

ケージの交換: ケージ交換は行わず, 毎日水洗した.

7.4 飼育材料と分析

7.4.1 飼料

名称: PS-A (固型)

供給源: オリエンタル酵母工業株式会社 (千葉)

ロット番号: 121206, 130104

分析:

栄養組成及び微生物: 供給源でのロットごとの分析

重金属などの混入物: 第三者機関によるロットごとの分析 (分析機関: Eurofins Scientific 社, ドイツ)

分析結果: 試験評価に影響を及ぼす可能性のある混入物はなかった.

7.4.2 飲料水

種類: 市営上水道水

分析: 伊那市水道局による毎月の分析 (分析機関: 上伊那圏域水道水質管理協議会 水質管理センター)

飼育区域内から採取した水について, 年に4回の分析 (分析機関: 社団法人 上伊那薬剤師会)

分析結果: 試験評価に影響を及ぼす可能性のある混入物はなかった.

7.5 個体識別

動物: 動物入荷前 (生産所において実施) に, 胸部又は大腿内側に番号 (記号) が入墨されており, その番号によって動物を識別した.

ケージ: 試験番号, 種, 性別, 識別番号, 投与物質名, 動物番号及び群別のカラーラベル^{a)} をケージカードに記載し表示した.

^{a)} 対照群: 白
 CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤群: 青
 酵母由来 GM-CSF 製剤群: 黄
 大腸菌由来 GM-CSF 製剤群: 赤

7.6 投与量

群	投与物質名	投与量 (mg/day)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/day)	動物番号
対照群	アルブミン	0.5	1	0.5	LQ1M01 LQ1M02
CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤群	CHO 細胞由来 GM-CSF	0.5	1	0.5	LQ2M01 LQ2M02
酵母由来 GM-CSF 製剤群	酵母由来 GM-CSF	0.5	1	0.5	LQ3M01 LQ3M02
大腸菌由来 GM-CSF 製剤群	大腸菌由来 GM-CSF	0.5	1	0.5	LQ4M01 LQ4M02

7.7 投与

投与経路: 気管内投与

投与方法: 塩酸メドトミジン (ドミトール[®], 1 mg/mL, 日本全薬工業株式会社) 20 µg/kg 及びミダゾラム (ドルミカム[®]注射液 10 mg, 5 mg/mL, アステラス製薬株式会社) 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」, フジタ製薬株式会社) 5 mg/kg を筋肉内投与した。
 麻酔状態になったことを確認した後, マイクロスプレイヤー (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[®], 5 mg/mL, 日本全薬工業株式会社) 0.3 mL を筋肉内投与して覚醒させた。

投与回数及び期間: 1日1回, 3日間

7.8 観察及び検査

各投与開始日を Day 1 として以降の日を表した。また, 各投与開始日の前日を Day -1 とした。

7.8.1 一般状態

観察対象: 全例

観察時期: Day -1 から Day 12 (剖検日) まで

観察頻度: 投与期間中及び BALF 採取日は 1日2回 (投与前又は検査前及び麻酔覚醒後), その他の期間は 1日1回 (午前)

観察方法: ケージの外からの個体別観察を行った。

7.8.2 体重

測定対象: 全例

測定時期: Day -1, 4, 11 (いずれも給餌前)

使用機器: デジタル台ばかり FV-150K (株式会社エー・アンド・デイ)

7.8.3 体温

測定時期: Day 4, 11 (麻酔実施前及び麻酔覚醒後の給餌前)

測定方法: 電子体温計を用いて直腸内温度を測定した。

7.8.4 試験委託者検討用血液採取

採取対象: 全例

採取時期: Day 4, 11

採血部位: 大腿静脈

採血量: 動物番号末尾 01: 3 mL
 動物番号末尾 02: 5 mL

- 採血方法: 動物番号末尾 01 の Day 4 では、ポリプロピレン製注射筒及び 22 ゲージの注射針（いずれも滅菌済ディスポーザブル製品）を用いて採血し、ヘパリンナトリウム入りのサンプルチューブに分注した。
その他の採血日では、ヘパリンナトリウム処理したポリプロピレン製注射筒及び 22 ゲージの注射針（いずれも滅菌済ディスポーザブル製品）を用いて採血し、サンプルチューブに分注した。
- サンプル送付: 採取した血液は凍結しないよう、採取当日に冷蔵状態で試験委託者に直接譲渡した。

7.8.5 血液学的検査

- 検査対象: 全例
- 検査時期: Day -1, 4*（動物番号末尾 02）, 11
*GM-CSF の影響を明確に検出できると思われたため追加した。
- 採血部位: 大腿静脈
- 採血量: 凝固の検査に 0.9 mL
その他の検査に約 1 mL
- 使用機器:
 - 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株式会社、以下 ADVIA120）
 - 全自動血液凝固測定装置 CA-510（シスメックス株式会社、以下 CA-510）
- 採血方法: 無麻酔で、ポリプロピレン製注射筒及び 22 ゲージの注射針（いずれも滅菌済ディスポーザブル製品）を用いて採血した。
- 血液の処理:

ADVIA120: 抗凝固剤 EDTA-2K 入りの採血管に約 1 mL 分注した。

CA-510: 抗凝固剤として 3.2 w/v%クエン酸ナトリウム液 0.1 mL を入れた採血管に、抗凝固剤とあわせて 1.0 mL になるように分注し、遠心分離（1600 ×g, 10 分, 4°C）して血漿を採取した。

標本作製: 全例について、May-Grunwald-Giemsa 染色法による血液塗抹標本を作製した。

検査項目:

項目	略語	単位	測定方法	使用機種
赤血球数	RBC	10 ⁶ /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
ヘモグロビン濃度	HGB	g/dL	シアンメトヘモグロビン変法	ADVIA120
ヘマトクリット値	HCT	%	(MCV×RBC)/10	ADVIA120
平均赤血球容積	MCV	fL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
平均赤血球色素量	MCH	pg	(HGB/RBC)×10	ADVIA120
平均赤血球色素濃度	MCHC	g/dL	[HGB/(RBC×MCV)]×1000	ADVIA120
網赤血球 百分率 絶対数	Retic	% 10 ⁹ /L	RNA 染色によるレーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
血小板数	PLT	10 ³ /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
白血球数	WBC	10 ³ /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120

項目	略語	単位	測定方法	使用機種	
白血球分類 ^{a)}	百分率 絶対数	Diff WBC	% 10 ³ /μL	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法+2角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
プロトロンビン時間	PT	s	光散乱検出方式	CA-510	
活性化部分トロンボプラスチン時間	APTT	s	光散乱検出方式	CA-510	

^{a)} 好中球 (Neut), リンパ球 (Lymph), 単球 (Mono), 好酸球 (Eos), 好塩基球 (Baso), 大型非染色球 (LUC)

7.8.6 血液生化学的検査

検査対象:	全例
検査時期:	Day -1, 4* (動物番号末尾 02), 11 *GM-CSF の影響を明確に検出できると思われたため追加した。
採血部位:	大腿静脈
採血量:	約 3 mL
使用機器:	7180 形自動分析装置 (株式会社日立ハイテクノロジーズ)
採血方法:	血液学的検査における採血と同時に, 無麻酔で, ポリプロピレン製注射筒及び 22 ゲージの注射針 (いずれも滅菌済ディスポーザブル製品) を用いて採血した。
血液の処理:	ヘパリンナトリウム入りの採血管に分注し, 遠心分離 (1600 ×g, 10 分, 4°C) して血漿を採取した。
試料の保存:	試料の一部は予備試料として -65°C 以下で凍結保存し, 最終報告書草案提出後に廃棄した。

検査項目:

項目	略語	単位	測定方法
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	AST	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
アラニンアミノトランスフェラーゼ	ALT	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
アルカリホスファターゼ	ALP	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
乳酸デヒドロゲナーゼ	LD	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
クレアチンキナーゼ	CK	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
グルコース	GLU	mg/dL	酵素法 (Gluc-DH 法)
総ビリルビン	BIL	mg/dL	酵素法 (BOD 法)
尿素窒素	UN	mg/dL	酵素法 (ウレアーゼ-LEDH 法)
クレアチニン	CRE	mg/dL	酵素法
総コレステロール	CHO	mg/dL	酵素法 (コレステロール酸化酵素法)
中性脂肪	TG	mg/dL	酵素法 (GK-GPO・遊離グリセロール消去法)
リン脂質	PL	mg/dL	酵素法 (コリン酸化酵素法)
無機リン	IP	mg/dL	酵素法 (マルトースホスホリラーゼ法)
カルシウム	CA	mg/dL	OCPC 法
ナトリウム	NA	mEq/L	イオン選択電極法
カリウム	K	mEq/L	イオン選択電極法
クロール	CL	mEq/L	イオン選択電極法
総蛋白	TP	g/dL	ビウレット法
アルブミン	ALB	g/dL	BCG 法

項目	略語	単位	測定方法
アルブミン・グロブリン比	A/G	-	計算処理
C反応性蛋白	CRP	mg/dL	ラテックス免疫比濁法

7.8.7 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取

採取対象: 全例

採取時期: Day 4, 11

BALF 採取方法:

麻酔: 投与時と同様に、塩酸メドミジン 20 µg/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。
麻酔中は、呼吸数、体温、心拍数を目視又は触診にてモニターした。

保定: 動物を仰臥位とし、四肢を伸ばした状態で保定した。

BALF 採取: キシロカイン 8% (キシロカイン®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。挿入中に 0.5%キシロカイン液の約 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。

なお、CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤群の 1 例 (動物番号 LQ2M01) の Day 4 において、6 回目の BALF 採取量が少なかったため、ファイバースコープによる楔状固定を中止して、気道内吸引物を採取した。

また、酵母由来 GM-CSF 製剤群の 1 例 (動物番号 LQ3M01) の Day 4 において、6 回目の BALF 採取量が少なかったため、7 回目として気道内吸引物を採取した。当該動物の BALF 採取量は 1~6 回目の合計値とし、7 回目の採取量は含めなかった。

覚醒: BALF 採取終了後、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。

サンプル送付: 採取した BALF は、動物番号末尾 01 の Day 4 では各動物 6 本、Day 11 では細菌検査用の 1 本目を除く各動物 5 又は 6 本、動物番号末尾 02 の Day 4 及び 11 では細菌検査用の 1 本目を除く各動物 5 本を血液と同様に凍結しないよう、採取当日に冷蔵状態で試験委託者に直接譲渡した。

7.8.8 BALFの細菌検査

検査時期: Day 4 (動物番号末尾 02) , 11

細菌検査用 BALF 送付: 採取した BALF の 1 回目採取分は、一般細菌及び真菌検査を実施するため、採取当日に冷蔵状態で以下の施設へ送付し、その結果を入手した。

社団法人予防衛生協会試験検査室
〒305-0003 茨城県つくば市桜 1-16-2

7.8.9 剖検

剖検対象: 全例
剖検時期: Day 12
剖検方法: チオペンタールナトリウム (ラボナール[®], 田辺三菱製薬株式会社) 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。

7.8.10 病理組織学的検査

検査対象: 全例
固定: 剖検時に下表に示すすべての器官・組織を固定した。固定液は 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液を使用した。
標本作製及び鏡検: 下表に示す器官・組織について、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本作製し、鏡検を実施した。

対象器官・組織:

器官・組織	固定	標本作製	
		HE 標本	備考
気管	O	O	
気管支	O 左右	O 左右	左右の前葉、中葉及び後葉
肺			
肺門リンパ節	O 左右	O 左右	

7.8.11 骨髄検査

対象動物: 全例
検査時期: 剖検時 (Day 12)
有核細胞数算定: 剖検時に、胸骨の骨髄液をマイクロディスペンサーを用いて採取し、希釈液 (セルパック, Sysmex) で 300 倍希釈した。夾雑物を除去後、自動分析装置 (K-4500, Sysmex) を用いて有核細胞数を測定した。
骨髄塗抹標本の作製: サイトスピン法を用いて胸骨骨髄の塗抹標本作製し、May-Grunwald-Giemsa 染色の二重染色を施した。
骨髄塗抹標本の観察: 作製したすべての動物において以下の観察を実施した。
光学顕微鏡を用いて、各 500 個の骨髄細胞を以下のように分類し、各細胞の割合及び絶対数 (有核細胞数×各細胞割合/100) 並びに M/E 比を算出した。
赤芽球系: 前赤芽球, 好塩基性赤芽球, 多染性赤芽球, 正染性赤芽球, 赤芽球系分裂細胞

顆粒球系: 骨髄芽球, 前骨髄球, 好中性骨髄球, 好中性後骨髄球, 好中性桿状核球, 好中性分葉核球, 好酸球, 好塩基球, 顆粒球系分裂細胞

その他: 単球, リンパ球, 形質細胞, 巨核球, 細網細胞, マクロファージ, 肥満細胞, その他

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

該当する事項は認められなかった。

9. 試験関係資料の処置

処置: 最終報告書提出後1ヵ月以内に, 試験委託者に送付する。

送付対象: 試験計画書, 最終報告書, 生データ及び下記の標本類

- 血液及び骨髄塗抹標本
- 病理組織標本 (パラフィンブロック及びプレパラート)

10. 試験関係資料の保存

保存対象: 下記の標本類

- 10 vol%中性緩衝ホルマリン液固定器官

保存期間: 最終報告書提出後5年間。その後の処置については, 所定の保存期間終了時まで試験委託者と協議する。

保存場所: 株式会社イナリサーチ本社施設内の資料保存施設

11. 成績及び考察

11.1 一般状態

(Table 1)

いずれの動物にも変化は認められなかった。

BALF採取時には, いずれのGM-CSF群においても気管及び気管支の充血が認められたが, 対照群の1例(動物番号LQ1M02)にも同様の変化が認められたことから, 投与操作に起因する変化と考えられた。

11.2 体重

(Table 2)

いずれの動物にもGM-CSFに起因すると考えられる変化は認められなかった。

GM-CSF群において体重が減少する動物がみられたが, 対照群においても同様の変化がみられたため, 投与操作及びBALF採取等の試験操作に起因する変化と考えられた。

11.3 体温

(Table 3)

いずれの動物にも変化は認められなかった。

11.4 血液学的検査

(Table 4)

GM-CSF 群の動物番号末尾 02 の動物において，対照群と比較して，Day 4（投与終了翌日）では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。また，白血球分類における，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 による結果¹⁾と同様の傾向を示した。

また，GM-CSF 群の動物では，対照群と比較して，網赤血球数及び比が増加する傾向が認められた。GM-CSF は多能性造血幹細胞を骨髄系前駆細胞に分化させ，これを前期赤芽球系前駆細胞等に分化させるサイトカインの一種であることから，造血が亢進されたと考えられた。

11.5 血液生化学的検査

(Table 5)

GM-CSF 群の動物番号末尾 02 の動物において，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。

乳酸デヒドロゲナーゼ活性及びクレアチンキナーゼ活性の高値が Day 4 に認められたが，この変化は対照群においても認められているため，投与操作の影響であると考えられた。

11.6 BALF採取

(Table 6)

GM-CSF 群では，対照群と比較して，BALF 採取量に違いは認められなかった。

ただし，酵母由来 GM-CSF 群の 1 例（動物番号 LQ3M01）の BALF 採取量は Day 4 では 15.0 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。

11.7 BALFの細菌検査

いずれの一般細菌及び真菌も陰性であった。

11.8 剖検

(Table 7)

いずれの動物にも GM-CSF に起因すると考えられる所見は認められなかった。

CHO 細胞由来 GM-CSF 群の 1 例（動物番号 LQ2M01）において右肺中葉に水腫が，他の 1 例（動物番号 LQ2M02）において，左肺全葉の葉間癒着が認められた。また，酵母由来 GM-CSF 群の 2 例中 1 例（動物番号 LQ3M02）において，右肺後葉に黒色結節が認められた。水腫は BALF 採取の影響，葉間癒着並びに黒色結節は自然発生の変化と考えられた。

11.9 病理組織学的検査

(Table 8)

いずれの動物にも GM-CSF に起因すると考えられる所見は認められなかった。

GM-CSF 群では、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、これらの変化は対照群にも認められており、また、右肺中葉に集中しているため、BALF 採取の影響と考えられた。なお、剖検時に水腫がみられた CHO 細胞由来 GM-CSF 投与群の 1 例（動物番号 LQ2M01）では、炎症及び好酸性物質の貯留の程度が強い傾向が認められた。

11.10 骨髄検査

(Table 9)

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。

12. 結論

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。

13. 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.

Table 1 Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure
Clinical observations (males)

From Day -1 to Day 12 (Day of necropsy)			
Group	Dose level	Animal No.	Findings
Control (Albumin)	0.5 mg/day	LQ1M01	No abnormalities
		LQ1M02	No abnormalities (Hyperemia of the trachea and lungs on Days 4 and 11.)
CHO cell-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ2M01	No abnormalities (Hyperemia of the trachea and lungs on Days 4 and 11.)
		LQ2M02	No abnormalities (Hyperemia of the trachea and lungs on Days 4 and 11.)
Yeast-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ3M01	No abnormalities (Hyperemia of the trachea and lungs on Days 4 and 11.)
		LQ3M02	No abnormalities (Hyperemia of the trachea and lungs on Days 4 and 11.)
Escherichia coli-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ4M01	No abnormalities (Hyperemia of the trachea and lungs on Days 4 and 11.)
		LQ4M02	No abnormalities (Hyperemia of the trachea and lungs on Days 4 and 11.)

Table 2 Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure
Body weight (males)

Group	Dose level	Animal No.	Day		
			-1	4	11
Control (Albumin)	0.5 mg/day	LQ1M01	3.70	3.40	3.75
		LQ1M02	5.35	5.10	5.15
CHO cell-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ2M01	2.45	2.35	2.35
		LQ2M02	6.40	6.40	6.30
Yeast-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ3M01	2.70	2.70	2.70
		LQ3M02	6.50	6.30	6.35
Escherichia coli-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ4M01	3.55	3.50	3.60
		LQ4M02	6.05	5.95	5.80

Unit: kg

Table 3 Evaluation of the Effects of Recombinant Human GranulocyteMacrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure
Body temperature (males)

Unit: °C

Group	Dose level	Animal No.	Day 4		Day 11	
			Prior to anesthesia	After recovery from anesthesia	Prior to anesthesia	After recovery from anesthesia
Control (Albumin)	0.5 mg/day	LQ1M01	38.3	38.1	37.6	37.8
		LQ1M02	38.0	37.6	37.5	37.7
CHO cell-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ2M01	39.2	38.0	38.3	38.6
		LQ2M02	38.6	38.8	38.4	37.9
Yeast-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ3M01	38.4	38.2	37.6	37.2
		LQ3M02	37.8	38.5	37.5	38.6
Escherichia coli-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ4M01	38.8	39.2	38.0	37.8
		LQ4M02	39.1	39.1	38.7	37.5

Table 4-1 Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure
Hematology - List of abbreviations -

Abbreviation	Expansion
RBC	Red blood cell count
HGB	Hemoglobin concentration
HCT	Hematocrit
MCV	Mean corpuscular volume
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
Retic	Reticulocytes
PLT	Platelet count
WBC	White blood cell count
Diff WBC	Differential white blood cells
Neut	Neutrophils
Lymph	Lymphocytes
Mono	Monocytes
Eos	Eosinophils
Baso	Basophils
LUC	Large unstained cells
PT	Prothrombin time
APTT	Activated partial thromboplastin time

Table 4-2 Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure Hematology (males)

Group	Dose level	Animal No.	Observation time	RBC (10 ⁶ /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Retic		PLT (10 ³ /μL)	WBC (10 ³ /μL)
										(%)	(10 ⁹ /L)		
Control (Albumin)	0.5 mg/day	LQ1M01	Day -1	6.04	12.3	44.1	73.1	20.3	27.9	0.8	47.0	397	11.18
			Day 11	5.87	12.0	41.9	71.4	20.5	28.6	0.6	36.0	423	10.92
		LQ1M02	Day -1	7.30	12.9	47.6	65.3	17.6	27.0	0.3	23.3	453	6.74
			Day 4	7.84	13.7	50.3	64.1	17.4	27.2	0.2	15.0	496	4.49
			Day 11	6.82	11.9	45.2	66.3	17.5	26.4	1.1	73.8	542	8.09
CHO cell-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ2M01	Day -1	6.39	11.8	42.2	66.1	18.4	27.8	0.6	37.7	322	7.35
			Day 11	5.91	10.6	39.3	66.5	17.9	26.9	1.0	61.6	664	19.67
		LQ2M02	Day -1	6.08	14.9	47.6	78.3	24.5	31.3	1.7	102.2	239	10.74
			Day 4	5.59	13.5	45.9	82.1	24.1	29.3	1.9	105.8	289	42.55
			Day 11	6.07	14.3	47.2	77.9	23.5	30.2	2.7	163.3	350	9.40
Yeast-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ3M01	Day -1	6.60	13.0	44.0	66.7	19.6	29.4	0.3	20.0	234	7.03
			Day 11	6.56	12.7	43.5	66.2	19.4	29.2	0.6	39.1	431	8.64
		LQ3M02	Day -1	5.39	13.5	46.1	85.5	25.0	29.2	1.0	53.1	326	9.80
			Day 4	5.22	12.5	45.5	87.2	23.9	27.4	1.8	93.6	381	32.74
			Day 11	5.54	13.1	48.4	87.3	23.6	27.0	4.2	235.2	542	9.88
Escherichia coli-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ4M01	Day -1	5.75	11.5	39.5	68.7	20.1	29.2	1.0	57.4	314	5.92
			Day 11	5.93	11.4	41.7	70.4	19.3	27.4	2.1	125.2	603	9.57
		LQ4M02	Day -1	6.09	13.5	44.8	73.5	22.2	30.2	0.8	46.7	341	9.61
			Day 4	6.22	13.2	47.4	76.2	21.2	27.8	1.4	90.2	307	32.12
			Day 11	5.68	11.9	42.9	75.6	21.0	27.8	1.0	56.8	496	13.17

Table 4-2 (Continued) Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure Hematology (males)

Group	Dose level	Animal No.	Observation time	Diff WBC (%)						Diff WBC (10 ³ /μL)						PT (s)	APTT (s)
				Neut	Lymph	Mono	Eos	Baso	LUC	Neut	Lymph	Mono	Eos	Baso	LUC		
Control (Albumin)	0.5 mg/day	LQ1M01	Day -1	25.0	60.8	4.1	8.1	0.7	1.3	2.80	6.80	0.46	0.90	0.08	0.14	8.9	24.5
			Day 11	39.7	49.9	3.3	5.5	0.5	1.1	4.34	5.46	0.36	0.60	0.06	0.12	8.7	23.3
		LQ1M02	Day -1	50.0	35.4	4.8	8.9	0.2	0.8	3.37	2.38	0.32	0.60	0.01	0.06	9.4	22.6
			Day 4	35.4	47.4	6.0	10.0	0.4	0.7	1.59	2.13	0.27	0.45	0.02	0.03	9.3	23.6
			Day 11	36.4	46.2	5.5	10.5	0.6	0.9	2.94	3.74	0.45	0.85	0.04	0.07	9.2	23.7
CHO cell-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ2M01	Day -1	28.9	63.6	4.0	2.4	0.3	0.8	2.13	4.67	0.29	0.17	0.03	0.06	8.6	24.0
			Day 11	55.8	27.0	2.0	12.4	0.5	2.4	10.98	5.30	0.39	2.43	0.09	0.47	8.7	25.0
		LQ2M02	Day -1	62.6	32.3	3.9	0.4	0.3	0.4	6.72	3.47	0.42	0.05	0.03	0.05	8.7	22.1
			Day 4	74.0	14.2	5.7	2.2	1.3	2.7	31.49	6.03	2.42	0.92	0.56	1.13	9.3	24.3
			Day 11	40.7	49.6	4.0	3.8	0.6	1.3	3.83	4.66	0.38	0.36	0.05	0.12	9.0	23.8
Yeast-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ3M01	Day -1	24.9	68.1	3.6	2.1	0.5	0.9	1.75	4.79	0.26	0.14	0.03	0.07	8.4	22.8
			Day 11	24.3	63.9	2.8	6.6	0.5	2.0	2.10	5.52	0.24	0.57	0.04	0.18	8.8	23.6
		LQ3M02	Day -1	25.6	67.8	4.4	1.3	0.5	0.3	2.51	6.65	0.43	0.13	0.05	0.03	8.3	23.0
			Day 4	77.5	14.8	4.5	1.8	0.6	0.7	25.39	4.85	1.46	0.61	0.19	0.24	8.7	23.7
			Day 11	19.8	67.6	4.0	7.4	0.5	0.7	1.95	6.68	0.39	0.73	0.05	0.07	8.6	23.6
Escherichia coli-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ4M01	Day -1	21.6	72.3	3.2	1.8	0.3	0.8	1.28	4.28	0.19	0.11	0.02	0.05	8.9	23.2
			Day 11	27.1	51.8	3.4	15.1	0.4	2.2	2.60	4.95	0.33	1.44	0.04	0.21	8.9	24.1
		LQ4M02	Day -1	45.7	50.5	2.1	0.6	0.4	0.7	4.39	4.85	0.21	0.06	0.04	0.06	8.9	22.2
			Day 4	77.7	14.8	3.6	1.2	0.8	1.9	24.98	4.74	1.14	0.40	0.25	0.62	9.7	27.0
			Day 11	39.2	52.7	2.4	3.2	0.6	1.8	5.16	6.95	0.32	0.43	0.08	0.23	8.5	25.2

Table 5-1 Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure
Clinical chemistry - List of abbreviations -

Abbreviation	Expansion
AST	Aspartate aminotransferase
ALT	Alanine aminotransferase
ALP	Alkaline phosphatase
LD	Lactate dehydrogenase
CK	Creatine kinase
GLU	Glucose
BIL	Total bilirubin
UN	Urea nitrogen
CRE	Creatinine
CHO	Total cholesterol
TG	Triglycerides
PL	Phospholipids
IP	Inorganic phosphorus
CA	Calcium
NA	Sodium
K	Potassium
CL	Chloride
TP	Total protein
ALB	Albumin
A/G	Albumin/globulin ratio
CRP	C-reactive protein

Table 5-2 Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure
Clinical chemistry (males)

Group	Dose level	Animal No.	Observation time	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	LD (U/L)	CK (U/L)	GLU (mg/dL)	BIL (mg/dL)	UN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	PL (mg/dL)
Control (Albumin)	0.5 mg/day	LQ1M01	Day -1	20	15	1415	273	151	128	0.12	18.5	0.49	129	26	179
			Day 11	18	10	1354	309	213	87	0.12	20.1	0.57	132	21	185
		LQ1M02	Day -1	20	26	572	258	207	71	0.24	14.3	0.75	115	20	159
			Day 4	43	36	676	461	1345	61	0.64	13.5	0.84	135	11	179
CHO cell-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ2M01	Day -1	45	66	1689	268	200	102	0.12	20.6	0.56	116	19	160
			Day 11	30	35	1675	457	124	50	0.08	20.6	0.47	102	77	189
		LQ2M02	Day -1	24	48	239	277	126	100	0.21	18.6	1.12	105	27	169
			Day 4	43	76	247	809	523	95	0.15	19.5	1.14	82	56	157
		LQ2M02	Day 11	16	46	223	377	115	94	0.20	13.7	0.92	100	29	143
			LQ3M01	Day -1	22	15	1977	207	144	96	0.19	19.2	0.54	142	23
LQ3M01	Day 11	16		11	1653	268	248	75	0.13	18.8	0.55	153	24	221	
	Yeast-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ3M02	Day -1	29	65	506	272	253	150	0.08	14.4	0.96	121	43
Day 4				36	78	634	705	1547	70	0.15	10.7	0.83	122	18	208
LQ3M02			Day 11	24	61	596	432	254	119	0.06	15.3	0.98	120	36	188
			LQ4M01	Day -1	16	26	2272	247	117	80	0.29	18.3	0.50	114	21
LQ4M01	Day 11	14		23	2091	382	135	89	0.17	20.3	0.52	113	40	196	
	Escherichia coli-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ4M02	Day -1	15	25	706	157	61	75	0.13	17.3	0.97	100	21
Day 4				12	35	797	376	287	115	0.10	17.2	1.05	89	51	191
LQ4M02			Day 11	10	21	864	242	42	70	0.08	17.6	0.80	92	59	126

Table 5-2 (Continued) Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure
Clinical chemistry (males)

Group	Dose level	Animal No.	Observation time	IP (mg/dL)	CA (mg/dL)	NA (mEq/L)	K (mEq/L)	CL (mEq/L)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	A/G	CRP (mg/dL)
Control (Albumin)	0.5 mg/day	LQ1M01	Day -1	6.05	9.54	149.2	3.93	107.1	7.41	4.14	1.27	0.14
			Day 11	4.81	9.42	147.2	3.25	103.9	7.54	4.11	1.20	0.19
		LQ1M02	Day -1	4.98	9.86	150.7	4.02	105.9	7.53	3.98	1.12	0.23
			Day 4	6.02	10.10	147.7	3.69	104.7	8.29	4.28	1.07	0.33
			Day 11	3.82	9.81	150.8	3.81	107.5	7.67	3.92	1.05	0.11
CHO cell-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ2M01	Day -1	4.94	8.50	149.4	4.26	110.8	6.41	3.57	1.26	0.13
			Day 11	2.56	8.85	149.6	4.39	110.7	7.09	2.91	0.70	0.87
		LQ2M02	Day -1	2.73	9.89	150.1	5.05	110.3	7.32	3.83	1.10	0.06
			Day 4	1.66	9.75	153.5	3.75	109.1	7.13	3.52	0.98	0.53
			Day 11	3.56	9.21	148.5	3.97	109.2	7.28	3.80	1.09	0.05
Yeast-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ3M01	Day -1	5.17	9.21	148.4	3.85	110.1	6.85	4.11	1.50	0.24
			Day 11	4.77	9.48	148.2	4.61	110.9	6.95	3.70	1.14	0.12
		LQ3M02	Day -1	4.72	9.65	152.7	4.16	109.1	7.71	4.26	1.23	0.09
			Day 4	6.81	10.01	155.2	3.72	107.3	8.07	4.09	1.03	1.07
			Day 11	3.18	9.96	151.6	3.69	105.1	8.07	4.18	1.07	0.06
Escherichia coli-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ4M01	Day -1	5.48	9.33	148.4	4.63	111.2	6.93	4.34	1.68	0.02
			Day 11	4.73	9.91	150.0	5.08	112.6	7.29	4.15	1.32	0.04
		LQ4M02	Day -1	3.50	9.85	154.2	3.77	108.8	7.61	4.16	1.21	0.01
			Day 4	3.20	10.04	146.4	3.54	102.5	7.72	3.44	0.80	2.94
			Day 11	3.94	9.44	147.5	4.45	108.5	7.63	3.18	0.71	0.04

Table 6 Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure
Volume of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collected

Group	Dose level	Animal No.	Observation time	Time of BALF collection							Total (1st-6th)
				1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	
Control (Albumin)	0.5 mg/day	LQ1M01	Day 4	2.6	4.0	4.6	5.0	5.2	5.0	.	26.4
			Day 11	2.8	4.0	4.0	4.4	4.6	4.4	.	24.2
		LQ1M02	Day 4	2.8	4.2	4.8	5.0	5.2	5.0	.	27.0
			Day 11	2.4	4.8	5.0	5.0	5.0	5.2	.	27.4
CHO cell-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ2M01	Day 4	3.0	4.0	4.6	4.8	3.4	4.8 ^{a)}	.	24.6
			Day 11	3.4	4.0	5.0	4.8	5.4	5.0	.	27.6
		LQ2M02	Day 4	1.8	4.2	4.2	5.0	5.0	5.0	.	25.2
			Day 11	1.4	3.8	5.4	5.2	4.4	5.4	.	25.6
Yeast-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ3M01	Day 4	2.2	2.2	2.6	2.2	3.2	2.6	1.6 ^{a)}	15.0
			Day 11	2.2	3.2	3.8	3.6	3.4	3.6	.	19.8
		LQ3M02	Day 4	2.8	4.6	4.8	5.6	5.4	5.4	.	28.6
			Day 11	2.6	4.8	4.8	5.2	5.0	5.2	.	27.6
Escherichia coli-derived GM-CSF	0.5 mg/day	LQ4M01	Day 4	3.4	4.2	5.0	5.0	5.0	5.2	.	27.8
			Day 11	3.8	4.2	4.8	5.2	4.8	5.0	.	27.8
		LQ4M02	Day 4	3.2	4.2	5.0	5.0	5.0	5.4	.	27.8
			Day 11	2.4	4.2	4.8	5.0	4.4	4.8	.	25.6

^{a)} Tracheal aspirate

Table 7 Evaluation of the Effects of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys by Inhalation Exposure
Gross pathology (males)

Organ and tissue	Findings	Group Animal No.	Control (Albumin)		CHO cell-derived GM-CSF		Yeast-derived GM-CSF		Escherichia coli-derived GM-CSF	
			Dose level		Dose level		Dose level		Dose level	
			0.5 mg/day		0.5 mg/day		0.5 mg/day		0.5 mg/day	
			LQ1M01	LQ1M02	LQ2M01	LQ2M02	LQ3M01	LQ3M02	LQ4M01	LQ4M02
Lung	Adhesion, left lobes		-	-	-	P	-	-	-	-
	Edema, right middle lobe		-	-	P	-	-	-	-	-
	Nodule, blackish, right posterior lobe, 5×8×2 mm		-	-	-	-	-	P	-	-

-: None/Negative P: Present