

## I. 総合研究報告書

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

医薬品を男性に投与に際の避妊の必要性については、当該医薬品の遺伝毒性や発生毒性の有無、体内動態などの特性を踏まえて決定される。しかし、催奇形性物質については、雄性生殖を介した発生毒性リスクを直接検討したデータはごく限られている。代表的な催奇形性物質であるサリドマイドについて、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おり、こうした措置の必要性を直ちに否定するものではないが、雄性生殖を介した発生毒性リスクを直接検討したデータは存在しないのが実情である。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2年度は、令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）にて実施した情報収集に基づき、ウサギに対するサリドマイドによる母動物および胎児への影響を検討し、250 mg/kg体重/dayの投与量は催奇形性作用を誘発する用量であることを確認した。この用量を基準として、雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与時のサリドマイド及び主代謝物である5-水酸化体サリドマイドの血漿中及び精漿中への移行推移を検討した。その結果、精漿中濃度は血漿中濃度とほぼ等しいか、若干下回ることを確認した。さらに、雄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生理学的薬物動態モデルを構築した。

令和3年度は、雄ウサギにおける試験結果から算出した最大精漿移行量の100倍濃度のサリドマイドを妊娠雌の膈内に反復投与し、胎児への形態影響を確認するとともに、母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）へのサリドマイドの移行を確認した。また、構築した生理学的薬物動態モデルのモデル値と実測値を比較した。その結果、膈内投与により母動物の全身循環を介して子宮にサリドマイドは到達していることが推測された。母動物および胎・胎児発生への影響は観察されず、催奇形性も認められなかった。

令和4年度は、膈内投与試験立案法（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た。膈内投与による曝露量と経口投与による曝露量を比較し、膈内投与による催奇形性発現リスクについて考察した。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倍量の膈内投与量（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。また、構築した生理学的薬物動態モデルを用いて雌ウサギ結果をモデル出力値と比較した結果、両者はほぼ一致した。比較的低い投与量では、性差、投与方法関係なくサリドマイドは生体内に移行、代謝していることが示唆された。

本研究において得られた結果から、膈内投与による母動物及び胎児の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倍量を連続膈内投与しても、母動物および胎・胎児発生への影響はほとんどなく、催奇形性発現リスクも非常に低いと考えられた。

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

動物実験は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場

研究所、分析は同社つくば研究所に委託した。

A. 研究目的

本研究は、令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）にて立案した、種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画を実証するために、下記4つの試験を実行し、雄性生殖を介した発生毒性リスクを検討した。

- (1) 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血中濃度及び精液中への移行を確認する。

- (2) 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与による血中及び精液中への蓄積を確認する。
- (3) (1)及び(2)の結果に基づき、器官形成期の雌に適切な濃度のサリドマイドを膈内投与し、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) 器官形成期の雌にサリドマイドを経口投与し、催奇形性が確認される投与用量における雌の血中動態を確認し(3)と比較する。

#### 令和2年度

- (1)及び(2)を実施し、(3)の用量設定を行った。
- 最初に、雄ウサギを用いた薬物動態試験における投与量を設定するために、妊娠ウサギを用いたサリドマイド経口投与による胚・胎児発生に及ぼす影響に関する予備的検討を行った。本研究課題で使用する既知の催奇形性物質であるサリドマイドのウサギに対する催奇形性発現用量を確認した(担当：北嶋)。
- 続いて、雄ウサギを用いたサリドマイド単回あるいは反復経口投与と血漿及び精漿中薬物動態試験を実施し、サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度を測定し、血漿中及び精漿中への移行推移を確認した(担当：栞形)。
- また、ウサギにサリドマイドを経口投与した後の血中濃度推移を再現する薬物動態モデルを構築した(担当：山崎)。
- これらの結果を基に、次年度実施する膈内投与試験の投与量を設定した(担当：栞形、北嶋、山崎)。

#### 令和3年度

- (3)を実施した。
- 即ち、(1)および(2)から算出した最大精漿移行量の100倍濃度のサリドマイドを妊娠雌の膈内に反復投与し、胎児への形態影響を確認するとともに(担当：北嶋)、母動物血漿中および子宮内容物(胎盤、卵黄囊膜、胎児)へのサリドマイドの移行を確認した(担当：栞形)。
- また、昨年度構築した雄ウサギにサリドマイドを経口投与および膈内投与した後の血中濃度推移を再現する薬物動態モデルを用いて、膈内投与試験から得られた母動物血中濃度とモデル出力結果値とを比較した(担当：山崎)。

#### 令和4年度

- (4)を行い、サリドマイドを用いてウサギにおける雄性生殖を介した母動物および胚・胎児発生への影響を考察した。

#### 【言葉の定義】

1. 精液：精液は精子と精漿から構成される。論文調査による精液中濃度は、その分析方法から精漿中濃度と考えられた。したがって、本課題における用語「精液中濃度」は精漿中濃度を示す。
2. 精漿：主として副生殖腺の分泌液が混合したもので、精巣上体、精管の分泌液も微量であるが含まれている。
3. 副生殖腺：精囊腺、傍前立腺、前立腺・尿道球腺を示す。精囊腺の後背側に小胞腺があり、精囊腺と小胞腺を合わせたものが、他の動物種の精囊腺に相当する。

#### B. 研究方法

本課題では催奇形性陽性対照物質としてサリドマイドを用いた。

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

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

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

#### 1. 共通事項

##### 1-1. 被験物質

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

##### 1-2. 媒体

0.5 w/v%メチルセルロース (0.5%MC)  
 名称 : メチルセルロース400 (化学用)  
 製造元 : 富士フィルム和光純薬株式会社  
 ロット番号 : CAM6671、CAE0466

##### 媒体の調製：

必要量のメチルセルロース400を秤取し、攪拌しながら温めた適量の注射用水(日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：9K87、9K94、1H99、2D94、2G80)を徐々に加えて分散させ、冷やして溶解させた後に注射用水を加えて0.5%溶液とした(冷蔵保存)。

##### 媒体選択理由：

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

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

##### 1-3. 被験物質の調製及び均一性・安定性分析

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

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

また、単回あるいは反復経口投与と血漿及び精漿中薬物動態試験の投与液について各1回、各濃度の投与検体の含量及び均一性・安定性(濃度許容範囲；表示値

に対して10%以内、変動係数 (CV) ; 10%以下) を確認した。その結果、含量の表示値に対する割合は、94.0%~98.6%、CVは0.8%~1.2% であり、許容範囲を満たした。

#### 1-4. 使用動物

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

なお、各試験にて用いた動物の匹数及び週齢については、各試験方法を参照。

#### 1-5. 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。

#### 1-6. 投与 (経口)

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

投与開始日を投与1日 (Day1)とした。

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

なお、膈内投与については、「6. 膈内反復投与と試験研究」の項を参照。

#### 1-7. 血漿中及び精液中のサリドマイド濃度測定

分析方法: 液体クロマトグラフータンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法

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

#### 分析対象物質:

サリドマイド (Thalidomide)

5-水酸化体サリドマイド (5-hydroxythalidomide)

#### 標準物質: pomalidomide

#### TKパラメータ:

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

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

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

精液試料: 重量及びpHを測定し、安定剤にて10倍希釈し保存した。

なお、各種試料の分析検出限界値はバリデーション試験検討の結果、下記の通りに設定した。

#### 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

#### 令和2年度

#### 2. サリドマイド (強制経口投与、5日間) による胚・胎児発生に及ぼす影響に関する予備的検討 (担当: 北嶋)

薬物動態試験に先立ち、文献調査を参考に母動物および胎児への影響を確認した。

#### 2-1. 供試動物

動物数: 交尾成立動物として雌5匹  
 交配: 外陰部が腫脹して暗紫色を呈し交配適期と認められた雌と交配用雄を1対1で交配用サークル (直径650×高さ500 mm) にて交配させた。

目視にて交尾行動が2回確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠0日とした。

交配時雌体重範囲: 2.8~4.0 kg

#### 2-2. 投与期間

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

#### 2-3. 投与量

群構成を下記に示す。

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

#### 投与量設定根拠

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

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

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

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

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

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

## 2-4. 動物の観察

一般状態は毎日観察した。

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

## 2-5. 剖検及び帝王切開

妊娠28日の午前中母動物全例をペントバルビタールナトリウム麻酔下(1 mL/kg体重)で腹大動脈切断により放血致死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。

## 2-6. 帝王切開(妊娠28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、卵巣については黄体数を数えた。子宮については子宮壁を切開し、生存胎児数、死亡胚・胎児数とその区分(着床痕、吸収胚、胎盤遺残、早期浸軟児、後期浸軟児、死亡胎児)を判定し、生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。また、生存胎児の胎盤異常の有無を肉眼的に調べ、重量を個々に測定した。

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

\*10%硫化アンモニウム溶液

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

## 2-7. 生存胎児の観察

### (1) 外表、体重及び性別

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

### (2) 内臓形態

全生存胎児について、新鮮標本を用いて頭部、胸腔内(心臓の内部観察を除く)及び腹腔内の内臓異常・変異の有無を検索した。脳及び心臓(気管及び食道の周辺組織も含む)を摘出後、リン酸緩衝10%ホルマリン液で固定した。固定後、脳はWilsonの粗大切片法<sup>1)</sup>、心臓は西村の顕微解剖法<sup>2)</sup>を参照して異常・変異の有無を検索した。観察終了後の標本はリン酸緩衝10%ホルマリン液で保存した。

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

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

## (3) 骨格形態

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

全生存胎児について、骨格異常・変異の有無及び骨化進行状態〔胸骨分節、中手骨、中足骨、指端骨(基節骨、中節骨及び末節骨)及び仙尾椎骨の各骨化数〕を調べた。観察終了後の標本はチモールを含んだ50%グリセリン液で保存した。

### 染色試薬

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

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

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

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

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

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

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

群構成を下記に示す。

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

### 投与量設定根拠

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

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

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

動物ごとの投与液量は直近の体重を基準に算出し、投与は午前中に1回行った。

### 3-1. 供試動物

動物数：雄12匹（購入動物14匹）  
入荷時週齢：16～17週齢  
群分け：投与開始日に各群の体重が均一になるように割り付けた  
群分け時体重範囲：3.0～4.5 kg

### 3-2. 動物の観察

一般状態は毎日観察した。  
体重は各投与について投与1日、投与7日及び剖検時に測定した。  
剖検時には、主要臓器の異常の有無を観察し肝臓重量を測定した。

### 3-3. 血漿中及び精液中のサリドマイド濃度測定

サンプリング  
全群：投与日の投与0.5、1、2、4、7、24時間後  
追加（250 mg/kg体重/day）：投与7、24、48、72時間後

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

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

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

群構成を下記に示す。

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

### 投与量設定根拠

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

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

### 4-1. 供試動物

動物数：雄6匹（購入動物7匹）  
入荷時週齢：16～17週齢

### 4-2. 動物の観察

一般状態は毎日観察した。  
体重は投与1、3、8、10、14日および剖検日に測定した。  
剖検時に、主要臓器の異常の有無を観察し、肝臓重量を測定した。

### 4-3. 血漿中と精液中のサリドマイド濃度測定

#### サンプリング

投与1日：投与7、24時間後  
投与14日：投与前（投与13日の投与から23時間30分以上経過後）、投与7、24、48、72時間後

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

## 5. 雄ウサギを用いた経口投与後の薬物動態の解析（担当：山崎）

単回経口投与TK試験で得られた、ウサギ血漿中薬物濃度推移情報を元に簡素な1-コンパートメントモデル用の吸収速度定数、分布容積および消失速度定数を薬物動態解析ソフトにより決定した。  
ウサギで得た知見と比較を行うため、サリドマイド 250 mg/kg体重 を3～5 匹の雄ラット、雄マウスあるいはヒト肝細胞移植雄マウスに単回経口投与し、動物の健康上状態を目視の上、同様に代謝物等を解析した。

## 令和3年度

### 6. 膈内反復投与試験研究（添付資料3）

本試験の目的は、thalidomideを投与された雄の精液を介した曝露による雌への催奇形作用の有無の確認である。

#### 6-1. 使用動物（購入雌）

動物種：ウサギ（SPF）  
系統：ニュージーランドホワイト種（Kbl:NZW）  
供給源：北山ラベス株式会社  
入荷時週齢：15～16週齢  
交配時週齢：17～18週齢

入荷後1週間の検疫・馴化の期間を経て、一般状態および体重推移に異常のない動物を用いた。  
交配：外陰部が腫脹して暗紫色を呈し、発情期と認められた雌を雄（交配用所有雄）と1:1で交配用サークル〔650(φ)×H500 mm〕に入れて行った。  
交尾が2回確認された雌を交尾動物とし、その日を妊娠0日とした。

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

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

6-2. 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。

6-3. 投与経路（膈内投与）  
 本試験の目的は、thalidomideを投与された雄の精液を介した曝露による雌への催奇形作用の有無の確認であることから、投与経路は膈内投与を選択した。

6-4. 投与期間および投与回数  
 交尾翌日（妊娠1日）からthalidomideによる催奇形作用への感受性が最も強い時期である妊娠13日までの13日間とした。  
 ウサギでは排卵が交尾後約11時間に起こることが報告されていることから、投与されたthalidomideの物性による膈内環境の変化が、精子運動性等に直接影響することにより妊娠動物が減少する状況を避けるため、交尾当日（妊娠0日）の膈内投与は実施しなかった。投与回数は1日1回（7日/週）とした。  
 なお、交尾成立日を妊娠0日（Gestation day 0; GD0）とした。

6-5. 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。

6-6. 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) | 交尾成立動物数 (妊娠動物数) |
|-------------|------------|--------------|-----------------|
| 0           | 0          | 0.05         | 8 (7)           |
| 0.4         | 8.0        | 0.05         | 8 (6)           |
| 10          | 200        | 0.05         | 8 (7)           |

膈内投与量設定根拠  
 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/日とした。

係数100の根拠  
 既報からヒトで200 mg/kg反復経口投与時のCmaxは約2 µg/mLであり、精液中へ1.2~2 µg/mg（既報では約6割）と推定される。ヒトとウサギでは感度が10倍異なることから、これに個体差10をかけ、係数100とした。  
 投与容量はウサギの精液量の1/3~1/5であり、膈から漏出ししない液量として0.2 mL/bodyを選び、投与する対象のウサギの推定平均体重4 kgで除して0.05 mL/kgとした。  
 最大精漿移行量から算出した0.4 mg/kg/日用量が低濃度であることから、胚・胎児への薬物移行を確実に確認するために、調製可能な最高濃度である200 mg/mLの調製液を同じ容量投与する高用量群（10 mg/kg群）を設定した。  
 なお、胎児形態への影響は0.4 mg/kg/日群のみで評価した。

膈内投与試験は2実験に分かれて実施した。  
 即ち、膈内投与による母動物への影響および胎児形態への影響を調べる実験（7. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児発生に関する実験）と膈内投与による母動物および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）への移行を調べる実験（8. サリドマイド膈内投与による胚・胎児移行に関する実験）である。

7. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児発生に関する実験（担当：北嶋）

本試験の目的は、thalidomideを経口投与した雄の精液を介した雌への曝露による催奇形作用の有無の確認である。  
 交尾成立雌ウサギに妊娠1日から妊娠13日まで0.4 mg/kg/日のサリドマイドを1日1回、膈内投与した。  
 群構成を下記に示す。

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

7-1. 動物の観察  
 投与期間中は投与前、投与直後及び投与2時間後の3回/日、その他の期間は午前中に1回/日、一般状態を観察した。  
 体重は妊娠0、3、6、8、10、12、13、14、16、19、22、24、26及び28日の午前中（投与期間中は測定当日の投与前）に測定した。

7-2. 剖検及び帝王切開  
 妊娠28日の午前中、保定・無麻酔下の投与群の母動物全例の耳介静脈から、ヘパリンナトリウム処理シリンジを用いて0.4 mL採血した後、全例をペントバルビタールナトリウム静脈内投与（1 mL/kg）による麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させ、体外表、胸

腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。

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

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

### 7-3. 帝王切開

常法に従って、帝王切開した。

2.6.帝王切開(妊娠28日)参照。

### 7-4. 生存胎児の観察及び測定

#### (1) 外表、体重及び性別

全生存胎児について、口腔内を含む外表異常の有無を観察した後、体重を個別に測定した。生存胎児は内部生殖器の観察により性別を判定した(2.7. 生存胎児の観察の項を参照)。

#### (2) サンプルング

投与群の全胎児は腹大静脈からヘパリン処理シリンジで約0.4 mL採血した。

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

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

凍結した試料はいずれも、送付まで-80°Cの冷凍庫で保存した。

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

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

#### (3) 内臓形態

全生存胎児について、内臓異常・変異の有無を検索した(2.7. 生存胎児の観察の項を参照)。

#### (4) 骨格形態

新鮮標本を用いた内臓観察後の全生存胎児は、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、骨格異常・変異の有無及び骨化進行状態を調べた。観察終了後の標本はチモールを含んだ50%グリセリン液で保存した(2.7. 生存胎児の観察の項を参照)。

### 7-5. 統計解析

#### (1) パラメータの算出

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つ

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

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。

#### (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)。

## 8. サリドマイド腔内投与による胚・胎児移行に関する試験研究(担当:栗形)

### 8-1. 腔内投与実験

本試験の目的は、thalidomideを経口投与した雄の精液を介した雌への曝露による催奇形作用の有無の確認実験(7. サリドマイド腔内反復投与による胚・胎児発生に関する実験)において、胚を始めとする子宮内容物が被験物質に曝露されていたことを確認するである。

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

投与回数は1日1回(7日/週)とした。



2実験での母動物採血スケジュールを以下に示す。

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

G13; gestational day 1 (交尾成立日 ; G0)

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

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

9-1. 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」(7. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児発生に関する試験研究)

(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、へ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へパリン処理シリンジで約0.4 mL採血した。

9-2. 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」(妊娠13日帝王切開)

(4. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児移行に関する試験研究)

(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、へパリンナトリウム処理シリンジを用いて無麻酔下で耳介静脈から採血した。

c) 帝王切開実施時期

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

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

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

## 8-2. 投与量および投与容量

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

群構成を次に示す (\*括弧内は妊娠動物数)。

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

## 8-3. 動物の観察

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

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

## 8-4. 剖検 (最終投与日 ; 妊娠13日)

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

## 8-5. 帝王切開 (最終投与日 ; 妊娠13日)

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

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

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

薬物動態は、上記、2回にわたって実施した膈内投与実験から調べた。即ち、

9-1. 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」(7. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児発生に関する試験研究)

9-2. 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」(8. サリドマイド膈内反復投与による胚・胎児移行に関する試験研究)

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。

・妊娠13日の投与24時間後：0.4 mg/kg群の動物番号の末尾が05~08の4例  
(以上、採血量は各動物から約0.4 mL)

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

(2) 子宮内容試料の採取 (最終投与後；妊娠13-14日)

a) 卵黄囊膜

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

b) 胚

卵黄囊膜と分離した胚は、ストロングチューブ各1本に入れ、重量を測定した。

c) 胎盤

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

各試料は送付まで-80°Cの冷凍庫で保存した。

9-3. 血液の処理

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

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

9-4. 動物の観察

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

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

9-5. 剖検(最終投与日；妊娠13日)

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

9-6. 帝王切開(最終投与日；妊娠13日)

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

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

## 10. 膈内投与による雌ウサギ薬物動態の解析(担当：山崎)

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

R4年度

### 11. 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)(添付資料4)(担当：葉形)

11-1. 目的

本検討の目的は、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への影響および胚・胎児への影響を確認する。併せて、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ための試料を得ることである。

11-2. 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。

11-3. 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。

11-4. 投与量

群構成を下記に示す。

| 投与量<br>(mg/kg) | 濃度<br>(mg/mL) | 投与容量<br>(mL/kg) | 交尾成立<br>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。

#### 11-5. 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。

#### 11-6. 剖検（最終投与日；妊娠13-14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。

#### 11-7. 帝王切開（最終投与日；妊娠13-14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。

#### 11-8. 統計解析

##### (1) パラメータの算出

帝王切開から得られたデータについてパラメータ算出方法は7-5. 統計解析の項を参照。

##### (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（7-5. 統計解析の項を参照）。

#### 12. 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）（添付資料4）（担当：栗形）

「8. 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）」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。

#### 12-1. 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<br>採血時期 | 採血時間<br>(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1.47 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°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。

## 12-2. 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。

## 13. サリドマイドの経口投与による母動物及び胚・胎児発生への影響（妊娠28日帝王切開）（添付資料5）（担当：北嶋）

### 13-1. 目的

本研究の目的は、2. 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と同様である（2-1. 参照）。

具体的には、本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することである。

### 13-2. 投与期間および投与回数

2. 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と同様に、交尾翌日（妊娠1日）から妊娠13日まで、1日1回、13日間、反復経口投与した。

投与回数は1日1回（7日/週）とした。

### 13-3. 投与方法

強制経口投与方法および投与容量は、2. 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と同様である。

なお、強制経口投与した時間は、08:44~10:36の間であった。

動物ごとの投与液量は直近の体重を基準に算出した。

### 13-4. 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 (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

## 投与量設定根拠

2. 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（2-4. 投与量）を参照。

### 13-5. 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。

### 13-6. 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。

### 13-7. 帝王切開

常法に従って、帝王切開した。

2.6.帝王切開（妊娠28日）参照。

### 13-8. 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（2.7. 生存胎児の観察の項を参照）。

#### (2) 内臓形態

全生存胎児について、内臓異常・変異の有無を検索した（2.7. 生存胎児の観察の項を参照）。

#### (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、アルシャンブルー・アリザリンレッドS二重染色透明骨格標本作製し、骨格異常・変異の有無及び骨化進行状態を調べた。観察終了後の標本はチモールを含んだ50%グリセリン液で保存した（2.7. 生存胎児の観察の項を参照）。

### 13-9. 統計解析

#### (1) パラメータの算出

帝王切開から得られたデータについてパラメータ算出方法は7-5. 統計解析の項を参照。

#### (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（7-5. 統計解析の項を参照）。

## 14. 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）

雄性ウサギを用いた経口投与試験結果から構築した生理学的薬物動態モデルを用い、「3. 経口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」から得られた数値を用いて、妊娠ウサギへの経口投与試験の投与量である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。

## （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

### 令和2年度

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

##### 1-1. 母動物

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

##### 1-2. 帝王切開（R2表1）

黄体数、着床数には個体間に差はなかった。着床後胚損失率が33.3%と比較的高い値を示した。全胚吸収例以外の3腹では生存胎児数に個体間で差はなかった。

胎児重量及び胎盤重量は2腹で低値傾向が認められた。

##### 1-3. 胎児観察

###### (1) 外表（R2表2、図1）

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

屈曲肢、短鼻、眼球突出は既報と同様の形態異常であった。

前肢の屈曲肢の発現率：5.3% (0/6+1/8+2/12×100)

後肢の屈曲肢の発現率：15.3% (0/6+1/8+4/12×100)

###### (2) 内臓（R2表3）

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

###### (3) 骨格（R2表4、図2）

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

##### 1-4. 薬物動態試験における投与量設定

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

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

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

## 2. 雄ウサギを用いた単回経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験

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

その他、剖検所見、肝臓重量にサリドマイド投与による影響はみられなかった。

##### 2-1. 血漿中濃度

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの血漿中濃度推移をR2表5、R2表6に、TKパラメータをR2表7、R2表8に示す。

追加群の血漿中サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度推移をR2表9、R2表10に示した。

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

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

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

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

また、1～3回目投与の血漿中サリドマイド濃度の推移は再現性が高かった。

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

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

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

##### 2-2. 精液採取量、pH

精液量の平均及びpHの中央値を下図に示す。

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

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

### 2-3. 精漿中濃度

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの精漿中濃度推移をR2表11、R2表12に示す。追加群の血漿中サリドマイドと5-水酸化体サリドマイド濃度推移を表13に示す。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3-1. 血漿中濃度

サリドマイドと5-水酸化体サリドマイドの血漿中濃度推移をR2表14、R2表15に、薬物動態パラメータをR2表16、R2表17に示す。

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

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

### 3-2. 精液採取量、pH

精液量の平均及びpHの中央値を下図に示す。

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

サリドマイドの投与により、精液量に変化はないと考えられた。

### 3-3. 精漿中濃度

サリドマイド及び5-水酸化体サリドマイドの精漿中濃度推移をR2表18並びにR2表19に示す。

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

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

なお、BLQは定量下限(4.00 ng/mL)未満を示す。

#### <サリドマイド濃度の比較>

##### 投与1日

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

##### 投与14日

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

<5-水酸化体サリドマイド濃度の比較>

投与1日

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

投与14日

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

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

単回投与と反復投与の比較

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

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

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

ヒト型代謝物（5-水酸化体サリドマイド）の存在

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

4. ウサギを用いた体内動態の解析（担当：山崎）

ウサギのサリドマイド低用量（2.0 mg/kg体重）群では、投与2時間後に最大血中濃度を示し、投与24時間後には検出限界まで消失した。本実験結果から、

サリドマイド経口投与後のウサギ血中動態を再現記述する1-コンパートメントモデル用の吸収速度定数 1.6 h<sup>-1</sup>、分布容積3.6 L/kg および消失速度定数 0.38 h<sup>-1</sup>を決定した。

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

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

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

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

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

5. 小括（令和2年度）

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

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

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

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

この用量での安全性を検討するための腔内投与試験における投与量としては、対象となる毒性が次世代に及ぼす影響であり不可逆であること並びに種差を考慮し、係数100倍を乗じて0.4 mg/kg体重/dayとして、腔内投与試験の試験計画を立案した。

## 令和3年度

### 6. サリドマイド腔内反復投与による胚・胎児発生への影響 B.研究方法、6. の結果を示す。

#### 6-1. 母動物

##### (1) 一般状態

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

##### (2) 体重

体重値をR3表1に、増加量をR3表2示した。  
0.4 mg/kg 群において、投与期間である妊娠1日から13日の増加量が媒体対照群に比較して有意な低値を示し、妊娠14日から28日の増加量は有意な高値を示したが、いずれも変化はわずかで体重実測値には変化が認められなかった。

##### (3) 剖検所見

体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官・組織に肉眼的な異常は見られなかった。

#### 6-2. 帝王切開 (R3表3)

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

#### 6-3. 胎児観察

##### (1) 胚・胎児死亡および外表 (R3表4、R3表5)

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

##### (2) 内臓 (R3表6)

生存胎児の内臓形態に被験物質投与による変化は認められなかった。  
内臓異常は、媒体対照群で横隔膜ヘルニアが1例に認められたのみであった。  
内臓変異を有する胎児は、肺副葉欠損が媒体対照群で5例、大静脈後尿管が媒体対照群で1例、0.4 mg/kg 群で2例みられたが、いずれも発現頻度は低頻度で有意差は認められなかった。

##### (3) 骨格 (R3表7、R3表8)

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

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

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

### 7. サリドマイド腔内投与による胚・胎児移行への影響 B.研究方法、7. の実験結果を示す。

#### 7-1. 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 (R3表9)。

#### 7-2. 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。

#### 7-3. 帝王切開 (R3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、僅かには変化であり、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。

### 8. 腔内投与による母動物および胎生末期胎児中の薬物動態 (胚・胎児発生に関する実験; 0.4 mg/kg 投与) B.研究方法、9-1. の結果を示す。

#### 8-1. 母動物

##### (1) 妊娠13日 (投与終了時)

妊娠13日の thalidomide (R3表11)、5-hydroxythalidomide (R3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R3表11～R3表13に示した。

TKパラメータの総括 (平均値) を下図に示す。

#### Thalidomide (妊娠13日)

| 腔内投与量 (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)

| 腔内投与量 (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 (R3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。

### 8-2. 胎児 (妊娠28日、R3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。

### 8-3. 小括

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

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

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

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

値：平均値 (最小値~最大値)

本試験におけるヒト型代謝物 (5-hydroxythalidomide) の平均C<sub>max</sub>及び平均AUC<sub>0-t</sub>はサリドマイドの1.2%及び1.1%であった。これらの値は雄の単回投与時の2 mg/kg 群でのC<sub>max</sub> (1.3~1.6%) 及びAUC<sub>0-t</sub> (1.5から1.6%) での割合にほぼ等しかった。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するといった代謝物の危険性について考慮する必要はないと考えられた。

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

B.研究方法、9-2. の結果を示す。

### 9-1. 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 (R3表17)、及び5'-hydroxythalidomide (R3表18) の母動物血漿中濃度推移およびTKパラメータをR3表16~R3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) (R3表16-1)

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

### (2) 妊娠13日 (最終投与日) (R3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。

| 群 (mg/kg/日) | 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) |                  |
|-------------|--|------------------|
|             | 7時間  | 24時間             |
| 0.4         | 9.41 (1.73~26.0)                                     | 2.02 (1.24~11.7) |
| 10          | 289 (87.8~507)                                       | 236 (107~358)    |

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

反復投与と単回投与、雄と妊娠雌、例数の差等、令和2年度実施の雄の実験と令和3年度実施した妊娠雌の実験では両者の条件は異なり、また、腔内投与の場合、雄の経口投与と比較して数値の偏差が大きいが、腔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と考えられた。

9-2. 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（R3表19）、5-hydroxythalidomide（R3表20）、及び5'-hydroxythalidomide（表21）濃度をR3表19～R3表21に示した。不妊動物を除いた妊娠動物の血漿中濃度及び子宮内容物の集計（平均値）を下図に示す。

(1) 0.4 mg/kg 群

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

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 (n=3), 24h (n=3) ) |     |              |              |                |             |
|---|-----|--------------|--------------|----------------|-------------|
| 測定対象物質                                      |     | 母<br>(ng/mL) | 胎盤<br>(ng/g) | 卵黄囊膜<br>(ng/g) | 胚<br>(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<br>(ng/mL) | 胎盤<br>(ng/g) | 卵黄囊膜<br>(ng/g) | 胚<br>(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。

10. 膈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、9-2.の結果を示す。

10-1. 子宮内容物中のサリドマイド濃度

最終膈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（R3表16-2、R3表19-1）

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

|      | 平均値（範囲）<br>ng/mL     | 組織中濃度/母血漿中濃度<br>平均値（範囲） |
|------|----------------------|-------------------------|
| 母血漿  | 5.09<br>(0.967～8.68) | —                       |
| 胎盤   | 2.04<br>(0～4.46)     | 0.273<br>(0.31～0.51)    |
| 卵黄囊膜 | 1.73<br>(0～3.82)     | 0.243<br>(0.13～0.65)    |
| G13胚 | 2.14<br>(0～5.64)     | 0.267<br>(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）<br>ng/mL      | 組織中濃度/母血漿中濃度<br>平均値（範囲） |
|------|-----------------------|-------------------------|
| 母血漿  | 0.791<br>(0.481～1.02) | —                       |
| 胎盤   | 0.335<br>(0～1.17)     | 0.458<br>(0～1.15)       |
| 卵黄囊膜 | 0.440<br>(0～1.66)     | 0.327<br>(0～1.63)       |
| G13胚 | 検出限界以下                | 検出限界以下                  |

(2) 10 mg/kg群（R3表16-2、R3表19-2）

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

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

同様に、24時間値の妊娠していた母動物3腹（動物番号2105, 2107, 2108）の母体血中サリドマイド濃度と子宮内容物濃度を比較すると、胎盤では母動物血漿濃度の約8割が、卵黄囊膜では母動物血漿濃度の約4割が胎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）<br>ng/mL    | 組織中濃度/母血漿中濃度<br>平均値（範囲） |
|------|---------------------|-------------------------|
| 母血漿  | 30.6<br>(4.38～74.4) |                         |
| 胎盤   | 19.9<br>(3.02～50.1) | 0.773<br>(0.23～1.54)    |
| 卵黄囊膜 | 15.6<br>(3.03～43.0) | 0.549<br>(0.23～0.94)    |
| G13胚 | 13.8<br>(2.22～38.2) | 0.472<br>(0.17～0.84)    |

## 10-2. 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きいと考えられた。

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

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

## 10-3. 子宮内容物の水酸化代謝物濃度（R3表17、R3表18）

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

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

## (1) Cmax

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 10-4. サリドマイドと水酸化物の割合（R3表17～R3表20）

腔内投与において、妊娠1日に比較して妊娠13日で血中濃度が大幅に増加することはなく、蓄積性はないことが明らかになったことから、最終腔内投与日（妊娠13日）の投与後7時間および24時間における子宮内容試料採取時点での母動物（R3表17-2、R3表18-2）および子宮内容物（R3表19、R3表20）について、サリド

マイド及び2種類の代謝物濃度の比率を算出し、比較した。

下記の評価対象は不妊動物を除外している。

(1) 0.4 mg/kg群

0.4 mg/kg群の投与後7時間における結果を示す。

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

BLQ; Blow the lower limit of quantification

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

NC; Not calculated

以下に0.4 mg/kg群の投与後24時間における結果を示す。

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

BLQ; Blow the lower limit of quantification

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

NC; Not calculated

サリドマイド原体と比較し、2種の代謝物の子宮内容物への移行率は少なかった。最終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、母体血中濃度の約4割のサリドマイドが子宮内容物へ移行していたが、代謝物は検出限界以下の濃度であった。

(2) 10 mg/kg 群

10 mg/kg群の投与後7時間における結果を示す。

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

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

10 mg/kg群の投与後24時間における結果を示す。

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

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

NC; Not calculated

10-5. 小括 (水酸化代謝物)

サリドマイド及びその2種類の代謝物の、子宮内容物におけるCmax及びAUCで比較した結果、Cmax又はAUC<sub>0-t</sub>の5-OH体の血漿中濃度は、サリドマイドの1割程度、5'-OH体は5-OH体の数倍の濃度であった (C研究結果及び考察、4-1. 母動物血漿中濃度)。臍内最終投与後7時間及び24時間に母動物から採血して得られた母動物血漿中、及び、同時点で帝王切開して得られた胎盤、卵黄囊膜及び胎児中のサリドマイド原体及び2種類の代謝物の濃度を比較すると、10 mg/kg 群では5-OH体の濃度はサリドマイド濃度の0.2~0.9%、5'-OH体濃度は5-OH体濃度の1.24倍~10.7倍を示し、Cmaxの成績とは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するといった状況ではないと考えられた。また、0.4 mg/kg群では母動物5-OH体の測定限界値未満の成績が比較的多かったが、これらは単純に曝露量が少なかったことによると考えられる。最終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、母体血中濃度の約5-6割のサリドマイドが子宮内容物へ移行していたが、子宮内容物の5-OH体の測定結果が胎児では全体に低かった。

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

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

## 1.1. 妊娠雌ウサギの膈内投与による薬物動態の解析

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

その結果、経膈投与1日（妊娠1日）と投与13日（妊娠13日）の投与後4時間および7時間のウサギ血漿中サリドマイド、5-hydroxythalidomide および 5'-hydroxythalidomide 濃度の実測血中濃度（R3表16、R3表17、R3表18）は仮想出力値とほぼ一致した（図4）。

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

### 1.2. 小括（令和3年度）

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

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

この時の母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）のサリドマイド濃度および2種の水酸化物濃度を調べた結果、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。また、胎児へは母動物血漿中濃度の4-5割程度のサリドマイドが移行していた。

性別が異なり単回投与後の成績であるが、この成績を令和2年度に実施した雄の単回投与試験の2 mg/kg単回投与群の成績と比較すると、本試験における投与量は2 mg/kgの1/5であるのに対し、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。

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。膈内投与の場合、経口投与と異なりfirst pass effectを受けない状況ではあるが、サリドマイド原体に対する代謝物の割合は経口投与の場合と大差がなかった。即ち、経口投与した場合と比較して、ヒト型代謝物の割合が上昇し、代謝物の危険性について考慮する必要はないと考えられた。

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

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

西村らの先行研究から精液中に含まれるサリドマ

イドが全量膈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、膈から吸収され、子宮内に到達するサリドマイド量は、経口投与により腸管から吸収され肝臓でのfirst pass effectを受けた場合の血中濃度よりもはるかに低い可能性が考えられた。即ち、先行研究の仮説を実測値で示し、より安全であることが補強された。

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

## 令和4年度

### 1.3. サリドマイドの経口投与による母動物及び胎・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

#### 13-1. 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（R4表1）。

#### 13-2. 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（R4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<sub>max</sub>、AUC<sub>0-t</sub>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。

#### 13-3. 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。

#### 13-4. 帝王切開所見（R4表3、R4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。

14. 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）

14-1. 母動物血漿中濃度（R4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R4表5～R4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 <sub>max</sub> | AUC    | C <sub>max</sub> | AUC  | C <sub>max</sub> | 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 <sub>max</sub> | AUC    | C <sub>max</sub> | AUC  | C <sub>max</sub> | 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<sub>max</sub>及びAUC<sub>0-t</sub>はいずれの測定日においても、25 mg/kg 群のC<sub>max</sub>の10倍及びAUC<sub>0-t</sub>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<sub>max</sub>が妊娠1日に比較して高値であったが、AUC<sub>0-t</sub>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。

14-2 胎盤、卵黄囊、胎児組織中濃度（R4表11～R4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R4表11からR3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。

14-3. 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 <sub>max</sub> | AUC    | C <sub>max</sub> | AUC   | C <sub>max</sub> | 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<sub>max</sub>) 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、経口投与と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。

15. 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日帝王切開)

15-1. 母動物

(1) 一般状態(R4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 (R4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。

## 15-2. 帝王切開 (R4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。

## 15-3. 胎児観察

### (1) 胚・胎児死亡 (R4表16、R4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 (R4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 (R4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。

## 15-4. 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。

## 1.6. 妊娠雌ウサギの経口投与による薬物動態の解析

### 16-1. 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 (R4表5~R4表11) は仮想出力値とほぼ一致した (図5、図6)。

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5、図6)。

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)。

### 16-2. 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。

## 1.7. 小括 (令和4年度)

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、母動物および胚・胎児発生への影響は認められないと考えられた。

### D. 結論

雄ウサギに催奇形性発現量のサリドマイドを経口投与した結果、精漿中のサリドマイド濃度は血漿中とほぼ等しい、あるいは若干低値を示した。この結果に基づき、最大精漿移行濃度の100倍量を連続腔内投与

した結果、母動物および胚・胎児発生への影響は観察されず、催奇形性も認められなかった。

一連の結果から、サリドマイドでは雄性生殖を介した腔内投与による母動物及び児の曝露量は、経口投与と比較して非常に微量であり、催奇形性発現リスクも非常に低いと考えられた。

### E. 健康危険情報

特になし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Y Kamiya, S Otsuka, T Miura, M Yoshizawa, A Nakano, M Iwasaki, Y Kobayashi, M Shimizu, M Kitajima, F Shono, K Funatsu, H Yamazaki: Physiologically based pharmacokinetic models predicting renal and hepatic concentrations of industrial chemicals after virtual oral doses in rats. *Chem Res Toxicol.*, 33, 1736-1751, 2020
- 2) Y Kamiya, M Yanagi, S Hina, K Shigeta, T Miura, H Yamazaki: Plasma, liver, and kidney exposures in rats after oral doses of industrial chemicals predicted using physiologically based pharmacokinetic models: A case study of perfluorooctane sulfonic acid. *J Toxicol Sci*, 45, 763-767, 2020
- 3) Y Kamiya, K Handa, T Miura, M Yanagi, K Shigeta, S Hina, M Shimizu, M Kitajima, F Shono, K Funatsu, H Yamazaki, In silico prediction of input parameters for simplified physiologically based pharmacokinetic models for estimating plasma, liver, and kidney exposures in rats after oral doses of 246 disparate chemicals, *Chem Res Toxicol* 34 507-513. 2021.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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
- 9) Miura, T., Uehara, S., Shimizu, M., Suemizu, H., and Yamazaki, H. Pharmacokinetics of Primary Oxidative

- Metabolites of Thalidomide in Rats and in Chimeric Mice Humanized with Different Human Hepatocytes. *J Toxicol Sci*, 46, 311-317, 2021
- 10) Kamiya, Y., Handa, K., Miura, T., Ohori, J., Shimizu, M., Kitajima, M., Shono, F., Funatsu, K., and Yamazaki, H. An Updated *In Silico* Prediction Method for Volumes of Systemic Circulation of 323 Disparate Chemicals for Use in Physiologically Based Pharmacokinetic Models to Estimate Plasma and Tissue Concentrations after Oral Doses in Rats. *Chem Res Toxicol* 34, 2180-2183, 2021
- 11) Kamiya, Y., Handa, K., Miura, T., Ohori, J., Kato, A., Shimizu, M., Kitajima, M., and Yamazaki, H. Machine Learning Prediction of the Three Main Input Parameters of a Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Model Subsequently Used to Generate Time-Dependent Plasma Concentration Data in Humans after Oral Doses of 212 Disparate Chemicals. *Biol Pharm Bull*, 45, 124-128, 2022.
2. 学会発表
- 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) 山崎浩史: 化学物質の予測物性値を用いる生理学的薬物動態(PBPK)モデルを活用するヒト臓器中濃度推移と毒性予測、第47回日本毒性学会学術年会(川崎(オンライン)) 2020年6月
- 2) 山崎浩史: 一般化学物質の経口吸収過程を含む簡素な生理学的薬物動態モデルを活用する体内動態評価、第47回日本毒性学会学術年会(川崎(オンライン)) 2020年6月
- 3) 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)
- 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、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)
- 5) 山崎浩史: CBI学会2021年大会シンポジウム「AI-SHIPSにおける一般化学物質の吸収および体内動態予測手法開発」2021年10月、東京(オンライン)
- 6) 山崎浩史: 2021 International Workshop for Non-animals Approaches in Food Sector, Prediction of metabolic fates of food chemicals for risk assessment, October 2021, Tokyo (online).
- 7) 栗形麻樹子: 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
- 8) 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
- 9) 栗形麻樹子: 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
- 10) 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: 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 長谷川拓郎、白方渉太、高島宏昌、山崎浩史、北嶋聡、栗形麻樹子: 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
- 14) 高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、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
- 15) 栗形麻樹子、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
- 16) 栗形麻樹子: 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