

20030697

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

GM-CSF吸入による重症特発性肺胞蛋白症の治療研究

平成16年(2004年)4月

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中田 光

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

総括研究報告書

GM-CSF吸入による重症特発性肺胞蛋白症の治療研究

主任研究者 中田 光

国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

細菌性呼吸器疾患研究室長

研究要旨 全国5施設による統一プロトコールに基づく重症特発性肺胞蛋白症の治療研究を行った。12例の患者に12週間の吸入治療を行い、6例において動脈血酸素分圧が改善し、呼吸機能上、肺活量の上昇がみられた。また、副作用は見られなかった。しかし、パイロットスタディー3例に比べて呼吸機能の改善が弱く、治療レジメンの改良を検討したい。

分担研究者氏名・

所属機関名及び所属機関における職名

工藤宏一郎 国立国際医療センター・副院長
貫和 敏博 東北大学加齢医学研究所・教授
慶長直人 国立国際医療センター・部長
井上義一 国立療養所近畿中央病院・部長

のある患者であるが、我が国では50%程度で、むしろ粉塵吸入歴のある患者が25%もいたことから、この疾患の発症に何らかの抗原暴露が関与しているのではないかと考える。我が国の罹患率は不明であるが、欧米の報告によれば、人口10万対0.3とされている。国内外ともに地域差は認められていない。我が国の人口が1億2千万であることから、推定400名の患者がいることになるが、平成14年に本研究班が行った全国の呼吸器科医400人を対象としたアンケート調査だけでも、196例の情報が寄せられたことから、実際の患者数は1000例を下らないだろうと予想される。主任研究者は1999年に、病因物質として患者の肺及び血液中に抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)中和自己抗体が大量に存在することを発見し(*J Exp Med*190(6), 875-880,1999)、その検出法の特許を出願した(優先権主張番号特願平10-303858)。GM-CSFの受容体を欠く先天性の肺胞蛋白症が存在することや、GM-CSFやその受容体

A.目的

特発性肺胞蛋白症は、肺胞及び終末気管支に過剰なサーファクタントの貯留がおり、労作時の呼吸困難を来す疾患である。分担研究者井上らが行った我が国の特発性肺胞蛋白症135例の疫学調査では、男女比は約2.2:1である。他のびまん性肺疾患と異なり、家系内発生が1例もないことは、欧米の報告と一致しており、環境要因の関与が想定される。診断時の年齢は平均で51±14歳で、欧米の総説よりも若干高年齢にシフトしている。Seymourらによると、欧米では、70%が喫煙者もしくは喫煙歴

のノックアウトマウスが肺胞蛋白症を起こすことから、本症の発症に GM-CSF の関与が考えられてきたが、本疾患の病因は、肺胞マクロファージの分化・機能維持に重要な肺の GM-CSF が自己抗体により中和され、肺胞マクロファージのサーファクタント分解能が低下するためであると考えられる。一方、全国アンケート調査で明らかとなった安静時動脈血酸素分圧が 70 mmHg 未満の重症者は 46 例で全体の 23% である。

これまで、こうした重症者に対する治療は、全身麻酔下の全肺洗浄法や気管支ファイバースコープによる反復区域洗浄が一般的で、患者の負担や苦痛が大きく、新治療法が望まれていた。近年、オーストラリアの Seymour らが始めた GM-CSF 連日皮下注療法は、肺洗浄によることなく、重症患者の 44% に呼吸機能の改善をもたらすことが報告されている。GM-CSF の全身投与は時に悪寒戦慄などの副作用を惹起することや、疾病が肺に局限していることから、我々は、GM-CSF を吸入で投与することを思い立ち、2001 年以降、重症患者 3 例に GM-CSF 吸入療法を試み、呼吸機能が劇的に改善すること、また、肺胞洗浄液中の自己抗体が消失することを確認した。本研究では、GM-CSF 吸入療法が重症特発性肺胞蛋白症の治療に有効であるか、また安全に施行しうるかどうかを多施設で行い、最適な治療レジメンを見出すことを目的としている。

B. 研究方法

症例及び方法：以下の全国 7 施設を試験施設として選定した。

北大第一内科、東北大学呼吸器腫瘍研究分野、

国立国際医療センター呼吸器科、愛知医科大学アレルギー呼吸機内科、国立療養所近畿中央病院内科、国立療養所山容病院内科、長崎大学熱帯病研究所内科

昨年報告したように、平成 14 年度に作成した 7 施設共同統一プロトコールに準拠して治療を行った。以下にその概略を示す。

①症例選択基準

以下の 1) ~ 5) の全てを満たす症例とする。

一般的事項

- 1) 年齢 16 歳以上 80 歳以下（登録日を基準）の患者。性別は問わない。
- 2) 文書により本人の同意を得られるもの
- 3) 治療前、治療中、治療後に評価のため、短期間検査入院が可能な症例
- 4) 特発性（原発性）肺胞蛋白症：下記の A あるいは B を満たし、かつ血清抗 GM-CSF 自己抗体価が、 $3 \mu\text{g/ml}$ 以上で陽性である患者。
A: 経気管支肺生検ないし外科的肺生検（胸腔鏡下肺生検等）で典型的病理所見（PAS 陽性蛋白様物質の肺胞内貯留）
B: 気管支肺胞洗浄液で典型的所見（白濁、蛋白様物質、マクロファージ減少）
- 5) 安静時 $\text{PO}_2 < 70\text{mmHg}$ の症例

4. 除外基準

[除外基準]

下記 1 ~ 5 のうち、いずれか一項目を満たす患者

1. 白血球数 $12000/\text{mm}^3$ 以上の症例
2. 38°C 以上の発熱を有する症例

3. Grade 2以上の浮腫を有する症例

4. 骨髄系悪性疾患

4. うっ血性心不全, 狭心症, 出血傾向, 原発性肺癌, 転移性肺癌, 気管支喘息などの合併症を有し治療評価困難と判定される場合.

5. 他のサイトカイン療法を受けている患者

6. 妊娠および妊娠している可能性のある女性, 授乳中の女性, あるいは試験中に妊娠を希望する女性.

7. 治療開始日よりさかのぼって6ヶ月以内に全肺洗浄, あるいは反復区域洗浄療法を受けた患者, ただし, 洗浄日より6ヶ月が経過すれば, この除外項目は適応されない。

8. その他担当医師が不適当と判断した症例 (例えば, 治療を完遂することが困難と考えられるような症例や, 非協力的な患者)。

①被験者

今回, 被験者とした12例の症例の試験施設は以下の通りである。

症例番号	試験施設
J9,103,105,158	国際医療センター
J135,148,160	国療近畿中央
J140,155	東北大学
J130	長崎大学熱研内科
J70	国療山陽

以上の症例は, 本治療が治療研究であることを患者と家族に説明し, 文書による承諾を得て, プロトコールを各施設の倫理委員会に申請し, 承認を得て施行した。

②GM-CSF製剤 Leucomax を厚生省医薬安全局より薬監証明の発給を受けて輸入した。
吸入療法: 製剤: Leukine (Berlex 社, 組換

え酵母によるGM-CSF製剤)

用量: 1回125 μ gを1日1回投与

経路: 吸入 (Pari LC Plus jet nebulizer を使用)

③試験方法の概要:

a) 無治療観察期間: 12週間, 無治療で観察する。6週, 12週において後述する観察項目について検討する。

b) 治療期間: 12週間の無治療観察期間の後, 治療開始の適否を検討し, 125 μ g/日 吸入6週後, 後述する治療効果判定を行い, 有効と判断された被験者についてはそのまま, 125 μ g/日 吸入を6週間行い, 無効と判断された症例については, 250 μ g/日 吸入を6週間行う。

④多施設試験方法: 中央登録方式による6施設共同オープン試験

⑤主たる評価項目

- ① 無治療観察期間: 自然寛解の有無
- ② 治療期間: 治療前に対する治療6週, 12週後の肺胞-動脈血酸素分圧較差の改善が10 mmHg 以上のものを有効とし, 未満を無効とする。

8) 評価方法

定期的 (観察時期については後述) に臨床症状, 胸部X線写真, 胸部CT (HRCT) 検査, 動脈血液ガス分析, 呼吸機能検査, 気管支肺胞洗浄検査, 6分間歩行試験を行い, 各パラメータについて無治療観察期間と治療期間の間で比較を行う。

⑥倫理面への配慮

本治療の開始にあたり, 治験担当医師は被験者本人に対し, 内容を十分に説明し, 本試験

への参加について文書により被験者本人の自由意志による同意を取得した。

C. 結果

治療を行った12例の年齢、性比、発症後月数、動脈血酸素分圧、%努力肺活量を以下の表に示す。このうち、在宅酸素療法を受けていた患者は4名であった。

表1：12例の治療前のプロフィール

症例番号	年齢	性	喫煙歴	発症後		合併症	呼吸器症状	洗浄後
				(月)				
J70	46M	CS		58なし			呼吸困難	増悪
J105	63F	NS		33なし			呼吸困難、咳	軽快
J130	63F	NS		58あり			呼吸困難	増悪
J135	24M	ES		なし			呼吸困難	増悪
J155	66F	NS		15なし			なし	不変
J158	66M	NS		110なし			呼吸困難、咳	増悪
J9	64F	NS		108			呼吸困難、咳	増悪
J103	56F	NS		119CHF			呼吸困難	増悪
J140	44M	CS(40x25)		13なし			労作時息切れ	増悪
J148	61F	NS		なし			労作時息切れ	不変
J69	35M	NS		35なし			労作時息切れ	不変
J160	58M	EX(30x16)		あり			労作時息切れ	増悪

表2：12例の治療前プロフィールの総括

患者数	年齢	性比 MF	発症後月数	動脈血 酸素分圧 (mmHg)	%努力 肺活量 (%)
12	59.5y.o (24-66)	6/6	58(12-168)	57.2 (34.068.6)	65.6 (31.4-100)

① 6週後の中間効果判定で、評価基準の肺胞-動脈血酸素分圧較差の減少が10mmHg未満で、一日吸入量125mg→250mgへと増量した患者は、J9, J105, J135, J140, J155, J148, J160であった。

② 無治療経過観察期間に自然寛解した症例はなかった。

③ 12週間の治療後、治療前後の肺胞-動脈血酸素分圧較差の減少が10mmHg以上あった症例は6例で、これらをresponderとし、無効例をnonresponderとした。

12例の治療前後の臨床データを下表に示した。

④ 動脈血ガス分析の推移

表3：responder の治療前後の動脈血ガス分析結果 (単位は全て mmHg)

症例	PO2		PCO2		AaDO2		ΔAaDO2
	pre	post	pre	post	pre	post	
J070	68.6	92.0	40.2	38.9	33.2	11.3	21.9
J105	53.3	68.0	37.9	35.4	51.2	39.5	11.7
J130	58.0	72.0	40.4	42.0	43.5	27.6	15.9
J135	58.4	76.0	38.5	33.3	45.4	34.0	11.4
J155	52.2	69.1	37.8	39.5	52.4	33.5	18.9
J158	34.0	52.0	35.4	43.1	73.5	46.3	27.2

表4：nonresponder の治療前後の動脈血ガス分析結果 (単位は全て mmHg)

症例	PO2		PCO2		AaDO2		Δ
	pre	post	pre	post	pre	post	
J009	57.0	55.0	47.9	51.2	35.5	33.6	1.9
J103	51.0	46.0	45.7	46.0	44.2	48.8	-4.6

J140	67.8	66.3	37.6	35.4	37.1	41.2	-4.1
J148	57.3	60.4	39.0	40.1	45.9	41.5	4.4
J 6 9	64.2	67.0	45.2	38.5	31.6	36.8	-5.2
J160	54.2	52.7	44.9	42.2	41.9	46.7	-4.8

以上のように治療の有効・無効は、動脈血酸素分圧及び肺胞—動脈血酸素分圧較差を見る限り、はっきりと治療反応群と無効群に分かれた。

⑤呼吸機能の推移

表5：responder 治療前後の呼吸機能

症例	%VCpre	%VCpost	%FVCpre	%FVCpost
J070	95.6	103.4	88.9	96.6
J105	82.5	79.4	70.1	86.0
J130	45.1	52.9	44.5	50.3
J135	60.8	69.4	61.1	72.4
J155	107.1	105.8	100.0	109.8
J158	45.0	51.5	47.4	51.5

表6：nonresponder の治療前後の呼吸機能

症例	%VCpre	%VCpost	%FVCpre	%FVCpost
J009	36.7	31.1	31.4	26.5
J103	28.5	37.9	37.2	33.7
J140	89.1	83.8	88.4	86.1
J148	85.7	84.4	84.7	87.0
J 6 9	92.9	97.5	90.9	93.6
J160	46.0	49.6	44.6	49.4

以上の結果から、responder では、肺活量に有意な改善は見られなかったものの、努力肺

活量に有意な増加 ($P<0.05$) が認められた。Responder ではいずれも有意ではなかった。

⑥末梢血白血球の推移

表7：responder 末梢血白血球の解析

症例	WBCpre	WBCpost	Eosino%pre	Eosino%post
J070	5,850	6,140	2.2	1.1
J105	4,380	5,370	1.8	0.4
J130	6,100	3,500	6.0	6.0
J135	5,300	5,800	3.3	0.6
J155	3,400	3,700	2.0	1.0
J158	7,570	7,290	7.4	6.9

表8：nonresponder 末梢血白血球の解析

症例	WBCpre	WBCpost	Eosino%pre	Eosino%post
J009	7,040	10,260	1.7	0.6
J103	4,560	7,940	4.6	1.0
J140	5,900	5,700	2.0	5.0
J148	4,100	3,700	0.6	0.5
J 6 9	6,600	6,500	1.0	1.0
J160	5,400	8,000	8.1	7.6

以上のように responder では治療前後で末梢血好酸球数%の減少が認められた ($P<0.05$)。これは、好酸球の実数についても同様であった。白血球数では responder, nonresponder とともに有意な変動は見られなかった。

⑦治療前後の血清マーカーの推移

表9：responder の血清マーカー解析結果

症例番号	KL6pre	KL-6 post	SP-D pre	SP-D post
J 7 0	5440.0	3750.0	573.0	551.0
J 1 0 5	15400.0	14900.0	883.0	482.0
J 1 3 0	22900.0	8690.0	715.0	511.0
J 1 3 5	2480.0	1450.0	275.0	151.0
J 1 5 5	721.0	252.0	189.0	141.0
J 1 5 8	6530.0	3890.0	588.0	482.0

症例番号	SP-A pre	SP-A post	CEA pre	CEA post
J 7 0	172.0	129.0	5.2	3.9
J 1 0 5	222.0	152.0	7.4	5.7
J 1 3 0	314.0	171.0	19.0	6.5
J 1 3 5	46.5	31.5	1.5	0.6
J 1 5 5	49.1	47.0	1.0	0.8
J 1 5 8	193.0	163.0	8.8	6.1

表 1 0 : nonresponder の血清マーカー解析結果

症例番号	KL6pre	KL-6 post	SP-D pre	SP-D post
J9	2850.0	3960.0	578.0	594.0
J103	20200.0	6540.0	586.0	412.0
J 1 4 0	10500.0	13100.0	431.0	437.0
J 1 4 8	4280.0	3780.0	299.0	317.0
J 6 9	未測定	未測定	未測定	未測定
J 1 6 0	7900.0	8820.0	270.0	231.0

症例番号	SP-A pre	SP-A post	CEA pre	CEA post
J9	49.5	70.3	1.7	2.4
J103	278.0	160.0	19.0	6.5
J 1 4 0	161.0	195.0	6.0	6.8
J 1 4 8	54.5	77.0	1.5	1.0
J 6 9	未測定	未測定	未測定	未測定
J 1 6 0	98.8	79.4	2.7	2.4

以上のように KL-6, SP-A,D, CEA など肺胞蛋白症で上昇する血清マーカーは responder で有意に減少した (いずれも $p < 0.05$)。これに対して、nonresponder では差が認められなかった。

⑧ 気管支肺胞洗浄液(BALF)所見の推移

表 1 1 : responder の BALF 細胞密度解析結果

症例	BALF 細胞密度 (個/ml)	
	治療前 (x10 ⁴)	治療 12W (x10 ⁴)
J070	12.6	31
J105	23.8	36.5
J130	1.76	12.5
J135	9.6	15.2
J155	13.6	28
J158	3.89	73.7

表 1 2 : responder BALF 細胞分画 (%)

症例	Neutro pre	Neutro post	Lymph pre	Lymph post
J070	2.80	14	18.90	21.8
J105	0.00	0.7	13.40	23.9
J130	0.00	0.4	27.70	3.8
J135	0.60	0.5	26.00	10.9
J155	1.30	0	52.30	13.7
J158	12.60	7.4	4.90	27.3

症例	macro pre	macro post	eosi pre	eosi post
J070	78.30	64.2	0	0
J105	86.60	75.4	0	0

J130	70.30	95.8	1.5	0
J135	73.40	88.6	0	0
J155	44.80	85.9	0.3	0.4
J158	78.00	64.2	4.5	0.6

表 1 3 : nonresponder の BALF 細胞密度
解析結果

細胞密度 (x10 ⁶ 個/ml)	
J009	5.58 65
J103	3.55 10.6
J140	17.6 37.8
J148	5.28 63
J69	5.76 11.48
J160	0.27

表 1 4 : nonresponder BALF 細胞分画 (%)

J009	2.00	4.6	J009	15.40	4.1
J103	0.00	2.9	J103	21.20	4.1
J140	0.50	0	J140	2.50	20.8
J148	2.00	1	J148	35.20	6.7
J69	0.90	0.5	J69	2.60	12
J160	0.00		J160	2.50	

J009	81.90	91.3	J009	0	0
J103	76.90	93	J103	1.9	0
J140	97.00	79.2	J140	0	0
J148	62.80	92.3	J148	0	0
J69	96.50	80.7	J69	0	0.7
J160	96.20		J160	1	

以上のことから、responder, nonresponder ともに治療前に比べて治療後の BALF 中細胞数の増加が見られた (p<0.05)。これは、主としてマクロファージの増加による。

⑨ 血清および気管支肺胞洗浄液中の抗 GM-CSF 自己抗体価の変動

表 1 5 : responder の BALF, 血清自己抗体価の推移

症例	autoAbs in	autoAbs in	antiGM	antiGM
	BAL pre	BAL post	serum pre	serum post
J070	1.22	0.67	205.9	228.7
J105	1.25	0.39	78.5	76.8
J130	2.2	0.18	34.3	47.3
J135	2.21	1.56	280.0	284.4
J155	0.29	0.39	94.6	88.9
J158	2.9	2.03	369.8	293.3

表 1 6 : nonresponder の BALF, 血清自己抗体価の推移

症例	autoAbs in	autoAbs in	antiGM	serum antiGM	serum
	BAL pre	BAL post	pre	post	
J009	0.16	0.17	45.7	87.4	
J103	0.33	0.15	83.6	55.7	
J140	1.33	1.17	145.8	134.9	
J148	2.06	2.88	145.0	247.2	
J69	1.53	0.73			
J160	0.11		122.2	148.6	

以上のことから、BALF 中の抗 GM-CSF 自己抗体価は responder でのみ、有意に減少した。血清中の自己抗体価はこれに対して

両群ともに変動がなかった。

副作用及び治療中の合併症について

GM-CSF吸入によると思われる重篤な副作用は認められなかったが、経過中以下の点に留意した。

- ① 近畿中央病院で治療登録した患者 J 1 3 3 の肺アスペルギルス症が治療前に悪化。治療を中止せざるを得なかった。今回の統計にはこの患者は含まれていない。
- ② 医療センターの症例 J 9 が治療中末梢血の白血球増加が見られたが、中止基準の $15000/\text{mm}^3$ に満たなかったため、そのまま治療を継続終了した。
- ③ 医療センターの症例 J 1 0 3 については、治療後に軽度の心不全が現れたが、治療前から心肥大が見られていたため、低酸素血症にもかかわらず過剰労働（学校給食の調理士）があったと判断し、休職・在宅酸素療法により経過観察している。

D.まとめ

今年度の治療研究を終えて得られた知見を以下にまとめた。

- ① 無治療経過観察により、自然寛解した患者は皆無であった。
- ② 本治療の有効率は 50%（12例中6例）であった。
- ③ 治療反応群と無効群の2群にはっきりと分かれた。反応群の平均動脈血酸素分圧の上昇は 17.4 mmHg であった。
- ④ 治療反応群では、治療前後で%努力肺活

量の増加、末梢血好酸球の減少、血清 KL-6, SP-A, SP-D, CEA の減少、

気管支肺胞洗浄液中の細胞数の増加、気管支肺胞洗浄液中の抗 GM-CSF 自己抗体価の減少が統計的有意差をもって現れた。これに対して治療無効群では、気管支肺胞洗浄液中の細胞数の増加のみが有意であった。

考察

パイロットスタディーで治療した3例では全例改善し、動脈血酸素分圧の上昇が平均 25mmHg と顕著であったのに対し、今回の多施設共同プロトコールによる治療研究では、有効率は 50% に留まり、かつ有効例の動脈血酸素分圧の上昇も 17 mmHg と低かった。パイロットスタディーは3例と少数例であることから、単純に今回の結果と比較出来ないが、以下の点で治療法が異なっている。

1. 用いた GM-CSF は、パイロットスタディーでは大腸菌由来、今回は酵母由来で生物活性は同一重量あたり、前者が 1.5 倍強い。
2. パイロットスタディーで吸入した GM-CSF は一日量 250 μg で今回の二倍。
3. 治療期間は、パイロットスタディーでは隔週投与で治療期間は全 24 週であった。今回は連日投与で全 12 週であった。

得られた結果をパイロットスタディーと今回を比べると、気管支肺胞洗浄液中の抗 GM-CSF 自己抗体価がパイロットスタディーの時には顕著に減少していたのが、今回は、減少がにぶく、その分、BALF 肺胞マクロフ

フェージの分化成熟が不十分であることが示唆された。しかしながら、ほとんどの症例で BALF 中肺胞マクロフェージの数は増加しており、GM-CSF 吸入の影響があったと考えられる。問題は、十分な成熟が得られる前に治療を終了したことにより、マクロフェージによるサーファクタントの吸収分解までに至らなかったのであろう。また、6 週後判定で dose up した症例 7 例のうち、12 週後に有効と判定された症例は、2 例のみであったことから、漸増法が極めて有効であるとは言いがたい。しかしながら、パイロットスタディーのプロトコールでは 1 例あたりの GM-CSF の費用が約 300 万円もかかることから、単純に dose と治療期間を延長することは難しい。

以上のことから、平成 16 年度の治療計画に際して以下の点に留意する。

- ① 治療導入時 250 μ g でスタートする。
- ② 休業期間を設けて全治療期間を長くする。
- ③ 漸増法をやめ、漸減法をとる。

現在のところ、以下の治療レジメンを検討している。

16 年度に施行予定のプロトコール

- ① 患者の同意書取得後、12 週間の無治療経過観察期間をおく。
- ② 無治療経過観察期間終了後、1 週間程度の入院。治療前検査後、治療開始
- ③ 治療期間 1～12 週まで 250 μ g を 1 日 2 回に分け、8 日間吸入 + 6 日間休業 を 1 クールとし、6 クール行う。
- ④ 治療期間 9～24 週まで 125 μ g 1 日 1 回吸入、4 日間吸入 + 10 日間休業 を 1 クー

ールとし、6 クール行う。

- ⑤ 24 週目に評価のための入院。治療後検査。治療終了。

E. 結論

12 例の特発性肺胞蛋白症患者に対し GM-CSF 吸入療法を試みた結果、6 例に効果が確認された。また、副作用もなく、在宅治療も可能であることが分かった。しかしながら、パイロットスタディーの 3 例に比べて治療効果が弱く、治療レジメンの変更が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

GM-CSF 吸入による副作用、弊害は確認できなかった。

G. 研究発表

英文原著

1. Seymour JF, Doyle IR, Nakata K, Presneil IJ, AR Dunn Relationship of anti-GM-CSF antibody concentration, surfactant protein A and B levels, and LDH to pulmonary parameters and response to GM-CSF therapy in patients with idiopathic alveolar proteinosis. *Thorax*

2003, 57, 252-257

2. Ohmishi T, Yamada G, Shijubo, N, Takagi Y, Itoh T, Nakata K, Abe S. Secondary alveolar proteinosis associated with myelodysplastic syndrome *Internal Medicine* 2003, 42(2), 187-190

3. F Khanjari, H Watier, J Domenech, E Asquier, P Diot, and K Nakata

Successful recombinant GM-CSF treatment of pulmonary alveolar proteinosis (PAP) in a patient without anti-GM-CSF antibodies *Thorax* 2003;58, 645

4. Kanji Uchida, Koh Nakata, Bruce C. Trapnell, Takahiro Terakawa, Emi Hamano, Ayako Mikami, Ikumi Matsushita, John F. Seymour, Masayoshi Oh-eda, Ikuo Ishige, Yoshinobu Eishi, Takayuki Kitamura, Yoshitsugu Yamada, Kazuo Hanaoka, and Naoto Keicho

High Affinity Autoantibodies Specifically Eliminate Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Activity In The Lungs Of Patients With Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis *Blood*, 2004;103, *in press*

英文総説

1. Trapnell B, Whitsett J, Nakata K. Pulmonary Alveolar Proteinosis; Mechanism of Disease. *New England Journal of Medicine*. 2003, 349:2528-40

邦文総説

1. 中田 光 肺胞蛋白症—最新の進歩、日本胸部臨床、2003, 62, 197-203
2. 中田 光 特発性肺胞蛋白症におけるGM-CSF吸入療法、2003, 51巻、10

27-1030

3. 曾根三郎、河野修興、林清二、柿内聡司、中田 光、呼吸器疾患の分子生物学と臨床への橋渡し、日本内科学会誌、2003, 92巻、118-132

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号 特願平11-244595

出願日 平成11年8月31日

優先権主張番号 特願平10-303858

名称：抗GM-CSF自己抗体およびその測定試薬

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
 分担研究報告書

我が国の特発性肺胞蛋白症135例の疫学研究

分担研究者 工藤 宏一郎

国立国際医療センター副院長

研究要旨 我が国の特発性肺胞蛋白症135例の疫学調査を行った。全例血清抗GM-CSF自己抗体陽性で、男女比は約2.2:1である。他のびまん性肺疾患と異なり、家系内発生が1例もないことは、欧米の報告と一致していた。診断時の年齢は平均で51±14歳で、欧米の総説よりも若干高年齢にシフトしている。喫煙者もしくは喫煙歴のある患者は50%程度で、むしろ粉塵吸入歴のある患者が25%もいた。この疾患の発症に何らかの抗原暴露が関与しているのではないかと考える。また、77例の予後調査では、1年後に無治療群で33%、区域洗浄を受けた患者では、50%、全肺洗浄群では56%に動脈血酸素分圧の改善が見られた。

目的

特発性肺胞蛋白症は、肺胞及び終末気管支に過剰なサーファクタントの貯留がおこり、労作時の呼吸困難を来す疾患である。これまで、我が国における本症の疫学調査は、長井らが行った69例の cross sectional study が最大規模で、本格的な疫学調査は、行われていない。

主任研究者 中田のところへは、1999年から2000例を越える内外の患者検体及び患者情報が寄せられてきたが、それをもとに、2000年から本症のデータベースを作成してきた。これまで寄せられた我が国の患者170例のうち、データが揃っている135例を対象に血清診断時の患者臨床情報、患者血清パラメーター、動脈血ガス分析、呼吸機能等のデータを解析した。また、2002年と2004年の二度にわたり、主治医へのアンケート調査を施行し、77例の患者について診断時から半年～4年後の後ろ向き予後調査を行った。本研究の目的は、以上の疫学調査を通じて①どのような患者に積極的な治療を施行すべきか、②どの時期に治療すべきかを勘案することである。

方法：

*対象：全国の諸施設から血清診断目的で送られて

くる血清を保存し、主治医より患者情報を e-mail で送ってもらった。

*データベース：エクセル形式で作成し、Stat View を用いて統計解析した。

*解析項目：年齢、性別、喫煙歴、症状、発症からの月数、及び血清マーカーとして抗GM-CSF自己抗体価、KL-6、CEA、SP-A、SP-D、LDH、呼吸機能として AaDO₂、%Dlco であった。

*重症度分類：以下の表のように、患者の重症度を動脈血酸素分圧に基づいて定義した。

表1：患者の重症度分類表

DISEASE SEVERITY SCORE (INOUE 2001)	
Score	
1	without symptom, and PaO ₂ ≥ 70 torr
2	with symptom (dyspnea, cough, subfever et al.), and PaO ₂ ≥ 70 torr
3	70 torr > PaO ₂ ≥ 60 torr
4	60 torr > PaO ₂ ≥ 50 torr
5	50 torr > PaO ₂

*後ろ向き予後調査：

77例の主治医にアンケート調査を行い、半年～4年後の重症度を上記重症度分類に基づき調査した。

B. 結果

1. 135例の患者の demographic data

表2：135例の demographic data

Severity score	n (female:male)	age (yr)	Smoking status				O ₂ (%)	
			NS	LS	CS	HA	V	NA
1	30 (13/17)	47±15	11	5	8	2	2	17/11
2	38 (7/31)	50±15	10	17	11	0	0	16/12
3	29 (10/19)	53±11	11	7	10	1	4	14/11
4	21 (8/13)	51±12	9	6	5	1	4	15/3
5	9 (1/8)	55±7	1	2	2	4	2	3/0
NA	12 (5/7)	55±15	7	1	1	3	0	8/4
Total	135 (42/93)	51±11	52	38	48	7	21	73/41

* NA=SD, NA: not available, ** O₂: exposure: occupational+environmental exposure

血清診断時の年齢は平均51歳で重症者ほど高齢となる傾向がみられた。欧米で指摘されている喫煙との因果関係であるが、非喫煙者52例、既喫煙者38例、喫煙者38例であり、喫煙と強い因果関係があるとは言い難かった。

職業上粉塵吸入歴のある患者は調査しえた94例のうち、21例(22%)もあった。かねてから、続発性肺胞蛋白症の患者の一部に吸入歴があるとされていたが、今回の調査では抗GM-CSF自己抗体陽性の患者にこうした一群があることが示唆された。

2. 発症から診断までの期間と治療

Severity score	period from the onset (m)	% of symptomatic patient (**)	Therapy		
			LI	SBAL lavage	GM-CSF and/or lavage
1	31±36	0	4	1	22
2	29±47	100	6	14	18
3	45±57	71	11	6	10
4	27±25	89	11	5	2
5	31±42	100	2	1	2
Total	31±47	92	34	30	54

* From the first symptom (or at presentation (P)) to the date of serological diagnosis (SD)
** Major symptom was dyspnea on exertion (DOE). Other symptoms: apnea, weight-purification, hypercapnia

発症あるいはレントゲン異常発見から血清診断までの期間は平均3.4ヶ月で、重症度とは関係がなかった。症状でもっとも多いのが、労作時息切れであるが、PO₂が50 torr台のかなり重症と思われる患者でも、11%は無症状であり、かねてから教科書的に指摘されていた「重症度のわりに症状が軽い」と

いうことが確認された。

治療であるが、無治療経過観察が全体の40%もあり、ついで全肺洗浄が25%であった。

3. 血清パラメーターと呼吸機能、重症度との相関
抗GM-CSF自己抗体価、KL-6、CEA、SP-A、SP-D、LDHとAaDO₂、%Dlco、重症度スコアとの相関を以下に示す。

Serum markers	AaDO ₂	r (p-value) %Dlco	Disease severity score
Anti-GM-CSF ab	0.027 (0.286)	-0.078 (0.413)	0.0825 (0.350)
KL-6	0.22 (0.001)	0.22 (0.001)	0.23 (0.0001)
CEA	0.11 (0.0001)	0.12 (0.0001)	0.301 (0.0001)
SP-A	0.25 (0.0001)	0.21 (0.0001)	0.18 (0.0001)
SP-D	0.33 (0.0001)	0.17 (0.001)	0.39 (0.0001)
LDH	0.46 (0.0001)	0.050 (0.007)	0.33 (0.0001)

na=135, p<0.05

AaDO₂、%Dlco、重症度スコアのどれともよく関連したのが、CEA及びKL-6で、自己抗体価は診断には絶対的に有用だが、重症度とは全く相関しないことが確認された。

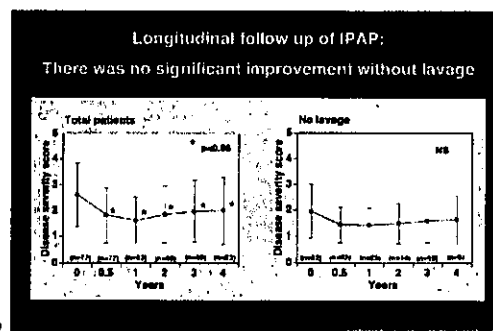
4. 特発性肺胞蛋白症患者の治療とその効果

135例のうち、経過観察の患者は54例、反復区域洗浄の患者は30例、全肺洗浄が34例、GM-CSF吸入療法を行ったのが5例であった。1年後の効果では、情報が寄せられた123例中、改善が37例、不変が51例、悪化が35例であった。

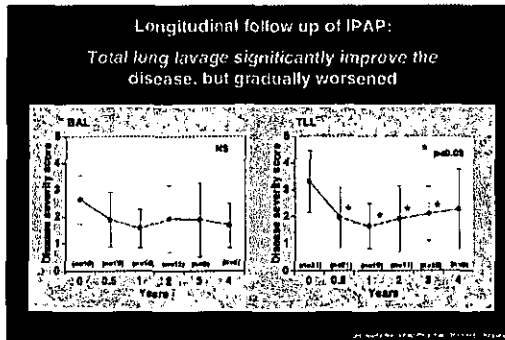
5. 予後調査の結果

前述したように、77例について予後調査を行った。

全患者及び無治療経過観察の患者について血清診断後の年数と重症度との関係を示したのが以下の図である。

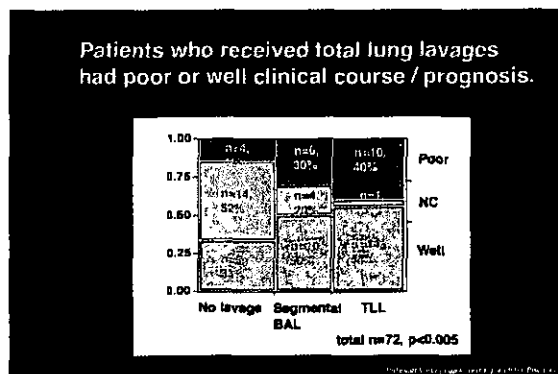


これによると、治療的肺洗浄をしない患者では4年間の経過観察中ほとんど重症度に変化がみられない。次に、反復区域洗浄を行った患者及び全肺洗浄を行った患者についての予後を以下に示す。



- 5) 反復区域洗浄では、1年後に改善傾向になり、その後も悪化していない。一方、全肺洗浄では、もともとの重症度が高いが、1年後には、有意に改善し、その後ゆっくりと悪化する傾向が見られた。

また、下図のように経過観察群では予後不変が52%を占めるのに対し、反復区域洗浄及び全肺洗浄では、予後不変の患者の割合が少なかった。



6. 結果のまとめ

- ① 特発性肺胞蛋白症135例の性別は男女比2.2:1、血清診断時平均51歳であり、62%が有症状者であり、主たる症状は労作時息切れであった。
- ② 30%の患者が全肺洗浄を受けており、23%が反復区域洗浄を受けた。
- ③ 予後では、30%が改善、41%が不変、28%が悪化した。
- ④ 血清KL-6、CEA、SP-A、SP-Dは重症度をよく反映していたが、抗GM-CSF自己抗体価は重症度とは全く関係がなかった。
- ⑤ 全肺洗浄を受けた患者は一時的に寛解したが、40%の患者は再悪化した。

C. 考察

今回の調査で、まず、本症の一群に道路工事やビルの解体、粉塵暴露の可能性がある工場などに勤務する人が22%もいたことは、特記すべきである。GM-CSF自己抗体価が重症度と相関しないことは、これまでも指摘していたが、今回の調査でより明確になった。分担研究者慶長が報告しているように、自己抗体のGM-CSF上のエピトープは患者によって分布がばらばらで、そのことが抗体価が重症度を反映しない理由と思われる。

予後調査では、全肺洗浄の効果が全体として1年までは継続するが、それ以降再悪化していくという結果がでたことは、注目に値する。予後と血清パラメーター、呼吸機能、喫煙歴、吸入歴との関係については、さらに症例数を増やして検討していきたい。

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

特発性肺胞蛋白症の発症機序における抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
自己抗体の役割に関する研究

分担研究者

国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

部長

慶長直人

要約：特発性肺胞蛋白症 (idiopathic PAP; iPAP) 患者の血清中及び気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 中に、サイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) に対する中和自己抗体が存在することが報告されている。GM-CSF は肺胞腔内において肺胞マクロファージ (alveolar macrophage; AM) の終末分化を促し、サーファクタント代謝に重要な役割を担っているということが、GM-CSF シグナルのノックアウトマウスの研究からわかっている。GM-CSF ノックアウトマウスが PAP 類似の病像を呈することから、ヒト iPAP でも抗 GM-CSF 自己抗体による GM-CSF シグナル伝達の阻害が疾患発症と関連しているという仮説を立て、検証した。iPAP 患者より分離した AM 及び GM-CSF 依存性の細胞株である TF-1 を用いたバイオアッセイから、iPAP 患者 BALF 中に、GM-CSF 活性を中和する作用が認められた。また iPAP 患者血清中および BALF 中に、高濃度の抗 GM-CSF 自己抗体が疾患特異的に存在することがわかった。さらに、抗 GM-CSF 自己抗体は、肺胞内に局在しており、一部は GM-CSF と免疫複合体を形成していることが確認された。iPAP 患者から分離した自己抗体の結合力、中和能、特異性を検討した結果、自己抗体は GM-CSF とその受容体との間の結合力よりも強い結合力を持っており、非常に強い中和活性をもち、更に GM-CSF の立体構造を認識してその結合は高い特異性を持つことがわかった。自己抗体のエピトープ検索をした結果、自己抗体は GM-CSF の活性中心と言われるドメインを特に強く認識することがわかった。これらの結果から、iPAP 患者に特異的に発現している抗 GM-CSF 自己抗体は、肺内の GM-CSF 活性を効果的かつ強力に中和して、GM-CSF のシグナル伝達を阻害することにより、AM の成熟を抑制していると考えられる。

研究目的

肺胞蛋白症 (Pulmonary alveolar proteinosis; PAP) は、肺胞に過剰なサーファクタント脂質と蛋白が貯留し、進行性の呼吸不全を起こす疾患である (1-3)。1958 年に Rosen らが報告して以来、現在までに 200 以上の報告があり、400 名以上の症例が確認されている。発病率は 0.36、有病率は 3.7 (人口 100 万対) (4)、診断確定時年齢の平均値は 37.8 ± 13.3 歳で、2:1 ~ 4:1 で男性に多い疾患とされている (5-7)。臨床的に PAP は先天性、後天性に分類され、後天性はさらに、血液疾患、呼吸器感染症、

粉塵吸入などに続いて発症する続発性と原因不明とされる特発性に分類される。このうち特発性肺胞蛋白症 (idiopathic PAP; iPAP) は、PAP の 90% を占めると言われている (2)。iPAP は、自然緩解する症例から、高度の呼吸不全を呈する症例まで、その臨床経過は様々である (2)。

iPAP の病因は現在も不明であるが、近年サイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) 欠損マウス (GM^{-/-} mice) やそのリセプター欠損マウス (GM-RbC^{-/-} mice) が、

PAP 類似の病態を呈することから、GM-CSF シグナル伝達の異常が疾患発症と関連があるのではないかと考えられている(8-11)。

GM-CSF は、分子量 23kDa の糖蛋白で、肺の組織から分離された。造血系の前駆細胞の中で顆粒球、マクロファージのコロニー増殖を促す作用をもつことからこの名が命名された(12)。単球、マクロファージなど食食系細胞の増殖因子として働くほか、好酸球、赤血球、樹状細胞の産生も刺激することが知られている(13-16)。また、造血系前駆細胞だけでなく、GM-CSF は肺泡マクロファージ(alveolar macrophage; AM)などの成熟した血球系細胞や、血球系細胞以外の肺泡上皮細胞なども刺激することがわかっている(17-20)。GM-CSF のサーファクタント内発現濃度は、血清中の数百倍とも言われており(21)、また血液細胞以外の、肺線維芽細胞、気管支、気管上皮、肺泡 II 型上皮でも産生されている(22-25)ことから、肺内で特に大きな作用を持つものと思われていたが、GM-CSF 欠損マウス(GM^{-/-} mice)やそのリセプター欠損マウス(GM-Rb^c mice)が造血系には異常を来さないのに対し、肺にはサーファクタント脂質が貯留する肺泡蛋白症類似の病像を呈した(8-11)ことで、GM-CSF の肺における重要性が特に認識されるようになった。

GM^{-/-}マウスの肺泡蛋白症様病像あるいは病態は、[1]リコンビナント GM-CSF を全身ではなく肺に投与すること(26)、[2]ベクターを用いて気道上皮に GM-CSF を強発現させること(27)、[3]気道上皮に肺特異的プロモーターを用いて GM-CSF を強発現させる(28, 29)ことによって改善した。また GM-Rb^cマウスの PAP 類似病像は、ワイルドタイプドナーから骨髓移植することで改善した(30)。GM^{-/-}マウスの AM はサーファクタント脂質、蛋白の貯留による、“泡沫状 (foamy appearance)” を呈し、食食能が低下し、接着力が低下するなど多くの機能低下が認められる(31-34)。これらの機能不全は GM^{-/-}マウスにおいて GM-CSF を補充することで改善した(26-28, 32, 34)。また肺腔内における GM-CSF 発現が、骨髓系細胞の分化を誘導

する転写因子である PU.1 の AM における発現を維持し、AM の終末分化を促すのに必須であることも確認されている(29, 33-35)。終末分化した AM はサーファクタントを代謝分解するという非常に重要な役割を担っていると考えられる。

ヒトの iPAP と GM-CSF^{-/-}マウスとの病態の類似点には、以下の共通点が認められる。[1]iPAP 患者の組織像が GM^{-/-}マウスのそれと非常に似ている(1, 8-11, 36, 37)。[2]iPAP のヒトと GM^{-/-}マウスの AM にはいくつかの形態的機能的異常が認められる。すなわち“foamy”な形態(8, 9, 36, 38)、食食能の低下(32, 33, 36, 37, 39)、そして付着能の低下(32, 36)である。

このためヒト iPAP においても GM-CSF シグナルの阻害によるサーファクタントホメオスタシスの障害が関与しているのではないかと考えられていたが、1999 年、中田らが iPAP 患者の血清、BALF 中に GM-CSF を中和する自己抗体を発見した(40, 41)。この抗体は iPAP 患者に疾患特異的に発現しており、先天性、続発性の PAP、他の肺疾患、健常者には認められなかった(41, 42)。

これらの知見より、患者肺において肺が産生する GM-CSF が自己抗体により中和され、その生物活性が阻害される結果、GM-CSF 欠損マウス同様に肺泡マクロファージの分化障害が惹起されることが想定されたが、これまでこの仮説を裏付ける根拠となる報告はなされていなかった。患者肺内の GM-CSF が自己抗体によって強く障害されていることを示す根拠として明らかにすべき点は以下の3点であると考えた。

1. iPAP 患者の肺内では GM-CSF 活性が実際に抑制されていること
2. またその阻害が自己抗体の存在によるものであること
3. 自己抗体が GM-CSF 活性を中和するに十分な性状(結合力、中和活性、特異性)をもち、また十分量存在すること

今回以上の各点を検討した。

IV. 対象と方法

IV-1. 材料

iPAP 患者 107 人、他の肺疾患患者 10 人 (特発性肺線維症 3 名、急性呼吸窮迫症候群 2 名、サルコイドーシス 3 名、膠原病性血管疾患 2 名)、健常者 19 人から血清を採取し、また iPAP 患者 34 人、他の肺疾患患者 14 人(サルコイドーシス 3 名、過敏性肺臓炎 2 名、好酸球性肺炎 4 名、特発性肺線維症 4 名、好酸球性肉芽腫 1 名)、健常者 18 人から気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)を採取した。また診断的肺生検を行った症例の肺組織を 3 検体、iPAP にアスペルギルス感染症を合併し、肺葉切除を行った症例の非感染肺を 1 検体、肺癌の肺葉切除症例の肺健常部を 4 検体得た。

iPAP は、臨床症状、胸部レントゲン写真、胸部 CT 写真、BALF の生化学的性状の解析 (proteinaceous material の存在、明らかな感染の否定、BALF 中の肺胞マクロファージの形状) で行い、肺生検を施行した症例は、組織病理学的な所見も含めて診断した。二次性 PAP の原因とされる、血液疾患、感染症などの基礎疾患を合併せず、toxic inhalation も無いことを確認した。また GM-CSF による治療歴の無い症例を対象とした。すべての患者から、文書によるインフォームドコンセントを得た。自己抗体価の測定用に採取した血清は自己抗体の血清診断目的で採取したものを使用した。抗体の性状解析用の血清、BALF、肺組織の採取は、本研究班に参加している 7 施設で行い、それぞれの施設の倫理委員会による承認を得た。

IV-2. 試薬

以下のリコンビナント試薬、抗体、細胞株は、併記した方々、施設から無償供与を受けた。大腸菌由来ヒト、マウス GM-CSF はキリンビール株式会社、Chinese hamster ovary cell (CHO)由来ヒト GM-CSF はノバルティスファーマ(株)、酵母由来ヒト GM-CSF は Immunex Corp.、リコンビナントウシ GM-CSF は横溝祐一氏(家畜衛生試験場)。

エピトープを決定した抗 GM-CSF マウス抗体(No. 4117, 1089, 3092, 1022 それぞれ GM-CSF のアミノ酸残基 1-11, 40-77, 78-94, 110-127 を認識する) (43) は、金倉謙氏(大阪大学)。GM-CSF、IL-3、エリスロポイエチン依存性に増殖する細胞株(cell line)である TF-1 cell (44)は、北村俊雄氏(東京大学医学部附属医科学研究所)。

以下の試薬、抗体等は併記の企業より購入した。 [¹²⁵I]-Bolton-Hunter 標識ヒトリコンビナント GM-CSF(recombinant human GM-CSF; rhGM-CSF)は NEN Life Science Products。リコンビナントヒトサイトカイン(Interleukin (IL)-3, IL-4, IL-10, 顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、インターフェロン γ (interferon- γ , IFN- γ)、フィコエリスリン標識 rhGM-CSF (phycoerythrin labeled GM-CSF, PE-GM-CSF)は R & D Systems。Fluorescein isothiocyanate (FITC)ラベル抗ヒト IgG マウス抗体は BD Biosciences 社。パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ウサギ F(ab')₂ ポリクローナル抗体、非標識抗ヒト IgG ヤギポリクローナル抗体は DAKO Corporation。パーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体は株式会社ニチレイ。抗ヒト GM-CSF ウサギ抗体、ヤギ中和抗体、マウス中和抗体は R&D Systems。ヒト精製 IgG は Sigma-Aldrich, Inc.。

GM-CSF 分子のアミノ酸残基 54-73 特異的ウサギ抗体は、同ペプチドをウサギに免疫し、アフィニティークロマトグラフィーで精製して得た。GM-CSF の 4 カ所のシステイン残基をカルボキシメチル化することで、S-S 結合を切断した GM-CSF (carboxymethylated)を作成した(45)。トリプシン消化した GM-CSF (trypsin fragment)は酵素/基質比を 1:50(wt/wt)で 37°C 18 時間反応させた後、high performance liquid chromatography (HPLC)で精製した(46)。

IV-3. 特発性肺胞蛋白症患者および健常者の気管

支肺胞洗浄

iPAP 患者、健常者の BALF は、リドカインによる局所麻酔下、気管支ファイバースコープを用いて採取した。50ml の生理食塩水を右の中葉あるいは左の舌区に注入し、ただちに回収した。BALF から、細胞成分と上清を遠心分離し、細胞成分は細胞数を数えた後、集細胞遠心装置 (Cytospin®, Thermo Electron Corp.) を用いてプレパラート上に単層細胞標本を作製し Wright-Giemsa 染色を行って、細胞分画を測定した。

IV-4. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液が患者肺胞マクロファージの *in vitro* の成熟に及ぼす影響

肺胞蛋白症患者の肺胞マクロファージは、大きく 3 つの形態的特徴を持っているとされる (38,47)。このうち iPAP 患者の肺胞マクロファージの典型的形態とされる泡沫状マクロファージ (foamy macrophage)、死細胞様マクロファージ (ghost-like macrophage) は、プラスチックプレート付着能が弱く、単球様マクロファージ (monocyte-like macrophage) といわれる細胞成分が付着する。

iPAP 患者の気管支肺胞洗浄液から肺胞マクロファージを分離し、プラスチックプレート上で、RPMI1640 培地 (日水製薬株式会社) 中で 2 時間培養した後、付着細胞をトリプシン・エチレンジアミンテトラ酢酸 (trypsin ethylenediaminetetraacetic acid; trypsin-EDTA, Invitrogen Corp.) で処理し、セルスクレーパー (住友ベークライト) を用いて回収した。回収した付着細胞を 5×10^4 cells / well で 96 穴プレートに播いた。培地中に、rhGM-CSF、及び 5 倍希釈の iPAP 患者または健常者の BALF を添加して、2 週間培養した。培養終了後、細胞の形態を位相差顕微鏡 (Diaphot 300, ニコン) で観察し、生細胞率をトリパンブルー色素排除試験で測定した。また細胞のフォルマザン形成能を 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) アッセイ法を用いて測定した (41, 48)。培地中に MTT (Sigma Chemical Co.) $5 \mu\text{g/ml}$ を加えて 5 時間培養

し、フォルマザンの針状結晶が形成された後、isopropanol/0.1N HCl で結晶を可溶化し、595nm の吸光度を測定した。

IV-5. 特発性肺胞蛋白症患者肺および正常肺における GM-CSF の免疫組織学的証明

iPAP 患者の診断的胸腔鏡下肺生検組織を 10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋したサンプル 3 症例から、 $5 \mu\text{m}$ 切片を作成した。また iPAP 経過中に肺アスペルギルス症に罹患した患者の切除肺で、病理学的に感染していない部分を periodate / lysine / paraformaldehyde で 10 時間 4°C で固定した (49)。サッカロースで組織を脱水したのち、Tissue Tek® (Sakura Finetechnical Co., Ltd.) に包埋して、液体窒素中で凍結し、Kryostat (Leitz) を用いて $5 \mu\text{m}$ 切片を作成した。コントロールとして肺癌患者 4 例の切除肺のうち、正常部の組織切片を用いた。これらの切片を室温でブロッッキング液 (10mM Tris, 5mM EDTA, 0.15M NaCl, 0.25% gelatin, 0.05% (vol/vol) Tween 20, pH 8.0) に 30 分浸透し、Tris buffered saline (TBS) で洗浄したのち、一次抗体として 100 倍希釈抗ヒト GM-CSF マウス抗体 (R&D Systems) を加えて 1 時間インキュベートした。TBS で洗浄し、パーオキシダーゼ標識抗マウス抗体 (ニチレイ) を加えて 30 分インキュベートした。洗浄後、3-amino-9-ethyl carbazole (AEC) liquid Substrate Chromogen (DAKO) を用いて発色させた。

また連続した切片で、サーファクタントアポ蛋白 A (surfactant apoprotein A, SP-A) の免疫染色も行った。上記と同じ方法で、一次抗体に 100 倍希釈マウス抗ヒト SP-A (DAKO) を用い、発色には Diaminobenzidine (DAB) (ニチレイ) を用いた。

IV-6. 特発性肺胞蛋白症患者および健常人の気管支肺胞洗浄液中 GM-CSF 生物活性の測定

Macrophage-SFM medium (Invitrogen Corp.) に、iPAP 患者 (n=8) の BALF、あるいは健常者 (n=6) の BALF を 5 倍希釈で添加した培地を作成し、GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞を 96 穴プレート中で培養した。各ウェルに段階的に濃

度を変化させた rhGM-CSF を加えた (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 ng/ml)。37°C、5%CO₂ で 3 日間培養したのち、細胞のフォルマザン形成能を前述の MTT アッセイ法を用いて測定した。

結果をもとに、細胞生存の割合を以下の計算式で求めた。

$$\text{Cell survival (\%)} = 100 \times [\text{Absorbance(A)} - \text{Absorbance(B)}] / [\text{Absorbance(C)} - \text{Absorbance(B)}]$$

Absorbance(A): 各ウェルで測定した吸光度

Absorbance(B): GM-CSF 濃度 0 ng/ml のウェルの吸光度

Absorbance(C): BALF を添加せず、GM-CSF 濃度 20 ng/ml のウェルの吸光度

TF-1 細胞の 50% 増殖率を得るために必要な rhGM-CSF 濃度 (50% survival concentration: SC₅₀, ng/ml) を各 BALF で算出し、以下の計算式により、各患者 BALF による GM-CSF 中和能を求めた。

$$\text{GM-CSF neutralizing capacity (ng equivalents / ml BALF)} = \text{SC}_{50}(\text{C}) - \text{SC}_{50}(\text{B})$$

SC₅₀ (C): BALF 非添加群の SC₅₀

SC₅₀ (B): BALF 添加群の SC₅₀

また、健常者 BALF 中の GM-CSF 濃度を高感度 enzyme-linked immuno adsorbent assay (ELISA) キット (AN' ALYSA®, R&D Systems) を用いて定量した。このキットはマイクロプレートに抗ヒト GM-CSF マウス抗体がコートされている。製造元の指定プロトコールに従って、200 μl のサンプルを加えて室温で 3 時間インキュベートし、アルカリホスファターゼ標識された抗ヒト GM-CSF 抗体で検出した。650 nm での吸光度を測定した。

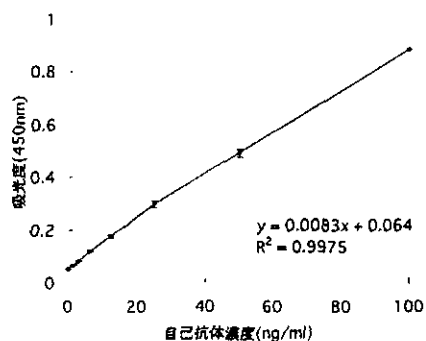
IV-7. 特発性肺胞蛋白症患者血清中の自己抗体の精製と純度の検討

iPAP 患者血清を、33% 硫酸アンモニウム沈殿法によって、粗精製を行った。10 mM リン酸バッファーで透析を行ったのち、NHS-activated

Hi-Trap (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.) に大腸菌由来の rhGM-CSF を重合させたアフィニティークロマトグラフィーカラムにかけて精製した。リガンドに結合した自己抗体は 0.1 M のリン酸バッファー pH 7.5 で洗浄後、同じバッファーと pH 2.0 のクエン酸バッファーのグラディエントにより pH を低下させて (pH 7.5-2.0) 溶出させた。分離した抗体の純度は、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulphate; SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) で確認した。また精製した抗体価は、Bradford 法による蛋白定量 (Bio Rad Co. Ltd.) と、非標識抗ヒト IgG 抗体 (DAKO) とパーオキシダーゼ標識の抗ヒト IgG 抗体 (DAKO) を用いた ELISA 法を用いて定量した。標準液としてヒト IgG (Sigma-Aldrich, Inc.) を用いた。

IV-8. 特発性肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液中、血清中の自己抗体価の定量

BALF 中、血清中の自己抗体価は、上述の精製した抗 GM-CSF 自己抗体を標準として、sandwich ELISA 法で定量した。ELISA 用マイクロタイタープレートを、リコンビナントヒト GM-CSF 1 μg/ml で 4°C 一晩コートし、1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) で室温 1 時間ブロッキングした。希釈バッファー (phosphate buffered saline (PBS) / 0.1% ヤギ血清 / 0.1% tween 20) で BALF は 10 倍、血清は 3000 倍に希釈して、50 μl をプレートに加えた。室温 1 時間インキュベートし、洗浄後、パーオキシダーゼ標識の抗ヒト IgG ウサギ F(ab)₂ 抗体 (DAKO) を加えて rhGM-CSF に結合した自己抗体を検出した。Tetramethylbenzidine (DAKO) を用いて発色させ、450 nm での吸光度を測定した。この方法は、0.78 - 100 ng/ml の範囲で非常に良い直線相関が得られた (図 1)。



IV-9. 特発性肺胞蛋白症患者肺における抗 GM-CSF 自己抗体の局在

IV-5 で述べた肺組織切片のうち、iPAP 患者肺 1 サンプル、健常肺 1 サンプルを使用した。肺切片を、1% BSA/PBS で 30 分ブロッキングし、同じバッファーで 100 倍希釈した PE 標識 rhGM-CSF と FITC 標識抗ヒト IgG を加えて 1 時間室温でインキュベートした。PBS で洗浄後、蛍光シグナルを共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss Co., Ltd.)で観察した。連続切片をヘマトキシリン-エオジン(hematoxylin and eosin, HE)染色し、対照とした。

IV-10. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF と自己抗体の免疫複合体の証明

iPAP 患者 BALF 中の GM-CSF と自己抗体との免疫複合体をイムノプロット法を用いて証明した。

IV-10-1. 免疫沈降法による証明

iPAP 患者の BALF 10ml を、水飽和した 1-butanol 10ml と混和し、分離した下層(水層部分; 親水性物質が溶出)を採取し、-20℃で 4 倍量のアセトンを加えて蛋白を濃縮した。析出蛋白を 2000 x g で遠心分離して、沈殿を PBS に溶解し、BALF のブタノール-アセトン抽出サンプルとした。このサンプル 27 μg を protein A Sepharose™ 4 Fast Flow (Amersham Biosciences)と混和し 4℃16 時間インキュベートしたのち、遠心分離して上清(分画 1: protein A beads に結合しない蛋白を含む)と protein

A beads を回収した。protein A 結合蛋白は、100mM glycine-HCl(pH2.7)で溶出させた(分画 2)。分画 1,2 を 80%冷アセトンで再び抽出し、SDS sample buffer (0.025M tris, 10%w/v glycerol, 1%w/v SDS, 0.05M β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue)に溶解した。陰性コントロールとして、健常者からの BALF に同様の処理を行った。40mA、30 分電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、引き続いて polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Millipore Corp.) に 12V, 75 分で転写した。PVDF 膜を 2.5% skimmed milk / PBS / 0.1% tween 20 で 4℃、16 時間ブロッキングし、引き続いて抗ヒト GM-CSF ウサギ抗体 1 μg/ml と室温、1 時間インキュベートし、洗浄後 100 倍希釈パーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体(ニチレイ)と室温 1 時間インキュベートした。抗体が結合した GM-CSF は、化学発光(ECL® plus; Amersham Pharmacia Biotech)させ、写真フィルム (Hyperfilm® ECL®; Amersham Pharmacia Biotech)に感光し、検出した。

IV-10-2. Native PAGE による証明

IV-10-1 で述べたブタノール-アセトン抽出サンプル 20 μg を、native PAGE 用サンプルバッファー (0.025M Tris-HCl, 10%w/v glycerol, 0.01% bromophenol blue)に溶解し、native PAGE を行った。40mA、40 分で電気泳動(SDS-PAGE)を行った。泳動後、IV-10-1 と同様に PVDF 膜へ転写し、抗ヒト GM-CSF ウサギ抗体による GM-CSF の検出を行った。また同様の操作で、パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ウサギ抗体によるヒト IgG の検出も行った。

IV-11. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液中の自己抗体による免疫複合体の de novo 形成

iPAP 患者 BALF100 μl 相当の蛋白を濃縮し、0.03pmol の [¹²⁵I]-GM-CSF と混和後、サンプルバッファー (100mM tris HCl pH7, 20%[vol/vol] glycerol, 0.1%[vol/vol] nonidet P-40, 0.025 bromophenol blue)に溶解して 30mA, 40 分電気泳動 (native PAGE)を行った。同量の健常者 BALF を対