

## 目 次

	(頁
1. 試験表題.....	5
2. 試験番号.....	5
3. 試験目的.....	5
4. 試験委託者.....	5
5. 試験施設.....	5
6. 試験実施.....	5
7. 試験責任者.....	6
8. 担当責任者.....	6
9. GLP 及びガイドライン.....	6
10. 動物実験倫理.....	6
11. 試験関係資料の保存.....	6
12. 要約.....	7
13. 被験物質.....	8
13.1. 被験物質.....	8
13.2. 陽性対照物質.....	8
13.3. 媒体 1.....	8
13.4. 媒体 2.....	8
13.5. 媒体 3.....	9
14. 投与検体.....	9
14.1. 被験物質.....	9
14.2. 陽性対照物質.....	9
14.3. 残余投与検体の処理.....	9
14.4. 試薬.....	9
15. 使用動物及び飼育環境.....	11
15.1. 使用動物.....	11
15.2. 飼育環境.....	11
16. 個体及びケージの識別方法.....	12
17. 群分け.....	12
18. 群構成及び投与量.....	12
19. 投与量の設定理由.....	13
20. 投与.....	13
21. 方法.....	13
21.1. 基準日.....	13
21.2. 試験日程.....	13
21.3. 一般状態観察.....	14
21.4. 死亡及び瀕死動物の取扱い.....	14
21.5. 体重.....	14
21.6. 感作.....	14
21.7. 抗原誘発.....	14

21.8.	IgE 抗体価の測定.....	14
21.9.	気道反応性の測定.....	15
21.10.	採血.....	15
21.11.	気管支肺胞洗浄液中細胞数の計数.....	15
21.12.	免疫グロブリン及びサイトカインの測定.....	16
21.13.	臓器重量測定.....	16
21.14.	組織学的検査.....	16
21.15.	試料の送付.....	16
21.16.	動物処理.....	16
22.	統計学的処理.....	16
23.	データ処理に使用した機器及びソフトウェア.....	17
24.	データの取扱い基準.....	17
25.	試験結果.....	18
25.1.	一般状態.....	18
25.2.	体重.....	18
25.3.	気道反応性.....	18
25.4.	BALF 中の細胞数.....	18
25.5.	免疫グロブリン及びサイトカイン.....	18
25.6.	臓器重量.....	19
25.7.	組織学的検査.....	19
26.	考察及び結論.....	21
27.	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験 計画書に従わなかったこと.....	21
28.	参考文献.....	21

Fig. 1 Body weights in mice treated with RK-569 and Dexamethasone

Fig. 2-1, 2-2 Effects of RK-569 and Dexamethasone on airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin in mice

Fig. 3 Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of bronchoalveolar lavage fluid induced by ovalbumin in mice

Fig. 4 Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of OVA-IgE and OVA-IgG1 induced by ovalbumin in mice

Fig. 5 Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of interleukin (IL) -5 and -13 induced by ovalbumin in mice

Table 1-1～1-3 Clinical signs in mice during study periods

Table 2 Body weights in mice treated with RK-569 and Dexamethasone

Table 3 Effects of RK-569 and Dexamethasone on airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin in mice

Table 4 Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of bronchoalveolar lavage fluid induced by ovalbumin in mice

Table 5	Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of OVA-IgE and OVA-IgG1 induced by ovalbumin in mice
Table 6	Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of interleukin (IL) -5 and -13 induced by ovalbumin in mice
Table 7	Organ weights in mice treated with RK-569 and Dexamethasone
Table 8	Gross pathological findings in mice treated with RK-569 and Dexamethasone
Table 9	Histopathological findings in mice treated with RK-569 and Dexamethasone

Appendix 1-1	Clinical signs in mice during quarantine and acclimation periods
Appendix 1-2	Body weights in mice during quarantine and acclimation periods
Appendix 2	Body weights in mice treated with RK-569 and Dexamethasone - The details of statistical analysis
Appendix 3-1, 3-2	Effects of RK-569 and Dexamethasone on airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin in mice
Appendix 3-3	Effects of RK-569 and Dexamethasone on airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin in mice - The details of statistical analysis inn specific airway resistance
Appendix 4-1~4-4	Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of bronchoalveolar lavage fluid induced by ovalbumin in mice
Appendix 4-5	Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of bronchoalveolar lavage fluid induced by ovalbumin in mice - The details of statistical analysis
Appendix 5-1, 5-2	Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of OVA-IgE and OVA-IgG1 induced by ovalbumin in mice
Appendix 5-3	Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of OVA-IgE and OVA-IgG1 induced by ovalbumin in mice - The details of statistical analysis
Appendix 6-1, 6-2	Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of interleukin (IL) -5 and -13 induced by ovalbumin in mice
Appendix 6-3	Effects of RK-569 and Dexamethasone on the changes of interleukin (IL) -5 and -13 induced by ovalbumin in mice - The details of statistical analysis
Appendix 7	Organ weights in mice treated with RK-569 and Dexamethasone - The details of statistical analysis
Appendix 8	Histopathological findings in mice treated with RK-569 and Dexamethasone
Photo. 1-1~1-4	Histopathological features in mice treated with RK-569 and Dexamethasone

## 1. 試験表題

RK-569 のマウス喘息モデルでの薬効評価

## 2. 試験番号

13K6591N

## 3. 試験目的

マウス卵白アルブミン誘発急性喘息モデルにおける RK-569 ( $\alpha$  ガラクトシルセラミド誘導体リポソーム製剤) の作用及び濃度依存性を以下の項目について検討した。

1. 気道反応性の亢進に対する作用
2. 血清中 IgE 及び IgG に対する作用
3. 気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中の炎症性細胞数の増加及びサイトカイン (IL-5 及び IL-13) に対する作用
4. 肺組織への炎症性細胞浸潤及び杯細胞に対する作用

## 4. 試験委託者

独立行政法人理化学研究所

〒230-0045

神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

TEL 045-503-7016 FAX 045-503-7015

委託担当者：石井 保之

## 5. 試験施設

株式会社シミックバイオリサーチセンター

〒408-0044 山梨県北杜市小淵沢町 10221 番地

TEL 0551-36-2455 FAX 0551-36-3895

## 6. 試験実施

試験期間	2013年12月16日	～	2014年3月20日
試験開始日	2013年12月16日		
動物受入日	2013年12月16日		
検疫・馴化期間	2013年12月16日	～	2013年12月23日
初回感作日 (Day 1)	2013年12月24日	～	2013年12月27日
追加感作日 (Day 8)	2014年12月31日	～	2014年1月3日
追加感作日 (Day 15)	2014年1月7日	～	2014年1月10日
採血日	2014年1月13日	～	2014年1月16日
群分け日	2014年1月20日	～	2014年1月23日
抗原誘発日	2014年1月21日	～	2014年2月5日
投与日 (1～6群)	2014年1月20日	～	2014年1月23日
	2014年1月27日	～	2014年1月30日
投与日 (7群)	2014年1月21日	～	2014年2月6日

気道反応性測定日	2014年2月4日	～	2014年2月7日
気管支肺胞洗浄液採取日	2014年2月4日	～	2014年2月7日
採血，肺摘出	2014年2月4日	～	2014年2月7日
試験終了日	2014年3月20日		

#### 7. 試験責任者

淵上 淳一  
株式会社シミックバイオリサーチセンター

#### 8. 担当責任者

検疫，馴化	高橋真樹
飼育，観察，感作，投与	鈴木芳幸
気道反応性測定	諸角芳友
採血・BALF採取	高橋真樹
BALF検査，血清分離	久保田貴之
免疫グロブリン・サイトカイン測定	橘田久美子
組織学的検査	江田 景
被験物質管理	小宮山芳幸
統計学的処理	正木文夫

#### 9. GLP 及びガイドライン

遵守した GLP：非適用  
参照したガイドライン：なし

#### 10. 動物実験倫理

本試験は IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, 動物実験審査委員会) によって承認を受けた (承認番号 2013-172)。当試験施設は AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 国際実験動物管理公認協会) の認証を取得した施設である (認証番号：001182)。

#### 11. 試験関係資料の保存

保存場所：当試験施設 資料保存施設

保存資料：試験計画書 (原本)，最終報告書 (原本)，被験物質及び動物に関する記録，生データ (CD-R 含む)，試験操作記録，通信文書等の記録文書，その他記録文書

保存期間：試験終了後 5 年間保存

## 12. 要約

本試験では、RK-569 ( $\alpha$  ガラクトシルセラミド誘導体リポソーム製剤) の作用及び濃度依存性を確認するために、マウス卵白アルブミン (OVA) 誘発急性喘息モデルを用いて、気道反応性の亢進、血清中 IgE 及び IgG、気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中の炎症性細胞数の増加、サイトカイン (IL-5 及び IL-13)、肺組織への炎症性細胞浸潤及び杯細胞に対する作用を検討した。陽性対照物質として dexamethasone を使用した。

マウスに感作物質 (OVA 20  $\mu$ g+Alum 2.25 mg/200  $\mu$ L) を、Day1 (初回感作日)、8 及び 15 に腹腔内投与して感作した。その後、マウスに連続した 6 日間 (Day 29~34) 及び 7 日間 (Day 36~41)、OVA を吸入させて誘発した。RK-569 は 0.1, 1, 10 及び 100 ng/head の用量を週に 1 回、計 2 回 (Day 28 及び 35) 尾静脈内投与した。Dexamethasone は Day 29 から Day 42 まで 1 日 1 回、14 日間反復経口投与した。

1. 喘息病態の発症：OVA で誘発した対照群では、正常群と比較して、気道反応性の亢進、BALF 中の総白血球数、好酸球数、好中球数及びリンパ球数の増加、OVA-IgG1 の上昇傾向、BALF 中の IL-5 の増加がみられた。気管支及び肺の病理検査では単核細胞の浸潤及び杯細胞過形成が観察された。
2. RK-569 の作用：RK-569 は、気道反応性亢進 (1~100 ng/head)、BALF 中の好酸球数 (1~100 ng/head) 及びリンパ球数 (100 ng/head) の増加、BALF 中 IL-5 の増加 (100 ng/head) を用量依存的に有意に抑制し、血清中 OVA-IgG1 の上昇に対しても 10 ng/head で有意な抑制が認められ、気管支及び肺の単核細胞の浸潤及び杯細胞過形成の軽減がみられた (1~100 ng/head)。
3. Dexamethasone の作用：ステロイド薬である dexamethasone では、気道反応性亢進、BALF 中の白血球数、好酸球数及びリンパ球数の増加、血清中 OVA-IgE 及び OVA-IgG1 の上昇、BALF 中 IL-5 の増加、気管支及び肺の単核細胞の浸潤及び杯細胞過形成を抑制した。

以上の結果から、マウス OVA 誘発急性喘息モデルにおいて、RK-569 は 1~100 ng/head の 2 回 (週 1 回) の静脈内投与により、抗原吸入誘発による気道反応性亢進、気道管腔内への好酸球及びリンパ球浸潤、血清中 OVA-IgG1 の上昇及び BALF 中 IL-5 の増加を抑制し、気管支及び肺の単核細胞の浸潤及び杯細胞過形成を軽減することが確認された。

### 13. 被験物質

#### 13.1. 被験物質

名 称：RK-569 ( $\alpha$  ガラク トシルセラミド誘導体リポソーム製剤) 溶液  
ロット番号：MD062  
濃 度：1, 10, 100 及び 1000 ng/mL  
供 給 元：独立行政法人理化学研究所  
入 手 日：2014 年 1 月 16 日  
使用予定量：各濃度×2 本  
保 存 条 件：冷蔵  
保 存 場 所：研究本館 検体調製室 低温保管庫 (実測値：3~6°C, 許容範囲：2~8°C)  
取扱い上の注意：保護衣, マスク, 手袋及びキャップを着用した。  
残余被験物質の処理：実験終了後, 残余被験物質を被験物質管理責任者へ移管した。

#### 13.2. 陽性対照物質

名 称：Dexamethasone  
ロット番号：BCBF2909V  
供 給 元：Sigma-Aldrich Corporation  
性 状：白色の粉末  
保 存 条 件：冷蔵, 遮光  
保 存 場 所：研究本館 検体調製室 低温保管庫 (許容範囲：2~8°C)  
取扱い上の注意：保護衣, マスク, 手袋, キャップを着用した。  
残余被験物質の処理：実験終了後, 残余被験物質を試薬として保管した。

#### 13.3. 媒体 1

名 称：0.5 w/v %メチルセルロース水溶液  
原 末：メチルセルロース 400 (以下, MC)  
原末のロット番号：WER5404  
原末の製造元：和光純薬工業株式会社  
原末の保存条件：室温  
原末の保存場所：研究本館 検体調製室 室温保管庫 (許容範囲：1~30°C)  
調 製 方 法：必要量の MC を秤取り, 日本薬局方注射用水を加えて一昼夜攪拌して溶解させ 0.5 w/v %水溶液を調製した。  
調製後の保存条件：冷蔵  
調製後の保存場所：研究本館 検体調製室 低温保管庫 (許容範囲：2~8°C)  
調製後の使用期限：調製完了日から 8 日間  
用 途：陽性対照物質の調製媒体として用いた。

#### 13.4. 媒体 2

名 称：日本薬局方注射用水 (以下, 注射用水)  
ロット番号：30701D  
製 造 元：扶桑薬品工業株式会社

保存条件：室温

保存場所：研究本館 検体調製室 室温保管庫（許容範囲：1～30℃）

調製方法：製品をそのまま使用した。

用途：媒体1の調製に用いた。

### 13.5. 媒体3

名称：日本薬局方 生理食塩液（以下、生理食塩液）

ロット番号：21116D

製造元：扶桑薬品工業株式会社

保存条件：室温

保存場所：研究本館 検体調製室 室温保管庫（許容範囲：1～30℃）

調製方法：製品をそのまま使用した。

用途：感作物質，誘発物質の調製用媒体として用いた。

## 14. 投与検体

### 14.1. 被験物質

調製方法：被験物質をそのまま用いた。

### 14.2. 陽性対照物質

調製方法：必要量を量り取り，メノウ乳棒及びメノウ乳鉢で砕き，0.5%MC 溶液を少しずつ加えて懸濁し，0.3 mg/mL の濃度に調製した。

調製頻度：用時調製した。

### 14.3. 残余投与検体の処理

紙に含ませ感染性廃棄物として処分した。

## 14.4. 試薬

### 14.4.1. 感作物質，誘発物質及び試薬

名称	メーカー	ロット番号	保管方法
卵白アルブミン Ovalbumin (OVA, GradeV)	Sigma-Aldrich Corporation	SLBB4340V	冷蔵
水酸化アルミニウムゲル (Alum)	株式会社エル・エス・エム	534100	冷凍
Acetyl-β-methyl choline chloride (メサコリン, MCh)	Sigma-Aldrich Corporation	SLBD9591V	冷凍

### 14.4.2. 感作物質の調製

調製日：Day 1, 8 及び Day 15

調製方法：OVA 及び Alum を生理食塩液に溶解し，OVA 20 µg+Alum 2.25 mg/200 µL の濃度



の溶液を用時調製した。

#### 14.4.3. 誘発物質の調製

調製日：Day 29～34, Day 36～42

調製方法：OVA を生理食塩液に溶解し，1% OVA 含有生理食塩液を用時調製した。

#### 14.4.4. 気道反応性測定用試薬（メサコリン）の調製

調製濃度：25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 mg/mL

調製方法：メサコリン (MCh) 1.25 g を秤量し，生理食塩液に溶解して 50 mL にし，25 mg/mL 溶液を調製した。25 mg/mL 溶液を原液として，生理食塩液を加えて段階希釈し，12.5, 6.25, 3.125, 1.56 mg/mL 溶液を調製した。調製後の MCh は，気道反応性測定まで氷冷下で取り扱った。

## 15. 使用動物及び飼育環境

### 15.1. 使用動物

[SOP No. AH010]

種 : マウス

系 統 : BALB/cAnNCrlj 系, SPF

系統の選択理由 : 本系統のマウスは, 気管支喘息の試験に頻繁に用いられており, ヒトと類似した反応を示すため.

供給源 : 日本チャールス・リバー株式会社

受入日 : 2013年12月16日

週齢・性別・数 : 8週齢, 雌50匹(入荷時), 12週齢, 雌42匹(投与開始時)

体重範囲 : 17.3 ~ 21.5 g (受入日)

検疫・馴化期間 : 8日間(入荷日を含む)

受入時検査 : 体重測定, 外観, 一般状態観察等の検査で異常の有無確認し, 異常の見られない動物を受入れた.

検疫・馴化期間中検査 : 一般状態を1日1回観察した.

検疫・馴化終了日 : 体重測定, 一般状態を観察し健康状態を判定した. その結果, 全例に異常は見られなかった (Appendix 1-1 及び 1-2) .

### 15.2. 飼育環境

動物室 : 薬理研究棟, 飼育実験室 C

ケージ : ポリカーボネイト製ケージ (W25×D40×H18 cm) に床敷き (ホワイトフレーク, オリエンタル酵母工業株式会社, ロット番号 : 13.10.16, 13.10.22) を敷いて, 1ケージに 5~6匹飼育した.

ケージは1週間に1回交換した.

温度・相対湿度 : 21.1~25.1°C (許容範囲 : 19~25°C), 25.7~63.5% (許容範囲 : 30~70%)

換気回数 : 12~15回/時

照明時間 : 7~19時

床清掃 : 毎日, 床面を清掃し, ベンザルコニウム塩化物液 (日興製薬株式会社) 100倍液で清拭消毒した.

飼料 : 固形飼料CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社, ロット番号 : 130904, 131008, 131108) を自由摂取させた.

飲料水 : 公共水道水を給水瓶により自由摂取させた.

汚染物質の分析 : 以下のデータについて, 当試験施設で定めた飼料中の汚染物質の許容基準値及び水質基準に適合していた.

床敷 : 供給者から入手した全使用ロットの分析結果

飼料 : 飼料供給者から入手した全使用ロットの分析結果

飲料水 : 6か月ごとに採取した飲料水について, 株式会社山梨県環境科学検査センターで測定した分析結果

## 16. 個体及びケージの識別方法

個体識別：受入日に背側尾根部に油性インクで記入した個体番号をつけて識別した。時間の経過とともに個体番号が不明瞭になった場合は、個体番号を再記入した。

ケージの識別：受入日から群分け日は、試験番号及び個体番号を記したラベル、群分け以降は、試験番号、群番号、投与物質名、投与量、動物番号及び個体番号を記したカラーラベルで表示した。

(1群：白, 2群：黒, 3群：黄, 4群：緑, 5群：青, 6群：桃, 7群：赤)

## 17. 群分け

実施日：血清中 OVA-IgE 抗体価確定後 (2014 年 1 月 21 日)

選 抜：一般状態観察により異常が認められた個体、体重推移が他の動物と明らかに異なる個体はいなかった。

群 分 け：採血日の血清中の OVA-IgE 抗体価を指標にして、各群 6 匹ずつ、計 7 群に振り分けた (SAS<sup>®</sup>9.1.3 使用)。動物番号末尾 6 番目の動物は、予期せぬ事態に備えて待機動物とした。なお、試験に組み込まれなかった動物は、群分け終了後に試験から除外した。

## 18. 群構成及び投与量

以下のとおり 7 群とした。

	投与群	投与経路	投与量 (ng/head)	濃度 (ng/mL)	投与液量 (mL/head)	動物数 (動物番号)
1	非誘発群	静脈内	0	0	0.1	6 (2101-2106)
2	対照群	静脈内	0	0	0.1	6 (2201-2206)
3	RK-569 0.1 ng/head	静脈内	0.1	1	0.1	6 (2301-2306)
4	RK-569 1 ng/head	静脈内	1	10	0.1	6 (2401-2406)
5	RK-569 10 ng/head	静脈内	10	100	0.1	6 (2501-2506)
6	RK-569 100 ng/head	静脈内	100	1000	0.1	6 (2601-2606)
7	Dexamethasone	経口	3 mg/kg	0.3 mg/mL	10 mL/kg	6 (2701-2706)

動物番号末尾 6 番は、予期せぬ事態に備えて待機動物としてモデル作製及び投与を実施した。本試験では各群 6 例全例を使用した。

## 19. 投与量の設定理由

被験物質：試験委託者における予備検討結果より、薬効が期待できる用量を含み、無作用量～最大投与量を公比 10 で設定した。

陽性対照物質：Dexamethasone の投与量は、Mark A Birrell ら<sup>1)</sup> の報告を基に実施した社内検討試験<sup>2)</sup> (試験番号：11V0131N, 株式会社シミックバイオリサーチセンター社内検討試験) において、3 mg/kg, 6 日間連続経口投与で気道反応性の亢進及び BALF 中の細胞数及び好酸球数の増加を有意に抑制したことから設定した。

## 20. 投与

### 1～6 群

投与経路：静脈内投与

投与経路の選択理由：臨床適用経路に準じた。

投与方法：ディスポーザブルシリンジ及び注射針を用いて投与した。

投与方法の選択理由：マウスの静脈内投与として一般的な方法である。

投与回数及び投与期間：Day 28, 35 に 1 日 1 回, 計 2 回投与した。

投与液量：1 匹あたり 0.1 mL を投与した。

非誘発群及び対照群には生理食塩液を同量投与した。

### 7 群 (陽性対照物質)

投与経路：経口投与

投与経路の選択理由：臨床適用経路に準じた。

投与方法：ディスポーザブルシリンジ及び胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

投与方法の選択理由：マウスの経口投与として一般的な方法である。

投与回数及び投与期間：1 日 1 回, Day 29 から Day 42 まで 14 日間反復投与した。

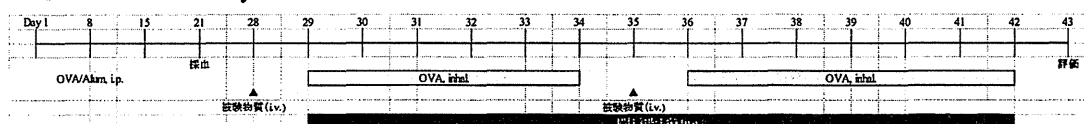
投与時間：OVA 誘発の 2 時間前に投与した。

投与液量：10 mL/kg とし, Day 29, Day 36 及び Day 42 の体重に基づき算出した。

## 21. 方法

### 21.1. 基準日

初回感作日を Day 1 とした。



### 21.2. 試験日程

気道反応性測定日ごとに 4 グループに分け, 以下の日程で実施した。

グループ	初回感作 (Day 1)	追加感作 (Day 8)	追加感作 (Day 15)	抗原誘発日 (Day 29～34) (Day 36～42)	気道反応性測定日 (Day 43)
1	12月24日	12月31日	1月7日	1月21日～1月26日 1月28日～2月3日	2月4日

2	12月25日	1月1日	1月8日	1月22日～1月27日 1月29日～2月4日	2月5日
3	12月26日	1月2日	1月9日	1月23日～1月28日 1月30日～2月5日	2月6日
4	12月27日	1月3日	1月10日	1月24日～1月29日 1月31日～2月6日	2月7日

グループ1：2101, 2102, 2201, 2202, 2301, 2401, 2501, 2601, 2701, 2702 (10匹)

グループ2：2103, 2203, 2302, 2303, 2402, 2403, 2502, 2602, 2703 (9匹)

グループ3：2104, 2204, 2304, 2404, 2503, 2504, 2603, 2704 (8匹)

グループ4：2105, 2205, 2305, 2405, 2505, 2604, 2605, 2705,  
2106, 2206, 2306, 2406, 2506, 2606, 2706 (15匹)

### 21.3. 一般状態観察

1日1回以上観察し、動物の生死及び一般状態を確認した。

### 21.4. 死亡及び瀕死動物の取扱い

死亡動物及び瀕死動物はいなかった。

### 21.5. 体重

実施時期：Day 1, 8, 15, 22, 29, 36, 42 及び Day 43 の操作前に測定した。

### 21.6. 感作

初回感作：初回感作 (Day 1) として、マウスに OVA 20 µg 及び Alum 2.25 mg を含む生理食塩液 200 µL を腹腔内投与することにより能動的に感作した。

追加感作：初回感作の7日後 (Day 8) 及び14日後 (Day 15), 同様に OVA/Alum を腹腔内投与して追加感作を行った。

### 21.7. 抗原誘発

実施時期：Day 29～34 及び Day 36～42

誘発時間：7群は検体投与終了2時間後に実施した。

方 法：マウスを感作用チャンバーに入れ、超音波ネブライザー (NE-U17, オムロン社) を用い、1%OVA 含有生理食塩液を1日に1回、30分間、13日間、群ごとに吸入させた。非誘発群 (1群) には、生理食塩液を同条件で吸入させた。

### 21.8. IgE 抗体価の測定

採血日：Day 21

採血方法：ヘマトクリット管を用いて尾静脈より血液を約 50 µL 採取した。

血液の保存条件：採血後の血液は、室温で1時間保存後、遠心分離した。

血清分離：3000 rpm, 4°C, 15分間遠心分離し、得られた血清をサンプルチューブに分注後、研究本館 分析室 (2) の超低温フリーザー (設定温度：-80°C, 許容範囲：-90～-70°C, MDF-U383, 三洋電機バイオメディカ株式会社) で凍結保存した。

測定：血清中 OVA-IgE 抗体価を ELISA 法で測定した。

### 21.9. 気道反応性の測定

実施時期：Day 43

評価項目：気道抵抗 (sRaw)

気道収縮惹起物質：メサコリン (MCh) 1.56, 3.125, 6.25, 12.5 及び 25 mg/mL 溶液

測定：マウスをアクリル製吸入チャンバーに入れ、加圧ネブライザー (LC ネブライザー, パリ社) を用いて、生理食塩液及び MCh を低濃度から順次各 1 分間ずつ吸入させ、各溶液吸入後に sRaw を測定した。sRaw は、総合呼吸機能測定システム (Pulmos-I, 株式会社 M.I.P.S.) を用い、double flow plethysmograph 法にて、覚醒下で測定した。測定中に体動が発現した場合は、所定のキーを押し、生データに体動発現のマークを残した。

データの採用：各測定ポイントで取得したデータの中から、sRaw 値がマイナス及び 20 以上の値を除いた体動が認められない 100 呼吸分の測定値を採用した。100 呼吸分の平均値を各測定ポイントにおける個体の sRaw とした。

### 21.10. 採血

採血日：Day 43

使用麻酔：ソムノペンチル® (共立製薬株式会社, ロット番号：3038101)

採血方法：気道反応性測定後、注射針及びディスポーザブルシリンジを用いて、麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) で後大静脈から血液を 0.5 mL 以上採取した。

血液の保存条件：採血後の血液は試験管に移し、室温で 1 時間保存後、遠心分離した。

血清分離：1800 g, 4°C, 15 分間遠心分離し、得られた血清をスクリーキャップチューブに分注後、研究本館 分析室 (2) の超低温フリーザー (設定温度：-80°C, 許容範囲：-90~-70°C, MDF-U383, 三洋電機バイオメディカ株式会社) で凍結保存し、後日、OVA-IgE 及び OVA-IgG の測定に使用した。

### 21.11. 気管支肺胞洗浄液中細胞数の計数

採取部位：右肺

採取方法：採血後、放血致死させた後、以下の操作手順で採取した。

1) 左側主気管支を糸で結紮した後、気管内にカニューレを挿入固定した。

2) カニューレを介して右肺に生理食塩液 0.5 mL を肺内に注入した。

回収液を再注入し、計 3 回繰り返して採取した。

本操作を 2 回行い、全量で約 1 mL 回収した液を気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) とした。

3) 氷中で一時保管し、4°C で 250 g, 10 分間遠心した。

白血球数の測定：沈渣を 1 mL の生理食塩液に懸濁し、チュルク氏液を加えて染色し、細胞計数盤にて総白血球数/μL を計測した。

塗抹標本作製：再遠心後、沈渣を 75%FBS (生理食塩液含有牛胎児血清) で懸濁して塗抹

標本を作製し、ライト・ギムザ染色した。

標本観察：好中球，単球・マクロファージ，好酸球及びリンパ球に分類し，総白血球数に対する比率を求め，1  $\mu$ Lあたりの各細胞数を算出した。

BALF 上清：BALF 検査後の上清は，動物ごとにマイクロチューブに分注し，21.10.で得られた血清と同様に凍結保存し，後日，サイトカインの測定に使用した。

#### 21.12. 免疫グロブリン及びサイトカインの測定

測定項目：血清；OVA-IgE 及び OVA-IgG

BALF 上清；interleukin (IL) -5 及び IL-13

測定：ELISA 法で測定した。測定後の残余 BALF 上清は， $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。

#### 21.13. 臓器重量測定

採取部位：肺，脾臓，腎臓（左右），肝臓

測定：BALF 採取後に，左主気管支の結紮を解き，各臓器の重量を測定し，10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。

#### 21.14. 組織学的検査

評価部位：左主気管支及び左肺

染色及び評価：臓器重量測定後に，10%中性緩衝ホルマリン液を注入し24時間以上浸漬して固定した。

左側主気管支及び左肺について，常法に従い hematoxylin-eosin (HE) 染色及び periodic acid Schiff (PAS) 染色を施した組織標本を作製した。顕微鏡下で組織学的検討を行い，炎症性細胞浸潤や杯細胞の過形成の程度を評価した。また，各群の代表例の写真を撮影した。

#### 21.15. 試料の送付

採取した臓器は室温状態で，測定後の残余血清及び残余 BALF 上清はドライアイスと共に梱包して凍結状態（冷凍便）で送付した。

送付日：血清；2014年2月25日

BALF 上清及び抗原誘発前の血清；2014年3月5日

臓器；2014年3月10日

送付先：〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

独立行政法人理化学研究所

石井 保之様

TEL 045-503-7016

#### 21.16. 動物処理

採血の終了した動物は，放血により安楽死させた。

#### 22. 統計学的処理

気道抵抗値，体重値，BALF 中細胞数及び BALF 中サイトカイン，血清 IgE 及び IgG につ

いて以下の通りに検定を実施した。

得られた試験成績は各群の平均値±標準誤差で表示した。

対照群	比較群	等分散性の検定	等分散の場合の 群間比較	不等分散の場合の 群間比較
1群	2群	F検定	Studentの <i>t</i> 検定	Aspin-Welchの近似検定
2群	3～6群	Bartlett法	Dunnettの 多重比較検定	Steelの多重比較検定
2群	7群	F検定	Studentの <i>t</i> 検定	Aspin-Welchの近似検定

有意水準( $p$ 値)が0.05未満の場合に統計学的に有意であると判断し, $p$ 値を $p<0.05$ と $p<0.01$ を分けて表示した。

### 23. データ処理に使用した機器及びソフトウェア

各種データ処理には、WindowsのOS上で動作するMicrosoft Excel(群分け, データの計算, 作表, 作図), Microsoft Word(文書)を用いた。

平均値と標準誤差: Microsoft® EXCEL 2003 Windows版 (Version 11) を用いた。

統計検定: SAS®システム Windows版 Release 9.1.3 を用いた。

### 24. データの取扱い基準

- ・試験途中で不測の事態により、試験続行が困難と判断された個体及び人為的操作ミス(投与過誤等)により瀕死状態となった個体及び死亡動物はいなかった。
- ・BALF中細胞数の計数において、動物番号2202のデータは異常値であったため、棄却検定の結果より統計解析から除外した。



## 25. 試験結果

### 25.1. 一般状態

結果を Table 1-1~1-3 に示した.

一般状態に特筆すべき異常は認められなかった.

### 25.2. 体重

結果を Fig. 1, Table 2 及び Appendix 2 に示した.

非誘発群, 対照群及び RK-569 投与群の体重値は, 経日的に増加し, 各群間特筆すべき変化は認められなかった. Dexamethasone 投与群においては, Day 36, 42 及び 43 の体重値は対照群と比較して有意な減少がみられた.

### 25.3. 気道反応性

結果を Fig. 2-1, 2-2, Table 3 及び Appendix 3-1~3-3 に示した.

対照群の気道抵抗は, MCh 1.56~25 mg/mL 吸入時のいずれにおいても, 正常群と比較して有意に上昇した.

RK-569 投与群の気道抵抗の上昇は, 0~6.25 mg/mL の MCh 吸入時に有意な変化はみられなかったが, MCh 12.5 mg/mL 吸入時に RK-569 10 及び 100 ng/head 投与群, MCh 25 mg/mL 吸入時に RK-569 1, 10 及び 100 ng/head 投与群において有意な抑制がみられ, その抑制効果は濃度依存的であった.

Dexamethasone 群の気道抵抗の上昇は, MCh 1.56~25 mg/mL 吸入時のいずれにおいても, 対照群と比較して有意に抑制された.

### 25.4. BALF 中の細胞数

結果を Fig. 3, Table 4 及び Appendix 4-1~4-5 に示した.

対照群において, BALF 中の白血球数, 好酸球数, 好中球数及びリンパ球数が, 正常群と比較して有意に増加した.

RK-569 投与群は, 好酸球数において 1, 10 及び 100 ng/head 群, リンパ球数において RK-569 100 群が, 対照群と比較して細胞数の増加が有意に抑制されており, その抑制効果は濃度依存的であった.

Dexamethasone 群においては, 白血球数, 好酸球数及びリンパ球数の増加が, 対照群と比較して有意に抑制された.

### 25.5. 免疫グロブリン及びサイトカイン

#### 25.5.1. OVA 特異的 IgE 及び IgG1

結果を Fig. 4, Table 5 及び Appendix 5-1~5-3 に示した.

対照群において, OVA-IgE は正常群と比較して変化はなかったが, OVA-IgG1 は上昇傾向がみられた ( $p=0.07$ ).

RK-569 投与群は, OVA-IgG1 は 10 ng/head 投与群においてのみ OVA-IgE の上昇が有意に抑制され, その他の RK-569 投与群における OVA-IgE 及び OVA-IgG1 は対照群と比較して有意な抑制はみられなかった.

Dexamethasone 群においては、OVA-IgE 及び OVA-IgG1 の上昇が、対照群と比較して有意に抑制された。

#### 25.5.2. BALF 上清中 IL-5

結果を Fig. 5, Table 6 及び Appendix 6-1~6-3 に示した。

対照群において、IL-5 は正常群と比較して有意に増加した。

RK-569 投与群は、対照群と比較して、濃度依存的に IL-5 の増加が抑制されており、100 ng/head 群において有意差が認められた。

Dexamethasone 群においては、IL-5 の増加が、対照群と比較して有意に抑制された。

#### 25.5.3. BALF 上清中 IL-13

結果を Fig. 5, Table 6 及び Appendix 6-1~6-3 に示した。

2 例の個体（対照群：A No.2203, RK-569 1 ng/head 群：2405）を除いて、IL-13 の定量値は 0.00 であった。

#### 25.6. 臓器重量

結果を Table 7 及び Appendix 7 に示した。

対照群において、肺重量が正常群と比較して有意に増加し、脾臓、腎臓及び肝臓重量に変化はなかった。

RK-569 投与群は、対照群と比較して、0.1, 10 及び 100 ng/head 投与群において脾臓重量の有意な増加がみられ、その変化は濃度依存的であった。肺、腎臓及び肝臓重量に変化はなかった。

Dexamethasone 群においては、対照群と比較して、肺重量の増加が有意に抑制され、脾臓重量の有意な減少がみられた。

#### 25.7. 組織学的検査

##### 25.7.1. 肉眼的所見

結果を Table 8 に示した。

正常群及び対照群において、肉眼的所見に特筆すべき変化はみられなかった。

RK-569 投与群は、投与量の増加とともに、肝表面のプラーク及び脾臓の大型化がみられた。

Test substance	Dose (ng/head)	Findings	
		Liver	Spleen
RK-569	0.1	1/6	0/6
	1	0/6	0/6
	10	2/6	3/6
	100	5/6	4/6

Dexamethasone 群は、全例において脾臓及び胸腺の小型化がみられた。

## 25.7.2. 組織病理学的所見

結果を Table 9 及び Appendix 8 に示した。

### 25.7.2.1. 気管支

正常群：軽微の単核細胞の浸潤が 2 例観察された。

対照群：軽微～軽度の単核細胞の浸潤が全例に観察され、軽微～軽度の杯細胞過形成が全例に観察された。

RK-569 0.1 ng/head 群：軽微～軽度の単核細胞の浸潤が全例に観察され、軽微～軽度の杯細胞過形成が全例に観察された。

RK-569 1 ng/head 群：軽微～軽度の単核細胞の浸潤が 5 例観察され、軽微～軽度の杯細胞過形成が 4 例観察された。

RK-569 10 ng/head 群：軽微～軽度の単核細胞の浸潤が全例に観察され、軽微～軽度の杯細胞過形成が 5 例観察された。

RK-569 100 ng/head 群：軽微～軽度の単核細胞の浸潤が 5 例観察され、軽微の杯細胞過形成が全例に観察された。

Dexamethasone 群：軽微の単核細胞の浸潤が 3 例観察され、軽微の杯細胞過形成が 1 例観察された。

### 25.7.2.2. 肺

正常群：軽微の杯細胞過形成が 1 例観察された。

対照群：細気管支及び血管周囲に軽度～中等度の単核細胞の浸潤が全例に観察され、軽度～高度の杯細胞過形成が全例に観察された。

RK-569 0.1 ng/head 群：細気管支及び血管周囲に軽微～軽度の単核細胞の浸潤が全例に観察され、軽度～高度の杯細胞過形成が全例に観察された。

RK-569 1 ng/head 群：細気管支及び血管周囲に軽微～軽度の単核細胞の浸潤が全例に観察され、軽度～中等度の杯細胞過形成が全例に観察された。

RK-569 10 ng/head 群：細気管支及び血管周囲に軽微～軽度の単核細胞の浸潤が 5 例に観察され、軽度～中等度の杯細胞過形成が 5 例に観察された。

RK-569 100 ng/head 群：細気管支及び血管周囲に軽微～軽度の単核細胞の浸潤が 5 例に観察され、軽度～中等度の杯細胞過形成が全例に観察された。

Dexamethasone 群：細気管支及び血管周囲に軽微の単核細胞の浸潤が 1 例に観察され、軽微の杯細胞過形成が 1 例に観察された。

## 26. 考察及び結論

本試験では、RK-569 ( $\alpha$  ガラクトシルセラミド誘導体リポソーム製剤) の作用及び濃度依存性を確認するために、マウス OVA 誘発急性喘息モデルを用いて、気道反応性の亢進、血清中 IgE 及び IgG, BALF 中の炎症性細胞数の増加及びサイトカイン (IL-5 及び IL-13), 肺組織への炎症性細胞浸潤及び杯細胞に対する作用を検討した。

OVA で誘発した対照群では、正常群と比較して、気道反応性の亢進、BALF 中の総白血球数、好酸球数、好中球数及びリンパ球数の増加、OVA-IgG1 の上昇傾向、BALF 中の IL-5 の増加がみられた。気管支及び肺の病理検査では単核細胞の浸潤及び杯細胞過形成が観察された。これらのことから、抗原誘発した対照群では喘息病態の発症が確認された。ステロイド薬である dexamethasone では、気道反応性亢進、BALF 中の白血球数、好酸球数及びリンパ球数の増加、血清中 OVA-IgE 及び OVA-IgG1 の上昇、BALF 中 IL-5 の増加、気管支及び肺の単核細胞の浸潤及び杯細胞過形成を抑制した。本試験結果は、以前のデータ<sup>2)</sup> 及び Mark A Birrell<sup>1)</sup> の報告と類似するものであった。

RK-569 は、気道反応性亢進 (1~100 ng/head), BALF 中の好酸球数 (1~100 ng/head) 及びリンパ球数 (100 ng/head) の増加、血清中 OVA-IgG1 の上昇 (10 ng/head), BALF 中 IL-5 の増加 (100 ng/head) を用量依存的に有意に抑制し、血清中 OVA-IgG1 の上昇に対しても 10 ng/head で有意な抑制が認められ、気管支及び肺の単核細胞の浸潤及び杯細胞過形成の軽減がみられた (1~100 ng/head)。

$\alpha$  ガラクトシルセラミドは、NKT 細胞のリガンドであり、IL-27 や IFN- $\gamma$  といったサイトカインを誘導し、Th2 を介してアレルギー性炎症を抑制することが報告<sup>3)</sup> されていることから、これらの機序によりマウス喘息反応に対する効果が発現したものと考えられる。しかしながら、本試験において RK-569 は I 型反応を司る IgE 抗体に対する作用は認められなかったことから、今後さらなる検討が必要である。

以上の結果から、マウス OVA 誘発急性喘息モデルにおいて、RK-569 は 1~100 ng/head の 2 回 (週 1 回) の静脈内投与により、抗原吸入誘発による気道反応性亢進、気道管腔内への好酸球及びリンパ球浸潤、血清中 OVA-IgG1 の上昇及び BALF 中 IL-5 の増加を抑制し、気管支及び肺の単核細胞の浸潤及び杯細胞過形成を軽減することが確認された。

## 27. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

飼育室の温湿度：

飼育室の温湿度が計画書の許容範囲 19~25°C, 30~70% から下表のように逸脱した。

逸脱日	最高温度	逸脱時間	最低湿度	逸脱時間
2013 年 12 月 29 日	25.1°C	2 分	25.7%	18 分

逸脱後の動物の一般状態及び体重推移に異常は認められなかつたことから、試験への影響はないものと判断した。

その他に該当する事態はなかつた。

## 28. 参考文献

- 1) Mark A Birrell et al. Dissociation by steroids of eosinophilic inflammation from airway hyperresponsiveness in murine airways. *Respir Res.* 2003; 4(1): 3