目次

2.6.1　緒言 5
2.6.1.1　参考文献一覧.....5

略語等一覧

略語	英語	日本語
ADA	Anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
A/G	Albumin / globulin	アルブミン／グロブリン
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
$AUC_{0\text{-}4h}$	Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 4 hours after the completion of dosing	投与終了時から投与終了後 4 時間までの血漿中濃度―時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}48h}$	Area under the plasma concentration-time curve from the start of dosing to 48 hours after the dosing	投与開始（時間 0）から 48 時間までの血漿中濃度―時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	Area under the plasma concentration-time curve from the start of final dosing to last time point quantitatable	最終投与開始時から，最終的に血漿中濃度が定量可能な時間（t）までの血漿中濃度―時間曲線下面積
$AUC_{24h\text{-}inf}$	Area under the plasma concentration-time curve from 24 hours after the completion of dosing to infinity	投与終了後 24 時間から無限時間までの血漿中濃度―時間曲線下面積
BLQ	Below the lower limit of quantification	定量下限値未満
BSA	Bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
C_0	Plasma drug concentration at the completion of dosing	投与終了時の血漿中濃度
CDC	Complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CDER	Center for Drug Evaluation and Research	米国 FDA・医薬品評価研究センター
CGRP	Calcitonin gene-related peptide	カルシトニン遺伝子関連ペプチド
CL	Clearance	クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
^{51}Cr	^{51}Chromium	クロム 51
ECG	Electrocardiogram	心電図
E:T	Effector cell : Target cell	エフェクター細胞：標的細胞
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法

略語	英語	日本語
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GAH-FITC	Fluorescein isothiocyanate-labelling Goat anti-human antibody	フルオレセイン標識ヤギ抗ヒト抗体
GAH-HRP	Horse radish peroxidase labelling Goat anti-human antibody	ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト抗体
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor	顆粒球コロニー刺激因子
GD	Disialoganglioside	ジシアロガングリオシド
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
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
HNSTD	Highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
HRP	Horse radish peroxidase	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
^{125}I	^{125}Iodine	ヨウ素 125
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
ID	Percentage of injected dose	投与放射能量に対する放射能の割合
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IHC	Immunohistochemistry	免疫組織染色法
IL-2	Interleukin-2	インターロイキン-2
^{111}In	^{111}Indium	インジウム 111
Kd	Dissociation constant	解離定数
K_2-EDTA	Dipotassium ethylenediaminetetraacetate	エチレンジアミン四酢酸二カリウム
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限値
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	マクロファージコロニー刺激因子
MHC	Major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
NCI	National Cancer Institute	米国国立がん研究所
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand White	－

略語	英語	日本語
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
QC	Quality control	－
rhG-CSF	Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor	遺伝子組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子
rhGM-CSF	Recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor	遺伝子組換え型ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
rhIL-2	Recombinant human interleukin-2	遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-2
rmGM-CSF	Recombinant mouse granulocyte macrophage colony-stimulating factor	遺伝子組換え型マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	－
SCID	Severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全
SD	Sprague-Dawley	－
SDS	Sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SE	Standard error	標準誤差
SEM	Standard error of mean	平均値の標準誤差
SJL	Swiss Jim Lambert	－
$t_{1/2}$	Elimination half-life at terminal phase	終末相半減期
$t_{1/2\alpha}$	Elimination half-life at phase α	α相半減期
$t_{1/2\beta}$	Elimination half-life at terminal phase β	β相半減期
TEA	Touch evoked agitation	接触誘発興奮
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	Time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TMB	Tetramethyl benzidine	テトラメチルベンジジン
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid subtype 1	－
UTC	United Therapeutics Corporation	－
ULOQ	Upper limit of quantification	定量上限値
Vd	Volume of distribution	分布容積

2.6.1　緒言

ジヌツキシマブ（遺伝子組換え）（ch14.18 とも表記，以下，「ジヌツキシマブ」）は，ヒト神経芽腫細胞表面に発現するジシアロガングリオシド（GD）2 を特異的に認識し結合するマウス抗 GD2 モノクローナル抗体（Mab 14.18 及び 14.G2a）の可変部領域とヒト免疫グロブリン G（IgG1κ）の定常領域からなるマウス-ヒトキメラ型モノクローナル抗体である．

ジヌツキシマブの開発にあたっては，可変領域遺伝子が同一であるMab 14.18及び14.G2aで得られた非臨床試験データも使用し評価した．Mab 14.18は，GD2を特異的に認識し結合するマウスモノクローナルIgG3抗体である[1)]．また，14.G2aは，Mab 14.18のIgG2aアイソタイプスイッチ変異型であり，親抗体と同程度の抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性，補体依存性細胞傷害（CDC）活性及びヌードマウスにおける神経芽腫増殖抑制作用を有する[2)]．

ジヌツキシマブは，マウスモノクローナル抗体である14.G2aの重鎖及び軽鎖の可変領域遺伝子並びにヒト重鎖（H鎖）IgG1及び軽鎖（L鎖）κ鎖の定常領域遺伝子からなるキメラ型モノクローナル抗体であり，GD2を特異的に認識し結合する．ジヌツキシマブは，マウスミエローマ（Sp2/0）細胞により産生される糖タンパク質（分子量：約150,000）であり，443個のアミノ酸残基からなる2本のH鎖（γ1鎖）及び220個のアミノ酸残基からなる2本のL鎖（κ鎖）から構成されている．

ジヌツキシマブは，メラノーマや神経芽腫など，ヒトの神経外胚葉性腫瘍に極めて多量に存在するGD2と特異的に結合し，ADCC作用[1, 3-7)]及びCDC作用[1, 3, 7)]を介して，メラノーマ細胞及び神経芽腫細胞の溶解を惹起する．

承認申請時の効能又は効果並びに用法及び用量を以下の通りに示す．

【効能又は効果】　神経芽腫

【用法及び用量】　フィルグラスチム（遺伝子組換え）又はテセロイキン（遺伝子組換え）との併用において，通常，ジヌツキシマブ（遺伝子組換え）として 1 回 17.5 mg/m^2（体表面積）を以下の投与間隔で 10～20 時間かけて点滴静注する．

1 コースを 28 日とした全 6 コースからなり，1，3，5 コースは本剤を 4～7 日目に投与する．2，4，6 コースは本剤を 8～11 日目に投与する．

2.6.1.1　参考文献一覧

1）　Mujoo, K., Cheresh, D.A., Yang, H.M., et al. Disialoganglioside G_{D2} on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytolysis and suppression of tumor growth. Cancer Res. 1987, 47(4), 1098-1104.

2） Mujoo, K., Kipps, T.J., Yang, H.M., et al. Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside G_{D2} antibody 14.18. Cancer Res. 1989, 49(11), 2857-2861.

3） Mueller, B.M., Romerdahl, C.A., Gillies, S.D., et al. Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. J Immunol. 1990, 144(4), 1382-1386.

4） Barker, E., Mueller, B.M., Handgretinger, R., et al. Effect of a chimeric anti-ganglioside G_{D2} antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. Cancer Res. 1991, 51(1), 144-149.

5） Kendra, K., Malkovska, V., Allen, M., et al. In vivo binding and antitumor activity of ch14.18. J Immunother. 1999, 22(5), 423-430.

6） Zeng, Y., Fest, S., Kunert, R., et al. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. Mol Immunol. 2005, 42(11), 1311-1319.

7） Chen, R.L., Reynolds, C.P., Seeger, R.C. Neutrophils are cytotoxic and growth-inhibiting for neuroblastoma cells with an anti-GD2 antibody but, without cytotoxicity, can be growth-stimulating. Cancer Immunol Immunother. 2000, 48(11), 603-612.

目次

2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....9
2.6.2.2.1 種々の腫瘍に対する Mab 14.18 の反応性（Mujoo 1987） 9
2.6.2.2.2 腫瘍細胞における抗 GD2 抗体の結合部位数（Mujoo 1987；Mueller 1990） ...10
2.6.2.2.2.1 Mab 14.18 の神経芽腫細胞への結合（Mujoo 1987） 10
2.6.2.2.2.2 ch14.18 又は 14.G2a のメラノーマ細胞への結合（Mueller 1990） 11
2.6.2.2.3 抗 GD2 抗体の神経芽腫細胞株及びメラノーマ細胞株に対する ADCC 誘導作用（Mujoo 1987；Mueller 1990；Barker 1991；Kendra 1999；Zeng 2005） 11
2.6.2.2.3.1 神経芽腫細胞に対する Mab 14.18 を介した ADCC（Mujoo 1987） 11
2.6.2.2.3.2 メラノーマ細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した ADCC（Mueller 1990） 12
2.6.2.2.3.3 神経芽腫細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した ADCC（Barker 1991） 12
2.6.2.2.3.4 メラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した ADCC（Kendra 1999） 14
2.6.2.2.3.5 神経芽腫細胞又はメラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した ADCC（Zeng 2005） 15
2.6.2.2.4 神経芽腫細胞の増殖における ch14.18 を介した ADCC 及び好中球の役割（Chen 2000） 16
2.6.2.2.5 顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）による抗 GD2 抗体の ADCC 活性増強作用 18
2.6.2.2.5.1 遺伝子組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子（rhG-CSF）投与を受けたがん患者由来の好中球により抗 GD2 抗体の神経芽腫細胞に対する ADCC 活性が発揮（増強）される（Michon 1995） 18
2.6.2.2.5.2 G-CSF が神経芽腫のマウス Xenograft モデルで抗 GD2 抗体（220-51）の抗腫瘍効果を増強する（Fukuda 1998） 20
2.6.2.2.5.3 G-CSF が ADCC 活性を増強し臨床効果を増大させる（リンパ腫）（Stockmeyer 2001；Stockmeyer 2002） 21
2.6.2.2.6 抗 GD2 抗体の CDC 誘導作用（Mujoo 1987；Mueller 1990；Zeng 2005） 23
2.6.2.2.6.1 メラノーマ細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した CDC（Mueller 1990） 24
2.6.2.2.6.2 神経芽腫細胞又はメラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した CDC（Zeng 2005） 25
2.6.2.2.6.3 神経芽腫細胞に対する Mab 14.18 を介した CDC（Mujoo 1987） 25
2.6.2.2.7 SCID マウスにおける ch14.18 のメラノーマ細胞への結合（Kendra 1999） 25
2.6.2.2.8 SCID マウスにおける ch14.18 の抗腫瘍活性（Kendra 1999） 27

2.6.2.2.9 無胸腺マウスにおける Mab 14.18 の抗腫瘍活性（Mujoo 1987） 28
2.6.2.3 副次的薬理試験.....29
2.6.2.3.1 14.G2a における神経組織への結合（IHC 評価）（Vriesendorp 1997） 29
2.6.2.3.2 抗 GD2 抗体の疼痛誘発作用.....29
2.6.2.3.2.1 ch14.18 投与による疼痛誘発作用（Slart 1997） 29
2.6.2.3.2.2 ch14.18 又は 14.G2a 投与による疼痛誘発作用（Xiao 1997） 32
2.6.2.3.2.3 14.G2a 投与による疼痛誘発作用（Sorkin 2002） 35
2.6.2.4 安全性薬理試験.....37
2.6.2.4.1 中枢神経系.....37
2.6.2.4.2 カニクイザルの安全性薬理試験における用量設定試験（試験番号：[redacted]354-004）
.....37
2.6.2.4.3 カニクイザルにおけるジヌツキシマブの心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験（試験番号：[redacted]354-005） 38
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用.....40
2.6.2.6 考察及び結論.....40
2.6.2.7 図表 42
2.6.2.8 参考文献 42

略語等一覧

略語	英語	日本語
ADA	Anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
A/G	Albumin / globulin	アルブミン／グロブリン
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC_{0-4h}	Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 4 hours after the completion of dosing	投与終了時から投与終了後 4 時間までの血漿中濃度―時間曲線下面積
AUC_{0-48h}	Area under the plasma concentration-time curve from the start of dosing to 48 hours after the dosing	投与開始（時間 0）から 48 時間までの血漿中濃度―時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the plasma concentration-time curve from the start of final dosing to last time point quantitatable	最終投与開始時から，最終的に血漿中濃度が定量可能な時間 (t) までの血漿中濃度―時間曲線下面積
$AUC_{24h-inf}$	Area under the plasma concentration-time curve from 24 hours after the completion of dosing to infinity	投与終了後 24 時間から無限時間までの血漿中濃度―時間曲線下面積
BLQ	Below the lower limit of quantification	定量下限値未満
BSA	Bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
C_0	Plasma drug concentration at the completion of dosing	投与終了時の血漿中濃度
CDC	Complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CDER	Center for Drug Evaluation and Research	米国 FDA・医薬品評価研究センター
CGRP	Calcitonin gene-related peptide	カルシトニン遺伝子関連ペプチド
CL	Clearance	クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
^{51}Cr	^{51}Chromium	クロム 51
ECG	Electrocardiogram	心電図
E:T	Effector cell : Target cell	エフェクター細胞：標的細胞
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法

略語	英語	日本語
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GAH-FITC	Fluorescein isothiocyanate-labelling Goat anti-human antibody	フルオレセイン標識ヤギ抗ヒト抗体
GAH-HRP	Horse radish peroxidase labelling Goat anti-human antibody	ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト抗体
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor	顆粒球コロニー刺激因子
GD	Disialoganglioside	ジシアロガングリオシド
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
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
HNSTD	Highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
HRP	Horse radish peroxidase	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
^{125}I	^{125}Iodine	ヨウ素 125
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
ID	Percentage of injected dose	投与放射能量に対する放射能の割合
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IHC	Immunohistochemistry	免疫組織染色法
IL-2	Interleukin-2	インターロイキン-2
^{111}In	^{111}Indium	インジウム 111
Kd	Dissociation constant	解離定数
K_2-EDTA	Dipotassium ethylenediaminetetraacetate	エチレンジアミン四酢酸二カリウム
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限値
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	マクロファージコロニー刺激因子
MHC	Major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
NCI	National Cancer Institute	米国国立がん研究所
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand White	－

略語	英語	日本語
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
QC	Quality control	－
rhG-CSF	Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor	遺伝子組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子
rhGM-CSF	Recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor	遺伝子組換え型ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
rhIL-2	Recombinant human interleukin-2	遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-2
rmGM-CSF	Recombinant mouse granulocyte macrophage colony-stimulating factor	遺伝子組換え型マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	－
SCID	Severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全
SD	Sprague-Dawley	－
SDS	Sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SE	Standard error	標準誤差
SEM	Standard error of mean	平均値の標準誤差
SJL	Swiss Jim Lambert	－
$t_{1/2}$	Elimination half-life at terminal phase	終末相半減期
$t_{1/2\alpha}$	Elimination half-life at phase α	α相半減期
$t_{1/2\beta}$	Elimination half-life at terminal phase β	β相半減期
TEA	Touch evoked agitation	接触誘発興奮
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	Time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TMB	Tetramethyl benzidine	テトラメチルベンジジン
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid subtype 1	－
UTC	United Therapeutics Corporation	－
ULOQ	Upper limit of quantification	定量上限値
Vd	Volume of distribution	分布容積

2.6.2.1 まとめ

ジヌツキシマブ（遺伝子組換え）（ch14.18とも表記，以下，「ジヌツキシマブ」）は，ヒト神経芽腫細胞表面に発現するジシアロガングリオシド（GD）2を特異的に認識し結合するマウス抗GD2モノクローナル抗体（Mab 14.18及び14.G2a）の可変部領域とヒト免疫グロブリンG（IgG1κ）の定常領域からなるマウス-ヒトキメラ型モノクローナル抗体である．

ジヌツキシマブは，米国国立がん研究所（NCI）により，高リスク神経芽腫の小児患者の治療薬ch14.18として約20年に渡って開発されてきた．第III相試験であるANBL0032（DIV-NB-301）試験で併用療法におけるジヌツキシマブの有効性が確認された後，2010年7月にUnited Therapeutics Corporation（UTC）がNCIと共同研究開発契約を締結し，ジヌツキシマブの承認申請のための非臨床評価を開始した．そのため，初期の開発段階ではNCIが製造した製剤（ch14.18と表記）を使用し，UTCが開発を開始した以降はUTCが製造した製剤（ジヌツキシマブと表記）を使用している．

ジヌツキシマブの開発にあたっては，可変領域遺伝子が同一であるMab 14.18及び14.G2aで得られた非臨床試験データも含めて評価した．Mab 14.18は，GD2を特異的に認識し結合するマウスモノクローナルIgG3抗体である[1)]．また，14.G2aは，Mab 14.18のIgG2aアイソタイプスイッチ変異型であり，親抗体と同程度の抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性，補体依存性細胞傷害（CDC）活性及びヌードマウスにおける神経芽腫増殖抑制作用を有する[2)]．なお，後述するように，ch14.18の結合親和性，結合パターン，*in vitro*及び*in vivo*生物学的活性は，Mab 14.18及び14.G2aと類似していた．

ch14.18 の薬理作用（効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験）については Mab 14.18 及び 14.G2a も含め公表論文を基に評価した．

カニクイザルの安全性試験における用量設定試験の結果を基にカニクイザルにおける心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験を実施した．カニクイザルにおける心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験は，「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」（平成 9 年 3 月 26 日付け厚生省令第 21 号）（GLP）に準じて実施した．

効力を裏付ける試験において，Mab 14.18 は，神経芽腫，メラノーマ，膠芽腫及び小細胞肺がん患者由来のがん組織あるいは株化がん細胞と結合することが，免疫組織染色法（IHC）及び酵素免疫測定法（ELISA）で明らかとなっている．これらの結果に基づいて Mujoo らは，神経外胚葉を起源とする腫瘍（神経芽腫，メラノーマ及び神経膠腫）を Mab 14.18 が認識して結合すると考察している．さらに Mab 14.18 は，6 種類の GD2 陽性ヒト神経芽腫細胞（IMR-6，SMS-KCNR，CHP-134，NMB-7，SK-N-AS 及び SMS-KAN）全てに結合し，その細胞 1 個あたりの平均結合部位数は $1.1\sim2.7\times10^5$ 個であった [1)]．また Mueller らは，GD2 陽性 M21 メラノーマ細胞 1 個あたりの ch14.18 又は 14.G2a の結合部位数はそれぞれ 1.5×10^7 個及び 1.4×10^7 個，解離定数（K_d）はそれぞれ 11.2 nmol/L 及び 11.9 nmol/L であり，両抗体は同等の親和性を示すことを報告している [3)]．

ch14.18，14.G2a 及び Mab 14.18 は，GD2 陽性神経芽腫細胞及びメラノーマ細胞の ADCC を誘導することが多くの研究者により報告されている．さらに可溶性サイトカインである

遺伝子組換え型ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（rhGM-CSF）及び遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-2（rhIL-2）は，ch14.18 を介した GD2 陽性腫瘍細胞の溶解を促進することから，ch14.18 の抗腫瘍効果を高めるのに有用であると考えられている[1, 3-6]．また，GD2 陽性神経芽腫細胞において，好中球及び末梢血単核細胞（PBMC）は ch14.18 とともに，ADCC を誘導した．さらに，rhGM-CSF が添加された場合，好中球のみで ADCC が増強された．好中球において，エフェクター細胞：標的細胞（E:T）比が高く，ch14.18 が高濃度でかつ rhGM-CSF が添加されているとき，GD2 陽性神経芽腫細胞の増殖がより強く阻害されたが, GD2 陰性神経芽腫細胞では好中球により神経芽腫細胞の増殖が亢進し, ch14.18 による抑制は認められなかった[7]．

ADCC 誘導作用に加えて，ch14.18 は神経芽腫細胞及びメラノーマ細胞に対して，14G2a はメラノーマ細胞に対して，Mab14.18 は神経芽腫細胞に対して，それぞれ CDC を誘導することが報告されている[1, 3, 6]．

重症複合免疫不全マウス（C.B.-17 scid/scid マウス）（以下，「SCID マウス」）の腹腔に 10^7 個の M21 メラノーマ細胞を接種すると，2～3 週間後には最大径 4 mm 程度の小結節が腹膜，腸間膜，横隔膜に認められる．この担がん SCID マウスに 1.0 mg の ch14.18 を腹腔内投与すると，投与 10 時間後には 27%の腫瘍細胞に ch14.18 の結合が認められ，結合レベルは投与 13 時間（58%）と 24 時間後（56%）の時点で一定であった．また，0.01，0.1 又は 1.0 mg の ch14.18 を腹腔内投与すると，ch14.18 の結合は投与量に比例して増加した．免疫組織化学的検討において，1.0 mg では ch14.18 は腫瘍細胞 20 個分の深さまで透過したが，0.01 mg では透過は認められなかった．さらに，M21 メラノーマ細胞（10^6 個）を，ch14.18（0.5 mg），PBMC（M21 細胞の 3～30 倍）及び rhIL-2（1,500 U/100 μL）とともに SCID マウスに皮下投与したとき，GD2 陽性メラノーマ腫瘍の増殖が阻害された[5]．

SK-N-AS 神経芽腫細胞を皮下移植したヌードマウス（BALB/c athymic (nu/nu)マウス）（以下，「無胸腺マウス」）に，200 μg の Mab 14.18 を反復腹腔内投与したとき，神経芽腫形成の遅延が認められている[1]．

副次的薬理試験に関しては，以下の報告がある．

SJL マウス，Lewis ラット，NZW ウサギ及びビーグル犬を用いて神経組織における GD2 の分布を検討するために IHC を実施した．これらの動物の腸間膜神経節及び背根神経節では神経細胞に部分的な GD2 の染色が観察され，小脳顆粒層にも染色が観察された．NZW ウサギ及びビーグル犬の坐骨神経では，多くの神経線維の染色が観察された一方，SJL マウス及び Lewis ラットの坐骨神経では，一部の神経線維のみに染色が観察された．ビーグル犬では迷走神経の神経線維に染色が観察された[8]．Slart らによれば，Sprague-Dawley（SD）ラットに 0.1，1.0，3.0 及び 10.0 mg/kg の ch14.18 を急速静脈内投与したとき，機械的アロディニアが見られ，1.0，3.0 及び 10.0 mg/kg の投与量では投与後 1 時間以内に一定に達し，24～48 時間後においても減弱したものの持続していた．この機械的アロディニアの発現に伴って，心拍数増加及び血圧上昇が観察された．これらの所見は，臨床で観察されている疼痛に関連している可能性があると Slart らは推察している[9]．Xiao らの SD ラットを用いた試験

では，1 mg/kg の ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与したとき，機械的アロディニアが投与後 15 分以内に発現し，45～60 分の時点で一定に達した．ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与すると，背景活動が認められた末梢神経の Aδ及び C 線維の数が，対照群及び陰性対照群と比較して増加した．また，対照群と比較して，ch14.18 及び 14.G2a 投与群では Aδ線維の平均機械的閾値の有意な低下が見られた．一方，C 線維の平均機械的閾値も低下傾向を示したが，減少は陰性対照群と同程度であった．リドカインを急速静脈内投与したとき，抗 GD2 抗体に関連する背景活動が減少した．これらの結果から，抗 GD2 抗体が末梢神経に作用して機械的アロディニアを直接的あるいは間接的に発現すること及びリドカインは抗 GD2 抗体と併用投与した場合に鎮痛薬として有用である可能性があると報告している [10]．Sorkin らは，14.G2a を 1 mg/kg の投与量で SD ラットに急速静脈内投与したとき，投与後 30 分の時点で機械的アロディニアが発現し，一定の状態に達すること，14.G2a を 0.01，0.05 及び 0.1 ng の投与量で髄腔内投与したとき，3 時間の観察期間を通して機械的アロディニアが発現したが，0.5 ng の投与量では機械的アロディニアの発現が見られなかったと報告している．一方，静脈内投与においても髄腔内投与においても 14.G2a により熱アロディニアは発現しなかった．75 μg のカプサイシンを髄腔内に前投与し，0.01 ng の 14.G2a を髄腔内投与した場合に，機械的アロディニアが見られなかった．カプサイシンにより脊髄背側部のカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）量が半分以下に減少した．これらの結果から Sorkin らは抗 GD2 抗体により惹起される機械的アロディニアは，ペプチド作動性求心線維を介している可能性が高いと推察している [11]．

カニクイザルの安全性薬理試験における用量設定試験で各群雄 2 例にジヌツキシマブを 10.5 mg/kg/日又は 21 mg/kg/日の用量で静脈内投与（30 分間の持続注入）したところ，陰茎包皮の腫脹が，10.5 mg/kg/日投与群の 2 例で，投与中又は投与終了直後～投与終了 2 時間後まで認められた．陰部皮膚の赤変化が，10.5 mg/kg/日投与群の 1 例で，投与中のみに認められた．陰茎包皮の腫脹が，21 mg/kg/日投与群の 1 例で，投与中～投与終了 2 時間後まで認められた．陰茎包皮の腫脹及び陰部皮膚の赤変化に用量依存性は認められなかった．また，嘔吐が 21 mg/kg/日投与群の 2 例で，投与終了直後から 30 分の間に発現した．

カニクイザルにおける心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験で，14 mg/kg/日のジヌツキシマブを単回静脈内投与（10 時間の持続注入）開始後に心血管系への影響（血圧上昇及び心拍数の増加）が認められたが，呼吸系への影響は認められず，心電図（ECG）パラメータの変化も認められなかった．

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 種々の腫瘍に対する Mab 14.18 の反応性（Mujoo 1987）

（添付資料：4.3-1）

種々の腫瘍組織及び腫瘍細胞株に対する Mab 14.18 の反応性を検討した．間接的免疫ペルオキシダーゼアッセイを用いて，腫瘍組織に対する Mab 14.18 の結合を IHC により可視化した．Mab 14.18 を産生するハイブリドーマの培養上清を希釈し，腫瘍組織切片に添加して室温で 1 時間インキュベートした．洗浄後，ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を添加し室温で 1 時間インキュベートし，洗浄後，ジアミノベンジジン及び過酸化水素で発色反応を引き起こした．種々の腫瘍細胞株に対する Mab 14.18 の反応性は ELISA により検討した．1 ウェルあたり 5×10^4 個の培養腫瘍細胞を播種し，Mab 14.18 を含む培養上清を 0.1％ウシ血清アルブミン（BSA）含有のバッファーで希釈（1:2）したものを添加して 4℃で 1 時間インキュベートした．洗浄後，HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を添加してさらに 4℃で 1 時間インキュベートした．再度洗浄後，基質溶液（*o*-フェニレンジアミン及び過酸化水素水を含む）を添加し，492 nm での吸光度を測定した [1)]．

腫瘍組織のなかでは，Mab 14.18 は神経芽腫，メラノーマ，膠芽腫及び小細胞肺がんと強く結合した（表 2.6.2.2.1-1 参照）．

表 2.6.2.2.1-1 Mab 14.18 の腫瘍組織との反応性（IHC）

腫瘍	反応性
神経芽腫	＋＋＋
メラノーマ	＋＋＋
膠芽腫	＋＋＋
小細胞肺がん	＋＋＋
ユーイング肉腫	＋／－
肺腺がん	－
胃がん	－
肺扁平上皮がん	－
乳がん	－
線維芽細胞様腫瘍	－
結腸がん	－
口腔扁平上皮がん	－

＋＋＋：強陽性，＋／－：弱陽性又は陰性，－：陰性
引用元：4.3-1（Mujoo 1987 表 2 改変）

また，Mab 14.18 は多くの神経芽腫，メラノーマ，神経膠腫及び小細胞肺がんの細胞株と結合した（表 2.6.2.2.1-2 参照）．

表 2.6.2.2.1-2　Mab 14.18 の腫瘍細胞株との反応性（ELISA）

腫瘍	種類	反応性
神経芽腫	LAN-1	＋＋＋＋
	LAN-5	＋＋＋＋
	SMS-KCNR	＋＋＋＋
	CHP-134	＋＋＋＋
	SMS-KAN	＋＋＋＋
	NMB-7	＋＋＋＋
	IMR-6	＋＋＋＋
	SK-N-AS	＋＋＋
メラノーマ	Melur	＋
	A375 P	＋＋＋
	A375 Met	＋＋＋
	FM8	＋＋＋
	FM9 Met	＋＋＋
	M-14	＋＋＋＋
	M21	＋＋＋＋
神経膠腫	U-138 MG*	＋＋＋＋
小細胞肺がん	T293	＋＋＋＋
	NCI-N-417	＋＋＋＋
	NCI-H-82	＋＋
	NCI-H-69	＋＋
その他の腫瘍株	膵がん（増殖が速い）	－
	膵がん（増殖が遅い）	－
	膵がん 1320（転移性）	－
	肺腺がん（UCLA-P3）	－
リンパ芽球様細胞株	L-14（B 細胞）	－
	LG-2（B 細胞）	－
	MOLT-4（T 細胞）	－
	HPB-ALL（T 細胞）	－

492 nm での吸光度：0.15～0.3（＋），0.3～0.6（＋＋），0.6～0.9（＋＋＋），0.9～＞2.0（＋＋＋＋），0～0.050（－）

＊：U-138 MG は膠芽腫由来の細胞株

引用元：4.3-1（Mujoo 1987 表 1 改変）

これらの結果から，Mab 14.18 は，神経外胚葉を起源とする腫瘍（神経芽腫，メラノーマ及び神経膠腫）を認識して結合すると Mujoo らは述べている．

2.6.2.2.2　腫瘍細胞における抗 GD2 抗体の結合部位数（Mujoo 1987；Mueller 1990）

2.6.2.2.2.1　Mab 14.18 の神経芽腫細胞への結合（Mujoo 1987）

（添付資料：4.3-1）

6 種類の GD2 陽性ヒト神経芽腫細胞の表面における Mab 14.18 への結合部位数をスキャッチャード解析して検討した．10^6 個［Roswell Park Memorial Institute（RPMI）培地 0.1 mL あたり］の神経芽腫細胞を，ヨウ素 125（^{125}I）で標識した Mab 14.18（5～600 ng に漸増）とともに 4℃で 1 時間インキュベートした [1)]．

その結果，Mab 14.18 は，検討した全ての神経芽腫細胞に結合した．しかし，神経芽腫細胞の種類によって 1 細胞あたりの Mab 14.18 平均結合部位数が異なっており，その範囲は，1.1～2.7×10^5 個であった（表 2.6.2.2.2.1-1 参照）．

表 2.6.2.2.2.1-1　ヒト神経芽腫細胞における Mab 14.18 の平均結合部位数

細胞株	1 細胞あたりの Mab 14.18 平均結合部位数（×10^5）
IMR-6	2.1.
SMS-KCNR	2.7.
CHP-134	1.6.
NMB-7	2.7.
SK-N-AS	1.4.
SMS-KAN	1.1.

引用元：4.3-1（Mujoo 1987 表 3 改変）

2.6.2.2.2.2　ch14.18 又は 14.G2a のメラノーマ細胞への結合（Mueller 1990）

（添付資料：4.3-3）

GD2 陽性 M21 メラノーマ細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a の結合をスキャッチャード解析して評価した．10^4 個の M21 メラノーマ細胞を，125～2,500 ng の ^{125}I 標識 ch14.18 又は ^{125}I 標識 14.G2a とともに 4℃で 2 時間インキュベートした [3)]．

その結果，M21 メラノーマ細胞 1 個あたりの結合部位数は，ch14.18 が 1.5×10^7 個，14.G2a が 1.4×10^7 個であり，K_d 値は ch14.18 が 11.2 nmol/L，14.G2a が 11.9 nmol/L であった．このことから Mueller らは，ch14.18 と 14.G2a は同等の親和性を有していると結論付けている．

2.6.2.2.3　抗 GD2 抗体の神経芽腫細胞株及びメラノーマ細胞株に対する ADCC 誘導作用（Mujoo 1987；Mueller 1990；Barker 1991；Kendra 1999；Zeng 2005）

ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18 の ADCC 作用を，GD2 陽性神経芽腫細胞株（NMB-7，SMS-KCNR，SK-N-AS，IMR-32 及び IMR-6）[1, 4, 6)] 及び GD2 陽性メラノーマ細胞株（M21 及び A375）[3, 5, 6)] を用いて評価した．これらの試験では，エフェクター細胞存在下で，各腫瘍細胞の特異的溶解率（%）を算出し，ADCC 誘導作用を検討した．

2.6.2.2.3.1　神経芽腫細胞に対する Mab 14.18 を介した ADCC（Mujoo 1987）

（添付資料：4.3-1）

クロム 51（^{51}Cr）で標識した SMS-KCNR，IMR-6 及び SK-N-AS 神経芽腫細胞を培養プレートに播種（1 ウェルあたり 5×10^3 個）した後，100 μg/mL の Mab 14.18 を添加した．健康成人由来の PBMC を E:T 比 50：1，100：1 又は 200：1 になるように添加し，37℃で 4 時間インキュベートした．特異的溶解率（%）は計算式｛［（実験における漏出 ^{51}Cr）－（自然漏出 ^{51}Cr）］／［（最大漏出 ^{51}Cr）－（自然漏出 ^{51}Cr）］｝×100 により求めた．自然漏出 ^{51}Cr は標的腫瘍細胞が単独で存在する状態で測定し，最大漏出 ^{51}Cr は 1%ノニデット P-40 を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した [1)]．

Mab 14.18 による特異的溶解率は E:T 比が高いほど大きく，E:T 比 200 : 1 での特異的溶解率は，SMS-KCNR，IMR-6 及び SK-N-AS 神経芽腫細胞で，それぞれ 49%，35%及び 20%であったが，Mab 14.18 非存在下における溶解率はいずれも 5～8%であった（Mujoo 1987 図 5 参照）．

2.6.2.2.3.2 メラノーマ細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した ADCC（Mueller 1990）

（添付資料：4.3-3）

^{51}Cr 標識した M21 及び A375 メラノーマ細胞を培養プレートに播種（1 ウェルあたり 10^3 個）した後，0.001～50 μg/mL の ch14.18 又は 14.G2a を添加した．健康成人由来の PBMC を E:T 比 50 : 1，100 : 1 及び 200 : 1 になるように添加し，37℃で 4 時間インキュベートした．特異的溶解率（%）は 2.6.2.2.3.1 項の計算式に準じて算出した．本実験では，最大漏出 ^{51}Cr は 10%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した [3]．

その結果，M21 メラノーマ細胞の最大特異的溶解率は PMBC のドナーによって異なっていたが，どのドナー由来の PMBC を用いた場合でも ch.14.18 のほうが大きな値を示し，0.5～10 μg/mL の ch14.18 で 25～55%，1～50 μg/mL の 14.G2a で 14～33%であった（Mueller 1990 図 4 参照）．A375 メラノーマ細胞に対しては，少なくとも 100 ng（2 μg/mL）の ch14.18 が細胞溶解に必要であり，14.G2a よりも低濃度の ch14.18 で最大特異的溶解率に達した．

2.6.2.2.3.3 神経芽腫細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した ADCC（Barker 1991）

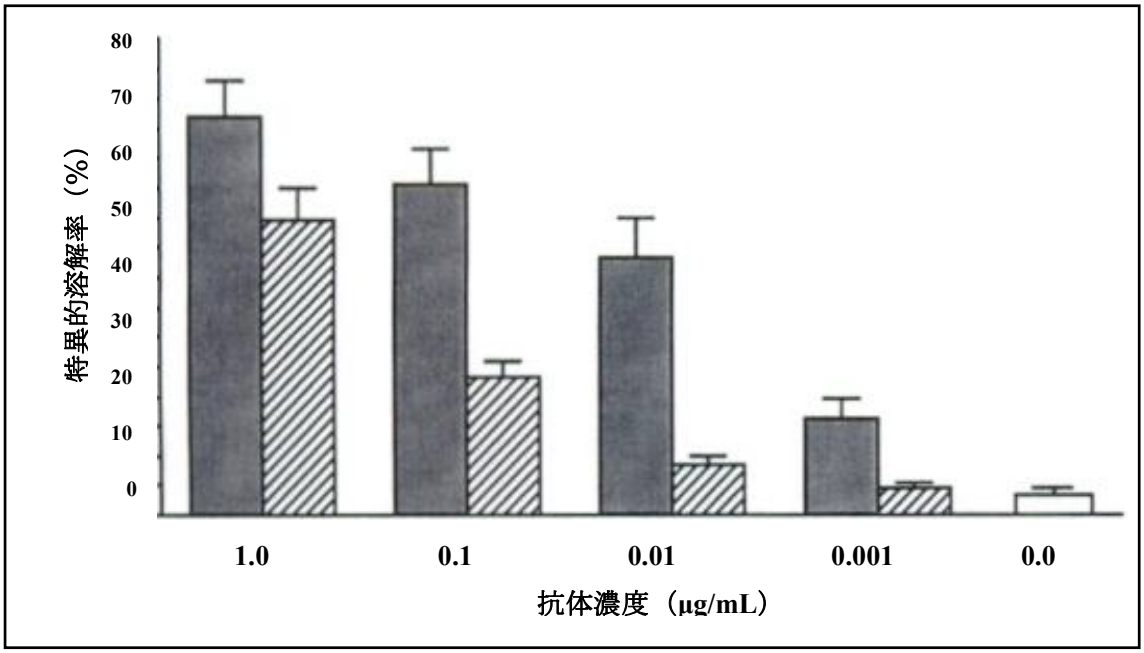
（添付資料：4.3-4）

^{51}Cr 標識した NMB-7 及び IMR-32 神経芽腫細胞を培養プレートに播種（1 ウェルあたり 1～2×10^3 個）した後，ch14.18 又は 14.G2a と PBMC を添加し，次いで rhGM-CSF 存在下又は非存在下，37℃で 4 時間インキュベートした．特異的溶解率（%）は 2.6.2.2.3.1 項の計算式に準じて算出した．本実験では，最大漏出 ^{51}Cr は 10%SDS を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した [4]．

実験 1 では，NMB-7 神経芽腫細胞に健康成人由来の PBMC を E:T 比 100 : 1 になるように添加後，0.001～1.0 μg/mL の ch14.18 又は 14.G2a を添加し，特異的溶解率を検討した．

図 2.6.2.2.3.3-1 から，健康成人由来の PBMC を使用したとき，E:T 比 100 : 1 において，ch14.18 及び 14.G2a は濃度に依存して NMB-7 神経芽腫細胞の特異的溶解率を増加させた．いずれの濃度においても ch14.18 が 14.G2a よりも強い作用を示した．

図 2.6.2.2.3.3-1　NMB-7 神経芽腫細胞における ch14.18 又は 14.G2a を介した ADCC



E:T 比 100：1 における特異的溶解率（3 例の平均値）を示す．黒塗り：ch14.18 存在下，斜線：14.G2a 存在下，白ぬき：抗体非存在下
引用元：4.3-4（Barker 1991 図 2）

実験 2 では，IMR-32 神経芽腫細胞に神経芽腫患者（最終治療後 4 週間以上経過した高リスク患者）由来の PBMC を E:T 比 1.25：1，2.5：1，5：1 又は 10：1 となるように添加し，次いで 0.005～2.5 μg/mL の ch14.18 又は 14.G2a を添加し，特異的溶解率を検討した．

神経芽腫患者由来の PBMC を使用したとき，E:T 比 10：1 での IMR-32 神経芽腫細胞の特異的溶解率は，0.005～2.5 μg/mL の ch14.18 において 33～58%であった．一方，0.005～2.5 μg/mL の 14.G2a では 10～50%であった（Barker 1991 表 1 参照）．本実験においても ch14.18 は 14.G2a よりも強い作用を示した．

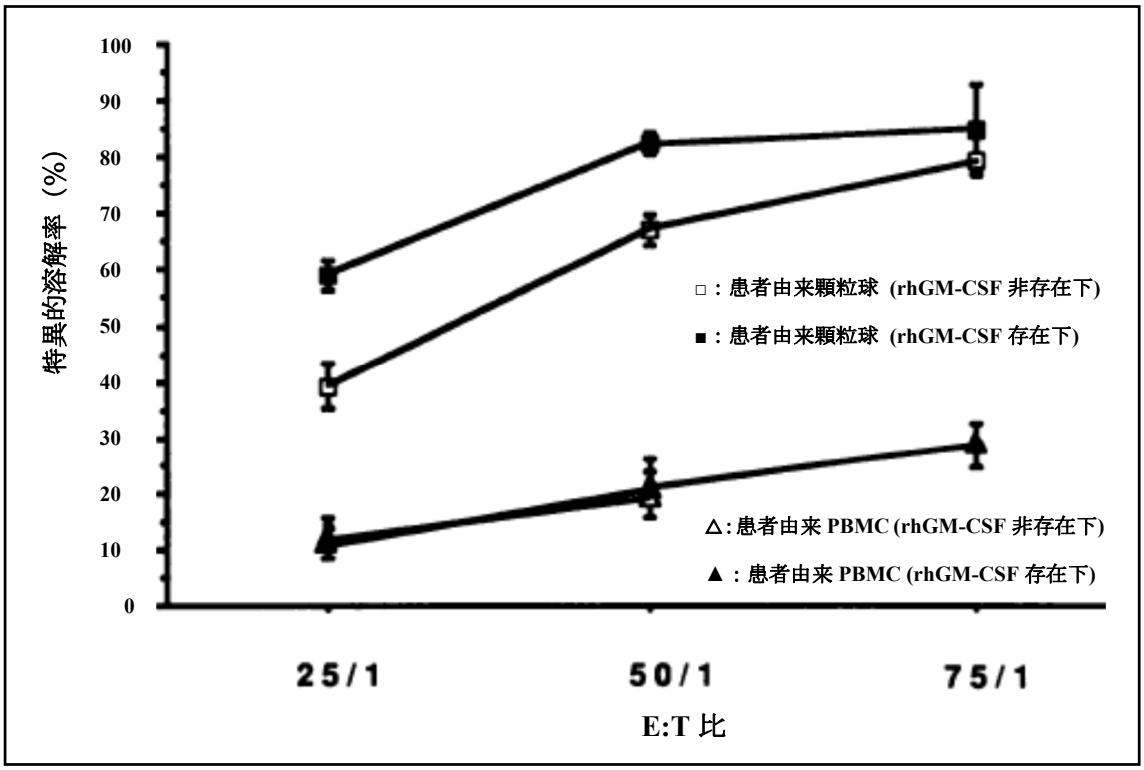
実験 3 では，NMB-7 神経芽腫細胞に健康成人由来の PBMC（接着性又は非接着性によって分離）を E:T 比 100：1 となるように添加後，0.001～1 μg/mL の ch14.18 を添加した．この実験では，接着性の異なる PBMC を用い，ch14.18 を介した特異的溶解率を検討した．

E:T 比 100：1 での健康成人由来の非接着性又は接着性 PBMC を使用したとき，非接着性 PBMC 使用下ではより効果的に標的腫瘍細胞を溶解した．しかし接着性 PBMC 使用下での標的腫瘍細胞の溶解は僅かであった（Barker 1991 図 3 参照）．

実験 4 では，NMB-7 神経芽腫細胞に，神経芽腫患者由来の顆粒球又は PBMC を添加し，100 ng/mL の rhGM-CSF 存在下又は非存在下で ch14.18 を介した特異的溶解率を検討した．

E:T 比は，25：1，50：1 又は 75：1 になるように添加後，1 μg/mL の ch14.18 を添加した．ch14.18 を介した特異的溶解率は，神経芽腫患者由来の PBMC よりも顆粒球において上昇した（図 2.6.2.2.3.3-2 参照）．さらにエフェクター細胞が顆粒球でかつ rhGM-CSF 存在下の場合に，高い溶解率が認められた．この結果は，健康成人由来の場合でも同様であった．

図 2.6.2.2.3.3-2　NMB-7 神経芽腫細胞に対する ch14.18 を介した神経芽腫患者由来の PBMC 又は顆粒球による ADCC



インキュベーション 4 時間での特異的溶解率（3 例の平均値）を示す.
引用元：4.3-4（Barker 1991 図 7）

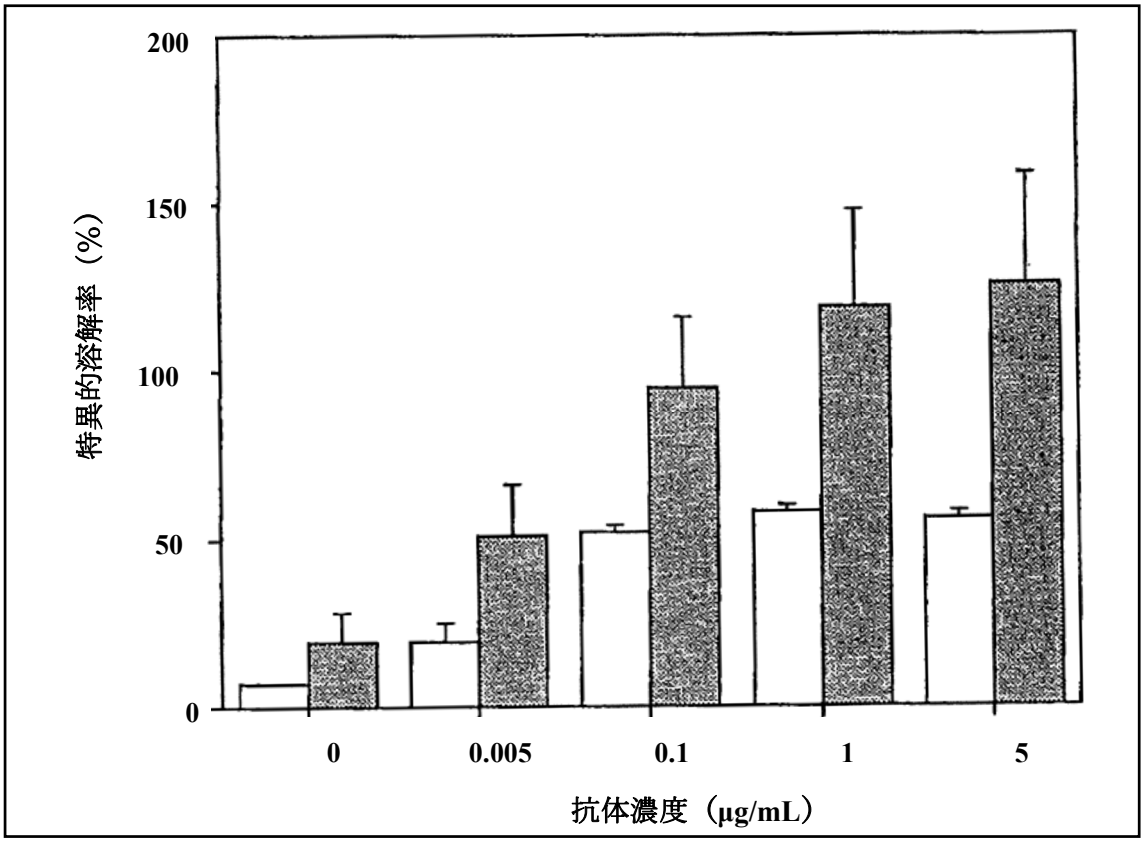
2.6.2.2.3.4　メラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した ADCC（Kendra 1999）

（添付資料：4.3-5）

^{51}Cr 標識した M21 メラノーマ細胞を培養プレートに播種（1 ウェルあたり 5×10^3 個）した．健康成人由来の PBMC を 200 U/mL の rhIL-2 の存在下又は非存在下でプレインキュベート（37℃で 1 時間）した．E:T 比は 6：1，12：1，25：1，50：1 又は 100：1 とした．0～5 μg/mL の ch14.18 を添加し，37℃で 4 時間インキュベートした後，特異的溶解率（%）を 2.6.2.2.3.1 項の計算式に準じて算出した．本実験では，最大漏出 ^{51}Cr は 2%セトリミド溶液を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した [5]．

その結果，0.005 μg/mL の ch14.18 は rhIL-2 非存在下で，PBMC による M21 細胞溶解を促進させることが確認された（図 2.6.2.2.3.4-1 参照）．0.1 μg/mL の ch14.18 では細胞溶解は更に上昇したが，0.1～5 μg/mL では細胞溶解はほぼ同等であった．これらの ch14.18 による細胞溶解作用は，rhIL-2 存在下で更に増強した．

図 2.6.2.2.3.4-1　rhIL-2 の存在下又は非存在下での M21 メラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した ADCC



結果は，rhIL-2 非存在下（白抜き棒）又は存在下（黒塗り棒）での健康成人由来 PBMC による ch14.18 を介した M21 メラノーマ細胞の特異的溶解率［平均値±標準誤差（SE），N＝5］を示す.
引用元：4.3-5（Kendra 1999 図 1）

2.6.2.2.3.5　神経芽腫細胞又はメラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した ADCC（Zeng 2005）

（添付資料：4.3-6）

健康成人由来の PBMC を 200 U/mL の rhIL-2 とともに 72 時間プレインキュベートした．7,500 個の ^{51}Cr 標識した SK-N-AS 神経芽腫細胞及び M21 メラノーマ細胞を E:T 比が 2.5：1，5：1 又は 10：1 になるように培養プレートに添加し，0.001～10 μg/mL の ch14.18 を添加後，37℃で 4 又は 20 時間インキュベートした．特異的溶解率（%）は 2.6.2.2.3.1 項の計算式に準じて算出した．本実験では，最大漏出 ^{51}Cr は 10%SDS を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した [6]．

その結果，インキュベーション時間が長く，E:T 比が高く，更に ch14.18 濃度が高いほど，高い特異的溶解率が得られることが明らかとなった（Zeng 2005 図 5 参照）．

ADCC に関する一連の実験において，Mujoo ら及び Mueller らの結果から，ch14.18, 14.G2a 又は Mab 14.18 と健康成人由来の PBMC を添加した場合，神経芽腫細胞又はメラノーマ細胞に対する ADCC が誘導されることが確認された [1, 3]．

Barker らの結果は，ch14.18 又は 14.G2a と健康成人あるいは神経芽腫患者由来の PBMC 又は顆粒球を添加すると，ADCC が誘導されることを示している．このことから，ch14.18 による ADCC 誘導作用は，神経芽腫患者でも惹起される可能性が考えられた．また ch14.18 の ADCC 誘導作用は，エフェクター細胞が顆粒球でかつ rhGM-CSF を添加することでより強められた[4]．

Kendra らの試験では，ch14.18 の ADCC 誘導作用は，エフェクター細胞に rhIL-2 を添加することにより更に増強した[5]．

Zeng らの試験では，インキュベーション時間が長く，E:T 比が高く，ch14.18 濃度が高いほど，ADCC 誘導作用が増強することが示された[6]．

これらの結果から，ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18 は，GD2 陽性神経芽腫細胞及びメラノーマ細胞に ADCC を誘導することを示している. また, 可溶性サイトカインである rhGM-CSF 及び rhIL-2 は, ch14.18 を介した GD2 陽性腫瘍細胞の溶解を促進することから, ch14.18 の抗腫瘍効果を高めるのに有用である.

2.6.2.2.4　神経芽腫細胞の増殖における ch14.18 を介した ADCC 及び好中球の役割（Chen 2000）

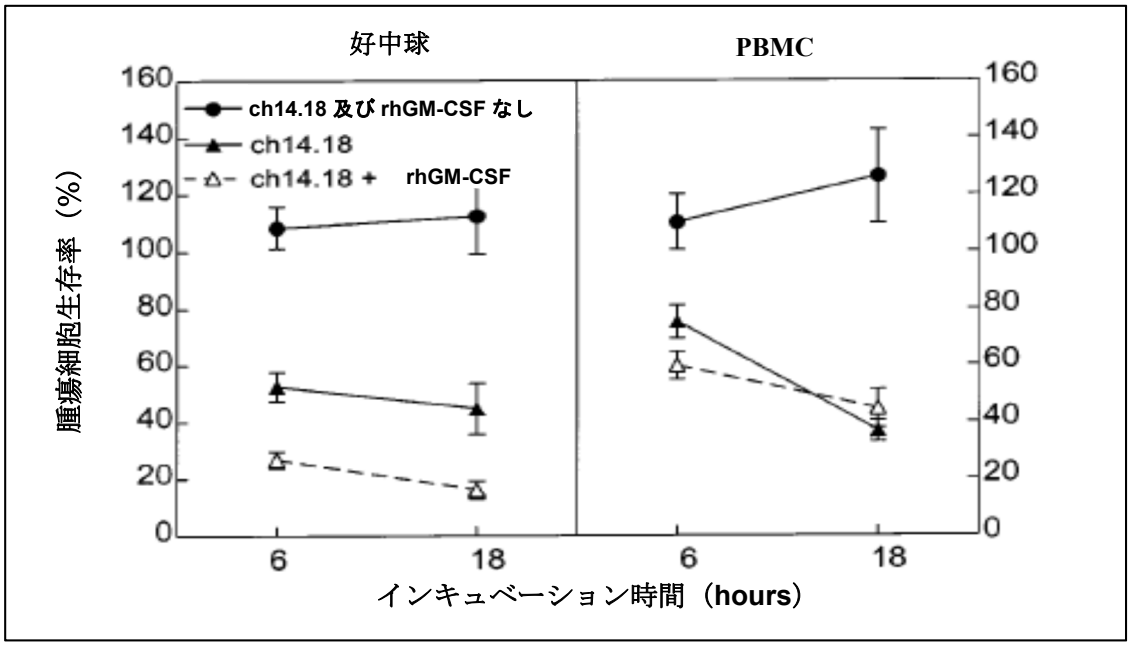
（添付資料：4.3-7）

神経芽腫細胞をカルセインアセトキシメチルエステル（カルセイン AM）又はフルオレセイン二酢酸で蛍光標識し，培養プレートの対照ウェルの蛍光強度に対する百分率［（検体ウェルの蛍光強度／対照ウェルの蛍光強度）×100］で腫瘍細胞生存率（%）を示した．腫瘍細胞生存率が低いほど ADCC 作用が増強されていることを示す[7]．

実験 1 では，カルセイン AM で蛍光標識した GD2 陽性神経芽腫細胞である SMS-LHN, SMS-KCN 又は LA-N-1 を，培養プレートに播種（1 ウェルあたり 2,000 個）した後，ch14.18 及び rhGM-CSF 非存在下，ch14.18（10 μg/mL）存在下及び ch14.18（10 μg/mL）＋rhGM-CSF（250 ng/mL）存在下で，健康成人由来のエフェクター細胞（好中球又は PBMC）とともに，E:T 比 50：1 で，37℃で 6 時間又は 18 時間インキュベートした.

実験 1 では，SMS-LHN 神経芽腫細胞を好中球又は PBMC の存在下で，ch14.18 あるいは ch14.18＋rhGM-CSF と 6 時間又は 18 時間インキュベートすると，腫瘍細胞生存率が低下した（図 2.6.2.2.4-1 参照）．さらに，エフェクター細胞が好中球のときにのみ，rhGM-CSF の添加により ADCC 増強に伴う神経芽腫細胞の生存率が低下したが，PBMC ではそのような効果は見られなかった．同様の結果が SMS-KCN 及び LA-N-1 神経芽腫細胞でも観察された.

図 2.6.2.2.4-1　SMS-LHN 神経芽腫細胞における ch14.18 を介した好中球又は PBMC による腫瘍細胞生存率の経時変化



カルセイン AM 標識した SMS-LHN 神経芽腫細胞に ch14.18 及び rhGM-CSF 無添加（●），ch14.18（10 μg/mL）添加（▲），又は ch14.18（10 μg/mL）＋rhGM-CSF（250 ng/mL）添加（△）の条件下，6 又は 18 時間インキュベートした．平均細胞生存率±SE（N＝8）をプロットした．
引用元：4.3-7（Chen 2000 図 3）

実験 2 では，好中球，ch14.18 及び rhGM-CSF 存在下における GD2 陽性神経芽腫細胞（SMS-KCN，SMS-LHN 及び LA-N-1）及び GD2 陰性神経芽腫細胞（SK-N-SH）の増殖について検討した．これらの神経芽腫細胞（1 ウェルあたり 500 個）に，好中球存在下で，ch14.18 単独（0.1 又は 10 μg/mL）あるいは ch14.18（0.1 又は 10 μg/mL）＋rhGM-CSF（250 ng/mL）を添加し，37℃で 7 日間インキュベートした後，神経芽腫細胞をフルオレセイン二酢酸で蛍光標識し，腫瘍細胞生存率（%）を測定した．なお，E:T 比は 5：1 又は 50：1 とした．その結果，好中球において，E:T 比が高く，ch14.18 が高濃度でかつ rhGM-CSF が添加されているとき，GD2 陽性神経芽腫細胞の増殖がより強く阻害された（Chen 2000 表 1 参照）．しかし，GD2 陰性神経芽腫細胞では好中球により神経芽腫細胞の増殖は促進され，ch14.18 及び rhGM-CSF による増殖阻害は認められなかった．

実験 3 では，好中球を介した神経芽腫細胞の増殖の阻害又は亢進と GD2 発現の関係を検討した．これらの神経芽腫細胞（1 ウェルあたり 500 個）に好中球，好中球＋ch14.18（10 μg/mL），あるいは好中球＋ch14.18（10 μg/mL）＋rhGM-CSF（250 ng/mL）を添加し，37℃で 7 日間インキュベートした後，神経芽腫細胞をフルオレセイン二酢酸で蛍光標識し，腫瘍細胞生存率（%）を測定した．なお，E:T 比は 50：1 とした．その結果，全ての GD2 陽性神経芽腫細胞において，好中球単独と比較して，好中球＋ch14.18 又は好中球＋ch14.18＋rhGM-CSF を添加すると有意に増殖が阻害された（表 2.6.2.2.4-1 参照）．一方，GD2 陰性神

経芽腫細胞では，好中球単独，好中球＋ch14.18 及び好中球＋ch14.18＋rhGM-CSF のいずれにおいても，同程度の神経芽腫細胞の増殖の亢進が認められた．

表 2.6.2.2.4-1 各種神経芽腫細胞における好中球存在下での腫瘍細胞生存率

細胞株	実験 No.	好中球単独	好中球＋ch14.18	好中球＋ch14.18＋rhGM-CSF
		腫瘍細胞生存率（%）		
SMS-KCN (GD2 陽性)	1	156*1	23*1, *2	17*1, *2
	2	104	32*1, *2	17*1, *2
	3	130	47*2	72*2
	4	140	130	61*2
SMS-LHN (GD2 陽性)	1	238*1	33*2	40*1, *2
	2	170	31*2	41*2
	3	177*1	92*2	45*1, *2
	4	137	76*2	80*2
LA-N-1 (GD2 陽性)	1	66*1	19*1, *2	9*1, *2
	2	19*1	9*1	1*1
SK-N-SH (GD2 陰性)	1	475*1	448*1	563*1
	2	270*1	ND	203*1
	3	170*1	141*1	168*1
	4	316*1	264*1	295*1

ND：測定せず
＊1：p＜0.05［対照（腫瘍細胞単独）との腫瘍増殖の比較］（Student's t-test）
＊2：p＜0.05（好中球単独の場合との増殖阻害作用の比較）（Student's t-test）
引用元：4.3-7（Chen 2000 表 2 改変）

以上の結果から，GD2 陽性神経芽腫細胞において，好中球及び PBMC は ch14.18 存在下で，ADCC を誘導した．さらに，rhGM-CSF が添加されることにより，好中球では ADCC が増強され腫瘍細胞の生存率が低下した．好中球の場合，E:T 比が高く，ch14.18 が高濃度でかつ rhGM-CSF が添加されているとき，GD2 陽性神経芽腫細胞の増殖がより強く阻害された．一方，GD2 陰性神経芽腫細胞では好中球により神経芽腫細胞の増殖が促進され，増殖は ch14.18 あるいは ch14.18+ rhGM-CSF により阻害されなかった．

したがって，GD2 陽性神経芽腫細胞において，エフェクター細胞の種類，高い E:T 比，高い抗体濃度及びサイトカインの存在など，複数の要因が最適化されるならば，*in vivo* で最大の抗腫瘍効果が得られると考えられる．

2.6.2.2.5 顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）による抗 GD2 抗体の ADCC 活性増強作用

2.6.2.2.5.1 遺伝子組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子（rhG-CSF）投与を受けたがん患者由来の好中球により抗 GD2 抗体の神経芽腫細胞に対する ADCC 活性が発揮（増強）される（Michon 1995）

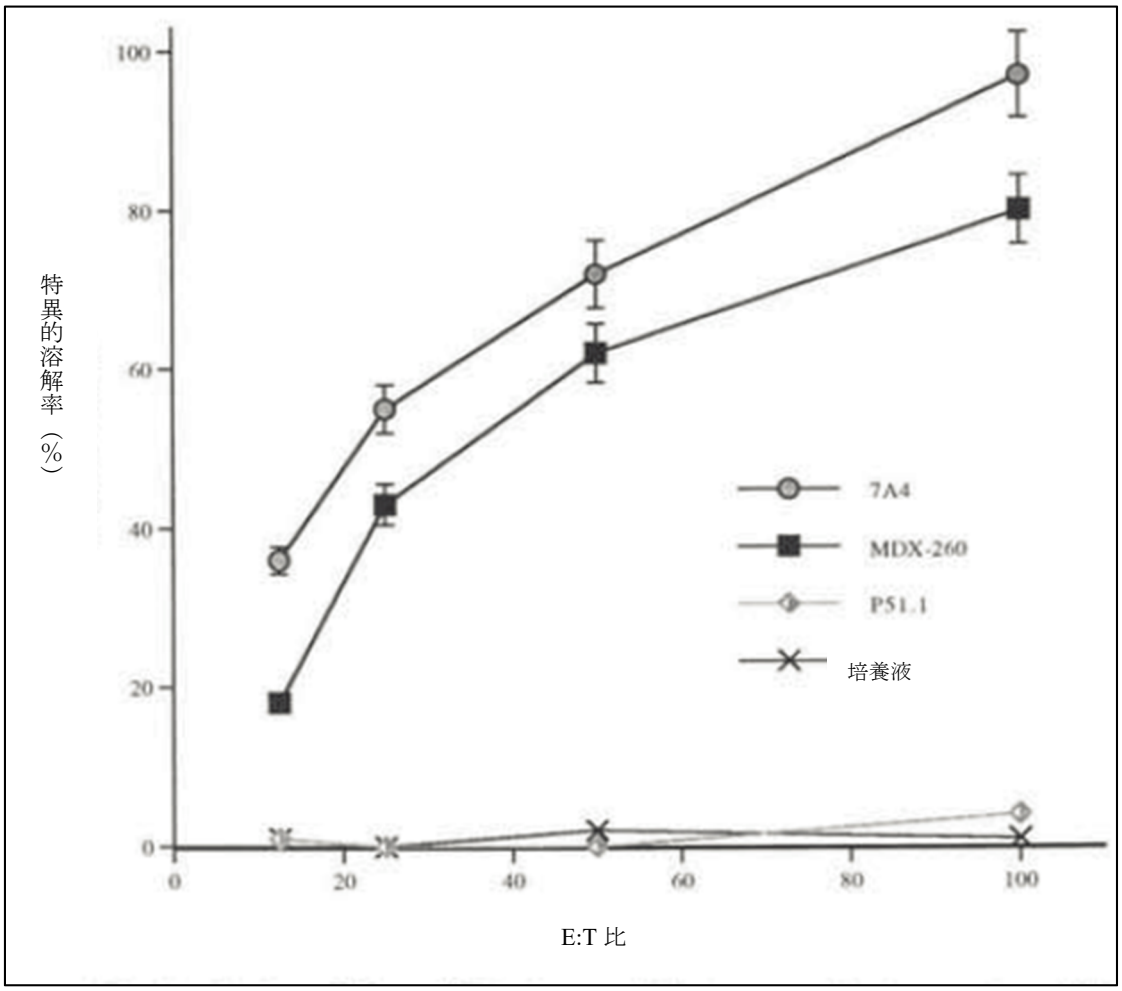
（添付資料：4.3-14）

Michon らは，*in vitro* において好中球による ADCC 増強に G-CSF が関わっていることを述べている[12)]．

^{51}Cr で標識した GD2 陽性神経芽腫細胞（LAN 1）を培養プレートに播種（1 ウェルあたり 5×10^3 個）した後，1 μg/mL の抗 GD2 抗体［7A4（マウス IgG3 モノクローナル抗体）］，MDX-260［7A4 の F(ab')及び抗 Fcγ RI 抗体（22）の F(ab') を結合させた二重特異性抗体］及び P51.1（抗ホスホリルコリン IgG3 抗体）（陰性対照）又は培養液（対照）を添加し，37℃で 30 分インキュベートした．がん患者（非ホジキンリンパ腫，乳がん又は卵巣がんを有する成人あるいは非ホジキンリンパ腫，ユーイング肉腫，横紋筋肉腫，網膜芽細胞腫，神経芽腫又は骨肉腫を有する小児）由来の好中球（成人患者は少なくとも 10 日以上，小児患者は 5 日，それぞれ G-CSF 投与を受けた後，好中球を単離した）を E:T 比 12.5：1～100：1 になるように添加し，37℃で 4 時間インキュベートし特異的溶解率（%）を算出した．なお，特異的溶解率（%）は 2.6.2.2.3.1 項の計算式に準じて算出した．

がん患者（rhG-CSF 投与）の好中球を使用した際の神経芽腫細胞の特異的溶解率（%）を，図 2.6.2.2.5.1-1 に示した．

図 2.6.2.2.5.1-1　がん患者（rhG-CSF 投与）の好中球を使用した際の神経芽腫細胞の特異的溶解率（%）



各時点の平均値±SD
引用元：4.3-14（Michon 1995 図 4）

その結果，全ての E:T 比で 7A4 及び MDX-260 は同様の特異的溶解率（%）を示し，対照群及び陰性対照群はどの E:T 比でも細胞溶解を示さなかった．なお，本系では健康成人末梢血由来好中球をエフェクターにした場合は 7A4 及び MDX-260 の ADCC は観察されなかった．

2.6.2.2.5.2　G-CSF が神経芽腫のマウス Xenograft モデルで抗 GD2 抗体（220-51）の抗腫瘍効果を増強する（Fukuda 1998）

（添付資料：4.3-15）

4～6 週齢の雌の無胸腺マウス（N＝6／群）の脇腹皮下に GD2 陽性ヒト神経芽腫細胞（TGW）を移植し，腫瘍の最大径が 5-10 mm となった後（約 2 週間），PBS（対照，100 μL），抗 GD2 抗体である 220-51（IgG3 マウスモノクローナル抗体）単独，220-51＋rmGM-CSF（遺伝子組換え型マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子），220-51＋rhG-CSF，220-51＋rmGM-

CSF＋rhG-CSF，rmGM-CSF 単独，rhG-CSF 単独，rmGM-CSF＋rhG-CSF の 8 群に分けた．220-51 は 1 μg/μL を 100 μL（PBS に溶解）を Day 0，3，7 及び 10 に静脈内投与，rmGM-CSF は 0.025 μg/μL を 100 μL（PBS に溶解），rhG-CSF は 0.1 μg/μL を 100 μL（PBS に溶解）を 10 日間連続皮下投与（Day 0～9）した．Day 7，14 及び 21 に腫瘍体積を測定した[13]．

各群における Day 7，14 及び 21 の腫瘍体積比を表 2.6.2.2.5.2-1 に示した．

表 2.6.2.2.5.2-1　各群における Day 7，14 及び 21 の腫瘍体積比（N＝6／群）

群	Day 7	Day 14	Day 21
PBS（対照）	8.7±0.4	32.9±3.5	88.2±14.4
220-51 単独	4.1±0.8*1	19.6±4.0*1	87.6±26.9
220-51＋rmGM-CSF	3.2±0.6*2	13.1±2.3*2	47.0±11.5
220-51＋rhG-CSF	3.3±0.4*2	12.3±2.1*2	49.3±6.9
220-51＋rmGM-CSF＋rhG-CSF	2.0±0.3*3	7.2±1.4*3	32.4±3.3*2
rmGM-CSF 単独	8.2±0.7	30.3±3.3	77.9±13.3
rhG-CSF 単独	10.6±0.9	44.9±6.3	120.0±11.0
rmGM-CSF＋rhG-CSF	8.3±1.0	33.5±3.6	96.5±8.5

＊1：p＜0.05（対照群と比較して）
＊2：p＜0.05（220-51 単独と比較して）
＊3：p＜0.05（220-51＋rmGM-CSF 又は 220-51＋rhG-CSF と比較して）

220-51 単独群と比較して，220-51＋rmGM-CSF 又は 220-51＋rhG-CSF 群で有意に抗腫瘍効果が増強された（Day 7 及び 14）．また 220-51＋rmGM-CSF＋rhG-CSF 群で最も高い抗腫瘍効果が認められた．対照群と比較してサイトカインのみを投与した群では，抗腫瘍効果は認められなかった．

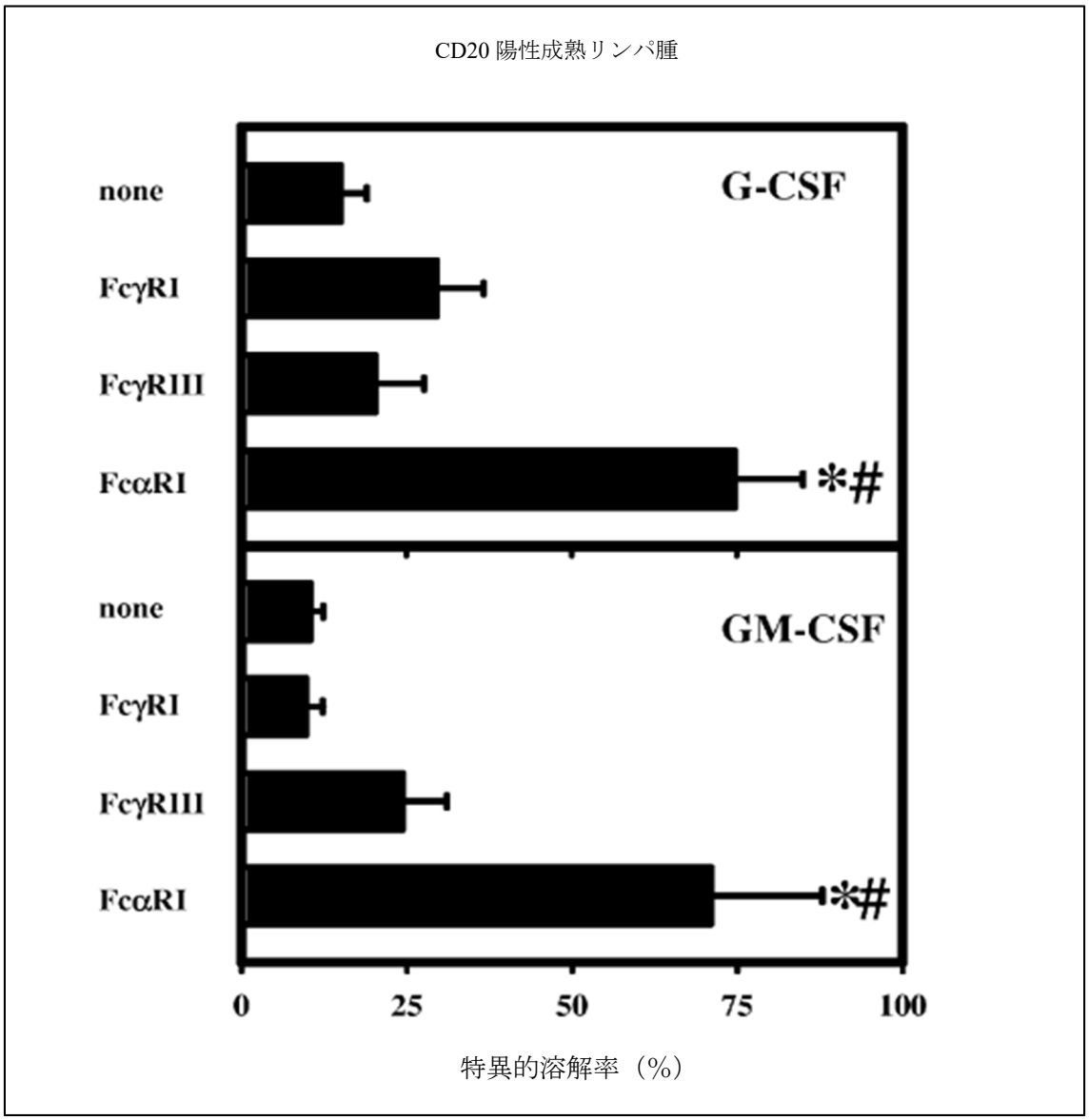
2.6.2.2.5.3　G-CSF が ADCC 活性を増強し臨床効果を増大させる（リンパ腫）（Stockmeyer 2001；Stockmeyer 2002）

（添付資料：4.3-16，4.3-17）

健康成人あるいは適応症に基づいて rhG-CSF（3～5 μg/kg）又は rhGM-CSF（5 μg/kg）を少なくとも 3 日投与された患者から採取した血液 50 μL に，CD20 と FcγRI，FcγRIII 又は FcαRI との 2 重特異性抗体あるいは培養液（対照群）と ^{51}Cr 標識した CD20 陽性成熟 B 細胞リンパ腫細胞（ARH-77，5×10^3 細胞/50 μL）を加え，37℃で 3 時間インキュベートし特異的溶解率（%）を算出した．なお特異的溶解率（%）は 2.6.2.2.3.1 項の計算式に準じて算出した．本実験では，最大漏出 ^{51}Cr は過塩素酸を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した[14]．

CD20 と FcγRI，FcγRIII 又は FcαRI の 2 重特異抗体による ARH-77 の特異的溶解率（%）を図 2.6.2.2.5.3-1 に示した．

図 2.6.2.2.5.3-1　CD20 と FcγRI，FcγRIII 又は FcαRI の 2 重特異抗体による ARH-77 の特異的溶解



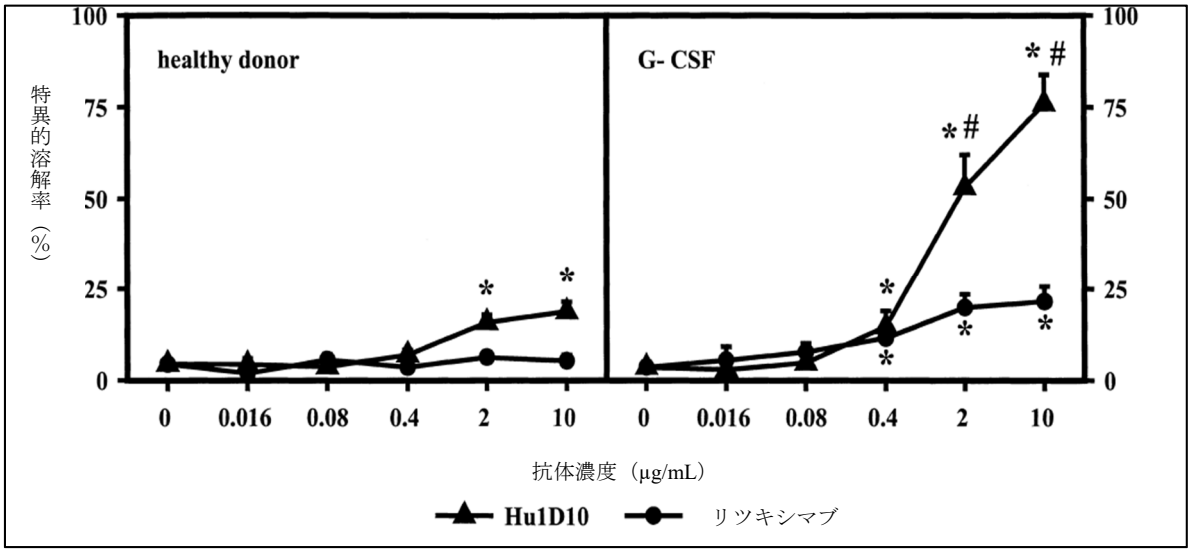
平均値±SEM，none：抗体添加なし
＊：抗体非添加群と比較して，抗体添加により有意に差が認められたもの．
＃：サイトカイン非投与健康成人血液をエフェクターとした時と比較して差が有意に認められたもの．なお，サイトカイン非投与健康成人血液の結果は Stockmeyer 2001 図 2 参照．
引用元：4.3-16（Stockmeyer 2001 図 3 一部改変）

その結果，rhG-CSF 又は rhGM-CSF を投与された患者から採取した血液を用いた場合には，CD20 と FcαRI との 2 重特異性抗体添加により特異的溶解率（%）が有意に高かった．さらに健康成人由来の血液に比較して，rhG-CSF 又は rhGM-CSF 投与された患者から採取した血液を用いた場合に，CD20 と FcαRI との 2 重特異性抗体による特異的溶解率（%）がより高かった（健康成人のデータは Stockmeyer 2001 図 2 参照）．

Stochmeyer らの実施した別の実験では，^{51}Cr 標識した成熟 B 細胞リンパ腫（ARH-77）を培養プレートに播種（50 µL あたり 5,000 個）した後，Hu1D10（ヒト白血球抗原クラス II のβ鎖上の多型エピトープに対するヒト化抗体）又はリツキシマブ（CD20 に対するキメラ抗体）を 0～10 µg/mL 添加した．健康成人又は患者［患者は適応症に基づいて rhG-CSF（3～5 µg/kg）を投与された］由来の血液（N＝8 以上／群）50 µL を，添加し，37℃で 3 時間インキュベートし特異的溶解率（%）を算出した．なお特異的溶解率（%）は 2.6.2.2.3.1 項の計算式に準じて算出した．本実験では，最大漏出 ^{51}Cr は過塩素酸を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した[15]．

rhG-CSF 投与による特異的溶解率（%）の影響について図 2.6.2.2.5.3-2 に示した．

図 2.6.2.2.5.3-2　健康成人および rhG-CSF 投与患者の血液を用いた場合の Hu1D10 あるいはリツキシマブによる ARH-77 の特異的溶解



各濃度における平均値±SEM
＊：抗体非添加群と比較して有意差が見られたもの．
＃：リツキシマブと比較して Hu1D10 で有意差が見られたもの．
引用元：4.3-17（Stockmeyer 2002 図 2）

その結果，健康成人の血液を用いた場合には Hu1D10 により，また rhG-CSF を投与された患者の血液を用いた場合には Hu1D10 及びリツキシマブにより，それぞれ有意に特異的溶解率（%）が増加した．さらに Hu1D10 による特異的溶解率（%）は健康成人の血液を用いた場合と比較して，rhG-CSF を投与された患者の血液を用いた場合に有意に高かった．

2.6.2.2.6　抗 GD2 抗体の CDC 誘導作用（Mujoo 1987；Mueller 1990；Zeng 2005）

ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18 の CDC 誘導作用を GD2 陽性神経芽腫細胞（IMR-6，SMS-KCNR，CHP-134，NMB-7，SK-N-AS，SMS-KAN 又は Kelly）[1, 6] 又は GD2 陽性メラノーマ細胞（M21 又は A375）[3, 6] を用いて評価した．

補体供給源として添加したヒト血清存在下の特異的溶解率（%）を算出し，CDC 誘導作用を検討した．

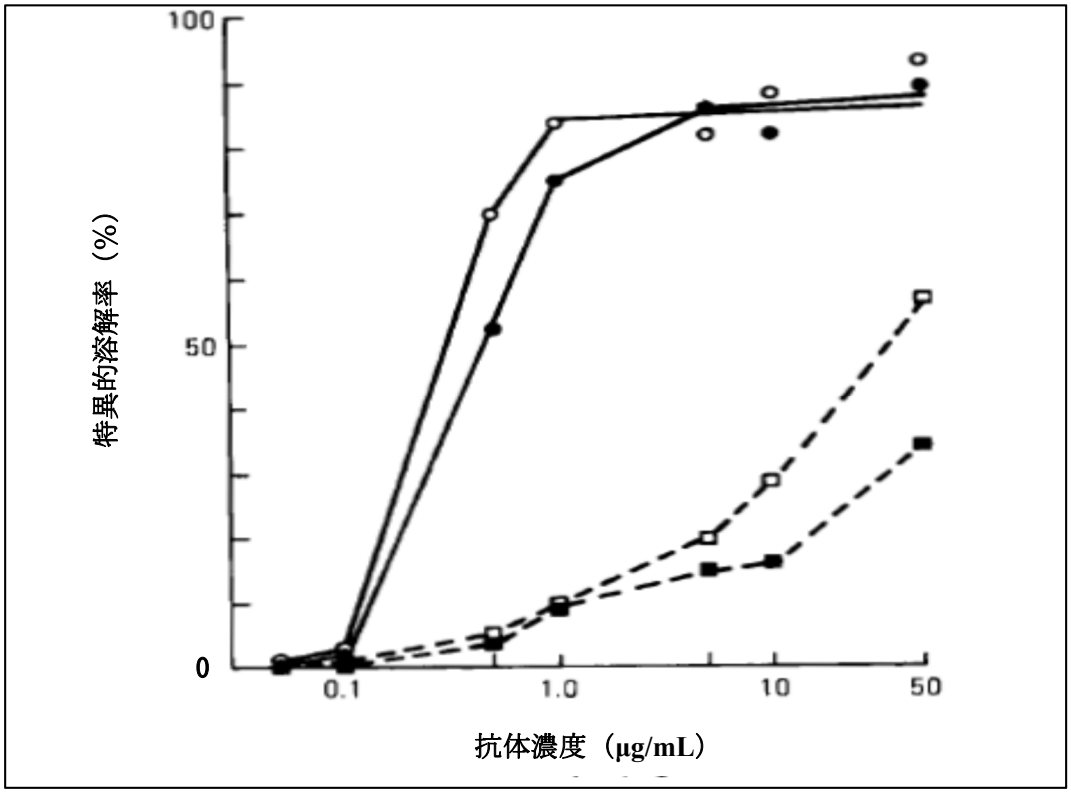
2.6.2.2.6.1 メラノーマ細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した CDC（Mueller 1990）

（添付資料：4.3-3）

^{51}Cr 標識した M21 及び A375 メラノーマ細胞を培養プレートに播種（1 ウェルあたり 10^3 個）した後，0.05～50 μg/mL の ch14.18 又は 14.G2a を添加し，4 倍希釈したヒト血清と共に 37℃で 2 時間インキュベートした．特異的溶解率（%）は 2.6.2.2.3.1 項の算出法に準じて求めた．本実験では，最大漏出 ^{51}Cr は 10%SDS を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した[3)]．

その結果，1 μg/mL 以上の ch14.18 及び 14.G2a の場合には，M21 メラノーマ細胞における特異的溶解率は 80%以上であった（図 2.6.2.2.6.1-1 参照）．それと比較して，A375 メラノーマ細胞の特異的溶解率は小さく，50 μg/mL の ch14.18 で 57%，50 μg/mL の 14.G2a で 32%であった．

図 2.6.2.2.6.1-1 M21 及び A375 メラノーマ細胞に対する ch14.18 及び 14.G2a を介した CDC



□及び○は ch14.18 を介した CDC，■及び●は 14.G2a を介した CDC を表示．実線は M21 細胞の溶解，破線は A375 の溶解を表す（いずれも 2 時間後）．
引用元：4.3-3（Mueller 1990 図 3）

2.6.2.2.6.2　神経芽腫細胞又はメラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した CDC（Zeng 2005）

（添付資料：4.3-6）

^{51}Cr 標識した NXS2，SK-N-AS，Kelly 神経芽腫細胞及び M21 メラノーマ細胞を培養プレートに播種（1 ウェルあたり 10^4 個）した後，0.0001～10 μg/mL の ch14.18 を添加し，ヒト血清と共に 37℃で 4 又は 20 時間インキュベートした．特異的溶解率（%）は 2.6.2.2.3.1 項の算出法に準じて求めた．本実験では，最大漏出 ^{51}Cr は 10%SDS を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した [6]．

その結果，用いた 4 種の細胞において ch14.18 を介する CDC 活性が認められた．M21 メラノーマ細胞では ch14.18 の濃度が 0.1～1.0 μg/mL の範囲で濃度に依存した特異的溶解率の増加が認められたが，Kelly 神経芽腫細胞は 0.1～1.0 μg/mL の範囲で，特異的溶解率が一定して高い状態であった（Zeng 2005 図 4 参照）．このことから Zeng らは，ch14.18 を介した CDC の感受性が Kelly 神経芽腫細胞では M21 メラノーマ細胞より高い可能性を報告している．

2.6.2.2.6.3　神経芽腫細胞に対する Mab 14.18 を介した CDC（Mujoo 1987）

（添付資料：4.3-1）

^{51}Cr 標識した IMR-6，SMS-KCNR，CHP-134，NMB-7，SK-N-AS 及び SMS-KAN 神経芽腫細胞を培養プレートに播種（1 ウェルあたり 10^4 個）した後，種々の濃度の Mab 14.18 を添加し，3 倍希釈したヒト血清と共に 37℃で 1 時間インキュベートした．特異的溶解率（%）は 2.6.2.2.3.1 項の算出法に準じて求めた．本実験では，最大漏出 ^{51}Cr は 1%ノニデット P-40 を用いて腫瘍細胞を溶解させた後に測定した [1]．

その結果，6 種類の神経芽腫細胞に 5～10 μg/mL の Mab 14.18 を添加すると，50～95%の範囲の CDC が認められた（Mujoo 1987 図 3 参照）．インキュベーション 30 分後においてすでに顕著な細胞死が認められたが，細胞死が最大（>95%）となったのはインキュベーション 2 時間後であった（Mujoo 1987 図 4 参照）．

CDC に関連する一連の実験において，Mujoo ら，Mueller ら又は Zeng らの結果から，ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18 は，GD2 陽性神経芽腫細胞及びメラノーマ細胞の CDC を誘導することが明らかとなった [1, 3, 6]．

2.6.2.2.7　SCID マウスにおける ch14.18 のメラノーマ細胞への結合（Kendra 1999）

（添付資料：4.3-5）

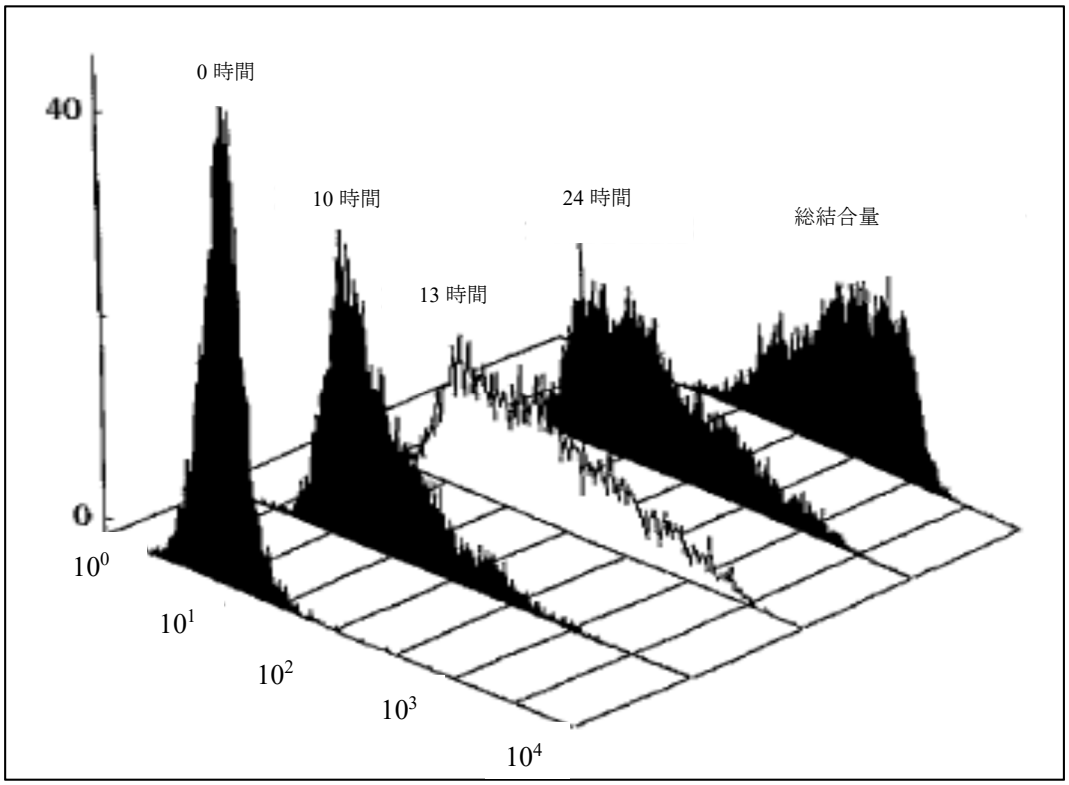
2 つの実験において，4～8 週齢の雌の SCID マウスに 1 例あたり 10^7 個の M21 メラノーマ細胞を腹腔内注入し，実験に供した [5]．

実験 1 では，SCID マウス（N＝12）に M21 メラノーマ細胞を腹腔に注入後 10～21 日に 1.0 mg［約 50 mg/kg，以下 kg 当たりの投与量算出は米国 FDA・医薬品評価研究センター（CDER）発行のガイダンス，2005 に基づく］[16] の ch14.18 を単回腹腔内投与した．ch14.18 投与後 0，10，13 又は 24 時間に動物を安楽死させ，各 SCID マウスの腹膜に形成された小

結節から調製した単一細胞懸濁液を，二次抗体としてフルオレセイン標識ヤギ抗ヒト抗体（GAH-FITC）で処置し，フローサイトメトリーにより ch14.18 の存在を検出した．また，ch14.18 の総結合量を算出するため，これらの SCID マウスから *ex vivo* 検討用に小結節を採取し，ch14.18 の添加実験も行った．

M21 メラノーマ細胞注入 2～3 週間後に，腹膜，腸間膜及び横隔膜に最大径 4 mm の複数の小結節が検出された．Kendra らはこの小結節が，がんの転移と類似していると報告している．フローサイトメトリーでは，ch14.18 非投与 SCID マウスから採取した腫瘍細胞の 84～95%で GD2 抗原が検出された（図 2.6.2.2.7-1 参照）．ch14.18 の *in vivo* での投与前（0 時間）の時点で，M21 メラノーマ細胞の 1%が非特異的に陽性に染色された．一方，1.0 mg（50 mg/kg）の ch14.18 腹腔内投与 10 時間後には M21 メラノーマ細胞の 27%が陽性に染色され，ch14.18 の結合が認められた．さらに，1.0 mg（約 50 mg/kg）の ch14.18 腹腔内投与 13 及び 24 時間後にはそれぞれ 58%及び 56%の細胞が陽性に染色され，ch14.18 の結合が確認された．この結果に基づいて Kendra らは，ch14.18 の結合が，少なくとも ch14.18 腹腔内投与 10 時間後から 24 時間後に渡って観察されたと報告している．

図 2.6.2.2.7-1　SCID マウスで増殖し，ch14.18 で標識した M21 メラノーマ細胞のフローサイトメトリー分析



ch14.18 の投与前（0 時間）及び投与後（10，13 及び 24 時間）の 1 時点につき 1 例の SCID マウスを用いて評価した．総結合量（腫瘍細胞に対する ch14.18 の総結合能）は，*ex vivo* 検討用に採取した小結節を用いて，ch14.18 で染色することによりを求めた．
引用元：4.3-5（Kendra 1999 図 2）

実験 2 では，各投与群当たり 3～5 例の SCID マウスに M21 メラノーマ細胞を腹腔内に注入し，10 日後に 0.01，0.1 又は 1.0 mg（約 0.5，5 又は 50 mg/kg）の ch14.18 又は 4.0 mg の陰性対照（ヒト IgG1 抗体）を腹腔内投与した．抗体投与 24 時間後に動物を安楽死させ，腫瘍組織を摘出後，切片を作成した．二次抗体としてのペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト抗体（GAH-HRP）で処置した．GD2 抗原又は ch14.18 の結合分布を IHC によって検出した．実験 2 の結果，腫瘍切片を ch14.18 と *ex vivo* で作用させると，ch14.18 の広範な結合が認められ, GD2 抗原が腫瘍組織に広範に分布していることが確認された（Kendra 1999 図 3 参照）．1.0 mg（約 50 mg/kg）の ch14.18 を腹腔内投与した SCID マウスから作製した腫瘍切片においては，ch14.18 が腫瘍表面に結合し，更に細胞約 20 個分の深さまで腫瘍内に透過した（Kendra 1999 図 4 参照）．血管及び類洞の周囲の染色が見られる場合もあった．0.1 mg（約 5 mg/kg）の ch14.18 を腹腔内投与すると，ch14.18 の結合が腫瘍表面にのみ認められたが，0.01 mg（約 0.5 mg/kg）の ch14.18 を腹腔内投与した場合，染色は見られなかった．

Kendra らの結果から，M21 メラノーマ担がん SCID マウスに 1.0 mg（約 50 mg/kg）の ch14.18 を腹腔内投与したとき，10 時間後に ch14.18 の腫瘍細胞への結合が検出された．結合レベルは 13 時間と 24 時間の時点で一定に維持されていた．また，0.01，0.1 又は 1.0 mg（約 0.5，5 又は 50 mg/kg）の ch14.18 を腹腔内投与すると，その 24 時間後において，1.0 mg（約 50 mg/kg）の ch14.18 投与では結合が腫瘍表面から腫瘍細胞 20 個分の深さまで認められた．一方，0.01 mg（約 0.5 mg/kg）では結合は見られなかった．

2.6.2.2.8　SCID マウスにおける ch14.18 の抗腫瘍活性（Kendra 1999）

（添付資料：4.3-5）

2 つの実験において，4～8 週齢の雌の SCID マウスに，様々な条件で M21 メラノーマ細胞（10^6 個），rhIL-2（1,500 U/100 μL），健康成人由来の PBMC 又は ch14.18［0.5 mg（約 25 mg/kg）］を皮下投与した．PBMC は E:T 比 3：1，10：1 又は 30：1 で投与した．SCID マウスを 3～4 週間観察した後に安楽死させ，剖検後，腫瘍を摘出してサイズ及び重量を測定した[5)]．

実験 1 では，M21 メラノーマ細胞単独，M21 メラノーマ細胞＋ch14.18，M21 メラノーマ細胞＋陰性対照（IgG1）を雌 SCID マウス（N＝7～8／群）に皮下投与し，投与後 29 日に腫瘍結節を測定した．その結果，M21 メラノーマ細胞単独，M21 メラノーマ細胞＋ch14.18 及び M21 メラノーマ細胞＋陰性対照の全例で腫瘍細胞の増殖が検出された（表 2.6.2.2.8-1 参照）．

実験 2 では，M21 メラノーマ細胞単独，M21 メラノーマ細胞＋rhIL-2＋PBMC（E:T 比 30：1），M21 メラノーマ細胞＋rhIL-2＋PBMC（E:T 比 10：1），M21 メラノーマ細胞＋rhIL-2＋PBMC（E:T 比 3：1），M21 メラノーマ細胞＋rhIL-2＋ch14.18＋PBMC（E:T 比 30：1），M21 メラノーマ細胞＋rhIL-2＋ch14.18＋PBMC（E:T 比 10：1）又は M21 メラノーマ細胞＋rhIL-2＋ch14.18＋PBMC（E:T 比 3：1）を，雌 SCID マウス（N＝2／群）に皮下投与し，投与後 24 日に腫瘍結節を測定した．その結果，M21 メラノーマ細胞単独及び M21 メラノー

マ細胞＋rhIL-2＋PBMC で腫瘍細胞の増殖が認められたが，M21 メラノーマ細胞＋rhIL-2＋ch14.18＋PBMC を同時投与した場合，いずれの E:T 比においても腫瘍細胞の増殖が阻害された（表 2.6.2.2.8-1 参照）．

表 2.6.2.2.8-1　SCID マウスにおける ch14.18，IL-2 及び PBMC 同時投与後のメラノーマ腫瘍のサイズ

実験	ch14.18*1	IL-2*2	PBMC（E:T 比）*3	腫瘍のサイズ（cm^2）*4
1	－	－	－	0.96，1.05，0.80，1.65，1.4，1.9，1.4
1	＋	－	－	2.04，0.42，1.05，0.63，0.65，1.68，2.70，1.28
1	－*5	－	－	1.08，2.40，9.0，1.36，2.80，3.99，3.3
2	－	－	－	0.54，0.34
2	－	＋	30：1	0.2，0.49
2	－	＋	10：1	0.32，0.0
2	－	＋	3：1	0.72，0.72
2	＋	＋	30：1	0.0，0.0
2	＋	＋	10：1	0.0，0.0
2	＋	＋	3：1	0.0，0.0

＊1：0.5 mg の ch14.18 含有リン酸緩衝生理食塩液（PBS）（＋）又は PBS 単独（－）のいずれかを SCID マウスに投与.
＊2：1,500 U/100 µL の rhIL-2 含有 PBS（＋）又は PBS 単独（－）のいずれかを SCID マウスに投与.
＊3：PBS 単独（－）又は記載した E:T 比の PBMC 含有 PBS を SCID マウスに投与.
＊4：腫瘍小結節の測定を，実験 1 では腫瘍注入 29 日後に，実験 2 では腫瘍注入 24 日後に実施した.
＊5：陰性対照を投与
引用元：4.3-5（Kendra 1999 表 1 改変）

Kendra らの結果から，ch14.18（0.5 mg）を PBMC 及び rhIL-2（1,500 U/100 µL）とともに皮下投与したところ，GD2 陽性メラノーマ腫瘍の増殖が阻害された.

2.6.2.2.9　無胸腺マウスにおける Mab 14.18 の抗腫瘍活性（Mujoo 1987）

（添付資料：4.3-1）

無胸腺マウス（N＝18）に 9×10^6 個の SK-N-AS 神経芽腫細胞を皮下注入し，以下の 2 つの実験を実施した [1)]．

実験 1 では，腫瘍細胞注入 1 日後（Day 2 とする），Day 4，6，8，13 及び 18 に 200 µg（約 10 mg/kg）の Mab 14.18（N＝6），200 µg の陰性対照［Mab C281（抗 GD3 抗体，神経芽腫細胞に発現していない GD3 に結合する）］（N＝6）又は 200 µL の対照（PBS，N＝6）を反復腹腔内投与した．23 日間の実験期間を通して腫瘍体積を定期的に測定した結果，対照群の全例で腫瘍細胞注入 9 日後（Day 10）から大きな腫瘍が急速に形成され始め，実験最終日（Day 23）の体積は 1,600～6,800 mm^3 であった（Mujoo 1987 図 6 参照）．同様に，陰性対照群でも Day 10 から大きな腫瘍が急速に形成され始め，Day 23 の体積は 600～4,500 mm^3 であった．一方，Mab 14.18 投与群では Day 20 以降認められた腫瘍の形成は緩徐であり，腫瘍の大きさも比較的小さく，Day 23 の体積は 200～900 mm^3 であった．対照群と

陰性対照群の間に統計学的な有意差はなかったが，Mab 14.18 投与群の腫瘍体積を対照群と比較したとき，Day 8～Day 23 で統計学的な有意差（$p<0.01$）が認められた．

実験 2 では，無胸腺マウス（各群 N＝6）に，腫瘍細胞注入 9 日後（Day 10）から，Day 13，15 及び 18 にわたり，200 μg（約 10 mg/kg）の Mab 14.18 又は 200 μg の陰性対照を反復腹腔内投与した．23 日間の試験期間を通して腫瘍体積を定期的に測定した結果，陰性対照群では Day 10 から急速に大きな腫瘍が形成され始め，Day 23 の体積は 3,000～7,500 mm^3 であった（Mujoo 1987 図 6 参照）．Mab 14.18 を投与した無胸腺マウスでも腫瘍が形成されたが，形成速度は遅く，体積の平均値は陰性対照群より小さく，Day 23 で 180～3,500 mm^3 であった．Day 10～Day 23 における Mab 14.18 投与群の腫瘍は，陰性対照群と比較して統計学的に有意に小さかった（$p<0.01$）．

Mujoo らの結果から，SK-N-AS 神経芽腫細胞を皮下移植した無胸腺マウスに，200 μg（約 10 mg/kg）の Mab 14.18 を反復腹腔内投与したところ，神経芽腫の形成が抑制された．

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　14.G2a における神経組織への結合（IHC 評価）（Vriesendorp 1997）

（添付資料：4.3-9）

SJL マウス，Lewis ラット，NZW ウサギ及びビーグル犬を用いて神経組織における GD2 の分布を検討するために IHC を実施した．なお，試験デザインの詳細は 2.6.6.8.2.1 項及び 2.6.6.8.2.2 項に記載した [8]．

これらの動物の腸間膜神経節及び背根神経節では神経細胞に部分的な GD2 の染色が観察され，小脳顆粒層にも染色が観察された．NZW ウサギ及びビーグル犬の坐骨神経では，多くの神経線維の染色が観察された一方，SJL マウス及び Lewis ラットの坐骨神経では，一部の神経線維のみに染色が観察された．ビーグル犬では迷走神経の神経線維に染色が観察された．

2.6.2.3.2　抗 GD2 抗体の疼痛誘発作用

抗 GD2 抗体による疼痛誘発作用が検討されている [9-11]．

2.6.2.3.2.1　ch14.18 投与による疼痛誘発作用（Slart 1997）

（添付資料：4.3-10）

成獣の雄の SD ラットを麻酔し，頸静脈にカテーテルを挿入した．麻酔から覚醒後 2 時間以上経過した後に行動試験を実施した．当該実験では，投与前にアロディニア及びストレス行動（異常発声，極度の興奮など）を示さなかった動物のみを使用した．機械的アロディニアの評価には 2 つの行動的指標［50%後肢逃避閾値及び接触誘発興奮（TEA）］を用いた．後肢足底表面に対して垂直に von Frey hair（毛状のフィラメント）を少し曲がるまで押し付け（von Frey hair による圧刺激の範囲は 0.41～15.1 g），6～8 秒間保持することにより，各時点での逃避閾値を全ての後肢で測定し（機械的逃避閾値），最大アロディニア（%）を，

［ベースライン逃避閾値（g）－誘発された逃避閾値（g）］／15（g）×100 で算出した．TEA の評価では，SD ラットの皮膚 6 カ所（耳の間，肩の間，背部中央，左側後部，右側後部及び腹部）を 15.1 g の von Frey hair を用いて圧迫した．圧迫した際の SD ラットの反応の程度により分類した（0＝反応なし，1＝中等度の刺激逃避行動，2＝高度の刺激逃避行動又は一過性の異常発声及び咬みつき行動あるいはその両方）．累積スコアを算出し，最大反応に対する百分率で表した[9]．

SD ラットを 20 分間測定用チャンバーに馴化させた後，ベースライン逃避閾値及び TEA を測定し，その後，SD ラットに 0.1，1.0，3.0 又は 10.0 mg/kg の ch14.18，1.0 mg/kg の陰性対照［KS1/4（上皮細胞及び上皮由来のがんに発現する抗原を認識するマウス抗体）］又は対照（生理食塩液）を，最大アロディニアが観察できるように急速静脈内投与した．投与後 15 分間隔で 2.5 時間にわたり行動試験を行い，50%後肢逃避閾値及び TEA を測定した．Day 2 及び Day 3 にも 3 時点 30 分間隔で同様に測定を行った．

別の群の SD ラット（1.0 mg/kg の ch14.18 投与群及び対照群，各 N＝6）を用いて，ch14.18 投与後 3 時間にわたり心拍数及び血圧を測定した．刺激に対応した反応を見るために右後側部を 15.1 g の von Frey hair で，背部を綿棒で刺激した．

SD ラットを用いた逃避閾値の試験では，上記 4 投与量の ch14.18 のいずれを投与した場合でも統計学的に有意に逃避閾値が低下し（$p<0.0001$），その結果，対照群に比較して ch14.18 投与群で最大アロディニア（%）が高くなった（表 2.6.2.3.2.1-1 参照）．0.1 mg/kg の ch14.18 では，この所見が試験最後の 1.75 時間でのみ観察されたが，より高投与量（1.0, 3.0 及び 10.0 mg/kg）の ch14.18 を投与された SD ラットでは，逃避閾値が投与直後から急激に低下し，投与後約 1 時間で一定に達した（Slart 1997 図 1 参照）．ch14.18 投与 24 及び 48 時間後（Day 2 及び Day 3）では，Day 1 と比較して閾値が上昇した（Slart 1997 図 1 参照）．しかし Day 2 及び Day 3 での対照群との比較では，依然として統計学的に有意なアロディニアが ch14.18 の 1.0 mg/kg 投与群（$p<0.05$）及び 3.0 mg/kg 投与群（$p<0.01$）で認められた．一方，10.0 mg/kg の ch14.18 投与群では，対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった．ch14.18 の 1.0 mg/kg 及び 3.0 mg/kg 投与群の Day 2 と Day 3 に得られたアロディニアスコアに群間差は認められなかった．なお，陰性対照群では，対照群と比較して，有意なアロディニアは観察されなかった．

表 2.6.2.3.2.1-1　ch14.18 投与による最大アロディニア（%）

用量（mg/kg）	Day 1	Day 2	Day 3
対照	14.4±3.7	10.8±8.9	7.4±5.8
0.1	26.3±2.6*	ND	ND
1.0	71.1±5.8*	24.3±5.5*	19.1±7.3*
3.0	68.7±5.1*	33.7±10.0*	23.1±11.1*
10.0	72.7±3.7*	26.1±18.0	11.4±4.2
陰性対照（1.0 mg/kg）	20.9±4.5	13.9±6.3	12.3±5.3

ND：実施せず
Day 1 における行動試験の最後の 2 時間（90～195 分の時点）の測定値に基づく．
＊：対照群の値を全て併せた結果と比較して有意差あり（ANOVA 及び unpaired t-tests）．平均値±平均値の標準誤差（SEM）（N＝4～6）
引用元：4.3-10（Slart 1997 表 1 改変）

TEA に関しては，ch14.18 のいずれの投与量においても，投与後 15 分～1 時間まで急速に上昇し，その後は Day 3 までほぼ一定で維持されていた（Slart 1997 図 2 参照）．Day 1 に 0.1 及び 1.0 mg/kg の ch14.18 投与により，同程度の最大 TEA（%）の増加が認められた（表 2.6.2.3.2.1-2 参照）．

表 2.6.2.3.2.1-2　ch14.18 投与による最大 TEA（%）

用量（mg/kg）	Day 1	Day 2	Day 3
対照	15.3±7.1	10.8±10.5	6.8±6.8
0.1	31.0±7.8*	ND	ND
1.0	29.5±10.9*	31.4±11.1*	35.6±13.7*
3.0	47.4±11.1*	43.5±11.1*	35.2±6.5*
10.0	20.9±8.3	25.6±8.1	25.9±3.3*

ND：実施せず
Day 1 のデータは投与 3 時間後までの値の平均値を示す．Day 2 及び 3 はそれぞれ投与 24 及び 48 時間後を示す．
＊：対照群の値を全て併せた結果と比較して有意差あり（paired t-tests 及び 1-way analysis）．平均値±SEM（N＝4～6）
引用元：4.3-10（Slart 1997 表 2 改変）

対照群と比較して，ch14.18 の 3 投与量群（0.1，1.0 及び 3.0 mg/kg）で最大 TEA（%）が増加した．ch14.18 投与 24 及び 48 時間後（Day 2 及び 3）では，1.0 及び 3.0 mg/kg における最大 TEA（%）間に群間差はなかったが，対照群と比較した場合明らかに増加した．10.0 mg/kg での変化は全期間を通して同程度であったが，Day 3 に対照群との有意差が認められた．Slart らは，10.0 mg/kg の ch14.18 で有意差が認められたのは，対照群の Day3 の TEA 変化がそれより前の時点（Day 1 及び Day 2）と比較して減少したためと述べている．

対照群を von Frey hair で短時間機械的に刺激したとき，一過性（＜30 秒）の血圧上昇（4～24 mmHg）が認められたが，心拍数には明らかな変化は見られなかった（Slart 1997 図 3 参照）．1.0 mg/kg の ch14.18 を投与したとき，6 例全例で血圧の上昇が認められた．この上昇（平均値±SEM：12±1.8 mmHg）に関しては，対照群との間に統計学的有意差（p≦0.02）があり，10～20 分で最高血圧に達した後，3 時間維持された．心拍数は 1 分あたり平均 30

回増加した．1.0 mg/kg の ch14.18 投与群において，von Frey hair で短時間機械的に刺激した際に誘発される血圧上昇及び心拍数の増加の程度は，対照群とほぼ同じであったが，持続時間が著しく長く，2.2±0.6 分から最長で 5 分続いた．

Slart らの結果から，0.1，1.0，3.0 及び 10.0 mg/kg の ch14.18 を急速静脈内投与すると，逃避閾値が有意（p＜0.0001）に低下した．1.0，3.0 及び 10.0 mg/kg の投与量で急速静脈内投与したとき，逃避閾値の低下が投与後短時間で出現し，1 時間以内に一定になった後，24～48 時間後でも依然として認められた．また同様の投与量で ch14.18 を急速静脈内投与すると，TEA が投与後 15 分で急激に増加し，全観察期間に渡って高値を維持又は増加し続けた．すなわち，ch14.18 を単回静脈内投与すると短時間で機械的アロディニアが発現し，一定期間持続することが示された．

SD ラットに ch14.18 を 0.1, 1.0, 3.0 及び 10.0 mg/kg の投与量で急速静脈内投与したとき，機械的アロディニアと共に心拍数増加及び血圧上昇が認められた．Slart らは，これらの所見は，臨床で観察される疼痛に関係している可能性を報告している．

2.6.2.3.2.2 ch14.18 又は 14.G2a 投与による疼痛誘発作用（Xiao 1997）

（添付資料：4.3-11）

単一神経線維，侵害受容器又は機械受容器の興奮性が ch14.18 によって変化するか否かを検討し，加えて，ch14.18 の神経活動に対する作用がリドカインの静脈内投与により影響を受けるか否かについても検討した [10]．

雄の SD ラット（N＝39）を麻酔し，頸静脈にカテーテルを挿入した．行動試験では von Frey hair を用いて 50%後肢逃避閾値を算出した（実験デザインは 2.6.2.3.2.1 項と同様）．ベースライン逃避閾値を測定した後, SD ラットに ch14.18（1 mg/kg, N＝18）, 14.G2a（1 mg/kg, N＝6），陰性対照［IgG2a，コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ヒトメラノーマ細胞及び皮膚のメラニン細胞に特異的に発現）を認識するマウス抗体］（1 mg/kg，N＝4）又は対照（生理食塩液，N＝8）を急速静脈内投与した．行動試験を 60 分間にわたり 15 分ごとに実施後，動物を麻酔し，腓腹神経を坐骨神経との接合部付近で切断した．次いで単一神経線維を機械的（エアパフ，von Frey heir，ブラシ及び鉗子）に刺激し，低刺激閾値を測定した．機械的刺激に感受性がある場合，15.1 g の von Frey hair（行動試験と同一）を用いてベースライン閾値を測定した．神経伝導速度を算出するために，皮膚に 2 つの針電極を差し込み，電気誘発応答による潜時を測定した．腓腹神経線維を，神経伝導速度が 25 m/s 超のとき A β線維（遅順応性），2～25 m/s のとき A δ線維（速順応性及び遅順応性），2 m/s 未満のとき C 線維に分類した．

一部の実験においては，軸索の特性を調べた後にリドカインを 15 mg/kg の用量で急速静脈内投与（N=5）あるいは血漿中薬物濃度を急速かつ一定に保つようにコンピューター制御された注入ポンプを用いて静脈内投与（N=9）した．ちなみにヒトに低投与量のリドカインを静脈内投与すると，ch14.18 投与中及び投与後のモルヒネ必要量が減少することが知られている [17]．

行動試験の結果，ベースライン時には von Frey hair 刺激に対する反応が見られなかったが（平均閾値＞15.1 g），ch14.18 投与後には顕著な機械的アロディニアが 60 分間の試験期間を通して観察された（Xiao 1997 図 1 参照）．ベースラインと比較して，アロディニアは最初の 15 分以内に観察され（$p<0.05$），45～60 分の時点では一定であった（$p<0.0001$）．14.G2a でも同じ時期に，ベースラインと比較して同様の傾向が認められたが，より軽度であった（$p<0.02$）．また，ch14.18 又は 14.G2a を投与された SD ラットでは，一般的に自発運動が低下しており，探索行動（例えばケージの側面で立ち上がることなど）の欠如が認められた．一方，陰性対照群は，対照群と比較して，最初の 45 分間では行動試験の結果に差は見られなかったが，60 分の時点では機械的アロディニアが観察された（$p\leqq0.05$）．対照群の機械的閾値は全検査期間を通して減少傾向を示したが，有意ではなかった．

ch14.18 又は 14.G2a を SD ラットに投与したとき，腓腹神経では背景活動の発現割合が増加した（表 2.6.2.3.2.2-1 参照）．Aβ線維で背景活動が認められた数はごくわずかであったが，Aδ線維ではかなりの割合で背景活動が見られ，C 線維では背景活動が見られる状態が一般的であった．対照群では，検討したいずれの線維においても背景活動が見られず，陰性対照群では，背景活動が認められたのが計 3 本の線維（Aδ線維：1 本，C 線維：2 本）のみであった．

表 2.6.2.3.2.2-1　ch14.18 又は 14.G2a 投与により背景活動の認められた求心性線維の数（背景活動を示した本数／測定本数）

	Aβ	Aδ	C
ch14.18	1/14	8/34	21/29
14.G2a	1/5	4/27	11/13
陰性対照	0/15	1/17	2/10
対照	0/13	0/26	0/19

背景活動は，単離後 30 秒以内に 1 回以上活動電位が発生すること（＞0.03 Hz）と定義した．
引用元：4.3-11（Xiao 1997 表 1 改変）

抗体投与 3 群（ch14.18，14.G2a 及び陰性対照）における求心性繊維の平均機械的閾値を表 2.6.2.3.2.2-2 に示した．抗体投与 3 群における Aδ線維の平均機械的閾値はいずれも，対照群よりも有意に低かった（$p<0.05$）．C 線維の平均機械的閾値も，対照群と比較し抗体投与 3 群において低値を示したが，対照群との有意差は認められなかった．ch14.18，14.G2a 及び陰性対照の間での Aδ線維又は C 線維の平均機械的閾値に差はなかった．

表 2.6.2.3.2.2-2　ch14.18 又は 14.G2a 投与による求心性線維*1の平均機械的閾値

	Aδ	C
ch14.18	2.1±0.6（25）*2	7.1±1.2（26）
14.G2a	3.7±0.9（19）*2	7.3±2.0（13）
陰性対照	2.8±0.8（12）*2	7.4±2.0（10）
対照	6.7±1.2（21）	9.5±1.5（19）

＊1：毛包求心性線維は除外した．括弧内は測定本数.
＊2：p＜0.05（Mann-Whitney test）．平均値±SEM
引用元：4.3-11（Xiao 1997 表 2 改変）

また，15 mg/kg のリドカインを急速静脈内投与したとき，Aδ及び C 線維の背景活動が 50%以上抑制された．このリドカインの阻害は投与後 40 秒から始まり，3～5 分持続した．また，ポンプを用いて持続注入した場合には Aδ及び C 線維の背景活動が抑制され，2 例においては注入中止後 45～60 分まで抑制が認められた.

ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与したとき，機械的アロディニアが投与後 15 分以内に発現し，45～60 分の時点で一定になった．ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与すると，背景活動が認められた末梢神経の Aδ及び C 線維の数が，対照群及び陰性対照群と比較して増加した．Xiao らは，これらの結果が陰性対照群では見られなかったことから，抗 GD2 抗体に特異的な効果であると判断している．抗 GD2 抗体で認められた Aδ及び C 線維の背景活動がどのような機序で発現したのかは，抗 GD2 抗体が GD2 の正常な機能を妨げた可能性，あるいは補体系やマクロファージなどを活性化した可能性を挙げているものの，不明であると報告している.

対照群と比較して，ch14.18 及び 14.G2a 投与群で Aδ線維の機械的閾値の有意な低下が見られ，C 線維の平均機械的閾値も低下傾向を示した．減少の程度は陰性対照群と同様であった．Aδ線維が発痛／起炎性メディエーターに感受性を示すこと，また 3 種の抗体が共に皮膚メラノサイトに結合し末梢神経に反応性を示すことが報告されていることから，これら 3 種の抗体が抗原に結合し補体系を活性化する結果，種々の起炎性サイトカイン例えばインターロイキン 1β や TNFα が遊離され，Aδ線維の機械的閾値の低下をもたらす可能性を指摘している．また，リドカインを急速静脈内投与したとき，抗 GD2 抗体に関連する背景活動が減少した.

以上の結果から，抗 GD2 抗体（ch14.18 及び 14.G2a）により Aδ及び C 線維の背景活動が増加すること並びに機械的刺激に対する Aδ線維の感受性が亢進することが明らかとなった．さらに低用量のリドカインにより抗 GD2 抗体による Aδ及び C 線維の背景活動の増加が抑制されることから，抗 GD2 抗体によるアロディニアの抑制にリドカインが有用である可能性が示唆された.

2.6.2.3.2.3 14.G2a 投与による疼痛誘発作用（Sorkin 2002）

（添付資料：4.3-12）

雄の SD ラットに 14.G2a を，急速静脈内投与又は髄腔内投与した．静脈内投与に先立って，SD ラットを麻酔し，頸静脈にカテーテルを挿入した．髄腔内投与の場合には，麻酔下に環椎後頭膜にカテーテルを挿入した [11]．

50%後肢逃避閾値（機械的閾値）は von Frey hair を用いて算出した（実験デザインは 2.6.2.3.2.1 項と同様）．ベースライン閾値を 30 分間隔で 2 回測定した．1 mg/kg の 14.G2a（N＝7）又は対照（生理食塩液，N＝6）を急速静脈内投与あるいは 0.01（N＝7），0.05（N＝9），0.1（N＝7），0.5（N＝6） ng の 14.G2a，0.05 ng の陰性対照（IgG2a，N＝6）又は対照（生理食塩液，N＝12）を髄腔内投与した．測定は，最初の 1 時間は 15 分毎に，次の 2 時間は 30 分毎に行った．

熱刺激時の潜時（熱逃避潜時）を，足底中央部測定用改良 Hargreaves 装置を用いて測定した．1（N＝6）又は 3（N＝7） mg/kg の 14.G2a を急速静脈内投与あるいは 0.1 ng の 14.G2a を髄腔内投与した．測定は，最初の 1 時間は 15 分毎に，次の 2 時間は 30 分毎に行った．別の 1 群には熱刺激に対する痛覚過敏が遅れて発現する可能性を考慮して，3 mg/kg（N＝8）の 14.G2a を投与し，最初の 2 時間は 30 分毎に，次の 4 時間は 1 時間毎に測定を行った．

軽麻酔下に別の 1 群の SD ラットに，75 µg のカプサイシン（N＝8）又は溶媒（Tween）（N＝5）を髄腔内投与し，投与後 48～72 時間に 0.01 ng の 14.G2a を髄腔内投与した．行動試験の後，脊髄腰部を取り出し，ラジオイムノアッセイを用いて脊髄背側部の CGRP を測定した．後角で発現する CGRP の減少は，カプサイシン感受性一次求心性線維［ペプチド作動性求心線維（C 線維）］の応答減少の指標として用いられている．カプサイシンは，Transient receptor potential vanilloid subtype 1（TRPV1）を介した痛み及び熱感受性ニューロンの活性化剤であり，長期の適用で感受性の欠如を惹起する [18]．

1 mg/kg の 14.G2a を SD ラットに急速静脈内投与したとき，投与後 3 時間にわたり，50%後肢逃避閾値の有意な低下が認められた（$p<0.003$）（Sorkin 2002 図 1 参照）．機械的アロディニアは速やかに発現し，30 分の時点で一定に達した後，残りの観察期間を通して維持された．Sorkin らはこの機械的アロディニアの結果が前の 2 つの試験（2.6.2.3.2.1 及び 2.6.2.3.2.2 項参照）における反応の経過時間及びその程度において同様であると報告している．対照群では変化は見られなかった．

0.01，0.05 及び 0.1 ng の 14.G2a を髄腔内投与したとき，3 時間の観察期間を通して 50%後肢逃避閾値の低下が認められた（それぞれ $p\leqq0.02$，$p\leqq0.0008$ 及び $p\leqq0.014$）（Sorkin 2002 図 3 参照）．0.5 ng の 14.G2a では，50%後肢逃避閾値にベースラインとの差は認められなかった．0.5 ng の 14.G2a を髄腔内投与された SD ラットは，刺激を受けた後肢を上げることはなかったものの，全身の立毛又は驚愕反射あるいはその両方を伴う反応を示した．このような反応は投与前や他の対照群で観察されなかった．

機械的アロディニアで認められた作用とは対照的に，静脈内投与又は髄腔内投与された 14.G2a のいずれにおいても熱逃避閾値に変化は見られなかった．閾値がベースラインレベ

ルから低下することはなく，対照群との差は認められなかった．観察期間を 6 時間まで延長して（N＝8）得られたデータにおいて，熱感受性の遅発性変化は観察されなかった（Sorkin 2002 図 2 参照）．

溶媒を前投与した後，0.01 ng の 14.G2a を髄腔内投与した場合，前投与を受けていない動物と変わらず, 3 時間の観察期間を通して 50%後肢逃避閾値の低下が認められた（p≦0.039）（Sorkin 2002 図 4 参照）．75 μg のカプサイシンを前投与後，0.01 ng の 14.G2a を髄腔内投与した場合，50%後肢逃避閾値にベースラインとの差は認められなかった．

Sorkin らの結果から，14.G2a を 1 mg/kg の投与量で急速静脈内投与したとき，投与後 30 分の時点で機械的アロディニアが発現し，その後は一定になった．0.01，0.05 及び 0.1 ng の 14.G2a を髄腔内投与したとき，3 時間の観察期間を通して機械的アロディニアが発現した．一方，静脈内投与においても髄腔内投与においても 14.G2a により熱アロディニアは発現しなかった．

また，75 μg のカプサイシンを前投与し，0.01 ng の 14.G2a を髄腔内投与した場合，50%後肢逃避閾値は低下しなかった．カプサイシンの前投与により CGRP の平均値が組織 1 g 当たり 180.8 pmol から 75.2 pmol に減少したことを，Sorkin らは確認している．したがって，抗 GD2 抗体により誘発される機械的アロディニアは, カプサイシン感受性一次求心線維（ペプチド作動性求心線維）を介していると考えられる．

抗 GD2 抗体の疼痛誘発作用を検討した Slart らの実験では，SD ラットに 0.1，1.0，3.0 及び 10.0 mg/kg の ch14.18 を急速静脈内投与したとき，機械的アロディニアが発現した．1.0, 3.0 及び 10.0 mg/kg の投与量で認められた機械的アロディニアは，投与後 1 時間以内に発現し，一定に達した後，24～48 時間後でも持続して観察された．この機械的アロディニアの発現に伴って，心拍数増加及び血圧上昇が認められた．Slart らは，これらの所見は，臨床で観察される疼痛に関係している可能性があると述べている [9]．

Xiao らの結果において，ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与したとき，機械的アロディニアが投与後 15 分以内に発現し，45～60 分の時点で一定に達した．ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与すると，背景活動が認められた末梢神経の Aδ及び C 線維の数が，対照群及び陰性対照群と比較して増加した．また，対照群と比較して，ch14.18 及び 14.G2a 投与群で Aδ線維の平均機械的閾値の有意な低下が認められた．一方，C 線維の平均機械的閾値も低下傾向を示した．減少の程度は陰性対照群と類似していた．リドカインを静脈内投与したとき，抗 GD2 抗体より発現した背景活動が減少した．Xiao らは，これらの結果に基づいて，抗 GD2 抗体が一次求心性神経（Aδ及び線維）に直接的あるいは間接的に作用して機械的閾値を低下させること及びリドカインが有用な抗 GD2 抗体による痛覚異常の治療薬となる可能性を記述している [10]．

Sorkin らの実験では，14.G2a を 1 mg/kg の投与量で急速静脈内投与したとき，投与後 30 分の時点で機械的アロディニアが発現し，その後は一定に達した．0.01，0.05 及び 0.1 ng の 14.G2a を髄腔内投与したとき，3 時間の観察期間を通して機械的アロディニアが発現した．一方，静脈内投与によっても髄腔内投与によっても 14.G2a による熱アロディニアは発現し

なかった．75 μg のカプサイシンを前投与し，0.01 ng の 14.G2a を髄腔内投与すると，50%後肢逃避閾値の低下が見られなかった．カプサイシンの前投与により CGRP の平均値が組織 1 g 当たり 180.8 pmol から 75.2 pmol に減少した．このことから，抗 GD2 抗体により誘発される機械的アロディニアは，ペプチド作動性求心線維を介している可能性が考えられた[11]．

2.6.2.4　安全性薬理試験

2.6.2.4.1　中枢神経系

中枢神経系の安全性薬理試験は実施していない．なお，幼若カニクイザルの反復投与毒性試験（試験番号：ch14.18 TOX-001及びch14.18 TOX-002）において，円背，振戦，運動性低下及び歩行異常等の中枢神経系（CNS）に関連する一般状態の変化が認められている．

2.6.2.4.2　カニクイザルの安全性薬理試験における用量設定試験（試験番号：[redacted]354-004）

（添付資料：4.2.1.3-1）

カニクイザルにおける心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験の用量設定を目的として，カニクイザルにジヌツキシマブを単回静脈内投与したときの一般状態に対する影響を確認した（試験番号：[redacted]354-004）．

3～5 歳齢の雄のカニクイザル 4 例を表 2.6.2.4.2-1 のように 2 群に割り付けた．本試験の高投与量は，体表面積あたりに換算して臨床予定投与量の 10 倍以上に相当する 21 mg/kg/日（252 mg/m^2/日，21 mg/kg/日にカニクイザルの体表面積換算 12 を乗じた値）[16]に設定した．また，低投与量として高投与量の半量となる 10.5 mg/kg/日（126 mg/m^2/日）を設定した．カニクイザルにジヌツキシマブを投与速度 14 mL/kg/h で，30 分間橈側皮静脈内に単回投与した．投与容量は 7 mL/kg とし，最新の体重を基に個別に算出した．投与濃度は 10.5 mg/kg/日で 1.5 mg/mL，21 mg/kg/日で 3 mg/mL とした．観察及び検査項目は，一般状態とした．

表 2.6.2.4.2-1　カニクイザルの安全性薬理試験における用量設定試験の試験デザイン

用量（mg/kg/日）	投与速度（mL/kg/h）	投与容量（mL/kg）	投与濃度（mg/mL）	動物数
				雄
10.5	14	7	1.5	2
21	14	7	3	2

陰茎包皮の腫脹が，10.5 mg/kg/日投与群の 2 例で，投与中又は投与終了直後～投与終了 2 時間後まで認められた．陰部皮膚の赤変化が，10.5 mg/kg/日投与群の 1 例で，投与中のみに認められた．陰茎包皮の腫脹が，21 mg/kg/日投与群の 1 例で，投与中～投与終了 2 時間後まで認められた．陰茎包皮の腫脹及び陰部皮膚の赤変化に用量依存性は認められなかった．また，嘔吐が 21 mg/kg/日投与群の 2 例で，投与終了直後から 30 分の間に発現した．

2.6.2.4.3 カニクイザルにおけるジヌツキシマブの心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験（試験番号：[redacted]354-005）

（添付資料：4.2.1.3-2）

雄のカニクイザルにジヌツキシマブを静脈内投与したときの心血管及び呼吸系に対する影響を検討するため，カニクイザルにおける心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験を実施した（試験番号：[redacted]354-005）．4～5 歳齢の雄カニクイザル 3 例を用い，表 2.6.2.4.3-1 に示す試験デザインで実施した．本試験の投与量は，用量設定試験（試験番号：[redacted]354-004）の結果を基に，14 mg/kg/日（168 mg/m^2/日）とした．この投与量は，臨床予定用量の約 10 倍に相当する．Day 1（投与初日）にプラセボ（20 mmol/L ヒスチジン，150 mmol/L 塩化ナトリウム，0.05%ポリソルベート 20，pH 6.8）を，1 日 1 回，10 時間かけて，静脈内投与した．2 日後（Day 3）に同一の個体に，14 mg/kg/日のジヌツキシマブを，1 日 1 回，投与の容量として 7 mL/kg 及び濃度として 2 mg/mL で 10 時間かけて，単回静脈内投与した．プラセボ及びジヌツキシマブの投与の容量は，プラセボを投与する前（Day 1）の体重から算出した．観察及び評価項目は，一般状態，血圧（収縮期，拡張期及び平均），心拍数，ECG［PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び QTc（Bazett 式で補正）］，呼吸数及び血液ガス（動脈血 pH，動脈血酸素分圧，動脈血二酸化炭素分圧及びヘモグロビン酸素飽和度）とした．血液を，プラセボ投与開始後 10 時間，並びにジヌツキシマブ投与前，投与開始後 5，10 及び 24 時間に採取し，カニクイザルにおける心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験における血漿中濃度測定試験（試験番号：[redacted]354-006）でジヌツキシマブの濃度を測定した（2.6.4.3.1 項に記載）．

投与開始前に，雄カニクイザル 3 例全ての腹腔内に，麻酔下でテレメトリー装置を装着し，腹部内壁に固定した．右大腿動脈を介して血圧測定用カテーテルを挿入し，腹部大動脈に配置し，ECG 記録用電極を右上及び左側胸部の皮下に装着した．さらに，静脈内投与のためのカテーテルを，右大腿静脈を介して後大静脈に挿入した．

また本試験の血圧，心拍数，ECG 及び呼吸数は，プラセボ又はジヌツキシマブの投与前 2 及び 3 時間（両時点の測定値の平均を投与前値とした），投与開始後 5，10，12 及び 24 時間に測定した．各時点における対照群とジヌツキシマブ投与群の値をそれぞれ比較した．血液ガスはプラセボ又はジヌツキシマブ投与前及び投与開始後 10 時間に測定し，各時点における対照群とジヌツキシマブ投与群の値をそれぞれ比較した．

表 2.6.2.4.3-1 カニクイザルにおける心血管及び呼吸系に対するジヌツキシマブの安全性薬理試験の試験デザイン

投与日	被験物質	用量（mg/kg/日）	投与容量（mL/kg）	投与濃度（mg/mL）	動物数（雄）
Day 1	プラセボ*	NA	7	NA	3
Day 3	ジヌツキシマブ	14	7	2	

NA：該当せず
＊：20 mmol/L ヒスチジン，150 mmol/L 塩化ナトリウム，0.05%ポリソルベート 20，pH 6.8

一般状態では，14 mg/kg/日のジヌツキシマブを単回静脈内投与した 1 例で，投与開始後 13.5～16 時間に嘔吐が発現した．さらに，Day 5～Day 9 で 3 例全てに摂餌量の低下（残餌が全量又は半量以上）が認められた．

血圧に関しては，14 mg/kg/日のジヌツキシマブ投与前 2 又は 3 時間，投与開始後 5，10，12 又は 24 時間のいずれの時間においても，対照と比較して収縮期，拡張期又は平均血圧に有意な差は認められなかった．しかし 14 mg/kg/日のジヌツキシマブを単回静脈内投与した 1 例で，収縮期，拡張期及び平均血圧の上昇がジヌツキシマブ投与開始後 5～24 時間の間に認められ，投与開始後 10 時間で対照の値からそれぞれ 34，37 及び 36 mmHg 増加した．

心拍数に関しては，14 mg/kg/日のジヌツキシマブ投与前 2 又は 3 時間，投与開始後 5，10，12 又は 24 時間のいずれの時間においても，対照と比較して有意な差は認められなかった．しかし 14 mg/kg/日のジヌツキシマブを単回静脈内投与した 2 例で，心拍数の増加がジヌツキシマブ投与開始後 5～24 時間の間に認められ，投与開始後 10 時間において対照の値からそれぞれ 45 及び 94 beats/min（2 例それぞれの値と対照との比較）増加した．

ECG に関しては，14 mg/kg/日のジヌツキシマブ投与前 2 又は 3 時間，投与開始後 5，10，12 又は 24 時間のいずれの時間においても，対照と比較して PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔又は QTc に有意な差は認められなかった．しかし 14 mg/kg/日のジヌツキシマブを単回静脈内投与した 2 例で，対照と比較して PR 間隔及び QT 間隔の短縮が，ジヌツキシマブ投与開始後 5，10，12 又は 24 時間に発現した．QRS 時間又は QTc にジヌツキシマブに関連した影響はなかった．また 14 mg/kg/日のジヌツキシマブを単回静脈内投与した 1 例で，ジヌツキシマブ投与開始後 10 及び 12 時間に期外収縮が各 1 回ずつ認められた．しかしこの変化は頻度が低かったため（発現回数は全体で 2 回のみ），ジヌツキシマブとの関連性はないものと考えられた．

呼吸数に関しては，14 mg/kg/日のジヌツキシマブ投与前 2 又は 3 時間，投与開始後 5，10，12 又は 24 時間のいずれの時間においても，対照と比較して有意な差は認められず，個々の動物の値にもジヌツキシマブに関連した所見は認められなかった．

血液ガスパラメータ（動脈血 pH，動脈血酸素分圧，動脈血二酸化炭素分圧及びヘモグロビン酸素飽和度）に関しては，14 mg/kg/日のジヌツキシマブ投与前及び投与開始後 10 時間のいずれの時間においても，対照と比較して有意な差は認められず，個々の動物の値にもジヌツキシマブに関連した所見は認められなかった．

14 mg/kg/日のジヌツキシマブを単回静脈内投与すると，一般状態において 1 例で，投与開始後 13.5～16 時間に嘔吐が認められた．さらに，Day 5～Day 9 で 3 例全てに摂餌量の低下（残餌が全量又は半量以上）が認められた．また血圧（収縮期，拡張期及び平均）上昇及び心拍数の増加が，それぞれ 1 及び 2 例で，ジヌツキシマブ投与開始後 5～24 時間に認められた．さらに PR 間隔及び QT 間隔の短縮が，2 例でジヌツキシマブ投与開始後 5，10，12 又は 24 時間に観察された．PR 間隔及び QT 間隔の短縮は，QTc に変化が認められなかったため，心拍数の増加によるものと考えられた．ジヌツキシマブの投与による直接的な影響はいずれの ECG パラメータにおいても認められなかった．ジヌツキシマブの心血管系の影響が直接的なものなのか他の器官などの影響を介した間接的なものなのかは不明であった．一方，呼吸数又は血液ガスパラメータにジヌツキシマブに関連した変化は認められず，呼吸系への影響はないと考えられた．

結論として，14 mg/kg/日のジヌツキシマブを単回静脈内投与開始後に心血管系への影響（血圧上昇及び心拍数の増加）が認められたが，呼吸系への影響は認められなかった．

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない．

2.6.2.6 考察及び結論

Mujoo らの効力を裏付ける試験において，Mab 14.18 は，神経芽腫，メラノーマ，膠芽腫及び小細胞肺がん細胞と結合した．このことから Mujoo らは，神経外胚葉を起源とする腫瘍（神経芽腫，メラノーマ及び神経膠腫）を Mab 14.18 が認識して結合すると考察している．さらに Mab 14.18 は，6 種類（IMR-6，SMS-KCNR，CHP-134，NMB-7，SK-N-AS 及び SMS-KAN）のヒト神経芽腫細胞（GD2 陽性）全てに結合し，その細胞 1 個あたりの平均結合部位数は 1.1～2.7×10^5 個であった [1)]．Mueller らによれば，ch14.18 及び 14.G2a の M21 メラノーマ細胞（GD2 陽性）1 個あたりの結合部位数は，それぞれ 1.5×10^7 個及び 1.4×10^7 個であり，K_d 値はそれぞれ 11.2 nmol/L 及び 11.9 nmol/L であった．この結果に基づいて Mueller らは，ch14.18 と 14.G2a はメラノーマ細胞に対して同等の親和性を有していると報告している [3)]．

ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18 の ADCC 誘導作用に関しては多くの研究がされており，GD2 陽性神経芽腫細胞及びメラノーマ細胞の ADCC が誘導されることが明らかとなっている．さらに可溶性サイトカインである rhGM-CSF 及び rhIL-2 は，ch14.18 を介した GD2 陽性腫瘍細胞溶解を促進することから，ch14.18 の抗腫瘍効果を高めるのに有用であると考えられている [1, 3-6)]．また Chen らは，GD2 陽性神経芽腫細胞の ADCC が，ch14.18 存在下で，好中球及び PBMC の作用により誘導されることを明らかにした．さらに，rhGM-CSF が添加されることにより，好中球では ADCC の増強が認められた．好中球において，E:T 比が高く，ch14.18 が高濃度でかつ rhGM-CSF が添加されているとき，GD2 陽性神経芽腫細胞では

増殖が阻害されたが，GD2 陰性神経芽腫細胞では好中球により神経芽腫細胞の増殖が促進され，ch14.18 による増殖阻害は認められなかった[7]．

ADCC 誘導作用に加えて，ch14.18 は神経芽腫細胞及びメラノーマ細胞に対して，14G2a はメラノーマ細胞に対して，Mab14.18 は神経芽腫細胞に対して，それぞれ CDC を誘導することが報告されている[1, 3, 6]．

Kendra らによれば，SCID マウスの腹腔に 10^7 個の M21 メラノーマ細胞を接種すると，2～3 週間後には最大径 4 mm 程度の小結節が腹膜，腸間膜，横隔膜に認められる．この担がん SCID マウスに 1.0 mg（約 50 mg/kg）の ch14.18 を腹腔内投与すると，投与 10 時間後には 27%の腫瘍細胞に ch14.18 の結合が認められ，結合レベルは投与 13 時間（58%）と 24 時間後（56%）の時点で一定であった．また，0.01，0.1 又は 1.0 mg（約 0.5，5 又は 50 mg/kg）の ch14.18 を腹腔内投与すると，ch14.18 の結合は投与量に比例して増加した．免疫組織化学的検討において，1.0 mg では ch14.18 は腫瘍細胞 20 個分の深さまで透過したが，0.01 mg では透過は認められなかった．さらに，M21 メラノーマ細胞（10^6 個）を，ch14.18（0.5 mg），PBMC（M21 細胞の 3～30 倍）及び rhIL-2（1,500 U/100 μL）とともに SCID マウスに皮下投与したとき，GD2 陽性メラノーマ腫瘍の増殖が阻害された[5]．

Mujoo らは，神経芽腫細胞を皮下移植した無胸腺マウスに，200 μg（約 10 mg/kg）の Mab 14.18 を反復腹腔内投与したとき，神経芽腫の形成が遅延したと報告している[1]．

副次的薬理試験において，SJL マウス，Lewis ラット，NZW ウサギ及びビーグル犬を用いて神経組織における GD2 の分布を検討するために IHC を実施した．これらの動物の腸間膜神経節及び背根神経節では神経細胞に部分的な GD2 の染色が観察され，小脳顆粒層にも染色が観察された．NZW ウサギ及びビーグル犬の坐骨神経では，多くの神経線維の染色が観察された一方，SJL マウス及び Lewis ラットの坐骨神経では，一部の神経線維のみに染色が観察された．ビーグル犬では迷走神経の神経線維に染色が観察された[8]．

Slart らの結果では，SD ラットに 0.1，1.0，3.0 及び 10.0 mg/kg の ch14.18 を急速静脈内投与したとき，投与後 1 時間以内に機械的アロディニアが発現して一定に達し，24～48 時間後でも持続していた．この機械的アロディニアの発現に伴って，心拍数増加及び血圧上昇が認められた．これらの所見は，臨床で観察される疼痛に関係している可能性があると Slart らは考察している[9]．Xiao らの結果では，1 mg/kg の ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与したとき，機械的アロディニアが投与後 15 分以内に発現し，45～60 分の時点で一定に達した．ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与すると，背景活動が認められた末梢神経の Aδ及び C 線維の数が，対照群及び陰性対照群と比較して増加した．また，対照群と比較して，ch14.18 及び 14.G2a 投与群で Aδ線維の平均機械的閾値の有意な低下が認められた．一方，C 線維の平均機械的閾値も減少傾向を示し，減少の程度は陰性対照群と同等であった．リドカインを静脈内投与したとき，抗 GD2 抗体に関連する背景活動が減少した．Xiao らは，これらの結果から，抗 GD2 抗体が一次求心線維の背景活動を増加させ機械的閾値を低下させること及びリドカインが抗 GD2 抗体により発現するアロディニアの治療薬として有用である可能性を述べている[10]．Sorkin らの結果では，1 mg/kg の 14.G2a を急速静脈内投与した

とき，投与後 30 分の時点で機械的アロディニアが発現し，一定に達していた．0.01，0.05 及び 0.1 ng の 14.G2a を髄腔内投与したとき，3 時間の観察期間を通して機械的アロディニアが発現したが，0.5 ng の投与量では機械的アロディニアの発現は見られなかった．一方，14.G2a の静脈内又は髄腔内投与では，熱アロディニアは発現しなかった．また，75 μg のカプサイシンを前投与し，0.01 ng の 14.G2a を髄腔内投与すると，50%後肢逃避閾値の低下が見られなかった．カプサイシンの前投与により脊髄背側部の CGRP の平均値が組織 1 g 当たり 180.8 pmol から 75.2 pmol に減少した．すなわち，抗 GD2 抗体により誘発される機械的アロディニアは，ペプチド作動性求心線維を介している可能性があると考えられる [11]．

カニクイザルの安全性薬理試験における用量設定試験の結果，陰茎包皮の腫脹が，10.5 mg/kg/日投与群の 2 例で，投与中又は投与終了直後～投与終了 2 時間後まで認められた．陰部皮膚の赤変化が，10.5 mg/kg/日投与群の 1 例で，投与中のみに認められた．陰茎包皮の腫脹が，21 mg/kg/日投与群の 1 例で，投与中～投与終了 2 時間後まで認められた．陰茎包皮の腫脹及び陰部皮膚の赤変化に用量依存性は認められなかった．また，嘔吐が 21 mg/kg/日投与群の 2 例で，投与終了直後から 30 分の間に発現した．

カニクイザルにおける心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験で，14 mg/kg/日のジヌツキシマブを単回静脈内投与開始後に心血管系への影響（血圧上昇及び心拍数の増加）が認められたが，呼吸系への影響は認められなかった．ECG パラメータに変化は認められなかった．

Sorkin らは，C6 補体欠損 SD ラット（C6 の上流にある C3a 又は C5a の産生に影響はない）又は C5a 補体受容体アンタゴニスト前投与 SD ラットに，ch14.18 を 1 mg/kg 投与したところ，機械的アロディニアが減少するか又は完全に消失したと述べている．このことから，ch14.18 により発現する機械的アロディニアが補体系カスケードの活性化により惹起される可能性を指摘している [19]．

以上のことから，ジヌツキシマブにより誘発される疼痛は，主に薬理作用の延長であると思われる．

2.6.2.7　図表

図表は本文中に含めた．

2.6.2.8　参考文献

1）　Mujoo, K., Cheresh, D.A., Yang, H.M., et al. Disialoganglioside G_{D2} on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytolysis and suppression of tumor growth. Cancer Res. 1987, 47(4), 1098-1104.

2）　Mujoo, K., Kipps, T.J., Yang, H.M., et al. Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside G_{D2} antibody 14.18. Cancer Res. 1989, 49(11), 2857-2861.

3） Mueller, B. M., Romerdahl, C.A., Gillies, S.D., et al. Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. J Immunol. 1990, 144(4), 1382-1386.

4） Barker, E., Mueller, B.M., Handgretinger, R., et al. Effect of a chimeric anti-ganglioside G_{D2} antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. Cancer Res. 1991, 51(1), 144-149.

5） Kendra, K., Malkovska, V., Allen, M., et al. In vivo binding and antitumor activity of ch14.18. J Immunother. 1999, 22(5), 423-430.

6） Zeng, Y., Fest, S., Kunert, R., et al. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. Mol Immunol. 2005, 42(11), 1311-1319.

7） Chen, R.L., Reynolds, C.P., Seeger, R.C. Neutrophils are cytotoxic and growth-inhibiting for neuroblastoma cells with an anti-GD2 antibody but, without cytotoxicity, can be growth-stimulating. Cancer Immunol Immunother. 2000, 48(11), 603-612.

8） Vriesendorp, F.J., Quadri, S.M., Flynn, R.E., et al. Preclinical analysis of radiolabeled anti-GD2 immunoglobulin G. Cancer. 1997, 80(12 Suppl), 2642-2649.

9） Slart, R., Yu, A.L., Yaksh, T.L., et al. An animal model of pain produced by systemic administration of an immunotherapeutic anti-ganglioside antibody. Pain. 1997, 69(1-2), 119-125.

10） Xiao, W.H., Yu, A.L., Sorkin, L.S. Electrophysiological characteristics of primary afferent fibers after systemic administration of anti-GD2 ganglioside antibody. Pain. 1997, 69(1-2), 145-151.

11） Sorkin, L.S., Yu, A.L., Junger, H., et al. Antibody directed against GD_2 produces mechanical allodynia, but not thermal hyperalgesia when administered systemically or intrathecally despite its dependence on capsaicin sensitive afferents. Brain Res. 2002, 930(1-2), 67-74.

12） Michon, J., Moutel, S., Barbet, J., et al. In vitro killing of neuroblastoma cells by neutrophils derived from granulocyte colony-stimulating factor - treated cancer patients using an anti-disialoganglioside/ anti-FcγRI bispecific antibody. Blood. 1995, 86(3), 1124-1130.

13） Fukuda, M., Horibe, K., Furukawa, K. Enhancement of in vitro and in vivo anti-tumor activity of anti-GD2 monoclonal antibody 220-51 against human neuroblastoma by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor. Int J Mol Med. 1998, 2(4), 471-475.

14） Stockmeyer, B., Elsässer, D., Dechant, M., et al. Mechanisms of G-CSF- or GM-CSF-stimulated tumor cell killing by Fc receptor-directed bispcific antibodies. J Immunol Methods. 2001, 248(1-2), 103-111.

15） Stockmeyer, B., Schiller, M., Repp, R., et al. Enhanced killing of B lymphoma cells by granulocyte clolony-stimulating factor-primed effector cells and Hu1D10 - a humanized human leucocyte antigen DR antibody. Br J Haematol. 2002, 118(4), 959-967.

16）Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. 2005, 1-27.

17）Wallace, M.S., Lee, J, Sorkin, L., et al. Intravenous lidocaine: Effects on controlling pain after anti-GD_2 antibody therapy in children with neuroblastoma--a report of a series. Anesth Analg. 1997, 85(4), 794-796.

18）Schumacher M.A. TRP channels in pain and inflammation: Therapeutic opportunities. Pain Pract. 2010, 10(3), 185-200.

19）Sorkin, L.S., Otto, M., Baldwin III, W.M., et al. Anti-GD_2 with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. Pain. 2010, 149(1), 135-142.

目次

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表（次頁に続く） 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験（次頁に続く） 5
2.6.3.3 副次的薬理試験（次頁に続く） 10
2.6.3.4 安全性薬理試験 14
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 14

2.6.3.1　薬理試験：　一覧表（次頁に続く）

被験物質：ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験					
種々の腫瘍に対する Mab 14.18 の反応性*1	各種腫瘍組織及び腫瘍細胞株	*In vitro*	NA	Mujoo 1987	4.3-1
Mab 14.18 の神経芽腫細胞への結合*1	GD2 陽性神経芽腫細胞株：IMR-6，SMS-KCNR，CHP-134，NMB-7，SK-N-AS，SMS-KAN	*In vitro*	NA	Mujoo 1987	4.3-1
ch14.18 又は 14.G2a のメラノーマ細胞への結合*2, *3	GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	*In vitro*	NA	Mueller 1990	4.3-3
神経芽腫細胞に対する Mab 14.18 を介した ADCC*1	GD2 陽性神経芽腫細胞株：SMS-KCNR，IMR-6，SK-N-AS	*In vitro*	NA	Mujoo 1987	4.3-1
メラノーマ細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した ADCC*2, *3	GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21，A375	*In vitro*	NA	Mueller 1990	4.3-3
神経芽腫細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した ADCC*2, *3	GD2 陽性神経芽腫細胞株：NMB-7，IMR-32	*In vitro*	NA	Barker 1991	4.3-4
メラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した ADCC*2	GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	*In vitro*	NA	Kendra 1999	4.3-5
神経芽腫細胞又はメラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した ADCC*2	GD2 陽性神経芽腫細胞株：SK-N-AS GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	*In vitro*	NA	Zeng 2005	4.3-6

NA：該当せず
＊1：Mab 14.18 を使用
＊2：ch14.18 を使用
＊3：14.G2a を使用

2.6.3.1　薬理試験：　一覧表（続き）

被験物質：ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験					
神経芽腫細胞の増殖における ch14.18 を介した ADCC 及び好中球の役割*1	GD2 陽性神経芽腫細胞株：SMS-LHN，SMS-KCN，LA-N-1 GD2 陰性神経芽腫細胞株：SK-N-SH	*In vitro*	NA	Chen 2000	4.3-7
メラノーマ細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した CDC*1，*2	GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21，A375	*In vitro*	NA	Mueller 1990	4.3-3
神経芽腫細胞又はメラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した CDC*1	GD2 陽性神経芽腫細胞株：NXS2，SK-N-AS，Kelly GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	*In vitro*	NA	Zeng 2005	4.3-6
神経芽腫細胞に対する Mab 14.18 を介した CDC*3	GD2 陽性神経芽腫細胞株：IMR-6，SMS-KCNR，CHP-134，NMB-7，SK-N-AS，SMS-KAN	*In vitro*	NA	Mujoo 1987	4.3-1
SCID マウスにおける ch14.18 のメラノーマ細胞への結合*1	C.B.-17 scid/scid マウス GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	腹腔内	NA	Kendra 1999	4.3-5
SCID マウスにおける ch14.18 の抗腫瘍活性*1	C.B.-17 scid/scid マウス GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	皮下	NA	Kendra 1999	4.3-5
無胸腺マウスにおける Mab 14.18 の抗腫瘍活性*3	BALB/c athymic (nu/nu)マウス GD2 陽性神経芽腫細胞株：SK-N-AS	腹腔内	NA	Mujoo 1987	4.3-1

NA：該当せず
＊1：ch14.18 を使用
＊2：14.G2a を使用
＊3：Mab 14.18 を使用

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表（続き）

被験物質：ジヌツキシマブ，ch14.18 又は 14.G2a

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
副次的薬理試験					
14.G2a における神経組織への結合*1	SJL マウス	腹腔内	NA	Vriesendorp 1997	4.3-9
	Lewis ラット	静脈内又は腹腔内			
	NZW ウサギ	静脈内			
	ビーグル犬	静脈内			
ch14.18 投与による疼痛誘発作用*2	SD ラット	急速静脈内	NA	Slart 1997	4.3-10
ch14.18 又は 14.G2a 投与による疼痛誘発作用*1，*2	SD ラット	急速静脈内	NA	Xiao 1997	4.3-11
14.G2a 投与による疼痛誘発作用*2	SD ラット	急速静脈内又は髄腔内	NA	Sorkin 2002	4.3-12
安全性薬理試験					
カニクイザルの安全性薬理試験における用量設定試験*3	カニクイザル	静脈内	[redacted] 日本）	[redacted]354-004	4.2.1.3-1
カニクイザルにおけるジヌツキシマブの心血管及び呼吸系に対する安全性薬理試験*3	カニクイザル	静脈内	[redacted] 日本）	[redacted]354-005	4.2.1.3-2
薬力学的薬物相互作用試験					
ND					

NA：該当せず，ND：実施せず
＊1：14.G2a を使用
＊2：ch14.18 を使用
＊3：ジヌツキシマブを使用

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（次頁に続く）

被験物質：ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18

試験の種類	試験系	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
種々の腫瘍に対する Mab 14.18 の反応性*1	各種腫瘍組織及び腫瘍細胞株	*In vitro*	NA	NA	Mab 14.18 は，神経芽腫，メラノーマ，膠芽腫及び小細胞肺がんと結合した.	非適	Mujoo 1987
Mab 14.18 の神経芽腫細胞への結合*1	GD2 陽性神経芽腫細胞株：IMR-6, SMS-KCNR, CHP-134 ， NMB-7 ， SK-N-AS，SMS-KAN	*In vitro*	5 ～ 600 ng 漸増	NA	Mab 14.18 は，検討した 6 種類全ての GD2 陽性ヒト神経芽腫細胞に結合し，その細胞 1 個あたりの平均結合部位数は 1.1～2.7×10^5 個であった.	非適	Mujoo 1987
ch14.18 又は 14.G2a のメラノーマ細胞への結合*2，*3	GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	*In vitro*	125 ～ 2,500 ng	NA	ch14.18 又は 14.G2a の M21 メラノーマ細胞（GD2 陽性）1 個あたりの結合部位数は，ch14.18 が 1.5×10^7 個，14.G2a が 1.4×10^7 個であり，K_d は ch14.18 が 11.2 nmol/L，14.G2a が 11.9 nmol/L であった.	非適	Mueller 1990

NA：該当せず
＊1：Mab 14.18 を使用
＊2：ch14.18 を使用
＊3：14.G2a を使用

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18

試験の種類	試験系	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
神経芽腫細胞に対する Mab 14.18 を介した ADCC*1	GD2 陽性神経芽腫細胞株：SMS-KCNR，IMR-6，SK-N-AS	*In vitro*	100 µg/mL	NA	エフェクター細胞として，健康成人由来の PBMC を使用．Mab 14.18 による E:T 比 200：1 での特異的溶解率は，SMS-KCNR，IMR-6 及び SK-N-AS 神経芽腫細胞で，それぞれ 49%，35%及び 20%であったが，Mab 14.18 非存在下における溶解率はいずれも 5～8%あった．	非適	Mujoo 1987
メラノーマ細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した ADCC*2, *3	GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21，A375	*In vitro*	0.001～50 µg/mL	NA	エフェクター細胞として，健康成人由来の PBMC を使用．M21 メラノーマ細胞の最大特異的溶解率は，ch14.18 が 0.5～10 µg/mL で 25～55%，14.G2a が 1～50 µg/mL で 14～33%であった．A375 メラノーマ細胞に対しては，少なくとも 100 ng（2 µg/mL）の ch14.18 が細胞溶解に必要であり，14.G2a よりも低濃度の ch14.18 で最大特異的溶解率に達した．	非適	Mueller 1990
神経芽腫細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した ADCC*2, *3	GD2 陽性神経芽腫細胞株：NMB-7, IMR-32	*In vitro*	0.001 ～ 1.0 µg/mL，0.005～2.5 µg/mL 又は 1 µg/mL	NA	ch14.18 又は 14.G2a と健康成人あるいは神経芽腫患者由来の PBMC 又は顆粒球を添加すると，ADCC が誘導された．また ch14.18 の ADCC 誘導作用は，エフェクター細胞が顆粒球でかつ rhGM-CSF を添加した場合に高い溶解率が認められた．	非適	Barker 1991

NA：該当せず
＊1：Mab 14.18 を使用
＊2：ch14.18 を使用
＊3：14.G2a を使用

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：ch14.18

試験の種類	試験系	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
メラノーマ細胞に対するch14.18を介したADCC	GD2陽性メラノーマ細胞株：M21	*In vitro*	0 ～ 5 µg/mL	NA	ch14.18のADCC誘導作用は，エフェクター細胞にrhIL-2を添加することによりさらに増強した.	非適	Kendra 1999
神経芽腫細胞又はメラノーマ細胞に対するch14.18を介したADCC	GD2陽性神経芽腫細胞株：SK-N-AS GD2陽性メラノーマ細胞株：M21	*In vitro*	0.001 ～ 10 µg/mL	NA	エフェクター細胞として，rhIL-2とプレインキュベーションした健康成人由来のPBMCを使用．インキュベーション時間が長く，E:T比が高く，ch14.18濃度が高いほど，高いADCC誘導作用が認められた.	非適	Zeng 2005
神経芽腫細胞の増殖におけるch14.18を介したADCC及び好中球の役割	GD2陽性神経芽腫細胞株：SMS-LHN, SMS-KCN，LA-N-1 GD2陰性神経芽腫細胞株：SK-N-SH	*In vitro*	10 µg/mL	NA	GD2陽性神経芽腫細胞において，好中球及びPBMCはch14.18存在下で，ADCCを誘導した．さらに，そこにrhGM-CSFが添加されることにより，好中球ではADCCが増強され細胞の生存率が低下した. 好中球の場合, E:T比が高く，ch14.18が高濃度でかつrhGM-CSFが添加されているとき, GD2陽性神経芽腫細胞の増殖がより強く阻害されたが, GD2陰性神経芽腫細胞では好中球により神経芽腫細胞の増殖が促進され，ch14.18による抑制は認められなかった.	非適	Chen 2000

NA：該当せず

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：ch14.18，14.G2a 又は Mab 14.18

試験の種類	試験系	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
メラノーマ細胞に対する ch14.18 又は 14.G2a を介した CDC*1, *2	GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21，A375	*In vitro*	0.05～50 μg/mL	NA	1 μg/mL 以上の ch14.18 及び 14.G2a の場合には，M21 メラノーマ細胞における特異的溶解率が 80%以上であった．それと比較して，A375 メラノーマ細胞の特異的溶解率は小さく，50 μg/mL の ch14.18 で 57%，50 μg/mL の 14.G2a で 32%であった．	非適	Mueller 1990
神経芽腫細胞又はメラノーマ細胞に対する ch14.18 を介した CDC*1	GD2 陽性神経芽腫細胞株：NXS2，SK-N-AS，Kelly GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	*In vitro*	0.0001～10 μg/mL	NA	用いた 4 種の細胞において ch14.18 を介する CDC 活性が認められた．M21 メラノーマ細胞では ch14.18 の濃度が 0.1～1.0 μg/mL の範囲で濃度に依存した特異的溶解率の増加が認められたが，Kelly 神経芽腫細胞は 0.1～1.0 μg/mL の範囲で，特異的溶解率が一定して高い状態であった．	非適	Zeng 2005
神経芽腫細胞に対する Mab 14.18 を介した CDC*3	GD2 陽性神経芽腫細胞株：SK-N-AS，SMS-KCNR，NMB-7，CHP-134，SMS-KAN，IMR-6	*In vitro*	5～10 μg/mL	NA	6 種類の神経芽腫細胞に 5～10 μg/mL の Mab 14.18 を添加すると，50～95%の範囲の CDC が認められた．	非適	Mujoo 1987

NA：該当せず
＊1：ch14.18 を使用
＊2：14.G2a を使用
＊3：Mab 14.18 を使用

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：ch14.18 又は Mab 14.18

試験の種類	試験系	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
SCID マウスにおける ch14.18 のメラノーマ細胞への結合*1	C.B.-17 scid/scid マウス GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	腹腔内	実験 1：1.0 mg（約 50 mg/kg） 実験 2：0.01, 0.1, 1.0 mg（約 0.5, 5，50 mg/kg）	雌 実験 1：12 例 実験 2：3～5 例／群	実験 1：M21 メラノーマ担がん SCID マウスに 1.0 mg の ch14.18 を腹腔内投与したとき，10 時間後に ch14.18 の腫瘍細胞への結合が検出された．結合レベルは 13 及び 24 時間の時点で一定に維持された． 実験 2：0.01，0.1 又は 1.0 mg の ch14.18 を腹腔内投与すると，ch14.18 の結合に用量依存性が認められた．1.0 mg では ch14.18 は腫瘍細胞 20 個分の深さまで透過したが，0.01 mg では結合は見られなかった．	非適	Kendra 1999
SCID マウスにおける ch14.18 の抗腫瘍活性*1	C.B.-17 scid/scid マウス GD2 陽性メラノーマ細胞株：M21	皮下	0.5 mg （約 25 mg/kg）	雌 実験 1：7～8 例／群 実験 2：2 例／群	ch14.18（0.5 mg）を PBMC 及び rhIL-2（1,500 U/100 µL）とともに皮下投与したところ，GD2 陽性メラノーマ腫瘍の増殖が阻害された．	非適	Kendra 1999
無胸腺マウスにおける Mab 14.18 の抗腫瘍活性*2	BALB/c athymic (nu/nu)マウス GD2 陽性神経芽腫細胞株：SK-N-AS	腹腔内	200 µg （約 10 mg/kg）	NA 6 例／群	SK-N-AS 細胞を皮下注入した無胸腺マウスに，200 µg の Mab 14.18 を反復腹腔内投与したところ，神経芽腫の形成が抑制された．	非適	Mujoo 1987

NA：該当せず
＊1：ch14.18 を使用
＊2：Mab 14.18 を使用

2.6.3.3 副次的薬理試験（次頁に続く）

被験物質：14.G2a

試験の種類	試験系	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
14.G2a における神経組織への結合	SJL マウス	腹腔内	8 ～ 32 mg （約 400 ～ 1,600 mg/kg）	NA 4 例	これらの動物の腸間膜神経節及び背根神経節では神経細胞に部分的な GD2 の染色が観察され，小脳顆粒層にも染色が観察された．NZW ウサギ及びビーグル犬の坐骨神経では，多くの神経線維の染色が観察された一方，SJL マウス及び Lewis ラットの坐骨神経では，一部の神経線維のみに染色が観察された．ビーグル犬では迷走神経の神経線維に染色が観察された．	非適	Vriesendorp 1997
	Lewis ラット	静脈内又は腹腔内	2 ～ 20 mg （約 13 ～ 133 mg/kg）	雌 11 例			
	NZW ウサギ	静脈内	1.5 ～ 40 mg （約 0.8 ～ 22 mg/kg）	雄 5 例			
	ビーグル犬	静脈内	2 mg（約 0.2 mg/kg）, 202 mg（約 20.2 mg/kg）	NA 4 例			

NA：該当せず

2.6.3.3 副次的薬理試験（続き）

被験物質：ch14.18

試験の種類	試験系	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
ch14.18 投与による疼痛誘発作用	SD ラット	急速静脈内	0.1，1.0，3.0，10.0 mg/kg 又は 1.0 mg/kg	雄 4～6 例／群	0.1，1.0，3.0 及び 10.0 mg/kg の ch14.18 を急速静脈内投与すると，逃避閾値が有意（$p<0.0001$）に低下し，それによって対照群より最大アロディニア百分率が高くなった．また同様の投与量で ch14.18 を急速静脈内投与すると，TEA が投与後 15 分で急激に増加し，全観察期間にわたって維持又は増加し続けた．ch14.18 を 0.1，1.0，3.0 及び 10.0 mg/kg の投与量で急速静脈内投与したとき，機械的アロディニアが認められた．1.0，3.0 及び 10.0 mg/kg の投与量で急速静脈内投与したとき，投与後 1 時間以内に完全に発現し，一定になった後，24～48 時間後でも依然として機械的アロディニアが認められた．この機械的アロディニアの発現に伴って，心拍数増加及び血圧上昇が認められた．	非適	Slart 1997

NA：該当せず

2.6.3.3 副次的薬理試験（続き）

被験物質：ch14.18 又は 14.G2a

試験の種類	試験系	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
ch14.18 又は 14.G2a 投与による疼痛誘発作用	SD ラット	急速静脈内	1 mg/kg	雄 ch14.18：18 例 14.G2a：6 例	1 mg/kg の ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与したとき，機械的アロディニアが投与後 15 分以内に発現し，45～60 分の時点で一定になった．ch14.18 及び 14.G2a を急速静脈内投与すると，背景活動が認められた末梢神経の Aδ及び C 線維の数が，対照群及び陰性対照群と比較して増加した．対照群と比較して，ch14.18 及び 14.G2a 投与群で Aδ線維の機械的閾値の有意な低下が生じ，C 線維の平均機械的閾値も低下傾向を示した．減少の程度は陰性対照群と同様であった．リドカインを急速静脈内投与したとき，抗 GD2 抗体に関連する背景活動が減少した．	非適	Xiao 1997

2.6.3.3 副次的薬理試験（続き）

被験物質：14.G2a

試験の種類	試験系	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
14.G2a 投与による疼痛誘発作用	SD ラット	急速静脈内又は髄腔内	急速静脈内 : 1, 3 mg/kg 髄腔内：0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ng	雄 6～9 例／群	14.G2a を 1 mg/kg の投与量で急速静脈内投与したとき，投与後 30 分の時点で機械的アロディニアが発現し, その後は一定になった. 0.01, 0.05 及び 0.1 ng の 14.G2a を髄腔内投与したとき，3 時間の観察期間を通して機械的アロディニアが発現したが, 0.5 ng の投与量では機械的アロディニアの発現は見られなかった． 14.G2a の静脈内投与あるいは髄腔内投与により熱アロディニアは発現しなかった. また, 75 µg のカプサイシンを前投与し，0.01 ng の 14.G2a を髄腔内投与した場合，50%後肢逃避閾値は低下しなかった．このことから，機械的アロディニアはカプサイシン感受性一次求心性線維（ペプチド作動性求心線維）を介して発現したものと推測した.	非適	Sorkin 2002

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：ジヌツキシマブ

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	用量（mg/kg/日）	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
心血管及び呼吸系	カニクイザル	静脈内（単回）	10.5，21	雄 2例／群	陰茎包皮の腫脹が，ジヌツキシマブ 10.5 mg/kg/日投与群の2例で投与中又は投与終了直後～投与終了 2 時間後まで認められた．また，21 mg/kg/日投与群の1例で，投与中～投与終了2時間後まで認められた．陰部皮膚の赤変化が，10.5 mg/kg/日投与群の1例で投与中のみに認められた．嘔吐が 21 mg/kg/日投与群の2例で，投与終了直後から 30 分の間に発現した．	非適	[redacted]354-004
心血管及び呼吸系	カニクイザル	静脈内（単回）	14	雄 3例	ジヌツキシマブ 14 mg/kg/日を単回静脈内投与開始後に心血管系への影響（血圧上昇及び心拍数の増加）が認められたが，ECGパラメータの変化は認められなかった．また，呼吸系への影響は認められなかった．	適	[redacted]354-005

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない．