

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

－妊娠ウサギを用いたサリドマイド臍内反復投与による胚・胎児発生への影響－

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。

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(臍内投与試験)を実証するために、昨年度(R2年度)に実施した雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与時のサリドマイドの血漿中及び精漿中への移行推移の結果から最大臍内移行量を算出し、臍内投与試験を実施した。分担研究として、臍内投与による胎児発生への影響、及び胎生末期胎児の形態異常の有無を確認し、母動物への影響および胎児形態への影響はないことを確認した。

A. 研究目的

本研究では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新規の発生毒性試験計画を実証することを目的とする。

令和2年度に実施した雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与時のサリドマイド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の結果から算出された最大臍内移行量から臍内投与試験を実施した。分担研究として、臍内投与による胎児発生への影響、及び胎児の形態異常の有無を確認した。

B. 研究方法

令和2年度に実施した雄ウサギを用いた単回あるいは反復経口投与試験結果から算出された最大臍内移行量(0.4 mg/kg)を妊娠ウサギの交配翌日から胎児の四肢形成期までの期間にあたる妊娠1日～妊娠13日に1日1回臍内投与し、妊娠動物及び胚・胎児の発生に及ぼす影響を調べた。

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. 被験物質の調製及び均一性・安定性分析

令和2年度に被験物の調製方法、調製頻度、安定性は確認している。

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

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

1-4. 使用動物(購入雌)

動物種 : ウサギ (SPF)
系統 : ニュージー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、20匹購入し、試験には16匹を配した。余剰動物は、動物管理部門へ移管した。

1-5. 使用動物(交配用所有雄)

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

供給源 : 北山ラベス株式会社
入手日 : 2020年3月27日(入荷時17週齢、24匹)
交配時の体重範囲 : 3.36~4.02 kg

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

1-6. 飼育環境

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

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

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

2. サリドマイドの膈内投与による胚・胎児発生への影響

2-1. 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。そのため、投与経路は膈内投与を選択した。

2-2. 投与期間および投与回数

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

ウサギでは排卵が交尾後約11時間に起こることが報告されていることから、投与されたthalidomideの物性による膈内環境の変化が、精子運動性等に直接影響することにより妊娠動物が減少する状況を避けるため、交尾当日(妊娠0日)の膈内投与は実施しなかった。

投与回数は1日1回(7日/週)とした。

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

2-3. 投与方法

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

投与の際にはネラトンカテーテル内を投与液で気泡が入らないよう満たし、投与すべき量の投与液をシリ

ンジ内に充填した状態で、ネラトンカテーテルの先端を膈内に挿入した。投与後は、フラッシングを実施せず、ネラトンカテーテル内の投与液は入れたまま抜去した。

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

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

2-4. 投与量

群構成を下記に示す。

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

*括弧内は妊娠動物数

投与量設定根拠

Thalidomideの雄ウサギを用いた14日間反復経口投与濃度測定試験(令和2年度実施)の結果、雄に250 mg/kgを14日間反復投与した場合の血中濃度は約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程度でプラトーに達し、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。

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

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

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。

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。

2-5. 動物の観察

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

体重は妊娠0、3、6、8、10、12、13、14、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。

2-6. 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、ウサギを用いた膈内投与時の胚・胎児への移行に関する検討にて解析した(分担報告書-2参照; 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。

2-7. 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。

2-8. 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。

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、ウサギを用いた膈内投与時の胚・胎児への移行に関する検討にて解析した(分担研究報告書-2参照; 栗形担当)。

(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¹⁾、心臓は西村の頭微解剖法²⁾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)

3. 統計解析

3-1. 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)並びに各骨化数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。

$$\begin{aligned} \text{着床前死亡率(\%)} &= [(\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数}] \times 100 \\ \text{着床率(\%)} &= (\text{着床数} / \text{黄体数}) \times 100 \\ \text{着床後死亡率(\%)} &= (\text{死亡胚} \cdot \text{胎児数} / \text{着床数}) \times 100 \\ \text{外表異常率(\%)} &= (\text{外表異常を示す胎児数} / \text{観察胎児数}) \times 100 \\ \text{内臓異常率(\%)} &= (\text{内臓異常を示す胎児数} / \text{観察胎児数}) \times 100 \\ \text{内臓変異率(\%)} &= (\text{内臓変異を示す胎児数} / \text{観察胎児数}) \times 100 \\ \text{骨格異常率(\%)} &= (\text{骨格異常を示す胎児数} / \text{観察胎児数}) \times 100 \\ \text{骨格変異率(\%)} &= (\text{骨格変異を示す胎児数} / \text{観察胎児数}) \times 100 \\ \text{胎児の性比(\%)} &= (\text{雄胎児数} / \text{全胎児数}) \times 100 \\ \text{外表異常を示す胎児を有した母動物の発現率(\%)} &= (\text{外表異常を示す胎児を有した母動物数} / \text{母動物数}) \times 100 \\ \text{内臓異常/変異を示す胎児を有した母動物の発現率(\%)} &= (\text{内臓異常/変異を示す胎児を有した母動物数} / \text{母動物数}) \times 100 \\ \text{骨格異常/変異を示す胎児を有した母動物の発現率(\%)} &= (\text{骨格異常/変異を示す胎児を有した母動物数} / \text{母動物数}) \times 100 \end{aligned}$$

3-2. 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、死亡胎・胎児数、生存胎児体重、胎盤重量、骨化数（胸骨分節、中手骨、中足骨、指端骨（基節骨、中節骨及び末節骨）、仙尾椎骨）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、内臓変異率、骨格異常率及び骨格変異率については、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、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あるいは異常胎盤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

1-1. 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。

1-2. 体重

体重値を表1に、増加量を表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。

1-3. 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。

2. 帝王切開（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。

3. 胎児観察

3-1. 胎・胎児死亡および外表（表4、表5）

0.4 mg/kg群において、着床後死亡率、胎・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見られなかった。

3-2. 内臓（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。

3-3. 骨格（表7、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。

D. 結論

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を投与する本試験を実施した。

その結果、母動物に対する毒性学的変化は検出されず、胎児の生存性、成長に関する指標にも被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。

また、外表、内臓及び骨格検査を実施した結果、この投与量における催奇形性は認められなかった。

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。

E. 健康危険情報

総括研究報告書参照

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

2) 高島宏昌、羽田亮、田中加奈子、関美沙、長谷川拓郎、山崎浩史、北嶋聡、栞形麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形性作用確認、第61回日本先天異常学会学術集会（2021.8.7）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし