

ヘルニコア[®]椎間板注用 1.25 単位
コンドリアーゼ

2.6.1 緒言

生化学工業株式会社

目次

2.6.1 緒言.....4

2.6.1.1 医薬品の構造.....4

2.6.1.2 薬理学的特性.....7

2.6.1.3 申請した臨床適応、用量及び投与期間.....7

2.6.1.4 参考文献.....8

図

図 2.6.1.1-1. コンドリアーゼのアミノ酸配列.....5

図 2.6.1.1-2. コンドリアーゼの想定される活性中心（参考文献（2）, Figure 7 より引用）.....5

図 2.6.1.1-3. 部位特異的変異導入より想定されるコンドリアーゼのコンドロイチン硫酸の分解機構（参考文献（3）, Figure 6 より引用）.....6

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）
GAG	Glycosaminoglycan	グリコサミノグリカン

2.6.1 緒言

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。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ことに起因する下肢麻痺などの重篤な神経障害を惹起したことから、現在は販売が中止されている。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としてコンドリアーゼの研究開発を行った。

2.6.1.1 医薬品の構造

コンドリアーゼ注用の有効成分は、*Proteus vulgaris* 由来のコンドリアーゼであり、997のアミノ酸残基から構成され、分子量は約11万である。コンドリアーゼのアミノ酸配列を [図 2.6.1.1-1](#) に示す。

ATSNPAFDPK	NLMQSEIYHF	AQNNPLADFS	SDKNSILTLS	DKRSIMGNQS	50
LLWKWKGSS	FTLHKKLIVP	TDKEASKAWG	RSSTPVFSFW	LYNEKPIDGY	100
LTIDFGEKLI	STSEAQAQGFK	VKLDFTGWRA	VGVSLNNDLE	NREMTLNATN	150
TSSDGTQDSI	GRSLGAKVDS	IRFKAPSNVS	QGEIYIDRIM	FSVDDARYQW	200
SDYQVKTRLS	EPEIQFHNVK	PQLPVTPENL	AAIDLIRQRL	INEFVGGEKE	250
TNLALEENIS	KLKSDFDALN	IHTLANGGTQ	GRHLITDKQI	IYQPENLNS	300
QDKQLFDNYV	ILGNVTLMF	NISRAYVLEK	DPTQKAQLKQ	MYLLMTKHLL	350
DQGFVKGSAL	VTTHHWGYSS	RWWYISTLLM	SDALKEANLQ	TQVYDSLWY	400
SREFKSSFDM	KVSADSSDLL	YFNLSRQHL	ALLLLEPDDQ	KRINLVNFTS	450
HYITGALTQV	PPGGKDGLRP	DGTAWRHEGN	YPGYSFPAFK	NASQLIYLLR	500
DTPFSVGESG	WNNLKKAMVS	AWIYSNPEVG	LPLAGRHPFN	SPSLKSVAQG	550
YYWLAMSAKS	SPDKTLASIV	LAISDKTQNE	STATFGETIT	PASLPQGFYA	600
FNGGAFGIHR	WQDKMVTLKA	YNTNVWSSEI	YNKDNRYGRY	QSHGVAQIVS	650
NGSQLSQGYQ	QEGWDWNRMQ	GATTIHLPLK	DLDSPKPHTL	MQRGERGFSG	700
TSSLEGQYGM	MAFDLIYPAN	LERFDPNFTA	KKSVLAADNH	LIFIGSNINS	750
SDKNKNVETT	LFQHAIPTPL	NTLWINGQKI	ENMPYQTTLQ	QGDWLIDSNG	800
NGYLITQAEK	VNVSQRHQVS	AENKNRQPTQ	GNFSSAWIDH	STRPKDASYE	850
YMVFLDATPE	KMGEMAQKFR	ENNGLYQVLR	KDKDVHIILD	KLSNVTGYAF	900
YQPASIEDKW	IKKVNKPAIV	MTHRQKDTLI	VSAVTPDLNM	TRQKAATPVT	950
INVTINGKWQ	SADKNSEVKY	QVSGDNTELT	FTSYFGIPQE	IKLSPLP	

A: alanine, C: cysteine, D: aspartic acid, E: glutamic acid, F: phenylalanine,
 G: glycine, H: histidine, I: isoleucine, K: lysine, L: leucine,
 M: methionine, N: asparagine, P: proline, Q: glutamine, R: arginine,
 S: serine, T: threonine, V: valine, W: tryptophan, Y: tyrosine

図 2.6.1.1-1. コンドリアーゼのアミノ酸配列

コンドリアーゼは、その立体構造、部位特異的変異導入を加えた活性中心における反応機構に関する解析結果が報告されている (図 2.6.1.1-2, 図 2.6.1.1-3) ^{(1) (2) (3)}。

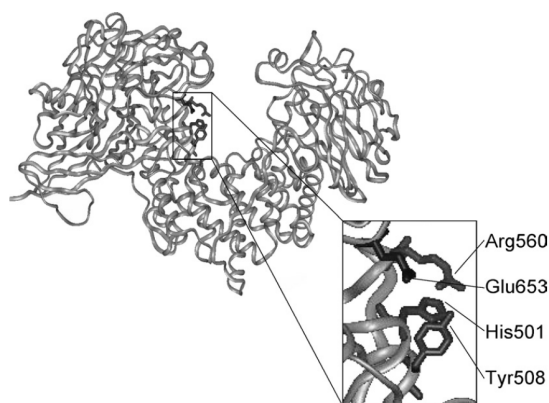


図 2.6.1.1-2. コンドリアーゼの想定される活性中心 (参考文献 (2) , Figure 7 より引用)

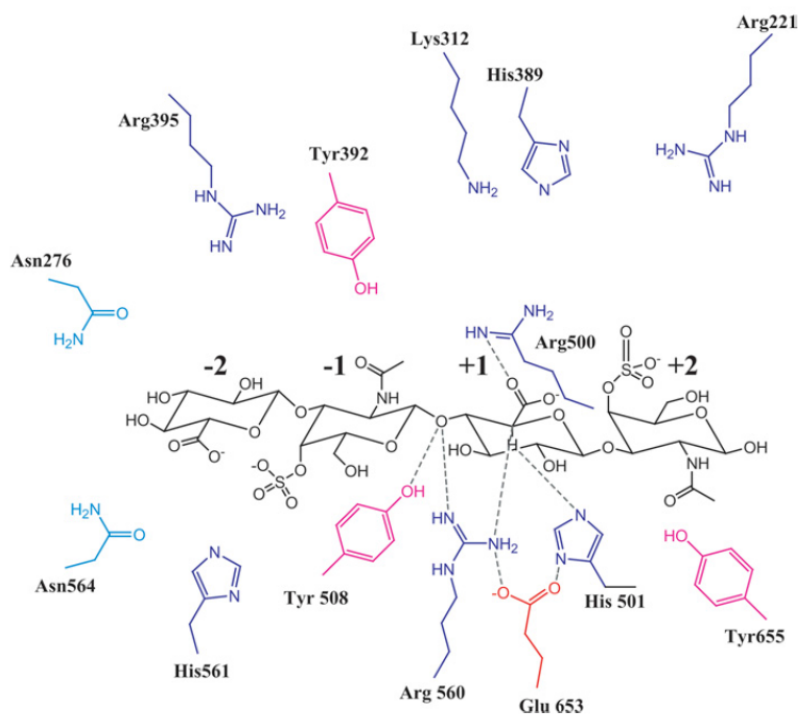


図 2.6.1.1-3. 部位特異的変異導入より想定されるコンドリラーゼのコンドロイチン硫酸の分解機構（参考文献 (3) , Figure 6 より引用）

これらの報告から、コンドリラーゼの活性中心は、Arg560、Glu653、His501、Tyr508により構成され⁽¹⁾⁽²⁾、部位特異的変異導入の結果より、Glu653が水素結合により活性中心の構造を維持し、Tyr508とArg560がコンドロイチン硫酸の分解に作用するものと推察されている⁽³⁾。

2.6.1.2 薬理学的特性

コンドリアーゼは、グリコサミノグリカン（GAG）のうち、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン及びヒアルロン酸に対して基質特異性を持ち、 β 1-4 グリコシド結合を脱離反応的に切断する⁽⁴⁾。一方、コンドリアーゼは同じく GAG であるケラタン硫酸、ヘパラン硫酸及びヘパリンを分解しない。また、コンドリアーゼは、タンパク質分解酵素活性を持たない。

椎間板ヘルニア患者の椎間板内にコンドリアーゼを単回投与することにより、髄核中プロテオグリカンの GAG が特異的に分解される。多量の水分子を取り込む性質を有する GAG の分解により保水能を低下させる結果、椎間板内圧を低下させ、ヘルニアによる脊髄神経根への圧迫を軽減し、腰椎椎間板ヘルニア患者の症状（下肢痛、腰痛など）を改善すると考えられる。

また、コンドリアーゼは、タンパク質分解酵素活性を有しないことから、キモパインで認められたような神経障害は発生しにくいと推測され、安全性が高い化学的髄核融解術用薬剤になることが期待される。

2.6.1.3 申請した臨床適応、用量及び投与期間

2.6.1.3.1 効能又は効果

保存療法で十分な改善が得られない後縦靭帯下脱出型の腰椎椎間板ヘルニア

<効能・効果に関連する使用上の注意>

- (1) 画像上ヘルニアによる神経根の圧迫が明確であり、腰椎椎間板ヘルニアの症状が画像所見から説明可能な患者にのみ使用すること。
- (2) 本剤は異種タンパクであり、再投与によりアナフィラキシー等の副作用が発現する可能性が高くなるため、本剤の投与前に十分な問診を行い、本剤の投与経験がない患者にのみ投与を行うこと。
- (3) 変形性脊椎症、脊椎すべり症、脊柱管狭窄症等の腰椎椎間板ヘルニア以外の腰椎疾患を合併する患者、骨粗鬆症、関節リウマチ等の合併により椎体に症状が認められる患者の場合は、本剤投与により腰椎不安定性（腰椎側面 X 線画像の前屈位における 5° 以上の椎間後方開大又は前後屈 X 線画像で 3 mm 以上の椎体のすべりが対象とする高位に認められる等）が強く認められるおそれがある。これらの患者において、合併症が原因で症状が認められる場合は、本剤の有効性が得られない可能性があるため、本剤のリスクを考慮し、症状の原因を精査した上で、本剤による治療を優先すべきか慎重に判断すること。投与を行った場合には、患者の状態を慎重に観察すること。
- (4) 20 歳未満の患者に対する有効性及び安全性は確立されていない。また、成長期の患者では、成長板が閉鎖していないため、本剤投与による成長板の限局性欠損により、腰椎不安定性を誘発するおそれ、本剤投与による軟骨層の骨化により、軟骨細胞の増殖が抑制され、椎体の伸長が阻害されるおそれがあるため、投与の可否を慎重に判断するとともに、投与を行った場合には、患者の状態を慎重に観察すること。

2.6.1.3.2 用法及び用量

通常、成人にはコンドリアーゼとして 1.25 単位を症状の原因である高位の椎間板内に単回投与する。

<用法・用量に関連する使用上の注意>

複数高位への同時投与の経験はなく、有効性及び安全性は確立されていない。本剤投与によりアナフィラキシー、腰椎不安定性等が発現するおそれがあり、複数高位への同時投与によりリスクが高まるおそれがあることから、複数高位への同時投与は行わないこと。

2.6.1.4 参考文献

- (1) Huang W, Lunin VV, Li Y, Suzuki S, Sugiura N, Miyazono H, et al. Crystal structure of proteus vulgaris chondroitin sulfate ABC lyase I at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol.* 2003;328:623-634.
- (2) Prabhakar V, Capila I, Bosques CJ, Pojasek K, Sasisekharan R. Chondroitinase ABC I from proteus vulgaris: cloning, recombinant expression and active site identification. *Biochem J.* 2005;386:103-112.
- (3) Prabhakar V, Raman R, Capila I, Bosques CJ, Pojasek K, Sasisekharan R. Biochemical characterization of the chondroitinase ABC I active site. *Biochem J.* 2005;390:395-405.
- (4) Linhardt RJ, Galliher PM, Cooney CL. Polysaccharide lyases. *Appl Biochem Biotechnol.* 1986;12:135-176.

ヘルニコア[®]椎間板注用 1.25 単位
コンドリアーゼ

2.6.2 薬理試験の概要文

生化学工業株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文.....5

2.6.2.1 まとめ.....5

2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....6

2.6.2.2.1 効力を裏付ける薬理試験.....6

2.6.2.2.1.1 椎間板ヘルニア罹患イヌの臨床症状に対する効果.....6

2.6.2.2.1.2 正常ウサギにおける椎間板高狭小化作用.....8

2.6.2.2.1.3 正常ヒヒにおける椎間板高狭小化作用.....11

2.6.2.2.2 作用機序.....12

2.6.2.2.2.1 酵素化学的性質.....12

2.6.2.2.2.2 髄核膨潤抑制作用及び髄核構成成分遊出作用.....14

2.6.2.2.2.3 正常ヒツジにおける椎間板内圧低下作用.....19

2.6.2.3 副次的薬理試験.....24

2.6.2.3.1 髄核体積の種差に関する検討.....24

2.6.2.4 安全性薬理試験.....25

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響.....25

2.6.2.4.2 呼吸器系に及ぼす影響.....25

2.6.2.4.3 心血管系に及ぼす影響.....25

2.6.2.4.3.1 無麻酔イヌを用いた心血管系に及ぼす影響.....25

2.6.2.4.3.2 hERG 電流に及ぼす影響.....26

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....26

2.6.2.6 考察及び結論.....26

2.6.2.7 図表.....28

2.6.2.8 参考文献.....28

表

表 2.6.2.2.1.1-1. 椎間板ヘルニア臨床症状の程度と所見.....7

表 2.6.2.2.2.1-1. コンドリアーゼ「生化学」の基質特異性（多糖類）.....13

表 2.6.2.2.2.1-2. コンドリアーゼ「生化学」の基質特異性（タンパク質）.....13

表 2.6.2.3.1-1. 髄核体積の比較.....25

図

図 2.6.2.1-1. コンドリアーゼの作用機序と薬理作用.....6

図 2.6.2.2.1.1-1. 椎間板ヘルニア罹患イヌにおけるコンドリアーゼの臨床症状改善作用.....8

図 2.6.2.2.1.2-1. ウサギにおける椎間板高インデックスの算出.....9

図 2.6.2.2.1.2-2. ウサギにおけるコンドリアーゼの椎間板高及び髄核水分含量に対する作用.....10

図 2.6.2.2.1.2-3. ウサギにおけるコンドリアーゼの椎間板高及び髄核水分含量に対する作用.....11

図 2.6.2.2.1.3-1. ヒヒにおける椎間板高インデックスの算出12

図 2.6.2.2.2-1. ウサギ摘出髄核でのコンドリアーゼ及びキモパパインの髄核膨潤抑制作用
及び髄核構成成分遊出作用（ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸及びケラタン硫酸）16

図 2.6.2.2.2-2. ウサギ摘出髄核でのコンドリアーゼ及びキモパパインの髄核構成成分遊出
作用（コラーゲン）17

図 2.6.2.2.2-3. ウサギ摘出髄核でのコンドリアーゼの髄核膨潤抑制作用及び髄核構成成分
遊出作用19

図 2.6.2.2.3-1. ヒツジにおける椎間板高インデックスの算出20

図 2.6.2.2.3-2. ヒツジにおけるコンドリアーゼ投与後の椎間板内圧最低値の経時的推移21

図 2.6.2.2.3-3. ヒツジにおけるキモパパイン投与後の椎間板内圧最低値の経時的推移22

図 2.6.2.2.3-4. ヒツジにおけるコンドリアーゼ投与後の椎間板内圧最高値の経時的推移22

図 2.6.2.2.3-5. ヒツジにおけるキモパパイン投与後の椎間板内圧最高値の経時的推移23

図 2.6.2.2.3-6. ヒツジにおけるコンドリアーゼ投与後の椎間板高インデックスの経時的推
移23

図 2.6.2.2.3-7. ヒツジにおけるキモパパイン投与後の椎間板高インデックスの経時的推移24

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）
CT	Computed tomography	コンピュータ断層撮影
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素標識免疫測定法
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価
GAG	Glycosaminoglycan	グリコサミノグリカン
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
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
L3/L4	Intervertebral disc between the third and fourth lumbar vertebrae (The notation of other lumbar intervertebral discs is also similar.)	第3腰椎と第4腰椎間の椎間板 (他の腰椎椎間板の表記も同様)
L6/S1	Intervertebral disc between the sixth lumbar vertebra and the first sacral bone	第6腰椎と第1仙骨間の椎間板
MRI	Magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
PBS	Phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
QTc	QT interval corrected for heart rate	補正 QT 間隔
T13/L1	Intervertebral disc between the thirteenth thoracic vertebra and the first lumbar vertebra	第13胸椎と第1腰椎間の椎間板
U	Unit	単位

2.6.2 薬理試験の概要文

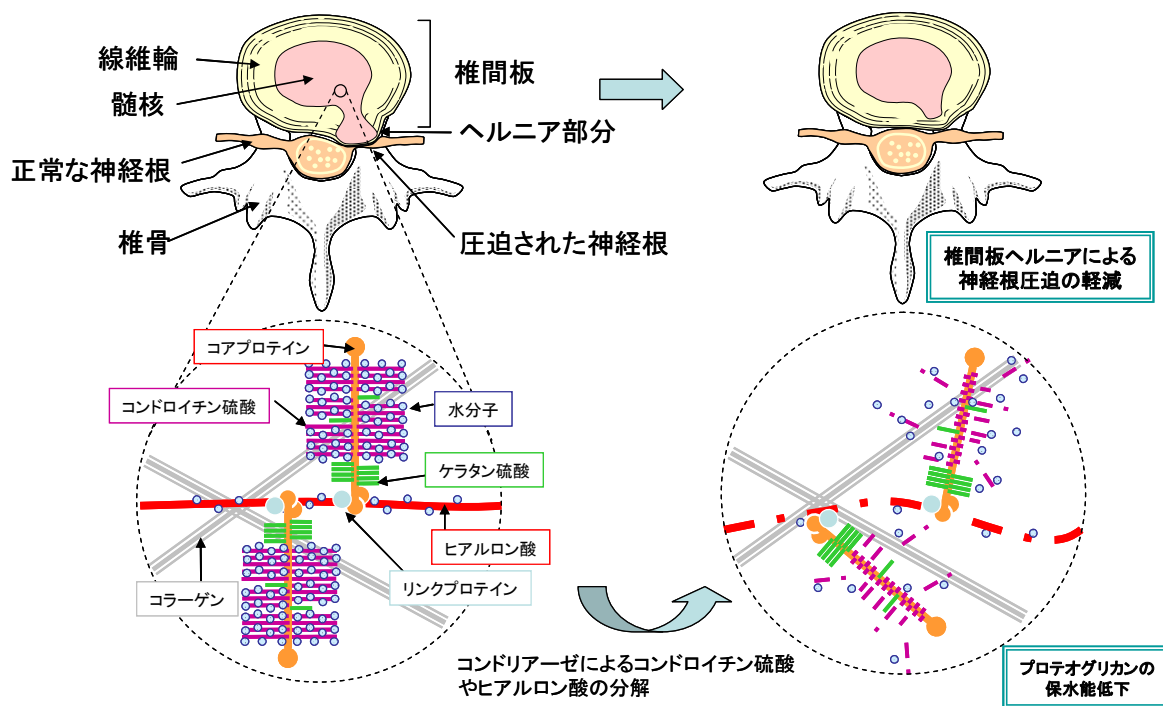
2.6.2.1 まとめ

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グリコサミノグリカン (GAG) 分解酵素である。腰椎椎間板ヘルニア患者におけるコンドリアーゼの椎間板内投与は、髄核中に存在するプロテオグリカンの GAG を分解し髄核の保水能を低下させると考えられる。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を改善することが期待される（[2.5.1.3 参照]、[図 2.6.2.1-1](#)）。これら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。

椎間板ヘルニア罹患イヌの椎間板内へコンドリアーゼを投与すると、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。さらに、コンドリアーゼを正常動物の椎間板内へ投与すると有意な椎間板高狭小化作用を示した。正常動物における椎間板高狭小化作用は、化学的髄核融解術に用いられる薬剤の評価に使用されており^{(1) (2)}、コンドリアーゼが化学的髄核融解術に用いられる薬剤として有用であることが示唆された。これらコンドリアーゼの効果は、以下に示す作用機序に関する検討結果からも裏づけされた。コンドリアーゼの基質特異性試験では、コンドリアーゼが GAG であるコンドロイチン硫酸に対し強い分解作用を示すことが明らかとなった。また、正常ウサギの摘出髄核を用いた試験では、コンドリアーゼが髄核からコンドロイチン硫酸を遊出させ、保水能の指標である髄核膨潤率を抑制した。さらに、正常ヒツジの椎間板内にコンドリアーゼを単回投与した試験では、髄核保水能低下に起因すると考えられる椎間板内圧の低下作用が確認された。

安全性薬理試験では、コンドリアーゼの中樞神経系、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ことが示唆された。

以上のことからコンドリアーゼの椎間板内投与は、臨床においても同様の作用機序で、椎間板ヘルニア患者の症状（下肢痛、腰痛など）を改善することが期待される安全性の高い薬剤であると考えられた。



左下図：髄核中に存在するプロテオグリカンの模式図である。プロテオグリカンは、コンドロイチン硫酸等の多量の水分子を取り込む性質を有するグリコサミノグリカンを豊富に含んでいる。

右下図：コンドリアーゼ投与後、髄核プロテオグリカン中のコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸等が分解される。これに伴い、プロテオグリカンの有する高い保水能は減弱し、椎間板内圧が低下する。その結果、椎間板ヘルニアによる神経根の圧迫が軽減される。

図 2.6.2.1-1. コンドリアーゼの作用機序と薬理作用

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 効力を裏付ける薬理試験

2.6.2.2.1.1 椎間板ヘルニア罹患イヌの臨床症状に対する効果

(資料番号 4.2.1.1-1 (参考資料) : 試験番号 6603-LDH-XXXXXXXXXX ; 概要表 2.6.3.2)

本試験は、XXXX年からXXXX年に実施された試験であり、1997年に施行された「申請資料の信頼性の基準（薬事法施行規則第43条）」に基づく信頼性を一部担保できないため参考資料とした。

X線所見及び姿勢反応や脊髄反射の障害を示す椎間板ヘルニア症状を有する雌雄イヌ48匹の椎間板内に、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。投与用量の平均値と標準偏差は、 9.7 ± 6.8 U/discであった。椎間板ヘルニア臨床症状の程度は表 2.6.2.2.1.1-1に基づき判定し、投与後最長59日まで観察した。コンドリアーゼ投与により椎間板ヘルニア臨床症状の改善が認められ、投与後7日では、24例(50%)において椎間板ヘルニアの臨床症状が消失した。投与後9日以降も緩やかに改善が進行し、投与後59日においては、36例(75%)において椎間板ヘルニアの臨床症状が消失した(図 2.6.2.2.1.1-1)。

表 2.6.2.2.1.1-1. 椎間板ヘルニア臨床症状の程度と所見

椎間板ヘルニア臨床症状の程度	椎間板ヘルニアの臨床症状所見
0	症状なし
1	姿勢反応：スコア 2 脊髄反射：スコア 2 患部の疼痛：あり
2	姿勢反応：固有知覚反応スコア 1、跳び直り反応及び踏み直し反応スコア 1 のどちらか一方もしくは両方 脊髄反射：スコア 2～1 患部の疼痛：あり
3	姿勢反応：固有知覚反応スコア 1～0、跳び直り反応及び踏み直し反応スコア 1～0 脊髄反射：一つ以上の反射試験に異常所見がみられる。 患部の疼痛：あり
4	姿勢反応：固有知覚反応スコア 0、跳び直り反応及び踏み直し反応スコア 0 脊髄反射：複数の反射試験に異常所見がみられる。 屈曲反射は障害されることがあり、深部痛覚は残存。 T10 以下の椎間板が罹患すれば排尿障害あり。圧迫排尿不可能。 患部の疼痛：あり又はなし
5	姿勢反応：スコア 0 脊髄反射：スコア 0 深部痛覚なし。排尿障害はあるが圧迫排尿が可能あるいは容易。 患部の疼痛：なし

姿勢反応及び脊髄反射のスコア、0：消失、1：低下、2：正常

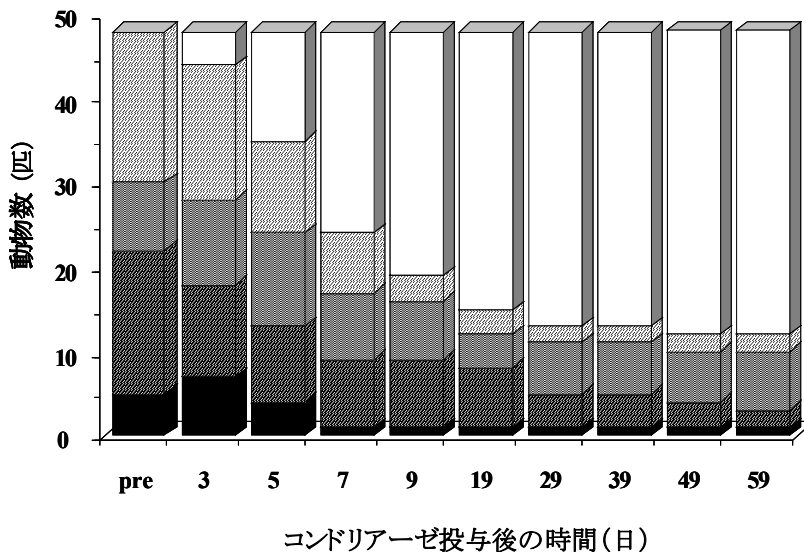


図 2.6.2.2.1.1-1. 椎間板ヘルニア罹患イヌにおけるコンドリアーゼの臨床症状改善作用
 椎間板ヘルニアの臨床症状を有する雌雄イヌ 48 匹の椎間板内に、250 U/mL のコンドリアーゼを 20～200 μL の用量 (██████████ などにより変動) で単回投与した。コンドリアーゼ投与前 (pre)、投与後 3、5、7、9、19、29、39、49 及び 59 日時点でのヘルニア臨床症状の程度を集計した。症状程度 0 (□)、症状程度 1 (▨)、症状程度 2 (▩)、症状程度 3 (▤) 及び症状程度 4 (■)。症状程度 5 と判断された症例はなかった。

(資料番号 4.2.1.1-1、図 4 を改変)

2.6.2.2.1.2 正常ウサギにおける椎間板高狭小化作用

(資料番号 4.2.1.1-2 : 試験番号 6603-LDH- ██████████ ; 概要表 2.6.3.2、資料番号 4.2.1.1-3 (参考資料) : 試験番号 ██████████ 49 ; 概要表 2.6.3.2)

以下の資料番号 4.2.1.1-3 (参考資料) : 試験番号 ██████████ 49 の試験は、██████ 年から ████████ 年に実施された試験であり、信頼性を十分に担保できないため参考資料とした。

雌性日本白色種ウサギの腰椎椎間板 (L3/L4、L4/L5、L5/L6 及び L6/L7) 内に、コンドリアーゼを 0.2、2、20 又は 200 mU/disc の用量で 10 μL 単回投与した。対照群には PBS を 10 μL 単回投与した。コンドリアーゼ投与前及び投与後 7 日に側方像の X 線撮影を行ったのち、髄核を摘出した。コンドリアーゼの薬効は、X 線画像から椎間板高インデックスを求め、椎間板高インデックスの割合及び髄核中の水分含量を指標に評価した (図 2.6.2.2.1.2-1)。各評価指標の計算式を以下に示す。

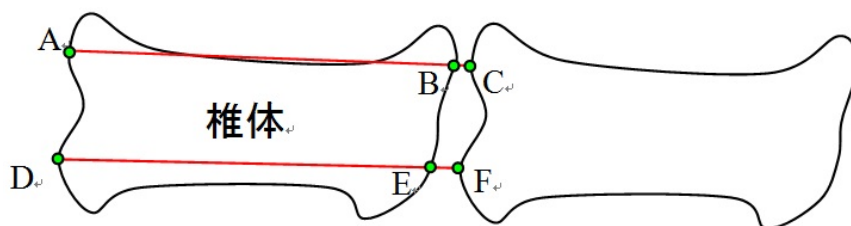


図 2.6.2.2.1.2-1. ウサギにおける椎間板高インデックスの算出

測定する椎間板を挟む前後の椎骨椎体の最も前方に突出している箇所（A と C、D と F）を直線で結び、この直線と頭側椎体の尾側縁との交点（B、E）を求めた。各々の線分（AB、BC、DE、EF）の長さを計測し、下式により、椎間板高インデックスを算出した。

$$\text{椎間板高インデックス} = \frac{\text{椎間板高 (BC+EF)}}{\text{上位椎体高 (AB+DE)}}$$

$$\text{椎間板高インデックスの割合 (\% of pre-injection)} = \frac{\text{投与7日後の椎間板高インデックス}}{\text{投与前の椎間板高インデックス}} \times 100$$

$$\text{髄核中の水分含量} = (\text{髄核湿重量} - \text{髄核乾燥重量})$$

コンドリアーゼ投与により、椎間板高インデックスの割合は減少し、0.2、2、20 及び 200 mU/disc 群で対照群に対し有意差が認められた。さらに、髄核水分含量は、2、20 及び 200 mU/disc 群で対照群に対し有意に減少した（[図 2.6.2.2.1.2-2](#)）。

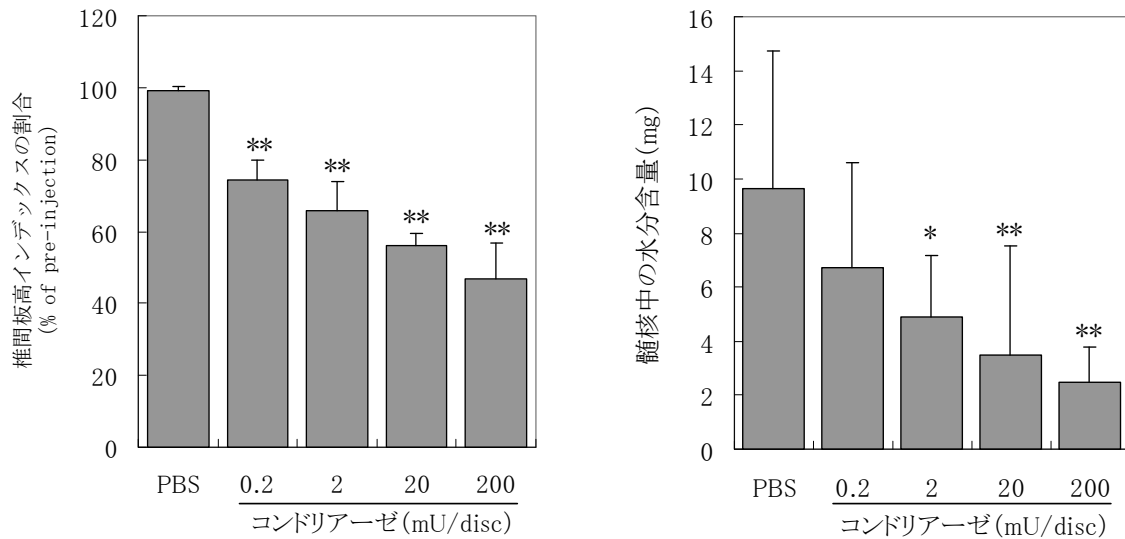


図 2.6.2.2.1.2-2. ウサギにおけるコンドリラーゼの椎間板高及び髄核水分含量に対する作用
ウサギ椎間板内に、コンドリラーゼを 0.2、2、20 又は 200 mU/disc の用量で単回投与した。対照群には PBS を単回投与した。投与前及び投与後 7 日に X 線撮影を行い、投与前の椎間板高インデックスを 100%とした際の投与後 7 日における椎間板高インデックスの割合を求めた。また、水分含量は投与後 7 日に髄核を摘出して測定した。

* : P<0.05、** : P<0.01、PBS 対照群と比較 (Dunnett 検定)

各値は平均値+標準偏差で示す (n=9~48)。

(資料番号 4.2.1.1-3、図 1 及び 5 を改変)

以下の資料番号 4.2.1.1-2 : 試験番号 6603-LDH- [redacted] の試験は、「申請資料の信頼性の基準 (薬事法施行規則第 43 条)」に則り再実施した試験である。

雌性日本白色種ウサギの腰椎椎間板 (L3/L4、L4/L5、L5/L6 及び L6/L7) 内に、コンドリラーゼを 0.2、2、20 又は 200 mU/disc の用量で 10 µL 単回投与した。対照群には PBS を 10 µL 単回投与した。コンドリラーゼ投与前及び効果がほぼ最大に達する投与後 7 日に側方像の X 線撮影を行ったのち、髄核を摘出した。コンドリラーゼの薬効は、X 線画像から椎間板高インデックスを求め、椎間板高インデックスの割合及び髄核中の水分含量を指標に評価した (図 2.6.2.2.1.2-1)。各評価指標の計算式を以下に示す。

$$\text{椎間板高インデックス} = \frac{\text{椎間板高 (BC + EF)}}{\text{上位椎体高 (AB + DE)}}$$

$$\text{椎間板高インデックスの割合 (\% of pre-injection)} = \frac{\text{投与7日後の椎間板高インデックス}}{\text{投与前の椎間板高インデックス}} \times 100$$

$$\text{髄核中の水分含量} = (\text{髄核湿重量} - \text{髄核乾燥重量})$$

コンドリアーゼは、用量依存的に椎間板高インデックスの割合を減少させ、2、20 及び 200 mU/disc 群で対照群に対し有意差が認められた。さらに、髄核水分含量も用量依存的に減少させ、2、20 及び 200 mU/disc 群で対照群に対し有意差が認められた (図 2.6.2.2.1.2-3)。これらコンドリアーゼによる椎間板高インデックスの割合の減少と髄核水分含量の減少には、相関 ($r=0.765$) が認められた。このことより、椎間板内に投与されたコンドリアーゼは、髄核中のコンドロイチン硫酸を主に分解することにより、プロテオグリカンの保水能を低下させ、椎間板高を狭小化させたと考えられた。

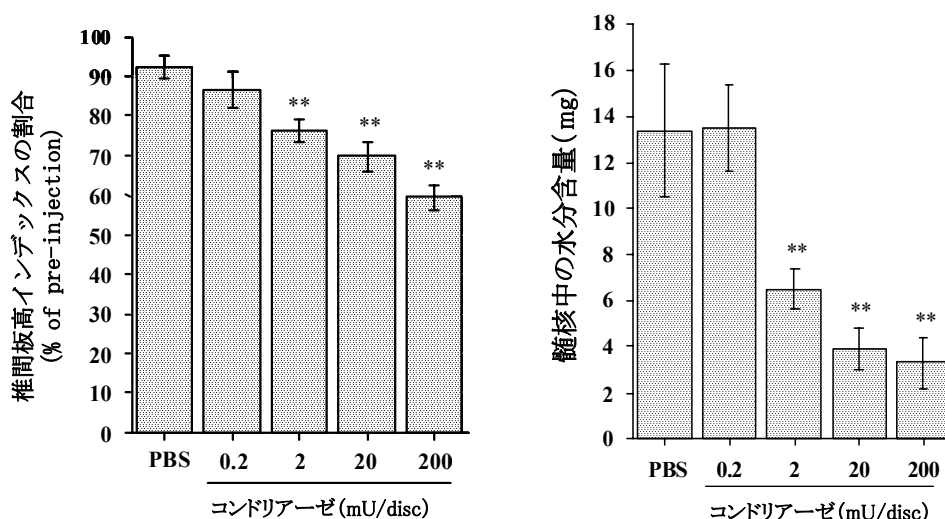


図 2.6.2.2.1.2-3. ウサギにおけるコンドリアーゼの椎間板高及び髄核水分含量に対する作用
ウサギ椎間板内に、コンドリアーゼを 0.2、2、20 又は 200 mU/disc の用量で単回投与した。対照群には PBS を単回投与した。投与前及び投与後 7 日に X 線撮影を行い、投与前の椎間板高インデックスを 100%とした際の投与後 7 日における椎間板高インデックスの割合を求めた。また、水分含量は投与後 7 日に髄核を摘出して測定した。

** : $P < 0.01$ 、PBS 対照群と比較 (Williams 検定)

各値は平均値±標準誤差で示す (n=8)。

(資料番号 4.2.1.1-2、図 1 及び 2 を改変)

2.6.2.2.1.3 正常ヒヒにおける椎間板高狭小化作用

(資料番号 4.2.1.1-4 (参考資料) : 試験番号なし ; 概要表 2.6.3.2)

本試験は、■■■■年に実施された試験であり、信頼性を十分に担保できないため参考資料とした。

雌雄ヒヒ (*Papio hamadryas*) の腰椎椎間板 (L3/L4、L4/L5、L5/L6 及び L6/S1) 内に、コンドリアーゼを 0.02、0.2、2、20、50、100 又は 200 U/mL の用量で単回投与した。投与用量の平均値と標準偏差は、それぞれ 4.3 ± 0.7 mU/disc、 44.7 ± 10.3 mU/disc、 500.0 ± 213.8 mU/disc、 4.8 ± 1.7 U/disc、 10.0 ± 0.0 U/disc、 22.2 ± 4.4 U/disc、 44.4 ± 8.8 U/disc であった。対照群には PBS を単回投与した。コンドリアーゼ投与前及び投与後 7 日に側方像の X 線撮影を行った。コンドリアーゼの薬効は X 線画像から椎間板高インデックスを求め、椎間板高インデックスの割合を指標に評価した (図 2.6.2.2.1.3-1)。

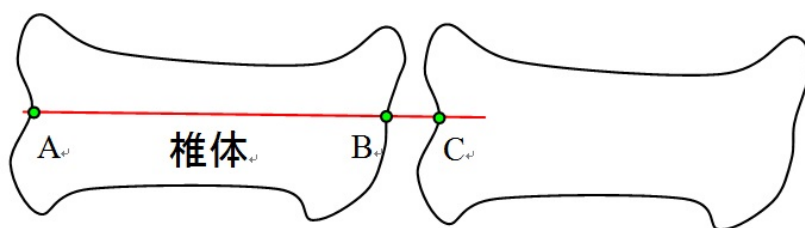


図 2.6.2.2.1.3-1. ヒヒにおける椎間板高インデックスの算出

各々の線分 (AB、BC) の長さを計測し、下式により、椎間板高インデックスを算出した。

$$\text{椎間板高インデックス} = \frac{\text{椎間板高 (BC)}}{\text{上位椎体高 (AB)}}$$

コンドリアーゼは、椎間板高インデックスの割合を減少させ、20、50、100 及び 200 U/mL 群で対照群に対し有意差が認められた。

2.6.2.2.2 作用機序

2.6.2.2.2.1 酵素化学的性質

(1) 基質特異性

(資料番号 [2.3.S.3.1.2] [3.2.S.3.1.2] 4.2.1.1-9 : 試験報告書番号 TR-QC-030 ; 概要表 2.6.3.2)

多糖類に対する基質特異性を以下の手順で評価した。コンドリアーゼ「生化学」を 0.01%カゼイン溶液で 10 倍に希釈した液を試験液とした。50 mmol/L 酢酸ナトリウムを含む 50 mmol/L トリス・塩酸塩緩衝液で 1 mg/mL に調製された多糖類溶液を基質溶液とした。あらかじめ 37°C に加温された基質溶液 0.8 mL に試験液 0.2 mL を添加し、232 nm における吸光度を経時的に記録した。得られた記録から、下記の式より各基質における反応初速度を求め、コンドロイチン硫酸 A の反応初速度を 100% とした相対反応初速度を算出した。

$$\text{反応初速度 (単位/mL)} = \text{吸光度差/反応時間差 (分)} \times 1.1818 \text{ (酵素活性単位への換算係数)}$$

コンドリアーゼ「生化学」は、GAG であるコンドロイチン硫酸、コンドロイチン及びヒ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しなかった。表 2.6.2.2.2.1-1 に、コンドロイチン硫酸 A の反応初速度を 100% とした各多糖類の相対反応初速度を示した。

タンパク質に対する基質特異性を以下の手順で評価した。1.0%カゼイン溶液または 1.0%ウシ血清アルブミン溶液 1 mL にコンドリアーゼ「生化学」1 mL を加えてよく振り混ぜ、直ちに 37°C の恒温槽で 3 時間放置した後、5%トリクロロ酢酸溶液 3 mL を加え、室温に 1 時間放置した。氷水中で 10 分間冷却後、遠心分離して上清を取得し、波長 280 nm における吸光度を測定した。別に、水 1 mL についても同様に操作し、波長 280 nm における吸光度を測定した。

コンドリアーゼ「生化学」は、タンパク質分解活性を有しないことが示された。また、表 2.6.2.2.1-2 に、タンパク質分解に伴う 280 nm の吸光度測定結果を示した。

表 2.6.2.2.1-1. コンドリアーゼ「生化学」の基質特異性（多糖類）

GAG	相対反応初速度 (%)			平均値	標準偏差
	Lot.BC059	Lot.BC060	Lot.BC061		
コンドロイチン	59	61	62	61	1.5
コンドロイチン硫酸 A	100	100	100	100	0
コンドロイチン硫酸 B	63	61	63	62	1.2
コンドロイチン硫酸 C	83	81	82	82	1.0
コンドロイチン硫酸ナトリウム「生化学」CD	108	111	110	110	1.5
コンドロイチン硫酸 D	69	69	69	69	0
ヘパラン硫酸	0	0	0	0	0
ヒアルロン酸	1	1	1	1	0
ケラタン硫酸	0	0	0	0	0
ヘパリン	0	0	0	0	0

表 2.6.2.2.1-2. コンドリアーゼ「生化学」の基質特異性（タンパク質）

タンパク質	吸光度 (Abs)			
	Lot.BC059	Lot.BC060	Lot.BC061	水
カゼイン	0.057	0.057	0.058	0.057
ウシ血清アルブミン	0.062	0.062	0.063	0.064

(2) 酵素活性に対する [] の影響

(資料番号 [2.3.S.3.1.2] [3.2.S.3.1.2] 4.2.1.1-9 : 試験報告書番号 TR-QC [] 030 ; 概要表 2.6.3.2)

コンドリアーゼ「生化学」のコンドロイチン硫酸ナトリウム「生化学」CD に対する活性は、各種イオンにより影響を受け、終濃度 [] mmol/L の [] により酵素活性が阻害された。一方、[] は終濃度 [] mmol/L では活性に影響しなかった。[] は終濃度 [] mmol/L で酵素活性を約 [] % 阻害し、一方 [] は終濃度 [] mmol/L ~ [] mmol/L において酵素活性を高め、終濃度 [] mmol/L においては、阻害する傾向が認められた。

椎間板内にコンドリアーゼを投与した時、酵素活性が、これらのイオンの影響をうける可能性は否定できないが、薬理試験及び作用機序 (2.6.2.2.1、2.6.2.2.2) で実施した椎間板内投与及び髓核を用いた各試験で、有効性は確認されている。また、XXXXXXXXXXなどのXXXXXXXXXXは、大部分がそれぞれのイオンに親和性を示すタンパク質やアルブミンに結合しているため、遊離のイオンとして存在することは少ない。ヒト間質液のリン酸イオン濃度は、1 mmol/L と低く⁽³⁾、XXXXXXXXXXについては、酵素活性の促進と阻害の割合は、それぞれ最大でXXXX%とXXXX%である。したがって、これらのイオンが、薬効に及ぼす影響は少ないと考えられる。

2.6.2.2.2 髓核膨潤抑制作用及び髓核構成成分遊出作用

(資料番号 4.2.1.1-5 : 試験番号 6603-LDH-XXXXXXXXXX ; 概要表 2.6.3.2、資料番号 4.2.1.1-6 (参考資料) : 試験番号なし ; 概要表 2.6.3.2)

資料番号 4.2.1.1-6 (参考資料) : 試験番号 なしの試験は、XXXX年に実施された試験であり、信頼性を十分に担保できないため参考資料とした。

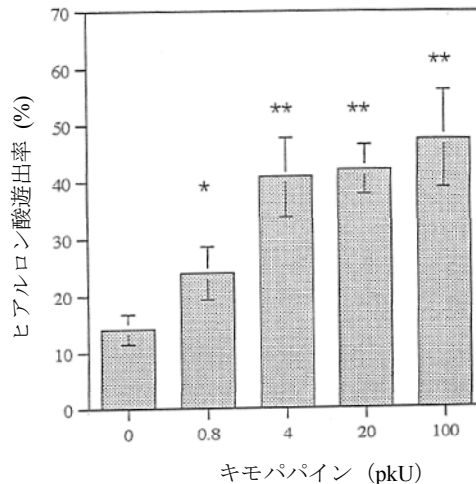
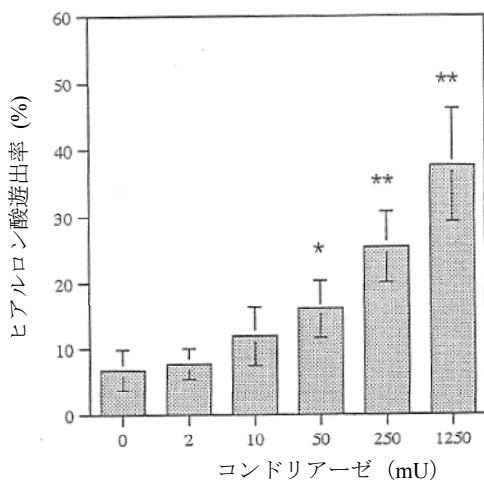
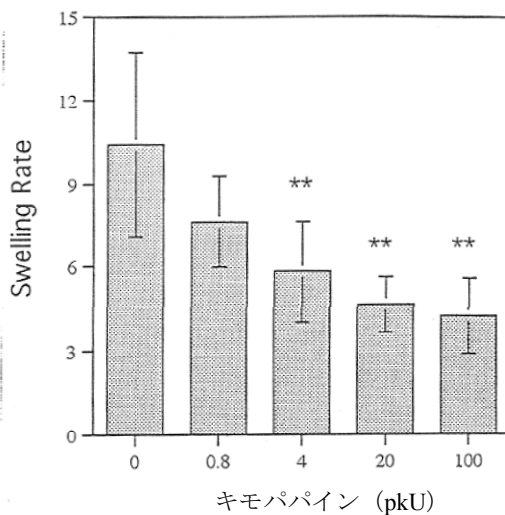
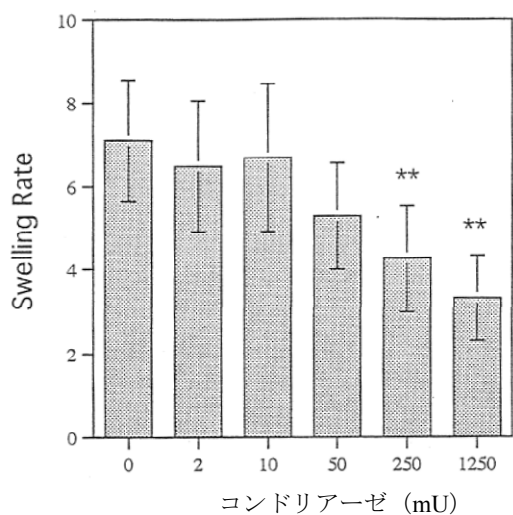
雌性日本白色種ウサギの脊椎から髓核を採取し、髓核約XXXXmg を1検体として体積を測定した。コンドリアーゼを2、10、50、250又は1250 mU/10 µL 添加し、XXXX°C でXXXX時間静置した。対照にはPBSを10 µL 添加して同様に静置した。比較対照としてキモパピンを0.8、4、20又は100 pkU/50 µL 添加し、37°C で2時間静置した。キモパピンの1 pkU は、pH6、37°C で1秒間にDL-ベンゾイルアルギニン-p-ニトロアニリドから1 pmol のp-ニトロアニリドを生成する酵素量である。

次いで、XXXX mL を添加し、攪拌することにより髓核を膨潤させた後、遠心して上清と沈渣を分離した。髓核膨潤率は、沈渣として回収される髓核の体積を被験物質添加前の体積で除して算出した。さらに、上清及び沈渣として回収された髓核中のヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸及びケラタン硫酸量をHPLCで測定するとともに、コラーゲン量はヒドロキシプロリン量を測定し、上清への遊出率を算出した。

コンドリアーゼは、250及び1250 mU/10 µL、キモパピンは4~100 pkU/50 µL の用量で髓核膨潤率を有意に減少させた。ヒアルロン酸遊出率をコンドリアーゼは、50~1250 mU/10 µL、キモパピンは0.8~100 pkU/50 µL の用量で、コンドロイチン硫酸遊出率をコンドリアーゼは50~1250 mU/10 µL、キモパピンは0.8~100 pkU/50 µL の用量で、ケラタン硫酸遊出率をコンドリアーゼは10~1250 mU/10 µL、キモパピンは0.8~100 pkU/50 µL の用量でいずれも有意に増加させた (図 2.6.2.2.2-1)。コラーゲンについては、コンドリアーゼは50~1250 mU/10 µL、キモパピンは4~100 pkU/50 µL の用量でいずれも遊出率を有意に増加させた (図 2.6.2.2.2-2)。

基質特異性試験 (2.6.2.2.2.1 (1)) において、コンドリアーゼにはケラタン硫酸分解作用のないことが確認されている。したがって、遊出したケラタン硫酸は、コンドリアーゼにより直接分解されたものではなく、コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸などのGAGが分解されることでプロテオグリカンの複合体構造が破壊され、ケラタン硫酸を含むプロテオグリカンの小断片が遊出したと推測された。ヒアルロン酸については、コンドリアーゼにより分解されるため、コンドロイチン硫酸と同様の機序で遊出したと推測された。

コンドリアーゼは、その立体構造及び反応機構から (4) (5) (6) (7)、コラーゲンに対する分解作用を有しないと推察され、ウシ皮膚より抽出したコラーゲンに対して作用しないことが報告されている (8)。したがって、コラーゲンは、コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸が分解されることでプロテオグリカンの複合体構造が破壊されて二次的に遊出したと推測された。



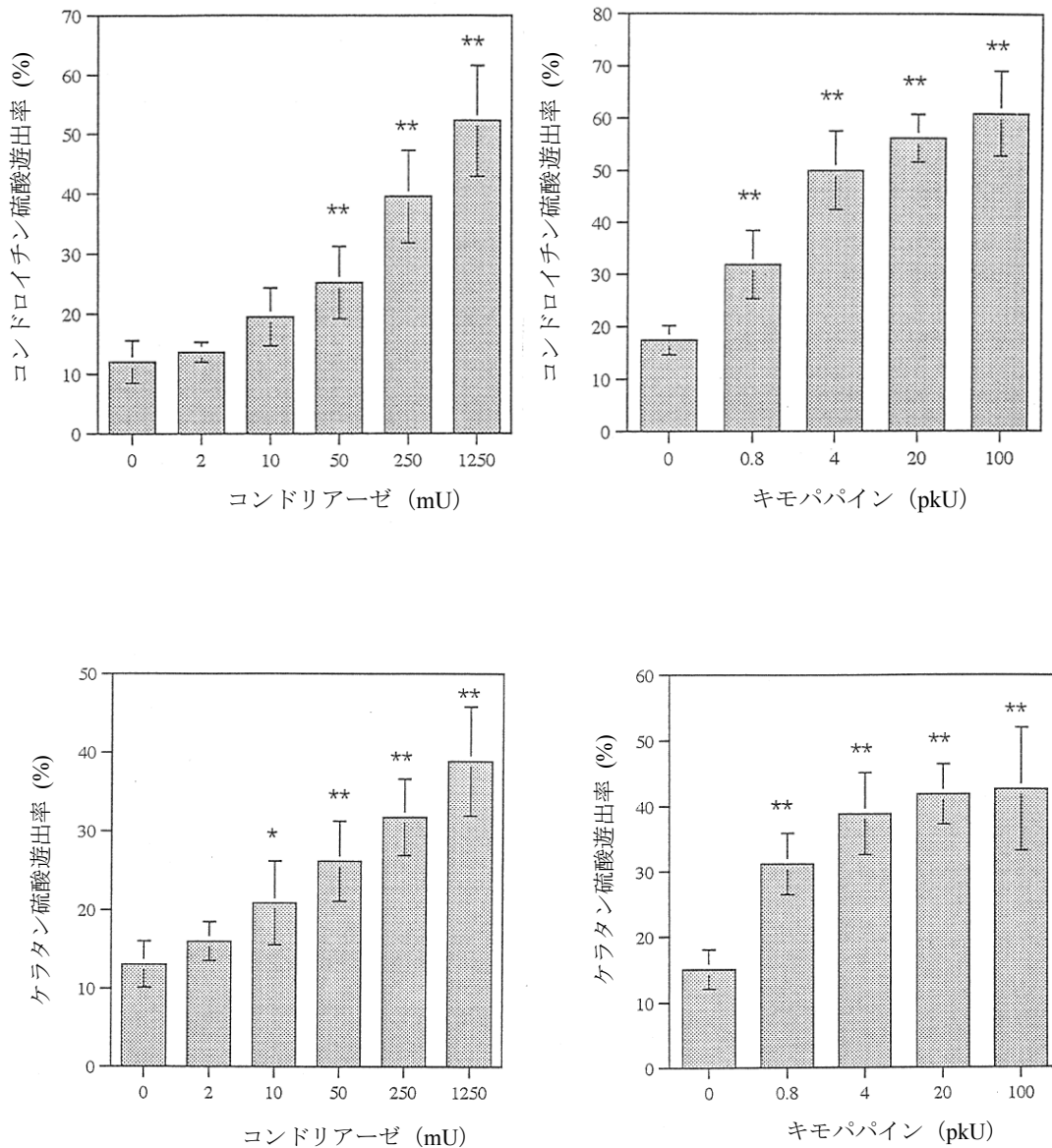


図 2.6.2.2.2-1. ウサギ摘出髄核でのコンドリアーゼ及びキモパパインの髄核膨潤抑制作用及び髄核構成成分遊出作用（ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸及びケラタン硫酸）

摘出したウサギ髄核にコンドリアーゼを2、10、50、250又は1250 mU/10 µLの濃度で、キモパパインを0.8、4、20又は100 pkU/50 µLの濃度で添加し、37℃、1時間適用した。対照にはPBSを適用した。次いで、1 mLのPBSで膨潤させた時の髄核膨潤率、ヒアルロン酸遊出率、コンドロイチン硫酸遊出率及びケラタン硫酸遊出率を算出した。

* : P<0.05、** : P<0.01 (Scheffe 検定)

各値は平均値±標準偏差で示す (n=10)。

(資料番号 4.2.1.1-6、図 1、3、4 及び 5 を改変)

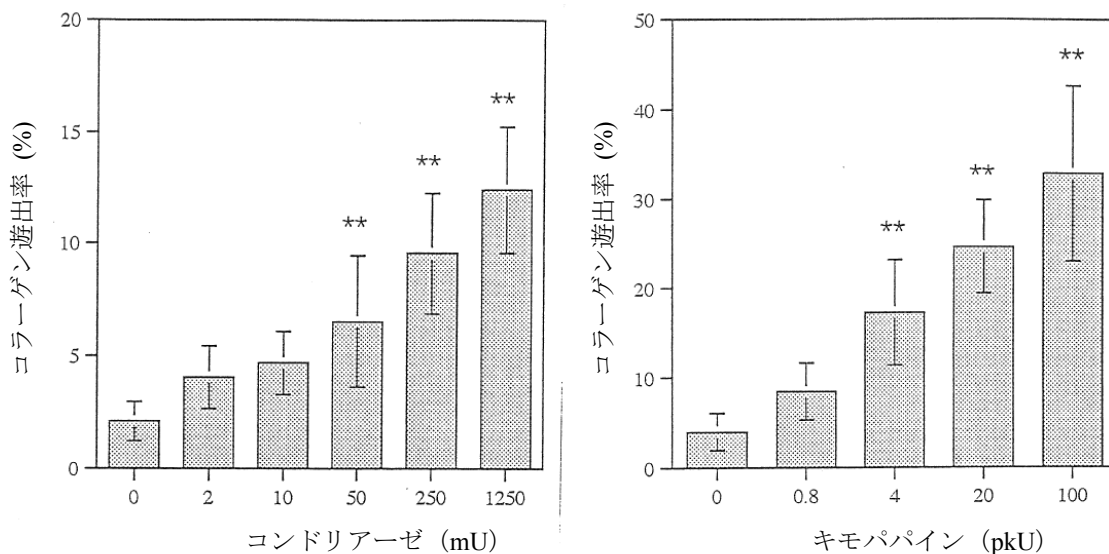


図 2.6.2.2.2-2. ウサギ摘出髄核でのコンドリアーゼ及びキモパパインの髄核構成成分遊出作用 (コラーゲン)

摘出したウサギ髄核にコンドリアーゼを 2、10、50、250 又は 1250 mU/10 μL の濃度で、キモパパインを 0.8、4、20 又は 100 pkU/50 μL の濃度で添加し 37℃、2 時間適用した。対照には PBS を適用した。次いで、1 mL の PBS で膨潤させた時のコラーゲンの遊出率を算出した。

** : P<0.01 (Scheffe 検定)

各値は平均値±標準偏差で示す (n=10)。

(資料番号 4.2.1.1-6、図 2 を改変)

以下の資料番号 4.2.1.1-5 : 試験番号 6603-LDH-000000 の試験は、申請資料の信頼性の基準 (薬事法施行規則第 43 条) に則り再実施した試験である。

雌性日本白色種ウサギの脊椎から髄核を採取し、椎間板分の髄核を 1 検体とした。それぞれの検体を 1.5 mL tube に移し髄核体積を測定したのち、コンドリアーゼを 2、10、50、250 又は 1250 mU /tube の濃度で 20 μL 添加し 37℃ で 2 時間静置した。対照群には PBS を 20 μL 添加して同様に静置した。次いで、1 mL の PBS を添加し、攪拌することにより髄核を膨潤させた後、遠心して上清と沈渣を分離した。髄核膨潤率は、沈渣として回収される髄核の体積を被験物質添加前の体積で除して算出した。さらに、上清及び沈渣として回収された髄核中のコンドロイチン硫酸量を HPLC、ケラタン硫酸量を ELISA で測定して上清への遊出率を算出した。

コンドリアーゼは、用量依存的に髄核膨潤率を減少させ、10~1250 mU/tube の濃度で対照群との間に有意差が認められた。また、コンドリアーゼは、コンドロイチン硫酸遊出率を用量依存的に増加させ、50~1250 mU/tube の濃度で対照群に対し有意差が認められた (図 2.6.2.2.2-3)。これらコンド

リアーゼによる髄核膨潤率の減少とコンドロイチン硫酸遊出率の増加には、負の相関 () が認められた。したがって、コンドリアーゼは、髄核のコンドロイチン硫酸を分解することで、髄核膨潤を抑制したと考えられた。一方、コンドリアーゼは、250 mU/tube 以上の濃度でケラタン硫酸の遊出率を増加させた。基質特異性試験 (2.6.2.2.1 (1)) において、コンドリアーゼにはケラタン硫酸分解作用のないことが確認されている。したがって、遊出したケラタン硫酸は、コンドリアーゼにより直接分解されたものではなく、コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸などの GAG が分解されることでプロテオグリカンの複合体構造が破壊され、ケラタン硫酸を含むプロテオグリカンの小断片が遊出したと推測された。

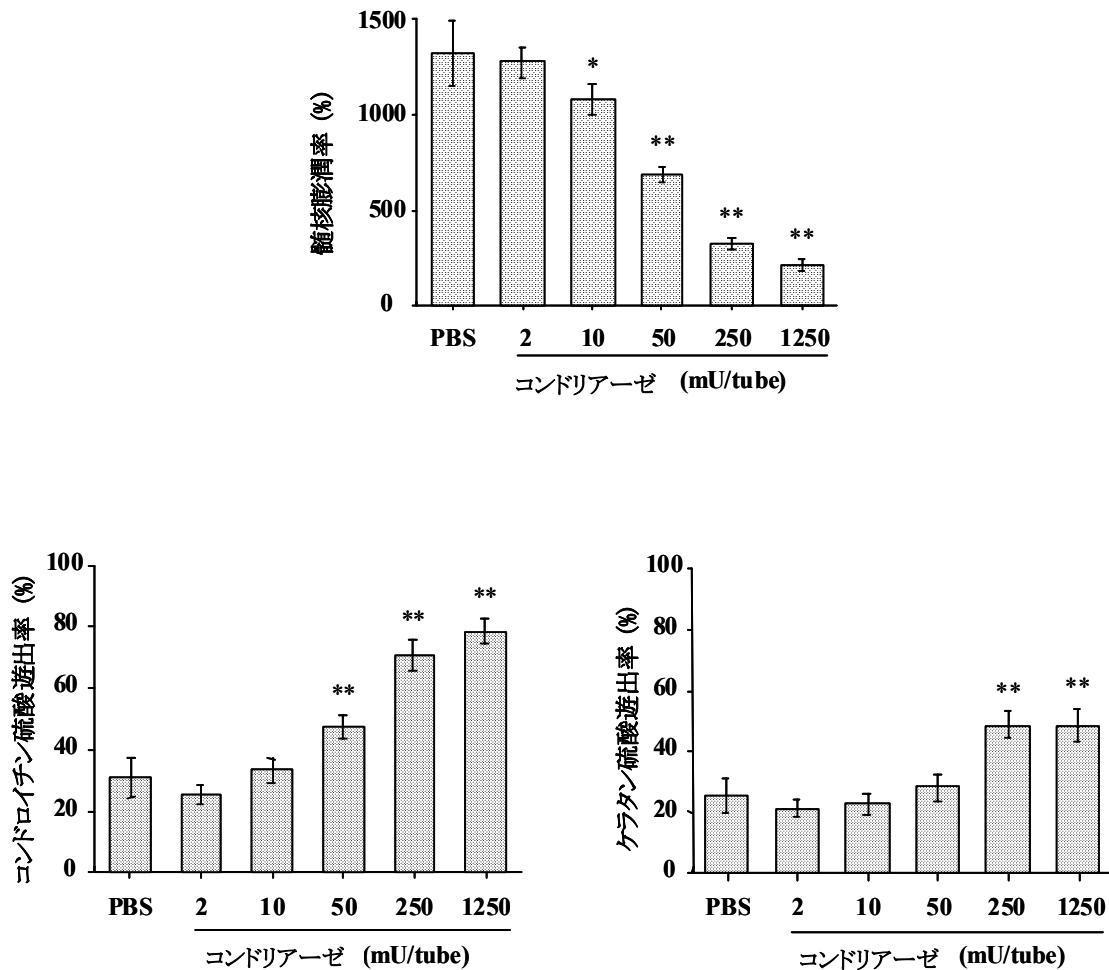


図 2.6.2.2.2.3. ウサギ摘出髄核でのコンドリアーゼの髄核膨潤抑制作用及び髄核構成成分遊出作用

摘出したウサギ髄核にコンドリアーゼを 2、10、50、250 又は 1250 mU/tube の濃度で 37℃、2 時間適用した。対照群には PBS を適用した。次いで 1 mL の 0.1% 台糖で膨潤させた時の髄核膨潤率、コンドロイチン硫酸並びにケラタン硫酸の遊出率を算出した。

* : P<0.05、** : P<0.01、PBS 対照群と比較 (Williams 検定)

各値は平均値±標準誤差で示す (n=7~10)。

(資料番号 4.2.1.1-5、図 1、2 及び 3 を改変)

2.6.2.2.2.3 正常ヒツジにおける椎間板内圧低下作用

(資料番号 4.2.1.1-7 (参考資料) : 試験番号 6603-LDH-██████、資料番号 4.2.1.1-8 (参考資料) : 試験番号 6603-LDH-██████ ; 概要表 2.6.3.2)

資料番号 4.2.1.1-7 (参考資料) : 試験番号 6603-LDH-██████ の試験は、██████ 年から ██████ 年に実施された試験であり、1997 年に施行された「申請資料の信頼性の基準 (薬事法施行規則第 43 条)」に

基づく信頼性を、一部担保できないため参考資料とした。そのデータを基に実施した統計解析試験である資料番号 4.2.1.1-8 (参考資料) : 試験番号 6603-LDH-XXXXXXXXXX についても、同様に参考資料とした。

雌性メリノー種ヒツジの椎間板 (T13/L1、L1/L2、L2/L3、L3/L4、L4/L5 及び L5/L6) 内に、コンドリアーゼを 1 又は 50 U/disc の用量で 0.2 mL 単回投与した。キモパインは、1000 pkU/disc の用量で 0.2 mL 単回投与した。1 pkU は、pH6、37°C で 1 秒間に DL-ベンゾイルアルギニン-p-ニトロアニリドから 1 pmol の p-ニトロアニリドを生成する酵素量である。

対照群には PBS を 0.2 mL 単回投与した。コンドリアーゼ及びキモパイン投与前、投与後 1、4、8 及び 13 週に圧力トランスデューサーを用いて椎間板内圧を測定した。測定された椎間板内圧の波形は、呼吸により上下に振幅するため、最高圧力及び最低圧力を椎間板内圧として評価した。さらに、薬剤投与前、投与日及び投与後 1、4、8 及び 13 週の内圧測定直前に腰椎を X 線撮影した。X 線画像から次式により椎間板高インデックスを求め、椎間板高インデックスの割合を評価した (図 2.6.2.2.3-1)。

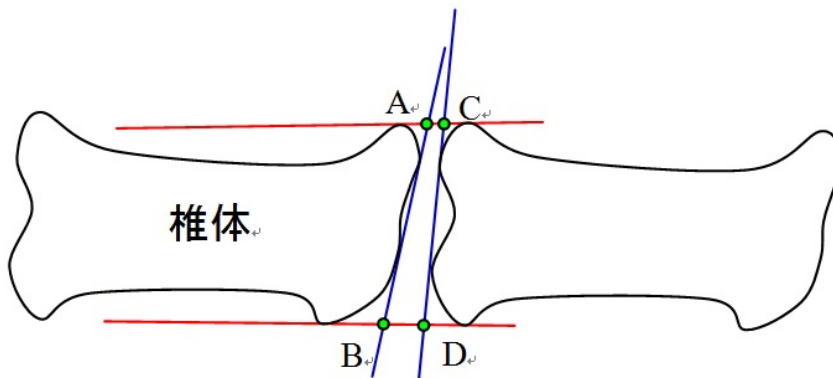


図 2.6.2.2.3-1. ヒツジにおける椎間板高インデックスの算出

椎体の終板に 4 本の接線を引き、交点 (A~D) を求めた。各々の線分 (AB、AC、BD) の長さを計測し、下式により、椎間板高インデックスを算出した。

$$\text{椎間板高インデックス} = \frac{\text{椎間板高 (AC + BD)}}{\text{上位椎体幅 (2 \times AB)}} \times 100$$

$$\text{椎間板高インデックスの割合 (\% \text{ of pre-injection})} = \frac{\text{各時点の椎間板高インデックス}}{\text{投与日の椎間板高インデックス}} \times 100$$

コンドリアーゼは、1 U 及び 50 U/disc の用量で、投与後 1 週より経時的に椎間板内圧最低値を低下させ、投与後 13 週における椎間板内圧最低値は、1 U/disc 群では投与前値の 48.5%、さらに 50 U/disc 群では 24.5% に低下し、統計学的にも対照群に対し有意差が認められた (図 2.6.2.2.3-2)。キモパインも同様に、投与後 1 週より経時的に椎間板内圧最低値を低下させ、投与後 13 週における椎間板内圧最低値は、投与前値の 20.1% に低下し、統計学的にも対照群に対し有意差が認められた (図 2.6.2.2.3-3)。

コンドリアーゼは、1 U/disc の用量で投与後 13 週の椎間板内圧最高値を投与前値の 92.8% に低下させた。50 U/disc の用量では投与後 8 週より椎間板内圧最高値を低下させ、投与後 13 週で 74.1% に

低下させた(図 2.6.2.2.2.3-4)。キモパpainは、投与後 8 週では椎間板内圧最高値を投与前値の 42.4% に低下させ、投与後 13 週における椎間板内圧最高値は 86.2%であった(図 2.6.2.2.2.3-5)。コンドリアーゼ及びキモパpainは、いずれも椎間板内圧最高値を低下させたが、対照群に対して統計学的に有意差は認められなかった。

また、コンドリアーゼは、1 U 及び 50 U/disc の用量で、投与後 1 週より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を減少させ、50 U/disc 群で対照群に対し有意差が認められた(図 2.6.2.2.2.3-6)。キモパpainも同様に、投与後 1 週より椎間板高インデックスの割合を減少させ、対照群に対し有意差が認められた(図 2.6.2.2.2.3-7)。

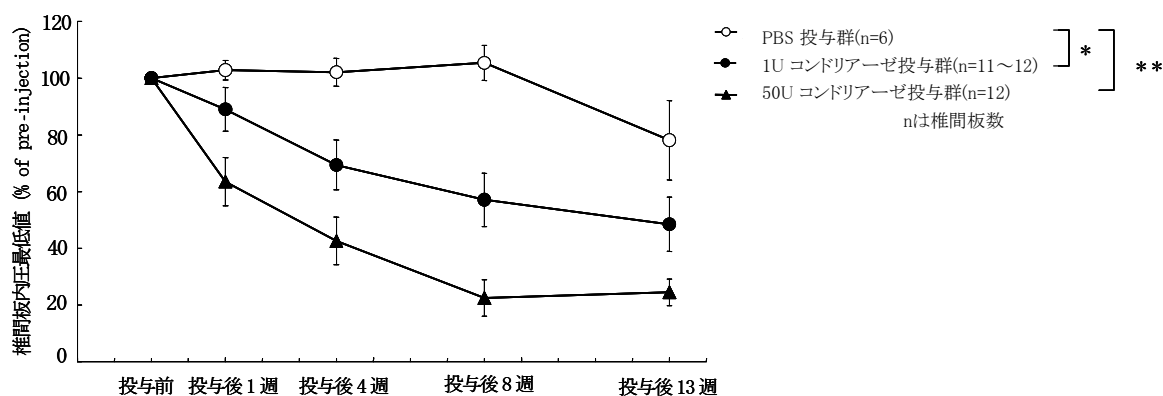


図 2.6.2.2.2.3-2. ヒツジにおけるコンドリアーゼ投与後の椎間板内圧最低値の経時的推移

ヒツジの椎間板内に、コンドリアーゼを 1 U/disc (—●—) 又は 50 U/disc (—▲—) の用量で 0.2 mL 単回投与した。対照群には PBS (—○—) を単回投与した。投与前 2~7 日、投与後 1、4、8 及び 13 週に圧力トランスデューサーを用いて椎間板内圧最低値を測定した。

* : P<0.05、** : P<0.01、PBS 対照群と比較 (Dunnett 検定)

各値は平均値±標準誤差で示す (n=6~12)。

(資料番号 4.2.1.1-8、図 1-1 を改変)

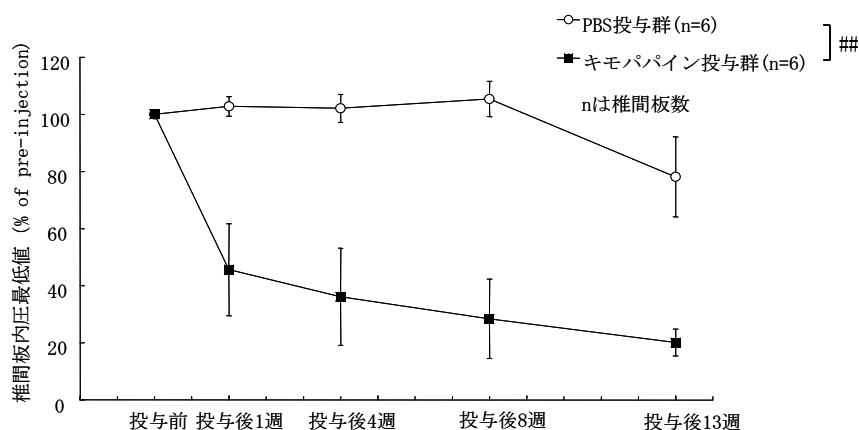


図 2.6.2.2.3-3. ヒツジにおけるキモパpain投与後の椎間板内圧最低値の経時的推移

ヒツジの椎間板内に、キモパpainを 1000 pkU/disc (—■—) の用量で 0.2 mL 単回投与した。対照群には PBS (—○—) を単回投与した。投与前 2~7 日、投与後 1、4、8 及び 13 週に圧力トランスデューサーを用いて椎間板内圧最低値を測定した。

: P<0.01、PBS 対照群と比較 (t 検定)

各値は平均値±標準誤差で示す (n=6)。

(資料番号 4.2.1.1-8、図 1-2 を改変)

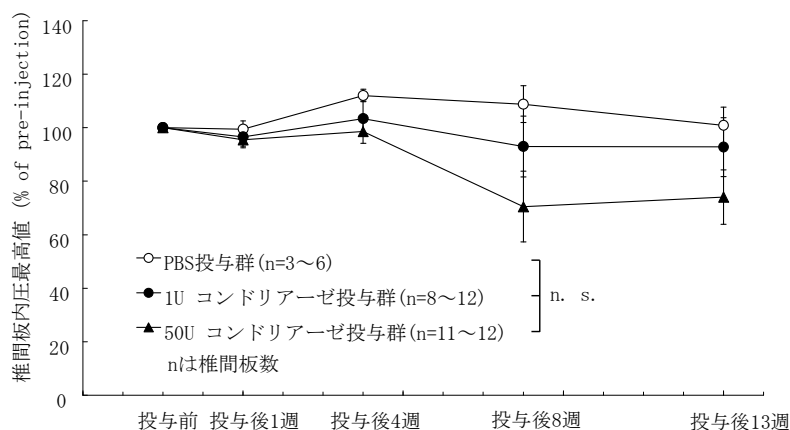


図 2.6.2.2.3-4. ヒツジにおけるコンドリアーゼ投与後の椎間板内圧最高値の経時的推移

ヒツジの椎間板内に、コンドリアーゼを 1 U/disc (—●—) 又は 50 U/disc (—▲—) の用量で 0.2 mL 単回投与した。対照群には PBS (—○—) を単回投与した。投与前 2~7 日、投与後 1、4、8 及び 13 週に圧力トランスデューサーを用いて椎間板内圧最高値を測定した。

n. s. : not significant、3 群間の比較 (分散分析)

各値は平均値±標準誤差で示す (n=3~12)。

(資料番号 4.2.1.1-8、図 2-1 を改変)

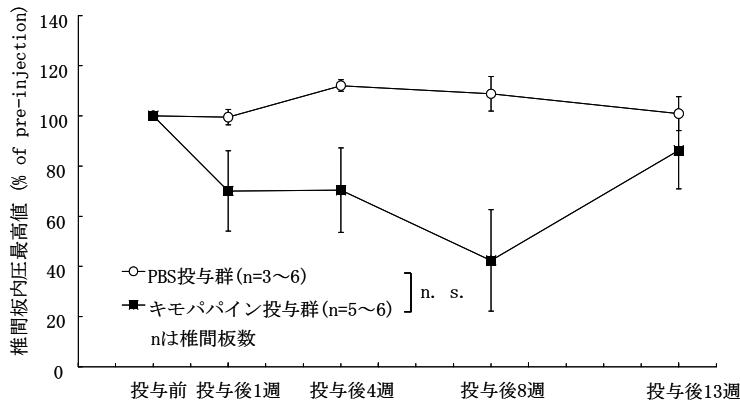


図 2.6.2.2.3-5. ヒツジにおけるキモパpain投与後の椎間板内圧最高値の経時的推移

ヒツジの椎間板内に、キモパpainを 1000 pkU/disc (—■—) の用量で 0.2 mL 単回投与した。対照群には PBS (—○—) を単回投与した。投与前 2~7 日、投与後 1、4、8 及び 13 週に圧カトランスデューサーを用いて椎間板内圧最高値を測定した。

n. s. : not significant、PBS 対照群と比較 (Welch 検定)

各値は平均値±標準誤差で示す (n=3~6)。

(資料番号 4.2.1.1-8、図 2-2 を改変)

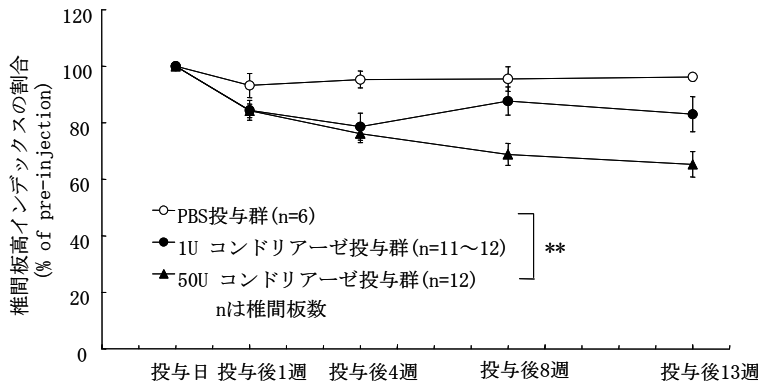


図 2.6.2.2.3-6. ヒツジにおけるコンドリアーゼ投与後の椎間板高インデックスの経時的推移

ヒツジの椎間板内に、コンドリアーゼを 1 U/disc (—●—) 又は 50 U/disc (—▲—) の用量で 0.2 mL 単回投与した。対照群には PBS (—○—) を単回投与した。投与前 2~7 日、投与前日、投与後 1、4、8 及び 13 週に X 線撮影し、投与前日の椎間板高インデックスを 100%とした際の各時点における椎間板高インデックスの割合を求めた。

** : P<0.01、PBS 対照群と比較 (Dunnett 検定)

各値は平均値±標準誤差で示す (n=6~12)。

(資料番号 4.2.1.1-8、図 4-1 を改変)

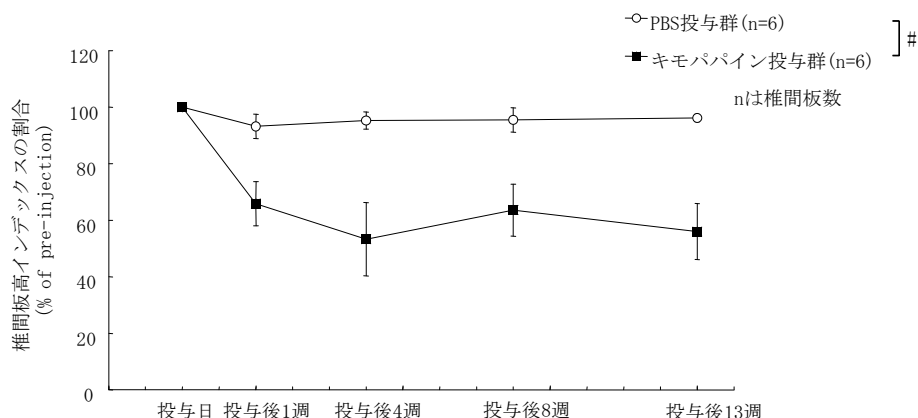


図 2.6.2.2.3-7. ヒツジにおけるキモパpain投与後の椎間板高インデックスの経時的推移
 ヒツジの椎間板内に、キモパpainを 1000 pkU/disc (—■—) の用量で 0.2 mL 単回投与した。対照群には PBS (—○—) を単回投与した。投与前 2~7 日、投与前日、投与後 1、4、8 及び 13 週に X 線撮影し、投与前日の椎間板高インデックスを 100%とした際の各時点における椎間板高インデックスの割合を求めた。
 # : P<0.05、PBS 対照群と比較 (Welch 検定)
 各値は平均値±標準誤差で示す (n=6)。
 (資料番号 4.2.1.1-8、図 4-2 を改変)

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 髓核体積の種差に関する検討

(資料番号 4.2.1.2-1 : 試験番号 6603-LDH-■■■■、資料番号 4.2.1.2-2 (参考資料) : 試験番号 6603-LDH-■■■■ ; 概要表 2.6.3.3)

資料番号 4.2.1.2-2 (参考資料) : 試験番号 6603-LDH-■■■■ については ■■■■ 年に実施された試験であり、信頼性を十分に担保できないため参考資料とした。

非臨床試験における薬効をヒトに外挿する場合の指標として、イヌ、サル及びウサギの髓核体積をヒトと比較した。

健康成人 (20 歳以上 50 歳未満の男性 6 名、女性 3 名)、イヌ (ビーグル犬雄 2 匹、雌 4 匹) 及びサル (カニクイザル雄 1 匹、雌 2 匹) の L4/L5 髓核体積を MRI 撮像より算出し (以下、MRI 測定体積)、イヌ及びサルについては、さらに、MRI 撮像後に L4/L5 髓核を採取し、実測体積も併せて測定した (資料番号 4.2.1.2-2)。ウサギ (日本白色種ウサギ雌 10 匹) については L4/L5 髓核を採取し、実測体積のみを測定した (資料番号 4.2.1.2-1)。

MRI 測定体積は、ヒト 7852.2 mm³、イヌ 111.8 mm³ 及びサル 127.2 mm³ であり、ヒトの髓核はイヌの 70.2 倍、サルの 61.7 倍であることが示された。また、イヌの実測体積は、79.7 mm³、サルは 96.7 mm³ であった。

一方、ウサギの L4/L5 の実測体積の平均値は、16.8 mm³ であり、イヌ及びサルの実測体積の 1/4.7 及び 1/5.8 であったことから、ヒトの髄核体積はウサギの 330～358 倍と算定された (表 2.6.2.3.1-1)。

表 2.6.2.3.1-1. 髄核体積の比較

種	MRI 測定体積 (mm ³)	実測体積 (mm ³)	体積比
ヒト	7852.2	—	1
ビーグル犬	111.8	79.7	1/70.2
カニクイザル	127.2	96.7	1/61.7
日本白色種ウサギ	—	16.8	1/330～1/358

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.3-1 : 試験番号 ████████-2124 ; 概要表 2.6.3.4)

6 週齢の雄性 SD 系ラット (1 群 8 匹) に、コンドリアーゼを 0.2、2 又は 20 U/kg の用量で単回皮下投与し、機能観察総合評価 (FOB) 法を用いて、一般症状、感覚・運動機能及び体温を測定した。その結果、コンドリアーゼのいずれの投与量においても中枢神経系に対する影響は認められなかった。

2.6.2.4.2 呼吸器系に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.3-2 : 試験番号 ████████-2125 ; 概要表 2.6.3.4)

6 週齢の雄性 SD 系ラット (1 群 6 匹) に、コンドリアーゼを 0.2、2 又は 20 U/kg の用量で単回皮下投与し、呼吸機能 (1 回換気量、呼吸数及び分時換気量) に対する影響を検討した。その結果、コンドリアーゼのいずれの投与量においても呼吸機能に対する影響は認められなかった。

2.6.2.4.3 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1 無麻酔イヌを用いた心血管系に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.3-3 : 試験番号 ████████-4126 ; 概要表 2.6.3.4)

無麻酔、無拘束の雄性ビーグル犬 (1 群 3～4 匹) に、コンドリアーゼを 0.2、2 又は 20 U/kg の用量で単回皮下投与し、心血管系に対する影響を検討した。その結果、コンドリアーゼのいずれの投与量においても心電図の持続時間 (PR 間隔、QRS 間隔、QT/QTc 間隔) に対する影響はなく、催不整脈作用もなかった。一般状態、行動観察、呼吸数、心拍数及び血圧 (平均血圧、拡張期血圧、収縮期血圧) に対しても影響は認められなかった。

2.6.2.4.3.2 hERG 電流に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.3-4 : 試験番号 ████████-9128 ; 概要表 2.6.3.4)

コンドリアーゼは、0.0436、0.436 及び 4.36 mU/mL の濃度で、パッチクランプ法を用いた hERG 導入 HEK 293 細胞 (1 群 n=5) における hERG 電流に対し影響しなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

2.6.2.6 考察及び結論

コンドリアーゼは、主にコンドロイチン硫酸またはヒアルロン酸からなる GAG を特異的に分解する酵素である⁽⁹⁾。コンドリアーゼは、その立体構造、部位特異的変異導入を加えた活性中心における反応機構に関する解析結果が報告されている。これらの報告から、コンドリアーゼの活性中心は、Arg560、Glu653、His501、Tyr508 により構成され^{(4) (5)}、部位特異的変異導入の結果より、Glu653 が水素結合により活性中心の構造を維持し、Tyr508 と Arg560 がコンドロイチン硫酸の分解に作用するものと推察されている⁽⁶⁾。コンドリアーゼは、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン及びヒアルロン酸の β 1-4 グリコシド結合を脱離反動的に切断して、非還元末端に不飽和ヘキサロン酸をもつ不飽和オリゴ糖を生成する⁽⁷⁾。

以上の立体構造とその反応機構の報告から、コンドリアーゼは選択的に GAG (コンドロイチン硫酸、コンドロイチン及びヒアルロン酸) を分解する。その酵素学的特徴から、腰椎椎間板ヘルニア患者の椎間板内に投与されたコンドリアーゼは、髄核中プロテオグリカンの GAG を特異的に分解し、多量の水分子を取り込む性質を有する GAG の分解により保水能を低下させる。その結果、椎間板内圧が低下し、椎間板ヘルニアによる脊髄神経根への圧迫を軽減すると考えられている。

近年、CT や MRI などの画像診断が発達したことに伴って椎間板ヘルニアの自然縮小メカニズムが解明されつつある。椎間板ヘルニアの自然縮小では、炎症反応に起因するメカニズムの関与が示唆されている^{(10) (11)}。この炎症反応は、ヘルニア組織が血行の豊富な硬膜外に脱出することで新生血管が増生され炎症性細胞が浸潤すると考えられており^{(11) (12)}、硬膜外に脱出したヘルニア塊で顕著に観察される事象である。一方、本剤の適用である膨隆型、突出型及び後縦靭帯下脱出型ヘルニアは血行への曝露がなく、ヘルニア組織への炎症性細胞浸潤はほとんどみられていない^{(11) (13) (14)}。また、本剤を正常動物の椎間板内に投与した毒性試験では、髄核への炎症性細胞浸潤は認められていない。したがって、本剤の薬理作用は前述の GAG 分解による保水能低下に起因すると考えられる。

化学的髄核融解術に用いられる代表的な薬剤としてタンパク質分解酵素のキモパインが知られている^{(15) (16)}。キモパインは、椎間板の中心部組織である髄核の水分保持に重要な役割を担うプロテオグリカンの結合タンパク質を分解し、椎間板内圧を低下させることにより、椎間板ヘルニアの神経根圧迫に伴う臨床症状を寛解させる⁽¹⁷⁾。しかし、キモパインは、タンパク質分解酵素である

ため、神経組織などにも作用し、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⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾。コンドリアーゼは、キモパインとは異なりタンパク質を分解しないことから、神経組織などに影響を及ぼすリスクはほとんどないと考えられ、安全性の高い有用な化学的髄核融解術用薬剤になりうることを期待される。

図 2.6.2.1-1 にコンドリアーゼの作用機序と薬理作用の関係を示した。椎間板ヘルニアによる下肢痛を再現する実験動物モデルには、機械的に髄核を硬膜外に脱出させ神経根に接触させるモデルや⁽²³⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾、外科的に摘出した自家髄核を神経根に留置するモデルなど⁽²⁸⁾の報告がある。しかし、これらのモデルは、椎間板内圧低下による神経根圧迫の軽減を評価するには適していない。そこで、コンドリアーゼの椎間板ヘルニアに対する有効性としては、椎間板ヘルニアに罹患したイヌにコンドリアーゼを椎間板内投与し、椎間板ヘルニアの臨床症状の改善作用を検討した。さらに正常動物に対する作用としては、髄核縮小の随件事象であり、薬効を示唆する指標として椎間板高狭小化作用⁽¹⁾⁽²⁾を検討した。さらに作用機序として、基質特異性、髄核からのコンドロイチン硫酸の遊出、髄核膨潤抑制作用、及び椎間板内圧低下作用を検討した。

椎間板ヘルニアに罹患したイヌの椎間板内にコンドリアーゼを単回投与することで、ヘルニア臨床症状の改善作用が認められた。さらに、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試験において、コンドリアーゼは、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及び髄核中水分含量を用量依存的に減少させ、コンドリアーゼの薬効が示唆された。コンドリアーゼ椎間板内投与による椎間板高狭小化作用については、正常ウサギ⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾⁽³²⁾⁽³³⁾、正常イヌ⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾及び正常サル⁽²⁾で同様の報告がされており、本試験結果を支持するものであった。基質特異性の試験では、コンドリアーゼは GAG、特にコンドロイチン硫酸及びコンドロイチンに対する高い基質特異性を有し、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、髄核からのコンドロイチン硫酸遊出率の増加及び髄核膨潤率の減少を示した。正常ヒツジの椎間板内にコンドリアーゼを単回投与した試験においては、椎間板内圧の低下及び椎間板高の狭小化がみられた。ヒトと各種動物の椎間板構造は、組織学的には一部異なるが⁽³⁶⁾コンドリアーゼの有効性は、髄核の構成成分に大きく左右されると考える。また、髄核と接している線維輪の構成成分並びに髄核及び線維輪の形状が、一部有効性に寄与すると推察される。髄核及び線維輪の構成成分並びに形状を比較すると、ヒトと各種動物間の種差は小さい⁽³⁷⁾～⁽⁴³⁾。したがって、各種動物を用いた薬理試験結果は、ヒトにおいても、コンドリアーゼが椎間板内圧を低下させることを示唆するものであり、内圧低下に起因したヘルニア縮小により、椎間板ヘルニアに有効性を示すと考えられる。

コンドリアーゼのヒト臨床試験では、血清中ケラタン硫酸濃度を測定し、有効性及び安全性との関連性について探索的に検討している。そこで髄核膨潤抑制試験においてケラタン硫酸の遊出率を評価したところ、コンドリアーゼ添加により髄核からのケラタン硫酸遊出率の増加が認められた。基質特異性の試験(2.6.2.2.1 (1))においては、コンドリアーゼにはケラタン硫酸分解作用のないことが確認されている。したがって、遊出したケラタン硫酸は、コンドリアーゼにより直接分解されたものではなく、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などの GAG が分解されることでプロテオグリカンの複合体構造が破壊され、ケラタン硫酸を含むプロテオグリカンの小断片が遊出したと推測された。

コンドリアーゼの申請用量と、ウサギ椎間板高狭小化試験の用量反応性において効果を示す用量を比較した。コンドリアーゼは、2 mU/disc 以上の用量でウサギの椎間板高を有意に狭小化させた。一方、ヒトの髄核はウサギに比べ 330~358 倍大きいことが示された。この髄核の倍率を 2 mU/disc に乗じると、ヒト椎間板において薬理学的作用を発現する用量はおおよそ ■ U/disc 以上と算出され、申請用量に近い値であった。

安全性薬理試験において、中枢神経系、呼吸器系、心血管系に対して影響は認められなかった。このことから、コンドリアーゼは、重篤な副作用を発現しないものと考えられた。さらに、試薬として市販されているコンドリアーゼを用いた論文では、ブタ及びウサギの脊髄クモ膜下腔又は末梢神経へのコンドリアーゼ局所投与で、形態学的変化並びに神経伝動速度を指標とした機能評価においても、神経障害性のないことが報告されている^{(20) (22) (44)}。また、コンドリアーゼは、ハムスター頬嚢及びウサギ耳介への局所投与で微小循環にも影響しないことが示されている⁽²¹⁾。

以上、コンドリアーゼは、椎間板髄核中のプロテオグリカンを構成するコンドロイチン硫酸などの GAG を選択的に分解し、髄核の保水能を低下させることにより椎間板内圧を低下させ、イヌにおける椎間板ヘルニア臨床症状を改善した。さらに、in vivo 薬理試験において、コンドリアーゼは単回投与で効果を示したことから、臨床においても椎間板内に単回投与することで有効性が得られる可能性が示された。また、安全性薬理試験において、中枢神経系、呼吸器系、心血管系に及ぼす影響は認められなかった。これらの結果より、コンドリアーゼは、椎間板ヘルニア治療の化学的髄核融解術における有効かつ安全性の高い薬剤であると考えられる。

2.6.2.7 図表

表及び図は、本文中に適宜記載した。

2.6.2.8 参考文献

- (1) Smith L, Garvin PJ, Gesler RM, Jennings RB. Enzyme dissolution of the nucleus pulposus. *Nature*. 1963;198:1311-1312.
- (2) Sugimura T, Kato F, Mimatsu K, Takenaka O, Iwata H. Experimental chemonucleolysis with chondroitinase ABC in monkeys. *Spine*. 1996;21:161-165.
- (3) 小幡 邦彦, 外山 敬介, 高田 明和, 熊田 衛, 著. 新生理学 第3版. 東京: 文光堂; 2000:307-309.
- (4) Huang W, Lunin VV, Li Y, Suzuki S, Sugiura N, Miyazono H, et al. Crystal structure of proteus vulgaris chondroitin sulfate ABC lyase I at 1.9Å resolution. *J Mol Biol*. 2003;328:623-634.
- (5) Prabhakar V, Capila I, Bosques CJ, Pojasek K, Sasisekharan R. Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification. *Biochem J*. 2005;386:103-112.

- (6) Prabhakar V, Raman R, Capila I, Bosques CJ, Pojasek K, Sasisekharan R. Biochemical characterization of the chondroitinase ABC I active site. *Biochem J.* 2005;390:395-405.
- (7) Linhardt RJ, Galliher PM, Cooney CL. Polysaccharide lyases. *Appl Biochem Biotechnol.* 1986;12:135-176.
- (8) Merkel JR, Dreisbach JH, Ziegler HB. Collagenolytic activity of some marine bacteria. *Appl Microbiol.* 1975;29:145-151.
- (9) Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J Biol Chem.* 1968;243:1523-1535.
- (10) Chun-Wei Chang, Ping-Hong Lai, Chi-Man Yip, Shu-Shong Hsu. Spontaneous regression of lumbar herniated disc. *J Chin Med Assoc.* 2009;72:650-653.
- (11) 越智 隆弘, 菊池 臣一, 編集. NEW MOOK 整形外科 腰椎椎間板ヘルニア. 東京: 金原出版株式会社; 1997:53-66.
- (12) 細金 直文, 松本 守雄, 戸山 芳昭. 腰部椎間板ヘルニアの診断と治療. *医学のあゆみ.* 2011;236:507-512.
- (13) Arai Y, Yasuma T, Shitoto K, Yamauchi Y, Suzuki F. Immunohistological study of intervertebral disc herniation of lumbar spine. *J Orthop Sci.* 2000;5:229-231.
- (14) Hatano E, Fujita T, Ueda Y, Okuda T, Katsuda S, Okada Y, et al. Expression of ADAMTS-4 (aggrecanase-1) and possible involvement in regression of lumbar disc herniation. *Spine.* 2006;31:1426-1432.
- (15) Smith L. Enzyme dissolution of the nucleus pulposus in humans. *JAMA.* 1964;187:137-140.
- (16) Brown MD. Update on chemonucleolysis. *Spine.* 1996;21:62S-68S.
- (17) 菊地寿幸, 新名正由, 根元理, 山岸正明, 下村裕. Chymopapain (Discase) の作用 — 家兎椎間板に及ぼす影響について — *臨床整形外科.* 1987;22:975-981.
- (18) Mackinnon SE, Hudson AR, Llamas F, Dellon AL, Kline DG, Hunter DA. Peripheral nerve injury by chymopapain injection. *J Neurosurg.* 1984;61:1-8.
- (19) 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.
- (20) 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.
- (21) Olmarker K, Danielsen N, Nannmark U, Sennerby L, Rydevik B. Microvascular effects of chondroitinase ABC and chymopapain. *Clin Orthop.* 1990;257:274-279.

- (22) Kato F, Mimatsu K, Iwata H, Miura T. Comparison of tissue reaction with chondroitinase ABC and chymopapain in rabbits as the basis of clinical application in chemonucleolysis. *Clin Orthop.* 1993;288:294-302.
- (23) Iwatsuki K, Yoshimine T, Sasaki M, Yasuda K, Akiyama C, Nakahira R. The effect of laser irradiation for nucleus pulposus: an experimental study. *Neurol Res.* 2005;27:319-323.
- (24) Yoshida M, Nakamura T, Sei A, Kikuchi T, Takagi K, Matsukawa A. Intervertebral disc cells produce tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, and monocyte chemoattractant protein-1 immediately after herniation: an experimental study using a new hernia model. *Spine.* 2005;30:55-61.
- (25) Sobajima S, Kempel JF, Kim JS, Wallach CJ, Robertson DD, Vogt MT, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine.* 2005;30:15-24.
- (26) Olmarker K, Nutu M, Storkson R. Changes in spontaneous behavior in rats exposed to experimental disc herniation are blocked by selective TNF-alpha inhibition. *Spine.* 2003;28:1635-1642.
- (27) Onda A, Murata Y, Rydevik B, Larsson K, Kikuchi S, Olmarker K. Nerve growth factor content in dorsal root ganglion as related to changes in pain behavior in a rat model of experimental lumbar disc herniation. *Spine.* 2005;30:188-193.
- (28) Tachihara H, Sekiguchi M, Kikuchi S, Konno S. Do corticosteroids produce additional benefit in nerve root infiltration for lumbar disc herniation? *Spine.* 2008;33:743-747.
- (29) Takahashi T, Kurihara H, Nakajima S, Kato T, Matsuzaka S, Sekiguchi T, et al. Chemonucleolytic effects of chondroitinase ABC on normal rabbit intervertebral discs. Course of action up to 10 days postinjection and minimum effective dose. *Spine.* 1996;21:2405-2411.
- (30) Eurell JAC, Brown MD, Ramos M. The effects of chondroitinase ABC on the rabbit intervertebral disc. A roentgenographic and histologic study. *Clin Orthop.* 1990;256:238-243.
- (31) Henderson N, Stanescu V, Cauchoix J. Nucleolysis of the rabbit intervertebral disc using chondroitinase ABC. *Spine.* 1991;16:203-208.
- (32) Kato F, Iwata H, Mimatsu K, Miura T. Experimental chemonucleolysis with chondroitinase ABC. *Clin Orthop.* 1990;253:301-308.
- (33) Park JS, Ahn JI. The effect of chondroitinase ABC on rabbit intervertebral disc. Radiological, histological and electron microscopic findings. *Int Orthop.* 1995;19:103-109.
- (34) Fry TR, Eurell JAC, Johnson AL, Brown MD, Losonsky JM, Schaeffer DJ. Radiographic and histologic effects of chondroitinase ABC on normal canine lumbar intervertebral disc. *Spine.* 1991;16:816-819.

- (35) Yamada K, Tanabe S, Ueno H, Oinuma A, Takahashi T, Miyauchi S, et al. Investigation of the short-term effect of chemonucleolysis with chondroitinase ABC. *J Vet Med Sci.* 2001;63:521-525.
- (36) ██████████. SI-6603 (C-ABC) を単回椎間板内投与した際の安全性についての考察 改訂版 1. 生化学工業株式会社 社内資料. ██████████.
- (37) O'Connell GD, Vresilovic EJ, Elliott DM. Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry. *Spine.* 2007;32:328-333.
- (38) Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, et al. The human lumbar intervertebral disc. *J Clin Invest.* 1996;98:996-1003.
- (39) Beckstein JC, Sen S, Schaer TP, Vresilovic EJ, Elliott DM. Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: Axial compression mechanics and glycosaminoglycan content. *Spine.* 2008;33:E166-E173.
- (40) 戸山 芳昭, 編集. 図説 腰椎の臨床. 東京: 株式会社メジカルビュー社; 2001:43-48.
- (41) 佐野 明美, 辻 陽雄, 丸田 喜美子, 北野 悟. 正常家兎腰椎椎間板における Collagen, Non-collagenous protein および Elastin の部位別含量と ³H-Lysine incorporation について. *整形外科基礎科学.* 1985;12:59-61.
- (42) Ghosh P, Taylor TKF, Braund KG, Larsen LH. The collagenous and non-collagenous protein of the canine intervertebral disc and their variation with age, spinal level and breed. *Gerontology.* 1976;22:124-134.
- (43) 日本生化学会, 編. 新生化学実験講座 3 糖質 II プロテオグリカンとグリコサミノグリカン. 東京: 株式会社東京化学同人; 1991:175-179.
- (44) Olmarker K, Danielsen N, Nordborg C, Rydevik B. Effects of chondroitinase ABC on intrathecal and peripheral nerve tissue. An in vivo experimental study on rabbits. *Spine.* 1991;16:43-45.

ヘルニコア[®]椎間板注用 1.25 単位
コンドリアーゼ

2.6.3 薬理試験概要表

生化学工業株式会社

目次

2.6.3 薬理試験概要表.....4

2.6.3.1 薬理試験：一覧表.....4

2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....8

2.6.3.3 副次的薬理試験.....15

2.6.3.4 安全性薬理試験.....16

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....17

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）
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素標識免疫測定法
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価
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
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
L3/L4	Intervertebral disc between the third and fourth lumbar vertebrae (The notation of other lumbar intervertebral discs is also similar.)	第3腰椎と第4腰椎間の椎間板 (他の腰椎椎間板の表記も同様)
L6/S1	Intervertebral disc between the sixth lumbar vertebra and the first sacral bone	第6腰椎と第1仙骨間の椎間板
MRI	Magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
PBS	Phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
QTc	QT interval corrected for heart rate	補正 QT 間隔
T13/L1	Intervertebral disc between the thirteenth thoracic vertebra and the first lumbar vertebra	第13胸椎と第1腰椎間の椎間板
U	Unit	単位

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：コンドリアーゼ

試験の種類	試験系	投与方法	性別及び動物数/ 群	実施施設	試験番号	資料番号
効力を裏付ける試験						
椎間板ヘルニア症状 改善作用	椎間板ヘルニア 罹患イヌ	椎間板内、 単回	雌、雄、48	中山獣医科病院 なかはら動物病院 千村動物医院 戸ヶ崎動物病院 生化学工業（株）	6603-LDH- XXXXXXXXXX	4.2.1.1-1 (参考資料)
椎間板高狭小化作用	ウサギ椎間板	椎間板内、 単回	雌、8 椎間板	生化学工業（株）	6603-LDH- XXXXXXXXXX	4.2.1.1-2
			雌、9～48 椎間板	生化学工業（株）	XXXX 49	4.2.1.1-3 (参考資料)
	ヒヒ椎間板	椎間板内、 単回	雌、雄、9 椎間板	University of Miami Mannheimer Foundation	—	4.2.1.1-4 (参考資料)

(続く)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：コンドリナーゼ

試験の種類	試験系	投与方法	性別及び動物数/ 群	実施施設	試験番号	資料番号
効力を裏付ける試験						
酵素化学的性質 (基質特異性)	酵素反応	In vitro 試験	—	生化学工業（株）	TR-QC-030	2.3.S.3.1.2 3.2.S.3.1.2 4.2.1.1-9
酵素化学的性質 (酵素活性に対する金属イオン、リン酸イオン及び酢酸イオンの影響)	酵素反応	In vitro 試験	—	生化学工業（株）	TR-QC-030	2.3.S.3.1.2 3.2.S.3.1.2 4.2.1.1-9
髄核膨潤抑制作用及び 髄核構成成分遊出作用	ウサギ摘出髄核	In vitro 試験	雌、7～10 検体	生化学工業（株）	6603-LDH-	4.2.1.1-5
			雌、10 検体	生化学工業（株）	—	4.2.1.1-6 (参考資料)
椎間板内圧低下作用	ヒツジ椎間板	椎間板内、 単回	雌、6～12 椎間板	国立大学法人帯広畜産 大学	6603-LDH-	4.2.1.1-7 (参考資料)
				生化学工業（株）	6603-LDH-	4.2.1.1-8 (参考資料)

(続く)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系	投与方法	性別及び動物数/ 群	実施施設	試験番号	資料番号
副次的薬理試験						
各種動物の髄核体積	ウサギ（実測）	—	雌、10	生化学工業（株）	6603-LDH- XXXXXXXXXX	4.2.1.2-1
	ヒト（MRI 測定） イヌ（MRI 測定、 実測） サル（MRI 測定、 実測）	—	男、女（ヒト）、9 雌、雄（イヌ）、6 雌、雄（サル）、3	生化学工業（株）	6603-LDH- XXXXXXXXXX	4.2.1.2-2 (参考資料)

(続く)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：コンドリナーゼ

試験の種類	試験系	投与方法	性別及び動物数/群	実施施設	試験番号	資料番号
安全性薬理試験						
中枢神経系に及ぼす影響	Crl:CD (SD) 系ラットでのFOB 法	皮下、単回 0.2、2、20 U/kg	雄、8	■	■-2124 ^{a)}	4.2.1.3-1
呼吸器系に及ぼす影響	Crl:CD (SD) 系ラットでの呼吸機能	皮下、単回 0.2、2、20 U/kg	雄、6	■	■-2125 ^{a)}	4.2.1.3-2
心血管系に及ぼす影響	テレメトリーシステム装着 無麻酔無拘束ビーグル犬	皮下、単回 0.2、2、20 U/kg	雄、3~4	■	■-4126 ^{a)}	4.2.1.3-3
	hERG 導入 HEK293 細胞	In vitro 試験 0.0436、0.436、 4.36 mU/mL	細胞、5	■	■-9128 ^{a)}	4.2.1.3-4
薬力学的薬物相互作用 該当試験なし 試験						

a) : GLP に適合した報告書

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：コンドロラーゼ

試験項目	動物種（性） /系統	試験方法	投与量	試験成績	資料番号
椎間板ヘルニア 症状改善作用	イヌ（雌、雄）	椎間板ヘルニアの臨床症状を有するイヌ 48 匹の椎間板内に、250 U/mL のコンドロラーゼを 20～200 μL の用量で単回投与した。その後、椎間板ヘルニアの臨床症状をコンドロラーゼ投与後最長 59 日まで観察した。	250 U/mL、 20～200 μL/disc	コンドロラーゼ投与により椎間板ヘルニア症状の改善がみられ、投与後 7 日では 24 例（50%）、投与後 59 日では 36 例（75%）においてヘルニアの臨床症状が消失した。	4.2.1.1-1 (参考資料)
椎間板高狭小化 作用	ウサギ（雌） 日本白色種	ウサギの腰椎椎間板（L3/L4、L4/L5、L5/L6 及び L6/L7）内に、コンドロラーゼを 10 μL 単回投与した。対照群には PBS を投与した。コンドロラーゼ投与前及び投与後 7 日に X 線撮影を行った後、髄核を摘出した。コンドロラーゼの薬効は X 線画像から算出した椎間板高インデックスの割合、及び髄核中の水分含量を指標に評価した。（n=8）	0.2、2、 20、200 mU/disc	コンドロラーゼは、2 mU/disc 以上で椎間板高インデックスの割合を減少させ、さらに髄核水分含量を減少させた。椎間板高インデックスの割合の減少と髄核水分含量の減少には相関が認められた。	4.2.1.1-2

（続く）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：コンドリアーゼ

試験項目	動物種（性） /系統	試験方法	投与量	試験成績	資料番号
椎間板高狭小化作用	ウサギ（雌） 日本白色種	ウサギの腰椎椎間板（L3/L4、L4/L5、L5/L6及びL6/L7）内に、コンドリアーゼを10 µL単回投与した。対照群にはPBSを投与した。コンドリアーゼ投与前及び投与後7日にX線撮影を行った後、髄核を摘出した。コンドリアーゼの薬効は、X線画像から算出した椎間板高インデックスの割合及び髄核中の水分含量を指標に評価した。（n=9～48）	0.2、2、20、200 mU/disc	コンドリアーゼは、0.2 mU/disc以上で椎間板高インデックスの割合を減少させ、さらに2 mU/disc以上で髄核水分含量を減少させた。	4.2.1.1-3 (参考資料)
椎間板高狭小化作用	ヒヒ（雌、雄） <i>Papio hamadryas</i>	ヒヒの腰椎椎間板（L3/L4、L4/L5、L5/L6及びL6/S1）内に、コンドリアーゼを単回投与した。対照群にはPBSを投与した。コンドリアーゼ投与前及び投与後7日にX線撮影を行った。（n=9）	0.02、0.2、2、20、50、100、200 U/mL	コンドリアーゼは、20 U/mL以上で椎間板高インデックスの割合を減少させた。	4.2.1.1-4 (参考資料)

（続く）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：コンドリアーゼ

試験項目	動物種（性） /系統	試験方法	投与量	試験成績	資料番号
酵素化学的性質 （基質特異性）	In vitro	多糖類における基質特異性は、 ■ mg/mL に調製した各基質溶液（pH8.0）にコンドリアーゼ「生化学」を添加し、波長 232 nm の吸光度を経時的にモニターした。コンドロイチン硫酸 A の反応初速度を 100% とした各多糖類の相対反応初速度を求めた。タンパク質に対する作用は、カゼイン及びウシ血清アルブミンを基質として、吸光度 280 nm を測定した。	—	コンドリアーゼは、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン及びヒアルロン酸に対して分解活性を有し、ヘパリン、ヘパリン硫酸及びケラタン硫酸には作用しなかった。タンパク質分解活性を有しないことが示された。	2.3.S.3.1.2 3.2.S.3.1.2 4.2.1.1-9

（続く）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：コンドリナーゼ

試験項目	動物種（性） /系統	試験方法	投与量	試験成績	資料番号
<p>二 酵素化学的性質 (酵素活性に対する の影響)</p>	<p>In vitro</p>	<p>コンドリナーゼを希釈した試験液に、緩衝液及びコンドロイチン硫酸ナトリウム「生化学」CDを加え、各種含有溶液（終濃度 mmol/L）、各濃度の溶液（終濃度 mmol/L）及び各濃度の緩衝液（終濃度 mmol/L）を添加した。℃で 分間放置した後、水浴中で加熱し、室温の水で冷却後 232 nm の吸光度を測定し、酵素活性（酵素単位）と相対酵素活性（%）を算出した。</p>	<p>—</p>	<p>コンドロイチン硫酸ナトリウム「生化学」CD に対する活性は、終濃度 mmol/L のにより酵素活性が阻害された。 は終濃度 mmol/L では活性に影響しなかった。は終濃度 mmol/L で酵素活性を約 % 阻害し、酢酸イオンは終濃度 mmol/L～ mmol/L において活性を高め、終濃度 mmol/L においては、阻害する傾向が認められた。</p>	<p>2.3.S.3.1.2 3.2.S.3.1.2 4.2.1.1-9</p>

（続く）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：コンドリナーゼ

こ

試験項目	動物種（性） /系統	試験方法	投与量	試験成績	資料番号
<p>髄核膨潤抑制作用 及び髄核構成成分 遊出作用</p>	<p>ウサギ（雌） 日本白色種</p>	<p>ウサギの脊椎から髄核を採取し、髄核約 10 mg を 1 検体とした。それぞれの検体の髄核体積を測定した後、各種濃度のコンドリナーゼ溶液または PBS を 10 µL 添加し、37℃ で 2 時間静置した。比較対照としてキモパピンを 0.8、4、20 又は 100 pKU/50 µL 添加して同様に静置した。次いで、10 mL を添加し、攪拌することにより髄核を膨潤させた後、遠心して上清と沈渣を分離した。 髄核膨潤率は、沈渣として回収される髄核の体積を被験物質添加前の体積で除して算出した。さらに、上清及び沈渣として回収された髄核中のヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸及びケラタン硫酸量を HPLC で測定し、コラーゲン量はヒドロキシプロリン量を測定し、上清への遊出率を算出した。</p>	<p>2、10、 50、250、 1250 mU/ 10 µL/tube</p>	<p>コンドリナーゼは、髄核の膨潤率を 250 及び 1250 mU/10 µL で減少させ、キモパピンは 4～100 pKU/50 µL で減少させた。ヒアルロン酸遊出率をコンドリナーゼは 50～1250 mU/10 µL、キモパピンは 0.8～100 pKU/50 µL の用量で、コンドロイチン硫酸遊出率をコンドリナーゼは 50～1250 mU/10 µL、キモパピンは 0.8～100 pKU/50 µL の用量で、ケラタン硫酸遊出率をコンドリナーゼは 10～1250 mU/10 µL、キモパピンは 0.8～100 pKU/50 µL の用量で増加させた。コラーゲンについては、コンドリナーゼは 50～1250 mU/10 µL、キモパピンは 4～100 pKU/50 µL の用量で遊出率を増加させた。</p>	<p>4.2.1.1-6 (参考資料)</p>

（続く）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：コンドリアーゼ

試験項目	動物種（性）/ 系統	試験方法	投与量	試験成績	資料番号
椎間板内圧低下 作用	ヒツジ（雌） メリノ一種	ヒツジの椎間板（T13/L1、 L1/L2、L2/L3、L3/L4、L4/L5 及びL5/L6）内にコンドリ アーゼを0.2 mL単回投与 した。キモパインは、 1000 pKU/discの用量で0.2 mLを投与した。対照群に はPBSを投与した。コンド リアーゼ及びキモパパイ ン投与前、投与後1、4、8 及び13週に圧力トランス デューサーを用いて椎間 板内圧最低値及び最高値 を測定した。さらに、内圧 測定直前に腰椎をX線撮 影し、椎間板高インデック スを求めた。（n=6~12）	1、50 U/disc	コンドリアーゼは、1 U 及び 50 U/disc の用量で投 与後1週より経時的に椎間板内圧最低値を低下さ せ、投与後13週における椎間板内圧最低値は、1 U/disc 群では投与前値の48.5%、50 U/disc 群では 投与前値の24.5%に低下した。キモパインも投 与後1週より経時的に椎間板内圧最低値を低下さ せ、投与後13週における椎間板内圧最低値は、 投与前の20.1%に低下した。コンドリアーゼは、 1 U/disc の用量で投与後13週の椎間板内圧最高値 を投与前値の92.8%に低下させた。50 U/disc の用 量では投与後8週より椎間板内圧最高値を低下さ せ、投与後13週で74.1%に低下させた。キモパ インは、投与後8週では椎間板内圧最高値を投 与前値の42.4%に低下させ、投与後13週における 椎間板内圧最高値は86.2%であった。また、コン ドリアーゼは、50 U/disc の用量で、投与後1週よ り椎間板高の指標である椎間板高インデックス の割合を減少させた。キモパインも投与後1週 より椎間板高インデックスの割合を減少させた。	4.2.1.1-7 (参考資料) 4.2.1.1-8 (参考資料)

2.6.3.3 副次的薬理試験

試験項目	動物種（性）/ 系統	試験方法	投与量	試験成績	資料番号
各種動物の髄核 体積	ウサギ（雌） 日本白色種 ヒト（男、女） ビーグル犬 （雌、雄） カニクイザル （雌、雄）	ウサギの L4/L5 髄核を採取し、実測体積を測定した。（n=10） ヒト（n=9）、イヌ（n=6）及びサル（n=3）の L4/L5 髄核体積を MRI により測定した。 イヌ及びサルについては、MRI 撮像後に L4/L5 髄核を採取し、実測体積も測定した。	—	ヒトの髄核体積は、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。	4.2.1.2-1 4.2.1.2-2 (参考資料)

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：コンドリナーゼ

評価対象となる組織	動物種/系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	資料番号
中枢神経系 ^{a)}	ラット/ CrI:CD(SD)系	皮下	0.2、2、20 U/kg	雄、8	影響なし	適	4.2.1.3-1
呼吸器系 ^{b)}	ラット/ CrI:CD(SD)系	皮下	0.2、2、20 U/kg	雄、6	影響なし	適	4.2.1.3-2
心血管系 ^{c)}	イヌ/ ビーグル	皮下	0.2、2、20 U/kg	雄、3~4	影響なし	適	4.2.1.3-3
	hERG 導入 HEK293 細胞	In vitro 試験	0.0436、0.436、 4.36 mU/mL	細胞、5	影響なし	適	4.2.1.3-4

16

a) : FOB 法により一般症状、感覚・運動機能及び体温を測定

b) : 1 回換気量、呼吸数及び分時換気量を測定

c) : 一般状態、行動観察、心電図持続時間 (PR 間隔、QRS 間隔、QT/QTc 間隔)、呼吸数、不整脈、血圧及び心拍数を測定

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。