

# クロピドグレル硫酸塩製剤の ラット及びウサギを用いた血小板凝集抑制作用の検討

Meiji Seika ファルマ株式会社

伊藤 富美      蓮沼 恵子      若林 翼      打田 光宏  
土屋 敏行      黒沢 亨      酒井 東日      三浦 哲也

## 要 旨

開発中のクロピドグレル硫酸塩製剤（試験製剤）は、抗血小板剤であるプラビックス<sup>®</sup>錠（サノフィ株式会社、標準製剤）と、有効成分クロピドグレルを同量含有する後発医薬品である。今回、標準製剤を比較対照として、試験製剤の血小板凝集抑制作用をラット及びウサギを用いて検討した。

### 1) ラットにおける血小板凝集抑制作用

試験製剤をクロピドグレルとして1.92, 3.83及び7.66 mg/kgの用量でラットに単回経口投与し、投与2, 6, 24及び48時間後に血小板凝集能を測定した。その結果、試験製剤は無処置と比較して用量依存的に血小板凝集を抑制した。1.92, 3.83及び7.66 mg/kg投与による血小板凝集の抑制は投与2または6時間後に最大となり、このときの抑制率はそれぞれ約30, 55及び70%であった。その後、血小板凝集の抑制は徐々に回復する傾向を示しながら投与48時間後まで持続した。この試験製剤の作用強度及び持続性は、標準製剤と同程度であった。

### 2) ウサギにおける血小板凝集抑制作用

試験製剤をクロピドグレルとして19.2 mg/kgの用量でウサギに単回経口投与し、投与2時間後に血小板凝集能を測定した。その結果、試験製剤は血小板凝集を投与前値と比較して約40%抑制した。この試験製剤の作用強度は標準製剤と同程度であった。

以上より、試験製剤はラット及びウサギにおいてプラビックス<sup>®</sup>錠と同様の血小板凝集抑制作用を示すことが明らかとなり、臨床においてプラビックス<sup>®</sup>錠と同等の治療効果を発揮することが期待される。

**キーワード** : クロピドグレル, 抗血小板剤, 血小板凝集, 虚血性脳血管障害, 虚血性心疾患, 末梢動脈疾患, 後発医薬品

## はじめに

クロピドグレル硫酸塩は、虚血性脳血管障害後の再発抑制、虚血性心疾患、末梢動脈疾患における血栓・塞栓の形成抑制に用いられる抗血小板剤であり、肝臓で活性代謝物に変換された後、adenosine 5'-diphosphate (ADP) 受容体であるP2Y<sub>12</sub>受容体を選択的かつ不可逆的に結合することにより血小板凝集を抑制する<sup>1)</sup>。

開発中のクロピドグレル硫酸塩製剤（試験製剤）

は、先発医薬品であるプラビックス<sup>®</sup>錠（標準製剤）と、有効成分クロピドグレルを同量含有する同一剤型の後発医薬品である。

本稿では、試験製剤の血小板凝集抑制作用を、ラット及びウサギを用いて標準製剤と比較検討した。

## 材料及び試験方法

### 1. 使用薬剤

試験製剤として開発中のクロピドグレル硫酸塩製

剤 75 mg 錠を、標準製剤としてプラビックス®錠 75 mg (サノフィ株式会社) を使用した。投与液については、試験製剤及び標準製剤をメノウ乳鉢を用いて破碎し、蒸留水 (株式会社大塚製薬工場) を溶媒として懸濁液を調製した。

## 2. 使用動物

ラットを用いた評価には、雌性 Sprague Dawley 系ラット [CrI:CD(SD), 日本チャールスリバー株式会社] を 7~9 日間の検疫・馴化飼育を行った後、投与時 11 週齢、体重 211~287 g で使用した。

ウサギを用いた評価には、雄性 New Zealand White 系ウサギ (Kbl:NZW, 北山ラベス株式会社) を 7 日間の検疫・馴化飼育を行った後、投与時 24 週齢、体重 3.2~3.4 kg で使用した。

動物は、温度 21~25°C、相対湿度 45~65%、換気回数 10 回以上/時間、照明時間 7~19 時の環境下で飼育した。飼料については、ラットに固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を、ウサギに固型飼料 RC4 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。飲料水については塩素濃度 2 ppm 前後の塩素殺菌水を自由摂取させた。

## 3. 動物倫理

本試験は、「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月法律第 105 号)」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月環境省告示第 88 号)」、「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月)」等の関連法規を遵守し、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後承認された方法で実施した (審査番号: B2014-017-0, B2014-019-0)。

## 4. 試験方法

### 4-1. ラットにおける血小板凝集抑制作用の評価

試験製剤をクロピドグレルとして 1.92, 3.83 及び 7.66 mg/kg の用量でラットに単回経口投与し、同用量の標準製剤を対照薬として血小板凝集抑制作用を評価した。投与用量は、ラットにおいてクロピドグレルの単回経口投与により血小板凝集の抑制が報告されている用量とした<sup>1)</sup>。投与容量は 10 mL/kg とした。動物数は各用量群の測定ポイント (投与 2, 6, 24 及び 48 時間後) 毎に 4 または 5 匹とした。対照群は無処置とし、5 匹を設定した。

血小板凝集能の測定は、対照群、試験製剤群及び

標準製剤群の全測定ポイントにおいて以下のように実施した。イソフルラン吸入麻酔下でラットの腹大動脈から 3.8% クエン酸ナトリウム処理 (1/10 量添加) により 5 mL 採血した。血液を 1000 rpm (150 × g), 25°C で 10 分間遠心して多血小板血漿 (PRP) を採取した。PRP 採取後の血液を 3000 rpm (1500 × g), 25°C で 10 分間遠心して乏血小板血漿 (PPP) を採取した。血小板数を  $3 \times 10^8$  cells/mL に調整した PRP に血小板凝集惹起剤を 1/20 量添加して血小板凝集能を測定した。測定には aggregometer MEBA-1 Model PAM-8T (SSR エンジニアリング株式会社製, メバニクス株式会社) を用い、比濁法<sup>2)3)</sup> により測定した。血小板凝集惹起剤には ADP (オリエンタル酵母工業株式会社製, 和光純薬工業株式会社販売) を用い、添加濃度を最終濃度 5  $\mu$ M とした。凝集反応を 8 分間測定し、最大凝集率を各検体の血小板凝集率とした。なお、測定は採血後 3 時間以内に行った。

また、対照群、試験製剤群及び標準製剤群について、血小板凝集能が最も低下した測定ポイント (投与 2 及び 6 時間後) の Prothrombin time (PT) 及び Activated partial thromboplastin time (APTT) を測定した。測定には CA-530 (シスメックス株式会社) を用い、PT は Quick 一段法、APTT はエラジン酸法により測定した。

### 4-2. ウサギにおける血小板凝集抑制作用の評価

試験製剤をクロピドグレルとして 19.2 mg/kg の用量でウサギに単回経口投与し、同用量の標準製剤を対照薬として血小板凝集抑制作用を評価した。投与用量は、ウサギにおいてクロピドグレルの単回経口投与により血小板凝集の抑制が報告されている用量とした<sup>1)</sup>。投与容量は 5 mL/kg とした。動物数は試験製剤群及び標準製剤群ともに 4 匹を設定し、測定ポイントは投与前及び投与 2 時間後とした。

血小板凝集能の測定は、以下のように実施した。無麻酔下でウサギの耳介動脈から 3.8% クエン酸ナトリウム処理 (1/10 量添加) により 5 mL 採血した。血液を 1000 rpm (150 × g), 25°C で 10 分間遠心して PRP を採取した。PRP 採取後の血液を 3000 rpm (1500 × g), 25°C で 10 分間遠心して PPP を採取した。測定条件及び方法並びに使用機器については、「4-1. ラットにおける血小板凝集抑制作用の評価」と同様とした。

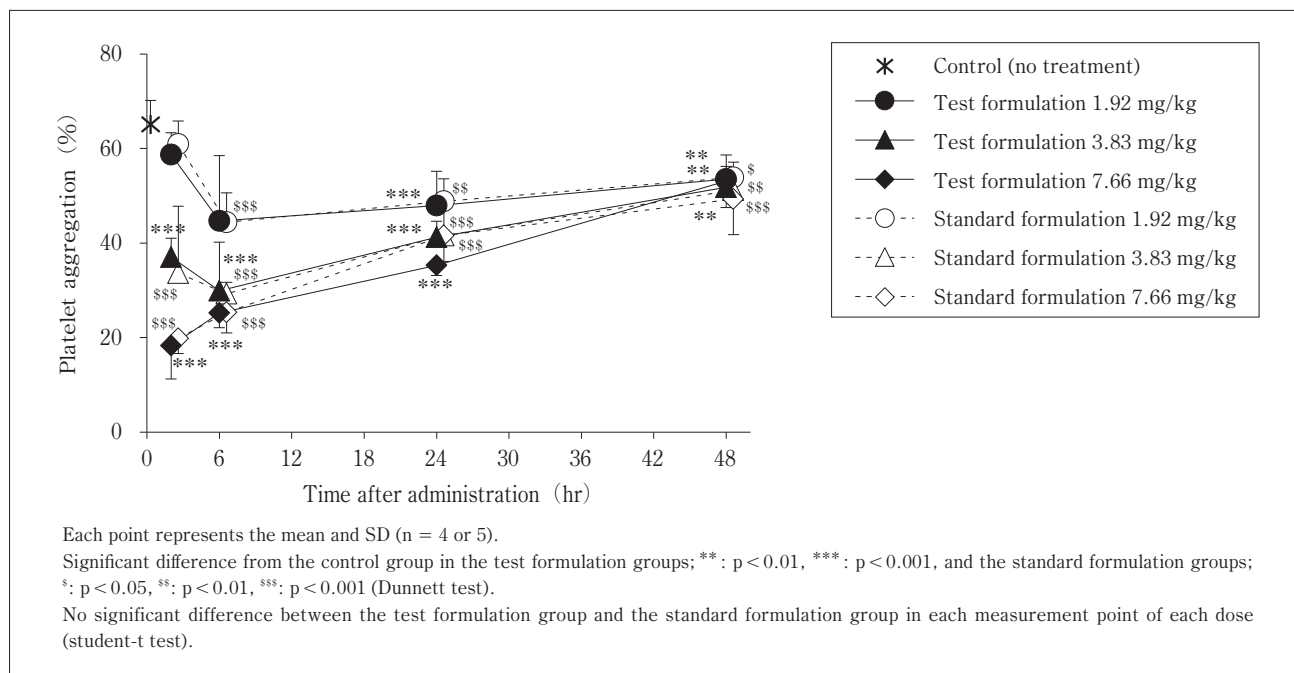


Fig. 1 Effect of the single oral administration of Clopidogrel on platelet aggregation in rats.

Table 1 PT and APTT in rats after the single oral administration of Clopidogrel.

Group		PT (sec)			APTT (sec)		
		0 hr <sup>a)</sup>	2 hr <sup>b)</sup>	6 hr <sup>b)</sup>	0 hr <sup>a)</sup>	2 hr <sup>b)</sup>	6 hr <sup>b)</sup>
Control(no treatment)		9.9 ± 0.3	—	—	15.4 ± 0.4	—	—
Test formulation	1.92 mg/kg	—	10.0 ± 0.4	10.0 ± 0.1	—	12.4 ± 1.5***	14.5 ± 0.8
	3.83 mg/kg	—	9.8 ± 0.2	10.0 ± 0.4	—	15.6 ± 0.6	16.1 ± 0.6
	7.66 mg/kg	—	10.0 ± 0.3	10.0 ± 0.6	—	14.5 ± 1.2	14.1 ± 1.1
Standard formulation	1.92 mg/kg	—	10.1 ± 0.4	10.0 ± 0.3	—	14.6 ± 0.8	14.2 ± 0.9 <sup>§§</sup>
	3.83 mg/kg	—	9.7 ± 0.2	10.0 ± 0.2	—	16.3 ± 0.4	16.5 ± 0.3 <sup>§</sup>
	7.66 mg/kg	—	10.2 ± 0.1	10.0 ± 0.2	—	15.5 ± 0.6	14.4 ± 0.4 <sup>§</sup>

Each value represents the mean ± SD (n = 5).

— : Not examined

a) PT and APTT was measured with no treatment in the control group.

b) Time after administration (hr)

Significant difference from the control group in the test formulation groups; \*\*\*: p < 0.001, and the standard formulation groups; §: p < 0.05, §§: p < 0.01 (Dunnett test).

また、血小板凝集能の測定と同じポイントで出血時間を測定した。無麻酔下で耳介にランセット (BD セーフティランセット, Catalog No.366594, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて傷を作製し出血させた。その後、30秒毎にろ紙で血液を吸い取り、ろ紙に血液が付着しなくなった時点を出血時間とした。

### 5. 統計学的処理

いずれの評価においても、各群の測定ポイント毎

に平均値及び標準偏差を算出した。検定には、EXSUS ver.8.0 (株式会社 CAC エクシケア) を用い、有意水準は両側 5%とした。検定方法を以下に示す。

#### 5-1. ラットにおける血小板凝集抑制作用の評価

試験製剤の各用量群、標準製剤の各用量群の血小板凝集率、PT及びAPTTについて、測定ポイント毎に対照群を基準にした Bartlett 検定による等分散性の評価を行い、等分散の場合は Dunnett の多重

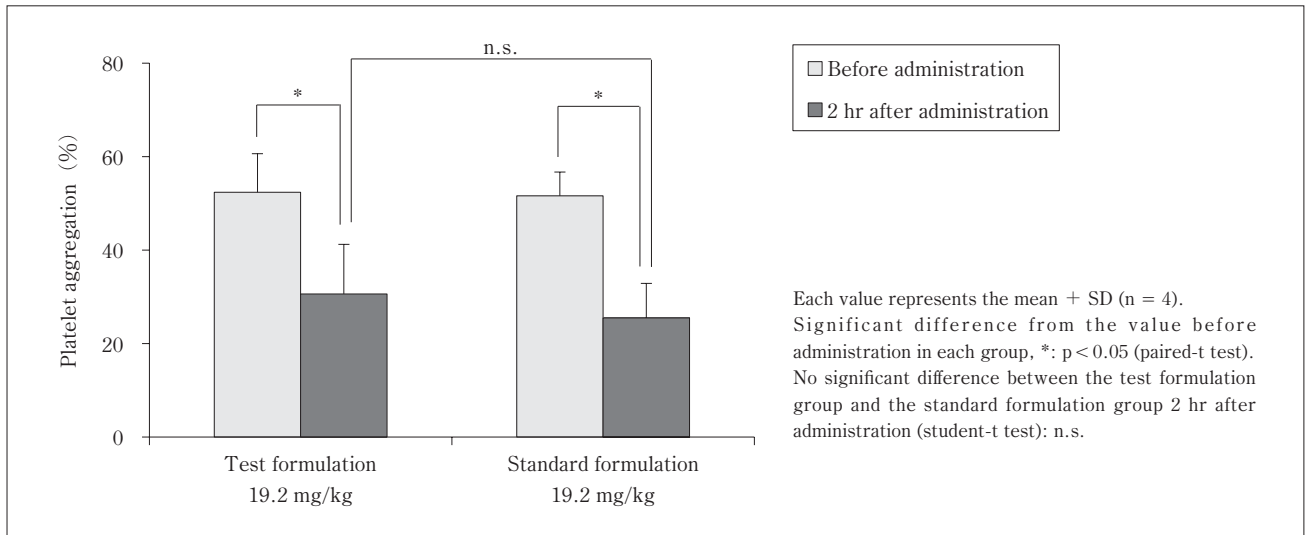


Fig. 2 Effect of the single oral administration of Clopidogrel on platelet aggregation in rabbits.

Table 2 Bleeding time in rabbits after the single oral administration of Clopidogrel

Group	Bleeding time (min)	
	Before administration	2 hr after administration
Test formulation 19.2 mg/kg	3.7 ± 0.8	3.5 ± 0.0
Standard formulation 19.2 mg/kg	3.8 ± 1.0	4.1 ± 1.8

Each value represents the mean ± SD (n = 3 or 4).

No significant difference from the value before administration in each group (paired-t test).

比較検定を、不等分散の場合はそれぞれのデータを対数変換して Dunnett の多重比較検定を行った。また、血小板凝集率については、試験製剤群及び標準製剤群の間で各用量の測定ポイント毎に student-t 検定を行った。

5-2. ウサギにおける血小板凝集抑制作用の評価

試験製剤群、標準製剤群の血小板凝集率及び出血時間について、群毎に投与前値を基準にした paired-t 検定を行った。また、投与2時間後の血小板凝集率について、試験製剤群及び標準製剤群の間で student-t 検定を行った。

結 果

1. ラットにおける血小板凝集抑制作用の評価

試験製剤群の血小板凝集率は、いずれの用量群においても対照群（無処置）と比較して投与2時間後から低下し、1.92 mg/kg 群では投与24時間後以降、3.83 及び 7.66 mg/kg 群ではすべての測定ポイントで有意な低下であった (Fig. 1)。血小板凝集

率は 1.92 及び 3.83 mg/kg 群では投与6時間後に、7.66 mg/kg 群では投与2時間後に最も低下し、このときの血小板凝集率は対照群が 64.9% であったのに対し、1.92, 3.83 及び 7.66 mg/kg 群ではそれぞれ 44.7, 29.9 及び 18.3% となった。その後、血小板凝集率の低下は徐々に回復する傾向を示しながら投与48時間後まで持続した。標準製剤群においても血小板凝集率は投与2または6時間後に最も低下し、このときの血小板凝集率は 1.92, 3.83 及び 7.66 mg/kg 群でそれぞれ 44.4, 29.3 及び 19.8% となった (Fig. 1)。この標準製剤群の血小板凝集率の低下は、その後の推移も含めて試験製剤群と同程度であった。試験製剤群と標準製剤群の間では、各用量のいずれの測定ポイントにおいても有意差は認められなかった。

PT 及び APTT については、試験製剤群及び標準製剤群のいずれの用量においても、投与2及び6時間後に対照群と比較して延長は認められなかった (Table 1)。なお、標準製剤 3.83 mg/kg 群の投与6

時間後にAPTTの有意な延長がみられたが、用量依存性のない軽度な変化であることから偶発的な変化と判断した。また、試験製剤1.92 mg/kg群の投与2時間後並びに標準製剤1.92及び7.66 mg/kg群の投与6時間後にAPTTの有意な短縮がみられたが、延長ではなく短縮であり、用量依存性もないことから意義のない変化と判断した。

## 2. ウサギにおける血小板凝集抑制作用の評価

試験製剤群の血小板凝集率は、投与前が52.4%であったのに対し投与2時間後には30.6%と有意に低下した (Fig. 2)。標準製剤群においても試験製剤群と同程度の有意な低下が認められ、投与前が51.6%であったのに対し投与2時間後には25.5%となった (Fig. 2)。また、投与2時間後の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。

出血時間については、試験製剤群及び標準製剤群のいずれにおいても、投与2時間後に投与前値と比較して延長はみられなかった (Table 2)。

## 考 察

開発中のクロピドグレル硫酸塩製剤 (試験製剤) は、抗血小板剤であるプラビックス®錠 (サノフィ株式会社、標準製剤) と、有効成分クロピドグレルを同量含有する後発医薬品である。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て製造販売承認される医薬品である。本稿では、治療効果に関する情報を提供するため、標準製剤を比較対照として試験製剤の血小板凝集抑制作用をラット及びウサギを用いて検討した。

試験製剤をクロピドグレルとして1.92, 3.83及び7.66 mg/kgの用量で雌性ラットに単回経口投与し、同用量の標準製剤を対照薬として血小板凝集抑制作用を評価した。投与2, 6, 24及び48時間後に採血して血小板凝集能を測定した結果、試験製剤群の血小板凝集はいずれの用量群においても投与2時間後から抑制された。血小板凝集の抑制は投与2または6時間後に最大となり、このときの1.92, 3.83及び7.66 mg/kg群の抑制率は対照群に対してそれぞれ約30, 55及び70%であった。その後、血小板凝集抑制は徐々に回復する傾向を示したが、作

用には持続性がみられ、投与48時間後まで有意な抑制が認められた。標準製剤群においても血小板凝集の抑制は投与2または6時間後に最大となり、1.92, 3.83及び7.66 mg/kg群の抑制率はそれぞれ約30, 55及び70%であった。この標準製剤群の血小板凝集抑制は、その後の推移も含めて試験製剤群と同程度であった。

クロピドグレルは肝臓で活性代謝物に変換された後、ADP受容体であるP2Y<sub>12</sub>受容体に選択的かつ不可逆的に結合することにより血小板凝集を抑制する<sup>1)</sup>。そのため、作用の持続時間は血小板の寿命に依存すると考えられている<sup>4)</sup>。今回のラットにおける評価では、試験製剤群及び標準製剤群いずれにおいても投与48時間後には血小板凝集率が対照群の80%まで回復した。臨床における血小板凝集率の回復は最終投与7～14日後であったと報告されており<sup>4)5)</sup>、ラットにおける回復はヒトより早いと考えられた。これは、血小板の寿命がヒトでは7～14日であるのに対し、ラットでは4～5日<sup>6)</sup>と短いためと考えられ、ラットにおける作用の持続時間はヒトの半分程度と推察された。

ラットにおいて血小板凝集の抑制が最大となった投与2及び6時間後にPT及びAPTTを測定したが、試験製剤群及び標準製剤群のいずれの用量群においても対照群と比較して延長は認められなかった。止血機構のひとつである血小板凝集を抑制すると出血傾向を引き起こす可能性があるが、作用が最大となった投与2または6時間後においても他の止血機構である凝固系に影響は認められなかった。これは、クロピドグレルの作用点がADP受容体であり、血液凝固カスケードには影響を及ぼさないためと考えられた。

ウサギにおいても血小板凝集抑制作用を評価した。試験製剤をクロピドグレルとして19.2 mg/kgの用量で雌性ウサギに単回経口投与し、同用量の標準製剤を対照薬として評価した。投与前及び投与2時間後に採血して血小板凝集能を測定した結果、試験製剤群の血小板凝集は投与2時間後に投与前値に対して約40%抑制された。標準製剤群においても同程度の血小板凝集抑制が認められた。

ウサギにおける出血時間については、試験製剤群及び標準製剤群のいずれにおいても投与2時間後に投与前値と比較して延長はみられなかった。血小板

凝集を抑制すると出血傾向を引き起こす可能性があるが、今回の条件では血小板凝集能が投与前（正常）の半分程度保持されていたため、明らかな出血傾向は誘発されなかったと考えられた。

さらに、製剤の安全性評価の一環として、雌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<sup>7)</sup>。両製剤をクロピドグレルとして50 mg/kgの用量でラットに単回経口投与した結果、一般状態、体重推移及び剖検において毒性を示す変化は認められなかった。このように、臨床最大用量の10倍に相当する50 mg/kgをラットに投与しても、試験製剤は標準製剤と同様に毒性を示さなかった。

以上のように、ラット及びウサギにおいて試験製剤の血小板凝集抑制作用が確認された。ラットでは用量反応性及び持続性も認められ、これらの作用は標準製剤と同程度であった。これらのことから、開発中のクロピドグレル硫酸塩製剤は臨床においても標準製剤と同等の治療効果を発揮するものと期待される。

#### 謝 辞

本研究実施にあたりご協力いただいた Meiji Seika フェル

マ株式会社の富岡聡子氏、川野有美氏及び柴崎義明氏に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 医薬品インタビューフォーム. 抗血小板剤 プラビックス<sup>®</sup>錠 25mg, プラビックス<sup>®</sup>錠 75 mg. 2014年9月改訂 (改訂第14版).
- 2) Born GV: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **194**: 927-929, 1962.
- 3) No authors listed: Platelet aggregation: Part II Some results from a new method of study. *J Clin Pathol* **15**: 452-455, 1962.
- 4) Kam PC, Nethery CM: The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical developments. *Anaesthesia* **58**: 28-35, 2003.
- 5) 佐藤志樹, 長谷川節雄: クロピドグレル反復投与後の血小板凝集能回復期間の検討—単施設, ランダム化, 二重盲検, プラセボ対照臨床試験—. *薬理と臨床* **22**: 7-20, 2012.
- 6) 谷本義文: 血液学—ヒトと動物の接点— (第1版). pp. 383-384. 清至書院, 東京, 1982.
- 7) Meiji Seika フェルマ株式会社: 社内資料, 2014.