

1. 要約

先に実施した試験「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, 試験番号 UZ13249」において, カニクイザルに GM-CSF 製剤の Leukine を単回気管内投与及び2種のネブライザ (エアロネブ及び TurboBOY[®]N を接続した Pari LC Star nebulizer) を用いて単回吸入投与した結果, いずれの投与経路においても血中 GM-CSF を検出することが可能であった。

本試験では, 前回試験の実験例数を追加するために, 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 (0.05 mg/body) 又は2種のネブライザ (エアロネブ及び TurboBOY[®]N を接続した Pari LC Star nebulizer) を用いて単回吸入投与 (0.5 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, 1又は2匹で 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, さらに全例で C 反応性蛋白の高値が認められた。

なお, 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。

以上の結果, 動物には GM-CSF の投与に起因する白血球数, 特に好中球及び好酸球の増加及び C 反応性蛋白の高値が認められた。

2. 試験目的

前回試験「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, 試験番号 UZ13249」において, カニクイザルに GM-CSF 製剤の Leukine を単回気管内投与及び2種のネブライザ (エアロネブ及び TurboBOY[®]N を接続した Pari LC Star nebulizer, 以下, Pari LC Star nebulizer と略) を用いて単回吸入投与した結果, いずれの投与経路においても血中 GM-CSF を検出することが可能であった。

本試験では, 前回試験の実験例数を追加するために, 前回試験と同様に投与を実施し, 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。また, GM-CSF の作用を確認するため, 血液検査を実施した。

3. 試験委託者

名称: 新潟大学 医歯学総合病院 生命科学医療センター
所在地: 新潟県新潟市中央区旭町通 1-754 (〒951-8520)

4. 試験施設

名称: 株式会社イナリサーチ
所在地: 長野県伊那市西箕輪 2148 番地 188 (〒399-4501)

5. 試験責任者及び試験分担責任者

試験責任者: 藤原 淳

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

6. 試験期間

試験開始日: 2015年1月14日

本試験への動物入手日(移管日):
 2015年1月16日

実施日程:

項目	実施日(年/月/日)
投与	2015年1月19日
血漿サンプル採取	2015年1月19日～1月20日
血液学的検査及び血液生化学的検査	2015年1月18日及び1月20日
BALF採取及び送付	2015年1月20日
血漿サンプル送付	2015年1月21日

試験終了日: 2015年2月26日

7. 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

8. 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)。

9. 材料及び方法

9.1 被験物質

名称: Leukine
 Sargramostim, 40 mg/6 mL の液剤

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: -95.0°C～-65.0°C)
 なお、解凍は保冷库(許容範囲: 1.0～8.0°C)内にて行った。

保存場所: 被験物質保管室の超低温フリーザー

残余分の処置: 被験物質管理責任者に移管した。

9.2 対照物質及び媒体

名称: PBS, 1× (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: 1.0~30.0°C)
 保存場所: 被験物質保管室
 残余分の処置: 廃棄した.

9.3 投与液の調製

調製時期: 投与日
 調製方法: 40 mg/6 mL の原液を 0.75 mL 計量し, PBS を加えて 5 mL にメスアップして 1 mg/mL 液とした.
 1 mg/mL 液を 1.0 mL 計量し, PBS を加えて 10 mL にメスアップして 0.1 mg/mL 液とした.
 1 mg/mL 液を 1.5 mL 計量し, PBS を加えて 12 mL にメスアップして 0.125 mg/mL 液とした.
 1 mg/mL 液を 2.0 mL 計量し, PBS を加えて 6 mL にメスアップして 0.33 mg/mL 液とした.

9.4 試験系

種: カニクイザル
 生産所: Del Mundo Trading (Philippines)
 供給源: Primate Quality Control Center (PQCC), Ina Research Philippines, Inc.
 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)
RUM01	DrpZ5-24A-G	2011/6/3
RUM02	DrpZ10-2B-E	2011/7/29
RUM03	DrpZ7-49B-G	2011/5/18
RUF01	DrpZ1-91A-G	2011/10/2
RUF02	DrpZ3-27C-C	2011/8/14
RUF03	DrpZ13-6C-C	2011/5/3

動物選抜: 一般状態に異常のないプール動物を本試験用とした.
 投与時齢: 3 歳

9.5 飼育条件

飼育室: 521 号飼育室
 温度: 許容範囲: 22.0~28.0°C (実測値: 24.3~24.5°C)
 湿度: 許容範囲: 40.0~80.0% (実測値: 57.9~68.7%)

換気回数:	許容範囲: 12～19 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) また、エンリッチメントとして、毎日バナナを約 1/4 本与えた。
給餌時間:	10:00～12:00 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。
残餌の確認:	翌朝の残餌は認められなかった。 ただし、血液検査採血の前日は、夕刻 (16:00～18:00) 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。
ケージの洗浄及び消毒:	毎日水洗した。

9.6 飼育材料と分析

9.6.1 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:	141119
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。

9.6.2 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。

9.7 個体識別

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

ケージ: 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.

9.8 投与量

投与経路	投与量 (mg/body)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/body)	動物番号
気管内	0.05	0.1	0.5	RUM01, RUF01
吸入 (エアロネブ使用)	0.5	0.125	4	RUM02, RUF02
吸入 (Pari LC Star nebulizer 使用)	0.5	0.33	1.5	RUM03, RUF03

9.9 投与

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 (エアロネブ, コヴィディエン ジャパン株式会社 又は Pari LC Star nebulizer, PARI GmbH) 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 (エアロネブ: 7~8 分間, Pari LC Star nebulizer: 10 分間) 吸入させた.

体重及び投与時刻:

投与方法	物質名	投与量 (mg/body)	動物番号	体重 (kg)	投与時刻
気管内	Leukine	0.05	RUM01	3.35	9:48
			RUF01	2.85	9:51
吸入 (エアロネブ)	Leukine	0.5	RUM02	3.50	9:33~9:41
			RUF02	2.80	9:36~9:43
吸入 (Pari LC Star nebulizer)	Leukine	0.5	RUM03	3.30	9:20~9:30
			RUF03	2.55	9:23~9:33

9.10 観察及び検査

9.10.1 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.

9.10.2 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)

9.10.3 体温

測定対象: 全例
 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。

9.10.4 血液検査

9.10.4.1 採血

検査対象: 全例
 検査時期: 投与前日及び投与翌日
 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。

9.10.4.2 血液学的検査

使用機器:
 - 総合血液学検査装置 ADVIA120（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社、以下 ADVIA120）
 - 全自動血液凝固測定装置 CA-510（シスメックス株式会社、以下 CA-510）

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

項目	略語	単位	測定方法	使用機種	
網赤血球	百分率 絶対数	Retic % 10 ⁹ /L	RNA 染色によるレーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120	
血小板数	PLT	10 ³ /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120	
白血球数	WBC	10 ³ /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120	
白血球分類 ^{a)}	百分率 絶対数	Diff WBC	% 10 ³ /μL	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法+2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
プロトロンビン時間	PT	s	光散乱検出方式	CA-510	
活性化部分トロンボプラスチン時間	APTT	s	光散乱検出方式	CA-510	

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

9.10.5 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 (約 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
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

9.10.6 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: 塩酸メデトミジン 20 μg/kg 及びミダゾラム 0.3 mg/kg を混合して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。
右肺の中葉気管支 (B5) でファイバースコープを楔状挿入して固定した。
ファイバースコープの処理チャンネルを通して温生理食塩液を 1 回につき 5 mL 注入し、BALF を吸引して採取する操作を 6 回繰り返した。
BALF の採取量を記録した。

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を促進した。

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
茨城県つくば市桜 1-16-2 (〒305-0003)

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送付した。

9.10.7 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: -83.6°C~-82.0°C, 保存期間: 2015 年 1 月 19 日~21 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。

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

試験実施期間中に該当する事例はなかった。

11. 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、最終報告書及び生データ

12. 成績及び考察

12.1 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。

12.2 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。

12.3 血液学的検査

(Table 3)

気管内投与では、投与前と比較して投与翌日において、いずれの動物においても、白血球数の増加、特に好中球と好酸球数及び比の増加、それに伴うリンパ球数及び比の減少が認められた。エアロネブによる気管内投与では、いずれの動物においても、好中球と好酸球数及び比の増加、それに伴うリンパ球数及び比の減少が認められた。白血球数の増加は雌でのみ認められた。Pari LC Star nebulizer による気管内投与では、雄において好酸球数及び比の増加、雌において好中球及び比の増加、それに伴うリンパ球数及び比の減少が認められた。いずれの動物においても白血球数の増加は認められなかった。

前回試験(試験番号 UZ13249)では、いずれの投与方法においても、今回の用量以上で GM-CSF の作用である¹⁾、白血球数の増加、特に好中球と好酸球数及び比の増加、それに伴うリンパ球数及び比の減少が、全例で認められている。したがって、本試験のエアロネブ及び Pari LC Star nebulizer による吸入投与による暴露量は前回試験と比較して、少なかった可能性がある。

12.4 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²⁾と考えられる C 反応性蛋白の高値が認められた。

なお、いずれの投与においても、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。

12.5 BALF 採取

(Table 5)

BALF 採取量は、18.7~28.7 mL であり、いずれの投与経路においても問題なく採取できた。

12.6 BALF の一般細菌及び真菌検査

いずれの動物の BALF も陰性であった。

13. 結論

動物には GM-CSF の投与に起因する白血球数，特に好中球及び好酸球の増加及び C 反応性蛋白の高値が認められた。

14. 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.
- 2) Deng Z, Yang C, Deng H, Yang A, Geng T, Chen X, *et al.* Effects of GM-CSF on the stem cells mobilization and plasma C-reactive protein levels in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2006;113(1):92-96.

Table 1 PK Study of Antibody Production by 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	Dose levels (mg/body)	Sex	Animal No.	Days -3 to -1	Day of dosing								
					Pre- dosing	After the end of dosing							
						0 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
Intratracheal administration Leukine	0.05	Male	RUM01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		Female	RUF01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Inhalation administration ^{a)} Leukine	0.5	Male	RUM02	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		Female	RUF02	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Inhalation administration ^{b)} Leukine	0.5	Male	RUM03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		Female	RUF03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

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

^{b)} Pari LC Star nebulizer connected to TurboBOY®N, (PARI GmbH) was used.

0 min: Immediately after the end of dosing

NA: No abnormalities

Table 2 PK Study of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Body temperature

Unit: °C

Dose method Test article	Dose levels (mg/body)	Sex	Animal No.	Day of BALF collection	
				Prior to anesthesia	After recovery from anesthesia
Intratracheal administration	0.05	Male	RUM01	38.6	36.4
Leukine		Female	RUF01	39.2	37.2
Inhalation administration ^{a)}	0.5	Male	RUM02	39.1	38.2
Leukine		Female	RUF02	39.4	36.2
Inhalation administration ^{b)}	0.5	Male	RUM03	38.4	36.1
Leukine		Female	RUF03	37.9	36.5

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

^{b)} Pari LC Star nebulizer connected to TurboBOY[®]N, (PARI GmbH) was used.

Table 3-1 PK Study of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Hematology -List of abbreviations-

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

Table 3-2 PK Study of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Hematology

Dose method Test article	Dose levels (mg/body)	Sex	Animal No.	Observation time	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	Retic		PLT	WBC
					(10 ⁶ /μL)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	(%)	(10 ⁹ /L)	(10 ³ /μL)	(10 ³ /μL)
Intratracheal administration Leukine	0.05	Male	RUM01	One day prior to dosing	6.38	12.0	46.6	73.0	18.7	25.7	0.7	44.6	293	9.62
				One day after dosing	5.61	10.6	39.8	70.9	18.9	26.6	1.0	53.5	281	12.23
		Female	RUF01	One day prior to dosing	6.23	12.1	46.1	74.0	19.4	26.2	0.8	50.0	516	18.51
				One day after dosing	5.11	10.1	37.4	73.3	19.8	27.0	1.1	56.0	435	21.28
Inhalation administration ^{a)} Leukine	0.5	Male	RUM02	One day prior to dosing	6.47	13.3	45.3	70.1	20.6	29.4	1.1	68.3	339	10.21
				One day after dosing	5.76	12.1	40.0	69.4	21.1	30.3	1.2	66.6	314	9.75
		Female	RUF02	One day prior to dosing	7.09	13.0	51.5	72.7	18.3	25.2	0.2	16.2	421	15.75
				One day after dosing	5.83	11.0	41.6	71.4	18.9	26.5	0.4	20.8	331	19.07
Inhalation administration ^{b)} Leukine	0.5	Male	RUM03	One day prior to dosing	7.53	13.3	51.8	68.8	17.7	25.8	0.3	19.9	490	13.59
				One day after dosing	6.87	12.3	47.5	69.1	17.9	25.8	0.4	27.2	412	13.84
		Female	RUF03	One day prior to dosing	6.31	11.6	45.8	72.6	18.4	25.3	0.6	40.7	454	11.32
				One day after dosing	5.67	10.9	40.2	70.9	19.3	27.2	0.5	29.0	373	11.85

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

^{b)} Pari LC Star nebulizer connected to TurboBOY®N₁ (PARI GmbH) was used.

Table 3-2 (Continued) PK Study of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Hematology

Dose method Test article	Dose levels (mg/body)	Sex	Animal No.	Observation time	Diff WBC (%)						Diff WBC (10 ³ /μL)						PT (s)	APTT (s)
					Neut	Lymph	Mono	Eos	Baso	LUC	Neut	Lymph	Mono	Eos	Baso	LUC		
Intratracheal administration Leukine	0.05	Male	RUM01	One day prior to dosing	13.8	78.5	4.0	1.6	0.5	1.6	1.33	7.55	0.38	0.16	0.05	0.15	10.7	23.1
				One day after dosing	53.6	37.2	2.2	5.2	0.2	1.5	6.56	4.55	0.26	0.64	0.02	0.19	11.3	23.1
		Female	RUF01	One day prior to dosing	63.7	32.3	2.8	0.4	0.3	0.5	11.78	5.98	0.53	0.08	0.05	0.09	9.9	23.0
				One day after dosing	76.3	19.7	1.3	2.0	0.2	0.4	16.23	4.19	0.28	0.43	0.05	0.10	9.9	23.8
Inhalation administration ^{a)} Leukine	0.5	Male	RUM02	One day prior to dosing	13.6	78.8	4.2	1.8	0.5	1.2	1.39	8.05	0.42	0.18	0.05	0.12	10.2	24.5
				One day after dosing	40.9	52.1	2.9	2.9	0.5	0.8	3.99	5.08	0.28	0.28	0.05	0.07	10.4	23.3
		Female	RUF02	One day prior to dosing	58.3	37.2	2.5	0.9	0.4	0.7	9.18	5.86	0.40	0.15	0.06	0.11	9.5	22.2
				One day after dosing	70.3	24.6	1.5	2.9	0.2	0.5	13.40	4.69	0.28	0.56	0.04	0.10	9.5	21.8
Inhalation administration ^{b)} Leukine	0.5	Male	RUM03	One day prior to dosing	42.2	52.0	3.0	1.6	0.4	0.8	5.73	7.07	0.41	0.21	0.06	0.11	10.2	24.1
				One day after dosing	41.7	50.8	3.6	2.3	0.3	1.2	5.78	7.04	0.50	0.33	0.04	0.16	10.2	23.9
		Female	RUF03	One day prior to dosing	24.1	63.6	5.1	5.2	0.5	1.4	2.73	7.20	0.58	0.59	0.05	0.16	9.8	22.7
				One day after dosing	62.4	28.5	2.9	4.6	0.2	1.3	7.40	3.38	0.35	0.55	0.02	0.16	9.7	22.1

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

^{b)} Pari LC Star nebulizer connected to TurboBOY®N, (PARI GmbH) was used.

Table 4-1 PK Study of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Clinical chemistry -List of abbreviations-

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

Table 4-2 PK Study of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Clinical chemistry

Dose method	Dose levels	Animal	AST	ALT	ALP	LD	CK	GLU	BIL	UN	CRE	CHO		
Test article	(mg/body)	Sex No.	Observation time	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)		
Intratracheal administration Leukine	0.05	Male	RUM01	One day prior to dosing	26	49	1541	231	168	59	0.14	18.2	0.57	116
				One day after dosing	42	59	1428	574	1495	87	0.20	16.4	0.55	89
		Female	RUF01	One day prior to dosing	27	35	1138	227	153	80	0.07	17.7	0.51	125
				One day after dosing	45	42	1070	428	624	88	0.07	18.5	0.49	98
Inhalation administration ^{a)} Leukine	0.5	Male	RUM02	One day prior to dosing	24	27	1422	309	128	90	0.12	17.5	0.61	135
				One day after dosing	72	54	1412	582	1331	74	0.14	17.3	0.60	109
		Female	RUF02	One day prior to dosing	14	24	1219	193	129	134	0.12	17.2	0.48	158
				One day after dosing	76	48	1178	780	3083	105	0.13	17.8	0.49	126
Inhalation administration ^{b)} Leukine	0.5	Male	RUM03	One day prior to dosing	23	28	1439	201	150	59	0.11	17.5	0.57	120
				One day after dosing	65	45	1460	674	2872	91	0.14	17.1	0.61	102
		Female	RUF03	One day prior to dosing	25	43	1715	198	176	83	0.10	16.7	0.46	134
				One day after dosing	61	62	1465	527	2470	82	0.12	20.0	0.47	110

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

^{b)} Pari LC Star nebulizer connected to TurboBOY®N, (PARI GmbH) was used.

Table 4-2 (Continued) PK Study of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Clinical chemistry

Dose method	Dose levels	Animal		TG	PL	IP	CA	NA	K	CL	TP	ALB	A/G	CRP	
Test article	(mg/body)	Sex	No.	Observation time	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mEq/L)	(mEq/L)	(mEq/L)	(g/dL)	(g/dL)	(mg/dL)	
Intratracheal administration Leukine	0.05	Male	RUM01	One day prior to dosing	17	143	5.99	9.31	152.1	4.46	116.5	6.61	3.83	1.38	0.01
				One day after dosing	17	133	3.18	8.81	153.8	3.88	115.3	6.42	3.57	1.25	1.42
		Female	RUF01	One day prior to dosing	34	182	3.69	9.43	154.1	4.31	117.1	7.67	3.88	1.02	0.05
				One day after dosing	40	167	1.88	9.63	153.2	3.74	111.4	7.26	3.53	0.95	1.11
Inhalation administration ^{a)} Leukine	0.5	Male	RUM02	One day prior to dosing	17	186	6.48	8.99	149.5	3.86	113.4	6.82	4.06	1.47	0.02
				One day after dosing	18	179	4.28	9.16	153.5	3.73	112.7	6.79	3.92	1.37	0.84
		Female	RUF02	One day prior to dosing	45	263	3.86	10.09	153.4	4.90	117.2	7.24	4.10	1.31	0.07
				One day after dosing	80	244	2.18	10.93	154.4	4.72	110.7	7.02	3.83	1.20	0.99
Inhalation administration ^{b)} Leukine	0.5	Male	RUM03	One day prior to dosing	49	152	5.51	10.01	153.4	4.11	114.5	7.52	3.83	1.04	0.14
				One day after dosing	40	155	3.56	10.01	153.4	3.74	108.5	7.55	3.76	0.99	1.37
		Female	RUF03	One day prior to dosing	38	239	5.27	9.92	153.8	4.18	116.8	7.56	3.96	1.10	0.02
				One day after dosing	27	186	3.26	10.29	154.5	4.76	112.1	7.42	3.77	1.03	1.06

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

^{b)} Pari LC Star nebulizer connected to TurboBOY®N, (PARI GmbH) was used.

Table 5 PK Study of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys
Volume of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collected

Unit: mL											
Dose method	Dose levels	Sex	Animal	Observation time	Time of BALF collection						
Test article	(mg/body)	No.			1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	Total
Intratracheal administration	0.05	Male	RUM01	One day after dosing	2.4	1.6	2.6	3.9	4.0	4.2	18.7
Leukine		Female	RUF01	One day after dosing	3.6	4.5	4.7	5.2	5.2	4.7	27.9
Inhalation administration ^{a)}	0.5	Male	RUM02	One day after dosing	3.0	4.5	4.8	4.9	4.8	5.6	27.6
Leukine		Female	RUF02	One day after dosing	3.4	3.3	4.5	4.6	4.6	5.2	25.6
Inhalation administration ^{b)}	0.5	Male	RUM03	One day after dosing	3.3	4.3	5.2	4.8	5.0	5.4	28.0
Leukine		Female	RUF03	One day after dosing	3.0	4.7	5.2	5.0	5.3	5.5	28.7

a) Aeroneb™ (Covidien Japan Inc.) was used.

b) Pari LC Star nebulizer connected to TurboBOY®N, (PARI GmbH) was used.

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) 製剤の抗体産生観察試験 II

試験期間: 2014年6月18日～2015年3月23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3月23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