

# 博 士 論 文

変形性関節症治療における新規関節注入ヒアルロン酸  
誘導体の創製研究

Study on Novel Intra-articular Hyaluronan Derivatives as  
Osteoarthritis Drugs

2020 年 5 月

May, 2020

吉岡 敬二

Keiji Yoshioka

本論文中に用いた略語は以下の通りである。

略語	省略していない表現
BLQ	below the lower limit of quantification
CD44	cluster of differentiation-44
COX	cyclooxygenase
DF	diclofenac
DF-Na	diclofenac sodium
EDTA-2Na	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate.
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	Food and Drug Administration
Gel-200	photo-cross-linked hyaluronate
Gel-One <sup>®</sup>	a sterile, transparent, and viscoelastic hydrogel composed of cross-linked hyaluronate, a derivative of highly purified sodium hyaluronate extracted from chicken combs
HA	sodium hyaluronate
HAS	hyaluronan synthase
HPLC	high-performance liquid chromatography
HYAL	hyaluronidase
IA-HA	intra-articular sodium hyaluronate
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL	interleukin
LAL	limulus ameocyte lysate
MMP	matrix metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug
NO	nitric oxide
OA	osteoarthritis
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
S.D.	standard deviation
S.E.	standard error
SI-613	development code of diclofenac etalhyaluronate sodium

## 目次

緒論.....	6
第1章 由来の異なるヒアルロン酸製剤の生体適合性試験.....	9
第1節 序論 .....	9
第2節 実験材料及び実験方法.....	11
1.2.1 実験材料 .....	11
1.2.2 実験動物 .....	11
1.2.3 実験方法 .....	11
1.2.3.1 正常ウサギ膝関節を用いた局所刺激性試験 .....	11
1.2.3.2 ウサギ関節洗浄液中のタンパク質濃度測定 .....	12
1.2.3.3 ウサギ関節洗浄液中の浸潤細胞数測定 .....	12
1.2.3.4 関節滑膜組織における病理組織学的評価 .....	12
1.2.3.5 各 HA 製剤中のエンドトキシン濃度測定.....	13
1.2.3.6 各 HA 製剤中のタンパク質濃度測定 .....	13
1.2.3.7 各 HA 製剤中の(1→3)-β-D-グルカン濃度測定 .....	13
1.2.3.8 統計解析 .....	13
第3節 実験結果 .....	14
1.3.1 関節洗浄液中の細胞数.....	14
1.3.2 関節洗浄液中のタンパク質量.....	15
1.3.3 病理組織学的評価.....	15
1.3.4 各 HA 製剤中のタンパク質濃度 .....	17
1.3.5 各 HA 製剤中のエンドトキシン濃度 .....	17
1.3.6 各 HA 製剤中の(1→3)-β-D-グルカン濃度.....	17
第4節 考察 .....	19
第2章 変形性関節症に対する単回投与型架橋ヒアルロン酸誘導体の評価.....	21
第1節 序論 .....	21
第2節 実験材料及び実験方法.....	23
2.2.1 実験材料 .....	23
2.2.2 実験方法 .....	23
2.2.2.1 ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルにおける Gel-200 の作用.....	23
2.2.2.1.1 実験動物 .....	23
2.2.2.1.2 ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルの作製.....	23
2.2.2.1.3 試験物質の投与.....	24
2.2.2.1.4 解剖 .....	24
2.2.2.1.5 軟骨変性の肉眼評価.....	24
2.2.2.1.6 関節液量の測定.....	25

2.2.2.1.7	関節液中タンパク質量の測定 .....	25
2.2.2.1.8	関節液中 PGE <sub>2</sub> 量の測定 .....	25
2.2.2.1.9	病理組織学的評価 .....	25
2.2.2.2	ブラジキニン誘発ラット関節疼痛モデルにおける Gel-200 の作用 .....	25
2.2.2.2.1	実験動物 .....	25
2.2.2.2.2	試験物質の投与 .....	26
2.2.2.2.3	ブラジキニン注入による関節疼痛の惹起 .....	26
2.2.2.2.4	疼痛評価 .....	26
2.2.2.3	正常ウサギ膝関節における Gel-200 の滞留性評価 .....	27
2.2.2.3.1	実験動物 .....	27
2.2.2.3.2	投与 .....	27
2.2.2.3.3	剖検及び残存率評価 .....	27
2.2.2.4	正常ヒト膝関節軟骨細胞を用いた MMPs 産生に対する Gel-200 の作用 .....	28
2.2.2.5	ヒト滑膜肉腫細胞株を用いた PGE <sub>2</sub> 産生に対する Gel-200 の作用 .....	28
2.2.2.6	統計解析 .....	28
第 3 節	実験結果 .....	30
2.3.1	ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルに対する Gel-200 の作用 .....	30
2.3.1.1	軟骨変性の肉眼評価 .....	30
2.3.1.2	関節液量 .....	31
2.3.1.3	関節洗浄液中タンパク質量 .....	31
2.3.1.4	関節洗浄液中 PGE <sub>2</sub> 量 .....	32
2.3.1.5	病理組織学的評価 .....	32
2.3.2	ブラジキニン誘発ラット関節疼痛モデルにおける Gel-200 の疼痛抑制作用 .....	34
2.3.3	正常ウサギ膝関節における Gel-200 の滞留性評価 .....	34
2.3.4	正常ヒト膝関節軟骨細胞を用いた MMPs 産生に対する Gel-200 の作用 .....	35
2.3.5	ヒト滑膜細胞を用いた PGE <sub>2</sub> 産生に対する Gel-200 の作用 .....	36
第 4 節	考察 .....	38
第 3 章	非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) 徐放型ヒアルロン酸誘導体の評価 .....	40
第 1 節	序論 .....	40
第 2 節	実験材料及び実験方法 .....	42
3.2.1	実験材料 .....	42
3.2.2	実験動物 .....	42
3.2.3	実験方法 .....	42
3.2.3.1	硝酸銀誘発ラット関節炎モデルの作製 .....	42
3.2.3.2	硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおける SI-613 の疼痛抑制作用 (用量反応性) .....	42
3.2.3.3	硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおける SI-613 の疼痛抑制作用 .....	43

3.2.3.4	抗原誘発ウサギ関節炎モデルに対する SI-613 の抗炎症作用	43
3.2.3.5	抗原誘発ウサギ関節炎モデルに対する SI-613 の抗炎症作用（持続性評価）	44
3.2.3.6	SI-613 単回膝関節内投与後の関節組織中及び血漿中 DF 濃度	44
3.2.3.7	SI-613 単回膝関節内投与後の関節組織中 DF 濃度（長期試験）	45
3.2.3.8	統計解析	45
第3節	実験結果	46
3.3.1	硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおける SI-613 の疼痛抑制作用（用量反応性）	46
3.3.2	硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおける SI-613 の疼痛抑制作用	46
3.3.3	抗原誘発ウサギ関節炎モデルに対する SI-613 の抗炎症作用	47
3.3.4	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）	49
3.3.5	SI-613 単回膝関節内投与後の関節組織中 DF 濃度	49
3.3.6	SI-613 単回膝関節内投与後の関節組織中 DF 濃度（長期試験）	51
3.3.7	SI-613 単回膝関節内投与後の血漿中 DF 濃度推移	52
第4節	考察	54
総括		56
謝辞		58
論文目録		59
参考文献		60

## 緒論

変形性関節症（osteoarthritis; OA）は、中高年者の罹患率が高い関節疾患であり、本邦における40歳以上のOA患者は2530万人（男性860万人・女性1670万人）以上<sup>1)</sup>、年間の新規罹患患者数は約90万人<sup>2)</sup>（1995年）と概算されている。2018年に実施された厚生労働省国民生活基礎調査によると、介護認定審査において要支援となる原因の第1位は関節疾患（17.2%、関節リウマチを含む）であったと報告されており<sup>3)</sup>（表1）、人口の急速な高齢化が進む本邦において大きな社会問題となりつつある。

OAの基本的な病態として、関節軟骨の変性及び破壊と、それに続く関節裂隙の狭小化、関節辺縁や軟骨下骨における骨の増殖性変化があり、さらに二次的な滑膜炎がみられる（図1）。OAの症状は、関節痛や関節水腫、可動域制限、関節の変形等がある。OAは、膝、股、肩、足、肘など全身の関節に発生し、脊椎の椎間関節や指趾の関節でも発症することがある。罹患関節が下肢の場合は、上記症状に伴い歩行障害等が現れ、患者の日常生活動作（activities of daily living; ADL）や生活の質（quality of life; QOL）が阻害されることが問題となる。

表1. 要介護度別にみた介護が必要となった主な原因の構成割合

(単位：%)

平成28年

	総数	要支援者			要介護者					
		要支援1	要支援2		要介護1	要介護2	要介護3	要介護4	要介護5	
総数	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
認知症	18.0	4.6	5.6	3.8	24.8	24.8	22.8	30.3	25.4	20.4
脳血管疾患（脳卒中）	16.6	13.1	11.5	14.6	18.4	11.9	17.9	19.8	23.1	30.8
高齢による衰弱	13.3	16.2	18.4	14.2	12.1	13.6	13.3	12.8	9.1	6.7
骨折・転倒	12.1	15.2	11.4	18.4	10.8	11.5	10.9	8.9	12.0	10.2
関節疾患	10.2	17.2	20.0	14.7	7.0	10.7	7.0	6.4	4.0	1.1
心疾患（心臓病）	4.6	6.7	5.8	7.4	3.8	4.3	4.3	3.3	4.2	0.9
パーキンソン病	3.1	2.4	1.6	3.2	3.4	2.8	3.7	3.2	4.2	3.5
糖尿病	2.7	3.3	3.0	3.6	2.4	2.6	2.5	1.9	3.7	0.9
悪性新生物（がん）	2.4	2.0	1.5	2.3	2.7	3.0	2.5	2.1	1.4	5.5
脊髄損傷	2.3	2.5	2.9	2.1	2.2	2.0	1.3	2.5	2.3	4.4
呼吸器疾患	2.2	2.1	3.0	1.3	2.3	2.9	2.6	1.0	1.9	2.3
視覚・聴覚障害	1.3	1.8	1.7	2.0	1.0	1.1	1.2	1.3	0.9	-
その他	8.2	9.2	9.1	9.3	7.7	7.3	8.2	5.4	7.0	12.3
わからない	1.1	1.4	1.1	1.6	0.8	1.1	0.6	0.9	0.2	0.9
不詳	2.0	2.3	3.3	1.4	0.7	0.6	1.2	0.3	0.6	0.2

注：1）「総数」には、要介護度不詳を含む。

2）熊本県を除いたものである。

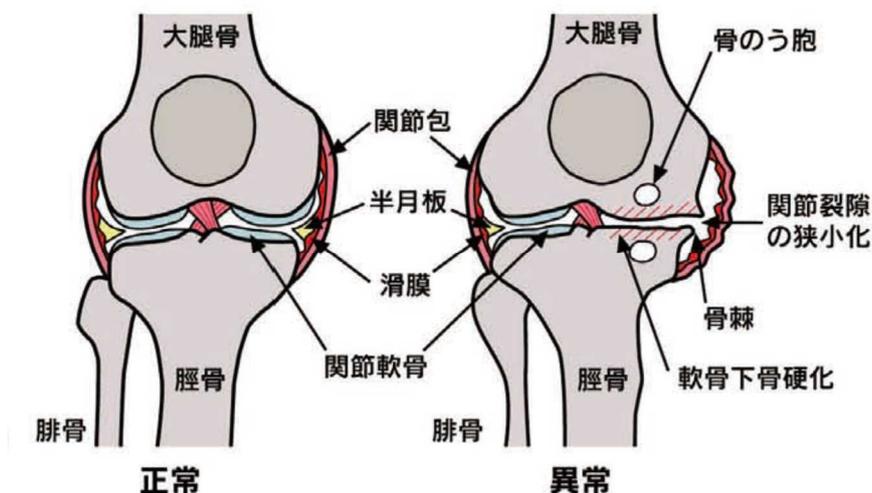


図1. 変形性膝関節症

(社団法人日本整形外科学会の承諾を得て転載)

OAの治療目標は、症状の軽減と関節機能の維持又は改善である。主な治療方法は、非薬物療法（運動療法、減量、患者教育等）及び薬物療法等の保存的治療であり、この両者の併用がOAの至適な管理において推奨されている。関節破壊が進行した患者で、保存的治療で症状の改善が得られない場合は、人工膝関節全置換術（total knee arthroplasty; TKA）などの手術的治療が考慮される。薬物療法には、アセトアミノフェンや非ステロイド性抗炎症薬（non-steroidal anti-inflammatory drug; NSAID）処方のほか、ヒアルロン酸ナトリウム（hyaluronic acid; HA）及び副腎皮質ステロイドの関節注射が行われている。NSAIDは、OA患者に広く処方されるが、長期使用による上部消化管障害はよく知られている<sup>4)</sup>。1990年代には、この副作用の回避を目的に多くのシクロオキシゲナーゼ（cyclooxygenase; COX）-2選択的阻害剤が開発された。しかし、2004年にそれらの多くは心血管系の副作用を示すことが報告され、市場から撤退した<sup>5)</sup>。ジクロフェナクナトリウム（diclofenac sodium; DF-Na）を含む経口NSAIDにもCOX-2選択的阻害剤と同じ副作用懸念があるという報告もある<sup>6, 7)</sup>。強い抗炎症効果を示す副腎皮質ステロイド製剤は、滑膜炎が重度で多量の関節液貯留がある患者に即効性の効果がある反面<sup>8)</sup>、*in vitro*試験において関節軟骨中のプロテオグリカン合成の抑制作用を示すことが報告されており、頻回投与による軟骨変性の加速が懸念されている<sup>9, 10)</sup>。HAは、1934年Meyerらによって初めてウシの硝子体から単離されたグリコサミノグリカンで、硝子体（hyaloid）のウロン酸の意味で命名された<sup>11)</sup>。HAは、D-グルクロン酸とN-アセチル-D-グルコサミンがβ1-3結合で繰り返し連結された陰イオン性の直鎖状多糖類であり、分子量が数百万にも及ぶ生体内で最大の高分子ポリマーである（図2）。

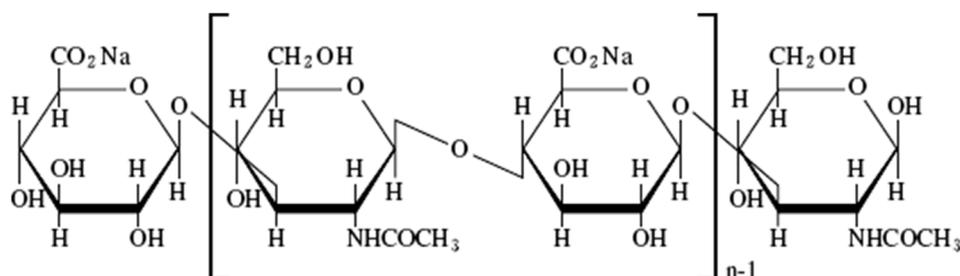


図 2. ヒアルロン酸ナトリウム (HA) の構造式

HAは全身の様々な臓器に分布するが、組織のHA濃度は臍帯で最も高く、次いで関節液、皮膚及び硝子体に高濃度に存在する。関節では関節滑膜から産生されて関節液の主成分となっているほか、関節軟骨アグリカンの構成成分である<sup>12)</sup>。OA患者の関節液中でのHAは、健常人のそれと比較して濃度及び分子量が低下しているとされ<sup>13, 14)</sup>、それによる関節液の粘弾性が低下していることが知られている<sup>15, 16)</sup>。OA治療に用いられるHA製剤は、その高い粘弾性から潤滑剤及びクッションのような役割を有する<sup>17-23)</sup>。また、HA受容体である接着分子CD44 (cluster of differentiation-44) 及びICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) を介して、軟骨からのアグリカンの遊離や、軟骨細胞からのタンパク分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) -1, 3, 13の産生を抑制するとともに<sup>24, 25)</sup>、滑膜細胞に作用してインターロイキン (interleukin; IL) -1 $\beta$ などの炎症性サイトカイン、プロスタグランジン (prostaglandin; PG) E<sub>2</sub>などの生理活性物質の産生を抑制する作用など、HAは様々な生理作用を有することが報告されている<sup>26-28)</sup>。OA患者に対するHA製剤の関節内投与は、週1回の複数回 (計3~5回) 投与が1980年代から行われているが、副作用はほとんどないものの稀に一部のHA製剤の投与後に膝関節局所の発熱、疼痛、水腫を伴う重度の急性炎症反応がみられること<sup>29-31)</sup>、投与が複数回に渡ることによる感染リスクの懸念と煩雑さ、疼痛抑制作用が必ずしも十分でないなどの課題があり、安全かつ有効性の高い新たなOA治療剤の開発が望まれている。

本研究では、これまでにOA治療に汎用されてきたHA製剤の課題を克服すべく、第1章は、由来の異なるHA製剤を用いた生体適合性評価及び不純物分析を行うことで一部のHA製剤でみられる急性炎症反応の原因探索を目的とした。第2章は、これまでの複数回投与から単回に投与頻度を低減することを企図し、新規光架橋技術を用いた単回投与持続型架橋HA誘導体を調製し、生物学的評価を行った。さらに第3章は、HAにNSAIDの消炎鎮痛作用を付与することを企図し、NSAID徐放型HA誘導体を調製し、生物学的評価を行った。これらにより、OA治療における新規関節注入HA誘導体の創製を本研究の目的とした。

## 第1章 由来の異なるヒアルロン酸製剤の生体適合性試験

### 第1節 序論

既存のHA製剤の生体適合性評価及び不純物探索を行い、各HA製剤の生体適合性の違いが原料となるHAの由来によるか否かを検証した。現在、HAは主に鶏冠（トサカ）からの抽出法あるいはHA産生菌を用いた微生物発酵法で製造されている。OA治療で使用されているHA製剤は、HAの含量、分子量、架橋構造の有無、原料の由来（鶏冠あるいは発酵法）などの違いによって細かく異なるが、大きくは架橋構造の有無と原料の由来から4種類に大別される。本研究では、3つのタイプのHA製剤に焦点を当てた（表2）。鶏冠由来製剤としてSUPARTZ FX™（以下、Avian-HA）とSYNVISC®（以下、Avian-CL-HA）を、発酵由来製剤としてORTHOVISC®（以下、Bio-HA）を用いた。それらのうち、SYNVISC®のみがその含有するタンパク質とジビニルスルホン（divinyl sulfone; DVS）で架橋する人工的な架橋構造をとり<sup>32)</sup>、SUPARTZ FX™及びORTHOVISC®は天然の非架橋HAである。

これらの全ての製剤は、一般的に忍容性も高く、副作用の多くは軽度の関節痛、腫脹及び関節液の貯留など、局所的に起こりかつ治療無しで回復する軽微なものである。しかし、稀なケースではあるが重篤な副作用として膝関節局所における重度の急性炎症反応が知られており、それにはSYNVISC®特有の架橋構造の関与が示唆されている<sup>33-35)</sup>。実際、その重度の急性炎症反応はSYNVISC®を投与された患者で数例報告されているものの<sup>36, 37)</sup>、他の鶏冠由来HAでは明確に急性炎症反応が生じたという症例は知られていない。一方、発酵由来HAが鶏冠由来HAと比較して安全性懸念が低いという報告もある<sup>38)</sup>。これらの相反する報告は、鶏冠由来HA製剤の中には上記の架橋構造を有する一部の生体適合性の低いHA製剤が含まれ、HAの由来と人工的な架橋構造の有無を混同させていることが原因となっていると考えられる。

表2. 本研究で用いたHA製剤

製品名 (ロット番号)	タイプ	HA濃度	由来	重量平均分子量
SUPARTZ FX™ (4X7Z01)	天然 HA	10 mg/mL (2.5 mL)	鶏冠	620-1,170 kDa
ORTHOVISC® (N170038B)	天然 HA	15 mg/mL (2 mL)	発酵	1,000-2,900 kDa
SYNVISC® (6RSP017)	架橋 HA (タンパク質及びジ ビニルスルホン) <sup>a)</sup>	8 mg/mL (2 mL)	鶏冠	ハイラン A; 6,000 kDa ハイラン B; > 6,000 kDa

a) ハイランAは、鶏冠由来HAに含まれるタンパク質を介した架橋HA。ハイランBは、ハイランAをさらにジビニルスルホンで架橋したHA。

本研究では、鶏冠由来 HA 製剤 (SUPARTZ FX™; Avian-HA) と発酵由来 HA 製剤 (ORTHOVISC®; Bio-HA) 及び鶏冠由来 HA の架橋 HA 製剤 (SYNVISC®; Avian-CL-HA) の生体適合性について正常ウサギ膝関節を用いて比較検討し、由来の異なる HA の生体適合性の違いを検証した。また、大島らは<sup>39)</sup>、HA 製剤中のタンパク質及びエンドトキシン濃度と投与後の急性炎症反応の関連性を示唆していることから、不純物分析として上記 HA 製剤中のタンパク質及びエンドトキシンを定量した。エンドトキシン測定法は、エンドトキシンがカブトガニ (*Limulus polyphemus* 等) の血球抽出成分 LAL (limulus amebocyte lysate) に含まれる C 因子 (セリンプロテアーゼ) を活性化し、ゲル化を引き起こす反応に基づいている<sup>40)</sup> (図 3)。大島らが用いた Toxicolor™ system LS-50M (Associates of Cape Cod, Inc.) は、C 因子に加えて(1→3)-β-D-グルカンに反応する G 因子を含むことが知られていることから<sup>41)</sup>、本研究ではエンドトキシン及び(1→3)-β-D-グルカンをそれぞれ特異的に検出可能なキット (Pyrochrome® plus Glucashield® kits 及び Glucatell®) を用いて定量し、HA 製剤の生体適合性に関与すると推察される原因因子の探索を行った。

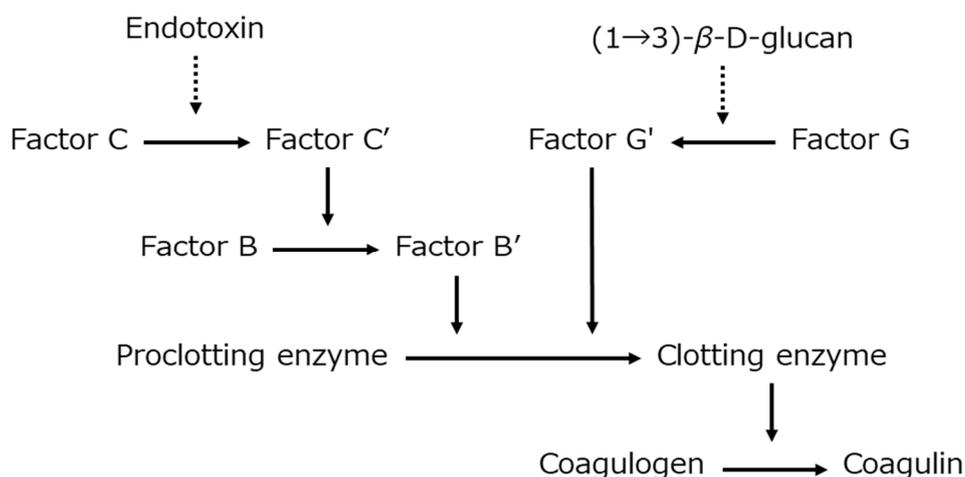


図 3. LAL システムにおけるエンドトキシン及び(1→3)-β-D-グルカン検出メカニズム

## 第2節 実験材料及び実験方法

### 1.2.1 実験材料

第1章の実験には下記 HA 製剤及び試薬を購入し、用いた。

SUPARTZ FX™ (以下 Avian-HA、生化学工業 (株)、東京、日本)

ORTHOVISC® (以下 Bio-HA、Anika Therapeutics, Inc.、Bedford、MA、US)

SYNVISC® (以下 Avian-CL-HA、帝人ファーマ (株)、東京、日本)

日本薬局方 生理食塩液 ((株) 大塚製薬工場、徳島、日本)

ミダゾラム (ドルミカム®注射液 10 mg、アステラス製薬 (株)、東京、日本)

キシラジン (2%セラクター®注射液、バイエル薬品 (株)、大阪、日本)

酒石酸ブトルファノール (ベトルファール®、Meiji Seika ファルマ (株)、東京、日本)

EDTA-2Na (富士フィルム和光純薬 (株)、大阪、日本)

DPBS (Thermo Fisher Scientific Inc.、Waltham、MA、US)

Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.、Waltham、MA、US)

Glucate® (Associates of Cape Cod, Inc.、East Falmouth、MA、US)

Pyrochrome® plus Glucashield® kits (Associates of Cape Cod, Inc.、East Falmouth、MA、US)

DC protein assay kit II (Bio-Rad Laboratories, Inc.、Hercules、CA、US)

### 1.2.2 実験動物

12~16 週齢雄性ニュージーランド白色種ウサギ (SPF、オリエンタル酵母工業 (株)、東京、日本) 27 匹を用いた。使用動物は全て入手時に一般状態観察を行い、異常のない動物について 14 日間の予備飼育を行った。予備飼育時に異常の認められなかった全例を試験に使用した。当該実験は、生化学工業株式会社動物実験倫理委員会により審査・承認された後、すべての動物は動物愛護・福祉の精神に則った適切な環境下で飼育・管理された。

### 1.2.3 実験方法

#### 1.2.3.1 正常ウサギ膝関節を用いた局所刺激性試験

試験物質投与時の全身麻酔には混合麻酔液 [セラクター (キシラジン 3.3 mg/kg) : ベトルファール (酒石酸ブトルファノール 0.4 mg/kg) : ドルミカム (ミダゾラム 0.4 mg/kg) : 生理食塩液 = 2 : 1 : 1 : 2] 2 mL の静脈内投与を用いた。ウサギを全身麻酔下で背位固定し、両後肢膝関節周囲をバリカンで剃毛した後、70%アルコールで噴霧消毒し、テルモシリンジ (1 mL、テルモ (株)、東京、日本) 及びテルモ注射針 (25G) を用いて各試験物質をそれぞれ両後肢膝関節内に投与した。投与量は、ヒアルロン酸製剤の生体適合性が評価されている 0.25 mL/関節とし<sup>42)</sup>、週 1 回の頻度で計 3 回投与した。3 回投与後翌日 (初回投与後 15 日) に、ウサギを混合麻酔液処置による全身麻酔下で放血屠殺により安楽死させた。屠殺後、ピンセット、メス及び剪刀を用いて両後肢膝関節を摘出した。テルモ注射針 (23G)

を装着したテルモシリンジ（1 mL）を用いて生理食塩液 0.5 mL を関節内に関節外側から穿刺・注入した。関節を約 50 回屈伸した後、テルモ注射針（23G）を装着したテルモシリンジ（1 mL）を関節内に外側から穿刺・吸引し、関節洗浄液を予め風袋重量を測定した滅菌チューブに回収した。この操作を 3 回繰り返した。関節洗浄液を回収したチューブ重量から風袋の重量を減算し、関節洗浄液量（g）を算出した。生理食塩液の比重（20℃）は約 1 であることから、天秤で測定したグラム表示を関節洗浄液量（mL）とした。関節洗浄液は細胞数の測定終了まで氷冷下で保存した。関節洗浄液の回収後、ピンセット及び剪刀を用いて膝関節から滑膜組織を分離・採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。摘出時、関節内は肉眼で観察した。

#### 1.2.3.2 ウサギ関節洗浄液中のタンパク質濃度測定

関節洗浄液を遠心分離したのち、そのタンパク質濃度を Pierce BCA Protein Assay kit を用いて測定した。得られたタンパク質濃度に回収関節洗浄液量を乗することで、関節洗浄液中の総タンパク質量（mg）を関節ごとに算出した。

#### 1.2.3.3 ウサギ関節洗浄液中の浸潤細胞数測定

氷冷しておいた関節洗浄液は静かに天地混和した後、ノイバウエル改良型ディスポーザブル血球計算盤（C-Chip）に 10  $\mu$ L 流し込み、外隅の 4 区画の白血球数を計数した（1 区画は 1 mm  $\times$  1 mm）。細胞数測定後の関節洗浄液を 300 g、4℃、5 分間の条件で遠心分離し、一部の上清をタンパク質濃度測定に供した。残りの細胞を再懸濁した後、ディフ・クイック染色（シスメックス（株）、兵庫、日本）を施し、そのスライドを用いて関節洗浄液中の単球、リンパ球及び偽好酸球数を計数した。

#### 1.2.3.4 関節滑膜組織における病理組織学的評価

ホルマリン固定した関節滑膜組織は、常法に従いヘマトキシリン・エオシン（hematoxylin eosin; HE）染色を施した後、病理組織学的評価を行った。標本の作製は、（株）DIMS 医科学研究所（愛知、日本）に委託した。組織学的評価は、2 名の評価者がそれぞれ滑膜肥厚スコア及び炎症細胞浸潤／水腫スコアを盲検下で下記 4 段階にスコア化した。各個体のスコアは 2 名の平均値を採用した。

##### <滑膜肥厚スコア>

- 0: 滑膜上皮細胞が 1-2 層
- 1: 滑膜上皮細胞が 3-5 層
- 2: 滑膜上皮細胞が 6-8 層あるいは軽度の細胞浸潤
- 3: 滑膜上皮細胞が 9 層以上あるいは重度の細胞浸潤

<炎症性細胞浸潤／水腫スコア>

0: ほとんどみられない

1: 部分的に少数みられる

2: 部分的に多数みられる

3: 広範囲に多数みられる／数カ所に集簇してみられる

#### 1.2.3.5 各 HA 製剤中のエンドトキシン濃度測定

各HA製剤中のエンドトキシン濃度は、Pyrochrome® with Glucashield® Buffer kitを用いて測定した。Avian-HAは注射用水で2倍希釈し、Bio-HA及びAvian-CL-HAは10倍希釈した。各試験物質の50 µLを96ウェルプレートに添加した後、ライセート試薬50 µLを各ウェルに添加した。プレートリーダー (Wellreader MP-96、生化学工業 (株)、東京、日本) を用い、405 nmの吸光度を3重測定した。検量線は、エンドトキシン濃度0.005～0.5 EU/mLの範囲で作成した。添加回収試験として、各HA製剤に既知量のエンドトキシンを添加した際の回収率を算出した。

#### 1.2.3.6 各 HA 製剤中のタンパク質濃度測定

各HA製剤中のタンパク質濃度は、DC protein assay kit IIを用いて測定した。各試料は注射用水で2倍希釈し、キット付属のアッセイ試薬を添加した後、室温で15分間以上インキュベートした。反応液の吸光度は分光光度計 (UV-1700、(株) 島津製作所、京都、日本) を用い、750 nmの吸光度を3重測定した。検量線はウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) 濃度5～125 µg/mLの範囲で作成した。添加回収試験として、各HA製剤に既知量のBSAを添加した際の回収率を算出した。

#### 1.2.3.7 各 HA 製剤中の(1→3)-β-D-グルカン濃度測定

各HA製剤中の(1→3)-β-D-グルカン濃度は、(1→3)-β-D-グルカン測定キットGlucateLL®を用いて測定した。Avian-HA、Bio-HA及びAvian-CL-HAは、それぞれ10、30及び300倍にキット付属のグルカンフリーの蒸留水を用いて希釈した。試料を反応液と混合した後、37°Cで1時間インキュベートし、マイクロプレートリーダー (ELx808IU、BioTek Instruments, Inc.、Vermont、VT、US) を用いて405 nmの吸光度を3重測定した。(1→3)-β-D-グルカンの検量線は3.125～50 pg/mLの範囲で作成した。添加回収試験として、各HA製品に既知量の(1→3)-β-D-グルカンを添加した際の回収率を算出した。

#### 1.2.3.8 統計解析

統計解析は統計支援システム SAS (SAS Institute Inc.、Cary、NC、US) を用いて行った。生体適合性試験における関節液中の細胞数、タンパク質量及び病理スコアは、正規性の検定を行った後、パラメトリック Tukey 検定を用いて解析した。危険率 5%未満を有意とした。測定値は平均値 ± 標準誤差で表記した。

### 第3節 実験結果

#### 1.3.1 関節洗浄液中の細胞数

試験物質3回投与後翌日の関節液中の総細胞数は、saline群が関節あたり  $1.96 \pm 0.33$  ( $\times 10^4$  cells)、Avian-HA群が  $4.66 \pm 0.79$  (同)、Bio-HA群が  $4.95 \pm 0.81$  (同) 及び Avian-CL-HA群が  $86.26 \pm 22.10$  (同) であった (図4)。saline群、Avian-HA群及びBio-HA群の総細胞数の間に有意な差はみられなかった。一方、Avian-CL-HA群の総細胞数は他の3群と比較して有意に高値を示した。

関節液中の単球数は、saline群が関節あたり  $1.47 \pm 0.20$  ( $\times 10^4$  cells)、Avian-HA群が  $2.72 \pm 0.69$  (同)、Bio-HA群が  $2.43 \pm 0.94$  (同) 及び Avian-CL-HA群が  $59.48 \pm 18.85$  (同) であった。saline群、Avian-HA群及びBio-HA群の単球数の間に有意な差はみられなかった。Avian-CL-HA群の単球数は他の3群と比較して有意に高値を示した。

関節液中のリンパ球数は、saline群が関節あたり  $0.49 \pm 0.19$  ( $\times 10^4$  cells)、Avian-HA群が  $1.94 \pm 0.72$  (同)、Bio-HA群が  $2.46 \pm 0.65$  (同) 及び Avian-CL-HA群が  $14.57 \pm 7.17$  (同) であった。いずれの群間にも有意な差は認められなかった。

関節液中の偽好酸球数は、saline群が関節あたり  $0.00 \pm 0.00$  ( $\times 10^4$  cells)、Avian-HA群が  $0.00 \pm 0.00$  (同)、Bio-HA群が  $0.06 \pm 0.06$  (同) 及び Avian-CL-HA群が  $12.21 \pm 4.80$  (同) であった。Avian-CL-HA群の偽好酸球数は Avian-HA群及びBio-HA群のそれと比較して有意に高値を示した。

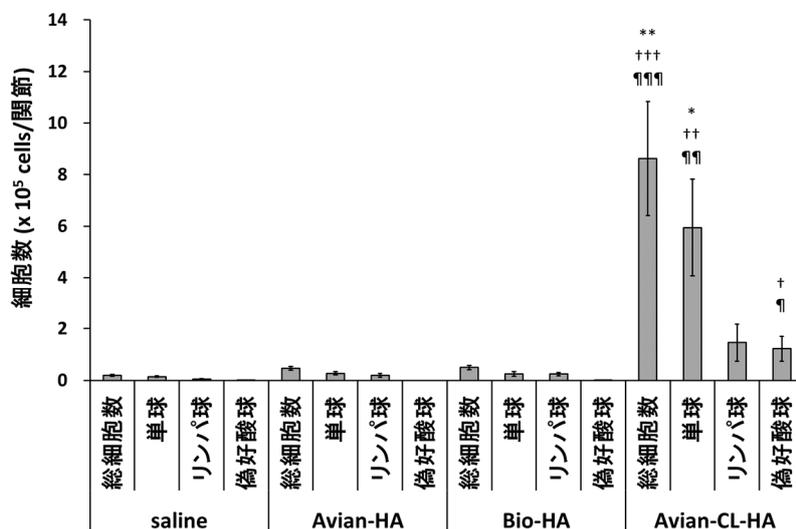


図4. 関節洗浄液中細胞数

Mean  $\pm$  S.E. (n = 6, saline群のみ n = 3)

\*\*P < 0.01, \*P < 0.05 vs. saline, †††P < 0.001, ††P < 0.01, †P < 0.05 vs. Avian-HA, ¶¶¶P < 0.001, ¶¶P < 0.01, ¶P < 0.05 vs. Bio-HA (パラメトリック Tukey 検定)

### 1.3.2 関節洗浄液中のタンパク質量

関節洗浄液中のタンパク質量は、saline 群が関節あたり  $2.5 \pm 0.2$  (mg)、Avian-HA 群が  $4.3 \pm 0.1$  (同)、Bio-HA 群が  $4.6 \pm 0.5$  (同) 及び Avian-CL-HA 群が  $7.9 \pm 1.2$  (同) であった (図 5)。saline 群、Avian-HA 群及び Bio-HA 群のタンパク質量の間に有意な差はみられなかった。一方、Avian-CL-HA 群のタンパク質量は他の 3 群のそれと比較して有意に高値であった。

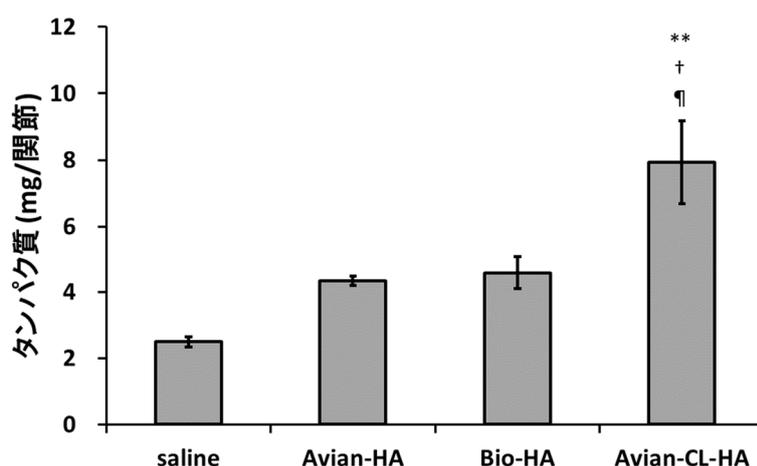


図 5. 関節洗浄液中タンパク質量

Mean  $\pm$  S.E. (n = 6、saline 群のみ n = 3)

\*\*P < 0.01 vs. saline、†P < 0.05 vs. Avian-HA、¶P < 0.05 vs. Bio-HA

(パラメトリック Tukey 検定)

### 1.3.3 病理組織学的評価

滑膜肥厚スコアは、saline 群が  $0.00 \pm 0.00$ 、Avian-HA 群が  $0.08 \pm 0.08$ 、Bio-HA 群が  $0.25 \pm 0.11$ 、Avian-CL-HA 群が  $1.25 \pm 0.36$  であった (図 6)。Avian-CL-HA 群のスコアは、saline 群、Avian-HA 群及び Bio-HA 群のそれと比較して有意に高値であった。このことから、Avian-CL-HA 群では滑膜表層細胞の増殖性が変化していると考えられた。

炎症細胞浸潤/水腫スコアは、saline 群が  $0.00 \pm 0.00$ 、Avian-HA 群が  $0.25 \pm 0.11$ 、Bio-HA 群が  $0.33 \pm 0.25$ 、Avian-CL-HA 群が  $2.67 \pm 0.25$  であった (図 7)。Avian-HA 群及び Bio-HA 群の炎症細胞浸潤は、それぞれ 3/6 及び 4/6 例でほとんどみられず、残る 3/6 及び 2/6 例で部分的に少数みられる程度であった。一方、Avian-CL-HA 群では全例 (6/6 例) で炎症細胞の浸潤が観察され、4/6 例では炎症細胞の集簇がみられた (図 8、矢頭)。

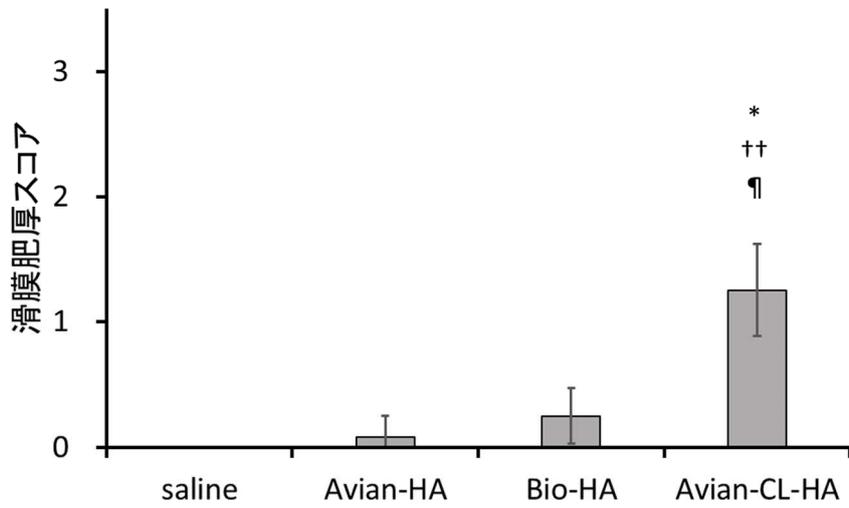


図 6. 滑膜肥厚スコア

Mean ± S.E. (n = 6、saline 群のみ n = 3)

\*P < 0.05 vs. saline、††P < 0.01 vs. Avian-HA、¶¶P < 0.05 vs. Bio-HA  
(パラメトリック Tukey 検定)

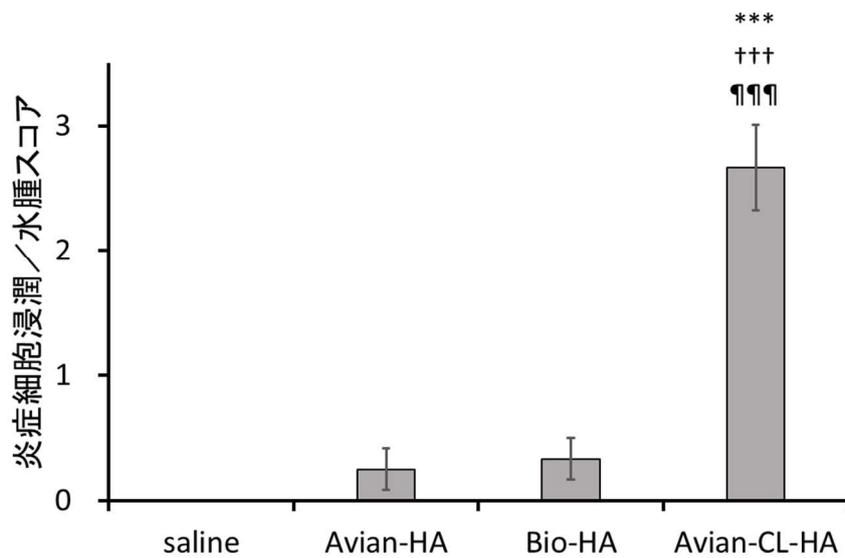


図 7. 炎症細胞浸潤/水腫スコア

Mean ± S.E. (n = 6、saline 群のみ n = 3)

\*\*\*P < 0.001 vs. saline、†††P < 0.001 vs. Avian-HA、  
¶¶¶P < 0.001 vs. Bio-HA (パラメトリック Tukey 検定)

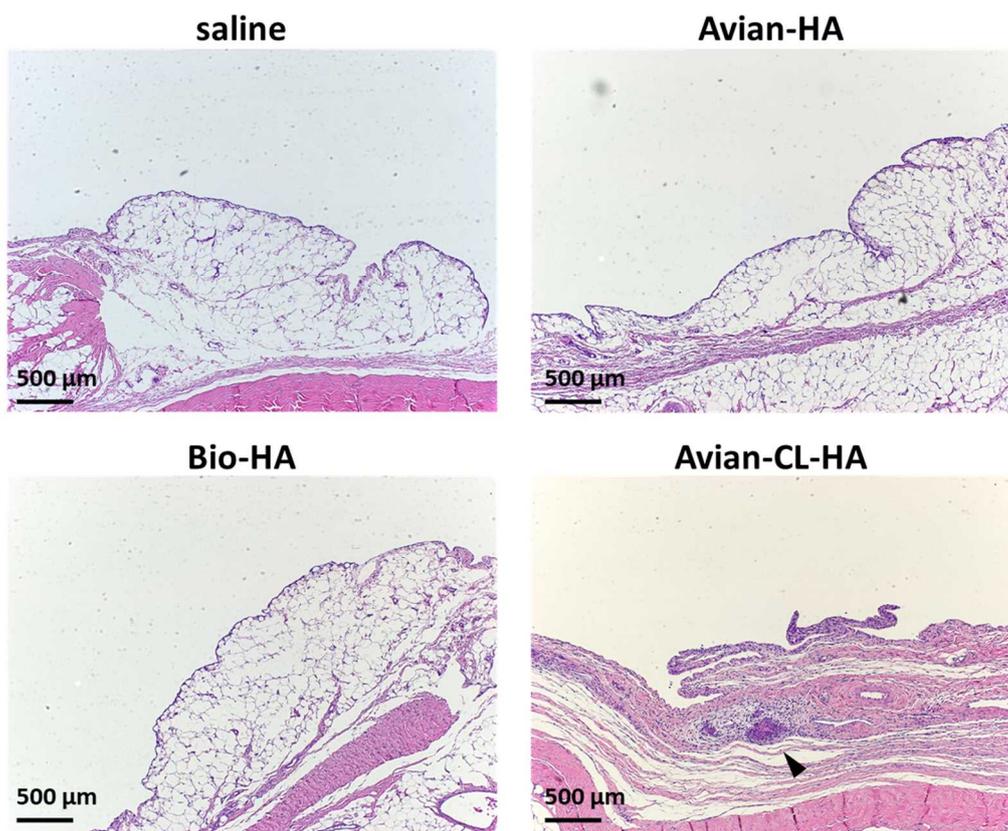


図 8. 試験物質 3 回投与後翌日の滑膜組織病理標本の代表例 (HE 染色)

#### 1.3.4 各 HA 製剤中のタンパク質濃度

各 HA 製剤からの抽出効率を検証するために、既知量の BSA を用いた添加回収試験を行い、回収率を算出した。BSA の回収率は 102~109% の範囲内であり、ほぼ 100% であった (表 3)。Avian-HA、Bio-HA 及び Avian-CL-HA 群の全ての HA 製剤において、タンパク質濃度は定量下限未満 (< 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) であった (表 4)。

#### 1.3.5 各 HA 製剤中のエンドトキシン濃度

添加回収試験を行った結果、エンドトキシンの回収率は、76% (Bio-HA) から 151% (Avian-CL-HA) の範囲内であった (表 3)。日本薬局方に従い、添加エンドトキシンの回収率が 50%~200% の範囲にあるため、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定した。全ての HA 製剤中のエンドトキシン濃度は、定量下限未満 (< 0.05 EU/mL、Avian-HA のみ < 0.01 EU/mL) であった (表 4)。

#### 1.3.6 各 HA 製剤中の(1→3)- $\beta$ -D-グルカン濃度

添加回収試験の結果、(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの回収率は、81% (Avian-HA) から 111% (Avian-CL-HA) の範囲内であった (表 3)。Avian-HA 及び Bio-HA の(1→3)- $\beta$ -D-グルカン量は、いずれも定量下限未満 (それぞれ、< 0.018 ng/mL 及び < 0.054 ng/mL) であった (表 4)。一方、Avian-CL-HA では、3.4 ng/mL の(1→3)- $\beta$ -D-グルカンが検出された。さらに、グルカ

ンフリーの蒸留水で100倍希釈したAvian-CL-HA (100  $\mu$ L) に(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンに特異性の高いendo-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカナーゼ (1.17 U/mLを5  $\mu$ L) を添加し、37°Cで1時間インキュベートした後に、同様に(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンを定量した。その結果、グルカンスIGNALの94.0%が消失し、Avian-CL-HAで検出された不純物が(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンであることが確認された。

表 3. 各測定系における添加回収率

群	タンパク質	エンドトキシン	(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン
Avian-HA	102%	147%	81%
Bio-HA	103%	76%	109%
Avian-CL-HA	109%	151%	111%

表 4. 各 HA 製剤中のタンパク質、エンドトキシン及び(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン濃度

群	タンパク質	エンドトキシン	(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン
Avian-HA	< 10 $\mu$ g/mL	< 0.01 EU/mL	< 0.018 ng/mL
Bio-HA	< 10 $\mu$ g/mL	< 0.05 EU/mL	< 0.054 ng/mL
Avian-CL-HA	< 10 $\mu$ g/mL	< 0.05 EU/mL	3.4 ng/mL

## 第4節 考察

HAの製造法は鶏冠からの抽出法とヒアルロン酸産生菌を用いた微生物発酵法に大別されるが、いずれのHAを用いたOA治療剤とも有効性と安全性は確立されている。しかし、稀なケースではあるが鶏冠由来のHAに架橋構造を持たせたHA製剤において重篤な副作用とされる膝関節局所における急性炎症反応が報告されており、Altman RDらは、鶏冠由来のHAが発酵法由来のHAと比較して安全性面で劣ると報告している<sup>38)</sup>。本研究では、上記の安全性懸念がHAの由来によるものか否かについて正常ウサギ膝関節を用いた生体適合性試験で検証するとともに、他の要因として製剤中に含まれる不純物の違いを検証した。試験物質には、米国で上市されているHAの由来及び架橋の有無でタイプの異なる3種類のヒアルロン酸製剤Avian-HA、Bio-HA及びAvian-CL-HAを用いた。

Avian-HA及びBio-HA関節内投与後の関節洗浄液中タンパク質量及び浸潤細胞数は、生理食塩液投与動物のそれらと比較してわずかに増加したものの有意な差はなく、マクロファージ系細胞による貪食及び適応性変化を含む膝関節内での生体処理反応と考えられた。関節滑膜組織の病理組織学的評価の結果においても、多核巨細胞、炎症性細胞の集簇及び炎症を示唆する変化や滑膜の壊死などは観察されなかったことから、それらの生体適合性に違いはなく、いずれも安全性が高いと考えられた。

一方、Avian-CL-HAの関節内投与により、関節洗浄液中のタンパク質量及び浸潤細胞数が生理食塩液、Avian-HA及びBio-HA投与動物のそれらと比較して有意に増加し、病理組織学的評価においては、滑膜組織の肥厚、炎症性細胞浸潤及び水腫など明らかな炎症性変化が認められた。Avian-CL-HAとして用いたSYNVISC<sup>®</sup>は、ハイラン溶液（ハイランA）80%とハイランゲル（ハイランB）20%で構成されるHA架橋体制剤である。ハイランAは鶏冠由来HAに含まれるタンパク質を介した架橋HAであり、ハイランBはそれをさらにジビニルスルホンで架橋したHAである。いくつかの臨床報告において、SYNVISC<sup>®</sup>投与後の滑膜組織にハイラン架橋体を取り囲むように急性炎症反応の典型的な所見である肉芽腫性炎症がみられており、ハイラン架橋体の生分解性の低さが肉芽腫性炎症に関与していると推察されている<sup>34,35,43)</sup>。また、我々は、別の架橋反応を用いた鶏冠由来架橋HAであるGel-200（製品名Gel-One<sup>®</sup>）の関節内投与は肉芽腫性炎症を誘発せず、SYNVISC<sup>®</sup>と比較して生体適合性が高いことを報告している<sup>42)</sup>。これらの結果は、重度の急性炎症反応の原因は鶏冠由来のHAではなく、SYNVISC<sup>®</sup>特有の架橋構造にあることを示唆している。

さらに、不純物分析を行った結果、いずれのHA製剤においてもタンパク質及びエンドトキシンは定量下限未満であり、Avian-CL-HAにおいてのみ(1→3)-β-D-グルカンが検出された。これまでに大島らは、Avian-CL-HA及びAvian-HAのエンドトキシン濃度は、それぞれ $0.19915 \pm 0.0741$ 及び $0.0045 \pm 0.0001$  EU/mLであり、Avian-CL-HAに含まれるエンドトキシンはAvian-HAに含まれるそれと比較して高値であると報告している<sup>39)</sup>。しかし、本研究ではいずれの製剤においても定量下限未満（それぞれ $< 0.05$ 及び $< 0.01$  EU/mL）であった。これらの結果の違いについて詳細は明確ではないが、Avian-CL-HA中のエンドトキシン含量が低減された可能性に加え、測定方法の違いが考えられた。既

報で用いられたエンドトキシン測定キット Toxicolor™ system LS-50M は、エンドトキシンに反応する C 因子と(1→3)-β-D-グルカンに反応する G 因子を含んでいる。すなわち、製剤中に(1→3)-β-D-グルカンが含まれる場合、エンドトキシンが偽陽性として検出される。本研究で用いた Pyrochrome® plus Glucashield® kits は、G 因子を含まないためエンドトキシンを特異的に検出する<sup>44)</sup>。したがって、既報<sup>39)</sup>では Avian-CL-HA 中のエンドトキシンではなく(1→3)-β-D-グルカンを検出していた可能性が考えられた。

(1→3)-β-D-グルカンは、真菌細胞壁を特徴づける主要な構成多糖成分であり、免疫賦活化作用を有することが知られている<sup>45-48)</sup>。(1→3)-β-D-グルカンは、真菌由来のほか、セルロースを原料に用いた透析膜やろ過フィルターに含まれ、製造工程でそれらを使用した医薬品中では(1→3)-β-D-グルカンが高値で検出されると報告されている<sup>49-51)</sup>。実際、免疫グロブリン製剤、綿ガーゼ及び手術用スポンジを使用された患者の血清中で(1→3)-β-D-グルカン濃度が上昇することも報告されている<sup>52,53)</sup>。医薬品に含まれる(1→3)-β-D-グルカンに関連した健康リスクは、2017年の Parenteral Drug Association annual meeting (一般社団法人日本 PDA 製薬学会)においても議論されている。近年、医薬品に含まれるエンドトキシンレベルは、ICH Q6A 及び Q6B において厳しく規制されている<sup>54,55)</sup>。しかしながら、(1→3)-β-D-グルカン混入による免疫賦活化の閾値や臨床的意義については明確にされておらず、許容値を示すガイドラインも存在しない。本研究において、(1→3)-β-D-グルカンを含む Avian-CL-HA 投与群のみで関節液中の細胞数やタンパク質量が高値を示し、滑膜組織においては炎症細胞の集簇も認められた。これは、Avian-CL-HA 特有の架橋構造が関与している可能性に加え、製剤中に混入した(1→3)-β-D-グルカンの関節内への注入が炎症反応のトリガーになった可能性を示すものであり、関節注射剤における(1→3)-β-D-グルカンのモニタリングは重要な意味を持つ可能性がある。

以上、本研究では、鶏冠抽出法あるいは微生物発酵法による HA の由来の違いは生体適合性に影響しないことが明らかとなり、その他の架橋構造あるいは不純物としての(1→3)-β-D-グルカンが急性炎症反応を含む生体適合性に関与していることが推察された。今後、Avian-CL-HA から抽出された(1→3)-β-D-グルカンの生体適合性評価や、タンパク質を介した架橋構造と生体適合性の関連に焦点を当てることで各種 HA 製剤の特性についての理解を深め OA 患者への適正使用に繋がると考えられた。

## 第2章 変形性関節症に対する単回投与型架橋ヒアルロン酸誘導体の評価

### 第1節 序論

変形性関節症（OA）患者の疼痛管理に対するヒアルロン酸（HA）製剤の関節注射療法は、国際変形性関節症学会（Osteoarthritis Research Society International; OARSI）及び米国リウマチ学会（American College of Rheumatology; ACR）等の関連学会において推奨されており<sup>56-58</sup>、用いられる HA 製剤は修飾されていない天然の HA からなる製剤と架橋された HA からなる製剤に大別される。前者の HA 製剤は 1 治療コースにつき週 1 回の頻度で 3～5 回の複数回投与が 1980 年代から施され、長年の臨床実績からその有効性と安全性が確認されている<sup>59</sup>。米国市場では、OA 患者の通院の煩雑さ及び関節注射による感染のリスク回避の観点からより少ない投与回数 of HA 製剤が求められており、それを満たすものとして HA を架橋することで分子量に依存する関節局所の滞留性を高めた持続型の架橋 HA 製剤 Gel-One<sup>®</sup>、SYNVISC<sup>®</sup>及び SYNVISC-ONE<sup>®</sup>の 3 製剤が上市されている。Gel-One<sup>®</sup>は、2011 年に米国食品医薬品局（Food and Drug Administration; FDA）から承認された新しい架橋 HA 製剤であり、光架橋技術を用いて架橋された 1% Cross-linked Hyaluronate（Gel-200）を有効成分とする単回投与型の HA 製剤である。SYNVISC<sup>®</sup>がタンパク質を用いた架橋技術を用いているのに対し、Gel-200 は HA のカルボキシ基に光反応性のケイ皮酸を共有結合させた中間体（光反応性 HA）を合成し、それに紫外線を照射することでケイ皮酸が 2 量体を形成することにより架橋する方法を用いている（図 9）。これは、縮合剤や架橋剤を用いないという点で、不純物が夾雑する可能性を排除した“クリーンな”架橋 HA と言える。これにより、より安全性が高く、かつ関節局所で長期間滞留することで持続的な薬効を発揮する架橋 HA 誘導体を創出することができると考え、開発研究に着手した。

本研究では、光架橋技術を用いて合成した Gel-200 の薬理学的特徴を *in vivo* 及び *in vitro* 試験において検討した。Gel-200 の OA に対する軟骨保護作用及び抗炎症作用はウサギ前十字靭帯切断 OA モデルを用いて検討した。当該モデルは、その軟骨変性がヒト OA に類似するとされ<sup>60</sup>、各種ヒアルロン酸製剤<sup>61-63</sup>及びグルコサミン<sup>64</sup>の薬効評価に用いられてきた。Gel-200 の関節疼痛に対する作用は、同じく HA 製剤の疼痛抑制作用の評価に汎用されているブラジキニン誘発ラット関節疼痛モデル<sup>65-67</sup>を用いて検討した。当該モデルは、内因性の発痛物質であるブラジキニンと発痛増強物質であるプロスタグランジン（prostaglandin; PG）E<sub>2</sub> を関節内に注入することで関節疼痛を誘発するモデルであり、注入直後にみられるラットの歩行異常（足上げ、跛行及び三足歩行）を指標に Gel-200 の疼痛抑制作用を評価した。また、Gel-200 を膝関節内に投与した際の関節液中及び滑膜組織中の局所滞留性は、架橋基として導入されたケイ皮酸を高速液体クロマトグラフ（high-performance liquid chromatography; HPLC）を用いて定量することで明らかにした。さらに、薬理試験の作用機序解明の一環として、正常ヒト膝関節軟骨細胞及びヒト滑膜肉腫細胞株 SW982 を用いた *in vitro* 試験において、Gel-200 のマトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase; MMPs）産生及び PGE<sub>2</sub> 産生に対する作用を検討した。

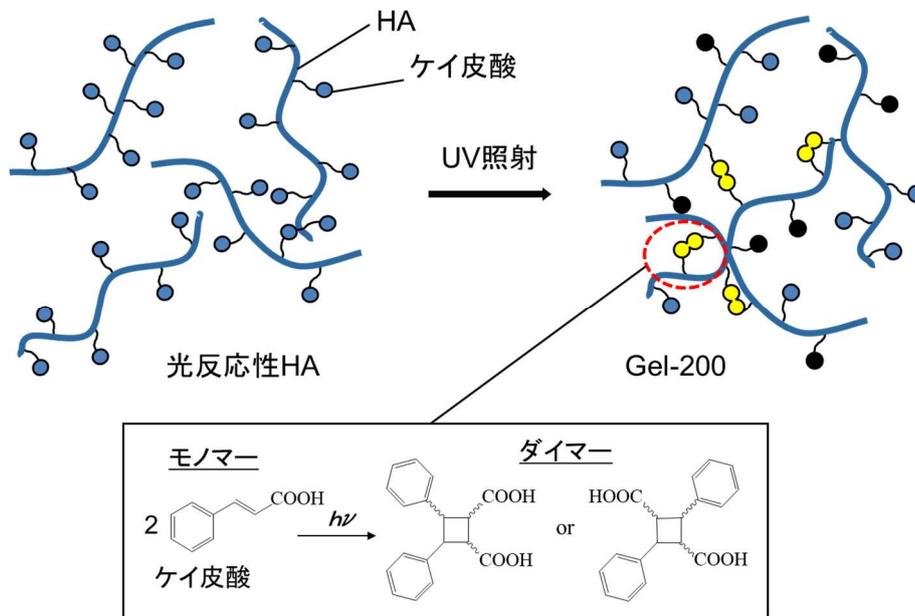
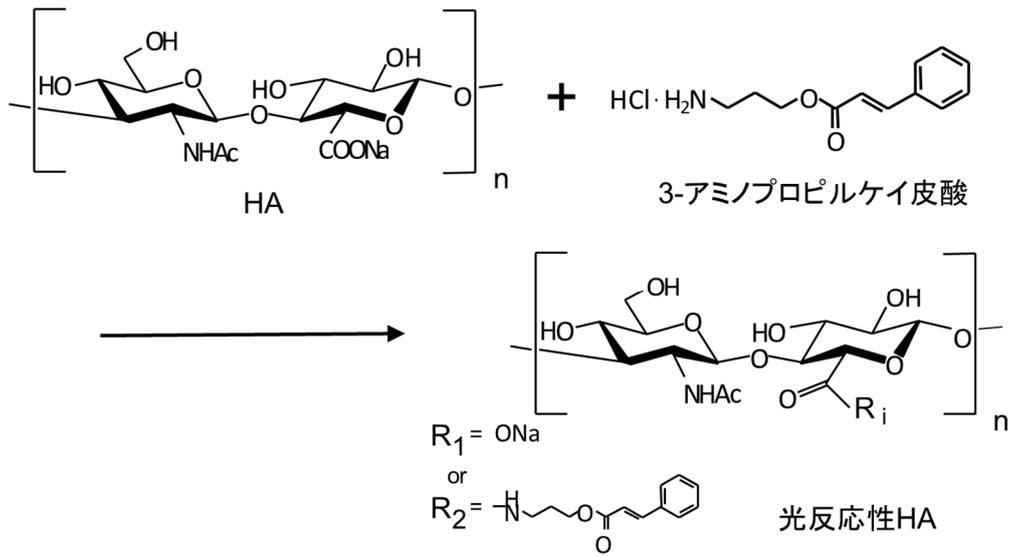


図9. Gel-200の化学構造と模式図

## 第2節 実験材料及び実験方法

### 2.2.1 実験材料

第2章の実験には下記試薬を購入し、用いた。

ケタミン（動物用ケタラール<sup>®</sup>50、50 mg/mL、三共エール薬品（株）、東京、日本）

キシラジン（セラクター<sup>®</sup>2%注射液、バイエル薬品（株）、大阪、日本）

生理食塩液（（株）大塚製薬工場、徳島、日本）

イソフルラン（フォーレン<sup>®</sup>、大日本住友製薬（株）、大阪、日本）

ポピドンヨード液（イソジン<sup>®</sup>液、Meiji Seika ファルマ（株）、東京、日本）

カルシウム C-テストワコー（富士フィルム和光純薬（株）、大阪、日本）

Pierce BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific Inc.、Waltham、MA、US）

PGE<sub>2</sub> EIA kit（Enzo Life Sciences, Inc.、New York、NY、US）

ヘパリン（ノボ・ヘパリン注 1000（5000 単位/5 mL）、持田製薬（株）、東京、日本）

インディアインク（FOUNT INDIA、Pelikan International Corporation Berhad、Selangor Darul Ehsan、Malaysia）

ブラジキニン（（株）ペプチド研究所、大阪、日本）

PGE<sub>2</sub>（Cayman Chemical、Ann Arbor、MI、US）

ファストグリーン FCF（ナカライテスク（株）、京都、日本）

プロテアーゼ K（43 units/mg protein、Sigma-Aldrich Co.、St. Louis、MO、US）

trans-ケイ皮酸（鹿特級、関東化学（株）、東京、日本）

MMP-1 Pro-Human ELISA kit（R&D Systems, Inc.、Minneapolis、MN、US）

MMP-3, total Human ELISA kit（R&D Systems, Inc.、Minneapolis、MN、US）

MMP-13 Pro-Human ELISA kit（R&D Systems, Inc.、Minneapolis、MN、US）

Cell counting kit-8（（株）同仁化学研究所、熊本、日本）

抗 CD44 抗体（IM-7、R&D Systems, Inc.、Minneapolis、MN、US）

### 2.2.2 実験方法

#### 2.2.2.1 ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルにおける Gel-200 の作用

##### 2.2.2.1.1 実験動物

16 週齢雄性日本白色種ウサギ（Healthy、オリエンタル酵母工業（株））24 匹を用いた。使用動物は全て入手時に一般状態観察を行い、異常のない動物について 5 日間以上の予備飼育を行った。予備飼育時に異常の認められなかった全例を試験に使用した。当該実験は、生化学工業株式会社動物実験倫理委員会により審査・承認された後、すべての動物は動物愛護・福祉の精神に則った適切な環境下で飼育・管理された。

##### 2.2.2.1.2 ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルの作製

導入麻酔剤として、ケタミン、キシラジン及び生理食塩液を等量混和したもの（以下、ケタミン）を用いた。全身麻酔剤として小動物用麻酔器（TK-4、（株）バイオマシナリー、

東京、日本)に充填したイソフルランの吸入麻酔(濃度 3.0%、流量 2.0 L/min)を用いた。ウサギをケタミン麻酔下(1 mL/body、静脈内)で背位固定し、左膝関節周辺を広くバリカンで剃毛した。切開部位を 70%エタノール及びポピドンヨード液で噴霧消毒した。左足膝関節外側をメスで約 2 cm 切開した後、膝蓋骨を脱臼させ関節内の前十字靭帯を切断し、可動関節とした。脱臼を整復後、4-0 ナイロン縫合糸で縫合し、手術を終了した。右側は無処置とした。

#### 2.2.2.1.3 試験物質の投与

前十字靭帯切断術後 4 週に、体重及び関節幅を指標として差分順位付け群分けソフトウェアを用いて Gel-200 及びリン酸緩衝生理食塩液(phosphate buffered saline; PBS、対照)群の 2 群に割り付けた。群分け後、ケタミン麻酔下で左後肢膝関節周囲を 70%エタノール及びポピドンヨード液で消毒し、Gel-200 あるいは PBS を左後肢膝関節内に外側から関節あたり 50  $\mu$ L/kg の容量で単回関節内投与した。Gel-200 は、製剤(1% Cross-linked Hyaluronate、3 mL)そのものを使用し、臨床で関節あたり 3 mL 投与されており、ヒトの体重を 60 kg と仮定すると 50  $\mu$ L/kg であることから、試験物質の投与量は 50  $\mu$ L/kg とした。

#### 2.2.2.1.4 剖検

剖検及び Gel-200 の評価は、既報<sup>61)</sup>で複数回投与されたヒアルロン製剤の有効性が検証されている術後 9 週に行った。

術後 9 週(試験物質投与後 5 週)において、ウサギ耳介静脈からヘパリンを添加した注射筒に採血し、血漿を調製した後、ケタミン麻酔下でウサギを放血により安楽死させた。左後肢膝関節を摘出した後、関節内を 2 mL の生理食塩液で 2 回洗浄し、関節洗浄液を回収した。次いで滑膜組織を摘出し、病理組織学的評価用に 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

#### 2.2.2.1.5 軟骨変性の肉眼評価

摘出した大腿骨及び脛骨の軟骨表面にインディアンインクを塗布し、10 秒間静置後、生理食塩液で洗浄した。インディアンインクは、軟骨の粗造化した変性部位を黒く可視化させるために用いた。軟骨の変性程度は定規を用いて計測し、下記の 7 段階のグレードに盲検下でスコア化した。その後、大腿骨は病理組織学的評価用に 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

グレード 1, 正常 (インディアンインクで染まらない)

グレード 2, 軽度の粗造化

グレード 3, 重度の粗造化

グレード 4, びらん (軟骨下骨が露出した軟骨欠損)

4a, 0 mm < びらんの長さ  $\leq$  2 mm

4b, 2 mm < びらんの長さ  $\leq$  5 mm

4c, 5 mm < びらの長さ

4d, 5 mm × 2 mm < びらの長さ×幅

#### 2.2.2.1.6 関節液量の測定

関節洗浄液及び血漿中のカルシウム濃度をカルシウム C-テストワコーを用いて操作マニュアルにしたがって測定し、回収した関節洗浄液の液量を乗じることによって関節液量を算出した。すなわち、体液（関節液及び血漿）中のカルシウム濃度は一定であるという報告<sup>68)</sup>に基づいて希釈関節液の希釈率を求め、この希釈率と関節洗浄液の液量から関節液量を算出した。

$$\text{希釈率} = \frac{\text{血漿中カルシウム濃度 (}\mu\text{g/mL)}}{\text{関節洗浄液中カルシウム濃度 (}\mu\text{g/mL)}}$$

$$\text{関節液量 (mL)} = \frac{\text{関節洗浄液量 (mL)}}{\text{希釈率}}$$

#### 2.2.2.1.7 関節洗浄液中タンパク質濃度の測定

関節洗浄液中のタンパク質濃度は、市販の Pierce BCA Protein Assay Kit を用いてキット付属の操作マニュアルにしたがって測定した。

#### 2.2.2.1.8 関節洗浄液中 PGE<sub>2</sub> 濃度の測定

関節洗浄液中の PGE<sub>2</sub> 濃度は、市販の PGE<sub>2</sub> ELISA Kit を用いてキット付属の操作マニュアルにしたがって測定した。

#### 2.2.2.1.9 病理組織学的評価

ホルマリン固定した滑膜はパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を施した。滑膜標本は、滑膜上皮細胞の立方化/重層化、上皮下の細胞浸潤、上皮下の線維化/浮腫、滑膜上皮下出血及び上皮下のカルシウム沈着を指標に炎症の程度を組織病理学的に評価した。大腿骨は、EDTA 脱灰後、サフラニン O 染色を施し、軟骨基質のサフラニン O 染色性、軟骨基質の裂隙形成、軟骨基質の細線維化、軟骨の欠損、軟骨細胞数、軟骨下骨の再構築像及び軟骨基質内の血管進入について盲検下で評価した。評価は、0 (no change)、1 (slight change)、2 (moderate change) 及び 3 (severe change) の 4 段階にスコア化した。

#### 2.2.2.2 ブラジキニン誘発ラット関節疼痛モデルにおける Gel-200 の作用

##### 2.2.2.2.1 実験動物

6~7 週齢雄性 Sprague Dawley (SD) ラット (SPF、日本チャールス・リバー (株)) 90 匹を用いた。使用動物は全て入手時に一般状態観察を行い、異常のない動物について 10

日間以上の予備飼育を行った。予備飼育時に異常の認められなかった全例を試験に使用した。当該実験は、生化学工業株式会社動物実験倫理委員会により審査・承認された後、すべての動物は動物愛護・福祉の精神に則った適切な環境下で飼育・管理された。

#### 2.2.2.2.2 試験物質の投与

全身麻酔には小動物用麻酔器に充填したイソフルランの吸入麻酔（濃度 3.0%、流量 2.0 L/min）を用いた。ラット 90 匹は、疼痛評価時点である試験物質投与後 7、14 及び 28 日の 3 時点（3 群）に割り付けた。ラットを全身麻酔下で背位固定し、左後肢膝関節周辺を広くバリカンで剃毛した後、関節周囲を 70%アルコールで噴霧消毒し、インスリン皮下投与用針付注射筒（マイジェクター<sup>®</sup>、テルモ（株））を用いて Gel-200 あるいは PBS を関節あたり 50  $\mu$ L の容量で左後肢膝関節腔内に投与した。

#### 2.2.2.2.3 ブラジキニン注入による関節疼痛の惹起

試験物質投与後 7、14 及び 28 日にブラジキニン溶液を関節内に注入することで、関節疼痛を誘発した。発痛物質であるブラジキニンは PBS で溶解し、あらかじめ疼痛を誘発する至適な濃度を定めたうえで 16  $\mu$ g/mL に調製した。発痛増強物質である PGE<sub>2</sub> は少量のエタノールに溶解した後、PBS で濃度 4  $\mu$ g/mL に調製した。それらを等量混和した後、米粒大のファストグリーン FCF を添加することで着色し（関節内に正確に注入されたことを可視的に確認するため）、ブラジキニン混合液（終濃度；ブラジキニン 8  $\mu$ g/mL、PGE<sub>2</sub> 2  $\mu$ g/mL）とした。ブラジキニン混合液は、関節あたり 50  $\mu$ L の容量で無麻酔下のラット左後肢膝関節内に注入し、関節疼痛を惹起した。

#### 2.2.2.2.4 疼痛評価

ブラジキニン混合液の注入直後から約 2 分間、ラットの歩行状態を盲検下で観察し、疼痛の程度を下記の 5 段階にスコア化した。疼痛スコア判定基準は後藤らの報告に従った<sup>65)</sup>。

疼痛スコア判定基準	
スコア	挙動
0	正常～跛行5秒以内
1	跛行 6 秒～30 秒
2	以下、どちらかの症状 跛行 31 秒以上 足上げ 5 秒以内
3	以下、どちらかの症状 足上げ、その後跛行 三足歩行 5 秒以内
4	6 秒以上の三足歩行

### 2.2.2.3 正常ウサギ膝関節における Gel-200 の滞留性評価

#### 2.2.2.3.1 実験動物

15～18 週齢雌性日本白色種ウサギ (Healthy、オリエンタル酵母工業 (株)) 30 匹を用いた。使用動物は全て入手時に一般状態観察を行い、異常のない動物について 5 日間以上の予備飼育を行った。予備飼育時に異常の認められなかった全例を試験に使用した。当該実験は、生化学工業株式会社動物実験倫理委員会により審査・承認された後、すべての動物は動物愛護・福祉の精神に則った適切な環境下で飼育・管理された。

#### 2.2.2.3.2 投与

全身麻酔には、ケタミン、キシラジン及び生理食塩液を等量混和したもの (以下、ケタミン) を用いた。ウサギをケタミン麻酔下 (1 mL/body、静脈内) で背位固定し、両後肢膝関節周辺を広くバリカンで剃毛・アルコール消毒した後、両後肢膝関節内に Gel-200 を関節あたり 50  $\mu$ L/kg の容量で関節内に投与した。

#### 2.2.2.3.3 剖検及び残存率評価

Gel-200投与後1、3、5、7、14及び28日に剖検した。ケタミン麻酔下で放血により安楽死させ、両後肢膝関節を摘出した。関節液は、2 mLの生理食塩液で2回洗浄することで関節洗浄液として回収した。各個体から採取された滑膜組織には、2 mg/mLのプロテアーゼK溶液を5 mL添加し、55°Cで40時間消化した。関節洗浄液中及び滑膜組織中におけるGel-200の残存率は、投与されたGel-200量とGel-200の架橋構造の一部であるtrans-ケイ皮酸の定量値を用いて算出した。内部標準には、2-メチルケイ皮酸を用いた。trans-ケイ皮酸は、関節洗浄液及び滑膜消化液からアルカリ条件下で抽出した後、40°Cに保温したODS (Octa Decyl Silyl) カラムを用いたHPLCにより定量した。関節洗浄液の分析には、移動相として0.01N 塩

酸及びアセトニトリルを用い、グラジエント条件は33%アセトニトリルを初期条件とし、その後、10分間かけて55%アセトニトリルとなるリニアグラジエントを設定した。滑膜消化液の分析には、移動相として0.01N 塩酸及びアセトニトリルを73 : 27 (v/v) で用いた。いずれも分析波長は280 nmとした。trans-ケイ皮酸の定量には、以下の機器で構成されるHPLCシステムを用いた。

ポンプ : DP-8020 (東ソー (株)、東京、日本)

検出器 : DP-8020 (東ソー (株)、東京、日本)

オートサンプラー : AS-8020R (東ソー (株)、東京、日本)

分析カラム : TSKgel ODS-120T (4.6 mm I.D. × 150 mm、パーティクルサイズ: 5 µm)  
(東ソー (株)、東京、日本)

#### 2.2.2.4 正常ヒト膝関節軟骨細胞を用いた MMPs 産生に対する Gel-200 の作用

正常ヒト膝関節軟骨細胞 (NHAC-Kn、Lonza Walkersville Inc.、Walkersville、MD、US) は、24 ウェルプレートに  $2 \times 10^5$  細胞/ウェルで播種し、非働化 10%ウシ胎児血清 (FBS、Sigma-Aldrich Co.、MO、US) 含有の DMEM/F-12 培地 (Life Technologies Corporation、Carlsbad、CA、US) で 5%CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。24 時間後に培養培地を除去した後、Gel-200 (終濃度 0.1~3.0 mg/mL) 調製液を 1 mL 添加し、5%CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で 30 分間培養した。その後、無刺激群を除く各ウェルにリコンビナントヒト IL-1β (rhIL-1β) を終濃度 10 ng/mL となるように 10 µL 添加し、細胞を刺激した。16 時間後に培養上清を回収し、MMP-1、-3、-13 濃度を各 ELISA キットを用いて測定した。

#### 2.2.2.5 ヒト滑膜肉腫細胞株を用いた PGE<sub>2</sub> 産生に対する Gel-200 の作用

炎症性サイトカインを発現し、炎症の応答解析のモデル系として汎用されているヒト滑膜肉腫細胞株 (SW982、American Type Culture Collection、Manassas、VA、US) を用いた<sup>69)</sup>。SW982 は 48 ウェルプレートに  $3 \times 10^4$  細胞/ウェルで播種し、非働化 10%FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有の RPMI1640 培地 (Life Technologies Corporation、Carlsbad、CA、US) で 5%CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。48 時間後、培養上清を除き、Gel-200 (終濃度 0.003~3.0 mg/mL) 及び rhIL-1β (終濃度 10 ng/mL) を含む培地を添加した。42 時間後に培養上清を回収し、PGE<sub>2</sub> 濃度を PGE<sub>2</sub> EIA kit を用いて測定した。

さらに、Gel-200 の PGE<sub>2</sub> 産生に対する作用が HA 受容体である CD44 を介していることを検証する目的で、SW982 細胞を抗 CD44 ラットモノクローナル抗体 (IM-7、終濃度 50 µg/mL) で 4 時間前処理し、3 mg/mL Gel-200 による PGE<sub>2</sub> 産生量を測定した。

#### 2.2.2.6 統計解析

統計解析は統計支援システム SAS (SAS Institute Inc.) を用いて行った。ウサギ OA モデルにおける軟骨保護作用の肉眼評価及びラット関節疼痛モデルにおける疼痛スコアは、Wilcoxon 順位和検定を用いて解析した。ウサギ OA モデルにおける関節洗浄液中のタンパ

ク質量、PGE<sub>2</sub>量及び関節液量は、Student t 検定を用いた。*in vitro* 試験の MMPs 及び PGE<sub>2</sub> 産生に対する作用は、Williams 検定を用いた。各測定値は、平均値 ± 95%信頼区間(95% CI)で示した。いずれの検定も危険率 5%未満を有意とした。

### 第3節 実験結果

#### 2.3.1 ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルに対する Gel-200 の作用

##### 2.3.1.1 軟骨変性の肉眼評価

試験物質投与後 5 週 (術後 9 週) に剖検した大腿骨の軟骨表面の代表例を示す (図 10A)。インディアンインクで黒く染色された粗造化部位は control 群と比較して Gel-200 群で小さかった。その軟骨変性程度は、D.Amiel らが当該モデルに対して HA 製剤を評価している方法<sup>70)</sup>に準じ、大腿骨、脛骨のそれぞれ内側、外側で重度の変性が見られた方のみをグレード 1~4d の 7 段階に盲検下でスコア化した [各群計 12 関節 (24 ポイント) を評価]。その結果、Gel-200 群のスコアは control 群のそれと比較して有意に低く、Gel-200 が軟骨変性の進行を抑制することが明らかとなった (図 10B)。

##### A. 大腿骨軟骨表面 (代表例)



##### B. 肉眼スコア

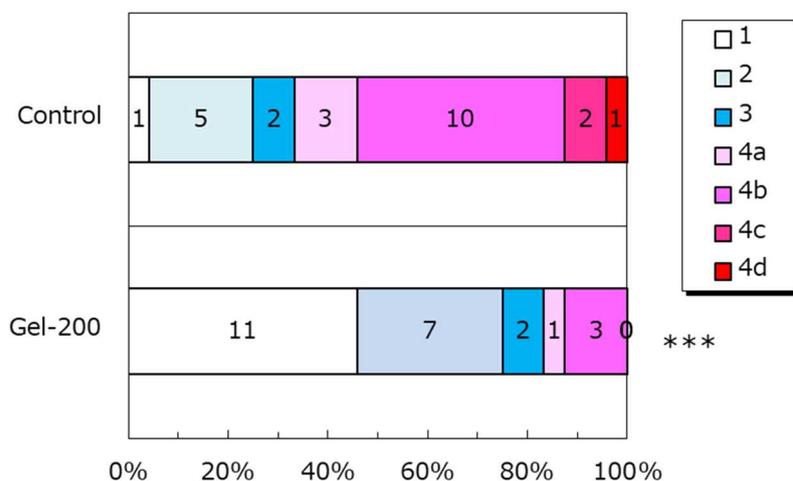


図 10. ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルにおける術後 9 週の Gel-200 の軟骨変性抑制作用

A: 術後 9 週 (試験物質投与後 5 週) における大腿骨軟骨表面の写真 (代表例)

B: 軟骨変性程度の肉眼所見によるスコア

n = 12 関節 (24 箇所) \*\*\*P < 0.0001 vs. control (Wilcoxon 順位和検定)

### 2.3.1.2 関節液量

Gel-200 群の関節液量（平均値  $\pm$  95% CI）は  $0.558 \pm 0.116$  mL であり、control 群の関節液量（ $0.901 \pm 0.122$  mL）に比べて有意に低値であった。これより、Gel-200 は PBS と比較して関節液量の増加を抑制することが明らかになった（図 11）。

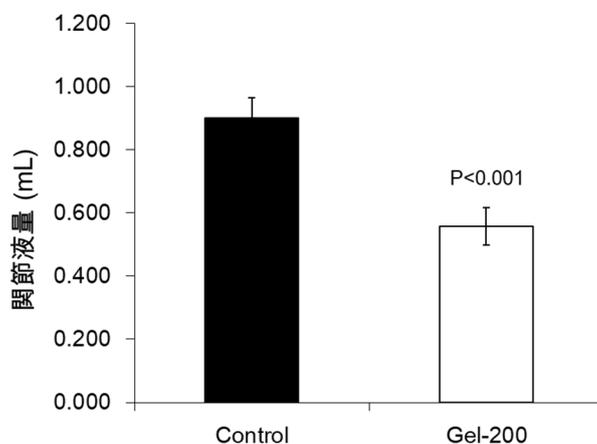


図 11. ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルにおける術後 9 週の Gel-200 の関節液量に対する作用

平均値  $\pm$  95% CI、n = 12、Student t 検定

### 2.3.1.3 関節洗浄液中のタンパク質量

control 群の関節洗浄液中タンパク質量（平均値  $\pm$  95% CI）は  $15.4 \pm 3.1$  mg であったのに対し、Gel-200 群では  $9.3 \pm 2.6$  mg であり、control 群のタンパク質量に比べて有意に低値であった。本結果より、Gel-200 は control と比較して関節液中タンパク質量の増加を抑制することが明らかになった（図 12）。

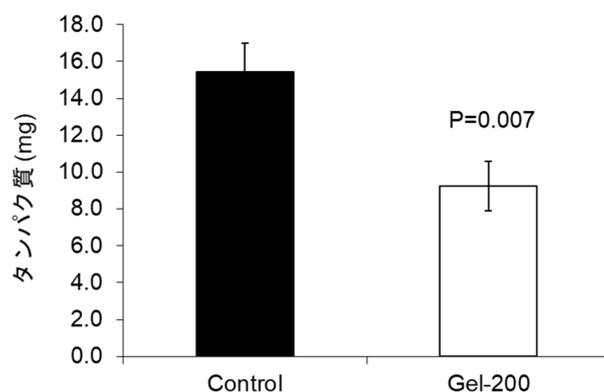


図 12. ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルにおける術後 9 週の Gel-200 の関節液中タンパク質量に対する作用

平均値  $\pm$  95% CI、n = 12、Student t 検定

#### 2.3.1.4 関節洗浄液中 PGE<sub>2</sub> 量

Gel-200 群の関節洗浄液中 PGE<sub>2</sub> 量 (平均値 ± 95% CI) は 278 ± 130 pg であり、control 群の関節洗浄液中 PGE<sub>2</sub> 量 (519 ± 138 pg) に比べて有意に低値となった。本結果より、Gel-200 は PBS と比較して関節洗浄液中 PGE<sub>2</sub> 量の増加を抑制することが明らかになった(図 13)。

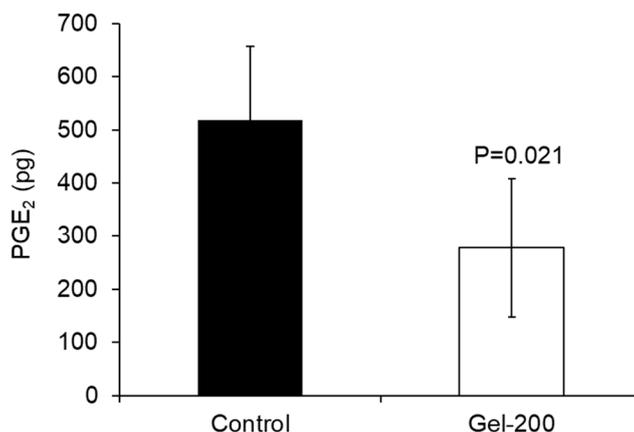


図 13. ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルにおける術後 9 週の Gel-200 の関節洗浄液中 PGE<sub>2</sub> 量に対する作用

平均値 ± 95% CI、n = 12、Student t 検定

#### 2.3.1.5 病理組織学的評価

滑膜組織は、滑膜上皮細胞の立方化／重層化、上皮下の細胞浸潤、上皮下の線維化／浮腫、滑膜上皮下出血及び上皮下のカルシウム沈着について評価した。これらの変化は control 及び Gel-200 両群において観察されたが、変化を群間で比較すると、Gel-200 群は control 群と比較していずれの変化も軽度であり、滑膜炎が軽減されていると考えられた(図 14)。

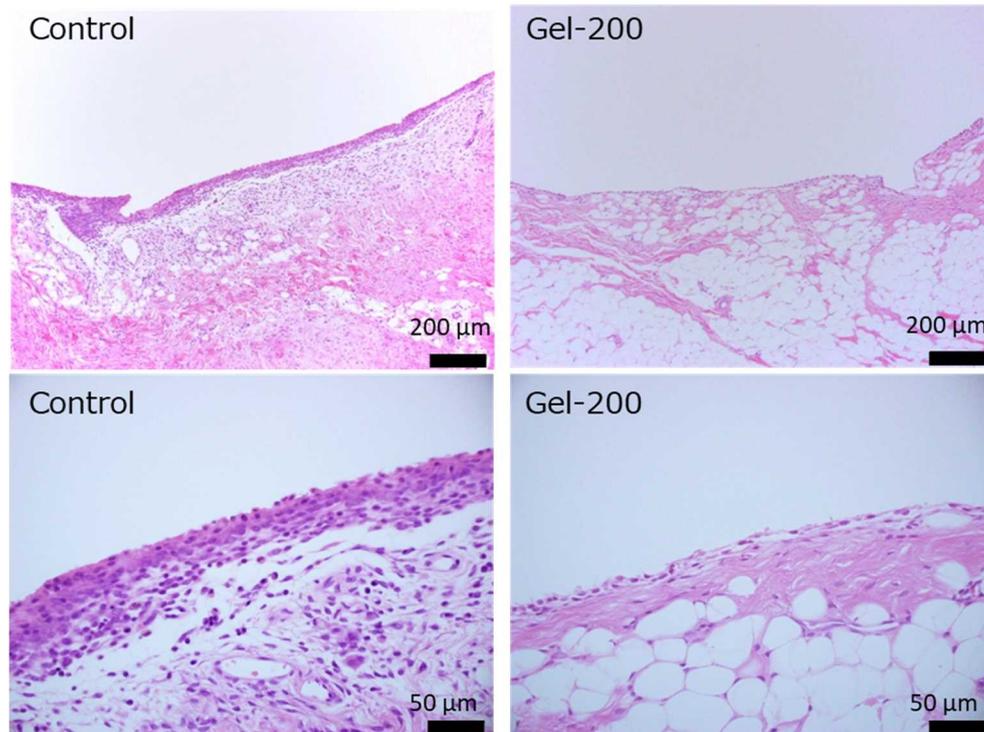


図 14. ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルにおける術後 9 週の Gel-200 の滑膜組織に対する作用

HE 染色した滑膜組織像の代表例を control 及び Gel-200 両群について示した。

大腿骨は軟骨基質のサフラニン O 染色性の低下／消失領域、軟骨基質の裂隙形成、軟骨基質の細線維化、軟骨の欠損、軟骨細胞数の減少、軟骨細胞数の増加、軟骨下骨の再構築像および軟骨基質内への血管進入について評価した。サフラニン O 染色性の低下／消失領域、軟骨基質の裂隙形成、軟骨の欠損および軟骨細胞数の減少は軟骨変性として、軟骨基質の細線維化、軟骨細胞数の増加および軟骨基質内への血管進入は軟骨変性に対する変化として観察され、軟骨下骨の再構築像は力学的負荷による軟骨変性に対する変化として観察された。これらの変化は互いに相関して観察されることが多く、例えば細線維化が観察された部位ではサフラニン O 染色性の低下と軟骨細胞の減数も観察された。これらの変化は control 及び Gel-200 群の両群において観察されたが、変化を群間で比較すると Gel-200 群は control 群と比較していずれの変化も軽度であり、軟骨変性が軽減されていると考えられた (図 15)。

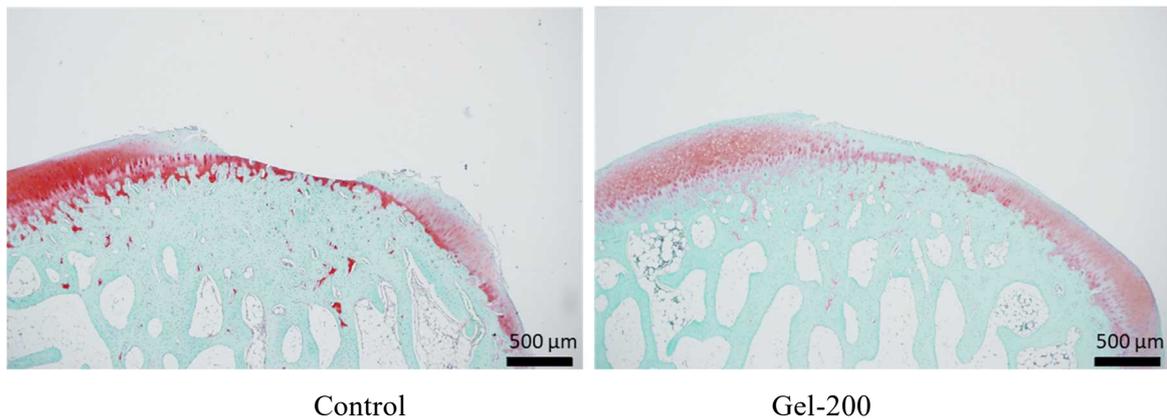


図 15. ウサギ前十字靭帯切断 OA モデルにおける術後 9 週の Gel-200 の軟骨変性抑制作用  
サフラニン O 染色した脛骨の組織像の代表例を control 及び Gel-200 両群について示した。

### 2.3.2 ブラジキニン誘発ラット関節疼痛モデルにおける Gel-200 の疼痛抑制作用

ラットの歩行状態を 5 段階に評価した疼痛スコア結果を図 16 に示す。Gel-200 群の疼痛スコアは、投与後 7、14 及び 28 日のいずれの評価時点においても control 群の疼痛スコアと比べて有意に低値であった。本結果より、Gel-200 は PBS と比較してブラジキニンによる関節疼痛を少なくとも 28 日間抑制することが明らかになった。

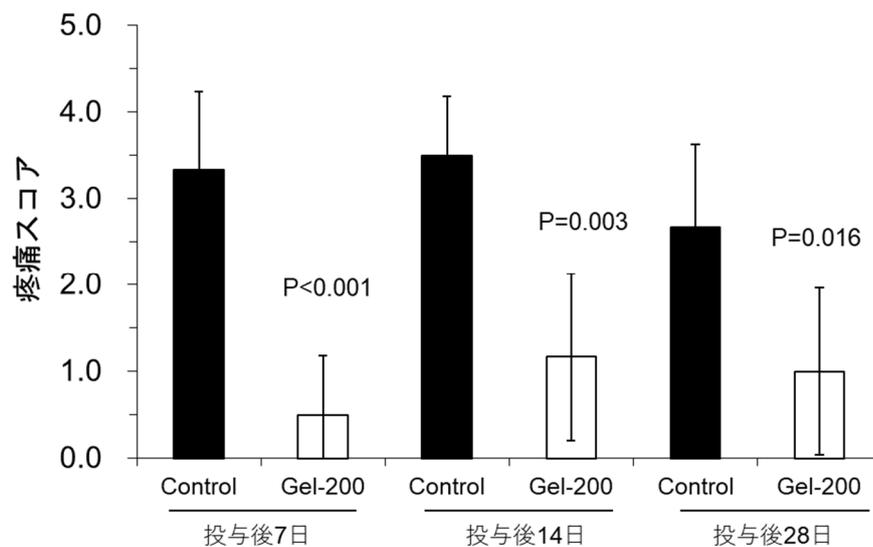


図 16. ブラジキニン誘発ラット関節疼痛モデルにおける Gel-200 の疼痛抑制作用  
平均値 ± 95% CI、n = 12、Wilcoxon 順位和検定

### 2.3.3 正常ウサギ膝関節における Gel-200 の滞留性評価

Gel-200 関節内投与後の関節液及び滑膜組織中の滞留性を評価した。

関節液中での Gel-200 の投与量に対する残留率（平均値）は、投与後 1、3、5、7、14 及び 28 日でそれぞれ 46.5、22.6、2.2、0.5、0.0 及び 0.0% であり、投与された Gel-200 の大部分はほぼ 7 日で関節内から消失した（図 17）。一方、滑膜組織中での Gel-200 の投与量に

対する残留率（平均値）は、投与後 1、3、5、7、14 及び 28 日でそれぞれ 30.0、17.2、22.1、27.0、10.2 及び 3.3%であった。

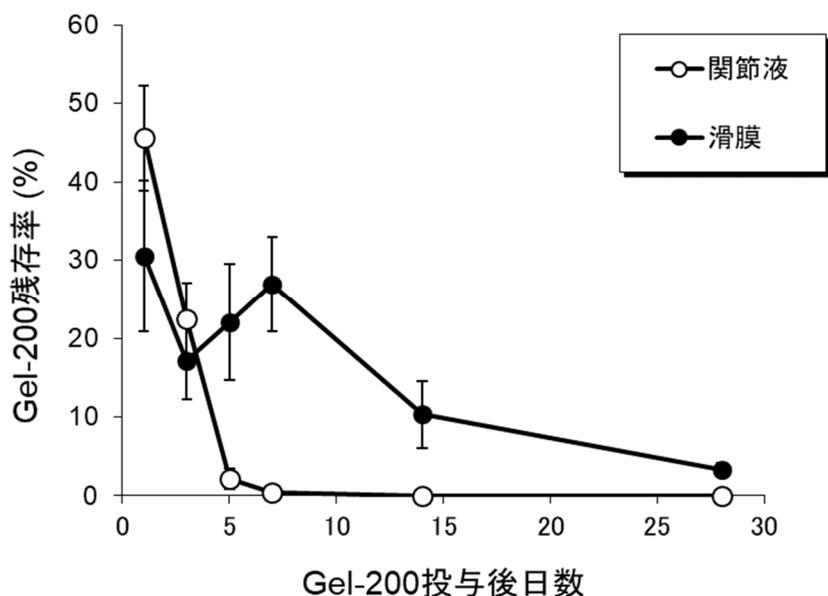


図 17. 正常ウサギ膝関節における Gel-200 の滞留性評価  
平均値 ± 95% CI、n = 10 関節

#### 2.3.4 正常ヒト膝関節軟骨細胞を用いた MMPs 産生に対する Gel-200 の作用

Gel-200 添加による正常ヒト膝関節軟骨細胞への影響を検討するために生細胞数の計測を行った結果、control 群と各 Gel-200 群の間に有意な差は認められなかった (data not shown)。

MMP-13 濃度は、control 群で 5000.0 pg/mL であったのに対して、0.1、0.3、1 及び 3 mg/mL Gel-200 群では、各々 3970.1、3133.0、1443.3 及び 1374.1 pg/mL であった。これらは、いずれも control 群に比べて有意に低値であった。本結果より、Gel-200 は 0.1~3 mg/mL の濃度で MMP-13 産生抑制作用を示すことが明らかになった (図 18A)。

MMP-3 濃度は、control 群で 217.7 ng/mL であったのに対して、0.1、0.3、1 及び 3 mg/mL Gel-200 群では、各々 182.9、154.3、68.2 及び 67.3 ng/mL であった。これらは、いずれも control 群に比べて有意に低値であった。本結果より、Gel-200 は 0.1~3 mg/mL の濃度で MMP-3 産生抑制作用を示すことが明らかになった (図 18B)。MMP-1 濃度は、control 群で 90.3 ng/mL であったのに対して、0.1、0.3、1 及び 3 mg/mL Gel-200 群では、各々 92.6、95.2、77.5 及び 45.3 ng/mL となり、3 mg/mL 投与群での値のみが control 群に比べて有意に低値であった。これより、Gel-200 は 3 mg/mL の濃度で MMP-1 産生抑制作用を示すことが明らかになった (図 18C)。

Gel-200 の MMPs 産生抑制作用は用量依存的であった。

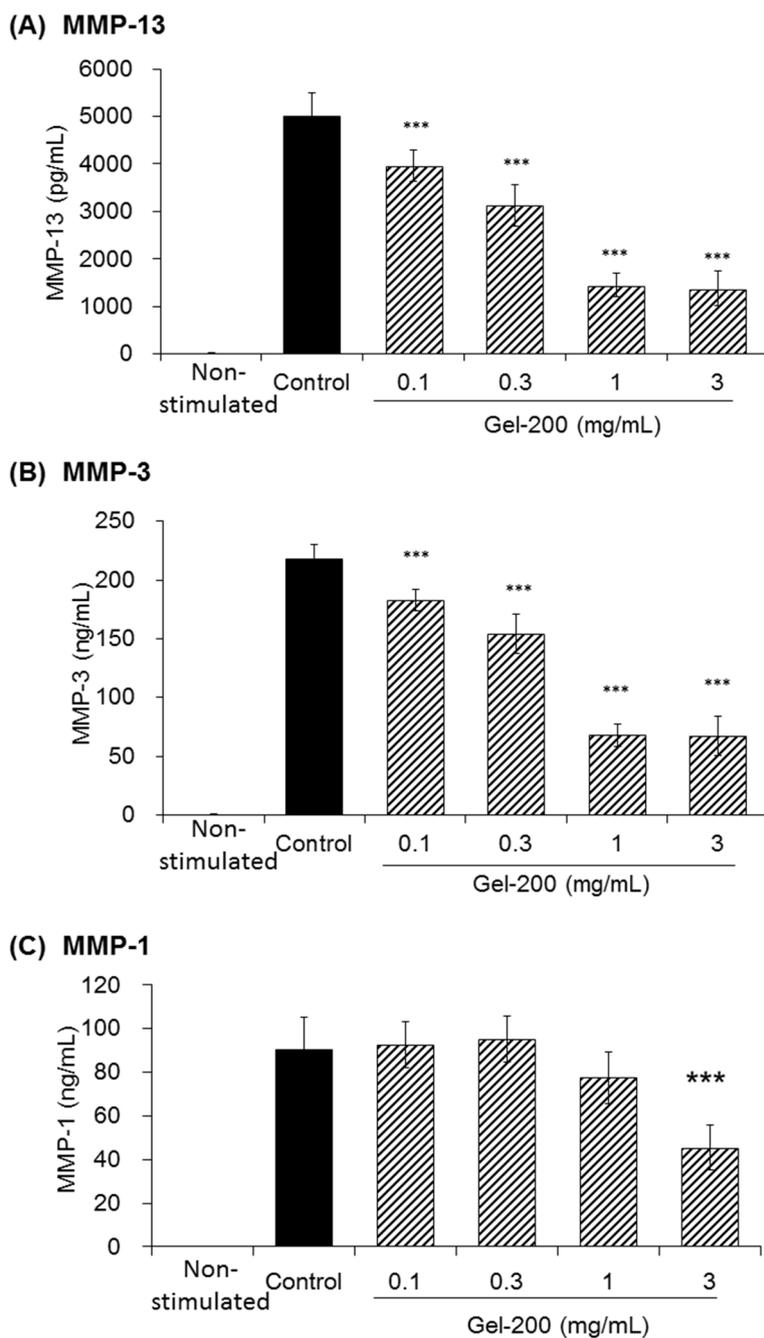


図 18. 正常ヒト膝関節軟骨細胞を用いた MMP-1, -3, -13 産生に対する Gel-200 の作用  
 平均値  $\pm$  95% CI、n = 6 ウェル (3 試験の代表例を示す)

\*\*\*P < 0.001 vs. control (Williams 検定)

### 2.3.5 ヒト滑膜細胞を用いた PGE<sub>2</sub> 産生に対する Gel-200 の作用

Cell counting kit-8 を用いて投与 42 時間後の細胞数を相対評価した結果、control 群と各 Gel-200 群との間に差がみられず、Gel-200 の細胞増殖への影響は認められなかった (data not shown)。

培養上清中 PGE<sub>2</sub> 濃度 (平均値  $\pm$  95% CI) を図 19 に示した。control 群が  $145.6 \pm 10.1$ 、

0.003 mg/mL Gel-200 群が  $151.0 \pm 12.7$ 、0.03 mg/mL Gel-200 群が  $118.8 \pm 4.9$ 、0.3 mg/mL Gel-200 群が  $80.2 \pm 3.8$ 、3 mg/mL Gel-200 群が  $73.9 \pm 7.3$  pg/mL であった。0.03、0.3 及び 3 mg/mL の Gel-200 投与群での PGE<sub>2</sub>濃度は control 群のそれと比較して有意に低値となり、Gel-200 がヒト滑膜細胞の PGE<sub>2</sub> 産生を抑制することが明らかになった。また、Gel-200 の PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用に用量依存性が認められた (図 19A)。

抗 CD44 抗体 (IM-7、終濃度 50 µg/mL) で前処理した滑膜細胞に対する Gel-200 (終濃度 3 mg/mL) の PGE<sub>2</sub> 産生に対する作用を検討した結果、抗 CD44 抗体の添加により Gel-200 の PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用が一部阻害されることが明らかになった (図 19B)。

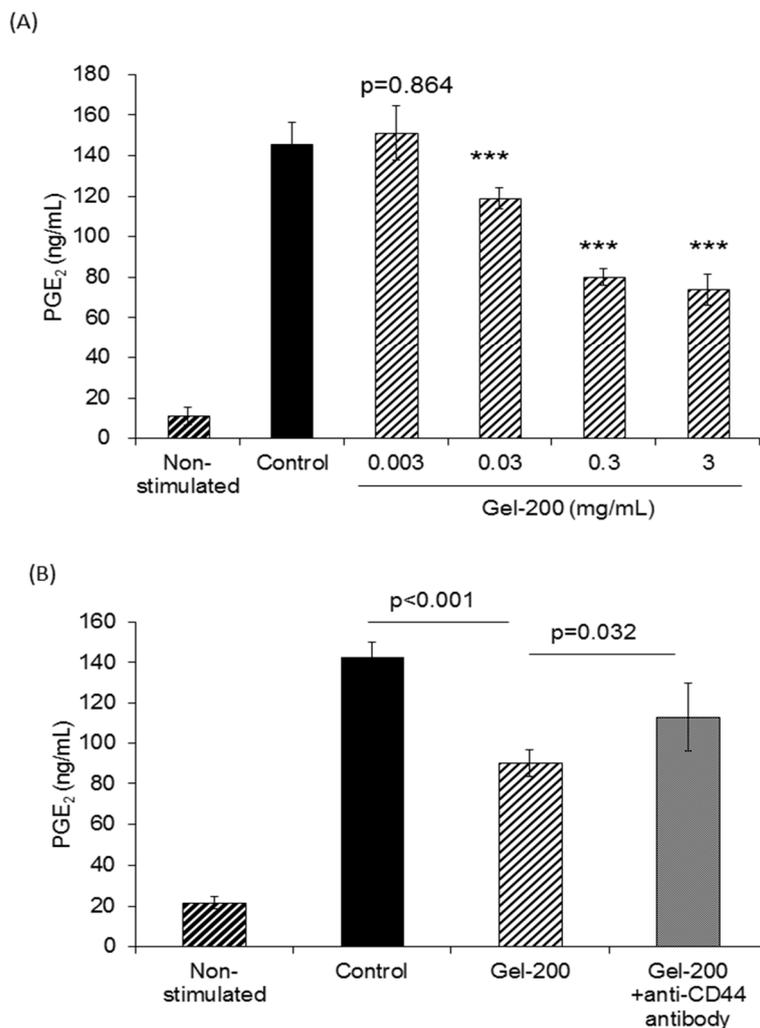


図 19. ヒト滑膜細胞を用いた PGE<sub>2</sub> 産生に対する Gel-200 の作用  
 平均値 ± 95% CI、n = 6 ウェル (3 試験の代表例を示す)  
 \*\*\*P < 0.001 vs. control (Williams 検定)

## 第4節 考察

本研究では、光架橋技術によって調製した架橋 HA (Gel-200) の薬理学的特徴を明らかにすることを目的に、各種動物を用いた OA モデル及び関節疼痛モデルにおける単回膝関節内投与された Gel-200 の滑膜炎、軟骨破壊及び関節疼痛に対する薬理作用を評価した。また、各種細胞を用いた *in vitro* 試験によりそれらの作用に対するメカニズム解析を行った。

本研究で用いたウサギ前十字靭帯切断 OA モデルは、膝関節内部の前十字靭帯を切断することで動揺関節を作製し、徐々に軟骨破壊を起こさせるモデルであり、この点において軟骨破壊が経時的に進行するヒト OA に類似する<sup>60)</sup>。これまでに当該モデルにおいて週1回の頻度で3週連続投与された架橋 HA<sup>62, 71)</sup>あるいは5週連続投与された天然の HA<sup>61, 62)</sup>は軟骨変性を軽減し、OA の進行抑制に有用であることが報告されている。その作用機序として、投与された HA によるクッションあるいは潤滑剤としての機能<sup>72)</sup>、一酸化窒素 (NO) 産生抑制<sup>73)</sup>及び MMPs 産生抑制<sup>74)</sup>の関与などが示唆されている。本研究は、単回投与型 HA 誘導体の軟骨変性抑制作用を検証した初めての報告である。今回、当該 OA モデルに対する Gel-200 単回投与の作用を軟骨変性の肉眼及び病理組織学的評価、滑膜炎の指標として関節液量、関節液中のタンパク質量、PGE<sub>2</sub> 量及び病理組織学的所見から多面的に評価した。その結果、Gel-200 は PBS と比較して軟骨変性を有意に軽減した。これは架橋された Gel-200 が持つ高い粘弾性や関節内で長期間残留することによる持続的な潤滑作用及び力学的ストレスを軽減する保護効果のほか、HA が有する MMPs 産生抑制作用などの生理作用が関与しているものと推察された。MMPs は、OA 患者の軟骨及び滑膜細胞に高発現し、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考えられている<sup>75-78)</sup>。今回、正常ヒト軟骨細胞培養系を用いて、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  刺激により誘発される MMPs 産生に対する Gel-200 の作用を検証した結果、Gel-200 は、濃度依存的に MMP-1、-3 及び-13 の産生を抑制した。Gel-200 の MMP-1 産生抑制を示す最小有効濃度は 3 mg/mL と MMP-3 及び-13 の有効濃度 (100  $\mu$ g/mL) と比較して高値であった。HA はその受容体である CD44 を介して p38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (p38 mitogen-activated protein kinase; p38MAPK) のリン酸化を阻害することで抗炎症作用を発揮するとされるが、MMP-1 産生への p38MAPK の関与は小さいとされている<sup>79, 80)</sup>。これらのことから、Gel-200 の上記軟骨変性抑制作用は、MMPs 産生抑制作用を介したものであることが示唆された。さらに、Gel-200 は関節液の貯留及びタンパク質量の増加を軽減する作用を示したことから滑膜炎を抑制したと考えられた。滑膜炎が軽度の個体は軟骨の変化も軽度であったことから、これら変化は相互に作用することで病態進行を抑制していると考えられた。病理組織学的所見からもそれらを支持する結果が得られた。すなわち、Gel-200 を投与されたウサギは軟骨基質中の GAG 及び生存軟骨細胞の数が比較的保持されており、変性変化が軽度であった。一方、滑膜については、Gel-200 は滑膜上皮細胞の立方化/重層化、上皮下の細胞浸潤、線維化/浮腫、出血を軽減させており、滑膜炎を改善することで血液成分の関節腔内への流入を抑制したことが推察された。これらのことから、Gel-200 はこれまでに報告されている複数回投与された天然の HA と同

様の作用を単回投与で発揮し、OA に対する滑膜炎及び軟骨破壊の軽減を示すと考えられた。

ブラジキニン誘発ラット関節疼痛モデルにおいて、Gel-200 の単回膝関節内投与は、少なくとも投与後 28 日間の持続的な疼痛抑制作用を示すことを明らかにした。当該モデルにおける HA の疼痛抑制メカニズムは明確ではないが、同モデルにおいて天然の HA が投与後 72 時間まで疼痛反応を抑制することが報告されており、その作用は滑膜組織中の HA 濃度に関連するとされている<sup>65, 66</sup>。Gel-200 単回関節内投与後の関節局所（関節液及び滑膜組織中）における滞留性を検証したところ、投与後 28 日においても滑膜組織中に投与された Gel-200 が滞留することが確認された。投与後 28 日の Gel-200 の残存率は 3.3%と低値であったが、これは重量にして 50 µg に相当し、滑膜組織の重量を 1 g とすると、50 µg/mL 程度の濃度が見込める。このため、薬理作用発揮に必要な Gel-200 が残存したと考察され<sup>81-83</sup>、長期持続効果を裏付ける結果が得られたものと考えられた。また、ヒト滑膜肉腫細胞株を用いて、IL-1β 刺激により誘発される PGE<sub>2</sub> 産生に対する Gel-200 の作用を評価した結果、濃度依存的に PGE<sub>2</sub> 産生を抑制した。このことは、Gel-200 の消炎鎮痛作用の作用機序として、PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用が関与することを示唆している。実際、HA による PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用は、ヒト滑膜細胞を用いた *in vitro* 試験<sup>84</sup>あるいは関節リウマチ患者を対照とした臨床試験においても報告されている<sup>85</sup>。さらに今回、HA 受容体である CD44 の抗 CD44 抗体の添加において Gel-200 の PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用が減弱したことから、Gel-200 の上記作用は物理化学的な粘弾性によるものではなく CD44 を介した生物学的作用であると考えられた。

一方、我々はこれまでに Gel-200 と異なる架橋構造を持つ SYNVISIC®の生体適合性を比較したところ、SYNVISIC®投与後にみられる滑膜組織における肉芽腫性炎症が Gel-200 投与後ではみられないことを報告している<sup>42</sup>。また、OA 患者を対象とした多施設共同、二重盲検、無作為化、プラセボ対照試験において Gel-200 単回関節内投与後 13 週間の有効性が報告されている<sup>86</sup>。

これらのことから、光架橋技術によって調製された Gel-200 は、HA が高分子化されたことにより関節局所での滞留性及び粘弾性が向上し、OA 患者に対して物理化学的及び生物学的に軟骨保護及び消炎鎮痛作用を発揮する安全性の高い新たな単回投与持続型 OA 治療剤となりうると考えられた。

### 第3章 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) 徐放型ヒアルロン酸誘導体の評価

#### 第1節 序論

変形性関節症 (OA) では、運動療法、物理療法、薬物療法などの保存的治療が主なアプローチとなり、薬物療法では、経口剤や外用剤としてアセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) が、また関節内注射剤としてヒアルロン酸製剤 (HA) や副腎皮質ステロイド製剤が用いられる。一方、保存療法で症状の改善が得られない、関節破壊が進展した患者では、手術療法が考慮される。

薬物療法のうち、経口剤及び外用剤では、NSAID の使用頻度が最も高い。NSAID は OA の症状改善に有効とされるが、経口剤の場合、長期間の使用により上部消化管障害が増加するとの報告がある<sup>87)</sup>。1990年代、この上部消化管障害を軽減する目的で多くのシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 選択的阻害剤が開発されたが、心血管系の副作用の懸念から、2005年までに相次いで市場からの回収或いは開発中止となった<sup>88)</sup>。ジクロフェナクナトリウム (DF-Na) を含む経口 NSAID もまた、COX-2 選択的阻害剤と同様の懸念が持たれるとの報告がある<sup>89)</sup>。関節注射剤では、代表的なものに副腎皮質ステロイド製剤や HA 製剤があり、膝 OA の保存療法のなかでいずれも重要な位置づけにある。副腎皮質ステロイド製剤は強い抗炎症作用を有し、中等度から重度の膝 OA 患者に対して膝関節内に投与される。しかし、これを反復投与することについては、望まれる治療効果とは逆に軟骨のプロテオグリカン合成抑制、化膿性関節炎など関節破壊が進展する懸念が持たれることから、1年間に4回以上繰り返して投与を行うことは推奨されていない<sup>90)</sup>。一方、関節内ヒアルロン酸 (HA) 製剤は、作用メカニズムは十分に解明されていないものの、多くの報告から抗炎症作用、鎮痛作用及び関節軟骨の保護作用を有することが示唆されている<sup>91)</sup>。また、その粘弾性により、関節の潤滑剤や衝撃吸収剤としての機能も果たす。これらの多面的な作用により、関節内 HA 注射剤は膝 OA 患者に対して長期間の疼痛緩和効果を示す<sup>92)</sup>。但しその効果は、NSAID 経口剤や関節腔内ステロイド製剤と比較して穏やかとされる。

本研究では上記 OA 薬物療法の課題を解決するため、NSAID の一つである DF-Na を HA に共有結合により化学的に結合させ、投与局所である関節組織において持続的にジクロフェナク (DF) を遊離させることにより、OA に対して HA と比較して即効的かつ持続的な消炎鎮痛作用を発揮すること及び安全性においても NSAID で見られる全身性の副作用を軽減することが期待できると考え、第3世代の関節内注射剤として DF 結合ヒアルロン酸ナトリウム (SI-613、図20) の創製を着想した。SI-613 は、発酵法により調製された高分子量 HA (重量平均分子量; 60万~120万) の構成糖のひとつであるグルクロン酸残基に2-アミノエタノールをリンカーとして DF を共有結合させることで調製した [DF 含量 11.8% (w/w)]。すなわち、SI-613 は関節注射 HA 製剤と NSAID の双方の利点を併せ持つ薬剤になり得ると考え、SI-613 の特性を薬理的及び薬物動態学的に検討した。

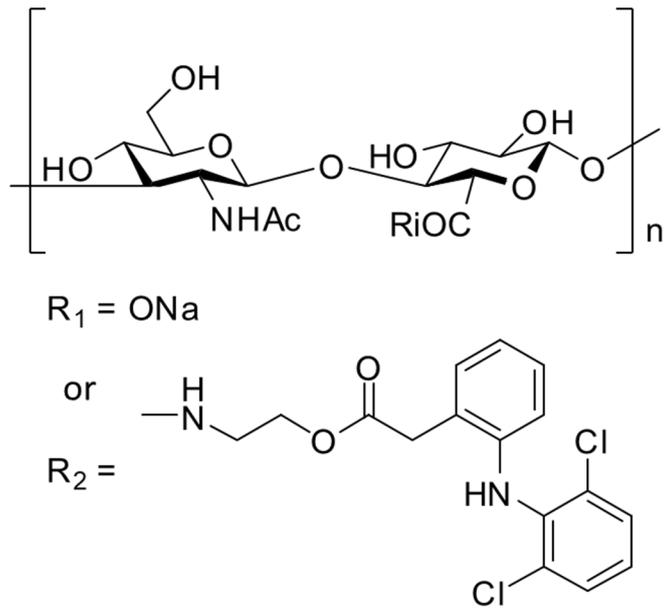


図 20. SI-613 (*N*-[2-[[2-[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetyl]oxy]ethyl]hyaluronamide、  
 一般名 diclofenac etalhyaluronate) の化学構造式

## 第2節 実験材料及び実験方法

### 3.2.1 実験材料

第3章の実験には下記試薬を購入し、用いた。SI-613は、生化学工業(株)(東京、日本)において調製された。

ジエチルエーテル(富士フィルム和光純薬(株)、大阪、日本)

イソフルラン吸入麻酔液(ファイザー(株)、東京、日本)

ヒアルロン酸ナトリウム(生化学工業(株)、東京、日本)

ジクロフェナクナトリウム(富士フィルム和光純薬(株)、大阪、日本)

インドメタシンナトリウム(インダシン®静注用1mg、MSD(株)、東京、日本)

日本薬局方 生理食塩液((株)大塚製薬工場、徳島、日本)

High Sensitivity PGE<sub>2</sub> Correlate-EIA kit (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, US)

卵白アルブミン(OVA、Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, US)

Freund's complete adjuvant (FCA、CAPPEL Laboratories Inc., Cochranville, PA, US)

### 3.2.2 実験動物

5週齢雄性SDラット(SPF、日本チャールス・リバー(株)、東京、日本) 136匹、及び12~15週齢雄性ニュージーランド白色種ウサギ(SPF、オリエンタル酵母工業(株)) 72匹を用いた。使用動物は全て入手時に一般状態観察を行い、異常のない動物について7日間の予備飼育を行った。予備飼育時に異常の認められなかった全例を試験に使用した。当該実験は、生化学工業株式会社動物実験倫理委員会により審査・承認された後、すべての動物は動物愛護・福祉の精神に則った適切な環境下で飼育・管理された。

### 3.2.3 実験方法

#### 3.2.3.1 硝酸銀誘発ラット関節炎モデルの作製

SI-613の疼痛抑制作用評価には、各種NSAIDsの疼痛抑制作用評価に用いられている硝酸銀誘発ラット関節炎モデルを用いた。

起炎剤には0.1 mol/L硝酸銀溶液を注射用水で1% (w/v)濃度に調製し、0.22 µmフィルター(Millex-GV、PVDF、33 mm、メルクミリポア(株))でろ過したものを用いた。導入麻酔にはジエチルエーテルを用い、全身麻酔には小動物用麻酔器に充填したイソフルラン吸入麻酔液(濃度3.0%、流量2.0 L/min)を用いた。ラットを全身麻酔下で背位固定し、左後肢膝関節周辺を広くバリカンで剃毛した。膝関節を70%アルコールで噴霧消毒し、インスリン皮下投与用針付注射筒を用いて1%硝酸銀溶液を関節あたり0.05 mLの容量でラットの左後肢膝関節内に注入し、硝酸銀惹起関節疼痛モデルを作製した。正常群は無処置とした。硝酸銀注入後、翌日に疼痛スコア及び炎症足への荷重負荷率を指標として、差分順位付け群分けソフトウェア((有)ヒューマンライフ)を用いて各試験群に割り付けた。

#### 3.2.3.2 硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおけるSI-613の疼痛抑制作用(用量反応性)

SI-613 の用量反応性を検証することを目的に行った。SI-613 [DF 含量; 11.8% (w/w)] は、硝酸銀溶液注入後翌日の群分け直後に各試験物質を投与した。正常群にはリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) を同様に投与した。導入麻酔にはジエチルエーテルを用い、全身麻酔には小動物用麻酔器に充填したイソフルランの吸入麻酔を用いた。ラットを全身麻酔下で背位固定し、左後肢膝関節周囲を 70% アルコールで噴霧消毒し、インスリン皮下投与用針付注射筒を用いて各試験物質を関節あたり 0.05、0.15、0.5 mg/50  $\mu$ L (DF 当量で 5.9、17.7、及び 59  $\mu$ g) の用量で左後肢膝関節内に単回投与した。対照には PBS を投与した。

群分け日及び試験物質の投与翌日から 1 日 1 回 3 日間、ラットの歩行状態を観察し、疼痛の程度を盲検下で下記の 4 段階にスコア化した。

<疼痛スコア評価基準>

- 0 : 正常
- 1 : 軽度の跛行
- 2 : 重度の跛行
- 3 : 三足歩行

群分け日及び試験物質の投与翌日から 1 日 1 回 3 日間、ラットの歩行時に炎症足 (左後肢) にかかる荷重を疼痛測定装置 ((株) トッケン、千葉、日本) を用いて測定した。具体的には、ラットが歩行時に炎症足を疼痛測定装置の荷重測定部 2 箇所のいずれかに置いた状態における測定値 (g) を小数点以下 1 桁まで読みとった。この操作を 4 回繰り返して、平均値を算出した。その平均値及び当日の体重を用いて、下記の計算式より荷重負荷率 (%) を算出した。投与後 3 日の測定終了まで盲検下で実施した。キーオープンは全ての測定終了後、統計解析前に行った。

$$\text{荷重負荷率 (\%)} = \frac{\text{炎症足荷重平均値 (g)}}{\text{体重 (g)}} \times 100 (\%)$$

### 3.2.3.3 硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおける SI-613 の疼痛抑制作用

SI-613 の疼痛抑制作用を構成成分のそれと比較することを目的に行った。SI-613 を関節あたり 0.5 mg (DF 当量で 59  $\mu$ g)、または HA を 0.5 mg、または DF-Na (59  $\mu$ g) と HA (0.5 mg) の混合物 (以下、DFNa+HA)、または PBS を 3.2.3.2 と同様の方法で関節内に単回投与した。混合物の DF-Na 及び HA 量は、SI-613 に含まれる用量と同じとした。また、DF-Na 水溶液 (1 mg/mL) は 2 mg/kg (約 0.3 mg/body) の用量で 1 日 1 回 3 日間経口投与した。DF-Na の経口投与量は臨床で変形性関節症及び関節リウマチ患者へ処方される 1 日最大量を 100 mg とした場合、ヒト 50 kg 成人への投与量は 2 mg/kg となる。従って、2 mg/kg に設定した。疼痛評価は 3.2.3.2 と同様に行った。

### 3.2.3.4 抗原誘発ウサギ関節炎モデルに対する SI-613 の抗炎症作用

卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) 誘発ウサギ関節炎モデルを用いて、SI-613 のプロス

タグランジン (PG) E<sub>2</sub> 産生抑制作用を経口投与 DF-Na、あるいは SI-613 の構成成分である HA 及び DF-Na と比較した。全身麻酔には混合麻酔液 [セラクター (キシラジン 3.3 mg/kg) : ベトルファール (酒石酸ブトルファノール 0.4 mg/kg) : ドルミカム (ミダゾラム 0.4 mg/kg) : 生理食塩液 = 2:1:1:2] 2 mL の静脈内注射を用いた。OVA と FCA の油中水型エマルジョンを作製し、80 匹のウサギの背部皮内に 5 mg/動物の用量で 13~14 日の間隔で 2 回皮内注射し、感作した。初回感作後 23 日に、1% OVA 溶液を関節あたり 500 µL の容量で左後肢膝関節に注入し、関節炎を誘発した。関節炎誘発後 2 日に、SI-613 を関節あたり 5 mg、DF-Na (0.59 mg) と HA (5 mg) の混合物、あるいは PBS (対照) を 500 µL の容量で関節内に単回投与した。DF-Na は、2 mg/kg の用量で経口投与した。投与後 3 時間あるいは 72 時間にウサギを安楽死させ、膝関節から関節液をインドメタシン添加 (20 µg/mL) 生理食塩液で洗浄することで回収した。関節洗浄液中の PGE<sub>2</sub> 濃度は、High Sensitivity Prostaglandin E<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay Kit を用いて測定した。

### 3.2.3.5 抗原誘発ウサギ関節炎モデルに対する SI-613 の抗炎症作用 (持続性評価)

3.2.3.4 と同様に抗原誘発ウサギ関節炎モデル 60 匹を作製した。関節炎誘発後 2 日に、ウサギの膝関節幅をデジタルシックネスゲージ ((株) テクロック、長野、日本) を用いて測定した。関節腫脹は、炎症足 (左) の関節幅から非炎症足 (右) のそれを減算することで算出した。関節腫脹が 7.3 mm 未満の 15 匹と 10.4 mm 以上の 5 匹は除外し、残る 40 匹を関節腫脹と体重を指標に 20 匹の 2 群に割り付け、SI-613 を関節あたり 5 mg あるいは PBS を 500 µL の容量で関節内に単回投与した。膝関節腫脹は、試験物質の投与前 (day 0)、投与後 1、3、7、14、21、28、35 及び 42 日に測定した。

### 3.2.3.6 SI-613 単回膝関節内投与後の関節組織中及び血漿中 DF 濃度

3.2.3.4 と同様に抗原誘発ウサギ関節炎モデル 12 匹を作製した。関節炎誘発後 2 日に、SI-613 を関節あたり 5 mg、または DF-Na+HA (関節あたり 0.59 mg の DF-Na 及び 5 mg の HA)、または PBS (対照) を 500 µL の容量で関節内に投与した。DF-Na は、2 mg/kg の用量で経口投与した。試験物質投与後 3 時間あるいは 72 時間の滑膜組織中及び関節洗浄液中の SI-613 から遊離した DF 濃度は、高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) で測定した。さらに、試験物質投与後の DF の全身曝露量を比較するために、血漿中 DF 濃度を測定した。滑膜組織は、40 倍量 (1 g に対して 40 mL) の 10 mM ギ酸アンモニウム (pH 6.0) /メタノール (3:2、v/v) 溶液を添加した後、氷冷下でホモジナイズした。その後、ホモジネート中の遊離 DF は、tert-ブチルメチルエーテル/1%酢酸 (6:1、v/v) 溶液で抽出した。関節洗浄液及び血漿中の遊離 DF は、Oasis HLB cartridge (30 mg/1 cm<sup>3</sup>、Waters Corporation、Milford、MA、US) に吸着させ、メタノールで溶出した。内部標準には重水素標識 DF を用いた。得られた抽出液または溶出液は、40°C に保温した CAPCELL PAK C18 MG HPLC カラム (カラムサイズ: 4.6 mm × 35 mm、パーティクルサイズ: 5 µm、(株) 資生堂、東京、日本) に注入し、移動相に 10 mM ギ酸アンモニウム (pH 6.0) /メタノール (2:3、v/v) を用いて、流速 0.5 mL/分

で分離した。分子量計測に、QTRAP® 5500 システム (AB SCIEX、Framingham、MA、US) を用いた。DF は、 $m/z$  249.1 及び  $m/z$  250.0 (CE: -15V) で検出した。検量線 ( $r > 0.999$ ) は、滑膜組織で 5~1000 ng/g、関節洗浄液及び血漿で 1~200 ng/mL で作成した。各組織からの DF の抽出効率は、滑膜組織で 84.2~92.9%、関節洗浄液で 95.2~100.3%、血漿中で 94.2~96.5%であった。

### 3.2.3.7 SI-613 単回膝関節内投与後の関節組織中 DF 濃度 (長期試験)

3.2.3.4 と同様に抗原誘発ウサギ関節炎モデル 24 匹を作製した。関節炎誘発後 2 日に、SI-613 を関節あたり 5 mg、あるいは PBS を 500  $\mu$ L の容量で関節内に投与した。試験物質投与後 1、3、7、14、21、28、35 及び 42 日後の関節洗浄液及び滑膜組織中の DF 濃度は 3.2.3.6 と同様に LC-MS/MS で測定した。

### 3.2.3.8 統計解析

統計解析は統計支援システム SAS (SAS Institute Inc.) を用いて行った。ラットにおける疼痛抑制作用は、Williams 検定及び Tukey 検定を用いて解析した。関節液中の PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用は、Student t 検定、Welch t 検定及び Tukey 検定を用いて解析した。抗炎症作用の持続性評価は Holm 補正した Student t 検定を用いた。いずれも危険率 5%未満を有意とした。疼痛抑制作用及び抗炎症作用結果は平均値  $\pm$  95%信頼区間 (95% CI) で、DF 濃度測定値は平均値  $\pm$  標準偏差で表記した。

### 第3節 試験結果

#### 3.3.1 硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおける SI-613 の疼痛抑制作用（用量反応性）

SI-613 は、関節あたり 0.05、0.15 及び 0.5 mg の用量で有意に疼痛スコアを改善した（図 21A 及び 21C）。また、SI-613 は、関節あたり 0.15 及び 0.5 mg の用量で炎症足への荷重負荷率を有意に上昇させた（図 21B 及び 21D）。それらの作用は用量依存的であった。

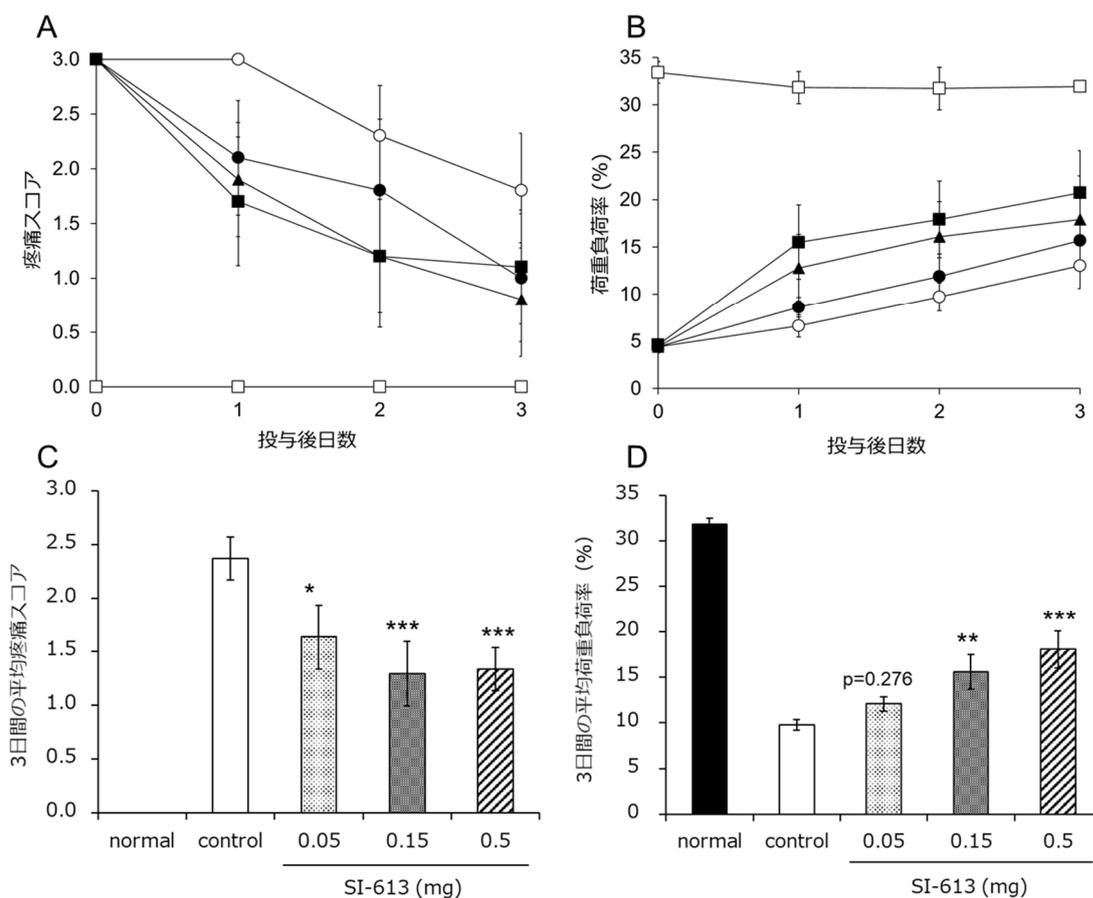


図 21. 硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおける SI-613 の疼痛抑制作用（用量反応性）

平均値 ± 95% CI (n = 9、正常のみ n = 3)

○; 対照、●; 0.05 mg SI-613、▲; 0.15 mg SI-613、■; 0.5 mg SI-613、□; 正常

\*P < 0.05、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.005 vs. control (Williams 検定)

#### 3.3.2 硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおける SI-613 の疼痛抑制作用

SI-613 の疼痛抑制作用を単回関節内投与された HA 及び DF-Na+HA、あるいは反復経口投与された DF-Na の作用と比較した結果、SI-613 はそれらと比較して有意に疼痛スコアを改善するとともに、荷重負荷率を上昇させた（図 22）。試験物質投与後 1 日では、DFNa+HA 群の疼痛スコアは対照と比較してわずかに改善したが、2 日後以降にはみられなかった。したがって、SI-613 の単回関節内投与は構成成分である HA、DF-Na+HA と比較して、強

く持続的であることが明らかとなった。

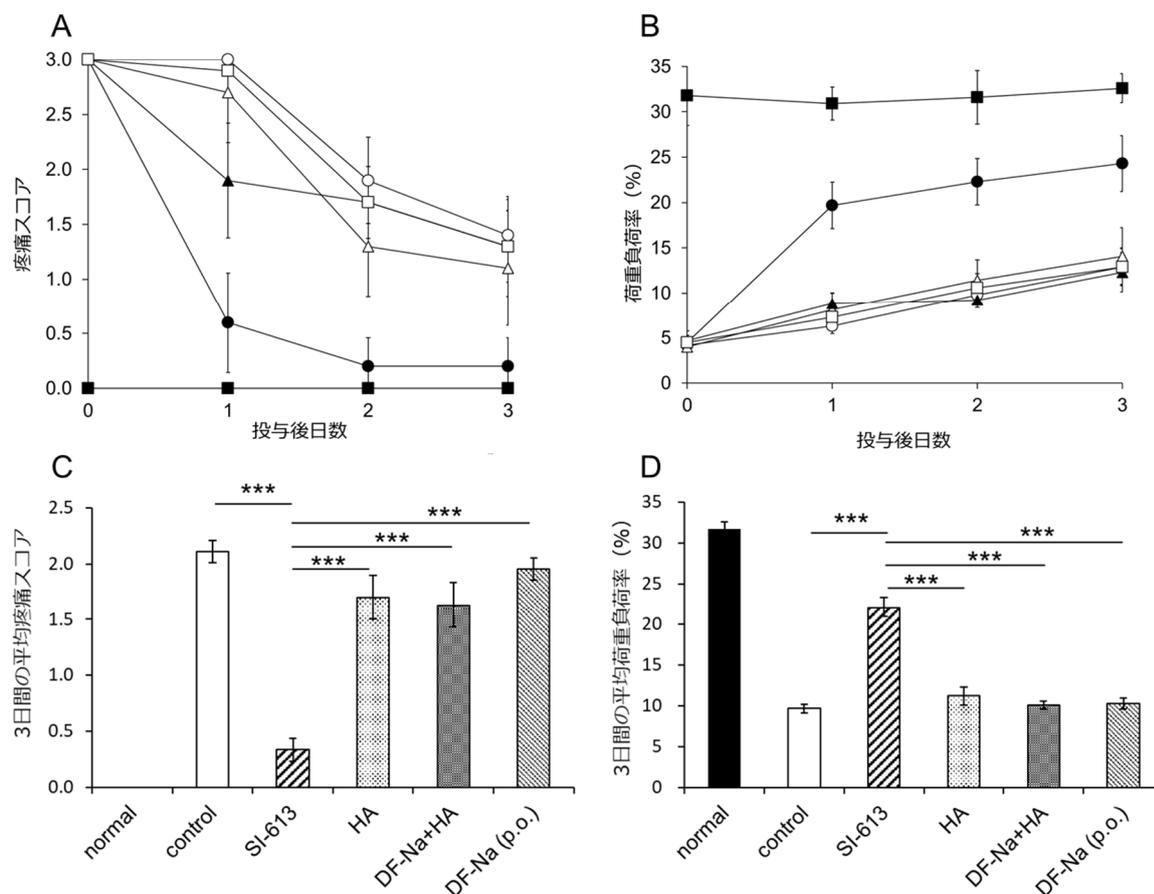


図 22. 硝酸銀誘発ラット関節炎モデルにおける SI-613 の疼痛抑制作用

平均値 ± 95% CI (n = 9, 正常のみ n = 3)

○; 対照、●; 0.5 mg SI-613、△; 0.5 mg HA、▲; DF-Na (59 μg) + HA (0.5 mg)、  
□; DF-Na 経口 (2 mg/kg、1 日 1 回 3 日間)、■; 正常

\*\*\*P < 0.001 vs. SI-613 (Tukey 検定)

### 3.3.3 抗原誘発ウサギ関節炎モデルに対する SI-613 の抗炎症作用

試験物質投与後 3 時間において、経口投与された DF-Na は、control と比較して関節液中の PGE<sub>2</sub> 濃度を有意に抑制した (図 23)。試験物質投与後 72 時間において、SI-613 は、DF-Na、DF-Na+HA 及び PBS と比較して有意に関節液中 PGE<sub>2</sub> の産生を抑制した。一方、DF-Na、DF-Na+HA の混合液及び対照群の間に有意な差は認められなかった (図 24)。以上より、単回膝関節内投与した SI-613 は、DF-Na 及び DF-Na+HA 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。

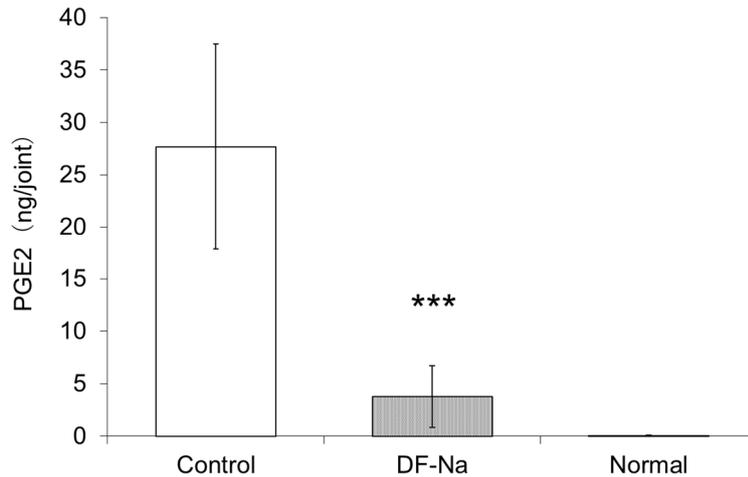


図 23. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける投与 3 時間後の関節液中 PGE<sub>2</sub> に対する作用

PBS (対照) は、500  $\mu$ L の容量で単回関節内投与した。DF-Na は、2 mg/kg の用量で単回経口投与した。

平均値  $\pm$  95% CI (n = 10、正常のみ n = 5)

\*\*\*P < 0.001 vs. control (Student t 検定)

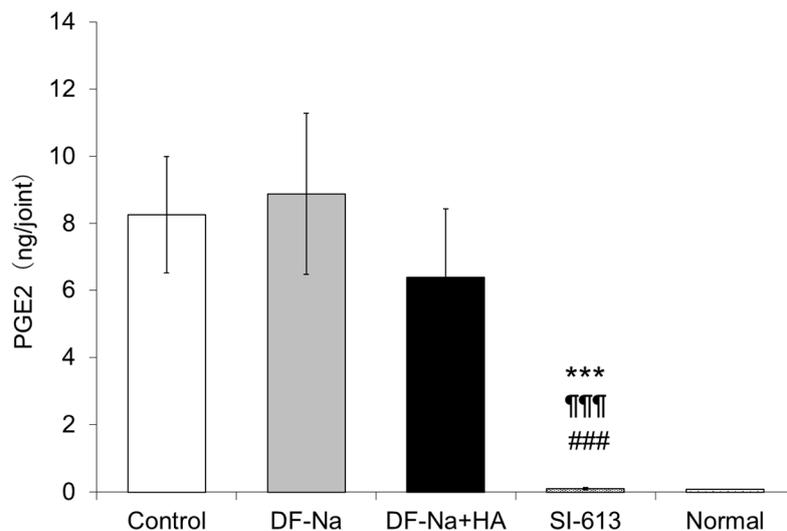


図 24. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける投与 72 時間後の関節液中 PGE<sub>2</sub> に対する作用

SI-613 (関節あたり 5 mg)、DF-Na (同 0.59 mg) と HA (同 5 mg) の混合物、あるいは PBS (対照) は、500  $\mu$ L の容量で単回関節内投与した。DF-Na は、2 mg/kg の用量で単回経口投与した。

平均値  $\pm$  95% CI (n = 10、正常のみ n = 5)

\*\*\*P < 0.001 vs. control、\*\*\*\*P < 0.001 vs. DF-Na、###P < 0.001 vs. DF-Na+HA (Tukey 検定)

### 3.3.4 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）

SI-613（関節あたり 5 mg）は、投与後 1 日から対照群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。その後、その作用は減弱し、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 25）。以上より、単回膝関節内投与した 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。

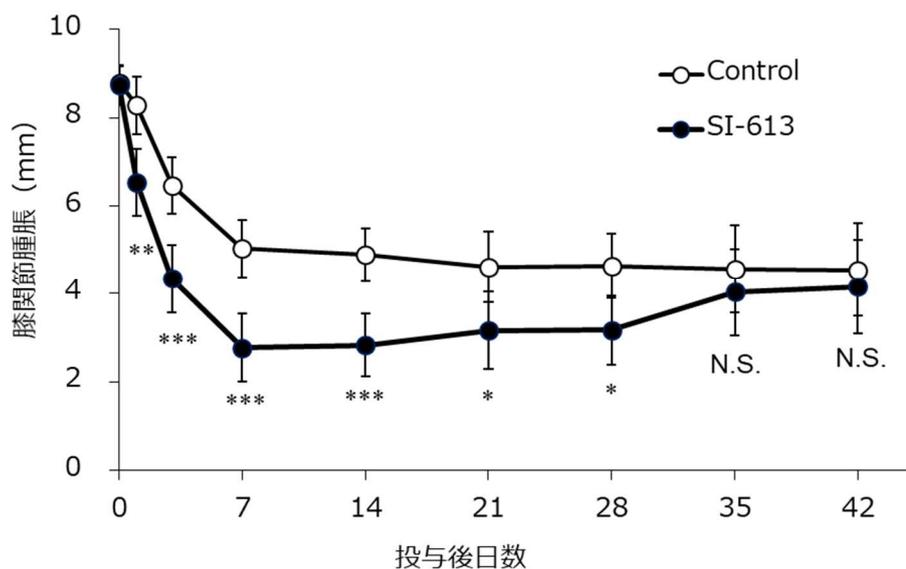


図 25. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける SI-613（5 mg）の抗炎症作用（持続性評価）

平均値 ± 95% CI (n = 20)

\*P < 0.05、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs. control (Holm 法により補正した Student t 検定)、N.S. : 有意差なし

### 3.3.5 SI-613 単回膝関節内投与後の関節組織中 DF 濃度

抗原誘発ウサギ関節炎モデルに SI-613 又は他剤（DF-Na 及び DF-Na+HA）を単回投与後 3 及び 72 時間の滑膜組織中及び関節洗浄液中 DF 濃度を LC-MS/MS で測定した。投与後 72 時間における滑膜組織中 DF 濃度は、他剤群と比較して SI-613 群の方が高かった（表 5）。また、同時点における関節洗浄液中 DF 量についても SI-613 群の方が他剤群よりも多かった（表 6）。

表 5. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける滑膜組織中 DF 濃度

群	採取時間 (h)	動物番号	滑膜組織中 DF 濃度(ng/g)
DF-Na	3	1	155.8
		2	52.88
		3	75.83
	72	1	BLQ
		2	BLQ
		3	BLQ
DF-Na+HA	72	1	BLQ
		2	BLQ
		3	48.02
SI-613	72	1	15.23
		2	45.47
		3	351.1

DF-Na は経口投与、DF-Na+HA 及び SI-613 は関節内投与

BLQ : 定量下限未満 (< 5 ng/g)

表 6. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける関節洗浄液中 DF 量

群	採取時間 (h)	動物 番号	関節洗浄液中 DF 濃度 (ng/mL)	関節 洗浄液量 (mL)	関節洗浄液中 DF 量 (ng/関節)
					個別値
DF-Na	3	1	34.58	3.604	124.6
		2	17.44	3.339	58.23
		3	11.84	3.856	45.66
	72	1	BLQ	3.593	BLQ
		2	BLQ	3.611	BLQ
		3	BLQ	3.474	BLQ
DF-Na+HA	72	1	BLQ	3.487	BLQ
		2	BLQ	3.574	BLQ
		3	5.961	3.640	21.70
SI-613	72	1	17.71	3.424	60.64
		2	11.39	3.408	38.82
		3	416.0	3.702	1540

DF-Na 群は経口投与、DF-Na+HA 群及び SI-613 群は膝関節内投与

BLQ : 定量下限未満 (関節洗浄液中 DF 濃度として < 1 ng/mL)

### 3.3.6 SI-613 単回膝関節内投与後の関節組織中 DF 濃度（長期試験）

SI-613 投与後の経時的な滑膜組織中及び関節洗浄液中 DF 濃度は、LC-MS/MS で測定した。抗原誘発ウサギ関節炎モデルに SI-613 を関節あたり 5 mg の用量で単回膝関節内投与した場合、滑膜組織中の DF 濃度は投与後 28 日で 9.754 ng/g、35 日で BLQ (< 5 ng/g) となった。また、関節内の DF 量は投与後 21 日で関節あたり 5.940 ng、28 日で定量下限未満（関節洗浄液中 DF 濃度として < 1 ng/mL）となった。図 26 及び図 27 に抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける滑膜組織中 DF 濃度推移及び関節洗浄液中 DF 量推移を示す。また、表 7 に滑膜組織中及び関節洗浄液中 DF 濃度推移から算出した PK パラメータを示す。

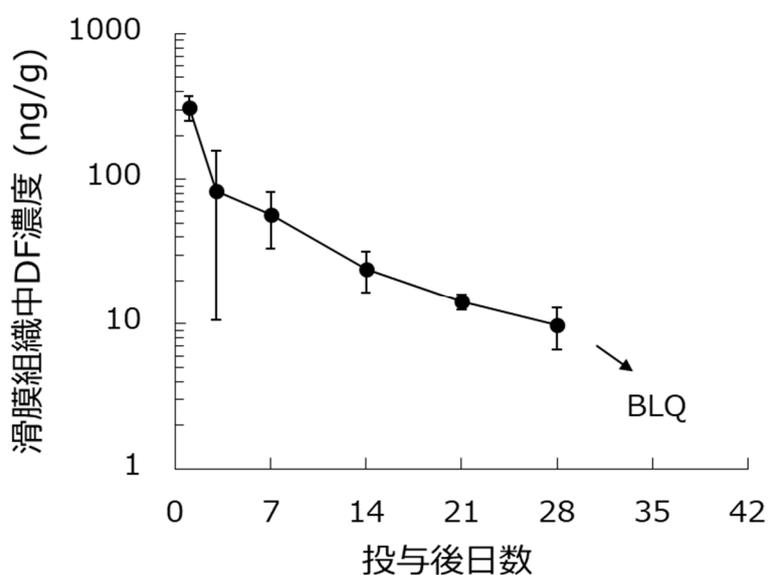


図 26. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける SI-613 (5 mg) 単回関節内投与後の滑膜組織中 DF 濃度推移  
平均値 ± S.D. (n = 3)

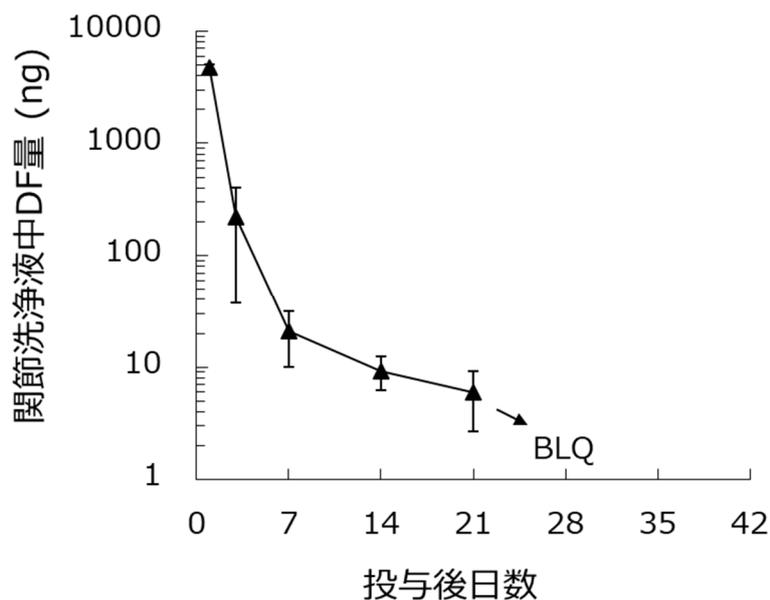


図 27. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける SI-613 (5 mg) 単回関節内投与後の関節洗浄液中 DF 量の推移  
 平均値 ± S.D. (n = 3)

表 7. 抗原誘発ウサギ関節炎モデルにおける SI-613 (5 mg) 単回関節内投与後の滑膜組織中及び関節洗浄液中 DF 量の PK パラメータ

	$C_{max}$ (ng/g)	$AUC_{0-28day}$ (ng·day/g)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·day/g)	$t_{1/2}$ (day)
滑膜組織	311.6	1336	1487	10.8*

	$C_{max}$ (ng/joint)	$AUC_{0-21day}$ (ng·day/joint)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·day/joint)	$t_{1/2}$ (day)
関節洗浄液	4726	7956	8018	7.7 <sup>§</sup>

\* : SI-613 投与後 14~28 日の値から算出された。

§ : SI-613 投与後 7~21 日の値から算出された。

### 3.3.7 SI-613 単回膝関節内投与後の血漿中 DF 濃度推移

抗原誘発ウサギ関節炎モデルに SI-613 又は他剤 (DF-Na 及び DF-Na+HA) を投与したときの血漿中 DF 濃度を LC-MS/MS で測定し、SI-613 と他剤における DF の全身曝露量を比較した。表 8 に血漿中 DF 濃度推移から算出した PK パラメータを示す。SI-613 群の DF の  $C_{max}$  の平均値は、DF-Na 群と比較し 1/462 であり、DF-Na +HA 群と比較し 1/94 であった。同様に SI-613 群の血漿中 DF の  $AUC_{0-t}$  の平均値は、DF-Na 群のその 1/187 の値であり、また、DF-Na +HA 群の 1/16 であった。

表 8. SI-613 (5 mg) 投与後の血漿中 DF 濃度の PK パラメータ

群	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng·h/mL)	t <sub>1/2</sub> (h)
DF-Na	621.0 ± 371.6	2.4 ± 3.2	4693 ± 1905	4132 <sup>¶</sup>	12.8 <sup>¶</sup>
DF-Na+HA	125.9 ± 68.5	0.39 ± 0.53	393.4 ± 167.6	423.2 ± 154.5	3.4 ± 2.0
SI-613	1.343 ± 0.050	24 ± 0	25.11 <sup>¶</sup>	NC	NC

平均値 ± 標準偏差 (n = 3 or n = 2) 、 NC : Not calculated

<sup>¶</sup>: n=2

BLQ: < 1 ng/mL.

## 第4節 考察

SI-613 は、HA に NSAID である DF-Na を共有結合により化学的に結合させた HA 誘導体である。投与局所である関節組織において持続的に DF を遊離させることにより、OA に対して即効的かつ持続的な消炎鎮痛作用を発揮すること、また安全性面においても NSAID で見られる全身性の副作用を軽減することが期待できると考え、第1世代の天然の HA、第2世代の単回投与型架橋 HA 誘導体に続く第3世代の関節注射剤として DF 導入 HA 誘導体 (SI-613) の創製を着想した。すなわち、SI-613 は関節注射 HA 剤と NSAID の双方の利点を併せ持つ薬剤になり得ると考え、SI-613 の開発研究に着手した。

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ことを確認している (data not shown)。DF のカルボキシ基は、COX-2 の活性部位にある 385 番目のチロシン残基及び 530 番目のセリン残基に親和性を示し、COX-2 を阻害するとされ<sup>93)</sup>、HA に化学的に結合された DF は、カルボキシ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ためと考えられる。

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<sub>2</sub> 濃度が上昇していることが確認されており<sup>94)</sup>、各種非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) 及び  $\kappa$  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<sup>95-97)</sup>。SI-613 の膝関節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 の混合溶液は明確な疼痛抑制作用を示さなかった。これにより、SI-613 の消炎鎮痛作用は、HA と DF-Na の混合物では達成し得ないこと、つまり DF と HA を共有結合する意義が明確になった。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 が消炎鎮痛効果を発揮したことを示唆している。SI-613 の消炎鎮痛効果の持続性は、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<sup>98-100)</sup>。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 患者において速効かつ 4 週間の持続的な消炎鎮痛効果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<sub>2</sub> 濃度を低下させたことから、SI-613 の抗炎症作用は PGE<sub>2</sub> 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効果に対する 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。滑膜組織中 DF 濃度でみられたバラつきの詳細な原因は不明であるが、個体差あるいは炎症程度の違いによるタンパク質と DF との相互作用の差異などが考えられた。今回の SI-613 投与後 28 日に滑膜組織中で検出された DF 濃度 (10 ng/g) は、OA あるいは関節リウマチ患者を対象とした臨床研究における経口 DF 製剤あるいは局所 DF 製剤の反復投与後の滑膜組織中で検出された DF 濃度 (5~35 ng/g)<sup>101, 102)</sup>と同程度であることも合わせると、SI-613 の臨床における有

効性は少なくとも 28 日間持続すると考えられた。関節内に投与された HA は、滑膜組織に浸透した後、長期間留まることが報告されており<sup>103, 104)</sup>、今回の DF の長期滞留性には滑膜細胞に発現している HA 受容体である CD44<sup>105, 106)</sup>と SI-613 の HA 構造との親和性が関与している可能性が考えられた。このことは、SI-613 が DF を効果的に滑膜組織にデリバリーしていることを示唆しており、SI-613 の消炎鎮痛作用に HA が重要な役割を果たしていると考えられる。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 から徐放された DF が COX-2 活性を阻害し、その結果、PGE<sub>2</sub> 産生を抑制することによって発揮されると考えられた。

SI-613 は、持続的な DF の消炎鎮痛作用に加えて、HA と同様の薬理作用を併せ持つことが期待されている。このコンセプト検証の一つとして、喜助田らは OA 患者由来滑膜細胞を用いて SI-613 が内因性 HA の産生促進作用を有することを報告している<sup>107)</sup>。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 HAS2 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 HYAL2 mRNA 発現抑制を介することが示唆されている。OA 患者及び関節リウマチ患者の関節液中の HA 濃度とその分子量は健常人のそれらと比較して低下していることが知られており<sup>108, 109)</sup>、関節内に投与されたあるいは滑膜細胞に添加された HA は内因性 HA 産生を促進することが報告されている<sup>110, 111)</sup>。すなわち HA の薬理作用の一つに内因性 HA 産生促進作用があり、それが病的関節液の正常化及び長期間の疼痛抑制作用に繋がると考えられている。以上のことから、SI-613 は DF の作用のみならず、HA と同様の薬理作用も兼ね備えていると考えられた。

本研究において、有効量の SI-613 を関節内投与したときの DF の C<sub>max</sub> 平均値は 1.343 ng/mL であり、DF-Na を経口投与したときの C<sub>max</sub> 平均値 (621.0 ng/mL) の 1/462 の低値を示した。同様に SI-613 投与後の DF の AUC<sub>0-t</sub> 平均値は 25.11 ng・h/mL であり、DF-Na 経口投与後の AUC<sub>0-t</sub> 平均値 (4693 ng・h/mL) の 1/187 の低値であった。さらに、臨床において DF-Na は連日経口投与されること及び DF-Na の局所製剤であるボルタレン®ゲル 1% を健常人の関節局所に反復塗布 (4 g × 4 回、7 日間) したときの DF の C<sub>max</sub> が 15 ± 7.3 ng/mL と報告されていることを考慮すると<sup>112)</sup>、SI-613 投与後の DF の全身曝露は十分低く、DF に起因した全身毒性を発現する可能性は低いと推察された。

以上、SI-613 は、DF 徐放誘導体としての強く持続的な消炎鎮痛効果と HA と同様の関節機能改善効果を併せ持ち、かつ DF-Na の全身性の安全性懸念を低減させた新たな関節注射 OA 治療剤になりうるものと考えられた。

## 総括

OA の治療目標は、症状の軽減と関節機能の維持又は改善である。主な薬物療法である HA 製剤の関節内投与は、長年の臨床実績からその有効性と安全性が確認されている。しかし、課題として、一部の HA 製剤で投与後に稀にみられる膝関節局所における重度の急性炎症反応が発現すること、投与が複数回に渡ることによる感染リスクの懸念と煩雑さ、疼痛抑制作用が必ずしも十分でないなどの課題があり、安全かつ有効性の高い新たな OA 治療剤の開発が望まれている。本研究は、上記課題を克服することによって、OA 治療における新たな関節注入 HA 誘導体の創製を目的とした。

第 1 章は、由来の異なる HA 製剤を用いた生体適合性評価及び不純物分析を行うことで一部の HA 製剤でみられる急性炎症反応の原因探索を目的とした。鶏冠抽出法あるいは微生物発酵法で調製された HA 製剤の生体適合性をウサギ膝関節を用いて検証した結果、いずれも生理食塩液と同様に刺激性を有さず、HA の由来の違いは生体適合性に影響しないことを明らかにした。一方、鶏冠由来 HA をタンパク質及びジビニルスルホンで架橋した Avian-CL-HA の関節内投与により、関節液中の細胞数が増加し、偽好酸球浸潤がみられたことに加え、関節滑膜組織の病理組織学的評価において、マクロファージ、多核巨細胞、好酸球などから構成される肉芽腫性炎症様の所見が認められた。次いで不純物分析を行った結果、Avian-CL-HA においてのみ(1→3)-β-D-グルカンが検出された。(1→3)-β-D-グルカンは、真菌細胞壁を特徴づける主要な構成多糖成分であるほか、ろ過などに用いられるセルロース膜にも含まれるとされ、免疫賦活化に作用する。症例報告として、OA 患者に Avian-CL-HA を関節内投与後、重度の急性炎症反応を誘発したケースも報告されている。これらのことから、稀にみられる重度の急性炎症反応の原因は、HA の由来によるものではなく、鶏冠由来タンパクを架橋する Avian-CL-HA 特有の架橋構造あるいは今回検出された(1→3)-β-D-グルカンが関与していることが推察された。

第 2 章は、これまでの複数回投与から単回投与を可能とする光架橋技術を用いた新規架橋 HA 誘導体の創製を目的とした。架橋にはタンパク質を使用せず、光反応性のケイ皮酸を HA に導入した中間体に紫外線照射することで 2 量体を形成するクリーンな光架橋技術を用いることで安全性の高い持続型の架橋 HA 誘導体 (Gel-200) を創製することを着想した。ウサギ OA モデルにおいて、単回関節内投与された Gel-200 は、軟骨破壊及び滑膜炎を軽減する作用を有することを肉眼評価、病理組織学的評価及び関節液の生化学分析により明らかにした。ラット関節疼痛モデルにおいて、Gel-200 の単回関節内投与は、投与後 4 週間の持続的な疼痛抑制作用を示すことを明らかにするとともに、投与後 4 週においても滑膜組織中に Gel-200 が滞留することが確認され、長期持続効果を裏付ける結果を得た。また、正常ヒト軟骨細胞培養系において、Gel-200 は IL-1β により誘発される MMP-1、-3 及び-13 産生を濃度依存的に抑制した。MMPs は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考えられていることから、Gel-200 は高い粘弾性による物理的な保護作用に加え、MMPs 産生抑制作用を介して軟骨破壊を軽減すると考えられた。さらに、ヒト滑膜肉腫細胞株を用い

て、IL-1 $\beta$ により誘発される PGE<sub>2</sub>産生に対する Gel-200 の作用を評価した結果、Gel-200 は、濃度依存的に PGE<sub>2</sub>産生を有意に抑制した。この作用は、ヒアルロン酸レセプターである CD44 の抗 CD44 抗体の添加において有意に減弱したことから、Gel-200 の消炎鎮痛作用は CD44 を介した PGE<sub>2</sub>産生抑制が関与していると考えられた。本研究により、Gel-200 の単回膝関節内投与は、物理的な作用のみでなくマルチモーダルな生物学的作用を介して軟骨保護及び持続的な消炎鎮痛効果を発揮することが明らかとなった。その後、OA 患者を対象とした臨床試験において Gel-200 単回関節内投与後 13 週間の有効性が確認された。

第 3 章は、HA に NSAID の消炎鎮痛作用を付与することを企図し、HA と NSAID の双方の利点を併せ持つ DF 徐放型 HA 誘導体の創製を目的とした。関節炎モデル動物における SI-613 の消炎鎮痛作用を検証した結果、単回関節内投与した SI-613 の消炎鎮痛作用は、HA を大きく上回り、HA と DF-Na の混合物では達成し得ないことを明らかにした。SI-613 の消炎鎮痛作用は、単回投与後 28 日間持続し、薬物動態試験からその作用は主に滑膜組織中で SI-613 から徐放される DF によるものであると推察された。さらに、SI-613 関節内投与後の DF の全身曝露量は、DF-Na の経口投与あるいは HA と DF-Na 混合物の関節内投与後のそれと比較して十分低減されていることを確認した。別途、OA 患者由来滑膜細胞を用いて SI-613 が内因性 HA の産生促進作用を有することを報告している。本研究により、SI-613 は、DF 徐放誘導体としての強く持続的な消炎鎮痛効果と HA と同様の関節機能改善効果を併せ持ち、かつ DF-Na の全身性の安全性懸念を低減させた新たな関節注射 OA 治療剤になりうるものと考えられた。

以上の研究結果から、単回投与持続型の架橋 HA 誘導体として Gel-200 の有効性を、NSAID 徐放型の HA 誘導体として SI-613 の有効性を明らかにした。Gel-200（製品名 Gel-One<sup>®</sup>）は、2011 年 3 月に FDA から承認され、SI-613 は 2020 年 1 月 6 日に国内製造販売承認申請が行われた。これらの新規 HA 誘導体の創製は、OA 治療に新たな保存療法の選択肢を提供するものであり、OA 患者の QOL 向上に貢献できるものと考えられる。

## 謝辞

本論文の作成にあたり、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院 薬学研究院 臨床薬効解析学分野 教授 伊藤邦彦博士に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、ご指導ならびにご助言を賜りました静岡県立大学大学院 薬学研究院 生化学分野 教授 鈴木隆博士、臨床薬剤学分野 教授 賀川義之博士、ならびに薬剤学分野 教授 尾上誠良博士に深謝申し上げます。

本研究の機会を与えて頂き、ご鞭撻を賜りました生化学工業株式会社 研究開発本部 中央研究所長 飯田真巳博士、生化学工業株式会社 研究開発本部 CMC研究所長 宮本建司様に心から感謝の意を表します。

また、本研究に関して、種々の貴重なご助言とご協力を頂きました生化学工業株式会社 研究開発本部 中央研究所 大瀧徹也博士、川俣裕二博士、安田洋祐副主任研究員、喜助田知央研究員、野寺梨紗研究員、片山まどか研究員、原田耕平博士、CMC研究所 西山武雄研究員、生化学工業株式会社 メディカル活動推進室 竹下佐和子博士、生化学工業株式会社 薬事部 随念亮至氏、及び日水製薬株式会社 執行役員 研究部長 田中善孝博士に深く感謝致します。

さらには、長年に渡り多大なご助言を頂きました生化学工業株式会社関係諸氏に篤くお礼申し上げます。

最後に本論文の作成に際し、いつも心温かく支援し、多大な協力のもと支えてくれた最愛の家族に感謝致します。

2020年5月  
吉岡敬二

## 論文目録

1. Yoshioka K, Yasuda Y, Kisukeda T, Nodera R, Tanaka Y and Miyamoto K. Pharmacological effects of novel cross-linked hyaluronate, Gel-200, in experimental animal models of osteoarthritis and human cell lines. *Osteoarthritis Cartilage*, **22**, 879 (2014).
2. Yoshioka K, Kisukeda T, Zuinen R, Yasuda Y and 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 Musculoskelet Disord.*, **19**, 157 (2018).
3. Yoshioka K, Katayama M, Nishiyama T, Harada K, Takeshita S and Kawamata Y. Biocompatibility study of different hyaluronan products for intra-articular treatment of knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* **20**, 424 (2019).

## 参考文献

1. 川口 浩、村木重之、岡 敬之、阿久根 徹、馬淵昭彦、中村 耕三、他. 変形性関節症の大規模臨床統合データベースの構築と、これを用いた観察疫学・ゲノム疫学研究. 日本整形外科学会誌. 2008;82:S289.
2. 川村秀哉、杉岡洋一、廣田良夫、井上 一、黒坂昌弘、緒方公介、他. 変形性膝関節症の疫学—患者数推定と患者調査結果の検討. 整外と災外. 1995;44:12–15.
3. 平成 28 年 国民生活基礎調査の概況 – 厚生労働省  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa16/dl/16.pdf>
4. Schaffer D, Florin T, Eagle C, Marschner I, Singh G, Grobler M, et al. Risk of serious NSAID-related gastrointestinal events during long-term exposure: a systematic review. *Med J Aust.* 2006;185:501–6.
5. Tarone RE, Blot WJ, McLaughlin JK. Nonselective nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal bleeding: relative and absolute risk estimates from recent epidemiologic studies. *Am J Ther.* 2004;11:17–25.
6. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med.* 2005;352:1092–102.
7. Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM, et al. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ.* 2011;342:c7086.
8. Bellamy N, Campbell JRV: Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006 Apr 19:CD005328.
9. 山田治基. 変形性関節症に対する関節内注入療法の基礎. 臨床リウマチ. 2003;15:63-9.
10. 加来信弘. ステロイド薬関節内注入療法の実際とステロイド関節症の危険性. 整形・関節外科. 2011;30:65–74.
11. Meyer K, Palmer JW: The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 1934;107:629–34.
12. 森田充浩. 関節破壊のバイオマーカー ヒアルロン酸 (HA) . *Keynote R / A.* 2014;2:71-4.
13. Balazs EA. The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid. In disorders of the knee. (ed. by AJ Helfet) Lippincott Co., Philadelphia, 1974, 63–75.
14. Dahl LB, Dahl IM, Engström-Laurent A, Granath K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis.* 1985;44:817–22.
15. Felson DT. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol Clin N Am.* 2004;42:1–9.
16. Garstang SV, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil.* 2006;85(Suppl 11):S2–S14.

17. 安井秀一、山名 慶. 関節軟骨の潤滑性と細胞外マトリクス. *Medical Science Digest*. 2011;37:596–600.
18. 近間英明. 関節潤滑に関する実験的研究 関節液蛋白およびヒアルロン酸の役割. *日本整形外科学会雑誌*. 1985;59:559–72.
19. 渡辺惣兵衛、方宇寿恒、横堀寿光、他. 関節潤滑機構に及ぼすヒアルロン酸の役割について. 1994;14:891–5.
20. 飯阪正俊、岡 正典、池内 健、他. ヒアルロン酸の関節潤滑に及ぼす効果. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*. 1998;19:247–52.
21. 遠藤太刀男、八木英憲、小島隆史、他. 変形性膝関節症関節液の粘弾性挙動に基づく実験的考察. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*. 1998;19:253–7.
22. 貝山 潤、宇月美和. 変形性膝関節症における関節液のヒアルロン酸とその性状の変化. *岩手医学雑誌*. 2006;58:9–21.
23. Ogston AG, Stanier JE. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. *J Physiol*. 1953;119:244–52.
24. Julovi SM, Yasuda T, Shimizu M, Hiramitsu T, Nakamura T. Inhibition of interleukin-1 $\beta$ -stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2004;50:516–25.
25. Hashizume M, Mihara M. Desirable effect of combination therapy with high molecular weight hyaluronate and NSAIDs on MMP production. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009;17:1513–8.
26. 村田英明、村上恒二、生田義和、他. 関節軟骨細胞の基質代謝に及ぼすHAとIL-1の影響. *中部日本整形外科災害外科学会雑誌*. 1993;36:439–40.
27. Altman RD, Dasa V, Takeuchi J. Review of the mechanism of action for Supartz FX in knee osteoarthritis. *Cartilage*. 2018;9:11–20.
28. Santangelo KS, Johnson AL, Ruppert AS, Bertone AL. Effects of hyaluronan treatment on lipopolysaccharide-challenged fibroblast-like synovial cells. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:R1.
29. Goldberg VM, Coutts RD. Pseudoseptic reactions to hylan viscosupplementation: diagnosis and treatment. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;419:130–7.
30. Chen AL, Desai P, Adler EM, Di Cesare PE. Granulomatous inflammation after Hylan G-F 20 viscosupplementation of the knee: a report of six cases. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84:1142–7.
31. Michou L, Job-Deslandre C, de Pinieux G, Kahan A. Granulomatous synovitis after intraarticular Hylan GF-20. A report of two cases. *Joint Bone Spine*. 2004;71:438–40.
32. Larsen NE, Dursema HD, Pollak CT, Skrabut EM. Clearance kinetics of a hylan-based viscosupplement after intra-articular and intravenous administration in animal models. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100:457–62.
33. Goldberg VM, Coutts RD. Pseudoseptic reactions to hylan viscosupplementation: diagnosis and treatment. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;419:130–7.
34. Chen AL, Desai P, Adler EM, Di Cesare PE. Granulomatous inflammation after Hylan G-F 20

- viscosupplementation of the knee: a report of six cases. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84:1142–7.
35. Michou L, Job-Deslandre C, de Pinieux G, Kahan A. Granulomatous synovitis after intraarticular Hylan GF-20. A report of two cases. *Joint Bone Spine.* 2004;71:438–40.
  36. Waddell DD, Bricker DC. Hylan G-F 20 tolerability with repeat treatment in a large orthopedic practice: a retrospective review. *J Surg Orthop Adv.* 2006;15:53–9.
  37. Puttick MP, Wade JP, Chalmers A, Connell DG, Rangno KK. Acute local reactions after intraarticular hylan for osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 1995;22:1311–4.
  38. Altman RD, Bedi A, Karlsson J, Sancheti P, Schemitsch E. Product Differences in Intra-articular Hyaluronic Acids for Osteoarthritis of the Knee. *Am J Sports Med.* 2016;44:2158–65.
  39. Ohshima Y, Yokota S, Kasama K, Ono H. Comparative studies of levels of proteins, bacterial endotoxins and nucleic acids in hyaluronan preparations used to treat osteoarthritis of the knee: could residual proteins and bacterial endotoxins relate to complications? *Jpn Pharmacol Ther.* 2004;32:655–62.
  40. Iwanaga S. The Limulus clotting reaction. *Curr Opin Immunol.* 1993;5:74–82.
  41. Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, Ohki M, Takahashi S, Arai M, et al. A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications. *Clin Chim Acta.* 1985;149:55-65.
  42. Ishikawa M, Yoshioka K, Urano K, Tanaka Y, Hatanaka T, Nii A. Biocompatibility of cross-linked hyaluronate (Gel-200) for the treatment of knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2014;22:1902–9.
  43. Zerdawi IM, Chan I. Synvisc perisynovitis. *Pathology.* 2001;33:519–20.
  44. Perdomo-Morales R, Pardo-Ruiz Z, Spreitzer I, Lagarto A, Montag T. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. *ALTEX.* 2011;28:227–35.
  45. Williams D, Mueller A, Browder W. Preclinical and clinical evaluation of carbohydrate immunopharmaceuticals in the prevention of sepsis and septic sequelae. *J Endotoxin Res.* 1995;2:203–8.
  46. Williams DL, Pretus HA, McNamee RB, Jones EL, Ensley HE, Browder IW, et al. Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunopharmacology.* 1991;22:139–56.
  47. Browder W, Williams D, Pretus H, Olivero G, Enrichens F, Mao P, et al. Beneficial effect of enhanced macrophage function in the trauma patient. *Ann Surg.* 1990;211:605–13.
  48. Williams D, Browder W. Development of natural product (1→3)- $\beta$ -D-glucan polymers as immune stimulating pharmaceuticals. *Polymer Adv Tech.* 1994;5:529–34.
  49. Barton C, Vigor K, Scott R, Jones P, Lentfer H, Bax HJ, et al. Beta-glucan contamination of

- pharmaceutical products: how much should we accept? *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65:1289–301.
50. Sandle T. Pharmaceutical product impurities: considering beta glucans. *Am Pharm Rev.* Posted 31 August, 2013.
  51. <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/152953-Pharmaceutical-Product-Impurities-Considering-Beta-Glucans/>. Accessed 21 November, 2019.
  52. Nakao A, Yasui M, Kawagoe T, Tamura H, Tanaka S, Takagi H. False-positive endotoxemia derives from gauze glucan after hepatectomy for hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *Hepatogastroenterology.* 1997;44:1413–8.
  53. Usami M, Ohata A, Horiuchi T, Nagasawa K, Wakabayashi T, Tanaka S. Positive (1→3)-beta-D-glucan in blood components and release of (1→3)-beta-D-glucan from depth-type membrane filters for blood processing. *Transfusion.* 2002;42:1189–95.
  54. ICH Q6A specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances, October 1999. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q6A\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q6A_Guideline.pdf). Accessed 21 November, 2019.
  55. ICH Q6B specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, March 1999. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf). Accessed 21 November, 2019.
  56. 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;16:137–62.
  57. 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;18:476–99.
  58. 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;43:1905–15.
  59. Peyron JG. Intraarticular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis: state-of-the-art review. *J Rheumatol Suppl* 1993;39:10–5.
  60. Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4:87–98.
  61. Yoshioka M, Shimizu C, Harwood FL, Coutts RD, Amiel D. The effects of hyaluronan during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:251–60.
  62. Shimizu C, Yoshioka M, Coutts RD, Harwood FL, Kubo T, Hirasawa Y, et al. Long-term effects of hyaluronan on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:1–9.
  63. Shimizu C, Kubo T, Hirasawa Y, Coutts RD, Amiel D. Histomorphometric and biochemical

- effect of various hyaluronans on early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1998;25:1813–9.
64. Ohnishi A, Osaki T, Matahira Y, Tsuka T, Imagawa T, Okamoto Y, et al. Evaluation of the chondroprotective effects of glucosamine and fish collagen peptide on a rabbit ACLT model using serum biomarkers. *J Vet Med Sci* 2013;75:421–9.
  65. Gotoh S, Miyazaki K, Onaya J, Sakamoto T, Tokuyasu K, Namiki O. Experimental knee pain model in rats and analgesic effect of sodium hyaluronate (In Japanese). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1988;92:17–27.
  66. Gotoh S, Onaya J, Abe M, Miyazaki K, Hamai A, Horie K, et al. Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. *Ann Rheum Dis* 1993;52:817–22.
  67. Boettger MK, Kümmel D, Harrison A, Schaible HG. Evaluation of long-term antinociceptive properties of stabilized hyaluronic acid preparation (NASHA) in an animal model of repetitive joint pain. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:R110.
  68. Gilanyi M. et al. Ion concentrations in subcutaneous interstitial fluid: measured versus expected values. *Am J Physiol.* 1988;255(3 Pt 2):F513–9.
  69. Yamazaki T. et al. Phenotypic characterization of a human synovial sarcoma cell line, SW982, and its response to dexamethasone. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003;39:337–9.
  70. Amiel D, Toyoguchi T, Kobayashi K, Bowden K, et al. Long-term effect of sodium hyaluronate(Hyalgan) on osteoarthritis progression in a rabbit model. *Osteoarthritis and Cartilage* 2003;11:636–43.
  71. Mainil-Varlet P, Schiavinato A, Ganster MM. Efficacy evaluation of a new hyaluronan derivative HYADD\_ 4-G to maintain cartilage integrity in a rabbit model of osteoarthritis. *Cartilage* 2013;4:28–41.
  72. Balazs EA, Watson D, Duff IF, Roseman S. Hyaluronic acid in synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1967;10:357–76.
  73. Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, Hirasawa Y, Lotz M, Amiel D. Effect of hyaluronan on chondrocyte apoptosis and nitric oxide production in experimentally induced osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000;27:1713–20.
  74. Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta (IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:182–90.
  75. Takaishi H, Kimura T, Dalal S, Okada Y, D'Armiento J. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13. *Curr Pharm Biotechnol* 2008;9:47–54.
  76. Okada A, Okada Y. Progress of research in osteoarthritis. Metalloproteinases in osteoarthritis (In Japanese). *Clin Calcium* 2009;19:1593–601.
  77. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of

- genespecific transcription factors. *Arthritis Res* 2002;4:157–64.
78. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006;1:1696–701.
  79. Julovi SM, Ito H, Hiramitsu T, Yasuda T, Nakamura T. Hyaluronan inhibits IL-1 $\beta$ -stimulated collagenase production via down-regulation of phosphorylated p38 in SW-1353 human chondrosarcoma cells. *Mod Rheumatol* 2008;18:263–70.
  80. 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: 258–64.
  81. Frean SP, Abraham LA, Lees P. In vitro stimulation of equine articular cartilage proteoglycan synthesis by hyaluronan and carprofen. *Res Vet Sci.* 1999;67:181–8.
  82. Frean SP, Gettinby G, May SA, Lees P. Influence of interleukin-1 $\beta$  and hyaluronan on proteoglycan release from equine navicular hyaline cartilage and fibrocartilage. *J Vet Pharmacol Ther.* 2000;23:67–72.
  83. Zhou PH, Liu SQ, Peng H. The effect of hyaluronic acid on IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 2008;26:1643–8.
  84. Mitsui Y, Gotoh M, Nakamura K, Yamada T, Higuchi F, Nagata K. Hyaluronic acid inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines and cyclooxygenase-2/prostaglandin E(2) production via CD44 in interleukin-1-stimulated subacromial synovial fibroblasts from patients with rotator cuff disease. *J Orthop Res* 2008;26:1032–7.
  85. Gotoh M, Hanyu T, Yoshino T, Matsuno H, Shimizu M, Murata N, et al. Intra-articular injection of hyaluronate (SI-6601D) improves joint pain and synovial fluid prostaglandin E2 levels in rheumatoid arthritis: a multicenter clinical trial. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:377–83.
  86. Strand V, Baraf HS, Lavin PT, Lim S, Hosokawa H. A multicenter, randomized controlled trial comparing a single intra-articular injection of Gel-200, a new cross-linked formulation of hyaluronic acid, to phosphate buffered saline for treatment of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:350–6.
  87. Schaffer D, Florin T, Eagle C, Marschner I, Singh G, Grobler M, et al. Risk of serious NSAID-related gastrointestinal events during long-term exposure: a systematic review. *Med J Aust.* 2006;185:501–6.
  88. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med.* 2005;352:1092–102.
  89. Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM, et al. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ.* 2011;342:7086.
  90. Tehranzadeh J, Booya F, Root J. Cartilage metabolism in osteoarthritis and the influence of

- viscosupplementation and steroid: a review. *Acta Radiol.* 2005;46:288–96.
91. Ghosh P, Guidolin D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? *Semin Arthritis Rheum.* 2002;32:10–37.
  92. Day R, Brooks P, Conaghan PG, Petersen M; Multicenter Trial Group. A double blind, randomized, multicenter, parallel group study of the effectiveness and tolerance of intraarticular hyaluronan in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 2004;31:775–82.
  93. 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;278:45763–9.
  94. 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 Musculoskelet Disord.* 2018;19:157.
  95. Belle AL, Tislow R. A method of evaluating analgesics of the antiarthralgic type in the laboratory animal. *J Pharm Exp Ther.* 1950;98:19.
  96. 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;33:1555–69.
  97. 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;647:62–7.
  98. Kiniwa M, Yamamoto N, Hashimoto Y, Miyake H, Masuda H. Antiinflammatory effect of THS-201, a new intra-articular steroid. (in Japanese). *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1986;87:89–97.
  99. Pettipher ER, Henderson B, Edwards JC, Higgs GA. Effect of indomethacin on swelling, lymphocyte influx, and cartilage proteoglycan depletion in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1989;48:623–7.
  100. Green KL, Foong WC. Treatment of antigen-induced arthritis in rabbits by the intra-articular injection of methylprednisolone, 90Y or chlorambucil. *J Pharm Pharmacol.* 1993;45:815–20.
  101. Miyatake S, Ichiyama H, Kondo E, Yasuda K. Randomized clinical comparisons of diclofenac concentration in the soft tissues and blood plasma between topical and oral applications. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;67:125–9.
  102. Mashima T, Kondo M, Sakiyama N. Concentrations of Voltaren (diclofenac sodium) SR capsule in serum and tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Japanese journal of inflammation (Japan).* 1995;15:255–9.
  103. Antonas KN, Fraser JR, Muirden KD. Distribution of biologically labelled radioactive

- hyaluronic acid injected into joints. *Ann Rheum Dis.* 1973;32:103–11.
104. Jackson DW, Simon TM. Intra-articular distribution and residence time of Hylan a and B: a study in the goat knee. *Osteoarthr Cartil.* 2006;14:1248–57.
105. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 1990;61:1303–13.
106. Hale LP, Haynes BF, McCachren SS. Expression of CD44 variants in human inflammatory synovitis. *J Clin Immunol.* 1995;15:300–11.
107. Kisukeda T, Onaya J, Yoshioka K. Effect of diclofenac etalhyaluronate (SI-613) on the production of high molecular weight sodium hyaluronate in human synoviocytes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2019;20:201.
108. Balazs EA. The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid. In disorders of the knee. (ed. by AJ Helfet) Lippincott Co., Philadelphia, 1974, 63–75.
109. Dahl LB, Dahl IM, Engström-Laurent A, Granath K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis.* 1985;44:817–22.
110. 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;61:125–35.
111. Ikeya H, Miyoshi T, Nakamura T, Endo M. Hyaluronate degradation and synthesis by cultured synovial fibroblasts derived from knee joints of patients suffering from rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Connective Tissue.* 1994;25:243–9.
112. Prescribing Information for Voltaren 1% Gel (diclofenac sodium topical gel). (revised: Nov. 2011, NDA No. 022 122).