

フルチカゾン点鼻液 50  $\mu$ g 「三和」 56 噴霧用  
生物学的同等性試験

(株) 三和化学研究所

2019.06 改訂

## 1. 緒言

ラット及びモルモットのアレルギー性鼻炎モデルを用い、抗原誘発鼻粘膜血管透過性亢進に対する抑制作用及び抗原誘発鼻腔抵抗増加に対する抑制作用についてフルチカゾン点鼻液 50  $\mu$ g「三和」56 噴霧用と薬物濃度が同じで、製剤の用量が 1/2 倍となっているフルチカゾン点鼻液 50  $\mu$ g「三和」28 噴霧用にて標準製剤（液剤、0.005%）との生物学的同等性を比較検討した。

## 2. 実施方法

### 2.1. 試験検体

試験製剤：フルチカゾン点鼻液 50  $\mu$ g「三和」28 噴霧用（製造番号：A）

標準製剤：フルナーゼ点鼻液（製造番号：FN2T1 グラクソ・スミスクライン株式会社）

いずれも 1 容器（4mL）中、フルチカゾンプロピオン酸エステル 2.04mg を含有する。

プラセボ：フルチカゾン点鼻液 50  $\mu$ g「三和」28 噴霧用よりフルチカゾンプロピオン酸エステルを除いて製した液（製造番号：B）

### 2.2. 使用動物

5 週齢の Brown Norway 系ラットの雌性動物及び 3 週齢の Hartley 系モルモットの雄性動物を購入し、予備飼育の後、一般状態および体重推移に異常がみられない動物を試験に使用した。

## 3. ラットの実験的アレルギー性鼻炎モデルにおける抗原誘発鼻粘膜血管透過性亢進に対する抑制作用

### 3.1. 試験方法

#### (1) 群構成

試験群	誘発の有無	投与液量	投与回数	使用匹数
生理食塩液	有	25 $\mu$ L/片鼻腔 (50 $\mu$ L/両鼻腔)	1	10
プラセボ	有	25 $\mu$ L/片鼻腔 (50 $\mu$ L/両鼻腔)	1	10
試験製剤	有	25 $\mu$ L/片鼻腔 (50 $\mu$ L/両鼻腔)	1	10
標準製剤	有	25 $\mu$ L/片鼻腔 (50 $\mu$ L/両鼻腔)	1	10

#### (2) 感作

EA(卵白アルブミン)/百日咳死菌懸濁液 4mg/2  $\times$  10<sup>10</sup> 個/mL をラットの前後肢皮下に注射針を取り付けた注射筒を用いて 4 分割（前足 0.1mL ずつ、後足 0.15mL ずつ）して 0.5mL 投与し、初回感作（感作 1 日）した。感作 6 日に EA/生理食塩液 0.5mg/0.5mL/animal を後肢大腿部に注射針を取り付けた注射筒を用いて、筋肉内投与し、追加感作した。

#### (3) 投与

被験物質の投与は、感作 10 日にマイクロシリンジを用いて EA/生理食塩液灌流開始 60 分前に 1 回行った。なお、投与液量は 25  $\mu$ L/片鼻（左右合計 50  $\mu$ L）とし、鼻腔内に投与した。

#### (4) 鼻粘膜血管透過性亢進作用の確認

1) 感作 10 日に動物にペントバルビタール溶液（40mg/mL/kg）を注射針を取り付けた注射筒を用いて腹腔内投与し、麻酔下で食道を結紮し、気道を切開した。切開した気管の肺側に気管カニューレを挿入し、鼻側にはマイクロチューブポンプに取り付けたチューブを挿入した。

- 2) 約 37°Cの生理食塩液を 0.25mL/min の流速で鼻腔内に灌流し、鼻吻から流出する液を以下の手順で採取した。
- 3) Period-1 : 生理食塩液を 10 分間灌流した。
- 4) Period-2 : 4%Brilliant blue/生理食塩液を 5mL/kg で尾静脈から注射針を取り付けた注射筒を用いて投与し、生理食塩液を 10 分間灌流した。
- 5) Period-3 : 1%EA/生理食塩液を 10 分間灌流した。
- 6) Period-4、Period-5、Period-6 : 再度生理食塩液を 30 分灌流し、10 分間毎に採取した。
- 7) 採取した各々の灌流液は、遠心分離 (約 4°C、3000rpm、10 分間) を行い、上清中の Brilliant blue 量を 620nm の波長で比色定量した。

### 3.2. 試験結果の解析方法

Period-2~6 の漏出色素量の曲線下面積 ( $AUC_{10-60min} [\mu g \cdot min]$ ) を主要評価項目とし、各 period における漏出色素量 [ $\mu g$ ] は参考データとした。

#### (1) 生理食塩液群とプラセボ群の比較

主要評価項目について、生理食塩液群とプラセボ群の 2 群間の平均の検定を行った。F 検定 (有意水準 25%) で等分散の確認後、Student の t 検定 (等分散の場合) または Welch の t 検定 (不等分散の場合) で検定した (いずれも有意水準、両側 5%)。ノンパラメトリックな手法を用いる場合は、Wilcoxon の順位和検定 (有意水準、両側 5%) とした。ここで、生理食塩液群に対するプラセボ群の平均の差が  $\pm 10\%$  の範囲内 (対数変換値の場合は  $\log(0.90) \sim \log(1.11)$  の範囲内) にあることを確認した後、次のプラセボ群と試験製剤群及びプラセボ群と標準製剤群のそれぞれの比較を行った。

#### (2) プラセボ群と試験製剤群及びプラセボ群と標準製剤群のそれぞれの比較

主要評価項目及び参考データについて、プラセボ群と試験製剤群及びプラセボ群と標準製剤群のそれぞれで 2 群間の平均の検定を行った。解析手法は、上記と同様とした。試験製剤又は標準製剤いずれかを投与した群がプラセボを投与した群に対して薬理作用に有意性を確認した場合に、次の試験製剤群と標準製剤群の比較を行った。

#### (3) 試験製剤群と標準製剤群の比較

主要評価項目について、試験製剤群と標準製剤群の 2 群間の平均の検定を行った。原則は対数変換とし、正規性に従い、F 検定 (有意水準 25%) で分散を確認後、Student の t 検定 (等分散の場合) または Welch の t 検定 (不等分散の場合) で有意性を検定し、有意差の認められない場合に同等とした。正規性が疑われるデータの場合はノンパラメトリックな手法を用いて同様に行った。

### 3.3. 結果及び考察

生理食塩液群及びプラセボ群では、抗原誘発後 (Period-3~6) の漏出色素量の平均値は、それぞれ 6.425~12.621  $\mu g$  及び 6.496~13.174  $\mu g$  と、抗原誘発前 (period-2) の漏出色素量の平均値 (生理食塩液群 : 1.822  $\mu g$ 、プラセボ群 : 1.563  $\mu g$ ) に比較して増加し、漏出色素量の曲線下面積 ( $AUC_{10-60min}$ ) の平均値は、それぞれ 382.72  $\mu g \cdot min$  及び 377.41  $\mu g \cdot min$  で、両群で同程度の鼻粘膜血管透過性亢進が認められた (表 1 及び図 1)。

一方、標準製剤群における抗原誘発後の漏出色素量の平均値は、period-3、4、5 及び

6で、それぞれ4.554、4.301、4.224及び3.399 $\mu\text{g}$ 、漏出色素量の $\text{AUC}_{10-60\text{min}}$ の平均値は163.81 $\mu\text{g}\cdot\text{min}$ で、いずれも生理食塩液群及びプラセボ群と比較して低値を示し、鼻粘膜血管透過性亢進が抑制された。試験製剤群においても、抗原誘発後の漏出色素量の平均値は、period-3、4、5及び6でそれぞれ、5.163、4.458、3.560及び3.484 $\mu\text{g}$ 、漏出色素量の $\text{AUC}_{10-60\text{min}}$ の平均値は165.81 $\mu\text{g}\cdot\text{min}$ で、いずれも標準製剤群と同程度であり、鼻粘膜血管透過性亢進が抑制された(表1及び図1)。

表2に示したように漏出色素量の $\text{AUC}_{10-60\text{min}}$ について、生理食塩液群とプラセボ群の比較では有意差は認められなかった。プラセボ群と試験製剤群及びプラセボ群と標準製剤群には有意差が認められ、試験製剤群と標準製剤群で漏出色素量増加に対する抑制効果が確認された。

各期の漏出色素量について、試験製剤群または標準製剤群とプラセボ群との比較を行った結果、Period-2及びPeriod-6では、試験製剤群及び標準製剤群ともにプラセボ群との間に有意差は認められなかった。一方、Period-3及びPeriod-4では、試験製剤群及び標準製剤群ともにプラセボ群との間に有意差が認められた。漏出色素量の $\text{AUC}_{10-60\text{min}}$ について試験製剤群と標準製剤群を比較したところ、両群間で有意差は認められず、両製剤の薬理学的同等性が確認された。

表1. 漏出色素量 ( $\mu\text{g}$ ) 及び  $\text{AUC}_{10-60\text{min}}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}$ ) 一覧表

群 \ 時間(分)	20	30	40	50	60	$\text{AUC}_{10-60\text{min}}$
生理食塩液	1.822 $\pm$ 0.261	12.621 $\pm$ 1.262	11.196 $\pm$ 1.563	9.422 $\pm$ 1.555	6.425 $\pm$ 1.046	382.72 $\pm$ 44.70
プラセボ	1.563 $\pm$ 0.322	13.174 $\pm$ 1.430	11.093 $\pm$ 1.518	8.664 $\pm$ 1.732	6.496 $\pm$ 1.205	377.41 $\pm$ 46.36
試験製剤	1.659 $\pm$ 0.291	5.163 $\pm$ 1.140	4.458 $\pm$ 1.092	3.560 $\pm$ 0.927	3.484 $\pm$ 0.853	165.81 $\pm$ 37.68
標準製剤	1.603 $\pm$ 0.283	4.554 $\pm$ 0.665	4.301 $\pm$ 0.815	4.224 $\pm$ 1.057	3.399 $\pm$ 0.881	163.81 $\pm$ 29.56

(Mean $\pm$ S.E., n=10)

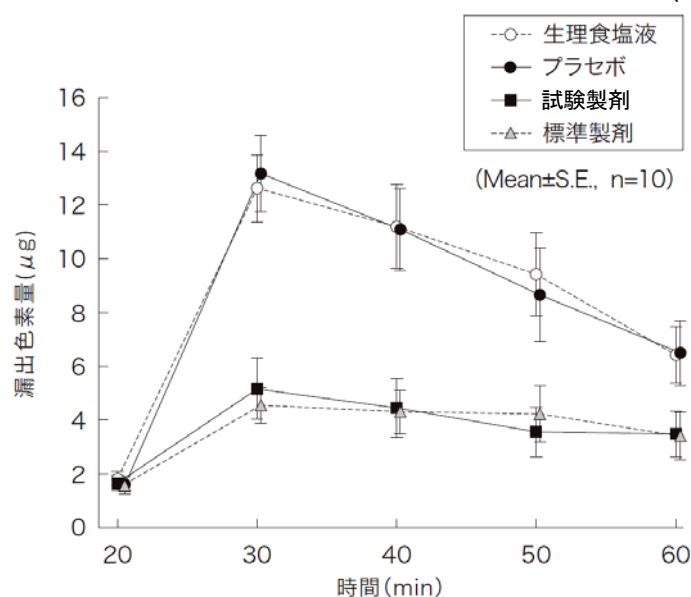


図 1. 漏出色素量の群別推移グラフ

表 2. t 検定の結果

群構成	有意差の検定					AUC <sub>10-60min</sub>
	Period-2	Period-3	Period-4	Period-5	Period-6	
生理食塩液 対 プラセボ						N. S.
プラセボ 対 試験製剤	N. S.	*	*	*	N. S.	*
プラセボ 対 標準製剤	N. S.	*	*	N. S.	N. S.	*
試験製剤 対 標準製剤						N. S.

N. S. : 有意差なし、\* : 有意差あり

Period-2~6 は、有意水準：等分散性の検定：0.25、Student 及び Welch の t 検定：0.01

AUC<sub>10-60min</sub> は、有意水準：等分散性の検定：0.25、Student の t 検定：0.05

以上のことから、試験製剤及び標準製剤は、ラットを用いた実験的アレルギー性鼻炎モデルにおける抗原誘発鼻粘膜血管透過性亢進に対する抑制効果を有し、薬理的に同等であると結論された。

#### 4. モルモットの実験的アレルギー性鼻炎モデルにおける抗原誘発鼻腔抵抗増加に対する抑制作用

##### 4.1. 試験方法

###### (1) 群構成

試験群	投与液量	投与回数	使用匹数
生理食塩液	50 $\mu$ L/片鼻腔(100 $\mu$ L/両鼻腔)	1	10
プラセボ	50 $\mu$ L/片鼻腔(100 $\mu$ L/両鼻腔)	1	10
試験製剤	50 $\mu$ L/片鼻腔(100 $\mu$ L/両鼻腔)	1	10
標準製剤	50 $\mu$ L/片鼻腔(100 $\mu$ L/両鼻腔)	1	10

###### (2) 抗血清の作製法

2mg/mL EA と FCA (フロイント完全アジュバント) 等量混合液を 1mL/匹の投与液量で背部皮下に投与した。投与回数は、4 日毎に 1 回、計 4 回とした。

最終感作日から 3 週間後に腹部大動脈から採血した。その後室温で約 30 分間放置し、さらに冷蔵 (4°C) で 4~5 時間放置した後、遠心分離した。分離後の血清は超低温フリーザーにて凍結 (-80°C) 保存した。

###### (3) 抗血清の抗体価測定

(2) で得た抗血清を生理食塩液で 4096、8192、16384 および 32768 倍に希釈した。希釈した抗血清 0.05mL をモルモットの背部皮内に 4 ヶ所投与し、受動感作した。投与後 3 時間に、0.5%エバンスブルーを含む 2mg/mL EA 生理食塩液を 5mL/kg の液量で静脈内投与した。投与 30 分後にエーテル麻酔下で放血致死させた動物の皮膚を剥離し、青色斑の径をノギスを用いて測定した。その結果、抗体価は 8192 であった。

###### (4) 鼻腔抵抗増加抑制作用の検討

受動的感作モルモットに、生理食塩液、プラセボ、試験製剤あるいは標準製剤を EA 注入 60 分前に両鼻腔内に 50  $\mu$ L ずつ投与した。その後、1%EA 1mL を三方活栓から鼻腔へ注入し、1 分間作用させた後、余分な抗原液を排出し、ventilation overflow 量の上昇を鼻腔抵抗上昇反応として測定した。以下に具体的な方法を記した。

- 1) モルモット抗 EA 血清の 0.3mL/匹を耳介静脈内投与し感作した。
  - 2) 絶食摂水で投与 24~26 時間後、受動的感作モルモットをウレタン(1.2g/5mL/kg、i. p.) で麻酔し、背位に固定して頸部正中切開により気管を露出した。気管切開部から鼻腔側にポリエチレンチューブを挿入して結紮した。呼吸維持のため肺側にポリエチレンチューブを装着し、鼻腔側に挿入したポリエチレンチューブに三方活栓を接続した Y 字型カニューレを装着した。
  - 3) Y 字型カニューレの一端からハーバード型人口呼吸器より 60beats/分で 5mL の空気を送り、Y 字型カニューレの他端からの定圧負荷での ventilation overflow 量を鼻腔抵抗としてブロンコスパズムトランスジューサーに誘導し、ventilation overflow 量の変化を生体電気用アンプを介してレコーダー上に誘発後 30 分まで記録した。
- (5) 鼻腔抵抗値 (%) の算出  
記録紙上の波形の高さをノギスで測定し、以下の式により鼻腔抵抗値を算出した。なお、測定ポイントは抗原注入開始前、抗原注入 3、5、7、10、15、20 及び 30 分とした。

鼻腔抵抗値 (%)

$$= [\text{測定値 (mm)} - \text{投与前値 (mm)}] \div [\text{完全閉塞値 (mm)} - \text{投与前値 (mm)}] \times 100$$

#### 4. 2. 試験結果の解析方法

抗原注入開始前、抗原注入 3、5、7、10、15、20 及び 30 分後の鼻腔抵抗値 (%) より、鼻腔抵抗値一時間曲線下面積 (AUC<sub>0-30min</sub> [%・min]) を台形法で計算し、主要評価項目とし、各時点の鼻腔抵抗値については、参考データとした。

##### (1) 生理食塩液群とプラセボ群の比較

主要評価項目について、生理食塩液群とプラセボ群の 2 群間の平均の検定を行った。F 検定 (有意水準 25%) で等分散の確認後、Student の t 検定 (等分散の場合) または Welch の t 検定 (不等分散の場合) で検定した (いずれも有意水準、両側 5%)。ノンパラメトリックな手法を用いる場合は、Wilcoxon の順位和検定 (有意水準、両側 5%) とした。ここで、生理食塩液群に対するプラセボ群の平均の差が ±10% の範囲内 (対数変換値の場合は  $\log(0.90) \sim \log(1.11)$  の範囲内) にあることを確認した後に、次のプラセボ群と試験製剤群及びプラセボ群と標準製剤群のそれぞれの比較を行った。

##### (2) プラセボ群と試験製剤群及びプラセボ群と標準製剤群のそれぞれの比較

主要評価項目及び参考データについて、プラセボ群と試験製剤群及びプラセボ群と標準製剤群のそれぞれで 2 群間の平均の検定を行った。解析手法は、上記と同様とした。いずれかの製剤を投与した群がプラセボ群に対して薬理作用に有意性を確認した場合に、次の試験製剤群と標準製剤群の比較を行った。

##### (3) 試験製剤群と標準製剤群の比較

主要評価項目について、試験製剤群と標準製剤群の 2 群間の平均の検定を行った。原則は対数変換とし、正規性に従い、F 検定 (有意水準 25%) で分散を確認後、Student の t 検定 (等分散の場合) または Welch の t 検定 (不等分散の場合) で有意性を検定し、有意差の認められない場合に同等とした。正規性が疑われるデータの場合はノンパラメトリックな手法を用いて同様に行った。

#### 4.3. 結果及び考察

生理食塩液群では、EA 生理食塩溶液の投与による抗原抗体反応の誘発により、誘発後 3 分の鼻腔抵抗値は平均 16.19%、誘発後 5～30 分の鼻腔抵抗値は平均 19.81～33.72%であり、鼻腔抵抗の増加が認められた。鼻腔抵抗値の曲線下面積 ( $AUC_{0-30min}$ ) の平均は  $715.46\% \cdot min$  であった(表 3 及び図 2)。

プラセボ群では、抗原誘発後 3 分の鼻腔抵抗値は平均 18.27%、誘発後 5～30 分の鼻腔抵抗値は平均 16.12～32.57%であり、生理食塩液群とほぼ同じ推移を示した。 $AUC_{0-30min}$  の平均は  $733.89\% \cdot min$  であり、生理食塩液群と比較して同程度の鼻腔抵抗の増加が認められた(表 3 及び図 2)。

標準製剤群における抗原誘発後 3 分の鼻腔抵抗値は平均 10.15%、誘発後 5～30 分の鼻腔抵抗値は平均 8.66～10.02%であり、各時点においてほぼ同じ値を示し、生理食塩液群及びプラセボ群と比較して低値を示した。また  $AUC_{0-30min}$  は平均  $270.69\% \cdot min$  であり、生理食塩液群及びプラセボ群と比較して低値を示し、標準製剤の鼻腔抵抗増加に対する抑制作用が認められた(表 3 及び図 2)。

試験製剤群においても、抗原誘発後 3 分の鼻腔抵抗値は平均 10.24%、誘発後 5～30 分の鼻腔抵抗値は平均 8.54～12.04%であり、 $AUC_{0-30min}$  は平均  $282.08\% \cdot min$  で、生理食塩液群及びプラセボ群と比較して低値を示し、鼻腔抵抗増加に対する抑制作用が認められた。試験製剤群の  $AUC_{0-30min}$  の値は、標準製剤群と同程度であった(表 3 及び図 2)。

表 4 に示したように、鼻腔抵抗値の  $AUC_{0-30min}$  は、生理食塩液群及びプラセボ群について有意差は認められなかった。プラセボ群と試験製剤群及びプラセボ群と標準製剤群では有意差が認められ、試験製剤群と標準製剤群の  $AUC_{0-30min}$  の抑制効果が確認された。

各時点の鼻腔抵抗値について、試験製剤群または標準製剤群とプラセボ群との比較を行った結果、誘発後 3 分では、試験製剤群及び標準製剤群ともにプラセボ群との間に有意差は認められなかった。一方、誘発後 5、7、10、15 及び 20 分では、試験製剤群と標準製剤群ともにプラセボ群との間に有意差が認められた。誘発後 30 分では両群ともに有意差が認められなかった。主要評価項目である鼻腔抵抗値の  $AUC_{0-30min}$  について試験製剤群と標準製剤群を比較した結果、両群間で有意差は認められず、両製剤の薬理学的同等性が確認された。

表 3. 鼻腔抵抗値 (%) 及び AUC<sub>0-30min</sub> (%・min) 一覧表

群	時間(分)	3	5	7	10	15	20	30	AUC <sub>0-30min</sub>
生理食塩液		16.19 ±3.23	22.41 ±2.69	27.92 ±2.88	33.72 ±3.11	31.10 ±4.44	22.79 ±3.90	19.81 ±3.91	715.46 ±85.61
プラセボ		18.27 ±2.89	25.93 ±2.14	29.96 ±2.46	32.57 ±2.86	32.10 ±2.29	25.35 ±3.42	16.12 ±2.83	733.89 ±52.65
試験製剤		10.24 ±1.41	10.28 ±1.42	11.04 ±1.61	12.04 ±1.75	9.86 ±1.49	9.09 ±1.52	8.54 ±1.33	282.08 ±34.59
標準製剤		10.15 ±2.09	9.18 ±2.12	9.97 ±2.07	10.02 ±1.29	9.48 ±1.27	9.50 ±1.30	8.66 ±1.96	270.69 ±37.17

(Mean±S.E., n=10)

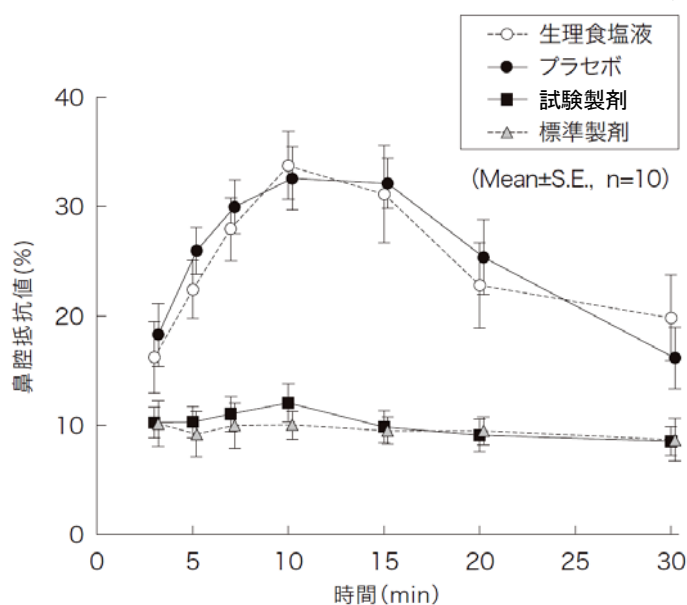


図 2. 抗原注入後の鼻腔抵抗値の群別推移グラフ

表 4. t 検定の結果

群構成	有意差の検定							AUC <sub>0-30min</sub>
	3分後	5分後	7分後	10分後	15分後	20分後	30分後	
生理食塩液 対 プラセボ								N. S.
プラセボ 対 試験製剤	N. S.	*	*	*	*	*	N. S.	*
プラセボ 対 標準製剤	N. S.	*	*	*	*	*	N. S.	*
試験製剤 対 標準製剤								N. S.

N. S. : 有意差なし、\* : 有意差あり

3分後～30分後は、有意水準：等分散性の検定：0.25、Student 及び Welch の t 検定：0.05/7  
AUC<sub>0-30min</sub> は、有意水準：等分散性の検定：0.25、Student 及び Welch の t 検定：0.05

以上のことから、試験製剤と標準製剤は、モルモットの実験的アレルギー性鼻炎モデルを用いた抗原誘発鼻腔抵抗増加に対する抑制効果を有し、薬理的に同等であると結論された。