

分担研究報告書

特発性肺胞蛋白症患者の GM-CSF 吸入治療の予後と再治療

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、GM-CSF 吸入治療を受けて改善した本症患者 2 例の経過を観察した。1 例は治療終了 24 ヶ月後も増悪はみられていない (PaO<sub>2</sub> 85torr 室内気吸入, 以下同じ)。1 例は治療終了 20 ヶ月後に再増悪(PaO<sub>2</sub> 38torr)がみられ, 同じプロトコルで再治療を行うも改善なく, 7 ヶ月後さらに呼吸不全が進行し(PaO<sub>2</sub> 31torr), 再々治療を吸入器を代えて液体製剤を使い同プロトコルで施行し, 改善をみた (PaO<sub>2</sub> 57torr)。本治療では, 製剤・吸入器・治療期間等も治療効果に重要な要因と考えられた。

A. 研究目的

[肺胞蛋白症とGM-CSF] 末梢気腔内にPAS陽性のリポ蛋白様物質が異常に蓄積する疾患である肺胞蛋白症 (以下PAP) 患者の9割以上が, 原因不明の特発性として分類される。この特発性肺胞蛋白症と, いまから四半世紀前にマウス肺の培養上清から精製されたGM-CSFが結び付けて考えられるようになったのは, 最近10年のことである。

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により特発性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が明らかにされ, 特発性PAP患者では, GM-CSFに対する自己抗体が肺胞マクロファージの機能障害を起し界面活性物質の除去能を低下させると考えられる。

[GM-CSFによる治療] ヒトリコンビナントGM-CSF製剤は, 欧米ですでに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

進を適応として臨床導入されており, これの皮下注射による本症治療例の症例報告が, GM-CSF ノックアウトマウスの報告の2年後に発表された。さらに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。豪州・欧州グループは, 奏功例6例のうち, 5例が再び増悪し, 4例でGM-CSFによる再治療を行い, 3例で改善したと報告している。本邦では皮下注射のかわりに, ネブライザーによる吸入投与で, 当科および国療近畿中央病院で3例のパイロ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て, 本研究班において, 第Ⅱ相臨床試験統一プロトコルが策定され, 実施がすすんでいるが, この治療を受けた本症患者の治療後の経過については, 経験がなく, まったく不明である。そこで当科で吸入治療を受けた2名の患者の, 治療後の経過を検討し, 再増悪のみられた1例には再治療を試みた。

## B. 研究方法

倫理的側面：肺胞蛋白症患者のGM-CSF吸入による治療ならびに再治療について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。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し、書面での同意を得た。

GM-CSF製剤の入手：Berlex社のLeukine (250  $\mu$ g/vial) を厚生労働省関東信越厚生局より薬監証明の発給をうけて、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。

観察期間(外来)：診察、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、肺機能検査等による観察を定期的に行った。

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。酵母由来のヒトGM-CSF製剤Leukine を、凍結乾燥製剤の場合は注射用蒸留水で1mlで溶解し、液体製剤の場合直接125  $\mu$ g分をシリンジでとり、生理食塩水2mlで希釈し、Pari社LCネブライザーに入れ、Pari社ターボボーイコンプレッサーに接続して、1日2回、7日間吸入し、隔週で12サイクル、吸入治療を行った。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せることを確認して外来治療へ移行した。

第1例の第2回治療については、Pari社のLCネブライザーを従来の「プラス」型から「スター」型(平均エロゾル粒子径がより小さい)に変更し、Leukineの液体製剤を用いた。

第1例については第3回の24週間の吸入治療の後、GM-CSF製剤125  $\mu$ gを隔週で1日2回2日間吸入による維持療法を行った。

治療期間(外来)：治療期間中、2週間ごとに

外来で、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。治療終了時(入院)：短期入院にて治療開始時と同じ項目を観察し、効果を評価した。

## C. 研究結果

症例1. 53歳女性

[主訴] 労作時息切れ

[家族歴] 父：胃癌

[既往歴] 特記すべきことなし

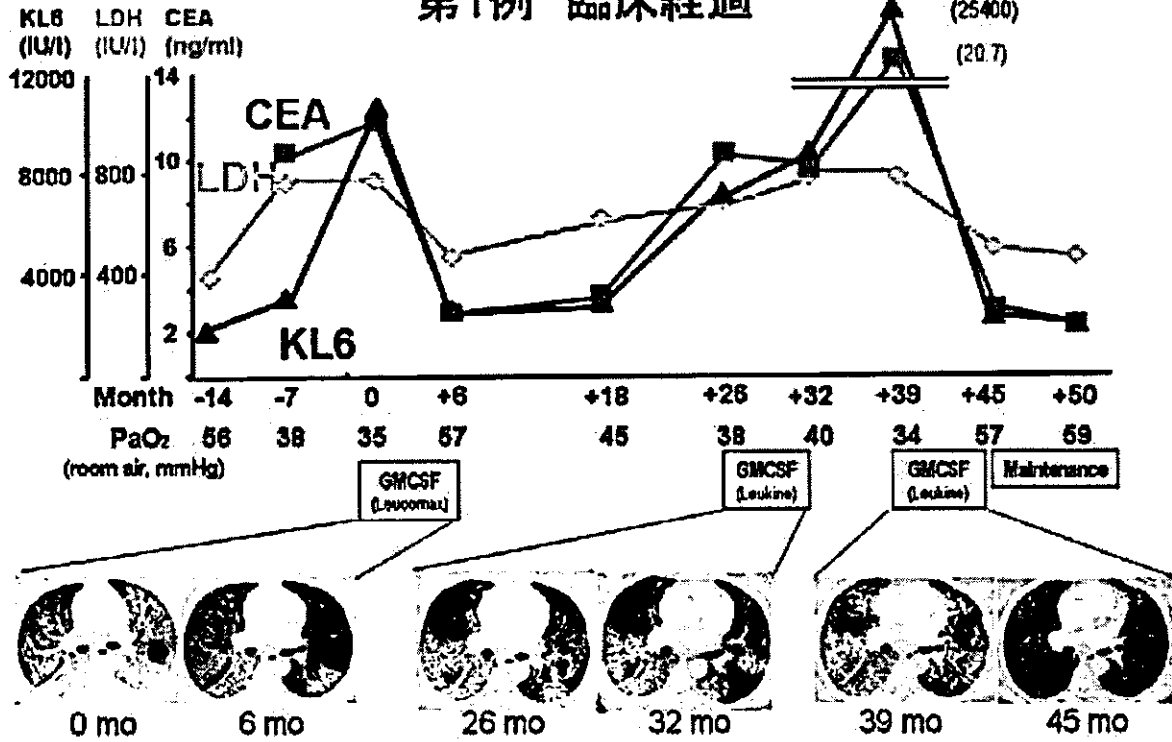
[現病歴] 1999年8月労作時息切れを自覚。10月に近医を受診し胸部X線写真上、両側にびまん性の粒状結節影がみられ、気管支肺胞洗浄、肺生検、および抗GM-CSF抗体陽性より特発性肺胞蛋白症の診断で2000年12月より5月まで当科入院で第1回のGM-CSF治療を施行した。退院後、定期的に外来で経過観察を行った。

[身体所見] 身長 155 cm, 体重 72.5 kg, 体温 36.2  $^{\circ}$ C, 血圧 116/74 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fine ~medium 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, 神経学的異常所見なし。

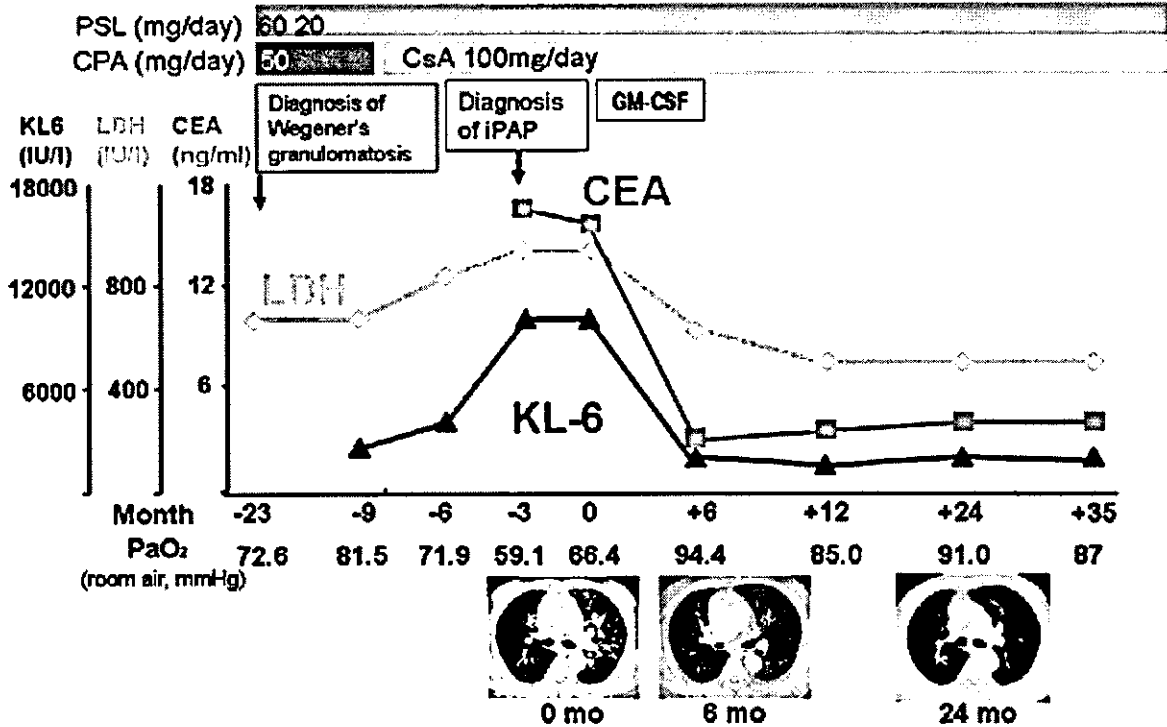
[検査/経過] 図参照

[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なかった。治療終了20ヶ月後に再増悪(PaO<sub>2</sub> 38torr)がみられ、同プロトコルで再治療を行うも改善

## 第1例 臨床経過



## 第2例 臨床経過



なく、7ヵ月後さらに呼吸不全が進行し(PaO<sub>2</sub> 31torr), 再々治療を吸入器を代えて液体製剤を使い同プロトコルで施行し, 改善をみた (PaO<sub>2</sub> 57torr).

#### 症例 2. 57歳男性

[主訴] 労作時息切れ

[家族歴] 姉: 子宮癌 母: 糖尿病

[既往歴] 18歳: 副鼻腔炎, 24歳: 交通事故(輸血歴あり), 43歳: 十二指腸潰瘍, 52歳: 尿管結石, 53歳 ウェグナー肉芽腫症

[現病歴] 2000年4月 ウェグナー肉芽腫症の診断で, プレドニンとエンドキサン, ついでプレドニンとネオーラルで治療を受けていた. 2001年夏ごろより両側びまん性粒状網状影が出現, 増悪するため2002年1月に気管支肺胞洗浄, 気管支鏡下肺生検を行い, 肺胞蛋白症の診断. 免疫抑制剤を使用中のため, 標準治療であり肺洗浄を行わず, GM-CSF吸入治療を行うため2002年4月入院.

[身体所見] 身長 171 cm, 体重 74 kg, 体温 36.6 °C, 血圧 160/90 mmHg, 脈拍 108 /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] 図参照

[臨床試験中経過] 2002年4月より10月の治療中, 自覚・他覚的に副作用はみられず, 労作時息切れ・低酸素血症は改善し, AaDO<sub>2</sub> も 20 torr 低下した. 治療終了後も, 自覚・他覚的に副作用はみられず, 労作時息切れ・低酸素血症は改善したままで, 経過し画像, 動脈血酸素分圧, 血清マーカーも改善したまま, 経過している.

#### 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, 皮疹があげられ市販後報告では, 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みられているが, 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, 血算, 白血球分画, 血小板数, 血清アルブミン値等に大き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つた, 軽度低下傾向にあった. また治療後の経過観察中に, 遅発性の副作用と思われる所見はみられなかった.

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1で第2回治療と第3回治療の治療効果について差が出た理由については, ①製剤の形態, ②薬剤の肺内への分布などの要素を考える. ①については第3回治療で用いた製剤が液体で, 溶解する操作が不要であったことが注目される. 自宅で患者自身による操作が必要な外来治療では, 簡便さが吸入の効率や確度に関係する可能性が考えられた. ②については, ネブライザーの効率, および平均粒子径の違いによる, 気道内分布の違いが, 治療効果に影響を与えたと考える. 今後の臨床試験では, 使用するネブライザーの選択や改良の可能性について考慮が必要と考えられた. また症例1では, 維持療法期間中も血清マーカーの改

善がみられており、今後のプロトコル策定に関して、治療のintensityと期間について、最適化の必要性が示唆された。

症例2では、免疫抑制剤投与下でGM-CSFに対する自己抗体が出現し、GM-CSF治療により改善し、長期間の寛解を得ている点が注目される。寛解中も血清自己抗体価は高値を維持しており、肺局所および全身での自己抗体産生と病勢への関与を考える上で重要な症例と考えられた。

#### E. 結論

GM-CSF吸入治療を受け、改善をみた2例の経過を観察した。1例は再治療、再々治療を要し、再改善をみた。1例は改善したまま2年を経過している。GM-CSF吸入は再増悪にも有効であることが示唆された。本治療では、製剤・吸入器・治療期間等も治療効果に重要な要因と考えられた。

#### 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

##### 論文発表

Tazawa R, Hamano E, Arai T, Ohta H, Ishimoto O, Uchida K, Watanabe M, Saito J, Takeshita M, Hirabayashi Y, Ishige I, Eishi Y, Hagiwara K, Ebina M, Inoue Y, Nakata K, Nukiwa T. Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor and Lung Immunity in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Feb 25; [Epub ahead of print]

田澤立之：特発性肺胞蛋白症のGM-CSF吸入治療と今後の展望。THE LUNG perspectives. 第13巻91-92頁，2005年。

#### 著書

田澤立之，貫和敏博：肺胞蛋白症のトランスレショナル研究と新しい治療。工藤翔二，中田絃一郎，貫和敏博編「呼吸器疾患最新の治療2004-2006」，南江堂，東京，26-31頁，2004年。

田澤立之：肺胞蛋白症。萩原弘一編「呼吸器研修医ノート」，診断と治療社，東京，604-606頁，2004年。

#### 学会発表

Tazawa R, Hamano E, Ohta H, Ishimoto O, Arai T, Uchida K, Watanabe M, Ebina M, Inoue Y, Nakata K, Nukiwa T. Effects of aerosolized GM-CSF therapy on alveolar macrophages in patients with pulmonary alveolar proteinosis. American Thoracic Society 100<sup>th</sup> International Conference, Orlando, May 2004.

田澤立之，濱野栄美，太田洋充，新井徹，石本修，内田寛治，渡辺雅人，海老名雅仁，井上義一，中田光，貫和敏博：肺胞蛋白症患者における顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）吸入治療が肺胞マクロファージに及ぼす影響。第44回日本呼吸器学会学術講演会，東京都，2004年3月。

#### \*学会賞

第17回内科学会奨励賞（日本内科学会）2004年4月8日

田澤立之 「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」

## 長崎大学医学部歯学部附属病院における 2 例の症例報告

### 特発性肺胞蛋白症に対して行った Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) 吸入療法が著効した 1 例及び現在治療中の 1 例について

長崎大学医学部歯学部病院熱研内科 (感染症内科)

研究協力者： 大石和徳

【研究要旨】 GM-CSF はマクロファージの分化成熟に欠かせない成長因子であるが、肺胞蛋白症の原因は、抗 GM-CSF 自己抗体のために、マクロファージの分化成熟が阻害され、サーファクタントの分解が阻害され蓄積する蛋白様物質が原因とされている。我々は稀な疾患である肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入療法の臨床試験に参加し、平成 16 年度は 2 症例の治療経験を得た。症例 1 は粉塵暴露歴があり、250  $\mu$ g/day の吸入療法 24 週間で著効した。症例 2 は現在治療進行中である。

#### A. 【研究目的】

肺胞蛋白症(pulmonary alveolar proteinosis; PAP) は肺胞腔内に phospholipid と surfactant apoprotein が貯留するまれな疾患である。原因により先天性(congenital PAP)、続発性 (secondary PAP)、特発性 (Idiopathic PAP:IPAP) に分類される。1958 年に Rosen らにより本疾患が報告されて以来、しばらくその原因は不明であった。しかし近年 Granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)ノックアウトマウスでは PAP を発症するという報告がなされ<sup>1)</sup>、またこのマウスに GM-CSF を吸入させることで PAP が改善することも報告された<sup>2)</sup>。続いて IPAP 患者において、肺、および血清中に GM-CSF の活性を阻害する中和自己抗体が存在することが発見された<sup>3)</sup>。すなわち、PAP のほとんどを占める IPAP において抗 GM-CSF 自己抗体は GM-CSF と結合し、

不活化することで肺胞マクロファージの分化障害、機能障害を来し、ひいてはマクロファージによる肺胞内のサーファクタント分解が低下することによって IPAP が発症することがわかってきた。これまで PAP に対する治療の基本は、気管支鏡を用いる反復区域洗浄法や、重症例における全身麻酔下片肺洗浄であったが患者の負担も大きかったことから、これにかわる治療法が求められてきた。そこで、PAP の原因が抗 GM-CSF 中和抗体による GM-CSF 作用欠如であることより、GM-CSF を補充する治療法が試みられるようになった。1996 年のオーストラリアの Seymour らに続き、以後、GM-CSF 皮下注療法についての有効性が報告されてきた<sup>4)</sup>。一方、GM-CSF ノックアウトマウスに GM-CSF 吸入を行い改善が得られた報告と、肺が本疾患の主座であることから吸入療法の有用性について検討されるようになった。わが国では、平成 14 年度までに IPAP

に対する GM-CSF 吸入療法のパイロット試験が 3 症例に施行され、いずれも良好な結果を得ている<sup>9)</sup>。平成 14~16 年度の予定で、「GM-CSF 吸入による重症特発性肺胞蛋白症の治療研究班」が発足した。GM-CSF 吸入療法第 II 相臨床試験の参加施設として、16 年度は 2 症例の臨床試験を施行することができたので結果を報告する。

## B. 【研究方法】

(1) GM-CSF 製剤の準備：GM-CSF はわが国においては未発売である。当院の倫理委員会において実施計画の承認を得、薬剤、および治験について患者本人、家族へ十分説明し、承諾を頂いた。米国 Berlex 社より Schering AG 社の組み換え型ヒト GM-CSF 製剤 sargramostim (商品名 Leukine<sup>®</sup>) を試験責任医師が個人輸入する形をとった。

(2) 吸入方法：Leukine<sup>®</sup> (500 μg) の 4 分の 1 量 (125 μg) を生理食塩水 2ml にて希釈した後、ジェット式ネブライザー (パリ・ターボボーイ<sup>®</sup> (パリ社)) を用いて 1 日 2 回吸入する (GM-CSF 250 μg/day)。前半は 8 日投薬、6 日休薬のサイクルで 12 週間継続し、後半は一日 125 μg 一回吸入 4 日投薬、10 日休薬で 12 週間継続した。

(3) 評価方法：治療前及び治療開始後経時的に胸部 Xp・胸部 HRCT 撮影、CEA・KL-6・SP-D・LDH などの血液マーカーの測定、動脈血ガス、肺機能検査、6 分間歩行試験等を行い、治療効果を判定した。

## C. 【研究結果】

### ① 症例 1

(1) 症例：26 歳、男性

主訴：労作時呼吸困難 (H-J II 度)

既往歴：20 歳扁桃摘出手術

生活歴：喫煙 15 本×9 年、飲酒焼酎 2 合/日

現病歴：18 歳より半導体工場勤務。部品に使用する樹脂の粉塵の吸入歴あり。平成 14 年ごろより労作時呼吸困難を自覚していた。H16 年 3 月の検診にて胸部異常陰影を指摘されて県立延岡病院にて精査施行、BAL 液の性状より肺胞蛋白症を疑われ同年 4 月熊本大学呼吸器内科に紹介となり、精査入院。特発性肺胞蛋白症と診断され、GM-CSF 吸入療法の適応と考えられ当科へ紹介、3 ヶ月の観察期間を経て H16 年 8 月 23 日入院。

入院時現症：166cm、78.5kg、呼吸数 16 回/分、両下肺野に fine crackles、ばち指なし。

### (2) 検査データ

血液検査 (Table 1)：一般血液検査では、LDH 高値、脂肪肝による軽度肝機能障害があり、血清検査では KL-6、CEA、SP-D の高値を認めた。低酸素血症があり、A-aDO<sub>2</sub> は 45.1 torr と開大していた。また、抗 GM-CSF 抗体は血清中で 43.15 μg/ml、と陽性で特発性 PAP に合致した。(Table 1)。

Table 1 Laboratory data on admission

Hematology		Serology	
WBC	9000 / μl	CRP	0.14 mg/ml
Neu	51%	CEA	7.7 ng/ml
Lym	39%	SP-D	993 ng/ml
Mo	5%	KL-6	9000<U/ml
Eo	4%	抗 GM-CSF 抗体	43.15 μg/ml
Ba	0%		
RBC	505x10 <sup>4</sup> / μl	Blood gas analysis	
Hb	16.7 g/dl	pH	7.397
Plt	20.5x10 <sup>4</sup> / μl	PaCO <sub>2</sub>	59 torr
		PaO <sub>2</sub>	38.1 torr
		HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	23 mmol/l
		SaO <sub>2</sub>	90%
		A-aDO <sub>2</sub>	45.1 torr
Biochemistry		BALF	
AST	39 IU/l	細胞数	2.86x10 <sup>5</sup> / ml
ALT	49 IU/l	Mφ	81.4%
LDH	236 IU/l	Neu	2.7%
ALP	193 IU/l	Lym	14.5%
γ-GTP	88 IU/l	Eo	1.4%
BUN	6.8 mg/dl		
Cr	0.9 mg/dl		
TP	7.7 g/dl		
Alb	4.7 g/dl		
Na	141 mEq/l		
K	3.9 mEq/l		
Cl	102 mEq/l		

画像所見：胸部 Xp (Fig.1)；両下肺野優位にスリガラス状陰影を認める。胸部 HRCT (Fig.2)；両側びまん性にスリガラス状陰影を認め crazy-paving pattern を伴っていた。

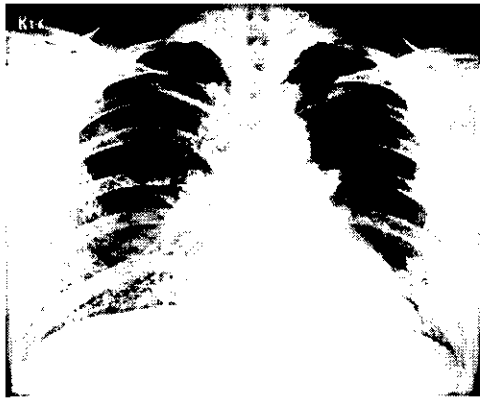


Fig.1 Chest X-ray on admission



Fig.2 HRCT on admission

肺機能検査：%VC は 80.8%であったが、%DLco は 40.7%と低下を認めた。

気管支鏡：気管支肺胞洗浄(rt. B<sup>3</sup>a)では 150ml 注入で 61ml の白色混濁液が回収された。細胞数  $2.86 \times 10^6/ml$ ，分画は M  $\phi$  81.4%，Lym14.5%，Neu2.7%，Eo1.4%であった(Table 1)。

### (3) 治療経過

2004年8月29日より GM-CSF 吸入療法 (250  $\mu g/日$ ) を行った。血清のマーカーは著明に低下し、肺機能も改善した (Table 2)。

胸部レントゲン (Fig.3)，HRCT (Fig.4) では陰

影は著明に改善した。治療後の BAL の外観はごく軽度の混濁が残存する程度に改善した。沈殿も少量になった。また、明らかな副作用を認めなかった。

Table2 Effect of inhaled GM-CSF

	pre-therapy	post-therapy
PaO <sub>2</sub> (torr)	59	76
A-aDO <sub>2</sub> (torr)	45.1	24.1
%VC (%)	80.8	87.8
FEV <sub>1.0</sub> (%)	87.9	78
%DLCO (%)	40.7	48.6
KL-6 (U/ml)	9000<	5570
LDH (IU/l)	236	200
6MD (m)	460	550



Fig.3 Chest X-ray post therapy



Fig.4 HRCT post therapy



② 症例 2

(1) 症例：72歳、女性

主訴：主訴：労作時呼吸困難（H-J III度）

既往歴：42歳子宮癌手術

生活歴：喫煙、飲酒なし 職業：主婦

現病歴：平成11年9月ころより労作時息切れを自覚、近医にて間質性肺炎の診断でステロイド投与されるも反応せず、同年12月他院にてBALを施行し肺胞蛋白症が疑われた。平成12年1月大分大学呼吸器内科（内科学第二）に紹介となり全麻下で全肺洗浄が行われた。その後は低酸素血症も改善し症状が落ちついていたためambroxol hydrochlorideの内服で経過を見ていた。平成16年になり再び症状の増悪と、画像でも悪化が認められるようになった。血清中の抗GM-CSF抗体陽性であることから特発性肺胞蛋白症に対するGM-CSF吸入療法治験を希望され、平成17年1月24日治療開始目的で当科入院となった。

入院時現症：138cm、49.25kg、36.7℃、両側下肺野のfine cracklesあり、パチ指なし

(2) 検査データ

血液検査（Table 3）：KL-6は3540U/mlと高値で抗GM-CSF抗体は102.5μg/ml（前医のデータ）と陽性で特発性PAPに合致した。

画像所見：胸部Xp（Fig. 5）；両中～下肺野にスリガラス状陰影を認めた。胸部HRCT（Fig.6）；中葉舌区、左右下葉、右上葉に小葉間隔壁肥厚を伴うGround glass opacity（GGO）とconsolidationびまん性に認める。典型的なcrazy-paving patternを呈する。

肺機能検査：動脈血ガスでは低酸素血症を示し、%DLcoは64.9%であった。

気管支鏡：気管支肺胞洗浄（rt. B<sup>3</sup>a）では150ml注入で75mlの白色混濁液が回収された。静置すると沈殿を生じた。細胞数5.4x10<sup>5</sup>/ml、総細胞数4.05

×10<sup>7</sup>、分画はMφ80%、Lym13%、Neu7%であった。

Table 3 Laboratory data on admission

Hematology		Serology	
WBC	4100 / μl	CRP	0.07 mg/ml
Neu	53%	CEA	2.9 ng/ml
Lym	41%	KL-6	3540 U/ml
Mo	5%	抗GM-CSF抗体	102.5 μg/ml
Eo	1%		
Ba	0%		
RBC	401x10 <sup>4</sup> / μl		
Hb	12.4 g/dl		
Plt	19.8x10 <sup>4</sup> / μl	Blood gas analysis	
ESR	22.6 mm/h	pH	7.425
		PaCO <sub>2</sub>	35.0 torr
		PaO <sub>2</sub>	63 torr
Biochemistry		HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	22.9 mmol/l
AST	26 IU/l	A-aDO <sub>2</sub>	44.8 torr
ALT	15 IU/l		
LDH	244 IU/l	BALF	
ALP	148 IU/l	細胞数	5.4x10 <sup>5</sup> / ml
T-bil	1.1 mg/dl	Mφ	80.0%
CPK	92 IU/l	Neu	7.0%
BUN	19 mg/dl	Lym	13.0%
Cr	0.7 mg/dl	Eo	0%
TP	6.2 g/dl		
Alb	3.8 g/dl		
Na	142 mEq/l		
K	3.9 mEq/l		
Cl	111 mEq/l		

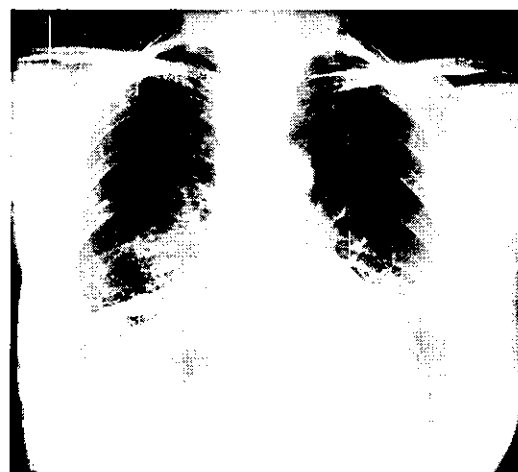


Fig. 5 Chest X-ray on admission

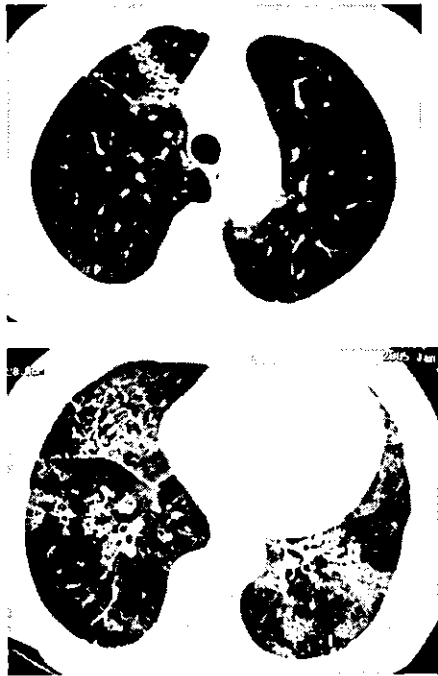


Fig.6 HRCT on admission

### (3) 治療経過

2005年1月31日よりGM-CSF $250\mu\text{g/day}$ の吸入療法を開始した。治療開始し6週間経過した現在、 $\text{PaO}_2$  68.7torr、 $\text{A-aDO}_2$  37.8torrと $\text{A-aDO}_2$ の改善は7torrでまだ有意な改善は得られていないが、悪化したパラメーターはなく、副作用もなく治療継続できている。

### D. 【考察】

我々の経験した2症例はいずれも抗GM-CSF抗体が高値であり典型的なIPAPであると思われた症例1においては粉塵吸入歴があるが、現在も職場の環境はほとんど同じであり、治療後の経過にどう影響してくるか非常に興味深い症例である。症例2は、6週間後の時点では有意な変化を認めていない。悪化傾向はないので、このまま続行し、何らかのパラメーターの有意な改善を期待したいところである。この第2相試験は17年度以降も症例を積み重ねて行く予定であり、治療反応性を決定する因子についての解析

が待たれる。

### E. 【結論】

はじめの1例は著効であった。17年度以降は適応症例の見極めに有用なパラメーターを明確にしていく必要がある。

### G. 【参考文献】

- 1) Dranoff G, et al. Involvement of Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science*. 1994 ; 264 : 713-6
- 2) Reed J, et al. Aerosolized GM-CSF ameliorates pulmonary alveolar proteinosis in GM-CSF deficient mice. *Am J Physiol*. 1999 ; 276 : L556-63
- 3) Kitamura T, et al. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *J Exp Med*. 1999 ; 190 : 875-80
- 4) Seymour JF, et al. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 ; 166 : 215-235
- 5) 中田 光ほか. GM-CSF 吸入による3例の重症特発性肺胞蛋白症の治療. 重症特発性肺胞蛋白症に対するGM-CSF吸入療法の手引き : 厚生労働科学研究費 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」班. 2003

## 北海道大学病院における1例の症例報告

### 特発性肺胞蛋白症に対して行った Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) 吸入療法中の1例について

北海道大学医学部第1内科

檜澤 伸之

【研究要旨】肺胞蛋白症の原因は、抗 GM-CSF 自己抗体により、マクロファージの分化成熟に欠かせない GM-CSF が中和され、マクロファージの分化成熟が阻害されることにより、サーファクタントの分解が阻害され蛋白様物質が蓄積されることによると考えられている。我々は原発性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入療法の臨床試験に参加し、平成 17 年度は 1 例の重症例に対して治療を開始した。現在治療中である。

#### A. 【研究目的】

肺胞蛋白症(pulmonary alveolar proteinosis; PAP)は肺胞腔内に phospholipid と surfactant apoprotein が過剰に貯留するまれな疾患として 1958 年に Rosen らにより本疾患が報告されている<sup>1)</sup>。原因により先天性(congenital PAP)、続発性(secondary PAP)、特発性(Idiopathic PAP:IPAP)に分類される。肺胞蛋白症の原因は長年不明であったが、1994年に Granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)ノックアウトマウスでは肺胞腔内にサーファクタントが貯留し PAP に類似した所見を呈するとの報告がなされ<sup>2)</sup>、PAP と GM-CSF の関連が考えられている。またこのマウスに GM-CSF を吸入させることで PAP が改善することも報告された<sup>3)</sup>。続いて IPAP 患者において、肺、および血清中に GM-CSF の活性を阻害する中和自己抗体が存在することが発見された<sup>4)</sup>。このことから、IPAP において抗 GM-CSF

自己抗体は GM-CSF と結合し、不活化することで肺胞マクロファージの分化障害、機能障害を来し、マクロファージによる肺胞内のサーファクタント分解が阻害されることによって IPAP が発症すると考えられるようになった。これまで PAP に対する治療の基本は、全身麻酔下肺洗浄を含む肺胞洗浄であったが治療による合併症など患者への負担が大きく新たな治療法が求められてきた。そこで、PAP の原因が抗 GM-CSF 中和抗体による GM-CSF 作用欠如であることから、GM-CSF を補充する治療法が試みられるようになった。1996年のオーストラリアの Seymour らに続き、以後、GM-CSF 皮下注療法についての有効性が報告されてきた<sup>5)</sup>。一方、GM-CSF ノックアウトマウスに GM-CSF 吸入を行い改善が得られた報告と、肺が本疾患の主座であることから吸入療法の有用性について検討され、Wylam らの報告により GM-CSF 吸入療法が IPAP 患者の肺機能を改善し効果があることが知られるよう

になった<sup>6)</sup>。このことからわが国では、平成14年度までにIPAPに対するGM-CSF吸入療法のパイロット試験が3症例に施行され、いずれも良好な結果を得ている<sup>7)</sup>。平成16~17年度の予定で、「GM-CSF吸入による重症特発性肺胞蛋白症の治療研究班」が発足した。当科ではGM-CSF吸入療法第II相臨床試験の参加施設として、現在1例治療中であり、その治療経過を報告する。

## B. 【研究方法】

(1) GM-CSF 製剤の準備：GM-CSFはわが国においては未発売である。当院の倫理委員会において実施計画の承認を得、薬剤、および治験について患者本人、家族へ十分説明し、承諾を頂いた。米国 Berlex 社より Schering AG 社の組み換え型ヒト GM-CSF 製剤 sargramostim (商品名 Leukine<sup>®</sup>) を試験責任医師が個人輸入する形をとった。

(2) 吸入方法：Leukine<sup>®</sup> (500\_g)の4分の1量

(125\_g)を生理食塩水2mlにて希釈した後、ジェット式ネブライザー(パリ・ターボボーイ<sup>®</sup>(パリ社))を用いて1日2回吸入する(GM-CSF 250\_g/day)。前半は8日投薬、6日休薬のサイクルで12週間継続し、後半は一日125\_g一回吸入4日投薬、10日休薬で12週間継続する。

(3)評価方法：治療前及び治療開始後経時的に胸部Xp・胸部HRCT撮影、CEA・KL-6・SP-D・LDHなどの血液マーカーの測定、動脈血ガス、肺機能検査、6分間歩行試験等を行い、治療効果を判定した。

## C. 【研究結果】

(1) 症例：25歳、女性

主訴：労作時呼吸困難(H-JI度)

既往歴：20歳 肺炎

生活歴：喫煙なし、飲酒なし

現病歴：22歳時、会社の検診にて胸部異常陰影指摘され、近医を受診。経気管支鏡的肺生検にて肺胞蛋白症との診断を受けた。その後は外来でfollowされていた。24歳時に全肺洗浄施行。他院にて血清抗GM-CSF抗体検査を行い84.5と高値を認め2004年4月30日、GM-CSF吸入療法目的に当科外来紹介初診。GM-CSF吸入療法臨床試験に登録。その後当科外来にて無治療でfollowしていたが12週経過後までに自然軽快は認められず、2005年1月17日に治療目的にて当科入院となった。入院時現症：158cm、56kg、呼吸数14回/分、肺音異常なし、fine crackleなし、ばち指なし。

## (2) 検査データ

血液検査 (Table 1)：一般血液検査では、白血球と赤血球の軽度上昇と、血清検査ではKL-6, CEA, SP-Dの高値を認めた。低酸素血症があり、A-aDO<sub>2</sub>は38.5torrと開大していた。(Table 1)。

Table 1 入院時検査所見

Hematology		Serology	
WBC	9200/μl	CRP	0.24 mg/ml
Neu	66.7 %	CEA	6.9 ng/ml
Lym	26.9 %	SP-D	148 ng/ml
Mo	5.8 %	SP-A	159 ng/ml
Eo	0 %	KL-6	2292 U/ml
Ba	0.6 %		
RBC	529x10 <sup>4</sup> /μl	Arterial blood gas analysis	
Hb	15.9 g/dl	pH	7.442
Plt	39.3x10 <sup>4</sup> /μl	PaCO <sub>2</sub>	36.6 torr
		PaO <sub>2</sub>	67.6 torr
		HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	21.3 mmol/l
		SaO <sub>2</sub>	92.4 %
		A-aDO <sub>2</sub>	38.5 torr
Biochemistry		BALF	
AST	26 IU/l	細胞数	4.29x10 <sup>5</sup> /ml
ALT	10 IU/l	M <sub>-</sub>	63.8 %
LDH	227 IU/l	Neu	6.5 %
ALP	250 IU/l	Lym	29.0 %
_GTP	19 IU/l	Eo	0.7 %
BUN	15 mg/dl		
Cr	0.7 mg/dl		
TP	7.4 g/dl		
Alb	4.5 g/dl		
Na	139 mEq/l		
K	4.1 mEq/l		
Cl	101 mEq/l		

画像所見：胸部 Xp (Fig.1)；両中下肺野優位に

微細粒状影とスリガラス状陰影を認める。胸部 HRCT (Fig.2) ; 両側びまん性に小葉間隔壁の肥厚とスリガラス状陰影を認め、 crazy-paving pattern を伴っていた。



Fig.1 入院時胸部レントゲン

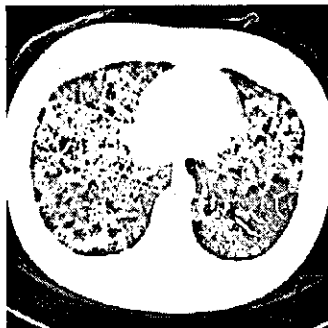


Fig.2 入院時胸部 HRCT

肺機能検査 : %VC は 97.0%であったが、%DLco は 47.6%と低下を認めた。

気管支肺胞洗浄 : rt. B<sup>5</sup> に対し 150ml 注入で 92ml の白色混濁液が回収された。細胞数  $4.29 \times 10^6$ /ml, 分画は M\_63.8%, Lym29.0%, Neu6.5%, Eo0.7% であった(Table 1)。

### (3) 治療経過

2005年1月24日より GM-CSF 吸入療法(250<sub>g</sub>/日)を行った。3月3日に治療6週目の検査を行った。血清のマーカーとしては KL-6 が微増し、肺機能に明らかな改善は認めなかったが、

動脈血液ガスは改善していた。(Table 2)。

胸部レントゲン (Fig.3) では右下肺野の陰影の改善を認めたが、HRCT (Fig.4) では著明な改善はなく、治療開始時とほぼ同様の所見であった。また、治療による副作用の所見もなく経過している。

Table2 治療前と治療6週目の検査結果

	治療前	6週目
PaO <sub>2</sub> (torr)	67.6	68.7
A-aDO <sub>2</sub> (torr)	38.5	32.6
%VC(%)	97	96.1
%DLCO(%)	47.6	50
KL-6(U/ml)	2292	2690
LDH(IU/l)	227	238



Fig.3 治療6週目胸部レントゲン

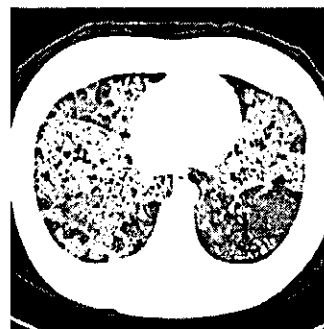


Fig.4 治療6週目 HRCT

#### D. 【考察】

我々は抗 GM-CSF 抗体が高値であり典型的な IPAP であると思われた 1 例を経験した。現在治療を開始し 6 週経過しているが明らかな改善は認めていない。血清マーカーにて若干の悪化があったが、呼吸状態の悪化はなく改善傾向にある。Seymour らの報告でも、6 週以降に治療効果が見られた<sup>5)</sup>との報告があることから、今後治療効果が期待されると考えている。このままプロトコールに従い、治療を継続していく予定である。

#### E. 【結論】

GM-CSF 吸入療法の適応となる重症 IPAP の患者を経験した。現在吸入治療中であり、今後の治療効果が期待される。

#### G. 【参考文献】

- 1) ROSEN SH, et al. Pulmonary alveolar proteinosis. N Engl J Med. 1958;258:1123-42
- 2) Dranoff G, et al. Involvement of Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor in pulmonary homeostasis. Science. 1994 ; 264 : 713-6
- 3) Reed J, et al. Aerosolized GM-CSF ameliorates pulmonary alveolar proteinosis in GM-CSF deficient mice. Am J Physiol. 1999 ; 276 : L556-63
- 4) Kitamura T, et al. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony stimulating factor. J Exp Med. 1999 ; 190 : 875-80
- 5) Seymour JF, et al. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. Am J Respir Crit Care Med. 2002 ; 166 : 215-235
- 6) Wylam ME et al. Aerosolized GM-CSF improves pulmonary function in idiopathic pulmonary proteinosis Am j respir crit care me vol161;A889;2000
- 7) 中田 光ほか. GM-CSF 吸入による 3 例の重症特発性肺胞蛋白症の治療. 重症特発性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入療法の手引き : 厚生労働科学研究費 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」班. 2003

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表(16年度)

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
田澤立之, 貫和敏博	肺胞蛋白症のトランスレーショナル研究と新しい治療	工藤翔二, 中田絃一郎, 貫和敏博編	呼吸器疾患最新の治療	南江堂	東京	2004	26-31
田澤立之	肺胞蛋白症	萩原弘一編	呼吸器研修医ノート	診断と治療社	東京	2004	604-606

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
田澤立之	肺胞蛋白症一顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)製剤吸入による治療例	分子呼吸器病	7	91-92	2005
田澤立之	特発性肺胞蛋白症のGM-CSF吸入治療と今後の展望	THE LUNG perspectives	13	101-107	2004
井上幸治、井上義一、新井徹、柏庸三、山本暁、田中高生、岡田全司、坂谷光則	低含量ベリリウム合金の使用者に認められたサルコイドーシスの一例	日本サルコイドーシス学会誌	22	79	2004
渡辺雅人、濱野栄美、寺川貴裕、内田寛治、中田光、慶長直人	肺胞蛋白症とGM-CSF	炎症と免疫	12(2)	111	2004
渡辺雅人、濱野栄美、寺川貴裕、内田寛治、中田光、慶長直人	特集/稀少疾患をめぐると最近の話題 肺胞蛋白症	呼吸器科	5(2)	459-463	2004
中田光	新たな分子標的治療と臨床問題—肺胞蛋白症	日本内科学会誌	92	1227-30	2004
Arai T, Hamano E, Inoue Y, Ryushi T, Nukiwa T, Sakatani M, Nakata K.	Serum neutralizing capacity of GM-CSF reflects disease severity in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with inhaled GM-CSF.	Respir Med	Dec;98(12)	593-613	2004



Presneill JJ, Nakata K, Inoue Y	Seymour JF. Pulmonary alveolar proteinosis.	Clin Chest Med.	Sep;25(3)	286-8.	2004
Trapnell, B. C., J. A. Whitsett, and K. Nakata.	Pulmonary alveolar proteinosis	N Engl J Med	349	1089	2004

## IV. 研究成果の刊行物・別刷



# Serum neutralizing capacity of GM-CSF reflects disease severity in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with inhaled GM-CSF

Toru Arai<sup>a</sup>, Emi Hamano<sup>b</sup>, Yoshikazu Inoue<sup>a,\*</sup>, Ryushi Tazawa<sup>c</sup>,  
Toshihiro Nukiwa<sup>c</sup>, Mitsunori Sakatani<sup>a</sup>, Koh Nakata<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Medicine, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Sakai, Osaka 591 8555, Japan

<sup>b</sup>International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

<sup>c</sup>Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Miyagi, Japan

Received 14 June 2004

## KEYWORDS

Pulmonary alveolar proteinosis;  
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor;  
Neutralizing capacity;  
Autoantibody;  
Serum marker

**Summary** Existence of anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) neutralizing antibody and treatment with recombinant GM-CSF are new topics in idiopathic pulmonary alveolar proteinosis (PAP). We have hypothesized inhaled GM-CSF is effective and neutralizing capacity of GM-CSF, not concentration of anti-GM-CSF antibody in serum reflect disease severity.

A 57-year-old female smoker with idiopathic PAP was treated with inhaled GM-CSF. The response to the treatment was evaluated by diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO), alveolar-arterial oxygen gradient ([A-a]DO<sub>2</sub>). Conventional serum markers, including KL-6, surfactant apoprotein (SP)-A, SP-D, carcino-embryonic antigen and cytokeratin fragment 19 (CYFRA), and concentration of anti-GM-CSF antibody were examined. The neutralizing capacity of GM-CSF in serum was evaluated using a GM-CSF dependent cell line, TF-1.

Ground glass opacity disappeared at the end of the treatment. Her DLCO, [A-a]DO<sub>2</sub> remarkably improved after treatment. The neutralizing capacity of GM-CSF declined in line with disease remission and it correlated significantly with DLCO ( $P = 0.0137$ ). The concentration of anti-GM-CSF antibody had no significant relation with disease severity and serum markers including neutralizing capacity. Conventional serum markers other than CYFRA showed no significant correlation with DLCO.

\*Corresponding author. Tel.: +81-72-252-3021.

E-mail address: giichi@kch.hosp.go.jp (Y. Inoue).

Inhaled GM-CSF was effective for idiopathic PAP. Serial measurement of neutralizing capacity of GM-CSF was useful to evaluate disease severity and the anti-GM-CSF antibody was proved to be a causative factor for PAP. In the future, inhaled GM-CSF may replace whole lung lavage and response to GM-CSF and its optimal amount may be decided by the capacity.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

The pathogenesis of pulmonary alveolar proteinosis (PAP) is supposed to be through impaired alveolar macrophage function caused by deficiency of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in alveolar spaces, induced by anti-GM-CSF antibody.<sup>1-4</sup> In 1996, Seymour et al.<sup>5</sup> reported that subcutaneous administration of GM-CSF was effective for PAP, and the result was confirmed in two published prospective phase II trials.<sup>6,7</sup> We hypothesize that inhaled GM-CSF in a patient with severe PAP are effective through a result of the experiment using GM-CSF knockout mouse<sup>8</sup> and that neutralizing capacity of GM-CSF in serum is a novel and useful serum marker to reflect disease severity.

## Methods

### Patient and clinical course before GM-CSF inhalation

A 57-year-old female smoker suffered from cough with white sputum and progressive shortness of breath on exertion for 4 months. High-resolution computed tomography (HRCT) of the chest showed crazy paving appearance. Diffusing capacity for carbon monoxide (*DLCO*) was reduced at 34.2% of the predicted value and the arterial oxygen tension (*PaO<sub>2</sub>*) on room air was 43 Torr. She was diagnosed with idiopathic PAP from the findings of bronchoalveolar lavage and transbronchial lung biopsy.<sup>2</sup> Anti-GM-CSF antibody was detected in the serum and bronchoalveolar lavage fluid. One month later, her disease did not improved and she was treated with GM-CSF inhalation.

### GM-CSF inhalation

Bacterially-synthesized recombinant GM-CSF (Leucomax; Schering-Plough, Baulkham Hills, Australia) of 125 mcg was nebulized with a PARI LC PLUS nebulizer set (Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, VA, USA) twice-a-day, 7 days a week, followed by a treatment-free week, repeated for

24 weeks. This method is based on the early study for cancer patients.<sup>9</sup>

### Assay of the neutralizing capacity of GM-CSF and concentration of anti-GM-CSF antibody in the serum

GM-CSF dependent TF-1 cells were cultured with or without recombinant human GM-CSF, in the presence of serum from idiopathic PAP or control serum. Survival of TF-1 cells was evaluated using MTT assay as described previously.<sup>2</sup> The neutralizing capacity was defined as the following equation:

Neutralizing capacity (%) =  $[1 - (A - B) / (C - D)] \times 100$ , where *A*, *B*, *C* and *D* are the absorbance of TF-1 cells grown with serum from PAP and GM-CSF, with serum from PAP and no GM-CSF, with control serum and GM-CSF, and with control serum and no GM-CSF, respectively.

Concentration of anti-GM-CSF antibody in serum and BALF was measured by the enzyme-linked immunosorbent assay previously described.<sup>10</sup>

### Statistical methods

Correlation of variables was assessed using the Spearman rank correlation coefficient. Linear regression lines were calculated using the least-squares method. The *P* value is significant, if it is less than 0.05.

## Results

### Response of GM-CSF inhalation and serial change of neutralizing capacity, anti-GM-CSF antibody level and the other serum markers

After the first 2 weeks of the treatment [A-a]DO<sub>2</sub> and *DLCO* improved (Fig. 1a). Ground glass opacity on HRCT almost completely disappeared at the final inhalation. This therapy was tolerable without apparent toxicity.

The levels of serum cytokeratin fragment 19 (CYFRA), KL-6, carcino-embryonic antigen (CEA), surfactant apoprotein (SP)-A, SP-D and lactate dehydrogenase (LDH), conventional serum markers