# 目次

略語・略号一覧 ..... 2
2.4 非臨床試験の概括評価 ..... 3
2.4.1 非臨床試験計画概略 ..... 3
2.4.2 薬理試験 ..... 4
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 ..... 4
2.4.2.2 副次的薬理試験 ..... 5
2.4.2.3 安全性薬理試験 ..... 5
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 6
2.4.3 薬物動態試験 ..... 6
2.4.3.1 吸収 ..... 6
2.4.3.2 分布 ..... 6
2.4.3.3 代謝 ..... 7
2.4.3.4 排泄 ..... 7
2.4.3.4.1 尿中排泄 ..... 7
2.4.3.4.2 胆汁中排泄 ..... 7
2.4.3.4.3 乳汁中排泄 ..... 7
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 ..... 7
2.4.4 毒性試験 ..... 7
2.4.4.1 単回投与毒性試験 ..... 7
2.4.4.2 反復投与毒性試験 ..... 8
2.4.4.3 遺伝毒性試験 ..... 9
2.4.4.4 がん原性毒性試験 ..... 9
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 ..... 9
2.4.4.6 局所刺激性試験 ..... 11
2.4.4.7 その他の毒性試験 ..... 11
2.4.5 総括及び結論 ..... 11
2.4.6 参考文献一覧 ..... 12

## 略語・略号一覧

| 略語・略号 | 内容 |
|---|---|
| $AUC_{0\text{-}24h}$ | 投与後 24 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積 |
| CFU-G | 顆粒球コロニー |
| CFU-GM | 顆粒球マクロファージコロニー |
| CFU-M | マクロファージコロニー |
| CHO | チャイニーズハムスター卵巣細胞 |
| $C_{max}$ | 最高血漿中濃度 |
| ELISA | Enzyme-linked immuno-sorbent assay（酵素結合免疫吸着検査法） |
| GLP | Good Laboratory Practice 医薬品安全性試験実施基準 |
| GM-CSF | 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 |
| hERG | human Ether-a-go-go Related Gene |
| mGM-CSF | マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 |
| PBMC | 末梢血単核細胞 |
| rhGM-CSF | 遺伝子組換えヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 |
| $T_{max}$ | 最高血漿中濃度到達時間($C_{max}$ 到達時間) |
| TCA | トリクロロ酢酸 |

## 2.4 非臨床試験の概括評価

### 2.4.1 非臨床試験計画概略

NPC-26（以下、「本剤」）は、酵母（Saccharomyces cerevisiae）由来の遺伝子組換えヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（rhGM-CSF）であるサルグラモスチムを有効成分とする自己免疫性肺胞蛋白症の治療薬である。なお、本剤は1回125μgを生理食塩液2 mLに溶解し、ネブライザーを用いて、1日2回、7日間吸入後、7日間休薬を1コースとして吸入する薬剤である。

ヒトとウサギのGM-CSFはある程度の遺伝配列同一性（約70%）を示し、ヒト組換えGM-CSFはウサギにおいて薬理活性を示すことが認められている[1)]。また、Sargramostimのウサギを用いた生殖毒性発生試験では、被験物質投与に関連すると考えられる白血球数の増加がみられている。増加の程度はサルを用いた毒性試験の10倍程度に比べて、ウサギでは約2倍と弱いものであったが、本剤の生理活性は確認されていると考えられる。

サルグラモスチムを有効成分とする製剤として、すでに1991年に米国のImmunex社が開発・承認を取得したLeukine®（注射剤）があり、現在はPartner Therapeutics社（以下、「Partner社」）が、米国で化学療法に伴う好中球減少などの適応症で製造販売している。国内においてサルグラモスチムは未承認薬である。

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の生物活性は、種特異的である。ヒトと非ヒト霊長類とでは遺伝子及びタンパク質の配列相同性は高く、ヒトに対する霊長類のアミノ酸の相同性は94.4%である。一方、イヌ（70.1%）やげっ歯類など（マウス：54.9%、ラット：63.2%）とのアミノ酸の相同性は極めて低い(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene 及びhttp://blast.ncbi.nlm.nih.gov より)。

以上のことから、本剤の非臨床試験の薬理試験に関し、効力を裏付ける試験ではサルを用いた肺胞蛋白症モデルが存在しないことも踏まえ、in vitro試験として、ヒト又はサルの顆粒球機能や単球マクロファージ系に対する本剤の有効成分であるサルグラモスチムの作用につき公表されている文献及び田澤らの臨床研究推進研究事業の総括・分担研究報告書の試験成績を用いて評価する。in vivo試験としては、新潟大学で実施されたカニクイザルの26週間間歇吸入投与毒性試験（Good Laboratory Practice （GLP）下で実施）で実施された造血系細胞に対する作用の試験成績を用いて評価する。副次的薬理試験、薬物相互作用試験は実施していない。安全性薬理試験についてもサルグラモスチムのカニクイザルの 26 週間間歇吸入投与毒性試験で実施された項目の中に安全性薬理評価に必要な項目は含まれていることから、これらの試験結果をCTD様式として編集した。なお、本剤はバイオ医薬品に分類される糖タンパク質で、その分子量はタンパク質部分で 14,430 g/mol であり、一般的に高分子物質が細胞膜を通過してhuman Ether-a-go-go Related Gene（hERG）チャネルを阻害する可能性は低いと考えられている[2)]ことから、hERG電流に対するin vitro電気生理学的試験は実施しなかった。

薬物動態試験は、本剤の臨床適用経路である吸入投与したときの吸収性については、サルグラモスチムのカニクイザルの 26 週間間歇吸入投与毒性試験に付随したトキシコキネティクス試験のデータを利用して評価した。分布及び排泄については、微生物に発現させた糖鎖を持た

ない rhGM-CSF 及びチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）に発現させた糖鎖を有する rhGM-CSF、並びに精製したマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（mGM-CSF）を材料とした公表文献に基づき評価した。本剤はバイオ医薬品であり投与後はペプチド及びアミノ酸に代謝分解されることが、一般的に知られていること及び上記の評価においても確認されたことから、『「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について』（薬食審査発 0323 第 1 号、平成 24 年 3 月 23 日（ICH-S6））を踏まえ、代謝試験を実施しなかった。また、『「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」について』（薬生薬審発 0723 第 4 号、平成 30 年 7 月 23 日）を踏まえ、薬物動態学的相互作用試験を実施しなかった。

毒性試験に関してはサルを用いた単回静脈内投与毒性試験、反復投与毒性試験（静注、皮下、吸入）及びウサギを用いた生殖発生毒性試験を医薬品毒性試験法ガイドラインに準拠して実施した。投与経路は臨床適用経路である吸入投与のほか、代替投与として皮下投与を用いた。用量設定試験の一部を除くすべての試験は GLP に準拠して実施した。なお、がん原性試験及び遺伝毒性試験は、本薬がバイオテクノロジー応用医薬品であることから実施しなかった。本試験成績のうちサルを用いた 6 ヵ間反復吸入投与毒性試験は新潟大学で、他は海外で実施されたものである。

## 2.4.2 薬理試験

### 2.4.2.1 効力を裏付ける試験

#### ① in vitro 試験

**＜添付資料 4.2.1.1-1 参考、添付資料 4.2.1.1-2 参考、添付資料 4.2.1.1-3 参考＞**

白血球系のヒト血液細胞に対する造血促進作用を検討する目的で、正常ヒト由来の骨髄血液細胞を用い、この細胞に対するサルグラモスチムの増殖作用を検討した。白血球系及び顆粒球マクロファージ系のコロニー形成に対しサルグラモスチムはおおむね濃度依存性にコロニー形成を誘導した。サルグラモスチムによるコロニー形成の形態は、顆粒球コロニー（CFU-G）はコンパクトに密集したコロニー、マクロファージコロニー（CFU-M）は細胞がばらけたコロニー、顆粒球マクロファージコロニー（CFU-GM）は両者の中間の形態を示すコロニーであった。

TF-1 細胞、単球及び末梢血単核細胞（PBMC）の増殖／生存活性に対するサルグラモスチムの作用並びに好中球又は単球の STAT5 のリン酸化及び接着因子の CD11b の発現量に対するサルグラモスチムの作用を検討した。TF-1 細胞、単球及び PBMC の増殖／生存に対し、サルグラモスチムは濃度依存性にこの細胞の増殖／生存率を高めた。同様に、大腸菌由来の rhGM-CSF 及び CHO 由来の rhGM-CSF も濃度依存性に TF-1 細胞の増殖／生存率を高めた。

単球及び好中球における STAT5 のリン酸化に対し、サルグラモスチム、大腸菌由来の rhGM-CSF 及び CHO 由来の rhGM-CSF は、15、60 及び 500 pM の濃度範囲内において濃度依存性に STAT5 のリン酸化を促進した。15 及び 60 pM の濃度ではサルグラモスチム及び大腸菌由来の rhGM-CSF の方が CHO 由来の rhGM-CSF に比べ強い STAT5 リン酸化作用が認められたが、500 pM の濃度では 3 種類の rhGM-CSF の STAT5 リン酸化作用は同等であった。サルグラモスチム、大腸菌由来の

rhGM-CSF 及び CHO 由来の rhGM-CSF の CD11b の発現量増加の最大増加率はそれぞれ 625±33、576±27 及び 425±15%であった。

サル肺胞マクロファージの増殖／生存並びにサーファクタント排除に対するサルグラモスチムの作用並びにそれらの作用に対する GM-CSF 抗体による抑制作用を検討した。サルの肺胞マクロファージに対し、サルグラモスチムは、5～20 pM において濃度依存性に肺胞マクロファージの増殖／生存を増加させた。ウシ由来サーファクタントを添加して培養したとき、サルグラモスチムの添加では細胞内にサーファクタント様物質は認められなかった。しかし、これらのサルグラモスチムの作用は GM-CSF 自己抗体により抑制された。

**② in vivo 試験**

**＜添付資料 4.2.3.2-5＞**

カニクイザルにサルグラモスチムを 26 週間間歇吸入投与したときの末梢血中の白血球系細胞（白血球数、単球、好中球数、好酸球数、好塩基球）に対する作用を検討した。

試験では各群 6 頭のカニクイザル（雌 3 頭、雄 3 頭）を使用した。サルグラモスチムの 3 用量（5、100 及び 500μg/kg/day）は 1 週間連続吸入投与後 1 週間休薬を設けるサイクルで 26 週間間歇吸入投与した。

サルグラモスチムを 100 又は 500μg/kg 投与したとき、雌雄を問わず、投与後 8 日に白血球数、好中球数及び比、単球数、好酸球数及び比、好塩基球数、大型非染色球数及び比の有意な増加又は増加傾向が認められた。しかしながら、投与後 92 及び 176 日には、いずれの変化もほとんど認められなくなった。

**③ 作用機序**

健常肺においては未分化な肺胞マクロファージは肺胞型（II 型）上皮細胞が産生する GM-CSF により終末分化し、サーファクタントを分解する。一方、肺胞蛋白症患者の肺では、GM-CSF 自己抗体により、GM-CSF が中和されてサーファクタントの分解が抑制され、肺胞内にサーファクタントが蓄積される。この自己抗体の出現により、II 型上皮細胞の出す GM-CSF が中和されて生物活性を失い、肺胞マクロファージが機能障害に陥り、肺サーファクタントの除去能が低下する[3)]。従って、外因性に投与された本剤も内因性 GM-CSF と同様な作用機序、すなわち肺に出現した GM-CSF 自己抗体を中和し、肺胞マクロファージのサーファクタント物質の除去能を回復させることで、肺胞蛋白症において認められるガス交換の阻害や呼吸不全を改善すると推察される。

## 2.4.2.2 副次的薬理試験

該当する試験を実施しなかった。

## 2.4.2.3 安全性薬理試験

**＜添付資料 4.2.3.2-5＞**

サルグラモスチムのカニクイザルの 26 週間間歇吸入投与毒性試験において、安全性薬理評価に必要な検査項目につき評価した。サルグラモスチムを 0、5、100 及び 500 μg/kg/day の用量で雌雄各 3 頭/群に 1 週間連日吸入投与＋1 週間休薬のサイクルで 26 週間投与した。

一般状態観察において、中枢神経系への影響を示唆する変化は認められなかった。循環器系に対し、サルグラモスチム投与による血圧あるいは心電図検査に異常は認められなかった。呼吸器系に対してもサルグラモスチムは一般状態観察において、呼吸器系への影響を示唆する変化は認められなかった。なお、サルグラモスチムはバイオ医薬品に分類される糖タンパク質であるため、hERG 電流を測定する in vitro 電気生理学的試験は実施していない。

### 2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験を実施しなかった。

## 2.4.3 薬物動態試験

### 2.4.3.1 吸収

**＜添付資料 4.2.3.2-5＞**

サルグラモスチムを雌雄カニクイザルにネブライザーを用いて吸入投与したときの血漿中 rhGM-CSF 濃度を ELISA 法により測定した。初回投与後、サルグラモスチムは速やかに全身循環へ吸収され、最高血漿中濃度到達時間（$T_{max}$）は 0.25～0.75 時間であった。最高血漿中濃度（$C_{max}$）及び投与後 24 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24h}$）は投与量の増加に伴い上昇し、その程度は用量比よりも大きかった。雌雄の薬物動態パラメータに明確な相違は見られなかった。吸入投与時の生物学的利用率は大きく見積もっても 1%程度と推定された。サルグラモスチムを雌雄カニクイザルに間歇吸入投与することにより、すべての個体から抗 GM-CSF 抗体が高濃度に検出された。

### 2.4.3.2 分布

**＜添付資料 4.2.2.3-1 参考、添付資料 4.2.2.3-2 参考＞**

[$^{123}$I]標識した rhGM-CSF を雌アカゲザルに単回静脈内投与した後、γ-シンチグラムにより放射能の組織分布を観察した。シンチグラム上では脾臓、肝臓、腎臓、心臓への放射能の分布が観察され、中でも腎臓には特に急速かつ高濃度の放射能の分布が観察された。

低タイターの抗 GM-CSF 抗体を有するアカゲザルに[$^{123}$I]標識した rhGM-CSF を単回静脈内投与した後の放射能の分布を観察した結果、肝臓への速やかかつ高濃度の放射能分布が認められ、抗 GM-CSF 抗体により rhGM-CSF の主たる組織分布が腎臓から肝臓に変化することが示唆された。

[$^{125}$I]で標識した mGM-CSF をマウスに単回静脈内投与したとき、甲状腺＞尿＞腎臓＞唾液腺＞肝臓＝脾臓＞血液＞胸腺＞耳＞筋肉＝脳＞骨髄の順に高濃度の放射能が検出された。甲状腺に検出された高濃度の放射能は、遊離した[$^{125}$I]が甲状腺に取り込まれたものと考えられた。また、

尿中の放射能は、トリクロロ酢酸（TCA）で沈殿しなかったことから低分子分解物であると考えられた。

### 2.4.3.3 代謝

該当する試験を実施しなかった。

### 2.4.3.4 排泄

#### 2.4.3.4.1 尿中排泄

**＜添付資料 4.2.2.3-1 参考、添付資料 4.2.2.3-2 参考＞**

rhGM-CSF を[$^{123}$I]又は[$^{35}$S]で標識し、これらを混合してアカゲザルに単回静脈内投与（15 μg/kg）又は単回皮下投与（10μg/kg）したときの放射能の尿中排泄率を測定した。静脈内又は皮下投与後 15～90 分という早い時間に、尿中に[$^{123}$I]及び[$^{35}$S]が検出され、その後、時間の経過とともに排泄率が増加した。

静脈内投与後の[$^{123}$I]の累積排泄率は、投与後 6 時間までに 37%、42 時間までに 54%であり、[$^{35}$S]の累積排泄率は投与後 70 時間までに 12%であった。皮下投与後の[$^{123}$I]の累積排泄率は、投与後 42 時間までに 40%であり、[$^{35}$S]の累積排泄率は投与後 140 時間までに 27%であった。

[$^{125}$I]で標識した mGM-CSF をマウスに静脈内投与したとき、投与後 1 及び 6 時間の尿中に血液と比較して非常に高濃度の放射能が検出された。尿中放射能は TCA で沈殿しなかったことから、低分子分解物であると考えられた。

#### 2.4.3.4.2 胆汁中排泄

該当する試験を実施しなかった。

#### 2.4.3.4.3 乳汁中排泄

該当する試験を実施しなかった。

### 2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

該当する試験を実施しなかった。

## 2.4.4 毒性試験

### 2.4.4.1 単回投与毒性試験

**＜添付資料：4.2.3.1-1＞**

カニクイザルに、サルグラモスチムの 300μg/kg を静脈内投与した結果、死亡は認められなかった。雌 1/2 例に脾臓の腫大及び盲腸・回腸・結腸の膨隆がみられた以外に異常はなく、静脈内投与における概略致死量は 300μg/kg 以上であった。

### 2.4.4.2 反復投与毒性試験

**＜添付資料：4.2.3.2-1、4.2.3.2-2、4.2.3.2-3、4.2.3.2-4、4.2.3.2-5＞**

カニクイザルを用いて静脈内、皮下及び吸入投与による反復投与毒性試験を実施した。

2 週間反復静脈内投与では、100μg/kg/day で白血球系パラメータ（白血球数・好中球数・リンパ球数・単球数・好酸球数・好塩基球数）の高値が認められた。剖検では 10μg/kg/day 以上の脾臓で腫大及び脾臓重量の高値（又は高値傾向）がみられ、病理組織学的検査で脾臓の組織球の増殖が認められた。その他、100μg/kg/day で骨髄増生、精巣上体の細胞浸潤が認められた。2 週間の回復群では雌で骨髄 M/E 比の低値傾向及び骨髄増生がみられた以外に異常はなく、無毒性量は雌雄とも 10μg/kg/day と判断した。

1 ヵ月間反復皮下投与では、投与部位の浮腫が 20μg/kg/day 以上で認められた。200μg/kg/day で白血球系パラメータの高値傾向及び赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度）の低値傾向が認められた。血液生化学的検査では 200μg/kg/day でアルブミン及び A/G 比の低値傾向、グロブリンの高値傾向がみられた。また、200μg/kg/day で脾臓の大型化、胸腺の小型化、投与部位の暗色化及び硬化が観察され、脾臓の実重量及び相対重量が高値傾向にあった。病理組織学的検査では 200μg/kg/day で骨髄の増生及び胸腺の萎縮がみられた。2 週間の回復群では投与部位の浮腫が休薬 1 週間で消失し、貧血傾向は回復に転じた。胸腺の萎縮以外に異常はなく、概ね回復傾向にあった。無毒性量は、雌雄とも 20μg/kg/day と判断した。

6 週間反復皮下投与では、200μg/kg/day で摂餌量の減少、自発運動の低下などを呈して衰弱した雄 1 匹及び雌 2 匹を瀕死期殺した。途中屠殺例の剖検では、心膜嚢及び関節の漿液貯留、脾臓の肥大、各種リンパ節の肥大、投与部位及びその皮下組織に膿瘍及び痂疲が認められた。病理組織学的検査では各種臓器における炎症性細胞浸潤及びリンパ様細胞浸潤並びにそれに関連した炎症性変化が認められた。計画殺例では、63μg/kg/day 以上の一般状態としてリンパ節の腫大及び投与部位（皮膚）の潮紅・浮腫・痂疲形成が認められた。摂餌量は 63μg/kg/day 以上、体重は 200μg/kg/day のいずれも雄で低値傾向にあった。血液検査では 20μg/kg/day 以上で白血球系パラメータ及び血小板の高値傾向が投与 2 週を最高に認められたが、多くは投与末期に減少した。血液生化学的検査では 20μg/kg/day 以上でグロブリンの高値、アルブミン及び A/G 比の低値傾向がみられた。器官重量では 63μg/kg/day 以上で脾臓の実重量及び相対重量の高値がみられた。病理組織学的検査では、炎症性細胞浸潤が肝臓、心臓、肺、膀胱、精巣、精巣上体、皮膚、脈絡叢（大脳）、気管及び下顎腺に観察された。また、リンパ様細胞浸潤が腎臓、食道、下顎腺、甲状腺、副甲状腺、下垂体、副腎、膵臓、精巣上体及び大脳にみられたほか、リンパ組織の過形成が腸間膜リンパ節、下顎リンパ節などに認められた。

12 週間の休薬後の回復群では各種臓器における炎症性細胞浸潤及びリンパ組織の過形成などの変化が認められたが、所見の重症度と発生率は投与終了時の病変と比較した場合、休薬後に減少し回復性を示した。無毒性量は、雌雄とも 20μg/kg/day 未満と判断した。

26 週間間歇吸入投与では、1 週間連日投与後に 1 週間休薬を設けるサイクルで、26 週間吸入投与した。死亡は認められなかった。血液検査では、100 又は 500μg/kg/day で、投与開始時に白血球パラメータの高値（又は高値傾向）が認められたが、投与 92 日及び 176 日には、いずれの変化もほとんど認められなかった。骨髄検査では 500μg/kg/day の雄で好塩基球比の高値が認められた。剖検では 5μg/kg/day 以上で、抗 GM-CSF 抗体産生による影響と考えられる肺門及び気管リンパ節の大型化が認められた。病理組織学的検査では 5μg/kg/day 以上で気管支関連リンパ節の増加、肺門及び気管リンパ節の過形成が認められた。

サルグラモスチムの曝露量（$C_{max}$ 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は、5μg/kg/day では定量限界未満であったが、100 及び 500μg/kg/day では明らかな性差は認められず、用量の増加に伴って上昇した。反復投与後（投与 91 日及び 175 日）では、ほとんどの動物の血中濃度は、定量限界未満であった。抗 GM-CSF 抗体産生はすべての薬物投与群に認められ、投与期間を通してみると 84 日、182 日で高値傾向がみられ、曝露量と相関が認められた。このためサルグラモスチム投与による明らかな毒性は認められず、無毒性量は雌雄とも 500μg/kg/day と判断した。

### 2.4.4.3 遺伝毒性試験

該当する試験を実施しなかった。

### 2.4.4.4 がん原性毒性試験

該当する試験を実施しなかった。

### 2.4.4.5 生殖発生毒性試験

**＜添付資料：4.2.3.5.2-1 参考、4.2.3.5.2-2 参考、4.2.3.5.2-3、4.2.3.5.2-4 参考、4.2.3.5.1-1、4.2.3.5.2-5、4.2.3.5.3-1＞**

ウサギの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、200μg/kg/day で母動物 1 例に死亡がみられた。体重及び摂餌量が 70μg/kg/day 以上で低値（又は低値傾向）を示し、200μg/kg/day で排便が減少した。血液学的検査では、25μg/kg/day 以上で白血球数の高値、200μg/kg/day で好中球、単球の高値、リンパ球の低値が認められたほか、血小板数の高値、網状赤血球数の低値又は高値、赤血球数の低値がみられた。初期胚に対しては 200μg/kg/day で着床数の低値傾向がみられたほか、初期吸収胚数、着床前死亡率、着床後死亡率の高値（又は高値傾向）が認められた。無毒性量は、雌親動物の一般毒性に対しては 25μg/kg/day、生殖能及び初期胚発生に対しては 70μg/kg/day と判断した。

ウサギの胚・胎児発生に関する試験では薬物投与期間を 2 群（妊娠 6～19 日投与及び妊娠 19～28 日投与）に分けて実施した。妊娠 6～19 日投与では、薬物投与に起因した母動物の死亡は

認められなかった。200μg/kg/day では流産が 1 例、全胚吸収の母動物が 1 例みられた。70μg/kg/day 以上で母動物の摂餌量が低値（又は低値傾向）となり、200μg/kg/day で体重の低値傾向がみられ、排便が減少した。血液学的検査では 200μg/kg/day で白血球数、好中球数、単球数の高値（又は高値傾向）、血小板数、網状赤血球数の高値、赤血球数の低値傾向が認められた。F1 胎児に対しては 200μg/kg/day で早期吸収胚数及び着床前・着床後死亡数の増加がみられた。胎児の形態検査では 200μg/kg/day で髄膜ヘルニア、小眼球症又は無眼球症、腎無形成、水頭症、脊椎異常、椎体異常、肋軟骨異常、胸骨分節の癒合がそれぞれ 1 例にみられたが、いずれも用量関係はなく、試験実施施設における背景データの範囲内であることから、サルグラモスチムに起因するものとは考えられなかった。

妊娠 19～28 日投与では、200μg/kg/day で 2 例の母動物が死亡した。流産が 200μg/kg/day で 5 例、25μg/kg/day で 1 例みられ、200μg/kg/day では妊娠 29 日での分娩が 3 例、非妊娠動物が 1 例みられた。70μg/kg/day 以上で母動物の摂餌量の低値及び体重の低値（又は低値傾向）がみられ、排便が減少した。その他、200μg/kg/day で白血球数、好中球数、単球数の高値（又は高値傾向）、リンパ球数の低値、網状赤血球数の高値、70μg/kg/day 以上で血小板数の高値及び赤血球数の低値が認められた。F1 胎児では 200μg/kg/day で妊娠母動物の減少により総胎児数が低値となった。胎児体重が 70μg/kg/day 以上で、胎盤重量が 200μg/kg/day で低値であった。胎児の形態検査では 70μg/kg/day で耳介の矮小（又は欠損）、眼瞼開裂、四肢の過伸展、肋軟骨の異常が各 1 例にみられたが、いずれも用量関係はなく、試験実施施設における背景データの範囲内であったことから、サルグラモスチムに起因するものとは考えられなかった。無毒性量は、親動物の一般毒性に対しては 25μg/kg/day 未満、胎児の発生に対しては 25μg/kg/day と判断した。

ウサギの出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験では、薬物投与期間を 3 群（妊娠 6～19 日投与、妊娠 19 日～分娩 0 日投与及び授乳 1～14 日）に分けて実施した。妊娠 6 日～19 日投与では、薬物投与に起因した母動物の死亡は認められなかった。また、200μg/kg/day では摂餌量が低値となり、排便が減少した。また、200μg/kg/day では流産が 1 例、全胚吸収の母動物が 1 例、分娩時に全胎児死亡の母動物が 2 例みられた。F1 出生児では、200μg/kg/day で出生児数及び生存出生児数の低値傾向がみられたが、出生後の生存率、発育分化などには差はなかった。

妊娠 19 日～分娩 0 日投与では、母動物の死亡が 200μg/kg/day の妊娠 23 日に 1 例、流産 2 例のうち 1 例にみられた。70μg/kg/day 以上で妊娠期間中の摂餌量及び体重が低値となり排便が減少したが、授乳期間中には差がなかった。F1 出生児では、200μg/kg/day の生後 1 日の体重が低値となった以外、異常は認められなかった。

授乳 1 日～14 日投与では、200μg/kg/day の母動物 1 例を授乳 6 日に瀕死期殺した。70μg/kg/day 以上で授乳期間中の摂餌量が低値となり、排便が減少した。全胎児死亡の母動物数が 25μg/kg/day 以上で少数例にみられた。F1 出生児では、出生児数、生存出生児数及び授乳期間中の生存率には差はなかった。無毒性量は、母動物の一般毒性及び F1 新生児に対しては 25μg/kg/day 未満、F1 出生児の毒性及び F2 胎児の発生に対しては 200μg/kg/day と判断した。

### 2.4.4.6 局所刺激性試験

該当する試験を実施しなかった。

### 2.4.4.7 その他の毒性試験

該当する試験を実施しなかった。

## 2.4.5 総括及び結論

本剤はサルグラモスチムを有効成分とする自己免疫性肺胞蛋白症の治療薬である。サルグラモスチムは酵母菌 Saccharomyces cerevisiae に発現させた rhGM-CSF である。

薬理試験において、本剤の効力を裏付ける in vitro 試験では、サルグラモスチムの造血系細胞マクロファージに対する増殖分化誘導作用並びに TF-1 細胞、PBMC 及び単球の各細胞の増殖／生存の増加作用が認められた。また、サル肺胞を用いた in vitro 試験の肺胞蛋白症再現モデルの試験では、サルグラスモスチムの肺胞マクロファージの増殖促進作用並びにサーファクタント様物質の除去作用が認められた。これらのサルグラモスチムの作用は GM-CSF 自己抗体の添加により抑制され、肺胞蛋白症の原因としての自己抗体の関与が確認された。この試験結果は、本剤を外因性に投与することで GM-CSF 自己抗体の作用を中和できる可能性を予測させる結果であった。本剤の in vivo 試験として、薬理作用の評価は GLP 下で実施されたサルのサルグラモスチム 26 週間間歇吸入投与毒性試験における末梢血中の白血球系細胞に対する作用から評価した。サルグラモスチムを 26 週間間歇吸入投与したとき、血中の白血球数の増加が認められた。白血球分画の連続測定の結果、この増加は好中球、単球及び好酸球の増加によることが確認された。

安全性薬理試験では、サルグラモスチムのカニクイザルの 26 週間間歇吸入投与毒性試験において、安全性薬理評価に必要な検査項目につき評価した。その結果、一般状態観察において、中枢神経系あるいは循環器系、呼吸器系への影響を示唆する変化は認められなかった。

薬物動態試験において、吸入投与したときのサルグラモスチムの投与部位からの吸収は極めてわずかであり、吸収され全身循環に移行した rhGM-CSF は速やかに腎臓に分布する一方、ペプチド又はアミノ酸等の低分子に代謝され尿中に排泄されるものと考えられた。また、循環血中に抗 GM-CSF 抗体が存在する場合、rhGM-CSF は抗 GM-CSF 抗体と結合して免疫複合体を形成し、肝臓へ移行することが示唆された。

毒性試験において、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験（静脈内投与 2 週間、皮下投与 1 ヵ月・6 週間、吸入投与 26 週間間歇）の主な変化として、サルグラモスチムの薬理作用である顆粒球造血の亢進による好中球数・好酸球数の高値、これに伴う白血球数の高値及び高値傾向が静脈内投与及び皮下投与のすべての試験で認められた。病理組織学的検査では脾臓の組織球増殖、骨髄の増生、肝臓及び精巣上体の細胞浸潤が認められたほか、6 週間皮下投与では炎症性細胞浸潤が肝臓、心臓、肺、膀胱、精巣、精巣上体、皮膚、脈絡叢（大脳）、気管及び下顎腺に観察された。また、リンパ様細胞浸潤が腎臓、食道、下顎腺、甲状腺、副甲状腺、下垂体、

副腎、膵臓、精巣上体及び大脳にみられたほか、リンパ組織の過形成が腸間膜リンパ節、下顎リンパ節などに認められた。

死亡例としては、6 週間反復皮下投与試験の 200μg/kg/day で摂餌量の減少、自発運動の低下などを呈して衰弱した雄 1 匹及び雌 2 匹を瀕死期殺した。剖検では心膜嚢及び関節の漿液貯留、脾臓の肥大、各種リンパ節の肥大、投与部位及びその皮下織に膿瘍及び痂疲が認められた。病理組織学的検査では上記計画殺例と同様に各種臓器に炎症性細胞浸潤及びリンパ様細胞浸潤並びにそれに関連した炎症性変化が認められた。なお、静脈内投与及び皮下投与で認められた変化は、休薬により回復又は回復傾向を示した。

26 週間間歇吸入投与試験では、500μg/kg/day で白血球パラメータの高値又は高値傾向及び骨髄の好塩基球比の高値（雄）が認められたほか、病理組織学的検査では気管支関連リンパ組織の増加、肺門及び気管リンパ節の過形成が認められたのみであった。これは吸入投与における曝露量($AUC_{0\text{-}last}$)が静脈内投与及び皮下投与に比べ 100 倍以上も低いことによると考えられた。

各毒性試験における無毒性量と臨床用量での最高血中濃度の比較について以下に述べる。サルを用いた 6 週間反復皮下投与毒性試験の無毒性量は 20μg/kg/day 未満、26 週間間歇吸入投与毒性試験の無毒性量は 500μg/kg/day と考えられた。また、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験での母動物の一般毒性に対する無毒性量は 25μg/kg/day 未満と考えられた。各毒性試験の無毒性量における最高血中濃度($C_{max}$)は、健康成人を対象とした臨床試験（臨床推奨用量の単回投与）における $C_{max}$ と比較して 346～2581 倍高く、臨床推奨用量には十分な安全域が確保されていると判断した。自己免疫性肺胞蛋白症患者では血液中に抗 GM-CSF 自己抗体が存在するため、循環血中に移行したサルグラモスチムは速やかに中和抗体と複合体を形成すると考えられることから、安全域が問題になることは少ないと考えられる。

がん原性について、サルグラモスチムのサル 26 週間間歇吸入毒性試験で、投与経路の所属リンパ節に限定してリンパ系細胞の過形成が認められた。これらの変化は雄動物では抗薬物抗体価の高い動物で認められていることから、抗薬物抗体に関わる変化であると考えられている（雌では明らかでなかった）。一方、サルの 6 週間皮下投与毒性試験では、サルグラモスチムの薬理効果によると考えられる脾臓及び他のリンパ系器官でのリンパ組織の過形成がみられたが、これらの所見は休薬 12 週後には回復又は回復傾向が認められた。

本剤は投与後ペプチド及びアミノ酸に代謝分解されることが一般的に知られていることから、DNA あるいは染色体成分に直接相互作用することは考え難い。従って、本剤のがん原性の懸念は少ないものと考えられる。

以上の結果をまとめると、本剤は肺胞内に蓄積されたサーファクタントを排除することにより肺胞蛋白症でみられる呼吸不全を改善する安全性の高い有用な薬剤と考えられる。

## 2.4.6 参考文献一覧

1) Uy CC, Bry K, Lappalainen U, Hallman M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases surfactant phospholipid in premature rabbits. Pediatr Res. 1999;46(5):613-20.

2）医薬品非臨床ガイドライン解説 2013［医薬品非臨床ガイドライン研究会編集　薬事日報社］ 2-9 バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価、p119-136.
3）中田光、肺胞蛋白症の病態と治療の最前線、日内会誌、2015;104:314-322.