

令和3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3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4年（2022）

## 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. 妊娠ウサギを用いたサリドマイド膈内反復投与による胚・胎児発生への影響---	14
北嶋 聡	
2. 妊娠ウサギを用いたサリドマイド膈内反復経口時の母動物および胚・胎児への移行 に関する検討-----	20
栗形 麻樹子	
3. 薬物動態の解析 -----	30
山崎 浩史	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添5）-----	33
IV. 資料 -----	34
添付資料1. 妊娠雌ウサギを用いた膈内投与発生毒性試験	
添付資料2. 奇形発現量における妊娠雌ウサギを用いた経口投与毒性試験	
図1. 生理学的薬物動態モデルによる出力結果値と膈内投与による実測値との比較	
表1. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物体重推移：胚・胎児発生に関する実験	
表2. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物体重増加量：胚・胎児発生に関する実験	
表3. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与後の帝王切開所見：胚・胎児発生に関する実験	
表4. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胚・胎児死亡数：胚・胎児発生に関する実験	
表5. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胎児外表観察：胚・胎児発生に関する実験	
表6. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胎児内臓観察：胚・胎児発生に関する実験	
表7. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胎児骨格観察：胚・胎児発生に関する実験	
表8. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胎児主要部位骨化数観察：胚・胎児発生に関する実験	
表9. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物体重推移：胚・胎児への移行に関する実験	
表10. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与後の帝王切開所見：胚・胎児移行に関する実験	
表11. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物血漿中サリドマイド濃度推移及びTKパラ メータ（妊娠13日）：胚・胎児発生に関する実験	
表12. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物血漿中5-hydroxythalidomide濃度推移及び TKパラメータ（妊娠13日）：胚・胎児発生に関する実験	

- 表 1 3. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による母動物血漿中5'-hydroxythalidomide 濃度推移及びTKパラメータ（妊娠13日）：胚・胎児発生に関する実験
- 表 1 4. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与後の母動物血漿中サリドマイド及び代謝物濃度（妊娠28日）：胚・胎児発生に関する実験
- 表 1 5. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎児血漿中サリドマイド及び代謝物濃度（妊娠28日）：胚・胎児発生に関する実験
- 表 1 6. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による母動物血漿中サリドマイド濃度：胚・胎児への移行に関する実験
- 表 1 7. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による母動物血漿中5-hydroxythalidomide濃度：胚・胎児への移行に関する実験
- 表 1 8. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による母動物血漿中5'-hydroxythalidomide濃度：胚・胎児への移行に関する実験
- 表 1 9. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎盤、卵黄囊膜、胚中のサリドマイド濃度（妊娠13日）：胚・胎児への移行に関する実験
- 表 2 0. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎盤、卵黄囊膜、胚中の5-hydroxythalidomide濃度（妊娠13日）：胚・胎児への移行に関する実験
- 表 2 1. 妊娠雌ウサギを用いたウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎盤、卵黄囊膜、胚中の5'-hydroxythalidomide濃度（妊娠13日）：胚・胎児への移行に関する実験

# 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(膈内投与試験)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。

昨年度(R2年度)に実施した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の血漿中及び精漿中への移行推移の結果から最大膈内移行量を算出し、今年度は妊娠雌ウサギを用いて膈内投与試験を実施した。

その結果、膈内投与により母動物および胎児発生に影響はなく、催奇形性作用は誘発されないことを確認した。また、サリドマイドの膈内投与後、母動物の全身循環を介して胎盤、卵黄囊膜を経て、母動物血漿中の約3~4割が胎児へ至ることが明らかになった。令和2年度に構築し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から算出した仮想出力値と、雌性ウサギを用いた膈内投与試験から得られた母動物血中濃度がほぼ一致したことから、投与経路、性差、妊娠日、投与量に関係なく、サリドマイドは生体内へ移行、代謝していることが示唆された。得られた結果は、サリドマイドを経口投与した雄の精液を介した雌への曝露による催奇形作用はないことを示している。

令和4年度は膈内投与実験の結果を基に、経口投与による奇形発現の際の妊娠ウサギでの血中濃度と比較し、その濃度差を明らかにした後、現行のテストガイドラインを考慮しながら、種差および薬物動態を加味した雄性生殖を介した新規発生毒性試験評価法を提案する予定である。

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

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

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量のサリドマイドを膈内投与し、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) 器官形成期の妊娠雌ウサギ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し、(3)と比較する。

令和3年度は、(3)を実施した。

即ち、(1)および(2)から算出した最大精漿移行量の100倍濃度のサリドマイドを妊娠雌の膈内に反復投与し、胎児への形態影響を確認するとともに(担当;北嶋)、母動物血漿中および子宮内容物(胎盤、卵黄囊膜、胎児)へのサリドマイドの移行を確認した(担当;栗形)。

また、昨年度構築した雄ウサギにサリドマイドを経口投与および膈内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用いて、膈内投与試験から得られた母動物血中濃度とモデル出力結果値とを比較した(担当;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。

【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。

### 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：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 :

サリドマイドの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

令和2年度に被験物の調製方法、調製頻度、安定性は確認している。

即ち、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を加えて調製した。被験液は冷蔵にて保存し、8日以内に使用した。

また、0.2及び200 mg/mL液（媒体：0.5%MC溶液）の冷蔵下（2～8℃）にて8日間保存後、室温下で24時間の安定性・均一性を確認している。

#### 1-4. 使用動物（購入雌）

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  
入荷時週齢 : 15～16週齢  
交配時週齢 : 17～18週齢

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

交配：外陰部が腫脹して暗紫色を呈し、発情期と認められた雌を雄（交配用所有雄）と1:1で交配用サークル〔650(φ)×H500 mm〕に入れて行った。交尾が2回確認された雌を交尾動物とし、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配置法により行った。

なお、40匹購入し、試験には32匹を配した。余剰動物は、動物管理部門へ移管した。

#### 1-5. 使用動物（交配用所有雄）

動物種 : ウサギ (SPF、所有動物)  
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  
入手日 : 2020年3月27日（入荷時17週齢、24匹）  
交配時の体重範囲 : 3.53～4.15 kg

入荷以降、体重推移および一般状態に異常がなく、高い受胎率を有した雄動物を選択し交配用とした。交配終了後、交配用雄動物として所有コロニーに戻した。

#### 1-6. 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。

飼育はアルミ製飼育ケージ (W560 x D550 x H410 mm、理工電機株式会社製の改良型、バンチングポート床) に個別飼育した。環境エンリッチメントとして、ステンレス板及びプラスチックチェーンを与えた

#### 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)  
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<sub>max</sub>)、最高薬物濃度到達時間(T<sub>max</sub>)及び濃度時間曲線下面積(AUC<sub>0-24</sub>)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°C、1600x g、10分間)により得た。血漿は等量の安定剤を添加し保存した。

検出限界値

	血漿* (ng/mL)	子宮内容物(胎児、 卵黄嚢、胎盤)(ng/g)
Thalidomide	0.400	0.0800
5-hydroxythalidomide	0.04	0.0800
5'-hydroxythalidomide	0.04	0.0800

\*、妊娠28日胎児血漿を含む

## 2. 膈内反復投与実験(添付資料1)

### 2-1. 投与経路(膈内投与)

本試験の目的は、thalidomideを投与された雄の精液を介した曝露による雌への催奇形作用の有無の確認である。そのため、投与経路は膈内投与を選択した。

### 2-2. 投与期間および投回数

交尾翌日(妊娠1日)からthalidomideによる催奇形作用への感受性が最も強い時期である妊娠13日までの13日間とした。

ウサギでは排卵が交尾後約11時間に起こることが報告されていることから、投与されたthalidomideの物性による膈内環境の変化が、精子運動性等に直接影響することにより妊娠動物が減少する状況を避けるため、交尾当日(妊娠0日)の膈内投与は実施しなかった。

投与回数は1日1回(7日/週)とした。

なお、交尾成立日を妊娠0日(Gestation day 0; GD0)とした。

### 2-3. 投与方法

投与容量は0.05 mL/kgとし、媒体に懸濁したthalidomideを、注射筒およびネラトンカテーテル(注1)を用いて膈内へ投与した(08:53~11:15の間)。

投与の際にはネラトンカテーテル内を投与液で気泡が入らないよう満たし、投与すべき量の投与液をシリンジ内に充填した状態で、ネラトンカテーテルの先端を膈内に挿入した。投与後は、フラッシングを実施せず、ネラトンカテーテル内の投与液は入れたまま抜去した。

媒体対照群には媒体(0.5% MC溶液)を同様に投与した。動物ごとの投与液量は直近の体重を基準に算出した。

注1) 注射筒は、1 mLツベルクリン用シリンジ(テルモ株式会社)、ネラトンカテーテルはテルモ社製サーフィード ネラトンカテーテルアダプター付きFr.16(5.3 mm)、40 cm、2孔式を用いた。

### 2-4. 投与量

群構成を下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立 雌動物数*
媒体対照群	0	0	0.05	8 (7)
0.4 mg/kg群	0.4	8.0	0.05	8 (6)
10 mg/kg群	10	200	0.05	8 (7)

\*括弧内は妊娠動物数

## 投与量設定根拠

Thalidomideの雄ウサギを用いた14日間反復経口投与濃度測定試験(令和2年度実施)の結果、雄に250 mg/kgを14日間反復投与した場合のC<sub>max</sub>は約20,000 ng/mLであり、血中半減期は24時間以内であること、精液中濃度が血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250 mg/kgを投与した状況においても、血液中濃度は20 μg/mL程度であり、プラトーに達した状態にあり、精液中濃度は20 μg/gにほぼ等しいか若干下回ると推定された(既報では精液/血漿=0.6)。

この状況でヒトの精液量を4 mL程度、射精回数を2回として計算すると、精液を通して女性が曝露されるthalidomide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であると推定された。

この用量での安全性を検討するための本試験での投与量としては、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および個体差を考慮し、より安全側に立脚し、より多量に摂取することを想定して係数100倍を乗じ繰り上げて0.4 mg/kg/日とした。

## 係数100の根拠

既報からヒトで200 mg/kg反復経口投与時のC<sub>max</sub>は約2 μg/mLであり、精液中へ1.2~2 μg/mg(既報では約6割)と推定される。ヒトとウサギでは感度が10倍異なることから、これに個体差10をかけ、係数100とした。

投与容量はウサギの精液量の1/3~1/5であり、膈から漏出しな液量として0.2 mL/bodyを選び、投与する対象のウサギの推定平均体重4 kgで除して0.05 mL/kgとした。

最大精漿移行量から算出した0.4 mg/kg/日用量が低濃度であることから、胚・胎児への薬物移行を確実に確認するために、調製可能な最高濃度である200 mg/mLの調製液を同じ容量投与する高用量群(10 mg/kg群)を設定した。

なお、胎児形態への影響は0.4 mg/kg/日群のみで評価した。

膈内投与試験は2実験に分かれて実施した。

即ち、膈内投与による母動物への影響および胎児形態への影響を調べる実験(3. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児発生に関する実験)と膈内投与による母動物および子宮内容物(胎盤、卵黄嚢膜、胎児)への移行を調べる実験(4. サリドマイド膈内投与による胚・胎児移行に関する実験)である。

## 3. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児発生に関する実験(担当：北嶋)

本試験の目的は、thalidomideを経口投与した雄の精液を介した雌への曝露による催奇形作用の有無の確認である。

交尾成立雌ウサギに妊娠1日から妊娠13日まで0.4 mg/kg/日のサリドマイドを1日1回、膈内投与した。

群構成を下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立 雌動物数*
媒体対照群	0	0	0.05	8 (7)
投与群	0.4	8.0	0.05	8 (8)

### 3-1. 動物の観察

投与期間中は投与前、投与直後及び投与2時間後の3回/日、その他の期間は午前中に1回/日、一般状態を観察した。

体重は妊娠0、3、6、8、10、12、13、14、16、19、22、24、26及び28日の午前中（投与期間中は測定当日の投与前）に測定した。

### 3-2. 剖検及び帝王切開

妊娠28日の午前中、保定・無麻酔下の投与群の母動物全例の耳介静脈から、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて0.4 mL採血した後、全例をペントバルビタールナトリウム静脈内投与（1 mL/kg）による麻酔下で腹大動脈からの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。

採血した血液は、遠心分離（4° C、1,600×g、10分間）により血漿（160 μL）を得た。これに等量の25mM Sorensen's citrate buffer (pH 1.5)（注2）を加えて血漿試料とした。血漿試料は、ウサギを用いた臍内投与時の胚・胎児への移行に関する検討にて解析した（葉形担当）。

（注2）くえん酸三ナトリウム二水和物（CAS No. 6132-04-3、富士フィルム和光純薬株式会社、ロット番号 SKN5973）の1.47 gを注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号 9K94）150 mLに溶解し、塩酸でpHを1.5に調整した後、注射用水を加えて200 mLとした。

### 3-3. 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、卵巣については妊娠黄体数を数えた。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・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

また、生存胎児は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かった対照群の1例の子宮は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。この動物の子宮に着床部位は認められなかったため、不妊と判断し、全てのデータを評価から除外した。

\*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）をその9倍容量の注射用水（株式会社大塚製薬工場）で溶解させて調製した。

### 3-4. 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、体重を個別に測定した。生存胎児は内部生殖器の観察により性別を判定した。

投与群の全胎児は腹大静脈からヘパリン処理シリンジで約0.4 mL採血した。

胎盤は灰白色の基底脱落膜部分を含め重量測定後、投与群についてはφ4 mmの生検トレパンで胎盤組織中濃度測定用試料4個を採材して重量を測定し、各胎児ごとに試料番号を記載したラベルを貼付した2.0 mLストロングチューブに入れ凍結した。

卵黄嚢膜は胎児ごとに個別に採取し、卵黄嚢液、子宮内腔液を可能な限り除去して重量を測定し、個別に試料番号を記載したラベルを貼付した2.0 mLストロングチューブに入れ凍結した。

凍結した試料はいずれも、送付まで-80°Cの冷凍庫で保存した。

胎児血漿、胎盤、卵黄嚢膜は、ウサギを用いた臍内投与時の胚・胎児への移行に関する検討にて解析した

（5. 臍内投与後母動物血漿中及び子宮内容物中薬物動態（トキシコキネティクス；TK）参照）。

### (2) 内臓形態

全生存胎児について、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）を摘出後、リン酸緩衝10%ホルマリン液で固定した。固定後、脳はWilsonの粗大切片法<sup>1)</sup>、心臓は西村の顕微解剖法<sup>2)</sup>を参照して異常・変異の有無を検索した。観察終了後の標本はリン酸緩衝10%ホルマリン液で保存した。

1) Wilson JG. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animals. "Teratology; Principles and Techniques" ed. By Wilson JG and Warkany J, Chicago University Press, Chicago 1965; 262-77.

2) Nishimura K. A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. Cong Anom 1974; 14: 23-40.

### (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、99%アルコール液で固定した後、アルシアンブルー・アリザリンレッドS二重染色透明骨格標本を作製した。全生存胎児について、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。観察終了後の標本はチモールを含んだ50%グリセリン液で保存した。

#### 染色試薬

・アリザリンレッドS

特級、関東化学、Cat no. 0113-30)

・アルシアンブルー

特級、Alcial blue 8GX certified、Electron Microscopy Sciences、Cat no. 10350)

### 3-5. 統計解析

妊娠動物より得られたデータに関し、媒体対照群と投与群との間で検定を行った。解析にはSAS Release 9.1.3 (SAS Institute Inc.)を使用した。

## 4. サリドマイド臍内投与による胚・胎児移行に関する実験（担当：葉形）

### 4-1. 臍内投与実験

本試験の目的は、thalidomideを経口投与した雄の精液を介した雌への曝露による催奇形作用の有無の確認実験（3. サリドマイド臍内反復投与による胚・胎児発生に関する実験）において、胚を始めとする子宮内容物が被験物質に曝露されていたことを確認するである。

従って、投与経路、投与期間、投与回数、投与方法は上記試験に合わせ、交尾翌日（妊娠1日）から妊娠13日まで、1日1回、13日間、反復臍内投与した。

投与回数は1日1回（7日/週）とした。

### 4-2. 投与量および投与容量

最大精漿移行濃度の100倍濃度である0.4 mg/kg/日群に加え、調製可能な最高濃度である200 mg/mLの調製液を同じ容量投与する10 mg/mk/日群を追加設定した。投与容量は0.05 mL/kgとした。

群構成を次に示す（\*括弧内は妊娠動物数）。



試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立 雌動物数*
0.4 mg/kg群	0.4	8.0	0.05	8 (6)
10 mg/kg群	10	200	0.05	8 (7)

#### 4-3. 動物の観察

投与期間中は投与前、投与直後及び投与2時間後の3回/日、その他の期間は午前中に1回/日、一般状態を観察した。

体重は妊娠0、3、6、8、10、12、13、14の午前中（投与期間中は測定当日の投与前）に測定した。

#### 4-4. 剖検（最終投与日；妊娠13日）

各群の動物番号の末尾が01~04番の動物は妊娠13日の投与7時間後の採血終了後に、末尾が05~08番の動物は妊娠13日の投与24時間後の採血終了後に、ペントバルビタールナトリウム静脈内投与（1 mL/kg）による麻酔下で腹大動脈からの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。

#### 4-5. 帝王切開（最終投与日；妊娠13日）

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た。卵巣については妊娠黄体数を数えた。子宮については子宮壁を切開し、生存胚数、死亡胚数を判定・記録した。生存胚と死亡胚の総数を着床数とした。

肉眼的に着床が認められなかった動物（0.4 mg/kg群：2例及び10 mg/kg群：1例）は妊娠黄体数を記録し、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。これらの動物の子宮に着床部位は認められなかったため、不妊と判断し、全てのデータを評価から除外した。

### 5. 膈内投与後母動物血漿中及び子宮内容物中薬物動態（トキシコキネティクス；TK）（担当：葉形）

薬物動態は、上記、2回にわたって実施した膈内投与実験から調べた。即ち、

#### 5-1. 妊娠末期胎児の形態への影響を確認した「胚・胎児発生に関する実験」（3. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児発生に関する実験）

#### 5-2. 投与最終日に子宮内容物への薬物移行を調べた「胚・胎児への移行に関する実験」（4. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児移行に関する実験）

から得た母動物および子宮内容物（胎児、胎盤、卵黄囊膜）の薬物動態を調べた。

2実験での母動物採血スケジュールを下記に示す。

試験識別	投与量 (mg/kg)	母動物 採血時期	投与後採血時間 (時間)
5-1.	0.4	G13	pre, 0.5, 1, 2, 4, 7
		G28	帝王切開時
5-2.	0.4, 10	G1	4, 7, 24
		G13-1	Pre, 4, 7, 24
		G13-2	帝王切開時

G13; gestational day 1（交尾成立日；G0）

続いて、2実験での子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、胎児）の採取スケジュールを下記に示す。

試験識別	投与量 (mg/kg)	母動物 採血時期	子宮内容物 (胎盤、卵黄囊膜、胎児)
5-1.	0.4	G13	なし
		G28	採取
5-2.	0.4, 10	G13 7h	採取（約半数の腹）
		G13 24h	採取（残りの約半数の腹）

#### 5-1. 胚・胎児発生に関する実験

##### (1) 母体試料の採取

##### a) 採血日及び採血時点

妊娠13日：投与前、投与0.5、1、2、4及び7時間後（6時点）

妊娠28日：帝王切開時

##### b) 対象動物及び採血量

0.4 mg/kg 投与群の8例

各時点各動物から約0.4 mL（動物を保定器に入れ、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて無麻酔下で耳介静脈から採血）

##### (2) 胎児試料

妊娠28日の帝王切開時に、胎児の腹大静脈からヘパリン処理シリンジで約0.4 mL採血した。

#### 5-2. 胚・胎児への移行に関する実験（妊娠13日帝王切開）

##### (1) 母体試料の採取

##### a) 採血日及び採血時点

妊娠1日（3時点）：投与4、7、24時間後（妊娠2日の投与前）

妊娠13日（4時点）：投与前、投与4、7、24時間後

##### b) 対象動物及び採血量

母動物を保定器に入れ、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて無麻酔下で耳介静脈から採血した。

##### c) 帝王切開実施時期

最終投与日（妊娠13日）の投与後7時間の採血時に各群半数の動物（動物番号末尾01~04）を帝王切開し、残り半分の動物（動物番号末尾05~08）は投与後24時間（妊娠14日）に帝王切開した。

- 妊娠1日の各測定点並びに妊娠13日の投与前及び投与4及び7時間後：0.4 mg/kg群の全例および10 mg/kg群の動物番号末尾05~08の4例

- 妊娠1日の各測定点並びに妊娠13日の投与前及び投与4時間後：10 mg/kg群の動物番号末尾01~04の4例

- 妊娠13日の投与24時間後：0.4 mg/kg群の動物番号の末尾が05~08の4例

（以上、採血量は各動物から約0.4 mL）

- 妊娠13日の投与7時間後：10 mg/kg群の動物番号末尾01~04の4例

- 妊娠13日の投与24時間後：10 mg/kg群の動物番号の末尾が05~08の4例

（以上、採血量は各時点各動物から約1.2 mL）

##### (2) 子宮内容試料の採取（最終投与後；妊娠13-14日）

##### a) 卵黄囊膜

生存胚と卵黄囊膜を分離し、卵黄囊膜は可能な限り水分を除去した後、ストロングチューブ各1本に入れ重量を測定した。

##### b) 胚

卵黄囊膜と分離した胚は、ストロングチューブ各1本に入れ、重量を測定した。

### c) 胎盤

各胎盤(脱落膜層を含む)は、重量測定後、トレパン(φ4 mm、Biopsy Punch, Kai メディカル)で各2ヶ所を採取し、ストロングチューブ各1本に入れ重量を測定した。

各試料は送付まで-80°Cの冷凍庫で保存した。

### 5-3. 血液の処理

採血した血液は、遠心分離(4°C、1,600×g、10分間)により血漿(160 µL)を得た。これに等量の25mM Sorensen's citrate buffer (pH 1.5) (注2)を加えて血漿試料とした。試料は測定時まで-80°Cの冷凍庫に保存した。

(注2) くえん酸三ナトリウム二水和物(CAS No. 6132-04-3、富士フィルム和光純薬株式会社、ロット番号 SKN5973)の1.47 gを注射用水(株式会社大塚製薬工場、ロット番号 9K94)150 mLに溶解し、塩酸でpHを1.5に調整した後、注射用水を加えて200 mLとした。

### 5-4. 動物の観察

投与期間中は投与前、投与直後及び投与2時間後の3回/日、その他の期間は午前中に1回/日、一般状態を観察した。

体重は妊娠0、3、6、8、10、12、13、14の午前中(投与期間中は測定当日の投与前)に測定した。

### 5-5. 剖検(最終投与日;妊娠13日)

各群の動物番号の末尾が01~04番の動物は妊娠13日の投与7時間後の採血終了後に、末尾が05~08番の動物は妊娠13日の投与24時間後の採血終了後に、ペントバルビタールナトリウム静脈内投与(1 mL/kg)による麻酔下で腹大動脈からの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。

### 5-6. 帝王切開(最終投与日;妊娠13日)

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た。卵巣については妊娠黄体数を数えた。子宮については子宮壁を切開し、生存胚数、死亡胚数を判定・記録した。生存胚と死亡胚の総数を着床数とした。

肉眼的に着床が認められなかった動物(0.4 mg/kg群:2例及び10 mg/kg群:1例)は妊娠黄体数を記録し、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。これらの動物の子宮に着床部位は認められなかったため、不妊と判断し、全てのデータを評価から除外した。

## 6. 薬物動態の解析(担当:山崎)

令和2年度に構築し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用いて、膈内投与により得られた母動物血漿中濃度と、サリドマイドを経口投与し雄性ウサギ用に構築した生理学的薬物動態モデルとの出力結果と比較し、膈内投与と経口投与との生体内血中濃度推移を比較した。

(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. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児発生への影響 B.研究方法、3. の実験結果を示す。

#### 1-1. 母動物

##### (1) 一般状態

死亡及び流産動物は発現しなかった。

一般状態では排糞量の低下が0.4 mg/kg 群の2例でみられたが一過性でいずれも翌日には回復したことから被験物質投与の影響ではないと判断した。

##### (2) 体重

体重値を表1に、増加量を表2示した。

0.4 mg/kg 群において、投与期間である妊娠1日から13日の増加量が媒体対照群と比較して有意な低値を示し、妊娠14日から28日の増加量は有意な高値を示したが、いずれも変化はわずかで体重実測値には変化が認められなかった。

##### (3) 剖検所見

体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官・組織に肉眼的な異常は見られなかった。

#### 1-2. 帝王切開(表3)

0.4 mg/kg 群では黄体数、着床数、着床前死亡率及び着床率に媒体対照群と比べ有意な差は認められなかった。

#### 1-3. 胎児観察

##### (1) 胚・胎児死亡および外表(表4、表5)

0.4 mg/kg 群において、着床後死亡率、胚・胎児死亡数、生存胎児数、生存胎児の性比、雌雄胎児体重、及び胎盤重量に媒体対照群と比べ差は認められなかった。外表異常を有する生存胎児は認められなかった。胎盤の肉眼的な異常は、いずれの投与群にもみられなかった。

##### (2) 内臓(表6)

生存胎児の内臓形態に被験物質投与による変化は認められなかった。

内臓異常は、媒体対照群で横隔膜ヘルニアが1例に認められたのみであった。

内臓変異を有する胎児は、肺副葉欠損が媒体対照群で5例、大静脈後尿管が媒体対照群で1例、0.4 mg/kg 群で2例みられたが、いずれも発現頻度は低頻度で有意差は認められなかった。

##### (3) 骨格(表7、表8)

生存胎児の骨格形態に被験物質投与による変化は認められなかった。

骨格異常は、胸骨分節癒合が媒体対照群と0.4 mg/kg 群の各1例で、肋骨癒合、胸椎弓癒合、胸椎半脊椎が0.4 mg/kg 群の別個の各1例で認められたが、いずれも低頻度で被験物質投与の影響を示唆するものではなかった。

骨格変異は仙椎前椎骨数27が媒体対照群の15例、0.4 mg/kg 群の24例にみられたが、発現頻度に有意差は認められなかった。その他、胸骨分節分離が媒体対照群と0.4 mg/kg 群の各2例で、胸椎体分離が0.4 mg/kg 群の1例で、仙椎前椎骨数25が0.4 mg/kg 群の1例で、距骨の未骨化が0.4 mg/kg 群の2例でそれぞれ認められた。

が、発現例数はいずれも少数であることから、被験物質投与の影響とは考えられなかった。

骨化進行状態については、0.4 mg/kg 群の胸骨分節、中手骨、中足骨及び仙尾椎骨の各骨化数には対照群との間に有意な差は認められなかった。

## 2. サリドマイド臍内投与による胚・胎児移行への影響 B.研究方法、4. の実験結果を示す。

### 2-1. 一般状態

母動物の死亡及び流産動物はなかった。いずれの例も一般状態に変化は認められなかった。

体重推移も投与による影響はなかった（表9）。

### 2-2. 剖検

いずれの例も体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官・組織に肉眼的な異常は見られなかった。

### 2-3. 帝王切開（表10）

10 mg/kg 群では着床前死亡率の増加傾向及び着床率の低下傾向が認められたが、僅かの変化であり、実施施設の背景値の範囲内であったことから、投与による影響ではないと判断した。

10 mg/kg 群の黄体数、着床数、着床後死亡率、胚・胎児死亡数、生存胎児数及び胎盤重量、0.4 mg/kg 群の全ての観察項目に異常は認められなかった。

胎盤にも異常は認められなかった。

## 3. 臍内投与による母動物および胎生末期胎児中の薬物動態（胚・胎児発生に関する実験；0.4 mg/kg 投与） B.研究方法、5-1. の結果を示す。

### 3-1. 母動物

#### (1) 妊娠13日（投与終了時）

妊娠13日のthalidomide（表11）、5-hydroxythalidomide（表12）、及び5'-hydroxythalidomide（表13）の血漿中濃度推移およびTKパラメータを表11～表13に示した。

TKパラメータの総括（平均値）を下図に示す。

#### Thalidomide（妊娠13日）

臍内投与量 (0.4 mg/kg/日)	
T <sub>max</sub> (h)	0.813
C <sub>max</sub> (ng/mL)	13.4
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	30.9

#### 5-hydroxythalidomide（妊娠13日）

臍内投与量 (0.4 mg/kg/日)	
T <sub>max</sub> (h)	1.06
C <sub>max</sub> (ng/mL)	0.155
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	0.345

#### 5'-hydroxythalidomide（妊娠13日）

臍内投与量 (0.4 mg/kg/日)	
T <sub>max</sub> (h)	2.00
C <sub>max</sub> (ng/mL)	0.370
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	1.32

#### (2) 妊娠28日（表14）

妊娠28日の母動物血漿中には、thalidomide、5-hydroxythalidomide、及び5'-hydroxythalidomideのいずれも検出限界以下であり残留はないと判断した。

### 3-2. 胎児（妊娠28日、表15）

妊娠28日の胎児血漿中には、thalidomide、5-hydroxythalidomide、及び5'-hydroxythalidomideのいずれも選出限界以下であり残留はないと判断した。

### 3-3. 小括

上記のように、0.4 mg/kg 臍内投与時の妊娠13日のサリドマイド濃度の C<sub>max</sub>は13.4 ng/mL、AUC<sub>0-t</sub>は30.9 h\*ng/mLであった。

今回得られた0.4 mg/kg 群の妊娠13日の結果は、別試験である、サリドマイドの0.4 mg/kg 又は10 mg/kg を同様に臍内投与し、妊娠1日及び13日のTK並びに妊娠13日の子宮内容物の濃度を測定した試験（5-2. 参照）における妊娠1日（C<sub>max</sub>=13.9 ng/mL、AUC<sub>0-t</sub>=84.9 h\*ng/mL）及び妊娠13日の成績（C<sub>max</sub>=9.41 ng/mL、AUC<sub>0-t</sub>=48.1 h\*ng/mL、後述）に近似していたことから、得られた血中濃度には再現性があると考えられた。

性別が異なり単回投与後の成績であるが、この成績を令和2年度に実施した雄の単回投与試験の2 mg/kg 単回投与群の成績と比較すると、本試験における投与量は2 mg/kgの1/5であるのに対し、C<sub>max</sub>は約1/20倍、AUC<sub>0-t</sub>は約1/50倍にすぎなかった（下図）。

試験種	C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
雄単回 2 mg/kg/日	357 (319~417)	1733 (1740~1880)
雌臍内投与 (G13) 0.4 mg/kg/日	13.4 (2.67~46.2)	30.9 (11.8~75.6)

値：平均値（最小値～最大値）

本試験におけるヒト型代謝物（5-hydroxythalidomide）の平均C<sub>max</sub>及び平均AUC<sub>0-t</sub>はサリドマイドの1.2%及び1.1%であった。これらの値は雄の単回投与時の2 mg/kg 群でのC<sub>max</sub>（1.3~1.6%）及びAUC<sub>0-t</sub>（1.5から1.6%）での割合にほぼ等しかった。臍内投与の場合、経口投与と異なりfirst pass effectを受けない状況ではあるが、サリドマイド原体に対する代謝物の割合は経口投与の場合と大差がなかった。即ち、経口投与した場合と比較して、ヒト型代謝物の割合が上昇するといった代謝物の危険性について考慮する必要はないと考えられた。

## 4. 臍内投与による母動物および子宮内容物の薬物動態（胚・胎児への移行に関する実験；0.4, 10 mg/kg 投与） B.研究方法、5-2. の結果を示す。

### 4-1. 母動物血漿中濃度（0.4 および10 mg/kg 群）

初回投与日（妊娠1日）および投与最終日（妊娠13日）のthalidomide（表16）、5-hydroxythalidomide（表17）、及び5'-hydroxythalidomide（表18）の母動物血漿中濃度推移およびTKパラメータを表16～表18に示した。

TKパラメータ総括（平均値）を下図に示す。

Thalidomide パラメータ	測定時期	臍内投与量 (mg/kg/日)	
		0.4	10
T <sub>max</sub> (h)	妊娠1日	4.00	4.00
	妊娠13日	4.00	4.75
C <sub>max</sub> (ng/mL)	妊娠1日	13.9	274
	妊娠13日	9.41	277
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	妊娠1日	84.9	3540
	妊娠13日	48.1	2340

不妊より除外した母動物番号：7h群: 1102、24h群: 1105

5-hydroxy-thalidomide パラメータ	測定時期	腔内投与量 (mg/kg/日)	
		0.4	10
T <sub>max</sub> (h)	妊娠1日	4.00	4.00
	妊娠13日	4.00	4.38
C <sub>max</sub> (ng/mL)	妊娠1日	0.141	2.24
	妊娠13日	0.206	2.47
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	妊娠1日	0.619	25.6
	妊娠13日	0.761	19.3

5'-hydroxy-thalidomide パラメータ	測定時期	腔内投与量 (mg/kg/日)	
		0.4	10
T <sub>max</sub> (h)	妊娠1日	4.00	4.00
	妊娠13日	4.00	4.38
C <sub>max</sub> (ng/mL)	妊娠1日	1.09	10.0
	妊娠13日	0.668	7.85
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	妊娠1日	6.62	124
	妊娠13日	2.88	72.4

(1) 妊娠1日（初回投与日）（表16-1）

0.4 mg/kg 群の薬物動態パラメータは、前述した「B. 研究方法、5-1. 胚・胎児発生に関する実験」で得られた結果と近似しており、腔内投与初回（妊娠1日）の血中濃度推移には再現性がみられた。

(2) 妊娠13日（最終投与日）（表16-2）

不妊動物を除いた母動物のサリドマイド濃度のC<sub>max</sub>値を下記に示す。

母動物妊娠13日のサリドマイドC <sub>max</sub> 濃度(ng/mL) ; 平均値 (範囲)		
群 (mg/kg/日)	7時間	24時間
0.4	9.41 (1.73~26.0)	2.02 (1.24~11.7)
10	289 (87.8~507)	236 (107~358)

これらの測定値から1 mg/kgを腔内投与した場合のC<sub>max</sub>を求め、雄に2 mg/kgを単回経口投与した場合（令和2年度実施結果）のC<sub>max</sub>が319~417 ng/mLを呈した状況と比較すると、腔内投与した場合のC<sub>max</sub>は、雄経口投与からの推定値よりも低値であることが確認された。

反復投与と単回投与、雄と妊娠雌、例数の差等、令和2年度実施の雄の実験と令和3年度実施した妊娠雌の実験では両者の条件は異なり、また、腔内投与の場合、雄の経口投与に比較して数値の偏差が大きいが、腔内投与では経口投与に比較して血中濃度は低値に保たれると考えられた。

4-2. 投与最終日（妊娠13日）の胎盤、卵黄囊膜および胚組織中濃度

子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、胚）中のThalidomide（表19）、5-hydroxythalidomide（表20）、及び5'-hydroxythalidomide（表21）濃度を表19~表21に示した。不妊動物を除いた妊娠動物の血漿中濃度及び子宮内容物の集計（平均値）を下図に示す。

(1) 0.4 mg/kg 群

妊娠13日の投与後7時間（7h）と24時間（24h）の子宮内容物中濃度の平均値を次表に示す。

0.4 mg/kg 投与群（妊娠13日、7h (n=3), 24h (n=3)）					
測定対象物質		母 (ng/mL)	胎盤 (ng/g)	卵黄囊膜 (ng/g)	胚 (ng/g)
Thalidomide	7h	5.09	2.04	1.73	2.14
	24h	0.791	0.335	0.440	BLQ
5-hydroxy-thalidomide	7h	0.045	BLQ	BLQ	BLQ
	24h	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
5'-hydroxy-thalidomide	7h	0.360	0.180	0.0877	0.148
	24h	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ; Blow the lower limit of quantification

最終投与後7時間では、thalidomide および5'-hydroxythalidomideが胎盤、卵黄囊膜、胚に認められたが、最終投与後24時間では、胎盤および卵黄囊膜は低値に近似値を示したが、胚は検出限界以下濃度であることがわかった。5-hydroxythalidomideは投与後7および24時間ともに子宮内容物中では検出限界であった。

(2) 10mg/kg 群

妊娠13日の投与後7時間後と24時間の子宮内容物濃度の平均値を下表に示す。

不妊より除外した動物番号：7h群: なし (n=4)、24h群: 2106 (n=3)

10 mg/kg 投与群（妊娠13日、7h, n=3; 24h, n=4）					
測定対象物質		母 (ng/mL)	胎盤 (ng/g)	卵黄囊膜 (ng/g)	胚 (ng/g)
Thalidomide	7h	235.1	156	120	115
	24h	30.6	19.8	15.6	13.8
5-hydroxy-thalidomide	7h	2.07	1.30	0.844	0.196
	24h	0.266	0.198	0.0765	BLQ
5'-hydroxy-thalidomide	7h	5.25	4.30	2.78	2.48
	24h	1.362	1.30	0.855	0.742

BLQ; Blow the lower limit of quantification

得られた結果から、母体濃度に対して子宮内容物の濃度は、胎盤>卵黄囊膜>胚の順であった。

5. 腔内投与による母体から胎児への薬物移行率  
(最終投与日；妊娠13日)

B. 研究方法、5-2.の結果を示す。

5-1. 子宮内容物中のサリドマイド濃度

最終腔内投与日である妊娠13日の投与後7時間および投与24時間の母動物血漿中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を示す。

(1) 0.4 mg/kg群（表16-2、表19-1）

妊娠していた妊娠13日母動物の3腹（動物番号1101、1103、1104）の7時間値の母体血漿中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を比較すると、母動物血漿濃度の約2割が胎盤、卵黄囊膜、胚に認められた（次図）。

	平均値 (範囲) ng/mL	組織中濃度/母血漿中濃度 平均値 (範囲)
母血漿	5.09 (0.967~8.68)	—
胎盤	2.04 (0~4.46)	0.273 (0.31~0.51)
卵黄囊膜	1.73 (0~3.82)	0.243 (0.13~0.65)
G13胚	2.14 (0~5.64)	0.267 (0.29~0.44)

同様に、24時間値の妊娠していた母動物3腹（動物番号1106, 1107, 1108）の血中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を比較すると、胎盤には母動物血漿濃度の約5割弱が、卵黄囊膜には約3割が認められたが、胚には検出されなかった（下図）。

	平均値 (範囲) ng/mL	組織中濃度/母血漿中濃度 平均値 (範囲)
母血漿	0.791 (0.481~1.02)	—
胎盤	0.335 (0~1.17)	0.458 (0~1.15)
卵黄囊膜	0.440 (0~1.66)	0.327 (0~1.63)
G13胚	検出限界以下	検出限界以下

## (2) 10 mg/kg群 (表16-2、表19-2)

妊娠していた妊娠13日母動物の4腹（動物番号2101, 2102, 2103, 2104）の7時間値の母体血中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を比較すると、胎盤では母動物血漿濃度の約6割が、卵黄囊膜および胚では約5割が認められた（下図）。

	平均値 (範囲) ng/mL	組織中濃度/母血漿中濃度 平均値 (範囲)
母血漿	235.1 (31.3~507)	—
胎盤	156.1 (12.3~428)	0.630 (0.20~0.89)
卵黄囊膜	120.4 (10.8~356)	0.518 (0.17~0.79)
胚	115.0 (8.01~265)	0.473 (0.13~0.71)

同様に、24時間値の妊娠していた母動物3腹（動物番号2105, 2107, 2108）の母体血中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を比較すると、胎盤では母動物血漿濃度の約8割が、卵黄囊膜では母動物血漿濃度の約4割が胚では母動物血漿濃度の約5割が分布していた（下図）。

	平均値 (範囲) ng/mL	組織中濃度/母血漿中濃度 平均値 (範囲)
母血漿	30.6 (4.38~74.4)	—
胎盤	19.9 (3.02~50.1)	0.773 (0.23~1.54)
卵黄囊膜	15.6 (3.03~43.0)	0.549 (0.23~0.94)
G13胚	13.8 (2.22~38.2)	0.472 (0.17~0.84)

## 5-2. 小括 (サリドマイド)

胎児の血流循環は、胎盤で母体と物質交換をした後、胎児に入るまでの間に卵黄囊膜で代謝を受ける。今回、測定した子宮内各組織中のサリドマイド濃度は、児毎に多少のばらつきはあるものの、胎児を個別にみると大半の例で胎盤が最も高値で、胎児が最も低値を呈し、胎盤や卵黄囊膜、胎児におけるそれぞれの代謝を反映している可能性も考えられた。また、母動物の血中濃度と子宮内容物濃度の比較から、妊娠13日胚において、胎盤、卵黄囊膜、胎児のいずれもその組織中サリドマイド濃度は、母体の血漿中サリドマイド濃度に依存する部分が大いと考えられた。

腔内投与後のサリドマイドの分布に、外子宮口から子宮内への投与液の侵入、あるいは腔壁から腹腔内を通して子宮壁からの分布といった経路が存在するのであれば、子宮広間膜で腹腔内に保定されている子宮の解剖学的位置から、着床位置に応じて腔に一番近い胎児（右子宮角では胎児番号が最も大きく、左子宮角では胎児番号の最も小さな児）と卵巣に一番近い胎児（右子宮角では胎児番号が最も小さく、左子宮角では胎児番号が最も大きな児）の間では濃度に差があると考えられる。そこで、胎盤及び胚中サリドマイド濃度に、着床位置との関係による法則性が存在するか検討した結果、一定の傾向は認められなかったことから（表19、表20）、胎盤・卵黄囊膜及び胚への母体血流以外の経路からの分布は微量で、影響につき考慮する必要はないと考えられた。従って、子宮内容物への移行は、血液を介する経路以外は無視できると考えられた。

生物学的薬物動態解析モデルにおいても投与後7時間までは投与経路による血中動態の差はないという結果を得ている（分担報告書-3参照；山崎分担）

## 5-3. 子宮内容物の水酸化代謝物濃度 (表17、表18)

前述の通り、母動物の血漿中には、妊娠1日、妊娠13日ともにサリドマイド原体の他に、ヒト型代謝物である5-hydroxythalidomide (5-OH体) とマウス型代謝物である5'-hydroxythalidomide (5'-OH体) が認められた。

下図に0.4および10 mg/kg 腔内投与群の投与初回（妊娠1日；G1）と最終投与日（妊娠13日；G13）におけるサリドマイド (THA) 原体と2種の水酸化物の薬物パラメータの比較を示した。

### (1) Cmax

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のCmax (0.4 mg/kg群)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
G1	13.9	0.62	1.09
G13	9.41	0.21	0.68

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のCmax (0.4 mg/kg群)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH/THA (%)	5'-OH/5-OH
G1	4.46	7.84	1.76
G13	2.19	7.10	3.24

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のCmax (10 mg/kg群)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
G1	274	2.24	10.00
G13	277	2.47	7.85

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のCmax (10 mg/kg群)			
	5-OH/THA(%)	5'-OH/THA(%)	5'-OH/5-OH
G1	0.82	3.65	4.46
G13	0.89	2.83	3.18

腔内投与により、妊娠雌のC<sub>max</sub> は5'-OH体の値が、5-OH体の値に比較して数倍高値であった。

(2) AUC<sub>0-t</sub>

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のAUC <sub>0-t</sub> (0.4 mg/kg群)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
G1	84.9	0.62	6.62
G13	48.1	0.76	2.88

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のAUC <sub>0-t</sub> (0.4 mg/kg群)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH/5-OH
G1	0.73	7.80	10.68
G13	1.58	5.99	3.78

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のAUC <sub>0-t</sub> (10 mg/kg群)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
G1	3540	25.6	124.0
G13	2340	19.3	72.4

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のAUC <sub>0-t</sub> (10 mg/kg群)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH/5-OH
G1	0.72	3.50	4.84
G13	0.82	3.09	3.75

腔内投与により、妊娠雌のAUC<sub>0-t</sub>は、C<sub>max</sub>と同様に、5'-OH体の値が、5-OH体の値に比較して高値であった。

R2年度に実施した雄の経口投与試験では、両代謝物濃度には大差はなかった。腔内投与時に認められた両代謝物量の違いが、性差に由来するものか、投与経路の差による吸収分布、または分布の差によるものかは別途検討が必要である。

5-4. サリドマイドと水酸化物の割合 (表17~表20)

腔内投与において、妊娠1日に比較して妊娠13日で血中濃度が大幅に増加することはなく、蓄積性はないことが明らかになったことから、最終腔内投与日(妊娠13日)の投与後7時間および24時間における子宮内容試料採取時点での母動物(表17-2、表18-2)および子宮内容物(表19、表20)について、サリドマイド及び2種類の代謝物濃度の比率を算出し、比較した。

下記の評価対象は不妊動物を除外している。

(1) 0.4 mg/kg群

0.4 mg/kg群の投与後7時間における結果を示す。

0.4 mg/kg 群、投与後7時間、組織中濃度 (平均値)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
母動物血漿	5.09	0.04	0.36
胎盤	2.04	BLQ	0.18
卵黄囊膜	1.73	BLQ	0.09
G13胚	2.14	BLQ	0.15

BLQ; Blow the lower limit of quantification

0.4 mg/kg 群、投与後7時間、比率 (平均値)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH /5-OH
母動物血漿	0.79	7.07	8.4
胎盤	NC	8.82	NC
卵黄囊膜	NC	5.20	NC
G13胚	NC	7.01	NC

NC; Not calculated

以下に0.4 mg/kg群の投与後24時間における結果を示す。

0.4 mg/kg 群、投与後24時間、組織中濃度 (平均値)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
母動物血漿	0.791	BLQ	BLQ
胎盤	0.335	BLQ	BLQ
卵黄囊膜	0.440	BLQ	BLQ
G13胚	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ; Blow the lower limit of quantification

0.4 mg/kg 群、投与後24時間、比率 (平均値)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH /5-OH
母動物血漿	NC	NC	NC
胎盤	NC	NC	NC
卵黄囊膜	NC	NC	NC
G13胚	NC	NC	NC

NC; Not calculated

サリドマイド原体と比較し、2種の代謝物の子宮内容物への移行率は少なかった。最終腔内投与日である妊娠13日の投与後7時間および24時間後の0.4 mg/kg群は、母体血中濃度の約4割のサリドマイドが子宮内容物へ移行していたが、代謝物は検出限界以下の濃度であった。

(2) 10 mg/kg 群

10 mg/kg群の投与後7時間における結果を示す。

10 mg/kg 群、投与後7時間 (平均値)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
母動物血漿	235.1	2.07	5.25
胎盤	155.8	1.30	4.30
卵黄囊膜	120.4	0.84	2.78
G13胚	114.9	0.20	2.48

10 mg/kg 群、投与後7時間、比率 (平均値)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH /5-OH
母動物血漿	0.9	2.2	254
胎盤	0.8	2.7	331
卵黄囊膜	0.7	2.3	331
G13胚	0.2	2.2	124

10 mg/kg群の投与後24時間における結果を示す。

10 mg/kg 群、投与後24時間 (平均値)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
母動物血漿	30.6	0.266	1.362
胎盤	19.8	0.20	1.31
卵黄囊膜	15.6	0.08	0.86
G13胚	13.8	BLQ	0.74

10 mg/kg 群、投与後24時間、比率 (平均値)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH /5-OH
母動物血漿	0.9	4.5	5.12
胎盤	1.0	6.6	6.55
卵黄囊膜	0.5	5.5	10.75
G13胚	NC	5.4	NC

NC; Not calculated

## 5-5. 小括（水酸化代謝物）

サリドマイド及びその2種類の代謝物の、子宮内容物におけるCmax及びAUCで比較した結果、Cmax又はAUC<sub>0-t</sub>の5-OH体の血漿中濃度は、サリドマイドの1割程度、5'-OH体は5-OH体の数倍の濃度であった（C研究結果及び考察、4-1. 母動物血漿中濃度）。腔内最終投与後7時間及び24時間に母動物から採血して得られた母動物血漿中、及び、同時点で帝王切開して得られた胎盤、卵黄囊膜及び胎児中のサリドマイド原体及び2種類の代謝物の濃度を比較すると、10 mg/kg 群では5-OH体の濃度はサリドマイド濃度の0.2~0.9%、5'-OH体濃度は5-OH体濃度の1.24倍~10.7倍を示し、Cmaxの成績とほぼ変わりなかった。また、両代謝物の比は胎盤、卵黄囊膜の間で大きな差はなかった。

これらの器官・組織では、胎児循環に沿って胎盤、卵黄囊膜、胎児の順にサリドマイドの測定値が低下していく傾向がみられ、サリドマイドの代謝が起こっていると考えられるものの、組織中に代謝物が蓄積するといった状況ではないと考えられた。また、0.4 mg/kg 群では母動物5-OH体の測定限界値未満の成績が比較的多かったが、これらは単純に曝露量が少なかったことによると考えられる。最終腔内投与日である妊娠13日の投与後7時間および24時間後の10 mg/kg 群は、母体血中濃度の約5-6割のサリドマイドが子宮内容物へ移行していたが、子宮内容物の5-OH体の測定結果が胎児では全体に低かった。

10 mg/kg 群では、卵黄囊膜の5-OH体濃度に高いものが存在したが、胚中の5-OH体濃度が低値である点を除き、大きな変化ではなかった。個体別に精査すると、卵黄囊膜において5-OH体が高い例（表20-2、動物番号2013）では、胎盤中濃度を上回る例が複数認められ、胎盤の2倍以上の濃度を示す例が複数認められた母動物では、胚中の5-OH体濃度は低値である傾向がみられた。

同様な傾向は軽度ながらもサリドマイドにおいてもみられたが、5'-OH体ではみられず、サリドマイドと5-OH体が卵黄囊膜に蓄積している胚が存在する可能性も考えられた。

## 6. 妊娠雌ウサギの腔内投与による薬物動態の解析

昨年度構築した、サリドマイドの雄性ウサギ体内動態を再現する生理学的薬物動態モデルを用いて、腔内投与試験の投与量である0.4および10 mg/kg 用量にてウサギに仮想経口投与したモデル出力結果値と、雌性ウサギに同用量を経腔投与した際の実測値を比較した。

その結果、経腔投与1日（妊娠1日）と投与13日（妊娠13日）の投与後4時間および7時間のウサギ血漿中サリドマイド、5-hydroxythalidomide および5'-hydroxythalidomide 濃度の実測血中濃度（表16、表17、表18）は仮想出力値とほぼ一致した（図1）。

即ち、投与経路、性差、妊娠日、投与量に関係なく、サリドマイドは生体内へ移行、代謝していることが示唆された。得られた結果は、腔内投与後、サリドマイドは腔粘膜下の血管から吸収され全身循環に入ったのち、子宮内の胎児へ到達すると考える一助となる結果であった。

## D. 結論

令和2年度の雄ウサギを用いた検討の結果から最高精液中濃度は 20 μg/gと計算され、これに基づきヒトにおける女性の曝露量を計算し、最大精漿中移行濃度の100倍量である0.4 mg/kgを投与する妊娠雌ウサギ腔内反復投与実験を実施した。

その結果、母動物、胎児の生存性、成長に関する指標にもサリドマイド腔内投与による影響は観察されなかった。胎児の外表、内臓及び骨格検査の結果から、この投与量における催奇形性は認められなかった。

この時の母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、胎児）のサリドマイド濃度および2種の水酸化物濃度を調べた結果、腔内投与により母動物にサリドマイドの蓄積性はなかった。また、胎児へは母動物血漿中濃度の4-5割程度のサリドマイドが移行していた。

性別が異なり単回投与後の成績であるが、この成績を令和2年度に実施した雄の単回投与試験の2 mg/kg単回投与群の成績と比較すると、本試験における投与量は2 mg/kgの1/5であるのに対し、Cmaxは約1/20倍、AUC<sub>0-t</sub>は約1/50倍にすぎなかった。

本試験におけるヒト型代謝物(5-hydroxythalidomide)の平均Cmax及び平均AUC<sub>0-t</sub>はサリドマイドの1.2%及び1.1%であった。これらの値は雄の単回投与時の2 mg/kg群でのCmax (1.3~1.6%) 及びAUC<sub>0-t</sub> (1.5から1.6%)での割合にほぼ等しかった。腔内投与の場合、経口投与と異なりfirst pass effectを受けない状況ではあるが、サリドマイド原体に対する代謝物の割合は経口投与の場合と大差がなかった。即ち、経口投与した場合と比較して、ヒト型代謝物の割合が上昇し、代謝物の危険性について考慮する必要はないと考えられた。

以上のことから、腔内投与時の血中濃度は同じ投与量の経口投与時の血中濃度を上回らないと考えられた。即ち、経口投与と比較して、腔内投与による血中移行は低いことが明らかになった。

子宮内の着床位置に、サリドマイドおよび水酸化代謝物濃度は影響を受けなかったことや、確立した生理学的薬物動態モデルを用いてウサギ血漿中サリドマイド、5-hydroxythalidomideおよび5'-hydroxythalidomide 濃度の実測血中濃度と仮想出力値とがほぼ一致したから、腔内投与後、母動物の全身循環を介し、胎盤、卵黄囊膜、胎児へと移行すると考えられた。

西村らの先行研究から精液中に含まれるサリドマイドが全量腔から吸収された場合でも、十分な安全係数を持って催奇形性が否定されると報告されていたが、本試験の結果、腔から吸収され、子宮内に到達するサリドマイド量は、経口投与により腸管から吸収され肝臓でのfirst pass effectを受けた場合の血中濃度よりもはるかに低い可能性が考えられた。即ち、先行研究の仮説を実測値で示し、より安全であることが補強された。

以上の結果から、サリドマイドの精液を通じた催奇形作用は認められないと結論した。

令和4年度は腔内投与実験の結果を基に、経口投与による奇形発現の際の妊娠ウサギでの血中濃度と比較し（添付資料2）、その濃度差を明らかにした後、現行のテストガイドラインを考慮しながら、種差および薬物動態を加味した雄性生殖を介した新規発生毒性試験評価法を完成する予定である。

## E. 健康危険情報

特になし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., Kitajima, S. and Yamazaki, H. Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J Toxicol Sci*, 46, 553-560, 2021
- 2) Miura, T., Uehara, S., Shimizu, M., Suemizu, H., and Yamazaki, H. Pharmacokinetics of Primary Oxidative Metabolites of Thalidomide in Rats and in Chimeric Mice Humanized with Different Human Hepatocytes. *J Toxicol Sci*, 46, 311-317, 2021
- 3) Kamiya, Y., Handa, K., Miura, T., Ohori, J., Shimizu, M., Kitajima, M., Shono, F., Funatsu, K., and Yamazaki, H. An Updated *In Silico* Prediction Method for Volumes of Systemic Circulation of 323 Disparate Chemicals for Use in Physiologically Based Pharmacokinetic Models to Estimate Plasma and Tissue Concentrations after Oral Doses in Rats. *Chem Res Toxicol* 34, 2180-2183, 2021
- 4) Kamiya, Y., Handa, K., Miura, T., Ohori, J., Kato, A., Shimizu, M., Kitajima, M., and Yamazaki, H. Machine Learning Prediction of the Three Main Input Parameters of a Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Model Subsequently Used to Generate Time-Dependent Plasma Concentration Data in Humans after Oral Doses of 212 Disparate Chemicals. *Biol Pharm Bull*, 45, 124-128, 2022.

### 2. 学会発表

- 1) 栗形麻樹子、高島宏昌、羽田亮、田中加奈子、長谷川拓郎、山崎浩史、北嶋聡：雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価、第48回日本毒性学会学術年会（2021.7.7）
- 2) 高島宏昌、羽田亮、田中加奈子、関美沙、長谷川拓郎、山崎浩史、北嶋聡、栗形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形性作用確認、第61回日本先天異常学会学術集会（2021.8.7）
- 3) 山崎浩史：CBI学会2021年大会シンポジウム「AI-SHIPSにおける一般化学物質の吸収および体内動態予測手法開発」2021年10月、東京（オンライン）
- 4) 山崎浩史：2021 International Workshop for Non-animals Approaches in Food Sector, Prediction of metabolic fates of food chemicals for risk assessment, October 2021, Tokyo (online).

## 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

－妊娠ウサギを用いたサリドマイド臍内反復投与による胚・胎児発生への影響－

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。

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(臍内投与試験)を実証するために、昨年度(R2年度)に実施した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の血漿中及び精漿中への移行推移の結果から最大臍内移行量を算出し、臍内投与試験を実施した。分担研究として、臍内投与による胎児発生への影響、及び胎生末期胎児の形態異常の有無を確認し、母動物への影響および胎児形態への影響はないことを確認した。

A. 研究目的

本研究では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新規の発生毒性試験計画を実証することを目的とする。

令和2年度に実施した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の結果から算出された最大臍内移行量から臍内投与試験を実施した。分担研究として、臍内投与による胎児発生への影響、及び胎児の形態異常の有無を確認した。

B. 研究方法

令和2年度に実施した雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与試験結果から算出された最大臍内移行量(0.4 mg/kg)を妊娠ウサギの交配翌日から胎児の四肢形成期までの期間にあたる妊娠1日～妊娠13日に1日1回臍内投与し、妊娠動物及び胚・胎児の発生に及ぼす影響を調べた。

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. 被験物質の調製及び均一性・安定性分析

令和2年度に被験物の調製方法、調製頻度、安定性は確認している。

即ち、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を加えて調製した。被験液は冷蔵にて保存し、8日以内に使用した。

また、0.2及び200 mg/mL液(媒体: 0.5%MC溶液)の冷蔵下(2～8℃)にて8日間保存後、室温下で24時間の安定性・均一性を確認している。

1-4. 使用動物(購入雌)

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

入荷時週齢 : 15～16週齢

交配時週齢 : 17～18週齢

入荷後1週間の検疫・馴化の期間を経て、一般状態

および体重推移に異常のない動物を用いた。  
交配 : 外陰部が腫脹して暗紫色を呈し、発情期と認められた雌を雄(交配用所有雄)と1:1で交配用サークル〔650(φ)×H500 mm〕に入れて行った。交尾が2回確認された雌を交尾動物とし、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配置法により行った。

なお、20匹購入し、試験には16匹を配した。余剰動物は、動物管理部門へ移管した。

#### 1-5. 使用動物(交配用所有雄)

動物種 : ウサギ(SPF、所有動物)  
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

入手日 : 2020年3月27日(入荷時17週齢、24匹)

交配時の体重範囲 : 3.36~4.02 kg

入荷以降、体重推移および一般状態に異常がなく、高い受胎率を有した雄動物を選択し交配用とした。交配終了後、交配用雄動物として所有コロニーに戻した。

#### 1-6. 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。

飼育はアルミ製飼育ケージ(W560 x D550 x H410 mm、理工電機株式会社製の改良型、バンチングボート床)に個別飼育した。環境エンリッチメントとして、ステンレス板及びプラスチックチェーンを与えた

## 2. サリドマイドの膈内投与による胚・胎児発生への影響

### 2-1. 投与経路(膈内投与)

本試験の目的は、thalidomideを投与された雄の精液を介した曝露による雌への催奇形作用の有無の確認である。そのため、投与経路は膈内投与を選択した。

### 2-2. 投与期間および投与回数

交尾翌日(妊娠1日)からthalidomideによる催奇形作用への感受性が最も強い時期である妊娠13日までの13日間とした。

ウサギでは排卵が交尾後約11時間に起こることが報告されていることから、投与されたthalidomideの物性による膈内環境の変化が、精子運動性等に直接影響することにより妊娠動物が減少する状況を避けるため、交尾当日(妊娠0日)の膈内投与は実施しなかった。

投与回数は1日1回(7日/週)とした。

なお、交尾成立日を妊娠0日(Gestation day 0;GD0)とした。

### 2-3. 投与方法

投与容量は0.05 mL/kgとし、媒体に懸濁したthalidomideを、注射筒およびネラトンカテーテル(注1)を用いて膈内へ投与した(08:53~11:15の間)。

投与の際にはネラトンカテーテル内を投与液で気泡が入らないよう満たし、投与すべき量の投与液をシリ

ンジ内に充填した状態で、ネラトンカテーテルの先端を膈内に挿入した。投与後は、フラッシングを実施せず、ネラトンカテーテル内の投与液は入れたまま抜去した。

媒体対照群には媒体(0.5% MC溶液)を同様に投与した。動物ごとの投与液量は直近の体重を基準に算出した。

注1)注射筒は、1 mLツベルクリン用シリンジ(テルモ株式会社)、ネラトンカテーテルはテルモ社製サーフィード ネラトンカテーテルアダプター付きFr.16(5.3 mm)、40 cm、2孔式を用いた。

### 2-4. 投与量

群構成を下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立 雌動物数*
媒体対照群	0	0	0.05	8 (7)
投与群	0.4	8.0	0.05	8 (8)

\*括弧内は妊娠動物数

### 投与量設定根拠

Thalidomideの雄ウサギを用いた14日間反復経口投与濃度測定試験(令和2年度実施)の結果、雄に250 mg/kgを14日間反復投与した場合の血中濃度は約20,000 ng/mLであり、血中半減期は24時間以内であること、精液中濃度が血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250 mg/kgを投与した状況においても、血液中濃度は20 μg/mL程度でプラトーに達し、精液中濃度は20 μg/gにほぼ等しいか若干下回ると推定された。

この状況でヒトの精液量を4 mL程度、射精回数を2回として計算すると、精液を通して女性が曝露されるthalidomide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であると推定された。

この用量での安全性を検討するための本試験での投与量としては、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および個体差を考慮し、より安全側に立脚し、より多量に摂取することを想定して係数100倍を乗じ繰り上げて0.4 mg/kgとした。

投与容量はウサギの精液量の1/3~1/5であり、膈から漏出ししない液量として0.2 mLを選び、投与する対象のウサギの推定平均体重4 kgで除して0.05 mL/kgとした。

### 係数100の根拠

既報からヒトで200 mg/kg反復経口投与時のCmaxは約2 μg/mLであり、精液中へ1.2~2 μg/mg(既報では約6割)と推定される。ヒトとウサギでは感度が10倍異なることから、これに個体差10をかけ、係数100とした。

投与容量はウサギの精液量の1/3~1/5であり、膈から漏出ししない液量として0.2 mLを選び、投与する対象のウサギの推定平均体重4 kgで除して0.05 mL/kgとした。

### 2-5. 動物の観察

投与期間中は投与前、投与直後及び投与2時間後の3回/日、その他の期間は午前中に1回/日、一般状態を観察した。

体重は妊娠0、3、6、8、10、12、13、14、16、19、22、24、26及び28日の午前中(投与期間中は測定当日の投与前)に測定した。

### 2-6. 剖検及び帝王切開

妊娠28日の午前中、保定・無麻酔下の投与群の母動物全例の耳介静脈から、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて0.4 mL採血した後、全例をペントバルビタールナトリウム静脈内投与(1 mL/kg)による麻酔下

で腹大動脈からの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。

採血した血液は、遠心分離(4°C、1,600×g、10分間)により血漿(160 μL)を得た。これに等量の25mM Sorensen's citrate buffer (pH 1.5) (注2)を加えて血漿試料とした。血漿試料は、ウサギを用いた膈内投与時の胚・胎児への移行に関する検討にて解析した(分担報告書-2参照; 栗形担当)。

(注2) くえん酸三ナトリウム二水和物(CAS No. 6132-04-3、富士フィルム和光純薬株式会社、ロット番号 SKN5973)の1.47gを注射用水(株式会社大塚製薬工場、ロット番号 9K94)150 mLに溶解し、塩酸でpHを1.5に調整した後、注射用水を加えて200 mLとした。

## 2-7. 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、卵巣については妊娠黄体数を数えた。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・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

また、生存胎児は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かった対照群の1例の子宮は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。この動物の子宮に着床部位は認められなかったため、不妊と判断し、全てのデータを評価から除外した。

\*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)をその9倍容量の注射用水(株式会社大塚製薬工場)で溶解させて調製した。

## 2-8. 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、体重を個別に測定した。生存胎児は内部生殖器の観察により性別を判定した。

投与群の全胎児は腹大静脈からヘパリン処理シリンジで約0.4 mL採血した。

胎盤は灰白色の基底脱落膜部分を含め重量測定後、投与群についてはφ4 mmの生検トレパンで胎盤組織中濃度測定用試料4個を採材して重量を測定し、各胎児ごとに試料番号を記載したラベルを貼付した2.0 mLストロングチューブに入れ凍結した。

卵黄囊膜は胎児ごとに個別に採取し、卵黄囊液、子宮内腔液を可能な限り除去して重量を測定し、個別に試料番号を記載したラベルを貼付した2.0 mLストロングチューブに入れ凍結した。

凍結した試料はいずれも、送付まで-80°Cの冷凍庫で保存した。

胎児血漿、胎盤、卵黄囊膜は、ウサギを用いた膈内投与時の胚・胎児への移行に関する検討にて解析した(分担研究報告書-2参照; 栗形担当)。

### (2) 内臓形態

全生存胎児について、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)を摘出後、リン酸緩衝10%ホルマリン液で固定した。固定後、脳はWilsonの粗大切片法<sup>1)</sup>、心臓は西村の頭微解剖法<sup>2)</sup>を参照して異常・変異の有無を検索した。観察終了後の標本はリン酸緩衝10%ホルマリン液で保存した。

1) Wilson JG. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animals. "Teratology; Principles and Techniques" ed. By Wilson JG and Warkany J. Chicago University Press, Chicago 1965; 262-77.

2) Nishimura K. A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. Cong Anom 1974; 14: 23-40.

## (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、99%アルコール液で固定した後、アルシアンブルー・アリザリンレッドS二重染色透明骨格標本を作製した。全生存胎児について、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。観察終了後の標本はチモールを含んだ50%グリセリン液で保存した。

### 染色試薬

・アリザリンレッドS

特級、関東化学、Cat no. 0113-30)

・アルシアンブルー

特級、Alcial blue 8GX certified、Electron Microscopy Sciences、Cat no. 10350)

## 3. 統計解析

### 3-1. パラメーターの算出

着床前死亡率、着床率、着床後死亡率、外表異常率、内臓異常率、内臓変異率、骨格異常率及び骨格変異率を腹ごとに、生存胎児の性比、外表異常・内臓又は骨格の異常又は変異を示す胎児を有した母動物の発現率あるいは異常胎盤を有した母動物の発現率を群ごとに、以下の式により算出した。

ただし、異常又は変異を示す胎児を有した母動物の発現率については、所見ごとの算出は行わなかった。なお、生存胎児の体重(雌雄別及び雌雄の合計値)及び胎盤重量(雌雄別及び雌雄の合計値)並びに各骨化数は各腹の平均値を求めた。死亡胚・胎児数と着床後死亡率は各区分についても算出した。

着床前死亡率(%) = [(黄体数 - 着床数) / 黄体数] × 100

着床率(%) = (着床数 / 黄体数) × 100

着床後死亡率(%) = (死亡胚・胎児数 / 着床数) × 100

外表異常率(%) = (外表異常を示す胎児数 / 観察胎児数) × 100

内臓異常率(%) = (内臓異常を示す胎児数 / 観察胎児数) × 100

内臓変異率(%) = (内臓変異を示す胎児数 / 観察胎児数) × 100

骨格異常率(%) = (骨格異常を示す胎児数 / 観察胎児数) × 100

骨格変異率(%) = (骨格変異を示す胎児数 / 観察胎児数) × 100

胎児の性比(%) = (雄胎児数 / 全胎児数) × 100

外表異常を示す胎児を有した母動物の発現率(%)

= (外表異常を示す胎児を有した母動物数 / 母動物数) × 100

内臓異常/変異を示す胎児を有した母動物の発現率(%)

= (内臓異常/変異を示す胎児を有した母動物数 / 母動物数) × 100

骨格異常/変異を示す胎児を有した母動物の発現率(%)

= (骨格異常/変異を示す胎児を有した母動物数 / 母動物数) × 100

骨格異常/変異を示す胎児を有した母動物の発現率(%)

= (骨格異常/変異を示す胎児を有した母動物数 / 母動物数) × 100

### 3-2. 検定

妊娠動物より得られたデータに関し、媒体対照群と投与群との間で検定を行った。解析にはSAS Release 9.1.3 (SAS Institute Inc.)を使用した。

1) 体重、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胎・胎児数、生存胎児体重、胎盤重量、骨化数（胸骨分節、中手骨、中足骨、指端骨（基節骨、中節骨及び末節骨）、仙尾椎骨）は、群ごとに平均値及び標準偏差を求めた。

母動物ごとに得られた値あるいは平均値を1標本単位とした。F検定にて等分散性を確認し、等分散であった場合には、Studentのt検定を、不等分散であった場合にはAspin-Welchのt検定を実施した。（有意水準0.05及び0.01、両側）。

2) 着床前死亡率、着床率、着床後死亡率、外表異常率、内臓異常率、内臓変異率、骨格異常率及び骨格変異率については、母動物ごとに得られた率を1標本単位として群ごとに平均値及び標準偏差を求め、媒体対照群と投与群の比較のため、Wilcoxonの順位和検定を行った（有意水準0.05及び0.01、両側）。

3) 生存胎児の性比、外表異常・内臓又は骨格の異常又は変異を示す胎児を有した母動物の発現率あるいは異常胎盤を有した母動物の発現率については、各群の雌雄胎児数、所見を示す胎児を有した母動物数あるいは異常胎盤を有した母動物数を基に、Fisherの直接確率計算法により検定を行った（有意水準0.05及び0.01、両側）。

（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

#### 1-1. 一般状態

死亡及び流産動物は発現しなかった。

一般状態では排糞量の低下が0.4 mg/kg群の2例でみられたが一過性でいずれも翌日には回復したことから被験物質投与の影響ではないと判断した。

#### 1-2. 体重

体重値を表1に、増加量を表2示した。

0.4 mg/kg群において、投与期間である妊娠1日から13日の増加量が媒体対照群に比較して有意な低値を示し、妊娠14日から28日の増加量は有意な高値を示したが、いずれも変化はわずかで体重実測値には変化が認められなかった。

#### 1-3. 剖検所見

体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官・組織に肉眼的な異常は見られなかった。

### 2. 帝王切開（表3）

0.4 mg/kg群では黄体数、着床数、着床前死亡率及び着床率に媒体対照群と比べ有意な差は認められなかった。

### 3. 胎児観察

#### 3-1. 胎・胎児死亡および外表（表4、表5）

0.4 mg/kg群において、着床後死亡率、胎・胎児死亡数、生存胎児数、生存胎児の性比、雌雄胎児体重、及び胎盤重量に媒体対照群と比べ差は認められなかった。

外表異常を有する生存胎児は認められなかった。

胎盤の肉眼的な異常は、いずれの投与群にも見られなかった。

#### 3-2. 内臓（表6）

生存胎児の内臓形態に被験物質投与による変化は認められなかった。

内臓異常は、媒体対照群で横隔膜ヘルニアが1例に認められたのみであった。

内臓変異を有する胎児は、肺副葉欠損が媒体対照群で5例、大静脈後尿管が媒体対照群で1例、0.4 mg/kg群で2例みられたが、いずれも発現頻度は低頻度で有意差は認められなかった。

#### 3-3. 骨格（表7、表8）

生存胎児の骨格形態に被験物質投与による変化は認められなかった。

骨格異常は、胸骨分節癒合が媒体対照群と0.4 mg/kg群の各1例で、肋骨癒合、胸椎弓癒合、胸椎半脊椎が0.4 mg/kg群の別個の各1例で認められたが、いずれも低頻度で被験物質投与の影響を示唆するものではなかった。

骨格変異は仙椎前椎骨数27が媒体対照群の15例、0.4 mg/kg群の24例にみられたが、発現頻度に有意差は認められなかった。その他、胸骨分節分離が媒体対照群と0.4 mg/kg群の各2例で、胸椎体分離が0.4 mg/kg群の1例で、仙椎前椎骨数25が0.4 mg/kg群の1例で、距骨の未骨化が0.4 mg/kg群の2例でそれぞれ認められたが、発現例数はいずれも少数であることから、被験物質投与の影響とは考えられなかった。

骨化進行状態については、0.4 mg/kg群の胸骨分節、中手骨、中足骨及び仙尾椎骨の各骨化数には対照群との間に有意な差は認められなかった。

## D. 結論

令和2年度の雄ウサギを用いた検討の結果から最高精液中濃度は20 µg/gと計算され、これに基づきヒトにおける女性の曝露量を計算し、最大精漿中移行濃度の100倍量である0.4 mg/kgを投与する本試験を実施した。

その結果、母動物に対する毒性学的変化は検出されず、胎児の生存性、成長に関する指標にも被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。

また、外表、内臓及び骨格検査を実施した結果、この投与量における催奇形性は認められなかった。

以上の結果から、サリドマイドの精液を通じた催奇形作用は認められないと結論した。

## 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) Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., Kitajima, S. and Yamazaki, H. Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species J Toxicol Sci, 46, 553-560, 2021

### 2. 学会発表

1) 葉形麻樹子、高島宏昌、羽田亮、田中加奈子、長谷川拓郎、山崎浩史、北嶋聡：雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価、第48回日本毒性学会学術年会（2021. 7. 7）

2) 高島宏昌、羽田亮、田中加奈子、関美沙、長谷川拓郎、山崎浩史、北嶋聡、栞形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形性作用確認、第61回日本先天異常学会学術集会（2021.8.7）

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

—妊娠ウサギを用いたサリドマイド膈内反復経口時の母動物および胚・胎児への移行に関する検討—

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。

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、昨年度(R2年度)に実施した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の血漿中及び精漿中への移行推移の結果から最大膈内移行量を算出し、R3年度は膈内投与試験を実施した。分担研究として、膈内投与後の母動物血漿および子宮内容物(胎盤、卵黄囊膜、胎児)の薬物移行を確認した。

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量のサリドマイドを膈内投与し、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) 器官形成期の妊娠雌ウサギ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し、(3)と比較する。

令和3年度は(3)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り、このこと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'-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。

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

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：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、調整後10日以内に使用した（冷蔵保存）。

#### 媒体選択理由：

サリドマイドの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

令和2年度に被験物の調製方法、調製頻度、安定性は確認している。

即ち、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を加えて調製した。被験液は冷蔵にて保存し、8日以内に使用した。

また、0.2及び200 mg/mL液（媒体：0.5%MC溶液）の冷蔵下（2～8℃）にて8日間保存後、室温下で24時間の安定性・均一性を確認している。

#### 1-4. 使用動物（購入雌）

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  
入荷時週齢：16週齢  
交配時週齢：17週齢

入荷後1週間の検査・馴化の期間を経て、一般状態および体重推移に異常のない動物を用いた。

交配：外陰部が腫脹して暗紫色を呈し、発情期と認められた雌を雄（交配用所有雄）と1:1で交配用サークル〔650(φ)×H500 mm〕に入れて行った。交尾が2回確認された雌を交尾動物とし、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配置法により行った。

なお、20匹購入し、試験には16匹を配した。余剰動物は、動物管理部門へ移管した。

#### 1-5. 使用動物（交配用所有雄）

動物種：ウサギ（SPF、所有動物）  
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  
入手日：2020年3月27日（入荷時17週齢、24匹）  
交配時の体重範囲：3.53～4.15 kg

入荷以降、体重推移および一般状態に異常がなく、高い受胎率を有した雄動物を選択し交配用とした。交配終了後、交配用雄動物として所有コロニーに戻した。

#### 1-6. 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。

飼育はアルミ製飼育ケージ（W560 x D550 x H410 mm、理工電機株式会社製の改良型、バンチングポート床）に個別飼育した。環境エンリッチメントとして、ステンレス板及びプラスチックチェーンを与えた

#### 1-7. 血漿中及び子宮内容物中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)  
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<sub>max</sub>)、最高薬物濃度到達時間(T<sub>max</sub>)及び濃度時間曲線下面積(AUC<sub>0-24</sub>)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。

#### 検出限界値

	血漿* (ng/mL)	子宮内容物 (胎児、卵黄嚢、胎盤) (ng/g)
Thalidomide	0.400	0.0800
5-hydroxythalidomide	0.04	0.0800
5'-hydroxythalidomide	0.04	0.0800

\*、妊娠28日胎児血漿を含む

#### 2. サリドマイドの膈内投与による胚・胎児発生への影響（添付資料1）

##### 2-1. 投与経路（膈内投与）

本試験の目的は、thalidomideを経口投与した雄の精液を介した雌への曝露による催奇形作用の有無の確認試験において（分担報告書-1参照、北嶋分担）、胚を始めとする子宮内容物が被験物質に曝露されていたことを確認することにある。このため、投与経路、投与期間、投与回数は、膈内投与による胚・胎児発生毒性試験に合わせ、交尾翌日（妊娠1日）から妊娠13日まで、1日1回、13日間、反復膈内投与する。投与回数は1日1回（7日/週）とした。（分担報告書-1参照、北嶋分担）

##### 2-2. 投与期間および投与回数

交尾翌日（妊娠1日）からthalidomideによる催奇形作用への感受性が最も強い時期である妊娠13日までの13日間とした。

ウサギでは排卵が交尾後約11時間に起こることが報告されていることから、投与されたthalidomideの物性による膈内環境の変化が、精子運動性等に直接影響することにより妊娠動物が減少する状況を避けるた

め、交尾当日(妊娠0日)の膈内投与は実施しなかった。  
投与回数は1日1回(7日/週)とした。

なお、交尾成立日を妊娠0日(Gestational day 0; G0)とした。

### 2-3. 投与方法

投与容量は0.05 mL/kgとし、媒体に懸濁したthalidomideを、注射筒およびネラトンカテーテル(注1)を用いて膈内へ投与した(08:53~11:15の間)。

投与の際にはネラトンカテーテル内を投与液で気泡が入らないよう満たし、投与すべき量の投与液をシリンジ内に充填した状態で、ネラトンカテーテルの先端を膈内に挿入した。投与後は、フラッシングを実施せず、ネラトンカテーテル内の投与液は入れたまま抜去した。

媒体対照群には媒体(0.5% MC溶液)を同様に投与した。動物ごとの投与液量は直近の体重を基準に算出した。

注1) 注射筒は、1 mLツベルクリン用シリンジ(テルモ株式会社)、ネラトンカテーテルはテルモ社製サーフィード ネラトンカテーテルアダプター付きFr.16(5.3 mm)、40 cm、2孔式を用いた。

### 2-4. 投与量

群構成を下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立 雌動物数*
0.4 mg/kg群	0.4	8.0	0.05	8 (6)
10 mg/kg群	10	200	0.05	8 (7)

\*括弧内は妊娠動物数

### 投与量設定根拠

Thalidomideの雄ウサギを用いた14日間反復経口投与濃度測定試験(令和2年度実施)の結果、雄に250 mg/kgを14日間反復投与した場合のCmaxは約20,000 ng/mLであり、血中半減期は24時間以内であること、精液中濃度が血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250 mg/kgを投与した状況においても、血液中濃度は20 µg/mL程度であり、プラトーに達した状態にあり、精液中濃度は20 µg/gにほぼ等しいか若干下回ると推定された(既報では精液/血漿=0.6)。

この状況でヒトの精液量を4 mL程度、射精回数を2回として計算すると、精液を通して女性が曝露されるthalidomide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であると推定された。

この用量での安全性を検討するための本試験での投与量としては、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および個体差を考慮し、より安全側に立脚し、より多量に摂取することを想定して係数100倍を乗じ繰り上げて0.4 mg/kgとした。

### 係数100の根拠

既報からヒトで200 mg/kg反復経口投与時のCmaxは約2 µg/mLであり、精液中へ1.2~2 µg/mg(既報では約6割)と推定される。ヒトとウサギでは感度が10倍異なることから、これに個体差10をかけ、係数100とした。

投与容量はウサギの精液量の1/3~1/5であり、膈から漏出しない液量として0.2 mL/bodyを選び、投与する対象のウサギの推定平均体重4 kgで除して0.05 mL/kgとした。

一方、調製可能な最高濃度である200 mg/mLの調製液を同じ容量投与する高用量群(10 mg/kg群)を設定した。

### 2-5. 動物の観察

投与期間中は投与前、投与直後及び投与2時間後の3回/日、その他の期間は午前中に1回/日、一般状態を観察した。

体重は妊娠0、3、6、8、10、12、13、14の午前中(投与期間中は測定当日の投与前)に測定した。

### 2-6. 剖検(最終投与日;妊娠13日)

各群の動物番号の末尾が01~04番の動物は妊娠13日の投与7時間後の採血終了後に、末尾が05~08番の動物は妊娠13日の投与24時間後の採血終了後に、ペントバルビタールナトリウム静脈内投与(1 mL/kg)による麻酔下で腹大動脈からの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。

### 2-7. 帝王切開(最終投与日;妊娠13日)

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た。卵巣については妊娠黄体数を数えた。子宮については子宮壁を切開し、生存胚数、死亡胚数を判定・記録した。生存胚と死亡胚の総数を着床数とした。

肉眼的に着床が認められなかった動物(0.4 mg/kg群:2例及び10 mg/kg群:1例)は妊娠黄体数を記録し、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。これらの動物の子宮に着床部位は認められなかったため、不妊と判断し、全てのデータを評価から除外した。

## 3. 膈内投与後母動物血漿中及び子宮内容物中薬物動態(トキシコキネティクス;TK)試験

薬物動態は、2回にわたって実施した膈内投与実験から調べた。即ち、

3-1. 妊娠末期胎児の形態への影響を確認した「胚・胎児発生に関する実験」(分担報告書-1参照;北嶋分担)

3-2. 投与最終日に子宮内容物への薬物移行を調べた「胚・胎児への移行に関する実験」(栗形分担)

から得た母動物および子宮内容物(胎児、胎盤、卵黄囊膜)の薬物動態を調べた。

2実験での母動物採血スケジュールを下記に示す。

試験識別	投与量 (mg/kg)	母動物 採血時期	投与後採血時間 (時間)
3-1.	0.4	G13	pre,0.5, 1, 2, 4, 7
		G28	帝王切開時
3-2.	0.4,10	G1	4, 7, 24
		G13-1	Pre, 4, 7, 24
		G13-2	帝王切開時

G13; gestational day 1(交尾成立日;G0)

続いて、2実験での子宮内容物(胎盤、卵黄囊膜、胎児)の採取スケジュールを下記に示す。

試験識別	投与量 (mg/kg)	母動物 採血時期	子宮内容物 (胎盤、卵黄囊膜、胎児)
3-1.	0.4	G13	なし
		G28	採取
3-2.	0.4,10	G13 7h	採取(約半数の腹)
		G13 24h	採取(残りの約半数の腹)

### 3-1. 胚・胎児発生に関する実験

#### (1) 母体試料の採取

##### a) 採血日及び採血時点

妊娠13日：投与前、投与0.5、1、2、4及び7時間後（6時点）

妊娠28日：帝王切開時

##### b) 対象動物及び採血量

0.4 mg/kg 投与群の8例

各時点各動物から約0.4 mL（動物を保定器に入れ、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて無麻酔下で耳介静脈から採血）

#### (2) 胎児試料

妊娠28日の帝王切開時に、胎児の腹大静脈からヘパリン処理シリンジで約0.4 mL採血した。

### 3-2. 胚・胎児への移行に関する実験（妊娠13日帝王切開）

#### (1) 母体試料の採取

##### a) 採血日及び採血時点

妊娠1日（3時点）：投与4、7、24時間後（妊娠2日の投与前）

妊娠13日（4時点）：投与前、投与4、7、24時間後

##### b) 対象動物及び採血量

母動物を保定器に入れ、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて無麻酔下で耳介静脈から採血した。

##### c) 帝王切開実施時期

最終投与前（妊娠13日）の投与後7時間の採血時に各群半数の動物（動物番号末尾01~04）を帝王切開し、残り半分の動物（動物番号末尾05~08）は投与後24時間（妊娠14日）に帝王切開した。

- ・妊娠1日の各測定点並びに妊娠13日の投与前及び投与4及び7時間後：0.4 mg/kg群の全例および10 mg/kg群の動物番号末尾05~08の4例
  - ・妊娠1日の各測定点並びに妊娠13日の投与前及び投与4時間後：10 mg/kg群の動物番号末尾01~04の4例
  - ・妊娠13日の投与24時間後：0.4 mg/kg群の動物番号の末尾が05~08の4例
- （以上、採血量は各動物から約0.4 mL）

- ・妊娠13日の投与7時間後：10 mg/kg群の動物番号末尾01~04の4例
  - ・妊娠13日の投与24時間後：10 mg/kg群の動物番号の末尾が05~08の4例
- （以上、採血量は各時点各動物から約1.2 mL）

#### (2) 子宮内容試料の採取（最終投与前7時間又は24時間）

##### a) 卵黄囊膜

生存胚と卵黄囊膜を分離し、卵黄囊膜は可能な限り水分を除去した後、ストロングチューブ各1本に入れ重量を測定した。

##### b) 胚

卵黄囊膜と分離した胚は、ストロングチューブ各1本に入れ、重量を測定した。

##### c) 胎盤

各胎盤（脱落膜層を含む）は、重量測定後、トレパン（φ4 mm、Biopsy Punch, Kai メディカル）で各2ヶ所を採取し、ストロングチューブ各1本に入れ重量を測定した。

各試料は送付まで-80°Cの冷凍庫で保存した。

### 3-3. 血液の処理

採血した血液は、遠心分離（4°C、1,600×g、10分間）により血漿を得た。これに等量の25mM Sorensen's citrate buffer (pH 1.5)（注2）を加えて血漿試料とした。試料は測定時まで-80°Cの冷凍庫に保存した。

（注2）くえん酸三ナトリウム二水和物（CAS No. 6132-04-3、富士フィルム和光純薬株式会社、ロット番号 SKN5973）の1.47gを注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号 9K94）150 mLに溶解し、塩酸でpHを1.5に調整した後、注射用水を加えて200 mLとした。

#### （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. 膈内投与による母動物及び胚・胎児に及ぼす影響（妊娠13日帝王切開）

B. 研究方法、3-2. の実験結果を示す。

##### 1-1. 一般状態

母動物の死亡及び流産動物はなかった。いずれの例も一般状態に変化は認められなかった。

体重推移も投与による影響はなかった（表9）。

##### 1-2. 剖検

いずれの例も体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官・組織に肉眼的な異常は見られなかった。

##### 1-3. 帝王切開（表10）

10 mg/kg 群では着床前死亡率の増加傾向及び着床率の低下傾向が認められたが、僅かでは変化であり、実施施設の背景値の範囲内であったことから、投与による影響ではないと判断した。

10 mg/kg 群の黄体数、着床数、着床後死亡率、胚・胎児死亡数、生存胎児数及び胎盤重量、0.4 mg/kg 群の全ての観察項目に異常は認められなかった。

胎盤にも異常は認められなかった。

#### 2. 膈内投与による母動物および胎生末期胎児への薬物動態（胚・胎児発生に関する実験：0.4 mg/kg 投与）

B. 研究方法、3-1. から得た試料に基づく結果を示す。

##### 2-1. 母動物

##### (1) 妊娠13日（投与終了時）

妊娠13日のthalidomide（表11）、5-hydroxythalidomide（表12）、及び5'-hydroxythalidomide（表13）の血漿中濃度推移およびTKパラメータを表11～表13に示した。

血漿推移およびTKパラメータの総括（平均値）を下図に示す。

##### Thalidomide（妊娠13日）

膈内投与量 (0.4 mg/kg/日)	
T <sub>max</sub> (h)	0.813
C <sub>max</sub> (ng/mL)	13.4
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	30.9

##### 5-hydroxythalidomide（妊娠13日）

膈内投与量 (0.4 mg/kg/日)	
T <sub>max</sub> (h)	1.06
C <sub>max</sub> (ng/mL)	0.155
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	0.345

### 5'-hydroxythalidomide (妊娠13日)

腔内投与量 (0.4 mg/kg/日)	
T <sub>max</sub> (h)	2.00
C <sub>max</sub> (ng/mL)	0.370
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	1.32

#### (2) 妊娠28日母動物 (表14)

妊娠28日の母動物血漿中には、thalidomide、5-hydroxythalidomide、及び5'-hydroxythalidomideのいずれも検出限界以下であり残留はないと判断した。

#### 2-2. 胎児 (妊娠28日、表15)

妊娠28日の胎児血漿中には、thalidomide、5-hydroxythalidomide、及び5'-hydroxythalidomideのいずれも選出限界以下であり残留はないと判断した。

#### 2-3. 小括

0.4 mg/kg 腔内投与時の妊娠13日母動物血漿中のサリドマイド濃度のC<sub>max</sub>は13.4 ng/mL、AUC<sub>0-t</sub>は30.9 h\*ng/mLであった。

今回得られた0.4 mg/kg 群の妊娠13日の結果は、別試験である、サリドマイドの0.4 mg/kg 又は10 mg/kgを同様に腔内投与し、妊娠1日及び13日のTK並びに妊娠13日の子宮内容物の濃度を測定した試験 (3-2. 参照) における妊娠1日 (C<sub>max</sub>=13.9 ng/mL、AUC<sub>0-t</sub>=84.9 h\*ng/mL) 及び妊娠13日の成績 (C<sub>max</sub>=9.41 ng/mL、AUC<sub>0-t</sub>=48.1 h\*ng/mL、後述) に近似していたことから、本試験の血中濃度には再現性があると考えられた。

性別が異なり単回投与後の成績であるが、この成績を令和2年度に実施した雄の単回投与試験の2 mg/kg 単回投与群の成績と比較すると、本試験における投与量は2 mg/kgの1/5であるのに対し、C<sub>max</sub>は約1/20倍、AUC<sub>0-t</sub>は約1/50倍にすぎなかった (下図)。

試験種	C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
雄単回 2 mg/kg/日	357 (319~417)	1733 (1740~1880)
雌腔内投与 (G13) 0.4 mg/kg/日	13.4 (2.67~46.2)	30.9 (11.8~75.6)

値：平均値 (最小値~最大値)

以上のことから、腔内投与時の血中濃度は同じ投与量の経口投与時の血中濃度を上回らないと判断した。

また、本試験におけるヒト型代謝物 (5-hydroxythalidomide) の平均C<sub>max</sub>及び平均AUC<sub>0-t</sub>はサリドマイドの1.2%及び1.1%であった。これらの値は雄の単回投与時の2 mg/kg群でのC<sub>max</sub> (1.3~1.6%) 及びAUC<sub>0-t</sub> (1.5から1.6%) での割合にほぼ等しかったことから、腔内投与の場合、経口投与と異なりfirst pass effectを受けない状況ではあるが、サリドマイド原体に対する代謝物の割合は経口投与の場合と大差がなかった。即ち、経口投与した場合と比較して、ヒト型代謝物の割合が上昇し、代謝物の危険性について考慮する必要はないと考えられた。

西村らの先行研究から精液中に含まれるサリドマイドが全量腔から吸収された場合でも、十分な安全係数を持って催奇形性が否定されると報告されていたが、本試験の結果、腔から吸収され、子宮内に到達するサリドマイド量は、経口投与により腸管から吸収され肝臓でのfirst pass effectを受けた場合の血中濃度よりもはるかに低い可能性が考えられたことから、先行

研究の仮説を実測値で示し、より安全であることが補強された。

### 3. 腔内投与による母動物および子宮内容物中の薬物動態 (胚・胎児への移行に関する実験 ; 0.4, 10 mg/kg/投与)

#### B.研究方法、3-2. の結果を示す。

#### 3-1. 母動物血漿中濃度 (0.4 および10 mg/kg 群)

初回投与日 (妊娠1日) および投与最終日 (妊娠13日) のthalidomide (表16)、5-hydroxythalidomide (表17)、及び5'-hydroxythalidomide (表18) の母動物血漿中濃度推移およびTKパラメータを表16~表18に示した。

TKパラメータ総括 (平均値) を下図に示す。

Thalidomide パラメータ	測定時期	腔内投与量 (mg/kg/日)	
		0.4	10
T <sub>max</sub> (h)	妊娠1日	4.00	4.00
	妊娠13日	4.00	4.75
C <sub>max</sub> (ng/mL)	妊娠1日	13.9	274
	妊娠13日	9.41	277
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	妊娠1日	84.9	3540
	妊娠13日	48.1	2340

5-hydroxy-thalidomide パラメータ	測定時期	腔内投与量 (mg/kg/日)	
		0.4	10
T <sub>max</sub> (h)	妊娠1日	4.00	4.00
	妊娠13日	4.00	4.38
C <sub>max</sub> (ng/mL)	妊娠1日	0.141	2.24
	妊娠13日	0.206	2.47
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	妊娠1日	0.619	25.6
	妊娠13日	0.761	19.3

5'-hydroxy-thalidomide パラメータ	測定時期	腔内投与量 (mg/kg/日)	
		0.4	10
T <sub>max</sub> (h)	妊娠1日	4.00	4.00
	妊娠13日	4.00	4.38
C <sub>max</sub> (ng/mL)	妊娠1日	1.09	10.0
	妊娠13日	0.668	7.85
AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	妊娠1日	6.62	124
	妊娠13日	2.88	72.4

#### (1) 妊娠1日 (初回投与日) (表16-1)

0.4 mg/kg 群の薬物動態パラメータは、前述した「B. 研究方法、3-1. 胚・胎児発生に関する実験」で得られた結果と近似しており、腔内投与初回 (妊娠1日) の血中濃度推移には再現性がみられた。

#### (2) 妊娠13日 (最終投与日) (表16-2)

不妊動物を除いた母動物のサリドマイド濃度のC<sub>max</sub>値を下記に示す。

母動物妊娠13日のサリドマイドC <sub>max</sub> 濃度ng/mL ; 平均値 (範囲)		
群 (mg/kg/日)	7時間	24時間
0.4	9.41 (1.73~26.0)	2.02 (1.24~11.7)
10	289 (87.8~507)	236 (107~358)

これらの測定値から1 mg/kgを腔内投与した場合の

Cmaxを求め、雄に2 mg/kgを単回経口投与した場合（令和2年度実施結果）のCmax が319～417 ng/mLを呈した状況と比較すると、膣内投与した場合のCmaxは、雄経口投与からの推定値よりも低値であることが確認された。

反復投与と単回投与、雄と妊娠雌、例数の差等、令和2年度実施の雄の実験と令和3年度実施した妊娠雌の実験では両者の条件は異なり、また、膣内投与の場合、雄の経口投与に比較して数値の偏差が大きいが、膣内投与では経口投与に比較して血中濃度は低値に保たれるものと考えられる。

### 3-2. 投与最終日（妊娠13日）の胎盤、卵黄囊膜および胚組織中濃度

子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、胚）中のThalidomide（表19）、5-hydroxythalidomide（表20）、及び5'-hydroxythalidomide（表21）濃度を表19～表21に示した。不妊動物を除いた、妊娠動物の血漿中濃度及び子宮内容物濃度の集計（平均値）を下図に示す。

#### (1) 0.4 mg/kg 群

妊娠13日の投与後7時間（7h）と24時間（24h）の子宮内容物中濃度の平均値を下表に示す。

不妊より除外した母動物番号：7h群：1102、24h群：1105

0.4 mg/kg 投与群（妊娠13日、7h, 24h 共に n=3）					
測定対象物質		母 (ng/mL)	胎盤 (ng/g)	卵黄囊膜 (ng/g)	胚 (ng/g)
Thalidomide	7h	5.09	2.04	1.73	2.14
	24h	0.791	0.335	0.440	BLQ
5-hydroxy-thalidomide	7h	0.045	BLQ	BLQ	BLQ
	24h	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
5'-hydroxy-thalidomide	7h	0.360	0.180	0.0877	0.148
	24h	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ; Blow the lower limit of quantification

最終投与後7時間では、thalidomideおよび5'-hydroxythalidomideが胎盤、卵黄囊膜、胚に認められたが、最終投与後24時間では、胎盤および卵黄囊膜は低値に近似値を示したが、胚は検出限界以下濃度であることがわかった。5-hydroxythalidomideは投与後7および24時間ともに子宮内容物中では検出限界であった。

#### (2) 10mg/kg 群

妊娠13日の投与後7時間後と24時間の子宮内容物濃度の平均値を下表に示す。

不妊より除外した動物番号：7h群：なし(n=4)、24h群：2106 (n=3)

10 mg/kg 投与群（妊娠13日、7h, n=3; 24h, n=4）					
測定対象物質		母 (ng/mL)	胎盤 (ng/g)	卵黄囊膜 (ng/g)	胚 (ng/g)
Thalidomide	7h	235.1	156	120	115
	24h	30.6	19.8	15.6	13.8
5-hydroxy-thalidomide	7h	2.07	1.30	0.844	0.196
	24h	0.266	0.198	0.0765	BLQ
5'-hydroxy-thalidomide	7h	5.25	4.30	2.78	2.48
	24h	1.362	1.30	0.855	0.742

BLQ; Blow the lower limit of quantification

得られた結果から、母体濃度に対して子宮内容物の濃度は、胎盤>卵黄囊膜>胚の順であった。

### 4. 膣内投与による母体から胎児への薬物移行率（最終投与日；妊娠13日）

B.研究方法、3-2.に基づく結果を示す。

#### 4-1. 子宮内容物中のサリドマイド濃度

最終膣内投与日である妊娠13日の投与後7時間および投与24時間の母動物血漿中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を示す。

##### (1) 0.4 mg/kg 群（表16-2、表19-1）

妊娠していた妊娠13日母動物の3腹（動物番号1101, 1103, 1104）の7時間値の母体血漿中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を比較すると、母動物血漿濃度の約2割が胎盤、卵黄囊膜、胚に認められた（下図）。

	平均値（範囲） ng/mL	組織中濃度/母血漿中濃度 平均値（範囲）
母血漿	5.09 (0.967～8.68)	—
胎盤	2.04 (0～4.46)	0.273 (0.31～0.51)
卵黄囊膜	1.73 (0～3.82)	0.243 (0.13～0.65)
G13胚	2.14 (0～5.64)	0.267 (0.29～0.44)

同様に、24時間値の妊娠していた母動物3腹（動物番号1106, 1107, 1108）の血中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を比較すると、胎盤には母動物血漿濃度の約5割弱が、卵黄囊膜には約3割が認められたが、胚には検出されなかった（下図）。

	平均値（範囲） ng/mL	組織中濃度/母血漿中濃度 平均値（範囲）
母血漿	0.791 (0.481～1.02)	—
胎盤	0.335 (0～1.17)	0.458 (0～1.15)
卵黄囊膜	0.440 (0～1.66)	0.327 (0～1.63)
G13胚	検出限界以下	検出限界以下

##### (2) 10 mg/kg 群（表16-2、表19-2）

妊娠していた妊娠13日母動物の4腹（動物番号2101, 2102, 2103, 2104）の7時間値の母体血漿中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を比較すると、胎盤では母動物血漿濃度の約6割が、卵黄囊膜および胚では約5割が認められた（次図）。

	平均値 (範囲) ng/mL	組織中濃度/母血漿中濃度 平均値 (範囲)
母血漿	235.1 (31.3~507)	—
胎盤	156.1 (12.3~428)	0.630 (0.20~0.89)
卵黄囊膜	120.4 (10.8~356)	0.518 (0.17~0.79)
G13胚	115.0 (8.01~265)	0.473 (0.13~0.71)

同様に、24時間値の妊娠していた母動物3腹（動物番号2105, 2107, 2108）の母体血中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を比較すると、胎盤では母動物血漿濃度の約7割が、卵黄囊膜および胚では母動物血漿濃度の約5割が分布していた（下図）。

	平均値 (範囲) ng/mL	組織中濃度/母血漿中濃度 平均値 (範囲)
母血漿	30.6 (4.38~74.4)	
胎盤	19.9 (3.02~50.1)	0.773 (0.23~1.54)
卵黄囊膜	15.6 (3.03~43.0)	0.549 (0.23~0.94)
G13胚	13.8 (2.22~38.2)	0.472 (0.17~0.84)

#### 4-2. 小括（サリドマイド）

胎児の血流循環は、胎盤で母体と物質交換をした後、胎児に入るまでの間に卵黄囊膜で代謝を受ける。今回、測定した子宮内各組織中のサリドマイド濃度は、児毎に多少のばらつきはあるものの、胎児を個別にみると大半の例で胎盤が最も高値で、胎児が最も低値を呈し、胎盤や卵黄囊膜、胎児におけるそれぞれの代謝を反映している可能性も考えられた。また、母動物の血中濃度と子宮内容物濃度の比較から、妊娠13日胚において、胎盤、卵黄囊膜、胎児のいずれもその組織中サリドマイド濃度は、母体の血漿中サリドマイド濃度に依存する部分が大いと考えられた。

腔内投与後のサリドマイドの分布に、外子宮口から子宮内への投与液の侵入、あるいは腔壁から腹腔内を通して子宮壁からの分布といった経路が存在するのであれば、子宮広間膜で腹腔内に保定されている子宮の解剖学的位置から、着床位置に応じて腔に一番近い胎児（右子宮角では胎児番号が最も大きく、左子宮角では胎児番号の最も小さな児）と卵巣に一番近い胎児（右子宮角では胎児番号が最も小さく、左子宮角では胎児番号が最も大きな児）の間では濃度に差があると考えられる。そこで、胎盤及び胚中サリドマイド濃度に、着床位置との関係による法則性が存在するか検討したとき、一定の傾向は認められなかったことから（表19、表20）、胎盤・卵黄囊膜及び胚への母体血流以外の経路からの分布は微量で、影響につき考慮する必要はないと考えられた。したがって、子宮内容物への移行は、血液を介する経路以外は無視できると考えられた。

生物学的薬物動態解析モデルにおいても投与後7時間までは投与経路による血中動態の差はないという結果を得ている（分担報告書-3参照；山崎分担）。

#### 4-3. 子宮内容物の水酸化代謝物濃度（表17、表18）

前述の通り、母動物の血漿中には、妊娠1日、妊娠13日

ともにサリドマイド原体の他に、ヒト型代謝物である5-hydroxythalidomide (5-OH体) とマウス型代謝物である5'-hydroxythalidomide (5'-OH体) が認められた。

下図に0.4および10 mg/kg 腔内投与群の投与初回（妊娠1日；G1）と最終投与日（妊娠13日；G13）におけるサリドマイド (THA) 原体と2種の水酸化物の薬物パラメータの比較を示した。

#### (1) Cmax

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のCmax (0.4 mg/kg群)				
	ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
G1		13.9	0.62	1.09
G13		9.41	0.21	0.68

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のCmax (0.4 mg/kg群)			
比率	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH/5-OH
G1	4.46	7.84	1.76
G13	2.19	7.10	3.24

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のCmax (10 mg/kg群)				
	ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
G1		274	2.24	10.00
G13		277	2.47	7.85

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のCmax (10 mg/kg群)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH/5-OH
G1	0.82	3.65	4.46
G13	0.89	2.83	3.18

腔内投与により、妊娠雌のC<sub>max</sub> は5'-OH体の値が、5-OH体の値に比較して高値であった。

#### (2) AUC<sub>0-t</sub>

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のAUC <sub>0-t</sub> (0.4 mg/kg群)				
	ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
G1		84.9	0.62	6.62
G13		48.1	0.76	2.88

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のAUC <sub>0-t</sub> (0.4 mg/kg群)			
比率	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH/5-OH
G1	0.73	7.80	10.68
G13	1.58	5.99	3.78

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のAUC <sub>0-t</sub> (10 mg/kg群)				
	ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
G1		3540	25.6	124.0
G13		2340	19.3	72.4

サリドマイド(THA) 原体と2種代謝物のAUC <sub>0-t</sub> (10 mg/kg群)			
比率	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH/5-OH
G1	0.72	3.50	4.84
G13	0.82	3.09	3.75

腔内投与により、妊娠雌のAUC<sub>0-t</sub>はC<sub>max</sub>と同様に、5'-OH体の値が5-OH体の値に比較して数倍高値であった。

R2年度に実施した雄の経口投与試験では、両代謝物濃度には大差はなかった。腔内投与時に認められた両代謝物量の違いが、性差に由来するものか、投与経路の差による吸収分布、または分布の差によるものかは別途検討が必要である。

#### 4-4. サリドマイドと水酸化代謝物の割合 (表17～表20)

臍内投与において、妊娠1日に比較して妊娠13日で血中濃度が大幅に増加することはなく、蓄積性はないことが明らかになったことから、最終臍内投与日(妊娠13日)の投与後7時間および24時間における子宮内容試料採取時点での母動物(表17-2、表18-2)および子宮内容物(表19、表20)について、サリドマイド及び2種類の代謝物濃度の比率を算出し、比較した。

下記の評価対象は不妊動物を除外している。

##### (1) 0.4 mg/kg群

0.4 mg/kg 群の投与後7時間における結果を次表に示す。

0.4 mg/kg 群、投与後7時間、組織中濃度 (平均値)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
母動物血漿	5.09	0.04	0.36
胎盤	2.04	BLQ	0.18
卵黄囊膜	1.73	BLQ	0.09
G13胚	2.14	BLQ	0.15

BLQ; Blow the lower limit of quantification

0.4 mg/kg 群、投与後7時間、比率 (平均値)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH /5-OH
母動物血漿	0.79	7.07	8.4
胎盤	NC	8.82	NC
卵黄囊膜	NC	5.20	NC
G13胚	NC	7.01	NC

NC; Not calculated

0.4 mg/kg 群の投与後24時間における結果を示す。

0.4 mg/kg 群、投与後24時間、組織中濃度 (平均値)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
母動物血漿	0.791	BLQ	BLQ
胎盤	0.335	BLQ	BLQ
卵黄囊膜	0.440	BLQ	BLQ
G13胚	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ; Blow the lower limit of quantification

0.4 mg/kg 群、投与後24時間、比率 (平均値)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH /5-OH
母動物血漿	NC	NC	NC
胎盤	NC	NC	NC
卵黄囊膜	NC	NC	NC
G13胚	NC	NC	NC

NC; Not calculated

サリドマイド原体と比較し、2種の代謝物の子宮内容物への移行率は少なかった。最終臍内投与日である妊娠13日の投与後7時間および24時間後の0.4 mg/kg 群は、母体血中の約4割のサリドマイド子宮内容物へ移行していたが、代謝物は検出限界以下の濃度であった。

##### (2) 10 mg/kg 群

10 mg/kg 群の投与後7時間における結果を示す。

10 mg/kg 群、投与後7時間 (平均値)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
母動物血漿	235.1	2.07	5.25
胎盤	155.8	1.30	4.30
卵黄囊膜	120.4	0.84	2.78
G13胚	114.9	0.20	2.48

10 mg/kg 群、投与後7時間、比率 (平均値)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH /5-OH
母動物血漿	0.9	2.2	254
胎盤	0.8	2.7	331
卵黄囊膜	0.7	2.3	331
G13胚	0.2	2.2	124

10 mg/kg 群の投与後24時間における結果を示す。

10 mg/kg 群、投与後24時間 (平均値)			
ng/mL	THA	5-OH	5'-OH
母動物血漿	30.6	0.266	1.362
胎盤	19.8	0.20	1.31
卵黄囊膜	15.6	0.08	0.86
G13胚	13.8	BLQ	0.74

10 mg/kg 群、投与後24時間、比率 (平均値)			
	5-OH/THA (%)	5'-OH /THA (%)	5'-OH /5-OH
母動物血漿	0.9	4.5	5.12
胎盤	1.0	6.6	6.55
卵黄囊膜	0.5	5.5	10.75
G13胚	NC	5.4	NC

NC; Not calculated

#### 4-5. 小括 (水酸化代謝物)

サリドマイド及びその2種類の代謝物の子宮内容物におけるCmax及びAUCで比較した結果、Cmax又はAUCo-tの5-OH体の血漿中濃度はサリドマイドの1割程度、5'-OH体は5-OH体の数倍の濃度であった(C 研究結果及び考察、3-1 母動物血漿中濃度)。

妊娠13日の最終臍内投与後7時間及び24時間に母動物から採血して得られた母動物血漿中、及び、同時点で帝王切開して得られた胎盤、卵黄囊膜及び胎児中のサリドマイド原体及び2種類の代謝物の濃度を比較すると、10 mg/kg群では5-OH体の濃度はサリドマイド濃度の0.2~0.9%、5'-OH体濃度は5-OH体濃度の1.24倍~10.7倍を示し、Cmaxの成績とほぼ変わらなかった。また、両代謝物の比は胎盤、卵黄囊膜の間で大きな差はなかった。これらの器官・組織では、胎児循環に沿って胎盤、卵黄囊膜、胎児の順にサリドマイドの測定値が低下していく傾向がみられ、サリドマイドの代謝が起こっていると考えられるものの、組織中に代謝物が蓄積していないと考えられた。

0.4 mg/kg 群では母動物5-OH体の測定限界値未満の成績が比較的多かったが、これらは単純に曝露量が少なかったことによると考えられた。

最終臍内投与日である妊娠13日の投与後7時間および24時間後の10 mg/kg 群は、母体血中の約5-6割サリドマイドが子宮内容物へ移行していたが、5-OH体の割合は胎児では全体に低かった。

また、10 mg/kg 群では、卵黄囊膜の5-OH体濃度が高いものが存在したが、胚中の5-OH体濃度が低値である点を除き、大きな変化ではなかった。

個体別に精査すると、卵黄囊膜において5-OH体が高い例（表20-2、動物番号2013）では、胎盤中濃度を上回る例が複数認められ、胎盤の2倍以上の濃度を示す例が複数認められた母動物では、胚中の5-OH体濃度は低値である傾向がみられた。

同様な傾向は軽度ながらもサリドマイドにおいてもみられたが、5'-OH体ではみられず、サリドマイドと5-OH体が卵黄囊膜に蓄積している胚が存在する可能性が考えられた。

3.その他  
なし

#### D. 結論

令和2年度に実施した催奇形性発現量をウサギに投与した実験を基に、最大精漿中移行濃度の100倍量を妊娠ウサギの膈内に妊娠1日から13日まで反復投与した結果、母動物の体重および摂餌量には影響はなく、着床数、胚胎児死亡率にも影響はなかった。

膈内投与により母動物にサリドマイドの蓄積性はなかった。子宮内の着床位置に、サリドマイドおよび水酸化代謝物濃度は影響を受けなかったことから、膈内投与後、母動物の全身循環を介し、胎盤、卵黄囊膜、胎児へと移行すると考えられた。また、経口投与と比較して、膈内投与による血中移行は低いことが明らかになった。

令和4年度は膈内投与実験の結果を基に、経口投与による奇形発現の際の妊娠ウサギでの血中濃度と比較し（添付資料2）、その濃度差を明らかにした後、現行のテストガイドラインを考慮しながら、種差および薬物動態を加味した雄性生殖を介した新規発生毒性試験評価法を提案する予定である。

#### 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) Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., Kitajima, S. and Yamazaki, H. Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species J Toxicol Sci, 46, 553-560, 2021

##### 2. 学会発表

1) 栗形麻樹子、高島宏昌、羽田亮、田中加奈子、長谷川拓郎、山崎浩史、北嶋聡：雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価、第48回日本毒性学会学術年会（2021. 7. 7）

2) 高島宏昌、羽田亮、田中加奈子、関美沙、長谷川拓郎、山崎浩史、北嶋聡、栗形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形性作用確認、第61回日本先天異常学会学術集会（2021. 8. 7）

#### 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



## 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、令和2年度に構築し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用いて、今年度実施した雌性ウサギを用いた膈内投与試験から得られた母動物血中濃度とモデル出力結果値とを比較した。

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する。

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'-水酸化体で代謝される。分担研究として、雄性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。ついで雌性ウサギの膈内投与後の実測血中濃度推移を、本雄性モデルでの経口投与後出力と比較し、サリドマイド胎内動態の可視化を試みた。

B. 研究方法

昨年度 (R2年度) に実施した雄性ウサギにサリドマイドを経口投与後の血漿中濃度時間推移の結果から、消化管、肝、全身循環および腎からなる生理学的薬物動態モデルの重要パラメータである吸収速度定数、分布容積および肝固有代謝消失速度定数をそれぞれ決定し、サリドマイドの雄性ウサギ体内動態を再現する生理学的薬物動態モデルを構築した。

今年度 (R3年度) は雄性ウサギに250 mg/kg/日のサリドマイドを経口投与した際の最大精漿中移行濃度の100倍量である0.4 mg/kg/日、および調製可能最大濃度である10 mg/kg/日を雌性ウサギに膈内投与し、母動物および子宮内の産物 (胎盤、卵黄囊膜、胎児) へのサリドマイドおよび2種の水酸化体 (5'-水酸化体サリドマイドおよび5'-水酸化体サリドマイド) の移行を液体クロマトグラフ-質量分析計により測定した。

膈内投与は妊娠1日から妊娠13日とした。初回投与日 (妊娠1日) および最終投与日 (妊娠13日) に経時的に母動物から採血し、膈内投与により得られた母動物血

漿中濃度と、サリドマイドを経口投与し雄性ウサギ用に構築した生理学的薬物動態モデルとの出力結果と比較し、膈内投与と経口投与との生体内血中濃度推移を比較した。

膈内投与試験の実験方法および結果は、分担研究-2 (葉形担当) を参照。

(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. 研究結果および考察

雄性ウサギ用に構築した生理学的薬物動態モデルを用い、膈内投与試験の投与量である0.4および10 mg/kg用量にてウサギに仮想経口投与したモデル出力結果値と、雌性ウサギに同用量を経膈投与した際の実測値を比較した。

その結果、経膈投与1日 (妊娠1日) と投与13日 (妊娠13日) の投与後4時間および7時間のウサギ血漿中サリドマイド、5'-水酸化体サリドマイドおよび5'-水酸化体サリドマイド濃度の実測血中濃度 (表16、表17、表18) は仮想出力値とほぼ一致した (図1)。

D. 結論

昨年度構築した、サリドマイドの雄性ウサギ体内動態を再現する生理学的薬物動態モデルを用いて、膈内投与後の母動物血中実測値濃度とモデル出力値を比較した結果、両者はほぼ一致した。即ち、投与経路、性差、妊娠日、投与量に関係なく、サリドマイドは生体内へ移行、代謝していることが示唆された。

膈内投与後、サリドマイドは膈粘膜下の血管から吸収され全身循環に入ったのち、子宮内の胎児へ到達すると考える一助となる結果であった。

令和4年度は、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、奇形発現の際の雌性ウサギ経口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。

#### 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) Miura, T., Uehara, S., Shimizu, M., Suemizu, H., and Yamazaki, H. Pharmacokinetics of Primary Oxidative Metabolites of Thalidomide in Rats and in Chimeric Mice Humanized with Different Human Hepatocytes. J Toxicol Sci, 46, 311-317, 2021
- 2) Kamiya, Y., Handa, K., Miura, T., Ohori, J., Shimizu, M., Kitajima, M., Shono, F., Funatsu, K., and Yamazaki, H. An Updated *In Silico* Prediction Method for Volumes of Systemic Circulation of 323 Disparate Chemicals for Use in Physiologically Based Pharmacokinetic Models to Estimate Plasma and Tissue Concentrations after Oral Doses in Rats. Chem Res Toxicol 34, 2180-2183, 2021
- 3) Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., Kitajima, S. and Yamazaki, H. Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species J Toxicol Sci, 46, 553-560, 2021
- 4) Kamiya, Y., Handa, K., Miura, T., Ohori, J., Kato, A., Shimizu, M., Kitajima, M., and Yamazaki, H. Machine Learning Prediction of the Three Main Input Parameters of a Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Model Subsequently Used to Generate Time-Dependent Plasma Concentration Data in Humans after Oral Doses of 212 Disparate Chemicals. Biol Pharm Bull, 45, 124-128, 2022.

##### 2. 学会発表

- 1) 山崎浩史: CBI学会2021年大会シンポジウム「AI-SH IPSにおける一般化学物質の吸収および体内動態予測手法開発」2021年10月、東京（オンライン）
- 2) 山崎浩史: 2021 International Workshop for Non-animals Approaches in Food Sector, Prediction of metabolic fates of food chemicals for risk assessment, October 2021, Tokyo (online).

#### 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
Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., Kitajima, S. and Yamazaki, H.	Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species	J Toxicol Sci	46	553-560	2021
Miura, T., Uehara, S., Shimizu, M., Suemizu, H., and Yamazaki, H.	Pharmacokinetics of Primary Oxidative Metabolites of Thalidomide in Rats and in Chimeric Mice Humanized with Different Human Hepatocytes.	J Toxicol Sci	46	311-317	2021
Kamiya, Y., Handa, K., Miura, T., Ohori, J., Shimizu, M., Kitajima, M., Shono, F., Funatsu, K., and Yamazaki, H.	An Updated <i>In Silico</i> Prediction Method for Volumes of Systemic Circulation of 323 Disparate Chemicals for Use in Physiologically Based Pharmacokinetic Models to Estimate Plasma and Tissue Concentrations after Oral Doses in Rats.	Chem Res Toxicol	34	2180-2183	2021
Kamiya, Y., Handa, K., Miura, T., Ohori, J., Kato, A., Shimizu, M., Kitajima, M., and Yamazaki, H.	Machine Learning Prediction of the Three Main Input Parameters of a Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Model Subsequently Used to Generate Time-Dependent Plasma Concentration Data in Humans after Oral Doses of 212 Disparate Chemicals.	Biol Pharm Bull	45	124-128	2022

## IV.資料

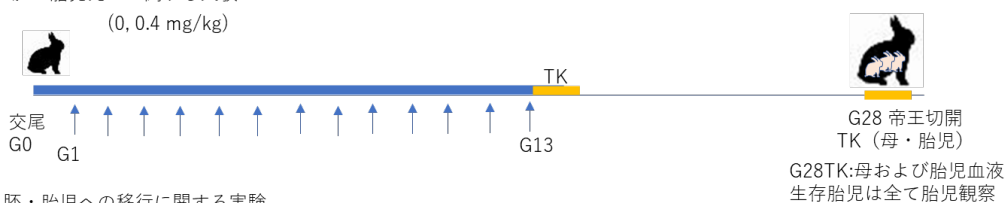
1. 妊娠雌ウサギを用いた腔内投与発生毒性試験(令和3年度実施)

目的：精漿を介した母体および胎児への影響を確認

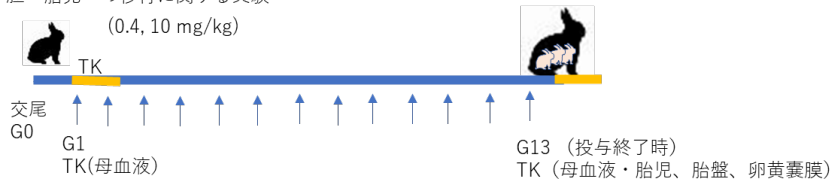
1. 群構成

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	容量/腔 mL/kg*	投与期間	解剖時期	動物数(妊娠雌)
1	0	0.05	G1-G13	G28	8
2 (TK)	0.4	0.05	G1-G13	G28	16(14)
3 (TK)	10	0.05	G1-G13	G13	8(7)

試験1 胚・胎児発生に関する実験



試験2 胚・胎児への移行に関する実験

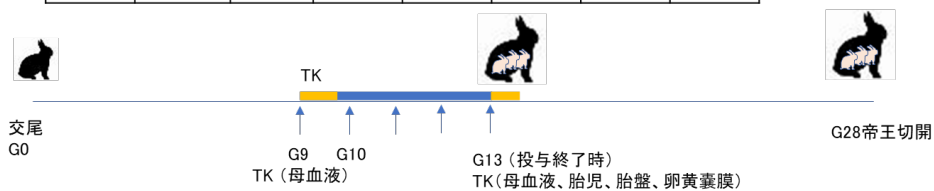


2. 奇形発現量における妊娠雌ウサギを用いた経口投与毒性試験(R4年度実施)

目的: 催奇形性が発現する用量での母体および胎児血中濃度を確認

1. 群構成

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	容量/ mL/kg	動物数 (妊娠雌)	投与期 間	G9採血	G13採血	G28 帝王切開
1	0	10	4	G9-G13		-	○
2(TK)	25	10	8	G9-G13	○	○	○
3(TK)	250	10	8	G9-G10	○	-	○



膣内投与結果と比較し、膣内投与では奇形発現濃度に達していないことを確認

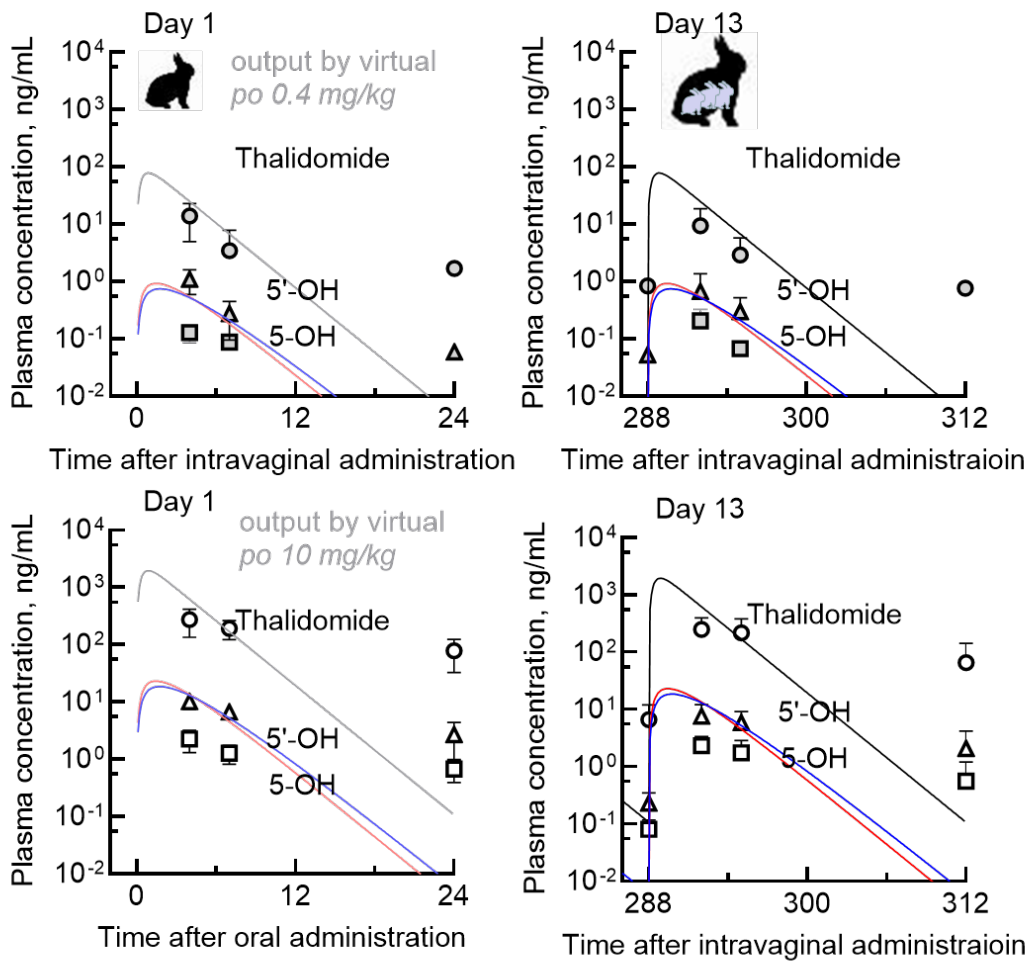


図1 生理学的薬物動態モデルによる出力結果値と膣内投与による実測値との比較



表 1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による母動物体重推移・胎・胎児発生に関する実験

Test article		Gestational day										
Dose		0	3	6	8	10	12	13	14	16	19	22
		Treatment period (GD1-GD13)										
thalidomide	n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
0 mg/kg	Mean	3.09	3.18	3.25	3.28	3.33	3.35	3.35	3.38	3.43	3.48	3.51
	S.D.	0.17	0.20	0.20	0.21	0.20	0.22	0.21	0.22	0.23	0.22	0.23
thalidomide	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
0.4 mg/kg	Mean	3.08	3.20	3.26	3.28	3.30	3.32	3.31	3.29	3.40	3.48	3.49
	S.D.	0.14	0.17	0.14	0.15	0.17	0.21	0.18	0.15	0.16	0.17	0.17

Test article		Gestational day		
Dose		24	26	28
thalidomide	n	7	7	7
0 mg/kg	Mean	3.53	3.58	3.62
	S.D.	0.22	0.22	0.22
thalidomide	n	8	8	8
0.4 mg/kg	Mean	3.53	3.60	3.65
	S.D.	0.16	0.15	0.15

Not significantly different from thalidomide 0 mg/kg

n: Number of dams

表 2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による母動物体重増加量: 胚・胎児発生に関する実験

Test article	Dose	Body weight gain			
		GDs1-14	GDs14-28	GDs0-28	
thalidomide	n	7	7	7	
	0 mg/kg	Mean	0.20	0.24	0.53
		S.D.	0.04	0.08	0.09
thalidomide	n	8	8	8	
	0.4 mg/kg	Mean	0.10	0.35	0.57
		S.D.	0.10	0.08	0.04
		A2 *	T2 *	NS	

NS; Not significantly different from thalidomide 0 mg/kg

Significantly different from thalidomide 0 mg/kg : \* P<0.05

A2 : Welch test (two-side)

T2 : Student t-test (two-side)

n: Number of dams

表3 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与後の帝王切開所見: 胚・胎児発生に関する実験

Test article	Dose	Number of corpora lutea	Number of implantation	Preimplantation loss (%) a)	Implantation index (%) b)	Number of resorptions Total c)	Postimplantation loss (%) Total d)	Number of live fetuses			Sex rate (fetuses) (%) e)	Fetal weight (g)			Placental weight (g)		
								Male	Female	Total		Male	Female	Total	Male	Female	Total
thalidomide	n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	26/54	7	7	7	7	7	7
0 mg/kg	Mean	8.7	8.1	5.2	94.8	0.4	6.0	3.7	4.0	7.7	48.1	35.12	35.55	35.26	5.07	5.14	5.10
	S.D.	1.6	1.3	13.8	13.8	0.8	10.5	1.5	1.0	1.8		2.80	2.76	2.70	0.64	0.63	0.63
thalidomide	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	25/64	8	8	8	8	8	8
0.4 mg/kg	Mean	9.3	8.3	10.9	89.1	0.3	2.7	3.1	4.9	8.0	39.1	35.86	33.71	34.60	5.33	5.21	5.30
	S.D.	1.2	2.0	17.5	17.5	0.5	5.1	1.4	2.0	1.9		2.67	3.99	3.38	0.52	0.77	0.59

Not significantly different from thalidomide 0 mg/kg

n: Number of dams

a):  $[(\text{Number of corpora lutea} - \text{Number of implantations}) / \text{Number of corpora lutea}] \times 100$

b):  $(\text{Number of implantations} / \text{Number of corpora lutea}) \times 100$

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

d):  $(\text{Number of resorptions} / \text{Number of implantations}) \times 100$

e):  $(\text{Number of live male fetuses} / \text{Number of live fetuses}) \times 100$

表 4 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胚・胎児死亡数：胚・胎児発生に関する実験

Test article	Number of implan- tation	Number of resorptions								Postimplantation loss(%) a)						
		i	r	p	e	l	d	Total	i	r	p	e	l	d	Total	
thalidomide	n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
0 mg/kg	Mean	8.1	0.0	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.4	0.0	4.2	0.0	1.8	0.0	0.0	6.0
	S.D.	1.3	0.0	0.5	0.0	0.4	0.0	0.0	0.8	0.0	7.2	0.0	4.7	0.0	0.0	10.5
thalidomide	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
0.4 mg/kg	Mean	8.3	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7
	S.D.	2.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1

i : Implantation site, r : Resorbed embryo, p : Placental remnant, e : Early macerated fetus, l : Late macerated fetus, d : Dead fetus

Not significantly different from thalidomide 0 mg/kg

n: Number of dams

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

表 5 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胎児外表観察：胚・胎児発生に関する実験

Test article	thalidomide	thalidomide
Dose	0	0.4
Dose unit	mg/kg	mg/kg
Number of dams	7	8
Number of fetuses	54	64
Number of dams with anomalous fetuses (incidence %) a)	0 (0.0)	0 (0.0)
Number of fetuses with any anomaly (incidence %) b)	0 (0.0)	0 (0.0)

Not significantly different from thalidomide 0 mg/kg

n: Number of dams

a): (Number of dams bearing live fetuses with external anomalies / Number of dams) x 100

b): (Number of fetuses with external anomalies / Number of live fetuses examined) x 100

表 6 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎児内臓観察：胚・胎児発生に関する実験

Test article		thalidomide	thalidomide
Dose		0	0.4
Dose unit		mg/kg	mg/kg
Number of dams		7	8
Number of fetuses		54	64
<hr/>			
Number of dams with anomalous fetuses (incidence %)	a)	1(14.3)	0(0.0)
Number of fetuses with any anomaly (incidence %)	b)	1(1.4)	0(0.0)
<hr/>			
Number of dams with variant fetuses (incidence %)	a)	3 (42.9)	2 (25.0)
Number of fetuses with any variation (incidence %)	b)	6 (9.5)	2 (3.5)
<hr/>			
Abnormality			
Diaphragmatic hernia	n	1(1)	0(0)
	Mean	1.4	
	S.D.	3.8	
<hr/>			
Variation			
Absent accessory lung lobe	n	5 (2)	0 (0)
	Mean	7.5	
	S.D.	12.9	
Retrocaval ureter	n	1 (1)	2 (2)
	Mean	2.0	3.5
	S.D.	5.4	6.6

n : Number of variant fetuses (number of dams with variant fetuses)

Mean : Number of variant fetuses / Number of fetuses examined x 100(%), on litter basis

Not significantly different from thalidomide 0 mg/kg

a): (Number of dams bearing live fetuses with visceral abnormalities or variations / Number of dams) x 100

b): (Number of fetuses with visceral abnormalities or variations / Number of fetuses examined) x 100

表7 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎児骨格観察：胚・胎児発生に関する実験

Test article		thalidomide	thalidomide
Dose		0	0.4
Dose unit		mg/kg	mg/kg
Number of dams		7	8
Number of fetuses		54	64
<hr/>			
Number of dams with anomalous fetuses (incidence %) a)		1(14.3)	2(25.0)
Number of fetuses with any anomaly (incidence %) b)		1(1.4)	2(3.5)
<hr/>			
Number of dams with variant fetuses (incidence %) a)		6 (85.7)	7 (87.5)
Number of fetuses with any variation (incidence %) b)		17 (34.1)	29 (44.9)
<hr/>			
Abnormality			
Fused sternebra	n	1(1)	1(1)
	Mean	1.4	1.4
	S.D.	3.8	3.9
Fused rib	n	0(0)	1(1)
	Mean		2.1
	S.D.		5.9
Fused thoracic arch	n	0(0)	1(1)
	Mean		2.1
	S.D.		5.9
Hemicentric thoracic centrum	n	0(0)	1(1)
	Mean		2.1
	S.D.		5.9
<hr/>			
Variation			
Split sternebra	n	2 (2)	2 (1)
	Mean	5.2	4.2
	S.D.	9.0	11.8
Split thoracic centrum	n	0 (0)	1 (1)
	Mean		2.1
	S.D.		5.9
27 presacral vertebrae	n	15 (5)	24 (5)
	Mean	28.8	35.9
	S.D.	24.2	31.4
25 presacral vertebrae	n	0 (0)	1 (1)
	Mean		2.1
	S.D.		5.9
Unossified talus	n	0 (0)	2 (2)
	Mean		2.8
	S.D.		5.3

n : Number of variant fetuses (number of dams with variant fetuses)

Mean : Number of variant fetuses / Number of fetuses examined x 100(%) , on litter basis

Not significantly different from thalidomide 0 mg/kg

a): (Number of dams bearing live fetuses with skeletal abnormalities or variations / Number of dams) x 100

b): (Number of fetuses with skeletal abnormalities or variations / Number of fetuses examined) x 100

表 8-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎児主要部位骨化数観察：胚・胎児発生に関する実験

(1) 胸骨、仙尾椎骨、手骨

Test article		thalidomide	thalidomide
Dose		0	0.4
Dose unit		mg/kg	mg/kg
Number of dams		7	8
Number of fetuses		54	64
Sternebra	Mean	5.43	5.50
	S.D.	0.56	0.52
Sac.&caud. Vertebra	Mean	19.01	19.24
	S.D.	0.48	0.36
Metacarpal phalanges of forelimbs R	Mean	4.68	4.61
	S.D.	0.30	0.22
Metacarpal phalanges of forelimbs L	Mean	4.68	4.66
	S.D.	0.27	0.20
Proximal phalanges of forelimbs R	Mean	5.00	5.00
	S.D.	0.00	0.00
Proximal phalanges of forelimbs L	Mean	5.00	5.00
	S.D.	0.00	0.00
Middle phalanges of forelimbs R	Mean	3.88	3.74
	S.D.	0.11	0.43
Middle phalanges of forelimbs L	Mean	3.90	3.73
	S.D.	0.08	0.43
Distal phalanges of forelimbs R	Mean	5.00	5.00
	S.D.	0.00	0.00
Distal phalanges of forelimbs L	Mean	5.00	5.00
	S.D.	0.00	0.00

Not significantly different from thalidomide 0 mg/kg

Sac.&caud.: sacral and caudal



表 8-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎児主要部位骨化数観察：胚・胎児発生に関する実験

(2) 足骨

Test article		thalidomide	thalidomide
Dose		0	0.4
Dose unit		mg/kg	mg/kg
Number of dams		7	8
Number of fetuses		54	64
Metatarsal phalanges of hindlimbs R	Mean	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00
Metatarsal phalanges of hindlimbs L	Mean	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00
Proximal phalanges of hindlimbs R	Mean	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00
Proximal phalanges of hindlimbs L	Mean	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00
Middle phalanges of hindlimbs R	Mean	3.98	3.95
	S.D.	0.05	0.13
Middle phalanges of hindlimbs L	Mean	3.98	3.95
	S.D.	0.06	0.13
Distal phalanges of hindlimbs R	Mean	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00
Distal phalanges of hindlimbs L	Mean	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00

Not significantly different from thalidomide 0 mg/kg

表 9 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膣内投与による母動物体重推移: 胚・胎児への移行に関する実験

Test article	Dose	Gestational day (GD)								Body weight gain (GDs 0-13)
		0	3	6	8	10	12	13	14	
		Intravaginal treatment days (GDs 1-13)								
thalidomide	n	6	6	6	6	6	6	6	3	6
0.4 mg/kg	Mean	3.15	3.21	3.27	3.32	3.34	3.38	3.39	3.31	0.18
	S.D.	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	0.14	0.05	0.03
thalidomide	n	7	7	7	7	7	7	7	3	7
10 mg/kg	Mean	3.17	3.26	3.37	3.39	3.43	3.44	3.45	3.35	0.19
	S.D.	0.12	0.09	0.10	0.09	0.09	0.10	0.10	0.05	0.05

n: Number of dams

表 10 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与後の帝王切開所見: 胚・胎児への移行に関する実験

Test article	Dose	Number of corpora lutea	Number of implantation	Preimplantation loss (%) a)	Implantation index (%) b)	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total c)	Number of live embryos Total	Placental weight(g)	
									GD13	GD14
thalidomide	n	6	6	6	6	6	6	6	3	3
0.4 mg/kg	Mean	8.7	8.3	3.9	96.1	0.0	0.0	8.3	1.79	2.06
	S.D.	1.2	1.4	6.1	6.1	0.0	0.0	1.4	0.15	0.02
thalidomide	n	7	7	7	7	7	7	7	4	3
10 mg/kg	Mean	8.7	6.6	26.2	73.8	0.4	8.3	6.1	1.52	2.12
	S.D.	1.6	3.3	33.4	33.4	0.8	14.4	3.4	0.28	0.30

n: Number of dams

GD: Gestation Day

a):  $[(\text{Number of corpora lutea} - \text{Number of implantations}) / \text{Number of corpora lutea}] \times 100$

b):  $(\text{Number of implantations} / \text{Number of corpora lutea}) \times 100$

c):  $(\text{Number of resorptions} / \text{Number of implantations}) \times 100$

表11 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膣内投与による母動物血漿中サリドマイド濃度及びTKパラメータ（妊娠13日）：胚・胎児発生に関する実験

(1) Thalidomide

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)						
		Pre	0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	
0.4	2101	BLQ	1.25	2.67	2.53	2.17	BLQ	
	2102	BLQ	6.04	7.45	7.08	3.10	1.21	
	2103	0.472	4.85	4.46	2.52	1.10	0.492	
	2104	BLQ	46.2	35.1	13.5	2.02	0.606	
	2105	BLQ	15.1	24.9	15.0	5.42	1.90	
	2106	BLQ	5.80	6.61	4.64	0.966	BLQ	
	2107	BLQ	4.64	5.98	4.88	2.17	0.826	
	2108	BLQ	8.91	6.05	2.77	0.520	BLQ	
	Mean	NC	11.6	11.7	6.62	2.18	0.629	
SD	NC	14.6	11.7	4.97	1.55	0.676		

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

NC: Not calculated

(2) TKパラメータ (thalidomide)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	TK parameter		
		C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
0.4	2101	2.67	1.00	11.8
	2102	7.45	1.00	28.8
	2103	4.85	0.500	13.2
	2104	46.2	0.500	75.6
	2105	24.9	1.00	65.1
	2106	6.61	1.00	17.2
	2107	5.98	1.00	20.8
	2108	8.91	0.500	14.4
	Mean	13.4	0.813	30.9
SD	14.9	0.259	25.1	

表12 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物血漿中5-hydroxythalidomide濃度及びTKパラメータ（妊娠13日）：胚・胎児発生に関する実験

(1) 5-hydroxythalidomide

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)					
		Pre	0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h
0.4	2101	BLQ	BLQ	BLQ	0.0448	BLQ	BLQ
	2102	BLQ	0.0944	0.172	0.141	0.0551	BLQ
	2103	BLQ	BLQ	0.0417	BLQ	BLQ	BLQ
	2104	BLQ	0.222	0.269	0.144	BLQ	BLQ
	2105	BLQ	0.227	0.347	0.234	0.0831	BLQ
	2106	BLQ	0.0704	0.0816	0.0556	BLQ	BLQ
	2107	BLQ	0.0557	0.0809	0.0697	BLQ	BLQ
	2108	BLQ	0.201	0.142	0.0615	BLQ	BLQ
	Mean	NC	0.109	0.142	0.0938	0.0173	NC
SD	NC	0.0952	0.118	0.0743	0.0329	NC	

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0400 ng/mL)

NC: Not calculated

(2) TKパラメータ (5-hydroxythalidomide)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	TK parameter		
		C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
0.4	2101	0.0448	2.00	0.0672
	2102	0.172	1.00	0.525
	2103	0.0417	1.00	0.0313
	2104	0.269	1.00	0.529
	2105	0.347	1.00	0.933
	2106	0.0816	1.00	0.180
	2107	0.0809	1.00	0.193
	2108	0.201	0.500	0.299
	Mean	0.155	1.06	0.345
SD	0.112	0.417	0.302	

表13 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物血漿中5'-hydroxythalidomide濃度及びTKパラメータ（妊娠13日）：胚・胎児発生に関する実験

(1) 5'-hydroxythalidomide

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)					
		Pre	0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h
0.4	2101	BLQ	BLQ	0.0721	0.160	0.213	BLQ
	2102	BLQ	0.0537	0.171	0.291	0.200	0.0595
	2103	BLQ	0.0681	0.110	0.126	0.0904	BLQ
	2104	BLQ	0.481	0.843	0.806	0.234	BLQ
	2105	BLQ	0.173	0.482	0.694	0.382	0.140
	2106	BLQ	0.0848	0.240	0.283	0.119	BLQ
	2107	BLQ	0.0451	0.152	0.258	0.148	0.0743
	2108	BLQ	0.143	0.253	0.231	0.0445	BLQ
	Mean	NC	0.131	0.290	0.356	0.179	0.0342
SD	NC	0.152	0.256	0.252	0.104	0.0525	

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0400 ng/mL)

NC: Not calculated

(2) TKパラメータ (5'-hydroxythalidomide)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	TK parameter		
		C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
0.4	2101	0.213	4.00	0.827
	2102	0.291	2.00	1.18
	2103	0.126	2.00	0.532
	2104	0.843	1.00	2.67
	2105	0.694	2.00	2.65
	2106	0.283	2.00	0.944
	2107	0.258	2.00	1.01
	2108	0.253	1.00	0.719
	Mean	0.370	2.00	1.32
SD	0.254	0.926	0.851	

表14 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与後の母動物血漿中サリドマイド及び代謝物濃度(妊娠28日)：胚・胎児発生に関する実験

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)		
		Thalidomide	5-hydroxythalidomide	5'-hydroxythalidomide
0.4	2101	BLQ	BLQ	BLQ
	2102	BLQ	BLQ	BLQ
	2103	BLQ	BLQ	BLQ
	2104	BLQ	BLQ	BLQ
	2105	BLQ	BLQ	BLQ
	2106	BLQ	BLQ	BLQ
	2107	BLQ	BLQ	BLQ
	2108	BLQ	BLQ	BLQ
	Mean	NC	NC	NC
	SD	NC	NC	NC

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/mL for thalidomide; 0.0400 ng/mL for 5-hydroxy/5'-hydroxy-thalidomide)

NC: Not calculated

表15-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎児血漿中サリドマイド濃度(妊娠28日): 胚・胎児発生に関する実験

(1) thalidomide

Dose level (mg/kg)	fetus No.	Concentration (ng/mL)							
		2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108
0.4	R-1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ
	R-2	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	R-3	-	-	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	R-4	-	-	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	-
	R-5	-	-	-	BLQ	-	-	BLQ	-
	R-6	-	-	-	BLQ	-	-	BLQ	-
	R-7	-	-	-	-	-	-	BLQ	-
	L-1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	L-2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ
	L-3	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-
	L-4	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ	BLQ	-
	L-5	-	BLQ	BLQ	-	-	BLQ	-	-
	L-6	-	BLQ	BLQ	-	-	-	-	-
	L-7	-	BLQ	-	-	-	-	-	-
Mean		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
SD		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

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

NC: Not calculated



表15-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎児血漿中5-hydroxythalidomide濃度(妊娠28日)：胚・胎児発生に関する実験

(2) 5-hydroxythalidomide

Dose level (mg/kg)	fetus No.	Concentration (ng/mL)							
		2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108
0.4	R-1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ
	R-2	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	R-3	-	-	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	R-4	-	-	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	-
	R-5	-	-	-	BLQ	-	-	BLQ	-
	R-6	-	-	-	BLQ	-	-	BLQ	-
	R-7	-	-	-	-	-	-	BLQ	-
	L-1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	L-2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ
	L-3	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-
	L-4	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ	BLQ	-
	L-5	-	BLQ	BLQ	-	-	BLQ	-	-
	L-6	-	BLQ	BLQ	-	-	-	-	-
	L-7	-	BLQ	-	-	-	-	-	-
Mean		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
SD		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0400 ng/mL)

NC: Not calculated

表15-3 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎児血漿中5'-hydroxythalidomide濃度(妊娠28日)：胚・胎児発生に関する実験

(3) 5'-hydroxythalidomide

Dose level (mg/kg)	fetus No.	Concentration (ng/mL)							
		2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108
0.4	R-1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ
	R-2	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	R-3	-	-	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	R-4	-	-	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	-
	R-5	-	-	-	BLQ	-	-	BLQ	-
	R-6	-	-	-	BLQ	-	-	BLQ	-
	R-7	-	-	-	-	-	-	BLQ	-
	L-1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	L-2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ
	L-3	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	-
	L-4	BLQ	BLQ	BLQ	-	BLQ	BLQ	BLQ	-
	L-5	-	BLQ	BLQ	-	-	BLQ	-	-
	L-6	-	BLQ	BLQ	-	-	-	-	-
	L-7	-	BLQ	-	-	-	-	-	-
Mean		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
SD		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0400 ng/mL)

NC: Not calculated

表16-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による母動物血漿中サリドマイド濃度  
: 胚・胎児への移行に関する実験

投与初日; 妊娠1日

(1) Thalidomide

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)		
		4 h	7 h	24 h
0.4	1101	9.55	1.06	BLQ
	1102 <sup>a)</sup>	8.46	0.957	BLQ
	1103	30.1	5.03	BLQ
	1104	7.36	0.690	BLQ
	1105 <sup>a)</sup>	15.9	2.05	BLQ
	1106	23.6	13.8	1.69
	1107	3.42	1.64	BLQ
	1108	12.6	2.35	BLQ
	Mean	13.9	3.45	NC
	SD	8.97	4.40	NC
10	2101	603 <sup>1)</sup>	307	22.1
	2102	277	261	97.8
	2103	236	182	106
	2104	210	155	58.7
	2105	191	140	99.1
	2106 <sup>a)</sup>	157	124	110
	2107	283	246	127
	2108	235	123	1.90
	Mean	274	192	77.8
	SD	139	70.2	45.3

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.400 ng/mL), a) not pregnant

1) Reanalysis value

(2) TK パラメータ (thalidomide)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
0.4	1101	9.55	4.00	44.0
	1102 <sup>a)</sup>	8.46	4.00	39.2
	1103	30.1	4.00	156
	1104	7.36	4.00	32.7
	1105 <sup>a)</sup>	15.9	4.00	76.2
	1106	23.6	4.00	235
	1107	3.42	4.00	28.4
	1108	12.6	4.00	67.6
	Mean	13.9	4.00	84.9
	SD	8.97	0.00	73.3
10	2101	603	4.00	5370
	2102	277	4.00	4410
	2103	236	4.00	3550
	2104	210	4.00	2780
	2105	191	4.00	2910
	2106 <sup>a)</sup>	157	4.00	2720
	2107	283	4.00	4530
	2108	235	4.00	2070
	Mean	274	4.00	3540
	SD	139	0.00	1130

a) not pregnant

表16-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による母動物血漿中サリドマイド濃度  
: 胚・胎児への移行に関する実験

投与最終日; 妊娠13日

(1) Thalidomide

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			
		Pre	4 h	7 h	24 h
0.4	1101	0.919	1.73	0.967	-
	1102 <sup>a)</sup>	1.14	11.4	2.38	-
	1103	0.934	18.4	8.68	-
	1104	0.688	26.0	5.62	-
	1105 <sup>a)</sup>	0.593	11.7	1.70	0.694
	1106	1.06	3.52	2.16	1.02
	1107	0.782	1.24	0.875	0.873
	1108	0.560	1.30	0.752	0.481
	Mean	0.835	9.41	2.89	0.767
	SD	0.214	9.19	2.82	0.233
10	2101	4.13	466 <sup>1)</sup>	339	-
	2102	6.55	96.4	31.3	-
	2103	1.81	87.8	62.9	-
	2104	17.5	329	507 <sup>1)</sup>	-
	2105	4.64	358	251	74.4
	2106 <sup>a)</sup>	5.04	349	270	170
	2107	11.3	107	37.4	13.0
	2108	2.25	196	244	4.38
	Mean	6.65	249	218	65.4
	SD	5.28	145	167	76.4

1) Reanalysis value, a) not pregnant

(2) TKパラメータ (thalidomide)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
0.4	1101	1.73	4.00	9.34
	1102 <sup>a)</sup>	11.4	4.00	45.8
	1103	18.4	4.00	79.3
	1104	26.0	4.00	101
	1105 <sup>a)</sup>	11.7	4.00	65.0
	1106	3.52	4.00	44.7
	1107	1.24	4.00	22.1
	1108	1.30	4.00	17.3
	Mean	9.41	4.00	48.1
	SD	9.19	0.00	32.1
10	2101	466	4.00	2150
	2102	96.4	4.00	397
	2103	87.8	4.00	405
	2104	507	7.00	1950
	2105	358	4.00	4400
	2106 <sup>a)</sup>	349	4.00	5380
	2107	107	4.00	882
	2108	244	7.00	3170
	Mean	277	4.75	2340
	SD	169	1.39	1850

a) not pregnant

表17-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による母動物血漿中5-hydroxythalidomide濃度  
: 胚・胎児への移行に関する実験

投与初日; 妊娠1日

(1) 5-hydroxythalidomide

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)		
		4 h	7 h	24 h
0.4	1101	0.152	BLQ	BLQ
	1102 <sup>a)</sup>	0.100	BLQ	BLQ
	1103	0.175	BLQ	BLQ
	1104	0.122	BLQ	BLQ
	1105 <sup>a)</sup>	0.135	BLQ	BLQ
	1106	0.156	0.0873	BLQ
	1107	0.038	BLQ	BLQ
	1108	0.147	BLQ	BLQ
	Mean	0.128	NC	NC
	SD	0.0429	NC	NC
10	2101	4.39	2.08	0.151
	2102	2.24	1.76	0.912
	2103	2.24	1.11	0.964
	2104	2.10	1.24	0.493
	2105	1.85	1.04	0.638
	2106 <sup>a)</sup>	1.20	0.755	0.756
	2107	2.26	1.39	0.798
	2108	1.63	0.813	BLQ
	Mean	2.24	1.27	0.589
	SD	0.945	0.457	0.352

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0400 ng/mL), a) not pregnant

(2) TKパラメータ (5-hydroxythalidomide)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
0.4	1101	0.152	4.00	0.532
	1102 <sup>a)</sup>	0.100	4.00	0.350
	1103	0.175	4.00	0.613
	1104	0.122	4.00	0.427
	1105 <sup>a)</sup>	0.135	4.00	0.473
	1106	0.156	4.00	1.42
	1107	NC	NC	NC
	1108	0.147	4.00	0.515
	Mean	0.141	4.00	0.619
	SD	0.0245	0.00	0.363
10	2101	4.39	4.00	37.4
	2102	2.24	4.00	33.2
	2103	2.24	4.00	27.1
	2104	2.10	4.00	23.9
	2105	1.85	4.00	22.3
	2106 <sup>a)</sup>	1.20	4.00	18.2
	2107	2.26	4.00	28.6
	2108	1.63	4.00	13.8
	Mean	2.24	4.00	25.6
	SD	0.945	0.00	7.71

NC: Not calculated, a) not pregnant

表17-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物血漿中5-hydroxythalidomide濃度  
: 胚・胎児への移行に関する実験

投与最終日; 妊娠13日

(1) 5-hydroxythalidomide

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			
		Pre	4 h	7 h	24 h
0.4	1101	BLQ	BLQ	BLQ	-
	1102 <sup>a)</sup>	BLQ	0.164	BLQ	-
	1103	BLQ	0.154	0.0647	-
	1104	BLQ	0.403	0.0697	-
	1105 <sup>a)</sup>	BLQ	0.0815	BLQ	BLQ
	1106	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	1107	BLQ	0.226	BLQ	BLQ
	1108	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Mean	NC	0.129	0.0168	NC
SD	NC	0.141	0.0311	NC	
10	2101	0.0553	3.90	3.35	-
	2102	0.107	1.30	0.532	-
	2103	0.0434	1.96	1.19	-
	2104	0.148	2.08	3.20	-
	2105	0.0791	3.26	1.87	0.664
	2106 <sup>a)</sup>	0.0726	3.20	1.74	1.44
	2107	0.0961	0.829	0.287	0.0709
	2108	0.0429	2.13	1.77	0.0630
	Mean	0.0806	2.33	1.74	0.559
SD	0.0358	1.04	1.11	0.651	

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0400 ng/mL), a) not pregnant

(2) TKパラメータ (5-hydroxythalidomide)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
0.4	1101	NC	NC	NC
	1102 <sup>a)</sup>	0.164	4.00	0.574
	1103	0.154	4.00	0.636
	1104	0.403	4.00	1.52
	1105 <sup>a)</sup>	0.0815	4.00	0.285
	1106	NC	NC	NC
	1107	0.226	4.00	0.791
	1108	NC	NC	NC
	Mean	0.206	4.00	0.761
SD	0.122	0.00	0.462	
10	2101	3.90	4.00	18.8
	2102	1.30	4.00	5.56
	2103	1.96	4.00	8.73
	2104	3.20	7.00	12.4
	2105	3.26	4.00	35.9
	2106 <sup>a)</sup>	3.20	4.00	41.0
	2107	0.829	4.00	6.57
	2108	2.13	4.00	25.8
	Mean	2.47	4.38	19.3
SD	1.08	1.06	13.6	

NC: Not calculated, a) not pregnant

表18-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物血漿中5'-hydroxythalidomide濃度  
: 胚・胎児への移行に関する実験

投与初日;妊娠1日

(1) 5'-hydroxythalidomide

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)		
		4 h	7 h	24 h
0.4	1101	1.09	0.146	BLQ
	1102 <sup>a)</sup>	0.616	0.129	BLQ
	1103	1.95	0.583	BLQ
	1104	1.47	0.196	BLQ
	1105 <sup>a)</sup>	1.30	0.240	BLQ
	1106	1.15	0.527	0.0587
	1107	0.396	0.172	BLQ
	1108	0.758	0.190	BLQ
	Mean	1.09	0.273	NC
SD	0.500	0.178	NC	
10	2101	13.4	8.24	0.776
	2102	8.69	8.17	3.45
	2103	12.1	7.47	4.12
	2104	7.67	5.12	1.84
	2105	13.4	8.49	5.01
	2106 <sup>a)</sup>	6.57	4.92	3.68
	2107	8.20	5.50	2.42
	2108	10.0	5.16	0.124
	Mean	10.0	6.63	2.68
SD	2.66	1.59	1.69	

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0400 ng/mL), a) not pregnant

(2) TKパラメータ (5'-hydroxythalidomide)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
0.4	1101	1.09	4.00	5.28
	1102 <sup>a)</sup>	0.616	4.00	3.45
	1103	1.95	4.00	12.7
	1104	1.47	4.00	7.11
	1105 <sup>a)</sup>	1.30	4.00	6.95
	1106	1.15	4.00	9.79
	1107	0.396	4.00	3.11
	1108	0.758	4.00	4.55
	Mean	1.09	4.00	6.62
SD	0.500	0.00	3.29	
10	2101	13.4	4.00	136
	2102	8.69	4.00	141
	2103	12.1	4.00	152
	2104	7.67	4.00	93.7
	2105	13.4	4.00	174
	2106 <sup>a)</sup>	6.57	4.00	103
	2107	8.20	4.00	104
	2108	10.0	4.00	87.7
	Mean	10.0	4.00	124
SD	2.66	0.00	31.2	

a) not pregnant

表18-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による母動物血漿中5'-hydroxythalidomide濃度  
: 胚・胎児への移行に関する実験

投与最終日; 妊娠13日

(1) 5'-hydroxythalidomide

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			
		Pre	4 h	7 h	24 h
0.4	1101	BLQ	0.133	BLQ	-
	1102 <sup>a)</sup>	0.0522	0.846	0.168	-
	1103	BLQ	1.06	0.472	-
	1104	BLQ	2.08	0.607	-
	1105 <sup>a)</sup>	BLQ	0.846	0.130	BLQ
	1106	BLQ	0.210	0.107	BLQ
	1107	BLQ	0.0978	BLQ	BLQ
	1108	BLQ	0.0694	BLQ	BLQ
	Mean	NC	0.668	0.186	NC
	SD	NC	0.696	0.231	NC
10	2101	0.0787	7.42	6.89	-
	2102	0.255	4.83	1.95	-
	2103	0.0774	5.44	4.58	-
	2104	0.381	5.86	7.57	-
	2105	0.328	17.3	11.8	3.55
	2106 <sup>a)</sup>	0.294	10.2	6.80	4.22
	2107	0.301	2.74	1.22	0.410
	2108	0.125	7.30	6.17	0.125
	Mean	0.230	7.64	5.87	2.08
	SD	0.119	4.47	3.35	2.11

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0400 ng/mL), a) not pregnant

(2) TKパラメータ (5'-hydroxythalidomide)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)
0.4	1101	0.133	4.00	0.466
	1102 <sup>a)</sup>	0.846	4.00	3.32
	1103	1.06	4.00	4.42
	1104	2.08	4.00	8.19
	1105 <sup>a)</sup>	0.846	4.00	4.26
	1106	0.210	4.00	1.81
	1107	0.0978	4.00	0.342
	1108	0.0694	4.00	0.243
	Mean	0.668	4.00	2.88
	SD	0.696	0.00	2.75
10	2101	7.42	4.00	36.5
	2102	4.83	4.00	20.3
	2103	5.44	4.00	26.1
	2104	7.57	7.00	32.6
	2105	17.3	4.00	209
	2106 <sup>a)</sup>	10.2	4.00	140
	2107	2.74	4.00	25.9
	2108	7.30	4.00	88.6
	Mean	7.85	4.38	72.4
	SD	4.41	1.06	69.1

a) not pregnant



表19-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎盤、卵黄囊膜、胚中のサリドマイド濃度(妊娠13日)  
: 胎・胎児への移行に関する実験

0.4 mg/kg投与群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)			
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo	
0.4	7 h	1101	L-1	BLQ	BLQ	BLQ	
		1101	L-6	BLQ	BLQ	BLQ	
		Mean			NC	NC	NC
		1103	L-1	4.46	3.82	5.53	
		1103	L-2	4.19	2.52	5.64	
		Mean			4.33	3.17	5.59
		1104	R-1	1.87	2.21	0.757	
		1104	R-6	1.74	1.83	0.911	
		Mean			1.81	2.02	0.834
	Mean			2.04	1.73	2.14	
	SD			2.17	1.60	3.01	
	24 h	1106	R-1	0.837	1.66	BLQ	
		1106	R-2	1.17	BLQ	BLQ	
		Mean			1.00	NC	NC
		1107	L-1	BLQ	0.977	BLQ	
		1107	L-3	BLQ	BLQ	BLQ	
		Mean			NC	NC	NC
		1108	R-1	BLQ	BLQ	BLQ	
		1108	R-5	BLQ	BLQ	BLQ	
		Mean			NC	NC	NC
Mean			0.335	0.440	NC		
SD			0.579	0.417	NC		

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.800 ng/g)

表19-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎盤、卵黄囊膜、胚中のサリドマイド濃度(妊娠13日)  
: 胚・胎児への移行に関する実験

10 mg/kg投与群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)			
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo	
10	7 h	2101	R-1	260	91.2	159	
		2101	R-2	221	267	186	
		Mean			241	179	173
		2102	L-1	27.8	24.7	22.1	
		Mean			NC	NC	NC
		2103	R-1	15.2	11.9	8.01	
		2103	R-2	15.2	15.4	10.9	
		2103	R-3	17.0	16.6	10.5	
		2103	R-4	13.2	15.1	10.1	
		2103	L-1	16.0	16.5	13.5	
		2103	L-2	12.3	11.9	8.32	
		2103	L-3	16.1	10.8	11.0	
	2103	L-4	17.8	15.6	11.6		
	2103	L-5	17.2	17.6	13.3		
	2103	L-6	14.4	16.5	12.3		
	Mean			15.4	14.8	11.0	
	SD			1.76	2.38	1.85	
	Mean			156	120	115	
	SD			160	121	118	
	2104			367	230	238	
2104			303	365	255		
2104			315	276	265		
2104			299	222	260		
2104			352	288	251		
2104			313	259	245		
2104			428	201	265		
Mean			340	263	254		
SD			46.6	54.5	10.2		
2105			50.1	43.0	38.2		
2105			49.1	36.5	33.1		
Mean			49.6	39.8	35.7		
2107			3.02	3.03	2.58		
2107			5.13	3.44	2.22		
Mean			4.08	3.24	2.40		
2108			5.01	4.13	2.93		
2108			6.73	3.43	3.67		
Mean			5.87	3.78	3.30		
Mean			19.8	15.6	13.8		
SD			25.8	20.9	18.9		

表20-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胎盤、卵黄囊膜、胚中の5-hydroxythalidomide 濃度(妊娠13日)  
: 胚・胎児への移行に関する実験

0.4 mg/kg投与群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)			
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo	
0.4	7 h	1101	L-1	BLQ	BLQ	BLQ	
		1101	L-6	BLQ	BLQ	BLQ	
		Mean		NC	NC	NC	
		1103	L-1	BLQ	BLQ	BLQ	
		1103	L-2	BLQ	BLQ	BLQ	
		Mean		NC	NC	NC	
		1104	R-1	BLQ	BLQ	BLQ	
		1104	R-6	BLQ	BLQ	BLQ	
		Mean		NC	NC	NC	
		Mean			NC	NC	NC
		SD			NC	NC	NC
		24 h	1106	R-1	BLQ	BLQ	BLQ
	1106		R-2	BLQ	BLQ	BLQ	
	Mean			NC	NC	NC	
	1107		L-1	BLQ	BLQ	BLQ	
	1107		L-3	BLQ	BLQ	BLQ	
	Mean			NC	NC	NC	
	1108		R-1	BLQ	BLQ	BLQ	
	1108		R-5	BLQ	BLQ	BLQ	
	Mean			NC	NC	NC	
Mean			NC	NC	NC		
SD			NC	NC	NC		

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0800 ng/g)

表20-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胎盤、卵黄囊膜、胚中の5-hydroxythalidomide 濃度(妊娠13日)  
:胚・胎児への移行に関する実験

10 mg/kg投与群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)			
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo	
10	7 h	2101	R-1	1.94	0.659	0.421	
		2101	R-2	1.73	1.76	0.392	
		Mean			1.84	1.21	0.407
		2102	L-1	0.130	0.128	BLQ	
		Mean			NC	NC	NC
		2103	R-1	0.455	0.263	BLQ	
		2103	R-2	0.471	0.889	BLQ	
		2103	R-3	0.567	0.785	BLQ	
		2103	R-4	0.285	0.340	BLQ	
		2103	L-1	0.247	0.975	BLQ	
		2103	L-2	0.193	0.456	BLQ	
		2103	L-3	0.337	0.333	BLQ	
		2103	L-4	0.276	0.202	BLQ	
		2103	L-5	0.646	2.29	BLQ	
	2103	L-6	0.186	1.01	BLQ		
	Mean			0.366	0.754	NC	
	SD			0.160	0.621	NC	
	2104			R-1	3.30	1.33	0.524
	2104			R-2	2.91	2.03	0.297
	2104			R-3	2.73	1.58	0.460
	2104			R-4	2.68	1.23	0.418
	2104			R-5	3.22	1.25	0.394
	2104			L-1	2.80	1.02	0.273
	2104			L-2	2.47	0.552	0.263
	Mean			2.87	1.28	0.376	
	SD			0.297	0.458	0.101	
	Mean			1.30	0.844	0.196	
	SD			1.29	0.532	0.226	
2105			L-1	0.568	0.260	BLQ	
2105			L-3	0.618	0.199	BLQ	
Mean			0.593	0.230	NC		
2107			L-1	BLQ	BLQ	BLQ	
2107			L-4	BLQ	BLQ	BLQ	
Mean			NC	NC	NC		
2108			R-1	BLQ	BLQ	BLQ	
2108			R-4	BLQ	BLQ	BLQ	
Mean			NC	NC	NC		
Mean			0.198	0.0765	NC		
SD			0.342	0.133	NC		

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0800 ng/g)

表21-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド臍内投与による胎盤、卵黄囊膜、胚中の5'-hydroxythalidomide 濃度(妊娠13日)  
: 胚・胎児への移行に関する実験

0.4 mg/kg投与群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)			
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo	
0.4	7 h	1101	L-1	BLQ	BLQ	BLQ	
		1101	L-6	BLQ	BLQ	BLQ	
		Mean		NC	NC	NC	
		1103	L-1	0.294	0.155	0.302	
		1103	L-2	0.315	0.102	0.305	
		Mean		0.305	0.129	0.304	
		1104	R-1	0.234	0.165	0.152	
		1104	R-6	0.239	0.104	0.130	
		Mean		0.237	0.135	0.141	
		Mean			0.180	0.0877	0.148
		SD			0.160	0.0760	0.152
		24 h	1106	R-1	BLQ	BLQ	BLQ
	1106		R-2	BLQ	BLQ	BLQ	
	Mean			NC	NC	NC	
	1107		L-1	BLQ	BLQ	BLQ	
	1107		L-3	BLQ	BLQ	BLQ	
	Mean			NC	NC	NC	
	Mean	1108	R-1	BLQ	BLQ	BLQ	
1108		R-5	BLQ	BLQ	BLQ		
Mean			NC	NC	NC		
SD			NC	NC	NC		

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0800 ng/g)

表21-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による胎盤、卵黄囊膜、胚中の5'-hydroxythalidomide 濃度(妊娠13日)  
:胚・胎児への移行に関する実験

10 mg/kg投与群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)			
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo	
10	7 h	2101	R-1	5.69	1.73	2.97	
		2101	R-2	5.40	4.12	3.32	
		Mean			5.55	2.93	3.15
		2102	L-1	1.50	0.964	0.883	
		Mean			NC	NC	NC
		2103	R-1	1.50	1.14	0.647	
		2103	R-2	1.46	1.11	0.898	
		2103	R-3	1.53	1.48	0.916	
		2103	R-4	1.42	1.33	0.893	
		2103	L-1	1.60	1.34	1.17	
		2103	L-2	1.27	1.13	0.690	
		2103	L-3	1.64	0.987	0.922	
		2103	L-4	1.69	1.58	1.11	
		2103	L-5	1.58	1.24	1.06	
	2103	L-6	1.38	1.26	0.958		
	Mean			1.51	1.26	0.926	
	SD			0.128	0.180	0.166	
	2104	R-1	9.15	5.56	5.05		
	2104	R-2	8.51	8.88	5.03		
	2104	R-3	8.26	6.38	5.06		
	2104	R-4	7.47	5.08	5.20		
	2104	R-5	8.53	6.22	4.77		
	2104	L-1	8.59	5.40	4.30		
	2104	L-2	9.89	4.32	5.35		
	Mean			8.63	5.98	4.97	
	SD			0.749	1.46	0.343	
	Mean			4.30	2.78	2.48	
	SD			3.46	2.30	1.97	
2105	L-1	3.53	2.71	2.14			
2105	L-3	3.24	2.02	1.66			
Mean			3.39	2.37	1.90		
24 h	2107	L-1	0.243	0.151	0.136		
	2107	L-4	0.230	0.0903	0.143		
	Mean			0.237	0.121	0.140	
	2108	R-1	0.299	0.159	0.177		
	2108	R-4	0.286	BLQ	0.197		
	Mean			0.293	NC	0.187	
Mean			1.30	0.855	0.742		
SD			1.80	1.31	1.00		

BLQ: Below the lower limit of quantification (0.0800 ng/g)

(別添6)

令和4年3月30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

次の職員のとおり令和3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) 栗形 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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: )	<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。

令和4年3月30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3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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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: )	<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。



2022年5月16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3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。

- 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
- 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
- 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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) 未審査の場合は、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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。