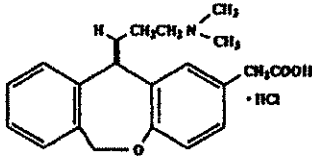
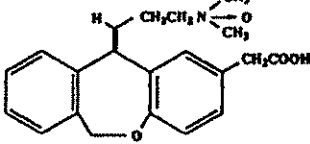
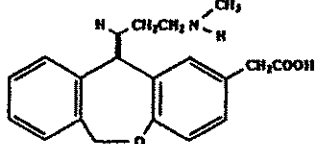
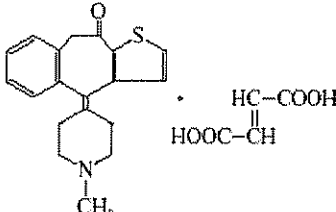
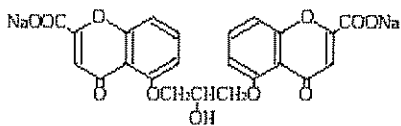
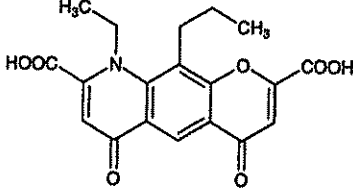


## ホ. 薬理作用

|                                                      |      |
|------------------------------------------------------|------|
| 総括                                                   | ホ-1  |
| 1. 局所点眼の効力を裏付ける一次試験                                  | ホ-6  |
| (1) 即時型アレルギーに及ぼす影響(モルモット結膜における受身アナフィラキシー)            | ホ-6  |
| 1) 抗原静脈内投与による惹起                                      | ホ-6  |
| 2) 抗原点眼投与による惹起                                       | ホ-8  |
| (2) モルモット結膜におけるヒスタミン誘発血管透過性亢進反応へ及ぼす影響及びその持続          | ホ-10 |
| (3) 臨床処方製剤の前臨床局所点眼効力の確認                              | ホ-14 |
| (4) 反復投与試験                                           | ホ-15 |
| 2. 作用機序                                              | ホ-16 |
| (1) ヒト結膜肥満細胞からの炎症性伝達物質遊離の抑制                          | ホ-16 |
| 1) <i>in vitro</i> での炎症性生理活性物質遊離へ及ぼす影響               | ホ-16 |
| 2) 精製ヒト結膜肥満細胞における $\text{TNF}\alpha$ 遊離に対するオロパタジンの影響 | ホ-22 |
| 3) ヒト結膜肥満細胞からのヒスタミン遊離に及ぼす作用について、オロパタジン及び類薬の比較        | ホ-23 |
| 4) ヒト結膜上皮細胞からのサイトカイン遊離抑制作用                           | ホ-25 |
| 3. <i>in vitro</i> 抗ヒスタミン作用                          | ホ-30 |
| (1) 受容体結合                                            | ホ-30 |
| (2) 作用機序に関する考察                                       | ホ-32 |
| (3) 代謝物がヒト結膜肥満細胞からのヒスタミン遊離へ及ぼす影響                     | ホ-34 |
| (4) オロパタジン代謝物の <i>in vitro</i> での結合プロフィール            | ホ-35 |
| (5) 臨床使用時におけるオロパタジン代謝物の抗ヒスタミン作用についての考察               | ホ-35 |
| 4. 一般薬理試験                                            | ホ-36 |
| 総括                                                   | ホ-36 |
| (1) <i>in vitro</i> 薬理作用                             | ホ-40 |
| 1) 受容体結合特性                                           | ホ-40 |
| 2) hERG チャネル                                         | ホ-41 |
| (2) <i>in vivo</i> 薬理作用                              | ホ-44 |
| (3) 結論                                               | ホ-44 |
| 5. 他の薬剤との薬力学的相互作用及び過剰投与                              | ホ-45 |
| (1) 経口剤承認時の資料及び本剤開発のために行われた試験成績に基づいた結論               | ホ-46 |

ホ. 薬理作用の項の略号一覧表

| 略号 (略称)                | 化学名 (一般名)                                                                                                                                      | 構造式                                                                                  | 由来             |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 塩酸オロパタジン               | (2)-11-(3-Dimethyl-aminopropylidene)-6,11-dihydrodibenz[ <i>b,e</i> ]oxepin-2-acetic acid monohydrochloride                                    |    | 原薬             |
| オロパタジン <i>N</i> -オキシド体 | (2)-11-(3-Dimethyloxidoamino-propylidene)-6,11-dihydrodibenz[ <i>b,e</i> ]oxepin-2-acetic acid                                                 |    | 代謝物            |
| <i>N</i> -デスメチルオロパタジン  | (2)-11-[3-(methylamino)-propylidene]-6,11-dihydrodibenz[ <i>b,e</i> ]oxepin-2-acetic acid                                                      |    | 代謝物            |
| ケトチフェン                 | 4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4 <i>H</i> -benzo[4,5]-cyclohepta-[1,2- <i>b</i> ]thiophen-10[9 <i>H</i> ]-one-hydrogen fumarate<br>(フマル酸ケトチフェン) |   | 対照薬            |
| クロモグリク酸ナトリウム           | Disodium 5,5'-(2-hydroxy-trimethylenedioxy)bis-(4-oxo-4 <i>H</i> -1-benzopyran-2-carboxylate)                                                  |  | 対照薬            |
| Nedocromil             | 9-Ethyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4 <i>H</i> -pyrano[3,2- <i>g</i> ]-quinoline-2,8-dicarboxylic acid                                     |  | 対照薬<br>(国内未承認) |

ホ. 薬理作用の項の略号一覧表 (つづき)

| 略号 (略称)        | 化学名 (一般名)                                                                                                                           | 構造式 | 由来             |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------|
| ペミロラスト<br>カリウム | 9-methyl-3-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)-<br>4 <i>H</i> -pyrido[1,2- <i>a</i> ]-pyrimidin-<br>4-one potassium                         |     | 対照薬            |
| トラニラスト         | <i>N</i> -(3,4-dimethoxycinnamoyl)-<br>anthranilic acid                                                                             |     | 対照薬            |
| エメダスチン         | 1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-<br>4-methyl-1 <i>H</i> -1,4-diazepin-1-<br>yl)benzimidazole difumarate<br>(フマル酸エメダスチン)              |     | 対照薬            |
| Antazoline     | 2-( <i>N</i> -benzylanilinomethyl)-2-<br>imidazoline                                                                                |     | 対照薬<br>(国内未承認) |
| フェニラミン         | <i>N</i> [( <i>RS</i> )-3-(4-Chlorophenyl)-3-<br>pyridin-2-ylpropyl]- <i>N,N</i> -<br>dimethylamine monomaleate<br>(マレイン酸クロルフェニラミン) |     | 対照薬            |
| テルフェナジン        | 1-[ <i>p</i> -tert-butylphenyl]-4-[4'-<br>( $\alpha$ -hydroxydiphenylmethyl)-<br>1'-piperidyl]butanol                               |     | 対照薬            |

略語

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| IL               | インターロイキン                  |
| OA               | 卵白アルブミン                   |
| ED <sub>50</sub> | 溶媒対照値に比べ反応を 50%抑制した濃度     |
| PG               | プロスタグランジン                 |
| TNF              | 腫瘍壊死因子                    |
| IC <sub>50</sub> | 50% 抑制濃度                  |
| GABA             | $\gamma$ -アミノ酪酸           |
| NMDA             | N-methyl D-aspartate      |
| LTB              | ロイコトリエン                   |
| hERG             | ヒトクローン ether-a-go-go チャネル |
| Ikr              | 急速遅延外向き整流チャネル             |
| ECG              | 心電図                       |

## ホ.薬理作用……………添付資料ホー1～12、ホー追 1\*、

## ホー参 1～6、ホー追参 1

### 総括

米国アルコン社は、アレルギー性結膜炎徴候と症状の治療用に、局所点眼用オロパタジン点眼液を開発した。

季節性アレルギー性結膜炎及び通年性アレルギー性結膜炎は、典型的な Coombs と Gell の I 型アレルギー反応による眼科的な病状である。細胞親和性を示す抗体（主に IgE）は、外来抗原に曝露した後に産生され、組織肥満細胞表面の Fc 受容体に結合する。次に抗原に曝露された際、この抗原が感作された肥満細胞表面の抗体分子に結合し、肥満細胞の脱顆粒化を惹起する。ヒト結膜内には肥満細胞が数多く存在しており、感作された肥満細胞は、細胞表面の IgE が認識する抗原への曝露により活性化される。その結果、細胞膜に変化が起き、リン脂質代謝変動、細胞内へのカルシウムの流入、ヒスタミンなどの炎症性伝達物質の放出、さらに新しく合成された血管作用性、炎症性メディエーターが遊離し、標的組織（結膜）内の関連受容体に結合することにより、アレルギー性結膜炎の徴候及び症状が発生する。ヒスタミンは、ヒト結膜肥満細胞から遊離する生理活性物質である。この血管作用性アミンは、アレルギー性結膜炎の典型的な徴候、症状である掻痒、浮腫と充血を誘発する。

本剤の有効成分は、既に経口剤として承認されているアレロック錠 2.5（承認番号：21200AMZ00645000、承認年月日：平成 12 年 12 月 22 日、会社名：協和醸酵工業株式会社）及び同 5（承認番号：21200AMZ00646000、承認年月日：同上、会社名：同上）の有効成分である塩酸オロパタジン（販売名：アレロック、承認番号：21200AMZ00648000、承認年月日：同上、会社名：同上）と同一である。オロパタジン（(Z)-11-[3-(ジメチルアミノ)プロピリデン]-6,11-ジヒドロジベンズ[b,e]オキセピン-2-酢酸 塩酸塩）は、協和醸酵工業株式会社がアレルギー性鼻炎と慢性蕁麻疹の治療用に開発した抗アレルギー・抗ヒスタミン剤である。アレルギー性結膜炎に対するオロパタジンの薬効は、ヒト結膜肥満細胞の脱顆粒を阻害するとともに、ヒスタミンと競合してヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体に結合することに基づいている。抗原曝露の前に薬物が存在する場合、薬物の肥満細胞安定化作用によりアレルギー反応が予防・緩和される。すでにアレルギー性結膜炎の症状が表れている患者に本薬を投与する場合、薬物はヒスタミンと競合してヒスタミン受容体に結合し、ヒスタミンとその受容体との結合を阻害することにより、ヒスタミン誘発症状（掻痒、充血、腫脹、流涙）を緩和させる。

\*：審査の過程に基づく補遺

オロパタジン経口投与後の *in vivo* での抗アレルギー効果及びその持続性は、すでに即時型アレルギー動物モデルを用いてアレロック錠申請時に確認されている。オロパタジンのヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体に対する親和性は、*in vitro* での受容体結合試験で実証されている。さらに、オロパタジンはこれらの試験において、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体に対する選択性が高いこと、 $\alpha$ -アドレナリン作動性、ムスカリン、ドパミン作動性受容体と他の多くの受容体に対する有意な結合作用は無いこと、抗アレルギー・抗ヒスタミン作用が有効な濃度での *in vivo* 抗コリン作用活性を持たないことも示されている。経口投与後、*in vivo* での抗ヒスタミン活性もすでに確認されており、さらに、オロパタジンは免疫的刺激によるヒト結膜肥満細胞からのメディエーター遊離を阻害する。塩酸オロパタジンの効力を裏付ける薬理試験及び作用機序については、経口剤の承認時に十分な検討がなされている。経口剤承認時に協和醸酵工業株式会社により検討及び提出された試験の要約を表ホー1に示す。

表ホー1 経口剤承認時に検討された効力を裏付ける試験一覧表  
(協和醸酵工業株式会社の資料概要(アレロック錠)より抜粋)

|             |          | 試験                          | 動物種            | 投与量<br>及び経路           | 評価方法                                  | 結果                                                                  |
|-------------|----------|-----------------------------|----------------|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 効力を裏付ける薬理試験 | in vivo  | 抗原誘発くしゃみと鼻掻き行動              | モルモット          | 0.01-1 mg/kg<br>経口    | 観察と反応の回数を数える                          | オロパタジンは0.03 mg/kg以上の用量では、鼻におけるアレルギー反応を抑制した。                         |
|             |          | 抗原誘発鼻粘膜血管透過性亢進反応            | モルモット          | 0.1-3.0 mg/kg<br>経口   | 色素漏出                                  | オロパタジンは抗原誘発鼻粘膜血管透過性亢進反応を有意にかつ用量依存的に抑制した。                            |
|             |          | 抗原誘発鼻粘膜血管透過性亢進反応            | ラット            | 0.1-1.0 mg/kg<br>経口   | 色素漏出                                  | オロパタジンは0.3 mg/kg以上の用量で色素漏出を有意に抑制した。                                 |
|             |          | 抗原誘発鼻閉症状                    | モルモット          | 0.1-10 mg/kg<br>経口    | 鼻腔内容積の変化                              | オロパタジンは0.1 mg/kgから鼻腔内容積の減少を有意に抑制した。ケトチフェンには有意な抑制作用が認められなかった。        |
|             |          | 受身皮膚アナフィラキシー                | ラット            | 0.01-3.0 mg/kg<br>経口  | 皮膚への色素漏出                              | オロパタジンは0.03 mg/kg以上の用量でPCA反応を有意に抑制し、ケトチフェンとエメダスチンより強力であった。          |
|             |          | 抗PCA作用の時間経過                 | ラット            | 0.2 mg/kg<br>経口       | 皮膚への色素漏出                              | オロパタジンの抑制作用は投与後30分から発現し、12時間後まで持続した。                                |
|             |          | 抗原誘発における即時型気道収縮反応           | モルモット          | 0.003-1.0 mg/kg<br>経口 | 気道収縮反応                                | オロパタジンは0.22 mg/kgの用量で気道収縮反応を50%抑制した。                                |
|             |          | 抗原誘発肺機能変化                   | モルモット          | 0.03-1.0 mg/kg<br>経口  | 呼吸抵抗と動肺コンプライアンスの測定                    | オロパタジンは抵抗の上昇及びコンプライアンスの低下を抑制した。                                     |
|             |          | 抗原誘発遅延型気道収縮反応               | モルモット          | 1.0 mg/kg<br>経口       | 抗原誘発後の気道抵抗の変化                         | オロパタジンは初期及び後期の気道抵抗の上昇を抑制した。                                         |
|             |          | 抗原誘発時の気道内への細胞浸潤             | モルモット          | 1.0-10.0 mg/kg<br>経口  | 気管支肺胞洗浄液中の細胞数測定                       | オロパタジンは気管支肺胞洗浄液中の好酸球比率を有意に低下した。しかし、ケトチフェンでは認められなかった。                |
| 作用機序        | in vivo  | ヒスタミン誘発気道収縮反応               | モルモット          | 3.0-30.0 µg/kg<br>静脈内 | 気道収縮反応                                | オロパタジンは3.0 µg/kg以上の用量でヒスタミン誘発気道収縮反応を有意に抑制した。                        |
|             |          | ヒスタミン誘発皮膚血管透過性亢進反応          | ラット            | 0.01-0.3 mg/kg<br>経口  | 皮膚の色素漏出                               | オロパタジンは0.03 mg/kg以上の用量でヒスタミン誘発皮膚血管透過性亢進反応を抑制した。                     |
|             | in vitro | ヒスタミンH <sub>1</sub> 受容体結合試験 | モルモット小脳、肺      |                       | 小脳と肺の膜組織由来ヒスタミンH <sub>1</sub> リガンドの置換 | オロパタジンの両組織におけるK <sub>i</sub> 値はいずれも1.6x10 <sup>-8</sup> Mであった。      |
|             |          | ヒスタミン誘発平滑筋収縮反応              | モルモット回腸、気管     |                       | ヒスタミン誘発収縮反応                           | オロパタジンは競合的抗ヒスタミン作用を示し、回腸と気管におけるpK <sub>B</sub> 値はそれぞれ7.70と8.89であった。 |
|             |          | 肥満細胞からの伝達物質遊離               | 肥満細胞を含むラット腹腔細胞 |                       | 抗原刺激後、細胞上清へのヒスタミン遊離を測定                | オロパタジンは能動感作又は受身感作された腹腔渗出細胞からのヒスタミン遊離を抑制した。                          |

オロパタジンが抗アレルギー活性を有しながら、持続期間の長いヒスタミン選択的拮抗作用を示していることから、米国アルコン社では実験的アレルギー及びヒスタミン誘発モルモット結膜炎モデルを用いてオロパタジンの点眼剤としての効果を検討した。また、肥満細胞脱顆粒の検討は、実際の臨床作用との関連性をみるためヒト結膜肥満細胞を用いた *in vitro* 試験を実施した。これらの試験の要約を表ホ-2に示す。

これら試験の結果、モルモット結膜炎モデルに対し本薬はアレルギー反応を有意に抑制した。また、*in vitro* 試験から、ヒト結膜肥満細胞からのヒスタミン放出抑制し、その 50%抑制濃度は約  $5.6 \times 10^{-4} \text{M}$  であり、かつ放射性リガンドとの結合試験の結果、オロパタジンはヒスタミン  $\text{H}_1$  受容体に選択的に作用し、その  $\text{K}_i$  値は  $41.1 \sim 59 \times 10^{-9} \text{M}$  と、本剤はケトチフェン同様、2つの機序により作用を発揮することが示唆された。

表ホ-2 点眼剤として開発するために検討された効力を裏付ける試験一覧表

| 試験          |                                                    | 動物種                                                                 | 投与量<br>及び経路              | 評価方法                                                         | 結果                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 効力を裏付ける薬理試験 | 結膜における受身アナフィラキシー                                   | モルモット                                                               | 0.001-1.0 % w/v<br>局所点眼  | 結膜への色素漏出                                                     | オロパタジンはアレルギー性結膜炎を抑制した。効力は局所点眼投与後 30 分から 8 時間の間に認められた。                                                                                                                                                                                                                     |
|             | ヒスタミン誘発結膜血管透過性亢進反応                                 | モルモット                                                               | 0.00001-3.0% w/v<br>局所点眼 | 結膜への色素漏出                                                     | オロパタジンはヒスタミン誘発結膜血管透過性亢進反応を用量依存的に抑制した。作用は単回局所点眼投与後 1 分から 24 時間の間に認められた。                                                                                                                                                                                                    |
|             | 臨床処方の前臨床効力                                         | モルモット                                                               | 0.1%<br>局所点眼             | 結膜への色素漏出                                                     | 臨床処方投与後 1 時間から 24 時間の間、ヒスタミン誘発結膜血管透過性亢進を抑制した。                                                                                                                                                                                                                             |
| (眼科的) 作用機序  | ヒト結膜肥満細胞からの炎症性伝達物質遊離                               | ヒト結膜肥満細胞                                                            | <i>in vitro</i>          | 細胞上清中の伝達物質の定量                                                | オロパタジンは抗ヒト IgE で刺激されたヒト結膜肥満細胞からのヒスタミン、トリプターゼと PGD <sub>2</sub> 遊離を有意に阻害した。                                                                                                                                                                                                |
|             | ヒト結膜肥満細胞からの TNF $\alpha$ 遊離                        | ヒト結膜肥満細胞                                                            | <i>in vitro</i>          | 細胞上清中 TNF $\alpha$ の定量                                       | オロパタジンは TNF $\alpha$ 遊離を抑制し、IC <sub>50</sub> 値は 13.1x10 <sup>-6</sup> M であった。                                                                                                                                                                                             |
|             | ヒト結膜肥満細胞へ及ぼす安定作用について、オロパタジンと市販されている抗アレルギー点眼治療薬との比較 | ヒト結膜肥満細胞                                                            | <i>in vitro</i>          | 抗 IgE 曝露後、細胞上清へのヒスタミン遊離を測定                                   | オロパタジンはヒト結膜肥満細胞からのヒスタミン遊離に対し有意な抑制を示した。クロモグリク酸ナトリウム、Nedocromil、ペミロラストカリウム、トラニラストは抑制作用を示さなかった。                                                                                                                                                                              |
|             | ヒト結膜上皮細胞からのヒスタミン誘発サイトカイン遊離の阻害                      | ヒト結膜上皮細胞                                                            | <i>in vitro</i>          | 細胞上清中へのサイトカイン遊離                                              | オロパタジンは、IL-6 及び IL-8 遊離を抑制した。                                                                                                                                                                                                                                             |
|             | 代謝物によるヒト結膜肥満細胞におけるヒスタミン遊離阻害                        | ヒト結膜肥満細胞                                                            | <i>in vitro</i>          | 抗 IgE 誘発時の細胞上清中のヒスタミン量を測定                                    | オロパタジン N-オキシド体は有意にかつ用量依存的にヒスタミン遊離を抑制し、IC <sub>50</sub> は 3.07 x10 <sup>-8</sup> M であった。                                                                                                                                                                                   |
| (非眼科的) 作用機序 | ヒスタミン受容体サブタイプに対する選択性                               | H <sub>1</sub> 、H <sub>2</sub> :<br>ラット脳<br>H <sub>3</sub> : モルモット脳 | <i>in vitro</i>          | ヒスタミン H <sub>1</sub> 、H <sub>2</sub> 、H <sub>3</sub> 受容体への結合 | オロパタジンは H <sub>1</sub> 受容体に選択的で (Ki 41.1 x10 <sup>-9</sup> M)、H <sub>2</sub> 及び H <sub>3</sub> 受容体に比較し、それぞれ 1059 倍及び 4177 倍の選択性を示した。                                                                                                                                      |
|             | 代謝物のヒスタミン H <sub>1</sub> 受容体選択性                    |                                                                     | <i>in vitro</i>          | アッセイ                                                         | オロパタジン N-オキシド体はヒスタミン H <sub>1</sub> 受容体にのみ結合した (10 $\mu$ mol/L で 87.12% 阻害)。N-デスメチルオロパタジンはヒスタミン H <sub>1</sub> 受容体に 10 <sup>-5</sup> M で 96.31% 阻害し、セロトニン 5HT <sub>2A</sub> 受容体へは 10 <sup>-5</sup> M で 72.93% 阻害した。また、ノルエピネフリントランスポーターを 10 <sup>-5</sup> M で 67.06% 阻害した。 |

## 1. 局所点眼の効力を裏付ける一次試験

炎症誘発物質に対する反応には種差が存在し、例えばラットはヒスタミンよりもセロトニンに感受性が良く、抗ヒスタミン剤の効果も弱い<sup>1)</sup>。モルモットの肥満細胞から放出される主な血管作用性アミンはヒスタミンであり、かつモルモットの血管組織はヒスタミン作用に感受性が良く、これらはヒトにもあてはまることから、モルモットを用いて非臨床薬理試験を行った。エバンスブルーは血清アルブミンに結合することから<sup>2)</sup>、正常の生理状態では血管外に漏れ出ない。しかし、アレルギー反応により血管透過性が亢進し、血清たんぱく質と液体成分の血管内から間質空間への漏出に伴い色素も漏出する。このことを利用して、色素の血管から組織内への漏出を測定する方法は、血管透過性の評価法として一般的に良く用いられている<sup>3),4)</sup>。モルモットへのヒスタミンの皮下投与でエバンスブルーの漏出が認められており<sup>5)</sup>、本剤の *in vivo* 抗ヒスタミン活性の推定にも、色素漏出量を目安とした。

### (1) 即時型アレルギーに及ぼす影響（モルモット結膜における受身アナフィラキシー）

……………添付資料ホー1、ホー追1、ホー参1

#### 1) 抗原静脈内投与による惹起

##### ①方法

モルモット（1群5～8匹）の片眼に抗卵白アルブミン血清（Marretta and Caseyの方法<sup>6)</sup>を改良した調製法に従い作製）を結膜嚢内投与して受身感作し、約24時間経過後に表ホー4に記載の濃度のオロパタジン溶液、あるいは生理食塩水（20  $\mu$ L）を点眼投与した。さらに、その30分又は8時間後に卵白アルブミン（OA、100  $\mu$ g）とエバンスブルー（1 mg）を含有する溶液（1.0 mL）を静脈内投与し反応を惹起させた。その30分後に動物を屠殺し、下眼瞼直下を切開し反転して、下眼瞼皮膚表面の膨疹の大きさと漏出色素量を半定量した。各動物の透過性スコアは、青染部の面積（色素に染まった血管外区域を肉眼検査し測定）に色素濃度（1～6までの6グレードに分ける）をかけて算出した。表ホー3にグレード及び色素濃度を示した。色の強度の度合は、12.5 cm Whatman 42 ashless 濾紙あるいはそれと同質の紙に各濃度のエバンスブルー20  $\mu$ Lをスポットした色との比較により決定した。各処置群と生理食塩水処置群のスコアの比較は、Dunnett's *t* 検定を用いた。尚、抗卵白アルブミン血清の抗体価は、異なった濃度に希釈した抗血清で感作した動物を用いて実施した受身アナフィラキシー試験結果から、確実に即時型アレルギー反応を示す濃度の抗血清を用いた。

1) Maling, H.M., et al., J. Pharm. Exp. Ther. 191: 300-310, 1974

2) Murphy, C.L. and Lever, M.J., Exp. Physiol. 87: 163-170, 2002

3) Bayer, A., et al., Ophthalmologica. 217: 119-123, 2003

4) Evilevitch, V., et al., Acta Physiol. Scand.. 165: 409-413, 1999

5) Yakuo et al. Pharmacol. Toxicol 89:171-176. 2001

6) Marretta, J. and Casey, F.B.: J. Immunological Methods 31: 183-185., 1979

表ホ-3 グレード及び色素濃度（添付資料ホ-追 1 より）

| グレード | エバンスブルー (mg/mL) |
|------|-----------------|
| 1    | 0.313           |
| 2    | 0.625           |
| 3    | 1.25            |
| 4    | 2.5             |
| 5    | 5.0             |
| 6    | 10.0            |

## ②成績

表ホ-4 に示すように、0.01 又は 0.1% (w/v) オロパタジンは抗原静脈内投与による惹起の 30 分前投与において、8 時間前投与においては 0.3、1.0% 点眼により、モルモット結膜における受身アナフィラキシー反応を有意に抑制した。各時点における ED<sub>50</sub>（溶媒対照値に比べ反応を 50%抑制した濃度）を、線形回帰を用いて求めた。30 分前及び 8 時間前の処置群の ED<sub>50</sub> は、それぞれ 0.0067%及び 0.2690% (w/v) であった。

表ホ-4 静脈内投与により抗原誘発されたモルモットにおける  
受身アナフィラキシーに及ぼすオロパタジンの点眼効果

| 前処置時間 | 化合物    | 濃度<br>(%, w/v) | 透過性スコア<br>(平均 ± SD) | 変化% | ED <sub>50</sub><br>(%, w/v) |
|-------|--------|----------------|---------------------|-----|------------------------------|
| 30 分  | 生理食塩水  | —              | 506 ± 123           | —   | —                            |
|       | オロパタジン | 0.1            | 102 ± 76*           | -80 | 0.0067                       |
|       |        | 0.01           | 264 ± 161*          | -48 |                              |
|       |        | 0.001          | 334 ± 133           | -34 |                              |
| 8 時間  | 生理食塩水  | —              | 445 ± 128           | —   | —                            |
|       | オロパタジン | 1.0            | 75 ± 58*            | -83 | 0.2690                       |
|       |        | 0.3            | 148 ± 126*          | -67 |                              |
|       |        | 0.1            | 388 ± 218           | -13 |                              |
|       |        | 0.03           | 458 ± 85            | +3  |                              |

\* p < 0.05, Dunnett's t 検定

## 2) 抗原点眼投与による惹起

本方法は米国アルコン社により開発された方法（添付資料ホ・参 1）であり、抗原の局所惹起によるアレルギー反応を予防または緩和する本剤の薬理作用は、患者のアレルギー性結膜炎で認められる三つの典型的症状（結膜充血、浮腫と眼汁（流涙））<sup>7)</sup>を評価して判定した。また、抗原惹起の際、十分な組織中薬物濃度が維持されていれば効果は認められ、その持続時間は組織中薬物滞留時間及び受容体解離速度に左右されることから、抗原惹起前の異なる時間に動物に薬物を点眼することにより、抗原曝露の時間を制御し、薬理作用の持続時間を検討できる。薬物点眼後の抗ヒスタミン活性の潜在的持続時間は、モルモットモデルを使って一般的に求められている<sup>8),9),10),11)</sup>ことから、本剤の効果の持続時間も検討した。

### ①方法

モルモット（1群 5～8匹）の片眼に抗卵白アルブミン血清を結膜嚢内投与して受身感作し、約 24 時間後に 0.001、0.01、0.1 又は 1.0% のオロパタジン溶液、あるいは生理食塩水（20  $\mu$ L）を点眼投与した。さらにその 30 分、4 又は 8 時間後に OA（1.0%, w/v）を感作眼に投与し、30 分後にその反応を以下に示す評価基準を用いて評価した。充血スコアは最大 3、腫脹は最大スコア 4 及び眼脂は最大スコア 3 とし、各スコアの和を各動物の応答スコアとした（1 匹あたりの最高スコアは 10）。各処置群と生理食塩水処置群のスコアの比較は、Dunnett's t 検定を用いた。尚、抗卵白アルブミン血清の抗体価は、異なった濃度に希釈した抗血清で感作した動物を使った受身アナフィラキシー試験を実施して求め、標準濃度の抗原（1% 卵白アルブミン溶液 30  $\mu$ L を点眼）に対し確実に即時型アレルギー反応を示す濃度の抗血清を用いた。

#### 眼瞼と眼球結膜の充血

- 0 – 正常
- 1 – 淡紅色結膜
- 2 – 紅色結膜
- 3 – 暗紅色結膜、点状出血の存在

#### 腫脹

- 0 – 無
- 1 – 下眼瞼のみ腫脹が見られる

---

7) Collum and Kilmartin, Chapter 15, in Abelson, M.B Allergic Diseases of the Eye, W.B. Saunders Co. Philadelphia Pa. 2000

8) Yanni, J.M., et al., J. Ocular Pharm. 10: 665–675, 1994

9) Stock, E.L., et al., J. Ocular Pharm. 1: 183–187, 1985

10) Khosravi, E., et al., Inflamm. Res. 44: 47–54, 1995

11) Khatami, M. et al., Ophthalmic Res. 17: 139–147, 1985

2－上下眼瞼に腫脹が見られ、眼瞼の部分的閉鎖

3－眼瞼外転、激しく腫脹、半分以上閉鎖

4－上下眼瞼及び顔側面腫脹

#### 眼脂

0－無

1－光沢あり、ガラスのような外見

2－眼瞼と周囲の毛が湿っている

3－眼瞼と周囲の毛が湿って、粘液のように濃くなっている

効果の持続時間を本実験モデルで検討した。この場合、モルモット（1群 5～8 匹）を受身感作し、約 24 時間後に 0.1%オロパタジン溶液（20  $\mu$ L）を点眼投与し、その 15 分、30 分、1、2、4、8、16 又は 24 時間後に OA（1.0%, w/v）を感作眼に投与した。反応の評価は、30 分後に同様に評価した。

## ②成績

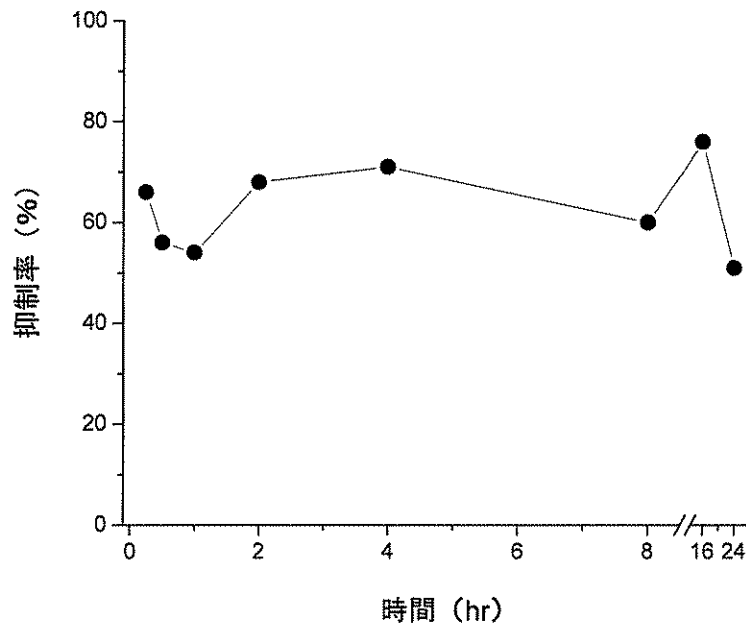
抗原点眼による惹起の 30 分前にオロパタジンを投与した時、モルモット結膜における即時型アレルギー反応は有意に抑制され、ED<sub>50</sub> 値は 0.0170%であった。また、抗原誘発の 4 時間、又は 8 時間前にオロパタジンを投与した場合でも、アレルギー反応の程度は濃度依存的に低下し、4 時間前及び 8 時間前処置群の ED<sub>50</sub> は、それぞれ 0.0529%及び 0.1000%であった。結果を表ホー5 に示す。

さらに、オロパタジンの効果の減少は図ホー1 に示すように 16 時間まで認められなかった。

表ホー5 点眼投与による抗原誘発されたモルモットにおける  
受身アナフィラキシーに及ぼすオロパタジンの点眼効果

| 前処置時間 | 化合物    | 濃度<br>(%, w/v) | 透過性スコア<br>(平均 $\pm$ SD) | 変化% | ED <sub>50</sub><br>(%, w/v) |
|-------|--------|----------------|-------------------------|-----|------------------------------|
| 30 分  | 生理食塩水  | —              | 8.2 $\pm$ 1.3           | —   | —                            |
|       | オロパタジン | 1.0            | 3.8 $\pm$ 0.8*          | -53 | 0.0170                       |
|       |        | 0.1            | 3.2 $\pm$ 1.3*          | -61 |                              |
|       |        | 0.01           | 4.5 $\pm$ 1.1*          | -45 |                              |
|       |        | 0.001          | 5.3 $\pm$ 2.0*          | -35 |                              |
| 4 時間  | 生理食塩水  | —              | 7.2 $\pm$ 1.0           | —   | —                            |
|       | オロパタジン | 1.0            | 2.3 $\pm$ 1.5*          | -67 | 0.0529                       |
|       |        | 0.1            | 3.3 $\pm$ 1.5*          | -54 |                              |
|       |        | 0.01           | 4.2 $\pm$ 2.0*          | -42 |                              |
|       |        | 0.001          | 5.3 $\pm$ 1.2           | -26 |                              |
| 8 時間  | 生理食塩水  | —              | 7.2 $\pm$ 1.7           | —   | —                            |
|       | オロパタジン | 1.0            | 1.7 $\pm$ 0.8*          | -77 | 0.1000                       |
|       |        | 0.1            | 4.2 $\pm$ 0.8*          | -41 |                              |
|       |        | 0.01           | 5.4 $\pm$ 1.2*          | -25 |                              |
|       |        | 0.001          | 5.8 $\pm$ 0.8           | -19 |                              |

\* p < 0.05, Dunnett's t 検定



図ホー1 0.1%オロパタジンのモルモットアレルギー性結膜炎に対する効果の持続時間

- (2) モルモット結膜におけるヒスタミン誘発血管透過性亢進反応へ及ぼす影響及びその持続  
 ..... 添付資料ホー1～3、ホー参 1、ホー参 2

#### 1) 方法

雄 VAF Dunkin/Hartley 系モルモット (1 群 3～6 匹) に、表ホー6に示すような濃度の被験化合物あるいは生理食塩水 (20  $\mu$ L) を点眼投与し、その 1 分～24 時間後にヒスタミン (300 ng) を結膜嚢内に投与した。エバンスブルー色素 (1.0 mg/mL) はヒスタミン投与の 45 分前に静脈内投与した。ヒスタミン投与の 30 分後に屠殺し、下眼瞼直下を切開し反転して、下眼瞼皮膚表面の漏出色素の面積を定量した。各動物の透過性スコアは、前述 (資料概要ホー6 頁) の方法で、青染部の面積に色素濃度 (1～6 までの 6 グレードに分ける) をかけて算出した。各処置群と生理食塩水処置群のスコアの比較は、Dunnett's t 検定を用いて統計解析した。

#### 2) 成績

表ホー6 に示すように、オロパタジン点眼投与はモルモット結膜におけるヒスタミン誘発血管透過性亢進反応をいずれの処置時間においても有意にかつ用量依存的に抑制した。このモデルにおける抗ヒスタミン剤点眼投与は、薬物投与からヒスタミン惹起までの間隔が 30 分で最高効力を示すことが知られている (ホー参 2) 。そこで、オロパタジン投与 30 分後における効果を検討したところ、ED<sub>50</sub> は 0.002% であった。

また、前処置時間が 1、5 及び 15 分の時の ED<sub>50</sub> 値は、それぞれ 0.465%、0.019% 及び 0.004% (w/v) であり、2、4、8 及び 24 時間の時の ED<sub>50</sub> 値は、0.0014%、0.0056%、

0.035%及び0.114% (w/v) であったことから、この実験モデルにおけるオロパタジン点眼時の作用の持続性は長いことが示唆された。

さらに、図ホ-2 に示すように、前処置時間 2、4 あるいは 8 時間におけるオロパタジンの作用は、ケトチフェンとほぼ同等の作用を示すことが明らかになった（ケトチフェンの ED<sub>50</sub> 値は、2 時間で 0.001%、4 時間で 0.003%、8 時間では 0.027%であった）。

Kamei ら<sup>12)</sup>は卵白アルブミン及びヒスタミンで誘発させたモルモット結膜炎モデルを用いて、結膜の症状からオロパタジンの IC<sub>50</sub> 値を求め、ケトチフェンと比較した。この試験では卵白アルブミン（OVA）で感作・惹起し、誘発させたモルモット結膜炎モデル及びヒスタミン誘発モルモット結膜炎モデルを用い、結膜の発赤、浮腫のスコアの変化から IC<sub>50</sub> を算出し、比較した。なお、病変のスコアは以下に示したスコアを用い、総スコアの減少から IC<sub>50</sub> を算出した。

0：変化なし、1：軽度発赤、2：重度の発赤、3：重度の発赤と軽度浮腫、4：重度浮腫

オロパタジン、ケトチフェンは OVA モデルでは惹起の 15 分前、ヒスタミンモデルではヒスタミン処置 15 分前に点眼した。

その結果、両結膜炎モデルに対し両薬剤とも濃度依存的な結膜炎の抑制効果を示した。オロパタジンの IC<sub>50</sub> 値は OVA モデルで 3.9µg/mL、ヒスタミンモデルで 2.44µg/mL と、ケトチフェンとほぼ同程度であった(表ホ-7)。

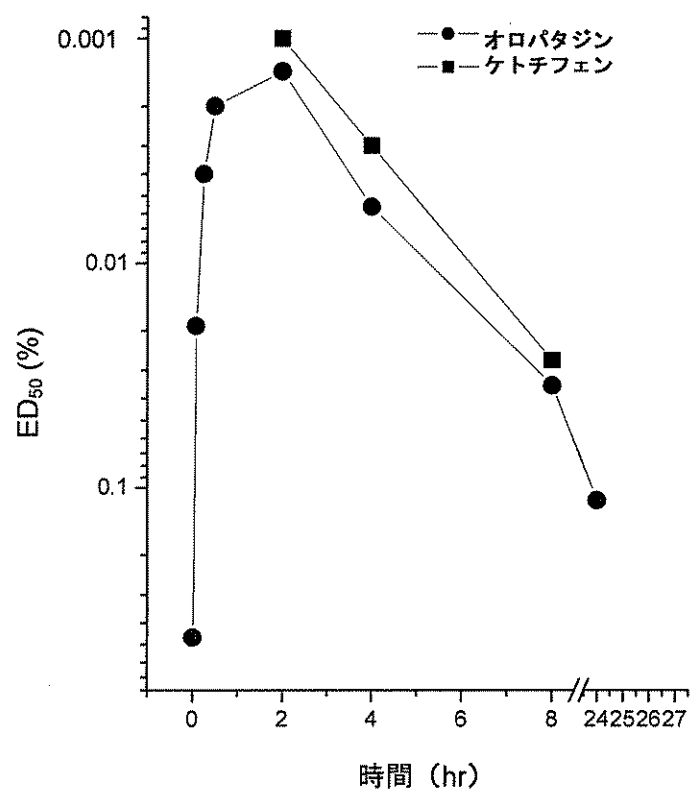
---

12) Kamei, C et al : *Arzneim-Forsch/Drug Res* 45(11) Nr9, 1005-1008, 1995

表ホ-6 モルモットにおけるヒスタミン誘発血管透過性亢進反応へ及ぼすオロパタジンの影響

| 前処置時間 | 化合物    | 濃度<br>(%, w/v) | 透過性スコア<br>(平均 ± SD) | 変化% | ED <sub>50</sub><br>(%) |
|-------|--------|----------------|---------------------|-----|-------------------------|
| 1 分   | 生理食塩水  | —              | 205 ± 43            | —   | —                       |
|       | オロパタジン | 3.0            | 30 ± 18*            | -85 | 0.465                   |
|       |        | 1.0            | 117 ± 38*           | -43 |                         |
|       |        | 0.1            | 141 ± 25*           | -31 |                         |
|       |        | 0.01           | 186 ± 47            | -9  |                         |
| 5 分   | 生理食塩水  | —              | 324 ± 59            | —   | —                       |
|       | オロパタジン | 0.3            | 94 ± 65*            | -71 | 0.019                   |
|       |        | 0.03           | 165 ± 74*           | -49 |                         |
|       |        | 0.003          | 197 ± 56            | -39 |                         |
| 15 分  | 生理食塩水  | —              | 431 ± 91            | —   | —                       |
|       | オロパタジン | 0.1            | 98 ± 87*            | -77 | 0.004                   |
|       |        | 0.03           | 180 ± 40*           | -58 |                         |
|       |        | 0.01           | 238 ± 49*           | -45 |                         |
|       |        | 0.001          | 240 ± 43*           | -44 |                         |
|       |        | 0.0001         | 302 ± 55*           | -30 |                         |
|       |        | 0.00001        | 370 ± 73            | -14 |                         |
| 30 分  | 生理食塩水  | —              | 228 ± 25            | —   | —                       |
|       | オロパタジン | 0.1            | 15 ± 15*            | -94 | 0.002                   |
|       |        | 0.01           | 69 ± 33*            | -70 |                         |
|       |        | 0.001          | 125 ± 36*           | -45 |                         |
|       |        | 0.0001         | 195 ± 53            | -15 |                         |
| 2 時間  | 生理食塩水  | —              | 423 ± 47            | —   | —                       |
|       | オロパタジン | 0.1            | 17 ± 3*             | -96 | 0.0014                  |
|       |        | 0.01           | 146 ± 87*           | -66 |                         |
|       |        | 0.001          | 201 ± 105*          | -52 |                         |
|       |        | 0.0001         | 342 ± 66            | -19 |                         |
| 4 時間  | オロパタジン | 1.0            | 5 ± 8*              | -99 | 0.0056                  |
|       |        | 0.1            | 66 ± 76*            | -84 |                         |
|       |        | 0.01           | 263 ± 49*           | -38 |                         |
|       |        | 0.001          | 240 ± 69*           | -43 |                         |
| 8 時間  | 生理食塩水  | —              | 374 ± 45            | —   | —                       |
|       | オロパタジン | 1.0            | 10 ± 8*             | -97 | 0.035                   |
|       |        | 0.1            | 152 ± 33*           | -60 |                         |
|       |        | 0.01           | 247 ± 29*           | -34 |                         |
|       |        | 0.001          | 389 ± 59            | 4   |                         |
| 24 時間 | 生理食塩水  | —              | 347 ± 27            | —   | —                       |
|       | オロパタジン | 1.0            | 12 ± 18*            | -96 | 0.114                   |
|       |        | 0.1            | 231 ± 35*           | -33 |                         |
|       |        | 0.01           | 302 ± 69            | -13 |                         |

\* p < 0.05, Dunnett's t 検定



図ホー2 モルモット結膜におけるヒスタミン誘発血管透過性亢進反応へ及ぼすオロパタジンの影響（添付資料ホ-1、図-6と添付資料ホ-3、表 1 から作成）

表ホー7 モルモット結膜炎モデルに対するオロパタジンとケトチフェンの比較  
（文献 12 より引用）

|         | オロパタジン<br>IC <sub>50</sub> 値 ( ) は 95%IC : $\mu\text{g/mL}$ | ケトチフェン<br>IC <sub>50</sub> 値 ( ) は 95%IC : $\mu\text{g/mL}$ |
|---------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| OVA 誘発  | 3.90<br>(1.87-5.36)                                         | 4.12<br>(0.19-16.0)                                         |
| ヒスタミン誘発 | 2.44<br>(0.59-5.55)                                         | 2.82<br>(0.03-11.4)                                         |

(3) 臨床処方製剤の前臨床局所点眼効力の確認……………添付資料ホー2

1) 方法

パタノール（0.1%オロパタジン）点眼液の臨床処方は、塩化ナトリウム（0.6%）、リン酸水素二ナトリウム（0.5%）及び塩化ベンザルコニウム（0.01%）を含有し、約 pH 7.0 に調整されている。この処方の効力を裏付ける試験として、前述（資料概要ホー10 頁）の方法でヒスタミン誘発結膜血管透過性亢進反応モデルを用いて検討した。なお、対照溶媒としては、臨床処方溶剤（オロパタジンを含有しない臨床処方液）を用いた。処置群と対照群のスコアの比較は、Dunnett's t 検定を用いた。

2) 成績

表ホー8 に示すように、オロパタジンの臨床処方製剤は、モルモットにおけるヒスタミン誘発血管透過性亢進反応を有意に抑制した。この抑制作用はヒスタミン惹起 1、6 あるいは 24 時間前に被験化合物を点眼投与した際に観察された。

表ホー8 局所点眼投与されたモルモットにおけるヒスタミン誘発血管透過性亢進反応へ及ぼすオロパタジン臨床処方の影響

| 化合物    | 前処置時間<br>(時間) | 濃度<br>(%, w/v) | 透過性スコア<br>(平均 ± S.D.) | 変化%  |
|--------|---------------|----------------|-----------------------|------|
| 臨床処方溶剤 | 1             | —              | 285 ± 23              | —    |
| 臨床処方製剤 | 1             | 0.1            | 0 ± 0*                | -100 |
| 臨床処方溶剤 | 6             | —              | 255 ± 39              | —    |
| 臨床処方製剤 | 6             | 0.1            | 6 ± 5*                | -98  |
| 臨床処方溶剤 | 24            | —              | 298 ± 22              | —    |
| 臨床処方製剤 | 24            | 0.1            | 128 ± 52*             | -57  |

\* p < 0.01、Dunnett's t 検定

n=5-6

(2)に記載の様に被験化合物を単回投与した。

#### (4) 反復投与試験

今回、反復投与薬理試験を行わなかった。この理由は、経口剤の開発の際、ラットに 14 日間反復経口投与し、PCA 反応を検討した試験結果（協和醸酵工業株式会社の資料概要(アレロック錠)、151 頁）から、反復投与した後の惹起後の色素露出斑の増強、効果の減弱を示さず、反復投与による影響は無いことが示唆された。この結果は点眼薬開発の際にも反復投与による影響は軽微であることを示唆させるものであった。更に、その後国内で実施された臨床試験や海外での臨床試験成績<sup>13)</sup> などから効果の減弱や終了後の明確なリバウンド現象などの報告はなく、反復投与試験は不要と判断し、実施しなかった。

---

13) Aguilar, A.J.: ACTA Ophthalmolo. Scand. Suppl. 230, 52-55, 2000.

## 2. 作用機序

### (1) ヒト結膜肥満細胞からの炎症性伝達物質遊離の抑制

#### 1) *in vitro* での炎症性生理活性物質遊離へ及ぼす影響

……………添付資料ホー1、ホー4、ホー5、ホー参3、ホー参4

##### ①方法

ヒト結膜由来の肥満細胞からの炎症性生理活性物質遊離へ及ぼすオロパタジンとケトチフェンの影響について比較検討を行った。ヒト結膜肥満細胞は、遺体より提供された組織を Tyrode's 緩衝液に移した後、コラーゲナーゼとヒアルロニダーゼを用いて消化分離した。酵素消化の後、フィルター濾過し、濾過液を集め、残りの組織はさらに消化を行った。集めた濾過液を遠心して、ペレットを再懸濁した。その細胞懸濁液を Percoll 勾配遠心分離法で遠心して肥満細胞リッチな細胞ペレットを得た。培地中に肥満細胞を懸濁させた後、平衡状態まで静置した。その細胞に抗ヒト IgE (10 µg/mL: 濃度依存試験において求めた十分な生理活性物質遊離を引き起こす濃度) を添加し、培地中に遊離するヒスタミン、トリプターゼあるいはプロスタグランジン D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) を放射免疫測定法にて測定した。

伝達物質遊離に対する被験化合物の作用を評価するため、抗ヒト IgE による惹起の 15 分前に細胞に薬物 (オロパタジンまたはケトチフェン) を下記に示すような濃度で添加した。薬物の調製はゼラチン (0.1%, w/v) 含有 Tyrode 緩衝剤を使用した。各試験系には、溶媒対照群、自然ヒスタミン遊離対照群 (無処置対照群) 及び全ヒスタミン遊離対照群 (薬物無処置群) を設けた。自然ヒスタミン遊離対照群は上記の方法で処置した肥満細胞を被験化合物や刺激剤を用いず、この試験の他の群と同じ方法で検討した。全ヒスタミン遊離量は、上記と同様の方法で処置した肥満細胞を用い、界面活性剤 Triton X-100 に 15 分間曝露して測定した。各試験で用いた濃度は以下の通りであった:

- ・ヒト結膜肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用に関する試験

オロパタジン :  $10^{-4} \sim 10^{-2} \text{M}$

ケトチフェン :  $3 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-4} \text{M}$

- ・ヒト結膜肥満細胞からのトリプターゼ遊離抑制作用に関する試験

オロパタジン :  $10^{-5} \sim 10^{-3} \text{M}$

- ・ヒト結膜肥満細胞からの PGD<sub>2</sub> 遊離抑制作用に関する試験

オロパタジン :  $10^{-4} \sim 2 \times 10^{-3} \text{M}$

各処置群と対照群の比較は、Dunnett's t 検定を用いた。

## ②成績

表ホ-9 及び図ホ-3 に示すように、オロパタジンは、抗ヒト IgE で刺激されたヒト結膜肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制し、 $10^{-4}\text{M}$  から  $2 \times 10^{-8}\text{M}$  (対数表示で -4 から -2.7) の範囲で濃度依存的な抑制を示した。試験の結果から、オロパタジンの  $\text{IC}_{50}$  値は、 $5.59 (\pm 2.77) \times 10^{-4}\text{M}$  (対数表示で -3.25) =  $209 \mu\text{g/mL} = 0.0209\%$  (w/v) と算出された。90%を超える阻害は、 $2 \sim 10 \times 10^{-8}\text{M}$  の範囲で観察された。なお、試験に用いた最高濃度 ( $10^{-2}\text{M}$  : 対数表示で -2) ではヒスタミン遊離を誘発しなかった。

ケトチフェンもヒスタミン遊離を濃度依存的に抑制し、その  $\text{IC}_{50}$  値は  $22.9 \times 10^{-6}\text{M}$  (対数表示で -4.64) であった。しかしながら、高濃度のケトチフェンではヒスタミン遊離作用がみられ、高濃度による肥満細胞の脱顆粒が示唆された。

表ホ-10、11、12 及び図ホ-4、5、6 に示すように、ヒト結膜肥満細胞からのトリプターゼ及び  $\text{PGD}_2$  遊離もオロパタジンは濃度依存的に抑制した。また、ヒスタミン遊離抑制作用とトリプターゼ遊離抑制作用及び  $\text{PGD}_2$  遊離抑制作用の間には高い相関性 [トリプターゼ ( $r = 0.79791$ )、 $\text{PGD}_2$  ( $r = 0.89145$ )] が認められた。これは、オロパタジンが肥満細胞活性化を抑制することを示唆している。 $\text{PGD}_2$  遊離に対する  $\text{IC}_{50}$  値は、 $7.36 \times 10^{-4}\text{M}$  (対数表示で -3.13) と算出された。

ケトチフェンと本剤の肥満細胞からのトリプターゼ遊離作用に関し、直接比較したデータはない。Schoch<sup>14)</sup> はヒト結膜肥満細胞を分離し、ヒト IgE で感作し、その後、抗ヒト IgE 抗体で惹起した後のケトチフェンのトリプターゼ及びヒスタミン遊離に及ぼす影響を検討した。その結果、ケトチフェンによる肥満細胞からのトリプターゼ遊離は濃度依存的に抑制され、ヒスタミン遊離抑制作用と同程度の活性を示した。しかしながら、 $10^{-4}\text{M}$  より高い濃度では抑制効果の減弱を示し、トリプターゼ遊離に対してもつり鐘型の反応を示すことを報告している。

以上の一連の試験及び文献報告の結果は、オロパタジンは肥満細胞からのヒスタミン及びトリプターゼ遊離に対し、同程度の抑制作用を有し、ケトチフェンも両生理活性物質遊離を同程度の活性で抑制することが示された。

なお、このケトチフェンとオロパタジンの肥満細胞に対する作用の違いについて、Brockman ら<sup>15)</sup> は、オロパタジンとケトチフェンは、ともに細胞膜リン脂質と相互作用を示すが、ケトチフェンはオロパタジンより大きな作用を示し、これがオロパタジンは高濃度でも細胞膜安定化作用を示すが、ケトチフェンでは脱顆粒を引き起こすことに関連することを報告しており、両薬剤の膜に対する相互作用の差によるものと推察される。

14) Schoch, C : J Ocular Pharmacol Ther 19(1), 75-81, 2003

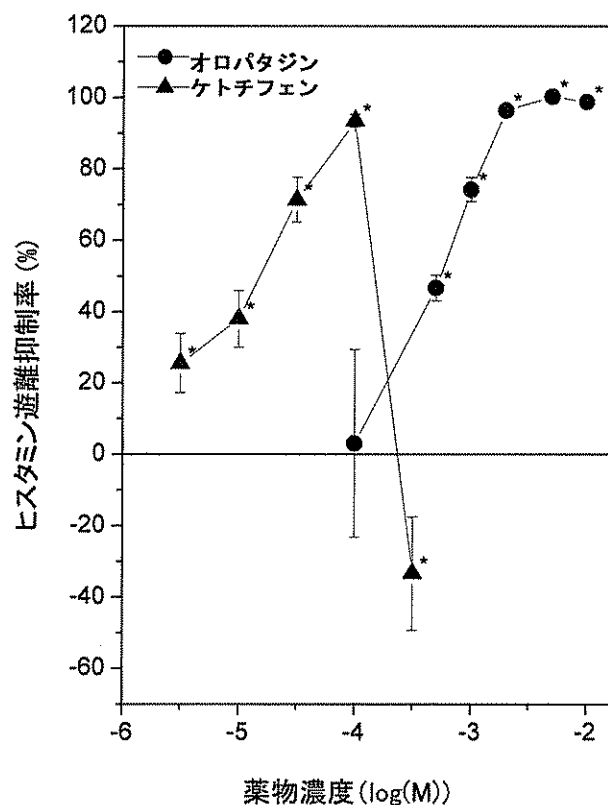
15) Brockman HL et al : Acta Ophthalmol Scand Suppl 230, 10-15, 2000

表ホー9 オロパタジンとケトチフェンによるヒスタミン遊離の抑制作用

| 薬物名    | 濃度                 |      | ヒスタミン(pg/<br>細胞)<br>(平均値±SD) | 抑制率<br>(%)       |
|--------|--------------------|------|------------------------------|------------------|
|        | M                  | Log  |                              |                  |
| オロパタジン | $10^{-2}$          | -2   | $0.133 \pm 0.009$            | $95.9 \pm 0.3$   |
|        | $5 \times 10^{-3}$ | -2.3 | $0.086 \pm 0.018$            | $97.3 \pm 0.6$   |
|        | $2 \times 10^{-3}$ | -2.7 | $0.209 \pm 0.025$            | $93.5 \pm 0.8$   |
|        | $10^{-3}$          | -3.0 | $0.899 \pm 0.106$            | $72.1 \pm 3.3$   |
|        | $5 \times 10^{-4}$ | -3.3 | $1.86 \pm 0.113$             | $45.3 \pm 3.5$   |
|        | $10^{-4}$          | -4.0 | $3.122 \pm 0.821$            | $3.0 \pm 25.5$   |
|        | 対照*                |      | $3.22 \pm 0.09$              | -                |
| ケトチフェン | $3 \times 10^{-4}$ | -3.5 | $4.029 \pm 0.456$            | $-33.4 \pm 15.9$ |
|        | $10^{-4}$          | -4   | $0.400 \pm 0.051$            | $93.5 \pm 1.8$   |
|        | $3 \times 10^{-5}$ | -4.5 | $1.034 \pm 0.179$            | $71.3 \pm 6.3$   |
|        | $10^{-5}$          | -5   | $1.988 \pm 0.227$            | $38 \pm 7.9$     |
|        | $3 \times 10^{-6}$ | -5.5 | $2.344 \pm 0.238$            | $25.5 \pm 8.3$   |
|        | 対照*                |      | $3.074 \pm 0.309$            | -                |

\*薬物濃度 0 の時

平均±SD、n=3



図ホー3 オロパタジンとケトチフェンによるヒスタミン遊離抑制作用

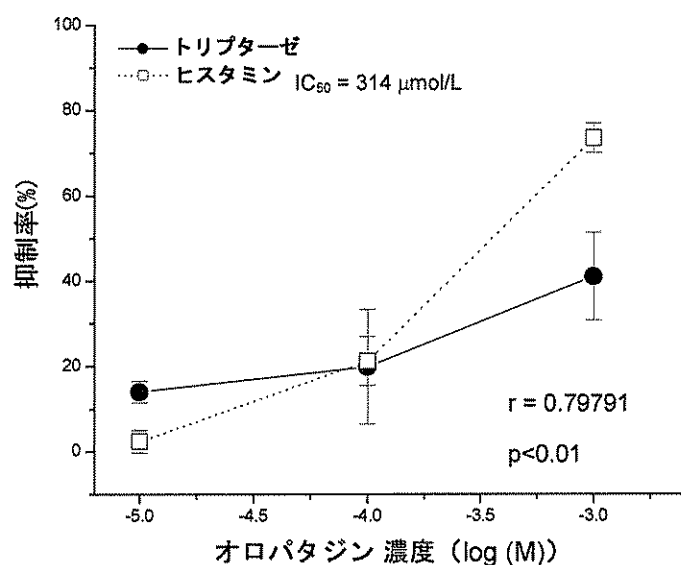
\* :  $p < 0.05$  で溶媒対照群と比べて有意な差がある (Dunnett's t 検定)

表ホー10 オロパタジンの抗ヒト IgE で刺激されたヒト結膜肥満細胞からのトリプターゼ遊離へ及ぼす影響

| 濃度               |      | トリプターゼ              |             | ヒスタミン               |             |
|------------------|------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|
| M                | Log  | (pg/細胞)<br>(平均値±SD) | 抑制率<br>(%)  | (pg/細胞)<br>(平均値±SD) | 抑制率<br>(%)  |
| 10 <sup>-3</sup> | -3.0 | 2.67 ± 0.23         | 41.0 ± 10.3 | 0.69 ± 0.52         | 73.47 ± 3.5 |
| 10 <sup>-4</sup> | -4.0 | 3.19 ± 0.30         | 19.8 ± 13.5 | 1.46 ± 0.84         | 21.2 ± 5.7  |
| 10 <sup>-5</sup> | -5.0 | 3.32 ± 0.30         | 14.1 ± 2.5  | 1.73 ± 0.04         | 2.47 ± 2.6  |
| 対照*              |      | 3.63 ± 0.12         | -           | 1.77 ± 0.05         | -           |

\*薬物濃度 0 の時

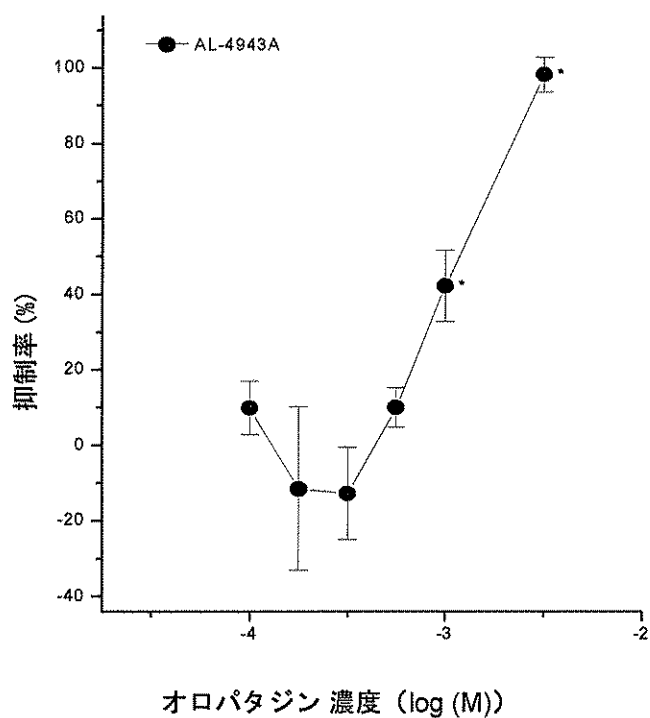
平均±SD、n=3



図ホー4 オロパタジンの抗ヒト IgE で刺激されたヒト結膜肥満細胞からのトリプターゼ遊離へ及ぼす影響

表ホー11 オロパタジンの抗ヒトIgEで刺激されたヒト結膜肥満細胞からのトリプターゼ遊離へ及ぼす影響（図ホー5 から直線部の4濃度の値を表記した）

| 濃度                   |       | トリプターゼ<br>(pg/細胞) | 抑制率 (%) |
|----------------------|-------|-------------------|---------|
| M                    | Log   |                   |         |
| $3 \times 10^{-3}$   | -2.5  | $1.36 \pm 0.18$   | 98.1    |
| $10^{-3}$            | -3.0  | $3.57 \pm 0.37$   | 42.3    |
| $5.6 \times 10^{-4}$ | -3.25 | $4.85 \pm 0.21$   | 10.0    |
| $3 \times 10^{-4}$   | -3.5  | $5.74 \pm 0.48$   | -12.7   |
| 0                    |       | $5.24 \pm 1.23$   | -       |



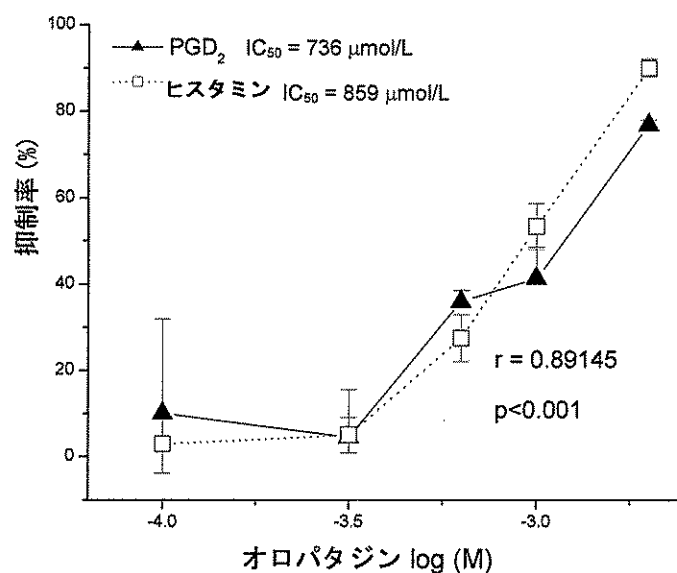
図ホー5 オロパタジンの抗ヒトIgEで刺激されたヒト結膜肥満細胞からのトリプターゼ遊離へ及ぼす影響

表ホー12 オロパタジンの抗ヒト IgE で刺激されたヒト結膜肥満細胞からの  
PGD<sub>2</sub>遊離へ及ぼす影響

| 濃度                 |      | PGD <sub>2</sub>    |            | ヒスタミン               |            |
|--------------------|------|---------------------|------------|---------------------|------------|
| M                  | Log  | (pg/細胞)<br>(平均値±SD) | 抑制率<br>(%) | (pg/細胞)<br>(平均値±SD) | 抑制率<br>(%) |
| 2x10 <sup>-3</sup> | -2.7 | 13.07±0.48          | 76.8±1.1   | 0.54±0.07           | 89.9±2.2   |
| 10 <sup>-3</sup>   | -3   | 28.16±3.08          | 41.3±7.2   | 1.71±0.17           | 53.3±5.3   |
| 6x10 <sup>-4</sup> | -3.2 | 30.45±1.11          | 35.9±2.6   | 2.53±0.17           | 27.4±5.5   |
| 3x10 <sup>-4</sup> | -3.5 | 43.78±4.66          | 4.5±11.0   | 3.24±0.12           | 5.0±4.1    |
| 10 <sup>-4</sup>   | -3.4 | 41.43±9.29          | 10.0±21.9  | 3.30±0.21           | 2.9±6.6    |
| 対照*                |      | 45.71±11.69         | -          | 3.4±0.078           | -          |

\*薬物濃度 0 の時

平均±SD、n=3



図ホー6 オロパタジンの抗ヒト IgE で刺激されたヒト結膜肥満細胞からの  
PGD<sub>2</sub>遊離へ及ぼす影響

## 2) 精製ヒト結膜肥満細胞における $\text{TNF}\alpha$ 遊離に対するオロパタジンの影響 添付資料ホ-6

### ①方法

ヒト結膜肥満細胞は、遺体組織から精製された (>95%)。組織をまず低濃度のヒアルロニダーゼとコラーゲナーゼで消化した後、高濃度のこれらの酵素を使ってさらに消化した。各消化後、分離された細胞を採取し、集め合せた細胞を遠心分離して得たペレットを肥満細胞培養液に再懸濁した。その懸濁液を 24 穴プレートに移し培養した。その後細胞をプレートより採取し、Percoll 勾配遠心分離により肥満細胞を採取精製し、試験使用まで 24 時間培養した。

細胞にオロパタジンを添加して 30 分培養した後、抗 IgE 抗体で 90 分間刺激し、上清中の  $\text{TNF}\alpha$  を ELISA 法にて定量した。用いたオロパタジン濃度は  $3 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-3} \text{M}$  であった。

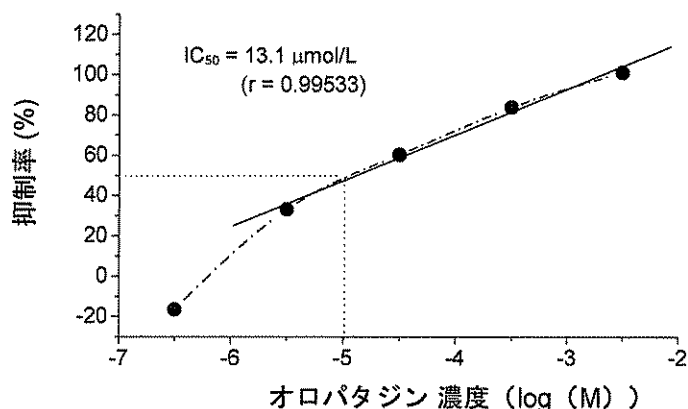
### ②成績

オロパタジンの前処置は、抗 IgE 抗体による  $\text{TNF}\alpha$  遊離を用量依存的に抑制し、 $\text{IC}_{50}$  値は  $1.3 \times 10^{-5} \text{M}$  (対数表示で -4.88) であった。  $3 \times 10^{-3} \text{M}$  (対数表示で -2.52) のオロパタジンは  $\text{TNF}\alpha$  遊離を、ほぼ無処置対照群と同程度まで抑制した (表ホ-13、図ホ-7)。

表ホ-13 オロパタジンによる  $\text{TNF}\alpha$  遊離抑制作用

| 濃度                 |      | $\text{TNF}\alpha$ |                           |                  |
|--------------------|------|--------------------|---------------------------|------------------|
| M                  | Log  | n                  | (pg/細胞)<br>(平均値 $\pm$ SD) | 抑制率<br>(%)       |
| $3 \times 10^{-3}$ | -2.5 | 5                  | $25.2 \pm 5.5$            | $101.1 \pm 17.0$ |
| $3 \times 10^{-4}$ | -3.5 | 5                  | $30.8 \pm 7.7$            | $83.8 \pm 23.7$  |
| $3 \times 10^{-5}$ | -4.5 | 4                  | $38.5 \pm 5.0$            | $60.2 \pm 15.3$  |
| $3 \times 10^{-6}$ | -5.5 | 3                  | $47.0 \pm 9.4$            | $33.1 \pm 29.0$  |
| $3 \times 10^{-7}$ | -6.5 | 2                  | 63.5                      | -16.5            |
| 対照*                |      | 7                  | $58.08 \pm 6.61$          | —                |

\*薬物濃度 0 の時



図ホ-7 オロパタジンによる  $\text{TNF}\alpha$  遊離抑制作用 (実線は値の回帰直線を示す)