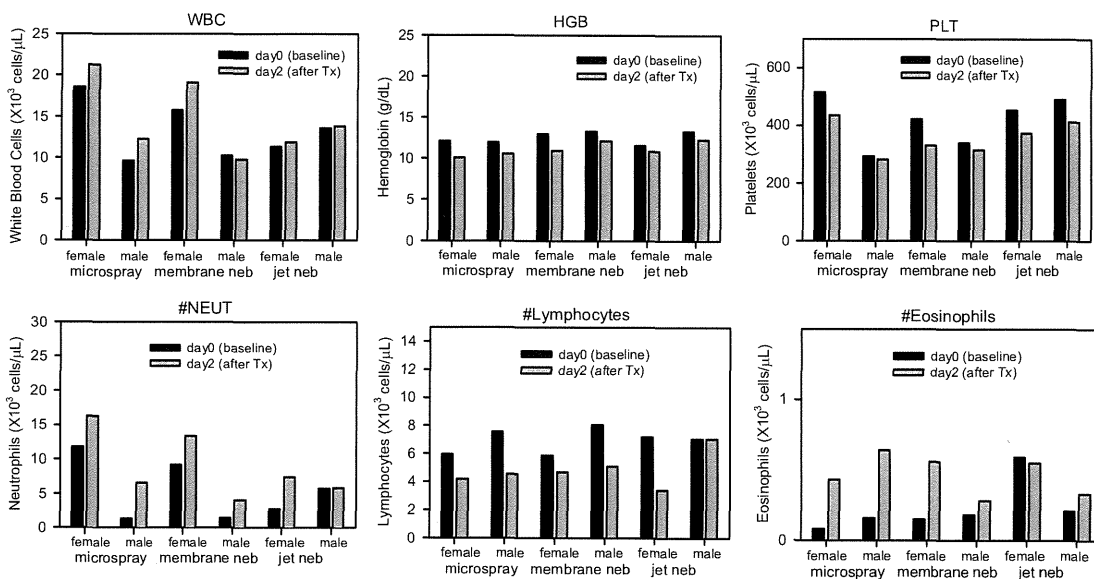
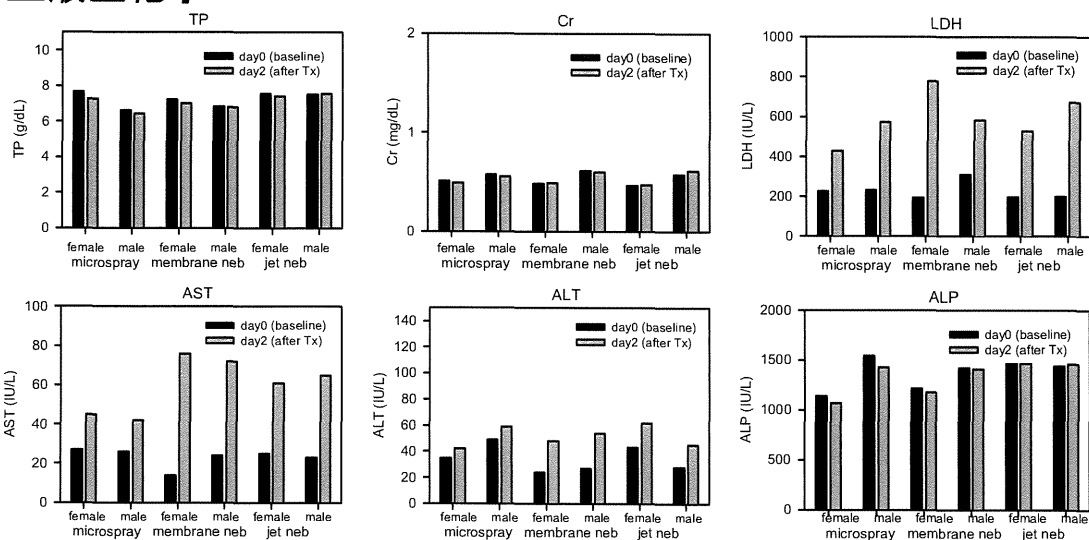


中等量単回投与前後の血液検査結果

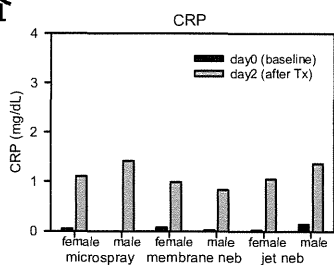
血算



血液生化学



血清検査



(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
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
(#14238 2014年11月14日承認)ならびに新潟
大学動物実験倫理委員会(承認番号26新大研第
240号3,平成26年12月11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

動物の一般状態は、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の方法にお
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。
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、6-15分ほどつづく
吸入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

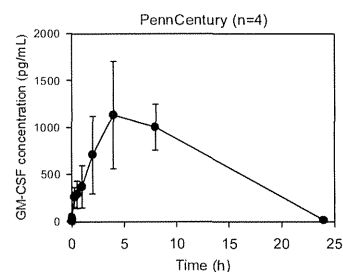
昨年度の結果で同等レベルの血中濃度がみられ
た、0.05mg/bodyのマイクロスプレー投与、
0.5mg/bodyの膜型ネブライザー投与、
0.5mg/body/ジェットネブライザーで同様の血
中濃度の結果が得られた。昨年度の結果とあわ
せて、中等量でのCmax, AUCをn=4として
計算を行いジェットネブライザーと膜型ネブラ
イザーでの5mg投与およびスプレーでの0.5mg
投与でのCmax, AUCはそれぞれ同様レベルの
結果を示した。一般状態、体温は正常範囲内で

一般細菌及び真菌検査に異常は認められなかつ
た。

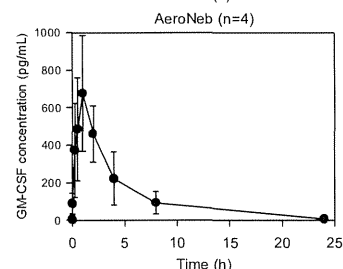
気管支肺胞洗浄液 (BALF) 所見

単回投与後24時間で採取したBALF中の細胞
密度は、マイクロスプレー気管内投与で、オス
0.78X10⁵ cells/mL, メス0.73X10⁵ cells/mL,
膜型ネブライザーで、オス0.75X10⁵ cells/mL,
メス0.94X10⁵ cells/mL, ジェットネブライザ
ー投与ではオス0.72X10⁵ cells/mL, メス
1.1X10⁵ cells/mLで、投与方法間で明らかな相
違はみられなかった。またBALF中のGM-CSF
濃度は、マイクロスプレー気管内投与で、オス
12.9 pg/mL, メス503 pg/mL, 膜型ネブライザ
ーで、オス480pg/mL, メス602pg/mL, ジェ
ットネブライザー投与ではオス170 pg/mL, メ
ス47.1 pg/mLでいずれもELISAで測定可能で
あった。

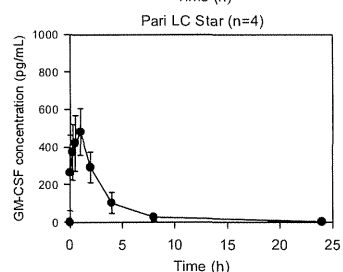
マイクロスプレー
(0.05mg/body)



膜型ネブライザー
(0.5mg/body)



ジェットネブライザー
(0.5mg/body)



中等量単回投与時の血中濃度推移

考察

本研究では、昨年度の検討で、マイクロスプレ
ーでの気管内噴霧投与だけでなく、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。各投与群 2 例と動物例数が少なかったため、今年度は中等用量でさらに 2 例追加して、n=4 として解析した。

通常の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、膜型ネブライザーとジェットネブライザーでの 5mg 投与は、スプレーでの 0.5mg 投与と 0.36-1.03ng/mL の範囲でおおよそ同様の Cmax 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。さらに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、サルでの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。

今年度のネブライザー投与での中等用量は 0.5mg/body でこれはおよそ 170mcg/kg に相当し、ヒトでの常用量 250mcg/body すなわち体重 50kg のヒトで 5 mcg/kg の、33 倍に相当する。昨年度の膜型/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) では血中 GM-CSF は検出限界レベルであった。この用量はヒトの常用量の 4 倍程度の intensity である。健常成人での薬物動態試験を行う際には、肺胞蛋白症患者と異なり抗 GM-CSF 抗体を持たないため有害事象の出現に厳重な注意をしなければならないため、本邦での常用量 250mcg/day を中心に、米国での常用量 500mcg を参考にして、125mcg/body, 250mcg/body, 500mcg/body の 3 用量での施行を計画している。ヒトで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る。より感度の高い GM-CSF 測定用 ELISA キットの検討も必要と考えられる。

結論

以上の結果より、動物吸入試験での GM-CSF 製剤の単回投与試験方法としては気管内噴霧、ジェットネブライザー、膜型ネブライザーのいずれの吸入方法でも可能であると考えられた。

謝辞

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種々の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に深謝いたします。

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¹，日本獣医生命科学大学²

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

研究要旨

これまで rhGM-CSF 投与により生じる抗体産生については，GM-CSF 皮下注射を間欠的に 4 か月受けた転移性大腸癌患者での報告がある．一方，抗 GM-CSF 抗体を有する自己免疫性肺胞蛋白症（aPAP）患者では，GM-CSF 吸入治療の前後で，抗 GM-CSF 抗体価に有意差はみられなかった．GM-CSF 吸入投与により抗 GM-CSF 抗体が生じる可能性があるが，aPAP 患者の内在性の抗 GM-CSF 抗体と外来性 GM-CSF 投与で生じた抗体を識別することは難しい．そこで本課題では，rhGM-CSF が生理活性を示すカニクイザルでの rhGM-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している．昨年度，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 μ 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，抗体の検出観察を行った動物に，今年度，3 ヶ月の休薬期間を置いて，同じ投与による抗体観察を 12 週行った．休薬期間直後には低値であった抗体価は，投与継続により，前回と同様のレベルの抗体価に達し，気管支肺胞洗浄液では一部に泡沫状マクロファージが見られた．さらに 2 カ月の休薬期間を置いて，週 1 回の GM-CSF 気管内噴を 12 週間行ったところ，治療直前の GM-CSF 抗体価は前回より高く，速やかに抗体価レベルは前回レベルに達した．BALF では，一部に泡沫状マクロファージがみられた．動物の一般状態観察，血算，血液生化学検査については，著しい変化はみられず推移した．

はじめに

ヒトリコンビナント（rh）GM-CSF 製剤の皮下投与での抗体出現については，間欠的に 4 か月投与を受けた転移性大腸癌患者で，抗体産生がみられたことが報告されている（1）．一方，吸入投与については，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，治療関し 35 例の抗 GM-CSF 抗体価は，治療前と比べて GM-CSF 吸入治療後も，有意の変化はみられなかった．GM-CSF 吸入投与により抗 GM-CSF 抗体が生じた可能性があるが，aPAP 患者の内在性の抗 GM-CSF 抗体と外来性 GM-CSF 投与で生じた抗体を rhGM-CSF を用いた ELISA で識別することは難しい．

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，本課題では，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，rhGM-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している．

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ている．ヒトでの皮下注射の常用量に相当する 15 μ g/body/回を週 2 回，12 週吸入投与を 1 コースとして，昨年度 1 コース施行した動物 4 例について，3 ヶ月の休薬期間のうち 2 コース目を行い，さらに 2 カ月の休薬期間のうち，週 1 回，12 週吸入投与を 3 コース目の投与として行った．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 種類を用いた．血中抗体濃度については週 1

回の測定とし、定期的に、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, CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤 (JCR 社, ロット番号 GJM121012), 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 μ 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, オリンプス) 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。

剖検

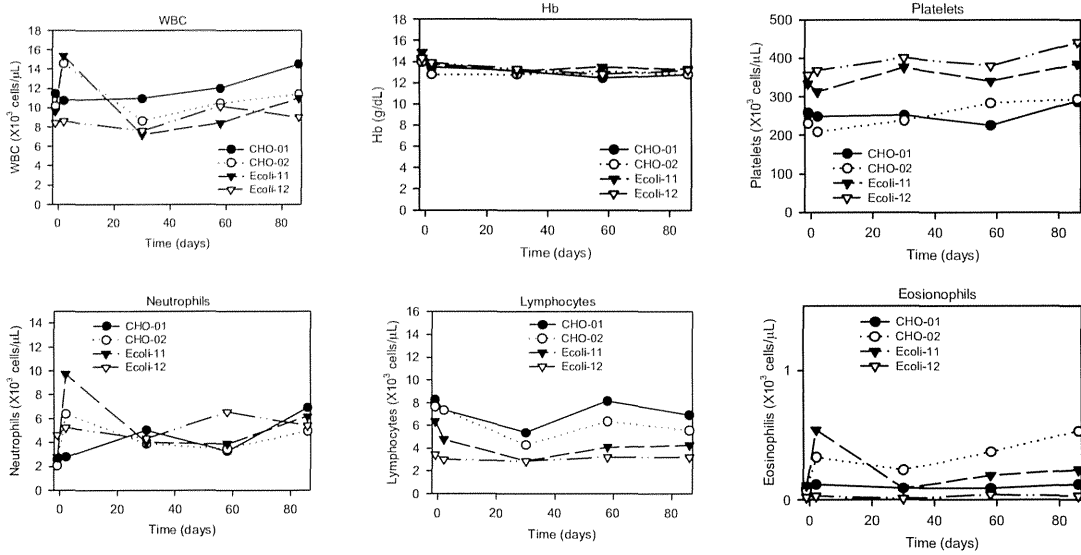
全例を対象に 3 コース目の 3 ヶ月の長期投与を終了後, チオペンタールナトリウム (ラボナール R, 田辺三菱製薬) の静注で麻酔し, 大腿部の動静脈を切断して放血致死させ, 剖検を行った。10 vol%中性緩衝ホルマリン液を使用して, 気管, 気管支, 肺, 肺門リンパ節を固定し, 常法に従ってヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本作製し, 鏡検した。

(倫理面への配慮)

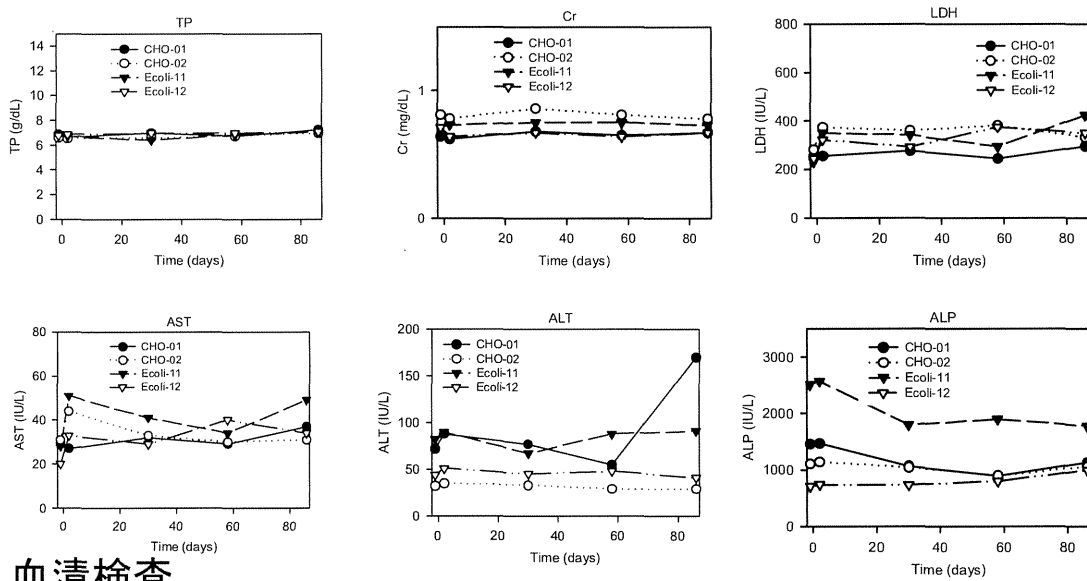
本研究は, 「動物の愛護及び管理に関する法律」, 「新潟大学動物実験指針」, 「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を順守し, 専門飼養施設 (株式会社イナリサーチ) の動物実験審査委員会 (#14099 2014 年 5 月 27 日承認, #14222 2014 年 10 月 16 日承認) ならびに新潟大学動物実験倫理委員会 (承認番号 26 新大研第 80 号 7 平成 26 年 6 月 19 日承認, 承認番号 26 新大研第 204 号 1 平成 26 年 11 月 10 日承認) により審査・承認された試験計画書に沿って実施された。

抗体観察実験(3コース目)の血液検査結果

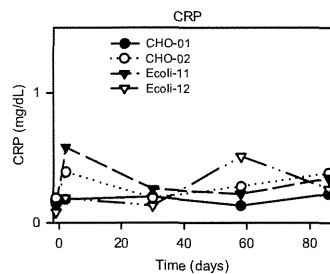
血算



血液生化学



血清検査



結果

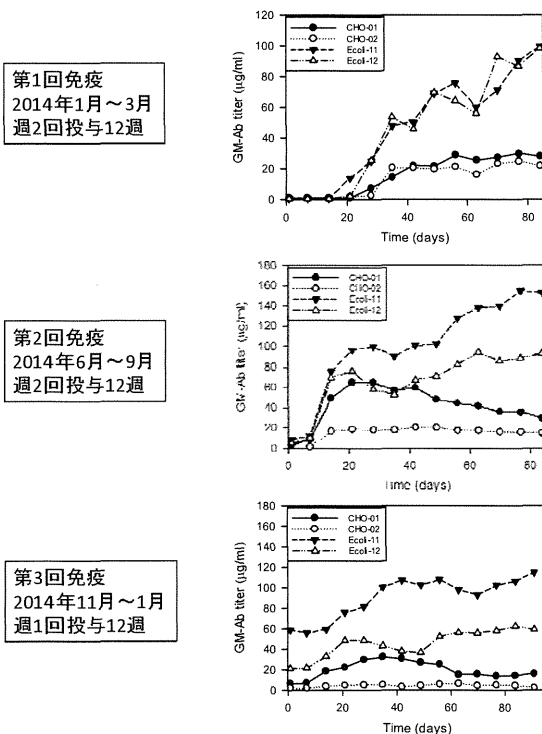
動物の一般状態は、全経過中を通して、CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤投与群、大腸菌由来 GM-CSF 製剤投与群のいずれにおいても、発熱や食欲の低下等みられず、変化はみられなかった。

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 週程度では白血球数、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。最後のコースでは週 1 回、12 週間の投与では、投与翌日の白血球数の上昇を観察したが、day 2 で若干の上昇が見られた後は、大きな変化は見られなくなった。ヘモグロビンは変化ないまま推移した、好酸球数は CHO 細胞由来製剤投与群の 1 例で投与開始後 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。

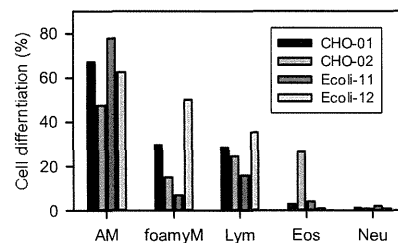
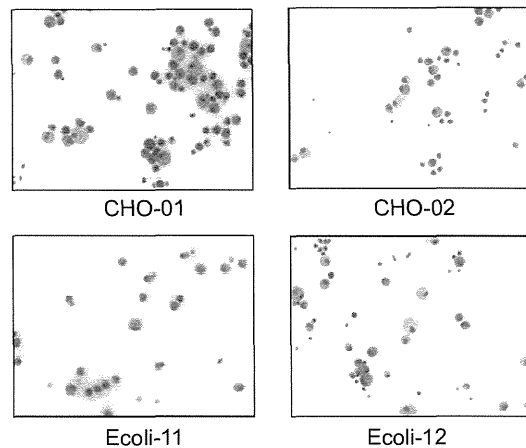


抗体価の推移

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については、ともに、昨年度の第 1 回目の GM-CSF 吸入投与後 3 ヶ月の休薬期間を置いた第 2 回投与の直前の値は、第 1 回投与実験前の値と同様の低値であったが、第 2 回投与開始 2 週間より抗体が検出され、反復投与継続により、第 3 週には第 1 回投与実験のレベルまで抗体価が上昇した。第 6 週以後 E.coli 細胞由来製剤投与では、50pg/mL 以上のレベルで抗体が検出されたが、CHO 細胞由来製剤投与抗体価は投与開始後 12 週まで 20-40 μ g/mL のレベルにとどまって推移した。

2 カ月の休薬期間を置いた置いたのち、第 3 回投与実験の直前での抗体価は、やや低下がみられたが、E.coli 由来製剤投与群では、20-60mcg/mL の抗体価が、CHO 細胞由来製剤投与群では、2-5mcg/mL の抗体価が維持されていた、各例の抗体価は第 5 週まで漸増し、以後は、同じレベルで推移した。



GM-CSF経気道投与（2コース目）

気管支肺胞洗浄液（BALF）所見

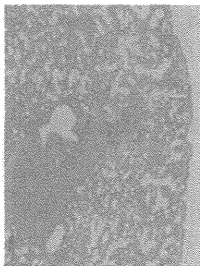
第 2 回投与実験終了時の気管支肺胞洗浄液では外観は無色で、無構造沈殿物もみられなかったが、抗 GM-CSF 抗体が検出され、一部で泡沫状マクロファージ細胞がみられた。

第 3 回投与実験終了時の気管支肺胞洗浄液では

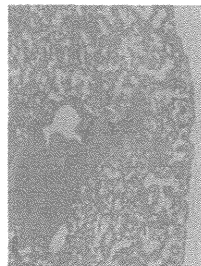
外観は無色で、抗 GM-CSF 抗体が検出され、一部で泡沫マクロファージ様細胞がみられ、各群 1 例で無構造沈殿物が少量みられた。

病理組織所見

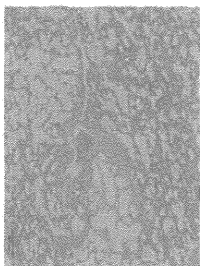
剖検肺については、E.coli 由来 GM-CSF 吸入動物 1 例で胸膜下の一部での細胞浸潤がみられ、CHO 細胞由来 GM-CSF 吸入動物 1 例で軽度の肺泡マクロファージの凝集、CHO 細胞由来 GM-CSF 吸入動物 1 例で吸入した外来異物と肉芽腫および一部肺泡マクロファージの軽度の凝集がみられたほかは病理学的所見はみられなかった。



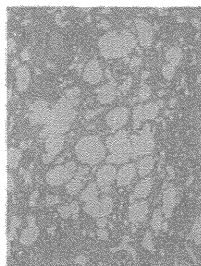
CHO-01 左中葉
肺泡マクロファージの凝集



CHO-02 左中葉
外来異物および肉芽腫



Ecoli-11 右中葉
胸膜下一部細胞浸潤



Ecoli-12 左中葉
病理学的異常なし

剖検肺所見

考察

昨年度に引き続き今年度に、同一の動物で、1 週 2 回 12 週の投与実験を 3 ヶ月の休薬期間において 2 コース、さらに 2 カ月の休薬期間において 1 コース行うことができた。本年度では CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤、大腸菌由来 GM-CSF 製剤のいずれの毎週 2 回の経気道的な 3 ヶ月間の 2 回目の長期反復投与を 3 ヶ月の休薬期間を置いておこなったところ、休薬後に大幅に低下した血中抗 GM-CSF 抗体が投与開始後、1 コース目より早く 2-3 週程度検出できることが明らかとなった。2 コース目の長期反復投与でも、1 コース目と同様、気管支肺泡洗浄液では抗 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。さらに 2 カ月の休薬期間において 3 コース目の毎週 1 回の長期投与試験をおこない、休薬期間が短いと抗体価の低下の程度が弱くなること、毎週 1 回の投与でも、抗体価は維持されることが、明らかとなった。3 コース目の投与終了時の気管支肺泡洗浄液では、1 コース目、2 コース目と同様に抗 GM-CSF 抗体を検出でき、泡沫マクロファージの出現がみられ、E.coli 由来 GM-CSF 吸入動物 1 例、CHO 細胞由来 GM-CSF 吸入動物 1 例で少量の無構造沈着物がみられたが、剖検肺では、肺泡腔内に無構造好酸性物質の蓄積はみられず、肺泡蛋白症の発症を示す病理組織学的所見はみられなかった。

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、肺泡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。米国でのカニクイザル 2 例での皮下投与（フロイントアジュバントを用いて 3 週間の間において 2 回接種）での検討では、投与後 30 日で血液中の抗体の出現をみて、白血球での STAT5 リン酸化評価による GM-CSF 信号伝達は低下し、肺泡マクロファージの遺伝子発現解析では、PU.1 と ABCG1 の発現が減り、CCL1 や CCL7 の発現が増すなど、肺泡蛋白症にみあう変化がみられたと報告されている（2015 年米国胸部疾患学会年次総会発表）いるが、気管支肺泡洗浄所見、胸部 CT 所見、肺組織所見等の解析はみられない。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、肺泡蛋白症の病態の解析にも有用な検討となる。

本研究での長期反復投与で観察された抗体は、ヒトでの抗 GM-CSF 抗体検査と同一の方法で大腸菌由来 GM-CSF を用いた ELISA 法で検出しており、大腸菌由来製剤投与群での抗体価が高値になっている。試みに CHO 細胞由来 GM-CSF を用いた ELISA での測定を行ったところ、大腸菌由来製剤投与群の抗体価は CHO 細胞由来投与群の抗体価と同様のレベルに下がっており抗体の認識部位等の差異によることが示唆され、より詳しい解析が必要と考えられた。

GM-CSF 製剤の刺激が続くことで、この抗体の特性に変化がみられる可能性が考えられる。

①3 コース目の投与では、初回投与翌日にみられた白血球上昇が、最終回投与時にはみられなくなっていること、②3 コース目後の気管支肺胞洗浄液では無構造沈着物が少量みられること、など内在性の GM-CSF の生理活性が一部抑えられていることを示唆する所見も得られており、抗体特性変化のより詳しい解析が必要と考えられた。

気管支肺胞洗浄液の無構造沈着物質は、CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤投与群で 1 例、大腸菌由来 GM-CSF 製剤投与群で 1 例みられており、抗体の活性の違いは、投与した製剤の差より、個体差によるところが大きいと思われた。上記の米国でのカニクイザル 2 例の検討でも皮下投与 3 ヶ月後の検討で 1 例は抗体価が高値を維持し、1 例は低下していたとのことで、抗体価や抗体の特性に関する要因の解析は、GM-CSF 吸入治療の効果の機序解明のみならず、肺胞蛋白症の発症機序の解明の鍵となると考えられた。

結論

カニクイザルに対する本年度での 12 週間の GM-CSF 長期投与の追加で気管支肺胞洗浄液に抗 GM-CSF 抗体が検出され、一部個体で泡沫状マクロファージや無構造沈殿物がみられた。この所見は CHO 細胞由来製剤吸入群でも大腸菌由来製剤吸入群でもみられ、抗体価や抗体活性に関する個体差の関与が考えられた。

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. Wadhwa M, Skog AH, Bird C, Ragnhammar P, Lilljefors M, Gaines-Das R, Mellstedt H, Thorpe R. Immunogenicity of Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) Products in Patients Undergoing Combination Therapy with GM-CSF. Clin Cancer Res. 5:1353-1361, 1999.
2. 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

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
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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(2)	105-117	2014
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).	J Vet Med Sci.	76(8)	1173-1176	2014
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.	68(2)	118-126	2014

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, Taguchi K, Yamaguchi E, Nakata K.	Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy.	Chest.	145(4)	729-737	2014
Ishii H, Seymour JF, Tazawa R, Inoue Y, Uchida N, Nishida A, Kogure Y, Saraya T, Tomi 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.	14	37	2014
Saraya T, Kuraji D, Nakagaki K, Sasaki Y, Niwa S, Tsukagoshi H, Nunokawa H, Ohkuma K, Tsujimoto N, Hirao S, Wada H, Ishii H, Nakata K, Kimura H, Kozawa K, Takizawa H, Goto H.	Novel aspects on the pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia and therapeutic implications.	Front Microbiol.	5	410	2014
Serikawa T, Nishiyama K, Tohyama J, Tazawa R, Goto K, Kuriyama Y, Haino K, Kanemura Y, Yamasaki M, Nakata K, Takakuwa K, Enomoto T.	Prenatal molecular diagnosis of X-linked hydrocephalus via a silent C924T mutation in the L1CAM gene.	Congenit Anom (Kyoto).	54(4)	243-245	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.	Respir Investig.	52(1)	75-79	2014

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.	402(1-2)	57-70	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.	19(2)	246-252	2014
Judson MA, Costabel U, Drent M, Wells A, Mair 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 H, Rotoli P, Inoue Y, Prasse A, Baughman RP, The WASOG Sarcoidosis ORGAN ASSESSMENT INSTRUMENT INVESTIGATORS.	The WASOG Sarcoidosis Organ Assessment Instrument: An update of a previous clinical tool.	Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.	31(1)	19-27	2014
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.	108(7)	136-143	2014

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-Herdeg R, Disse B, Collard HR; INPULSIS Trial Investigators.	Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis.	N Engl J Med.	370(22)	2071-2082	2014
Gupta R, Kitaichi M, Inoue Y, Kotloff R, McCormack FX.	Lymphatic manifestations of lymphangioleiomyomatosis.	Lymphology.	47(3)	106-117	2014
Kanazu M, Arai T, Sugimoto C, Kitaichi M, Akira M, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Inoue Y.	An intractable case of hermannsky-pudlak syndrome.	Intern Med.	53(22)	2629-2634	2014
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.	105(12)	1584-1590	2014

Ogura T, Taniguchi H, Azuma A, Inoue Y, Kondoh Y, Hasegawa Y, Bando M, Abe S, Mochizuki Y, Chida K, Klücklich 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.		ERJ-01980-2013. [Epub ahead of print]	2014
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.		ERJ-02147-2014. [Epub ahead of print]	2014
Matsuda Y, Tachibana K, Sasaki Y, Tsuyuguchi K, Kitaichi M, Inoue Y.	Tracheobronchial lesions in eosinophilic pneumonia.	Respiratory Investigation	52(1)	21-27	2014
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.	52(2)	136-143	2014
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.	14	172	2014

Nunomura, Y Nakagaki, K.	Human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor fails to activate mouse granulocytes.	Journal of Comparative Clinical Medicine.	In press		2015
Kusakabe Y, Uchida K, Hiruma T, Suzuki Y, Totsu T, Suzuki T, Carey BC, Yamada Y, Trappnell 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
Lee CK, Wu YL, Ding PN, Lord SJ, Inoue A, Zhou C, Mitsudomi T, Rosell R, Pavlakis N, Links M, GebSKI V, Gralla RJ, Yang JC.	Impact of Specific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations and Clinical Characteristics on Outcomes After Treatment With EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Versus Chemotherapy in EGFR-Mutant Lung Cancer: A Meta-Analysis.	J Clin Oncol.		[Epub ahead of print]	2015
Fukuhara T, Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T.	Factors associated with a poor response to gefitinib in the NEJ002 study: Smoking and the L858R mutation.	Lung Cancer.	88(2)	181-186	2015

<p>Kawashima Y, Inoue A, Sugawara S, Oizumi S, Maemondo M, Okudera K, Suzuki T, Usui K, Harada M, Morikawa N, Hasegawa Y, Saito R, Ishimoto O, Sakakibara T, Asahina H, Nukiwa T.</p>	<p>Phase II study of amrubicin combined with carboplatin for refractory relapsed small-cell lung cancer: North Japan Lung Cancer Group Trial 0802.</p>	<p>Respir Investig.</p>	<p>52(3)</p>	<p>190-194</p>	<p>2014</p>
<p>Maemondo M, I noue A, Sugaw ara S, Harada T, Minegishi Y, Usui K, Miwa K, Morikawa N, Kambe M, Ube K, Watana be K, Ishimoto O, Sakakibara T, Gemma A, Nukiwa T.</p>	<p>Randomized phase II trial comparing car boplatin plus weekly paclitaxel and docet axel alone in elderly patients with advan ced non-small cell lu ng cancer: north jap an lung cancer grou p trial 0801.</p>	<p>Oncologist.</p>	<p>19(4)</p>	<p>352-353</p>	<p>2014</p>

V. 資料

最終報告書

カニクイザルにおける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) 製剤の PK 試験

試験期間: 2015年1月14日～2015年2月26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: 2015年2月26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. 試験委託者	3
4. 試験施設	3
5. 試験責任者及び試験分担責任者	3
6. 試験期間	4
7. 遵守基準及び参照ガイドライン	4
8. 動物愛護	4
9. 材料及び方法	4
9.1 被験物質	4
9.2 対照物質及び媒体	5
9.3 投与液の調製	5
9.4 試験系	5
9.5 飼育条件	5
9.6 飼育材料と分析	6
9.6.1 飼料	6
9.6.2 飲料水	6
9.7 個体識別	6
9.8 投与量	7
9.9 投与	7
9.10 観察及び検査	7
9.10.1 一般状態	7
9.10.2 体重	7
9.10.3 体温	8
9.10.4 血液検査	8
9.10.4.1 採血	8
9.10.4.2 血液学的検査	8
9.10.5 血液生化学的検査	9
9.10.6 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取	9
9.10.7 血漿サンプル採取	10
10. 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
11. 試験関係資料	11
12. 成績及び考察	11
12.1 一般状態	11
12.2 体温	11
12.3 血液学的検査	11
12.4 血液生化学的検査	11
12.5 BALF 採取	11
12.6 BALF の一般細菌及び真菌検査	12
13. 結論	12
14. 文献	12

Annexes

Tables 1～5