

考えられる。

## E. 結論

指定難病の認定と、GM-CSF 吸入療法の開発の現場を報告した。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

論文発表

- (1) Akasaka K, Tanaka T, Maruyama T, Kitamura N, Hashimoto A, Ito Y, Watanabe H, Wakayama T, Arai T, Hayashi M, Moriyama H, Uchida K, Ohkouchi S, Tazawa R, Takada T, Yamaguchi E, Ichiwata T, Hirose M, Arai T, Inoue Y, Kobayashi H, Nakata K. A mathematical model to predict protein wash out kinetics during whole-lung lavage in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Jan 15;308(2):L105-17.
- (2) Nakatani T, Arai T, Kitaichi M, Akira M, Tachibana K, Sugimoto C, Hirooka A, Tsuji T, Minomo S, Hayashi S, Inoue Y. Pleuroparenchymal fibroelastosis from a consecutive database: a rare disease entity?, *Eur Respir J*. 2015 Feb 19. pii: ERJ-02147-2014. [Epub ahead of print].
- (3) Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, Kim DS, Kolb M, Nicholson AG, Noble PW, Selman M, Taniguchi H, Brun M, Le Maulf F, Girard M, Stowasser S, Schlenker-Herceg R, Disse B, Collard HR; INPULSIS Trial Investigators. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014 May 29;370(22):2071-82.
- (4) Richeldi L, Cottin V, Flaherty KR, Kolb M, Inoue Y, Raghu G, Taniguchi H, Hansell DM, Nicholson AG, Le Maulf F, Stowasser S, Collard HR. Design of the INPULSIS™ trials: two phase 3 trials of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2014 Jul;108(7):1023-30.
- (5) Ogura T, Taniguchi H, Azuma A, Inoue Y, Kondoh Y, Hasegawa Y, Bando M, Abe S, Mochizuki Y, Chida K, Klüglich M, Fujimoto T, Okazaki K, Tadayasu Y, Sakamoto W, Sugiyama Y. Safety and pharmacokinetics of nintedanib and pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis, *Eur Respir J*. 2014 Dec 10. pii: ERJ-01980-2013. [Epub ahead of print]
- (6) Gupta R, Kitaichi M, Inoue Y, Kotloff R, McCormack FX. Lymphatic manifestations of lymphangioliomyomatosis. *Lymphology*. 2014 Sep;47(3):106-17.
- (7) Gemma A, Kudoh S, Ando M, Ohe Y, Nakagawa K, Johkoh T, Yamazaki N, Arakawa H, Inoue Y, Ebina M, Kusumoto M, Kuwano K, Sakai F, Taniguchi H, Fukuda Y, Seki A, Ishii T, Fukuoka M. Final safety and efficacy of erlotinib in the phase 4 POLARSTAR surveillance study of 10 708 Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2014 Dec;105(12):1584-90. doi: 10.1111/cas.12550. PMID: 25287435 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- (8) Kanazu M, Arai T, Sugimoto C, Kitaichi M, Akira M, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Inoue Y. An intractable case of hermansky-pudlak syndrome, *Intern Med* 2014 Nov 15;53(22):2629-2634.
- (9) Judson MA, Costabel U, Drent M, Wells A, Maier L, Koth L, Shigemitsu H, Culver DA, Gelfand J, Valeyre D, Sweiss N, Crouser E, Morgenthau AS, Lower EE, Azuma A, Ishihara M, Morimoto S, Yamaguchi T, Shijubo N, Grutters JC, Rosenbach M, Li HP, Rottoli P, Inoue Y, Prasse A, Baughman RP, Organ Assessment Instrument Investigators TW. The WASOG Sarcoidosis Organ Assessment Instrument: An update of a previous clinical tool. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2014 Apr 18;31(1):19-27.
- (10) Arai T, Inoue Y, Sasaki Y, Tachibana K, Nakao K, Sugimoto C, Okuma T, Akira M, Kitaichi M, Hayashi S. Predictors of the clinical effects of pirfenidone on idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Investig*. 2014 Mar;52(2):136-43.
- (11) Kinehara Y, Kida H, Inoue Y, Hirose M, Nakabayashi A, Takeuchi Y, Hayama Y, Fukushima K, Hirata H, Inoue K, Minami T, Nagatomo I, Takeda Y, Funakoshi T, Kijima T, Kumanogoh A. Development of microscopic polyangiitis-related pulmonary fibrosis in a patient with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *BMC Pulm Med*. 2014 Nov 4;14:172. doi: 10.1186/1471-2466-14-172. PMID: 25366193 [PubMed - in process]
- (12) Matsuda Y, Tachibana K, Sasaki Y, Tsuyuguchi K, Kitaichi M, Inoue Y. Tracheobronchial lesions in eosinophilic pneumonia. *Respir Investig*. 2014 Jan;52(1):21-7.
- (13) 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. *J Immunol Methods*. 2014 Jan 15;402(1-2):57-70.
- (14) 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 Pulm Med. 2014 Mar 5;14:37.

2. 学会発表  
省略

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

特記事項なし。

2. 実用新案登録

特記事項なし。

3. その他

特記事項なし。

## 生体におけるGM-CSF生物活性測定に関する研究

研究分担者 内田 寛治 東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンター

研究要旨：本研究で目指す GM-CSF 製剤の治療的臨床適用では、GM-CSF の生物活性をモニタリングすることが必須である。本分担研究では、GM-CSF の生物活性を測定する簡便で再現性の良い方法として、全血中の好中球表面に発現する接着因子 CD11b を定量して、GM-CSF 刺激を加えることでそれが上昇する現象を測定する、CD11b stimulation index を開発し、その方法の最適化を研究してきた。CD11b は接着因子として炎症反応の第一段階として鋭敏な指標であるが、複数のサイトカインでも活性化した好中球では細胞表面の発現量が増加しうる。このため、GM-CSF の特異性がどの程度であるかを検討したところ、一般的な炎症性、抗炎症性サイトカインの中では、GM-CSF による刺激がもっとも強い反応を示す事があきらかとなった。また昨年度開発した方法で、健常者血液を用いて CD11b stimulation index を測定したところ、同じサンプルの複数回測定によるばらつき (Intra-individual variation) と異なるサンプルのばらつき (Inter-individual variation) で、Intra-individual variation が有意に小さく、異なるサンプル同士の違いを比較検討しうる事が証明された。さらに、血清中 GM-CSF 活性を測定するうえで、特に肺胞蛋白症患者では、抗 GM-CSF 自己抗体と結合している GM-CSF を測定する方法を開発すべく、過去の研究成果から計画を立てた。

### A. 研究目的

自己免疫性肺胞蛋白症では、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) の中和自己抗体が、その病因に関わっている。本研究班では、リコンビナント GM-CSF を上記疾患の治療薬としての臨床応用を目指しており、その生物活性の測定方法の開発が必要である。

昨年度我々は、GM-CSF 生物活性を測定する方法の一つとして、GM-CSF 刺激を受けた好中球が、細胞表面上の接着因子 CD11b の発現量を上昇させる現象に着目し、フローサイトメトリー法を用いて測定する、CD11b 刺激係数 (CD11b Stimulation Index) を開発した。この方法は、自己免疫性肺胞蛋白症の診断に、および二次性肺胞蛋白症、および GM-CSF 受容体異常に伴う肺胞蛋白症、原因不明の肺胞蛋白症との鑑別に重要であることは以前より報告されており、昨年度本方法の条件の最適化、診断閾値などを検討

した。しかしながら、GM-CSF 以外のサイトカインでも、好中球を活性化した際に細胞表面の CD11b は上昇することが知られており、GM-CSF の特異性を検討する余地があった。さらに、測定の際のばらつきが、サンプル間の差異を検出するだけの感度があるかどうか、臨床検体を実際に使用する際には重要となる。今回これらの追加検討を行った。またこの他に、自己免疫性肺胞蛋白症患者血清中の GM-CSF の活性検討するうえでは、フリーの GM-CSF だけでなく、自己抗体と結合している GM-CSF の量も検討する必要がある。今回は今後検討する課題として、我々のグループが過去に開発した抗体結合型 GM-CSF の測定法についてあらたな方法を検討した。

### B. 研究方法

健常ボランティア 9 名よりヘパリンによって抗凝固された全血を用いた。

昨年度研究で確定した以下のプロトコールに沿って行った。

血液 200  $\mu$ l 中に、GM-CSF および各種サイトカイン、ケモカインを最終濃度 10 ng/mL となるよう投与し、37°C30 分培養し、その後 FITC-CD11b 抗体を混和して、氷上 15 分培養することで得られる、CD11b 値の基礎値からの上昇率を比較した。また GM-CSF 10ng/mL による刺激を行う、CD11b stimulation index (CD11bSI) を 9 名のサンプルでそれぞれ 5 回測定し、各検体の繰り返し測定 の ばらつき (Intra-individual variation) と、それらの平均で得られる各サンプルの代表値の、健常者全体平均値からのばらつき (Inter-individual variation) を、比較した。

次に、抗原抗体複合体に含まれる抗原を測定する方法論を検討した過去の我々の論文を再検討した。

**(倫理面への配慮)**

健常者血液採取は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。被験者の同意を文書で取得したのち採血した。データは連結可能匿名化され、個人情報 は公開されない。

**C. 研究結果**

各種サイトカイン、ケモカインを用いて刺激した結果、炎症性サイトカインは一般的に CD11b 上昇を来しやすい事が分かった。しかしながら、これらの中では GM-CSF が最も CD11b 上昇効果が大きく、最も特異性が高いことが伺えた (図 1)。

また、健常者検体を測定したところ、各サンプル内での繰り返し測定では、CD11b stimulation index が 200 前後のサンプルが多

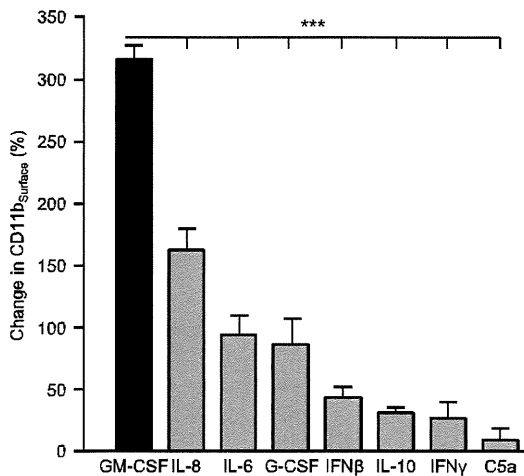


図 1. CD11b 発現量上昇率

かったが、300-400 程度のサンプルよりもばらつきの度合いが大きい傾向があった (図 2 A)。各サンプルの繰り返し測定 の ばらつき (Intra-individual variation) は、5%程度であった一方、異なるサンプルの代表値のばらつき (Inter-individual variation) は 30%程度で、有意差があった (Student' s t test  $p < 0.01$ ) (図 2 B)。

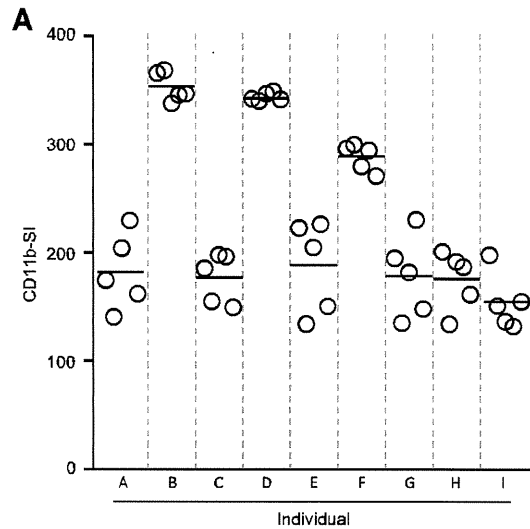


図 2 A. CD11b stimulation index の個々のデータ

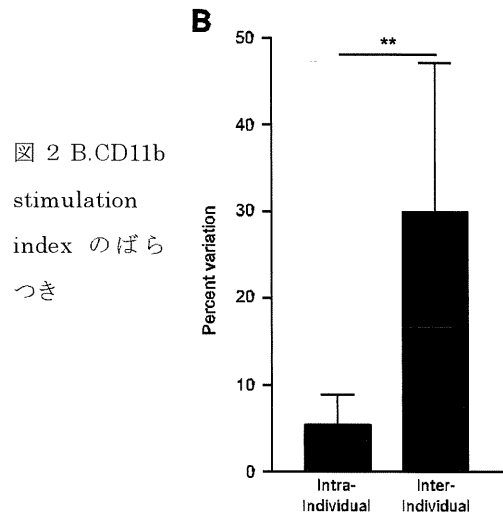


図 2 B. CD11b stimulation index のばらつき

また、過去に我々のグループが開発した、SDS 処理と熱変性による抗原抗体分離後、抗原である GM-CSF を検出する ELISA 法を文献から再検討した。GM-CSF を検出する ELISA に、GM-CSF 抗体を混和すると、複合体となった GM-CSF は検出出来なくなる。そこで、同じサンプルを SDS 0.8-1.0% で処理をすることにより、抗体と結合している抗原をほぼ 100% ELISA 法により回収できることを確認した (図 3) が、この方法に使用した ELISA 用抗体は現在入手出来ないため、

熱変性した GM-CSF をマウスおよびウサギに免疫することで、変性状態の GM-CSF を検出できる ELISA 用抗体のペアの作成準備を開始した。

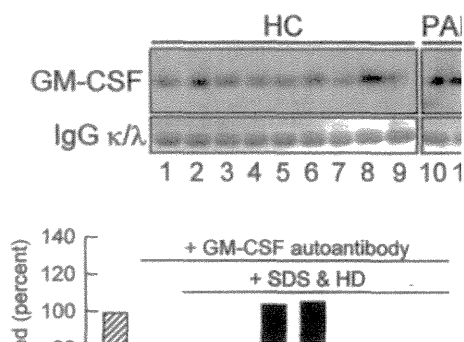


図3.GM-CSF を検出する ELISA.自己抗体と混和すると検出できなくなるが、SDS 処理と熱処理を行うと、SDS 濃度 0.8-1.0%でほぼ 100%GM-CSF が再検出できる。(Uchida et al. Blood. 2009)

#### D. 考察

昨年度 GM-CSF 刺激による CD11b の細胞表面発現量上昇度測定 of 標準化、最適化には一定の成果を得た。本方法が GM-CSF に特異的であるかどうかは、これまで検討されていなかった。今回の結果から、細胞表面の CD11b は、特に GM-CSF による反応性が強く、他の炎症性サイトカインが second mediator となっている可能性が低いことが示唆された。さらに、健常者の検体を用いた validation study で、十分堅牢な低いばらつきが得られた事は、異なる検体間の違いを検討できる感度を持っていることを示唆する。

GM-CSF 生物活性を測定することは、自己免疫性肺胞蛋白症の診断に有効であるだけでなく、自己抗体を定量する ELISA と合わせて検討する事で、GM-CSF シグナル伝達の異常が病因である、家族性肺胞蛋白症との鑑別や、GM-CSF 吸入療法を行う患者の治療効果測定などでも有用であると考えられる。

また、抗原抗体複合体を形成している GM-CSF を測定することができれば、患者の重症度や治療効果を推定する指標を新たに得る事にもつながり、治療適応判断や治療中のモニタリング手段としても有効性が期待される。

#### E. 結論

好中球 CD11b 発現量の上昇率を見る CD11b stimulation index 法は、最適化された方法では、堅牢な方法である。また GM-CSF は CD11b 発

現に際して、他のサイトカインよりも特異的に作用していることが分かった。抗原抗体複合体を形成している GM-CSF の測定法は ELISA 法に用いる抗体の作成計画が進行中である。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表 (4件)

1. Akasaka K, Tanaka T, Maruyama T, Kitamura N, Hashimoto A, Ito Y, Watanabe H, Wakayama T, Arai T, Hayashi M, Moriyama H, Uchida K, Ohkouchi S, Tazawa R, Takada T, Yamaguchi E, Ichihata T, Hirose M, Arai T, Inoue Y, Kobayashi H, Nakata K. A mathematical model to predict protein wash out kinetics during whole-lung lavage in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 308:L105-L117, 2015
2. Kusakabe Y, Uchida K, Hiruma T, Suzuki Y, Totsu T, Suzuki T, Carey BC, Yamada Y, Trapnell BC. A standardized blood test for the routine clinical diagnosis of impaired GM-CSF signaling using flow cytometry. *J Immunol Methods.* 413:1-11, 2014
3. Nakagaki K, Nunomura Y, Uchida K, Nakata K, Tazawa R. Up-regulation of Cluster of Differentiation (CD) 11b Expression on the Surface of Canine Granulocytes with Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). *Journal of Veterinary Medical Science.* 76(8). 1173-6, 2014
4. 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

##### II. 学会発表

- A. 国際学会 (0件)
- B. 国内学会 (0件)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべき事無し

## 種間でのGM-CSF薬理効果の検討に関する研究

研究分担者 中垣 和英 日本獣医生命科学大学 准教授  
布村 由香 日本獣医生命科学大学 実験助手

### 研究要旨

ヒト型 GM-CSF をカニクイザルに長期間吸入させた場合、中和活性を有する抗体産生応答が引き起こされるか、否かを明らかにするために、本研究を行った。molgramostim または CHO 細胞産生ヒト型 GM-CSF (CHO-GM) をカニクイザル 2 頭ずつに、12 週間、週 1 または 2 回間吸入させて、毎週採血し、血漿を保存した。吸入は 12 週間の投与を 1 回として、休薬期間を置いて繰り返し、3 回の吸入投与を行った。それぞれの血漿に GM-CSF の活性を中和する能力があるかを調べるために、段階希釈血漿と 0.5ng/ml の GM-CSF を反応させて、残存する活性を TF-1 細胞の増殖活性として測定した。血漿の混合により増殖が抑制された割合を計算し、プロビット法によって IC<sub>50</sub> を求めた。ELISA 法による抗体量の定量では、一連の吸入投与によって、全頭に抗体産生応答が認められた（新潟大学データ）が、1 回目の投与の中和活性は、molgramostim 投与の 1 頭のみ、2 回目には 2 頭に認められた。しかし、3 回目の投与では、molgramostim 投与のカニクイザルの中和活性が消失した。血漿の中和活性は、ELISA 法による抗 GM-CSF 抗体量（新潟大学データ）と一致しなかった。また、中和抗体の産生は個体差が大きく、中和能を実測することなく予測することはできないと考えられた。

### A. 研究目的

GM-CSF 製剤治療によって、抗 GM-CSF 抗体が産生されることが知られている（Revoltella ら 1997）。外来性に投与されたとは言っても、この抗体は内因性の GM-CSF に結合することができる。ヒト型 GM-CSF の安全性試験や薬理効果試験には、macaque 属のサルが汎用されており、ヒト型 GM-CSF はカニクイザルにとって異種タンパクであることから、長期投与による抗体産生が薬理効果試験や毒性試験への影響が懸念される。はじめに、長期安全性試験のような連続投与の状況で、中和活性を持った抗体が産生されるのかを調べた。

### B. 研究方法

GM-CSF 吸入カニクイザルの血液を経時的に採取した血漿サンプルを新潟大学より入手、測定まで -80℃ に保存した。

カニクイザル 4 頭は、モンキーチェアに拘束し、鼻口マスクを装着、ジェットネブライザーを使って、GM-CSF を吸入投与した。動物には、

CHO 細胞に産生させたヒト型 GM-CSF (CHO-GM) (カニクイザル個体コード ; M01, M02) または molgramostim (カニクイザル個体コード ; M11, M12) 15µg を週 2 回、12 週間投与し (1 回目)、休薬期間を置いて同じプロトコルを繰り返した (2 回目)。さらに、休薬期間を挟んで、同用量を週 1 回、12 週間投与した (3 回目)。吸入投薬の前後を含めた期間、毎週採血を行い、血漿を分離して、凍結保存した (新潟大学)。この凍結血漿を、宅配業者を通して本学へ搬送した。

血漿の GM-CSF 中和活性は、血漿を系列希釈し、molgramostim または CHO-GM と反応を行い、中和されずに残存した GM-CSF 活性を TF-1 の増殖によって測定した。すなわち、ヒト型 GM-CSF 0.1ng/ml と系列希釈した血漿とを等量混合し、37℃ で 1 時間反応させた後、 $2 \times 10^4$  個の TF-1 細胞に加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 日培養した。68 時間目に WST-8 試薬 (同仁化学) を加え、さらに 4 時間培養した後、マイクロプレートリーダーで、450nm の吸光度を測定した。GM-CSF のみの培養を 0%、GM-CSF を加えない培養を 100% 抑

制として、各希釈血漿で得られた吸光度から、減少した吸光度の割合を計算し、プロビット法によって、中和活性力価  $IC_{50}$  を算定した。さらに、新潟大学より提供された各血漿の抗体量のデータから、血漿中の抗体  $1\mu\text{g}$  の力価、すなわち比活性を計算した。

### (倫理面への配慮)

本吸入実験は、新潟大学動物実験倫理委員会および実験実施施設、イナリサーチの動物倫理委員会および新潟大学より動物実験倫理委員会より承認を受けた。吸入や採血は、ストレス軽減のため、薬物沈静下、モンキーチェア上で行った。

### C. 研究結果

GM-CSF 長期吸入投与カニクイザル血漿と  $10\text{ng}$  の GM-CSF の反応後、残存する GM-CSF の活性を、TF-1 の増殖活性を指標として測定すると、1 回目の連日投与 (図 1) では molgramostim を吸入した 1 頭 (M12) のみに中和活性を認めた。

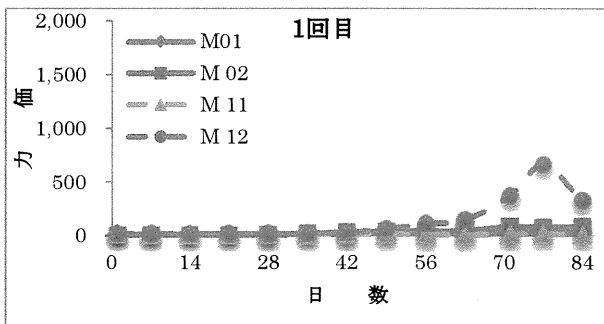


図 1. 1 回目連日 GM 吸入による中和活性の推移

2 回目の吸入 (図 2) では、前出の 1 頭に加え、CHO-GM 投与のもう 1 頭 (M01) にも中和活性を認めた。2 回目の抗体産生は、1 回目より早く認められた。2 回目吸入によって、M12 は迅速に応答し、ピーク時は 1 回目の最高値の 3.5 倍まで上昇した。M01 の中和活性値も吸入開始 2 週間目にはプラトーに達し、この活性が持続した。M02 と M11 は、抗 GM 抗体量が上昇した (新潟大学 田澤グループ参照) が、中和活性を認めなかった。

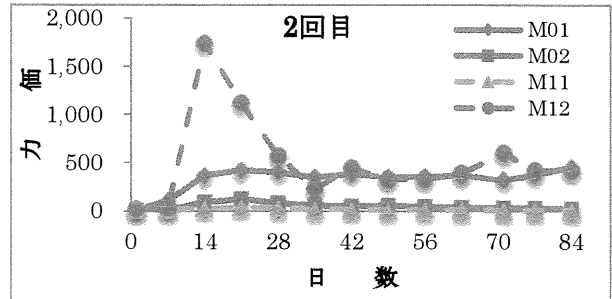


図 2. 2 回目連日 GM 吸入による中和活性の推移

3 回目 (図 3) では、この中和抗体を産生した 2 頭の内、CHO-GM 投与のカニクイザル (M01) の中和活性値は高値維持され、さらに上昇して推移したのに対し、molgramostim 投与のカニクイザル (M12) の血漿中の中和活性が消失した。

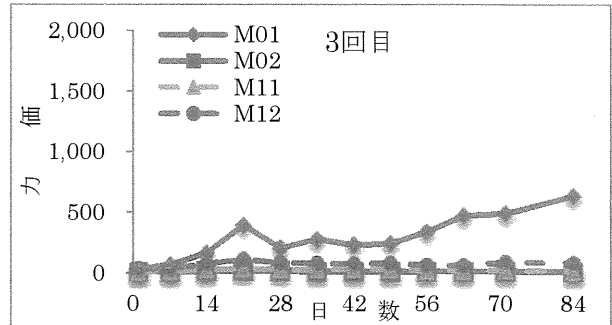


図 3. 3 回目連日 GM 吸入による中和活性の推移

一方、抗 GM 抗体  $1\mu\text{g}$  の力価を計算すると、1 回目の M12 の中和能の力価は極めて低かった (図 4)。

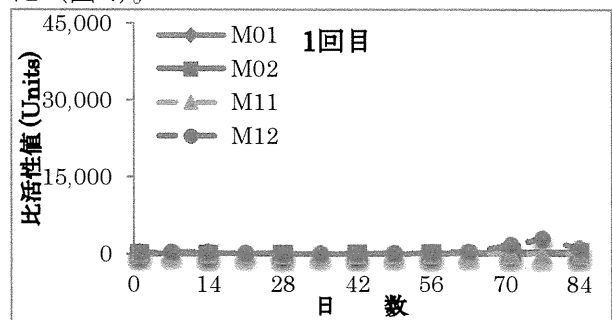


図 4. 1 回目連日 GM 吸入による抗 GM 抗体の比活性の推移

2 回目の投薬では、M12 の血漿は 14 日目に著しく高い中和活性を示した (図 5)。また、M01 の抗 GM-CSF 抗体の比活性は低値で推移したが、わずかに上昇傾向が認められた。



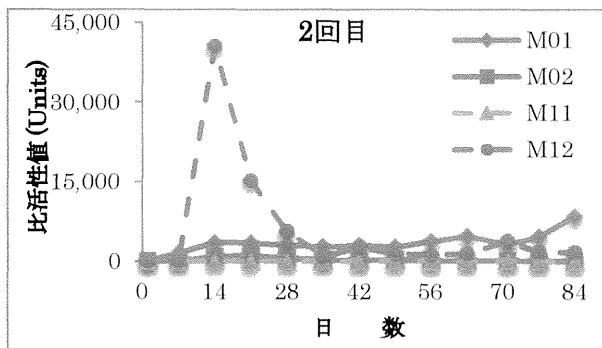


図 5.2 回目連日 GM 吸入による抗 GM 抗体の比活性の推移

3 回目の吸入投与では、M01 の抗 GM-CSF 抗体の比活性が維持され、56 日以降活性値は上昇した。一方、開始時、M12 の抗 GM-CSF 抗体量が高い値にあって、吸入と共に上昇した(新潟大学データ参照)が、中和活性は認められなかった(図 6)。

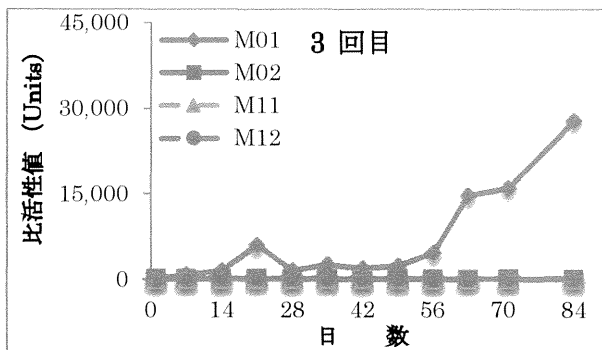


図 6.3 回目連日 GM 吸入による抗 GM 抗体の比活性の推移

#### D. 考察

試験期間中、供試した 4 頭のうち、2 頭に中和抗体産生を認めたが、残り 2 頭は同様の抗体産生をするにも関わらず、中和抗体産生を認めなかった。この違いは、一般的な「個体差」と認識され得るが、その原因は明らかではなかった。また、休薬期間を置いて投与を継続すると比活性は増加する傾向が見られた (M01)。しかし、繰り返しの投与により中和能が消失してしまう個体 (M12) も認められた。中和能が消失するメカニズムは分からないが、抗 GM-CSF 特異抗体産生は維持されており、アナジーが誘導されたとは考えられない。一方、抗イディオタイプ抗体による干渉の可能性を否定できない。

中和抗体を産生できるカニクイザルに限れば、血漿の中和活性と抗体 1 $\mu$ g の比活性値は比較的近似した動態を示しており、血漿の中和活性値が上昇するときは、中和能の強い抗体も増加することが分かった。

本研究が少数のカニクイザルを使った研究

ではあるが、中和抗体を産生するか、否かは個体差が大きいため、中和試験を行わなければ、ELISA 等による抗体量のデータから中和抗体の存在を認知することは不能であると思われた。今回の研究では、この高い中和活性の上昇が長期毒性試験や薬効試験にどのように影響してくるのか明らかにはできてはおらず、今後の研究が必要である。

#### E. 結論

GM-CSF 吸入経過中に、血漿が中和活性を持つことが示され、時間経過、再暴露によって中和活性が上昇することを証明した。このことから、この中和活性は中和抗体によるものであることが強く示唆されたが、ELISA による抗体量と相関しなかった。また、molgramostim 投与と CHO-GM 投与群各 2 頭の内、それぞれ 1 頭ずつの血漿の中和活性を認めたこと、中和活性の推移に傾向が認められないことから、中和活性産生は個体差が大きく、それぞれの個体の経時的採取血漿の中和活性を測定しない限り、抗体価から、予想することは困難であった。血清または血漿の中和活性測定はモニターの一つとして重要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表 (2 件)

1. Nakagaki K, Nunomura Y, Uchida K. et al.. 2014 Up-regulation of cluster of differentiation (CD) 11b expression on the surface of canine granulocytes with human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Journal of Veterinary Medical Science*, 76, 1173-1176.
2. Nunomura Y. and Nakagaki K. 2015 Human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor fails to activate mouse granulocytes. *Journal of Comparative Clinical Medicine*. (in press)

##### II. 学会発表

- A. 国際学会 (0件)
- B. 国内学会 (0件)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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・治験推進研究事業））  
「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）  
分担研究報告書

「肺胞蛋白症の吸入治療のための新規GM-CSF製剤の非臨床試験に関する検討」に関する研究

研究分担者 井上 彰 東北大学病院

## 研究要旨

難治性疾患領域に関する他の医師主導治験その他重要な臨床試験の情報収集を行い、本研究終了後に予定されている承認申請へ向けた臨床試験（医師主導治験など）の実施に向けた検討を行った。

### A. 研究目的

本研究後の臨床試験（医師主導治験など）を順調に遂行するために必要な難治性疾患領域に関する他の医師主導治験その他の重要な臨床試験の情報収集を行う。

### B. 研究方法

肺胞蛋白症について実施されている他試験の情報収集に加え、異なる呼吸器領域の難治性疾患である肺癌を対象として、計画から実施段階にある医師主導治験に参加し、情報を得る。

#### （倫理面への配慮）

実際の患者を対象とした臨床試験を行う際には、すべて「ヘルシンキ宣言」および「臨床試験に関する倫理指針」に従って実施し、IRB審査承認が得られた説明文書による説明と自由意思による文書同意、個人情報保護の厳守を徹底するものとする。

### C. 研究結果

国内未承認ながら有効な薬剤が存在するRET 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌に対する観察研究および当該薬剤を用いた医師主導治験について研究代表者と連絡を取り、同観察研究に参加することで情報を収集した。

### D. 考察

本研究課題である肺胞蛋白症は国内の患者が1000例未満の希少疾病であり、そのための薬剤開発には多くの制約が伴う。先述の「RET 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌」も発症頻度が肺

癌全体の1%と年間数百例で、平均余命が1年前後であることから本研究課題と同様の難治性疾患であるが、海外で承認されている薬剤を用いた医師主導治験が順調に行われている。同試験に関する情報を得ることは本研究課題が非臨床試験から臨床試験へ移行する際に有用であると思われる。

### E. 結論

本研究課題と同じ呼吸器領域の難治性疾患を対象とした医師主導治験から有用な情報を得た。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### I. 論文発表（7件）

1. Watanabe S, Minegishi Y, Yoshizawa H, Maemondo M, **Inoue A**, et al. Effectiveness of Gefitinib against Non-Small-Cell Lung Cancer with the Uncommon EGFR Mutations G719X and L861Q. **J Thorac Oncol** 2014; 9: 189-94.
2. Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, **Inoue A**, et al. 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** 2013; 31: 3335-41.

3. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, **Inoue A**, et al. 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** 2013; 14: 590-8.

4. Sugawara S, Maemondo M, Tachihara M, **Inoue A**, et al. 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 : NJLCCG 0601. **Lung Cancer** 2013; 81: 91-6.

5. 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**, et al. 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** 2013; 105: 595-605.

6. Akamatsu H, **Inoue A**, Mitsudomi T, et al. 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** 2013; 43: 664-8.

7. Yanagisawa S, **Inoue A**, Koarai A, et al. Successful crizotinib retreatment after crizotinib-induced interstitial lung disease. **J Thoracic Oncol** 2013; 8: e73-4.

## II. 学会発表

### A. 国際学会 (3件)

1. **Inoue A**, et al. Individualized dose adjustments facilitate continuous

treatment with afatinib, allowing patients (pts) with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy and erlotinib or gefitinib to maintain clinical benefit. **ESMO** 2013, Amsterdam, abst 3478.

2. **Inoue A**, et al. Phase II study of S-1 plus irinotecan for EGFR-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) resistant to both platinum-based chemotherapy and EGFR-TKI: NJLCCG0804. **WCLC** 2013, Sydney. abst 1373.

3. **Inoue A**, et al. One-year follow-up of a Phase I/II study of a highly selective ALK inhibitor CH5424802/RO5424802 in ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). **WCLC** 2013, Sydney. abst 2591.

### B. 国内学会 (1件)

1. **井上彰**: EGFR-TKI の現状と展望. 第53回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム 11、東京、2013、4月

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし

### Ⅲ. 項目別研究報告

## 生体におけるGM-CSF生物活性測定に関する研究

研究分担者 内田 寛治 東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンター

### はじめに

昨年度我々は、GM-CSF 生物活性を測定する一つの方法として、GM-CSF 刺激を受けた好中球が、細胞表面上の接着因子 CD11b の発現量を上昇させる現象に着目し、フローサイトメトリー法を用いて測定する、CD11b 刺激係数（CD11b Stimulation Index）を開発した。この方法は、自己免疫性肺胞蛋白症の診断に、および二次性肺胞蛋白症、および GM-CSF 受容体異常に伴う肺胞蛋白症、原因不明の肺胞蛋白症との鑑別に重要であることは以前より報告されており、昨年度本方法の条件の最適化、診断閾値などを検討した。しかしながら、GM-CSF 以外のサイトカインでも、好中球を活性化した際に細胞表面の CD11b は上昇することが知られており、GM-CSF の特異性を検討する余地があった。さらに、測定のばらつきが、サンプル間の差異を検出するだけの感度があるかどうか、臨床検体を実際に使用する際には重要となる。今回これらの追加検討を行った。またこの他に、自己免疫性肺胞蛋白症患者血清中の GM-CSF の活性検討するうえでは、フリーの GM-CSF だけでなく、自己抗体と結合している GM-CSF の量も検討する必要がある。今回は今後検討する課題として、我々のグループが過去に開発した抗体結合型 GM-CSF の測定法についてあらたな方法を検討した。

### 対象と方法

東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。健常者ボランティア 9 名の同意を文書で取得したのち採血した。ヘパリン加全血を用いた。

血液 200  $\mu$ l 中に、GM-CSF および各種サイトカイン、ケモカインを最終濃度 10 ng/mL となるよう投与し、37°C 30 分培養し、その後 FITC-CD11b 抗体を混和して、氷上 15 分培養することで得られる、CD11b 値の基礎値からの上昇率を比較した。また GM-CSF 10ng/mL による刺激を行う、CD11b stimulation index (CD11bSI) を 9 名のサンプルでそれぞれ 5 回測定し、各検体の繰り返

し測定のばらつき (Intra-individual variation) と、それらの平均で得られる各サンプルの代表値の、健常者全体平均値からのばらつき (Inter-individual variation) を、比較した。

次に、抗原抗体複合体に含まれる抗原を測定する方法論を検討した過去の我々の論文を再検討した。

### 結果

各種サイトカイン、ケモカインを用いて刺激した結果、炎症性サイトカインは一般的に CD11b 上昇を来しやすい事が分かった。しかしながら、これらの中では GM-CSF が最も CD11b 上昇効果が大きく、最も特異性が高いことが伺えた (図 1)。

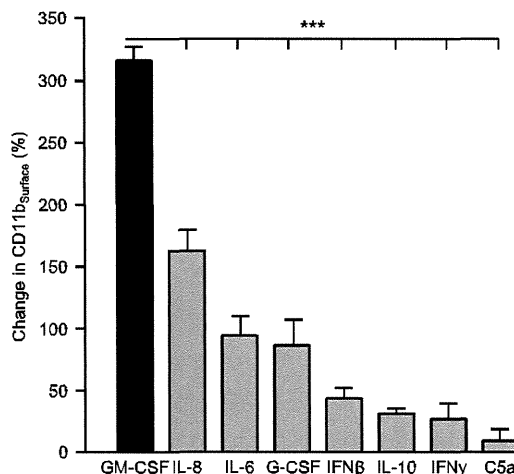


図 1. CD11b 発現量上昇率

また、健常者検体を測定したところ、各サンプル内での繰り返し測定では、CD11b stimulation index が 200 前後のサンプルが多かったが、300-400 程度のサンプルよりもばらつきの度合いが大きい傾向があった (図 2A)。各サンプルの繰り返し測定のばらつき (Intra-individual variation) は、5%程度であった一方、異なるサンプルの代表値のばらつき (Inter-individual variation) は 30%程度で、有意差があった (Student's t test  $p < 0.01$ ) (図

2B)。

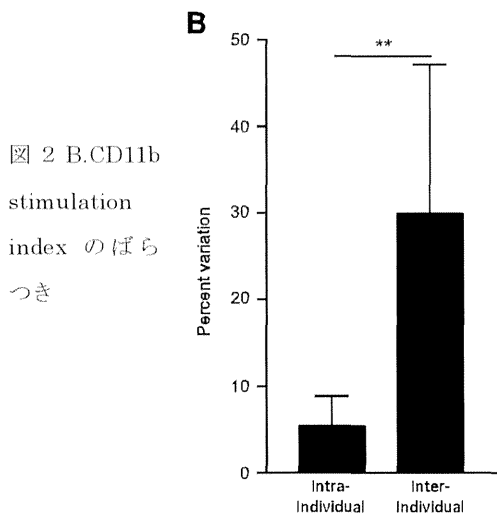


図 2 B. CD11b stimulation index のばらつき

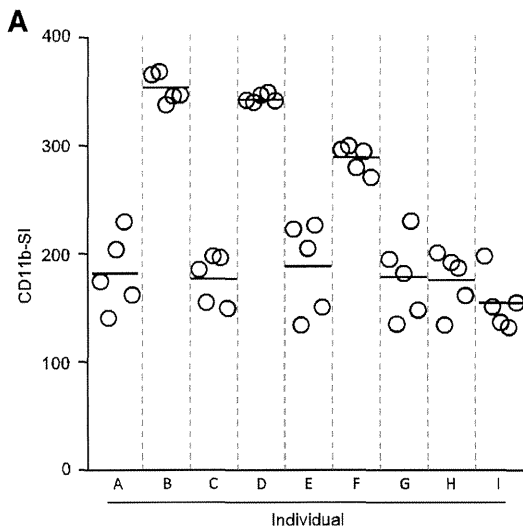


図 2 A. CD11b stimulation index の個々のデータ

また、過去に我々のグループが開発した(1)、SDS 処理と熱変性による抗原抗体分離後、抗原である GM-CSF を検出する ELISA 法を文献から再検討した。GM-CSF を検出する ELISA に、GM-CSF 抗体を混和すると、複合体となった GM-CSF は検出出来なくなる。そこで、同じサンプルを SDS 0.8-1.0% で処理をすることにより、抗体と結合している抗原をほぼ 100% ELISA 法により回収できることを確認した(図 3)が、この方法に使用した ELISA 用抗体は現在入手出来ないため、熱変性した GM-CSF をマウスおよびウサギに免疫することで、変性状態の GM-CSF を検出できる ELISA 用抗体のペアの作成準備を開始した。

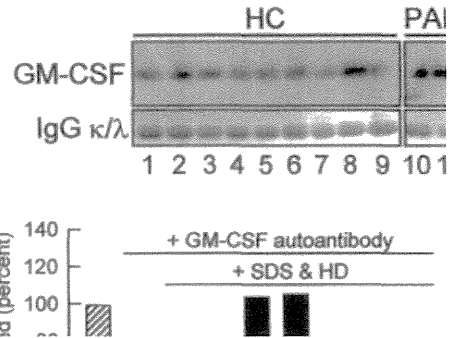


図 3. GM-CSF を検出する ELISA. 自己抗体と混和すると検出できなくなるが、SDS 処理と熱処理を行うと、SDS 濃度 0.8-1.0% でほぼ 100% GM-CSF が再検出できる。(Uchida et al. Blood. 2009)

### 考察

昨年度 GM-CSF 刺激による CD11b の細胞表面発現量上昇度測定の結果、標準化、最適化には一定の成果を得た。本方法が GM-CSF に特異的であるかどうかは、これまで検討されていなかった。今回の結果から、細胞表面の CD11b は、特に GM-CSF による反応性が強く、他の炎症性サイトカインが second mediator となっている可能性が低いことが示唆された。さらに、健常者の検体を用いた validation study で、十分堅牢な低いばらつきが得られた事は、異なる検体間の違いを検討できる感度を持っていることを示唆する。

GM-CSF 生物活性を測定することは、自己免疫性肺胞蛋白症の診断に有効であるだけでなく、自己抗体を定量する ELISA と合わせて検討する事で、GM-CSF シグナル伝達の異常が病因である、家族性肺胞蛋白症との鑑別や、GM-CSF 吸入療法を行う患者の治療効果測定などでも有用であると考えられる。

また、抗原抗体複合体を形成している GM-CSF を測定することができれば、患者の重症度や治療効果を推定する指標を新たに得る事にもつながり、治療適応判断や治療中のモニタリング手段としても有効性が期待される。

### 結論

好中球 CD11b 発現量の上昇率を見る CD11b stimulation index 法は、最適化された方法では、堅牢な方法である。また GM-CSF は CD11b 発現に際して、他のサイトカインよりも特異的に作用していることが分かった。抗原抗体複合体を形成している GM-CSF の測定法は ELISA 法に用いる抗体の作成計画が進行中である。

### 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) Uchida K, Nakata K, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe M, Koch DE, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey BC, Keicho N, Krischer JP, Yamada Y, Trapnell BC.

Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects.

Blood. 2009 Mar 12;113(11):2547-56.

## 種間でのGM-CSF薬理効果の検討に関する研究

研究分担者 中垣 和英 日本獣医生命科学大学 准教授  
布村 由香 日本獣医生命科学大学 実験助手

### はじめに

薬物候補の安全性や薬理効果試験における中和抗体が形成されると、真の作用を修飾して、判断を誤る可能性がある。慢性試験では、生物製剤が長期投与されることで、持続的な抗原刺激を与えることになり、免疫応答の機会が増える。古くから、高分子ほど免疫原性が強いとされているが、必ずしもこの原則に当てはまるものばかりではない。ヒト型 顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)は分子サイズ14,600で、免疫原性を有する。実際、白血病の免疫療法にアジュバントとして投与された GM-CSF に対し、高タイトーの抗体産生が生じ、肺胞蛋白症が発症したことが報告されている<sup>1</sup>。国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部<sup>2</sup>によれば、免疫原性とは「一般的に、抗原が抗体の産生や細胞性免疫を誘導する性質を免疫原性と呼びます。バイオ医薬品は抗原として作用し、治療した患者さんで抗体の産生が誘導される場合があります。FDAの安全性情報に基づいたバイオ医薬品による抗体産生の誘導率に関する Baker の論文<sup>3</sup>では、誘導率は0%から約25%と製品により異なることが報告されています。このように抗体が誘導されることで場合によっては有効性・安全性に悪影響を及ぼす可能性があるため、バイオ医薬品の有効性・安全性を確保するためには、免疫原性について十分に理解し、評価することが重要です。」と記されている。本研究対象である GM-CSF についても、免疫原性を有する分子としての条件は満たされている。また、慢性的な抗原刺激はカニクイザルの自己寛容も破綻仕兼ねない。そこで、長期安全性試験に用いたカニクイザルが、中和活性を持った抗体産生を誘導でき

るかを調べた。

### 対象と方法

実験に供した動物は、3-4歳のカニクイザル4頭で、この中の2頭には molgramostim を、残り2頭には CHO-GM 15 $\mu$ g を一回量として、週に2回、鼻マスクを装着させて、ジェット式ネブライザーで吸入投与した。投与期間は、12週を一つのコースとし、約3ヶ月の休薬期間を置いて、第3コースの吸入投与を行った。ただし、第3コースは、週に1回投与した。

投与開始時と開始後毎週、採血を行い、血漿を凍結保存した。血漿中和活性は、段階希釈した血漿とヒト型 rGM-CSF を反応させた後、残存する GM-CSF の活性を、TF-1 の増殖で測定した。すなわち、molgramostim または CHO-GM 0.5ng/ml と段階希釈したカニクイザル血漿を混合、37C で1時間孵置した後、この混合物を96-well プレーットの TF-1 細胞 2 x 10<sup>4</sup> 個/well に加えて68時間培養し、WST-8(同仁化学; Cell count kit-8)を1/10加え、さらに4時間培養した。計72時間の培養終了後に、マイクロプレート・リーダーで、450nmの吸光度を測定した。GM-CSF のみの培養を0%、何も加えない培養を100%中和として、段階希釈の吸光度データから、

中和率を計算した。この中和活性のデータから、プロビット法によって、希釈倍数をもとに力価活性中央値(IC<sub>50</sub>)を求め、それぞれの経過血清のIC<sub>50</sub>とした。さらに、新潟大学より提供された抗GM-CSF抗体の定量データ(新潟大学田澤班データ参照)から、抗体1 $\mu$ g当たりの力価、すなわち、比活性値を求めた。

### 結果

GM-CSF 長期吸入投与カニクイザル血漿と10ngのGM-CSFの反応後、残存するGM-CSFの活性を、TF-1の増殖活性は、第1コースの連日投与(図1)ではmolgramostimを吸入した1頭(M12)のみに中和活性を認めた。



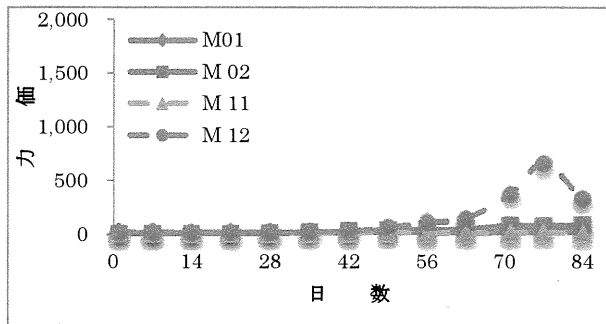


図1. 第1コース連日 GM 吸入による中和活性の推移

第2コースの吸入(図2)では、前出の1頭に加え、CHO-GM投与のもう1頭(M01)にも中和活性を認めた。第2コースの抗体産生は、第1コースより早く認めた。第2コース吸入によって、M12は迅速に応答し、ピーク時は第1コースの最高値の3.5倍まで上昇した。M01の中和活性値も吸入開始2週間目にはプラトーに達し、この活性が持続した。M02とM11は、抗GM抗体量が上昇した(新潟大学 田澤グループ参照)が、中和活性を認めなかった。

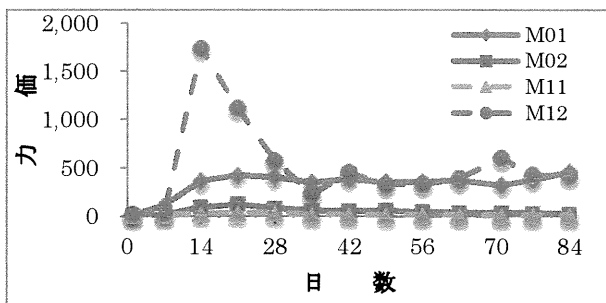


図2. 第2コース連日 GM 吸入による中和活性の推移

第3コース(図3)では、この中和抗体を産生した2頭の内、CHO-GM投与のカニクイザル(M01)の中和活性値は高値維持され、さらに上昇して推移したのに対し、molgramostim投与のカニクイザル(M12)の血漿中の中和活性が消失した。

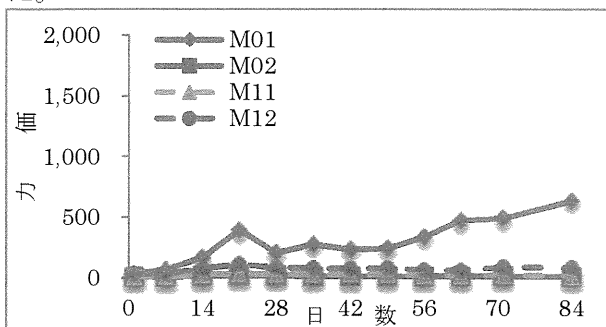


図3. 第3コース連日 GM 吸入による中和活性の推移

さらに、抗GM抗体1 $\mu$ gの力価を計算すると、

第1コースのM12の中和能の力価は極めて低かった(図4)。

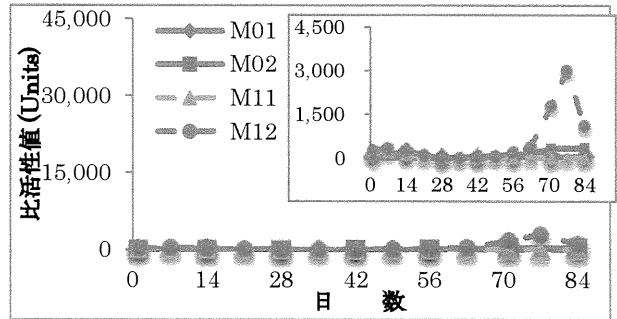


図4. 第1コース連日 GM 吸入による抗GM抗体の比活性の推移

第2コースの投薬では、M12の血漿は14日目に著しく高い中和活性を示した(図5)。また、M01の抗GM-CSF抗体の比活性は低値で推移したが、わずかに上昇傾向が認められた。

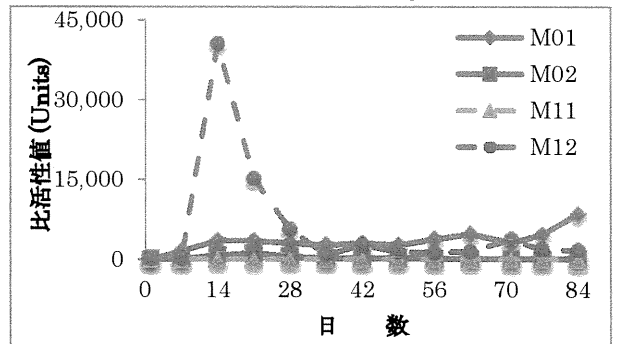


図5. 第2コース連日 GM 吸入による抗GM抗体の比活性の推移

第3コースの吸入投与では、M01の抗GM-CSF抗体の比活性が維持され、56日以降活性値は上昇した。一方、開始時、M12の抗GM-CSF抗体量が高い値にあって、吸入と共に上昇した(新潟大学田澤班データ参照)が、中和活性は認められなかった(図6)。

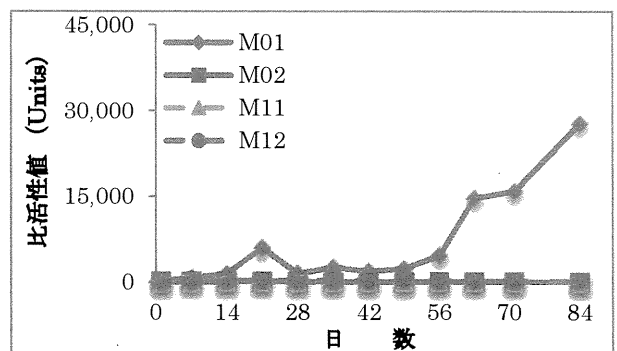


図6. 第3コース連日 GM 吸入による抗GM抗体の比活性の推移

## 考察

今回の長期投与による安全性試験期間中に、中和能を産生する抗体が産生されたことは、GM-CSF の本来の安全性を修飾する可能性が推測される。ヒト型 GM-CSF はカニクイザルにとって、異種タンパクであり、容易に抗原となる可能性が推測できる。事実、本研究でも ELISA 法によって、血漿中の特異抗体が証明されている（新潟大学田澤班データ参照）。しかし、中和抗体は、この第 3 コースの実験期間中に、4 頭中 2 頭にしか認めなかった。中和抗体を産生するか、否かの違いは、一般的な「個体差」と認識され得るが、その背景と成るものは明らかではなかった。また、休薬期間を置いて投与を継続すると比活性は増加する傾向が見られた (M01)。一方、第 1 コースに弱い中和活性が見られた個体 (M12) は、第 2 コースで早期（開始 2 週目）に、強い中和活性を示したが、第 3 コースには中和能が消失した。この中和能消失のメカニズムについて言及できないが、ELISA 法で測定した抗 GM-CSF 特異抗体産生は維持されており、アナジェーが誘導されたとは考えられない。一方で、抗イディオタイプ抗体による干渉の可能性を否定できない。

中和抗体を産生できるカニクイザルに限れば、血漿の中和活性と抗体 1 $\mu$ g の比活性値は比較的近似した動態を示しており、血漿の中和活性値が上昇するときは、中和能の強い抗体も増加することを意味している。

本実験の様なカニクイザルを供した長期安全性試験期間中に産生された中和抗体は、サルやヒト以外の動物に投与して産生される抗体が投与された GM 薬剤に向けられるのとは異なり、ヒト型 GM-CSF ばかりかサル自身の内在性 GM-CSF に対しても生理活性を有している可能性がある。本研究が肺胞タンパク症の治療薬のための安全性試験であるにもかかわらず、皮肉にも、この抗体が肺胞タンパク症の原因となる危険性を秘めているが、ヒトの肺胞タンパク症の患者血清の中和活性は著しく高いものがあり（未発表データ）、カニクイザルの最も高い中和活性でも、患者血清の活性値と比較すると、低い範囲にしか相当しない。

本研究が少数のカニクイザルを使った研究ではあるが、中和抗体を産生するかは個体差が大きいので、中和抗体を実測すること無く、ELISA 等による抗体量のデータから中和抗体の

存在を認知することは不能であると思われた。今回の研究では、この高い中和活性の上昇が長期毒性試験や薬効試験にどのように影響してくるのか明らかにはできてはおらず、今後の研究が必要である。

## 結論

GM-CSF 吸入経過中に、血漿が中和活性を持つことが示され、時間経過、再暴露によって中和活性が上昇することを証明した。このことから、この中和活性は中和抗体によるものであることが強く示唆されたが、ELISA による抗体量と相関しなかった。また、molgramostim 投与と CHO-GM 投与群各 2 頭の内、それぞれ 1 頭ずつの血漿の中和活性を認めたこと、中和活性の推移に傾向が認められないことから、中和活性産生は個体差が大きく、それぞれの個体の経時的採取血漿の中和活性を測定しない限り、抗体価から、予想することは困難であった。血清または血漿の中和活性測定はモニターの一つとして重要であると考えられた。

## 謝辞

本研究の中和抗体測定の出発に当たり、有力な助言を頂いた新潟大学生命科学医療センター長 中田 光教授に感謝の意を表します。

## 参考文献

1. Sergeeva, A. et al. High titer autoantibodies to GM-CSF in patients with AML, CML and MDS are associated with active disease. *Leukemia*, 22:783-790 (2008)
2. 国立医薬品衛生研究所生物薬品部「食品バイオ医薬品と免疫原性に関する情報」 (<http://www.nih.go.jp/dbcb/immunogenicity.html>) より
3. Baker, M. P., et al. Immunogenicity of protein therapeutics. The key causes, consequences and challenges. *Self Notself*, 1: 314-322 (2010)

## カニクイザルでのGM-CSF吸入単回投与による薬物動態解析の検討

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

本研究では、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、単回投与試験による薬物動態濃度の解析を 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の 3 種類の投与方法で検討している。昨年度に施行した雌雄各 1 匹のカニクイザルでの酵母由来 GM-CSF 製剤 Leukine の単回投与試験で用いた 3 用量のうち、中等量、すなわちマイクロスプレーによる単回気管内投与 (0.05 mg/body) 又は 2 種のネブライザー (膜型/ジェット) を用いての単回吸入投与 (0.5 mg/body) を行い、投与前および投与後 24 時間まで経時的に血漿を採取し、昨年度の結果とあわせて、中等量での薬物動態解析を n=4 として行うことを目的とした。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および気管支肺胞洗浄液で GM-CSF が検出可能で、24 時間の血中濃度推移を測定できた。ジェットネブライザーと膜型ネブライザーでの 5mg 投与およびスプレーでの 0.5mg 投与での Cmax および AUC はそれぞれ同レベルの結果を示した。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、平成 24 年度に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 (0.5mg/body/day) 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 GM-CSF の ELISA 法での検出が可能であることが明らかになった。

一方、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、PMDA での薬事戦略相談の事前相談を受けたところ、ヒトでの投与方法であるネブライザーを用いてのカニクイザルでの試験が必要であるとの指摘を受けた。

この指摘を受けて、平成 25 年度は、気道内への投与量の確保が確実な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 濃度測定により比較検討した。ネブライザーでの投与については、サル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した。3 用量で比較検討したところ、マイクロスプレーでの気管内投与 (0.05 mg/body) が、2 種のネブライザー (膜型/ジェット) での単回吸入投与 (0.5 mg/body) と同程度の血中濃度を示すことが明らかになった。そこで本年度は、中等量で各投与方法での雌雄各 1 例の試験を行い、昨年度の結果とあわせて血中薬物濃度推移の解析 (Cmax, AUC の算出) を行った。

### 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 (米国 Penn-Century 社製) 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 (コヴィンディエン 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) 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, 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。