

照とした。泳動後ゲルを乾燥し、BAS2500(FUJIFILM)を用いてゲル中の放射活性を画像化した。

IV-12. 抗 GM-CSF 自己抗体の性状解析—中和活性

GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞を用いて自己抗体の中和活性を定量した。患者血清より Protein G を用いたカラムクロマトグラフィーを用いて IgG 画分を精製し、前述の ELISA 法で自己抗体濃度を定量したものを材料とした。対照として、抗ヒト GM-CSF 中和マウス抗体(R&D Systems)、抗ヒト GM-CSF 中和ヤギ抗体(R&D Systems)、ヒト標準 IgG(DAKO)を用いた。TF-1 細胞(4×10^4 cells/well)を、rhGM-CSF 5ng/ml と様々な濃度の自己抗体(または他動物種の抗 GM-CSF 抗体、ヒト IgG)を含む RPMI1640 培地中で 3 日間培養した後、細胞の生残率を前述の MTT アッセイ法で定量した。

抗体による TF-1 cells の%阻害を以下の式で計算した。

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

Absorbance(A): 抗体(-)、GM-CSF 5ng/ml(+)の well の吸光度

Absorbance(B): 各 well の吸光度測定値

Absorbance(C): rhGM-CSF(-)の well の吸光度

各抗体の増殖阻害曲線から、50%の細胞増殖抑制を起こす抗体濃度(inhibitory concentration: IC_{50})を求めた。

IV-13. 抗 GM-CSF 自己抗体の性状解析—結合力

自己抗体と rhGM-CSF との結合の強さ(avidity, K_{AV})と結合容量(Capacity, B_{max})は、iPAP 患者血清から protein A カラムクロマトグラフィーによって抽出した IgG 画分を用い、Svenson らの方法で測定した(50)。0-500pM の様々な濃度に設定した $[^{125}I]$ -GM-CSF を、リン酸バッファー(PBS / 0.1%Triton X / 2%BSA)中で、10pM の自己抗体と 4℃、16 時間反応させた。非特異的結合は、標準ヒト IgG(DAKO)を用いて測定した。その後反応液を Protein G Sepharose^(TM) Fast Flow (Amersham

Biosciences) 100 μ l(この Protein G 量は、反応液中の自己抗体をすべて結合するのに十分量である)を入れたカラムに加え、4℃で反応させた。カラムを容量の 6 倍量の PBS / 0.1% Triton X と 2 倍量の 10mM 酢酸アンモニウムで洗浄して自己抗体と非結合の $[^{125}I]$ -GM-CSF を回収した後、自己抗体、及び自己抗体と結合した $[^{125}I]$ -GM-CSF を 100mM の glycine-HCl pH 2.2 で溶出させ、回収した。

自己抗体結合 $[^{125}I]$ -GM-CSF と、非結合 $[^{125}I]$ -GM-CSF の放射活性をガンマカウンター (Packard Instrument Co. Ltd.)で測定した。その結果得られた飽和結合曲線のプラトー値を Binding capacity (B_{max} , sites/mol IgG)として算出し、また患者個々の抗体に対して、50% B_{max} を得る時の free GM-CSF 濃度を平均 affinity(avidity, K_{AV})として算出した(図 2)。

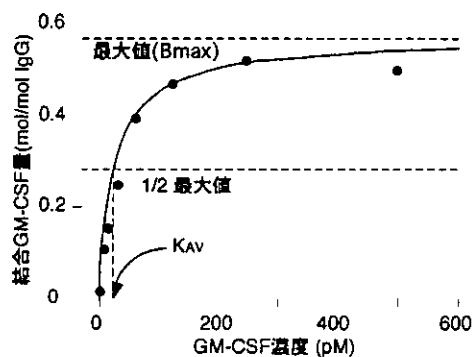


図 2 : 抗 GM-CSF 自己抗体と $[^{125}I]$ -GM-CSF との飽和結合曲線 (典型例)

曲線のプラトー値を B_{max} 、 $1/2B_{max}$ を得る GM-CSF 濃度を K_{AV} とした。

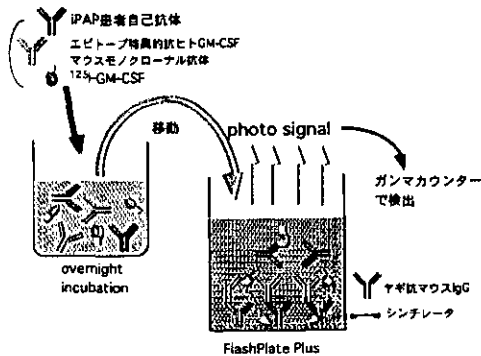
IV-14. 抗 GM-CSF 自己抗体の性状解析—結合の特異性

抗 GM-CSF 自己抗体と各種 rhGM-CSF、他の動物種の GM-CSF 及び同種の他のサイトカインとの結合を ELISA 法を用いて検討した。IV-8 で

述べた方法と同様、上記サイトカインを $1 \mu\text{g/ml}$ でマイクロプレートにコートし、洗浄、ブロッキングしたものに、iPAP 患者 12 例の血清から Protein G カラムクロマトグラフィー法で精製した自己抗体 100ng/ml を $50 \mu\text{l}$ 加え、室温 1 時間反応させた。洗浄後パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ウサギ F(ab)'_2 抗体(DAKO)と室温 1 時間インキュベートし、再び洗浄後 Tetramethylbenzidine (DAKO)を用いて発色させ、 450nm での吸光度を測定した。positive control として、*E. coli* 由来の rhGM-CSF をコートしたウェルの吸光度を基準にとり、これに対するパーセンテージで各蛋白と自己抗体との結合度を比較した。

IV-15. 抗 GM-CSF 自己抗体の性状解析—GM-CSF 分子の認識部位の同定

4 種類の抗ヒト GM-CSF マウスモノクローナル抗体 (No. 4117, 1089, 3092, 1022、これらはそれぞれ GM-CSF のアミノ酸残基 1-11, 40-77, 78-94, 110-127 中にエピトープを持つとされている



FlashPlate Plus[®]を用いた拮抗阻害試験の該略図。自己抗体、マウスモノクローナル抗体および放射ラベルの GM-CSF とを混合してインキュベートし、それを FlashPlate Plus[®]に移動する。マウス抗体は底面に固相化されているヤギ抗マウス抗体によって補足される。マウス抗体と結合した放射ラベル GM-CSF の放射活性が、シンチレータと反応して photo signal を発生する。これをガンマカウンターで検出する。

(43)) $1 \mu\text{g/ml}$ と、 $0-1 \mu\text{g/ml}$ の iPAP 患者自己抗体とを混和した。対照として、ウサギ抗 GM-CSF 54-73 アミノ酸残基に対するペプチド抗

体(IV-2. 試薬の項参照)、ヒト標準 IgG(DAKO)を用いた (図 3)。混合液に $[^{125}\text{I}]\text{-GM-CSF } 1\text{ng/ml}$ を加えて $2\% \text{BSA} / 0.1\% \text{Triton X-100} / \text{PBS}$ 中で 4°C 、一晚インキュベートした。その後混合液を抗マウス IgG ヤギ抗体がコートされているプラスチックシンチレータを底面に含む 96 穴の FlashPlate Plus[®](Perkin-Elmer)に移し、更に 2 時間インキュベートした。マウスモノクローナル抗体と結合した $[^{125}\text{I}]\text{-GM-CSF}$ をシンチレーションカウンター (TopCount[®], Perkin-Elmer)で測定した。自己抗体によるマウスモノクローナル抗体と $[^{125}\text{I}]\text{-GM-CSF}$ との結合阻害の割合は以下の計算式で算出した。

$$\text{Percent inhibition (\%)} = 100 \times [\text{Cpm(A)} - \text{Cpm(B)}] / [\text{Cpm(A)} - \text{Cpm(C)}]$$

Cpm(A): 自己抗体(-)、マウスモノクローナル抗体(+), $[^{125}\text{I}]\text{-GM-CSF}(+)$

Cpm(B): 各ウェルの測定放射活性

Cpm(C): 自己抗体(-)、マウスモノクローナル抗体(-), $[^{125}\text{I}]\text{-GM-CSF}(+)$

IV-16. 統計解析

統計解析は StatView version 4.0 software (Abacus Concepts, Inc.)を用いて行った。ノンパラメトリックデータの群間有意差は、マン・ホイットニ検定またはクラスカル・ワリス検定で判定した。P 値が 0.05 未満を有意と判定した。

V. 結果

V-1. 特発性肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液による肺胞マクロファージの成熟抑制

iPAP 患者($n=34$)の BALF 中の細胞(BAL cell)の分画および細胞数を健常者($n=18$)のそれらと比較すると、健常者が 90%以上 AM であるのに対して、iPAP 患者は AM の数が約 3 分の 1 まで減少し (中間値; 健常者 $13.2 \times 10^4/\text{ml}$ 、iPAP 患者 $4.2 \times 10^4/\text{ml}$)、リンパ球の数が有意に増加していた (中

間値：健常者： $0.8 \times 10^4/\text{ml}$, iPAP 患者 $3.2 \times 10^4/\text{ml}$
(表 1)。

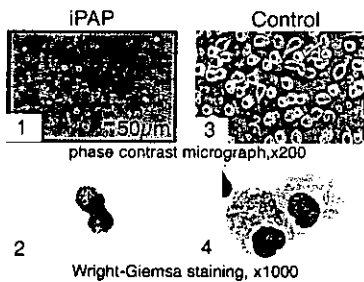
表 1 : iPAP 患者と健常者気管支肺胞洗浄液中細胞数、
分画

	患者数	性別 (男女)	年齢 中央値(範囲)	BAL 中細胞数 ($\times 10^4/\text{ml}$) 中央値(範囲)	細胞分画			
					上皮(細胞数/ $\times 10^4/\text{ml}$) 中央値(範囲)		非上(細胞数/ $\times 10^4/\text{ml}$) 中央値(範囲)	
					macrophage	lymphocyte	neutrophil	eosinophil
iPAP 患者	34	10/24	52 (28-79)	10.5 (2.8-35.9)	42 (2.17-26.5) [†] 60.0 (5.9-90.9) [†]	32 (0.5-52.6) [†] 32.5 (6.8-94.1) [†]	0.3 (0.0-4.8) 2.3 (0.0-15.0) [†]	0.0 (0.0-0.3) 0.3 (0.0-6.3)
健常者	18	10/8	50 (27-72)	14.0 (3.8-42.2)	13.2 (0.3-39.8) 93.3 (84.0-96.8)	0.8 (0.2-3.1) 6.0 (0.9-14.0)	0.1 (0.0-0.4) 0.3 (0.0-2.0)	0.0 (0.0-0.2) 0.0 (0.0-1.0)

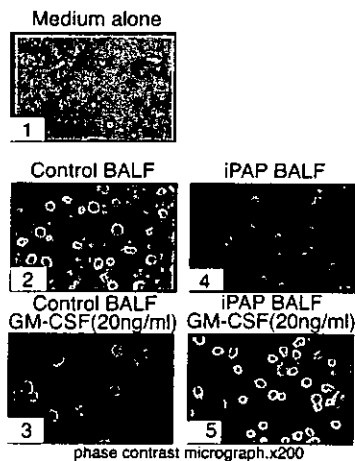
[†] 健常者と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

プラスチックプレート付着分離法によつて得られた iPAP 患者の肺胞マクロファージ(iPAP-AM)は、健常者の AM と比較して小さい単球様の形態を示した(図 4-A)。この iPAP-AM の GM-CSF 存在下での成長に、iPAP 患者の BALF が抑制効果をもつかどうかを検証するために、BALF を培地

A : 分離直後



B : 2 週間培養後の形態

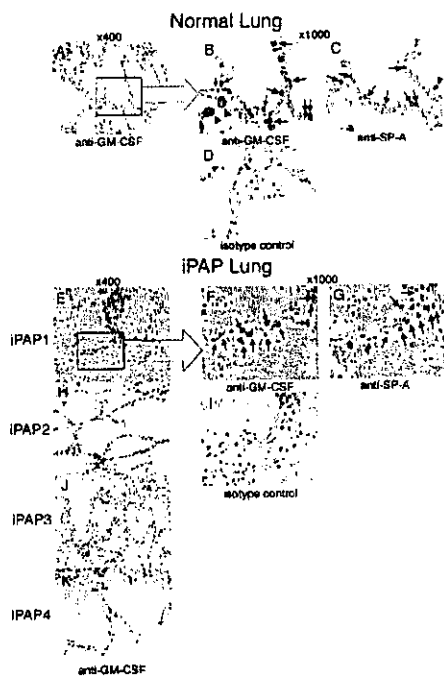


中に添加して形態の変化、成長を観察した。5 倍希釈の健常者 BALF 存在下で 14 日間培養したところ、iPAP-AM は培養前(図 4-A-1)、あるいは培地のみで 14 日間培養したもの(図 4-B-1)と比較して成長していた(図 4-B-2)。

健常者 BAL に 20ng/ml の rhGM-CSF を加えると細胞の成長はさらに促進された(図 4-B-3)。しかし iPAP-BALF を加えた場合は、細胞の成長は阻害された(図 4-B-4)。20ng/ml の GM-CSF を加えることで、この阻害は解除された(図 4-B-5)。健常者 BALF(n=3)、iPAP-BALF(n=3)と rhGM-CSF による iPAP-AM の成長を MTT アッセイ法で確認したところ、培地のみウェルの 595nm 吸光度を 100%とすると、健常者 BALF 添加群で $101.4 \pm 9.3\%$ 、平均±標準偏差)、健常者 BALF+GM-CSF20ng/ml 添加群で 119.8 ± 8.9 、iPAP-BALF 添加群で 83.8 ± 8.6 、iPAP-BALF+GM-CSF20ng/ml 添加群で 122.0 ± 17.1 と、形態の変化とはほぼ同様の結果が得られた(図 4-C)。すべての培養条件で、トリパンブルーを用いた色素排除試験による生存率は 90%以上であった。この結果から、GM-CSF の bioactivity は、iPAP-BALF 中では阻害されており、またこの阻害効果は過剰な GM-CSF を投与することで解除できることがわかった。

V-2. 特発性肺胞蛋白症患者の肺における GM-CSF 発現

V-1 の結果から、iPAP 患者の BALF 中には GM-CSF 活性が欠失していると考えられる。そこで iPAP 患者の肺組織での GM-CSF 発現があるかどうかを免疫組織化学染色で検討した。また連続切片上で、肺胞 II 型上皮を Surfactant protein-A(SP-A)を染色することにより同定した。その結果、正常肺では GM-CSF が、肺胞 II 型上皮(赤、図 5-A,B、矢印)に強く発現しており、AM(5-B;矢印頭)にも発現が認められた。また iPAP 肺でも、肺胞 II 型上皮に GM-CSF の局在がみられた(赤、図 5-E, F 矢印, H, J, K)。また、iPAP4 例、正常肺 4 例の全肺胞上皮細胞中、GM-CSF 陽性細胞の割合



ることがわかった(p=0.08)。

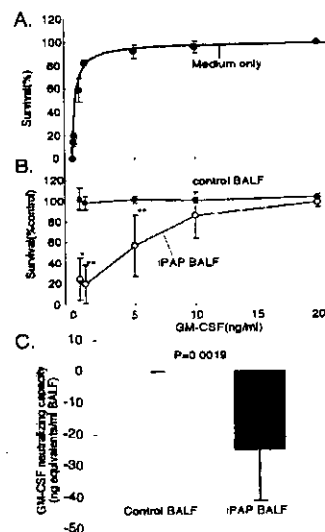
V-3. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF の生物活性の測定

V-1,2 の結果、iPAP 患者では、肺組織中に GM-CSF の発現は認められるが、BALF 中にはその生物活性が存在しないということが示唆された。そこで GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞を使って、実際に BALF 中の GM-CSF 生物活性を定量した。TF-1 細胞は、GM-CSF によって用量依存的に増殖し、2-3ng/ml という低濃度で生存率が極大に達した(図 6-A)。培地に 20%vol/vol の健常者 BALF(n=6)を加えても、GM-CSF 依存性の細胞増殖には影響を来さなかった。このことから健常者 BALF には、GM-CSF 活性阻害効果が存在しないと考えられた(図 6-B)。一方 iPAP 患者(n=8)の BALF を加える(20%vol/vol)と、生存曲線が有意に右方へ移動し、GM-CSF の阻害活性が存在することが明らかになった(図 6-B)。添加する GM-CSF を 20ng/ml まで増加させると、この阻害活性は消滅した。

BALF 中の GM-CSF の生物活性を TF-1

は、iPAP 肺が 50.5 ± 8.4%(平均 ± 標準偏差)、正常肺が 40.8 ± 5.0%(平均 ± 標準偏差)であり、少なくとも iPAP 肺では正常肺と同レベルであ

細胞の生存曲線の回帰曲線から求めると、iPAP 患者 BALF では、 $-24.9 \pm 16.4 \text{ ng equivalents/ml BALF}$ (平均 ± 標準偏差、中間値 -23.3, 範囲 -57.5 - -4.3)で、健常者 BALF では、 $0.017 \pm 0.387 \text{ ng/ml}$ (中間値 -0.126, 範囲 -0.341-0.635)であった(図 6-C)。BALF 中の GM-CSF 濃度を ELISA 法で定量した結果、健常者では $1.07 \pm 0.16 \text{ pg/ml}$ (n=6, 平均 ± 標準偏差、範囲 0.88-1.28)であったことから、iPAP 患者 BALF が中和しうる GM-CSF 量は、健常者に存



在する GM-CSF 量を 4000 倍以上大きく上回っていることがわかった。

V-4. 特発性肺胞蛋白症患者血清中抗 GM-CSF 自己抗体の精製

33%硫酸アンモニウム沈殿法による粗精製後、*E. coli* 由来のリコンビナント GM-CSF をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによって自己抗体を精製した。典型的な精製過程は表 2 にまとめた。精製の過程で、IgG 濃度と蛋白濃度を測定した。IgG の内 GM-CSF 結合抗体の割合を吸光度 450nm の sandwich ELISA 法で測定した。

抗GM-CSF自己抗体精製の精製

サンプル	総蛋白 (μg/ml)	総IgG (μg/ml)	総IgG 濃度 (%)	GM-CSF 特異的活性部 位 (OD 450 吸光度)	純度 (血清を 1 とした時)
1. 血清	117	31.7	27.1	50.23	1
2. 脱脂アンモニウムによる基質沈殿分	38.9	15.7	40.4	748.3	14.9
3. アフィニティークロマトグラフィー精製 後分	0.062	0.06	97.6	1792.7	35.7

・ GM-CSF 特異的活性は、フenchinキープチャーアッセイによる450nmの吸光度で測定した。
 ・ GM-CSF 特異的活性部はGM-CSF 特異的活性も総蛋白で割ったもの。

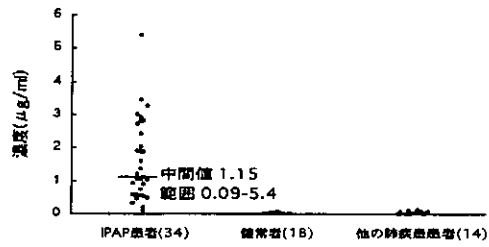
GM-CSF に結合した自己抗体は、バッファーと酸のグラディエントにより溶出したが、pH 6.6-5.8 の部分で小さなピークが認められ、これは GM-CSF との非特異的結合蛋白と考えられた(図 7A)。主要なピークは pH 3.5-2.7 の部分にあり、これは rhGM-CSF と強力に結合するものと考えられ、この部分を回収した(図 7A)。最終標品中の抗体-総蛋白比は 0.98 で、SDS-PAGE 上も単一のバンドになり、純度が高いことが確認された(図 7B)。

表 2 : 抗 GM-CSF 自己抗体精製のプロファイル

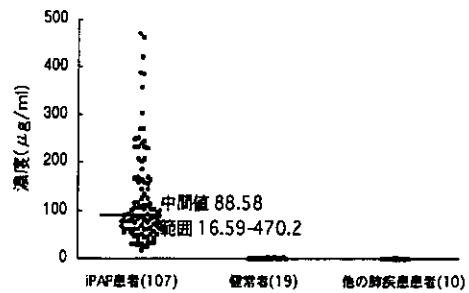
V-5. 特発性肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液および血清中の抗 GM-CSF 自己抗体の定量

V-4. で精製した抗 GM-CSF 自己抗体をスタンダードとして、sandwich ELISA 法によって iPAP 患者 (BALF 34 名、血清 107 名) および健常人 (BALF 18 名、血清 19 名)、他の肺疾患患者 (BALF 14 名、血清 10 名) の BALF、血清中の抗 GM-CSF 自己抗体を定量した。その結果、iPAP 患者の BALF 中自己抗体価は中央値 1.15 μg/ml、範囲 0.09-5.4 μg/ml、血清中自己抗体価は中央値 88.58 μg/ml、範囲 16.59-470.2 μg/ml(n=107)と高い値を示した。一方健常人、他の肺疾患では、何れも検出限界

BALF中自己抗体濃度



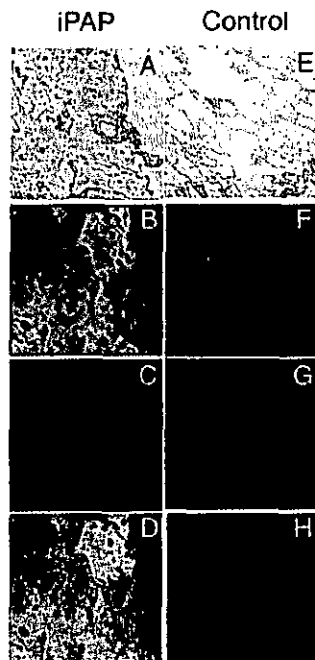
血清中自己抗体濃度



(BALFでは0.01 μg/ml、血清では3 μg/ml) 以下であった(図 8)。このことから、自己抗体は iPAP 患者の肺内と血清中に高濃度に存在しており、また疾患特異性が非常に高いことがわかった。

V-6. 非結合性の抗 GM-CSF 自己抗体の特発性肺胞蛋白症患者肺における局在

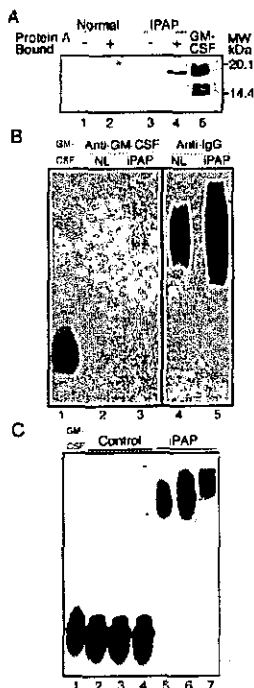
V-5 の結果から、iPAP 患者に存在する抗 GM-CSF 自己抗体が肺胞腔に局在すると考えられる。このことを検証するため、iPAP 患者の肺組織を PE 標識 rhGM-CSF と、FITC 標識抗ヒト IgG を用いて蛍光抗体染色した。その結果 IgG (図 9B、緑) と GM-CSF 結合活性部位 (図 9C、赤) は iPAP 患者の肺胞腔内の貯留物に強い co-localization を示した (図 9D、黄)。これに対して健常人肺では、iPAP 肺と比較して血管以外の部位で IgG は少なく (図 9F、緑)、また GM-CSF 結合活性部位も殆ど認められず (図 9G、赤)、両者の co-localization は認められなかった (図 9H、黄)。以上のことが



ら患者の肺胞腔内には GM-CSF と結合しうる自己抗体が存在していることが確認された。

V-7. 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形成の証明

V-2 で証明された、iPAP 患者の肺内で産生されている GM-CSF は、



第三に iPAP 患者

V-5 により証明された過剰量の自己抗体により、免疫複合体を形成していると考えられる。これを証明するために以下の 3 つの方法を用いた。第一に、免疫沈降法により、免疫複合体を回収後、還元剤で GM-CSF と自己抗体とを分離し、ウェスタンブロット法により GM-CSF を直接検出した。第二に、免疫複合体を分解せずに BALF 蛋白中を電気泳動し、免疫複合体中の GM-CSF を抗 GM-CSF ポリクローナル抗体により直接検出した。第三に iPAP 患者

の BALF 中に存在するフリーの自己抗体と放射ラベルした GM-CSF とを反応させ、免疫複合体の生成を *in vitro* で確認した。

その結果、iPAP 患者 BALF 中蛋白の protein A 結合画分中に、GM-CSF が認められ、非結合画分中には認められなかった。健常者 BALF では、何れの画分にも GM-CSF は検出されなかった (図 10A)。

BALF 中の免疫複合体を前処理なしに泳動し、ウェスタンブロット法により GM-CSF を検出すると、GM-CSF は IgG の位置に一致した高い分子量の位置に検出された (図 10B)。これらの結果より、iPAP 患者 BALF 中には、GM-CSF が IgG と免疫複合体を形成して存在していることが示唆された。

また、 $[^{125}\text{I}]$ -GM-CSF は iPAP 患者 BALF とを混和して電気泳動することにより、より大きい分子量の位置に "supershift" した (図 10C)。前述の結果より、この現象は $[^{125}\text{I}]$ -GM-CSF が自己抗体と結合したためと考えられた。なおこの現象は健常者 BALF では起こらなかった (図 10C)。このことより iPAP 患者の肺では、GM-CSF と結合しうる自己抗体の存在が確認された。

V-8. 抗 GM-CSF 自己抗体の中和活性

V-3 の結果から、iPAP の自己抗体は中和活性を持つことが示唆されたが、バイオアッセイにより定量した。すなわち、培地に添加された rhGM-CSF を中和して TF-1 cell の増殖を 50%抑制する自己抗体の必要量 (IC_{50} : mol/mol rhGM-CSF) は、ヤギ中和ポリクローナル抗体、マウス中和モノクローナル抗体のそれぞれ 1/10、1/500 であった。このことから、iPAP 患者中に発現する抗 GM-CSF 自己抗体の中和活性は非常に強いことが示された (表 3)。

V-9. 抗 GM-CSF 自己抗体の結合力、結合容量

患者抗 GM-CSF 自己抗体が強い中和能をもつことから、それは GM-CSF とその受容体と

の結合力 (GM-CSF と GM-CSF 受容体 α 鎖との親和性は 5-10nM, 高親和性受容体との親和性は 25-100pM) に拮抗するに足る十分強い結合力を持つ

患者No.	結合力 (Avidity, K_{AV}) (pM)	結合容量 (Capacity, Bmax) (sites/mol IgG)	中和活性50% inhibitory concentration, IC ₅₀ (mol/mol of GM-CSF)
1	20.1	0.125	5.84
2	13.3	0.153	4.43
3	16.7	0.168	3.83
4	24.9	0.253	6.65
5	11.1	0.134	8.66
6	24.8	0.332	6.65
7	12.1	0.194	2.42
8	15	0.184	11.88
9	22.3	0.565	2.42
10	37	0.273	12.08
11	22.3	0.281	12.69
A + / SD	19.96 ± 7.54	0.24 ± 0.13	7.05 ± 3.81
commercialized goat anti-GM-CSF*	275.4	0.402	74.91
commercialized mouse anti-GM-CSF*	nd	nd	> 4000

患者No.	結合力 (Avidity, K_{AV}) (pM)	結合容量 (Capacity, Bmax) (sites/mol IgG)	中和活性50% inhibitory concentration, IC ₅₀ (mol/mol of GM-CSF)
1	20.1	0.125	5.84
2	13.3	0.153	4.43
3	16.7	0.168	3.83
4	24.9	0.253	6.65
5	11.1	0.134	8.66
6	24.8	0.332	6.65
7	12.1	0.194	2.42
8	15	0.184	11.88
9	22.3	0.565	2.42
10	37	0.273	12.08
11	22.3	0.281	12.69
A + / SD	19.96 ± 7.54	0.24 ± 0.13	7.05 ± 3.81
commercialized goat anti-GM-CSF*	275.4	0.402	74.91
commercialized mouse anti-GM-CSF*	nd	nd	> 4000

表 3 : 患者血清から精製した抗 GM-CSF 自己抗体の結合力、結合容量、中和活性

と考えられる。このことを確認するために、iPAP 患者 11 例の血清から精製した自己抗体の結合力 (avidity)、結合容量 (capacity) を検討した。自己抗体と [¹²⁵I]-GM-CSF を用いた飽和結合曲線を作成して、自己抗体と GM-CSF との結合力 (avidity; K_{AV}) と結合容量 (capacity; Bmax) を測定した (図 2) と、 K_{AV} は一様に非常に強い値 (19.96 ± 7.54pM, 平均 ± 標準偏差) を示した。対照として用いたヤギ抗ヒト GM-CSF 中和ポリクローナル抗体では 275.4pM であった (表 3)。自己抗体の結合容量 (Bmax) は 0.24 ± 0.13 sites/mol IgG (平均 ± 標準偏差) で、これは自己抗体が GM-

CSF 1 分子につき 1.8-7.8 分子結合することを意味した (表 3)。

V-10. 抗 GM-CSF 自己抗体の結合特異性

抗 GM-CSF 自己抗体が、患者肺内で十分存在し、強い結合力を持つことがわかったが、特異的に GM-CSF と結合するかどうかは未確認のままであった。iPAP 患者 12 人から精製した自己抗体は、*E. coli* 由来の rhGM-CSF (糖鎖修飾なし)、CHO cell 由来の rhGM-CSF (糖鎖修飾あり) に同程度に結合した (図 11-A)。このことから、自己抗体の認識に糖鎖部分は含まれていないと考えられた。また GM-CSF 分子に 2 箇所存在する s-s 結合が切断された、カルボキシメチル化 GM-CSF 分子に対しては全く結合しなかったことから、自己抗体は 2 次、3 次構造を認識していると考えられた (図 11-A)。また自己抗体はトリプシン消化を行った GM-CSF 分子にも結合しなかった (図 11-A)。トリプシン消化後の GM-CSF 分子では、2 つの s-s 結合は保存されているが、1-30, 59-85, 108-111 のアミノ酸残基が脱落している。このことから、脱落部に結合エピトープが含まれている可能性が考えられた。

自己抗体はヒト GM-CSF とアミノ酸配列で 68% 相同なウシリコンビナント GM-CSF には弱く結合した。しかし 53% 相同なマウスリコンビナント GM-CSF には結合しなかった (図 11-B)。

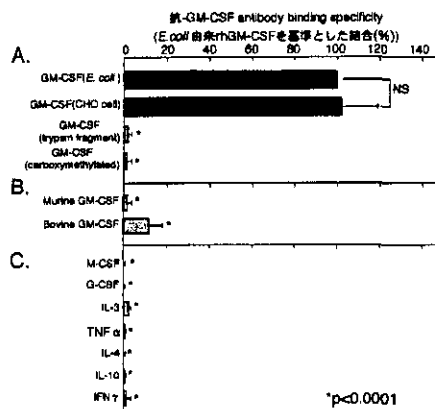
同種以外のサイトカインである、M-CSF、G-CSF、IL-3,4,10、TNF- α 、IFN- γ に対しても自己抗体は結合しなかった (図 11-C)。

自己抗体の性状を解析した V-8-10 より、自己抗体は GM-CSF の非糖鎖修飾部を複数箇所認識し、結合には高次構造が保持されている必要があり、また高い特異性と結合力をもって、強力に GM-CSF を中和することがわかった。

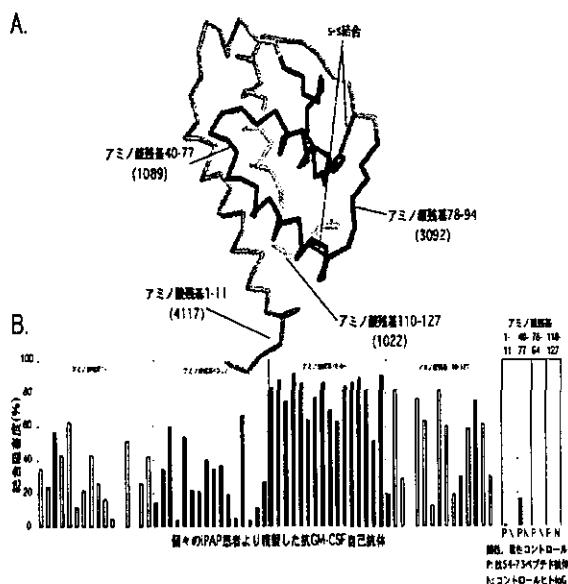
V-11. 抗 GM-CSF 自己抗体の GM-CSF 上のエピトープ検索

自己抗体が強い中和活性を持つことから、

自己抗体は GM-CSF の活性中心を効率よく認識し、そこをブロックする可能性が考えられた。そこで



自己抗体の GM-CSF に対する特異的なエピトープを、エピトープ特異的なマウスモノクローナル抗体と $[^{25}I]$ -GM-CSF を用いた拮抗阻害実験 (competitive binding assay) で検討した。GM-CSF のアミノ酸残基 1-11, 40-77, 110-127 を認識するマウスモノクローナル抗体(それぞれ No. 4117, 1089, 1022, 図 12-A)の結合は自己抗体により部分的に阻害され、またその阻害度は症例によりばらつきがあった。これに対して 78-94 アミノ酸残基を認識するマウス抗体(No. 3092)の GM-CSF との結合は 16 例ではほぼ一様に強く抑制された (図 12-B)。平



均の阻害率は 78.97 ± 11.71 (平均 \pm 標準偏差)% であった。このエピトープは GM-CSF の活性中心であるとする報告も認められる(43, 46, 51, 52)。従っ

て、GM-CSF 認識部位は患者間で様々であるが、自己抗体は GM-CSF の活性にとって重要である部位を一様に強く認識することから、この部位が iPAP 患者における抗 GM-CSF 自己抗体が GM-CSF 活性を特異的に強く中和する上での "hot spot" であると考えられる。

VI. 考察

VI-1. 結果のまとめ

肺内にサーファクタント脂質が貯留するという、ヒト iPAP と類似の病像を呈する GM-CSF シグナル欠損マウスの研究から、GM-CSF はマウス肺において、AM の終末分化を誘導することによってサーファクタント代謝を促進し、肺内のサーファクタント恒常性を維持するという役割をもつ、肺において特に重要なサイトカインであるということが認められている(29,35)。iPAP 患者の血清及び BALF 中に、特異的に発現している抗 GM-CSF 自己抗体の存在が報告されたことから、ヒトにおいてもこの抗体が iPAP 発症の病因であると推測されていた。

しかしながら、この抗体が実際に肺内の GM-CSF 活性を阻害しているかどうかを証明する報告はこれまでなかった。このため、

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

以上の点を検討することで、自己抗体が患者の肺内の GM-CSF の生物活性を破壊せうることを証明し、iPAP 発症の機序の解明を試みた。

その結果、以下のような結果が得られた。

1. iPAP 患者の肺組織中に GM-CSF の発現は確認されたが、iPAP 患者の BALF

中に、AM の成熟及び GM-CSF 依存性細胞株 TF-1 の増殖を強く抑制する物質が存在しており、GM-CSF 生物活性は存在しない。

2. iPAP 患者の肺内には、GM-CSF 結合性の自己抗体が存在しており、一部は GM-CSF と免疫複合体を形成し、フリーな自己抗体も十分量存在していた。
3. iPAP 患者血清から精製した自己抗体の結合力は GM-CSF と受容体 α 鎖とのそれを遙かに凌駕し、また中和能は非常に強かった。
4. 自己抗体は、GM-CSF の立体構造を認識し、その特異性は非常に高かった。
5. 自己抗体は、GM-CSF の活性中心として報告されている部分（アミノ酸残基 78-94）を特に強く認識していた。

これらの結果より、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 生物活性を十分中和して、そのシグナルをブロックできるものであることが確認された。

VI-2. 特発性肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF 活性測定

GM-CSF は、もともと肺内では BALF 中で数 pg/ml オーダーの微量なサイトカインである (21,53)。iPAP 患者の BALF 中には抗 GM-CSF 自己抗体が存在していることから、ELISA で使用する抗体と拮抗阻害を起こす可能性もあり、これらより iPAP 患者 BALF 中の GM-CSF 活性測定を ELISA 法で行うことは、非常に困難であると考えられる。このため我々は BALF の GM-CSF 生物活性を測定する上で、GM-CSF 依存性細胞株である TF-1 細胞と iPAP 患者 BALF 中から付着法により分離した AM を用いた。その結果、患者 BALF 中には、AM の成熟、増殖を阻害する作用が認めら

れ、その効果は rhGM-CSF を加えることで解除された。また BALF 中の GM-CSF を中和する活性が、 $-24.9 \pm 16.4 \text{ ng equivalents/ml}$ BALF（平均 \pm 標準偏差）と非常に強いこともわかった。今回免疫染色法で GM-CSF 産生細胞の数を定量したが、GM-CSF 産生細胞の割合は、健常者のそれと大差認めなかったことから、iPAP 患者 BALF 中の GM-CSF 濃度も健常者と同程度（数 pg/ml \sim ）だと仮定すると、数千 \sim 数万倍の GM-CSF 中和活性を持つ BALF 中で、これら GM-CSF は直ちに中和されると考えられる。

VI-3. 特発性肺胞蛋白症患者自己抗体の量とその性状からみた中和活性の検討

自己抗体価定量的結果、患者の血清中、BALF 中の自己抗体価は非常に高かった。この測定法自体は、高度に精製した自己抗体を標準としているので、非常に正確で信頼できると思われる。前述の GM-CSF 濃度と比較しても、中和に十分な量が存在していると考えられる。

自己抗体は他動物種の抗ヒト GM-CSF 抗体よりも遙かに強い結合力 (avidity) を示した。興味深いことに、binding avidity は、過去の報告で認められる健常者血清由来のヒト IgG 製剤中に認められる抗 GM-CSF 自己抗体とほぼ同程度の強さであった (4-11pM)(54)。過去に報告されている抗サイトカイン抗体の avidity は、IL-1 α に対する自己抗体が 5.5-11pM(55)、IL-5 自己抗体が 15pM(54)、IL-10 自己抗体が 80-351pM(54)、IFN- α 自己抗体が 30pM(56)とどれも非常に強い。これらは生体内のサイトカイン受容体の親和性と非常に近い(50, 54-57)ことから、これら自己抗体は in vivo でも受容体とリガンドの結合に効果的に拮抗し、サイトカインシグナルを調節するという機能を発揮できる重要な存在なのかもしれない。

GM-CSF の受容体との結合のメカニズムを考えると、まず低親和性(5-10nM)である GM-CSF 受容体 α 鎖と結合し、引き続いてこの複合体が GM-CSF 受容体 β 鎖と結合し、親和性が高くなる

とされている。このβ鎖はそれ自体は GM-CSF と結合しないが、α鎖の結合力を高親和性(25-100pM)に変換する(35, 58, 59)。今回の結果から、GM-CSF と抗 GM-CSF 自己抗体との avidity(〜20pM)は、α受容体との親和性よりは明らかに強い。このため、自己抗体は、GM-CSF とα受容体との結合をまず阻害してそのシグナルをブロックすると考えられる。今回自己抗体と GM-CSF との免疫複合体が確認されたことから、このメカニズムの可能性が高いと考えられる。

今回のデータから、自己抗体は、糖鎖修飾を受けている rhGM-CSF、受けていない rhGM-CSF とともに同じように結合した。このことは糖鎖部分は自己抗体のエピトープに含まれないということの意味する。カルボキシメチル化によって s-s 結合を切断した GM-CSF を自己抗体が認識しなかったことから、自己抗体の認識部位は、一次構造ではない、すなわち二次構造、三次構造を認識すると考えられる。

これらの結合特徴から、自己抗体のエピトープは、ペプチドフラグメントを用いて同定することは困難であると考えられた。そこで今回 Kanakura らにより報告されているエピトープ特異的モノクローナル抗体による自己抗体と GM-CSF の結合の拮抗阻害によってエピトープの予測を行う方法を採用した(43)。この方法では、自己抗体が結合することが GM-CSF 分子の構造変化をおこし、マウスモノクローナル抗体の結合を阻害する可能性もあるため、今回の結果が、詳細なエピトープを決定するものではないと考えられる。しかし自己抗体が GM-CSF 分子のなかで、78-94 アミノ酸残基をエピトープとする抗体と特に強く、かつ一様に拮抗阻害をしたことは、この部位が GM-CSF の活性部位であるとする説があること(43, 46, 51, 52)から、自己抗体がこの活性中心と結合することによって中和活性を示す可能性を示唆するものである。また加えて、この部位を認識する抗体画分の量、割合が疾患の重症度と相関する可能性もあるかもしれない。血清中の単純な自己抗体価の総量と、患者の肺胞-動脈血酸素分圧格差([A-

a]DO₂)を指標とした重症度との相関はこれまでの報告では認められていない(60)。しかしこれらの仮説を確認するには、患者の重症度と自己抗体の結合力、中和能、エピトープの変化を経時的に調べる必要がある。

VI-4. 肺内での GM-CSF 活性阻害と肺胞マクロファージ機能との関連

肺内の GM-CSF 活性を中和するのに、十分な結合力があり、かつ十分量存在しているという自己抗体は、iPAP の病因と密接な関連があると考えられる。今回の結果では、これら自己抗体が、肺内で GM-CSF 活性を効果的に抑制していることが示された。

ヒト AM に対する GM-CSF の真の役割は完全には解明されていないが、マウスではノックアウトマウスによる研究で多くの知見が得られている。GM-CSF が、AM の終末分化において中心的な役割を果たし、サーファクタントの分解を促進させるとされている(29, 33, 34)。GM-CSF、あるいはその受容体欠損マウスは、肺胞蛋白症類似の病態を呈する(8-11)だけでなく、分子細胞的特徴も類似していることから(1, 3, 8-11, 32, 33, 36-39)、ヒト iPAP の発症にも、肺の GM-CSF シグナルの阻害が関連していると考えられた(図 13 シェーマ)。

VI-5. 抗 GM-CSF 自己抗体の、特発性肺胞蛋白症の診断、病勢把握との関連、そして病因との関連

抗 GM-CSF 自己抗体が疾患特異的に発現しており、診断に有効であることは、以前報告されているが(41,42,61)、今回さらに多くの血清、BALF を用いた大規模コホート研究で、抗 GM-CSF 自己抗体が、iPAP 患者に疾患特異的に発現していることが確認された。今回の結果から血清中の自己抗体価を、cut off 値を 3 μg/ml に設定すると、感度、特異性とも 100%で診断が可能であった。この血清診断法を用いることで、肺理学所見と画像所見だけでなく、肺胞洗浄液、肺生検の鏡見像で確定診断していた iPAP の診断をより簡便に、

低侵襲で行うことが可能となった。

しかし現在までのところ、iPAP 患者の血清中自己抗体価と疾患重症度との相関は認められていない(60)。自己抗体価の中和活性、認識部位の違いなど、個体差が認められる特徴と、疾患の臨床的重症度、活動性とで相関する因子が無いかどうかを検討する必要があると考えられる。また、iPAP 患者の抗体価や中和能、エピトープ等の経時的な測定も、疾患の重症度との関連を見る上で重要であると考えられる。治療的な試みとして肺洗浄(62)や、リコンビナント GM-CSF の皮下注射療法(63,64)による症状の改善例もあり、GM-CSF 吸入療法の試みも始まっている。これら治療経過と症状の推移、自己抗体価およびその性状との関連性も引き続き調べることにより、より病因との関連性の深い因子を見付けることができるかもしれない。

VII. 結語

今回の研究では、iPAP 患者に疾患特異的に存在している抗 GM-CSF 自己抗体が、強力な GM-CSF 中和活性を持ち、かつ十分量存在しており、患者肺内の GM-CSF の生物活性を破壊させることが明らかとなった。自己抗体が GM-CSF シグナルを阻害することが、iPAP 発症の病因であるとする仮説を支持する結果が得られたと考えられる。

分担研究報告書

特発性肺胞蛋白症患者の GM-CSF 吸入治療

分担研究者：東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野教授 貫和敏博
研究協力者： 同 助手 田澤立之

研究要旨： 特発性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入治療の安全性と治療効果を検討するため、本研究班策定の統一プロトコールに沿い、健診で発見され徐々に低酸素血症の進んだ 2 人の同症患者に GM-CSF 吸入治療を行った。副作用なく治療を終了し、1 例の有効例を得た。統一プロトコールでの試験継続は妥当であると考えられた。将来的には、治療期間、用量、吸入方法の検討、および GM-CSF 吸入による改善のメカニズムの解析が、治療成績向上に必要であると考えられた。

A. 研究目的

[肺胞蛋白症] 肺胞蛋白症 (以下 PAP) は末梢気腔内に PAS 陽性のリポ蛋白質様物質が異常に蓄積する疾患である。1958 年の最初の報告以後、英文での報告が数百例にすぎない稀な疾患で、90%以上の患者は、先天性 PAP にみられるような遺伝子背景や、二次性 PAP にある白血病等の先行疾患を欠き、原因不明の特発性として分類される。全身麻酔下での全肺洗浄が標準治療とされる。343 例の報告例の解析では 10 年生存率が 68%で、8%程度の患者に自然寛解をみる一方、進行して不幸の転帰をとる例もある。
[特発性 PAP の病態] 肺胞マクロファージの存在する肺組織は GM-CSF 活性を有し、1977 年マウス肺の培養上清から初めて GM-CSF が精製された。1994~95

年に GM-CSF とその受容体のノックアウトマウスの肺に PAP 様の病変が指摘され、さらに主任研究者の中田らは、特発性 PAP 患者の BAL 液と血清に抗 GM-CSF 抗体があり、この抗体は二次性、先天性の PAP 患者ではみられないことを報告した。これらの事実により、特発性 PAP 患者においては、GM-CSF に対する自己抗体による肺胞マクロファージの機能障害が界面活性物質の除去能につながると思われる。

[GM-CSF による治療] ヒトリコンビナント GM-CSF 製剤は欧米では臨床導入され、抗腫瘍剤投与後の好中球減少症の治療や骨髄移植後の回復促進に使用されている。上記病態の解明に伴い、GM-CSF 皮下注射による本症治療の臨床試験が米

国・豪州の2グループで行われ、overall response rate 48% (21例中10例で奏功)という結果であった。またGM-CSF吸入についても肺癌患者での安全性を確認したのちPAP患者での治療成功例が1例報告された。さらに昨年度までに当科および国療近畿中央病院で3例のパイロ

B. 研究方法

倫理的側面：上記統一プロトコールに沿った実施計画書を東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会に提出しその実施について承認をうけた(平成15年2月21日第2003-033号)。実施にあたり、試験参加者に対しては、観察期間開始時と治療開始時の2回、同プロトコール中の説明書に沿って説明を行い、書面での同意を得た。

GM-CSF製剤の入手：Berlex社のLeukine (250 μ g/vial)を厚生労働省関東信越厚生局より薬監証明(平成15年4月3日第3897号)の発給をうけて、株式会社レメディ・アンド・ヘルス・コーポレーション(東京都港区)を通して輸入した。無治療観察期間(外来)：統一プロトコールに沿い、観察開始時、6週後、12週後の3回の外来受診時に、診察、QOL質問表記入、酸素飽和度測定、血液学・血液生化学検査、動脈血ガス分析、胸部X線検査、胸部CT検査、肺機能検査等の検査を行った。

治療期間(入院)：無治療観察期間と同じ項目に加えて、6分間歩行負荷検査、気管支肺胞洗浄等の検査・観察を行った。凍結乾燥製剤であるLeukine 1バイアル(250 μ g)を注射用蒸留水で1mlで溶解し、0.5mlを生理食塩水2mlで希釈し、Pari社LCネブライザーに入れ、Pari

ットスタデイが行われ、全例で副作用なく、低酸素血症の改善をみた。これらの結果より、肺胞蛋白症に対するGM-CSF吸入治療の安全性と治療効果を検討するため第II相臨床試験統一プロトコールが策定された。

社ターボボーイコンプレッサーに接続して、1日1回吸入した。試験参加者は、入院期間中、製剤の溶解・希釈操作を主治医の指導のもとに練習し、退院時に主治医は参加者が一連の操作を確実にこなすことを確認して外来治療へ移行した。治療期間(外来)：治療期間中、2週間ごとに外来で、統一プロトコールにそって無治療観察期間と同じ項目の観察を行った。吸入治療については、GM-CSF製剤を供給して自宅冷蔵庫で保存させ、ネブライザーおよびコンプレッサーを貸し出して入院時と同様に自宅で継続し、2週ごとの外来で、保冷材入りのスチロール箱に入れたGM-CSF製剤および製剤調製用シリンジ等の衛生器材・注射用蒸留水・生理食塩水等を供給し、同時に吸入薬の空バイアルおよび製剤調製用シリンジ等を回収し、治療が順調に進んでいることを確認した。治療開始6週後の動脈血ガス分析で有効・無効の判断を行い、無効例については、1日250 μ g吸入に増量して、自宅での吸入をさらに6週間継続した。

治療終了時(入院)：短期入院にて治療開始時と同じ項目の観察を行い、効果を評価した。

C. 研究結果

症例 1. 45 歳男性

[主訴] 労作時息切れ

[家族歴] 父：心不全 母：高血圧

[既往歴] 25-30 歳時気管支喘息（発作時のみ吸入，入院歴なし），30 歳時より高血圧で内服治療中

[現病歴] 2002 年 8 月健診で胸部 X 線 上両側中下肺野に網状影を指摘され，9 月 I 赤十字病院を受診（PaO₂ 79, KL-6 4360），9 月同院で VATS を施行し，肺胞蛋白症の診断．2003 年 1 月労作時息切れの増悪あり（PaO₂ 76, KL-6 7740），3 月当科外来紹介受診．6 月 PaO₂ 65.5 に低下し本臨床試験に登録．

[身体所見] 身長 175 cm，体重 79 kg，体温 36.9 °C，血圧 122 /89 mmHg，脈

拍 100 /分 整 意識清明，頭頸部：結膜黄疸・貧血なし 表在リンパ節触知せず，胸部：心音正常 心雑音なし，両側下肺野に coarse crackles 軽度，腹部：平坦・柔 圧痛なし 肝・腎・脾触知せず，四肢：浮腫なし バチ状指なし，神経学的に異常所見なし．

[検査所見] 表 1 参照

[臨床試験中経過] 無治療観察期間中，労作時息切れ・低酸素血症は緩徐に進行した．治療期間中，自覚・他覚的に副作用はみられず，治療前 AaDO₂ 37.1 torr は治療 6 週後 37.0 torr で無効の判断で，250 μg/日に増量するも，治療 12 週後の AaDO₂ は 41.2 torr で，無効と判断された．

表 1

	症例 1			症例 2		
	観察前	治療前	治療後	観察前	治療前	治療後
WBC (μl)	5900	5900	5700	3500	3400	3700
Eosinophil (%)	4.0	2.0	5.0	1.0	2.0	1.0
LDH (IU/l)	692	795	783	404	413	384
CEA (ng/ml)		6.0	6.8		1.0	0.8
KL-6 (U/ml)		10500	13100		721	252
SP-D (ng/ml)		431	437		189	141
SP-A (ng/ml)		161	195		49.1	47
血清自己抗体 (μg/ml)		145.8	134.9		94.6	88.9
BALF 自己抗体 (μg/ml)		1.33	1.18		0.39	0.30
PaO ₂ (torr)	65.0	67.8	66.3	62.6	57.2	69.1
PaCO ₂ (torr)	39.9	37.6	35.4	35.3	37.8	39.5
AaDO ₂ (torr)	37.1	37.1	41.2	45.0	47.4	33.5

FVC (%)	96.2	88.4	86.1	99.1	100	109.8
%DLco	89.3	81.3	65.8	91.4	87.4	107.7
BALF 細胞数 (X10 ⁵ /ml)		1.8	3.8		1.4	2.8
BALF マクロファージ (%)		97.0	79.2		44.8	85.9
BALF リンパ球 (%)		2.50	20.8		52.3	13.7

症例 2. 67 歳女性

[主訴] 労作時息切れ

[家族歴] 父：70 歳で急性心筋梗塞で死亡

[既往歴] 26 歳時虫垂炎手術，27 歳時帝王切開，39 歳・60 歳時急性腎盂腎炎

[現病歴] 2002 年 5 月健診で胸部 X 線
上両側上肺野中心に網状影を指摘され，
7 月県立 S 病院を受診．8 月精査のため
同院入院し 9 月の TBLB にて肺胞内に
PAS 陽性の無構造，微細顆粒状の沈着物
(SP-A 陽性) がみられ肺胞蛋白症と診
断され，2003 年 4 月当科外来紹介受診．
血清の抗 GM-CSF 抗体は 98.85 μ g/ml で
特発性 PAP の診断．室内気吸入下での
PaO₂ 79 で外来経過観察中 6 月より PaO₂
62 と低下し労作時息切れ出現し，7 月本
臨床試験に登録．

[身体所見] 身長 150 cm，体重 51 kg，
体温 36.0 $^{\circ}$ C，血圧 112 /65 mmHg，脈

拍 72 /分 整

意識清明，頭頸部：結膜黄疸・貧血なし
表在リンパ節触知せず，胸部：心音正常
心雑音なし呼吸音正常 ラ音なし，腹
部：平坦・柔 圧痛なし 肝・腎・脾触
知せず，四肢：浮腫なし バチ状指なし，
神経学的に異常所見なし．

[検査所見] 表 1 参照

[臨床試験中経過] 無治療観察期間中，
労作時息切れ・低酸素血症は緩徐に進行
した．治療期間中，自覚・他覚的に副作
用はみられず，治療前 AaDO₂ 47.4 torr は
治療 6 週後 43.0 torr で無効の判断で，250
 μ g/日に増量したところ，治療 12 週後
には AaDO₂ 33.5 torr まで改善し，有効
と判断された．

D. 考察

[副作用について] Leukine(sargramostim)
の副作用としては，頻度の多いものに発
熱，無力症，頭痛，骨痛，悪寒，筋肉痛，
頻度の少ないものとして呼吸困難，浮腫，
皮疹があげられているが，上記 2 例では
みられなかった．また不整脈，失神，好
酸球増多症，めまい，低血圧，注射部位

の反応，痛み（腹・胸・背部・関節），
頻脈，血栓，一時的な肝機能異常が市販
後報告されているが，上記 2 例ではみら
れなかった．また本剤の使用により浮
腫・毛細管漏出症候群・胸水・血清クレ
アチニン・ビリルビンの上昇が報告され
ているが，上記の 2 例にはみられず，検

査所見についても血算，白血球分画，血小板数，血清アルブミン値等に著明な変化はみられなかった．本剤を用いることで GM-CSF に対する抗体の出現は投与後 2%程度の患者にみられるが，上記 2 例では，吸入治療後抗 GM-CSF 抗体の増加はみられなかった．

特発性 PAP に対する GM-CSF 皮下注射での臨床試験では，発熱，注射局所の発赤など比較的軽微な副作用がみられたにとどまり，その理由として，抗 GM-CSF 抗体の存在が考えられている．本吸入療法をうけた 2 例では発熱等みられず，気道刺激症状等もみられず治療を終了した．

[効果について] 症例 2 で AaDO₂ が改善し，またパイロットスタディでは全例が改善しながら，症例 1 が反応しなかった原因として，①治療期間，②用量，③

薬剤の肺内への分布などの要素を考える．①についてはパイロットスタディの治療期間 6 ヶ月に対して今回の治療は 3 ヶ月と短く，長期間の刺激が肺胞マクロファージへの機能改善につながる可能性がある．②については，パイロットスタディでは 1 週間吸入-1 週間休薬の繰り返しではあったが用量は 250 μg/日であったことや，症例 1 でも 250 μg/日に増量後有効となったことから，今後検討すべき課題である．③については，ネブライザーの効率，吸入時の気温や気管支内腔の状態，吸入の時間（朝か就寝前か）などの要素もさらに検討する必要がある．さらに自己抗体が圧倒的に多い環境で GM-CSF 投与による改善がなぜみられるかのメカニズムの解析も治療効率の改善に重要であると考えられる．

E. 結論

健診で発見され，徐々に低酸素血症の進んだ 2 例について，統一プロトコールに従い GM-CSF 吸入治療を行い，副作用

なく経過し，1 例の有効例を得た．次年度も統一プロトコールにて臨床試験を進めることは妥当であると思われた．

F. 健康危険情報

GM-CSF 製剤（Berlex 社 Leukine）吸入による副作用，健康被害は当科における

2 例にはまったく見られなかった．

G. 研究発表

1. 田澤立之，太田洋充，海老名雅仁，徳江豊，平林泰彦，中田光，萩原弘一，渡辺彰，貫和敏博：Wegener 肉芽腫症に合併した特発性肺胞蛋白症（PAP）に対する顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）吸入療法．第 43 回

日本呼吸器学会総会．2003 年 3 月 14 日．福岡市．

2. 田澤立之，中田光，貫和敏博：希少疾患に対する未承認製剤による治療：肺胞蛋白症に対する GM-CSF 療法を試みて．ミニシンポジウム 6 「先端医療の実

用化に向けてのシステム構築」. 第 43 回
日本呼吸器学会総会. 2003 年 3 月 15 日.
福岡市.

3. 田澤立之, 石本修, 太田洋充, 海老
名雅仁, 萩原弘一, 渡辺彰, 中田光, 貫
和敏博: 特発性肺胞蛋白症 (PAP) に対
する顆粒球-マクロファージコロニー刺
激因子 (GM-CSF) 吸入療法. 第 100 回
日本内科学会講演会. 2003 年 4 月 1 日.
福岡市.

4. Tazawa R, Ishimoto O, Ohta H,
Maemondo M, Ebina M, Hagiwara K,
Nakata K, Nukiwa K. Aerosolized
granulocyte-macrophage colony stimulating
factor (GM-CSF) as treatment for

pulmonary alveolar proteinosis (PAP).
American Thoracic Society 2003
International Conference, May 21, 2003,
Seattle, WA, Am. J. Resp. Crit. Care Med.
167:A952, 2003

5. Tazawa R, Ishimoto O, Ohta H, Suzuki
T, Maemondo M, Ebina M, Hagiwara K,
Nakata K, Nukiwa K. Granulocyte-
macrophage colony stimulating factor
inhalation therapy as a treatment for
pulmonary alveolar proteinosis. The 13th
European Respiratory Society Annual
Congress. September 30, 2003. Vienna,
Austria, Eur. Resp. J. 22:377s, 2003.

Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor 吸入療法を

施行した特発性肺胞蛋白症の 3 例

～シャトルウォーキングテストの有用性について～

国立療養所近畿中央病院 井上義一

【研究要旨】我々は特発性肺胞蛋白症 (idiopathic pulmonary alveolar proteinosis; IPAP) の 3 例に対して granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) 吸入療法を行った。研究班のプロトコールに従いジェットネブライザーにて 125 μ g/body/day 吸入を 6 週間行ったが、全例 A-aDO₂ 10torr 以上改善との有効判定に至らず、250 μ g/body/day へ吸入増量を行った。12 週間の治療終了時点では、1 例が有効、2 例が無効と判定された。しかし、無効例の 1 例においては自覚症状の改善、シャトルウォーキングテストによる運動負荷で改善を認めた。GM-CSF 吸入量、期間、効果判定について、今後、さらに検討が必要と考えられる。

分担研究者：井上義一
国立療養所近畿中央病院，
臨床研究センター，呼吸不全研究部部長

A. 【研究目的】

特発性肺胞蛋白症 (idiopathic pulmonary alveolar proteinosis; IPAP) に対する GM-CSF 皮下注療法の有効性は報告されてきた¹⁾²⁾³⁾が、GM-CSF ノックアウトマウスに発生する IPAP 様の肺病変に対する GM-CSF 吸入効果⁴⁾から、GM-CSF 吸入療法の有効性も予想され、H14 年度の本研究班の検討⁵⁾で、当院の 1 例を含む 3 例で有効性が確認された。この経験に基づき、H15 年度には新たな共通のプロトコールに基づき全国の IPAP 症例に対する GM-CSF 吸入療法の有効性を確認するための臨床試験を行った。当院において 3 例の治療が行われた。

IPAP の病勢評価には種々の方法が知ら

れているが⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾、今回の臨床試験では AaDO₂ により治療効果判定が行われたが、最終的には運動耐容能の改善が期待される。一般的には運動耐容能の評価には 6 分間歩行試験が汎用されているが、シャトルウォーキングテストは簡便な漸増負荷試験の一種であり、欧州を中心として運動負荷試験の標準法として普及しつつある。H15 年度に本研究班の治療研究に参加した当院の IPAP 3 例についてシャトルウォーキングテスト¹⁰⁾による運動耐容能評価の有用性を含めて検討し報告する。

B. 【研究方法】

(1)本研究班の治療研究プロトコールに従って当院の IPAP 3 症例に対して GM-CSF 吸入療法を行い、治療効果、副作用判定の為に各種の臨床パラメータの検討を行った。今回の治療に用いた GM-CSF は

Leukine(Schering AG 社)であった⁹⁾。

(2)GM-CSF 吸入による運動耐容能の変化を確認するために、プロトコールに定められた6分間歩行試験に加えて、シャトルウォーキングテストを行い、その意義について検討を加えた。

C. 【研究結果】

1. GM-CSF 吸入療法までの治療経過

(1) 症例1 (登録番号 J148)

61歳, 女性, 大阪府出身

主訴: 労作時呼吸困難(H-J II)

既往歴: 特記すべきことなし

生活歴: 喫煙歴なし, マンション管理人, 近隣にガム工場あり, 5年前からペット飼育歴あり

現病歴: 2002年7月から労作時呼吸困難と咳が出現した。同年10月上旬に淀川キリスト教病院を受診した。BAL, TBLBにて肺胞蛋白症と診断され, 排痰理学療法としてアカペラを使用するも改善しないため, GM-CSF 吸入療法目的に当院に紹介となった。

(2) 症例2 (登録番号 J135)

25歳, 男性, 愛知県出身

主訴: 労作時呼吸困難(H-J III)

既往歴: 特記すべきことなし

生活歴: 喫煙歴 30本 x 4年 (2002年から禁煙), 建築・化学系の工場に勤務しマスク着用せず化学薬品を吸入する機会あり

現病歴: 2000年10月頃から労作時呼吸困難出現(HJ-III)。2001年6月中旬, 間質性肺炎との診断のもと近医入院。2001年6月, 藤田保健衛生大学紹介となり, 気管

支鏡にて肺胞蛋白症と診断された。2001年9月までに5回全身麻酔下肺胞洗浄を行い, 外来にて経過観察となっていたが, 徐々に労作時呼吸困難, 多血症が増悪。2002年11月に再入院し, 3回の全身麻酔下肺胞洗浄を施行。低酸素血症の改善が得られなかったため, HOT 導入の上, 退院となった。その後も病状の増悪を認めため, GM-CSF 吸入目的に当院紹介となった。

(3) 症例3 (登録番号 J160)

歳, 男性, 兵庫県

主訴: 労作時呼吸困難(H-J III)

既往歴: 肺結核 (IPAP 発症後)

生活歴: 喫煙歴 30本 x 10年, 溶接工 16年

現病歴: 1991年, 健診で胸部異常陰影を指摘され, 1992年7月, 国立姫路病院受診し肺胞蛋白症と診断された。1992年, 気管支鏡下肺洗浄14回, 1994年, 全肺洗浄, 1995年気管支鏡下肺洗浄10回, 96年7月全肺洗浄を行った。1996年7月の全肺洗浄後に発熱と両肺びまん性陰影が出現した。胸腔鏡下肺生検にて過敏性肺臓炎様の病理所見を認めたため, 肺洗浄に関連した「アレルギー性肺疾患」との診断に基づき, ステロイド投与を行い著明に改善した。しかし, ステロイド治療中に空洞病変が多発, 喀痰より結核菌ガフキー陽性で肺結核と診断。ステロイド漸減, 結核治療を行った。2000年5月びまん性陰影増悪によりプレドニン 20mg/日を再開し, 同年7月までに 5mg/日に漸減した。2003年2月より GGO の増強を認め, 肺胞蛋白症の増悪と考えられたが, 結核

の既往のため全肺洗浄より GM-CSF 吸入療法が望ましいと考えられたため当院紹介となった。

2. GM-CSF 吸入療法の効果 (Table 1)

GM-CSF 吸入 (125 μ g/body/day) 6 週間後には、いずれの症例とも A-aDO₂ が 10Torr 以上改善との有効基準を満たさなかったため、吸入量を 250 μ g/body/day に増量した。吸入療法 12 週間後には症例 2 のみ A-aDO₂ の改善から有効と判定された。画像的にも症例 2 では CT 上、明らかな ground glass opacity (GGO) の減少が確認された (Fig. 1)。しかし、残りの 2 例では明らかな画像、血清マーカーの改善は得られなかった。

Table 1 Disease severity and serum markers before and after GM-CSF inhalation

	Case 1		Case 2		Case 3	
	before	after	before	after	before	after
Disease severity						
Severity grade*	4	3	4	2	4	4
DOE (H-J)	II	II	III	I	III	IV
PaO ₂ (Torr)	57.3	60.4	58.4	76.0	54.2	52.7
A-aDO ₂ (Torr)	45.9	41.5	45.4	34.0	41.9	46.7
%DL _{CO} (%)	61	53.4	32.9	49.7	13.9	27.2
Serum marker						
LDH (U/L)	245	248	249	200	226	211
KL-6 (U/ml)	4200	3620	2430	1250	7900	8820
SP-D (ng/ml)	294	288	263	174	270	231
CEA (ng/ml)	3.1	3.3	2.8	1.2	6.2	5.8
CYFRA (ng/ml)	6.6	6.4	3.6	1.9	6.0	9.9

*: defined by Y. Inoue (ref. 7)

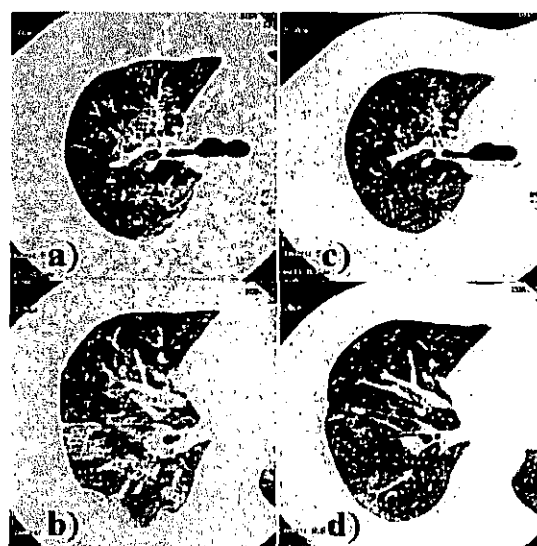


Fig. 1 (Case 2)

a) b) : 治療前の HRCT

c) d) : 治療後の HRCT

治療後の HRCT にて明らかな GGO の減少が確認された。

3. AaDO₂ と運動負荷試験による効果判定の解離

運動負荷試験として 6 分間歩行試験、シャトルウォーキングテストを行った。症例 2 のみが有効例で、6 分間歩行試験、シャトルウォーキングテストのいずれにおいても明らかな改善が確認された。一方、症例 3 はいずれの方法でも明らかな運動耐容能の低下が確認された。症例 1 は A-aDO₂ に関しては十分な改善効果が認められなかったが、自覚的には明らかな労作時呼吸困難の改善が認められた。6 分間歩行試験では歩行距離が 100m 以上減少したが、シャトルウォーキングテストでは 100m 以上歩行距離の改善が得られた。