

## 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.

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）  
研究報告書

自己免疫性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入製剤の医師主導治験についての検討

新潟大学医歯学総合病院<sup>1</sup>，東北大学病院<sup>2</sup>，NHO 近畿中央胸部疾患センター<sup>3</sup>

田澤立之<sup>1</sup> 北村信隆<sup>1</sup> 田中崇裕<sup>1</sup> 白井久美子<sup>1</sup> 上田隆宏<sup>1</sup> 井上彰<sup>2</sup> 井上義一<sup>3</sup> 中田光<sup>1</sup>

はじめに

自己免疫性肺胞蛋白症（aPAP）患者に対する新規治療としての GM-CSF 吸入治療は、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有望な治療法であるが、GM-CSF 製剤は本邦未承認である。

薬事承認を得るための治験として、偽薬群・実薬群を置いてのランダム化による第Ⅲ相試験が必要となるが、aPAP 自身が稀少疾患であるので、適切な症例数の設定と参加者の募集がこの治験を成功させるための鍵となると考えられる。

GM-CSF 製剤のヒトでの吸入例は、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。

本研究での非臨床試験での 6 カ月間反復吸入投与毒性試験の結果を得て、速やかに医師主導治験を始められるよう、先行研究の多施設第Ⅱ相試験を参考に、適切な症例数設定およびプロトコル策定を行い、円滑な医師主導治験の開始を図ることがこの研究項目の目的である。

対象と方法

PMDA 薬事戦略相談

本課題の 6 カ月慢性毒性試験計画の策定と並行して医師主導治験の実実施計画にも資するため、PMDA の薬事戦略相談で、様々な事項についての相談をお願いした。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。それぞれの相談での臨床試験に関する相談事項を以下の通りである。

2012 年 9 月 7 日第 1 回事前相談

酵母由来製剤との関係について。

2013 年 7 月 30 日第 2 回事前相談

proof of concept (POC) ，非臨床試験データパッケージ，第Ⅰ相試験および国際共同治験について。

2014 年 3 月 28 日第 3 回事前相談

臨床試験計画（稀少疾患治療薬として第Ⅰ/Ⅱ相試験での承認申請の可能性，第Ⅰ相試験の倫理性と必要性）と吸入器について。

症例数の設定

新潟大学医歯学総合病院プロトコルデータセンターに先行した多施設第Ⅱ相試験のデータの検討を依頼した。

プロトコル策定

第Ⅲ相試験と，付随研究としての薬物動態試験のプロトコルを策定し，薬事戦略相談の対面助言で PMDA に示して，機構の意見を得心，さらに修正した。

以上の準備により，POC 資料，連携企業により準備された治験薬概要書ならびに非臨床試験データパッケージの一覧表，策定した治験実施計画書案をあわせて，2014 年 8 月に対面助言を PMDA に申し込んだ。

2014 年 10 月 24 日対面助言での臨床試験に関する質問事項はつぎのとおりである。

- ・第Ⅰ相試験の要否及びその実施時期について
- ・第Ⅲ相試験（検証的試験）の試験デザインについて

1) 目標例数の設定について

2) 用法・用量の設定について

3) 主要評価項目及び評価時期について

4) その他の評価項目について

結果

薬事戦略相談

いずれの相談でも，1 時間以上の時間をかけて，懇切に対応していただいた。

第 1 回事前相談

酵母由来製剤での検討は製造企業の意向によ

る部分が大きいと考えられ、酵母由来製剤とCHO由来製剤のスイッチについては、非臨床試験の方法やデータとして参考にはなると思うが、申請用のデータとしての使用は難しく、細胞の由来が違うのでつなげて使うことは困難と思われるとのコメントが示された。

## 第2回事前相談

①POCの資料をまとめるにあたって、どの研究が、大腸菌由来製剤によるものか、また酵母由来製剤によるものか、を明示してまとめてほしい、②非臨床試験については一覧表の形で対面助言で示しGLPで実施したかも明示してほしい、③日本人健康成人での第1相試験の必要性に乏しいとの考えとのことであるが、対面助言の際に根拠となる試験をあげて記載してほしい、④日本人を組み入れた国際共同第II相試験、第III相試験を評価資料とできるかどうかは、皮下注・静注などでの民族差のデータとともに対面助言で詳しい計画を記載してほしい、とのコメントが示された。

## 第3回事前相談

①日本での第I/II試験のみで承認を得るのは、例数の面から正直難しいと思われ、国際共同試験が望ましく、国内のみでの検証試験による承認取得は議論が必要である、②健常者での第I相試験はサルでの毒性試験の結果から可能であればやった方がよい、③吸入器は物理的な特性の基準をクリアしていればOKで、指定しての承認は考えない、とのコメントが示された。

以上のコメントをもとに検証試験実施計画案を策定し、対面助言を申し込んだ。

## 対面助言 (2014年10月24日)

### 第I相試験について

健康成人を対象とした単回投与による薬物動態の検討について、第III相試験と同時期に可能な限り早い段階で薬物動態データが入手可能となるよう計画するよう機構の見解が示されたため、薬物動態試験の概要を作成し、機構に示してコメントを求めたところ、①健康成人における血中GM-CSF濃度の背景値が入手可能であればプラセボ対照群省略も一案、②用量漸増試験ではなく3用量並行実施で可とのコメントが示された。

上のコメントをもとに薬物動態試験計画概要

を以下のように策定した。

## 健常成人での単回投与による薬物動態試験計画案の概要

1. スキーム (資料参照)
2. 目的  
自己免疫性肺胞蛋白症を適応とするGM-CSF吸入製剤の、健常成人での薬物動態の解析を行い、有害事象発現割合を評価し安全性の評価を行う。
  - ・主要評価項目：薬物動態パラメータ
  - ・副次評価項目：有害事象発現割合
3. 対象  
登録時20歳以上45歳未満の健常成人男性
4. 治療
  - ・グループ1：GM-CSF吸入製剤125mcg/bodyを1回吸入
  - ・グループ2：GM-CSF吸入製剤250mcg/bodyを1回吸入 予定症例：実薬3例
  - ・グループ3：GM-CSF吸入製剤500mcg/bodyを1回吸入 予定症例：実薬3例
5. 予定登録数と登録期間  
予定登録参加者9例 登録期間：3か月  
予定例数に達しないときさらに3か月延長

## 検証試験について

治験実施計画案を策定し、対面助言で示して、以下の概要で概ね受け入れ可能とのコメントが示された。

1. スキーム (資料参照)
2. 目的：自己免疫性肺胞蛋白症患者におけるGM-CSF吸入の安全性およびAaD02改善における有効性の確認
3. 目標例数：60例 (実薬30例 偽薬30例)
4. 用法・用量：(125 $\mu$ g/回、1日2回、7日間吸入投与後、7日間休薬を1コースとして、12コース)
5. 主要評価項目：ベースラインからのAaD02の改善量
6. 評価時期：治験薬投与開始後24週時点
7. その他の評価項目：  
徴候 (QOL, 息切れ, 咳), 酸素療法の必要性, 肺機能 (%VC, %DLCO, PaO<sub>2</sub>), 画像所見 (CTスコア), 血清マーカー (KL-6, CEA, CYFRA 21-1, SP-A, SP-D, LDH, 抗GM-CSF抗体.)

その他に次のようなコメントが示された。

- ・本試験の対象患者が「肺胞蛋白質症の重症度が 2~4 の患者」であることが明らかになるよう、  
選択基準又は除外基準を修正すること
- ・過去に GM-CSF 療法を受けた経験がある患者は、  
期間、投与方法にかかわらず、本試験の対象から除外すること
- ・肺胞蛋白質症の対症療法として一般的に使用されている薬剤があれば、  
試験期間中、その用法・用量を変更しない旨を併用可能薬等の項に規定すること
- ・検査項目中に、血中 GM-CSF 濃度の測定を追加すること

### 考察

#### 予定症例数の算定について

必要サンプルサイズの計算のためには、

- ・統計的解析方法
- ・検定の有意水準
- ・目標検出力
- ・実験により想定される効果の差 (効果量: effect size)

を予め設定する必要がある。

#### 1) 統計的解析方法について

本臨床試験においては、ランダム化割り付けによる GM-CSF 吸入群とプラセボ群の 2 群間での A-aDO<sub>2</sub> の変化量を比較することにより、GM-CSF 吸入療法の効果を評価することが目標となる。

解析方法としては、比較する群間における単変量解析ならびに多変量解析を行う。

まず単変量解析としては、GM-CSF 吸入群とプラセボ群の 2 群間における A-aDO<sub>2</sub> の平均変化量の差に関する 2 標本検定を行う。

#### 2) 検定の有意水準

5% に設定する。

#### 3) 目標検出力

80% とする。

#### 4) 実験により想定される効果の差 (= 効果量: effect size) に関する検討

効果量の計算に際しては、Cohen の d を用いることとする。Cohen の d の算出の際は、これまでの類似的な先行研究のデータを元に、比較する各群における上記効果の平均値ならびに両群の合併標準偏差を求める。

まず計算に用いる両群における各統計量の記号をそれぞれ以下の通り定義する。その際、各記号の添え字 1, 2 は、それぞれの群番号を表す。

- ・標本の大きさ:  $n_1, n_2$
- ・平均効果:  $\bar{x}_1, \bar{x}_2$
- ・効果の標準偏差:  $s_1, s_2$

以上よりそれぞれの各群の自由度( $n_1-1$ ), ( $n_2-1$ )を重みとする加重平均標準偏差は、

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

となる。なお上記の合併標準偏差の自由度は  $n_1+n_2-2$  となる

このとき、Cohen の d は以下のように定義される。

$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s}$$

以上の計算法を用いて、実際のデータを用いて効果量の推定値を計算する。

まず、各群における基本統計量は、

$$\begin{aligned} n_1 &= 35 \\ n_2 &= 35 \\ \bar{x}_1 &= 2.15 \\ \bar{x}_2 &= -8.97 \\ s_1 &= 6.74 \\ s_2 &= 10.21 \end{aligned}$$

となる。

したがって 両群の自由度を重みとする加重平均合併標準偏差 s は、上記の(1)を用いて、

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} = \sqrt{\frac{(35 - 1) \times (6.74)^2 + (35 - 1) \times (10.21)^2}{35 + 35 - 2}}$$

8.47

となる。

また効果の平均差は、 $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ となるので、Cohen の d の点推定値は、

$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} = \frac{2.15 - (-0.79)}{0.47} = 1.31$$

となる。

さらに今回、それぞれの条件におけるサンプルサイズである  $n_1$  と  $n_2$  とを用いて、上記の d の標準誤差  $s_{es}$  を以下のように求める。

$$s_{es} = \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 \times N_2} + \frac{d^2}{2(N_1 + N_2 - 2)}}$$

上記を用いると、

$$s_{es} = \sqrt{\frac{33+33}{33 \times 33} + \frac{1.31^2}{2(33+33-2)}} = 0.26$$

となるため、d の 95%信頼区間は、

下限値が

$$d - t(n_1 + n_2 - 1, 0.05) \times s_{es} = 1.31 - 1.995 \times 0.26 = 0.76$$

上限値が

$$d + t(n_1 + n_2 - 1, 0.05) \times s_{es} = 1.31 + 1.995 \times 0.26 = 1.81$$

となる。

以上の計算より、効果量の点推定値は 1.31 であるが、上記で用いた研究デザインは自己対照デザインであり、今回用いるプラセボ対照比較試験よりも交絡等の影響がやや少なかったと考えられること等から、本研究における必要サンプルサイズの算出にあたっては、effect size の見積もりを、95%信頼区間 [0.76, 1.81] の下限値 0.76 を用いることとする。

以上の検討より、平均値の差に関する 2 標本 t 検定を用いて、有意水準 5%、検出力 80% で A-aDO2 の平均変化量の効果量 0.76 を検出するために必要なサンプルサイズは、 $28.17 \times 2 \div$

60 例と考えられた。

さらに今回、観察期間が visit1 から visit10 までの 10 時点における A-aDO2 の経時的変化を 2 群間で比較することから、多変量解析として、一般線形モデルである「実薬群-プラセボ群」の因子と「観察期間」の因子による反復測定 2 元配置分散分析を行い、実薬、プラセボによって、A-aDO2 の経時的変化のパターンに差があるかどうかを検証する。その際、被験者間因子として前述の疾患の重症度、KL-6 等の二値化変数や喫煙歴の有無等の質的変数ならびに、共変量として各種検査値や smoking index 等の連続変数を用いて、それらの影響についても検討する。

その際、「実薬群-プラセボ群」の因子と「観察期間」の因子による反復測定 2 元配置分散分析により、有意水準 5%、検出力 80% で経時的変化のパターンの差として効果量 0.7 を検出するために必要なサンプルサイズは、 $31.17 \times 2 \div 62$  例と考えられた。

以上のことから、単変量解析、多変量解析のいずれにおいても、60 例程度の症例数を確保することが望ましいと考えられた。

### 実際の患者数の評価

2014 年 7 月 2 日の時点で本治験実施施設へ PaO2<75 の PAP 患者数をアンケート調査したところ以下の通りだった。

北海道大学 2, 東北大学 3, 千葉大学 1, 国立国際医療研究センター 杏林大学 4, 新潟大学 3, 愛知医科大学 5, 京都大学 2 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 42 倉敷市立児島市民病院 長崎大学 1

合計 62 名

## 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。血中濃度も測定できることがわかり、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するとき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。

## 結論

これまでの検討結果および薬事戦略相談を通じたPMDAのコメントを得て、本研究の目的である、6カ月間反復吸入投与試験の計画を立てることができ、さらに医師主導治験の形で行う検証試験と薬物動態試験の計画を策定し、分担研究者の中田を研究代表者としてAMED研究費に応募し、幸いに採択通知を受け、次年度よりこれらの試験を開始の予定である。

## 謝辞

CHO細胞由来GM-CSFのご提供と情報の提供をくださった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。

## 参考文献

1. Anderson PM et al. Aerosol granulocyte macrophage-colony stimulating factor: a low toxicity, lung-specific biological therapy in patients with lung metastases. Clin Cancer Res. 1999;5:2316-23.
2. Wylam ME et al. Aerosolized GM-CSF

improves pulmonary function in idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:A889.

3. Tazawa R et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:1142-49.
4. Wylam ME et al. Aerosol granulocyte--macrophage colony stimulating factor for pulmonary alveolar proteinosis. Eur Respir J. 2006;27:585-93.
5. Tazawa R et al. Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy of pulmonary alveolar proteinosis. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181:1345-54.

## IV. 資料

試験計画書 (案 3)

**Sagramostim のカニクイザルにおける 26 週間間歇吸入投与毒性試験**

## 目次

	ページ
1. 表題.....	4
2. 試験目的.....	4
3. 遵守基準及び参照ガイドライン.....	4
4. 動物福祉.....	4
5. 試験委託者.....	4
6. 試験施設.....	5
7. 試験分担責任者.....	5
8. 試験日程.....	5
8.1 試験実施.....	5
8.2 報告書.....	6
9. 被験物質.....	6
10. 対照物質及び媒体.....	7
11. 投与液.....	7
11.1 媒体の調製.....	7
11.2 投与液の調製.....	7
11.3 投与液の分析.....	8
11.3.1 投与条件下における被験物質の安定性.....	8
11.3.2 濃度確認.....	8
12. 試験系.....	8
13. 飼育条件.....	8
14. 飼育材料と分析.....	9
14.1 飼料.....	9
14.2 飲料水.....	9
15. 個体識別.....	10
16. 群分け.....	10
17. 投与量.....	11
18. 投与量設定理由.....	11
19. 投与.....	11
19.1 投与経路.....	11
19.2 投与方法.....	11
19.3 投与回数.....	11
19.4 投与期間.....	11
20. 観察及び検査.....	11
20.1 一般状態.....	12
20.2 体重.....	12
20.3 摂餌量.....	12
20.4 心電図検査.....	12
20.5 血圧測定.....	13
20.6 眼科的検査.....	13
20.7 血液検査.....	13
20.7.1 採血.....	13
20.7.2 血液学的検査.....	14
20.7.3 血液生化学的検査.....	15
20.8 尿検査.....	15
20.9 骨髄検査.....	16
20.10 剖検.....	17

20.11	器官重量	17
20.12	病理組織学的検査	18
20.13	TK測定	19
20.14	抗薬物抗体測定	20
20.15	死亡又は瀕死動物の取扱い	20
21.	統計解析	20
22.	提出する資料	21
22.1	最終報告書草案	21
22.2	最終報告書	21
23.	保存する試験関係資料	21
24.	その他の事項	21
24.1	写真の撮影基準	21
24.2	使用するコンピュータシステム	22
25.	参考文献	22
26.	試験計画書の変更	22
27.	試験計画書の承認	23

添付資料

投与液の分析法（濃度確認）（資料番号 UZ15033-C1）

TK 測定法（資料番号 UZ15033-TK1）

抗薬物抗体測定法（資料番号 UZ15033-抗体価測定）

## 1. 表題

表題: Sagramostim のカニクイザルにおける 26 週間間歇吸入投与毒性試験

英文表題: A 26-Week Intermittent Inhalation Toxicity Study of Sagramostim in Cynomolgus Monkeys

試験番号: UZ15033

## 2. 試験目的

リコンビナントヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 製剤の Sagramostim をカニクイザルに 1 週間連日吸入投与後に 1 週間休薬を設けて 26 週間間歇吸入投与し、その反復投与毒性を調べる。また、被験物質の全身的暴露及び抗薬物抗体産生について評価する。

## 3. 遵守基準及び参照ガイドライン

GLP: 厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(1997 年 3 月 26 日)

毒性試験ガイドライン: 「反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について」(1999 年 4 月 5 日付医薬審第 655 号)

「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」(2010 年 2 月 19 日付薬食審査発 0219 第 4 号)

「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」2012 年 3 月 23 日付薬食審査発 0323 第 1 号

TK ガイダンス: 「トキシコキネティクス (毒性試験における全身的暴露の評価) に関するガイダンスについて」(1996 年 7 月 2 日付薬審第 443 号)

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法 (リガンド結合法) のバリデーションに関するガイドライン (2014 年 4 月 1 日付薬食審査発 0401 第 1 号)

## 4. 動物福祉

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する。なお、試験施設は AAALAC International により認証されている (認証番号: 001107)。

## 5. 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)

委託責任者: 田澤 立之

TEL: 025-227-2022 FAX: 025-227-0377

E-mail: ryushi@med.niigata-u.ac.jp

## 6. 試験施設

名称: 株式会社イナリサーチ<sup>a)</sup>  
 所在地: 長野県伊那市西箕輪 2148 番地 188 (〒399-4501)  
 試験責任者: 藤原 淳  
 TEL: 0265-73-8611 FAX: 0265-73-8612  
 E-mail: fujiwara@ina-research.co.jp

<sup>a)</sup> 病理組織学的検査 (鏡検) は病理東京分室で実施する.

所在地: 東京都千代田区外神田五丁目 2 番 2 号  
 (〒101-0021)

## 7. 試験分担責任者

飼育, 投薬及び臨床観察: \_\_\_\_\_  
 被験物質調製: \_\_\_\_\_  
 投与液の分析: \_\_\_\_\_  
 心電図検査及び血圧測定: \_\_\_\_\_  
 眼科的検査: \_\_\_\_\_  
 血液, 尿及び骨髄検査: \_\_\_\_\_  
 剖検及び器官重量測定: \_\_\_\_\_  
 病理組織標本作製: \_\_\_\_\_  
 病理組織学的検査: \_\_\_\_\_  
 TK 測定用試料の採取: \_\_\_\_\_  
 TK 測定: \_\_\_\_\_  
 抗薬物抗体測定: \_\_\_\_\_

## 8. 試験日程

### 8.1 試験実施

試験開始日: 試験責任者による試験計画書の署名日  
 本試験への動物入手日 (移管日): 2015 年\_\_月\_\_日  
 群分け日: 2015 年\_\_月\_\_日  
 投与期間:  
     雄: 2015 年 7 月 9 日 (開始日) ~ 2016 年 1 月 6 日 (終了日)  
     雌: 2015 年 7 月 16 日 (開始日) ~ 2016 年 1 月 13 日 (終了日)  
 投与液の分析予定日:  
     初回調製時: 2015 年\_\_月\_\_日  
     最終調製時: 2015 年\_\_月\_\_日

検査日程 (\*は予定日を示す) :

検査項目	時期	雄 (年/月/日)	雌 (年/月/日)	
心電図検査*, 血圧測定*	投与開始前	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
	投与 13 週	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
	投与 25 週	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
眼科的検査*	投与開始前	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
	投与 13 週	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
	投与 25 週	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
血液学的検査*	投与開始前	200*/**/**	200*/**/**	
	投与 8 日			
	投与 92 日	200*/**/**	200*/**/**	
	投与 176 日	200*/**/**	200*/**/**	
血液生化学的検査*	投与開始前	200*/**/**	200*/**/**	
	投与 8 日			
	投与 92 日	200*/**/**	200*/**/**	
	投与 176 日	200*/**/**	200*/**/**	
尿検査*	投与開始前	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
	投与 13 週	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
	投与 25 週	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
剖検日	投与期間終了時	2016/1/7	2016/1/14	
病理組織学的検査*		200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**	
TK 測定	投与 1 日	採血	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**
		測定*	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**
	投与 91 日	採血	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**
		測定*	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**
	投与 175 日	採血	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**
		測定*	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**
抗薬物抗体測定	投与開始前	採血	200*/**/**	200*/**/**
		測定*	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**
	投与 4 週	採血	200*/**/**	200*/**/**
		測定*	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**
	投与 12 週	採血	200*/**/**	200*/**/**
		測定*	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**
	投与 26 週	採血	200*/**/**	200*/**/**
		測定*	200*/**/**~**/**	200*/**/**~**/**

## 8.2 報告書

最終報告書草案作成予定日:2016 年 2 月 \_\_\_日

最終報告書作成予定日 (試験責任者による最終報告書の署名日) :

2016 年 3 月 18 日

## 9. 被験物質

名称: Sagramostim  
 提供元: Genzyme Corporation  
 ロット番号: \*\*\*\*

特性:

純度: \_\_\_\_\_ %  
 性状: \_\_\_\_\_  
 使用期限: \_\_\_\_\_  
 保存条件: 遮光, 気密, 冷蔵 (1.0~8.0°C)  
 保存場所: 被験物質保管室の保冷库  
 取扱い上の注意: 作業着, マスク及び手袋を着用して取り扱う.  
 保存用サンプル: 1ロットあたり \_\_ mL  
 残余分の処置: 試験委託者に返却.  
 SOP No.: SOP/TST/01/11

## 10. 対照物質及び媒体

名称: TMS  
 提供元: Genzyme Corporation  
 ロット番号: \_\_\_\_\_  
 保存条件: 遮光, 気密, 冷凍 (-95.0°C~-65.0°C)  
 保存場所: 被験物質保管室の超低温フリーザー  
 取扱い上の注意: 作業着, マスク及び手袋を着用して取り扱う.  
 SOP No.: SOP/TST/01/11

## 11. 投与液

### 11.1 媒体の調製

調製方法: \_\_\_\_\_  
 保存条件: 遮光, 気密, 冷凍 (-95.0°C~-65.0°C)  
 保存場所: 被験物質保管室の超低温フリーザー  
 使用期限: 調製日を含めて \_\_\_\_ 日間  
 SOP No.: SOP/TST/11/31

### 11.2 投与液の調製

調製方法: \_\_\_\_\_  
 保存条件: 遮光, 気密, 冷凍 (-95.0°C~-65.0°C)  
 保存場所: 被験物質保管室の超低温フリーザー  
 使用期限: 調製日を含めて \_\_\_\_ 日間  
 投与後残液の処置: 焼却専用の産業廃棄物容器に廃棄する.  
 SOP No.: SOP/TST/11/31

### 11.3 投与液の分析

#### 11.3.1 投与条件下における被験物質の安定性

実施施設: 株式会社イナリサーチ  
 成績書: Sagramostim 投与液の安定性証明書 (試験番号: \_\_\_\_\_)  
 成績概要: Sagramostim は, \_\_及び\_\_ mg/mL の濃度 (媒体: \_\_\_\_\_) では, 冷凍 (-95.0°C~-65.0°C) で\_\_日間, 引き続き, 室温で 24 時間の保存条件において安定であることが確認されている.

#### 11.3.2 濃度確認

実施施設: 株式会社イナリサーチ  
 実施時期: 初回及び投与 13 週及び最終調製時  
 サンプル: 対照群を除く各群の投与液\_\_mL  
 分析方法: 濃度確認は ELISA 法で行う. 詳細は添付資料 (資料番号: UZ15XXX-C1) に従う.  
 判定基準: 対表示濃度が90.0~110.0%のとき「適」とする.  
 SOP No.: SOP/TST/22/21

### 12. 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: 非げっ歯類の反復投与毒性試験で使用される種である. また, 背景データも豊富であることから選択した.  
 性別及び入手匹数: 雄: 13 匹 雌: 13 匹  
 入手時齢: 雄: 2~3 歳 雌: 2~3 歳  
 検疫及び馴化: 30 日間以上の法定検疫済の動物 (試験施設への搬入日 200\_\_年\_\_月\_\_日) を本試験用とする.  
 馴化期間は本試験への動物入手日から投与開始前日までとし, 馴化期間中の試験操作は後述の「観察及び検査」の規定に従う.  
 投与開始時齢: 雄: 2~3 歳 雌: 2~3 歳  
 投与開始時体重範囲: 雄: 2~5 kg 雌: 2~5 kg  
 SOP No.: SOP/FCL/30/12

### 13. 飼育条件

飼育室: \_\_号飼育室  
 温度: 22.0~28.0°C (目標値: 25°C)  
 湿度: 40.0~80.0% (目標値: 55%)  
 換気回数: 15~17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) 補助食として, 毎日, バナナ約 1/4 本を与える.
給餌時間:	9:00~13:00 の間 (動物入手日は規定しない) ただし, 投与期間中は投与後, 心電図検査日及び眼科的検査日は検査後, 血圧測定日は測定後, 血液検査及び抗体価測定採血日は採血後, TK 採血日は投与後 4 時間以降に給餌する. 剖検当日は給餌しない.
残餌:	翌日給餌の際に, 残餌量測定後廃棄する. ただし, 血液検査採血の前日は, 夕刻 (16:00~18:00) に残餌量を測定後廃棄する.
給水方法:	自動給水装置により自由に摂取させる. ただし, 採尿中はポリプロピレン製の給水器を使用する.
ケージ:	
種類:	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)
収容数:	1 匹/ケージ
洗浄及び消毒:	毎日水洗する. また, 微酸性次亜塩素酸水で 2 週間に 1 回以上噴霧消毒する.

## 14. 飼育材料と分析

### 14.1 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)
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)
混入物の許容基準:	上記の分析において, 試験施設の基準 (SOP/FCL/21/21) に適合していること.

### 14.2 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)

混入物の許容基準: 上記の分析において、試験施設の基準 (SOP/FCL/21/21) に適合していること。

## 15. 個体識別

動物: 生産所において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する。

ケージ: ケージカードに下記の内容を記載し、表示する。

動物入手日: 試験番号, 種, 性別, 試験入手時番号<sup>a)</sup> 及び識別番号

群分け時: 試験番号, 種, 性別, 識別番号, 群名 (投与量), 投与開始日, 動物番号及び群別のカラーラベル<sup>b)</sup> を新たなカードに記載し表示する。

a) 雄は\_\_\_, 雌は\_\_\_の番号

b) 対照群: 白

低用量群: 青

中用量群: 黄

高用量群: 赤

SOP No.: SOP/ANM/11/21, SOP/ANM/22/11

## 16. 群分け

群分け時期: 投与開始\_\_日前

選抜: 群分け前の諸検査の結果を考慮して供試動物を選抜する。

群分け方法: コンピュータのプログラム (Provantis システム) を用いて、群分け日の体重を基に層別にクラス分けし、クラスごとに動物を各群にランダムに割り付ける。割付後、群内でランダムに動物番号を付与する。

群	雄		雌	
	動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	3	PD1M01~PD1M03	3	PD1F01~PD1F03
低用量群	3	PD2M01~PD2M03	3	PD2F01~PD2F03
中用量群	3	PD3M01~PD3M03	3	PD3F01~PD3F03
高用量群	3	PD4M01~PD4M03	3	PD4F01~PD4F03

非供試動物の取扱い:

供試動物として不適切なもの:

不適切と判断した時点で試験から除外し、試験施設の管理とする。

群分け時の残余動物: 投与開始日に試験から除外し、試験施設の管理とする。

SOP No.: SOP/EXP/11/11

**17. 投与量**

群	投与物質名	投与量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	投与容量 ( $\text{mL}/\text{kg}/\text{day}$ )
対照群	媒体	0	0	0.5
低用量群	Sagramostim	5	10	0.5
中用量群	Sagramostim	50	100	0.5
高用量群	Sagramostim	500	1000	0.5

**18. 投与量設定理由**

ヒトにおける臨床用量は  $250 \mu\text{g}/\text{day}$  である。ヒトの体重を  $50 \text{ kg}$  とした場合、用量は  $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であり、当該用量を低用量に設定した。また、高用量は「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」を参照し、臨床暴露量の 50 倍を期待できる用量として設定した。中用量は公比 10 として設定した。

**19. 投与****19.1 投与経路**

投与経路: 吸入  
 選択理由: 臨床適用経路と同一経路を選択した。

**19.2 投与方法**

投与方法: 動物をモンキーチェアに保定し、吸入用マスクを装着する。マスクにネブライザ（パリ・LC スプリントネブライザー、パリ・ジャパン株式会社）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吸入させる。  
 投与液量算出基準: 個体ごとに、各投与日に最も近い測定日の体重を基準とする。  
 選択理由: サルに対する投与方法として適切である。  
 SOP No.: SOP/EXP/24/11

**19.3 投与回数**

投与回数: 1 日 1 回  
 投与時刻: 8:00~13:00（給餌前）  
 選択理由: 臨床適用と同一の投与回数を選択した。

**19.4 投与期間**

投与期間: 26 週間  
 1 週間連日投与、1 週間休薬を繰り返す。  
 選択理由: 臨床適用と同一の投与期間を選択した。

**20. 観察及び検査**

投与及び休薬の日数は、投与開始日を投与 1 日として以降の日を表す。また、投与 1~7 日を投与 1 週として以降の週を表す。さらに、投与開始日の前日を投与開始前 1 日として以前の日を表す。  
 各項目の対象動物は記載がない限り全例とする。

**20.1 一般状態**

観察時期:	投与開始前7日から剖検日まで
観察頻度:	投与期間中は1日2回（投与前と投与後2時間），その他の期間は1日1回（午前）
観察方法:	ケージの外からの個体別観察を基本とし，異常が疑われた場合はケージから動物を取り出して観察を行う。
記録事項:	上記観察時以外にも異常を発見した場合は記録する。
SOP No.:	SOP/GNR/51/11

**20.2 体重**

測定時期及び測定頻度:	
投与開始前:	投与開始前7日
投与期間中:	投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92, 99, 106, 113, 120, 127, 134, 141, 148, 155, 162, 169, 175 及び 182 日 なお，投与期間中は投与前，その他の期間は給餌前に測定する。
使用機器:	デジタル台ばかり LDS-150H（株式会社島津製作所）
SOP No.:	SOP/EXP/41/11

**20.3 摂餌量**

測定時期及び測定頻度:	投与開始前7日に給餌量，その後毎日残餌及び給餌量，剖検日に残餌量を測定する。 1日あたりの摂餌量を算出し，それぞれ給餌量測定日の摂餌量とする。
使用機器:	台ばかり TANITA1345（株式会社タニタ）
SOP No.:	SOP/EXP/41/21

**20.4 心電図検査**

検査時期:	投与開始前，投与13週及び25週
解析ポイント:	
投与開始前:	投与期間中の投与前及び投与後の解析時間帯に可能な限り合わせる。
投与期間中:	投与前及び投与後2時間（投与後1.5～2.5時間）
使用機器:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ホルター心電計（QR2100及びQR2500，フクダ エム・イー工業株式会社）</li> <li>- 心電図自動解析システム（HS1000，フクダ エム・イー工業株式会社）</li> </ul>
検査方法:	無麻酔下で第II誘導の心電図を，所定の日に解析ポイントを含めて連続採取する。ホルター心電計は各測定日の前日に装着させ，測定終了後に取り外す。心電図は，所定の日々の2つの解析ポイント

トに近い安定して連続した 5 波形を解析システムを用いて解析し、PR 間隔[ms]、QRS 間隔[ms]及び QT 間隔[ms]を求める。また、Bazett の補正式  $[QTc = QT/(RR/1000)^{1/2}]$  により QTc を算出し、60000/RR により心拍数 (回/分) を算出する。さらに、不整脈などの所見を記録する。

馴化: 各検査時期の前に、測定操作に対する馴化を行う (ジャケット装着の馴化を実施する)。

SOP No.: SOP/EXP/53/31

## 20.5 血圧測定

測定時期: 投与開始前、投与 13 週及び 25 週

測定ポイント:

投与開始前: 投与期間中の投与前及び投与後の解析時間帯に可能な限り合わせる。

投与期間中: 投与前及び投与後 2 時間 (投与後 1.5~2.5 時間)

使用機器: 血圧計 (BP-88V, コーリンメディカルテクノロジー株式会社)

測定方法: 動物をモンキーチェアに固定し、上腕部にカフを装着し、血圧計を用いて非観血的に測定する。

SOP No.: SOP/EXP/53/11

## 20.6 眼科的検査

検査時期: 投与開始前、投与 13 週及び 25 週

使用機器:

- スリットランプ SL シリーズ (興和株式会社), スリットランプ SM-50F 又はスリットランプマイクロスコープ SM-70N (株式会社タカギセイコー)
- ナイツハロゲン双眼倒像検眼鏡 IO- $\alpha$ , ナイツ双眼倒像検眼鏡 IO- $\alpha$  LED (以上, 株式会社ナイツ) 又はオメガ 200 額带式双眼倒像検眼鏡 (ハイネ社)
- 眼底カメラ TRC-50 シリーズ (株式会社トプコンメディカルジャパン) 又は手持ち式デジタル眼底カメラ GENESIS-Df (興和株式会社)

検査方法: 散瞳剤 (ミドリン<sup>®</sup>P, 参天製薬株式会社) 点眼後、塩酸ケタミン (約 0.1 mL/kg, 動物用ケタミン注 5% 「フジタ」, フジタ製薬株式会社) の筋肉内投与で麻酔し、スリットランプ及び双眼倒像検眼鏡を用いて、前眼部、中間透光体及び眼底を検査する。

SOP No.: SOP/EXP/51/11

## 20.7 血液検査

### 20.7.1 採血

採血時期: 投与開始前、投与 8 日、92 日及び 176 日

採血部位: 大腿静脈