

Hashimoto A, Tanaka T, Itoh Y, Yamagata A, Kitamura N, Tazawa R, Nakagaki K, Nakata K.	Low concentrations of recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor derived from Chinese hamster ovary cells augments long-term bioactivity with delayed clearance in vitro.	Cytokine	in press		2014
Handa T, Nakatsue T, Baba M, Takada T, Nakata K, Ishii H.	Clinical features of three cases with pulmonary alveolar proteinosis secondary to myelodysplastic syndrome developed during the course of Behçet's disease.	Respiratory Investigation	in press		2014
Arai T, Inoue Y, Sugimoto C, Inoue Y, Nakao K, Takeuchi N, Matsumuro A, Hirose M, Nakata K, Hayashi S	CYFRA 21-1 as a disease severity marker for autoimmune pulmonary alveolar proteinosis	Respirology	18(4)	DOI: 10.1111/r esp.1221 0	
Young LR, Lee HS, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Downey GP, Swigris JJ, Taveira-Dasilva AM, Krischer JP, Trapnell BC, McCormack FX	Serum VEGF-D concentration as a biomarker of lymphangioliomyomatosis severity and treatment response: a prospective analysis of the Multicenter International Lymphangioliomyomatosis Efficacy of Sirolimus (MILES) trial	Lancet Respiratory Medicine		DOI 10.1016/ S2213-26 00(13)70 090-0	2013

Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bouros D, Brown KK, Colby TV, Collard HR, Cordeiro CR, Cottin V, Crestani B, Drent M, Dudden RF, Egan J, Flaherty K, Hogaboam C, Inoue Y, Johkoh T, Kim DS, Kitaichi M, Loyd J, Martinez FJ, Myers J, Protzko S, Raghu G, Richeldi L, Sverzellati N, Swigris J, Valeyre D	An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias	Am J Respir Crit Care Med	188(6)	733-48	2013
Tokura S, Okuma T, Akira M, Arai T, Inoue Y, Kitaichi M	Utility of expiratory thin-section CT for fibrotic interstitial pneumonia	Acta Radiologica		DOI:10.1177/0284185113512300	
Swigris JJ, Lee HS, Cohen M, Inoue Y, Moss J, Singer L, Young LR, McCormack FX	St. George's Respiratory Questionnaire has Longitudinal Construct Validity in Lymphangioleiomyomatosis	Chest	143(6)	1671-78	2013
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.	18(4)	743-9	2013
Kurai D, Nakagakai K, Wada H, Saraya T, Kamiya S, Fujioka Y	Mycoplasma pneumoniae extract induces an IL-17-associated inflammatory reaction in murine lung: implication for mycoplasmal pneumonia.	Inflammation	36(2)	285-93	2013

Uchida K, Yasunaga H, Sumitani M, Horiguchi H, Fushimi K, Yamada Y.	Effects of Remifentanil on In-hospital Mortality and Length of Stay Following Clipping of Intracranial Aneurysm: A Propensity Score Matched Analysis.	Journal of Neurosurgical Anesthesiology	Epub ahead of printing		2014
Nakamura M, Uchida K, Akahane M, Watanabe Y, Ohtomo K, Yamada Y.	Effects on Gastric Emptying and Carbohydrate Loading of an Oral Nutritional Supplement and an Oral Rehydration Solution: A Crossover Study with Magnetic Resonance Imaging.	Anesthesia and Analgesia	Epub ahead of printing		2013
Uchida K, Nakata K, Carey B, Chalk C, Suzuki T, Sakagami T, Koch DE, Stevens C, Inoue Y, Yamada Y, Trapnell BC.	Standardized Serum GM-CSF Autoantibody Testing for the Routine Clinical Diagnosis of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis.	Journal of Immunological Methods	402(1-2)	57-70	2014
Sumitani M, Yasunaga H, Uchida K, Horiguchi H, Nakamura M, Ohe K, Fushimi K, Matusda S, Yamada Y.	Perioperative factors affecting the occurrence of acute complex regional pain syndrome following limb bone fracture surgery: Data from the Japanese Diagnosis Procedure Combination database.	Rheumatology	Epub ahead of printing		2013
Watanabe S, Minegishi Y, Yoshizawa H, Maemondo M, Inoue A, Sugawara S, Isobe H, Harada M, Ishii Y, Gemma A, Hagiwara K, Kobayashi K.	Effectiveness of Gefitinib against Non-Small-Cell Lung Cancer with the Uncommon EGFR Mutations G719X and L861Q	J Thorac Oncol	9	189-94	2014
Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, Inoue A, Ichinose Y, Kobayashi K, Takeda K, Kiura K, Nishio K, Seki Y, Ebisawa R, Shahidi M, Yamamoto N.	LUX-Lung 4: A Phase II Trial of Afatinib in Patients with Advanced, Non-Small Cell Lung Cancer who Progressed on Prior Treatment with Erlotinib, Gefitinib, or Both.	J Clin Oncol	31	3335-41	2013

Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioka H, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Takeuchi K, Shimada T, Tanaka T, Tamura T.	Efficacy and safety of the selective ALK inhibitor CH5424802/RO5424802 in patients with ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer: a phase I/II study (AF-001JP study).	Lancet Oncol	14	590-8	2013
Sugawara S, Maemondo M, Tachihara M, Inoue A, Ishimoto O, akibara T, Usui K, Watanabe H, Matsubara N, Watanabe K, Kanazawa K, Ishida T, Saijo Y, Nukiwa T	Randomized Phase II Trial of Uracil/tegafur and Cisplatin Versus Vinorelbine and Cisplatin with Concurrent Thoracic Radiotherapy for Locally Advanced Unresectable Stage III Non-small-cell Lung Cancer : NJLCG 0601.	Lung Cancer	81	91-6	2013
Lee CK, Brown C, Gralla RJ, Hirsh V, Thongprasert S, Tsai CM, Tan EH, Ho JC, Chu da T, Zaatar A, Osorio Sanchez JA, Vu VV, Au JS, Inoue A, Lee SM, Gebbski V, Yang JC.	Impact of epidermal growth factor receptor inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis.	J Natl Cancer I	105	595-605	2013
Akamatsu H, Inoue A, Mitsudomi T, Kobayashi K, Nakagawa K, Mori K, Nukiwa T, Nakanishi Y, Yamamoto N.	Interstitial Lung Disease associated with Gefitinib in Japanese Patients with EGFR Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Combined analysis of two phase III trials (NEJ 002 and WJTOG 3405).	Jpn J Clin Oncol	43	664-8	2013
Yanagisawa S, Inoue A, Koarai A, Koarai A, Ono M, Tamai T, Ichinose M.	Successful crizotinib retreatment after crizotinib-induced interstitial lung disease.	J Thoracic Oncol	8	e73-4	2013

V. 資料

最終報告書

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) 製剤吸入方法の検討

試験期間: 2013年9月18日～2014年3月14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: 2014年 3月 14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

藤原 淳

目次

ページ

1.	要約	3
2.	試験目的	3
3.	試験分担責任者	3
4.	試験期間	3
5.	遵守基準及び参照ガイドライン	4
6.	動物愛護	4
7.	材料及び方法	4
7.1	被験物質	4
7.2	媒体	4
7.3	投与液の調製	4
7.4	試験系	5
7.5	飼育条件	5
7.6	飼育材料と分析	6
7.6.1	飼料	6
7.6.2	飲料水	6
7.7	個体識別	6
7.8	投与量	7
7.9	投与方法	7
7.10	観察及び検査	8
7.10.1	一般状態	8
7.10.2	体重	8
7.10.3	体温	8
7.10.4	血液検査	8
7.10.4.1	採血	8
7.10.5	血液学的検査	8
7.10.6	血液生化学的検査	9
7.10.7	気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取	10
7.10.8	血漿サンプル採取	11
7.10.9	動物の処置	11
7.11	結果の評価	11
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	11
9.	試験関係資料	11
10.	成績及び考察	12
10.1	一般状態	12
10.2	体温	12
10.3	血液学的検査	12
10.4	血液生化学的検査	12
10.5	BALF採取	12
10.6	BALFの一般細菌及び真菌検査	12
11.	結論	12
12.	文献	13

Annexes

Tables 1～5

1. 要約

GM-CSF 製剤吸入方法を検討するため、各用量雌雄各 1 匹のカニクイザルに 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 (エアロネブ 及び TurboBOY[®]N) を用いて単回吸入投与 (0.05, 0.5 及び 5 mg/body) し、経時的に血漿を採取した。また、GM-CSF の作用を確認するため、体温測定、血液検査及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取を実施し、その他、一般状態を観察した。採取した血漿及び BALF は試験委託者に送付した。また、採取した BALF の一部で一般細菌及び真菌検査を実施した。

気管内及び吸入投与のいずれにおいても、GM-CSF の作用である、白血球数の増加、特に好中球及び好酸球数の増加、それに伴うリンパ球数及び比の減少が認められ、さらに C 反応性蛋白の高値が認められた。投与方法及びネブライザの違いに伴う明らかな差は認められなかった。

また、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。

以上のとおり、GM-CSF に起因する白血球数、特に好中球及び好酸球数の増加及び C 反応性蛋白の高値が認められたことから、GM-CSF 製剤の投与方法としては気管内及び吸入の両方法が可能であると考えられた。また、ネブライザの違いにおける明らかな差は認められなかった。

2. 試験目的

カニクイザルにおける GM-CSF 製剤吸入方法を検討するため、GM-CSF 製剤 Leukine を単回気管内投与及び単回吸入投与し、血漿及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取して試験委託者に送付した。

3. 試験分担責任者

飼育、投薬及び臨床観察: 西村 正吾

被験物質調製: 伯耆原 淳

血液検査、BALF 採取及び送付:
米山 昭宏

血漿サンプル送付: 小池 和恵

4. 試験期間

試験開始日: 2013 年 9 月 18 日

本試験への動物入手日 (移管日):
2013 年 9 月 20 日

実施日程:

項目	気管内投与	吸入投与 1	吸入投与 2
血液学的検査及び血液生化学的検査	2013 年 9 月 24 日	2013 年 10 月 27 日	2014 年 1 月 6 日
投与	2013 年 9 月 25 日	2013 年 10 月 28 日	2014 年 1 月 6 日
血漿サンプル採取	2013 年 9 月 25 日 ～26 日	2013 年 10 月 28 日 ～29 日	2014 年 1 月 6 日 ～7 日
血液学的検査及び血液生化学的検査	2013 年 9 月 26 日	2013 年 10 月 29 日	2014 年 1 月 7 日
BALF 採取及び送付	2013 年 9 月 26 日	2013 年 10 月 29 日	2014 年 1 月 7 日
血漿サンプル送付	2013 年 9 月 26 日	2013 年 10 月 29 日	2014 年 1 月 7 日

試験終了日: 2014年3月14日

5. 遵守基準及び参照ガイドライン

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

名称: Leukine
(Sargramostim, 40 mg/6 mL の液剤を 2 本入手した。)

製造元: Genzyme Corporation

提供元: 試験委託者

ロット番号: B17840AR

保存条件: 冷凍 (許容範囲: -95°C ~ -65°C)

保存場所: 被験物質保管室の超低温フリーザー

特記事項: 投与液調製のための解凍は、調製前日に保冷库 (許容範囲: $1\sim 8^{\circ}\text{C}$) に移して行った。

残余分の処置: 試験委託者に返却した。

7.2 媒体

名称: PBS, 1X (以下, PBS と略)

製造元: Corning Incorporated

提供元: 試験委託者

ロット番号: 21040277R

保存条件: 室温 (許容範囲: $1\sim 30^{\circ}\text{C}$)

保存場所: 被験物質保管室

残余分の処置: 試験委託者に返却した。

7.3 投与液の調製

調製時期: 各投与日

調製方法:

気管内投与用: 40 mg/6 mL の原液を 1.5 mL 計量し, PBS を加えて 10 mL にメスアップして 1 mg/mL 液とした。0.1 mg/mL 液では 1 mg/mL 液を,

0.01 mg/mL 液では 0.1 mg/mL 液をそれぞれ 1 mL 計量し, PBS を加えて, いずれも 10 mL にメスアップした.

吸入投与 1 用: 40 mg/6 mL の原液を 3 mL 計量し, PBS を加えて 16 mL にメスアップして 1.25 mg/mL 液とした. 0.125 mg/mL 液では 1.25 mg/mL 液を, 0.0125 mg/mL 液では 0.125 mg/mL 液をそれぞれ 2 mL 計量し, PBS を加えて, いずれも 20 mL にメスアップした.

吸入投与 2 用: 40 mg/6 mL の原液を 4 mL 計量し, PBS を加えて 8 mL にメスアップして 3.3 mg/mL 液とした. 0.33 mg/mL 液では 3.3 mg/mL 液を, 0.033 mg/mL 液では 0.33 mg/mL 液をそれぞれ 1 mL 計量し, PBS を加えて, いずれも 10 mL にメスアップした.

投与後残液の処置: 焼却専用の産業廃棄物容器に廃棄した.

7.4 試験系

種: カニクイザル
生産所: Hainan Jingang Biotech Co., Ltd. (中国)
供給源: 株式会社 GMJ (輸入検疫場所: ハムリー株式会社)
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: 3 匹 雌: 3 匹

動物番号	識別番号	生年月日 (年/月/日)
XTM01	C1005125	2010/5/20
XTM02	C1006065	2010/6/9
XTM03	C1004015	2010/4/8
XTF01	C1002190	2010/2/27
XTF02	C1005324	2010/5/4
XTF03	C1003146	2010/3/13

動物選抜: 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に選抜した.

投与開始時齢: 3 歳

7.5 飼育条件

飼育室: 201 号飼育室
温度: 許容範囲: 22.0~28.0°C (実測値: 23.5~27.2°C)
湿度: 許容範囲: 40.0~80.0% (実測値: 51.0~87.9%^{a)})

^{a)} 「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」の項参照

換気回数: 許容範囲: 15~17 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:	9:00～13:00 の間 ただし、投与日は投与後 4 時間採血終了後、投与翌日は BALF 採取 2 時間以降に給餌した。
残餌:	翌朝の残餌は認められなかった。 また、血液検査採血の前日は、夕刻（16:00～17:00）に残餌がないことを確認した。
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。
ケージの交換:	ケージ交換は行わず、毎日水洗した。

7.6 飼育材料と分析

7.6.1 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:	130716, 130813, 130903, 131001
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。

7.6.2 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: 一般社団法人 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。

7.7 個体識別

動物:	生産所において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:	動物入手日に試験番号、種、性別、識別番号及び動物番号をケージカードに記載し表示した。

7.8 投与量

試行	投与経路	物質名	投与量 (mg/body)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/body)	動物番号
気管内投与	気管内	Leukine	0.005	0.01	0.5	XTM01, XTF01
			0.05	0.1	0.5	XTM02, XTF02
			0.5	1	0.5	XTM03, XTF03
吸入投与 1	吸入	Leukine	0.05	0.0125	4	XTM01, XTF01
			0.5	0.125	4	XTM02, XTF02
			5	1.25	4	XTM03, XTF03
吸入投与 2	吸入	Leukine	0.05	0.033	1.5	XTM01, XTF01
			0.5	0.33	1.5	XTM02, XTF02
			5	3.3	1.5	XTM03, XTF03

7.9 投与方法

気管内投与: 動物を保定し、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 0.1~0.3 mL を口腔内に散布して喉頭を局所麻酔後、マイクロスプレイヤー (Penn-Century, Inc.) を用いて気管内に被験物質を投与した。

吸入投与: 動物をモンキーチェアに保定し、吸入用マスクを装着した。マスクにネブライザを接続してネブライザ内に投与液を入れ、投与液がなくなるまで吸入させた。

ネブライザは、吸入投与 1 ではエアロネブ (コヴィディエン ジャパン株式会社), 吸入投与 2 では TurboBOY[®]N (PARI GmbH) を用いた。

体重, 投与時刻:

試行	物質名	投与量 (mg/body)	動物番号	体重 (kg)	投与時刻
気管内	Leukine	0.005	XTM01	3.10	9:00
			XTF01	2.60	9:05
		0.05	XTM02	2.65	9:10
			XTF02	2.60	9:15
		0.5	XTM03	2.75	9:20
			XTF03	2.40	9:25
吸入投与 1	Leukine	0.05	XTM01	3.25	8:59~9:06
			XTF01	2.90	9:03~9:09
		0.5	XTM02	2.80	9:08~9:15
			XTF02	2.80	9:12~9:18
		5	XTM03	2.90	9:17~9:25
			XTF03	2.60	9:20~9:26
吸入投与 2	Leukine	0.05	XTM01	3.35	9:24~9:37
			XTF01	3.10	9:29~9:41
		0.5	XTM02	2.80	9:40~9:58
			XTF02	2.80	9:43~10:02
		5	XTM03	3.05	9:59~10:18
			XTF03	2.65	10:04~10:26

7.10 観察及び検査

7.10.1 一般状態

観察対象:	全例
観察時期:	動物入手日から採血終了日まで
観察頻度:	投与日は投与前及び採血時点ごと，その他の日は1日1回観察した。
観察方法:	ケージの外からの個体別観察を行った。

7.10.2 体重

測定対象:	全例
測定時期:	投与日（投与前）
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）

7.10.3 体温

測定時期:	BALF 採取実施日（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。

7.10.4 血液検査

7.10.4.1 採血

検査対象:	全例
検査時期:	気管内投与及び吸入投与 1: 投与前日及び投与翌日 吸入投与 2: 投与日（投与前）及び投与翌日
採血部位:	大腿静脈
採血量:	血液学的検査: 凝固の検査に 0.9 mL その他の検査に約 1 mL 血液生化学的検査: 約 1 mL
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，各検査の必要量を分注した。

7.10.5 血液学的検査

使用機器:	<ul style="list-style-type: none">- 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）
-------	--

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	Retic	%	RNA 染色によるレーザーフローサイト	ADVIA120
網赤血球 絶対数		10 ⁹ /L	メトリー法	
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
白血球分類 ^{a)} 百分率	Diff	%	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメト	ADVIA120
白血球分類 ^{a)} 絶対数	WBC	10 ³ /μL	リー法+2 角度レーザーフローサイトメトリー法	
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)

7.10.6 血液生化学的検査

- 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)
- 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: 試料の残余分は予備試料として-65°C 以下で凍結保存し、最終報告書提出後に廃棄する.

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

項目	略語	単位	測定方法
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
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

7.10.7 気管支肺胞洗浄液（BALF）採取

検査対象: 全例

検査時期: 投与翌日

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。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。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。気管内投与及び吸入投与 2 では右肺，吸入投与 1 では左肺の中葉気管支（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，気管内投与における動物番号 XTF03 では，6 回目の BALF 量が多かったため 2 回に分けて吸引した。採取した BALF の量を記録した。

覚醒: 終了後，アチパメゾール 0.3 mL を筋肉内投与して覚醒させた。

BALF の一般細菌及び真菌検査:

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

BALF の送付: 採取した BALF の 2 回目以降の採取分は凍結しないように注意し、採取当日に冷蔵状態で試験委託者に直接譲渡（気管内投与）又は送付（吸入投与 1 及び 2）した。

7.10.8 血漿サンプル採取

採血対象: 全例
採血時間: 投与前, 投与終了直後, 投与終了後 15 及び 30 分, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間 (9 ポイント)
採血部位: 大腿静脈
採血量: 1 ポイントあたり約 1 mL (血漿量として 0.4 mL 以上)
採血方法: 無麻酔で, ヘパリンナトリウムで処理したポリプロピレン製注射筒及び 23 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: 採取した血液はポリプロピレン製チューブに入れ, 直ちに氷水中に保存し, 採血後 30 分以内に遠心分離 (1600 ×g, 10 分, 4°C) を開始して血漿を分取した。分取した血漿はポリプロピレン製チューブに分取し, 速やかに凍結保存した。
血漿の保存条件: 凍結 (許容範囲: -95°C~-65°C, 実測値: -85.9°C~-82.4°C, 保存期間: 2013 年 9 月 25 日~26 日, 10 月 28 日~29 日, 2014 年 1 月 6 日~7 日)
血漿の保存場所: フリーザー室の超低温フリーザー
血漿の送付: ドライアイスと共に梱包し, 試験委託者に送付した。

7.10.9 動物の処置

すべての動物を実験終了後に試験から除外し, 試験施設の管理とした (2014 年 1 月 7 日)。

7.11 結果の評価

8. 試験計画書からの逸脱及び予見することができなかつた事態

以下の事例があったが, 試験評価に影響を及ぼすものではなかつた。

- 1) 試験期間中, 201 号飼育室内の湿度について, 許容範囲の上限 (80.0%) を超えた日が 2 日みられ, 87.9%まで上昇した。水洗作業に起因した一時的な湿度上昇であり, 水洗作業終了後 1 時間以内に回復したことから, 試験に及ぼす影響はないと判断した。
- 2) 吸入投与 2 において, 投与前日に血液検査を実施するよう規定していたが, 実際には, 投与日の投与前に実施した。投与前値を採取することが目的であり, 投与日の実施ではあったが投与前値を採取できたため, 試験の評価に及ぼす影響はないと判断した。

9. 試験関係資料

処置: 最終報告書提出後 1 ヶ月以内に, 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

10. 成績及び考察

10.1 一般状態

(Table 1)

いずれの動物にも、摂餌を含めて異常は認められなかった。

なお、雌の全例において、月経による出血が認められたが、カニクイザルにおいて通常認められる所見であるため、被験物質に起因した所見ではないと判断した。

10.2 体温

(Table 2)

いずれの動物にも、BALF 採取による急性の発熱は認められなかった。

10.3 血液学的検査

(Table 3)

気管内及び吸入投与のいずれにおいても、投与前と比較して投与翌日では、GM-CSF の作用である¹⁾、白血球数の増加、特に好中球数及び比の増加、それに伴うリンパ球数及び比の減少が認められた。また、気管内投与では 0.05 mg/body、吸入投与では 0.5 mg/body 以上で好酸球数及び比の増加が認められた。投与方法及びネブライザの違いにおける明らかな差は認められなかった。

10.4 血液生化学的検査

(Table 4)

気管内及び吸入投与のいずれにおいても、投与前と比較して投与翌日では、サイトカインの一種である GM-CSF の作用と考えられる C 反応性蛋白の高値が認められた。投与方法及びネブライザの違いにおける明らかな差は認められなかった。

なお、吸入投与において、投与時の拘束によると考えられるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、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認められた。

10.5 BALF採取

(Table 5)

BALF 採取量は、気管内投与では 20.1~28.2 mL、エアロネブによる吸入投与では 24.0~28.2 mL、TurboBOY[®]N による吸入投与では 24.4~29.8 mL であった。投与方法及びネブライザの違いにおける明らかな差は認められなかった。

10.6 BALFの一般細菌及び真菌検査

気管内投与時の 1 例（動物番号 XTF03）において、常在口腔内細菌の *α-Streptococcus* が認められた。

11. 結論

GM-CSF に起因する白血球数、特に好中球及び好酸球数の増加及び C 反応性蛋白の高値が認められたことから、GM-CSF 製剤の投与方法としては気管内及び吸入の両方法が可能であると考えられた。また、ネブライザの違いにおける明らかな差は認められなかった。

12. 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 Investigation of Inhalation Method of a Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Clinical observations

From Day of animal assignment to the study to after the end of blood sampling

Dose method Test article	Sex	Animal No.	Dose levels (mg/body)	Findings	2013/9/20 to 9/24	Day of dosing (2013/9/25)								2013/9/26 to 10/27				
						Pre- dosing	After the end of dosing											
							0 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h					
Intratracheal administration Leukine	Males	XTM01	0.005	No abnormalities														
		XTM02	0.05	No abnormalities														
		XTM03	0.5	No abnormalities														
	Females	XTF01	0.005	No abnormalities														
		XTF02	0.05	No abnormalities														
		XTF03	0.5	Menses														2013/10/26, 10/27

Dose method Test article	Sex	Animal No.	Dose levels (mg/body)	Findings	2013/10/28	Day of dosing (2013/10/28)								2013/10/29 to 2014/1/5					
						Pre- dosing	After the end of dosing												
							0 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h						
Inhalation administration ^{a)} Leukine	Males	XTM01	0.05	No abnormalities															
		XTM02	0.5	No abnormalities															
		XTM03	5	No abnormalities															
	Females	XTF01	0.05	Menses															2013/11/5, 11/6, 11/7, 12/5, 12/6, 12/7 and 2014/1/5
		XTF02	0.5	Menses															2013/11/18, 11/19, 11/20
		XTF03	5	Menses		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		2013/11/29, 11/30, 12/1 and 2014/1/3, 1/4, 1/5

Dose method Test article	Sex	Animal No.	Dose levels (mg/body)	Findings	2014/1/6	Day of dosing (2014/1/6)								2014/1/7					
						Pre- dosing	After the end of dosing												
							0 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h						
Inhalation administration 2 ^{b)} Leukine	Males	XTM01	0.05	No abnormalities															
		XTM02	0.5	No abnormalities															
		XTM03	5	No abnormalities															
	Females	XTF01	0.05	Menses		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		2014/1/7
		XTF02	0.5	No abnormalities															
		XTF03	5	No abnormalities															

0 min: Immediately after the end of dosing A: Appearance of signs Blank spaces indicate "no abnormalities".

^{a)} Aeroneb™ (Covidien Japan Inc.) was used.

^{b)} TurboBOY®N, (PARI GmbH) was used.

Table 2 Investigation of Inhalation Method of a Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Body temperature

Unit: °C

Dose method Test article	Sex	Animal No.	Dose levels (mg/body)	Day of BALF collection	
				Prior to anesthesia	After recovery from anesthesia
Intratracheal administration Leukine	Males	XTM01	0.005	39.1	37.8
		XTM02	0.05	38.7	37.1
		XTM03	0.5	39.2	37.2
	Females	XTF01	0.005	38.6	38.3
		XTF02	0.05	39.2	37.7
		XTF03	0.5	38.5	37.0
Inhalation administration ^{a)} Leukine	Males	XTM01	0.05	38.7	37.9
		XTM02	0.5	39.1	38.2
		XTM03	5	39.4	38.5
	Females	XTF01	0.05	38.7	38.4
		XTF02	0.5	38.9	37.9
		XTF03	5	38.8	38.1
Inhalation administration 2 ^{b)} Leukine	Males	XTM01	0.05	38.8	37.4
		XTM02	0.5	38.6	37.7
		XTM03	5	38.8	37.3
	Females	XTF01	0.05	38.6	37.7
		XTF02	0.5	38.8	38.3
		XTF03	5	38.5	37.6

^{a)} Aeroneb™ (Covidien Japan Inc.) was used.

^{b)} TurboBOY®N, (PARI GmbH) was used.