

2020 年 9 月作成（第 1 版、資料の仕様変更に伴う改訂（データ等変更なし））

レボカバスチン点眼液 0.025%「FFP」の 生物学的同等性試験について

共創未来ファーマ株式会社

1. 家兎結膜中における薬物滞留性

<概要>

日本白色家兎に本剤あるいは標準製剤を点眼後 0.5、1、3、8 及び 24 時間に眼瞼結膜を摘出し結膜中薬物濃度を測定した。結膜中の薬物濃度は、本剤の点眼 0.5 時間後に最高値 (199.19ng/g) を示した後、一次速度式に従って徐々に消失した。本剤と標準製剤の値を用いて Student の t 検定にて統計解析を行った結果、いずれの測定点においても両剤の間に有意な差は認められず、両剤の生物学的同等性が確認された。

<試験方法>

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。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。LC/MS によって試料中薬物濃度を測定した後、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。

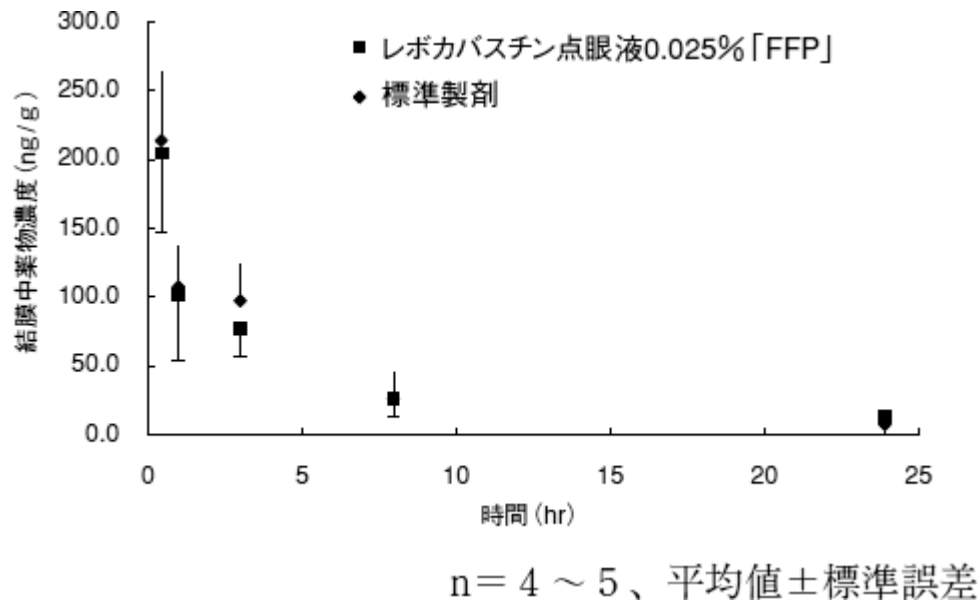
<試験結果>

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变化を示した。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 \pm 48.58、199.19 \pm 52.54ng/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 \pm 3.26、13.87 \pm 1.62ng/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ですが、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变化

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 \pm 52.54	211.90 \pm 48.58
1.0	99.20 \pm 45.56	105.94 \pm 29.31
3.0	76.46 \pm 21.05	97.32 \pm 25.04
8.0	25.22 \pm 13.11	28.72 \pm 14.61
24.0	13.87 \pm 1.62	7.82 \pm 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变化



<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¹⁾。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²⁾。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(AUEC₀₋₂₄)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。

<参考文献>

- 1) 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」
- 2) 羽鳥晶子 他：基礎と臨床, 28(12):3775-3794(1994)

2. ラット実験的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に対する作用 ＜概要＞

ラット実験的アレルギー性結膜炎モデルに対する作用：抗卵白アルブミンラット血清をラット結膜下に注射することにより感作し、48 時間後に卵白アルブミン/エバンスブルー溶液を静脈内投与し結膜にアレルギー反応を惹起した。惹起 30 分後に眼球結膜及び眼瞼結膜を摘出し、組織中漏出色素量を血管透過性の指標とし評価した。本剤及び標準製剤において得られた値を用いて 90%信頼区間法にて統計解析を行った結果、 $\log(0.80) \sim \log(1.25) (= -0.09691 \sim 0.09691)$ の範囲内にあることから両剤の生物学的同等性が確認された

モルモットヒスタミン誘発結膜炎モデルに対する作用：ヒスタミン溶液をモルモット眼瞼結膜嚢に投与し実験的結膜炎を惹起した。本剤あるいは標準製剤を惹起 15 分前に点眼投与することにより予防効果を検証し、惹起後 5 分及び 10 分に 2 回点眼することにより治療効果を検証した。結膜炎の程度を肉眼的に観察し、基準に従いスコア化することで評価した。基剤のスコア値に対する本剤及び標準製剤のスコア値の比率より結膜炎抑制率を算出し、それらの値を用いて 90%信頼区間法にて統計解析を行った結果、予防効果、治療効果共に $\log(0.80) \sim \log(1.25) (= -0.09691 \sim 0.09691)$ の範囲内にあることから両剤の生物学的同等性が確認された。

＜試験方法＞

ラット実験的アレルギー性結膜炎モデルに対する作用：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い、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。

モルモットヒスタミン誘発結膜炎モデルに対する作用：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（有意水準：5%未満）。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[※]。

※統計手法に懸念がある内容が含まれていますが、本剤の申請時点では製造販売承認が認められた経緯を踏まえてそのまま記載しております。

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

<試験結果>

ラット実験的アレルギー性結膜炎モデルに対する作用：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 \pm 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。

モルモットヒスタミン誘発結膜炎モデルに対する作用：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 \pm 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。

<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。

<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)