目次

略語・略号一覧 2
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.1 緒言 3
2.6.2 引用文献 4

略語・略号一覧

略語・略号	内容
CHO	チャイニーズハムスター卵巣細胞
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
kDa	キロダルトン
mGM-CSF	マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
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
SDS-PAGE	SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

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。

サルグラモスチムはアミノ酸残基127個の糖タンパク質である。SDS-PAGEにより19.5、16.8及び15.5 kDaのバンドが検出される3種のグリコフォームにより特徴付けられる。サルグラモスチムのアミノ酸配列は、23位ロイシンの置換のため天然型ヒトGM-CSF（23位はアルギニン）とは異なる。

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。以下サルグラモスチムの構造式を示す。

分子式：$C_{639}H_{1002}N_{168}O_{196}S_8$、分子量：非糖化タンパク質の分子量は14430である。

Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Pro-Ser-Pro-Ser-Thr-Gln-Pro-Trp-Glu-His-Val-Asn-Ala-Ile-Gln-Glu-Ala-Leu-Arg-Leu-Leu-Asn-Leu-Ser-Arg-Asp-Thr-Ala-Ala-Glu-Met-Asn-Glu-Thr-Val-Glu-Val-Ile-Ser-Glu-Met-Phe-Asp-Leu-Gln-Glu-Pro-Thr-Cys-Leu-Gln-Thr-Arg-Leu-Glu-Leu-Tyr-Lys-Gln-Gly-Leu-Arg-Gly-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-Lys-Gly-Pro-Leu-Thr-Met-Met-Ala-Ser-His-Tyr-Lys-Gln-His-Cys-Pro-Pro-Thr-Pro-Glu-Thr-Ser-Cys-Ala-Thr-Gln-Ile-Ile-Thr-Phe-Glu-Ser-Phe-Lys-Glu-Asn-Leu-Lys-Asp-Phe-Leu-Leu-Val-Ile-Pro-Phe-Asp-Cys-Trp-Glu-Pro-Val-Gln-Glu

肺胞蛋白症は肺胞内にサーファクタントが蓄積して呼吸不全が進行する希少難病である。肺胞蛋白症の約90%がGM-CSFに対するGM-CSF自己抗体の発現が原因であるといわれている。標準治療は、全身麻酔下での全肺洗浄であるが患者にとっての侵襲は大きい。しかしながら、未だ非侵襲的な治療法は存在しておらず、簡便な治療法として有効性と安全性の高い薬剤が望まれている。

2019年、新潟大学の中田光教授らにより、自己免疫性肺胞蛋白症を対象として、サルグラモスチムの吸入投与によるプラセボ対照第Ⅲ相試験（医師主導治験）が実施され、有効性と安全性が確認された[1)]。従って、難病に指定されている肺胞蛋白症において、NPC-26の吸入投与はGM-CSF自己抗体の出現に伴う肺胞内サーファクタントを排除し、呼吸不全の症候を改善する有益性の高い薬剤と考えられる。

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も存在しないことを踏まえ、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した。in vivo 試験としては、毒性試験のカニクイザル 26 週間間歇吸入試験において白血球細胞に対するサルグラスモスチムの作用の試験成績を用いて評価した。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サルを用いたカニクイザル 26 週間間歇吸入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、これらの試験成績を CTD 様式として編集した。

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 26 週間間歇吸入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（MEDLINE を用いて検索）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より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。

2.6.2 引用文献

1) Tazawa R, Ueda T, Abe M, Tatsumi K, Eda R, Kondoh S, Morimoto K, Tanaka T, Yamaguchi E, Takahashi A, Oda M, Ishii H, Izumi S, Sugiyama H, Nakagawa A, Tomii K, Suzuki M, Konno S, Ohkouchi S, Tode N, Handa T, Hirai T, Inoue Y, Arai T, Asakawa K, Sakagami T, Hashimoto A, Tanaka T, Takada T, Mikami A, Kitamura N and Nakata K, Inhaled GM-CSF for Pulmonary Alveolar Proteinosis. N Engl J Med 2019; 381:923-932.

目次

略語・略号一覧 2
2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 3
2.6.2.2.1 in vitro 試験 3
2.6.2.2.2 in vivo 試験 10
2.6.2.2.3 作用機序 14
2.6.2.3 副次的薬理試験 15
2.6.2.4 安全性薬理試験 15
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 15
2.6.2.6 考察及び結論 16
2.6.2.7 引用文献 17

略語・略号一覧

略語・略号	内容
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
FCS	胎児ウシ血清
GMAb	GM-CSF 自己抗体
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
PBMC	末梢血単核細胞
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
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(Cmax 到達時間)

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

in vitro 試験において、サルグラモスチムはヒトの白血球系及び顆粒球マクロファージのコロニー形成に対し、おおむね濃度依存的にコロニー形成を誘導した。サルグラモスチムは TF-1 細胞、PBMC 及び単球いずれの細胞に対しても細胞増殖／生存を高めた。NPC-26 は好中球又は単球内へのシグナルを STAT5 のリン酸化を通じて伝達すること、及び接着因子の CD11b の発現を誘導して細胞を活性化することが示唆された。サルグラモスチムはサル肺胞マクロファージの増殖／生存を高めること、及び肺胞内のサーファクタントを除去する作用を有することが認められた。これらのサルグラモスチムの作用は顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)自己抗体により抑制された。

in vivo 試験において、サルの末梢血中において NPC-26 の顆粒球及びマクロファージ系細胞の増殖作用及び分化促進作用が認められた。

以上の結果から、肺胞蛋白症の原因としての GM-CSF 自抗体の出現による肺胞内サーファクタントの蓄積は、外因性に NPC-26 を投与することで、自己抗体の中和作用により抑制されることが推察される。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 in vitro 試験

① 正常ヒト骨髄血液細胞増殖に対するサルグラモスチムの作用

（添付資料 4.2.1.1-1 参考）

サルグラモスチム（Leukine）の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、健常人由来の骨髄血液細胞を用い、この細胞に対する NPC-26 の増殖作用を検討した。

実験方法は、半固形培地でのコロニーアッセイ法を用いた。半固形培地はメチルセルロースを用いた MethoCult4230 培地を使用した。コロニーアッセイに用いた細胞は市販の健常成人由来のヒト骨髄細胞で細胞培養密度を 3×10^4 個/well とした。サルグラモスチムは 0.001、0.01、0.03、0.1、1 及び 10 ng/mL の 6 段階の濃度にいて検討した。正常ヒト由来の骨髄血液細胞を 14 日間培養し、その後に well 毎のコロニー数をコロニー形態（顆粒球コロニー（CFU-G）、顆粒球マクロファージコロニー（CFU-GM）及びマクロファージコロニー（CFU-M）の 3 種類）に分類した上、目視により算定した。有意差検定は Student’s t-test を用いた。

表 2.6.2.2-1 に示したように、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概ね濃度依存性にコロニー形成を誘導した。サルグラモスチムは 1 及び 10 ng/mL の濃度において最大の活性を有していた。また、コロニー形成の中で Large CFU-G の活性に対し最も定量性が顕著であった。なお、サルグラモスチムによるコロニー形成の形態は、典型的で過去の文献に合致するものであり CFU-G はコンパクトに密集したコロニー、CFU-M は細胞がばらけたコロニー、CFU-GM は両者の中間の形態を示すコロニーであった(図 2.6.2.2-1)。

以上の結果からサルグラモスチムの造血系細胞に対する増殖分化誘導作用が認められた。

表 2.6.2.2-1　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するサルグラモスチムの作用

濃度(ng/mL)	Small CFU-G	Large CFU-G	Total CFU-G	CFU-GM	CFU-M	Total Myeloid
Control	30±6	2±2	32±4	10±1	32±5	74±9
0.001	28±6	3±1	31±7	6±2	32±3	69±9
0.01	32±6	4±1	36±6	10±4	28±7	74±9
0.03	37±6	4±2	41±8	7±2	29±2	77±11
0.1	32±5	8±3	40±3	10±3	32±3	82±6
1	33±4	21±4*	54±8	11±2	33±7	97±6
10	32±7	25±6*	57±12	10±3	30±3	97±8

*p<0.005 vs Control (by Student's t-test)、mean±SE

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

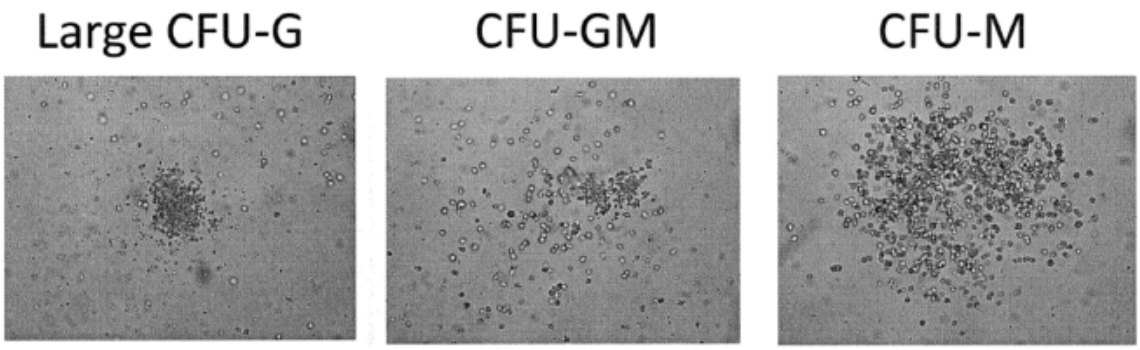


図 2.6.2.2-1　サルグラモスチムの添加により形成されたコロニーの形態

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

② TF-1、単球及び PBMC の増殖／生存活性に対するサルグラモスチムの作用

（添付資料 4.2.1.1-2 参考）

GM-CSF に反応する細胞株である TF-1 細胞は元東京大学第三内科北村俊雄医師（現在東京大学医科学研究所教授）より供与された。末梢血単核球（PBMC）及び単球は健常者より採取した血液から分離した。各細胞数は 2×10^4 個／well で、これらの細胞増殖／生存活性に対するサルグラモスチム及びその対照薬として、大腸菌（E.coli）由来の 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）及びチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）由来の rhGM-CSF の作用（0～60 pM の濃度）を検討した。各種 rhGM-CSF を添加して Macrophage serum free medium 中で TF-1 細胞は 72 時間、PBMC 及び単球は 168 時間培養した。その後、培養液 100 µL に対し Cell counting kit-8（5-[2,4-bis(sodiooxysulfonyl)phenyl-3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazole-3-ium]）溶液を 10 µL 各 well に添加した。添

加後 37℃、5%CO_2 の条件下で 4 時間培養し、各 well のホルマザン形成を OD_{450nm} として吸光光度計を用いて測定した。

結果を図 2.6.2.2-2 に示す。TF-1 細胞の増殖／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(図 2.6.2.2-2A)。低濃度では CHO 由来の rhGM-CSF の細胞増殖／生存に対する作用は強かったが、60 pM の濃度のときは 3 種類の rhGM-CSF は同等の効果を示した。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 ED_{50} はそれぞれ 24、21 及び 3.9 pM であった。単核球の増殖／生存に対しても、サルグラモスチム、大腸菌由来の rhGM-CSF 及び CHO 由来の rhGM-CSF は濃度依存性にこの細胞の増殖／生存を高めた（図 2.6.2.2-2B)。　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 ED_{50} はそれぞれ 4.9、10.7 及び 1.8 pM であった。末梢血単核細胞（PBMC）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 は濃度依存性にこの細胞の増殖／生存を高めた（図 2.6.2.2-2C)。CHO 由来の rhGM-CSF はサルグラモスチム及び大腸菌由来の rhGM-CSF に比べ、PBMC の増殖／生存に対する作用は最も強かった。

以上の結果から、サルグラモスチムは TF-1 細胞、単球及び PBMC いずれの細胞に対しても細胞増殖／生存を高めることが示された。

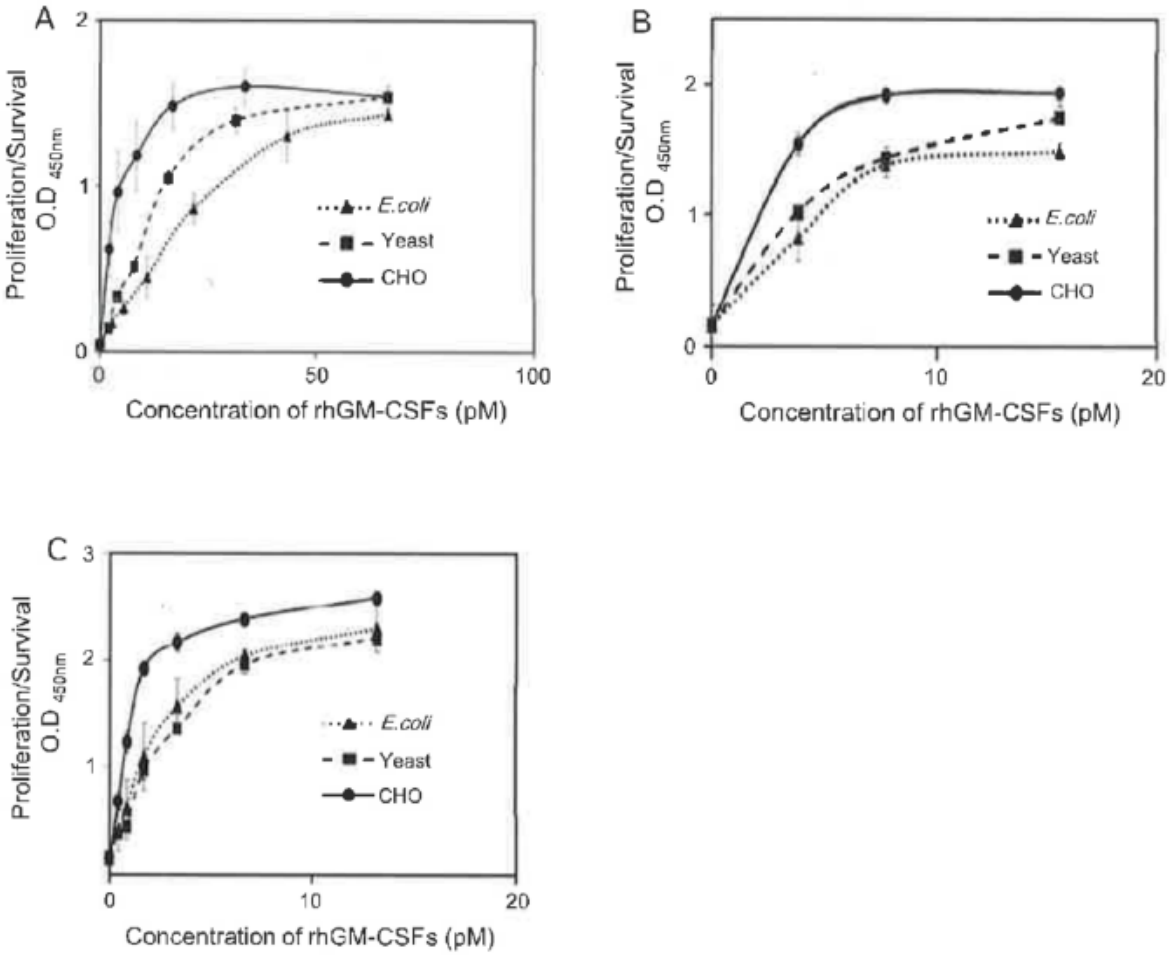


図 2.6.2.2-2　TF-1 細胞、単球及び PBMC の増殖／生存活性に対するサルグラモスチムの作用

E.coli：大腸菌由来の rhGM-CSF、Yeast：サルグラモスチム、CHO：CHO 由来の rhGM-CSF

A:TF-1 細胞に対する作用、B：単球に対する作用、C:PBMC に対する作用、mean±SE

③ STAT5 のリン酸化及び CD11b の発現に対するサルグラモスチムの作用

（添付資料 4.2.1.1-2 参考）

GM-CSF 受容体活性化に伴う STAT5 リン酸化を指標に、サルグラモスチムの単球及び好中球における STAT5 リン酸化に対する作用を検討した STAT5 のリン酸化反応の試験では、健常人ボランティアからヘパリン採血したヘパリン血にサルグラモスチム又は他の rhGM-CSF を最終濃度 15、30、60 及び 500 pM となるように加え、37℃で 30 分間培養後、赤血球を Fix/Lyse buffer 中で溶血させ、白血球を遠心後に氷冷エタノール中に-20℃で 1 時間固定させた。遠心してエタノールを除去し、3%胎児ウシ血清（FCS）/0.01%NaN_3/リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に再懸濁し、Alexa Fluor 647-labeled anti-pSTAT5 で染色しフローサイトメトリーを用いて測定した。

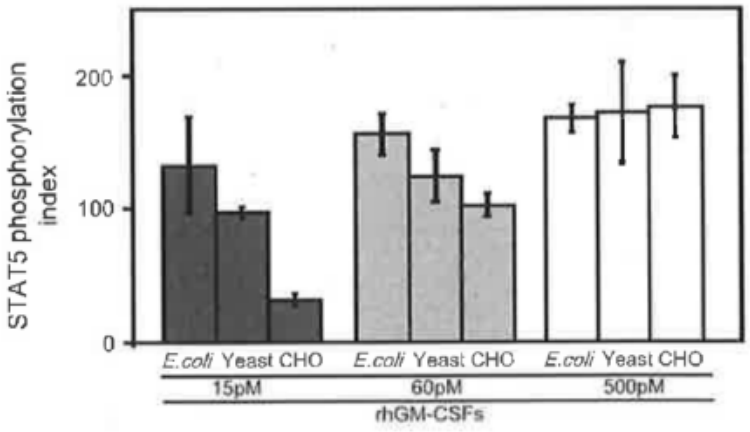
結果を図 2.6.2.2-3A に示す。単球及び好中球における STAT5 のリン酸化に対し、サルグラモスチム、大腸菌由来の rhGM-CSF 及び CHO 由来の rhGM-CSF は、15、60 及び 500 pM の濃度範囲

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-CSG の STAT5 リン酸化作用は同等であった。

単球 CD11b は接着因子として炎症反応の第一段階としての指標であるが、種々のサイトカインにより活性化された好中球では細胞表面の Cd11b 発現量が増加する。そこで好中球の CD11b の発現に対しサルグラモスチムの作用を検討した。好中球 CD11b 発現量の測定試験でも同様に、健常人ボランティアからヘパリン採血したヘパリン血に NPC-26 を最終濃度 0.1 及び 10 ng/mL となるように加え、37℃で 30 分間培養後 FITC-CD11b 抗体及び PE-CD16 抗体染色を混和して、氷上に 15 分間放置し、lysing solution で赤血球の溶血と白血球の固定を行い、BD Accuri C6 フローサイトメーターで好中球画分の CD11b 発現量を測定した。結果は CD11b インデックス＝（刺激したときの好中球の CD11b 発現量 － 刺激していない好中球の CD11b 発現）／刺激していない好中球の CD11b 発現×100 を計算し評価した。その結果（図 2.6.2.2-3B)、サルグラモスチムは濃度依存性に CD11b（好中球の活性化度を示すマーカー）の発現量を増加させた。大腸菌由来の rhGM-CSF 及び CHO 由来の rhGM-CSF は 15 及び 60 pM の濃度においてほぼ同等な CD11b 発現量増加作用を示した。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。

以上の結果から、サルグラモスチムは好中球又は単球内へのシグナルを STAT5 のリン酸化を通じて伝達すること、及び接着因子の CD11b の発現を誘導し細胞を活性化していることが示唆された。

A



B

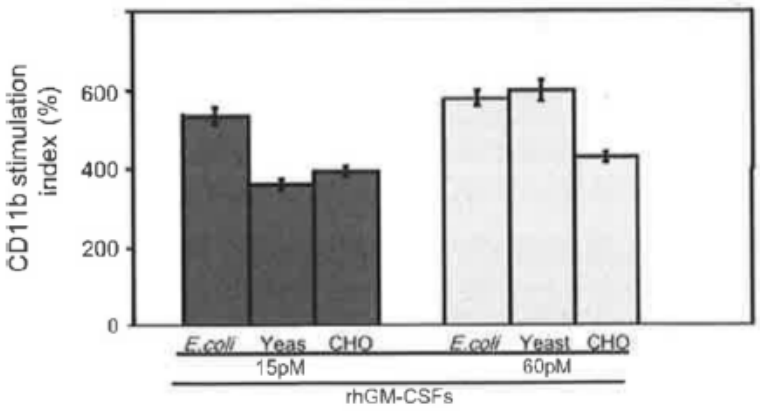


図 2.6.2.2-3　サルグラモスチムの好中球における STAT5 のリン酸化及び CD11b 発現に対する作用

A:STAT5 リン酸化に対する作用

mean±SE

縦軸：リン酸化された細胞数の解析対象の全細胞集団に対する割合

E.coli：大腸菌由来の rhGM-CSF、Yeast：サルグラモスチム、

CHO：CHO 由来の rhGM-CSF

B:CD11b の発現に対する作用、mean±SE

mean±SE

縦軸：CD11b インデックス＝（刺激したときの好中球の CD11b 発現量 － 刺激していない好中球の CD11b 発現）／刺激していない好中球の CD11b 発現×100

E.coli：大腸菌由来の rhGM-CSF、Yeast：サルグラモスチム、

CHO：CHO 由来の rhGM-CSF

④ サル肺胞マクロファージの増殖／生存に対するサルグラモスチムの作用並びにその作用に対する GM-CSF 抗体による抑制作用

（添付資料 4.2.1.1-3 参考）

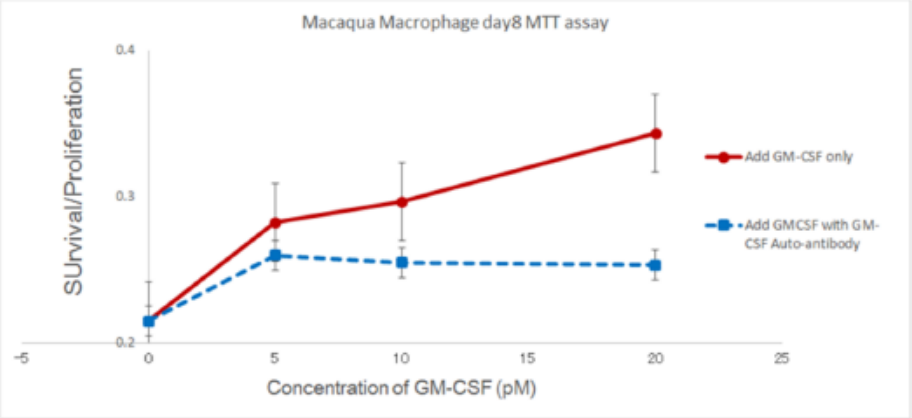
カニクイザルの気管支肺胞洗浄で得られた肺胞マクロファージを使用した。肺胞マクロファージ増殖に対するサルグラモスチムの作用を MTT アッセイにより検討した。採取した肺胞マクロファージにサルグラモスチム（5、10 及び 20 pM）単独又はサルグラモスチムに GM-CSF 自己抗体（GMAb）1μg/mL を添加してマクロファージ血清フリーメジウムで 7 日間培養した。培養後 8 日目に各 well 内の培養液 100μL に対し、5-[2,4-bis(sodiooxysulfonyl)phenyl-3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazole-3-ium]）;Cell counting kit-8 を 10μL を加え 37° C、5%CO_2 の条件下で 4 時間培養した。各 well のホルマザン形成を $OD_{450\,nm}$ として吸光光度計を用いて測定した。

肺胞サーファクタント分解能に対するサルグラモスチムの作用を検討した試験では、採取したサルの肺胞マクロファージをマクロファージ血清フリーメジウムにサルグラモスチム 10 pM 又はサルグラモスチム 10 pM+GMAb 1μg/mL を添加して培養し、5 日後にウシのサーファクタントを加えて 2 時間培養した。サーファクタントを洗浄後再度同じ培養メジウムで 2 日間培養した。ライトギムザ染色後、位相差顕微鏡、Oil-Red O 染色で確認した。

図 2.6.2.2-4A に示したように、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 の濃度範囲内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。一方、サルグラモスチムに GM-CSF 抗体の GMAb を同時に添加するとサルグラモスチム単独で培養したときにみられたマクロファージの増殖／生存の増加は抑制された。ウシ由来サーファクタントを添加して培養したとき、サルグラモスチム単独の添加では細胞内にサーファクタント様物質がみられなかったが、GM-CSF 抗体の GMAb を同時添加して培養すると細胞内に分解されないサーファクタント様物質が確認された。（図 2.6.2.2-4B）。

以上の結果から、サルグラモスチムはサル肺胞内のマクロファージの増殖／生存を高め、細胞内のサーファクタントの分解能を有すること、肺胞蛋白症で認められる GM-CSF 自己抗体はサルグラモスチムの作用を阻害すること、及びこれらの結果を踏まえると、外因性にさらなるサルグラモスチムを投与することでこの GM-CSF 自己抗体の作用は中和される可能性が示唆された。

A



B

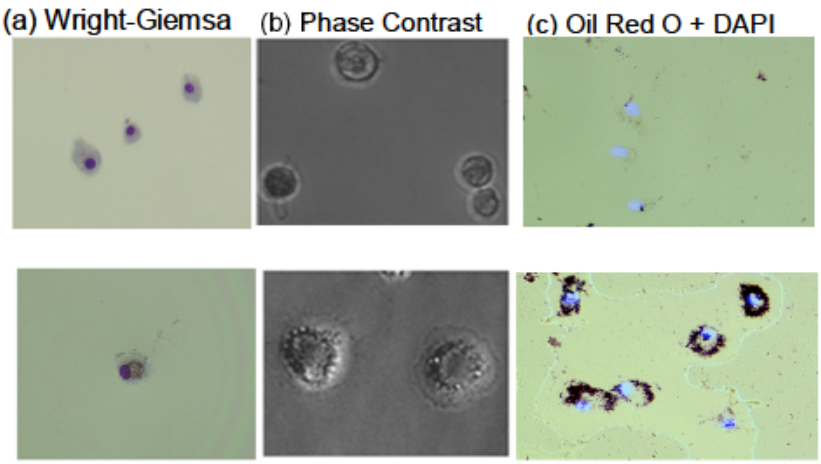


図 2.6.2.2-4 カニクイザル肺胞マクロファージの増殖／生存及びウシサーファクタント分解能に対するサルグラモスチムの作用並びにこのサルグラモスチムの作用に対する GM-CSF 抗体の影響

A:肺胞マクロファージの増殖／生存に対する作用

B:ウシサーファクタント分解能に対する作用、

(a)ライトギムザ染色、(b)位相差顕微鏡、(c)オイルレッド O 染色の結果を示す。上段はサルグラモスチム単独で培養したとき、下段はサルグラモスチム及び GMAb 併用で培養したときを示す。

2.6.2.2.2 in vivo 試験

① サ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

（添付資料 4.2.3.2-5）

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500 μg/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。末梢血中の造血系細胞の測定はサルグラモスチム又はその媒体（Tris/Mannitol/Sucrose溶液、pH7.4）投与前、投与後8、92及び176日に大腿静脈より採血した。白血球数は2角度レーザーフローサイトメトリー法により、白血球分類（好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球及び大型非染色球数）に関してはペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法+2角度レーザーフローサイトメトリー法により測定した。

表2.6.2.2-2は雄性サルの結果を、表2.6.2.2-3は雌性サルの結果を示した。サルグラモスチムを100又は500 μg/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。各計量値について，Dunnett 法によって対照群と各被験物質群との間で平均値の検定を行った。

以上の結果からサルグラモスチムはサルの末梢血中において顆粒球マクロファージ系細胞の増殖及び分化を促進させていることが示唆された。

表 2.6.2.2-2 雄性サ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造血系細胞に対する作用

投与量 μg/kg/day	投与後の時間（日）	WBC (10^3/μL)	Neut (%)	Lymph (%)	Mono (%)	Eos (%)	Baso (%)	LUC (%)	Neut (10^3/μL)	Lymph (10^3/μL)	Mono (10^3/μL)	Eos (10^3/μL)	Baso (10^3/μL)	LUC (10^3/μL)
Control	-3	11.22±1.46	42.3±5.6	52.2±5.1	3.0±0.5	1.5±0.8	0.4±0.1	0.6±0.3	4.70±0.22	5.90±1.33	0.33±0.03	0.18±0.10	0.04±0.02	0.07±0.04
	8	9.96±2.42	36.6±9.0	56.4±9.9	3.7±1.0	2.1±0.6	0.3±0.1	0.8±0.2	3.74±1.53	5.53±1.12	0.36±0.11	0.21±0.07	0.03±0.01	0.08±0.03
	92	10.00±1.55	38.3±13.7	55.8±13.7	3.2±0.5	1.6±0.2	0.3±0.2	0.8±0.3	3.84±1.48	5.57±1.65	0.32±0.05	0.16±0.05	0.03±0.02	0.08±0.04
	176	10.59±1.07	33.5±10.6	60.1±10.2	3.3±0.6	2.1±0.3	0.2±0.1	0.8±0.3	3.48±0.87	6.44±1.75	0.35±0.06	0.22±0.04	0.03±0.01	0.08±0.05
5	-3	10.56±1.92	34.1±13.8	61.0±15.0	2.6±0.7	1.4±0.5	0.4±0.1	0.6±0.2	3.74±2.11	6.28±1.08	0.28±0.12	0.16±0.08	0.03±0.01	0.06±0.02
	8	9.21±2.17	27.9±6.0	65.2±6.7	3.3±1.4	2.8±0.9	0.3±0.1	0.5±0.1	2.53±0.64	6.07±1.85	0.29±0.08	0.24±0.04	0.03±0.01	0.05±0.02
	92	8.28±1.43	29.5±1.0	63.9±3.0	3.9±2.2	1.7±1.1	0.3±0.1	0.7±0.1	2.44±0.44	5.32±1.14	0.30±0.12	0.13±0.07	0.03±0.01	0.06±0.01
	176	8.88±1.54	24.2±3.0	69.3±4.5	4.2±2.6	1.3±0.9	0.2±0.1	0.8±0.1	2.12±0.26	6.20±1.46	0.36±0.17	0.11±0.06	0.02±0.00	0.08±0.02
100	-3	10.23±1.27	27.3±9.3	65.0±10.3	3.4±0.4	3.4±0.8	0.3±0.1	0.7±0.3	2.72±0.60	6.72±1.75	0.35±0.06	0.34±0.08	0.03±0.01	0.07±0.03
	8	11.03±1.30	45.4±17.0	41.7±18.2	3.7±1.0	7.7±2.2	0.4±0.1	1.1±0.4	5.15±2.35	4.44±1.35	0.41±0.11	0.86±0.31	0.04±0.01	0.13±0.04
	92	11.64±0.90	35.0±16.2	57.4±13.6	2.9±0.4	3.4±2.8	0.3±0.1	0.9±0.3	4.05±1.74	6.71±1.76	0.34±0.08	0.40±0.32	0.04±0.01	0.10±0.04
	176	12.10±3.81	27.7±4.1	62.4±4.8	4.0±0.4	4.8±2.6	0.3±0.1	0.9±0.2	3.31±1.06	7.53±2.42	0.47±0.12	0.64±0.44	0.04±0.02	0.11±0.04
500	-3	7.51±1.78	22.0±8.3	70.6±10.1	3.7±1.2	2.6±1.8	0.3±0.1	0.7±0.2	1.74±0.97*	5.18±0.53	0.29±0.13	0.21±0.18	0.02±0.01	0.05±0.03
	8	18.67±3.21**	63.5±8.6*	22.9±7.0*	3.6±1.0	8.3±4.4*	0.4±0.0	1.3±0.3	12.04±3.47**	4.13±0.60	0.69±0.27	1.51±0.78*	0.07±0.01**	0.24±0.02**
	92	8.26±0.83	31.8±9.3	61.7±10.7	3.8±1.5	1.8±0.8	0.2±0.1	0.7±0.3	2.64±0.84	5.09±0.96	0.30±0.11	0.15±0.06	0.02±0.01	0.06±0.02
	176	8.87±1.45	31.9±16.4	60.8±17.1	4.3±1.0	1.8±0.3	0.2±0.1	1.0±0.3	2.98±2.01	5.23±0.82	0.39±0.15	0.15±0.03	0.02±0.01	0.09±0.03

n=3、mean±SD、*p<0.05, **p<0.01 vs Control (by Dunnett 2 Sided test)、WBC:白血球、Neut:好中球、Lymph;リンパ球、Mono;単球、Eos;好酸球、Baso;好塩基球、LUC;大型非染色球

表 2.6.2.2-3 雌性サ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造血系細胞に対する作用

投与量 μg/kg/day	投与後の時間（日）	WBC (10^3/μL)	Neut (%)	Lymph (%)	Mono (%)	Eos (%)	Baso (%)	LUC (%)	Neut (10^3/μL)	Lymph (10^3/μL)	Mono (10^3/μL)	Eos (10^3/μL)	Baso (10^3/μL)	LUC (10^3/μL)
Control	-3	8.61±1.14	29.7±6.4	60.9±8.7	4.3±1.9	3.9±2.7	0.4±0.1	0.7±0.1	2.58±0.73	5.20±0.50	0.38±0.18	0.36±0.29	0.03±0.00	0.07±0.02
	8	7.70±0.84	28.3±5.8	62.5±7.4	4.7±2.2	3.4±2.0	0.4±0.1	0.7±0.1	2.21±0.69	4.78±0.32	0.36±0.14	0.28±0.19	0.03±0.00	0.05±0.01
	92	8.64±1.97	39.8±6.7	51.5±4.6	5.3±2.0	2.2±0.8	0.3±0.0	1.0±0.2	3.52±1.25	4.40±0.82	0.43±0.07	0.18±0.07	0.03±0.01	0.08±0.01
	176	7.88±0.14	35.2±7.7	57.1±8.9	4.4±1.8	2.1±0.5	0.3±0.1	1.0±0.3	2.77±0.56	4.50±0.76	0.35±0.14	0.16±0.04	0.02±0.01	0.08±0.02
5	-3	9.56±1.75	35.7±11.8	58.3±10.0	3.2±0.9	1.7±0.7	0.4±0.2	0.7±0.3	3.54±1.83	5.47±0.46	0.30±0.04	0.16±0.04	0.04±0.01	0.06±0.02
	8	7.72±1.69	31.4±9.9	61.4±9.1	3.1±1.4	3.1±0.6	0.3±0.2	0.8±0.2	2.53±1.35	4.65±0.51	0.23±0.07	0.24±0.06	0.02±0.01	0.06±0.01
	92	7.69±1.76	41.2±10.1	51.8±8.4	3.6±1.1	2.5±1.0	0.2±0.1	0.8±0.3	3.28±1.59	3.90±0.38	0.26±0.03	0.18±0.04	0.02±0.01	0.05±0.01
	176	7.45±0.82	40.9±6.7	53.2±7.1	3.2±1.1	1.9±0.1	0.3±0.1	0.6±0.1	3.06±0.70	3.95±0.56	0.24±0.06	0.14±0.02	0.02±0.00	0.04±0.01
100	-3	10.54±2.32	27.0±11.2	62.0±11.5	4.7±0.5	5.0±1.5	0.4±0.1	0.8±0.2	3.01±1.94	6.37±0.53	0.51±0.16	0.52±0.13	0.04±0.01	0.08±0.04
	8	9.14±1.87	31.8±6.6	55.1±9.2	4.4±0.6	7.2±3.5	0.4±0.1	1.2±0.4	2.95±1.06	4.95±0.56	0.39±0.05	0.70±0.49	0.03±0.01	0.11±0.05
	92	9.88±1.40	28.2±4.8	60.9±4.8	5.2±2.1	4.2±1.8	0.4±0.1	1.0±0.1	2.83±0.81	5.98±0.56*	0.50±0.12	0.43±0.22	0.03±0.01	0.10±0.02
	176	10.49±1.66	36.2±9.3	53.0±8.5	5.0±0.9	4.2±0.3*	0.4±0.1	1.3±0.2	3.86±1.34	5.50±0.83	0.51±0.03	0.45±0.10**	0.03±0.01**	0.13±0.04
500	-3	6.12±1.02	29.5±3.5	61.1±0.3	5.3±3.0	3.2±1.2	0.3±0.1	0.6±0.1	1.83±0.50	3.74±0.61*	0.30±0.13	0.19±0.07	0.02±0.01	0.04±0.01
	8	24.54±1.87**	69.6±3.3**	15.1±3.7**	3.2±1.1	9.9±4.4	0.5±0.1	1.7±0.9	17.07±1.35**	3.67±0.70	0.80±0.34*	2.45±1.23*	0.11±0.02**	0.43±0.27*
	92	6.43±1.24	34.8±9.6	57.3±6.0	4.0±1.6	2.6±1.7	0.3±0.1	1.0±0.4	2.30±1.02	3.65±0.46	0.25±0.09	0.16±0.09	0.02±0.01	0.06±0.02
	176	6.08±1.73	34.7±3.6	57.3±3.4	4.4±1.7	2.6±1.3	0.2±0.0	0.9±0.4	2.15±0.85	3.47±0.88	0.26±0.09	0.14±0.04	0.01±0.00	0.05±0.02

n=3、mean±SD、*p<0.05、**p<0.01 vs Control (by Dunnett 2 Sided test)、WBC:白血球、Neut:好中球、Lymph;リンパ球、Mono;単球、Eos;好酸球、Baso;好塩基球、LUC；大型非染色球

2.6.2.2.3 作用機序

NPC-26 を用いた吸入療法は、枯渇した GM-CSF を外から補う新しい治療法である。図 2.6.2.2-5 に示したように、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 [1]。従って、外因性に投与された NPC-26 は肺に出現した GM-CSF 自己抗体を中和することで肺胞内に蓄積されたサーファクタントを除去し、肺胞蛋白症を改善すると考えられる。

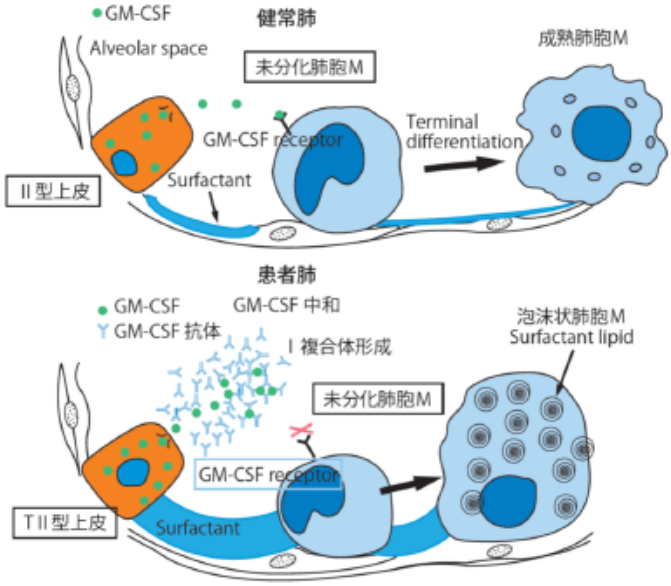


図 2.6.2.2-5 肺胞蛋白症（自己免疫性）の発症機序 [1]

肺胞蛋白症の発症機序は長年不明であった。その理由として 2.6.1 で述べたようにヒトや霊長類とマウスなどのげっ歯類とでは GM-CSF のアミノ酸相同性が低いことから、GM-CSF の種特異性が挙げられる。しかしながら、GM-CSF 遺伝子欠損マウス及び GM-CSF 受容体 common β 鎖遺伝子欠損マウスにおいて、肺胞蛋白症様の病理像所見がみられ、肺胞蛋白症の原因因子として GM-CSF の関与が指摘された [2-5]。すなわち、GM-CSF 欠損マウスの肺は生後時においては Wild type マウスと同様で異常は認められなかったが、3 週間後には細顆粒状の好酸球性無構造物の貯留や泡沫状マクロファージが肺胞内に認められるようになる。サーファクタント蛋白の mRNA 量は両者で差はみられなかったが、GM-CSF 欠損マウスの肺胞マクロファージはサーファクタントの分解能が低下していることが示された。GM-CSF 受容体 common β 鎖遺伝子欠損マウスで観察された肺胞蛋白症を Wild type マウスから採取した骨髄を移植すると肺胞蛋白症が治癒することが示された。さらに、Kitamura ら（1999）[6]により、肺胞蛋白症患者の血中に高濃度の GM-

CSF 自己抗体の存在が発見され、この発見は、GM-CSF 自己抗体が肺性蛋白症の原因である可能性を示唆しており、事実、サルを用いた Sakagami ら（2010）[7]の試験によって支持された。すなわち、患者由来の GM-CSF 自己抗体をサルに輸注すると、このサルにおいてヒト肺性蛋白症と同様に気管支肺胞洗浄液の白濁と、リン脂質濃度の上昇及び泡沫状マクロファージ数の増加が観察された。in vitro 試験においてもサル肺胞を用いて、NPC-26 のマクロファージ増加作用及びサーファクタントの除去作用に対し GM-CSF 自己抗体が、これらの作用を抑制することが示されている（添付資料 4.2.1.1-3 参考）。

以上まとめると、外因性に投与された NPC-26 も内因性 GM-CSF と同様の作用機序により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。

2.6.2.3 副次的薬理試験

当該試験を実施していない。

2.6.2.4 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を用いた 26 週間の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を実施した。本試験では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。一般状態の観察を投与期間中は 1 日 2 回、休薬期間中は 1 日 1 回行った。血圧及び心電図を投与開始前及び投与 13 週、投与 25 週の投与前及び投与後約 2 時間（T_{max} 付近）に測定した。また、投与初日と投与 13 及び 25 週に経時的な採血を行い、サルグラモスチムの血中濃度を測定した。

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或いは心電図検査に異常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。サルグラモスチムの分子量はタンパク質部分で 14,430 であり、一般的に高分子物質が細胞膜を通過して hERG チャネルを阻害する可能性は低いと考えられる [8]。呼吸器系に対してもサルグラス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。

以上のことから、サルグラスモスチムのカニクイザルを用いた 26 週間間歇吸入投与毒性試験の中で安全性薬理薬理作用について検討した結果、懸念される作用は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

当該試験を実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

肺胞上皮の II 型細胞は肺サーファクタントを分泌することで、気相・液相の界面の表面張力を減じて肺胞の虚脱を防いでいる。肺胞内に分泌された肺サーファクタントは、肺胞マクロファージにより代謝されるか、II 型細胞に再利用のため吸収される。作用機序の項（2.6.2.2.3）に記載したように肺胞蛋白症は、この肺サーファクタント由来の物質が肺胞から終末細気管支内に集積し、呼吸不全を来たす稀な肺疾患である[9、2.6.2.2.3の項]。現在、肺蛋白症の標準治療は全肺洗浄法である。この方法は全身麻酔下でダブルルーメンチューブを気管内挿管下で片側の肺に大量の生理食塩水（20～50 L）の注入と排液を繰り返し、肺胞内に蓄積したサーファクタント物質を洗い出す方法である[10)]。しかしながら、全肺洗浄法は侵襲性の大きさから患者にとって負担が大きく、より簡便な治療法が望まれる。この難病疾患に対する有効な薬物治療法は未だ存在しない。

これまで原因不明とされてきたが、近年、肺胞マクロファージの分化増殖に必須である GM-CSF に対する自己抗体の出現が患者の約 9 割で確認されており、肺胞蛋白症の原因である可能性が明らかとなってきた[11)]。以上のことから、好中球、単球/マクロファージおよび骨髄由来樹状細胞を含む顆粒球-マクロファージ経路において、細胞の分化及び誘導を促進する GM-CSF の作用は広く知られていることを鑑み、GM-CSF の有するこれらの作用は肺胞蛋白症の治療において有効な手段となりうるかもしれないと考えられた。

NPC-26 はサルグラモスチムを有効成分とする薬剤である。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。GM-CSF の作用と同様に、NPC-26 の効力を裏付ける in vitro 試験において、サルグラス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、更なる NPC-26 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。

In vivo 試験に関し、特別な NPC-26 吸入投与薬理試験は実施しなかった。NPC-26 の in vivo 試験として、薬理作用の評価は GLP 下で実施された毒性試験においてサ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依ることが確認された。

すでに述べたように、GM-CSF 欠損マウスではヒトの肺胞蛋白症と類似した病態であり、このマウスにおいて認められた肺胞蛋白症様症状は、エアロゾル化されたマウスの GM-CSF で改善されたが、全身投与では改善されなかったとの報告がなされている[12)]。このマウスモデルと一致して、最近の臨床試験においても吸入 GM-CSF 投与は皮下投与に比べ高い反応率及び安全性が示されており[13-14)]、GM-CSF ノックアウトマウスでの結果は臨床試験結果を支持する報告である。

従って、サルグラモスチムの投与経路として吸入投与は有効な投与方法であると考えられる。

本剤の安全性薬理試験は実施していないが、本剤の有効成分であるサルグラモスチムのカニクイザルを用いた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を実施した。その結果、一般状態観察において、中枢神経系或いは呼吸器系への影響を示唆する変化は認められなかった。循環器系に対しても血圧或いは心電図検査に異常は認められなかった。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[8]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。

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。

2.6.2.7 引用文献

1) 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.

2) Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, Dickersin GR, Bachurski CJ, Mark EL, Whitsett JA and Mulligan RC, Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. Science 1994;264:713-716.

3) Stanley, E., G. J. Lieschke, D. Grail, D. Metcalf, G. Hodgson, J. A. M. Gall, D. W. Maher, J. Cebon, V. Sinickas, and A. R. Dunn. Granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994;91: 5592-5596.

4) Nishinakamura R, Nakayama N, Hirabayashi Y, Inoue T, Aud D, McNeil T, Azuma S, Yoshida S, Toyoda Y, Arai K, Miyajima A and Murray R. Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 βc receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while βIL3 receptor-deficient mice are normal. Immunity 1995;2:211-222.

5) Robb K, Drinkwater CC, Metcalf D, Li R, Kontgen F, Nicola N A and Begley CG. Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common β subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interluekins 3 and 5. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:9565-9569.

6) Kitamura T, Tanaka, N, Watanabe J, Uchida K, Kanegasaki S, Yamada Y and Nakata K, Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med 1999;190:875-880.

7) Sakagami T, Beck D, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Nakata K, Keller G, Wood RE, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Luisetti M, Davies S, Krischer JP, Brody A,

Ryckman F and Trapnell BC. Patient-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor autoantibodies reproduce pulmonary alveolar proteinosis in nonhuman primates. Am J Respir Crit Care Med 2010;182:49-61.

8) 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.

9) Seymour JF and Presneill JP, Pulmonary alveolar proteinosis : progress in the first 44 years. Am J Respir Crit Care Med 2002;166:215—235.

10) Campo I, Luisetti M, Griese M, Trapnell BC, Bonella F, Grutters J, Nakata K, Van Moorsel CHM, Costabel U, Cottin V, Ichiwata T, Inoue Y, Braschi A, Bonizzoni G, Iotti GA, Tinelli C, Rodi G and for the WLL International Study Group, Whole lung lavage therapy for pulmonary alveolar proteinosis: a global survey of current practices and procedures.Orphanet J Rare Dis 2016;11:115.DOI 10.1186/s13023-016-0497-9

11) Trapnell BC, Whitsett JA and Nakata K, Pulmonary alveolar proteinosis. N Engl J Med 2003;349:2527—2539.

12) Reed JA, Ikegami M, Cianciolo ER, Lu W, Cho PS, Hull W, Jobe AH and Whitsett JA. Aerosolized GM-CSF ameliorates pulmonary alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol) 1999:276:L556-L563.

13) Tazawa R, Hamano E, Arai T, Ohta H, Ishimoto O, Uchida K, Watanabe M, Saito J, Takeshita M, Hirabayashi Y, Ishige I, Eishi Y, Hagiwara K, Ebina M, Inoue Y, Nakata K and Nukiwaet T, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:1142-9.

14) Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, Arai T, Takada T, Nasuhara Y, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ishii H, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Morimoto K, Akira M, Terada M, Otsuka J, Ebina M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Akazawa K and Nakata K, Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy for pulmonary alveolar proteinosis. Am J Respir Crit Care Med 2010;181:1345-54.

目次

略語・略号一覧 2
2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 6
2.6.3.4 安全性薬理試験 7
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 8

略語・略号一覧

略語・略号	内容
CFU-G	顆粒球コロニー
CFU-GM	顆粒球マクロファージ
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
GM-CSF	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

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

一覧表

被験物質：サルグラスチム又はLuekine

試験の種類	試験系	投与方法	動物種／組織	実施施設	添付資料番号
効力を裏付ける試験	白血球系のヒト骨髄血液細胞に対する造血促進作用試験	in vitro	ヒト骨髄血液細胞	国立国際医療研究センター	添付資料 4.2.1.1-1（参考）
	TF-1、単球及びPBMCの増殖／生存活性に対する作用、STAT5のリン酸化及びCD11bの発現に対する作用試験	in vitro	TF-1細胞、ヒトPBMC及び単球	新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター及び医療情報学研究室、東和環境科学（株）、日本獣医生命科学大学獣医学部感染症病研究室	添付資料 4.2.1.1-2（参考）
	サル肺胞マクロファージ増殖作用及び肺胞サーファクタント蓄積除去作用並びに自己抗体との併用試験	in vitro	サル／肺胞マクロファージ	新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター	添付資料 4.2.1.1-3（参考）
	末梢血中の白血球に対する作用試験	吸入投与	カニクイザル	[redacted]	添付資料 4.2.3.2-5（GLP）
安全性薬理試験	一般症状に対する作用試験	吸入投与	カニクイザル	[redacted]	添付資料 4.2.3.2-5（GLP）
	循環器系に対する作用試験	吸入投与	カニクイザル	[redacted]	添付資料 4.2.3.2-5（GLP）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

筆頭著者・雑誌名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	添付資料番号
湯尾　明、厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業(臨床研究推進研究事業）総括研究報告書、平成 24 年度総括・分担研究報告書	GM-CSF 薬理試験の検討	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する。	in vitro 試験 ヒト骨髄血液細胞／Leukine（サルグラモスチム ） 0.001～10 ng/mL	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、CFU-G はコンパクトに密集したコロニー、CFU-M は細胞がばらけたコロニー、CFU-GM は両者の中間の形態を示すコロニーであった。	4.2.1.1-1 （参考）
Hashimoto A ら、Cytokine、2014 Aug;68(2):118-26	Low concentrations of recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor derived from Chinese hamster ovary cells augments long-term bioactivity with delayed clearance in vitro	TF-1、単球及び 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する。	in vitro 試験 TF-1 細胞、ヒト単球、PBMC／サルグラモスチム、大腸菌由来の rhGM-CSF 及び CHO 由来の rhGM-CSF（0～500 pM）	TF-1 細胞の増殖／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-CSG の STAT5 リン酸化作用は同等であった。	4.2.1.1-2 （参考）

				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。	
中田　光ら、厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業(臨床研究・治験推進研究事業））、平成26年度総括・分担研究報告書	サル肺胞マクロファージを用いた、in vitroでのPAP患者肺胞内の再現の試み	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する。	in vitro試験 サル肺胞マクロファージ／サルグラモスチム	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。	4.2.1.1-3 （参考）
藤原　淳、ノーベルファーマ株式会社社内資料　試験番号：[redacted]　2016年	サルグラモスチムのカニクイザルにおける26週間間歇吸入投与毒性試験	サ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する。	カニクイザル（雄3頭、雌3頭））／サルグラモスチム5、100及び500 μg/kg/day	サルグラモスチムを100又は500 μg/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。	4.2.3.2-5

2.6.3.3 副次的薬理試験

当該試験は実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：サルグラモスチム

筆頭著者／雑誌 試験名及び試験番号	表題	動物種／系統	投与方法	投与量 (μg/kg/day)	性別及び 動物数/群	評価対象 項目	特記すべき所見	GLP 適用	添付資料
藤原　淳、ノーベルファーマ株式会社 社内資料　試験番号：[redacted] 2016年	Sargramostim のカニクイザルにおける 26 週間間歇吸入投与毒性試験	カニクイザル	吸入投与	0、5、100、500	雄雌 各 3／群	一般状態、血圧及び心電図	いずれの評価項目にも異常は認められなかった。	適	4.2.3.2-5

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

当該試験は実施していない。