

ピタバスタチンCa錠「明治」の 正常イヌ及びモルモット高脂血症モデルにおける 血中脂質低下作用

Meiji Seika ファルマ株式会社

打田 光宏 蓮沼 恵子 富岡 聡子
伊藤 富美 平塚 一幸 梅木 祐仁

要 約

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したピタバスタチンCa錠「明治」(試験製剤)は、高コレステロール血症及び家族性高コレステロール血症治療薬であるリパロ錠(興和株式会社, 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。

今回、正常イヌ及びモルモット高脂血症モデルを用いて、試験製剤の血中脂質に対する低下作用を標準製剤と比較検討した。

1) 正常イヌを用いた血中脂質低下作用

正常イヌを用いて、試験製剤又は標準製剤をピタバスタチンカルシウムとして1 mg/kg/日の用量で2週間反復経口投与したところ、血漿中総コレステロール、LDLコレステロール、トリグリセリド及びリン脂質値は経時的に低下し、どちらの製剤も投与前値に比べ有意な低下がみられた。投与終了時点の血漿中総コレステロールの低下率は、試験製剤群及び標準製剤群で、それぞれ26%及び24%と同程度であった。また、その低下は2週間の休薬により、投与前値と同程度まで回復した。

2) モルモット高脂血症モデルを用いた血中脂質低下作用

高脂肪食を給餌して作製したモルモット高脂血症モデルを用いて、試験製剤又は標準製剤をピタバスタチンカルシウムとして0.3及び3 mg/kg/日の用量で2週間反復経口投与したところ、どちらの製剤も溶媒投与群に比べ、血漿中総コレステロール及びLDLコレステロール値は用量依存的に低下した。3 mg/kg/日群における、投与終了時点の血漿中総コレステロールの低下率は、試験製剤群及び標準製剤群で、それぞれ86%及び94%と同程度であった。

以上より、正常イヌ及びモルモット高脂血症モデルにおいて、試験製剤は血中脂質に対する低下作用を示し、その程度は標準製剤と同程度であった。このことから、臨床においても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：ピタバスタチン、高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症、後発医薬品

【略語】 LDL : Low density lipoprotein, HMG-CoA : 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A, ALT : Alanine aminotransferase, AST : Aspartate aminotransferase, HDL : High density lipoprotein

はじめに

HMG-CoA還元酵素はコレステロール合成の律速酵素であり、HMG-CoA還元酵素阻害剤は、この働きを阻害することで肝臓のコレステロール合成を抑

制し、リポ蛋白分泌を抑制するとともに肝臓のLDL受容体数を増加させ、血中コレステロール量を低下させる¹⁾。

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したピタバスタチンCa錠1 mg「明治」及びピタバスタチン

Ca 錠 2 mg 「明治」(試験製剤)は、HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるリバロ錠 1 mg 及びリバロ錠 2 mg (興和株式会社, 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。

今回、試験製剤及び標準製剤の非臨床薬理学的な有効性の比較を行うために、正常イヌ及びモルモット高脂血症モデルを用いて両製剤の血中脂質に対する低下作用を評価した。

材料及び実験方法

1. 正常イヌを用いた血中脂質低下作用の検討

1-1. 使用薬剤

試験製剤としてピタバスタチン Ca 錠 2 mg 「明治」を、標準製剤としてリバロ錠 1 mg 及びリバロ錠 2 mg を使用した。

1-2. 使用動物

3～4歳の雄性ビーグル犬(Marshall BioResources社)を12頭使用した。飼料は固型飼料(ラボDストック, 日本農産工業株式会社)を毎日約250g給餌し、飲料水は水道水を自由に摂取させた。血漿中総コレステロール値、体重及び一般状態を基に、試験製剤又は標準製剤投与群(全2群)に1群6匹ずつ振り分けた。

1-3. 試験方法

(1) 投与

ピタバスタチンカルシウムとして1 mg/kgの用量となるように、試験製剤又は標準製剤を錠剤のままプルランカプセル0号(株式会社松屋)に充填し、1日1回2週間反復経口投与した。投与は午前中に実施した。試験製剤は体重に応じて2分割し、1 mg錠として使用した。投与直後に約10 mLの水道水を与え、カプセルの嚥下を促した。さらに、回復性の確認のため2週間の休薬期間を設定した。ピタバスタチンカルシウムをイヌに経口投与した時の有効用量範囲は、0.1～1 mg/kg/日と報告されていることから、両製剤の用量は1 mg/kg/日とした²⁾。薬剤投与開始日をDay 1、その前日をDay -1とした。

(2) 採血及び血液生化学検査

薬剤投与開始前に2回、投与期間及び休薬期間中は1週間に1回、ヘパリンを添加したシリンジを用いて橈側皮静脈から採血した。血漿を分取し、総コレステロール、LDLコレステロール、トリグリ

セリド、リン脂質、ALT及びASTを自動分析装置(TBA120-FR, 東芝メディカルシステムズ株式会社)を用いて測定した。

(3) 一般状態観察と体重測定

投与及び休薬期間中、一般状態観察は毎日、体重測定は1週間に1回実施した。

(4) 統計学的方法

群毎に平均値及び標準誤差を算出した。血液生化学検査の各項目に関して、各群の投与前値(Day -1)に対する投与期間中の測定値について、Paired-t検定を実施した。検定はEXSAS Ver.8.0(株式会社CACエクシケア)を用いて、有意水準は両側5%とし、5%未満($p < 0.05$)と1%未満($p < 0.01$)とに分けて表示した。

2. モルモット高脂血症モデルを用いた血中脂質低下作用の検討

2-1. 使用薬剤

試験製剤としてピタバスタチン Ca 錠 2 mg 「明治」を、標準製剤としてリバロ錠 2 mg を使用した。

2-2. 使用動物

7週齢のHartley系雄性モルモット(日本エスエルシー株式会社)を40匹用いた。高脂血症モデルを作製するために、高脂肪食として、15%パーム核油(不二製油株式会社, 脂肪酸組成; ラウリン酸48%, ミリスチン酸16%, オレイン酸16%)を含有させたRC-4固型飼料(オリエンタル酵母工業株式会社にて作製)を自由摂取させた。通常食コントロール群の動物には、RC-4固型飼料を自由摂取させた。4週間高脂肪食を給餌させた後、高脂肪食コントロール、試験製剤又は標準製剤(それぞれ0.3及び3 mg/kg/日)群に、体重、一般状態及び血液生化学検査値を基に1群6～7匹ずつ振り分けた。なお、高脂肪食の給餌は、薬剤投与期間中も継続した。

2-3. 試験方法

(1) 投与

試験製剤又は標準製剤をメノウ乳鉢及びメノウ乳棒を用いて磨砕した後、0.5 w/v%メチルセルローズ(MC)溶液を加えてピタバスタチンカルシウムとして0.06又は0.6 mg/mLの濃度に懸濁調製した。投与溶媒(0.5% MC溶液)、試験製剤又は標準製剤を1日1回14日間反復経口投与した。投与容量は5 mL/kgとし、投与は16:00～17:00に実施した。ピタバスタチンカルシウムをモルモットに

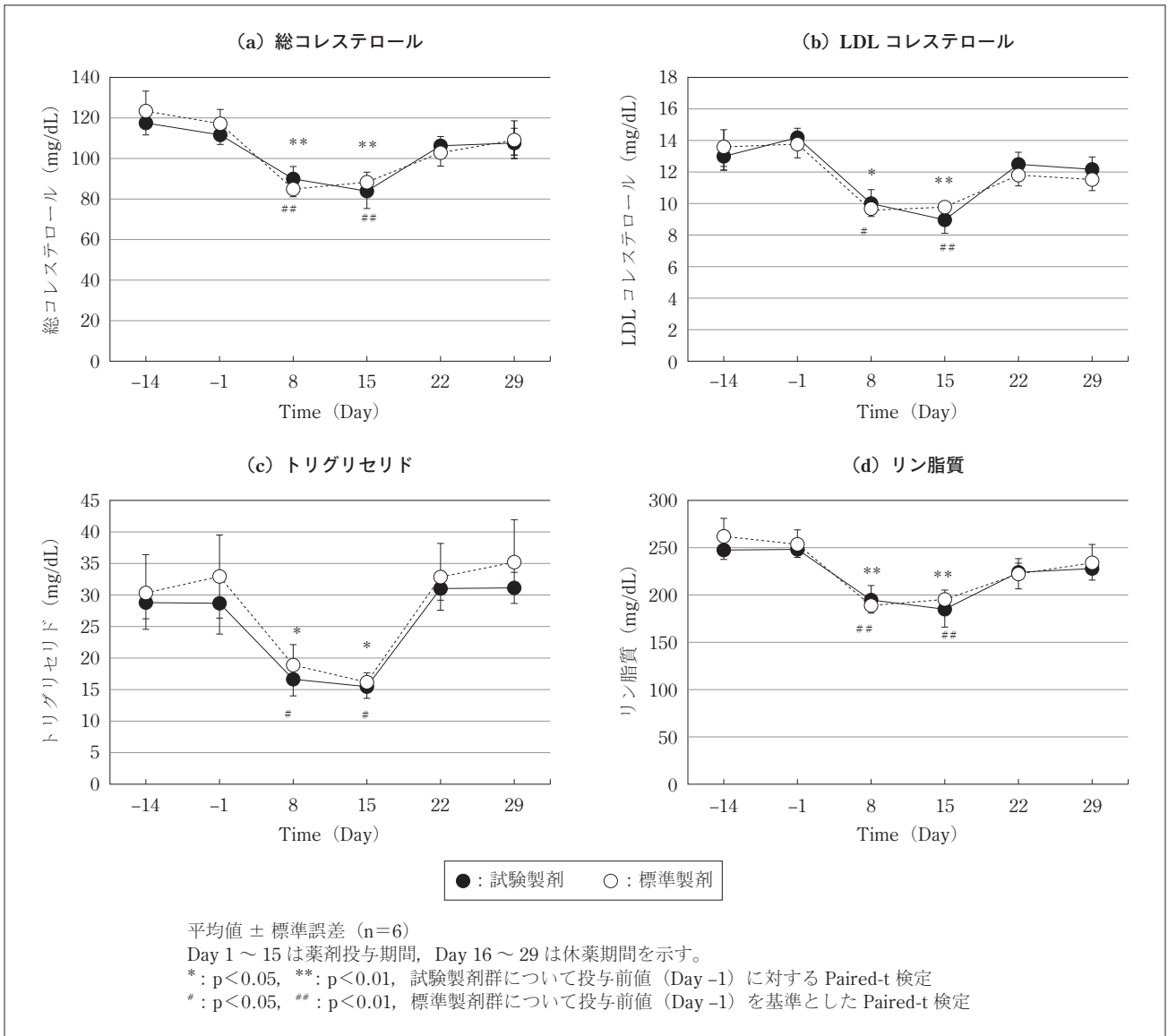


図1 正常イヌにおける試験製剤及び標準製剤の血漿中脂質パラメータに対する作用

経口投与した時の有効用量範囲は、0.3 ~ 3 mg/kg/日と報告されていることから、両製剤の用量は0.3及び3 mg/kg/日とした²⁾。高脂肪食の摂餌開始日をDay 1, その前日をDay -1, 薬剤投与開始日をDay 28とした。

(2) 採血及び血液生化学検査

高脂肪食の給餌開始前に1回 (Day -1), 高脂肪食給餌期間 (投与期間中含む) は1週間に1回, ヘパリンを添加したシリンジを用いて、頸静脈から採血した。血漿を分取し、総コレステロール, LDLコレステロール及びALTを自動分析装置で測定した。

(3) 一般状態観察, 体重及び摂餌量測定

高脂肪食開始から投薬期間終了まで, 一般状態観

表1 正常イヌにおける試験製剤及び標準製剤の体重, 血漿中ALT (U/L) 及びAST (U/L) に対する作用

項目	群	Day -1	Day 15	Day 29
体重	試験製剤	7.8 ± 0.3	7.8 ± 0.4	7.8 ± 0.3
	標準製剤	8.8 ± 0.5	8.5 ± 0.5	8.6 ± 0.6
ALT	試験製剤	49.3 ± 8.1	56.2 ± 9.8	43.5 ± 8.7
	標準製剤	35.0 ± 2.4	40.0 ± 2.4 ^{##}	33.5 ± 2.7
AST	試験製剤	53.2 ± 6.7	50.5 ± 5.3	44.5 ± 5.1
	標準製剤	36.3 ± 4.5	38.5 ± 3.3	30.7 ± 2.0

平均値 ± 標準誤差

^{##}: p < 0.01, 各群の投与前値 (Day -1) を基準とした Paired-t 検定

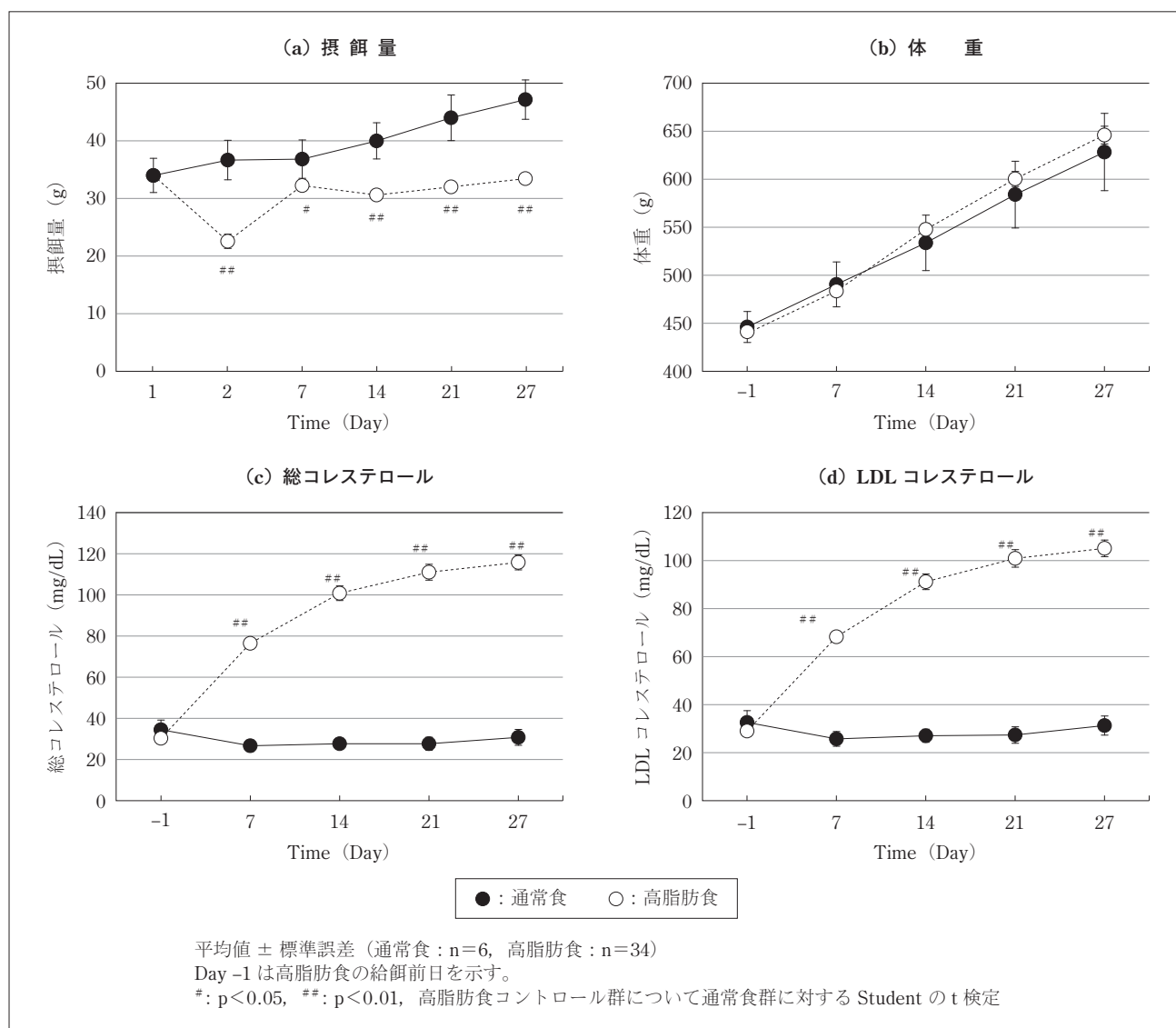


図2 モルモットの各種パラメータに対する高脂肪食給餌の影響

察は毎日、体重及び摂餌量測定は1週間に1回実施した。

(4) 統計学的方法

群毎に平均値及び標準誤差を算出した。通常食群及び高脂肪食コントロール群間で Student の t 検定を行い、高脂肪食コントロール群に対する試験製剤又は標準製剤群の間では、それぞれ Dunnett の多重比較検定を行った。検定は EXSAS Ver.8.0 を使用し、いずれの検定も有意水準は両側で 5% とし、5% 未満 ($p < 0.05$) と 1% 未満 ($p < 0.01$) とに分けて表示した。

3. 動物倫理

本試験は、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指針」を遵守し、Meiji Seika ファルマ株式会社の動物実験管理委員会で審査承認された方法に従い実施した。

結 果

1. イヌを用いた血中脂質低下作用の検討

試験製剤又は標準製剤の反復投与により、血漿中総コレステロール、LDL コレステロール、トリグリセリド及びリン脂質値は有意に低下した (図 1)。投与 2 週目の血漿中総コレステロールの低下率は、試験製剤群及び標準製剤群で、それぞれ 26% 及び 24% であった。また、これらの脂質パラメータの低下は 2 週間の休業により、全て投与前値まで回復した。試験期間を通して、両群とも一般状態及び体

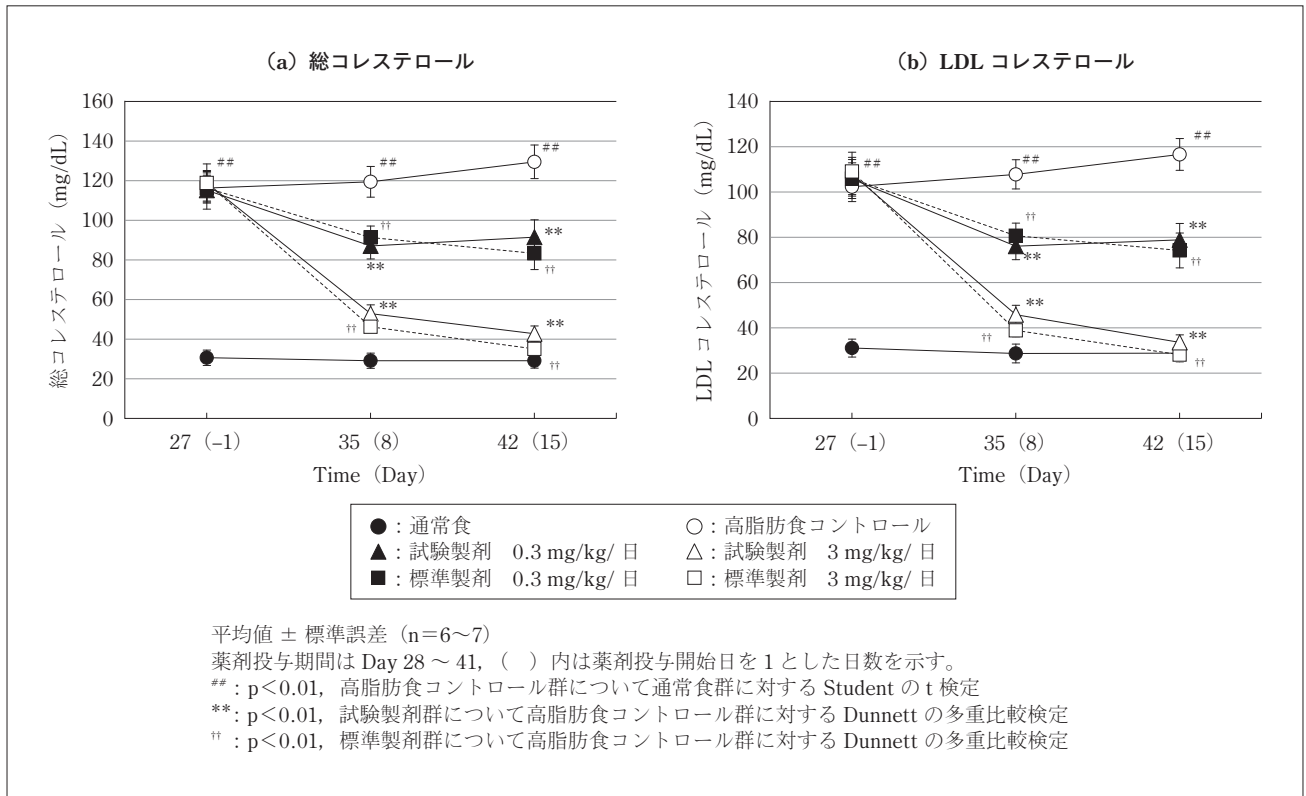


図3 モルモット高脂血症モデルにおける試験製剤及び標準製剤の血漿中総コレステロール及び LDL コレステロールに対する作用

重に変化はなかった。さらに、標準製剤群で Day 15 の ALT 値は、統計学的有意に増加したものの、施設背景データの範囲内であり、その程度は僅かであった (表1)。試験期間を通して、試験製剤又は標準製剤投与に起因した毒性を示唆する変化はみられなかった。

2. モルモット高脂血症モデルを用いた血中脂質低下作用の検討

既報³⁾を参考に、餌を通常食から高脂肪食に変更することで、高脂血症モデルを作製した。摂餌量は変更初日 (Day 1 ~ 2 の摂餌量) に大きく低下し、その後も通常食に比べ低値で推移した。高脂肪食群の体重は、通常食群に比べ、大きな差はみられなかったものの、高脂肪食群の血漿中総コレステロール及び LDL コレステロール値は経時的に増加した (図2)。試験製剤又は標準製剤の 0.3 及び 3 mg/kg/日の反復投与により、血漿中総コレステロール及び LDL コレステロール値は経時的かつ用量依存的に低下した。投与2週目の血漿中コレステロールの低下率は、試験製剤群及び標準製剤群の 3 mg/kg/日、それぞれ 86%及び 94%であった (図3)。高脂

表2 モルモット高脂血症モデルにおける試験製剤及び標準製剤の血漿中 ALT (U/L) に対する作用

群		Day 27 (-1)	Day 42 (15)
通常食		37.5 ± 1.3	56.5 ± 8.8
高脂肪食コントロール		104.4 ± 19.8 ^{##}	113.9 ± 20.5 [*]
試験製剤	0.3 mg/kg/日	71.2 ± 9.3	93.5 ± 17.7
	3 mg/kg/日	87.6 ± 16.8	74.6 ± 3.2
標準製剤	0.3 mg/kg/日	79.5 ± 15.6	87.7 ± 22.6
	3 mg/kg/日	81.7 ± 12.6	79.3 ± 8.5

平均値 ± 標準誤差

薬剤投与期間は Day 28 ~ 41

() 内は薬剤投与開始日を1とした日数を示す。

* : p<0.05, ** : p<0.01, 高脂肪食コントロール群について通常食群に対する Student の t 検定

肪食コントロール群の ALT 値は、通常食群に比べ、高値を示した (表2) が、全ての群で一般状態又は体重変動に異常は認められなかった。試験期間を通して、試験製剤又は標準製剤投与に起因した毒性を示唆する変化はみられなかった。

考 察

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるピタバスタチンカルシウムは、高脂血症患者並びに家族性高コレステロール血症患者に対して優れた血中コレステロール低下作用を示すことが報告されている¹⁾。今回、Meiji Seika ファルマ株式会社が後発医薬品として開発したピタバスタチンCa錠「明治」(試験製剤)が、イヌ及びモルモットにおいて血中脂質の低下作用を示すこと、その作用が有効成分を同量含有するリバロ錠(標準製剤)とほぼ同様であることを明らかにした。

イヌは錠剤をそのまま経口投与できる大型動物であり、より臨床での服薬に近い条件下で有効性を評価できることから、イヌを用いて血中脂質低下作用について、試験製剤と標準製剤とを比較した。試験製剤又は標準製剤を、ピタバスタチンカルシウムとして1 mg/kg/日の用量で2週間反復経口投与したところ、血漿中総コレステロール、LDLコレステロール、トリグリセリド及びリン脂質値は低下し、その程度はいずれのパラメータにおいても両製剤で同様であった。また、2週間の休薬により、全てのパラメータが投与前値まで回復したことから、これらの低下は薬剤の作用によるものであることが示唆された。また、イヌの一般状態、体重、ALT及びASTは、両製剤群とも試験期間を通して毒性学的に有意な変動がみられず、副作用を示唆する変化は認められなかった。

リポ蛋白の組成は動物種により大きく異なり、ラットやマウスではコレステロールのほとんどがHDLとして運搬されるが、ヒトやモルモットではコレステロールの大部分がLDLとして運搬されている²⁾³⁾。さらに、モルモットではリポ蛋白の代謝にlecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)、cholesteryl ester transfer protein (CETP) 及びLipoprotein lipase (LPL)などの脂質代謝酵素が関与していることが報告されており、ヒトと類似したリポ蛋白代謝であることが報告されている⁴⁾⁵⁾。このような類似性から、げっ歯類の中でもモルモットはヒトにおける血中脂質低下作用を類推するための試験系として適切であると考えられた。

そこで、モルモット高脂血症モデルを用いて、血中脂質の低下作用について検討した。試験製剤又は

標準製剤をピタバスタチンカルシウムとして0.3及び3 mg/kg/日の用量で2週間の反復経口投与したところ、血漿中総コレステロール及びLDLコレステロール値は用量依存的に低下し、その程度は両製剤で同様であった。また、モルモットの一般状態、体重、ALTは、両製剤群とも試験期間を通して、毒性学的に有意な変動はみられず、副作用を示唆する変化は認められなかった。

本試験のモルモット高脂血症モデルは、既報³⁾の方法を参考に作製した。高脂肪食群の摂餌量は、通常食群に比べ、餌を変更した初日に一時的に大きく低下し、その後も低値で推移した。通常食(RC-4固型飼料)を285 kcal/100 g、高脂肪食を381 kcal/100 gとして、摂取カロリーを算出したところ、高脂肪食給餌開始4週目(Day 27)の摂取カロリーは、通常食群で134 kcal/day、高脂肪食群で127 kcal/dayと、同程度であった。血漿中総コレステロール、LDLコレステロールはDay 27の時点で有意に高値を示したため、高脂血症病態は成立したと考えられた。本試験では、本モデルにおいて試験製剤の血中脂質に対する低下作用が示され、その程度は標準製剤と同様であることが確認された。

さらに、製剤の安全性評価として、6週齢SD系雄性ラットを用いて試験製剤及び標準製剤の単回投与毒性試験を実施した。一般状態、体重推移及び剖検による肉眼的所見について評価を行ったが、両製剤とも1 mg/kg(臨床最大用量の10倍以上)の用量において、何ら毒性を示す変化は認められなかった。このことから、標準製剤と比較して、試験製剤が重篤な毒性を示す可能性は低いと考えられた。

以上より、試験製剤は、正常イヌ及びモルモット高脂血症モデルにおいて標準製剤と同程度の有効性を示した。さらに、いずれの試験系においても副作用を示唆する変化は認められなかった。これらのことから、ピタバスタチンCa錠「明治」は、臨床においても標準製剤と同様の治療効果を発揮し、高コレステロール血症及び家族性高コレステロール血症の治療に貢献するものと期待される。

参 考 文 献

- 1) 山崎裕之, 藤野秀樹, 金澤瑞穂, 玉木太郎, 佐藤文泰, 鈴木幹夫, 北原真樹: 新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチン(リバロ錠)の薬理および薬物動態的

- 特徴と臨床効果. 日薬理誌 2004; **123**: 349-362.
- 2) 医療用医薬品の承認審査情報, 申請資料概要「リバロ錠 1 mg, リバロ錠 2 mg に関する資料」ホ. 薬理作用, 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 平成 15 年 7 月.
 - 3) Aoki T, Yamazaki H, Suzuki H, Tamaki T, Sato F, Kitahara M, Saito Y: Cholesterol-lowering effect of NK-104, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor, in guinea pig model of hyperlipidemia. *Arzneimittelforschung* 2001; **51**: 197-203.
 - 4) Fernandez ML, Conde AK, Ruiz LR, Montano C, Ebner J, McNamara DJ: Carbohydrate type and amount alter intravascular processing and catabolism of plasma lipoproteins in guinea pigs. *Lipids* 1995; **30**: 619-26.
 - 5) Fernandez ML: Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *J Nutr* 2001; **131**: 10-20.
-