

令和 2 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業

催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法の開発に関する研究

令和 2 年度 総括・分担研究報告書

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験センター 毒性部
研究代表者 栗形 麻樹子

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験センター 毒性部
研究分担者 北嶋 聡

昭和薬科大学 薬学部
研究分担者 山崎 浩史

令和 3 年（2021）

目 次

I. 総括研究報告（別添3）	
催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法の開発 -----	1
栗形 麻樹子	
II. 分担研究報告（別添4）	
1. 当該研究分野における最新の既存資料調査 -----	10
北嶋 聡	
2. 雄性生殖を介した新規発生毒性評価試験計画書の作成 -----	14
栗形 麻樹子	
3. 雄性生殖を介した新規発生毒性評価試験計画書の作成 -----	21
山崎 浩史	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添5） -----	24
IV. 資料 -----	25
添付資料1. 雄ウサギを用いた単回経口投与トキシコキネティクス(TK)試験	
添付資料2. 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与トキシコキネティクス(TK)試験	
添付資料3. 雌ウサギを用いた膈内投与発生毒性試験	
図1. サリドマイド器官形成期投与により胎児に観察された形態変化	
図2. サリドマイド器官形成期投与により胎児四肢に観察された形態変化	
図3. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与による血漿中サリドマイド濃度推移	
図4. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与による血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移	
図5. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与による精漿中サリドマイドおよび5-水酸化体サリドマイド濃度推移	
図6. サリドマイド単回あるいは反復投与時のウサギにおける体内動態	
表1. 帝王切開所見（胚・胎児発生への影響：予備試験）	
表2. 胎児外表観察（胚・胎児発生への影響：予備試験）	
表3. 胎児内臓観察（胚・胎児発生への影響：予備試験）	
表4. 胎児骨格観察（胚・胎児発生への影響：予備試験）	
表5. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血漿中サリドマイド濃度推移	
表6. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度	
表7. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血漿中サリドマイドに関するTKパラメータ	
表8. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回投与後の血漿中5-水酸化体サリドマイドに関するTKパラメータ	

表 9. 追加検討: 雄ウサギを用いたサリドマイド単回投与後の血漿中サリドマイド濃度推移及びTKパラメータ

表 10. 追加検討: 雄ウサギを用いたサリドマイド単回投与後の血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移及びTKパラメータ

表 11. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回投与後の精漿中サリドマイド濃度推移

表 12. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回投与後の精漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移

表 13. 追加検討: 雄ウサギを用いたサリドマイド単回投与後の精漿中サリドマイド及び5-水酸化体サリドマイド濃度推移

表 14. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の血漿中サリドマイド濃度推移

表 15. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移

表 16. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後のサリドマイドに関するTKパラメータ

表 17. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の5-水酸化体サリドマイドに関するTKパラメータ

表 18. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の精漿中サリドマイド濃度推移

表 19. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の精漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移

I. 総括研究報告書

研究要旨

サリドマイド被害の重篤性に鑑み、より安全側に立脚して服用中の避妊を男性にも求めている。本来、エビデンスに基づいた安全性確保を担保すべきであるが、そのために必要な催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法が確立していない。本研究では薬物動態や薬物応答性の種差を考慮しつつ、催奇形性誘発懸念物質の体内動態を基盤とする医薬品毒性評価法の確立に向けて、ヒトへの外挿可能性を踏まえた毒性試験プロトコールを完成させることを目的とする。

具体的には、令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）にて実施した情報収集をもとに立案した、即ち、雄性生殖を介した種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画（腔内投与試験）を実証する。なお、催奇形性陽性対象物質として本課題ではサリドマイドを用いる。

初年度は、文献調査に基づき、ウサギに対するサリドマイドによる母動物および胎児への影響を検討し、250 mg/kg体重/day の投与量は催奇形性作用を誘発する用量であることを確認した。この用量を基準として、雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与時のサリドマイド及び主代謝物である5-水酸化体サリドマイドの血漿中及び精漿中への移行推移を検討した。さらに、ウサギにサリドマイドを経口投与した後の血中濃度推移を再現する薬物動態モデルを構築した。

得られた結果から、腔内投与試験の投与量を設定した。来年度は腔内投与試験を実施し、サリドマイド腔内曝露により母動物および胎児血液中へのサリドマイドの移行を調べ、胎児への形態変化との関連を調べる予定である。

研究分担者

北嶋 聡

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・部長

山崎 浩史

昭和薬科大学・薬学部・教授

態を確認する。

令和2年度は、(1) 及び (2) を実施し、(3) の用量設定を行った。

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

最初に、雄ウサギを用いた薬物動態試験における投与量を設定するために、妊娠ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胚・胎児発生に及ぼす影響に関する予備的検討を行った。本研究課題で使用する既知の催奇形性物質であるサリドマイドのウサギに対する催奇形性発現用量を確認した（担当：北嶋）。

続いて、雄ウサギを用いたサリドマイド単回あるいは反復経口投与と血漿及び精漿中薬物動態試験を実施し、サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度を測定し、血漿中及び精漿中への移行推移を確認した（担当：栗形）。

また、ウサギにサリドマイドを経口投与した後の血中濃度推移を再現する薬物動態モデルを構築した（担当：山崎）。

これらの結果を基に、次年度実施する腔内投与試験の投与量を設定した（担当：栗形、北嶋、山崎）。

なお、動物実験は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所、分析は同社つくば研究所に委託した。

A. 研究目的

本研究は、令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）にて立案した、種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画を実証するために、下記4つの試験を実行し、新規試験法の確立を目指す。

- (1) 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血中濃度及び精液中への移行を確認する。
- (2) 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与による血中及び精液中への蓄積を確認する。
- (3) (1)及び(2)の結果に基づき、器官形成期の雌に適切な濃度のサリドマイドを腔内投与し、母動物及び胎児組織への移行を確認するとともに催奇形性の有無を確認する。
- (4) 器官形成期の雌にサリドマイドを経口投与し、催奇形性が確認される投与用量における雌の血中動

【言葉の定義】

1. 精液： 精液は精子と精漿から構成される。論文調査による精液中濃度は、その分析方法から精漿中濃度と考えられた。したがって、本課題における用語「精液中濃度」は精漿中濃度を示す。
2. 精漿： 主として副生殖腺の分泌液が混合したもので、精巣上体、精管の分泌液も微量であるが含

まれている。

3. 副生殖腺：精囊腺、傍前立腺、前立腺・尿道球腺を示す。精囊腺の後背側に小胞腺があり、精囊腺と小胞腺を合わせたものが、他の動物種の精囊腺に相当する。

B. 研究方法

本課題では催奇形性陽性対照物質としてサリドマイドを用いた。

使用動物種は、サリドマイドの経口投与により催奇形性が確認されており、発生毒性試験にて汎用されているNew Zealand White (NZW) 系ウサギを用いた。

サリドマイドは、その芳香環が酸化されるヒト不均衡性代謝物5-水酸化体サリドマイドに変換され、さらなる活性化反応を受ける経路に代謝される一方、主要な解毒反応と考えられるげっ歯類型の脂肪環5-水酸化体サリドマイドに代謝される。これらのことから、サリドマイドの代謝経路が、催奇形性発現の種差の一因と考えられている。

本課題ではサリドマイド未変化体とともに代謝物である5-水酸化体サリドマイド（ヒトにおける主代謝物）及び5'-水酸化体サリドマイド（マウスにおける主代謝物）についても測定し、試験法立案の補助とした。

なお、今年度は先行して検討を開始した5-水酸化体サリドマイドについてのみ報告する。

1. 共通事項

1-1. 被験物質

製造元 : Carbosynth (CAB)
名称 : サリドマイド
CAS 番号 : 50-36-1
ロット番号 : FT156482001
純度 : 99%以上 (HPLC)*
性状 : 白色～オフホワイトの結晶性粉末*
保管方法 : 冷蔵 (2~8℃)、遮光
* 2020年2月19日分析証明書から転記

1-2. 媒体

0.5 w/v% メチルセルロース (0.5%MC)
名称 : メチルセルロース400 (化学用)
製造元 : 富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号 : CAM6671

媒体の調製 :

必要量のメチルセルロース400を秤取し、攪拌しながら温めた適量の注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：9K87、9K94）を徐々に加えて分散させ、冷やして溶解させた後に注射用水を加えて0.5%溶液とした（冷蔵保存）。

媒体選択理由 :

サリドマイドは水への溶解度は低い。0.5%MCは懸濁液を調整する際に汎用されており、既報においてもサリドマイド投与実験に使用されている。

さらに我々はマウスにサリドマイドを投与し網羅的遺伝子発現解析を実施していることから、本課題で用いる試薬及び溶媒を一致させた。

1-3. 被験物質の調製及び均一性・安定性分析

必要量のサリドマイドを秤取し、メノウ乳鉢にてす

り潰しながら、0.5%MCを加えて懸濁させた。

なお、0.2及び200 mg/mL液（媒体：0.5%MC溶液）について、事前に冷蔵（2~8℃）にて8日間保存後、室温下で24時間の保存したときの安定性および均一性を確認している。

また、単回あるいは反復経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験の投与液について各1回、各濃度の投与検体の含量及び均一性・安定性（濃度許容範囲；表示値に対して10%以内、変動係数（CV）；10%以下）を確認した。その結果、含量の表示値に対する割合は、94.0%~98.6%、CVは0.8%~1.2% であり、許容範囲を満たした。

1-4. 使用動物

動物種 : ウサギ (SPF)
系統 : ニューゼalandホワイト種 (Kbl:NZW)
供給源 : 北山ラベス株式会社
識別 : 耳介に個体番号を記入
飼育 : 適切な飼育ケージに個別飼育

1-5. 飼育環境

温度(22±3℃)、湿度(50±20%)、照明(1日12時間、07:00~19:00)、換気回数(10~15回/時間)が統御された動物飼育室で飼育した。

飼料は固型飼料LRC4 (オリエンタル酵母工業株式会社)を、給水は自動給水装置により水道水を自由摂取させた。

1-6. 投与

投与容量は5 mL/kgとし、ウサギ用経口投与チューブ（ネラトンカテーテル、テルモ社製）を用いて強制経口投与した（注1）。

投与開始日を投与1日（Day1）とした。

（注1）2孔式サフィードネラトンカテーテル16Fr（53 mm）（コード番号：SF-ND1610）に、サフィードコネクタ100（コード番号：XX-SF0100）を付けて使用。

1-7. 血漿中及び精液中のサリドマイド濃度測定

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)、Triple Quad 5500	AB SCIEX
データ処理ソフト Analyst 1.6.1	AB SCIEX
高速液体クロマトグラフ (HPLC) ACQUITY UPLC-CLASS	Waters Corporation

分析対象物質 :

サリドマイド(Thalidomide)

5-水酸化体サリドマイド(5-hydroxythalidomide)

標準物質 : pomalidomide

TKパラメータ :

各投与群の最高薬物濃度(C_{max})、最高薬物濃度到達時間(T_{max})及び濃度時間曲線下面積(AUC₀₋₂₄)を算出した。

安定剤 : 25 mM Sorenen's citrate buffer (pH 1.5)

血漿試料 : 遠心分離 (約4℃、1600x g、10分間) により得た。等量の安定剤を添加し保存した。

精液試料 : 重量及びpHを測定し、安定剤にて10倍希釈し保存した。

2. サリドマイド（強制経口投与、6日間）による胚・胎児発生に及ぼす影響に関する予備的検討（担当：北嶋）

薬物動態試験に先立ち、文献調査を参考に母動物および胎児への影響を確認した。

2-1. 供試動物

動物数：交尾成立動物として雌5匹
交配：外陰部が腫脹して暗紫色を呈し交配適期と認められた雌と交配用雄を1対1で交配用サークル（直径650×高さ500mm）にて交配させた。
目視にて交尾行動が2回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。
交配時雌体重範囲：2.8～4.0 kg

2-2. 投与期間

前肢芽発生から四肢奇形の臨界期を網羅した妊娠8日より13日までの6日間とした。

2-3. 投与量

群構成を下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (mg/mL)	交尾成立雌 動物数
1	250	25	5

投与量設定根拠

過去の研究から、サリドマイドの奇形発現量はヒトやサル（カニクイサル、ミドリザル）では1 mg/kg体重/day以上、ウサギでは50 mg/kg体重/day以上である（注2）。

令和元年度に実施した文献調査ではウサギに四肢異常を発現する投与量は200～300mg/kg体重/dayである。また、New Zealand White種のウサギで250 mg/kg体重/dayを投与した検討も認められる（注3）。

本検討の目的はサリドマイドによるウサギでの催奇形作用を発現させる投与手順を確認することにあることから、投与可能な最大量を投与することとした。以上のことから、本試験における投与量を臨床使用の最大量（注4）の15倍量でウサギにおいて催奇形作用が報告されており、6日間の強制経口投与に耐えられると考えられる250 mg/kg体重/dayとした。

（注2）Shepard TH: Catalog of teratogenic agents. 13th ed. (2010) pp437-439 The Johns Hopkins university press.

（注3）石井則久、石田裕、岡野美子、岡崎元昭、儀同政一、熊野公子、後藤正道、野上玲子、秦野研太郎、山田暁、四津里英：らい性結節性紅斑（ENL）に対するサリドマイド診療ガイドライン。Jpn. J. Lepr 80 (2011) 275-285

（注4）日本臨床血液学会 医薬品等適正使用評価委員会「多発性骨髄腫に対するサリドマイドの適正使用ガイドライン（平成15・16年度厚生労働省関係学会医薬品等適正使用推進事業）」

2-4. 動物の観察

一般状態は毎日観察した。
体重は妊娠8、10、12、13、14、16、19、24及び28日（投与期間中は測定当日の投与前）に測定した。
摂餌量は給餌量を妊娠8～16日、残餌量を妊娠9～17日に測定し、1日当たりの摂餌量を算出した。

2-5. 剖検及び帝王切開

妊娠28日の午前に母動物全例をペントバルビタールナトリウム麻酔下（1 mL/kg体重）で腹大動脈切断により放血致死させ、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。

2-6. 帝王切開

剖検時に着床の有無により妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物は卵巣及び子宮を摘出し、卵巣については黄体数を数えた。子宮については子宮壁を切開し、生存胎児数、死亡胚・胎児数とその区分（着床痕、吸収胚、胎盤遺残、早期浸軟児、後期浸軟児、死亡胎児）を判定し。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。また、生存胎児の胎盤異常の有無を肉眼的に調べ、重量を個々に測定した。

肉眼的に着床が認められない動物は黄体数を記録し、子宮は10%硫化アンモニウム溶液*に浸漬し、着床部位の有無を観察した。着床部位が認められ、妊娠と判断した動物は着床数を記録した。着床部位が認められない場合は不妊と判断し、全てのデータを試験成績より除外した。

*10%硫化アンモニウム溶液

硫化アンモニウム溶液（富士フィルム和光純薬株式会社、ロット番号CAN5674）をその9倍容量の注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号 8C97）で溶解させて調製した。

2-7. 生存胎児の観察及び測定

(1) 外表、体重及び性別

全生存胎児について、口腔内を含む外表異常の有無を観察した後、外表異常を有する胎児を含め、体重を個別に測定した。観察及び体重測定が終了した後、呼吸、体色（ピンク様又は赤みがかかった色調）の変化あるいは接触刺激に対する反応などが見られた場合、麻酔液を胎児の背部皮下に投与し、安楽死させた。生存胎児（外表異常を有する胎児を含む）は内部生殖器の観察により性別を判定した。

(2) 内臓形態

全生存胎児（外表異常を有する胎児を含む）について、新鮮標本を用いて頭部、胸腔内（心臓の内部観察を除く）及び腹腔内の内臓異常・変異の有無を検索した。脳及び心臓（気管及び食道の周辺組織も含む）を摘出し、リン酸緩衝10%ホルマリン液で固定した後、脳はWilsonの粗大切片法、心臓は西村の顕微解剖法を参照して異常・変異の有無を検索した。

(3) 骨格形態

新鮮標本を用いた内臓観察後の全生存胎児は、一度凍結した後、70～99%アルコール液で固定し、アルシヤンブルー・アリザリンレッドS二重染色透明骨格標本を作製した。

染色試薬

・アリザリンレッドS
特級、関東化学、Cat no. 0113-30
・アルシヤンブルー
特級、Alcial blue 8GX certified、Electron Microscopy Sciences、Cat no. 10350

全例について、骨格異常・変異の有無及び骨化進行状態〔胸骨分節、中手骨、中足骨、指端骨（基節骨、

中節骨及び末節骨)及び仙尾椎骨の各骨化数]を調べた。

3. 雄ウサギを用いた単回経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験(以下、単回投与TK試験、添付資料1)(担当: 栗形)

サリドマイドを雄ウサギに単回経口投与し、投与0.5~24時間後(250 mg/kg体重/day群では72時間後まで)に耳介静脈から採血、及び精液を採取し、血漿中と精漿中のサリドマイド及び代謝物5-水酸化体サリドマイドを測定し、移行推移を確認した。

なお、測定値の再現性を確認すること、動物保護の観点上、動物数を削減すること、精液採取は各動物につき1週間に2回以下に抑えることから、投与は各動物1週間以上のwash out期間を置いて3回実施した。

採血は、各投与につき全ての採血時点について、精液の採取は、2及び500 mg/kg体重/day群では投与後4、7又は24時間のいずれかの時点、250 mg/kg体重/day群では全採血点のうちのいずれか2点で実施し、各時点3例ずつが揃うようにした。

さらに、血漿中濃度測定の結果、250 mg/kg体重/day群以上の投与群ではT_{max}が遅延する傾向が認められ、投与24時間後までの測定では消失相の捕捉が不十分である可能性が考えられた。このため、250 mg/kg体重/day群では追加群として、2週間以上のwash out期間を置いて4回目の投与を行い、投与後7、24、48及び72時間に採血又は精液採取を実施した。

群構成を下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (mg/mL)	動物数
低用量	2	0.4	3
中用量	250	50	6
高用量	500	100	3

投与量設定根拠

文献調査の結果から、本試験における最小量を臨床使用の開始量である2 mg/kg体重/day、中用量は臨床使用の最大量の10倍以上の量で、ウサギにおいて催奇形作用が報告されている250 mg/kg体重/dayとし、高用量は既報(注6)にて血漿中及び精漿中濃度を測定していた最も高い投与量である500 mg/kg体重/dayとした。

(注6) 雄ウサギに500 mg/kg のサリドマイドを55回反復投与し、血漿中及び精液中濃度を測定した報告があり、精子数及び精子運動能及び形態には影響は認められていない (Teo SK et al., 2004)。

動物ごとの投与液量は直近の体重を基準に算出し、投与は午前中に1回行った。

3-1. 供試動物

動物数: 雄12匹(購入動物14匹)

入荷時週齢: 16~17週齢

群分け: 投与開始日に各群の体重が均一になるように割り付けた

群分け時体重範囲: 3.0~4.5 kg

3-2. 動物の観察

一般状態は毎日観察した。

体重は各投与について投与1日、投与7日及び剖検時に測定した。

剖検時には、主要臓器の異常の有無を観察し肝臓重量を測定した。

3-3. 血漿中及び精液中のサリドマイド濃度測定

サンプリング

全群: 投与日の投与0.5、1、2、4、7、24時間後

追加(250 mg/kg体重/day): 投与7、24、48、72時間後

血漿中と精漿中のサリドマイド及び5-水酸化体サリドマイド濃度測定は、1-7. に準じて行った。

4. 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験(以下、反復投与TK試験、添付資料2)(担当: 栗形)

単回投与TK試験の結果から、500 mg/kg体重/day群では、吸収の遷延によると考えられる測定結果が得られたことから、反復投与試験の投与量を250 mg/kg体重/dayとした。14日間反復経口投与のうち、投与1日の投与後7、24時間及び投与14日(最終投与日)の投与前、投与7、24、48及び72時間に耳介静脈から採血及び精液を採取し、血漿中と精漿中のサリドマイド及び5-水酸化体サリドマイドを測定し、蓄積性の有無、精液の量及びpH変化の有無について検討した。

群構成を下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (mg/mL)	動物数
中用量	250	50	6

投与量設定根拠

単回投与TK試験の結果から、血漿中及び精漿中濃度を測定している最大量である500 mg/kg体重/dayでは、吸収の遷延によると考えられる測定結果が得られたことから、その半分である250 mg/kg体重/dayとした。

動物ごとの投与液量は直近の体重を基準に算出した。投与は、1日1回、連続14日間(14回)、午前中に行った。

4-1. 供試動物

動物数: 雄6匹(購入動物7匹)

入荷時週齢: 16~17週齢

4-2. 動物の観察

一般状態は毎日観察した。

体重は投与1、3、8、10、14日および剖検日に測定した。

剖検時に、主要臓器の異常の有無を観察し、肝臓重量を測定した。

4-3. 血漿中と精液中のサリドマイド濃度測定

サンプリング

投与1日: 投与7、24時間後

投与14日: 投与前(投与13日の投与から23時間30分以上経過後)、投与7、24、48、72時間後

血漿中と精漿中のサリドマイド及び5-水酸化体サリドマイド濃度測定は、1-7. に準じて行った。

5. 薬物動態の解析 (担当: 山崎)

単回経口投与TK試験で得られた、ウサギ血漿中薬物濃度推移情報を元に簡素な1-コンパートメントモデル用の吸収速度定数、分布容積および消失速度定数を薬物動態解析ソフトにより決定した。

ウサギで得た知見と比較を行うため、サリドマイド 250 mg/kg体重を3-5匹の雄ラット、雄マウスあるいはヒト肝細胞移植雄マウスに単回経口投与し、動物の健康上状態を目視の上、同様に代謝物等を解析した。

(倫理面への配慮)

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

1. サリドマイド (強制経口投与、6日間) による胚・胎児発生に及ぼす影響に関する予備的検討 (担当: 北嶋)

1-1. 母動物

母動物5例中1例が不妊であった。4例のうち1例で、投与後の体重減少及び摂餌量減少が認められ、この個体は全胚吸収例であった (着床数2)。

1-2. 帝王切開 (表1)

黄体数、着床数には個体間に差はなかった。着床後胚損失率が33.3%と比較的高い値を示した。全胚吸収例以外の3腹では生存胎児数に個体間で差はなかった。胎児重量及び胎盤重量は2腹で低値傾向が認められた。

1-3. 胎児観察

(1) 外表 (表2、図1)

短尾 (2匹/1腹)、屈曲肢 (5匹/2腹)、短鼻 (1匹/腹)、眼球突出 (1匹/腹) が認められた。

屈曲肢、短鼻、眼球突出は既報と同様の形態異常であった。

前肢の屈曲肢の発現率: 5.3% (0/6+1/8+2/12×100)

後肢の屈曲肢の発現率: 15.3% (0/6+1/8+4/12×100)

(2) 内臓 (表3)

変異として、肺副葉欠損、鎖骨下動脈位置異常が、異常として、側脳室拡張、騎乗大動脈、動脈弓拡張、動脈管狭窄、肺動脈幹狭窄、動脈幹狭窄、食道拡張が観察された。

(3) 骨格 (表4、図2)

変異として、ダンベル型胸椎、過剰肋骨が、異常として、胸椎椎体二分、顔面異形成 (鼻骨癒合、顎間骨癒合)、小掌 (前肢屈曲)、脛骨の欠損・短小、腓骨彎曲、指節骨欠損 (前肢) が観察された。

1-3. 薬物動態試験における投与量設定

投与条件の検討を検討した結果、得られた結果は既報と概ね一致し催奇形性 (屈曲肢、短鼻、眼球突出、欠指など) が確認できた。アザラシ肢症は、既報通り認められなかった。この誘発の検討のためには、別途、妊娠ウサギの匹数を、ガイドラインの推奨動物数 (妊娠動物として各群16匹以上) の規模での検討が必要と

考える。

本試験条件下で、母動物の妊娠維持が確認され、胎児にはサリドマイド誘発と考えられる形態変化が認められたことから、250 mg/kg体重/dayの投与量は母動物に催奇形性作用を誘発する用量であることが確認された。

この用量を基準として、雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口TK投与試験における投与量として、催奇形性を発現する投与量での薬物動態試験を実施することにした。

2. 雄ウサギを用いた単回経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験

一般状態では、投与2日及び3日に、250 mg/kg体重/day群以上の全例で排糞量の減少が散見されたが、いずれも投与4日以降は回復した。また、各群で投与後一過性の体重減少が散見されたが、継続的な減少を示した個体はみられないことから、体重推移にサリドマイド投与の影響はないと考えられた。

その他、剖検所見、肝臓重量にサリドマイド投与による影響はみられなかった。

2-1. 血漿中濃度

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの血漿中濃度推移を表5、表6並びに図3、図4に、TKパラメータを表7、表8に示す。

追加群の血漿中サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度推移を表9、表10に示した。

3回の単回投与を通し、2 mg/kg体重/day群では平均血漿中サリドマイド濃度は、投与0.5~2時間後にC_{max}に達した後、速やかに低下し、24時間で定量限界 (BLQ; 4.00 ng/mL未満) となった。

250及び500 mg/kg体重/day群では、平均血漿中サリドマイド濃度は、投与1時間から24時間後までほぼ一定の濃度を維持した。

投与量が2 mg/kg体重/dayから250 mg/kg体重/dayと125倍に増加すると、AUC_{0-t}は投与量に比例して増加 (132倍) したが、C_{max}は37倍にしか増加せず飽和を示し、T_{max}は1.67時間から12.7時間に延長した。

投与量が250 mg/kg体重/dayから500 mg/kg体重/dayと2倍になってもC_{max}は1.2倍、AUC_{0-t}は1.3倍に増加したのみであった。T_{max}には変化はなかった (12.7時間)。

また、1~3回目投与の血漿中サリドマイド濃度の推移は再現性が高かった。

血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度はいずれの用量でも未変化体であるサリドマイドの0.5%~2.5%であったが、推移は未変化体とよく近似していた。

追加群での血漿中サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度測定の結果、7及び24時間値は1~3回目投与時の250 mg/kg体重/day群の測定値とほぼ同じ結果が得られた。48時間での血漿中サリドマイド濃度は24時間値の3.7%と急激に低下した。また、72時間値は48時間値の2.2%であった。

48時間での血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度はサリドマイドの0.6%~1.4%と、24時間までとほぼ同じ比率で推移した。

2-2. 精液採取量、pH

精液量の平均及びpHの中央値を下図に示す。

投与群 (mg/kg 体 重/day)	精液量 (mg) 平均値 (最大値-最小値)	pH 中央値 (最大値-最小値)
2	589 (1028-241)	7.4 (8.2-7.0)
250	458 (915-120)	7.25 (7.8-6.8)
500	360 (944-108)	7.0 (8.6-6.4)

2 mg/kg体重/day群に比較して高用量群では、精液量の平均は低値傾向を示し、pHの中央値は低下傾向を示したが、いずれの項目も各群の最大値と最小値を比較すると、互いに範囲は重複しており、傾向は明瞭には認められなかった。

2-3. 精漿中濃度

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの精漿中濃度推移を表11、表12、並びに図5に示す。追加群の血漿中サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度推移を表13、図5に示す。

精漿中サリドマイド濃度は、2 mg/kg体重/dayから500 mg/kg体重/dayの範囲で用量依存的に増加した。2 mg/kg体重/dayでは4時間以降低下を示したが、250 mg/kgでは2時間から24時間の間、500 mg/kgでも4時間から24時間の間、ほぼ一定の値を維持した。

精液を採取した動物について、血漿中濃度と精漿中濃度を比較した結果、投与24時間までの時点で、精漿中サリドマイド濃度は、血漿中濃度の0.52~1.06倍であった。また、精漿中濃度が血漿中濃度を上回ったのは39例中2例のみで、その値も1.03倍と1.06倍と1.0に近似した値であった。

以上の結果から、精漿中サリドマイド濃度は、血漿中濃度に等しいか又は若干の低値であると考えられた。

なお、追加検討した投与48時間後の時点においても、精漿中濃度は血漿中濃度を下回っていたが、72時間後には全例で精漿中濃度が血漿中濃度を上回った。これは、投与72時間後には血漿中濃度が投与24時間後の1/1500倍未満に低下していることによると考えられ、精漿が分泌される時期と、精液採取時点の時間差が原因と考えられた。

精漿中5-水酸化体サリドマイド濃度は、250 mg/kg体重/dayと500 mg/kg体重/dayで投与24時間に各1例、高濃度を示す個体が存在したが、この2例を除くと、いずれの用量でも未変化体の0.1%~0.6%であった。

追加群の精漿中サリドマイド濃度は48時間でも血漿中濃度の62%~90%で、24時間までとほぼ同じ比率で推移した。48時間での精漿中5-水酸化体サリドマイド濃度は未変化体の0.3%~0.7%と、24時間までとほぼ同じ比率で推移し、72時間では3例中2例が定量下限 (0.400 ng/g) 未満であった。

これらの結果から、いずれの用量でも精漿中サリドマイド濃度は血漿中濃度の52%~106%であったことから、単回経口投与により、精漿中へ過度にサリドマイドが移行しないことが明らかになった。

3. 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験 (担当：葉形)

一般状態では投与2日に6例中5例で排糞量の減少がみられたが、投与3日目以降は認められなかった。また、体重には影響はみられなかった。

その他、剖検所見、肝臓重量にサリドマイド反復投与による影響はみられなかった。

3-1. 血漿中濃度

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの血漿中濃度推移を表14、表15に、薬物動態パラメータを表16、表17に示す。

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドともに、C_{max}とAUC_{0-t}の投与14日の結果は、投与1日に比較してわずかに高値傾向を示したが、両者のAUCにはほとんど差はなく蓄積性は明瞭ではなかった。最高血漿中濃度は20,000 ng/mL未満であった。

反復投与によるT_{max}の延長は認められなかった。血中半減期は24時間以内であると考えられた。

3-2. 精液採取量、pH

精液量の平均及びpHの中央値を下図に示す。

投与群 (mg/kg 体 重/day)	精液量 (mg) 平均値 (最大値-最小値)	pH 中央値 (最大値-最小値)
250	567.8 (1309-170)	7.0 (7.8-5.4)

サリドマイドの投与により、精液量に変化はないと考えられた。

3-3. 精漿中濃度

サリドマイド及び5-水酸化体サリドマイドの精漿中濃度推移を表18並びに図19に示す。

サリドマイドでは血漿中濃度に比較して、精漿中濃度は一部の例外を除き血漿中濃度とほぼ同じ又は若干低値であった。このことから、250 mg/kg体重/dayを連日経口投与した場合も、精漿中の濃度は20,000 ng/gを超えることはないと考えられた。

また、各ステージの精液を採取した3匹について血漿中濃度と精漿中濃度を比較した。

なお、BLQは定量下限 (4.00 ng/mL) 未満を示す。

<サリドマイド濃度の比較> 投与1日

Day 1	7時間	24時間
動物番号	1001、1003、 1005	1002、1004、 1006
血漿中濃度 (ng/mL)	13200	7993
最大値-最小値	15700-10800	11200-3440
精漿中濃度 (ng/g)	4960	4153
最大値-最小値	5430-4410	6580-2080

投与14日

Day 14	7時間	24時間	48時間	72時間
動物番号	1001、 1003、1005	1002、 1004、1006	1001、 1003、1005	1002、 1004、1006
血漿中濃度 (ng/mL)	18766	243	11.9	BLQ
最大値－ 最小値	19800－ 17600	304－200	16.9－8.01	BLQ－BLQ
精漿中濃度 (ng/g)	8813	171	10.5	BLQ
最大値－ 最小値	13100－4100	206－142	14.9－4.60	BLQ－BLQ

<5-水酸化体サリドマイド濃度の比較>

投与1日

Day 1	7時間	24時間
動物番号	1001、1003、1005	1002、1004、1006
血漿中濃度 (ng/mL)	66.5	73.1
最大値－最小値	70.6－63.0	98.1－35.1
精漿中濃度 (ng/g)	5.12	5.83
最大値－最小値	5.67－4.84	6.38－5.41

投与14日

Day 14	7時間	24時間	48時間	72時間
動物番号	1001、 1003、1005	1002、 1004、1006	1001、 1003、1005	1002、 1004、1006
血漿中濃度 (ng/mL)	56.9	4.30	BLQ	BLQ
最大値－ 最小値	60.4－52.4	5.51－3.30	BLQ－BLQ	BLQ－BLQ
精漿中濃度 (ng/g)	94.1	4.07	BLQ	BLQ
最大値－ 最小値	271－5.69	11.0－0.508	BLQ－BLQ	BLQ－BLQ

血漿と精液の関係において、血中でイオン化されている化学物質の精液中への排泄率は、pHにより大きく異なることが明らかになっているが、本試験の結果、サリドマイドによる精液pHの変化はほとんどないと考えられた。

単回投与と反復投与の比較

単回投与TK試験と反復投与TK試験における投与1日のTKの結果には再現性が認められ、投与24時間においても血漿及び精漿中ともに投与7時間とほぼ同じで高い値を示した。

しかし、反復投与14日の投与前（投与13日の投与約24時間後）の測定値は、投与1日の24時間後の測定値の約1/10倍程度まで低下した。また、投与14日の投与24時間後の測定値は、投与前の測定値とほぼ同じ程度まで低下した（表14）。

反復投与14日の T_{max} は、単回投与時に比較して高値を示したが、 AUC_{0-t} には差がないことから蓄積性はないと判断した（表16）。

ヒト型代謝物（5-水酸化体サリドマイド）の存在

ヒトとマウスではサリドマイドの代謝経路が異なることから、催奇形性発現の種差の一因と考えられている。ヒトの主たる代謝物である5-水酸化体サリドマイドについても検証した。その結果、ウサギにおいても、未変化体の約1%が5-水酸化体サリドマイドとして血漿及び精漿中に確認された。今後、ウサギ胎児に認められる形態異常の型及び発現頻度と薬物動態結果と比較し、精査していく予定である。

4. ウサギを用いた体内動態の解析（担当：山崎）

ウサギのサリドマイド低用量（2.0 mg/kg体重）群では、投与2時間後に最大血中濃度を示し、投与24時間後には検出限界まで消失した。本実験結果から、サリドマイド経口投与後のウサギ血中動態を再現記述する1-コンパートメントモデル用の吸収速度定数 1.6 h^{-1} 、分布容積 3.6 L/kg および消失速度定数 0.38 h^{-1} を決定した。

一方、サリドマイド中用量（250 mg/kg体重）群および高用量（500 mg/kg体重）群では、投与7時間後に最大血中濃度を示し、24時間時点まで高濃度を維持した（図6）。

サリドマイドは、その芳香環が酸化されるヒト不均衡性代謝物5-水酸化体サリドマイドに変換される経路に代謝される一方、主な解毒反応と考えられるげっ歯類型の脂肪環5'-水酸化体サリドマイドに代謝される。ラットにサリドマイド中用量（250 mg/kg体重）を経口投与した場合、後者の5'-水酸化体サリドマイドに優先的に変換された。この5'-水酸化体サリドマイドは、尿中への排泄が容易な硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体としてラット血中に存在した。

一方、ラットの血中5-水酸化体サリドマイド濃度は、上記ウサギの場合に比較して低値であった。予備的にヒト肝細胞移植マウスに中用量サリドマイドを投与した場合、その半数程度が48時間以内に死亡したが、ヒト肝細胞非移植マウスでは、ラットの場合と同様に、見かけのサリドマイド毒性作用は全く観察されなかった。

今回決定した、サリドマイドの体内動態を再現する簡素な1-コンパートメントモデルから、詳細な生理学的薬物動態モデルの構築に向けた薬物動態学的取組みを継続する。

予備検討（分担報告書-1、北嶋）により、ウサギにサリドマイド中用量を経口投与した場合に、ウサギ循環血中にヒト不均衡性代謝物5-水酸化体を伴い、形態学な骨格奇形をもたらす結果が得られた。げっ歯類では、サリドマイド同用量経口投与にて解毒の水酸化代謝物とその抱合体が高濃度に観察された。これらの実験動物におけるサリドマイドの薬物動態や薬物応答性の種差を総合的に考慮しつつ、ウサギにて実験的に得られた薬物動態特性を基盤情報とし、雌性ウサギ膈内へのサリドマイド投与試験を、薬物動態の視点から、さらに推進する。

D. 結論

膈内投与発生毒性試験の投与量を設定するために、雄ウサギを用いた単回投与TK試験及び14日間反復経口投与TK試験を実施し、血漿中と精漿中へのサリドマイドの移行について確認した。

検討の結果、雄に250 mg/kg体重/dayを14日間反復投与した場合の最高血漿中濃度は20,000 ng/mLであ

り、血中半減期は24時間以内で蓄積はないか、ごくわずかであること、精漿中濃度が血漿中濃度を上回る状況は極めて稀であることが明らかとなった。

このことから、ヒトにおいて250 mg/kg体重/dayを2週間以上連日投与した状況でも、血液中濃度はすでに定常状態に達し、20 µg/mL程度を大きく上回る可能性は少なく、この状況において精漿中濃度は20 µg/gにほぼ等しいか若干下回ると推定された。

サリドマイドの投与により精液量やpHに大きな変化が生じる可能性は少ないと考えられることから、今回の結果をヒトにおける精液量を4 mL程度、射精回数を2回として外挿すると、精液を通して女性が曝露されるサリドマイド量の最大値は160 µg/日、女性の平均体重を50 kgとして3.2 µg/kg体重/dayであると推定される。

この用量での安全性を検討するための膣内投与試験における投与量としては、対象となる毒性が次世代に及ぼす影響であり不可逆であること並びに種差を考慮し、係数100倍を乗じて0.4 mg/kg体重/dayとして、膣内投与試験の試験計画を立案した。来年度は計画に則して、サリドマイド膣内投与試験を実践する予定である（添付資料3）。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y Kamiya, S Otsuka, T Miura, M Yoshizawa, A Nakano, M Iwasaki, Y Kobayashi, M Shimizu, M Kitajima, F Shono, K Funatsu, H Yamazaki: Physiologically based pharmacokinetic models predicting renal and hepatic concentrations of industrial chemicals after virtual oral doses in rats. *Chem Res Toxicol.*, 33, 1736-1751 (2020)
- 2) Y Kamiya, M Yanagi, S Hina, K Shigeta, T Miura, H Yamazaki: Plasma, liver, and kidney exposures in rats after oral doses of industrial chemicals predicted using physiologically based pharmacokinetic models: A case study of perfluorooctane sulfonic acid. *J Toxicol Sci*, 45, 763-767 (2020)
- 3) Y Kamiya, K Handa, T Miura, M Yanagi, K Shigeta, S Hina, M Shimizu, M Kitajima, F Shono, K Funatsu, H Yamazaki, In silico prediction of input parameters for simplified physiologically based pharmacokinetic models for estimating plasma, liver, and kidney exposures in rats after oral doses of 246 disparate chemicals, *Chem Res Toxicol* 34 507-513 (2021)
- 4) T Miura, S Uehara, M Shimizu, H Suemizu, H Yamazaki: Pharmacokinetics of primary oxidative metabolites of thalidomide in rats and in chimeric mice humanized with different human hepatocyte. *J Toxicol Sci*, in press.

2. 学会発表

- 1) 山崎浩史: 化学物質の予測物性値を用いる生理学的薬物動態(PBPK)モデルを活用するヒト臓器中濃度推移と毒性予測、第47回日本毒性学会学術年会(川崎(オンライン)) 2020年6月
- 2) 山崎浩史: 一般化学物質の経口吸収過程を含む簡素な生理学的薬物動態モデルを活用する体内動態評価、第47回日本毒性学会学術年会(川崎(オンライン)) 2020年6月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II.分担報告書－ 1

分担研究者 北嶋 聡
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

分担研究報告書

-ウサギを用いたサリドマイド催奇形性発現確認試験-

研究分担者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

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)

研究要旨

サリドマイド被害の重篤性に鑑み、より安全側に立脚して服用中の避妊を男性にも求めている。本来、エビデンスに基づいた安全性確保を担保すべきであるが、そのために必要な催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法は確立していない。本研究では種差や薬物動態を考慮しつつサリドマイドを含むこれ以外の物質への一般化を含めた評価法の確立に向けて、ヒトへの外挿可能性を踏まえたプロトコルを完成させることを目的とする。

分担研究として、令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚生労働科学特別研究事業)にて立案した雄性生殖を介した、即ち、種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画(膈内投与試験)を実証するために、文献調査に基づき、ウサギに対するサリドマイドの催奇形性発現を確認した。得られた投与条件を基に、雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験を計画した(稟形分担報告書参照)。

A. 研究目的

本研究では種差や薬物動態を考慮しつつサリドマイドを含むこれ以外の物質への一般化を含めた評価法の確立に向けて、ヒトへの外挿可能性を踏まえたプロトコルを作成するために必要な情報収集を行うことを目的とする。

分担研究として、令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚生労働科学特別研究事業)にて立案した、種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画を実証するために、本研究課題で使用する既知の催奇形性物質であるサリドマイドのウサギに対する催奇形性発現用量を確認し、雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験(単回あるいは反復投与TK試験)における投与量を設定することを目的とする。

B. 研究方法

令和元年度に実施した文献調査から、ウサギに対してサリドマイドは感受性を有することは確認でき、ウサギを用いた薬物動態情報も得ることができた。しかしながら、試験に使用したウサギの系統、薬剤の供給元、溶媒、投与量などは一致しておらず、催奇性生発現量における薬物動態を考察することは困難であった。そこで、令和元年度に実施した文献調査に基づき投与量を設定し、四肢発現臨界期である器官形成期にサリドマイドを連続経口投与し、母動物及び胎児への影響を確認した。

得られる結果は、引き続き実施する雄性ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与TK試験における投与量設定の資料となる。

なお、動物実験は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所に外部委託した。

1. 共通事項

1-1. 被験物質

製造元 : CarboSynth (CAB)

名称 : サリドマイド

CAS 番号 : 50-36-1

ロット番号 : FT156482001*

純度 : 99%以上 (HPLC) *

性状 : 色～オフホワイトの結晶性粉末*

保管方法 : 冷蔵(2～8℃)、遮光

* 2020年2月19日分析証明書から転記

1-2. 媒体

0.5 w/v% メチルセルロース (0.5%MC溶液)

名称 : メチルセルロース400 (化学用)

製造元 : 富士フィルム和光純薬株式会社

ロット番号 : CAM6671

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適量の注射用水(日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: 9K87、9K94)を徐々に加えて分散させ、冷やした後に注射用水を加えて0.5%溶液とした(冷蔵保存)。

媒体選択理由:

サリドマイドは水への溶解度は低い。0.5%MCは懸濁液を調整する際に汎用されており、既報においてもサリドマイド投与実験に使用されている。

さらに我々はマウスにサリドマイドを投与し網羅的遺伝子発現解析を実施していることから、本課題で用いる試薬及び溶媒を一致させた。

1-3. 被験物質の調製

必要量のサリドマイドを秤取し、メノウ乳鉢にてすり潰しながら、0.5%wMCを加えて均一に懸濁させた。なお、用時調製とした。

1-4. 使用動物

動物種 : ウサギ (SPF)

系統 : ニュージーランドホワイト種 (Kbl:NZW)

供給源 : 北山ラベス株式会社
識別 : 耳介に個体番号を記入
飼育 : 適切な飼育ケージに個別飼育

1-5. 飼育環境

温度(22±3℃)、湿度(50±20%)、照明(1日12時間、07:00～19:00)、換気回数(10～15回/時間)が統御された動物飼育室で飼育した。

飼料は固型飼料LRC4 (オリエンタル酵母工業株式会社)を、給水は自動給水装置により水道水を自由摂取させた。

1-6. 投与

投与容量は10 mL/kgとし、ウサギ用経口投与チューブ (ネラトシカテール、テルモ社製)を用いて強制経口投与した (注1)。

投与開始日を投与1日 (Day1)とした。

(注1) 2孔式サフィードネラトシカテール16Fr (53 mm) (コード番号: SF-ND1610) に、サフィードコネクター100 (コード番号: XX-SF0100)を付けて使用。

2. サリドマイド (強制経口投与、6日間) による胚・胎児発生に及ぼす影響に関する予備的検討

2-1. 供試動物

動物数: 交尾成立動物として雌5匹

交配: 外陰部が腫脹して暗紫色を呈し交配適期と認められた雌と交配用雄を1対1で交配用サークル (直径650 ×高さ500 mm) にて交配させた。

目視にて交尾行動が2回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。

交配時雌体重範囲: 2.8～4.0 kg

2-2. 投与期間

前肢芽発生から四肢奇形の臨界期を網羅した妊娠8日より13日までの6日間とした。

2-3. 投与量

群構成を下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (mg/mL)	交尾成立雌動物数
1	250	25	5

投与量設定根拠

過去の研究から、サリドマイドの奇形発現量はヒトやサル (カニクイサル、ミドリザル) では1 mg/kg体重/day以上、ウサギでは50 mg/kg体重/day以上である (注2)。

令和元年度に実施した文献調査ではウサギに四肢異常を発現する投与量は200～300mg/kg体重/dayである。また、New Zealand White種のウサギで250 mg/kg体重/dayを投与した検討も認められる (注3)。

本検討の目的はサリドマイドによるウサギでの催奇形作用を発現させる投与手順を確認することにあることから、投与可能な最大量を投与することとした。

以上のことから、本試験における投与量を臨床使用の最大量 (注4) の15倍量でウサギにおいて催奇形作用が報告されており、6日間の強制経口投与に耐えられると考えられる250 mg/kg体重/dayとした。

(注2) Shepard TH: Catalog of teratogenic agents. 13th ed. (2010) pp437-439 The Johns Hopkins university press.

(注3) 石井則久、石田裕、岡野美子、岡崎元昭、儀同政一、熊野公子、後藤正道、野上玲子、秦野研太郎、山田暁、四津里英: らい性結節性紅斑 (ENL) に対するサリドマイド診療ガイドライン. Jpn. J. Lepr 80 (2011) 275-285

(注4) 日本臨床血液学会 医薬品等適正使用評価委員会「多発性骨髄腫に対するサリドマイドの適正使用ガイドライン (平成15・16年度厚生労働省関係学会医薬品等適正使用推進事業)」

2-4. 動物の観察

一般状態は毎日観察した。

体重は妊娠8、10、12、13、14、16、19、24及び28日 (投与期間中は測定当日の投与前) に測定した。

摂餌量は給餌量を妊娠8～16日、残餌量を妊娠9～17日に測定し、1日当たりの摂餌量を算出した。

2-5. 剖検及び帝王切開

妊娠28日の午前に母動物全例をペントバルビタールナトリウム麻酔下 (1 mL/kg体重) で腹大動脈切断により放血致死させ、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。

2-6. 帝王切開

剖検時に着床の有無により妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物は卵巣及び子宮を摘出し、卵巣については黄体数を数えた。子宮については子宮壁を切開し、生存胎児数、死亡胚・胎児数とその区分 (着床痕、吸収胚、胎盤遺残、早期浸軟児、後期浸軟児、死亡胎児) を判定し、生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。また、生存胎児の胎盤異常の有無を肉眼的に調べ、重量を個々に測定した。

肉眼的に着床が認められない動物は黄体数を記録し、子宮は10%硫化アンモニウム溶液*に浸漬し、着床部位の有無を観察した。着床部位が認められ、妊娠と判断した動物は着床数を記録した。着床部位が認められない場合は不妊と判断し、全てのデータを試験成績より除外した。

*10%硫化アンモニウム溶液

硫化アンモニウム溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社、ロット番号CAN5674) をその9倍容量の注射用水 (株式会社大塚製薬工場、ロット番号 8C97) で溶解させて調製した。

2-7. 生存胎児の観察及び測定

(1) 外表、体重及び性別

全生存胎児について、口腔内を含む外表異常の有無を観察した後、外表異常を有する胎児を含め、体重を個別に測定した。観察及び体重測定が終了した後、呼吸、体色 (ピンク様又は赤みがかかった色調) の変化あるいは接触刺激に対する反応などが見られた場合、麻酔液を胎児の背部皮下に投与し、安楽死させた。生存胎児 (外表異常を有する胎児を含む) は内部生殖器の観察により性別を判定した。

(2) 内臓形態

全生存胎児 (外表異常を有する胎児を含む) について、新鮮標本を用いて頭部、胸腔内 (心臓の内部観察を除く) 及び腹腔内の内臓異常・変異の有無を検索した。脳及び心臓 (気管及び食道の周辺組織も含む) を摘出し、リン酸緩衝10%ホルマリン液で固定した後、脳はWilsonの粗大切片法、心臓は西村の顕微解剖法を参照して異常・変異の有無を検索した。

(3)骨格形態

新鮮標本を用いた内臓観察後の全生存胎児は、一度凍結した後、70～99%アルコール液で固定し、アルシヤンブルー・アリザリンレッドS二重染色透明骨格標本を作製した。

染色試薬

- ・アリザリンレッドS
特級、関東化学、Cat no. 0113-30)
- ・アルシヤンブルー
特級、Alcial blue 8GX certified、Electron Microscopy Sciences、Cat no. 10350)

全例について、骨格異常・変異の有無及び骨化進行状態〔胸骨分節、中手骨、中足骨、指端骨（基節骨、中節骨及び末節骨）及び仙尾椎骨の各骨化数〕を調べた。

(倫理面への配慮)

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

1. 母動物

5例中1例に着床痕がないことから不妊と判断し、評価対象から除外した。

4例のうち1例で、投与後の体重減少及び摂餌量減少が認められ、この個体は全胚吸収例であった（着床数2）。

2. 帝王切開（表1）

黄体数、着床数には個体間に差はなかった。
着床後胚損失率が33.3%と比較的高い値を示した。全胚吸収例以外の3腹では生存胎児数に個体間で差はなかった。
胎児重量及び胎盤重量は2腹で低値傾向が認められた。

3. 胎児観察

(1) 外表（表2、図1）

短尾（2匹/1腹）、屈曲肢（5匹/2腹）、短鼻（1匹/腹）、眼球突出（1匹/腹）が認められた。

屈曲肢、短鼻、眼球突出は既報と同様の形態異常であった。

前肢の屈曲肢の発現率：5.3% (0/6+1/8+2/12×100)

後肢の屈曲肢の発現率：15.3% (0/6+1/8+4/12×100)

(2) 内臓（表3）

変異として、肺副葉欠損、鎖骨下動脈位置異常が、異常として、側脳室拡張、騎乗大動脈、動脈弓拡張、動脈管狭窄、肺動脈幹狭窄、動脈幹狭窄、食道拡張が観察された。

(3) 骨格（表4、図2）

変異として、ダンベル型胸椎、過剰肋骨が、異常として、胸椎椎体二分、顔面異形成（鼻骨癒合、顎間骨癒合）、小掌（前肢屈曲）、脛骨の欠損・短小、腓骨彎曲、指節骨欠損（前肢）が観察された。

D. 結論

投与条件を検討した結果、得られた結果は既報と概ね一致し催奇形性（屈曲肢、短鼻、眼球突出、欠指など）が確認できた。アザラシ肢症は、既報通り認めら

れなかった。この誘発の検討のためには、別途、妊娠ウサギの匹数を、ガイドラインの推奨動物数（妊娠動物として各群16匹以上）の規模での検討が必要と考える。

本試験条件下で、母動物の妊娠維持が確認され、胎児にはサリドマイド誘発と考えられる形態変化が認められたことから、250 mg/kg体重/day の投与量は母動物に催奇形性作用を誘発する用量であることが確認された。

この用量を基準として、雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口TK投与試験における投与量として、催奇形性を発現する投与量での薬物動態試験を実施する。

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

本課題に関連した論文はなし。

2. 学会発表

本課題に関連した発表はなし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II.分担報告書－ 2

分担研究者 栗形 麻樹子
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・第二室長

分担研究報告書

-ウサギを用いたサリドマイドの単回あるいは反復経口時の血漿及び精漿中薬物動態試験-
(腔内投与試験における用量設定試験)

研究分担者 栗形 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・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)

研究協力者 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

サリドマイド被害の重篤性に鑑み、より安全側に立脚して服用中の避妊を男性にも求めている。本来、エビデンスに基づいた安全性確保を担保すべきであるが、そのために必要な催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法は確立していない。本研究では種差や薬物動態を考慮しつつサリドマイドを含むこれ以外の物質への一般化を含めた評価法の確立に向けて、ヒトへの外挿可能性を踏まえたプロトコルを完成させることを目的とする。

分担研究として、令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）にて立案した雄性生殖を介した、即ち、種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画（腔内投与試験）を実証するために、初年度は雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与時のサリドマイド及び主代謝物である5-水酸化体サリドマイドの血漿中及び精漿中への移行推移を確認した。

A. 研究目的

本研究では種差や薬物動態を考慮しつつサリドマイドを含むこれ以外の物質への一般化を含めた評価法の確立に向けて、ヒトへの外挿可能性を踏まえたプロトコルを作成するために必要な情報収集を行うことを目的とする。

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）にて立案した、種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画を実証するために、下記4つの試験を実行し、新規試験法の確立を目指す。

- (1) 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血中濃度及び精液中への移行を確認する。
- (2) 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与による血中及び精液中への蓄積を確認する。
- (3) (1)～(2)の結果に基づき、器官形成期の雌に適切な濃度のサリドマイドを腔内投与し、母動物及び胎児組織への移行を確認するとともに催奇形性の有無を確認する。
- (4) 器官形成期の雌にサリドマイドを経口投与し、催奇形性が確認される投与用量における雌の血中動態を確認する。

令和2年度は、(1)及び(2)を実施し、(3)の用量設定を行った。

なお、動物実験は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所、分析は同社つくば研究所に委託した。

【言葉の定義】

1. 精液：精液は精子と精漿から構成される。論文調査による精液中濃度は、その分析方法から精漿中濃度と考えられた。したがって、本課題におけ

る用語「精液中濃度」は精漿中濃度を示す。

2. 精漿：主として副生殖腺の分泌液が混合したもので、精巣上体、精管の分泌液も微量であるが含まれている。
3. 副生殖腺：精囊腺、傍前立腺、前立腺・尿道球腺を示す。精囊腺の後背側に小胞腺があり、精囊腺と小胞腺を合わせたものが、他の動物種の精囊腺に相当する。

B. 研究方法

本課題ではサリドマイドに限定した。

使用動物種は、サリドマイドの経口投与により催奇形性が確認されており、発生毒性試験にて汎用されているNew Zealand White (NZW) 系ウサギを用いた。

ヒトとマウスではサリドマイドの代謝経路が異なることから、催奇形性発現の種差の一因と考えられている。本課題ではサリドマイド未変化体とともに代謝物である5-水酸化体サリドマイド（ヒトにおける主代謝物）及び5'-OH体サリドマイド（マウスにおける主代謝物）についても測定し、試験法立案の補助とした。なお、令和2年度は先行して検討を開始した5-水酸化体サリドマイドについてのみ報告する。

1. 共通事項

1-1. 被験物質

製造元 : Carbosynth (CAB)

名称 : サリドマイド

CAS 番号 : 50-36-1

ロット番号 : FT156482001

純度 : 99%以上*

性状 : 白色～オフホワイトの結晶性粉末*

保管方法 : 冷蔵 (2～8℃)、遮光

* 2020年2月19日分析証明書から転記

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)、Triple Quad 5500	AB SCIEX
データ処理ソフト Analyst 1.6.1	AB SCIEX
高速液体クロマトグラフ (HPLC) ACQUITY UPLC-CLASS	Waters Corporation

分析対象物質：

サリドマイド (Thalidomide)
5-水酸化体サリドマイド (5-hydroxythalidomide)

標準物質：pomalidomide

TKパラメータ：

各投与群の最高薬物濃度 (C_{max})、最高薬物濃度到達時間 (T_{max}) 及び濃度時間曲線下面積 (AUC_{0-24}) を算出した。

安定剤：25 mM Sorenen's citrate buffer (pH 1.5)

血漿試料：遠心分離 (約4℃、1600x g、10分間) により得た。等量の安定剤を添加し保存した。

精液試料：重量及びpHを測定し、安定剤にて10倍希釈し保存した。

2. 雄ウサギを用いた単回経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験 (以下、単回投与TK試験、添付資料1)

サリドマイドを雄ウサギに単回経口投与し、投与0.5～24時間後 (250 mg/kg体重/day群では72時間後まで) に耳介静脈から採血、及び精液を採取し、血漿中と精漿中のサリドマイド及び代謝物5-水酸化体サリドマイドを測定した。

なお、測定値の再現性を確認すること、動物保護の観点上、動物数を削減すること、精液採取は各動物につき1週間に2回以下に抑えることから、投与は各動物1週間以上のwash out期間において3回実施した。

採血は、各投与につき全ての採血時点について、精液の採取は、2及び500 mg/kg体重/day群では投与後4、7又は24時間のいずれかの時点、250 mg/kg体重/day群では全採血点のうちのいずれか2点で実施し、各時点3例ずつが揃うようにした。

さらに、血漿中濃度測定の結果、250 mg/kg体重/day群以上の投与群では T_{max} が遅延する傾向が認められ、投与24時間後までの測定では消失相の捕捉が不十分である可能性が考えられた。このため、250 mg/kg体重/day群では追加群として2週間以上のwash out期間において4回目の投与を行い、投与後7、24、48及び72時間に採血又は精液採取を実施した。

群構成を下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (mg/mL)	動物数
低用量	2	0.4	3
中用量	250	50	6
高用量	500	100	3

投与量設定根拠

文献調査の結果から、本試験における最小量を臨床使用の開始量である2 mg/kg体重/day、中用量は臨床使用の最大量の10倍以上の量で、ウサギにおいて催奇形作用が報告されている250 mg/kg体重/dayとし、高用量

1-2. 媒体

0.5 w/v% メチルセルロース (0.5%MC)

名称：メチルセルロース400 (化学用)

製造元：富士フィルム和光純薬株式会社

ロット番号：CAM6671

媒体の調製：

必要量のメチルセルロース400を秤取し、攪拌しながら温めた適量の注射用水 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：9K87、9K94) を徐々に加えて分散させ、冷やして溶解させた後に注射用水を加えて0.5%溶液とした (冷蔵保存)。

媒体選択理由：

サリドマイドは水への溶解度は低い。0.5%MCは懸濁液を調整する際に汎用されており、既報においてもサリドマイド投与実験に使用されている。

さらに我々はマウスにサリドマイドを投与し網羅的遺伝子発現解析を実施していることから、本課題で用いる試薬及び溶媒を一致させた。

1-3. 被験物質の調製及び均一性・安定性分析

必要量のサリドマイドを秤取し、メノウ乳鉢にてすり潰しながら、0.5%MCを加えて懸濁させた。

なお、0.2及び200 mg/mL液 (媒体：0.5%MC溶液) について、事前に冷蔵 (2～8℃) にて8日間保存後、室温下で24時間の保存したときの安定性および均一性を確認している。

また、単回投与TK試験、反復経口投与TK試験とも、投与液について各1回、各濃度の投与検体の含量および均一性・安定性 (濃度許容範囲; 表示値に対して10%以内、変動係数 (CV) ; 10%以下) を確認した。その結果、含量の表示値に対する割合は94.0%～98.6%、CVは0.8%～1.2% であり、許容範囲を満たした。

1-4. 使用動物

動物種：ウサギ (SPF)

系統：ニュージーランドホワイト種 (Kbl:NZW)

供給源：北山ラベス株式会社

識別：耳介に個体番号を記入、

飼育：適切な飼育ケージに個別飼育

1-5. 飼育環境

温度(22±3℃)、湿度(50±20%)、照明(1日12時間、07:00～19:00)、換気回数(10～15回/時間)が統御された動物飼育室で飼育した。

飼料は固型飼料LRC4 (オリエンタル酵母工業株式会社)を、給水は自動給水装置により水道水を自由摂取させた。

1-6. 投与

投与容量は5 mL/kgとし、ウサギ用経口投与チューブ (ネラトンカテーテル、テルモ社製)を用いて強制経口投与した (注5)。

投与開始日を投与1日 (Day1)とした。

(注5) 2孔式サフィードネラトンカテーテル16Fr (53 mm) (コード番号: SF-ND1610) に、サフィードコネクター100 (コード番号: XX-SF0100)を付けて使用。

1-7. 血漿中及び精液中のサリドマイド濃度測定

は既報（注6）にて血漿中及び精漿中濃度を測定していた最も高い投与量である500 mg/kg体重/dayとした。

（注6）雄ウサギに500 mg/kg のサリドマイドを55回反復投与し、血漿中及び精液中濃度を測定した報告があり、精子数及び精子運動能及び形態には影響は認められていない（Teo SK et al., 2004）。

動物ごとの投与液量（表示単位：1 mL）は直近の体重を基準に算出し、投与は午前中に1回行った。

2-1. 供試動物

動物数：雄12匹（購入動物14匹）

入荷時週齢：16～17週齢

群分け：投与開始日に各群の体重が均一になるように割り付けた

群分け時体重範囲：3.0～4.5 kg

2-2. 動物の観察

一般状態は毎日観察した。

体重は各投与について投与1日、投与7日及び剖検時に測定した。

剖検時には、主要臓器の異常の有無を観察し肝臓重量を測定した。

2-3. 血漿中及び精液中のサリドマイド濃度測定

サンプリング

全群：投与日の投与0.5、1、2、4、7、24時間後

追加（250 mg/kg体重/day）：投与7、24、48、72時間後

血漿中と精漿中のサリドマイド及び5-水酸化体サリドマイド濃度測定は、1-7. に準じて行った。

3. 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験（以下、反復投与TK試験、添付資料2）

単回投与TK試験の結果から、500 mg/kg体重/day群では、吸収の遷延によると考えられる測定結果が得られたことから、反復投与試験の投与量を、250 mg/kg体重/dayとした。14日間反復経口投与のうち、投与1日の投与後7、24時間及び投与14日（最終投与日）の投与前、投与7、24、48及び72時間に耳介静脈から採血、及び精液を採取し、血漿中及び精漿中のサリドマイド及び代謝物5-水酸化体サリドマイドを測定し、蓄積性の有無、精液の量及びpH変化の有無について検討した。

群構成は下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (mg/mL)	動物数
中用量	250	50	6

投与量設定根拠

単回投与TK試験の結果から、血漿中及び精漿中濃度を測定している最大量である500 mg/kg体重/dayでは、吸収の遷延によると考えられる測定結果が得られたことから、その半分量である250 mg/kg体重/dayとした。

動物ごとの投与液量（表示単位：1 mL）は直近の体重を基準に算出した。投与は1日1回、連続14日間（14回）、午前中に行った。

3-1. 供試動物

動物数：雄6匹（購入動物7匹）

入荷時週齢：16～17週齢

3-2. 動物の観察

一般状態は毎日観察した。

体重は投与1、3、8、10、14日並びに剖検日に測定した。

剖検時には、主要臓器の異常の有無を観察し肝臓重量を測定した。

3-3. 血漿中及び精液中のサリドマイド濃度測定

サンプリング

投与1日：投与7、24時間後

投与14日：投与前（投与13日の投与から23時間30分以上経過後）、投与7、24、48、72時間後

血漿中と精漿中のサリドマイド及び5-水酸化体サリドマイド濃度測定は、1-7. に準じて行った。

（倫理面への配慮）

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

1. 雄ウサギを用いた単回経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験

一般状態では投与2日及び3日に250 mg/kg体重/day群以上の全例で排糞量の減少が散見されたが、いずれも投与4日以降は回復した。また、各群で投与後一過性の体重減少が散見されたが、継続的な減少を示した個体はみられないことから、体重推移にサリドマイド投与の影響はないと考えられた。

その他、剖検所見、肝臓重量にサリドマイド投与による影響はみられなかった。

1-1. 血漿中濃度

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの血漿中濃度推移を表5、表6並びに図3、図4に、TKパラメータを表7、表8に示す。

追加群の血漿中サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度推移を表9及び表10に示した。

3回の単回投与を通し、2 mg/kg体重/day群では平均血漿中サリドマイド濃度は、投与0.5～2時間後にC_{max}に達した後、速やかに低下し、24時間で定量限界（BLQ；4.00 ng/mL未満）となった。

250及び500 mg/kg体重/day群では、平均血漿中サリドマイド濃度は投与1時間から24時間後までほぼ一定の濃度を維持した。

投与量が2 mg/kg体重/dayから250 mg/kg体重/dayと125倍に増加すると、AUC_{0-t}は投与量に比例して増加（132倍）したが、C_{max}は37倍にしか増加せず飽和を示し、T_{max}は1.67時間から12.7時間に延長した。

投与量が250 mg/kg体重/dayから500 mg/kg体重/dayと2倍になってもC_{max}は1.2倍、AUC_{0-t}は1.3倍に増加したのみであった。T_{max}には変化はなかった（12.7時間）。

また、1～3回目投与の血漿中サリドマイド濃度の推移は再現性が高かった。

血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度はいずれの用量でも未変化体であるサリドマイドの0.5%～2.5%であ

ったが、推移は未変化体とよく近似していた。

追加群での血漿中サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度測定の結果、7及び24時間値は1～3回目投与時の250 mg/kg体重/day群の測定値とほぼ同じ結果が得られた。48時間での血漿中サリドマイド濃度は24時間値の3.7%と急激に低下した。また、72時間値は48時間値の2.2%であった。

48時間での血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度はサリドマイドの0.6%～1.4%と、24時間までとほぼ同じ比率で推移した。

1-2. 精液採取量、pH

精液量の平均及びpHの中央値を下図に示す。

投与群 (mg/kg 体重 /day)	精液量 (mg) 平均値 (最大値-最小値)	pH 中央値 (最大値-最小値)
2	589 (1028-241)	7.4 (8.2-7.0)
250	458 (915-120)	7.25 (7.8-6.8)
500	360 (944-108)	7.0 (8.6-6.4)

2 mg/kg体重/day群に比較して高用量群では、精液量の平均は低値傾向を示し、pHの中央値は低下傾向を示したが、いずれの項目も各群の最大値と最小値を比較すると、互いに範囲は重複しており、傾向は明瞭には認められなかった。

1-3. 精漿中濃度

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの精漿中濃度推移を表11、表12、並びに図5に示す。追加群の血漿中サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度推移を表13、図5に示した。

精漿中サリドマイド濃度は、2 mg/kg体重/dayから500 mg/kg体重/dayの範囲で用量依存的に増加した。2 mg/kg体重/dayでは4時間以降低下を示したが、250 mg/kgでは2時間から24時間の間、500 mg/kgでも4時間から24時間の間、ほぼ一定の値を維持した。

精液を採取した動物について、血漿中濃度と精漿中濃度を比較した結果、投与24時間までの時点で、精漿中サリドマイド濃度は、血漿中濃度の0.52～1.06倍であった。また、精漿中濃度が血漿中濃度を上回ったのは39例中2例のみでその値も1.03倍と1.06倍と1.0に近似した値であった。

以上の結果から、精漿中サリドマイド濃度は、血漿中濃度に等しいか又は若干の低値であると考えられた。

なお、追加検討した投与48時間後の時点においても精漿中濃度は、血漿中濃度を下回っていたが、72時間後には全例で精漿中濃度が血漿中濃度を上回った。これは、投与72時間後には血漿中濃度が投与24時間後の1/1500倍未満に低下していることによると考えられ、精漿が分泌される時期と、精液採取時点の時間差が原因と考えられた。

精漿中5-水酸化体サリドマイド濃度は、250 mg/kg体重/dayと500 mg/kg体重/dayで投与24時間に各1例、高濃度を示す個体が存在したが、この2例を除くと、いずれの用量でも未変化体の0.1%～0.6%であった。

追加群の精漿中サリドマイド濃度は48時間でも血

漿中濃度の62%～90%で、24時間までとほぼ同じ比率で推移した。48時間での精漿中5-水酸化体サリドマイド濃度は未変化体の0.3%～0.7%と、24時間までとほぼ同じ比率で推移し、72時間では3例中2例が定量下限 (0.400 ng/g) 未満であった。

これらの結果から、いずれの用量でも精漿中サリドマイド濃度は血漿中濃度の52%～106%であったことから、単回経口投与により、精漿中へ過度にサリドマイドが移行しないことが明らかになった。

2. 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与血漿および精漿中薬物動態試験

一般状態では投与2日に6例中5例で排糞量の減少がみられたが、投与3日目以降は認められなかった。また、体重には影響はみられなかった。

その他、剖検所見、肝臓重量にサリドマイド反復投与による影響はみられなかった。

2-1. 血漿中濃度

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの血漿中濃度推移を表14及、15に、薬物動態パラメータを表16、表17に示す。

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドとも、C_{max}とAUC_{0-t}の投与14日の結果は、投与1日に比較してわずかに高値傾向を示したが、両者のAUCにはほとんど差はなく蓄積性は明瞭ではなかった。最高血漿中濃度は20,000 ng/mL未満であった。

反復投与によるT_{max}の延長は認められなかった。血中半減期は24時間以内であると考えられた。

2-2. 精液採取量、pH

精液量の平均及びpHの中央値を下図に示す。

投与群 (mg/kg 体重 /day)	精液量 (mg) 平均値 (最大値-最小値)	pH 中央値 (最大値-最小値)
250	567.8 (1309-170)	7.0 (7.8-5.4)

サリドマイドの投与により精液量に変化があったと考えられる例はみられなかった。

2-3. 精漿中濃度

サリドマイド及び5-水酸化体サリドマイドの精漿中濃度推移を表18及び表19に示す。

サリドマイドでは血漿中濃度に比較して、精漿中濃度は一部の例外を除き血漿中濃度とほぼ同じ又は若干低値であった。このことから、250 mg/kg体重/dayを連日経口投与した場合も、精漿中の濃度は20,000 ng/gを超えることはないと考えられた。

また、各ステージの精液を採取した3匹について血漿中濃度と精漿中濃度を比較した。

なお、BLQは定量下限 (4.00 ng/mL) 未満を示す。

<サリドマイド濃度の比較>

投与1日

Day 1	7時間	24時間
動物番号	1001、1003、1005	1002、1004、1006
血漿中濃度 (ng/mL)	13200	7993
最大値-最小値	15700-10800	11200-3440
精漿中濃度 (ng/g)	4960	4153
最大値-最小値	5430-4410	6580-2080

投与14日

Day 14	7時間	24時間	48時間	72時間
動物番号	1001、1003、1005	1002、1004、1006	1001、1003、1005	1002、1004、1006
血漿中濃度 (ng/mL)	18766	243	11.9	BLQ
最大値-最小値	19800-17600	304-200	16.9-8.01	BLQ-BLQ
精漿中濃度 (ng/g)	8813	171	10.5	BLQ
最大値-最小値	13100-4100	206-142	14.9-4.60	BLQ-BLQ

<5-水酸化体サリドマイド濃度の比較>

投与1日

Day 1	7時間	24時間
動物番号	1001、1003、1005	1002、1004、1006
血漿中濃度 (ng/mL)	66.5	73.1
最大値-最小値	70.6-63.0	98.1-35.1
精漿中濃度 (ng/g)	5.12	5.83
最大値-最小値	5.67-4.84	6.38-5.41

投与14日

Day 14	7時間	24時間	48時間	72時間
動物番号	1001、1003、1005	1002、1004、1006	1001、1003、1005	1002、1004、1006
血漿中濃度 (ng/mL)	56.9	4.30	BLQ	BLQ
最大値-最小値	60.4-52.4	5.51-3.30	BLQ-BLQ	BLQ-BLQ
精漿中濃度 (ng/g)	94.1	4.07	BLQ	BLQ
最大値-最小値	271-5.69	11.0-0.508	BLQ-BLQ	BLQ-BLQ

血漿と精液の関係において、血中でイオン化されている化学物質の精液中への排泄率はpHにより大きく異なることが明らかになっているが、本試験の結果、サリドマイドによる精液pHの変化はほとんどないと考えられた。

単回投与と反復投与の比較

単回投与TK試験と反復投与TK試験における投与1日のTKの結果には再現性が認められ、投与24時間に

においても血漿及び精漿中ともに投与7時間とほぼ同じで高い値を示した。

しかし、反復投与14日の投与前（投与13日の投与約24時間後）の測定値は、投与1日の24時間後の測定値の約1/10倍程度まで低下した。また、投与14日、投与24時間後の測定値は、投与前の測定値とほぼ同じ程度まで低下した（表14）。

反復投与14日のT_{max}は、単回投与時に比較して高値を示したが、AUC_{0-t}には差がないことから蓄積性はないと判断した（表16）。

ヒト型代謝物（5-水酸化体サリドマイド）の存在

ヒトとマウスではサリドマイドの代謝経路が異なることから、催奇形性発現の種差の一因と考えられている。ヒトの主たる代謝物である5-水酸化体サリドマイドについても検証した。その結果、ウサギにおいても、未変化体の約1%が5-水酸化体サリドマイドとして血漿及び精漿中に確認された。今後、ウサギ胎児に認められる形態異常の型及び発現頻度と薬物動態結果と比較し、精査していく予定である。

D. 結論

膈内投与発生毒性試験の投与量を設定するために、雄ウサギを用いた単回投与TK試験及び14日間反復経口投与TK試験を実施し、血漿中と精漿中へのサリドマイドの移行について確認した。

検討の結果、雄に250 mg/kg体重/dayを14日間反復投与した場合の最高血漿中濃度は20,000 ng/mLであり、血中半減期は24時間以内で蓄積はないか、ごくわずかであること、精漿中濃度が血漿中濃度を上回る状況は極めて稀であることが明らかとなった。

このことから、ヒトにおいて250 mg/kg体重/dayを2週間以上連日投与した状況でも、血液中濃度はすでに定常状態に達し、20 µg/mL程度を大きく上回る可能性は少なく、この状況において精漿中濃度は20 µg/gにほぼ等しいか若干下回ると推定された。サリドマイドの投与により精液量やpHに大きな変化が生じる可能性は少ないと考えられることから、今回の結果をヒトにおける精液量を4 mL程度、射精回数を2回として外挿すると、精液を通して女性が曝露されるサリドマイド量の最大値は160 µg/日、女性の平均体重を50 kgとして3.2 µg/kg体重/dayであると推定される。この用量での安全性を検討するための膈内投与試験における投与量としては、対象となる毒性が次世代に及ぼす影響であり不可逆であること並びに種差を考慮し、係数100倍を乗じて0.4 mg/kg体重/dayとし、膈内投与試験を立案した（添付資料3）。

E. 健康危険情報

総括研究報告書参照

F. 研究発表

- 論文発表
なし
- 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II.分担報告書－ 3

分担研究者 山崎 浩史
昭和薬科大学・薬学部・教授

分担研究報告書

催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法の開発
－ 薬物動態の解析－

研究分担者 山崎 浩史

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究要旨

サリドマイド被害の重篤性に鑑み、より安全側に立脚して服用中の避妊を男性にも求めている。本来、エビデンスに基づいた安全性確保を担保すべきであるが、そのために必要な催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法が確立していない。

本研究では薬物動態や薬物応答性の種差を考慮しつつ、サリドマイドをモデル物質とした催奇形性誘発懸念物質の体内動態を基盤とする医薬品毒性評価法の確立に向けて、ヒトへの外挿可能性を踏まえた毒性試験プロトコールを作成するために重要な基盤情報収集を行うことを目的とした。分担研究として、ウサギにサリドマイドを経口投与した後の血中濃度推移を再現する薬物動態モデルを構築した。さらにサリドマイドの第一段階の酸化的代謝反応とその体内動態に関して、催奇形性を示すモデル動物であるウサギと、同作用が観察されないげっ歯類との間で比較することを目的とした。

A. 研究目的

本研究では薬物動態や薬物応答性の種差を考慮しつつ、サリドマイドをモデル物質とした催奇形性誘発懸念物質の体内動態を基盤とする医薬品毒性評価法の確立に向けて、ヒトへの外挿可能性を踏まえた毒性試験プロトコールを作成するために重要な基盤情報収集を行うことを目的とした。

なお分担研究として、ウサギにサリドマイドを経口投与した後の血中濃度推移を再現する薬物動態モデルを構築した。サリドマイドは、その芳香環が酸化されるヒト不均衡性代謝物5-水酸化体サリドマイドに変換され、さらなる活性化反応を受ける経路に代謝される一方、主要な解毒反応と考えられるげっ歯類型の脂肪環5'-水酸化体サリドマイドに代謝される。本研究ではサリドマイドの第一段階の酸化的代謝反応とその体内動態に関して、催奇形性を示すモデル動物であるウサギと、同作用が観察されないげっ歯類との間で比較することを目的とした。

B. 研究方法

雄性ウサギにサリドマイドを経口投与後、血漿および精漿中濃度時間推移を検討した。すなわち、サリドマイド 2.0 mg/kg体重、250 mg/kg体重 および 500 mg/kg体重 を一群 3 匹の雄性ウサギに単回経口投与し、経時的に血漿中および精漿中のサリドマイドおよびヒト不均衡性代謝物 5-水酸化体サリドマイドを液体クロマトグラフ-質量分析計により測定した。サリドマイドを各用量にて経口投与後のウサギ血中薬物濃度推移情報を元に 簡素な1-コンパートメントモデル用の吸収速度定数、分布容積および消失速度定数を薬物動態解析ソフトにより決定した。

ウサギで得た知見と比較を行うため、サリドマイド 250 mg/kg体重 を3-5 匹の雄性ラット、雄性マウスあるいはヒト肝細胞移植雄性マウスに単回経口投与し、動物の健康上状態を目視の上、同様に代謝物等を解析した。

方法の詳細および結果の各データの図表は、「II.分

担報告書－ 2 (葉形分) 」を参照。

(倫理面への配慮)

科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、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. 研究結果および考察

ウサギのサリドマイド低用量 (2.0 mg/kg体重) 群では、投与 2 時間後に最大血中濃度を示し、投与24時間後には検出限界まで消失した。本実験結果から、サリドマイド経口投与後のウサギ血中動態を再現記述する1-コンパートメントモデル用の吸収速度定数 1.6 h⁻¹、分布容積 3.6 L/kg および消失速度定数 0.38 h⁻¹を決定した。一方、サリドマイド中用量 (250 mg/kg体重) 群および高用量 (500 mg/kg体重) 群では、投与7時間後に最大血中濃度を示し、24時間時点まで高濃度を維持した (図6)。

サリドマイドの第一段階の酸化的代謝物に注目すると、ウサギ血漿中 5-水酸化体サリドマイド濃度は、いずれもサリドマイド濃度の約1/100 程度の低値を示した。ウサギ精漿中のサリドマイドおよび 5-水酸化体サリドマイドもウサギ血漿中と同様の濃度推移を示し、両者の血漿中と精漿中の濃度比に特段の濃縮は認められず、0.5から1.1の範囲内であった。以上の結果から、サリドマイドの経口投与により血漿中と概ね同程度のサリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの受動的な精液移行が明らかになった。

サリドマイドは、その芳香環が酸化されるヒト不均衡性代謝物5-水酸化体サリドマイドに変換される経路に代謝される一方、主な解毒反応と考えられるげっ歯類型の脂肪環5'-水酸化体サリドマイドに代謝される。ラットにサリドマイド中用量 (250 mg/kg体重) を経口投与した場合、後者の 5'-水酸化体サリドマイドに優先的に変換された。この 5'-水酸化体サリドマイドは、尿中への排泄が容易な硫酸抱合体とグ

ルクロン酸抱合体としてラット血中に存在した。一方、ラットの血中5-水酸化体サリドマイド濃度は、上記ウサギの場合に比較して低値であった。予備的にヒト肝細胞移植マウスに中用量サリドマイドを投与した場合、その半数程度が48時間以内に死亡したが、ヒト肝細胞非移植マウスでは、ラットの場合と同様に、見かけのサリドマイド毒性作用は全く観察されなかった。

D. 結論

サリドマイド経口投与後のウサギ血中動態を再現記述する簡素な薬物動態パラメータ値を決定した。ウサギへの経口投与によるサリドマイド動態評価の過程で、中用量の反復投与と比較し、単回投与時にはサリドマイドの血中曝露が継続する知見も得られた。今後、サリドマイドの体内動態を再現する簡素な1-コンパートメントモデルから、詳細な生理学的薬物動態モデルの構築に向けた薬物動態学的取組みを継続する。

本研究班主任研究者により、ウサギにサリドマイド中用量を経口投与した場合に、ウサギ循環血中にヒト不均衡性代謝物5-水酸化体を伴い、形態学な骨格奇形をもたらす結果が得られた。げっ歯類では、サリドマイド同用量経口投与にて解毒的水酸化代謝物とその抱合体が高濃度に観察された。これらの実験動物におけるサリドマイドの薬物動態や薬物応答性の種差を総合的に考慮しつつ、ウサギにて実験的に得られた薬物動態特性を基盤情報とし、雌性ウサギ膈内へのサリドマイド投与試験を、薬物動態の視点から、さらに推進する予定である。

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

- 1) Y Kamiya, S Otsuka, T Miura, M Yoshizawa, A Nakano, M Iwasaki, Y Kobayashi, M Shimizu, M Kitajima, F Shono, K Funatsu, H Yamazaki: Physiologically based pharmacokinetic models predicting renal and hepatic concentrations of industrial chemicals after virtual oral doses in rats. *Chem Res Toxicol.*, 33, 1736-1751 (2020)
- 2) Y Kamiya, M Yanagi, S Hina, K Shigeta, T Miura, H Yamazaki: Plasma, liver, and kidney exposures in rats after oral doses of industrial chemicals predicted using physiologically based pharmacokinetic models: A case study of perfluorooctane sulfonic acid. *J Toxicol Sci*, 45, 763-767 (2020)
- 3) Y Kamiya, K Handa, T Miura, M Yanagi, K Shigeta, S Hina, M Shimizu, M Kitajima, F Shono, K Funatsu, H Yamazaki, In silico prediction of input parameters for simplified physiologically based pharmacokinetic models for estimating plasma, liver, and kidney exposures in rats after oral doses of 246 disparate chemicals, *Chem Res Toxicol* 34 507-513 (2021)
- 4) T Miura, S Uehara, M Shimizu, H Suemizu, H Yamazaki: Pharmacokinetics of primary oxidative metabolites of thalidomide in rats and in chimeric mice humanized with different human hepatocyte. *J Toxicol Sci*, in press.

2. 学会発表

- 1) 山崎浩史: 化学物質の予測物性値を用いる生理学的薬物動態(PBPK)モデルを活用するヒト臓器中濃度推

移と毒性予測、第47回日本毒性学会学術年会(川崎(オンライン)) 2020年6月

- 2) 山崎浩史: 一般化学物質の経口吸収過程を含む簡素な生理学的薬物動態モデルを活用する体内動態評価、第47回日本毒性学会学術年会(川崎(オンライン)) 2020年6月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y Kamiya, S Otsuka, T Miura, M Yoshizawa, A Nakano, M Iwasaki, Y Kobayashi, M Shimizu, M Kitajima, F Shono, K Funatsu, H Yamazaki	Physiologically based pharmacokinetic models predicting renal and hepatic concentrations of industrial chemicals after virtual oral doses in rats.	Chem Res Toxicol	33	1736-1751	2020
Y Kamiya, M Yanagi, S Hina, K Shigeta, T Miura, H Yamazaki	Plasma, liver, and kidney exposures in rats after oral doses of industrial chemicals predicted using physiologically based pharmacokinetic models: A case study of perfluorooctane sulfonic acid.	J Toxicol Sci	45	763-767	2020
Y Kamiya, K Handa, T Miura, M Yanagi, K Shigeta, S Hina, M Shimizu, M Kitajima, F Shono, K Funatsu, H Yamazaki	In silico prediction of input parameters for simplified physiologically based pharmacokinetic models for estimating plasma, liver, and kidney exposures in rats after oral doses of 246 disparate	Chem Res Toxicol	34	507-513	2021
T Miura, S Uehara, M Shimizu, H Suemizu, H Yamazaki	Pharmacokinetics of primary oxidative metabolites of thalidomide in rats and in chimeric mice humanized with different human hepatocyte.	J Toxicol Sci	in press.		

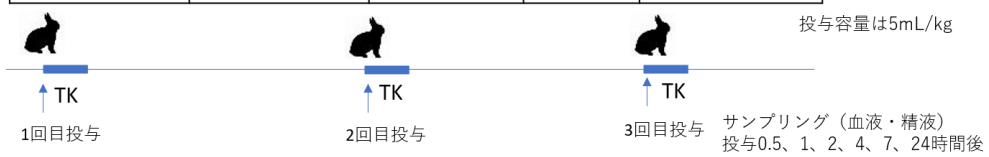
IV.資料

1. 雄ウサギを用いた単回経口投与トキシコキネティクス (TK)試験

目的：単回投与後の血漿中および精液中サリドマイド動態を確認（腔内投与試験の予備試験-1）

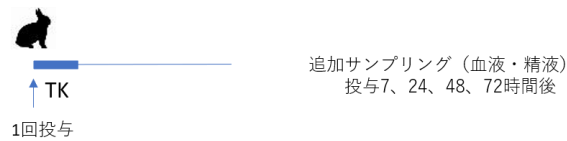
1.群構成 同一個体に3回投与（1週間休業）

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (mg/mL)	動物数	動物番号
低用量群	2	0.4	3	1001~1003
中用量群	250	50	6	2001~2006
高用量群	500	100	3	3001~3003



2.追加検討

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (mg/mL)	動物数
中用量群	250	50	6



2. 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与トキシコキネティクス (TK)試験

目的：反復投与による血漿中および精液中への蓄積を確認 (腔内投与試験の予備試験-2)

1. 群構成

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (mg/mL)	動物数
中用量群	250	50	3

投与容量は5mL/kg



採血および精液採取ポイント

1. 投与初回：投与後7及び24時間後
2. 最終投与：投与前0、投与後7, 24, 48及び72時間後

3. 雌ウサギを用いた膈内投与発生毒性試験（令和3-4年度実施予定）

目的：精漿を介した母体および胎児への影響

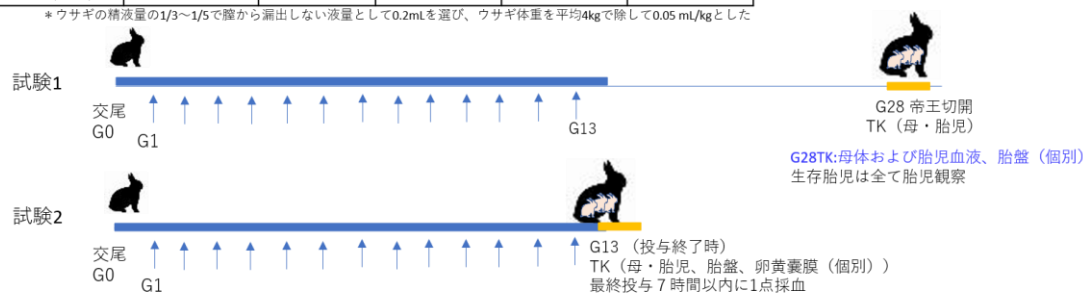
1. 群構成

試験群	投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/day)	容量/膈 mL/kg *	投与期間	解剖時期	妊娠動物数
1	0	0.05	G1-G13	G28	8
2 (TK)	400	0.05	G1-G13	G28	8
3 (TK)	400	0.05	G1-G13	G13	8

* ウサギの精液量の1/3~1/5で膈から漏出ししない液量として0.2mLを選び、ウサギ体重を平均4kgで除して0.05 mL/kgとした

2. 投与期間：G1~G13

理由：
ヒトへの外挿性を考慮し投与開始日はG0に近いG1とし、投与終了時は先行して実施した催奇形性試験と合わせてG13とする。



膈内投与量設定根拠

250 mg/kg体重の投与量で、14日反復経口投与した時のCmax：19800 ng/mL \approx 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。血中半減期が24時間以内で反復投与による蓄積はなく、血漿中濃度と精漿中濃度であったことから、反復投与時の最高精液中濃度は20 $\mu\text{g}/\text{g}$ と考えられる。すなわち、ヒトに250 mg/kgを反復経口投与したと仮定した時、ヒトでのCmaxは20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度になると考えられ、この時の精漿中濃度は20 $\mu\text{g}/\text{g}$ 又はこれを下回る濃度になると考えられる（既報から精液/血液=0.6）。この濃度で、ヒトの1回射出精液量を4 mL程度、射精回数を2回と仮定すると、精液を通して女性に移行する危険性のあるthalidomide量は、1日約160 μg である。これはヒトの平均体重を50kgとすると3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となり、係数約100として400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ となる。

係数100の妥当性

既報からヒトで200 mg/day反復経口投与時のCmax：約2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、精液中へ1.2~2 $\mu\text{g}/\text{g}$ (既報では6割) と推定する。ヒトとウサギで10倍感度が異なることから、これに個体差10をかけ、100倍とした。

外表異常



短尾

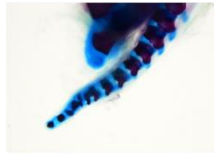


屈曲肢

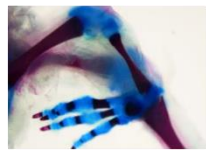


眼球突出、短鼻

骨格異常



尾椎癒合



脛骨欠損



左右顎間骨癒合
左右鼻骨癒合

(アルシアン青・アリザリン赤骨格二重染色標本)

図1. サリドマイド器官形成期投与により胎児に観察された形態変化



正常な前肢



サリドマイド肢 (両側)



サリドマイド肢 (左) と正常前肢 (右)

屈曲肢発現率
胎児(観察腹数: 3腹)

屈曲肢 (前肢) 5.3 % $(0/6 + 1/8 + 2/12 \times 100)$
屈曲肢 (後肢) 15.3 % $(0/6 + 1/8 + 4/12 \times 100)$

図2. サリドマイド器官形成期投与により胎児四肢に観察された形態変化

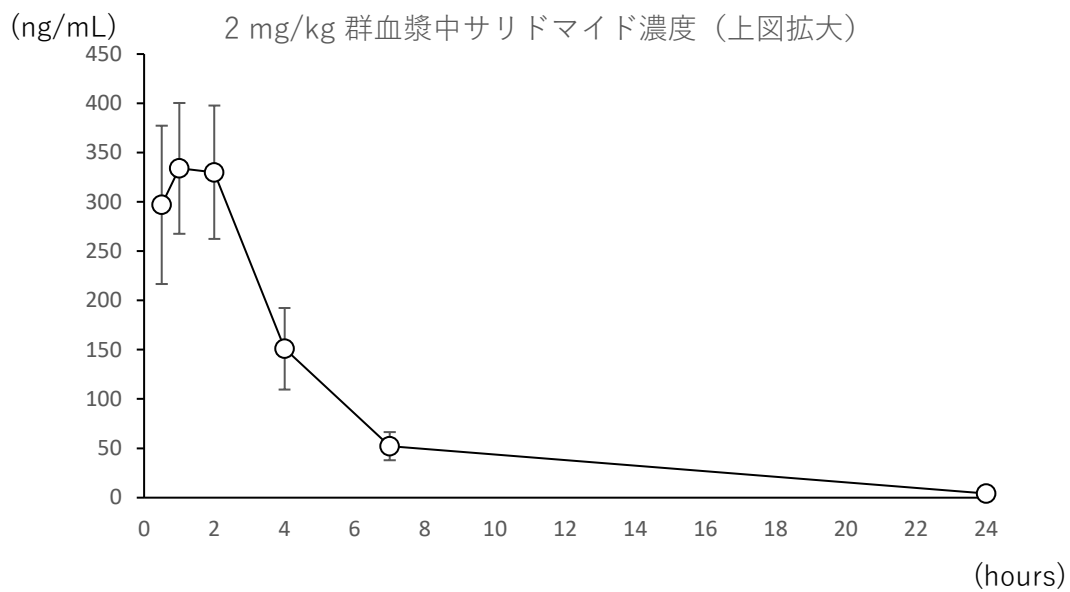
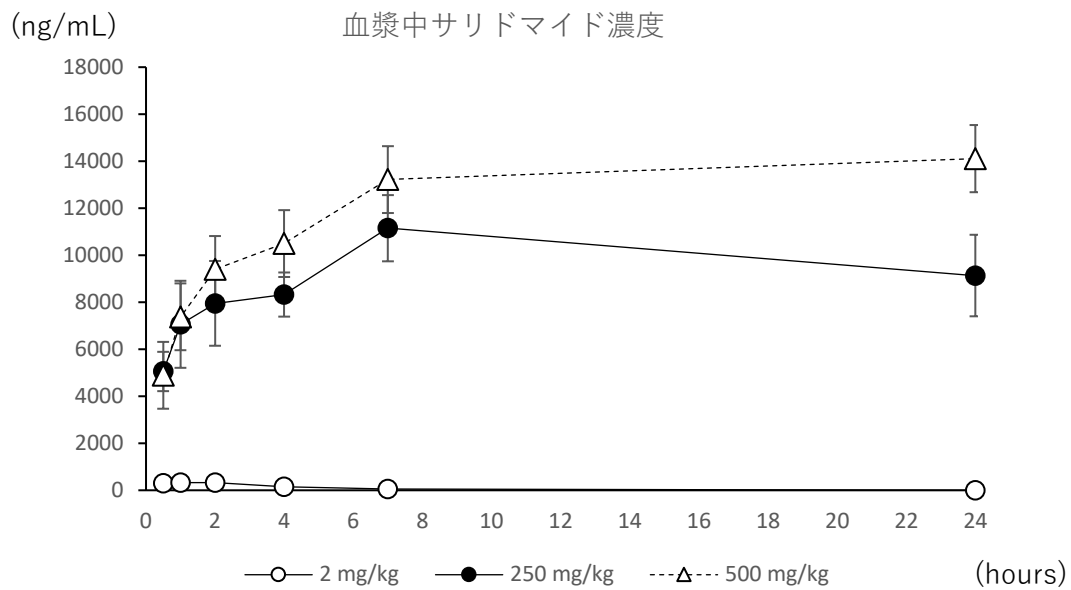


図3. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与による血漿中サリドマイド濃度推移

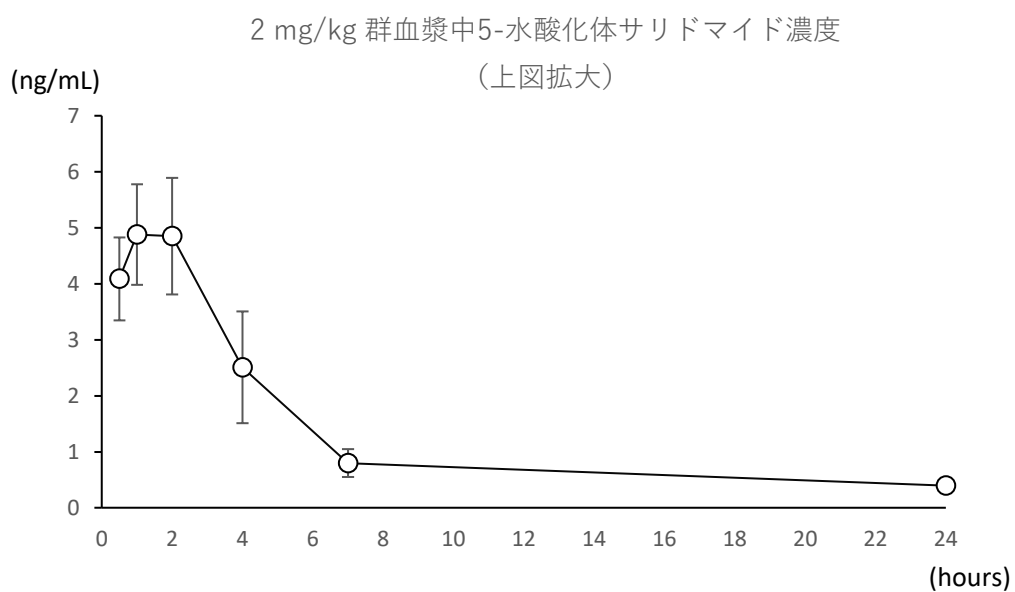
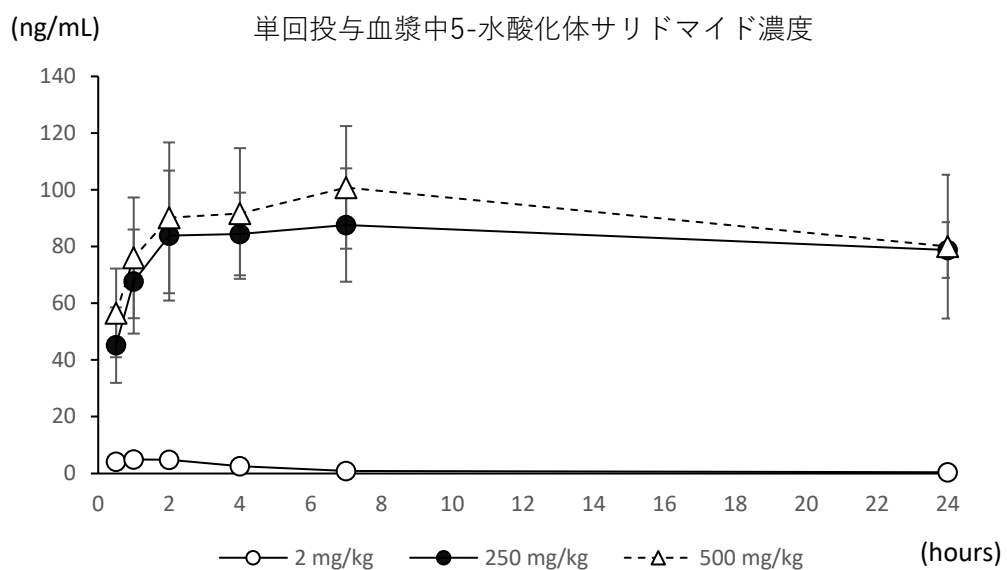


図4. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与による血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移

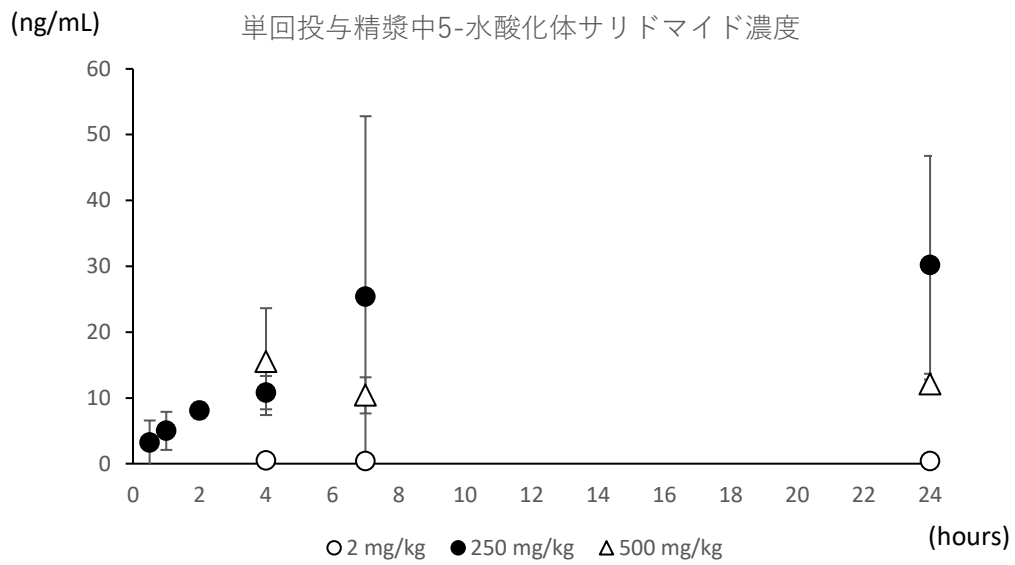
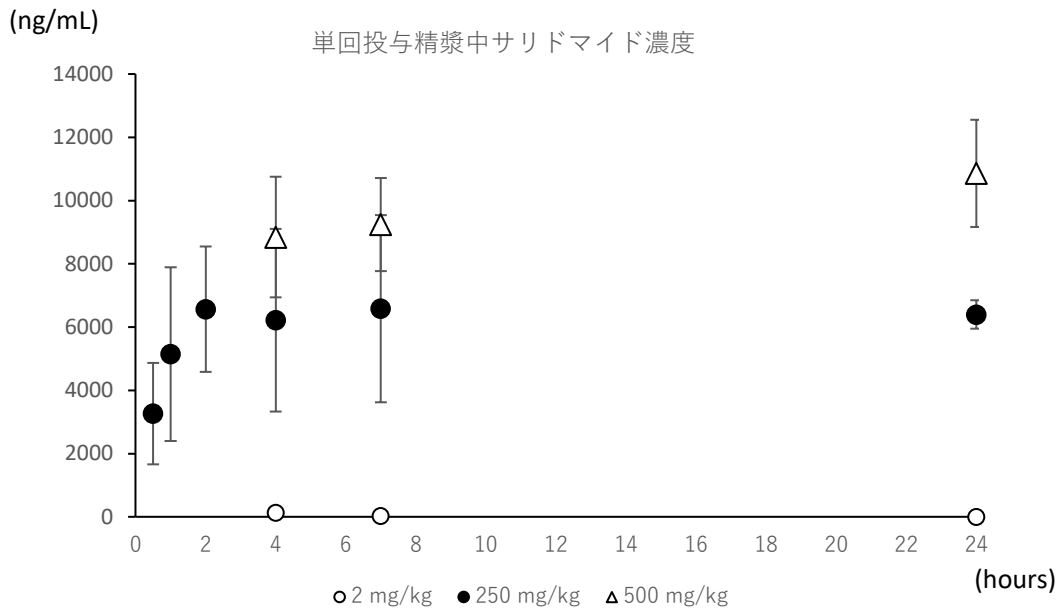
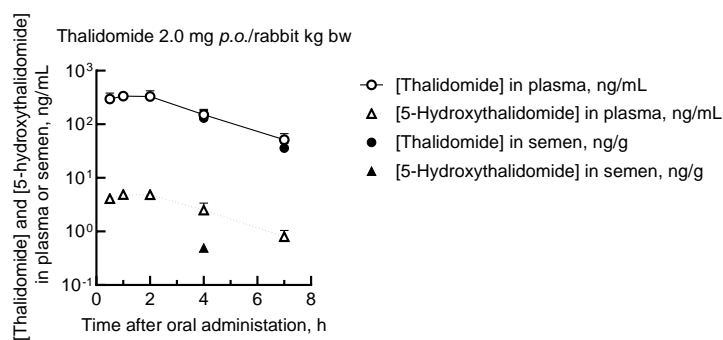


図5. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与による精漿中サリドマイドおよび5-水酸化体サリドマイド濃度推移

(1) 単回経口投与



(2) 反復経口投与

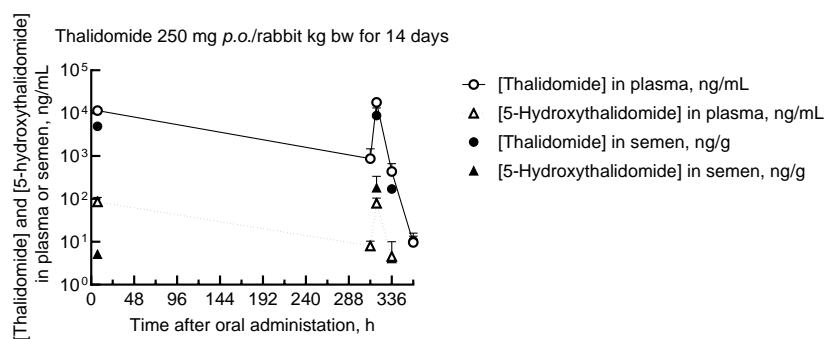


図6. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回あるいは反復投与時のウサギにおける体内動態

表1. 帝王切開所見(胚・胎児発生への影響:予備試験)

Dam No.	Number of corpora lutea	Number of implantations	Preimplantation loss (%) a)	Implantation index (%) b)	Number of resorptions Total c)	Postimplantation loss(%) Total d)	Number of live fetuses			Fetal weight(g)			Placental weight(g)		
							Male	Female	Total	Male	Female	Total	Male	Female	Total
1101	9(4/5)	9(4/5)	0.0	100.0	3	33.3	3	3	6	38.3	36.3	37.3	6.2	5.9	6.1
1102	9(4/5)	8(3/5)	11.1	88.9	0	0.0	1	7	8	34.9	31.7	32.1	2.8	2.3	2.4
1104	12(10/2)	10(8/2)	16.7	83.3	0	0.0	2	8	10	26.6	28.2	27.9	2.6	2.8	2.7
1105	6(3/3)	2(1/1)	66.7	33.3	2	100.0	0	0	0						
Total	36	29			5		6	18	24						
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3
Mean	9.0	7.3	23.6	76.4	1.3	33.3	1.5	4.5	6.0	33.3	32.1	32.4	3.9	3.7	3.7
S.D.	2.4	3.6	29.5	29.5	1.5	47.1	1.3	3.7	4.3	6.0	4.1	4.7	2.0	2.0	2.1

(/): Right/Left

n: Number of dams

Animal No. 1103: Non-pregnancy

a): [(Number of corpora lutea - Number of implantations) / Number of corpora lutea] x 100

b): (Number of implantations / Number of corpora lutea) x 100

c): Resorptions: Implantation site, resorbed embryo, placental remnant, early macerated fetus, late macerated fetus and dead fetus

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

表2. 胎児外表観察(胚・胎児発生への影響:予備試験)

Dam No.	Number of fetuses examined	/Findings			
		A01	A02	A03	A04
1101	6	2(33.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
1102	8	0(0.0)	1(12.5)	0(0.0)	0(0.0)
1103	Non-Pregnancy				
1104	10	0(0.0)	4(40.0)	1(10.0)	1(10.0)
1105	No fetuses				
Total	24	2	5	1	1
n	3				
Mean		11.1	17.5	3.3	3.3
S.D.		19.2	20.5	5.8	5.8

Mean : Average of incidence (%): (Number of fetuses with external anomalies / Number of live fetuses examined) x 100

n: Number of dams

Animal No. 1103: Non-pregnancy

A01: Short Tail, A02: Hyperflexion of limb, A03: Short snout, A04: Exophthalmos

表3. 胎児内臓観察 (胚・胎児発生への影響: 予備試験)

Dam No.	Number of fetuses examined	/Variation		/Anomaly						
		V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07	V08	V09
1101	6	2(33.3)	2(33.3)	0(0.0)	0(0.0)	1(16.7)	1(16.7)	1(16.7)	1(16.7)	0(0.0)
1102	8	No variation or anomaly								
1103	Non-Pregnancy									
1104	10	0(0.0)	1(10.0)	1(10.0)	1(10.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(10.0)	1(10.0)
1105	No fetuses									
Total	24	2	3	1	1	1	1	1	2	1
n	3									
Mean		11.1	14.4	3.3	3.3	5.6	5.6	5.6	8.9	3.3
S.D.		19.2	17.1	5.8	5.8	9.6	9.6	9.6	8.4	5.8

Mean : Average of incidence (%): (Number of fetuses with variations or anomalies / Number of fetuses examined) x 100

n: Number of dams

V01 : Malpositioned subclavian artery origin

V02 : Absent accessory lung lobe

V03 : Dilated cerebral ventricle

V04 : Overriding aorta

V05 : Dilated aortic arch

V06 : Narrowed ductus arteriosus

V07 : Narrowed pulmonary trunk

V08 : Persistent truncus arteriosus

V09 : Dilated esophagus

One fetus in Animal No. 1101 had complicated visceral anomalies (dilated aortic arch, narrowed ductus arteriosus, narrowed pulmonary trunk).

One fetus in Animal No. 1104 had complicated visceral anomalies (dilated cerebral ventricle, persistent truncus arteriosus).

"No variation or anomaly" was calculated as "0".

表4. 胎児骨格観察 (胚・胎児発生への影響: 予備試験)

Dam No.	Number of fetuses examined	/Variation		/Anomaly								
		S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10	
1101	6	4 (66.7)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (33.3)	3 (50.0)	
1102	8	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	0 (0.0)	2 (25.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	
1103	Non-Pregnancy											
1104	10	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	2 (20.0)	1 (10.0)	2 (20.0)	2 (20.0)	1 (10.0)	2 (20.0)	
1105	No futuses											
Total	24	5	1	2	1	4	2	2	2	3	6	
n	3											
Mean		26.4	4.2	9.7	3.3	15.0	7.5	6.7	6.7	14.4	27.5	
S.D.		35.4	7.2	8.7	5.8	13.2	6.6	11.5	11.5	17.1	19.8	

Mean : Average of incidence (%): (Number of fetuses with variations or anomalies / Number of fetuses examined) x 100

n: Number of dams

S01 : Dumbelled shape, thoracic vt.

S03 : Spilited thoracic vt.body

S05 : Small palm, wrist flexion

S07 : Absence of tibia

S09 : Malposition, vertebra (thoracic, lumbar, caudal)

S02 : Supernumerary thoracic rib

S04 : Facial dysplasia a)

S06 : Absent 1st forepaw phalanx

S08 : Shortened, tibia b)

S10 : Fused vertebral bodies (thoracic, caudal, sternum)

a) Fused nasal bones and fused premaxillary bones

b) Flexion and enlargement , fibula

"No variation or anomaly" was calculated as "0".

表5. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血漿中サリドマイド濃度推移

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/mL)					
			0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h
1st	2	1001	378	431	428	206	70.7	BLQ
		1002	245	302	303	103	29.1	BLQ
		1003	193	218	223	156	50.1	BLQ
		Mean	272	317	318	155	50.0	NC
		SD	95.4	107	103	51.5	20.8	NC
		2001	2630	4200	5170	5630	7560	10000
	2002	6110	11400	12000	8820	6670	12400	
	2003	4070	6960	8940	9460	13100	10600	
	2004	8050	11000	9520	6860	12100	5960	
	2005	7080	9920	10200	11300	11800	8740	
	2006	4630	7040	5700	6570	11700	10200	
	Mean	5430	8420	8590	8110	10500	9650	
	SD	2020	2820	2660	2130	2670	2160	
	500	3001	3400	4740	4930	9670	13300	14700
	3002	5090	7780	12000	11800	14100	12300	
	3003	4230	10800	10100	10300	13600	11700	
	Mean	4240	7770	9010	10600	13700	12900	
	SD	845	3030	3660	1090	404	1590	
2nd	2	1001	357	358	408	156	45.9	BLQ
		1002	379	377	283	105	39.6	BLQ
		1003	212	313	463	196	63.2	BLQ
		Mean	316	349	385	152	49.6	NC
		SD	90.7	32.9	92.2	45.6	12.2	NC
		2001	4320	5250	8850	7600	9150	9020
	2002	5230	8420	7800	9910	13100	9310	
	2003	6090	7630	10800	10800	12400	9400	
	2004	3050	4820	4880	8150	13700	4900	
	2005	4770	6400	7710	7740	11000	9080	
	2006	2940	3390	4970	7830	12300	7100	
	Mean	4400	5990	7500	8670	11900	8140	
	SD	1240	1870	2290	1350	1640	1800	
	500	3001	5530	6000	9060	8790	10700	14000
	3002	5730	6850	9290	12100	14600	14600	
	3003	3710	8570	9090	9470	13400	17000	
	Mean	4990	7140	9150	10100	12900	15200	
	SD	1110	1310	125	1750	2000	1590	
3rd	2	1001	416	423	365	172	74.1	BLQ
		1002	215	298	209	100	40.5	BLQ
		1003	273	286	291	160	51.1	BLQ
		Mean	301	336	288	144	55.2	NC
		SD	103	75.9	78.0	38.6	17.2	NC
		2001	6780	6370	8510	10500	11600	7310
	2002	6250	10200	9750	9360	10100	12600	
	2003	5510	7260	9090	7570	12000	10700	
	2004	4680	5720	7420	8340	13400	7860	
	2005	5490	6950	7630	6920	10000	9740	
	2006	3340	4250	4200	6490	9050	9550	
	Mean	5340	6790	7770	8200	11000	9630	
	SD	1220	1980	1950	1520	1600	1920	
	500	3001	5670	5920	9410	11600	9800	14800
	3002	4450	6310	10200	10600	12400	13500	
	3003	6240	9450	10500	10200	17100	14400	
	Mean	5450	7230	10000	10800	13100	14200	
	SD	914	1940	563	721	3700	666	

BLQ: Below the lower limit of quantification (4.00 ng/mL)

NC: Not calculated

表6. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血漿中 5-水酸化体サリドマイド濃度推移

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/mL)					
			0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h
1st	2	1001	2.69	3.80	3.95	2.02	0.710	BLQ
		1002	4.75	5.27	5.13	1.80	0.437	BLQ
		1003	4.32	4.89	5.56	3.84	1.18	BLQ
		Mean	3.92	4.65	4.88	2.55	0.776	NC
		SD	1.09	0.763	0.834	1.12	0.376	NC
	250	2001	44.8	65.9	83.0	73.0	73.6	90.7
		2002	71.5	108	117	107	73.2	104
		2003	58.2	90.4	114	94.9	121	93.5
		2004	83.1	102	117	80.9	119	52.7
		2005	73.7	89.2	94.6	121	96.8	69.1
		2006	36.5	51.6	52.1	48.8	62.1	57.7
		Mean	61.3	84.5	96.3	87.6	91.0	78.0
	SD	18.1	21.7	25.7	25.7	25.2	21.0	
	500	3001	34.0	47.8	54.3	80.9	74.8	71.0
		3002	54.3	86.9	112	110	111	81.1
		3003	54.7	87.9	92.1	86.9	87.0	70.7
		Mean	47.7	74.2	86.1	92.6	90.9	74.3
		SD	11.8	22.9	29.3	15.4	18.4	5.92
2nd	2	1001	3.33	3.62	4.08	1.87	0.583	BLQ
		1002	5.24	5.89	4.39	1.92	0.788	BLQ
		1003	3.62	4.52	6.76	3.80	1.15	BLQ
		Mean	4.06	4.68	5.08	2.53	0.840	NC
		SD	1.03	1.14	1.47	1.10	0.287	NC
	250	2001	46.0	69.3	105	83.9	81.3	76.2
		2002	58.8	78.9	88.9	116	128	78.5
		2003	87.1	108	136	124	137	123
		2004	32.2	47.5	58.7	90.7	118	44.4
		2005	46.8	62.7	82.4	93.1	103	85.1
		2006	24.0	30.0	42.7	50.8	79.6	48.7
		Mean	49.2	66.1	85.6	93.1	108	76.0
	SD	22.2	26.8	33.2	25.9	24.0	28.4	
	500	3001	28.9	47.5	59.0	59.0	63.2	64.9
		3002	59.3	69.5	97.8	94.3	96.1	95.1
		3003	44.1	77.0	80.9	76.8	83.5	86.8
		Mean	44.1	64.7	79.2	76.7	80.9	82.3
		SD	15.2	15.3	19.5	17.7	16.6	15.6
3rd	2	1001	3.90	4.36	3.91	1.96	0.714	BLQ
		1002	4.31	6.01	4.16	2.03	0.698	BLQ
		1003	4.64	5.58	5.68	3.34	0.935	BLQ
		Mean	4.28	5.32	4.58	2.44	0.782	NC
		SD	0.371	0.856	0.958	0.777	0.132	NC
	250	2001	76.2	84.3	95.1	124	113	74.8
		2002	59.4	90.1	115	114	110	108
		2003	85.3	105	118	102	106	139
		2004	47.6	71.0	76.9	91.9	136	63.2
		2005	60.8	79.0	89.4	89.8	102	79.3
		2006	26.8	36.0	37.0	45.1	55.8	51.9
		Mean	59.4	77.6	88.6	94.5	104	86.0
	SD	20.8	23.4	29.7	27.5	26.4	32.1	
	500	3001	26.8	44.7	62.2	69.8	57.2	68.6
		3002	48.6	72.0	99.5	92.6	102	86.3
		3003	56.2	76.1	97.4	89.8	114	84.7
		Mean	43.9	64.3	86.4	84.1	91.1	79.9
		SD	15.3	17.1	21.0	12.4	29.9	9.79

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/mL)

NC: Not calculated

表7. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血漿中サリドマイドに関するTKパラメータ

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	TK parameter					
			C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-24h} (h*ng/mL)	ka (1/h)	kel (1/h)	V/F (L/kg)
1st	2	1001	431	1.00	2380	1.61	0.368	2.78
		1002	303	2.00	1350	0.825	0.759	2.36
		1003	223	2.00	1490	1.72	0.258	5.97
		Mean	319	1.67	1740	1.39	0.462	3.70
		SD	105	0.577	559	0.488	0.263	1.97
		2001	10000	24.0	187000			
	2002	12400	24.0	224000				
	2003	13100	7.00	265000				
	2004	12100	7.00	215000				
	2005	11800	7.00	247000				
	2006	11700	7.00	236000				
	Mean	11900	12.7	229000				
	SD	1040	8.78	27000				
	3001	14700	24.0	295000				
	3002	14100	7.00	301000				
	3003	13600	7.00	287000				
	Mean	14100	12.7	294000				
	SD	551	9.81	7020				
2nd	2	1001	408	2.00	1910	1.29	0.477	2.64
		1002	379	0.500	1560	3.04	0.425	3.65
		1003	463	2.00	2160	0.592	0.592	1.87
		Mean	417	1.50	1880	1.64	0.498	2.72
		SD	42.7	0.866	301	1.26	0.0855	0.893
		2001	9150	7.00	207000			
	2002	13100	7.00	256000				
	2003	12400	7.00	256000				
	2004	13700	7.00	211000				
	2005	11000	7.00	225000				
	2006	12300	7.00	214000				
	Mean	11900	7.00	228000				
	SD	1640	0.00	22400				
	3001	14000	24.0	269000				
	3002	14600	7.00	322000				
	3003	17000	24.0	324000				
	Mean	15200	18.3	305000				
	SD	1590	9.81	31200				
3rd	2	1001	423	1.00	2240	2.98	0.315	3.44
		1002	298	1.00	1300	1.89	0.418	4.73
		1003	291	2.00	1700	1.98	0.304	4.51
		Mean	337	1.33	1750	2.28	0.346	4.23
		SD	74.3	0.577	472	0.605	0.0629	0.690
		2001	11600	7.00	225000			
	2002	12600	24.0	257000				
	2003	12000	7.00	252000				
	2004	13400	7.00	239000				
	2005	10000	7.00	219000				
	2006	9550	24.0	199000				
	Mean	11500	12.7	232000				
	SD	1490	8.78	21800				
	3001	14800	24.0	274000				
	3002	13500	24.0	288000				
	3003	17100	7.00	345000				
	Mean	15100	18.3	302000				
	SD	1820	9.81	37600				

表8. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血漿中5-水酸化体サリドマイドに関するTK パラメータ

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	TK parameter		
			C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-24h} (h*ng/mL)
1st	2	1001	3.95	2.00	22.3
		1002	5.27	1.00	22.9
		1003	5.56	2.00	35.6
		Mean	4.93	1.67	26.9
		SD	0.858	0.577	7.51
		2001	90.7	24.0	1890
	250	2002	117	2.00	2180
		2003	121	7.00	2510
		2004	119	7.00	2130
		2005	121	4.00	2100
		2006	62.1	7.00	1370
		Mean	105	8.50	2030
	SD	24.1	7.87	380	
	500	3001	80.9	4.00	1690
		3002	112	2.00	2330
		3003	92.1	2.00	1920
		Mean	95.0	2.67	1980
		SD	15.8	1.15	324
3001		80.9	4.00	1690	
2nd	2	1001	4.08	2.00	21.0
		1002	5.89	1.00	26.3
		1003	6.76	2.00	36.3
		Mean	5.58	1.67	27.9
		SD	1.37	0.577	7.77
		2001	105	2.00	1900
	250	2002	128	7.00	2460
		2003	137	7.00	3050
		2004	118	7.00	1920
		2005	103	7.00	2180
		2006	79.6	7.00	1440
		Mean	112	6.17	2160
	SD	20.5	2.04	552	
	500	3001	64.9	24.0	1470
		3002	97.8	2.00	2230
		3003	86.8	24.0	1970
		Mean	83.2	16.7	1890
		SD	16.7	12.7	386
3001		64.9	24.0	1470	
3rd	2	1001	4.36	1.00	23.1
		1002	6.01	1.00	25.0
		1003	5.68	2.00	32.7
		Mean	5.35	1.33	26.9
		SD	0.873	0.577	5.08
		2001	124	4.00	2320
	250	2002	115	2.00	2570
		2003	139	24.0	2790
		2004	136	7.00	2320
		2005	102	7.00	2140
		2006	55.8	7.00	1210
		Mean	112	8.50	2230
	SD	30.7	7.87	547	
	500	3001	69.8	4.00	1470
		3002	102	7.00	2210
		3003	114	7.00	2320
		Mean	95.3	6.00	2000
		SD	22.9	1.73	462
3001		69.8	4.00	1470	

表9. 追加検討:

雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血漿中サリドマイド濃度推移及びTKパラメータ

(1) サリドマイド濃度推移

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			
			7 h	24 h	48 h	72 h
Additional	250	2001	8830	12100	225	5.00
		2002	9010	13500	835	6.62
		2003	13800	10900	82.0	BLQ
		2004	12100	7580	355	6.49
		2005	10900	12100	439	31.0
		2006	6950	9310	473	4.53
		Mean	10300	10900	402	8.94
		SD	2490	2150	257	11.1

BLQ: Below the lower limit of quantification (4.00 ng/mL)

(2) TKパラメータ(サリドマイド)

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	TK parameter		
			C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-72h} (h*ng/mL)
Additional	250	2001	12100	24.0	359000
		2002	13500	24.0	405000
		2003	13800	7.00	391000
		2004	12100	7.00	309000
		2005	12100	24.0	390000
		2006	9310	24.0	286000
		Mean	12200	18.3	357000
		SD	1590	8.78	48800

表10. 追加検討：

雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移及びTKパラメータ

(1) 5-水酸化体サリドマイド濃度推移

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			
			7 h	24 h	48 h	72 h
Additional	250	2001	85.7	95.8	2.49	BLQ
		2002	89.2	100	6.93	BLQ
		2003	128	99.6	1.13	BLQ
		2004	130	54.8	3.65	BLQ
		2005	92.5	90.4	4.08	0.500
		2006	42.1	50.4	2.85	BLQ
		Mean	94.6	81.8	3.52	NC
		SD	32.4	22.9	1.96	NC

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/mL)

NC: Not calculated

(2) TKパラメータ (5-水酸化体サリドマイド)

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	TK parameter		
			C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-72h} (h*ng/mL)
Additional	250	2001	95.8	24.0	3050
		2002	100	24.0	3290
		2003	128	7.00	3600
		2004	130	7.00	2770
		2005	92.5	7.00	3070
		2006	50.4	24.0	1610
		Mean	99.5	15.5	2900
		SD	29.0	9.31	689

表11. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の精漿中サリドマイド濃度推移

Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/g)					
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h
2	1001	—	—	—	171 a)	37.0 b)	BLQ c)
	1002	—	—	—	74.0 c)	26.4 a)	BLQ b)
	1003	—	—	—	146 b)	44.4 c)	BLQ a)
250	2001	—	—	—	3060 a)	5650 b)	6810 c)
	2002	—	—	—	6870 c)	4210 a)	5920 b)
	2003	—	—	—	8730 b)	9900 c)	6470 a)
	2004	5040 a)	3250 b)	7230 c)	—	—	—
	2005	2830 c)	8300 a)	8140 b)	—	—	—
	2006	1930 b)	3890 c)	4340 a)	—	—	—
500	3001	—	—	—	8510 a)	7880 b)	10500 c)
	3002	—	—	—	10900 c)	9050 a)	12700 b)
	3003	—	—	—	7130 b)	10800 c)	9380 a)

BLQ: Below the lower limit of quantification (4.00 ng/g)

— ; not sampling, a); the first treatment, b); the second treatment, c); the third treatment

表12. 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の精漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移

Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/g)					
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h
2	1001	—	—	—	0.596 a)	0.400 b)	BLQ c)
	1002	—	—	—	0.437 c)	0.400 a)	BLQ b)
	1003	—	—	—	0.437 b)	0.400 c)	BLQ a)
250	2001	—	—	—	8.12 a)	6.64 b)	41.9 c)
	2002	—	—	—	13.1 c)	12.7 a)	119 b)
	2003	—	—	—	11.1 b)	56.8 c)	18.5 a)
	2004	7.07 a)	2.6 b)	8.11 c)	—	—	—
	2005	1.40 c)	8.21 a)	9.25 b)	—	—	—
	2006	1.08 b)	4.10 c)	6.93 a)	—	—	—
500	3001	—	—	—	13.5 a)	8.22 b)	11.6 c)
	3002	—	—	—	24.4 c)	9.54 a)	725 b)
	3003	—	—	—	8.53 b)	13.5 c)	12.6 a)

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/g)

—; not sampling, a); the first treatment, b); the second treatment, c); the third treatment

表13. 追加検討：

雄ウサギを用いたサリドマイド単回投与後の精漿中サリドマイド及び5-水酸化体サリドマイド濃度推移

(1)サリドマイド濃度推移

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/g)			
			7 h	24 h	48 h	72 h
Additional	250	2001	4590	—	139	—
		2002	—	8050	—	20.3
		2003	6610	—	74.0	—
		2004	—	4530	—	15.1
		2005	6120	—	292	—
		2006	—	5540	—	14.3

BLQ: Below the lower limit of quantification (4.00 ng/g)

(2)5-水酸化体サリドマイド濃度推移

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/g)			
			7 h	24 h	48 h	72 h
Additional	250	2001	7.79	—	0.539	—
		2002	—	14.4	—	1.59
		2003	12.2	—	0.516	—
		2004	—	5.55	—	BLQ
		2005	11.1	—	0.805	—
		2006	—	37.2	—	BLQ

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/g)

表14. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の血漿中サリドマイド濃度推移

(1) 投与1日

Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/mL)	
		7 h	24 h
250	1001	15700	10300
	1002	11300	9340
	1003	10800	10000
	1004	10100	3440
	1005	13100	9500
	1006	7860	11200
	Mean	11500	8960
SD	2680	2790	

BLQ: Below the lower limit of quantification (4.00 ng/mL)

(2) 投与14日

Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/mL)				
		Pre	7 h	24 h	48 h	72 h
250	1001	1700	17600	772	16.9	BLQ
	1002	293	18900	226	8.82	BLQ
	1003	1080	19800	513	8.01	BLQ
	1004	362	15200	200	6.01	BLQ
	1005	1380	18900	590	10.9	BLQ
	1006	407	18000	304	7.28	BLQ
	Mean	870	18100	434	9.65	NC
SD	600	1600	228	3.91	NC	

BLQ: Below the lower limit of quantification (4.00 ng/mL)

NC: Not calculated

表15. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の血漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移

(1) 投与1日

Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/mL)	
		7 h	24 h
250	1001	70.6	41.3
	1002	115	98.1
	1003	63.0	43.9
	1004	112	35.1
	1005	65.9	56.1
	1006	88.0	86.1
	Mean	85.8	60.1
SD	23.2	26.0	

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/mL)

(2) 投与14日

Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/mL)				
		Pre	7 h	24 h	48 h	72 h
250	1001	8.50	52.4	4.77	BLQ	BLQ
	1002	4.41	103	3.30	BLQ	BLQ
	1003	9.13	57.9	4.71	BLQ	BLQ
	1004	7.43	108	4.08	BLQ	BLQ
	1005	11.5	60.4	4.73	BLQ	BLQ
	1006	7.03	93.0	5.51	BLQ	BLQ
	Mean	8.00	79.1	4.52	NC	NC
SD	2.36	24.9	0.749	NC	NC	

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/mL)

NC: Not calculated

表16. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後のサリドマイドに関するTKパラメータ

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	TK parameter		
			C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
Day 1	250	1001	15700	7.00	276000
		1002	11300	7.00	215000
		1003	10800	7.00	215000
		1004	10100	7.00	150000
		1005	13100	7.00	238000
		1006	11200	24.0	190000
		Mean	12000	9.83	214000
		SD	2050	6.94	42600
Day 14	250	1001	17600	7.00	233000
		1002	18900	7.00	233000
		1003	19800	7.00	252000
		1004	15200	7.00	188000
		1005	18900	7.00	244000
		1006	18000	7.00	224000
		Mean	18100	7.00	229000
		SD	1600	0.00	22300

表17. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の5-水酸化体サリドマイドに関するTKパラメータ

Period	Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	TK parameter		
			C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
Day 1	250	1001	70.6	7.00	1200
		1002	115	7.00	2210
		1003	63.0	7.00	1130
		1004	112	7.00	1640
		1005	65.9	7.00	1270
		1006	88.0	7.00	1790
		Mean	85.8	7.00	1540
		SD	23.2	0.00	419
Day 14	250	1001	52.4	7.00	756
		1002	103	7.00	1320
		1003	57.9	7.00	823
		1004	108	7.00	1410
		1005	60.4	7.00	862
		1006	93.0	7.00	1250
		Mean	79.1	7.00	1070
		SD	24.9	0.00	288

表18. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の精漿中サリドマイド濃度推移

(1) 投与1日

Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/g)	
		7 h	24 h
250	1001	5430	—
	1002	—	3800
	1003	4410	—
	1004	—	2080
	1005	5040	—
	1006	—	6580

BLQ: Below the lower limit of quantification (4.00 ng/g)

—; not sampling

(2) 投与14日

Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/g)			
		7 h	24 h	48 h	72 h
250	1001	13100	—	14.9	—
	1002	—	164	—	BLQ
	1003	9240	—	12.1	—
	1004	—	142	—	BLQ
	1005	4100	—	4.60	—
	1006	—	206	—	BLQ

BLQ: Below the lower limit of quantification (4.00 ng/g)

—; not sampling

表19. 雄ウサギを用いたサリドマイド14日間反復経口投与後の精漿中5-水酸化体サリドマイド濃度推移

(1) 投与1日

Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/g)	
		7 h	24 h
250	1001	4.86	—
	1002	—	6.38
	1003	4.84	—
	1004	—	5.41
	1005	5.67	—
	1006	—	5.70

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/g)

—; not sampling

(2) 投与14日

Dose level (mg/kg/day)	Animal No.	Concentration (ng/g)			
		7 h	24 h	48 h	72 h
250	1001	271	—	BLQ	—
	1002	—	0.508	—	BLQ
	1003	5.75	—	BLQ	—
	1004	—	11.0	—	BLQ
	1005	5.69	—	BLQ	—
	1006	—	0.693	—	BLQ

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/g)

—; not sampling

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働行政推進調査事業費補助金 医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法の開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部 室長
(氏名・フリガナ) 薬形 麻樹子・クワガタ マキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：遺伝子組換え実験安全管理規則)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働行政推進調査事業費補助金 医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス政策研究事業

2. 研究課題名 催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法の開発

3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・部長

(氏名・フリガナ) 北嶋 聡・キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: 遺伝子組換え実験安全管理規則)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 施行前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2021年3月30日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 昭和薬科大学

所属研究機関長 職名 学 長

氏名 山本 恵子



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策
2. 研究課題名 催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法の開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 山崎 浩史 ・ヤマザキ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。