# ヘルニコア椎間板注用 1.25 単位

# コンドリアーゼ

## 2.4 非臨床試験の概括評価

生化学工業株式会社

# 目次

2.4 非臨床試験の概括評価 ....4
2.4.1 非臨床試験計画概略 ....4
2.4.2 薬理試験 ....5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 ....5
2.4.2.2 副次的薬理試験 ....6
2.4.2.3 安全性薬理試験 ....6
2.4.3 薬物動態試験 ....6
2.4.3.1 吸収 ....6
2.4.3.2 分布 ....7
2.4.3.3 代謝 ....7
2.4.3.4 排泄 ....7
2.4.4 毒性試験 ....7
2.4.4.1 単回投与毒性 ....7
2.4.4.2 反復投与毒性 ....8
2.4.4.3 遺伝毒性 ....9
2.4.4.4 生殖発生毒性 ....9
2.4.4.5 局所刺激性 ....9
2.4.4.6 抗原性 ....9
2.4.4.7 不純物の毒性 ....10
2.4.4.8 長期保存原薬の局所刺激性 ....10
2.4.4.9 原薬製法変更に伴う同等性 ....10
2.4.4.10 添加物の安全性評価 ....10
2.4.5 総括及び結論 ....10
2.4.6 参考文献 ....12

## 略号一覧

| 略号 | 省略していない表現（英語） | 省略していない表現（日本語） |
|---|---|---|
| $AUC_{0\text{-last}}$ | Area under the plasma concentration-time curve from zero to the last measurable time | 0 から最終測定可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 |
| $C_{max}$ | Maximum plasma concentration | 最高血漿中濃度 |
| GAG | Glycosaminoglycan | グリコサミノグリカン |
| GLP | Good laboratory practice | 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令 |
| HEK | Human embryonic kidney | ヒト胎児腎臓 |
| hERG | Human ether-à-go-go related gene | ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子 |
| MRI | Magnetic resonance imaging | 核磁気共鳴画像法 |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis | ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動法 |
| TCA | Trichloroacetic acid | トリクロロ酢酸 |
| TK | Toxicokinetics | トキシコキネティクス |
| U | Unit | 単位 |

## 2.4　非臨床試験の概括評価

### 2.4.1　非臨床試験計画概略

腰椎椎間板ヘルニアは、脊柱管内に突出あるいは脱出した腰椎椎間板組織（ヘルニア）が馬尾・神経根を圧迫して下肢痛、腰痛を引き起こす病態である。腰椎椎間板ヘルニアの治療法は保存療法が原則であるが、保存療法で改善が得られない患者は、さらに保存療法を継続しながら症状の軽減を待つか、手術療法以外に治療選択肢がない。化学的髄核融解術は、手術療法に比べてより低侵襲であり、保存療法と手術療法の中間に位置する治療法として医療現場より求められており、化学的髄核融解術に用いる薬剤の医療ニーズはある。これまでに化学的髄核融解術に用いる薬剤として、1980 年代に欧米でタンパク質分解酵素であるキモパパインが用いられた [(1)] [(2)]。キモパパインは、十分な臨床効果を示したが、異種タンパク質であることに起因するアナフィラキシーやタンパク質分解酵素であるために神経組織などに作用し、稀ではあるが重篤な神経障害を誘導することが報告されている [(3)] [(4)] [(5)] [(6)]。

コンドリアーゼは、グラム陰性桿菌の一種である *Proteus vulgaris* より分離・精製された分子量約 11 万のグリコサミノグリカン（GAG）分解酵素である [(7)]。コンドリアーゼを腰椎椎間板ヘルニア患者の椎間板内に投与することで、髄核中に存在するプロテオグリカンの GAG が分解され髄核の保水能が低下する。その結果、椎間板内圧が低下し、ヘルニアによる脊髄神経根への圧迫が軽減し、腰椎椎間板ヘルニア患者の症状（下肢痛、腰痛など）が改善されることが期待される。また、コンドリアーゼは、GAG を特異的に分解するが、タンパク質分解活性を有しないことからキモパパインでみられたような神経組織などへの重篤な障害が発生しにくいことが推察された。そこで、腰椎椎間板ヘルニアに対して化学的髄核融解術を安全に施行し得る薬剤の開発を目指し、コンドリアーゼの薬理学的、薬物動態学的及び毒性学的特徴を明らかにする目的で以下の各種試験を実施した。

効力を裏付ける薬理試験として、椎間板ヘルニア罹患イヌにおける椎間板ヘルニア臨床症状の改善作用を検討した。また、化学的髄核融解術に用いる薬剤の有効性評価に使用されている試験系 [(8)] [(9)] として、正常動物における椎間板高狭小化作用を検討した。作用機序に関する試験では、基質特異性、髄核構成成分遊出作用と髄核膨潤抑制作用、及び椎間板内圧低下作用を検討した。副次的薬理試験として、ヒトと各種動物の髄核体積を比較し、非臨床試験結果をヒトに外挿する際の指標とした。安全性薬理試験として、ラット及びイヌを用いて中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響を、また hERG 導入 HEK 293 細胞を用いて hERG 電流に及ぼす影響を検討した。なお、安全性薬理試験は、安全性薬理試験ガイドラインに準拠し、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（GLP）適合試験として実施した。

薬物動態試験として、薬理試験及び毒性試験に用いた動物種であるラット、イヌ及びカニクイザルを用いて単回投与時及び反復投与時の薬物動態を検討した。イヌ及びカニクイザルを用いた椎間板内投与試験に加え、コンドリアーゼが全身循環血中へ移行した後の薬物動態を検討するため、ラット、イヌ及びカニクイザルを用いた静脈内投与試験を実施した。コンドリアーゼは、グラム陰性桿菌が産生するタンパク質であるため、「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」（平成 24 年 3 月 23 日薬食審査発 0323 第 1 号） [(10)] を参考として、低分子医薬品で通常実施される非臨

床薬物動態試験項目の一部（in vitro 試験での血漿タンパク結合、推定代謝経路、in vitro 試験での代謝、薬物代謝酵素誘導及び阻害）については試験を実施しなかった。

主たる毒性試験は、GLP 適合試験として実施した。単回投与毒性試験は、カニクイザル、ウサギ及びイヌを用いて椎間板内投与により実施した。さらに、椎間板内投与では十分な全身曝露が達成できないため、マウス、ラット及びイヌを用いた単回静脈内、筋肉内及び皮下投与毒性試験を実施した。反復投与毒性試験は、ラット及びイヌを用いた 4 週間反復皮下投与試験を実施した。遺伝毒性試験は、細菌及びほ乳類の培養細胞を用いる in vitro 試験及びマウスを用いる in vivo 小核試験を実施した。がん原性試験は、コンドリアーゼの臨床適用は椎間板内への単回投与であり、また、単回及び反復投与毒性試験並びに遺伝毒性試験で発がん性が懸念される結果は認められなかったことから実施しなかった。生殖発生毒性試験は、ラットを用いた受胎能試験、ラット及びウサギを用いた胚･胎児発生毒性試験、並びにラットを用いた出生前後の発生毒性試験を皮下投与により実施した。コンドリアーゼの反復投与により血清中の抗コンドリアーゼ抗体価の上昇がみられ、投与期間を通じた全身曝露の継続ができていなかった可能性が考えられたことから、一部の試験は投与期間を分割してコンドリアーゼを投与した。局所刺激性試験は、ウサギ及びモルモットを用いて、単回椎間板内、髄腔内、脊髄神経根内、筋肉内及び皮内投与試験を実施した。その他の毒性試験として以下の試験を実施した。抗原性試験は、モルモットを用いて実施した。不純物の毒性試験は、コンドリアーゼ原薬中に含まれる可能性が考えられる　**不純物A***　について、ラットを用いた単回及び反復投与毒性試験並びに遺伝毒性試験を実施した。長期保存原薬の局所刺激性試験は、コンドリアーゼ原薬由来の　**不純物C***　を含む保存期間の異なる複数の原薬について、ウサギを用いた椎間板内投与による試験を実施した。原薬製法変更に伴う同等性試験は、製法変更後のコンドリアーゼ原薬について、ラットを用いた単回皮下投与毒性試験を実施した。さらに、添加物の安全性評価は、コンドリアーゼ製剤中に含有する添加物（マクロゴール 4000 及び精製白糖）について、ウサギを用いた椎間板内投与局所刺激性試験を実施した。

## 2.4.2　薬理試験

### 2.4.2.1　効力を裏付ける試験

椎間板ヘルニアに罹患したイヌの椎間板内に250 U/mLのコンドリアーゼを20～200 µLの用量で単回投与した結果、姿勢反応や脊髄反射障害などのヘルニア症状が改善された（参考資料）。また、化学的髄核融解術に用いる薬剤の有効性評価に使用されている、正常動物における椎間板高狭小化作用を評価した。正常ウサギの椎間板内にコンドリアーゼを単回投与した結果、2～200 mU/disc の用量で、椎間板高狭小化の指標である椎間板高インデックスの割合が用量依存的かつ有意に減少した。正常ヒヒにおいても、同様な椎間板高インデックスの割合の有意な減少がみられた（参考資料）。これらの結果より、コンドリアーゼが化学的髄核融解術に用いる薬剤として有用であることが示唆された。

作用機序に関する検討では、コンドリアーゼの基質特異性、髄核からのコンドロイチン硫酸の遊出、保水能の指標である髄核膨潤率抑制作用、及び正常動物を用いた椎間板内圧低下作用を検討した。基質特異性の試験では、コンドリアーゼは、GAG であるコンドロイチン硫酸、コンドロイチン及びヒ



***新薬承認情報提供時に置き換えた**

アルロン酸に対して分解活性を有し、ヘパリン、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸には作用せず、また、タンパク質分解活性を有しないことが示された。正常ウサギの摘出髄核を用いた髄核膨潤抑制試験において、コンドリアーゼは、髄核からのコンドロイチン硫酸の遊出率を用量依存的かつ有意に増加させ、髄核の保水能の指標である髄核膨潤率を用量依存的かつ有意に減少させた。さらに、正常ヒツジの椎間板内にコンドリアーゼを、1 又は 50 U/disc の用量で単回投与した結果、椎間板高の狭小化に随伴し、椎間板内圧の有意な低下がみられた（参考資料）。これらの結果から、コンドリアーゼは、髄核中プロテオグリカンの GAG、特にコンドロイチン硫酸を分解し、髄核の保水能を低下させることにより椎間板内圧が低下することが示され、これに伴い、脊髄神経根への圧迫が軽減し、ヘルニアによる症状が改善されることが示唆された。

#### 2.4.2.2 副次的薬理試験

動物試験での薬効をヒトに外挿する場合の指標として、イヌ（ビーグル犬）、サル（カニクイザル）及びウサギ（日本白色種ウサギ）の髄核体積をヒト髄核体積と比較した（参考資料）。髄核体積は、MRI あるいは摘出した髄核の実測体積から求めた。その結果、ヒト髄核体積は、イヌの 70.2 倍、サルの 61.7 倍、ウサギの 330～358 倍と算定された。

#### 2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験において、コンドリアーゼは、0.2、2 及び 20 U/kg の単回皮下投与でラットの中枢神経系、呼吸器系及びビーグル犬の心血管系に影響を及ぼさなかった。さらに、コンドリアーゼは、4.36 mU/mL までの濃度でパッチクランプ法を用いた hERG 導入 HEK 293 細胞における hERG 電流に対し影響しなかった。これらの結果からコンドリアーゼは重篤な副作用を発現しないことが示唆された。

### 2.4.3 薬物動態試験

#### 2.4.3.1 吸収

ビーグル犬に $^{125}$I-コンドリアーゼを 50 U/disc の用量で単回椎間板内投与した場合、血漿中放射能濃度推移には明瞭なピークはみられず、14 日間 0.2～0.5 mU eq./mL のほぼ同程度の濃度で推移した。また、血漿中コンドリアーゼ濃度は、定量下限未満とわずかであったことから、$^{125}$I-コンドリアーゼを単回椎間板内投与した場合、コンドリアーゼは緩やかに全身循環血中へ移行すると考えられた。

ラット、ビーグル犬及びカニクイザルに $^{125}$I-コンドリアーゼを単回静脈内投与した場合、血漿中コンドリアーゼ濃度は 1.0～1.6 時間の終末相半減期で速やかに消失したことから、全身循環血中に移行したコンドリアーゼは、速やかに消失することが示された。

### 2.4.3.2　分布

ビーグル犬に $^{125}$I-コンドリアーゼを 50 U/disc の用量で単回椎間板内投与した場合、投与後 3 及び 14 日において主要組織中放射能が甲状腺を除き投与量の 0.1%以下とわずかであったことより、コンドリアーゼは緩やかに全身に移行すると推察された。

ビーグル犬に $^{125}$I-コンドリアーゼを 50 U/disc の用量で単回椎間板内投与した場合、投与椎間板周辺組織の局所オートラジオグラムでは、放射能は投与部位の椎間板内に限局していた。また、椎間板中酵素活性は、投与後 14 日では 30.8%が残存しており、コンドリアーゼは椎間板内において酵素活性を維持しながら長時間残存していた。

### 2.4.3.3　代謝

ビーグル犬に $^{125}$I-コンドリアーゼを 50 U/disc の用量で単回椎間板内投与した場合、SDS-PAGE における投与椎間板組織の主要な放射能バンドは未変化の $^{125}$I-コンドリアーゼと同じ位置に検出されたことから、コンドリアーゼは椎間板中においてほとんど代謝を受けず、未変化体として存在すると推察された。

### 2.4.3.4　排泄

ビーグル犬に $^{125}$I-コンドリアーゼを 50 U/disc の用量で単回椎間板内投与した時の放射能の排泄は遅く、投与後 14 日までの尿中に投与量の 38.4%、糞中に 4.0%の放射能が排泄された。なお、尿中の放射能は、TCA によってほとんど沈殿しなかったことから、尿中に存在する放射能は $^{125}$I-コンドリアーゼより遊離した $^{125}$I が主であると考えられた。一方、コンドリアーゼは、タンパク質であることから、一般的なバイオ医薬品と同様小さなペプチド及びアミノ酸へ分解され [(10)] 、排泄されると考えられた。

## 2.4.4　毒性試験

### 2.4.4.1　単回投与毒性

カニクイザルにコンドリアーゼを 0.25 又は 10 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 1、4 及び 13 週に観察を行った。さらに、コンドリアーゼを 0.25、1.6 又は 10 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 26 週に観察を行った。その結果、すべてのコンドリアーゼ投与群で投与後 1 週から、髄核及び線維輪にコンドリアーゼの薬効に関連した変化（薬理作用の延長上の変化）が認められたほか、軟骨終板及び成長板に細胞の変性及び壊死、染色性低下がみられ、さらに時間の経過とともに軟骨終板では血管侵入、骨化及び菲薄化、成長板では限局性欠損がみられた。椎体においては骨髄細胞の減少及び壊死並びに骨新生に関連した変化が認められた。ただし、これらの変化は、重度なものではなく、一部の変化は投与後 13 週では明らかな回復傾向を示した。投与後 26 週では、軟骨終板の染色性低下及び菲薄化並びに成長板の限局性欠損がみられたが、組織変化は沈静化していると考え

られた。投与後 26 週以降は再び壊死などの急性期の変化が誘発される可能性は低いと考えられ、組織像に著変は生じないと推察された。

ウサギにコンドリアーゼを 0.2、4 又は 100 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 1.5 及び 2 年に観察を行った（参考資料）。コンドリアーゼの薬効に関連した変化のほか、4 U/disc 以上の群で投与後 2 年まで椎体（二次骨化中心起源）において骨改変を伴わない骨細胞壊死がみられたが、組織構造の異常はみられなかった。

ビーグル犬にコンドリアーゼを 0.25、1、4、16 又は 50 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 13 及び 26 週に観察を行った。さらに、コンドリアーゼを 50 U/disc の用量で単回椎間板内投与し、投与後 1、2 及び 3 年に観察を行った。コンドリアーゼの薬効に関連した変化のほか、4 U/disc 以上の群で投与後 13 週及び 26 週ともに髄核及び軟骨終板の消失、椎体への髄核の脱出、椎体における骨梁の改変及び炎症性変化がみられた。一旦消失した髄核や軟骨終板組織が回復することはなかったが、投与後 3 年では椎体における炎症性変化は沈静化した。また、一般状態及び各種検査項目に異常は認められず、これら椎間板及び椎体における変化は全身機能に影響を及ぼすものではないと考えられた。

上記の動物種のうちカニクイザルは、椎間板構造が最もヒトと類似していることから [(11)] [(12)]、コンドリアーゼの影響を考察する上で最も重要と考えられた。カニクイザルにおいては、申請用量の 500 倍弱に相当する用量のコンドリアーゼを投与したが、投与後 1 週から認められた変化は、投与後 26 週には沈静化し修復を示唆する組織像を示した。また、投与後 26 週の組織像はヒトの加齢に伴い自然発生が報告されている変化 [(13)] [(14)] と同質のものであり、椎体の変形や脆弱化を示唆するものではないと考えられた。

以上のことから、コンドリアーゼの単回椎間板内投与により、ヒトにおいて重篤な組織変化が誘発される可能性は低いと考えられた。

その他の投与経路としては、マウス、ラット及びビーグル犬にコンドリアーゼを 2000 U/kg の用量で単回静脈内、筋肉内及び皮下投与した。いずれの動物種及び投与経路においても死亡例はみられず、概略の致死量は雌雄ともに 2000 U/kg を超える用量であった。ラットを用いた皮下投与試験における $C_{max}$ は、雄で 132 mU/mL、雌で 236 mU/mL、$AUC_{0\text{-last}}$ は雄で 300 mU·h/mL、雌で 563 mU·h/mL であった。ビーグル犬を用いた皮下投与試験における $C_{max}$ は、雄で 2560 mU/mL、雌で 2840 mU/mL、$AUC_{0\text{-last}}$ は雄で 20656 mU·h/mL、雌で 23764 mU·h/mL であった。

### 2.4.4.2　反復投与毒性

ラット及びビーグル犬にコンドリアーゼを 2、20 又は 200 U/kg/日の用量で 4 週間反復皮下投与した。ラット及びビーグル犬における無毒性量は、雌雄ともに 200 U/kg/日と判断した。なお、すべてのコンドリアーゼ投与群で血清中抗コンドリアーゼ抗体が検出された。トキシコキネティクス（TK）測定の結果、ラット及びビーグル犬ともに、投与 1 日の血漿中コンドリアーゼ濃度は定量可能であったが、投与 14 又は 15 日及び投与終了後は定量下限未満であった。

### 2.4.4.3 遺伝毒性

細菌及びほ乳類の培養細胞を用いる in vitro 試験、及びマウスを用いる in vivo 小核試験は、いずれも陰性の結果であり、コンドリアーゼは遺伝毒性を有しないと考えられた。

### 2.4.4.4 生殖発生毒性

生殖発生毒性試験は、皮下投与により実施したが、一定期間の反復投与後に認められる抗コンドリアーゼ抗体が原因と推察される、血漿中コンドリアーゼ濃度の消失がみられた。そこで、同一動物への反復投与期間を 8 日以内とし、評価すべき生殖発生過程を通しての全身曝露が達成されるように投与期間を分割した試験を実施した。

投与期間分割による試験では、TK 測定の結果、初回投与後及び最終投与後の血漿中コンドリアーゼ濃度が定量下限以上であることが確認されたため、評価すべき生殖発生過程を通しての全身曝露が達成されていると判断した。

ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギにおける胚・胎児発生に関する試験、ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験のいずれにおいても、親動物の生殖機能及び胚・胎児・出生児への影響はみられず、生殖発生毒性に関する無毒性量はいずれも 200 U/kg/日と判断した。

### 2.4.4.5 局所刺激性

ウサギにコンドリアーゼ製剤（7.5 U/mL）を椎間板内（0.075 U/disc）、髄腔内（7.5 U/site）及び筋肉内（7.5 U/site）に単回投与した。椎間板内投与では髄核のみに刺激性が認められ、髄腔内投与では刺激性は認められなかった。筋肉内投与では軽微な刺激性が認められた。モルモットにコンドリアーゼを 8 U/site まで単回皮内投与した結果、刺激性は認められなかった。

### 2.4.4.6 抗原性

モルモットを用いた能動的全身性アナフィラキシー試験、受身皮膚アナフィラキシー試験及び受身赤血球凝集試験は、いずれも陽性の結果であり、コンドリアーゼはモルモットにおいて抗原性を有すると考えられた。

一般に、モルモットやウサギを用いた抗原性試験において、薬物による感作性が認められてもアナフィラキシー反応の誘発に至らず惹起原性はないと判断される場合もある。本剤の場合、ヒト椎間板内に投与されるコンドリアーゼは微量（約 [redacted]μg）である。また、臨床試験の結果、ヒトにコンドリアーゼを投与した時の血漿中コンドリアーゼ濃度は定量下限未満であり、薬物動態試験の結果からも、椎間板内投与されたコンドリアーゼのうち極めて微量のみが緩慢に全身へ移行するものと考えられる。したがって、仮にコンドリアーゼによる椎間板ヘルニア治療の既往歴のある、また、別の何らか

の原因により抗コンドリアーゼ抗体を有する患者に対して、コンドリアーゼが投与されたとしても重篤なアレルギー症状の発現に至る可能性は低いと考えられた。

### 2.4.4.7　不純物の毒性

コンドリアーゼ原薬中に含まれる可能性が考えられる不純物、**不純物A***を 6 mg/kg で単回皮下投与した試験では、**不純物A***投与の影響はみられなかった。また、28 日間反復皮下投与した試験では、**不純物A***の無毒性量は雄で 0.15 mg/kg/日、雌で 0.6 mg/kg/日であった。細菌又はほ乳類の培養細胞を用いる遺伝毒性試験では、いずれも陰性の結果であった。

### 2.4.4.8　長期保存原薬の局所刺激性

保存期間の異なる複数のコンドリアーゼ原薬（原薬由来の**不純物C***を含む）を、2 U/disc の用量でウサギに単回椎間板内投与した。いずれのコンドリアーゼ原薬においても、髄核、線維輪並びに椎体（二次骨化中心起源）の骨及び骨髄に対して刺激性が認められたが、軟骨終板及び椎間板周囲の椎体組織に影響はみられなかった。また、いずれの原薬においても刺激性に差はなかった。

### 2.4.4.9　原薬製法変更に伴う同等性

コンドリアーゼ原薬の製法は、本申請に至るまでに 3 回変更されているため、それぞれの製法変更後の原薬について、ラットを用いた単回皮下投与試験を実施した。いずれの試験においても 2000 U/kg の用量で死亡例はみられず、製法変更前後の原薬で毒性に差はなかった。

### 2.4.4.10　添加物の安全性評価

コンドリアーゼ製剤の添加物は、椎間板内投与での使用実績はないことから椎間板内投与による局所刺激性試験を実施した。ウサギに、添加物であるマクロゴール 4000、精製白糖又はプラセボ製剤を椎間板内投与した結果、いずれも刺激性は認められなかった。

## 2.4.5　総括及び結論

コンドリアーゼは、GAG を特異的に分解する酵素である [(7)]。コンドリアーゼを腰椎椎間板ヘルニア患者の椎間板内に投与することで、髄核中に存在するプロテオグリカンの GAG が分解され、髄核の保水能が低下する。その結果、椎間板内圧が低下し、ヘルニアによる脊髄神経根への圧迫が軽減し、腰椎椎間板ヘルニア患者の症状（下肢痛、腰痛など）が改善されることが期待された。そこで、コンドリアーゼの有効性を検討するために各種薬理評価を実施し、以下の結果が得られた。椎間板ヘルニアに罹患したイヌの椎間板内へコンドリアーゼを単回投与した結果、ヘルニア臨床症状の改善効果が

示された。また、化学的髄核融解術に用いる薬剤の有効性評価に使用されている試験系として、正常動物における椎間板高狭小化を評価した結果、コンドリアーゼの単回椎間板内投与は椎間板高の狭小化作用を示した。これらの結果から、コンドリアーゼが化学的髄核融解術に用いる薬剤として有用であることが示唆された。作用機序に関する試験として、基質特異性、髄核構成成分遊出作用及び髄核膨潤抑制作用、並びに椎間板内圧低下作用を検討した。コンドリアーゼは、コンドロイチン硫酸に対して高い基質特異性を示した。また、摘出髄核を用いた試験において、コンドリアーゼは、髄核からのコンドロイチン硫酸の遊出を増加させ、髄核の保水能の指標である髄核膨潤率について抑制作用を示した。さらに、ヒツジにおけるコンドリアーゼの単回椎間板内投与は、椎間板内圧の低下作用を示した。以上の結果から、コンドリアーゼを椎間板内に投与することで、髄核中に存在するプロテオグリカンの GAG が分解され、髄核の保水能が低下すること、また、それに伴い椎間板内圧が低下し、ヘルニアによる神経根への圧迫が軽減され、腰椎椎間板ヘルニア患者の症状（下肢痛、腰痛など）を改善することが示唆された。

安全性薬理試験において、コンドリアーゼの中枢神経系、呼吸器系、心血管系に対する影響は認められず、重篤な副作用を発現しないと考えられた。

イヌの $^{125}$I-コンドリアーゼ単回椎間板内投与試験において、投与椎間板中には投与後 14 日でも酵素活性と放射能の残存が認められたことから、コンドリアーゼは椎間板内において酵素活性を維持しながら長時間残存することが明らかとなった。椎間板内投与後の甲状腺を除く主要組織中の放射能は、いずれも投与量の 0.1%以下とわずかであり、また全身への曝露も極めて低いと考えられることから、コンドリアーゼは投与椎間板中から緩やかに全身に移行すると推察された。また、ラット、イヌ及びカニクイザルの $^{125}$I-コンドリアーゼ単回静脈内投与試験における血漿中放射能濃度推移より、全身循環血中に移行したコンドリアーゼは速やかに消失することが示された。なお、今回コンドリアーゼの詳細な代謝試験は実施していないが、コンドリアーゼはタンパク質であることから一般的なバイオ医薬品と同様、小さなペプチド及びアミノ酸へ分解され [(10)] 、排泄されると考えられた。

コンドリアーゼの単回椎間板内投与により、標的部位である髄核及び線維輪に加え、椎間板に隣接する椎体の一部にまで組織障害性が及ぶ可能性が示された。しかしながら、ヒトと椎間板構造が類似しているカニクイザルにおいて、その障害の程度は椎体の基本構造や全身機能に影響を及ぼすものではなく、時間の経過とともに一部の変化は回復性を示し、障害は沈静化することが確認されたことから、ヒトにおいて重篤な組織変化は誘発されないものと考えられた。また、コンドリアーゼの全身毒性、遺伝毒性及び生殖発生毒性は認められなかった。コンドリアーゼの抗原性については、ヒトにおいて感作性を示す可能性は否定できないが、臨床用法・用量が椎間板内への微量の単回投与であることや薬物動態試験の成績を踏まえ、アレルギー症状発現の可能性は低いと考えられた。

以上、薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の結果から、コンドリアーゼは単回椎間板内投与により、GAG を特異的に分解することでヘルニア臨床症状を改善すること、及びヒトにおける安全性について懸念すべき問題はないことが示唆された。すなわち、コンドリアーゼは臨床において安全で有用な化学的髄核融解術用薬剤になると期待された。

## 2.4.6　参考文献


（1） Smith L. Enzyme dissolution of the nucleus pulposus in humans. JAMA. 1964;187:137-140.

（2） Brown MD. Update on chemonucleolysis. Spine. 1996;21:62S-68S.

（3） Mackinnon SE, Hudson AR, Llamas F, Dellon AL, Kline DG, Hunter DA. Peripheral nerve injury by chymopapain injection. J Neurosurg. 1984;61:1-8.

（4） Agre K, Wilson RR, Brim M, Mcdermott DJ. Chymodiactin postmarketing surveillance. Demographic and adverse experience data in 29,075 patients. Spine. 1984;9:479-485.

（5） Olmarker K, Strömberg J, Blomquist J, Zachrisson P, Nannmark U, Nordborg C, et al. Chondroitinase ABC (pharmaceutical grade) for chemonucleolysis. Functional and structural evaluation after local application on intraspinal nerve structures and blood vessels. Spine. 1996;21:1952-1956.

（6） Olmarker K, Danielsen N, Nannmark U, Sennerby L, Rydevik B. Microvascular effects of chondroitinase ABC and chymopapain. Clin Orthop. 1990;257:274-279.

（7） Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. J Biol Chem. 1968;243:1523-1535.

（8） Smith L, Garvin PJ, Gesler RM, Jennings RB. Enzyme dissolution of the nucleus pulposus. Nature. 1963;198:1311-1312.

（9） Sugimura T, Kato F, Mimatsu K, Takenaka O, Iwata H. Experimental chemonucleolysis with chondroitinase ABC in monkeys. Spine. 1996;21:161-165.

（10） 「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について．薬食審査発 0323 第 1 号.

（11） Longo G, Ripalda P, Denaro V, Forriol F. Morphologic comparison of cervical, thoracic, lumbar intervertebral discs of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Eur Spine J. 2006;15:1845-1851.

（12） Eurell JAC, Kazarian LE. The vertebral cartilaginous endplate of the preadult rhesus monkey (*Macaca mulatta*). A correlative scanning electron-and light-microscopic study. Spine. 1986;11:483-486.

（13） Bernick S, Cailliet R. Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae. Spine. 1982;7:97-102.

（14） Grignon B, Grignon Y, Mainard D, Braun M. Netter P, Roland J. The structure of the cartilaginous end-plates in elder people. Surg Radiol Anat. 2000;22:13-19.