ジムソ膀胱内注入液 50%

(ジメチルスルホキシド)

第 2 部　CTD の概要(サマリー)

2.4　非臨床試験の概括評価

杏林製薬株式会社

目次

略語及び専門用語一覧表 3
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験(*in vitro*) 5
2.4.2.2 効力を裏付ける試験(*in vivo*) 5
2.4.2.3 作用機序 6
2.4.2.4 副次的薬理試験 6
2.4.2.5 安全性薬理試験 6
2.4.3 薬物動態試験 7
2.4.3.1 分析法 7
2.4.3.2 吸収 7
2.4.3.3 分布 7
2.4.3.4 代謝 8
2.4.3.5 排泄 8
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 8
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 8
2.4.4 毒性試験 9
2.4.4.1 単回投与毒性試験 9
2.4.4.2 反復投与毒性試験 9
2.4.4.3 遺伝毒性試験 10
2.4.4.4 がん原性試験 10
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 10
2.4.4.6 局所刺激性試験 11
2.4.4.7 その他の毒性試験 11
2.4.5 総括及び結論 11
2.4.5.1 薬理試験 11
2.4.5.1.1 効力を裏付ける試験 11
2.4.5.1.2 副次的薬理試験 11
2.4.5.1.3 安全性薬理試験 12
2.4.5.2 薬物動態試験 12
2.4.5.3 毒性試験 13
2.4.6 参考文献 14

略語及び専門用語一覧表

略語及び専門用語	用語の説明
ATP	Adenosine 5'-triphosphate：アデノシン 5'-三リン酸
ACh	Acetylcholine：アセチルコリン
BCRP	Breast cancer resistance protein：乳癌耐性タンパク
Ca^{2+}	Calcium ion：カルシウムイオン
CCh	Carbachol：カルバコール
$CD8^+$ T 細胞	Cluster of differentiation 8 positive T cell：CD8 陽性 T 細胞
Cl^-	Chloride ion：クロライドイオン
C_{max}	Maximum observed plasma (serum) concentration：最高血漿(血清)中濃度
CYP	Cytochrome P450：チトクロム P450
DMS	Dimethyl sulfide：ジメチルスルフィド
DMSO	Dimethyl sulfoxide：ジメチルスルホキシド
$DMSO_2$	Dimethyl sulfone：ジメチルスルホン 又は Methylsulfonylmethane：メチルスルホニルメタン
ECG	Electrocardiogram：心電図
FAERS	FDA adverse event reporting system：米国 FDA の有害事象自発報告システム
FDA	U.S. food and drug administration：米国食品医薬品局
fMLP	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine：ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293：ヒト胎児腎細胞 293
hERG	Human ether-a-go-go-related gene：ヒト急速活性型遅延整流性カリウムチャネル遺伝子
IC_{50}	Half maximal (50%) inhibitory concentration：50%抑制濃度
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1：細胞接着分子 1
IFN-γ	Interferon-gamma：インターフェロン γ
IL-1β	Interleukin-1beta：インターロイキン 1β
IL-2	Interleukin-2：インターロイキン 2
IL-6	Interleukin-6：インターロイキン 6
IL-8	Interleukin-8：インターロイキン 8
K^+	Potassium ion：カリウムイオン
KRP-116D	申請薬剤の開発コード、50% DMSO 膀胱内注入液
LDH	lactate dehydrogenase：乳酸脱水素酵素
LLC-PK1	Porcine kidney cell：ブタ腎臓近位尿細管由来細胞株
LTB_4	Leukotriene B4：ロイコトリエン B4
MATE	Multidrug and toxin extrusion protein：多剤・毒性化合物排出タンパク
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1：単球走化性タンパク質-1
MDR	Multiple drug resistance：多剤耐性タンパク
MLC	Myosin light chain：ミオシン軽鎖

略語及び専門用語	用語の説明
MLCK	Myosin light chain kinase：ミオシン軽鎖キナーゼ
mRNA	Messenger ribonucleic acid：メッセンジャーRNA
Na^+	Sodium ion：ナトリウムイオン
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸の還元型
NF-κB	Nuclear factor-kappa B：核内因子 κB
NGF	Nerve growth factor：神経成長因子
OAT	Organic anion transporter：有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide：有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter：有機カチオントランスポーター
OT-I	OVA 特異的 T 細胞受容体
OVA	Ovalbumin：卵白アルブミン
PTZ	Pentylenetetrazol：ペンチレンテトラゾール
RIMSO-50	50%DMSO を含む間質性膀胱炎治療薬(米国及び加国で承認済み)
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha：腫瘍壊死因子 α
URO-OVA	OVA 抗原発現膀胱上皮
V_{max}	Maximum rate of rise：活動電位最大立ち上がり速度

単位換算：DMSO の比重を 1.1 として算出、例) mL/kg × 1.1→ g/kg

2.4.1 非臨床試験計画概略

本申請にあたって、非臨床試験は一部試験(吸収に関する薬物動態試験、薬物動態学的薬物相互作用試験：CYP 誘導試験及びトランスポーター阻害試験)を除き、公表論文及び OECD SIDS (Screening Information Data Set)などを用いて評価・検討を行った。

薬理試験に関しては、DMSO の効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験について、公表論文などを用いて評価した。効力を裏付ける試験として、DMSO の膀胱処置又は臨床投与経路である膀胱内投与で得られた作用及び間質性膀胱炎モデル動物に対する作用について評価した。また、作用機序として抗炎症作用、鎮痛作用、筋弛緩作用及びコラーゲン分解作用について評価した。副次的薬理試験として、肥満細胞の脱顆粒作用及び膜透過性亢進作用について評価し、それらの作用が及ぼす影響を考察した。安全性薬理試験として、中枢神経、心血管及び呼吸系について評価した。

薬物動態に関しては、ラットに DMSO を膀胱内投与したときの薬物動態試験の結果及び公表論文の結果から薬物動態的特徴を評価した。経口、腹腔内及び経皮投与したときの DMSO は、膀胱内投与したときの血中動態と同様な挙動を示したことから、膀胱内投与後に全身循環血に到達した DMSO は他の投与経路と同様の血中動態を示すと考えられた。よって、分布、代謝及び排泄に関しては、他の投与経路で得られた検討結果より膀胱内投与時の DMSO の薬物動態的特徴が評価可能と考えた。また、併用薬剤の薬物動態に影響を与える可能性のある薬物相互作用については *in vitro* 試験の結果及び公表論文を用いて評価した。

毒性試験に関しては、DMSO の単回投与毒性、反復投与毒性、遺伝毒性、がん原性、生殖発生毒性及びその他の毒性について、公表論文及びガイドライン等をもとに評価・検討を行った。本剤の臨床投与経路は膀胱内投与であるが、膀胱内投与以外の投与経路についても、投与による影響が見られていること及び薬物動態学的に全身曝露されていることから毒性評価の対象とした。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験(*in vitro*)

ラット摘出膀胱標本に DMSO を 7 分間処置し洗浄後の電気刺激による収縮において、30%及び 35% DMSO は可逆的な収縮抑制作用を示したが、40%及び 50% DMSO では収縮を完全に抑制し、回復しなかった(2.6.2.2.1.1)。

ブタの摘出膀胱標本の管腔表面に 50% DMSO を 15 分間処置したところ、処置中の溶液に ATP 及び ACh の強い遊離が観察されたが、洗浄後の溶液には観察されなかった。また、DMSO 処置中の溶液には LDH の遊離も観察された。15 分間 50% DMSO で事前処置した排尿筋、尿路上皮/粘膜固有層及びこれらを分割していない膀胱(intact)標本では KCl 及び ATP の収縮反応に、また、排尿筋標本では CCh 収縮反応にも影響しなかったが、尿路上皮/粘膜固有層及び intact 標本における CCh 収縮は最大収縮を増強させ、排尿筋標本では DMSO 処置後の電気刺激による収縮を頻度依存的かつ有意に増強した(2.6.2.2.1.2)。

2.4.2.2 効力を裏付ける試験(*in vivo*)

ラット硫酸プロタミン誘発間質性膀胱炎モデルにおいて、膀胱内に投与した 50% DMSO (200 µL、30 分間保持)は膀胱組織の浮腫及び血管充血スコアの増加を抑制し、多形核白血球数及びリンパ単核球数を有意に減少させ、好中球数を減少させた(2.6.2.2.2.1.1)。

OT-I トランスジェニックマウスの脾臓細胞に *in vitro* で OVA 刺激を加えて活性化させた T 細胞を自己免疫性膀胱炎症 URO-OVA トランスジェニックマウスに移入して作製した急性膀胱炎症モデルにおいて、50% DMSO の膀胱内投与(50 µL、1 時間保持、膀胱内投与は細胞移入 1 日後、4

日後及び 7 日後に実施)は膀胱組織への $CD8^+$T 細胞浸潤、浮腫及び充血などの炎症を抑制し、膀胱組織の IFN-γ、MCP-1、NGF、TNF-α 及び IL-6 の mRNA 増加を抑制した(2.6.2.2.2.1.2.1)。10 週齢以上で膀胱炎症が自然発症する自己免疫性膀胱炎症 URO-OVA/OT-I トランスジェニックマウスを用いた慢性膀胱炎症モデルにおいて、50% DMSO の膀胱内投与(50 μL、1 時間保持、1 回/週、3 週間)は膀胱組織の炎症スコアの増加を抑制した。慢性膀胱炎症マウスにナイーブ T 細胞を移入して生じることが知られている重篤な急性膀胱炎症は DMSO の最終処置 7 日後に移入しても観察されなかった。また、*in vitro* で DMSO はエフェクターT 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを増加させた(2.6.2.2.2.1.2.2)。

除脳したラットにおいて、膀胱内投与した 50% DMSO (0.5 mL、30 分間保持)は膀胱拡張により得られた脊髄後角ニューロンの活動増大を抑制した(2.6.2.2.2.2)。

2.4.2.3　作用機序

0.5%及び 1% DMSO はヒト軟骨細胞株で IL-6 及び IL-8 産生を抑制した。ヒト末梢血単核球で 1%及び 2% DMSO はリンパ球の増殖を抑制し、5%及び 10% DMSO は総リンパ球、$CD4^+$及び $CD8^+$ リンパ球による IL-2、IFN-γ 及び TNF-α の産生を抑制した。140 mmol/L DMSO は化学誘引物質(fMLP 及び LTB_4)刺激によるラット白血球接着を抑制し、ザイモサン活性化血清刺激によるヒト白血球の遊走を抑制した。また、ラット敗血症モデルで腹腔内投与した 6.6 g/kg DMSO は血清中 TNF-α 量、肝臓中 ICAM-1 mRNA の発現及び NF-κB 結合活性を抑制した(2.6.2.2.3.1)。

ラットを用いたホットプレート法及びテールフリック法における侵害刺激に対し、DMSO は侵漬投与、5.5 g/kg 腹腔内及び静脈内投与において鎮痛作用を示した。麻酔ネコの腓腹神経を用いた C 線維の神経活動に対する検討で、9%～50% DMSO は活動電位の振幅を、5%～10% DMSO は神経伝導速度を減少させた。ネコの橈骨神経を用いた C 線維及び Aδ 線維への検討で、75% DMSO は C 線維及び Aδ 線維の神経伝導を完全に抑制した(2.6.2.2.3.2)。

ウサギ摘出排尿筋標本を用いたメカニズムの検討で、DMSO は細胞内 Ca^{2+}濃度に影響することなく高 K^+及び CCh による排尿筋の収縮を抑制した。また、DMSO は無細胞評価系において、Ca^{2+}及びカルモジュリン存在下の MLC リン酸化反応を有意に抑制した(2.6.2.2.3.3)。

2.4.2.4　副次的薬理試験

肥満細胞の脱顆粒促進作用の検討において、モルモットの耳介に皮内投与した 100% DMSO は、耳介の有意な肥厚及び重量増加を示した(2.6.2.3.1)。

膜透過性亢進の検討において、DMSO は膜を薄くし疎水性中心の流動性を増加させ、脂質二重膜の端で親水性頭部が疎水性尾部を保護し、一過性に水分子の導管を作製して水分子の膜内への透過性を亢進させた(2.6.2.3.2)。

2.4.2.5　安全性薬理試験

中枢神経系作用に関して、マウスでは 2.5 g/kg 以上の DMSO の単回腹腔内投与又は 11.0 g/kg の単回経口投与により自発運動の減少が、1.25 g/kg 以上の単回腹腔内投与によりヘキソバルビタール誘発睡眠時間の延長が観察され、さらに 1.25 g/kg 以上の単回経口投与により PTZ 誘発強直性痙攣閾値低下・死亡までの時間短縮が観察された(2.6.2.4.1.1)。ラットでは 0.4 g/kg/日以上の DMSO の 10 日間反復腹腔内投与で一般行動及び握力に影響しなかったが、アロデニアが観察された。また、6 g/kg の単回腹腔内投与で体温低下が、0.8 g/kg 以上の単回腹腔内投与で睡眠に対して浅い眠りの延長及び深い眠りの短縮が観察された(2.6.2.4.1.2)。

2% DMSO は hERG 電流に対するテルフェナジン及び E-4031 の電流抑制作用を増強しなかった

(2.6.2.4.2.1.1)。モルモット乳頭筋の活動電位及び単一心室筋細胞のイオン電流に対しそれぞれDMSOの1%～10%及び0.1%～10%濃度で影響が観察され、10% DMSOでは活動電位の持続時間を延長し、V_{max}を減少させ、振幅を増大させ、緩徐活性型遅延整流性 K^+電流を顕著に抑制し、Na^+ポンプ電流、Na^+電流及びCl^-電流を中程度抑制した(2.6.2.4.2.1.2)。

心血管及び呼吸系作用に関して、マウスに2.5 g/kg/日のDMSOを反復腹腔内投与(5日/週、3週間)、アカゲザルに8.9 g/kg/日を反復経口又は皮膚に反復経皮投与(朝夕2回に分けて7日/週、18箇月)しても、血圧、心拍数、呼吸数及びECGパラメータに影響しなかったが(2.6.6.3.4)、マウスに5 g/kg/日を反復腹腔内投与(5日/週、3週間)した場合は、徐脈及び不整脈が観察された(2.6.2.4.2.2.1)。

アカゲザルに2 g/kgのDMSOを単回静脈内投与した場合、呼吸数は増加したが、毎分換気量は投与1分後に一過性に減少し、投与3分後には増加が観察された(2.6.2.4.3.2)。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

自社で実施したラットの薬物動態試験では、ラット血漿中DMSO濃度は液体クロマトグラフィー-紫外検出法を用いて測定した。

公表論文において実施された薬物動態試験では、試料中の薬物濃度はガスクロマトグラフィー及び薄層クロマトグラフィーで測定された。放射性標識体を用いた試験では液体シンチレーションカウンター及びオートラジオグラフィーにより放射活性が検出された。

2.4.3.2 吸収

ラットにDMSO又は放射性標識されたDMSOを膀胱内、経口、腹腔内及び経皮投与したとき、投与後10分～2時間でC_{max}に達した(2.6.4.3.1)。

ウサギに放射性標識されたDMSOを経皮投与したとき、投与後4時間でC_{max}に達した(2.6.4.3.2)。イヌに放射性標識されたDMSOを経皮投与したとき、投与後4及び24時間には投与量の約80%及び90%以上が皮膚から吸収された(2.6.4.3.3)。また、サルにDMSOを経口投与後、4時間でC_{max}に達した(2.6.4.3.4)。

2.4.3.3 分布

マウス、ラット、モルモット、ウサギ及びイヌにDMSO又は放射性標識されたDMSOを経口、静脈内、腹腔内及び経皮投与したとき、いずれの投与方法においても全身に広く分布した(2.6.4.4.1)。血漿より高濃度に分布する組織が認められたが、血漿中濃度の減少とともにいずれの組織中濃度も投与後24時間までに減少した。ラットに腹腔内及び経皮投与した試験では、硬組織に比較し、軟組織の放射活性が高かった。

ラットに放射性標識されたDMSOを経皮投与したときの眼内動態は、角膜の放射活性が最も高く、投与後4時間に放射活性が最大に達した(2.6.4.4.1.2)。いずれの眼組織においても投与後72時間までに各眼組織の最大放射活性の半分以下に減少し、8日後には検出されなかった。同様にウサギに放射性標識されたDMSOを経皮投与したときの眼内動態はラットにおける挙動と類似しており、いずれの眼組織においても投与後24時間までに各眼組織の放射活性は減少した(2.6.4.4.1.4)。

ヒト血漿を用いて*in vitro*タンパク結合を検討した結果、DMSOのヒト血漿でのタンパク結合率は30%であった。ヒト血液に添加した場合、25%のDMSOが沈渣に存在した(2.6.4.4.2)。

ラット及びウサギの組織分布試験の結果より、ヘマトクリット値を0.4と仮定して算出した血

球移行率はいずれも約 25%であった(2.6.4.4.3)。

2.4.3.4 代謝

ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験では、DMSO は酸化的代謝を受けジメチルスルホン($DMSO_2$)に代謝されることが示された(2.6.4.5.1)。また、ラット及びウサギに腹腔内、皮下及び経皮投与したときの尿又は呼気中には DMSO、$DMSO_2$ 及び還元的代謝物であるジメチルスルフィド(DMS)が認められた(2.6.4.5.2)。

2.4.3.5 排泄

ラット、モルモット、ウサギ、イヌ及びサルに DMSO 又は放射性標識された DMSO を経口、静脈内、腹腔内、皮下及び経皮投与したとき、いずれの投与経路においても、投与後 24 時間までに主に DMSO として尿中に排泄されることが示され、尿及び糞中に 30%以上の放射活性が検出された(2.6.4.6)。尿中には DMSO 以外に $DMSO_2$ が認められた。また、ラットに放射性標識された DMSO を静脈内及び経皮投与したときの呼気中には、投与量に対して 3.5～6%の放射活性が認められた。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

DMSO はヒト CYP 発現系ミクロソーム又はヒト肝ミクロソームにおいて CYP2C8/2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 に対して阻害作用を示した(2.6.4.7.1)。CYP1A2 及び CYP2B6 に対しては阻害作用を示さなかった。阻害が認められた CYP 分子種の IC_{50} 値は CYP2C8/2C9：11 mg/mL 以上、CYP2C19：3.3 mg/mL 以上、CYP2D6：3.3 mg/mL 以上及び CYP3A4：5.5 mg/mL 以上であり、KRP-116D の臨床推奨用量における非結合型 C_{max}(2.7.2.2.2.1)の 65.3 倍以上であった。

初代培養ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 試験(DMSO 濃度 1.1～27.5 mg/mL、添加濃度として 0.1%～2.5%)において、CYP1A2 の誘導作用は認められなかった。DMSO 濃度 27.5 mg/mL(添加濃度 2.5%)では CYP3A4 の誘導作用を示したが、濃度 5.5 mg/mL(添加濃度 0.5%)では誘導作用が認められなかった(2.6.4.7.2)。CYP3A4 の誘導が認められなかった添加濃度は KRP-116D の臨床推奨用量における非結合型 C_{max} (2.7.2.2.2.1)の 100 倍以上であった。

初代培養ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 試験において DMSO 濃度 5.5 mg/mL(添加濃度 0.5%)では CYP2B6 の誘導作用を示したが、DMSO 濃度 2.75 mg/mL(添加濃度 0.25%)では誘導作用が認められなかった(2.6.4.7.2)。CYP2B6 の誘導が認められなかった DMSO 濃度は KRP-116D の臨床推奨用量における非結合型 C_{max}(2.7.2.2.2.1)の 50 倍以上であった。

各種トランスポーター発現細胞を用いた *in vitro* 試験において、DMSO はヒト BCRP、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K を阻害しなかった(2.6.4.7.3)。一方、DMSO はヒト MDR1、OATP1B1、OATP1B3 及び OAT1 の弱い阻害剤であることが示されたが、その IC_{50} 値は DMSO 濃度 13.8 mg/mL(添加濃度 1.25%)以上であると推定され、KRP-116D の臨床推奨用量における非結合型 C_{max}(2.7.2.2.2.1)の 200 倍以上であった。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験

ラット過酸化水素誘発間質性膀胱炎モデルを作製し、DMSO を膀胱内投与したときの血漿中薬物動態について正常ラットと比較した。膀胱内投与された DMSO は速やかに吸収され、ラット過酸化水素誘発間質性膀胱炎モデル及び正常ラットの平均血漿中濃度推移及び薬物動態パラメータは概ね一致していた。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

マウス及びラットの経口投与では、大量投与により急性毒性の症状を呈し、死亡が認められた。イヌの経口投与及び臨床投与経路である膀胱内投与での死亡は認められなかった(2.6.6.2)。なお、イヌの膀胱内投与では、臨床では使用されることのない濃度(100%)及び保持時間(3 時間)により、浮腫及び炎症性細胞反応が認められた。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラット(経口投与) (2.6.6.3.1)、イヌ(膀胱内及び経口投与) (2.6.6.3.2 及び 2.6.6.3.3)及びサル(経口及び経皮投与) (2.6.6.3.4)の反復投与毒性試験について評価した。その結果、一般状態、体重及び摂餌量に変化が認められたが、血液学的及び血液化学的検査の著明な変化並びに病理検査における変化は見られず、生活及び生命に重篤な影響を及ぼす変化は認められなかった。

反復投与毒性試験における血中濃度については、公表論文で確認できなかった。そのため、第 I 相臨床薬理試験(L101 試験(2.7.2.2.2.1))の実投与量と各動物種の無毒性量の投与量を比較した。実投与量は、本剤 50 mL(DMSO として 27 g 含有)を膀胱内投与後の DMSO の回収率から体内残存量を算出し、更に各症例の体重当たりの値に換算し、0.073 g/kg とした。各動物種の無毒性量は、ラット経口投与で 1.1 g/kg/日、イヌ膀胱内投与で 0.5 g/kg、サル経口及び経皮投与で 3.0 g/kg/日及び 8.9 g/kg/日であった。また、イヌ経口投与での最小毒性量は 1.1 g/kg/日であった。体表面積換算 [1]を行い実投与量と各動物種の無毒性量又は最小毒性量との比(以下、実投与量比)を算出すると、ラットの経口投与では 2.4 倍、イヌの膀胱内及び経口投与では 3.7 倍及び 8.1 倍、サルの経口投与及び経皮投与では 13 倍及び 40 倍であった。なお、臨床使用時の投与頻度は 2 週間に 1 回であるが、非臨床毒性試験では毎日(経口及び経皮)又は週 2 回(膀胱内)で、臨床使用時と比べて頻繁に投与しており、臨床の投与頻度と比較すると 14 倍(経口及び経皮)又は 4 倍(膀胱内)であった。また、臨床では膀胱内に保持する時間が 15 分であり DMSO の曝露量は十分に小さいことから、実際の実投与量比は示した数値以上になると考えられた。

第 III 相検証的試験(L301 試験(2.7.4.2))では、DMSO 投与による因果関係が否定できない重篤な有害事象及び重要な有害事象並びに副作用は認められていない。FAERS[2]では、調査対象とした約16年間*の報告で重篤な副作用は 1 例のみであった(2.7.4.6.2)。また、臨床使用時よりも投与頻度が高い反復投与毒性試験で明らかな毒性が認められていないことからも、臨床における 2 週間に 1 回のDMSO 投与では、重篤な有害事象が発現する可能性は低いと考えられた。

眼への影響について、イヌの反復経口投与毒性試験では眼(水晶体)に明らかな変化が見られたが、反復膀胱内投与毒性試験では認められなかった。ラットの反復経口投与毒性試験では高用量の少数例に軽度の屈折率の変化が認められた。一方、サルでは影響が認められなかったことから、水晶体への影響には種差があり、投与経路も関連すると考えられた。イヌでは、屈折率の変化が最初に見られ、その後に水晶体の変化が認められた。この変化は毎日投与して 10 週目から認められたが、臨床使用時(2 週間に 1 回の投与)よりも高頻度の曝露(1 日 1 回の投与)で発現し、休薬によって回復傾向を示した。なお、水晶体に対する有害事象は臨床試験(2.7.4.2.1.5.1.3)では認められず、FAERS[2]でも水晶体に対する明らかな副作用の報告はなかった。

以上から、米国の添付文書では水晶体への影響について注意喚起がなされているものの [3]、主にイヌの経口投与で認められた水晶体の変化は、種差、臨床で使用される投与量、投与経路及び症例報告を考慮すると臨床使用で発現する可能性は低く、水晶体への影響に関する懸念は小さいと考えられた。

*新薬承認情報提供時に置き換えた。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験(2.6.6.4.1.1)、哺乳類培養細胞を用いる小核試験(2.6.6.4.1.4)及びマウスリンフォーマ試験(2.6.6.4.1.2)、並びにラットを用いる骨髄小核試験(2.6.6.4.2.1)において全て陰性を示した。なお、*in vitro* の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(2.6.6.4.1.3)で染色体構造異常出現率に軽度の増加傾向が見られたが、ラットを用いる骨髄小核試験では陰性を示していることから、DMSO が染色体異常誘発作用を示す可能性は低いと考えられた。

以上から、DMSO が遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた。

2.4.4.4 がん原性試験

マウス、ラット、イヌ及びサルにおいて、DMSO の長期反復投与に関連した腫瘍性変化の発現は認められなかった(2.6.6.5)。

DMSO の発がん性との関連性については、古くから研究されている。DMSO については、発がん抑制因子の活性化、アポトーシスの誘導及び多種のがん細胞増殖抑制作用が報告されている [4),5),6)]。また、DMSO では、ヒドロキシラジカル消去作用によるプロモーション作用の抑制も報告されている [7)]。プロモーション作用に関しては、マウスの経皮若しくはラットの経口投与による二段階発がん試験において腫瘍発生の増加は認められておらず、DMSO はプロモーターではないと報告されている(2.6.6.5.2)。その一方、膀胱内投与で DMSO がプロモーション作用を有するとの報告もある(2.6.6.5.2)。DMSO の膀胱内投与は投与液量、濃度及び膀胱内曝露時間に依存して浮腫及び炎症性細胞反応を引き起こすことが示されていることから、当該報告でも、細胞障害性による代償性の細胞増殖が生じ、二次的に発がん性を高めた可能性もあると考えられた。

イニシエーション作用については、マウスの皮膚二段階発がん性試験で腫瘍の増加は認められなかった(2.6.6.5.1)。

また臨床では、1978 年の米国の製造販売承認以降、治療目的のため多くの患者に RIMSO-50 を含む 50% DMSO 製剤が膀胱内投与されているが、FAERS では、腫瘍形成を含め、がん発生に関連した副作用の報告は認められていない [2)]。

以上から、DMSO ががん原性を有する可能性は低いと考えられた。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

OECD ガイドラインに従った方法で実施された試験として、ラットにおける一世代試験(受(授)胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験) (2.6.6.6.1)、並びにラット及びウサギにおける胚・胎児発生に関する試験(2.6.6.6.2)について評価した。受(授)胎能及び着床までの初期胚発生、出生前及び出生後の発生並びに母体機能に対して、DMSO による影響は認められなかった。胚・胎児発生に関する試験では、母動物の体重及び摂餌量の低値に関連した胚・胎児への二次的な影響が見られたが、生存胎児に催奇形性等の重篤な影響は認められなかった。また、DMSO の主要代謝物の胚・胎児発生に関する試験でも母動物及び胚･胎児の明らかな毒性並びに催奇形性は認められなかった(2.6.6.8.3.1.3 及び 2.6.6.8.3.2.3)。

体表面積換算 [1)]をもとに実投与量と無毒性量との比(以下、安全域)を算出すると、受(授)胎能及び着床までの初期胚発生、並びに出生前及び出生後の発生並びに母体機能(全ての無毒性量：1 g/kg/日)では 2.2 倍であった。胚・胎児発生(ラット無毒性量：1 g/kg/日、ウサギ無毒性量：1 g/kg/日)に対しては、ラットで 2.2 倍、ウサギで 4.4 倍であった。催奇形性については(催奇形性の無毒性量：ラットは 5 g/kg/日、ウサギは 1 g/kg/日)、実投与量と比較し 11 倍及び 4.4 倍であった。ただし、生殖発生毒性試験でも反復投与毒性試験と同様に、臨床使用時よりも頻回に投与していたため(臨床の投与頻度と比較すると 14 倍)、また臨床では膀胱内に保持する時間が 15 分であり

DMSO の曝露量は十分に小さいことから、実際の安全域は示した数値以上になると考えられた。

米国の添付文書では非臨床試験で催奇形性を示したとの記載[3)]があるが、これは腹腔内投与により高濃度及び高用量の DMSO が子宮に直接曝露された結果の発現であると考えられた。本剤の臨床投与経路は膀胱内投与であるため、子宮に高用量の DMSO が直接曝露されることはない。また、経口投与による生殖発生毒性試験で催奇形性は認められていない。妊婦の使用に関しては、米国の添付文書で「潜在的な利益が胎児への潜在的危険性よりも大きい場合にのみ使用すること」との記載であり、TGA (オーストラリア医療製品規制庁)では、DMSO はカテゴリーC (薬理効果による有害作用を引き起こす可能性はあるが、催奇形性はない)[8)]に分類されている。更に、妊婦の間質性膀胱炎治療のために DMSO が使用された報告があり、妊娠、分娩、哺育、産褥及び出生児に影響がなかったことが確認されている[9)]。

以上から、DMSO が催奇形性を含む重篤な生殖発生毒性を発現する可能性は低く、妊婦及び授乳婦の臨床使用上における懸念は小さいと考えられた。

2.4.4.6 局所刺激性試験

ウサギを使用した刺激性試験では、皮膚で軽微な刺激性、眼では軽度の可逆的な刺激性を有すると考えられた(2.6.6.7)。

2.4.4.7 その他の毒性試験

DMSO は太陽光の波長内に光毒性を誘起する光の吸収を認めなかったため、光毒性試験は実施しなかった(2.6.6.8.1)。

モルモットを使用した試験の結果、DMSO は皮膚感作性を示さないと考えられた(2.6.6.8.2)。

DMSO の主要代謝物である $DMSO_2$ 及び DMS では、反復投与毒性試験、*in vivo* 小核試験及び胚・胎児発生に関する試験において、明らかな影響は認められなかった(2.6.6.8.3)。

2.4.5 総括及び結論

DMSO の非臨床評価により、明らかとなった特徴を以下に示す。

2.4.5.1 薬理試験

2.4.5.1.1 効力を裏付ける試験

DMSO は膀胱上皮の機能不全を主体にした硫酸プロタミン誘発モデルで膀胱内投与により有効性を示した(2.6.2.2.2.1.1)。また、自己免疫、肥満細胞の活性化及び神経炎症・神経活性化が関与した自己免疫性膀胱炎症トランスジェニックマウスを用いた急性膀胱炎症マウスにおいて、DMSO は膀胱内投与により有効性を示し、膀胱炎組織の IFN-γ、MCP-1、NGF、TNF-α 及び IL-6 の mRNA 増加を抑制した(2.6.2.2.2.1.2.1)。慢性膀胱炎症マウスにおいても膀胱内投与により有効性を示し、また、ナイーブ T 細胞を移入して生じる重篤な急性膀胱炎症は、事前に DMSO 処置したマウスでは観察されなかった(2.6.2.2.2.1.2.2)。

DMSO の間質性膀胱炎に対する作用機序は主に、抗炎症作用、鎮痛作用及び筋弛緩作用の関与が示されており、これらが総合的に作用することによって DMSO の間質性膀胱炎に対する効果が発揮されると考えられた。また、50% DMSO は 1978 年に間質性膀胱炎の治療薬として FDA に承認されて以来、米国で長期間臨床使用されており、臨床公表論文[10),11)]も多数報告されている。

2.4.5.1.2 副次的薬理試験

DMSO により肥満細胞から遊離したヒスタミンや他の血管拡張物質が、一部の患者で報告され

ている投与初期の膀胱及び排泄時の尿道の強い痛み[10]に関与している可能性が考えられた。しかし、DMSO を間質性膀胱炎患者に膀胱内投与しても尿中ヒスタミン量には影響せず、肥満細胞の脱顆粒を示さないとも報告されており[12]、間質性膀胱炎患者の肥満細胞に対する DMSO の作用については、いまだ統一した見解は得られていない。なお、皮膚感作性試験において DMSO は感作性を示さないことが確認されている(2.6.6.8.2)。

DMSO は膜透過性を亢進させる作用を有しているため(2.6.2.3.2)、他の薬剤が DMSO と同時に膀胱内注入される場合には、組織内及び血中への吸収を促進する可能性が考えられた。

2.4.5.1.3　安全性薬理試験

中枢神経、心血管及び呼吸系試験では、いずれも投与に起因した変化が認められたものの、KRP-116D 製剤から換算されたヒト投与量 0.5g/kg において観察された現象は、反復腹腔内投与 9 日目の試験による神経過敏(アロデニア)のみであった。よって、万一、本剤が他の投与経路で投与されたとしても臨床上重篤な副作用を生じる可能性は低いと考えられた。また、50% DMSO を使用した臨床公表論文[10),11)]の副作用情報、FAERS (2.7.4.6.2.1)及び臨床試験(2.7.4.2 及び 2.7.4.4)でも安全性薬理試験に関連した変化は認められていないことから、申請する投与経路、用法用量においては非臨床安全性薬理試験として評価した中枢神経、心血管及び呼吸系で観察された変化が、臨床上問題となる可能性はほとんどないと考えられた。

2.4.5.2　薬物動態試験

DMSO の薬物動態的特徴を明らかにするため、ラットに膀胱内投与したときの薬物動態試験の結果及び公表論文の結果から考察した。薬物動態学的薬物相互作用についても *in vitro* 試験の結果及び公表論文から考察した。

正常ラットに DMSO を単回膀胱内投与したとき、投与後 1.40 時間で C_{max} に達し、速やかに吸収されることが示された。過酸化水素誘発間質性膀胱炎モデル及び正常ラットに DMSO を膀胱内投与したときの平均血漿中濃度推移及び薬物動態パラメータは、両ラットで概ね一致しており、膀胱の基質的な違いによる吸収性への影響は認められなかった。また、ラット、ウサギ及びサルに DMSO 又は放射性標識された DMSO を経口、腹腔内及び経皮投与したとき、いずれの投与方法においても、投与後 10 分～4 時間に C_{max} に達し、速やかに吸収されることが示された。イヌに放射性標識された DMSO を経皮投与したとき、投与後 4 及び 24 時間には投与量の約 80%及び 90%以上が皮膚から吸収されたことから、DMSO は速やかに吸収されることが示された。動物種や投与経路によらず DMSO は速やかに吸収され、同様の血中動態を示したことから、膀胱内投与後に全身循環血に到達した DMSO は他の投与経路と同様の血中動態を示すと考えられた。よって、分布、代謝及び排泄に関しては、他の投与経路で得られた検討結果より膀胱内投与時の DMSO の薬物動態的特徴が評価可能と考えた。

マウス、ラット、モルモット、ウサギ及びイヌに DMSO 又は放射性標識された DMSO を経口、静脈内、腹腔内及び経皮投与したとき、いずれの投与方法においても、全身に広く分布することが示された。血液より高濃度に分布する組織がいくつか認められたが、いずれも投与後 24 時間までに減少し、特異的に蓄積する組織は認められなかった。

ラットに放射性標識された DMSO を経皮投与したときの眼内動態は、角膜の放射活性が最も高く、投与後 4 時間に放射活性が最大に達した。いずれの眼組織においても投与後 72 時間の放射活性は各眼組織の最大放射活性の半分以下に減少し、8 日後には検出されなかった。同様にウサギに放射性標識された DMSO を経皮投与したときの眼内動態はラットにおける挙動と類似しており、投与後 24 時間までに各眼組織の放射活性は減少し、蓄積性は認められなかった。

ヒト血漿を用いて *in vitro* タンパク結合を検討した結果、DMSO のヒト血漿でのタンパク結合率は 30%であった。血液に添加した結果、25%の DMSO が沈渣に存在した。ラット及びウサギの血球移行率は約 25%であり、検討された 2 種については血球移行率に種差は認められなかった。

ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験の結果、DMSO は酸化され、$DMSO_2$ に代謝されることが示された。また、ラット及びウサギに放射性標識された DMSO を腹腔内、皮下及び経皮投与したときの尿又は呼気中には DMSO、$DMSO_2$ 及び DMS が認められた。DMSO は生体内で還元され DMS となるか、酸化されて $DMSO_2$ となることが示された。ウサギに $DMSO_2$ を皮下投与したときの尿中には DMSO が検出されず、呼気中にも DMS 臭がなかったことから、$DMSO_2$ から DMSO へ、DMSO から DMS へ還元される可能性は低いと考えられた。

ラット、モルモット、ウサギ、イヌ及びサルに DMSO 又は放射性標識された DMSO を経口、静脈内、腹腔内、皮下及び経皮投与したとき、いずれの投与方法においても、投与後 24 時間までに主に DMSO として尿中に排泄されることが示され、尿及び糞中に 30%以上の放射活性が検出された。尿中には DMSO 以外に $DMSO_2$ が認められた。また、ラットに放射性標識された DMSO を静脈内及び経皮投与後の呼気中には、投与量に対して 3.5%～6%の放射活性が認められた。

DMSO は CYP1A2 及び CYP2B6 に対しては阻害作用を示さなかったが、CYP2C8/2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 に対して阻害作用を示した。阻害が認められた CYP 分子種の IC_{50} 値は、KRP-116D の臨床推奨用量における非結合型 C_{max}(2.7.2.2.2.1)の 65.3 倍以上で、十分に高値であった。初代培養ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 試験において DMSO は CYP1A2 の誘導作用は示さなかったが、高濃度条件で CYP3A4 及び CYP2B6 の誘導作用を示した。CYP3A4 及び CYP2B6 の誘導作用が認められなかった DMSO 濃度は、KRP-116D の臨床推奨用量における非結合型 C_{max}(2.7.2.2.2.1)の 50 倍以上で十分に高値であった。各種トランスポーター発現細胞を用いた *in vitro* 試験において、DMSO はヒト BCRP、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K を阻害しなかった。一方、DMSO はヒト MDR1、OATP1B1、OATP1B3 及び OAT1 の弱い阻害剤であることが示されたが、その IC_{50} 値は KRP-116D の臨床推奨用量における非結合型 C_{max} (2.7.2.2.2.1)の 200 倍以上で、十分に高値であった。薬物動態学的薬物相互作用については、臨床用量において併用薬剤に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

2.4.5.3　毒性試験

単回投与毒性試験では、大量投与により死亡を含む重篤な急性毒性が見られた。膀胱内投与では、ヒトで使用されることのない高濃度(100%)及び膀胱内貯留時間(3 時間)により、浮腫及び炎症性細胞反応が認められた。

反復投与毒性試験では、ラット及びイヌの反復経口投与による水晶体の変化以外に DMSO 投与に関連した明らかな変化は認められなかった。国内臨床試験結果、FAERS 及び参考文献から、臨床使用時に水晶体の影響に関する懸念は小さいと考えられた。

遺伝毒性試験では、*in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果、DMSO は遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた。

がん原性試験では、非臨床の報告及び臨床情報から、発がん性を有する可能性は低いと考えられた。

生殖発生毒性試験では、母動物、初期胚発生、胚・胎児発生及び出生児に対して、特異的な毒性は認められず、DMSO が催奇形性を含む生殖発生毒性を有する可能性は低いと考えられた。更に、DMSO に関する海外の取り扱い情報及び臨床情報からも、生殖発生毒性を示す可能性は低いと推測され、妊婦及び授乳婦の臨床使用上において、安全性に対する懸念は小さいと考えられた。

局所刺激性試験では、皮膚及び眼において軽度の刺激性を示すことが認められた。

感作性試験で、モルモットにおいて皮膚感作性は示さず、DMSO が感作性を示す懸念は小さいと考えられた。

主要代謝物である $DMSO_2$ 及び DMS について、反復投与毒性試験、*in vivo* 小核試験及び生殖発生毒性試験(胚・胎児発生に関する試験)の結果、投与による影響は認められず、安全性に対する懸念は小さいと考えられた。

以上のように、DMSO による特異的又は重篤な毒性が発現する可能性は低いと考えられた。よって、臨床において適切な用法及び用量を遵守する場合、重篤な副作用が発現する可能性は低く、安全性の担保は可能と考えられた。

2.4.6 参考文献

1) FDA Guidance for industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. July 2005. [資料番号 4.3-37]
2) FDA Adverse Event Reporting System (FAERS), Freedom of Information Act (FOIA) Detailed Report. [資料番号 5.3.6-1]
3) RIMSO-50 - dimethyl sulfoxide irrigant, Mylan Ins titutional LLC [資料番号 1.6.2.1]
4) Wang J, Lin D, Peng H, Huang Y, Huang J, Gu J. Cancer-derived immunoglobulin G promotes tumor cell growth and proliferation through inducing production of reactive oxygen species. Cell Death Dis. 2013; 4: e945. [資料番号 4.3-38]
5) Koiri RK, Trigun SK. Dimethyl sulfoxide activates tumor necrosis factorα-p53 mediated apoptosis and down regulates D-fructose-6-phosphate-2-kinase and lactate dehydrogenase-5 in Dalton's lymphoma in vivo. Leuk Res. 2011; 35: 950-6. [資料番号 4.3-39]
6) Wang CC, Lin SY, Lai YH, Liu YJ, Hsu YL, Chen JJW. Dimethyl sulfoxide promotes the multiple functions of the tumor suppressor HLJ1 through activator protein-1 activation in NSCLC cells. PLoS One. 2012; 7: e33772. [資料番号 4.3-40]
7) Kennedy AR, Symons MCR. 'Water structure' versus 'radical scavenger' theories as explanations for the suppressive effects of DMSO and related compounds on radiation-induced transformation in vitro. Carcinogenesis. 1987; 8: 683-8. [資料番号 4.3-41]
8) https://search.tga.gov.au/s/search.html?collection=tga-websites-web&query=dmso+SAS+Category+C+codes
https://www.tga.gov.au/australian-categorisation-system-prescribing-medicines-pregnancy
9) Onwude JL, Selo-Ojeme DO. Pregnancy outcomes following the diagnosis of interstitial cystitis. Gynecol Obstet Invest. 2003; 56: 160-2. [資料番号 4.3-42]
10) Sant GR. Intravesical 50% dimethyl sulfoxide (Rimso-50) in treatment of interstitial cystitis. Urology. 1987;29: Suppl 17-21. [資料番号 4.3-27]
11) Rössberger J, Fall M, Peeker R. Critical appraisal of dimethyl sulfoxide treatment for interstitial cystitis: discomfort, side-effects and treatment outcome. Scand J Urol Nephrol 2005;39:73-77. [資料番号 4.3-36]
12) Stout L, Gerspach JM, Levy SM, Yun SK, Lad PM, Leach GE, Zimmern PE. Dimethyl sulfoxide does not trigger urine histamine release in interstitial cystitis. Urology. 1995;46:653-656. [資料番号 4.3-28]