

氏名(本籍)	岩瀬隆之(兵庫県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第361号
学位授与の番号	学位規則第3号第2項該当
学位論文の要件	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
論文審査委員	(主査) 江口保暢 (副査) 赤堀文昭 二宮博義 有嶋和義

### 論文内要の要旨

Ethylenethiourea (ETU) は、そのもの自体かつて果実や野菜等に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 (Czeglédi-Janko, 1967; Jordan, *et al.*, 1979; Brocker, *et al.*, 1980; Autio, *et al.*, 1983)。

高用量のEthylenebisthiocarbamate系殺菌剤をラット胎子の器官形成期に母体に連続投与すると、胎子に奇形が生じることが知られている (Khera, 1987)。さらに、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、<sup>14</sup>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つ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究明したものである。

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妊娠20日に帝王切

開検査した時、10 mg/kgでは胎子の外表奇形は全く観察されず、無影響量であった。50 mg/kgでは短尾が観察された。200mg/kgでは脳奇形、口蓋裂、口唇裂、小下顎症、前肢の異常、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、そのほか妊娠11.5日投与では口唇裂が、妊娠12.5日投与では、後肢の奇形と小下顎症、無舌症が観察された。また、妊娠13.5日で開腹してみると、これらの奇形に対応する形態変化がすでに観察され、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。従って、200mg/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妊娠13.5日に開腹して調べた胎子（胎生13.5日）ですでに評価できると考えられた。

第2章では、胎生11.5日のラット胎子を48時間培養し、*in vitro*でETUに胎子を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時間培養した後、100および300  $\mu$ g/mlのETUを用い、1) 最初の17時間のみETUに暴露してその後ETUなしで29時間培養、2) ETUなしで22時間培養のち24時間ETUに暴露、3) 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、前肢芽および後肢芽の低形成、尾の短小化が観察された。従って、胎生11.5日から13.5日の間ラット胎子のETUの催奇形性に対する感受性は、*in vitro*でも*in vivo*でもほぼ同じであると考えられた。

第3章では、ETUの催奇形性がETU自体によるのか、あるいは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（S9 mix）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。このS9 mixはETUを代謝する作用がある。

10および30  $\mu$ g/mlのETUにS9 mixの存在および非存在下でラット培養胎子を暴露した時、S9 mix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S9 mixの存在下では、つまりETUが代謝されると、形態異常がほとんど観察されなかった。従って、ETUの催奇形性は代謝物にあるのではなくETU自体にあると推察された。

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。一方、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。つまり、ETUの胎子に対する催奇形性機序の一部は、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た。

第5章では、胎子に奇形を誘発するのに要する子宮内でのETU暴露時間について検討した。すなわち、妊娠11.5日もしくは12.5日のラットに200mg/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時間暴露し、さらに24時間培養して形態異常を観察した。

子宮内でのETUの6時間以上の暴露は、ラット胎子の発達を軽度遅延させたものの、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。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。従って、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た。

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  $\mu\text{g/ml}$ 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  $\mu\text{g/ml}$ 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。従って、ETUがラット胎子に明確な形態異常を誘発するには、10  $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で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) 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、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。
- (6) 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暴露される。
- (7) ETUがラット胎子に形態異常を誘発するには、胎子がETUの10  $\mu\text{g/ml}$ 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、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とどまり、また胎子羊水中には母体血中と同程度に長くとどまり、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。

## 論文審査の結果の要旨

Ethylenebisthiocarbamate系殺菌剤は果実や野菜等に散布されているが、高濃度であると催奇形性を示すと

いわれている。たとえば、実験的に、ラット胎子の器官形成期に母体にこれを高用量で投与すると胎子に種々の奇形が生じると報告されている。この催奇形性の本体は、この系統の殺菌剤の、環境中での分解産物としての、あるいは動植物体内での代謝物としてのethylenethiourea（以下ETUと略す）であるといわれている。このETUはそれ自体がかつて殺菌剤として散布されていた。

ETUをラット胎子の器官形成期に母体に連続投与すると、低用量であっても、胎子に外脳症、脳瘤、髄膜瘤、水頭症などの中枢神経系の奇形、小下顎症を主徴とする頭部奇形や四肢の低形成、欠指症、短尾、曲尾などのいろいろな異常が生じる。したがって、この系統の殺菌剤の散布には、とくに妊婦や妊娠動物がこれを大量に吸引して胎児（胎子）に影響する恐れもあることから、その取り扱いには十分な注意が必要であろう。

文献的にみれば、ETUの代謝阻害剤を同時に使えば催奇形性が增強されるということであるか、ETUの催奇形性はETU自体にあるように思われるし、ラット胎子の羊水内に直接ETUを注入すれば奇形が生じないとも報告されているので、その催奇形性はETUそれ自体にあるのかETUの代謝物にあるのか未だにはっきりしていない。また、ETUの体内への吸収について、<sup>14</sup>CをラベルしたETUを妊娠ラットに経口投与した実験によれば、ETUは母体の血中や組織中および胎子体中に速やかに移行することが示されている。しかし、代謝されないETUそのもの（ETU未代謝体）の体内濃度推移を詳細に検討した報告はない。

本論文中の諸実験は、実験奇形学的手法を用いてETUの催奇形性はETU未代謝体そのものにあるのか、代謝物にあるのかを明らかにするとともに、生体内でのETUの推移を薬物動態学的に調べることを目的として企画されたものである。

本論文は六つの章からなっている。

第1章では、妊娠11.5日および妊娠12.5日のラットにいろいろな用量でETUを経口投与し、妊娠20日に剖検したときの奇形を観察するとともに、これらの奇形がETU投与後一両日で剖検した胎子で確認できるかどうかを調べている。10mg/kgのETUでは、20日胎子の外表奇形は全く観察されず、50mg/kgでは短尾が観察されたにすぎない。200mg/kgでは妊娠11.5日投与で、脳奇形、口蓋裂、口唇裂、小下顎症、前肢の異常、欠指（趾）および合指（趾）、短尾などの種々の奇形が生じ、12.5日の投与では後肢の奇形と小上顎症、無舌症が加わり妊娠11.5日と12.5日の連続投与では、ここに挙げた全ての奇形が観察された。そこで、妊娠20日という妊娠末期ではなく、ETU投与後1~2日の妊娠13.5日に剖検すると、妊娠20日に剖検して観察された種々の奇形がすでにこのときに観察された。したがって、ETUの催奇形性については妊娠13.5日ですでに評価可能であることを示した。また、ETUは脳に奇形を誘発することから、脳脊髄液の浸透圧に変化があるかどうかを調べており、その結果、母体の血清と胎子の羊水ならびに脳脊髄液の浸透圧には差が見られなかった。

第2章では、胎生11.5日の胎子を全胚培養法を用いて48時間培養し、その間、ETUに暴露して形態異常を観察した。まず、胎生11.5日の胎子を2時間培養したのち、次の三種類の実験を行った。

1) 最初の17時間ETUに暴露し、その後ETUなしで29時間培養、2) ETUなしで22時間培養したのち24時間ETUに暴露、3) 46時間連続でETUに暴露。これらの実験条件は第1章における*in vivo*での11.5日投与、12.5日投与、両日連続投与の場合に対応させてある。その結果、第1章で観察されたものとほとんど同様な形態異常が観察された。したがって、胎生11.5日から13.5日のラット胎子のETUに対する感受性は、*in vivo*であれ、*in vitro*であれ、ほとんど変わらないことが示された。

第3章では、ETUを代謝分解させる作用のある肝マイクロゾーム分画（S9mix）を用い、ETUの催奇形性の

本体がETUそのものかETUの代謝物を明らかにするための実験を行った。10および30  $\mu\text{g/ml}$  のETUを含む培養液で胎子を培養した。S9mixを培養液に添加していない場合には、胎子に奇形が誘発され、用量依存性に形態異常の頻度が高くなった。一方、S9mixを培養液に添加した場合には、つまり、ETUが代謝されている場合には、形態異常はほとんど観察されなかった。したがって、これらのことから、ETUの催奇形性はETUの代謝物にあるのではなく、ETU自体にあることが示された。

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閾値を推測し、さらにETU未代謝体の母体血漿中、胎子体中、羊水中、胎盤中の濃度の推移を調べた。ETUの10mg/kg母体投与では胎子に外表奇形をもたらさないが、50mg/kg投与では短尾を誘発することから、奇形誘発の最低投与量はその範囲にあると考えられ、ETUの未代謝体の濃度推移を調べた結果、その閾値濃度は母体血漿中では12.5~34.7  $\mu\text{g/ml}$ 、羊水中では11.8~47.7  $\mu\text{g/ml}$ であると推定された。胎子に全身性の奇形を誘発する200mg/kg母体投与後のETU未代謝体の濃度推移を調べると、母体血漿中および胎子羊水中のETU未代謝体はほぼ同じ濃度で推移し、約2時間でピークに達し、次第に減弱して48時間後に消失した。一方、胎子体中のETU未代謝体は母体投与後30分で最高濃度に達するものの、12時間後にはほぼ消失し、胎盤中では最高濃度も非常に低く、同様に12時間後にはほぼ消失した。したがって、ETUの催奇形作用の多くは、羊水中にETU未代謝体が長時間滞留することによりもたらされるものと推察された。

第5章では、ETUが胎子に奇形を誘発するのに要する母体子宮内での暴露時間について検討した。妊娠11.5日もしくは12.5日の母体に200mg/kgのETUを投与し、2~12時間後に母体子宮内から胎子を取り出し（つまり、2~12時間子宮内暴露）、それからin vitroで24時間培養したのちに形態異常を観察した。その結果、子宮内での6時間暴露から胎子の軽度な発達遅延が認められたものの、8時間暴露でも明瞭な形態異常は認められなかった。しかし、12時間暴露すると、前脳、中脳、前肢および尾に形態異常が生じた。したがって、12時間子宮内でETUに暴露されれば、胎子に形態異常が誘発されることが明らかとなった。

第6章では、妊娠11.5日で胎子を取り出し、これをin vitroで培養し、培養液に6, 30, 100および300  $\mu\text{g/ml}$ のETUを加えて胎子をETUに暴露し、ETUが胎子に形態異常を誘発するのに要する暴露時間について検討した。実験に用いた暴露時間は6, 12, 17時間とし、その後ETUの存在しない培養液で培養し、合計48時間後に形態以上を観察した。6  $\mu\text{g/ml}$ は形態異常を生じない量であるが、17時間暴露でも形態異常は生じなかった。最大量の300  $\mu\text{g/ml}$ でも6時間暴露では形態異常は生じなかった。一方、10  $\mu\text{g/ml}$ では12時間暴露で尾の異常が認められ、100  $\mu\text{g/ml}$ では12時間暴露で前脳、中脳、前肢に異常が生じた。したがって、in vitroでのETU暴露で培養胎子に奇形を誘発させるには、10  $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で12時間を要することが明らかとなった。これはin vivoの場合と同様であった。

以上、ラット胎子の器官形成期でのETUの催奇形性に関する本研究結果を総括すれば、次のようになる。

- 1) ETUはin vivoであれ、in vitroであれ、胎子にさまざまな奇形を誘発させるものである。
- 2) ETUは代謝が進むとその催奇形性が減弱する。したがって、ETUの催奇形性はその代謝物にあるのではなく、ETU自体にある。
- 3) ETUは母体血中や胎子羊水中に代謝されずに長くとどまる。
- 4) ETUはその催奇形性を示すには、in vivoであれin vitroであれ、ある濃度以上で12時間以上保てば十分である。

本研究はこのようにETUの催奇形性をin vivoおよびin vitroで解析し、胎子に奇形を誘発する作用本体を明らかにし、さらにまた、生体内におけるその薬物動態学的推移を明らかにした。ETU系殺菌剤の果実や野菜への散布について、警鐘を鳴らすとともに、その発生毒性の発生機序を明らかにすることにより、その解毒についても手がかりを与えたことは、発生毒性学上、大いに貢献したものと考えられる。よって、本研究は獣医学上有意義なものとし、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいものと判定した。