

薬物誘発性の自己免疫性溶血性貧血に関する研究:  
カニクイザルにおけるヒト型化抗 HM1.24 モノクローナル  
抗体による溶血性貧血の誘発機序

2004

渡 部 一 人



薬物誘発性の自己免疫性溶血性貧血に関する研究：  
カニクイザルにおけるヒト型化抗 **HM1.24** モノクローナル  
抗体による溶血性貧血の誘発機序

2004

渡 部 一 人

# 目 次

頁

緒 言 .....	1
第 1 章      カニクイザルにおける前臨床安全性研究 .....	3
第 1 節    材料および方法 .....	3
第 2 節    成 績 .....	14
第 3 節    考 察 .....	19
第 4 節    小 括 .....	28
第 2 章      溶血性貧血の機序解明に関する免疫学的研究 .....	30
第 1 節    材料および方法 .....	32
第 2 節    成 績 .....	40
第 3 節    考 察 .....	45
第 3 章      総括および結論 .....	53
謝 辞 .....	59
引用文献 .....	60
図 .....	68
表 .....	91
ABSTRACT .....	103

## 緒 言

近年、バイオテクノロジー応用医薬品の開発が盛んに行われ、ヒトにおける標的分子に対する特異性の優れたヒト型化抗体医薬品が難病治療の画期的な新薬として有望視されている。しかし、ヒト型化抗体はその特徴的かつ多様な構造並びに種特異性、免疫原性および予想外の多形質発現活性の生物学的な性質を有する。そのため、適用患者の安全性を確保するためには、抗原に対する特異性、補体結合性および標的組織以外のヒト組織に対する意図されない反応性ならびに細胞毒性などを含めて、そのヒト型化抗体の免疫学的特性について詳細に検討されなければならない[1]。多くのヒト型化抗体は免疫系の亢進または抑制による薬効発現を意図しているため、体液性免疫のみならず細胞性免疫にも影響を与えることがある。さらに、標的細胞上の表面抗原の発現が変化する場合には自己免疫反応を引き起こす可能性を示唆している。

ヒトへ適用されるバイオ医薬品の多くは、動物で免疫原性を示すと考えられる。従って、前臨床において毒性を評価し、ヒトへ外挿する際には、被験動物で産生された抗体の特性を考究し、その抗体が薬物動態および薬動学的パラメータ、副作用の発現および重篤度、補体の活性化または新しい毒性作用の発現にどのように影響するかについて考慮しなければならない。それ故、ヒト型化抗体の前臨床安全性研究にはヒトへの外挿性が期待できる適切な動物種を選択することが重要である。適切な動物種とは、標的分子として意図するエピトープを発現し、ヒト組織の場合と類似した組織交差反応性を示すような動物種である。このような動物種を用いることで、エピトープへの結合や意図しない組織交差反応性によって引き起こされる毒性の評価を最も効果的に行うことができると考えられる。

一方、ヒト疾患と類似していると考えられる実験動物モデルの開発はめざましい進歩を遂げている。これらの病態動物モデルの使用は、毒性評価項目の明確化、臨床適応の選択および



適切な剤形、投与経路および投与方法の決定において有益である。しかしながら、ヒト以外の霊長類が唯一の適切な動物種である場合、霊長類を用いた病態動物モデルの作出および使用は動物愛護の観点から避けるべきであり、また試験結果を評価する際の参考として利用できる十分な背景データを多数の動物を用いて集積することも困難である。そのため、通常は正常動物を用いた前臨床安全性試験を実施し、得られた毒性変化に関する作用機序の解明および種差に関する検討などを加えることにより、生物学的な特性を把握し、意図する適用患者への外挿が行われる。前臨床における安全性評価の主な目的は、1) ヒトに適用する際の安全な初回投与量とその後の増量計画を設定すること、2) 毒性の標的となる恐れのある臓器を特定し、その毒性が可逆的なものであるかの検討を行うこと、3) 臨床でのモニタリングを実施する際の安全性の評価項目を見出すことである[1]。

以上のような背景に基づき、新規のヒト型化抗体医薬品として開発中である抗 HM1.24 モノクローナル抗体(以下 Anti-HM1.24)について、カニクイザルを用いて前臨床安全性研究を行った。本研究は多発性骨髄腫患者における副作用発現の量的および質的な予測と毒性発現メカニズムを解明することを目的とした。

Anti-HM1.24 は骨髄腫細胞に高頻度に発現している HM1.24 抗原を認識するヒト型化モノクローナル IgG<sub>1</sub> 抗体であり、多発性骨髄腫の治療薬としての開発が期待されている。Anti-HM1.24 の薬効作用機序は骨髄腫細胞に対するナチュラルキラー細胞を介した抗体依存性細胞傷害(Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity: ADCC)であり[2、3、4]、補体依存性細胞傷害活性は殆どないとされている。しかし、ヒトにおいて HM1.24 抗原は骨髄腫細胞に限らず全身の組織に分布しており、正常な B リンパ球あるいは T リンパ球にも発現し、リンパ球の活性化に伴い抗原発現量が増加することが知られている[5]。しかしながら、HM1.24 抗原の生理学的な機能に関してはいまだ不明な点が多く、今後の研究課題である。

## 第1章 カニクイザルにおける前臨床安全性研究

本章では、多発性骨髄腫の治療薬として期待されているヒト型化抗 HM1.24 モノクローナル抗体 (Anti-HM1.24) のカニクイザルにおける毒性変化を明確にするために、臨床適用経路として予定されている静脈内投与による単回投与毒性試験および1ヵ月間反復投与毒性試験を実施し、安全性評価を行った[6]。本前臨床安全性研究は、カニクイザルおよびヒトにおいて HM1.24 抗原は全身に分布していることから、本薬の全身暴露による標的組織以外の組織に対する意図されない反応性ならびに細胞毒性などを含めて、特に Anti-HM1.24 の免疫学的特性を把握することを研究の目的とした。また、全身暴露における薬物動態学的な検討および Anti-HM1.24 抗体の測定を行い、それらが毒性変化の発現率および重篤度、または新たな毒性作用の発現にどのように影響するかを考察した。

### 第1節 材料および方法

#### 1. 被験物質

Anti-HM1.24 はマウス型抗 HM1.24 モノクローナル抗体を移植法によりヒト型化した IgG<sub>1</sub> モノクローナル抗体である。定常領域はヒト型化されているが、CDR (相補性決定領域) はマウス型であり、可変領域のアミノ酸配列はマウス型と 80% 以上の相同性を保持している (Fig. 1)。Anti-HM1.24 は遺伝子組換え技術を用いてチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) で産生した。

本研究には中外製薬㈱で製造された Anti-HM1.24 溶液 (Lot No.AHM99F01) を用いた。これは Anti-HM1.24 を 18.5 mg/mL の濃度で含有する無色澄明の溶液であった。入手後、使用時まで約-80℃で凍結保存し、使用時に融解した。対照群用の投与液および希釈用溶媒として Anti-HM1.24 希釈液 (Lot No.AHM99B、150 mmol/L NaCl 含有 20 mmol/L 酢酸緩衝液、約 pH 6) を用いた。これは無色澄明の溶液であった。入手後、使用時まで冷蔵保存した。

## 2. 使用動物

中国より輸入したカニクイザルを国内で 9 週間の検疫を行い (Table 1)、健康であることが確認された動物を (株) 中外医科学研究所より購入し、単回投与毒性試験に雌雄各 4 匹、1 ヶ月反復投与毒性試験に雌雄各 16 匹をそれぞれ使用した。試験開始時のカニクイザルの年齢は 3 ～4 歳、体重範囲は雄で 2.7～3.5 kg、雌で 2.3～3.9 kg であった。

カニクイザルは入手後、馴化・検疫期間を 21 日間 (単回投与試験) または 53 日間 (1 ヶ月間反復投与試験) 設け、動物の健康状態を観察するとともに、モンキーチェアー保定への慣れを目的としてトレーニングを行い、投与前検査値の採取のために体重測定、尿、血液および血液化学的検査などを実施した。群分けは一般状態、体重推移、各種検査値などを考慮し、群間に偏りが少なくなるように各群へ動物を振り分けた。

## 3. 飼育環境

カニクイザルは温度  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、換気回数 14～16 回/時、14 時間照明 (午前 5 時～午後 7 時点灯) に設定した動物室で、ステンレススチール製サル用吊りケージ (幅 583 mm × 奥行き 600 mm × 高さ 665 mm) を用いて個別飼育した。

飼料は固型飼料 (PS、オリエンタル酵母工業 (株)) 約 70 g およびバナナ 1/2 本 (果肉) を、それぞれ 1 日 1 回給餌した。飲料水は自動給水装置により水道水を不断給与した。

## 4. 動物種の選択理由

動物種の選択については、Anti-HM1.24 に対する感受性の有無を考慮した。すなわち、各種動物のリンパ球を用いた交差反応性試験 [7] において、マウス、ラット、モルモット、ウサギおよびイヌは Anti-HM1.24 に対して交差反応性を示さないが、カニクイザルでは交差反応性が認



められた。また、組織(32種類)を用いた交差反応性試験[8]において、カニクイザルはヒト組織と類似した交差反応性を有する動物種であった(Table 2)。従って、カニクイザルは本薬に対する感受性を有していることから、ヒトへの外挿性がある唯一の動物種と位置付け、前臨床の安全性研究に適した動物であると判断した。

## 5. 動物実験の倫理的配慮

本研究は全て中外製薬㈱「動物実験指針」に則り、使用動物の削減(reduction)、動物実験の洗練(refinement)および置き換え(replacement)に留意し、自己規制の必要性を基本姿勢として、動物福祉の観点から動物の生理、生態、習性などを理解し、愛情をもって飼育管理し、その生命を尊重し、かつ苦痛軽減などの措置を可能な限り施す倫理的配慮をもって遂行した。

## 6. 群構成および投与方法

予想される臨床適用量が 0.5～5 mg/kg であったことから、この用量を含む用量範囲を考慮し、低用量を 2 mg/kg、中用量を 20 mg/kg、高用量を予想最高臨床用量の 40 倍に相当する 200 mg/kg に設定した。対照群には溶媒(Anti-HM1.24 希釈液)を投与した。単回投与では各群に雌雄各 1 匹をあてた。また、1ヵ月間反復投与では各群に雌雄各 4 匹をあて、内 1 匹を 28 日間の休薬用動物(末尾 4 番)とした(Table 3)。

投与経路は臨床にて予定されている静脈内持続投与とした。カニクイザルをモンキーチェアに保定し、留置針を用いて橈側皮静脈内に約 1 mL/分の投与速度で、各群とも体重 1kg あたり 10.81 mL の溶液を投与した。各個体の投与液量(約 30～40 mL)は最新の体重値から算出した。臨床適用では週に 1 回の投与が予定されていたが、基礎的な薬物動態学的研究においてカニクイザルの血漿中消失半減期は 1.7 日と短かったことを考慮して、反復投与試験では

週 2 回の間欠投与とし、4 週間にわたって計 8 回投与した。

## 7. 観察期間

単回投与では投与後 112 日までを観察期間とした。反復投与試験では初回投与日から投与開始後 28 日までを投与期間とし、その後 28 日間を休薬期間とした。なお、単回投与試験の投与日および反復投与試験の初回投与日を投与 0 日として起算した。

## 8. 検査項目および検査方法

各試験における各検査の実施時期を Fig. 2 に示した。

動物の健康に影響を及ぼさないように、各検査における採血量は必要最小限にとどめ、総採血量は体重の 1%以内(全血量の 10%未満)を目処とした。以下に各検査の実施方法および検査項目を記載した。

### 1) 一般状態、摂餌状況および体重測定

各個体の外貌、行動、排泄物の異常の有無および摂餌状況を毎日観察した。また、雄動物については精巣下降の状態を週 1 回の頻度で触診により観察した。体重は週 1 回の頻度で測定した。

### 2) 尿検査

自然排尿の新鮮尿を用いて pH、潜血、ケトン体、グルコース、蛋白質、ウロビリノーゲン、ビリルビンをミニオーションアナライザー (MA-4240、(株)京都第一科学)を用いて測定した。また、新鮮尿を遠心分離して、得られた沈渣を Sedi-stain (Becton Dickinson 社)で染色した後、光学顕

微鏡下で結晶および円柱の有無を観察し、白血球(WBC)、赤血球(RBC)、扁平上皮細胞(Squamous)、円形上皮細胞(Round)および小円形上皮細胞(Small round)を計数した。

約 16 時間の蓄尿については、尿比重を尿比重計(URICON-S、(株)アタゴ)を用いて測定し、また尿中ナトリウム(Na)、カリウム(K)および塩素(Cl)を自動分析装置(7170、(株)日立製作所)を用いて測定した。

### 3) 血液学的検査

伏在静脈から EDTA・2K、3.8%クエン酸ナトリウムまたはヘパリンナトリウムによる抗凝固処理をして採血を行い、以下の項目を測定した。

EDTA・2K 処理血液については、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)、血色素量(HGB)、平均赤血球容積(MCV)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を測定し、白血球分類として好中球数(NEUT)、好酸球数(EOSINO)、好塩基球数(BASO)、単球数(MONO)、リンパ球数(LYMP)および大型非染色性細胞数(LUC)の測定を行い、比率を算出した。以上の項目は総合血液学検査装置(THMS H・1E、バイエルメディカル(株))を用いた。網赤血球数および比率(RETIC)は自動網赤血球測定装置(R-2000、東亜医用電子(株))を用いて測定した。また、血液塗抹標本を作製し、Wright 染色を施し、光学顕微鏡下で血球形態の観察を行った。

3.8%クエン酸ナトリウム処理血液については、遠心分離を行い血漿を得た後、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびプロトロンビン時間(PT)を血液凝固自動測定装置(アメルング KC-10A、ハインリッヒ・アメルング社)を用いて測定した。

ヘパリンナトリウム処理血液については、溶血処理を行い得られた末梢血リンパ球を用いて CD4/CD8 および CD2/CD20 リンパ球サブセット解析を行った。測定はフローサイトメーター



(EPICS ELITE、コールター社)を用い 488nm の励起波長により行い、各細胞の比率(%)を求めた。

#### 4) 血液化学的検査

伏在静脈または大腿静脈から採血を行い、遠心分離して得られた血清を用いて以下の項目を測定した。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性 (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性 (ALT)、アルカリホスファターゼ (Al-P)、乳酸脱水素酵素活性 (LDH)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性 ( $\gamma$ -GTP)、クレアチンホスホキナーゼ活性 (CPK)、グルコース (Glu)、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、間接ビリルビン (I-Bil)、総コレステロール (T-Cho)、トリグリセリド (TG)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、無機リン (IP)、カルシウム (Ca)、鉄 (Fe)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、C 反応性蛋白 (CRP) およびハプトグロビン (Haptoglobin) を自動分析装置 (7170、(株)日立製作所)を用いて測定し、アルブミン・グロブリン比 (A/G) を算出した。さらに、蛋白分画を自動電気泳動装置 (AES600、オリンパス光学工業(株))を用いて、アルブミン (Alb)、 $\alpha_1$ -グロブリン ( $\alpha_1$ -G)、 $\alpha_2$ -グロブリン ( $\alpha_2$ -G)、 $\beta$ -グロブリン ( $\beta$ -G) および  $\gamma$ -グロブリン ( $\gamma$ -G) の 5 分画に分類し、各々の比率(%)および実数値を算出した。

#### 5) 骨髄検査

剖検時に胸骨を摘出し、集細胞遠心装置 (サイトスピン-2、Shandon 社)を用いて、胸骨骨髄の遠心塗抹標本を作製し、Wright-Giemsa 染色を施した後、細胞 500 個を光学顕微鏡で観察し、骨髄百分比を求めるとともに、ME 比 (M/E:M-sub/E-sub) を算出した。

## 6) 心電図検査

全自動心電計 (LABO-SYSTEM ZM-5012、フクダ・エム・イー工業(株)) を用いて心電図を記録し、PR、QRS、QT、QTc (QTc:corrected QT=QT/ $\sqrt{RR}$ ) 間隔および P、R、T 高を測定した。

## 7) 眼科学的検査

塩酸ケタミン麻酔下で、散瞳剤 (トロピカミド塩酸フェニレフリン、ミドリン P<sup>(R)</sup>、参天製薬(株)) を点眼後、スリットランプ (SL-14、興和(株)) を用いて前眼部および中間透光体の観察を行うとともに、眼底カメラ (興和(株)) を用いて眼底を観察・撮影した。

## 8) 血漿中 Anti-HM1.24 濃度測定

伏在静脈よりヘパリンナトリウムによる抗凝固処理をして採血し、直ちに氷冷下に置いた後、遠心分離して血漿を分取した。この血漿を用いて、Anti-HM1.24 濃度を HM1.24 を検出抗原とした ELISA により測定した (Fig. 3)。吸光度測定にはマイクロプレートリーダー (EL340i、BIO-TEK Instruments、Inc.) を用い、血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC)、平均滞留時間 (MRT)、消失半減期 (t<sub>1/2</sub>) を算出した。本法による定量限界は 0.195  $\mu$ g/mL であった。

## 9) 血漿中抗 Anti-HM1.24 抗体濃度測定

伏在静脈よりヘパリンナトリウムによる抗凝固処理をして採血し、直ちに氷冷下に置いた後、遠心分離して血漿を分取した。この血漿を用いて、抗 Anti-HM1.24 抗体濃度を、標準抗体としてカニクイザル抗 Anti-HM1.24 イディオタイプ抗体 (中外製薬(株)) を用いて、Fab' 化した Anti-HM1.24 を検出抗原として ELISA により測定した (Fig. 3)。吸光度測定にはマイクロプレートリーダーを用いた。本法による定量限界は 0.0625  $\mu$ g/mL であった。

## 10) 病理学的検査

### 10-1) 剖検

塩酸ケタミンおよびペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血して安楽死させた後に、病理学的に解剖して、諸臓器の異常の有無を肉眼的に観察した。

### 10-2) 臓器重量測定

肝臓(胆嚢を含む)、膵臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、肺(気管支を含む)、脳(大脳、小脳、脳幹)、下垂体、胸腺、顎下腺、甲状腺・上皮小体、精巣、前立腺、精嚢、卵巣、子宮を採取し、重量を測定した。また、最終体重 100 g あたりの相対重量を算出した。

### 10-3) 病理組織学的検査

上述の重量測定対象臓器に加え、眼球、涙腺、耳下腺、舌、扁桃、気管、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、大動脈、腸間膜リンパ節、腋窩リンパ節、膀胱、皮膚、精巣上体、陰、乳腺(雌のみ)、脊髄(胸部)、骨(胸骨、大腿骨)、骨髓(胸骨、大腿骨)、骨格筋(大腿部)、座骨神経、投与部位および肉眼的異常部位を採取した。精巣および精巣上体はブアン固定液、眼球は 4 %グルタルアルデヒド固定液、その他の臓器は 20 %中性緩衝ホルマリン液で固定した。常法によりパラフィン包埋して薄切組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施して光学顕微鏡下で観察した。また、腎臓についてはPAS染色およびベリリン青(BB)染色、脾臓についてはBB染色を施し鏡検した。さらに、脾臓の凍結ブロックから薄切組織標本を作製し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン-ビオチンキット(LSAB<sup>(R)</sup> 2kit: K0609、Dako)を用いて、T リンパ球、B リンパ球およびマクロファージに免疫組織化学的染色を実施した後、ヘマトキシリンによる核染色を施し光学顕微鏡下で観察した。



#### 10-4) 電子顕微鏡検査

免疫複合体の沈着を検索する目的で、免疫反応性の変化が強かった代表例(200 mg/kg 群の No.50403 および 50404)ならびに対照群(No.50101)の腎臓について超薄切切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛による二重染色を施し、透過型電子顕微鏡(JEM-1220 日本電子(株))を用いて糸球体の微細構造の観察および撮影を行った。

#### 11) 組織中リンパ球の免疫学的検査

細胞免疫(T 細胞系)への影響を調べることを目的として、各群の代表例(溶媒対照、20 および 200mg/kg 群の雌雄各 2 例および 200mg/kg 群の切迫殺例 No. 50404)の胸腺および脾臓リンパ球を用いて、以下のサブセット解析および幼若化反応の免疫学的検査を行った。また、投薬歴のない雌雄各 4 例の脾臓リンパ球を用いて、*in vitro* Anti-HM1.24 添加による幼若化反応への影響についても調べた。

##### 11-1) 胸腺細胞リンパ球 CD4 および CD8 サブセット解析

各個体の胸腺を採取後、リンパ球浮遊液( $1 \times 10^6$  個)を作製し、CD4/CD8 サブセット解析を行った。蛍光標識抗体はカニクイザルに交差反応性が確認されている抗ヒト CD 抗原モノクローナル抗体[9]を用いた。すなわち、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD4 抗体(ニチレイ社)および Peridinin chlorophyll protein (PerCP) 標識 CD8 抗体(ベクトンディッキンソン社)を用いた。測定はフローサイトメーター(EPICS ELITE、コールター社)を用い488nmの励起波長により行い、CD4 および CD8 陽性細胞の比率(%)を求めた。

### 11-2) 脾臓細胞リンパ球の幼若化反応および CD2、CD20 および CD25 サブセット解析

各個体の脾臓を採取後、リンパ球浮遊液 ( $2 \times 10^6$  個) を作製し、マイトージェンとして Concanavalin A (Con A、和光純薬株) を 2.5 および  $5 \mu\text{g/mL}$  添加して 48 時間および 72 時間 (No. 50404 のみ 96 時間) 培養した。蛍光標識抗体[9]として、PerCP 標識抗 CD20 抗体 (ベクトンディッキンソン社)、Phycoerythrin (PE) 標識抗 CD2 抗体 (ベクトンディッキンソン社) および FITC 標識抗 CD25 抗体 (コールター社) を用いた。測定はフローサイトメーター (EPICS ELITE、コールター社) を用い 488nm の励起波長により行い、各細胞の比率 (%) を求め、CD20 陽性と CD2 陽性細胞の比 (CD2/CD20) および CD25 陽性細胞中の CD2 陽性、CD20 陽性細胞の各比率を算出した。

なお、幼若化反応を調べる系として  $^3\text{H}$ -チミジンの取込みで測定する方法[10]が一般的であるが、1) 簡便である、2) どの細胞集団が活性化したかを解析出来る、3) 放射性同位元素を用いずに細胞増殖を検出できるなど利点から、本研究では既にカニクイザルのリンパ球を用いた研究において汎用されているフローサイトメトリーによる解析[11、12]を行った。活性化マーカーとして測定した CD25 (Tac 抗原) は、IL-2 受容体の  $\alpha$  サブユニットであり、抗原刺激などにより活性化したリンパ球に発現し、リンパ球に恒常的に発現されている IL-2 受容体の  $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットと結合して高親和性 IL-2 受容体を形成する[13、14、15]ことが知られている。

### 11-3) Anti-HM1.24 の in vitro 添加によるリンパ球幼若化反応への影響

投薬歴のない雌雄各 2 例の脾臓リンパ球に Anti-HM1.24 を 1、10 および  $100 \mu\text{g/mL}$  の濃度で添加し、リンパ球幼若化反応に及ぼす影響の有無を調べた。すなわち、脾臓リンパ球浮遊液 ( $2 \times 10^6$  個) に Anti-HM1.24 を添加して 1 日の前培養を行った後に、Con A を  $5.0 \mu\text{g/mL}$

添加して 3 日間培養を行った。前項 11-2)と同様に蛍光標識抗体を用いて、CD2、CD20 および CD25 陽性細胞の各比率を求めた。なお、使用したカニクイザルは別途実施した Anti-HM1.24 の安全性試験[16]における溶媒対照群の供試動物であった。

## 9. 統計学的解析方法

毒性変化の評価においては、個体毎の投与前値および時系列的な検査値の変動を考慮して、個体別に生物学的な有意性の有無を判定した。

なお、各群の標本数が 3 以上の場合は、以下の統計学的解析を行い、評価の参考とした。体重、尿検査、血液学的検査、血液化学的検査、骨髓検査、心電図検査および臓器重量における計量値について、各群雌雄別、検査時期毎に Anti-HM1.24 投与各群の溶媒対照群に対する有意性を、多重比較検定により比較した。

検定に際しては、Bartlett 法により分散の均一性について検定し、等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間で有意差が認められた場合には Dunnett の多重比較検定を行った。Bartlett 法の結果、分散が等しくない場合には Kruskal-Wallis の H 検定を行い、群間で有意差が認められた場合には順位変換による Dunnett の多重比較検定を行った。血球形態および尿検査の評価段階で表される計数値については、累積カイ二乗検定を用いて群間の有意差を検定した。すべての統計手法において有意性を危険率 5 %の水準で判定した。

なお、一般状態、血漿中 Anti-HM1.24 濃度、抗 Anti-HM1.24 抗体濃度、薬物動態学的パラメータ、末梢血および組織中リンパ球サブセット比率、剖検所見および病理組織学的所見に関しては、統計学的解析を行わなかった。

## 第2節 成績

### 1. 静脈内単回投与における毒性変化

#### 1) 臨床検査

投与後 112 日間の観察期間中に、いずれの投与量においても死亡はなく、一般状態、体重推移、摂餌状況、血液学的大約血液化学的検査、体温ならびに心電図パラメータに Anti-HM1.24 投与によると考えられる毒性変化は認められなかった。

#### 2) 血漿中 Anti-HM1.24 濃度の推移

血漿中 Anti-HM1.24 濃度の推移を Fig. 4 に、薬物動態学的パラメータを Table 4 に示した。投与直後の血漿中 Anti-HM1.24 濃度は、ほぼ投与量に比例した値を示し、200 mg/kg の雄雌でそれぞれ 5,790 および 5,400  $\mu$ g/mL であった。その後経時的に減少して、投与後 21 日までに全ての個体で定量限界 (0.195  $\mu$ g/mL) 未満となった。血漿中濃度時間曲線下面積 ( $AUC_{0-24}$ ) は 2 mg/kg の雄雌で 0.511 および 0.388 mg $\cdot$ h/mL、20 mg/kg の雄雌で 18.3 および 10.4 mg $\cdot$ h/mL、200 mg/kg の雄雌で 190 および 135 mg $\cdot$ h/mL であった。また、各個体の消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は 6.01～63.7 時間の範囲であった。

#### 3) 血漿中抗 Anti-HM1.24 抗体の推移

血漿中抗 Anti-HM1.24 抗体の推移を Fig. 5 に示した。2 mg/kg の雌を除く各個体で投与後 14 ないし 21 日以降に抗 Anti-HM1.24 抗体が検出された。その後、抗 Anti-HM1.24 抗体濃度は経時的に漸増し、投与後 57 日以降はほぼ定常状態に達したが、投与後 112 日においても 2 mg/kg の雄で 146  $\mu$ g/mL、20 mg/kg の雄雌で 335 および 0.959  $\mu$ g/mL、200 mg/kg の雄雌で

246 および  $43.2 \mu\text{g/mL}$  の抗体濃度が維持されていた。なお、 $2 \text{ mg/kg}$  の雌では投与後 98 日のみに  $0.141 \mu\text{g/mL}$  が検出された。これらの抗 Anti-HM1.24 抗体は、雄においては各群ともほぼ同等の濃度を示した。一方、雌では投与量の増加に伴って上昇したが、 $200 \text{ mg/kg}$  投与でも雄の抗 Anti-HM1.24 抗体濃度を下回っていた。抗 Anti-HM1.24 抗体の測定は Fab' 化した Anti-HM1.24 を検出抗原としていることから、CDR を含む Fab' に対する特異抗体のみを検出している。従って、Fc 他に対する抗 Anti-HM1.24 抗体の存在は未確認であるにもかかわらず、静脈内単回投与により高濃度の特異抗体が検出されたことから、Anti-HM1.24 のカニクイザルに対する免疫原性は極めて高いと考えられた。

## 2. 静脈内 1 ヶ月間反復投与における毒性変化

### 1) 臨床検査

Anti-HM1.24 投与の影響と考えられる毒性変化は、 $20 \text{ mg/kg}$  以上で認められた免疫系に関連した血液学的および血液化学的検査値の変動ならびにリンパ性組織の変化、 $200 \text{ mg/kg}$  の雄における細胞傷害性の変化(壊死)および雌における貧血に要約された。以下に各群での成績を示す。 $2 \text{ mg/kg}$  の雌雄および  $20 \text{ mg/kg}$  の雄では抗 Anti-HM1.24 抗体の産生が認められた以外に、種々の臨床検査および病理学的検査において Anti-HM1.24 投与の影響と考えられる毒性変化は認められなかった。

$20 \text{ mg/kg}$  の雌においては単球、好塩基球の増加および血清グロブリンの増加が認められた他、尿中蛋白排泄の増加を伴う血清アルブミンの減少が認められた。病理学的検査においては、脾臓で重量増加を伴う白脾髄の腫大ないし萎縮およびマントルゾーンにおけるリンパ球の増加ないし減少、リンパ節では濾胞の萎縮、傍皮質のリンパ球減少および髄索の拡張などが認められた。

200 mg/kg の雌雄においては単球、好塩基球の増加および血清グロブリンの増加が認められた。他、雌では尿中蛋白排泄の増加を伴う血清アルブミンの減少が認められた。病理学的検査においては、20 mg/kg の雌で認められた変化に加え、消化管付属リンパ組織でマントルゾーンにおけるリンパ球増加および胚中心のリンパ球減少、胸腺で皮質のリンパ球減少なども認められた。さらに、一部の例では脾臓の白脾髄の萎縮および胚中心、マントルゾーンのリンパ球減少も認められた。また、電子顕微鏡において 200 mg/kg の雌に腎臓の糸球体で上皮細胞の足突起の融合および基底膜の肥厚が認められ、切迫殺例では基底膜内に免疫複合体と思われる dense deposit が僅かに観察されたが、hump はなかった。

200 mg/kg の雄 1 例で細胞傷害性の変化として、肝臓、胃、脾臓、脾臓、骨髓、肺、精嚢、副腎に病理組織学的な限局性、巣状あるいは巣状多発性壊死が認められた。これらの壊死性の変化は、胃を除き、いずれも好中球の debris を伴っていた。同例では血清 AST、ALT および LDH 活性の上昇が認められ、壊死に由来するパラメータの変動と判断された。

200 mg/kg の雌 2 例において溶血性貧血が発症した。1 例 (No. 50403) は投与開始後 21 日に赤血球の減少、網赤血球の増加および骨髓の赤芽球系細胞の増加が認められ、28 日に末梢血 CD20 陽性リンパ球比率の増加がみられた。他 1 例 (No. 50404) では投与開始後 21 日までは血液学的検査に末梢血 CD20 陽性リンパ球比率の増加がみられた以外に異常は認められなかったが、最終投与後 10 日 (休薬開始後 6 日) に極度の貧血により瀕死状態となったため切迫殺した。これらの貧血例では病理組織学的に脾臓のうっ血、ヘモジデリン沈着および洞内皮の肥大、肝細胞の乏血性変性・壊死および髄外造血などが認められた。加えて、切迫殺例 (No. 50404) では心臓において心筋の変性壊死および出血も認められた。これら雌 2 例の貧血個体の臨床検査成績を Table 5 および Table 6 に、病理組織学的所見を Table 7 にそれぞれ示した。

## 2) 血漿中 Anti-HM1.24 濃度の推移

血漿中 Anti-HM1.24 濃度の推移を Fig. 6(雄)および Fig. 7(雌)に、薬物動態学的なパラメータを Table 8 にそれぞれ示した。初回投与時には血漿中 Anti-HM1.24 濃度は用量に比例して増大し、200 mg/kg 群の雄雌で投与直後に  $3,960 \pm 990$  および  $4,050 \pm 220 \mu\text{g/mL}$  を示し、血漿中濃度時間曲線下面積 ( $\text{AUC}_{0-72\text{h}}$ ) は  $140 \pm 24$  および  $156 \pm 8 \text{ mg}\cdot\text{h/mL}$  であった。消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は 20 および 200 mg/kg 群では 16.1～38.4 時間であったが、2 mg/kg 群では 3.96～11.3 時間と消失が速やかであった。第 8 回投与時には 2 mg/kg 群の雌雄各 2 例で投与直後から血漿中 Anti-HM1.24 が検出されなかった。2 mg/kg 群の雌雄および 20 mg/kg 群の雌では初回投与時に比べ  $\text{AUC}_{0-72\text{h}}$  の減少および  $t_{1/2}$  の短縮が認められた。

## 3) 血漿中抗 Anti-HM1.24 抗体の推移

血漿中抗 Anti-HM1.24 抗体の推移を Fig. 8(雄)、Fig. 9(雌)に示した。抗 Anti-HM1.24 抗体は投与期間中には 2 mg/kg の雄 2 例に僅かに検出されたのみであったが、休薬期間中は 200 mg/kg の雌(切迫殺例)を除き、雌雄全例で検出された。休薬期間中に抗 Anti-HM1.24 抗体濃度は経時的に上昇し、休薬期間終了時には 2 mg/kg 群の雄雌で 30.2 および 0.740  $\mu\text{g/mL}$ 、20 mg/kg 群の雄雌で 7.31 および 66.8  $\mu\text{g/mL}$ 、200 mg/kg 群の雄で 0.0752  $\mu\text{g/mL}$  を示した。抗 Anti-HM1.24 抗体は雌では 2 mg/kg に比べ 20 mg/kg では高濃度を示したが、雄では逆に投与量の増加に伴い減少していた。



#### 4) 組織中リンパ球サブセット解析

組織リンパ球サブセット解析の結果について、胸腺リンパ球の CD4 および CD8 比率を Fig. 10 に、脾臓リンパ球の幼若化反応による CD2/CD20 比率を Fig. 11 に、CD25 比率を Fig. 12 にそれぞれ示した。胸腺リンパ球においては 20mg/kg の雌 1 例 (No.50302) で CD4 単陽性細胞比率の増加、200mg/kg の貧血による切迫殺例 (No.50404) では CD4 単陽性細胞比率の増加および CD4&CD8 両陽性細胞比率の著明な減少が認められた。脾臓リンパ球においては 200mg/kg の切迫殺例を除き、Con A 刺激により CD2 陽性細胞比率の増加に伴い CD2/CD20 比が増加した。増加の程度は Con A 濃度に依存的であり、培養時間の経過とともに増強された。切迫殺例では CD2/CD20 比はいずれの Con A 濃度でも増加はみられず、培養時間の経過に伴い CD2/CD20 比は低下した。この原因は CD20 陽性細胞が経時的に増加したためであった。さらに、同切迫殺例では CD2&CD20 両陰性細胞比率が他例に比べ著明に増加していた。一方、脾臓リンパ球の CD25 陽性細胞は Con A 濃度に依存して増加したが、20 mg/kg の雌 1 例 (No. 50302) では増加が著しく抑制されていた。増加した CD25 陽性細胞は殆どが CD2 陽性であった。一方、切迫殺例では他例とは異なり、CD25 陽性細胞中の CD20 陽性の増加が顕著であった。

Anti-HM1.24 添加による脾臓リンパ球幼若化反応による各細胞比率を Fig. 13 に示した。CD2 および CD20 単陽性細胞の各比率は、Con A 非添加時では Anti-HM1.24 による影響はなかった。Con A 刺激時では Anti-HM1.24 添加により CD25 陽性細胞の増加抑制がみられ、CD25 & CD2 両陽性細胞の増加抑制および CD25 & CD20 両陽性細胞の増加が認められた。

### 第3節 考 察

Anti-HM1.24 のカニクイザルにおける前臨床安全性研究の結果、単回投与では抗 Anti-HM1.24 抗体の産生が認められたが、Anti-HM1.24 投与の影響と考えられる毒性変化はみられなかった。しかし、1 ヶ月間の間欠反復投与を行った結果、抗 Anti-HM1.24 抗体の産生および種々の毒性変化が認められた。

#### 免疫系の変化について

免疫系に関連した変化として、20 mg/kg 以上で血清蛋白のグロブリン分画の増加および血清アルブミンの減少が認められた。血清中の Anti-HM1.24 は電気泳動像で陰極側に別ピークとして確認されたことから、増加したグロブリン分画は Anti-HM1.24 以外の免疫グロブリンの増加を示していると判断された。

抗 Anti-HM1.24 抗体は投与期間中には 2 mg/kg 群で僅かに検出されたのみであったが、休薬後には血漿中 Anti-HM1.24 が消失した後に増加した。しかし、抗 Anti-HM1.24 抗体濃度を上回る Anti-HM1.24 の共存下では抗 Anti-HM1.24 抗体は検出できないことから、20 および 200 mg/kg 群では投与期間中に抗 Anti-HM1.24 抗体が存在していても検出されなかった可能性も考えられた。抗 Anti-HM1.24 抗体濃度は 2 ヶ月間の休薬後でも単回投与試験に比べて低値であり、雌では用量依存性に上昇したが、雄では逆に用量増加に伴い減少していた。休薬個体は各群に雌雄各 1 例であったことから、これらの結果が何らかの免疫寛容を示唆するのか、個体差の範疇であるかは言及できなかった。本抗体測定は Fab'化した Anti-HM1.24 を検出抗原としていることから、CDR を含む Fab'に対する特異抗体のみを検出している。従って、増加したグロブリン分画には Fc 他に対する抗 Anti-HM1.24 抗体や免疫複合体も含まれていると推察される。

血液学的検査において、20 mg/kg の雌および 200 mg/kg の雌雄で、末梢血中に好塩基球の増加および骨髄での好塩基球および好酸球の増加が認められた。これらの所見は、免疫複合体による補体の活性化に随伴した反応性の変化[17、18]と考えられた。

病理組織学的な免疫反応性の変化は、20 mg/kg 群において雄には認められず、雌の 4 例中 3 例(No. 50301、50302、50303)で脾臓、リンパ節、扁桃に認められ、200 mg/kg 群においては雄の 4 例中 3 例(No.00402、00403、00404)、雌の 4 例中 4 例(No.50401、50402、50403、50404)で脾臓、リンパ節、扁桃、GALT(Gut-associated lymphoid tissue)および胸腺に認められた。これらの免疫系に観察された変化をグレード別に整理すると 3 つのタイプ、すなわち Type I:変化の程度が弱い個体、Type II:Type I と III の中間に位置する個体、Type III:変化の程度が強くリンパ球減少が明瞭な個体に分けられた。各タイプ別のリンパ性組織の特徴を Table 9 に示した。なお、Fig. 14 に脾臓、リンパ節、扁桃および GALT の組織構造をシェーマで示した。

Type I の変化をリンパ性組織への影響の始まりと仮定すると、B リンパ球に対しては脾臓の白脾髄およびリンパ節などの濾胞において、胚中心では減少を示すが、一方で周囲のマントルゾーンでは増加する現象が認められている。T リンパ球については、脾臓の PALS (Periarterial lymphatic sheath) およびリンパ節の傍皮質領域において、減少が認められている。Type II では Type I の変化の程度が進み白脾髄は大きくなるが、さらに Type III になると白脾髄およびリンパ節などの濾胞が小さくなっている。すなわち、リンパ性組織の変化は、最初にリンパ球産生が増大し、その後リンパ球が減少しはじめ、最終的には白脾髄や濾胞の萎縮になるものと考えられた。脾臓の濾胞を例にして、これらの変化の過程を Fig. 15 に模式的に示した。

このような複雑なリンパ性組織の変化が認められた理由として、第一に Anti-HM1.24 が認識する HM1.24 抗原がリンパ球の機能発現において何らかの役割を果たしていることが考えられる。換言すれば、リンパ球表面の HM1.24 抗原に Anti-HM1.24 が結合し阻止されるとリンパ球の機能発現に影響を与えることを示唆している。第二に異種蛋白であるヒト型化抗体に対する免疫系の反応がさらに複雑に修飾を加えている可能性を考慮する必要がある。従って、第二の異種蛋白に対する免疫系の反応は毒性を過大評価する因子と考えられる。

胸腺リンパ球を用いたサブセット解析の結果、貧血発症例(No.50404)で通常は胸腺リンパ球全体の約 70～80%を占める CD4 および CD8 両陽性 (DP)細胞の比率が著明に減少し、CD4 陽性細胞が増加するなどの T 細胞の分化異常が認められた。同例では病理組織所見においても胸腺の皮質リンパ球の減少がみられており、皮質は DP 細胞分化の場である[19、20]ことを考えれば、リンパ球サブセットの成績と一致した所見であった。しかしながら、本例は極度の貧血を呈して切迫と殺されたことから、全身状態の悪化に伴い胸腺が萎縮し、リンパ球の分化を抑制した可能性も否定できない。一方、末梢血リンパ球のサブセットでは、CD2、CD4 および CD8 細胞比率に明確な変化は認められなかった。しかし、DP 細胞は非常に多様な認識特異性を有しているため、負の選択および正の選択により自己反応性を持ち生体にとって有害な細胞や無用な細胞は排除され、その 95%が死滅し、CD4 単陽性、CD8 単陽性細胞に分化成熟するのはわずか数%である[19、20]ことを考慮すれば、必ずしも末梢の T 細胞プールに影響が及ぼされなかったとも考えられる。しかしながら、DP 細胞分化に異常が認められ、CD4 陽性細胞比率が増加したことから、本来は排除されるべき自己反応性 T 細胞が増加し、自己免疫寛容の維持へ影響を及ぼした可能性も考えられた。

一方、脾臓リンパ球をT細胞ミトジェンであるCon Aで刺激した結果、殆どの例でT細胞の増殖を示すCD2陽性細胞の増加に伴うCD2/CD20細胞比率の上昇およびIL-2受容体 $\alpha$ 鎖であるCD25陽性細胞の増加が認められた。しかし、200 mg/kgの貧血発症例(No.50404)ではCon A添加でCD2/CD20比の増加はみられず、培養時間の経過に伴いCD2/CD20比は低下した。この原因はCD20陽性細胞が経時的に増加したためであった。また、CD25陽性細胞の比率に関しては20 mg/kgの雌1例(No. 50302)で増加が著しく抑制されていた。貧血例ではCD25陽性細胞は増加したが、他例では増加した細胞の殆どがCD2陽性であったのに対して、同例ではCD25陽性細胞中のCD20陽性の増加が顕著である点で異なった反応を示した。これらの成績から、Anti-HM1.24によってT細胞の分化異常およびIL-2依存性増殖の抑制ならびにB細胞の活性化亢進が惹起されたことが明らかとなった。IL-2依存性のリンパ球増殖が抑制された理由として、IL-2非依存性の増殖細胞が亢進された可能性が考えられる。すなわち、CD4陽性のTh1型はIL-2依存性であるが、Th2型はIL-2非依存的に主にIL-4に依存して増殖可能な細胞である[21]。また、Th2型細胞はIL-4を自己産生し、好塩基球や肥満細胞の増殖活性を高めるとともにB細胞の分化・増殖を促進し体液性免疫を亢進することが知られている[19]。これらのTh1/Th2のサイトカインバランスの破綻は自己免疫性疾患の原因と考えられており、Th1優位では細胞性免疫の過剰により臓器特異的自己免疫性疾患が、一方Th2優位では体液性免疫の過剰により全身性自己免疫性疾患が惹起されと考えられている[22、23]。CD25発現抑制がみられた個体では末梢血好塩基球およびCD20陽性細胞比率の増加や脾臓マントルゾーン(B細胞領域)でのリンパ球増加が認められたことも、これらの推察を裏付けている。一方、貧血発症例(No. 50404)ではリンパ球の減少を伴う白脾髄や濾胞の萎縮が認められたが、この原因はB細胞がポリクローナルな活性化を繰り返すことによって、抗原反応性細胞が「疲弊(exhaustion)」することが知られている[19、24、25]ことから、Anti-HM1.24の

反復投与によりポリクローナルな刺激が繰り返し与えられた結果、リンパ球の消耗を招いたと考えられる。その一方で、活性化し形質細胞に分化したリンパ球は脾臓から末梢血を循環し、骨髓に移入して活発に抗体産生を行っている状態であった[20]ことも推察される。

これらの Anti-HM1.24 を投与された動物で認められた異常は、正常動物の脾臓リンパ球に Anti-HM1.24 を添加して幼若化反応を調べた結果、ほぼ同様の CD25 陽性細胞の増加抑制および B 細胞の活性化亢進が認められたことから、Anti-HM1.24 がリンパ球に対して直接的に作用することによって、免疫応答に変化を及ぼすことが明らかとなった。Anti-HM1.24 がリンパ球の分化および機能へ及ぼす影響について、Fig. 16 に模式図で示した。これらの作用のうち、特に直接的な B 細胞の活性化作用については、いくつかの報告からも支持される。すなわち、HM1.24 抗原は骨髓腫細胞株からクローニングされたが、その後骨髓およびリウマチ患者の滑膜から単離されたストローマ細胞からクローニングされた BST-2 と同一分子であることが確認された[26]。BST-2 を遺伝子導入したストローマ細胞は pre-B 細胞の増殖支持能を有した[26]ことから、HM1.24 抗原も pre-B 細胞の増殖に関わる分子である可能性が高い。また、HM1.24 抗原は pre-B 細胞のみならず、成熟 T および B 細胞にも発現しており、活性化に伴い抗原発現が増加することから、CD19、CD21 および CD38 といった分子と同様に成熟 B 細胞の活性化に関与している[27]と考えられる。

### 貧血について

200 mg/kg 群の雌 2 例で投与後 21 日以降に認められた貧血(末梢赤血球の減少)は、末梢血での網赤血球の増加および骨髓において赤芽球系細胞の増加がみられ、造血抑制は認められなかったことから、赤血球の破壊亢進が原因の溶血性貧血と考えられた。また、末梢血で形態的な小型または球形赤血球の増加がみられ、脾臓の腫大、うっ血およびヘモジデリン沈

着などが認められたことから、溶血性貧血の原因は血管外溶血の亢進が主因であると推察される。血管外溶血の本態は赤血球が細網内皮系に抑留・貪食され、溶血が亢進されることにある。貧血の発症例では血液、血液化学的および病理組織学的な免疫反応性の変化が顕著に認められていることから、免疫グロブリンが赤血球に結合した可能性が高い。赤血球に結合した免疫グロブリンとしては、抗赤血球抗体の他、Anti-HM1.24 自身、抗 Anti-HM1.24 抗体もしくは両者の免疫複合体が考えられた。特に霊長類では補体を結合した免疫複合体は赤血球表面に存在する補体 C3b 受容体 (CR-1) に結合し、肝臓および脾臓に移行して組織のマクロファージに貪食され除去されることが知られている[28、29]。この除去機構は補体活性に依存しており、補体の消耗に従い血漿中を循環する免疫複合体が増加し、種々の臓器へ沈着して障害を引き起こすと考えられている[30]。従って、20 mg/kg の雌および 200 mg/kg の雌雄において、組織学的な脾索のマクロファージの活性化および肝臓の Kupffer 細胞の活性化が認められたことは、破壊された赤血球の処理を反映した所見と推察される。また、最終投与後 10 日 (休薬開始後 6 日) に切迫と殺した 200 mg/kg の雌は、投与開始後 21 日までは血液学的検査に異常は認められず、休薬開始後 3 日までは臨床症状に変化はなかった。これらの臨床経過を考慮すると、本例では急激な赤血球の減少が生じたことが推測され、血管外溶血に加え、血管内溶血が起こった可能性が高かった。血清 LDH および間接ビリルビンの上昇ならびにハプトグロビンの減少は血管内溶血を示唆する所見と考えられた。血管内溶血の発症には赤血球に対する自己抗体および免疫複合体による補体の活性化が深く関与していると推察される。以上の免疫性溶血性貧血の発症に関する仮説を Fig. 17 に示した。

200 mg/kg で認められたカニクイザルにおける溶血性貧血は、ヒトにおける自己免疫性溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia: AIHA) の病態に類似している[31、32、33、34]ことは特筆される。ヒトでの AIHA の溶血機序は主に脾臓マクロファージの IgG-Fc レセプタを介する



IgG 結合赤血球の認識・捕捉・貪食による血管外溶血である。また、肝臓の Kupffer 細胞によっても同様な機序が考えられている。さらに、赤血球膜に結合した補体の活性化による補体溶血や赤血球膜結合 IgG を介した NK 細胞による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) が血管内溶血を起こすことが知られている[34]。

AIHA の本態は免疫寛容の破綻に由来する抗赤血球自己抗体の産生にあるが、その機序についてはいまだ明らかではない。しかし、近年は自己免疫性疾患とリンパ球 B 細胞の亜集団である B-1 細胞の関連が明らかになりつつある。B-1 細胞は CD5 を発現する B 細胞が主体であり、胎児期には全身に数多く分布しているが、成熟すると主に腹腔・胸腔内、腸管に分布し、自然抗体を産生して原始免疫による生体防御の重要な役割を果たしている[20、35]。通常の脾臓やリンパ節を占める B-2 細胞は胸腺依存性抗原 (thymus dependent antigen: TD 抗原) を認識し抗体産生に T 細胞の補助を必要とするが、B-1 細胞は胸腺非依存性抗原 (thymus independent antigen: TI 抗原) といわれる自己抗原や細菌の共通抗原を認識し、T 細胞の補助を必要とせず、低親和性で種々の抗原に反応しうる多価の IgM や IgA クラス抗体を産生する[35]。B-1 細胞の発生と分化については、B-2 細胞とは異なる前駆細胞から分化・自己増殖する説[36、37]と B-2 細胞に抗原レセプター刺激を加え続けると活性化されて B-1 細胞に分化する説[38、39、40]が考えられているが、近年は後説を支持する報告が多い。このように B-1 細胞が産生する抗体がある種の自己抗原と反応すること、NZB/NZW F1 のような自己免疫疾患モデルマウスやヒトのリウマチ患者において B-1 細胞の増加がみられることなどから、B-1 細胞と自己免疫疾患とは密接な関連があると考えられている[35]。抗赤血球自己抗体を発現する遺伝子導入マウスを用いた溶血性貧血モデルでは、B-1 細胞が病因となる自己抗体の産生源であることが知られており[41]、B-1 細胞の活性化が自己免疫疾患の病態維持に重要であることが示されている[42]。前述のリンパ球サブセット解析の成績からも、Anti-HM1.24 は直接的に B

細胞の活性化を亢進させる作用があると考えられることから、この B-1 細胞の活性化を誘導している可能性も示唆される。

### 細胞傷害性の変化(壊死)について

投薬終了時に 200 mg/kg 群の雄 1 例で肝臓、胃、膵臓、脾臓、骨髄、肺、精嚢、副腎に病理組織学的な限局性、巣状あるいは巣状多発性壊死が認められた。これらの壊死性の変化は、胃を除き、いずれも好中球の残骸(debris)を伴っていた。カニクイザル組織の免疫染色による交差反応性の結果では、上記の巣状壊死がみられた諸臓器で交差反応性が認められている。また、Anti-HM1.24 の薬効作用機序は抗体依存性細胞傷害(ADCC)であり、エフェクター細胞は一般的に NK 細胞とされているが、好中球も ADCC を起こすことが知られている[43、44]。従って、これらの壊死性の変化は、高用量の Anti-HM1.24 の反復投与による ADCC 様作用に起因した変化であると考えられた。なお、輸入カニクイザルには自然発生的にも肝臓に壊死が散見される[45、46]が、この場合は単球細胞の浸潤を特徴とする点で上述の薬物誘発性の壊死とは異質な変化である。

### 個体差について

毒性変化の個体毎の反応性の違いは、主に免疫応答性の個体差(年齢、性、遺伝的背景など)が要因となり、様々な病態の進行度を示したことに起因していると考えられた。しかし、貧血の発症、免疫反応性の変化などを総合的に評価すると、雄に比べ雌で強く毒性が発現した。性差の原因は不明であるが、一般的にヒトにおいても免疫性疾患の発症は女性に多く報告されていることと本研究での成績は合致していた。

### その他の所見について

血液塗抹標本の鏡検によって、投与開始前および各検査時期で、Anti-HM1.24 投与各群に赤血球中のマラリア原虫が散見された。しかし、貧血個体はいずれともマラリア感染はなかったこと、また試験期間中に感染個体でマラリア感染赤血球の増加は認められず、感染個体と毒性変化の重症度および発現様式に明確な関連性はなかったことから、毒性評価に影響を及ぼさない偶発所見と判断した。なお、輸入カニクイザルにはマラリアが慢性的に潜在感染していることはよく知られており、一般的に不顕性である理由として、カニクイザルが種保存のために遺伝的にマラリアに対する耐性を獲得している可能性が示唆されている[47]。

### 血漿中 Anti-HM1.24 濃度

初回投与時の血漿中 Anti-HM1.24 濃度はほぼ投与量に比例して増大したが、血漿中濃度時間曲線下面積 ( $AUC_{0-72h}$ ) は投与量比を上回って増加して非線形を示した。これは 2 mg/kg 群の血漿からの消失が 20 および 200 mg/kg 群に比べ速やかであったためである。第 8 回投与時において、20 mg/kg 群の雄および 200 mg/kg 群の雌雄では反復投与による血漿中 Anti-HM1.24 濃度推移の変動は認められなかった。しかし、2 mg/kg 群の雌雄各 2 例で投与直後から血漿中 Anti-HM1.24 が検出されず、また Anti-HM1.24 が検出された同群の他例でも、初回投与時に比べ  $AUC_{0-72h}$  の減少および消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) の短縮が認められた。20 mg/kg 群の雌でも同様の現象が認められた。反復投与により薬物動態が変化した原因として、2 mg/kg 群の雄 2 例では投与期間中から抗 Anti-HM1.24 抗体が検出されていることから、他の個体においても投与期間中に抗 Anti-HM1.24 抗体が産生されていたため、血漿中 Anti-HM1.24 濃度に影響した可能性が考えられた。

#### 第4節 小 括

Anti-HM1.24 に感受性を有する動物種であるカニクイザルを用いて、静脈内投与による単回投与毒性試験および 1 ヶ月間反復投与毒性試験を実施し、安全性評価を行った。

本安全性研究の目的は、カニクイザルおよびヒトでは HM1.24 抗原は全身性に類似した分布をしていることから、本薬の全身暴露による標的組織以外の組織に対する意図されない反応性ならびに細胞毒性などを含めて、Anti-HM1.24 の免疫学的特性を把握し、さらに薬物動態学的な検討および抗 Anti-HM1.24 抗体の産生を調べ、ヒトにおける副作用発現の有無を予測することであった。

その結果、2、20 および 200 mg/kg の単回投与では、投与後 2 週間以降に抗 Anti-HM1.24 抗体の産生が認められ、長期間(投与後 112 日まで観察)にわたり血漿中に継続して検出されたが、Anti-HM1.24 投与の影響と考えられる急性毒性はなく、また遅発性の毒性変化も認められなかった。しかし、同用量で 1 ヶ月間反復投与を行った結果、全ての用量群で抗 Anti-HM1.24 抗体が検出され、20 mg/kg 以上の用量では種々の免疫反応性の毒性変化が認められた。Anti-HM1.24 のカニクイザルを用いた前臨床安全性研究から得られた知見は以下の通りである。

1. Anti-HM1.24 はカニクイザルに対する免疫原性が非常に強く、体液性免疫(B 細胞)の活性化を亢進することにより、抗 Anti-HM1.24 抗体を過剰に産生させた。産生された特異抗体は、種々の免疫反応性の毒性変化に対して影響を及ぼしていると推察される。
2. 全身のリンパ系組織に複雑な免疫反応性の変化が 20 mg/kg 以上の用量(予想臨床用量の約 4 倍以上)で認められ、これらは一般的な異種蛋白に対する免疫反応性の変化

の範疇を超えた反応であった。このことは、Anti-HM1.24 が HM1.24 抗原に結合することによって、リンパ系組織における免疫機能の発現に影響を及ぼしたことが原因であると考えられた。すなわち、末梢血 B 細胞の増加、胸腺リンパ球の T 細胞分化・増殖異常および脾臓リンパ球の B 細胞活性化の亢進・T 細胞の活性化抑制などの機能異常を誘発し、体液性免疫優位となったため、全身性自己免疫疾患が発症しやすい状態にあったことが示唆された。

3. 細胞傷害性の壊死が 200 mg/kg 群(予想臨床用量の約 40 倍)で認められた。壊死は Anti-HM1.24 に交差反応性を示した諸臓器に一致してみられたことから、薬理作用の過大発現と考えられた。
4. 溶血性貧血が 200 mg/kg 群(予想臨床用量の約 40 倍)で発症し、致死性の重篤な症状を呈する個体がみられた。貧血の原因は血管外での赤血球破壊の亢進が主因と考えられた。血管外溶血の発現機序は不明であったが、上記の免疫反応性に関連した毒性変化である可能性が高かった。この貧血は通常の臨床検査では発症の兆候を正確に把握することが困難であったこと、発症後に急激な病態の増悪を示したことから、臨床使用上で最も危惧すべき毒性変化と考えられた。
5. 種々の毒性変化には明らかな個体差がみられ、用量反応性は乏しかった。しかし、溶血性貧血および壊死は高用量のみで認められたこと、また低用量では抗 Anti-HM1.24 抗体の産生は認められたものの、何ら毒性変化は認められなかったことから、毒性発現には少なくとも閾値が存在すると考えられた。

## 第2章 溶血性貧血の機序解明に関する免疫学的研究

Anti-HM1.24 のカニクイザルを用いた 1 ヶ月間静脈内反復投与毒性試験において、本薬はカニクイザルに対して強い免疫原性を示し、特異抗体を過剰に産生させ、様々な免疫反応性の毒性変化を惹起した。その原因として、Anti-HM1.24 が HM1.24 抗原に結合することにより、リンパ組織における体液性免疫(B 細胞系)の活性化亢進のみならず細胞性免疫(T 細胞系)の分化異常を引き起こすことが見出された。

カニクイザルの前臨床安全性評価において認められた種々の毒性変化の内、ヒトにおいて最も懸念される毒性変化は溶血性貧血の発症であると考えられた。何故ならば、この溶血性貧血の病態がヒトにおける自己免疫性溶血性貧血(autoimmune hemolytic anemia: AIHA)に酷似していたからである。免疫性溶血性貧血は何らかの免疫グロブリンや免疫複合体が赤血球膜に結合することによって、血管内で凝集を起こしたり、変形能が減弱することにより、細網内系に抑留され、マクロファージなどに貪食され、赤血球破壊(血管外溶血)が亢進されることにより発症する(Fig. 17)。また、極度の貧血を呈したため切迫と殺した 1 例は、臨床経過から急激な赤血球の減少が生じたと推測され、血管外溶血に加え、血管内溶血が起こった可能性が考えられた。血管内溶血の発症には赤血球に対する自己抗体および免疫複合体による補体の活性化が深く関与していると推察される

薬剤誘発性の免疫性溶血性貧血の発症様式には種々のタイプが知られており、1. ハプテン型、2. 免疫複合体型、3. 自己抗体産生型などが代表的である。特に自己抗体産生型に関しては、赤血球が細網内系で抑留・貪食される際に膜の一部が自己修飾膜抗原として遊離して、自己免疫応答を促し、抗赤血球自己抗体が産生され、溶血性貧血を発症する過程が最も予測される機序である[34]。

カニクイザルにおける Anti-HM1.24 の前臨床安全性研究の結果から、Anti-HM1.24 に起因する溶血性貧血は種々の臨床検査において発症の兆候を把握することが困難であったこと、また発症後に急激な病態の増悪を示したことから、溶血性貧血の発現機序を解明することが、本薬の臨床試験における副作用発現の有無を予測し、患者のリスクを回避する手段を講じる上で最も重要な課題と位置付け、以下の研究を行った。

まず、Anti-HM1.24 が直接的に赤血球に作用して溶血性貧血を誘発した可能性を検証するために、標識 Anti-HM1.24 を用いて赤血球に対する結合性および Anti-HM1.24 添加による赤血球凝集反応の有無を調べた。さらに、AIHA を発症したことを検証するために、1 ヶ月投与試験の被験動物血清または血漿を用いて、抗赤血球抗体の有無を間接 Coombs 試験で調べ、また抗赤血球抗体が血管内容血を引き起こした可能性を調べるために、補体依存性の溶血性試験を実施した。さらに、自己抗体産生の有無を調べるために、抗 Single stranded DNA 抗体 (抗 ssDNA 抗体) の経時的な変動の有無を調べた。



## 第1節 材料および方法

### 1. 被験物質

前章の単回および 1 ヶ月間反復投与毒性試験に使用した被験物質と同一ロットの Anti-HM1.24 溶液 (Lot No.AHM99F01、(株)中外製薬)を用いた。これは前述の通り Anti-HM1.24 を 18.5 mg/mL の濃度で含有する無色澄明の溶液であった。

また、比較対照物質として、ヒト型化 IgG<sub>1</sub> モノクローナル抗体 (rhIgG<sub>1</sub>、(株)中外製薬)を 5.7 mg/mL の濃度で含有する無色澄明の溶液を用いた。rhIgG<sub>1</sub> は Anti-HM1.24 と同様の CDR 移植法により作製された同一サブクラス抗体であり、CDR 以外の領域は Anti-HM1.24 とほぼ同一の構造を有している。

これらの被験物質は入手後、使用時まで -80℃ で冷凍保存し、使用時に 25℃ 温浴中にて急速溶解させた。

### 2. 使用動物および飼育環境

中国より輸入したカニクイザルを国内で 9 週間の検疫を行い、健康であることが確認された雄 4 匹および雌 3 匹を(株)中外医科学研究所より購入して使用した。これらの動物はいずれも投薬歴はなく、入手時の年齢は 3～4 歳、体重範囲は雄で 3.0～4.1 kg、雌で 2.3～4.2 kg であった。

カニクイザルは温度 24±2℃、湿度 55±10%、換気回数 14～16 回/時、14 時間照明 (午前 5 時～午後 7 時点灯) に設定した動物室で、ステンレススチール製サル用吊りケージ (幅 583 mm × 奥行き 600 mm × 高さ 665 mm) を用いて個別飼育した。飼料は固型飼料 (PS、オリエンタル酵母工業(株) 約 70 g およびバナナ 1/2 本 (果肉) を、それぞれ 1 日 1 回給餌した。飲料水は水道水を不断給与した。

これらの動物は毎日、一般状態および摂餌状況を観察し、2～4週に1回の割合で体重を測定した。試験期間中の使用動物に異常は認められなかった。

### 3. 被験試料

1ヵ月間反復投与毒性試験において、カニクイザルから採取された血清または血漿を被験試料とした。また、対照試料として投薬歴のない動物から採取した血清または血漿を用いた。いずれの試料とも使用時まで、冷凍(-30～-80℃)で保存した。

投薬歴のないカニクイザルおよびヒト(健康人男性)からヘパリンまたは EDTA-2K 処理により採血した後、遠心分離して得られた赤血球を生理食塩液で洗浄し、赤血球浮遊液を調製して用いた。

### 4. カニクイザルおよびヒト赤血球に対する Anti-HM1.24 結合性の検討

#### 1) FITC 標識 Anti-HM1.24 の赤血球への結合性

血球試料として、投薬歴のない雌雄各1例のカニクイザルおよび健康な成人男性2名よりヘパリン処理により採取した末梢血を用いて、生理食塩液の赤血球浮遊液を調製した。赤血球数は総合血液学検査装置 (THMS H・1E、バイエル・三共(株))を用いて測定した。

比較対照として、高瀬の方法[48]に準じて各血液を ACK 液 (0.15M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、1mM  $\text{KHCO}_3$ 、0.1 mM EDTA-2Na)を用いて溶血処理した後、リンパ球細胞を分離し0.1% 牛血清アルブミン(BSA)および 0.1%アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ )含有のリン酸緩衝生理食塩液(PBS)浮遊液(0.1%  $\text{NaN}_3$ -0.1% BSA-PBS)を調製した。リンパ球はチュルク液(和光純薬工業)を用いて染色して計数した。陽性対照として、HM1.24 抗原を恒常的に高発現しているヒト骨髓腫細胞株の KPMM2 および ARH-77 (株)中外製薬)を用いた。使用抗体として、FITC 標識

Anti-HM1.24 および FITC 標識ヒト IgG 抗体を使用した。

上記の赤血球、リンパ球および骨髓腫細胞のそれぞれ  $5 \times 10^5$  個ごとに 0.1%  $\text{NaN}_3$ -0.1% BSA-PBS を 1 mL 加え、遠心後に FITC 標識ヒト IgG あるいは FITC 標識 Anti-HM1.24 を 12.5  $\mu\text{L}$  加え、氷上で 30 分間反応させた。各試料とも約  $10^4$  の細胞数を EPICS ELITE (BECKMAN COULTER) を用い、488 nm の励起波長により解析した。これらの細胞の内、赤血球領域もしくはリンパ球領域における蛍光細胞を測定し、Anti-HM1.24 蛍光細胞の増加の有無を、FITC 標識 Anti-HM1.24 および FITC 標識ヒト IgG 処理で各々作成されたヒストグラムを重ね合わせて目視的に調べ、Anti-HM1.24 の特異的な結合の有無を判定した。

## 2) $^{125}\text{I}$ -Anti-HM1.24 の赤血球に対する結合量の測定

血球試料として、投薬歴のない雌雄各 1 例のカニクイザルおよび健康な成人男性 2 名よりヘパリン処理により採取した末梢血を用いて、生理食塩液の赤血球浮遊液を調製した。赤血球数は総合血液学検査装置 (THMS H-1E、バイエル・三共㈱) を用いて測定した。

$^{125}\text{I}$ -Anti-HM1.24 (47.9 ng/mL  $\sim$  6.13  $\mu\text{g/mL}$ ) を含有したカニクイザルまたはヒト赤血球浮遊液 ( $2.8 \sim 4.0 \times 10^7/\text{mL}$ ) を調製し、4°C で 2 時間インキュベートした。遠心分離により赤血球画分を沈殿物として得た後、生理食塩水を用いて沈殿物を洗浄した。 $\gamma$  - カウンター (COBRA Quantum、パッカードジャパン) を用いて、沈殿物の放射能を測定し、「総結合量」とした。また、非標識の Anti-HM1.24 (1.85 mg/mL) および  $^{125}\text{I}$ -Anti-HM1.24 (47.9 ng/mL  $\sim$  6.13  $\mu\text{g/mL}$ ) を含有したカニクイザルまたはヒト赤血球浮遊液 ( $2.8 \sim 4.0 \times 10^7/\text{mL}$ ) を調製し、4°C で 2 時間インキュベートした。同様に赤血球画分の放射能を測定し、「非特異結合量」とした。「総結合量」から「非特異結合量」を差し引き、「特異結合量」を算出した。

次に抗 Anti-HM1.24 抗体存在下での総結合量を測定するために、 $^{125}\text{I}$ -Anti-HM1.24 (250 ng/mL) に対して 2 倍量の精製したカニクイザル抗 Anti-HM1.24 イディオタイプ抗体 (500 ng/mL、(株)中外製薬) を添加した混合溶液を調製後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。混合溶液  $50\text{ }\mu\text{L}$  に生理食塩水を  $150\text{ }\mu\text{L}$  および  $0.15\text{ mol/L}$  NaCl 含有酢酸緩衝液 ( $\text{pH}5.86$ ) を  $50\text{ }\mu\text{L}$  添加し、カニクイザルまたはヒト赤血球浮遊液 ( $7.0\sim 7.7\times 10^7/\text{mL}$ ) を  $250\text{ }\mu\text{L}$  加えた後、 $4^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベートした。同様に赤血球画分の放射能を  $\gamma$  -カウンターを用いて測定した。

## 5. カニクイザルおよびヒト赤血球を用いた *in vitro* 凝集試験

血球試料として、投薬歴のない雌雄各 3 例のカニクイザルおよび健康な成人男性 3 名より EDTA-2K 処理にて採取した末梢血を用いて、生理食塩液の 2% 赤血球浮遊液を調製した。

赤血球浮遊液に添加する被験抗体として、Anti-HM1.24 に加え、もう一種のヒト型化 IgG<sub>1</sub> モノクローナル抗体 (rhIgG<sub>1</sub>、(株)中外製薬) を用いた。rhIgG<sub>1</sub> は Anti-HM1.24 と同一サブクラス抗体であり、CDR 以外の領域は Anti-HM1.24 とほぼ同一の構造を有していた。各抗体は生理食塩液にて希釈し、それぞれ 5,700、2,850、1,425、713、356、178、89  $\mu\text{g/mL}$  濃度溶液を調製した。なお、最高濃度の 5,700  $\mu\text{g/mL}$  は rhIgG<sub>1</sub> の原液濃度に相当した。

### 1) 生理食塩液浮遊液を用いた *in vitro* 赤血球凝集試験

赤血球浮遊液を 96 穴 V 底プレート (NUNC) に  $50\text{ }\mu\text{L/well}$  添加し、各被験抗体  $50\text{ }\mu\text{L/well}$  を添加 (最終的な抗体濃度: 2,850、1,425、713、356、178、89、45  $\mu\text{g/mL}$ ) した。攪拌後  $37^{\circ}\text{C}$ 、60 分間静置し、凝集の程度を確認後、生理食塩液を  $100\text{ }\mu\text{L/well}$  添加し遠心 ( $270\text{g}$ 、 $22^{\circ}\text{C}$ 、5 分間) して 3 回洗浄した。上清を除去した後、2 次抗体として抗ヒト IgG 血清 (三光純薬) を  $50\text{ }\mu\text{L/well}$  添加した。攪拌後  $37^{\circ}\text{C}$ 、60 分間静置し、凝集の程度を肉眼で確認した。

凝集の程度は沈殿した赤血球の周辺が明確な場合を「－」、沈殿した赤血球の周辺がやや不明瞭で一部に凝集した赤血球が認められる場合を「±」、沈殿した赤血球が認められず、ウェル一面に凝集している場合を「＋」、凝集している一部が中心部に向かってスリップするなど、程度がより強い場合を「++」とした。各被験抗体に少なくとも1例で「＋」が認められた濃度を凝集ありと判定した。各プレートはデジタル HD マイクロスコープ (VH-7000、株式会社キーエンス) を用いて、写真撮影を行った。

## 2) 血清浮遊液を用いた *in vitro* 赤血球凝集試験

赤血球浮遊液を 96 穴 V 底プレート (NUNC) に 50  $\mu$  L/well 添加し、5 分間遠心 (270g、22°C、5 分間) した後、上清を除去した。保温して非働化 (56°C、30 分間) させた血清を同一個体の赤血球浮遊液に 50  $\mu$  L/well 添加し、血清浮遊液を調製した。各被験抗体を 50  $\mu$  L/well 添加 (最終的な抗体濃度: 2,850、1,425、713、356、178、89、45  $\mu$  g/mL) した。攪拌後 37°C、60 分間静置し、凝集の程度を肉眼で確認した。以降の実験操作および判定方法は前述の生理食塩液浮遊液を用いた系に準じた。

## 6. カニクイザル血清を用いた間接 Coombs 試験

被験血清として、1カ月間静脈内反復投与毒性試験における各動物の剖検時 (投与 28 日) に採取した保存 (-80°C) 血清を用いた。なお、200 mg/kg の雌 1 例 (No.50404) は切迫殺時 (投与 34 日) の血清を用いた。各被験血清は使用前に加温して非働化 (56°C、30 分間) し、原血清および 2、4 および 8 倍の生理食塩液希釈血清を使用した。血球試料は投薬歴のないカニクイザル雌雄各 1 例からヘパリン処理により採取した末梢血を用いて、生理食塩液の 2% 赤血球浮遊液を調製した。

試験操作は鈴木の方法[49]に準拠して行った。すなわち、赤血球浮遊液を 96 穴 V 底プレートに 50  $\mu$  L/well 添加し、次に希釈調製した被験血清を 25  $\mu$  L/well 添加した(最終の血清希釈倍数:3、6、12、24)。攪拌後 37°C、60 分間静置して凝集の程度を確認した後、生理食塩液を 100  $\mu$  L 添加し遠心(270g、22°C、5 分間)して 3 回洗浄した。上清を除去した後、2 次抗体として非働化し生理食塩液にて 3 倍希釈したヤギ抗サル IgG 血清(Cappel)を 50  $\mu$  L/well 添加した。攪拌後 37°C、60 分間静置し、凝集の程度を肉眼で確認した。

凝集の程度は沈殿した赤血球の周辺が明確な場合を「-」、沈殿した赤血球の周辺がやや不明瞭で一部に凝集した赤血球が認められる場合を「±」、沈殿した赤血球が認められず、ウェル一面に凝集している場合を「+」、凝集塊の一部が中心部に向かってスリップするなど程度がより強い場合を「++」と判定した。各プレートはデジタルカメラ(コダック)を用いて写真撮影を行った。

## 7. カニクイザル血清を用いた *in vitro* 溶血性試験

被験血清として1カ月間静脈内反復投与毒性試験における各動物の剖検時(投与 28 日)に採取した保存(-80°C)血清を用いた。なお、200 mg/kg の雌 1 例(No.50404)は切迫殺時(投与 34 日)の血清を用いた。血球試料として投薬歴のないカニクイザル雌雄各 1 例からヘパリン処理により採取した末梢血を用いて、GVB<sup>++</sup> buffer(gelatin / veronal-buffered saline with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>)で 5%赤血球浮遊液を調製した。2 次抗体として抗ヒト IgG 血清(三光純薬)、補体として無処置モルモット血清を用いた。

実験操作は Coligan らの方法[50]を参考に一部改変して実施した。すなわち、5%赤血球浮遊液を遠心(270g、22°C、5 分間)し、上清を除去した後、被験血清もしくは GVB<sup>++</sup> buffer を 250  $\mu$  L ずつ加え、攪拌後に 37°C で 1 時間インキュベートした。GVB<sup>++</sup> buffer で洗浄後、抗ヒ

ト IgG 血清を 100  $\mu$  L 添加し、攪拌後に 37°C で 1 時間反応させた。再度洗浄後、GVB<sup>++</sup> buffer を 500  $\mu$  L 添加し、赤血球を再浮遊させた。この赤血球浮遊液を 96 穴 V 底プレートに 25  $\mu$  L/well 添加した後、2～8 倍希釈した正常モルモット血清を 25  $\mu$  L/well 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。遠心後、上清を 100  $\mu$  L ずつ採取し 96 穴 V 底プレートに分注し、540 nm における吸光度を吸光光度計 (Multiscan BICHROMATIC、Labsystems、Finland) で測定した。

溶血率 (Hemolysis、%) は以下の式により算出した。なお、被験血清を添加しなかったウェルに脱イオン水を 125  $\mu$  L/well 添加し、赤血球を完全に溶血させた上清の吸光度を測定して Total Lysis 値を算出した。

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{A_{540} (\text{Sample}) - A_{540} (\text{Blank})}{A_{540} (\text{Total}) - A_{540} (\text{Blank})} \times 100$$

$A_{540} (\text{Sample})$  ; 血清サンプルを加えた well の上清の吸光度

$A_{540} (\text{Blank})$  ; 空 well の吸光度

$A_{540} (\text{Total})$  ; 脱イオン水で溶血させた well の上清の吸光度

## 8. カニクイザル血漿中の抗 single stranded DNA 抗体測定

被験血漿として1カ月間静脈内反復投与毒性試験において、各動物の投与開始前 18 日、投与 10 日および 28 日に採取した保存 (-30°C) 血漿を用いた。なお、200 mg/kg の雌 1 例 (No.50404) は切迫殺時 (投与 34 日) の血漿も用いた。カニクイザルの抗 single stranded DNA 抗体測定は、国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センターに指導を受け実施した。

固相化抗原として、calf thymus single stranded DNA (以下 ssDNA、SIGMA、MO) を TE buffer に 500  $\mu$  g/mL の濃度に溶解し、これを原液として使用時まで -80°C に保存した。



洗浄液として 0.05% Tween20 含有 PBS(-)、ブロッキング緩衝液としてカゼイン 1% 含有 PBS(-) を用いた。また、発色用基質液として phosphate-citrate buffer with perborate 粉末 (SIGMA、MO) の蒸留水溶解液に o-phenylenediamine を添加 (0.4 mg/mL) して用いた。

ELISA による抗 ssDNA 抗体の測定法を Fig. 18 に示した。すなわち、96 穴プレートに ssDNA を 100  $\mu$  L/well 入れ、4°C に 1 晩静置して固相化した。洗浄後、ブロッキング緩衝液を 200  $\mu$  L/well 添加し、4°C に 1 晩静置した。被験血漿はブロッキング用緩衝液を用いて 500 倍に希釈して 100  $\mu$  L/well 加え、4°C に 1 晩静置して固相化抗原と抗体との反応を行った。各個体につき、ssDNA 添加 well および PBS 添加 well のそれぞれ 2 well を設けた。洗浄後、検出用抗体として、ブロッキング用緩衝液で 20,000 倍に希釈した horseradish peroxidase 標識抗サル IgG (SIGMA、MO) を 100  $\mu$  L/well 加えて、室温に 2 時間静置した。洗浄後、発色用基質液を 100  $\mu$  L/well 加え、15 分間静置して発色反応を行った。4 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて発色反応を停止し、492 nm の波長における吸光度を吸光光度計 (Multiscan BICHROMATIC、Labsystems、Finland) で測定した。

各希釈血漿の「ssDNA 添加 well の吸光度」から「PBS(-) 添加 well の吸光度」を引いた値を各個体の抗 ssDNA 抗体の吸光度とした。各採血日において、各個体値が「溶媒対照群動物の平均値  $\times$  3 倍以上を示した場合」を陽性と判定した。

## 9. 統計学的解析方法

各検査で得られた成績はいずれも統計学的解析は行わず、個体別に反応の有無または投与開始前値からの経時的な推移を判断基準とした。

## 第2節 成 績

### 1. カニクイザルおよびヒト赤血球に対する Anti-HM1.24 結合性の検討

#### 1) FITC 標識 Anti-HM1.24 の赤血球への結合性

カニクイザルおよびヒトにおける赤血球およびリンパ球の FITC 標識 Anti-HM1.24 処理および標識ヒト IgG 処理を重ね合わせたヒストグラムの代表例を Fig. 19 に示した。

赤血球については、ヒトおよびカニクイザルのいずれにおいても Anti-HM1.24 処理群とヒト IgG 処理群のヒストグラムは同様に重なり、蛍光強度の増強は認められなかった。従って、赤血球に対する Anti-HM1.24 の特異的な結合はないと判断した。一方、リンパ球については、ヒトおよびカニクイザルで、ヒト IgG 処理群に比べ Anti-HM1.24 処理群の蛍光強度は増強し、赤血球に対する結合性 (HM1.24 抗原の発現) が確認された。また、HM1.24 抗原を高発現している陽性対照細胞の KPMM2 あるいは ARH-77 においては、Anti-HM1.24 の蛍光強度は著明に増加した (Fig. 20)。

#### 2) $^{125}\text{I}$ -AntiHM1.24 の赤血球に対する結合量の測定

赤血球に対する放射能の特異結合量を Table 10 に示した。カニクイザルおよびヒトともに赤血球への放射能の特異結合量は極めて低値であり、添加した放射能の 0.2% 以下であった。添加した放射能に対する特異結合量の比は、 $^{125}\text{I}$ -Anti-HM1.24 濃度を増加してもほぼ同等であり、結合の飽和は認められなかった。従って、赤血球に結合した放射能は  $^{125}\text{I}$ -Anti-HM1.24 溶液中に僅かに (2% 以下) 含まれる  $^{125}\text{I}$  イオンである可能性が高いと考えられた。

抗 Anti-HM1.24 抗体存在下での放射能の総結合量を Table 11 に示した。 $^{125}\text{I}$ -Anti-HM1.24 と抗 Anti-HM1.24 抗体を反応させ免疫複合体を形成しても、放射能の赤血球への結合量は増加しなかった。

このように  $^{125}\text{I}$ -Anti-HM1.24 単独および抗 Anti-HM1.24 抗体を共存させた条件のいずれでも、カニクイザルの雌雄およびヒト(男性)ともに、 $^{125}\text{I}$ -Anti-HM1.24 の赤血球への特異的な結合は認められなかった。

## 2. カニクイザルおよびヒト赤血球を用いた *in vitro* 凝集試験

### 1) 生理食塩液赤血球浮遊液を用いた系

Anti-HM1.24 を生理食塩液浮遊液に添加した系において、赤血球の凝集が認められた。Anti-HM1.24 添加により凝集が認められたカニクイザルおよびヒト赤血球の代表例をそれぞれ Fig. 21 および Fig. 22 に示した。カニクイザル赤血球において、一部の個体で  $1,425 \mu\text{g/mL}$  の濃度で直接的に赤血球凝集が認められ、 $2,850 \mu\text{g/mL}$  濃度では全例(雌雄各 3 例)で凝集が認められた。2 次抗体(抗ヒト IgG 血清)を添加した場合には、僅かに凝集が増強される場合もあったが、 $713 \mu\text{g/mL}$  未満ではいずれの個体とも陰性と判定された。ヒト赤血球においても、一部の個体で  $1,425 \mu\text{g/mL}$  で直接的に凝集が認められ、 $2,850 \mu\text{g/mL}$  濃度では全例(男性 3 例)で凝集が認められた。2 次抗体を添加した場合にも、同様の凝集反応が認められた。

一方、類似のヒト型化 IgG<sub>1</sub> 抗体(rhIgG<sub>1</sub>)については、 $2,850 \mu\text{g/mL}$  濃度まで直接的にも 2 次抗体を添加してもカニクイザルおよびヒト赤血球のいずれにも凝集は認められなかった。

このように Anti-HM1.24 は  $713 \mu\text{g/mL}$  を超える濃度で直接的に赤血球を凝集させるが、2 次抗体として抗ヒト IgG を加えた場合にも明らかな凝集の増強は起こさないことが明らかとなった。

### 2) 血清赤血球浮遊液を用いた系

Anti-HM1.24 を血清浮遊液に添加した系では、カニクイザルおよびヒト赤血球ともに、 $2,850 \mu\text{g/mL}$  濃度までいずれの個体でも凝集は認められなかった。比較対照として用いた rhIgG<sub>1</sub> 添

加の結果でも、カニクイザルおよびヒトの赤血球に対して全く凝集は認められなかった。

### 3. カニクイザル血清を用いた間接 Coombs 試験

各個体の成績を Table 12 に示した。

雌動物の被験血清については、雄動物の赤血球を用いた場合に、200 mg/kg の 2 例 (Nos.50403、50404) で「+」以上の凝集が認められた。雌動物の赤血球を用いた場合には、20 mg/kg の 1 例 (No.50302) および 200 mg/kg の 3 例 (Nos.50402、50403、50404) で「+」以上の凝集が認められた。

一方、雄動物の被験血清は雌雄いずれの赤血球を用いた場合においても「+」以上の凝集を示す個体は認められなかった。なお、雌雄とも 2 次抗体 (抗サル IgG) 添加前の血清では凝集は認められず、直接的な凝集作用はなかった。

このように間接 Coombs 試験において、陽性を示した個体は 20mg/kg の雌 1 例 (No.5030) および 200mg/kg の雌 3 例 (Nos.50402、50403、50404) であった。

### 4. カニクイザル血清を用いた *in vitro* 溶血性試験

補体として添加したモルモット血清の影響を検討したところ、2 倍希釈血清を加えた場合には陰性対照 (被験血清非添加) においても 10 %前後の溶血がみられた。この溶血作用は、おそらく異種動物の赤血球に対する補体系の活性化が抗体非依存的に起ったためと思われるが、希釈倍率を上げるに従い陰性対照の赤血球における溶血率は減少したため、評価に及ぼす影響はないと判断した。

雌動物の被験血清を無処置雄の赤血球に添加した系において、200 mg/kg 群の 1 例 (No.50401) で陰性対照と比較して約 2~5 倍の溶血率の増加がみられ、他 1 例 (No.50404) に

においては約 1.2～3 倍の溶血率の増加が認められた。特に、No.50401 では 2 倍希釈の補体血清を添加した際に、溶血率は 32%に達した (Fig. 23)。

また、雌動物の被験血清を無処置雌の赤血球に添加した系において、200 mg/kg 群の 1 例 (No. 50404) では陰性対照と比較して約 4～5 倍の溶血率の増加が認められ、最高値で 34% に達した。しかし、No.50401 では陰性対照と比較して差はなかった (Fig. 24)。

一方、雄動物の被験血清においては、無処置の雌雄いずれの赤血球に添加しても、陰性対照と比較して溶血率の増加は認められなかった。

このように 200 mg/kg の雌 2 例 (Nos. 50401 および 50404) で補体活性化による溶血率の増加が認められた。

## 5. カニクイザル血漿中の抗 single stranded DNA 抗体 (抗 ssDNA 抗体) の測定

各個体における投与開始前および投与開始後における抗 ssDNA 抗体価 (吸光度) の推移を Fig. 25 (雄) および Fig. 26 (雌) に示した。

雌動物の被験血漿では、溶媒投与群および 2 mg/kg 群では何れの採血時期においても抗 ssDNA 抗体は検出されなかった。20 mg/kg 群では雌 1 例 (No.50302) が投与 28 日に陽性と判定された。また、200 mg/kg 群の雌 3 例 (Nos.50402、50403、50404) も陽性と判定された。すなわち、No.50402 は投与 28 日、No.50404 は投与 28 および 34 日に吸光度の上昇が認められた。また、No.50403 では投与開始前にも抗 ssDNA 抗体が高度に検出されたが、投与 28 日まで吸光度が漸増し、全例中で最高値を示していた。

一方、雄動物の被験血漿では、溶媒投与群を含めた全例とも投与開始前および投与開始後の何れの採血時期においても吸光度の増加は認められなかった。

このように血漿中の抗 ssDNA 抗体の経時的な推移を調べた結果、20 mg/kg の雌 1 例 (No.50302) および 200 mg/kg の雌 3 例 (Nos.50402、50403、50404) では投与期間中に抗 ssDNA 抗体が漸増していたことが明らかとなった。これらの ssDNA 抗体の上昇例は間接 Coombs 試験で陽性反応を示した個体と一致していた。

### 第3節 考 察

本章では Anti-HM1.24 が直接的に溶血性貧血を惹起した可能性を検証するために、標識 Anti-HM1.24 を用いて赤血球に対する結合性の有無を調べ、また Anti-HM1.24 添加による *in vitro* 赤血球凝集反応の有無を調べた。これらの実験では正常の雌雄カニクイザルおよびヒト (健康人男性) の赤血球を用いて、種差の有無を確認し、ヒトへの外挿性を検討した。また、1 カ月間反復投与試験の被験動物 (カニクイザル) 血清または血漿を用いて、抗赤血球抗体の存在の有無および特性を調べる目的で、間接 Coombs 試験、補体活性化による *in vitro* 溶血性試験を行い、さらに抗 single stranded DNA 抗体 (抗 ssDNA 抗体) の経時的な推移を調べた。得られた成績から、予測される溶血性貧血の誘発機序を考察した。

#### Anti-HM1.24 の赤血球に対する結合性

直接的に Anti-HM1.24 が赤血球に結合するのであれば、溶血性貧血の初期要因は明らかであることから、Anti-HM1.24 の赤血球に対する特異的な結合性 (HM1.24 抗原の有無) を FITC 標識 Anti-HM1.24 および  $^{125}\text{I}$ -標識 Anti-HM1.24 を用いて調べた。その結果、両標識 Anti-HM1.24 ともカニクイザルおよびヒト赤血球に対する特異的な結合は認められなかった。また、 $^{125}\text{I}$ -標識 Anti-HM1.24 は抗 Anti-HM1.24 抗体 (カニクイザルに感作した後、精製したイデオタイプ抗体) の共存および非共存下のいずれにおいても、赤血球に対して特異的な結合はなかった。よって、Anti-HM1.24 が特異的に赤血球に結合し、溶血性貧血の初期要因となった可能性はなく、ヒトにおいてもその危険性はないと推察された。しかしながら、FITC および  $^{125}\text{I}$ -標識 Anti-HM1.24 は両者とも精製された monomer であることを考慮すべきである。すなわち、Anti-HM1.24 溶液中には heterogeneity として dimer および oligomer やイオン交換クロマトグラム上の heteromolecules が混在 (3%程度) しており、これらの異性体に関する特性は把握できて

いない。しかし、これらの多量体や電荷の異なる異性体は現在の生産技術をもっても単離精製もしくは分取が極めて困難であったこと、また溶液中での生成および存在様式ならびに安定性などが未検討のため、単離精製品を用いた追究ができなかった。

### in vitro 赤血球凝集反応

Anti-HM1.24 が赤血球を凝集させるか否かを検討した結果、生理食塩液の赤血球浮遊液に Anti-HM1.24 を添加すると  $713 \mu\text{g/mL}$  を超える高濃度域で直接的にカニクイザルおよびヒト赤血球を凝集させた。また、Anti-HM1.24 を添加した後、洗浄して 2 次抗体として抗ヒト IgG を添加した結果でも同様に凝集がみられたが、明らかな凝集の増強は認められなかった。一方、比較対照として用いた Anti-HM1.24 と同様の移植法によってヒト型化した rhIgG<sub>1</sub> (類似のヒト型化モノクローナル IgG<sub>1</sub> 抗体) では最高濃度である  $2,850 \mu\text{g/mL}$  でも凝集は陰性であった。この rhIgG<sub>1</sub> 抗体は Anti-HM1.24 と CDR 領域以外はほぼ同一の構造を有していることから、ヒト型化 IgG<sub>1</sub> 抗体が、共通の特性としてある濃度領域で直接的に赤血球を凝集させる作用を有しているわけではないことを示している。

前述の標識 Anti-HM1.24 を用いた実験結果から、Anti-HM1.24 は赤血球に対して特異的に結合しないこと、また通常では IgG クラスの抗体は赤血球間を架橋することが出来ないため、直接的に赤血球を凝集させないことを考慮すると、Anti-HM1.24 添加による直接的な凝集作用は非特異的な接着が要因ではないかと推察される。すなわち、非特異的な接着であれば、Fc 部を認識する 2 次抗体による架橋が形成され難いため凝集が増強されないことも説明し得る。この直接的な赤血球凝集の成因は不明であるが、前述の dimmer、oligomer もしくは電荷の異なる heteromolecule のいずれかが関与している可能性も否定できない。



一方、自己血清による赤血球浮遊液を用いた場合には、ヒトおよびカニクイザルとも 2,850  $\mu$  g/mL 濃度まで全く凝集は認められなかった。この結果が必ずしも生体内の反応を反映しているとは言えないが、血清成分が非特異的な接着を回避させ得ることを示唆している。

いずれにせよ、Anti-HM1.24 による直接的な赤血球凝集作用は高濃度域に限られた反応であることは明らかである。すなわち、直接的な赤血球凝集を惹起した Anti-HM1.24 濃度 (713  $\mu$  g/mL<) は、20 mg/kg をカニクイザルに静脈内投与した際の投与直後の血漿中濃度 (約 400  $\mu$  g/mL) を超える濃度である。一方、溶血性貧血が発症した 200 mg/kg 群の投与直後の血漿中濃度は約 4,000  $\mu$  g/mL を示していた。しかしながら、この凝集実験はあくまでも 2% 赤血球浮遊液を用いた条件下での結果であるため、生体反応への外挿は難しいが、ヒトの予想最高投与量 (5 mg/kg) での最高血漿中 Anti-HM1.24 濃度は、カニクイザルの成績から 80~100  $\mu$  g/mL と予測されることを勘案すれば、凝集反応が認められた濃度 (713  $\mu$  g/mL<) とは乖離しており、ヒトでの安全性は確保できると考えられた。

#### 間接 Coombs 試験による抗赤血球抗体の検出

1 ヶ月間反復投与毒性試験の被験動物血清を用いた間接 Coombs 試験の結果、被験血清のみを添加した時点では、いずれの被験血清でも直接的な凝集反応は認められなかった。しかし、被験血清と反応させた赤血球を洗浄後に 2 次抗体として抗サル IgG を添加した結果、20 mg/kg の雌 1 例 (No.50302) および 200 mg/kg の雌 3 例 (Nos. 50402、50403、50404) に赤血球の凝集反応が認められた。これらは臨床検査で貧血を呈した個体 (Nos. 50403、50404) に加え、免疫反応性の毒性変化が強く認められた個体と一致していた。一方、雄動物の血清は全例とも陰性と判定された。

通常、間接 Coombs 試験においては非自己認識による false positive を避けるために、血清と赤血球は同一血液型を用いなければならない。従って、今回の間接 Coombs 試験成績はアロ抗体の存在による非特異な反応を否定することはできない。しかし、カニクイザルの血液型を分類することは困難であること、また溶媒対照群の血清では雌雄いずれの赤血球に対しても凝集反応は認められなかったことから、非自己認識の影響は成績の評価に影響は及ぼさないと判断した。今後の研究では、自己赤血球を用いた直接 Coombs 試験による赤血球凝集の有無を確認することが、自己免疫性溶血性貧血の診断には不可欠である。さらに、抗 IgG、IgM 抗体を用いてグロブリンクラスの同定や抗 C3b、C3d 抗体による補体活性化の判定などが重要と考えられる。また、ヒトにおいては Coombs 試験の改良法として、直接 Coombs 陰性の溶血性貧血を検出可能なフローサイトメトリーを利用する方法[51, 52]や、臨床検査試薬としてアクリルアミド-デキストランゲルによるゲルカラム遠心凝集法[53]などを用いて、綿密な溶血性貧血の初期診断を行うことによって、ヒトでの安全性を確保するべきであろう。

### 抗赤血球抗体の *in vitro* 溶血性試験

被験血清に抗赤血球抗体が存在することが確認されたため、この抗赤血球抗体が赤血球膜に結合した補体の活性化による補体溶血が起きるか否かを調べた結果、雌 1 例(No.50404)が陽性と判定された。一般的に溶血性貧血では血管外溶血が主体であり、血管内溶血は希である[31, 32, 34]。しかし、本例では急激な赤血球減少が起こり、血清 LDH および間接ビリルビンの上昇およびハプトグロビンの減少を呈して瀕死状態に陥ったことを勘案すると、補体の活性化による血管内溶血が起きた可能性が高かった。なお、200 mg/kg 群の雌 1 例(No. 50401)では雄の赤血球に対して、補体溶血が認められたが、雌の赤血球に対しては陰性であった。この原因は血液型などの個体差あるいは性差のある抗原を認識する自然抗体が関与していること

などが考えられたが、詳細は不明である。従って、本例(No. 50401)については、前述の間接 Coombs も陰性であったことから補体溶血は陰性と判断した。

### 抗 single strand DNA 抗体の推移

被験血清中の single stranded DNA(ssDNA)に対する抗体の推移を調べた結果、雄動物は投与開始前から剖検時まで、全例とも陰性であった。一方、雌では 20 mg/kg の雌 1 例(No.50302)で剖検時(投与開始後 28 日)に高値を示し、200 mg/kg の雌 2 例(Nos. 50403、50404)は投与開始後 10 および 28 日に漸増して高値を示した。また、200 mg/kg 雌の他 1 例(No. 50402)も軽度であるが投与経過に伴い漸増し、投与開始後 28 日には対照群における平均値の 3 倍以上の値を示したことから、陽性と判定した。

抗 ssDNA 抗体の測定は自己免疫性疾患の有用な診断法であり、自己に対する免疫寛容の破綻により産生される汎自己抗体を検出している[54]。よって、直接的に抗赤血球抗体の増加を示すものではない。しかし、抗 ssDNA 抗体の陽性個体が全例とも、間接 Coombs で赤血球凝集が認められていることから、これらの例では抗赤血球自己抗体が産生されていると判断した。

なお、抗 ssDNA 抗体の陽性個体において、雌 1 例(No.50403)は投与開始前で抗 ssDNA 抗体価がすでに非常に高い値を示したことは注目すべきである。本例が最も早期に貧血を発症したこと、および諸検査で免疫反応性の変化が強く認められていることを勘案すると、潜在的に自己免疫性疾患のリスクを持っていた可能性が示唆される。しかし、この個体を供試したことによって、多様な遺伝的背景を有するヒトにおいて自己免疫性の溶血性貧血発症の可能性があることを予測でき、さらに臨床試験における患者の除外規定を厳しく設定することが出来たことの意義は高いと考えられた。

ヒトにおいては自己免疫性疾患の診断として抗 double stranded DNA (dsDNA) 抗体も重要視されている。しかし、現状ではカニクイザルにおける抗 dsDNA 抗体の測定法は確立されておらず、また実験条件なども最適化されていないため、本研究ではすでに国立感染症研究所において開発・確立されていたカニクイザルにおける抗 ssDNA 抗体を自己免疫性疾患の診断法として選定した。この抗 ssDNA 抗体測定法は、サルにおける自己免疫性溶血性貧血の病態とよく相関することが確認されている[55]。

### 予測される自己免疫性溶血性貧血の誘発機序

溶血性貧血の誘発機序検討の成績から、Anti-HM1.24 により誘発された溶血性貧血は、明らかに用量反応性がある薬物依存性の毒性変化であることが明らかとなった。また、比較対照薬として用いたもう一種のヒト型化 rhIgG<sub>1</sub> 抗体 (CDR 領域以外は Anti-HM1.24 とほぼ同一の構造を有している) のカニクイザルを用いた前臨床安全性試験[56]においては、rhIgG<sub>1</sub> 抗体に対する特異抗体の産生は認められたが、血漿中薬物濃度が 6,000  $\mu$ g/mL に達する高暴露条件でも溶血性貧血の発症やリンパ組織における顕著な免疫反応性の変化は認められていない。従って、Anti-HM1.24 により誘発された溶血性貧血は異種蛋白であるヒト型化抗体を過剰に投与することによって、薬物とは関連のない何らかの偶発的な要因で惹起された病態ではないと考えられる。すなわち、Anti-HM1.24 が全身の HM1.24 抗原に結合することによって、胸腺および脾臓リンパ球に T 細胞の分化異常および B 細胞の活性化亢進などが惹起され、自己免疫性溶血性貧血の発症に繋がった可能性が高い。ヒト AIHA 患者における免疫系の変化として、本研究のカニクイザルで認められた成績と同様の T 細胞の分化異常および IL-2 依存性増殖の抑制ならびに B 細胞の活性化亢進などリンパ球の機能異常が報告されている[57]。これらの各リ

ンパ球の異常がどのような過程で生じ、またどのような相互作用を示しているかなどの詳細については不明であるが、本研究で見出された AIHA はヒトで報告されている病態と酷似している。また、ヒト AIHA における Th1/Th2 サイトカインバランスの偏重に関しては、IL-12 の減少および IL-10 の増加が初期要因であり、Th2 優位になるために、IL-4、5、6 などのサイトカイン産生が増加して、病態の悪化を招くことが明らかになっている[58、59]。本研究においては、これらのサイトカインは現時点では適切な測定法が確立できていないため、本研究では測定することはできなかったが、別途実施した Anti-HM1.24 のカニクイザル安全性試験[16]において、末梢血での IL-4 産生細胞比率を調べた結果、高用量(100 mg/kg)群で IL-4 産生細胞の増加が認められている。この試験では AIHA の発症はなかったため、直接的な証明には至らなかったが、Anti-HM1.24 がカニクイザルのサイトカインバランスに影響を及ぼすことを示唆している。

Anti-HM1.24 のカニクイザルにおける前臨床毒性評価および溶血性貧血の誘発機序検討の成績を総括すると、AIHA の発現機序は以下のように推察される。

Anti-HM1.24 はリンパ球の HM1.24 抗原に結合することにより、B 細胞(体液性免疫)の活性化亢進に加え、T 細胞(細胞性免疫)の分化異常を引き起こし、体液性免疫優位の状態に陥らせ、自己反応性の B 細胞の活性化を亢進させる。そのような状況下で、何らかの原因により赤血球膜が自己抗原として認識されたと考えられる。この要因のひとつとして、高濃度の Anti-HM1.24 が赤血球凝集を引き起こし、抗 Anti-HM1.24 抗体が結合したことにより、これらの免疫グロブリンに修飾された赤血球が網内系において抑留され、溶血するか、貪食細胞が抗 Anti-HM1.24 抗体に対する Fc レセプタを介して赤血球を抑留・貪食した可能性が考えられる。これらの過程で赤血球は変形能を失ったり、一部を貪食されることによって異型(球形・小型)赤血球が末梢血で増加するとともに、遊離した赤血球膜抗原が活性化された自己反応性の B

細胞により認識され、自己免疫応答が惹起される。その結果、抗赤血球自己抗体が産生され、網内系での血管外溶血の亢進と補体結合による血管内溶血が誘発され、急激な病態の悪化に陥ると考えられる。この推論は AIHA の発症が一般的な特異抗体産生の時期(投与後 2 週)以降であり、自己産生の特異抗体(抗 Anti-HM1.24 抗体や抗赤血球自己抗体)に対する Fc レセプタを介した貪食や補体活性化に伴う除去機構は強力な免疫反応であることと合致する。さらに、Anti-HM1.24 がカニクイザルに対して強い免疫原性を有するために、抗 Anti-HM1.24 抗体を過剰に産生させることがこれらの過程を増長させる因子と推察される。

以上の研究結果から、ヒト型化抗体である Anti-HM1.24 の反復投与により発症したカニクイザルにおける溶血性貧血は、薬物誘発性の自己免疫性溶血性貧血(autoimmune hemolytic anemia : AIHA)と診断され、IgG クラスの抗赤血球自己抗体の産生が主因であると結論した。

### 第3章 総括および結論

Anti-HM1.24 は骨髄腫細胞に高頻度に発現しているヒト HM1.24 抗原を認識するヒト型化モノクローナル抗体であり、多発性骨髄腫の治療薬としての開発が期待されている。Anti-HM1.24 は主に骨髄腫細胞に対してナチュラルキラー細胞を介した抗体依存性細胞傷害作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) を有しており、補体依存性細胞傷害活性は殆どないとされている。しかし、ヒトでは HM1.24 抗原は骨髄腫細胞に限らず正常な B リンパ球または T リンパ球を含む全身の組織に分布している。

本研究は Anti-HM1.24 に感受性を有する唯一の動物種であるカンクイザルを用いて、標的組織以外の組織に対する意図されない反応性ならびに細胞毒性などを含めて、Anti-HM1.24 の免疫学的特性を把握し、さらに薬物動態学的な検討および抗 Anti-HM1.24 抗体の産生を調べ、ヒトにおける副作用発現の有無を予測し、毒性発現メカニズムを解明することを目的として行った。

#### Anti-HM1.24 のカンクイザルにおける前臨床安全性評価

カンクイザルを用いて静脈内持続投与による単回投与試験 (各用量に雌雄各 1 例) および 1 ヶ月間 (週 2 回間欠) の反復投与試験 (各用量に雌雄各 4 例) を 0、2、20、200mg/kg の用量で行った。高用量の 200mg/kg はヒトでの予想最高用量の約 40 倍に相当した。単回投与では 200mg/kg の用量まで何ら急性毒性は認められず、また遅発性の毒性も認められなかった。

一方、1 ヶ月間の反復投与では 2 mg/kg は無毒性量であったが、20 mg/kg 以上で免疫反応性の変化として、好塩基球、単球および血清グロブリンの増加や脾臓、リンパ節、扁桃、消化管付属リンパ組織および胸腺におけるリンパ球の増減を伴う増殖性または萎縮性の病理学的変

化が観察された。最高用量の 200mg/kg では雄 4 例中 1 例で Anti-HM1.24 に交差反応性を示す臓器に一致して、限局性または巣状壊死が認められ、ADCC 作用の過大発現によるものと推察された。また、200 mg/kg の雌 4 例中 2 例では貧血が認められ、1 例では投与開始後 3 週以降に赤血球の減少、網赤血球および小型・球形赤血球の増加を示し、脾臓の腫大・ヘモジデリン沈着の増加および骨髓赤芽球の増加が認められた。従って、この貧血は主に網内系における血管外溶血の亢進による溶血性貧血であると考えられた。もう 1 例は最終投与後 10 日（休薬開始後 6 日）に極度の貧血を呈し、乳酸脱水素酵素および間接ビリルビンの上昇並びにハプトグロビンの減少を伴い瀕死状態となったため切迫と殺した。本切迫と殺例は投与開始後 21 日まで末梢血 CD20 陽性リンパ球（B 細胞）比率の増加がみられた以外に血液学的な異常は認められなかったことから、急激な赤血球減少が生じたと推測され、血管外溶血に加え血管内容血が起こった可能性が高いと考えられた。また、同例では剖検時に胸腺中の T 細胞（細胞性免疫）の分化異常および脾臓中リンパ球の B 細胞（体液性免疫）の活性化亢進が認められた。このことから、Anti-HM1.24 がリンパ球に結合することによって、リンパ球の分化・増殖に影響を及ぼしたため、機能異常が発現して体液性免疫優位となり、全身性自己免疫疾患が発症しやすい状態に陥ったことが示唆された。さらに、抗 Anti-HM1.24 抗体（Fab' に対する IgG 抗体）が単回および 1 ヶ月間反復投与ともに 2 mg/kg 以上で検出され、産生量に用量依存性はないものの単回投与においても投与後 9 ヶ月間以上にわたり高濃度に検出された。このことから、Anti-HM1.24 はカニクイザルに対して強い免疫原性を有することが明らかとなり、産生された抗 Anti-HM1.24 抗体は種々の免疫反応性の毒性変化に影響を及ぼしていることが推察された。なお、持続的な免疫複合体の形成に伴うと考えられる明らかな炎症性変化や組織沈着による腎障害などは認められなかった。



## Anti-HM1.24 に誘発されたカニクイザルの溶血性貧血の機序に関する検討

カニクイザルにおける前臨床安全性評価において見出された溶血性貧血の病態はヒトにおける自己免疫性溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia: AIHA) に酷似していたことから、ヒトにおいて最も懸念される毒性であると考えられた。この溶血性貧血は通常の臨床検査では発症の兆候を把握することが困難であったこと、発症後に急激な病態の増悪を示したことから、別途溶血性貧血の誘発機序を解明することが、本薬の臨床試験における副作用発現の有無を予測し、患者のリスクを回避する手段を講じる上で重要な課題となった。

すなわち、Anti-HM1.24 が直接的に赤血球に作用して溶血性貧血を誘発した可能性を検証するために、標識 Anti-HM1.24 を用いて赤血球に対する結合性および Anti-HM1.24 添加による赤血球凝集反応の有無を調べた。また、AIHA を発症したことを検証するために、1 ヶ月投与試験の被験動物血清または血漿を用いて、抗赤血球抗体の有無を間接 Coombs 試験で調べ、また抗赤血球抗体が血管内容血を引き起こした可能性を調べるために、補体依存性の溶血性試験を実施した。さらに、自己抗体産生の有無を調べるために、抗 Single stranded DNA 抗体 (抗 ssDNA 抗体) の経時的な変動の有無を調べた。

その結果、FITC あるいは  $^{125}\text{I}$  標識した Anti-HM1.24 はカニクイザルおよびヒトの赤血球膜に対して、特異的な結合は認められなかった。また、これらの標識 Anti-HM1.24 にカニクイザル抗イディオタイプ Anti-HM1.24 抗体を共存させた条件下でも特異的な結合は認められなかった。従って、Anti-HM1.24 が赤血球に特異的に結合して、溶血性貧血の初期要因となった可能性は否定され、ヒトにおいてもその危険性はないと推察された。カニクイザルおよびヒト赤血球浮遊液 (生理食塩液) に高濃度 ( $713 \mu\text{g/mL}$ ) の Anti-HM1.24 を添加すると、*in vitro* で直接的に赤血球を凝集させた。しかし、2 次抗体として抗ヒト IgG を添加しても、この赤血球凝集は増強されなかった。Anti-HM1.24 は赤血球に対して特異的に結合しないことから、直接的な赤血球

凝集の成因は不明であるが、Anti-HM1.24 溶液中に混在(3%>)する多量体や電荷の異なる異性体が関与している可能性も考えられた。一方、生理食塩液の代わりに自己血清を用いて作製した赤血球浮遊液ではカニクイザルおよびヒトとも Anti-HM1.24 添加による赤血球凝集は認められなかったことから、血清成分が直接的な赤血球凝集を回避させ得ることが示唆された。

間接 Coombs 試験において、200mg/kg で溶血性貧血を発症した雌 2 例に加え、発症はみられなかった 20 および 200 mg/kg の雌各 1 例に陽性反応が認められ、赤血球に特異的に結合する IgG 抗体の存在が確認された。また、切迫と殺例では補体の活性化による *in vitro* 溶血反応も認められ、産生された抗赤血球抗体によって血管内溶血が生じた可能性が示唆された。さらに、間接 Coombs 陽性例では抗 ssDNA 抗体が投与後に経時的に増加していた。抗 ssDNA 抗体の測定は自己に対する免疫寛容の破綻により産生される汎自己抗体を検出しているため、直接的に抗赤血球抗体の増加を示すものではないが、抗 ssDNA 抗体が増加した個体が全例とも間接 Coombs で陽性反応が認められたことから、自己免疫性の抗赤血球抗体が産生されていると判断した。一方、切迫と殺例ではない貧血発症個体は投与開始前から非常に高い抗 ssDNA 抗体価を示しており、本例が最も早期に貧血を発症したことおよび免疫反応性の変化が強く認められていたことを勘案すると、潜在的に自己免疫性疾患発症のリスクが高かった個体と考えられる。この個体を供試したことによって、多様な遺伝的背景を有するヒトにおいて自己免疫性の溶血性貧血発症の可能性を予測でき、さらに臨床試験における患者の除外規定を厳しく設定することが出来たことの意義は高いと考えられた。

Anti-HM1.24 のカニクイザルにおける前臨床毒性評価および溶血性貧血の誘発機序検討の成績を総括すると、AIHA の発現機序は以下のように推察される。

Anti-HM1.24 はリンパ球の HM1.24 抗原に結合することにより、B 細胞 (体液性免疫) の活性化亢進に加え、T 細胞 (細胞性免疫) の分化異常を引き起こし、体液性免疫優位の状態に陥らせ、自己反応性の B 細胞の活性化を亢進させる。その様な状況下で、何らかの原因により赤血球膜が自己抗原として認識されたと考えられる。この要因のひとつとして、高濃度の Anti-HM1.24 が赤血球凝集を引き起こし、抗 Anti-HM1.24 抗体が結合したことにより、これらの免疫グロブリンに修飾された赤血球が網内系において抑留され、溶血するか、貪食細胞が抗 Anti-HM1.24 抗体に対する Fc レセプタを介して赤血球を抑留・貪食した可能性が考えられる。これらの過程で赤血球は変形能を失ったり、一部を貪食されることによって異型 (球形・小型) 赤血球が末梢血で増加するとともに、遊離した赤血球膜抗原が活性化された自己反応性の B 細胞により認識され、自己免疫応答が惹起される。その結果、抗赤血球自己抗体が産生され、網内系での血管外溶血の亢進と補体結合による血管内溶血が誘発され、急激な病態の悪化に陥ると考えられる。この推論は AIHA の発症が一般的な特異抗体産生の時期 (投与後 2 週) 以降であり、自己産生の特異抗体 (抗 Anti-HM1.24 抗体や抗赤血球自己抗体) に対する Fc レセプタを介した貪食や補体活性化に伴う除去機構は強力な免疫反応であることと合致する。さらに、Anti-HM1.24 がカニクイザルに対して強い免疫原性を有するために、抗 Anti-HM1.24 抗体を過剰に産生させることがこれらの過程を増長させる因子と推察される。

以上の研究結果から、ヒト型化抗体である Anti-HM1.24 の反復投与により発症したカニクイザルにおける溶血性貧血は、薬物誘発性の自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) と診断され、IgG クラスの抗赤血球自己抗体の産生が主因であると結論した。

Anti-HM1.24 はヒトにおいてカニクイザルと酷似した交差反応性を示すため、ヒトにおいてもカニクイザルと同様にリンパ球の機能異常を誘発し、全身性の自己免疫疾患を惹起する危険は十分に考えられる。また、Anti-HM1.24 はヒト型化されているが、CDR (相補性決定領域) を含む可変領域のアミノ酸配列はマウス型と 80%以上の相同性を保持していることから、ヒトにとってもカニクイザル同様に非自己として認識され、抗 Anti-HM1.24 抗体が過剰に産生される可能性は否定できない。

本薬は根治困難な難病である多発性骨髄腫に対して、前臨床の薬効薬理試験において有効性を示しており、新規の治療薬として患者へ貢献度が期待できるものの、本研究の成果によって、ヒトにおける安全性確保には細心の注意を払う必要があることが明らかとなり、患者の不利益なリスクを回避するために適切な予防手段を講じた臨床試験を計画することが出来た。すなわち、自己免疫性溶血性貧血または全身性エリテマトーデスの既往歴のある患者、あるいは抗核抗体、抗 single stranded DNA 抗体、抗 double stranded DNA 抗体などの自己抗体陽性の患者は被験患者から除外するとともに、免疫毒性 (特に AIHA) のモニタリング指標として、免疫グロブリン (IgG、IgM、IgA、IgE、IgD)、免疫複合体、補体、リンパ球サブセット、抗核抗体、抗 DNA 抗体、直接クームス、血清ハプトグロビンなどの検査を行うこととした。

最後に、本研究によって確立されたカニクイザルにおける種々の免疫毒性学的な検査法は今後多くのバイオテクノロジー医薬品の安全性評価に汎用され、患者における副作用発現の可能性を精度よく予測し、また適切な早期診断項目を設定することによって、医療に有益な新薬を創製し、世界の医学の発展と人々の健康に毒性学分野および獣医学領域から貢献できるものと確信する。

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご指導・ご鞭撻を賜りました麻布大学獣医学部 薬理学研究室 赤堀文昭教授、麻布大学獣医学部 微生物学第一研究室 木内明男教授および麻布大学獣医学部 内科学第二研究室 山田隆紹教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の企画・遂行および評価に多大なご助言・ご指導を頂きました国立感染症研究所筑波医学実験動物用霊長類センター 寺尾恵治先生ならびに自己免疫性溶血性貧血に関する臨床専門医の立場から貴重なご意見を賜りました自治医科大学地域医療学、法医学・人類遺伝学 梶井英治教授に心より深謝いたします。また、本研究の遂行にご協力を頂きました中外製薬株式会社富士御殿場研究所 杉本哲朗博士、小田部耕二博士、横田忠氏、塩田明文氏、渡辺亮介氏、溝口啓二氏、名波雅彦氏および安全性研究部の皆様に御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1 International Conference on Harmonization (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use guideline (2000): “Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals”
- 2 Ono, K., (1999): The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity. *Molecular Immunology*. **36**, 387-395.
- 3 Ozaki, S., Kosaka, M., Wakatsuki, S., Abe, M., Koishihara, Y. and Matsumoto, T. (1997): Immunotherapy of Multiple Myeloma With a Monoclonal Antibody Directed Against a Plasma Cell-Specific Antigen HM1.24 *Blood*. **90**, 3179-3186.
- 4 Ozaki, S., Kosaka, M., Wakahara, Y., Ozaki, Y., Tsuchiya, M., Koishihara, Y., Goto, T. and Matsumoto, T. (1999): Humanized Anti-HM1.24 Antibody Mediates Myeloma Cell Cytotoxicity That Is Enhanced by Cytokine Stimulation of Effector Cells. *Blood*. **93**, 3922-3930.
- 5 Goto, T., Kennel, S.J., Abe, M., Takishita, M., Kosaka, M., Solomon, A. and Saito, S. (1994): A Novel Membrane Antigen Selectively Expressed on Terminally Differentiated Human B Cells. *Blood*. **84**, 1922-1930.
- 6 Watanabe, K., Mizoguchi, K., Otabe, K., Noguchi, N., Shioda, A., Yokota, M., Yoroze, K., Namba, E. and Sugimoto, T. (2000): Single-dose and one-month repeated-dose intravenous toxicity studies of anti-HM1.24 MoAb in cynomolgus monkeys. Internal report, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

- 7 Shioda, A., Yokota, M., Watanabe, R. and Inoue, M. (2000): Cross reactivity testing of anti-HM1.24 using peripheral lymphocytes from several animal species. Internal report, Chugai pharmaceutical Co., Ltd.
- 8 Lawrence, A. (2000): Cross reactivity study of anti-HM1.24 using human and cynomolgus monkey tissues. Internal report, Chugai pharmaceutical Co., Ltd.
- 9 Yoshino, N., Ami, Y., Terao, K., Tashiro, F. and Honda, M. (2000): Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) by using anti-human cross-reactive antibodies. *Exp. Anim.* **49**, 97-110.
- 10 Coligan, JE., Kruisbeck, AM. and Margulies, DH. (1991): *Current protocols in immunology*. New York, Greene publishing associates & Wiley-interscience.
- 11 Verdier, F., Aujoulat, M., Condervaux, F. and Descotes, J. (1995): Determination of lymphocyte subsets and cytokine levels in cynomolgus monkeys. *Toxicology*, **105**, 81-90.
- 12 Yoshino, N., Ami, Y., Terao, K., Tashiro, F. and Honda, M. (2000): Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) by using anti-human cross-reactive antibodies. *Exp. Anim.* **49**, 97-110.
- 13 Waldmann, TA. (1993): The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Immunol Today*. **14**, 264-270.
- 14 Uchiyama, T., Broder, S. and Waldmann, TA. (1981): A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac

- monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J.Immunol*,**126**,1393-1397.
- 15 Uchiyama, T., Nelson, DL., Fleisher, TA. and Waldmann, TA. (1981): A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. II. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells, and on one of two types of helper T cells. *J.Immunol*,**126**,1398-1403.
- 16 Watanabe, K., Mizoguchi, K., Otabe, K., Noguchi, N., Shioda, A., Yokota, M., Yorozu, K., Namba, E. and Sugimoto, T. (2002): Three-month repeated-dose intravenous toxicity studies of anti-HM1.24 MoAb in cynomolgus monkeys. Internal report, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
- 17 Tanizaki, Y., Nakagawa, S. and Kimura, I. (1992): Histamine release and morphological changes in basophilic granulocytes of atopic asthmatics induced by antigen, anti-IgE and Ca ionophore A 23187. *Arerugi*. **41**, 571-576.
- 18 Ishizaka, T., Ishizaka, K., Conrad, DH. and Froese, A.(1978): A new concept of triggering mechanisms of IgE-mediated histamine release. *J Allergy Clin Immunol*. **61**, 320-330.
- 19 Tada, T. (chief translator) (2000): *Immunology illustrated*, (original 5th ed.). pp.158-197, Nankodo, Tokyo. Original, *Immunology* 5th ed. (1998): Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. ed.
- 20 Sasazuki, T. (chief translator) (1998): *Immunobiology*, (original 3rd ed.). pp.197-216, Nankodo, Tokyo. Original, *Immunobiology* 3<sup>rd</sup> ed. (1997): Janeway Jr, CA. and Travers, P. ed.



- 21 Kasakura, S. (ed.)(1997): Cytokine (2<sup>nd</sup> ed., revised). pp. 58, Nihon-Igakukan, Tokyo.
- 22 Ishida, H., Yanagida, H. and Dobashi, H.(1998): Cytokine and autoimmune diseases. *Mebio* **15**, 78-88
- 23 Burns, L.A., Meade, B.J. and Munson, A.E. (1996): Toxic responses of the immune system. In: Klaassen C.D. (ed.): Casarett & Duoll's Toxicology (5<sup>th</sup> ed.), McGraw-Hill, pp355-402.
- 24 Assoku, RK., Hazlett, CA. and Tizard, I.(1979): Immunosuppression in experimental African trypanosomiasis: Polyclonal B-cell activation and mitogenicity of trypanosome-derived saturated fatty acids. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **59**, 298-307.
- 25 Corsini, AC., Clayton, C., Askonas, BA. and Ogilvie, BM.(1977): Suppressor cells and loss of B-cell potential in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Clin. Exp. Immunol.* **29**, 122-131.
- 26 Ishikawa, J., Kaisho, T., Tomizawa, H., Lee, BO., Kobune, Y., Inazawa, J., Oritani, K., Itoh, M., Ochi, T. and Ishihara, K.(1995): Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST-2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics.*, **26**, 527-534.
- 27 Kikuchi, H., Yata, J. and Okumura, Y. (ed.) (1997): Annual Review Immunology 1998. Chugai Igaku Co., Tokyo, pp. 93-99.
- 28 Cornacoff, J.B., Hebert, L.A., Smead, W.L. and VanAman, M.E. (1983): Primate erythrocyte immune complex cleaning mechanism. *J. Clin. Invest.*, **71**, 236-247.
- 29 Emlen, W., Carl, V. and Burdick, G. (1992): Mechanism of transfer of immune complexes from red blood cell CR1 to monocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, **89**, 8-17.

- 30 Waxman, FJ., Hebert, LA., Cornacoff, JB., VanAman, ME., Smead, WL., Kraut, EH., Birmingham, DJ. And Taguian, JM. (1984): Complement depletion accelerates the clearance of immune complexes from the circulation of primates. *J Clin Invest.* **74**, 1329-1340.
- 31 Kajii, E., Miura, Y. and Ikemoto, S. (1991): Characterization of Autoantibodies in Mixed-Type Autoimmune Hemolytic Anemia. *Vox Sang.*, **60**, 45-52.
- 32 Cacie, J.V. (1975): Autoimmune hemolytic anemia. *Archs. Intern. Med.*, **135**, 1293-1300.
- 33 Flaherty, T. and Geary, C.G. (1979): Autoimmune hemolytic anemia. *Br. J. Hosp. Med.*, **14**, 334-345.
- 34 Foerster, J. (1993): Autoimmune hemolytic anemias. In *Wintrobe's Clinical Hematology* (Lee G.R., et al., ed.), 9th ed., pp. 1170-1193, Lea and Febiger, Philadelphia, London.
- 35 Takaki, S., Moon, B. and Takatsu, K. (2000): Regulation of B-1 cell function by cytokines. In *Immunology 1999-2000* (Kishimoto C. ed.), pp.120-128, Nakayama Shoten, Tokyo.
- 36 Hayakawa, K., Hardy, RR., Herzenberg, LA and Herzenberg, LA.(1985): Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med.* **161**, 1554-1568.
- 37 Solvason, N., Chen, X., Shu, F. and Kearney, JF.(1992): The fetal omentum in mice and humans. A site enriched for precursors of CD5 B cells early in development. *Ann N Y Acad Sci.* **651**, 10-20.
- 38 Haughton, G., Arnold, LW., Whitmore, AC. and Clarke, SH.(1993): B-1 cells are made, not born. *Immunol Today.* **14**, 84-87.
- 39 Arnold, LW., Pennell, CA., McCray, SK. and Clarke, SH.(1994): Development of B-1 cells: segregation of phosphatidyl choline-specific B cells to the B-1 population occurs after

- immunoglobulin gene expression. *J Exp Med.* **179**, 1585-1595.
- 40 Clarke, SH. and Arnold, LW.(1998): B-1 cell development: evidence for an uncommitted immunoglobulin (Ig)M+ B cell precursor in B-1 cell differentiation. *J Exp Med.* **187**, 1325-1334.
- 41 Murakami, M., Tsubata, T., Okamoto, M., Shimizu, A., Kumagai, S., Imura, H. and Honjo, T.(1992): Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice. *Nature.* **357**, 77-80.
- 42 Murakami, M., Nakajima, K., Yamazaki, K., Muraguchi, T., Serikawa, T. and Honjo, T.(1997): Effects of breeding environments on generation and activation of autoreactive B-1 cells in anti-red blood cell autoantibody transgenic mice. *J Exp Med.* **185**, 791-794.
- 43 Wurflein, D., Dechant, M., Stockmeyer, B., Tutt, AL., Hu, P., Repp, R., Kalden, JR., van de Winkel, JG., Epstein, AL., Valerius, T., Glennie, M. and Gramatzki, M. (1998): Evaluating antibodies for their capacity to induce cell-mediated lysis of malignant B cells. *Cancer Res.* **58**, 3051-3058.
- 44 Dallegri, F. and Ottonello, L. (1992): Neutrophil - mediated cytotoxicity against tumor cells: state of art. *Archivum Imm.* **40**, 39-42.
- 45 Ito, T., Chatani, F., Sasaki, S., Ando, T. and Miyajima, H. (1992): Spontaneous lesions in cynomolgus monkeys used in toxicity studies. *Exp Anim.* **41**, 455-469.
- 46 Shimoi, A. (1998): Comparison of spontaneous minor lesions in wild-caught and laboratory-bred monkeys. *J Toxicol Pathol.* **11**, 85-94.
- 47 Matsumoto, J., Kawai, S., Terao, K., Kirinoki, M., Yasutomi, Y., Aikawa, M. and Matsuda,

- H. (2000): Malaria infection induces rapid elevation of the soluble fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of *Macaca* monkeys to *Plasmodium coatneyi* infection. *Infection and immunity*. **68**, 1183-1188.
- 48 Takase, K. (1987): Practical analysis of lymphocyte cell-surface antigens using FCM (flow cytometry). *Clinical Immunology*, **19** (Suppl. 12), 19-27.
- 49 Suzuki, H. (1984): Antiglobulin test. *Nippon Rinsho*, **42**, Spring Special Edition. 1404-1408.
- 50 Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W. (1994): CH50 Assay For Total Classical Pathway Hemolytic Activity. In *Current Protocols in Immunology* (Coico, R. ed.), Vol. 3, Chap. 13, pp. 1-26, John Wiley and Sons, New Jersey.
- 51 Komine, M. (1995): Microdetection method of erythrocyte-binding immunoglobulin. *Clinical Examination* **39**, 798-804.
- 52 Kawakita, M., (1992): Three cases of negative Coombs' AIHA diagnosed by flow cytometry. Ministry of Health and Welfare. Designated disease - idiopathic hematopoiesis disorder study group. Heisei-3 Report pp.146-147.
- 53 Lapiere, Y., Rigal, D., Adam, D., Josef, D., Meyer, F., Greber, S. and Drot, C. (1989): The gel test : a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion*, **30**, 109-113.
- 54 Laffr, E.M. and Rauch, J (1981): Polyspecific monoclonal lupus antoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J. Exp. Med.*, **153**, 897-909.
- 55 Suzuki, J., Gotoh, S., Miwa, N., Terao, K. and Nakayama, H. (2000): Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) in an infant rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol*. **29**, 88-94.

- 56 Watanabe, K., Matsuzawa, T., Misawa, Y., Mishima, M., Namba, E., Hara, T. and Marutani, K. (1997): One-month repeated-dose intravenous toxicity studies of rhIgG<sub>1</sub> MoAb in cynomolgus monkeys. Internal report, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
- 57 Fagiolo, E. and Abenante, L. (1996): Lymphocyte Activation and cytokine production in autoimmune haemolytic anaemia (AIHA). *Autoimmunity*. **24**, 147-156.
- 58 Fagiolo, E. and Toriani-Terenzi, C. (2002): Th1 and Th2 cytokine modulation by IL-10/IL-12 imbalance in autoimmune haemolytic anaemia (AIHA). *Autoimmunity*. **35**, 39-44.
- 59 Toriani-Terenzi, C., Pozzetto, U., Bianchi, M. and Fagiolo, E. (2002): Cytokine network in autoimmune haemolytic anaemia: new probable targets for therapy. *Cancer Detect Prev*. **26**, 292-298.
- 60 Jeje, MO., Blajchman, MA., Steeves, K., Horsewood, P. and Kelton, JG. (1984): Quantitation of red cell-associated IgG using an immunoradiometric assay. *Transfusion*. **24**, 473-476.

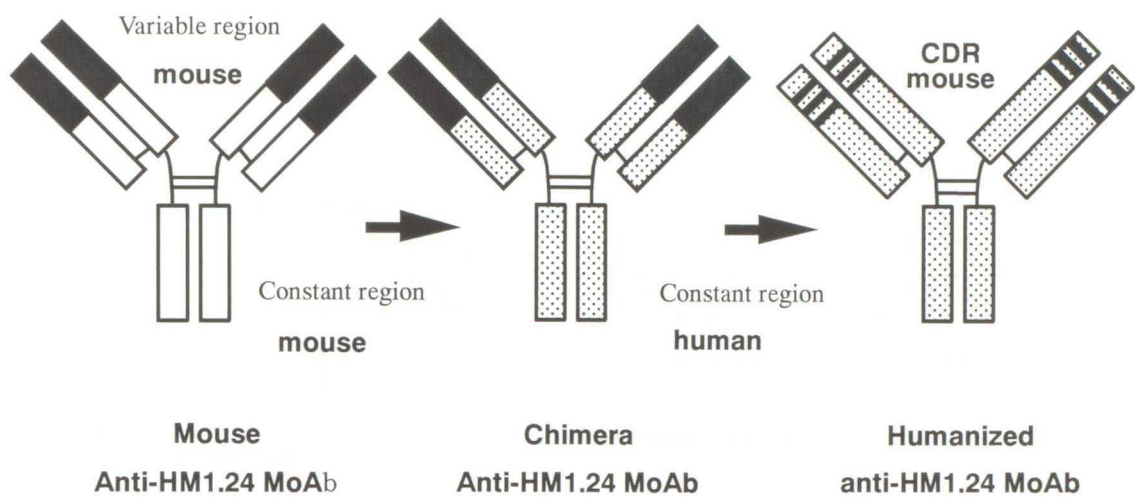


Fig. 1	Humanized of Anti-HM1.24 monoclonal antibody (Anti-HM1.24 MoAb).....	71
Fig. 2	Experimental schedule of the single-dose and the one-month repeated dose intravenous toxicity of Anti-HM1.24 in cynomolgus monkeys .....	72
Fig. 3	Diagrams of ELISA assay for Anti-HM1.24 and Anti-“Anti-HM1.24” antibody .....	73
Fig. 4	Plasma concentration of Anti-HM1.24 in the single-dose intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys.....	74
Fig. 5	Plasma concentration of Anti-“Anti-HM1.24” antibody in the single-dose intravenous toxicity study using cynomolgus monkeys .....	74
Fig. 6	Plasma concentration of Anti-HM1.24 in male monkeys in the one month intravenous toxicity study.....	75
Fig. 7	Plasma concentration of Anti-HM1.24 in female monkeys in the one month intravenous toxicity study.....	75
Fig. 8	Plasma concentration of Anti-“Anti-HM1.24” antibody in male monkeys in the one month toxicity study .....	76
Fig. 9	Plasma concentration of Anti-“Anti-HM1.24” antibody in female monkeys in the one month toxicity study.....	76
Fig. 10	Percentage of CD4 single positive (CD4 SP), CD8 single positive (CD8 SP), CD4&CD8 double positive (DP), CD4&CD8 double negative (DN) cells and the percentage ratio of CD8 / CD4 positive cell in the thymus lymphocytes of the cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month. ....	77
Fig. 11	Percentage ratio of CD2 / CD20 positive cells in the spleen lymphocytes stimulated	

by Con A in the female cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month.	78
Fig. 12 Percentage of CD25 positive (CD25+), CD20&CD25 double positive (CD20+) and CD2&CD25 double positive (CD2+) cells in the spleen lymphocytes stimulated for 72-96 hrs by Con A in the female cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month.	79
Fig. 13 Effects of Anti-HM1.24 pre-treatment on percentage of CD25 positive (CD25+), CD20&CD25 double positive (CD20/25+) and CD2&CD25 double positive (CD2/25+) cells of the spleen lymphocytes stimulated for 72 hrs by Con A in the untreated cynomolgus monkeys.	80
Fig. 14 Schematic structure of typical lymphoid tissues include spleen, lymph node, tonsilla and gut associated lymphoid tissue (GALT)	81
Fig. 15 Schematic histopathological characteristic of normal, Type I, Type II and Type III lesions in the splenic white pulp.	82
Fig. 16 Estimated affects of Anti-HM1.24 on lymphocyte T-cell differentiation and B-cell activation in cynomolgus monkeys.	83
Fig. 17 Hypothesis of manifestation of the immune hemolytic anemia	84
Fig. 18 ELISA assay for anti-single stranded DNA antibodies in cynomolgus monkeys	84
Fig. 19 Flow cytometric analysis of FITC-labeled Anti-HM1.24 (solid line; bold) and FITC-labeled human IgG <sub>1</sub> (dotted line; light) using lymphocytes or erythrocytes in human and cynomolgus monkeys.	85
Fig. 20 Flow cytometric analysis of FITC-labeled Anti-HM1.24 (solid line; bold) and FITC-labeled human IgG <sub>1</sub> (dotted line; light) using KPMM2 and ARH-77 cells.	85
Fig. 21 Erythrocyte agglutination test of Anti-HM1.24 and recombinant human IgG <sub>1</sub> using	

cynomolgus monkey erythrocytes.....	86
Fig. 22 Erythrocyte agglutination test of Anti-HM1.24 and recombinant human IgG <sub>1</sub> using human erythrocytes.....	86
Fig. 23 in vitro hemolysis assay activated by guinea pig's serum using untreated male erythrocytes for the sera of female cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month .....	87
Fig. 24 in vitro hemolysis assay activated by guinea pig's serum using untreated female erythrocytes for the sera of female cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month. ....	88
Fig. 25 Time course plotting of anti-single stranded-DNA antibody production in the plasma of male cynomolgus monkeys that were treated with Anti-HM1.24 over a one month period.....	89
Fig. 26 Time course plotting of anti-single stranded-DNA antibody production in the plasma of female cynomolgus monkeys that were treated with Anti-HM1.24 over a one month period.....	90





**Fig. 1 Humanized of Anti-HM1.24 monoclonal antibody (Anti-HM1.24 MoAb)**

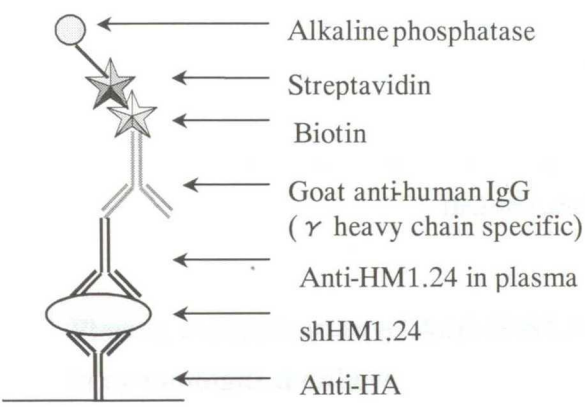
Single dose toxicity study

	-13	-4	0	1	4	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	85	92	112
Administration			○																
Hematology Biochemistry	○			○		○	○						○					○	○
Electrocardiogram Body temperature		○	○																
Toxicokinetics Antibody		○	○	○	○	○	○	○	○		○		○		○		○		○
Necropsy																			Not perform

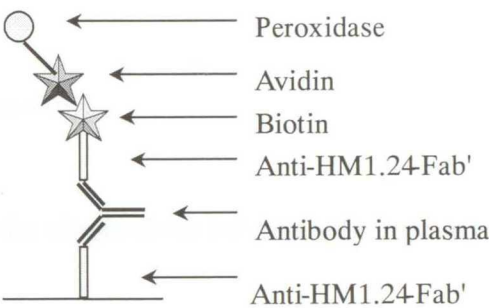
One month repeated dose toxicity study

	← Days of administration →										← Days of withdrawal →								
	-18	-6	0	3	7	10	14	17	21	24	28	8	15	22	29	36	43	50	57
Administration			○	○	○	○	○	○	○	○									
Urinalysis	○									○					○				
Hematology Biochemistry	○	○					○		○		○	○	○		○		○		○
Electrocardiogram Ophthalmology		○	○						○						○				
Toxicokinetics Antibody			○	○		○		○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Necropsy											○								○

Fig. 2 Experimental schedule of the single-dose and the one-month repeated dose intravenous toxicity of Anti-HM1.24 in cynomolgus monkeys

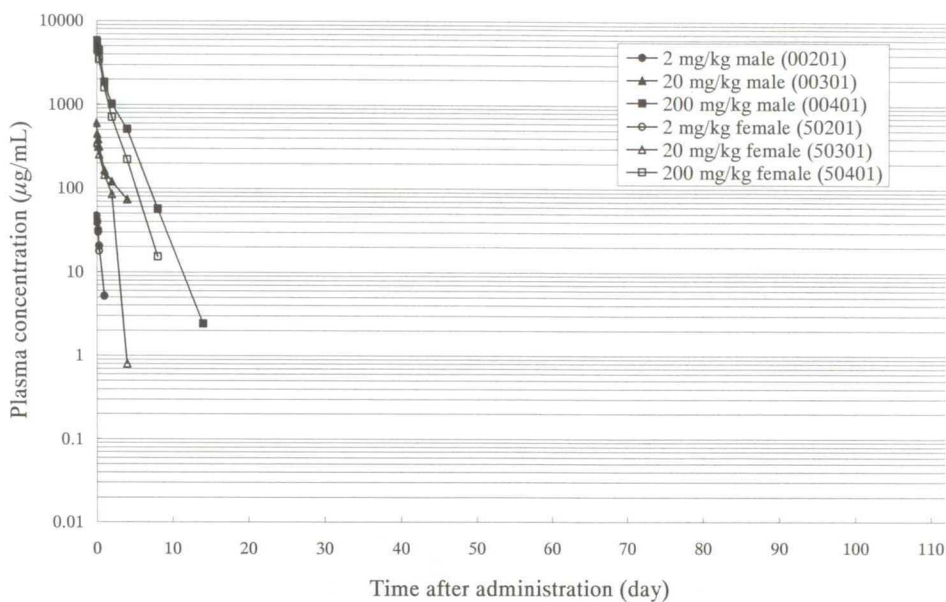


**Anti-HM1.24**

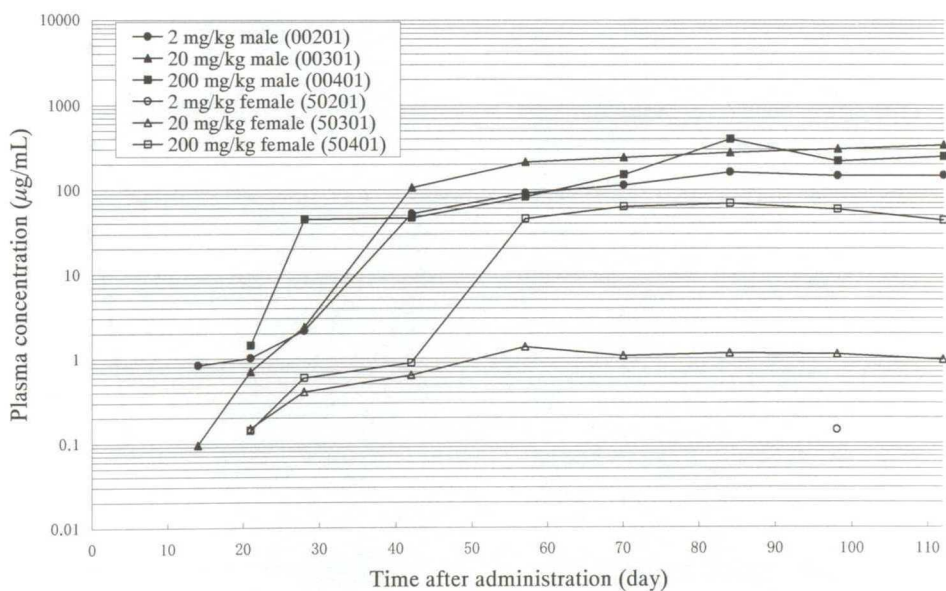


**Anti-"Anti-HM1.24" antibody**

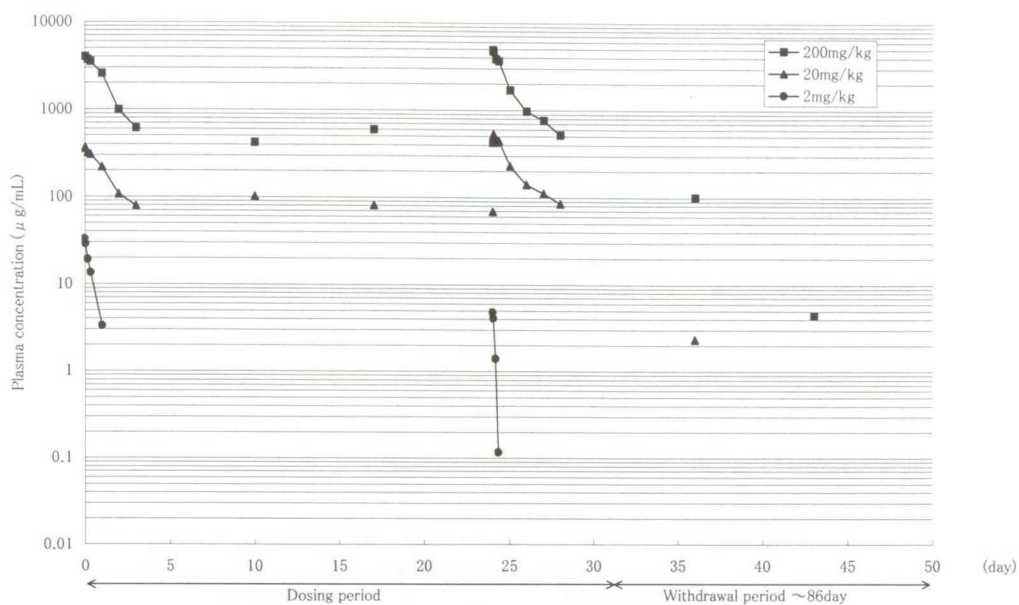
**Fig. 3 Diagrams of ELISA assay for Anti-HM1.24 and Anti-"Anti-HM1.24" antibody**



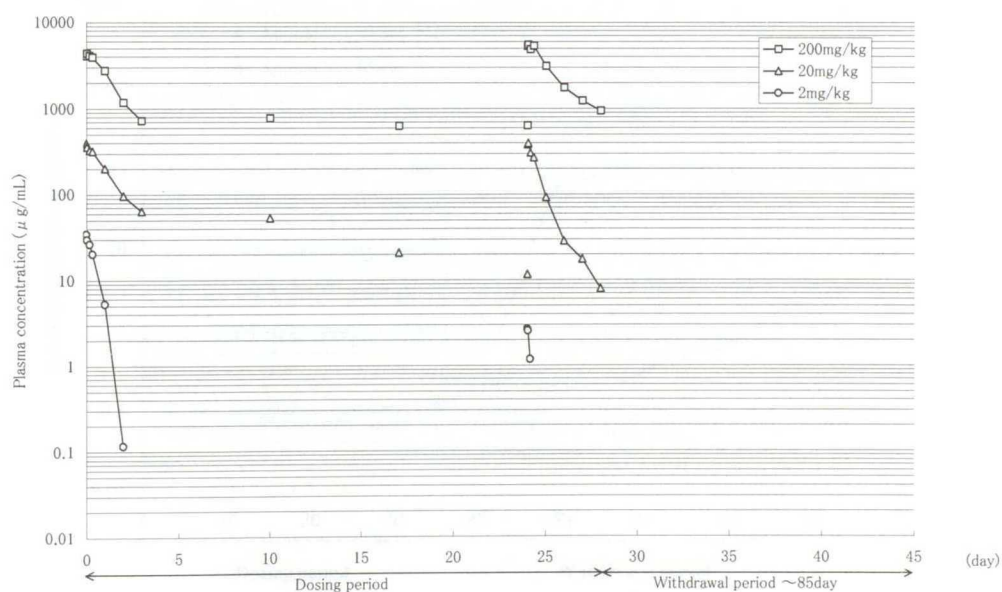
**Fig. 4 Plasma concentration of Anti-HM1.24 in the single-dose intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys**



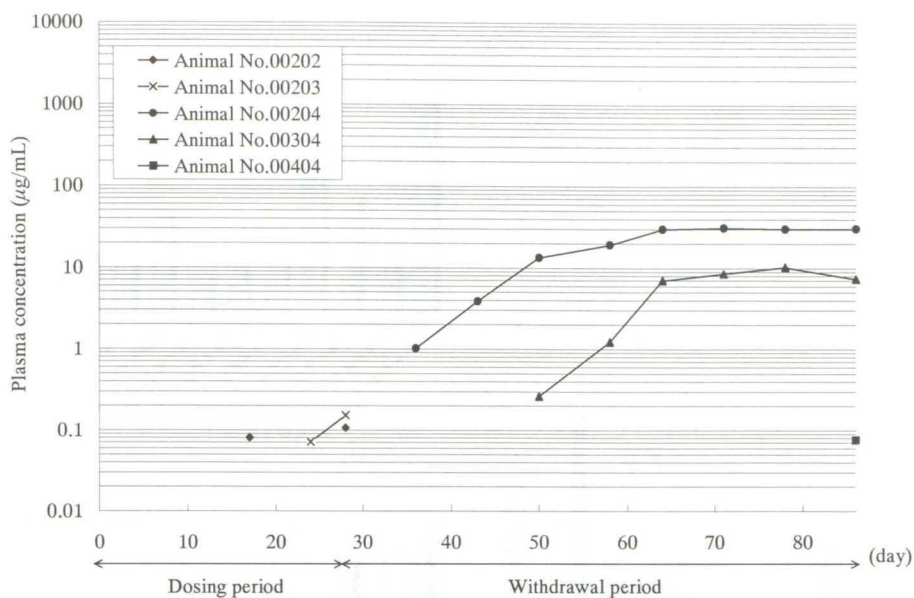
**Fig. 5 Plasma concentration of Anti-‘Anti-HM1.24’ antibody in the single-dose intravenous toxicity study using cynomolgus monkeys**



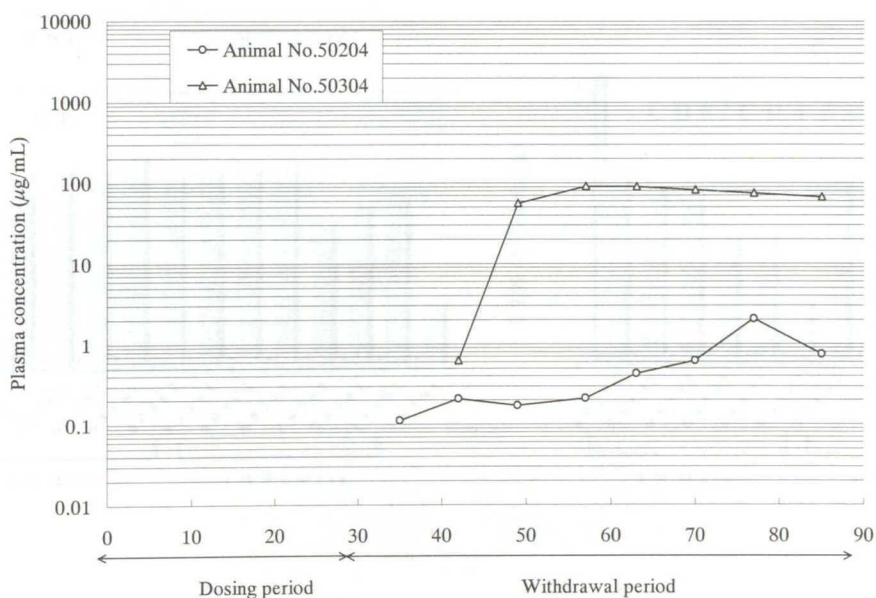
**Fig. 6 Plasma concentration of Anti-HM1.24 in male monkeys in the one month intravenous toxicity study**



**Fig. 7 Plasma concentration of Anti-HM1.24 in female monkeys in the one month intravenous toxicity study**

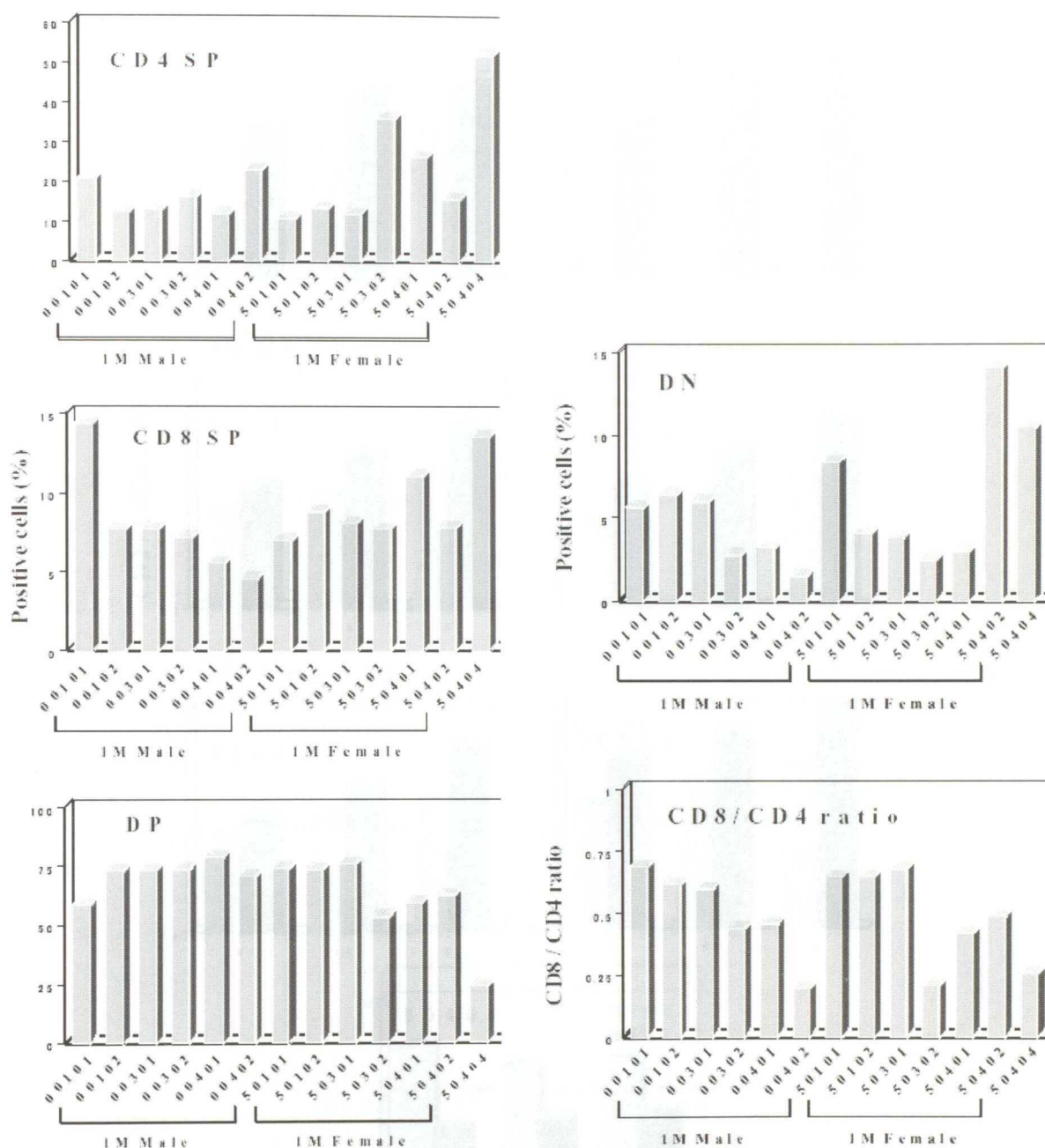


**Fig. 8 Plasma concentration of Anti-“Anti-HM1.24” antibody in male monkeys in the one month toxicity study**

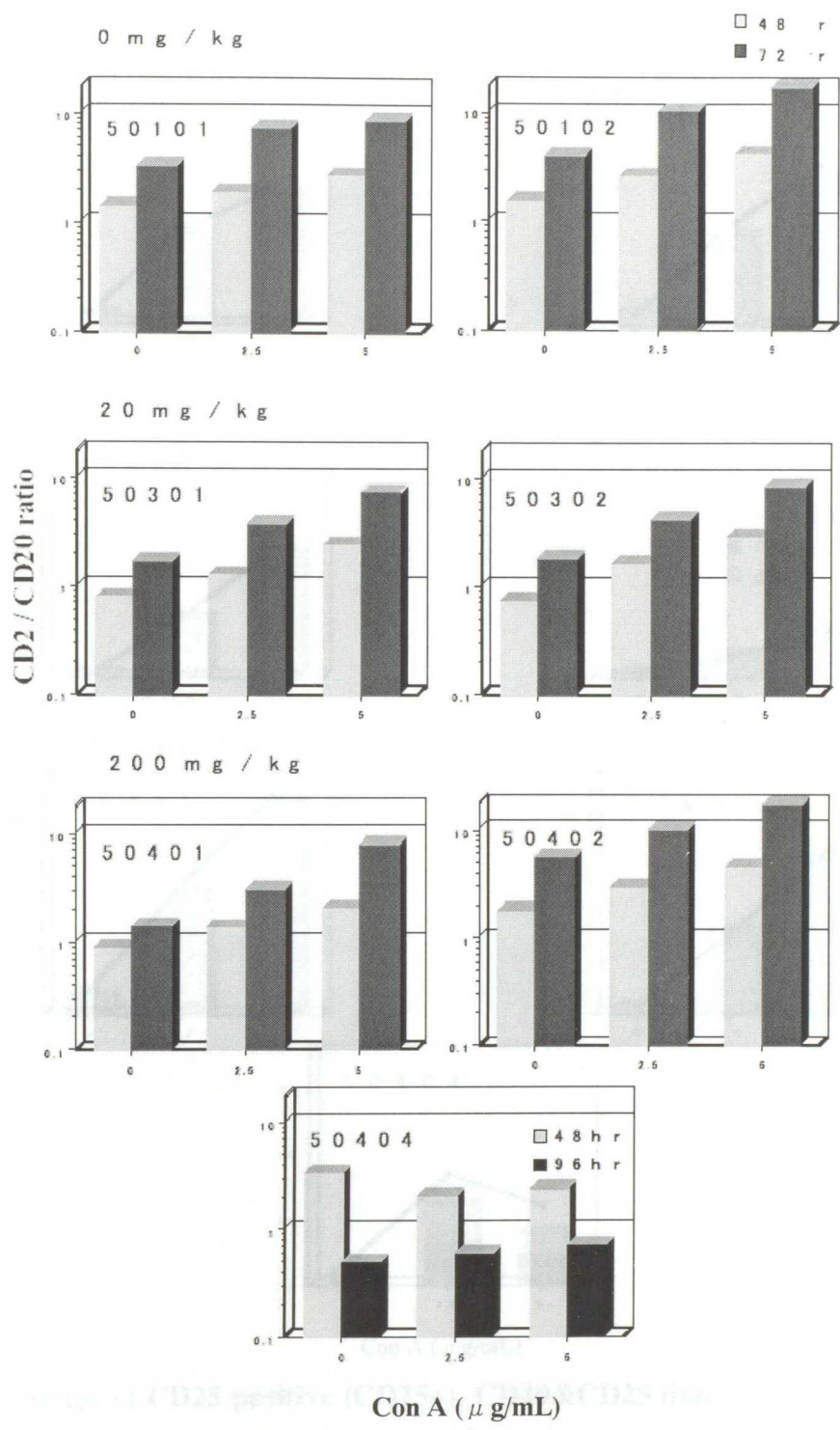


**Fig. 9 Plasma concentration of Anti-“Anti-HM1.24” antibody in female monkeys in the one month toxicity study**



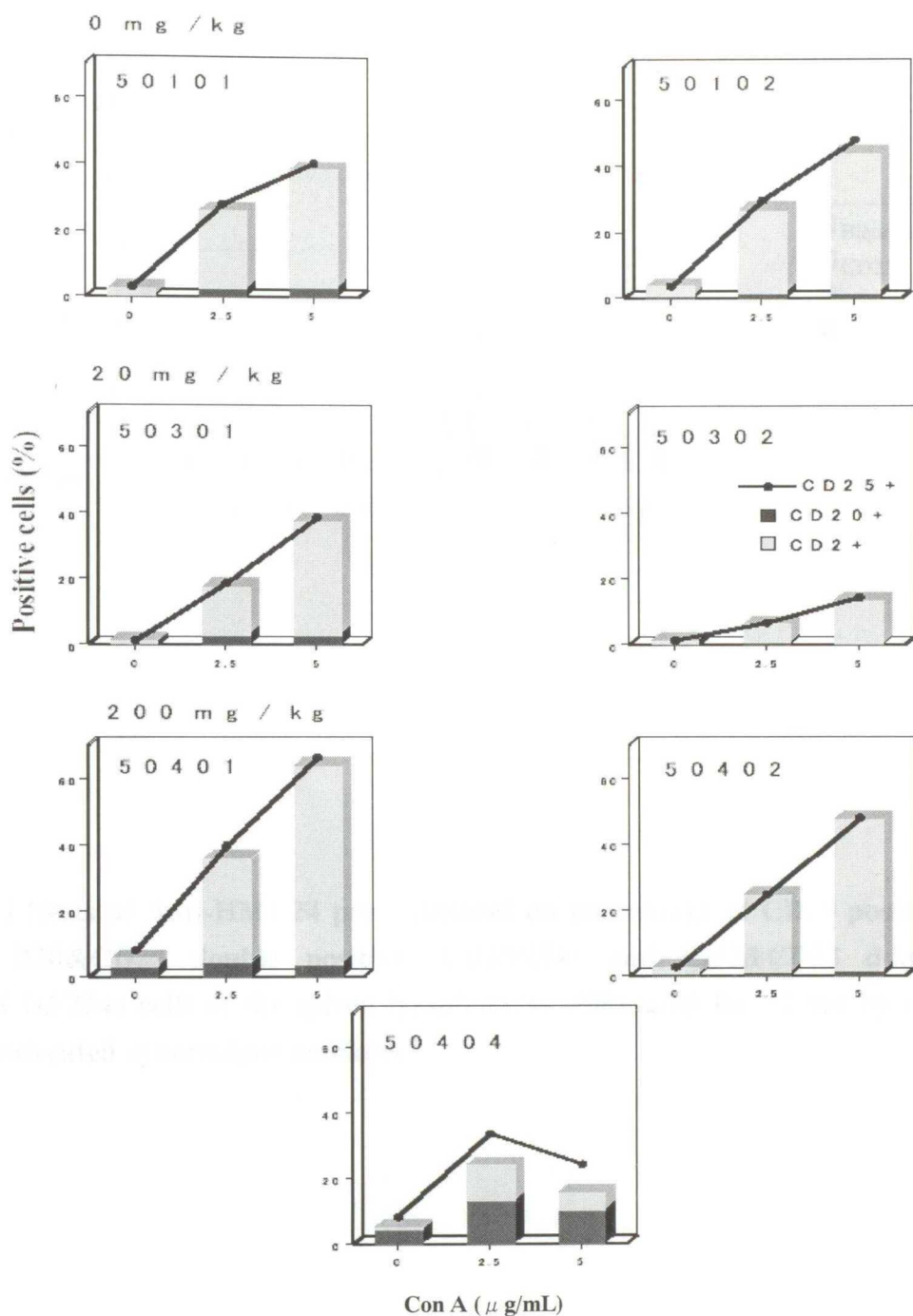


**Fig. 10** Percentage of CD4 single positive (CD4 SP), CD8 single positive (CD8 SP), CD4&CD8 double positive (DP), CD4&CD8 double negative (DN) cells and the percentage ratio of CD8 / CD4 positive cell in the thymus lymphocytes of the cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month.

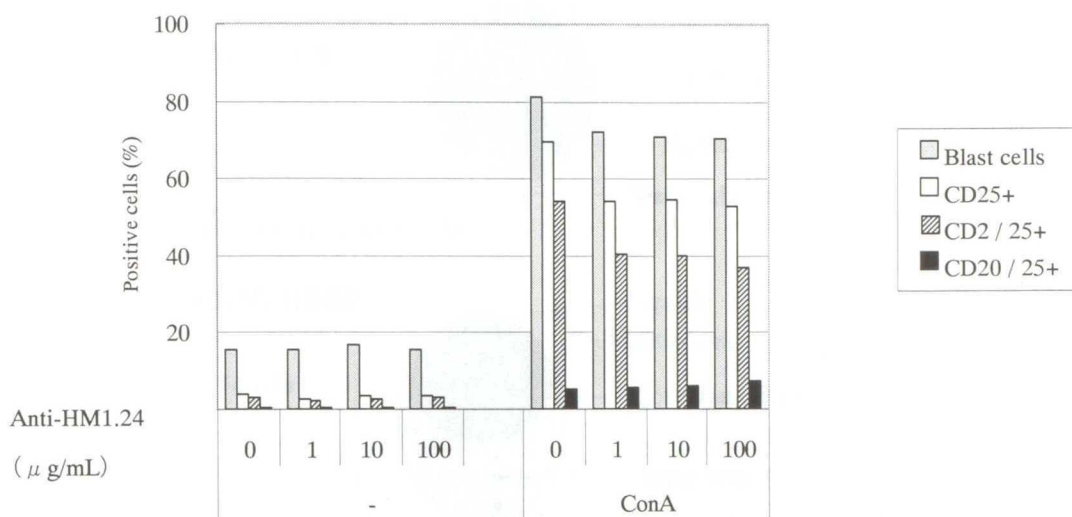


**Fig. 11** Percentage ratio of CD2 / CD20 positive cells in the spleen lymphocytes stimulated by Con A in the female cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month.

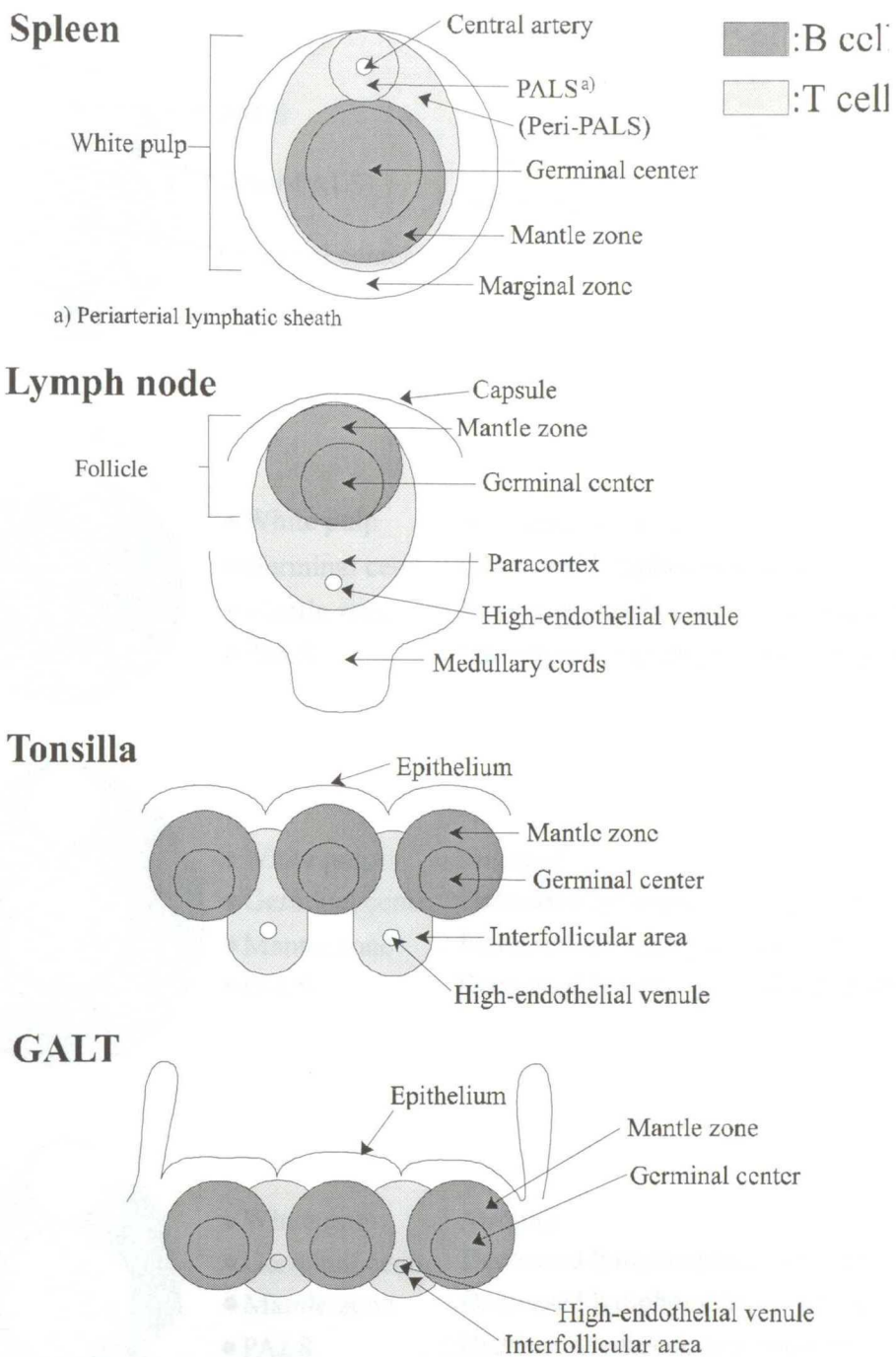




**Fig. 12** Percentage of CD25 positive (CD25+), CD20&CD25 double positive (CD20+) and CD2&CD25 double positive (CD2+) cells in the spleen lymphocytes stimulated for 72-96 hrs by Con A in the female cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month.

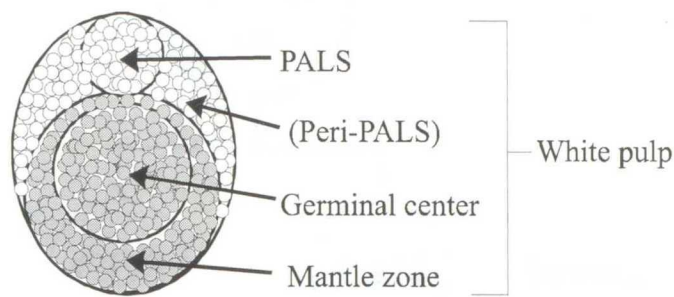


**Fig. 13** Effects of Anti-HM1.24 pre-treatment on percentage of CD25 positive (CD25+), CD20&CD25 double positive (CD20/25+) and CD2&CD25 double positive (CD2/25+) cells of the spleen lymphocytes stimulated for 72 hrs by Con A in the untreated cynomolgus monkeys



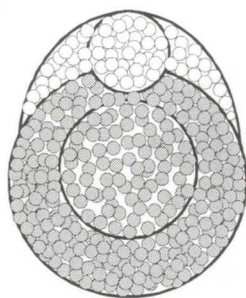
**Fig. 14 Schematic structure of typical lymphoid tissues include spleen, lymph node, tonsilla and gut associated lymphoid tissue (GALT)**

Normal



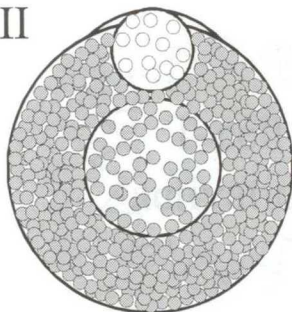
●:B cell  
○:T cell

I



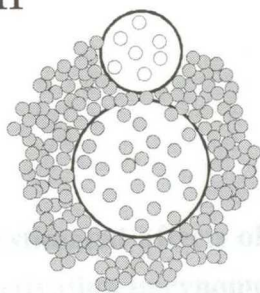
- White pulp : No change/enlarged
- Germinal center : Decreased lymphocytes, no change/slight
- Mantle zone : Increased lymphocytes, no change/slight
- PALS : Decreased lymphocytes, no change/slight

II



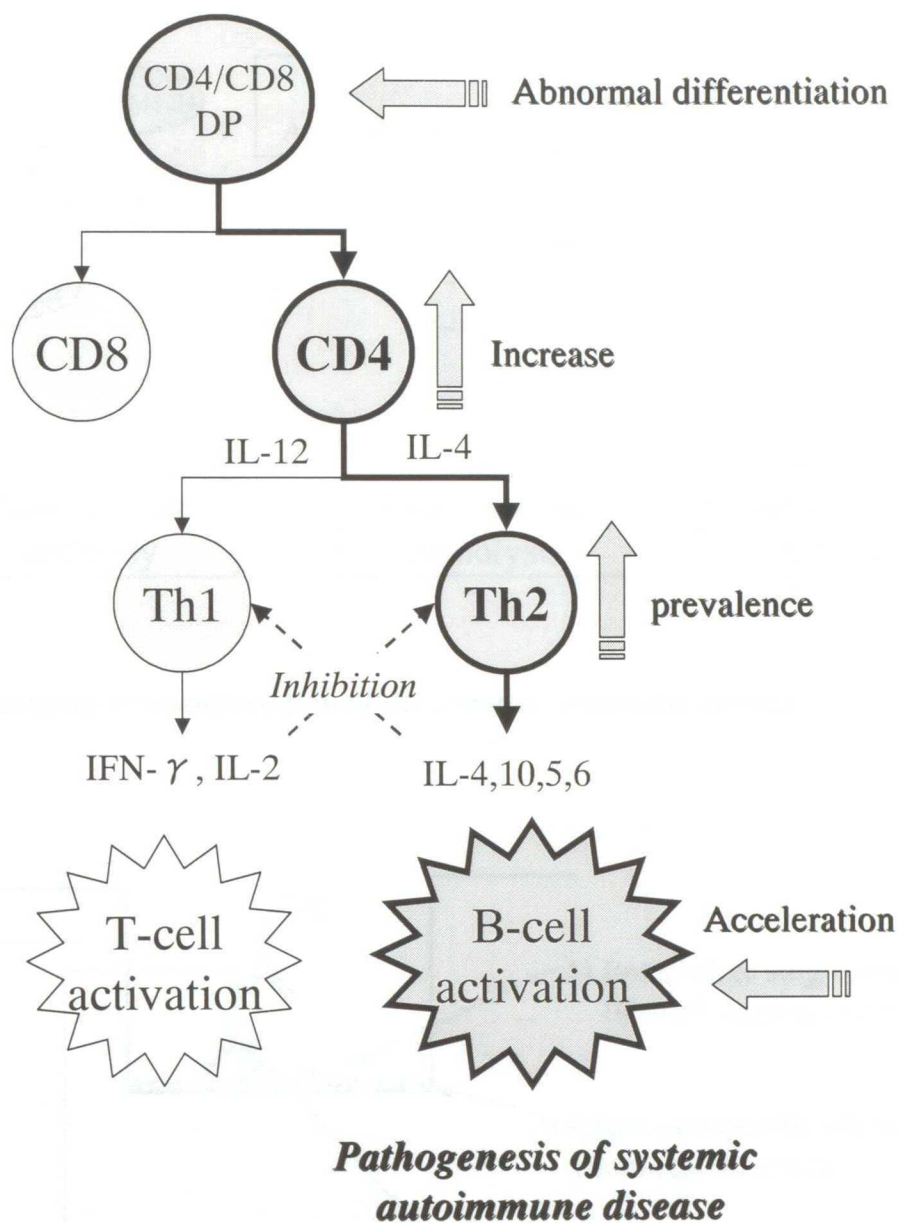
- White pulp : Enlarged
- Germinal center : Decreased lymphocytes, slight/moderate
- Mantle zone : Increased lymphocytes, moderate
- PALS : Decreased lymphocytes, slight/moderate

III



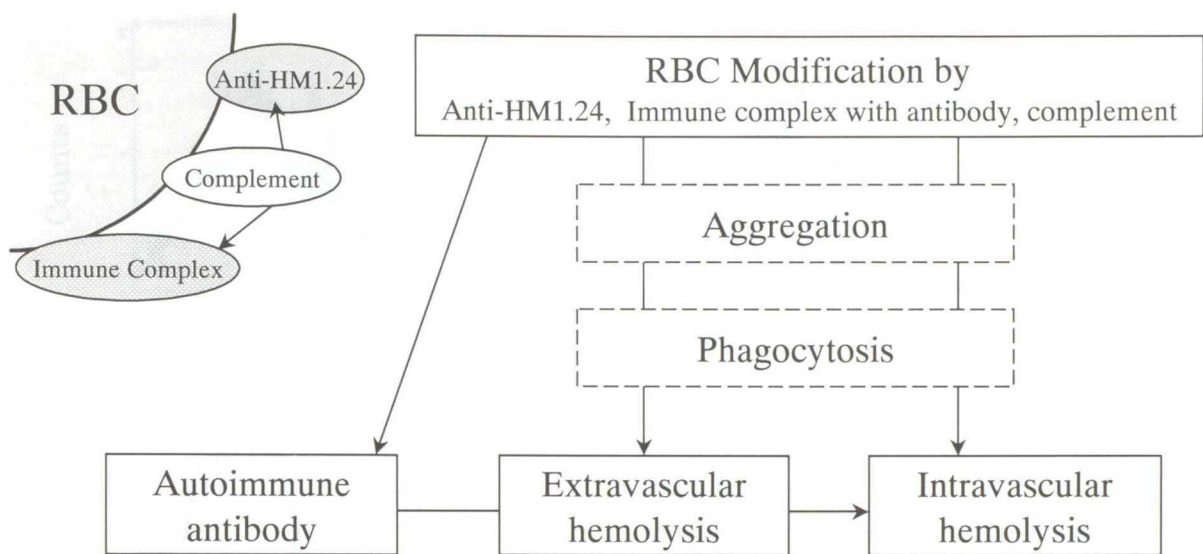
- White pulp : Atrophy
- Germinal center : Decreased lymphocytes, moderate
- Mantle zone : Decreased lymphocytes, no change/slight
- PALS : Decreased lymphocytes, moderate

**Fig. 15 Schematic histopathological characteristic of normal, Type I, Type II and Type III lesions in the splenic white pulp**

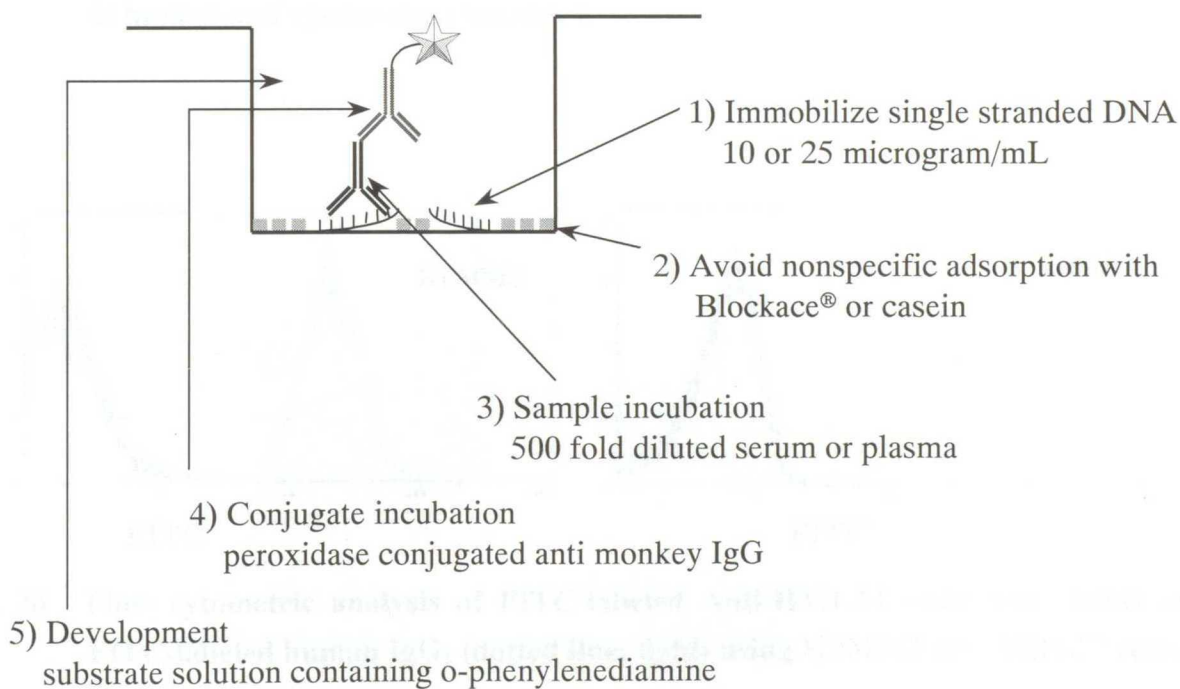


**Fig. 16** Estimated affects of Anti-HM1.24 on lymphocyte T-cell differentiation and B-cell activation in cynomolgus monkeys

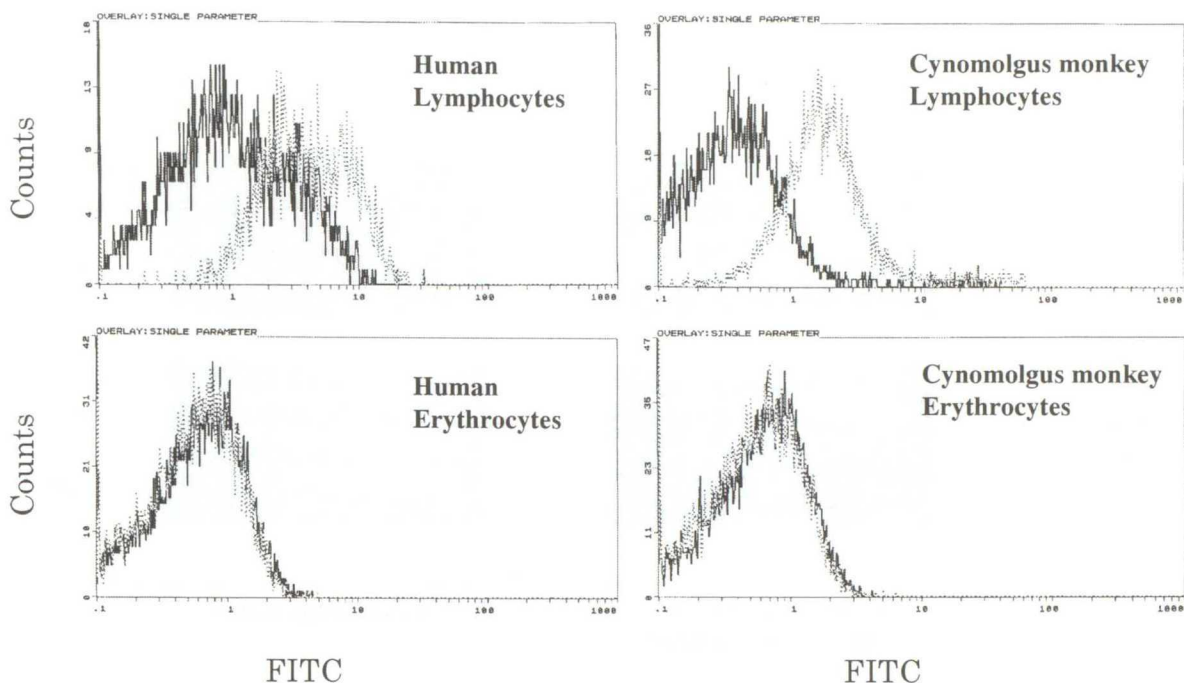




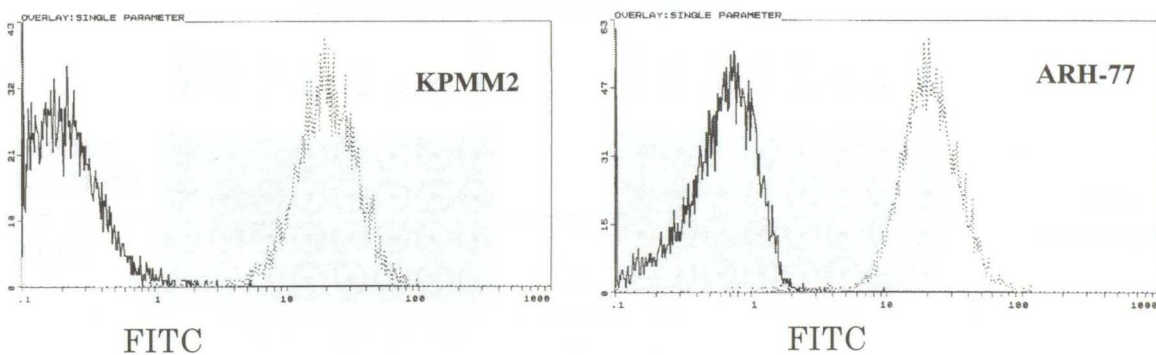
**Fig. 17 Hypothesis of manifestation of the immune hemolytic anemia**



**Fig. 18 ELISA assay for anti-single stranded DNA antibodies in cynomolgus monkeys**

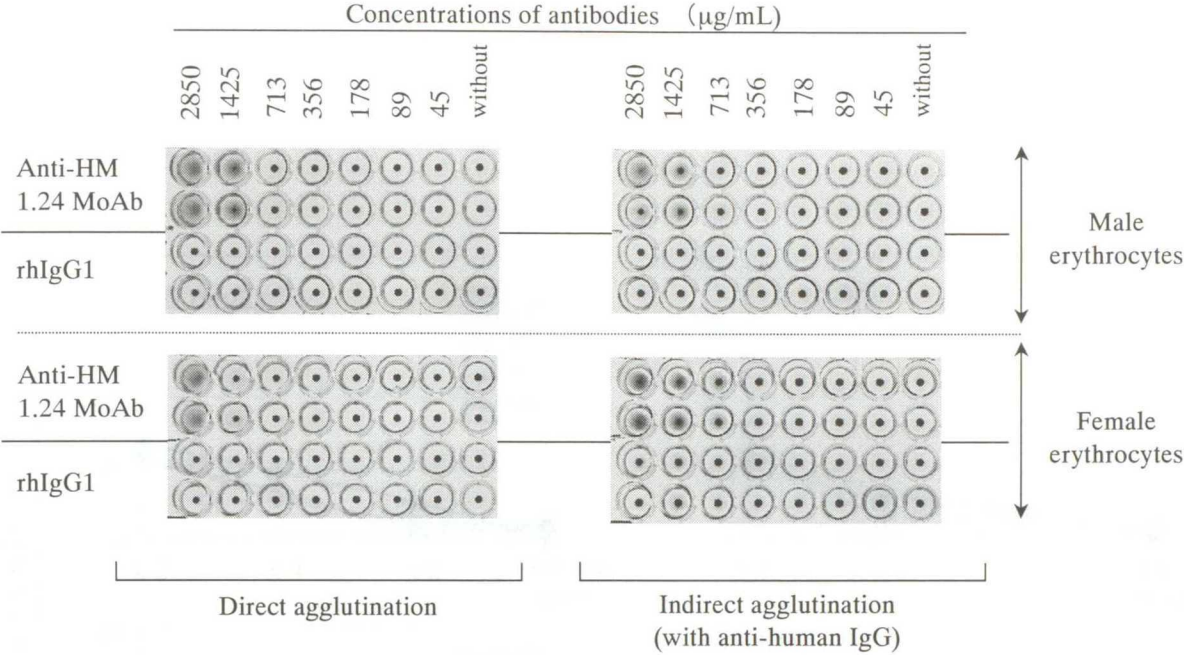


**Fig. 19** Flow cytometric analysis of FITC-labeled Anti-HM1.24 (solid line; bold) and FITC-labeled human IgG<sub>1</sub> (dotted line; light) using lymphocytes or erythrocytes in human and cynomolgus monkeys.

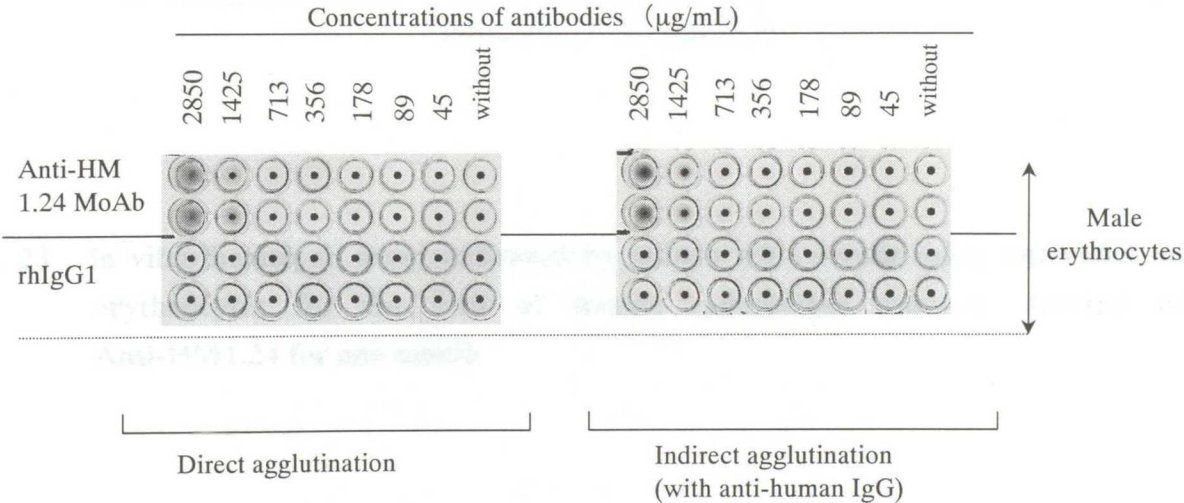


**Fig. 20** Flow cytometric analysis of FITC-labeled Anti-HM1.24 (solid line; bold) and FITC-labeled human IgG<sub>1</sub> (dotted line; light) using KPM2 and ARH-77 cells.

**Fig. 22** Erythrocyte agglutination test of Anti-HM1.24 and human IgG<sub>1</sub> versus 3.5% sodium citrate solution.

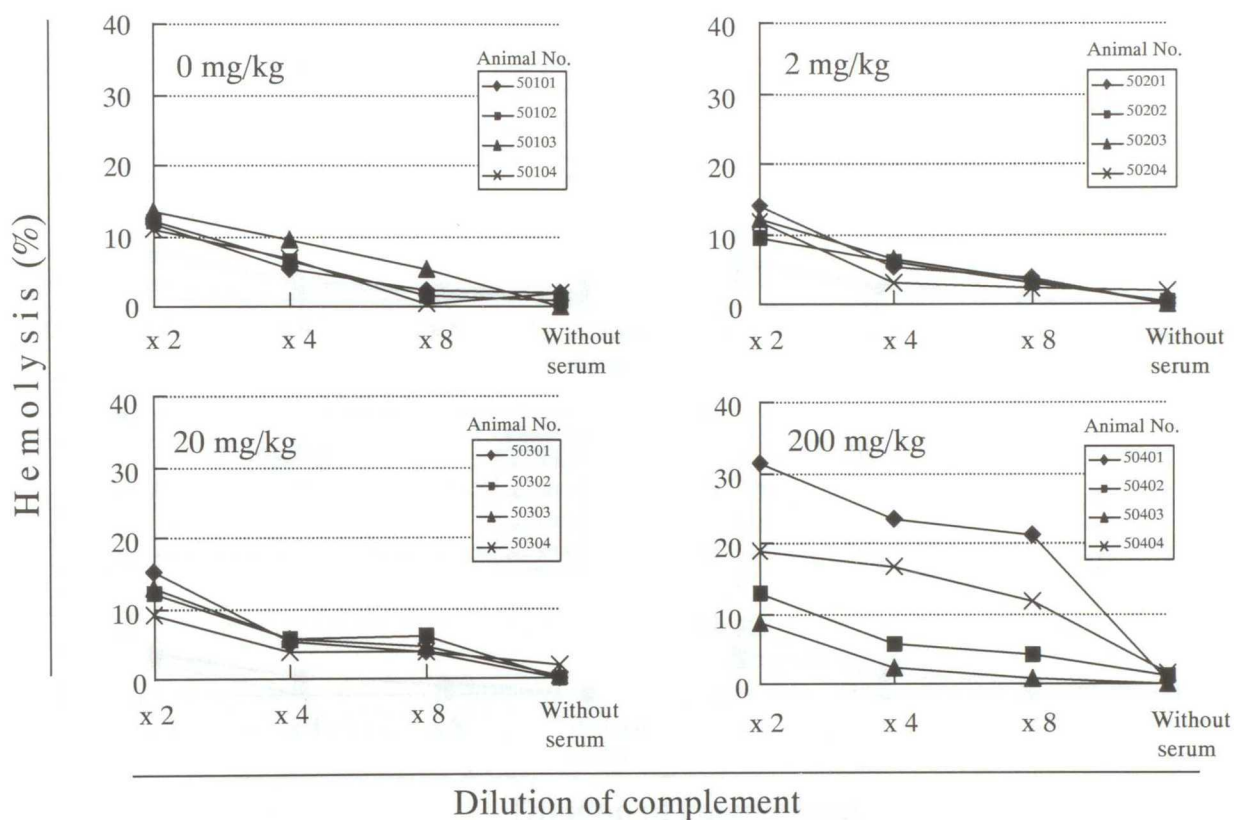


**Fig. 21 Erythrocyte agglutination test of Anti-HM1.24 and recombinant human IgG<sub>1</sub> using cynomolgus monkey erythrocytes**

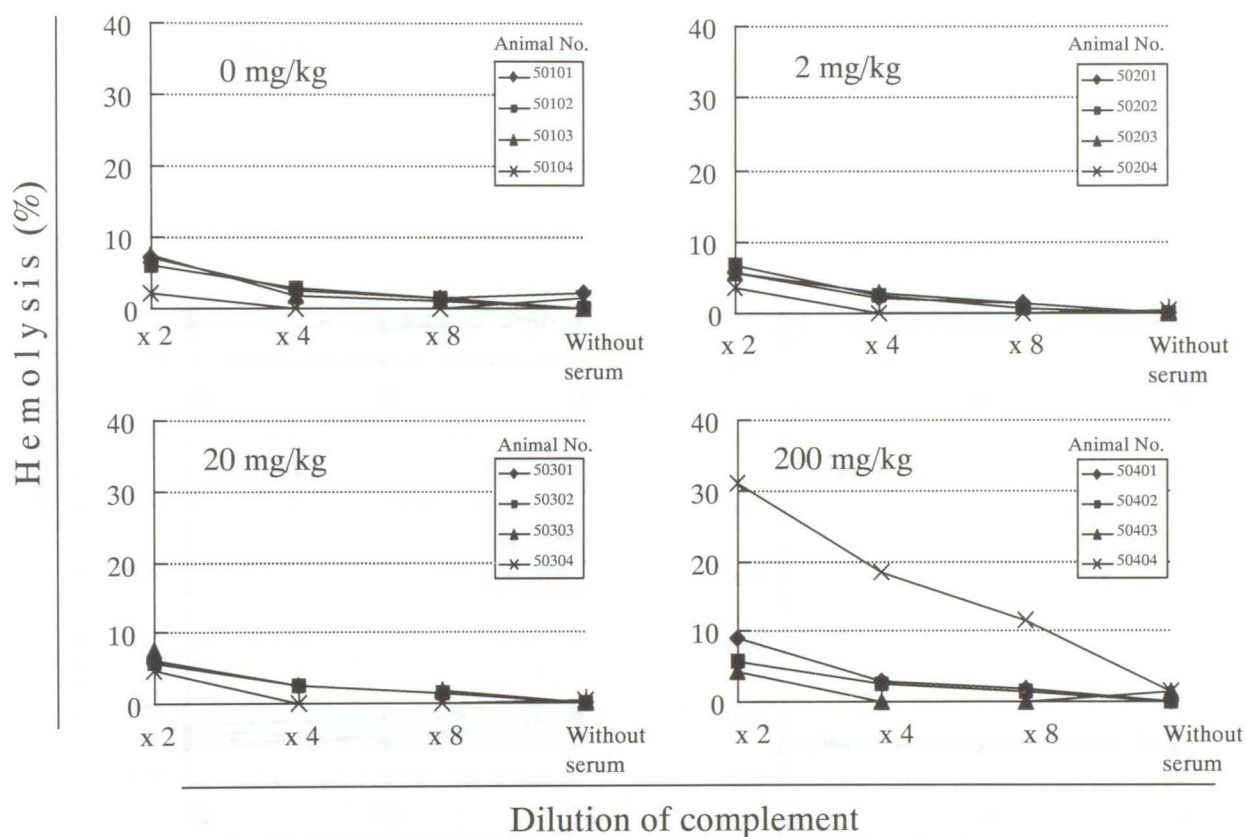


**Fig. 22 Erythrocyte agglutination test of Anti-HM1.24 and recombinant human IgG<sub>1</sub> using human erythrocytes**

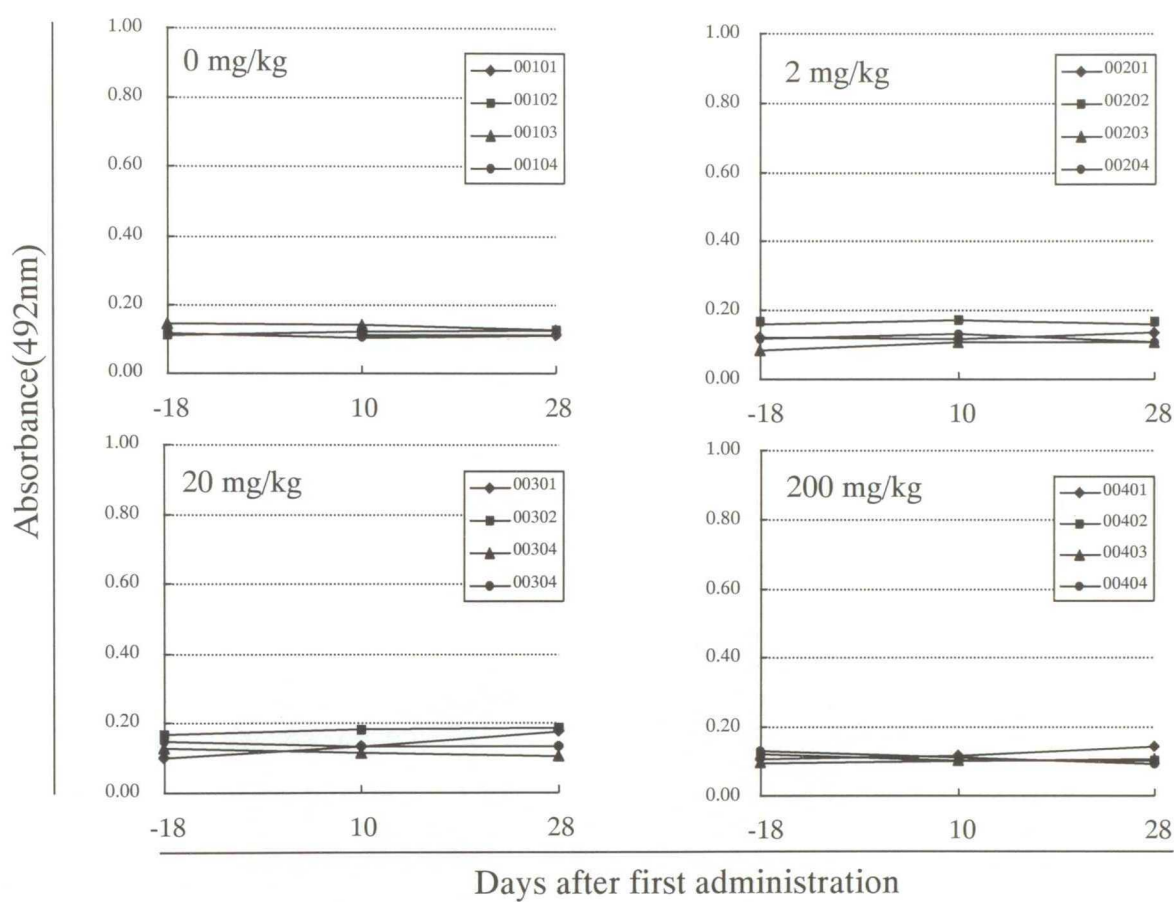




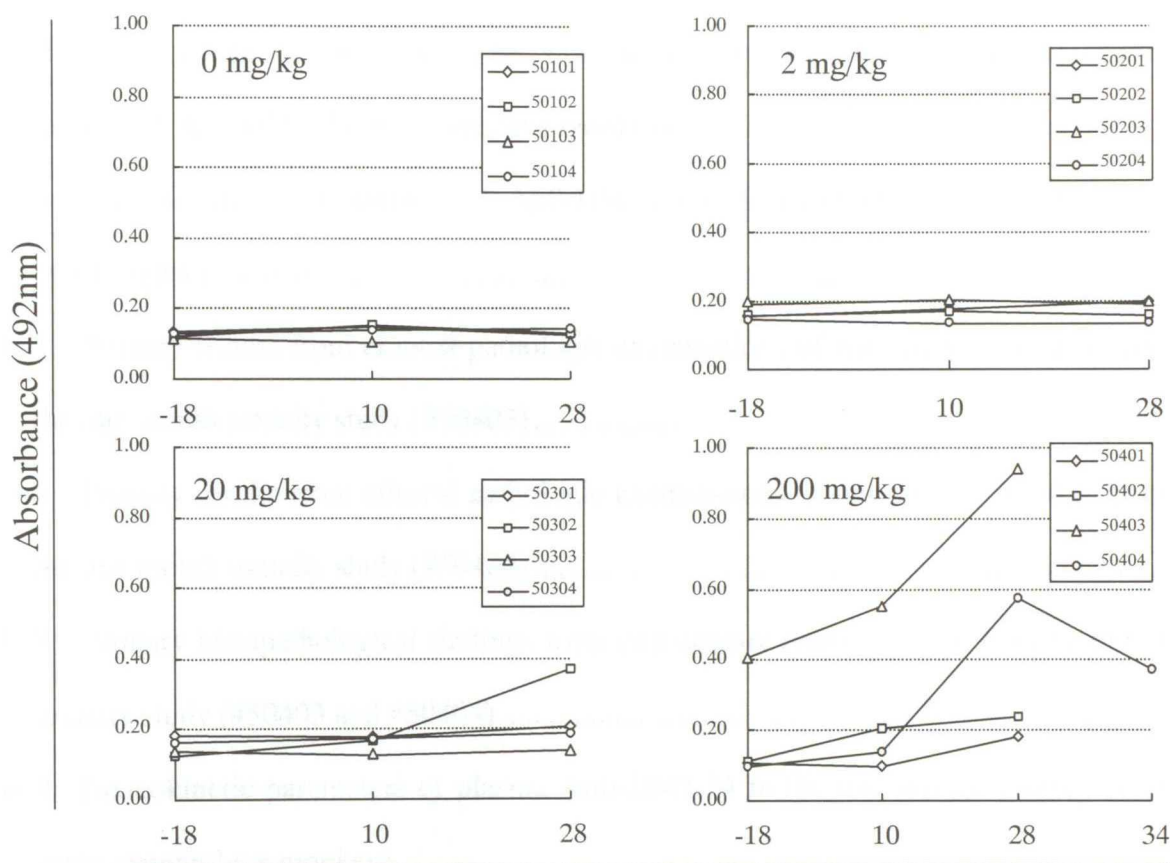
**Fig. 23** in vitro hemolysis assay activated by guinea pig's serum using untreated male erythrocytes for the sera of female cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month



**Fig. 24** in vitro hemolysis assay activated by guinea pig's serum using untreated female erythrocytes for the sera of female cynomolgus monkeys treated with Anti-HM1.24 for one month.



**Fig. 25** Time course plotting of anti-single stranded-DNA antibody production in the plasma of male cynomolgus monkeys that were treated with Anti-HM1.24 over a one month period



**Fig. 26** Time course plotting of anti-single stranded-DNA antibody production in the plasma of female cynomolgus monkeys that were treated with Anti-HM1.24 over a one month period.

表

Table 1 Domestic quarantine procedures of import monkeys for health monitoring..... 92

Table 2 Tissue cross reactivity of Anti-HM1.24 in human and cynomolgus monkeys..... 93

Table 3 Study design of the single-dose and the one-month repeated dose intravenous toxicity of Anti-HM1.24 in cynomolgus monkeys ..... 94

Table 4 Pharmacokinetic parameters of Anti-HM1.24 in single-dose toxicity study using cynomolgus monkeys..... 95

Table 5 Primary results from clinical pathologic examinations of one anemic monkey from the one month toxicity study (#50403)..... 96

Table 6 Primary results from clinical pathologic examinations of one anemic monkey from the one month toxicity study (#50404)..... 97

Table 7 Primary histopathological findings from two anemic monkeys from the one month toxicity study (#50403 and #50404) ..... 98

Table 8 Toxicokinetic parameters of plasma Anti-HM1.24 in the one month toxicity study using cynomolgus monkeys..... 99

Table 9 Histopathological characteristic of lymphoid tissues in one month toxicity study using cynomolgus monkeys..... 100

Table 10 Individual specific binding radioactivity of <sup>125</sup>I-Anti-HM1.24 to erythrocytes ..... 101

Table 11 Individual total binding radioactivity of <sup>125</sup>I-Anti-HM1.24 with the idiotype antibody to erythrocytes..... 101

Table 12 Results from the indirect coombs' testing using cynomolgus monkey sera from the one month toxicity study..... 102

Table 1 Domestic quarantine procedures of import monkeys for health monitoring

Items	Import	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks	6 weeks	7 weeks	8 weeks	9 weeks
Appearance and body weight	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Herpes B-virus infection	*							*		
Tuberculin test	*							*		
<i>Shigella</i> and <i>Salmonella</i> spp	*	*		*			*			*
Endoparasites		*		*			*			*
Hematology 1)		*					*			
Blood morphology (malaria)		*					*			
Clinical chemistry 2)		*					*			

1) Hematology : RBC, WBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, Hemogram

2) Clinical chemistry : TP, Alb, A/G, AST, ALT, BUN, Glu, TG, CRP

Certification of health status

- Free of Ebola, Marburg virus infection
- Free of Herpes B virus infection
- Negative in Tuberculin test
- Negative in *Shigella* and *Salmonella* spp.
- Negative in Endoparasites
- No significant abnormality in clinical pathology

**Table 2    Tissue cross reactivity of Anti-HM1.24 in human and cynomolgus monkeys**

Tissues	Human Sites of positive staining/antibody binding	Cynomolgus monkey Sites of positive staining/antibody binding
Adrenal	Widespread staining	Zona fasciculata and medulla, weak staining in reticularis and glomerulosa
Urinary bladder	Endothelial cells	Urothelium
Bone marrow	-	Occasional scattered cells
Breast	Endothelial cells and epithelium	Epithelium, adipose tissue and hair follicles in overlying
Cerebellum	Focal within white matter	-
Cerebral cortex	-	Endothelial cells
Colon	Goblet and endothelial cells	Goblet cells
Blood	-	-
Eye	NT	-
Endothelium	Endothelial cells	-
Fallopian tube	Endothelial cells and epithelium	-
Cardiac muscle	Interstitial cells, fibroblasts and endothelium between	Endothelium and adipose cells in interstitial tissue
Ileum	Goblet and endothelial cells	Goblet cells
Kidney	Glomeruli, cortical tubular epithelium, endothelial cells, groups of tubules in papilla	Cortical tubules and glomeruli staining
Liver	Sinusoidal cells	Bile duct epithelium, possible hepatocytes and sinusoidal
Lung	Occasional septal cells	Alveolar septal cells
Lymph node	Endothelial cells	Cells in sinuses
Ovary	Endothelial cells	Luteal cells and a few interstitial cells
Pancreas	Exocrine acinar cells and endothelial cells	Exocrine acinar cells
Parathyroid	Endothelial cells	NT
Placenta	Occasional cells	NT
Pituitary	Scattered cells, a few positive cells	Widespread staining in anterior lobe of pituitary
Prostate	Endothelial cells and epithelium	Interstitial cells and epithelium
Skin	Endothelial cells and epithelium	Epidermis, epithelium of sweat glands and sebaceous cells
Spinal cord	Endothelial cells	-
Spleen	Cells within red and white pulp, widespread staining	Staining in red pulp
Striated muscle	Endothelial or interstitial cells	-
Stomach	Endothelial cells and scattered epithelium	Mucus secreting cells
Testis	Interstitial cells	-(immature)
Thymus	NT	Endothelium and some scattered cells
Thyroid	Follicular epithelium	Follicular epithelium
Ureter	Urothelium, epithelium	Urothelium staining
Cervix/Endometrium	Endothelial cells	-

- : negative    NT : Not Tested

**Table 3 Study design of the single-dose and the one-month repeated dose intravenous toxicity of Anti-HM1.24 in cynomolgus monkeys**

**Singe-dose toxicity study**

Dosage (mg/kg)	Number of animals (Animal No.)	
	Male	Female
0 (Control)	1 (00101)	1 (50101)
2	1 (00201)	1 (50201)
20	1 (00301)	1 (50301)
200	1 (00401)	1 (50401)

**1-month toxicity study**

Dosage (mg/kg)	Number of animals (Animal No.)	
	Male	Female
0 (Control)	4 (00101-00104)	4 (50101-50104)
2	4 (00201-00204)	4 (50201-50204)
20	4 (00301-00304)	4 (50301-50304)
200	4 (00401-00404)	4 (50401-50404*)

\*: One female monkey (#50404) was sacrificed、 *in extremis*,  
10 days after the final (8th) administration.



**Table 4 Pharmacokinetic parameters of Anti-HM1.24 in single-dose toxicity study using cynomolgus monkeys**

Sex : Male				
Dose (mg/kg)	Animal No.	AUC <sub>0-t</sub> (mg·h/mL)	MRT (h)	t1/2 (h)
0	00101	N.C.	N.C.	N.C.
2	00201	0.511	10.1	7.70
20	00301	18.3	80.6	63.7
200	00401	190	41.9	32.7
Sex : Female				
Dose (mg/kg)	Animal No.	AUC <sub>0-t</sub> (mg·h/mL)	MRT (h)	t1/2 (h)
0	50101	N.C.	N.C.	N.C.
2	50201	0.388	8.40	6.01
20	50301	10.4	23.4	11.6
200	50401	135	30.2	23.7

N.C. : Not Calculated

**Table 5    Primary results from clinical pathologic examinations of one anemic monkey from the one month toxicity study (#50403)**

Animal No.: 50403; Sex: Female; Dose: 200 mg/kg.  
Status: Scheduled sacrifice on Day 28 of administration period.

Hematology						Peripheral lymphocyte subset				
Items	Erythrocyte	Hemoglobin	Hematocrit	Reticulocyte	Leukocyte	Items	CD20+ B-cell	CD2+ T-cell	CD4+ Th-cell	CD8+ Tc-cell
(Unit)	(10 <sup>6</sup> /μL)	(g/dL)	(%)	(%)	(10 <sup>3</sup> /μL)	(Unit)	(%)	(%)	(%)	(%)
Pre-dose	4.50	11.3	36.1	2.3	9.7	Pre-dose	14.7	83.5	48.4	34.0
Day 14	4.19	10.5	30.4	2.1	8.1	Day 14	18.4	77.4	68.7	19.1
Day 21	3.68 ↓	8.7 ↓	26.6 ↓	3.8 ↑	10.3	Day 28	25.6	70.6	54.6	30.8

↑ : Increase, ↓ : Decrease

Blood morphology: Peripheral round or small erythrocytes increased on Days 14 and 21.

Blood chemistry											
Items	AST	ALT	LDH	BUN	Creatinine	CRP	Indirect- bilirubin	Haptoglobin	Iron	Total protein	Albumin
(Unit)	(IU/L)	(IU/L)	(IU/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(μg/mL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(μg/dL)	(g/dL)	(g/dL)
Pre-dose	36	67	592	12.3	0.63	0.0	0.05	37	142	8.83	3.91
Day 14	31	58	867	12.5	0.69	0.0	0.05	65	109	9.01	3.47
Day 21	43	26	1518 ↑	39.8 ↑	1.09 ↑	0.1	0.00	0 ↓	130	7.22	1.82 ↓
Day 28	50	31	2446 ↑	14.0	0.65	1.8 ↑	0.14	1 ↓	102	6.23	1.83 ↓

↑ : Increase, ↓ : Decrease

Serum protein fraction				
Items	A/G	Albumin	β-globulin	γ-globulin
(Unit)	ratio	(%)	(%)	(%)
Pre-dose	0.79	61.1	21.2	9.9
Day 14	0.63	54.2	14.9	23.2 ↑
Day 21	0.34 ↓	31.5 ↓	19.3	32.8 ↑
Day 28	0.42 ↓	34.8 ↓	18.5	27.5 ↑

↑ : Increase, ↓ : Decrease

Table 6 Primary results from clinical pathologic examinations of one anemic monkey from the one month toxicity study (#50404)

Animal No.: 50404; Sex: Female; Dose: 200 mg/kg.  
Status: Sacrificed *in extremis* 10 days after the final administration (Day 34).

Hematology

Items	Erythrocyte	Hemoglobin	Hematocrit	Reticulocyte	Leukocyte
(Unit)	(10 <sup>6</sup> /μL)	(g/dL)	(%)	(%)	(10 <sup>3</sup> /μL)
Pre-dose	4.62	12.4	39.7	1.0	9.3
Day 14	4.64	12.0	38.6	1.3	7.3
Day 21	4.71	12.2	40.2	1.8	16.1
Day 34	0.52 ↓	1.6 ↓	6.3 ↓	34.7 ↑	22.0 ↑

↑ : Increase, ↓ : Decrease

Peripheral lymphocyte subset

Items	CD20+ B-cell	CD2+ T-cell	CD4+ Th-cell	CD8+ Tc-cell
(Unit)	(%)	(%)	(%)	(%)
Pre-dose	16.5	81.2	65.5	27.5
Day 14	13.5	84.1	65.1	27.6
Day 21	23.8 ↑	72.1	55.6	37.1
Day 34	38.6 ↑	55.3 ↓	41.3	45.4

↑ : Increase, ↓ : Decrease

Blood morphology: Peripheral round or small erythrocytes increased on Day 34.

Blood chemistry

Items	AST	ALT	LDH	BUN	Creatinine	CRP	Indirect- bilirubin	Haptoglobin	Iron	Total protein	Albumin
(Unit)	(IU/L)	(IU/L)	(IU/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(μg/mL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(μg/dL)	(g/dL)	(g/dL)
Pre-dose	22	28	313	16.0	0.64	0.0	0.03	51	115	7.46	3.31
Day 14	22	38	582	16.1	0.75	0.0	0.05	92	64	8.21	3.00
Day 21	31	41	650	17.0	0.75	0.0	0.01	101	109	7.46	2.30 ↓
Day 34	68 ↑	57	1517 ↑	55.6 ↑	0.93	8.6 ↑	0.42 ↑	4 ↓	367 ↑	7.20	2.36 ↓

↑ : Increase, ↓ : Decrease

Serum protein fraction

Items	A/G	Albumin	β-globulin	γ-globulin
(Unit)	ratio	(%)	(%)	(%)
Pre-dose	0.80	60.7	21.4	8.6
Day 14	0.58 ↓	51.0	21.6	17.5 ↑
Day 21	0.45 ↓	41.9 ↓	29.8	16.6 ↑
Day 34	0.49 ↓	46.0 ↓	22.9	16.7 ↑

↑ : Increase, ↓ : Decrease

**Table 7    Primary histopathological findings from two anemic monkeys from the one month toxicity study (#50403 and #50404)**

Organ	Histopathological findings	Animal No. 50403	50404
Spleen			
	enlarged white pulp	++	-
	atrophy, white pulp	-	++
	increased lymphocytes, mantle zone	++	-
	decreased lymphocytes, mantle zone	-	+
	decreased lymphocytes, germinal center	+	++
	decreased lymphocytes, periarterial lymphatic sheath	+	++
	increased hemosiderin deposition	+	+
Axillary lymph node			
	atrophy, follicle	+	+
	decreased lymphocytes, paracortex	++	+
	expansion, medullary cord	+	+
Thymus			
	decreased lymphocytes, cortex	+	+
Liver			
	inflammatory cell, surrounding central veins	++	+
	activated Kupffer/sinusoidal cell	+	+
	neutrophil infiltration, sinus	+	+
	mononuclear cell infiltration, sinus	++	+
	ischemic degeneration/necrosis, hepatocyte	+	++
Lung			
	mononuclear cell infiltration, periartery	+	-
Bone marrow			
	increased erythroid cell	+	+
Kidney			
	degeneration of tubules with inflammatory cells	+	-

Grade (-: no lesion, +/-: very slight, +:slight, ++:moderate)

Table 8 Toxicokinetic parameters of plasma Anti-HM1.24 in the one month toxicity study using cynomolgus monkeys

Sex : male							
Dose (mg/kg)	Animal No.	1st administration			8th administration		
		AUC <sub>0-72h</sub> (mg·h/mL)	MRT (h)	t1/2 (h)	AUC <sub>0-72h</sub> (mg·h/mL)	MRT (h)	t1/2 (h)
0	00101	0	-	-	0	-	-
	00102	0	-	-	0	-	-
	00103	0	-	-	0	-	-
	00104	0	-	-	0	-	-
	mean	0	-	-	0	-	-
	S.D.	-	-	-	-	-	-
2	00201	0.282	5.70	4.44	0.0172	0.959	0.833
	00202	0.247	5.58	3.96	0	-	-
	00203	0.472	16.0	11.3	0	-	-
	00204	0.356	12.0	9.19	0.0492	2.44	1.73
	mean	0.339	9.82	7.22	0.0166	1.70	1.28
	S.D.	0.099	5.10	3.60	0.0232	1.05	0.63
20	00301	12.9	55.0	36.0	13.6	47.4	37.4
	00302	14.0	56.6	38.4	16.7	63.1	48.3
	00303	11.6	33.8	24.6	17.6	45.2	30.0
	00304	13.0	34.4	23.1	18.3	48.9	32.6
	mean	12.9	45.0	30.5	16.6	51.2	37.1
	S.D.	1.0	12.5	7.8	2.1	8.1	8.1
200	00401	112	47.3	32.9	149	66.8	53.2
	00402	158	39.4	27.5	119	55.3	43.1
	00403	161	28.7	18.1	122	31.8	21.9
	00404	127	25.2	16.5	122	36.1	24.1
	mean	140	35.2	23.8	128	47.5	35.6
	S.D.	24	10.1	7.8	14	16.4	15.1

Sex : female							
Dose (mg/kg)	Animal No.	1st administration			8th administration		
		AUC <sub>0-72h</sub> (mg·h/mL)	MRT (h)	t1/2 (h)	AUC <sub>0-72h</sub> (mg·h/mL)	MRT (h)	t1/2 (h)
0	50101	0	-	-	0	-	-
	50102	0	-	-	0	-	-
	50103	0	-	-	0	-	-
	50104	0	-	-	0	-	-
	mean	0	-	-	0	-	-
	S.D.	-	-	-	-	-	-
2	50201	0.463	12.5	9.44	0	-	-
	50202	0.472	9.69	7.58	0	-	-
	50203	0.523	14.3	10.7	0.0194	16.6	11.8
	50204	0.448	10.0	7.58	0.0222	2.62	2.02
	mean	0.477	11.6	8.83	0.0104	9.61	6.91
	S.D.	0.033	2.2	1.53	0.0121	9.89	6.92
20	50301	11.1	48.6	32.6	4.57	13.9	8.70
	50302	11.6	44.1	29.7	4.78	10.2	5.26
	50303	13.3	38.6	27.0	12.7	34.5	23.2
	50304	13.1	25.2	16.1	7.72	11.4	7.52
	mean	12.3	39.1	26.4	7.44	17.5	11.2
	S.D.	1.1	10.1	7.2	3.79	11.4	8.1
200	50401	166	46.8	32.1	315	55.5	39.3
	50402	154	34.2	24.0	136	29.0	21.1
	50403	154	34.3	24.2	219	58.4	39.9
	50404	148	27.9	18.0	137	30.5	21.9
	mean	156	35.8	24.6	202	43.4	30.6
	S.D.	8	7.9	5.8	85	15.8	10.5

- : Not calculable

**Table 9    Histopathological characteristic of lymphoid tissues in one month toxicity study using cynomolgus monkeys**

Type	I	II	III
Animal No.	00404	00402	00403
	50301	50401	50303
	50302	50403	50404
Lymphoid tissues	50402		
Spleen			
white pulp	- / Enlarged	Enlarged	Atrophy
germinal center [B]	- / ↓	↓ / ↓ ↓	↓ ↓
mantle zone [B]	- / ↑	↑ ↑	- / ↓
PALS [T]	- / ↓	↓ / ↓ ↓	↓ ↓
Lymph node			
follicle	-	- / Atrophy	- / Atrophy
germinal center [B]	-	- / ↓ ↓	↓
mantle zone [B]	-	- / ↑ ↑ / ↓	- / ↑ / ↓
paracortex [T]	- / ↓	- / ↓ ↓	↓ / ↓ ↓
medullary cord [B>T]	-	- / ↓	- / ↓
Tonsilla			
germinal center [B]	- / ↓	- / ↓	- / ↓
mantle zone [B]	- / ↓	- / ↑	- / ↑
interfollicular area [T]	- / ↓	- / ↓	- / ↓
GALT			
germinal center [B]	-	- / ↓	- / ↓
mantle zone [B]	- / ↑	- / ↑ ↑	- / ↑ / ↓
Thymus			
cortex [T]	-	↓	- / ↓

[B]: B-lymphocyte dominant tissues

[T]: T-lymphocyte dominant tissues

- : no change
- ↑ : increased lymphocytes、 slight
- ↑ ↑ : increased lymphocytes、 moderate
- ↓ : decreased lymphocytes、 slight
- ↓ ↓ : decreased lymphocytes、 moderate

**Table 10 Individual specific binding radioactivity of <sup>125</sup>I-Anti-HM1.24 to erythrocytes**

Concentrations of <sup>125</sup> I-Anti-HM1.24 (ng/mL)	Specific binding radioactivity (ng eq. to Anti-HM1.24)			
	Cynomolgus monkey		Human	
	(male)	(female)	(male)	(male)
6134.7	6.595	7.827	4.698	4.227
3067.4	3.061	2.313	2.206	1.446
1533.7	1.069	0.037	0.583	0.227
766.8	0.438	0.185	0.225	0.096
383.4	0.258	0.049	0.203	0.006
191.7	0.098	0.049	0.052	0.032
95.9	0.018	0.022	0.049	-0.018
47.9	0.002	0.022	0.046	0.011

**Table 11 Individual total binding radioactivity of <sup>125</sup>I-Anti-HM1.24 with the idiotype antibody to erythrocytes**

Additive antibodies and concentrations of anitibodies	Total binding radioactivity (ng eq. to Anti-HM1.24)			
	Cynomolgus monkey		Human	
	(male)	(female)	(male)	(male)
<sup>125</sup> I-Anti-HM1.24 (250 ng/mL)	0.553	0.571	0.385	0.627
<sup>125</sup> I-Anti-HM1.24 (250 ng/mL) + idiotype antibody (500 ng/mL)	0.300	0.364	0.666	0.748

**Table 12    Results from the indirect coombs' testing using cynomolgus monkey sera from the one month toxicity study**

Dose (mg/kg)	Animal No.	Sex	Agglutination to male erythrocytes					Agglutination to female erythrocytes				
			Serum dilution				Saline	Serum dilution				Saline
			×3	×6	×12	×24		×3	×6	×12	×24	
0	00101	Male	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
	00104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	00201		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00202		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00203		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00204		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	00301		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00302		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00303		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00304		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	00401		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00402		-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
	00403		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	00404		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dose (mg/kg)	Animal No.		Agglutination to male erythrocytes					Agglutination to female erythrocytes				
			Serum dilution				Saline	Serum dilution				Saline
			×3	×6	×12	×24		×3	×6	×12	×24	
0	50101	Female	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	50201		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50202		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50203		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50204		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	50301		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50302		-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	50303		-	-	-	-	-	±	±	-	-	-
	50304		-	-	-	-	-	±	±	-	-	-
200	50401		-	-	-	-	-	±	±	±	±	-
	50402		-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
	50403		+	-	-	-	-	++	+	+	-	-
	50404		++	++	++	++	-	++	++	++	++	-

The extent of macroscopically judged agglutination was classified as (-) when the margin of the precipitated erythrocytes was clear, (±) when the margin of the precipitated erythrocytes was somewhat obscure and partially aggregated erythrocytes were observed, (+) when the precipitated erythrocytes were not observed but the entire well surface was aggregated and (++) when a part of the aggregate was moving toward the center of well and the degree of agglutination was marked. When the agglutination was judged to be (+) or (++) the indirect Coombs' test was labeled as a positive response.



## ABSTRACT

Anti-HM1.24 monoclonal antibody (MoAb) is a humanized monoclonal IgG<sub>1</sub> antibody that recognizes the HM1.24 antigen. The antigen is highly expressed in multiple myeloma cells and is being developed as a possible therapeutic agent for the treatment of multiple myeloma. The pharmacological mechanism of anti-HM1.24 MoAb is antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) with natural killer (NK) cells as effectors. However, the HM1.24 antigen in human is also distributed not just in myeloma cells but throughout the tissues of the body including normal B and T lymphocytes. It is also known that the expression of this antigen increases when these lymphocytes are activated. In a cross-reactivity study using lymphocytes from various animal species, cross-reactivity with anti-HM1.24 MoAb was detected in cynomolgus monkeys but not present in rats, mice, guinea pigs, rabbits or dogs. In another study using normal tissues, it was confirmed that cynomolgus monkey and human tissues showed the similar cross-reactivity with anti-HM1.24 MoAb. The demonstration of this cross-reactivity supports the use of the cynomolgus monkey for the assessment of the biological activity of this MoAb. The animals used in the toxicity study were treated in accordance with Chugai Pharmaceutical's ethical guidelines of animal care, handling and termination.

As part of the anti-HM1.24 MoAb safety assessment, single-dose and one-month repeated-dose intravenous toxicity studies in cynomolgus monkeys were performed. The results of a single dose of 2, 20 and 200 mg/kg showed no toxic changes attributable to anti-HM1.24 MoAb administration. However anti- "anti-HM1.24 MoAb" antibodies were detected in all animals except for female of the 2 mg/kg group, since 14 or 21 days after administration. The anti- "anti-HM1.24 MoAb" antibody level gradually increased over time, reaching a steady state on 57 days. On the other hand, anti-HM1.24 MoAb was administered intravenously twice a week at dosage of 2, 20 and 200 mg/kg for one month. The principal toxic changes attributable to MoAb-treatment were as follows; increases of monocytes and basophils and elevated serum globulin, and histopathological changes in the lymphoid tissue associated with the immune system in the 20 and 200 mg/kg groups; cytotoxic changes (necrosis) in males from the 200 mg/kg group; anemia in females from the 200 mg/kg group. In a one-month study, anti- "anti-HM1.24 MoAb" antibodies were detected in males from the 2 mg/kg during the treatment period and in all animals except for female of the 200 mg/kg group during 2 month withdrawal period.

The anemia detected from day 21 through the end of treatment period in two female monkeys was diagnosed as hemolytic anemia. It was caused by the accelerated destruction of red blood cells and this conclusion was supported by the observation of an increase of reticulocytes in the peripheral blood and an increase of erythroblasts in bone marrow. Since an increase in morphologically peripheral round erythrocytes was observed, and splenic enlargement, tissue congestion and hemosiderin deposition in the spleen were also detected, the primary cause of the hemolytic anemia was postulated to be the promotion of extravascular hemolysis. These anemic monkeys exhibited no detectable abnormality in their general condition throughout the treatment period. However one female monkey developed extreme erythrocytopenia after the treatment period. Therefore this animal was judged to be moribund and was sacrificed *in extremis* 10 days after the final administration. The lymphocytes subset analysis in this anemic animal revealed the abnormal differentiation of thymic T cells (cellular immunity) and the increase of splenic B cells (humoral immunity) activation by stimulation with concanavalin A accompanied by the suppression of increase in CD25 (IL-2 receptor alpha-subunit) positive cells. These findings suggest the enhancement of humoral immunity due to the induction of the immune response by anti-HM1.24 treatment, causing the pathogenesis of systemic autoimmune diseases.

Because the hematological, blood chemical and histopathological changes in immunoreactivity were marked for these anemic monkeys, there is a strong possibility of immunoglobulin binding by erythrocytes. Immunoglobulin binding by the erythrocytes could occur not only with anti-erythrocyte antibodies but also with anti-HM1.24 MoAb or anti-“anti-HM1.24 MoAb” antibodies or the immune complexes. The hemolytic anemia described in the cynomolgus monkey is particularly similar to the autoimmune hemolytic anemia (AIHA) documented in human.

As the further investigation study, we investigated the mechanism of hemolytic anemia detected in a toxicity study using cynomolgus monkeys. In order to determine the possibility of direct affect with anti-HM1.24 MoAb against erythrocytes, whether HM1.24 antigen is present on the erythrocyte membranes and the erythrocyte agglutination test following the addition of anti-HM1.24 MoAb was performed. Moreover, to examine the presence and characteristics of anti-erythrocyte antibodies, an indirect Coombs' test, a hemolysis test by complement activation and an anti-single stranded DNA antibodies assay were conducted using test animal serum or plasma.

If anti-HM1.24 MoAb could bind directly to the erythrocytes, the primary cause of the hemolytic anemia is clear. Therefore the specific binding of anti-HM1.24 MoAb to the human and cynomolgus monkey erythrocytes was investigated using FITC- and <sup>125</sup>I -labeled

anti-HM1.24 MoAb. However, negative results were obtained using both test methods. Furthermore,  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-HM1.24 MoAb was judged not to bind specifically to the erythrocytes, either in the presence or absence of the monkey anti-“anti-HM1.24 MoAb” idiotype antibody. However the fact that labeled anti-HM1.24 MoAb utilized in both methods may be entirely in the form of a monomer should be taken into consideration, because there might be few heterogeneities in the form of dimers and oligomers and heteromolecules from ion-exchange chromatogram in the anti-HM1.24 MoAb solution, the characteristics of these related substances are unclear.

When anti-HM1.24 MoAb was added to the erythrocyte suspensions in physiological saline, the high concentrations (more than  $713\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) caused the direct agglutination of normal cynomolgus monkey and human erythrocytes. For the analogous recombinant humanized IgG<sub>1</sub> drug used as the comparative control, agglutination was negative at the maximum concentration of  $2,850\text{ }\mu\text{g/mL}$ . When the facts that anti-HM1.24 MoAb does not directly bind to the erythrocytes, that IgG class antibodies cannot normally bridge the gap between erythrocytes and cannot directly cause agglutination are taken into consideration, the direct agglutination effect of anti-HM1.24 MoAb addition is assumed to be caused by non-specific adhesion. The specific reason for the erythrocyte agglutination remains unclear but the participation of the above-mentioned dimers, oligomers and distinct electrically charged heteromolecules cannot be ruled out. However, when using the erythrocyte suspensions in serum, no agglutination was detected. These results obtained under *in vitro* conditions are difficult to extrapolate to an *in vivo* reaction, but it suggests that the serum components would be able to avoid non-specific adhesion.

In an indirect Coombs' test using test serum collected from the one-month study, agglutination was detected with the addition of anti-monkey IgG as secondary antibody in one female monkey from the  $20\text{ mg/kg}$  group and in three females, including two anemic monkeys from the  $200\text{ mg/kg}$  treatment group. Usually, to avoid false positives attributable to non-self recognition in an indirect Coombs' test, the serum and erythrocyte of identical blood groups must be used. Also a possible non-specific reaction due to the existence of allo-antibodies cannot be dismissed. Cynomolgus monkey blood group classification is, however, difficult and because there was no observation of erythrocyte agglutination for both the male and female sera from the control group, non-self recognition was considered to have no effect on the results obtained in this study. For future examination definitive diagnosis of confirmed agglutination using a direct Coombs' test against autologous erythrocytes is essential.

From the results of hemolysis assay caused by activation of complement, one anemic monkey was judged to be positive. Generally speaking, extravascular hemolysis is the main cause of hemolytic anemia while intravascular hemolysis is rare. This animal developed sudden erythrocytopenia with concurrent increases in the serum LDH and indirect bilirubin and a decrease in haptoglobin. Therefore it was believed that intravascular hemolysis had occurred in this animal. Complement hemolysis was also observed in another female from the 200 mg/kg group when male erythrocytes were used, but was negative when tested with female erythrocytes. This was thought to be due to the participation of natural antibodies that recognized the antigens from blood group and sex differences, although the specific details are unclear.

For the ELISA measurement of antibodies against single stranded DNA (ssDNA), all of the male animals were negative. However one female monkey from the 20 mg/kg group and three females from the 200 mg/kg group displayed a gradual increase in their anti-ssDNA titers on the 10th and 28th day of the treatment period. The measurement of anti-ssDNA antibodies is a useful diagnostic method for autoimmune diseases in human and is also helpful in the detection of general autoantibodies following the breakdown of self-tolerance. This test alone does not directly represent anti-erythrocyte antibody production. However, from the positive reaction in the indirect Coombs' test and those that were also positive for anti-ssDNA antibodies, the production of anti-erythrocyte autoantibody is thought to be a valid diagnosis as the primary cause for hemolytic anemia. In the anti-ssDNA antibody-positive animals, one female monkey with an extremely high value prior to the beginning of the treatment period is noteworthy. This animal developed anemia at an early stage and experienced marked changes in immunoreactivity, suggesting the possibility of having a latent risk of autoimmune disease.

From the results of the present mechanistic investigations and clinical pathology of the anemic animals, it is estimated that AIHA probably appeared according to following processes. By combining with the HM1.24 antigen of the lymphocytes, Anti-HM1.24 causes abnormal differentiation of T cell in addition to activation of B cell. It is made to fall into the condition of the humoral immunity superiority, so that the autoreactive B cells could be activated. Under such situation, it seemed to recognize the erythrocyte membrane by some causes as an autoantigen. It is considered that as one of the this factors, high concentration Anti-HM1.24 caused the erythrocyte agglutination and anti-"anti-HM1.24 MoAb" antibodies bind to the anti-HM1.24 MoAb on the erythrocyte. The modified erythrocytes are detained by the reticular endothelial system and the splenic macrophages phagocytize the erythrocytes through the IgG-Fc receptor. The antigen of the erythrocyte membrane is released, and being recognized in the immune system

which is activated by MoAb-treatment. Accordingly, the autoimmune response is induced, and the anti-erythrocyte autoantibodies are produced. This hypothesis could be supported by the facts that the manifestation of hemolytic anemia agreed with the time when the specific antibody is generally produced (after 2 week of treatment), and the phagocytosis through Fc receptor for specific antibodies of the self-production is the strong immune response. In addition, remarkable producing of the specific antibodies, since the anti-HM1.24 MoAb had the significant immunogenicity for cynomolgus monkeys, would exacerbate these processes.

In conclusion, the hemolytic anemia observed in the repeated-dose toxicity study of the anti-HM1.24 MoAb using cynomolgus monkeys was diagnosed to be drug-induced autoimmune hemolytic anemia (AIHA). The primary cause of this AIHA was assumed to be the production of IgG class anti-erythrocyte autoantibodies.

Multiple myeloma as targeted disease of anti-HM1.24 MoAb is an intractable disease that is difficult to cure, therefore if therapeutic action for human will be expected certainly, the benefits of anti-HM1.24 MoAb for patient can be assumed to be very considerable. Although it is possible that an immune response to the humanized antibody as a foreign protein for cynomolgus monkeys may have contributed to the manifestation of autoimmune hemolytic anemia in the present study, close attention must be paid to assuring safety in human clinical trials. This means that patients with previous history of autoimmune diseases such as AIHA or SLE and patients with positive antinuclear or anti-DNA antibodies must be excluded from enrolment. Furthermore detailed immune toxicological parameters include quantitation of immune globulins (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD), immune complexes and complement concentrations, lymphocyte subset analysis, determination of antinuclear and anti-DNA antibodies, direct Coombs tests and haptoglobin must be carried out in addition to the usual hematological and blood chemistry tests, as indicators for monitoring autoimmune hemolytic anemia.