

アルクレイン内用液 5%
生物学的同等性に関する資料

鶴原製薬株式会社

アルクレイン内用液 5%と標準製剤との生物学的同等性について検討した

緒言

アルクレイン内用液 5%と標準製剤との生物学的同等性を検討した。両製剤の有効成分であるアルギン酸ナトリウムは体内に吸収されないとされており、またその薬理作用は消化管粘膜に対する直接的な作用であることが薬理実験からも認められている。従って両製剤の生物学的同等性を検討するには血中濃度推移の比較では不適切と判断し、薬効薬理試験を行った。

■使用薬剤

- ・ 被験薬 アルクレイン内用液 5%
- ・ 対照薬 標準製剤

① 人工胃液中での胃粘膜融解実験におけるアルクレイン内用液 5%と標準製剤の薬効比較試験

◆ 原理

アルギン酸ナトリウム溶液は胃酸などの攻撃因子から胃・十二指腸、食道粘膜を保護するとされている。そこでラット摘出胃を用いて *in vitro* で、両製剤を胃に付着させて人工胃液中に入れ、その保護作用を肉眼的に観察し、また胃壁消化の程度を、蛋白消化によって生じる遊離チロジン量を測定することにより検討した。なお、非投与対照群としては製剤の代わりに水を用いて検討し、またアルギン酸ナトリウムを除いた他の成分のみを投与した群についても検討した。

◆ 操作方法

24 時間水のみ与えて絶食したラットをエーテル麻酔後、断頭致死し、胃を摘出する。胃を大弯にそって切開し、生理食塩液で胃内容物を洗い流し、さらに十分に洗う。水分をろ紙でふき取り、胃重量をはかった後、各製剤 0.5mL を胃全体に付着させ、 $37 \pm 1^{\circ}$ に保った人工胃液 25mL 中に入れる。対照群は人工胃液 25mL に水 0.5mL と胃を、他の成分群は水のかわりに他の成分のみ 0.5mL を入れた。30 分、1, 2, 3、時間後に人工胃液 0.5mL を正確に採取して、遊離チロジン量を測定し、また同時に胃粘膜融解の状態を肉眼で観察した。

・チロジン量測定：採取した人工胃液 0.5mL に 5%トリクロル酢酸溶液 2mL を正確に加え混合した後、 $37 \pm 1^{\circ}$ で 30 分間放置する。遠心分離 (3000r. p. m. 10 分間) 後、上清 1mL を正確に取り 0.5M 炭酸ナトリウム溶液 5mL を正確に加え、薄めたフォリン試液 (1→2) 1mL を正確に加えて混和し、 $37 \pm 1^{\circ}$ で 1 時間放置した後水を対照として波長 660nm における吸光度を測定する。別にチロジン標準品を 105° で 3 時間乾燥し、50mg を正確にとり人工胃液で希釈して 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200、 $\mu\text{g/mL}$ の液を調製する、この液各 0.5mL を正確にとり同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作成する、この検量線より採取した人工胃液中のチロジン量を求める。

◆結果

肉眼的観察

時間	非投与対照群	他の成分群	アルクレイン内用液 5%	標準製剤
30分	粘膜が胃本体から少し浮いている。胃液中に剥離した粘膜と思われる塵状のものがわずかに認められる	粘膜が胃本体から少し浮いている。胃液中に剥離した粘膜と思われる塵状のものがわずかに認められる	ほとんど変化なし	ほとんど変化なし
1時間	粘膜の融解・剥離が認められ胃液中には剥離した粘膜が浮遊している	粘膜の融解・剥離が認められ、胃液中には剥離した粘膜が浮遊している。	ほとんど変化なし	ほとんど変化なし
2時間	胃本体から粘膜が融解・剥離しているのがはっきりとわかり胃液中にかなり大きな粘膜片が認められる	胃本体から粘膜が融解・剥離しているのがはっきりとわかり胃液中にかなり大きな粘膜片が認められる	胃液中に剥離してきたと思われる塵状のものがわずかに認められる	胃液中に剥離してきたと思われる塵状のものがわずかに認められる
3時間	胃本体が崩れてきている。ピンセットで静かに触れると弾力が少なくなっている。胃液中には粘膜片が認められ底には塵のように積もっている	胃本体が崩れてきている。ピンセットで静かに触れると弾力が少なくなっている。胃液中には粘膜片が認められ底には塵のように積もっている	胃液中に塵状のものが認められる。胃本体を取り出してみるとアルギン酸と思われるゲル状のものが薄く付着していた	胃液中に塵状のものが認められる。胃本体を取り出してみるとアルギン酸と思われるゲル状のものが薄く付着していた

遊離チロジン量 ($\mu\text{g/mL/g}$ 胃重量) 平均 \pm 標準誤差

薬剤	胃重量(g)	30分	1時間	2時間	3時間
対照群	0.869 \pm 0.016	21.9 \pm 1.1	42.5 \pm 2.0	126.6 \pm 8.6	166.4 \pm 8.9
他の成分	0.861 \pm 0.015	20.8 \pm 1.5	44.0 \pm 2.4	116.8 \pm 7.9	158.1 \pm 9.2
アルクレイン内用液 5%	0.871 \pm 0.017	7.3 \pm 1.2	22.0 \pm 1.8	52.7 \pm 2.5	86.7 \pm 5.8
標準製剤	0.865 \pm 0.018	8.1 \pm 1.6	20.6 \pm 2.0	49.8 \pm 2.4	88.8 \pm 5.0

統計学的検討

得られたチロジン量につきF検定及び student の t 検定を行ったところ以下の結果が得られた

比較群		30分	1時間	2時間	3時間
t 検定	対照群と他の成分群	0.600 NS	0.484 NS	0.806 NS	0.649 NS
	対照群とアルクレイン内用液 5%群	9.193 **	7.533 **	8.254 **	7.524 **
	対照群と標準製剤群	7.166 **	7.685 **	8.595 **	7.630 **
	他の成分群とアルクレイン内用液 5%群	7.163 **	7.388 **	7.722 **	6.550 **
	アルクレイン内用液 5%群と標準製剤群	0.405 NS	0.519 NS	0.836 NS	0.274 NS
F 検定	対照群と他の成分群	1.884 NS	1.359 NS	1.165 NS	1.084 NS
	アルクレイン内用液 5%群と標準製剤群	1.875 NS	1.145 NS	1.046 NS	1.351 NS

**=危険率 1%で有意差あり
NS=危険率 5%で有意差なし

人工胃液中での胃粘膜融解に対してアルクレイン内用液 5%及び標準製剤は肉眼的に見て明らかに抑制作用を示し、対照群及び他の成分群ではラット摘出胃はボロボロになっていたのに対し、投与群ではほぼ原形を保っていた。この保護作用でアルクレイン内用液 5%と標準製剤の間には差は認められなかった。遊離チロジン量の測定においても対照群及び他の成分群に比べ投与群では有意にチロジン量は少なく、胃融解が抑制されていた。チロジン量においても両製剤に有意の差はみられなかった。また他の成分群に有意の薬効はみられなかった。

② 塩酸・ガストリン潰瘍モデルにおけるアルクレイン内用液 5%と標準製剤の薬効比較試験

◆ 原理

アルクレイン内用液 5%と標準製剤の抗潰瘍作用をラット塩酸・ガストリン潰瘍モデルにおいて比較検討した。ガストリンは胃液分泌を亢進させて潰瘍を誘発させるといわれている。アルギン酸ナトリウム製剤は胃酸から胃粘膜を保護するとされているので、この潰瘍モデルは薬効比較に適していると考えられた。

◆ 操作法

24 時間絶食したラットに 20%塩酸 0.2mL を経口ゾンデで胃内に投与しテトラガストリン 1 μ g/100g を腹腔内投与した。以後 1 日 1 回テトラガストリン 1 μ g/100g を腹腔内投与して潰瘍を作成した。

薬物投与は、潰瘍作成 24 時間後から各 1mL/100g、1 日 2 回経口投与した。対照群には同量の水を投与した。飼料、水は自由に摂取させた。

2 週間後にラットをエーテル麻酔後、断頭致死し、胃を摘出する。胃を大弯にそって切開し、生理食塩液で胃内容物を洗い出し肉眼的に観察した。潰瘍係数は実体顕微鏡（10 倍）で潰瘍の長径（mm）と短径（mm）を測定し、その積を潰瘍係数（S）とした。

◆ 結果

いずれの群においても前胃には全く潰瘍はみられず、腺胃にのみ潰瘍がみられた。潰瘍は線状からやや広がった帯状を示しており、対照群では割合はっきりした線状を示すか、帯状でも中心に深い切れ込み用の潰瘍がみられる例が多かった。投与群では潰瘍の境界がはっきりとせず、潰瘍係数が測定しにくかった。対照群と投与群では肉眼的に差が認められ、個体差がみられるものの投与群では潰瘍治癒が進んでいた。

潰瘍係数

薬剤	平均±標準誤差
非投与対照群	320.2±31.5
他の成分群	306.3±29.5
アルクレイン内用液 5%	150.7±18.2
標準製剤	157.3±15.9

統計学的検討

得られた潰瘍係数につき student の t 検定を行ったところ以下の結果が得られた

比較群	t 値	判定
対照群と他の成分群	0.322	NS
対照群とアルクレイン内用液 5%群	4.664	**
他の成分群とアルクレイン内用液 5%群	4.493	**
対照群と標準製剤群	4.623	**
アルクレイン内用液 5%群と標準製剤群	0.273	NS

**=危険率 1%で有意差あり

NS=危険率 5%で有意差なし

ラット塩酸・ガストリン潰瘍に対して、アルクレイン内用液 5%及び標準製剤は肉眼的に見て明らかに潰瘍治癒促進作用を示し、2 週間目における潰瘍係数は非投与対照群及び他の成分群に比べ有意に小さかった。またこの作用においてアルクレイン内用液 5%と標準製剤の間には有意差は認められなかった。また、他の成分群に薬効はみられなかった。

③ 急性逆流性食道炎モデルにおけるアルクレイン内用液 5%と標準製剤の薬効比較試験

◆ 原理

ラットの幽門及び前胃と腺胃の境界線を結紮することにより胃液の逆流による急性食道炎を作成し、これに対するアルクレイン内用液 5%と標準製剤の粘膜保護を比較検討した。

◆ 操作法

24 時間絶食したラットにチオペンタールナトリウム 25mg/mL を 1 匹当たり 0.5mL 腹腔内投与して麻酔した。解剖板にラットを固定し、腹部をエタノール消毒し、胸骨剣状突起横一指下の毛を刈る。外皮を縦 3cm 切開しさらに腹膜を正中線にそって 2.5~3cm 切開する。注意してピンセット 2 本で胃を静かに取り出す。幽門部及び前胃・線胃移行部を結紮する。内皮及び外皮を縫合し、出血は生理食塩液でふき取った後綿花でふき取っておく。

施術直後、2, 4 時間後にアルクレイン内用液 5%、標準製剤、他の成分、及び対照として水を 1 匹当たり各 0.5mL 経口投与した。施術 5 時間後にエーテル麻酔した後断頭致死する。食道を摘出して縦に切開して広げ肉眼的に観察し、食道炎係数(出血斑なし=0、点状出血斑=1、線状出血斑=2、面状出血斑=3、穿孔=4)を求めた。

◆ 結果

食道炎係数

処置群	1 群動物数	各食道炎係数を示す動物数					平均	標準誤差
		0	1	2	3	4		
非投与対照群	20	0	2	2	8	8	3.10	0.22
他の成分群	20	0	3	1	9	7	3.00	0.23
アルクレイン内用液 5%群	20	4	7	4	3	2	1.60	0.28
標準製剤群	20	3	6	6	4	1	1.60	0.25

非投与対照群及び他の成分投与群では全ラットに何らかの出血がみられうち 35～40%が穿孔、40～45%が面状に出血しており、全体の 80%で高度の食道炎が形成されていた。これに対し投与群では穿孔は 1～2 例しかみられず、全く出血のないものが 15～20%あっても点状出血にすぎないもの 30～35%で約両方で半分をしめていた。

統計学的検討

得られた食道炎係数につき student の t 検定を行ったところ以下の結果が得られた

比較群	t 値	判定
対照群と他の成分群	0.317	NS
対照群とアルクレイン内用液 5%群	4.194	**
他の成分群とアルクレイン内用液 5%群	3.829	**
対照群と標準製剤群	4.211	**
アルクレイン内用液 5%群と標準製剤群	0.263	NS

**=危険率 1%で有意差あり

NS=危険率 5%で有意差なし

ラット急性逆流性食道炎に対して、アルクレイン内用液 5%及び標準製剤は肉眼的に見て明らかに粘膜を胃酸から保護し、食道炎係数は非投与対照群及び他の成分群に比べ有意に小さかった。他の成分群には有意の保護作用はみられなかった。また、この作用においてアルクレイン内用液 5%と標準製剤の間には有意差は認められなかった。

結果：

両製剤はいずれの試験においても非投与対照群に比べて有意に薬効を示し、両製剤間には有意の差は見られなかった。また、アルクレイン内用液 5%中からアルギン酸ナトリウムを除いた他の成分のみを投与した群では、薬効は認められず、アルクレイン内用液 5%投与群とは有意の差が認められた。

以上のような結果より、アルクレイン内用液 5%と標準製剤は生物学的に同等の製剤であると推定された。