

カニクイザルを用いたGM-CSF吸入動物実験の検討

田澤立之¹，中垣和英²，伊藤祐子¹，橋本淳史¹，中田 光¹

1) 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

2) 日本獣医生命科学大学

研究要旨

肺胞蛋白症の新規治療として顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; GM-CSF)の吸入治療の臨床研究が本邦で進み、有望な結果が得られているが、吸入に使える承認製剤は本邦だけでなく世界的にみても存在しない。本研究では、チャイニーズハムスター卵巣細胞株を用いて精製されたリコンビナント GM-CSF (CHO-GM-CSF) を本症の吸入治療薬として開発することを目的に、その前臨床試験で必要となる吸入動物実験の方法を検討するため、カニクイザルで、気管内へのスプレーカニューレによる投与と、細径気管支鏡による気管支肺胞洗浄液採取による評価の予備実験を行った。CHO-GMCSF および酵母由来、大腸菌由来の GM-CSF 製剤を 0.5mg/body の連日 3 日気管内投与を行った。いずれの製剤でも、一般状況に変化はみられず、投与終了翌日および 1 週間後に細径気管支鏡検査を行い、気管支肺胞洗浄液を安全に採取しえた。投与終了翌日の気管支肺胞洗浄液および血漿中から、GM-CSF 活性を検出し、末梢血白血球数の増加および気管支肺胞洗浄液中の総細胞数の増加をみとめた。1 週間後の気管支鏡検査翌日の剖検では、右肺に軽度の水腫様変化がみられたほかには有意の所見なく、この変化は気管支鏡の影響と考えられた。これらより GM-CSF 製剤の気管内スプレー投与により生理学的変化が全身性に確認でき、本動物での細径気管支鏡での気管支肺胞洗浄液評価が可能であり、CHO-GMCSF は他の製剤と比較して吸入動物実験で同様の活性を示すことが示唆された。

A. 研究目的

肺胞蛋白症は、末梢気腔内にサーファクタント由来物質が蓄積し、呼吸不全に至る稀少びまん性肺疾患である。その病因としては、肺泡マクロファージの分化増殖に関与するサイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(Granulocyte-Macrophage Colony-

Stimulating Factor; GM-CSF)の中和抗体が関与するとされている¹。本研究班では、チャイニーズハムスター卵巣細胞株を用いて精製され

たりコンビナント GM-CSF（以下、CHO-GMCSF）を上記疾患の新規治療薬としての臨床開発を目標としている。

本課題で用いる CHO-GMCSF 製剤の吸入薬開発にかんしては非臨床試験で、動物での吸入毒性試験が必要になると考えられる。現在海外で承認市販されている GM-CSF 製剤は、酵母由来のサルグラムスチムであるが、皮下注射および静脈注射の用法での承認であり、吸入薬としては承認されておらず、動物での吸入毒性試験

もなされていないため参考とすべきデータがない。したがって、動物での吸入毒性試験の方法について、検討する必要がある。

ヒトの GM-CSF は種特異性が高く、げっ歯類では生理活性を示さない。そこで、ヒトに近いカニクイザルを用いた実験を検討することとした。投与方法については、投与量を確実に担保できる気管内噴霧投与とし、評価方法としては、通常の摂食活動、体重などの身体所見、血液所見、病理所見に加えて、細径気管支ファイバースコープを用いて気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取してその影響を調べる計画を立てた。

カニクイザルは大型哺乳動物であり、実験にあたっては、経験ある獣医師の指導のもとで十分な注意を払い進める必要がある。カニクイザルの飼養専門施設を有し、前臨床試験で経験の豊富な国内の専門企業 2 社に問い合わせ協力を依頼したところ、1 社より、前向きのお返事をいただき、以後当該の企業イナリサーチ社との協議を、4 月、8 月、12 月に行い、実験計画を検討し、同社に委託して実験を行った。

B. 研究方法

実験計画

予備実験 (オスメス 1 頭) および吸入実験第 1 コース、吸入実験第 2 コースの 3 回にわけて行った。

予備実験は、細径気管支ファイバースコープによる気管支肺胞洗浄液採取の方法を実際に検討するために行ったものである。

投与方法

ネブライザーやチャンバーでの投与を検討したが、確実な投与量の確保または、吸入投与量の確実な評価が困難であるとの結論となった。そこで PennCentury 社のマイクロスプレーを、気管内に挿入して、噴霧する方法とした。この方法では気管内に 0.5mL の液量までは安全に

投与できることを確認した。

気管内投与

塩酸メデトミジン (ドミトール R, 1 mg/mL, 日本全薬工業) 20 μ g/kg 及びミダゾラム (ドルミカム R 注射液 10 mg, 5 mg/mL, アステラス製薬) 0.3 mg/kg を筋肉内投与して鎮静させた後、ケタミン (ケタミン注 5% 「フジタ」, フジタ製薬) 5 mg/kg を筋肉内投与し、麻酔状態になったことを確認した後、マイクロスプレー (Penn-Century, Inc.) を用いて、気管内に被験物質又は対照物質を投与した。投与終了後、塩酸アチパメゾール (アンチセダン R, 5 mg/mL, 日本全薬工業) 0.3 mL を筋肉内投与して覚醒させた。投与は 1 日 1 回、3 日間行った。

評価方法

吸入による毒性試験の評価方法として、血液学的検査および血液生化学検査、ならびに、治療終了後の剖検による病理組織学的検査および骨髓検査を計画した。あわせて、肺胞内の細胞学的検索方法として、気管支肺胞洗浄液採取による評価を計画した。この評価方法が可能であれば、病理組織学的検索に代わるものとして、とくに長期投与毒性試験などに際し、有用と考えられたからである。

血算・血液生化学検査

全例を対象に Day ?1, 4 (動物番号末尾 02), 11 に大腿静脈よりポリプロピレン製注射筒及び 22 ゲージの注射針で約 5mL 採血し、以下の機械で血算・凝固系検査・血液生化学検査を行った。

血算: (1mL EDTA 処理) 総合血液学検査装置 ADVIA120 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス)

凝固: (0.9mL クエン酸処理) 全自動血液凝固

測定装置 CA-510 (シスメックス)

血液生化学: (3mL ヘパリン処理) 7180 形自動分析装置 (日立ハイテクノロジーズ)

気管支ファイバースコープによる気管支肺胞洗浄液採取

GM-CSF 吸入による肺胞内環境への影響を評価するため、気管支ファイバースコープによる気管支肺胞洗浄液採取を計画した。ヒト抗 GM-CSF 抗体血清輸注によるカニクイザルでの肺胞蛋白症モデル作成での気管支肺胞洗浄液採取の先行研究を参考に、以下のような方法で進めることを計画した。

使用気管支鏡: 細径気管支ファイバースコープ BF Type XP60 (オリンパス)
ビデオ装置により、モニターで観察しながら行った。

BALF 採取方法:

麻酔: 塩酸メドミジン 20 μ g/kg 及びミダゾラム 0.3 mg/kg を筋肉内投与して鎮静させた後、ケタミン 5 mg/kg を筋肉内投与した。動物を仰臥位で四肢を伸ばした状態で保定し、呼吸数、体温、心拍数を目視又は触診にてモニターした。

BALF 採取: キシロカイン R ポンプスプレー 8% (アストラゼネカ株式会社) の約 0.3 mL を口腔内に散布して喉頭を局所麻酔した。喉頭鏡を用いて開口し、気管内に細径気管支ファイバースコープ (OES 気管支ファイバースコープ BF TYPE XP60, オリンパス株式会社) を経口的に挿入後、マウスピースを装着した。0.5% キシロカイン液約 0.5 mL を数回、ファイバースコープの処理チャンネルを通して気管支内に散布しながら、ファイバースコープを進めた。右肺の中葉気管支 (B5) でファイバースコープを楔状挿入して固定した。

ファイバースコープの処理チャンネルを通して

温生理食塩液を 1 回につき 5 mL 注入し、BALF を吸引して採取する操作を 6 回繰り返した。

覚醒: 終了後、投与時と同様に、アチパメゾール 0.3 mL を筋肉内投与して覚醒させた。

BALF の細胞の解析

6 回に分けて採取した気管支肺胞洗浄液のうちはじめの 1 回分を細菌検査に提出し、2 回目~6 回目に採取した気管支肺胞洗浄液を合わせて、細胞数算定を計算盤で行った。遠心分離して得た細胞をデイフクイック液で染色し、分画を計算した。

剖検

全例を対象に Day 12 に、チオペンタールナトリウム (ラボナール R, 田辺三菱製薬) の静注で麻酔し、腋窩部及び大腿部の動静脈を切断して放血致死させ、剖検を行った。10 vol% 中性緩衝ホルマリン液を使用して、気管、気管支、肺、肺門リンパ節を固定し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作製し、鏡検した。骨髄の検索もおこなった。

倫理審査

以上の動物実験について、イナリサーチ社の動物実験審査委員会 (#12221, #12222, 2012 年 11 月 21 日承認) ならびに新潟大学動物実験倫理委員会 (新大研第 295-2 号, 2012 年 12 月 17 日承認) に実験計画書を提出し、審査を受け、指摘事項を修正して、承認を受けた。

個体差を考慮して予備実験および第 1 回実験に加えて第 2 回実験を施行することを計画し、修正した実験計画書をイナリサーチ社の動物実験審査委員会 (#13012, 2013 年 1 月 22 日承認) ならびに新潟大学動物実験倫理委員会 (新大研第 330 号, 2013 年 2 月 4 日承認) に提出し審査を受け、指摘事項を修正して承認を受けた。

実施にあたっては、飼養施設の獣医師が立ち会

い、実験操作が苦痛の軽減に配慮し、倫理的に行われていることを確認した。

C. 研究結果

予備実験において、雌雄各1頭ずつ細径気管支ファ E-バースコープを挿入して、気管支肺胞洗浄を行った。右肺左肺とも中葉の気管支に挿入して良好に洗浄液を回収できた。回収率、細胞数ともに雌雄で大きな差はみられなかったため、GM-CSF 投与実験は、オスで行うこととし、オス3歳4頭を用いる第1回実験と、オス6-9歳4頭を用いる第2回実験とに分けて施行した。一般状態、体温についてはいずれの動物においても変化はみられなかった。体重の減少は、コントロール群、GM-CSF 群双方にみられた。

血液学的検査

GM-CSF 投与動物では、対照動物と比較して、Day 4 (投与終了翌日) で白血球数の増加が認められ、Day 11 (投与終了8日目) では回復する傾向が認められた。白血球の内、好中球、単球、好酸球、好塩基球及び大型非染色球数は Day 4 で増加し、Day 11 で回復する傾向が認められたが、リンパ球数に大きな変化は認められなかった。これらの変化は、COS 細胞由来 GM-CSF での検討 1) と同様の傾向を示した。

また、いずれの GM-CSF 群の動物においても、対照群と比較して、網赤血球が増加する傾向が認められた (図 1, 図 2)。

血液生化学検査

いずれの GM-CSF 群においても、対照群と比較して、Day 4 では C 反応性蛋白の高値が認められ、Day 11 には回復する傾向がみられた。GM-CSF はサイトカインの一種であることから、この高値は GM-CSF の作用と考えられた。クレアチンキナーゼの高値が Day 4 に認められたが、この変化は対照群にでもみられているた

め、投与操作の影響であると考えられた (図 3)。

BALF

いずれの GM-CSF 群においても、対照群と比較して、採取量に違いは認められなかった。

酵母由来 GM-CSF 群の 1 例の BALF 採取量は Day 4 では 15 mL (回収率 50%)、Day 11 では 19.8 mL (回収率 66%) であり、対照群を含む他の動物の採取量 24.2~28.6 mL (回収率 81~95%) と比較して少ない傾向が認められた。しかし、COS 細胞由来 GM-CSF1) では、同様の条件での BALF 採取量は 50% 程度であるため、当該動物の採取量は個体差の範囲であると考えられた。

一般細菌および真菌は検出されなかった。

総細胞数、細胞密度とも、GM-CSF 吸入群で高値の傾向があった (図 4)。また細胞分画では、好酸球の上昇の傾向がみられたが、対照群でも上昇がみられた (図 5)。

BAL 上清のアルブミン濃度は対照群、GM-CSF 群ともに大きな差はみられなかったが、GM-CSF 活性については、GM-CSF 吸入群で大きく上昇していた。GM-CSF 活性は BALF と同日に採血して得た血漿中でも検出できた (図 6, 7)。

剖検

肉眼所見としては、第 1 回実験の CHO-GMCSF 投与動物の 1 例に右肺中葉に水腫がみられ、他の 1 例に左肺の葉間癒着がみられた。

病理組織検査では、主に右肺中葉に炎症細胞浸潤、出血又は好酸性物質の貯留などが認められたが、これらの変化は GM-CSF 群、対照群ともに認められており、また、右肺中葉にのみみられ、左肺にはみられないため、BALF 採取の影響と考えられた (図 8)。なお、剖検時に水腫がみられた第 1 回実験での CHO-GMCSF 投与群の 1 例では、炎症及び好酸性物質の貯留の程

図1.血液学的検査

(A) 第1回実験(オス3歳4頭)

(B) 第2回実験(オス6-9歳4頭)

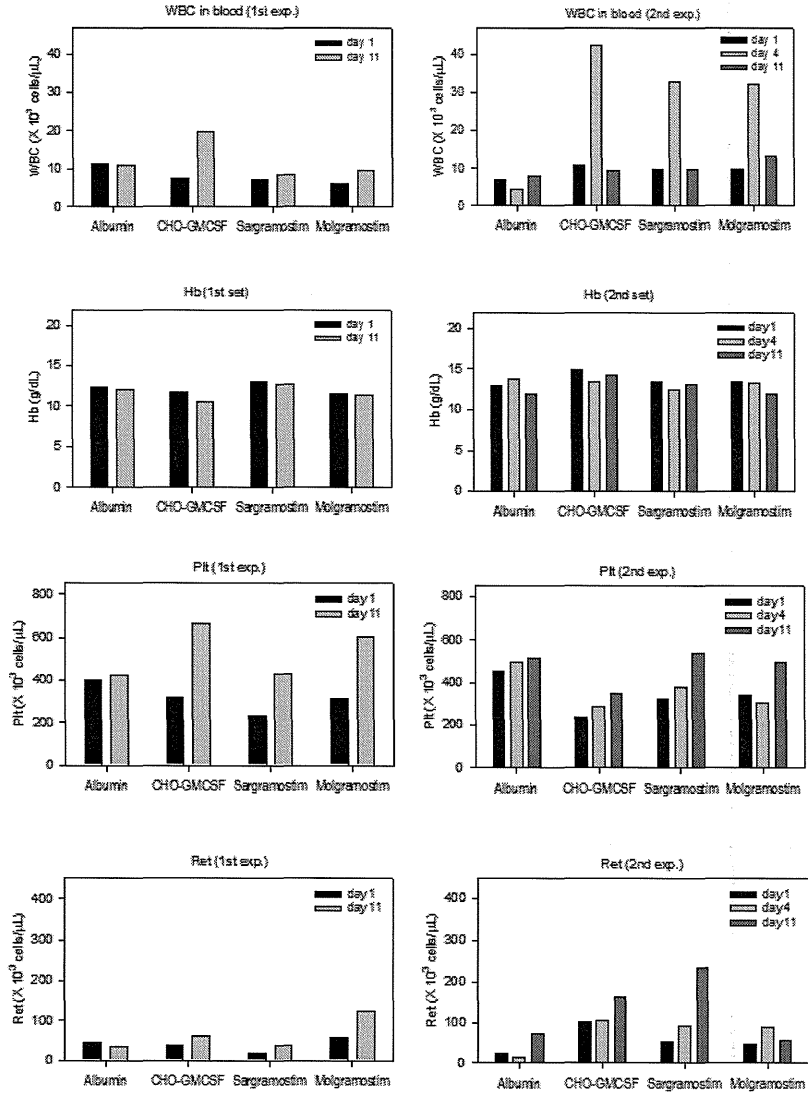


図2.末梢血白血球分画

(A) 第1回実験(オス3歳4頭)

(B) 第2回実験(オス6-9歳4頭)

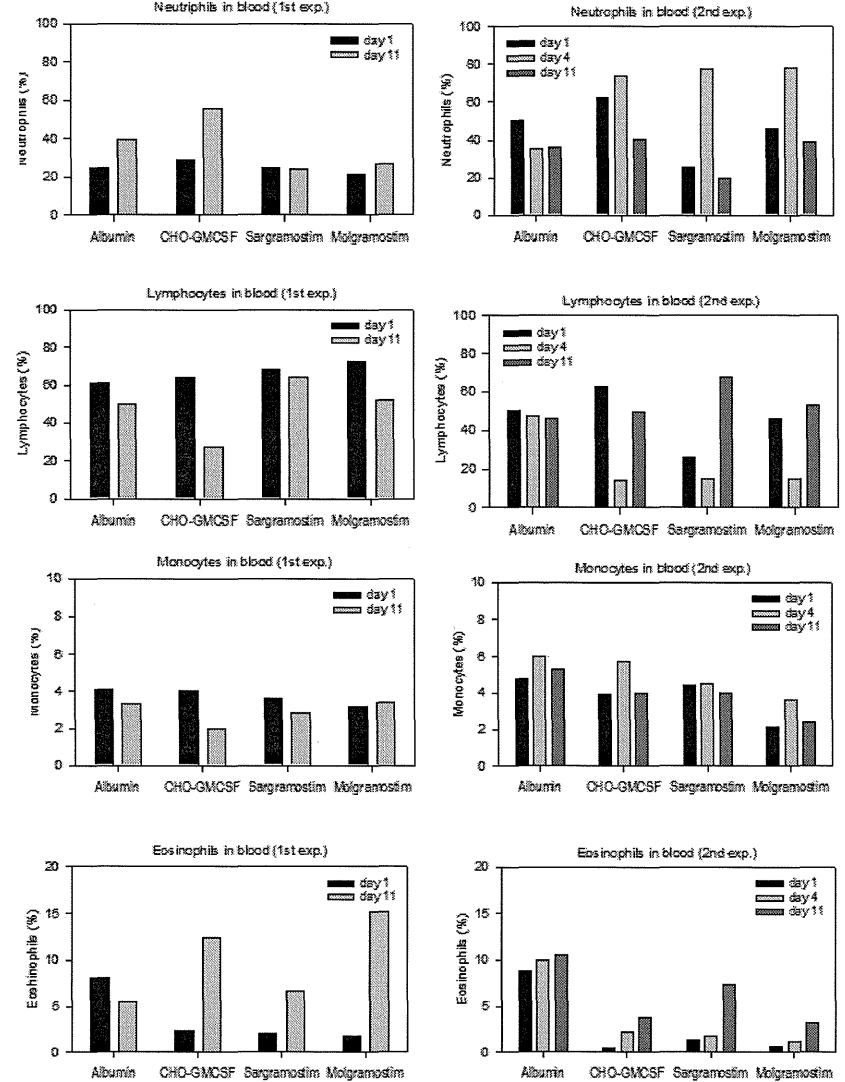


図3.血液生化学検査

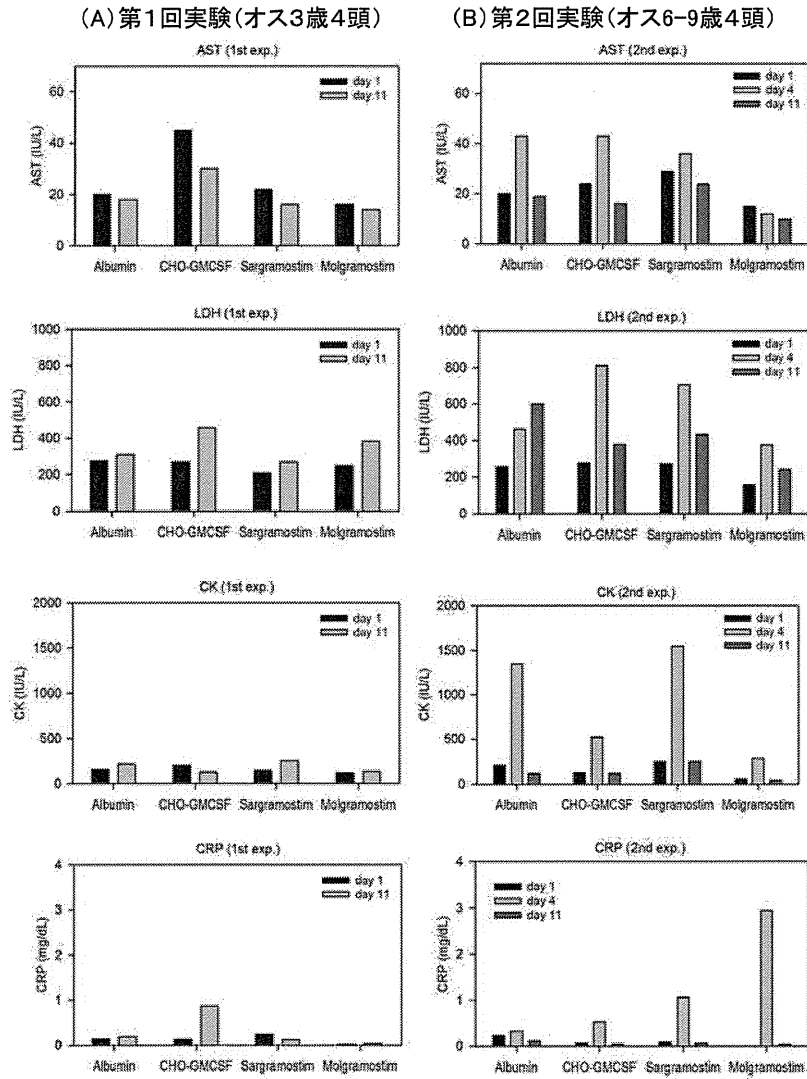


図4. 気管支肺胞洗浄液所見 (総細胞数・細胞密度・回収量)

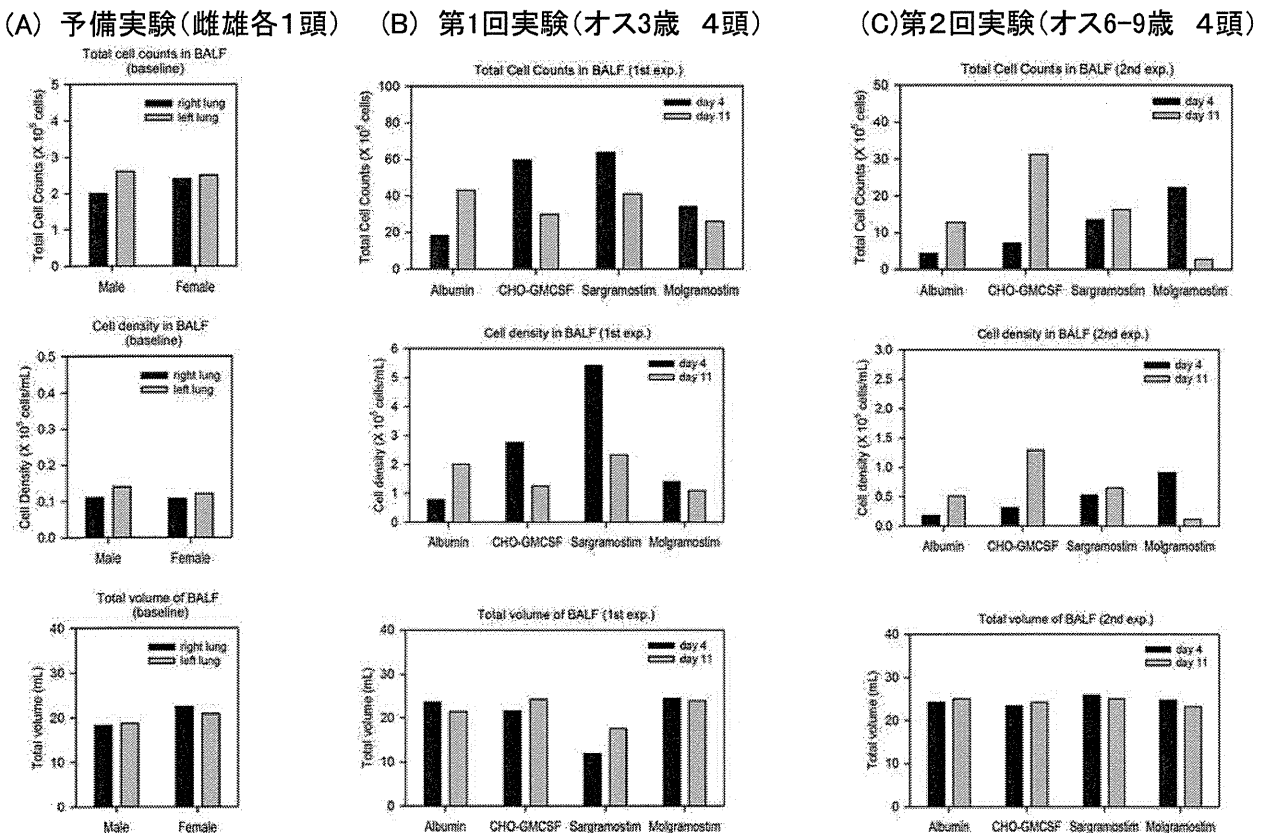
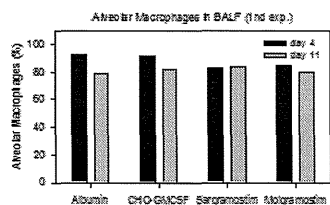


図5. 気管支肺胞洗浄液所見(細胞分画)

(A) 第1回実験(オス3歳4頭)



(B) 第2回実験(オス6-9歳)

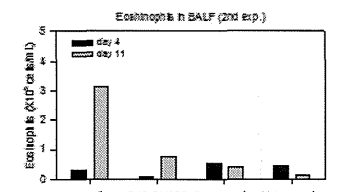
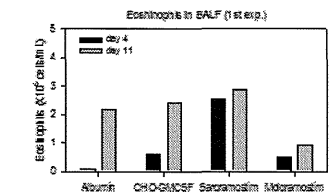
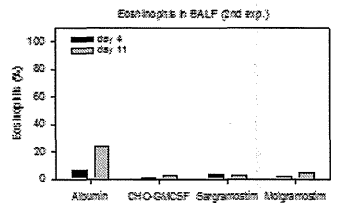
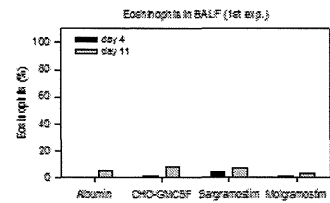
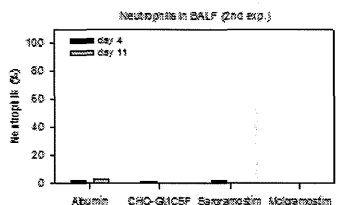
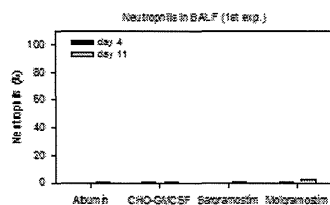
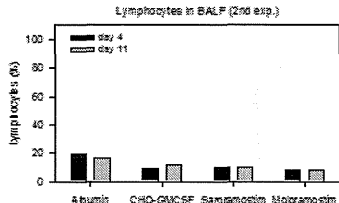
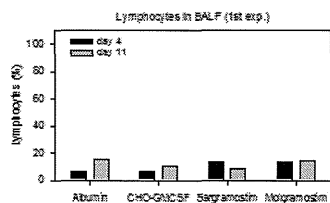
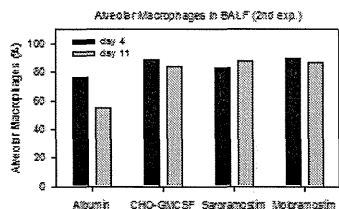
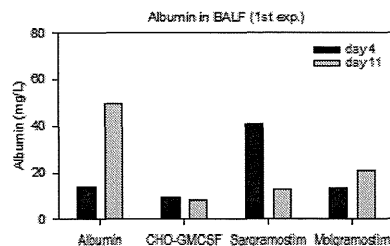


図6. 気管支肺胞洗浄液所見(アルブミン濃度)

(A) 第1回実験(オス3歳4頭)



(B) 第2回実験(オス6-9歳4頭)

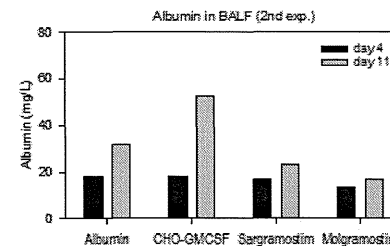
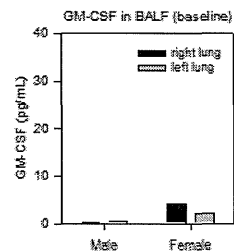
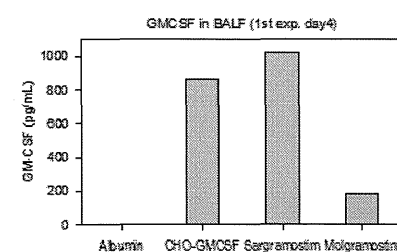


図7. 気管支肺胞洗浄液(BALF)および血漿のGM-CSF活性

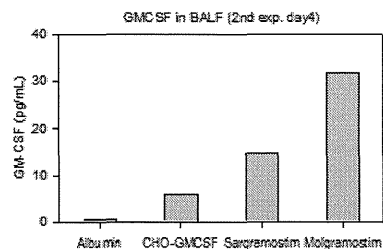
(A) 予備実験BALF(雌雄各1頭)



(B) 第1回実験BALF(オス3歳4頭)



(C) 第2回実験BALF(オス6-8歳4頭)



(B) 第2回実験血漿

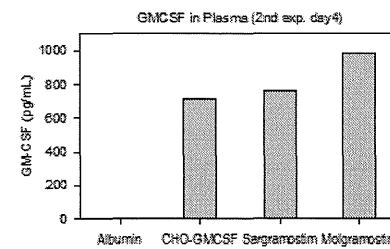
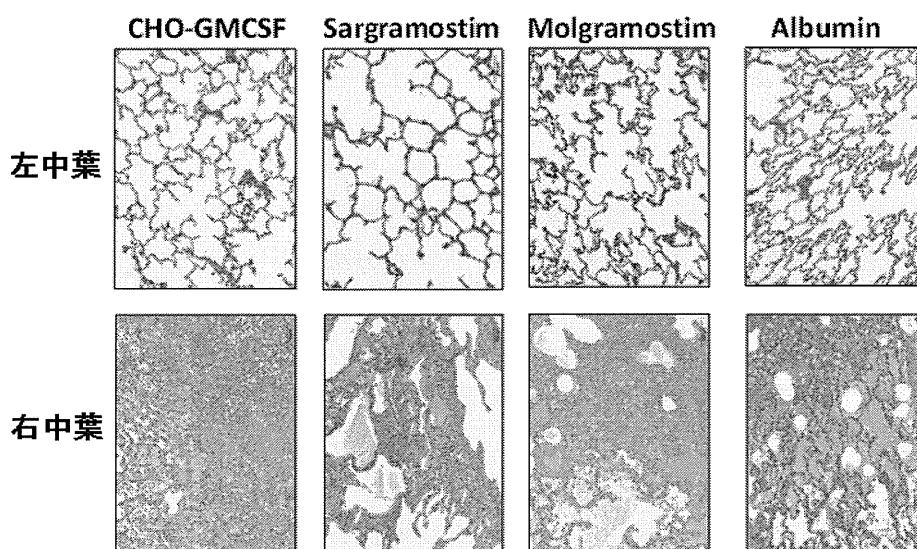
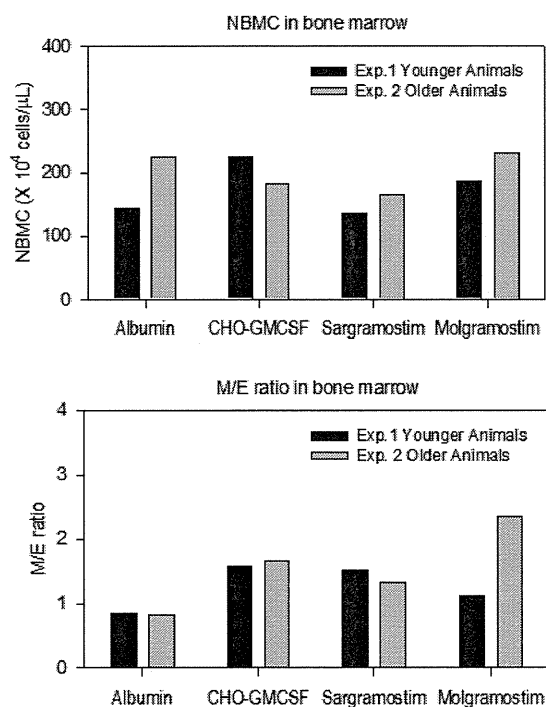


図 8. 肺組織所見（第1回実験オス3歳，4頭）



- ・ 左中葉に病理学的変化はみられなかった。
- ・ 右中葉に細胞浸潤，好酸性物質の沈着がみられたが，対照群・GM-CSF投与群ともみられており，BALの操作の影響と思われた。

図 9. 骨髄所見（有核細胞数・M/E比）



- ・ GM-CSF投与群のM/E比は高い傾向にあった

度が強い傾向がみられた。

いずれの GM-CSF 群においても、M/E (顆粒球/赤芽球) 比の増加が認められた。GM-CSF は骨髄系細胞増殖因子であることから、この変化は GM-CSF の作用と考えられた。

D. 考察

本研究結果より、GM-CSF 製剤の気管内スプレー投与により生理学的変化が確認でき、本動物での細径気管支鏡での気管支肺胞洗浄液評価が可能であり、CHO-GMCSF は他の製剤と比較して吸入動物実験で同様の活性を示すことが示唆された。

吸入投与については、チャンバーやネブライザーの利用も考えられたが、投与量を確保する観点から、今回は、スプレーカニューレを気管内に挿入して投与する方法をとった。この操作では、動物を保定し喉頭展開をして確実に気管内にカニューレを挿入して投与している。投与液量が個体あたり 0.5mL に限られるので、試験液調製上、0.5mg が投与可能な最高用量であった。これにより、全身性に、GM-CSF の生理活性を確認できる結果が得られた。本用量は、体重あたり、第 1 回実験で、約 0.16mg/kg、第 2 回実験では約 0.08mg/kg であり、ヒトでの肺胞蛋白症吸入投与での 0.25mg/body (体重 50kg とし 0.005mg/kg) にネブライザーの吸入効率 (10-15% 程度) を勘案した 1 日用量 (約 0.75 μ g/kg)、と比較すると 100 倍以上の intensity の高い用量であった。これにより、全身性に、GM-CSF の生理活性を確認できる結果が得られた。特に肺への GM-CSF 投与後の BALF 中で GM-CSF 活性が確認されたことは重要な所見と考えられる。

今後の毒性試験では長期投与の慢性毒性試験も必要であり、sacrifice する動物数をできるだけ減らす意味からも、剖検以外の侵襲性の低い評価方法を検討する必要がある。本研究では細径気管支鏡を用いて、気管支肺胞洗浄液を採取

することを試みた。予備実験で気管支鏡機器の機能や、実際の手順、気管支肺胞洗浄液採取が可能かどうかを確認して、投与実験を行ったが、いずれも順調に操作を行えた。とくにビデオ装置によるモニターは、客観性をたもち、洗浄気管支を選択する際のビデオ記録が簡便に行え、術者間の意志疎通や技術指導の上でも非常に有用な方法であった。また気管支肺胞洗浄液細胞の処理もほぼヒトと同様に行え、GM-CSF 投与の効果の確認もできた。細径気管支ファイバースコープによる BAL は、カニクイザルで可能で、GM-CSF 投与による肺内環境の変化を確認できる方法であることが示された。

今回の検討では、第 1 回が体重 2-3kg の比較的若い個体、第 2 回が体重 4-6kg の成年の個体での検討で、各製剤 1 例ずつの投与による予備実験であるが、CHO-GMCSF、sargramostim、molgramostim とともに、投与後の動物の一般状態に変化はみられず、投与終了直後の血漿と気管支肺胞洗浄液で GM-CSF 活性が確認され、末梢血での白血球数増加、気管支肺胞洗浄液での総細胞数増加、骨髄での有核細胞数増加等の効果が、いずれの GM-CSF でもみられていた。以上の結果より、CHO-GMCSF は、本研究におけるカニクイザルを用いた吸入動物実験の実験系で、既存の GM-CSF 製剤と同様に投与を行って有害事象の評価し、体内動態の解析をすることが可能と考えられ、既存の GM-CSF 製剤と同様の生理学的効果が、本実験系で確認できることが示唆された。今後、十分な例数を用いての検討で、CHO-GMCSF の吸入投与による安全性、体内動態、生理学的効果の検証が必要となるものと思われる。

E. 結論

GM-CSF 製剤の気管内スプレー投与によるカニクイザルを用いた吸入動物実験系で、生理学的変化が全身性に確認でき、本動物での細径

気管支鏡での気管支肺胞洗浄液評価が可能であり, CHO-GMCSF は他の製剤と比較して吸入動物実験で同様の活性を示すことが示唆された.

F. 健康危険情報

該当事項なし

1. 特許取得
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他
該当しない

参考文献

1. Rose RM, Kobzik L, Dushay K, Wolfthal S, Hondalus M, Metzger M, et al. The effect of aerosolized recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor on lung leukocytes in nonhuman primates. Am Rev Respir Dis. 1992;146:1279-1286.

謝辞

CHO 細胞由来 GM-CSF のご提供と情報の提供をして下さった日本ケミカルリサーチ株式会社に感謝いたします。

また動物実験計画において貴重なご助言をいただき実施に際して多大なご支援をいただいた株式会社イナリサーチに感謝いたします。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載した.

G. 研究発表

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
田澤立之	肺胞蛋白症	山口徹, 北原光夫, 福井次矢編	今日の治療指針 2013年版	医学書院	東京	2013	311-312
田澤立之	肺胞蛋白症	貫和敏博, 杉山幸比古, 門田淳一編	呼吸器疾患最新の治療 2013-2015	南江堂	東京	2013	331-333
Trapnell BC, Nakata K, Kavuru	Pulmonary Alveolar Proteinosis,	Mason JR, Broaddus VC, Martin TR, King TE, et al	Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine,	Saunders Elsevier	Philadelphia	2010	1516-36

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌	巻	ページ	出版年
Satoh H, Tazawa R, Sakakibara T, Ohkouchi S, Ebina M, Miki M, Nakata K, Nukiwa T.	Bilateral peripheral infiltrates refractory to immunosuppressants were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of granulocyte/macrophage-colony	Intern Med.	51	1737-42	2012
Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, Satake M.	Runx1 Deficiency in CD4+ T Cells Causes Fatal Autoimmune Inflammatory Lung Disease Due to Spontaneous Hyperactivation of Cells.	J Immunol.	188	5408-20	2012

Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Kasahara Y, Hojo M, Nei T, Nakayama H, Motoi N, Urano S, Eda R, Yokoba M, Tsuchihashi Y, Nasuhara Y, Ishii H, Ebina M, Yamaguchi E, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R.	Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis.	Eur Respir J.	39	777-80	2012
Nei T, Urano S, Motoi N, Takizawa J, Kaneko C, Kanazawa H, Tazawa R, Nakagaki K, Akagawa KS, Akasaka K, Ichiwata T, Azuma A, Nakata K.	IgM-type GM-CSF autoantibody is etiologically a bystander but associated with IgG-type autoantibody production in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis.	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.	302	L959-64	2012
Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Ishii H, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nasuhara Y, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R.	Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis.	Respir Med.	106	284-93	2012
田澤立之	【難治性びまん性肺疾患克服への取り組み】 肺胞蛋白症.	呼吸と循環	60	363-8	2012
Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, <u>Yuo A</u>	Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays.	Cell Reprogram	14.	171-185	2012

Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, Kawai Y, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Tobe K, <u>Yuo A</u> , Kubota K, Saito M, Saeki K	Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer.	Cell Metab	16	394-406	2012
Muroya M, Chang K, <u>Uchida K</u> , Bougaki M, Yamada Y.	Analysis of cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in the human alveolar epithelial cell line A549.	Biosci Trends	6	70-80	2012
<u>Uchida K</u> , Yasunaga H, Miyata H, Sumitani M, Horiguchi H, Matsuda S, Yamada Y.	Impact of remifentanil use on early postoperative outcomes following brain tumor resection or rectal cancer surgery.	J Anesth	26	711-20	2012
Gao JJ, Song PP, Tamura S, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N, Uchida K, Orii R, Qi FH, Dong JH, Tang W.	Standardization of perioperative management on hepato-biliary-pancreatic surgery.	Drug Discov Ther	6	108-11	2012
Tsujino K, Takeda Y, Arai T, Shintani Y, Inagaki R, Saiga H, Iwasaki T, Tetsumoto S, Jin Y, Ihara S, Minami T, Suzuki M, Nagatomo I, Inoue K, Kida H, Kijima T, Ito M, Kitaichi M, Inoue Y, Tachibana I, Takeda K, Okumura M, Hemler ME, Kumanogoh A.	Tetraspanin CD151 protects against pulmonary fibrosis by maintaining epithelial integrity.	Am J Respir Crit Care Med.	186	170-80	2012

Horiuchi-Yamamoto Y, Gemma A, Taniguchi H, Inoue Y, Sakai F, Johkoh T, Fujimoto K, Kudoh S.	Drug-induced lung injury associated with sorafenib: analysis of all-patient post-marketing surveillance in Japan	Int J Clin Oncol	DOI 10.1007/s10147-012-0438-0		2012
Tachibana K, Arai T, Kagawa T, Minomo S, Akira M, Kitaichi M, Inoue Y.	A case of combined sarcoidosis and usual interstitial pneumonia	Intern Med.	51	1893-7	2012
内田 寛治	手術患者リスク評価と周術期管理に関連した周術期アウトカム	麻酔	61	514-25	2012
Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, et al.	Updated Overall Survival Results from A Randomized Phase III Trial Comparing Gefitinib with Carboplatin-Paclitaxel for Chemo-Naïve Non-Small Cell Lung Cancer with Sensitive EGFR Gene Mutations (NEJ002).	Ann Oncol	24	54-9	2012
Maemondo M, Minegishi Y, Inoue A, et al.	First-Line Gefitinib in Patients Aged 75 or Older With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Harboring Epidermal Growth Factor Receptor Mutations: NEJ003 Study.	J Thorac Oncol	7	1417-22	2012
Soda M, Isobe K, Inoue A, et al.	A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer.	Clin Cancer Res	18	5682-9	2012

最終報告書草案

カニクイザルでのヒトリコンビナント顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
(GM-CSF) 製剤吸入の効果の解析

(作成日: 2013 年 3 月 21 日)

試験期間: 2013 年 1 月 23 日～2013 年 3 月**日

試験委託者: 新潟大学 医歯学総合病院 生命科学医療センター
〒951-8520 新潟県新潟市中央区旭町通 1-754

試験施設: 株式会社イナリサーチ
〒399-4501 長野県伊那市西箕輪 2148 番地 188

試験責任者: 年 月 日

株式会社イナリサーチ
試験研究センター 試験管理部

藤原 淳

目次

	ページ
1. 要約	4
2. 試験目的	4
3. 試験分担責任者	4
4. 試験期間	5
5. 遵守する基準及び参照したガイドライン	5
6. 動物愛護	5
7. 材料及び方法	5
7.1 被験物質及び対照物質	5
7.2 試験系	6
7.3 飼育条件	6
7.4 飼育材料と分析	7
7.4.1 飼料	7
7.4.2 飲料水	7
7.5 個体識別	7
7.6 投与量	7
7.7 投与	8
7.8 観察及び検査	8
7.8.1 一般状態	8
7.8.2 体重	8
7.8.3 体温	8
7.8.4 試験委託者検討用血液採取	8
7.8.5 血液学的検査	9
7.8.6 血液生化学的検査	10
7.8.7 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取	11
7.8.8 BALFの細菌検査	11
7.8.9 剖検	12
7.8.10 病理組織学的検査	12
7.8.11 骨髄検査	12
8. 試験計画書からの逸脱及び予見することができなかった事態	13
9. 試験関係資料の処置	13
10. 試験関係資料の保存	13
11. 成績及び考察	13
11.1 一般状態	13
11.2 体重	13
11.3 体温	13
11.4 血液学的検査	14
11.5 血液生化学的検査	14
11.6 BALF採取	14
11.7 BALFの細菌検査	14
11.8 剖検	14
11.9 病理組織学的検査	14
11.10 骨髄検査	15
12. 結論	15
13. 文献	15

Annexes

Tables 1~9

1. 要約

CHO, 酵母及び大腸菌由来のヒトリコンビナント顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 並びに対照としてアルブミンの 0.5 mg/day をそれぞれ 2 匹の雄性カニクイザルに 3 日間反復気管内投与し (Day 1~3), 気管支肺胞洗浄液を採取してその影響を調べた。投与終了翌日 (Day 4) 及び投与終了 8 日目 (Day 11) に体重及び体温測定並びに血液学的検査及び血液生化学的検査を実施し, 投与終了 9 日目 (Day 12) に剖検を実施して, 気管, 気管支, 肺及び肺門リンパ節の病理組織学的検査並びに胸骨の骨髄検査を実施した。また, Day 4 及び 11 には気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取及び採血を行い, 採取したサンプルは試験委託者に送付した。採取した BALF の一部で一般細菌及び真菌検査を実施した。その他, 一般状態を毎日観察した。

一般状態, 体重, 体温, BALF 採取量, 剖検及び病理組織学的検査では, GM-CSF に起因する変化は認められなかった。また, BALF の一般細菌及び真菌検査は全て陰性であった。

血液学的検査では, いずれの GM-CSF 群の動物においても, Day 4 で白血球数の増加, 特に, 好中球, 単球, 好酸球, 好塩基球及び大型非染色球数の増加が認められ, これらの増加は Day 11 で回復する傾向が認められた。また, 網赤血球数及び比が増加する傾向が認められた。

血液生化学的検査では, いずれの GM-CSF 群においても, C 反応性蛋白の高値が認められた。

骨髄検査では, いずれの GM-CSF 群においても, 顆粒球/赤芽球比の増加が認められた。

以上の通り, いずれの GM-CSF 群においても, GM-CSF に起因すると考えられる, 白血球数, 特に, 好中球, 単球, 好酸球, 好塩基球及び大型非染色球数の増加及び網赤血球数及び比の増加, C 反応性蛋白の高値並びに顆粒球/赤芽球比の増加が認められた。また, GM-CSF 製剤の由来による明らかな作用の違いは認められなかった。

2. 試験目的

3 種類の GM-CSF 製剤をカニクイザルに 3 日間反復気管内投与し, 気管支肺胞洗浄液を採取してその影響を調べた。

3. 試験分担責任者

飼育, 投薬及び臨床観察:	西村 正吾
被験物質取扱い:	伯耆原 淳
血液及び骨髄検査:	米山 昭宏
剖検:	武井 由弘
病理組織標本作製:	佐倉 京子
病理組織学的検査:	畠山 洋文

4. 試験期間

試験開始日: 2013年1月23日

項目	時期	動物番号各群末尾 01 (年/月/日)	各群動物番号末尾 02 (年/月/日)
本試験への動物入手日 (移管日)		2013/1/24	2013/2/13
投与日		2013/1/26~1/28	2013/2/15~2/17
血液学的検査 及び 血液生化学的検査	投与開始前1日 投与4日 投与11日	2013/1/25 — 2013/2/5	2013/2/14 2013/2/18 2013/2/25
気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取	投与4日 投与11日	2013/1/29 2013/2/5	2013/2/18 2013/2/25
BALF 細菌検査	投与4日 投与11日	— 2013/2/5	2013/2/18 2013/2/25
採血 (送付用)	投与4日 投与11日	2013/1/29 2013/2/5	2013/2/18 2013/2/25
剖検日	投与12日	2013/2/6	2013/2/26

試験終了日: 2013年3月29日

5. 遵守する基準及び参照したガイドライン

GLP: なし

ガイドライン: なし

6. 動物愛護

本試験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会 (IACUC) による審査を受けた試験計画書に従って適正に実施された。なお、試験施設は AAALAC International により認証されている (認証番号: 001107)。

7. 材料及び方法

7.1 被験物質及び対照物質

名称	ロット番号	製造元, 製品名など	保存条件	保存場所
CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤	GMJ121012	日本ケミカルリサーチ株式会社, ラボラベル品		
酵母由来 GM-CSF 製剤	B18829	Genzyme Corporation, ルーカイン	冷凍 (許容範囲: -30°C~ -10°C)	被験物質 保管室の メディカル フリーザー
大腸菌由来 GM-CSF 製剤	201105A09	Xiamen Amoytop Biotech Co., Ltd, rHuGM-CSF		
アルブミン (対照物質)	LAR5237	和光純薬工業株式会社, 牛血清由来品		

提供元: 試験委託者から調製済みの投与液を入手した。

投与後残液の処置: 投与分ずつ分注されていたため、投与後残液はなかった。

残余分の処置: 試験委託者に返却した.

7.2 試験系

種: カニクイザル

生産所: Del Mundo Trading 及び SICONBREC (Philippines), Nafovanny (ベトナム)

供給源: Primate Quality Control Center (PQCC), Ina Research Philippines, Inc., エルエスジー株式会社, 株式会社日本医科学動物資材研究所

試験系選択の理由: ヒトの GM-CSF が生理活性を示す動物種を選択した.

性別及び入手匹数: 雄: 8 匹

動物番号	識別番号	生年月日 (年/月/日)
LQ1M01	DrpZ5-64A-G	2009/5/21
LQ1M02	DrpZ7-49B-B	2005/9/6
LQ2M 01	DrpZ11-45A-G	2009/5/31
LQ2M 02	317415207	2003/11/27
LQ3M 01	DrpZ18-15B-C	2009/7/29
LQ3M 02	345963200	2005/12/21
LQ4M01	DrpZ4-42B-E	2009/8/5
LQ4M02	9660A	2006/11/17

検疫: 30 日間以上の法定検疫済のプール動物で, 一般状態に異常のない動物を本試験用とした.

投与開始時齢: 3~9 歳

7.3 飼育条件

飼育室: 521 号飼育室

温度: 許容範囲: 22.0~28.0°C (実測値: 22.5~23.8°C)

湿度: 許容範囲: 40.0~80.0% (実測値: 52.3~68.5%)

換気回数: 許容範囲: 12~19 回/時間

照明時間: 12 時間/日 (7 時から 19 時までの人工照明)

給餌方法:

給餌量: 100 g/匹/日 (ステンレス製給餌器使用)

給餌時間: 9:00~16:00 の間

投与期間中は投与後, 血液検査採血日は採血後, BALF 採取日は BALF 採取後に給餌し, 剖検当日は給餌しなかった.

残餌: 血液検査採血前日の 16:00~18:00 又は翌朝に残餌の有無を確認したところ, 残餌はなかった.

給水方法: 自動給水装置から自由に摂取させた.

ケージへの収容: ステンレス・高圧メラミン化粧板製ケージ (48W × 85D × 80H cm, エンリッチメント用のステンレス製遊具付き) に個別に収容した.