

ビーソフテン[®]油性クリーム 0.3%の 生物学的同等性試験

—モルモットおよびウサギを用いた薬力学的同等性の評価—

岩 間 秋 人¹⁾
鈴 木 陽 子¹⁾
西 堀 頼 史¹⁾
和 田 千 賀 子²⁾

Bioequivalence study of BESOFTEN OILY CREAM 0.3%

Akito IWAMA, et al: *New Drug Research Center, Inc*

はじめに

ヘパリン類似物質は、持続性のある高い保湿能と血液凝固抑制作用を有し、これを有効成分とするビーソフテン[®]クリーム 0.3%は血行促進・皮膚保湿剤として既に臨床で使用されている。ビーソフテン[®]クリーム 0.3%は水中油型の乳剤性基剤であり、ヒルドイド[®]クリーム 0.3%の後発医薬品である。

日医工^(株)が開発したビーソフテン[®]油性クリーム 0.3% [1 g 中にヘパリン類似物質 3.0 mg 含有 (油中水型)] は、先発医薬品であるヒルドイド[®]ソフト軟膏 0.3% (1 g 中にヘパリン類似物質 3.0 mg 含有) と同一有効成分を同量含有する同一剤型の製剤である。

今回、ビーソフテン[®]油性クリーム 0.3% (以下、「試験製剤」と略す) とヒルドイド[®]ソフト軟膏 0.3

% (以下、「標準製剤」と略す) の生物学的同等性を検証するため、「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」^{1)~4)} (以下、「同等性試験ガイドライン」と略す) に準じて、「モルモットを用いた紫外線紅斑抑制作用を指標とした薬力学的同等性の評価」、「ウサギを用いた血液凝固抑制作用を指標とした薬力学的同等性の評価」および「ウサギにおける皮膚一次刺激性試験」を^(株)新薬リサーチセンターにて実施した。

I. 試験方法

1. 使用薬剤

表 1 に使用した薬剤を示した。

2. モルモットを用いた紫外線紅斑抑制作用

1) 使用動物

雄性モルモット Slc : Hartley 系 (SPF) 3 週齢

1) 株式会社新薬リサーチセンター 2) 日医工株式会社 開発・企画本部

Key words : ヘパリン類似物質, 生物学的同等性試験, 薬力学的試験

表1 使用薬剤 (投与物質)

製 剤	試験薬剤	標準薬剤
販 売 名	ピーソフテン [®] 油性クリーム 0.3%	ヒルドイド [®] ソフト軟膏 0.3%
ロット番号	HEP03Cr-1	15806
製 造	日医工株式会社	マルホ株式会社
成分・含量	1 g 中にヘパリン類似物質 3.0 mg を含有	

表2 試験群の構成〈紫外線紅斑抑制作用〉

群	投与物質	投与量 (mg/body)	動物数 (匹)	動物番号
対 照	—	0	10	001 ~ 010
基 剤	基 剤	200×2*	10	101 ~ 110
試験薬剤	試験薬剤	200×2*	10	201 ~ 210
標準薬剤	標準薬剤	200×2*	10	301 ~ 310

* : 2回投与

46匹を日本エスエルシー(株)より入手した。動物は入荷日に耳パンチ法により個体識別を行い、入荷日から投与開始日まで馴化した。ただし、入荷日を0日として7日までの期間は検疫を行った。一般状態観察を毎日行い、体重を入荷翌日(1日)、3日および7日に測定した。

2) 試験方法⁵⁾

試験群の構成は、検疫・馴化期間の観察において一般状態に異常のなかった動物より、体重推移(入荷1日および7日)を基準に40匹選択し、表2に従い行った。

投与前日にモルモットの背部から左腹側部を電気バリカンおよびシェーバーで剃毛し、投与部位を設定した。

投与日の投与前には、投与部位を剃毛した。この剃毛した部位に直径10mmの小孔を開けた黒いゴム板を左腹側部にあて、その穴を中央とする2.5×4cmの広さに各投与物質を塗布した(図1)。塗布後1時間で、同部位の投与物質を皮膚に刺激を与えないように脱脂綿で拭き取ってから、再度各投与物質を塗布した。最終塗布1時間後、微温湯を含ませた脱脂綿で清拭し、塗布部位を同様の黒いゴム板で覆い紫外線を照射した。照射は、GL20SEランプ(三共電気(株): λ 280~320nm, λ max=306nm)を配列した照射装置を用い、約8cmの距離から8分間照射(総照射量約0.48Joules/cm²)した。

なお、対照群は塗布を行わない以外は各投与群と

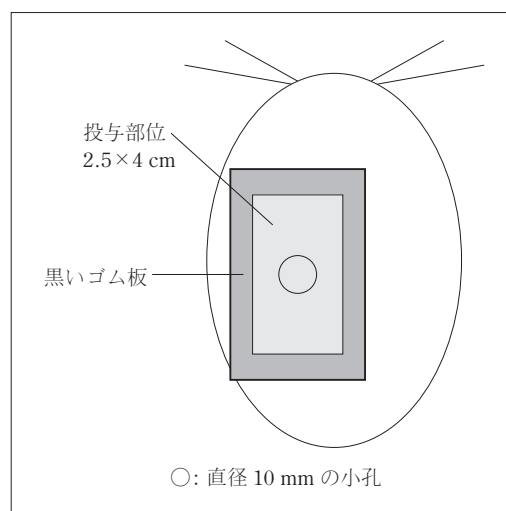


図1 塗布部位〈紫外線紅斑抑制作用〉

同様の操作を行った。

照射2時間後、照射部位判定において紅斑なし:0, わずかに紅斑が認められる:1, 境界不鮮明な明瞭な紅斑:2, 境界明瞭な紅斑:3として評点化した。

一般状態観察は投与日まで1日1回行った。

体重測定はパーソナル電子天秤を用い、投与日の投与前に行った。

3) 評価法・統計処理

得られた数値から各群で平均値と標準誤差を算出した。

各群間との有意差検定は、Mann-WhitneyのU検定を行った。有意水準は危険率5%および1%とした。試験薬剤群と標準薬剤群の検定結果に有意差が

表3 試験群の構成〈血液凝固抑制作用〉

群	投与物質	投与量 (mg/body)	動物数 (匹)	動物番号
試験製剤	試験製剤	3	27	001～027
標準製剤	標準製剤	3	27	101～127

認められない場合に、試験製剤と標準製剤は生物学的に同等と判断することとした。

3. ウサギを用いた血液凝固抑制作用

1) 使用動物

雄性ウサギ〔Kbs : JW (Healthy), 入荷時規格 : 体重 2.00 kg ~ 2.49 kg〕60 匹を北山ラベス(株)より入手した。動物は油性フェルトペンで耳介に番号(耳番号)を記入し個体識別し、入荷から投与前日まで馴化した。ただし、入荷日を0日として7日までの期間は検疫とした。検疫・馴化期間中は一般状態の観察を毎日行い、体重は動物はかりを使用して、入荷翌日(1日)、3日および7日に測定した。

2) 試験方法⁶⁾⁷⁾

試験群の構成は、検疫終了後にウサギの耳介静脈より採血した血液を用いて活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定し、そのAPTTを指標に、表3に従い層別連続無作為化法により行った。

ウサギの背部を除毛し、キシロカインゼリー2%による表面麻酔を施し、皮膚を2 cm 切開した。切開部より滅菌ガラス棒を挿入して皮膚と組織の空隙を作り、被験物質を埋没させた。その後切開部を縫合した。

投与後2, 4, 6, 24, 48 および72 時間に耳介静脈より採血し、APTTの測定を行った。

一般状態観察は、投与日から採血終了日(投与後72時間)まで1日1回行った。

体重測定は、投与日の投与前および採血終了日(投与後72時間)に行った。

3) 評価法・統計処理

得られた数値は各群で平均値および標準誤差を算出した。また、下記に従い統計解析を行った。

試験製剤および標準製剤間の生物学的同等性については「同等性試験ガイドライン」に準じて行った。すなわち、試験製剤および標準製剤において同等性判定パラメータである凝固時間の投与前からの変化量のAUCの対数変換値を指標として、分散分析およびその平均値の差の90%信頼区間の算出を

行い、生物学的同等性について検証した。なお、分散分析の有意水準は $\alpha = 0.05$ ないし0.10とした。各製剤間で、90%信頼区間が $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ の範囲にあるとき、生物学的に同等と判定することとした。

すべての統計学的解析は、SPSS14.0J (SPSS Inc.), Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corp.) およびOS (Windows 7, Windows XP) を用いて実施した。なお、同等性の検証については、SAS 9.3 (SAS Institute Japan 社) を用い実施した。

4. ウサギにおける皮膚一次刺激性試験

1) 使用動物

雄性ウサギ〔Kbs : JW (Healthy, スムーススキン), 入荷時規格 : 体重 3.00 kg ~ 3.49 kg〕7 匹を北山ラベス(株)より入手した。動物は油性フェルトペンで耳介に番号(耳番号)を記入し個体識別し、入荷から投与前日まで馴化した。ただし、入荷日を入荷0日として入荷7日までの期間は検疫とした。検疫・馴化期間中は一般状態の観察を毎日行い、体重は動物はかりを使用して、入荷翌日(1日)、3日および7日に測定した。

2) 試験方法

試験群の構成は、総無作為化法により、表4に従い行った。

投与経路は経皮投与(背部皮膚)とし、24時間投与を1回行った。

投与前日に電気バリカンで背部の毛を刈り、投与区分を4箇所設定した。投与区分は、内枠2.5×2.5 cm とし、四隅に油性フェルトペンで印を付けた。これを投与部位とした。その投与部位に5×5 cmの外枠を設定し四隅が判るような印を付けた。図2に示すように点対称となる2箇所を正常皮膚とし、残りの2箇所は損傷皮膚とした。

損傷皮膚は、投与日の投与前に作製した。シェーバーで軽く剃毛し府川らの方法⁸⁾に従いセロファンテープでストリッピングした。ストリッピングは3回とした。

表4 試験群の構成〈皮膚一次刺激性試験〉

群	投与物質				動物数 (匹)	動物番号
	区分1 (正常皮膚)	区分2 (損傷皮膚)	区分3 (損傷皮膚)	区分4 (正常皮膚)		
I	標準製剤		試験製剤		3	101～103
II	試験製剤		標準製剤		3	104～106

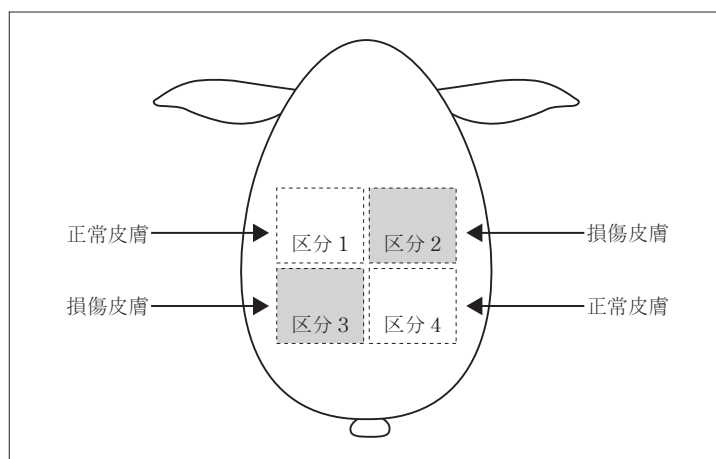


図2 塗布部位〈皮膚一次刺激性試験〉

投与方法は、投与物質を0.5 g量り取り2.5×2.5 cmのリント布に均一に塗り付けて投与区分に貼付した。その上から5×5 cmのテーピングテープを貼付して固定した。布製カバーを着せて胸を覆い、さらにチューブ型ネット包帯を上から着せて頸部に粘着性伸縮包帯を巻いて被覆固定した。

除去方法は、投与終了後に粘着性伸縮包帯、布製カバー、チューブ型ネット包帯、テーピングテープおよびリント布をゆっくり剥がした後、微温湯を含ませた脱脂綿で投与部位を清拭した。

一般状態観察は、投与日から観察期間終了日まで、1日1回行った。

体重測定は、投与日の投与前および観察期間終了日(投与物質除去後48時間)に動物はかりを用いて行った。また、刺激性の評価を延長した動物に関しては、観察期間終了日にも体重測定を行った。

3) 評価法・統計処理

投与日の投与前、投与物質除去後1, 24および48時間目に投与部位の肉眼的判定を行った。投与物質除去後48時間で刺激性反応がみられた動物(動物番号:101～103)は、刺激性反応が消失するまで観察した。判定はDraize⁹⁾の判定基準に準拠して、「A. 紅斑および痂皮の形成」および「B. 浮

腫の形成」をそれぞれ評価した。紅斑および浮腫は、投与部位の中で程度が最も強い部分について評価した。投与物質ごとに正常皮膚と損傷皮膚に分けて、各観察時点の「A. 紅斑および痂皮の形成」および「B. 浮腫の形成」の合計評点(TS)について平均値と標準偏差を算出した。また、正常および損傷皮膚のそれぞれ投与物質除去後1時間および投与物質除去後48時間の評価により一次刺激指数〔「A. 紅斑および痂皮の形成」と「B. 浮腫の形成」の合計評点の平均値, P.I.I., 最大8.0〕を算出し、反応の判定基準に従って刺激性の程度を判定した(表5; 式1)。

また、各判定時点の刺激性反応の評点について、投与物質ごとに正常皮膚と損傷皮膚に分けて、平均値と標準偏差を算出した。なお、有意差検定は実施しなかった。

II. 結果および考察

1. モルモットを用いた紫外線紅斑抑制作用

1) 一般状態観察および体重測定

観察期間中に死亡はなく、一般状態の変化も認められなかった。また、投与日の体重に異常は認められなかった。

表5 刺激性の評価〈皮膚一次刺激性試験〉

i) Draize の判定基準

	評点
A. 紅斑および痂皮の形成	
紅斑なし	0
ごく軽度の紅斑 (かろうじて識別できる)	1
明らかな紅斑	2
中等度から強度の紅斑	3
強度の紅斑 (深紅色) からの軽度の痂皮形成 (深部に及ぶ傷害)	4
紅斑の最大評点	4
B. 浮腫の形成	
浮腫なし	0
ごく軽度の浮腫 (かろうじて識別できる)	1
軽度の浮腫 (明らかに識別できる)	2
中等度の浮腫 (約1mmの隆起)	3
強度の浮腫 (約1mm以上隆起し, 投与部位周囲に及ぶ)	4
浮腫の最大評点	4
C. 合計評点 (TS) = A + B	

ii) 一次刺激指数 (P.I.I.) の算出

$$P.I.I. = \frac{TS(1i) + TS(48i) + TS(1a) + TS(48a)}{4} \dots\dots\dots (式1)$$

TS : 合計評点の平均値
 1 : 投与物質除去後1時間 48 : 投与物質除去後48時間
 i : 正常皮膚 a : 損傷皮膚

iii) 反応の判定基準

0 : 刺激性なし, 0 < P.I.I. < 2 : 軽度, 2 ≤ P.I.I. < 5 : 中等度, 5 ≤ P.I.I. ≤ 8 : 強度

表6 照射部位判定〈紫外線紅斑抑制作用〉

群	投与量 (mg/body)	動物数 (匹)	照射部位判定 ^{a)}
対 照	0	10	2.8 ± 0.1
基 剤	200 × 2*	10	2.5 ± 0.2
試験製剤	200 × 2*	10	1.1 ± 0.2**、##
標準製剤	200 × 2*	10	1.4 ± 0.2**、##

* : 2回投与 (平均 ± 標準偏差, n = 10)
 ** : p < 0.01, 対照群と比較して有意差あり (Mann-Whitney-U 検定)
 ## : p < 0.01, 基剤群と比較して有意差あり (Mann-Whitney-U 検定)
 試験製剤と標準製剤の比較では有意差なし (Mann-Whitney-U 検定)
^{a)} 0 : 紅斑なし
 1 : わずかに紅斑が認められる
 2 : 境界不鮮明な明瞭な紅斑
 3 : 境界明瞭な紅斑

2) 照射部位判定

結果を表6に示した。

対照群において8例に評点3, 2例に評点2が認められ, 平均評点値は2.8であった。

基剤群において5例に評点3, 5例に評点2が認められ, 平均評点値は2.5であった。

試験製剤群において3例に評点2, 5例に評点1および2例に評点0が認められ, 平均評点値は1.1

表7 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) および変化量曲線下面積 (AUC) 〈血液凝固抑制作用〉

群	動物数	投与前	投与後 2時間	投与後 4時間	投与後 6時間	投与後 24時間	投与後 48時間	投与後 72時間	AUC (0 h → 72 h)
試験製剤 (3 g/body)	27	19.8 ± 0.3	21.8 ± 0.6	25.4 ± 0.7	28.2 ± 0.7	27.1 ± 0.8	20.5 ± 0.6	20.1 ± 0.6	275.2 ± 22.6
標準製剤 (3 g/body)	27	19.8 ± 0.4	22.7 ± 0.5	26.2 ± 0.8	28.3 ± 0.8	26.8 ± 0.8	20.4 ± 0.5	20.0 ± 0.6	268.7 ± 22.8

(sec, 平均 ± 標準偏差, n = 27)

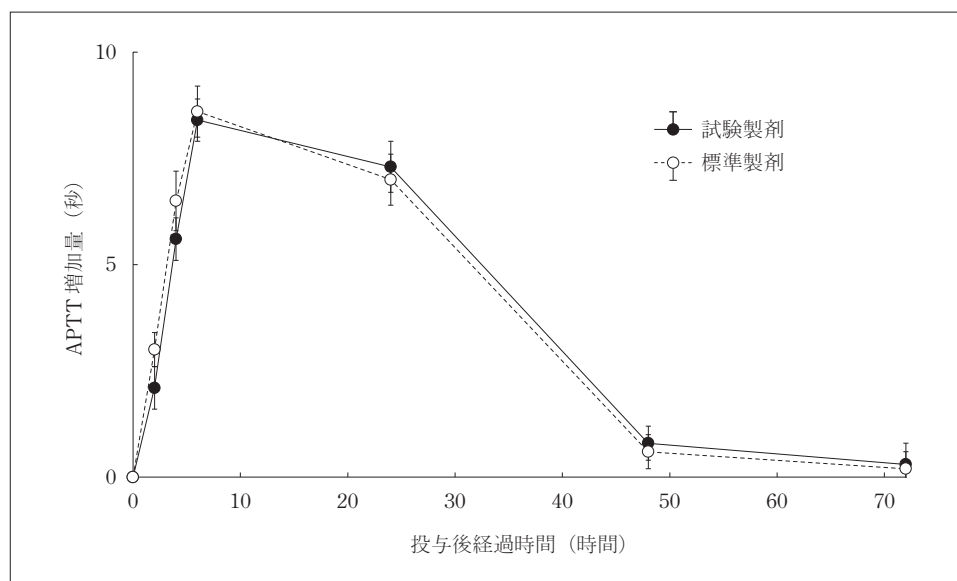


図3 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 変化量 〈血液凝固抑制作用〉

であった。

標準製剤群において4例に評点2, 6例に評点1が認められ, 評点平均は1.4であった。

各群比較の有意差検定において, 対照群と基剤群には有意差は認められなかった。対照群と比較し試験製剤群および標準製剤群には各々有意な低値が認められた。また, 基剤群と比較した試験製剤群および標準製剤群にも各々有意な低値が認められた。試験製剤群と標準製剤群には, 有意な差は認められなかった。

2. ウサギを用いた血液凝固抑制作用

1) 一般状態観察および体重測定

観察期間中に死亡はなく, 一般状態の変化も認められなかった。また, 観察期間中に投与の影響と思われる体重の変化は認められなかった。投与日の投与前は2.08 ~ 2.64 kg, 観察期間終了日(投与後72時間)は2.21 ~ 2.72 kgであった。

表8 90%信頼区間 〈血液凝固抑制作用〉

	90%信頼区間
log(AUC)	log(0.80) ~ log(1.20)

2) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 血液凝固時間の測定

結果を表7に示した。

試験製剤群および標準製剤群では, 投与後2 ~ 24時間にAPTTの延長傾向が認められ, 投与後48時間以降は投与前とほぼ同様の値を示した。

試験製剤群では, 投与前の値が 19.8 ± 0.3 秒を示し, 投与後6時間の 28.2 ± 0.7 秒を最高値として延長傾向が認められ, 投与後72時間には 20.1 ± 0.6 秒を示した。

標準製剤群では, 投与前の値が 19.8 ± 0.4 秒を示し, 投与後6時間の 28.3 ± 0.8 秒を最高値として延長傾向が認められ, 投与後72時間には $20.0 \pm$

表9 刺激性の評価 (A. 紅斑および痂皮の形成) <皮膚一次刺激性試験>

群		投与前	1時間後	24時間後	48時間後	3日後	P.I.I.
標準製剤	正常皮膚	0.0 ±0.0	1.8 ±0.4	1.3 ±0.8	0.3 ±0.5	0.0 ±0.0	1.0
	損傷皮膚	0.0 ±0.0	1.7 ±0.5	1.2 ±0.8	0.3 ±0.5	0.0 ±0.0	
試験製剤	正常皮膚	0.0 ±0.0	1.7 ±0.5	1.0 ±0.0	0.2 ±0.4	0.0 ±0.0	0.9
	損傷皮膚	0.0 ±0.0	1.3 ±0.5	1.0 ±0.6	0.3 ±0.5	0.0 ±0.0	

B. 浮腫の形成はいずれも浮腫なしであったため, C. 合計評点 (TS) = A とする。

0.6秒を示した。

試験製剤群と標準製剤群の生物学的同等性について, 2群の凝固時間の投与前からの変化量を図3に示し, さらにそのAUCを求めた(表7)。試験製剤群では, 275.2 ± 22.6 , 標準製剤群では 268.7 ± 22.8 であった。凝固時間の投与前からの変化量のAUCの対数値の平均値の差の90%信頼区間を求め, 表8に示した。90%信頼区間は $\log(0.80) \sim \log(1.20)$ であった。

3. ウサギにおける皮膚一次刺激性試験

1) 一般状態観察

観察期間中に死亡はなく, 一般状態の変化も認められなかった。

2) 体重測定

投与日の投与前は 3.20 ~ 3.46 kg, 投与物質除去後 48時間は 3.25 ~ 3.51 kg であった。また, 観察期間を延長した動物の観察期間終了日(投与物質除去後3日)は 3.37 ~ 3.48 kg であった。

3) 刺激性の評価

結果を表9に示した。

(1) 試験製剤 (正常皮膚)

試験製剤投与の正常皮膚では, 投与物質除去後1時間より, 全例(6/6例)に評点1~2の紅斑が認められた。投与物質除去後24時間に, 全例(6/6例)で評点1の紅斑となり, 投与物質が除去後48時間に5/6例で紅斑が消失したが, 1/6例で評点1の紅斑が認められた。観察期間を延長した投与物質除去後3日に1/1例で紅斑が消失した。

(2) 試験製剤 (損傷皮膚)

試験製剤投与の損傷皮膚では, 投与物質除去後1時間より, 全例(6/6)に評点1~2の紅斑が認め

られた。投与物質除去後24時間に, 1/6例で紅斑が消失したが, 5/6例で評点1~2の紅斑が認められた。投与物質除去後48時間に3/5例で紅斑が消失したが, 2/5例で評点1の紅斑が認められた。観察期間を延長した投与物質除去後3日に2/2例で紅斑が消失した。

(3) 標準製剤 (正常皮膚)

標準製剤投与の正常皮膚では, 投与物質除去後1時間より, 全例(6/6)に評点1~2の紅斑が認められた。投与物質除去後24時間に, 1/6例で紅斑が消失したが, 5/6例で評点1~2の紅斑が認められた。投与物質除去後48時間に3/5例で紅斑が消失したが, 2/5例で評点1の紅斑が認められた。観察期間を延長した投与物質除去後3日に2/2例で紅斑が消失した。

(4) 標準製剤 (損傷皮膚)

標準製剤投与の損傷皮膚では, 投与物質除去後1時間より, 全例(6/6)に評点1~2の紅斑が認められた。投与物質除去後24時間に, 1/6例で紅斑が消失したが, 5/6例で評点1~2の紅斑が見取られた。投与物質除去後48時間に3/5例で紅斑が消失したが, 2/5例で評点1の紅斑が認められた。観察期間を延長した投与物質除去後3日に2/2例で紅斑が消失した。

試験製剤の一次刺激指数(P.I.I.)は0.9と算出され, 「軽度」と判定された。

標準製剤の一次刺激指数(P.I.I.)は1.0と算出され, 「軽度」と判定された。

結 論

「モルモットを用いた紫外線紅斑抑制作用を指標

とした薬力学的同等性の評価」において、試験製剤群および標準製剤群は、対照群および試験製剤基剤群と比較しても各々有意な低値が認められ、試験製剤と標準製剤には紅斑抑制作用が示された。また、試験製剤群と標準製剤群の間には有意差が認められなかった。

「ウサギを用いた血液凝固抑制作用を指標とした薬力学的同等性の評価」においては、試験製剤群および標準製剤群に、投与後に活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の有意な延長が認められ、試験製剤群と標準製剤群の、血液凝固時間の投与前からの変化量の AUC の対数変換値の平均値の差の 90% 信頼区間が $\log(0.80) \sim \log(1.25)$ の範囲内であった。

さらに、「ウサギにおける皮膚一次刺激性試験」を実施したところ、ウサギの正常皮膚および損傷皮膚に対する皮膚刺激性は、試験製剤について、標準製剤と同等の「軽度」と判定された。

したがって、日医工(株)製ビーソフテン[®]油性クリーム 0.3% とマルホ(株)製ヒルドイド[®]ソフト軟膏 0.3% は生物学的に同等の品質を有していると判断

された。

文 献

- 1) 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 (医薬審第 487 号 平成 9 年 12 月 22 日)
- 2) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について (医薬審第 786 号 平成 13 年 5 月 31 日)
- 3) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について (薬食審査発第 1124004 号 平成 18 年 11 月 24 日)
- 4) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について (薬食審査発第 0229 第 10 号 平成 24 年 2 月 29 日)
- 5) Winder CV, Wax J, Burr V, et al: Arch Int Pharmacodyn Ther **116**: 261-293, 1958.
- 6) 石川浩一, 他: 外科 **17**: 849, 1955.
- 7) 日野志郎, 他: 新訂 臨床検査講座 21 臨床血液学, 医歯薬出版, 東京, 1996.
- 8) 府川和永, 伊藤義彦, 大林繁夫, 他: 刺激性試験法に関する研究 (第 2 報) 外用散剤の皮膚刺激性試験法の確立. 薬学雑誌 **102**: 89-98, 1982.
- 9) Draize JH: Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics. Association of Food and Drug Officials of the United States, Texas, 1959.