

採血後 1 日以上経過すると、CD11bSI は 100 を大幅に下回ったが、採血後すぐに刺激、染色を行って、固定すると 5 日間は測定可能であった (図 4)。0°C で保存すると、好中球表面上の CD11b 基礎値の上昇は抑制された (図 3 A) が、その後 37°C に上昇させると著明に CD11b が上昇し、温度変化が細胞表面の CD11b 上昇を引き起こすことが明らかとなった (図 5)。

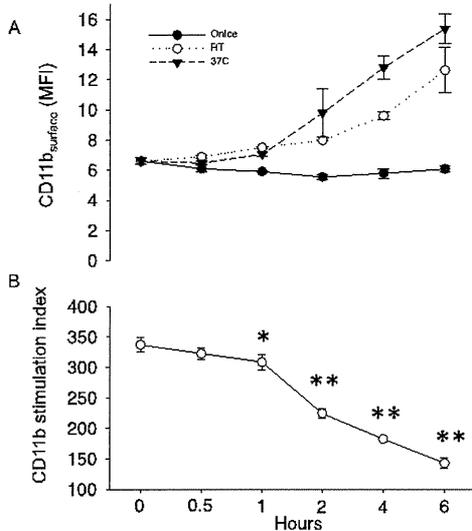


図 3. 採血後の CD11b 基礎値の変化 (A) と CD11bSI の動き (B)

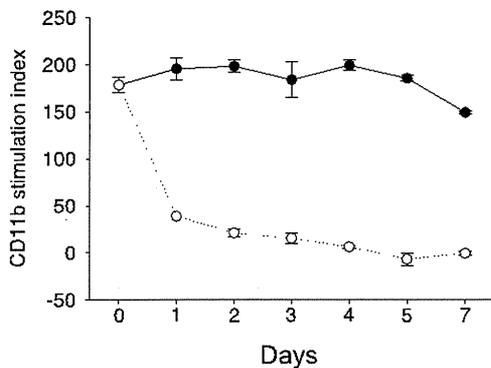


図 4. 採血後の CD11bSI の変化

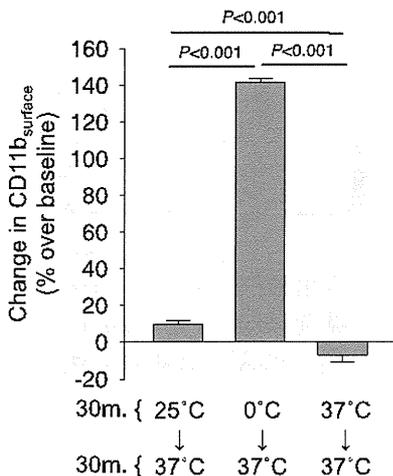


図 5. 温度変化と CD11b 基礎値の変化 (%)

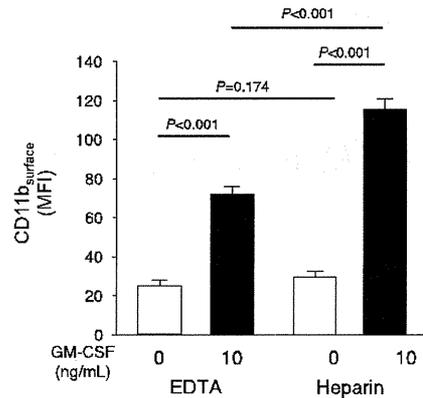


図 6. 抗凝固薬による CD11b の値の違い

抗凝固薬の EDTA を用いると、GM-CSF 刺激を行った際の CD11b 上昇が低く抑えられ、CD11b の細胞表面の上昇が Ca イオンを介していることが示唆された (図 6)。

さらに、細胞内と細胞外の CD11b を別々の蛍光物質をもつ抗 CD11b 抗体で染色すると、細胞内に細胞外よりも大量の CD11b が存在しており、GM-CSF 刺激で細胞内 CD11b が細胞外へシフトしていることが示唆された (図 7A)。細胞内外の CD11b をあわせた total CD11b は有意差が無かった (図 7B, C)。

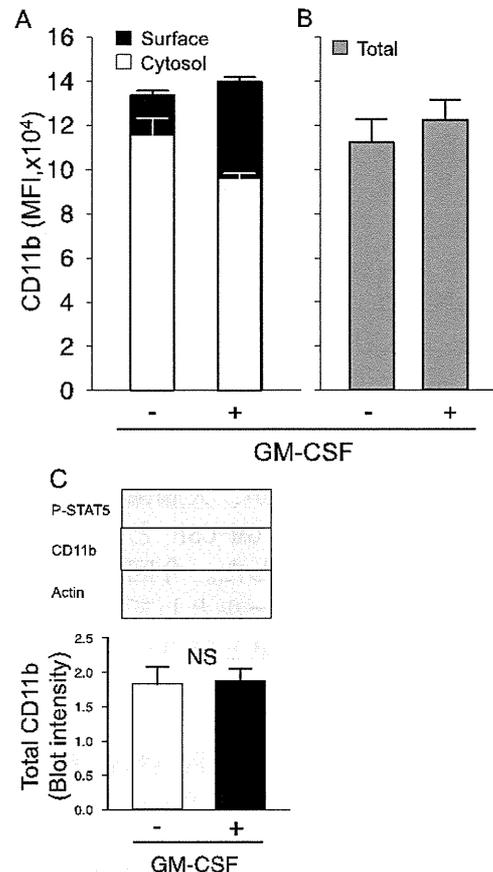


図 7. 細胞内外の CD11b の量 (A, B) フローサイトメトリー法, (C) ウェスタンブロッティング法。

自己免疫製肺胞蛋白症患者は健常者と比較して、CD11bSI が有意に低く (図 8)、今回行ったパイロットスタディでは、112 という数値が、診断の sensitivity, specificity 共に 100% であった (図 9)。

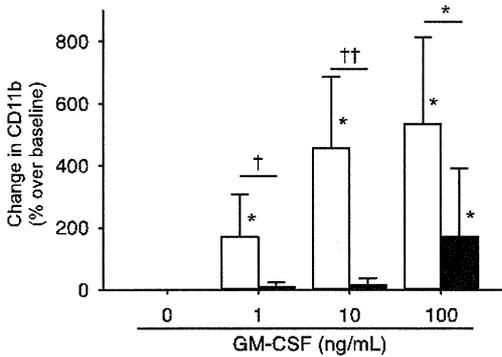


図 8. CD11b 変化率 (%). 白 : 健常者、黒 : 自己免疫製肺胞蛋白症

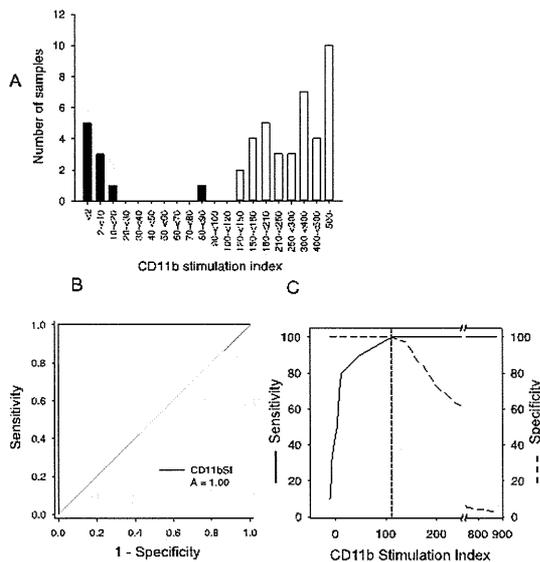


図 9. A. CD11bSI のヒストグラム。白: 健常者、黒、自己免疫製肺胞蛋白症。B, C, AUC 曲線、112 を診断閾値とすると感度、特異度が 100% となる。

### 結論

本方法は、適切にコントロールされた実験環境で行えば、再現性が高い結果が得られ、GM-CSF 生物活性を簡便に短時間で測定することができる。

### 謝辞

本研究の費用の一部は、厚生労働科学研究費補助金 医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究推進研究事業)「肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験」(H24-臨研推一般-003) から一部援助を受けた。

### 参考文献

- (1) Sakagami T, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Wood RE, Wert SE, Whitsett JA, Trapnell BC, Luisetti M. Human GM-CSF autoantibodies and reproduction of pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 2009 Dec 31;361(27):2679-81.
- (2) Coxon A, Tang T, Mayadas TN. Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1999; 190(7): 923-34
- (3) Uchida K, Beck DC, Yamamoto T, Berclaz PY, Abe S, Staudt MK, Carey BC, Filippi MD, Wert SE, Denson LA, Puchalski JT, Hauck DM, Trapnell BC. GM-CSF autoantibodies and neutrophil dysfunction in pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 2007;356(6):567-79.
- (4) Suzuki T, Sakagami T, Rubin BK, Nogee LM, Wood RE, Zimmerman SL, Smolarek T, Dishop MK, Wert SE, Whitsett JA, Grabowski G, Carey BC, Stevens C, van der Loo JC, Trapnell BC. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J Exp Med.* 2008;205(12):2703-10.

## 種間での GM-CSF 薬理効果の検討に関する研究

日本獣医生命科学大学 獣医感染症学教室 中垣 和英  
布村 由香

### はじめに

近年、分子標的薬やサイトカイン薬のようなバイオテクノロジーによる製剤の開発が加速的に増加している(1)。これらの製剤は種特異性が高く、従来用いられてきたマウス、ラット、ウサギ、イヌのような汎用実験動物によって生物活性や毒性を評価することが難しくなってきた。International Conference of Harmonization(Switzerland)の指針でも、バイオテクノロジーによる製剤の活性や毒性の評価には、適切な動物種を選択することが重要であると、指摘している(2)。

GM-CSF はガンの化学療法に伴う白血球減少症の改善(3)や肺胞タンパク症の吸入治療(4)に用いられている。ヒト型 GM-CSF 製剤は、遺伝子組み換えによって、大腸菌で産生される molgramostim と真菌で産生される sargramostim が入手可能である。これら、リコンビナント・ヒト型 GM-CSF の評価においては、サルが用いられてきたが、ヒト型 GM-CSF に対するサルの感受性の程度は明確に示されていない。また、サル以外の動物を用いて、本製剤を評価することの可能性についても、系統だった研究がみられない。そこで、この研究では、ヒト型 GM-CSF の活性をカニクイザル、ウサギ、イヌ、ラットの末梢血白血球を用いて、CD11b の発現増強によって比較した(5)。

### 対象と方法

ヒト型 GM-CSF の活性を、ヒト以外の動物

細胞で比較検討した。研究対象となるヒト型 GM-CSF は CHO 細胞由来 GM-CSF (CHO-GM-CSF)、大腸菌由来 GM-CSF (molgramostim)、酵母由来 GM-CSF (sargramostim)であり、さらに、対象として被検細胞の動物種型の GM-CSF (アカゲザル GM-CAF; Cell Sciences、ウサギ GM-CSF とネコ GMCSF; R&D systems) を用いた。カニクイザルのヘパリン血液を、実験動物業者(カニクイザル; NAS 研究所; GLP 実験施設、より購入した。ラット血液をえるために、日本獣医生命科学大学獣医看護学部で実習用に飼育されている個体より、麻酔下で心採血を行った。ウサギはオリエンタル酵母株式会社より購入し、数日の馴致期間を置いて、耳静脈より採血した。各動物から得られたヘパリン血液は、採血後 1 時間以内に使用した。はじめに、ヘパリン血液を 100  $\mu$ l ずつ滅菌エッペンドルフチューブに分注し、GM-CSF それぞれに 0.1~62.5ng/ml になるように添加した。すべての操作を室温で行い、一斉に 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内に 30 分間孵置した。血液は、蛍光ラベル CD11b, Gr-1, CD14 モノクローナル抗体(BioLegend)で、4°C、30 分間染色した。塩化アンモニウムで溶血後、血液細胞をパラフォルムアルデヒド固定液 (BioLegend) で固定し、FACS 洗浄液で洗浄した。抗体染色した細胞は FACSArray cytometer でデータを取り込んだ。データから、CD14 陽性細胞を除外し、抗顆粒球抗体 (Gr-1, CD89(サル)) 陽性細胞

集団で、CD11b 陽性の平均蛍光強度 (MFI) を算出した。各 GM-CSF 濃度における MFI 値から、ED<sub>50</sub> を算出した。それぞれの GM-CSF の ED<sub>50</sub> 値は、対応のある t 検定で比較した。

一方、NCBI の DNA database から、GM-CSF、GM-CSF receptor  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖アミノ酸配列を、ヒトと他の種間の相同性を比較した。特に、GM-CSF はシグナル配列を除去して比較した。

## 結果

ラットでは、ヒト型 GM-CSF に対し、全く応答しなかった。また、陽性コントロールとして用いたマウス・ラットのリコンビナント GM-CSF 刺激に対し、CD11b の発現が増加するが、ED<sub>50</sub> を計算できるほど明確な用量対反応関係が検出できなかった。

ウサギの CD11b 発現はヒトの GM-CSF で発現増加した。ウサギの ED<sub>50</sub> はサルの ED<sub>50</sub> に比べ、molgramostim 1/8, sargramostim 1/26, CHO 由来 GM-CSF で 1/624 と、CHO 由来 GM-CSF の活性が有意に低かった (P<0.05、図 1、表 1)。

図 1 ウサギの末梢血顆粒球発現における各種ヒト型 GM-CSF の影響 (ED<sub>50</sub> 値)

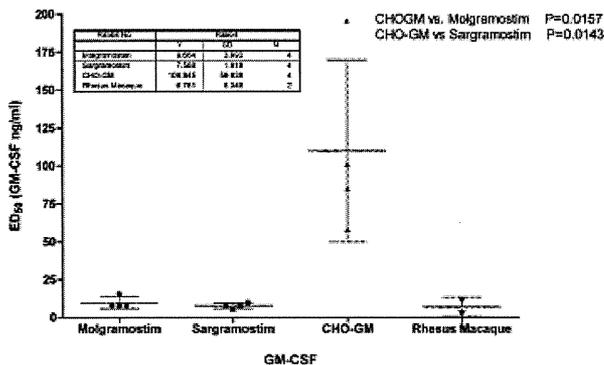
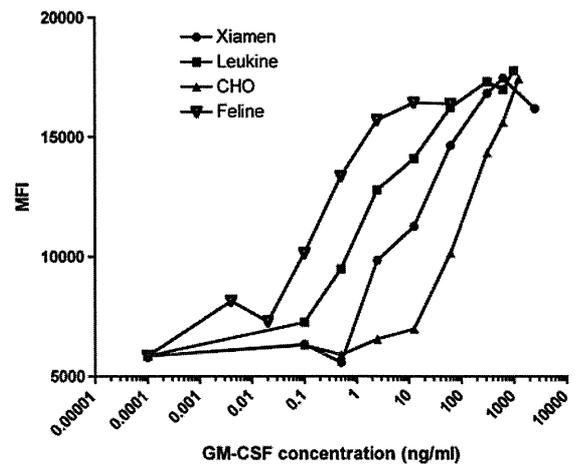


表 1 各種動物末梢血顆粒球の CD11b 発現増強を指標とした由来別 huGM-CSF の ED<sub>50</sub> 値 (ng/ml)

	Molgramostim	Sargramostim	CHO 由来
サル	0.170	0.287	0.176
ウサギ	9.664	7.588	109.8
ネコ	10.25	1.73	139.5

一頭のみ結果ではあるが、ネコの末梢血顆粒球でも同様の傾向が見られた (図 2、表 1)。

図 2 ネコの末梢血顆粒球発現における各種ヒト型 GM-CSF の用量-反応グラフ



各由来 huGM-CSF によるカニクイザル末梢血顆粒球の CD11b 発現増強を測定したところ、3 種 GM-CSF の ED<sub>50</sub> 値に有意差を認めなかった (P>0.05、図 3、表 1)。また、アカゲザルのリコンビナント GM-CSF と比較しても、有意差を認めなかった (P>0.05、図 3)。

ヒトの GM-CSF、GM-CSF レセプター  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖のアミノ酸配列を、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、カニクイザルと比較すると、GM-CSF ではマウスがやや低めであるが著しい違いは見られなかった (表 2)。一方、レセプター  $\alpha$  鎖を比較すると、マウス、ラットで特に低く、ウサギはやや低めであった (表 2)。

図 3 カニクイザルの末梢血顆粒球発現における各種ヒト型 GM-CSF の影響 (ED<sub>50</sub> 値)

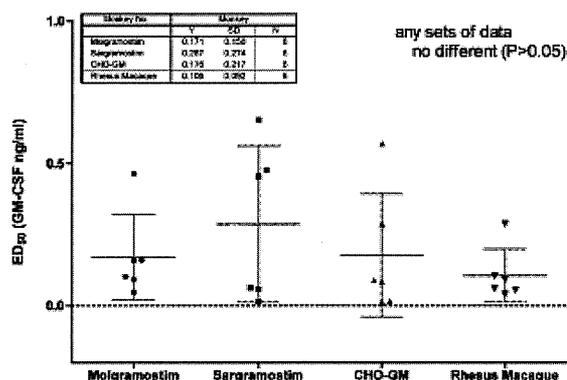


表 2 ヒトの GM-CSF, レセプター α 鎖、β 鎖と各種動物の相同性比較 (NCBI, DNA bank より)

	マウス	ラット	ウサギ	イヌ	サル
GM-CSF	54	63	69	69	95
α 鎖	36	33	55	60	92
β 鎖	56	56	64	65	90

## 考察

昨年度のマウスの成績と本年度のラットの結果から考察すると、CD11b 発現増強を指標として、ヒト型 GM-CSF の活性を測定するには、齧歯目 (ラット・マウス) を用いることができないで在ろうと考えられる。一方、同測定法で、ヒト型 GM-CSF をカニクイザル末梢血顆粒球を用いて測定すると、それらの ED<sub>50</sub> は 170-280pg であった (表 1)。このことは、GM-CSF レセプター α 鎖のアミノ酸配列を比較した結果と傾向が一致した (表 3)。従って、今回の CD11b 発現を測定する実験の結果を考慮すると、ヒトを除き、マカクを用いて測定することが最適であると考えられる。このことは、GM-CSF 製剤の安全性試験でマカク属のサルが利用されていることに、十分な妥当性を与えている。

一方、ウサギやネコ末梢血顆粒球 (イヌ) の CD11b 発現増強を測定した場合、CHO 細胞由来 GM-CSF の活性は他の GM-CSF の 1/10 近くまで低下した。このことは GM-CSF の糖鎖

修飾量の違いの影響と推定される。今回の実験結果からは、GM-CSF とその受容体のアミノ酸配列の相同性が低いほど、糖鎖修飾の影響を受けやすいことを示している。糖鎖の影響をヒトに外挿する上で、ウサギやネコは、質量分析と合わせて、有用な道具になると考えられる。

## 結論

ヒト型 GM-CSF の活性を測定する上で、CD11b 発現増強を測定する方法は有益な情報を与えてくれた。この検査法では、齧歯目の動物は適さない。ヒト型 GM-CSF の活性測定のためには、サルが最も妥当性のあるモデル動物であるが、ウサギやイヌ、ネコも別な角度から、有益であると考えられる。

## 謝辞

当研究における CD11b 測定法は東京大学病院内田寛治博士の方法を動物に応用したものであることを明記し、ご指導に対し、深謝いたします。

## 参考文献

1. Zachariah, S. and Pappachen, L. 2008, A Study Of Genetic Engineering Techniques In Biotechnology Based Pharmaceuticals. The Internet Journal of Nanotechnology Vol.3 (1) [http:// ispub.com/IJNT/3/1/12869](http://ispub.com/IJNT/3/1/12869).
2. ICH Steering Committee, 1997 Animal Species/Model Selection in 'Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1)' p.3.
3. Antman KS et al. 1988 Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. New England Journal of Medicine 319, 593-598.
4. 田澤立之、中田光 2011 自己免疫性肺胞蛋白症に帯する GM-CSF 吸入治療。日本薬理学会誌 138、64-67。
5. Uchida K., et al. 2007. GM-CSF auto-antibodies and neutrophil dysfunction in pulmonary alveolar proteinosis. The New England Medical Journal. 356, 567-579.

## カニクイザルでのGM-CSF吸入試験方法の検討

新潟大学医歯学総合病院<sup>1</sup>，日本獣医生命科学大学<sup>2</sup>

田澤立之<sup>1</sup>，中垣和英<sup>2</sup>，伊藤祐子<sup>1</sup>，橋本淳史<sup>1</sup>，田中崇裕<sup>1</sup>，赤坂圭一<sup>1</sup>，中田光<sup>1</sup>

### 研究要旨

ヒトでの投与方法と同じ GM-CSF 製剤吸入方法での動物吸入試験の方法を検討するため，マイクロスプレーによる気管内噴霧投与，膜型ネブライザー，ジェットネブライザーでの単回投与を施行した．各用量雌雄各 1 匹のカニクイザルに酵母由来 GM-CSF 製剤 Leukine を単回気管内投与（0.005，0.05 及び 0.5 mg/body）又は 2 種のネブライザー（膜型/ジェット）を用いて単回吸入投与（0.05，0.5 及び 5 mg/body）し，投与前および投与後 24 時間まで経時的に血漿を採取した．GM-CSF の作用を確認するため，一般状態観察，体温測定，血液検査及び気管支肺胞洗浄液（BALF）採取を行った．いずれの投与方法でも末梢血中の白血球数，好中球及び好酸球数，CRP の上昇が認められ，血中 GM-CSF が検出可能で，24 時間の濃度推移を測定できた．ネブライザーでの 5mg 投与と スプレーでの 0.5mg 投与はほぼ同等の血中濃度を示した．一般状態，体温及び一般細菌及び真菌検査に異常は認められなかった．これらの結果より，動物吸入試験での GM-CSF 製剤の投与方法としては気管内噴霧及びネブライザー吸入の双方とも可能であると考えられた．

### はじめに

自己免疫性肺胞蛋白症の GM-CSF 吸入治療薬開発のための非臨床試験における動物吸入毒性試験の方法として，昨年度は投与量を確実に担保できる気道内噴霧投与方法を検討することとし，カニクイザルを対象として，マイクロスプレーを用いて，最大投与可能用量での 3 日間連続の気道内噴霧法を試みたところ，末梢血中の白血球，好中球数の増加，気管支肺胞洗浄液中の細胞数の増加，および血中 GM-CSF の ELISA 法での検出が可能であることが確認できた．

この結果を基礎に，GM-CSF 吸入薬開発のための非臨床試験での吸入毒性動物試験の経気道的投与の方法について，薬事戦略相談の事前相談を受けたところ，気道内噴霧投与よりヒトでの投与方法に近いネブライザーでの試験の必要性の指摘を受けた．

そこで，今年度は，マイクロスプレーによるカニクイザルへの単回投与と，実際の吸入量の確認が難しいネブライザー（膜型ネブライザーおよびジェットネブライザー）での単回投与による影響を，末梢血中の白血球数や ELISA による血中 GM-CSF 濃度測定により検討することを

計画した．ネブライザーでの投与については，サルの顔面をスキャンして設計し 3D プリンターを用いて製作したフェイスマスクにネブライザーを接続し，サルの鼻および口をマスクで覆って投与することとした．血中濃度については薬物動態の評価のため，投与後 24 時間まで 8 回採血を行うこととした．また気道内への影響を評価するため 24 時間後に気管支肺胞洗浄液を採取して解析した．

### 対象と方法

GM-CSF 製剤: Genzyme 社より，酵母由来 GM-CSF 製剤 sargramostim 40mg/6mL の液体製剤 2 本（ロット番号 B17840AR）の提供を受けた．製剤は Genzyme 社が指定した PBS（Corning 社）で希釈して投与用の液剤を調製した．

動物: ヒト GM-CSF に生理活性を示す動物種としてカニクイザルを用いた（投与開始時年齢 3 歳，オス 3 例，メス 3 例）．動物は，AAALAC International により認証されている専門飼養施設で，専門スタッフにより飼養され，実験操作を受けた．

## 投与方法

### 検討1：マイクロスプレーによる単回投与試験

動物を保定し、キシロカイン8%（キシロカインRポンプスプレー8%，アストラゼネカ）の約0.1～0.3 mLを口腔内に散布して喉頭を局所麻酔後，マイクロスプレー（Penn-Century）を用いて，酵母由来GM-CSF製剤（Genzyme社）を0.005，0.05，0.5mg/bodyの各用量オスメス各1例のカニクイザルに，単回吸入投与した．投与前および投与後24時間の血算および血液生化学検査を行った．また投与前および投与後0分，15分，30分，1時間，2時間，4時間，8時間，24時間の採血を行い，血漿中のGM-CSF濃度をELISA法で測定した．

### 検討2：膜型ネブライザーによる単回投与試験

膜型ネブライザーとして，米国Aerogen社製のエアロネブ ソロ ネブライザー（コヴィディエン ジャパン社より購入）を用いて，酵母由来GM-CSF製剤（Genzyme社）を0.05，0.5，5mg/bodyの各用量オスメス各1例のカニクイザルに，単回吸入投与した．サル顔面をスキャンして設計され3Dプリンターを用いて製作された吸入用フェイスマスクをネブライザーに接続し，モンキーチェアに保定したサルに，マスクを装着した．ネブライザーの使用説明書に沿って4mLの投与液をネブライザーに入れて投与液がなくなるまで（約6分間）吸入させた．

### 検討3：ジェットネブライザーによる単回投与試験

ジェットネブライザーとして，ドイツのPari社製のLCプラスネブライザーを，同社の携帯用コンプレッサーTurboBOY Nにつないで，酵母由来GM-CSF製剤（Genzyme社）を0.05，0.5，5mg/bodyの各用量オスメス各1例のカニクイザルに，単回吸入投与した．モンキーチェアにサルを保定し，上記フェイスマスクをネブライザーに接続し，サルに装着した．1.5mLの投与液をネブライザーに入れて投与液がなくなるまで（約12～15分間）吸入させた．

## 評価方法

### 血算・血液生化学検査

投与前日（Day 0）および投与翌日（Day 2）に大腿静脈より滅菌ポリプロピレン製注射筒および22ゲージの注射針で採血し，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），全自動血液凝固測定装置CA-510（シスメックス），7180形自動分析装置（日立ハイテクノロジーズ）により，血算・凝固系検査・血液生化学検査を行った．

### 血漿GM-CSF濃度測定

投与前日および投与後0分，15分，30分，1時間，2時間，4時間，8時間，24時間の採血を行い，血漿中のGM-CSF濃度をELISA法（Quantikine ELISA Human GM-CSF Immunoassay, R&D systems）で測定した．

### 気管支肺胞洗浄液（BALF）採取

麻酔：塩酸メドトミジン20 μg/kg 及びミダゾラム0.3 mg/kgの筋注で鎮静させ，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Rポンプスプレー8%，アストラゼネカ）の約0.3 mLで喉頭を局所麻酔し，喉頭鏡を用いて，細径気管支ファイバースコープ（BF TYPE XP60，オリンパス）を経口的に気管に挿入し，マウスピースを装着，0.5%キシロカイン液の約0.5 mLを数回，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．

検討1および検討3では右肺，検討2では左肺の中葉気管支でファイバースコープを楔状挿入した．処理チャンネルを通して温生理食塩液を1回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．1回目の回収液を細菌検査に提出し，2回目～6回目の回収液をまとめて，細胞数算定を計算盤で行った．



図1. 実験計画—スプレー/ネブライザー単回投与

(倫理面への配慮)

本研究は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「新潟大学動物実験指針」、

「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を順守し、専門飼養施設(株式会社イナリサーチ)の動物実験審査委員会

(#13179, 2013年8月22日承認, ジェットネブライザー追加実験#

13259, 2013年11月14日承認)ならびに新潟大学動物実験倫理委員会(新大研第193号1, 2013年9月18日承認, ジェットネブライザー追加実験, 新大研第269号7, 2013年12月4日承認)により審査・承認された試験計画書に沿って実施された。

## 結果

動物の全身状態は、マイクロスプレー投与、膜型ネブライザー投与、ジェットネブライザー投与のいずれにおいても、変化はみられなかった。

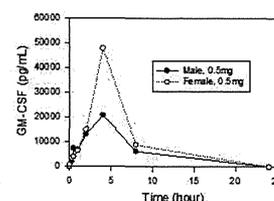
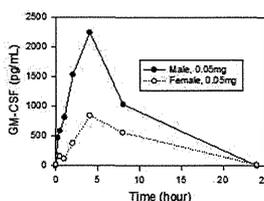
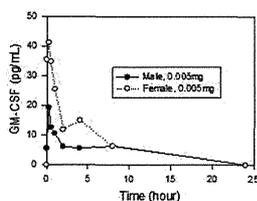
### 血液学検査

マイクロスプレー投与、膜型ネブライザー投与、ジェットネブライザー投与のいずれにおいても、投与前と比べ、投与翌日には、白血球数、好中球数、好酸球数の増加傾向がみられ、最高用量で増加が大きくなる傾向がみられた。吸入したGM-CSFの投与による効果と考えられた。またリンパ球数には減少傾向がみられた。ヘモグロビン濃度や血小板数には大きな変化はみられなかった。

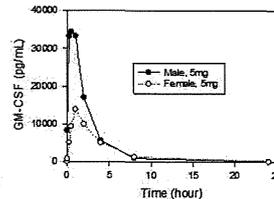
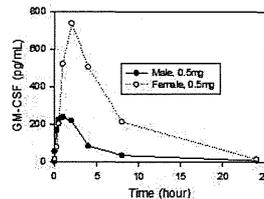
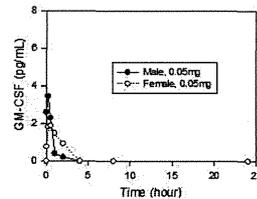
### 血液生化学検査

マイクロスプレー投与、膜型ネブライザー投与、ジェットネブライザー投与のいずれにおいても、投与前と比べ、投与翌日にはCRPの上昇がみられ、吸入したGM-CSFによる作用と考えられた。

マイクロ  
スプレー



膜型ネブ  
ライザー



ジェットネ  
ブライザー

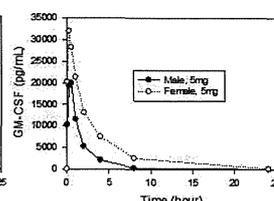
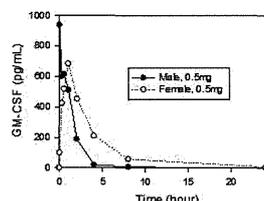
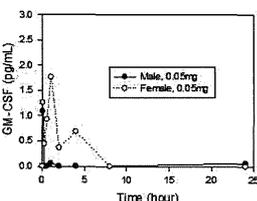


図2. 血漿中GM-CSF濃度—スプレー/各ネブライザー単回投与

膜型ネブライザー群、ジェットネブライザー投与群では、投与翌日に、AST, LDH, CK等の上昇がみられたが、これは、マスク装着時の保定による変化と考えられた。総タンパク濃度、血清クレアチニン値等には大きな変化はみられなかった。

### 血漿GM-CSF値

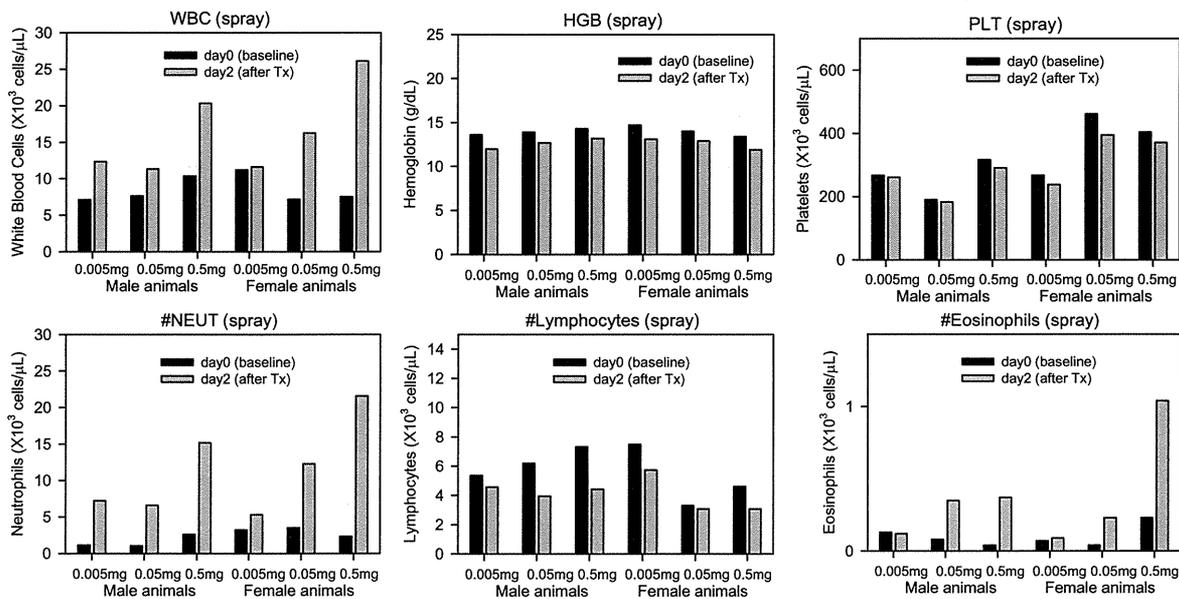
マイクロスプレー投与、膜型ネブライザー投与、ジェットネブライザー投与のいずれにおいても単回投与されたGM-CSFの血中での検出は可能であった。マイクロスプレー投与では、血漿GM-CSFは、0.005mg投与群では15分値が最高値であったが、0.05mgおよび0.5mg投与群での4時間値が最高値だった。これに対して、膜型ネブライザー投与では、血漿中GM-CSFは0.5mgおよび5mg投与群では、30分-2時間値が最高値で、ジェットネブライザー投与では、0.5mgおよび5mg投与群では、15-30分時間値が最高値であった。

### 気管支肺胞洗浄液(BALF)所見

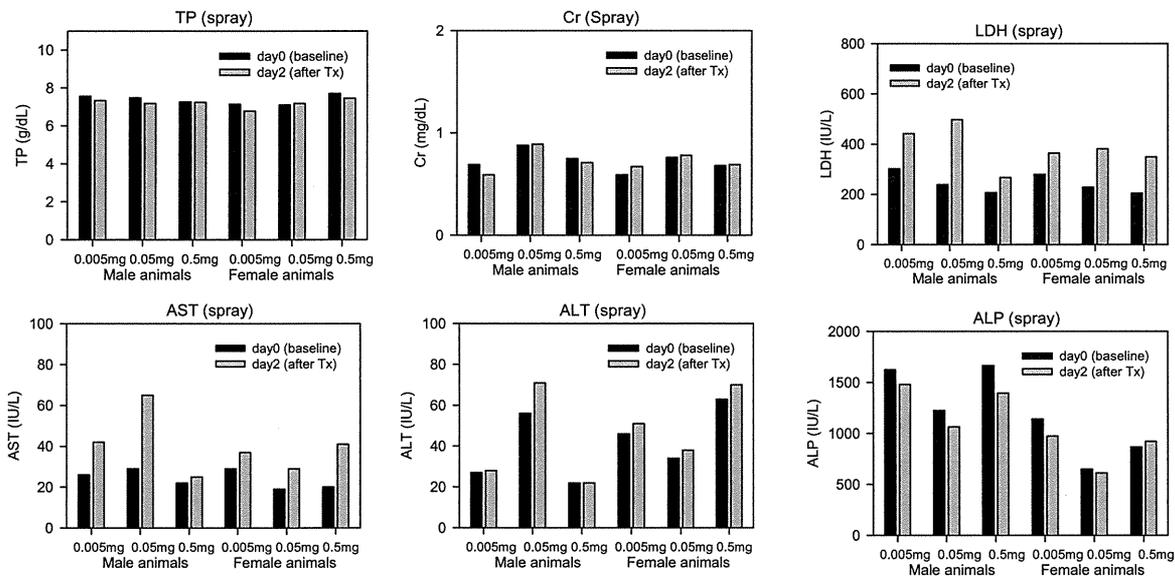
単回投与後24時間で採取したBALF中の細胞密度は、マイクロスプレー投与でもネブライザー投与でも、最大用量群で増加傾向がみられた。またBALF中のGM-CSFはELISAで検出可能レベルであり、最大用量で最高となる傾向がみられた。

# マイクロスプレー単回投与前後の血液検査結果

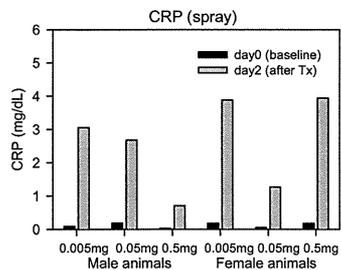
## 血算



## 血液生化学

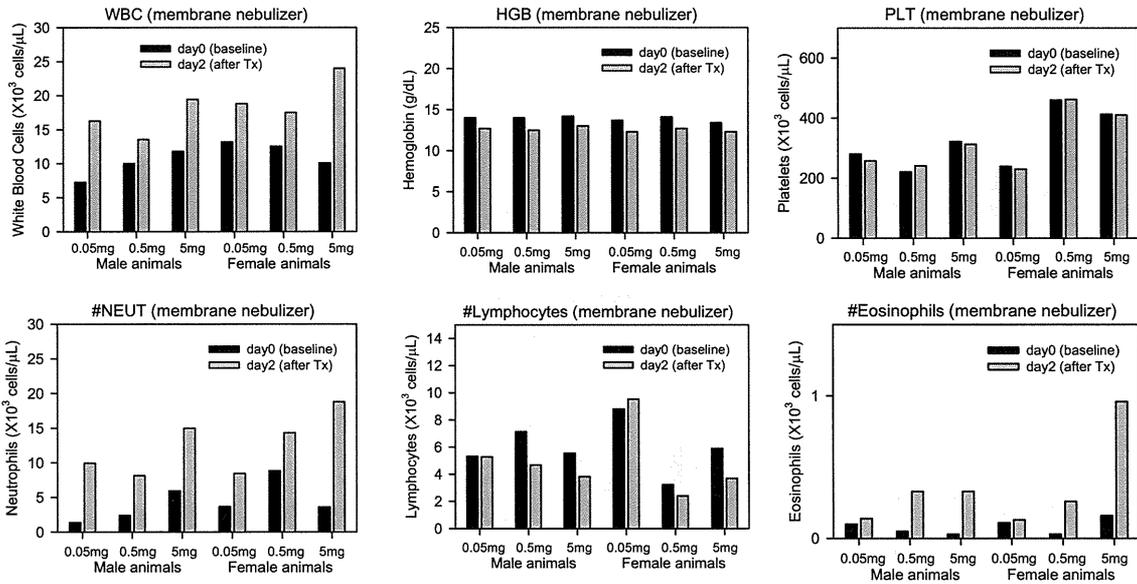


## 血清検査

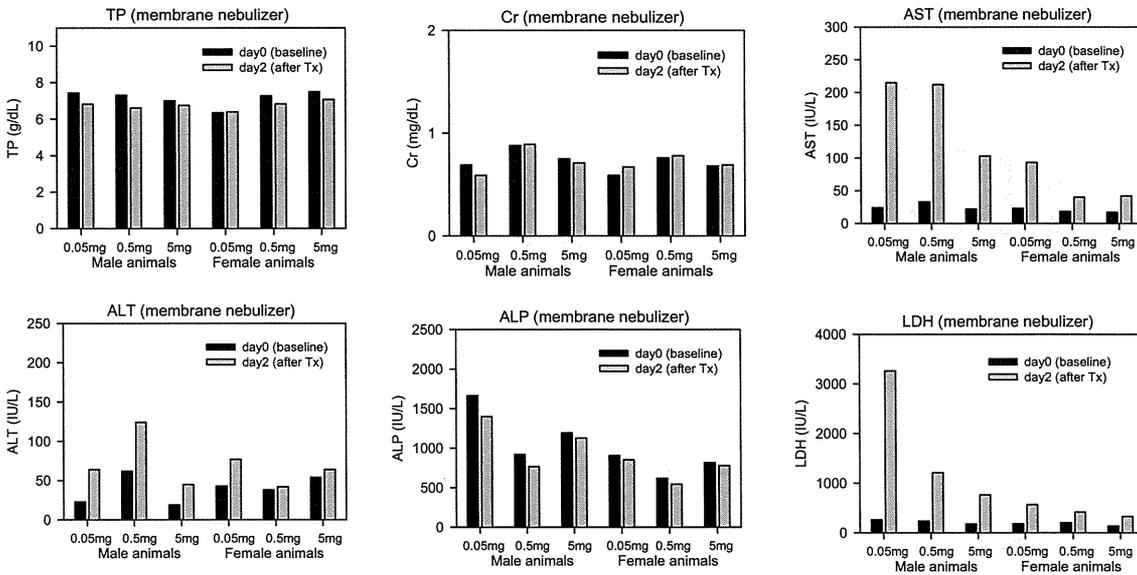


# 膜型ネブライザー単回投与前後の血液検査結果

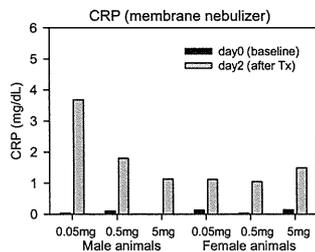
## 血算



## 血液生化学

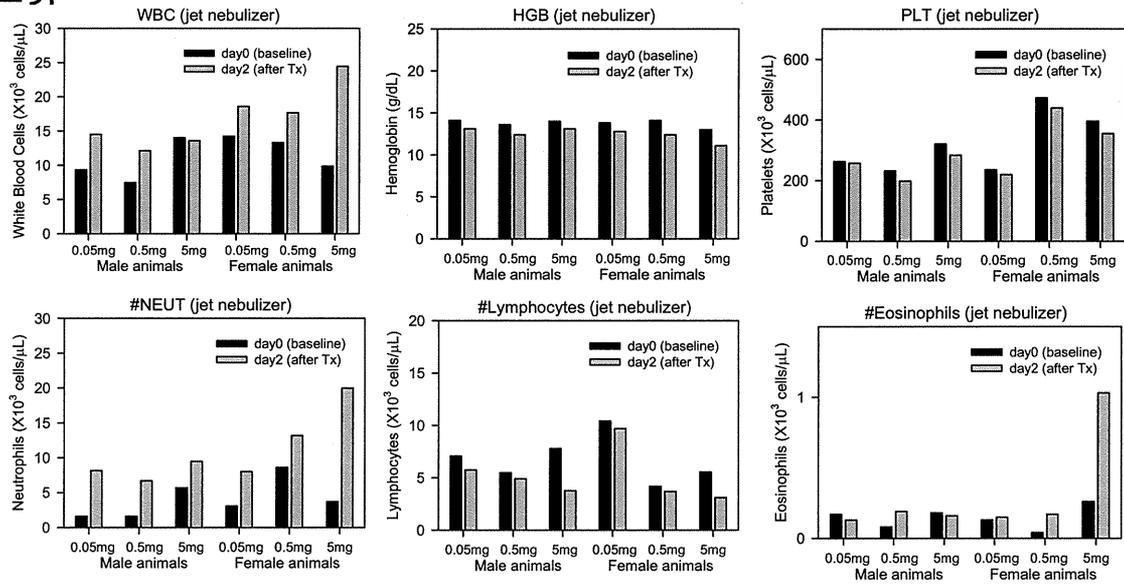


## 血清検査

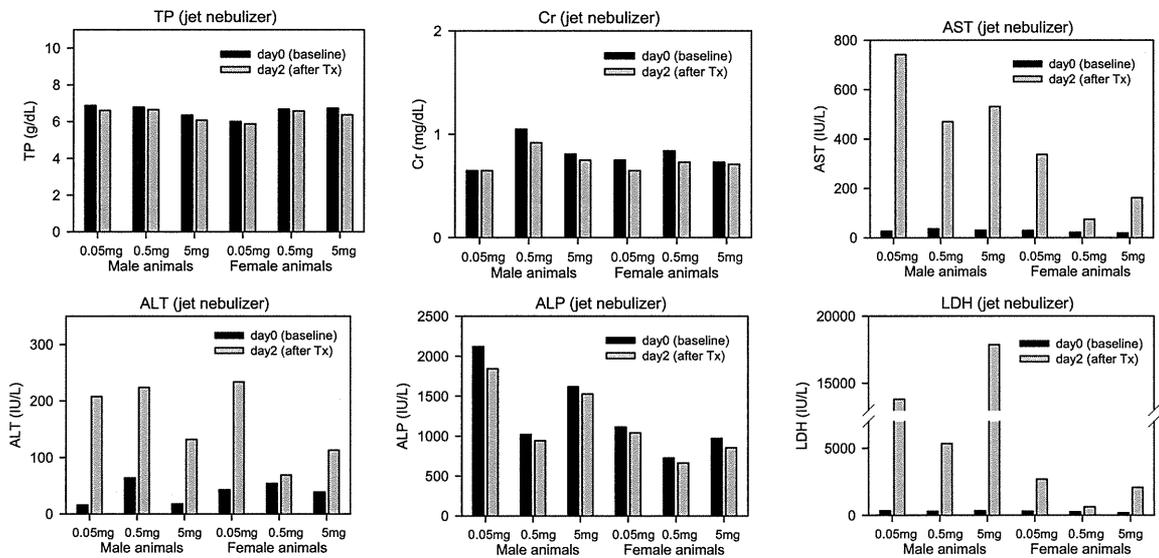


# ジェットネブライザー単回投与前後の血液検査結果

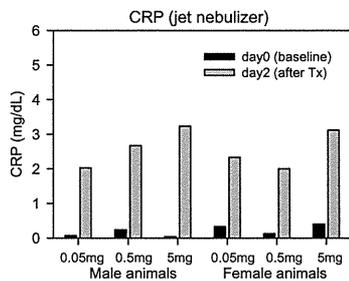
## 血算



## 血液生化学



## 血清検査



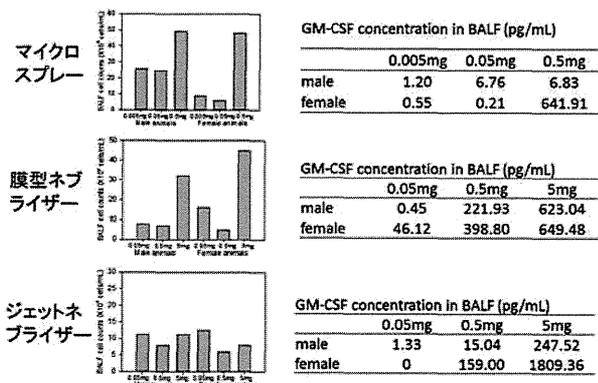


図3. BALF所見—スプレー/各ネブライザー単回投与

### 考察

本研究で、マイクロスプレー、膜型ネブライザー、ジェットネブライザーのいずれによる酵母由来 GM-CSF 製剤の経気道的単回投与でも、血中 GM-CSF を検出できることが明らかとなった。

ネブライザー投与では、投与薬剤の相当量が呼気中に放出され、臨床的にはネブライザーの吸入効率は、10-15%程度とされる。このため、本研究では、マイクロスプレーでの投与量の10倍量をネブライザーでの投与量としたが、ネブライザーでの5mg投与とスプレーでの0.5mg投与はほぼ同等の血中濃度を示した。また膜型ネブライザーとジェットネブライザーはほぼ同等の血中濃度を示した。

血中 GM-CSF 濃度の最高値は、マイクロスプレー投与では、4時間値であった。気管内噴霧投与された GM-CSF 製剤は気道内に一定時間滞留して、血管内に吸収されるものと考えられた。これに対して、膜型ネブライザーあるいはジェ

ットネブライザー投与での血中 GM-CSF 濃度の最高値は 30分—2時間値であった。ネブライザーにより生成される GM-CSF 製剤の液剤の微粒子は噴霧投与より末梢気道に到達し、より早く血管内に吸収されると考えられた。

ジェットネブライザーの方が、膜型ネブライザーよりより早い時間で血中濃度が最高値に達する傾向がみられたが、これは、吸入に要する時間と関係すると思われる。ジェットネブライザーでは吸入時間としておよそ12-15分程度ほど要したが、膜型では6分程度で吸入を終了しており、吸入開始からの時間で比較するとジェットネブライザーでは初回採血時ですでに10分程度膜型より先行していると考えられる。

マイクロスプレー投与では、最少用量の0.005mg/bodyで、血中 GM-CSF 濃度の検出限界(3pg/mL)を越えていた。これに対して、膜型/ジェットネブライザー投与での最少用量0.05mg/body (ヒトの1mg/bodyに相当)では血漿 GM-CSF は検出限界レベルであった。ヒトの常用量の4倍程度のintensityであり、ヒトの場合にはより吸入効率が上がることを見込んでも、ヒトの第I相試験を行う場合には、血中 GM-CSF 濃度の検出限界に近いレベルでの測定となることが予想された。

本研究では、ネブライザーでの GM-CSF 製剤経気道投与でも、血中 GM-CSF 濃度の検出可能レベルとなりうることを示唆された。各投与群2例と動物例数が少ないため、今後、中等用量を中心に例数を増やして検討する必要がある。

### 結論

これらの結果より、動物吸入試験での GM-CSF 製剤の投与方法としては気管内噴霧及びネブライザー吸入の双方とも可能であると考えられた。動物例数が少ないため、今後、中等用量を中心に例数を増やして検討する必要がある。

### 謝辞

貴重な被験試薬を提供いただいたジェンザイム社、ならびに試験実施にあたり、貴重なご示唆をいただいた株式会社イナリサーチのスタッフの皆様へ深謝いたします。

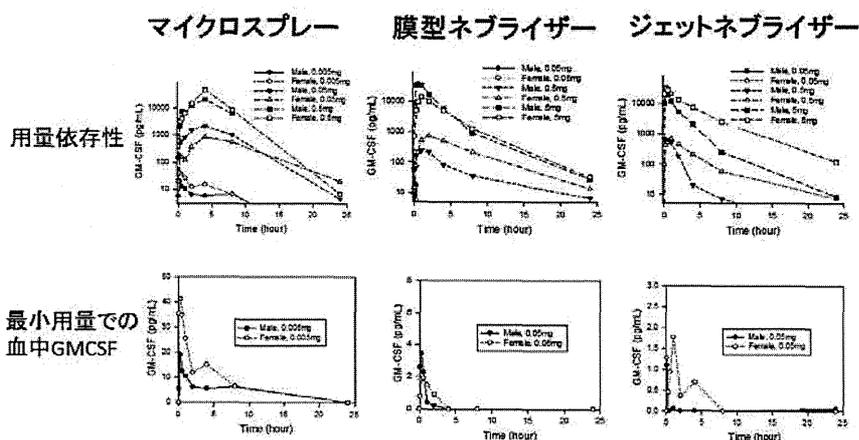


図4. 用量依存性と検出限界—スプレー/各ネブライザー単回投与

#### 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.

## カニクイザルでのヒトGM-CSF製剤反復気管内投与による抗GM-CSF抗体産生

新潟大学医歯学総合病院<sup>1</sup>，日本獣医生命科学大学<sup>2</sup>

田澤立之<sup>1</sup>，中垣和英<sup>2</sup>，伊藤祐子<sup>1</sup>，橋本淳史<sup>1</sup>，田中崇裕<sup>1</sup>，赤坂圭一<sup>1</sup>，中田光<sup>1</sup>

### 研究要旨

動物へのヒト GM-CSF 製剤吸入の反復投与により，抗 GM-CSF 抗体の産生がみられるかどうかを検討するため，CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤および大腸菌由来 GM-CSF 製剤の 2 種類の製剤を用いて，マイクロスプレーによる気管内噴霧投与（15  $\mu$ g/body/回，2 回/週，12 週）を各製剤オス 2 例のカニクイザルに施行し，1 週間毎に採血し抗体の検出を行うとともに，一般状態観察，2 週間毎の血液検査及び 12 週後に気管支肺胞洗浄液（BALF）採取を行った．大腸菌由来製剤投与群では，投与開始 3 週後より抗体が検出され，反復投与継続により，投与開始後 12 週までに 60  $\mu$ g/mL 以上のレベルまで抗体価が上昇した．これに対して，CHO 細胞由来製剤投与群では，投与開始後 4 週より抗体が検出されたが，抗体価は投与開始後 12 週まで 20–30  $\mu$ g/mL のレベルにとどまって推移した．いずれの製剤投与群でも血算，血液生化学検査では，著しい変化はみられず推移し，有意の腎機能異常，肝機能異常はみられなかった．12 週終了時の気管支肺胞洗浄液では外観の白濁はみられず，無構造沈殿物もみられなかったが，抗 GM-CSF 抗体が検出され，泡沫マクロファージ様細胞が少数みられた．製剤による抗体価の差については，糖鎖構造の関与が考えられた．糖鎖構造による抗体産生の調節機構の解明と，より長期での反復投与による観察が今後の課題として考えられる．

### はじめに

ヒトリコンビナント GM-CSF 製剤の皮下注射等での長期投与では抗体産生がみられることが知られている．一方，自己免疫性肺胞蛋白症患者での本邦での GM-CSF 吸入治療研究では，参加者の抗 GM-CSF 抗体価は，治療前と比べて GM-CSF 吸入治療後も，有意の変化がみられなかった．

ヒト GM-CSF 製剤の気道内投与により，抗 GM-CSF 抗体が生ずるかどうかは，本製剤の非臨床試験の方法を検討する上で重要であるとともに，自己免疫性肺胞蛋白症の病態を考える上でも，また今後の本製剤の他疾患への適応を考える上でも重要な課題である．そこで，ヒト GM-CSF と 95% 相同の GM-CSF を有するカニクイザルを用いて，ヒト GM-CSF 製剤の気道内投与での抗体の産生を観察した．気道内投与の方法としては，投与量を確実に担保できるマイクロスプレーによる気道内噴霧投与方法を用い，ヒトでの皮下注射の常用量に相当する 15  $\mu$ g/body/回を週 2 回，12 週投与することを計画した．製剤とし

ては，糖鎖のない大腸菌由来 GM-CSF 製剤と，哺乳類細胞での糖鎖修飾を受けている CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤の 2 種類を用いることとした．血中抗体濃度については週 1 回の測定とし，2 週に 1 回，血液学的検索，血液生化学検査を行い 12 週後に気管支肺胞洗浄液を採取して解析した．

### 対象と方法

GM-CSF 製剤：JCR ファーマ社より提供された CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤 1mg/mL の液体製剤，および大腸菌由来 GM-CSF 製剤（Amoytop 社）を用いた．

動物：ヒト GM-CSF と 95% 相同の GM-CSF を有する動物種としてカニクイザルを用いた（投与開始時年齢 3 歳，各製剤投与群オス 2 例）．動物は，AAALAC International により認証されている専門飼養施設で，専門スタッフにより飼養され，実験操作を受けた．

## 投与方法

### マイクロスプレーによる反復投与

動物を保定し、キシロカイン 8% (キシロカイン R ポンプスプレー 8%, アストラゼネカ) の約 0.1~0.3 mL を口腔内に散布して喉頭を局所麻酔後、マイクロスプレー (Penn-Century) を用いて、CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤 (JCR 社, ロット番号 GMJ121012), 大腸菌由来 GM-CSF 製剤 (Amoytop 社 ロット番号 201105A09) を 0.015mg/body の各製剤オス 2 例のカニクイザルに、週 2 回単回吸入投与した。週に 1 回、採血し、当施設でヒトの肺胞蛋白症診断のための抗 GM-CSF 抗体の測定方法と同一の ELISA 法により、同抗体の抗体価を測定した。また 2 週に 1 回血算および血液生化学検査を行った。

## 評価方法

### 血算・血液生化学検査

投与前日 (Day 0) および投与翌日 (Day 2) に大腿静脈より滅菌ポリプロピレン製注射筒および 22 ゲージの注射針で採血し、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), 全自動血液凝固測定装置 CA-510 (シスメックス), 7180 形自動分析装置 (日立ハイテクノロジーズ) により、血算・凝固系検査・血液生化学検査を行った。

### 抗GM-CSF抗体濃度測定

週に 1 回、採血し分離した血漿を 3000 倍に希釈し、当施設でヒトの肺胞蛋白症診断のための抗 GM-CSF 抗体の測定方法と同一の ELISA 法により、同抗体の抗体価を測定した。

### 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取

麻酔: 塩酸メドミジン 20  $\mu$ g/kg 及びミダゾラム 0.3 mg/kg の筋注で鎮静させ、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 R ポンプスプレー 8%, アストラゼネカ) の約 0.3 mL で喉頭を局所麻酔し、喉頭鏡を用いて、細径気管支ファイバースコープ (BF TYPE XP60, オリンパス) を経口的に気管に挿入し、マウスピースを装着、0.5%キシロカイン液の約 0.5 mL を数回、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、右肺の

中葉気管支でファイバースコープを楔状挿入した。処理チャンネルを通して温生理食塩液を 1 回 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。1 回目の回収液を細菌検査に提出し、2 回目~6 回目の回収液をまとめて、細胞数算定を計算盤で行った。

覚醒: アチパメゾール 0.3 mL を筋肉内投与して覚醒させた。

### (倫理面への配慮)

本研究は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「新潟大学動物実験指針」、「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を順守し、専門飼養施設 (株式会社イナリサーチ) の動物実験審査委員会 (#13261, 2013 年 11 月 15 日承認) ならびに新潟大学動物実験倫理委員会 (新大研第 269 号 6, 2013 年 12 月 4 日承認) により審査・承認された試験計画書に沿って実施された。

## 結果

動物の全身状態は、CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤投与群、大腸菌由来 GM-CSF 製剤投与群のいずれにおいても、変化はみられなかった。

### 血液学検査

CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤投与群、大腸菌由来 GM-CSF 製剤投与群のいずれにおいても、投与前と比べ著しい変化はみられなかった。投与開始後 2-4 週程度で白血球数、血小板数の若干の漸増傾向がみられたが、その後回復した。ヘモグロビンは変化ないまま推移した。好中球数、好酸球数は CHO 細胞由来製剤投与群で投与開始後 2-4 週の増加傾向のあと回復傾向がみられたが、大腸菌由来製剤投与群では一定の傾向はみられなかった。

### 血液生化学検査

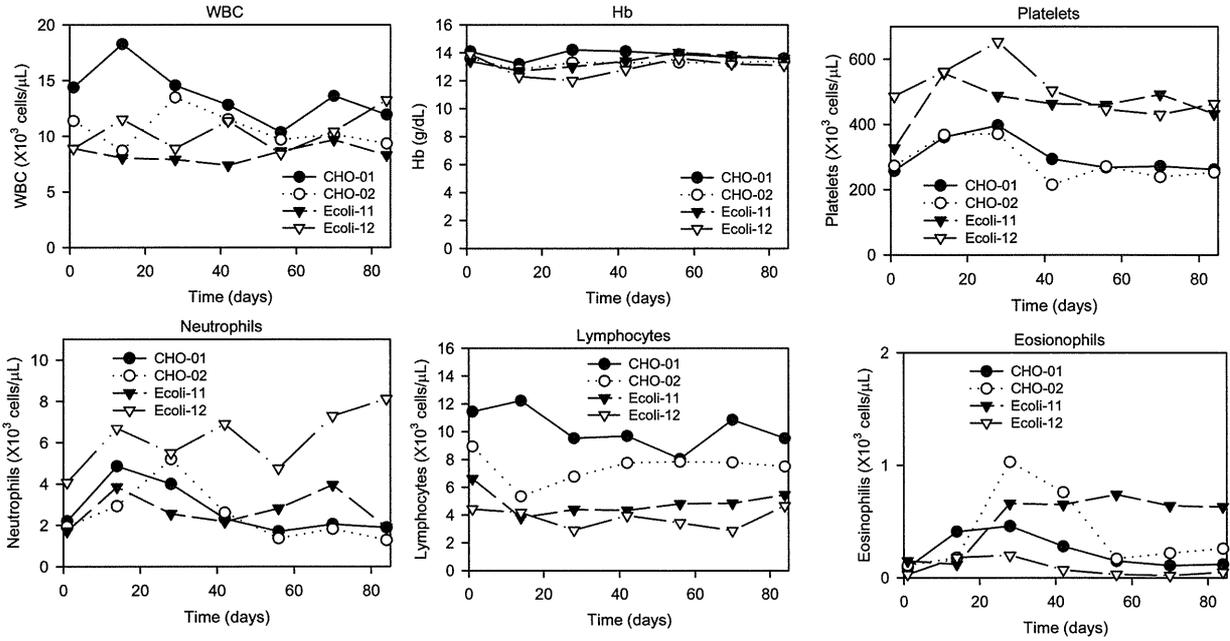
CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤投与群、大腸菌由来 GM-CSF 製剤投与群のいずれにおいても、投与前と比べ、腎機能、肝機能、CRP 等では大きな変化はみられないまま推移した。

### 抗GM-CSF抗体価

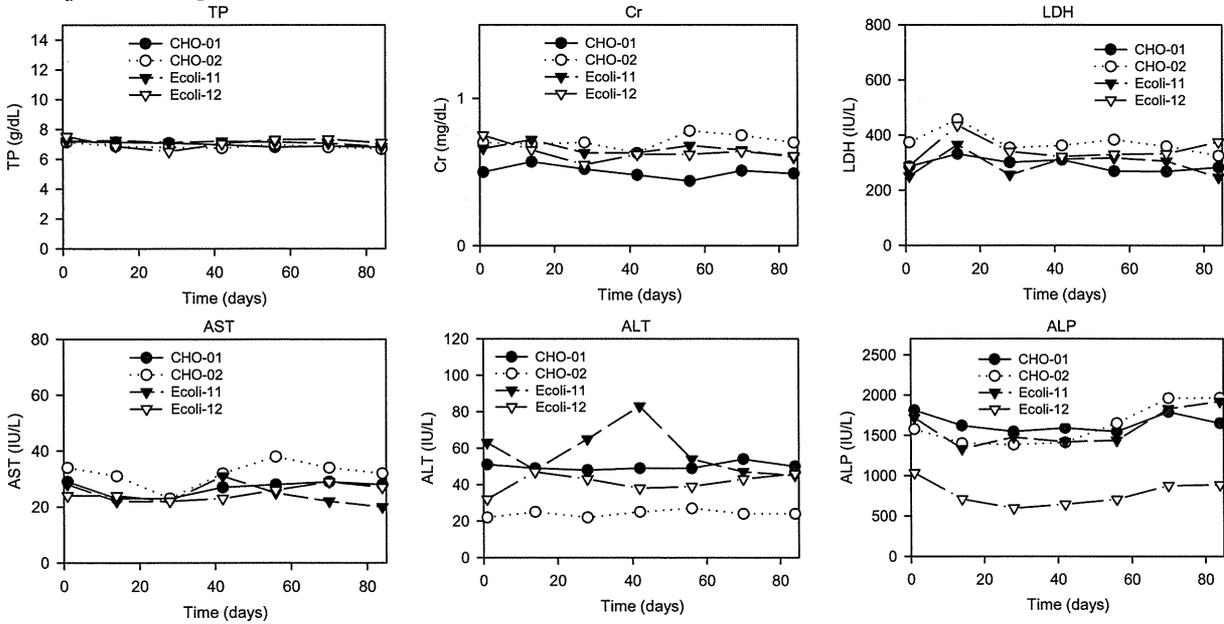
CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤投与群、大腸菌由来 GM-CSF 製剤投与群の間では抗体価の推移については違いがみられた。大腸菌由来製剤投与群で

# 抗体観察実験の血液検査結果

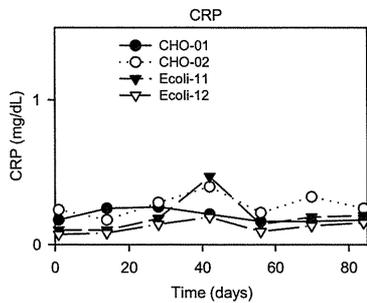
## 血算



## 血液生化学



## 血清検査



は、投与開始3週後より抗体が検出され、反復投与継続により、投与開始後12週までに60 $\mu$ g/mL以上のレベルまで抗体価が上昇した。これに対して、CHO細胞由来製剤投与群では、投与開始後4週より抗体が検出されたが、抗体価は投与開始後12週まで20–30 $\mu$ g/mLのレベルにとどまって推移した。

#### 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 所見

12週終了時の気管支肺胞洗浄液では外観の明らかな白濁はみられず、無構造沈殿物もみられなかったが、抗GM-CSF抗体が検出され、泡沫マクロファージ様細胞が少数みられた。

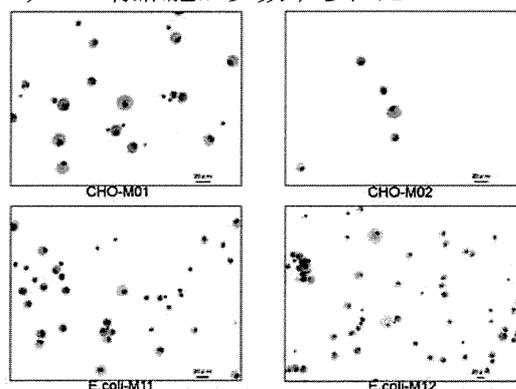


図1. スプレーによるGM-CSF製剤の反復気道内投与による抗体出現観察での気管支肺胞洗浄液所見

#### 考察

本研究で、CHO細胞由来GM-CSF製剤、大腸菌由来GM-CSF製剤のいずれの経気道的な反復投与によっても、血中抗GM-CSF抗体を投与開始後4週程度で検出できることが明らかとなった。気管支肺胞洗浄液でも抗GM-CSF抗体は検出でき、泡沫マクロファージの出現もみられたが、無構造沈殿物や洗浄液の白濁などはみられず、肺胞蛋白症の発症を示す所見はなかった。

今回は、12週までの反復投与で観察された抗体をELISA法で検出したが、反復投与が続くにつれ、この抗体の特性に変化がみられる可能性が考えられ、GM-CSF依存細胞株などでの、中和能のバイオアッセイも必要と考えられる。幸いこの動物群の飼養が続けられているので、GM-CSF反復投与をさらに続けて、抗体の特性の変化を解析する必要がある。

本実験系では経気道的にGM-CSF製剤を投与している。したがって、全身的に産生された抗GM-CSF抗体が肺内に広がり、内在性のGM-CSFの生理活性が抑えられたとしても、気管支・肺を通して外在性のGM-CSFが定期的に補充されている状態であるため、肺胞蛋白症の発症にいたらなかったと考えられる。

この仮説を検証するには、皮下注射などの全身投与によるGM-CSF投与での動物試験を行って、気道内投与と比較する必要がある。これまでの動物での検討では、気管支肺胞洗浄所見、胸部CT所見、あるいは肺組織所見の解析はされていない。全身投与でのGM-CSF投与による肺への影響は、GM-CSF吸入薬剤開発にとって重要な解析であるだけでなく、肺胞蛋白症の病態の解析にも有用な検討となる。

CHO細胞由来GM-CSF製剤投与群と大腸菌由来GM-CSF製剤投与群との間で、抗GM-CSF抗体価に差がみられた機序に、GM-CSFの糖鎖修飾が関係している可能性が考えられる。糖鎖のない大腸菌由来GM-CSFと、糖鎖修飾の豊富なCHO細胞由来GM-CSFとでは、受容体との親和性、細胞への内在化、抗原性等で差がみられる可能性がある。この仮説を検証するためには、シアリダーゼ処理をしたCHO細胞由来GM-CSF、あるいはHPLCなどによって分画したCHO細胞由来GM-CSFを動物に反復投与して、抗体産生を観察する必要があると考えられる。糖鎖修飾による、本製剤の抗原性の差については、肺胞蛋白症の病態を探る上でも重要な所見と考えられる。

#### 結論

本検討での12週終了時の気管支肺胞洗浄液では外観の白濁や無構造沈殿物はみられなかったが、抗GM-CSF抗体が検出され、泡沫マクロファージ様細胞が少数みられた。製剤による抗体価の差については、糖鎖構造の関与が考えられた。糖鎖構造による抗体産生の調節機構の解明とより長期での反復投与による観察が今後の課題として考えられる。

#### 謝辞

貴重な被験試薬を提供いただいたJCRファーマ株式会社、ならびに試験実施にあたり、貴重なご示唆と卓越した技術的サポートをいただいた株式会社イナリサーチのスタッフの皆様に深謝いたします。

#### 参考文献

1. Reed JA, Ikegami M, Cianciolo ER, Lu W, Cho PS, Hull W, Jobe AH, Whitsett JA. Aerosolized GM-CSF ameliorates pulmonary alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol.* 1999;276:L556–63.

#### 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
井上義一	リンパ脈管筋腫症	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	334-337
新井徹, 井上義一	肺胞蛋白症	泉 孝英	今日の診療のた めに ガイドラ イン 外来診療 2013	日経メディ カル開発	東京	2013	430-432
井上義一	特発性間質性肺炎	永井 良三, 大田 健	疾患・症状別 今 日の治療と看護 (改訂第3版)	南江堂	東京	2013	388-390
圓城寺若奈, 守屋順子, 井上義一, 中村しをり	第Ⅶ章-IIPs の看護 2. その2	杉山幸比古	特発性間質性 肺炎の治療と 管理	克誠堂出 版	東京	2013	195-200
井上義一	X. IPF と鑑別が必要 な疾患 1. 特発性間 質性肺炎の新しい分 類	杉山幸比古	特発性肺線維 症(IPF) 改訂版	医薬ジャ ーナナル社	大阪	2013	208-211

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	年
Tazawa R, Inoue Y, Arai T, Takada T, Kasahara Y, Hojo M, Ohkouchi S, Tsuchihashi Y, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Ishii H, Nei T, Morimoto K, Nasuhara Y, Ebina M, Akira M, Ichiwata T, Tatsumi K, Yamaguchi E, Nakata K.	Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy.	Chest	in press		2014
Hisata S, Moriyama H, Tazawa R, Ohkouchi S, Ichinose M, Ebina M.	Development of pulmonary alveolar proteinosis following exposure to dust after the Great East Japan Earthquake.	Respir Investig.	51	212-6	2013
Ishii H, Seymour JF, Tazawa R, Inoue Y, Uchida N, Nishida A, Kogure Y, Saraya T, Tomii K, Takada T, Itoh Y, Hojo M, Ichiwata T, Goto H, Nakata K.	Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan.	BMC Pulmonary Medicine	in press		2014
Nei T, Urano S, Itoh Y, Kitamura N, Hashimoto A, Tanaka T, Motoi N, Kaneko C, Tazawa R, Nakagaki K, Arai T, Inoue Y, Nakata K.	Light chain ( $\kappa/\lambda$ ) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis	Clin. Immunol.	149(3)	357-64	2013