

ロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠 (T197T) の 自然発症高血圧ラットにおける降圧作用及び利尿作用の評価 並びに SD ラットにおける急性毒性の評価

Meiji Seika ファルマ株式会社

矢 來 幸 弘 打 田 光 宏 柴 崎 義 明
平 塚 一 幸 梅 木 祐 仁

要 旨

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発中のロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠 (開発番号 T197T; 以下, 試験製剤) は, アンジオテンシン II 受容体阻害薬 (ARB) であるロサルタンカリウムとサイアザイド系利尿薬であるヒドロクロロチアジドとの配合剤であり, 高血圧症治療薬であるプレミネント[®]配合錠 (MSD 株式会社: 以下, 標準製剤) と有効成分を同量含有する同一剤型の後発医薬品である。

本稿では, 自然発症高血圧ラット (SHR) を用いて, 試験製剤の降圧作用及び利尿作用を標準製剤と比較した。また, 両製剤の非臨床における安全性確認のために, SD 系雄性ラットを用いた急性毒性の評価を行った。

1) SHR を用いた降圧作用の評価

SHR に試験製剤及び標準製剤を, 有効成分であるロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジドとして, ロサルタンカリウム 5 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 1.25 mg/kg 及びロサルタンカリウム 15 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 3.75 mg/kg の 2 用量で, 1 日 1 回, 3 日間反復経口投与し, 初回投与日から最終投与 5 日後まで血圧及び心拍数を測定した。試験群は, 陰性対照群 (溶媒投与群), 試験製剤の低用量群及び高用量群, 並びに標準製剤の低用量群及び高用量群の合計 5 群とし, 各群の例数は 6 匹とした。血圧及び心拍数の測定は覚醒下で非観血的に行い, 評価には収縮期血圧及び心拍数を用いた。その結果, 試験製剤群及び標準製剤群では, 各用量で初回投与日から血圧が有意に低下し, 投与期間中は効果が持続した。最終投与終了後は両製剤群とも徐々に血圧が回復し, 投与終了後に投与前値よりも血圧が高くなるようなリバウンド現象は観察されなかった。一方, 試験製剤群と標準製剤群との比較では, 試験期間を通じて明らかな差は認められなかった。また, 試験製剤及び標準製剤ともに, 投与による心拍数への影響はみられなかった。

2) SHR を用いた利尿作用の評価

SHR に試験製剤及び標準製剤を, 有効成分であるロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジドとして, ロサルタンカリウム 15 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 3.75 mg/kg の用量で単回経口投与し, 投与後 5 時間の蓄尿量及び尿中電解質濃度 (Na⁺, K⁺ 及び Cl⁻) を測定した。試験群は, 陰性対照群 (溶媒投与群), 試験製剤群及び標準製剤群の 3 群とし, 各群の例数は 6 匹とした。その結果, 試験製剤群及び標準製剤群では尿量及び尿中電解質量が有意に増加し, 利尿作用が認められた。

3) SD 系ラットを用いた急性毒性の評価

SD 系ラットに試験製剤及び標準製剤を, 有効成分であるロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジドとして, ロサルタンカリウム 100 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 25 mg/kg の用量で単回経口投与し, 急性期の毒性を評価した。試験群は, 陰性対照群 (溶媒投与群), 試験製剤群及び標準製剤群の 3 群とし, 各群の例数は 3 匹とした。その結果, いずれの群にも死亡は認められず, 投与後の一般状態にも変化は認められなかった。体重は, 両製剤ともに陰性対照群と同様に推移し, 差は認められなかった。投与から 7 日後に実施した剖検では, いずれの群にも毒性所見は認められなかった。

以上より, SHR 及び SD 系ラットを用いた今回の評価において, ロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠 (T197T) は, プレミネント[®]配合錠と同様の有効性及び安全性を有していることが明らかとなり, 臨床においてプレミネント[®]配合錠と同様な治療効果を発揮することが期待される。

キーワード: ロサルタンカリウム, ヒドロクロロチアジド, 高血圧症, 配合剤, 後発医薬品

はじめに

プレミネント®配合錠はアンジオテンシンII受容体阻害薬 (ARB) であるロサルタンカリウム 50 mg とサイアザイド系利尿薬であるヒドロクロロチアジド 12.5 mg を配合した高血圧症治療薬である。ロサルタンカリウムは経口吸収後にその一部がカルボン酸体に代謝され、ロサルタンカリウム及びカルボン酸体の両化合物がアンジオテンシンII受容体のサブタイプである AT₁ 受容体に選択的に結合し、昇圧因子として作用するアンジオテンシンII に対して拮抗することにより、降圧作用を示すことが知られている¹⁾。一方、ヒドロクロロチアジドは尿細管におけるナトリウム再吸収を抑制し、循環血液量を減少させることにより降圧作用を示すと考えられている¹⁾。また、ヒドロクロロチアジドはその利尿作用によりレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の活性化を引き起こすことが知られている²⁾。ロサルタンカリウムは RAS 活性化状態で顕著な降圧作用を示すことが知られているため、ロサルタンカリウムとヒドロクロロチアジドの併用投与は、各単剤投与に比べてより顕著な降圧作用を示すと考えられている³⁾。

安全面においては、ヒドロクロロチアジドを単剤で使用した場合、高尿酸血症や血清カリウムの低下など副作用の発現が懸念されるが、ロサルタンカリウムは尿酸排泄促進作用やアルドステロン分泌低下作用によるカリウム上昇作用を有していることから、ヒドロクロロチアジドの副作用を軽減することが知られている³⁾。

したがって、ロサルタンカリウムとヒドロクロロチアジドの合剤は有効性及び安全性の両面から合理的であり、服薬錠数の減少による服薬コンプライアンスの改善にも貢献することが期待されている⁴⁾。

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発中のロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠 (開発番号 T197T; 以下、試験製剤) は、先発医薬品であるプレミネント®配合錠 (以下、標準製剤) と有効成分であるロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジドを同量含有する同一剤型の後発医薬品である。

本稿では、試験製剤の降圧作用及び利尿作用について、自然発症高血圧ラット (SHR) を用いて標準製剤と比較検討を行った。また、両製剤の非臨床

における安全性を確認するために、SD系ラットを用いた急性毒性試験を行った。

I. 材料及び試験方法

1. 使用薬剤

試験製剤としてロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠 (T197T, Meiji Seika ファルマ株式会社) を、標準製剤としてプレミネント®配合錠 (MSD 株式会社) を使用した。各製剤をメノウ乳鉢及び乳棒を用いて磨砕し、溶媒を用いて懸濁液を調製した。溶媒は、降圧作用及び急性毒性の評価では 0.5%メチルセルロース溶液を、利尿作用の評価では生理食塩液を使用した。

2. 使用動物

2-1. SHR (降圧作用)

雄性 SHR (SHR/Izm, 日本エスエルシー株式会社) を 6~7 日間の検疫・馴化飼育の後、11 週齢で試験に供した。動物は温度 22 ± 3°C, 相対湿度 50 ± 20%, 換気回数 10 回以上/時, 照明時間 7:00 ~ 19:00 の環境下で飼育し、飲料水は紫外線照射した山梨県北杜市公共水道水を、飼料は固型飼料 SP (株式会社フナバシファーム) を自由摂取させた。

2-2. SHR (利尿作用)

雄性 SHR (SHR/Izm, 日本エスエルシー株式会社) を 7 日間の検疫・馴化飼育の後、16 週齢で試験に供した。動物は温度 23 ± 2°C, 相対湿度 55 ± 10%, 換気回数 10 回以上/時, 照明時間 7:00 ~ 19:00 の環境下で飼育し、飲料水は塩素濃度 2 ppm 前後の塩素殺菌水を、飼料は固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。

2-3. SD系ラット

雄性 SD系ラット [CrI:CD(SD), 日本チャールス・リバー株式会社] を 7 日間の検疫・馴化飼育の後、6 週齢で試験に供した。動物は温度 23 ± 2°C, 相対湿度 55 ± 10%, 換気回数 10 回以上/時, 照明時間 7:00 ~ 19:00 の環境下で飼育し、飲料水は塩素濃度 2 ppm 前後の塩素殺菌水を、飼料は固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。

3. 動物倫理

SHR を用いた降圧作用の評価試験は、株式会社シミックバイオリサーチセンターで実施した。当施設は AAALAC (Association for Assessment and

Accreditation of Laboratory Animal Care International, 国際実験動物管理公認協会) の認証を取得しており, 本実験は試験施設の IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, 動物実験審査委員会) で審査・承認された方法で実施した。さらに, Meiji Seika ファルマ株式会社「動物実験管理に関する指針」に従い, 同社の動物実験管理委員会で審査・承認された方法で実施した。

利尿作用及び急性毒性の評価試験は, Meiji Seika ファルマ株式会社で実施した。厚生労働省通知 科発第 0601001 号 (平成 18 年 6 月 1 日)「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本方針」を遵守し, Meiji Seika ファルマ株式会社「動物実験管理に関する指針」に従い, 動物実験管理委員会で審査・承認された方法で実施した。

4. 試験方法

4-1. SHR を用いた降圧作用の評価

体重 257 ~ 293 g, 11 週齢で収縮期血圧が 160 mmHg 以上の雄性 SHR を用いた。試験群は, 陰性対照群, 試験製剤の低用量群及び高用量群, 並びに標準製剤の低用量群及び高用量群の合計 5 群とし, 各群の例数を 6 匹とした。試験製剤及び標準製剤の投与用量は, 有効成分であるロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジドとして低用量群でロサルタンカリウム 5 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 1.25 mg/kg, 高用量群でロサルタンカリウム 15 mg・ヒドロクロロチアジド 3.75 mg/kg とした。投与容量は 10 mL/kg とし, 午前 10 時頃に 1 日 1 回, 3 日間反復経口投与した。陰性対照群には溶媒である 0.5%メチルセルロース溶液を同様の方法で投与した。最終投与の翌日より 5 日間の休薬期間を設けた。

血圧及び心拍数は, 非観血自動血圧測定装置 (BP-98A 及び BP-98A-L, 株式会社ソフトロン) を用いて尾動脈の収縮期血圧及び心拍数を測定した。測定時点は, 投与期間中は投与 1 時間前 (午前 9 時頃), 投与 1, 3 及び 6 時間後とし, 休薬期間中は午前 9 時頃に 1 日 1 回とした。血圧及び心拍数測定中の SHR の保定装置は 38°C に設定した。

4-2. SHR を用いた利尿作用の評価

体重 300 ~ 330 g, 16 週齢の雄性 SHR を用いた。試験群は, 陰性対照群, 試験製剤群及び標準製

剤群の 3 群とし, 各群の例数を 6 匹とした。約 18 時間の絶食後, 試験製剤または標準製剤をロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジドとしてロサルタンカリウム 15 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 3.75 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与容量は 10 mL/kg とし, 各製剤投与後直ちに溶媒である生理食塩液を 15 mL/kg の容量で投与した。陰性対照群には溶媒を 25 mL/kg の容量で投与した。

代謝ケージを用いて投与直後から 5 時間の蓄尿サンプルを採取した。尿量及び尿中電解質濃度 (Na^+ , K^+ 及び Cl^-) を測定し, 各電解質の総量を算出した。

4-3. SD 系ラットを用いた急性毒性試験

体重 217 ~ 236 g, 6 週齢の雄性 SD 系ラットを用いた。試験群は, 陰性対照群, 試験製剤群及び標準製剤群の 3 群とし, 各群の例数を 3 匹とした。非絶食下で, 試験製剤または標準製剤をロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジドとしてロサルタンカリウム 100 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 25 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与容量は 10 mL/kg とした。陰性対照群には溶媒である 0.5%メチルセルロース溶液を同様の方法で投与した。投与翌日より 7 日間の休薬期間を設けた。

試験期間中は生死を含む一般状態観察及び体重測定を行い, 休薬最終日にイソフルラン麻酔下でラットを放血安楽死させた後, 剖検を行った。剖検の対象臓器は脳, 心臓, 脾臓, 肺, 気管, 食道, 胃, 小腸, 大腸, 膵臓, 肝臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 精巣, 前立腺, 精嚢, 胸腺, 甲状腺, 腸間膜リンパ節, 皮膚及び大腿部骨格筋とし, 肉眼的観察を行った。

5. 統計学的処理

5-1. SHR を用いた降圧作用の評価

収縮期血圧値及び心拍数の平均値及び標準誤差を算出した。各測定時点において, 陰性対照群と試験製剤の低用量群及び高用量群, 並びに陰性対照群と標準製剤の低用量群及び高用量群について, Dunnett の多重比較検定を実施した。検定には SAS[®] 9.1.3 Windows 版を使用し, 有意水準は両側 5%とした。

5-2. SHR を用いた利尿作用の評価

尿量及び尿中電解質量の平均値及び標準誤差を算出した。陰性対照群と試験製剤群間, 並びに陰性対照群と標準製剤群間で F 検定による等分散性の検

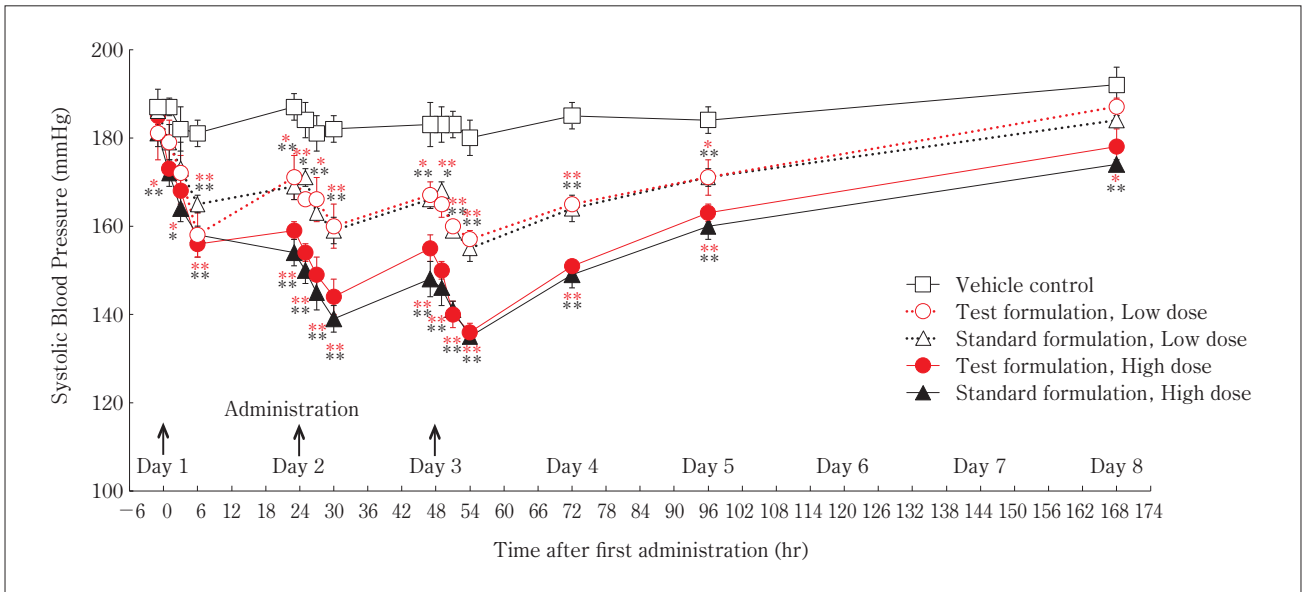


Figure 1 Effect of Losartan potassium • Hydrochlorothiazide on systolic blood pressure (SBP) in SHR

Each value represents the mean ± SE (n=6).

SBP was analyzed using Dunnett's test between vehicle control group and test formulation groups or standard formulation groups at the same time points.

P < 0.05 (two-tail) was considered statistically significant; *P < 0.05 and **P < 0.01 vs vehicle control group

Dosage: Low dose, Losartan potassium 5 mg/kg • Hydrochlorothiazide 1.25 mg/kg;

High dose, Losartan potassium 15 mg/kg • Hydrochlorothiazide 3.75 mg/kg

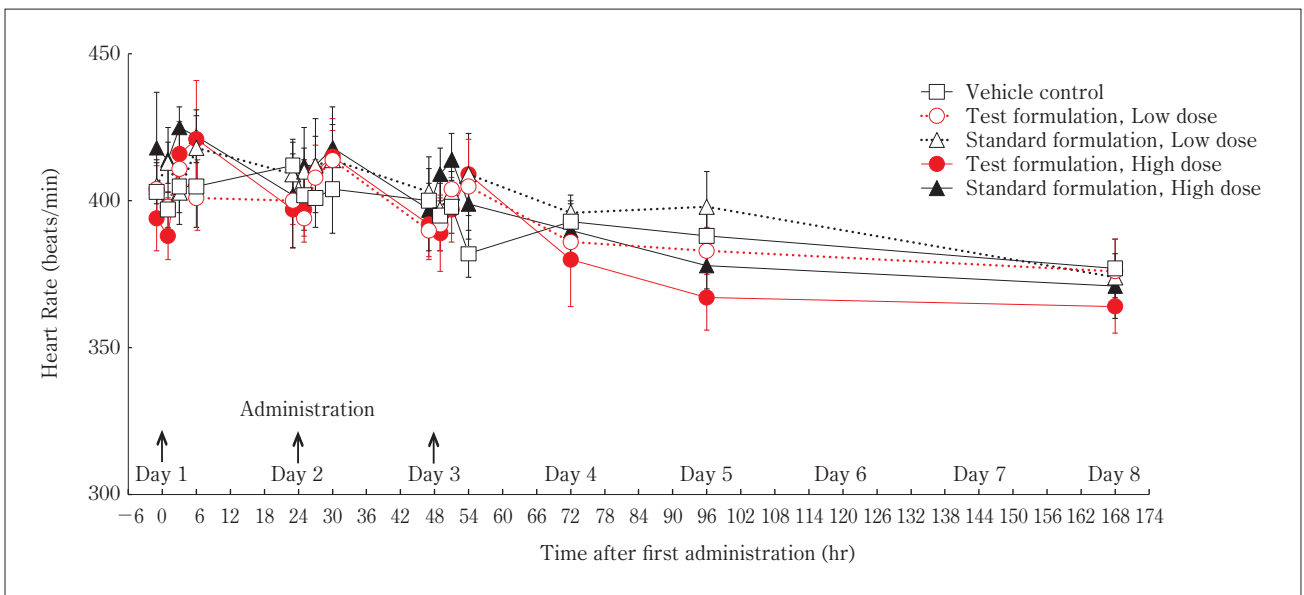


Figure 2 Effect of Losartan potassium • Hydrochlorothiazide on heart rate in SHR

Each value represents the mean ± SE (n=6).

No significant differences were noted from vehicle control group by Dunnett's test.

Dosage: Low dose, Losartan potassium 5 mg/kg • Hydrochlorothiazide 1.25 mg/kg;

High dose, Losartan potassium 15 mg/kg • Hydrochlorothiazide 3.75 mg/kg

定を行い、等分散の場合は Student の t 検定を、非等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定を実施した。検定には EXSAS Ver.8.0 (株式会社アームシステム) を使用し、有意水準は両側 5% とした。

5-3. SD 系ラットを用いた急性毒性試験

体重の平均値及び標準誤差を算出した。各測定時点において、陰性対照群と試験製剤群間、並びに陰性対照群と標準製剤群間で Student の t 検定を実施

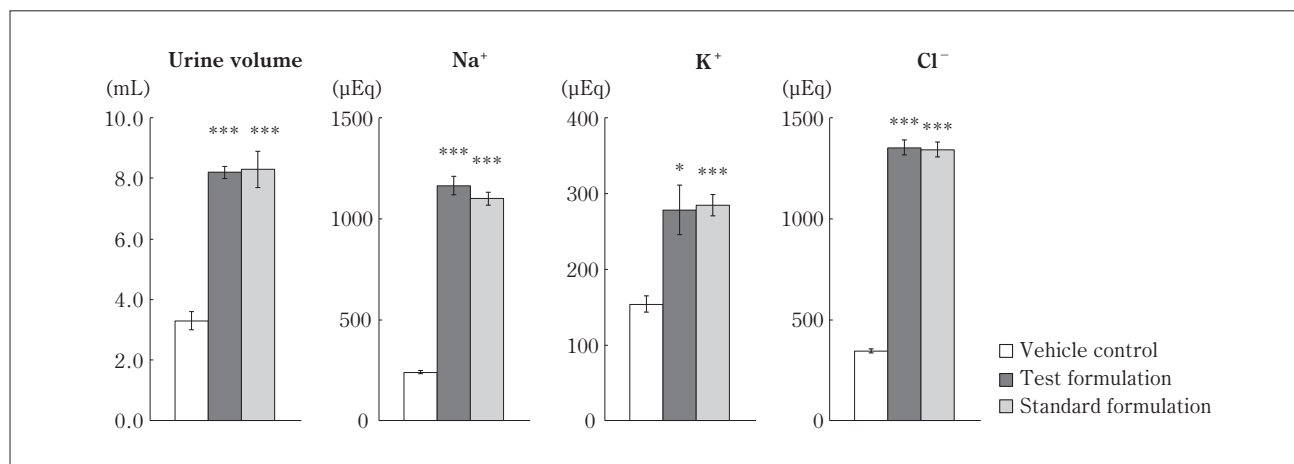


Figure 3 Effect of Losartan potassium · Hydrochlorothiazide on urinary volume and electrolyte excretion in SHR

Each value represents the mean ± SE (n=6).

Each parameter was analyzed using Student t-test or Aspin-Welch test after F-test for homoscedasticity.

P < 0.05 (two-tail) was considered statistically significant; *P < 0.05 and ***P < 0.001 vs vehicle control group

Dosage: Losartan potassium 15 mg/kg · Hydrochlorothiazide 3.75 mg/kg

Table 1 Clinical observation in SD rats treated with Losartan potassium · Hydrochlorothiazide

Group	Findings	Day 1					Day							
		Pre	IA	1 hr	2 hr	6 hr	2	3	4	5	6	7	8	
Vehicle control (0.5% MC)	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No remarkable changes	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Test formulation	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No remarkable changes	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Standard formulation	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No remarkable changes	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

IA, Immediately after administration; n, number of animals

Dosage: Losartan potassium 100 mg/kg · Hydrochlorothiazide 25 mg/kg

した。検定には EXSAS Ver.8.0 (株式会社アームシステックス) を使用し、有意水準は両側 5% とした。

II. 結 果

1. SHR を用いた降圧作用の評価

試験製剤群及び標準製剤群の血圧は、いずれの用量においても、初回投与後から陰性対照群に比べて低値を示し、有意差が認められた (Figure 1)。高用量群では、投与期間中はすべての測定時点において有意差がみられ、血圧の低下は低用量群に比べてより顕著であった。また、いずれの用量においても最終投与終了後は徐々に血圧が回復した。試験製剤群及び標準製剤群の比較では、本試験期間を通じて明らかな差は認められなかった。

また、試験製剤群及び標準製剤群の心拍数は、い

Table 2 Body weight change in SD rats treated with Losartan potassium · Hydrochlorothiazide

Group	Body weight (g)		
	Day 1	Day 4	Day 8
Vehicle control (0.5% MC)	228 ± 5	257 ± 4	285 ± 5
Test formulation	225 ± 4	254 ± 3	290 ± 4
Standard formulation	224 ± 4	253 ± 5	291 ± 4

Each value represents the mean ± SE (n=3).

Dosage: Losartan potassium 100 mg/kg · Hydrochlorothiazide 25 mg/kg

ずれの用量においても、すべての測定時点で陰性対照群と有意差はみられず、両製剤とも投与による心拍数への影響は認められなかった (Figure 2)。

2. SHR を用いた利尿作用の評価

試験製剤群及び標準製剤群では、陰性対照群に比

べて尿量及び尿中電解質量 (Na^+ , K^+ 及び Cl^-) が有意に増加した (Figure 3)。試験製剤群及び標準製剤群の比較では、明らかな差は認められなかった。

3. SD系ラットを用いた急性毒性の評価

いずれの群にも、投与日から剖検日まで死亡は認められず、一般状態の異常も認められなかった (Table 1)。体重は試験製剤群及び標準製剤群ともに、陰性対照群と同様に推移し、試験製剤群と標準製剤群の間に有意差は認められなかった (Table 2)。剖検において、いずれの群にも毒性所見は認められなかった。

III. 考 察

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発中のロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠 (T197T) は、選択的 AT_1 受容体ブロッカーであるロサルタンカリウムとサイアザイド系利尿薬であるヒドロクロロチアジドとの配合剤であり、高血圧症治療薬であるプレミネント[®]配合錠 (MSD 株式会社) の後発医薬品である。後発医薬品は、「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」に従い製剤評価 (溶出試験及びヒトでの生物学的同等性試験) を実施し、先発医薬品と同等であることが認められ、製造販売承認される医薬品である。さらに、後発医薬品はこれら承認申請に必要なデータの他に、可能な限り品質や治療効果、副作用に関する情報提供が必要と考えられる。本稿では試験製剤が非臨床において先発品と同様の有効性及び安全性を示すか検討した。有効性評価として SHR を用いた降圧効果及び利尿効果の評価を行い、安全性評価として SD 系ラットを用いた急性毒性の評価を行った。

SHR に試験製剤及び標準製剤をロサルタンカリウム 5 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 1.25 mg/kg 及びロサルタンカリウム 15 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 3.75 mg/kg の2用量で1日1回、3日間反復経口投与し、血圧及び心拍数を測定した。初回投与から血圧が有意に低下した。投与期間中は効果が持続し、最終投与終了後は両製剤群とも徐々に血圧が回復した。ロサルタンカリウムは SHR を用いた評価において、投与終了後に投与前値よりも血圧が高くなるようなリバウンド現象が観察されないこ

とが明らかとなっている³⁾。本稿においても、試験製剤及び標準製剤の両剤でリバウンド現象は認められなかった。一方、試験製剤と標準製剤の比較では、試験期間を通じて同様の血圧の推移をたどった。また、試験製剤及び標準製剤ともに、心拍数への影響はみられなかった。

SHR に試験製剤及び標準製剤をロサルタンカリウム 15 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 3.75 mg/kg の用量で経口投与し、投与後5時間の蓄尿量及び尿中電解質濃度 (Na^+ , K^+ 及び Cl^-) を測定した。その結果、両製剤群ともに尿量及び尿中電解質量が有意に増加し、同程度の利尿作用が認められた。

SD系ラットに試験製剤及び標準製剤をロサルタンカリウム 100 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 25 mg/kg の用量で経口投与し、一般状態観察、体重測定及び剖検を行った。その結果、一般状態に変化はなく、体重の推移及び剖検に異常は認められなかった。なお、本試験の投与用量であるロサルタンカリウム 100 mg/kg・ヒドロクロロチアジド 25 mg/kg は、成人の体重を 60 kg として換算した場合、ロサルタンカリウム 6000 mg・ヒドロクロロチアジド 1500 mg (=ロサルタンカリウム 100 mg/kg×60 kg, ヒドロクロロチアジド 25 mg/kg×60 kg) となり、プレミネント[®]配合錠の臨床での1日用量 (ロサルタンカリウム 50 mg・ヒドロクロロチアジド 12.5 mg¹⁾) の120倍の用量であった。

以上より、ロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド錠 (T197T) は、プレミネント[®]配合錠と同程度の有効性及び安全性を有していることが明らかとなり、臨床においてプレミネント[®]配合錠と同様な治療効果を発揮することが期待される。

参 考 文 献

- 1) プレミネント[®]配合錠, 添付文書, MSD 株式会社
- 2) Lijnen P, Fagard R, Staessen J, et al: Effect of chronic diuretic treatment on the plasma renin-angiotensin-aldosterone system in essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 12: 387-92, 1981
- 3) 藤原豊博: ロサルタンカリウム/ヒドロクロロチアジド合錠 (プレミネント[™]錠) の基礎と臨床. *薬理と治療* 35: 841-57, 2007
- 4) 森次幸男: 新薬の紹介 持続性 ARB/利尿薬合剤ロサルタンカリウム/ヒドロクロロチアジド (プレミネント[™]錠). *日本病院薬剤師会雑誌* 43: 250-1, 2007