

Ⅱ.分担報告書－ 1

分担研究者 北嶋 聡
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

分担研究報告書

-ウサギを用いたサリドマイド催奇形性発現確認試験-

研究分担者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

研究協力者 高島 宏昌 (株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所)

研究要旨

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

分担研究として、令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚生労働科学特別研究事業)にて立案した雄性生殖を介した、即ち、種差及び薬物動態を加味し精液移行性に特化して評価する発生毒性試験計画(膈内投与試験)を実証するために、文献調査に基づき、ウサギに対するサリドマイドの催奇形性発現を確認した。得られた投与条件を基に、雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験を計画した(稟形分担報告書参照)。

A. 研究目的

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

分担研究として、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、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、雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与血漿及び精漿中薬物動態試験(単回あるいは反復投与TK試験)における投与量を設定することを目的とする。

B. 研究方法

令和元年度に実施した文献調査から、ウサギに対してサリドマイドは感受性を有することは確認でき、ウサギを用いた薬物動態情報も得ることができた。しかしながら、試験に使用したウサギの系統、薬剤の供給元、溶媒、投与量などは一致しておらず、催奇性生発現量における薬物動態を考察することは困難であった。そこで、令和元年度に実施した文献調査に基づき投与量を設定し、四肢発現臨界期である器官形成期にサリドマイドを連続経口投与し、母動物及び胎児への影響を確認した。

得られる結果は、引き続き実施する雄性ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与TK試験における投与量設定の資料となる。

なお、動物実験は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所に外部委託した。

1. 共通事項

1-1. 被験物質

製造元 : Carbosynth (CAB)

名称 : サリドマイド

CAS 番号 : 50-36-1

ロット番号 : FT156482001*

純度 : 99%以上 (HPLC) *

性状 : 色～オフホワイトの結晶性粉末*

保管方法 : 冷蔵(2~8℃)、遮光

* 2020年2月19日分析証明書から転記

1-2. 媒体

0.5 w/v% メチルセルロース (0.5%MC溶液)

名称 : メチルセルロース400 (化学用)

製造元 : 富士フィルム和光純薬株式会社

ロット番号 : CAM6671

媒体の調製:

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

媒体選択理由:

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

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

1-3. 被験物質の調製

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%wMCを加えて均一に懸濁させた。なお、用時調製とした。

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

1-5. 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。

1-6. 投与

投与容量は10 mL/kgとし、ウサギ用経口投与チューブ (ネラトシカテール、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シカテール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. 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

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日の午前に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

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、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 (外表異常を有する胎児を含む) 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) を摘出し、リン酸緩衝10%ホルマリン液で固定した後、脳はWilsonの粗大切片法、心臓は西村の顕微解剖法を参照して異常・変異の有無を検索した。

(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、アルシヤンブルー・アリザリンレッドS二重染色透明骨格標本を作製した。

染色試薬

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果及び考察

1. 母動物

5例中1例に着床痕がないことから不妊と判断し、評価対象から除外した。

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）。

2. 帝王切開（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。

3. 胎児観察

(1) 外表（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（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（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。

D. 結論

投与条件を検討した結果、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。

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

本課題に関連した論文はなし。

2. 学会発表

本課題に関連した発表はなし。

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

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