

**レボフロキサシン点眼液 0.5%「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

ウサギ眼組織内濃度測定試験

I. 試験の目的

本試験はレボフロキサシン点眼液(試験製剤及び標準製剤)をウサギの眼結膜嚢内に点眼した後のウサギ前眼房水および角膜中レボフロキサシン濃度を測定し、比較検討することを目的とした。

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 : レボフロキサシン点眼液 0.5%「FFP」(EE03)

標準製剤 : 点眼剤 0.5%

2. 試験方法

2-1. 試験動物

使用動物 : ウサギ(Kbl:JW、雄性、15 週齢、北山ラベス株式会社)

2-2. 試験方法

試験製剤または標準製剤それぞれ 50 μ L をウサギの右眼または左眼の眼瞼結膜嚢に単回点眼した後、約 1 秒間上下眼瞼を穏やかに合わせて保持した。投与後、所定時間において耳介静脈より過量のソムノペンチルを投与して安楽死させた。眼球を摘出し、注射筒を用いて前眼房水を採取した後に角膜を採取した。角膜は重量を測定した後に 5%ホモジネートとなるように蒸留水でホモジナイズした。採取した前眼房水および角膜 5%ホモジネートは-25℃~-15℃で保存した。前眼房水および角膜 5%ホモジネート中のレボフロキサシン濃度を LC-MS/MS を用いて定量した。組織サンプルは、点眼 0.25、0.5、1、2、3、8 時間後に採取した。組織サンプルは試験製剤、標準製剤ともに各測定時点において 10 眼とした。

2-3. 生物学的同等性の検証

Windows SAS system(Release 8.02,SAS Institute)を使用し、各測定時点の眼房水中および角膜中濃度に関してそれぞれ t 検定を実施した。危険率は 5%とし、有意差が認められない場合、同等と判断した。

III. 結果

試験製剤および標準製剤をウサギに単回点眼した後の前眼房水および角膜中レボフロキサシン濃度推移をそれぞれ図 1 および 2 に示した。統計解析の結果、試験製剤と標準製剤の間でレボフロキサシン濃度に有意差は認められなかった。

以上の結果から、レボフロキサシン点眼液 0.5%「FFP」および標準製剤は生物学的に同等であると判断された。

図 1. 前眼房水中レボフロキサシン濃度推移

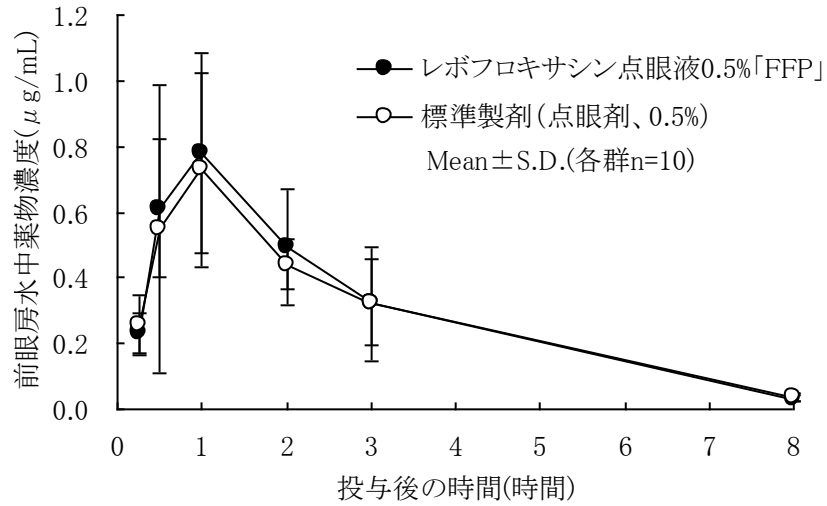
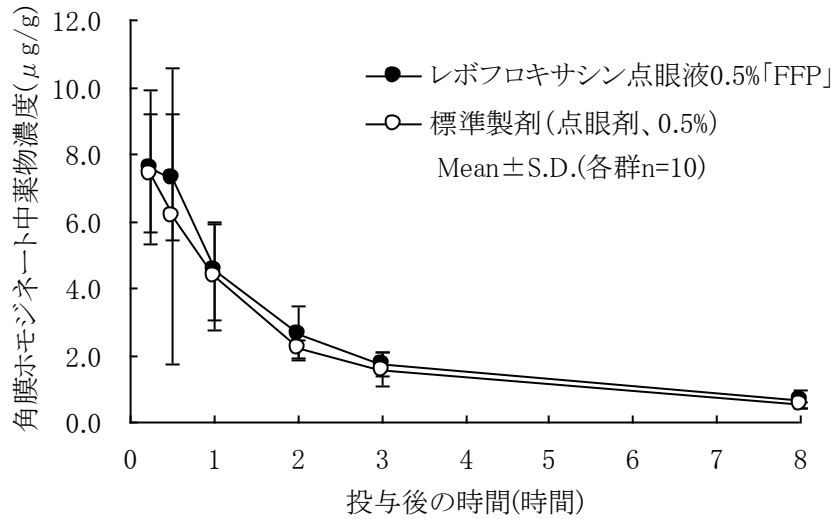


図 2. 角膜中レボフロキサシン濃度推移



実験的ウサギ緑膿菌角膜感染モデルに対する治療効果

I. 試験の目的

緑膿菌感染により作製したウサギ角膜潰瘍モデルに対するレボフロキサシン点眼液 0.5%「FFP」及び標準製剤の生物学的同等性試験を実施し検討した。

本試験は申請資料の信頼性の基準(薬事法施行規則第 43 条、平成 17 年 4 月 1 日施行)を遵守し、動物福祉に関するガイドラインに準拠し実施した。

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：レボフロキサシン点眼液 0.5%「FFP」(EE03)

標準製剤：点眼剤 0.5%

2. 試験方法

2-1. 試験動物及び使用菌株

使用動物：ウサギ(JW/CSK、雄性、9 週齢、日本 SLC 株式会社)

動物数：12 匹/群、合計 36 匹

使用菌株：*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

2-2. 試験方法

ウサギを全身麻酔し右眼球圧迫脱臼後、トレパンで角膜中央に浅い傷を作製し、その中に「#」字型の創を注射針を用いて作製し、緑膿菌液(1×10^9 cfu/mL)50 μ L を 2 回点眼した。菌液接種日は菌液接種後 4 時間から 4 時間毎に 2 回、翌日からは 4 時間毎に 3 回試験製剤または標準製剤を 3 日間点眼した。角膜は、創作製日(0 日)から 3 日目までは各試験製剤点眼前に、4~7 日目は 3 日目までと同時刻に観察した。角膜感染部位の評価は、秦野、中村らの評価基準に従った角膜所見の評価法(表 1)及び Draize 法に従った眼組織全体の評価法(表 2)を用いた。

表 1. 秦野・中村等の評価基準(角膜スコア評価)

部位	観察像	評価
角膜	角膜の混濁の範囲	
	角膜混濁がないもの	0
	角膜混濁がなく、軽い浮腫がみられる	+0.5
	角膜混濁が 6mm より小さいもの	+1
	角膜混濁が 6mm 全体におよぶもの	+2
	角膜混濁が 6mm より大きいもの	+3
	角膜混濁が角膜全体におよぶもの	+4

表 2. 評価基準(Draize 法)

部位	反応の程度	評点
角膜 (I)	(A) 混濁の程度(最も濃い領域を判定した)	
	透明、混濁なし	0
	散在性またはび漫性の混濁、虹彩ははっきり認める	1
	半透明部で容易に識別可能、虹彩の細部はやや不明瞭	2
	乳濁、虹彩の細部は不明、瞳孔の大きさをやっと認める	3
	白濁、混濁部を通して虹彩は見分けられない	4
	(B) 該当する角膜混濁部の面積	
	0 ~ 1/4	1
	1/4 ~ 1/2	2
	1/2 ~ 3/4	3
	3/4 ~ 4/4	4
虹彩 (II)	(A)	
	正常	0
	著明に虹彩襞が深くなる、うっ血、腫脹、角膜周囲充血 (いずれか 1 つ、または組み合わせ)、多少とも対光反応有り (瞬き反応も陽性)	1
	対光反応なし、出血、著しい組織破壊(いずれか 1 つ)	2
結膜 (III)	(A) 結膜の発赤(眼瞼および眼球結膜で判定)	
	血管は正常	0
	正常より明らかに血管は充血	1
	び慢性、深紅色で個々の血管は識別しにくい	2
	び慢性の牛肉様の赤色	3
	(B) 結膜の浮腫	
	腫脹なし	0
	正常より僅かな腫脹(瞬膜を含む)	1
	眼瞼の一部の外反を伴った明らかな腫脹	2
	眼瞼の 1/2 の閉鎖を伴った腫脹	3
	眼瞼の 1/2 以上の閉鎖を伴った腫脹	4
	(C) 分泌物	
分泌物が認められない	0	
正常より少し多い	1	
分泌物があり、眼瞼とそのすぐ近くの毛を濡らしている	2	
分泌物があり、眼瞼とその周囲のかなりの部分の毛を濡らしている	3	

眼反応の評点の集計

小計 角膜(I) = A × B × 5、虹彩(II) = A × 5、結膜(III) = (A + B + C) × 2
 合計 = 角膜(I) + 虹彩(II) + 結膜(III)

2-3. 生物学的同等性の検証

SAS システムを用いた EXSAS で角膜及び眼組織全体所見のスコアをノンパラメトリックの多群間比較検定である Tukey Type Test (Joint Type) で解析した。危険率は 5%未満を有意とした。試験製剤群と標準製剤群間に有意差が認められない場合、両者は同等と判断した。

III. 結果

感染部位の角膜および眼組織の評価スコアを図 1,2 に示した。角膜所見および眼組織所見は、無処置群と比較して標準製剤群および試験製剤群で症状の改善が認められた。その統計学的解析結果 (Tukey Type Test (Non parametric Joint Type)) を図 3,4 に示した。統計学的解析において秦野・中村等の評価法による角膜所見は、菌液接種 1 日目(被験物質点眼 1 日目)より菌液接種 7 日目(観察終了日)で試験製剤群および標準製剤群に有意な治療効果が認められ、Draize 等の評価法による眼組織所見においても、同様に試験製剤群および標準製剤群に有意な治療効果がみられた。いずれの評価方法でも両製剤間に有意な差は認められず、試験製剤と標準製剤の生物学的同等性が確認された。

図 1. 角膜所見評価スコア(秦野、中村らの評価基準による評価)

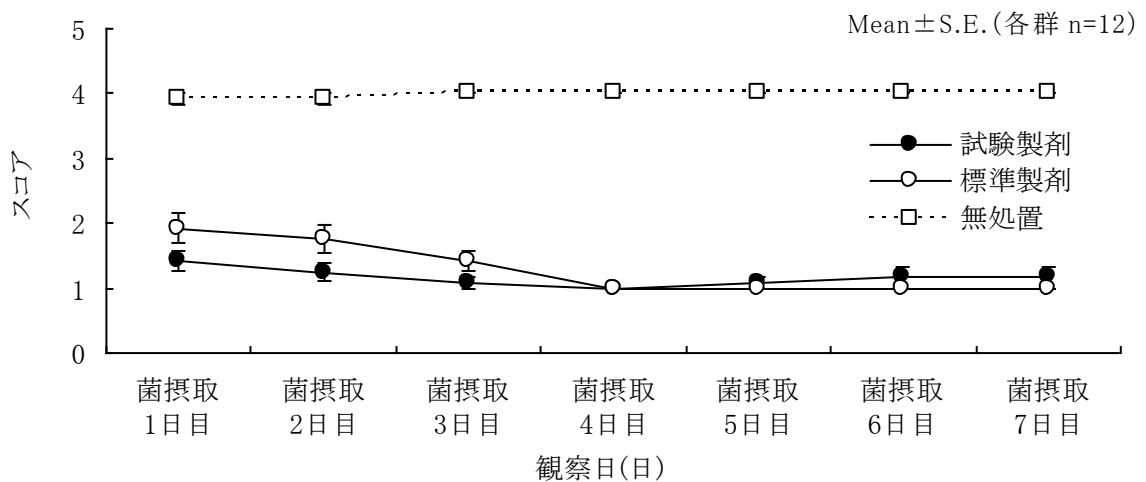


図 2. 眼組織所見評価スコア(Draize 法による評価)

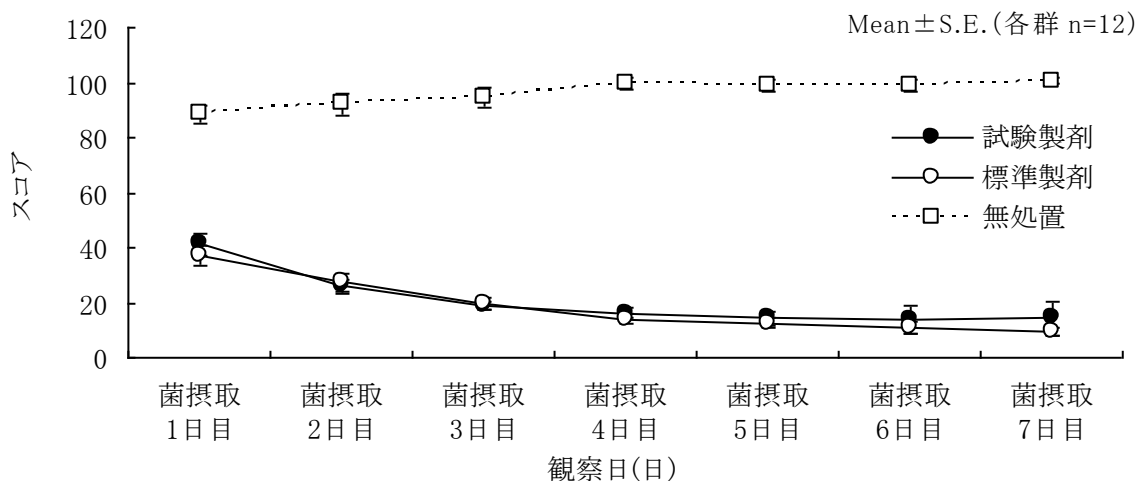


図3. 秦野・中村等の角膜評価基準による角膜スコアにおける統計学的解析

< 1 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0000 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.5390 n.s.	0.0005 **

< 2 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0000 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.5004 n.s.	0.0004 **

< 3 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0000 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.5652 n.s.	0.0001 **

< 4 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0000 **
標準製剤 (1日3回3日間)	1.0000 n.s.	0.0000 **

< 5 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0000 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.9585 n.s.	0.0000 **

< 6 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0000 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.9585 n.s.	0.0000 **

< 7 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0000 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.9585 n.s.	0.0000 **

n.s. : Not significant, ** : $p < 0.01$
 (Tukey Type Test (Non parametric Joint Type))

図4. Draize 法の評価基準による眼組織スコアにおける統計学的解析

< 1 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0002 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.8636 n.s.	0.0000 **

< 2 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0001 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.9992 n.s.	0.0001 **

< 3 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0001 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.9967 n.s.	0.0001 **

< 4 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0002 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.8868 n.s.	0.0000 **

< 5 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0002 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.9344 n.s.	0.0000 **

< 6 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0001 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.9991 n.s.	0.0001 **

< 7 day >		無処置 (菌液接種のみ)
	試験製剤 (1日3回3日間)	0.0000 **
標準製剤 (1日3回3日間)	0.9822 n.s.	0.0001 **

n.s. : Not significant, ** : p<0.01
 (Tukey Type Test (Non parametric Joint Type))

LVFX0.5%-BE①