

A. 研究目的

1. ヒト以外の動物を用いて、GM-CSF の安全性や薬理評価が可能かを明らかにした。
2. カニクイザルに GM-CSF を吸入させ、血漿中の抗体の中和活性を測定した。

B. 研究方法

1. 各種動物のヒト型 GM-CSF に対する感受性の違い：各種動物から採血したヘパリン血にリン酸緩衝生理食を等量加えて希釈し、その 100ul に系列希釈した GM-CSF を加えて、37C で 30 分間孵置した。血液中の顆粒球表面の CD11b を蛍光ラベル抗体で染色、固定して、FACSArray バイオアナライザーで、平均蛍光強度を測定した。この希釈系列からプロビット法で ED₅₀ を算出し、各種動物を比較した。

2. GM-CSF 長期吸入投与による中和抗体産生

中和活性測定：GM-CSF を長期吸入したカニクイザルから定期的に採血された血漿を新潟大学より入手した。すなわち、鼻口マスクを用いて、2 頭のカニクイザルに molgramostim を、2 頭に CHO-GM を週に 2 回または 1 回吸入させた。投与は 3 ヶ月の休薬期間を設け、3 回の吸入投与を繰り返した。採血は毎週行い、測定まで血漿を -80C に保存した。

血漿を系列希釈して、GM-CSF (0.5ng/ml) と混合し、37C で 1 時間孵置後、2 x 10⁴ 個の TF-1 細胞に加えて、72 時間培養した。培養 68 時間目に WST-8 を加え、さらに 4 時間培養し、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 のみを加えた吸光度を 0%、GM-CSF を加えない培養を 100% 中和として、各サンプルの中和率を計算した。血清希釈系列の中和率から IC₅₀ を算出し、その希釈倍率を力価とした。また、ELISA 法によって求めた抗体量とこの力価から、1μg 当たりの力価、比活性値を計算した。

(倫理面への配慮)

動物は、動物倫理委員会の設置された動物施設より入手するか、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守する動物病院で供血用として飼育されている動物から採血した。動物の取り扱いには苦痛を与えないように配慮し、採血量も体重比 1：1,000 を越えるものは無かった。

C. 研究結果

1. 各種動物のヒト型 GM-CSF に対する感受の違い

い。

CD11b 発現を指標として各種動物の顆粒球の活性化を調べ、GM-CSF の ED₅₀ を求めた (図 1)。

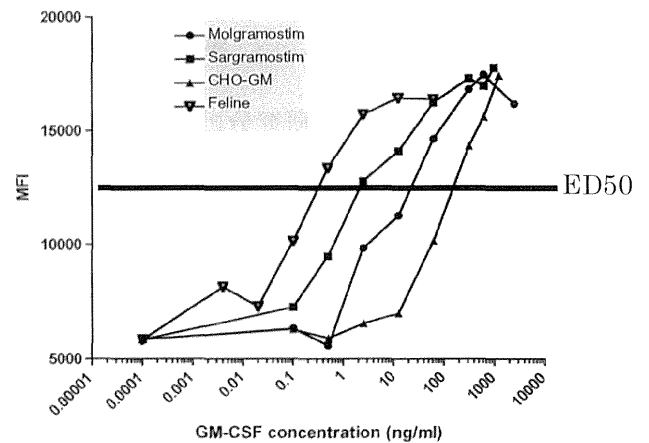


図 1. ネコ顆粒球の CD11b 発現量と GM-CSF 濃度との用量反応曲線

カニクイザルの顆粒球では、sargramostim の ED₅₀ が 0.29, molgramostim が 0.17, CHO-GM が 0.18ng であったのに対し、イヌでは同、1.64、1.39、2.23ng、ウサギが同 7.58、9.66、109.8ng、ネコは同 1.73、10.25、139.5ng であった (表 1)。一方、マウス、ラットはヒト型 GM-CSF に不応答であった。

表 1. 各種動物の顆粒球の CD11b 発現から求めたヒト型 GM-CSF の ED₅₀

	Molgraostim	Sargramostim	CHO-GM
カニクイザル (n=6)	0.1698 ± 0.150	0.2865 ± 0.274	0.1762 ± 0.217
イヌ (n=4)	1.390 ± 0.5107	1.638 ± 0.4232	2.229 ± 0.3646
ウサギ (n=4)	9.664 ± 1.996	7.588 ± 0.9590	109.8 ± 29.97
ネコ (n=1)	10.25	1.73	139.5

カニクイザルとイヌで、3 薬剤の ED₅₀ は大きく異ならないが、ウサギとネコでは、CHO-GM の活性は著しく低かった (表 1)。また、同種 GM-CSF に対する ED₅₀ を 100% とすると、カニクイザル顆粒球の反応は 30-60% の活性であったが、イヌでは 10-20% であった。最も反応性が高いカニクイザル顆粒球の molgramostim に対する CD11b 発現の ED₅₀ を基準に、イヌやウサギ、ネコと比較すると、それぞれ 1/8.2、1/57、1/60.3 の活性であった。一方、CHO-GM の ED₅₀ で比較すると、イヌでは 1/12.7、ウサギ 1/623.9、ネコ 1/792.6 であった

(図 2)。

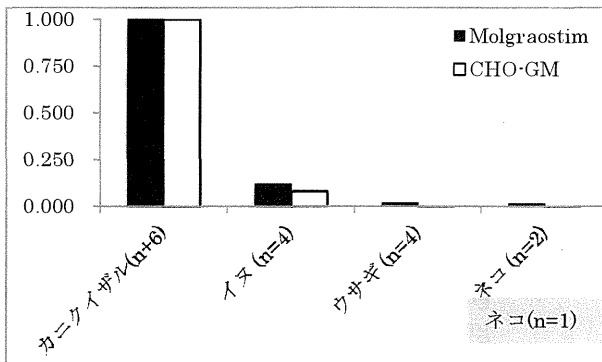


図 2. ヒト型 GM-CSF に対する各種動物の顆粒球の相対感受性

2. GM-CSF 長期吸入投与による中和抗体産生

GM-CSF 長期吸入投与カニクイザル血漿と 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、第 1 コース (図 3) では molgramostim を吸入した 1 頭 (M12) のみに中和活性を認めた。

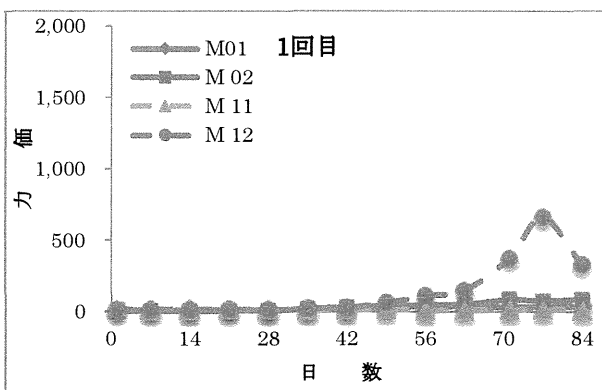


図 3. 第 1 コース GM 吸入による中和活性の推移

第 2 コースの吸入 (図 4) 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。

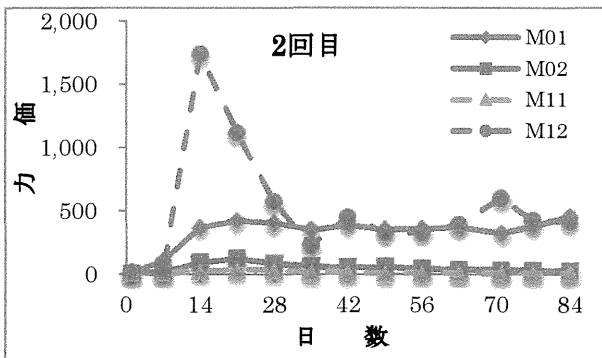


図 4. 第 2 コース GM 吸入による中和活性の推移

第 3 コース (図 5) では、この 2 頭の内 CHO-GM 投与のサルの中和活性値が開始時にも高値維持され、さらに上昇して推移したのに対し、molgramostim 投与のサル (M12) 血漿中の中和活性は低値で推移した。

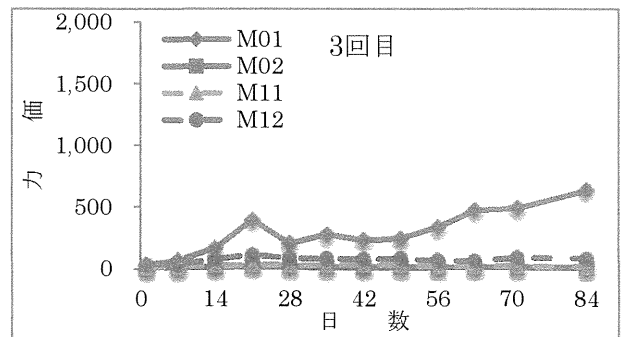


図 5. 第 3 コース GM 吸入による中和活性の推移

D. 考察

GM-CSF の生理活性を定量する古典的な方法は、骨髄細胞の顆粒球や単球の増殖分化を測定する、コロニー形成法である。しかし、GM-CSF の生理作用は多様であり、それぞれのパラメータが活性化の指標となり得る。GM-CSF 刺激による顆粒球の CD11b 発現増高によって活性化を定量する方法が内田ら (2007) によって報告された。この方法は、Flow cytometer が必要ではあるが、作業時間が短く、簡便であることから本研究に用いた。

ヒト型 GM-CSF の安全性試験や薬効評価に、マカク属サルを用いることがゴールド・スタンダードとなっているが、ヒトとカニクイザルの GM-CSF のアミノ酸の相同性は 95% と高い。本研究に供した動物との相同性は、マウス 54%、ラット 63%、ウサギ 69%、ネコ 72%、イヌ 69% であり、マウス・ラットの不应答の動物とイヌ、ネコ、ウサギとを隔てるほどの相違は認められない。さらに、レセプターの相同性は、β 鎖の違いは、GM-CSF と同様であるが、α 鎖は、マウス 36%、ラット 33%、ウサギ 55%、ネコ 57%、イヌ 60% である。GM-CSF 受容体は α 鎖と β 鎖が会合してヘテロ二量体を形成しており、β 鎖は細胞質内ドメインにシグナル伝達分子が結合する領域をもち、GM-CSF レセプターは β 鎖を IL-5、IL-3 と共有することから共通 β 鎖と呼ばれている。一方、α 鎖はシグナル伝達には係わらないが、リガンドである GM-CSF と特異的に結合する。この α 鎖の相同性は、今回の成績をサポートしているように見える。本研究の成績から、さらにカニクイザルとヒトの α 鎖のアミノ酸相同性が 92% であり、イヌとヒト間には 60% の相同性を有することも考慮すれば、イヌをヒト

型 GM-CSF の薬理活性や安全性試験に用いることが出来る可能性がある。

最近では、GM-CSF を用いたアジュバント療法を受けたメラノーマの患者の 93% に抗 GM-CSF 中和抗体が形成され、治療効果を妨げたことが報告された (Spitler 2014)。これと同様に、長期毒性試験や薬効評価においても、中和抗体の産生は結果を修飾してしまう可能性がある。そこで、GM-CSF の長期毒性試験に用いたカニクイザルの血漿が中和活性を持つのかを調べた。中和活性は、0.5ng/ml の GM-CSF の TF-1 細胞増殖効果を妨げる割合によって、定量測定した。長期試験全体で 4 頭中 2 頭が中和抗体を産生したが、使用頭数が少なかったため、遺伝的な影響を判断できなかった。中和抗体を産生した 2 頭は、それぞれ molgrammostim と CHO-GM を投与した個体で、GM-CSF の生産法の違いが中和抗体の産生に影響するとは思えなかった。また、中和抗体を産生した 2 頭の中和能の動態も同じではない。1 頭は第 1 コース後半から認められたが、もう一頭は第 2 コースから認められた。前者は、休薬後の再暴露に対する中和抗体産生が著しく増加した。この増加は、メモリー細胞による通常の既往反応であることが分かる。第 3 コース、中和抗体産生が低値で推移した時の血漿中の特異抗体の定量では、この個体はどのサルより抗体量が多く、アナジーが引き起こされたとは考え難く、中和活性を持たない抗体の極度な増産によって希釈効果を受けたかも知れないし、経日と共に生じた抗イディオタイプ抗体による干渉の可能性も否定はできない。

今回は、週 2 回の長期吸入によって中和抗体が半分のサルにしか認められなかったことは、現時点で個体差によるものであると述べるに止めざるを得ない。さらに、中和抗体の安全性試験に及ぼす影響を言及できないが、CBC や血液化学の結果に著しく干渉したと言う証拠は得られていない。本研究で、全頭ではないにしても、中和活性を持つ抗体の存在が証明されたので、薬効試験や安全性試験を正しく評価するために、中和抗体の影響についての、さらなる検討が必要である。

E. 結論

1. ヒト型 GM-CSF の安全性や薬理効果試験にサル類を用いることの妥当性が示されたが、イヌの利用の可能性も示唆された。

2. ヒト型 GM-CSF の長期吸入によって、カニクイザル血漿に中和活性を認めたが、個体差が大きかった。

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

「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 : NJLCG 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: NJLCG0804. **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

指定難病肺胞蛋白症の認定基準紹介と GM-CSF吸入治療開発の海外の動向に関する報告

研究分担者 井上義一 NHO近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター長

はじめに

GM-CSF 吸入療法の承認後は、肺胞蛋白症 (PAP) 患者が医療費の補助を得る事は重要である。我が国では難病対策では医療費の助成が行われてきたが、平成 27 年 1 月、指定難病制度が開始され大きな転換期を迎えた。我々は肺胞蛋白症の指定難病化を目指してきたが、他研究費により指定難病の認定基準案を作成し、最近厚労省に提出した。認定基準案を紹介し、かつ GM-CSF 吸入療法の海外での現状を報告する。

対象と方法

肺胞蛋白症指定難病の認定基準案を紹介する（びまん性肺疾患に関する調査研究卵班、肺胞蛋白症、遺伝性間質性肺疾患に関する研究：重症難治化要因とその克服研究班）。GM-CSF 吸入療法は、インターネットで公開されている情報を紹介する。

結果

(1) PAP 指定難病の診断と認定基準（案）

図 1 のアルゴリズムに従って自己免疫性 PAP (抗 GM-CSF 自己抗体未測定の場合は、特発性 PAP と呼び自己免疫性 PAP に含める)、続発性 PAP、先天性 PAP (遺伝子解析がなされた場合遺伝性 PAP と呼び先天性 PAP に含める)、未分類 PAP を診断する。自己免疫性 PAP (特発性 PAP) 及び先天性 PAP (遺伝性 PAP) を指定難病の対象とする。

(2) PAP 重症度と認定基準（案）

PAP 重症度 (表 1) に難治例を考慮し管理区分重症度を計算する。管理区分重症度Ⅲ以上を対象とする。

【管理区分重症度】

以下の場合、難治例として、重症度を 1 度加えて管理区分重症度とする (I ~ VI で表記)。その場合、管理区分重症度の後に () を附記し詳細を記入。

例：管理区分重症度：I I I (肺線維症合併)

- 1) 明らかな肺線維症の合併
- 2) 反復、継続する感染症合併
- 3) CPAP の場合

※なお、症状の程度が上記の重症度分類等で一定以上に該当しない者であるが、高額な医療を継続することが必要な者については、医療費助成の対象とする。

図 1 PAP 診断アルゴリズム。自己免疫性 PAP (特発性 PAP) 及び先天性 PAP (遺伝性 PAP) を指定難病の対象とする。

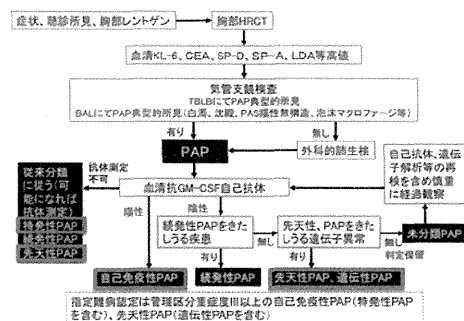


表 1 PAP 重症度

重症度 (DSS)	症状	PaO ₂
1	無し	PaO ₂ ≥ 70 Torr
2	有り	PaO ₂ ≥ 70 Torr
3	不問	70 Torr > PaO ₂ ≥ 60 Torr
4	不問	60 Torr > PaO ₂ ≥ 50 Torr
5	不問	50 Torr > PaO ₂

(3) GM-CSF 吸入治療開発の海外の動向

GM-CSF には酵母由来の sargramostim (Leukine™ (Berlex, Immunex, Genzyme)) と、大腸菌由来の molgramostim (Leucomax™ (Novartis)、Molgradex™ (Serendex)、Topleucon™ (Amoytop)、Te'erli™ (Dongbao)) の 2 種類について、これまで臨床試験の報告が

されてきた。わが国でも両剤の使用報告がある。Sargramostim は本研究班で用いている薬剤であり、米国でも医師主導治験が準備されている。Molgramostim は欧州で共同企業治験の準備が進められ、わが国を含めた国際共同治験の準備が進められている。また、詳細は不明であるが中国でも開発が進められている。

考察

GM-CSF 吸入療法の薬事承認後、使用できる薬剤があっても指定難病になっていなければ患者は治療を受ける事は困難であろう。PAP は 2015 年指定難病のリストに入っており、認定基準の固定、診療ガイドライン等の整備が前述の研究班を中心に進められている。

GM-CSF 吸入療法の開発はわが国、海外で進行中である。Sargramostim と molgramostim の比較データはないが、糖鎖、アミノ酸配列が両剤は異なり、わが国でともに使用できるようになれば患者にとりメリットがあると考えられる。

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。

参考文献 (GM-CSF 吸入療法)

1. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, Arai T, Takada T, Nasuhara Y, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ishii H, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Morimoto K, Akira M, Terada M, Otsuka J, Ebina M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Akazawa K, Nakata K. Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy for pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Jun 15;181(12):1345-54.
2. Tazawa R, Hamano E, Arai T, Ohta H, Ishimoto O, Uchida K, Watanabe M, Saito J, Takeshita M, Hirabayashi Y, Ishige I, Eishi Y, Hagiwara K, Ebina M, Inoue Y, Nakata K, Nukiwa T. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 May 15;171(10):1142-9.
3. Arai T, Hamano E, Inoue Y, Ryushi T, Nukiwa T, Sakatani M, Nakata K. Serum neutralizing capacity of GM-CSF reflects disease severity in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with inhaled GM-CSF. *Respir Med.* 2004 Dec;98(12):1227-30.
4. Yu Hy, Sun Xf, Wang Yx, Xu Zj, Huang Hl. Whole lung lavage combined with Granulocyte-macrophage colony stimulating factor inhalation for an adult case of refractory pulmonary alveolar proteinosis. *BMC Pulm Med.* 2014 May 19;14:87

カニクイザルでのGM-CSF吸入単回投与による薬物動態についての検討

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

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、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での単回投与を施行した。各用量雌雄各 1 例（中等用量のみ平成 26 年度に試験を追加して 2 例）のカニクイザルに酵母由来 GM-CSF 製剤 Leukine を単回気管内投与（0.005, 0.05 及び 0.5 mg/body）又は 2 種のネブライザー（膜型/ジェット）を用いて単回吸入投与（0.05, 0.5 及び 5 mg/body）し、投与前および投与後 24 時間まで経時的に血漿を採取した。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中の白血球数、好中球及び好酸球数、CRP の上昇が認められ、血中 GM-CSF が検出可能で、24 時間の濃度推移を測定できた。ネブライザーでの 5mg 投与と スプレーでの 0.5mg 投与はほぼ同等の血中濃度を示した。一般状態、体温及び一般細菌及び真菌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りと考えられた。

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、昨年度は投与量を実際に担保できる気道内噴霧投与方法を検討することとし、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、末梢血中の白血球、好中球数の増加、気管支肺胞洗浄液中の細胞数の増加、および血中 GM-CSF の ELISA 法での検出が可能であることが確認できた。

この結果を基礎に、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、気道内噴霧投与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での試験の必要性の指摘を受けた。

そこで、今年度は、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 濃度測定により検討することを

計画した。ネブライザーでの投与については、サルの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することとした。血中濃度については薬物動態を知る上で、投与後 24 時間まで 8 回採血を行うこととした。また気道内への影響を評価するため 24 時間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: Genzyme 社より、酵母由来 GM-CSF 製剤 sargramostim 40mg/6mL の液体製剤 2 本（ロット番号 B17840AR）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）。平成 26 年度に中等用量のみ雌雄各 1 例を追加して試験を行った。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（Penn-Century）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ズ）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：塩酸メドトミジン20 μg/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。

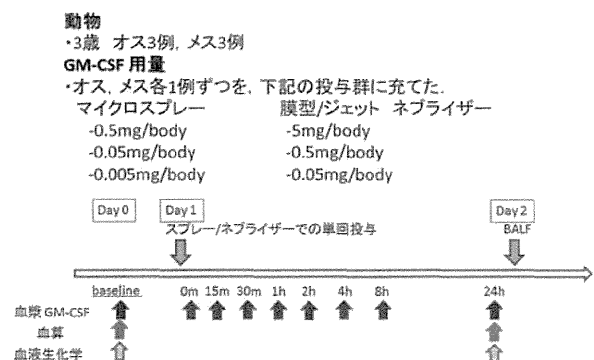


図1. 実験計画—スプレー/ネブライザー単回投与

(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(#13179, 2013年8月22日承認, ジェットネブライザー追加実験#

13259, 2013年11月14日承認)ならびに新潟大学動物実験倫理委員会(新大研第193号1, 2013年9月18日承認, ジェットネブライザー追加実験, 新大研第269号7, 2013年12月4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

動物の全身状態は、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。

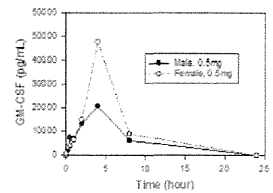
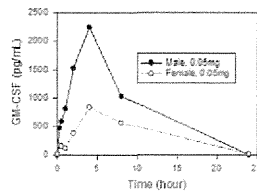
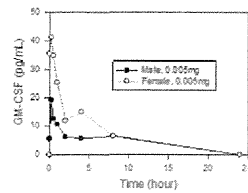
血液学検査

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。

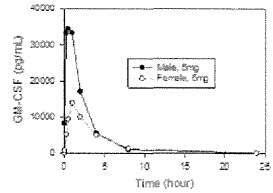
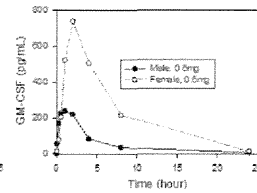
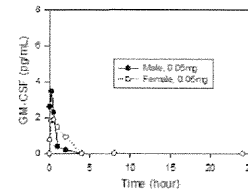
血液生化学検査

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。

マイクロ
スプレー



膜型ネブ
ライザー



ジェットネ
ブライザー

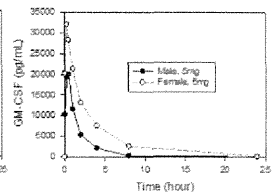
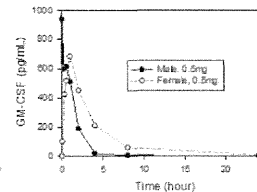
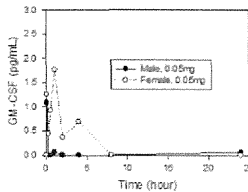


図2. 血漿中GM-CSF濃度—スプレー/各ネブライザー単回投与

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、マスク装着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

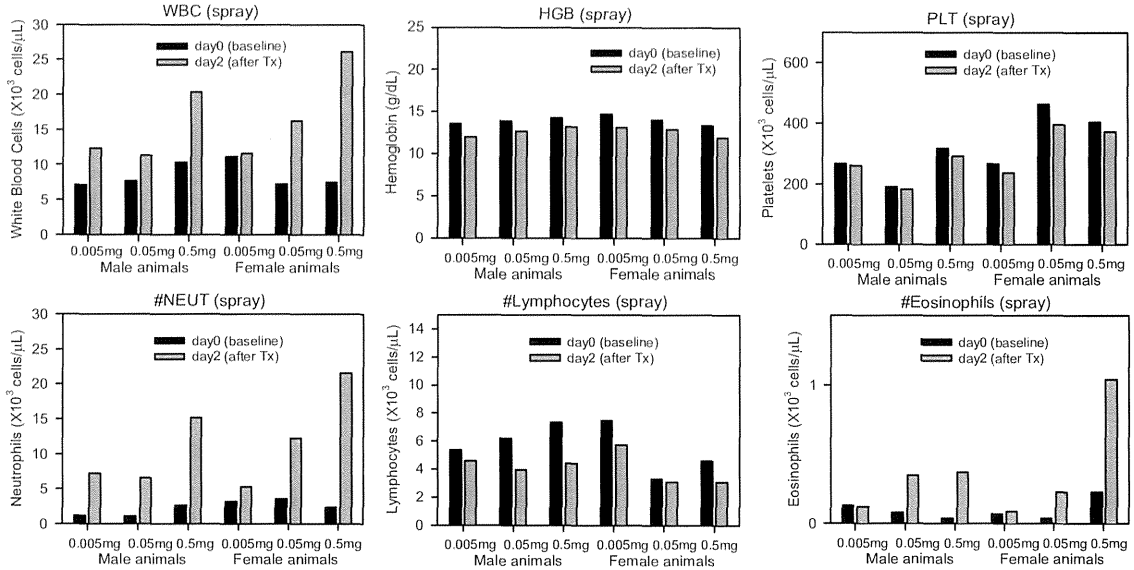
マイクロスプレー投与、膜型ネブライザー投与、ジェットネブライザー投与のいずれにおいても単回投与されたGM-CSFの血中での検出は可能であった。マイクロスプレー投与では、血漿GM-CSFは、0.005mg投与群では15分値が最高値であったが、0.05mgおよび0.5mg投与群での4時間値が最高値だった。これに対して、膜型ネブライザー投与では、血漿中GM-CSFは0.05mgおよび0.5mg投与群では、30分-2時間値が最高値で、ジェットネブライザー投与では、0.05mgおよび0.5mg投与群では、15-30分時間値が最高値であった。

気管支肺胞洗浄液 (BALF) 所見

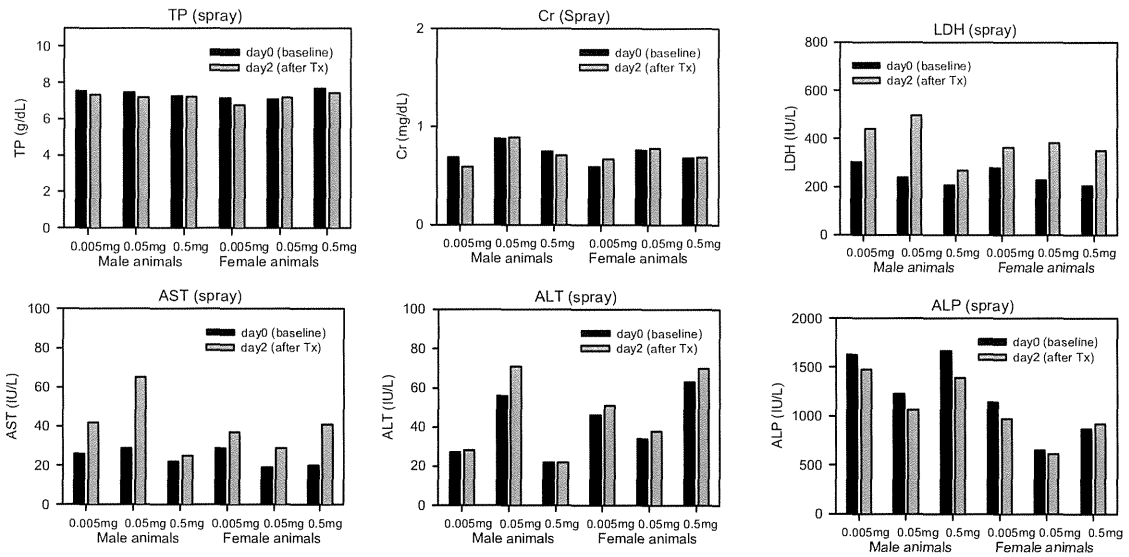
単回投与後24時間で採取したBALF中の細胞密度は、マイクロスプレー投与でもネブライザー投与でも、最大用量群で増加傾向がみられた。またBALF中のGM-CSFはELISAで検出可能レベルであり、最大用量で最高となる傾向がみられた。

マイクロスプレー単回投与前後の血液検査結果

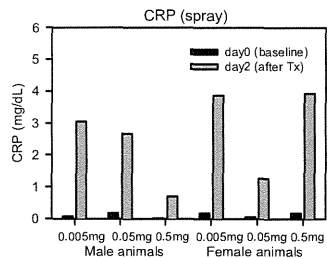
血算



血液生化学

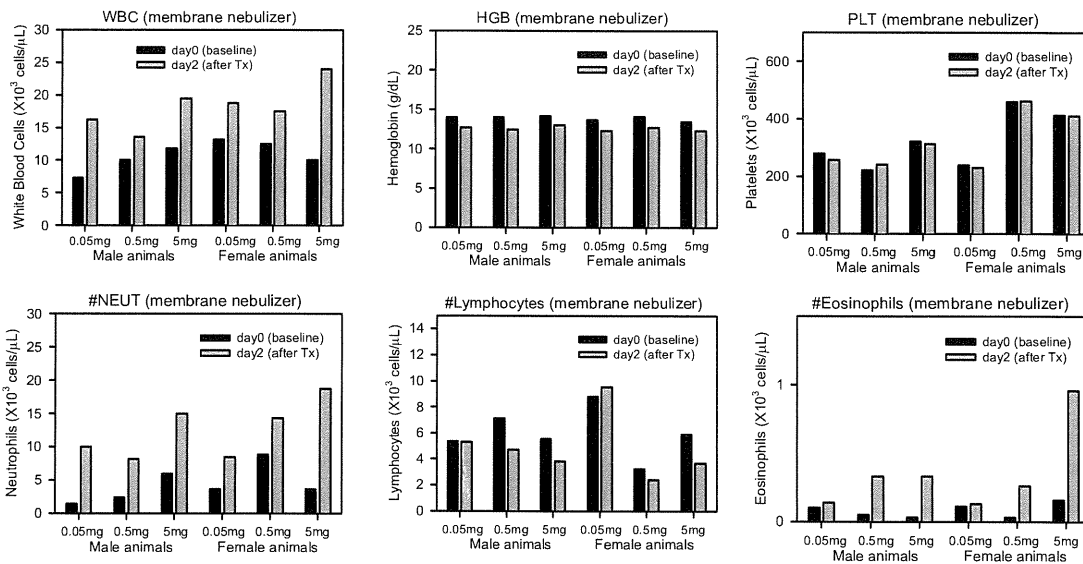


血清検査

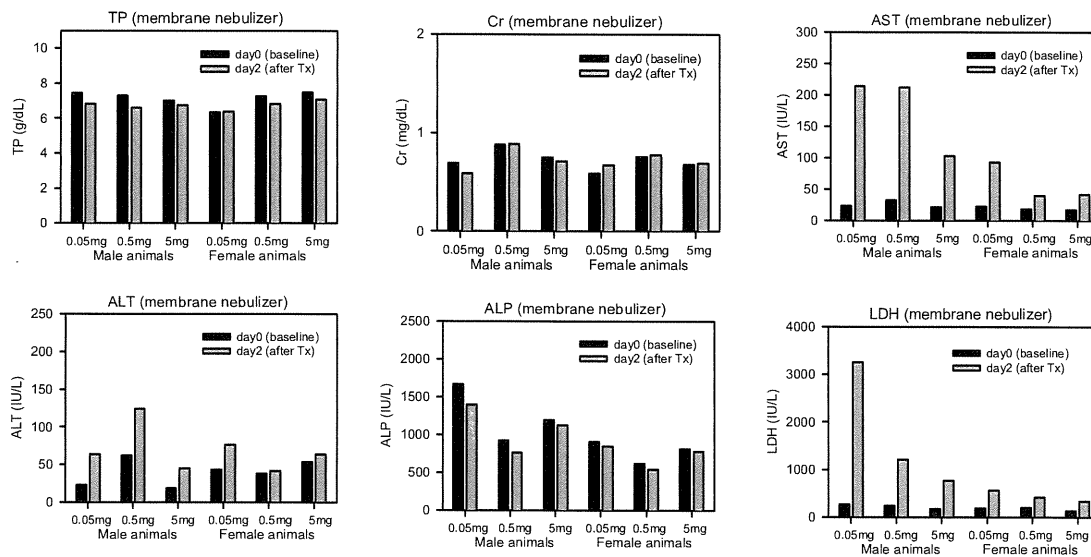


膜型ネブライザー単回投与前後の血液検査結果

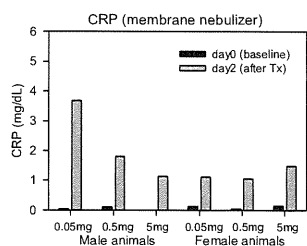
血算



血液生化学

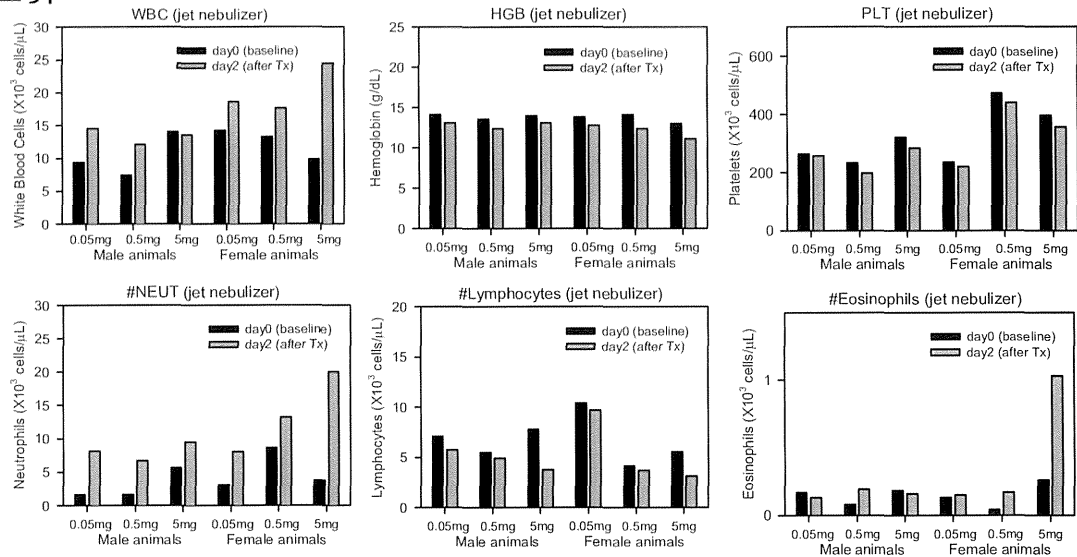


血清検査

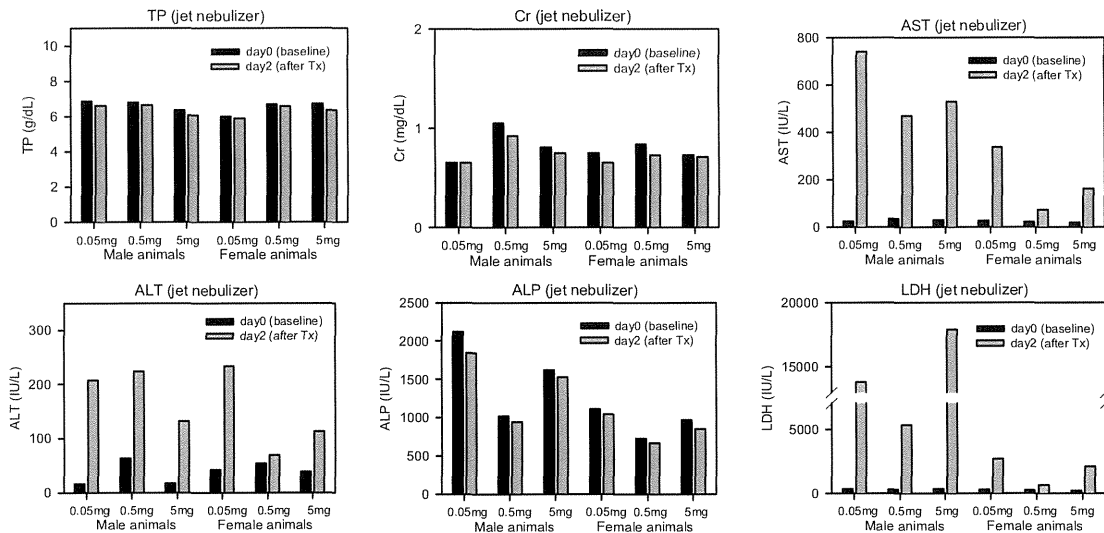


ジェットネブライザー単回投与前後の血液検査結果

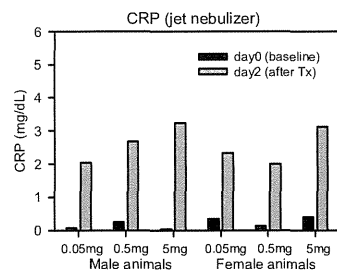
血算



血液生化学

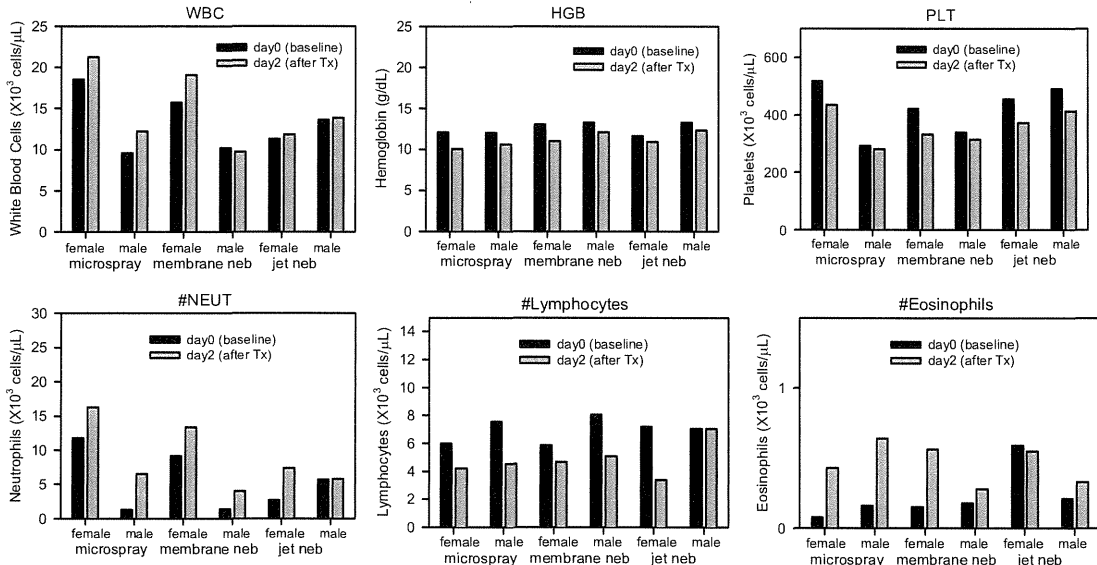


血清検査

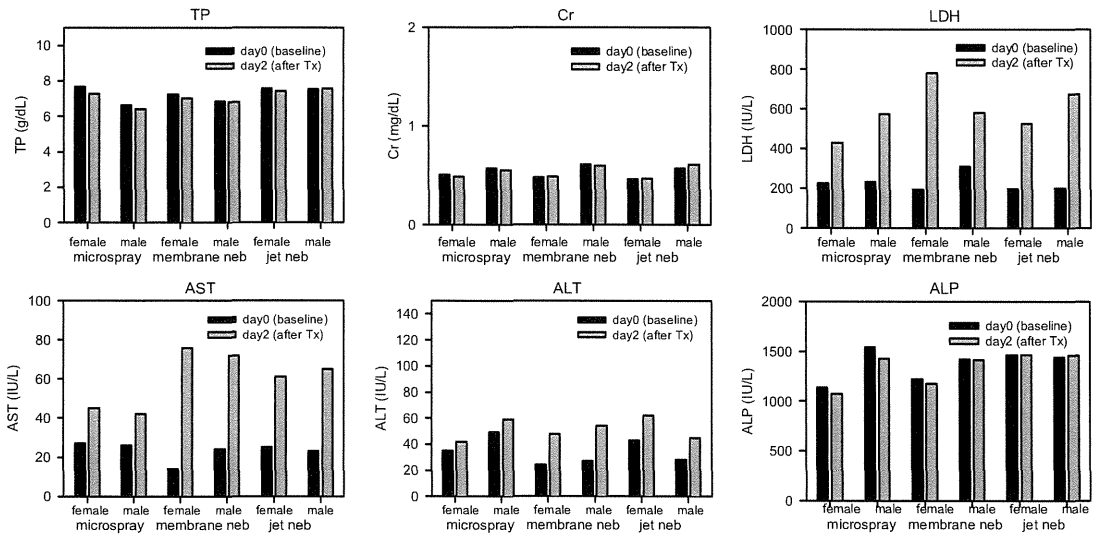


平成26年度中等量単回投与前後の血液検査結果

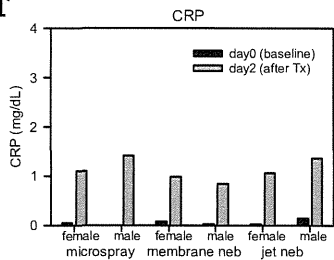
血算



血液生化学



血清検査



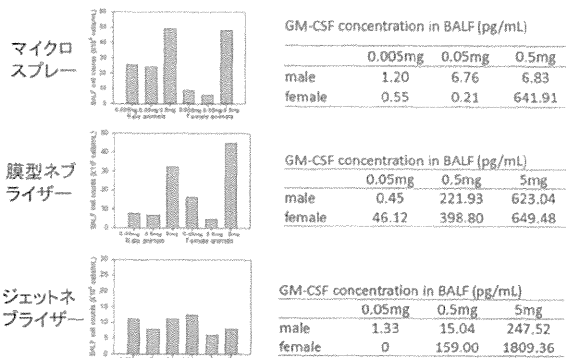


図3. BALF所見—スプレー/各ネブライザー単回投与

考察

本研究で、マイクロスプレー、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 製剤の経気道の単回投与で、血中 GM-CSF を検出できることが明らかとなった。

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、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、ネブライザーでの5mg投与とスプレーでの0.5mg投与はほぼ同等の血中濃度を示した。また膜型ネブライザーとジェットネブライザーはほぼ同等の血中濃度を示した。

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。

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、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。

マイクロスプレー投与では、最少用量の0.005mg/bodyで、血中 GM-CSF 濃度の検出限界(3pg/mL)を越えていた。これに対して、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)では血漿 GM-CSF は検出限界レベルであった。ヒトの常用量の4倍程度の intensity であり、ヒトの場合にはより吸入効率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た。

本研究では、ネブライザーでの GM-CSF 製剤経気道投与でも、血中 GM-CSF 濃度の検出可能レベルとなりうることを示唆された。各投与群2例と動物例数が少ないため、今後、中等用量を中心に例数を増やして検討する必要がある。

結論

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。

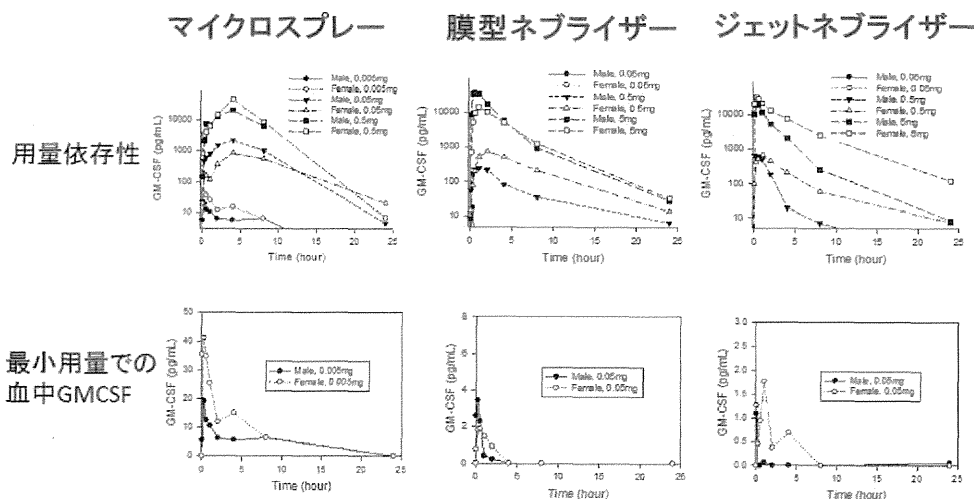
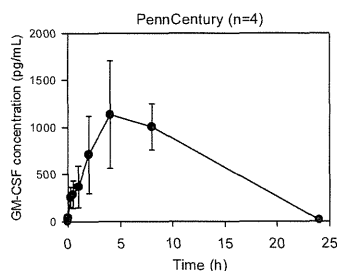
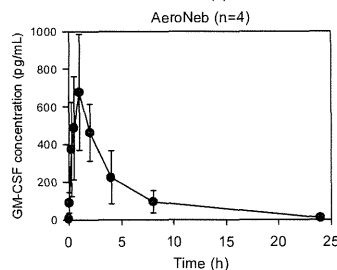


図4. 用量依存性と検出限界—スプレー/各ネブライザー単回投与

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)

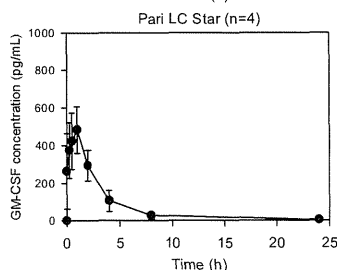


図5 中等量単回投与時の血中濃度推移

謝辞

貴重な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，貴重な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.

6 カ月間反復吸入投与毒性試験についての検討

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，中田光¹

はじめに

自己免疫性肺胞蛋白症患者に対する新規治療としての GM-CSF 吸入治療については、本邦でのパイロット試験および第Ⅱ相試験で、安全性および有効性が示唆されているが、GM-CSF 吸入製剤の開発に関して、非臨床試験特に、大型哺乳動物での吸入慢性毒性試験の施行が大きな課題である。

すでにヒトでの吸入例は、本邦だけでも GM-CSF 抗体陽性の自己免疫性肺胞蛋白症患者で 50 例を越え、米国でも 12 例の報告があり、さらに GM-CSF 抗体をもたない転移性肺癌患者で 80 例を越える使用例が米国で報告されているが、米国の共同研究者による米国 FDA への IND 申請の際にも non-human primates での、臨床プロトコルと同様の intensity と duration での吸入慢性毒性試験を求められており、吸入製剤開発の鍵となる課題と考えられた。

種特異性の高いヒト GM-CSF はげっ歯類等の動物では生理活性が見られず、毒性試験にはカニクイザル等を用いる必要がある。本課題では、カニクイザルでの本製剤の吸入投与の方法ならびにその効果評価の方法を検討し、PMDA の薬事戦略相談を活用しながら、GM-CSF 吸入製剤の治験の資料となり製造販売承認申請に使用しうる非臨床試験である慢性毒性試験計画の策定を行った。

対象と方法

医薬品・医療機器総合機構薬事戦略相談

本課題を進め、慢性毒性試験計画を策定するため、医薬品医療機器総合機構（PMDA）の薬事戦略相談を受けた、事前相談として 2012 年 9 月 7 日、2013 年 7 月 30 日、2014 年 3 月 28 日の 3 回実施し、2014 年 8 月に対面助言を申し込み、10 月 24 日に対面助言を受けた。さらに動物試験での策定のため 2014 年 3 月 30 日に事前相談を受けた。それぞれの相談での非臨床試験に関する相談事項を以下の通りである。

第 1 回事前相談（2012 年 9 月 7 日）

非臨床試験での動物実験として、静脈投与試験を行う必要があるか

第 2 回事前相談（2013 年 7 月 30 日）

前臨床試験の内容について一特にカニクイザルを用いた吸入試験について

第 3 回事前相談（2014 年 3 月 28 日）

毒性試験の方法と吸入器について

対面助言（2014 年 10 月 24 日）

非臨床試験の項目の充足性について

第 4 回事前相談（2015 年 3 月 30 日）

3 用量での試験計画（用量，吸入器，製剤）について

実験

項目別研究報告にあるように、気管支肺胞洗浄液採取の予備実験，GM-CSF 投与予備実験，単回投与試験，抗体産生観察試験を新潟大学動物実験倫理委員会の審査・承認を受けて行い、6 カ月慢性毒性吸入投与試験の計画策定の資料とした。詳細については項目別研究報告書に記載の通りで、以下に概要を記載する。

1. 気管支肺胞洗浄液（BALF）採取の予備実験
肺内環境の評価の剖検以外の方法を確立するため、雌雄各 1 例で、細径気管支ファイバースコープによる BALF を試みた。新生児用の細径気管支ファイバースコープ（BX-60 オリンパス社）で右中葉気管支に、楔状固定し、1 回 5mL の温生理食塩水の注入排出を 5—6 回繰り返した

2. GM-CSF 投与予備実験

カニクイザルでのヒト GM-CSF 投与による生理学的な変化が観察できるかどうかを調べるため、調製可能な最大濃度（1mg/mL）で、気管内投与が可能な最大液量（0.5mL）をマイクロスプレーで気管内噴霧投与を 3 日間行い、血算，血液生化学，BALF 細胞解析等の検索を行った

3. 単回投与試験

吸入投与した GM-CSF の血中濃度が ELISA で測定可能であることが、上の GM-CSF 投与予備実験で

分かったので、種々の用量でマイクロスプレーおよびネブライザーでの GM-CSF1 回投与前後の、投与前および投与後 15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間の 8 ポイントでの採血より血中濃度の推移を検討した。

4. 抗体産生観察試験

反復長期投与（1 週に 2 回、マイクロスプレーで注入投与、12 週間）を 3 ヶ月の休薬期間を置いて 2 コースおよび 3 コース目として 1 週に 1 回の投与のコースを 2 カ月の休薬期間において行い、定期的に抗体を測定した。

結果

薬事戦略相談

いずれの相談でも、機構側は、1 時間以上の時間を割いて、相談に応じていただいた。

第 1 回事前相談

非臨床試験の動物実験での静脈投与実験については、①急性毒性試験として考えた場合には、吸入では投与量が限られること、②急性毒性のみならず、その他のがん原性、生殖器への影響等のデータパッケージも必要になること、を考えれば静脈投与などの全身投与の経路もステップのどこかで考える必要があるとの機構のコメントであった。なおこの件は、協力会社の非臨床試験データパッケージの一覧表を示して対面助言で充足性についての相談となった。

第 2 回事前相談

6 カ月慢性吸入投与毒性試験（当初は米国で行う計画）については GLP 下の試験であること、経気道的投与（当方では投与量が確実に担保できるマイクロスプレーでの実験を計画）についてはヒトと同じ投与方法で行うのが原則で、ネブライザーでの試験が必要であること、が機構側の考えが示された。

第 3 回事前相談

慢性毒性吸入試験について、①最終製剤で行ってほしい、②GLP であればよい、③これが終了してから臨床試験に入るべきである、とのコメントがあった。また使用される吸入器は物理的な特性の基準を満たしていればよく、吸入器を指定しての製剤の承認は考えないとのコメントがあった。

実験結果の概要

1. 気管支肺胞洗浄液（BALF）採取の予備実験

新生児用の細径気管支ファイバースコープ（BX-60 オリンパス社）で右中葉気管支から、1 回 5mL の温生理食塩注入・吸引で気管支肺胞洗浄液が採取して各種解析が行えた。

2. GM-CSF 投与予備実験

カニクイザルで 0.5mg の GM-CSF をマイクロスプレーで気管内噴霧投与を 3 日間行ったところ、白血球数や CRP の上昇など、BALF 細胞数などの生理学的変化が確認でき、血中 GM-CSF 濃度を ELISA で検出可能であった。

3. 単回投与試験

気管内噴霧投与した GM-CSF の血中濃度が ELISA で測定可能であることが、上の GM-CSF 投与予備実験で分かったので、種々の用量でマイクロスプレーおよびネブライザーでの GM-CSF1 回投与前後の血中濃度推移を解析した。マイクロスプレーでの投与量の 10 倍の用量であれば、ネブライザーでも同等の血中濃度推移を確認できた。

4. 抗体産生観察試験

反復長期投与（1, 2 コース目は週に 2 回で 3 コース目は週に 1 回、マイクロスプレーで注入投与、12 週間

）を行い、抗体産生を観察できた。投与を休止すると抗体価は下がった。抗体陽性期間が続くと、泡沫状マクロファージの出現、さらに少量の無構造物質の沈着がみられたが、肺胞蛋白症の発症には至らなかった。

対面助言（2014 年 10 月 24 日）

非臨床試験の充足性については、GLP 準拠の 6 カ月間反復吸入投与毒性試験で特段の問題がなく、今後の臨床試験で、新たな毒性試験を要する安全性上の問題がなければ、提示された非臨床試験データパッケージで本剤の製造販売承認申請を行える可能性はあるとの機構の意見が示された。留意点として 6 カ月慢性毒性試験の結果の固定後に III 相試験を開始することとの意見が示された。

6 カ月間反復吸入投与毒性試験の試験計画

以上のような準備を進めている間、米国側で実施予定であった上記試験が、実施されない可能性が考えられるようになり、その場合に備えて雌雄カニクイザル各群 4 例、対照群および 5mcg/kg/日の用量を含む被験物質 2 用量群で 26

週間反復吸入投与毒性試験を計画し、この計画概要の適切性について対面助言で機構に確認した。

機構側からは、被験物質は3用量設定することが望ましく、米国で実施予定のサルを用いた28日間反復吸入投与毒性試験の結果等も踏まえて、長期投与毒性試験の用量を検討すべきで、その他の試験計画については特段問題ないと考えるが、実際に試験の実施を計画する場合には投与量の設定を含めて事前に機構に相談することをすすめる、との意見が示された。

ここまでの計画で概要のような実施計画を策定し、amedの研究費の申請書の資料とした。

第4回事前相談（2015年3月30日）

3用量での試験計画（用量、吸入器、製剤）について相談し、用量と吸入器については、吸入器は6カ月間反復吸入投与毒性試験と臨床試験とで違う物を用いる場合には、吸入器でのミスト濃度の比較が必要になるとの意見が示された。また製剤については、臨床試験での凍結乾燥品の融解物と、6カ月反復吸入投与毒性試験のために提供される凍結乾燥前の製品が同等であることを確認できればよい、とのコメントだった。

以上から、6カ月間反復吸入投与毒性試験の計画を策定した。

考察

吸入器について

非臨床試験のための経気道的投与では投与量が担保できるマイクロスプレーによる気管内投与による方法を考えていたが、薬事戦略相談でネブライザーでの試験を機構に求められてネブライザーでの投与の検討を始めたところ、血中濃度も測定でき、6カ月間反復吸入投与試験もこれで行うことになった。2番目の問題として振動膜型ネブライザーとジェットネブライザーのどちらを用いるか、ということが残る。膜型ネブライザーは効率のよいネブライザーであり、最近の膜型ネブライザーでは吸気・呼気を検知して吸気の際のみ振動するタイプのものもあり、効率が高く使用薬物の節減にもつながる可能性があるが、GM-CSFについての使用経験がなく、効率があがると有害事象の発生率も上がる可能性もある。現状ではGM-CSF吸入については、本邦のみならず、世界でも豊富な臨床データの

あるジェットネブライザーの使用を考えている。

抗体形成のこと

本邦でのaPAPに対する多施設第Ⅱ相試験では、24週間の治療期間中にaPAP患者の自己抗体価は有意の変化を示さなかった。一方、大腸癌患者でのGM-CSFの間欠的な皮下注射投与で抗体が生じたことが報告されている。本研究でも、大腸菌由来製剤およびCHO由来製剤の週2回の気管内噴霧投与で、4週後より抗体産生が確認されている。そのため抗体存在下でGM-CSF投与を続けても十分な暴露にならないとの考え方もあり、規制当局の考え方も一部で異なる可能性があるが、本製剤が吸入7日休薬7日の24週間投与という長期にわたる治療期間のため、これに相当する期間・用量での反復吸入投与試験を求めるPMDAの考え方に従って、抗体の有無にかかわらず26週間投与での毒性試験を計画している。

用量設定

ICHの考え方では常用量の50倍までの範囲をとって毒性試験を行うとされ、くわえて、サルでの体重あたりの肺重量は、ヒトでの体重あたりの肺重量と異なるため、肺重量あたりの負荷を考える必要がある。現状では、ヒトでの吸入と異なり、ネブライザー付きマスクでの投与であり吸入効率がさがることとも考慮して、常用量、10倍量、100倍量の3用量での毒性試験を計画している。

結論

各種実験で、カニクイザルでの本製剤の吸入投与の方法ならびにその効果評価の方法を検討し、PMDAの薬事戦略相談を活用しながら、GM-CSF吸入製剤の治験の資料となり製造販売承認申請に使用しうる非臨床試験となる6カ月間反復吸入投与毒性試験計画の策定を行った。

謝辞

CHO細胞由来GM-CSFのご提供と情報の提供をしてくださったJCRファーマ株式会社、酵母由来GM-CSF製剤を提供してくださったGenzyme社、動物実験計画において貴重なご助言をいただき実施に際して多大なご支援をいただいた株式会社イナリサーチ、薬事戦略相談を懇切に支援くださいました医薬品医療機器総合機構の皆さまに深謝申し上げます。