, R., Eckstein, R., Weisbach, V., Angerer, J., 2005c. Intravenous exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation. *Arch. Toxicol.* 79, 689–693.
- Koch, H.M., Drexler, H., Angerer, J., 2003. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206, 77–83.
- Koch, H.M., Drexler, H., Angerer, J., 2004b. Internal exposure of nursery-school children and their parents and teachers to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 15–22.
- Koch, H.M., Preuss, R., Angerer, J., 2006. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure— an update and latest results. *Int. J. Androl.* 29, 155–165, discussion 181–185.
- Kohn, M.C., Parham, F., Masten, S.A., Portier, C.J., Shelby, M.D., Brock, J.W., Needham, L.L., 2000. Human exposure estimates for phthalates. *Environ. Health Perspect.* 108, A440–A442.
- Koo, H.J., Lee, B.M., 2004. Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health A67*, 1901–1914.
- Koo, H.J., Lee, B.M., 2005. Human monitoring of phthalates and risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health A68*, 1379–1392.
- Koo, J.W., Parham, F., Kohn, M.C., Masten, S.A., Brock, J.W., Needham, L.L., Portier, C.J., 2002. The association between biomarker-based exposure estimates for phthalates and demographic factors in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* 110, 405–410.
- Kurata, Y., Kidachi, F., Yokoyama, M., Toyota, N., Tsuchitani, M., Katoh, M., 1998. Subchronic toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate in common marmosets: lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia. *Toxicol. Sci.* 42, 49–56.
- Kurata, Y., Makinodan, F., Shimamura, N., Okada, M., Katoh, M., 2005. Metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in juvenile and fetal marmoset and rat. Abstract No. 1251. 2005 Itinerary Planner. New Orleans, LA: Society of Toxicology.
- Lamb, J.C., Chapin, R.E., Teague, J., Lawton, A.D., Reel, J.R., 1987. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88, 255–269.
- Latini, G., 2005. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin. Chim. Acta.* 361, 20–29.
- Latini, G., De Felice, C., Presta, G., Del Vecchio, A., Paris, I., Ruggieri, F., Mazzeo, P., 2003a. Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report. *Biol. Neonate* 83, 22–24.
- Latini, G., De Felice, C., Presta, G., Del Vecchio, A., Paris, I., Ruggieri, F., Mazzeo, P., 2003b. In utero exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 111, 1783–1785.
- Lee, B., Koo, H., 2007. Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health A70*, 1365–1370.
- Lee, K.Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., Takigami, S., Uneyama, C., Hirose, M., 2004. Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology* 203, 221–238.
- Main, K.M., Mortensen, G.K., Kaleva, M.M., Boisen, K.A., Damgaard, I.N., Chellakooty, M., Schmidt, I.M., Suomi, A.M., Virtanen, H.E., Petersen, D.V., Andersson, A.M., Toppari, J., Skakkebaek, N.E., 2006. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ. Health Perspect.* 114, 270–276.
- Marx, J.L., 1972. Phthalic acid esters: biological impact uncertain. *Science* 178, 46–47.
- Mayer, F.L., Stalling, D.L., Johnson, J.L., 1972. Phthalate esters as environmental contaminants. *Nature.* 238, 411–413.
- McKee, R.H., Butala, J.H., David, R.M., Gans, G., 2004. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps. *Reprod. Toxicol.* 18, 1–22.
- MHLW, Notification of Pharmaceutical and Food Safety Bureau; Yakushoku-hatsu No. 0611001 Amendments to standards for devices, containers package and toys. 2002.
- Moore, R.W., Rudy, T.A., Lin, T.M., Ko, K., Peterson, R.E., 2001. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* 109, 229–237.
- Mortensen, G.K., Main, K.M., Andersson, A.M., Leffers, H., Skakkebaek, N.E., 2005. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1084–1092.
- Murature, D.A., Tang, S.Y., Steinhardt, G., Dougherty, R.C., 1987. Phthalate esters and semen quality parameters. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 14, 473–477.
- Nagao, T., Ohta, R., Marumo, H., Shindo, T., Yoshimura, S., Ono, H., 2000. Effect of butyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reprod. Toxicol.* 14, 513–532.

- Pan, G., Hanaoka, T., Yoshimura, M., Zhang, S., Wang, P., Tsukino, H., Inoue, K., Nakazawa, H., Tsugane, S., Takahashi, K., 2006. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ. Health Perspect.* 114, 1643–1648.
- Peck, C.C., Albro, P.W., 1982. Toxic potential of the plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate in the context of its disposition and metabolism in primates and man. *Environ. Health Perspect.* 45, 11–17.
- Poon, R., Lecavalier, P., Mueller, R., Valli, V.E., Procter, B.G., Chu, I., 1997. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 35, 225–239.
- Preuss, R., Koch, H.M., Angerer, J., 2005. Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 816, 269–280.
- Pugh Jr., G., Isenberg, J.S., Kamendulis, L.M., Ackley, D.C., Clare, L.J., Brown, R., Lington, A.W., Smith, J.H., Klaunig, J.E., 2000. Effects of di-isononyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys. *Toxicol. Sci.* 56, 181–188.
- Rais-Bahrami, K., Nunez, S., Revenis, M.E., Luban, N.L., Short, B.L., 2004. Follow-up study of adolescents exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) as neonates on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support. *Environ. Health Perspect.* 112, 1339–1340.
- Reddy, B.S., Rozati, R., Reddy, B.V., Raman, N.V., 2006. Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *BJOG* 113, 515–520.
- Rozati, R., Reddy, P.P., Reddanna, P., Mujtaba, R., 2002. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil. Steril.* 78, 1187–1194.
- Salazar-Martinez, E., Romano-Riquer, P., Yanez-Marquez, E., Longnecker, M.P., Hernandez-Avila, M., 2004. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ. Health* 3, 8.
- Satoh, K., Nonaka, R., Ikeda, M., Satoh, T., Kamimura, H., Nagai, F., 2004. Study on androgenic and anti-androgenic effects of phthalate esters with the reporter gene assay using AR-EcoScreen, stable transfected CHO-K1 cells. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. PH.* 55, 307–314.
- Schardein, J., 2000. *Hormones and Hormonal Antagonists. Chemically Induced Birth Defects.* Marcel Dekker, New York, pp. 281–357.
- Schettler, T., 2006. Human exposure to phthalates via consumer products. *Int. J. Androl.* 29, 134–139, discussion 181–185.
- Schilling, K., Gembardt, C., Hellwig, J., 1999. Reproduction toxicity of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *Toxicol. Sci.* 48 (1-S), 147–148.
- Schmid, P., Schlatter, C., 1985. Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. *Xenobiotica* 15, 251–256.
- Silva, M.J., Barr, D.B., Reidy, J.A., Kato, K., Malek, N.A., Hodge, C.C., Hurtz 3rd, D., Calafat, A.M., Needham, L.L., Brock, J.W., 2003. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch. Toxicol.* 77, 561–567.
- Silva, M.J., Barr, D.B., Reidy, J.A., Malek, N.A., Hodge, C.C., Caudill, S.P., Brock, J.W., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2004a. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2000. *Environ. Health Perspect.* 112, 331–338.
- Silva, M.J., Reidy, J.A., Herbert, A.R., Preau Jr., J.L., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2004b. Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 1226–1231.
- Silva, M.J., Reidy, J.A., Preau, J.L., Samandar, E., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2006a. Measurement of eight urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment. *Biomarkers* 11, 1–13.
- Silva, M.J., Reidy, J.A., Preau Jr., J.L., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2006b. Oxidative metabolites of diisononyl phthalate as biomarkers for human exposure assessment. *Environ. Health Perspect.* 114, 1158–1161.
- Sina, D., Schuhmann, R., Abraham, R., Taubert, H.D., Dericks-Tan, J.S., 1975. Increased serum FSH levels correlated with low and high sperm counts in male infertile patients. *Andrologia* 7, 31–37.
- Sonnenschein, C., Soto, A.M., Fernandez, M.F., Olea, N., Olea-Serrano, M.F., Ruiz-Lopez, M.D., 1995. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin. Chem.* 41, 1888–1895.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 7), 113–122.
- Stroheker, T., Cabaton, N., Nourdin, G., Regnier, J.F., Lhuguenot, J.C., Chagnon, M.C., 2005. Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicology* 208, 115–121.
- Subhan, F., Tahir, F., Ahmad, R., Khan, Z.D., 1995. Oligospermia and its relation with hormonal profile. *J. Pak. Med. Assoc.* 45, 246–247.
- Swan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Ternand, C.L., Sullivan, S., Teague, J.L., 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health Perspect.* 113, 1056–1061.
- Tomita, I., Nakamura, Y., Yagi, Y., Tutikawa, K., 1986. Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) in mice. *Environ. Health Perspect.* 65, 249–254.
- Tomonari, Y., Kurata, Y., David, R.M., Gans, G., Kawasuso, T., Katoh, M., 2006. Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on genital organs from juvenile common marmosets: I. Morphological and biochemical investigation in 65-week toxicity study. *J. Toxicol. Environ. Health A69*, 1651–1672.
- Tyl, R.W., Price, C.J., Marr, M.C., Kimmel, C.A., 1988. Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 10, 395–412.
- Uhler, M.L., Zinaman, M.J., Brown, C.C., Clegg, E.D., 2003. Relationship between sperm characteristics and hormonal parameters in normal couples. *Fertil. Steril.* 79 (Suppl 3), 1535–1542.
- US EPA, Integrated Risk Information System. 2006. Available from: <<http://www.epa.gov/iris/index.html>>.
- Yano, K., Hirose, N., Sakamoto, Y., Katayama, H., Moriguchi, T., Asaoka, K., 2005. Phthalate levels in baby milk powders sold in several countries. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74, 373–379.
- Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.H., Wu, Z.F., Fielden, M.R., Matthews, J.B., 1998. Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* 46, 282–293.
- Zhang, Y., Jiang, X., Chen, B., 2004. Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOAEL. *Reprod. Toxicol.* 18, 669–676.
- Zhang, Y.H., Zheng, L.X., Chen, B.H., 2006. Phthalate exposure and human semen quality in Shanghai: a cross-sectional study. *Biomed. Environ. Sci.* 19, 205–209.
- Zhu, J., Phillips, S.P., Feng, Y.L., Yang, X., 2006. Phthalate esters in human milk: concentration variations over a 6-month postpartum time. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5276–5281.

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of reproductive and developmental toxicity of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in rats

Makoto Ema¹, Sakiko Fujii², Kaoru Yabe², Mariko Matsumoto¹, and Mutsuko Hirata-Koizumi¹¹Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo, and ²Safety Research Institute for Chemical Compounds, Sapporo, Japan

ABSTRACT Male and female Crl:CD(SD) rats were fed a diet containing the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) at 0, 1500, 3000, 6000 or 10 000 p.p.m. (0, 83, 172, 343 or 551 mg/kg bw/day in males and 0, 126, 264, 476 or 707 mg/kg bw/day in females) for a total of 57 days beginning 16 days before mating in males, and a total of 61–65 days from 16 days before mating to day 21 of lactation in females. Body weight gains and food consumption were reduced in males at 6000 p.p.m. and higher and in females at 3000 p.p.m. and higher. The weights of the spleen at 6000 and 10 000 p.p.m. and of the thymus at 10 000 p.p.m. were decreased in females. No changes in estrous cyclicity, copulation index, fertility index, gestation index, delivery index, precoital interval or gestation length were observed at any dose of DCBS. Numbers of implantations at 6000 and 10 000 p.p.m. and pups delivered at 10 000 p.p.m. were reduced. There were no changes in the sex ratio or viability of pups. The body weights of male and female pups were lowered at 6000 p.p.m. and higher. Decreased weight of the spleen in weanlings was also observed in males at 1500 p.p.m. and higher and in females at 3000 p.p.m. and higher. The data indicate that DCBS possesses adverse effects on reproduction and development in rats.

Key Words: developmental toxicity, N, N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide, rat, reproductive toxicity, rubber accelerator

INTRODUCTION

Sulfenamide accelerator compounds are widely used in the manufacture of automotive compartments and industrial rubber products such as tires, hoses, conveyer belts, bushings seals, gaskets and windshield wiper blades (EPA 2001). N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS, Fig. 1) is a sulfenamide accelerator. The annual production level of DCBS in Japan was approximately 1000 tons in 1990–1993 and 1900 tons in 2000–2003. Most of this amount was sold and handled domestically (OECD 2007). DCBS is used as an accelerator of vulcanization and is completely reacted in the vulcanizing process (OECD 2007). DCBS is regulated in Germany for use in articles that contact food, but is not regulated by the United States Food and Drug Administration for use in food contact applications (Flexsys 2000).

Exposure of workers handling sulfenamide accelerator materials is likely to be highest in the area of materials packaging. During material packout at the manufacturing site, and to a lesser degree during weigh-up activities at the consumer site, there is a possibility of skin and inhalation exposure. Although consumer exposure should be minimal, the most likely route of consumer exposure is skin contact with rubber or latex articles (EPA 2001).

Only up to 6% biodegradation has been determined for DCBS in a ready biodegradability test, and a measured log Kow value of 4.8 suggests that DCBS may have a high bioaccumulation potential (OECD 2007). The possibility of such a chemical compound entering biological systems has aroused great concern regarding its toxicological potential. Generally, biological effects of chemicals should be studied in laboratory animals to investigate their possible influences on human health, and the results of animal tests of chemical toxicity relevant to humans (Clayson & Krewski 1990). However, very little information on the toxicity of DCBS has been published. The toxic effects of DCBS have been briefly summarized by the European Chemical Bureau (2000) and US EPA (2001). It was reported that the oral LD50 values were 1077–10 000 mg/kg bw in rats, the oral NOAEL for 44-day repeated dose toxicity was higher than 100 mg/kg bw/day in rats, and no effects on reproduction were observed at doses up to 400 mg/kg bw/day in rats (EPA 2001). The oral LD50 value was 8500 mg/kg bw in male mice, and repeated daily inhalation exposure of male rats for 15 days at 2 h/day and 350–400 mg/m³ caused mucous membrane irritation (Vorobera 1969).

The Japanese Government (MHW 1998) conducted toxicity studies for DCBS, including acute toxicity, *in vitro* genotoxicity and repeat dose toxicity combined with reproductive/developmental toxicity as a part of the Safety Examination of Existing Chemical Substances and Chemical Safety Programmes. These toxicity studies are summarized in the IUCLID Data Sets (EPA 2006), OECD Screening Information Data Sets (OECD 2007) and the Hazard Assessment Sheet (CERI 2002). We previously reported the results of a screening test for repeat dose toxicity combined with a reproductive/developmental toxicity in rats, where DCBS at 400 mg/kg bw/day had a deleterious effect on reproduction and development and caused a marked decrease in the number of live pups as well as a total loss of pups by postnatal day (PND) 4 (Ema *et al.* 2007). The primary effects may be on the gestation index for dams and live birth index for pups, both of which appear to be affected at multiple points along the female reproductive process. The viability of neonatal pups may also be affected. To examine the adverse effect of dietary DCBS on survival and growth of pups, a reproductive and developmental toxicity study was performed in rats given DCBS during an extended administration period up to the weaning of pups.

Correspondence: Makoto Ema DVM, PhD, Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan. Email: ema@nih.go.jp

Received July 31, 2007; revised and accepted August 27, 2007.

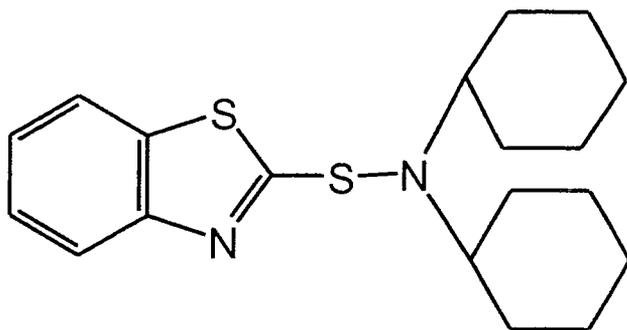


Fig. 1 Structural formula of N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide.

MATERIALS AND METHODS

This study was performed in 2005–2006 at the Safety Research Institute for Chemical Compounds (Sapporo, Japan) in compliance with *Law for the Humane Treatment and Management of Animals* (Law no. 105, October 1, 1973, revised December 22, 1999, Revised Law no. 221; revised June 22, 2005, Revised Law no. 68), *Standards Relating to the Care, Management and Refinement of Laboratory Animals* (Notification no. 88 of the Ministry of the Environment, Japan, April 28, 2006) and *Fundamental Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiment and Related Activities in the Testing Facility under the Jurisdiction of the Ministry of Health, Labour and Welfare* (Notification no. 0601005 of the Health Sciences Division, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, June 1, 2006).

Chemical and dosing

DCBS (CAS no. 4979-32-2) was obtained from Ouchishinko Chemical Industrial (Tokyo, Japan). DCBS in the form of off-white to tan granules is very slightly soluble in water and methanol but soluble in oil. Its melting point is 100–105°C, density is 1230 kg/m³ and molecular weight is 347 (Flexsys 2000). DCBS (Lot no. 508001) used in this study was 99.7% pure and was kept in a sealed container under cool (1–8°C) and dark conditions. The purity and stability of the chemical were verified by analysis using high-performance liquid chromatography before and after the study. Rats were given dietary DCBS at a concentration of 0 (control), 1500, 3000, 6000 or 10 000 p.p.m. Males were fed a diet containing DCBS for a total of 57 days beginning 16 days before mating. Females were fed a diet containing DCBS for a total of 61–65 days from 16 days before mating to day 21 of lactation throughout the mating, gestation and lactation periods. Control rats were fed a basal diet only.

The dosage levels were determined based on the results of a previous study in rats that were given DCBS by gavage at 0, 6, 25, 100, or 400 mg/kg bw/day for a total of 44 days from 14 days before mating in males and a total of 40–51 days beginning 14 days before mating to day 3 of lactation throughout the mating and gestation periods in females (Ema *et al.* 2007). In that study, toxicologically significant changes were observed only at 400 mg/kg bw/day. Three of 10 females died during parturition. An increased incidence of females showing decreased locomotor activity, soil of the lower abdominal fur and reddish tears was observed. Decreased body weights were found in males and females. Decreased weight of the thymus in both sexes was noted. Decreases in the gestation

index, numbers of corpora lutea, implantations, pups born and pups born alive, live birth index and viability index were detected.

Dosed diet preparations were formulated by mixing DCBS into an appropriate amount of a powdered basal diet (CRF-1; Oriental Yeast, Tokyo, Japan) for each dietary concentration. Chemical analysis showed that DCBS in the diet was stable for at least 21 days at room temperature and the formulations were maintained in a room temperature for no more than 21 days. Generally, the diet was replaced once a week.

Animals and housing conditions

Sprague–Dawley (CrI:CD[SD]) rats were used throughout this study. Rats of this strain were chosen because they are the most commonly used in reproductive and developmental toxicity studies and historical control data are available. Male and female rats at nine weeks of age were purchased from the Tsukuba Breeding Center (Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan). The rats were acclimated to the laboratory for six days prior to the start of the experiment. Male and female rats found to be in good health were selected for use. Rats (F0) were randomly distributed into five groups of six males and six females each, and all animals were assigned a unique number and tattooed on the ear prior to the start of the experiment. Animals were housed individually in suspended aluminum/stainless steel cages except during the acclimation, mating and nursing periods. From day 17 of pregnancy to the day of weaning, individual dams and litters were reared using wood chips as bedding (White Flake; Charles River Laboratories Japan.).

Animals were reared on a basal diet or a diet containing DCBS and filtered tap water *ad libitum* and maintained in an air-conditioned room at 22 ± 3°C with a humidity of 50 ± 20% and a 12-h light (8:00–20:00)/dark (20:00–8:00) cycle. The room was ventilated 10–15 times/h.

Observations

All rats were observed twice a day for clinical signs of toxicity. The body weight was recorded once a week for males and once a week during the pre-mating period, on days 0, 7, 14 and 20 of pregnancy, and on days 0, 4, 7, 14 and 21 of lactation for females. Food consumption was recorded once a week for males, and once a week during the pre-mating period, on days 0, 7, 14 and 20 of pregnancy and on days 0, 7, 14 and 21 of lactation for females.

Rats were euthanized by exsanguination under ether anesthesia. Males were euthanized at 17 weeks and females at 18 weeks on day 21 of lactation. The external surfaces of the rats were examined for abnormalities. The abdomen and thoracic cavities were opened and gross internal examination was performed. In females, the number of implantation sites was recorded. The brain, pituitary, thymus, thyroid, liver, kidney, spleen, adrenal gland, testis, epididymis, seminal vesicle, ventral prostate, ovary and uterus were weighed. The thyroid and seminal vesicle were weighed after fixation with 10% neutral buffered formalin.

Daily vaginal lavage samples from each female were evaluated for estrous cyclicity for two weeks of the pre-mating period. Females with repeated 4–6 day estrous cycles were judged to be normal. Each female rat was mated overnight with a single male rat of the same dosage group until copulation occurred. During the mating period, daily vaginal smears were examined for the presence of sperm. The presence of sperm in the vaginal smear and/or a vaginal plug was considered evidence of successful mating (day 0 of pregnancy). Copulated females were checked for signs of parturition three times a day on days 21–23 of pregnancy.

The females were allowed to deliver spontaneously and nurse their pups until PND 21. The day on which parturition was

completed by 13:00 was designated as PND 0. Total litter size and the numbers of live and dead pups were recorded. Live pups were counted, sexed, examined grossly and individually weighed on PND 0, 4, 7, 14 and 21. On PND 4, litters were randomly adjusted to eight pups comprised of four males and four females. No adjustment was made for litters with fewer than 8 pups. Selected pups were assigned a unique number and tattooed on a limb on PND 4. Unselected pups were necropsied on PND 4. Weanlings were necropsied on PND 21 and the brain, thymus, liver, spleen and uterus were weighed.

Statistical analysis

Statistical analysis of the offspring was carried out using the litter as the experimental unit.

Body weight, body weight gain, food consumption, length of estrous cycle, precoital interval, gestation length, number of implantations and pups delivered, delivery index, organ weight, organ/body weight ratio (relative organ weight) and the viability of pups were analyzed for statistical significance in the following way. Bartlett's test of homogeneity of variance was used to determine if the groups had equivalent variances. If the variances were equivalent, the groups were compared by one-way analysis of variance

(ANOVA). If significant differences were found, Dunnett's multiple comparison test was performed. If the groups did not have equivalent variances, the Kruskal-Wallis test was used to assess the overall effects. Whenever significant differences were noted, pairwise comparisons were made by Mann-Whitney *U*-test. The incidence of females with normal estrous cycles, copulation index, fertility index, gestation index and neonatal sex ratio was analyzed by the χ^2 test or Fisher's exact test.

The 0.05 level of probability was used as the criterion for significance.

RESULTS

Clinical observations, body weight and food consumption (F0 males and females)

No deaths were found in F0 males and females. In males, there were no compound related clinical signs of toxicity at any doses. Hematuria and soil of perigenital fur were each observed at 10 000 p.p.m. in one female.

Table 1 shows body weight gain in F0 males and females during dosing. In males, body weight gain on days 0-7 of the dosing period at 6000 p.p.m. and higher was significantly lowered. In females,

Table 1 Body weight gains of F0 parental male and female rats given N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide

Dose (p.p.m.)	0 (Control)	1500	3000	6000	10 000
No. males	6	6	6	6	6
Initial body weight (g)†	367 ± 7	367 ± 6	366 ± 7	366 ± 8	366 ± 7
Body weight gain during dosing period (g)†					
Days 0-7	48.0 ± 10.4	36.8 ± 14.5	36.3 ± 4.8	26.7 ± 8.5**	25.2 ± 6.5**
Days 7-14	38.2 ± 9.2	33.7 ± 13.4	34.5 ± 8.7	35.2 ± 5.6	29.5 ± 5.5
Days 14-21	21.7 ± 9.2	27.3 ± 7.1	24.3 ± 5.2	23.0 ± 12.6	21.8 ± 3.1
Days 21-28	26.8 ± 10.2	25.7 ± 8.3	22.3 ± 10.5	23.5 ± 6.7	25.2 ± 5.0
Days 28-35	21.2 ± 7.7	20.8 ± 6.5	28.5 ± 12.6	24.0 ± 3.7	19.2 ± 4.1
Days 35-42	14.8 ± 6.9	15.3 ± 6.5	20.3 ± 6.9	17.3 ± 6.3	20.5 ± 5.2
Days 42-49	13.8 ± 8.3	19.5 ± 4.2	13.5 ± 2.7	19.8 ± 5.5	17.2 ± 2.9
Days 49-56	14.8 ± 7.6	19.5 ± 6.3	16.7 ± 5.0	20.5 ± 6.2	17.0 ± 3.5
No. females	6	6	6	6	6
Initial body weight (g)†	238 ± 6	239 ± 7	237 ± 5	238 ± 6	237 ± 7
Body weight gain during pre mating period (g)†					
Days 0-7	6.5 ± 7.7	8.8 ± 8.8	6.8 ± 4.6	-6.5 ± 9.7*	-19.3 ± 9.3**
Days 7-14	15.7 ± 8.5	16.3 ± 6.9	14.2 ± 5.9	12.2 ± 8.0	13.0 ± 8.7
Body weight gain during pregnancy (g)†					
Days 0-7	45.3 ± 6.5	42.5 ± 4.2	32.8 ± 5.4*	31.2 ± 8.6*	19.5 ± 12.0**
Days 7-14	38.3 ± 6.0	35.7 ± 5.4	36.8 ± 7.0	35.2 ± 6.2	31.2 ± 8.6
Days 14-20	76.7 ± 14.6	68.3 ± 4.3	75.8 ± 12.4	68.7 ± 7.7	62.5 ± 12.2
Body weight gain during lactation (g)†					
Days 0-4	28.0 ± 15.7	10.8 ± 24.3	28.0 ± 15.7	8.2 ± 8.7	-2.5 ± 14.6*
Days 4-7	6.5 ± 2.7	12.0 ± 9.0	10.0 ± 10.2	5.3 ± 7.3	0.5 ± 10.9
Days 7-14	1.3 ± 10.7	10.2 ± 7.3	4.2 ± 8.1	14.2 ± 11.1	6.0 ± 12.5‡
Days 14-21	-19.0 ± 14.7	-31.7 ± 9.9	-17.0 ± 8.3	-8.8 ± 9.8	2.6 ± 14.3‡*

*Significantly different from the control, $P < 0.05$; **significantly different from the control, $P < 0.01$.

†Values are given as mean ± SD; ‡data were obtained from five females because one female was excluded (total litter loss on day 9 of lactation).

body weight gains were decreased on days 0–7 of the pre-mating period at 6000 p.p.m. and higher, on days 0–7 of pregnancy at 3000 p.p.m. and higher, and on days 0–4 of lactation at 10 000 p.p.m. Body weight gain on days 14–21 of lactation was significantly increased at 10 000 p.p.m.

In F0 males, food consumption was significantly decreased during the first week at 6000 p.p.m. and higher and during the second week at 10 000 p.p.m. In F0 females, food consumption was significantly decreased throughout the pre-mating, pregnancy and lactation periods at 6000 and 10 000 p.p.m., except on days 7–14 and 14–20 of pregnancy at 6000 p.p.m. A tendency towards decreased food consumption was observed on days 0–7 of pregnancy at 3000 p.p.m.

The mean daily intakes of DCBS were 83, 172, 343 and 551 mg/kg bw in F0 males, and 126, 264, 476 and 707 mg/kg bw in F0 females for 1500, 3000, 6000 and 10 000 p.p.m., respectively.

Estrous cyclicity (F0 females)

All F0 females showed normal estrous cycles in all groups, and the length of the estrous cycles was not significantly different between the control and DCBS-treated groups.

Reproductive and developmental effects (F0 parents/F1 offspring)

The reproductive and developmental parameters for F0 parents/F1 offspring are presented in Table 2. In F0 parent animals in all groups, all pairs copulated, all male and female rats were fertile and all females delivered live pups. All rats of all groups mated within four days. There were no significant differences between control and DCBS-treated groups in copulation index, fertility index, gestation index, pre-coital interval, gestation length, delivery index, sex ratio of F1 pups, or viability of F1 pups during lactation. Significantly lower numbers of implantations at 6000 and 10 000 p.p.m. and pups delivered at 10 000 p.p.m. were observed. Body weights of male pups were significantly lowered on PND 4, 7 and 21 at 6000 p.p.m. and on PND 7, 14 and 21 at 10 000 p.p.m. In female pups, significantly lower body weights were observed on PND 7, 14 and 21 at 6000 p.p.m. and higher. No malformed pups were detected in any groups.

Necropsy and organ weights (F0 males and females)

Atrophy of the thymus was found in two females at 10 000 p.p.m. No compound-related gross lesions of the reproductive organs were noted in F0 males and females. In males, significantly increased relative weights of the liver and kidney were observed at 10 000 p.p.m.

The organ weights of F0 females are shown in Table 3. The body weight at the scheduled terminal sacrifice was significantly lowered at 6000 and 10 000 p.p.m. The absolute weight of the ovary was significantly lowered at 10 000 p.p.m. Significantly increased relative weights were found for the pituitary at 3000 p.p.m., the liver at 6000 p.p.m., and the brain, kidney and adrenal gland at 10 000 p.p.m. The absolute and relative weights of the thymus at 10 000 p.p.m. and the spleen at 6000 p.p.m. and higher were significantly decreased.

Necropsy and organ weights (F1 weanlings)

No compound related gross lesions were observed in F1 weanlings.

The organ weights of F1 male weanlings are presented in Table 4. The body weight at the scheduled sacrifice was significantly reduced at 6000 and 10 000 p.p.m. The absolute weights of the brain at 6000 and 10 000 p.p.m. and the liver at 10 000 p.p.m. were also significantly reduced. The relative weights of the liver at

1500 and 6000 p.p.m. and of the brain at 10 000 p.p.m. were significantly increased. Significantly decreased absolute and relative weights of the spleen, except for the relative weight at 3000 p.p.m., were noted at 1500 p.p.m. and higher.

The organ weights of F1 female weanlings are presented in Table 5. The body weight at the scheduled sacrifice was significantly reduced at 6000 p.p.m. and higher. Significantly reduced absolute weights of the brain at 6000 and 10 000 p.p.m., the liver at 10 000 p.p.m. and the uterus at 3000 p.p.m. and 10 000 p.p.m. were also observed. The relative weight of the brain was significantly increased at 10 000 p.p.m. The absolute and relative weights of the spleen were significantly reduced at 3000 p.p.m. and higher.

DISCUSSION

This study was designed to assess the effects of DCBS on continuous parameters such as body weight and food consumption, as well as endpoints for reproductive and developmental toxicity.

Significant decreases in body weight gain and food consumption were observed at 6000 p.p.m. and higher in F0 males and females. In females at 3000 p.p.m., body weight gain was significantly decreased during early pregnancy. Food consumption also decreased, but not significantly. The data indicate that changes in body weight gain were associated with changes in food consumption and that DCBS adversely affects body weight gain and food consumption at 6000 p.p.m. in male rats and 3000 p.p.m. in female rats. The higher relative weights of the liver and kidney at the highest dose in F0 males seem to be due to secondary effects of lowered body weight rather than direct effects of DCBS on the organs. More pronounced effects on organ weights were noted in females. Lower absolute and relative weights of the thymus at 10 000 p.p.m. and spleen at 6000 p.p.m. and higher were detected. In our previous study, histopathological examination revealed atrophy of the thymus and spleen at 400 mg/kg bw/day (Ema *et al.* 2007). Other changes in female organ weight such as the relative weights of the brain, pituitary, liver, kidney and adrenal gland, as well as the absolute weight of the ovary are unlikely to be due to the toxic effects of DCBS because the degree of changes was relatively small, no dose-dependency was shown and no changes were noted in absolute or relative weight. These findings suggest that the immune system may be a target of DCBS toxicity, and that female rats have a higher susceptibility to the toxicity of DCBS than male rats. These findings are consistent with our previous study (Ema *et al.* 2007). The higher susceptibility to DCBS toxicity in females may be explained by the stress of pregnancy and lactation. DCBS is likely to be not reproductively toxic in male rats because DCBS caused neither pathological changes in male reproductive organs nor changes in male reproductive parameters.

In our previous study, DCBS given by gavage to rats at 400 mg/kg bw/day from 14 days before mating to day 3 of lactation caused significant decreases in the gestation index, number of corpora lutea, implantations, pups born and pups born alive, live birth index and viability index (Ema *et al.* 2007). This dose also caused severe maternal toxicity and a total loss of pups by PND 4. No maternal or reproductive/developmental toxicity was detected at 100 mg/kg bw/day in our previous study. In the present study, no serious reproductive difficulties were noted even at the highest dose of 10 000 p.p.m., and necropsy of the reproductive organs revealed no evidence of reproductive failure. Although decreased numbers of implantations and pups delivered were noted at the highest dose, the viability of pups until weaning was not significantly decreased. In the present feeding study, the mean daily intakes of DCBS at the

Table 2 Reproductive and developmental findings for F0 parents/F1 offspring of rats given N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide

Dose (p.p.m.)	Control	1500	3000	6000	10 000
No. pairs	6	6	6	6	6
Copulation index ^b					
Male/female (%)	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100
Pre-coital interval (days) ^a	2.2 ± 0.8	2.3 ± 1.2	3.2 ± 0.8	3.0 ± 0.9	2.7 ± 1.2
Fertility index ^c					
Male/female (%)	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100
Gestation index (%) ^d	100	100	100	100	100
Gestation length (days) ^a	22.2 ± 0.4	22.2 ± 0.4	22.2 ± 0.4	22.0 ± 0.0	22.2 ± 0.4
No. implantations ^a	16.0 ± 1.8	15.0 ± 0.9	16.3 ± 1.2	13.5 ± 2.0*	12.8 ± 1.2**
Delivery index (%) ^{a,e}	95.8 ± 8.0	96.7 ± 3.7	95.8 ± 5.3	95.6 ± 8.1	86.7 ± 21.1
No. pups delivered ^a	15.3 ± 2.2	14.5 ± 1.0	15.7 ± 1.8	13.0 ± 2.6	11.2 ± 3.1*
Sex ratio of F1 pups ^f	0.467	0.448	0.564	0.526	0.463
Viability index (%) ^g					
PND 0 ^g	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	91.2 ± 12.9
PND 4 ^h	99.1 ± 2.3	97.9 ± 3.3	95.9 ± 5.3	90.6 ± 12.2	72.1 ± 40.8
PND 21 ⁱ	97.9 ± 5.1	97.9 ± 5.1	100.0 ± 0.0	89.6 ± 25.5	83.3 ± 40.8
Male pup body weight during lactation (g) ^a					
PND 0	6.8 ± 0.4	6.7 ± 0.7	6.3 ± 0.4	6.2 ± 0.6	6.5 ± 0.7
PND 4	10.6 ± 0.9	10.3 ± 0.8	9.6 ± 0.6	9.1 ± 0.7**	9.1 ± 2.2 ^j
PND 7	18.7 ± 1.3	17.7 ± 1.3	17.6 ± 1.3	14.5 ± 2.2**	13.3 ± 3.7**
PND 14	39.2 ± 3.0	36.2 ± 3.0	37.3 ± 2.9	33.0 ± 4.0	26.3 ± 7.2**
PND 21	67.0 ± 4.6	61.1 ± 6.1	62.8 ± 3.2	55.7 ± 7.6*	44.1 ± 9.9**
Female pup body weight during lactation (g) ^a					
PND 0	6.4 ± 0.4	6.4 ± 0.5	6.0 ± 0.3	5.8 ± 0.6	6.2 ± 0.5
PND 4	10.1 ± 1.1	9.9 ± 0.7	9.0 ± 0.6	8.7 ± 0.7	8.5 ± 1.9
PND 7	18.2 ± 2.0	17.4 ± 0.7	16.0 ± 1.2	13.8 ± 1.3**	11.7 ± 4.2*
PND 14	38.6 ± 3.5	36.1 ± 2.1	35.0 ± 2.4	31.5 ± 4.9*	25.3 ± 7.2**
PND 21	65.1 ± 5.2	60.1 ± 3.7	58.2 ± 3.3	53.5 ± 9.0*	42.5 ± 9.9**

*Significantly different from the control, $P < 0.05$; **significantly different from the control, $P < 0.01$.

^aValues are given as mean ± SD; ^bcopulation index (%) (number of animals with successful copulation/number of animals paired) × 100; ^cfertility index (%) (number of animals that impregnated a female or were pregnant/number of animals with successful copulation) × 100; ^dgestation index (%) (number of females that delivered live pups/number of pregnant females) × 100; ^edelivery index (%) (number of pups delivered/number of implantations) × 100; ^fsex ratio (total number of male pups/total number of pups delivered); ^gviability index on PND 0 (number of live pups on PND 0/number of pups delivered) × 100; ^hviability index on PND 4 (number of live pups on PND 4/number of live pups on PND 0) × 100; ⁱviability index on PND 21 (number of live pups on PND 21/number of live pups selected on PND 4) × 100; ^jdata were obtained from five litters because one female experienced total male litter loss by day 4 of lactation; and ^kdata were obtained from five litters because one female experienced total litter loss by day 9 of lactation.

PND, post natal day.

highest dose were 551 and 707 mg/kg bw in F0 males and females, respectively. One possible explanation for the discrepancy in the degree of reproductive and developmental toxicity between the present and previous studies may be the difference in administration method. Some studies have shown that gavage and feed administration result in different toxicokinetics for various chemicals (Yuan *et al.* 1994, 1995). Further studies are needed to clarify the difference in DCBS toxicokinetics between gavage and feed administrations.

Regarding the development of offspring, decreases in the numbers of implantations and pups delivered and lowered body

weights of male and female pups were noted at 6000 p.p.m. and higher. These findings indicate that the dose level of 6000 p.p.m. used in this study was potent enough to adversely affect the survival and growth of pups. Reduced weight of the spleen was also observed in male and female weanlings. These findings also suggest that the immune system may be a target of DCBS toxicity. Other changes in the weights of organs, such as the brain and liver in male weanlings and the brain, liver and uterus in female weanlings are unlikely to be due to the toxic effects of DCBS because the degree of changes was relatively small, no dose-dependency was shown, no changes were noted in the absolute or relative weight, and also

Table 3 Absolute and relative organ weights of F0 female rats given N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide

Dose (p.p.m.)	Control	1500	3000	6000	10 000
No. females	6	6	6	6	5
Body weight (g)†	331 ± 18	316 ± 16	320 ± 11	306 ± 14*	274 ± 20**
Brain (g)†	2.10 ± 0.05‡	2.11 ± 0.08	2.10 ± 0.05	2.06 ± 0.10	2.06 ± 0.03
	0.63 ± 0.03§	0.67 ± 0.04	0.66 ± 0.02	0.67 ± 0.04	0.76 ± 0.05**
Pituitary (mg)†	13.3 ± 1.6‡	13.4 ± 2.4	15.4 ± 0.9	13.9 ± 1.9	12.9 ± 2.6
	4.03 ± 0.44§	4.24 ± 0.65	4.81 ± 0.32*	4.53 ± 0.46	4.70 ± 0.66
Thyroid (mg)†	18.3 ± 3.6‡	17.6 ± 3.5	17.7 ± 4.3	18.8 ± 2.7	17.5 ± 3.6
	5.52 ± 0.87§	5.55 ± 0.99	5.51 ± 1.18	6.15 ± 0.94	6.39 ± 1.02
Thymus (mg)†	255 ± 47‡	205 ± 63	237 ± 45	186 ± 89	116 ± 60**
	77.1 ± 14.4§	65.0 ± 19.6	74.2 ± 13.1	60.1 ± 26.5	41.7 ± 19.9*
Liver (g)†	13.03 ± 0.83‡	12.51 ± 0.71	13.42 ± 1.18	13.69 ± 0.68	12.18 ± 1.60
	3.94 ± 0.21§	3.97 ± 0.23	4.20 ± 0.27	4.48 ± 0.09**	4.46 ± 0.59
Kidney (g)†	2.34 ± 0.16‡	2.38 ± 0.13	2.35 ± 0.10	2.20 ± 0.12	2.51 ± 0.41
	0.71 ± 0.04§	0.75 ± 0.05	0.74 ± 0.04	0.72 ± 0.03	0.92 ± 0.18**
Spleen (mg)†	682 ± 74‡	589 ± 68	600 ± 89	493 ± 24**	459 ± 46**
	206 ± 20§	187 ± 19	188 ± 31	161 ± 5**	168 ± 15**
Adrenal (mg)†	75.5 ± 11.0‡	81.8 ± 12.9	77.0 ± 8.8	72.0 ± 8.8	88.2 ± 8.3
	22.9 ± 3.2§	26.0 ± 3.9	24.1 ± 2.7	23.5 ± 2.8	32.4 ± 3.8**
Ovary (mg)†	109 ± 18‡	113 ± 17	101 ± 5	101 ± 10	75 ± 23**
	32.9 ± 3.8§	36.1 ± 6.8	31.6 ± 2.4	32.9 ± 3.9	27.1 ± 6.4
Uterus (mg)†	513 ± 68‡	465 ± 73	489 ± 101	414 ± 71	369 ± 183
	156 ± 24§	148 ± 26	153 ± 32	135 ± 22	132 ± 56

*Significantly different from the control, $P < 0.05$; **significantly different from the control, $P < 0.01$.

†Values are given as the mean ± S.D.; ‡absolute organ weight; §relative organ weight (organ weight [g or mg]/100 g body weight).

Table 4 Absolute and relative organ weights for F1 male weanlings of rats given N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide

Dose (p.p.m.)	Control	1500	3000	6000	10 000
No. males	6	6	6	6	5
Body weight (g)†	67.1 ± 6.7	62.5 ± 4.5	63.8 ± 4.2	55.3 ± 8.9*	43.8 ± 10.6**
Brain (g)†	1.70 ± 0.05‡	1.63 ± 0.12	1.59 ± 0.04	1.51 ± 0.05**	1.45 ± 0.11**
	2.55 ± 0.21§	2.61 ± 0.24	2.50 ± 0.15	2.78 ± 0.42	3.44 ± 0.74*
Thymus (mg)†	257 ± 44‡	219 ± 33	265 ± 45	246 ± 36	190 ± 65
	382 ± 50§	351 ± 57	415 ± 59	449 ± 60	424 ± 50
Liver (g)†	2.56 ± 0.35‡	2.65 ± 0.29	2.69 ± 0.38	2.37 ± 0.38	1.72 ± 0.49**
	3.80 ± 0.17§	4.22 ± 0.20*	4.20 ± 0.37	4.30 ± 0.33*	3.90 ± 0.22
Spleen (mg)†	372 ± 63‡	276 ± 53**	296 ± 32*	250 ± 45**	148 ± 36**
	556 ± 84§	442 ± 80*	466 ± 56	452 ± 32*	337 ± 31**

*Significantly different from the control, $P < 0.05$; **significantly different from the control, $P < 0.01$.

†Values are given as mean ± S.D.; ‡absolute organ weight; §relative organ weight (organ weight [g or mg]/100 g body weight).

because the changes seem to be secondary effects of the lowered body weight. In the present study, external and internal morphological examinations of offspring were performed, but no skeletal examinations were conducted. To accurately evaluate prenatal developmental toxicity including teratogenicity, it is necessary to interrupt pregnancy 12–24 h before the expected term either by hysterectomy or the necropsy of maternal animals (Wilson 1965).

The adverse effects of DCBS on reproduction and development noted in the present feeding study are almost consistent with the findings of our previous gavage study (Ema *et al.* 2007), which showed decreased numbers of implantations and pups delivered and decreased body weight of the pups at higher doses. These endpoints appear to be affected at multiple points of the female reproductive and developmental process. The decreased number of implantations

Table 5 Absolute and relative organ weights for F1 female weanlings of rats given N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide

Dose (p.p.m.)	Control	1500	3000	6000	10 000
No. females	6	6	6	6	5
Body weight (g)†	65.7 ± 7.2	61.1 ± 3.4	59.9 ± 4.6	54.0 ± 9.6*	42.8 ± 9.6**
Brain (g)†	1.60 ± 0.09‡	1.56 ± 0.07	1.53 ± 0.03	1.50 ± 0.05*	1.37 ± 0.08**
	2.46 ± 0.25§	2.56 ± 0.16	2.57 ± 0.18	2.84 ± 0.39	3.34 ± 0.78**
Thymus (mg)†	272 ± 46‡	253 ± 33	252 ± 27	243 ± 51	216 ± 82
	415 ± 56§	415 ± 57	422 ± 37	456 ± 101	491 ± 92
Liver (g)†	2.58 ± 0.31‡	2.47 ± 0.27	2.42 ± 0.42	2.27 ± 0.43	1.71 ± 0.49**
	3.93 ± 0.14§	4.03 ± 0.22	4.02 ± 0.41	4.19 ± 0.13	3.96 ± 0.29
Spleen (mg)†	360 ± 57‡	296 ± 16	267 ± 60*	247 ± 50**	163 ± 59**
	548 ± 66§	484 ± 9	442 ± 72*	456 ± 37*	371 ± 58**
Uterus (mg)†	44.7 ± 6.6‡	41.3 ± 6.1	35.7 ± 2.1‡	42.0 ± 6.9	32.4 ± 4.8**
	68.9 ± 14.0 Temp.§	67.7 ± 9.8	60.0 ± 7.4	78.5 ± 10.8	77.3 ± 10.3

*Significantly different from the control, $P < 0.05$; ** significantly different from the control, $P < 0.01$.

†Values are given as the mean ± S.D; ‡absolute organ weight; §relative organ weight (organ weight [g or mg]/100 g body weight).

was the most striking effect in the present study. In our previous study, a decreased number of corpora lutea was noted in female rats given DCBS (Ema *et al.* 2007). Therefore, it is likely that the decreased number of implantations can be attributed to the decreased number of corpora lutea. The present study does not provide complete information on all aspects of reproduction and development due to the relatively small numbers of animals in the dose groups and selectivity of the endpoints. To further evaluate the reproductive and developmental toxicity of DCBS in rats, a two-generation reproductive toxicity study should be performed.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

Reference

- CERI (2002) N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide. Hazard Assessment Sheet, 2001–72. [Cited 13 June 2007.] Available from URL: http://qsar.cerij.or.jp/SHEET/S2001_72.pdf (Chemicals Evaluation and Research Institute Japan) (in Japanese).
- Clayson DB, Krewski DR (1990) Objectives of toxicity testing. In: Arnold DL, Grice HC, Krewski DR (eds). *Handbook of in Vivo Toxicity Testing*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 3–18.
- Ema M, Ito Y, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E (2007) Screening study for repeated dose and reproductive/developmental toxicity of rubber accelerator, N, N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide, in rats. *Drug Chem Toxicol* 30: 167–180.
- EPA (2001) Sulfenamide Accelerators Category Justification and Test Rationale. [Cited 13 June 2007.] Available from URL: <http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/sulfaccl/c13323tc.htm> (US Environmental Protection Agency).
- EPA (2006) Sulfenamide Accelerators Category IUCLID Data Set. [Cited 13 June 2007.] Available from URL: <http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/sulfaccl/c13323tc.htm> (US Environmental Protection Agency).
- European Chemical Bureau (2000) Existing-Chemicals IUCLID Data Set. [Cited 13 June 2007.] Available from URL: http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/IUCLID/DATA_SHEETS/4979322.
- Flexsys (2000) Product Data SANTOCURE DCBS. [Cited 13 June 2007.] Available from URL: <http://www.flexsys.com/internet/pages/pds.jsp?Product=F1108&ProductForm=F1108220&bugMS=.pdf>.
- MHW (1998) N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide. Chemical toxicity database-Toxicity Testing Reports of Environmental Chemicals. [Cited 13 June 2007.] Available from URL: <http://www.wdb.mhlw.go.jp/ginc/html/db1.html> (Ministry of Health and Welfare Japan) (in Japanese).
- OECD (2007) OECD Integrated HPV Database. [Cited 13 June 2007.] Available from URL: <http://cs3-hq.oecd.org/scripts/hpv/> (Organization for Economic Co-operation and Development).
- Vorobera RS (1969) N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide. *Chem Abstr* 71: 176.
- Wilson J (1965) Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: Wilson JG, Warkany J (eds). *Teratology: Principles and Techniques*. The University of Chicago Press, Chicago, IL, pp. 262–277.
- Yuan JH, Goehl TJ, Abdo K *et al.* (1995) Effects of gavage versus dosed feed administration on the toxicokinetics of benzyl acetate in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 33: 151–158.
- Yuan JH, Goehl TJ, Murrill E *et al.* (1994) Toxicokinetics of pentachlorophenol in the F344 rat. Gavage and dosed feed studies. *Xenobiotica* 24: 553–560.

有機スズ化合物の生殖発生毒性

江馬 眞

Reproductive and Developmental Toxicity of Organotin Compounds
Makoto Ema

有機スズ化合物の生殖発生毒性

江馬 眞

Reproductive and Developmental Toxicity of Organotin Compounds

Makoto Ema

Organotin compounds are chemicals widely used in agriculture and industry. Widespread use of organotins has caused increasing amounts to be released into the environment. Organotins show many aspects of toxicity, such as immunotoxicity, neurotoxicity, and reproductive/developmental toxicity. However, the reproductive and developmental toxicity of organotins is not well understood. The findings of the studies on reproductive and developmental effects of organotin compounds in mammals were summarized in this review.

Keywords: Organotin, reproductive toxicity, developmental toxicity, implantation failure, teratogenicity

1. はじめに

有機スズ化合物は農業や工業の分野で広く使われている^{1, 2)}。四価のスズ化合物は主に他の有機スズ化合物生産の中間体として使用されている。三価の有機スズ化合物は殺生物作用を有しており、防黴剤、ダニ駆虫剤、ネズミ駆散剤、軟体動物駆除剤等として、また、船底防汚剤として広く用いられている。特に、トリフェニルスズ (TPT) とトリブチルスズ (TBT) は藻類駆除剤、軟体動物駆除剤として、防汚剤製品中によく使われてきた。二価の有機スズ化合物は商業上で最も重要な誘導体であり、主にプラスチック工業の分野でポリマーの劣化を防止するためにポリ塩化ビニル (PVC) プラスティックの熱、光安定剤として使われている。一価の有機スズ化合物はPVCの安定剤として使用されている。有機スズ化合物の生産量をTable 1に示した。

近年の有機スズ化合物の広範な使用により有機スズ化合物による環境汚染の懸念が高まっている。農薬としての使用以外の有機スズ化合物の環境汚染の経路は、PVC プラスティックの安定剤として使われた有機スズ化合物の水中への溶出であり³⁾、また、船底防汚剤としての使用が水環境汚染の原因となっている⁴⁾。海棲生物⁵⁻⁷⁾ や海産物⁸⁻¹²⁾ からTBTやTPTが検出されており、カキ¹³⁾、泥ガニ¹⁴⁾、ムールガイ¹⁵⁾、チヌークサーモン¹⁶⁾、イルカ、マグロ及びサメ¹⁷⁾ における食物連鎖によるTBTの生物濃

Table 1. スズ化合物の生産量

物質名	CAS	生産量 (トン)
Dibutyltin dichloride	683-18-1	10,000 - 15,000
Dibutyltin dilaurate	77-58-7	1000 - 5000
Dibutyltin maleate	78-04-6	500 - 1000
Dibutyltin oxide	818-08-6	1000 - 5000
Dibutyltin bis (2-ethylhexylmercap-acetate)	10584-98-2	7,500 - 12,500
Dibutyltin bis (isooctyl mercap-acetate)	25168-24-5	Not available
Dimethyltin dichloride	753-73-1	1,000 - 5,000
Dimethyltin bis (2-ethylhexyl mercap-acetate)	57583-35-4	5,000 - 10,000
Dimethyltin bis (isooctyl mercap-acetate)	26636-01-1	Not available
Diocetyl tin dichloride	3542-36-7	5,000 - 10,000
Diocetyl tin bis (2-ethylhexyl mercap-acetate)	15571-58-1	7,500 - 12,500
Diocetyl tin bis (isooctyl mercap-acetate)	26401-86-5	Not available
Monobutyltin trichloride	1118-46-3	10,000-15,000
Monobutyltin tris (2-ethylhexyl mercap-acetate)	26864-37-9	2,500-7,500
Monobutyltin tris (isooctyl mercap-acetate)	25852-70-4	Not available
Monomethyltin trichloride	993-16-8	1,000 - 5,000
Methyltin Reverse Ester Tallate	201687-57-2	7,500 - 10,000
Monomethyltin tris (2-ethylhexylmercap-acetate)	57583-34-3	5,000 - 10,000
Monomethyltin tris (isooctylmercap-acetate)	54849-38-6	Not available
Mono-octyltin trichloride	3091-25-6	1,000 - 5,000
Mono-octyltin tris (2-ethylhexylmercap-acetate)	27107-89-7	2,500 - 7,500
Mono-octyltin tris (isooctylmercap-acetate)	26401-86-5	Not available
Tributyltin chloride	1461-22-9	2500 - 3000
Tetrabutyltin	1461-25-2	10,000 - 12,500
Tetraoctyltin	3590-84-9	2,500 - 7,500
Tin Tetrachloride	7646-78-8	20,000 - 25,000

出典: ORTEP Association. 2004. Global production data

To whom correspondence should be addressed:

Makoto Ema; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Phone: +81-3700-9878; Fax: +81-3-9700-1408; E-mail: ema@nihs.go.jp

縮, またコイ¹⁰⁾ 及びカプトガニ¹⁸⁾ における食物連鎖によるTPTの生物濃縮が報告されている. ヒトは海産物を通じて有機スズを摂取しており, 滋賀県人のTBTの1日摂取量は4.7-6.9 μg (1991年), 2.2-6.7 μg (1992年), TPTの1日摂取量は4.7-6.9 μg (1991年), 2.2-6.7 μg (1992年) であり¹⁹⁾, また, 1998年のトータルダイエツト方式調査による日本人の1日摂取量は, TPT: 0.09 μg , ジフェニルスズ (DPT) : 0 μg , TBT: 1.7 μg , ジブチルスズ (DBT) : 0.45 μg と報告されている¹⁹⁾. これらの値はFAO/WHO合同残留農薬専門家会議によるTPTの許容1日摂取量 (25 μg)²⁰⁾ 及びtributyltin oxide (TBTO) の経口曝露指針値 (18 μg)²¹⁾ よりも低く, 海産物中の有機スズ濃度はヒトの健康に悪影響を及ぼすほど高くはない^{11, 19)} と考えられるが, Belfoidら (2000)⁹⁾ は, ヒトの健康影響の可能性について結論を下すためには海産物中のTBT含量についての更なる研究が必要であると述べている.

近年, 環境汚染物質による内分泌系の障害の結果, 野生動物の生殖に対する悪影響が惹起される可能性が指摘されている²²⁾. TBT及びTPTは内分泌攪乱作用が疑われる物質とされており²³⁾, 低濃度で巻貝のインボセックス (imposex: 雌にペニスと輸精管が形成される現象), さらに繁殖障害を引き起こす²⁴⁾ ことから, 哺乳類における生殖発生毒性が懸念されている.

有機スズ化合物の一般毒性については古くから比較的良好に知られている^{2, 21, 25-28)} が, 生殖発生毒性の理解は十分ではない. 本稿では, Ema M and Hirose A (2006)²⁹⁾ Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. In *Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity*, CRC Pressの実験動物における生殖発生毒性の項を基に最近の新たな知見を加えて, 有機スズ化合物の生殖発生毒性について概説した.

2. フェニルスズ化合物の生殖毒性

2-1 トリフェニルスズ (TPT) の生殖毒性

TPTは昆虫の不妊化剤として知られている³⁰⁾. Table 2にTPTの生殖毒性試験の結果を示した. 雄に対する影響として, 100または200 ppmのtriphenyltin hydroxide (TPTH) を含む飼料を64日間与えた雄Sharmanラットを無処置雌ラットと繰り返し5回交配させたところ, 体重増加及び摂餌量の著しい低下とともに, 受精率, 出産生児数及び交配あたりの生児数の低下が認められたが, 摂餌量の回復とともに受精率が回復したことが報告されている³¹⁾. Holtzmanラットに20 mg/kgのtriphenyltin acetate (TPTA) またはtriphenyltin chloride (TPTCl) を19日間混餌投与したとき, 体重及び精巣重量への影響が顕著であった. 精巣では, 精細管の精上皮細胞層の減少, ステージの進行した精上皮細胞の減少及び精細管腔の狭小

化等の精巣の退行性変化がみられ, TPTAを投与したときにより強い毒性が観察されている³²⁾. 同様に, 20 mg/kgのTPTAまたはTPTClのHoltzmanラットへの20日間混餌投与により精子形成が障害されたが, 70日間正常飼料を与えると精子形成の完全な回復がみられた³³⁾. ICR/Ha SwissマウスにTPTA (2.4, 12 mg/kg) またはTPTH (1.3, 8.5 mg/kg) を単回腹腔内投与, もしくはTPTA (6mg/kg) またはTPTH (11 mg/kg) を5日間連続強制経口投与した後に, 無処置雌と交配させ, 妊娠13日に剖検した結果, 優性致死作用は認められなかった³⁴⁾.

TPTの雌動物における生殖毒性についても報告がある. 20 mg/kgのTPTAまたはTPTClのHoltzmanラットへの4日間混餌投与により, 成熟卵胞の減少, 初期卵胞の閉鎖の増加, 黄体の著しい減少が観察されている³⁵⁾. このような現象は排卵の減少, 延いては受胎率の低下の原因となる.

ラットの妊娠初期にTPTClを投与したときの妊娠の成立及び維持に対する影響が検討されている³⁶⁾. Wistarラットの妊娠0-3日に3.1, 4.7, 6.3 mg/kgまたは妊娠4-6日に6.3, 12.5, 25.0 mg/kg のTPTClを強制経口投与したところ, 用量依存的な着床阻害が引き起こされ, 妊娠0-3日の4.7 mg/kg以上, 妊娠4-6日の12.5 mg/kg以上で妊娠率の低下が観察された. 着床前胚死亡率の増加は妊娠0-3日の4.7 mg/kg以上でみられたが, TPTCl投与群の妊娠が成立した雌における着床数, 生存胎児数, 着床前及び着床後の胚死亡率は対照群と同様であった. これらの結果は妊娠初期に投与したTPTClは着床阻害作用を示し, 着床前に投与した方が強い影響を及ぼすことを示している.

子宮内膜の正常な機能は胚生存のために重要であり, 子宮の脱落膜化は正常な着床及び胎盤形成, その後の正常妊娠の維持に必須である. 偽妊娠動物における内膜創傷による子宮内膜の変化は, 胚の着床によって惹起される妊娠子宮における脱落膜反応と同様であり^{37, 38)}, 着床に関連した母体の生理学的変化のモデルとなりうる³⁷⁾. この方法を用いて脱落膜反応を誘起することにより化学物質の生殖発生毒性を母体と胚/胎児とに分けて検討することが可能となる³⁷⁻⁴¹⁾. TPTClの着床阻害作用の原因を明らかにするために, 子宮機能に対する作用が偽妊娠Wistarラットを用いて検討されている⁴²⁾. ラットの偽妊娠0-3日にTPTCl (3.1, 4.7, 6.3 mg/kg) を強制経口投与し, 偽妊娠4日の11:00から13:00の間に麻酔下で偽妊娠ラットの子宮内膜を創傷することにより脱落膜反応を誘起し, 偽妊娠9日の子宮重量を子宮脱落膜化の指標として測定した⁴³⁾. その結果, 子宮重量の低下 (子宮脱落膜化の抑制), 偽妊娠4及び9日の血清中プロゲステロン低下が4.7 mg/kg以上の投与でみられた. この投与量は妊娠0-3日に投与したときには着床前胚致死を引き起こす

Table 2 フェニルスズ化合物による生殖毒性

物質名	動物種	投与量	投与日	投与経路	生殖発生毒性	著者
TPTH	Sharman ラット	100-200 ppm	64-238 日	経口 (混餌)	↓ 生存児のある母体数 ↓ 同腹児数/交配	Gains & Kimbrough (1968)
TPTA TPTCl	Holtzman ラット	20 mg/kg	19 日	経口 (混餌)	↓ 精巣サイズ ↑ 精巣の形態学的変化	Pate & Hays (1968)
TPTA TPTCl	Holtzman ラット	20 mg/kg	20 日	経口 (混餌)	↑ 精子形成過程の障害	Snow & Hays (1983)
TPTA	ICR/Ha Swiss マウス	2.4-12 mg/kg	1 日	腹腔内	優性致死作用なし	Epstein et al. (1972)
TPTH		6 mg/kg	5 日	強制経口	優性致死作用なし	
		1.3-8.5 mg/kg	1 日	腹腔内	優性致死作用なし	
		11 mg/kg	5 日	強制経口	優性致死作用なし	
TPTA TPTCl	Holtzman ラット	20 mg/kg	4-24 日	経口 (混餌)	↓ 成熟卵胞数 ↑ 初期卵胞の閉鎖数 ↓ 黄体数	Newton & Hays (1968)
TPTCl	Wistar ラット	4.7-6.3 mg/kg 12.5-25 mg/kg	妊娠 0-3 日 妊娠 4-6 日	強制経口 強制経口	↓ 妊娠率, ↓ 胎児体重 ↓ 妊娠率	Ema et al. (1997a)
TPTCl	Wistar ラット	4.7-6.3 mg/kg	偽妊娠 0-3 日	強制経口	↓ 子宮内膜脱落膜化 ↓ 血清プロゲステロン	Ema et al. (1999a)
DPTCl	Wistar ラット	16.5-24.8 mg/kg	妊娠 0-3 日	強制経口	↓ 妊娠率, 着床前胚死亡 ↓ 胎児体重	Ema et al. (1999b)
		33.3 mg/kg	妊娠 4-7 日	強制経口	同上, ↑ 着床後胚死亡	
DPTCl	Wistar ラット	4.1-24.8 mg/kg	偽妊娠 0-3 日	強制経口	↓ 子宮内膜脱落膜化 ↓ 血清プロゲステロン	Ema & Miyawaki (2002)

TPTH: Triphenyltin hydroxide, TPTA: Triphenyltin acetate, TPTCl: Triphenyltin chloride, DPTCl: Diphenyltin dichloride.

量であった³⁶⁾。これらの結果は、TPTClはプロゲステロン低下を伴う子宮内膜の脱落膜化抑制を惹起し、これらがTPTClによる着床阻害に関与していることを示唆している。TPTClの子宮の脱落膜化抑制及び着床阻害作用に対する卵巣ホルモンの作用を検討したところ、プロゲステロンとエストロンの投与はTPTClを投与した卵巣摘出ラットの脱落膜化を維持し、4.7 mg/kg以上のTPTClとプロゲステロンを併用投与したラットの妊娠率及び着床数はTPTClを単独投与したラットよりも高かった⁴⁴⁾。これらの結果から、TPTClによる子宮内膜の脱落膜化抑制は、少なくとも部分的には、卵巣ホルモンを介しており、またプロゲステロンはTPTClによる着床阻害を防御することが示された。

2-2 ジフェニルスズ (DPT) の生殖毒性

ラットに経口摂取されたTPTは、ジフェニルスズ (DPT)、モノフェニルスズ (MPT) さらに無機スズに代謝される⁴⁵⁻⁴⁷⁾。DPT化合物の生殖毒性試験の結果をTable 3に示した。Diphenyltin dichloride (DPTCl) の妊娠成立及び妊娠維持に対する影響についてラットを用いて検討した⁴⁸⁾。DPTClをWistarラットの妊娠0-3日に4.1, 8.3, 16.5, 24.8 mg/kg, 妊娠4-7日に8.3, 16.5, 24.8, 33.0 mg/kgを強制経口投与したところ、妊娠率の低下が妊娠0-3日の24.8 mg/kg, 妊娠4-7日の33.0 mg/kgの投与でみられた。妊娠0-3日の16.5mg (48 μmol) /kg以上の投与で着床前の胚

致死が増加したが、妊娠の成立した雌の着床前胚死亡率は対照群と同様であった。着床後胚死亡率は妊娠4-7日の33.0 mg/kg 投与で上昇した。これらの結果から、妊娠初期に投与したDPTClは着床阻害を引き起こし、着床前の投与は着床中及び着床直後の投与よりも作用が強く発現することが明らかになった。妊娠0-3日の投与ではDPTClの親化合物であるTPTClも4.7 mg (12 μmol) / kg以上で着床前胚致死作用を示す⁴⁹⁾。モル投与量の比較により、TPTClの作用がDPTClよりも強いことが明らかなので、DPTClまたはその代謝物がTPTClの着床阻害作用の原因物質である可能性は低いと考えられる。しかしながら、TPT化合物はDPTClを投与したラットの肝で生成される⁴⁷⁾ので、投与されたDPT化合物の一部がTPTとして有害作用を発現している可能性があり、DPTの毒性研究の際にはこのことを考慮する必要がある。TPTとDPTによる生殖毒性の差異を明らかにし、その原因物質を明らかにするためには更なる研究を要する。

DPTClの子宮機能に対する影響について偽妊娠ラットを用いて検討されている。Wistarラットの偽妊娠0-3日に4.1, 8.3, 16.5, 24.8 mg/kgのDPTClを強制経口投与した結果、16.5 mg/kg以上の投与で子宮内膜脱落膜化の抑制、偽妊娠4日及び9日の血清プロゲステロンの低下が観察された⁵⁰⁾。これらの投与量はラットの妊娠0-3日に投与したときには着床前胚致死作用を示す量であった⁴⁸⁾。これらの知見は、DPTClはプロゲステロン低下を伴う子宮内

膜の脱落膜化抑制を惹起し、これらがDPTCIによる着床阻害の要因であることを示唆している。DPTCIの子宮内膜脱落膜化抑制及び着床阻害作用に対する卵巣ホルモンの作用を検討したところ、DPTCIを与えた卵巣摘出ラットにおける子宮脱落膜化がプロゲステロンとエストロンの投与で維持された⁵⁰⁾。また、16.5 mg/kg以上のDPTCIとプロゲステロンを併用投与したラットの妊娠率及び着床数はDPTCIを単独投与したラットよりも高かった。これらの結果から、DPTCIによる子宮内膜脱落膜化の抑制は、少なくとも部分的には、卵巣ホルモンを介しており、プロゲステロンはDPTCIによる着床阻害を防御することが示唆された。

3. フェニルスズ化合物の発生毒性

Table 3にフェニルスズ化合物の発生毒性試験の結果を示した。妊娠6-15日のSDラットにTPTA (5, 10, 15 mg/kg)を強制経口投与した実験では、10 mg/kg以上で母体重増加抑制、15 mg/kgで着床後胚死亡の増加、5 mg/kg以上で胎児の骨化遅延の増加が観察されているが、明らかな母体毒性を発現する投与量でも催奇形性は検出されていない⁵¹⁾。同様に、妊娠7-17日のWistarラットへのTPTA (1.5, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 mg/kg)の強制経口投与により、9.0 mg/kg以上の投与で母体重増加抑制、着床後胚死亡率の上昇及び胎児の骨化遅延がみられているが、催奇形性は認められていない⁵²⁾。TPTAの出生前投与による児の生後の行動変化が報告されている。CFYラットの妊娠6-14日に6 mg/kgのTPTAを強制経口投与した結果、母ラットに明確な毒性徴候はみられなかったが、児の自発運動の一過性の増加及び離乳前の死亡率の上昇が観察されている⁵³⁾。妊娠6-20日にTPTA (4, 8 mg/kg)を強制経口投与したTokai High Avoiders (THA)ラットの児では、シドマン回避学習試験での低回避率、E型水

迷路学習試験の逆転試験でのエラー数増加と到達点までの時間の延長等の学習獲得への影響が観察されている⁵⁴⁾。この実験では母体死亡及び体重増加抑制は8 mg/kgでみられたが、児の奇形はいずれの投与量でも観察されなかった。

SDラットにVancide KS (TPTH)を強制経口投与した実験では、妊娠1-7日の20 mg/kg投与では吸収胚の増加はみられなかったが、妊娠8-14日の15 mg/kgの投与では6母体中2母体でしか生児が得られず、妊娠14-20日の15 mg/kgの投与では6母体中4母体で生児が得られたことが報告されている⁵⁵⁾。しかし、この実験で使用した動物数は少なく、実験方法の詳しい報告がなされていない。妊娠6-15日のSDラットにTPTH (13 mg/kg)を強制経口投与した実験では、母体重増加抑制及び着床後胚死亡の増加が認められ、母体毒性と胎児体重及び胚/胎児死亡率との相関性がみられたが、TPTHによる胎児奇形の発現はなかった⁵⁶⁾。

Wistarラットの器官形成期にTPTCIを強制経口投与した実験では、母ラットの体重と摂餌量の低下が妊娠7-9日の3.1 mg/kg以上、妊娠10-12日または妊娠13-15日の6.3 mg/kg以上でみられた。着床後胚死亡率の上昇が妊娠7-9日の6.3 mg/kg以上、妊娠10-12日または妊娠13-15日の9.4 mg/kg以上でみられ、器官形成期の遅い時期ほど胚致死作用が強く発現する傾向がみられた。さらに、妊娠10-12日の12.5 mg/kgまたは妊娠13-15日の9.4 mg/kg以上で低体重胎児が認められたが、いずれの投与日及び投与量でも奇形胎児の発現率の上昇はみられていない⁵⁷⁾。

Table 3 フェニルスズ化合物による発生毒性

物質名	動物種	投与量	投与日	投与経路	生殖発生毒性	著者
TPTA	Wistar ラット	5-15 mg/kg	妊娠 6-15 日	強制経口	↑着床後胚死亡, ↓胎児骨化	Giavini et al. (1980)
TPTA	Wistar ラット	9-12 mg/kg	妊娠 7-17 日	強制経口	↑着床後胚死亡, ↓胎児骨化	Noda et al. (1991a)
TPTA	CFY ラット	6 mg/kg	妊娠 6-14 日	強制経口	↑生後児死亡, ↑児の自発運動 (一過性)	Lehotzky et al (1982)
TPTA	THA ラット	4-8 mg/kg	妊娠 6-20 日	強制経口	↓児の学習獲得	Miyake et al.(1991)
TPTH	SD ラット	20 mg/kg 15 mg/kg 15 mg/kg	妊娠 1-7 日 妊娠 8-14 日 妊娠 14-12 日	強制経口 強制経口 強制経口	↓妊娠率 ↑着床後胚死亡, ↓胎児体重 同上	Winek et al. (1978)
TPTH	SD ラット	13 mg/kg	妊娠 6-15 日	強制経口	↑着床後胚死亡	Chernoff et al.(1990)
TPTCI	Wistar ラット	6.3-12.5 mg/kg 9.4-12.5 mg/kg	妊娠 7-9 日 妊娠 10-12 日・13-15 日	強制経口 強制経口	↑着床後胚死亡 ↑着床後胚死亡, ↓胎児体重	Ema et al. (1999c)

TPTA: Triphenyltin acetate, TPTH: Triphenyltin acetate, TPTCI: Triphenyltin chloride.

4. ブチルスズ化合物の生殖毒性

4-1 トリブチルスズ (TBT) の生殖毒性

Table 4にブチルスズ化合物の生殖毒性試験の結果を示した。雄ICRマウスにTBTO (2, 10 mg/kg) を2回/週の頻度で4週間強制経口投与したところ、精子の減少及びセルトリ細胞の空胞化が認められている⁵⁸⁾。Wistarラットを用いた2世代繁殖試験において、F0の妊娠0日からF1の離乳まで、さらに交配前、交配中、妊娠中、授乳中を通じてF2の生後91日までのtributyltin chloride (TBTCI: 5, 25, 125 ppm: 0.4, 2.0, 10.0 mg/kgに相当) の混餌投与により、雄児に対する影響が報告されている⁵⁹⁾。125 ppmのF1及びF2雄で体重増加が抑制され、精巣及び精巣上体の重量低下、精子細胞及び精子数の減少が125 ppmでみられた。さらに、腹部前立腺重量低下及び精子細胞減少がF1の125 ppm, F2の25及び125 ppmで観察され、F2世代に対する影響はF1世代よりも大きかった。血清エストラジオールの低下が125 ppmでみられたことから、著者らはこれらの変化はアロマトーゼ抑制による影響であり、TBTCIは雄ラットにおいて弱いアロマトーゼ抑制因子として作用していると述べている。

上記の2世代繁殖試験における雌児ラットへの影響が

報告されている⁶⁰⁾。125 ppmのF0及びF1雌動物において、膣開口遅延、性周期の乱れ、妊娠中の体重増加、児数、児体重及び生児分娩率の低下が観察されている。肛門生殖突起間距離 (AGD) の体重による補正值⁶¹⁾ は、5 ppm以上のF1の生後1日、125 ppmのF1の生後4日及びF2の生後1日及び4日が高かった。これらの結果は、生涯にわたるTBTCI曝露が雌ラットの性発生と生殖機能に影響する可能性を示しており、著者らは雌のAGD延長はTBTCIの男性化作用を示唆していると述べている。

妊娠の成立及び維持に対するTBTCIの影響についてHarazonoら (1996;1998ab)^{62) 63) 64)}、HarazonoとEma (2000)⁶⁵⁾によりWistarラットを用いて詳しく調べられている。妊娠0-7日にTBTCI (8.1, 12.2, 16.3 mg/kg) を強制経口投与したところ、12.2 mg/kg以上で母体重の増加抑制、8.1 mg/kg以上で摂餌量低下がみられ、着床阻害は母体毒性が認められた12.2 mg/kg以上で観察されたが、妊娠の成立した雌においては黄体数、着床数及び胚死亡数にTBTCIの影響は認められなかった⁶²⁾。妊娠阻害がTBTCIそのものによるのか、母体の摂餌量低下によりもたらされた栄養不良によるものかを確認するために、ペア・フィーディング (PF) 試験を行ったところ

Table 4 ブチルスズ化合物による生殖毒性

物質名	動物種	投与量	投与日	投与経路	生殖発生毒性	著者
TBTO	ICR マウス	2-10 mg/kg	4 週間 (2 回/週)	強制経口	↓精子頭部数 ↑セルトリ細胞空胞化	Kumasaka et al. (2002)
TBTCI	Wistar ラット	25-125 ppm	2 世代	経口 (混餌)	↓精巣・精巣上体重量 ↓精子細胞数, ↓血清エストラジオール ↓雄児の体重増加	Omura et al. (2001)
TBTCI	Wistar ラット	5-125 ppm	2 世代	経口 (混餌)	↓生児分娩率, ↓児数・児の体重 ↓膣開口, ↑雌 AGD ↓雌児の体重増加	Ogata et al. (2001)
TBTCI	Wistar ラット	12.2-16.3 mg/kg	妊娠 0-7 日	強制経口	↓妊娠率 ↓胎児体重	Harazono et al. (1996)
TBTCI	Wistar ラット	16.3-32.5 mg/kg 16.3-65.1 mg/kg	妊娠 0-3 日 妊娠 4-7 日	強制経口 強制経口	↓妊娠率, ↓胎児体重 同上, ↑着床後胚死亡	Harazono et al. (1998b)
TBTCI	Wistar ラット	16.3-32.5 mg/kg 16.3-65.1 mg/kg	偽妊娠 0-3 日 偽妊娠 4-7 日	強制経口 強制経口	↓子宮内膜脱落膜化 ↓血清プロゲステロン ↑血清エストラジオール ↓子宮内膜脱落膜化 ↓血清プロゲステロン	Harazono & Ema (2000)
DBTCI	Wistar ラット	7.6-15.2 mg/kg	妊娠 0-3 日・4-7 日	強制経口	↓妊娠率 ↑着床前後胚死亡, ↓胎児体重	Ema & Harazono (2000)
DBTCI	IRC マウス	7.6-30.4 mg/kg	妊娠 0-3 日・4-7 日	強制経口	↓妊娠率 ↑着床前後胚死亡, ↓胎児体重 ↓血清プロゲステロン	Ema et al. (2007a)
DBTCI	Wistar ラット	7.6-15.2 mg/kg	偽妊娠 0-3 日・4-7 日	強制経口	↓子宮内膜脱落膜化 ↓血清プロゲステロン	Harazono & Ema (2003)
MBTCI	Wistar ラット	903 mg/kg	妊娠 0-3 日・4-7 日	強制経口	↓胎児体重	Ema & Harazono (2001)

TBTO: Tributyltin oxide, TBTCI: Tributyltin chloride, DBTCI: Dibutyltin dichloride, MBTCI: Butyltin trichloride.

ろ、TBTCI投与群の妊娠阻害はTBTCIそのものによるものであり、母体の栄養不良によるものでないことが示された⁶³⁾。次に、TBTCIの投与時期による影響を調べるために妊娠0-3日に4.1, 8.1, 16.3, 32.5 mg/kg または妊娠4-7日に8.1, 16.3, 32.5, 65.1 mg/kgを強制経口投与した結果、妊娠0-3日の16.3 mg/kg以上及び妊娠4-7日の65.1 mg/kgで妊娠率の低下及び着床前胚死亡の増加が認められた⁶⁴⁾。また、妊娠4-7日の16.3 mg/kg以上の投与では着床後胚死亡率の上昇が観察された。これらの結果は、TBTCIによる着床に対する悪影響は投与した妊娠時期により異なり、着床前に投与したときには着床阻害を、着床中及び着床直後に投与したときには着床した胚の生存に悪影響を及ぼすことを示している。TBTCIによる着床阻害の要因を調べるために、子宮機能に対する影響が偽妊娠ラットを用いて検討されている。偽妊娠0-3日の16.3 mg/kgの強制経口投与により、子宮重量低下（子宮内膜の脱落膜化の抑制）及び偽妊娠4日及び9日の血清中プロゲステロンの低下が認められた⁶⁵⁾。偽妊娠4-7日の16.3 mg/kg以上の投与により偽妊娠9日の血清中プロゲステロンの低下がみられた。偽妊娠ラットの子宮重量低下及びプロゲステロン低下を引き起こす投与量は、妊娠ラットにおいて着床前及び着床後の胚死亡を惹起する投与量と同じであった。これらの実験結果は、TBTCIは子宮内膜の脱落膜化抑制とプロゲステロン低下を引き起こし、これらがTBTCIによる着床阻害の要因となっていることを示唆している。

4-2 ジブチルスズ (DBT) 及びモノブチルスズ (MBT) の生殖毒性

ラットに投与されたTBTはDBT及びモノブチルスズ (MBT) に代謝され、また投与されたDBTはMBTに代謝される^{45, 66-68)}。TBTの生殖毒性発現におけるdibutyltin dichloride (DBTCI) の役割を検討するために、DBTCIの妊娠成立及び維持に対する影響についてWistarラットを用いて調べられている⁶⁹⁾。妊娠0-3日または妊娠4-7日に3.8, 7.6, 15.2 mg/kgを強制経口投与した。3.8 mg/kg以上で摂餌量の低下が観察されたため、PF群を設けた。妊娠0-3日の投与では、妊娠率は7.6 mg/kgで対照群より低く、15.2 mg/kgで対照群及びPF群よりも低かった。着床後胚死亡率は妊娠4-7日の7.6 mg/kg以上で対照群及びPF群よりも高くなった。これらの知見から、DBTCIによる初期胚の死亡は摂餌量の低下による影響ではなく、DBTCIによる直接的な作用であると考えられる。初期胚の死亡率上昇をもたらす最も低いDBTCIの投与量は7.6 mg (25 μ mol) /kgであった。DBTCIの親化合物のTBTCIは16.3 mg (50 μ mol) /kg以上の投与で着床阻害を惹起させた⁶⁴⁾。DBTCIはTBTCIよりも低い投与量で初期胚の

死亡を引き起こすことから、DBTCIまたはその代謝物がTBTCIによる胚死亡の原因物質である可能性がある。着床阻害を引き起こす投与量のDBTCIを強制経口投与した偽妊娠ラットでは、プロゲステロン低下を伴った子宮内膜の脱落膜化抑制がみられ⁷⁰⁾、プロゲステロンの投与により、少なくとも部分的には、DBTCIによる着床阻害が防御された⁷¹⁾。これらのことはプロゲステロンの低下がDBTCIによる着床阻害の第一の要因であることを示唆している。Wistarラットの妊娠0-3日または妊娠4-7日に903 mg (3200 μ mol) /kgのbutyltin trichloride (MBTCI) を強制経口投与しても着床前及び着床後の胚死亡率の上昇は認められなかった⁷²⁾ ことから、MBTCIまたはその代謝物がブチルスズによる着床阻害の原因物質であるとは考え難い。脱落膜反応の低下及びプロゲステロン低下をもたらすDBTCIはモル比較でTBTCIよりも低いことは、TBTCIによるこれらの現象にDBTCIが関与していることを示唆している。偽妊娠0-3日にTBTCIを投与したときには血清エストラジオールが低下した⁶⁵⁾ が、DBTCIの投与ではこのような低下は観察されなかったことから、TBTCIとDBTCIの卵巣機能に及ぼす悪影響の機序は異なっている可能性もある。卵巣を含めて母体の内分泌系に対するTBTCIとDBTCIの影響については更なる検討を要する。また、ICRマウスにDBTCIを強制経口投与して着床阻害作用が検討され、妊娠0-3日の30.4 mg/kgの投与により妊娠率の低下及び着床前胚死亡率の上昇、妊娠0-3日の15.2 mg/kg以上及び妊娠4-7日の7.6 mg/kg以上の投与により着床後胚死亡率の上昇が認められた⁷³⁾。妊娠0-3日または妊娠4-7日に30.4 mg/kgを投与したときには、妊娠ラット血清中プロゲステロンの低下がみられたことから、マウスにおけるDBTCIによる着床阻害作用においてもプロゲステロン低下が要因となっており、ラットと同様の機序により着床阻害が惹起される可能性が示唆された。

5. ブチルスズ化合物の発生毒性

5-1 ブチルスズのin vivo発生毒性

ブチルスズの発生毒性試験の結果をTable 5に示した。TBTOの発生毒性についてはマウス及びラットを用いて検討されている。NMRIマウスの妊娠6-15日にTBTOを強制経口投与したとき、母体体重低下を引き起こす最も低い投与量は11.7 mg/kgであり、35 mg/kgでは吸収胚が59%の頻度でみられ、低胎児体重も観察されている⁷⁴⁾。口蓋裂が11.7 mg/kgで7%、35 mg/kgで48%の頻度で観察されたが、Davisら (1987)⁷⁴⁾ は、口蓋裂はTBTOに非特異的な発現であり、TBTOによる発現ではないと結論した。Swiss マウスの妊娠6-15日にTBTOを強制経口投与した実験では、40 mg/kgで母体体重及び胎児体重低下、

Table 5 プチルスズ化合物による発生毒性

物質名	動物種	投与量	投与日	投与経路	生殖発生毒性	著者
TeBT	Wistar ラット	1832 mg/kg	妊娠 13-15 日	強制経口	↑ 口蓋裂	Ema et al. (1996a)
TBTO	NMRJ マウス	11.7-35 mg/kg	妊娠 6-15 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重 ↑ 口蓋裂	Davis et al. (1987)
TBTO	Swiss マウス	40 mg/kg	妊娠 6-15 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重	Baroncelli et al.(1990)
TBTO	Swiss マウス	10-30 mg/kg	妊娠 6-15 日	強制経口	↓ 同腹児数, ↓ 児体重 妊娠期間の変化, ↓ 営巣行動を示す母体	Baroncelli et al.(1995)
TBTO	Swiss マウス	5-20 mg/kg	妊娠 6-15 日	強制経口	↑ 非特異的血液学的変化	Karrer et al (1995)
TBTO	Ha:NMRJ マウス	27 mg/kg	妊娠 6-17 日	強制経口	↓ 胎児体重, ↑ 口蓋裂 ↑ 骨格異常	Faqi et al. (1997)
TBTO	Long Evans ラット	2.5-16 mg/kg	妊娠 6-20 日	強制経口	↓ 児数・児体重 ↑ 口蓋裂, ↓ 出産後体重増加 ↓ 膈開口, ↓ 脳重量, ↓ 児運動 (一過性)	Crofton et al. (1989)
TBTO	THA ラット	5-10 mg/kg	妊娠 6-20 日	強制経口	↑ 生後児死亡, ↓ 学習獲得	Miyake et al. (1990)
TBTA	Wistar ラット	16 mg/kg	妊娠 7-17 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↑ 口蓋裂 ↓ 胎児体重	Noda et al. (1991b)
TBTCl	Wistar ラット	5-25 mg/kg	妊娠 7-15 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児骨化	Itami et al. (1990)
TBTCl	Wistar ラット	25-50 mg/kg 50-100 mg/kg 25-100 mg/kg	妊娠 7-9 日 妊娠 10-12 日 妊娠 13-15 日	強制経口 強制経口 強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重 ↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重, ↑ 口蓋裂 ↓ 胎児体重, ↑ 口蓋裂	Ema et al. (1995a)
TBTCl	Wistar ラット	100-200 mg/kg	妊娠 7-15 日の 1 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重 ↑ 口蓋裂 (妊娠 8, 11, 12, 13, 14 日の投与)	Ema et al. (1997b)
TBTCl	SD ラット	0.25-20 mg/kg 2.5-10 mg/kg	妊娠 0-19 日 妊娠 8-19 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重 ↑ 雄 AGD, ↓ 胎児骨化 ↓ 血清チロキシン・トリヨードチロニン ↓ 血清チロキシン	Adeeko et al. (2003)
TBTCl	SD ラット	0.025-2.5 mg/kg	妊娠 8 日から離乳	強制経口	↓ 肝臓・脾臓・胸腺重量 ↓ 血清クレアチニン・トリグリセリド ↓ アミラーゼ・チロキシン 成長プロファイルの変化	Cooke et al. (2004)
TBTCl	SD ラット	0.25-2.5 mg/kg	妊娠 8 日から離乳	強制経口	↑ 胸腺萎縮, ↑ NK 細胞数 ↑ IgM・IgG ↑ 未成熟 T リンパ球数, ↓ IgG2a	Tryphonas et al. (2004)
TBTCl	SD ラット	1-5 mg/kg	妊娠 6-20 日	強制経口	↑ 自発運動 ↓ 放射迷路課題遂行能力獲得 ↑ d-アンフェタミンによる活動亢進	Gårdlung et al. (1991)
TBTCl	Wistar ラット	40-80 mg/kg	妊娠 7-8 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重	Ema et al. (1995b)
TBTCl	Wistar ラット	54-108 mg/kg	妊娠 13-15 日	強制経口	↓ 胎児体重, ↑ 口蓋裂	Ema et al. (1996a)
DBTA	Wistar ラット	15 mg/kg	妊娠 0-19 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重, ↑ 下顎異常 ↑ 舌癒合・舌裂, ↑ 骨格変異	Noda et al. (1988)
DBTA	Wistar ラット	5-15 mg/kg	妊娠 7-17 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重 ↑ 下顎裂・下唇裂・舌癒合・舌裂 ↑ 尾異常・肋骨及び椎骨の奇形・骨格変異	Noda et al. (1992a)
DBTA	Wistar ラット	15 mg/kg 22 mg/kg	妊娠 7-9 日 妊娠 8 日	強制経口 強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重 ↑ 下顎裂・下唇裂・舌癒合・舌裂 ↑ 尾異常・肋骨及び椎骨の奇形・骨格変異	Noda et al. (1992b)
DBTA	Wistar ラット	28.1 mg/kg	妊娠 8 日	強制経口	↑ 同上の奇形	Noda et al. (1993)
DBTA	Wistar ラット	10-22 mg/kg	妊娠 8 日	強制経口	↑ 同上の奇形	Noda et al. (2001)
DBTCl	Wistar ラット	5-10 mg/kg	妊娠 7-15 日	強制経口	↑ 着床後胚死亡, ↓ 胎児体重 ↑ 下顎裂・口蓋裂・舌癒合・膈ヘルニア ↑ 尾異常・肋骨及び椎骨の奇形	Ema et al. (1991)
DBTCl	Wistar ラット	20 mg/kg 20-40 mg/kg	妊娠 7-9, 10-12, 13-15 日 妊娠 6, 7, 8, 9 日	強制経口 強制経口	↓ 胎児体重, ↑ 着床後胚死亡 ↑ 同上の奇形 (妊娠 7-9 日の投与) ↓ 胎児体重, ↑ 着床後胚死亡 (妊娠 6, 7, 8 日の投与) ↑ 同上の奇形 (妊娠 7, 8 日の投与)	Ema et al. (1992)
DBTCl	Wistar ラット	24.3 mg/kg	妊娠 8 日	強制経口	↓ 胎児体重, ↑ 下顎裂・下唇裂・舌癒合 ↑ 舌裂・膈ヘルニア・肋骨及び椎骨の奇形	Noda et al. (1993)

DBTCI	Wistar ラット	10-15 mg/kg	妊娠 7-8 日	強制経口	↓胎児体重, ↑口蓋裂	Ema et al. (1995b)
DBTCI	Wistar ラット	50-100 mg/kg	妊娠 13-15 日	強制経口	↓胎児体重	Ema et al. (1996a)
DBTCI	Wistar ラット	1-10 mg/kg	妊娠 6-15 日	強制経口	影響なし	Farr et al. (2001)
DBTCI	SD ラット	15 mg/kg	妊娠 6-15 日	強制経口	↓胎児体重, ↑着床後胚死亡 ↑水頭症・下顎異常・外脳・開眼・口蓋裂・舌癒合・無舌	Thullen & Holson (2006)
DBTCI	NZW ウサギ	5 mg/kg 0.4-1.0 mg/kg	妊娠 6-19 日 妊娠 6-28 日	強制経口 強制経口	↓胎児体重, ↑着床後胚死亡 ↑流産	Thullen & Holson (2006)
DBTCI	カニクイザル	2.5-3.8 mg/kg	妊娠 20-50 日	胃内(経鼻)	↑着床後胚死亡	Ema et al. (2007b)
DBTM	Wistar ラット	27.8 mg/kg	妊娠 8 日	強制経口	↑下顎裂・下唇裂・舌癒合, ↑舌裂・脳ヘルニア・肋骨及び椎骨の奇形	Noda et al. (1993)
DBTO	Wistar ラット	19.9 mg/kg	妊娠 8 日	強制経口	↑同上の奇形	Noda et al. (1993)
DBTL	Wistar ラット	50.0 mg/kg	妊娠 8 日	強制経口	↑同上の奇形	Noda et al. (1993)
3-OHDBTL	Wistar ラット	100 mg/kg	妊娠 8 日	強制経口	↓胎児体重, ↑尖下顎	Noda et al. (1993)
MBTCI	Wistar ラット	50-400 mg/kg	妊娠 7-17 日	強制経口	影響なし	Noda et al. (1992a)
MBTCI	Wistar ラット	1000-1500 mg/kg	妊娠 7-8 日	強制経口	↓胎児体重	Ema et al. (1995b)

TeBT: Tetrabutyltin, TBTO: Tributyltin oxide, TBTA: Tributyltin acetate, TBTCI: Tributyltin chloride, DBTA: Dibutyltin diacetate, DBTCI: Dibutyltin dichloride, DBTM: Dibutyltin maleate, DBTO: Dibutyltin oxide, DBTL: Dibutyltin dilaurate, 3-OHDBTL: Butyl (3-hydroxybutyl)tin diacetate, MBTCI: Butyltin trichloride.

胚死亡率の上昇がみられたが、催奇形性は認められていない⁷⁵⁾。

児の生後観察に関する実験では、妊娠6-15日のSwissマウスへのTBTOの強制経口投与により、20 mg/kg以上で児数の低下及び児の低体重、10 mg/kg以上で母マウスの営巣行動不良、5 mg/kg以上で低体重母体、分娩時期の乱れが認められたが、児の奇形は観察されていない⁷⁶⁾。同様に、Swissマウスの妊娠6-15日にTBTO (5, 10, 20 mg/kg)を強制経口投与したところ、児動物に非特異的血液学的変化、胸腺及び脾臓重量の低下が認められた⁷⁷⁾。Han:NMRIマウスの妊娠6-17日にTBTOを強制経口投与した実験では、27 mg/kgで11.4%の頻度で口蓋裂が観察され、2例の胎児では橈骨彎曲、8例の胎児で短頸、5例の胎児で後頭骨癒合がみられたが、13.5 mg/kg以下の投与では母体及び胎児に対する悪影響は認められなかった⁷⁸⁾。ラットを用いた実験では、妊娠6-20日にTBTO (2.5, 5, 10, 12, 16 mg/kg)を強制経口投与したLong Evansラットを自然分娩させ、出生後の児を調べたところ、10 mg/kg以上で母体重増加抑制、児数、児体重及び生後1日及び3日の児生存率の低下、12 mg/kgで3%の頻度で口蓋裂、10 mg/kgで臍開口遅延、全ての投与量で生後14日の児の運動低下が観察されている⁷⁹⁾。また、妊娠6-20日にTBTOを強制経口投与したTHAラットの児は、10 mg/kgでは生後3日までにすべて死亡し、5 mg/kgではシドマン回避学習試験、E型水迷路学習試験の逆転試験における学習獲得が障害されていた⁸⁰⁾。

Nodaら (1991b)⁵²⁾は、妊娠7-17日のWistarラットにtributyltin acetate (TBTA: 1, 2, 4, 8, 16 mg/kg)を強制経口投与したところ、16 mg/kgで子宮内死亡及び口蓋裂

の頻度増加、低体重胎児がみられ、この投与量では母体重と摂餌量の著しい低下、4 mg/kg以上で妊娠ラットの胸腺重量の低下がみられたと報告している。彼らは、この実験で観察された胎児の奇形はDaivisら (1987)⁷⁴⁾により報告されたものと同様であることから、TBTAによる特異的な作用ではないと結論した。

TBTCIについては比較的よく研究されている。Wistarラットの妊娠7-15日にTBTCIを強制経口投与したところ、9 mg/kg以上で母体毒性、5 mg/kg以上で胎児の骨化遅延がみられたが、胎児奇形は観察されなかった⁸¹⁾。この実験結果をより詳しく調べるために、器官形成期を三分割して、妊娠7-9日に25, 50 mg/kg、妊娠10-12日に50, 100 mg/kgまたは妊娠13-15日に25, 50, 100 mg/kgをWistarラットに強制経口投与して発生毒性を検討した⁸²⁾。投与日にかかわらず母体重増加抑制が認められ、着床後胚死亡率の上昇は、妊娠7-9日の25 mg/kg以上及び妊娠10-12日の100 mg/kgでみられたが、妊娠13-15日の投与では100 mg/kgでも認められなかった。低体重胎児は妊娠10-12日の50 mg/kg以上及び妊娠13-15日の100 mg/kgでみられた。奇形胎児の発現頻度は妊娠10-12日の100 mg/kg及び妊娠13-15日の25 mg/kg以上で上昇し、口蓋裂が最も高頻度で観察された。これらの結果は、TBTCIによる発生毒性は投与時の胚の発生段階によって異なり、TBTCIの催奇形性には時期特異性があることを示している。催奇形性の感受期を更に詳しく調べるために、Wistarラットの器官形成期のいずれか1日にTBTCIを強制経口投与したところ、TBTCIの催奇形性の発現頻度は2峰性を示し、妊娠8日の100 mg/kg以上、妊娠11日、12日、13日または14日の200 mg/kgの投与で外表奇形の

発現頻度が上昇した⁴⁹⁾。SDラットの妊娠0-19日 (0.25, 2.5, 10, 20 mg/kg) または妊娠8-19日 (0.25, 2.5, 10 mg/kg) にTBTCIを強制経口投与したところ、妊娠0-19日の20 mg/kgの投与で母体重増加抑制、妊娠率低下、着床後胚死亡率上昇及び低体重胎児が認められた⁸³⁾。この結果は、妊娠初期のラットにTBTCIを投与したとき12.2 mg/kg以上で着床前及び着床後胚死亡率の上昇が認められた、というHarazonoら (1996, 1998a,b)⁶²⁻⁶⁴⁾の報告を支持する知見である。Adeekoら (2003)⁸³⁾の試験では、いずれのTBTCI投与群でも奇形胎児の発現頻度の上昇はみられていない。10 mg/kg以上では胸骨分節の骨化遅延が認められたが、著者らはこの胎児体重の低下を伴わない変化には母体血中甲状腺ホルモン低下が関与している可能性があるとして述べている。

哺乳類の性分化時期 (周生期) にホルモン活性物質を投与すると外生殖器及び内生殖器に影響を与えることが知られている⁸⁴⁾。ラットでは、妊娠16-17日がfinasteride⁸⁵⁾、妊娠15-17日がdibutyl phthalate⁸⁶⁾による雌性化 (雄児のAGD短縮) に最も鋭敏な時期であることが報告されている。これらのことは、AGDに対する影響の感受期は妊娠後期にあることを示している。しかしながら、0.25 mg/kg以上のTBTCIを妊娠0-19日に投与したときに雄児のAGD延長がみられたという所見と、10 mg/kgでも妊娠8-19日に投与したときにはAGDへの影響がみられなかったという所見⁸³⁾、さらには、2世代繁殖試験では雌のAGD延長が認められたという所見⁸⁷⁾の間には矛盾があり、TBTCIのAGDに対する影響、すなわち、性分化に対する影響を明らかにするためには更なる研究を要する。TPT及びTBTはin vitroで哺乳類細胞において転写を介してアンドロゲン受容体を活性化させ⁸⁸⁾、TPTCI、TBTCI及びDBTCIはヒト副腎皮質がん株化細胞においてアロマターゼ抑制を引き起こす⁸⁹⁾ことが報告されている。テトラブチルスズ (TeBT) とMBTCIはヒト5 α -還元酵素 type 1及びtype 2に作用を示さないが、TBTCIとDBTCIはヒト5 α -還元酵素アイソザイムに影響を及ぼす⁹⁰⁾。DBTCIは前立腺5 α -還元酵素 type 2に作用せずに、特異的に脳5 α -還元酵素 type 1を抑制するが、TBTCIは両アイソザイムを抑制する。また、正常な雄性生理状態はtype 2によって障害される。これらのin vitroの知見は、in vivoで観察された生殖発生毒性所見を解釈するのに有用と思われるが、更なる知見の集積が必要である。

SDラットの妊娠8日から児の離乳までTBTCI (0.025, 0.25, 2.5 mg/kg) を強制経口投与し、児にも同じ投与量を成熟期まで強制経口投与した実験^{91, 92)}では、母体の体重、摂餌量、甲状腺、肝臓、副腎及び結腸の病理組織学的所見に影響はみられず、児の数、性比、生存率、肝臓、副腎及び結腸の病理組織学的所見にも影響は観察されな

かった。2.5 mg/kgで雄児の血清チロキシン低下、雌児の血清クレアチニン、トリグリセリド及びマグネシウム低下、0.25 mg/kg以上で雄児の脾臓及び雌児の胸腺の重量低下、0.025 mg/kg以上で雌雄の児の成長プロファイルへの影響、雌児の肝臓重量の低下がみられた⁹¹⁾。これらの児ラットの免疫学的影響について調べた⁹²⁾ところ、2.5 mg/kgで胸腺萎縮、NK細胞及びIgMの増加、IgG2a低下がみられ、0.25 mg/kg以上で未分化T細胞IgGの増加が認められ、0.025 mg/kgでもわずかな影響が観察された。Tryphonasら (2004)⁹²⁾は、低用量のTBTCIは液性及び細胞性免疫に影響を与えると共に腫瘍やウイルス感染に対する免疫系にかかわる種々の細胞の機能に影響を与えるとして結論している。

TBTCIを成熟ラットに投与したときには、自発運動の低下及び日内周期の乱れ、条件回避反応の低下がみられることが報告されている^{93, 94)}。妊娠6-20日のSDラットにTBTCIを強制経口投与したところ、母体毒性が発現しない投与量 (1及び5 mg/kg) で生後の児の自発運動増加、迷路での学習獲得の遅延、d-アンフェタミンによる活動亢進の増強が観察されている⁹⁵⁾。

TBTの主要な代謝物であるDBTを器官形成期に投与したときの胚/胎児の発生に対する影響が数多く報告されている。Dibutyltin diacetate (DBTA; 1.7, 5, 15 mg/kg) をWistarラットの妊娠0-19日に強制経口投与した結果、15 mg/kgで母体重増加と胸腺重量の低下、低体重胎児及び奇形胎児の発現頻度の上昇がみられている⁹⁶⁾。DBTA (1.7, 5, 15 mg/kg) を妊娠7-17日のWistarラットに強制経口投与したところ、15 mg/kgで母体重増加抑制、10 mg/kg以上で下顎裂、下唇裂、舌癒合、舌裂、外脳、尾異常、肋骨及び椎骨の異常等の奇形、胎児体重及び胸腺重量の低下が観察された⁹⁷⁾。DBTAによる奇形胎児発現の感受性は妊娠8日が最も高かったことが報告されている⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾。

DBTCIについてもWistarラットの器官形成期に強制経口投与して発生毒性が検討されている。妊娠7-15日の投与では、7.5 mg/kg以上で母体重増加抑制、摂餌量低下及び着床後胚死亡の増加がみられた。また、5 mg/kg以上で小眼症、下顎裂、舌癒合、臍帯ヘルニア、尾異常、下顎異常、肋骨及び椎骨の異常等の奇形を有する胎児の発現頻度の上昇がみられ、小眼症が最も高頻度でみられた¹⁰¹⁾。これらの結果は、母体毒性の発現しない投与量でもDBTCIの催奇形性が発現することを示している。一方、Farrら (2001)¹⁰²⁾は妊娠6-15日に1, 2.5, 5, 10 mg/kgを投与したところ、10 mg/kgでは母体重増加、摂餌量及び胸腺重量の低下がみられたが、発生毒性は認められなかったと報告している。しかし、奇形の発現率に有意差はなかったものの、262例の胎児の内、4例に舌癒合、下顎異常、尾異常及び椎骨異常が観察されており、これら

はNodaら (1993)⁹⁸⁾ 及び我々^{101, 103, 104)} の実験において DBTCIによって惹起された奇形と同様であった。Farrら (2001)¹⁰²⁾ は母体毒性を惹起する投与量でしかDBTCIの催奇形性は発現しないと結論しているが、我々の実験結果を含めて考えると、DBTCIの母体毒性、胚致死作用及び催奇形性の臨界量が非常に接近または重っている可能性がある。SDラットの妊娠6-15日にDBTCI (15 mg/kg) を強制経口投与した実験においても、死亡等を含む母体毒性と着床後胚死亡の増加、低体重胎児と共に、頭蓋顔面奇形や舌癒合等Wistarラットを用いた実験で観察された外表奇形の発現頻度の上昇がみられている¹⁰⁵⁾。

DBTCIによる奇形発現の感受期を調べるために比較的高い投与量を用いて検討が行われている。Wistarラットの妊娠7-9日、10-12日または13-15日に投与したところ、投与日に関わらず20 mg/kgで着床後胚死亡率及び低胎児体重は観察されたが、奇形胎児の発現頻度の上昇は妊娠7-9日の投与でしか認められなかった¹⁰³⁾。器官形成期のいずれか1日に単回投与して奇形発現の感受期を調べたところ、妊娠6日の投与では催奇形性はみられず、妊娠7日に催奇形性が発現し、妊娠8日に催奇形性の感受性が最も高くなり、妊娠9日の投与では催奇形性は認められなかった¹⁰³⁾。同様な奇形はDBTCIを妊娠8日または妊娠7-8日に投与したときにも観察されている^{98, 104)}。

New Zealand Whiteウサギの妊娠6-19日にDBTCI (0.5, 1, 5, 10, 15, 20 mg/kg) を強制経口投与した投与量設定のための予備試験では、10 mg/kg以上の投与量で著しい母体毒性が認められたため、妊娠11日までに実験を中断した¹⁰⁵⁾。1及び5 mg/kgでも下痢、体重増加及び摂餌量の低下等の母体毒性がみられたが、10 mg/kgで観察されたほど重篤ではなかった。5 mg/kgでは着床後胚死亡の増加と低体重胎児がみられた。これらの結果をもとに、投与量を0.1, 0.4, 1.0 mg/kgとして一群25匹のNew Zealand Whiteウサギの妊娠6-28日に強制経口投与して本試験を行ったところ、0.4 mg/kgで3例、1.0 mg/kgで4例の母体で流産がみられたが、着床後胚死亡率、胎児体重、着床数及び生存胎児数に対する影響は認められなかった。0.1 mg/kgでは母体及び胎児への影響は観察されなかった¹⁰⁵⁾。これらの所見は、ウサギにおいては胚死亡や奇形等の胚/胎児に対する影響が発現するよりも低用量で流産を含む母体に対する毒性影響が強く発現することを示している。

カニクイザルの器官形成期 (妊娠20-50日) を通じてDBTCI (2.5, 3.8 mg/kg) を胃内投与し、妊娠100日に母体を剖検して胎児への影響を調べた実験¹⁰⁶⁾ では、両DBTCI投与量群で母体の下痢または軟便、母体重増加の抑制または摂餌量の低下がみられた。胎児生存率は両DBTCI投与群で低下し、3.8 mg/kgでは有意に低かった。

生存胎児の体重、頭臀長、尾長、性比、AGD、胎盤重量に投与の影響はみられず、胎児の外表、内臓及び骨格所見にも異常は認められなかった。また、死亡胚にも奇形は観察されなかった。これらの結果から、カニクイザルではDBTCIは胚致死作用を示すが、催奇形性は示さないと結論された。

DBTA, DBTCI, dibutyltin maleate (DBTM), dibutyltin oxide (DBTO) 及びdibutyltin dilaurate (DBTL) 等 (DBTとして 80 μ mol/kg) を、DBTA及びDBTCIの催奇形性に対して最も感受性が高い妊娠8日のWistarラットに強制経口投与してその催奇形性を比較した⁹⁸⁾。それぞれのDBTによる奇形発現率は異なっていたが、発現した奇形の型は同様であったことから、Nodaら (1993)⁹⁸⁾ は奇形発現にはブチル基が重要な役割を果たしているとして述べている。また、DBTCIの主要な代謝物⁶⁷⁾ であるbutyl (3-hydroxybutyl) tin dilaurate (3-OHDBTL) の催奇形性は弱く、3-OHDBTLはDBTCIの催奇形性の原因物質ではないとしている。

TeBTはTBT, DBT更にMBTに代謝される⁴⁵⁾。また、TBTはDBT及びMBTに代謝され、DBTはMBTに代謝される⁶⁸⁾。ブチルスズ化合物の催奇形性の原因物質を推定するために、WistarラットにTeBT, TBTCI, DBTCIまたはMBTCIを強制経口投与して胚/胎児への影響を調べた^{107, 108)}。TBTCIの催奇形性の感受期である妊娠13-15日にTeBT, TBTCIまたはDBTCIを投与したところ、TeBTでは1832 mg (5280 μ mol) /kgで口蓋裂、TBTCIでは54 mg (165 μ mol) /kg以上で口蓋裂及び108 mg (330 μ mol) /kgで低体重胎児がみられた。DBTCIの投与では50 mg (165 μ mol) /kg以上で低体重胎児が観察されたが、100 mg (330 μ mol) /kgでも着床後胚死亡、奇形胎児の発現頻度の上昇は認められなかった¹⁰⁷⁾。これらの結果は、TeBT, TBTまたはDBTの発生毒性の強さ及び発現様式が異なっていることを示している。DBTCIの催奇形性の感受期である妊娠7-8日にTBTCI, DBTCIまたはMBTCIを投与した実験では、TBTCIの40及び80 mg/kgでは着床後胚死亡率は上昇したが、催奇形性は観察されなかった¹⁰⁸⁾。10 mg/kg以上のDBTCIでは着床後胚死亡率上昇、低胎児体重及び奇形胎児発現率の著明な上昇がみられ、DBTCIの発生毒性の発現様式はTBTCIとは異なることが示唆された。一方、MBTCIの投与では1500 mg/kgでも着床後胚死亡率及び奇形発現頻度の上昇は認められなかった。MBTCIは、妊娠7-17日のWistarラットに400 mg/kgを強制経口投与した試験においても母体毒性及び発生毒性を現さないこと⁹⁷⁾ から、MBTCIはブチルスズ化合物の発生毒性に関与していないと考えられる。