

II.分担報告書－ 2

分担研究者 栗形 麻樹子
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・第二室長

分担研究報告書

-ウサギを用いたサリドマイドの単回あるいは反復経口時の血漿及び精漿中薬物動態試験-
(腔内投与試験における用量設定試験)

研究分担者 栗形 麻樹子

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・室長

研究協力者 高島 宏昌 (株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所)

研究協力者 長谷川 拓郎 (株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所)

研究要旨

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

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（腔内投与試験）を実証するために、初年度は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確認した。

A. 研究目的

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

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

- (1) 雄ウサギを用いたサリドマイド単回経口投与後の血中濃度及び精液中への移行を確認する。
- (2) 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与による血中及び精液中への蓄積を確認する。
- (3) (1)～(2)の結果に基づき、器官形成期の雌に適切な濃度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する。

令和2年度は、(1)及び(2)を実施し、(3)の用量設定を行った。

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。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。なお、令和2年度は先行して検討を開始した5-水酸化体サリドマイドについてのみ報告する。

1. 共通事項

1-1. 被験物質

製造元 : Carbosynth (CAB)

名称 : サリドマイド

CAS 番号 : 50-36-1

ロット番号 : FT156482001

純度 : 99%以上*

性状 : 白色～オフホワイトの結晶性粉末*

保管方法 : 冷蔵 (2～8℃)、遮光

* 2020年2月19日分析証明書から転記

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

1-2. 媒体

0.5 w/v% メチルセルロース (0.5%MC)

名称：メチルセルロース400 (化学用)

製造元：富士フィルム和光純薬株式会社

ロット番号：CAM6671

媒体の調製：

必要量のメチルセルロース400を秤取し、攪拌しながら温めた適量の注射用水 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：9K87、9K94) を徐々に加えて分散させ、冷やして溶解させた後に注射用水を加えて0.5%溶液とした (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、単回投与TK試験、反復経口投与TK試験とも、投与液について各1回、各濃度の投与検体の含量および均一性・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

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5)。

投与開始日を投与1日 (Day1)とした。

(注5) 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。

1-7. 血漿中及び精液中のサリドマイド濃度測定

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

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

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

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。

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 (以下、単回投与TK試験、添付資料1)

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_{max}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 (mg/kg体重/day)	濃度 (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（表示単位：1 mL）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。

2-1. 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

2-2. 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。

2-3. 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。

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（以下、反復投与TK試験、添付資料2）

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、血漿中及び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、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。

群構成は下記に示す。

試験群	投与量 (mg/kg体重/day)	濃度 (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（表示単位：1 mL）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。

3-1. 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

3-2. 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日並びに剖検日に測定した。

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

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。

（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. 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。

1-1. 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表5、表6並びに図3、図4に、TKパラメータを表7、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表9及び表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_{max}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_{0-t}は投与量に比例して増加（132倍）したが、C_{max}は37倍にしか増加せず飽和を示し、T_{max}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_{max}は1.2倍、AUC_{0-t}は1.3倍に増加したのみであった。T_{max}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。

1-2. 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 (mg/kg 体重 /day)	精液量 (mg) 平均値 (最大値-最小値)	pH 中央値 (最大値-最小値)
2	589 (1028-241)	7.4 (8.2-7.0)
250	458 (915-120)	7.25 (7.8-6.8)
500	360 (944-108)	7.0 (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。

1-3. 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表11、表12、並びに図5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、図5に示した。

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。

2. 雄ウサギを用いた14日間反復経口投与血漿および精漿中薬物動態試験

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。

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表14及、15に、薬物動態パラメータを表16、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、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。

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

サリドマイドの投与により精液量に変化があったと考えられる例はみられなかった。

2-3. 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表18及び表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、1005	1002、1004、1006
血漿中濃度 (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、1003、1005	1002、1004、1006	1001、1003、1005	1002、1004、1006
血漿中濃度 (ng/mL)	18766	243	11.9	BLQ
最大値-最小値	19800-17600	304-200	16.9-8.01	BLQ-BLQ
精漿中濃度 (ng/g)	8813	171	10.5	BLQ
最大値-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

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、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_{max}は、単回投与時に比較して高値を示したが、AUC_{0-t}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。

D. 結論

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膈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、膈内投与試験を立案した（添付資料3）。

E. 健康危険情報

総括研究報告書参照

F. 研究発表

- 論文発表
なし
- 学会発表
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