

# 後発品レバミピド錠の溶出試験 および人工膜透過試験

**Evaluation of generic and brand-name rebamipide tablets by dissolution test  
and parallel artificial membrane permeability assay.**

每 熊 隆 誉 ・ 池 田 光 真  
平 田 実 里 ・ 深 井 裕 子  
宮 本 裕 貴 ・ 宮 口 良  
浦 上 悠 ・ 末 宗 悠 生  
宮 本 佳 奈 ・ 藤 原 孝 子  
増 田 憲 俊 ・ 手 嶋 大 輔

# 後発品レバミピド錠の溶出試験および人工膜透過試験

Evaluation of generic and brand-name rebamipide tablets by dissolution test and parallel artificial membrane permeability assay.

每 熊 隆 誉<sup>1</sup>  
池 田 光 真<sup>2</sup>  
平 田 実 里<sup>1</sup>  
深 井 裕 子<sup>1</sup>  
宮 本 裕 貴<sup>1</sup>  
宮 口 良<sup>1</sup>  
浦 上 悠<sup>2</sup>  
末 宗 悠 生<sup>2</sup>  
宮 本 佳 奈<sup>2</sup>  
藤 原 孝 子<sup>2</sup>  
増 田 憲 俊<sup>2</sup>  
手 嶋 大 輔<sup>1</sup>

MAIGUMA takayoshi<sup>1</sup>, IKEDA mitsumasa<sup>2</sup>,  
HIRATA misato<sup>1</sup>, FUKAI yuko<sup>1</sup>,  
MIYAMOTO yuki<sup>1</sup>, MIYAGUCHI ryo<sup>1</sup>,  
URAKAMI yu<sup>2</sup>, SUEMUNE yuki<sup>2</sup>,  
MIYAMOTO kana<sup>2</sup>, FUJIWARA takako<sup>2</sup>,  
MASUDA noritoshi<sup>2</sup>, TESHIMA daisuke<sup>1</sup>

1 就実大学薬学部薬学科 2 金光薬品株式会社

## 1. 緒言

1990年、本邦初の経口レバミピド製剤として発売されたムコスタ<sup>®</sup>錠は胃潰瘍治療薬としてだけでなく、胃粘膜の内因性プロスタグランジン（PGE<sub>2</sub>およびPGL<sub>2</sub>）増加作用および胃粘膜障害の発症因子の1つであるフリーラジカル抑制作用を有することから胃炎に対しても適応をもつ。また、市中病院における院内製剤として、抗癌剤誘発性の口内炎に対する外用製剤としての報告もなされており、2012年にはドライアイに適応を有する点眼製剤も発売された。このようにレバミピド製剤は有効性と安全性の確立された古くて新しい医薬品と言え、現在、レバミピド錠の後発品として35品目が上市されている。

2012年4月より処方せん様式の変更や調剤加算の見直しが行われ、後発医薬品の使用割合は着実に増加してきている。しかしながら、後発医薬品は先発医薬品と同一の有効成分を含有し、且つ、日本人に多く見られるような低胃酸状態における溶出挙動も確認されているにも関わらず、世間一般において未だに後発医薬品の有効性や安全性に対する不安を払拭できていないのも事実である。その背景には、後発医薬品を処方する立場の医師や患者に対して十分な情報が納得できるかたちで提供できていない事が一因として挙げられる。特に、後発医薬品では先発医薬品と添加物が異なる点が指摘されており、その添加物による製剤放出性の違いや有効成分の安定性に及ぼす影響、および添加物によるアレルギーに対する不信感が存在している。そこで今回、後発医薬品の製剤放出性に着目し、各錠剤中に含まれる添加剤を分離したうえで純粋な成分としてのレバミピドを検出するために高速液体クロマトグラフィ（HPLC）を用い、各製剤の溶出挙動について検討を行なった。

経口投与された医薬品は消化管内で崩壊・分散し、その後、溶解および膜透過の過程を経て吸収される。薬物の吸収過程は固形製剤からの薬物の溶出と、それに続く、薬物の消化管脂質膜透過過程の二つが重要である。分子量1000以下のレバミピド（Mw: 370.79）は受動拡散による細胞膜透過を経て薬効を発現すると考えられるため、今回、後発医薬品の生物学的同等性を論じる上で Parallel artificial membrane permeability assays（以下、PAMPA）を用いて膜透過性についても検討を行った。

## 2. 方法

### 2-1. 試薬および材料

使用した医薬品および試薬は全て特級品を用いた。各医薬品および試薬は以下の会社より購入した。先発医薬品：ムコスタ<sup>®</sup>錠100mg（大塚製薬株式会社、東京、Lot; 6L82MT1）、後発医薬品：レバミピド錠100mg（A, B, C）、レバミピド原末（LKT Laboratories Inc, USA, Lot 2597206）、the pre-coated PAMPA plate system（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、東京、Lot; 82449）、10XPBS（without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, Ambrex Bio Science Walkersville Inc, MD, USA, Lot; 01114224）。アセトニトリル（Lot; 302U1746）、酢酸（Lot; 210N113）、メタノール（Lot; 304N1003）は関東化学株式会社（東京）より購入した。また以下の試薬は Nacal tesque（京都）より購入した。テトラヒドロフラン（Lot; V1F5746）、無水クエン酸（Lot; MOT4224）、リン酸水素二ナトリウム・12水（Lot; M1R493）。

### 2-2. 溶出試験

試験液には、第十六改正日本薬局方の溶出試験第1液（塩化ナトリウム2.0gを塩酸7.0mL及び水に溶かして1000mLとした。以下 pH1.2の試験液）、および溶出試験第2液〔0.025Mのクエン酸と0.05Mのリン酸水素二ナトリウム・12水を185：500を目安に混合し、pHメーター（HORIBA ; D-51）により pH6.8を確認後、1容量に対して水1容量を加えた〕を用い

た。また、pH6.0のMcIlvain緩衝液の調製は、0.025Mのクエン酸と0.05Mのリン酸水素二ナトリウム・12水を用い、それらの混合比を変えることでpHを調節した（目安とした混合比、343：500）。溶出試験器およびそれに関連する器具は、富山産業株式会社（大阪）より購入した。溶出試験器：NRT-6100A DISSOLUTION TESTER、オートサンプラー：PAS-615 AUTO AMPLER-W、フィルター：Fine Filter F-72を用いた。溶出試験の試験条件として後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン<sup>1)</sup>に示された酸性薬物に対する試験条件をレバミピド錠（rebamipide, pka = 3.3, 25℃）に適応した（Table 1）。

Table 1 酸性薬物を含む製剤におけるパドル法の条件

回転数 (rpm)	pH
50	①1.2
	②5.5～6.5 <sup>†</sup>
	③6.8～7.5 <sup>†</sup>
	④水
100	①、②、③のうちいずれか一つ <sup>†</sup>

<sup>†</sup> 標準製剤が規定された試験時間内にその含量の平均85%以上が溶出する条件で、溶出の遅い試験液を選択する。いずれの試験液においても、標準製剤が規定された試験時間内にその含量の平均85%未満の場合には、最も速い溶出液を選択する<sup>1)</sup>。

### 2-3. HPLC 法における溶出濃度測定

移動相は、水：アセトニトリル：テトラヒドロフラン：酢酸が128：64：6：2となるように調製し、超音波で10分間脱気した。HPLCの使用機器として、ポンプ：LC-10AD (SHIMADZU)、カラムオープン：CTO-10Avp (SHIMADZU)、検出器：SPD-M10Avp (SHIMADZU)、カラム：TSK-GEL ODS-80Tm (TOSOH)を使用した。流量：1.2mL/min、蛍光検出器：RF-10AXL (SHIMADZU)、温調装置：RF-10AXL Super (SHIMADZU)、検出波長：254nm、カラム温度：40℃、注入量：40μLの測定条件で行なった。

### 2-4. 溶出挙動の類似性の判定

各後発医薬品における溶出挙動の類似性については、後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン<sup>1)</sup>に従い判定した（Fig. 1）。また、pH6.0試験液については平均溶出率のみでは判定できなかったため、ガイドラインに示されたf<sub>2</sub>関数についても算出した。使用したf<sub>2</sub>関数の式および、f<sub>2</sub>関数を算出する際に必要な溶出率比較時点（先発品が、下記に規定された溶出率%となる時間）についての詳細を以下に示す。

$$f_2 = 50 \log \left[ \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{i=1}^n (T_i - R_i)^2}{n}}} \right]$$

Ti 及び Ri はそれぞれ各時点における試験製剤（後発品）及び標準製剤（先発品）の平均溶出率を示し、n は平均溶出率を比較する時点の数（下記の溶出率比較時点4点）である。

先発品の溶出率が、試験開始30分以降から60分（規定時間）以内において平均85%以上となる場合には（レバミピドの先発品において平均85%が溶出する時間は33.6分である）、先発品の平均溶出率が約85%となる適当な時点を Ta とするとき（Ta=33.6分）、Ta/4（8.4分）、2Ta/4（16.8分）、3Ta/4（25.2分）、Ta（33.6分）の以上4点を溶出率比較時点とする。

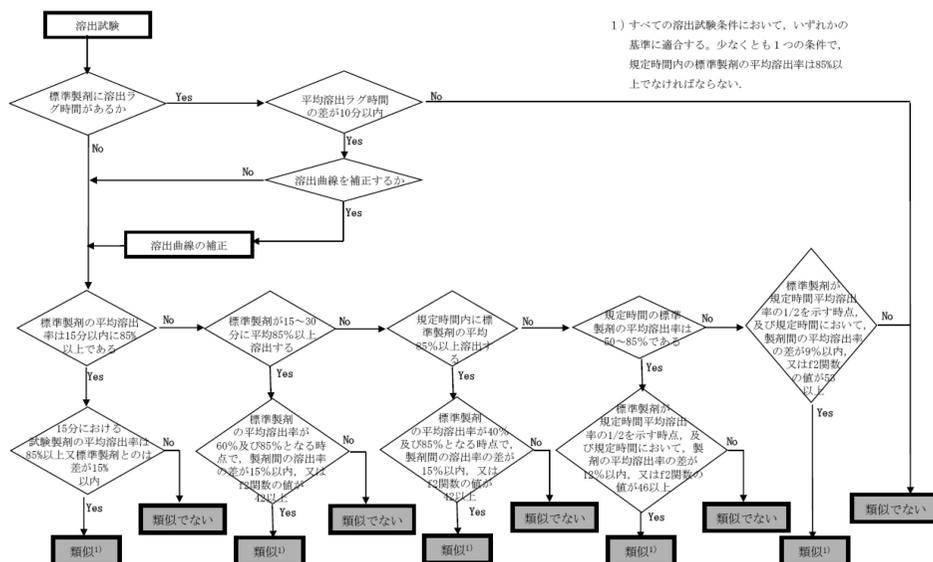


Fig. 1 生物学的同索性試験ガイドラインに示された溶出挙動の類似性の判定基準

## 2-5. 人工膜透過試験

Fig. 2に今回用いた the pre-coated PAMPA plate system の概要を示す。本製品は96wellのマイクロタイタープレート（donor plate）および底面に人工膜を装着したインサートプレート（acceptor plate）とのキット製品である。操作は製品の使用説明に従い実施した<sup>2)</sup>。ただし、静置時間に関しては、Mensch Jらの報告に従った<sup>3)</sup>。その方法を略説すると、少なくとも使用する30分前に the pre-coated PAMPA plate system を -20℃ 保管庫から取り出して室温に戻す。その後、donor plate に PBS 100μL/well および溶出試験液200μL/well（pH6.0）を入れ全量300μL/well とした。これをマイクロプレートミキサーで5分間攪拌して well 内の液を均一にした。acceptor plate にも PBS 200μL/well 加えた後、donor plate に気泡が入らないように気をつけながら acceptor plate をゆっくり donor plate に重ねた。18時間室温遮光保存下で静置した後、donor plate から acceptor plate を取り外し、HPLC を用いて両 plate の各 well のレバミピド濃度を測定し、膜透過率を以下の式にて算出した。

膜透過率（= Permeability ; Pe）（in unit of  $10^{-6}$  cm/s）：

$$P_e = \frac{-\ln[1 - C_A(t)/C_{equilibrium}]}{A \times (1/V_D + 1/V_A) \times t}$$

$C_D(t)$  = donor well の 18 時間後の濃度 (  $\mu\text{M}$  )

$C_A(t)$  = acceptor well の 18 時間後の濃度 (  $\mu\text{M}$  )

$V_D$  = donor well volume = 0.3 mL

$V_A$  = acceptor well volume = 0.2 mL

$$C_{equilibrium} = \frac{C_D(t) \times V_D + C_A(t) \times V_A}{V_D + V_A}$$

$A$  = filter area = 0.3  $\text{cm}^2$

$t$  = 静置時間 = 64800 s (= 18 hr)

評価基準<sup>2)</sup>

$Pe > 1.5 \times 10^{-6}$  cm/s ; 高い透過率を示す

$Pe < 1.5 \times 10^{-6}$  cm/s ; 低い透過率を示す

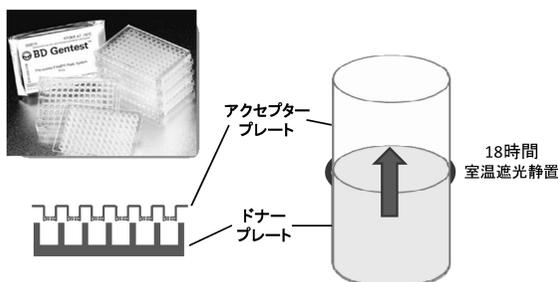


Fig. 2 the pre-coated PAMPA plate system の概略図

## 2-6. 統計処理

すべてのデータは平均値  $\pm$  標準偏差で示し、4 製剤間の比較には 1 元配置分散分析 (one way ANOVA) と多重比較法 (multiple comparison) である Dunnett 法を用いた。危険率が 5 % 未満の場合に統計学的に有意な差があると判定した。統計処理には、IBM SPSS Statistics (日本アイビーエム株式会社、東京) を用いた。

## 3. 結果

### 3-1. HPLC による先発品と後発品における溶出率の比較

Fig. 3に各製剤の溶出曲線を示す。全ての製剤に共通し、酸性条件である pH1.2の試験液では 1 % 前後、および水については 10% 前後と溶出率は低かった。その一方で、pH6.8の試験液においては開始15分以内に全ての製剤で 80% 以上溶出していた。

医薬品の品質再評価における公的溶出試験では、pH6.0条件下で試験するとき、60分以内に成分含量の 75% 以上が溶出しなければならないと規定されている。今回の結果、先発品は 92.6%、後発品 A で 82.2%、後発品 B で 82.1%、および後発品 C で 79.3% となり、全ての

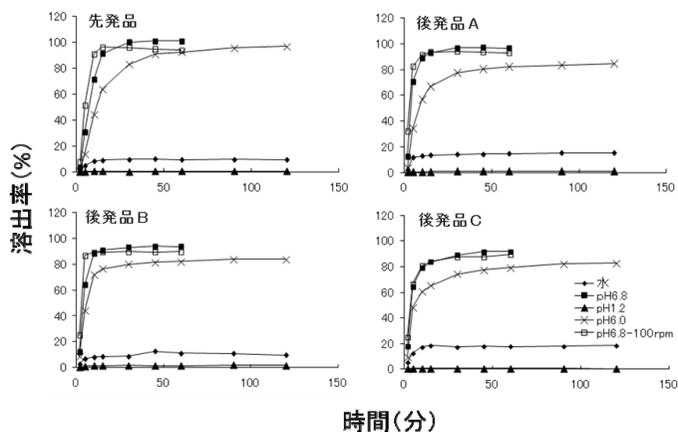


Fig. 3 先発医薬品と後発医薬品の溶出挙動

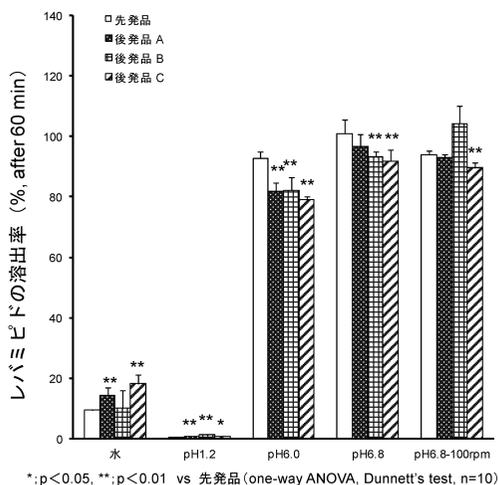


Fig. 4 試験60分後の溶出率の比較

溶出率が基準を満たす75%以上であった。しかしながら、試験 pH 条件ごとに4製剤を比較してみると、先発品といずれかの後発品において60分後の溶出率に違いが認められ、特に、pH6.0条件下では全ての後発品の溶出率が先発品に比べて有意に低い結果となり、また、pH1.2条件下では全ての後発品が先発品に比して高い溶出率を示した (Fig. 4)。

後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン<sup>1)</sup>に従い、ムコスタ<sup>®</sup>錠100mgを標準製剤として、各後発品製剤との溶出挙動の類似性について判定を行なった。水、pH1.2、およびpH6.8の試験液について、全ての後発品と先発品との類似した溶出挙動が確認された (Table 2a, b, d, e)。しかしながら、pH6.0の試験液では後発品Bのみにおいて類似性は認められなかった (Table 2c)。また、pH6.0の試験液における0-30分までの溶出濃度曲線下面積 (mg・min/mL) を算出して4製剤を比較した。その結果、後発品Bのみにおいて有意な上昇が認められた (Table 3)。

Table 2 生物学的同等性試験ガイドラインに基づいた溶出挙動の類似性の判定

a. 水 (50 rpm)				60分後の溶出率(%)			総合判定
4.9分後の溶出率(%)	標準製剤との差(%)	判定	標準製剤との差(%)	判定	判定		
先発品	4.8	—	9.5	—	—	—	
後発品A	11.5	6.7	14.6	5.1	類似	類似	
後発品B	6.6	1.8	11.3	1.8	類似	類似	
後発品C	12.4	7.6	17.6	8.1	類似	類似	

※標準製剤が規定時間平均溶出率の1/2を示す時点(4.9分)及び規定時間(60分)において、製剤間の平均溶出率の差が9%以内であれば類似。

b. pH 1.2試験液 (50 rpm)				60分後の溶出率(%)			総合判定
7.6分後の溶出率(%)	標準製剤との差(%)	判定	標準製剤との差(%)	判定	判定		
先発品	0.3	—	0.6	—	—	—	
後発品A	0.8	0.3	0.9	0.3	類似	類似	
後発品B	1.5	0.9	1.4	0.8	類似	類似	
後発品C	0.7	0.4	0.5	0.1	類似	類似	

※標準製剤が規定時間平均溶出率の1/2を示す時点(7.6分)及び規定時間(60分)において、製剤間の平均溶出率の差が9%以内であれば類似。

c. pH 6.0試験液 (50 rpm)				33.6分後の溶出率(%)			f2開散結果	総合判定
9.3分後の溶出率(%)	標準製剤との差(%)	判定	標準製剤との差(%)	判定	判定			
先発品	40	—	85	—	—	—	—	
後発品A	53.6	13.6	78.1	6.9	類似	—	類似	
後発品B	76	36	86.5	1.5	類似	34	類似でない	
後発品C	58.9	18	75	10	類似	45	類似	

※標準製剤の平均溶出率 40%(9.3分後)及び 85%(33.6分後)となる時点で、製剤間の溶出率の差が15%以内、又はf2開散の値が42以上であれば類似。

d. pH 6.8試験液 (50 rpm)				e. pH 6.8試験液 (100 rpm)		
15分後の溶出率(%)	標準製剤との差(%)	判定	15分後の溶出率(%)	標準製剤との差(%)	判定	
先発品	91.2	—	先発品	96.3	—	
後発品 A	96.7	5.5	後発品 A	93.3	3	
後発品 B	89	2.2	後発品 B	89.3	7	
後発品 C	83.8	7.4	後発品 C	84.2	12.1	

※15分における試験製剤の溶出率が85%以上、又は標準製剤との差が15%以内であれば類似。

Table 3 pH6.0試験液における溶出0-30分までの溶出濃度曲線下面積 (mg・min/mL)

先発品	後発品 A	P 値	後発品 B	P 値	後発品 C	P 値
1723.4±213.8	1869.5±108.4	0.342	2159.8±128.9	<0.001	1918.2±96.8	0.111

P 値 vs 先発品 (one-way ANOVA, Dunnett's test, n=10)

### 3-2. PAMPA による先発品と後発品による膜透過率の比較

PAMPA とは、メンブレンフィルターにリン脂質と有機溶媒を塗布し、生体膜に類似した人工脂質膜として製したものである。これは生体条件下での受動輸送による薬物透過性を予測するためのツールとして広く用いられている。

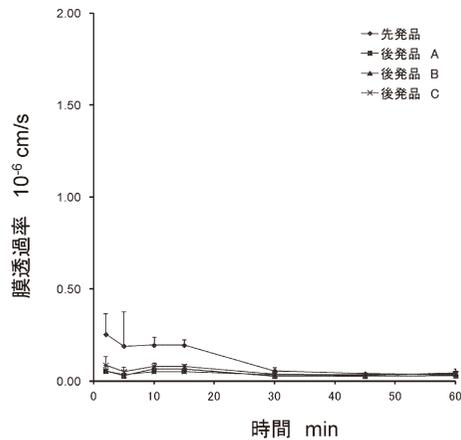


Fig. 5 pH6.0の試験液における膜透過率の変化

今回、公的溶出試験において定められた pH6.0の試験液を用いて溶出試験を実施し、2-60分後の各溶出液を用いて PAMPA による膜透過率を測定した。その結果、全てのレバミピド製剤において膜透過率が $1.5 \times 10^{-6}$ cm/s 以下と極めて低い膜透過率であった (Fig. 5)。医薬品の品質再評価に関わる公的溶出試験において、レバミピド錠の溶出規定時間は60分とされている。今回、60分後の溶出液における膜透過率は先発品と後発品において有意な差は見られなかった (data not shown)。

#### 4. 考察

後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン<sup>1)</sup>に従い、溶出挙動の類似性を判定した。その結果、今回用いた製剤のうち後発品 B のみ pH6.0の試験液における溶出挙動が類似しなかった。0-30分までの溶出濃度曲線下面積を算出して4製剤の比較をしたところ、後発品 B の値は有意に高くなったことから、低胃酸状態の患者における溶出開始30分までの溶出量が増大する可能性があり、本製剤に関しては低胃酸状態の患者における生物学的同等性試験を行う必要があると思われる。

今回、先発品および後発品3製剤の膜透過率はいずれも $1.5 \times 10^{-6}$ cm/s 以下でありほとんど膜透過していないことが明らかとなった。これは pH 分配仮説により説明できる。つまり pKa 3.3 (25°C) であるレバミピドは、pH6.0の条件下でイオン型分率が高く、溶解しやすい反面、完全な脂質二重膜をほとんど膜透過できなかつたと考えられる。

Iinuma S らによるとレバミピド1-10 $\mu$ M において胃粘膜内細胞に対する好中球の接着が抑制されると報告されており<sup>4)</sup>、この濃度域内においてレバミピドは薬理作用を発現すると思われる。ムコスタ<sup>®</sup>錠100mg のインタビューフォームによると<sup>5)</sup>、1錠を空腹時に経口投与した場合の血中濃度 Cmax は0.216 $\mu$ M であり、またレバミピドの血漿蛋白非結合率が1.4-1.6%であることを考慮すると、胃に到達するレバミピド濃度は高くても0.0030-0.0035 $\mu$ M となり、これが胃粘膜に到達して薬理作用を発現するとは考えにくい。したがって、レバミピドの薬効発現には胃粘膜細胞に直接、接触・作用した量が重要であり、胃内でのレバミピド溶出量が薬効と相関すると思われる。

今回、HPLC 法を用いて先発品と後発品を比較した結果、胃内を想定した pH1.2の試験液におけるレバミピドの溶出率は2%未満と非常に溶出しにくかった。しかしながら、その溶出率は後発品において有意に上昇するという結果が得られた。したがって、今回用いた後発品3製剤は先発品よりも胃粘膜に吸収され易い可能性がある。

結論として、レバミピドは小腸の液性を想定した pH6.0の試験液では溶解しやすい反面、膜透過はしにくいことが明らかになった。血中濃度を考慮すると、小腸粘膜から吸収されたレバミピドが薬効を示す可能性は低く、胃粘膜に直接接触した量と薬効が相関すると思われる。したがって、胃内 pH を想定した pH1.2における溶出挙動および膜透過率が生物学的同等性を評価する上で重要であり、今後、pH1.2条件下におけるレバミピドの膜透過性を検討

することで有効性や先発医薬品との同等性を考える上での有用な情報が得られるものと考え  
る。

## 5. 参考文献

- 1) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインなどの一部改訂について，医食審査発  
1124004号，(2006)
- 2) BD Gentest™ プレコート PAMPA プレートシステム，日本ベクトン・ディッキンソン  
株式会社，東京
- 3) Mensch J, Melis A, Mackie C, Verreck G, Brewster ME, Augustijns P. Evaluation of  
various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of  
BBB permeability, *Eur J Pharm Biopharm*, 74, 495-502 (2010)
- 4) Iinuma S, Naito Y, Yoshikawa T, Takahashi S, Takemura T, Yoshida N, Kondo M.  
Department of Medicine, Otowa Hospital, Kyoto, Japan. In vitro studies indicating  
antioxidative properties of rebamipide. 43(9 suppl), 35S-39S (1989)
- 5) 医薬品インタビューフォーム，ムコスタ®錠100mg，改定10版，大塚製薬株式会社，東京，  
pp13-16 (2010)