

**レボカバスチン点眼液 0.025%「FFP」の
生物学的同等性に関する資料**

共創未来ファーマ株式会社

2019年2月作成

ラット及びモルモットアレルギー性結膜炎モデルにおける生物学的同等性試験

I. 試験の目的

レボカバスチン点眼液 0.025%「FFP」及び標準製剤の生物学的同等性をラット受動感作アレルギー性結膜炎モデル及びモルモットヒスタミン誘発結膜炎モデルを用い薬力学的に検討した。

II. 試験方法

1. 検体

本試験には下記検体を使用した。

試験製剤：レボカバスチン点眼液 0.025%「FFP」(共創未来ファーマ株式会社)

標準製剤：点眼剤、0.025%

基剤：レボカバスチン点眼液 0.025%「FFP」からレボカバスチンを除いたもの

2. 試験方法

(1) ラット受動感作アレルギー性結膜炎モデルを用いた検証

1) 使用動物

Wistar 系雄性ラット(試験開始時:6 週齢、185.7~212.2g)

2) 試験方法

Mota の方法¹⁾を参考に抗血清を作製し、壬生らの方法²⁾を参考に試験を実施した。すなわち、ラットにジエチルエーテル麻酔を施し、予め生理食塩液で抗体価が 8 になるように希釈した抗血清を両眼球結膜下に 50 μ L 注射することにより受動感作した。その 2 日後に 2%アルブミンと 1%エバンスブルーの等量混合液を 3mL/kg 静脈内に投与して、アレルギー反応を惹起した。動物は反応惹起 30 分後に放血致死させ、眼組織(眼球結膜及び眼瞼結膜)を摘出し、組織中の色素を 5mL の抽出液(アセトン:0.5%硫酸ナトリウム溶液=7:3)に一晩浸漬することにより抽出した。検体点眼投与は、炎症惹起 15 分前に各 10 μ L 点眼した。各動物の左眼に標準製剤あるいは試験製剤を、右眼に基剤を各 10 μ L 点眼し、1 群 10 例で検討を行った。評価は、抽出液の 620nm の吸光度を測定し、Dunnett 多重比較検定による有意差検定を行った。

3) 生物学的同等性の検証

標準製剤及び試験製剤における吸光度の対数の平均値の差の 90%信頼区間を算出し得られた値が $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ の範囲内にある場合に同等と判定した。

(2) モルモットヒスタミン誘発結膜炎モデルを用いた検証

1) 使用動物

Hartley 系雄性モルモット(試験開始時:6 週齢、体重:349.5~470.8g)

2) 試験方法

Kamei らの方法³⁾を参考に実施した。すなわち、ヒスタミン/生理食塩液 25 μ L をモルモット眼瞼結膜嚢に投与することにより実験的結膜炎を惹起した。結膜炎の予防効果の検証では、検体を結膜炎惹起前 15 分に 1 回点眼した。治療的効果の検証は結膜炎惹起 5 分および 10 分後の計 2 回点眼した。検体は、動物各個体の左眼に試験製剤、右眼に基剤を 25 μ L 点眼し、予防効果に 1 群 8 例、治療効果に 1 群 14 例で実施した。評価は、スコア基準(表 1)に従い結膜炎の程度を肉眼観察にて点数評価し、群間における有意差検定は Student の t 検定を用いて検討した。

表 1. スコア基準

スコア 0	－ 症状なし
スコア 1	－ 軽度の充血を示したもの
スコア 2	－ 強度の充血を示したもの
スコア 3	－ 充血に軽度～中等度の浮腫が加わったもの
スコア 4	－ 著明な浮腫が生じたもの

3) 生物学的同等性の検証

試験製剤及び標準製剤における抑制率の対数の平均値の差の 90%信頼区間を算出し、得られた値が $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ ($= -0.09691 \sim 0.09691$) の範囲内にある場合に同等と判定した。

III. 結果

1. ラット受動感作アレルギー性結膜炎モデルを用いた検証

アレルギー性結膜炎に対する抑制作用の結果を表 2 に示した。試験製剤、標準製剤及び基剤における吸光度はそれぞれ 0.1414 ± 0.0041 、 0.1393 ± 0.0069 、 0.2397 ± 0.0083 であり、基剤に対して試験製剤及び標準製剤は有意な抑制作用が認められ、試験製剤及び標準製剤間には有意な差は認められなかった (Dunnett 多重比較検定)。

表 2. ラット受動感作アレルギー性結膜炎に対する抑制作用

検体	例数	吸光度
試験製剤	10	$0.1414 \pm 0.0041^{**}$
標準製剤	10	$0.1393 \pm 0.0069^{**}$
基剤	20	0.2397 ± 0.0083

(平均±標準誤差、Dunnett 多重比較検定、**: $p < 0.01$ 、対基剤)

試験製剤及び標準製剤の吸光度の対数の平均値の差の 90%信頼区間は、 $-0.03576 \sim 0.05556$ と算出され、 $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ ($= -0.09691 \sim 0.09691$) の範囲内であった。

2. モルモットヒスタミン誘発結膜炎モデルを用いた検証

試験製剤及び標準製剤のヒスタミン誘発結膜炎に対する抑制効果を表 3 に示した(平均値±標準誤差)。

表 3. ヒスタミン誘発結膜炎に対する抑制効果

	検体	例数	抑制率(%)
予防効果	試験製剤	8	70.4 ± 3.29
	標準製剤		67.1 ± 4.30
治療効果	試験製剤	14	41.8 ± 2.99
	標準製剤		41.8 ± 2.99

ヒスタミン誘発結膜炎モデルに対する予防効果及び治療効果における抑制率の対数の平均値の差の 90%信頼区間はそれぞれ $-0.04527 \sim 0.09327$ 、 $-0.09665 \sim 0.09665$ と算出され、ともに $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ ($= -0.09691 \sim 0.09691$) の範囲内であった。

IV. 結論

今回、ラット受動感作アレルギー性結膜炎モデル及びモルモットヒスタミン誘発結膜炎モデルを用いて、レボカバスチン点眼液 0.025%「FFP」と標準製剤の生物学的同等性について薬力学的検証を行った。

ラット受動感作アレルギー性結膜炎モデルを用いた検証では、両製剤ともに基剤に対して統計学的有意に結膜炎を抑制した。両製剤の吸光度の対数の平均値の差の90%信頼区間は $-0.03576 \sim 0.05556$ と算出され、判定基準である $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ ($= -0.09691 \sim 0.09691$)の範囲内にあることから生物学的に同等であると判断した。また、モルモットヒスタミン誘発結膜炎モデルを用いた検証では、両製剤の抑制率の対数の平均値の差の90%信頼区間は、予防効果で $-0.04527 \sim 0.09327$ 、治療効果で $-0.09665 \sim 0.09665$ であり、生物学的同等性の判定基準内であった。

以上の結果より、レボカバスチン点眼液 0.025%「FFP」と標準製剤は生物学的に同等である事が確認され、両製剤は臨床的にも同等に有用な製剤であると推測された。

V. 参考文献

- 1) Mota I: Immunology 7:681-699 (1964)
- 2) 壬生寛之ほか: 眼紀 41:867-870 (1990)
- 3) C Kamei et al.: J. Pharmacobio-Dyn 14:467-473 (1991)

LC/MS によるレボカバステチン点眼液 0.025%「FFP」及び標準製剤点眼後のウサギ結膜中塩酸レボカバステチン濃度測定試験

I. 試験の目的

アレルギー性結膜炎治療点眼剤の効果は眼局所で発揮されるものであり、結膜における薬物濃度が薬理作用の発現に関連していると考えられることから、レボカバステチン点眼液 0.025%「FFP」及び標準製剤投与後のウサギ結膜中薬物濃度を比較検討した。

II. 試験方法

1. 検体

本試験には下記検体を使用した。

試験製剤：レボカバステチン点眼液 0.025%「FFP」(共創未来ファーマ株式会社)

標準製剤：点眼剤、0.025%

2. 試験方法

(1) 使用動物

日本白色種雄性家兎(使用時体重:1470.1~2613.9 g)

(2) 試験方法

1) 組織採取

検体を 50 μ L 点眼したウサギ(1 群 5 羽)を一定時間後に屠殺し、眼瞼結膜を摘出し生理食塩液にて洗浄後、組織重量を測定し定量用試料とした。

2) LC/MS 用測定試料の調製¹⁾

採取した結膜にリン酸緩衝液 (pH1.5) を加え、ホモジナイズ後、ジクロロメタン/イソプロピルアルコール混液を添加した。振盪抽出、遠心分離後、下層を分取した。集めた下層を減圧下で濃縮乾固し、メタノールを加え、遠心分離後得られた上清を LC/MS 測定試料とした。

3) 装置及び条件

HPLC(島津製作所製)

分析カラム：内径 2.0 mm, 長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てん

カラム設定温度：40 $^{\circ}$ C

流量：0.2 mL/min

注入量：5 μ L

移動相：10mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.58)/アセトニトリル=7/3

MS(島津製作所製)

スキャンタイプ：SIM, ポジティブ

イオン化モード：ESI

モニタリングイオン：レボカバステチン CH1m/z:421.0

検出器ゲイン：2.0 kV

サンプリングレート：1.0

4) 統計処理

各測定点において Student の t 検定を行い、有意水準 5%未満の場合、有意差ありと判定した。また、組織中濃度 (ng/g) を時間に対してプロットし、隣り合う 2 点間の曲線の面積は台形法により求め、結膜中薬物濃度-時間曲線下面積 (AUEC_{0→24}) を算出した。

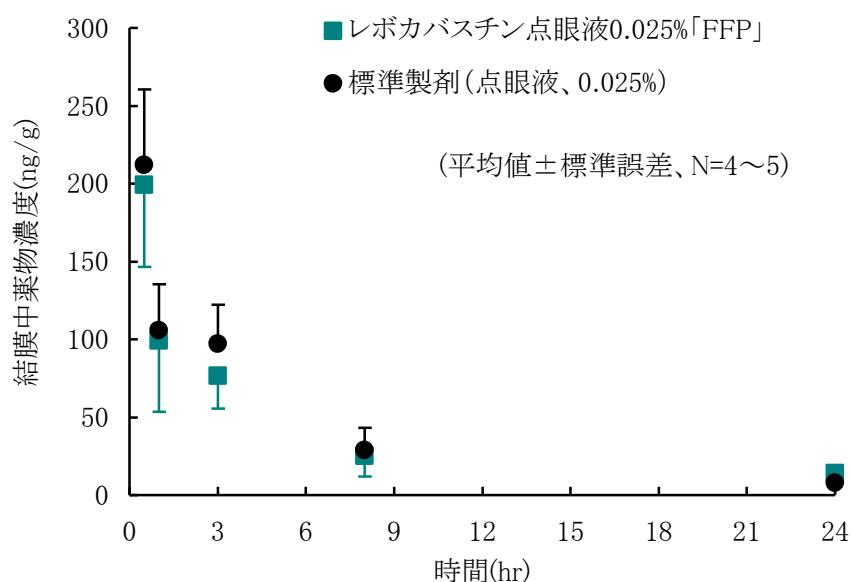
Ⅲ. 結果

表1及び図1に点眼後の結膜中塩酸レボカバスチン濃度の経時的変化を示した。結膜中塩酸レボカバスチン濃度は、点眼後 0.5 時間に最高値を示し、標準製剤及び試験製剤でそれぞれ 211.90 ± 48.58 、 199.19 ± 52.54 ng/g であった。点眼後 24 時間の結膜中濃度は、標準製剤及び試験製剤それぞれ 7.82 ± 3.26 、 13.87 ± 1.62 ng/g であった。点眼後 24 時間では定量下限付近および定量下限以下のサンプルが認められた。点眼後の結膜中塩酸レボカバスチン濃度推移は個体間のばらつきが大きい、点眼後は一次速度式に従い結膜中から消失すると考えられた。また、いずれの時間においても、両製剤投与後の結膜中塩酸レボカバスチン濃度に有意な差は認められなかった。

表 1. ウサギ結膜中塩酸レボカバスチン濃度の経時的変化

点眼後時間 (hr)	結膜中薬物濃度 (ng/g)	
	試験製剤	標準製剤
0.5	199.19 ± 52.54	211.90 ± 48.58
1.0	99.20 ± 45.56	105.94 ± 29.31
3.0	76.46 ± 21.05	97.32 ± 25.04
8.0	25.22 ± 13.11	28.72 ± 14.61
24.0	13.87 ± 1.62	7.82 ± 3.26
AUC _{0→24}	867.02	943.07

図1 ウサギ結膜中塩酸レボカバスチン濃度の経時的変化



IV. 結論

後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインによれば、通常生物学的同等性は薬理活性物質が体循環血中に入る速度と量を比較することにより検証することになっている²⁾。塩酸レボカバスチンは LC/MS を用いることで、生体成分による妨害がほとんどなく、特異的かつ高感度に測定できる物質であるが、点眼後の血中濃度を測定することは不可能と思われる。アレルギー性結膜炎は IgE 抗体関与の局所アナフィラキシー性の疾患であり、点眼投与後の眼局所薬物濃度推移の方が血中薬物濃度より本製剤の有効性により強く関与していると考えられるため、両製剤の生物学的同等性の検証には、点眼後の血中薬物濃度推移ではなく、結膜中の薬物濃度推移を指標として検討した。

結膜中の薬物濃度を測定するには、結膜を摘出し薬物を抽出する必要があるためウサギを用いて実施した。結膜中塩酸レボカバスチン濃度は、投与後 0.5 時間に最高濃度を示し、経時的な濃度推移は羽鳥らの報告とほぼ同様であった³⁾。点眼後の各測定点で結膜中薬物濃度に統計学的な有意差は認められず、組織中薬物濃度-時間曲線下面積(AUEC_{0→24})においても近い値が得られた。

点眼後の結膜中塩酸レボカバスチン滞留量は標準製剤とほぼ同様に推移し、両群において有意差は認められなかったことから、両製剤は同様の効果が期待できる抗アレルギー点眼剤であると考えられた。

V. 参考文献

- 1) M.Gergov, J.N.Robson, I.Ojanpera, O.P.Heinonen, E.Vuori: Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry. Forensic Science International: 121,108-115(2001)
- 2) 医薬審第 487 号、平成9年 12 月 22 日「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインについて」
- 3) 羽鳥晶子 他: 基礎と臨床, 28(12):3775-3794(1994)