

博士論文

サリドマイドの胚・胎児発生毒性研究における
Kbl:JW ウサギの有用性

平成 26 年 1 月

河村佳徳

目次

省略記号対照表	3
第1章 序論	5
1-1 研究の目的	5
1-2 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性評価	7
1-3 サリドマイドの催奇形性	9
1-4 サリドマイドの四肢奇形誘発メカニズム	11
参考文献	13
第2章 胚・胎児発生毒性試験における Kbl:JW ウサギの評価	16
2-1 背景データ(生殖パラメーターおよび自然発生の形態学的変化)ならびに サリドマイド誘発胎児奇形の解析	16
2-1-1 緒言	16
2-1-2 実験方法	18
2-1-3 結果および考察	21
2-1-4 結論	43
参考文献	44
2-2 サリドマイドのウサギ胚・胎児発生への影響：実験動物系統、Kbl:JW と Kbl:NZW 間の違いと共通性	45
2-2-1 緒言	45
2-2-2 実験方法	47
2-2-3 結果	51
2-2-4 考察	66

2-2-5	結論	71
	参考文献	72
第3章	肢形成過程で働く遺伝子のサリドマイドによる発現変化	76
3-1	Kbl:JW ウサギ胚の肢芽における Fgf8、Bmp4 および Hoxa11 の発現へのサリドマイドの影響	76
3-1-1	緒言	76
3-1-2	実験方法	80
3-1-3	結果	83
3-1-4	考察	93
3-1-5	結論	97
	参考文献	98
第4章	要約および総合考察	101
4-1	要約	101
4-2	総合考察	104
	参考文献	106
	謝辞	107

省略記号対照表

AER : apical ectodermal ridge (外胚葉性頂堤)

AUC : area under the blood concentration-time curve (血中濃度-時間曲線下面積)

Cmax : maximum concentration (最高血中濃度)

EFD 試験 : embryo-fetal development study (胚・胎児発生試験)

IFTS : international federation of teratology societies (国際先天異常学会連合)

JW : Japanese white (日本白色種)

NZW : New Zealand white (ニュージーランド白色種)

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)

SP 試験 : sensitive period study (感受期検討試験)

Tmax : maximum drug concentration time (最高血中濃度到達時間)

WISH : whole mount in situ hybridization

遺伝子名

Bmp : bone morphogenic protein

c-Jun : c-Jun

Crbn : cereblon

Dkk : dickkopf

Fgf : fibroblast growth factor

Gremlin : gremlin

Hox : homeobox

Irs : insulin receptor substrate

Msx : Msh homeobox

NF- κ B : nuclear factor- κ B

p53 : p53

Sall : spalt-like transcription factor

Tbx : T-box

Twist : twist

Wnt : wingless-related MMTV integration site

第1章 序論

1-1 研究の目的

ヒトの医薬品開発において実験動物を用いた毒性評価は、ヒトでの副作用の予測や機序の解析に極めて重要である。その中でも胚・胎児発生毒性試験は、サリドマイド事件のような悲劇の再発を防ぐために、開発候補化合物について胚・胎児の発生に対する影響を調べる目的で実施されている。ウサギは、サルと共にサリドマイドによってヒトと類似した四肢奇形が誘発される動物であり(Schardein 2000年)、薬物の催奇形性の検討に使用されてきた。

胚・胎児発生毒性試験では主に胎児の奇形や変異の増加を評価するが、一般的に、医薬品候補化合物により誘発される形態学的変化の発生頻度が顕著に増加する例は少なく、発生頻度のわずかな増加が化合物の影響か否かを自然発生の頻度と比較して判断することが必要になる。そのため、胚・胎児発生毒性試験に使用する実験動物の有用性を検証する際には、当該動物の自然発生の奇形や変異の種類および頻度に関するデータ(背景データ)を十分に把握すると共に、その特性や被験物質に対する感受性が長期間安定していることを確認することが肝要である。しかしながら、サリドマイドの胚・胎児発生に対する影響について日本白色種(JW : Japanese white)を用いて評価するにあたり、本系統のウサギ胎児における自然発生の奇形・変異のデータやサリドマイドによって誘発される奇形の報告は不十分であった。医薬品開発において薬物の催奇形性の有無の判断は極めて重要であり、その検定には厳密な検証が必要である。従って、本邦でよく使用される Kbl:JW ウサギ(生産者：北山ラベス株式会社)について背景データの遡及的な評価を行い、サリドマイドへの感受性に対する経時的な変化の有無の検証を最初の目的とした。

また、胚・胎児発生毒性試験に使用されているウサギの系統は、世界的にはニュージーランド白色種(NZW : New Zealand white)がほとんどである。本邦においても NZW 系統が多く使用されているが、日本で作出された JW 系統も比較的よく用いられている。医薬品開発のための毒性試験は世界的に行われており、他系統での試験結果を互いに参考にする必要性も増大していることか

ら催奇形性物質に対する感受性は系統間で大差なく、比較可能であることが望ましい。よって、Kbl:NZW(生産者：北山ラベス株式会社)と Kbl:JW ウサギを用いてサリドマイドの胚・胎児発生毒性試験および奇形に対する感受期の検討試験を実施し、系統差を比較した。

実験動物のデータをヒトでの副作用の予測に供するためには、まず当該動物における作用機序を明らかにし、その作用機序がヒトに外挿し得るものかどうかを検討する必要がある。サリドマイドの催奇形性、特に四肢に誘発される奇形の作用機序については、主にニワトリおよびゼブラフィッシュなどの実験動物で検証されてきたが、未だ不十分であり、ヒトへの外挿性に関する考察も十分とは言えなかった。ウサギにおいても、NZW 系統で行われた四肢奇形に関する形態学的解析や分子発生的な観点からの報告は散見されるものの、JW 系統では分子発生的な解析は報告されていなかった。JW 系統において肢芽の正常発生時における遺伝子発現とそれに及ぼすサリドマイドの影響を調べることは、本系統のウサギにおけるサリドマイド誘発性奇形の作用機序に対する理解を深めるとともに、ヒトへの外挿性を考察する際に有用なデータを提供することに繋がると考えられた。従って、Kbl:JW ウサギ胚において肢形成に関与する遺伝子群の肢芽での発現変化を対照群とサリドマイド処置群で比較解析することにより、サリドマイドの胚・胎児発生毒性研究における Kbl:JW ウサギの有用性を分子発生的な側面から考察した。

1-2 ウサギを用いた胚・胎児発生毒性評価

医薬品の開発においては、ヒトでの副作用を予測するために、非臨床毒性試験が実施される。毒性試験には、急性毒性や長期的な投与による慢性毒性を調べるための一般毒性試験と生殖・発生毒性やがん原性を調べるための特殊毒性試験がある。

生殖・発生毒性試験は、(1)交配前から交尾、着床に至るまでの被験物質の投与に起因する雌雄動物の毒性および障害を検索する「受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験」、(2)着床から離乳までの間、雌動物に被験物質を投与し、妊娠／授乳期の雌動物、受胎産物および出生児の発生に及ぼす悪影響を検索する「出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験」ならびに(3)着床から硬口蓋が閉鎖するまでの期間中雌動物に被験物質を投与し、妊娠動物および胚・胎児の発生に及ぼす悪影響を検索する「胚・胎児発生に関する試験」の3種類の試験が行われている。この中で、医薬品の催奇形性を調べる「胚・胎児発生に関する試験」においては、2種類の哺乳動物を用いることが要求されており、げっ歯類としてラットが、非げっ歯類としてウサギが望ましいとされている(厚生省薬務局 1997年)。ウサギが望ましいとされる理由は、背景データが比較的豊富であること、入手し易く実用的であることが挙げられている。ウサギは性成熟に達すると1年中繁殖が可能であり、イヌやサルに比べて妊娠期間も1ヶ月弱と短く、性質が比較的穏和であり、多産であることが実用性に寄与しているものと考えられる。その他、体型がやや大きく胎児の観察が比較的容易であることも理由の一つとされている(医薬品非臨床試験ガイドライン研究会 2010年)。また、ヒトと動物の催奇形性試験成績の一致率をみるとヒトで催奇形性を示す38化合物と示さない165化合物に対して期待される陽性反応と陰性反応がラットでは80および50%であるのに対し、ウサギでは60および70%である(Federal Register 1980年)。ラットでは陽性反応率が高い反面、擬陽性反応率も高く、一方でウサギでは陽性反応率が若干低いものの擬陽性反応率も比較的低いことから、胚・胎児発生毒性試験で必要とされるげっ歯類以外の種での評価に使用される動物種として推薦し得るとされている(日本トキシコロジー学会教育委員会 2009年)。

ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験においては、通常、着床時期である妊娠 6-7 日に被験物質の投与を開始し、口蓋が閉鎖する妊娠 18-19 日まで投与を継続する。主要な臓器・組織が形成されるこの期間に被験物質に曝露することで、催奇形性を含む胎児毒性を評価する。投与後、妊娠末期である妊娠 28-29 日に帝王切開し、黄体数、着床数および死亡胚／胎児数を計数する。摘出した胎児は、外表異常の有無を観察し、頭部、胸部および腹部を切開し、内臓異常および変異を検査する。内臓を摘出した胎児は、剥皮し、骨格を染色した後に骨格異常および変異を観察する。得られたデータは対照群データと比較し、被験物質投与量との相関性を調べ、時に背景データとも照らし合わせて投薬起因の変化の有無を評価する。

1-3 サリドマイドの催奇形性

サリドマイドは、毒性試験において過剰量を投与しても致死作用がみられない安全性の高い催眠鎮静薬として西ドイツの Grünenthal GmbH (グリュネンターール社)が 1957 年に発売を開始し、妊婦のつわりの治療にも使用された。その後、重症の四肢奇形を有する出生児の増加が西ドイツの学会等で報告され、1961 年にアザラシ肢症を含む四肢の低形成および無形成の増加について McBride および Lenz らが論文報告し(McBride 1961 年、Lenz 1961 年)、サリドマイドは市場から回収された。

当時、生殖毒性試験は、生殖器に選択的に作用する医薬品を除いて通常実施されておらず、その試験方法も、発生過程にある胚および胎児への影響を調べるのではなく、複数世代の妊娠率、一腹の出生児数および出生児の発育を評価しており、化学物質の催奇形性を評価できない試験であった(Schardein 2000 年)。日本においても、サリドマイドが発売中止となった昭和 37 年(1962 年)まで、生殖・発生に関する非臨床毒性試験は行われておらず、妊婦に対する使用規制もなかった。サリドマイド事件を契機に、実験動物を用いた生殖発生毒性評価方法が整備され、日本においては、動物を用いた最初の非臨床毒性試験ガイドラインとして、昭和 38 年(1963 年)4 月に「胎児に及ぼす影響に関する毒性試験法ガイドライン」が厚生省薬務局通知として発出された(医薬品非臨床試験ガイドライン研究会 2010 年)。サリドマイドは、さまざまな動物に種々の奇形を誘発するが、ヒトの場合と同様の四肢奇形が再現性をもって誘発される動物はサルとウサギのみであった(Schardein 2000 年)。このことが、ウサギが医薬品開発における胚・胎児発生毒性試験の使用動物として推奨され、例示されている一因である。

サリドマイドによってヒトに誘発される特徴的な奇形は、前後肢の無肢症あるいはアザラシ肢症である。無肢症は、四肢の完全な欠損、あるいは著しく短縮した基脚(上腕骨/大腿骨)ならびに欠損した軀脚(橈骨および尺骨/脛骨および腓骨)と自脚(手根骨/足根骨および指)を特徴とし、アザラシ肢症は、基脚および軀脚の短縮あるいは欠損とほぼ正常な自脚を特徴とする四肢奇形である。その他、ヒトで低頻度にみられる奇形には、心臓および腎臓の奇形、小眼球症および外耳欠

損がある(Knobloch ら 2011 年)。

ウサギでは、サリドマイドによる四肢奇形として、無肢症やアザラシ肢症といった重篤な脚部の欠損あるいは短縮は生じないが、異常回転手や橈骨、大腿骨および脛骨の欠損または短小化といったヒトと比べて相対的に軽度な変化がみられる。また、心血管系の奇形や腎臓の欠損ならびに小眼球症はヒトと同様に生ずる。その他、髄膜脳瘤や頭部顔面骨の欠損、水頭症などもみられるが、これらはヒトでは胎児あるいは出生後の死亡につながる変化であることから、十分なデータとして報告されていない可能性がある。

1-4 サリドマイドの四肢奇形誘発メカニズム

サリドマイドの四肢奇形誘発メカニズムについては、長期間にわたって研究が継続されており、種々のメカニズムが提唱されてきた。その一つの酸化ストレス説では、ウサギにおいてサリドマイドによる DNA の酸化が活性酸素種を介して胚で生ずること、活性酸素種を不活性化する α -phenyl N-t-butyl nitrone の投与によって DNA の酸化と四肢奇形の誘発が共に抑制されること、サリドマイドによる催奇形性が誘発されないマウスでは DNA の酸化が生じないことが明らかされた(Parman ら 1999 年)。また、血管新生阻害説では、Fgf2 蛋白質によって誘導されたウサギ角膜の血管新生に対してサリドマイドが阻害作用を有し(D'Amato ら 1994 年)、阻害作用のないサリドマイド誘導体はニワトリ胚において四肢奇形を誘発しないことが報告されている(Therapontos ら 2009 年)。しかしながら、いずれのモデルにおいても四肢などの特定の部位で特徴的な奇形が生ずる理由は、いまだ不明である。

サリドマイドによる四肢奇形の誘発に関し、肢形成に関与する遺伝子への影響は、ウサギ、ゼブラフィッシュおよびニワトリで調べられている。ウサギでは Fgf8、Fgf10 および Twist の前肢芽での発現が、ゼブラフィッシュでは Fgf8 の鰭芽での発現が、ニワトリでは Fgf8 および Fgf10 の肢芽での発現がサリドマイドによって低下することが whole mount in situ hybridization (WISH)法で調べられている(Hansen ら 2002 年、Ito ら 2010 年)。ニワトリではサリドマイドへの曝露により Fgf8 および Fgf10 は肢芽で増減すること、Bmp4、Bmp5、Bmp7、Dkk1 および Irs2 は増加し、Tbx5 および Sall4 は低下することが Knobloch らによって RT-PCR 法で検出されている(Knobloch ら 2007 年、2008 年および 2011 年、Knobloch および Ruther 2008 年)。Bmp4 と Dkk1 は、外胚葉性頂堤(AER) およびその直下の間充織で発現しており、サリドマイドの曝露によってこれらの発現がニワトリ胚の肢芽で増加することも WISH 法で検出されている(Knobloch ら 2007 年)。これらの遺伝子の関連性に関しては Knobloch らも特定のシグナル伝達経路は示していないが、サリドマイドにより肢芽の予定領域で発生した活性酸素種が NF- κ B を抑制し、それが Bmp の発現増加や Twist の低下をもたらす経路や、活性酸素種が p53 や c-Jun を通じて Dkk1 の発現を誘導する経路を推察している

(Knobloch ら 2011 年)。

一方で、近年、Ito らは *cereblon* 遺伝子がサリドマイドの催奇形性に関連すると考えられる事を報告した(Ito ら 2010 年)。*cereblon* 蛋白質は E3 ユビキチンリガーゼの構成蛋白質の 1 つであり、サリドマイドと結合すると E3 ユビキチンリガーゼの機能が阻害される。ゼブラフィッシュにおいて *cereblon* のホモログである *zCrbn* の発現を抑制すると、サリドマイド処理と類似したヒレの短縮が誘発されることが報告されている。また、サリドマイドと結合しないタイプの変異を導入した遺伝子 *zCrbn^{YA/AA}* によって、サリドマイドによる催奇形性が消失することも示された。しかしながら、*cereblon* はヒトにおいてユビキタスに発現していることから(Su ら 2004 年)、サリドマイドによって四肢などの特定の部位に奇形が誘発されるメカニズムについては、*cereblon* の下流で働く遺伝子の探索が必要と考えられる。

参考文献

D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 82–4085.

Federal Register. 1980. Deletion of GRAS status, proposed declaration lhFd no prior sanction exists, and use of an interim basis pending additional study. *Fed Regist.* 45, 69817-69838.

Hansen JM, Gong SG, Philbert M, Harris C. 2002. Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappab-dependent limb outgrowth pathway by thalidomide. *Dev Dyn* 225: 186-194.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. 2010. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327: 1345-1350.

Knobloch J, Jungck D, Koch A. 2011. Apoptosis induction by thalidomide: critical for limb teratogenicity but therapeutic potential in idiopathic pulmonary fibrosis? *Curr Mol Pharmacol* 4:26-61.

Knobloch J, Ruther U. 2008. Shedding light on an old mystery: thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects. *Cell Cycle* 7:1121–1127.

Knobloch J, Schmitz I, Gotz K, Schulze-Osthoff K, Ruther U. 2008. Thalidomide induces limb anomalies by PTEN stabilization, Akt suppression, and stimulation of caspase-dependent cell death. *Mol Cell Biol* 28:529–538.

Knobloch J, Shaughnessy JD, Jr, Ruther U. 2007. Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway. *FASEB J* 21:1410–1421.

Lenz W. 1961. Kindliche Missbildungen nach Medikament-Einnahme während der Gravidität? *Dtsch Med Wochenschr* 86:2555-2556.

McBride WG. 1961. THALIDOMIDE AND CONGENITAL ABNORMALITIES. *Lancet* 2: 1358

Parman T, Wiley MJ, Wells PG. 1999. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 5: 582–585.

Schardein JL. 2000. Chemically induced birth defects. 3rd Ed. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.

Su AI, Wiltshire T, Batalov S et al. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6062-7.

Therapontos C, Erskine L, Gardner ER, Figg WD, Vargesson N. 2009. Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 8573–8578.

医薬品非臨床試験ガイドライン研究会. 2010. 医薬品 非臨床試験ガイドライン解説. 東京, 日本: 株式会社 薬事日報社

厚生省薬務局. 1997. 医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインの改定について. 薬審第 316 号

日本トキシコロジー学会教育委員会. 2009. 新版トキシコロジー. 東京, 日本: 株式会社 朝倉書店

第2章 胚・胎児発生毒性試験における Kbl:JW ウサギの評価

2-1 背景データ(生殖パラメーターおよび自然発生の形態学的変化)ならびにサリドマイド誘発胎児奇形の解析

医薬品候補化合物の胚や胎児の発生に対する毒性評価における Kbl:JW ウサギの有用性を検討するために、長期間蓄積した胚・胎児発生毒性試験の対照群のデータを一定期間ごとに分割し、生殖パラメーターや自然発生の奇形および変異の変動を解析した。また、過去に3回実施したサリドマイドによる胚・胎児発生毒性試験で胎児に誘発された奇形の種類や発生頻度を試験間で比較した。

2-1-1 緒言

実験動物の様々な生理学的・形態学的パラメーターは、毒性試験において対照群(非投薬群)であっても変動するため、自然発生の変化と投薬による変化を区別するために実験施設において蓄積された対照群のデータ(背景データ)を参照して実験結果を評価することが時に必要となる。胚・胎児発生毒性試験でみられる奇形の発生頻度は、一般的に投薬群(医薬品候補化合物を投与した群)で顕著に増加することはあまりなく、背景データに記録された自然発生の奇形との比較は、化合物の催奇形性作用の判断を左右する。従って、ウサギの系統を選択する場合、奇形や変異の種類および自然発生の頻度に関する背景データができるだけ多いことに加え、背景データの変動が少なく、催奇形性物質に対する胎児の反応が安定して再現されることが重要と考えられる。実験動物の生産者は動物の遺伝的な安定性を維持するべく努力しているが、背景データや催奇形性物質に対する感受性は、徐々に変動している可能性がある。そのため対照動物の生殖パラメーターの変化や胎児の催奇形性物質への感受性を分析することは、胚・胎児発生毒性試験で使用される動物種の有用性の検証に必要である。

Kbl:JW ウサギは、北山ラベス株式会社で生産されており、日本では胚・胎児発生毒性試験のための実験動物としてよく使用されている。Kbl:JW ウサギ系統の単一施設での背景データは、生産者と我々の施設からそれぞれ一度(Hirasawa および Takeiri 1981 年、Kurishita ら 1987 年)報告されているが、JW ウサギの背景データの長期的な変動を分析した報告はなかった。さらに、サリドマイド投与によって JW ウサギ胎児に誘発された異常や変異の種類及び発生頻度については、2つの異なるグループによる報告があるが(Ikeda ら 1965 年、生産者不明、Matsubara ら 1983 年、生産者：セブン産業株式会社および日生研株式会社)、近年の報告はなく、同一施設におけるサリドマイド誘発奇形の長期的な再現性は分析されていなかった。

従って、我々の研究所で 20 年以上(1990-2010 年)にわたって蓄積された Kbl:JW ウサギを用いて実施された胚・胎児発生毒性試験の背景データを 5 または 6 年毎に分割して遡及的に解析し、各期間の流産動物数、黄体数や着床数などの生殖パラメーターならびに外表、内臓および骨格異常や変異などの形態学的変化の自然発生の頻度を比較した。また、1988 年、1995 年および 2007 年に実施したサリドマイドによる胚・胎児発生毒性試験について、胎児に誘発された奇形の種類や発生頻度を試験間で比較した。

2-1-2 実験方法

背景データ

試験数および試験場所

1990-2010年に実施した合計98の胚・胎児発生毒性試験の対照群を解析した。2006年以前の78試験は山口県光市の研究所で、1998年の1試験および2006-2010年の19試験は、大阪市の研究所で実施した。研究所では、2000年以降、International Federation of Teratology Societies (IFTS)委員会が作成した用語集 Version 1 (Horimoto ら 1998年)に基づいた専門用語を使用していたことから、背景データは2000年を起点に5または6年毎に4期間(I期:1990-1994年、II期:1995-1999年、III期:2000-2004年およびIV期:2005-2010年)に分割した。

動物および飼育条件

Kbl:JW ウサギは北山ラベス株式会社から購入した。ほとんどの雌は、研究所への到着時に14週齢であった。外観および健康状態に異常がみられない動物を使用した。未経産雌を雄と1対1で午前中に交配させた。交尾確認日を妊娠0日と定義した。交尾を確認した15-21週齢の雌動物の妊娠6日に投与を開始した。

動物は吊り下げ型の金属製網底ケージを用いて動物室で個別飼育した。室温は20-27°C、相対湿度は40-80%、換気回数は1時間当たり8-25回、照明周期(12時間)は7:00-19:00(明期)に設定した。動物には水道水および実験動物用飼料(1993年まではRC4、1994年以降はLRC4、いずれもオリエンタル酵母株式会社製造、ガンマ線滅菌済)を自由に摂取させた。

投与方法

ほとんどの試験では、被験物質を懸濁または溶解する溶媒として使用した5%アラビアゴム溶液、0.5%メチルセルロース溶液または生理食塩液を投与した。投与経路毎の試験数は、経口が73試験、皮下が15試験、静脈内投与が8試験であった。2試験では、投与を実施しなかった。投与は、主

に妊娠 6-18 日の午前中に 1 日 1 回実施した。母動物毎の投与液量は、ほとんどの試験で妊娠 6 日の体重に基づいて算出した。

母動物の観察、剖検および胎児の評価

すべての動物は、妊娠 0-28 日の間、生死と外観や行動などの状態について投与日は 1 日 2 回(投与前および投与 0.5-2 時間後)、非投与日は 1 日 1 回、観察し、体重を定期的に測定した。妊娠 0 日の体重測定は群分け、妊娠 6 日は投与液量の算出のために測定した。妊娠 28 日にペントバルビタールナトリウム溶液あるいはチオペンタールナトリウム溶液による過麻酔で安楽死させた後、あるいは麻酔下で開腹し放血死させた後、剖検を行い、黄体数、着床数、死亡胚/胎児数(吸収胚、胎盤遺残および死亡胎児)ならびに生存児数を計数した。生存児は性別を調べ、体重を測定し、外表異常ならびに内臓異常および変異を観察した。次に内臓を摘出し、10 vol%ホルマリンあるいは 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定後、心臓および腎臓の異常および変異を観察した。内臓を摘出した胎児は、95 vol%エタノールで固定し、Dawson の変法(Dawson 1926 年)によるアリザリンレッド S 染色標本を作製した。染色標本の骨格異常および変異を調べ、骨化の程度を評価するため骨化仙尾椎数を計数した。

サリドマイド投与試験

サリドマイドを用いた胚・胎児発生毒性試験は、1988 年、1995 年および 2007 年に実施した。1988 年および 1995 年の試験に使用したサリドマイドはグリュネンター社から入手し、2007 年の試験のサリドマイドは和光純薬工業株式会社から購入した。1988 年および 1995 年の試験では、上記した実験方法の「動物および飼育条件」の項に記載した方法と同様の方法で雌を交配させ、2007 年は同様の方法で交配させた雌を北山ラベス株式会社から購入した。サリドマイドは、5 w/v%アラビアゴム溶液あるいは 0.5 w/v%メチルセルロース溶液に懸濁し、午前中に投与した。1988 年の試験の投与量は、JW ウサギ胎児のサリドマイド催奇形性に関する実験において 300 mg/kg/日で外表異常の発生頻度が頭打ちになっていた(Ikeda ら 1965 年)ことからその用量を設定し

た。1988 年の実験で、異常回転手を含む多数の異常が観察されたので、同一の投与量を 1995 年および 2007 年の試験でも投与した。投与液量は妊娠 6 日の体重を元に算出した。投与期間は、1988 年の試験は妊娠 6-18 日、1995 年および 2007 年の試験は妊娠 7-15 日であった。母動物の観察、剖検および胎児の評価は、上述した背景データの実験方法と同じ方法で実施した。

2-1-3 結果および考察

背景データ

背景データとして被験物質を投与した胚・胎児発生毒性試験における対照群から得られたデータを解析した。本研究で得られた背景データの値の中で、いくつかの異常や変異については若干の変動が見られた。比較的高い自然発生頻度を示す異常や変異は、Kbl:JW 胎児にそれらが誘発されやすいことを示しており、毒性試験の評価を行う際に考慮する必要があると考えられる。なお、異常とは活動(ヒトにおいては生活)に支障のある重篤な形態の変化、変異とはそれらに支障のない軽度な形態の変化を意味している。

母動物の生殖パラメーターおよび胎児の死亡率・性比・体重

事故死を除き、背景データの全期間における妊娠雌 928 羽中死亡が 1 例あった。早産はなかった (Table 2-1-1)。I 期では 307 羽中流産が 7 例みられ、これは他の期間での流産数(II 期 : 234 羽中 0 例、III 期 : 224 羽中 2 例、IV 期 : 163 羽中 1 例)よりも多かった。しかしながら、個別の試験では流産数が少ない(最大 1 例/試験、データ提示せず)ことから、背景データの変動として重要視する必要はないと考えられる。母動物に対して投与を開始する妊娠 6 日(受精卵の着床時期)の体重の平均値および妊娠 6 日から剖検日である妊娠 28 日(分娩の 2、3 日前)までの母動物の体重増加量、黄体数および着床数、着床前および着床後死亡率、死亡胚・胎児数(吸収胚、胎盤遺残および死亡胎児数を含む)、生存胎児数、性比ならびに胎児の体重は、いずれの期間でも同等であり、安定していた(Table 2-1-1 および 2)。

Table 2-1-1 Kbl:JW ウサギ母動物の背景データ

データ解析期間	I期：1990-1994年	II期：1995-1999年	III期：2000-2004年	IV期：2005-2010年
投与開始時週齢	16-21	17-20	16-18	16-19
妊娠動物数	307	234	224	163
死亡動物数†	0	0	1§	0
流産動物数	7	0	2	1
早産動物数	0	0	0	0
体重(妊娠6日)(kg)‡	3.50±0.23	3.50±0.24	3.45±0.18	3.37±0.20
体重増加量 (妊娠6-28日)(kg)‡	0.35±0.15	0.31±0.13	0.34±0.11	0.33±0.12
黄体数‡	10.5±2.0	10.3±2.1	10.2±1.9	9.8±2.0
着床数‡	8.9±2.6	8.4±2.8	8.3±2.4	8.5±2.4
着床前死亡率(%)‡	15.2±18.3	18.7±21.4	18.7±20.2	13.3±16.4

†：事故死は除く、‡：平均値±標準偏差、§：妊娠19日に1例が死亡したが、剖検の結果、異常はなく、死因は不明であった。

Table 2-1-2 Kbl:JW ウサギ胎児の背景データ：死亡率・性比・体重

データ解析期間	I期：1990-1994年	II期：1995-1999年	III期：2000-2004年	IV期：2005-2010年
妊娠動物数†	300	234	221	162
胎児数	2514	1790	1689	1277
着床後死亡率(%)‡	6.0±9.9	9.5±15.8	8.3±13.5	8.8±15.5
死亡胚・胎児数				
吸収胚数‡	0.0±0.2	0.0±0.4	0.0±0.1	0.0±0.2
胎盤遺残数‡	0.2±0.5	0.4±0.8	0.4±0.8	0.4±0.7
死亡胎児数‡	0.3±0.7	0.3±0.7	0.2±0.5	0.2±0.6
生存胎児数‡	8.4±2.5	7.6±2.8	7.6±2.4	7.9±2.4
性比(%)‡	49.0±18.1	49.5±20.6	52.5±19.8	51.3±19.0
体重(g)‡				
雄	38.5±4.8	38.6±5.1	38.2±4.3	38.0±4.0
雌	37.4±4.8	37.5±5.0	37.1±4.4	36.9±4.2

性比：[雄動物数/(雄動物数+雌動物数)]×100、†：死亡あるいは流産動物は除く、‡：平均値±標準偏差

胎児外表異常

II 期、III 期および IV 期の 3 期間での外表異常の総発生頻度に差は認められず、これらの期間では特定の異常の増加もみられなかった(Table 2-1-3)。しかしながら、I 期の総発生頻度は、他の 3 期間の頻度よりも高く、小上顎、小下顎、無尾および躯幹短縮の発生頻度が高値を示した(Table 2-1-3)。これらの異常所見のほとんどは、I 期の 26 試験中 5 試験で観察されたが、それぞれの試験での発生胎児数は 1 または 2 例と低頻度であったことから(データ提示せず)、実質的な毒性評価への影響はほぼないと考えられる。

Table 2-1-3 Kbl:JW ウサギ胎児の背景データ：外表異常

データ解析期間		I期：1990-1994年	II期：1995-1999年	III期：2000-2004年	IV期：2005-2010年
妊娠動物数		300	231	219	159
胎児数		2514	1790	1689	1277
外表異常	% (n)	0.76 (19)	0.56 (10)	0.47 (8)	0.39 (5)
無脳	% (n)	0.04 (1)	0.11 (2)	-	0.08 (1)
髄膜瘤	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
髄膜脳瘤	% (n)	0.08 (2)	-	-	-
顔面形態異常	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
眼部隆起扁平	% (n)	0.08 (2)	0.11 (2)	-	-
眼瞼開裂	% (n)	0.08 (2)	-	-	-
小耳	% (n)	0.04 (1)	-	0.06 (1)	-
小上顎	% (n)	0.44 (11)	-	0.12 (2)	0.08 (1)
小下顎	% (n)	0.40 (10)	-	0.12 (2)	0.08 (1)
口蓋垂裂	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
口蓋ヒダ異常	% (n)	0.08 (2)	-	-	0.08 (1)
裂舌	% (n)	0.08 (2)	-	-	-
脊髄裂	% (n)	0.16 (4)	-	-	-
二分脊椎	% (n)	0.04 (1)	-	0.12 (2)	-
胸壁破裂	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
腹壁破裂	% (n)	0.08 (2)	0.11 (2)	-	-
臍帯ヘルニア	% (n)	0.04 (1)	-	0.06 (1)	0.16 (2)
臍ヘルニア	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
臍帯位置異常	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
無肢	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
小肢(前肢)	% (n)	0.12 (3)	-	-	-
小肢(後肢)	% (n)	0.12 (3)	-	-	0.08 (1)
凹足(前肢)	% (n)	0.04 (1)	0.11 (2)	-	-
異常回転手(前肢)	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
異常回転手(後肢)	% (n)	0.04 (1)	-	-	-
短指(前肢)	% (n)	0.04 (1)	-	-	-
短指(後肢)	% (n)	0.08 (2)	-	-	-
欠指(前肢)	% (n)	-	0.06 (1)	-	0.16 (2)
欠指(後肢)	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
多指(前肢)	% (n)	0.04 (1)	-	-	-
付着指(後肢)	% (n)	0.04 (1)	-	-	-
爪欠損(後肢)	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
鎖肛	% (n)	0.08 (2)	-	-	-
肛門狭窄	% (n)	0.12 (3)	-	0.12 (2)	-
短尾	% (n)	0.12 (3)	-	0.06 (1)	0.08 (1)
無尾	% (n)	0.28 (7)	0.11 (2)	0.12 (2)	-
短躯	% (n)	0.28 (7)	0.11 (2)	0.12 (2)	-
皮下出血	% (n)	0.08 (2)	0.11 (2)	0.18 (3)	-

- : 異常無し、(n) : 異常発生胎児数

胎児内臓異常

I期およびIII期の内臓異常の総発生頻度は、II期およびIV期の頻度よりも高かったが、異常の種類毎にみると、ほとんどの異常では発生胎児数がいずれの期間でも3例以下と少なかった(Table 2-1-4)。また、I期の肝臓分葉異常の発生頻度およびIII期の膜性部心室中隔欠損の発生頻度は、他の期間に比べて高かったが、個別の試験でみると、これらの所見は、最大で2例/試験であった(データ提示せず)。従って、内臓異常の総発生頻度や肝臓分葉異常および膜性部心室中隔欠損の発生頻度の増減は、期間中あるいは試験毎の発生例数が少ないことから、毒性の評価に影響するようなレベルの変動ではないと考えられる。

Table 2-1-4 Kbl:JW ウサギ胎児の背景データ：内臓異常

データ解析期間		I期：1990-1994年	II期：1995-1999年	III期：2000-2004年	IV期：2005-2010年
妊娠動物数		229	174	219	159
胎児数		1933	1351	1689	1277
内臓異常	% (n)	1.40 (27)	0.89 (12)	1.36 (23)	0.63 (8)
水頭症	% (n)	-	0.07 (1)	0.12 (2)	-
水晶体形態異常	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
二心房単心室	% (n)	0.10 (2)	0.07 (1)	-	-
大血管転換	% (n)	-	0.07 (1)	-	-
大血管位置異常	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
大動脈狭窄	% (n)	0.10 (2)	-	0.06 (1)	0.08 (1)
騎乗大動脈	% (n)	-	-	0.06 (1)	0.08 (1)
共通房室口遺残	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
動脈幹遺残	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
総頸動脈欠損	% (n)	0.10 (2)	-	-	-
総頸動脈起始異常	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
総頸動脈狭窄	% (n)	0.05 (1)	0.15 (2)	0.12 (2)	-
食道背方鎖骨下動脈	% (n)	0.16 (3)	-	0.06 (1)	-
肺動脈幹狭窄	% (n)	0.10 (2)	0.15 (2)	0.24 (4)	-
肺動脈幹低形成	% (n)	-	0.07 (1)	-	-
心室中隔筋性部欠損	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
心室中隔膜性部欠損	% (n)	-	0.07 (1)	0.36 (6)	0.16 (2)
胸部液体貯留	% (n)	-	0.15 (2)	-	-
肺小型化	% (n)	0.16 (3)	0.15 (2)	-	0.16 (2)
肺中間葉欠損	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
胸腺小型化	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
横隔膜ヘルニア	% (n)	0.05 (1)	0.07 (1)	0.06 (1)	0.08 (1)
肝臓嚢胞	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
肝臓病巣	% (n)	-	0.07 (1)	0.12 (2)	-
肝臓分葉異常	% (n)	0.26 (5)	-	-	-
肝臓形態異常	% (n)	0.05 (1)	-	0.06 (1)	0.08 (1)
肝臓と腎臓の癒着	% (n)	-	0.07 (1)	-	-
胆嚢欠損	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
胆嚢二分	% (n)	0.16 (3)	-	0.06 (1)	-
胆嚢憩室	% (n)	-	0.07 (1)	0.06 (1)	-
胆嚢拡張	% (n)	0.10 (2)	-	-	0.08 (1)
胆嚢小型化	% (n)	0.05 (1)	-	0.06 (1)	-
総胆管狭窄	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
胃変形	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
無脾	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
脾臓小型化	% (n)	0.10 (2)	-	-	-
脾臓形態異常	% (n)	0.10 (2)	-	-	-
腎臓位置異常	% (n)	-	0.15 (2)	-	-
卵巣小型化	% (n)	-	-	0.18 (3)	-
精巣小型化	% (n)	-	-	0.06 (1)	0.08 (1)
内臓逆位	% (n)	0.05 (1)	-	-	-

-：異常無し、(n)：異常発生胎児数

胎児内臓変異

II期およびIV期の内臓変異の総発生頻度は、I期およびIII期の頻度よりも高かった (Table 2-1-5)。しかしながらほとんどの変異の種類毎の発生胎児数はいずれの期間でも3例以下と少なく、また、IV期の胚葉間裂低形成は、試験毎にみると最大で2例/試験であった(データ提示せず)ことから、毒性評価には影響しない程度の変化と考えられる。

Table 2-1-5 Kbl:JW ウサギ胎児の背景データ：内臓変異

データ解析期間		I期：1990-1994年	II期：1995-1999年	III期：2000-2004年	IV期：2005-2010年
妊娠動物数		229	174	219	159
胎児数		1933	1351	1689	1277
内臓変異	% (n)	0.10 (2)	0.30 (4)	0.18 (3)	0.31 (4)
肺葉間裂低形成	% (n)	0.10 (2)	0.07 (1)	0.12 (2)	0.31 (4)
肺中間葉小型化	% (n)	0.05 (1)	—	—	0.08 (1)
肝葉間裂過形成	% (n)	—	0.22 (3)	—	—
腎盂拡張	% (n)	—	0.07 (1)	0.06 (1)	—
尿管拡張	% (n)	—	—	0.06 (1)	—

—：変異無し、(n)：変異発生胎児数

胎児骨格異常

I 期から IV 期までの骨格異常の総発生頻度には、若干の増減がみられたが、多くの骨格異常の種類毎の胎児数は、いずれの期間でも 3 例以下であった (Table 2-1-6)。III 期および IV 期は頭部骨縫合異常、III 期は尾椎体配列異常、I 期および III 期は尾椎形態異常の発生頻度が、他の期間に比べて高値を示し、胸骨分節癒合は、4 つの期間全てで高頻度にみられた (Table 2-1-6)。これらの異常が発生した試験毎の胎児数は、尾椎体配列異常および胸骨分節癒合を除いていずれの期間でも 2 例以下と少なかった (データ提示せず)。尾椎体配列異常および胸骨分節癒合がみられた試験毎の胎児数は、最大で 3 例であったが、発生した試験では使用した母動物数 (いずれも 18 羽 / 試験) および胎児数 (いずれも 143 匹 / 試験) が多く、実質的な発生頻度は低いことから、毒性評価には影響を及ぼさないものと判断される (データ提示せず)。なお、2000 年以降にのみ尾椎体配列異常がみられるようになったが、これは IFTS 委員会用語集 Version 1 (Horimoto ら 1998 年) に本所見が加えられたため記載されるようになったものである。

Table 2-1-6 Kbl:JW ウサギ胎児の背景データ：骨格異常

データ解析期間		I 期：1990-1994 年	II 期：1995-1999 年	III 期：2000-2004 年	IV 期：2005-2010 年
妊娠動物数		219	179	219	159
胎児数		1839	1393	1689	1277
骨格異常	% (n)	1.47 (27)	1.72 (24)	2.37 (40)	1.96 (25)
頭蓋骨欠損	% (n)	-	0.07 (1)	-	0.08 (1)
頭蓋顔面骨欠損	% (n)	0.05 (1)	-	-	0.08 (1)
頭蓋骨形態異常	% (n)	0.11 (2)	-	-	-
頭蓋顔面骨形態異常	% (n)	0.05 (1)	-	0.12 (2)	-
顔面骨形態異常	% (n)	0.11 (2)	-	-	-
外後頭骨第一頸椎癒合	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
前頭骨癒合	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
鼻骨間縫合異常	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
頭部骨縫合異常	% (n)	0.16 (3)	0.14 (2)	0.41 (7)	0.63 (8)
鼓室輪形態異常	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
上顎骨小型化	% (n)	0.11 (2)	-	-	-
下顎骨小型化	% (n)	0.16 (3)	-	-	-
舌骨欠損	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
頸椎弓欠損	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
頸椎体欠損	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
頸椎分節障害	% (n)	0.05 (1)	-	0.12 (2)	-
頸椎形態異常	% (n)	0.22 (4)	0.14 (2)	0.12 (2)	0.08 (1)
鎖骨欠損	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
鎖骨形態異常	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
肋骨欠損	% (n)	-	0.14 (2)	-	0.08 (1)
肋骨数減少	% (n)	-	0.07 (1)	0.06 (1)	-
肋骨短小	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
肋骨分岐	% (n)	-	0.22 (3)	-	-
肋骨癒合	% (n)	-	0.14 (2)	-	-
肋骨形態異常	% (n)	0.22 (4)	0.14 (2)	0.12 (2)	-
胸骨分節欠損	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
胸骨分節癒合	% (n)	0.49 (9)	0.50 (7)	0.41 (7)	0.31 (4)
胸骨分節形態異常	% (n)	-	0.22 (3)	0.12 (2)	-
胸骨分節裂	% (n)	-	-	0.06 (1)	-
胸椎弓欠損	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
胸椎欠損	% (n)	-	-	0.12 (2)	-
胸椎数減少	% (n)	-	0.07 (1)	-	-
胸椎形態異常	% (n)	0.22 (4)	0.14 (2)	0.12 (2)	-
胸椎分節障害	% (n)	-	0.22 (3)	0.06 (1)	0.08 (1)
腰椎欠損	% (n)	-	-	0.06 (1)	0.08 (1)
腰椎数減少	% (n)	0.11 (2)	-	-	-
腰椎弓椎体癒合	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
腰椎形態異常	% (n)	0.16 (3)	0.14 (2)	0.12 (2)	-
腰椎分節障害	% (n)	0.11 (2)	0.07 (1)	0.06 (1)	-
仙椎形態異常	% (n)	0.16 (3)	0.14 (2)	0.12 (2)	-
仙椎分節障害	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
橈骨欠損	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
橈骨短小	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
尺骨弯曲	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
尺骨短小	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
上腕骨短小	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
腓骨短小	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
脛骨欠損	% (n)	0.05 (1)	-	-	0.08 (1)
脛骨短小	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
指節骨欠損(前肢)	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
指節骨欠損(後肢)	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
指節骨形態異常(前肢)	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
指節骨形態異常(後肢)	% (n)	0.05 (1)	-	-	-
尾椎癒合	% (n)	-	0.14 (2)	-	-
尾椎体配列異常	% (n)	-	-	0.53 (9)	0.23 (3)
尾椎形態異常	% (n)	0.76 (14)	0.29 (4)	0.59 (10)	0.23 (3)

-：異常無し、(n)：異常発生胎児数

胎児骨格変異

骨格変異は、I期の総発生頻度が、その他の期間の頻度よりも高く、骨格変異の種類毎にみるとI期の過剰肋骨の発生頻度(35.67%)が、II期の発生頻度(25.18%)よりも高かった(Table 2-1-7)。IFTS委員会用語集 Version 1 (Horimoto ら 1998 年)に基づいて、我々の研究所では 2000 年以降(III および IV 期)は過剰肋骨を完全過剰肋骨と短小過剰肋骨に分けて評価していたので、I および II 期のデータと比較するため、これらの変異の発生頻度を合計したところ、I 期の過剰肋骨の発生頻度(35.67%)よりやや低かった[III 期 : 26.88% (7.28%+19.60%)、IV 期 : 24.75% (7.52%+17.23%)]。従って、I 期の骨格変異の総発生頻度が他の期間に比べて高い原因は、過剰肋骨の発生頻度の違いに起因したものと考えられた。しかしながら、I 期とその他の期の過剰肋骨の発生頻度の差に比べて、個別の試験における対照群と投薬群の過剰肋骨の発生頻度の差の方が大きいことから、薬物の毒性評価には影響しないと考えられる。腰椎数変異の発生頻度は、III 期以降にわずかに増加したが、この原因は 2000 年以降の所見判断基準の違いによるものと判断する(旧基準では腸骨の先端付近の椎骨における背側の骨化部位を第一仙椎としていたが、新基準では腸骨先端の脇の椎骨における腹側の骨化部位を第一仙椎としている)。骨化の程度を表す骨化仙尾椎数は、全期間でほぼ同等であった (Table 2-1-7)。

Table 2-1-7 Kbl:JW ウサギ胎児の背景データ：骨格変異

データ解析期間		I期：1990-1994年	II期：1995-1999年	III期：2000-2004年	IV期：2005-2010年
妊娠動物数		219	179	219	159
胎児数		1839	1393	1689	1277
骨格変異	% (n)	37.89 (698)	29.91 (417)	27.83 (470)	26.86 (343)
頸椎弓不対称	% (n)	-	0.07 (1)	-	-
頸椎弓双状	% (n)	-	0.07 (1)	-	-
頸椎体二分骨化	% (n)	-	-	0.12 (2)	0.39 (5)
頸肋	% (n)	1.95 (36)	3.44 (48)	2.61 (44)	3.13 (40)
過剰肋骨	% (n)	35.67 (657)	25.18 (351)	NE	NE
完全過剰肋骨	% (n)	NE	NE	7.28 (123)	7.52 (96)
短小過剰肋骨	% (n)	NE	NE	19.60 (331)	17.23 (220)
第12肋骨短小	% (n)	-	-	-	0.08 (1)
胸骨分節階段状	% (n)	0.11 (2)	0.29 (4)	0.36 (6)	0.16 (2)
胸骨分節二分骨化	% (n)	0.05 (1)	0.79 (11)	-	0.31 (4)
胸骨分節余剰骨化片	% (n)	0.11 (2)	0.72 (10)	0.12 (2)	0.39 (5)
胸骨分節糸状癒合	% (n)	0.43 (8)	0.79 (11)	0.24 (4)	0.39 (5)
胸椎弓不対称	% (n)	-	0.07 (1)	-	-
胸椎体二分骨化	% (n)	0.22 (4)	0.43 (6)	0.06 (1)	0.16 (2)
腰椎数変異	% (n)	1.47 (27)	0.29 (4)	3.02 (51)	4.07 (52)
腰椎仙椎化	% (n)	-	-	-	0.16 (2)
仙椎腰椎化	% (n)	-	-	1.01 (17)	0.16 (2)
骨化仙尾椎数†		19.0±0.7	19.1±0.8	18.9±0.8	18.9±0.8

-：変異無し、n：変異発生胎児数、†：平均値±標準偏差、

NE：未観察（2000年より判断基準が過剰肋骨から短小および完全過剰肋骨に変更されたため）

サリドマイドに対する胎児の感受性

母動物の生殖パラメーターおよび胎児の死亡率・性比・体重

1988年、1995年および2007年に実施したサリドマイドを用いた胚・胎児発生毒性試験(サリドマイド試験)の黄体数ならびに1995年および2007年のサリドマイド試験の着床数と着床前死亡率は、背景データの平均値とほぼ同一であった(Table 2-1-1 および 8)。1988年の試験では他の2試験と比較して着床数が低値傾向、着床前死亡率が高値傾向であった。しかしながら、これらの値は我々の研究所で1984-1986年に実施した11試験の背景データの範囲にほぼ含まれており[平均着床数(各試験の最小-最大): 7.5-11.8、着床率(着床前死亡率の補完値、各試験の最小-最大): 63.5-96.9%] (Kurishita ら 1987年)、より多量の500 mg/kgのサリドマイドを雑種の妊娠ウサギに妊娠3日から反復投与しても着床前死亡率を上昇させないこと(Hay 1964年)、また妊娠6日のJW-NIBSウサギに500 mg/kgのサリドマイドを単回投与しても着床数に影響がないことが報告されている(Matsubara および Mikami 1985年)ことから、着床数の低値傾向および着床前死亡率の高値傾向は自然発生性と考えられる。いずれの試験でも背景データの平均値と比べて着床後死亡率ならびに胎盤遺残および死亡児数は高値を、生存胎児数および胎児体重は低値を示しており、サリドマイドによる胎児に対する致死作用は再現性がみられた。2007年の試験の性比は背景データの平均値と比べて低値傾向を示した(Table 2-1-2 および 8)。しかしながら、2007年の性比の元となる母動物の個別データ(Table 2-1-9)をみると8例の生存胎児全てが雌という母動物番号1の異常値(性比0%)によって平均値が大きく低下したことが影響していた。本母動物で仮に死亡した胚または胎児が全例雄であったとしても、すべての着床数10例中の2例にすぎず、また、その他の母動物の性比に偏りはないことから、2007年の性比の低値傾向は、サリドマイドによる雄の胚または胎児への選択的な致死作用ではなく、自然発生性の変動と考えられた。

Table 2-1-8 サリドマイドの母動物および胎児への影響：母動物の生殖パラメーターおよび胎児死亡率・性比・体重

試験実施年	1988	1995	2007
投与量 (mg/kg/日)	300		
投与期間	妊娠 6-18 日	妊娠 7-15 日	
妊娠動物数	10	4	4
黄体数†	10.6±3.2	10.3±2.1	10.8±1.5
着床数†	7.1±3.6	8.3±1.5	9.5±3.1
着床前死亡率 (%)†	33.5±27.3	18.3±14.8	13.2±21.2
胎児数	51	24	28
着床後死亡率 (%)†	27.0±23.2	27.6±12.9	31.0±19.8
死亡胚・胎児数			
吸収胚数†	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
胎盤遺残数†	1.5±1.8	1.8±1.3	2.0±0.8
死亡胎児数†	0.5±1.3	0.5±0.6	0.5±0.6
生存胎児数†	5.1±3.0	6.0±1.6	7.0±3.5
性比 (%)†	43.7±31.6	56.9±16.8	35.0±23.8 ‡
体重 (g)†			
雄	32.4±6.2	24.8±5.0	32.7±1.5
雌	32.7±7.0	23.7±7.6	31.8±1.6

性比：[雄動物数/(雄動物数+雌動物数)]×100、†：同腹児単位の平均値±標準偏差、

‡：2007年の母動物毎の性比はTable 2-1-9を参照

Table 2-1-9 2007年の母動物毎の着床数・雌雄胎児数・性比

母動物番号	着床数	胎児数 (雄：雌)	性比 (%)
1	10	0：8	0
2	11	4：4	50
3	5	1：1	50
4	12	4：6	40

性比：[雄胎児数/(雄胎児数+雌胎児数)]×100

胎児外表異常

1988年、1995年および2007年に実施したサリドマイド試験における胎児外表異常全体の発生頻度の範囲は、85.1-96.9%であり (Table 2-1-10)、背景データ (Table 2-1-3) と比較して極めて高頻度であった。主な発生部位は頭部顔面、四肢および尾であった。最も高頻度に発生した外表異常は短尾 (Fig. 2-1-1) であり、その発生頻度は3試験とも同等であった。異常回転手 (前肢) (Fig. 2-1-1) や欠指も高頻度にみられ、2007年の試験におけるこれらの発生頻度は、1998年および1995年の試験の頻度よりもかなり高かった。短指も2007年の試験ではやや高頻度に観察された。

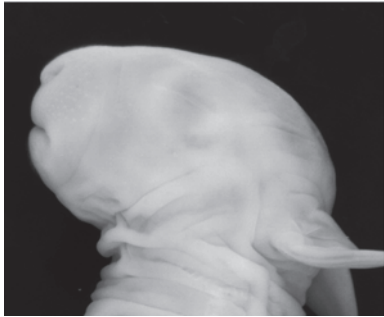
Table 2-1-10 サリドマイドの胎児への影響：外表異常

試験実施年	1988	1995	2007	
投与量 (mg/kg/日)		300		
投与期間		妊娠 6-18 日	妊娠 7-15 日	
妊娠動物数	10	4	4	
観察胎児数	51	24	28	
外表異常	% (n)			
外脳	% (n)	85.1 (44)	91.7 (22)	96.9 (27)
髄膜脳瘤	% (n)	2.5 (1)	14.6 (3)	6.3 (2)
眼部隆起扁平	% (n)	–	–	12.5 (1)
口唇裂	% (n)	12.2 (7)	4.2 (1)	–
口蓋裂	% (n)	9.2 (4)	–	–
臍帯ヘルニア	% (n)	5.0 (2)	–	–
異常回転手 (前肢)	% (n)	2.6 (2)	6.3 (1)	–
異常回転手 (後肢)	% (n)	11.3 (6)	25.0 (5)	66.3 (16)
欠指 (前肢)	% (n)	–	6.3 (1)	28.1 (3)
欠指 (後肢)	% (n)	18.8 (9)	25.0 (5)	60.0 (14)
短指 (前肢)	% (n)	–	6.3 (1)	25.0 (2)
短指 (後肢)	% (n)	3.3 (2)	–	25.0 (5)
多指 (後肢)	% (n)	–	–	12.5 (1)
指形態異常 (前肢)	% (n)	–	6.3 (1)	6.3 (2)
鎖肛	% (n)	3.3 (2)	12.5 (3)	3.1 (1)
肛門狭窄	% (n)	0.9 (1)	–	–
短尾	% (n)	–	6.3 (1)	–
無尾	% (n)	69.6 (37)	75.0 (19)	81.3 (22)
	% (n)	–	12.5 (2)	–

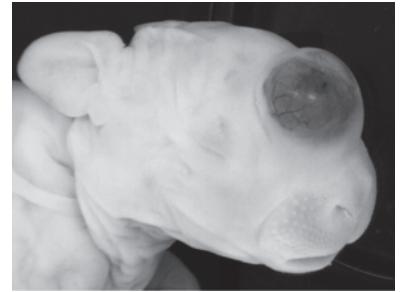
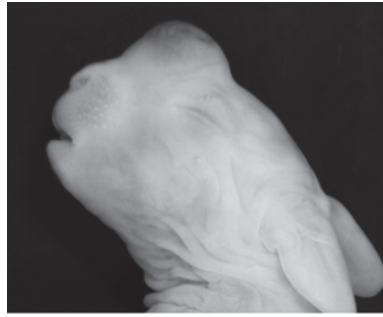
–：異常なし、%：同腹児単位の平均値、(n)：異常発生胎児数

Fig. 2-1-1 サリドマイドにより誘発されたウサギ胎児外表異常

正常



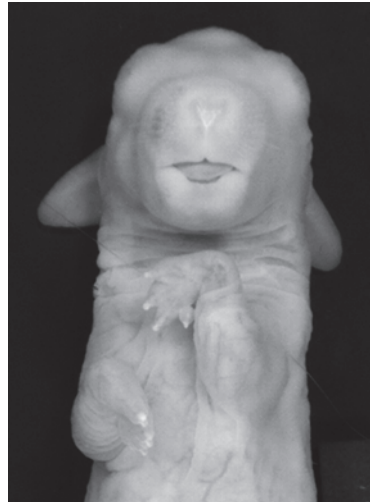
髄膜脳瘤



正常



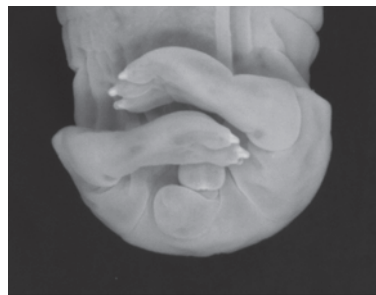
異常回転手(前肢)



正常



異常回転手(後肢)・短尾



胎児内臓異常

1988年、1995年および2007年に実施したサリドマイド試験における胎児内臓異常の発生頻度の範囲は53.1-83.1%であり(Table 2-1-11)、背景データ(Table 2-1-4)と比べて著しい高値を示した。主な異常の発生部位は頭部、心血管系、肺、肝臓および腎臓であった。高頻度に発生した異常は、水頭症、肺中間葉欠損および肝臓分葉異常であった。2007年の肺中間葉欠損の発生頻度は、他の年よりも高かった。

Table 2-1-11 サリドマイドの胎児への影響：内臓異常

試験実施年	1988	1995	2007
投与量 (mg/kg/日)	300		
投与期間	妊娠 6-18 日	妊娠 7-15 日	
妊娠動物数	10	4	4
観察胎児数	51	24	28
内臓異常	% (n)		
水頭症	% (n)		
小眼球	% (n)		
心室中隔膜性部欠損	% (n)		
大動脈弓離断	% (n)		
騎乗大動脈	% (n)		
大動脈狭窄	% (n)		
肺動脈幹狭窄	% (n)		
動脈管狭窄	% (n)		
鎖骨下動脈起始異常	% (n)		
食道背方鎖骨下動脈	% (n)		
肺中間葉欠損	% (n)		
肺小型化	% (n)		
胸部液体貯留	% (n)		
横隔膜ヘルニア	% (n)		
肝臓分葉異常	% (n)		
肝臓嚢胞	% (n)		
胆嚢二分	% (n)		
胆嚢憩室	% (n)		
胆嚢小型化	% (n)		
胆嚢欠損	% (n)		
腎臓位置異常	% (n)		
腎臓欠損	% (n)		
腎臓小型化	% (n)		
水腎症	% (n)		

- : 異常なし、% : 同腹児単位の平均値、(n) : 異常発生胎児数

胎児内臓変異

1988年、1995年および2007年に実施したサリドマイド試験における胎児内臓変異の発生頻度の範囲は39.8%-73.1%であり(Table 2-1-12)、背景データ(Table 2-1-5)よりも著しく多かった。主な変異の発生部位は肺であり、肺葉間裂低形成が高頻度に観察された。

Table 2-1-12 サリドマイドの胎児への影響：内臓変異

試験実施年	1988	1995	2007
投与量 (mg/kg/日)	300		
投与期間	妊娠 6-18 日	妊娠 7-15 日	
妊娠動物数	10	4	4
観察胎児数	51	24	28
内臓変異	% (n)		
肺葉間裂低形成	% (n)	49.0 (12)	73.1 (18)
肺中間葉小型化	% (n)	42.7 (11)	70.6 (17)
腎盂拡張	% (n)	1.7 (1)	11.9 (4)
	% (n)	6.3 (1)	—

—：変異なし、%：同腹児単位の平均値、(n)：変異発生胎児数

胎児骨格異常

1988年、1995年および2007年に実施したサリドマイド試験における胎児骨格異常の発生頻度の範囲は、62.1-94.4%であり(Table 2-1-13)、背景データ(Table 2-1-6)と比較して顕著な高値を示した。頭部顔面(Fig. 2-1-2)、中軸骨格、尾、四肢および指の奇形が高頻度に観察された。主な異常は、尾椎形態異常および癒合、橈骨の欠損または短小(Fig. 2-1-2)ならびに指節骨欠損であった。橈骨や指節骨の異常の発生頻度は2007年の試験の方が1988年および1995年の試験に比べてかなり高かった。前頭骨および鼻骨間縫合の形態異常、ならびに頭部顔面骨の部分欠損は、2007年の試験のみ観察された。これは2000年以降にIFTS委員会用語集 Version 1 (Horimoto ら 1998年)に本所見が加えられたことによる骨格所見の基準の変化に起因したものである。

Table 2-1-13 サリドマイドの胎児への影響：骨格異常

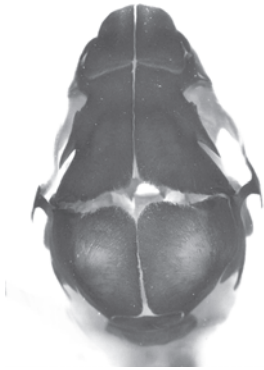
試験実施年	1988	1995	2007
投与量 (mg/kg/日)	300		
投与期間	妊娠 6-18 日	妊娠 7-15 日	
妊娠動物数	10	4	4
観察胎児数	51	23	28
骨格異常	% (n)	72.9 (16)	94.4 (26)
頭蓋骨欠損	% (n)	–	3.1 (1)
前頭骨縫合異常	% (n)	–	51.3 (14)
頭蓋骨形態異常	% (n)	16.7 (3)	15.6 (2)
頭蓋顔面骨形態異常	% (n)	–	3.1 (1)
顔面骨形態異常	% (n)	–	–
鼻骨間縫合異常	% (n)	–	43.1 (8)
上顎骨形態異常	% (n)	–	3.1 (1)
頭蓋顔面骨部分欠損	% (n)	–	43.8 (8)
口蓋骨欠損	% (n)	–	–
仙椎癒合	% (n)	7.1 (2)	–
仙椎体癒合	% (n)	–	25.0 (2)
仙尾椎癒合	% (n)	–	–
仙尾椎体癒合	% (n)	14.3 (4)	–
尾椎形態異常	% (n)	46.4(9)	23.8 (9)
尾椎癒合	% (n)	11.3 (3)	39.4 (7)
尾椎欠損	% (n)	–	–
尾椎体配列異常	% (n)	–	12.5 (4)
橈骨欠損	% (n)	–	15.6 (2)
橈骨短小	% (n)	12.5 (2)	33.1 (8)
大腿骨欠損	% (n)	–	12.5 (1)
大腿骨短小	% (n)	–	25.0 (2)
脛骨欠損	% (n)	8.3 (1)	25.0 (2)
脛骨短小	% (n)	–	3.1 (1)
腓骨彎曲	% (n)	8.3(1)	25.0 (2)
恥骨欠損	% (n)	–	12.5 (1)
指節骨欠損(前肢)	% (n)	33.3 (6)	68.8 (17)
指節骨欠損(後肢)	% (n)	8.3 (1)	25.0 (2)
指節骨形態異常(前肢)	% (n)	4.2 (1)	–
中手骨欠損(前肢)	% (n)	4.2 (1)	–
指節骨過剰(後肢)	% (n)	8.3 (1)	3.1 (1)

–：異常なし、%：同腹児単位の平均値、(n)：異常発生胎児数

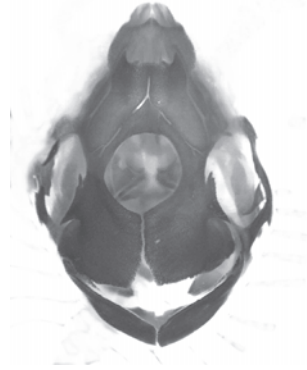
Fig. 2-1-2

サリドマイドにより誘発されたウサギ胎児骨格異常

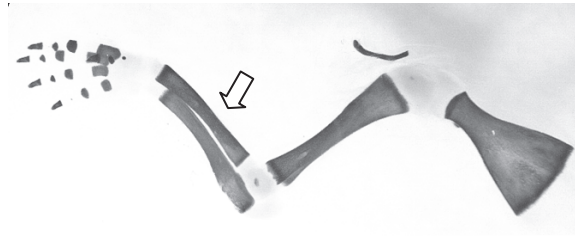
正常



頭蓋骨形態異常



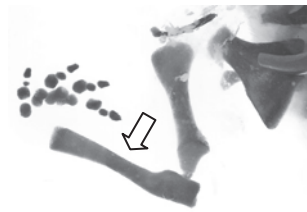
正常



橈骨短小

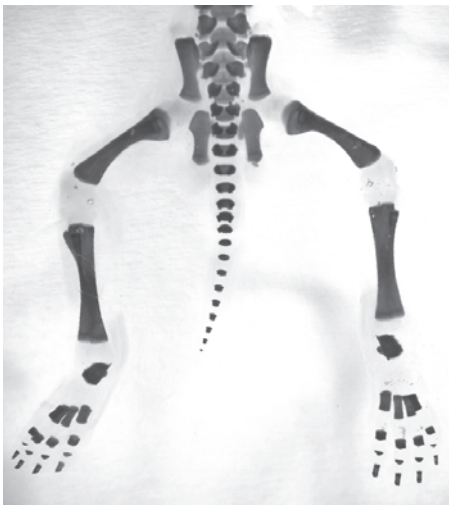


橈骨欠損

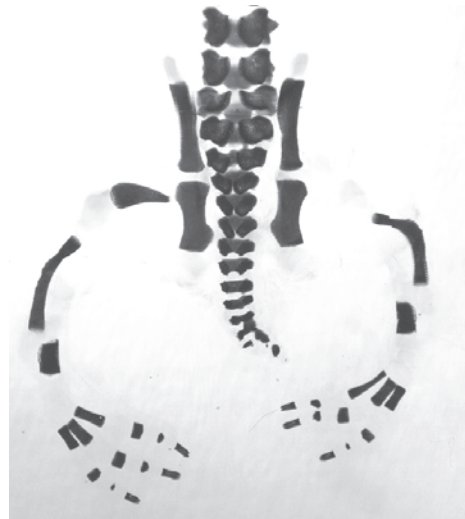


矢印：橈骨または橈骨相当部位

正常



下肢複合異常



胎児骨格変異

1988年、1995年および2007年に実施したサリドマイド試験における胎児骨格変異の総発生頻度は、28.8-43.5%の範囲にあり(Table 2-1-14)、背景データの各期の変異の発生頻度の範囲である26.86-37.89%(Table 2-1-7)と大差なかった。また種類別の変異の発生頻度についても同様にサリドマイド試験と背景データの対照群の平均値との間に明確な差はみられなかった(Tables 2-1-7 および14)。従って、骨格異常とは異なり、胎児の骨格変異の発生にはサリドマイドは影響を及ぼさないと判断した。

Table 2-1-14 サリドマイドの胎児への影響：骨格変異

試験実施年	1988	1995	2007
投与量 (mg/kg/日)	300		
投与期間	妊娠 6-18 日	妊娠 7-15 日	
妊娠動物数	10	4	4
観察胎児数	51	23	28
骨格変異	% (n)		
頸肋	% (n)	43.5 (10)	28.8 (10)
過剰肋骨	% (n)	10.7 (3)	2.5 (1)
短小過剰肋骨	% (n)	32.7 (7)	NE
胸骨分節糸状癒合	% (n)	NE	23.1 (8)
胸骨分節階段状	% (n)	11.3 (3)	3.1 (1)
胸骨分節二分骨化	% (n)	4.2 (1)	-
腰椎数変異	% (n)	-	2.5 (1)
			-

-：変異なし、%：同腹児単位の平均値、(n)：変異発生胎児数、

NE：未観察 (2000年より判断基準が過剰肋骨から短小および完全過剰肋骨に変更されたため)

サリドマイド試験でみられた形態異常および変異に関する考察

外表、内臓および骨格異常ならびに内臓変異の総発生頻度は、我々の施設の背景データに比べて顕著に増加していた。異常の種類毎の発生頻度も、一部の例外を除いて、同程度であった。2007年の試験において異常回転手や欠指および短指(外表異常)、肺中間葉欠損(内臓異常)、橈骨の欠損や短小および指節骨の欠損(骨格異常)の発生頻度は、1988年および1995年の試験よりもかなり高かった。これらの所見の観察方法および基準は、3試験間で変更がなく、2007年の試験におけるこれらの所見の増加は、サリドマイドの入手先が1988年および1995年の試験ではグリュネンター社であり、2007年の試験では和光純薬工業であることの違い(化合物の吸収性に影響する純度や粒子径などのデータは、いずれも未入手)に起因した可能性がある。しかしながら、外表、内臓および骨格異常に関する総発生頻度はほぼ同等であり、同種の異常および変異がいずれの試験でも観察されていることから、サリドマイドの催奇形性を検出可能かどうかという観点からは、これらの発生頻度の差は問題にはならないと判断した。他施設で実施された JW ウサギの胚・胎児発生毒性試験は本研究と同じ 300 mg/kg のサリドマイドを用いて行われている。その外表異常の総発生頻度は、72.8% (44 胎児中 32 例。生産者の記載無し。投与期間：妊娠 8-15 日) (Ikeda ら 1965 年)、65.7% (35 胎児中 23 例。生産者：セブン産業株式会社、投与期間：妊娠 6-18 日、Matsubara ら 1983 年)および 92.3% (52 胎児中 48 胎児、生産者：日本生物科学研究所、系統名：JW-NIBS、投与期間：妊娠 6-18 日、Matsubara ら 1983 年)であり、我々の施設で実施した 3 試験の発生頻度と大差なかった。サリドマイドによる奇形として最も特徴的な前肢および後肢の異常回転手の発生頻度は、我々が実施した 3 試験では、それぞれ 11.3-66.3%および 0.0-28.1%であり、松原らの報告 (Matsubara ら 1983 年)では、前肢および後肢奇形の発生頻度は、セブン産業株式会社の JW 系統では、それぞれ 51.4% (前肢拘縮と分類されている)および 28.6% (内反足と分類されている)、そして JW-NIBS 系統では 9.6%および 34.6%であった。Kbl:JW 系統とセブン産業株式会社の JW 系統では、同様に前肢の異常回転手の発生頻度が後肢よりも高い傾向がみられたが、JW-NIBS 系統では逆の傾向がみられた。同じ JW 系統でも長期飼育によりサリドマイドに対する応答が変化した可能性も考えられ、Kbl:JW 系統についても継続的に調査していく必要がある。

2-1-4 結論

過去 20 年以上(1990~2010 年)にわたって行われた Kbl:JW ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験での対照群データにおける母動物の生殖パラメーターや自然発生の形態変化について解析した。さらに、サリドマイドにより胎児に誘発される奇形について 1988 年、1995 年、2007 年に Kbl:JW ウサギを用いて実施した 3 試験のデータについても解析した。その結果、対照群のウサギの生殖パラメーターや胎児死亡率に加えて、ほとんどの外形、内蔵、骨格に関する異常と変異の種類と発生頻度が長期的に安定していることが判明した。さらに、サリドマイドによって誘発された奇形の特徴は 3 試験で再現性があった。従って、Kbl:JW 系統ウサギは医薬品候補化合物の影響を評価できる動物の一つであり、特に自然発生の形態変化と薬物誘発奇形が長期にわたって安定であるという観点から胚・胎児発生毒性試験に有用であると結論した。

参考文献

Dawson AB. 1926. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain technology* 1: 123-124.

Hay MF. 1964. Effects of thalidomide on pregnancy in the rabbit. *J Reprod Fertil* 8: 59-76.

Hirasawa K, Takeiri S. 1981. Introduction of normal data in SPF (KBL: JW) rabbits. *Jikken Dobutsu Gizyutsu* 16: 103-109.

Horimoto M, Ariyuki F, Daidohji S et al. 1998. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (Japanese Version 1). *Congenit Anom (Kyoto)* 38: 153-237. (In Japanese)

Ikeda Y, Horiuchi S, Yoshimoto H, Suzuki Y, Furuya T, Kawamata K, Kaneko T. 1965. Examination in rabbit - teratogenicity of thalidomide and aspirin -. *Congenit Anom (Kyoto)* 5: 201-205. (In Japanese)

Kurishita A, Negishi R, Ihara T. 1987. Incidence of spontaneous abnormalities in the rat and rabbit used in teratological study during 1981-1986. *Takeda Kenkyusho Hô* 46: 69-79.

Matsubara Y, Goto M, Mikami T, Suzuki Y, Chiba T. 1983. Teratogenic effects of thalidomide in the rabbit: difference in susceptibility between two breeds. *Congenit Anom (Kyoto)* 23: 223-229.

Matsubara Y, Mikami T. 1985. Teratogenic potentiality of single dose of thalidomide in JW-NIBS rabbits. *Exp Anim* 34: 295-302. (In Japanese)

2-2 サリドマイドのウサギ胚・胎児発生への影響：実験動物系統、Kbl:JW と Kbl:NZW 間の 違いと共通性

医薬品開発のための胚・胎児発生毒性試験に世界的に使用されている NZW 系統と日本で NZW と共に使用されている JW 系統において、胎児の器官形成期を通じてサリドマイドを投与した実験および器官形成期を分割して投与した実験を行い、胚・胎児への影響を調べ、系統間の違いと共通性を比較検討した。

2-2-1 緒言

これまで、NZW、チンチラ、JW、ヒマラヤンおよびダッチなどの様々なウサギの系統や雑種が、サリドマイドの催奇形性評価に使用されてきた (Somers 1962 年、Seller ら 1962 年、Dekker および Mehrizi 1964 年、Fabro および Smith 1966 年、Ikeda ら 1965 年、Sterz ら 1987 年、Staples および Holtkamp 1963 年、Hay 1964 年、Ingalls ら 1964 年)。これらの中で世界的には、NZW ウサギがサリドマイドの催奇形性評価のために最もよく使用されている。JW ウサギは本邦の催奇形性研究において頻用される系統の一つであるが、サリドマイドの Kbl:JW ウサギ胎児への影響に関する詳細な報告はなかった。

化学物質により誘発される奇形には、系統差がみられることがあり、いくつかの催奇形性物質については、げっ歯類で感受性の系統差が報告されている。例えば、コルチゾール投与によるマウスの口蓋裂(Fraser および Fainstat 1951 年)、ビタミン A 投与によるラットの奇形(Nolen 1969 年)、ビオチンによるマウスの奇形(Watanabe および Endo 1989 年)および全トランス型レチノイン酸 (Collins ら 2006 年)によるマウスの奇形などが、その典型的な事例である。ウサギにおけるサリドマイドの催奇形性の系統差は、NZW、NZW 雑種およびダッチウサギ(Sawin ら 1965 年)における種々の奇形や JW(生産者：セブン産業株式会社)および JW-NIBS ウサギ(生産者：日本生物科学研究所)における頭部の奇形についての報告がある(Matsubara ら 1983 年)。しかしながら、我々の知

る限り、同一の試験施設で NZW および JW ウサギ胎児へのサリドマイドの影響を直接、比較した報告はない。

本研究ではサリドマイドの器官形成期投与により誘発される胎児奇形の系統差について同一の生産者の 2 系統(Kbl:JW および Kbl:NZW)を用いた胚・胎児発生試験(EFD 試験：Embryo-Fetal Development study)の結果を比較検討した。次にこれらの 2 系統においてサリドマイドを妊娠 7-8 日、9-10 日および 11-12 日に分割して投与する感受期検討試験(SP 試験：Sensitive Period study)を実施し、それぞれの投与期間毎に誘発された奇形の種類を比較した。

2-2-2 実験方法

動物および飼育条件

交配済みの Kbl:JW および Kbl:NZW 雌ウサギを北山ラベス株式会社から購入した。交配は生産者が午前中に発情期の未経産雌と雄を一対一で同居させて実施した。交尾確認日を妊娠 0 日と定義した。研究所に到着の時点で雌動物の週齢は 16-18、妊娠日齢は 1 または 2 日であった。

動物は、吊り下げ型の金属製網底ケージを用いて動物室で個別に飼育した。室温は 20-26°C、相対湿度は 40-80%、換気回数は 1 時間当たり 8-25 回、照明周期(12 時間)は 7:00-19:00(明期)に設定した。動物には水道水および実験動物用飼料(LRC4、オリエンタル酵母株式会社製造、ガンマ線滅菌済)を自由に摂取させた。

サリドマイドおよび投与方法

サリドマイドは和光純薬工業株式会社から購入した(純度：98.0%以上)。サリドマイドは、0.5 w/v%メチルセルロース溶液に懸濁し、午前中に 1 日 1 回、経口投与した。投与液量は、妊娠 6 日の体重に基づいて算出した。対照動物には、0.5 w/v%メチルセルロース溶液を同様の方法で投与した。

投与量および投与期間

1988 年と 1995 年の胚・胎児発生毒性試験で、それぞれ妊娠 6-18 日および 7-15 日に 300 mg/kg のサリドマイドを経口投与したところ、異常回転手を含む種々の奇形が再現性を伴って誘発された(Table 2-1-10~13)。従って、EFD 試験における Kbl:JW および Kbl:NZW ウサギへの投与量も 300 mg/kg に設定した。

SP 試験のサリドマイドの投与量として、Kbl:JW ウサギには 50、150 および 300 mg/kg を、Kbl:NZW ウサギには 150 および 300 mg/kg を設定した。高用量は EFD 試験と同じ 300 mg/kg を、Kbl:JW ウサギの低および中用量は、50、100 および 150 mg/kg を投与した予備的な EFD 試験で全

での投与量で異常回転手が観察された (発生頻度：各々8.3、3.1 および 36.0%、データ提示せず) ことから、50 および 150 mg/kg を設定した。Kbl:JW ウサギの SP 試験における 50 mg/kg 群で異常回転手が誘発されなかったことから、Kbl:NZW ウサギの SP 試験では 50 mg/kg を設定しなかった。EFD 試験において様々な奇形が妊娠 7-15 日の投与で誘発されたことから、SP 試験ではこれらの奇形の感受期を検討するために、投与期間を妊娠 7-8、9-10 および 11-12 日に設定した。

母動物の観察、剖検および胎児の評価

すべての動物は、入手後から剖検までの間、生死と外観や行動などの状態を毎日観察した。妊娠 28 日にチオペンタールナトリウム溶液による過麻酔で安楽死させた後、剖検を行い、着床数、死亡胚/胎児数(吸収胚、胎盤遺残および死亡胎児)ならびに生存児数を計数した。生存児は性別を調べ、外表異常ならびに内臓異常および変異を観察した。次に内臓を摘出し、10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定後、心臓および腎臓の異常および変異を観察した。内臓を摘出した胎児は、95 vol%のエタノールで固定し、Dawson の変法(Dawson 1926 年)によるアリザリンレッド S 染色標本を作製し、骨格異常および変異を調べた。

血漿中薬物濃度測定

ヘパリンを添加した注射筒で血液サンプル(約 0.5 mL)を交尾確認雌の耳介静脈から、各投与期間の投与初日(妊娠 7、9 および 11 日)の投与 0.5、1、2、4、8 および 24 時間後に採血した。血液は、冷却下で遠心し、血漿を採取した。各投与群の採血ポイント毎に 3-5 匹の母動物から採取した血漿中のサリドマイドの濃度を、高速液体クロマトグラフィーを使用して UV で検出した。方法の詳細および測定条件は以下の通り；酸性血漿(60 μ L)をマイクロチューブに入れ、10 μ L のアセトニトリルを添加した(検量線作成用試料にも標準溶液として 10 μ L のアセトニトリルを添加)。除蛋白のため、さらに 150 μ L のアセトニトリルを加え、30 秒間攪拌した。10°C、1,500 rpm で 5 分間遠心した後、100 μ L の上清を別のマイクロチューブに移した。300 μ L の 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム (pH 5.4)を加えて攪拌した後、100 μ L を HPLC に注入した。分離には L カラム(4.6 x 250

mm, I.D., CERI)と 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム (pH 5.4)-アセトニトリル (75:25, v/v)からなる定組成の移動相を使用し、流速は毎分 1.0 mL で実施した。カラムの温度は 40°Cに維持した。保持時間は約 9 分であった。本法の定量限界は、0.05 µg/mL であり、60 µg/mL の酸性血漿サンプル使用時の検量線範囲は 0.05 から 20 µg/mL であった。

動物倫理

本実験は、武田薬品の実験動物倫理委員会の承認を受けた。

統計処理

EFD 試験：Kbl:JW ウサギは対照群を設定しておらず、Kbl:NZW ウサギの対照群の動物数は極めて少なかった(2 匹)ため、統計処理は実施しなかった。

SP 試験：全ての統計処理は、系統毎に 1 群を対照群と定義し、そのデータを投与期間毎に投与群と比較した[Kbl:JW ウサギの SP 試験では 1 群と 2-4 群(妊娠 7-8 日投与)、5-7 群(妊娠 9-10 日投与)または 8-10 群(妊娠 11-12 日投与)、Kbl:NZW ウサギの SP 試験では 1 群と 2-3 群(妊娠 7-8 日投与)、4-5 群(妊娠 9-10 日投与)または 6-7 群(妊娠 11-12 日投与)を比較]。

母動物の流産および早産数の計数データについては、Fisher の正確検定(Siegel 1956 年)を実施し、対照群と各投与群を比較した。

着床前胚死亡率、着床後胚・胎児死亡率、胎児の外表異常、内臓および骨格異常および変異の発生頻度については、母動物毎の発生頻度を 1 測定単位として順位変換し、Shirley-Williams 検定(Shirley 1977 年、Williams 1986 年)により用量反応関係の単調性の評価および無毒性量の検討を行った。Shirley-Williams 検定で有意でない場合には、対照群と各投与群との平均順位の差について順位に基づく Steel 検定(Steel 1959 年)を実施した。

生存児数および死亡胚／胎児数(吸収胚、胎盤遺残および死亡胎児)ならびに性比に関する母動物毎の平均値を伴う間隔尺度データについては、母動物毎に得られた値を 1 測定単位として、Bartlett 検定(Snedecor および Cochran 1980 年)により各群の分散の一様性の検定を行った。その結

果、等分散の場合には、Williams 検定(Williams 1972 年)により用量反応関係の単調性の評価および無毒性量の検討を行い、Williams 検定で有意でない場合には、Dunnett 検定(Dunnett 1955 年)を用いて対照群と各投与群との平均値の差の検定を行った。不等分散の場合には、Shirley-Williams 検定(Shirley 1977 年、Williams 1986 年)により用量反応関係の単調性の評価および無毒性量の検討を行い、Shirley-Williams 検定で有意でない場合には、対照群と各投与群との平均順位の差について順位に基づく Steel 検定(Steel 1959 年)を実施した。検定の有意水準については、Bartlett 検定は 5%、Williams 検定および Shirley-Williams 検定は両側 5%、その他の検定は両側 5%および 1%とした。Dunnett 検定、Steel 検定、Williams 検定および Shirley-Williams 検定には、統計パッケージ SAS の PROBMC 関数(SAS Institute Inc. 1996 年)を使用した。血漿中薬物濃度については統計学的解析を行わなかった。

2-2-3 結果

母毒性

EFD および SP 試験において、流産を除いて、死亡、投薬後の外観や行動などの状態、体重および剖検所見などの母毒性は、同一の投与量および投与期間の場合、両系統について同等であった(データ提示せず)。SP 試験で用いた妊娠 7-8 日の 300 mg/kg 投与群での流産は、Kbl:JW および Kbl:NZW 系統において、それぞれ 0 および 3 例であった(Table 2-2-2)。しかしながら SP 試験よりも長い期間投与し、サリドマイドの影響がより強いと考えられる EFD 試験における流産は両系統とも共に 1 例であり(Table 2-2-1)、SP 試験における流産動物数の違いは、本質的な系統差を示すものではないと考えられた。

胎児死亡

EFD 試験では両系統とも着床後死亡率および胎盤遺残数が増加し、生存児数が低下したが、Kbl:NZW 系統の胎児の死亡率は、Kbl:JW 系統よりも高かった(Table 2-2-1)。SP 試験では、同様に死亡率の高値傾向が妊娠 7-8 日の 300 mg/kg 投与群の Kbl:NZW 系統で認められたが、妊娠 9-10 および 11-12 日の投与群には、そのような傾向はみられなかった (Table 2-2-2)。

Table 2-2-1 EFD 試験：胎児死亡関連パラメーター

系統 群	Kbl:JW		Kbl:NZW	
	対照†	サリドマイド‡	対照	サリドマイド
投与量 (mg/kg/日)	0	300	0	300
妊娠動物数	5-6	5	2	7
流産動物数	0	1	0	1
生存胎児数(総数)	39-55	28	19	20
着床後死亡率 (%)§	4.5-10.4	31.0±19.8	9.1±12.9	60.5±23.7
死亡胚・胎児数				
吸収胚数§	0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
胎盤遺残数§	0.2-0.8	2.0±0.8	0.5±0.7	4.3±1.9
死亡胎児数§	0.0-0.4	0.5±0.6	0.5±0.7	0.3±0.5
生存胎児数(平均値)§	7.2-9.2	7.0±3.5	9.5±0.7	3.3±2.5

EFD：胚・胎児発生、†：サリドマイドの胚・胎児発生毒性試験と同年に実施された5つのEFD試験の最小-最大値、
‡：第2章2-1の2007年の試験のデータ、§：Kbl:JWの対照(最小-最大)データを除き同腹児単位の平均値±標準偏差

Table 2-2-2 SP 試験：胎児死亡関連パラメーター

系統	Kbl:JW				Kbl:NZW			
	群	対照	サリドマイド			対照	サリドマイド	
投与量 (mg/kg/日)		0	50	150	300	0	150	300
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 7-8 日		妊娠 7-12 日	妊娠 7-8 日	
妊娠動物数		5	5	5	5	6	5	8
流産動物数		0	0	0	0	1	0	3
早産動物数		0	0	0	0	1	0	0
生存胎児数(総数)		39	35	37	40	42	39	31
着床後死亡率 (%)§		4.7±6.5	7.8±8.3	17.2±15.5	17.9±23.7	2.5±5.0	12.7±19.9	35.0±30.4
死亡胚・胎児数								
吸収胚数§		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
胎盤遺残数§		0.4±0.5	0.4±0.9	1.0±1.0	1.2±1.3	0.3±0.5	0.8±1.3	3.2±3.7
死亡胎児数§		0.0±0.0	0.4±0.5	0.2±0.4	0.4±0.9	0.0±0.0	0.6±0.9	0.2±0.4
生存胎児数(平均値)§		7.8±0.8	7.0±2.9	7.4±3.0	8.0±3.1	10.5±2.4	7.8±2.7	6.2±3.3
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 9-10 日		妊娠 7-12 日	妊娠 9-10 日	
妊娠動物数		5	4	4	5	6	4	5
流産動物数		0	0	0	0	1	0	0
早産動物数		0	0	0	0	1	0	0
生存胎児数(総数)		39	30	26	34	42	31	40
着床後死亡率 (%)§		4.7±6.5	0.0±0.0	5.6±6.6	7.1±6.7	2.5±5.0	6.3±12.5	15.8±11.4
死亡胚・胎児数								
吸収胚数§		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
胎盤遺残数§		0.4±0.5	0.0±0.0	0.3±0.5	0.4±0.5	0.3±0.5	0.3±0.5	0.4±0.9
死亡胎児数§		0.0±0.0	0.0±0.0	0.3±0.5	0.2±0.4	0.0±0.0	0.3±0.5	1.0±1.2
生存胎児数(平均値)§		7.8±0.8	7.5±3.1	6.5±1.9	6.8±2.9	10.5±2.4	7.8±2.2	8.0±2.7
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 11-12 日		妊娠 7-12 日	妊娠 11-12 日	
妊娠動物数		5	5	4	4	6	5	4
流産動物数		0	0	0	0	1	0	0
早産動物数		0	0	0	0	1	0	0
生存胎児数(総数)		39	46	34	34	42	48	39
着床後死亡率 (%)§		4.7±6.5	7.7±7.8	0.0±0.0	6.3±7.4	2.5±5.0	4.0±5.6	15.0±19.1
死亡胚・胎児数								
吸収胚数§		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
胎盤遺残数§		0.4±0.5	0.2±0.4	0.0±0.0	0.3±0.5	0.3±0.5	0.4±0.5	1.0±1.2
死亡胎児数§		0.0±0.0	0.6±0.9	0.0±0.0	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
生存胎児数(平均値)§		7.8±0.8	9.2±2.2	8.5±3.1	8.5±1.9	10.5±2.4	9.6±1.1	9.8±5.9

SP：感受期、§：同腹児単位の平均値±標準偏差

胎児外表異常

奇形は両系統とも主に頭部、四肢および尾で発生した。EFD 試験においては、Kbl:JW 系統で頭部奇形として神経管欠損症である外脳および髄膜脳瘤が、Kbl:NZW 系統で眼部隆起扁平および小顎がみられた(Table 2-2-3)。SP 試験では神経管欠損症(無脳、髄膜脳瘤と髄膜瘤)が、妊娠 7-8 日の Kbl:JW ウサギの 150 および 300 mg/kg 投与群ならびに Kbl:NZW ウサギの 300 mg/kg 投与群でみられた(Table 2-2-4)。EFD 試験で観察された四肢奇形には、異常回転手、欠指、多指、短指や指形態異常などが含まれ、これらは SP 試験の妊娠 9-10 日投与群において両系統で観察された。Kbl:JW 系統では前肢の異常回転手の発生頻度が後肢での発生頻度よりも高かったが、Kbl:NZW 系統では EFD および SP 試験のいずれも発生頻度は前肢と後肢で同等であった。指奇形の発生頻度は、EFD 試験では両系統で同等であったが、SP 試験の 300 mg/kg 群では、Kbl:JW 系統の方が Kbl:NZW 系統よりも高かった。両系統における尾の奇形の主要な種類は、短尾であった。SP 試験では、両系統とも短尾は主に妊娠 9-10 日投与群にみられ、Kbl:JW 系統での発生頻度は、EFD および SP 試験のいずれも Kbl:NZW 系統よりも高かった。妊娠 11-12 日投与群は、いずれの系統にも外表奇形はみられなかった。SP 試験の各投与量における奇形発生頻度は、用量に伴って増加した。

Table 2-2-3 胎児外表異常 – EFD 試験

系統名	Kbl:JW		Kbl:NZW		
	群	対照†	サリドマイド‡	対照	サリドマイド
投与量 (mg/kg/日)		0	300	0	300
胎児数		39–55	28	19	20
外表異常	%(n)	0.0 (0)	96.9 (27)	5.0 (1)	91.7 (18)
外脳	%(n)	–	6.3 (2)	–	–
髄膜脳瘤	%(n)	–	12.5 (1)	–	–
眼部隆起扁平	%(n)	–	–	–	16.7 (2)
小上顎	%(n)	–	–	–	22.2 (3)
異常回転手(前肢)	%(n)	–	66.3 (16)	5.0 (1)	35.4 (7)
欠指(前肢)	%(n)	–	60.0 (14)	–	66.7 (13)
短指(前肢)	%(n)	–	25.0 (5)	–	26.4 (5)
指形態異常(前肢)	%(n)	–	3.1 (1)	–	16.0 (3)
異常回転手(後肢)	%(n)	–	28.1 (3)	–	37.5 (6)
欠指(後肢)	%(n)	–	25.0 (2)	–	–
多指(後肢)	%(n)	–	6.3 (2)	–	8.3 (1)
短指(後肢)	%(n)	–	12.5 (1)	–	2.1 (1)
短尾	%(n)	–	81.3 (22)	–	35.4 (5)
全身性浮腫	%(n)	–	–	5.0 (1)	–

EFD：胚・胎児発生、†：サリドマイドの胚・胎児発生毒性試験と同年に実施された5つのEFD試験の最小–最大値、
‡：第2章2-1の2007年の試験のデータ、%：同腹児単位の平均値、(n)：異常発生胎児数、–：異常なし

Table 2-2-4 胎児外表異常 – SP 試験

系統名	Kbl:JW				Kbl:NZW			
	群	対照	サリドマイド			対照	サリドマイド	
投与量 (mg/kg/日)		0	50	150	300	0	150	300
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 7-8 日		妊娠 7-12 日	妊娠 7-8 日	
胎児数		39	35	37	40	42	39	31
外表異常	%(n)	2.9 (1)	0.0 (0)	12.2 (5)	16.8 (8)	0.0 (0)	3.3 (1)	40.7 (13)s
無脳	%(n)	-	-	2.5 (1)	2.0 (1)	-	-	-
髄膜脳瘤	%(n)	-	-	-	8.6 (4)s	-	-	25.3 (10)s
髄膜瘤	%(n)	-	-	7.2 (3)	6.1 (3)	-	-	2.0 (1)
口蓋垂裂	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
口蓋ヒダ異常	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
小上顎	%(n)	2.9 (1)	-	2.5 (1)	-	-	-	-
小下顎	%(n)	2.9 (1)	-	2.5 (1)	-	-	-	-
顔面裂	%(n)	-	-	2.5 (1)	2.5 (1)	-	-	-
異常回転手(前肢)	%(n)	-	-	-	-	-	-	6.7 (1)
腹壁破裂	%(n)	-	-	-	-	-	3.3 (1)	-
肛門狭窄	%(n)	-	-	-	-	-	3.3 (1)	-
無尾	%(n)	-	-	-	-	-	3.3 (1)	-
短尾	%(n)	2.9 (1)	-	2.5 (1)	-	-	-	-
屈曲尾	%(n)	-	-	2.5 (1)	-	-	-	6.7 (1)
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 9-10 日		妊娠 7-12 日	妊娠 9-10 日	
胎児数		39	30	26	34	42	31	40
外表異常	%(n)	2.9 (1)	16.7 (2)	51.3 (11)s	83.3 (27)s	0.0 (0)	8.3 (2)	17.8 (7)
口蓋垂裂	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
口蓋ヒダ異常	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
小上顎	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
小下顎	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
異常回転手(前肢)	%(n)	-	-	8.6 (2)	51.1 (14)s	-	-	5.6 (2)
異常回転手(後肢)	%(n)	-	-	-	-	-	-	11.7 (4)
欠指(前肢)	%(n)	-	-	-	53.3 (15)s	-	-	6.7 (2)
短指(前肢)	%(n)	-	8.3 (1)	8.6 (2)	26.7 (4)	-	8.3 (2)	-
指形態異常(前肢)	%(n)	-	-	20.0 (4)	16.1 (7)s	-	-	4.4 (2)
短尾	%(n)	2.9 (1)	8.3 (1)	27.8 (6)	76.1 (24)s	-	-	10.6 (4)s
屈曲尾	%(n)	-	8.3 (1)	5.0 (1)	-	-	-	-
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 11-12 日		妊娠 7-12 日	妊娠 11-12 日	
胎児数		39	46	34	34	42	48	39
外表異常	%(n)	2.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
口蓋垂裂	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
口蓋ヒダ異常	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
小上顎	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
小下顎	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
短尾	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-

SP : 感受期、% : 同腹児単位の平均値、(n) : 異常発生胎児数、- : 異常なし、
s : 対照群との間に有意差有り(p≤0.05、Shirley-Williams検定)

胎児内臓異常及び変異

EFD 試験における主要な奇形は、水頭症、心血管奇形、肺中間葉欠損、横隔膜ヘルニアおよび肝臓分葉異常であり、主な変異は肺葉間裂低形成および肺中間葉小型化であった(Table 2-2-5)。肺中間葉欠損および横隔膜ヘルニアの発生頻度は、Kbl:NZW 系統の方が Kbl:JW 系統よりも高値または高値傾向を示した。一方で、肺葉間裂低形成の発生頻度は、Kbl:JW 系統の方が Kbl:NZW 系統よりも高かった。胃小型化は、Kbl:NZW ウサギ胎児の半数例でみられた。SP 試験では、両系統の妊娠 7-8 日投与群で主として水頭症および心血管系奇形が観察された(Table 2-2-6)。150 mg/kg 投与群における水頭症の発生頻度は、Kbl:JW 系統の方が Kbl:NZW 系統よりも高値傾向であった。肺中間葉欠損、肺葉間裂低形成や肺中間葉小型化などの肺の異常および変異は、投与期間の違いにかかわらず両系統とも全投与群で観察された(Table 2-2-5 および 6)。肺中間葉欠損または肺中間葉小型化の合計の発生頻度は、Kbl:NZW 系統の方が Kbl:JW 系統より高値傾向であった。横隔膜ヘルニアは、Kbl:NZW 系統で妊娠 7-8 および 9-10 日投与群にみられた。SP 試験の 150 および 300 mg/kg 投与群の奇形および変異発生頻度は、多くの場合で同等かもしくは用量に伴って増加した。Kbl:JW 系統のみ実施した 50 mg/kg 投与群の発生頻度は、顕著に低かった。

Table 2-2-5 胎児内臓異常・変異 - EFD 試験

系統名	Kbl:JW		Kbl:NZW		
	群	対照†	サリドマイド‡	対照	サリドマイド
投与量 (mg/kg/日)		0	300	0	300
胎児数		39-55	28	19	20
内臓異常	%(n)	0.0-1.9 (1)	83.1 (22)	30.0 (6)	95.8 (19)
水頭症	%(n)	-	37.5 (9)	-	28.5 (5)
小眼球	%(n)	-	2.5 (1)	-	13.9 (2)
心室中隔膜性部欠損	%(n)	0.0-1.9 (1)	21.9 (4)	-	4.2 (1)
大動脈弓離断	%(n)	-	5.6 (2)	-	-
騎乗大動脈	%(n)	-	6.3 (2)	-	4.2 (1)
肺動脈幹狭窄	%(n)	-	9.4 (3)	-	4.2 (1)
食道背方鎖骨下動脈	%(n)	-	25.0 (2)	-	-
肺中間葉欠損	%(n)	-	29.4 (10)	30.0 (6)	77.1 (15)
肺小型化	%(n)	0.0-1.9 (1)	3.1 (1)	-	20.8 (2)
胸部液体貯留	%(n)	-	3.1 (1)	-	-
横隔膜ヘルニア	%(n)	0.0-1.9 (1)	9.4 (3)	-	27.1 (5)
胃小型化	%(n)	-	-	-	50.7 (9)
肝臓分葉異常	%(n)	-	41.3 (10)	-	22.9 (5)
胆嚢小型化	%(n)	-	5.6 (2)	-	4.2 (1)
内臓変異	%(n)	0.0 (0)	73.1 (18)	0.0 (0)	29.2 (8)
肺葉間裂低形成	%(n)	-	70.6 (17)	-	25.0 (7)
肺中間葉小型化	%(n)	-	11.9 (4)	-	6.3 (2)

EFD：胚・胎児発生、†：サリドマイドの胚・胎児発生毒性試験と同年に実施された5つのEFD試験の最小-最大値、
‡：第2章2-1の2007年の試験のデータ、%：同腹児単位の平均値、(n)：異常または変異発生胎児数、
-：異常または変異なし

Table 2-2-6 胎児内臓異常・変異 - SP 試験

系統名	Kbl:JW				Kbl:NZW			
	群	対照	サリドマイド			対照	サリドマイド	
投与量 (mg/kg/日)		0	50	150	300	0	150	300
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 7-8 日		妊娠 7-12 日	妊娠 7-8 日	
胎児数		39	35	37	40	42	39	31
内臓異常	%(n)	2.9 (1)	19.4 (6)s	61.5 (23)s	62.5 (25)s	3.1 (1)	54.0 (19)s	67.1 (21)s
水頭症	%(n)	-	12.9 (3)	48.6 (19)s	43.7 (20)s	3.1 (1)	11.0 (4)	27.1 (11)
小眼球	%(n)	-	-	1.8 (1)	1.8 (1)	-	-	3.3 (1)
心室中隔膜性部欠損	%(n)	-	-	-	5.5 (3)	-	-	-
騎乗大動脈	%(n)	-	-	-	3.6 (2)	-	-	-
肺動脈幹狭窄	%(n)	-	-	-	1.8 (1)	-	-	-
食道背方鎖骨下動脈	%(n)	-	2.0 (1)	4.4 (2)	-	-	11.1 (5)	13.3 (2)
食道背方大動脈弓	%(n)	-	-	-	1.8 (1)	-	-	-
肺中間葉欠損	%(n)	-	2.0 (1)	6.7 (1)	12.1 (4)	-	29.6 (8)s	38.0 (12)s
肺小型化	%(n)	-	-	-	-	-	4.0 (2)	2.2 (1)
胸腺小型化	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
横隔膜ヘルニア	%(n)	-	-	-	-	-	4.0 (2)	2.2 (1)
肝臓嚢胞	%(n)	-	-	-	1.8 (1)	-	-	-
胆嚢憩室	%(n)	-	2.5 (1)	-	-	-	-	-
腎臓欠損	%(n)	-	-	-	6.7 (1)	-	3.3 (1)	6.7 (1)
腎臓大型化	%(n)	-	-	-	-	-	-	6.7 (1)
内臓変異	%(n)	2.9 (1)	0.0 (0)	1.8 (1)	9.8 (5)	0.0 (0)	5.3 (2)	34.2 (8)s
肺葉間裂低形成	%(n)	2.9 (1)	-	1.8 (1)	-	-	-	-
肺中間葉小型化	%(n)	2.9 (1)	-	-	6.1 (3)	-	5.3 (2)	34.2 (8)s
肝葉間裂低形成	%(n)	-	-	-	3.6 (2)	-	-	-
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 9-10 日		妊娠 7-12 日	妊娠 9-10 日	
胎児数		39	30	26	34	42	31	40
内臓異常	%(n)	2.9 (1)	0.0 (0)	6.3 (2)	5.6 (2)	3.1 (1)	8.3 (2)	17.7 (6)
水頭症	%(n)	-	-	-	-	3.1 (1)	-	-
大血管転換	%(n)	-	-	-	-	-	4.2 (1)	2.5 (1)
肺中間葉欠損	%(n)	-	-	2.8 (1)	5.6 (2)	-	4.2 (1)	8.0 (2)
胸腺小型化	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
横隔膜ヘルニア	%(n)	-	-	-	-	-	-	9.0 (3)s
胆嚢二分	%(n)	-	-	3.6 (1)	-	-	-	-
胆嚢小型化	%(n)	-	-	-	-	-	-	2.2 (1)
内臓変異	%(n)	2.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	18.9 (5)	0.0 (0)	25.6 (7)	16.3 (5)
肺葉間裂低形成	%(n)	2.9 (1)	-	-	16.7 (4)	-	3.6 (1)	6.7 (2)
肺中間葉小型化	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	22.0 (6)	9.7 (3)
肝葉間裂低形成	%(n)	-	-	-	6.7 (3)	-	-	-
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 11-12 日		妊娠 7-12 日	妊娠 11-12 日	
胎児数		39	46	34	34	42	48	39
内臓異常	%(n)	2.9 (1)	0.0 (0)	15.3 (3)	2.5 (1)	3.1 (1)	12.2 (6)	25.0 (12)
無眼球	%(n)	-	-	-	-	-	2.5 (1)	-
水頭症	%(n)	-	-	-	-	3.1 (1)	-	-
胸腺小型化	%(n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
肺中間葉欠損	%(n)	-	-	15.3 (3)	2.5 (1)	-	9.7 (5)	25.0 (12)s
内臓変異	%(n)	2.9 (1)	3.3 (1)	0.0 (0)	2.5 (1)	0.0 (0)	4.3 (2)	4.5 (2)
肺葉間裂低形成	%(n)	2.9 (1)	3.3 (1)	-	-	-	-	-
肺中間葉小型化	%(n)	2.9 (1)	-	-	2.5 (1)	-	4.3 (2)	4.5 (2)

SP: 感受期、%: 同腹児単位の平均値、(n): 異常または変異発生胎児数、-: 異常または変異なし、s: 対照群との間に有意差有り (p<0.05、Shirley-Williams検定)

胎児骨格異常

主要な異常は、頭部、四肢および尾の中軸骨格で観察された。EFD 試験では、頭部異常として前頭骨や鼻骨間の縫合異常、頭蓋骨や上顎骨などの形態異常が両系統にみられた(Table 2-2-7)。SP 試験では、いずれの系統でも主に妊娠 7-8 日投与群に同種の頭部異常がみられ、150 mg/kg 投与時の Kbl:JW 系統の発生頻度は Kbl:NZW 系統よりも高かった(Table 2-2-8)。EFD 試験における四肢奇形は、橈骨、大腿骨および脛骨の欠損または短小ならびに指節骨の欠損や形態異常であった。SP 試験では、同じ種類の四肢奇形が妊娠 9-10 日投与群にみられた。EFD 試験において Kbl:JW 系統の橈骨の欠損および短小(前肢奇形)の合計の発生頻度は、脛骨の欠損および短小(後肢奇形)の発生頻度よりも高かったが、Kbl:NZW 系統では同等であった。SP 試験では、橈骨の欠損および短小は Kbl:JW 系統にのみ、脛骨の欠損および短小は Kbl:NZW 系統にのみ観察された。前肢および後肢での指節骨欠損の発生頻度は、EFD 試験では両系統で同等であったが、SP 試験の 300 mg/kg 群では Kbl:JW 系統の方が Kbl:NZW 系統よりも高かった。EFD 試験では、尾の中軸骨格における主な奇形は、仙椎癒合、尾椎形態異常または癒合および尾椎体配列異常であった。同種の奇形は、SP 試験の妊娠 9-10 日投与群で観察された。これらの奇形の発生頻度は、EFD および SP 試験のいずれにおいても、Kbl:JW 系統の方が Kbl:NZW 系統よりも高かった。妊娠 11-12 日投与群では、両系統とも投与に起因した骨格異常はみられなかった。Kbl:JW の妊娠 7-8 日の 150 および 300 mg/kg 投与群の総発生頻度が同等であった以外は、両系統の奇形発生頻度は用量に伴って増加した。

Table 2-2-7 胎児骨格異常 – EFD 試験

系統名	Kbl:JW		Kbl:NZW		
	群	対照†	サリドマイド‡	対照	サリドマイド
投与量 (mg/kg/日)		0	300	0	300
胎児数		39-55	28	19	20
骨格異常	% (n)	0.0-4.8 (3)	94.4 (26)	0.0 (0)	100.0 (20)
前頭骨縫合異常	% (n)	-	51.3 (14)	-	45.1 (8)
頭蓋骨形態異常	% (n)	-	15.6 (2)	-	16.7 (2)
頭蓋顔面骨形態異常	% (n)	-	3.1 (1)	-	-
頭部骨縫合異常	% (n)	0.0-3.2 (2)	-	-	-
鼻骨間縫合異常	% (n)	-	43.1 (8)	-	22.2 (3)
上顎骨形態異常	% (n)	-	3.1 (1)	-	10.4 (2)
頭蓋骨欠損	% (n)	-	3.1 (1)	-	-
頭蓋顔面骨部分欠損	% (n)	-	43.8 (8)	-	-
上顎骨小型化	% (n)	-	-	-	18.1 (3)
胸骨分節癒合	% (n)	0.0-1.9 (1)	-	-	22.2 (3)
肋骨短小	% (n)	0.0-1.7 (1)	-	-	-
胸椎弓欠損	% (n)	0.0-2.8 (1)	-	-	-
橈骨欠損	% (n)	-	15.6 (2)	-	16.7 (2)
橈骨短小	% (n)	-	33.1 (8)	-	14.6 (4)
大腿骨欠損	% (n)	-	12.5 (1)	-	-
大腿骨短小	% (n)	-	25.0 (2)	-	8.3 (1)
脛骨欠損	% (n)	-	25.0 (2)	-	41.7 (6)
脛骨短小	% (n)	-	3.1 (1)	-	4.2 (1)
腓骨彎曲	% (n)	-	25.0 (2)	-	8.3 (1)
恥骨欠損	% (n)	-	12.5 (1)	-	8.3 (1)
指節骨欠損(前肢)	% (n)	-	68.8 (17)	-	66.7 (12)
指節骨欠損(後肢)	% (n)	-	25.0 (2)	-	16.7 (2)
指節骨形態異常(前肢)	% (n)	-	-	-	5.6 (1)
指節骨過剰(後肢)	% (n)	-	3.1 (1)	-	-
仙椎癒合	% (n)	-	25.0 (2)	-	-
尾椎形態異常	% (n)	-	23.8 (9)	-	-
尾椎癒合	% (n)	-	39.4 (7)	-	39.6 (8)
尾椎体配列異常	% (n)	-	12.5 (4)	-	2.1 (1)

EFD : 胚・胎児発生、† : サリドマイドの胚・胎児発生毒性試験と同年に実施された5つのEFD試験の最小-最大値、
‡ : 第2章2-1の2007年の試験のデータ、% : 同腹児単位の平均値、(n) : 異常発生胎児数、- : 異常なし

Table 2-2-8 胎児骨格異常 – SP 試験

系統名	Kbl:JW				Kbl:NZW			
	群	対照	サリドマイド			対照	サリドマイド	
投与量 (mg/kg/日)		0	50	150	300	0	150	300
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 7-8 日		妊娠 7-12 日	妊娠 7-8 日	
胎児数		39	35	37	40	42	39	31
骨格異常	% (n)	2.9 (1)	10.5 (4)	57.7 (22)s	51.2 (19)s	2.1 (1)	15.7 (5)	54.4 (19)s
頭部骨縫合異常	% (n)	-	-	-	-	2.1 (1)	-	-
前頭骨縫合異常	% (n)	-	4.0 (1)	29.6 (12)s	28.5 (10)s	-	-	7.8 (3)
前頭骨癒合	% (n)	2.9 (1)	-	17.3 (6)	5.5 (3)	-	5.0 (1)	-
前頭骨鼻骨癒合	% (n)	-	-	12.4 (5)s	6.8 (3)s	-	-	4.0 (2)
頭蓋骨形態異常	% (n)	-	-	-	6.3 (3)s	-	-	25.3 (10)s
頭蓋顔面骨形態異常	% (n)	-	-	2.5 (1)	-	-	-	-
鼻骨間縫合異常	% (n)	2.9 (1)	-	5.2 (2)	-	-	2.0 (1)	2.0 (1)
鼻骨癒合	% (n)	-	4.0 (1)	2.5 (1)	-	-	5.0 (1)	2.0 (1)
頭蓋骨欠損	% (n)	-	-	5.0 (2)	8.0 (4)	-	-	-
上顎骨形態異常	% (n)	-	-	-	-	-	5.0 (1)	-
肋骨癒合	% (n)	-	-	-	-	-	3.3 (1)	-
胸骨分節癒合	% (n)	-	4.0 (2)	-	-	-	2.0 (1)	-
胸椎分節障害	% (n)	-	2.5 (1)	-	-	-	-	-
脛骨欠損	% (n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
腰椎形態異常	% (n)	-	-	-	-	-	3.3 (1)	-
仙椎癒合	% (n)	-	-	-	6.7 (1)	-	-	-
仙椎形態異常	% (n)	-	-	-	-	-	3.3 (1)	-
尾椎形態異常	% (n)	-	-	-	-	-	3.3 (1)	6.7 (1)
尾椎癒合	% (n)	-	-	2.5 (1)	3.6 (2)	-	-	-
尾椎配列異常	% (n)	-	-	-	-	-	-	6.7 (1)
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 9-10 日		妊娠 7-12 日	妊娠 9-10 日	
胎児数		39	30	26	34	42	31	40
骨格異常	% (n)	2.9 (1)	27.8 (6)s	39.8 (10)s	70.6 (22)s	2.1 (1)	14.2 (4)	24.4 (10)
前頭骨縫合異常	% (n)	-	-	-	7.8 (3)	-	-	-
頭部骨縫合異常	% (n)	-	-	-	-	2.1 (1)	3.6 (1)	-
前頭骨癒合	% (n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
鼻骨間縫合異常	% (n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	3.3 (1)
頭蓋骨欠損	% (n)	-	-	-	-	-	-	2.2 (1)
胸骨分節癒合	% (n)	-	5.3 (2)	-	4.4 (2)	-	-	-
胸椎欠損	% (n)	-	-	-	-	-	-	1.7 (1)
肋骨数減少	% (n)	-	-	-	-	-	-	1.7 (1)
上腕骨短小	% (n)	-	-	-	2.2 (1)	-	-	-
橈骨欠損	% (n)	-	-	-	23.3 (6)s	-	-	-
橈骨短小	% (n)	-	-	-	36.7 (9)s	-	-	-
脛骨欠損	% (n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	6.7 (2)
脛骨短小	% (n)	-	-	-	-	-	-	7.2 (3)s
腓骨短小	% (n)	-	-	-	2.2 (1)	-	-	-
恥骨欠損	% (n)	-	-	-	-	-	-	3.3 (1)
指節骨欠損(前肢)	% (n)	-	-	8.6 (2)	54.4 (15)s	-	8.3 (2)	6.7 (2)
指節骨過剰(前肢)	% (n)	-	-	10.0 (2)	4.7 (2)	-	-	-
腰椎欠損	% (n)	-	-	-	3.3 (1)	-	-	2.2 (1)
尾椎形態異常	% (n)	-	11.5 (2)	-	23.6 (7)s	-	-	-
尾椎癒合	% (n)	-	-	24.9 (6)s	8.9 (3)s	-	2.3 (1)	1.7 (1)
尾椎配列異常	% (n)	-	11.1 (2)	12.7 (4)	4.4 (2)	-	-	3.3 (2)
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 11-12 日		妊娠 7-12 日	妊娠 11-12 日	
胎児数		39	46	34	34	42	48	39
骨格異常	% (n)	2.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	2.5 (1)	2.1 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
前頭骨癒合	% (n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-
頭部骨縫合異常	% (n)	-	-	-	-	2.1 (1)	-	-
鼻骨間縫合異常	% (n)	2.9 (1)	-	-	2.5 (1)	-	-	-
脛骨欠損	% (n)	2.9 (1)	-	-	-	-	-	-

SP : 感受期、% : 同腹児単位の平均値、(n) : 異常発生胎児数、- : 異常なし、
s : 対照群との間に有意差有り (p<0.05、Shirley-Williams検定)

胎児骨格変異

EFD 試験では、両系統とも対照群および投与群の間に骨格変異の発生頻度および種類に差はなかった(Table 2-2-9)。SP 試験では、Kbl:NZW 系統の妊娠 9-10 日投与群の総変異発生頻度および完全過剰肋骨の発生頻度は有意な低値を示し、腰椎数変異は観察されなかった(Table 2-2-10)。いずれの系統にも変異の発生頻度と用量との関連性はみられなかった。

Table 2-2-9 胎児骨格変異 – EFD 試験

系統名	Kbl:JW		Kbl:NZW		
	群	対照†	サリドマイド‡	対照	サリドマイド
投与量 (mg/kg/日)		0	300	0	300
胎児数		39-55	28	19	20
骨格変異	%(n)	22.0 (10)-41.3 (20)	28.8 (10)	78.3 (15)	79.2 (16)
頸肋	%(n)	2.5 (1)-21.5 (10)	2.5 (1)	-	-
完全過剰肋骨	%(n)	3.7 (2)-12.1 (6)	-	57.8 (11)	66.7 (14)
短小過剰肋骨	%(n)	12.9 (5)-16.0 (9)	23.1 (8)	20.6 (4)	18.1 (3)
胸骨分節糸状癒合	%(n)	0.0-2.4 (1)	3.1 (1)	-	2.1 (1)
胸骨分節二分骨化	%(n)	-	2.5 (1)	-	4.2 (1)
胸椎体二分骨化	%(n)	0.0-2.8 (1)	-	-	-
腰椎数変異	%(n)	0.0-12.5 (5)	-	-	11.1 (2)

EFD：胚・胎児発生、†：サリドマイドの胚・胎児発生毒性試験と同年に実施された5つのEFD試験の最小-最大値、‡：第2章2-1の2007年の試験のデータ、%：同腹児単位の平均値、(n)：変異発生胎児数、-：変異なし

Table 2-2-10 胎児骨格変異 – SP 試験

系統名	Kbl:JW				Kbl:NZW			
	群	対照	サリドマイド			対照	サリドマイド	
投与量 (mg/kg/日)		0	50	150	300	0	150	300
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 7-8 日		妊娠 7-12 日	妊娠 7-8 日	
胎児数		39	35	37	40	42	39	31
骨格変異	% (n)	18.2 (7)	28.7 (10)	56.7 (21)	21.4 (11)	81.9 (35)	84.9 (33)	100.0 (31)s
頸椎弓双状	% (n)	-	-	2.2 (1)	-	-	-	-
頸肋	% (n)	-	4.0 (1)	3.3 (1)	2.0 (1)	3.1 (1)	8.0 (4)	-
完全過剰肋骨	% (n)	5.4 (2)	6.0 (3)	27.0 (10)	11.8 (6)	63.1 (27)	67.8 (25)	82.2 (26)
短小過剰肋骨	% (n)	12.9 (5)	18.7 (6)	27.0 (12)	7.8 (4)	22.5 (10)	26.4 (12)	25.3 (8)
胸骨分節階段状	% (n)	-	2.0 (1)	9.2 (2)	1.8 (1)	-	7.2 (2)	6.7 (1)
胸骨分節糸状癒合	% (n)	-	-	-	-	-	2.0 (1)	-
腰椎数変異	% (n)	-	-	25.2 (9)	7.5 (4)	42.4 (17)	39.6 (13)	53.8 (19)
仙椎腰椎化	% (n)	-	-	2.2 (1)	2.5 (1)	5.2 (2)	2.0 (1)	-
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 9-10 日		妊娠 7-12 日	妊娠 9-10 日	
胎児数		39	30	26	34	42	31	40
骨格変異	% (n)	18.2 (7)	37.2 (10)	29.1 (7)	20.0 (5)	81.9 (35)	38.1 (12)s	28.3 (13)s
頸肋	% (n)	-	13.9 (3)	-	12.2 (2)	3.1 (1)	7.1 (2)	2.5 (1)
完全過剰肋骨	% (n)	5.4 (2)	-	5.0 (1)	-	63.1 (27)	10.4 (4)s	9.7 (5)s
短小過剰肋骨	% (n)	12.9 (5)	-	24.1 (6)	3.3 (1)	22.5 (10)	19.3 (6)	15.0 (7)
胸骨分節余剰骨化片	% (n)	-	24.2 (5)	-	-	-	-	-
胸骨分節糸状癒合	% (n)	-	2.5 (1)	-	4.4 (2)	-	3.6 (1)	-
胸骨分節二分骨化	% (n)	-	5.0 (2)	-	-	-	-	-
腰椎仙椎化	% (n)	-	-	-	-	-	-	4.4 (2)
腰椎数変異	% (n)	-	-	-	-	42.4 (17)	-	-
仙椎腰椎化	% (n)	-	-	-	-	5.2 (2)	-	-
投与期間		妊娠 7-12 日		妊娠 11-12 日		妊娠 7-12 日	妊娠 11-12 日	
胎児数		39	46	34	34	42	48	39
骨格変異	% (n)	18.2 (7)	21.1 (10)	11.8 (3)	9.8 (3)	81.9 (35)	56.5 (26)	53.4 (25)
頸肋	% (n)	-	3.3 (2)	-	4.2 (1)	3.1 (1)	2.0 (1)	3.1 (1)
完全過剰肋骨	% (n)	5.4 (2)	4.4 (2)	-	-	63.1 (27)	28.8 (13)	43.5 (20)
短小過剰肋骨	% (n)	12.9 (5)	15.6 (7)	11.8 (3)	5.6 (2)	22.5 (10)	28.2 (13)	12.7 (7)
腰椎仙椎化	% (n)	-	1.7 (1)	-	-	-	-	-
腰椎数変異	% (n)	-	-	-	-	42.4 (17)	4.4 (2)	24.9 (12)
仙椎腰椎化	% (n)	-	-	-	-	5.2 (2)	-	-

SP : 感受期、% : 同腹児単位の平均値、(n) : 変異発生胎児数、- : 変異なし、

s : 対照群との間に有意差有り (p≤0.05、Shirley-Williams検定)

トキシコキネティクス

血漿中のサリドマイド濃度の Cmax (血漿中濃度の最高値)および AUC0-24h (薬物投与から 24 時間後までの血中濃度-時間曲線下面積、薬物の吸収量の指標)は、両系統とも用量に依存して増加し、Kbl:JW 系統の 150 mg/kg 以上の投与群の Tmax (投与後に血漿中濃度が最高値を示した採血時点)はやや延長した(Table 2-2-11 および Fig. 2-2-1)。Kbl:JW および Kbl:NZW 系統ならびに各妊娠日の間には、同一の投与量では Tmax、Cmax および AUC0-24h に関して明らかな差はなかった。従って、胎児死亡や四肢、肺および尾の奇形発生頻度などでみられた系統差は、サリドマイドの血漿中濃度の違いによるものではないと考えられた。

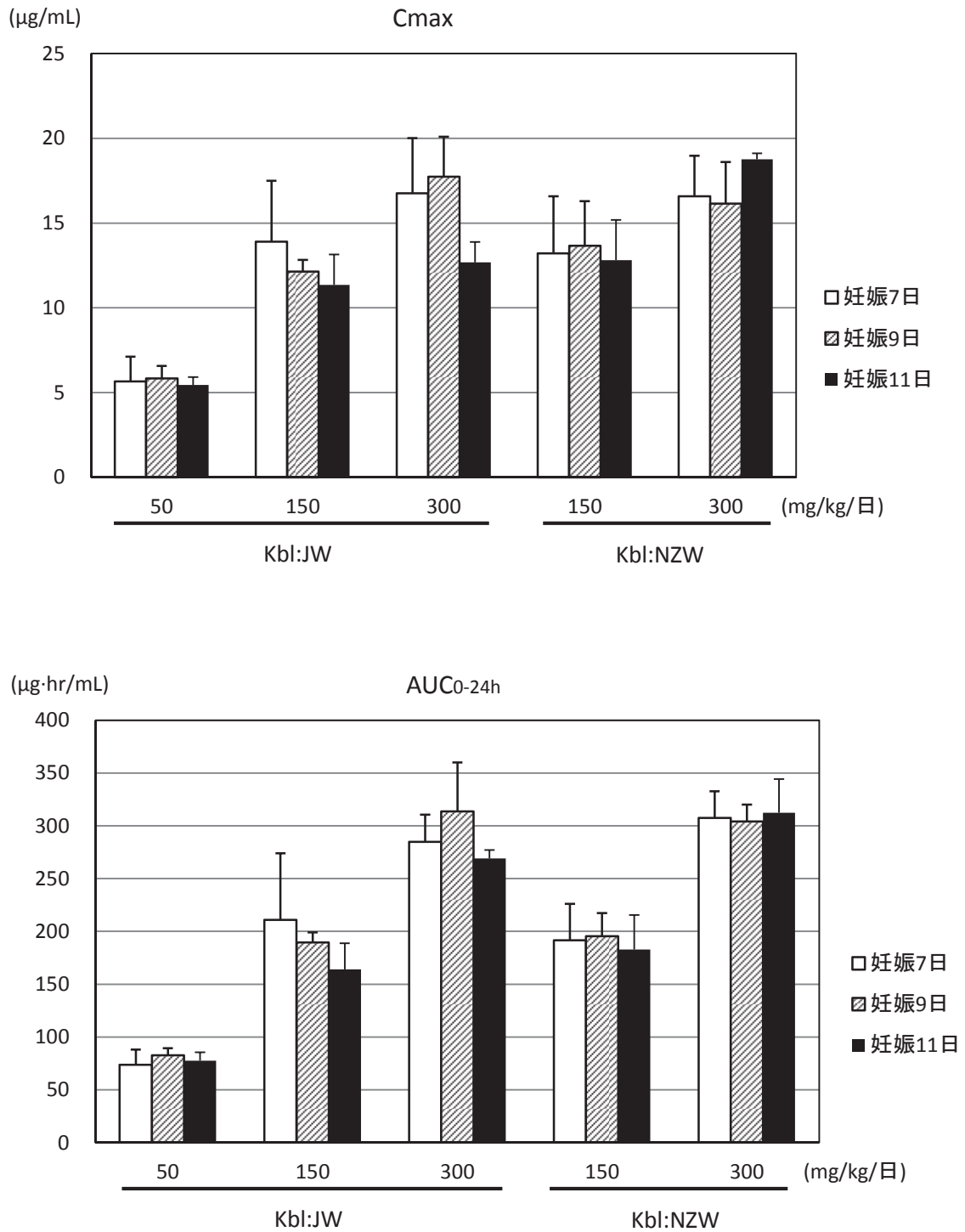
Cmax および AUC0-24h の増加の程度は、両系統とも用量比より低かった。その機序は不明であるが、一般的には、吸収の飽和や血漿蛋白結合の飽和が考えられる。

Table 2-2-11 SP 試験のトキシコキネティクスパラメーター

系統		Kbl:JW			Kbl:NZW	
		50	150	300	150	300
投与量 (mg/kg/日)						
妊娠動物数		4	4	4	4	5
妊娠 7 日	Tmax (hr) §	4.3±2.9	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	6.6±3.1
	Cmax (µg/mL) §	5.65±1.46	13.90±3.60	16.76±3.25	13.21±3.37	16.59±2.39
	AUC0-24h (µg·hr/mL) §	73.8±14.4	210.9±63.1	284.8±25.7	191.7±34.5	307.4±25.3
妊娠動物数		3	4	4	3	4
妊娠 9 日	Tmax (hr) §	4.7±3.1	7.0±2.0	7.0±2.0	8.0±0.0	6.3±3.5
	Cmax (µg/mL) §	5.82±0.75	12.14±0.69	17.74±2.36	13.65±2.64	16.15±2.46
	AUC0-24h (µg·hr/mL) §	82.8±6.5	189.7±9.3	313.7±46.3	195.5±21.9	304.1±16.0
妊娠動物数		4	4	3	4	3
妊娠 11 日	Tmax (hr) §	6.0±2.3	8.0±0.0	13.3±9.2	8.0±0.0	8.0±0.0
	Cmax (µg/mL) §	5.45±0.47	11.36±1.79	12.68±1.20	12.81±2.38	18.76±0.36
	AUC0-24h (µg·h/mL) §	77.6±8.0	164.1±24.6	269.2±7.9	182.8±32.7	312.3±32.1

SP : 感受期、§ : 平均値±標準偏差

Fig. 2-2-1 SP 試験の血漿中薬物濃度



SP : 感受期、C_{max} : 最高血中濃度、AUC_{0-24h} : 投与 24 時間後までの血中濃度-時間曲線下面積

2-2-4 考察

胎児死亡

EFD 試験では、両系統で胎児死亡が増加したが、Kbl:NZW 系統の死亡率は Kbl:JW 系統よりも高かった。SP 試験では Kbl:NZW 系統の死亡率が妊娠 7-8 日の 300 mg/kg 群で増加したが、Kbl:JW 系統の死亡率には影響がなかった。従って、サリドマイドの胚・胎児致死作用は、Kbl:NZW 系統の方が Kbl:JW 系統よりも強いと考えられた。

胎児奇形概要

両系統において、EFD 試験で発生した外表、内臓および骨格異常の種類は、ほぼ一致しており、SP 試験では、同種の奇形が同一の投与量および投与期間において誘発された。しかしながら、四肢、尾および肺などでいくつかの奇形発生頻度に相違がみられた。

四肢奇形

EFD および SP 試験において Kbl:JW 系統では、前肢の異常回転手や橈骨の欠損および短小の発生頻度が後肢の異常回転手や脛骨の欠損および短小の発生頻度よりも高かった。松原らは、300 mg/kg のサリドマイドを妊娠 6-18 日に投与した JW 系統(生産者:セブン産業株式会社)の胎児において、我々の試験における異常回転手(前肢)に相当する前肢拘縮が 51.8%(18/35 胎児)、異常回転手(後肢)に相当する内反足が 28.6%(10/35 胎児)の胎児にみられたことを報告した(Matsubara ら 1983 年)。この前肢拘縮と内反足の発生頻度の違いは、EFD 試験で Kbl:JW 系統にみられた前肢および後肢の異常回転手の発生頻度の違いに類似していた。Christian らは、180 mg/kg のサリドマイドを妊娠 7-19 日に投与した Hra:(NZW)系統の胎児において、橈骨短小(前肢奇形)が 142 胎児中 13 例に、大腿骨短小、脛骨変形および腓骨湾曲(後肢奇形)がそれぞれ、142 胎児中 11、8 および 22 例にみられたことを報告した(Christian ら 2007 年)。これらの骨格奇形の前肢と後肢の頻度差は、我々の EFD 試験の Kbl:NZW 系統の頻度に類似していた。従って、JW の方が NZW ウサギに比べてサリ

ドマイド投与によって異常回転手(前肢)ならびに橈骨短小および欠損などの前肢奇形を発生しやすいと考えられた。

尾奇形

EFD および SP 試験とも外表異常である短尾の発生頻度や尾椎形態異常、尾椎癒合および尾椎体配列異常などの尾の奇形の合計の発生頻度は、Kbl:JWの方がKbl:NZW系統よりも高かった。従って、尾の奇形はKbl:JW系統でより誘発されやすいと考えられ、Kbl:JW系統はKbl:NZW系統と比べてこの種の奇形を検出するのに有用な可能性がある。しかしながら、JWの尾の奇形の発生頻度が常にNZWウサギよりも高値を示すわけではない。例えば、300 mg/kgのサリドマイドを妊娠8-15日に投与したJW系統(生産者不明)において18.2%(8/44例)の胎児に短尾が観察されたことが池田らによって報告されている(Ikedaら1965年)。また、NZWウサギでは、180 mg/kgのサリドマイドを妊娠7-19日に投与したHra:(NZW)系統の142胎児中、短尾が69例、尾椎配列異常が53例、尾椎癒合が54例に観察されている(Christianら2007年)。従って、尾の奇形の発生頻度はJWとNZWウサギの差に関連しているのではなく個々の系統あるいは生産者に由来している可能性がある。

肺奇形および変異

肺中間葉欠損および小型化の合計の発生頻度は、EFDおよびSP試験においてKbl:NZW系統がKbl:JW系統よりも高い傾向を示した。Kbl:JW系統に関する我々の20年以上の背景データにおいて、肺中間葉欠損は1胎児、肺中間葉小型化は2胎児にしか観察されていない(Table 2-1-4および5)。一方で、EFD試験の対照群で肺中間葉欠損はKbl:NZW系統の19胎児中6例でみられ、Hsdlf:NZW系統を使用したE7115(造影剤であるガドベン酸ジメグルミン製剤)のEFD試験において、中間用量群の156胎児中3例と低用量群の148胎児中1例でも観察されている(Okudaraら1999年)。この所見は対照群にはみられていないが、用量相関性がなく、Okudaraらの背景データにもみられていることから、投与起因ではないと判断されている。肺中間葉欠損は、Hra:(NZW)系統の

EFD 試験の対照群の 200 胎児中 2 例でも観察された(Christian ら 2007 年)。これらの結果は、NZW ウサギにおける肺中間葉欠損および小型化の自然発生頻度が JW 系統よりも高いことを示唆している。従って、サリドマイド投与により誘発された肺中間葉欠損および小型化の合計の発生頻度の相違は、遺伝的背景に基づく自然発生頻度の系統差に起因した可能性がある。一方で、肺葉間裂低形成の EFD 試験での発生頻度は Kbl:JW 系統の方が Kbl:NZW 系統よりも高かったが、この傾向は SP 試験では再現されていないことから本質的な系統差ではないと考えられた。

横隔膜ヘルニア

EFD 試験における Kbl:NZW 系統の横隔膜ヘルニアの発生頻度は、Kbl:JW 系統よりも高値傾向を示し、SP 試験では、この所見は Kbl:NZW 系統の妊娠 7-8 および 9-10 日投与群にしかみられなかった。この所見は 50 および 150 mg/kg を投与した我々の予備的な EFD 試験(データ提示せず)ではみられなかったが、180 mg/kg のサリドマイドを妊娠 7-19 日に投与した Hra:(NZW)系統の 142 胎児中 14 例に観察された(Christian ら 2007 年)。従って、サリドマイド投与に起因した横隔膜ヘルニアは NZW 系統で発生しやすいと考えられた。

胃奇形

EFD 試験において胃小型化が Kbl:NZW 系統の約半数例の胎児で観察されたが、Kbl:JW 系統の胎児にはみられず、SP 試験では両系統とも誘発されなかった。Kbl:JW 系統で本所見がみられなかった原因は不明であるが、同様の所見は、200 mg/kg を妊娠 8-11 日に投与したヒマラヤンウサギで胃低形成として記録されている(Sterz ら 1987 年)。従って、本所見はサリドマイドの反復投与によって発生し、Kbl:NZW 系統に特異的な異常ではないと考えられた。

他の奇形および変異

EFD 試験では、外脳および髄膜脳瘤などの神経管欠損が Kbl:JW ウサギにのみ発生した。しかしながら SP 試験では両系統で神経管欠損が観察された。眼部隆起扁平および小顎は EFD 試験に

において Kbl:NZW ウサギにのみ誘発されたが、眼部隆起扁平に関連する小眼は両系統において EFD 試験および SP 試験の 300 mg/kg の妊娠 7-8 日投与群でみられ、小顎は SP 試験では Kbl:JW ウサギの 150 mg/kg 群にのみ観察された。従って、これらの発生頻度の差は両試験間のばらつきの範囲内に含まれており、系統差を示唆する変化ではないと考えられた。

SP 試験では、Kbl:JW ウサギの 150 mg/kg の妊娠 7-8 日投与群における無脳、髄膜瘤、水頭ならびに頭蓋骨および頭部縫合の形態異常などの頭部奇形ならびに同系統の 300 mg/kg の妊娠 9-10 日投与群における欠指および指節骨欠損などの指奇形の発生頻度が Kbl:NZW ウサギより高値を示した。一方、SP 試験のその他の投与量や EFD 試験の結果に明確な発生頻度の差はないことから、これらの相違は系統差を示唆するものではないと判断した。

SP 試験では、Kbl:NZW ウサギの妊娠 9-10 日投与のサリドマイド投与群の合計の変異発生頻度および完全過剰肋骨の発生頻度が対照群に比べて有意に減少し、投与群に腰椎数変異は観察されなかった。しかしながら、これらの変動は、Kbl:NZW ウサギの EFD 試験および Kbl:JW ウサギの試験には認められず、再現性を伴わない生物学的に重要性の乏しい変化と考えられた。

感受期と組織および器官発生との関連性

頭部、尾部および心血管系の奇形の感受期は、それらの組織あるいは器官の初期発生段階である原始線条、神経板、尾芽および両側性心原基などの発生時期と一致すると考えられた(Ronald 2006 年)。異常回転手、橈骨および脛骨の欠損あるいは短小などの四肢奇形の感受期は妊娠 9-10 日であるが、ウサギでは前肢芽および後肢芽の形成はそれぞれ妊娠 10.5-11.0 日に観察され(Ronald 2006 年)、本試験における奇形感受期よりやや遅れていた。しかしながら Fgf8、Fgf10 および Twist などの四肢発生に関連する遺伝子は、妊娠 10 日のウサギ胚の進行帯あるいは外胚葉性頂堤において検出され(Hansen ら 2002 年)、四肢発生は妊娠 10 日以前に始まっていると考えられた。指奇形の感受期は妊娠 9-10 日であり、この時点では指様の構造は観察されないことから、指の形成が始まる以前にサリドマイドに感受性がある過程が存在することが示唆された。肺の奇形感受期は妊娠 7-12 日であり、ほかの奇形に比べて長かった。初期の肺憩室は妊娠 10.5 日に認めら

れ、主要な気管支の分離は妊娠 15 日に観察される(Ronald 2006 年)。理由は不明であるが、肺発生は、頭部、四肢、指および尾の奇形とは異なり、サリドマイドにより長期間にわたって連続的に影響されるものと考えられた。

上記の奇形において、四肢、尾および肺にはサリドマイド投与によって誘発される奇形発生頻度に系統差が存在した。しかしながら、系統差は奇形の発生頻度に関連しており、奇形の感受期に差はなかった。さらに Sivaraman らは、主要な器官形成の開始と終了に相当すると考えられる着床および口蓋閉鎖時期は JW と NZW 系統で同等であることを報告している(Sivaraman ら 2008 年)。従って、本試験でみられた系統差は、組織あるいは器官のサリドマイドに対する反応性の違いに起因するものと考えられた。

JW および NZW ウサギ系統の遺伝的背景

NZW およびダッチ系統間には、耳、眼、胃、大腸、腎臓、心臓、肺および血管系などでサリドマイドにより誘発された奇形に系統差がみられた(Sawin ら 1965 年)。NZW とダッチウサギでみられる系統差は、Kbl:JW と Kbl:NZW ウサギ間でみられる系統差よりも顕著であり、NZW とダッチウサギ間では特定の奇形発生についての有無という質的な差異があったが、Kbl:JW と Kbl:NZW ウサギ間では主に奇形の発生頻度の差であり、サリドマイドへの感受性が異なっていた。一方、系統の遺伝的背景に関し、我々が知る限りダッチと NZW ウサギには系統上の関連性を示唆する文献はないが、JW ウサギは本邦の在来種と NZW およびフレミッシュジャイアントウサギから作出されたことが報告されている(家畜改良センター長野牧場業務課 2007 年)。従って、Kbl:JW と Kbl:NZW ウサギ間の軽度な系統差は、遺伝的背景の類似性を反映している可能性がある。

2-2-5 結論

世界的に使用されている NZW 系統と本邦で頻用されている JW 系統において、サリドマイドを器官形成期に投与した実験および期間を分割して投与した実験を行い、胚・胎児毒性の系統間の違いと共通性を比較検討した。その結果、両系統でサリドマイドにより誘発された形態異常の多くについて、その種類と感受期について共通性が認められ、サリドマイドの催奇形性を評価するという観点からは、両系統の有用性は同等であると結論した。しかし、着床後死亡率、前後肢の奇形や肺中間葉の奇形発生頻度など、一部の測定項目や奇形については系統差がみられ、特にサリドマイドによって誘発される前肢奇形誘発メカニズムの解析には Kbl:JW ウサギの方が有用であると考えられた。

参考文献

Christian MS, Laskin OL, Sharper V, Hoberman A, Stirling DI, Latriano L. 2007. Evaluation of the developmental toxicity of lenalidomide in rabbits. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 80(3):188-207.

Collins MD, Eckhoff C, Weiss R, Resnick E, Nau H, Scott WJ Jr. 2006. Differential teratogenesis of all-trans-retinoic acid administered on gestational day 9.5 to SWV and C57BL/6N mice: emphasis on limb dysmorphism. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 76(2):96-106.

Dawson AB. 1926. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain technology* 1:123-124.

Dekker A, Mehrizi A. 1964. The use of thalidomide as teratogenic agent in rabbits. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115:223-230.

Dunnett CW. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Statist Assoc* 50:1096-121.

Fabro S, Smith RL. 1966. The teratogenic activity of thalidomide in the rabbit. *J Path Bact* 91: 511-519.

Fraser FC, Fainstat TD. 1951. Production of congenital defects in the offspring of pregnant mice treated with cortisone. *Pediatr* 8:527-533.

Hansen JM, Gong SG, Philbert M, Harris C. 2002. Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappaB-dependent limb outgrowth pathway by thalidomide. *Dev Dyn* 225: 186-194.

Hay MF. 1964. Effects of thalidomide on pregnancy in the rabbit. *J Reprod Fertil* 8:59-76.

Ikeda Y, Horiuchi S, Yoshimoto H, Suzuki Y, Furuya T, Kawamata K, Kaneko T. 1965. Examination in rabbit - teratogenicity of thalidomide and aspirin -. *Congenit Anom (Kyoto)* 5: 201-205. (In Japanese)

Ingalls TH, Curley FJ, Zappasodi P. 1964. Thalidomide embryopathy in hybrid rabbits. *New England J Medicine* 271: 441-444.

Matsubara Y, Goto M, Mikami T, Suzuki Y, Chiba T. 1983. Teratogenic effects of thalidomide in the rabbit: difference in susceptibility between two breeds. *Congenit Anom (Kyoto)* 23: 223-229.

Nolen GA. 1969. Variations in teratogenic response to hypervitaminosis A in three strains of the albino rat. *Food Cosmet Toxicol* 7: 209-214.

Okuda Y, Sagami F, Tirone P, Morisetti A, Bussi S, Masters RE. 1999. Reproductive and developmental toxicity study of gadobenate dimeglumine formulation (E7155) (3) -Study of embryo-fetal toxicity in rabbits by intravenous administration -. *J Toxicol Sci.* 24 Suppl 1: 79-87. (In Japanese)

Ronald DH ed. 2006. *Developmental and reproductive toxicology – a practical approach* - . 2nd Ed. Chapter 6. Taylor & Francis group LLC.

SAS Institute Inc. 1996. *SAS/STAT Software. Changes and Enhancements, through Release 6.11.* Cary, NC: SAS Institute Inc.

Sawin PB, Crary D, Fox RR, Wuest HM. 1965. Thalidomide malformations and genetic background in the rabbit. *Experientia*. 21(11): 672-7.

Seller MJ, Knap V, Christie GA. 1962. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 280: 249.

Shirley EAC. 1977. A non-parametric equivalent of Williams' test for contrasting increasing dose levels of a treatment. *Biometrics* 33: 386-9.

Siegel S. 1956. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: McGraw-Hill

Sivaraman L, Horimoto M, Tassinari M, Hurtt M, Cappon G. 2008. Timing of implantation and closure of the palatal shelf in New Zealand white and Japanese white rabbits. *Drug Chem Toxicol*. 31:255-261.

Snedecor GW, Cochran WG. 1980. *Statistical methods*, 7th ed. Ames: Iowa State University Press

Somers GS. 1962. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 279: 912-913.

Staples RE, Holtkamp DE. 1963. Effects of parental thalidomide treatment on gestation and fetal development. *Exp Mol Pathol Suppl* 2: 81-106.

Steel RGD. 1959. A multiple comparison rank sum test: Treatments versus control, *Biometrics* 15: 560-72.

Sterz H, Nothdurft H, Lexa P, Ockenfels H. 1987. Teratologic studies on the Himalayan rabbit: new aspects of thalidomide-induced teratogenesis. *Archive Toxicol* 60: 376-381.

Watanabe T, Endo A. 1989. Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. *J Nutr* 119(2): 255-61.

Williams DA. 1972. The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-31.

Williams DA. 1986. A note on Shirley's nonparametric test for comparing several dose levels with a zero-dose control. *Biometrics* 42: 183-6.

家畜改良センター長野牧場業務課. 2007. ウサギの飼養管理・受精卵移植マニュアル. 家畜改良センター技術マニュアル 18.

第3章 肢形成過程で働く遺伝子のサリドマイドによる発現変化

3-1 Kbl:JW ウサギ胚の肢芽における Fgf8、Bmp4 および Hoxa11 の発現へのサリドマイドの影響

Kbl:JW ウサギを用いて、肢形成に重要な働きをもつ3種類の遺伝子(Fgf8、Bmp4、Hoxa11)の胚の肢芽での発現についてサリドマイドによる影響を検討した。

3-1-1 緒言

ウサギにおけるサリドマイドの催奇形性については、種々の系統で調べられているが、サリドマイドを投与した母動物から得られたウサギ胚(サリドマイド胚)における、肢形成に関与する遺伝子発現についてはどの系統においても十分に調べられておらず、NZW ウサギ胚の肢芽において Fgf8、Fgf10 および Twist 発現の変化を検出した報告が1つ存在するのみであった(Hansen ら 2002 年)。その他の動物種では Fgf8 についてはゼブラフィッシュで(Ito ら 2010 年)、Fgf8、Fgf10、Bmp4、Bmp5、Bmp7、Dkk1、Irs2、Tbx5 および Sall4 についてはニワトリ胚で(Ito ら 2010 年、Knobloch ら 2007 年、2008 年および 2011 年、Knobloch および Ruther 2008 年) サリドマイドによる肢芽での発現の変化が報告されていた。しかしながら、JW 系統のウサギでは肢形成に関与する遺伝子の変化については調べられていなかったことから、我々は、サリドマイドによる前肢奇形の発生頻度が Kbl:NZW ウサギよりも高い Kbl:JW ウサギを用いて、肢形成に重要な働きをもつ3種類の遺伝子(Fgf8、Bmp4、Hoxa11)の肢芽での発現についてサリドマイドの影響を検討した。

肢形成において Fgf8 は肢芽が形成され始めると主に AER で発現し、AER の直下で増殖して胚の遠位方向への成長を誘導する進行帯の維持に関与している(Fig. 3-1-1 A および B)。Fgf8 の発現は、NZW ウサギにおいてサリドマイドの影響で本来なら発現しているはずの妊娠 10 日胚の予定 AER 領域において発現がみられず、妊娠 12 日には予定極性化域後部での発現が低下することが WISH 法で調べられている(Hansen ら 2002 年)。さらに、Fgf8 の発現はサリドマイドによりニワトリ胚の肢芽ならびにゼブラフィッシュの鰭芽で低下することが報告されている(Knobloch ら 2011

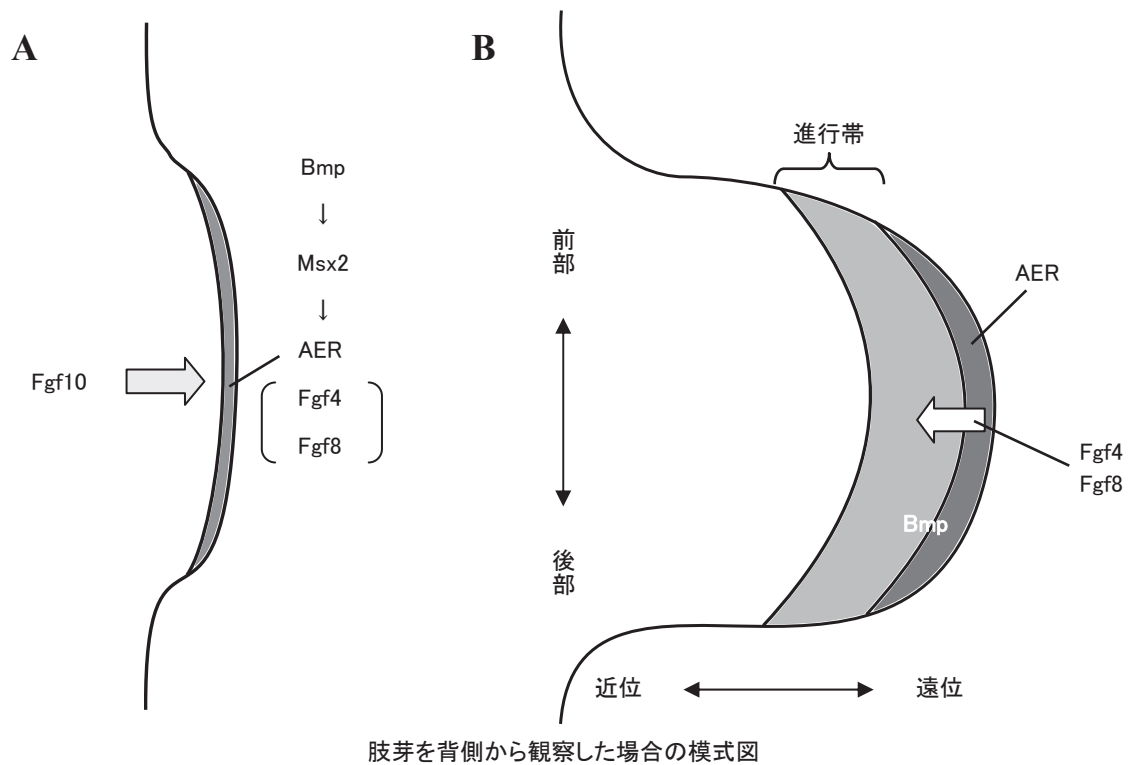
年、Ito ら 2010 年)。

Bmp (Bmp2、Bmp4、Bmp7)も初期肢芽発生において AER の誘導に関連し、その後、AER および進行帯で発現し、その成長に対して抑制的に作用する(Fig. 3-1-1 A および B)。Bmp 遺伝子の中で Bmp4 の発現はサリドマイドの曝露によりニワトリ胚の肢芽で増加することが WISH 法によって示されている(Knobloch ら 2007 年)。

Hoxa11 は、そのノックアウトマウスで尺骨および橈骨の形態異常が生じ(Small および Potter 1993 年)、Hoxa11 および Hoxd11 のダブルノックアウトマウスではより顕著な骨の短縮化が起こることが報告されている(Davis ら 1995 年)。我々の知る限り、Hox 遺伝子のウサギ肢芽での発現に関する報告はないが、Kbl:JW ウサギ胎児ではサリドマイドにより橈骨の短小および欠損が誘発されることから、Hoxa11 遺伝子発現が変化する可能性があると考えられた。Hoxa11 遺伝子は軀脚部全体で発現するが、Hoxd11 は基本的に前肢では尺骨、後肢では腓骨に関連する軀脚部の後部を規定するように発現する(Nelson ら 1996 年)。また、サリドマイドによりウサギ胎児には欠指などの自脚部の奇形が誘発されるが、Hoxd11 は Hoxa11 と異なり自脚部にも強く発現することから、自脚部の奇形に関連した遺伝子発現変化との区別が困難と予想された(Kamiyama ら 2012 年)。従って、ここでは Hoxa11 の発現について解析することとした(Fig. 3-1-2 A および B)。

本研究の目標は、JW 系統のウサギを用いてサリドマイドの前肢奇形誘発作用を早期に予測できるマーカーとなり、さらには四肢奇形のメカニズムを調べる手がかりとなり得る遺伝子がどれかを見いだすことである。

Fig. 3-1-1 四肢の発生における Fgf および Bmp の役割

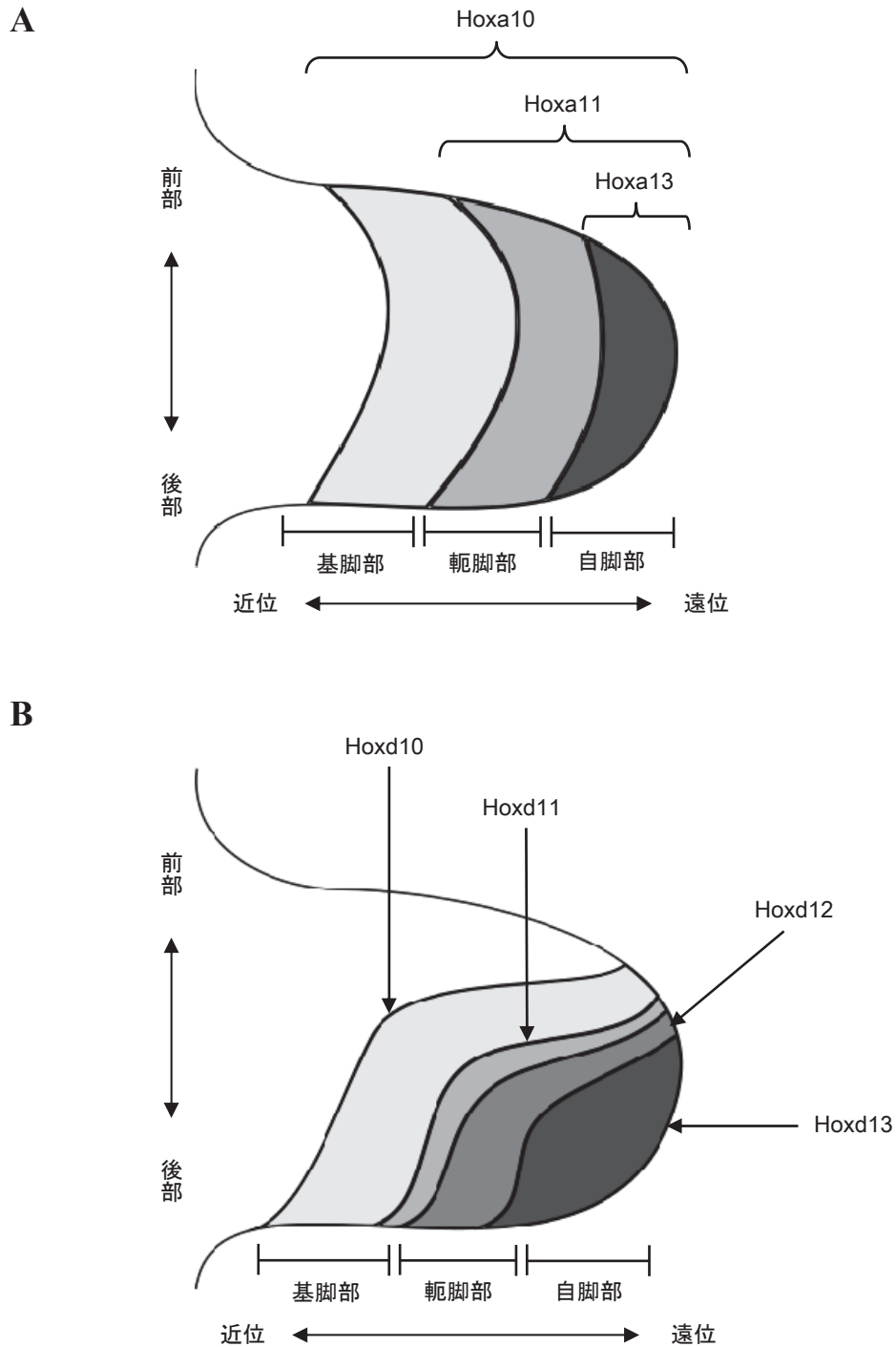


A: 側板中胚葉に発現した Fgf10 の作用により外胚葉が肥厚しはじめる。肥厚部分の腹側中胚葉で Bmp (Bmp2、Bmp4、Bmp7) が Msx2 を介して外胚葉性頂堤(AER)の形成を誘導する。形成された AER では Fgf4 および Fgf8 が発現する。

B: AER から分泌される Fgf4 および Fgf8 蛋白質によって進行帯での細胞分裂が維持され、肢芽は遠位部方向に伸長する。AER とその直下の間絨織で発現する Bmp は、Fgf に対して抑制的に作用し、過度な AER の伸長を抑える。

Fig. 3-1-2 Hoxa10-13 および Hoxd10-13 の肢発生への関与

肢芽を背側から観察した場合の模式図



Hoxa10 および Hoxd10 遺伝子は基脚部—自脚部、Hoxa11、Hoxd11 および Hoxd12 遺伝子は軛脚部—自脚部、Hoxa13 遺伝子は自脚部の形成に関与する。(基脚部：上腕骨など、軛脚部：橈骨・尺骨など、自脚部：指根骨・中手骨・指骨など)

3-1-2 実験方法

動物および飼育条件

Kbl:JW ウサギは北山ラベス株式会社から購入した。未経産雌を雄と1対1で午前中に交配させた。交尾確認日を妊娠0日と定義した。動物は、吊り下げ型の金属製網底ケージを用いて動物室で個別飼育した。室温は20-26℃、相対湿度は40-80%、換気回数は1時間当たり6-25回、照明周期(12時間)は7:00-19:00(明期)に設定した。動物は水道水および実験動物用飼料(LRC4、オリエンタル酵母株式会社製、ガンマ線滅菌)を自由に摂取させた。

サリドマイドおよび投与方法

サリドマイドは和光純薬工業株式会社から購入した(純度：98.0%以上)。サリドマイドは、0.5 w/v%メチルセルロース溶液に懸濁し、1日1回経口投与した。サリドマイド胚を採取した母動物への投与日および投与量は以下の通り；妊娠10日のサリドマイド胚：妊娠9日、300 mg/kg、妊娠11日のサリドマイド胚：妊娠9および10日、300 mg/kg、妊娠12日のサリドマイド胚：妊娠9および10日、300または500 mg/kg。Kbl:JW ウサギへの300 mg/kgの妊娠9および10日投与によって異常回転手などの前肢奇形が高頻度に(14/34 胎児)誘発されることが判明している(Table 2-2-4)。また、300 mg/kgを投与した実験で妊娠12日のFgf8の発現に変化がみられなかったことから、500 mg/kgを投与した胚についても解析した。対照群の母動物は無処置とした。

胚の採取

妊娠10、11または12日の午前中に母動物をチオペンタールナトリウム(0.5 g、静注)で麻酔し、帝王切開した。胚を摘出し、速やかに4%パラホルムアルデヒド含有PBSで固定した後、エタノールで脱水した。胚はWISHを実施するまで-20℃以下のエタノールで保存した。

RNA プローブ

Fgf8 および Bmp4 の RNA プローブ(antisense RNA)は、株式会社アワジェニック(徳島県)で、Hoxa11 の RNA プローブは、ジェノスタッフ株式会社(東京都)で Digoxigenin 標識 RNA (dig-RNA)として合成した。Fgf8 : プローブ作成用塩基配列として Fischer らが使用したマウス cDNA (Accession No. AF474181)の 174-763 に相当する 590 bp と同等の配列を設定した(Fischer ら 2002 年)。Bmp4 : プローブ作成用塩基配列として Hopf らが使用したウサギ cDNA (Accession No. NM_001195723.1)の 689-1181 に相当する 493 bp を設定した(Hopf ら 2011 年)。Hoxa11 : プローブ配列作成用塩基としてウサギ cDNA (Accession No. 001171404.1)の 236-504 に相当する 269 bp を設定した。

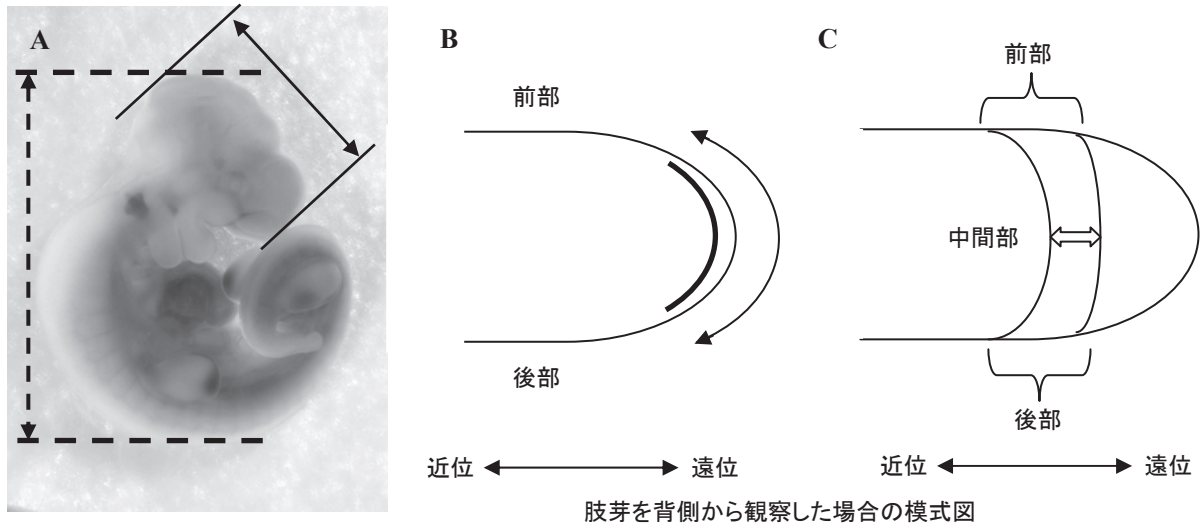
Whole mount in situ hybridization

Dig 標識 RNA プローブを用いた WISH 法は、ウサギ初期胚用の Cold Spring Harbor Protocol (Püschel ら 2010 年)に従った。ハイブリダイゼーション温度は 70°C で実施した。

胚の形態学的解析

頭殿長および頭長(胚の後頭部から前頭部先端までの長さ)(Fig. 3-1-3 A)ならびに AER における Fgf8 発現領域長は、デジタル顕微鏡で測定し(Fig. 3-1-3 B)、体節数は実体顕微鏡下で計数した。肢芽の Hoxa11 発現領域の前部側、中間部および後部側の幅は、同一の角度から撮影した写真を用い、画像分析ソフトで計測した(Fig. 3-1-3 C)。

Fig. 3-1-3 頭殿長および頭長ならびに肢芽での Fgf8 および Hoxa11 の発現領域



- A. 点線の両矢印は頭殿長、実線の両矢印は頭長を示す。
- B. 太い黒線は Fgf8 の発現部位を示し、発現領域の広さは両矢印で示される長さ(発現領域長)で測定した。
- C. Hoxa11 の発現領域帯の幅(発現領域幅)を前部、中間部及び後部で測定した(括弧および両矢印で示す)。

統計処理

発生指標データおよび発現領域の長さ／幅(Table 3-1-1~4)は、F 検定(Snedecor および Cochran 1980年)により対照胚とサリドマイド胚の分散の一様性の検定を実施し、等分散の場合には Student の t 検定(Snedecor および Cochran 1980 年)、不等分散の場合には Aspin-Welch の t 検定(Snedecor および Cochran 1980 年)により平均値の差の検定を実施した。散布図(Fgi. 3-1-5 および 7)における頭長と発現領域の長さ／幅については、ピアソンの相関係数(Snedecor および Cochran 1980 年)を求めた。検定の有意水準は、F 検定は 20%、その他の検定は両側 5%および 1%とした。

動物倫理

本実験は、武田薬品の実験動物倫理委員会の承認を受けた。

3-1-3. 結果

胚発生

妊娠 10、11 および 12 日の対照胚とサリドマイド胚の間に形態学的に明確な違いはみられなかったが、頭殿長、頭長および体節数などの発生指標には、妊娠 10 および 11 日のサリドマイド胚で低下傾向あるいは有意な低下が認められた(Table 3-1-1)。しかしながら、妊娠 12 日胚では、これらの発生指標については対照胚とサリドマイド胚との間に相違はみられなかった (Table 3-1-1)。

Table 3-1-1 胚の発生指標

群	妊娠 10 日		妊娠 11 日		妊娠 12 日	
	対照	サリドマイド	対照	サリドマイド	対照	サリドマイド
妊娠動物数	3	2	3	3	7	9
胚数	18	16	21	22	36	39
頭殿長(mm) †	3.22±0.32	3.10±0.19	5.14±0.37	4.52±0.37**	6.29±0.35	6.27±0.37
頭長(mm) †	1.32±0.16	1.27±0.08	2.61±0.21	2.17±0.25**	3.41±0.30	3.41±0.26
体節数 †	24.9±1.4	24.1±0.9*	37.4±0.9	35.6±1.3**	45.1±1.4	45.2±1.2

WISH法による遺伝子発現の解析に使用した全ての胚のデータに基づく数値、†: 平均値±標準偏差、
*または** : 対照群との間に有意差有り (* : p≤0.05、** : p≤0.01、Studentのt検定またはAspin-Welchのt検定)

Fgf8 の発現

解析に用いた妊娠 10 および 11 日のサリドマイド胚の発生指標および AER における Fgf8 の線状の発現領域の広さ(発現領域長として計測)は、対照胚に比べて有意な低値または低値傾向を示した(Table 3-1-2)。妊娠 10 日胚で後肢芽での発現が認められたのは、対照胚の 1 例のみであった(Fig. 3-1-4 C)。妊娠 10 および 11 日の前肢および後肢での発現領域長は、成長抑制を伴う矮小サリドマイド胚の方が、そうでない胚に比べて縮小する傾向を示した(Fig. 3-1-4 A-B および E-H)。妊娠 12 日の対照胚とサリドマイド胚の間には、発生指標および発現領域長に差はみられなかった(Table 3-1-2 および Fig. 3-1-4 I-L)。

頭長に対する発現領域長の関係を表す散布図では、個体間のばらつきが大きかったデータ(対照胚の妊娠 10 日の前肢および妊娠 11 日の後肢のデータ)を除き、頭長と発現領域長の間には統計学的に有意な正の相関が認められた(Fig. 3-1-5)。妊娠 11 日のサリドマイド胚では、この正の相関の傾きは対照胚と差がなかったが、発現領域長と頭長のいずれについてもデータ分布は、より短い側にシフトした(Fig. 3-1-5)。しかし、妊娠 12 日の胚には、このようなシフトはみられなかった(Fig. 3-1-5)。従って、妊娠 10 および 11 日の発現領域長の低値は、サリドマイド胚における成長抑制に伴う二次的变化であり、サリドマイドによる遺伝子発現への直接的な関与を示唆するものではないと考えられた。

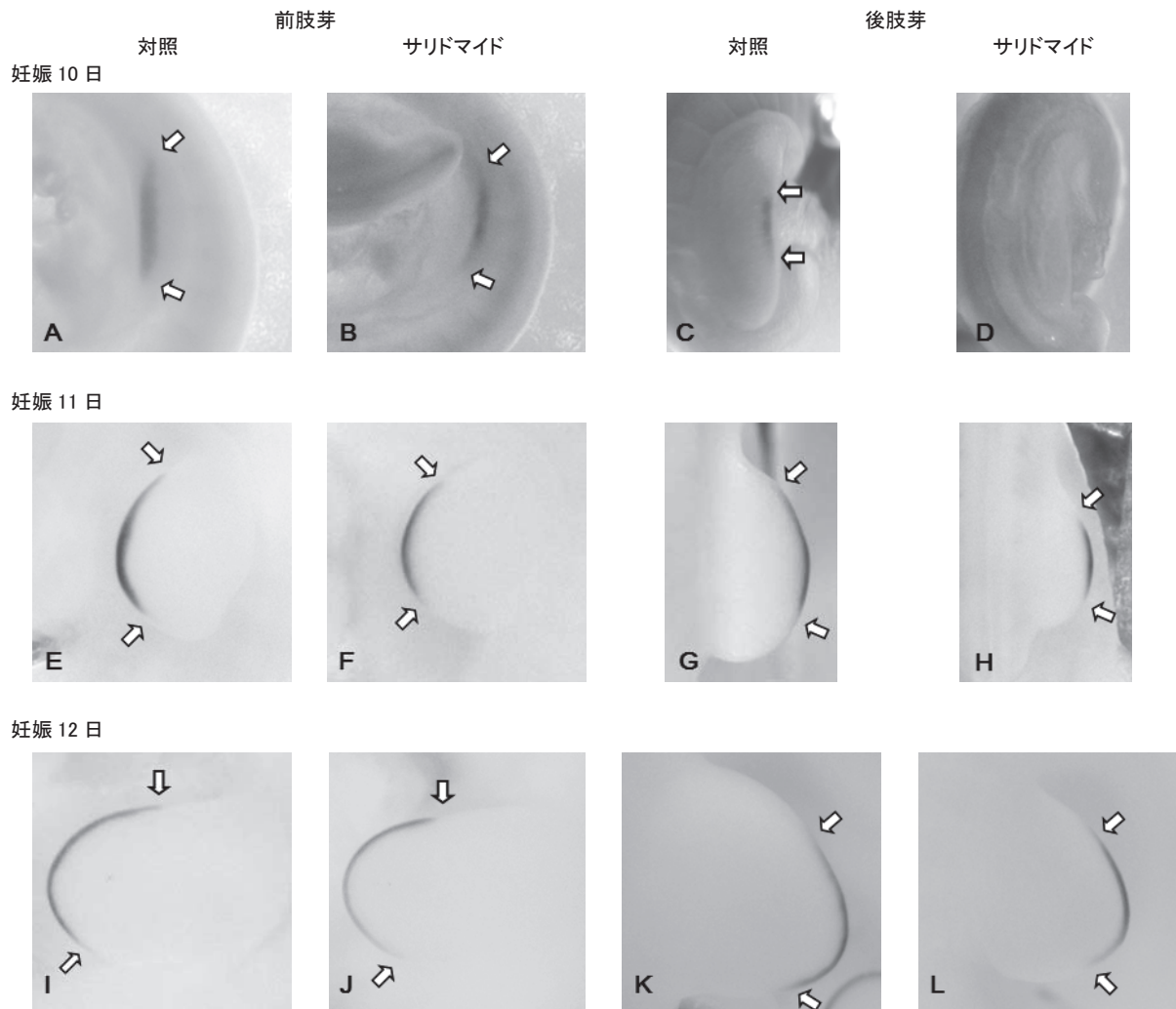
Table 3-1-2 Fgf8 発現確認胚の発生指標および発現領域長

群	妊娠 10 日		妊娠 11 日		妊娠 12 日	
	対照	サリドマイド	対照	サリドマイド	対照	サリドマイド
妊娠動物数	2	1	2	3	5	6
胚数	7	7	7	8	15	14
頭殿長(mm) †	3.37±0.37	3.13±0.22	5.18±0.46	4.69±0.36*	6.25±0.40	6.29±0.38
頭長(mm) †	1.39±0.19	1.29±0.09	2.68±0.26	2.27±0.22**	3.30±0.24	3.38±0.31
体節数 †	25.9±1.3	24.6±0.8*	37.6±1.1	36.1±1.2*	44.7±1.5	44.9±1.3
発現領域長(mm)						
右前肢芽 †	0.61±0.20	0.48±0.14	0.76±0.07	0.56±0.13**	1.33±0.23 (13)	1.41±0.24
左前肢芽 †	0.62±0.18	0.42±0.11*	0.76±0.06	0.55±0.13**	1.34±0.23	1.39±0.23
右後肢芽 †	0.35 (1)	–	0.73±0.05	0.54±0.12**	1.16±0.15 (13)	1.25±0.15
左後肢芽 †	0.3 (1)	–	0.76±0.04 (6)	0.54±0.11**	1.17±0.15	1.24±0.15 (13)

†: 平均値±標準偏差、(): 胚数、–: データ無し、

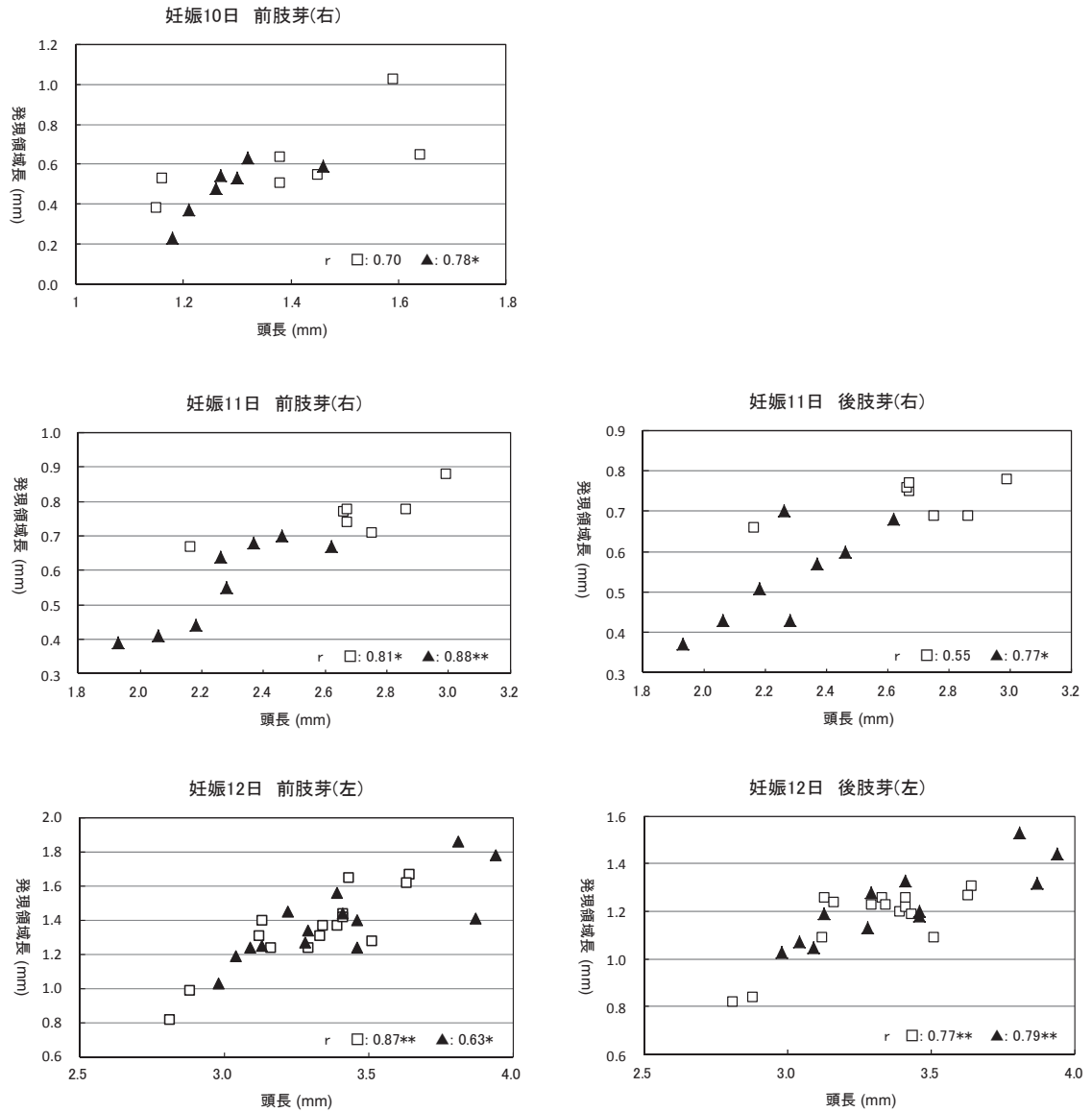
*または**: 対照群との間に有意差有り(*: p<0.05、**: p<0.01、Studentのt検定またはAspin-Welchのt検定)

Fig. 3-1-4 肢芽での Fgf8 の発現



妊娠 10 日のサリドマイド胚の後肢芽を除き、Fgf8 は肢芽の AER で発現した。妊娠 10 および 11 日胚の前肢芽(B, F)および妊娠 11 日胚の後肢芽(H)でのサリドマイド胚の発現領域長は対照群に比べて短縮した(A, E, G)。妊娠 12 日胚では対照群とサリドマイド投与群の発現領域長に明確な差は無かった(I-L)。矢印：測定の開始および終了点。写真の上側が胚前側を、下側が胚後側を示す。

Fig. 3-1-5 頭長と Fgf8 発現領域長の散布図



□ : 対照群、▲ : サリドマイド群、r : 相関係数、*または** : 相関の有意差 (* : $p \leq 0.05$ 、** : $p \leq 0.01$ 、相関係数の検定)

Hoxa11 の発現

妊娠 10 日の対照およびサリドマイド胚では、Hoxa11 の発現が認められなかった(Fig. 3-1-6 A-B)。妊娠 11 日のサリドマイド胚の発生指標は、対照群に比べて有意な低値を示した(Table 3-1-3)。しかし、サリドマイド胚のサイズが対照胚より小さいにもかかわらず、Hoxa11 の前肢および後肢芽における発現パターンは変化しなかった(Fig. 3-1-6 C-F)。なお、妊娠 11 日胚の Hoxa11 の発現領域は、染色部位の縁が不明瞭であり、部位の特定が困難であったことから測定しなかった。妊娠 12 日のサリドマイド胚の発生指標は対照群と同等であり、また、妊娠 12 日の対照およびサリドマイド胚の後肢芽では、どの発現部位の幅(帯状発現領域の前部、中間部、後部の幅を計測)にも明確な差は無かったが、サリドマイド胚の前肢芽の前部側での発現領域幅は、対照胚よりも明らかに狭まっていた(Table 3-1-3 および Fig. 3-1-6 G-J)。

妊娠 12 日胚の散布図から判断して、対照胚では個体の大きさは発現領域の違いと相関が無く、3 カ所の発現領域幅は頭長の長短に関わらず一定であり、統計学的に有意な相関はみられなかった(Fig. 3-1-7)。このように対照胚前部側での発現領域幅は頭長の違いに関わらず一定であったが、サリドマイド胚では対照胚の場合と比べてより狭い側へシフトした。対照胚の発現領域幅との差は、頭長が長いサリドマイド胚でより顕著であり、サリドマイド胚においては頭長と前部側の発現領域幅の間に有意な負の相関が認められた(Fig. 3-1-7)。従って、この前部側における Hoxa11 発現領域幅のサリドマイドによる縮小は、サリドマイドによる成長抑制と関連性はなく、肢形成過程でのサリドマイドの直接的な作用によって誘発されたものと考えられた。

Table 3-1-3 Hoxa11 発現確認胚の発生指標および発現領域幅

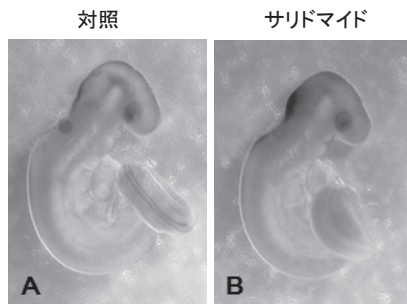
群	妊娠 11 日		妊娠 12 日	
	対照	サリドマイド	対照	サリドマイド
妊娠動物数	3	2	5	5
胚数	7	7	13	12
頭殿長(mm) †	5.03±0.29	4.42±0.41**	6.34±0.33	6.32±0.33
頭長(mm) †	2.55.19	2.10±0.25**	3.50±0.29	3.39±0.26
体節数†	37.0±0.6	35.0±1.2**	45.8±1.1	45.3±1.0

群	妊娠 12 日		
	対照	サリドマイド	
胚数	13	12	
発現領域幅 (mm)			
右前肢芽†	前部	0.45±0.03	0.34±0.06**
	中間部	0.25±0.02	0.25±0.02
	後部	0.33±0.03	0.34±0.04
左前肢芽†	前部	0.44±0.04	0.35±0.06**
	中間部	0.26±0.03	0.26±0.03
	後部	0.32±0.02	0.33±0.03
右後肢芽†	前部	0.63±0.13	0.65±0.08
	中間部	0.46±0.05	0.44±0.05
	後部	0.60±0.10	0.61±0.10
左後肢芽†	前部	0.59±0.13	0.58±0.07
	中間部	0.43±0.04	0.43±0.04
	後部	0.58±0.07	0.61±0.10

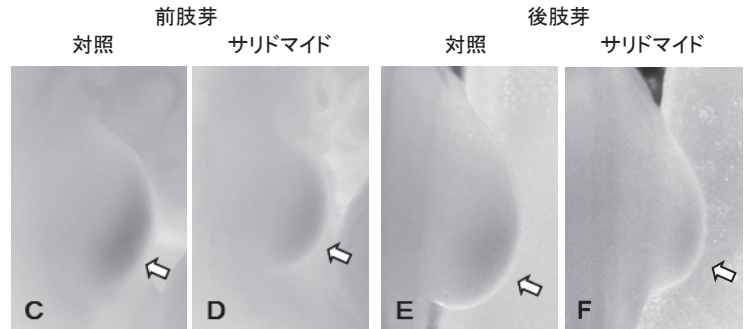
† : 平均値±標準偏差、** : 対照群との間に有意差有り(p≤0.01、Studentのt検定またはAspin-Welchのt検定)

Fig. 3-1-6 肢芽での Hoxa11 の発現

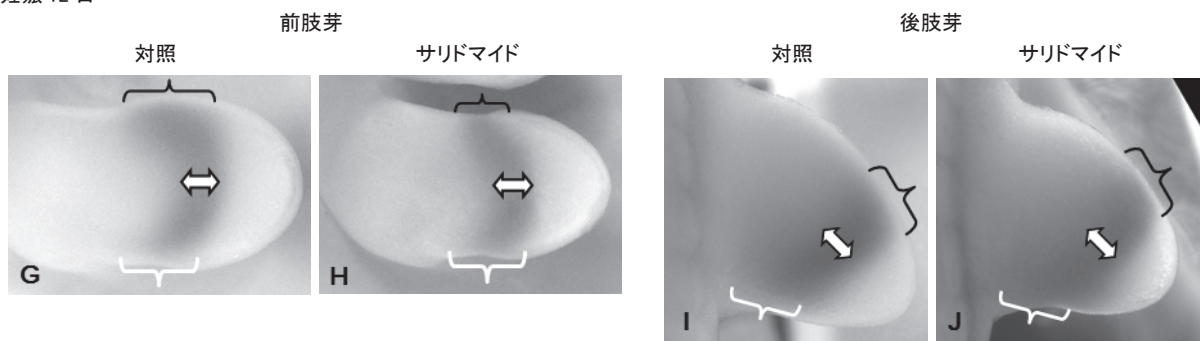
妊娠 10 日



妊娠 11 日

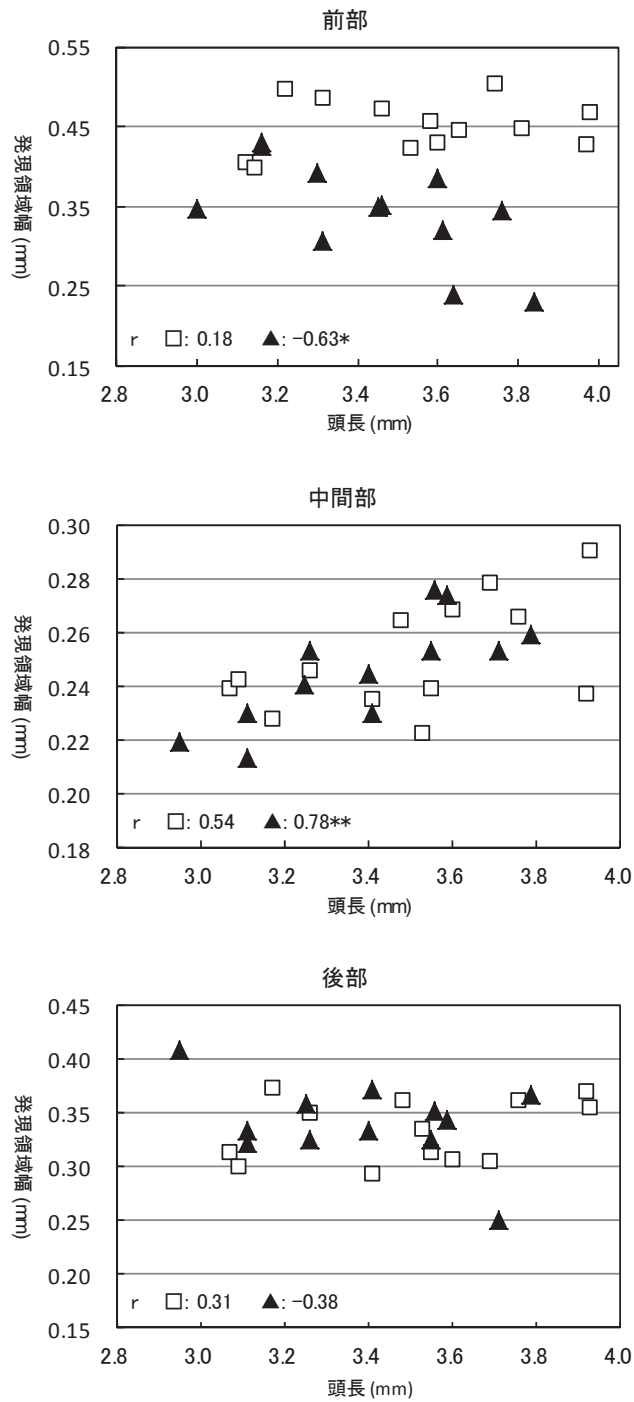


妊娠 12 日



妊娠 10 日胚では Hoxa11 の発現は検出できなかった(A, B)。対照胚と比較し、サリドマイドによる発現パターンの変化は、妊娠 11 日胚で前後肢芽のいずれにもみられなかった(C-F)。前肢芽の前部側での発現領域幅(H、黒の山括弧)は対照群のそれに比べて狭かった(G、黒い山括弧)。前肢芽中間部および後部側の発現領域幅(G, H、白い両矢印および白い山括弧)ならびに後肢芽の全ての部位の発現領域幅(I, J、両矢印および黒と白の山括弧は)、対照胚とサリドマイド胚の間に差はなかった。矢印(C-F)：主要な発現部位、黒い山括弧(G-J)：前部側発現領域幅、白い両矢印(G-J)：中間部発現領域幅、白い山括弧(G-J)：後部側発現領域幅。写真の上側が胚前側を、下側が胚後側を示す。

Fig. 3-1-7 妊娠 12 日胚の頭長と Hoxa11 発現領域の散布図



□ : 对照群、▲ : サリドマイド群、r : 相関係数、*または** : 相関の有意差 (* : $p \leq 0.05$ 、** : $p \leq 0.01$ 、相関係数の検定)

Bmp4 の発現

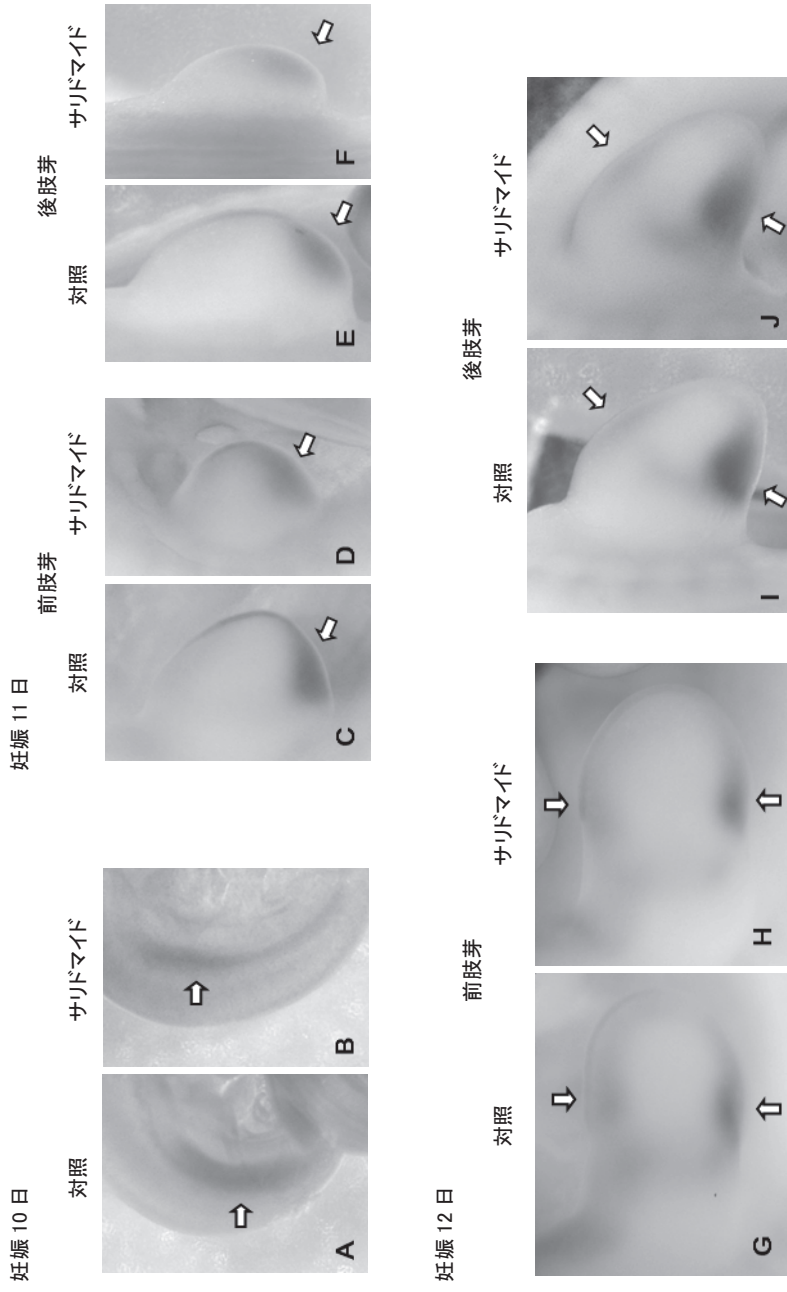
解析に用いたサリドマイド胚の発現指標は、妊娠 10 日では対照胚の指標と比べて有意差はないがわずかに低値を示し、妊娠 11 日では有意に低下した(Table 3-1-4)。しかしながら、妊娠 12 日では、対照およびサリドマイド胚の間の発現指標の値に差はなかった(Table 3-1-4)。肢芽における Bmp4 の発現パターンについて、対照胚とサリドマイド胚との間に明確な違いはみられなかった(Fig. 3-1-8 A-J)。なお、Bmp4 の発現領域は、染色部位の縁が不明瞭であり、妊娠 11 および 12 日胚では発現パターンの形状も複雑であることから、発現領域は測定しなかった。

Table 3-1-4 Bmp4 発現確認胚の発現指標

群	妊娠 10 日		妊娠 11 日		妊娠 12 日	
	対照	サリドマイド	対照	サリドマイド	対照	サリドマイド
妊娠動物数	1	1	3	3	3	5
胚数	7	7	7	7	8	13
頭殿長(mm) †	3.24±0.23	3.08±0.17	5.20±0.39	4.42±0.31**	6.29±0.30	6.20±0.41
頭長(mm) †	1.34±0.07	1.26±0.08	2.59±0.17	2.12±0.29**	3.46±0.36	3.45±0.22
体節数 †	24.7±1.0	23.7±0.8	37.6±0.8	35.6±1.5**	45.0±1.1	45.3±1.3

† : 平均値±標準偏差、** : 対照群との間に有意差有り (p≤0.01 Studentのt検定またはAspin-Welchのt検定)

Fig. 3-1-8 肢芽での Bmp4 の発現



妊娠 10-12 日胚のいずれにおいても、対照群と(A, C, E, G, I)とサリドマイド胚 (B, D, F, H, J)の間に明確な発現パターンの違いはみられなかった。矢印：主要な発現部位。写真の上側が胚前側を、下側が胚後側を示す。

3-1-4 考察

サリドマイドの胚発生への影響

Lee CJ らは、ウサギ胚の全胚培養系において、妊娠 9 日に摘出した胚にサリドマイドを 48 時間曝露すると、後脳の発生が 17%低下すると同時に前肢芽および後肢芽の成長が最大 71%抑制されることを報告した(Lee ら 2011 年)。我々の実験では、妊娠 10 および 11 日のサリドマイド胚の胚全体の発生指標は対照胚に比べて低下したが、サリドマイド胚における肢芽特異的な成長抑制は検出できなかった(Fig. 3-1-4、6 および 8)。Lee らの実験における培養液のサリドマイド濃度は 117 μM (30.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)であり、ウサギにおいて催奇形性を誘発する 300 mg/kg のサリドマイドを妊娠 9 日に投与した時の母動物血漿中のサリドマイドの C_{max} は 17.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(Table 2-2-11)。従って、Lee らの *in vitro* 実験で肢芽の顕著な成長抑制がみられた理由は、サリドマイドの曝露量が高かったことに起因すると考えられた。我々の実験では、妊娠 9 および 10 日にサリドマイドを投与した母動物から得られた妊娠 11 日胚では成長が抑制されていたが、妊娠 12 日胚では対照群との間に差はみられなかった。これはサリドマイドの曝露が消失した後、急速に回復したためと考えられるが、サリドマイドには血管新生抑制作用があることが知られており(D'Amato ら 1994 年)、それが母動物の胎盤からの栄養供給や胎児の血管新生を阻害することに起因した可能性が考えられる。Hansen らの NZW 系統ウサギを用いた研究では、妊娠 12 日の前肢芽の形態がサリドマイド投与により非対称になり、明らかに小さくなることを報告している(Hansen ら 2002 年)が、本研究ではサリドマイド胚の肢芽にこのような形態学的変化はみられなかった(Fig. 3-1-4 I-J、6 G-H および 8 G-H)。我々の実験条件(300 mg/kg の妊娠 9 および 10 日投与)では、四肢奇形(異常回転手)がサリドマイドを投与した母動物より得られた 34 胎児中 14 例に誘発されたので (Table 2-2-4)、適切な条件と考えられた。しかしながら、Hansen らと我々の実験デザインの間には、投与期間(妊娠 8 および 9 日に対して妊娠 9 および 10 日)、投与量(400 mg/kg に対して 300 または 500 mg/kg)ならびに系統(NZW と JW)等のいくつかの違いが存在し、これらの違いが、肢芽の奇形の非対称性や程度および頻度に影響した可能性がある。

Fgf8 遺伝子の発現への影響

Hansen らは 400 mg/kg のサリドマイドを妊娠 8 および 9 日に投与した NZW ウサギの胚において、肢芽での Fgf8 が、本来であれば発現しているはずの妊娠 10 日に検出されず、妊娠 12 日には AER で発現が低下することを報告した(Hansen ら 2002 年)。一方で、我々は肢芽での Fgf8 発現が対照胚の肢芽と同様に妊娠 10、11 および 12 日にみられ、発現領域と頭長との間に正の相関があることを見出した(Fig. 3-1-5)。このことは Fgf8 の発現領域の拡大が胚の発生の進行度に依存していることを意味している。従って、我々の実験でみられた Fgf8 の発現低下は、サリドマイドによる肢芽での特異的な遺伝子発現の抑制ではないと考えられた。Hansen らの実験において、妊娠 10 日のサリドマイド胚では対照群とは異なり Fgf8 の発現がみられなかったことや妊娠 12 日の AER での発現低下も成長抑制や個体間あるいは系統差間の発生のばらつきに関連している可能性がある。サリドマイドによる Fgf8 の顕著な発現低下は、ニワトリ胚の肢芽ならびにゼブラフィッシュ胚の鰭芽でもみられたことが報告されている(Knobloch ら 2011 年、Ito ら 2010 年)。ウサギにおけるサリドマイドの血中濃度(妊娠 9 日投与時の Cmax : 17.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と鶏卵の曝露濃度(卵重量当たり 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$)は直接的には比較できないが、ゼブラフィッシュの実験における培養液のサリドマイド濃度(200 および 400 μM 、51.6 および 103.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)は、我々の実験よりもかなり高かった。従って、これらの実験結果の不一致は、サリドマイドの曝露量の違いに起因している可能性がある。

Hoxa11 遺伝子の発現への影響

サリドマイドによる Hoxa11 発現抑制は、前肢芽前部側で特異的であることが判明した。Hoxa11 は橈骨および尺骨の形態形成に関与することが知られているので(Small および Potter 1993 年)、本研究で Hoxa11 の発現抑制がみられた位置は、おそらく橈骨側と一致していると考えられる。このことは観察されたサリドマイドによる四肢奇形が橈骨側に見られることと矛盾がないと思われる。我々の知る限り、この発見はウサギ胎児において Hox 遺伝子とサリドマイド奇形に相関があることを示した最初の例である。

前肢芽では Hoxa11 の発現は抑制されたが、ウサギ胚の後肢芽ではサリドマイドによる Hoxa11

の発現の変化については検出できなかった(Table 3-1-3)。事実、妊娠 9 および 10 日にサリドマイドを投与した母動物から得られた胎児には橈骨の欠損および短小が誘発されたが(Table 2-2-8、それぞれ 34 胚中 6 および 9 例)、脛骨の欠損および短小は誘発されなかった。このことは、今回の実験で Hoxa11 の発現の変化が、前肢芽のみにみられたことと合致している。

cereblon 蛋白質はサリドマイドの催奇形性に関連するユビキチン E3 リガーゼの構成要素として知られている(Ito ら 2010 年)が、cereblon と Hoxa11 の関連性を示した報告はない。我々の実験では、サリドマイドが Kbl:JW ウサギ胚に四肢奇形を誘発する投与期間は妊娠 9 及び 10 日であり、サリドマイドに特徴的な Hoxa11 発現の変化は妊娠 12 日にみられる。従って、サリドマイド投与と Hoxa11 発現の変化にかなりの時間差があることから、Hoxa11 が cereblon を含む E3 ユビキチンリガーゼの直接的な標的ではなく、cereblon 蛋白質へのサリドマイドの結合から Hoxa11 の発現変動までの間に何らかの遺伝子発現カスケードが存在すると考えられた。さらに、サリドマイドにより生じた活性酸素種を不活性化する a-phenyl-N-tertbutylnitron の投与により、DNA の酸化と四肢奇形の誘発が共に抑制される(Parman ら 1999 年)ことから、Hoxa11 の上流には、こういったメカニズムに関連する遺伝子発現カスケードが存在すると推察される。

Bmp4 遺伝子の発現への影響

成長抑制の有無に関わらず、肢芽においてサリドマイド投与による Bmp4 の発現パターンの変化は検出できなかった(Fig. 3-1-8)。ニワトリ胚では、サリドマイドの曝露によって肢芽における Bmp4 の発現が増加することが報告されており、自脚および軀脚部が顕著に短小化している(Knobloch ら 2007 年)。この形態学的変化は、本研究でみられたサリドマイドにより誘発された異常回転手や橈骨の短小あるいは欠損といった肢の変化よりも重篤と思われた。もし、Bmp4 の過剰発現がこの異常の主要因であり、実質的なサリドマイド作用濃度についてウサギとニワトリでの実験間で大きな違いがなければ、Bmp4 の発現があまり変化しないウサギでは形態異常が減弱するという結果と矛盾しない。しかし、Bmp4 の過剰発現が、サリドマイドによる奇形に類似した形態異常を引き起こすという証拠は知られていない。

その他の軀脚部発生関連遺伝子について

Fgf8、Bmp4 および Hoxa11 以外に Gremlin、Wnt5a および Hoxc11 など、いくつかの肢形成遺伝子が存在し、これらの遺伝子も、サリドマイドによりその発現が変化する可能性があることから、前肢芽におけるサリドマイドの催奇形性作用を早期に予測するためのマーカーとして使用できるかも知れない。しかしながら、Gremlin および Wnt5a は自脚部の発生にも関わっており(Nissim ら 2006 年、Yamaguchi ら 1999 年)、その発現が軀脚部に限定されていない。また、指の奇形はウサギ胎児でサリドマイドにより誘発されることから、軀脚部の奇形と自脚部の奇形に関連する遺伝子発現の変化が合わさって観察される可能性がある。従って、サリドマイドによって誘発された軀脚部に関連する遺伝子の発現変化を評価の対象にすることは困難と予想される。Hoxa11 と Hoxd11 のダブルノックアウトマウスにおいては、脛骨と腓骨の変化は軽微であるが、橈骨と尺骨はほとんど形成されない(Davis ら 1995 年)。一方、Hoxa11、Hoxc11 および Hoxd11 のトリプルノックアウトマウスでは、後肢の軀脚の著しい短小化が誘発されている (Wellik および Capecchi 2003 年)。さらに Hoxc11 は後肢にのみ発現し(Hostikka および Capecchi 1998 年)、Hoxa11 よりも後肢奇形に関与していると考えられるため、Hoxc11 は後肢奇形を検出する良いマーカーになると推察される。このように、肢形成過程で発現する Hox 遺伝子群はサリドマイド誘発奇形の早期マーカーとして有望である。

3-1-5 結論

Kbl:JW ウサギを用いて、肢形成に重要な働きをもつ 3 種類の遺伝子 (Fgf8、Bmp4、Hoxa11) の胚の肢芽での発現についてサリドマイドによる影響を検討した。その結果、妊娠 10 および 11 日のサリドマイド胚では成長抑制がみられたが、四肢奇形に関連すると考えられる遺伝子発現パターンの変化はなかった。妊娠 12 日胚では、成長が抑制されず、Fgf8 および Bmp4 の発現パターンも変化しなかったが、Hoxa11 の前肢芽前部側のみ発現領域幅が対照群に比べて減少した。サリドマイド投与によりウサギ胎児の前肢には橈骨の奇形が誘発され、前肢芽前部側は肢芽の橈骨側であることから、この部位の Hoxa11 の発現領域幅の減少はサリドマイドによる奇形に関連した変化であり、Hoxa11 は橈骨の奇形を予測する指標になる可能性があると考えられた。

参考文献

D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 82–4085.

Davis AP, Witte DP, Hsieh-Li HM, Potter SS, Capecchi MR. 1995. Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* 375: 791-795.

Fischer A, Viebahn C, Blum M. 2002. FGF8 acts as a right determinant during establishment of the left-right axis in the rabbit. *Curr Biol* 12: 1807-1816.

Hansen JM, Gong SG, Philbert M, Harris C. 2002. Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappaB-dependent limb outgrowth pathway by thalidomide. *Dev Dyn* 225: 186-194.

Hopf C, Viebahn C, Püschel B. 2011. BMP signals and the transcriptional repressor BLIMP1 during germline segregation in the mammalian embryo. *Dev Genes Evol* 221: 209-223.

Hostikka SL, Capecchi MR. 1998. The mouse *Hoxc11* gene: genomic structure and expression pattern. *Mech Dev* 70: 133-145.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. 2010. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327: 1345-1350.

Kamiyama N, Seki R, Yokoyama H, Tamura K. 2012. Heterochronically early decline of Hox expression prior to cartilage formation in the avian hindlimb zeugopod. *Dev Growth Differ* 54: 619-32.

Knobloch J, Shaughnessy JD, R  ther U. 2007. Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway. *FASEB J* 21: 1410-1421.

Knobloch J, R  ther U. 2008. Shedding light on an old mystery: thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects. *Cell Cycle* 7: 1121-1127.

Knobloch J, Schmitz I, Gotz K, Schulze-Osthoff K, R  ther U. 2008. Thalidomide induces limb anomalies by PTEN stabilization, Akt suppression, and stimulation of caspase-dependent cell death. *Mol Cell Biol* 28: 529-538.

Knobloch J, Jungek D, Koch A. 2011. Apoptosis induction by thalidomide: critical for limb teratogenicity but therapeutic potential in idiopathic pulmonary fibrosis? *Curr Mol Pharmacol* 4: 26-61.

Lee CJ, Gonçalves LL, Wells PG. 2011. Embryopathic effects of thalidomide and its hydrolysis products in rabbit embryo culture: evidence for a prostaglandin H synthase (PHS)-dependent, reactive oxygen species (ROS)-mediated mechanism. *FASEB J* 25: 2468-2483.

Nelson CE, Morgan BA, Burke AC et al. 1996. Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development* 122: 1449-1466.

Nissim S, Hasso SM, Fallon JF, Tabin CJ. 2006. Regulation of Gremlin expression in the posterior limb bud. *Dev Biol* 299: 12-21.

Parman T, Wiley MJ, Wells PG. 1999. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 5: 582-585.

Püschel B, Blum M, Viebahn C. 2010. Whole-mount in situ hybridization of early rabbit embryos. *Cold Spring Harb Protoc* 2010 (1) doi:10.1101/pdb.prot5355

Small KM, Potter SS. 1993. Homeotic transformations and limb defects in Hox A11 mutant mice. *Genes Dev* 7: 2318-2328.

Snedecor GW, Cochran WG. 1980. *Statistical methods*, 7th ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press.

Wellik DM, Capecchi MR. 2003. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 301: 363-367.

Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. 1999. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126: 1211-23.

第4章 要約および総合考察

本研究では、20年以上にわたって蓄積された Kbl:JW ウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験の陰性対照群から得られた背景データを遡及的に解析し、サリドマイドが誘発する奇形・変異に対する感受性について過去の3試験を比較した。また、Kbl:JW と Kbl:NZW ウサギについてサリドマイドの胚・胎児発生毒性試験ならびに各種奇形の奇形感受期検討試験を実施し、系統差を比較した。さらに Kbl:JW ウサギ胚の肢芽でサリドマイドによって誘発される遺伝子変化を調べた。

4-1 要約

・ Kbl:JW ウサギの背景データならびにサリドマイド誘発胎児奇形の解析（第2章 2-1）

我々の研究所で20年以上(1990-2010年)にわたって Kbl:JW ウサギを用いて実施された胚・胎児発生毒性試験の陰性対照群から得られた背景データ(母動物 928 例、胎児 7270 例)を5ないし6年毎に分割し、各期間の流産動物数、黄体数や着床数などの生殖パラメーターならびに外表、内臓および骨格異常や変異などの形態変化の自然発生頻度を比較した。また、1988年、1995年および2007年に実施したサリドマイドによる胚・胎児発生毒性試験について、胎児に誘発された奇形の種類や発生頻度を3試験間で比較した。対照動物の背景データの分析から、20年以上にわたって母動物の生殖パラメーターならびに胎児の形態変化の種類や発生頻度に大きな変動がなかったことが示された。さらに、サリドマイドによって誘発される奇形の種類は、3試験で類似していた。従って、Kbl:JW は、胎児における自然発生の形態変化の長期的な安定性やサリドマイドにより誘発された奇形の再現性という観点から、胚・胎児発生毒性試験に適した系統の一つであることが示唆された。

・ Kbl:JW と Kbl:NZW 間の違いと共通性（第2章 2-2）

Kbl:JW および Kbl:NZW ウサギを使用して、サリドマイドを胎児の主要な器官形成期である妊

妊娠 7-15 日に投与した EFD 試験ならびにサリドマイドの投与期間を妊娠 7-8 日、9-10 日および 11-12 日に分割し、種々の奇形に対する感受期を検討した SP 試験を実施し、系統差を検討した。EFD 試験では両系統とも着床後死亡率が高くなり、生存児数が低くなった。この変化は SP 試験では妊娠 7-8 日に 300 mg/kg/日を投与した Kbl:NZW のみでみられた。外表および骨格検査では、頭部、四肢、尾の奇形が、内臓検査では、水頭症、心血管系の奇形、肺中間葉欠損や肝臓分葉異常が EFD 試験および SP 試験ともに両系統で高頻度に発生し、いずれの系統でもサリドマイドの投与量の増加に伴って奇形発生頻度が上昇する傾向がみられた。両系統において多くの奇形あるいは変異の種類と感受期に共通性が認められたことから、Kbl:JW と Kbl:NZW 胎児のサリドマイドに対する感受性の差は少なく、サリドマイドの催奇形性を評価する上で両系統の有用性は同等であると結論した。ただし、前肢の異常回転手、橈骨の欠損または短小、短尾などの奇形については Kbl:JW の方が Kbl:NZW よりも高頻度に発生するが、一方で後肢の異常回転手、脛骨の欠損または短小、肺中間葉欠損、横隔膜ヘルニアや胃小型化などの奇形は Kbl:NZW で多く認められた。従って、サリドマイドによって誘発される前肢奇形や短尾の奇形誘発メカニズムの解析には Kbl:JW の方が有用であると考えられた。

・ Kbl:JW ウサギ胚の肢芽における Fgf8、Bmp4 および Hoxa11 の発現へのサリドマイドの影響
(第 3 章)

サリドマイドを妊娠 9 および 10 日目にそれぞれ 1 日 1 回投与し、対照胚およびサリドマイド胚の肢芽における Fgf8、Bmp4 および Hoxa11 の mRNA の発現を WISH 法で検討した。これらの遺伝子はいずれも肢形成に重要な働きを有している。

サリドマイドにより妊娠 10 および 11 日で胚全体の成長抑制がみられた。肢芽の AER における Fgf8 の発現領域は、サリドマイド胚において縮小したが、Fgf8 発現領域の縮小と頭長には正の相関がみられたことから、この縮小は胚の成長抑制に伴う変化であり、サリドマイドの肢芽形成過程への直接作用ではないと考えられた。なお、妊娠 12 日のサリドマイド胚では成長抑制がみられず、Fgf8 の発現領域も対照胚の場合と差がなかった。Bmp4 の発現は妊娠 10、11 および 12 日の

サリドマイド胚で観察されたが、対照胚と比べて違いがなかった。Hoxa11 は妊娠 11 および 12 日のサリドマイド胚の前肢および後肢で、対照胚と同様に肢芽の遠近軸に対して直角に帯状に発現した。妊娠 11 日のサリドマイド胚では対照胚との間に発現パターンの違いは認められなかったが、妊娠 12 日のサリドマイド胚の前肢芽では、後肢芽と異なり、前部側での発現領域が減少した。前部側はサリドマイドを投与したウサギ胎児で奇形がみられる橈骨の発生部位に相当すると考えられ、この Hoxa11 発現領域幅の前部側に特異的な減少はサリドマイドで誘発される四肢奇形の要因の一つと推察される。このことは、肢芽全体の形成に関連する Fgf や Bmp 等の遺伝子発現の変化とは異なり、サリドマイドの Hoxa11 の発現への影響がウサギ胎児でみられる橈骨の欠損および短小という奇形に関与している可能性を初めて明らかにしたという点で大きな意義があると考えられる。

4-2 総合考察

本研究において、Kbl:JW ウサギは母動物や胎児についての種々の生殖パラメーターならびに胎児の形態学的な安定性が長期間、維持されていることが示された。さらに、サリドマイドを用いた Kbl:JW 系統と Kbl:NZW 系統での胚・胎児発生毒性試験結果の比較において、Kbl:JW では前肢奇形や短尾が高頻度に発現し、肺中間葉欠損や横隔膜ヘルニアなどの発生頻度が低いという違いがみられたが、Kbl:JW の 1988 年および 1995 年の試験でも同様な傾向がみられており、本系統のウサギのサリドマイドに対する質的な反応性も長期にわたって安定している事が示された。Kbl:JW および Kbl:NZW の背景データをまとめた報告はいくつか存在するが(Morita ら 1987 年、Ema ら 2012 年)、いずれも多数の施設の陰性対照群データをまとめたものである。本研究のように同一研究施設で長期にわたって調査された Kbl:JW の背景データはない。医薬品開発において胚・胎児発生毒性試験で観察された奇形の所見名は、一般的には先天異常用語集(日本先天異常学会 1991 年)や International Federation of Teratology Societies 委員会が作成した用語集 Version 1 (Horimoto ら 1998 年)などに基づいて決定するが、大小や長短などが関与する所見、例えば小眼球や短尾などは、形態学的変化の判断基準に関する施設毎の差異が生ずる可能性がある。従って、本研究では同一施設におけるほぼ一定の基準をもとに、長期間の背景データやサリドマイドへの反応性を解析することで、より厳密に安定性や系統比較を検証できたと考えられる。

Kbl:JW と Kbl:NZW ウサギ胎児のサリドマイドに対する感受性の比較検討結果から、医薬品の毒性評価に使用するという観点では差がなく、両系統ともサリドマイドの催奇形性を評価する系統として有用であると考えられたが、一部の所見には系統差が認められた。特に前肢の奇形発生頻度については Kbl:JW のほうが Kbl:NZW よりも高く、妊娠 9-10 日投与時には、特に大きな差がみられ、後肢の発生頻度を含めても Kbl:JW の方が高かった(Table 2-2-4、異常回転手発生頻度、Kbl:JW 前肢：51.1%、後肢：0%、Kbl:NZW 前肢：5.6%、後肢：11.7%)。サリドマイドはウサギの胚や胎児に対する致死作用や成長抑制作用を有し、これらの作用は投薬期間の長期化に伴い顕著となる。そのため、これらの作用による二次的な影響を受けずに催奇形性と関連する初期の変化

を感度良く評価するには、短い投与期間でより高い発生頻度を示す奇形の方が、その奇形のメカニズム解析には有用と考えられる。実際、Kbl:JW では *Hoxa11* の mRNA 発現の減少が前肢芽の前部側のみでみられ、後肢ではみられなかったが、この mRNA 発現の部位差は奇形発現の前後肢の発生頻度の差を反映していると考えられた。今回、Kbl:NZW のデータは得られなかったが、前肢の奇形に関連した遺伝子の発現解析には、前肢の奇形発生頻度がより高い Kbl:JW の方が Kbl:NZW よりも適していると考えられる。また、サリドマイドによる四肢奇形のメカニズムについては *cereblon* 以降の経路が解明されていないが、これらの前後肢の奇形発生頻度の部位差や系統差を利用し、前肢芽形成予定部位での遺伝子や蛋白質の発現の差を網羅的に解析することにより、奇形発現に関与する経路のみを抽出し、奇形メカニズム解明の一助にすることができる可能性がある。

参考文献

Ema M, Aoyama H, Arima A et al. 2012. Historical control data on prenatal developmental toxicity studies in rabbits. *Congenit Anom (Kyoto)*. 52:155-61.

Horimoto M, Ariyuki F, Daidohji S et al. 1998. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (Japanese Version 1). *Congenit Anom (Kyoto)* 38: 153-237. (In Japanese)

Morita H, Ariyuki F, Inomata N et al. 1987. Spontaneous malformations in laboratory animals: frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. *Congenit Anom (Kyoto)*. 27:147-206.

日本先天異常学会. 1991. 先天異常用語集. 東京, 日本: 金原出版株式会社

謝辞

長期間にわたってウサギ胚・胎児発生毒性試験のデータを取得し、また、サリドマイドを用いた実験の補助をしていただいた、武田薬品工業株式会社薬剤安全性研究所生殖毒性グループ在籍者の方々、同グループと一緒にサリドマイドを用いた実験を手伝っていただいた城塚康毅さん、山内俊明さん、山下輝芳さん、ウサギ母動物の血漿中濃度を測定していただいた粟辻啓文さん、サリドマイドの投与液を調製していただいた林敏子さんに感謝申し上げます。

WISH 法の実施に際し、技術的な指導やアドバイスをいただいた横浜薬科大学 川嶋芳枝先生、株式会社アワジェニック 田中仁夫様、広島大学総合科学部 河原明先生、肢形成遺伝子についてご教授いただいた東北大学 田村宏治先生に深く感謝申し上げます。

本研究をまとめ、発表するにあたり、きめ細かいご指導とご激励をいただきました武田薬品工業株式会社薬剤安全性研究所の佐藤恵一朗さん、松本清さん、広島大学総合科学部 河原明先生に心より感謝申し上げます。

最後に、実験や論文作成にあたり、心身両面を常にサポートしてくれた家族に感謝します。