

令和4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4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6年（2024）

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反復経口投与による母動物および胚・胎児への薬物移行に関する検討	----- 14
栗形 麻樹子	
2. 妊娠ウサギを用いたサリドマイド反復経口投与による胚・胎児発生への影響	---- 23
北嶋 聡	
3. 薬物動態の解析	----- 29
山崎 浩史	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添5）	----- 32
IV. 資料	----- 33
添付資料1. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胚・胎児移行への影響	
添付資料2. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胚・胎児発生への影響	
図 1. 生理学的薬物動態モデルによる出力結果値と経口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経口投与による母動物一般状態：胚・胎児移行に関する検討	
表 2. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による母動物体重推移：胚・胎児移行に関する検討	
表 3. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による帝王切開所見（妊娠13-14日）：胚・胎児移行に関する検討	
表 4. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による帝王切開所見個別表（妊娠13-14日）：胚・胎児移行に関する検討	
表 5. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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1日）：胚・胎児移行に関する検討	
表 6. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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・胎児移行に関する検討	
表 7. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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1日）：胚・胎児移行に関する検討	
表 8. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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・胎児移行に関する検討	

- 表 9. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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1日）：胚・胎児への移行に関する検討
- 表 10. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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・胎児への移行に関する検討
- 表 11. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、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検討
- 表 12. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、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検討
- 表 13. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、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検討
- 表 14. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による母動物一般状態：胚・胎児発生に関する検討（妊娠28日帝王切開）
- 表 15. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による母動物体重推移：胚・胎児発生に関する検討（妊娠28日帝王切開）
- 表 16. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与後の帝王切開所見（妊娠28日）：胚・胎児発生に関する検討
- 表 17. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胚・胎児死亡数（妊娠28日）：胚・胎児発生に関する検討
- 表 18. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児外表観察：胚・胎児発生に関する検討
- 表 19. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児内臓観察：胚・胎児発生に関する検討
- 表 20. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児骨格観察：胚・胎児発生に関する検討
- 表 21. 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児主要部位骨化数観察：胚・胎児発生に関する検討

総括研究報告書

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

研究代表者 栗形 麻樹子

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・室長

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データはない。本研究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、ヒトへの外挿可能性を踏まえたプロトコー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。具体的には、サリドマイドによる催奇形性発現に感受性をもつウサギを用いて、雄性生殖を介した発生毒性発現のリスクについて評価しうるデータを得ることである。

本研究で得られた結果は、将来的に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つながるものである。

令和3年度に実施した最大精漿移行濃度の約100倍量を腔内投与により、精漿移行による催奇形性発現は非常に低いことを報告した。令和4年度は分担研究として、腔内投与試験立案法（投与量設定）の妥当性を確認するために、妊娠雌ウサギに催奇形性量のサリドマイドを経口投与した時の母動物および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）の薬物動態を確認し、腔内投与による曝露量と経口投与による曝露量を比較し、腔内投与による催奇形性発現リスクについて考察するためのデータを得た。

令和4年度は、奇形発現量と考えられる250 mg/kg/dayおよびその1/10量で文献検索上、奇形の報告がなかった25 mg/kg/dayのサリドマイドを妊娠雌に経口投与し、母動物および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）の薬物曝露量の確認を先行して確認した。その結果、投与7時間の採血点で、不妊動物あるいは全胚胎児死亡母体の増加により母動物数が1～2例のみになってしまったこと、25 mg/kg群においてサリドマイド投与による催奇形性が疑われたことから、追加検討として、動物数および投与量(12.5 mg/kg/day群)を見直し、同様の検討を実施した。本課題の本幹となる令和3年度に実施した腔内投与試験から得られた母動物および子宮内容物の薬物動態結果の妥当性を、経口投与試験結果から検討した。

その結果、経口投与時の最大無作用量（12.5 mg/kg）とヒトでの曝露量を考慮した最大精漿移行濃度の100倍量の腔内投与量(0.4 mg/kg、)には用量的に31.25倍の開きがあるが、母動物の血中濃度パラメータを比較すると最高血中濃度（Cmax）では経口投与の最大無作用量の188分の1に過ぎず、血中濃度下面積（AUC）では199分の1であった。腔内投与した結果と令和4年度に実施した経口投与の結果から、腔内投与による曝露量は経口投与と比較して非常に微量であり、最大精漿移行濃度の100倍量を連続腔内投与しても、本条件下において、母動物および胚・胎児発生への影響は認められないと考えられた。

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ー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、サリドマイドの雄性生殖を介した催奇形性発現リスクについて検討する。

- (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腔内投与し、母動物及び胎児組織への移行を確認するとともに催奇形性の有無を確認する。
- (4) 器官形成期の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4年度は(4)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 : 50-35-1
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を秤取り、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：1H99）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りし、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、先行及び追加検討あわせて52匹購入し、試験には42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 : 2022年2月4日 (入荷時16週齢、30匹)

交配時の体重範囲 : 2.8～3.65 kg (先行試験)

3.0～4.5 kg (追加試験)

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、ステンレス板及びステンレス製チェーンを与えた。

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

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

血漿試料：遠心分離 (約4°C、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. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する検討 (妊娠13-14日解剖) (添付資料1) 【先行実験】 (担当：栗形)

2-1. 目的

本試験の目的は、令和3年度に実施した最大精漿移行濃度の約100倍量を膈内投与量と算出して実施した試験計画の妥当性を確認することである。

具体的には、薬物吸収が良い経口投与において、文献検索及び予備的検討により奇形発現量である250 mg/kg、およびその1/10量で文献上奇形発現の報告の認められない25 mg/kg のサリドマイドを経口投与した妊娠雌における、血漿中濃度の推移と胎児を始めとする子宮内容における被験物質の曝露状況を検討することである (令和4年度先行実験、中間報告)。

2-2. 投与期間および投与回数

投与経路、投与期間、投与回数は、膈内投与試験に合わせ、交尾翌日 (妊娠1日) から妊娠13日まで、1日1回、13日間、反復経口投与する。投与回数は1日1回 (7日/週) とした。

この投与期間はthalidomideによる催奇形作用への感受性が高い時期である。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。

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

2-3. 投与方法

投与容量は5 mL/kgとし、媒体に懸濁したthalidomideを、ウサギ用経口投与チューブ (ネラトンカテーテル、テルモ社製) (注1)を用いて強制経口投与した (08:22~12:06の間)。

投与後は、カテーテル内を約4mLの水道水でフラッシングした。

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

2-4. 投与量

群構成を下記に示す。

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌動物数*	動物番号
25	5	5	8 (7)	1101~1108
250	50	5	8 (7)	2101~2108

*括弧内は妊娠動物数

投与量設定根拠

令和2年度に実施したサリドマイドを用いた発生毒性の予備的検討においては、妊娠9日から13日の5日間、250 mg/kg を反復経口投与した結果、早期死亡胚の増加が認められ、生存胎児の得られた全腹で胎児に奇形 (短鼻や眼突出等の顔面の異常、屈曲肢、過屈曲肢、肺副葉欠損、脳室の拡張等の異常) が認められた。

また、文献検索の結果からは、ウサギの妊娠8日あるいは9日に100 mg/kg 以上を投与した論文では、奇形の発現が報告されている。この予備的検討と文献検索の結果から、本試験における高用量群の投与量として奇形を有する胎児が認められることが期待される、250 mg/kg とした。

なお、250 mg/kg は雄ウサギ単回経口投与および反復経口投与試験にも使用した用量である (令和2年度実施)。

一方、低用量には文献検索において奇形の発現の報告がなく、投与量として高用量群の10分の1量であり、無毒性量であることが期待される25 mg/kg を選択した。

投与容量は5 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、生死及び流早産の確認と合わせて、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察した。

体重は妊娠0、1、3、6、8、10、12、13、および14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 (最終投与日 ; 妊娠13日)

剖検は子宮内容物濃度が最も高くなると考えられる妊娠13日の投与後7時間と24時間に行った。

解剖する動物は、ペントバルビタールナトリウム静脈内投与による深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)

剖検時に肉眼的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については、卵巢の妊娠黄体数を数え、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）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、生存胎児の胎盤異常の有無を肉眼的に調べ、重量を個々に測定した。

肉眼的に着床が認められなかった3例(25 mg/kg 群: 動物番号1101及び1102、250 mg/kg 群: 動物番号2101)については妊娠黄体数を記録し、子宮は10%硫酸アンモニウム溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。その結果、25 mg/kg 群の1例(動物番号1102)は着床が認められたため、全胚吸収している妊娠動物であると判断し着床数を記録し、子宮と卵巢をリン酸緩衝10%ホルマリン液で固定・保存した。その他の動物の子宮に着床部位は認められなかったため、不妊と判断し子宮と卵巢は廃棄した。不妊動物のデータは全てのデータを評価から除外した。

3. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する追加検討(妊娠13-14日解剖)(添付資料2)【追加実験】(担当: 栗形)

【先行実験】の結果、投与7時間の採血点で、不妊動物あるいは全胚胎児死亡母体の増加により、母動物数が1~2例のみになってしまったこと、25 mg/kg群においてサリドマイド投与による胎児への影響が疑われたことから、動物数の追加およびさらに低い12.5 mg/kg/day群を追加して、2. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する検討(妊娠13-14日解剖)と同様の検討を実施し経口投与のよる母動物および胎児への曝露量を補強した。

3-1. 目的
2-1. 参照

3-2. 投与期間および投与回数
2-2. 参照

3-3. 投与方法
2-3. 参照

なお、8:25~11:15の間に経口投与した。

3-4. 投与量
群構成を以下に示す。

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌動物数*	動物番号
12.5	2.5	5	8(6)	2101~2108
25	5	5	2(2)	3101~3102
250	50	5	4(4)	4101~4104

*括弧内は妊娠動物数

投与量設定根拠

先行して実施した2-1.ウサギを用いた経口投与による胚・胎児発生に関する試験において、経口投与において形態形成に異常を認めない用量(最大無毒性量)及びその時の母体及び子宮内容物中の最大無毒性量を求め、膈内投与の最大無作用と(用量)比較して、雄の生殖器系を介した被験物質の曝露による影響が、経口投与に比較していかに軽度なものであるかを明示する予定であった。

しかし、この試験において、25 mg/kgの経口投与に

より、外表検査においてドーム状頭部がみられた胎児が1例発現し、骨格及び内臓検査でも形態異常が認められた。これらの形態異常について検討した結果、①サリドマイドの投与により、発生が報告されている異常が認められること、及び②背景的には比較的稀な所見がみられることの2点から、これらの形態異常がサリドマイド投与とは無関係であると結論することができなかった。すなわち、サリドマイド25 mg/kgの妊娠1日から13日の経口投与は最大無毒性量とは出来なかった。

以上のことから、経口投与時の最大無毒性量を求めることを目的に軽度な影響のみられた25 mg/kgの半量である、12.5 mg/kgを投与し、妊娠28日に帝王切開して胎児の生存性及び形態観察を実施することとした。

一方、奇形発現量のサリドマイドを投与した場合の母動物血中濃度及び子宮内容物中濃度について、昨年度の検討での不妊および全胚吸収例の成績を補完するため、母動物の妊娠1日から妊娠13日にサリドマイドの250 mg/kgを反復経口投与し、妊娠13日に剖検して母動物血中濃度及び子宮内容物中濃度を測定する群及びこれと比較するための25 mg/kg群を設けた。

3-5. 動物の観察
2-5. 参照

3-6. 剖検(最終投与日; 妊娠13日)
2-6. 参照

3-7. 帝王切開(最終投与日; 妊娠13日)
2-7. 参照

4. サリドマイドの経口投与による母動物血漿中及び子宮内容物中の薬物動態(トキシコキネティクス;TK)【先行実験】(担当: 栗形)

「2. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する検討(妊娠13-14日解剖)【先行実験】」で得られた試料を用いて、母動物血漿中および子宮内容物(胎盤、卵黄囊膜、胎児)中の薬物動態を調べた。

4-1. 母動物

(1) 母体試料の採取

妊娠1日に3時点、妊娠13日に7時点において母動物から採血した。

母動物採血時期	採血時間(時間)
GD1	4, 7, 24 (GD2 pre)
GD13	Pre, 0.5, 1, 2, 4, 7, 24

(2) 対象動物及び採血量

対象動物を保定器に入れ、へパリンナトリウム処理シリンジを用いて以下の時点で無麻酔下で耳介静脈から採血した。

GD13解剖時期	解剖対象動物番号
投与7時間後	末尾01~04
投与24時間後	末尾05~08

(3) 血液の処理

血液をポリプロピレン製容器に移して氷冷し、遠心

分離 (4°C、1,600×g、10分間) により血漿 (約160 μL) を得た。これに等量の 25 mM Sorensen's citrate buffer (注2)を加えて血漿試料とした。

(注2)pH 1.5: 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 SKE6244) の1.47gを注射用水 (株式会社大塚製薬工場、ロット番号 1H99) 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。

(4) 血漿試料 (TK試料) の保存

得られた試料は試験番号、採血時期、動物番号、試料番号、採血年月日、採血時点、試料名を明記したラベルを貼付したポリプロピレン製容器各2本に分注し、送付まで-80°Cの冷凍庫 (許容値:-70°C以下、実測値は許容範囲内であった) で保存した。

4-2. 子宮内容物試料の採取

(1) 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。試料は送付まで-80°Cの冷凍庫 (許容値:-70°C以下、実測値は許容範囲内であった) で保存した。

(2) 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。試料は送付まで-80°Cの冷凍庫 (許容値:-70°C以下、実測値は許容範囲内であった) で保存した。

(3) 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。

試料は測定まで-80°Cの冷凍庫 (許容値:-70°C以下、実測値は許容範囲内であった) で保存した。

5. サリドマイドの経口投与による母動物血漿中及び子宮内容物中の薬物動態 (TK) 【追加試験】 (担当: 葉形)

「3. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する追加検討 (妊娠13-14日解剖) 【追加実験】」で得られた試料を用いて、母動物血漿中および子宮内容物 (胎盤、卵黄囊膜、胎児) 中の薬物動態を調べた。

5-1. 母動物

(1) 母体試料の採取

4-1. と同様

(2) 対象動物及び採血量

対象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以下の時点で無麻酔下で耳介静脈から採血した。

GD13解剖時期	解剖対象動物番号
投与7時間後	12.5 mg/kg群の末尾01~08例 25および250 mg/kg群の全例
投与24時間後	12.5 mg/kg群の末尾05~08の4例

(3) 血液の処理

4-1. と同様

(4) 血漿試料 (TK試料) の保存

4-1. と同様

5-2. 子宮内容物試料の採取

(1) 卵黄囊膜

4-2. と同様

(2) 胚

4-2. と同様

(3) 胎盤

4-2. と同様

試料は測定まで-80°Cの冷凍庫 (許容値:-70°C以下、実測値は許容範囲内であった) で保存した。

6. サリドマイドの経口投与による胚・胎児発生への影響 (妊娠28日解剖) (担当: 北嶋)

6-1. 目的

本研究の目的は、令和3年度に実施した最大精漿移行濃度の約100倍量を膈内投与量と算出して実施した試験計画の妥当性を確認することである。

具体的には、薬物吸収が良い経口投与において、文献検索及び予備的検討により奇形発現量である250 mg/kg、およびその1/10量で文献上奇形発現の報告の認められない25 mg/kg を投与した妊娠雌への影響および胚・胎児への影響を確認する (先行実験)。

先行実験の結果、軽度であるが25 mg/kg群で催奇形性が疑われたため、さらに半用量である12.5 mg/kgを追加した (追加実験)。

本分担研究ではサリドマイド経口投与後、妊娠28日に帝王切開し、妊娠全期間を通した母動物への影響および胎児発生への影響を確認した。

6-2. 投与期間および投与回数

投与経路、投与期間、投与回数は、膈内投与試験に合わせ、交尾翌日 (妊娠1日) から妊娠13日まで、1日1回、13日間、反復経口投与する。投与回数は1日1回 (7日/週) とした。

この投与期間はサリドマイドによる催奇形作用への感受性が高い時期である。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、投与されたサリドマイド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。

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

6-3. 投与方法

投与容量は5 mL/kgとし、媒体に懸濁したthalidomideを、ウサギ用経口投与チューブ (ネラトンカテーテル、テルモ社製) (注1)を用いて強制経口投与した (08:22~12:06の間)。

投与後は、カテーテル内を約4mLの水道水でフラッシングした。

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

6-4. 投与量

群構成を下記に示す。

先行実験

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌 (生存胎児含有雌/妊娠雌)	動物番号
0	5	5	8 (7/7)	1101～1108
25	50	5	8 (8/8)	2101～2108
250	50	5	12 (5/12) *	3101～3112

*12例中1例は流産

追加実験

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌 (生存胎児含有雌/妊娠雌)	動物番号
0	5	5	4 (4/4)	1101～1104
12.5	2.5	5	8 (8/8)	2109～2116

投与量設定根拠

令和2年度に実施したサリドマイドを用いた発生毒性の予備的検討においては、妊娠9日から13日の5日間、250 mg/kg を反復経口投与した結果、早期死亡胚の増加が認められ、生存胎児の得られた全腹で胎児に奇形（短鼻や眼突出等の顔面の異常、屈曲肢、過屈曲肢、肺副葉欠損、脳室の拡張等の異常）が認められた。

また、文献検索の結果からは、ウサギの妊娠8日あるいは9日に100 mg/kg 以上を投与した論文では、奇形の発現が報告されている。この予備的検討と文献検索の結果から、本試験における高用量群の投与量として奇形を有する胎児が認められることが期待される、250 mg/kg とした。

なお、250 mg/kg は雄ウサギ単回経口投与および反復経口投与試験にも使用した用量である（令和2年度実施）。

一方、低用量には文献検索において奇形の発現の報告がなく、投与量として高用量群の10分の1量であり、無毒性量であることが期待される25 mg/kg を選択した。

先行実験の結果、軽度であるが25 mg/kg群で催奇形性が疑われたため、さらに半用量である12.5 mg/kgを追加した（追加実験）。

投与容量は5 mL/kg とした。

6-5. 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、1、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。

6-6. 剖検及び帝王切開

妊娠28日の午前中、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）による深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。

6-7. 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。

6-8. 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。

(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¹⁾、心臓は西村の顕微解剖法²⁾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作製した。

染色試薬

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

7. 妊娠雌ウサギの経口投与による薬物動態の解析

（担当：山崎）

令和2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ている。

令和4年度はこの動態モデルを用いて、2. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する検討(妊娠13-14日解剖) (添付資料1) 【先行実験】および3. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する追加検討(妊娠13-14日解剖) (添付資料2) 【追加実験】から得られた結果を用いて、経口投与により得られた母動物血漿中濃度と、同様に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、経口投与による生体内血中濃度推移を比較した(経口投与試験の方法および結果は、分担報告書-1参照)。

8. 統計解析

8-1. 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)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

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

8-2. 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、死亡胚・胎児数、生存胎児体重、胎盤重量は、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、内臓異常率及び内臓変異率については、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、内臓および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の配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果及び考察

1. サリドマイドの経口投与による母動物及び胚・胎児移行に関する検討(妊娠13-14日帝王切開)

【先行実験】および【追加実験】の群構成および使用動物を下記に示す。

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌動物数*
12.5	2.5	5	8(6)
25	5	5	10(9)
250	50	5	12(11)

*括弧内は妊娠動物数

1-1. 一般状態

先行及び追加実験ともに、死亡及び流産動物は発現しなかった。排糞量の減少が250 mg/kg 群の5例で1~5日間認められ、うち1例では無便がみられた。25 mg/kg 以下の群では、一般状態の異常は認められなかった(表1)。

1-2. 体重

250 mg/kg 群と25 mg/kg 群の体重推移及び投与期間中の体重増加量に明確な差はなかった(表2)。

250 mg/kg 群の1例(動物番号 2103)で妊娠1日から妊娠13日の投与期間中の体重増加量が負の値を示した。この動物の体重推移をみると投与開始直後の妊娠1日~3日の減少が最も大きく、その後も妊娠6日~8日、妊娠10日~13日に断続的に低値がみられている。この体重増加が抑制された時期と一般状態観察において排糞量の低下が認められた時期が一致すること、母動物の血漿中濃度測定の結果、投与後7時間後剖検群の中では、この動物が妊娠1日及び妊娠13日のC_{max}、AUC_{0-t}とも最も高値を示した例であることから、この動物の体重増加抑制は、被験物質投与による毒性学的影響によるものと判断した。なお、この腹は全胚吸収例(着床数7)であった。

250 mg/kg 群のその他の動物及び25 mg/kg 以下の群では体重推移に被験物質投与の影響は認められなかった。

1-3. 剖検所見(妊娠13日)

いずれの投与群においても体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官・組織に肉眼的な異常はみられなかった。

1-4. 帝王切開所見(表3、表4)

帝王切開所見を表3およびその個別表を表4に示す。
250 mg/kg 群では1例が不妊、3例が全胚吸収例で、死胚数及び着床後死亡率が高値を示した。

12.5 mg/kg群では2例25 mg/kg 群では1例が不妊、1例の着床が1（妊娠黄体1）であった。

黄体数、着床数、着床前死亡率及び着床率には投与による影響は認められず、胎盤にも異常は認められなかった。

2. サリドマイドの経口投与による母動物血漿中および子宮内容物中の薬物動態（トキシコキネティクス；TK）

2-1. 母動物血漿中濃度（表5～10）

投与開始日（妊娠1日）及び投与最終日（妊娠13日）の母動物血漿中のthalidomide、5-hydroxythalidomide (5-OH体)、及び5'-hydroxythalidomide (5'-OH体) の血漿中濃度推移およびTKパラメータを表5～表10に示した。なお、25 および250 mg/kg群は先行試験及び追加試験のデータを合わせ再計算した結果を示す。

GD1

(mg/kg)	Thalidomide		5-OH 体		Total 5'-OH 体	
	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC
12.5	1320	10800	9.21	72.2	68.4	576
25	3190	36300	18.2	196	92.2	927
250	13300	222000	67.7	1110	211	3510

GD13

(mg/kg)	Thalidomide		5-OH 体		Total 5'-OH 体	
	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC
12.5	1770	9590	9.09	49.7	64.6	416
25	4320	32700	21.2	160	65.1	519
250	21900	191000	63.8	581	214.9	2011

250 mg/kg 群のC_{max}及びAUC_{0-t}はいずれの測定日においても、25 mg/kg 群のC_{max}の10倍及びAUC_{0-t}の10倍には及ばないことから、サリドマイドの母動物血漿中濃度は25 mg/kgから250 mg/kgの間で比例関係が破綻していると考えられた。

妊娠1日と妊娠13日のパラメータを比較すると全投与2群とも妊娠13日のC_{max}が妊娠1日に比較して高値であったが、AUC_{0-t}ではその傾向は顕著ではなかったことから、生体内の顕著な蓄積性はないと考えられた。

母動物血漿中の主要代謝物については、いずれの投与群においてもヒト型代謝物がげっ歯類型代謝物よりも高濃度を示す母動物は認められなかった。

2-2. 胎盤、卵黄囊、胎児組織中濃度（表11～表13）

最終投与日（GD13）の投与7時間および24時間後にける子宮内容物におけるサリドマイド濃度を表11から表13に示した。

(1) 胎盤

胎盤中のサリドマイド濃度はいずれの群も母動物血漿中濃度のおよそ30～75%であり、母動物の血漿中濃度を上回る例は認められなかった。

主要代謝物については、ヒト型主要代謝物である5-OH体濃度はサリドマイド原体の2%以下、ラット型主要代謝物である5'-OH体濃度はサリドマイド原体の7%以下であった。胎児毎にみると5-OH体濃度が5'-OH体を上回る例はなかった。

(2) 卵黄囊膜

卵黄囊膜中濃度は胎児中濃度とほぼ同様の値を示した。いずれの投与量においても、胎盤中濃度は母動物血漿中濃度に比較して、30～75%の値を示した。

(3) 胎児

毒性発現量である250 mg/kg群の一腹1例の胎児にて胎児中濃度が胎盤中濃度を上回り101%を呈した。同群のそれ以外の胎児を含め、いずれの投与群においても胎児中濃度は胎盤中濃度の25～75%であった。

主要代謝物については、卵黄囊膜及び胎児中の5-OH体および5'-OH体の割合は胎児毎にみてもほぼ同様な傾向を示し、ヒト型代謝物がげっ歯類型代謝物よりも高濃度を示した例は認められなかった。

2-3. 小括

令和3年度に実施した膈内投与と試験経口投与における母動物中及び子宮内容物のサリドマイドおよび主要代謝物濃度の比較を下表に示す。

なお、経口投与による12.5 mg/kg/dayは最大無作用量、250 mg/kg/dayは毒性発現量を示し、膈内投与による0.4 mg/kgは最大精漿移行濃度の100倍量、10 mg/kgは投与最大量の用量である。

母動物血漿中TKパラメータ（GD13, ng/mL）

投与経路	(mg/kg)	Thalidomide		5-OH		Total 5'-OH	
		C _{max}	AUC	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC
経口	12.5	1770	9590	9.09	49.7	64.6	416
	250	21855	190818	63.8	581	215	2011
膈内	0.4	9.41	48.1	0.206	0.761	0.668	2.88
	10	277	2340	2.47	19.3	7.85	72.4

子宮内容物中のサリドマイド濃度(GD13, 7hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 7hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	129	126	160
	250	8445	6601	10101
膈内	0.4	1.73	2.14	2.04
	10	120	115	156

子宮内容物中のサリドマイド濃度(GD13, 24hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 24hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta

経口	12.5	1.45	2.52	2.15
	250	442	330	546
膣内	0.4	0.440	NC	0.335
	10	15.6	13.8	19.8

子宮内容物中の5-OH体濃度(GD13, 7hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 7hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	1.02	0.395	1.64
	250	47.3	11.1	45.1
膣内	0.4	ND	ND	ND
	10	0.844	0.196	1.30

子宮内容物中の5-OH体濃度(GD13, 24hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 24hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	ND	ND	ND
	250	13.3	5.29	4.60
膣内	0.4	ND	ND	ND
	10	0.0765	ND	0.198

子宮内容物中の5'-OH体濃度(GD13, 7hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 7hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	4.34	3.52	6.10
	250	54.0	37.2	74.8
膣内	0.4	0.0877	0.148	0.180
	10	2.78	2.48	4.30

子宮内容物中の5'-OH体濃度(GD13, 24hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 24hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	0.0734	0.0729	0.104
	250	6.72	4.78	10.0
膣内	0.4	ND	ND	ND
	10	0.855	0.742	1.30

経口投与時の最大無作用量 (12.5 mg/kg) とヒトでの曝露量を考慮して算出した最大精漿移行濃度の100倍量に相当する膣内投与量(0.4 mg/kg)には用量的に31.25倍の開きがあるが、母動物の血中濃度パラメータを比較すると最高血中濃度 (C_{max}) では経口投与の最大無作用量の188分の1に過ぎず、血中濃度下面積 (AUC) では199分の1であった。両者の投与量に対する血中濃度の割合には6倍程度の解離があるが、この投

与量と母動物血中濃度の解離は、経口投与に比較して膣からのサリドマイドの吸収が遅延することに由来すると考えられる。

調製可能な最高濃度の被験液を膣内投与可能な最大液量投与する時、得られる最大投与量は10 mg/kgであるが、この量を膣内投与した時のサリドマイドの血中濃度は、投与量の違いを補正すると当該試験で12.5 mg/kgを経口投与した時に得られた血中濃度の3分の1から5分の1に過ぎなかった。

また、母動物血中の主要代謝物の割合も、サリドマイド原体での割合に近似していることから、膣内投与時の吸収量は経口投与の3分の1程度に過ぎないと考えられた。なお、吸収から子宮内容物への分布には経口投与および膣内投与に間に大差がないと考えられた。

3. サリドマイドの経口投与による母動物および胎・胎児発生への影響 (妊娠28日帝王切開)

3-1. 母動物

(1) 一般状態(表14)

死亡動物は認められなかった。

流産が妊娠23日に250 mg/kg の1例に観察された。

一般状態の変化として、投与期間中に排糞量の低下が25 mg/kg 群で1例、250 mg/kg 群で8例に認められた。この変化は投与終了後も25 mg/kg 群の4例、250 mg/kg 群の5例に、それぞれ、観察された。対照群においても排糞量の低下は投与期間終了後、2例に認められた。

12.5 mg/kg群の3例及び媒体対照群の1例で排糞量の減少が認められたが、250 mg/kg群での発現は妊娠3から13日のn投与期間中に認められているが、媒体対照群及び12.5 mg/kg群では投与後の妊娠15~19日に1~3回みられたのみであり、投与量の増加によって症状発現頻度の増加はみられないこと、同系統のウサギを用いた他の試験の媒体対照群及び同系統のウサギを使用した試験において比較的高頻度で日常的に認められる所見であることから、被験物質投与の影響ではないと推定した。以上の他には試験を通じて異常は認められなかった。

(2) 体重 (表15)

250 mg/kg 群では妊娠12日以降の体重実測値が妊娠期間を通して妊娠28日まで対照群と比較して有意に低値を示した。同群の体重増加量は、妊娠1日から14日 (投与期間中)、妊娠14日から28日 (投与期間終了後)、妊娠0日から妊娠28日の各期間の体重増加量は対照群と比較して有意に低値を示した。特に、投与後にあたる妊娠14日から28日の増加量は対照群が0.24 kg に対して、-0.01 kgであった。

25 mg/kg 群では、実測値に対照群との間に差は観察されなかったが、妊娠1日から14日 (投与期間中) 及び妊娠0日から妊娠28日の体重増加量は対照群と比較して有意に低値を示した。投与期間終了後の体重増加量には対照群と差は認められなかった。

12.5 mg/kg群では、妊娠期間中及び投与期間中 (妊娠1日~14日) の体重増加量が媒体対照群に比較して有意な高値を示した。投与期間終了後 (妊娠14日~28日) の増加量には変化はみられなかった。250 mg/kg群では体重の低値が認められており、ベクトルが逆であることから被験物質投与による変化とは考えられなかった。

(3) 剖検所見

対照群を含むいずれの投与群において、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観察されなかった。

3-2. 帝王切開 (表16)

250 mg/kg群では黄体数及び着床数の有意な低値が認められた。本試験においては交配直後に投与した被験物質の影響によって生殖学的影響が起こり、観察対象となる胎児が減少する状況を防止するため、交尾当日の投与を避ける計画で試験を実施したが、なお被験物質投与による影響は残留していると考えられた。

25 mg/kgおよび12.5 mg/kg群では黄体数、着床数、着床前死亡率、着床率、死亡胚・胎児数、着床後死亡率に媒体対照群との間で有意差は認められなかった。

3-3. 胎児観察

(1) 胚・胎児死亡 (表16、表17)

250 mg/kg群の胚・胎児死亡数及び着床後死亡率は有意な高値を示し、雌雄別及び雌雄を合わせた生存胎児数並びに雌雄を平均した生存胎児体重は低値を示した。

25 mg/kg群では雌の生存児数の有意な低値が認められた。性比にはいずれの投与群も媒体対照群と比べ有意な差は認められなかった。

12.5 mg/kgでは、雌の生存胎児数の有意な増加及び雌の生存胎児体重及び雌の胎盤重量の有意な低値が観察された。雌の生存胎児数の変化は増加であることから、偶発的に媒体対照の雌の生存胎児数が低値で会った事による二次的な変化と考えられた。雌胎児の生存胎児体重及び胎盤重量の低値は、生存胎児数が多かったことによる二次的な影響が考えられること、雄及び雄雌合計の体重胎盤重量には差がみられないことから、偶発的な有意差と考えられた。

胎盤に形態異常はみられず、胎盤重量にも変化は認められなかった。

(2) 胎児外表観察 (表18)

250 mg/kg 群では外表異常発現率が対照群と比較して有意に増加した。観察された外表異常は、四肢の湾曲、異常回転肢、過屈曲肢、小耳、異常回転手掌、欠指、過剰指、浮遊指、鉤状尾、短尾であり、異常回転肢、異常回転手掌、欠指の発現率に有意差が認められた。

25 mg/kg 群の1例にドーム型頭部が観察された。

12.5 mg/kg群に異常を呈した胎児は観察されなかった。

(3) 胎児内臓観察 (表19)

250 mg/kg 群及び25 mg/kg 群ともに内臓異常および変異の発現率が対照群と比較して有意に増加した。

観察された内臓異常および変化のうち、心室中隔筋性部欠損および大動脈拡張の発現頻度に統計学的有意差が観察された。

12.5 mg/kg群では内臓異常として心室中隔筋性部欠損、大動脈弓拡張、腎欠損、尿管欠損、心形態異常 (Misshapen heart) が、小数例観察され、内臓変異も認

められたが、発現頻度には12.5 mg/kg群と媒体対照群で有意差は認められなかった。

(4) 胎児骨格観察

250 mg/kg群では骨格異常率及び異常を示す胎児を有した母動物の発現率が有意な高値を示した。

観察された骨格異常及び変異のうち、中手骨欠損、前肢指骨欠損、脛骨欠損、距骨未骨化の発現頻度に統計学的有意差が観察された。

25 mg/kg群では骨格異常および変異が観察されたが、対照群との間に有意差はなかった。

12.5 mg/kg群では、骨格異常は認められなかった。骨格変異は対照群ともに観察されたが、両群の発現頻度には差はなかった。

3-4. 小括

令和3年度に実施した、最大精漿移行濃度の100倍量を腔内投与試験の投与量の妥当性および腔内投与と経口投与による胎児曝露量の比較検討のために、本分担研究では、サリドマイドを腔内投与試験と同時期である妊娠1~13日に経口投与し経口投与による母動物および胚・胎児への影響を確認した。

高用量群である250 mg/kg/dayの結果、母動物の一般状態及び体重に影響を及ぼし、一般毒性学的影響が及んだ投与量であると判断した。また、胎児の生存率が低下し、胎児の成長が抑制された。

外表、内臓及び骨格観察の結果、外表異常として異常回転肢、前肢過屈曲肢及び欠指が、内臓異常として心室中隔筋性部欠損、大動脈弓拡張などが、内臓変異として肺の副葉欠損などが認められた。骨格異常としては中手骨、脛骨及び前肢指節骨の欠損が認められ、骨格変異としては距骨未骨化の発現頻度のそれぞれ増加が認められた。

中間用量である25 mg/kg群ではこのうち、胎児の生存性及び胎児体重には変化がみられなかったものの、一部の骨での骨化数の低値が認められ、形態観察の結果、内臓観察では心室中隔筋性部欠損や大動脈弓拡張、骨格観察では中手骨欠損及び前肢指節骨欠損が少数例ながら認められた。

低用量である12.5 mg/kg群では、母動物への影響は認められず、胎児の生存性及び体重にも影響はなかった。また、外表異常も観察されず、無作用量の判断基準となった感度の高い指標と考えられる骨格観察における中手骨の欠損及び前肢の指節骨の欠損等も観察されなかった。

一方、同群では有意差はなかったが、心室中隔筋性部欠損が2腹の3例 (発現頻度5.7%) に認められた。この内臓異常は、25 mg/kg群で7.5%、250 mg/kg群では30.7%の発現頻度であり用量依存性がみられたことから、サリドマイドの経口投与との関連を否定できなかった。

なお、一連の動物試験を実施した施設における背景データでは、この異常は32試験 (対象胎児数355匹) において0~4.0% (Mean±2SD=0.13±1.55) の発現頻度である。

以上の結果から、サリドマイド12.5 mg/kgの反復経口投与は最大無作用量 (NOEL) と考えられた。

4. 妊娠雌ウサギの経口投与による薬物動態の解析

4-1. 結果

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、妊娠ウサギへの経口投与試験の投与量である12.5、25および250 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、妊娠ウサギに同用量を経口投与した際の実測値を比較した。

その結果、12.5および25 mg/kg/日 群では投与1日(妊娠1日)と投与13日(妊娠13日)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5~表11)は仮想出力値とほぼ一致した(図1)。

サリドマイド 250 mg/kg/日群では、25 mg/kg/日群と血中濃度-時間推移がやや異なり、初回投与後24時間値は比較的高濃度値で推移した。一方、反復投与13日(妊娠13日)の24時間後は、明らかな消失に伴う低血中濃度値を示したことから、薬物動態学的に平易な取扱いが難しい結果となった(図1)。

よって、2 mg/kg での経口投与のサリドマイドの初発代謝物を含む体内動態は、25 mg/kgまで用量に比例関係(線形)があることが明らかになった。しかし、250 mg/kg は代謝が飽和して消失が遅延すると考えられた。なお、ウサギに対して高用量サリドマイドの初回投与後に薬物血中消失が緩徐となる傾向は再現性があり、雄経口投与実験の250 および500 mg/kg/日群においても認められている(令和2年度実施)。

4-2. 小括

令和2年度に構築した、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、妊娠ウサギへの経口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。比較的低い投与量では、性差および投与量に関係なく、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。

D. 結論

本課題の本幹となる令和3年度に実施した腔内投与試験から得られた母動物および子宮内容物の薬物動態結果の妥当性を、経口投与試験結果から検討した。

その結果、経口投与時の最大無作用量(12.5 mg/kg)とヒトでの曝露量を考慮した最大精漿移行濃度の100倍量の腔内投与量(0.4 mg/kg、)には用量的に31.25倍の開きがあるが、母動物の血中濃度パラメータを比較すると最高血中濃度(C_{max})では経口投与の最大無作用量の188分の1に過ぎず、血中濃度下面積(AUC)では199分の1であった。

腔内投与した結果と令和4年度に実施した経口投与の結果から、腔内投与による曝露量は経口投与と比較して非常に微量であり、最大精漿移行濃度の100倍量を連続腔内投与しても、本条件下において、母動物および胎・胎児発生への影響は認められないと考えられた。

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) Ogiya D, Murayama N, Kamiya Y, Saito R, Shiraiwa S, Suzuki R, Machida S, Tazume K, Ando K, Yamazaki H. Low cerebrospinal fluid-to-plasma ratios of orally administered lenalidomide mediated by its low cell

membrane permeability in patients with hematologic malignancies. *Ann Hematol*, 101, 2013–2019, 2022.

- 2) Adachi K, Shimizu M, Yamazaki H. Updated in silico Prediction methods for fractions absorbed and key input parameters of 355 disparate chemicals for physiologically based pharmacokinetic models for time-dependent plasma concentrations after virtual oral doses in humans. *Biol Pharm Bull*, 45, 1812-1817, 2022.
- 3) Yamazaki, H, and Shimizu, M. Species specificity and selection of models for drug oxidations mediated by polymorphic human enzymes. *Drug Metab Dispos.*, 51, 123-129, 2023.
- 4) Uehara S, Murayama N, Higuchi Y, Shimizu M, Suemizu H, Guengerich FP, Yamazaki H. In vivo and in vitro induction of cytochrome P450 3A4 by thalidomide in humanized-liver mice and experimental human hepatocyte HepaSH cells. *Chem Res Toxicol*, 37, 671-674, 2024.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Yamazaki, H., 7th Asia Pacific Regional International Society of Study of Xenobiotics (ISSX) meeting, "Species Specificity and Selection of Animal Models for Drug Oxygenations Mediated by Polymorphic Human Enzymes," Bangalore, India. 2023年1月
- 2) Kuwagata M, Takashima H, Haneda R, Tanaka K, Hasegawa T, Yamazaki H, Kitajima S.: Possible teratogenic effects via male semen exposed to thalidomide in rabbits. The 62nd Annual meeting and ToxExpo ナッシュビル、アメリカ、2023年3月
- 3) Yamazaki, H., Species and individual differences of drug oxygenations mediated by polymorphic human cytochrome P450 enzymes, The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (Taipei, Taiwan) 2023年7月
- 4) Yamazaki, H., Model Selection for Drug Oxygenations Mediated by Polymorphic Human Enzymes 2023 international joint meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics (Shizuoka, Japan) 2023年 9月
- 5) Kuwagata M, Takashima H, Haneda R, Tanaka K, Hasegawa T, Yamazaki H, Kitajima S.: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits Eurotox Congress 2023 (Ljubjana, Slovenia) 2023年9月

国内学会

- 1) 葉形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイドの発生毒性；雄精漿移行による催奇形性発現の可能性、第49回日本毒性学会学術年会シンポジウム(サリドマイド研究の新展開：代謝から種差を説明する)、札幌、2022年6月
- 2) 山崎 浩史 第49回日本毒性学会シンポジウム「サリドマイドのヒト型酸化的代謝物のウサギでの生成：奇形のないラットとの比較」、札幌、2022年6月

- 3) 桑形麻樹子：精漿を介した催奇形性発現の可能性
第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2022年6月
- 4) 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、桑形麻樹子：サリドマイドに係る雄性生殖を介した発生毒性、第62回日本先天異常学会学術集会、つくば、2022年7月
山崎 浩史 日本動物実験代替法学会第35回大会シンポジウム「データ駆動型生理学的薬物動態モデルを用いる化学物質の体内濃度予測」、静岡、2022年11月
- 5) 山崎 浩史：特別講演 II「薬物代謝研究の進歩と展望」第30回HAB研究機構学術年会、東京、2023年5月
- 6) 山崎 浩史：「医薬品における雄性生殖を介した発生毒性リスクの考え方」モデル動物体内動態情報から考えるサリドマイド類のヒト精漿への移行 第50回日本毒性学会学術年会シンポジウム、横浜、2023年6月
- 7) 長谷川拓郎、白方渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子：LC-MS/MSを用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション。第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月
- 8) 高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、山崎浩史、北嶋聡、桑形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド腔内投与による催奇形作用評価。第50回日本毒性学会学術年、横浜、2023年6月
- 9) 桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋聡：ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明。第63回日本先天異常学会学術集会、つくば、2023年7月
- 10) 桑形麻樹子：ウサギ精漿を介したサリドマイドによる発生毒性のリスク、第97回日本薬理学会年会、神戸、2023年12月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

II.分担報告書－1

分担研究者 桑形 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反復経口投与による母動物および胚・胎児への薬物移行に関する検討—

研究分担者 栞形 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データはない。本研究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、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。具体的には、サリドマイドによる催奇形性発現に感受性をもつウサギを用いて、雄性生殖を介した発生毒性発現のリスクについて評価しうるデータを得ることである。

令和3年度に実施した最大精漿移行濃度の約100倍量を腔内投与により、精漿移行による催奇形性発現は非常に低いことを報告した。令和4年度は分担研究として、腔内投与試験立案法(投与量設定)の妥当性を確認するために、妊娠雌ウサギに催奇形性量のサリドマイドを経口投与した時の母動物および子宮内容物(胎盤、卵黄囊膜、胎児)の薬物動態を確認し、腔内投与による曝露量と経口投与による曝露量を比較し、腔内投与による催奇形性発現リスクについて考察するためのデータを得た。

令和4年度は、奇形発現量と考えられる250 mg/kg/dayおよびその1/10量で文献検索上、奇形の報告がなかった25 mg/kg/dayのサリドマイドを妊娠雌に経口投与し、母動物および子宮内容物(胎盤、卵黄囊膜、胎児)の薬物曝露量の確認を先行して確認した。その結果、投与7時間の採血点で、不妊動物あるいは全胚胎児死亡母体の増加により母動物数が1~2例のみになってしまったこと、25 mg/kg群においてサリドマイド投与による催奇形性が疑われたことから、追加検討として、動物数および投与量(12.5 mg/kg/day群)を見直し、同様の検討を実施した。本課題の本幹となるR3年度に実施した腔内投与試験から得られた母動物および子宮内容物の薬物動態結果の妥当性を、経口投与試験結果から検討した。

その結果、経口投与時の最大無作用量(12.5 mg/kg)とヒトでの曝露量を考慮した最大精漿移行濃度の100倍量の腔内投与量(0.4 mg/kg、)には用量的に31.25倍の開きがあるが、母動物の血中濃度パラメータを比較すると最高血中濃度(Cmax)では経口投与の最大無作用量の188分の1に過ぎず、血中濃度下面積(AUC)では199分の1であった。腔内投与した結果とR4年度に実施した経口投与の結果から、腔内投与による曝露量は経口投与と比較して非常に微量であり、最大精漿移行濃度の100倍量を連続腔内投与しても、本条件下において、母動物および胚・胎児発生への影響は認められないと考えられた。

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、サリドマイドの雄性生殖を介した催奇形性発現リスクについて検討する。

- (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腔内投与し、母動物及び胎児組織への移行を確認するとともに催奇形性の有無を確認する。
- (4) 器官形成期の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4年度は(4)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 : 50-35-1

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を秤取り、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 : 1H99) 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り、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、先行及び追加検討あわせて52匹購入し、試験には42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 : 2022年2月4日 (入荷時16週齢、30匹)

交配時の体重範囲 : 2.8~3.65 kg (先行試験)

3.0~4.5 kg (追加試験)

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、ステンレス板及びステンレス製チェーンを与えた

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

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

血漿試料 : 遠心分離 (約4℃、1600x g、10分間) によ

り得た。等量の安定剤を添加し保存した。

250	50	5	8 (7)	2101~2108
-----	----	---	-------	-----------

*括弧内は妊娠動物数

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. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する検討 (妊娠13-14日解剖) (添付資料1) 【先行実験】

2-1. 目的

本試験の目的は、令和3年度に実施した最大精漿移行濃度の約100倍量を膈内投与量と算出して実施した試験計画の妥当性を確認することである。

具体的には、薬物吸収が良い経口投与において、文献検索及び予備的検討により奇形発現量である250 mg/kg、およびその1/10量で文献上奇形発現の報告の認められない25 mg/kg のサリドマイドを経口投与した妊娠雌における、血漿中濃度の推移と胎児を始めとする子宮内容における被験物質の曝露状況を検討することである (R4年度先行実験、中間報告)。

2-2. 投与期間および投与回数

投与経路、投与期間、投与回数は、膈内投与試験に合わせ、交尾翌日 (妊娠1日) から妊娠13日まで、1日1回、13日間、反復経口投与する。投与回数は1日1回 (7日/週) とした。

この投与期間はthalidomideによる催奇形作用への感受性が高い時期である。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。

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

2-3. 投与方法

投与容量は5 mL/kgとし、媒体に懸濁したthalidomideを、ウサギ用経口投与チューブ (ネラトンカテーテル、テルモ社製) (注1)を用いて強制経口投与した (08:22~12:06の間)。

投与後は、カテーテル内を約4mLの水道水でフラッシングした。

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

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

2-4. 投与量

群構成を下記に示す。

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立 雌動物数*	動物番号
25	5	5	8 (7)	1101~1108

投与量設定根拠

令和2年度に実施したサリドマイドを用いた発生毒性の予備的検討においては、妊娠9日から13日の5日間、250 mg/kg を反復経口投与した結果、早期死亡胚の増加が認められ、生存胎児の得られた全腹で胎児に奇形 (短鼻や眼突出等の顔面の異常、屈曲肢、過屈曲肢、肺副葉欠損、脳室の拡張等の異常) が認められた。

また、文献検索の結果からは、ウサギの妊娠8日あるいは9日に100 mg/kg 以上を投与した論文では、奇形の発現が報告されている。この予備的検討と文献検索の結果から、本試験における高用量群の投与量として奇形を有する胎児が認められることが期待される、250 mg/kg とした。

なお、250 mg/kg は雄ウサギ単回経口投与および反復経口投与試験にも使用した用量である (令和2年度実施)。

一方、低用量には文献検索において奇形の発現の報告がなく、投与量として高用量群の10分の1量であり、無毒性量であることが期待される25 mg/kg を選択した。

投与容量は5 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、生死及び流産の確認と合わせて、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察した。

体重は妊娠0、1、3、6、8、10、12、13、および14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 (最終投与日; 妊娠13日)

剖検は子宮内容物濃度が最も高くなると考えられる妊娠13日の投与後7時間と24時間に行った。

解剖する動物は、ペントバルビタールナトリウム静脈内投与による深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)

剖検時に肉眼的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については、卵巣の妊娠黄体数を数え、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) 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、生存胎児の胎盤異常の有無を肉眼的に調べ、重量を個々に測定した。

肉眼的に着床が認められなかった3例 (25 mg/kg 群: 動物番号1101及び1102、250 mg/kg 群: 動物番号2101) については妊娠黄体数を記録し、子宮は10%硫酸アンモニウム溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。その結果、25 mg/kg 群の1例 (動物番号1102) は着床が認められたため、全胚吸収している妊娠動物であると判断し着床数を記録し、子宮と卵巣をリン酸緩衝10%ホルマリン液で固定・保存した。その他の動物の子宮に着床部位は認められなかったため、不妊と判断し子宮と卵巣は廃棄した。不妊動物のデータは全てのデータを評価から除外した。

3. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する追加検討（妊娠13-14日解剖）（添付資料2）【追加実験】

【先行実験】の結果、投与7時間の採血点で、不妊動物あるいは全胚胎児死亡母体の増加により、母動物数が1~2例のみになってしまったこと、25 mg/kg群においてサリドマイド投与による胎児への影響が疑われたことから、動物数の追加およびさらに低い12.5 mg/kg/day群を追加して、2. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する検討（妊娠13-14日解剖）と同様の検討を実施し経口投与のよる母動物および胎児への曝露量を補強した。

3-1. 目的

2-1. 参照

3-2. 投与期間および投与回数

2-2. 参照

3-3. 投与方法

2-3. 参照

なお、8:25~11:15の間に経口投与した。

3-4. 投与量

群構成を以下に示す。

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌動物数*	動物番号
12.5	2.5	5	8(6)	2101~2108
25	5	5	2(2)	3101~3102
250	50	5	4(4)	4101~4104

*括弧内は妊娠動物数

投与量設定根拠

先行して実施した2-1.ウサギを用いた経口投与による胚・胎児発生に関する試験において、経口投与において形態形成に異常を認めない用量（最大無毒性量）及びその時の母体及び子宮内容物中の最大無毒性量を求め、膈内投与の最大無作用と（用量）比較して、雄の生殖器系を介した被験物質の曝露による影響が、経口投与に比較していかに軽度なものであるかを明示する予定であった。

しかし、この試験において、25 mg/kgの経口投与により、外表検査においてドーム状頭部がみられた胎児が1例発現し、骨格及び内臓検査でも形態異常が認められた。これらの形態異常について検討した結果、①サリドマイドの投与により、発生が報告されている異常が認められること、及び②背景的には比較的稀な所見がみられることの2点から、これらの形態異常がサリドマイド投与とは無関係であると結論することができなかった。すなわち、サリドマイド25 mg/kgの妊娠1日から13日の経口投与は最大無毒性量とは出来なかった。

以上のことから、経口投与時の最大無毒性量を求めることを目的に軽度な影響のみみられた25 mg/kgの半量である、12.5 mg/kgを投与し、妊娠28日に帝王切開して胎児の生存性及び形態観察を実施することとした。

一方、奇形発現量のサリドマイドを投与した場合の母動物血中濃度及び子宮内容物中濃度について、昨年度の検討での不妊および全胚吸収例の成績を補完するため、母動物の妊娠1日から妊娠13日にサリドマイ

ドの250 mg/kgを反復経口投与し、妊娠13日に剖検して母動物血中濃度及び子宮内容物中濃度を測定する群及びこれと比較するための25 mg/kg群を設けた。

3-5. 動物の観察

2-5. 参照

3-6. 剖検（最終投与日；妊娠13日）

2-6. 参照

3-7. 帝王切開（最終投与日；妊娠13日）

2-7. 参照

4. サリドマイドの経口投与による母動物血漿中及び子宮内容物中の薬物動態（トキシコキネティクス;TK）【先行実験】

「2. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する検討（妊娠13-14日解剖）【先行実験】」で得られた試料を用いて、母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、胎児）中の薬物動態を調べた。

4-1. 母動物

(1) 母体試料の採取

妊娠1日に3時点、妊娠13日に7時点において母動物から採血した。

母動物採血時期	採血時間 (時間)
GD1	4, 7, 24 (GD2 pre)
GD13	Pre, 0.5, 1, 2, 4, 7, 24

(2) 対象動物及び採血量

対象動物を保定器に入れ、へパリンナトリウム処理シリンジを用いて以下の時点で無麻酔下で耳介静脈から採血した。

GD13解剖時期	解剖対象動物番号
投与7時間後	末尾01~04
投与24時間後	末尾05~08

(3) 血液の処理

血液をポリプロピレン製容器に移して氷冷し、遠心分離（4℃、1,600×g、10分間）により血漿（約160 µL）を得た。これに等量の 25 mM Sorensen's citrate buffer（注2）を加えて血漿試料とした。

（注2）pH 1.5: 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 SKE6244）の1.47 gを注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号 1H99）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。

(4) 血漿試料（TK試料）の保存

得られた試料は試験番号、採血時期、動物番号、試料番号、採血年月日、採血時点、試料名を明記したラベルを貼付したポリプロピレン製容器各2本に分注し、送付まで-80℃の冷凍庫（許容値：-70℃以下、実測値は許容範囲内であった）で保存した。

4-2. 子宮内容物試料の採取

(1) 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。試料は送付まで-80°Cの冷凍庫（許容値：-70°C以下、実測値は許容範囲内であった）で保存した。

(2) 胚

卵黄嚢膜と分離した胚は、ストロングチューブ各1本に入れ、重量を測定した。試料は送付まで-80°Cの冷凍庫（許容値：-70°C以下、実測値は許容範囲内であった）で保存した。

(3) 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。

試料は測定まで-80°Cの冷凍庫（許容値：-70°C以下、実測値は許容範囲内であった）で保存した。

5. サリドマイドの経口投与による母動物血漿中及び子宮内容物中の薬物動態（TK）【追加試験】

「3. サリドマイドの経口投与による胚・胎児移行に関する追加検討（妊娠13-14日解剖）【追加実験】」で得られた試料を用いて、母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）中の薬物動態を調べた。

5-1. 母動物

(1) 母体試料の採取

4-1. と同様

(2) 対象動物及び採血量

対象動物を保定器に入れ、へパリンナトリウム処理シリンジを用いて以下の時点で無麻酔下で耳介静脈から採血した。

GD13解剖時期	解剖対象動物番号
投与7時間後	12.5 mg/kg群の末尾01~08例 25および250 mg/kg群の全例
投与24時間後	12.5 mg/kg群の末尾05~08の4例

(3) 血液の処理

4-1. と同様

(4) 血漿試料（TK試料）の保存

4-1. と同様

5-2. 子宮内容物試料の採取

(1) 卵黄嚢膜

4-2. と同様

(2) 胚

4-2. と同様

(3) 胎盤

4-2. と同様

試料は測定まで-80°Cの冷凍庫（許容値：-70°C以下、実測値は許容範囲内であった）で保存した。

6. 統計解析

6-1. パラメータの算出

着床前死亡率、着床率、着床後死亡率を腹ごとに、以下の式により算出した。

着床前死亡率 (%) =

$$\left[\frac{\text{黄体数} - \text{着床数}}{\text{黄体数}} \right] \times 100$$

着床率 (%) = (着床数/黄体数) × 100

着床後死亡率 (%) = (死亡胚数/着床数) × 100

6-2. データ処理

各測定日の体重、妊娠1~13日の体重増加量、妊娠黄体数、着床数、生存胚数、死亡胚数及び胎盤重量については、群ごとに平均値及び標準偏差を求めた。

なお、データ採取に使用したコンピュータシステムは、MiTOX-BOZOシステム（Version 9.3.1.1、三井E&Sシステム技研株式会社）である。

(倫理面への配慮)

科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果及び考察

1. サリドマイドの経口投与による母動物及び胚・胎児移行に関する検討（妊娠13-14日帝王切開）

【先行実験】および【追加実験】の群構成および使用動物を下記に示す。

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌動物数*
12.5	2.5	5	8(6)
25	5	5	10(9)
250	50	5	12(11)

*括弧内は妊娠動物数

1-1. 一般状態

先行及び追加実験ともに、死亡及び流産動物は発現しなかった。排糞量の減少が250 mg/kg 群の5例で1~5日間認められ、うち1例では無便がみられた。25 mg/kg以下の群では、一般状態の異常は認められなかった（表1）。

1-2. 体重

250 mg/kg 群と25 mg/kg 群の体重推移及び投与期間中の体重増加量に明確な差はなかった（表2）。

250 mg/kg 群の1例（動物番号 2103）で妊娠1日から妊娠13日の投与期間中の体重増加量が負の値を示した。この動物の体重推移をみると投与開始直後の妊娠1日~3日の減少が最も大きく、その後も妊娠6日~8日、妊娠10日~13日に断続的に低値がみられている。この体重増加が抑制された時期と一般状態観察において排糞量の低下が認められた時期が一致すること、母動物の血漿中濃度測定の結果、投与後7時間後剖検群の中では、この動物が妊娠1日及び妊娠13日のC_{max}、AUC_{0-t}とも最も高値を示した例であることから、この動物の体重増加抑制は、被験物質投与による毒性学的影響によるものと判断した。なお、この腹は全胚吸収例（着床数7）であった。

250 mg/kg 群のその他の動物及び25 mg/kg以下の群では体重推移に被験物質投与の影響は認められなかった。

1-3. 剖検所見（妊娠13日）

いずれの投与群においても体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官・組織に肉眼的な異常はみられなかった。

1-4. 帝王切開所見 (表3、表4)

帝王切開所見を表3およびその個別表を表4に示す。
 250 mg/kg 群では1例が不妊、3例が全胚吸収例で、死胚数及び着床後死亡率が高値を示した。
 12.5 mg/kg群では2例25 mg/kg 群では1例が不妊、1例の着床が1 (妊娠黄体1) であった。
 黄体数、着床数、着床前死亡率及び着床率には投与による影響は認められず、胎盤にも異常は認められなかった。

2. サリドマイドの経口投与による母動物血漿中および子宮内容物中の薬物動態 (トキシコキネティクス; TK)

2-1. 母動物血漿中濃度 (表5~10)

投与開始日 (妊娠1日) 及び投与最終日 (妊娠13日) の母動物血漿中のthalidomide、5-hydroxythalidomide (5-OH体)、及び5'-hydroxythalidomide (5'-OH体) の血漿中濃度推移およびTKパラメータを表5~表10に示した。なお、25 および250 mg/kg群は先行試験及び追加試験のデータを合わせ再計算した結果を示す。

GD1

(mg/kg)	Thalidomide		5-OH 体		Total 5'-OH 体	
	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC
12.5	1320	10800	9.21	72.2	68.4	576
25	3190	36300	18.2	196	92.2	927
250	13300	222000	67.7	1110	211	3510

GD13

(mg/kg)	Thalidomide		5-OH 体		Total 5'-OH 体	
	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC
12.5	1770	9590	9.09	49.7	64.6	416
25	4320	32700	21.2	160	65.1	519
250	21900	191000	63.8	581	214.9	2011

250 mg/kg 群のC_{max}及びAUC_{0-t}はいずれの測定日においても、25 mg/kg 群のC_{max}の10倍及びAUC_{0-t}の10倍には及ばないことから、サリドマイドの母動物血漿中濃度は25 mg/kgから250 mg/kgの間で比例関係が破綻していると考えられた。

妊娠1日と妊娠13日のパラメータを比較すると全投与2群とも妊娠13日のC_{max}が妊娠1日に比較して高値であったが、AUC_{0-t}ではその傾向は顕著ではなかったことから、生体内の顕著な蓄積性はないと考えられた。
 母動物血漿中の主要代謝物については、いずれの投与群においてもヒト型代謝物がげっ歯類型代謝物よりも高濃度を示す母動物は認められなかった。

2-2. 胎盤、卵黄囊、胎児組織中濃度 (表11~表13)

最終投与日 (GD13) の投与7時間および24時間後にける子宮内容物におけるサリドマイド濃度を表11から表13に示した。

胎盤

胎盤中のサリドマイド濃度はいずれの群も母動物血漿中濃度のおよそ30~75%であり、母動物の血漿中濃度を上回る例は認められなかった。
 主要代謝物については、ヒト型主要代謝物である5-OH体濃度はサリドマイド原体の2%以下、ラット型主要代謝物である5'-OH体濃度はサリドマイド原体の7%以下であった。胎児毎にみると5-OH体濃度が5'-OH体を上回る例はなかった。

卵黄囊膜

卵黄囊膜中濃度は胎児中濃度とほぼ同様の値を示した。いずれの投与量においても、胎盤中濃度は母動物血漿中濃度に比較して、30~75%の値を示した。

胎児

毒性発現量である250 mg/kg群の一腹1例の胎児にて胎児中濃度が胎盤中濃度を上回り101%を呈した。同群のそれ以外の胎児を含め、いずれの投与群においても胎児中濃度は胎盤中濃度の25~75%であった。

主要代謝物については、卵黄囊膜及び胎児中の5-OH体および5'-OH体の割合は胎児毎にみてもほぼ同様な傾向を示し、ヒト型代謝物がげっ歯類型代謝物よりも高濃度を示した例は認められなかった。

また、令和3年度に実施した膈内投与と試験経口投与における母動物中及び子宮内容物のサリドマイドおよび主要代謝物濃度の比較を下表に示す。

なお、経口投与による12.5 mg/kg/dayは最大無作用量、250 mg/kg/dayは毒性発現量を示し、膈内投与による0.4 mg/kgは最大精漿移行濃度の100倍量、10 mg/kgは投与最大量の用量である。

母動物血漿中TKパラメータ (GD13, ng/mL)

投与経路	(mg/kg)	Thalidomide		5-OH		Total 5'-OH	
		C _{max}	AUC	C _{max}	AUC	C _{max}	AUC
経口	12.5	1770	9590	9.09	49.7	64.6	416
	250	21855	190818	63.8	581	215	2011
膈内	0.4	9.41	48.1	0.206	0.761	0.668	2.88
	10	277	2340	2.47	19.3	7.85	72.4

子宮内容物中のサリドマイド濃度 (GD13, 7hr, ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 7hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	129	126	160
	250	8445	6601	10101
膈内	0.4	1.73	2.14	2.04
	10	120	115	156

子宮内容物中のサリドマイド濃度 (GD13, 24hr, ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 24hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta

経口	12.5	1.45	2.52	2.15
	250	442	330	546
膣内	0.4	0.440	NC	0.335
	10	15.6	13.8	19.8

子宮内容物中の5-OH体濃度(GD13, 7hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 7hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	1.02	0.395	1.64
	250	47.3	11.1	45.1
膣内	0.4	ND	ND	ND
	10	0.844	0.196	1.30

子宮内容物中の5-OH体濃度(GD13, 24hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 24hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	ND	ND	ND
	250	13.3	5.29	4.60
膣内	0.4	ND	ND	ND
	10	0.0765	ND	0.198

子宮内容物中の5'-OH体濃度(GD13, 7hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 7hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	4.34	3.52	6.10
	250	54.0	37.2	74.8
膣内	0.4	0.0877	0.148	0.180
	10	2.78	2.48	4.30

子宮内容物中の5'-OH体濃度(GD13, 24hr. ng/g)

投与経路	(mg/kg)	GD13, 24hr		
		Yolk sac	Embryo	Placenta
経口	12.5	0.0734	0.0729	0.104
	250	6.72	4.78	10.0
膣内	0.4	ND	ND	ND
	10	0.855	0.742	1.30

経口投与時の最大無作用量 (12.5 mg/kg) とヒトでの曝露量を考慮して算出した最大精漿移行濃度の100倍量に相当する膣内投与量(0.4 mg/kg)には用量的に31.25倍の開きがあるが、母動物の血中濃度パラメータを比較すると最高血中濃度 (C_{max}) では経口投与の最大無作用量の188分の1に過ぎず、血中濃度下面積 (AUC) では199分の1であった。両者の投与量に対する血中濃度の割合には6倍程度の解離があるが、この投

与量と母動物血中濃度の解離は、経口投与に比較して膣からのサリドマイドの吸収が遅延することに由来すると考えられる。

調製可能な最高濃度の被験液を膣内投与可能な最大液量投与する時、得られる最大投与量は10 mg/kgであるが、この量を膣内投与した時のサリドマイドの血中濃度は、投与量の違いを補正すると当該試験で12.5 mg/kgを経口投与した時に得られた血中濃度の3分の1から5分の1に過ぎなかった。

また、母動物血中の主要代謝物の割合も、サリドマイド原体での割合に近似していることから、膣内投与時の吸収量は経口投与の3分の1程度に過ぎないと考えられた。なお、吸収から子宮内容物への分布には経口投与および膣内投与に間に大差がないと考えられた。

D. 結論

本課題の本幹となるR3年度に実施した膣内投与試験から得られた母動物および子宮内容物の薬物動態結果の妥当性を、経口投与試験結果から検討した。

その結果、経口投与時の最大無作用量(12.5 mg/kg)とヒトでの曝露量を考慮した最大精漿移行濃度の100倍量の膣内投与量(0.4 mg/kg)には用量的に31.25倍の開きがあるが、母動物の血中濃度パラメータを比較すると最高血中濃度 (C_{max}) では経口投与の最大無作用量の188分の1に過ぎず、血中濃度下面積 (AUC) では199分の1であった。

膣内投与した結果とR4年度に実施した経口投与の結果から、膣内投与による曝露量は経口投与と比較して非常に微量であり、最大精漿移行濃度の100倍量を連続膣内投与しても、本条件下において、母動物および胎・胎児発生への影響は認められないと考えられた。

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
なし
2. 学会発表

国際学会

1) Kuwagata M*, Takashima H, Haneda R, Tanaka K, Hasegawa T, Yamazaki H, Kitajima S.: Possible teratogenic effects via male semen exposed to thalidomide in rabbits. The 62nd Annual meeting and ToxExpo (2023.03.19-23) ナッシュビル、アメリカ

2) Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. (2023.9.10-13) リュブリャナ、スロベニア

国内学会

1) 葉形麻樹子: ウサギを用いたサリドマイドの発生毒性; 雄精漿移行による催奇形性発現の可能性、第49回日本毒性学会学術年會シンポジウム (サリドマイ

ド研究の新展開：代謝から種差を説明する)
(2022.6.30) 札幌

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、桑形麻樹子：サリドマイドに係る雄性生殖を介した発生毒性、第62回日本先天異常学会学術集会（2022.7.28）つくば

3) 桑形麻樹子：精漿を介した催奇形性発現の可能性
第50回日本毒性学会学術年会(2022.6.30) 横浜

4) 長谷川拓郎、白方渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子：LC-MS/MSを用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション．第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

5) 高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、山崎浩史、北嶋聡、桑形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド腔内投与による催奇形作用評価．第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

6) 桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋聡：ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明．第63回日本先天異常学会学術集会(2023.7.28-30)つくば

7) 桑形麻樹子：ウサギ精漿を介したサリドマイドによる発生毒性のリスク
第97回日本薬理学会年会(2023.12.14) 神戸

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 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経口反復投与による胚・胎児発生への影響（妊娠28日帝王切開）－

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、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。具体的には、サリドマイドによる催奇形性発現に感受性をもつウサギを用いて、雄性生殖を介した発生毒性発現のリスクについて評価しうるデータを得ることである。

令和3年度に実施した、最大精漿移行濃度の約100倍量を腔内への曝露量として立案した腔内投与試験の妥当性を確認するために、令和4年度は、妊娠雌ウサギに催奇形性量のサリドマイドを器官形成期に経口投与した。分担研究として、経口投与による母動物への影響および胎児形態への影響を確認した。その結果、サリドマイド12.5 mg/kgの反復経口投与は妊娠雌ウサギに対する最大無作用量（NOEL）と考えられた。

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。

分担研究としての目的は、本研究で設定したサリドマイド用量の経口投与による母動物および胚・胎児発生への影響を確認することである。

B. 研究方法

令和3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腔内移行量の100倍量(0.4 mg/kg)を腔内投与した試験計画の妥当性を確認するために、催奇形性量のサリドマイドを妊娠ウサギの妊娠1～13日まで経口投与し、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 (thalidomide)
CAS 番号 : 50-35-1
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 : 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、34匹購入し、試験には28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：2022年2月4日（入荷時16週齢、30匹）
交配時の体重範囲：3.0~4.5 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°C)、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

2. サリドマイドの経口投与による母動物および胚・胎児発生への影響（妊娠28日解剖）

2-1. 目的

本研究の目的は、令和3年度に実施した最大精漿移行濃度の約100倍量を膈内投与量と算出して実施した試験計画の妥当性を確認することである。

具体的には、薬物吸収が良い経口投与において、文献検索及び予備的検討により奇形発現量である250 mg/kg、およびその1/10量で文献上奇形発現の報告の認められない25 mg/kg を投与した妊娠雌への影響および胚・胎児への影響を確認する（先行実験）。

先行実験の結果、軽度であるが25 mg/kg群で催奇形性が疑われたため、さらに半用量である12.5 mg/kgを追加した（追加実験）。

本分担研究ではサリドマイド経口投与後、妊娠28日に帝王切開し、妊娠全期間を通した母動物への影響および胎児発生への影響を確認した。

2-2. 投与期間および投与回数

投与経路、投与期間、投与回数は、膈内投与試験に合わせ、交尾翌日（妊娠1日）から妊娠13日まで、1日1回、13日間、反復経口投与する。投与回数は1日1回（7日/週）とした。

この投与期間はサリドマイドによる催奇形作用への感受性が高い時期である。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、投与されたサリドマイド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。

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

2-3. 投与方法

投与容量は5 mL/kgとし、媒体に懸濁したthalidomideを、ウサギ用経口投与チューブ（ネラトンカテーテル、テルモ社製）（注1）を用いて強制経口投与した（08:22~12:06の間）。

投与後は、カテーテル内を約4mLの水道水でフラッシングした。

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

2-4. 投与量

群構成を下記に示す。

先行実験

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌 (生存胎児含有雌/妊娠雌)	動物番号
0	5	5	8 (7/7)	1101~1108
25	50	5	8 (8/8)	2101~2108
250	50	5	12 (5/12) *	3101~3112

*12例中1例は流産

追加実験

投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	交尾成立雌 (生存胎児含有雌/妊娠雌)	動物番号
0	5	5	4 (4/4)	1101~1104
12.5	2.5	5	8 (8/8)	2109~2116

投与量設定根拠

令和2年度に実施したサリドマイドを用いた発生毒性の予備的検討においては、妊娠9日から13日の5日間、250 mg/kg を反復経口投与した結果、早期死亡胚の増加が認められ、生存胎児の得られた全腹で胎児に奇形（短鼻や眼突出等の顔面の異常、屈曲肢、過屈曲肢、肺副葉欠損、脳室の拡張等の異常）が認められた。

また、文献検索の結果からは、ウサギの妊娠8日あるいは9日に100 mg/kg 以上を投与した論文では、奇形の発現が報告されている。この予備的検討と文献検索の結果から、本試験における高用量群の投与量として奇形を有する胎児が認められることが期待される、250 mg/kg とした。

なお、250 mg/kg は雄ウサギ単回経口投与および反復経口投与試験にも使用した用量である（令和2年度

実施)。

一方、低用量には文献検索において奇形の発現の報告がなく、投与量として高用量群の10分の1量であり、無毒性量であることが期待される25 mg/kg を選択した。

先行実験の結果、軽度であるが25 mg/kg群で催奇形性が疑われたため、さらに半用量である12.5 mg/kgを追加した(追加実験)。

投与容量は5 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、1、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日の午前に、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)による深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

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。

(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¹⁾、心臓は西村の顕微解剖法²⁾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作製した。

染色試薬

- ・アリザリンレッドS
特級、関東化学、Cat no. 0113-30)
- ・アルシアンブルー
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)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

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

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、死亡胚・胎児数、生存胎児体重、胎盤重量は、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、内臓異常率及び内臓変異率については、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、内臓および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(表14)

死亡動物は認められなかった。

流産が妊娠23日に250 mg/kg の1例に観察された。

一般状態の変化として、投与期間中に排糞量の低下が250 mg/kg 群で1例、250 mg/kg 群で8例に認められた。この変化は投与終了後も250 mg/kg 群の4例、250 mg/kg 群の5例に、それぞれ、観察された。対照群においても排糞量の低下は投与期間終了後、2例に認められた。

12.5 mg/kg群の3例及び媒体対照群の1例で排糞量の減少が認められたが、250 mg/kg群での発現は妊娠3から13日のn投与期間中に認められているが、媒体対照群及び12.5 mg/kg群では投与後の妊娠15～19日に1～3回みられたのみであり、投与量の増加によって症状発現頻度の増加はみられないこと、同系統のウサギを用いた他の試験の媒体対照群及び同系統のウサギを使用した試験において比較的高頻度で日常的に認められる所見であることから、被験物質投与の影響ではないと推定した。以上の他には試験を通じて異常は認められなかった。

1-2. 体重(表15)

250 mg/kg 群では妊娠12日以降の体重実測値が妊娠期間を通して妊娠28日まで対照群と比較して有意に低値を示した。同群の体重増加量は、妊娠1日から14日(投与期間中)、妊娠14日から28日(投与期間終了後)、妊娠0日から妊娠28日の各期間の体重増加量は対照群と比較して有意に低値を示した。特に、投与後にあたる妊娠14日から28日の増加量は対照群が0.24 kg に対して、-0.01 kgであった。

250 mg/kg 群では、実測値に対照群との間に差は観察されなかったが、妊娠1日から14日(投与期間中)及び妊娠0日から妊娠28日の体重増加量は対照群と比較して有意に低値を示した。投与期間終了後の体重増加量には対照群と差は認められなかった。

12.5 mg/kg群では、妊娠期間中及び投与期間中(妊娠1日～14日)の体重増加量が媒体対照群に比較して有意な高値を示した。投与期間終了後(妊娠14日～28日)の増加量には変化はみられなかった。250 mg/kg群では体重の低値が認められており、ベクトルが逆であることから被験物質投与による変化とは考えられなかった。

1-3. 剖検所見

対照群を含むいずれの投与群において、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観察されなかった。

2. 帝王切開(表16)

250 mg/kg群では黄体数及び着床数の有意な低値が認められた。本試験においては交配直後に投与した被験物質の影響によって生殖学的影響が起り、観察対象となる胎児が減少する状況を防止するため、交尾当日の投与を避ける計画で試験を実施したが、なお被験物質投与による影響は残留していると考えられた。

25 mg/kgおよび12.5 mg/kg群では黄体数、着床数、着床前死亡率、着床率、死亡胚・胎児数、着床後死亡率に媒体対照群との間で有意差は認められなかった。

3. 胎児観察

3-1. 胚・胎児死亡(表16、表17)

250 mg/kg群の胚・胎児死亡数及び着床後死亡率は有意な高値を示し、雌雄別及び雌雄を合わせた生存胎児数並びに雌雄を平均した生存胎児体重は低値を示した。

250 mg/kg群では雌の生存胎児数の有意な低値が認められた。性比にはいずれの投与群も媒体対照群と比べ有意な差は認められなかった。

12.5 mg/kgでは、雌の生存胎児数の有意な増加及び雌の生存胎児体重及び雌の胎盤重量の有意な低値が観察された。雌の生存胎児数の変化は増加であることから、偶発的に媒体対照の雌の生存胎児数が低値で会った事による二次的な変化と考えられた。雌胎児の生存胎児体重及び胎盤重量の低値は、生存胎児数が多かったことによる二次的な影響が考えられること、雄及び雄雌合計の体重胎盤重量には差がみられないことから、偶発的な有意差と考えられた。

胎盤に形態異常はみられず、胎盤重量にも変化は認められなかった。

3-2. 胎児外表観察(表18)

250 mg/kg 群では外表異常発現率が対照群と比較して有意に増加した。観察された外表異常は、四肢の湾曲、異常回転肢、過屈曲肢、小耳、異常回転手掌、欠指、過剰指、浮遊指、鉤状尾、短尾であり、異常回転肢、異常回転手掌、欠指の発現率に有意差が認められた。

250 mg/kg 群の1例にドーム型頭部が観察された。

12.5 mg/kg群に異常を呈した胎児は観察されなかった。

3-3. 胎児内臓観察(表19)

250 mg/kg 群及び25 mg/kg 群ともに内臓異常および変異の発現率が対照群と比較して有意に増加した。

観察された内臓異常および変化のうち、心室中隔筋性部欠損および大動脈拡張の発現頻度に統計学的有意差が観察された。

12.5 mg/kg群では内臓異常として心室中隔筋性部欠損、大動脈弓拡張、腎欠損、尿管欠損、心形態異常(Misshapen heart)が、小数例観察され、内臓変異も認められたが、発現頻度には12.5 mg/kg群と媒体対照群で有意差は認められなかった。

3-4. 胎児骨格観察

250 mg/kg群では骨格異常率及び異常を示す胎児を有

した母動物の発現率が有意な高値を示した。

観察された骨格異常及び変異のうち、中手骨欠損、前肢指骨欠損、脛骨欠損、距骨未骨化の発現頻度に統計学的有意差が観察された。

25 mg/kg群では骨格異常および変異が観察されたが、対照群との間に有意差はなかった。

12.5 mg/kg群では、骨格異常は認められなかった。骨格変異は対照群ともに観察されたが、両群の発現頻度には差はなかった。

D. 結論

令和3年度に実施した、最大精漿移行濃度の100倍量を膈内投与試験の投与量の妥当性および膈内投与と経口投与による胎児曝露量の比較検討のために、本分担研究では、サリドマイドを膈内投与試験と同時期である妊娠1～13日に経口投与し経口投与による母動物および胚・胎児への影響を確認した。

高用量群である250 mg/kg/dayの結果、母動物の一般状態及び体重に影響を及ぼし、一般毒性学的影響が及んだ投与量であると判断した。また、胎児の生存率が低下し、胎児の成長が抑制された。

外表、内臓及び骨格観察の結果、外表異常として異常回転肢、前肢過屈曲肢及び欠指が、内臓異常として心室中隔筋性部欠損、大動脈弓拡張などが、内臓変異として肺の副葉欠損などが認められた。骨格異常としては中手骨、脛骨及び前肢指節骨の欠損が認められ、骨格変異としては距骨未骨化の発現頻度のそれぞれ増加が認められた。

中間用量である25 mg/kg群ではこのうち、胎児の生存性及び胎児体重には変化がみられなかったものの、一部の骨での骨化数の低値が認められ、形態観察の結果、内臓観察では心室中隔筋性部欠損や大動脈弓拡張、骨格観察では中手骨欠損及び前肢指節骨欠損が少数例ながら認められた。

低用量である12.5 mg/kg群では、母動物への影響は認められず、胎児の生存性及び体重にも影響はなかった。また、外表異常も観察されず、無作用量の判断基準となった感度の高い指標と考えられる骨格観察における中手骨の欠損及び前肢の指節骨の欠損等も観察されなかった。

一方、同群では有意差はなかったが、心室中隔筋性部欠損が2腹の3例（発現頻度5.7%）に認められた。この内臓異常は、25 mg/kg群で7.5%、250 mg/kg群では30.7%の発現頻度であり用量依存性がみられたことから、サリドマイドの経口投与との関連を否定できなかった。

なお、一連の動物試験を実施した施設における背景データでは、この異常は32試験（対象胎児数355匹）において0～4.0%(Mean±2SD=0.13±1.55)の発現頻度である。

以上の結果から、サリドマイド12.5 mg/kgの反復経口投与は最大無作用量（NOEL）と考えられた。

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
なし

2. 学会発表

1) Kuwagata M*, Takashima H, Haneda R, Tanaka K, Hasegawa T, Yamazaki H, Kitajima S.: Possible teratogenic effects via male semen exposed to thalidomide in rabbits. The 62nd Annual meeting and ToxExpo (2023.03.19-23) ナッシュビル、アメリカ

2) Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. (2023.9.10-13)リュブリャナ、スロベニア

国内学会

1) 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、桑形麻樹子：サリドマイドに係る雄性生殖を介した発生毒性、第62回日本先天異常学会学術集会（2022.7.28）つくば

2) 長谷川拓郎、白方渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子：LC-MS/MSを用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション。第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

3) 高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、山崎浩史、北嶋聡、桑形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド膈内投与による催奇形作用評価。第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

4) 桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋聡：ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明。第63回日本先天異常学会学術集会(2023.7.28-30)つくば

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II.分担報告書-3

分担研究者 山崎 浩史
昭和薬科大学・薬学部・教授

分担研究報告書

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

研究分担者 山崎 浩史
昭和薬科大学・薬学部・教授

研究要旨

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

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

分担研究として、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、令和4年度実施した雌性ウサギを用いた経口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結果、両者はほぼ一致した。比較的低い投与量では、性差および投与量に関係なく、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。

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'-水酸化体に代謝される。分担研究として、令和2年度に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。今年度は雌性ウサギの経口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、サリドマイド体内動態の可視化を試みた。

B. 研究方法

令和2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。

令和4年度は毒性発現量である250 mg/kg/日及び1/10量の25 mg/kg/日およびその半量である12.5 mg/kg/日のサリドマイドを妊娠雌ウサギに経口投与し、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。

経口投与は妊娠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、経口投与により得られた母動物血漿中濃度と、同様に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、経口投与による生体内血中濃度推移を比較した。

経口投与試験の実験方法および結果は、分担研究-1(稜形担当)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、妊娠ウサギへの経口投与試験の投与量である12.5、25および250 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、妊娠ウサギに同用量を経口投与した際の実測値を比較した。

その結果、12.5および25 mg/kg/日 群では投与1日(妊娠1日)と投与13日(妊娠13日)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5~表11)は仮想出力値とほぼ一致した(図1)。

サリドマイド 250 mg/kg/日群では、25 mg/kg/日群と血中濃度-時間推移がやや異なり、初回投与後24時間値は比較的高濃度値で推移した。一方、反復投与13日(妊娠13日)の24時間後は、明らかな消失に伴う低血中濃度値を示したことから、薬物動態学的に平易な取扱いが難しい結果となった(図1)。

よって、2 mg/kg での経口投与のサリドマイドの初発代謝物を含む体内動態は、25 mg/kgまで用量に比例関係(線形)があることが明らかになった。しかし、250 mg/kgは代謝が飽和して消失が遅延すると考えら

れた。なお、ウサギに対して高用量サリドマイドの初回投与後に薬物血中消失が緩徐となる傾向は再現性があり、雄経口投与実験の250 および500 mg/kg/日群においても認められている（令和2年度実施）。

D. 結論

令和2年度に構築した、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、妊娠ウサギへの経口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。比較的低い投与量では、性差および投与量に関係なく、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。

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) Ogiya D, Murayama N, Kamiya Y, Saito R, Shiraiwa S, Suzuki R, Machida S, Tazume K, Ando K, Yamazaki H. Low cerebrospinal fluid-to-plasma ratios of orally administered lenalidomide mediated by its low cell membrane permeability in patients with hematologic malignancies. *Ann Hematol*, 101, 2013–2019, 2022.
- 2) Adachi K, Shimizu M, Yamazaki H. Updated in silico Prediction methods for fractions absorbed and key input parameters of 355 disparate chemicals for physiologically based pharmacokinetic models for time-dependent plasma concentrations after virtual oral doses in humans. *Biol Pharm Bull*, 45, 1812-1817, 2022.
- 3) Yamazaki, H., and Shimizu, M. Species specificity and selection of models for drug oxidations mediated by polymorphic human enzymes. *Drug Metab Dispos.*, 51, 123-129, 2023.
- 4) Uehara S, Murayama N, Higuchi Y, Shimizu M, Suemizu H, Guengerich FP, Yamazaki H. In vivo and in vitro induction of cytochrome P450 3A4 by thalidomide in humanized-liver mice and experimental human hepatocyte HepaSH cells. *Chem Res Toxicol*, 37, 671-674, 2024.

2. 学会発表

- 1) 山崎 浩史 第49回日本毒性学会シンポジウム「サリドマイドのヒト型酸化的代謝物のウサギでの生成: 奇形のないラットとの比較」2022年6月、札幌
- 2) 山崎 浩史 日本動物実験代替法学会第35回大会シンポジウム「データ駆動型生理学的薬物動態モデルを用いる化学物質の体内濃度予測」2022年11月、静岡
- 3) Yamazaki, H., 7th Asia Pacific Regional International Society of Study of Xenobiotics (ISSX) meeting, “Species Specificity and Selection of Animal Models for Drug Oxygenations Mediated by Polymorphic Human Enzymes,” 2023年1月, Bangalore, India.
- 4) 長谷川 拓郎、白方 渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、栗形 麻樹子、北嶋 聡: LC-MS/MSを用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション 第50回日本毒性学会学術年会 (横浜) 2023年6月
- 5) 山崎 浩史: 特別講演 II 「薬物代謝研究の進歩と展

- 望」第30 回HAB研究機構学術年会 (東京) 2023年5月
- 6) 山崎 浩史: 「医薬品における雄性生殖を介した発生毒性リスクの考え方」モデル動物体内動態情報から考えるサリドマイド類のヒト精漿への移行 第50回日本毒性学会学術年会シンポジウム (横浜) 2023年6月
 - 7) Yamazaki, H., Species and individual differences of drug oxygenations mediated by polymorphic human cytochrome P450 enzymes, The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (Taipei, Taiwan) 2023年7月
 - 8) Yamazaki, H., Model Selection for Drug Oxygenations Mediated by Polymorphic Human Enzymes 2023 international joint meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics (Shizuoka, Japan) 2023年 9月
 - 9) Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits Eurotox Congress 2023 (Ljubjana, Slovenia) 2023年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogiya D, Murayama N, Kamiya Y, Saito R, Shiraiwa S, Suzuki R, Machida S, Tazume K, Ando K, Yamazaki H.	Low cerebrospinal fluid- to-plasma ratios of orally administered lenalidomide mediated by its low cell membrane permeability in patients with hematologic malignancies.	Ann Hematol,	101	2013-2019	2022
Adachi K, Shimizu M, Yamazaki H.	Updated in silico Prediction methods for fractions absorbed and key input parameters of 355 disparate chemicals for physiologically based pharmacokinetic models for time-dependent	Biol Pharm Bull	46	311-317	2022
Yamazaki, H., and Shimizu, M.	Species specificity and selection of models for drug oxidations mediated by polymorphic human enzymes.	Drug Metab Dispos	51	123-129	2023
Uehara S, Murayama N, Higuchi Y, Shimizu M, Suemizu H, Guengerich FP, Yamazaki H.	In vivo and in vitro induction of cytochrome P450 3A4 by thalidomide in humanized-liver mice and experimental human hepatocyte HepaSH cells.	Chem Res Toxicol	37	671-674	2024

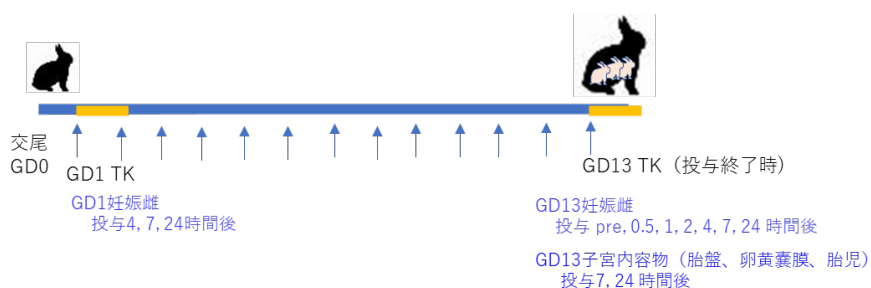
IV.資料

1. 妊娠ウサギを用いたサリドマイド反復経口投与による胚・胎児移行への影響（TK試験、妊娠13-14日帝王切開）

群構成

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	容量/ mL/kg	動物数(妊娠雌)	全胚吸収 胚例	腹数	投与期間
1(TK)	12.5	5	8(6)	0	6	GDs1-13
1(TK)	25	5	10(9)	1	6	GDs1-13
2(TK)	250	5	12(11)	3	4	GDs1-13

動物数は先行試験及び追加試験の合計

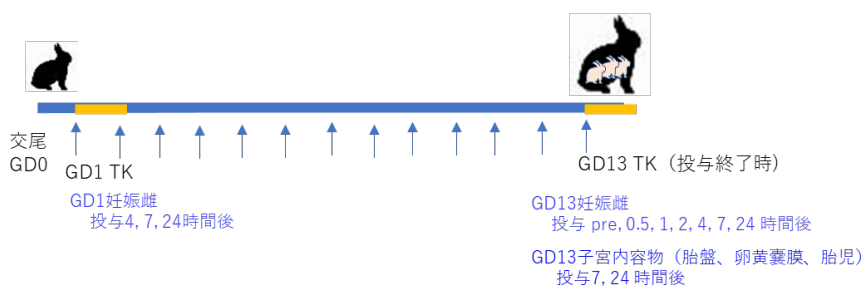


1. 妊娠ウサギを用いたサリドマイド反復経口投与による胚・胎児移行への影響（TK試験、妊娠13-14日帝王切開）

群構成

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	容量/ mL/kg	動物数(妊娠雌)	全胚吸収 胚例	腹数	投与期間
1(TK)	12.5	5	8(6)	0	6	GDs1-13
1(TK)	25	5	10(9)	1	6	GDs1-13
2(TK)	250	5	12(11)	3	4	GDs1-13

動物数は先行試験及び追加試験の合計



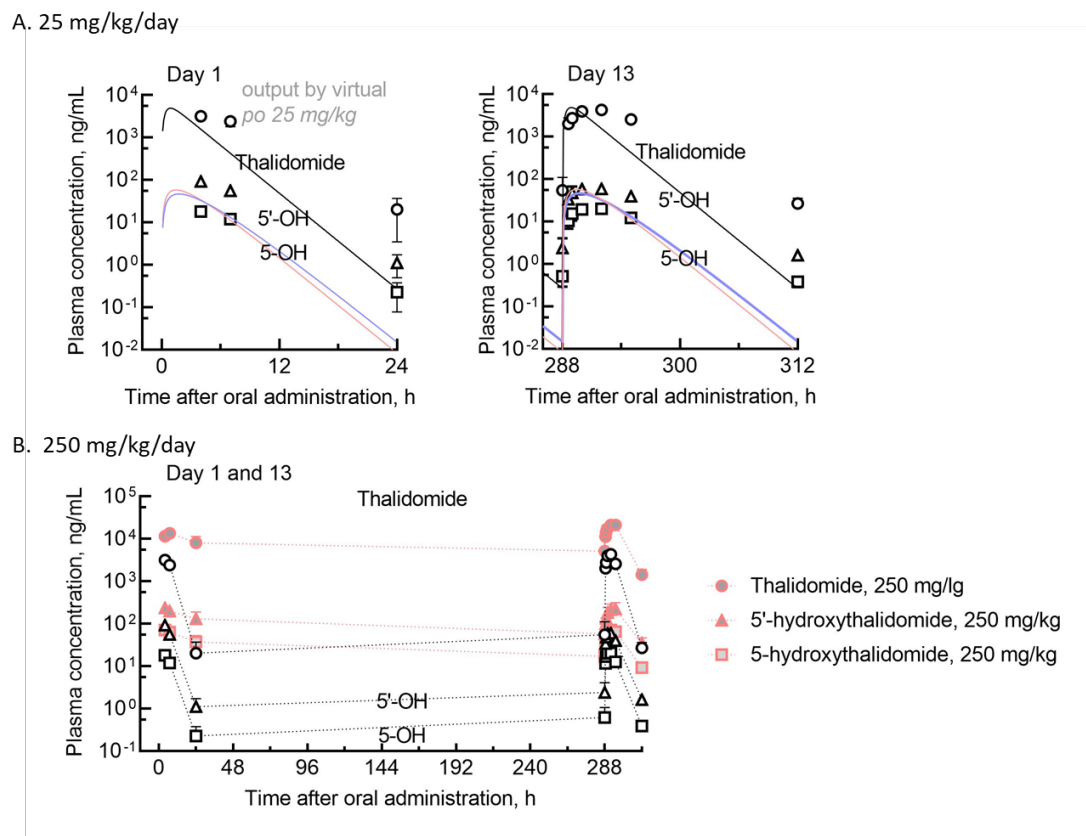


図1-1 生理学的薬物動態モデルによる出力結果と妊娠雌経口投与による実測値の比較(先行実験)

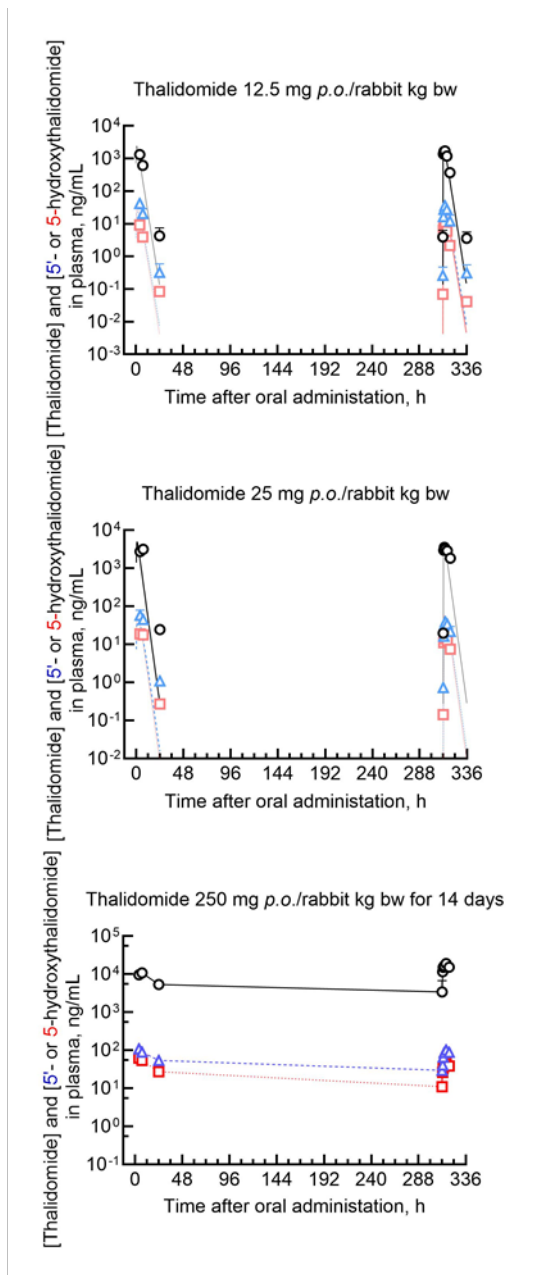


図1-2 生理学的薬物動態モデルによる出力結果と妊娠雌経口投与による実測値の比較 (追加実験)

表1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による母動物一般状態:胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

Dose (mg/kg)	Signs	Gestational day														
		1	3	6	8	10	12	13	14							
		Treatment period (GDs1-13)														
25	Number of dams	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	4	
	Abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
250	Number of dams	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	4	
	Number of dams with abnormal findings	0	0	4	4	2	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
	Decrease feces	0	0	3	4	2	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
	No feces	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(2)追加実験

Dose (mg/kg)	Signs	Gestational day														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		Treatment period (GDs1-13)														
12.5	Number of dams	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3
	Abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	Number of dams	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	Abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	Number of dams	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
	Number of dams with abnormal findings	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	Decrease feces	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0

表2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による母動物体重推移:胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

Dose (mg/kg)		Gestational day									Body weight gain
		0	1	3	6	8	10	12	13	14	
		Treatment period (GDs1-13)									GDs1-13
25	No.dams	7	7	7	7	7	7	7	7	4	7
	Mean	3.10	3.19	3.17	3.20	3.26	3.30	3.34	3.36	3.50	0.17
	S.D.	0.28	0.31	0.29	0.30	0.30	0.29	0.30	0.31	0.34	0.05
250	No.dams	7	7	7	7	7	7	7	7	4	7
	Mean	3.01	3.06	3.01	3.06	3.12	3.15	3.17	3.17	3.19	0.11
	S.D.	0.12	0.14	0.12	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20	0.08	0.18

(2)追加実験

Dose (mg/kg)		Gestational day								
		0	1	3	6	8	10	12	13	14
		Treatment period (GDs1-13)								
12.5	No.dams	6	6	6	6	6	6	6	6	3
	Mean	3.11	3.15	3.16	3.24	3.28	3.30	3.32	3.33	3.20
	S.D.	0.22	0.24	0.21	0.23	0.23	0.25	0.24	0.24	0.13
25	No.dams	2	2	2	2	2	2	2	2	0
	Mean	3.40	3.42	3.43	3.48	3.55	3.57	3.57	3.59	
	S.D.	0.11	0.15	0.11	0.08	0.08	0.08	0.11	0.15	
250	No.dams	4	4	4	4	4	4	4	4	0
	Mean	3.21	3.28	3.22	3.21	3.26	3.28	3.24	3.29	
	S.D.	0.17	0.20	0.14	0.19	0.19	0.21	0.21	0.24	

表3 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による帝王切開所見(妊娠13-14日):胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

Test article		Number of corpora lutea	Number of implantations	Preimplantation loss (%) a	Implantation index (%) b	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total c	Number of live fetuses Total
thalidomide	No.dams	7	7	7	7	7	7	7
25 mg/kg	Mean	7.9	7.6	3.3	96.7	1.6	27.7	6.0
	S.D.	3.4	3.3	5.9	5.9	2.6	40.0	3.1
thalidomide	No.dams	7	7	7	7	7	7	7
250 mg/kg	Mean	7.6	7.0	7.2	92.8	4.4	63.1	2.6
	S.D.	1.7	1.5	7.0	7.0	2.8	36.1	2.6

(2)追加実験

Test article		Number of corpora lutea	Number of implantations	Preimplantation loss (%) a	Implantation index (%) b	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total d	Number of live fetuses Total
thalidomide	No.dams	6	6	6	6	6	6	6
12.5 mg/kg	Mean	8.3	7.2	10.7	89.4	0.5	7.9	6.7
	S.D.	2.1	0.8	17.6	17.6	0.8	13.7	1.5
thalidomide	n	2	2	2	2	2	2	2
25 mg/kg	Mean	11.0	10.0	9.4	90.6	1.0	12.5	9.0
	S.D.	2.8	2.8	2.4	2.4	1.4	17.7	4.2
thalidomide	No.dams	4	4	4	4	4	4	4
250 mg/kg	Mean	8.3	8.0	2.8	97.2	5.3	71.1	2.8
	S.D.	4.3	4.3	5.6	5.6	4.0	31.7	3.1

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

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

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

表4-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による帝王切開所見個別表(妊娠13-14日): 胚・胎児への移行に関する検討
先行実験

(1) 25 mg/kg 群

Dam No.	Number of corpora lutea	Number of implantation	Preimplantation loss (%) a	Implantation index (%) b	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total c)	Number of live fetuses Total
1101	Non-Pregnancy						
1102	1(0/1)	1(0/1)	0.0	100.0	1	100.0	0
1103	8(1/7)	8(1/7)	0.0	100.0	0	0.0	8
1104	8(3/5)	8(3/5)	0.0	100.0	0	0.0	8
1105	11(4/7)	10(3/7)	9.1	90.9	3	30.0	7
1106	11(9/2)	11(9/2)	0.0	100.0	7	63.6	4
1107	7(4/3)	6(4/2)	14.3	85.7	0	0.0	6
1108	9(4/5)	9(4/5)	0.0	100.0	0	0.0	9
Total	55	53			11		42
n	7	7	7	7	7	7	7
Mean	7.9	7.6	3.3	96.7	1.6	27.7	6.0
S.D.	3.4	3.3	5.9	5.9	2.6	40.0	3.1

(2) 250 mg/kg 群

Dam No.	Number of corpora lutea	Number of implantation	Preimplantation loss (%) a	Implantation index (%) b	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total c)	Number of live fetuses Total
2101	Non-Pregnancy						
2102	5(4/1)	5(4/1)	0.0	100.0	5	100.0	0
2103	7(4/3)	7(4/3)	0.0	100.0	7	100.0	0
2104	9(4/5)	8(3/5)	11.1	88.9	4	50.0	4
2105	10(6/4)	9(6/3)	10.0	90.0	9	100.0	0
2106	8(8/0)	8(8/0)	0.0	100.0	3	37.5	5
2107	6(5/1)	5(4/1)	16.7	83.3	2	40.0	3
2108	8(2/6)	7(2/5)	12.5	87.5	1	14.3	6
Total	53	49			31		18
n	7	7	7	7	7	7	7
Mean	7.6	7.0	7.2	92.8	4.4	63.1	2.6
S.D.	1.7	1.5	7.0	7.0	2.8	36.1	2.6

(/) : Right/Left

n: Number of dams

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

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

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

表4-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による帝王切開所見個別表(妊娠13-14日): 胚・胎児への移行に関する検討
追加実験

(1) 12.5 mg/kg

Dam No.	Number of corpora lutea	Number of implantation	Preimplantation loss (%) a)	Implantation index (%) b)	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total c)	Number of live fetuses Total
2101	6(1/5)	6(1/5)	0.0	100.0	2	33.3	4
2102	Non-Pregnancy						
2103	12(7/5)	7(5/2)	41.7	58.3	0	0.0	7
2104	8(2/6)	8(2/6)	0.0	100.0	0	0.0	8
2105	Non-Pregnancy						
2106	9(5/4)	7(4/3)	22.2	77.8	1	14.3	6
2107	8(4/4)	8(4/4)	0.0	100.0	0	0.0	8
2108	7(2/5)	7(2/5)	0.0	100.0	0	0.0	7
Total	50	43			3		40
n	6	6	6	6	6	6	6
Mean	8.3	7.2	10.7	89.4	0.5	7.9	6.7
S.D.	2.1	0.8	17.6	17.6	0.8	13.7	1.5

(2) 25 mg/kg

Dam No.	Number of corpora lutea	Number of implantation	Preimplantation loss (%) a)	Implantation index (%) b)	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total c)	Number of live fetuses Total
3101	9(6/3)	8(5/3)	11.1	88.9	2	25.0	6
3102	13(5/8)	12(5/7)	7.7	92.3	0	0.0	12
Total	22	20			2		18
n	2	2	2	2	2	2	2
Mean	11.0	10.0	9.4	90.6	1.0	12.5	9.0
S.D.	2.8	2.8	2.4	2.4	1.4	17.7	4.2

(3) 250 mg/kg

Dam No.	Number of corpora lutea	Number of implantation	Preimplantation loss (%) a)	Implantation index (%) b)	Number of resorptions Total	Postimplantation loss(%) Total c)	Number of live fetuses Total
4101	12(6/6)	12(6/6)	0.0	100.0	11	91.7	1
4102	9(5/4)	8(5/3)	11.1	88.9	5	62.5	3
4103	2(2/0)	2(2/0)	0.0	100.0	2	100.0	0
4104	10(4/6)	10(4/6)	0.0	100.0	3	30.0	7
Total	33	32			21		11
n	4	4	4	4	4	4	4
Mean	8.3	8.0	2.8	97.2	5.3	71.1	2.8
S.D.	4.3	4.3	5.6	5.6	4.0	31.7	3.1

(/): Right/Left

n: Number of dams

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

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

c): (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経口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1日):胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

Thalidomide (GD1)					TKパラメータ (Thalidomide; GD1)				
Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			Dose level (mg/kg)	Animal No.	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
		4 h	7 h	24 h					
25	1102	2730	2000	6.86	25	1102	2730	4.00	29600
	1103	2670	2600	48.8		1103	2670	4.00	35800
	1104	2790	1560	5.64		1104	2790	4.00	25400
	1105	3140	3380	27.1		1105	3380	7.00	45000
	1106	3060	2590	7.83		1106	3060	4.00	36700
	1107	2920	2440	11.2		1107	2920	4.00	34700
	1108	4760	2050	32.4		1108	4760	4.00	37400
	Mean		3150	2370		20.0	Mean		3190
SD		729	580	16.5	SD		734	1.13	6200
250	2102	11000	14100	7140	250	2102	14100	7.00	240000
	2103	13400	17700	5790		2103	17700	7.00	273000
	2104	9870	11700	10300		2104	11700	7.00	239000
	2105	7330	7360	13300		2105	13300	24.0	212000
	2106	11500	16900	3700		2106	16900	7.00	241000
	2107	11900	9530	9730		2107	11900	4.00	220000
	2108	15100	16600	6170		2108	16600	7.00	271000
	Mean		11400	13400		8020	Mean		14600
SD		2480	4000	3260	SD		2470	6.71	23100

(2)追加実験

Thalidomide (GD1)					TKパラメータ (Thalidomide; GD1)						
Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			Dose level (mg/kg)	Animal No.	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)		
		4 h	7 h	24 h							
12.5	2101	1440	561	1.26	12.5	2101	1440	4.00	10700		
	2103	1590	947	8.75		2103	1590	4.00	15100		
	2104	1190	356	2.21		2104	1190	4.00	7740		
	2106	1170	725	2.95		2106	1170	4.00	11400		
	2107	1260	428	2.41		2107	1260	4.00	8710		
	2108	1260	686	8.11		2108	1260	4.00	11300		
	Mean		1320	617		4.28	Mean		1320	4.00	10800
	SD		164	216		3.27	SD		164	0.00	2560
25	3101	2200	3170	30.0	25	3101	3170	7.00	39700		
	3102	3250	3120	19.0		3102	3250	4.00	42700		
	Mean		2730	3150		24.5	Mean		3210	5.50	41200
250	4101	6850	7040	7430	250	4101	7430	24.0	158000		
	4102	8030	10900	5480		4102	10900	7.00	184000		
	4103	13600	13400	3990		4103	13600	4.00	216000		
	4104	9880	12000	4530		4104	12000	7.00	193000		
	Mean		9590	10800		5360	Mean		11000	10.5	188000
	SD		2950	2730		1510	SD		2610	9.11	24000

表6-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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・胎児への移行に関する検討

先行実験

(1) Thalidomide (GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)							
		Pre	0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h	
25	1102	12.2	1320	2260	3740	4840	2050	-	
	1103	60.7	1390	2030	3280	3740	3130	-	
	1104	25.5	2630	3180	4570	4490	2040	-	
	1105	48.4	1070	1940	3680	5140	3170	31.1	
	1106	25.0	2600	3150	2750	2820	3760	22.8	
	1107	38.4	3140	3680	4750	4200	1540	16.4	
	1108	174	1830	2940	5030	4760	2210	36.5	
	Mean	54.9	2000	2740	3970	4280	2560	26.7	
SD	54.9	794	666	836	791	799	8.88		
250	2102	1410	8730	14500	17600	22000	21800	-	
	2103	25300	25700	26700	24200	27500	29300	-	
	2104	2090	8730	12400	15300	20400	13800	-	
	2105	1650	11400	13100	17800	18300	26900	1570	
	2106	994	10500	15100	17900	21700	17200	730	
	2107	2210	7160	9980	12400	16000	21600	1720	
	2108	2220	5800	8530	17400	21200	16900	1680	
	Mean	5120	11100	14300	17500	21000	21100	1430	
SD	8910	6690	5940	3560	3570	5590	468		

(2) TKパラメータ (Thalidomide; GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
25	1102	4840	4.00	23100
	1103	3740	4.00	21200
	1104	4570	2.00	24800
	1105	5140	4.00	52300
	1106	3760	7.00	52600
	1107	4750	2.00	37500
	1108	5030	2.00	45000
	Mean	4550	3.57	36600
SD	575	1.81	13700	
250	2102	22000	4.00	130000
	2103	29300	7.00	188000
	2104	20400	4.00	109000
	2105	26900	7.00	371000
	2106	21700	4.00	276000
	2107	21600	7.00	301000
	2108	21200	4.00	272000
	Mean	23300	5.29	235000
SD	3390	1.60	95800	

表6-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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・胎児への移行に関する検討

追加実験

(1) Thalidomide (GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)							
		Pre	0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h	
12.5	2101	1.69	1240	1750	1590	992	197	-	
	2103	4.49	1290	2010	2220	1350	414	-	
	2104	2.00	1340	1580	1780	1410	479	-	
	2106	6.25	1770	1800	1950	1110	306	4.35	
	2107	2.13	941	1250	1260	986	312	1.24	
	2108	7.05	1640	1510	1450	1270	497	5.12	
	Mean	3.94	1370	1650	1710	1190	368	3.57	
	SD	2.34	297	263	348	183	116	2.05	
25	3101	23.5	3290	3820	3210	3220	1930	-	
	3102	15.5	2680	3210	3160	2500	1730	-	
	Mean	19.5	2990	3520	3190	2860	1830	-	
250	4101	977	10400	13100	12900	15400	13900	-	
	4102	1000	12700	14800	16300	21700	14200	-	
	4103	3590	12300	18900	21700	20200	16700	-	
	4104	8010	10800	13500	14900	18500	16400	-	
	Mean	3390	11600	15100	16500	19000	15300	-	
	SD	3310	1120	2650	3770	2700	1450	-	

(2) TKパラメータ (Thalidomide; GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
12.5	2101	1750	1.00	7090
	2103	2220	2.00	9480
	2104	1780	2.00	8770
	2106	1950	2.00	11000
	2107	1260	2.00	8890
	2108	1640	0.500	12300
	Mean	1770	1.58	9590
	SD	320	0.665	1830
25	3101	3820	1.00	20300
	3102	3210	1.00	17300
	Mean	3520	1.00	18800
250	4101	15400	4.00	94000
	4102	21700	4.00	118000
	4103	21700	2.00	129000
	4104	18500	4.00	111000
	Mean	19300	3.50	113000
	SD	3020	1.00	14700

表7 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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1日):胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

(1) 5-Hydroxythalidomide (GD1)					(2) TKパラメータ (5-Hydroxythalidomide; GD1)				
Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			Dose level (mg/kg)	Animal No.	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₄ (h*ng/mL)
		4 h	7 h	24 h					
25	1102	15.7	12.0	0.145	25	1102	15.7	4.00	176
	1103	14.5	12.5	0.432		1103	14.5	4.00	179
	1104	14.6	7.31	0.0598		1104	14.6	4.00	125
	1105	17.6	15.2	0.305		1105	17.6	4.00	216
	1106	20.8	13.1	0.113		1106	20.8	4.00	205
	1107	18.1	12.8	0.131		1107	18.1	4.00	192
	1108	24.4	9.60	0.389		1108	24.4	4.00	185
	Mean		18.0	11.8		0.225	Mean		18.0
SD		3.61	2.57	0.148	SD		3.61	0.00	29.1
250	2102	72.4	58.7	32.3	250	2102	72.4	4.00	1110
	2103	70.9	73.0	29.3		2103	73.0	7.00	1230
	2104	75.4	75.9	56.3		2104	75.9	7.00	1500
	2105	53.3	49.1	56.8		2105	56.8	24.0	1160
	2106	72.9	69.7	17.0		2106	72.9	4.00	1100
	2107	72.5	47.4	41.6		2107	72.5	4.00	1080
	2108	73.6	63.8	24.3		2108	73.6	4.00	1100
	Mean		70.1	62.5		36.8	Mean		71.0
SD		7.55	11.3	15.4	SD		6.38	7.32	149

(2)追加実験

(1) 5-Hydroxythalidomide (GD1)					(2) TKパラメータ (5-Hydroxythalidomide; GD1)						
Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			Dose level (mg/kg)	Animal No.	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₄ (h*ng/mL)		
		4 h	7 h	24 h							
12.5	2101	12.2	4.71	BLQ	12.5	2101	12.2	4.00	89.8		
	2103	9.25	4.27	0.0623		2103	9.25	4.00	75.6		
	2104	8.41	2.27	BLQ		2104	8.41	4.00	52.1		
	2106	7.72	5.14	BLQ		2106	7.72	4.00	78.4		
	2107	8.89	3.03	BLQ		2107	8.89	4.00	61.4		
	2108	8.78	4.42	0.104		2108	8.78	4.00	75.8		
	Mean		9.21	3.97		0.0277	Mean		9.21	4.00	72.2
	SD		1.55	1.09		0.0449	SD		1.55	0.00	13.4
25	3101	14.9	15.7	0.317	25	3101	15.7	7.00	212		
	3102	22.5	19.6	0.224		3102	22.5	4.00	277		
	Mean		18.7	17.7		0.271	Mean		19.1	5.50	245
250	4101	42.6	30.9	26.7	250	4101	42.6	4.00	685		
	4102	70.1	63.9	40.6		4102	70.1	4.00	1230		
	4103	79.1	69.1	22.9		4103	79.1	4.00	1160		
	4104	55.7	52.3	19.1		4104	55.7	4.00	880		
	Mean		61.9	54.1		27.3	Mean		61.9	4.00	989
SD		16.1	17.0	9.38	SD		16.1	0.00	253		

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

表8-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

(1) 5-Hydroxythalidomide (GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)						
		Pre	0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h
25	1102	0.268	12.1	17.4	25.9	26.1	11.7	-
	1103	0.620	6.21	9.36	14.2	17.9	14.2	-
	1104	0.259	12.1	17.6	19.6	17.7	10.6	-
	1105	0.646	6.82	10.8	15.3	23.7	15.2	0.475
	1106	0.385	11.8	15.7	16.9	17.4	17.4	0.349
	1107	0.597	23.9	33.1	27.0	21.4	9.20	0.313
	1108	1.53	7.74	12.6	20.3	18.0	9.45	0.415
	Mean	0.615	11.5	16.7	19.9	20.3	12.5	0.388
SD	0.436	6.04	7.92	4.99	3.48	3.13	0.0717	
250	2102	9.40	33.4	53.4	78.5	92.4	98.8	-
	2103	57.6	60.6	56.9	57.0	57.2	65.1	-
	2104	12.7	32.5	45.5	63.4	71.6	48.1	-
	2105	8.81	39.0	50.1	67.2	67.2	68.5	11.1
	2106	7.44	43.1	61.7	73.9	85.0	55.6	6.33
	2107	9.09	24.3	34.9	48.6	55.7	70.4	8.12
	2108	13.2	25.9	34.2	53.8	63.1	40.6	11.1
	Mean	16.9	37.0	48.1	63.2	70.3	63.9	9.16
SD	18.1	12.4	10.6	10.8	13.9	18.9	2.35	

(2) TKパラメータ (5-Hydroxythalidomide; GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
25	1102	26.1	4.00	141
	1103	17.9	4.00	97.6
	1104	19.6	2.00	109
	1105	23.7	4.00	250
	1106	17.4	4.00	264
	1107	33.1	1.00	226
	1108	20.3	2.00	187
	Mean	22.6	3.00	182
SD	5.58	1.29	67.6	
250	2102	98.8	7.00	556
	2103	65.1	7.00	414
	2104	71.6	4.00	400
	2105	68.5	7.00	1110
	2106	85.0	4.00	1000
	2107	70.4	7.00	1030
	2108	63.1	4.00	781
	Mean	74.6	5.71	756
SD	12.8	1.60	301	

表8-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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・胎児への移行に関する検討

(2)追加実験

(1) 5-Hydroxythalidomide (GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)							
		Pre	0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h	
12.5	2101	BLQ	7.39	9.38	10.3	6.36	1.61	-	
	2103	BLQ	6.11	8.95	11.8	6.34	2.17	-	
	2104	BLQ	6.34	7.53	9.63	6.84	2.76	-	
	2106	BLQ	6.58	6.48	8.58	4.88	1.99	BLQ	
	2107	BLQ	4.09	5.25	6.02	5.05	1.78	BLQ	
	2108	0.0689	8.20	7.78	8.01	6.16	2.66	0.0410	
	Mean	NC	6.45	7.56	9.06	5.94	2.16	NC	
SD	NC	1.39	1.54	2.00	0.789	0.466	NC		
25	3101	0.128	9.63	12.8	14.2	11.4	6.01	-	
	3102	0.155	12.3	15.7	18.9	13.7	8.87	-	
	Mean	0.142	11.0	14.3	16.6	12.6	7.44	-	
250	4101	3.69	19.5	22.5	28.3	28.3	28.7	-	
	4102	4.76	31.9	42.5	53.3	64.9	49.9	-	
	4103	11.8	24.9	38.5	43.9	44.3	34.8	-	
	4104	24.0	28.8	33.8	40.7	41.7	41.9	-	
	Mean	11.1	26.3	34.3	41.6	44.8	38.8	-	
	SD	9.35	5.35	8.65	10.3	15.1	9.14	-	

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

(2) TKパラメータ (5-Hydroxythalidomide; GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
12.5	2101	10.3	2.00	44.5
	2103	11.8	2.00	46.6
	2104	9.63	2.00	44.5
	2106	8.58	2.00	53.1
	2107	6.02	2.00	45.4
	2108	8.20	0.500	64.3
	Mean	9.09	1.75	49.7
SD	1.98	0.612	7.83	
25	3101	14.2	2.00	73.3
	3102	18.9	2.00	93.9
	Mean	16.6	2.00	83.6
250	4101	28.7	7.00	184
	4102	64.9	4.00	366
	4103	44.3	4.00	273
	4104	41.9	7.00	274
	Mean	45.0	5.50	274
	SD	15.0	1.73	74.3

表9 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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1日):胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

(1) 5'-Hydroxythalidomide (GD1)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)		
		4 h	7 h	24 h
25	1102	96.5	56.0	0.493
	1103	61.1	43.3	1.76
	1104	82.0	43.0	0.451
	1105	113	73.2	1.59
	1106	91.3	61.7	0.571
	1107	100	62.5	1.05
	1108	96.4	46.2	1.81
	Mean		91.5	55.1
SD		16.3	11.5	0.613
250	2102	365	298	179
	2103	217	197	88.1
	2104	146	131	116
	2105	258	199	238
	2106	249	231	76.7
	2107	163	114	115
	2108	229	210	96.5
	Mean		232	197
SD		71.9	61.6	58.0

(2) TKパラメータ (5'-Hydroxythalidomide; GD1)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
25	1102	96.5	4.00	902
	1103	61.1	4.00	662
	1104	82.0	4.00	721
	1105	113	4.00	1140
	1106	91.3	4.00	941
	1107	100	4.00	984
	1108	96.4	4.00	815
	Mean		91.5	4.00
SD		16.3	0.00	163
250	2102	365	4.00	5780
	2103	217	4.00	3480
	2104	146	4.00	2810
	2105	258	4.00	4920
	2106	249	4.00	3830
	2107	163	4.00	2690
	2108	229	4.00	3720
	Mean		232	4.00
SD		71.9	0.00	1110

(2)追加実験

(1) 5'-Hydroxythalidomide (GD1)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)			
		4 h	7 h	24 h	
12.5	2101	66.5	31.5	0.159	
	2103	58.7	29.2	0.749	
	2104	51.0	20.7	0.232	
	2106	51.7	31.2	0.339	
	2107	64.3	26.9	0.431	
	2108	118	59.8	1.37	
	Mean		68.4	33.2	0.547
	SD		25.1	13.6	0.453
25	3101	74.3	68.8	1.59	
	3102	115	80.6	1.89	
	Mean		94.7	74.7	1.74
250	4101	156	122	99.4	
	4102	163	153	98.9	
	4103	204	175	68.8	
	4104	168	157	74.0	
	Mean		173	152	85.3
	SD		21.4	22.0	16.2

(2) TKパラメータ (5'-Hydroxythalidomide; GD1)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)	
12.5	2101	66.5	4.00	549	
	2103	58.7	4.00	504	
	2104	51.0	4.00	387	
	2106	51.7	4.00	496	
	2107	64.3	4.00	498	
	2108	118	4.00	1020	
	Mean		68.4	4.00	576
	SD		25.1	0.00	224
25	3101	74.3	4.00	962	
	3102	115	4.00	1220	
	Mean		94.7	4.00	1090
250	4101	156	4.00	2610	
	4102	163	4.00	2940	
	4103	204	4.00	3050	
	4104	168	4.00	2790	
	Mean		173	4.00	2850
SD		21.4	0.00	191	

表10-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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・胎児への移行に関する検討

(1) 先行実験

(1) 5'-Hydroxythalidomide (GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)							
		Pre	0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h	
25	1102	1.06	38.7	56.1	75.7	80.4	39.8	-	
	1103	1.95	18.6	26.3	38.3	39.0	35.4	-	
	1104	1.30	40.8	56.7	66.9	58.1	34.9	-	
	1105	2.57	22.8	36.1	56.0	71.9	53.7	1.84	
	1106	1.32	32.7	42.2	47.4	43.4	43.4	1.12	
	1107	2.78	57.8	82.9	74.3	65.9	36.6	1.34	
	1108	5.80	24.0	34.1	53.2	54.0	31.9	2.16	
	Mean	2.40	33.6	47.8	58.8	59.0	39.4	1.62	
SD	1.64	13.5	19.1	14.0	15.0	7.31	0.472		
250	2102	58.7	115	179	271	326	341	-	
	2103	157	142	143	146	147	177	-	
	2104	36.1	75.5	102	137	176	137	-	
	2105	46.9	124	167	247	278	353	51.0	
	2106	32.8	113	149	206	245	215	27.5	
	2107	31.1	60.7	88.5	113	131	161	26.6	
	2108	38.7	61.4	84.4	144	193	165	32.5	
	Mean	57.3	98.8	130	181	214	221	34.4	
SD	45.0	32.6	38.5	60.9	71.7	89.1	11.4		

(2) TKパラメータ (5'-Hydroxythalidomide; GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
25	1102	80.4	4.00	436
	1103	39.0	4.00	238
	1104	66.9	2.00	361
	1105	71.9	4.00	856
	1106	47.4	2.00	671
	1107	82.9	1.00	745
	1108	54.0	4.00	591
	Mean	63.2	3.00	557
SD	16.8	1.29	221	
250	2102	341	7.00	1940
	2103	177	7.00	1070
	2104	176	4.00	974
	2105	353	7.00	5230
	2106	245	4.00	3480
	2107	161	7.00	2440
	2108	193	4.00	2730
	Mean	235	5.71	2550
SD	81.0	1.60	1480	

表10-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口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・胎児への移行に関する検討

(2)追加実験

(1) 5'-Hydroxythalidomide (GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	Concentration (ng/mL)						
		Pre	0.5 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h
12.5	2101	0.207	57.3	63.8	69.0	42.8	12.5	-
	2103	0.410	38.6	53.0	59.1	40.0	16.3	-
	2104	0.173	41.3	49.1	52.0	39.0	18.9	-
	2106	0.540	41.9	50.3	57.1	38.1	14.6	0.457
	2107	0.297	40.4	49.0	51.4	37.7	15.4	0.187
	2108	1.20	67.9	85.3	98.8	87.8	40.6	1.06
	Mean	0.471	47.9	58.4	64.6	47.6	19.7	0.568
	SD	0.382	11.9	14.3	17.9	19.8	10.4	0.447
25	3101	1.22	44.0	58.3	56.4	51.6	29.4	-
	3102	1.29	55.2	77.6	85.3	67.3	44.6	-
	Mean	1.26	49.6	68.0	70.9	59.5	37.0	-
250	4101	21.4	89.9	126	138	159	150	-
	4102	23.0	96.2	123	149	194	139	-
	4103	58.2	103	153	201	208	172	-
	4104	87.1	89.0	113	124	157	154	-
	Mean	47.4	94.5	129	153	180	154	-
	SD	31.4	6.49	17.1	33.6	25.5	13.7	-

(2) TKパラメータ (5'-Hydroxythalidomide; GD13)

Dose level (mg/kg)	Animal No.	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)
12.5	2101	69.0	2.00	306
	2103	59.1	2.00	272
	2104	52.0	2.00	261
	2106	57.1	2.00	390
	2107	51.4	2.00	384
	2108	98.8	2.00	881
	Mean	64.6	2.00	416
	SD	17.9	0.00	234
25	3101	58.3	1.00	324
	3102	85.3	2.00	449
	Mean	71.8	1.50	387
250	4101	159	4.00	974
	4102	194	4.00	1060
	4103	208	4.00	1260
	4104	157	4.00	961
	Mean	180	4.00	1060
	SD	25.5	0.00	138

表11-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、卵黄嚢、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検討

追加実験

12.5 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Yolk sac membrane	Embryo	Placenta
12.5	7	2101	R-1	81.7	60.1	93.6
			L-2	64.1	55.7	89.4
			L-3	62.3	67.1	81.9
			L-4	117	62.0	88.1
		Mean		81.3	61.2	88.3
		SD		25.4	4.72	4.84
		2103	R-1	122	123	178
			R-2	118	126	189
			R-3	172	135	153
			R-4	108	130	187
	R-5		184	122	164	
	L-1		86.3	134	206	
	Mean		127	129	178	
	SD		36.8	5.24	17.6	
	2104	R-1	161	396	203	
		R-2	167	151	240	
		L-1	184	148	205	
		L-2	186	159	227	
		L-3	143	159	190	
		L-4	138	170	203	
L-5		221	148	221		
L-6		221	175	214		
Mean		178	188	213		
SD		31.7	84.5	16.0		
Mean		129	126	160		
SD		48.2	63.6	64.3		
12.5	2106	R-1	1.03	1.37	2.77	
		R-2	2.26	5.02	2.36	
		R-4	1.52	2.13	2.58	
		L-1	1.20	2.46	2.83	
		L-2	1.60	1.55	2.43	
		L-3	1.93	7.01	1.87	
	Mean		1.59	3.26	2.47	
	SD		0.455	2.26	0.348	
	2107	R-1	0.753	0.707	1.56	
		R-2	0.735	0.854	1.42	
R-3		1.10	0.584	1.43		
R-4		1.19	0.755	1.52		
L-1	0.916	0.881	1.25			
L-2	1.31	0.713	1.27			
L-3	0.655	0.532	1.35			
L-4	1.14	0.604	1.51			
Mean		0.975	0.704	1.41		
SD		0.243	0.126	0.116		
24	2108	R-1	2.45	1.42	2.42	
		R-2	2.36	6.30	2.76	
		L-1	1.39	1.28	2.36	
		L-2	2.25	3.65	2.43	
		L-3	1.50	1.69	2.61	
	L-4	1.22	8.75	2.69		
	L-5	1.37	2.08	2.65		
	Mean		1.79	3.60	2.56	
	SD		0.535	2.88	0.155	
	Mean		1.45	2.52	2.15	
SD		0.425	1.58	0.638		

表11-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、卵黄嚢、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検討

(1)先行実験

25 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo
25	7	1103	R-1	1370	997	881
			L-1	1490	702	826
			L-2	1130	1320	792
			L-3	1340	1050	836
			L-4	1220	1180	909
			L-5	1320	675	744
			L-6	1370	736	868
		L-7	1240	1090	992	
		Mean		1310	969	856
		SD		111	240	75.6
		1104	L-1	851	485	555
			L-5	981	784	602
			Mean	916	635	579
		Mean		1110	802	717
	SD		279	236	196	
	24	1105	R-3	17.8	23.9	10.5
			L-1	16.6	15.4	10.7
			L-2	18.6	15.0	11.4
			L-3	17.9	41.5	12.5
			L-5	18.8	15.6	10.8
			L-6	19.9	17.6	11.8
			L-7	21.4	11.8	13.2
		Mean		18.7	20.1	11.6
		SD		1.56	10.1	1.01
		1106	R-8	17.0	12.5	8.66
R-9			16.1	14.3	9.42	
Mean			16.6	13.4	9.04	
1107		R-1	8.38	5.47	4.75	
		R-2	8.58	4.40	4.63	
	R-3	9.30	12.7	4.60		
	R-4	8.18	2.93	4.92		
	L-1	8.81	5.89	4.84		
	L-2	8.20	5.95	5.11		
Mean		8.58	6.22	4.81		
SD		0.428	3.37	0.191		
1108	L-1	24.7	15.2	14.9		
	L-5	21.3	20.4	13.1		
Mean		23.0	17.8	14.0		
Mean		16.7	14.4	9.85		
SD		6.05	6.11	3.92		

(2)追加実験

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo
25	7	3101	R-1	522	536	1020
			R-2	892	636	1010
			R-3	809	626	941
			R-4	671	622	900
			R-5	415	696	955
			L-1	380	579	889
			Mean		615	616
		SD		210	54.2	54.4
		3102	R-1	369	405	656
			R-2	740	492	639
			R-3	425	526	611
			R-4	512	491	632
			R-5	902	562	711
			L-1	621	476	621
	L-2		601	494	696	
	L-3	641	488	643		
	L-4	494	445	674		
	L-5	413	527	697		
	L-6	491	419	595		
	L-7	698	470	831		
	Mean		576	483	667	
	SD		155	44.9	63.1	
	Mean		595	549	810	
	SD		27.8	94.0	202	

表11-3 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、卵黄嚢、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検討

(1) 先行実験

250 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo
250	7	2104	R-1	6930	3850	5130
			R-2	7530	4780	4380
			L-1	7040	2980	4160
			L-2	6240	3780	4260
		Mean	6940	3850	4480	
		SD	532	736	441	
		2106	R-3	310	190	68.8
			R-5	267	163	87.4
	R-6		262	249	183	
	R-7		265	141	155	
	Mean	282	190	131		
	SD	24.4	41.5	49.9		
	24	2107	R-1	722	503	464
			R-2	712	616	345
			R-4	743	914	464
			Mean	726	678	424
SD		15.8	212	68.7		
2108		R-1	613	499	409	
		R-2	665	594	415	
		L-1	700	412	412	
	L-2	640	660	381		
Mean	629	459	433			
SD	49.7	178	80.9			
Mean	546	442	330			
SD	233	244	172			

(2) 追加実験

250 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo
250	7	4101	L-2	6620	6790	8960
			R-1	5490	5260	6620
		4102	R-4	4700	5280	7540
			R-5	3710	5250	7650
		Mean	4630	5260	7270	
		SD	892	15.3	566	
		4104	R-1	10700	7540	13700
			R-3	5860	7560	11900
			L-1	15000	9060	15400
			L-2	15400	8610	12900
	L-3	11500	7810	12700		
	L-4	17600	8630	12700		
	L-6	14700	9290	13700		
	Mean	13000	8360	13300		
	SD	3920	719	1120		
	Mean	9050	7000	10500		
SD	5540	1920	3950			

表12-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、卵黄囊、胚中の5-hydroxythalidomide 濃度(妊娠13日)
: 胚・胎児への移行に関する検討

(2)追加実験

12.5 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Yolk sac membrane	Embryo	Placenta
12.5	7	2101	R-1	0.605	0.300	1.24
			L-2	0.567	0.299	1.06
			L-3	0.595	0.363	0.849
			L-4	1.83	0.317	1.00
		Mean		0.899	0.320	1.04
		SD		0.621	0.0300	0.162
		2103	R-1	0.645	0.316	1.72
			R-2	0.707	0.326	1.76
			R-3	0.931	0.332	1.24
			R-4	2.86	0.409	1.89
			R-5	1.75	0.296	1.68
			L-1	0.454	0.390	1.93
	L-2	0.509	0.361	1.53		
	Mean		1.12	0.347	1.68	
	SD		0.883	0.0411	0.235	
	2104	R-1	1.14	1.11	2.45	
		R-2	0.962	0.389	2.22	
		L-1	1.39	0.431	2.33	
		L-2	0.910	0.412	1.90	
		L-3	0.641	0.312	2.07	
L-4		0.685	0.526	1.94		
L-5		1.39	0.441	2.04		
L-6		1.24	0.515	2.61		
Mean		1.04	0.517	2.20		
SD		0.294	0.249	0.253		
Mean		1.02	0.395	1.64		
SD		0.113	0.107	0.580		
12.5	24	2106	R-1	BLQ	BLQ	BLQ
			R-2	BLQ	BLQ	BLQ
			R-4	BLQ	BLQ	BLQ
			L-1	BLQ	BLQ	BLQ
			L-2	BLQ	BLQ	BLQ
			L-3	BLQ	BLQ	BLQ
		Mean		NC	NC	NC
		SD		NC	NC	NC
		2107	R-1	BLQ	BLQ	BLQ
			R-2	BLQ	BLQ	BLQ
			R-3	BLQ	BLQ	BLQ
			R-4	BLQ	BLQ	BLQ
	L-1		BLQ	BLQ	BLQ	
	L-2		BLQ	BLQ	BLQ	
	L-3		BLQ	BLQ	BLQ	
	L-4		BLQ	BLQ	BLQ	
	Mean		NC	NC	NC	
	SD		NC	NC	NC	
	2108	R-1	BLQ	BLQ	BLQ	
		R-2	BLQ	BLQ	BLQ	
L-1		BLQ	BLQ	BLQ		
L-2		BLQ	BLQ	BLQ		
L-3		BLQ	BLQ	BLQ		
L-4		BLQ	BLQ	BLQ		
L-5		BLQ	BLQ	BLQ		
Mean			NC	NC	NC	
SD			NC	NC	NC	
Mean			NC	NC	NC	
SD		NC	NC	NC		

表12-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、卵黄嚢、胚中の5-hydroxythalidomide 濃度 (妊娠13日)
:胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)			
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo	
25	7	1103	R-1	7.38	7.01	1.39	
			L-1	6.40	3.11	1.95	
			L-2	7.51	6.56	1.30	
			L-3	8.22	6.12	1.64	
			L-4	7.25	9.87	1.58	
			L-5	6.29	3.92	1.24	
			L-6	6.75	5.18	1.75	
	Mean			7.04	6.06	1.53	
		SD		0.664	2.08	0.243	
	1104	L-1	5.98	4.22	1.11		
		L-5	7.46	4.99	0.966		
	Mean			6.72	4.61	1.04	
		SD		0.227	1.03	0.349	
	25	7	1105	R-3	0.198	0.242	BLQ
				L-1	0.177	0.344	BLQ
				L-2	0.166	0.187	BLQ
				L-3	0.175	0.764	BLQ
				L-5	0.179	0.299	BLQ
				L-6	0.163 ¹⁾	0.427	BLQ
				L-7	0.255	0.216	BLQ
		Mean			0.188	0.354	NC
			SD		0.0318	0.198	NC
		1106	R-8	0.164	0.438	BLQ	
			R-9	0.162	0.365	BLQ	
		Mean			0.163	0.402	NC
SD							
24		1107	R-1	0.149	BLQ	BLQ	
	R-2		0.143	BLQ	BLQ		
	R-3		0.148	0.186	BLQ		
	R-4		0.147	BLQ	BLQ		
	L-1		0.133	0.123	BLQ		
	L-2		0.119	0.262	BLQ		
	Mean				0.140	0.0952	NC
SD			0.0118	0.113	NC		
1108	L-1	0.378	0.174	BLQ			
	L-5	0.331	0.464	BLQ			
Mean			0.355	0.319	NC		
	SD						
Mean			0.211	0.292	NC		
	SD		0.0975	0.136	NC		

(2)追加実験

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)			
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo	
25	7	3101	R-1	15.1	2.43	5.89	
			R-2	3.40	1.02	5.37	
			R-3	2.45	0.990	4.73	
			R-4	1.45	1.40	4.88	
			R-5	1.54	1.66	5.27	
			L-1	1.17	1.82	4.82	
			Mean			4.19	1.55
	SD			5.41	0.543	0.440	
	25	7	3102	R-1	1.39	0.905	5.25
				R-2	4.19	1.20	5.52
				R-3	1.37	0.963	4.77
				R-4	1.68	0.855	5.31
				R-5	4.32	1.18	5.30
				L-1	3.37	0.866	4.51
				L-2	2.47	1.09	5.99
		Mean			2.64	1.02	5.31
			SD		1.18	0.173	0.480
		Mean			3.41	1.29	5.24
			SD		1.10	0.376	0.108

表12-3 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、卵黄嚢、胚中の5-hydroxythalidomide 濃度 (妊娠13日): 胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

250 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Yolk sac membrane	Embryo	Placenta
250	7	2104	R-1	21.2	14.9	28.3
			R-2	23.5	8.56	37.2
			L-1	21.0	6.68	40.0
			L-2	16.5	8.90	30.6
		Mean	20.6	9.76	34.0	
		SD	2.93	3.56	5.49	
		24	2106	R-3	9.65	0.951
	R-5			1.65	1.00	2.79
	R-6			7.50	18.0	3.10
	R-7			3.24	1.72	3.10
	R-8		3.30	5.68	3.32	
	Mean		5.07	5.47	3.12	
	SD		3.36	7.27	0.213	
	2107	R-1	2.50	0.889	5.86	
R-2		15.6	1.27	5.06		
R-4		70.7	6.90	4.88		
Mean		29.6	3.02	5.27		
SD	36.2	3.37	0.522			
2108	R-1	3.83	0.663	5.03		
	R-2	4.58	0.698	5.63		
	L-1	4.23	2.62	6.18		
	L-2	11.7	2.29	5.80		
	L-3	2.16	37.1	5.14		
	L-4	4.65	0.945	4.60		
	Mean	5.19	7.39	5.40		
SD	3.32	14.6	0.577			
Mean	13.3	5.29	4.60			
SD	14.1	2.19	1.28			

(2)追加実験

250 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Yolk sac membrane	Embryo	Placenta
250	7	4101	L-2	12.4	9.81	42.6
			R-1	12.4	14.0	40.8
		4102	R-4	10.5	9.69	39.4
			R-5	8.92	8.54	41.6
		Mean	10.6	10.7	40.6	
		SD	1.74	2.88	1.11	
		4104	R-1	11.7	15.0	59.8
			R-3	19.9	10.2	55.8
			L-1	35.1	12.8	54.9
			L-2	278	12.8	50.6
	L-3		21.8	8.87	49.0	
	L-4		132	12.0	53.2	
	L-6	84.4	13.8	53.3		
	Mean	83.3	12.2	53.8		
SD	96.2	2.09	3.54			
Mean	47.2	11.4	47.5			
SD	51.1	1.20	8.98			

表13-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、卵黄嚢、胚中の5'-hydroxythalidomide 濃度（妊娠13日）
: 胚・胎児への移行に関する検討

(2)追加実験

12.5 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Yolk sac membrane	Embryo	Placenta
12.5	7	2101	R-1	3.91	2.26	5.55
			L-2	2.88	1.73	5.33
			L-3	3.07	3.17	5.02
			L-4	6.04	2.93	4.86
		Mean		3.98	2.52	5.19
		SD		1.45	0.654	0.309
		2103	R-1	3.63	3.24	6.68
			R-2	3.55	3.70	6.59
			R-3	5.01	3.81	5.38
			R-4	2.94	4.15	6.65
			R-5	4.95	2.71	5.73
			L-1	2.94	3.34	7.41
	Mean		3.76	3.56	6.31	
	SD		0.873	0.491	0.715	
	2104	R-1	4.26	10.4	6.16	
		R-2	5.63	3.54	7.20	
		L-1	6.08	3.46	7.28	
		L-2	5.29	3.45	6.65	
		L-3	4.47	3.81	5.66	
		L-4	4.30	3.38	6.60	
L-5		6.20	3.71	7.22		
L-6		6.00	4.19	7.65		
Mean		5.28	4.49	6.80		
SD		0.827	2.40	0.661		
Mean		4.34	3.52	6.10		
SD		0.821	0.985	0.827		
12.5	24	2106	R-1	BLQ	0.0833	BLQ
			R-2	BLQ	0.106	0.105
			R-4	BLQ	BLQ	0.0803
			L-1	BLQ	0.0996	0.0950
			L-2	0.0817	BLQ	0.0986
			L-3	0.0934	0.103	0.0898
		Mean		0.0292	0.0653	0.0781
		SD		0.0454	0.0512	0.0392
		2107	R-1	BLQ	BLQ	BLQ
			R-2	BLQ	BLQ	BLQ
			R-3	BLQ	BLQ	BLQ
			R-4	BLQ	BLQ	BLQ
	L-1		0.143	BLQ	BLQ	
	L-2		BLQ	BLQ	BLQ	
	L-3	BLQ	BLQ	BLQ		
	L-4	BLQ	BLQ	BLQ		
	Mean		NC	NC	NC	
	SD		NC	NC	NC	
2108	R-1	0.252	0.149	0.212		
	R-2	0.228	0.187	0.221		
	L-1	0.138	0.146	0.221		
	L-2	0.192	0.118	0.212		
	L-3	0.128	0.142	0.226		
	L-4	0.125	0.178	0.270		
L-5	0.149	0.154	0.270			
Mean		0.173	0.153	0.233		
SD		0.0512	0.0231	0.0257		
Mean		0.0734	0.0729	0.104		
SD		0.0866	0.0770	0.119		

表13-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、卵黄嚢、胚中の5'-hydroxythalidomide 濃度（妊娠13日）：胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

25 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Yolk sac membrane	Embryo	Placenta
25	7	1103	R-1	12.8	8.49	16.3
			L-1	5.63	9.98	15.3
			L-2	18.6	7.18	15.2
			L-3	14.9	8.20	16.2
			L-4	13.6	8.91	15.3
			L-5	6.89	7.29	15.4
			L-6	8.83	8.35	16.2
	L-7	14.0	9.74	15.4		
	Mean			11.9	8.52	15.7
	SD			4.41	1.02	0.478
	1104	L-1	7.58	8.69	15.8	
		L-5	13.9	6.38	18.3	
	Mean			10.7	7.54	17.1
	SD			11.3	8.03	16.4
24	7	1105	R-3	0.943	0.390	0.898
			L-1	0.475	0.404	0.881
			L-2	0.630	0.444	0.933
			L-3	1.71	0.440	0.990
			L-5	0.623	0.432	0.980
			L-6	0.757	0.455	0.910
			L-7	0.335	0.498	1.01
	Mean			0.782	0.438	0.943
	SD			0.453	0.0352	0.0502
	1106	R-8	0.342	0.279	0.604	
		R-9	0.383	0.282	0.615	
	Mean			0.363	0.281	0.610
	1107	R-1	0.199	0.240	0.551	
		R-2	0.218	0.214	0.546	
R-3		0.658	0.241	0.567		
R-4		0.129	0.280	0.527		
L-1		0.246	0.260	0.591		
L-2		0.263	0.270	0.418		
Mean				0.286	0.251	0.533
SD			0.188	0.0240	0.0605	
1108	L-1	0.457	0.546	1.06		
	L-5	0.964	0.504	1.05		
Mean			0.711	0.525	1.06	
SD			0.535	0.373	0.785	
SD			0.247	0.130	0.253	

(2)追加実験

25 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Placenta	Yolk sac membrane	Embryo
25	7	3101	R-1	7.06	6.49	15.3
			R-2	10.7	6.81	14.0
			R-3	10.5	7.20	12.8
			R-4	8.64	7.33	13.4
			R-5	4.30	7.74	13.8
			L-1	4.48	6.01	12.9
			Mean			7.61
	SD			2.83	0.623	0.917
	7	R-1	7.73	8.42	18.0	
		R-2	16.0	9.76	16.4	
		R-3	9.76	10.2	16.2	
		R-4	9.22	8.40	15.6	
		R-5	18.9	10.9	17.6	
		L-1	13.0	8.95	15.0	
L-2		12.0	8.62	17.2		
3102	L-3	13.9	9.21	15.7		
	L-4	9.71	8.17	16.3		
	L-5	8.31	8.49	17.6		
	L-6	10.9	7.15	13.8		
	L-7	15.1	7.94	17.2		
	Mean			12.0	8.85	16.4
	SD			3.42	1.03	1.23
Mean			9.83	7.89	15.0	
SD			3.13	1.36	1.90	

表13-3 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎盤、卵黄嚢、胚中の5'-hydroxythalidomide 濃度（妊娠13日）：胚・胎児への移行に関する検討

(1)先行実験

250 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Yolk sac membrane	Embryo	Placenta
250	7	2104	R-1	29.6	36.3	53.6
			R-2	43.4	31.0	61.2
			L-1	23.7	29.1	58.2
			L-2	29.5	29.0	51.3
		Mean	31.6	31.4	56.1	
		SD	8.37	3.43	4.46	
		24	2106	R-3	4.92	1.39
	R-5			4.77	1.53	8.32
	R-6			7.25	4.90	8.75
	R-7			4.30	4.46	9.26
	R-8		5.52	2.53	9.83	
	Mean		5.35	2.96	9.04	
	SD		1.15	1.64	0.565	
	2107	R-1	5.94	5.28	9.99	
R-2		6.31	3.36	10.2		
R-4		11.7	5.50	10.1		
Mean		7.98	4.71	10.1		
SD	3.22	1.18	0.105			
2108	R-1	7.88	6.20	10.9		
	R-2	8.52	6.67	11.2		
	L-1	6.80	5.62	12.2		
	L-2	8.90	4.63	11.4		
	L-3	2.41	10.8	10.7		
	L-4	6.36	6.06	9.64		
	Mean	6.81	6.66	11.0		
SD	2.37	2.14	0.847			
Mean	6.72	4.78	10.0			
SD	1.32	1.85	0.982			

(2)追加実験

250 mg/kg 群

Dose level (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Fetus No.	Concentration (ng/g)		
				Yolk sac membrane	Embryo	Placenta
250	7	4101	L-2	47.3	36.9	77.0
			R-1	28.2	26.5	60.2
		4102	R-4	29.6	31.9	62.0
			R-5	30.5	37.2	65.5
		Mean	29.4	31.9	62.6	
		SD	1.16	5.35	2.70	
		4104	R-1	56.0	36.9	99.0
			R-3	32.6	38.8	87.6
			L-1	76.9	48.6	107
			L-2	105	45.8	83.4
			L-3	65.2	39.4	84.8
			L-4	125	44.5	85.0
	L-6	88.6	46.4	86.3		
	Mean	78.5	42.9	90.4		
SD	31.0	4.49	8.98			
Mean	56.2	38.0	78.3			
SD	31.5	6.92	17.2			

表14 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による母動物一般状態観察:胚・胎児発生に関する検討(妊娠28日帝王切開)

(1) 先行試験

Dose (mg/kg)	Signs	Gestational day													
		Treatment period (GDs1-13)													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	Number of dams	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Number of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease feces	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
25	Number of dams	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Number of dams with abnormal findings	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease feces	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Number of dams with abnormal findings	0	0	8	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Decrease feces	0	0	8	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	No feces	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abortion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dose (mg/kg)	Signs	Gestational day													
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
0	Number of dams	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Number of dams with abnormal findings	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Decrease feces	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
25	Number of dams	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Number of dams with abnormal findings	0	0	4	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	1
	Decrease feces	0	0	4	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	1
250	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	11	11	11
	Number of dams with abnormal findings	1	4	3	2	5	5	5	3	2	0	0	0	0	0
	Decrease feces	1	4	3	2	5	4	5	3	1	0	0	0	0	0
	No feces	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abortion	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

(2) 追加試験

Dose (mg/kg)	Signs	Gestational day													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	Number of dams	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Number of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease feces	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.5	Number of dams	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Number of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease feces	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dose (mg/kg)	Signs	Gestational day													
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
0	Number of dams	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Number of dams with abnormal findings	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease feces	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.5	Number of dams	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Number of dams with abnormal findings	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease feces	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表15 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による母動物体重推移・胚・胎児発生に関する検討(妊娠28日帝王切開)

(1) 先行試験

Dose (mg/kg)		Gestational day								
		0	1	3	6	8	10	12	13	14
		Treatment period (GDs1-13)								
	No. dams	7	7	7	7	7	7	7	7	7
0	Mean	3.26	3.30	3.32	3.39	3.42	3.47	3.50	3.53	3.56
	S.D.	0.18	0.19	0.20	0.19	0.19	0.20	0.20	0.21	0.22
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
25	Mean	3.32	3.37	3.35	3.38	3.41	3.44	3.46	3.48	3.49
	S.D.	0.22	0.21	0.20	0.22	0.23	0.25	0.24	0.24	0.24
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12
250	Mean	3.11	3.16	3.15	3.19	3.22	3.25	3.27 *	3.28 *	3.29 *
	S.D.	0.14	0.14	0.15	0.17	0.17	0.17	0.16	0.17	0.16
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Dose (mg/kg)		Gestational day						Body weight		
		16	19	22	24	26	28	GD0-28	GD1-14	GD14-28
0	n	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Mean	3.63	3.67	3.70	3.73	3.76	3.80	0.54	0.26	0.24
	S.D.	0.22	0.21	0.23	0.21	0.21	0.20	0.10	0.08	0.07
25	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Mean	3.48	3.46	3.53	3.58	3.62	3.65	0.33 **	0.12 *	0.16
	S.D.	0.25	0.22	0.23	0.24	0.23	0.20	0.14	0.14	0.10
250	n	12	12	12	11	11	11	11	12	11
	Mean	3.19 **	3.09 **	3.09 **	3.18 **	3.24 **	3.28 **	0.16 **	0.14 **	-0.01 **
	S.D.	0.16	0.20	0.20	0.19	0.15	0.18	0.10	0.05	0.09

Significantly different from the control : * P<0.05, ** P<0.01

(2) 追加試験

Dose (mg/kg)		Gestational day								
		0	1	3	6	8	10	12	13	14
		Treatment period (GDs1-13)								
thalidomi 0 mg/kg	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Mean	3.53	3.54	3.56	3.60	3.64	3.64	3.66	3.68	3.67
	S.D.	0.30	0.28	0.28	0.25	0.26	0.25	0.25	0.29	0.28
thalidomi 12.5 mg/l	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Mean	3.28	3.34	3.36	3.43	3.48	3.51	3.54	3.56	3.57
	S.D.	0.37	0.39	0.38	0.37	0.36	0.37	0.38	0.37	0.39

Dose (mg/kg)		Gestational day						Body weight		
		16	19	22	24	26	28	GD0-28	GD1-14	GD14-28
thalidomi 0 mg/kg	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Mean	3.70	3.69	3.71	3.73	3.72	3.70	0.17	0.12	0.04
	S.D.	0.26	0.21	0.23	0.22	0.21	0.21	0.10	0.03	0.08
thalidomi 12.5 mg/l	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Mean	3.57	3.59	3.61	3.63	3.66	3.70	0.42 **	0.23 *	0.13
	S.D.	0.40	0.39	0.38	0.36	0.37	0.38	0.09	0.08	0.11

Significantly different from thalidomide 0 mg/kg : ** P<0.01

表16 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による帝王切開所見(妊娠28日):胚・胎児発生に関する検討

(1) 先行試験

Dose (mg/kg)	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	
	n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	25/63	7	7	7	7	7	7
0	Mean	10.1	9.4	6.4	93.6	0.4	4.5	3.6	5.4	9.0	39.7	33.66	33.76	33.83	3.34	3.14	3.22
	S.D.	2.0	1.7	8.6	8.6	0.5	5.6	1.6	1.0	1.7		3.53	3.10	3.14	0.71	0.70	0.70
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	30/59	8	8	8	8	8	8
25	Mean	10.0	8.6	13.1	86.9	1.3	13.4	3.8	3.6	7.4	50.8	31.56	29.77	30.70	3.28	3.03	3.17
	S.D.	1.2	0.9	9.5	9.5	2.4	24.6	1.2	1.3	2.1		2.29	3.22	2.56	0.46	0.45	0.39
											DT *						
	n	11	11	11	11	11	11	11	11	11	7/14	5	3	5	5	3	5
250	Mean	7.5 **	6.6 **	10.3	89.7	5.4 **	83.2 **	0.6 **	0.6 **	1.3 **	50.0	29.99	30.81	29.60 *	4.19	3.02	3.79
	S.D.	1.6	1.4	11.2	11.2	1.4	22.4	0.8	1.1	1.7		3.14	3.87	2.72	0.67	0.39	0.74

(2) 追加試験

Dose (mg/kg)	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 0 mg/kg	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	15/20	4	4	4	4	4	4
	Mean	8.3	5.3	34.8	65.2	0.3	2.8	3.8	1.3	5.0	75.0	35.47	37.72	36.01	3.91	4.27	3.96
	S.D.	3.3	3.0	30.8	30.8	0.5	5.6	2.8	0.5	2.6		6.08	5.03	6.20	0.86	1.03	0.88
thalidomide 12.5 mg/kg	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	30/61	8	7	8	8	7	8
	Mean	9.1	8.1	10.9	89.1	0.5	6.9	3.8	3.9 *	7.6	49.2	30.99	30.04 *	31.07	3.30	2.97 *	3.18
	S.D.	1.9	1.9	12.5	12.5	0.5	8.0	1.4	2.2	2.1		3.64	4.00	3.92	0.59	0.48	0.51

Significantly different from the control : * P<0.05, ** P<0.01

n: Number of dams

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

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

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

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

e): (Number of live male fetuses / Number of live fetuses) x 100

表17 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胚・胎児死亡数(妊娠28日) :胚・胎児発生に関する検討

(1) 先行試験

Dose (mg/kg)	Number of implan- tation	Number of resorptions								Postimplantation loss(%) a)						
		i	r	p	e	l	d	Total	i	r	p	e	l	d	Total	
	n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
0	Mean	9.4	0.0	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	1.6	2.9	0.0	0.0	0.0	4.5
	S.D.	1.7	0.0	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	4.2	5.0	0.0	0.0	0.0	5.6
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
25	Mean	8.6	0.0	0.3	1.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	2.5	10.9	0.0	0.0	0.0	13.4
	S.D.	0.9	0.0	0.7	1.8	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	7.1	18.2	0.0	0.0	0.0	24.6
	n	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
250	Mean	6.6 **	3.2 *	0.4	1.5	0.3	0.0	0.0	5.4 **	54.5 *	4.4	20.4	3.9	0.0	0.0	83.2 **
	S.D.	1.4	3.2	0.7	2.3	0.9	0.0	0.0	1.4	52.2	8.3	29.9	12.9	0.0	0.0	22.4

(2) 追加試験

Dose (mg/kg)	Number of implan- tation	Number of resorptions								Postimplantation loss(%) a)						
		i	r	p	e	l	d	Total	i	r	p	e	l	d	Total	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
0	Mean	5.3	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	2.8
	S.D.	3.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	5.6	0.0	0.0	5.6
	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
12.5	Mean	8.1	0.0	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.5	0.0	3.0	2.5	1.4	0.0	0.0	6.9
	S.D.	1.9	0.0	0.5	0.4	0.4	0.0	0.0	0.5	0.0	5.7	7.1	3.9	0.0	0.0	8.0

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

Significantly different from the control : * P<0.05, ** P<0.01

DT : Dunnett test (two-side), ST : Steel test (two-side), W2 : Wilcoxon rank sum test (two-side)

n: Number of dams

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

表18 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児外表観察:胚・胎児発生に関する検討

(1) 先行試験

Test article	Thalidomide		
	0	25	250
Dose (mg/kg)	0	25	250
Number of dams	7	8	5
Number of fetuses	63	59	14
Number of dams with anomalous fetuses (%) a)	0 (0.0)	1 (12.5)	5 (100.0) **
Number of fetuses with any anomaly (%) b)	0 (0.0)	1 (2.1)	11 (82.0) **
Types of abnormality			
Domed head	n	0 (0)	1 (1)
	Mean		2.1
	S.D.		5.9
Hyperflexion of limb	n	0 (0)	1 (1)
	Mean		20.0
	S.D.		44.7
Malrotated limb	n	0 (0)	6 (3)
	Mean		34.7 *
	S.D.		33.5
Micromelia	n	0 (0)	1 (1)
	Mean		6.7
	S.D.		14.9
Ectrodactyly	n	0 (0)	5 (3)
	Mean		50.0 *
	S.D.		50.0
Hyperflexion of paw	n	0(0)	7(4)
	Mean		57.3 **
	S.D.		45.9
Polydactyly	n	0 (0)	1 (1)
	Mean		20.0
	S.D.		44.7
Hooked tail	n	0 (0)	1 (1)
	Mean		4.0
	S.D.		8.9
Short tail	n	0 (0)	1 (1)
	Mean		6.7
	S.D.		14.9
Pendulous digit	n	0 (0)	3 (2)
	Mean		28.0
	S.D.		43.8

(2) 追加試験

Test article	Thalidomide	
	0	12.5
Dose (mg/kg)	0	12.5
Number of dams	4	8
Number of fetuses	20	61
Number of dams with anomalous fetuses (%) a)	0 (0.0)	0 (0.0)
Number of fetuses with any anomaly (%) b)	0 (0.0)	0 (0.0)

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

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

Significantly different from the control : *P<0.05, ** P<0.01

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19-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児内臓観察:胚・胎児発生に関する検討

(1) 先行試験

Test article		thalidomide	thalidomide	thalidomide
Dose (mg/kg)		0	25	250
Number of dams (Number of fetuses)		7 (63)	8 (59)	5 (14)
Number of dams with anomalous fetuses (incidence %) a)		0 (0.0)	7 (87.5) **	5 (100.0) **
Number of fetuses with any anomaly (incidence %) b)		0 (0.0)	10 (19.5) **	9 (72.0) **
Number of dams with variant fetuses (incidence %) a)		6 (85.7)	6 (75.0)	4 (80.0)
Number of fetuses with any variation (incidence %) b)		7 (11.7)	12 (21.5)	8 (48.7)
Types of abnormality				
Fluid-filled abdomen	n	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	Mean		1.6	
	S.D.		4.4	
Dilated cerebral ventricle	n	0 (0)	3(3)	1(1)
	Mean		5.0	6.7
	S.D.		7.1	14.9
Muscular ventricular septal defect	n	0 (0)	3(3)	3(3)
	Mean		7.5	30.7 *
	S.D.		12.1	41.3
Persistent atrioventricular canal	n	0 (0)	1(1)	0 (0)
	Mean		1.6	
	S.D.		4.4	
Overriding aorta	n	0 (0)	0 (0)	3(2)
	Mean			18.0
	S.D.			24.9
Dilated aortic arch	n	0 (0)	3(2)	3(3)
	Mean		4.9	36.7 *
	S.D.		9.5	41.5
Interrupted aortic arch	n	0 (0)	1(1)	0(0)
	Mean		1.8	
	S.D.		5.1	
Retrosophageal aortic arch	n	0 (0)	0 (0)	1(1)
	Mean			6.7
	S.D.			14.9
Right-sided aortic arch	n	0 (0)	0 (0)	1(1)
	Mean			10.0
	S.D.			22.4
Diaphragmatic hernia	n	0 (0)	0 (0)	1(1)
	Mean			10.0
	S.D.			22.4
Distended bladder	n	0 (0)	1(1)	0 (0)
	Mean		2.1	
	S.D.		5.9	
Types of variation				
Malpositioned subclavian artery origin	n	1 (1)	7 (3)	3 (2)
	Mean	1.4	10.1	23.3
	S.D.	3.8	15.8	32.5
Absent accessory lung lobe	n	4 (4)	4 (3)	3 (2)
	Mean	7.0	9.8	14.7
	S.D.	6.7	14.3	20.2
Small gallbladder	n	0 (0)	4 (2)	2 (1)
	Mean		6.9	8.0
	S.D.		15.2	17.9
Retrocaval ureter	n	3 (3)	1 (1)	3 (2)
	Mean	5.0	4.2	20.0
	S.D.	6.3	11.8	29.8

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

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

Significantly different from the control : *P<0.05, ** P<0.01

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

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

表19-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児内臓観察: 胎・胎児発生に関する検討

(2) 追加試験

Test article		thalidomide	thalidomide
Dose (mg/kg)		0	12.5
Number of dams (Number of fetuses)		4(20)	8(61)
Number of dams with anomalous fetuses (incidence %) a)		0 (0.0)	4(50.0)
Number of fetuses with any anomaly (incidence %) b)		0 (0.0)	6(13.5)
Number of dams with variant fetuses (incidence %) a)		2(50.0)	6(75.0)
Number of fetuses with any variation (incidence %) b)		2(10.4)	9(15.1)
Types of anomaly			
Muscular ventricular septal defect	n	0(0)	3(2)
	Mean		5.7
	S.D.		12.0
Dilated aortic arch	n	0(0)	3(2)
	Mean		8.3
	S.D.		17.8
Absent kidney	n	0(0)	1(1)
	Mean		1.6
	S.D.		4.4
Absent ureter	n	0(0)	1(1)
	Mean		1.6
	S.D.		4.4
Misshapen heart	n	0(0)	1(1)
	Mean		3.1
	S.D.		8.8
Types of variation			
Malpositioned subclavian artery origin	n	0(0)	2(2)
	Mean		4.7
	S.D.		9.3
Absent accessory lung lobe	n	1(1)	5(4)
	Mean	6.3	8.6
	S.D.	12.5	10.5
Retrocaval ureter	n	1(1)	3(2)
	Mean	4.2	4.9
	S.D.	8.4	9.5

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 variations / Number of dams) x 100

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

表20-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児骨格観察:胚・胎児発生に関する検討

(1) 先行試験

Test article		thalidomid 0	thalidomid 25	thalidomid 250
Dose (mg/kg)				
Number of dams (Number of fetuses)		7(63)	8(59)	5(14)
Number of dams with anomalous fetuses (incidence %)		2(28.6)	3(37.5)	5(100.0) *
Number of fetuses with any anomaly (incidence %)		2(3.2)	3(5.4)	10(75.3) **
Number of dams with variant fetuses (incidence %) a)		5(71.4)	5(62.5)	3(60.0)
Number of fetuses with any variation (incidence %) b)		9(15.9)	8(12.2)	9(52.0)
Types of anomalies				
Misaligned sacral and caudal vertebra	n	0(0)	0(0)	1(1)
	Mean			4.0
	S.D.			8.9
11 ribs	n	1(1)	0(0)	0(0)
	Mean	1.8		
	S.D.	4.7		
Incomplete ossified parietal	n	0(0)	1(1)	0(0)
	Mean		2.1	
	S.D.		5.9	
Short humerus	n	0(0)	0(0)	1(1)
	Mean			6.7
	S.D.			14.9
Absent radius	n	0(0)	0(0)	2(1)
	Mean			13.3
	S.D.			29.8
Absent metacarpal	n	0(0)	1(1)	6(4)
	Mean		1.6	54.0 **
	S.D.		4.4	45.6
Absent forepaw phalanx	n	0(0)	1(1)	6(4)
	Mean		1.6	54.0 **
	S.D.		4.4	45.6
Fused sternebra	n	0(0)	1(1)	0(0)
	Mean		1.8	
	S.D.		5.1	
Branched rib	n	1(1)	0(0)	0(0)
	Mean	1.8		
	S.D.	4.7		
Hemicentric lumbar centrum	n	1(1)	0(0)	0(0)
	Mean	1.4		
	S.D.	3.8		
Bent fibula	n	0(0)	0(0)	2(2)
	Mean			13.3
	S.D.			18.2
Absent tibia	n	0(0)	0(0)	5(3)
	Mean			30.7 *
	S.D.			33.9
Misshapen tibia	n	0(0)	0(0)	1(1)
	Mean			4.0
	S.D.			8.9

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

Significantly different from thalidomide 0 mg/kg : * P<0.05, ** P<0.01

表20-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児骨格観察:胚・胎児発生に関する検討

(1) 先行試験

Test article		thalidomid	thalidomid	thalidomid
Dose (mg/kg)		0	25	250
Number of dams (Number of fetuses)		7(63)	8(59)	5(14)
Number of dams with anomalous fetuses (incidence %)		2(28.6)	3(37.5)	5(100.0) *
Number of fetuses with any anomaly (incidence %)		2(3.2)	3(5.4)	10(75.3) **
Number of dams with variant fetuses (incidence % a)		5(71.4)	5(62.5)	3(60.0)
Number of fetuses with any variation (incidence % b)		9(15.9)	8(12.2)	9(52.0)
Types of variation				
Split sternbra	n	2(1)	3(2)	1(1)
	Mean	3.6	4.0	6.7
	S.D.	9.4	8.1	14.9
27 presacral vertebrae	n	5(3)	5(3)	0(0)
	Mean	9.1	7.8	
	S.D.	12.7	12.3	
25 presacral vertebrae	n	2(2)	0(0)	0(0)
	Mean	3.2		
	S.D.	5.5		
Unossified talus	n	0(0)	1(1)	9(3)
	Mean		1.8	52.0 *
	S.D.		5.1	50.2
Asymmetric sternbra	n	0(0)	0(0)	1(1)
	Mean			6.7
	S.D.			14.9

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

Significantly different from thalidomide 0 mg/kg : * P<0.05, ** P<0.01

表20-3 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児骨格観察: 胎・胎児発生に関する検討

(2) 追加試験

Test article		thalidomid	thalidomid
Dose (mg/kg)		0	12.5
Number of dams (Number of feuses)		4(20)	8(61)
Number of dams with anomalous fetuses (incidence %)		0(0.0)	0(0.0)
Number of fetuses with any anomaly (incidence %)		0(0.0)	0(0.0)
Number of dams with variant fetuses (incidence %) a)		2(50.0)	2(25.0)
Number of fetuses with any variation (incidence %) b)		8(26.1)	4(6.3)
Types of variation			
Split sternebra	n	1(1)	1(1)
	Mean	4.2	1.6
	S.D.	8.4	4.4
27 presacral vertebrae	n	6(1)	2(1)
	Mean	18.8	3.1
	S.D.	37.5	8.8
Unossified talus	n	1(1)	1(1)
	Mean	3.1	1.6
	S.D.	6.3	4.4

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 variations / Number of dams) x 100

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

表21-1 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児主要部位骨化数観察: 胎児発生に関する検討

(1) 先行試験

(a) 胸骨、仙尾椎骨、手骨

Test article		thalidomid	thalidomid	thalidomid
Dose		0	25	250
Dose unit		mg/kg	mg/kg	mg/kg
Number of dams		7	8	5
Number of fetuses		63	59	14
Sternebra	Mean	5.41	5.45	5.47
	S.D.	0.52	0.44	0.60
Sac.&caud. Vertebra	Mean	19.15	18.67	17.91 **
	S.D.	0.34	0.60	0.48
Metacarpal phalanges of forelimbs R	Mean	4.66	4.29 *	4.15 *
	S.D.	0.27	0.22	0.39
Metacarpal phalanges of forelimbs L	Mean	4.67	4.30	4.08
	S.D.	0.32	0.25	0.51
Proximal phalanges of forelimbs R	Mean	5.00	4.95	4.46 *
	S.D.	0.00	0.15	0.46
Proximal phalanges of forelimbs L	Mean	5.00	4.96	4.22 **
	S.D.	0.00	0.06	0.56
Middle phalanges of forelimbs R	Mean	3.89	3.25 *	2.97 **
	S.D.	0.20	0.40	0.61
Middle phalanges of forelimbs L	Mean	3.83	3.30 **	3.04 **
	S.D.	0.29	0.35	0.09
Distal phalanges of forelimbs R	Mean	5.00	5.00	4.76
	S.D.	0.00	0.00	0.43
Distal phalanges of forelimbs L	Mean	5.00	4.99	4.37 *
	S.D.	0.00	0.04	0.71

Significantly different from thalidomide 0 mg/kg : * P<0.05, ** P<0.01

表21-2 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児主要部位骨化数観察: 胚・胎児発生に関する検討

(1) 先行試験

(b) 足骨

Test article		thalidomid	thalidomid	thalidomid
Dose		0	25	250
Dose unit		mg/kg	mg/kg	mg/kg
Number of dams		7	8	5
Number of fetuses		63	59	14
Metatarsal phalanges of hindlimbs R	Mean	4.00	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00	0.00
Metatarsal phalanges of hindlimbs L	Mean	4.00	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00	0.00
Proximal phalanges of hindlimbs R	Mean	4.00	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00	0.00
Proximal phalanges of hindlimbs L	Mean	4.00	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00	0.00
Middle phalanges of hindlimbs R	Mean	3.98	3.77	3.35 *
	S.D.	0.06	0.32	0.60
Middle phalanges of hindlimbs L	Mean	3.98	3.73	3.35 *
	S.D.	0.06	0.43	0.60
Distal phalanges of hindlimbs R	Mean	4.00	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00	0.00
Distal phalanges of hindlimbs L	Mean	4.00	4.00	4.00
	S.D.	0.00	0.00	0.00

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

ST : Steel test (two-side)

EF : The group mean is the same and unbiased variance 0 for all groups. All data of all groups are same.

n: Number of dams

表21-3 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児主要部位骨化数観察: 胚・胎児発生に関する検査

(2) 追加試験

(a) 胸骨、仙尾椎骨、手骨

Test article		thalidomide	thalidomide
Dose		0	12.5
Dose unit		mg/kg	mg/kg
Number of dams		4	8
Number of fetuses		20	61
Sternebra	Mean	5.62	5.22 *
	S.D.	0.16	0.27
Sac.&caud. Vertebra	Mean	19.00	18.95
	S.D.	0.35	0.32
Metacarpal phalanges of forelimbs R	Mean	4.91	4.51
	S.D.	0.19	0.36
Metacarpal phalanges of forelimbs L	Mean	4.88	4.50
	S.D.	0.25	0.36
Proximal phalanges of forelimbs R	Mean	5.00	5.00
	S.D.	0.00	0.00
Proximal phalanges of forelimbs L	Mean	5.00	4.99
	S.D.	0.00	0.04
Middle phalanges of forelimbs R	Mean	3.85	3.69
	S.D.	0.31	0.38
Middle phalanges of forelimbs L	Mean	3.85	3.69
	S.D.	0.31	0.35
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

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

表21-4 妊娠雌ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胎児主要部位骨化数観察: 胚・胎児発生に関する検討

(2) 追加試験

(b) 足骨

Test article		thalidomide	thalidomide
Dose		0	12.5
Dose unit		mg/kg	mg/kg
Number of dams		4	8
Number of fetuses		20	61
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	3.97	3.91
	S.D.	0.06	0.19
Middle phalanges of hindlimbs L	Mean	3.97	3.91
	S.D.	0.07	0.19
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

令和6年3月29日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器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6年3月29日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本間 正充

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器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。

厚生労働大臣 殿

機関名 昭和薬科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 山本 恵子

次の職員の令和4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□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。