

## II.分担報告書－ 2

分担研究者 栗形 麻樹子  
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・第二室長

分担研究報告書

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

研究分担者 栗形 麻樹子

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・室長

研究協力者 高島 宏昌 (株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所)

研究協力者 長谷川 拓郎 (株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所)

研究要旨

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

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚生労働科学特別研究事業)にて立案した雄性生殖を介した、即ち、種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画(膈内投与試験)を実証するために、昨年度(R2年度)に実施した雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与時のサリドマイドの血漿中及び精漿中への移行推移の結果から最大膈内移行量を算出し、R3年度は膈内投与試験を実施した。分担研究として、膈内投与後の母動物血漿および子宮内容物(胎盤、卵黄囊膜、胎児)の薬物移行を確認した。

A. 研究目的

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

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

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

令和3年度は(3)を行った。

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

【言葉の定義】

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

ので、精巣上体、精管の分泌液も微量であるが含まれている。

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

B. 研究方法

本課題ではサリドマイドに限定した。

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

ヒトとマウスではサリドマイドの代謝経路が異なり、このことが催奇形性発現の種差の一因と考えられている。本課題ではサリドマイド未変化体とともに代謝物である5-水酸化体サリドマイド(ヒトにおける主代謝物)及び5'-OH体サリドマイド(マウスにおける主代謝物)についても測定し、試験法立案の補助とした。

1. 共通事項

1-1. 被験物質

製造元 : Carbosynth (CAB)

名称 : サリドマイド

CAS 番号 : 50-36-1

ロット番号 : FT156482001

純度 : 99%以上\*

性状 : 白色～オフホワイトの結晶性粉末\*

保管方法 : 冷蔵(2～8℃)、遮光

\* 2020年2月19日分析証明書から転記

1-2. 媒体

0.5 w/v%メチルセルロース(0.5%MC)

名称 : メチルセルロース400(化学用)

製造元 : 富士フィルム和光純薬株式会社

ロット番号：CAM6671

#### 媒体の調製：

必要量のメチルセルロース400を秤取し、攪拌しながら温めた適量の注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：9K94）を徐々に加えて分散させ、冷やして溶解させた後に注射用水を加えて0.5%溶液とし、調整後10日以内に使用した（冷蔵保存）。

#### 媒体選択理由：

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

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

#### 1-3. 被験物質の調製及び均一性・安定性分析

令和2年度に被験物の調製方法、調製頻度、安定性は確認している。

即ち、必要量のサリドマイドを秤取し、メノウ乳鉢にてすり潰しながら、0.5%MCを加えて調製した。被験液は冷蔵にて保存し、8日以内に使用した。

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

#### 1-4. 使用動物（購入雌）

動物種：ウサギ（SPF）  
系統：ニュージーランドホワイト種（Kbl:NZW）

供給源：北山ラベス株式会社  
入荷時週齢：16週齢  
交配時週齢：17週齢

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

交配：外陰部が腫脹して暗紫色を呈し、発情期と認められた雌を雄（交配用所有雄）と1:1で交配用サークル〔650(φ)×H500 mm〕に入れて行った。交尾が2回確認された雌を交尾動物とし、その日を妊娠0日とした。

群分け：交尾成立日（妊娠0日）ごとに行い、妊娠0日の体重を基に各群の体重が可能な限り均等となるようにコンピュータを用いたブロック配置法により行った。

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

#### 1-5. 使用動物（交配用所有雄）

動物種：ウサギ（SPF、所有動物）  
系統：ニュージーランドホワイト種（Kbl:NZW）

供給源：北山ラベス株式会社  
入手日：2020年3月27日（入荷時17週齢、24匹）  
交配時の体重範囲：3.53～4.15 kg

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

#### 1-6. 飼育環境

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

飼育室で飼育した。

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

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

#### 1-7. 血漿中及び子宮内容物中サリドマイド濃度測定分析方法：

液体クロマトグラフータンデム質量分析（LC-MS/MS）法

機器名及び型式	メーカー
四重極タンデム型質量分析計 (MS/MS)、Triple Quad 5500	AB SCIEX
データ処理ソフト Analyst 1.6.1	AB SCIEX
高速液体クロマトグラフ (HPLC) ACQUITY UPLC-CLASS	Waters Corporation

#### 分析対象物質：

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

標準物質：pomalidomide

#### TKパラメータ：

各投与群の最高薬物濃度(C<sub>max</sub>)、最高薬物濃度到達時間(T<sub>max</sub>)及び濃度時間曲線下面積(AUC<sub>0-24</sub>)を算出した。

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

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

#### 検出限界値

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

\*、妊娠28日胎児血漿を含む

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

##### 2-1. 投与経路（膈内投与）

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

##### 2-2. 投与期間および投与回数

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

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

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

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

### 2-3. 投与方法

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

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

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

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

### 2-4. 投与量

群構成を下記に示す。

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

\*括弧内は妊娠動物数

### 投与量設定根拠

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

この状況でヒトの精液量を4 mL程度、射精回数を2回として計算すると、精液を通して女性が曝露されるthalidomide量の最大値は160 µg/日、女性の平均体重を50 kgとして3.2 µg/kgであると推定された。

この用量での安全性を検討するための本試験での投与量としては、対象となる毒性が次世代に及ぼす影響であり不可逆であること並びに種差および個体差を考慮し、より安全側に立脚し、より多量に摂取することを想定して係数100倍を乗じ繰り上げて0.4 mg/kgとした。

### 係数100の根拠

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

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

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

### 2-5. 動物の観察

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

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

### 2-6. 剖検（最終投与日；妊娠13日）

各群の動物番号の末尾が01~04番の動物は妊娠13日の投与7時間後の採血終了後に、末尾が05~08番の動物は妊娠13日の投与24時間後の採血終了後に、ペントバルビタールナトリウム静脈内投与（1 mL/kg）による麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。

### 2-7. 帝王切開（最終投与日；妊娠13日）

剖検時に着床の有無により妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物は卵巣及び子宮を摘出した。卵巣については妊娠黄体数を数えた。子宮については子宮壁を切開し、生存胚数、死亡胚数を判定・記録した。生存胚と死亡胚の総数を着床数とした。

肉眼的に着床が認められなかった動物（0.4 mg/kg群：2例及び10 mg/kg群：1例）は妊娠黄体数を記録し、子宮は10%硫化アンモニウム溶液に浸漬し、着床部位の有無を観察した。これらの動物の子宮に着床部位は認められなかったため、不妊と判断し、全てのデータを評価から除外した。

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

薬物動態は、2回にわたって実施した膈内投与実験から調べた。即ち、

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

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

から得た母動物および子宮内容物（胎児、胎盤、卵黄囊膜）の薬物動態を調べた。

2実験での母動物採血スケジュールを下記に示す。

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

G13; gestational day 1（交尾成立日；G0）

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

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

### 3-1. 胚・胎児発生に関する実験

#### (1) 母体試料の採取

##### a) 採血日及び採血時点

妊娠13日：投与前、投与0.5、1、2、4及び7時間後（6時点）

妊娠28日：帝王切開時

##### b) 対象動物及び採血量

0.4 mg/kg 投与群の8例

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

#### (2) 胎児試料

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

### 3-2. 胚・胎児への移行に関する実験（妊娠13日帝王切開）

#### (1) 母体試料の採取

##### a) 採血日及び採血時点

妊娠1日（3時点）：投与4、7、24時間後（妊娠2日の投与前）

妊娠13日（4時点）：投与前、投与4、7、24時間後

##### b) 対象動物及び採血量

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

##### c) 帝王切開実施時期

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

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

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

#### (2) 子宮内容試料の採取（最終投与前7時間又は24時間）

##### a) 卵黄囊膜

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

##### b) 胚

卵黄囊膜と分離した胚は、ストロングチューブ各1本に入れ、重量を測定した。

##### c) 胎盤

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

各試料は送付まで-80°Cの冷凍庫で保存した。

### 3-3. 血液の処理

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

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

#### （倫理面への配慮）

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

### C. 研究結果及び考察

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

B. 研究方法、3-2. の実験結果を示す。

##### 1-1. 一般状態

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

体重推移も投与による影響はなかった（表9）。

##### 1-2. 剖検

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

##### 1-3. 帝王切開（表10）

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

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

胎盤にも異常は認められなかった。

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

B. 研究方法、3-1. から得た試料に基づく結果を示す。

##### 2-1. 母動物

##### (1) 妊娠13日（投与終了時）

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

血漿推移およびTKパラメータの総括（平均値）を下図に示す。

##### Thalidomide（妊娠13日）

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

##### 5-hydroxythalidomide（妊娠13日）

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

### 5'-hydroxythalidomide (妊娠13日)

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

#### (2) 妊娠28日母動物 (表14)

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

#### 2-2. 胎児 (妊娠28日、表15)

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

#### 2-3. 小括

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

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

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

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

値：平均値 (最小値~最大値)

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

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

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

研究の仮説を実測値で示し、より安全であることが補強された。

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

#### B.研究方法、3-2. の結果を示す。

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

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

TKパラメータ総括 (平均値) を下図に示す。

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

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

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

#### (1) 妊娠1日 (初回投与日) (表16-1)

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

#### (2) 妊娠13日 (最終投与日) (表16-2)

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

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

これらの測定値から1 mg/kgを腔内投与した場合の

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

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

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

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

#### (1) 0.4 mg/kg 群

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

不妊より除外した母動物番号：7h群：1102、24h群：1105

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

BLQ; Blow the lower limit of quantification

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

#### (2) 10mg/kg 群

妊娠13日の投与後7時間後と24時間の子宮内容物濃度の平均値を下表に示す。

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

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

BLQ; Blow the lower limit of quantification

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

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

B.研究方法、3-2.に基づく結果を示す。

#### 4-1. 子宮内容物中のサリドマイド濃度

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

##### (1) 0.4 mg/kg 群（表16-2、表19-1）

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

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

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

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

##### (2) 10 mg/kg 群（表16-2、表19-2）

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

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

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

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

#### 4-2. 小括（サリドマイド）

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

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

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

#### 4-3. 子宮内容物の水酸化代謝物濃度（表17、表18）

前述の通り、母動物の血漿中には、妊娠1日、妊娠13日

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

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

#### (1) Cmax

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 4-4. サリドマイドと水酸化代謝物の割合 (表17～表20)

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

下記の評価対象は不妊動物を除外している。

##### (1) 0.4 mg/kg群

0.4 mg/kg 群の投与後7時間における結果を次表に示す。

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

BLQ; Blow the lower limit of quantification

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

NC; Not calculated

0.4 mg/kg 群の投与後24時間における結果を示す。

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

BLQ; Blow the lower limit of quantification

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

NC; Not calculated

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

##### (2) 10 mg/kg 群

10 mg/kg 群の投与後7時間における結果を示す。

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

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

10 mg/kg 群の投与後24時間における結果を示す。

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

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

NC; Not calculated

#### 4-5. 小括 (水酸化代謝物)

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

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

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

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

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

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

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

#### D. 結論

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

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

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

#### E. 健康危険情報

総括研究報告書参照

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

##### 2. 学会発表

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

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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他 なし