

目次

	ページ
1. 要約.....	4
2. 試験目的.....	5
3. 試験責任者及び試験分担責任者.....	5
4. 試験期間.....	5
5. 遵守基準及び参照ガイドライン.....	6
6. 動物愛護.....	6
7. 材料及び方法.....	7
7.1 被験物質.....	7
7.2 試験系.....	7
7.3 飼育条件.....	7
7.4 飼育材料と分析.....	8
7.4.1 飼料.....	8
7.4.2 飲料水.....	8
7.5 個体識別.....	8
7.6 投与量.....	9
7.7 投与.....	9
7.8 観察及び検査.....	9
7.8.1 一般状態.....	9
7.8.2 体重.....	9
7.8.3 体温.....	9
7.8.4 血液検査.....	10
7.8.4.1 採血.....	10
7.8.4.2 血液学的検査.....	10
7.8.4.3 血液生化学的検査.....	11
7.8.5 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取.....	12
7.8.6 血清サンプル採取.....	12
7.8.7 剖検.....	13
7.8.8 病理組織学的検査.....	14
7.8.9 骨髄検査.....	14
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.....	15
9. 試験関係資料.....	15
9.1 送付.....	15
9.2 保存.....	15
10. 成績及び考察.....	15
10.1 一般状態.....	15
10.2 体重.....	15
10.3 体温.....	15
10.4 血液学的検査.....	16
10.5 血液生化学的検査.....	16
10.6 BALF 採取.....	16
10.7 BALF の一般細菌及び真菌検査.....	16
10.8 剖検.....	17
10.9 病理組織学的検査.....	17
10.10 骨髄検査.....	17
11. 結論.....	17
12. 文献.....	17

Annexes

Tables 1~9

1. 要約

2匹の雄性カニクイザルに、2種（CHO細胞及び大腸菌由来）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15 µg/body/回を、第1クールとして1週間に2回、3又は4日間隔で12週間、約2カ月の休薬の後、さらに第2クールとして1週間に1回の頻度で12週間、間歇気管内投与した。投与期間中に、抗体測定用の血清採取、体重測定及び体温測定を1週間間隔、血液検査を約4週間間隔で実施し、いずれのクールも最終投与後に気管支肺胞洗浄液（BALF）を採取した。また、第2クール終了後に剖検及び病理組織学的検査を実施した。採取した血清及びBALFは試験委託者に送付した。また、BALFの一部を用いて一般細菌及び真菌検査を実施した。その他、一般状態を毎日観察した。なお、投与に使用したカニクイザルは、以前に同GM-CSF製剤を投与され、抗体産生が確認されている動物であったが、前回試験の最終投与から約3ヵ月経過していたため、投与前の抗体の有無も確認するため、第1クールの投与開始前にも抗体測定用の血清採取を行った。

一般状態、体重及び体温に異常は認められず、両群ともにBALF採取量に差はなかった。

BALFの一般細菌及び真菌検査では、第2クールにおいて、CHO細胞由来GM-CSF製剤群の1匹で常在菌であるコアグラウゼ陰性ブドウ球菌が検出されたが、感染の兆候は認められなかった。

血液学的検査では、第1クールの初回投与翌日に、いずれの群においても2匹ともに白血球数、好中球と好酸球数及び比の一過性の明らかな増加が認められ、以降も好中球と好酸球数及び比は高値のまま維持された。第2クールも同様の変化が2匹中1匹でのみ認められた。

血液生化学的検査では、第1及び第2クールともにC反応性蛋白の一過性の高値がCHO細胞由来GM-CSF製剤群の2匹中1匹及び大腸菌由来GM-CSF製剤群の2匹に認められ、その後、低下する傾向が認められた。

剖検では、CHO細胞由来GM-CSF製剤群の2匹中1匹において、肺の左右前葉に黄褐色巣が認められた。

病理組織学的検査では、CHO細胞由来GM-CSF製剤投与群では、肺マクロファージの集簇が2匹の左右肺に多巣状性に認められた。その他、投与及びBALF操作に起因したGM-CSFに特異的ではない変化として、CHO細胞由来GM-CSF製剤投与群の2匹中1匹では、剖検時にみられた黄褐色巣と一致した左前葉及び後葉、右前葉の細気管支・肺胞上皮に異物性肉芽腫、右前葉に肺胞拡張が、大腸菌由来GM-CSF製剤投与群の2匹中1匹では胸膜下の単核細胞浸潤が右中葉に認められた。

骨髄検査では、いずれのGM-CSF群においても、赤芽球、顆粒球、単球及びリンパ球数の高値が認められた。また、CHO細胞由来GM-CSF製剤群の2匹中1匹では、顆粒球/赤芽球比の高値が認められた。

以上の通り、CHO細胞及び大腸菌由来の2種のGM-CSF製剤の間歇気管内投与により、GM-CSFに起因する白血球数、好中球及び好酸球数の増加並びにC反応性蛋白の高値が認められたが、これらの変化は一過性であり、抗体産生に起因すると考えられる反応の減弱が認められた。また、GM-CSFに起因する骨髄の赤芽球、顆粒球、単球及びリンパ球数の高値が認められた。CHO細胞由来GM-CSFではさらに、GM-CSFに起因する顆粒球/赤芽球比の高値及び肺への肺マクロファージの集簇が認められた。また、GM-CSFに特異的ではない変化として、肺の左右前葉に黄褐色巣、肺胞拡張、肺への異物性肉芽腫及び胸膜下の単核細胞浸潤が認められた。

2. 試験目的

前回試験¹⁾において、カニクイザルに2種（CHO細胞及び大腸菌由来）のGM-CSF製剤を1週間に2回の頻度で間歇気管内投与した結果、いずれのGM-CSF製剤においても抗体産生が認められた。

本試験では、前回試験¹⁾において抗体産生の認められたカニクイザルに、さらに同じGM-CSF製剤を、第1クールとして1週間に2回、3又は4日間隔で12週間、約2カ月の休薬の後、さらに第2クールとして1週間に1回の頻度で12週間、間歇気管内投与して、抗体産生の推移を観察するために血清を採取した。なお、本試験開始時点において、前回試験¹⁾の最終投与から約3カ月経過していたため、投与前の抗体の有無も確認した。

3. 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

被験物質の取扱い: 伯耆原 淳

血液検査, BALF採取及び送付, 骨髄検査:

米山 昭宏

剖検: 武井 由弘

病理組織標本作製: 佐倉 京子

病理組織学的検査: 畠山 洋文

血清サンプル送付: 小池 和恵

4. 試験期間

試験開始日: 2014年6月18日

実施日程: 投与開始日をDay 1とし、その翌日をDay 2, 前日をDay -1とした。

第1クール:

項目	実施日 (Day)	実施日 (年/月/日)
本試験への動物入手日 (移管日)	-2	2014/6/18
投与	1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 47, 50, 54, 57, 61, 64, 68, 71, 75, 78, 82	2014/6/20, 2014/6/24, 2014/6/27, 2014/7/1, 2014/7/4, 2014/7/8, 2014/7/11, 2014/7/15, 2014/7/18, 2014/7/22, 2014/7/25, 2014/7/29, 2014/8/1, 2014/8/5, 2014/8/8, 2014/8/12, 2014/8/15, 2014/8/19, 2014/8/22, 2014/8/26, 2014/8/29, 2014/9/2, 2014/9/5, 2014/9/9
血清送付用採血	-1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84	2014/6/19, 2014/6/26, 2014/7/3, 2014/7/10, 2014/7/17, 2014/7/24, 2014/7/31, 2014/8/7, 2014/8/14, 2014/8/21, 2014/8/28, 2014/9/4, 2014/9/11

項目	実施日 (Day)	実施日 (年/月/日)
血液学的検査及び血液生化学的検査	-1, 2, 28, 30, 56, 58, 83, 84	2014/6/19, 2014/6/21, 2014/7/17, 2014/7/19, 2014/8/14, 2014/8/16, 2014/9/10, 2014/9/11
BALF 採取及び送付	89	2014/9/16
血清サンプル送付	Day -1~28 分	34
	Day 35~56 分	61
	Day 63~84 分	89

第2クール:

項目	実施日 (Day)	実施日 (年/月/日)
投与	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85	2014/11/11, 2014/11/18, 2014/11/25, 2014/12/2, 2014/12/9, 2014/12/16, 2014/12/23, 2014/12/30, 2015/1/6, 2015/1/13, 2015/1/20, 2015/1/27, 2015/2/3
血清送付用採血	-1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91	2014/11/10, 2014/11/17, 2014/11/24, 2014/12/1, 2014/12/8, 2014/12/15, 2014/12/22, 2014/12/29, 2015/1/5 2015/1/12, 2015/1/19, 2015/1/26, 2015/2/2, 2015/2/9
血液学的検査及び血液生化学的検査	-1, 2, 30, 58, 86	2014/11/10, 2014/11/12, 2014/12/10, 2015/1/7, 2015/2/4
BALF 採取及び送付	91	2015/2/9
血清サンプル送付	Day -1~28 分	29
	Day 35~56 分	58
	Day 63~91 分	94
剖検	92	2015/2/10
病理組織学的検査		2015/2/10~3/6

試験終了日: 2015年3月23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	ロット番号	製造元, 製品名など	保存条件	保存場所
CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤	GMJ121012	日本ケミカルリサーチ株式会社, ラボラベル品	冷凍 (許容範囲: -30°C~ -10°C)	被験物質 保管室の メディカル フリーザー
大腸菌由来 GM-CSF 製剤	201105A09	Xiamen Amoytop Biotech Co., Ltd, rHuGM-CSF		

提供元: 試験委託者から調製済みの投与液を入手した。

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。

残余分の処置: 試験委託者に返却した。

7.2 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: 4 匹

動物選抜: 前回試験に供試した動物を本試験用とした。

動物番号	識別番号	生年月日 (年/月/日)	前回試験の動物番号
UJM01	C1004017	2010/4/9	DYM01
UJM02	C1005039	2010/5/6	DYM02
UJM11	C1005047	2010/5/7	DYM11
UJM12	C1003179	2010/3/29	DYM12

投与開始時齢: 4 歳

使用開始時体重: 2.80~3.95 kg

7.3 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: 23.9~26.5°C)

湿度: 許容範囲: 40.0~80.0% (実測値: 54.3~81.5%)

「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」の項参照

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:	9:00～13:00の間 ただし、投与日及び採血日は操作終了後に給餌した。また、BALF採取日は採取後2時間以降に給餌した。
残餌の廃棄:	翌朝、残餌が認められた場合には、記録後に廃棄した。 なお、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。
ケージの交換:	ケージ交換は行わず、毎日水洗した。

7.4 飼育材料と分析

7.4.1 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:	140411, 140513, 140620, 140718, 140830, 140930, 141024, 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。

7.4.2 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。

7.5 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:	ケージカードを用い、動物入手日に試験番号、種、性別、識別番号及び動物番号を表示した。

7.6 投与量

群	物質名	投与量 ($\mu\text{g}/\text{body}$)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	投与容量 (mL/body)	動物番号	前回試験 ¹⁾ の 投与物質
I	CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤	15	30	0.5	UJM01, UJM02	CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤
II	大腸菌由来 GM-CSF 製剤	15	30	0.5	UJM11, UJM12	大腸菌由来 GM-CSF 製剤

7.7 投与

投与時期:

第1クール: Day 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 47, 50, 54, 57, 61, 64, 68, 71, 75, 78, 82 (給餌前)

第2クール: Day 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 (給餌前)

投与方法: 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。

7.8 観察及び検査

7.8.1 一般状態

観察対象: 全例

観察時期:

第1クール: Day -2 (動物入手日) から Day 89 (BALF 採取日) まで

第2クール: Day -1 から Day 92 (剖検日) まで

観察頻度: 投与日: 1日2回 (投与前及び投与後 30分~1時間)
その他の日: 1日1回 (午前中)

観察方法: ケージの外からの個体別観察を実施した。

特記事項: 第1クールの最終日 (Day 89) から第2クールの開始日 (Day -1) 前日までは、観察は行うが、評価に用いなかった。

7.8.2 体重

測定対象: 全例

測定時期:

第1クール: Day -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 (給餌前) 及び 89 (麻酔前)

第2クール: Day -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 (給餌前)

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)

7.8.3 体温

測定対象: 全例

測定時期:

第1クール: Day -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 (体重測定後) に各1回

Day 89 では, 麻酔前及び麻酔からの覚醒後の給餌前に1回

第2クール: Day -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 (体重測定後) に各1回

Day 91 ではさらに BALF 採取実施日の麻酔からの覚醒後の給餌前に1回

測定方法:

電子体温計を用いて直腸内温度を測定した。

7.8.4 血液検査

7.8.4.1 採血

検査対象:

全例

検査時期:

第1クール: Day -1, 2, 28, 30, 56, 58, 83, 84 の午前中 (血清送付用採血前)

第2クール: Day -1, 2, 30, 58, 86 の午前中 (血清送付用採血前)

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 3 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。

7.8.4.2 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)

7.8.4.3 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, 最終報告書提出前に廃棄した。

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

項目	略語	単位	測定方法
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

7.8.5 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取

検査対象: 全例

検査時期:

第 1 クール: Day 89

第 2 クール: Day 91

BALF 採取方法:

麻酔: 塩酸メドトミジン 20 µg/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。ファイバースコープは右肺の中葉気管支 (B5) で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 回目採取分の一部は、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 の譲渡:

採取した BALF は凍結しないように注意し、採取当日に冷蔵下 (保冷剤詰め) で、第 1 クールでは試験委託者に直接譲渡し、第 2 クールでは送付した。

7.8.6 血清サンプル採取

採血対象: 全例

採血時期:

第1クール:	Day -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 (給餌前, 体温測定後)
第2クール:	Day -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 (給餌前, 体温測定後)
採血部位:	大腿静脈
採血量:	約7 mL (血清として2.8 mL以上)
採血方法:	動物を保定し, ポリプロピレン製シリンジ及び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) を用いて採血した。
血液の処理:	採取した血液は, 凝固促進剤入りの採血管に入れ30分から120分間室温に静置後に遠心分離 (1600 ×g, 10分, 4°C) して血清を分取した。分取した血清は速やかに凍結した。
血清の保存場所:	フリーザー室の超低温フリーザー
血清の保存条件:	凍結 (許容範囲: -95°C~-65°C, 実測値: -84.8°C~-68.4°C, 保存期間: 2014年6月19日~2014年7月23日, 2014年7月24日~8月19日, 2014年8月21日~9月16日, 2014年11月10日~12月9日, 2014年12月15日~2015年1月7日, 2015年1月12日~2015年2月12日)
血清の送付:	ドライアイスと共に梱包し, 試験委託者へ送付した。

7.8.7 剖検

剖検対象:	全例
剖検時期:	第2クールのDay 92
剖検方法:	チオペンタールナトリウム (ラボナール [®] , 田辺三菱製薬株式会社) の静注で麻酔し, 後大静脈から約0.1 mLのヘパリンナトリウムで処理した10 mLポリプロピレン製注射筒及び注射針又は留置針 (いずれも滅菌済ディスポーザブル製品) を用いて, 可能な限り採血した。採血後, 腋窩部及び大腿部の動静脈を切断して放血致死させ, 剖検を行い, 病理組織学的検査を行った (毒性評価)。
血液の処理:	採取した血液は15 mLチューブで採取して, 直ちに氷水中に保存し, 採血後2時間以内に遠心分離 (1600 ×g, 10分, 4°C) を開始して血漿, バフィーコート及び赤血球に分離した。血漿を別のチューブに分取し, バフィーコートを試験委託者から提供された細胞培養用培地 (RPMI Medium 1640, L-Glutamine, Life Technologies) 入りの別のチューブに分取した。血漿は, 速やかに凍結保存 (許容範囲: -95°C~-65°C) し, バフィーコートは冷蔵状態 (保冷剤詰め) で試験委託者に直接手渡した。
遺伝子検査用サンプル採取:	肺門リンパ節及び縦隔リンパ節の一部, 膝下リンパ節及び5 mmの生検トレパンを用いて採取した肝臓の10箇所を, mRNA安定化剤 (RNA later) 入りの容器に入れ, 一晚冷蔵で保存し, その後凍結保存 (許容範囲: -95°C~-65°C) した。残りの肝臓は, 約1 cm角に切断し, 10個程度をチューブに入れて, ドライアイスで冷凍後, 凍結保存 (許容範囲: -95°C~-65°C) した。

血漿, パフィーコート及び遺伝子検査用サンプルの送付:

凍結状態 (ドライアイス詰め) で試験委託者に送付した (2015年2月12日)。

脾臓の採取及び送付:

可能な限り無菌的に脾臓の一部を採取してメスで細切後, 試験委託者から提供された細胞培養用培地 (RPMI Medium 1640, L-Glutamine, Life Technologies) に入れ, 冷蔵した。冷蔵状態 (保冷剤詰め) で試験委託者に直接手渡した (2015年2月10日)。

7.8.8 病理組織学的検査

検査対象:

全例

固定:

剖検時に下表に示すすべての器官・組織を個体識別部位とともに固定した。固定液は 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液を使用した。

標本作製及び鏡検:

下表に示す器官・組織について, 常法に従ってヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本作製した。また, 未染色標本を 10 枚ずつ作製した。

鏡検は作製したすべての HE 標本について実施した。

対象器官・組織:

器官・組織	固定	標本作製	
		HE 標本	備考
気管	○	○	
気管支	○ 左右	○ 左右	左右の前葉, 中葉及び後葉
肺			
肺門リンパ節*	○ 左右	○ 左右	
縦隔リンパ節*	○ 左右	○ 左右	

*リンパ節は右側を標本作製用, 左側を遺伝子検査用として採取した。

7.8.9 骨髄検査

検査対象:

全例

検査時期:

剖検時

有核細胞数算定:

剖検時に, 胸骨の骨髄液をマイクロディスペンサーを用いて採取し, 希釈液 (セルバック, Sysmex) で 300 倍希釈した。夾雑物を除去後, 自動分析装置 (K-4500, Sysmex) を用いて有核細胞数を測定した。

骨髄塗抹標本の作製:

サイトスピン法を用いて胸骨骨髄の塗抹標本作製し, May-Grunwald-Giemsa 染色の二重染色を施した。

骨髄塗抹標本の観察:

作製したすべての動物において実施した。

光学顕微鏡を用いて, 各 500 個の骨髄細胞を以下のように分類し, 各細胞の割合及び絶対数 (有核細胞数 × 各細胞割合/100) 並びに M/E 比を算出した。

赤芽球系: 前赤芽球, 好塩基性赤芽球, 多染色赤芽球, 正染色赤芽球, 赤芽球系分裂細胞

顆粒球系: 骨髄芽球, 前骨髄球, 好中性骨髄球, 好中性後骨髄球, 好中性桿状核球, 好中性分葉核球, 好酸球, 好塩基球, 顆粒球系分裂細胞

その他: 単球, リンパ球, 形質細胞, 巨核球, 細網細胞, マクロファージ, 肥満細胞, その他

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

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った.

- 1) 試験期間中, 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, 最高で81.5%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1分以内に回復したこと, 及び動物の一般状態に異常がみられなかったことから, 試験に及ぼす影響はないと判断した.

9. 試験関係資料

9.1 送付

処置: 最終報告書提出後1ヵ月以内に, 試験委託者に送付する.
送付対象: 試験計画書 (原本), 最終報告書 (原本), 生データ及び下記の標本類

- 血液及び骨髄塗抹標本
- 病理組織標本 (パラフィンブロック及びプレパラート)

9.2 保存

保存対象: 下記の標本類

- 10 vol%中性緩衝ホルマリン液固定器官

保存期間: 最終報告書提出後5年間. その後の処置については, 所定の保存期間終了時までに試験委託者と協議する.

保存場所: 株式会社イナリサーチ本社施設内の資料保存施設

10. 成績及び考察

10.1 一般状態

(Table 1)

第1及び第2クールを通して, 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.

10.2 体重

(Table 2)

第1及び第2クールを通して, いずれの動物にも, 異常な変動は認められなかった.

10.3 体温

(Table 3)

第1及び第2クールを通して, いずれの動物にも, 異常な変動は認められなかった.

10.4 血液学的検査

(Table 4)

第1クール:

CHO 細胞及び大腸菌由来 GM-CSF 製剤群のいずれの動物においても、投与前と比較して、初回投与翌日 (Day 2) では、好中球と好酸球数の増加を伴う白血球数の増加が、一過性に認められた。Day 2 以降も好中球と好酸球数及び比は高値傾向のまま維持され、相対的なリンパ球数及び比の低値傾向が認められた。

第2クール:

CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤群のいずれの動物においても、投与前と比較して、初回投与翌日 (Day 2) から、好中球数及び比の増加が認められた。その内の1匹 (動物番号 UJM02) では、好酸球数及び比も増加したが、他の1匹 (動物番号 UJM01) では、ほとんど変動が認められなかった。白血球数は、1匹 (動物番号 UJM02) では Day 2 に一過性に増加、他の1匹 (動物番号 UJM01) では Day 86 でのみ増加し、好中球と好酸球数の増加と一致しない時点が認められた。その他、好中球と好酸球数及び比の増加に伴う相対的なリンパ球数及び比の低値傾向が認められた。

大腸菌由来 GM-CSF 製剤群では、投与前と比較して、2匹中1匹 (動物番号 UJM11) でのみ Day 2 に好中球と好酸球数の増加を伴う白血球数の増加が、一過性に認められた。Day 2 以降も好中球と好酸球数及び比は高値傾向のまま維持され、相対的なリンパ球数及び比の低値傾向が認められた。

10.5 血液生化学的検査

(Table 5)

第1クール:

CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤群では、投与前と比較して、2匹中1匹 (動物番号 UJM12) で Day 2 及び 58 にのみ C 反応性蛋白が明らかな高値を示し、その他の検査日にも投与前より高値を示したが、他の1匹 (動物番号 UJM01) では、明らかな変動は認められなかった。

大腸菌由来 GM-CSF 製剤群では、投与前と比較して、いずれの動物も C 反応性蛋白が Day 2 をピークとして高値を示し、その後もその他の検査日にも投与前より高値を示した。

第2クール:

CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤群では、第1クールと同様に1匹 (動物番号 UJM12) で C 反応性蛋白が高値を示したが、他の1匹 (動物番号 UJM01) では、明らかな変動は認められなかった。

大腸菌由来 GM-CSF 製剤群では、第1クールと同様に、いずれの動物も C 反応性蛋白が投与前より高値を示した。

10.6 BALF 採取

(Table 6)

BALF 採取量は、22.4~27.8 mL であり、CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤群及び大腸菌由来 GM-CSF 製剤群で差は認められなかった。

10.7 BALF の一般細菌及び真菌検査

第1クールでは、いずれの動物の一般細菌及び真菌も陰性であった。

第2クールでは、CHO細胞由来 GM-CSF 製剤群の1匹（動物番号 UJM01）でコアグラゼ陰性ブドウ球菌が検出されたが、常在菌であり、感染の兆候は認められなかった。

10.8 剖検

(Table 7)

CHO細胞由来 GM-CSF 製剤群の1匹（動物番号 UJM02）において、肺の左右前葉に黄褐色巣（右側: 8×3 mm, 左側: 5×2 mm）が認められた。

10.9 病理組織学的検査

(Table 8)

CHO細胞由来 GM-CSF 製剤投与群では、肺胞マクロファージの集簇が1匹（動物番号 UJM01）の左右全葉、他の1匹（動物番号 UJM02）の左右前葉においていずれも軽度ながら多巣状性に認められた。その他、動物番号 UJM02 では、左の前葉及び後葉、右前葉の細気管支・肺胞上皮に異物性肉芽腫が軽度又は中等度にみられ、右前葉では肺胞拡張を伴っていた。左右前葉に観察された変化は剖検時にみられた黄褐色巣と一致していた。右後葉においては、細気管支・肺胞上皮の肉芽腫は中等度にみられ、肺胞拡張及び水腫を伴った気管支肺炎が強度に認められた。

大腸菌由来 GM-CSF 製剤投与群では、胸膜下の単核細胞浸潤が1匹（動物番号 UJM11）の右の中葉に中等度に認められた。

肺胞マクロファージの集簇は、GM-CSF の薬理作用²⁾による影響であると考えられた。

気管支肺炎及び肺胞の拡張を伴う肉芽腫並びに胸膜下の単核細胞浸潤は、右葉を中心にみられたことから BALF 回収時のファイバースコープの挿入操作による影響であることが示唆された。なお、これらの変化はいずれも周囲リンパ節への波及は無く、投与及び操作に起因した限局性変化であった。また、異物については被験物質由来成分によるものと考えられた。

10.10 骨髓検査

(Table 9)

いずれの GM-CSF 群においても、赤芽球、顆粒球、単球及びリンパ球数の高値が認められた。また、CHO細胞由来 GM-CSF 製剤群の1匹（動物番号 UJM01）では、M/E（顆粒球/赤芽球）比の高値が認められた。GM-CSF は骨髓系細胞増殖因子であることから、この変化は GM-CSF の作用と考えられた。

11. 結論

CHO細胞及び大腸菌由来の2種の GM-CSF 製剤の間歇気管内投与により、GM-CSF に起因する白血球数、好中球及び好酸球数の増加並びに C 反応性蛋白の高値が認められたが、これらの変化は一過性であり、抗体産生に起因すると考えられる反応の減弱が認められた。また、GM-CSF に起因する骨髓の赤芽球、顆粒球、単球及びリンパ球数の高値が認められた。CHO細胞由来 GM-CSF ではさらに、GM-CSF に起因する顆粒球/赤芽球比の高値及び肺への肺胞マクロファージの集簇が認められた。また、GM-CSF に特異的ではない変化として、肺の左右前葉に黄褐色巣、肺胞拡張、肺への異物性肉芽腫及び胸膜下の単核細胞浸潤が認められた。

12. 文献

- 1) 藤原 淳. 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. 株式会社イナリサーチ最終報告書; 2014年. 試験番号 UZ13338. 試験委託者 新潟大学 歯学総合病院 生命科学医療センター.

- 2) 田澤立之ら. 自己免疫性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入治療. 日薬理誌. 138. 64~67. 2011.

Table 1-1 Evaluation of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys: II
Clinical observations (males) -1st course-

From Day -2 (Day of animal arrival) to Day 89 (Day of BALF sampling)

Group	Dose level	Animal No.	Findings
I CHO cell-derived GM-CSF	15 µg/body	UJM01	No abnormalities
		UJM02	No abnormalities
II Escherichia coli-derived GM-CSF	15 µg/body	UJM11	No abnormalities
		UJM12	No abnormalities

Table 1-2 Evaluation of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys: II
Clinical observations (males) -2nd course-

From Day -1 to Day 92 (Day of necropsy)

Group		Dose level	Animal No.	Findings
I	CHO cell-derived	15 µg/body	UJM01	No abnormalities
	GM-CSF		UJM02	No abnormalities
II	Escherichia coli-derived	15 µg/body	UJM11	No abnormalities
	GM-CSF		UJM12	No abnormalities

Table 2-1 Evaluation of Antibody Production by Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Product in Cynomolgus Monkeys: II
Body weight (males) -1st course-

Group	Dose level	Animal No.	Day													
			-1	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	89
I CHO cell-derived GM-CSF	15 µg/body	UJM01	3.95	4.00	4.10	4.05	4.05	4.00	4.00	4.00	4.05	4.15	4.10	4.15	4.20	4.20
		UJM02	2.85	2.85	2.80	2.90	2.90	2.85	2.90	2.95	2.90	2.95	2.90	2.90	2.90	2.90
II Escherichia coli-derived GM-CSF	15 µg/body	UJM11	3.00	3.05	3.10	3.20	3.15	3.20	3.20	3.20	3.20	3.25	3.30	3.30	3.35	3.30
		UJM12	2.80	2.85	2.85	2.85	2.80	2.80	2.80	2.75	2.70	2.70	2.70	2.75	2.85	2.80

Unit: kg