

# カルボクリン末の生物学的同等性試験

大洋薬品工業株式会社 研究開発部

## 試験目的

担子菌類サルノコシカケ科に属するかわらたけの菌糸体より抽出・精製されたたん白多糖類を含む製剤は、副作用が少なく長期間経口投与できる抗悪性腫瘍剤であり、担癌により低下した免疫応答機構に作用することにより抗腫瘍作用を発揮するものと考えられている。臨床においては、胃癌（手術例）、結腸・直腸癌（治癒切除例）及び小細胞肺癌に対し化学療法等との併用により効果が期待できる。

今回、1g中にたん白質と結合した多糖類で、かわらたけの菌糸体より得られたもの1gを含有するカルボクリン末の生物学的同等性を、マウスを用いたSarcoma-180腫瘍細胞及びMeth-A腫瘍細胞を用いた抗腫瘍効果について、比較検討したので報告する。

## 実験材料および実験方法

### (1) 検体

試験薬；カルボクリン末（大洋薬品工業）

対照製剤；クレスチン（呉羽化学工業 - 三共）

### (2) 動物

ICR系雄性マウス及びBALB/c系雄性マウスを使用した。

### (3) 実験方法

#### 1) Sarcoma-180腫瘍細胞増殖抑制作用

ICR系雄性マウスの腋下部皮下に $1 \times 10^6$ 個/0.1mLのSarcoma-180腫瘍細胞を移植し、移植翌日から検体0.1mL(10mg/10mL)を隔日10回腹腔内に注射した。別に生理食塩液を用いて同様に試験し、コントロール群とした。最終投与後5日目に腫瘍結節を摘出し、その重量を測定した。

#### 2) Meth-A腫瘍増殖抑制作用

##### 腫瘍転移抑制作用

BALB/c系雄性マウスの右腋下部皮内に $1 \times 10^6$ 個/0.1mLのMeth-A腫瘍細胞を移植し、検体5mg/0.1mLを移植3、5及び7日後の3回腫瘍内に投与し、21日後に腫瘍の有無、重量(g)及び腫瘍径(mm)を測定した。また、移植21日後に腫瘍増殖が全く認められなかったマウスに、初回移植部位と反対側の腋下部皮内に $5 \times 10^5$ 個/0.1mLのMeth-A腫瘍細胞を再移植し、その21日後に腫瘍の有無、重量(g)及び腫瘍径(mm)を測定した。

##### 二重移植腫瘍系に対する作用

BALB/c雄性マウスの右腋下部皮内に $1 \times 10^6$ 個/0.1mL、左腋下部皮内に $2 \times 10^5$ 個/0.1mLのMeth-A腫瘍細胞を同時に移植し、その3、5及び7日後の3回、右側腫瘍内に検体5mg/0.1mLを投与した。移植21日後に右側及び左側腫瘍の有無、重量(g)及び腫瘍径(mm)を測定した。

##### 養子免疫系に対する作用

二重移植腫瘍系に対する作用の実験で、移植21日後に腫瘍増殖の全く認められなかったマウスから脾臓を摘出した。摘出脾臓は、鋏で細切した後ステンレスメッシュ上ですりつぶし、ハンクス氏液に脾臓細胞を浮遊させた。1,500rpmで5分間遠心分離後、0.83%塩化アンモニウム溶液中で5分間室温放置し、赤血球を除去した。洗浄後のハンクス氏液に浮遊させて、単細胞浮遊液( $2 \times 10^8$ 個/mL)を調製した。二重移植腫瘍系の実験と同様にBALB/c雄性マウスの両側腋下部皮内にMeth-A腫瘍細胞を移植し、その3日後に脾単細胞浮遊液0.1mLを右側腫瘍内に投与し、21日後に両側の腫瘍の有無、重量(g)及び腫瘍径(mm)を測定した。また、サブレッサーT細胞の影響を除くために、脾単細胞浮遊液の腫瘍内投与1時間前にサイクロフォスファミド2mg/0.2mLを静脈内投与した。

(4) 統計学的検定

有意差検定は Bartlett の等分散検定を行った後、一元配置分散分析 (ANOVA) または Kruskal - Wallis の順位和検定を行い、 $p < 0.05$  で差のある場合に Tukey あるいは Scheffe の多重比較法による有意差検定を行い、危険率が  $p < 0.05$  の場合に有意差ありと評価した。なお、腫瘍有無に関する有意差検定は、Fisher の直接確立計算法を用いて行った。

**実験結果**

(1) Sarcoma-180 腫瘍細胞増殖抑制作用

Sarcoma-180 腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性試験 (移植 24 日後) の結果を表 1 に示した。カルボクリン末及びクレスチンは、いずれのロットにおいてもコントロールに対し有意な腫瘍増殖抑制作用を示し、抑制率はカルボクリン末で 89.4~93.8% 及びクレスチンで 92.0~98.6% であった。カルボクリン末及びクレスチンの腫瘍増殖抑制作用はいずれも同程度であった。

表 1 Sarcoma-180 腫瘍細胞増殖抑制作用結果

検体	Lot.	例数	腫瘍重量 (g)	抑制率 (%)
コントロール	-	10	9.243	-
カルボクリン末	A	10	0.573**	93.8
	B	10	0.977*	89.4
	C	10	0.702**	92.4
クレスチン	D	10	0.744*	92.0
	E	10	0.132**	98.6
	F	10	0.383**	95.9

\*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  対コントロール (Kruskal-Wallis / Tukey 多重比較法)

(2) Meth-A の腫瘍増殖抑制作用

Meth-A 腫瘍細胞の増殖に対する初回移植及び再移植 21 日後の結果を表 2 に示した。BALB/c マウスに皮下移植された Meth-A 腫瘍細胞の増殖は、カルボクリン末及びクレスチンにより有意に抑制され、10 例中それぞれ 5 例及び 4 例に腫瘍の増殖阻止が認められた。初回移植で腫瘍増殖阻止が認められたマウスに再移植した Meth-A 腫瘍細胞の増殖に対してもカルボクリン末及びクレスチンは明らかな抑制効果を示し、それぞれ 5 例中 3 例及び 4 例中 3 例に腫瘍増殖阻止が認められた。なお、初回移植及び再移植ともにカルボクリン末とクレスチンの抗腫瘍作用に有意差は認められなかった。

表 2 腫瘍転移抑制作用結果

検体	初回移植			再移植		
	腫瘍有無	腫瘍重量 (g)	腫瘍径 (mm)	腫瘍有無	腫瘍重量 (g)	腫瘍径 (mm)
コントロール	0/10	4.74	25.5	0/10	3.76	18.2
カルボクリン末	5/10*	1.14**	8.6**	3/5*	0.41**	3.3**
クレスチン	4/10*	0.98**	8.5**	3/4*	0.28**	2.0**

腫瘍有無: 増殖阻止例数 / 実験例数

\*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  対コントロール

(腫瘍有無: Fisher の直接確立法、

腫瘍重量: ANOVA / Tukey または Scheffe の多重比較法、

腫瘍径: Kruskal-Wallis / Tukey または Scheffe の多重比較法)

(3) 二重移植腫瘍系に対する作用

二重移植腫瘍系における移植21日後の結果を表3に示した。BALB/cマウスの両側腋下部皮内に同時に移植されたMeth-A腫瘍細胞の増殖は、右腫瘍内へのカルボクリン末及びクレスチンの投与により有意に抑制され、10例中3例及び2例に腫瘍増殖阻止が認められた。また、左側の腫瘍増殖に対しても、カルボクリン末及びクレスチンの右腫瘍内投与により明らかに抑制され、腫瘍の増殖阻止が10例中2例及び3例に認められた。なお、カルボクリン末及びクレスチンの抗腫瘍作用に有意差は認められなかった。

表3 二重移植腫瘍系に対する作用結果

検 体	右側腫瘍			左側腫瘍		
	腫瘍有無	腫瘍重量(g)	腫瘍径(mm)	腫瘍有無	腫瘍重量(g)	腫瘍径(mm)
コントロール	0/10	4.21	22.8	0/10	2.88	17.9
カルボクリン末	3/10	0.87**	7.8	2/10	1.42**	11.1**
クレスチン	2/10	1.25**	12.2	3/10	1.04**	9.6**

腫瘍有無：増殖阻止例数 / 実験例数

\*\*： p<0.01 対コントロール

(腫瘍有無：Fisherの直接確立法、

腫瘍重量・腫瘍径：ANOVA またはKruskal-Wallis / Tukey またはSheffeの多重比較法)

(4) 養子免疫系に対する作用

二重移植系での養子移入における移植21日後の結果を表4に示した。サイクロフォスファミドにより両側の腫瘍増殖は抑制され、また、正常脾細胞(非免疫脾細胞)+サイクロフォスファミドでは、サイクロフォスファミドコントロールと比べ、腫瘍増殖抑制作用が増強されたが、増殖阻止は認められなかった。これに対し、カルボクリン末及びクレスチンの投与によりMeth-A腫瘍細胞が阻止されたマウスの脾細胞は、右側のMeth-A腫瘍細胞の増殖を著明に抑制し、それぞれ10例中5例及び6例に増殖阻止が認められた。一方、左側のMeth-A腫瘍細胞の増殖に対しては、正常脾細胞+サイクロフォスファミドと同程度の抑制効果を示したものの、増殖阻止は認められなかった。なお、カルボクリン末とクレスチンの抗腫瘍作用に有意差は認められなかった。

表4 養子免疫系に対する作用結果

検 体	右側腫瘍			左側腫瘍		
	腫瘍有無	腫瘍重量(g)	腫瘍径(mm)	腫瘍有無	腫瘍重量(g)	腫瘍径(mm)
コントロール	0/10	4.44	22.7	0/10	3.35	18.0
CYコントロール	0/10	2.64**	17.5**	0/10	1.86	14.3*
正常脾細胞+CY	0/10	1.67**、#	13.1**	0/10	1.36**	12.4**
カルボクリン末 免疫脾細胞+CY	5/10*	0.63**、##	5.7**、#、\$	0/10	1.23**	11.6**
クレスチン 免疫非細胞+CY	6/10**	0.48**、##	4.6**、##、\$\$	0/10	1.24**	11.2**

腫瘍有無：増殖阻止例数 / 実験例数

免疫脾細胞：検体投与により腫瘍細胞増殖が阻止された動物の脾臓細胞。

CY：サイクロフォスファミド \*、\*\*： p<0.05、0.01 対コントロール

#、##： p<0.05、0.01 対CYコントロール \$、\$\$： p<0.05、0.01 対正常脾細胞+CY

(腫瘍有無：Fisherの直接確立法、腫瘍重量・腫瘍径：ANOVA またはKruskal-Wallis / Tukeyの多重比較法)

4. 結論

カルボクリン末及びクレスチンの抗腫瘍作用について動物を用いた薬効薬理試験で比較検討した結果、いずれの実験項目においても両製剤間で有意差が認められなかった。従って、両製剤は薬効薬理試験において生物学的に同等であると判断され、臨床における両製剤投与後の効果も同等と考えられた。