

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

エクソソーム RNA を毒性指標とした  
次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究  
(21KD1001)

令和4年度 分担研究報告書

分担研究課題：妊娠母動物の毒性評価と胎仔の催奇形性評価

研究分担者 桑形麻樹子  
国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター・毒性部  
第二室・室長

研究協力者：高島 宏昌（株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所）  
長谷川 拓郎（株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所）

### 研究要旨

科学技術の進展に伴い年々増加する新規化学物質の安全性確保は極めて重要な課題であり、それらの生体影響の評価には、毒性機序の解明が必須とされるが、特に、生殖発生毒性学の分野は他の毒性分野よりもメカニズム解析が遅れている。評価方法が経験値に依存する由縁でもある。

我々は、これまでに、細胞間情報伝達の1つとして細胞から分泌される小胞であるエクソソーム中に含まれる RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2 年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (**Ono R. et al., Toxicology Reports 2020**)。

本研究においては、エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法の開発を行うことで、これまでの経験重視に依存していた催奇形性の評価をメカニズムに基づいた安全性評価にステップアップし、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能となることで、催奇形性作用を持つ化合物の迅速化、高感度化した評価を可能とすることを目的としている。

また、本研究においては、胎盤形成異常や、神経形成異常、代謝異常、免疫異常などの表現型を持つ遺伝子改変マウスを利用することで、催奇形性に関連する各表現型に対応したバイオマーカーとなるエクソソーム RNA を単離することも目的としている。そこから得られたバイオマーカーにより、未知の催奇形性物質に対しても、催奇形性を評価することが可能になる。さらに、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法がオルガノイド3D培養法における培養上清中のエクソソームにも応用が可能な検証を行なうことで、将来的な新規の動物実験代替法の開発に資する研究も行う。

3年計画の初年目にあたる令和3年度の本分担研究の進捗は以下の通りである。

・エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法の開発のために、マウス母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取法を検討し確立した。また、催奇形性陽性対照物質として、C57BL マウスに外脳症を誘発するバルプロ酸ナトリウムを選択した。バルプロ酸ナトリウムを妊娠マウスに経口投与して母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、羊膜、胎児）中の薬物動態を確認し、エクソソーム解析の補助とすることとした。今年度は、母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、羊膜、胎児）中における分析バリデーション試験を実施し、分析法を各化学物質投与により催奇形性を発現する動物実験の条件検討を行った。

3年計画の2年目にあたる令和4年度の本分担研究の進捗は以下の通りである。

・次世代型催奇形性評価法の開発の一環として、妊娠中のばく露により二分脊柱などの催奇形性や生後の自閉症などを発現することが知られる催奇形性陽性対照物質であるバルプロ酸を妊娠 9～11 日のマウスに経口

投与した。投与量は0、300、600、800 mg/kg で、投与容量は16 mL/kg とした。また、母動物および胎児中のバルプロ酸濃度の確認を行った。結果として、600 mg/kg 群では1例の胎児に神経管閉鎖不全が観察され、800 mg/kg 群ではほとんどの胎児が死亡しました。両群ともに、胎児には母動物血漿中のバルプロ酸濃度の約30～60%が確認され、子宮内位置による影響は見られなかった。

令和4年度研究（3年計画の2年目）は、計画通りに進捗している。

## A. 研究目的

化学物質の有害性評価、特に化審法におけるヒト健康影響に関する有害性において、化学物質の生殖発生への影響を迅速かつ正確に評価することは最重要課題の一つである。現行の生殖発生毒性試験法は、莫大な費用、時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、得られる判定基準が必ずしも施設間で一定とは言えない部分がある。

その内の1つである胚・胎児発生に関する試験（発生毒性試験）では、母毒性評価とともに胎児形態観察（外表、内臓および骨格観察）から催奇形性を評価する。その際に、腹内・腹間の感受性に差がある中で、形態変化を異常か変異に分類し、その発現率から催奇形性を判断する事は困難な場合がある。

近年、細胞間情報伝達の1つとして、細胞から分泌される小胞であるエクソソームが注目されている。エクソソームは体液中（血液、髄液など）を循環し、細胞特異的なマイクロRNAを内包することから、研究分担者の東京医大・落谷らは、腫瘍細胞に特異的なマイクロRNAを指標にした、血液1滴による13種類の早期がん診断法（精度95%以上）を開発した経験を持つ。

我々は、エクソソームRNAを指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している（**Ono R. et al., Toxicology Reports 2020**）。

本研究は、これまでの実績、経験を活かし、エクソソームRNAを指標にした次世代型の催奇形性評価法の確立と催奇形性の発現メカニズムの解明を目的とする。

エクソソーム中に多く内包されることが知られるマイクロRNAが催奇形性に寄与している報告もあることから、本研究の特徴は、エクソソームRNAを指標することで、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋がることである。

昨年度（令和3年度）に確立した試料採取法に基づ

いて、今年度は催奇形性陽性対照物質であるバルプロ酸投与後の母動物血清および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取することを目的とした。

また、胎盤形成異常や、神経形成異常、代謝異常、免疫異常などの表現型を持つ遺伝子改変マウスを利用することで、催奇形性に関連する各表現型に対応したバイオマーカーとなるエクソソームRNAを単離することも目的としている。そこから得られたバイオマーカーにより、未知の催奇形性物質に対しても、催奇形性を評価することが可能になる。

さらに、エクソソームRNAを毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド3D培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D培養環境の中で形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できると考えられる。

そこで、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにすることも目的としている。これは、動物福祉（3Rs）の観点による代替法への応用を考慮した取組の一環である。具体的には、オルガノイドの培養上清中のエクソソームが*in vivo*のエクソソームと同様に毒性バイオマーカーとなりうるのかの検証を行う。

## B. 研究方法

本研究においては、毒性発現メカニズムを考慮した次世代型の生殖発生毒性評価法を確立することを目的に、以下の概要を行う。

● エクソソームRNAを腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法を開発するために、妊娠マウスに既知の催奇形性化合物を経口投与し、胎児に発現する形態変化から毒性指標となるエクソソームRNAの同定を次世代シーケンス解析により行う。

● 次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、ウィルソン病モデルマウスを用いて、母動物の体内にいるAtp7b KOマウス胎児が分泌するエクソソームRNAを母体血で検出できるかを検証す

る。

● *in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとされるオルガノイド 3D 培養法の培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームを毒性指標として利用可能かを検討し、動物実験によらない次世代型代替法の開発を行う。

これらに加えて、対象マウス個体の一般的な毒性評価を行うことで、現行の生殖毒性評価と本研究で開発する次世代型生殖毒性評価法の比較を行う。

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センターにおいては、化学物質のマウスへの投与実験および採血および胎児観察（桑形）、化学物質の用量設定実験および病理組織学的検査・生化学検査（平林）、エクソソームの抽出およびエクソソーム RNA の次世代シーケンサーによる網羅的解析（小野）を行い、東京医科大学・医学総合研究所・分子細胞治療研究部門においては、催奇形性のバイオマーカー候補の探索およびその詳細の解析（落谷）を行い、大阪大学・微生物病研究所（伊川）においては、本研究において得られる発生ステージに特異的なマイクロ RNA の変異マウスの作製、および催奇形性解析に適したモデルマウスの作製（伊川）を行う。また、国立がん研究センター（成瀬）においては、毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討する。

#### ・マウス血液からのエクソソーム RNA 単離（R3-4 年度）

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルを用いて、国立医薬品食品衛生研究所および東京医科大学・分子細胞治療研究部門においてエクソソームの単離を行う。具体的には、超遠心ペレットダウン法を行い、エクソソーム単離後は、Nanosight またはエクソソームの表面抗原に対するウエスタンブロットティングやエクソスクリーン法により、単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウントを行い、エクソソーム単離効率の評価を行う。

#### ・マウスを用いたバルプロ酸ナトリウム経口投与による母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取法（R4 年度）

催奇形性陽性対照物質として二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を用いた。バルプロ酸は抗てんかん薬として使用されている。本研究では、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠9日

から11日にバルプロ酸を経口投与し、投与最終日（妊娠11日）、これまでにエクソソーム解析実績のある妊娠15日、および催奇形性評価に選択されている妊娠20日に、それぞれ、母動物血漿および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取した。

また、曝露状態を確認するために、母動物および胎児中のバルプロ酸濃度を確認した。

#### 1. 共通事項

##### 1-1. 被験物質

測定対象物質：バルプロ酸ナトリウム

製造元：Sigma-Aldrich Japan G.K.

CAS番号：1069-66-5

分子量：166.19

ロット番号：WXBD4552V

純度：99.0%

性状：白色、粉末

保管条件：密栓、冷暗所

##### 1-2. 媒体

名称：0.5 w/v%メチルセルロース溶液（略称：0.5% MC溶液）

製造元：富士フィルム和光純薬株式会社

ロット番号：CAE0466

#### 媒体の調製

必要量のメチルセルロースを秤取し、攪拌しながら温めた注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号1J76）に徐々に加えて分散させた。これを冷やしてメチルセルロースを溶解させ、更に注射用水を加えて0.5%MC溶液とした。調製後、冷蔵保存した。

##### 1-3. 被験液の分析

18.75 mg/mL（300 mg/kg群）および37.5 mg/mL（600 mg/kg）の被験液について、媒体中濃度を測定した。各被験液の濃度の表示値に対する割合は100.0%及び102.2%であり、いずれも許容範囲内（濃度：表示値に対する割合が100% ± 10%）であった。

測定施設：一般財団法人日本食品分析センター

##### 1-4. 使用動物

動物種：マウス（SPF）

系統：C57BL/6J

供給源：ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、厚木飼育センター

入荷時週齢：雌10週齢、雄11週齢

匹数：交配用雄82匹、雌92匹

使用した妊娠動物：46匹

入荷後1週間の検疫・馴化期間を経て、一般状態及び体重推移に異常のない動物を用いた。

交配：11週齢以上の雌1匹に12週齢以上の雄1匹を終夜同居させた。翌朝、膈内に膈栓が確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠0日とした。

群分け：交尾成立日（妊娠0日）ごとに行い、妊娠0日の体重を基に各群の体重が可能な限り均等となるようにコンピュータを用いたブロック化により行った。余剰動物は動物管理部門へ移管した。

##### 1-5. 飼育環境

温度（23 ± 3℃）、湿度（50 ± 20%）、換気

回数(10~15回/時間)、照明(1日12時間、07:00~19:00)に統御された動物飼育室で飼育した。飼育は床敷(コンフィネスト、株式会社ファルマ)を入れたプラスチックケージ(W155×D245×H150 mm)に個別飼育した(交配期間を除く)。飼料は固型飼料CRF-1(γ線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社)をステンレス製給餌器に入れて自由に摂取させ、給水は自動給水装置により自由に水道水を摂取させた。環境エンリッチメントとして、IACUCの指針に従って、ケージの蓋からステンレス棒を吊り下げて遊具とし、床敷と同じ素材のBiting board(3cm四方のプレートを中央で山折りにしたもの)を噛み材として与えた。

## 2. エクソソーム解析用試料採取試験

### 2-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は臨床適用経路である経口投与を選択し、投与期間はバルプロン酸ナトリウムの催奇形作用の臨界期である妊娠9日より11日までの3日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回(計3回)とした。

### 2-2. 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与方法に際して一般的な強制経口投与とした。バルプロン酸ナトリウムは注射用水に5%濃度で溶解することが知られていることから、催奇形作用が明瞭に発現すると考えられる800 mg/kgを投与可能な16 mL/kgを投与容量とした。投与液は、フレキシブル胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した(8:00~11:00の間)。動物ごとの投与液量(表示単位:0.01 mL)は投与当日の体重を基準に算出した。

### 2-3. 投与量及び群構成

投与量は300、600及び800 mg/kgの3用量とし、媒体対照群を含め試料採取時点を考慮した10群構成とした。すなわち、媒体対照群、300及び600 mg/kg群に妊娠11日剖検群、妊娠15日剖検群及び妊娠18日剖検群をそれぞれ設けた。また、800 mg/kg群には妊娠18日剖検群を設定した。剖検群ごとの交尾成立雌動物数を4匹(800 mg/kgは死亡等を考慮し8匹)とした。群構成を表1に示した。ただし、媒体対照群、300及び600 mg/kg群に不妊が認められた場合は、適宜交尾成立動物を追加した(動物番号は各群5番以降を続けて割当てた)。

表1

投与量(mg/kg)	剖検時期	投与容量(mL/kg)	濃度(ng/mL)	交尾成立雌数	動物番号
0	GD1 1	16	0	4	1101~1104
	GD1 5			4	2101~2106

300	GD1 8	16	18.75	4	3101~3105
	GD1 1			4	4101~4107
	GD1 5			4	5101~5106
	GD1 8			4	6101~6105
600	GD1 1	16	37.5	4	7101~7106
	GD1 5			4	8101~8106
	GD1 8			4	9101~9106
800	GD1 8	16	50	8	10101~10108

### 投与量設定根拠

本被験物質の臨床適用量は成人1人当たり1日400~1200 mgである。基準体重を50 kgとすると、この量は8~24 mg/kgに相当する。バルプロ酸を妊娠初期に服用したヒトでは二分脊椎の他、心室中隔欠損等の心奇形や多指症、口蓋裂、尿道下裂などの外表奇形を持つ児が出現することが知られている。本試験においては、明確な影響量における母動物及び胎児のエクソソームの量や内容に対する影響を検討するため、臨床用量の13~75倍で、奇形を起こすとした文献が存在する300 mg/kg及び600 mg/kgを投与する群を設けた。なお、600 mg/kgの投与によっても奇形が認められない胎児が存在したため、800 mg/kgを追加した。

### 2-4. 動物の観察

全動物について、生死並びに体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。観察は、投与期間中は1日3回、投与前、投与直後及び投与1~3時間後の間(ただし、妊娠11日剖検群の妊娠11日は投与前、投与直後及び採血前の3回)、その他の期間は1日1回(午前中)行った。体重は、妊娠0、4、9、10、11、15、18日(妊娠11日剖検群及び妊娠15日剖検群はそれぞれ妊娠11及び15日まで)の07:00~12:30の間(投与期間中は投与前)に測定した。また、投与期間中(妊娠9日から妊娠11日)の体重増加量を算出した。

### 2-5. 剖検

妊娠11日剖検群の各4~7例より、妊娠11日の投与後1時間の時点(許容範囲60±5分)において、イソフルラン吸入麻酔下に無処置シリンジを用いて腹大動脈から可能な限り採血した後、腹大動脈を切断して放血により安楽死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。妊娠15日剖検群の各6例は妊娠15日の、妊娠18日剖検群の各5~6例(800 mg/kg群は8例)は妊娠18日の、いずれも妊娠11日に採材した動物とほぼ同じ時刻(09:00~12:00の間)に、同様に採血後放血して安楽死させ、剖検した。

### 2-6. 帝王切開及び母血清中エクソソーム解析用試料採取

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物について

は、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

肉眼的に着床が認められない動物の子宮は、2%NaOH水溶液により透明化して着床部位の有無を観察した。着床部位が認められない動物は不妊と判断した。

#### 2-7. 母動物血清中エクソソーム解析用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、室温で30分以上放置した後、遠心分離（4°C、6000 ×g、2分間）により血清を得た。得られた血清試料は試験番号、試料採取時点、動物番号、試料番号、採血年月日、試料名を明記したラベルを貼付したタンパク低吸着チューブに入れ、測定時まで-80°Cの冷凍庫（許容値：-70°C以下）に保存した。

#### 2-8. 羊水、胎児血漿（GD18）、胎児（GD11、GD15）、胎盤の採取

##### 1) 採取日及び採取時点

妊娠11日剖検群：各群4例

最終投与1時間後（09:00~12:00の間）

妊娠15日剖検群：各群4例、

妊娠11日帝王切開とほぼ同じ時刻

（09:00~12:00の間）

妊娠18日剖検群：各群4例（800 mg/kg群は8例）、

妊娠11日帝王切開とほぼ同じ時刻（09:00~12:00の間）

##### 2) 対象部位（サンプル）の採取

###### (a) 妊娠11日剖検群

子宮壁を切開し、卵黄囊膜に被包された胎児を摘出した。その後、生理食塩液を入れたシャーレ中等で卵黄囊膜を切開し、胎児と胎盤を分離した。胎盤はほぼ均等に2分割し、それぞれRNA laterと10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。胎児は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、形態観察を実施した。

###### (b) 妊娠15日剖検群

妊娠動物の子宮壁を切開後、卵黄囊膜の外側から切開し、バリアチップで羊水をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に採取した。羊水を採取した後、卵黄囊膜に被包された胎児及び胎盤を摘出した。胎児と胎盤を分離し、個別に重量を記録した。胎盤はほぼ均等に2分割し、それぞれRNA laterと10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。羊水は遠心分離（4°C、6000 ×g、2分間）後、上清をバリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。胎児は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

###### (c) 妊娠18日剖検群

妊娠動物の子宮壁を切開し、卵黄囊膜に被包された胎児を摘出後、胎児の頸部を切開して頸動脈を切断し、漏出した血液をヘパリン処理したヘマトクリット毛細管を用いて可能な限り採血した。血液はポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、遠心分離（4°C、6000 ×g、2分間）により血漿とし、バリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。採血後の胎児は重量を記録し、10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

また、胎盤は重量を記録後、ほぼ均等に2分割し、それぞれRNA laterと10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。

#### 3) 試料番号

羊水又は胎児血漿、胎盤及び胎児は、それぞれ試料番号を記載したものをラベルしたサンプル管に収納した。試料番号は、着床番号と内容物を示す番号をハイフンで繋ぎ表示した。着床番号は以下の表2に従って1生存胎児ごとに割り振った。

表2

投与量 (mg/kg)	剖検時期	着床番号
0	GD11	101~
	GD15	201~
	GD18	301~
300	GD11	401~
	GD15	501~
	GD18	601~
600	GD11	701~
	GD15	801~
	GD18	901~
800	GD18	1001~

着床番号、ハイフンに続けて示す内容物は、サンプル管内の試料の種類を1桁の数字で示した。すなわち、-1は羊水又は胎児血漿、-2は胎児、-3は胎盤（RNA later）、-4は胎盤と識別した。

サンプル	枝番号	保存条件
羊水又は胎児血漿	-1	冷凍（-80°C）
胎児	-2	室温
胎盤（RNA later）	-3	冷蔵
胎盤（10%リン酸緩衝ホルマリン液）	-4	室温

#### 2-8. 統計処理

・MiTOX-BOZOシステム（Version 9.3.1.1、三井E&Sシステム技研株式会社）

#### 3. バルプロ酸経口投与後の母動物血漿中および子宮内容物中の濃度確認

バルプロ酸をその奇形の臨界期（妊娠9~11日まで）の妊娠雌動物に投与し、胚・胎児発生への有害作用を起こした状況での、母動物血漿中並びにその胎児中のバルプロ酸濃度を測定することにより、被験物質の妊娠動物における曝露状況を評価した。

#### 3-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

2. エクソソーム解析用試験と同様（2-1.参照）

#### 3-2. 投与方法

2. エクソソーム解析用試験と同様（2-2.参照）

#### 3-3. 投与量及び群構成

投与量は300及び600 mg/kgの2群構成とした。1群当たりの交尾成立雌動物数を5匹とした。群構成を表3に示した。

表3

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容 量 (mL/kg)	交尾成 立雌数	動物番号
300	18.75	16	5	1101~1105
600	37.5	16	5	2101~2105

### 3-4. 投与量設定根拠

被験物質の臨床適用量は1日400~1200 mgである。基準体重を50 kgとすると、この量は8~24 mg/kgに相当する。この量のバルプロ酸を妊娠初期に服用したヒトでは二分脊椎の他、心室中隔欠損等の心奇形や多指症、口蓋裂、尿道下裂などの外表奇形を持つ児が出現することが知られている。

Dawning et al. (注1)によれば、800 mg/kg又は400 mg/kgのバルプロ酸を妊娠9日（膣栓＝妊娠0日）の昼に単回腹腔内投与した結果、脊椎、肋骨及び指の奇形が報告されている。本試験においては、当初、明確な影響量における母動物及び胎児のエクソゾームの量や内容に対する影響を検討するため、臨床用量の16~100倍で、全胎児に奇形を起こすとした文献が存在する400 mg/kg及び800 mg/kgを投与する群を設けた。実際に投与を行うと、800 mg/kgでは初回投与で母動物が死亡し、この用量では必要なTK試料数の確保が難しいと想定されたことから、投与量を600及び300 mg/kgに変更した。

(注1) Downing Chris, Biers Jami, Larson Colin, Kimball Alexi, Wright Hali, Ishii Takamasa, Gilliam David, Johnson Thomas: Genetic and Maternal Effects on Valproic Acid Teratogenesis in C57BL/6J and DB A/2J Mice. Toxicological Sciences. 116 (2) 632-639 (2010).

### 3-5. 動物の観察

生死並びに体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。観察は、投与期間中は1日3回、投与前、投与直後及び投与1~3時間後の間（ただし、妊娠11日は投与前、投与直後及び採血前の3回）、その他の期間は1日1回（午前中）行った。体重は妊娠0、4、9、10、11日の07:00~12:30の間（投与期間中は投与前）に測定した。なお、800 mg/kgを投与した1例の死亡動物は、搬出前に測定した結果、著しい重量低下は認められなかった。

### 3-6. 剖検及び帝王切開

妊娠11日の投与後1時間の時点（許容範囲60±5分）において、イソフルラン吸入麻酔下にて、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて腹大動脈から可能な限り採血（剖検時間の偏りを考慮し、低用量群と高用量群を交互に採血した）した後、腹大動脈を切断し放血により安楽死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。

また、800 mg/kgを投与した1例の死亡動物は、発見後速やかに、剖検を行ったが、特記すべき異常は認められなかった。本例では死亡に先立つ一般状態の異常も観察されなかった。800 mg/kgを投与し死亡した1例の一般状態観察、体重測定、剖検所見については本試験の結果から、削除した。

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

肉眼的に着床が認められない動物の子宮は、2%NaOH水溶液により透明化して着床部位の有無を観察した。着床部位が認められない動物は不妊と判断した。母動物ごとに妊娠状態を記録し、第6.1.3項で採血し、第6.1.5項に従って処理した血漿とともに試験場所に送付した。肉眼的に着床が認められない動物の子宮は観察後廃棄し、TK試料は測定対象としなかった。

### 3-7. 母動物血漿中濃度測定用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器に移し、遠心分離（4℃、6000 ×g、2分間）により血漿を得た。得られた血漿試料は試験番号、採血時期、動物番号、試料番号、採血年月日、採血時点、試料名を明記したラベルを貼付したポリプロピレン製容器に入れ、測定時まで-80℃の冷凍庫（許容値：-70℃以下）に保存した。

### 3-8. 胎児の採取

#### 1) 採取日及び採取時点

妊娠11日：各群5例、最終投与1時間後

#### 2) 対象部位の採取

子宮壁を切開後、卵黄嚢膜と胎児及び胎盤を摘出し分離した。

胎児はそれぞれ試料番号をラベルしたサンプル管に個別に収納し、重量を記録した。

#### 3) 試料番号

試料番号は、着床番号と内容物を示す番号をハイフンで繋ぎ表示した。

着床番号は、300 mg/kg群は201番から、600 mg/kg群は301番から1生存胎児ごとに割り振った。

着床番号、ハイフンに続けて示す内容物は、サンプル管内の試料の種類を1桁の数字で示した。すなわち、1は胎児がサンプル管の内容物であった。

#### 4) サンプルの保管

全てのサンプル管は測定まで-80℃の冷凍庫（許容値：-70℃以下）に保存した。

### 3-9. 母動物血漿中濃度及び胎児中濃度測定

分析は株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所に委託した。

測定対象試料は、各群、各時点の妊娠成立動物のうち個体番号が若い3例から得られたTK試料を測定対象とした。

#### 分析方法：

液体クロマトグラフータンデム質量分析（LC-MS/MS）法

機器名及び型式	メーカー
四重極タンデム型質量分析計（MS/MS）	Waters Corporation
データ処理ソフト MassLynx 4.1	Waters Corporation
高速液体クロマトグラフ（HPLC）ACQUITY UPLC I-CLASS	Waters Corporation

測定対象物質：バルプロ酸

標準物質：valproic acid sodium salt

ロット番号：WXBD4552V

塩換算係数：0.8677 (=144.21/166.19)

内標準物質：Diclofenac sodium salt

ロット番号：P7E3B

なお、簡易分析バリデーションは昨年度（R3年度）に

実施している。

(倫理面の配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

## C. 研究結果及び考察

### ・次世代型催奇形性試験法の確立に向けた動物実験系の高度化 (R3 年度：桑形)

#### 1. 帝王切開

本研究における妊娠期エクソソーム解析は妊娠9日、妊娠15日および妊娠18日を予定している。

研究代表者の先行研究により妊娠15日のエクソソーム解析予備データがあることから、今年度は妊娠15日にて試料を採取した。

2日間にわたり、解剖を実施した。7例いずれも妊娠していた。

#### 2. 母動物採血

麻酔後、心採血および腹大動脈からの採血を試みたが、薬物動態を調べることから血液成分を一定にするために腹大動脈から採血することにした。

ヘパリンNa入りの1mLシリンジにて採血し、1.5 mLチューブに採取して、1000Gにて3分間、遠心し、血漿を分離した。血漿はタンパク低吸着の1.5 mLチューブにいれ、-80℃の冷凍庫に保管した。

#### 3. 子宮内容物の採取

着床位置に合わせて子宮内容物番号をふり、PBS入り滅菌シャーレ(110x10 mm)中にて子宮壁を両鈍眼科ハサミおよび先鋭ピンセットにて子宮広間膜側を切開し、1個体ずつ子宮壁から先曲がりピンセット(NO.7)を用いて子宮壁から剥離させ、PBS入りのペトリディッシュ(35 x10 mm, sterile, Falcon)にいれた。

PBSが入っていない別のペトリディッシュ内で卵黄囊膜の一部マクロスプリング剪刀にて切れ込みをいれ、250 $\mu$ LのエップENDORFチューブを卵黄囊内に挿入し、羊水を採取した。

羊水採取後、卵黄囊膜を切開し、胚、卵黄囊膜および胎盤に分け、それぞれ2.5 mLのポリプロピレンチューブに入れた。

なお、全てのチューブは試料保管前に重量を測定し、試料保管後に再度重量を測定し、その差を求めて試料重量として記録した。

#### 4. マウス血漿および子宮内容物(卵黄囊膜、羊水、胚、胎盤)のバルプロ酸ナトリウム濃度測定法の分析バリデーション

血漿、羊水、胚、胎盤、卵黄囊膜の検量線の各濃度(血漿、羊水：1.00~2.00  $\mu$ g/mL、胎児、胎盤、卵黄囊膜：2.00~4.00  $\mu$ g/mL)における真度はそれぞれ、92.5~114.0%、94.5~105.0%、93.5~110%、88.0~105.5%及び85.7~114.5%となり、いずれも判定基準を満たした。従って、検量線の直線性は良好であると判断した。

バリデーション項目(選択性、検量線の直線性)が判定基準を満たしたため、本測定法はマウス血漿、羊水：1.00~2.00  $\mu$ g/mL、子宮内容物：2.00~4.00  $\mu$ g/mLの範囲にてバルプロ酸濃度測定に適用できると判断した。

## 1. エクソソーム解析用試料採取試験

### 1-1. 一般状態および体重推移

800 mg/kg群の1例が初回投与(妊娠9日)の投与後1~3時間に腹臥を呈し、投与2日に死亡した。剖検では肉眼的異常はみられなかった。死亡例には肉眼的に着床が認められ、妊娠が確認された。

生存例の一般状態は、800 mg/kg群では投与期間中(妊娠9-11日)の投与後1~3時間に自発運動の減少あるいは腹臥がほぼ全例に観察された。

媒体対照群、300及び600 mg/kg群では、いずれの動物にも一般状態に異常はみられなかった。

### 1-2. 体重 (Table 1)

800 mg/kg群では、投与期間(妊娠9-11日)及び投与終了後期間(妊娠11-18日)の体重に増加抑制傾向がみられた。

媒体対照群、300及び600 mg/kg群では、いずれの動物にも体重推移に異常はみられなかった。

### 1-3. 剖検

いずれの動物にも剖検所見に異常はみられなかった。

### 1-4. 帝王切開所見 (Table 2)

800 mg/kg群では、死亡胚・胎児数に増加傾向がみられたが、いずれの胎児にも外表異常はみられなかった。

媒体対照群、300及び600 mg/kg群では、いずれの動物にも帝王切開時観察所見に異常はみられず、媒体対照群及び300 mg/kg群では、いずれの胎児にも外表異常はみられなかった。600 mg/kg群では、妊娠15日剖検群の1胎児(胎児番号：8104-R2、着床番号：819)で神経管閉鎖不全がみられた。

### 1-5. 小括

バルプロ酸投与後の妊娠11、15及び18日に300 mg/kg群および600 mg/kg群の各4匹の母動物からそれぞれ4~11匹の生存胚・胎児が得られ、母動物血清、胎児、羊水、胎児血漿及び胎盤を採取した。

800 mg/kgでは4匹の妊娠が確認されたが、1匹は途中死亡、2匹は全胚死亡となった。残りの1母体から8匹の生存胚・胎児が得られ、母動物血清、胎児、胎児血漿及び胎盤を採取した。

得られた試料を用いて令和5年にエクソソーム解析を実施する予定である。

## 2. バルプロ酸経口投与後の母動物血漿中および子宮内容物中の濃度確認

### 2-1. 一般状態および体重推移

いずれの動物にも一般状態に異常は認められず、体重推移に異常は観察されなかった。

### 2-2. 剖検および帝王切開

剖検時に異常は観察されず、帝王切開所見にも異常は認められなかった。

### 2-3. 母血漿中バルプロ酸濃度 (Table 3)

300又は600 mg/kgのバルプロ酸を、妊娠マウスの妊娠9日~11日に1日1回反復経口投与した時の、妊娠11日の投与1時間後の平均血漿中バルプロ酸濃度は、それぞれ224及び498  $\mu$ g/mLであった。



#### 2-4. 胎児組織中バルプロ酸濃度 (Table 4)

300又は600 mg/kgのバルプロ酸を、妊娠マウスの妊娠9~11日に反復経口投与した時の妊娠11日の投与後約1時間の個体ごとの平均胎児中バルプロ酸濃度は、それぞれ66.7~106及び159~312 µg/gであった。

子宮内位置に大きな差はなかった。

#### 2-5. 小括 (Table 5)

300 mg/kg群の1母動物の1胎児 (母動物番号1102-R1) については、胎児中濃度が明らかに低かった。この児は肉眼的に小型であり、剖検時である妊娠11日に比較的近い時期に死亡していた可能性が考えられた。厳密な死亡の判断は困難であるが、当該胎児中濃度は同腹の他の児に比較して明確な外れ値であったことから、最終投与時には血流が途絶していたこと等により、被験物質が分布しなかったものと判断し評価データから除外した。

母動物血漿中バルプロ酸濃度の群平均濃度は、300 mg/kg群が224 µg/mLであるのに対し、600 mg/kg群では498 µg/mLであった。投与量が2倍に増加したのに対し2.22倍の血漿中濃度を示した。この値は各投与量の母動物3例毎のばらつき (CV 300 mg/kg群 : 18.8%、600 mg/kg群 : 24.7%) から、母動物血漿中濃度も2倍になっていると考えられた。

胎児中バルプロ酸濃度は300 mg/kg群の群平均値が86.1 µg/g、600 mg/kg群では239 µg/gで、2.77倍であった。300 mg/kg群の各腹の胎児中バルプロ酸濃度の腹ごとの平均値は母動物血漿中濃度の36.9~40.5%、600 mg/kg群では43.8~51.8%で両用量間に大差はなかった (各腹における個々の胎児中濃度の母動物血漿中濃度に対する割合は、300 mg/kg群では21.9~45.9%、600 mg/kg群では25.5~63.3%)。

両者には大差はなかったものの、600 mg/kg群は300 mg/kg群に比較して高値傾向を示した。本試験における用量段階は2段階で、確度の高い推定を行うことはできないが、この傾向は胎児に至るまでの間に投与量に依存しない一定速度の代謝が存在し相対的に低用量群の胎児中濃度が低値であったのか、測定対象である胎児以外の器官への分布に飽和が生じた等によって高用量群の胎児中濃度が高値であったといった事態が発生した可能性等が考えられる。

また、測定値の偏差に子宮角の左右、着床位置の卵巣からの距離等による一定の傾向は認められず、いずれの胎児中濃度にも着床位置による差は認められないと結論した。

#### 4. 結論

催奇形性物質であるバルプロ酸を胎児の神経管閉鎖時期の母動物に経口投与し、母動物血清、子宮内容物をエクソソーム解析用に採取した。

既報を参考に、300~800 mg/kgのバルプロ酸を経口投与した結果、600mg/kg群で胎児に神経管閉鎖不全が、観察され800 mg/kg群ではほとんどの胚胎児が死亡した。胎児中のバルプロ酸濃度は母動物血漿中濃度の300 mg/kg群では36.9~40.5%、600 mg/kg群では43.8~51.8%であった。なお、子宮内着床位置に差はなかった。

この試料を用いて、来年度に解析を行う予定である。

#### E. 健康危険情報

総括研究報告書参照

## F. 研究発表

### 1. 論文発表 (令和4年度)

- 1) Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.  
Molecular network analysis of RNA viral infection pathway in diffuse- and intestinal-type gastric cancer  
Fundamental Toxicological Sciences 9 (2) 37-46, 2022
- 2) Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Perkins E, Yokozaki H, Sasaki H.  
Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition Pathway and Artificial Intelligence-Based Modeling for Pathway Activity Prediction  
Onco 2023, 3(1), 13-25
- 3) **Kuwagata M**, Sato A, Izumi Y, Chihara K, Yamasaki H, Katsumata Y, Ooshima Y, Buschmann J, Fujiwara M:  
Current activities between the DevTox Berlin workshops and the Japanese Teratology Society Terminology Committee in harmonizing the terminology for classifying anomalies in laboratory animals in developmental toxicity studies: Report from the Satellite Workshop of the 60th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society; Congenic Anom (Kyoto). 2022; 62: 198-202
- 4) Yuda M., Aizawa S., Tsuboi I., **Hirabavashi Y.**, Harada T., Hino H.,  
Hirai S., Imbalanced M1 and M2 Macrophage Polarization in Bone Marrow  
Provokes Impairment of the Hematopoietic Microenvironment in a Mouse  
Model of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. Biol Pharm Bull. 45(2022),  
1602-1608.
- 5) JPMA 課題対応チーム(13名), ICH S6 対応研究班(5名).  
核酸医薬品の非臨床安全性評価における疑問と考え方について 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、2022;53  
(3), 211-218.
- 6) Okamura A, **Yoshioka Y**, Saito Y, **Ochiya T**.  
Can Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems Be a Game Changer in Cardiac Disease?  
Pharm Res. 2022 Dec 28. Review.
- 7) Naito Y, **Yoshioka Y**, **Ochiya T**.  
Intercellular crosstalk between cancer cells and cancer-associated fibroblasts via extracellular vesicles.  
Cancer Cell Int. 2022 Nov 24;22(1):367. Review.
- 8) Kobayashi M, Fujiwara K, Takahashi K, **Yoshioka Y**, **Ochiya T**, Podyma-Inoue KA, Watabe T.  
Transforming growth factor- $\beta$ -induced secretion of extracellular vesicles from oral cancer cells evokes endothelial barrier instability via endothelial-mesenchymal transition.  
Inflamm Regen. 2022 Sep 4;42(1):38.
- 9) Tamura T, **Yoshioka Y**, Sakamoto S, Ichikawa T, **Ochiya T**.  
Extracellular vesicles in bone homeostasis: key roles of physiological and pathological conditions.  
J Bone Miner Metab. 2022 Aug 9. Review.
- 10) **Yoshioka Y**, Shimomura M, Saito K, Ishii H, Doki Y, Eguchi H, Nakatsura T, Itoi T, Kuroda M, Mori M, **Ochiya T**.  
Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection and recurrence biomarkers for pancreatic cancer.  
Cancer Sci. 2022 Oct;113(10):3498-3509.
- 11) Ishigamori, R., **Naruse, M.**, Hirata, A., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T.: Featured Article : The Potential of Organoids in Toxicologic Pathology. Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model. J. Toxicol. Pathol. 35 (3) 211–223 (2022)
- 12) Imai, T., **Naruse, M.**, Ochiai, M., Matsumoto, K., Ikeda, S., Kani, M., Kato, Y., Hirayama, A., Soga, T., Hori, Y., Yokoi, A., Ochiai, A: Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs. Oncol Lett 24, 221 (2022)
- 13) Imai, T., **Naruse, M.**, Machida, Y., Fujii, G., Mutoh, M., Ochiai, M., Takahashi, M., Nakagama, H.: Feeding a high-fat diet for a limited duration increases cancer incidence in a breast cancer model. Nutr. and Cancer 2022 Oct 20;1-13
- 14) Kaneda Y, Miyata H, Shimada K, Oura S, **Ikawa M**.  
Testis-specific proteins, TSNAXIP1 and 1700010I14RIK, are important for sperm motility and male fertility in mice.  
Andrology. 2023 Jan 4. doi: 10.1111/andr.13378. Epub ahead of print. PMID: 36598146.
- 15) Oura S, Ninomiya A, Sugihara F, Matzuk MM, **Ikawa M**.  
Proximity-dependent biotin labeling in testicular germ cells identified TESMIN-associated proteins. Sci Rep. 2022 Dec 23;12(1):22198. doi: 10.1038/s41598-022-26501-7. PMID: 36564444; PMCID: PMC9789103.
- 16) Ozawa M, Taguchi J, Katsuma K, Ishikawa-Yamauchi Y, Kikuchi M, Sakamoto R, Yamada Y, **Ikawa M**.  
Efficient simultaneous double DNA knock-in in murine embryonic stem cells by CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated circular plasmid targeting for generating gene-manipulated mice. Sci Rep. 2022 Dec 13;12(1):21558. doi: 10.1038/s41598-022-26107-z. PMID: 36513736; PMCID: PMC9748034.
- 17) Ozawa M, Emori C, **Ikawa M**.  
CRISPR/Cas9-Mediated Highly Efficient Gene Targeting in Embryonic

Stem Cells for Developing Gene-Manipulated Mouse Models. J Vis Exp. 2022 Aug 24;(186). doi: 10.3791/64385. PMID: 36094255.

18) Oura S, Hino T, Satoh T, Noda T, Koyano T, Isotani A, Matsuyama M, Akira S, Ishiguro KI, **Ikawa M**. Trim41 is required to regulate chromosome axis protein dynamics and meiosis in male mice. PLoS Genet. 2022 Jun 1;18(6):e1010241. doi: 10.1371/journal.pgen.1010241. PMID: 35648791; PMCID: PMC9191731.

19) Oyama Y, Miyata H, Shimada K, Larasati T, Fujihara Y, **Ikawa M**. TULP2 deletion mice exhibit abnormal outer dense fiber structure and male infertility. Reprod Med Biol. 2022 May 23;21(1):e12467. doi: 10.1002/rmb2.12467. PMID: 35619658; PMCID: PMC9126596.

## 2. 学会発表

(令和4年度)

1) **小野竜一**, 山本 雄介, **成瀬 美衣**, 田邊 思帆里, **吉岡 祐亮**, 相崎 健一, 広瀬 明彦, **落谷 孝広**, **平林 容子**, **北嶋 聡**  
cfDNA による毒性評価  
第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.29.)  
(口頭発表)

2) **Ryuichi Ono**.  
Horizontal Gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing.  
International Congress of Toxicology, Maastricht, October, 2022 (口頭発表; シンポジウムオーガナイザー)

3) **小野 竜一**, 田埜 慶子, 安田 智, 佐藤 陽治, 内田 恵理子, **平林 容子**, **北嶋 聡**  
ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立  
日本食品衛生学会第118回学術講演会 2022.11.11  
長崎 (口頭発表)

4) **Ryuichi Ono**.  
Toxicity Concerns of Exosome Products.  
American College of Toxicology, Denver, Novembr, 2022  
(招待講演)

5) **小野竜一**  
哺乳類のレトロトランスポゾン研究から解き明かす  
多様な生命機能  
第92回日本遺伝学会学術年会 (2020.9.17.)  
(招待講演)

6) **桑形麻樹子**, 種村健太郎  
周産期の甲状腺機能低下による次世代影響  
第49回日本毒性学会、シンポジウム、2022. 6/30-7/2、  
札幌 (口頭発表)

7) **桑形麻樹子**  
ウサギを用いたサリドマイドの発生毒性; 雄精漿移行  
による催奇形性発現の可能性  
第49回日本毒性学会、シンポジウム、2022. 6/30-7/2、  
札幌 (口頭発表)

8) 高島宏昌、田中加奈子、羽田亮、長谷川拓郎、山崎  
浩史、**北嶋聡**、**桑形麻樹子**  
サリドマイドに係る雄性生殖を介した発生毒性  
第62回日本先天異常学会学術集会、2022. 7/29-7/31、  
金沢 (ポスター)

9) 五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、相田麻子、高  
橋祐次、**北嶋聡**、**桑形麻樹子**  
ビスフェノール類 4,4'-(1,3-  
Dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおけ  
る皮下および経口投与による子宮肥大試験  
第49回日本毒性学会、2022. 6/30-7/2、札幌 (ポスタ  
ー)

10) 五十嵐智女、松村万里、小川いずみ、矢川千織、  
早川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、**桑形麻樹子**、**北  
嶋聡**  
「新規の食品」の安全史枝を確保するための諸外国の  
精度比較  
第49回日本毒性学会、2022. 6/30-7/2、札幌 (ポスタ  
ー)

11) **平林容子**: 核酸医薬品の非臨床安全性評価におけ  
る ICH  
S6 対応研究班の取組、日本核酸医薬学会 第7回年  
会、東京、2022年8月3日、招聘講演

12) **平林容子**: 安全性評価の課題と展望、令和4年度  
国立医薬品食品衛生研究所シンポジウム、川崎、2022  
年8月9日

13) **平林容子**: JaCVAMにおける New Approach  
Methods への取組、2022年度 日化協 LRI 研究報告  
会、オンライン、2022年8月26日、招聘講演

14) **平林容子**: 核酸医薬品の非臨床安全性試験ガイド  
ラインについて、第12回レギュラトリーサイエンス  
学会学術大会、東京、2022年9月10日、招聘講演

15) **平林容子**: 稀少疾患への核酸医薬品適用における  
安全性評価の考え方、BioJapan2022、横浜、2022年10  
月12日、招聘講演

16) **HIRABAYASHI, Yoko**: Initiatives for Safety  
Assessment of Nanomaterials  
at Center for Biological Safety and Research, National  
Institute of  
Health Sciences, the 12th Global Summit on Regulatory  
Science (GSRS)  
2022 Conference, Singapore, 19 Oct., 2022 (招待講演)

17) 大久保佑亮, 菅野聖世, 北嶋聡, 平林容子,  
福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱

作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト  
発生毒性試験法の開発、第 49 回日本毒性学会学術年  
会、札幌、2022 年 7 月 1 日（口頭発表）

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

Table 1 - 1 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice  
Body weight (necropsy group on GD 11)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Animal No.	/Day					Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	
1101	21.7	22.5	24.2	25.2	26.5	2.3
1102	22.5	22.5	25.8	26.5	27.8	2.0
1103	19.4	20.2	22.7	23.9	24.4	1.7
1104	19.7	20.6	23.3	24.2	25.4	2.1
n	4	4	4	4	4	4
Mean	20.8	21.5	24.0	25.0	26.0	2.0
S.D.	1.5	1.2	1.3	1.2	1.5	0.2

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Animal No.	/Day					Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	
4103	20.1	20.2	22.8	23.5	22.8	0.0
4104	20.7	22.5	25.5	24.6	25.5	0.0
4105		22.3	25.2	25.5	26.4	1.2
4106		20.1	23.4	24.2	25.3	1.9
n	2	4	4	4	4	4
Mean	20.4	21.3	24.2	24.5	25.0	0.8
S.D.	0.4	1.3	1.3	0.8	1.5	0.9

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Animal No.	/Day					Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	
7102	20.8	21.6	25.1	26.2	26.6	1.5
7103	20.5	21.8	25.9	25.0	25.9	0.0
7105		22.6	25.2	25.6	27.1	1.9
7106		20.8	24.3	25.0	26.2	1.9
n	2	4	4	4	4	4
Mean	20.7	21.7	25.1	25.5	26.5	1.3
S.D.	0.2	0.7	0.7	0.6	0.5	0.9

n: Number of dams

Table 1 - 2 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice  
Body weight (necropsy group on GD 15)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Animal No.	/Day						Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	15	
2102	20.6	21.5	24.6	25.7	26.5	31.5	1.9
2103	20.0	21.2	23.7	24.7	25.5	30.4	1.8
2104	19.2	21.2	23.5	24.6	25.7	30.3	2.2
2105	20.0	21.0	23.8	24.6	25.7	31.0	1.9
n	4	4	4	4	4	4	4
Mean	20.0	21.2	23.9	24.9	25.9	30.8	2.0
S.D.	0.6	0.2	0.5	0.5	0.4	0.6	0.2

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Animal No.	/Day						Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	15	
5102	21.0	21.9	24.1	25.5	25.6	29.3	1.5
5103	19.6	20.0	22.9	24.0	25.4	31.3	2.5
5104	22.9	23.1	25.5	25.1	26.3	30.3	0.8
5105	21.9	23.2	25.9	25.6	26.0	32.5	0.1
n	4	4	4	4	4	4	4
Mean	21.4	22.1	24.6	25.1	25.8	30.9	1.2
S.D.	1.4	1.5	1.4	0.7	0.4	1.4	1.0

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Animal No.	/Day						Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	15	
8102	21.9	22.3	24.6	25.4	26.7	31.3	2.1
8103	19.5	19.8	22.3	22.9	24.1	28.7	1.8
8104	20.3	21.0	23.1	23.0	24.1	28.3	1.0
8105	19.2	19.3	21.9	21.5	22.0	26.4	0.1
n	4	4	4	4	4	4	4
Mean	20.2	20.6	23.0	23.2	24.2	28.7	1.3
S.D.	1.2	1.3	1.2	1.6	1.9	2.0	0.9

n: Number of dams

Table 1 - 3 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice  
Body weight (necropsy group on GD 18)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Animal No.	/Day							Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	15	18	
3101	20.8	21.7	24.3	26.0	26.0	31.8	38.0	1.7
3102	20.9	21.2	24.0	24.8	25.7	32.9	38.0	1.7
3104	19.2	21.6	24.7	26.4	27.1	34.1	40.4	2.4
3105	19.4	20.9	23.5	24.6	24.7	31.2	36.0	1.2
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Mean	20.1	21.4	24.1	25.5	25.9	32.5	38.1	1.8
S.D.	0.9	0.4	0.5	0.9	1.0	1.3	1.8	0.5

Dose : Valproic acid 300 mg/kg

Animal No.	/Day							Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	15	18	
6102	20.9	20.8	23.3	23.3	24.0	29.6	35.3	0.7
6103	20.7	22.0	25.5	25.0	25.2	31.0	36.2	-0.3
6104	20.2	20.4	23.5	24.5	24.8	29.6	34.8	1.3
6105	20.1	21.0	23.0	23.4	23.6	28.8	33.2	0.6
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Mean	20.5	21.1	23.8	24.1	24.4	29.8	34.9	0.6
S.D.	0.4	0.7	1.1	0.8	0.7	0.9	1.3	0.7

Dose : Valproic acid 600 mg/kg

Animal No.	/Day							Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	15	18	
9101	20.4	20.5	23.5	24.4	23.3	27.4	32.2	-0.2
9102	19.2	20.1	22.6	22.5	23.2	28.6	35.1	0.6
9103	20.7	21.7	24.2	24.0	25.3	29.3	34.2	1.1
9104	20.2	20.7	22.2	21.8	21.8	28.2	33.4	-0.4
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Mean	20.1	20.8	23.1	23.2	23.4	28.4	33.7	0.3
S.D.	0.7	0.7	0.9	1.2	1.4	0.8	1.2	0.7

(4) Valproic acid 800 mg/kg

Animal No.	/Day							Body weight gain(9-11)
	0	4	9	10	11	15	18	
10101			25.4	24.5	24.9	29.9	36.9	-0.5
10104 a)			22.0					
10106			23.1	22.0	22.3	22.7	24.5	-0.8
10108			22.5	21.5	21.9	23.7	25.3	-0.6
n			4	3	3	3	3	3
Mean			23.3	22.7	23.0	25.4	28.9	-0.6
S.D.			1.5	1.6	1.6	3.9	6.9	0.2

n: Number of dams

a): Died on day 2 administration

Table 2-1

Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta  
for analysis of exosomes by orally administered in mice

Cesarean section data (necropsy group on GD 11)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Dam No.	Number of implan- tation	Number of resorptions Total	Postimplan- tation loss(%) Total a)	Number of live fetuses
1101	9 (8/1)	1	11.1	8
1102	10 (6/4)	0	0.0	10
1103	8 (3/5)	2	25.0	6
1104	10 (5/5)	0	0.0	10
Total	37	3		34
n	4	4	4	4
Mean	9.3	0.8	9.0	8.5
S.D.	1.0	1.0	11.9	1.9

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Dam No.	Number of implan- tation	Number of resorptions Total	Postimplan- tation loss(%) Total a)	Number of live fetuses
4103	7 (2/5)	3	42.9	4
4104	9 (4/5)	0	0.0	9
4105	9 (7/2)	1	11.1	8
4106	8 (5/3)	1	12.5	7
Total	33	5		28
n	4	4	4	4
Mean	8.3	1.3	16.6	7.0
S.D.	1.0	1.3	18.4	2.2

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Dam No.	Number of implan- tation	Number of resorptions Total	Postimplan- tation loss(%) Total a)	Number of live fetuses
7102	11 (7/4)	0	0.0	11
7103	9 (7/2)	1	11.1	8
7105	9 (5/4)	0	0.0	9
7106	9 (4/5)	0	0.0	9
Total	38	1		37
n	4	4	4	4
Mean	9.5	0.3	2.8	9.3
S.D.	1.0	0.5	5.6	1.3

(/): Right/Left

a): (Number of resorptions / Number of implantations) x 100

n: Number of dams



Table 2-2 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice Cesarean section data (necropsy group on GD 11)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)					
			Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.
1101	8	1	R-1	A	101	R-5	A	104	L-1	A	108			
			R-2	A	102	R-6	A	105						
			R-3	d		R-7	A	106						
			R-4	A	103	R-8	A	107						
1102	10	0	R-1	A	109	R-4	A	112	L-1	A	115	L-4	A	118
			R-2	A	110	R-5	A	113	L-2	A	116			
			R-3	A	111	R-6	A	114	L-3	A	117			
1103	6	2	R-1	A	119				L-1	A	121	L-4	d	
			R-2	A	120				L-2	A	122	L-5	A	124
			R-3	d				L-3	A	123				
1104	10	0	R-1	A	125	R-4	A	128	L-1	A	130	L-4	A	133
			R-2	A	126	R-5	A	129	L-2	A	131	L-5	A	134
			R-3	A	127				L-3	A	132			

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)					
			Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.
4103	4	3	R-1	A	401				L-1	A	403	L-4	d	
			R-2	A	402				L-2	d		L-5	d	
									L-3	A	404			
4104	9	0	R-1	A	405	R-4	A	408	L-1	A	409	L-4	A	412
			R-2	A	406				L-2	A	410	L-5	A	413
			R-3	A	407				L-3	A	411			
4105	8	1	R-1	A	414	R-5	A	418	L-1	d				
			R-2	A	415	R-6	A	419	L-2	A	421			
			R-3	A	416	R-7	A	420						
			R-4	A	417									
4106	7	1	R-1	A	422	R-4	A	425	L-1	d				
			R-2	A	423	R-5	A	426	L-2	A	427			
			R-3	A	424				L-3	A	428			

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)					
			Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.	Loc.	C	S.No.
7102	11	0	R-1	A	701	R-5	A	705	L-1	A	708	L-4	A	711
			R-2	A	702	R-6	A	706	L-2	A	709			
			R-3	A	703	R-7	A	707	L-3	A	710			
			R-4	A	704									
7103	8	1	R-1	A	712	R-5	A	716	L-1	d				
			R-2	A	713	R-6	A	717	L-2	A	719			
			R-3	A	714	R-7	A	718						
			R-4	A	715									
7105	9	0	R-1	A	720	R-4	A	723	L-1	A	725	L-4	A	728
			R-2	A	721	R-5	A	724	L-2	A	726			
			R-3	A	722				L-3	A	727			
7106	9	0	R-1	A	729	R-4	A	732	L-1	A	733	L-4	A	736
			R-2	A	730				L-2	A	734	L-5	A	737
			R-3	A	731				L-3	A	735			

Loc. : Location in the uterus, C : Classification, S. No.: Sample number

A : Live fetus, d : Dead fetus

Table 2-3

Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta  
for analysis of exosomes by orally administered in mice  
Cesarean section data (necropsy group on GD 15)

## (1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Dam No.	Number of implan- tation	Number of resorptions Total	Postimplan- tation loss(%) Total a)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
2102	8 (3/5)	0	0.0	8	0.33	0.10
2103	8 (4/4)	1	12.5	7	0.34	0.13
2104	9 (6/3)	1	11.1	8	0.29	0.09
2105	7 (5/2)	1	14.3	6	0.37	0.09
Total	32	3		29		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	8.0	0.8	9.5	7.3	0.33	0.10
S.D.	0.8	0.5	6.5	1.0	0.03	0.02

## (2) Valproic acid 300 mg/kg

Dam No.	Number of implan- tation	Number of resorptions Total	Postimplan- tation loss(%) Total a)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
5102	8 (5/3)	3	37.5 #	5	0.35	0.11
5103	9 (5/4)	0	0.0	9	0.33	0.10
5104	8 (4/4)	2	25.0	6	0.35	0.09
5105	9 (7/2)	0	0.0	9	0.30	0.09
Total	34	5		29		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	8.5	1.3	15.6	7.3	0.33	0.10
S.D.	0.6	1.5	18.8	2.1	0.02	0.01

## (3) Valproic acid 600 mg/kg

Dam No.	implan- tation	resorptions Total	tation loss(%) Total a)	live fetuses	weight(g)	weight(g)
8102	8 (2/6)	0	0.0	8	0.34	0.10
8103	9 (6/3)	0	0.0	9	0.29	0.09
8104	8 (7/1)	0	0.0	8	0.24	0.07
8105	7 (5/2)	2	28.6	5	0.33	0.08
Total	32	2		30		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	8.0	0.5	7.2	7.5	0.30	0.09
S.D.	0.8	1.0	14.3	1.7	0.05	0.01

( / ) : Right/Left

a): (Number of resorptions / Number of implantations) x 100

n: Number of dams

Table 2-4 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice  
 Cesarean section data (necropsy group on GD 15)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)													
			Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.					
2102	8	0	R-1	A	0.33	0.10	201						L-1	A	0.32	0.10	204	L-4	A	0.34	0.12	207
			R-2	A	0.23	0.08	202					L-2	A	0.36	0.10	205	L-5	A	0.34	0.10	208	
			R-3	A	0.33	0.11	203					L-3	A	0.37	0.11	206						
2103	7	1	R-1	A	0.33	0.14	209	R-4	A	0.29	0.11	211	L-1	A	0.37	0.12	212	L-4	A	0.35	0.18	215
			R-2	A	0.33	0.12	210					L-2	A	0.34	0.11	213						
			R-3	d								L-3	A	0.38	0.10	214						
2104	8	1	R-1	A	0.27	0.08	216	R-4	A	0.32	0.08	218	L-1	A	0.32	0.09	221					
			R-2	d				R-5	A	0.33	0.09	219	L-2	A	0.33	0.09	222					
			R-3	A	0.24	0.08	217	R-6	A	0.27	0.08	220	L-3	A	0.26	0.09	223					
2105	6	1	R-1	A	0.34	0.07	224	R-4	A	0.39	0.11	227	L-1	A	0.37	0.09	229					
			R-2	A	0.41	0.10	225	R-5	A	0.35	0.10	228	L-2	d								
			R-3	A	0.38	0.09	226															

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)													
			Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.					
5102	5	3	R-1	A	0.35	0.10	501	R-4	A	0.38	0.12	502	L-1	A	0.36	0.12	504					
			R-2	d				R-5	A	0.32	0.09	503	L-2	A	0.34	0.10	505					
			R-3	d									L-3	d								
5103	9	0	R-1	A	0.29	0.11	506	R-4	A	0.31	0.07	509	L-1	A	0.36	0.09	511	L-4	A	0.33	0.10	514
			R-2	A	0.36	0.11	507	R-5	A	0.33	0.10	510	L-2	A	0.35	0.09	512					
			R-3	A	0.36	0.12	508					L-3	A	0.30	0.08	513						
5104	6	2	R-1	d			R-3	A	0.37	0.12	515	L-1	A	0.37	0.09	517	L-3	A	0.31	0.08	519	
			R-2	d				R-4	A	0.31	0.09	516	L-2	A	0.35	0.08	518	L-4	A	0.36	0.09	520
5105	9	0	R-1	A	0.25	0.10	521	R-5	A	0.29	0.09	525	L-1	A	0.34	0.07	528					
			R-2	A	0.31	0.11	522	R-6	A	0.28	0.08	526	L-2	A	0.35	0.09	529					
			R-3	A	0.33	0.11	523	R-7	A	0.29	0.08	527										
			R-4	A	0.30	0.10	524															

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)													
			Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.					
8102	8	0	R-1	A	0.37	0.12	801						L-1	A	0.36	0.10	803	L-4	A	0.36	0.09	806
			R-2	A	0.34	0.10	802					L-2	A	0.34	0.10	804	L-5	A	0.32	0.09	807	
												L-3	A	0.31	0.10	805	L-6	A	0.32	0.09	808	
8103	9	0	R-1	A	0.28	0.08	809	R-4	A	0.28	0.09	812	L-1	A	0.30	0.09	815					
			R-2	A	0.32	0.09	810	R-5	A	0.32	0.10	813	L-2	A	0.29	0.09	816					
			R-3	A	0.30	0.09	811	R-6	A	0.28	0.08	814	L-3	A	0.27	0.09	817					
8104	8	0	R-1	A	0.17	0.06	818	R-5	A	0.24	0.09	822	L-1	A	0.22	0.06	825					
			R-2	a) A	0.24	0.08	819	R-6	A	0.24	0.07	823										
			R-3	A	0.27	0.07	820	R-7	A	0.25	0.07	824										
			R-4	A	0.30	0.08	821															
8105	5	2	R-1	A	0.34	0.08	826	R-4	d				L-1	A	0.31	0.08	829					
			R-2	d				R-5	A	0.35	0.09	828	L-2	A	0.32	0.08	830					
			R-3	A	0.33	0.08	827															

Loc. : Location in the uterus, C : Classification, S. No.: Sample number

A : Live fetus, d : Dead fetus

F.W. : Body weight of live fetuses, P.W. : Placental weight of live fetuses

a): Neural tube defect

Table 2-5 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice  
 Cesarean section data (necropsy group on GD 18)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total a)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
3101	8 (6/2)	0	0.0	8	1.00	0.11
3102	8 (6/2)	0	0.0	8	1.07	0.10
3104	9 (3/6)	0	0.0	9	1.03	0.08
3105	8 (2/6)	1	12.5	7	1.06	0.09
Total	33	1		32		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	8.3	0.3	3.1	8.0	1.04	0.10
S.D.	0.5	0.5	6.3	0.8	0.03	0.01

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total a)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
6102	7 (3/4)	0	0.0	7	1.03	0.09
6103	8 (4/4)	1	12.5	7	0.99	0.08
6104	7 (2/5)	0	0.0	7	1.04	0.08
6105	6 (4/2)	0	0.0	6	0.85	0.08
Total	28	1		27		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	7.0	0.3	3.1	6.8	0.98	0.08
S.D.	0.8	0.5	6.3	0.5	0.09	0.01

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total a)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
9101	8 (6/2)	2	25.0	6	0.79	0.08
9102	8 (4/4)	0	0.0	8	0.87	0.09
9103	9 (3/6)	2	22.2	7	0.80	0.08
9104	7 (4/3)	0	0.0	7	0.88	0.08
Total	32	4		28		
n	4	4	4	4	4	4
Mean	8.0	1.0	11.8	7.0	0.84	0.08
S.D.	0.8	1.2	13.7	0.8	0.05	0.01

(4) Valproic acid 800 mg/kg

Dam No.	Number of implantation	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total a)	Number of live fetuses	Fetal weight(g)	Placental weight(g)
10101	8 (5/3)	0	0.0	8	0.80	0.07
10106	8 (5/3)	8	100.0	0		
10108	7 (3/4)	7	100.0	0		
Total	23	15		8		
n	3	3	3	3	1	1
Mean	7.7	5.0	66.7	2.7	0.80	0.07
S.D.	0.6	4.4	57.7	4.6		

(/): Right/Left

a): (Number of resorptions / Number of implantations) x 100

n: Number of dams

Table 2-6 Valproic acid: Sampling of maternal serum, amniotic fluid, fetal plasma and placenta for analysis of exosomes by orally administered in mice  
 Cesarean section data (necropsy group on GD 18)

(1) Valproic acid 0 mg/kg (vehicle control)

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)												
			Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.				
3101	8	0	R-1	A	0.95	0.10	301	R-4	A	1.04	0.11	304	L-1	A	0.96	0.10	307				
			R-2	A	0.93	0.11	302	R-5	A	1.05	0.13	305	L-2	A	1.08	0.10	308				
			R-3	A	0.96	0.08	303	R-6	A	1.00	0.11	306									
3102	8	0	R-1	A	1.09	0.11	309	R-4	A	1.11	0.10	312	L-1	A	1.12	0.10	315				
			R-2	A	1.06	0.08	310	R-5	A	1.06	0.10	313	L-2	A	1.04	0.08	316				
			R-3	A	1.06	0.10	311	R-6	A	1.02	0.09	314									
3104	9	0	R-1	A	1.05	0.10	317					L-1	A	1.06	0.08	320	L-4	A	1.05	0.08	323
			R-2	A	1.04	0.09	318					L-2	A	1.00	0.07	321	L-5	A	1.03	0.08	324
			R-3	A	1.03	0.08	319					L-3	A	1.00	0.06	322	L-6	A	1.00	0.09	325
3105	7	1	R-1	A	1.10	0.11	326					L-1	A	1.10	0.10	328	L-4	A	1.05	0.09	331
			R-2	A	1.00	0.09	327					L-2	A	1.00	0.08	329	L-5	A	1.07	0.10	332
												L-3	A	1.12	0.09	330	L-6	d			

(2) Valproic acid 300 mg/kg

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)													
			Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.					
6102	7	0	R-1	A	1.06	0.09	601					L-1	A	1.08	0.11	604	L-4	A	1.05	0.10	607	
			R-2	A	1.06	0.10	602					L-2	A	0.93	0.07	605						
			R-3	A	1.01	0.08	603					L-3	A	1.03	0.08	606						
6103	7	1	R-1	A	0.93	0.09	608	R-4	A	0.94	0.08	611	L-1	A	1.00	0.07	612	L-4	A	1.00	0.07	614
			R-2	A	1.00	0.08	609					L-2	d									
			R-3	A	0.95	0.08	610					L-3	A	1.10	0.09	613						
6104	7	0	R-1	A	1.00	0.09	615					L-1	A	1.04	0.08	617	L-4	A	1.12	0.10	620	
			R-2	A	1.00	0.07	616					L-2	A	1.02	0.07	618	L-5	A	1.08	0.07	621	
												L-3	A	1.00	0.09	619						
6105	6	0	R-1	A	0.86	0.06	622	R-3	A	0.85	0.08	624	L-1	A	0.89	0.07	626					
			R-2	A	0.85	0.08	623	R-4	A	0.79	0.07	625	L-2	A	0.87	0.09	627					

(3) Valproic acid 600 mg/kg

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)													
			Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.					
9101	6	2	R-1	A	0.84	0.09	901	R-4	A	0.89	0.09	903	L-1	A	0.87	0.08	906					
			R-2	A	0.67	0.07	902	R-5	A	0.81	0.08	904	L-2	d								
			R-3	d				R-6	A	0.68	0.07	905										
9102	8	0	R-1	A	0.75	0.11	907	R-3	A	0.86	0.09	909	L-1	A	0.89	0.10	911	L-3	A	0.99	0.06	913
			R-2	A	0.87	0.08	908	R-4	A	0.94	0.12	910	L-2	A	0.77	0.07	912	L-4	A	0.87	0.09	914
9103	7	2	R-1	A	0.67	0.08	915					L-1	A	0.79	0.08	917	L-4	d				
			R-2	A	0.80	0.08	916					L-2	A	0.85	0.08	918	L-5	A	0.86	0.09	920	
			R-3	d							L-3	A	0.79	0.07	919	L-6	A	0.83	0.10	921		
9104	7	0	R-1	A	0.92	0.09	922	R-3	A	0.90	0.09	924	L-1	A	0.90	0.08	926	L-3	A	0.73	0.08	928
			R-2	A	0.86	0.07	923	R-4	A	0.83	0.08	925	L-2	A	1.00	0.10	927					

(4) Valproic acid 800 mg/kg

Dam No.	Number of live fetuses	Number of resorptions	Fetus data (right in the uterus)						Fetus data (left in the uterus)												
			Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.	Loc.	C	F.W. (g)	P.W. (g)	S.No.				
10101	8	0	R-1	A	0.74	0.05	1001	R-4	A	0.89	0.08	1004	L-1	A	0.78	0.07	1006				
			R-2	A	0.77	0.05	1002	R-5	A	0.88	0.07	1005	L-2	A	0.74	0.08	1007				
			R-3	A	0.78	0.06	1003					L-3	A	0.84	0.06	1008					
10106	0	8	R-1	d				R-4	d				L-1	d							
			R-2	d				R-5	d				L-2	d							
			R-3	d									L-3	d							
10108	0	7	R-1	d				R-3	d			L-1	d				L-3	d			
			R-2	d													L-4	d			

Loc. : Location in the uterus, C : Classification, S. No.: Sample number

A : Live fetus, d : Dead fetus

F.W. : Body weight of live fetuses, P.W. : Placental weight of live fetuses

Table 3 Valproic acid concentrations in plasma  
after oral administration of sodium valproate to female mice (Gestation day 11)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )
		1 h
300	1102	179
	1103	231
	1104	263
	Mean	224
	SD	42
600	2102	529
	2103	363
	2104	603
	Mean	498
	SD	123

Table 4 Valproic acid concentrations in fetus  
after oral administration of sodium valproate to female mice (Gestation day 11)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Location	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	Dose level (mg/kg)	Animal No.	Location	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )
300	1102	R-1	(2.6)	600	2102	R-1	230
		R-2	64.4			R-2	335
		R-3	70.2			R-3	246
		R-4	81.6			L-1	160
		R-5	64.5			L-2	306
		L-1	73.2			L-3	135
		L-2	67.1			L-4	274
		L-3	73.1			L-6	270
		L-4	39.2			Mean	245
		Mean	66.7			SD	68
	1103	R-1	76.6	R-1	182		
		R-3	86.5	R-2	183		
		R-4	99.4	R-3	128		
		R-5	106	R-4	173		
		R-6	87.3	R-5	154		
		R-7	78.4	R-6	172		
		L-1	79.3	R-7	145		
		L-2	70.0	R-8	157		
		L-3	84.1	L-1	138		
		Mean	85.3	Mean	159		
1104	R-1	113	SD	20			
	R-2	119	R-1	317			
	R-3	109	R-2	298			
	R-4	96.2	R-3	357			
	R-5	101	R-4	288			
	L-1	105	L-1	297			
	L-2	102	L-2	310			
	L-3	106	L-3	344			
	L-4	106	L-4	286			
	Mean	106	Mean	312			
SD	6	SD	26				

The fetus (Animal No. 1102, location: R-1) was white and small.

Table 5 Varproic acid concentrations in dam plasma and fetuses on GD11 in mice.

(1) Dose level: 300 mg/kg

Dam No. 1102	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)	Dam No. 1103	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)	Dam No. 1104	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)
Loc.	(µg/mL)	(µg/mL)	(%)	Loc.	(µg/mL)	(µg/mL)	(%)	Loc.	(µg/mL)	(µg/mL)	(%)
r1	179	2.60	1.5	r1	231	76.6	33.2	r1	263	113	43.0
r2	179	64.4	36.0	r3	231	86.5	37.4	r2	263	119	45.2
r3	179	70.2	39.2	r4	231	99.4	43.0	r3	263	109	41.4
r4	179	81.6	45.6	r5	231	106	45.9	r4	263	96.2	36.6
r5	179	64.5	36.0	r6	231	87.3	37.8	r5	263	101	38.4
11	179	73.2	40.9	r7	231	78.4	33.9	11	263	105	39.9
12	179	67.1	37.5	11	231	79.3	34.3	12	263	102	38.8
13	179	73.1	40.8	12	231	70.0	30.3	13	263	106	40.3
14	179	39.2	21.9	13	231	84.1	36.4	14	263	106	40.3
								15	263	107	40.7
Ave		66.7	37.2	Ave		85.3	36.9	Ave		106	40.5
SD		12.4	7.0	SD		11.3	4.9	SD		6	2.4
CV		18.7	18.7	CV		13.3	13.3	CV		6.0	6.0
max		81.6	45.6	max		106.0	45.9	max		119.0	45.2
min		39.2	21.9	min		70.0	30.3	min		96.2	36.6
max/min		2.08		max/min		1.51		max/min		1.24	
R_max		122.4		R_max		124.3		R_max		111.8	
R_min		58.8		R_min		82.1		R_min		90.4	

(2) Dose level: 600 mg/kg

Dam No. 2102	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)	Dam No. 2103	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)	Dam No. 2104	Dam conc.	Fetal conc.	Fetus/ Dam (%)
Loc.	(µg/mL)	(µg/mL)	(%)	Loc.	(µg/mL)	(µg/mL)	(%)	Loc.	(µg/mL)	(µg/mL)	(%)
r1	529	230	43.5	r1	363	182	50.1	r1	603	317	52.6
r2	529	335	63.3	r2	363	183	50.4	r2	603	298	49.4
r3	529	246	46.5	r3	363	128	35.3	r3	603	357	59.2
11	529	160	30.2	r4	363	173	47.7	r4	603	288	47.8
12	529	306	57.8	r5	363	154	42.4	11	603	297	49.3
13	529	135	25.5	r6	363	172	47.4	12	603	310	51.4
14	529	274	51.8	r7	363	145	39.9	13	603	344	57.0
16	529	270	51.0	r8	363	157	43.3	14	603	286	47.4
				11	363	138	38.0				
Ave		244.5	46.2	Ave		159.1	43.8	Ave		312.1	51.8
SD		68.5	12.9	SD		19.7	5.4	SD		26.1	4.3
CV		28.0	28.0	CV		12.4	12.4	CV		8.3	8.3
max		335.0	63.3	max		183.0	50.4	max		357.0	59.2
min		135.0	25.5	min		128.0	35.3	min		286.0	47.4
max/min		2.48		max/min		1.43		max/min		1.25	
R_max		137.0		R_max		115.0		R_max		114.4	
R_min		55.2		R_min		80.4		R_min		91.6	