

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
- 末梢血単核細胞採取: 約 3 mL

採血方法:

- 血液学的検査及び血液生化学的検査:
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する。
- 末梢血単核細胞採取: 無麻酔で、ヘパリン処理した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）を用いて採血する。採取した血液は試験番号 UZ15XXX に移管する。

20.7.2 血液学的検査

検査時期: 投与開始前, 投与 8 日, 92 日及び 176 日

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 分注する。
- 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 (約 1600 ×g, 10 分, 4°C) して血漿を採取する。
- 特記事項: 全例について、May-Grunwald-Giemsa 染色法による血液塗抹標本を作製する。

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
平均赤血球血色素量	MCH	pg	(HGB/RBC)・10	ADVIA120
平均赤血球血色素濃度	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

項目	略語	単位	測定方法	使用機種
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)

SOP No.: SOP/SPC/11/11, SOP/LBR/20/12, SOP/LBR/20/13, SOP/LBR/31/12, SOP/LBR/31/33, SOP/LBR/31/52

20.7.3 血液生化学的検査

検査時期: 投与開始前, 投与 8 日, 92 日及び 176 日

採血部位: 大腿静脈

採血量: 約 3 mL

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, 以下日立 7180)

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) して血漿を採取する.

試料の保存: 試料の一部は予備試料として -65°C 以下で凍結保存し, 最終報告書草案提出後に廃棄する.

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

SOP No.: SOP/SPC/11/11, SOP/LBR/20/12, SOP/LBR/20/13, SOP/LBR/41/12

20.8 尿検査

検査時期: 投与開始前, 投与 13 週及び 25 週

使用機器:

- 尿比重屈折計 URC-JE (株式会社アタゴ, 以下 URC-JE)
- 日立 7180
- 尿自動分析装置 クリニテック 500 (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 クリニテック 500)

試験紙法:

試験紙 (マルティスティックス®SG-L: シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社) 使用

採尿方法:

投与後, 速やかに採尿を開始する。
投与開始前及び休薬 4 週については, 投与 4 週の採尿時刻に相当する時間帯に採尿を開始する。

新鮮尿:

採尿開始後 4 時間まで尿を蓄積し, ここから採尿用スポイドを用いて検査用に約 2 mL 以上採取する。規定量が採取できなかった場合は採尿開始後 8 時間まで継続して採尿を行う。この場合, 規定量が採取できた時点で, 新鮮尿の採取を終了する。

蓄積尿:

採尿開始後 24 時間蓄積した全量を採取し, 採尿用スポイドを用いて検査用に約 3 mL 以上分取する。分取後の残尿はメスシリンダーを用いて尿量を測定後, 廃棄する。

尿の処理:

沈渣及び電解質測定では遠心分離 (約 400×g, 5 分, 4°C) による沈渣及び上清をそれぞれを用いる。

検査終了後の尿:

蓄積尿の一部は予備試料として-20°C 以下で凍結保存し, 最終報告書草案提出後に廃棄する。

検査項目:

項目	略語	単位	測定方法	検査対象	使用機種
尿量	Vol.	mL/day	計量	蓄積尿	-
色調	Col.	-	目視	蓄積尿	-
比重	S.G.	-	屈折法	蓄積尿	URC-JE
pH	-	-	試験紙法	新鮮尿	クリニテック 500
蛋白	Pro.	-	試験紙法	新鮮尿	クリニテック 500
糖	Glu.	-	試験紙法	新鮮尿	クリニテック 500
ケトン体	Ket.	-	試験紙法	新鮮尿	クリニテック 500
ビリルビン	Bil.	-	試験紙法	新鮮尿	クリニテック 500
潜血	Occ.	-	試験紙法	新鮮尿	クリニテック 500
ウロビリノーゲン	Uro.	Ehrlich unit/dL	試験紙法	新鮮尿	クリニテック 500
沈渣	-	-	Sternheimer 染色後鏡検	新鮮尿	-
ナトリウム	NA	mEq/day	イオン選択電極法	蓄積尿	日立 7180
カリウム	K	mEq/day	イオン選択電極法	蓄積尿	日立 7180
クロール	CL	mEq/day	イオン選択電極法	蓄積尿	日立 7180

SOP No.:

SOP/SPC/21/11, SOP/LBR/20/12, SOP/LBR/20/13, SOP/LBR/21/11, SOP/LBR/21/12, SOP/LBR/21/13, SOP/LBR/41/12

20.9 骨髓検査

対象動物:

死亡例及び瀕死例を除く剖検例全例

検査時期:

投与期間終了時及び休薬期間終了時 (剖検時)

骨髓採取部位:

肋骨

使用機器:

- 骨髓像分類計数装置 (LADIC-300, シスメックス株式会社)
- 自動血球計数装置 (K-4500, シスメックス株式会社)

有核細胞数算定:

対象動物全例について、剖検時に、マイクロディスペンサーを用いて骨髓を採取し、希釈液 (セルパック, シスメックス株式会社) で 300 倍希釈する。夾雑物を除去後、自動血球計数装置を用いて有核細胞数を測定する。

骨髓塗抹標本の作製:

対象動物全例について、サイトスピン法を用いて骨髓の塗抹標本を作製し、May-Grunwald-Giemsa 染色の二重染色を施す。

骨髓塗抹標本の観察:

作製したすべての動物において実施する。

観察方法:

光学顕微鏡及び骨髓像分類計数装置を用いて、各 500 個の骨髓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 比を算出する。

赤芽球系:

前赤芽球, 好塩基性赤芽球, 多染性赤芽球, 正染性赤芽球, 赤芽球系分裂細胞

顆粒球系:

骨髓芽球, 前骨髓球, 好中性骨髓球, 好中性後骨髓球, 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

SOP No.:

SOP/LBR/31/41, SOP/LBR/31/42, SOP/LBR/31/11

20.10 剖検

剖検時期:

投与期間終了時 (最終投与後 1 週間の休薬終了日の翌日)

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、可能な限り採血する。採取した血液は試験番号 UZ15XXX に移管する。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、剖検を行う。

SOP No.:

SOP/NCR/11/11, SOP/NCR/21/11, SOP/NCR/30/11, SOP/NCR/53/11, SOP/NCR/71/11

20.11 器官重量

測定時期:

剖検時

使用機器:

電子天秤 UX620H (株式会社島津製作所)

測定器官:

病理組織学的検査の項の表に記載

特記事項:

剖検日に体重を測定 (使用機器は体重の項を参照) し、これを基に器官体重比重量を算出する。

SOP No.:

SOP/NCR/61/11

20.12 病理組織学的検査

固定: 剖検時に下表に示すすべての器官・組織を固定する。使用する固定液は 10 vol%中性緩衝ホルマリン液。
ただし、精巣、眼及び視神経はあらかじめ以下の固定液に浸漬した後、10 vol%中性緩衝ホルマリン液に固定する。

精巣: FSA (Formalin-sucrose-acetic acid) 液

眼及び視神経: リン酸緩衝 1%ホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド液

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) 染色標本作製する。

鏡検は作製したすべての標本について実施する。

対象器官・組織:

器官・組織	固定	重量測定	標本作製	
			HE 標本	備考
心臓	○	○	○	左室乳頭筋, 右室壁, 冠状動脈と大動脈弁を含む部位
大動脈 (胸部)	○	-	○	
胸骨	○	-	○	
胸骨骨髄		-		
大腿骨	○ 左右	-	○ 左	遠位端関節軟骨, 骨幹部
大腿骨骨髄	○ 右	-	○ 右	
胸腺	○	○	○	
脾臓	○	○	○	
顎下リンパ節	○	-	○	
腸間膜リンパ節	○	-	○	
肺門リンパ節	○ 左右	-	○ 左右	
気管	○	-	○	
気管支	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	左前葉, 右後葉 or 左右の前葉, 中葉及び後葉
肺				
舌	○	-	○	
顎下腺	○ 左右	○ 左右合計	○ 左	
耳下腺	○ 左右	-	○ 左	
食道	○	-	○	
胃	○	-	○	噴門部, 胃体部, 幽門部
十二指腸	○	-	○	
空腸	○	-	○	
回腸	○	-	○	
パイエル板				
盲腸	○	-	○	
結腸	○	-	○	
直腸	○	-	○	
肝臓	○	○ 胆汁を除去した胆嚢を含む	○	外側左葉, 胆嚢を含む内側右葉
胆嚢			○	
膵臓	○	○	○	
腎臓	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	PAS 染色標本 (左) も作製
膀胱	○	-	○	
下垂体	○	○	○	
甲状腺	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	
上皮小体			○ 左	

器官・組織	固定	重量測定	標本作製	
			HE 標本	備考
副腎	○左右	○左右別	○左右	
精巣	○左右	○左右別	○左右	
精巣上部	○左右	○左右別	○左右	
前立腺	○	○	○	
精嚢	○	○	○	
卵巣	○左右	○左右別	○左右	
子宮	○	○	○	体部, 頸部
膣	○	-	○	
脳	○	○	○	大脳 [前頭葉, 頭頂葉 (基底核及び海馬を含む), 後頭葉], 小脳, 橋, 延髄
脊髓 (胸部)	○	-	○	
坐骨神経	○左	-	○左	
眼	○左右	-	○左右	
視神経	○左右	-	○左右	
涙腺	○左右	-	○左	
骨格筋 (大腿二頭筋)	○左	-	○左	
皮膚 (胸部)	○	-	○	
乳腺 (雌のみ)	○	-	○	
剖検で異常の認められた器官・組織	○	-	○	

○: 実施

左右: 左右を対象

-: 実施しない

左: 左右いずれか一方を対象, 原則は左とする

右: 左右いずれか一方を対象, 原則は右とする

SOP No.: SOP/NCR/71/11, SOP/SPC/00/11, SOP/SPC/41/11, SOP/HST/11/10, SOP/HST/21/11, SOP/HST/21/12, SOP/HST/31/11, SOP/HST/41/11, SOP/HST/50/11, SOP/HST/51/11, SOP/HST/52/11, SOP/HST/71/11

20.13 TK測定

採血対象:

全例

採血時期及び採血時間:

規定の採血時間の前後 1 分間を許容範囲とする。

投与 1 日:

投与後 15 分, 1, 2, 6 及び 24 時間 (5 ポイント)

投与 91 日及び 175 日:

投与前, 投与後 15 分, 1, 2, 6 及び 24 時間 (6 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) を用いて採血する。

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 (約 1600×g, 10 分, 4°C) して血漿を分取する。分取した血漿はポリプロピレン製チューブに分取し, 可及的速やかに凍結保存する。

血漿の保存条件:

凍結 (-95°C~-65°C)

血漿の保存場所:

フリーザー室の超低温フリーザー

測定方法: ELISA 法により、各採血ポイントにおける血漿中 ABCDE 濃度を測定する。詳細は添付資料（資料番号 UZ15XXX-TK1）に従う。

SOP No.: SOP/SPC/11/11, SOP/LBR/70/21, SOP/LBR/72/11

20.14 抗薬物抗体測定

採血対象: 全例
対照群の動物についても同様に採血し、採取した血液は廃棄する。

検査時期: 投与開始前、投与 4 週、12 週及び投与期間終了時

採血部位: 大腿静脈

採血量: 約 6 mL（血清として 2 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）を用いて採血する。

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（約 1600 ×g, 10 分, 4°C）して血清を分取する。分取した血清は約 1 mL × 2 本に分注し、1 本を速やかに凍結する。他の 1 本は試験番号 UZ15XXX に移管する。

血清の保存条件: 凍結（-95°C～-65°C）

血清の保存場所: フリーザー室の超低温フリーザー

測定方法: ELISA 法により、各採血ポイントにおける抗 ABCDE 抗体を測定する。詳細は添付資料（資料番号 UZ15XXX-抗体価測定）に従う。

20.15 SOP No.: SOP/SPC/11/11, SOP/LBR/51/11, SOP/LBR/70/21, SOP/LBR/72/11 死亡又は瀕死動物の取扱い

死亡動物: 発見後可及的速やかに体重を測定し、剖検を行う。また、器官・組織を固定し、病理組織学的検査を行う。試験操作については該当項の規定に従う。

瀕死動物: 体重を測定後、可能な限り採血し、血液学的検査及び血液生化学的検査を行う。採血後に麻酔下で放血致死させて、剖検を行う。また、器官・組織を固定し、病理組織学的検査を行う。試験操作については該当項の規定に従う。

SOP No.: SOP/MRB/00/11

21. 統計解析

投与期間終了時まで得られた各計量値について、Dunnnett 法によって対照群と各被験物質群との間で平均値の検定を行う。

左右別で測定した器官重量については、左右の合算値についてのみ、統計処理を実施する。

1 群あたりの計量値が 2 例以下の場合は統計解析から除外する。

検定はいずれも両側で、有意水準 5% で対照群との差が認められた場合に有意な変動とし、表中には 5% と 1% に区別して示す。

なお、休薬期間中又は休薬期間終了時に得られた各計量値については、有意差検定は行わない。

SOP No.: SOP/CNP/32/41

22. 提出する資料

試験計画書及び最終報告書は原本を株式会社イナリサーチで保存し、原本の写しを試験委託者へ提出する。

22.1 最終報告書草案

使用言語: 日本語

提出物: Word ファイル及び PDF ファイル (e-mail で送信)

22.2 最終報告書

使用言語: 日本語

部数: 1 部 (写し)

その他の提出物:

- 電子媒体 (PDF ファイル)
- GLP 陳述書 (試験責任者署名)
- 最終報告書と PDF ファイルが同一であることの証明書

23. 保存する試験関係資料

保存対象: 試験計画書, 最終報告書草案及び最終報告書, 生データ, その他の記録文書, 被験物質及び下記の標本類

- 血液塗抹標本
- 骨髄塗抹標本
- 10 vol%中性緩衝ホルマリン液固定器官・組織
- 病理組織標本 (パラフィンブロック及びプレパラート)

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は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

24. その他の事項**24.1 写真の撮影基準**

下記項目において, 投薬の影響が疑われる変化の代表例を可能な限り写真撮影する.

- 一般状態
- 眼科的検査
- 剖検

24.2 使用するコンピュータシステム

Provantis システム: 群分け, 体重, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 尿検査 (クリニテック 500 及び日立 7180 で測定する項目), 骨髄細胞分類, 器官重量及び病理組織学的検査, 図表作成

INATOX-DP (SAS) システム: 統計解析及び図表作成

25. 参考文献

26. 試験計画書の変更

試験計画書を変更する場合はその都度, 試験責任者が試験計画変更書を作成し, 試験委託者に連絡する.

稀少肺疾患研究班

Rare Lung Disease Consortium Japan Chapter

SK-1401 (rhGM-CSF 吸入薬)

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

Pulmonary Alveolar Proteinosis GM-CSF Inhalation Efficacy Trial in Japan; PAGE-J trial

治験実施計画書案

Ver. 0.2.0: 2014 年 9 月 10 日

Ver. 0.2.1: 2014 年 12 月 14 日

Ver. 0.2.2: 2014 年 12 月 16 日

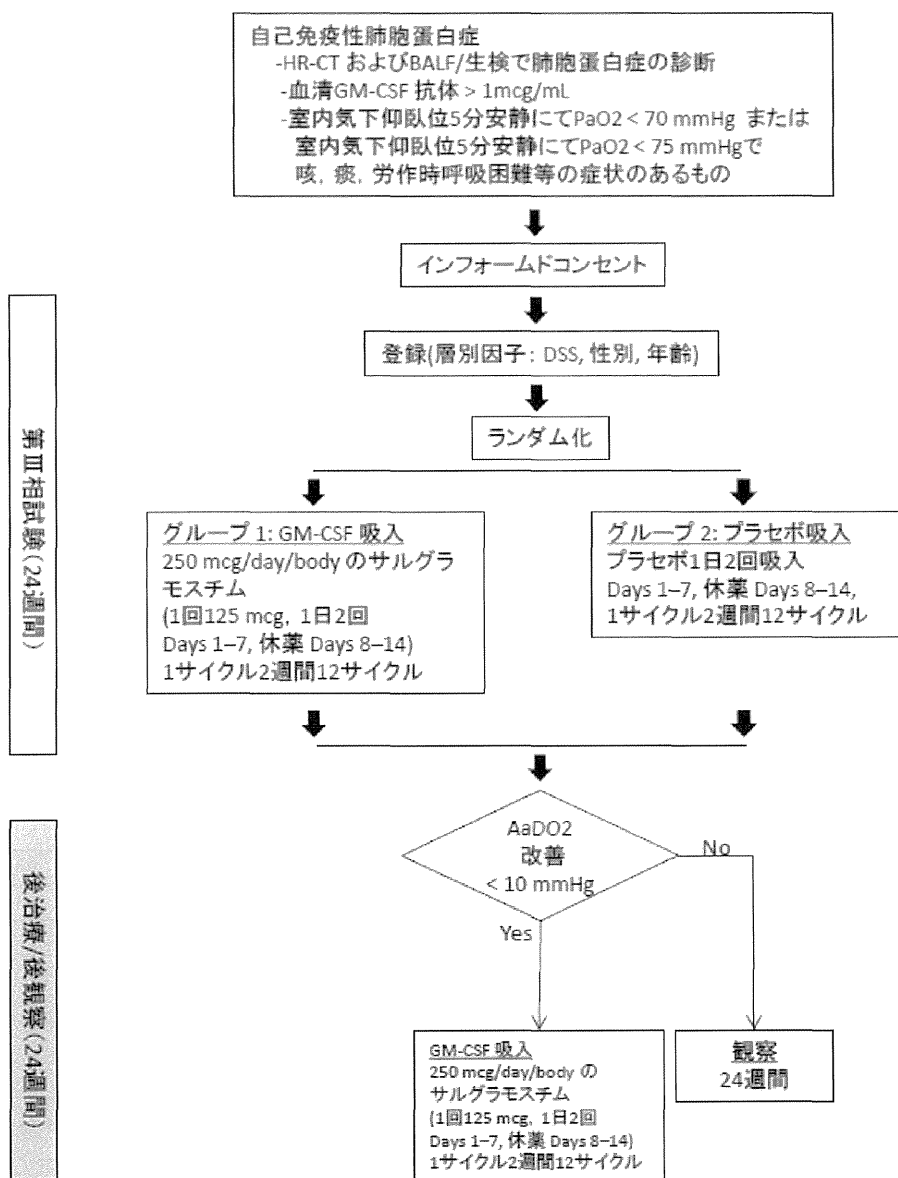
目次

0. 試験実施計画書の概要	4
0.1. スキーム	4
0.2. 目的	4
0.3. 対象	5
0.4. 治療	5
0.5. 予定登録数と研究期間	6
0.6. 問い合わせ先	6
1. 治験の目的	7
2. 緒言—治験計画の経緯及び背景	7
2.1 背景と意義	7
2.2 GM-CSF およびその吸入療法の根拠	8
2.3 GM-CSF 吸入治療に関する予備的データ	9
3. 略号および用語の定義一覧	10
3.1 略語および用語の定義	10
3.2 疾患重症度分類の定義	11
3.3 奏効例の定義	11
4. 遵守事項	11
5. 治験の方法	12
5.1 試験デザイン	12
5.2 症例選択基準	12
5.3 除外基準	12
5.4 治療方法	12
5.5 併用療法	13
5.6 被験者の選定 登録 同意 入院	13
6. 試験薬の薬剤情報, 相互作用, 投与方法, 毒性, および用量調整	15
6.1 試験薬の薬剤情報	15
6.2 肺胞蛋白症への適応 (投与経路, 用量, 副作用)	16
7. 中止基準	17
7.1 個々の被験者に対する治験の中止	17
7.2 治験の中止基準	17
8. 調査—観察・検査・評価項目の方法と時期	17
8.1 調査項目	17
8.2 調査スケジュール	19
9. 評価	19
9.1 主要評価項目	19
9.2 副次的評価項目	19
10. 試験実施予定期間	20

11. データ管理-----	20
11.1 登録・割付-----	20
11.2 データ収集-----	21
11.3 モニタリングと監査-----	21
12. 治験の倫理的事項および管理の側面-----	22
12.1 検査に伴うリスクおよび不快感-----	22
12.2 秘密保持にかかわるリスク-----	23
12.3 考えられる利益と不利益-----	23
12.4 治験実施計画書および同意説明文書-----	23
12.5 モニタリングおよび品質保証-----	23
12.6 利益相反および研究資金について-----	23
12.7 患者の費用負担-----	24
12.8 健康被害の補償および保険への加入-----	24
12.9 施設の倫理審査委員会（機関審査委員会）の承認-----	24
12.10 患者の保護-----	25
12.11 新たな情報の提供-----	26
12.12 他の医師への治験参加の通知-----	26
12.13 被験者への情報および同意-----	26
12.14 治験参加の中止，中断，終了-----	27
13. プロトコル逸脱・違反-----	27
13.1 試験計画書からの逸脱の報告-----	28
14. 統計的事項-----	28
14.1 解析対象集団の定義-----	28
14.2 主要評価項目-----	29
14.3 副次評価項目-----	29
14.4 予定症例数-----	29
14.5 予定症例数と設定根拠-----	29
15. 付随研究-----	32
16. 治験実施体制-----	32
16.1 組織-----	32
16.2 治験調整委員会-----	32
16.3 治験調整事務局-----	33
16.4 治験薬提供者-----	33
16.5 統計解析担当者-----	33
16.6 施設治験責任医師-----	33
16.7 安全性監視委員会-----	33
16.8 治験実施施設・研究者一覧（連絡先情報）-----	33
17. 文献-----	36

0. 概要

0.1. スキーム



0.2. 目的

- ・ 主要研究目的
 - 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 AaDO2 改善における有効性の確認
- ・ 二次研究目的
 - a. 日本人健常成人男性 9 例での単回 GM-CSF 吸入での薬物動態試験
 - b. プラセボ群—GM-CSF 吸入群間の 24 週吸入前後の二次評価項目, すなわち, 徴候(QOL, 息切れ, 咳), 酸素療法の必要性, 肺機能(%VC, %DLCO, PaO₂), 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.) の差異の比較評価
- ・ 試験計画
 - 第Ⅲ相, ランダム化, 二重盲検, プラセボ/コントロール, 安全性/有効性試験

0.3. 対象

症例選択基準

以下の a.~e. の全てを満たす症例とする。

- a. 年齢 16 歳以上 80 歳以下（登録日を基準）の患者。性別は問わない。
- b. 文書により本人の同意を得られる者。未成年者の場合は代諾者の承諾を得られる者。
- c. 治療前、治療中、治療後に評価のため、短期間検査入院が可能な症例
- d. 自己免疫性肺胞蛋白症の患者、すなわち HRCT で両肺に本症に合致する陰影を呈し、以下の A または B を満たし血清抗 GM-CSF 自己抗体価が $1 \mu\text{g/ml}$ 以上で陽性の患者。
 - A: 経気管支肺生検ないし外科的肺生検（胸腔鏡下肺生検等）で典型的病理所見（PAS 陽性蛋白様物質の肺胞内貯留）
 - B: 気管支肺胞洗浄液で典型的所見（白濁、蛋白様物質、マクロファージ減少）
- e. 安静時 $\text{PO}_2 < 70\text{mmHg}$ の症例 または安静時 $\text{PO}_2 < 75\text{mmHg}$ で咳、痰、労働作時呼吸困難等の症状のある症例

除外基準

下記 a.~n.のうち、いずれか 1 項目以上を満たす患者

- a. 白血球数 $12000/\text{mm}^3$ 以上の患者
- b. 38°C 以上の発熱の患者
- c. Grade 2 以上の浮腫の患者
- d. 骨髄系悪性疾患の患者
- e. うっ血性心不全、狭心症、出血傾向、原発性肺癌、転移性肺癌、気管支喘息などの合併症を有し治療評価困難と判定される場合
- f. 他のサイトカイン療法を受けている患者
- g. 妊娠および妊娠している可能性のある女性、授乳中の女性、あるいは試験中に妊娠を希望する女性
- h. 治療開始日よりさかのぼって 6 ヶ月以内に全肺洗浄、反復区域洗浄療法、リツキシマブによる治療を受けた患者
- i. 気管支喘息の既往のある患者
- j. 薬物の吸入治療後に重篤あるいは説明不能な有害事象の既往のある患者
- k. 続発性肺胞蛋白症あるいは遺伝性肺胞蛋白症と診断された患者
- l. 重症度分類 1 の患者または重症度分類 5 の患者
- m. 過去に GM-CSF 吸入療法を受けたことがある患者
- n. その他担当医師が不相当と判断した症例（例えば、治療を完遂することが困難と考えられるような症例や、非協力的な患者）

0.4. 治療

薬剤：サルグラモスチム（酵母由来ヒトリコンビナント GM-CSF）

用量、用法：

グループ 1

$125 \mu\text{g}$ /回、 1 日 2 回吸入、7 日間吸入後、7 日間休薬の 2 週間を 1 コースとして、12 回繰り返し、計 24 週、

グループ 2

プラセボ 1 日 2 回吸入、7 日間吸入後、7 日間休薬の 2 週間を 1 コースとして、12 回繰り返し、計 24 週

後治療/後観察（グループ 1、グループ 2 の両グループの被験者を対象とする）

・治療 24 週後、治療前と比し AaDO₂ 改善が 10mmHg 未満のとき、
 $125 \mu\text{g}$ /回、 1 日 2 回吸入、7 日間吸入後、7 日間休薬の 2 週間を 1 コースとして、12 回繰り返し、計 24 週。

- ・治療 24 週後、治療前と比し AaDO₂ 改善が 10mmHg 以上のとき、無治療で 6 週毎の経過観察を行う。
 - ・吸入中増悪時
- 治療開始後 50 週までの間に、AaDO₂ が 15mmHg 以上増悪した被験者は、試験から脱落として、全肺洗浄による治療を行う。

評価方法

観察時期：

visit 0 ベースライン	visit 1 治療直前	visit 2 治療開始 6 週後
visit 3 治療開始 12 週後	visit 4 治療開始 18 週後	visit 5 治療開始 24 週後
visit 6 治療開始 26 週後	visit 7 治療開始 32 週後	visit 8 治療開始 38 週後
visit 9 治療開始 44 週後	visit 10 治療開始 50 週後	

観察項目：臨床症状、胸部 X 線写真、胸部 CT (HRCT) 検査、動脈血液ガス分析、血液学的検査、血液生化学的検査、血中 GM-CSF 濃度、呼吸機能検査、6 分間歩行試験、気管支肺胞洗浄液検査 (オプション)。

主要評価項目：AaDO₂

副次的評価項目：徴候 (QOL, 息切れ, 咳), 酸素療法の必要性, 肺機能 (%VC, %DLCO, PaO₂), 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)。

0.5 予定登録数と研究期間

目標症例数

60 例

実施予定期間

2016 年 (平成 28 年) 1 月～2018 年 (平成 30 年) 2 月

0.6 問い合わせ先

研究全体に関すること

研究事務局 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

統計に関すること

新潟大学医歯学総合病院プロトコルデータセンター

肺胞蛋白症に関すること

稀少肺疾患研究班

各参加施設に関すること

北海道大学 東北大学 千葉大学 国立国際医療研究センター 杏林大学

新潟大学 愛知医科大学 京都大学 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

倉敷市立児島市民病院 長崎大学

データ管理に関すること

新潟大学医歯学総合病院プロトコルデータセンター

画像所見に関すること

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター放射線科

0.7 研究費資源

研究費：平成 27 年度日本医療研究開発機構研究費に応募

関係会社：ジェンザイム・ジャパン株式会社

Genzyme, Inc.

1. 治験の目的

本治験の目的は、自己免疫性肺胞蛋白症の新規治療薬として GM-CSF 吸入製剤の薬事法における製造販売承認のために必要なデータを得ることである。2004 年～2008 年の本邦における全国 9 施設による第 II 相臨床研究によって、GM-CSF 吸入治療の自己免疫性肺胞蛋白症に対する有効性および安全性が示唆されたが、①本剤が本邦では未承認であり外国で市販されている注射用製剤を用いたこと、②無治療観察期間のデータを internal control として AaDO2 の改善を解析したこと、などから、安全性、有効性、薬物動態について、偽薬群を置いた第 III 相試験を含めて、症例数を増やしての検討が必要である。本治験の主な目的（主要評価項目）は、本剤について、自己免疫性肺胞蛋白症患者における、安全性と AaDO2 の改善に関する有効性について、30 例の実薬群と 30 例の偽薬群の比較をして、確認することである。副次項目として、徴候、酸素療法の必要性、肺機能、画像所見、血清マーカーについても検証する。具体的には、実薬群 30 例、偽薬群 30 例に、1 回 125mcg/日 2 回 7 日間隔週投与を 12 回繰り返して、治療開始後 6 週毎に 50 週後まで検討する。

2. 緒言—治験計画の経緯及び背景

2.1 背景と意義

2.1.1 肺胞蛋白症の病因と GM-CSF

自己免疫性肺胞蛋白症は、肺胞及び終末気管支に過剰なサーファクタントの貯留がおり、進行性の呼吸困難を来す疾患である。好発年齢は 40～50 歳代で、男女比は約 2.2 : 1 である。稀少疾患であり、我が国の人口 100 万人あたりの罹患率は 0.49、有病率は 6.0 であり、地域差は認められていない(文献 1-3)。中田らは 1999 年に、病因物質として 患者の肺及び血液中に抗顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) 中和自己抗体が大量に存在することを発見し(文献 4,5)、その検出法の特許を取得した(特許第 4372904 号、文献 6)。GM-CSF の受容体を欠く先天性の肺胞蛋白症が存在することや、GM-CSF やその受容体のノックアウトマウスが肺胞蛋白症を起こすことから(文献 7-9)、本症の発症に GM-CSF の関与が想定されてきたが、GM-CSF 中和自己抗体の発見により、本疾患の病因は、肺胞マクロファージの分化・機能維持に重要な肺の GM-CSF が自己抗体により中和され(文献 10)、肺胞マクロファージのサーファクタント分解能が低下するためであると考えられるようになり、2009 年に、患者の血漿から精製された GM-CSF 抗体を投与したカニクイザルの肺で本症の病理所見が確認された(文献 11)。

2.1.2 肺胞蛋白症の新規治療薬剤としての GM-CSF

一方、患者の約 3 分の 1 は、呼吸不全に陥るが、治療は、全身麻酔下の全肺洗浄法や気管支鏡での反復区域洗浄が一般的で、患者の負担や苦痛が大きく、新治療法が望まれていた。1996 年にオーストラリアの Seymour らが始めた GM-CSF 連日皮下注療法(文献 12)は、肺洗浄によることなく、重症患者の 44%に呼吸機能の改善をもたらすことが報告された(文献 13, 14)。米国での中等症患者 25 例を対象に皮下注射の第 II 相試験でも、48%の奏効率がみられた(文献 17)が、注射部位の副反応が高頻度に見られた(文献 15)。2000 年 12 月より我々は重症患者 3 例に GM-CSF 吸入療法を試み(250 μ g/日、7 日間吸入後 7 日間休薬を 12 クール)、呼吸機能が大幅に改善すること、また、肺胞洗浄液中の自己抗体が減少することを確認した(文献 16)。その後、2003 年の 1 2 週間、連日 125 μ g 吸入の早期 II 相試験を経て、2004 年から 2008 年まで全国 9 施設共同多施設臨床試験(第 II 相)を企画し 35 症例に対し、250 μ g/日 8 日間吸入+6 日間休薬を 6 クール、つづいて 125 μ g/日 4 日間吸入+10 日間休薬の治療を 6 クール治療を行った。その結果、治療完遂 35 例中、24 例で奏効し、重篤な有害事象はみられなかった(文献 17)。

2.1.3 GM-CSF 吸入製剤の開発の環境

上の第 II 相試験から、GM-CSF 吸入療法は肺胞蛋白症の治療として大変有望と考えられるが、GM-CSF は本邦では未承認の薬剤であり、欧米でも吸入薬としては承認されてい

ない。さらに 2004 年より大腸菌由来組み換え GM-CSF の製造が中止され、酵母由来組換え製剤が現在、唯一、欧米で上市されている製剤である。幸いに、この酵母由来製剤を製造販売している Genzyme 社が、2013 年に、本症を適応とした GM-CSF 吸入治療薬の開発への協力の意向をしめし、治験薬概要書の提供や、GM-CSF 製剤の提供に同意している。今般、この Genzyme 社の提供による GM-CSF 吸入製剤を用いた医師主導治験を計画した。研究期間内に自己免疫性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入製剤による治療を実験群偽薬群それぞれ 30 例の患者で試み、有効性と安全性を確認する。

2.1.4 GM-CSF 吸入製剤開発の意義

自己免疫性肺胞蛋白症は、これまで標準治療として全肺洗浄を繰り返す以外に有効とされる治療法がなかった。全肺洗浄は全身麻酔を要し、患者に大きな負担となり、呼吸不全、心不全や肺感染症を合併した患者では施行が難しい場合もある。また、治療には時間と手術室の確保、麻酔科の支援、体外循環スタッフなど多くのリソースを要する。GM-CSF 吸入療法は、外来診療で可能で、自宅で毎日 15～30 分間の吸入を 24 週間行うだけで、効果が期待できる簡便な治療であり、肺胞蛋白症患者の治療法に新しい重要な選択肢をもたらすと考えられる。

2.2 GM-CSF およびその吸入療法の根拠

2.2.1 GM-CSF について

顆粒球・マクロファージコロニー形成刺激因子 (GM-CSF) は 127 個のアミノ酸残基よりなる分子量約 23kDa の糖蛋白であり、1991 年にマウス肺培養上清より精製され、サイトカインとしての機能をもつ。細胞表面の α 鎖 (CD116) および、 β 鎖 (CD131) よりなる受容体に結合し、JAK (Janus activating kinase) 2 や STAT (signal transducer of activation and transcription) 5 等を含む細胞内信号伝達系を介して、顆粒球・マクロファージの分化増殖に関与する。

2.2.2 GM-CSF と肺胞マクロファージ

In vitro の系で、GM-CSF は、ヒトの肺胞マクロファージにおける、3H チミジンの取り込みと細胞核を増やすことが示されている。ヒト肺組織培養液も同様の効果を示し、この効果は GM-CSF 抗体で阻害される、M-CSF にはこうした作用はみられない (文献 18)。

2.2.3 GM-CSF ノックアウトマウスの肺胞マクロファージ

GM-CSF のノックアウトマウスの報告は 1994 年に出され、骨髄・血液細胞では病的変化はみられなかったが肺胞蛋白症様の病変が肺にみられた (文献 9)。このマウスの肺胞マクロファージでは、転写因子 PU.1 の発現が低下しているが、肺局所で GM-CSF を発現させると回復し、またこのマクロファージに、PU.1 を発現させると、宿主防衛反応が回復することが示されている (文献 19)。

2.2.4 GM-CSF 吸入の効果

GM-CSF の吸入に関しては、カニクイザルにヒトリコンビナント GM-CSF の吸入で、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数が上昇し、血流中の骨髄細胞の数が增加することが観察されている (文献 20)。さらに GM-CSF ノックアウトマウスに 0.07mcg/kg/day に相当する量の GM-CSF 吸入投与を 4-5 週間行ったところ肺組織所見、肺胞マクロファージの分化、BAL 中の SP-B 量の改善をみたが、腹腔内注射ではこの効果はなかった (文献 21)。

2.2.5 GM-CSF 吸入治療 (治療例の報告)

自己免疫性肺胞蛋白症患者では、全身的に抗 GM-CSF 抗体が存在するが、肺にのみ病的所見がみられるため、肺局所での GM-CSF の投与すなわち吸入での投与も試みられてきた。1999 年に米国のメイヨークリニックのグループは転移性肺腫瘍患者 7 例に対して GM-CSF 吸入を試みて副作用がみられなことを確認し、(文献 22)、40 歳代の女性喫煙肺胞蛋白症患者 1 例にエアゾル化 GM-CSF 吸入治療 (1 日量 250 μ g, 7 日間吸入 7 日

間休薬隔週投与)を行い、肺機能が改善したことを2000年に報告した(文献23)。この報告をもとに、本邦でも3例の自己免疫性肺胞蛋白症患者にGM-CSF治療を行い、酸素化指標・血清マーカーの改善をみた。気管支肺胞洗浄液中の抗GM-CSF自己抗体価は減少し、細胞数が回復した(文献16)。小児科領域でも、13歳の小児の肺胞蛋白症患者(GM-CSF抗体陽性例)が3回目の全肺洗浄を受けた3ヶ月後に再発し、GM-CSF吸入治療(250mcg)1日2回吸入4か月のあと1日1回吸入を続けて1年後に中止としたが、副作用なく改善した(文献24)。また米国でも、16歳および19歳の自己免疫性肺胞蛋白症患者に、GM-CSF吸入治療を行い、CT画像の定量的解析が行われ、治療に伴い、スリガラス影の減少、気腔容積の増加が観察された(文献25)。

2.3 GM-CSF 吸入治療に関する予備的データ

2.3.1 本邦における前向き多施設第Ⅱ相臨床研究

2003年～2004年に本邦全国6施設での予備的な早期Ⅱ相試験では、12週の観察期間中自然寛解のなかった例で、125mcg/day 6週間連日吸入し、AaDO₂が10mmHg以上改善したものは、そのまま治療をさらに6週継続、改善しなかった場合には250mcg/dayに増量して6週吸入として治療を行った。13例のうち7例が6週後の増量を要し、12週全体で奏効例は7例だった。重篤な有害事象はみられなかった。(文献17supplemental data)

2004年～2008年に行われた本邦の全国9施設のGM-CSF吸入治療研究のグループによる多施設第Ⅱ相臨床研究では、50例登録されたGM-CSF抗体陽性でPaO₂<75mmHgの参加者のうち、3か月の無治療観察期間に自然寛解のみられなかった不変/増悪例39例に対して、12週間の導入治療(1回125mcg, 1日2回8日吸入6日休薬12週)およびそれに引き続く12週間の維持治療(1日1回4日吸入, 10日休薬12週)を行い、35例が治療を完遂、重篤な有害事象なく24例が奏効(AaDO₂の10mmHg以上の改善)みた。経過中に肺炎と結核性リンパ節炎の出現例があったが軽快し、重篤な副作用はみられなかった(文献17)。

2.3.2 本邦の2倍用量のGM-CSF吸入を用いた米国単施設後方視研究

前述のメイヨークリニックのグループから、GM-CSF吸入で治療した肺胞蛋白症患者12例についてのレトロスペクティブな検討の報告が2006年にでており、本邦での用量の2倍の500μg/日吸入7日間+休薬7日間の12サイクルによる治療で、11例が奏効、92%の奏効率を示し、AaDO₂は18.4mmHg改善し、治療に関連した副作用もみられなかったとの結果であった(文献19)。2名は追加治療なく、4名は追加治療でも改善し、1名が用量増加を要した、と記載されている。

2.3.3 他疾患に対するGM-CSF吸入治療での呼吸器系毒性についての予備的データ

1) 米国での悪性黒色腫の肺転移に対するGM-CSF吸入用量増加試験

上記と同じメイヨークリニックの報告で、悪性黒色腫の肺転移の成人患者40例に対して、GM-CSF 500-2000mcg/回の用量増加試験(250mcgずつ増量, 1用量5例, 1日2回 d1-7, d15-21に吸入, 28日1サイクル, 病状の悪化また重篤有害事象の出現までくりかえす)の研究では、有害事象としてgrade4の呼吸困難とgrade3の咳の併発が2000mcgの初回投与で1例, 1750mcgの1サイクルで1例生じ, grade3の全身倦怠感とgrade2の呼吸困難の併発が1000mcgの1サイクル終了時に1例生じ, 治療中止となった。grade2の有害事象として750mcgで咳, 貧血, 発疹各1例, 1500mcgで便秘, 全身倦怠感各1例, 2000mcgでめまい, 悪心各1例がみられた。治療中止を要する肺機能上の変化はなかった(文献27)。

2) 米国多施設での骨肉腫の肺転移に対するGM-CSF吸入用量増加試験

骨肉腫の肺転移に対するGM-CSF吸入治療の研究として43例(7-25歳)に250-1750mcg/回1日2回隔週吸入を2サイクル行い, 組織学的検索のため転移巣の外科的切除後, さらに12サイクル吸入が行われ, 15例が250mcg, 7例が1000mcg, 21例

が 1750mcg で治療を受けた。Grade3 の呼吸器系毒性が 9 例みられ 2 例がプロトコルから脱落となった。250mcg 群では grade3 の気管支攣縮 1 例, grade3 の VC と FEV1 の低下 1 例, 1000mcg 群ではなく, 1750mcg 群では 5 例 (術後の VC と FEV1 の低下 1 例, 肺血栓塞栓症 1 例, FEV1 低下または咳・息切れ 2 例, GMCSF 吸入に関連すると考えられる呼吸困難・両側肺びまん性浸潤影・胸水貯留が 1 例) がみられた。さらにもう 1 例は, 術後数日して血圧低下, 呼吸不全, 心不全を呈した。この例は前治療のアンスラサイクリン心毒性の関与が考えられた (9 例のうちあと 1 例は記載がみあたらない)。(文献 28)。

3. 本試験で用いる略号, 用語, 規準の定義一覧

3.1 略語および用語の定義

略号および用語	定義
AaDO ₂	alveolar-arterial oxygen difference 肺胞気動脈血酸素分圧較差
aPAP	autoimmune pulmonary alveolar proteinosis 自己免疫性肺胞蛋白症
CEA	carcinoembryonic antigen 癌胎児性抗原
CYFRA21-1	cytokeratin 19 fragment サイトケラチン 19 フラグメント
DLco	diffusing capacity of carbon monoxide 一酸化炭素拡散能
GM-CSF	granulocyte/macrophage-colony stimulating factor 顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子
HRCT	high-resolution computed tomography 高分解能コンピュータ断層撮影 (CT)
KL-6	Sialylated carbohydrate antigen KL-6 シアル化糖鎖抗原 KL-6
LDH	lactate dehydrogenase 乳酸脱水素酵素
PaCO ₂	partial pressure of carbon dioxide in arterial blood 動脈血二酸化炭素分圧
PaO ₂	partial pressure of oxygen in arterial blood 動脈血酸素分圧
PAP	pulmonary alveolar proteinosis 肺胞蛋白症
SP	surfactant protein サーファクタント蛋白
SpO ₂	oxygen saturation measured by pulse oximetry パルスオキシメーターでの測定による酸素飽和度
VC	vital capacity 肺活量

3.2 疾患重症度分類の定義

肺胞蛋白症の重症度の評価については、下の井上らの重症度分類（DSS）に沿って行う。

DSS 1: 徴候なし, PaO₂>70 mmHg

DSS 2: 徴候あり PaO₂>70 mmHg

DSS3: PaO₂>60 mmHg かつ<70 mmHg

DSS 4: PaO₂>50 mmHg かつ<60 mmHg

DSS 5: PaO₂<50 mmHg.

3.3 奏効例の定義

室内気吸入下仰臥位安静 5 分後に採取した動脈血のガス分析により算出した動脈血肺胞気酸素分圧較差が吸入治療前後で 10 mmHg 以上の改善を見た例を奏効例とする。

4. 遵守事項

本治験は平成 9 年 3 月 27 日厚生省令第 28 号（最終改正：平成 24 年 12 月 28 日付厚生労働省令第 161 号）「医薬品の臨床治験の実施の基準に関する省令」に準拠するものとする。また、ヘルシンキ宣言（2013 年 10 月改訂）を遵守して実施する。