

レトロゾール 2.5 mg 「明治」 の DMBA 誘発ラット乳腺腫瘍に対す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 奥山裕一 間中正恵
斉藤 健 酒井東日 青山式孝

要 旨

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したレトロゾール 2.5 mg 「明治」 (以下, Letrozole 「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フェマラー[®]錠 2.5 mg (以下, Femara[®]) を対照に, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 誘発ラット乳腺腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果を比較検討した。

7週齢のCrI:CD(SD) 雌ラットに DMBA を 75 mg/kg の用量で 1 回経口投与後, 外表観察で乳腺腫瘍 (直径 8 ~ 20 mm の腫瘍が 1 ~ 3 個) が確認できた動物について群分けを実施した。

群分け翌日より Femara[®]もしくは Letrozole 「Meiji」ともに 1.0 mg/kg の用量を 1 日 2 回 (午前及び午後) に分けて 5 週間反復経口投与した。媒体対照群は投与期間中に腫瘍径を測定し, 各群に発生した乳腺腫瘍の発生個数と発生した乳腺腫瘍の総体積の推移により, 乳腺腫瘍発生に対する両製剤投与の影響について比較検討した。

その結果, Letrozole 「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。Letrozole 「Meiji」の平均総腫瘍体積の推移と 1 匹あたりの腫瘍発生個数を標準製剤である Femara[®]投与群と比較すると, ほぼ同様の著明な抑制効果が示され, Letrozole 「Meiji」と Femara[®]のラット乳腺腫瘍発生に対する抗腫瘍効果は同様であると考えられた。

以上から, Letrozole 「Meiji」のラット乳腺腫瘍発生に対する抗腫瘍効果は先発医薬品である Femara[®]と同様であることが示された。

キーワード: レトロゾール, アロマターゼ阻害剤, 抗腫瘍効果, 後発医薬品, DMBA 誘発乳腺腫瘍

はじめに

アロマターゼ阻害剤であるフェマラー[®]錠 2.5 mg (以下, Femara[®]) は, エストロゲン合成経路中のアロマターゼを阻害し, 血漿中等のエストロゲン濃度を低下させることにより, エストロゲン依存性の乳がんに対する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レトロゾール 2.5 mg 「明治」 (以下, Letrozole 「Meiji」) は, 先発医薬品である Femara[®]と, 有効成分であるレトロゾールを同量含有する同一剤型の製剤である。本稿では, Letrozole 「Meiji」の乳腺腫瘍に対

する抗腫瘍作用について, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 誘発のラット乳腺腫瘍モデル系を用いて, 標準製剤である Femara[®]と比較検討した。

材料及び試験方法

1. 使用製剤

試験製剤としてレトロゾール 2.5 mg 「明治」 (Meiji Seika ファルマ株式会社) を, 標準製剤としてフェマラー[®]錠 2.5 mg (ノバルティス ファーマ株式会社) を使用した。

2. 腫瘍起始物質

乳腺腫瘍起始物質は DMBA (東京化成工業株式会社) を使用した。

3. 使用動物

6週齢の雌性 Crl:CD(SD)ラット (日本チャールス・リバー株式会社) を6日間の馴化飼育の後、試験に供した。生後50～65日の雌性SDラットにDMBAを投与した場合、乳腺腫瘍の発生率が高いことが報告されている³⁾。

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 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 15\%$ 、照明時間12時間/日 (7:00～19:00) の環境下で飼育し、飲料水は水道水を、飼料は固型飼料MF (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。

4. 試験方法

1) 投与液の調製

DMBAはコーンオイル (ナカライテスク株式会社) に溶解し、DMBA投与液 (15 mg/mL) を調製した。

Letrozole 「Meiji」 及び Femara[®]各製剤の投与液は、各製剤の錠 (2.5 mg) を乳鉢にて粉碎し、媒体として日本薬局方注射用水 (株式会社大塚製薬工場) を用い、0.1 mg/mL の濃度となるように調製した。

2) DMBA 誘発乳腺腫瘍ラットの作製

DMBAの投与量及び投与方法は既報¹⁾³⁾に基づき、試験開始時に7週齢の雌性ラットにDMBAを75 mg/kgの用量で経口ゾンデを用いて1回強制経口投与した。本系で誘発された乳腺腫瘍はヒト乳がんで見られるホルモン (エストロゲン) 依存性の増殖と病理組織型に類似性が認められており、乳がん治療薬の非臨床研究によく用いられる動物モデルである⁴⁾。

3) 投与方法

DMBAを経口投与したラットの外表観察で乳腺腫瘍 (直径8～20 mmの腫瘍が1～3個) が確認できた動物を選択して群分けを実施し、1.0 mg/kg/日のLetrozole 「Meiji」 及び Femara[®]を5週間、1日2回 (午前及び午後) に分けて、反復経口投与した。経時的に触診し、乳腺に発生した腫瘍の個数と各々の体積測定を行い、乳腺腫瘍発生に対する両製剤投与の影響を検討した。両製剤の投与容量 (5

mL/kg) は直近の体重に基づいて個体別に算出した。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¹⁾²⁾。

4) 腫瘍径の測定

毎週2回、すべての動物について、触診して確認できるすべての腫瘍の発生部位及び数を個体別に記録するとともに、確認した腫瘍は電子ノギスを用いて長径及び短径を測定し、腫瘍体積 (mm^3) [長径 (mm) \times 短径 (mm)² \times 0.5] を算出した。各個体で発生した腫瘍体積の総和を算出し、各群における腫瘍のサイズの推移を比較した。

5. 統計学的処理

体重、子宮重量、腫瘍に関するデータ (体積、個数、重量) における媒体対照群と各製剤投与群間の差の検定は、Bartlett法による等分散検定 (1%有意水準) により等分散の場合はパラメトリックのDunnett法による両側検定を行い、不等分散の場合はノンパラメトリックのSteel法による両側検定を行った。同様のデータで製剤間の差の検定はF検定を用い、等分散である場合はStudentのt検定 (両側) を用い、等分散でない場合にはWelch検定 (両側) を用いて解析した。有意水準は5% ($P < 0.05$) 又は1% ($P < 0.01$) のレベルで判定した。解析にはStatLightシリーズ (ユックムス社) を用いた。

6. 動物倫理

本実験は、株式会社DIMS医科学研究所において実施された。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月環境省告示第88号)」、 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」 (厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知平成18年6月科発第0601005号) 並びに「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) に基づいたDIMS医科学研究所動物実験指針 (平成26年5月2日) に従い、同研究所の実験動物委員会の承認を得て実施された。

結 果

投与期間中に被験物質の投与に起因する顕著な一

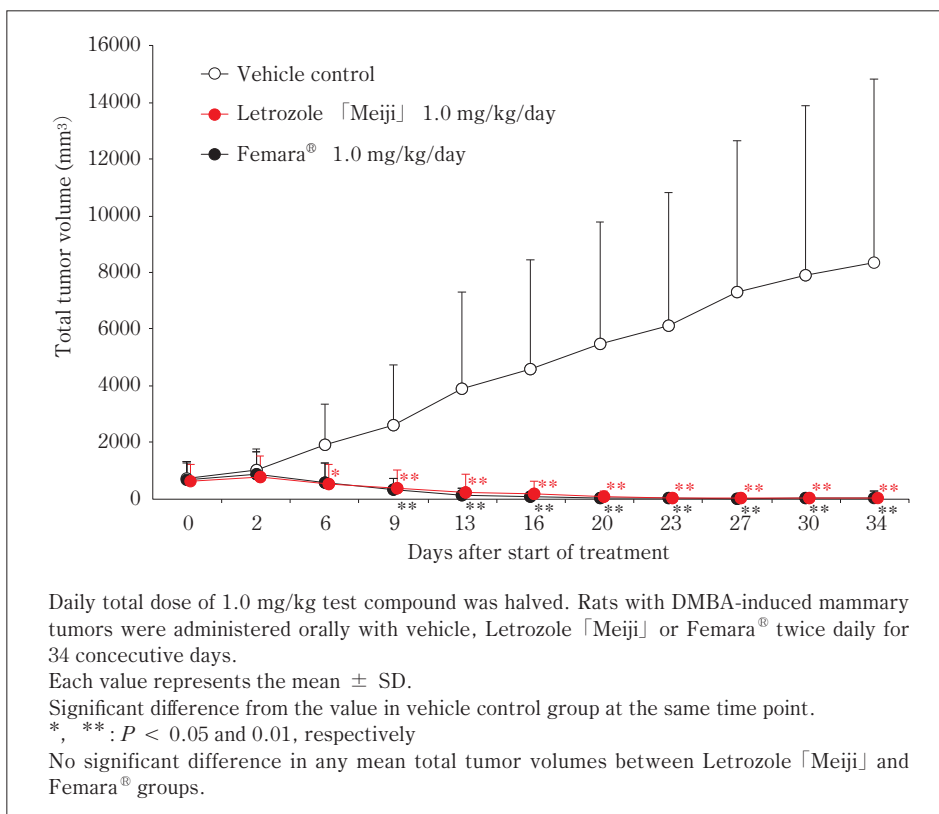


Fig.1 Effects of 1.0 mg/kg Letrozole [Meiji] or Femara[®] treatment on the mean tumor volume of DMBA-induced mammary tumors in female SD rats.

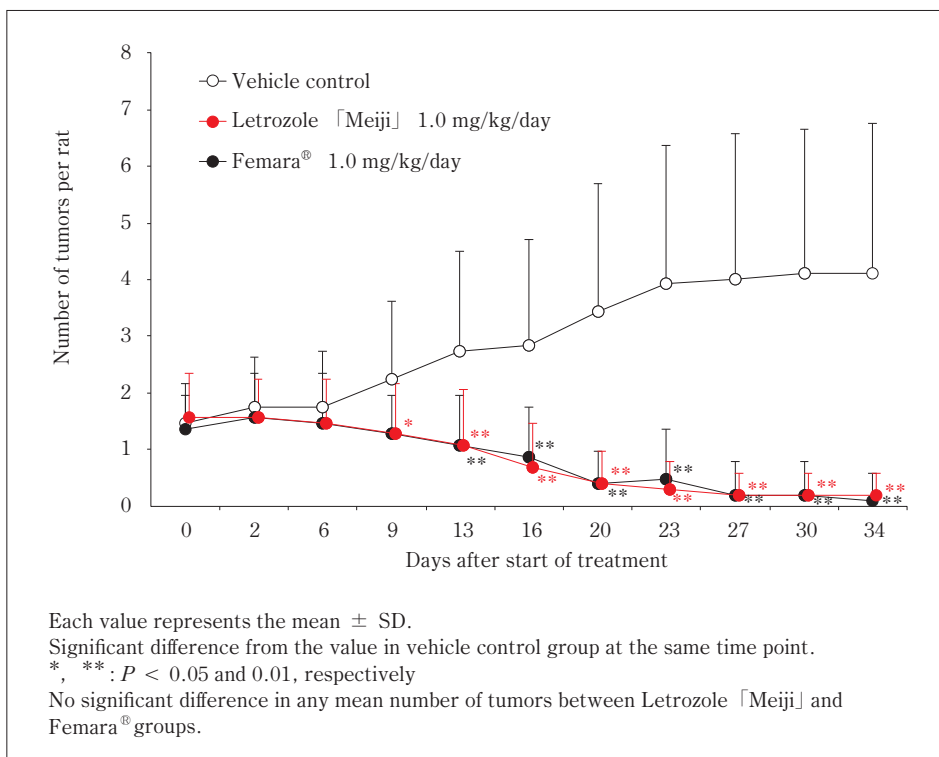


Fig.2 Effects of 1.0 mg/kg Letrozole [Meiji] or Femara[®] treatment on the mean number of DMBA-induced mammary tumors per rat in female SD rats.

Table 1 Effects of Letrozole 「Meiji」 or Femara[®] treatment on the multiplicity and total volume of DMBA-induced mammary tumor in female SD rats on day 34 of treatment.

Groups	Dose (mg/kg/day)	No. of rats	Total no. of tumors	Multiplicity (no. of tumor/rat)	Total volume of tumor (mm ³)
Vehicle control	0	13	55	4.2 ± 2.7	8351.6 ± 6477.3
Letrozole 「Meiji」	1.0	13	3	0.2 ± 0.4**	25.7 ± 57.3**
Femara [®]	1.0	14	2	0.1 ± 0.5**	60.4 ± 226**

Each value represents the mean ± SD.

** : Significantly different from vehicle control at $P < 0.01$.

No significant difference in any mean values between Letrozole 「Meiji」 and Femara[®] groups.

Table 2 Effects of Letrozole 「Meiji」 or Femara[®] treatment on the body weights, and uterine and mammary tumor weights in female SD rats.

Groups	Dose (mg/kg/day)	Body weights (g)		Uterine weight (g)	Tumor weight (g)
		Initial	Final		
Vehicle control	0	289.5 ± 24.9	294.8 ± 30.6	0.564 ± 0.274	9.978 ± 7.763
Letrozole 「Meiji」	1.0	293.7 ± 24.7	374.2 ± 23.6**	0.187 ± 0.021**	0.104 ± 0.113**
Femara [®]	1.0	290.7 ± 36.5	365.9 ± 42.5**	0.184 ± 0.025**	0.232 ± 0.573**

Each value represents the mean ± SD.

** : Significantly different from vehicle control at $P < 0.01$.

No significant difference in any mean values between Letrozole 「Meiji」 and Femara[®] groups.

般症状の変化は認められなかった。

各群における平均総腫瘍体積及び平均腫瘍個数の推移を各々 Fig.1 と 2 に示した。また、各群の最終投与日（投与 34 日目）の総腫瘍個数と 1 匹当たりの平均腫瘍個数及び総腫瘍体積を Table 1 に、各群の平均体重（試験開始時及び終了時）と剖検時に摘出した子宮及びすべての腫瘍の平均重量を Table 2 に示した。

Letrozole 「Meiji」投与群の総腫瘍体積は投与 6 日目から、腫瘍個数は投与 9 日目から、媒体対照群と比較して統計学的に有意な抑制効果を示し、その後、最終投与 34 日目まで明瞭な抗腫瘍効果が認められた。また、剖検時に摘出した腫瘍の重量においても Letrozole 「Meiji」投与群は媒体対照群と比較して有意な減少が認められた。これら Letrozole 「Meiji」でみられた抗腫瘍効果は、標準製剤である Femara[®]投与群と同様であり、両製剤間で有意な差は認められなかった。

各群の剖検時の平均体重は媒体対照群と比較して両製剤とも増加を示したが、一方、子宮重量は両製剤群ともに媒体対照群と比較して有意な減少が認められた。これらの変化は両製剤群間では有意な差を

認めなかった。

考 察

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発した Letrozole 「Meiji」は、閉経後乳がん治療剤である Femara[®]の後発医薬品である。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、これら承認申請に必要なデータのほかに、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。

本稿ではさらに有効性面から DMBA 誘発ラット乳腺腫瘍モデル系を用いて先発品と同様の抗腫瘍効果を示すかを検討した。

Letrozole 「Meiji」は投与期間中に計測した腫瘍体積及び腫瘍個数の推移において、媒体対照群と比較して有意な抑制効果がみられた。また、剖検時の腫瘍の重量の比較でも有意な減少が認められ、乳腺腫瘍の縮小効果が観察され、さらに、これら抗腫瘍

効果とともに子宮重量についても有意な低値がみられた。

DMBA 誘発乳腺腫瘍ラット系は臨床で用いられている様々なアロマターゼ阻害剤の薬効を裏付ける試験系として汎用されている⁴⁾。また、本モデルで発生したラットの乳腺腫瘍はホルモン依存性で、ヒトの乳腺腫瘍と類似の組織型を示すことが報告されている³⁾。以前の本系を用いた Femara[®] の報告では、抗腫瘍効果を示したラットにおいて血漿中のエストロゲンの濃度の低下と子宮重量の減少が観察されている²⁾。したがって、本試験でみられた子宮重量の減少は血中のエストロゲン濃度の低下を間接的に示す結果であり、本製剤の DMBA 誘発乳腺腫瘍に対する増殖抑制効果はアロマターゼ阻害作用に伴うエストロゲンの低下に基づくものと考えられた。

Letrozole 「Meiji」 投与群に認められた抗腫瘍効果に伴う子宮重量の減少は標準製剤である Femara[®] 投与群と同様であり、このことから Letrozole 「Meiji」 のエストロゲン依存性の DMBA 誘発乳腺腫瘍に対する薬効は標準製剤と同様のメカニズムであると考えられた。

Letrozole 「Meiji」 及び Femara[®] 投与群の各平均体重は媒体対照群と比較して増加を認めたが、両製剤間に差はなく、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、DMBA 誘発乳腺腫瘍ラット系を用いた抗腫瘍評価におけるレトロゾール 2.5 mg 「明治」の薬効は、標準製剤であるフェマーラ[®]錠 2.5 mg と同様と考えられた。

謝 辞

本研究実施にあたりご協力いただいた株式会社 DIMS 医学研究所の萩原昭裕氏、今井則夫氏、竹之内紀子氏、古川文夫氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 医薬品インタビューフォーム フェマーラ[®]錠 2.5 mg ノバルティス ファーマ株式会社 (2010年1月 新様式第4版).
- 2) Schieweck K, Bhatnagar AS, Batzl C, Lang M: Anti-tumor and endocrine effects of non-steroidal aromatase inhibitors on estrogen-dependent rat mammary tumors. *J Steroid Biochem Molec Biol* **44**: 633-636, 1993.
- 3) Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ: Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* **62**: 244-278, 1990.
- 4) Dukes M: The relevance of preclinical models to the treatment of postmenopausal breast cancer. *Oncology* **54** (Suppl 2): 6-10, 1997.