

エスワンメイジ[®]配合カプセル T25 の ヌードマウスを用いたヒト胃癌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 打田光宏 平塚一幸
間中正恵 酒井東日 佐溝邦夫 梅木祐仁

要 旨

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したエスワンメイジ[®]配合カプセル T25 (以下, S-1Meiji) について, 先発医薬品である大鵬薬品工業株式会社のティーエスワン[®]配合カプセル T25 (以下, TS-1) を比較対照に, ヌードマウス皮下移植ヒト胃癌細胞に対する抗腫瘍効果並びに造血器及び小腸への影響を検討した。

MKN45 ヒト胃癌細胞を6週齢の雌ヌードマウスの背部皮下に移植し, 移植の11日後より, S-1Meiji 及び TS-1 とともに各々 10 mg/kg の用量を1日1回の頻度で9日間, 強制経口投与した。投与期間終了後, 動物は継続して12日間の観察期間を設けた。投与及び観察期間中に腫瘍径を測定した。サテライト群として一部の動物は両製剤の 10 mg/kg を9日間強制経口投与後に解剖し, 全採血を行い, 造血器への影響を検討するため白血球数を計測した。また, これらの動物の小腸について病理組織学的に投与の影響を検討した。

その結果, S-1Meiji 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。S-1Meiji の平均腫瘍体積の推移を標準製剤である TS-1 投与群と比較すると, ほぼ同様の抑制傾向が示され, S-1Meiji と TS-1 の薬効はほぼ同様であると考えられた。

サテライト群では, 媒体対照群と比較して両製剤群に有意な白血球数の減少が観察されたが, 両製剤群間では差はなかった。また, 小腸陰窩上皮細胞に軽度の単細胞壊死と TUNEL 染色陽性のアポトーシスの増加が両製剤ともにみられたが, これらの程度は両製剤間で差はみられなかった。

以上より, エスワンメイジ[®]配合カプセル T25 の薬効並びに造血器及び小腸への影響は, 標準製剤であるティーエスワン[®]配合カプセル T25 とほぼ同様と考えられた。

キーワード: フルオロウラシル, テガフル, ギメラシル, オテラシルカリウム, 胃癌, 抗腫瘍効果, 後発医薬品

はじめに

ティーエスワン[®]配合カプセル T25 は, フルオロウラシル (5-FU) のプロドラッグであるテガフルに, 二つのモジュレーターであるギメラシル及びオテラシルカリウムをモル比で各々 1 : 0.4 : 1 にて

配合した経口抗悪性腫瘍剤である。ギメラシルは 5-FU の分解阻害剤で血中 5-FU 濃度を上昇させて抗腫瘍効果を高める目的で, さらにオテラシルカリウムは消化管粘膜細胞に分布し, 5-FU のリン酸化酵素を阻害して消化管毒性を軽減する目的で配合されている¹⁾。

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したエスワンメイジ®配合カプセル T25 (以下, S-1Meiji) は, 先発医薬品であるティーエスワン®配合カプセル T25 (以下, TS-1) と有効成分であるテガフル並にその配合剤であるギメラシル及びオテラシルカリウムを同量含有する同一剤型の薬剤である。

今回, S-1Meiji の胃癌に対する抗腫瘍作用について, ヒト胃癌細胞株である MKN45 細胞をヌードマウスに移植した系を用い, 標準製剤である TS-1 と比較検討した。また, 投与終了時の血液を用いて, 抗腫瘍効果に伴う骨髄抑制を反映する白血球数の変動と小腸の病理変化を両製剤について検討した。

I. 材料及び試験方法

1. 使用薬剤

試験製剤としてエスワンメイジ®配合カプセル T25 (Meiji Seika ファルマ株式会社) を, 標準製剤としてティーエスワン®配合カプセル T25 (大鵬薬品工業株式会社) を使用した。

2. 使用動物

5 週齢の雌ヌードマウス (CAN.N.Cg-Foxn1^{tm1}/CrlCrlj マウス, 日本チャールス・リバー株式会社) を 4 日間の検疫期間を含む 10 日間の馴化飼育の後, 6 週齢で試験に供した。動物は入荷後, 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, 行動などの一般症状観察を行った。

動物は, 温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 $50 \pm 20\%$, 換気回数 $10 \sim 20$ 回/時, 照明時間 7:00 ~ 19:00 の環境下で飼育し, 飲料水は水道水を給水ビンにて, 飼料は放射線滅菌固型飼料 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) ヒト胃癌細胞移植マウスの作製

ヒト胃癌細胞株, MKN45 (独立行政法人理化学研究所 筑波研究所 バイオリソースセンター) を, 10%牛胎児血清及び抗生物質含有 RPMI1640 (Life Technologies) で約 4 週間培養したものを移植に供した。

移植当日に, 培養細胞をトリプシン処理した後回収し, 50%の BD マトリゲル基底膜マトリックス (BD Biosciences) を含む D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Life Technologies) に

5×10^7 cells/mL の細胞濃度で懸濁した。細胞数の計測は血球計算盤を用いて行った。調製した細胞懸濁液は移植まで氷上にて維持した。動物にイソフルラン麻酔を施した後, この腫瘍細胞懸濁液 (5×10^6 cells/100 μL /animal) を右背部皮下に移植した。

2) 投与液の調製

投与液の調製は, 各製剤の 1 カプセル (25 mg) 中の薬剤を蒸留水 (株式会社大塚製薬工場) に溶解させ, 該当する用量に応じて投与液濃度を調整した。

3) 投与方法

腫瘍細胞移植の 11 日後 (投与開始日) に, 腫瘍体積を指標に動物を選択した。選択された動物は腫瘍体積で順位付けを行い, 主群として各群の平均腫瘍体積が均一になるように 1 群 12 匹の 3 群に分け, 媒体対照群と 10 mg/kg の S-1Meiji 及び TS-1 投与群に割り付けた。選択されなかった動物から血液学的検査及び小腸の病理組織学的検査実施のサテライト群として任意に 9 匹を選択し 1 群 3 匹の 3 群に群分けし, 各々を媒体対照群と 10 mg/kg の S-1Meiji 及び TS-1 投与群とした。S-1Meiji 及び TS-1 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 9 日間経口投与した。媒体対照群の動物には蒸留水を同じ投与スケジュール及び投与経路で投与した。投与容量は 10 mL/kg とし, 当日の体重を基に投与量を算出した。なお, 投与量及び投与期間の設定は既報を参考に設定した²⁾³⁾。

4) 腫瘍径の測定

動物にイソフルラン麻酔を施した後, 腫瘍の長径及び短径について電子ノギス (株式会社ミットヨ) を用いて測定し, 腫瘍体積は次式を用いて算出した。

$$\text{腫瘍体積}(\text{mm}^3) = \text{長径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm})^2 \times 0.5$$

また, 各測定日における媒体対照群の平均腫瘍体積及び各薬剤投与群の平均腫瘍体積から以下により腫瘍増殖抑制率を計算し, 両製剤の最大となる抑制率を算出した。

$$\text{腫瘍増殖抑制率} = \left(1 - \frac{\text{薬剤投与群の平均腫瘍体積}}{\text{媒体対照群の平均腫瘍体積}} \right) \times 100 (\%)$$

5) 血液学的検査及び小腸の病理組織学的検査

最終投与日の翌日に、サテライト群の動物にイソフルラン麻酔を施し開腹した。腹部後大静脈よりシリンジ及びマイクロティナ微量採血管（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いて全採血を行った。全採血終了後、小腸を摘出しホルマリン固定した。採取した血液は総合血液学検査装置 ADVIA2120i（Siemens Healthcare Diagnostics K.K.）を用いて白血球（WBC）数を計測した。摘出した小腸は常法に従いパラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し病理組織学的に薬剤投与による影響を検討した。また、小腸陰窩上皮細胞のアポトーシスの検出のために TUNEL 法（The ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, 日本ミリポア株式会社）による染色を実施した。病理標本作製及び検査は Meiji Seika ファルマ株式会社にて実施した。

4. 統計学的処理

腫瘍体積の有意差検定は Student's t-test により実施した。体重は各群の投与開始時と試験終了時の体重について Paired t-test, 白血球数では各群間で Student's t-test により実施した。

検定には GraphPad Prism 5 を使用し、有意水準は両側 5% とした。

5. 動物倫理

本実験は、株式会社ボゾリサーチセンター つくば研究所の施設で実施された。本実験は、「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，平成 23 年 8 月 30 日法律第 105 号），「実験動物の飼養及び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）」及び「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議，平成 18 年 6 月 1 日）に合致し、株式会社ボゾリサーチセンター つくば研究所 動物実験委員会の承認を得て、試験施設で定めている実験動物の管理及び福祉に関する指針（動物実験委員会規則）に従って実施した。

II. 結 果

各投与群における平均腫瘍体積の推移を Fig. 1 に示した。

S-1Meiji の 10 mg/kg 投与群の腫瘍体積は、媒体対照群と比較して、投与開始後から増殖抑制効果がみられ、投与期間終了後の腫瘍細胞移植 20 日後以降において媒体対照群と比較して有意な抗腫瘍効果が示された。S-1Meiji 投与による腫瘍体積の推移は、標準製剤である TS-1 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、腫瘍増殖抑制率は両製剤ともに観察期間終了時である移植後 31 日で最大となり、S-1Meiji 及び TS-1 では各々 48% と 47% と同様の値を示した。

各群の試験開始及び終了時の動物数と平均体重を Table 1 に示した。媒体対照群を含めた各群の試験開始時の体重は、試験終了時に比較して減少が認められた。また、両製剤投与群の終了時の平均体重は対照群に比較して低い値を示したが、両製剤群間に差は認められなかった。投与期間中に死亡例はみられなかったが、投与終了後の観察期間中（投与終了後 5 日目）に TS-1 投与群の 1 例に死亡が認められた。

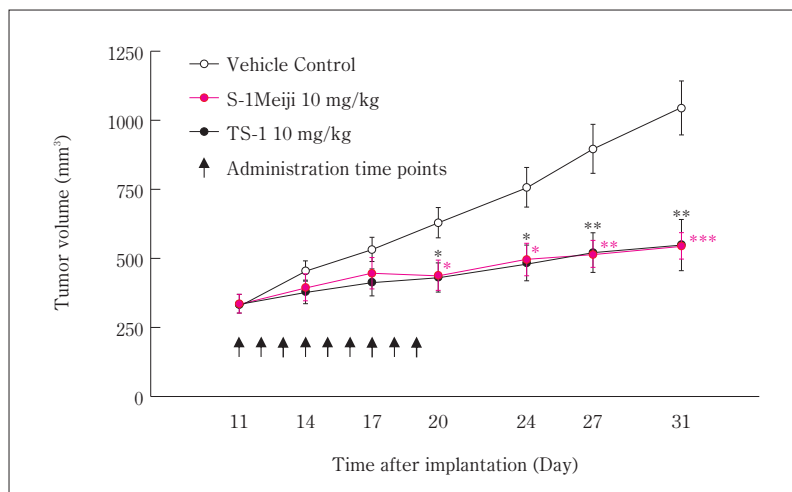


Fig. 1 Tumor volume

MKN45 tumor-bearing mice were administered orally with S-1Meiji or TS-1 daily for 9 days followed by observation periods of 12 days without treatment. Each value represents the mean \pm SEM. Significant difference from vehicle control group at the same time point. *, ** and ***: $P < 0.05$, 0.01 and 0.001 , respectively

Table 1 Body weights in female nude mice after treatment with S-1Meiji and TS-1 for 9 days followed by observation period of 12 days

| Groups | Dose (mg/kg) | No. of mice | | Body weights (g) | |
|-----------------|--------------|-------------|------------------|------------------|---------------|
| | | Initial | Final | Initial | Final |
| Vehicle Control | 0 | 12 | 12 | 17.8 ± 0.7 | 15.9 ± 0.8*** |
| S-1Meiji | 10 | 12 | 12 | 17.8 ± 0.6 | 14.5 ± 0.5*** |
| TS-1 | 10 | 12 | 11 ^{a)} | 17.9 ± 0.6 | 14.9 ± 0.7*** |

Each value represents the mean ± SEM.

^{a)} One animal died on 24 days after implantation.

Significant difference from initial body weight in each group. *** : P < 0.001

サテライト群の各群における平均白血球数を Fig. 2 に、各群の小腸粘膜の病理組織写真を Fig. 3 に示した。投与期間終了の翌日に測定された媒体対照群の平均白血球数は 26.4 ± 5.9 ($\times 10^2$ 個/ μL , 平均値 ± 標準偏差) であったが、S-1Meiji 及び TS-1 投与群では各々 8.6 ± 4.0 ($\times 10^2$ 個/ μL) と 4.5 ± 1.4 ($\times 10^2$ 個/ μL) であり、両製剤とも媒体対照群に比較して有意な減少がみられた。しかし、両製剤群間に差は認められなかった。

小腸の病理組織学的検査では、S-1Meiji 及び TS-1 投与 (9 日間) による明らかな障害性の変化は観察されなかったが、媒体対照群 (Fig. 3-a) に比較して両製剤ともに小腸陰窩上皮細胞に単細胞壊死が軽度に見られた (Fig. 3-c, e)。さらに、TUNEL 法による免疫組織化学的検討では、これら同部位の小腸陰窩に TUNEL 陽性の細胞が散見された (Fig. 3-d, f)。

III. 考 察

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したエスワンメイジ[®]配合カプセル T25 は、経口抗悪性腫瘍剤であるティーエスワン[®]配合カプセル T25 の後発医薬品である。後発医薬品は、「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」に従い製剤評価 (溶出試験及びヒトでの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が必要と考えられる。本稿では先発品と同様の有効性および安全性が得られるかどうかについて、MKN45 細胞移植系による *in vivo* モデルを用いて検討した。

MKN45 ヒト胃癌細胞皮下移植ヌードマウスモデルを用いて、腫瘍増殖抑制効果、体重変化、白血球数及び小腸の病理変化を指標に S-1Meiji と標準製剤である TS-1 の薬効及び忍容性を比較検討した。

投与及び観察期間中の腫瘍体積推移では、S-1Meiji 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。また、S-1Meiji 投与群の平均腫瘍体積の推移を標準製剤である TS-1 投与群と比較すると、ほぼ同様の抑制傾向が示され、本試験系において S-1Meiji の薬効は標準製剤とほぼ同様と考えられた。

体重変化に関しては、媒体対照群を含む全ての群で体重の減少がみられたが、S-1Meiji と TS-1 の両製剤投与群では、媒体対照群よりもさらに体重減少がみられた。媒体対照群でみられた体重減少は、MKN45 皮下移植腫瘍の増殖による影響と考えられた。一方、両製剤投与群でみられた媒体対照群を超える体重減少は、両製剤投与の影響によるものと考えられたが、S-1Meiji と TS-1 投与群の体重減少の程度はほぼ同様と考えられた。

既報において、TS-1 の有効成分である 5-FU には造血器系及び消化器系に対する影響が報告されている²⁾⁴⁾⁵⁾。血液学検査 (白血球数測定) では、両製剤群において、媒体対照群と比較して有意な白血球数の減少が観察された。白血球減少は TS-1 投与で認められる副作用の 1 つであるが、S-1Meiji と TS-1 の白血球減少作用に大きな差はないと考えられた。また、小腸の病理学的な検討では両製剤投与群ともに著しい影響は認められなかったが、小腸陰窩上皮細胞の単細胞壊死が何れの製剤群においても軽度に見られ、両製剤間では小腸に与える影響に大きな差はなかった。一方これら小腸陰窩上皮の単細胞

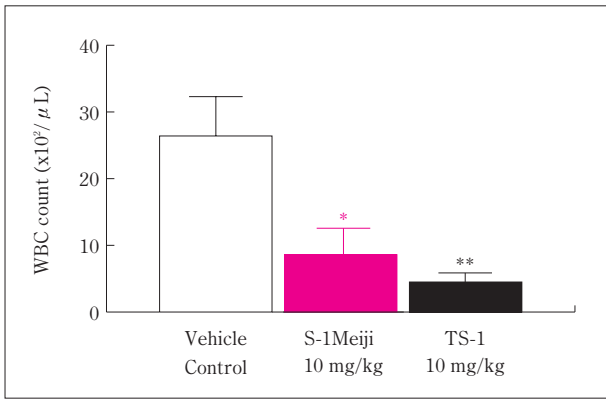


Fig. 2 Leukocyte counts

Leukocyte counts of nude mice after treatment with 10 mg/kg S-1Meiji or TS-1 for 9 days. Each value represents the mean \pm SD (n = 3). Significant difference from vehicle control group. *, **: P < 0.05, 0.01, respectively

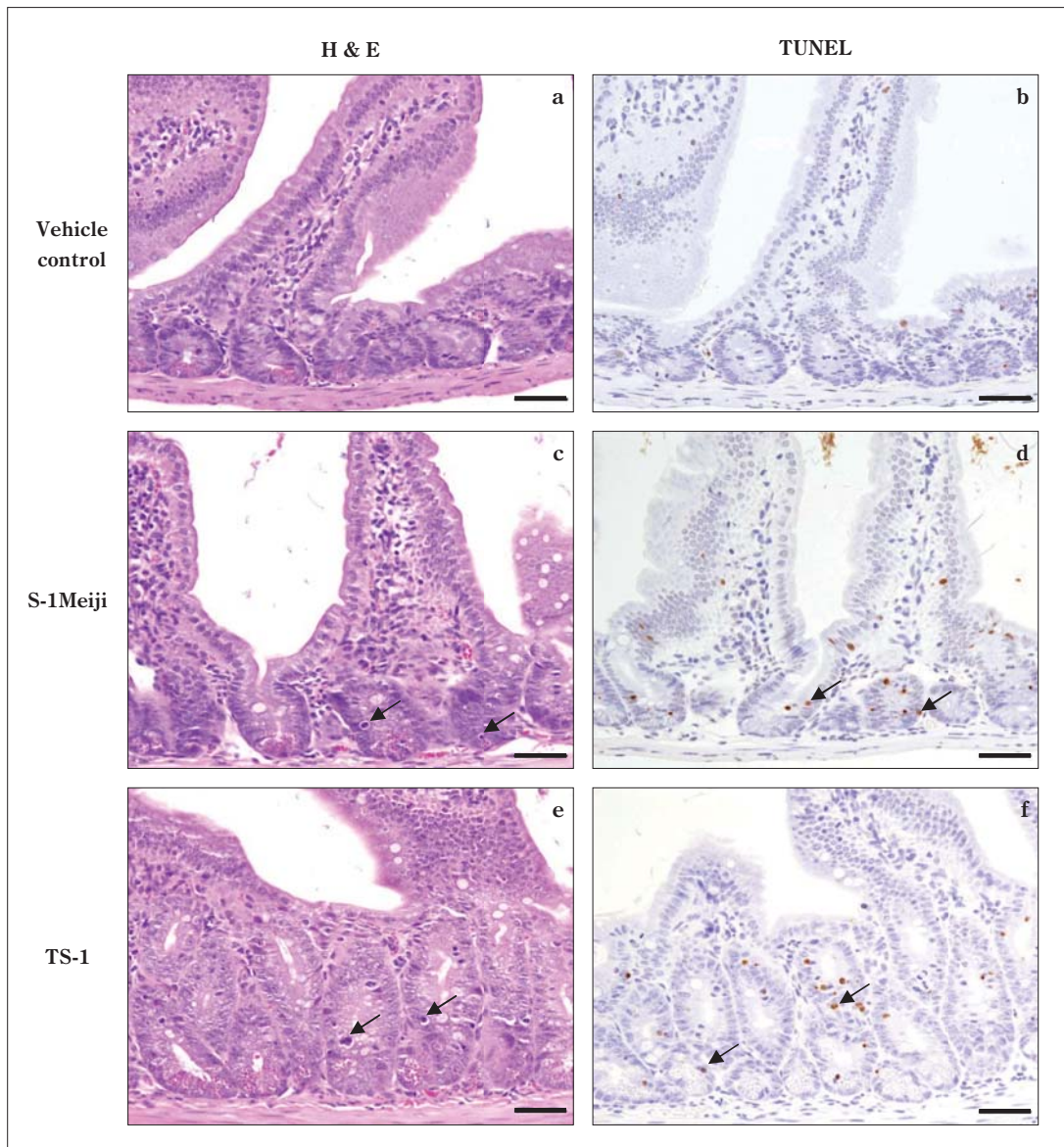


Fig. 3 Photomicrographs of H & E and TUNEL staining sections (x200) of the small intestinal mucosa of vehicle control (a, b) and after treatment with 10 mg/kg of S-1Meiji (c, d) and TS-1 (e, f) for 9 days, respectively. The small intestine in MKN45 tumor-bearing mice in the vehicle control group was in normal appearance (a) and TUNEL staining showed negative in the crypt (b). Single-cell necroses (arrows) in the crypt cell were mildly seen in the mice treated with S-1Meiji (c) and TS-1 (e). TUNEL staining revealed positive cells (arrows) mainly in the crypt (d, f). Scale bars: 50 μ m

胞壊死の出現部位に一致して TUNEL 陽性細胞が認められ、これらはアポトーシスと考えられた。両製剤の活性体である 5-FU は腸上皮のアポトーシスを誘導することが知られている⁶⁾。これらのことから、両製剤の9日間の投与により認められた腸の変化は同程度であり、また、その変化にはいずれもアポトーシスの出現を伴っていた。

以上から、ヒト胃癌細胞皮下移植ヌードマウスモデルを用いた評価におけるエスワンメイジ[®]配合カプセル T25 の薬効並びに造血器及び小腸への影響は、標準製剤であるティーエスワン[®]配合カプセル T25 とほぼ同様と考えられた。

文 献

- 1) Shirasaka T: Development history and concept of an oral anticancer agent S-1 (TS-1[®]): its clinical usefulness and future vistas. *Jpn J Clin Oncol*, **39**: 2-15, 2009.
- 2) Arai W, Hosoya Y, Haruta H, Kurashina K, Saito S, Hirashima Y, Yokoyama T, Zuiki T, Sakuma K, Hyodo M, Yasuda Y, Nagai H, Shirasaka T: Comparison of alternate-day versus consecutive-day treatment with S-1: assessment of tumor growth inhibition and toxicity reduction in gastric cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int J Clin Oncol*, **13**: 515-20, 2008.
- 3) Kodera Y, Fujiwara M, Yokoyama H, Ohashi N, Miura S, Ito Y, Koike M, Ito K, Nakao A: Combination of oral fluoropyrimidine and docetaxel: reappraisal of synergistic effect against gastric carcinoma xenografts. in vivo, **19**: 861-6, 2005.
- 4) Lokich JJ, Ahlgren JD, Gullo JJ, Philips JA, Fryer JG: A prospective randomized comparison of continuous infusion fluorouracil with a conventional bolus schedule in metastatic colorectal carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program Study. *J Clin Oncol*, **7**: 425-32, 1989.
- 5) Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. Meta-analysis Group In Cancer. *J Clin Oncol*, **16**: 301-8, 1998.
- 6) Pritchard DM, Potten CS, Hickman JA: The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation, and 5-fluorouracil-induced histopathology in murine intestinal epithelia. *Cancer Res*, **58**: 5453-65, 1998.

ANTI-TUMOR EFFECTS OF S-1MEIJI® COMBINATION CAPSULES T25 IN NUDE MICE IMPLANTED WITH HUMAN GASTRIC CANCER-DERIVED CELLS

Yasushi KURATA, Toshiyuki TSUCHIYA, Kazuyuki HIRATSUKA,
Masae MANAKA, Toki SAKAI, Kunio SAMIZO and Yuji UMEKI

Meiji Seika Pharma, Co., Ltd.

Abstract

S-1Meiji® Combination Capsules T25 (test formulation) developed by Meiji Seika Pharma, Co., Ltd. was examined on its anti-tumor effects in comparison with TS-1 combination capsule® T25 (Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.; standard formulation) that have been mainly used in treatment of gastric cancer. We used female nude mice (CAnN.Cg-Foxn1tm/CrjCrj) subcutaneously implanted with the human gastric cancer cell lines, MKN45. After 11 days of tumor cell transplantation, mice were administered orally with test or standard formulation at dose of 10 mg/kg daily for 9 days, respectively. After the treatment with the two formulations, all animals were observed for 12 days. The size of the tumor was measured for comparison from the start of treatment to the end of the study. Leukocyte counts and intestinal mucosal injury were examined in the additional three groups of mice treated with two formulations at dose of 10 mg/kg for 9 days.

As a result, a tendency of tumor growth inhibition by the test formulation was observed during a period of 9 days treatment. Thereafter, tumors in the test formulation group significantly decreased in volume throughout the observation period of 12 days. Similar antitumor effects for tumor growth during the study period were seen for the test and standard formulation.

Leukocyte counts in two groups of formulations were significantly decreased. Furthermore, intestinal mucosal damage in both groups was not clearly evident, however, single-cell necroses or apoptotic cells stained with TUNEL in the crypts were mildly observed in the groups.

The degree of decrease in leukocyte counts and the change of crypt cells of small intestine by the test formulation were comparable to those induced by the standard formulation.

The results concluded that the test formulation is expected to exert therapeutic effects in humans as in the case of standard formulation.

Key words: 5-fluorouracil, tegafur, gimeracil, oteracil potassium, gastric cancer,
anti-tumor effect, generic drug
