ジョイクル関節注 30mg

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 5
2.6.1.3 申請された臨床適応、用量及び投与期間に関する情報 6

図

図 2.6.1.1-1. SI-613 の化学構造 4
図 2.6.1.1-2. SI-613 からの加水分解によるジクロフェナクの推定遊離形式 5

略号一覧

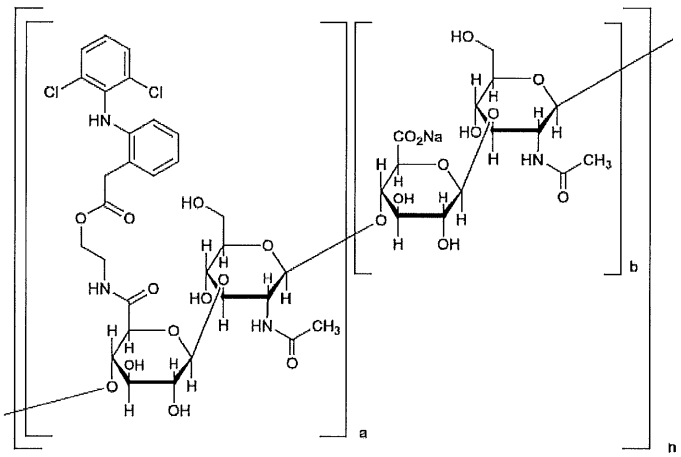
略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
[redacted]	[redacted]	[redacted]
COX	Cyclooxygenase	シクロオキシゲナーゼ
DF	Diclofenac	ジクロフェナク
DF-Na	Diclofenac sodium	ジクロフェナクナトリウム
HA	Sodium hyaluronate	ヒアルロン酸ナトリウム
HA-2-AE	Substructure a diclofenac released from SI-613	SI-613 からジクロフェナクが遊離した部分構造
IA-HA	Intra-articular sodium hyaluronate	関節腔内投与ヒアルロン酸ナトリウム製剤
MMP	Matrix metalloproteinase	マトリックスメタロプロテアーゼ
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug	非ステロイド性抗炎症薬
SI-613	Development code of Diclofenac Etalhyaluronate Sodium	一般的名称 ジクロフェナクエタルヒアルロン酸ナトリウムの開発コード

2.6.1 緒言

SI-613 は、ヒアルロン酸ナトリウム（HA）にジクロフェナク（DF）を共有結合により化学的に結合させた化合物である。SI-613 は、それ自体シクロオキシゲナーゼ（COX）-2 阻害活性を有しないが、関節内で DF を遊離することで持続的な消炎鎮痛作用を示し、また、関節腔内投与ヒアルロン酸ナトリウム製剤（IA-HA）と同様の関節機能改善作用を持つことを期待して創製された。安全性面においては、SI-613 は関節局所で DF を徐々に遊離するため DF の全身曝露を低く抑えることによって非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）でみられる全身性の副作用を軽減させることを期待し創製した。

2.6.1.1 医薬品の構造

SI-613 製剤の有効成分は、HA の二糖構造（*N*-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸から構成）の繰り返し中の D-グルクロン酸のカルボキシル基の一部にアミド結合を介して[redacted]を共有結合により化学的に結合させた化合物である。SI-613 原薬中の[redacted]は、[redacted]である。SI-613 の化学構造を図 2.6.1.1-1 に示す。投与された SI-613 は、関節局所における加水分解により DF を持続的に遊離すると考えている（DF の推定遊離形式を図 2.6.1.1-2 に示す）。



医薬品一般的名称（JAN）日本名：ジクロフェナクエタルヒアルロン酸ナトリウム

英　名：Diclofenac Etalhyaluronate Sodium

登録番号：28-6-B11, 分子式 $[(C_{30}H_{35}Cl_2N_3O_{12})_a(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_b]_n$

2-(2-{2-[(2,6-ジクロロフェニル)アミノ]フェニル}アセチルオキシ)エタンアミンで部分的にアミド化されたヒアルロン酸ナトリウム

図 2.6.1.1-1. SI-613 の化学構造

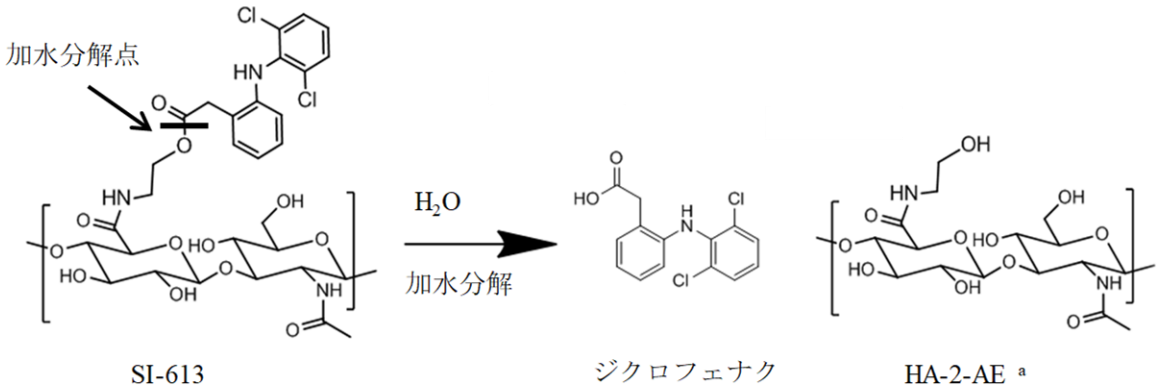


図 2.6.1.1-2. SI-613 からの加水分解によるジクロフェナクの推定遊離形式

a: SI-613 からジクロフェナクが遊離した部分構造（HA-2-AE）

2.6.1.2 薬理学的特性

〔2.6.2.2 参照〕

ヒト COX-2 酵素に対する SI-613 の阻害活性を in vitro で評価した結果、SI-613 そのものは COX-2 阻害活性を示さなかった。

関節炎モデルラットに SI-613 を単回膝関節腔内投与すると、HA あるいは HA とジクロフェナクナトリウム（DF-Na）の混合液と比較して強力かつ持続的な消炎鎮痛作用を示した。関節炎モデルウサギにおいて、単回膝関節腔内投与した SI-613 は、投与後 1 日から抗炎症作用を発揮し、その作用は投与後 28 日まで持続した。当該モデルにおいて、SI-613 投与後に炎症足の関節液中プロスタグランジン E_2 濃度の低下が認められ、SI-613 の抗炎症作用はプロスタグランジン E_2 の産生抑制によるものと推察された。同関節炎モデルウサギに SI-613 を単回膝関節腔内投与したとき、少なくとも投与後 28 日まで DF が滑膜組織に残留することが明らかとなり、当該モデルにおいて、抗炎症作用と滑膜組織中 DF 濃度に関連性が認められた。これらのことから、SI-613 による持続的な抗炎症作用は、関節腔内投与された SI-613 から DF が持続的に遊離することによって発揮されると考えられた。

SI-613 は、正常ヒト軟骨細胞においてマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1、-3 及び-13 の産生を抑制すると共に、ヒト変形性関節症患者由来の滑膜細胞において高分子量 HA の産生を促進した。これらの作用は HA で報告されているものと同様であった。

以上のことから、SI-613 は、持続的に DF を遊離することによる消炎鎮痛作用と IA-HA と同様の関節機能改善作用を持つ、変形性関節症に対する新たな治療薬となり得ると考えられた。

2.6.1.3 申請された臨床適応、用量及び投与期間に関する情報

2.6.1.3.1 効能又は効果

本申請における効能又は効果の案は以下のとおりである。

変形性関節症（膝関節、股関節、足関節）

2.6.1.3.2 用法及び用量

本申請における用法及び用量の案は以下のとおりである。

通常、成人 1 回 1 シリンジ（ジクロフェナクエタルヒアルロン酸ナトリウムとして、1 回 30 mg）を 4 週間ごとに関節腔内に投与する。

ジョイクル関節注 30mg

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 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 19
2.6.2.4 安全性薬理試験 19
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 21
2.6.2.6 考察及び結論 22
2.6.2.7 図表 23
2.6.2.8 参考文献 23

図

図 2.6.2.2-1. ヒト COX-2 活性に対する作用 6
図 2.6.2.2-2. IL-1β 誘発 MMP-13 産生に対する作用 7
図 2.6.2.2-3. ヒト滑膜細胞の高分子量 HA 産生に対する作用 8
図 2.6.2.2-4. ヒト滑膜細胞における HAS mRNA 発現に対する作用 9
図 2.6.2.2-5. ヒト滑膜細胞における HYAL mRNA 発現に対する作用 9
図 2.6.2.2-6. 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける疼痛スコアに対する作用 11
図 2.6.2.2-7. 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける荷重負荷率に対する作用 12
図 2.6.2.2-8. 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける疼痛スコアに対する作用 13
図 2.6.2.2-9. 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける荷重負荷率に対する作用 14
図 2.6.2.2-10. コラーゲン誘発ラット関節炎モデルにおける関節腫脹に対する作用 15
図 2.6.2.2-11. コラーゲン誘発ラット関節炎モデルにおける関節腫脹に対する作用 16
図 2.6.2.2-12. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける抗炎症作用 17
図 2.6.2.2-13. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける投与後 3 時間の関節液中 PGE_2 に対する作用 18
図 2.6.2.2-14. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける投与後 72 時間の関節液中 PGE_2 に対する作用 19

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）
COX	Cyclooxygenase	シクロオキシゲナーゼ
DF	Diclofenac	ジクロフェナク
DF-Na	Diclofenac sodium	ジクロフェナクナトリウム
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
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
HA	Sodium hyaluronate	ヒアルロン酸ナトリウム
HAS	Hyaluronan synthase	ヒアルロン酸合成酵素
hERG	Human *ether-a-go-go-related gene*	ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子
HYAL	Hyaluronidase	ヒアルロン酸分解酵素
IA-HA	Intra-articular sodium hyaluronate	関節内投与ヒアルロン酸ナトリウム製剤
IL	Interleukin	インターロイキン
MMP	Matrix metalloproteinase	マトリックスメタロプロテアーゼ
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug	非ステロイド性抗炎症薬
OA	Osteoarthritis	変形性関節症
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝塩化ナトリウム液
PGE_2	Prostaglandin E_2	プロスタグランジン E_2
SI-613	Development code of Diclofenac Etalhyaluronate Sodium	一般的名称 ジクロフェナクエタルヒアルロン酸ナトリウムの開発コード
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylenediamine Dihydrochloride	N,N,N',N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミン二塩酸塩

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

SI-613 は、ヒアルロン酸ナトリウム（HA）にジクロフェナク（DF）を共有結合により化学的に結合させた化合物である。SI-613 は、それ自体シクロオキシゲナーゼ（COX）-2 阻害活性を有しないが、関節内で DF を遊離することで持続的な消炎鎮痛作用を示し、また、関節内投与ヒアルロン酸ナトリウム製剤（IA-HA）と同様の関節機能改善作用を持つことが期待される。これらのコンセプトを検証するために、各種薬理試験を実施して以下の結果を得た。

ヒト COX-2 酵素に対する SI-613 の阻害活性を in vitro で評価した結果、SI-613 そのものは COX-2 阻害活性を示さなかった。

SI-613 の消炎鎮痛作用は、硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデル及びコラーゲン誘発ラット関節炎モデルを用いて検証した。単回膝関節腔内投与した SI-613 は、用量依存的に疼痛抑制作用及び抗炎症作用を示した。SI-613 の疼痛抑制作用及び抗炎症作用は、単回膝関節腔内投与した HA 及びジクロフェナクナトリウム（DF-Na）と HA の混合液ならびに連日経口投与した DF-Na の作用を上回った。以上の結果から、SI-613 は単回投与において消炎鎮痛作用を発揮することが示された。SI-613 の消炎鎮痛作用の持続性は、抗原誘発ウサギ関節炎モデルを用いて検証した。単回膝関節腔内投与した SI-613 は、投与後 1 日から抗炎症作用を発揮し、その作用は投与後 28 日まで持続した。当該モデルにおいて、SI-613 投与後に炎症足の関節液中プロスタグランジン E_2（PGE_2）濃度の低下が認められ、SI-613 の抗炎症作用は PGE_2 の産生抑制によるものと推察された。薬効の持続性における DF の関与は、薬物動態試験〔2.6.4.8.2〕との相関で検証した。抗原誘発ウサギ関節炎モデルに SI-613 を単回膝関節腔内投与したとき、少なくとも投与後 28 日まで DF が滑膜組織に残留することが明らかとなり、当該モデルにおいて、抗炎症作用と滑膜組織中 DF 濃度に関連性が認められた。これらのことから、SI-613 から持続的に遊離した DF が COX-2 阻害を介し、PGE_2 の産生抑制による消炎鎮痛作用を発揮すると推察された。

SI-613 の関節機能改善作用は、ヒト軟骨細胞及びヒト変形性関節症（OA）患者由来滑膜細胞を用いた in vitro 試験で検証した。ヒト軟骨細胞において、SI-613 は濃度依存的にマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1、-3 及び-13 の産生を抑制した。HA はこれらの酵素の産生を抑制することが報告されており [(1)]、SI-613 も HA と同様に関節軟骨に対する保護作用を有することが示唆された。また、ヒト OA 患者由来滑膜細胞において、SI-613 は高分子量 HA 産生を促進した。その作用機序は、ヒアルロン酸合成酵素（HAS）の遺伝子である *HAS*2 mRNA 発現上昇及びヒアルロン酸分解酵素（HYAL）の遺伝子である *HYAL*2 mRNA 発現抑制を含むことが示唆された。これらのことから、SI-613 は IA-HA と同様の関節機能改善作用を有することが推察された。

安全性薬理評価では、安全性薬理コアバッテリーとして、ラットを用いて中枢神経系に対する作用、ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子（hERG）電流に対する作用、イヌ（静脈内投与）及びカニクイザル（膝関節腔内投与）を用いて心血管系に対する作用、並びにラットを用いて呼吸系に対する作用を評価した。in vivo 評価は独立した試験として実施せず、単回及び反復投与毒性試験の結果から評価した。

いずれの試験も医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。SI-613は、hERG電流に対する作用を示さなかった。静脈内投与したときに、心血管系への影響として血圧低下が認められたが、膝関節腔内投与したときには認められなかった。当該変化は、粘弾性の高い投与液を静脈内投与したことに起因する変化と考えられ、SI-613は静脈内に直接投与されないことを踏まえると、臨床使用において生じる可能性は低いと考えられた。SI-613は、中枢神経系及び呼吸系に対する作用を示さなかった。

以上、SI-613は、DFを遊離することによる持続的な消炎鎮痛作用とIA-HAと同様の関節機能改善作用を持つことが示された。また、SI-613は臨床において、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In vitro 機能的特性

2.6.2.2.1.1 ヒトシクロオキシゲナーゼ-2に対する作用

〔4.2.1.1-1 参照〕

ヒトCOX-2に対するSI-613の阻害活性をin vitroで評価した。COX-2のペルオキシダーゼ活性は、N,N,N',N'-テトラメチル-*p*-フェニレンジアミン二塩酸塩（TMPD）を基質とし、酸化TMPDを比色定量する方法で測定した。

SI-613は、DF濃度として0.0043～10 μMの範囲でCOX-2阻害活性を示さなかった。対照物質として用いたDF-Naは、1.1 μM以上の濃度で濃度依存的にヒトCOX-2活性を阻害した。（図 2.6.2.2-1）。以上より、HAに化学的に結合されたDFはCOX-2に対する親和性が低下していると考えられた。

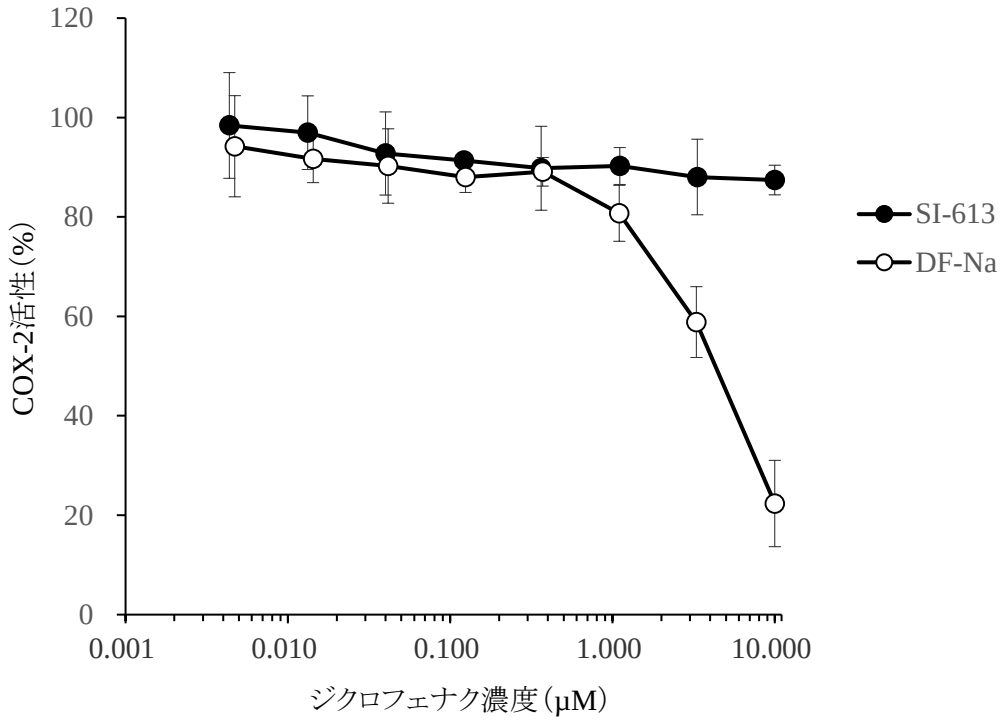


図 2.6.2.2-1. ヒト COX-2 活性に対する作用
平均値 ± 標準偏差で表示（n = 3）

2.6.2.2.1.2 ヒト軟骨細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-1、-3 及び-13 産生に対する作用

〔4.2.1.1-2 参照〕

正常ヒト膝関節軟骨細胞を 24 ウェルプレートに 1.5×10^5 細胞/ウェルで播種し、37°C で培養した。翌日に SI-613（終濃度 0.5、1 又は 2 mg/mL）、HA（終濃度 2 mg/mL）又はリン酸緩衝塩化ナトリウム液（PBS、対照）を含有する培地に交換した。30 分後にインターロイキン（IL）-1β を添加し、16 時間培養した後、培養上清を回収した。培養上清中の MMP-1、-3 及び-13 濃度を酵素免疫測定法（ELISA）により測定した。

SI-613 は、0.5～2 mg/mL の範囲で濃度依存的に MMP-13 の産生を有意に抑制した。陽性対照の HA も MMP-13 産生を抑制した（図 2.6.2.2-2）。MMP-1 及び MMP-3 においても同様の結果が得られた。以上より、SI-613 は HA と同様に変形性膝関節症患者の軟骨破壊を軽減すると考えられた。

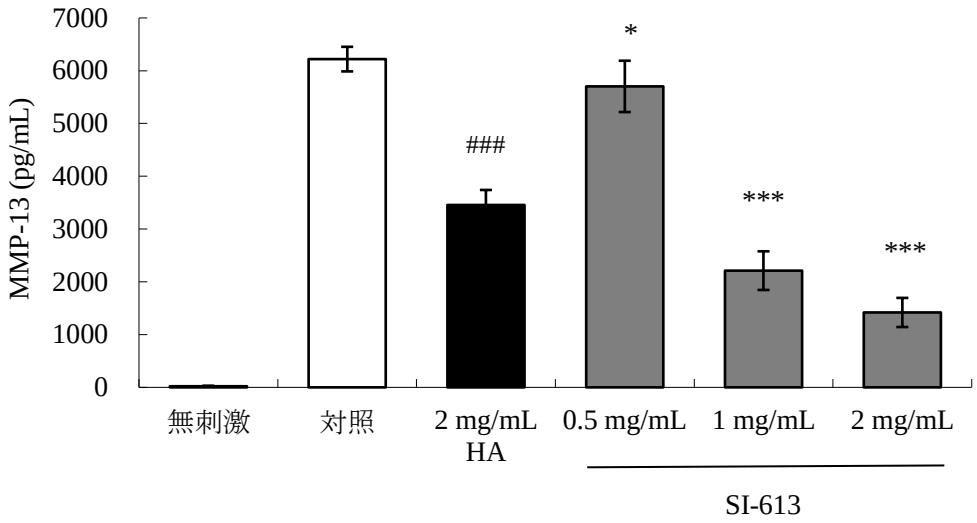


図 2.6.2.2-2. IL-1β 誘発 MMP-13 産生に対する作用

平均値 ± 標準偏差で表示（n = 6）

* p <0.05、*** p <0.001：対照に対する Williams 検定による有意差

p <0.001：対照に対する Student *t* 検定による有意差

2.6.2.2.1.3 ヒト滑膜細胞における高分子量ヒアルロン酸産生に対する作用

〔4.2.1.1-3 参照〕

ヒト OA 患者由来滑膜細胞を 6 ウェルプレートに 3×10^5 細胞/ウェルで播種した。トリチウム標識グルコサミン及び SI-613（終濃度 1 mg/mL）、HA（終濃度 1 mg/mL）又は PBS（対照）を添加し、48 時間培養した。培養上清を回収した後、トリチウム標識グルコサミンを取り込んで新たに産生された培養上清中の HA をサイズ排除クロマトグラフィーにより分画し、各フラクションの放射線量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

SI-613 は、HA と同様に高分子量 HA 産生を促進した。SI-613 添加後に産生された HA の分子量は、HA 添加後に産生されたものよりもさらに高く、240 万 Da 以上であった（図 2.6.2.2-3）。以上より、SI-613 は内因性 HA 産生による病的関節液の正常化作用を有すると考えられた。

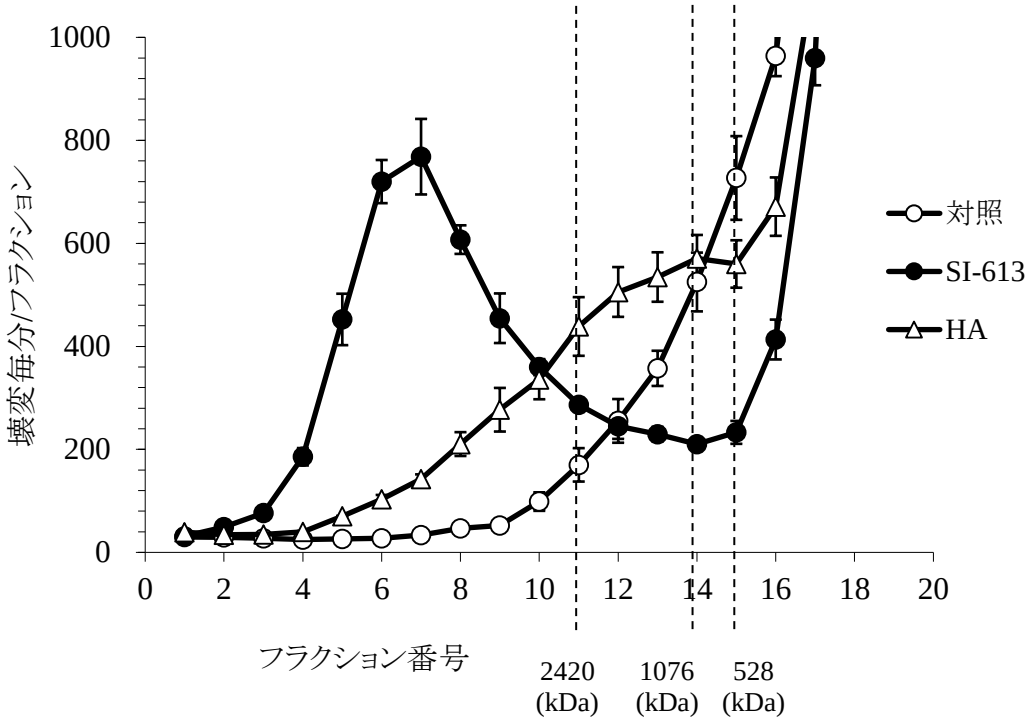


図 2.6.2.2-3. ヒト滑膜細胞の高分子量 HA 産生に対する作用
平均値 ± 標準誤差で表示（n = 3）

2.6.2.2.1.4 ヒト滑膜細胞におけるヒアルロン酸合成酵素及びヒアルロン酸分解酵素の mRNA 発現に対する作用

〔4.2.1.1-4 参照〕

ヒト OA 患者由来滑膜細胞を 6 ウェルプレートに 3×10^5 細胞/ウェルで播種した。SI-613（終濃度 1 mg/mL）、HA（終濃度 1 mg/mL）又は PBS（対照）を添加し、48 時間培養した。培養終了後、細胞ライセートを回収し、細胞内における HAS（*HAS1*、*2*、*3*）及び HYAL（*HYAL1*、*2*、*3*）の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。

SI-613 は、*HAS2* mRNA 発現を対照と比較して有意に促進し、*HYAL2* mRNA 発現を対照と比較して有意に抑制した（図 2.6.2.2-4 及び図 2.6.2.2-5）。以上より、SI-613 の高分子量 HA 産生の作用機序は、*HAS2* の mRNA 発現促進による高分子量 HA 産生促進及び *HYAL2* の mRNA 発現抑制による高分子量 HA 分解抑制によるものと考えられた。

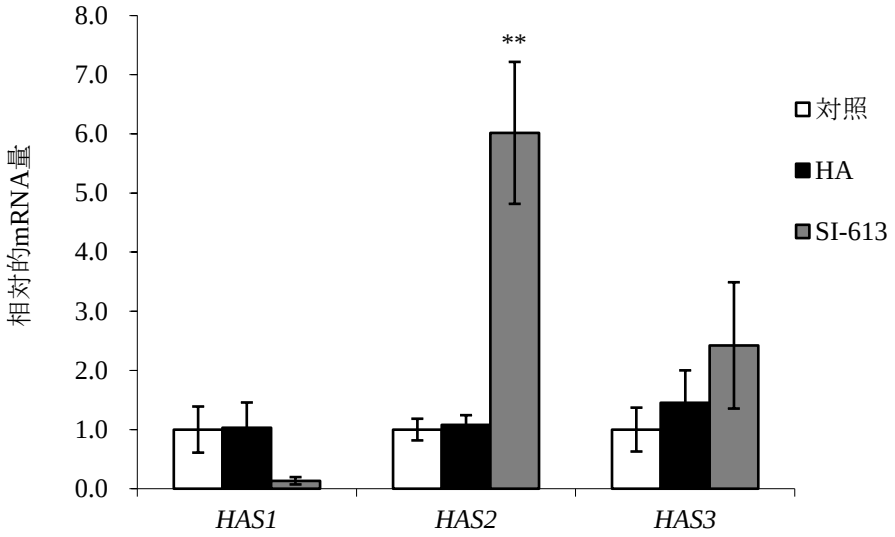


図 2.6.2.2-4. ヒト滑膜細胞における HAS mRNA 発現に対する作用
平均値 ± 標準誤差で表示（n = 3）
** p <0.01：対照に対する Dunnett 検定による有意差

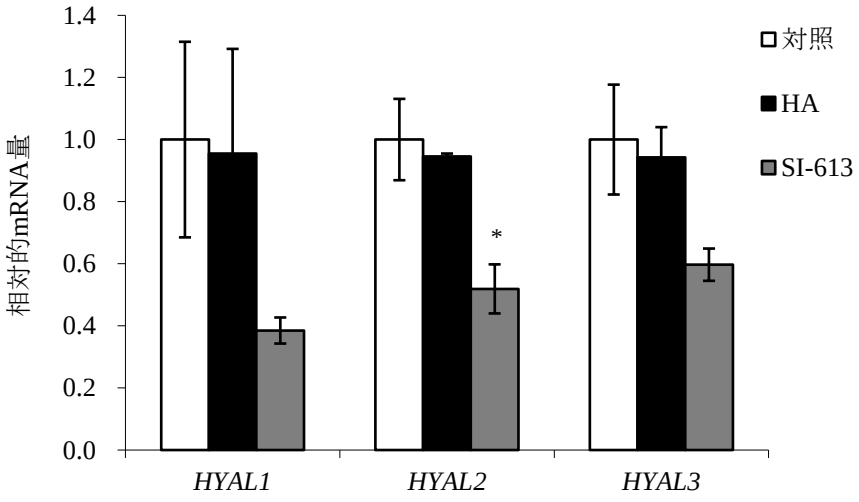


図 2.6.2.2-5. ヒト滑膜細胞における HYAL mRNA 発現に対する作用
平均値 ± 標準誤差で表示（n = 3）
* p <0.05：対照に対する Dunnett 検定による有意差

2.6.2.2.2 In vivo 機能的特性

2.6.2.2.2.1 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける疼痛抑制作用（用量反応）

〔4.2.1.1-5 参照〕

雄性 Sprague Dawley ラットの左後肢膝関節腔内に 1%硝酸銀溶液 50 µL を注入してモデルを作製した。注入後 1 日に同関節腔内に 0.05、0.15 又は 0.5 mg/関節の SI-613 を 50 µL/関節の容量で単回投与した。なお、対照には PBS を同様に投与した。疼痛反応は、歩行状態を 4 段階にスコア化するとともに左後肢への荷重負荷率を測定することによって、経時的に評価した。

SI-613 を 0.05、0.15 及び 0.5 mg/関節の用量で投与した結果、SI-613 は用量依存的に歩行時の疼痛スコアを改善した（図 2.6.2.2-6）。また、SI-613 を 0.15 及び 0.5 mg/関節の用量で投与した結果、SI-613 は対照と比較して有意に荷重負荷率を増加させた（図 2.6.2.2-7）。以上より、SI-613 は関節疼痛に対して用量依存的に疼痛抑制作用を示すと考えられた。

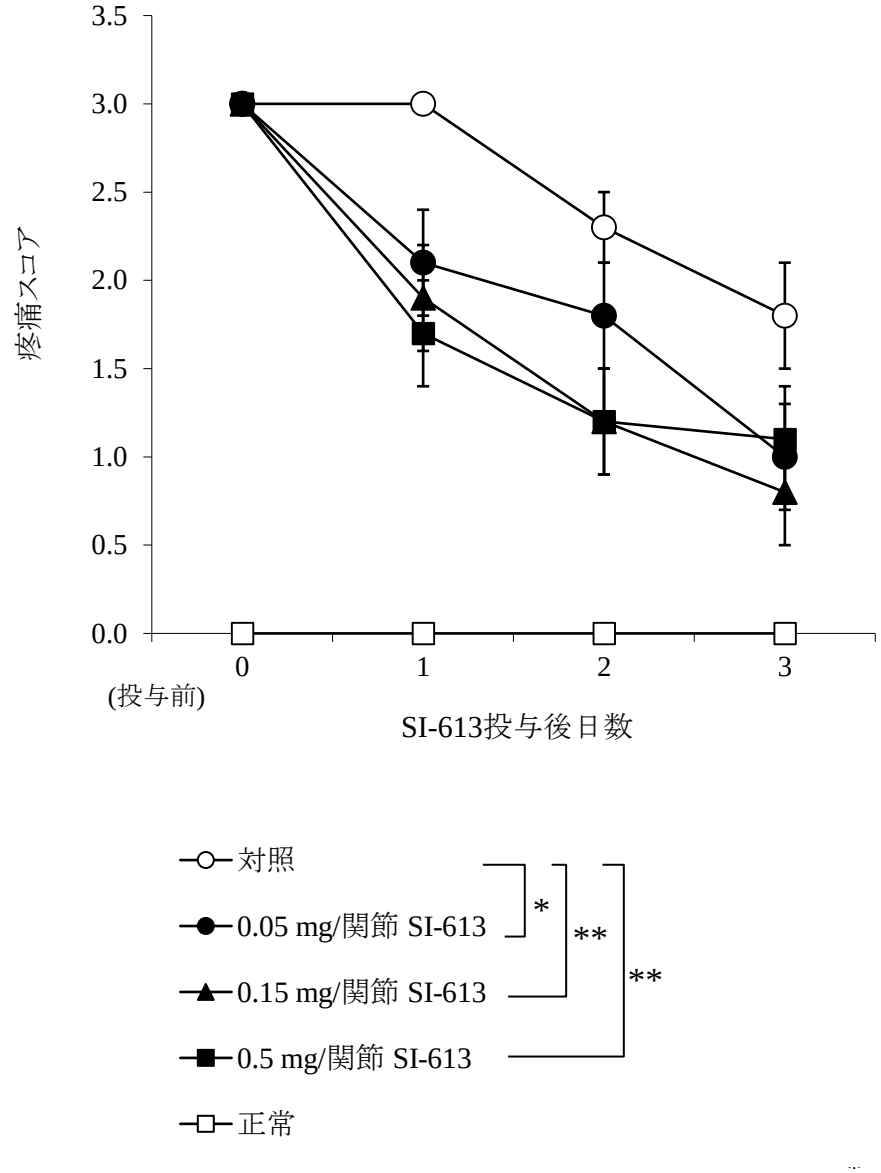


図 2.6.2.2-6. 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける疼痛スコアに対する作用

平均値 ± 標準誤差で表示（n = 9、正常は n = 3）

* p <0.05、** p <0.01：対照に対する Williams 検定による有意差

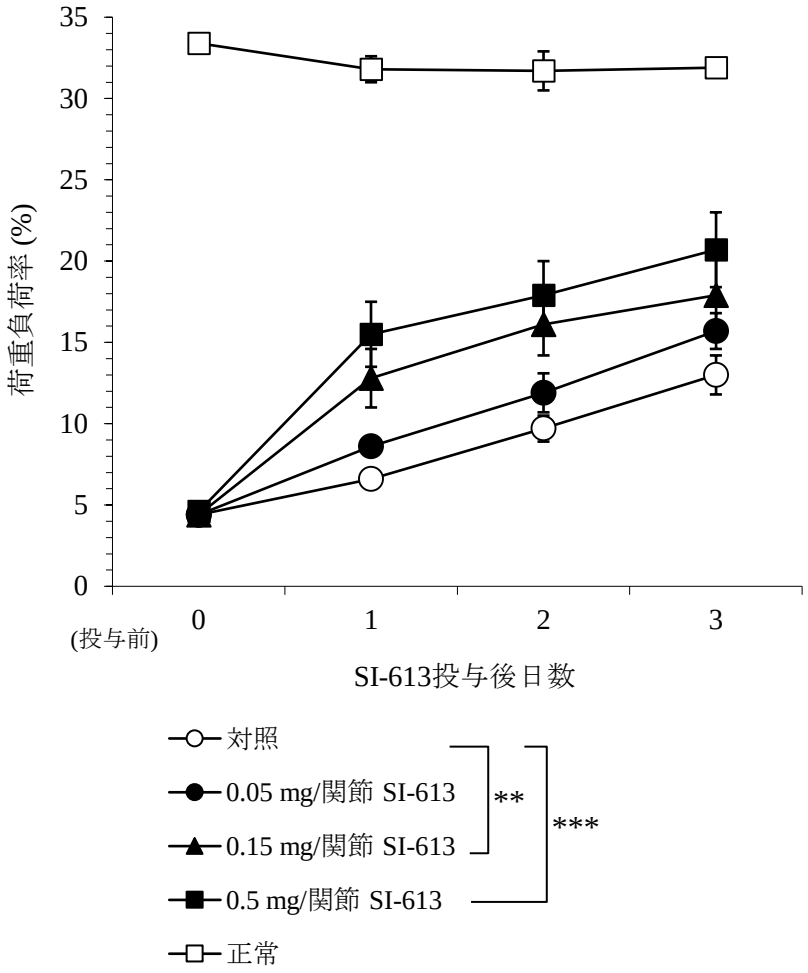


図 2.6.2.2-7. 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける荷重負荷率に対する作用
平均値 ± 標準誤差で表示（n = 9、正常は n = 3）
** p <0.01、*** p <0.001：対照に対する Williams 検定による有意差

2.6.2.2.2.2 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける疼痛抑制作用（他剤比較）

〔4.2.1.1-6 参照〕

2.6.2.2.2.1 と同様の方法で関節疼痛モデルを作製した。SI-613（0.5 mg/関節）、HA（0.5 mg/関節）、SI-613 の 0.5 mg/関節に相当する DF-Na（59 µg/関節）と HA（0.5 mg/関節）の混合液（DF-Na+HA）又は PBS（対照）を 50 µL/関節の容量で膝関節腔内に単回投与した。DF-Na に関しては、2 mg/kg の用量で 1 日に 1 回 3 日間経口投与した。

SI-613 の膝関節腔内投与は、PBS、HA、DF-Na と HA の混合液の膝関節腔内投与及び DF-Na の経口投与と比較して有意に疼痛スコアを改善させるとともに、荷重負荷率を増加させた。DF-Na と HA の混合液は、投与後 1 日では対照と比較して疼痛スコアを改善させたが、その作用は投与後 2 日には消失した（図 2.6.2.2-8 及び図 2.6.2.2-9）。以上より、単回膝関節腔内投与した SI-613 は、関節疼痛に対してこれら化合物と比較して強く持続的な疼痛抑制作用を有すると考えられた。

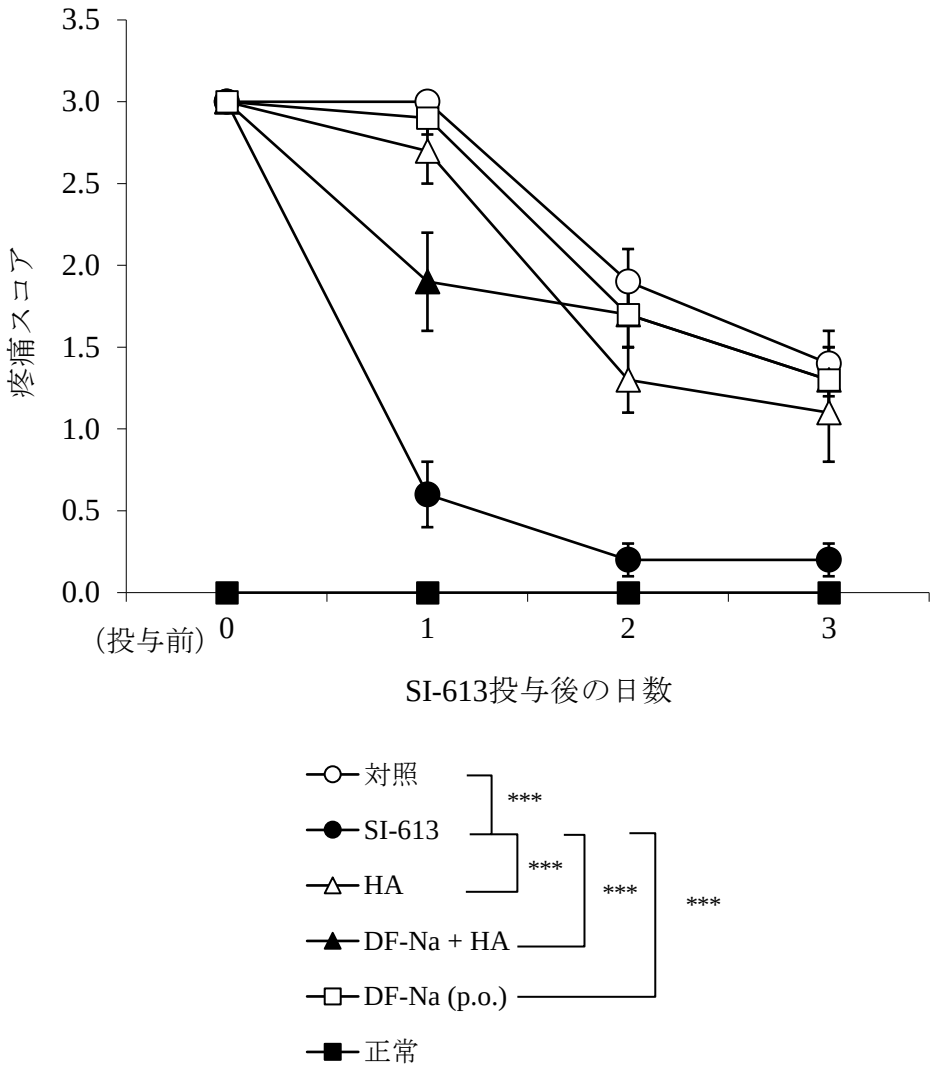


図 2.6.2.2-8. 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける疼痛スコアに対する作用
平均値 ± 標準誤差で表示（n = 9、正常は n = 3）
*** p <0.001：SI-613 に対する Tukey 検定による有意差

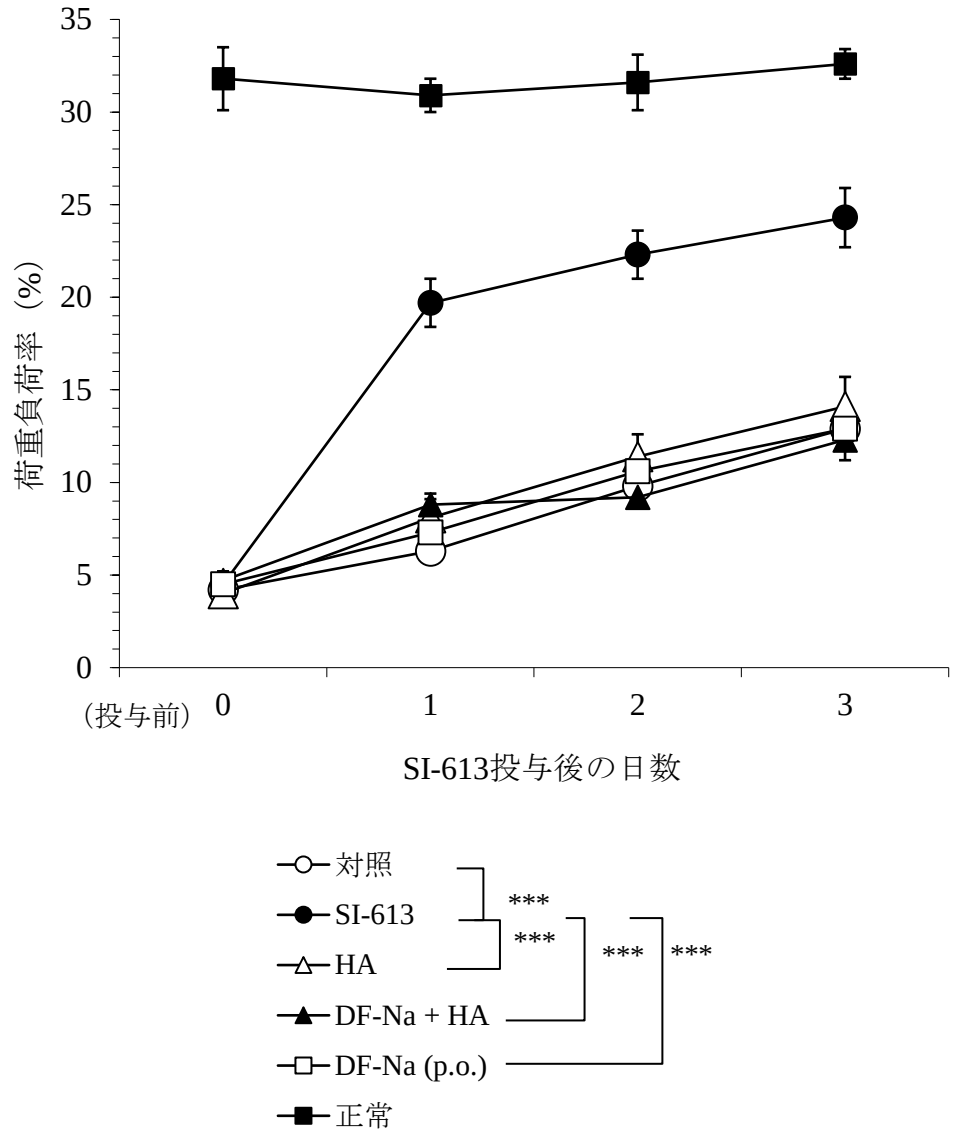


図 2.6.2.2-9. 硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける荷重負荷率に対する作用
平均値 ± 標準誤差で表示（n = 9、正常は n = 3）
*** p <0.001：SI-613 に対する Tukey 検定による有意差

2.6.2.2.2.3 コラーゲン誘発ラット関節炎モデルにおける抗炎症作用（用量反応）

〔4.2.1.1-7 参照〕

雌性 Dark Agouti ラットの尾根部にウシ II 型コラーゲンエマルジョンを 0.2 mg/個体の用量で注入感作し、膝関節腫脹を誘発した。感作後 14 日に、SI-613 を 0.05、0.15 又は 0.5 mg/50 µL/関節の用量で両後肢膝関節腔内に単回投与した。対照には PBS を同様に投与した。膝関節腫脹は、コラーゲン感作前、感作後 7、13、14、15、16、17、19、21、23、24、26 及び 28 日に評価した。

SI-613 は、0.05～0.5 mg/関節の用量で用量依存的に膝関節腫脹を抑制した（図 2.6.2.2-10）。以上より、SI-613 は関節炎に対して用量依存的な抗炎症作用を発揮すると考えられた。

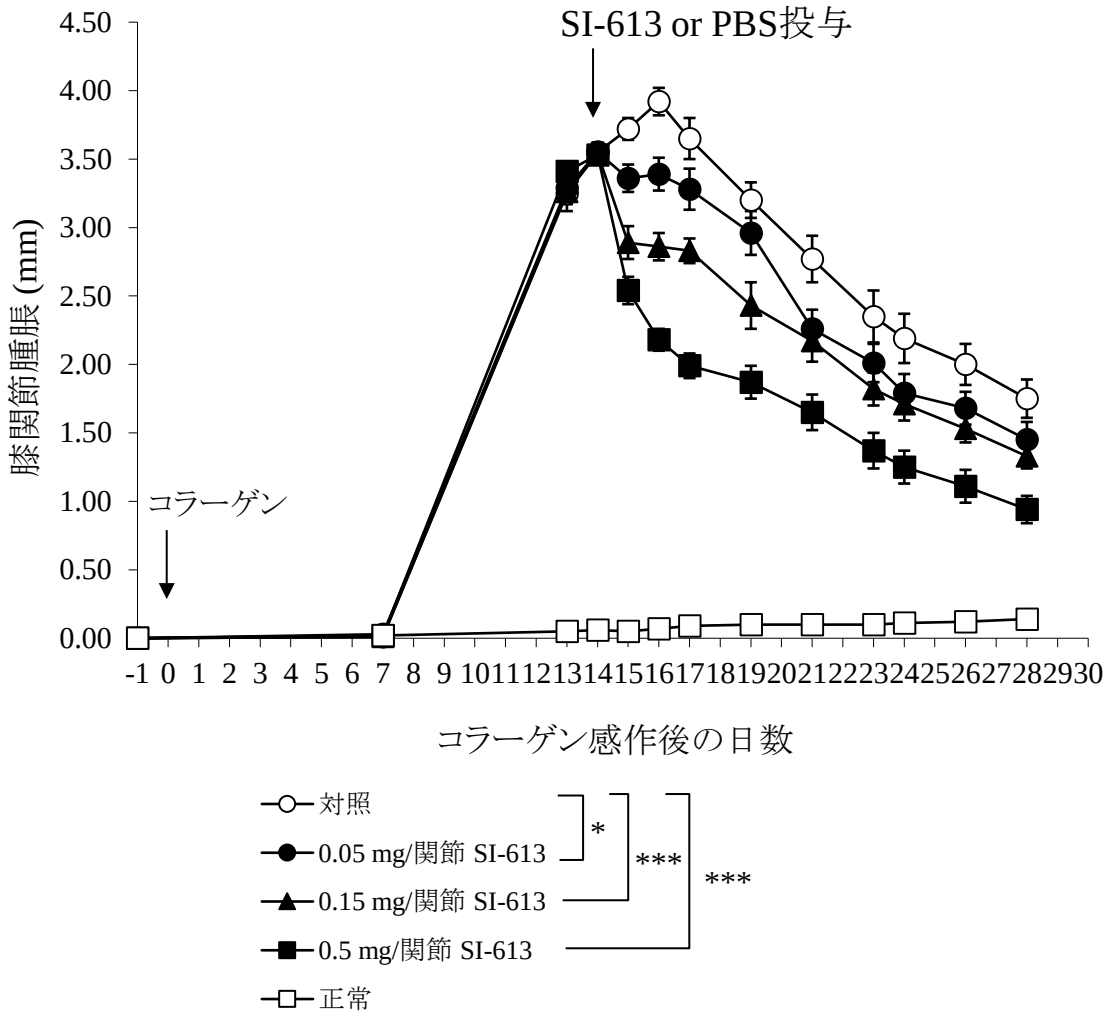


図 2.6.2.2-10. コラーゲン誘発ラット関節炎モデルにおける関節腫脹に対する作用
平均値 ± 標準誤差で表示（n = 9、正常は n = 5）
* p <0.05、*** p <0.001：対照に対する Williams 検定による有意差

2.6.2.2.2.4 コラーゲン誘発ラット関節炎モデルにおける抗炎症作用（他剤比較）

〔4.2.1.1-8 参照〕

2.6.2.2.2.3 と同様の方法で関節炎モデルを作製した。感作後 14 日に、SI-613（0.5 mg/関節）、HA（0.5 mg/関節）、SI-613 の 0.5 mg/関節に相当する DF-Na（59 µg/関節）と HA（0.5 mg/関節）の混合液又は PBS（対照）を 50 µL/関節の容量で両後肢膝関節腔内に単回投与した。DF-Na に関しては 2 mg/kg の用量で 1 日 1 回 14 日間経口投与した。膝関節腫脹は、2.6.2.2.2.3 と同様の方法で評価した。

SI-613 は、HA、DF-Na と HA の混合液、PBS 及び連日経口投与した DF-Na と比較して膝関節腫脹を有意に抑制した。経口投与した DF-Na は、対照と比較して有意に関節腫脹を抑制した（図 2.6.2.2-11）。以上より、単回膝関節腔内投与した SI-613 は、その構成成分と比較して強く持続的な抗炎症作用を発揮すると考えられた。

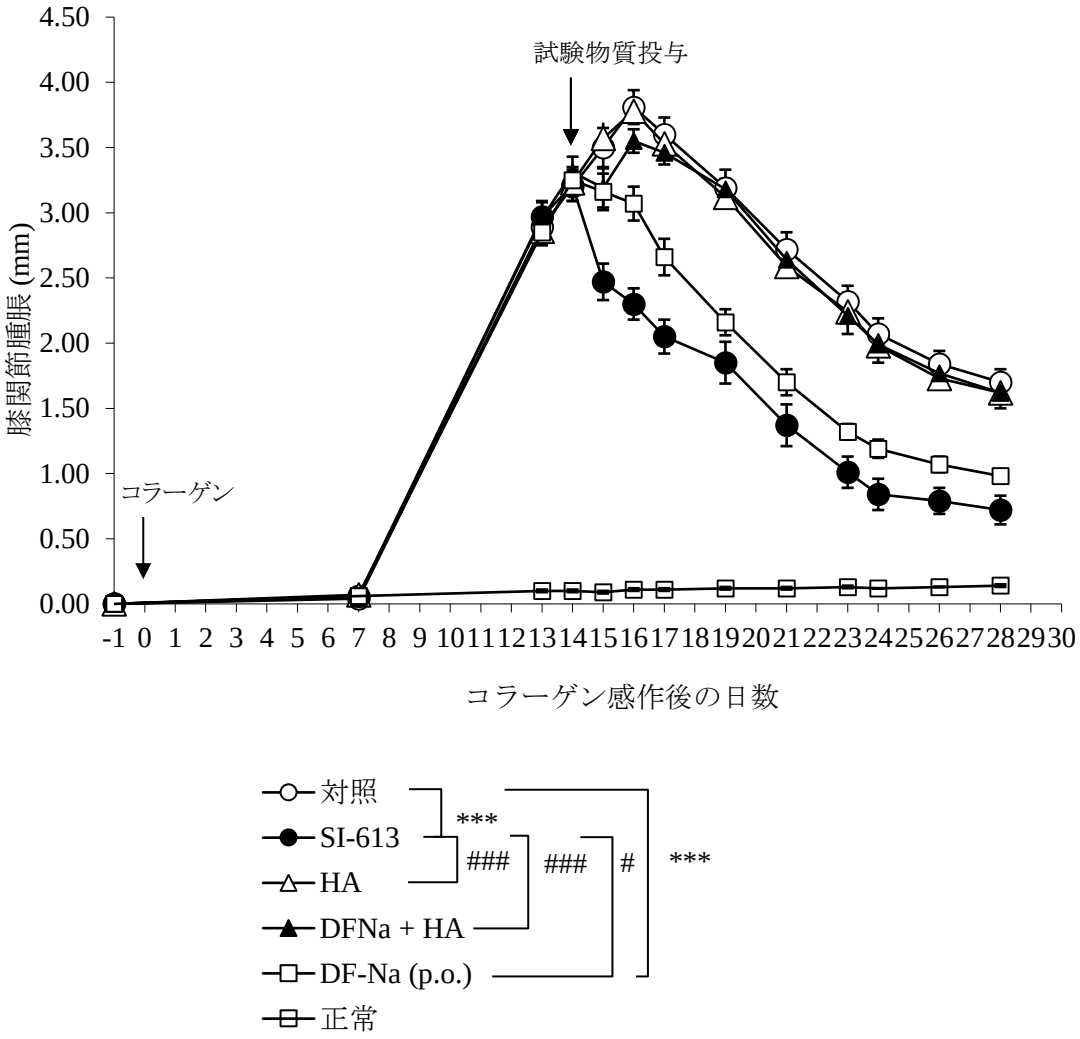


図 2.6.2.2-11. コラーゲン誘発ラット関節炎モデルにおける関節腫脹に対する作用

平均値 ± 標準誤差で表示（n = 9、正常は n = 5）

*** p <0.001：対照に対する Tukey 検定による有意差
# p <0.05、### p <0.001：SI-613 に対する Tukey 検定による有意差

2.6.2.2.2.5 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける抗炎症作用（持続性評価）

〔4.2.1.1-9 参照〕

雄性ニュージーランドホワイトウサギの背部皮内に卵白アルブミンエマルジョンを 5 mg/個体の用量で 2 回皮内感作した。初回感作後 25 日に 1%卵白アルブミン溶液を 500 µL/関節の容量で左後肢膝関節腔内に注入することで関節炎を誘発した。関節炎誘発後 2 日に、SI-613（5 mg/関節）又は PBS（対照）を 500 µL/関節の容量で同膝関節腔内に単回投与した。膝関節腫脹は、試験物質投与前、投与後 1、3、7、14、21、28、35 及び 42 日に評価した。

SI-613 は、投与後 1 日から対照と比較して有意に膝関節腫脹を抑制した。その作用は投与後 28 日まで持続した。投与後 35 日及び 42 日では有意な差は認められなかった（図 2.6.2.2-12）。以上より、単回膝関節腔内投与した SI-613 は、投与後 28 日間の持続的な抗炎症作用を発揮すると考えられた。

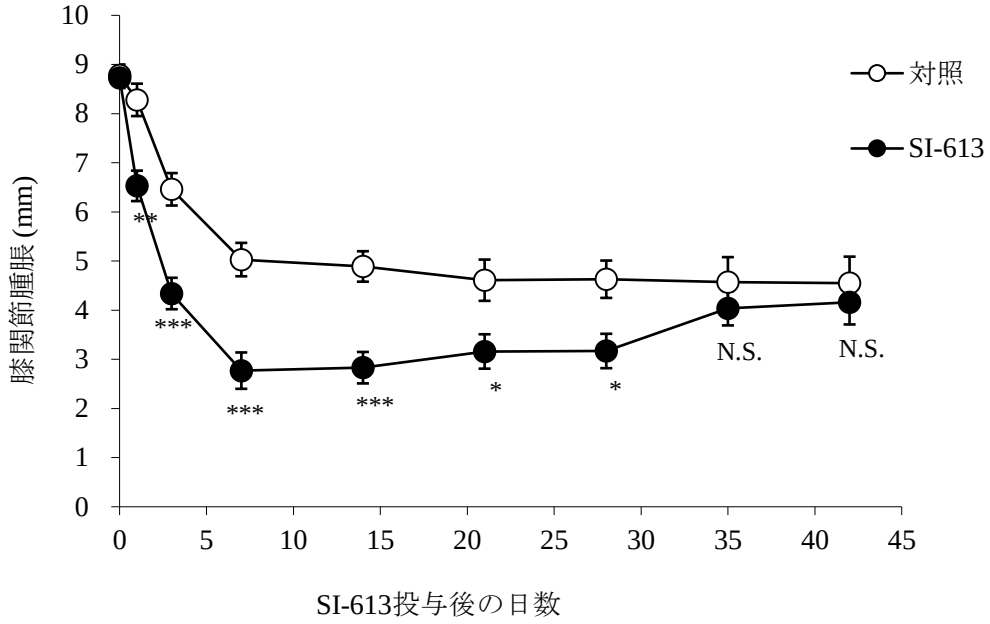


図 2.6.2.2-12. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける抗炎症作用
平均値 ± 標準誤差で表示（n = 20）
* p <0.05、** p <0.01、*** p <0.001：対照に対する Holm 補正 Student *t* 検定による有意差
N.S.：有意差なし

2.6.2.2.2.6 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける関節液中プロスタグランジン E_2 産生に対する作用

〔4.2.1.1-10 参照〕

2.6.2.2.2.5 と同様の方法で関節炎モデルを作製した。関節炎誘発後 2 日に、SI-613（5 mg/関節）、SI-613 の 5 mg/関節に相当する DF-Na（0.59 mg/関節）と HA（5 mg/関節）の混合液（DF-Na+HA）又は PBS（対照）を 500 µL/関節の容量で左後肢膝関節腔内に単回投与した。DF-Na に関しては 2 mg/kg の用量で単回経口投与した。試験物質投与後 3 時間及び 72 時間に関節液を採取し、抗炎症作用のバイオマーカーとして関節液中の PGE_2 濃度を ELISA キットを用いて測定した。

試験物質投与後 3 時間において、経口投与された DF-Na は、対照と比較して関節液中の PGE_2 濃度を有意に抑制した（図 2.6.2.2-13）。試験物質投与後 72 時間において、SI-613 は、DF-Na、DF-Na と HA の混合液及び対照と比較して有意に関節液中 PGE_2 の産生を抑制した。一方、DF-Na、DF-Na と HA の混合液及び対照の間に有意な差は認められなかった（図 2.6.2.2-14）。以上より、単回膝関節

腔内投与した SI-613 は、DF-Na 及び DF-Na と HA の混合液と比較して持続的な抗炎症作用を発揮すると考えられた。

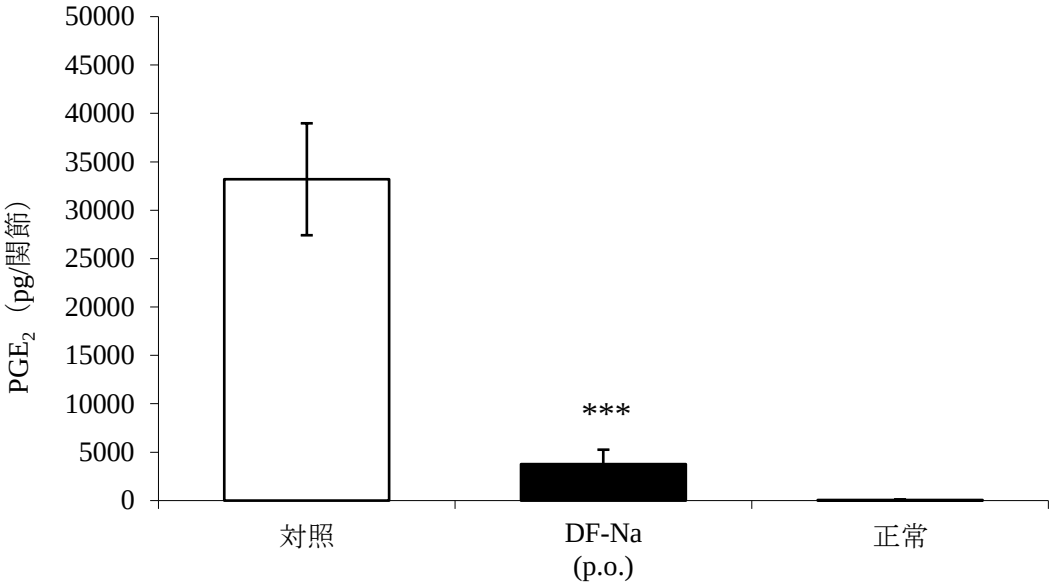


図 2.6.2.2-13. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける投与後 3 時間の関節液中 PGE_2 に対する作用

平均値 ± 標準誤差で表示（n = 10、正常は n = 5）
*** p <0.001：対照に対する Student *t* 検定による有意差

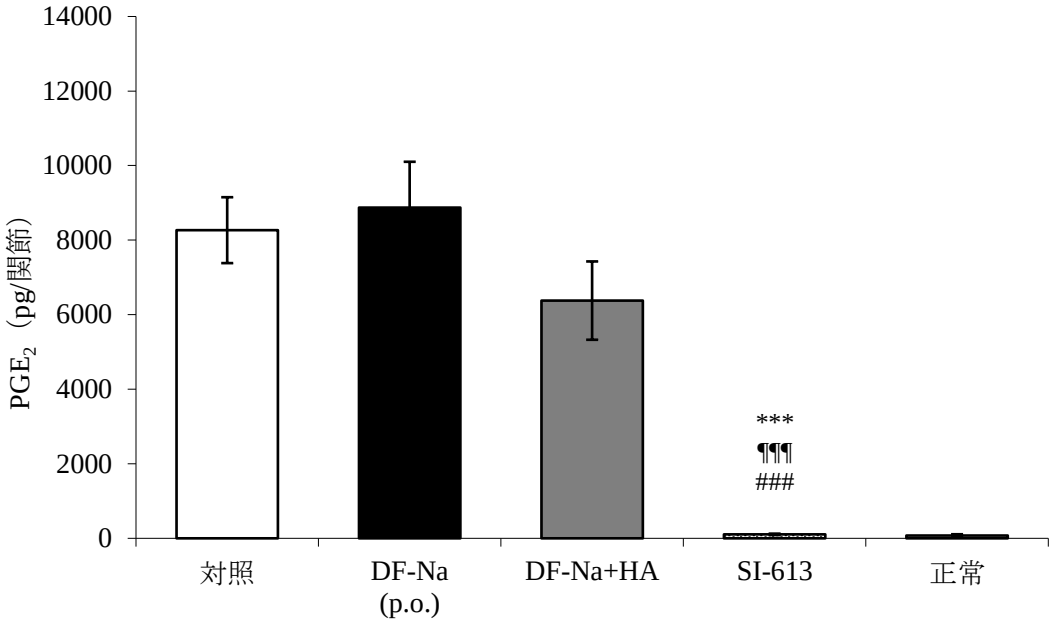


図 2.6.2.2-14. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける投与後 72 時間の関節液中 PGE_2 に対する作用

平均値 ± 標準誤差で表示（n = 10、正常は n = 5）
*** p <0.001：対照に対する Tukey 検定による有意差
¶¶¶ p <0.001：DF-Na に対する Tukey 検定による有意差
p <0.001：DF-Na+HA に対する Tukey 検定による有意差

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は、実施しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

「安全性薬理試験ガイドラインについて（医薬審発第 902 号、平成 13 年 6 月 21 日）」（ICH S7A ガイドライン）及び「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価について（薬食審査発 1023 第 4 号、平成 21 年 10 月 23 日）」（ICH S7B ガイドライン）に基づき、安全性薬理コアバッテリーとして、ラットを用いて中枢神経系に対する作用、hERG 電流に対する作用、イヌ及びカニクイザルを用いて心血管系に対する作用、並びにラットを用いて呼吸系に対する作用を評価した。in vivo 評価は独立した試験として実施せず、単回及び反復投与毒性試験の結果から評価した。いずれの試験も GLP を遵守して実施した。

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

2.6.2.4.1.1 ラットの中枢神経系に対する作用

ラットを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験〔2.6.6.3.4〕において、機能観察総合評価により中枢神経系に対する作用を評価した。評価時点は、投与 1 日及び 22 日の投与後 30 分及び 4 時間とした。SI-613 の用量は、0（媒体）及び 1 mg/kg とした。投与容量は 5 mL/kg とし、SI-613 は媒体である PBS に溶解させた。

SI-613 は、1 mg/kg にて中枢神経系に対する作用を示さなかった。

2.6.2.4.2 心血管系に対する作用

2.6.2.4.2.1 hERG 電流に対する作用

〔4.2.1.3-1 参照〕

hERG を導入したヒト胎児腎細胞 293（5 細胞/濃度）を用いて、ホールセルパッチクランプ法により、SI-613 の hERG 電流に対する作用を評価した。PBS に溶解させた SI-613 を灌流液に添加し、10、30 及び 100 µg/mL の濃度で試験を実施した。

SI-613 は、100 µg/mL までの濃度において hERG 電流に対する作用を示さなかった。

2.6.2.4.2.2 イヌの心血管系に対する作用

イヌを用いた単回静脈内投与毒性試験〔2.6.6.2.2〕、並びに 4 及び 13 週間反復膝関節腔内投与毒性試験〔2.6.6.3.2、2.6.6.3.3〕において、血圧及び心電図に対する作用を評価した。血圧の評価項目は、拡張期血圧、収縮期血圧及び平均血圧とし、心電図検査の評価項目は、心拍数並びに心電図パラメータ（PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔、RR 間隔及び QTcF（Fridericia の補正式から求めた QTc））とした。評価時点は、1 回目投与後 45 分及び 1 日、4 回目投与後 45 分、1 日及び 30 日並びに 13 回目投与後 11、23 及び 47 時間とした。SI-613 の用量は、静脈内投与試験では 0（媒体）及び 5 mg/kg、膝関節腔内投与試験では 0（媒体）、1、2 及び 6 mg/kg とした。投与容量は、静脈内投与試験では 2.5 mL/kg、膝関節腔内投与試験では 0.05、0.1 及び 0.3 mL/kg/joint とし、SI-613 は媒体である PBS に溶解させた。

SI-613 は、代替投与経路である静脈内投与試験では、5 mg/kg にて心拍数及び心電図パラメータに対して作用を示さなかったが、血圧の低下が投与後 45 分に認められた。血圧は、投与後 1 日に回復した。臨床適用経路である膝関節腔内投与試験では、最高用量である 6 mg/kg まで血圧、心拍数及び心電図に対する作用を示さなかった。

2.6.2.4.2.3 カニクイザルの心血管系に対する作用

カニクイザルを用いた 53 週間反復膝関節腔内投与毒性試験〔2.6.6.3.1〕において、血圧及び心電図に対する作用を評価した。血圧の評価項目は、拡張期血圧及び収縮期血圧とし、心電図検査の評価項目は、心拍数並びに心電図パラメータ（PR 間隔、QRS 間隔、QT 間隔及び QTcB（Bazett の補正式から算出した QTc））とした。評価時点は、6 及び 14 回目投与直後、投与後 2 日及び 14 日とした。SI-613 の用量は、0（生理食塩液又はプラセボ製剤）及び 4 mg/kg とした。投与容量は 0.2 mL/kg/joint とし、SI-613 製剤を投与した。

SI-613 は、4 mg/kg にて血圧、心拍数及び心電図に対する作用を示さなかった。

2.6.2.4.3 呼吸系に対する作用

2.6.2.4.3.1 ラットの呼吸系に対する作用

ラットを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験〔2.6.6.3.4〕において、呼吸系に対する作用を評価した。呼吸系検査の評価項目は、呼吸パラメータ（呼吸数、一回換気量及び分時換気量）とし、投与 1 日及び 22 日の投与後 30 分及び 4 時間に測定した。SI-613 の用量は、0（媒体）及び 1 mg/kg とした。投与容量は 5 mL/kg とし、SI-613 は媒体である PBS に溶解させた。

SI-613 は、1 mg/kg にて呼吸系に対する作用を示さなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は、実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

SI-613 のヒト COX-2 に対する阻害活性を in vitro で評価した結果、SI-613 そのものは COX-2 阻害作用を有しなかった。DF のカルボキシル基は、COX-2 の活性部位にある 385 番目のチロシン及び 530 番目のセリンに親和性を示し、COX-2 を阻害する [2] 。したがって、HA に化学的に結合された DF は、カルボキシル基を有しないこと及び立体構造的に嵩高であることから COX-2 に対する親和性が低下していると考えられた。

SI-613 の疼痛抑制作用を検証するため、硝酸銀誘発ラット関節疼痛モデルにおける疼痛反応に対する SI-613 の作用を評価した。当該モデルは、関節液中 PGE_2 濃度が上昇していることが報告されており [3] 、各種非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）及び κ オピオイド受容体アゴニストの疼痛抑制作用評価に用いられている炎症性疼痛モデルである [4] [5] [6] 。SI-613 の膝関節腔内投与は用量依存的に疼痛抑制作用を示し、一方、SI-613 の構成成分である HA と DF-Na の混合溶液は疼痛抑制作用を示さなかった。次に、SI-613 の抗炎症作用を検証するため、コラーゲン誘発ラット関節炎モデルにおける関節腫脹に対する SI-613 の抑制作用を評価した。当該モデルは、軟骨の主要タンパクである II 型コラーゲンを免疫することにより自己免疫応答として発症する炎症性関節炎モデルであり、症状及び病理組織学的所見から関節リウマチに類似するとされている [7] 。また、NSAIDs、副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤などの薬効評価に汎用されている [8] [9] 。当該モデルに対する SI-613 の膝関節腔内投与は用量依存的に関節腫脹を軽減し、HA と DF-Na の混合溶液あるいは HA 溶液の膝関節腔内投与あるいは DF-Na の連日経口投与を上回る抗炎症作用を示した。SI-613 自体が COX-2 阻害活性を有しないことを鑑みると、これらの結果は、SI-613 が関節内で DF を持続的に遊離し、その DF が消炎鎮痛作用を発揮したことを示唆している。

SI-613 の消炎鎮痛作用の持続性は、炎症作用が比較的長期間持続する抗原誘発ウサギ関節炎モデルを用いて検証した。SI-613 は単回膝関節腔内投与後 1 日から 28 日まで抗炎症作用を示し、ヒト OA 患者において早期から 4 週間の持続的な消炎鎮痛作用を発揮することが期待された。同病態モデルにおいて関節液中の PGE_2 濃度を低下させたことから、SI-613 の抗炎症作用は PGE_2 の産生抑制によるものと推察された。SI-613 の持続的な消炎鎮痛作用に対する DF の関与は、同病態モデルにおける滑膜組織中 DF 濃度測定〔2.6.4.8.2〕により考察した。SI-613 単回膝関節腔内投与後の滑膜組織中の DF 濃度は、投与後 1 日に最大値である 311.6 ng/g に達したのち、緩やかに減少し、投与後 28 日では 10 ng/g、投与後 35 日には定量下限未満（< 5 ng/g）まで減少した。つまり、SI-613 による抗炎症作用の持続性と滑膜組織中 DF 濃度に関連性が認められた。これらのことから、SI-613 による持続的な抗炎症作用は、膝関節組織に滞留する SI-613 から遊離した DF が COX-2 活性を阻害し、その結果、PGE_2 産生を抑制することによって発揮されると考えられた。

IA-HA は、膝 OA に伴う痛みの治療オプションとして認識されており [10] [11] [12] 、物理的な潤滑作用のほか、薬理学的作用として、炎症性サイトカイン、MMPs、COX-2 などの産生抑制作用及び高分子量 HA の産生促進作用などを有することが報告されている [13] [14] [15] 。そこで、SI-613 が IA-HA と同様の関節機能改善作用を有していることを in vitro 試験で検証した。正常ヒト膝関節軟骨細胞を用い、軟骨の主要プロテオグリカンであるアグリカンやコラーゲンの分解を通して軟骨破壊に関与す

ると報告されている[16] MMPs 産生に対する SI-613 の作用を評価した。その結果、SI-613 は MMP-1, 3 及び 13 の産生を濃度依存的に抑制した。HA は、その受容体である CD44 を介し、p38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（p38MAP キナーゼ）のリン酸化を抑制することでこれらの酵素の産生を抑制することが報告されている[1] [17]。一方、DF はヒト滑膜細胞及び軟骨細胞を用いた試験において、MMP-1, -3 及び-13 産生に影響しないこと、あるいは産生を誘導することが報告されている[18] [19]。これらのことから、SI-613 の MMPs 産生抑制作用は、HA と同様の作用機序を介していると推察された。さらに、ヒト OA 患者由来滑膜細胞を用いて、病態関節液の正常化に寄与すると推察される高分子量ヒアルロン酸産生に対する作用について評価した結果、SI-613 は高分子量 HA の産生を促進した。この作用は、HAS のアイソザイムの 1 種である *HAS2* mRNA 発現亢進及び HYAL のアイソザイムの 1 種である *HYAL2* mRNA 発現抑制を介していることが示唆された。これらの結果から、SI-613 は、軟骨破壊の軽減作用や病的関節液の正常化作用を有し、IA-HA と同様に OA 患者に対して関節機能改善作用を発揮することが期待された。

SI-613 の安全性薬理コアバッテリーとして、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する作用を評価した。SI-613 は、hERG 電流に対する作用を示さなかった。心血管系に対する作用として、静脈内投与したときには血圧低下が認められたが、膝関節腔内投与したときには認められなかった。当該変化は、粘弾性の高い投与液を静脈内投与したことに起因する変化[20] [21]と考えられ、SI-613 は静脈内に直接投与されないことを踏まえると、臨床使用において生じる可能性は低いと考えられた。SI-613 は、中枢神経系及び呼吸系に対する作用を示さなかった。これらの結果より、SI-613 は臨床において、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上より、SI-613 は、DF を遊離することによる持続的な消炎鎮痛作用と、IA-HA と同様の関節機能改善作用を持つ、OA に対する新たな治療薬となり得ると考えられた。

2.6.2.7 図表

図及び表は、本文中に適宜記載した。

2.6.2.8 参考文献

（1） Julovi SM, Yasuda T, Shimizu M, Hiramitsu T, Nakamura T. Inhibition of interleukin-1beta-stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage. Arthritis Rheum. 2004;50:516-525.

（2） Rowlinson SW, Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, Kalgutkar AS, et al. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. J Biol Chem. 2003;278:45763-45769.

（3） Yoshioka K, Kisukeda T, Zuinen R, Yasuda Y, Miyamoto K. Pharmacological effects of N-[2-[[2-[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetyl]oxy]ethyl]hyaluronamide (diclofenac

Etalhyaluronate, SI-613), a novel sodium hyaluronate derivative chemically linked with diclofenac. BMC Musculoskeletal Disorders. 2018;19:157-168.

（4） Belle AL, Tislow R. A method of evaluating analgesics of the antiarthralgic type in the laboratory animal. J Pharm Exp Ther. 1950;98:19.

（5） Nakamura H, Yokoyama Y, Motoyoshi S, Ishii K, Imazu C, Seto Y, et al. The pharmacological profile of 2-(8-methyl-10,11-dihydro-11-oxodibenz[b,f]oxepin-2-yl)propionic acid (AD-1590), a new non-steroidal antiinflammatory agent with potent antipyretic activity. Arzneimittelforschung. 1983;33:1555-1569.

（6） Tsukahara-Ohsumi Y, Tsuji F, Niwa M, Nakamura M, Mizutani K, Inagaki N, et al. SA14867, a newly synthesized kappa-opioid receptor agonist with antinociceptive and antipruritic effects. Eur J Pharmacol. 2010;647:62-67.

（7） Trentham DE. Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1982;25:911-916.

（8） Kamada H, Goto M, Matsuura S, Takaoka Y, Nagai H. Immunopharmacological studies on collagen-induced arthritis in dark Agouti (DA) rats. Jpn J Pharmacol. 1997;74:313-322.

（9） Murakami N, Takase H, Saito T, Iwata K, Miura H, Naruse T. Effects of a novel non-steroidal anti-inflammatory drug (M-5011) on bone metabolism in rats with collagen-induced arthritis. Eur J Pharmacol. 1998;352:81-90.

（10） Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on osteoarthritis guidelines. Arthritis Rheum. 2000;43:1905-1915.

（11） Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. Osteoarthritis Cartilage. 2008;16:137-162.

（12） Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18:476-499.

（13） Ogston AG, Stanier JE. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. J Physiol. 1953;119:244-252.

（14） Altman RD, Dasa V, Takeuchi J. Review of the Mechanism of Action for Supartz FX in Knee Osteoarthritis. Cartilage. 2018;9:11-20.

（15） Asari A, Miyauchi S, Matsuzaka S, Ito T, Kominami E, Uchiyama Y. Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium. Arch Histol Cytol. 1998;61:125-135.

（16） Okada A, Okada Y. Progress of research in osteoarthritis. Metalloproteinases in osteoarthritis. Clin Calcium. 2009;19:1593-1601.

（17） Julovi SM, Ito H, Nishitani K, Jackson CJ, Nakamura T. Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-13 in human arthritic chondrocytes via CD44 and P38. J Orthop Res. 2011;29:258-264.

（18） Alvarez-Soria MA, Herrero-Beaumont G, Sánchez-Pernaute O, Bellido M, Largo R. Diacerein has a weak effect on the catabolic pathway of human osteoarthritis synovial fibroblast--comparison to its effects on osteoarthritic chondrocytes. Rheumatology (Oxford). 2008;47:627-633.

（19） Sanchez C, Mateus MM, Defresne MP, Crielaard JM, Reginster JY, Henrotin YE. Metabolism of human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Longterm effects of interleukin 1beta and nonsteroidal antiinflammatory drugs. J Rheumatol. 2002;29:772-782.

（20） 松田 宏三, 松永 寛幸, 高木 邦格, 増田 幹生, 村田 学治, 池田 裕子, ほか. ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) の一般薬理作用 (第 2 編) . 薬理と治療. 1991;19:273-281.

（21） 斉藤 洋, 松木 則夫, 西山 信好, 小野 千鶴子, 鈴木 義裕, 福嶋 千春, ほか. 高分子ヒアルロン酸ナトリウム (NRD101) の一般薬理作用 (第 1 報) . 薬理と治療. 1994;22:283-292.

ジョイクル関節注 30mg

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 6
2.6.3.3 副次的薬理試験 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 10
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 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）
COX	Cyclooxygenase	シクロオキシゲナーゼ
DA	Dark Agouti	－
DF	Diclofenac	ジクロフェナク
DF-Na	Diclofenac sodium	ジクロフェナクナトリウム
HA	Sodium hyaluronate	ヒアルロン酸ナトリウム
HAS	Hyaluronan synthase	ヒアルロン酸合成酵素
HEK293 細胞	Human embryonic kidney 293 cell	ヒト胎児腎細胞 293
hERG	Human *ether-a-go-go-related gene*	ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子
HYAL	Hyaluronidase	ヒアルロン酸分解酵素
MMP	Matrix metalloproteinase	マトリックスメタロプロテアーゼ
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NZW	New Zealand White	－
OA	Osteoarthritis	変形性関節症
PGE_2	Prostaglandin E_2	プロスタグランジン E_2
SD	Sprague Dawley	－
SI-613	Development code of Diclofenac Etalhyaluronate Sodium	一般的名称 ジクロフェナクエタルヒアルロン酸ナトリウムの開発コード

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

試験の種類	試験系	被験物質	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験						
ヒト COX-2 に対する作用		SI-613 DF-Na	in vitro	生化学工業株式会社	613-[redacted]	4.2.1.1-1
MMP-1, 3, 13 産生に対する作用	正常ヒト膝関節軟骨細胞	SI-613 HA	in vitro	生化学工業株式会社	613-[redacted]	4.2.1.1-2
高分子量 HA 産生に対する作用	ヒト OA 患者由来滑膜細胞	SI-613 HA	in vitro	生化学工業株式会社	613-KOA-[redacted]	4.2.1.1-3
HAS 及び HYAL の mRNA 発現に対する作用	ヒト OA 患者由来滑膜細胞	SI-613 HA	in vitro	生化学工業株式会社	613-KOA-[redacted]	4.2.1.1-4
硝酸銀誘発関節疼痛モデルにおける疼痛抑制作用（用量反応）	ラット/SD	SI-613	膝関節腔内	生化学工業株式会社	613-[redacted]	4.2.1.1-5
硝酸銀誘発関節疼痛モデルにおける疼痛抑制作用（他剤比較）	ラット/SD	SI-613	膝関節腔内	生化学工業株式会社	613-[redacted]	4.2.1.1-6
		HA	膝関節腔内			
		DF-Na 及び HA 混合液	膝関節腔内			
		DF-Na	経口			
II 型コラーゲン誘発関節炎モデルにおける抗炎症作用（用量反応）	ラット/DA	SI-613	膝関節腔内	生化学工業株式会社	613-[redacted]	4.2.1.1-7

2.6.3.1　薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系	被験物質	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
II型コラーゲン誘発関節炎モデルにおける抗炎症作用（他剤比較）	ラット/DA	SI-613	膝関節腔内	生化学工業株式会社	613-[redacted]	4.2.1.1-8
		HA	膝関節腔内			
		DF-Na 及び HA 混合液	膝関節腔内			
		DF-Na	経口			
抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける抗炎症作用（持続性評価）	ウサギ/NZW	SI-613	膝関節腔内	生化学工業株式会社	613-[redacted]	4.2.1.1-9
抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける抗炎症作用（他剤比較）	ウサギ/NZW	SI-613	膝関節腔内	生化学工業株式会社	613-[redacted]	4.2.1.1-10
		DF-Na 及び HA 混合液	膝関節腔内			
		DF-Na	経口			
安全性薬理試験						
中枢神経系に対する作用	ラット/SD[a]	SI-613	静脈内	[redacted]	[redacted]042	4.2.3.2-4
心血管系に対する作用	HEK293 細胞	SI-613	in vitro	[redacted]	[redacted]378	4.2.1.3-1
	イヌ/ビーグル犬[a]	SI-613	静脈内	[redacted]	[redacted]271	4.2.3.1-2
			膝関節腔内	[redacted]	[redacted]369 [redacted]274	4.2.3.2-2 4.2.3.2-3
	カニクイザル[a]	SI-613 製剤	膝関節腔内	[redacted]	[redacted]-071	4.2.3.2-1
呼吸系に対する作用	ラット/SD[a]	SI-613	静脈内	[redacted]	[redacted]042	4.2.3.2-4

a：独立した試験は実施せず、毒性試験に組み込んで実施

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

試験項目	動物種／系統	被験物質	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
ヒト COX-2 に対する作用		SI-613	in vitro	DF 濃度として、0.0043～10 μM	SI-613 はヒト COX-2 活性に対して阻害作用を有しなかった。	613-[redacted]	4.2.1.1-1
		DF-Na	in vitro	0.0047～10 μM			
MMP-1、-3 及び-13 産生に対する作用	正常ヒト膝関節軟骨細胞	SI-613	in vitro	0.5、1 及び 2 mg/mL	SI-613 は培養軟骨細胞において濃度依存的に MMP-1、-3 及び-13 の産生を抑制した。	613-[redacted]	4.2.1.1-2
		HA	in vitro	2 mg/mL			
高分子量 HA 産生に対する作用	ヒト OA 患者由来滑膜細胞	SI-613、HA	in vitro	1 mg/mL	SI-613 は培養滑膜細胞において高分子量 HA 産生を促進した。	613-KOA-[redacted]	4.2.1.1-3
HAS 及び HYAL の mRNA 発現に対する作用	ヒト OA 患者由来滑膜細胞	SI-613、HA	in vitro	1 mg/mL	SI-613 は培養滑膜細胞において *HAS2* の mRNA 発現を上昇させるとともに *HYAL2* の mRNA 発現を抑制した。	613-KOA-[redacted]	4.2.1.1-4
硝酸銀誘発関節疼痛モデルにおける鎮痛作用（用量反応）	ラット／SD（各群 9 例）	SI-613	膝関節腔内	0.1、0.3 及び 1% SI-613、50 μL/関節	SI-613 は 0.15～0.5 mg/関節の範囲で用量依存的に鎮痛作用を示した。	613-[redacted]	4.2.1.1-5

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

試験項目	動物種／系統	被験物質	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
硝酸銀誘発関節疼痛モデルにおける鎮痛作用（他剤比較）	ラット／SD（各群 9 例）	SI-613	膝関節腔内	1% SI-613、50 µL/関節	SI-613 は HA 及び DF-Na と HA の混合液の膝関節腔内投与又は DF-Na の経口投与と比較して、強く持続的な鎮痛作用を示した。	613-[redacted]	4.2.1.1-6
		HA	膝関節腔内	1% HA、50 µL/関節			
		DF-Na 及び HA 混合液	膝関節腔内	1.18 mg/mL[a] DF-Na 及び 1% HA 混合液 50 µL/関節			
		DF-Na	経口	2 mg/kg、1 日に 1 回 3 日間			
II型コラーゲン誘発関節炎モデルにおける抗炎症作用（用量反応）	ラット／DA（各群 9 例）	SI-613	膝関節腔内	0.1、0.3 及び 1% SI-613、50 µL/関節	SI-613 は 0.05～0.5 mg/関節の範囲で用量依存的に抗炎症作用を示した。	613-[redacted]	4.2.1.1-7

a：1% SI-613 に含有する DF-Na 濃度

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

試験項目	動物種／系統	被験物質	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
II型コラーゲン誘発関節炎モデルにおける抗炎症作用（他剤比較）	ラット／DA（各群9例）	SI-613	膝関節腔内	1% SI-613、50 μL/関節	SI-613はHA及びDF-NaとHAの混合液の膝関節腔内投与又はDF-Naの経口投与と比較して、強く持続的な抗炎症作用を示した。	613-[redacted]	4.2.1.1-8
		HA	膝関節腔内	1% HA、50 μL/関節			
		DF-Na及びHA混合液	膝関節腔内	1.18 mg/mL[a] DF-Na及び1% HA混合液 50 μL/関節			
		DF-Na	経口	2 mg/kg、1日に1回14日間			
抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける抗炎症作用（持続性評価）	ウサギ／NZW	SI-613	膝関節腔内	1% SI-613、500 μL/関節	SI-613の抗炎症作用は、投与後28日まで持続した。	613-[redacted]	4.2.1.1-9
抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける抗炎症作用（他剤比較）	ウサギ／NZW	SI-613	膝関節腔内	1% SI-613、500 μL/関節	SI-613はDF-NaとHAの混合液の膝関節腔内投与及びDF-Naの経口投与と比較して、持続的にPGE_2の産生を抑制した。	613-[redacted]	4.2.1.1-10
		DF-Na及びHA混合液	膝関節腔内	1.18 mg/mL[a] DF-Na及び1% HA混合液 500 μL/関節			
		DF-Na	経口	2 mg/kg			

a：1% SI-613に含有するDF-Na濃度

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.3.4　安全性薬理試験

被験物質：SI-613

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	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
中枢神経系	ラット/SD	静脈内	0、1 mg/kg（4週間連日投与）	雌雄各6	4週間反復投与毒性試験にて、投与1日及び22日の投与後30分及び4時間に機能観察総合評価を実施	無影響	適用	[redacted]042	4.2.3.2-4
心血管系	HEK293細胞	in vitro	10、30、100 μg/mL	各濃度5細胞	ホールセルパッチクランプ法にてhERG電流に対する作用を評価	無影響	適用	[redacted]378	4.2.1.3-1
	イヌ/ビーグル犬	静脈内	0、5 mg/kg（単回投与）	雌雄各2	単回投与毒性試験にて、血圧（拡張期血圧、収縮期血圧及び平均血圧）及び心電図（心拍数並びに心電図パラメータとしてPR間隔、QRS時間、QT間隔、RR間隔及びFridericiaの補正式から求めたQTcを算出）を投与後45分及び投与後1日に測定	投与後45分に血圧低下が認められたが、投与後1日に回復 心拍数及び心電図パラメータには無影響	適用	[redacted]271	4.2.3.1-2
	イヌ/ビーグル犬	膝関節腔内	0、1、2、6 mg/kg（週1回、計4回投与）	雌雄各2～5	4週間反復投与毒性試験にて、血圧（拡張期血圧、収縮期血圧及び平均血圧）及び心電図（心拍数並びに心電図パラメータとしてPR間隔、QRS時間、QT間隔、RR間隔及びFridericiaの補正式から求めたQTcを算出）を1及び4回目投与後45分及び24時間、並びに4回目投与後30日に測定	無影響	適用	[redacted]369	4.2.3.2-2

2.6.3.4　安全性薬理試験（続き）　被験物質：SI-613 又は SI-613 製剤

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	方法	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
心血管系	イヌ/ビーグル犬	膝関節腔内	0 mg/kg（4 週 1 回、計 4 回投与） 6 mg/kg（週 1 回、計 13 回投与）	雌雄各 5	13 週間反復投与毒性試験にて、心電図（心拍数並びに心電図パラメータとして PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔、RR 間隔及び Fridericia の補正式から求めた QTc を算出）を 13 回目投与後 11、23 及び 47 時間に測定	無影響	適用	[redacted]274	4.2.3.2-3
	カニクイザル	膝関節腔内	0、4 mg/kg（4 週 1 回、計 14 回投与）	雌雄各 2～9	53 週間反復投与毒性試験にて、血圧及び心電図（心拍数並びに心電図パラメータとして PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び Bazett の補正式から算出した QTc を算出）を 6 及び 14 回目投与直後、投与後 2 日及び 14 日に測定	無影響	適用	[redacted]0 71	4.2.3.2-1
呼吸系	ラット/SD	静脈内	0、1 mg/kg（4 週間連日投与）	雌雄各 6	4 週間反復投与毒性試験にて、呼吸数、一回換気量及び分時換気量を投与 1 日及び 22 日の投与後 30 分及び 4 時間に測定	無影響	適用	[redacted]042	4.2.3.2-4

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施しなかった。