

博 士 論 文

Ethylenethiourea(ETU)のラット胎子への
奇形誘発に関する作用機序の解析

岩 瀬 隆 之

1997年

博 士 論 文

**Ethylenethiourea (ETU) のラット胎子への
奇形誘発に関する作用機序の解析**

岩 瀬 隆 之

目次

目次	・・・・・・・・・・・・・・・・	i 頁
緒言	・・・・・・・・・・・・・・・・	1 頁
第 1 章 Ethylenethiourea のラット胎子に対する in vivo での 催奇形性	・・・・・・・・・・・・・・・・	5 頁
第 1 節 材料と方法	・・・・・・・・・・・・・・・・	6 頁
第 2 節 実験成績	・・・・・・・・・・・・・・・・	9 頁
第 3 節 考察	・・・・・・・・・・・・・・・・	17 頁
第 4 節 小括	・・・・・・・・・・・・・・・・	20 頁
第 2 章 ラット培養胎子に対する ethylenethiourea 暴露の影 響	・・・・・・・・・・・・・・・・	22 頁
第 1 節 材料と方法	・・・・・・・・・・・・・・・・	23 頁
第 2 節 実験結果	・・・・・・・・・・・・・・・・	27 頁
第 3 節 考察	・・・・・・・・・・・・・・・・	31 頁
第 4 節 小括	・・・・・・・・・・・・・・・・	33 頁
第 3 章 催奇形性の作用本体について一培養ラット胎子を 用いた ethylenethiourea の形態異常誘発能に対する 肝ミクロソーム分画添加の影響—	・・・・・・・・	34 頁
第 1 節 材料と方法	・・・・・・・・・・・・・・・・	36 頁
第 2 節 実験結果	・・・・・・・・・・・・・・・・	39 頁
第 3 節 考察	・・・・・・・・・・・・・・・・	40 頁

目次

第 4 節	小 括	42 頁
第 4 章	妊娠ラットにおける ethylenethiourea の体内動態について	43 頁
第 1 節	材料と方法	45 頁
第 2 節	実験結果	49 頁
第 3 節	考 察	52 頁
第 4 節	小 括	55 頁
第 5 章	Ethylenethiourea による形態異常誘発に関与する薬物動態学的要因の解析 I — 総暴露量、最高濃度および暴露時間と形態異常誘発の関連性に関する <i>in vivo-in vitro</i> 系での解析 —	56 頁
第 1 節	材料と方法	57 頁
第 2 節	実験結果	59 頁
第 3 節	考 察	60 頁
第 4 節	小 括	62 頁
第 6 章	Ethylenethiourea による形態異常誘発に関与する薬物動態学的要因の解析 II — 総暴露量、最高濃度および暴露時間と形態異常誘発の関連性に関する <i>in vitro</i> 系での解析 —	63 頁
第 1 節	材料と方法	65 頁
第 2 節	実験結果	68 頁

目次

第 3 節 考 察	69 頁
第 4 節 小 括	71 頁
結 語	72 頁
總 括	74 頁
謝 辭	82 頁
参 考 文 献	83 頁
Tables	88 頁
Photos	107 頁
Figures	124 頁
Abstract	128 頁

緒 言

Ethylenethiourea (ETU)は、かつてそのもの自体が果実や野菜等に適用された殺菌剤であり (Vettorazzi, G., *et al.*, 1995), また, 現在使用されている ethylenebisthiocarbamate 系殺菌剤の環境中分解物および動植物内での代謝産物である (Czeplédi-Jankó, 1967; Jordan, *et al.*, 1979; Brocker, *et al.*, 1980; Autio, *et al.*, 1983)。ETUをラット胎子の器官形成期にある妊娠ラットに連続投与すると, 胎子に外脳症, 脳瘤, 髄膜瘤, 水頭症, 小下顎症, 四肢の低形成, 欠指症, 短尾, 曲尾などの異常が低用量で認められると報告されている (Khera, 1973; Petrova-Vergieva *et al.*, 1973; Larsson *et al.*, 1976)。一方, ethylenebisthiocarbamate系殺菌剤である zineb, manebおよび macozebを高用量で妊娠ラットに経口投与した時にも, ETUを低用量投与した時胎子に観察されるのと同じ様な奇形が誘発されることが知られており, その作用本体はETUであると推察されてきている (Khera, 1987)。ETUを数種の実験動物の器官形成期に母体に経口投与した研究によれば, ハムスターでは催奇形性を示すが, その感受性はラットより低く (Teramoto *et al.* 1978), マウス, ウサギ, モルモットおよびネコでは奇形は観察されていない (Khera,

1973, 1978; Teramoto *et al.* 1978; Chernoff *et al.*, 1979)。これらの報告から，ETUの奇形誘発能に対する感受性はラット胎子が最も高いと判断されている。

ETU誘発奇形の作用本体に関して，ETUは*in vivo*および*in vitro*でラット肝ミクロソーム薬物代謝酵素（主にP-450）により代謝されることが報告されている (Iverson, *et al.*, 1980.)が，代謝阻害剤（P-450阻害物質）のSKF-525Aを前処置したラットにETUを投与すると，その催奇形性が増強されると報告されている (Khera. & Iverson, 1981)。しかし，ラットにおける*in vivo*でのETUの羊水内投与では奇形が誘発されないことから，ETUの催奇形性はETUそれ自体にあるのではなく，ETUの代謝物もしくは母体機能の変化を介した作用による可能性を示唆した報告もある (Teramoto, *et al.*, 1980)。これらの相反する報告から，ETUの催奇形性がETU自体によるのか，あるいはその代謝物によるのかは未だ明確になってはいない。

ETUの妊娠動物における体内動態についての研究は， ^{14}C でラベルしたETUをラットに経口投与し，母体血中，組織中，尿中および胎子中での測定結果が報告されている (Ruddick *et al.*, 1975; Kato *et al.*, 1976; Ruddick *et al.*, 1977)。

しかし、ラジオアイソトープを用いた実験では、ETUの未代謝体や代謝物の¹⁴Cの総量を検出してしまうので、ETU未代謝体の濃度は不明確となってしまうと考えられる。また、経口投与した場合の羊水中の濃度を詳細に測定した報告は未だなく、羊水を介する胎子への暴露についてはほとんど検討されていない。Nanbo(1988)は、妊娠ラットに *p*-phenylbenzoic acidを妊娠ラットに点滴静注した研究において、薬物の胎子への移行経路もしくは暴露経路として、羊水は薬物動態学上重要な役割を演じていることを報告している。このことは、羊水を介する薬物の暴露が、胎子毒性を誘発する重要な経路となることを示唆している。これらのことから、羊水を経由したETU未代謝体への暴露について詳細な検討を行うことは、ETUの催奇形性を解析する上で重要であると考えられる。

本研究は、上述のこれまでのさまざまな研究の歴史を踏まえて、*in vivo*と*in vitro*の実験奇形学の手法を用い、妊娠ラットにETUを経口投与したときに、胎子に奇形を誘発する作用本体、すなわちETUの未代謝体か代謝物か、を明らかにすること、ETUが催奇形性を示すのに必要な薬物動態学的パターンを明らかにすることを主目的とし、そのた

めに，次のような各方面からのアプローチを試みた。

第 1 に妊娠 11.5 日および 12.5 日におけるラット胎子の ETU に対する感受性を調べる目的で，ETU を妊娠ラットに強制経口投与し，胎子の奇形の種類とその成立過程を観察した。

第 2 に，妊娠ラットの影響を切り放すことが可能な *in vitro* 系での実験として，胎生 11.5 日から 13.5 日の間の培養ラット胎子の ETU に対する感受性を検討した。

第 3 に，培養ラット胎子を肝ミクロゾーム分画の共存および非共存下で ETU に暴露し，ETU の催奇形性がそのもの自体によるのか，あるいは代謝物によるのかを検討した。

第 4 に，ラット胎子は羊水を通じて ETU の多量暴露を受けているとの仮定のもとに，妊娠ラットに ETU を経口投与した時の母体血漿中，羊水中，胎子および胎盤中の ETU 濃度を経時的に調べ，薬物動態学的な立場から検討した。

最後に，ETU の暴露条件がコントロール可能な，*in vivo-in vitro* 系および *in vitro* 系でラット胎子を ETU に暴露し，ETU が催奇形性を示す薬物動態学的パターンを検討した。

第 1 章 Ethylenethiourea のラット胎子に対する *in vivo* での 催奇形性

緒言に論述したように，Ethylenethiourea (ETU) をラットの器官形成期に連続投与すると，胎子に外脳症，脳瘤，髄膜瘤，水頭症，小下顎症，四肢の低形成，欠指症，短尾，曲尾などの外形奇形が低用量でも誘発されることが報告されている。本章においては，ETU の催奇形性誘発の機序を検討するための基礎的知識を得るため，妊娠 11.5 日および 12.5 日に ETU を Wistar-Imamichi ラットに単回もしくは連日強制経口投与した時に，誘発される外形奇形の種類と形態異常の成立過程を観察した。また，催奇形性の閾値および無影響量となる投与量についても考察した。

第 1 節 材料と方法

1) 使用動物

Wistar-Imamichiラットを（財）動物繁殖研究所より購入し，実験に供した。膣垢内に精子が観察された日を妊娠0日と算定した。動物は室温 22 ± 2 °C に空調管理され，明暗12時間（7：00点灯，19：00消灯）の部屋で，1-2匹/ケージで飼育し，餌（MF, Charles River Japan, 横浜）および水道水を自由摂取させた。

2) 投与液の調製

Ethylenethiourea (ETU) は和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。ETU は用時に 0.5% tragacanth gum 水溶液に懸濁し，1, 10, 40 mg/ml 濃度液を作製した。投与液量は 5 ml/kg とし，各投与日の体重を基に，各動物の投与液量を算出した。

3) 投与および帝王切開検査

妊娠11もしくは12日の午後（以後，妊娠11.5および12.5日と記載する）に10, 50, 200 mg/kgのETUを単回もしくは

連日経口投与した。1群当たりの母動物数は2-8匹とし，母体体重は投与日および妊娠20日に測定した。対照群には溶媒の0.5% tragacanth gum水溶液(5 ml/kg)のみを投与した。妊娠20日にエーテル麻酔下で放血致死させた後，帝王切開検査を実施した。着床数，生存胎子数，遺残胎盤，胚死亡および胎子死亡数を検査後，生存胎子についてその外表奇形の有無を検査し，体重，体長および尾の長さも測定した。

次に，形態異常の成立過程を観察するため，妊娠11.5もしくは12.5日に200 mg/kgのETUを単回投与し，妊娠12.5，13.5，14.5および15.5日に胎子の形態観察を実施した。なお，無処置の母動物からも同様に胎子を摘出し形態観察を実施した。各時点での使用母動物数は3～6匹とし，無作為に一腹から6胎子以上を抽出して観察した。これらの剖検時に母体の腹大動脈から血液を採取するとともに，胎子の羊水と脳脊髄液を実体顕微鏡下で27Gの注射針を装着した1mlの注射筒で採取し，それらの浸透圧を氷点降下法で測定した。

4) 統計解析

母体および胎子の各測定値については，一元配置分散分

析の後，有意であれば Dunnett の多重比較を用い，奇形の発生率には Fisher の直接確率計算法を用いて検定した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

第 2 節 実験成績

1. 妊娠 11.5 日単回経口投与の結果

ETU をラットの妊娠 11.5 日に単回経口投与して得られた帝王切開時の計測結果を Table 1 に示した。妊娠 11.5 日から 20 日までの母体体重の増加量は，200 mg/kg 群で低値を示し，さらにまた，胎子体重および胎盤重量のが対照群に比べ有意に低い値を示した。10 mg/kg および 50 mg/kg 群においては，これらの各パラメーターは，対照群と変わらなかった。着床数および生存胎子数は 50 mg/kg 群においていくらか差があるものの，胚/胎子死亡率によれば各群間に統計学的有意差は認められなかった。

外形異常所見を Table 2 に示した。50 mg/kg および 200 mg/kg の投与群において，奇形が用量依存的に認められた。50 mg/kg 群では多くの胎子に曲尾を伴った短尾が認められ (Photo 1)，200 mg/kg 群では全胎子に全身性の複合奇形が認められた (Photos 2, 3)。200 mg/kg 群での奇形の種類は，頭部奇形として，脳ヘルニアと水頭症が単独もしくは複合で全胎子に認められた。顔面奇形として，小眼球症，口唇裂，口蓋裂，小下顎症が認められ，とくに口蓋裂と小下顎

症は全胎子に認められた。前肢の異常として、前肢の短小、欠指および合指がほぼ全胎子に認められた。尾では全胎子が痕跡尾もしくは無尾であり、これらの大部分は肛門閉鎖を伴っていた。これらの他に後肢の多趾が少数例ではあるが統計学的な有意差をもって観察された。しかし、10 mg/kg 群ではなんら異常は認められなかった。

2. 妊娠 12.5 日単回経口投与の結果

ETU をラットの妊娠 12.5 日に単回経口投与して得られた帝王切開時の計測結果を Table 3 に示した。妊娠 12.5 日から 20 日までの母体体重の増加量は、200 mg/kg 群で僅かに低値を示したが、対照群と投与各群の比較において統計学的な有意差はなかった。胎子体重と胎盤重量は有意に軽かった。50 mg/kg 群においては、胎子体重、体長および尾長が対照群に比べ有意に低い値を示した。しかし、10 mg/kg 群における胎子発達の各パラメーターは、対照群と同じであった。着床数、生存胎子数および胚/胎子死亡率には各群間に差が認められなかった。

外形異常所見を Table 4 に示した。50 mg/kg および 200 mg/kg の投与群において、奇形が用量依存的に認められた。

50 mg/kg 群ではほぼ全胎子に短尾が認められ (Photo 4), 前肢の欠指および合指が少数例ではあるが有意に観察された。200 mg/kg 群では全胎子に全身性の複合奇形が認められた (Photos 5, 6)。奇形の種類は, 頭部奇形として, 脳ヘルニア, 水頭症, 小頭症もしくは無脳症が単独もしくは複合型で全胎子に観察された。顔面奇形として, 口蓋裂と小下顎が全胎子に, 小眼球症, 無舌と小上顎症が統計学的に有意に観察された。前肢の異常として, 前肢の短小, 欠指および合指, 後肢では彎曲と欠趾および合趾が全胎子に観察された。尾では, 曲尾, 短尾, 痕跡尾もしくは無尾が多くの胎子に認められ, 短尾では時に曲尾も伴っていた。これらの大部分は肛門閉鎖を伴っていた。

しかし, 10 mg/kg 群ではなんら異常は認められなかった。

3. 妊娠 11.5 日および 12.5 日の連日 (2 回) 経口投与の結果

ETU をラットの妊娠 11.5 日および 12.5 日の連日に計 2 回経口投与して得られた帝王切開時の計測結果を Table 5 に示した。

着床数は対照群と各投与群でほぼ同数であったが, 200

mg/kg 群では，早期胚死亡が有意に多く，生存胎子数が対照群の約 60%となった。胎子の体長は，10 および 50 mg/kg 群で対照群に比べ有意に短かかった。胎子体重は，対照群の胎子に比べ，50 mg/kg 群でやや軽い傾向が観察され，200 mg/kg 群では有意に軽い値であった。尾長は，50 mg/kg 群において有意に短かかったが，10 mg/kg 群では対照群と同程度の長さを示した。

外形異常所見を Table 6 に示した。50 mg/kg および 200 mg/kg の投与群において，奇形が用量依存的に認められた。50 mg/kg 群ではほぼ全胎子に短尾および曲尾が認められ，前肢の欠指および合指が少数例に観察された。200 mg/kg 群では全胎子に全身性の複合奇形が認められた。奇形の種類は，脳内の出血を除けば，妊娠 11.5 日もしくは 12.5 日に単回投与した時に認められた異常と同じであった。すなわち，頭部では，脳ヘルニア，水頭症，小頭症もしくは無脳症，脳内の出血が単独もしくは複合型で全胎子に観察された。顔面では，口唇裂，口蓋裂，無舌，小上顎症，下顎の欠損もしくは小下顎症が全胎子に，小もしくは無眼球症が高率に観察された。前肢では，短肢，欠指および合指が全胎子に，後肢では彎曲と欠趾および合趾が全胎子に観察さ

れた。尾では，無尾と肛門閉鎖が全胎子に認められた。

しかし，10 mg/kg 群ではなんら外表異常は観察されなかった。

4. 形態異常の成立過程に関する観察結果

4-1. 妊娠 11.5 日の母体に 200 mg/kg の ETU を経口投与した結果

妊娠 11.5 日に 200 mg/kg の ETU を経口投与された母ラットから得られた胎子の経時的形態変化を Table 7 に示した。

妊娠 11.5 日に 200 mg/kg の ETU を母動物に投与した場合，24 時間後の胎生 12.5 日では，胎子に前脳の低形成，中脳領域の突出，内側鼻突起の血腫および尾端の浮腫と短尾が認められた (Photos 7, 8)。胎生 13.5 日では，胎子に前脳の低形成，中脳領域の突出と浮腫，鼻突起の結合不全，下顎の低形成，前肢芽の低形成，背部の軽度浮腫および短尾と尾端の浮腫が認められた (photo 9)。胎生 14.5 日では，胎生 13.5 日で認められた異常部位で前脳の低形成を伴う水頭症，口唇裂，前肢の変形，前肢指板の低形成と欠指，背部の浮腫および短尾が認められた (photos 10, 11)。また，中脳領域の破裂，後肢の変形，後肢指板の低形成と欠趾がそれぞれ少

数例に認められた。胎生 15.5 日では，胎生 14.5 日の胎子で観察された異常の内，後肢の形態異常を除く全ての異常と短尾がさらに高度になり痕跡尾が認められた(photo 12)。なお，Table には示さなかったが，各妊娠日に 6 匹の無処置の母体から胎子を摘出して観察したが，形態異常はなんら観察されなかった。

4-2. 妊娠 12.5 日の母体に 200 mg/kg の ETU を経口投与した結果

妊娠 12.5 日に 200 mg/kg の ETU を経口投与された母ラットから得られた胎子の経時的形態変を Table 8 に示した。

妊娠 12.5 日に 200 mg/kg の ETU を母体に投与した場合，24 時間後の胎生 13.5 日では，胎子に前脳の低形成，中脳領域の突出，下顎の低形成，前肢芽と後肢芽の低形成，および短尾と尾端の浮腫が認められた。胎生 14.5 日では，前脳の低形成を伴う水頭症，上顎の低形成，下顎の低形成，前肢の変形，前肢指板の低形成と欠指，後肢趾板の低形成と欠趾，および短尾が認められた。さらに，脳胞領域での血管の破綻が高頻度で観察された。胎生 15.5 日では胎生 14.5 日の形態異常と同じ異常がさらに明確に観察された。さらに，脳胞内での血瘤と背部の浮腫が観察された。

4-3. 妊娠 11.5 日および 12.5 日に母体に 200 mg/kg の ETU を経口投与した結果

妊娠 11.5 と 12.5 日の両日に 200 mg/kg の ETU をそれぞれ経口投与された母ラットから得られた胎生 13.5 日の胎子の形態変化を Table 9 に示した。

前脳の低形成，鼻突起の結合不全，前肢芽と短尾が全胎子に，中脳領域の突出，内側鼻突起の血腫および後肢芽の低形成が約 1/3～1/2 胎子に認められた。

5. 母体の血清，胎子の羊水および脳脊髄液の浸透圧の測定結果

妊娠 11.5 日に 200 mg/kg の ETU を経口投与された母ラットから得られた母体血清，胎子の羊水および脳脊髄液の浸透圧を妊娠 12.5 から 15.5 日まで測定した結果を Table 10 に示した。なお，測定に必要な量の脳脊髄液の採取が，胎生 12.5 日の各群の胎子および胎生 13.5 日の対照群の胎子（ETU 投与胎子は水頭症）において困難であったため，測定できなかった。

各測定日における母動物の血清，胎子の羊水および脳脊

髄液の浸透圧はほぼ同じ値を示し，ETU 投与の影響は認められなかった。

第 3 節 考察

ETUをラットの胎盤形成初期である妊娠11.5日および12.5日に単回もしくは連日経口投与した時、50 mg/kgでは短尾が、200 mg/kgでは脳奇形、口蓋裂、四肢の異常と欠指（趾）および合指（趾）、短尾を主徴とする種々の奇形が誘発された。各投与日で観察された奇形の特徴は、妊娠11.5日投与では口唇裂であり、後肢の奇形は極めて低頻度であった。また、妊娠12.5日投与では、逆に口唇裂は全く観察されないが、後肢の奇形は全胎子に観察され、小上顎と無舌症も観察された。妊娠11.5日および12.5日の連日経口投与では、各日での単回投与で観察された異常が全て観察されたが、それら以外の奇形は観察されなかった。観察された奇形のタイプは、Joseph et al. (1975)およびTeramoto et al. (1978)が妊娠11日もしくは12日のラットに50 mg/kg以上の単回投与で報告した外形奇形とほぼ同じであり、発現用量もほぼ同じであった。これらのことから、尾の奇形は、50 mg/kg以上の投与により誘発される奇形であり、ETUの催奇形性能に感度良く反応する外形上の変化であると考えられる。本実験では10 mg/kgではなんら外形異常は誘発され

なかった。この 10 mg/kg をラットの器官形成期に連続投与した報告によると、外形および骨格異常は誘発されないが、側脳室の拡張がわずかに増える (2/58, 3.4%) との報告 (Teramoto, et al., 1978) と、曲尾 (1/132, 0.8%)、外脳症 (3/176, 1.7%)、並びに頭頂骨骨化の遅延がごく低頻度に観察されたとの報告 (Khera, 1973) がある。これらのことより、10 mg/kg の ETU を器官形成期に連続投与することより、ラットに外形奇形を極低頻度で誘発する場合と誘発しない場合があり、内臓検査においては側脳室の拡張が、骨格検査においては頭頂骨骨化の遅延が低頻度で観察される可能性があると考えられる。しかし、上記報告で観察された外形奇形は低頻度であり、自然発生的な異常としてもしばしば報告されること (Morita et al. 1987)、かつ統計学的な有意差を示さないことから、ETU の明確な作用とするには疑問が残る。今回の実験においては、上記報告とは異なり、妊娠ラットへの単回投与で、かつ外形異常が観察されず、かつ尾長も対照群と同等であったことから、妊娠 11 日および 12 日における 10 mg/kg の単回もしくは連日投与は、本系統ラット胎子の外形奇形に対しては無影響量であると推察される。

形態異常の経日観察において、妊娠 11.5 日もしくは 12.5

日のどちらかに 200 mg/kg の ETU を母体に経口投与しても胎生末期に観察されるのと同様な形態異常が、すでに胎生 13.5 日において観察された。胎生 10 日から 12 日のラット培養胚に 120 μ g/ml の濃度で ETU を *in vitro* で暴露した実験において、胎子の胚外体腔液における浸透圧の低下が生じ、このことが ETU による形態異常一因であるとの報告がある (Daston et al. 1987)。しかし、今回の実験においては、母体の血清、胎子の羊水および脳脊髄液での浸透圧変化が認められなかった。

以上の実験結果より、Wistar-Imamichi ラットの胎子は胎生 11.5 日および 12.5 日に、ETU の催奇形性に対し感受性を有することが明らかとなった。さらに、200 mg/kg の ETU を妊娠 11.5 日および 12.5 日に母ラットに経口投与した時、胎生末期に観察される奇形は、すでに胎生 13.5 日の胎子に低形成等の異常として検出できることが明らかになった。一方、母体の血清浸透圧、および胎子の羊水と脳脊髄液の浸透圧は母動物への ETU 投与により変化せず、胎子の形態異常は、ETU 自体が胎子細胞の分化増殖を阻害することにより生じる可能性が考えられる。

第 4 節 小括

妊娠 11.5 日および 12.5 日のラットに ETU を単回もしくは連日経口した時，50 mg/kg では短尾が，200 mg/kg ではほぼ全身性に低形成性の奇形が誘発された。妊娠 11.5 日もしくは妊娠 12.5 日に ETU を母ラットに 200 mg/kg 経口投与した場合の特徴的な奇形は，それぞれ口唇裂と後肢の奇形であった。妊娠 11.5 日と 12.5 日の両日に 200 mg/kg の ETU を母ラットに投与して妊娠末期に認められた胎子の奇形は，両日に単回投与して認められた奇形の複合であり，特異な奇形は観察されなかった。しかし，10 mg/kg の ETU を妊娠 11.5 日および 12.5 日に母ラットに投与しても，外表奇形は観察されなかった。

妊娠 11.5 日および 12.5 日の母ラットに 200 mg/kg の ETU を単回もしくは連日経口した場合，胎生末期で観察されると同様な形態異常が，すでに胎生 13.5 日の胎子に観察された。この際，母体の血清，胎子の羊水と脳脊髄液の浸透圧には変化は認められなかった。

これらのことより，妊娠 11.5 日および 12.5 日のラットにおいて，ETU を経口投与した際の胎子の外形奇形発現に対する無影響量は 10 mg/kg と考えられ，50 mg/kg 以上の量によって誘発されるほとんど全ての形態異常は，胎生 13.5 日

の胎子においてすでに観察されることが明らかとなった。
また，胎子の羊水および脳脊髄液の浸透圧は母体血清の浸透圧とほぼ同等であり，ETU 投与により胎子の羊水および脳脊髄液の浸透は変化しないことが明らかとなった。

第 2 章 ラット培養胎子に対する ethylenethiourea 暴露の影響

第 1 章において，ラット胎子が胎生 11.5 日および 12.5 日に ethylenethiourea (ETU) に感受性を有し全身性に奇形が生じること，並びに両日での ETU に対する感受性の程度はほぼ等しいことを *in vivo* で示した。また，胎生 11.5 日に ETU に暴露された胎子では口唇裂が，胎生 12.5 日暴露では後肢の奇形が特徴的な形態異常であることを立証した。さらに，母ラットの妊娠 11.5 日および 12.5 日に単回もしくは連日 ETU を投与した時，妊娠末期に観察される胎子の形態異常が胎生 13.5 日の胎子においてすでに観察されることを明らかにした。本章では，胎生 11.5 日に摘出したラット胎子を培養系に移し，*in vitro* で ETU に暴露した時の形態変化を観察した。さらに，その結果と母ラットの妊娠 11.5 日および 12.5 日に ETU を単回もしくは連日経口投与した場合に生じる子宮内胎子の形態変化が同様であるかどうかを検討した。

第 1 節 材料と方法

1) 使用動物

Wistar-Imamichiラットを(財)動物繁殖研究所より購入し、実験に供した。膣垢内に精子が観察された日を妊娠0日と算定した。動物は室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に空調管理され、明暗12時間(7:00点灯, 19:00消灯)の部屋で、1-2匹/ケージで飼育し、餌(MF, Charles River Japan, 横浜)および水道水を自由摂取させた。

2) ラット胎子の培養液の準備

培養液にはラット I.C. 血清 (Immediately centrifuged serum) に 2 mg/ml のグルコース, 5 IU/ml のペニシリン G 並びに $5 \mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを添加し, $22 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過したものをを用いた。I.C. 血清は以下の手順で準備した。エーテル麻酔下でラットの腹大動脈から採血し, 10 分以内に 2,500 もしくは 3,000 r.p.m で遠心分離し, クロットの形成されたものを約 2~4 時間冷蔵保存した。その後, クロットを試験管壁から切り再度 3,000 r.p.m で遠心分離し血清を採取し, この血清を 56°C で 30 分非働化した (I.C. 血清)。この I.C. 血清は使用時まで -40°C の冷凍庫で

保存した。

3) ラット胎子の培養法

胎生 11.5 日のラット胎子を摘出後，江藤らの方法(1981, 1985)に従って培養した。すなわち，エーテル麻酔下で，妊娠 11.5 日のラットから子宮を取り出し Tyrode 液に移し以下の操作を実施した。実体顕微鏡下で，胎子を含む受胎産物を脱落膜に包まれた状態で摘出後，胎盤から脱落膜を，卵黄囊から脱落膜，栄養膜細胞層，ライヘルト膜を順次除去し，胎子が卵黄囊，羊膜および胎盤と正常な関係を保った状態で培養液（1 胎子/4ml/培養瓶）に移した。胎子が入った培養瓶を回転式胎子培養装置（池本理科工業 K.K.，東京）に装着し 20 rpm で回転させ 48 時間培養した。培養温度は 38℃とし，培養瓶に 95%O₂・5%CO₂混合ガスを毎分 50～120 ml で培養期間中供給した。2 時間の前培養後，卵黄囊循環および体循環不全の胎子，並びに心拍動の薄弱な胎子を培養から除外した。

4) In vitro での ETU への暴露方法

ETU(和光純薬工業株式会社，大阪)を蒸留水に溶解し 1

および 3 mg/ml の溶液を作製し、それらの 100 μ l を培養液に添加し（溶液を培養液の 2.5% 分添加）、ETU の暴露濃度が 1 胎児当たり 100 および 300 μ g/ml になるようにした。対照群の胎児には溶媒である蒸留水のみを培養液の 2.5% 分添加した。ETU に胎児を暴露する時期は以下の様に設定した。

1. 胎生 11.5 日に採出してから 2 時間の前培養後に、ETU に 17 時間暴露し、Tyrode 液で 2 回洗浄した後、卵黄嚢を解放し、次の 29 時間は ETU に暴露しないので（ETU 含まない新しい培養液で培養）、これを 11 日暴露群とする。
2. 2 時間の前培養後、さらに ETU を含まない培養液で 17 時間培養し、卵黄嚢を解放し、さらに培養を続けて 5 時間後に状態の良好な胎児にのみ ETU を 24 時間暴露し計 48 時間培養した（ETU 暴露を前半に行わず、後半に行うからこれを 12 日暴露群とする）。
3. 2 時間の前培養終了後から連続 46 時間暴露（連続暴露群）。

本実験では、対照群および各暴露群の使用胎児数は 20 匹とした。なお、対照群はすべての暴露群に共通とし、前培

養の後，蒸留水のみを添加し，卵黄囊解放前に Tyrode 液で 2 回洗浄し，前培養 2 時間，卵黄囊解放前 17 時間，卵黄囊解放後 28 時間の計 48 時間培養した。

5) 観察および測定方法

培養胎子の形態観察は卵黄囊解放時および培養終了時にそれぞれ実施した。観察時に心拍動および体循環が停止していたものは，死亡胎子と判定した。胎子の発達指標として，胎盤直径，頭長および体長（頂殿長，CRL）を培養終了時に観察した。

6) 統計解析

胎子の各測定値については，一元配置分散分析の後有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較を用い，奇形の発生率には Fisher の直接確率計算法を用いて検定した。有意水準には $p < 0.05$ を用いた。

第 2 節 実験結果

ETU の *in vitro* での各暴露により生じた培養胎子の形態異常と, *in vivo* で 200 mg/kg を経口投与された母体の胎生 13.5 日の胎子の形態異常を比較した。この際, 胎生 13.5 日の胎子所見は第 1 章の結果を用いた。

1. 11 日暴露群の結果

前培養終了後に ETU の 100 および 300 μ g/ml に 17 時間暴露し, ETU を含まない新しい培養液でさらに 29 時間培養した結果を Table 11 に示した。

100 および 300 μ g/ml の暴露群で前脳の低形成, 下顎の低形成, 鼻突起の結合不全, 前肢芽の低形成および短尾が統計学的に有意に高い頻度で観察された。これらの異常は胎生 11.5 日に母体を通じて ETU に子宮内で暴露された胎生 13.5 日の胎子とほぼ同じであった。この他に, 後肢芽の低形成が 300 μ g/ml 暴露群で有意に高く観察された (Photos 13, 14)。

発達の指標としての胎盤直径は, 100 と 300 μ g/ml の各暴露群で対照群に比べ低値を示したが, 胎子の頭殿長および頭長では対照群と各 ETU 暴露群の間に差はなかった。ま

た、*in vivo*で同時期に ETU に暴露された胎子に比べ、培養胎子では頭殿長および頭長とも短かった。なお、第 1 章で用いた無処置の 6 母体での胎生 13.5 日の子宮内胎子における頭殿長および頭長の一腹単位での平均と標準誤差 (S.E.) は、それぞれ 8.3 ± 0.23 、 4.5 ± 0.17 であった。ちなみに、無処置の子宮内胎子と *in vivo*で胎生 11.5 日に ETU の暴露を受けた胎子の頭殿長および頭長はほぼ同様であった。

2. 12 日暴露群の結果

培養 17 時間目に卵黄囊解放を実施し、5 時間後に状態の良好な胎子にのみ ETU に 24 時間暴露した結果を Table 12 に示した。

100 μ g/ml 暴露群で前脳の低形成と短尾が統計学的に有意に高い頻度で観察され、前肢芽の低形成が有意差はないものの低頻度で観察された。300 μ g/ml 暴露群では前脳の低形成、下顎の低形成、前肢芽の低形成および短尾が統計学的に有意に高い頻度で観察された。しかし、鼻突起の結合不全は観察されなかった (Photo 15)。これらの異常は胎生 12.5 日に母体を通じて ETU に子宮内で暴露された胎生 13.5 日の胎子とほぼ同様であった。胎盤直径、頭殿長お

よび頭長には対照群と各 ETU 暴露群の胎子との間に差を認めなかった。また、*in vivo* で胎生 12.5 日に ETU を暴露された胎生 13.5 日の胎子の頭殿長および頭長は、同時期の無処置の子宮内胎子（頭殿長： 8.3 ± 0.23 ，頭長： 4.5 ± 0.17 ，平均 \pm S.E.）と比べ差はないが，培養胎子に比べ頭殿長および頭長とも長かった（*in vitro* と *in vivo* の観察胎子数が著しく異なるため，統計処理は実施しなかった）。

3. 連続暴露群の結果

前培養終了後から連続 46 時間暴露した結果を Table 13 に示した。

100 および 300 μ g/ml の暴露群で前脳の低形成，下顎の低形成，鼻突起の結合不全，前肢芽と後肢芽の低形成および短尾が統計学的に有意に高い頻度で，しかも用量依存性に観察された。これらの異常は胎生 11.5 日と 12.5 日の連日に母体を通じて ETU に子宮内で暴露された胎生 13.5 日の胎子とほぼ同様であった。100 μ g/ml 暴露群の胎盤直径，胎子の頭殿長，頭長および 300 μ g/ml 暴露群の頭殿長は，対照群のそれらと同程度であったが，300 μ g/ml の暴露群における胎盤直径と胎子の頭長は，対照群に比べ統計学的

に有意な低値を示した。

一方，胎生 11.5 日と 12.5 日の連日子宮内で ETU に暴露された胎生 13.5 日胎子の頭殿長と頭長は，同時期の無処置の子宮内胎子のそれら（頭殿長： 8.3 ± 0.23 ，頭長： 4.5 ± 0.17 ，平均 \pm S.E.）と比べ長い傾向が認められた。

第 3 節 考察

ラット胎子の培養において、胎生 11.5 日までの培養による分化・発達、子宮内での分化・発達と比べて差はないが、胎生 11.5 以降のラット胎子の培養では、胎子体内での蛋白合成能が低いためか、子宮内胎子に比べ全身性の発達が遅延することが報告されている (New, 1977)。このことより、胎生 11.5 日からラット胎子を培養する本実験においても、培養ラット胎子での蛋白合成能が低下することにより子宮内胎子に比べ発達が遅くなったため、頭殿長と頭長が子宮内胎子に比べ短かかったものと考えられる。しかし、本実験において、100 および 300 μ g/ml 濃度の ETU に培養胎子を前培養後の最初の 17 時間に暴露した時と、培養 22 時間後に ETU に 24 時間暴露した時と、並びに前培養終了後から連続 46 時間暴露した時と、それぞれに対応する時期に子宮内で ETU の暴露を受けた胎子に見られた形態異常の種類はほぼ同じであった。また、本実験とほぼ同じ胎生期の胎子に ETU の 30~300 μ g/ml を 46 時間 *in vitro* で暴露した実験においても、本実験の連続 46 時間暴露群の培養胎子とほぼ同様な形態異常がより高頻度に起きることが報告されている (Tsuchiya *et al*, 1991)。これらのことから、胎生 11.5

日から 13.5 日の間のラット胎子は，*in vitro* でも *in vivo* でも ETU に対する反応性はほぼ同じであると考えられる。

第 4 節 小括

胎生 11.5 日のラット胎子を 2 時間前培養した後，最初の 17 時間，22 時間後から最後の 24 時間，並びに 46 時間連続で 100 および 300 μ g/ml の ETU を *in vitro* で暴露した。これらの暴露条件下で培養胎子に生じる形態変化を観察し，その結果と母ラットの妊娠 11.5 日および 12.5 日に ETU を単回もしくは連日経口投与した場合に生じる子宮内胎子の形態変化が同じであるかどうかを検討した。その結果，対応する各時期の *in vitro* もしくは *in vivo* の暴露で誘発される形態異常の種類に差はなかった。このことより，胎生 11.5 日から 13.5 日の間のラット胎子は，*in vitro* でも *in vivo* でも ETU に対する反応性はほぼ同じであると考えられる。

第 3 章 催奇形性の作用本体について—培養ラット胎子を用いた ethylenethiourea の形態異常誘発能に対する肝ミクロソーム分画添加の影響—

緒言に述べたように，ethylenethiourea (ETU)は *in vivo* および *in vitro* でラット肝ミクロソーム代謝酵素（主に P-450）により代謝されることが報告されており (Iverson, *et al.*, 1980) (Fig. 1)，代謝酵素阻害剤の SKF-525A を前処置したラットに ETU を投与すると，その催奇形性が増強されることが報告されている (Khera & Iverson, 1981)。しかし，ラットにおける *in vivo* での ETU の羊水内投与では奇形が誘発されないことから，ETU の催奇形性は ETU それ自体にあるのではなく，ETU の代謝物もしくは母体機能の変化を介した作用による可能性を示唆した報告もある (Teramoto, S., *et al.*, 1980)。これらの相反する報告から，ETU の催奇形性が ETU 自体によるのか，あるいはその代謝物によるのかは未だ明確になってはいない。

すでに，胎生 11.5 日から 13.5 日の間のラット胎子は，培養条件下でも ETU に対して *in vivo* と同じ反応性を示すことを第 2 章で明らかにした。

本章では，ETUの催奇形性がETU自体によるのか，あるいはその代謝物によるのかを明確にするため，培養ラット胎子をラット肝ミクロソーム分画の存在下および非存在下でETUに暴露し，形態異常の誘発について検討した。

第 1 節 材料と方法

1) 使用動物

Wistar-Imamichiラットを（財）動物繁殖研究所より購入し、実験に供した。膣垢内に精子が観察された日を妊娠0日と算定した。動物は室温 22 ± 2 °C に空調管理され、明暗12時間（7:00点灯，19:00消灯）の部屋で、1-2匹/ケージで飼育し、餌（MF, Charles River Japan, 横浜）および水道水を自由摂取させた。

2) S9mix の調製

Phenobarbital および 5,6-benzoflavon で誘導されたラット肝ミクロソーム分画（S9）（キッコウマン株式会社，野田），コファクターキット（和光純薬工業株式会社，大阪）を用い S9mix を調製した。S9mix の 1ml 中には $300 \mu\text{l/ml}$ の S9（蛋白含量 $0.4 \text{ mg protein/ml}$ ）， $5 \mu\text{mol}$ の Glucose-6-phosphatase， $4 \mu\text{mol}$ の NADPH， $4 \mu\text{mol}$ の NADP， $8 \mu\text{mol}$ の MgCl_2 ， $33 \mu\text{mol}$ の KCl， $100 \mu\text{mol}$ の Na-phosphate buffer を含むように調製した。ETU は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。

S9mix 中の S9 濃度は予備試験により決定した。予備試験

では S9mix 中の S9 濃度として 3.75, 10 および 30%を用い (Ames, et al., 1975; Fantel, et al., 1979; Matsuoka, et al., 1979), 培養液中に S9mix を 11.1%添加し, 更に, 代謝物に催奇形性があると報告されている cyclophosphamide (CP, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) (Mirkes, 1985)の $50\mu\text{g/ml}$ を添加して, 培養胎子の形態変化について検討した。その結果 S9mix 中の S9 濃度が 30%で全身性の形態異常, 10%で頭顔面, 前肢および尾の異常が観察されたが, 3.75%では形態異常は観察されなかった (Table 14)。このことから, 最も強い形態変化が観察された S9 濃度 30%を本試験に採用した。

3) 胎子の培養法および暴露方法

胎生 11.5 日のラット胎子を摘出後, 岩瀬らの方法 (1994) に従って培養した。培養液および培養条件は第 2 章で述べた方法に従った。2 時間の前培養終了時に, ETU 溶液を 10, 30 および $100\mu\text{g/ml}$ の濃度になるよう, S9mix の存在下もしくは非存在下で培養液に添加し 17 時間暴露した。S9mix は培養液 4 ml に対し 0.5 ml (11.1%)を添加した。暴露終了時に, 2 回 Tyrode 液で洗浄後卵黄囊解放を実施し, ETU を含まない培養液に戻し, さらに 29 時間培養を継続した。陰性

対照には蒸留水を用い 2.5% で暴露し，陽性対照には cyclophosphamide (CP) を Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) に溶解し，最終濃度が 30 $\mu\text{g/ml}$ になるように培養液に添加し，ETU 暴露群と同様に培養した。1 濃度当たりの培養胎子数は 6-12 匹とした。

4) 観察および測定方法

培養胎子の形態観察は卵黄囊解放時および培養終了時にそれぞれ実施した。その際，心拍動および体循環が良好なものは，生存胎子と判定した。胎子の発達指標として，頭長，頂殿長および体節数を培養終了時に観察した。

5) 統計解析

胎子の形態異常の発生率の比較には Fisher の直接確率計算法を，各測定値については Wilcoxon の順位和検定を用い $P < 0.05$ の有意水準で検定した。

第 2 節 実験結果

ETU に暴露された培養ラット胎子は S9mix の存在および非存在に関わらず全例生存した。Table 15 に観察された形態異常の種類とその頻度および計測結果を示した。S9mix の非存在下では，ETU の 10 $\mu\text{g/ml}$ 暴露から濃度依存性に短尾を主徴とした形態異常が観察され，30 $\mu\text{g/ml}$ 暴露では尾体節数も有意に低い値であった(Photo 16)。

一方，S9mix 存在下では，30 $\mu\text{g/ml}$ 暴露で短尾が 1 例に観察されたのみであった。ETU の同一暴露濃度における S9mix の非存在下と存在下での形態異常の発現頻度を比較すると，S9mix の存在は，10 $\mu\text{g/ml}$ 暴露での異常胎子の出現頻度を 0% に低下させ，さらに 30 $\mu\text{g/ml}$ 暴露でも異常胎子と短尾の出現頻度を有意に低下させた(Fig. 2)。また，S9mix の存在下における 30 $\mu\text{g/ml}$ 暴露での尾体節数は，S9mix の非存在下のそれに比べ有意に多かった。しかし，発達指標としての頂殿長および顔面長には暴露の影響を認められず，各群でほぼ同様であった。

なお，S9mix の存在下で CP に暴露された培養ラット胎子は全例に全身性の形態異常が観察され，S9mix の代謝活性が本実験条件下で正常に機能していたことが確認された。

第 3 節 考察

本実験において，S9mixの存在および非存在下でETUの10および30 $\mu\text{g/ml}$ 濃度のETUに培養ラット胎子を暴露した結果，形態異常の発現頻度がS9mixの存在下で有意に抑制された。このことから，培養中にETUがS9mixにより代謝され，その催奇形性が減弱したと考えられる。ラットにおけるETUの代謝物として，imidazoline, imidazolone, ethylene urea, 1-methyl thioureaが*in vivo*および*in vitro*の実験から報告されている(Iverson, *et al.*, 1980, Kobayashi, *et al.*, 1982.)(Fig. 1)。これら化合物の*in vivo*での催奇形性はETUに比べ弱いかもしれない(Ruddick, *et al.*, 1976, Teramoto, *et al.*, 1981)。今回の我々の実験においても，同様な代謝物が生じそのためETUの催奇形性が減弱したと考えられる。しかし，ETUの代謝物には未だ同定されていないものがほかにあり(Iverson, *et al.*, 1980)，それらの催奇形性に関しては検討されていない。今回の我々の実験においては，培養中にETUがS9mixにより直接代謝されており，未知のETUの代謝物をも含めて検討したことになり，ETUの代謝物にはETUより強い催奇形性を有する物質はないと推察された。

従って，ETUの催奇形性はETU自体にあり，代謝物が関

与している可能性はないと推察される。

第 4 節 小括

Ethylenethiourea (ETU)の催奇形性がそれ自体にあるのか、それともその代謝物にあるのかを検討するため、ラット肝ミクロソーム分画(S9mix)の存在および非存在下で 10 および 30 $\mu\text{g/ml}$ の ETU に培養ラット胎子を暴露した。S9mix の非存在下では用量依存性に形態異常の頻度が高くなった。一方、S9mix の存在下では形態異常がほとんど観察されなかった。これらより、ETU の催奇形性は ETU 自体にあり、代謝によりその作用が減弱されるものと推察される。

第 4 章 妊娠ラットにおける ethylenethiourea の体内動態について

Ethylenethiourea (ETU) の妊娠動物における体内動態については、 ^{14}C でラベルした ETU を妊娠ラットに経口投与し、母体血中、組織中、尿中および胎子中での ^{14}C 測定結果が報告されている (Ruddick *et al.*, 1975; Kato *et al.*, 1976; Ruddick *et al.*, 1977)。しかし、このラジオアイソトープを用いた実験では、未代謝体、代謝物および分解物中の ^{14}C の総量を検出してしまふので、ETU 未代謝体の濃度は不明確であると考えられる。また、羊水中の濃度を詳細に測定した報告は未だなく、羊水を介する ETU への胎子の暴露についてはほとんど検討されていない。Nanbo (1988) は、妊娠ラットに p-phenylbenzoic acid を点滴静注した研究において、羊水は胎子の薬物暴露に関し薬物動態学上重要な役割を演じていると報告している。このことは、羊水が胎子毒性を誘発する重要な経路となることを示唆している。これらのことから、羊水を経由した ETU 未代謝体への胎子暴露について詳細な検討を実施することは、ETU の催奇形性を解析する上で重要であると考えられる。

本実験は、妊娠ラット血中および胎子羊水中での ETU の動態を解明し、ETU による奇形誘発の薬物動態学的閾値を推測すること、また、ETU 未代謝体の羊水並びに血中濃度と胎子中および胎盤中濃度の推移を比較検討することを目的として実施した。そのため、第 1 章で明らかにしたことに従い、妊娠 11.5 日および 12.5 日の母体に ETU を単回経口投与した時、胎子に全身性の奇形を誘発する用量として 200mg/kg を、短尾のみを誘発する用量として 50 mg/kg を、外表奇形を誘発しない用量として 10 mg/kg を本実験での ETU 用量とした。まず、妊娠 11.5 日のラットに ETU を単回投与し、同一個体で経時的に血漿中 ETU 濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。次に妊娠 12.5 日のラットに ETU を単回投与し、ETU の母体血漿中、羊水中、胎子および胎盤中の濃度分析を経時的に実施した。

第 1 節 材料と方法

1) 使用動物

Wistar-Imamichiラットを(財)動物繁殖研究所より購入し、実験に供した。膣垢内に精子が観察された日を妊娠0日と算定した。動物は室温 22 ± 2 °C に空調管理され、明暗12時間(7:00点灯, 19:00消灯)の部屋で、1-2匹/ケージで飼育し、餌(MF, Charles River Japan, 横浜)および水道水を自由摂取させた。

2) 投与液の調製

Ethylenethiourea (ETU)は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。ETUは用時に0.5% tragacanth gum水溶液で懸濁し、1, 10, 40 mg/ml濃度液を作製した。投与液量は5 ml/kgとし、各投与日の体重を基に、各動物の投与液量を算出した。

3) 妊娠11日投与における母体血漿中のETU濃度測定

妊娠11日にETUの10, 50, 200 mg/kgを各4-7匹に単回経口投与し、15分, 30分, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72時間目に心採血により血液を0.1 ml採取した。血液はへ

パリン処理した500 μ lのチューブに移し，12,000 rpmで1分間遠心分離後，上清の血漿を濃度分析に供した。

4) 妊娠12日投与における各測定材料の収集

妊娠12日に10, 50, 200 mg/kgのETUを単回経口投与し，5分，10分，15分，30分，2, 6, 12, 24, 36, 48時間目に，各用量毎に3-5匹の妊娠動物をエーテル麻酔下で採血後安楽死させ，直ちに羊水を採取した。羊水の採取は，25Gの注射針を用い，血液の混入および胎子組織の吸引が生じない様に，実体顕微鏡下で実施した。その後胎子および胎盤を採取した。採血した血液の0.1 mlはヘパリン処理した500 μ lのチューブに移し，12,000 rpmで1分間遠心分離後，上清の血漿を濃度分析に供した。採取した羊水は，胎子別に500 μ lのチューブに移し，12,000 rpmで1分間遠心分離後，上清を濃度分析に供した。胎子および胎盤は，重量を個別に測定した後，分析日まで-40°Cのフリーザーに保存した。

5) ETU濃度の測定

血漿および羊水の50 μ lにメタノール100 μ lを加え遠心分離後，上清を0.45 μ mのフィルターで濾過した。濾液50 μ l

に 250 μ l の純水を加え、攪拌し HPLC サンプルとし、その 50 μ l を HPLC に注入した。ETU 濃度は、HPLC (LC6A, 島津製作所) に YMC-Pak AQ303 カラム (250 \times 4.6 mm I.D., YMC Co. Ltd.) を装着し波長 240 nm で測定した。試料の流速は 1 ml/min とした。検量線は、ETU の 0.5 ~ 5 ppm 水溶液で作成した。羊水中の ETU 濃度については、同腹胎子からの 6 サンプル (左右子宮角から各 3 サンプル) について測定し、その平均値を一腹の羊水内濃度とした。これらの測定値を基に血中濃度-時間曲線下面積 (以下、AUC もしくは総暴露量と略す)、最高血中濃度 (C_{max}) およびその時間 (T_{max}) を算定した。なお、添加回収実験から、血漿 1 ml 当たり 0.2 μ g の ETU が蛋白と結合すると推察された。

胎子および胎盤は、生理的食塩水に 1 秒以内浸漬して、表面についた羊水を洗いおとし、胎子もしくは胎盤 100 mg に対し水 1 ml およびフッ化カリウム 1.5 g を添加した後、75% メタノール 1.5 ml を加えポリトロンで 2 分間ホモジナイズした。更に 75% メタノール 0.5 ml を加えた後、0.45 μ m のフィルターで濾過し、濾液を 50 $^{\circ}$ C で約 10 ml に減圧濃縮した。濃縮液に水 100 ml を加えヘキサン 50 ml で洗浄し、50 $^{\circ}$ C で水層を 5 ~ 10 ml に減圧濃縮した。濃縮した水層に 1% 水酸化ア

ンモニウム溶液 1 ml を加えて混合し，Extrelut 20 カラム（30 × 140 mm, Merk）に流し入れ，20～30 分放置した後ジクロロメタン 200 ml で溶出させた。溶出液の溶媒を蒸発させ，残留物を 5 % メタノール水 5 ml に溶解したものを分析用試料とし，10 μ l を HPLC に注入した。検量線は ETU の 0.5～5 ppm 水溶液を用いて作成した。

6) 統計解析

母体データおよび胎子の各測定値については，一元配置分散分析で有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較検定を用い，奇形の発生率については Fisher の直接確率計算法を用いて，それぞれ解析した。

また，羊水中および血中濃度の比較が可能な場合（ $n=5$ ）は，paired t test を実施した。有意水準には $p<0.05$ を採択した。

第2節 実験結果

1. 妊娠11.5日に単回経口投与した時の母体血漿中のETU濃度推移

血漿中のETU濃度の推移，AUC，C_{max}およびT_{max}をFig.2に示した。全投与群において，投与後15分にはすでにほぼC_{max}に近い濃度で血漿中に検出された。T_{max}は，10 mg/kg投与においては投与後約1時間で，50および200 mg/kgでは投与後約2時間で観察され，その後は徐々に血漿中から消失していき，10および50 mg/kg投与においては投与後48時間以降，200 mg/kg投与においては投与後72時間で血漿中から消失した。AUCおよびC_{max}と投与用量の回帰係数はAUCで $\gamma = 0.999$ ，C_{max}で $\gamma = 0.992$ を示し，この投与量の範囲ではAUCとC_{max}は共に直線性に増加した。

2. 妊娠12.5日に単回経口投与した時の母体血漿中，羊水中，胎子および胎盤中でのETUの濃度推移

羊水中および母体血漿中のETU濃度の推移，AUC，C_{max}およびT_{max}をFig.3に示した。全投与群において，投与後5分にはすでに母体血漿中および羊水中にETUが検出され，投与後15分まで羊水中濃度が血漿中濃度より低い値を示し，

投与後30分では羊水中濃度が母体血漿中濃度より僅かに低いものの（200 mg/kg群：血漿中濃度の88%），両値に有意差はなく（paired t test），ほぼ同じ濃度に達したといえる。2時間以降は母体血漿中および羊水中のETU濃度はほぼ同様な推移を示した。このことに伴い，AUCおよびCmaxは各投与群でほぼ同じ値を示し，Tmaxにも大きな相違は観察されなかった。AUCおよびCmaxの回帰式および相関係数は，羊水中濃度で $Y(AUC)=9.39X(dose)+26.13$ ， $r=0.999$ ； $Y(Cmax)=0.59X(dose)+7.22$ ， $r=0.990$ ，血漿中濃度で $Y(AUC)=9.60X(dose)+37.51$ ， $r=0.998$ ； $Y(Cmax)=0.59X(dose)+7.22$ ， $r=0.984$ となり，この投与範囲では直線回帰を示した。

200 mg/kgを母体に投与した時の胎子および胎盤中のETU未代謝体の濃度推移をFig.4に示した。胎子中のETU濃度は30分でCmaxを示し，その後徐々に減衰し48時間で検出限界以下になった。Cmaxの時間が母体血漿中および羊水中に比べ若干早くかつ測定値も約1/15と低かったものの，この推移パターンは母体血漿中および羊水中とほぼ同じであった。胎盤中の濃度推移については，30分でCmaxを示し6時間までそのlevelを維持し，その後徐々に減衰し48時間で検出限

界以下になった。

第 3 節 考察

母体血漿中の ETU 濃度の AUC と C_{max} は，ETU を妊娠 11.5 日に投与した時の方が，妊娠 12.5 日に投与した時よりいくらか低かった。しかし，投与後 15 分で両日の投与ともほぼ C_{max} に近い濃度に達し，消失時間もほぼ同じであり，全体の推移パターンはほぼ同じであると判断される。妊娠 11.5 日投与では，同一個体から経時的に血液を採取したのに対し，妊娠 12.5 日投与では 1 時点で 1 個体を屠殺して採血したことから，採血方法の違いによりいくらかの差異が生じた可能性が考えられる。しかし，薬物動態試験においては，両者の推移パターンに差がないことから，今回認められた程度の差異はばらつきの範囲内であると判断することができ，両者の血中濃度推移は同じであると考えられる。

ETU をラットの胎盤形成初期である妊娠 12 日に経口投与した時の，羊水中および母体血漿中の ETU 濃度の推移を見ると，経口投与後 5 分ですでに羊水中および母体血漿中に検出され，消化管からの吸収が極めて早いことが示された。さらに投与後 15 分までは，羊水中濃度が母体血漿中濃度に比べ低い推移を示したが，投与後 30 分で両者中の濃度はほぼ同じになり，それ以降はほぼ同様な推移を示した。この

ことから，ETUは経口投与により，迅速に吸収されるとともに，母体血中に移行したETUは速やかに羊水中に移行し，約30分で羊水中および母体血漿中濃度がほぼ平衡状態になると考えられる。このことは，各投与量におけるCmaxおよびTmaxがほぼ同じ値を示すことから推察される。その後の推移に関しては，羊水中および母体血漿中濃度がほぼ平衡状態を保ちながら，血中から尿および糞中へのETUの排泄に伴い両者中から消失し，その結果，各投与量における羊水中および母体血漿中でのETUのAUCがほぼ同じ値を示すと推察される。Kato *et al.* (1976)は100 mg/kgの¹⁴C-ETUをラットの妊娠12日に投与し，2，6 および24時間後に羊水中および母体血漿中のほか各種臓器でその放射性活性を測定している。その結果において，ETUは速やかに吸収され母体血中および羊水中に移行すると報告しているおり，今回の我々の結果と一致する。また，妊娠12日に10，50および200 mg/kgのETUを投与した場合，母体血漿中および羊水中濃度は直線的に増加することが今回の実験から明らかになり，10から200 mg/kgの範囲では吸収性に関して線形性が保たれていると判断された。これらのことから，ETUの胎子への暴露経路として，羊水からの暴露が重要な役割を演

じている可能性が考えられる。また，今回の我々の結果において，胎子中および胎盤中の ETU は投与後 12 時間でほぼ消失しており，羊水中の ETU に比べ消失が早かった。このことから胎子に ETU は蓄積しないものの，胎子は羊水中において長時間高濃度の ETU に暴露されていると考えられる。

また，母体への 10 mg/kg の ETU 単回経口投与では胎子に奇形が誘発されず，50 mg/kg では胎子に短尾を誘発することを第 1 章で明らかにした。このことから，ETU の催奇形性に対する閾値は，母体血漿中濃度の AUC で 102 ~ 467.6 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ ， C_{max} で 12.5 ~ 34.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，羊水中濃度では AUC で 100 ~ 555 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ ， C_{max} で 11.8 ~ 47.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である可能性が考えられる。

以上より，妊娠 12 日に ETU をラットに経口投与した時，羊水および母体血漿中でほぼ同じ濃度推移を示し，かつ胎子に蓄積しないことが示された。即ち，胎子は母体血中と同じ ETU の濃度で羊水中において全身暴露されており，ETU による奇形誘発には羊水を介しての暴露が重要である可能性が考えられる。

第 4 節 小括

妊娠 11.5 および 12.5 日のラットに，10，50，200 mg/kg の ETU を単回経口投与し，母体血漿，羊水，胎子自身での ETU の濃度推移を観察した。妊娠 11.5 日および 12.5 日の単回経口投与による母体血漿中の ETU の推移はほぼ同じであった。妊娠 12.5 日投与による母体血漿中および羊水中の ETU 濃度は，ほぼ 2 時間でピークに達し，その後徐々に減少し，48 時間で完全に消失した。しかし，胎子自身の ETU 濃度は 30 分でピークに達し，投与後 12 時間でほぼ消失した。胎子に対する ETU の影響の一部は，羊水中での高い ETU 濃度に胎子が長時間暴露されたことによるものと考えられる。

第 5 章 Ethylenethiourea による形態異常誘発に関与する薬物動態学的要因の解析 I—総暴露量、最高濃度および暴露時間と形態異常誘発の関連性に関する *in vivo-iv vitro* 系での解析—

第 4 章において、妊娠 11.5 日のラットに ethylenethiourea (ETU) を投与した時の母体血漿中濃度の推移、並びに妊娠 12.5 日に投与した時の母体血漿中、羊水中、胎子および胎盤中での ETU の濃度の推移を明らかにし、羊水からの ETU 暴露が胎子の奇形誘発に重要な役割を果たす可能性があることを示唆した。本章では、妊娠ラットに ETU を単回経口投与することにより、胎生 11.5 日もしくは 12.5 日の胎子を ETU に *in vivo* で 2～12 時間暴露し、その後、*in vitro* で培養することにより、ETU が奇形を誘発するのに必要な *in vivo* での暴露時間について検討した。

第 1 節 材料と方法

1) 使用動物

Wistar-Imamichiラットを(財)動物繁殖研究所より購入し、実験に供した。膣垢内に精子が観察された日を妊娠0日と算定した。動物は室温 22 ± 2 °C に空調管理され、明暗12時間(7:00点灯, 19:00消灯)の部屋で、1-2匹/ケージで飼育し、餌(MF,, Charles River Japan, 横浜)および水道水を自由摂取させた。

2) 投与液の調製と投与方法

Ethylenethiourea (ETU)は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。ETUは用時に0.5% tragacanth gum水溶液で懸濁し、40 mg/ml濃度液を作製した。投与液量は5 ml/kgとし、投与直前の体重を基に各動物の投与液量を算出し、強制経口投与した。対照群には溶媒の0.5% tragacanth gum水溶液のみを投与した。1群当たりの動物数は6匹とした。投与は妊娠12.5日の2, 4, 6, 8もしくは12時間前、すなわち、胎子を摘出し培養に移す2~12時間前に実施した。

3) ラット胎子の培養法

母体を介して子宮内で ETU に 2, 4, 6, 8 もしくは 12 時間暴露された胎生 12.5 日のラット胎子を摘出後, 第 2 章で述べた江藤らの方法 (1981, 1985) に従って 24 時間培養した。胎子の摘出時には, 実体顕微鏡下で卵黄囊解放を実施し, Hanks 液で 2 回洗浄後, 培養液に移した。

4) 観察および測定方法

培養胎子の形態観察は摘出直後の卵黄囊解放時および 24 時間の培養終了時にそれぞれ実施した。その際, 心拍動および体循環が良好な胎子を生存胎子とし, 心拍動が認められないものは死亡胎子と判定した。胎子の発達指標として, 頭長, 頭殿長および体節数を培養終了時に観察した。

5) 統計解析

胎子の各測定値については, 一元配置分散分析で有意差が認められた場合は, Dunnett の多重比較検定を用い, 奇形の発生率については Fisher の直接確率計算法を用いて, それぞれ解析した。有意水準には $p < 0.05$ を採択した。

第 2 節 実験結果

200 mg/kg の ETU を単回経口投与された母体から摘出し 24 時間培養した胎子の結果を Table 16 に示した。子宮内で ETU に 2~12 時間暴露された後に 24 時間培養されたラット胎子は全例生存した。子宮内での 6 時間暴露群（推定 AUC: 570 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ ）では，頭殿長と尾体節数の軽度な低値が認められ，胎子の発達抑制が観察されたが，形態異常を示す培養胎子は全く観察されなかった。8 時間暴露群（推定 AUC: 713 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ ）でも 6 時間暴露群と同様に頭殿長と尾体節数の軽度な低値が認められ，発達抑制が観察された。形態変化としては尾の充血が高頻度で認められたのみで，明確な形態異常は観察されなかった。子宮内での 12 時間暴露群（推定 AUC: 937 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ ）では，全胎子に形態異常が観察された。観察された異常は，前脳の低形成，中脳の浮腫，下顎の低形成，前肢芽および後肢芽の低形成，短尾であった (Photos 17, 18)。12 時間暴露群では，尾体節数の低値が認められた。頭殿長が対照群と同じ値を示したのは，中脳の浮腫に起因する変化であり，胎子の発達促進を示す変化ではなく，尾体節数の低値は短尾に伴った変化であった。

なお，4 時間暴露群で頭長が対照群に比べ有意に短かった。

第 3 節 考察

ETU が奇形を誘発するのに必要な暴露時間について検討するため，妊娠 11.5 日から妊娠 12.5 日の間に 200 mg/kg の ETU を母ラットに単回経口投与したのち，2～12 時間後に胎子を摘出してさらに 24 時間培養した。

4 時間暴露群で頭長が対照群に比べ有意に短かったのは，6, 8 および 12 時間暴露群での胎子の頭長が対照群と差がなかったことから，ETU 暴露による影響ではなく，偶発的な変化と考える。また，6 時間暴露群での頭殿長は対照群の胎子に比べ有意に短かく，尾体節数が対照群の胎子に比べ平均で 1.6 対少ないことから，発達の遅延が生じていると考えられる。Tsuchiya ら（1991）は，この時期の胎子培養において，150 μ g/ml の ETU を 46 時間，ラット胎子に暴露した時，胎子の DNA 量と蛋白量が低下することを報告している。すなわち，ETU は DNA 合成を抑制することにより蛋白合成も抑制すると考えられる。これらのことより，子宮内での 6 時間暴露は，胎子の軽度の発達遅延もたらず程度で DNA 合成が抑制されている可能性が示唆された。しかし，6 時間暴露において，形態異常がなんら観察されなかった

ことから，子宮内での ETU の 6 時間暴露（推定 AUC: 570 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ ）では奇形は誘発されないと考えられる。8 時間暴露においては，頭殿長と尾体節数の軽度な低値が認められ発達抑制が観察されたが，尾の充血以外形態変化は観察されなかった。また，第 1 章で述べた *in vivo* の経時観察においては尾の充血は観察されてなかったことから，本変化が将来の奇形になるとは考え難い。これらのことから，子宮内のラット胎子に形態異常を誘発するためには 6 時間を越え 12 時間までの ETU の暴露が必要であると考えられる。

第 4 節 小括

ETU が奇形を誘発するのに必要な暴露時間について検討するため、妊娠 11.5 日から妊娠 12.5 日の間に 200 mg/kg の ETU を母ラットに単回経口投与したのち、2~12 時間後に胎生 12.5 日の胎子を摘出して、さらに 24 時間培養した。子宮内での 6 時間暴露からラット胎子の軽度な発達遅延が認められたが、8 時間暴露においても明確な形態異常は認められなかった。一方、12 時間暴露においては、前脳、中脳、前肢および尾に形態異常が観察された。これらのことから、子宮内のラット胎子に形態異常を誘発するためには 6 時間を越え 12 時間までの ETU の暴露が必要であると推定した。

第 6 章 Ethylenethiourea による形態異常誘発に關与する薬

物動態学的要因の解析 II—総暴露量, 最高濃度およ

び暴露時間と形態異常誘発の關連性に関する *in*

vitro 系での解析—

Ethylenethiourea (ETU)は *in vivo* でラット胎子に奇形を誘発することはすでに第 1 章で報告した。*In vitro* で培養ラット胎子を ETU に暴露した実験においては, 胎生 10 日から 48 時間の 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 暴露, および胎生 11 日から 48 時間の 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 暴露において, 脳胞および尾に形態異常が観察されている (Daston, *et al.*, 1987, Tsuchiya, *et al.*, 1991)。しかし, ETU が形態異常を誘発するのに必要な最少の暴露濃度と暴露時間については検討されていない。本実験は, *in vivo* でラットが ETU に対し高い感受性を示す妊娠 11 日および 12 日 (Ruddick, *et al.*, 1975) の培養ラット胎子を用い, ETU が形態異常を誘発するのに必要な暴露時間について検討した。なお, 本実験の暴露濃度は, 第 4 章で検討した, ETU の母体の血漿中および羊水中の最高濃度から, *in vivo* でラット胎子に全身性の奇形を誘発する時の濃度である 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と溶媒の溶解限界量に近い 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 尾のみに奇形を誘発

する濃度の $30\mu\text{g/ml}$, 並びに外形奇形を誘発しない濃度の $6\mu\text{g/ml}$ を中心に設定した。

第 1 節 材料と方法

1) 使用動物

Wistar-Imamichiラットを(財)動物繁殖研究所より購入し、実験に供した。膈垢内に精子が観察された日を妊娠0日と算定した。動物は室温 22 ± 2 °C に空調管理され、明暗12時間(7:00点灯, 19:00消灯)の部屋で、1-2匹/ケージで飼育し、餌(MF, Charles River Japan, 横浜)および水道水を自由摂取させた。

2) ラット胎子の培養法

胎生 11.5 日のラット胎子を摘出後、江藤らの方法(1981, 1985)に従って 95%O₂・5%CO₂ 混合ガスを連続給気しながら 20rpm で回転培養した。培養液(ラット I.C.血清)の調製方法並びに培養方法の詳細は第 2 章で述べた通りとし、48 時間の培養を実施した。胎子を 17 時間培養した後、Hanks 液に移し、実体顕微鏡下で卵黄嚢解放を実施し、さらに 29 時間培養した。

3) ETU の暴露方法

ETU(和光純薬工業株式会社, 大阪)は蒸留水に溶解し、暴

露濃度が 6, 10, 30, 100 および 300 $\mu\text{g/ml}$ になるよう培養液に添加した。ETU の 6 時間暴露は, 卵黄囊解放直後に 100 および 300 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で実施した。暴露終了時には培養胎子を 2 回 Hanks 液で洗浄し, ETU を含まない培養液に戻しさらに 24 時間培養を継続した。卵黄囊解放前に, 12 時間の ETU 暴露は 10, 30 および 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で, 17 時間の ETU 暴露は 6 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で実施し, 卵黄囊解放および Hanks 液での 2 回の洗浄の後, ETU を含まない培養液でさらに 24 時間培養した。いずれの実験においても培養時間は 48 時間とし, 卵黄囊解放は培養開始後 18 もしくは 24 時間目に実施した。

4) 観察および測定方法

培養胎子の形態観察は培養終了時に実施し, 活発な心拍動および体循環を示すものを生存胎子と判定した。胎子の発達指標として頭長および頭殿長 (CRL) を培養終了時に観察した。さらに, 体節数を暴露終了時と培養終了時に数え, 24 時間で増加した体節数 (尾体節の増加数) をも算出した。

5) 統計解析

胎子の形態異常の発生率の比較には Fisher の直接確率計算法を，各測定値については Wilcoxon の順位検定を用い $P < 0.05$ の有意水準で検定した。

第 2 節 実験結果

ETU に暴露された培養ラット胎子は全例生存した。Table 17 に 6 時間暴露の結果を示した。300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 暴露群においても形態異常を示す培養胎子は全く観察されなかった (Photo 19)。Table 18 に 12 時間暴露での形態異常の種類とその発現頻度ならびに形態計測結果を示した。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で濃度依存性に異常胎子，尾の異常（浮腫，短尾および曲尾）の頻度が増加し，30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では短尾と曲尾が統計学的に有意に高い頻度で観察された (Photo 20)。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではさらに，前脳の低形成，中脳領域の浮腫および前肢芽の浮腫が観察された。形態計測結果においては，尾体節数，および暴露後 24 時間で増加した尾体節数が，30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で有意に少なかった。Table 19 に ETU の 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での 17 時間暴露の結果を示した。6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での 17 時間暴露では形態異常は全く観察されず，各形態計測結果も対照胎子と同様であった。

第 3 節 考察

本実験において，培養ラット胎子を ETU の 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に 6 時間暴露した時には，肉眼的な形態異常および発達抑制を示唆する各形態計測値の低値は観察されなかった。第 4 章で明らかにした様に，*in vivo* でラット胎子に全身性の奇形を誘発する 200 mg/kg を経口投与した時の最高母体血漿中濃度は 92.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ もしくは 114.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，最高羊水中濃度は 121.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。また，*in vivo* でラット胎子に全身性の奇形を誘発する 240 mg/kg の ETU を母体に経口投与した時の最高血漿中濃度は 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ との報告もある (Ruddick, *et al.*, 1977)。今回の実験で用いた濃度はそれらの約 2.5 倍に相当する。この高濃度での 6 時間暴露において，形態異常が観察されなかったことから，ETU の 6 時間の暴露は形態異常を誘発するには不十分であると考えられる。しかし，培養ラット胎子を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の ETU に 12 時間暴露した時，尾の異常が濃度依存性に観察され，100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では前脳，中脳および前肢にも高率な形態異常が誘発された。また，第 5 章のラットの *in vivo-in vitro* 系での実験においても，子宮内での 8 時間暴露では形態異常は誘発されず 12 時間暴露でのみ形態異常が誘発されている。これらのことから，

ラット胎子に形態異常を誘発するには、12時間が必要であると判断される。一方、ヒトおよび実験動物に催奇形性を示す valproic acid (VPA)においては、本実験結果と対照的な暴露時間に関する報告がされている。すなわち、Nauら(1981) および Nau(1985)は、VPAをマウス胎子に奇形を起こさせる用量で母体に皮下投与した時、4時間でVPAの90%が排泄されてしまうこと、およびVPAの最高血中濃度の1/15-1/6になるように浸透圧ポンプでVPAを継続的に7日間母体に投与した時は奇形が生じないことから、VPAが奇形を誘発するには短時間で高濃度の暴露が必要であると報告している。一方、本実験結果においては、ETUが培養ラット胎子に形態異常を誘発するには、10 µg/ml以上での12時間の暴露が必要であることを示した(算定 AUC: 120 µg·hr/ml)。しかし、6 µg/mlでの17時間の暴露(算定 AUC: 102 µg·hr/ml)では培養ラット胎子に形態異常が誘発されなかった。これらのことより、ETUはVPと異なり、形態異常を誘発するにはある一定濃度(10 µg/ml)以上での12時間の暴露が必要であると考えられる。

第 4 節 小括

Ethylenethiourea (ETU) がラット胎子に形態異常を誘発するのに必要な暴露時間を全胎子培養法により検討した。300 $\mu\text{g/ml}$ の 6 時間および 6 $\mu\text{g/ml}$ の 17 時間暴露においては形態異常は観察されなかった。一方, 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度での 12 時間暴露においては, 尾の異常が濃度依存性に認められ, 100 $\mu\text{g/ml}$ では, さらに前脳, 中脳および前肢に形態異常が観察された。これらより, ETU がラット胎子に明確な形態異常を誘発するには, 12 時間の暴露が必要であると推察された。

結語

以上の本研究の成績から、

- (1) ETUをラットに妊娠 11.5日および 12.5日に経口投与した時、妊娠末期胎子において脳奇形、口蓋裂、四肢の異常と欠指および合指、短尾、曲尾を主徴とする種々の奇形が観察され、これらの奇形と対応する変化がすでに胎生 13.5日の胎子に観察される。
- (2) ETUは母体血、胎子の羊水および脳脊髄液の浸透圧に変化を与えることはない。
- (3) 胎生 11.5日から 13.5日の間の胎子の ETUの催奇形性に対する感受性は *in vivo* および *in vitro* の条件下で差がない。
- (4) ETUのラット胎子に対する催奇形性は、肝臓の代謝により減弱される。
- (5) 母ラットに ETUを投与した時、ETUは速やかに体内に吸収され各体液へ移行し、10～200mg/kgの投与量の範囲では、血漿中および羊水中での ETUのピーク値並びに総暴露量は直線回帰を示す。
- (6) 母体血漿中および羊水中の ETU濃度はほぼ同じ濃度で推移する。

(7) 胎子自身の ETU 濃度は早い時間で消失するが、その後も羊水中での高い ETU 濃度に胎子が長時間曝露される。

(8) ETU がラット胎子に形態異常を誘発するためには、*in vivo*での羊水中もしくは *in vitro*での培養液中で、胎子が ETU の 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度に 12 時間連続して曝露されることが必要である。

などの結果がえられた。

これらより、一括すれば ETU は *in vivo* であれ *in vitro* であれ胎子にさまざまな奇形を生じさせるものであり、母体血中に長くとどまり、また胎子羊水中には母体血中と同程度に長く代謝されずにとどまるし、ETU の代謝を促進せしめると、奇形の発現が減弱することから、その催奇形性は ETU の代謝物によるのではなく ETU そのものによるものであると結論される。さらに、ETU がラット胎子に奇形を発現させるためには、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度の ETU に 12 時間、羊水中であれ培養液中であれ胎子が曝露されることが必要であることから、ETU が胎子に催奇形性を示すには、ETU の 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度が 12 時間以上母体血中で維持される必要があると結論される。

総括

Ethylenethiourea (ETU)は、それ自体、果実や野菜等にかつて散布された殺菌剤であり (Vettorazzi, *et al.*, 1995), また, ethylenebisthiocarbamate系殺菌剤の環境中分解物および動植物内での代謝産物である (Czeplédi-Jankó, 1967; Jordan, *et al.*, 1979; Brocker, *et al.*, 1980; Autio, *et al.*, 1983)。

ETUをラット胎子の器官形成期に母体に連続投与すると、胎子に外脳症、脳瘤、髄膜瘤、水頭症、小下顎症、四肢の低形成、欠指症、短尾、曲尾などの異常が低用量でも認められる (Khera, 1973; Petrova-Vergieva, *et al.*, 1973; Larsson *et al.*, 1976; Khera, 1987)。これらのことから、ETUはラットに催奇形性を示すことは明らかである。従って、本化合物の環境中への散布によりヒト胎児にも影響するかもしれないことが懸念される。しかし、代謝阻害剤のSKF-525Aを前処置したラットにETUを投与すると、その催奇形性が増強されるとの報告 (Khera & Iverson, 1981)と、これに相反して、ラットにおける *in vivo*でのETUの羊水内投与では奇形が誘発されないとの報告 (Teramoto, *et al.*, 1980)から、ETUの催奇形性がETU自体によるのか、あるいはその代謝物に

よるのかは未だ明確になってはいない。また，ETUの妊娠ラットにおける体内動態についての研究として， ^{14}C でラベルしたETUを妊娠ラットに経口投与したのち，母体血中，組織中，尿中および胎子中でのETU濃度の測定結果が報告されており，それによれば，経口投与されたETUは母体の血中，組織中並びに胎子中に速やかに移行することが示されている (Ruddick et al., 1975; Kato et al., 1976; Ruddick et al., 1977)。しかし，母体血中および羊水中でのETU未代謝体の濃度推移を詳細に検討した報告は未だなく，羊水を介する胎子への暴露に付いてもほとんど検討されていない。

本論文は，実験奇形学的な手法を用い，ETUによる催奇形性がETU自体によるのか，あるいはETUの代謝物によるのかを明らかにし，ETUが催奇形性を示す薬物動態学的パターンを明らかにするために行ったものである。

第1章では，妊娠11.5日および12.5日にETUを妊娠ラットに単回もしくは連日強制経口投与した時に，誘発される胎子の外形奇形の種類と形態異常の成立過程を観察した。

妊娠11.5日および12.5日にETUを単回もしくは連日経口投与した時，10 mg/kgでは胎子の外表奇形は全く観察さ

総括

れず，無影響量であった。50 mg/kgでは短尾が観察された。200 mg/kgでは脳奇形，口蓋裂，小下顎症，四肢の異常と欠指および合指，短尾を主徴とする種々の奇形が誘発され，妊娠 11.5 日投与では口唇裂が，妊娠 12.5 日投与では，さらに後肢の奇形と小上顎症，無舌症が観察された。妊娠 11.5 日と 12.5 日の連日投与では，両日の単回投与により認められた奇形が全て観察された。また，胎生 13.5 日には，これらの奇形に対応する部位で形態異常が観察され，この際，母動物の血清，胎子の羊水と脳脊髄液に浸透圧の変化は認められなかった。したがって，200 mg/kg の ETU を妊娠 11.5 日および 12.5 日の母ラットに単回経口投与した場合，その催奇形性に関して胎生 13.5 日の胎子ですでに評価可能であると考えられる。

第 2 章では，ラット胎子を胎生 11.5 日から培養系に移し，*in vitro* で ETU に暴露した時の形態変化を観察した。

胎生 11.5 日のラット胎子を 2 時間前培養した後，100 および 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の ETU を用い最初の 17 時間 ETU に暴露，ETU なしで 22 時間培養ののち 24 時間 ETU に暴露，並びに 46 時間連続で ETU に暴露の三種類の実験を行った。これらの条

件下で ETU に暴露された培養ラット胎子では，第 1 章で見られたような，母ラットの妊娠 11.5 日および 12.5 日に ETU を単回もしくは連日経口投与した場合の子宮内胎子の形態変化と同様な変化，すなわち，前脳の低形成，鼻突起の結合不全，小下顎症，前肢芽および後肢芽の低形成，短尾が観察された。したがって，胎生 11.5 日から 13.5 日の間のラット胎子の ETU に対する感受性は，*in vitro* でも *in vivo* でもほぼ同じであると考えられる。

第 3 章では，ETU の催奇形性が ETU 自体によるのか，あるいはその代謝物によるのかを明確にするため，培養ラット胎子をラット肝ミクロゾーム分画 (S9mix) の存在および非存在下で ETU に暴露し，形態異常の誘発について検討した。

10 および 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の ETU に S9mix の存在および非存在下でラット培養胎子を暴露した時，S9mix の非存在下では用量依存性に形態異常の頻度が高くなった。一方，S9mix の存在下では形態異常がほとんど観察されなかった。したがって，ETU の催奇形性は ETU 自体にあると推察される。

第4章では、ETUがラット胎子に奇形を誘発するのに要する薬物動態学的な閾値についての知見を得るため、ラットの妊娠12.5日にETUを10、50および200 mg/kgで単回経口投与し、母体血漿中、羊水中、胎子中および胎盤中でのETU濃度を経時的に測定した。

母体血漿中および羊水中のETUはともにほぼ同じ濃度で推移し、約2時間でピークに達し、その後徐々に減少し、48時間で消失した。この際、10~200 mg/kgの投与量の範囲で、ピーク値並びに総暴露量に各々直線回帰が認められ、用量に依存した体内吸収と各体液への移行が認められた。しかし、胎子自身のETU濃度は30分でピークに達し、投与後12時間でほぼ消失した。胎子に対するETUの効果の一部は、羊水中での高いETU濃度に胎子が長時間曝露されたことによるものと考えられる。

第5章では、ETUが胎子に奇形を誘発するのに要する子宮内での暴露時間について検討するため、妊娠11.5日もしくは12.5日のラットに200 mg/kgのETUを単回経口投与することにより、胎子をin vivoで2~12時間曝露し、さらに24時間培養して形態異常を観察した。

子宮内での6時間暴露からラット胎子の軽度な発達遅延が認められたが、8時間暴露においても明確な形態異常は認められなかった。一方、12時間暴露においては、前脳、中脳、前肢および尾に形態異常が観察された。したがって、子宮内のラット胎子に形態異常を誘発するためには12時間のETUへの暴露が必要であると考えられる。

第6章では、胎生11.5日からの培養ラット胎子を6, 30, 100および300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のETUに2~12時間暴露し、ETUが形態異常を誘発するのに要する暴露時間について *in vitro* で検討した。

300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の6時間および6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の17時間暴露においては形態異常は観察されなかった。一方、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度での12時間暴露においては、尾の異常が濃度依存性に認められ、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではさらに前脳、中脳および前肢に形態異常が観察された。したがって、ETUがラット胎子に明確な形態異常を誘発するには、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度での12時間の暴露が必要であると考えられた。

以上の本研究の成績から、(1) ETUをラットに妊娠11.5

日および 12.5 日に経口投与した時，妊娠末期胎子において観察される奇形と対応する変化がすでに胎生 13.5 日の胎子に観察される，(2) ETU は母体血，胎子の羊水および脳脊髄液の浸透圧に変化を与えることはない，(3) 胎生 11.5 日から 13.5 日の間の胎子の ETU に対する感受性は *in vivo* および *in vitro* の条件下で差がない，(4) 母ラットに ETU を投与した時，ETU は速やかに体内に吸収され各体液へ移行し，母体血漿中および羊水中の ETU 濃度はほぼ同じ濃度で推移する，(5) 胎子自身の ETU 濃度は早い時間で消失するが，その後も羊水中での高い ETU 濃度に胎子が長時間曝露される，(6) ETU がラット胎子に形態異常を誘発するのには，胎子が ETU の 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で 12 時間，羊水もしくは培養液中で暴露されることが必要である，ことなどの結果がえられた。

これらより，ETU は *in vivo* であれ *in vitro* であれ胎子にさまざまな奇形を生じさせるものであり，母体血中に長くとどまり，また胎子羊水中には母体血中と同程度に長く代謝されずにとどまるし，ETU の代謝を促進せしめると，奇形の発現が減弱することから，その催奇形性は ETU の代謝物によるのではなく ETU そのものによるものである，と結

論される。さらに，ETU がラット胎子に奇形を発現させるためには， $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度のETUに12時間，羊水中であれ培養液中であれ胎子が暴露されることが必要であることから，ETUが胎子に催奇形性を示すには，ETUの $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度が12時間以上母体血中で維持される必要がある，と結論される。

謝 辞

本研究は麻布大学獣医学部解剖学第二講座 教授 江口保暢博士，同 教授 有嶋和義博士，並びに同 助教授 山本雅子博士のご鞭撻とご指導並びにご校閲の賜物であり，ここに深甚なる謝意を表します。

本論文のとりまとめに関して，ご校閲と貴重なご助言を頂きました麻布大学獣医学部薬理学講座 教授 赤堀文昭博士，同 獣医学部実験動物学講座 教授 二宮博義博士に対し心より感謝いたします。

最後に，本研究の遂行に当たり，多大のご協力を頂きました三菱化学(株)横浜総合研究所 安全性研究所の諸氏に深く謝意を表します。

参考文献

- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ mammalian microsomes mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347-364.
- Autio, K. and Pyysalo, H. (1983): Application of γ -irradiation technique in the identification of some metabolites of maneb in mice. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 568-571.
- Brocker, E. R., and Schlatter, C. (1980): Dose dependence of the excretion of maneb metabolites in urine of rats. *Toxicol. Letters*, 6, 221-224.
- Chernoff, N., Kavlock, R. J., Rogers, E. H., Carver, B.D., and Murray, S. (1979): Perinatal toxicity of maneb, ethylene thiourea and ethylenebisisothiocyanate sulfide in rodents. *J. Toxicol. Environ. Health*, 5, 821-834.
- Czeglédi-Jankó, G. (1967): Determination of the degradation products of ethylenebis-(dithiocarbamates) by thin layer chromatography and some investigations of their decomposition in vitro. *J. Chromatog.*, 31, 89-95.
- Daston, G. P., Ebron, M.T., Carver, B. and Stefanadis, J. G. (1987): In vitro teratogenicity of ethylenethiourea in the rat. *Teratology*, 35, 239-245.
- Fantel, A. G., Greenaway, J. C., Juchau, M. R., and Shepard, T. H. (1979): Teratogenic bioactivation of cyclophosphamide *in vitro*. *Life Sci.*, 25, 67-72.
- Iverson, F., Kera, K.S. and Hierlihy S.L (1980): *In vivo* and *in vitro* metabolism of ethylenethiourea in the rat and the cat. *Toxicol. Appl.*

Pharmacol. 52: 16-21.

Iwase, T., Arishima, K., Ohyama, N., Inazawa, K., Iwase, Y., Ikeda, Y., Shirai, M., Yamamoto, M., Somiya, H., and Eguchi, Y. (1994): *In vitro* study of teratogenic effects of caffeine on cultured rat embryos and embryonic cells. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 619-621.

Jordan, L. W., and Neal, R. A. (1979): Examination of the *in vivo* metabolism of maneb and zineb to ethylenethiourea (ETU) in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 271-277.

Kato, Y., Odanaka, Y., Teramoto, S., and Matano, O. (1976): Metabolic fate of ethylenethiourea in pregnant rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 16, 546-555.

Khera, K.S. (1973): Ethylenethiourea: Teratogenicity study in rats and rabbits. *Teratology*, 7, 243-252.

Khera, K.S., and Iverson F. (1978): Toxicity of ethylenethiourea in pregnant cats. *Teratology*, 18, 311-314.

Khera, K.S. and Iverson, F. (1981): Effects of pretreatment with SKF-525A, N-methyl-2-thioimidazole, sodium phenobarbital, or methyl cholanthrene on ethylenethiourea-induced teratogenicity in rats. *Teratology* 24: 131-137.

Khera, K. S. (1987): Ethylenethiourea: A review of teratogenicity and distribution studies and an assessment of reproductive risk. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 18, 129-139.

Kobayashi, H, Kaneda, M. and Teramoto, S. (1982): Identification of 1-

- methylthiourea as the metabolite of ethylenethiourea in rats by high-performance liquid chromatography. *Toxicol. Letters* 12: 109-113.
- Larsson, K. S., Arnander, C., Cekanova, E. and Kjellberg, M. (1976): Studies of teratogenic effects of the dithiocarbamates maneb, mancozeb and propineb. *Teratology*, 14, 171-184.
- Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutat. Res.*, 66, 277-290
- Mirkes, P.E. (1985): Cyclophosphamide teratogenesis: A review. *Teratogen., Carcinogen., and Mutagen.* 5: 75-88.
- Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Hasegawa, K., Miyamoto, K. and Watanabe, T. (1987): Spontaneous malformations in laboratory animals: Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. *Cong. Anom.*, 27, 147-206.
- Nambo, T. (1988): Pharmacokinetics of clearance in the maternal-fetal amniotic fluid system of the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92, 381-389.
- Nau, H., Zierer, R., Spielman, h., Neubert, D. and Gansau, Ch. 1981: A new model for embryotoxicity testing: teratogenicity and pharmacokinetics of valpronic acid following constant-rate administration in the mouse using human therapeutic drug and metabolite concentrations. *Life sciences* 29: 2803-2714.
- Nau. H. 1985: Teratogenic valpronic acid concentrations: Infusion by implanted minipumps vs conventional injection regimen in the

- mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80: 246-250.
- New, D.A.T., (1977): Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.*, 53, 81-122
- Peterova-Vergieva, T., and Ivanova-Tchemishanska, L. (1973): Assessment of the teratogenic activity of dithiocarbamate fungicides. *Fd. Cosmet, Toxicol.* 11, 239-244.
- Rosenberg, C. and Siltanen, H. (1979): Residues of mancozeb and ethylenethiourea in grain samples *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 22: 475-478.
- Ruddick, J. A. and Khera, K.S. (1975): Pattern of anomalies following single oral doses of ethylenethiourea to pregnant rats. *Teratology*, 12, 277-282.
- Ruddick, J. A., Williams, D. T., Hierlihy, L. and Khera, K.S. (1976): [¹⁴C] Ethylenethiourea : Distribution, excretion, and metabolism in pregnant rats. *Teratology*, 13, 35-39.
- Ruddick, J.A., Newsome, W.H. and Nash, L. (1976): Correlation of teratogenicity and molecular structure: Ethylenethiourea and related compounds. *Teratology* 13: 263-266.
- Ruddick, J. A., Newsome, W. H. and Iverson, F. (1977): A comparison of the distribution, metabolism and excretion of ethylenethiourea in the pregnant mouse and rat. *Teratology*, 16, 159-162.
- Teramoto, S., Shingu, A., Kaneda, M. and Sato, R. (1978): Teratogenicity studies with ethylenethiourea in rats, mice and hamsters. *Cong. Anom.*, 18, 11-17.

- Teramoto, S., Kanda, M., Kato, Y. and Shirasu, Y. (1980): Failure of inducing malformations after intra-amniotic injection of ethylenethiourea in the rats. *Cong. Anom.* 20: 17-23.
- Teramoto, S., Kaneda, M., Aoyama, H. and Shirasu, Y. (1981). Correlation between the molecular structure of *N*-alkylureas and *N*-alkylthioureas and their teratogenic properties. *Teratology* 23: 335-342.
- Tsuchiya, T., Takahashi, A., Asada, S., Takakubo, F., Ohsumi-Yamashita, N. and Eto, K. (1991): Comparative studies of embryotoxic action of ethylenethiourea in ray whole embryo and embryonic cell culture. *Teratology*, 43, 319-324.
- Vettorazzi, G., Almeida, F. W., Burin, J. G., Jaeger, B. R., Puge, R. F., Rahde, F. A., Reyes, G., A. and Schwartsman, S. (1995): International Safety Assessment of pesticides: Dithiocarbamatepesticides, ETU, and PTU - A review and update. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis.*, 15, 313-337.

Table 1 Findings in maternal cesarean section on day 20 of gestation following oral treatment with ETU on day 11.5

	Dose of ETU (mg/kg/day)			
	0 (control)	10	50	200
No. of litters examined	6	6	6	6
Maternal body weight gain (mean \pm SEM, g)	96.1 \pm 5.1	87.4 \pm 5.1	91.6 \pm 8.9	66.4 \pm 7.3*
No. of implantations (mean \pm SEM)	13.8 \pm 1.0	14.5 \pm 0.4	15.0 \pm 0.5*	13.5 \pm 0.8
No. of live fetuses (mean \pm SEM)	12.5 \pm 1.2	13.8 \pm 0.5	14.3 \pm 0.6*	12.0 \pm 0.8
Incidence of dead embryos/fetuses (%)	9.6	4.6	4.4	17.3
Early maceration (%)	8.4	4.6	3.3	13.6
Late maceration (%)	1.2	0	1.1	3.7
Fetal body weight (mean \pm SEM, g)	3.89 \pm 0.07	3.86 \pm 0.09	3.56 \pm 0.15	2.89 \pm 0.11**
Placental weight (mean \pm SEM, g)	0.37 \pm 0.01	0.37 \pm 0.01	0.34 \pm 0.03	0.31 \pm 0.00**

* **, Significantly different from the control ($p < 0.05$ and 0.01 , respectively)

Table 2 Fetal external anomalies at term following maternal ETU-treatment on day 11.5 of gestation

Type of anomaly	Dose of ETU (mg/kg/day)			
	0 (control)	10	50	200
No. of litters examined	6	6	6	6
No. of fetuses examined	75	82	86	67
Fetuses with external anomalies (%)	0	0	100 **	100 **
Brain hernia (%)	0	0	0	37.3 **
Hydrocephaly (%)	0	0	0	65.7 **
Microphthalmia (%)	0	0	0	17.9 **
Cleft lip (%)	0	0	0	92.5 **
Cleft palate (%)	0	0	1.2	100 **
Mandibula micrognathia (%)	0	0	0	100 **
Shortened forelimb (%)	0	0	0	100 **
Forelimb syndactyly and/or oligodactyly (%)	0	0	0	91.0 **
Hindlimb polydactyly (%)	0	0	0	6.0 *
Kinky tail (%)	0	0	77.9 **	0
Short tail (%)	0	0	100 **	0
Vestigial tail (%)	0	0	0	1.5
No tail (%)	0	0	0	98.5 **
Anal atresia (%)	0	0	0	97.0 **

* **, Significantly different from the control (p<0.05 and 0.01, respectively)

Table 3 Findings in maternal cesarian section on day 20 of gestation following oral treatment with ETU on day 12.5

	Dose of ETU (mg/kg/day)			
	0 (control)	10	50	200
No. of litters examined	6	6	6	8
Maternal body weight gain (mean \pm SEM, g)	85.7 \pm 5.5	93.9 \pm 3.9	84.4 \pm 4.4	70.0 \pm 6.6
No. of implantations (mean \pm SEM)	13.2 \pm 1.8	15.5 \pm 0.9	13.7 \pm 0.9	15.1 \pm 0.6
No. of live fetuses (mean \pm SEM)	12.8 \pm 1.7	14.5 \pm 1.1	13.2 \pm 1.2	14.6 \pm 0.5
Incidence of dead embryos/fetuses (%)	2.5	6.5	3.7	5.8
Placental remnant (%)	2.5	6.5	2.4	5.0
Late maceration (%)	0	0	1.3	0.8
Fetal body weight (mean \pm SEM, g)	3.92 \pm 0.23	3.78 \pm 0.13	3.31 \pm 0.11*	2.28 \pm 0.06**
Placental weight (mean \pm SEM, g)	0.37 \pm 0.02	0.37 \pm 0.01	0.35 \pm 0.01	0.31 \pm 0.01*
Crown rump length (mean \pm SEM, mm)	36.6 \pm 1.5	36.0 \pm 1.0	27.4 \pm 3.8*	-
Tail length (mean \pm SEM, mm)	13.9 \pm 0.8	14.0 \pm 0.3	8.7 \pm 0.3**	-

*, **, Significantly different from the control ($p < 0.05$ and 0.01 , respectively)

-: Not measured

Table 4 Fetal external anomalies at term following maternal ETU-treatment on day 12.5 of gestation

Type of anomaly	Dose of ETU (mg/kg/day)			
	0 (control)	10	50	200
No. of litters examined	6	6	6	8
No. of fetuses examined	77	87	79	117
Fetuses with external anomalies (%)	1.3	0	98.7 **	100 **
Brain hernia (%)	0	0	0	13.2 **
Hydrocephaly (%)	0	0	0	88.6 **
Micro-/ anencephalia	0	0	0	20.2 **
Microphthalmia (%)	0	0	0	12.0 **
Cleft palate (%)	0	0	0	100 **
Aglossia	0	0	0	40.4 **
Maxillary micrognathia (%)	0	0	0	13.2 **
Mandibula micrognathia (%)	0	0	0	100 **
Shortened forelimb (%)	0	0	0	100 **
Forelimb syndactily and/ or oligodactily (%)	0	0	6.3 *	100 **
Clubfoot (%)	0	0	0	100 **
Hindlimb syndactily and/ or oligodactily (%)	0	0	0	100 **
Kinky tail (%)	0	0	0	35.9 **
Short tail (%)	0	0	98.7 **	72.6 **
Vestigial tail (%)	1.3	0	0	13.2 **
No tail (%)	0	0	0	2.6
Anal atresia (%)	0	0	0	93.0 **

*, **: Significantly different from the control (p<0.05 and 0.01, respectively)

Table 5 Findings in maternal cesarian section on day 20 of gestation following oral treatment with ETU on days 11.5 and 12.5

	Dose of ETU (mg/kg/day)			
	CONTROL	10	50	200
No. of litters examined	5	4	2	5
Maternal body weight gain (GD11-GD20) (mean \pm SEM)	99.7 \pm 2.3	90.2 \pm 5.4	84.1	-
Implantations (mean \pm SEM)	15.8 \pm 1.5	15.5 \pm 1.29	14.5	15.2 \pm 1.3
Live fetuses (mean \pm SEM)	14.0 \pm 1.5	14.25 \pm 1.26	14.5	8.6 \pm 0.55**
Incidence of dead embryos/fetuses (%)	11.4	8.1	0.0	43.4**
Early maceration (%)	10.1	8.1	0.0	42.1**
Late maceration (%)	1.3	0.0	0.0	1.3
Fetal body weight (mean \pm SEM, g)	3.94 \pm 0.10	3.74 \pm 0.09	3.51	2.36 \pm 0.25**
No. of fetuses examined	29	57	29	0
Placental weight (mean \pm SEM, g)	0.35 \pm 0.01	0.38 \pm 0.01	0.37 \pm 0.01	-
Crown rump length (mean \pm SEM, mm)	35.0 \pm 0.30	34.0 \pm 0.23*	31.8 \pm 0.3**	-
Tail length (mm) (mean \pm SEM, mm)	13.2 \pm 0.20	13.8 \pm 0.11	8.3 \pm 0.4**	-

* , **: Significantly different from the control (p<0.05 and 0.01, respectively)

-: Not measured

Table 6 Fetal external anomalies at term following maternal ETU-treatment on days 11.5 and 12.5 of gestation

Type of anomaly	Dose of ETU (mg/kg/day)				
	0	10	50	200	
	(control)				
No. of litters examined	5	4	2	5	
No. of fetuses examined	70	57	29	43	
Fetuses with external anomalies (%)	0	0	100 **	100 **	
Brain hernia (%)	0	0	0	53.5 **	
Hydrocephaly (%)	0	0	0	48.8 **	
Micro-/ anencephalia	0	0	0	62.8 **	
Haemorrhage in brain	0	0	0	27.9 **	
Micro-/ anophthalmia (%)	0	0	0	79.1 **	
Cleft lip (%)	0	0	0	100 **	
Cleft palate (%)	0	0	0	100 **	
Aglossia	0	0	0	100 **	
Maxillary micrognathia (%)	0	0	0	100 **	
Mandibula micrognathia (%)	0	0	0	100 **	
Umbilical hernia	0	0	0	2.3	
Shortened forelimb (%)	0	0	0	100 **	
Forelimb syndactily and/ or oligodactily (%)	0	0	3.5	100 **	
Clubfoot (%)	0	0	0	100 **	
Hindlimb syndactily and/ or oligodactily (%)	0	0	0	100 **	
Kinky tail (%)	0	0	93.1 **	0	
Short tail (%)	0	0	100 **	0	
No tail (%)	0	0	0	100 **	
Anal atresia (%)	0	0	0	100 **	

* , **: Significantly different from the control (p<0.05 and 0.01, respectively)

Table 7 Dymorphogenesis in fetuses derived from dams given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation

		Days of observation			
		12.5	13.5	14.5	15.5
	No. of litters used	6	6	4	6
	No. of fetuses observed	80	72	51	65
Brain region	Prosencephalon hypoplasia (%)	100	100	77	85
	Mesencephalon extrudocclusion (%)	36	38	-	-
	Mesencephalon edema (%)	0	14	-	-
	Mesencephalon rupture (%)	0	0	2	0
	Hydrocephaly (%)	-	-	96	100
Nasal region	Medial nasal process hematoma (%)	15	6	-	-
	Nasal process noncontact (%)	0	100	-	-
	Cleft lip (%)	-	-	100	100
Cervical region	Mandibula hypoplasia (%)	0	100	98	100
Forelimb	Forelimb bud hypoplasia (%)	0	100	-	-
	Forelimb dysplasia (%)	0	0	28	66
	Forelimb plate hypoplasia (%)	-	-	100	100
	Oligodactyly (%)	-	-	75	94
Hindlimb	Hindlimb bud hypoplasia (%)	0	0	-	-
	Hindlimb bud hematoma (%)	0	0	-	-
	Hindlimb dysplasia (%)	0	0	2	0
	Hindlimb plate hypoplasia (%)	-	-	2	0
	Oligodactyly (%)	-	-	4	0
Somatic region	Dorsum edema (%)	0	44	96	100
Tail	Tail edge edema (%)	26	24	2	0
	Tail shortened (%)	100	100	96	85
	Tail rudiment (%)	0	0	0	15

-: The term not applied.

Table 8 Dymorphogenesis in fetuses derived from dams given 200 mg/kg ETU on day 12.5 of gestation

		Days of observation		
		13.5	14.5	15.5
	No. of litters used	6	6	3
	No. of fetuses observed	73	71	35
Brain region	Prosencephalon hypoplasia (%)	100	100	100
	Mesencephalon extrudocclusion (%)	32	-	-
	Mesencephalon edema (%)	0	-	-
	Rupture of blood vessels (%)	0	51	100
	Brain region hemocele (%)	0	0	69
	Hydrocephaly (%)	-	100	100
Nasal region	Medial nasal process hematoma (%)	0	0	-
	Nasal process noncontact (%)	0	0	-
	Cleft lip (%)	-	0	0
Maxillary	Maxillary hypoplasia (%)	0	51	100
Cervical region	Mandibula hypoplasia (%)	82	100	98
Forelimb	Forelimb bud hypoplasia (%)	58	-	-
	Forelimb dysplasia (%)	42	100	100
	Forelimb plate hematoma (%)	0	21	54
	Forelimb plate hypoplasia (%)	-	49	100
	Oligodactyly (%)	-	32	100
Hindlimb	Hindlimb bud hypoplasia (%)	56	-	-
	Hindlimb bud hematoma (%)	0	21	-
	Hindlimb dysplasia (%)	0	62	97
	Hindlimb plate hypoplasia (%)	-	49	97
	Oligodactyly (%)	-	34	97
Somatic region	Dorsum edema (%)	0	0	100
Tail	Tail edge edema (%)	12	38	0
	Tail shortened (%)	79	100	100
	Tail rudiment (%)	0	0	0

-: The term not applied.

Table 9 Dymorphogenesis in 13.5-day fetuses derived from dams given 200 mg/kg ETU on days 11.5 and 12.5 of gestation

	Day of observation
	13.5
No. of litters used	6
No. of fetuses observed	68
Prosencephalon hypoplasia (%)	100
Mesencephalon extrudocclusion (%)	46
Medial nasal process hematoma (%)	56
Mandibula hypoplasia	100
Nasal process noncontact (%)	100
Forelimb bud hypoplasia (%)	100
Hindlimb bud hypoplasia (%)	38
Tail shortened (%)	100

Table 10 Osmotic pressure of dam's serum, fetal amniotic fluid and fetal cerebrospinal fluid after administration of 200 mg/kg ETU to dams on day 11.5 of gestation

	Days of measurement			
	12.5	13.5	14.5	15.5
Dam's serum (mOsm/kg)				
Control	303	302	304	303
ETU 200 mg/kg	292	298	304	305
Amniotic fluid (mOsm/kg)				
Control	282	289	295	293
ETU 200 mg/kg	287	290	294	291
Cerebrospinal fluid (mOsm/kg)				
Control	-	-	299	291
ETU 200 mg/kg	-	295	290	289

-: Not measured, because of technical difficulty in collection

Table 11 Morphological defects in cultured rat fetuses exposed to ETU for the first 17 hr

	ETU concentration ($\mu\text{g/ml}$)			Reference ^{a)} In utero exposure
	0	100	300	
No. of fetuses used	Control 20	20	20	80
Prosencephalon hypoplasia (%)	0	60 **	95 **	100
Mandibula hypoplasia (%)	0	60 **	60 **	100
Nasal process noncontact (%)	0	60 **	60 **	100
Forelimb bud hypoplasia (%)	0	30 *	75 **	100
Hindlimb bud hypoplasia (%)	0	10	30 *	0
Tail shortened (%)	0	100 **	100 **	100
Placental diameter (mm, mean \pm S.E.)	2.7 \pm 0.05	2.2 \pm 0.05*	2.5 \pm 0.05*	-
Crown rump length (mm, mean \pm S.E.)	7.9 \pm 0.09	7.8 \pm 0.09	8.1 \pm 0.16	8.7 \pm 0.17
Head length (mm, mean \pm S.E.)	4.3 \pm 0.05	4.3 \pm 0.05	4.3 \pm 0.07	5.0 \pm 0.22

^{a)}: Fetuses derived from rat dams given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation

*, **: Significantly different from the control (p<0.05 and 0.01, respectively)

-: Not measured

Table 12 Morphological defects in cultured rat fetuses exposed to ETU for the last 24 hr

	ETU concentration ($\mu\text{g/ml}$)			Reference ^{a)}
	0	100	300	
No. of fetuses used	Control 20	20	20	In utero exposure 73
Proencephalon hypoplasia (%)	0	30 *	70 **	100
Mandibula hypoplasia (%)	0	0	40 **	82
Nasal process noncontact (%)	0	0	0	0
Forelimb bud hypoplasia (%)	0	15	75 **	58
Hindlimb bud hypoplasia (%)	0	0	40 **	56
Tail shortened (%)	0	95 **	95 **	79
Placental diameter (mm, mean \pm S.E.)	2.7 \pm 0.05	2.6 \pm 0.07	2.6 \pm 0.05	-
Crown rump length (mm, mean \pm S.E.)	7.9 \pm 0.09	7.9 \pm 0.13	7.6 \pm 0.11	8.2 \pm 0.10
Head length (mm, mean \pm S.E.)	4.3 \pm 0.05	4.3 \pm 0.07	4.2 \pm 0.07	4.6 \pm 0.06

^{a)}: Fetuses derived from rat dams given 200 mg/kg ETU on day 12.5 of gestation

*, **: Significantly different from the control (p<0.05 and 0.01, respectively)

-: Not measured

Table 13 Morphological defects in cultured rat fetuses exposed to ETU for 46 hr

	ETU concentration ($\mu\text{g/ml}$)			Reference ^{a)}
	0	100	300	
No. of fetuses used	Control			In utero exposure
	20	20	20	68
Proencephalon hypoplasia (%)	0	100 **	100 **	100
Mandibula hypoplasia (%)	0	60 **	80 **	100
Nasal process noncontact (%)	0	55 **	80 **	100
Forelimb bud hypoplasia (%)	0	85 **	100 **	100
Hindlimb bud hypoplasia (%)	0	65 **	100 **	38
Tail shortened (%)	0	100 **	100 **	100
Placental diameter (mm, mean \pm S.E.)	2.7 \pm 0.05	2.5 \pm 0.07	2.5 \pm 0.05*	-
Crown rump length (mm, mean \pm S.E.)	7.9 \pm 0.09	8.5 \pm 0.20	7.8 \pm 0.18	9.0 \pm 0.15
Head length (mm, mean \pm S.E.)	4.3 \pm 0.05	4.3 \pm 0.07	4.0 \pm 0.07*	5.0 \pm 0.07

^{a)}: Fetuses derived from rat dams given 200 mg/kg ETU on days 11.5 and 12.5 of gestation

* **, Significantly different from the control (p<0.05 and 0.01, respectively)

-: Not measured

Table 14 Preliminary examinations for the active-metabolizing system

	Control		Pre-exam 1		Pre-exam 2		Pre-exam 3	
	CP 50	-	CP 50	-	CP 50	-	CP 50	-
S9 concentration in S9mix (%)	0	30	0	30	10	10	3.75	3.75
Protein content of S9/ medium (mg protein/ ml)	0	1.2	0	1.2	0.4	0.4	0.15	0.15
Chemical concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CP 50	-	CP 50	-	CP 50	-	CP 50	-
Fetuses with morphological defects (%)	0	0	100*	0	100*	0	100*	0
Whole body dysmorphogenesis (%)	0	0	100*	0	0	0	0	0
Craniofacial defects (%)	0	0	100*	0	100*	0	100*	0
Forelimb bud hypoplasia (%)	0	0	100*	0	100*	0	100*	0
Tail hypoplasia (%)	0	0	100*	0	100*	0	100*	0

*: significantly different from the control ($p < 0.01$)

Rat fetuses were exposed to $50\mu\text{g CP}/\text{ml}$ for 17 hr in culture after 2-hr preculture.

CP: Cyclophosphamide

-: 0.1% DMSO, solvent for CP.

Table 15 Incidence of morphological defects in rat fetuses exposed in vitro to ETU or CP with/ without S9mix

Type of dysmorphogenesis	Concentration of chemicals							
	0 (control)		CP 30 µg/ml		ETU 10 µg/ml		ETU 30 µg/ml	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
No. of fetuses used	12	8	10	10	6	6	10	10
No. of live fetuses	12	8	0	10	6	6	12	10
Fetuses with dysmorphogenesis (%)	0	0	100 ^{**} , ^b	60 ^{**}	0 ^a	0 ^a	90 ^{**}	10 ^b
Proencephalon hypoplasia (%)	0	0	100 ^{**} , ^b	0	0	0	0	0
Face hypoplasia (%)	0	0	70 ^{**} , ^b	0	0	0	0	0
Nasal process hypoplasia (%)	0	0	100 ^{**} , ^b	0	0	0	0	0
Forelimb bud hypoplasia (%)	0	0	30	10	0	0	0	10
Forelimb bud edema (%)	0	0	10	20	0	0	10	0
Tail shortened (%)	0	0	100 ^{**} , ^b	40 [*]	0	0	80 ^{**}	10 ^b
Crown rump length (mean±SEM, mm)	7.5 ± 0.11	7.5 ± 0.10	-	7.9 ± 0.20	7.5 ± 0.06	7.5 ± 0.06	7.5 ± 0.19	7.4 ± 0.14
Head length (mean±SEM, mm)	4.2 ± 0.09	4.1 ± 0.08	-	4.4 ± 0.11	4.1 ± 0.07	4.1 ± 0.07	4.0 ± 0.12	4.0 ± 0.06
No of paired tail somites (mean±SEM)	16.1 ± 0.38	15.8 ± 0.45	-	14.7 ± 0.82	15.8 ± 0.54	15.8 ± 0.54	12.1 ± 1.14 [*]	15.6 ± 0.06 ^a

+S9: Presence of S9mix, -S9: Absence of S9 mix, -: Not measured

^{*}, ^{**}: Significantly different from the control (P<0.05 and 0.01, respectively)

^a, ^b: Significantly different from the -S9 group at the same concentration (P<0.05 and 0.01, respectively)

Table 16 Morphological parameters of rat fetuses exposed in utero to 200 mg ETU/kg and then cultured for 24 hr

	In utero exposure time (h)						
	0	2	4	6	8	12	
(Control)							
Expected AUC value ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) ^a	0	175	334	570	713	937	
No. of fetuses examined	18	18	12	19	6	16	
Crown rump length (Mean \pm SD, mm)	8.7 \pm 0.3	8.8 \pm 0.9	8.5 \pm 0.4	8.3 \pm 0.4**	8.1 \pm 0.3**	8.7 \pm 0.3	
Head length (Mean \pm SD, mm)	4.7 \pm 0.2	4.8 \pm 0.2	4.3 \pm 0.2**	4.8 \pm 0.2	4.5 \pm 0.2	5.2 \pm 0.3	
No. of tail somite pairs (Mean \pm SD)	21.6 \pm 1.7	22.2 \pm 3.3	20.9 \pm 1.1	19.8 \pm 1.9**	19.2 \pm 0.8**	14.1 \pm 1.1**	
No. (%) of fetuses with anomalies	0	0	0	0	5 (83)**	16 (100)**	
No. (%) of fetuses with:							
Prosencephalon hypoplasia	0	0	0	0	0	16 (100)**	
Mesencephalon edema	0	0	0	0	0	16 (100)**	
mandibula hypoplasia	0	0	0	0	0	8 (50)**	
Forelimb bud edema	0	0	0	0	0	14 (88)**	
Forelimb bud hypoplasia	0	0	0	0	0	10 (63)**	
Tail hyperemia	0	0	0	0	5 (83)**	0	
Tail edge edema	0	0	0	0	0	2 (13)	
Tail shortened	0	0	0	0	0	16 (100)**	

^a: AUC values were calculated from a concentration-time curve of ETU in amniotic fluid (see Fig. 4)

** Significantly different from the control ($p < 0.01$)

Table 17 Morphological parameters of rat fetuses exposed to ETU for 6 hr *in vitro*

	ETU concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	0	100	300
	Control		
No. of live fetuses	12	6	12
Fetuses with dismorphogenesis (%)	0	0	0
Crown rump length (mean \pm SEM, mm)	7.7 \pm 0.11	7.5 \pm 0.06	7.9 \pm 0.10
Head length (mean \pm SEM, mm)	4.5 \pm 0.07	4.4 \pm 0.04	1.3 \pm 0.08
No. of tail somite pairs (mean \pm SEM)	18.1 \pm 0.56	17.3 \pm 0.92	18.5 \pm 0.31
Increased no. of tail somite pairs (mean \pm SEM)	11.0 \pm 0.55	10.2 \pm 0.75	10.7 \pm 0.40

*: Significantly different from the control ($p < 0.05$)

Table 18 Dysmorphogenic effects of ETU on cultured rat fetuses exposed *in vitro* for 12 hr

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	0	10	30	100
	Control			
No. of live fetuses	12	10	9	12
Fetuses with dismorphogenesis (%)	0	30	78 **	100 **
Prosencephalon hypoplasia (%)	0	0	0	33 *
Mesencephalon edema (%)	0	0	0	33 *
Forelimb bud hypoplasia (%)	0	0	0	17
Forelimb bud edema (%)	0	0	0	83 **
Tail edge edema	0	10	0	0
Tail shortened (%)	0	30	78 **	83 **
Tail curved (%)	0	10	44 *	50 **
Crown rump length (mean \pm SEM, mm)	7.9 \pm 0.09	7.7 \pm 0.07	7.7 \pm 0.12	7.8 \pm 0.11
Head length (mean \pm SEM, mm)	4.5 \pm 0.08	4.4 \pm 0.05	4.2 \pm 0.03	4.5 \pm 0.06
No. of tail somite pairs (mean \pm SEM)	18.3 \pm 0.65	17.7 \pm 0.68	14.8 \pm 0.68**	12.3 \pm 0.79**
Increased no. of tail somite pairs (mean \pm SEM)	11.0 \pm 0.55	9.8 \pm 0.57*	9.0 \pm 0.58*	4.6 \pm 0.73**

*, **: Significantly different from the control ($p < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively)

Table 19 Effects of ETU on cultured rat fetuses exposed *in vitro* at 6 $\mu\text{g/ml}$ for 17 hr

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	
	0	6
	Control	
No. of live fetuses	12	10
Fetuses with dismorphogenesis (%)	0	0
Tail shortened (%)	0	0
Tail curved (%)	0	0
Crown rump length (mean \pm SEM, mm)	7.9 \pm 0.09	8.2 \pm 0.06
Head length (mean \pm SEM, mm)	4.5 \pm 0.08	4.7 \pm 0.08
No. of tail somite pairs (mean \pm SEM)	18.3 \pm 0.65	18.3 \pm 0.62
Increased no. of tail somite pairs (mean \pm SEM)	11.0 \pm 0.55	10.6 \pm 0.67



Photo 1. A rat fetus (left side) derived from a dam given 50 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation showing a short and kinky tail.



Photo 2. A rat fetus derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation showing brain hernia, hydrocephalic, mandibular micrognathia, shortened forelimb, forelimb digit anomalies, and no tail.

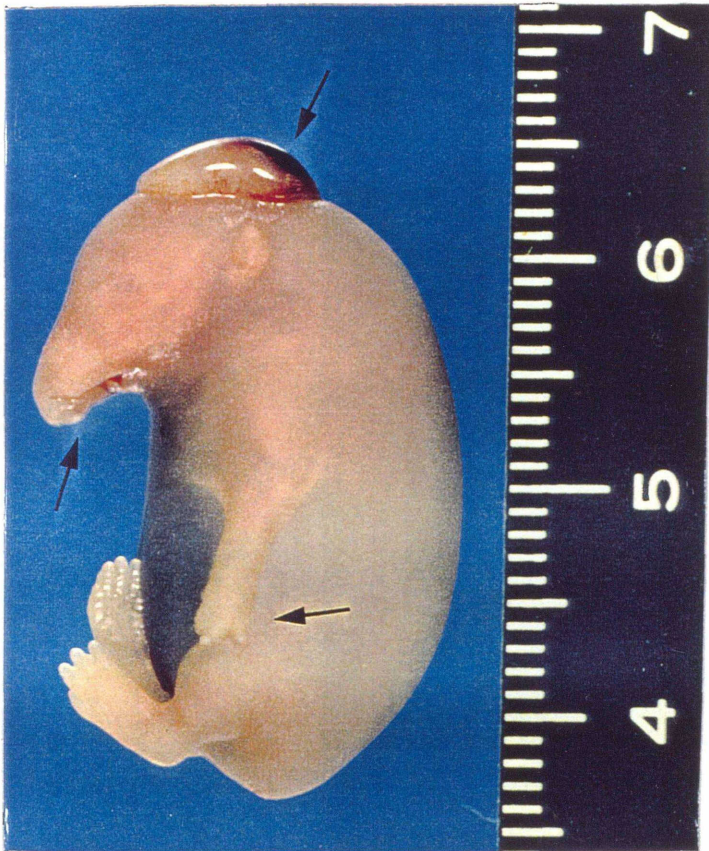


Photo 3. A rat fetus derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation showing brain hernia (top arrow), cleft lip, cleft palate (middle arrow), mandibular micrognathia, shortened forelimb, forelimb syndactyly (lower arrow) and oligodactyly, no tail and anal atresia.

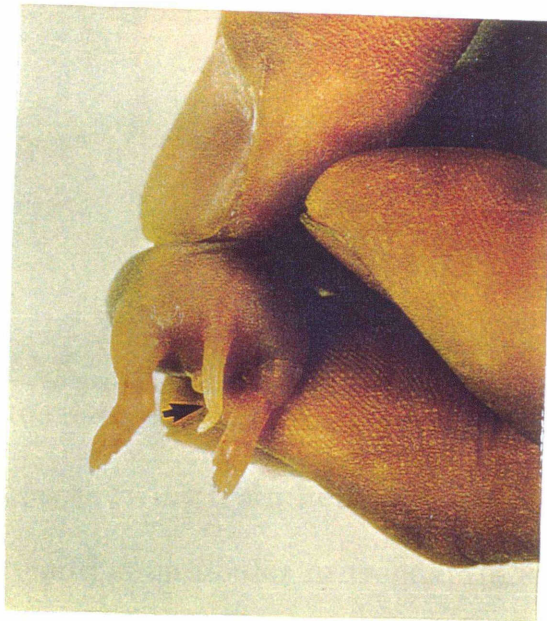


Photo 4. A rat fetus derived from a dam given 50 mg/kg ETU on day 12.5 of gestation showing a short and kinky tail (arrow).

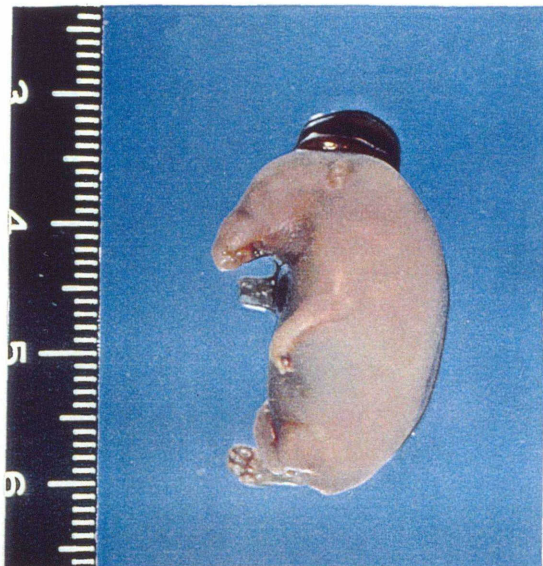


Photo 5. A rat fetus derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 12.5 of gestation showing brain hernia, hydrocephaly including blood, mandibular micrognathia, cleft palate, shortened fore- and hind-limbs, fore- and hind-limb digit anomalies, and no tail.



Photo 6. A rat fetus derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 12.5 of gestation showing brain hernia, hydrocephaly including blood, maxillary and mandibular micrognathia, cleft palate, shortened fore- and hind-limbs, fore- and hind-limb digit anomalies, and short tail.



Photo 7. A 12.5-day rat fetus (right side) derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation showing prosencephalon hypoplasia (arrow head).



Photo 8. A 12.5-day rat fetus (right side) derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation showing mesencephalon extrusion and edema in tail edge (arrow head).

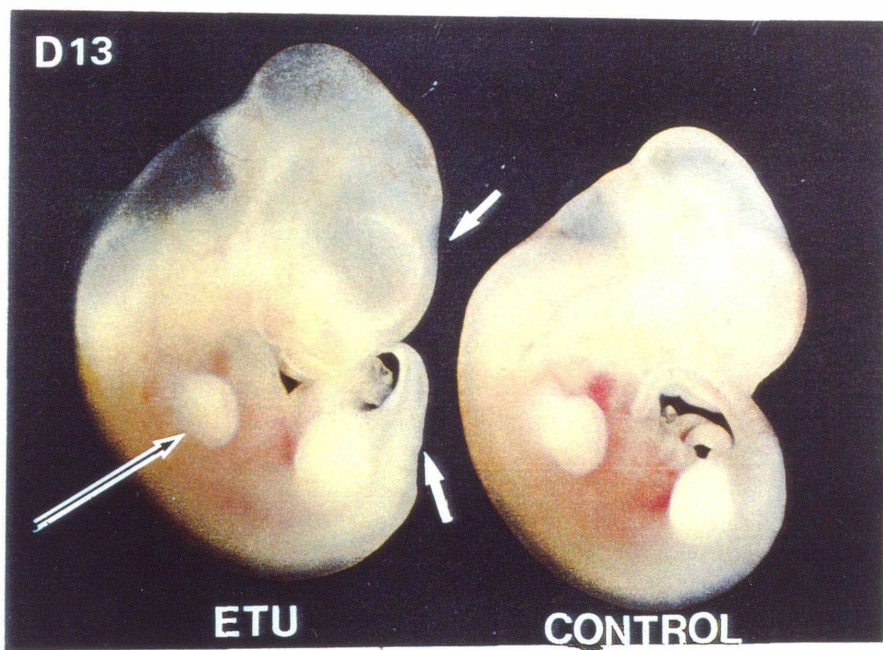


Photo 9. A 13.5-day rat fetus (left side) derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation showing prosencephalon hypoplasia (white arrow), mesencephalon extrusion and edema, forelimb bud hypoplasia (arrow), and short tail (white arrow).



Photo 10. A 14.5-day rat fetus derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation showing prosencephalon hypoplasia, mesencephalon extrudocclusion and edema, nasal processes noncontact, mandibula hypoplasia, forelimb bud hypoplasia, dorsum edema, and short tail.



Photo 11. A 14.5-day rat fetus derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation showing prosencephalon hypoplasia, mesencephalon extrudocclusion and edema, rupture of blood vessels in brain region, nasal processes noncontact, mandibula hypoplasia, forelimb bud hypoplasia, dorsum edema, and short tail.



Photo 12. A 15.5-day rat fetus derived from a dam given 200 mg/kg ETU on day 11.5 of gestation showing prosencephalon hypoplasia, mesencephalon extrudocclusion and edema, rupture of blood vessels in brain region, nasal processes noncontact, mandibula hypoplasia, dorsum edema, forelimb bud hypoplasia and oligodactuly, and short tail.



Photo 13. Two-day cultured rat fetuses exposed to 0 (control), 100, and 300 μg ETU/ml for first 17 hr after 2-hr preincubation. Both fetuses exposed to 100 and 300 μg ETU/ml show prosencephalon hypoplasia, mesencephalon extrudocclusion, nasal processes noncontact, mandibula hypoplasia, forelimb bud hypoplasia, and short tail.

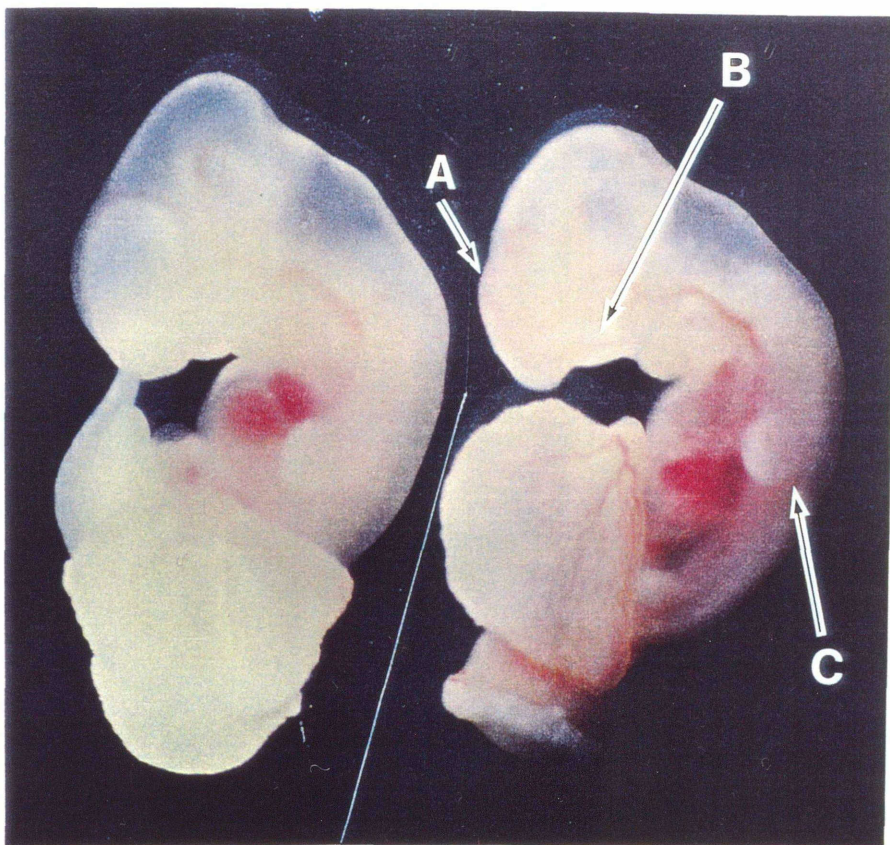


Photo 14. Two-day cultured rat fetuses exposed to 0 (control) and 300 μg ETU/ml for the first 17 hr after 2-hr preincubation. The ETU-exposed fetus shows prosencephalon hypoplasia, mesencephalon extrudocclusion, nasal processes noncontact, mandibula hypoplasia, and forelimb bud hypoplasia.



Photo 15. Two-day cultured rat fetuses exposed to 0 (control), 100, and 300 μg ETU/ml for the last 24 hr. Both fetuses exposed to 100 and 300 μg ETU/ml show prosencephalon hypoplasia, mesencephalon extrusion, mandibular hypoplasia, forelimb and hindlimb buds hypoplasia, and short tail.

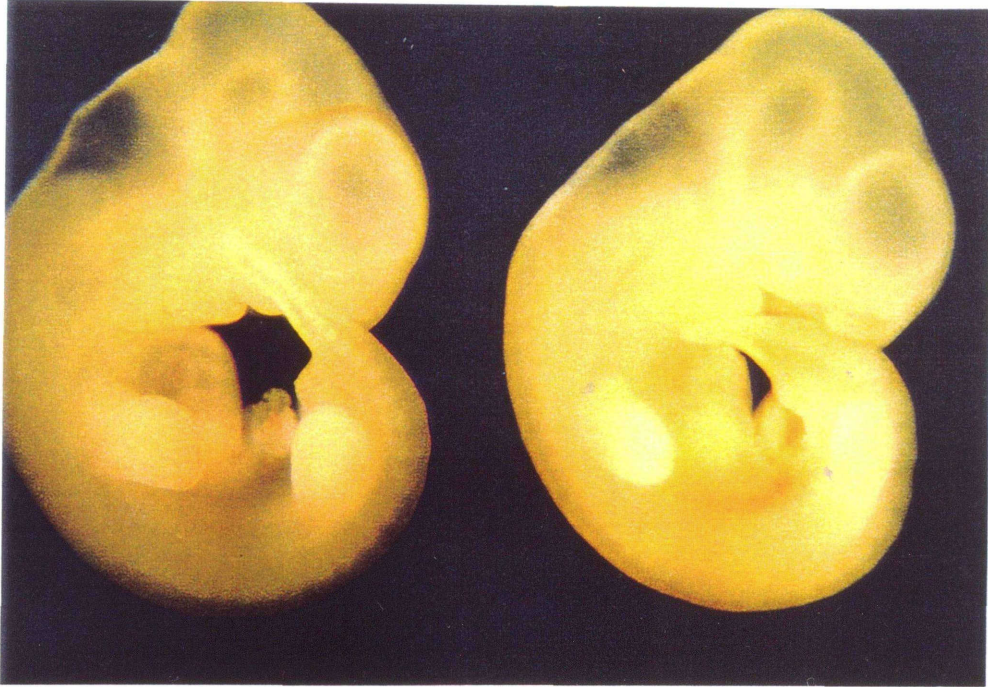


Photo 16. Two-day cultured rat fetuses. The left fetus, control, The right fetus, exposed to 30 µg ETU/ml for 17 hr without S9mix, shows prosencephalon hypoplasia, and short tail.

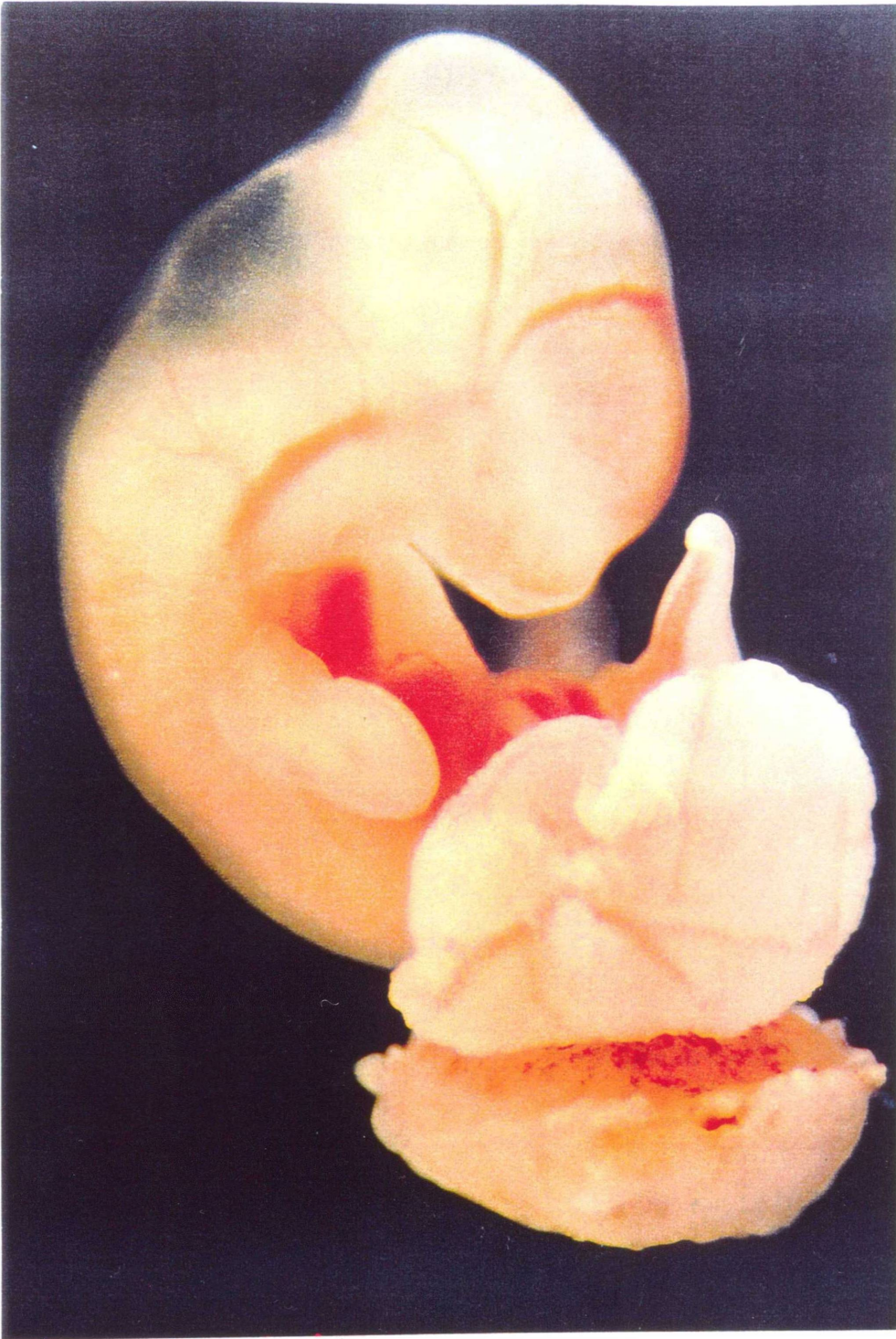


Photo 17. A fetus exposed in utero to 200 mg ETU/kg for 12 hr and then cultured with ETU-free serum for 24 hr. The ETU-exposed fetus shows prosencephalon hypoplasia, mesencephalon extrudocclusion, mandibula hypoplasia and tail shortened.

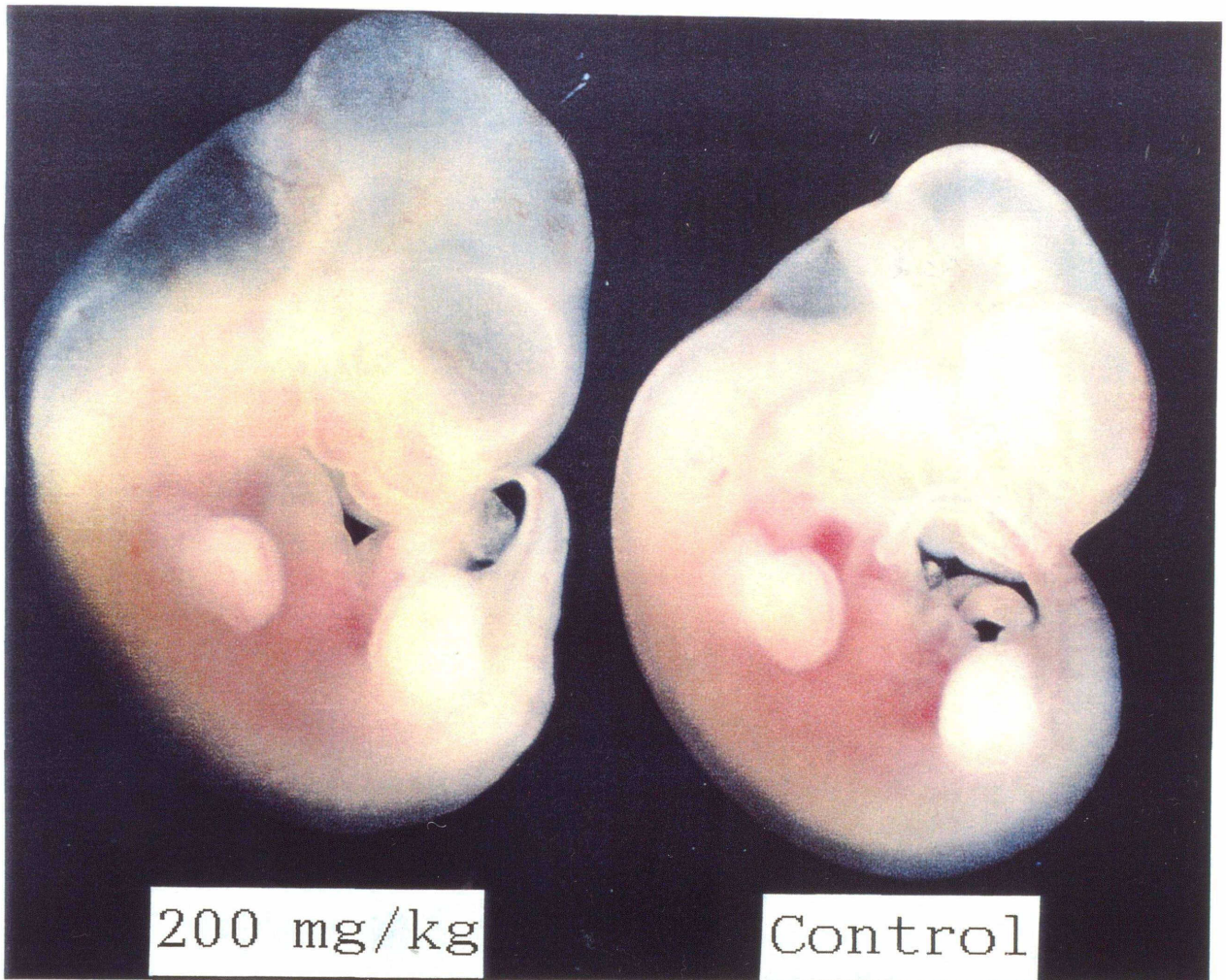


Photo 18. A fetus exposed in utero to 200 mg ETU/kg for 12 hr and then cultured with ETU-free serum for 24 hr. The right fetus is its paired control. The ETU-exposed fetus shows prosencephalon hypoplasia, mesencephalon extrusion, mandibula hypoplasia, and short tail.

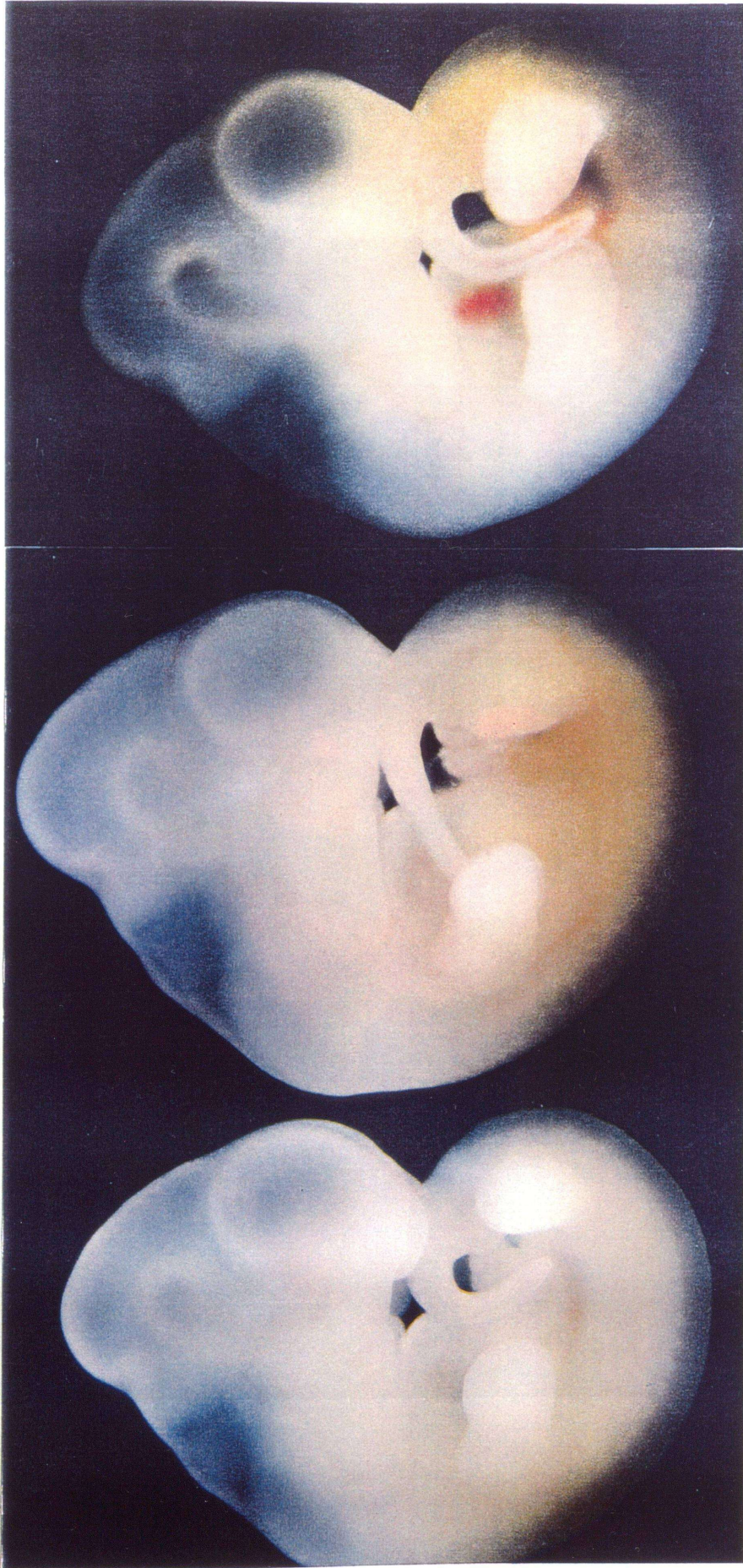


Photo 19. Fetuses exposed to 100 (the middle) and 300 $\mu\text{g ETU/kg}$ (the right) for 6 hr and then cultured with ETU-free serum for 24 hr. The left fetus is their control. The ETU-exposed fetuses show no morphological defects.



Photo 20. Fetus exposed to 10 µg ETU/kg for 12 hr and then cultured with ETU-free serum for 24 hr. The left fetus is its control. The 10 µg ETU-exposed fetus shows the short tail.

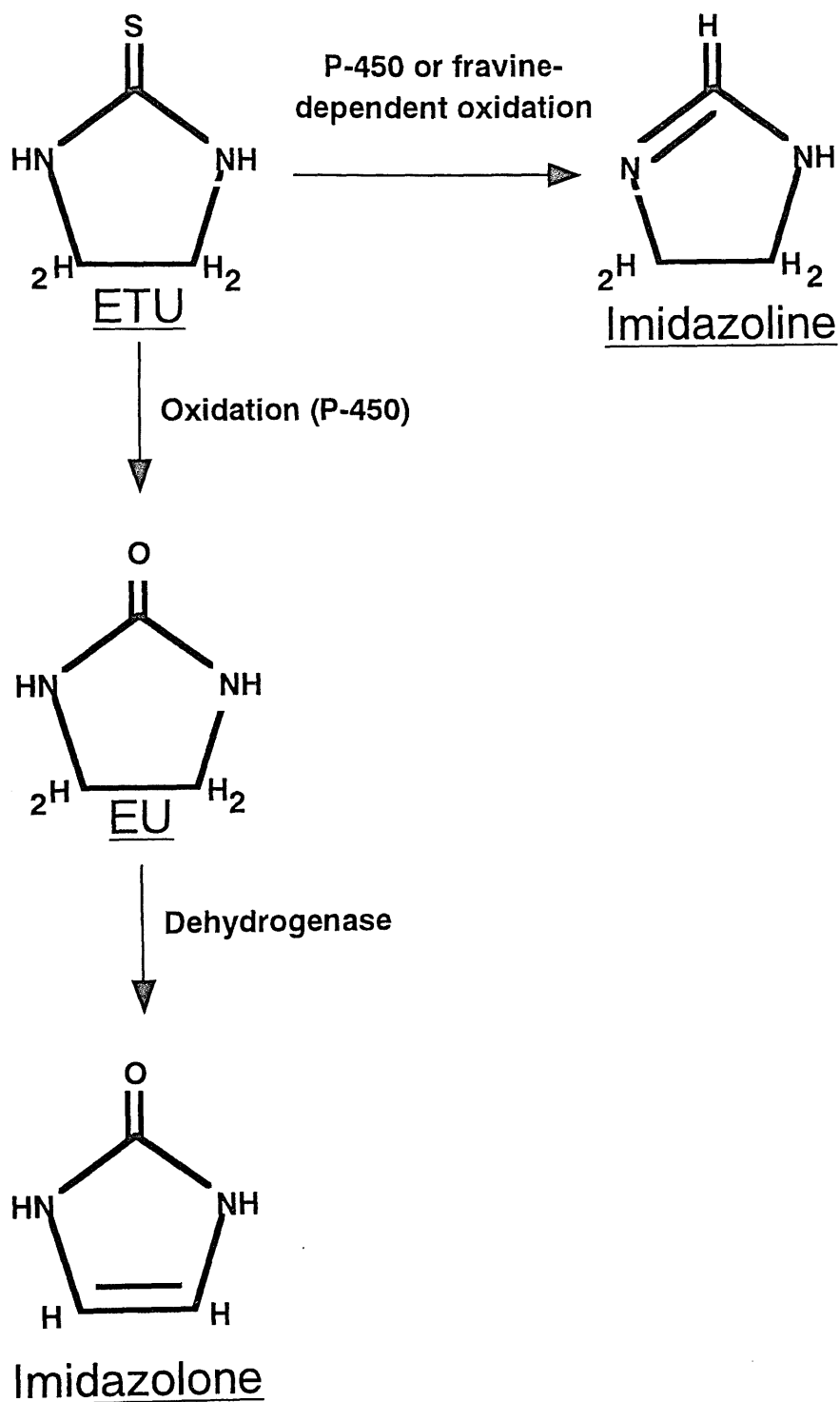


Fig. 1 Metabolism of ETU reported by Iverson, F. *et al.* (1980)

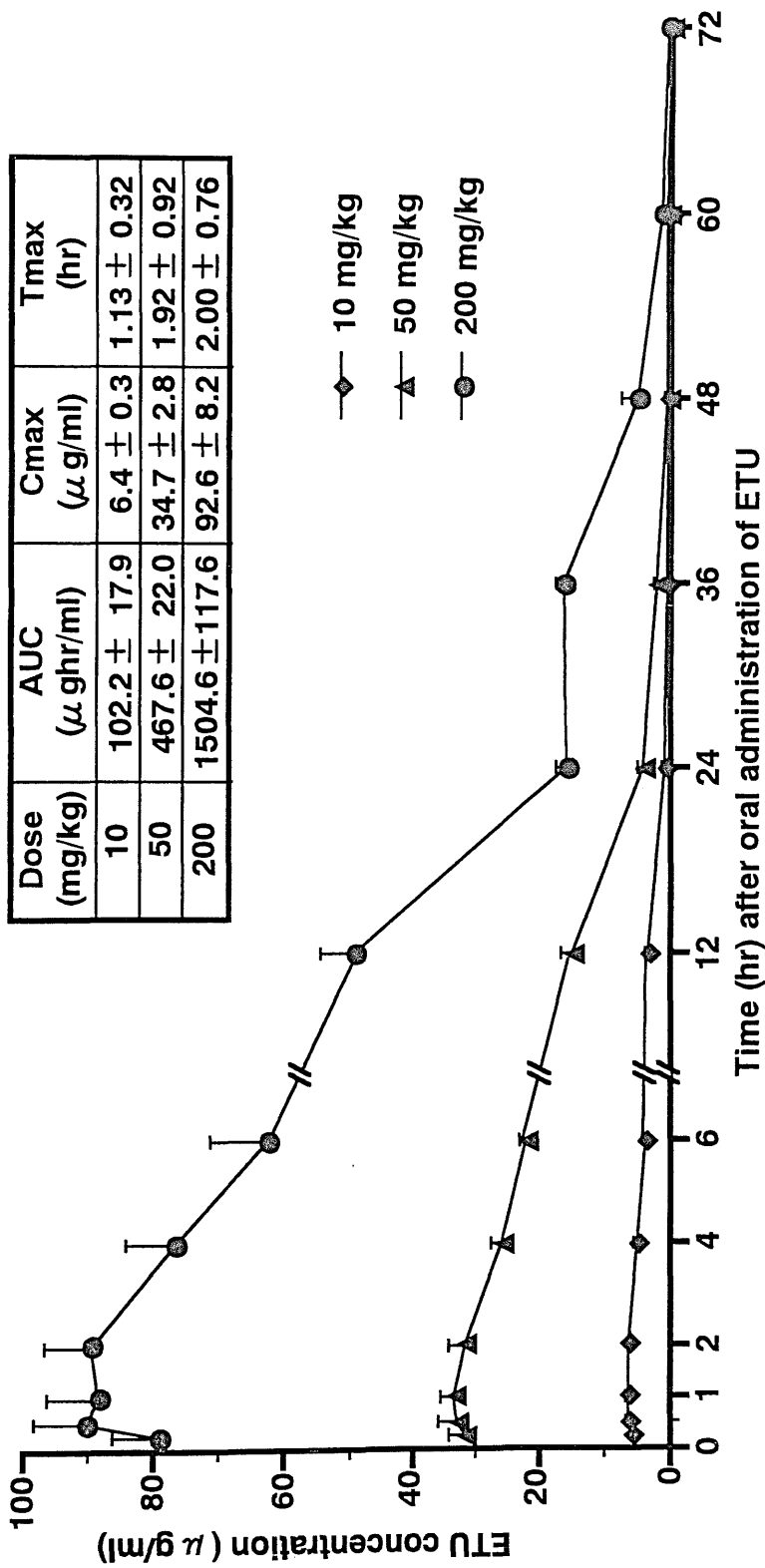


Fig. 2 Concentration-time curve of ETU in maternal plasma after oral administration on day 11 of gestation. Each vertical bar indicates SEM. Each value in table shows mean \pm SEM.

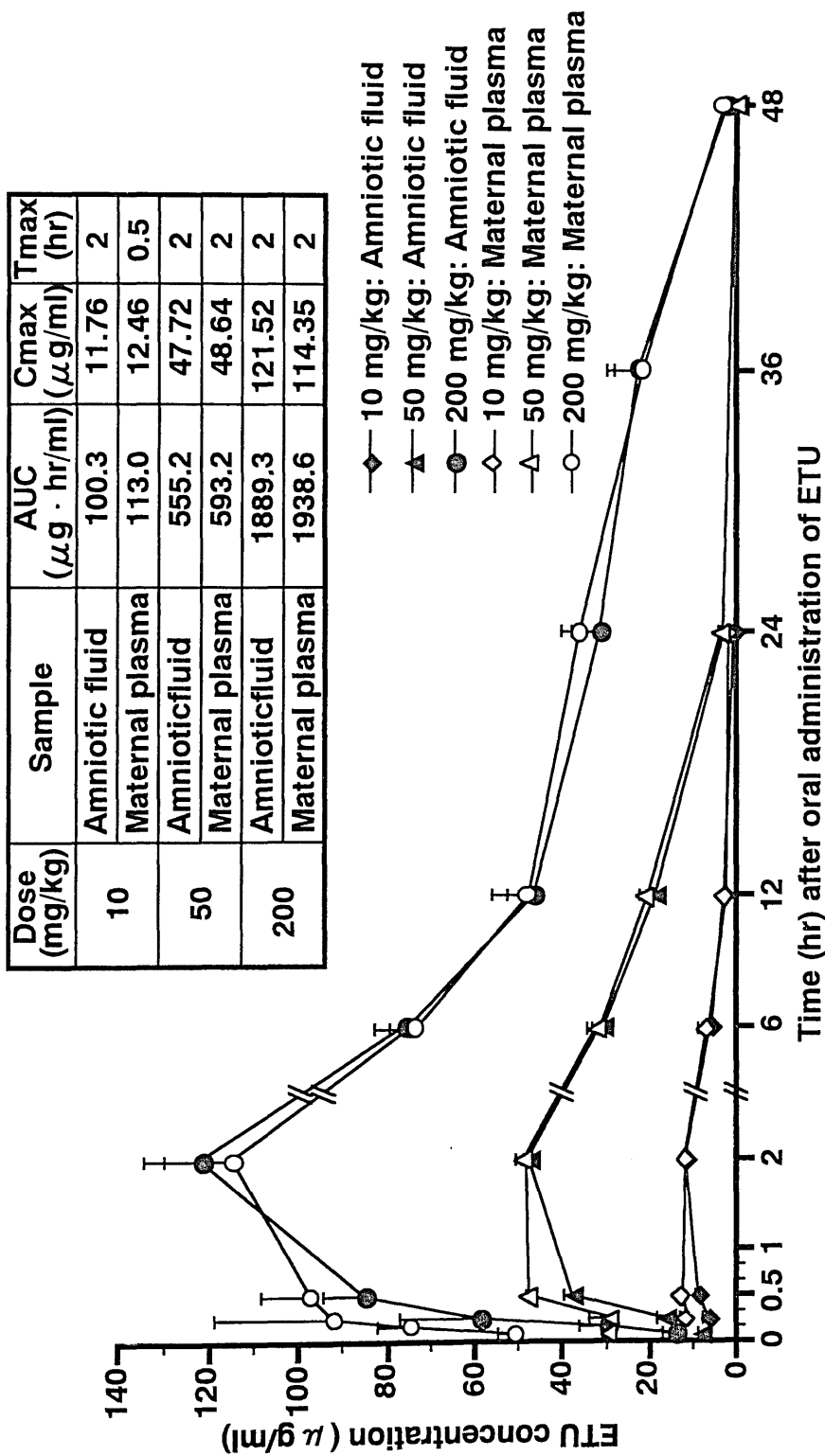


Fig. 3 Concentration-time curve of ETU in amniotic fluid and maternal plasma after oral administration on day 12 of gestation
Each vertical bar indicates SEM.

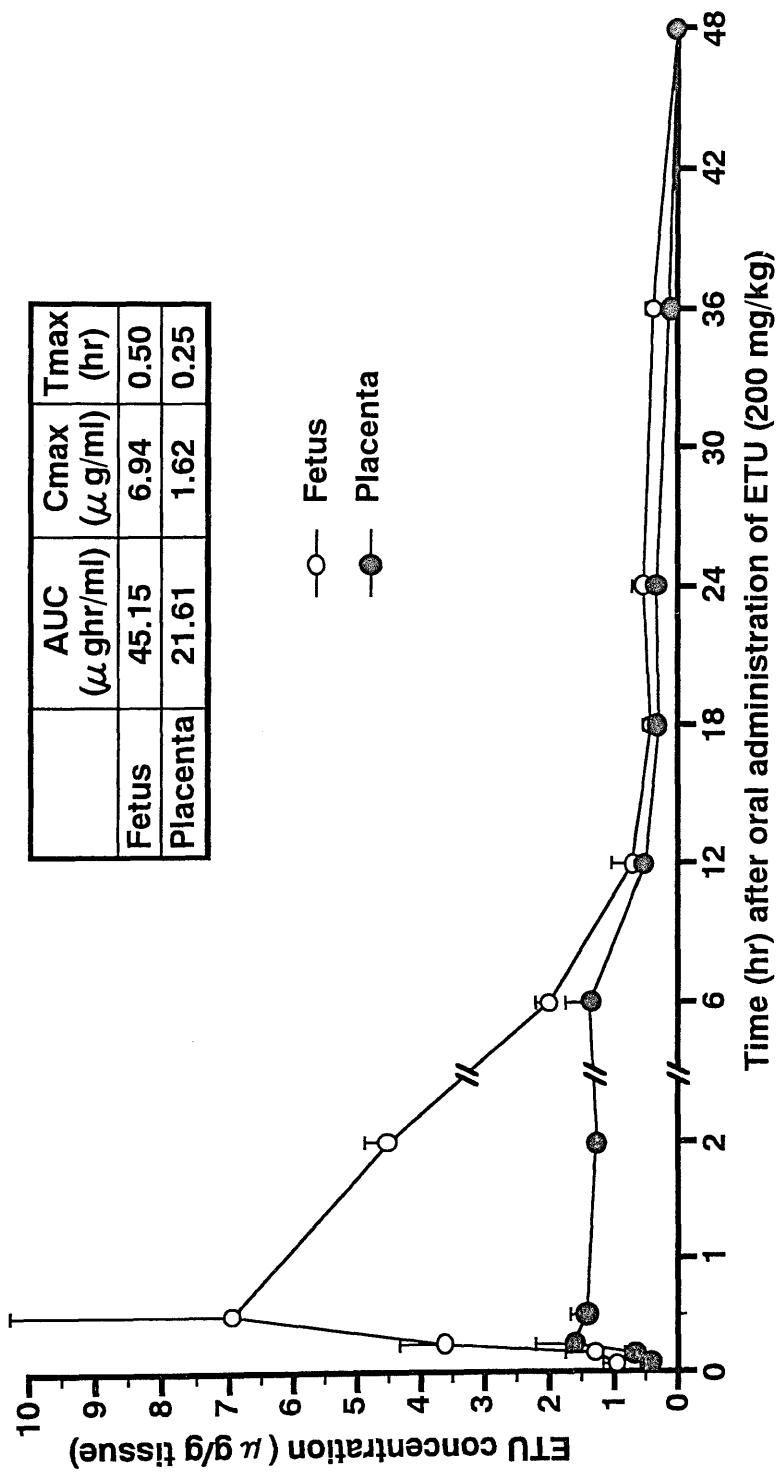


Fig. 4 Concentration-time curve of ETU in rat fetal tissues and placentae after oral administration on day 12 of gestation. Each vertical bar indicates SEM.

A Study of Teratogenic Mechanism of Ethylenethiourea (ETU) in Rat Fetuses

By Takayuki Iwase

ABSTRACT

Ethylenethiourea (ETU), one of fungicides, has been used for food crops and fruits (Vettorazzi *et al.*, 1995). ETU is also a degradation product of the ethylenebisthiocarbamate group in the environment and also its metabolite in plants and animals (Czegléi-Jankó, 1967; Jordan *et al.*, 1979; Brocker *et al.*, 1980; Autio *et al.*, 1983). It is well known that such a kind of fungicides induces malformations in rat fetuses when orally given to mother rats at a high dose level during fetal organogenetic period (Khera, 1987). Moreover, ETU even at a low dose level causes fetal exencephaly, encephalocele, meningocele, hydrocephaly, mandibula micrognathia, forelimb hypoplasia, hindlimb hypoplasia, oligodactyly, short tail, kinky tail and so forth (Khera, 1973; Petrova-Vergieva *et al.*, 1973; Larsson *et al.*, 1976; Khera, 1987). Accordingly, it is clear that ETU has a teratogenic potential for rats. From this point of view, this teratogenic potential of ETU would give rise to a possible teratogenic risk for human fetuses when pregnant women are exposed to sprinkled ETU.

It has been reported that, in rat fetuses, the teratogenicity of ETU is reinforced by a maternal pre-treatment with SKF-525A, an inhibitor of drug-metabolism (Khera & Iverson, 1981). On the other hand, it has been also reported that, when directly injected into amniotic fluid of rat fetuses *in vivo*, ETU causes no malformations (Teramoto *et al.*, 1980). From these conflicting reports, whether the teratogenicity of ETU depends on ETU itself or on its metabolites remains to be solved.

ABSTRACT

In a few toxicokinetic studies, after oral administration of ^{14}C -ETU to pregnant rats, its radioactivity levels in maternal blood, tissues, and urine, and in fetuses were measured at a few points (Ruddick et al., 1975; Kato, et al., 1976; Ruddick et al., 1977). As a result, it was found that ^{14}C -ETU was rapidly transferred into maternal blood, tissues, urine and feces, and into fetuses. However, there has been no report dealing with a detailed time-concentration curve of native ETU in maternal blood and fetal amniotic fluid. Also, a few studies were made for exposure of ETU to rat fetuses through amniotic fluid.

The present study, by the use of experimental teratological methods was conducted mainly to clarify whether the teratogenicity of ETU depends on ETU itself or on its metabolites, and then to elucidate the pharmacokinetic pattern of ETU occurring in its teratogenic dynamics.

In Chapter 1, after the administration of ETU to pregnant rats on day 11.5 and/or 12.5 of gestation, their fetuses were subjected to observation of external malformations and processes of dysmorphogenesis at term.

When pregnant rats were orally given 10 mg/kg of ETU on day 11.5 and/or 12.5 of gestation, no external malformations were observed in their fetuses. Therefore, this dose level of 10 mg/kg was concluded to be non-effective. The dose level of 50 mg/kg induced short tails. The dose level of 200 mg/kg. induced various kinds of external malformations including brain malformations, cleft palate, mandibula micrognathia, forelimb malformations, oligodactyly, syndactyly, short tail and so forth. Additionally, cleft lip was observed in fetuses derived from dams given 200 mg/kg of ETU on day 11.5 of gestation, and hindlimb malformations, maxillary micrognathia and aglossia were observed in fetuses derived from dams given the same dose on day 12.5 of gestation. Treatment with 200 mg/kg of ETU on both days 11.5 and 12.5 of

gestation induced all of similar malformations. On day 13.5, fetuses from treated dams already showed morphological defects similar to those to be found at term. The osmotic pressures of maternal serum, fetal amniotic fluid and fetal cerebrospinal fluid showed no differences between the control and ETU-exposed fetuses.

Accordingly, it is possible that the teratogenicity of ETU is evaluated already in 13.5-day fetuses after a single oral administration of 200 mg/kg of ETU to pregnant rats on day 11.5 and/or 12.5 of gestation.

In Chapter 2, 11.5-day rat fetuses were cultured *in vitro* for 48 hr in total during which period they were exposed to ETU under various experimental conditions. The cultured fetuses were then subjected to observation of morphological changes.

Using 100 and 300 $\mu\text{g/ml}$ of ETU, 3 types of exposure conditions were made as follows. After a 2-hr preincubation, the first series of fetuses was exposed to ETU for the first 17 hr, and then cultured without ETU for subsequent 29 hr. The second series of fetuses was cultured without ETU for the first 22 hr, and then exposed to ETU for the final 22 hr. The third series of fetuses was cultured with ETU for 46 hr continuously. Under these experimental conditions, cultured fetuses exposed to ETU showed various morphological changes similar to those found in 13.5-day fetuses of dams orally given ETU one or two days earlier as shown in Chapter 1. The observed malformations were prosencephalon hypoplasia, nasal process noncontact, mandibula micrognathia, forelimb and hindlimb bud hypoplasia, shortened tail, and so forth. Consequently, it is assumed that between day 11.5 and day 13.5, the susceptibility of the *in vitro* rat fetuses to teratogenicity of ETU is very similar to that of the *in vivo* rat fetuses.

In Chapter 3, in order to clarify whether the teratogenicity of ETU depends on ETU itself or on its metabolites, the cultured rat fetuses were exposed to ETU with or without added hepatic microsomal fraction and cofactors (S9mix) to examine the resulting morphological defects.

When the cultured rat fetuses were exposed to ETU without S9mix, frequencies of morphological defects were increased concentration-dependently. In contrast, with S9mix, morphological changes were almost not detected. Consequently, it is likely that ETU itself possesses a direct teratogenic action.

In Chapter 4, in order to detect the pharmacokinetic threshold of ETU to induce malformations in rat fetuses, following the single oral administration of 10, 50 or 200 mg/kg of ETU to pregnant rats on day 12.5 of gestation, ETU-concentrations in maternal plasma, amniotic fluid, fetuses and placentas were determined chronologically.

The results showed that ETU-concentrations both in maternal plasma and in fetal amniotic fluid showed similar concentration-time curves in that they reached the peak approximately 2 hr after dosing, and gradually decreased to be null 48 hr later. To the contrary, ETU-concentration in fetuses reached the peak 30 min after dosing, and decreased to be null 12 hr later. It is assumed that a part of teratogenic effects of ETU on fetuses is due to a relatively long time stagnation of a high amount of native ETU in the amniotic fluid.

In Chapter 5, a study was conducted to assess the least duration of ETU-exposure needed to induce malformations in rat fetuses in utero. After a single oral administration of 200 mg/kg of ETU to pregnant rats on day 11.5 or 12.5, their fetuses were allowed to remain in utero for 2 to 12 hr and then

cultured for additional 24 hr without ETU for detection of morphological defects.

The 6-hr ETU exposure in utero induced a slight growth retardation in fetuses, but even the 8-hr exposure caused no morphological defects. Nevertheless, the 12-hr ETU exposure in utero caused morphological defects in prosencephalon, mesencephalon, forelimb and tail. Therefore, it is assumed that the 12-hr ETU exposure in utero is needed at least to induce malformations in rat fetuses.

In Chapter 6, in order to examine the least duration of *in vitro* ETU-exposure to induce fetal malformations, 11.5-day rat fetuses were cultured and exposed to 6, 30, 100 or 300 $\mu\text{g/ml}$ of ETU for 2 to 12 hr.

No morphological defects were observed in cultured fetuses exposed to 300 $\mu\text{g/ml}$ of ETU for 6 hr and to 6 $\mu\text{g/ml}$ of ETU for 17 hr. Whereas, defects of tail were detected concentration-dependently in fetuses exposed to 10 or more $\mu\text{g/ml}$ of ETU for 12 hr. With 100 $\mu\text{g/ml}$ of ETU, moreover, morphological defects in prosencephalon, mesencephalon and forelimb were observed. Consequently, it seems that the concentrations of 10 or more $\mu\text{g/ml}$ of ETU and the 12-hr ETU exposure are needed at least to induce malformations in fetuses cultured *in vitro*.

From these studies, following results were obtained: (1) the 13.5-day rat fetuses already showed morphological defects similar to those found in full-term fetuses after maternal oral administration of ETU on day 11.5 and/or 12.5 of gestation; (2) ETU did not affect the osmotic pressure of maternal serum, fetal

ABSTRACT

amniotic fluid and fetal cerebrospinal fluid; (3) the susceptibility of *in vitro* fetuses to ETU was about the same as that of *in vivo* fetuses between day 11.5 and day 13.5; (4) the teratogenic action of ETU was reduced by the hepatic metabolism; (5) ETU that was introduced to pregnant rats was rapidly absorbed by and transferred into each maternal and fetal body fluid, and thereafter, the ETU concentration-time curve in fetal amniotic fluid was changed in a fashion similar to that in maternal plasma; (6) the ETU-concentration in fetal bodies declined to be null earlier than that in amniotic fluid which remained to be high for a while. Thus, fetuses remained to be exposed to a relatively high concentration of ETU through amniotic fluid for long duration; (7) The display of teratogenic action of ETU would need the dose levels of 10 or more $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the existing duration for 12 hr both in the amniotic fluid *in vivo* and in the culture medium *in vitro*.

Summing up these results, the teratogenic action of ETU is responsible for ETU itself, but not for its metabolites. ETU induces various malformations in rat fetuses under *in vivo* and *in vitro* exposure conditions. ETU itself is retained in maternal blood for a long time and also retained in fetal amniotic fluid at a level similar to that in maternal blood. The frequency of malformations in rat fetuses is reduced by an increased metabolism of ETU. Moreover, it is concluded that ETU requires, for its teratogenic action, the 12-hr retention at the concentration of 10 or more $\mu\text{g}/\text{ml}$ in maternal blood.