

ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」の生物学的同等性試験について

ニプロ株式会社

ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」を先発品を対照薬とし、ウサギ固定関節モデル及びびイヌ関節疼痛モデルを用いた薬効薬理による生物学的同等性試験を実施した。

[I . ウサギ固定関節モデルを用いた薬効薬理による生物学的同等性試験]

1. 試料

試験薬: ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」 LOT No. HI-001
対照薬: 先発品

2. 使用動物

14週齢の雄性KBL: NZW (SPF) ウサギを10日間馴化飼育し、その間一般状態の観察及び体重測定を行った。

3. 使用モデル

変形性関節炎のモデルの代表であり、ヒアルロン酸が有効であることが報告されている、ウサギ固定関節モデルを用いた。

4. 関節固定方法

麻酔下にて、右後肢を毛刈りし、膝関節を伸展位で3週間固定した。

5. 投与量の設定

先発品が動物実験で治療効果を発現した量である0.1 mL/kgとした。

6. 実験成績

(1) 関節可動域 (ROM)

測定結果を図1及び表1に示し、その結果について統計解析を行った。

これらの成績を2元配置分散分析法及びTukey法により多重比較したところ、陰性対照群に対しヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群では可動域の回復に有意差が認められた。一方、ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群間では有意差は認められなかった。

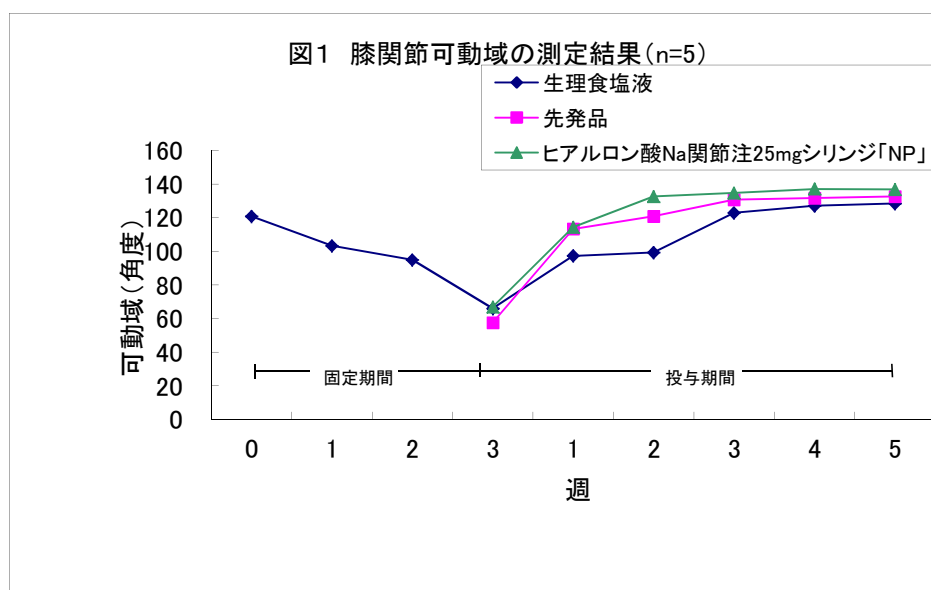


表1 膝関節可動域(ROM)の測定結果

群	動物 番号	----- 固定期間 -----				----- 投与期間 -----				
		固定前	1 週 後	2 週 後	3 週 後	1 週 後	2 週 後	3 週 後	4 週 後	5 週 後
生理食塩液	111	110	105	122	85	103	100	125	130	132
	112	128	97	78	63	98	105	124	132	127
	113	122	103	97	68	100	101	117	115	116
	114	130	112	93	69	86	100	125	131	135
	115	115	100	85	45	100	91	124	128	133
	Mean	121.0	103.4	95.0	66.0	97.4	99.4	123.0	127.2	128.6
	S. E.	3.8	2.5	7.5	6.4	3.0	2.3	1.5	3.1	3.4
先 発 品	121	128	102	88	37	100	112	130	120	127
	122	138	91	87	55	113	122	132	135	130
	123	128	96	85	68	117	125	130	130	136
	124	130	106	80	67	120	128	132	142	142
	125	125	102	108	61	117	118	130	132	129
	Mean	129.8	99.4	89.6	57.6	113.4	121.0	130.8	131.8	132.8
	S. E.	2.2	2.6	4.8	5.7	3.5	2.8	0.5	3.6	2.7
ヒアルロン酸Na関節注 25mgシリンジ「NP」	131	123	110	80	65	105	127	133	146	138
	132	113	115	111	82	117	130	138	136	130
	133	120	115	85	65	118	134	138	138	140
	134	125	95	76	48	105	133	132	131	137
	135	125	110	85	75	127	140	133	135	140
	Mean	121.2	109.0	87.4	67.0	114.4	132.8	134.8	137.2	137.0
	S. E.	2.2	3.7	6.1	5.7	4.2	2.2	1.3	2.5	1.8
Mean	124.0	103.9	90.7	63.5	108.4	117.7	129.5	132.1	132.8	
S. E.	1.9	1.9	3.4	3.4	2.8	3.9	1.5	2.0	1.7	

値は角度を示す

2元配置分散分析の結果、群間に有意差あり (p<0.001)

Tukeyの多重比較[棄却限界値と()内に平均値の値を示す ** : p<0.01]

	先発品群	ヒアルロン酸Na関節注 25mgシリンジ「NP」群
生理食塩液群	6.258 (9.733) **	6.258 (13.667) **
	先発品群	4.978 (3.933)

(2) 組織学的検査

ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群では、陰性対照群と比較して組織構造の消失及び細胞密度の減少はいずれも軽度であることが観察された。

これらの変化を評点化して比較すると、大腿骨内顆において陰性対照群に対してヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群で有意な低値が認められ、大腿骨外顆及び脛骨外顆では低値の傾向が認められた。また、ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群間にはいずれの部位においても有意差は認められなかった。

表2に評点化成績を示した。

表2 各組織における光学顕微鏡学的所見の評点

群		生理食塩液	先発品	ヒアルロン酸Na関節注 25mgシリンジ「NP」
動物数		5	5	5
大腿骨	内顆	22.4 ± 2.4	13.6 ± 2.2*	12.0 ± 2.7*
	外顆	13.4 ± 3.6	11.0 ± 3.0	10.2 ± 1.4
脛骨	内顆	11.2 ± 2.7	11.8 ± 2.7	12.2 ± 2.5
	外顆	16.4 ± 4.4	11.4 ± 1.9	9.2 ± 2.9
	関節顆中央部	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
大腿骨側面	内側	4.8 ± 3.1	4.6 ± 2.1	5.2 ± 2.8
	外側	1.2 ± 0.7	2.0 ± 1.1	0.8 ± 0.8
滑膜組織		7.6 ± 1.6	6.2 ± 1.2	6.6 ± 1.7

平均±標準誤差

* : 生理食塩液群に対して有意水準5%で有意 (Tukeyの多重比較)

7. 結論

ウサギ固定関節モデルにおける関節拘縮ならびに軟骨変性に対する効果は、ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」と先発品投与群間には有意差が認められなかったことから、ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」及び先発品は同等の効果をもつことが明らかとなった。

[II . イヌ関節疼痛モデルを用いた薬効薬理による生物学的同等性試験]

1. 試料

試験薬:ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」 LOT No. HI-001
対照薬:先発品

2. 使用動物

健康と認められた雌性ビーグル犬を7日間馴化飼育し、その間一般状態の観察及び体重測定を行った。

3. 使用モデル

関節炎治療剤に対する代表的なモデルであるイヌの尿酸によって誘発される関節疼痛モデルを用いた。

4. 投与量の設定

先発品が動物実験で治療効果を発現した量である0.3mL/kgとした。
なお、関節疼痛起炎物質投与30分前に試験薬又は対照薬を投与した。

5. 疼痛測定方法

①負重の測定

両前肢、右後肢及び左後肢の負重を同一時間に測定した。測定は連続10回行い、右後肢について平均負荷重を算出し、次式に従って負重率を求めた。

$$\text{負重率 (\%)} = \frac{\text{起炎物質投与後の各時点の右後肢平均負重 (g)}}{\text{起炎物質投与前の右後肢平均負重 (g)}} \times 100$$

②跛行の観察

負重の測定後直ちに、右後肢の跛行を観察し、表3の5段階スコアに従って評点化した。

表3 跛行の判定基準

程度	症 状	スコア
最重度	立位の場合に関節疼痛の発生している足肢への負荷重が殆ど不可能で、更に、歩行も残る三肢のみで行う。	4
重度	立位の場合に関節疼痛の発生している足肢の肢端のみを僅かに接地する。	3
中等度	立位の場合に足蹠の全面が接地するが、関節疼痛の発生している足肢には短時間負荷重するに過ぎない。	2
軽度	立位の場合に四肢の足蹠の全面が接地し、その姿勢を持続的に維持するが、歩行に異常が観察される。	1
無跛行	立位の場合に四肢への負荷重に特に異常は観察されず、歩行にも異常が認められない。	0

6. 実験成績

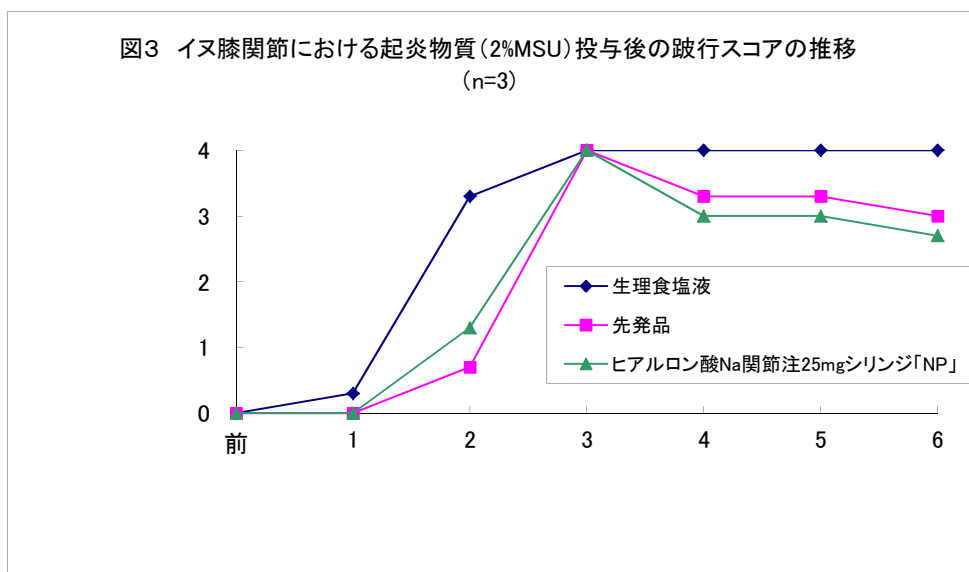
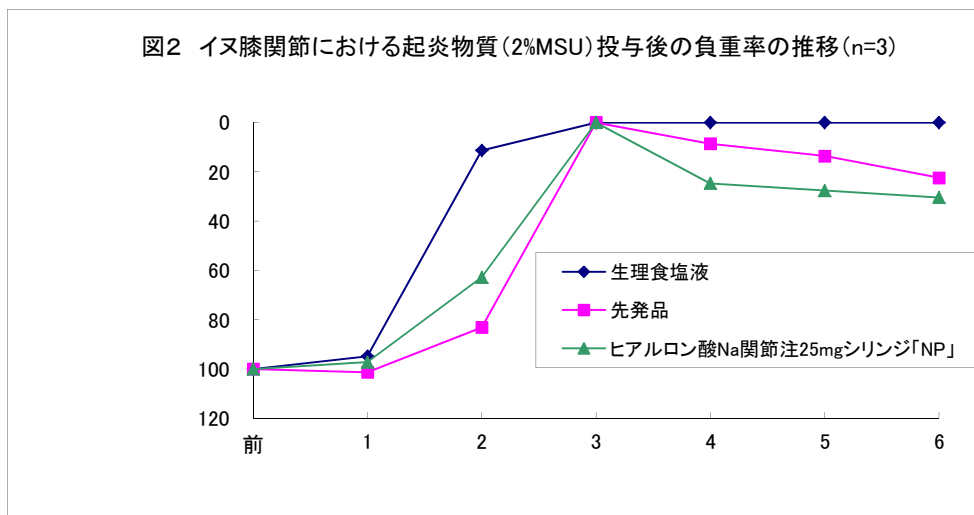
①負重率の推移

ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群では起炎物質投与3時間後で陰性対照群と差は認められなかったが、2、4、5及び6時間後で陰性対照群と比較して高値を示した。ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群と陰性対照群を、各々の時点ごとの群平均値としてTukey法による多重比較したところ、有意差が認められたが、ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群と先発品投与群間には有意差は認められなかった。

②跛行スコアの推移

ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群では起炎物質投与2時間後で両群のそれぞれ2例に軽度～中等度の跛行が観察されたが、残りの各1例には跛行が観察されなかった。起炎物質投与3時間後では両群の全例に最重度の跛行が観察されたが、4時間以降では全ての群で1～2例に明らかな軽減が認められた。ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群と陰性対照群を各々の時点ごとの群平均値としてTukey法による多重比較したところ、有意差が認められた。しかし、ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群と先発品投与群間には有意差は認められなかった。

図2、図3に負重率及び跛行スコアの推移成績を示した。



7. 結論

ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」投与群及び先発品投与群では陰性対照群と比較して負重率の低下抑制及び跛行の悪化の抑制が観察され、関節疼痛の発生の抑制が認められ、これらの両抑制効果は陰性対照群と比較して統計的に有意差が認められた。また、この抑制効果はヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」および先発品の両投与群間で有意差が認められず、同等の効果であることが確認された。

[Ⅲ. まとめ]

以上のように、ウサギ固定関節モデル及びイヌの尿酸疼痛モデルにおいて、同等の薬効薬理作用を有することが明らかになったことから、ヒアルロン酸Na関節注25mgシリンジ「NP」及び先発品は生物学的に同等であると結論した。

表4 イヌ膝関節における起炎物質(2%MSU)投与後の負重率と跛行スコアの推移

群	時間 動物番号	前		1		2		3		4		5		6	
		負重率 (%)	スコア	負重率 (%)	スコア	負重率 (%)	スコア	負重率 (%)	スコア	負重率 (%)	スコア	負重率 (%)	スコア	負重率 (%)	スコア
生理食塩液	211	100.0	0	64.5	1	0.0	4	0.0	4	0.0	4	0.0	4	0.0	4
	212	100.0	0	87.2	0	0.0	4	0.0	4	0.0	4	0.0	4	0.0	4
	213	100.0	0	132.7	0	34.0	2	0.0	4	0.0	4	0.0	4	0.0	4
	Mean	100.0	0.0	94.8	0.3	11.3	3.3	0.0	4.0	0.0	4.0	0.0	4.0	0.0	4.0
	S. E.	0.0	0.0	20.0	0.3	11.3	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
先発品	221	100.0	0	101.8	0	61.1	1	0.0	4	25.7	2	40.7	2	38.9	2
	222	100.0	0	101.3	0	121.4	0	0.0	4	0.0	4	0.0	4	28.3	3
	223	100.0	0	100.7	0	66.7	1	0.0	4	0.0	4	0.0	4	0.0	4
	Mean	100.0	0.0	101.3	0.0	83.1	0.7	0.0	4.0	8.6	3.3	13.6	3.3	22.4	3.0
	S. E.	0.0	0.0	0.3	0.0	19.2	0.3	0.0	0.0	8.6	0.7	13.6	0.7	11.6	0.5
ヒアルロン酸Na関節注 25mgシリンジ「NP」	231	100.0	0	94.8	0	51.0	2	0.0	4	25.8	3	37.4	3	25.8	3
	232	100.0	0	102.9	0	96.4	0	0.0	4	48.2	2	45.3	2	65.5	1
	233	100.0	0	93.9	0	40.9	2	0.0	4	0.0	4	0	4	0.0	4
	Mean	100.0	0.0	97.2	0.0	62.8	1.3	0.0	4.0	24.7	3.0	27.6	3.0	30.4	2.7
	S. E.	0.0	0.0	2.9	0.0	17.1	0.7	0.0	0.0	13.9	0.5	14.0	0.5	19.0	0.9

負重率データ

2元配置分散分析の結果、群間に有意差あり (p=0.002)

Tukeyの多重比較

[棄却限界値と()内に平均値の差を示す * : p<0.05. ** : p<0.01]

	先発品群	ヒアルロン酸Na関節注 25mgシリンジ「NP」群
生理食塩液群	16.10(-20.45) *	20.48(-22.74)*
	先発品群	16.10(- 2.29)

跛行スコアデータ

2元配置分散分析の結果、群間に有意差あり (p=0.001)

Tukeyの多重比較

[棄却限界値と()内に平均値の差を示す ** : p<0.01]

	先発品群	ヒアルロン酸Na関節注 25mgシリンジ「NP」群
生理食塩液群	0.822(0.889) **	0.822(0.944)**
	先発品群	0.647(0.056)