

イマチニブ錠 100 mg 「明治」の NOG マウスを用いたヒト慢性骨髄性白血病細胞 皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果の検討

Meiji Seika ファルマ株式会社

倉田 靖 土屋敏行 間中正恵 佐藤誠孝
斉藤 健 酒井東日 高橋義三郎

要 旨

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したイマチニブ錠 100 mg 「明治」(以下, Imatinib 「Meiji」) について, 先発医薬品であるノバルティスファーマ株式会社のグリベック®錠 100 mg (以下, Glivec®) を対照に, NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ^{null}) マウス皮下移植ヒト慢性骨髄性白血病細胞に対する抗腫瘍効果を比較検討した。

6 週齢の雌 NOG マウスの側腹部皮下にヒト慢性骨髄性白血病由来の K562 細胞を移植し, その 5 日後, Imatinib 「Meiji」及び Glivec®ともに 200 mg/kg の用量を 1 日 1 回の頻度で 14 日間強制経口投与した。媒体対照群には媒体のみを投与した。投与期間中に腫瘍径を測定し, 算出された各群の体積の推移により, 抗腫瘍効果を比較検討した。

その結果, Imatinib 「Meiji」投与群では媒体対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果が観察された。Imatinib 「Meiji」の平均腫瘍体積の推移を Glivec®投与群と比較すると, ほぼ同様の抑制効果が示され, Imatinib 「Meiji」と Glivec®のヒト慢性骨髄性白血病細胞に対する抗腫瘍効果はほぼ同様であると考えられた。

以上から, Imatinib 「Meiji」のヒト慢性骨髄性白血病細胞に対する抗腫瘍効果は先発医薬品である Glivec®と同様であることが示された。

キーワード: イマチニブ, 慢性骨髄性白血病, 抗腫瘍効果, 後発医薬品, NOG マウス

はじめに

グリベック®錠 100 mg (以下, Glivec®) は, 選択的なチロシンキナーゼ阻害作用を有する分子標的薬である。本剤は Bcr-Abl 発現細胞のチロシンキナーゼを阻害し, 増殖抑制及びアポトーシスを誘導することにより抗腫瘍効果を発揮する¹⁾²⁾。

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したイマチニブ錠 100 mg 「明治」(以下, Imatinib 「Meiji」) は, 先発医薬品である Glivec®と有効成分のイマチニブメシル酸塩を同量含有する同一剤型の製剤であ

る。

今回, Imatinib 「Meiji」の慢性骨髄性白血病 (CML) に対する抗腫瘍作用について, ヒト慢性骨髄性白血病細胞株である K562 細胞を NOG マウスに移植したモデル系を用い, 標準製剤である Glivec®と比較検討した。

I. 材料及び試験方法

1. 使用製剤

試験製剤としてイマチニブ錠 100 mg 「明治」(Meiji Seika ファルマ株式会社) を, 標準製剤とし

てグリベック[®]錠 100 mg (ノバルティスファーマ株式会社) を使用した。

2. 使用動物

5 ~ 7 週 齢 の 雌 NOG (NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ^{null}) マウス (日本クレア株式会社) を 7 日間の馴化飼育の後、試験に供した。動物は入荷後、マウス用ポリカーボネート製ケージにて飼育した。

試験期間中は、体重測定、外観、行動等の一般症状観察を行った。

動物は、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、照明時間 7:00 ~ 19:00 の環境下で飼育し、飲料水は加熱滅菌水道水を、飼料は固型飼料 CE-2 (日本クレア株式会社) を自由摂取させた。

3. 試験方法

1) ヒト慢性骨髄性白血病細胞皮下移植 NOG マウスの作製

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 (公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンク) を、血球計算板にて細胞数を計数し、RPMI1640 (Life Technologies) を用いて 5×10^6 cells/mL の細胞懸濁液を調製した。NOG マウスにイソフルラン麻酔を施した後、側腹部皮下に K562 細胞懸濁液を 100 $\mu\text{L/head}$ (5×10^5 cells) 移植した。

2) 投与液の調製

投与液の調製は、各製剤の錠 (100 mg) を乳鉢にて粉碎し、媒体 (0.5 w/v% メチルセルロース 400 溶液、和光純薬工業株式会社) と混和し、20 mg/mL の濃度となるように、懸濁液を作製した。

3) 投与方法

腫瘍細胞移植の 5 日後 (投与開始日) に、腫瘍体積及び体重を指標として、各群の平均腫瘍体積が均一になるように 12 匹ずつ 3 群に分け、媒体対照群と 200 mg/kg の Imatinib 「Meiji」及び Glivec[®]投与群に割り付けた。

Imatinib 「Meiji」及び Glivec[®]投与群の各々の投与液は投与開始日より 1 日 1 回の頻度で 14 日間経口投与した。投与液量 (10 mL/kg) は直前に測定した体重値より算出した。媒体対照群の動物には、媒体を同じ投与スケジュール及び投与経路で投与した。なお、投与量及び投与期間は既報を参考に設定した³⁾。

4) 腫瘍径の測定

移植後、マウスの体重測定及びノギスによる腫瘍の長径 (L) と短径 (W) の測定を実施し、計算式 $V=LW^2/2$ により腫瘍体積 (V) を算出した⁴⁾。

4. 統計学的処理

統計解析には「GrafPad Prism 6」(有限会社エムデーエフ) を使用した。体重及び腫瘍体積における媒体対照群と各製剤投与群間の差は、対象となる 2 群が等分散の場合は Student の t-検定を、不等分散の場合は Welch の検定を用い (片側検定)、5%水準で有意性を判定した。

5. 動物倫理

本実験は、公益財団法人実験動物中央研究所の試験施設において実施された。本試験は「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号)」並びに「実験動物の飼養保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)」, 「研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日文科科学省告示第 71 号)」等の関連法規を遵守し、同研究所の動物実験委員会の承認を得て、施設で定めている実験動物の管理及び福祉に関する規定 [(公財) 実験動物中央研究所動物実験等に関する規定] に従って実施された。

II. 結 果

投与期間中に死亡例はなく、一般状態の顕著な異常も認められなかった。

各群における平均腫瘍体積の推移を Fig. 1 に、投与終了時の各群の平均腫瘍重量を Fig. 2 に示した。

Imatinib 「Meiji」投与群の腫瘍体積は、投与 7 日目から溶媒対照群に比較して統計学的に有意な増加抑制が認められ、最終投与日の投与 14 日目では媒体対照群との差は最大となり、明らかな抗腫瘍効果が認められた。Imatinib 「Meiji」投与による腫瘍体積増加抑制の推移は、標準製剤である Glivec[®]と比較して有意差はなく、類似した抗腫瘍効果が示された。さらに投与 14 日目に摘出した腫瘍の重量は両製剤とも媒体対照群に比較して有意な減少が認められ、腫瘍の重量においても両製剤は同様の抑制効果を示した。

各群の平均体重の推移を Fig. 3 に示した。両製

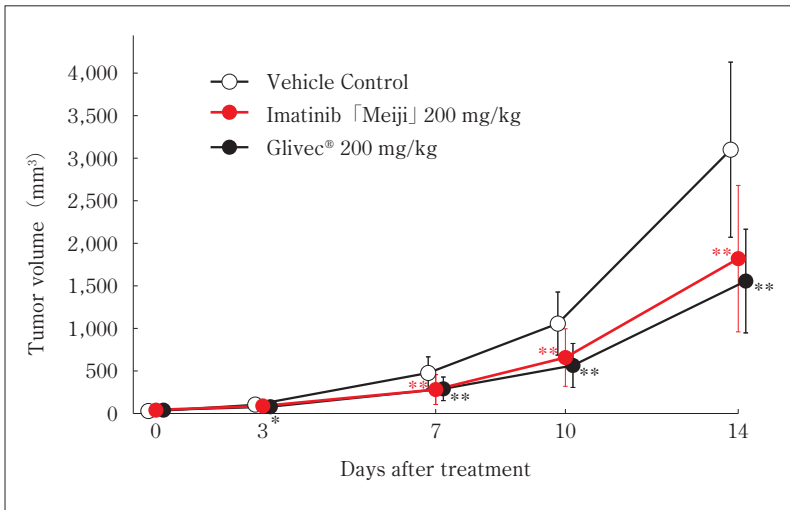


Fig. 1 The growth curves of subcutaneous xenografts of K562 cells.

K562 tumor-bearing NOG mice were administered orally with vehicle, 200 mg/kg Imatinib [Meiji] or Glivec® for 14 days. Each value represents the mean \pm SD, n=12.

Significant difference from vehicle control group at the same time point.

*, **: $P < 0.05$ and 0.01 , respectively

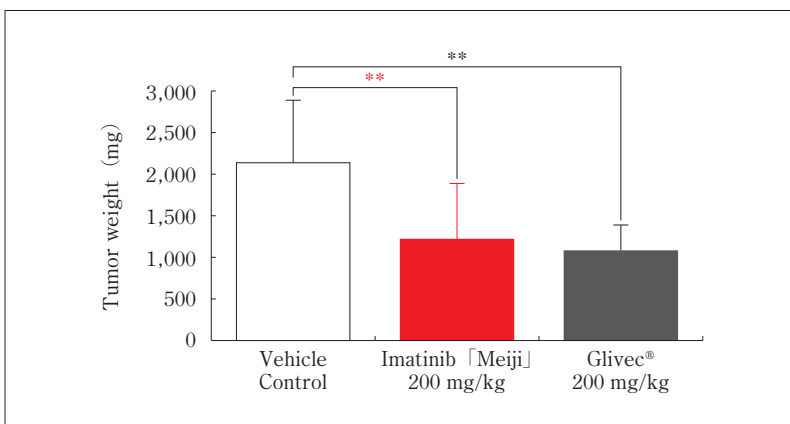


Fig. 2 Weights of tumors dissected from each group (n=12) on Day 14 post-treatment with vehicle, 200 mg/kg Imatinib [Meiji] or Glivec®.

Columns, mean; error bars, SD.

Significant difference from vehicle control group.

** : $P < 0.01$.

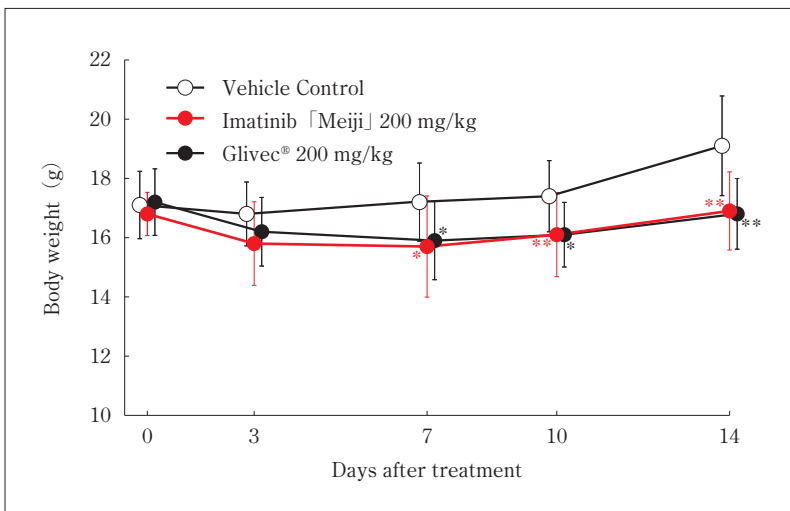


Fig. 3 Changes in body weight of K562 tumor-bearing NOG mice administered orally with vehicle, 200 mg/kg Imatinib [Meiji] or Glivec® for 14 days.

Each value represents the mean \pm SD, n=12.

Significant difference from vehicle control group at the same time point.

*, **: $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

剤投与群の平均体重の推移は媒体対照群と比較して低値を示したが、両製剤群間に差は認められなかった。

Ⅲ. 考 察

後発医薬品は、薬食発第 0331015 号 (平成 17 年

3 月 31 日)「医薬品の承認申請について」に基づき、規格及び試験方法の設定、安定性試験 (加速試験)、生物学的同等性試験を実施し、先発医薬品と同等であることが認められ、製造販売承認される医薬品である。一方、後発医薬品は発売時に使用成績等の情報がないため、これら承認申請に必要なデー

タの他に、可能な限り品質や治療効果、副作用に関する情報提供をすることが望ましいと考えられる。

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発した Imatinib 「Meiji」は、Glivec®の後発医薬品である。Glivec®の適応として、様々な疾患特異的なキナーゼの阻害作用により CML, フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 (Ph⁺ ALL), KIT (CD117) 陽性消化管間質腫瘍 (GIST) 及び FIP1L1-PDGFR α 陽性の好酸球増多症候群又は慢性好酸球性白血病がある^{1)5)~7)}。本稿ではこれら適応のうち CML の *in vivo* モデルとして Bcr-Abl の発現が知られている K562 細胞移植系を用いて、Imatinib 「Meiji」と先発医薬品との Bcr-Abl チロシンキナーゼ阻害作用に基づく抗腫瘍作用を比較検討した。

Imatinib 「Meiji」の投与期間中の腫瘍体積の推移は、媒体対照群と比較して有意な増殖抑制効果が観察され、さらに投与終了後の移植腫瘍の重量の比較においても有意な減少がみられた。また、Imatinib 「Meiji」投与群の腫瘍体積の推移と腫瘍重量は標準製剤である Glivec®投与群と同様の抑制が示され、このことから Imatinib 「Meiji」の薬効は標準製剤と同様と考えられた。

Imatinib 「Meiji」及び Glivec®投与群の各平均体重の推移は媒体対照群と比較して低値を示したが、その程度は両製剤群で同様であった。両製剤群と媒体対照群の各平均体重の差は皮下腫瘍の重量差を考慮すると軽微と考えられ、一般状態に異常もなかったことから、本試験条件下では両製剤とも顕著な毒性は示さなかった。

以上から、ヒト慢性骨髄性白血病細胞皮下移植 NOG マウスモデルを用いた抗腫瘍評価におけるイマチニブ錠 100 mg 「明治」の薬効は、標準製剤で

あるグリベック®錠 100 mg と同様であると考えられた。

謝 辞

本研究実施にあたりご協力いただいた公益財団法人実験動物中央研究所の水島友子氏及び Meiji Seika ファルマ所属の富岡聡子氏、田形典子氏、川野有美氏の各研究員に感謝いたします。

文 献

- 1) Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, et al: Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 493-502, 2002.
- 2) Druker BJ, Lydon NB: Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **105**: 3-7, 2000.
- 3) Wu JY, Yang DJ, Angelo LS, et al: Molecular imaging of Bcr-Abl phosphokinase in a xenograft model. *Mol Cancer Ther* **8**: 703-710, 2009.
- 4) Inaba M: Experimental Treatment Protocols. In: Nomura T, Sakurai Y, Inaba M, eds; *The nude mouse and anticancer drug evaluation*, Appendix 2, Tokyo: Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Publishers Inc., 43-56, 1996.
- 5) Bernt KM, Hunger SP: Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol* **4**: 1-21, 2014.
- 6) Serrano C, George S: Recent advances in the treatment of gastrointestinal stromal tumors. *Ther Adv Med Oncol* **6**: 115-127, 2014.
- 7) Baccarani M, Cilloni D, Rondoni M, et al: The efficacy of imatinib mesylate in patients with FIP1L1-PDGFR α -positive hypereosinophilic syndrome. Results of a multicenter prospective study. *Haematologica* **92**: 1173-1179, 2007.