

# 総括研究報告書

催奇形性物質に係る雄性生殖を介した新規発生毒性評価法の開発

研究代表者 栗形 麻樹子

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・室長

研究要旨

サリドマイド被害の重篤性に鑑み、より安全側に立脚して服用中の避妊を男性にも求めている。本来、エビデンスに基づいた安全性確保を担保すべきであるが、そのために必要な催奇形性物質に係る雄性生殖を介したデータはない。本研究は種差や薬物動態を考慮しつつ、サリドマイドを含むこれ以外の物質への一般化を含めた評価法の確立、ヒトへの外挿可能性を踏まえたプロトコールを作成するために必要な情報収集を行うことを目的とする。具体的には、サリドマイドによる催奇形性発現に感受性をもつウサギを用いて、雄性生殖を介した発生毒性発現のリスクについて評価しうるデータを得ることである。

本研究で得られた結果は、将来的にサリドマイドを含むこれ以外の物質への一般化を含めた評価法の確立につながるものである。

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

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

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

研究分担者

北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・部長

山崎 浩史

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究協力者

高島 宏昌

株式会社ボゾリサーチセンター・御殿場研究所

長谷川 拓郎

株式会社ボゾリサーチセンター・つくば研究所

A. 研究目的

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

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚

生労働科学特別研究事業)にて立案した、種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画を実証するために、下記4つの試験を実行し、サリドマイドの雄性生殖を介した催奇形性発現リスクについて検討する。

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

令和4年度は(4)を行った。

なお、動物実験は株式会社ボゾリサーチセンター御

殿場研究所、分析は同社つくば研究所に委託した。

## 【言葉の定義】

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

## B. 研究方法

本課題ではサリドマイドに限定した。

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

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

### 1. 共通事項

#### 1-1. 被験物質

製造元 : Carbosynth (CAB)  
名称 : サリドマイド  
CAS 番号 : 50-35-1  
ロット番号 : FT156482001  
純度 : 99%以上\*  
性状 : 白色～オフホワイトの結晶性粉末\*  
保管方法 : 冷蔵 (2～8℃)、遮光  
\* 2020年2月19日分析証明書から転記

#### 1-2. 媒体

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

#### 媒体の調製 :

必要量のメチルセルロース400を秤取り、攪拌しながら温めた適量の注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：1H99）を徐々に加えて分散させ、冷やして溶解させた後に注射用水を加えて0.5%溶液とし、調整後10日以内に使用した（冷蔵保存）。

#### 媒体選択理由 :

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

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

#### 1-3. 被験物質の調製及び均一性・安定性分析

令和2年度に被験物の調製方法、調製頻度、安定性は確認している。

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

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

#### 1-4. 使用動物 (購入雌)

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

供給源 : 北山ラベス株式会社

入荷時週齢 : 16週齢

交配時週齢 : 17週齢

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

交配：外陰部が腫脹して暗紫色を呈し、発情期と認められた雌を雄（交配用所有雄）と1:1で交配用サークル [650(φ)×H500 mm] に入れて行った。

交尾が2回確認された雌を交尾動物とし、その日を妊娠0日とした。

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

なお、先行及び追加検討あわせて52匹購入し、試験には42匹を配した。余剰動物は、動物管理部門へ移管した。

#### 1-5. 使用動物 (交配用所有雄)

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

供給源 : 北山ラベス株式会社

入手日 : 2022年2月4日 (入荷時16週齢、30匹)

交配時の体重範囲 : 2.8～3.65 kg (先行試験)

3.0～4.5 kg (追加試験)

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

#### 1-6. 飼育環境

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

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

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

#### 1-7. 血漿中及び子宮内容物中サリドマイド濃度測定分析方法 :

液体クロマトグラフータンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法

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

**分析対象物質：**

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

**標準物質：** pomalidomide

**TKパラメータ：**

各投与群の最高薬物濃度(C<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。

**検出限界値**

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

\*、妊娠28日胎児血漿を含む

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

**2-1. 目的**

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

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

**2-2. 投与期間および投与回数**

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

この投与期間はthalidomideによる催奇形作用への感受性が高い時期である。ウサギでは排卵が交尾後約11時間に起こることが報告されていることから、投与されたthalidomideの物性による膈内環境の変化が、精子運動性等に直接影響することにより妊娠動物が減少する状況避けるため、交尾当日 (妊娠0日) の膈内投与は実施しなかった。

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

**2-3. 投与方法**

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

投与後は、カテーテル内を約4mLの水道水でフラッシングした。

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

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

**2-4. 投与量**

群構成を下記に示す。

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

\*括弧内は妊娠動物数

**投与量設定根拠**

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

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

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

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

投与容量は5 mL/kg とした。

**2-5. 動物の観察**

投与期間中は投与前、投与直後及び投与2時間後の3回/日、その他の期間は午前中に1回/日、生死及び流早産の確認と合わせて、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察した。

体重は妊娠0、1、3、6、8、10、12、13、および14日の午前中 (投与期間中は測定当日の投与前) に測定した。

**2-6. 剖検 (最終投与日 ; 妊娠13日)**

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

解剖する動物は、ペントバルビタールナトリウム静脈内投与による深麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。

**2-7. 帝王切開 (最終投与日 ; 妊娠13日)**

剖検時に肉眼的着床の有無により妊娠の成否を確

認した。妊娠が認められた母動物については、卵巢の妊娠黄体数を数え、生存胎児数、死亡胚胎児数とその区分（着床痕、吸収胚、胎盤遺残、早期浸軟児、後期浸軟児）を判定・記録した。生存胎児と死亡胚胎児の総数を着床数とした。また、生存胎児の胎盤異常の有無を肉眼的に調べ、重量を個々に測定した。

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

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

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

3-1. 目的  
2-1. 参照

3-2. 投与期間および投与回数  
2-2. 参照

3-3. 投与方法  
2-3. 参照

なお、8:25~11:15の間に経口投与した。

3-4. 投与量  
群構成を以下に示す。

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

\*括弧内は妊娠動物数

投与量設定根拠

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

しかし、この試験において、25 mg/kgの経口投与に

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

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

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

3-5. 動物の観察  
2-5. 参照

3-6. 剖検（最終投与日；妊娠13日）  
2-6. 参照

3-7. 帝王切開（最終投与日；妊娠13日）  
2-7. 参照

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

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

4-1. 母動物

(1) 母体試料の採取

妊娠1日に3時点、妊娠13日に7時点において母動物から採血した。

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

(2) 対象動物及び採血量

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

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

(3) 血液の処理

血液をポリプロピレン製容器に移して氷冷し、遠心

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

(注2)pH 1.5: くえん酸三ナトリウム二水和物 (CAS No. 6132-04-3、富士フィルム和光純薬株式会社、ロット番号 SKE6244) の1.47gを注射用水 (株式会社大塚製薬工場、ロット番号 1H99) 150 mLに溶解し、塩酸でpHを1.5に調整した後、注射用水を加えて200 mLとした。

#### (4) 血漿試料 (TK試料) の保存

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

#### 4-2. 子宮内容物試料の採取

##### (1) 卵黄囊膜

生存胚と卵黄囊膜を分離し、卵黄囊膜は可能な限り水分を除去した後、ストロングチューブ各1本に入れ重量を測定した。試料は送付まで-80°Cの冷凍庫 (許容値:-70°C以下、実測値は許容範囲内であった) で保存した。

##### (2) 胚

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

##### (3) 胎盤

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

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

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

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

#### 5-1. 母動物

##### (1) 母体試料の採取

4-1. と同様

##### (2) 対象動物及び採血量

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

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

##### (3) 血液の処理

4-1. と同様

##### (4) 血漿試料 (TK試料) の保存

4-1. と同様

#### 5-2. 子宮内容物試料の採取

##### (1) 卵黄囊膜

4-2. と同様

##### (2) 胚

4-2. と同様

##### (3) 胎盤

4-2. と同様

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

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

##### 6-1. 目的

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

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

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

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

##### 6-2. 投与期間および投与回数

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

この投与期間はサリドマイドによる催奇形作用への感受性が高い時期である。ウサギでは排卵が交尾後約11時間に起こることが報告されていることから、投与されたサリドマイドの物性による膈内環境の変化が、精子運動性等に直接影響することにより妊娠動物が減少する状況を避けるため、交尾当日 (妊娠0日) の膈内投与は実施しなかった。

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

##### 6-3. 投与方法

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

投与後は、カテーテル内を約4mLの水道水でフラッシングした。

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

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

#### 6-4. 投与量

群構成を下記に示す。

##### 先行実験

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

\*12例中1例は流産

##### 追加実験

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

#### 投与量設定根拠

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

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

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

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

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

投与容量は5 mL/kg とした。

#### 6-5. 動物の観察

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

体重は妊娠0、1、3、6、8、10、12、13、14、16、19、22、24、26及び28日の午前中（投与期間中は測定当日の投与前）に測定した。

#### 6-6. 剖検及び帝王切開

妊娠28日の午前中、全例をペントバルビタールナトリウム静脈内投与（1 mL/kg）による深麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させ、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。

#### 6-7. 帝王切開

剖検時に着床の有無により妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物は卵巣及び子宮を摘出し、卵巣については妊娠黄体数を数えた。子宮については子宮壁を切開し、生存胎児数、死亡胚・胎児数とその区分（着床痕、吸収胚、胎盤遺残、早期浸軟児、後期浸軟児、死亡胎児）を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

また、生存胎児は胎盤異常の有無を肉眼的に調べ、重量を個々に測定した。

肉眼的に着床が認められなかった対照群の1例の子宮は10%硫化アンモニウム溶液\*に浸漬し、着床部位の有無を観察した。この動物の子宮に着床部位は認められなかったため、不妊と判断し、全てのデータを評価から除外した。

\*10%硫化アンモニウム溶液

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

#### 6-8. 生存胎児の観察及び測定

##### (1) 外表、体重及び性別

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

##### (2) 内臓形態

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

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

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

##### (3) 骨格形態

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

#### 染色試薬

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

#### 7. 妊娠雌ウサギの経口投与による薬物動態の解析

（担当：山崎）

令和2年度に実施した雄性ウサギにサリドマイドを経口投与後の血漿中濃度時間推移の結果から、消化管、肝、全身循環および腎からなる生理学的薬物動態モデルの重要パラメータである吸収速度定数、分布容積および肝固有代謝消失速度定数をそれぞれ決定し、サリ

ドマイドの雄性ウサギ体内動態を再現する生理学的薬物動態モデルを構築している。

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

## 8. 統計解析

### 8-1. パラメーターの算出

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

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

着床前死亡率 (%) = [ (黄体数 - 着床数) / 黄体数 ] × 100

着床率 (%) = (着床数 / 黄体数) × 100

着床後死亡率 (%) = (死亡胚・胎児数 / 着床数) × 100

外表異常率 (%) = (外表異常を示す胎児数 / 観察胎児数) × 100

内臓異常率 (%) = (内臓異常を示す胎児数 / 観察胎児数) × 100

内臓変異率 (%) = (内臓変異を示す胎児数 / 観察胎児数) × 100

胎児の性比 (%) = (雄胎児数 / 全胎児数) × 100

外表異常を示す胎児を有した母動物の発現率 (%)

= (外表異常を示す胎児を有した母動物数 / 母動物数) × 100

内臓異常/変異を示す胎児を有した母動物の発現率 (%)

= (内臓異常/変異を示す胎児を有した母動物数 / 母動物数) × 100

### 8-2. 検定

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

1) 体重、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数、生存胎児体重、胎盤重量は、群ごとに平均値及び標準偏差を求めた。

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

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

及び0.01、両側)。

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

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果及び考察

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

【先行実験】および【追加実験】の群構成および使用動物を下記に示す。

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

\*括弧内は妊娠動物数

#### 1-1. 一般状態

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

#### 1-2. 体重

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

250 mg/kg 群の1例(動物番号 2103)で妊娠1日から妊娠13日の投与期間中の体重増加量が負の値を示した。この動物の体重推移をみると投与開始直後の妊娠1日~3日の減少が最も大きく、その後も妊娠6日~8日、妊娠10日~13日に断続的に低値がみられている。この体重増加が抑制された時期と一般状態観察において排糞量の低下が認められた時期が一致すること、母動物の血漿中濃度測定の結果、投与後7時間後剖検群の中では、この動物が妊娠1日及び妊娠13日のC<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。

#### 1-3. 剖検所見(妊娠13日)

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

#### 1-4. 帝王切開所見(表3、表4)

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

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

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

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

### 2-1. 母動物血漿中濃度（表5～10）

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

#### GD1

(mg/kg)	Thalidomide		5-OH 体		Total 5'-OH 体	
	C <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。

### 2-2. 胎盤、卵黄囊、胎児組織中濃度（表11～表13）

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

#### (1) 胎盤

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

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

#### (2) 卵黄囊膜

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

#### (3) 胎児

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

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

### 2-3. 小括

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

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

#### 母動物血漿中TKパラメータ（GD13, ng/mL）

投与経路	(mg/kg)	Thalidomide		5-OH		Total 5'-OH	
		C <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、経口投与に比較して膣からのサリドマイドの吸収が遅延することに由来すると考えられる。

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

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

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

3-1. 母動物

(1) 一般状態(表14)

死亡動物は認められなかった。

流産が妊娠23日に250 mg/kg の1例に観察された。

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

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

(2) 体重 (表15)

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

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

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

### (3) 剖検所見

対照群を含むいずれの投与群において、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官・組織に肉眼的な異常は観察されなかった。

#### 3-2. 帝王切開 (表16)

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

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

#### 3-3. 胎児観察

##### (1) 胚・胎児死亡 (表16、表17)

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

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

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

胎盤に形態異常はみられず、胎盤重量にも変化は認められなかった。

##### (2) 胎児外表観察 (表18)

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

25 mg/kg 群の1例にドーム型頭部が観察された。

12.5 mg/kg群に異常を呈した胎児は観察されなかった。

##### (3) 胎児内臓観察 (表19)

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

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

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

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

#### (4) 胎児骨格観察

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

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

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

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

#### 3-4. 小括

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

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

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

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

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

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

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

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

## 4. 妊娠雌ウサギの経口投与による薬物動態の解析

### 4-1. 結果

雄性ウサギ用に構築した生理学的薬物動態モデルを用い、妊娠ウサギへの経口投与試験の投与量である12.5、25および250 mg/kg 用量にてウサギに仮想経口投与したモデル出力結果値と、妊娠ウサギに同用量を経口投与した際の実測値を比較した。

その結果、12.5および25 mg/kg/日 群では投与1日（妊娠1日）と投与13日（妊娠13日）のウサギ血漿中サリドマイド、5-水酸化体サリドマイドおよび5'-水酸化体サリドマイド濃度の実測血中濃度（表5～表11）は仮想出力値とほぼ一致した（図1）。

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

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

#### 4-2. 小括

令和2年度に構築した、サリドマイドの雄性ウサギ体内動態を再現する生理学的薬物動態モデルを用いて、妊娠ウサギへの経口投与後の母動物血中実測値濃度とモデル出力値を比較した結果、両者はほぼ一致した。比較的低い投与量では、性差および投与量に関係なく、サリドマイドは生体内へ移行、代謝していることが示唆された。

#### D. 結論

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

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

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

#### E. 健康危険情報

総括研究報告書参照

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

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

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

#### 2. 学会発表

##### 国際学会

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

##### 国内学会

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

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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし