

## 平成16年度改訂プロトコール

### 1. 試験実施計画書の概要

#### 1) フェーズ

#### 第Ⅱ相試験

#### 2) 目的

特発性肺胞蛋白症患者を対象に、GM-CSF吸入療法の有効性と安全性を調べる。

#### 3) 対象

安静時 Room Air で動脈血酸素分圧 (Pao<sub>2</sub>) <75 mmHg の特発性肺胞蛋白症患者

#### 4) 治療

##### a) 無治療観察期間

12週間、無治療で観察する。期間直前、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、後述する投与法を24週間行い、治療後効果を判定する。

#### 5) 目標症例数

40例

#### 6) 試験方法

中央登録方式による7施設共同オープン試験

#### 7) 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24週後の肺胞—動脈血酸素分圧較差の改善。

#### 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。

安全性の評価を併せて行う。

#### 9) 試験実施期間

平成17年4月1日～平成19年2月28日

### 2. 試験計画の経緯及び背景

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、進行性の呼吸困難を来す疾患である。好発年齢は30～40代で男女比は約3：1である。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。申請者は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、文献4)、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、患者の約3分の1は、呼吸不全に陥るが、治療は、全身麻酔下の全肺洗浄法や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連日皮下注射法は、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(文献2)。2001年以降、我々は重症患者3例にGM-CSF吸入療法を試み(250 $\mu$ g/日、7日間吸入後7日間休薬を1クール)、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。国内で、本治療を試みたいという医師、患者の要望が高まりつつあるが、GM-CSFは未承認の薬剤であり、一症例の治療に100万～200万円要することから、これまで普及するに至らなかった。しかし、本研究は基礎研究成果が実際に患者の治療に繋がったトランスレーショナルリサーチの典型であり、厚生労働科学研究費により、本治療の有効性が明らかになれば、本疾患の治療に革新をもたらすものであると考える。本研究では、重症特発性肺胞蛋白症に対するGM-CSF吸入療法を30～40例の患者で試み、有効性と安全性を確認する。

### 3. 目的

3.1. 対象： 安静時動脈血酸素分圧が75 mmHg未満の特発性肺胞蛋白症

3.2. 対象に対する標準治療(現在の治療)

- 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、再同意取得、治療開始
- ③ 治療期間1～12週まで250 $\mu$ gを1日2回に分け、8日間吸入+6日間休薬を1クールとし、6クール行う。
- ④ 治療期間9～24週まで125 $\mu$ g1日1回吸入、4日間吸入+10日間休薬を1クールとし、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。

### 3.3. 本試験の意義

重症の特発性肺胞蛋白症は、これまで治療として肺洗浄を繰り返す以外に有効な手だてがなかった。肺洗浄は患者に多大な苦痛を与えるばかりでなく、呼吸不全、心不全や肺感染症を合併した患者には危険な場合もある。また、治療に時間と労力を要する。GM-CSF吸入療法は毎日15分間の吸入を24週間行うだけで、肺洗浄以上の効果が期待できる画期的なものである。また、在宅治療が可能であるため、経済面でも患者への負担が少ない。

GM-CSFは、クローン病、成人呼吸促迫症候群でも有効性が報告されており、本試験治療は、他の肺疾患への臨床応用を将来考える上で、重要な情報を提供するであろう。

#### 4. 試験薬剤の概要

一般名：顆粒球マクロファージコロニー刺激因子

略号：GM-CSF

- ① 製品名：Leukine
- ② 成分：yeast 細胞由来 組み換え型ヒトGM-CSF
- ③ 含有量：1バイアル中GM-CSFとして250, 500  $\mu\text{g}$ を含有する。
- ④ 剤型：注射剤、液剤 (500 $\mu\text{g}$  vial) 凍結乾燥品(250 $\mu\text{g}$  vial)
- ⑤ 性状：透明液 (500 $\mu\text{g}$  vial)、白色粉末(250 $\mu\text{g}$  vial)
- ⑥ 安定性：溶液の場合、2-8 $^{\circ}\text{C}$ 中で20日間安定
- ⑦ 貯法：冷蔵保存
- ⑧ 製造元：Schering AG 社
- ⑨ 販売会社：Berlex 社

注) Immunex 社が開発し、Hoechst 社 (現 Aventis 社) が販売権を得ていたが、適応が狭く市場が限定されるため、1992 年 Hoechst 社は権利を Immunex 社に返還した。米国以外では Immunex 社が原体を供給し、Behringwerke 社が販売を担当していたが、1998 年 Immunex 社は世界各国での本剤関連事業を再取得した。本剤の権利の売却が Amgen 社による Immunex 社買収 (2002 年 7 月) の条件の一部とされ、2002 年 5 月、Immunex 社は Schering AG 社に売却することを発表した。現在 Schering AG 社が販売している。米国では Schering AG 社の米国法人 Berlex 社が販売している。日本での開発状況については、1988 年 8 月からヘキストジャパン (現 アベンティス ファーマ) が臨床試験に入り、抗癌剤投与に伴う白血球減少症の治療薬の他、骨髄移植、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群を適応として開発を行っていたが、Hoechst 社が権利を Immunex 社に返還したことにより、開発は 1995 年に Phase III で中止された。

- ⑩ 適応・用量：Leukine の添付文書(7)によると白血病化学療法後の骨髄抑制、骨髄移植後の骨髄機能回復、自家骨髄移植後の血球回復などを適応として、250  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{day}$  の用量で皮下注射ないし静脈注射で用いられる。
- ⑪ 禁忌：白血病細胞の増加している患者、GM-CSF・酵母由来物質・その他製剤に含まれる物質に対する過敏性のある患者、化学療法・放射線療法との同時使用。
- ⑫ 警告：本剤の使用により浮腫・毛細管漏出症候群・胸水・心嚢液貯留、呼吸困難、上室性不整脈、血清クレアチニン・ビリルビンの上昇が報告されている。

副作用：第 I/II 相試験でみられた頻度の多いものとしては、発熱、無力症、頭痛、骨痛、悪寒、筋肉痛があり、軽度ないし中等度のものが多く、通常アセトアミノフェンなどの鎮痛剤で対処できた。その他に頻度の低いものとして、呼吸困難、浮腫、皮疹が見られた。市販後に報告されたものとして、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ある。

#### ⑬ 肺胞蛋白症への適応

Kavuru らによるアメリカでの臨床試験では、最初の 4 週間 Leukine 250  $\mu\text{g}/\text{body}/\text{day}$  を皮下注射で投与し、改善なければ 2 ヶ月目 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、3 ヶ月目 7-9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  として、12 週間で終了するプロトコールで、患者 7 人中 5 人に改善をみている。Wylam らは 40 歳の女性肺胞蛋白症患者に GM-CSF 製剤をエアゾル化し

て、吸入させる方法で、250  $\mu$ g/body 7日間隔週投与で、肺機能の改善をみたと報告している（文献5）。日本では、2001年に東北大学において医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得て、50歳女性の肺胞蛋白症患者にGM-CSF製剤を吸入で投与し（250  $\mu$ g/body 7日間隔週投与 6ヶ月）、自覚症状、画像所見、動脈血ガス分析の改善をみた。この結果は2001年9月ベルリンで開かれたヨーロッパ呼吸器学会で報告された（文献6）。ついで東北大学と国立療養所近畿中央病院において呼吸不全をともなう特発性肺胞蛋白症症例に同様のプロトコールで吸入療法が試みられ、いずれも呼吸不全が著明に改善した。

GM-CSF製剤は前記のような副作用が知られているが、肺胞蛋白症の患者ではGM-CSFに対する自己抗体の値が高く、副作用はほとんど見られない。また抗体価が高いにもかかわらず、リコンビナントGM-CSFによる治療は有効であるとされ、脱感作的な治療効果も推測されている。

## 5. 症例選択基準（適格基準）

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  $\mu$ 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PO<sub>2</sub><75 mmHgの症例

## 6. 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/mm<sup>3</sup>以上の症例
2. 38℃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. 胸部X線写真、あるいは胸部CT上肺線維化honey combing、あるいは気腫化が疑われる症例。
9. その他担当医師が不相当と判断した症例（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)。

## 7. 被験者の同意

### 1) 説明事項

本試験の開始にあたり、試験担当医師は被験者本人に対し、試験内容等7-2)項に示す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思による同意を取得する。また、被験者の同意に影響を及ぼすような実施計画等の変更が行われるときには、速やかに被験者に情報を提供し、試験等に参加するか否かについて被験者の意思を再度確認するとともに、実施計画書の変更に対して各施設の治験審査委員会の承認を得て同意文書等の改訂を行い、被験者の再同意を得る。

### 2) 説明項目

- ① 臨床試験の目的および方法参加予定者・期間
- ② 治療スケジュール（観察期間を含む）
- ③ GM-CSFの特徴（副作用）
- ④ 予期される効果およびその内容
- ⑤ 重大な影響を与える情報
- ⑥ 他の治療方法の有無およびその内容
- ⑦ 医療側が被験者の安全のため中止する場合
- ⑧ 臨床試験への参加に同意しない場合であっても不利益は受けないこと
- ⑨ 臨床試験への参加に同意した場合でもいつでもこれを撤回できること
- ⑩ その他、人権の保護に関する配慮
- ⑪ 薬剤及び検査に関わる費用について
- ⑫ 予期せぬ副作用に対する処置、健康被害が発生した場合の治療および補償について
- ⑬ 臨床試験担当医師の氏名および連絡先

## 8. 試験方法

### 1) 試験のデザイン

- ① 班会議は各施設の試験責任医師と連絡を取り重症特発性肺胞蛋白症に対するGM-CSF吸入療法  
の臨床試験を企画し、統一プロトコールを作成する。
- ② 各試験責任医師は、統一プロトコールにもとづいて、各施設の治験審査委員会及び倫理委員会に本  
試験を申請。承認を得る。
- ③ 各施設の試験責任医師は、被験者の研究への参加に対する同意を文書で得る。カルテにも貼付。
- ④ 各施設の試験責任医師は、被験者の登録連絡票を登録管理センターに送る。カルテにも貼付。
- ⑤ 治験管理センターは、登録の適否を確認し、登録確認表を各試験責任医師に FAX にて送付。登録患  
者のリストを作成する。
- ⑥ 各施設の試験責任医師は登録された被験者と相談し、無治療経過観察期間の開始時期を決定する。  
治験管理センターに開始時期を FAX で通知する。
- ⑦ 各施設の試験責任医師は、外来にて無治療観察を開始する。開始直前、12週に外来受診してもら  
い、後述する安静時動脈血液ガス等の検査を行う。各責任医師は、登録管理センターへ FAX で検査結果  
を送付する。カルテにも貼付。
- ⑧ 登録管理センターは、送付されたデータから、治療開始の適否を再確認し、各試験責任医師に FAX

にて連絡。

⑨ 各施設の試験責任医師は、被験者と相談し、治療の再同意を文書にて取得（カルテにも添付）、また、入院時期を決定。登録管理センターに開始時期を FAX で通知する。カルテにも貼付。登録管理センターは近畿中央病院井上部長に連絡し、必要量の GM-C S F を各施設に送付してもらう。

⑩ 被験者の入院。各施設の試験責任医師は、後述する治療前検査を行う。投与開始。投与開始確認表に記入し、開始を登録管理センターに FAX で報告する。治療効果判定表に記入し、登録管理センターに FAX にて送信。カルテにも貼付。入院は原則として 1 週間。その後、各被験者は在宅で自己吸入療法を連日実施。

⑪ 各施設の試験責任医師は、被験者に治療開始後 2 週後、4、8、12、16、20、24 週後に来院してもらい、効果を調べ、副作用の発現について観察する。副作用発現調査表に記入し、登録管理センターへ FAX にて送信。カルテにも貼付。必要あれば、随時登録管理センターと相互に連絡をとり、後述する副作用の発現にともなう中止基準にもとづき、治療継続の可否について相談し、決定する。

⑫ 有効群、無効群ともに有害事象の発現を観察しつつ、治療開始後 24 週まで在宅吸入療法を実施。

⑬ 24 週後に各施設の試験責任医師は、後述する治療終了時検査を行う。治療効果判定票、副作用発現調査票に記入し、登録管理センターに FAX にて送信。カルテにも貼付。

⑭ 登録管理センターは送付されたデータにもとづき、① 有害事象のまとめ ② 治療効果の判定を行う。

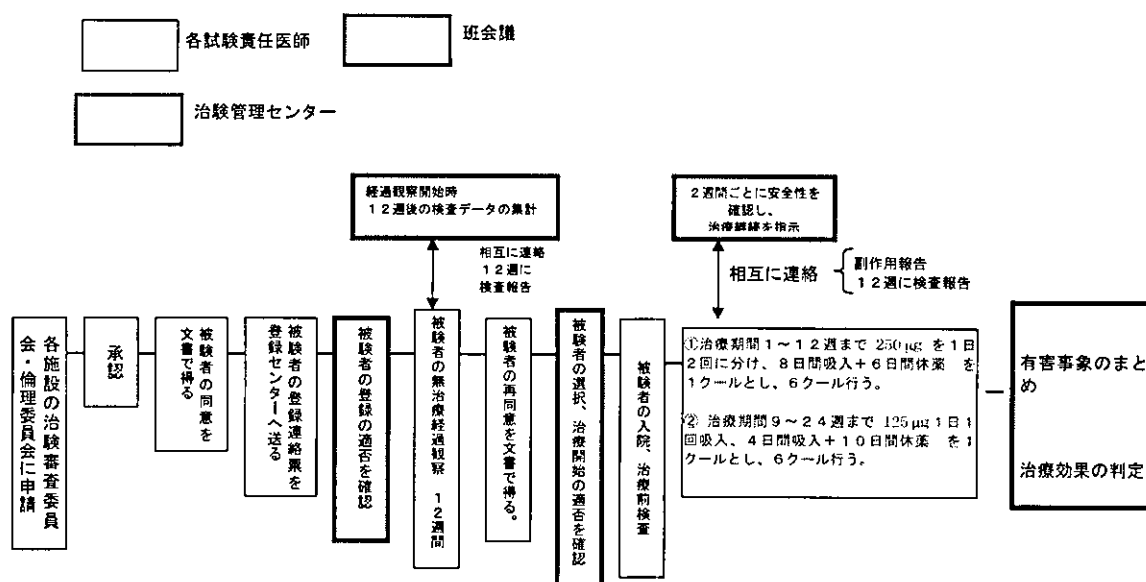


図 1 : 試験方法のフローチャート

## 2) 注釈

### ① 投与方法

毎朝、GM-CSFバイアルに1mlの注射用蒸留水を添加し、よく攪拌し、GM-CSFを溶かす。ここから各投与レベル分の液量をつベルクリン注射器で吸う、残りは冷蔵保存。生理食塩水2mlで希釈して、Pari Boy LC ネブライザーで毎日一定の時刻に吸入。投与開始から3-4日間は、医師あるいは看護師の立ち会いの下で吸入投与する。喘息発作など、有害事象が発生した場合は、医師は可能な限りの処置を行い、場合によっては投与を中止する。

### ② 吸入にPari社のジェットネブライザーを用いる根拠

超音波ネブライザーでは、蛋白製剤が分解されるという報告があり、一般的にタンパク質を含んだ薬液の吸入ではジェットネブライザーが用いられる。Pari社の資料によると吸入量10リッター/分で生理食塩水を吸入する場合、肺末梢に到達すると思われる5 $\mu$ m以下の径の粒子は65%に達し、他社のジェットネブライザーよりも優れていると考えられた。

### ③ 投与中の患者の観察

投与期間中、試験責任医師は別項に記載した検査を実施し、必要事項を記録する。投与開始後、12週間後、24週間後にFAXで登録管理センターへ送付する。また、副作用の発現についても記録し、同様に送付する。また、投与を中止しなければならないような有害事象が生じた場合は、各試験責任医師は登録管理センターに直ちに電話し、後に投与実施連絡カードに記入し、FAXで報告する(カルテにも貼付)。

④ 各試験責任医師は被験者の治療後最低1年間は治療経過を観察し、治療効果の持続期間を決定する。

### ⑤ 治療効果の判定

上記フェーズII試験における有効性を別項に設けた効果判定基準により判定し、治療期間と経過観察期間の有意差を対応のあるノンパラメトリック検定する。詳細は後述。

### ⑥ 無治療経過観察期間の被験者の取り扱い

経過観察群の被験者で試験中に呼吸不全が進行し、治療を急がなければならない場合、各試験責任医師と登録管理センターが検討の上、経過観察を中止し、GM-CSF吸入療法あるいは肺洗浄療法を行えることとする。

## 3) 投与中止基準

以下の事態が発生した場合は当該症例における投与を中止する。

- ① 重篤な副作用が発現した場合
- ② 病勢の著しい進行が認められた場合—この場合の中止は各試験責任医師と登録管理センターが相談の上、決定する。
- ③ 新たな疾患の併発または合併症の増悪により試験の継続が困難と判断された場合。
- ④ 患者が投与中止を希望した場合。
- ⑤ 他の治療、特に全肺洗浄、反復区域洗浄が行われた場合。

## 4) 併用療法

### ① 併用禁止療法及び薬剤

試験薬の評価に影響を与えられられる効果判定のための肺洗浄以外の治療法、フラッター療法、去痰剤(ムコソルバン、ムコダイン等)、鎮咳去痰剤、ステロイドホルモンの投与は試験期間中禁止する。

② 発熱時

軽度の発熱時に解熱剤の使用は行ってもよいこととする。

③ 咳そう

咳そうに対する鎮咳剤の使用はよいこととする。

④ 呼吸困難

呼吸困難に対する酸素吸入は行ってもよいこととする。

⑤ 喘息

軽度の喘息発作については、適宜、気管支拡張剤の使用はよいこととする。しかし、吸入ステロイドや静注ステロイドを要するときには、治験自体を中止することとする。

5) 後治療

① 本臨床試験終了後、有効例については、それぞれの持続期間が確定するまでは特発性肺胞蛋白症に対する治療は行わないこととする。観察は本研究班の終了をもって終わりとする。

② GM-CSF吸入療法を受け十分な効果が認められなかった被験者で、自然軽快が認められなかった症例については、被験者の同意を得て、試験終了後、適切な方法で治療できるものとする。これらの症例の効果判定は上記と同様とする。

6) 予期される副作用およびその対処

初回投与時には入院の上十分な観察のもとに投与すること。肺胞蛋白症以外の患者で注射により重篤な過敏反応（アナフィラキシー、血管浮腫、気管支攣縮）が生じたことがある。

① 血液毒性

白血球増加に関しては、15000/mm<sup>3</sup> までは処置をせず、それ以上になったときには投与を一時中止する。好酸球増加については、白血球分画で30%までは処置をせず、それ以上になったときに一時中止する。血小板減少は5万以下となったときに投与を中止する。

② 気道刺激症状

咳そうについては軽度なものは、鎮咳剤で対処。喘息発作で、気管支拡張剤で対処できないときには、投与を一時中止とする。

③ 発熱

38℃を越えないときには、解熱剤で対処。38℃以上の熱がGM-CSFの吸入によるものである可能性が高い場合は、投与を一時中止とする。

④ 悪心、呼吸困難、下痢、発疹、悪寒、嘔吐、倦怠感、食欲不振、筋肉痛、胸痛発赤など患者が耐え難い症状を訴えたときには投与を一旦中止する。

⑤ 中等～重症の肝機能異常、腎機能異常、電解質異常、胸膜炎、心膜炎が出現したときには投与を中止する。

⑥ ショック

直ちに投与を中止し、補液、輸血、酸素投与等最大限の支持療法を行う。

7) 重篤な副作用発現時の報告

下記に示す重篤と思われる副作用については、本試験のGM-CSF吸入との因果関係の有無に関わらず、直ちに主任研究者に口頭、電話、またはFAXにて連絡する。

① 死亡

② 死亡につながるおそれのあるもの

③ 障害



- ④ 障害につながるおそれのあるもの
- ⑤ その他、①～④に準じて重篤であるもの

## 9. 登録方法

- ① 症例の選択基準を満たし、除外基準に該当しない症例がある場合、各責任医師は被験者の同意を得た後、登録管理センターに症例登録する。すなわち、登録連絡票に必要事項を記入の上、登録管理センターへFAXにて送信する。カルテにも貼付。
- ③ 登録管理センターは登録症例の適格、不適格を審査し決定する。

## 10. GM-CSF製剤の輸入・送付

GM-CSF製剤の輸入、保管は薬事法にのっとり、各試験責任医師が個別に行う。治療開始までに必要量を米国 Berlex 社より輸入し、各施設にて冷蔵保存する。吸入ジェットネブライザーも同様に各試験責任医師が購入し、各施設で保管する。

### 11. 患者の入院

各試験責任医師は、適応被験者に1週間程度入院をお願いし、治療前検査、自己吸入療法の訓練、副作用の監視を行う。試験開始前入院日数については、各施設に一任する。治療終了時の検査については各試験責任医師と被験者の話し合いで入院あるいは外来で検査を行う。その他の期間については在宅治療とする。

### 12. 観察・検査・評価項目、方法および時期

#### 1) 背景因子

- ① 被験者背景：匿名化被験者番号、性別、生年月日、カルテ No.、身長、体重
- ② 被験者の同意：同意書、同意方法、同意日、再同意取得日（無治療経過観察期間後）。
- ③ 特発性肺胞蛋白症の診断：気管支肺胞洗浄液所見、病理診断（VATS, TBLB 等）、血清抗GM-CSF自己抗体価
- ④ 既往歴：本試験開始時までに罹患した疾患の有無、疾患名
- ⑤ 薬剤アレルギー：アレルギーの有無、薬剤名
- ⑥ 合併症：本試験開始時に罹患中の疾患の有無、疾患名

#### 2) 試験薬の投与状況

投与状況について各試験責任医師は被験者に記録を依頼し、使用後のGM-CSFのバイアル瓶とともに提出してもらう。被験者にバイアルを使い終わった日付を瓶にマジックで記入してもらう。

#### 3) 治療効果判定のための検査計画

##### A. 必須調査項目

##### ① 自覚症状

呼吸困難呼吸困難度分類すなわち H-J 分類を使用して評価する。治療開始前、その後2週間ごと。咳そう、喀痰、発熱、その他の症状について程度と頻度を記録する（日誌を作って患者に渡す。試験終了時回収する）。

##### ② 血液ガス所見 (PaO<sub>2</sub>, Paco<sub>2</sub>, A-aDO<sub>2</sub>)

仰臥位 room air 下で5分間安静後、動脈より採取。

無治療経過観察直前、12週後、治療直前、4週間後、8週間後、12週後、16週後、20週間後、24週間後

### ③ 肺機能検査 (VC, FEV, %DLco 等)

患者が検査に耐えられなければそのこと自体が重要なポイントなので記載する。治療直前、12週後、24週後

④ 胸部X線検査：無治療経過観察直前、12週後、治療前および開始後4週間ごと24週まで

⑤ 胸部CT検査 (HRCT)：治療直前、24週後。中央管理 (コピー送付。オリジナルのばあいは明記していただきコピーして直ちに返送。近畿中央にてビジュアルスコアリング法にてスコア化。)

### ⑥ 血液検査

血算、白血球分画：無治療経過観察直前、12週後、治療直前および開始後4週間ごと24週まで

血清検査：無治療経過観察直前、6週後、12週後、治療直前および開始後2週間ごとに総蛋白、アルブミン、肝機能、腎機能、電解質を測定する。また各血清4mlを凍結保存。これらは、井上へ送付し、以下の項目を一括測定 (検査料は本研究費より拠出)

LDH, KL-6, CEA, SP-A, SP-D, 抗GM-CSF自己抗体価等

## B. 補足的調査項目

以下の検査はオプションとする。

### ① 6分間歩行試験

患者に平地を6分間歩行してもらい、その前後の動脈血酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>)、歩行距離を測定する。治療直前、24週後

### ② 自記式HR-QOL質問票 (SF-36) 治療直前、4、8、12、16、20、24週後

### ③ 気管支肺胞洗浄

治療直前、治療終了直後に同一区域気管支あるいは亜区域気管支に気管支肺胞洗浄を50ml x 3回行い、1+2+3本目のうち50mlをすみやかに主任研究者 中田に冷蔵送付する。同時にヘパリン血20mlを常温で中田へ送付する。

新潟大学医歯学総合病院において抗GM-CSF自己抗体量、細胞数細胞分画等のデータをとる。

### ④ 治療終了後経過観察

必須調査項目①～⑥の検査を3ヶ月毎に行い、増悪、再発、再燃の有無を調べる。

## 13. エンドポイント及びその定義

### 1) プライマリーエンドポイント

治療開始時と終了時の肺動脈血酸素分圧較差 (A-aDo<sub>2</sub>) が20mmHg以上の改善を著効、10mmHg以上20mmHg未満の改善を有効と定義し、治療群、経過観察群の適格症例のうち、評価可能例数を分母とし、著効+有効例数を分子とする奏効率を算出する。また、無治療観察期間の前後のA-aDo<sub>2</sub>の差と治療開始時と終了時のA-aDo<sub>2</sub>の差を対応のあるノンパラメトリック検定にて統計解析し、有意差検定する。

### 2) セカンダリーエンドポイント

① 上記で定義した有効および著効症例のうち、治療開始時の肺動脈血酸素分圧較差 (A-aDo<sub>2</sub>) +10mmHg以上を維持した期間を奏効期間と定義する。

② 治療前後のHRCT画像を以下の判定基準により比較する。

HRCTのコピー (左右上中下の計6肺野の「スリガラス様陰影 (crazy paving

像含む)の占める面積の割合をを半定量し以下の基準でグレードに分ける。各肺のグレードの平均を計算し用いる。

画像の判定法は以下の基準による。

Grade 0; none

Grade 1 (+); less than 5%

Grade 2 (++); 5-24%

Grade 3 (+++); 25-49%

Grade 4 (++++); 50-74%

Grade 5 (+++++); 75% or more

③ 治療前後の以下の呼吸機能項目

%VC、%DLco

④ 治療前後の以下の血清マーカー

CEA, KL-6, SP-A, SP-D, LDH

#### 1.4. 症例の取り扱い、評価方法およびその基準

##### 1) 症例取り扱い

① 登録例

班会議において選択基準等を確認し、登録した症例

② 適格例

対象症例選択基準を満たしている症例

③ 不適格例

試験開始前にすでに対象選択基準を満たしていない症例

④ 評価可能例

適格例のうち、以下の症例は評価可能例とする。

規定の治療が実施されたと判断され、安全性および有効性が判定できる症例。副作用のため、規定に従い投与間隔が延長した症例は評価可能例とする。

この規定については班会議で協議決定する。

⑤ 評価不能例

適格例のうち、治療中止、逸脱、違反、不遵守、追跡不能、事後不適格等の患者は評価不能例とする。

##### 2) 有効性の評価

1) 班会議を招集して効果判定を行う。

2) 全適格症例の治療終了後に奏効率算出、有意差検定を行う。

3) 研究班終了直前に奏効維持期間を算出する。

##### 3) 安全性の評価

① 本試験開始後、試験中に認められた一般所見の異常、自他覚症状、臨床検査値の異常変動を記録する。

② 安全性の検討は適格例のうち評価可能例、評価不能例の一部(理由、内容によって検討可能な症例)について行う。

③ 安全性の集計には、因果関係「なし」以外のものを採用する。

#### 1.5. 試験計画書からの逸脱の報告

試験責任医師はGCPに準じ、以下の事項を守る。

1. 研究代表者の事前の合意および班会議の事前の審査に基づく承認を得る前に試験計画書から逸脱あるいは変更を行ってはならない。
2. やむを得ず、緊急避難的に逸脱あるいは変更を承認前に行った場合は、その理由を研究代表者および班会議に提出し、承認を得るものとする。また、試験計画書の改訂が必要であれば、その案をすみやかに研究代表者および班会議に提出する。
3. 試験実施計画書から逸脱があった場合は、逸脱事項をその理由とともに全て記録し、所定の様式によりすみやかに研究代表者に提出しなければならない。また、この写しを保存しなければならない。

## 16. 試験実施期間

平成17年4月1日から平成19年2月28日（登録締め切り平成18年9月30日）

注1：1症例目の同意取得から最終症例の最終観察日までを含む期間

## 17. 目標症例数および設定根拠

目標症例数 40例

設定根拠 本研究予算で購入できるGM-CSF量から算定した。

## 18. 被験者の人権および安全性・不利益に対する配慮

### 1. 人権への配慮

試験実施に係わる生データ類および同意書を取り扱う際は、被験者の秘密保護に十分配慮する。病院外に提出する症例報告等では、イニシャル及び被験者識別コード等を用いて行う。試験の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含めないようにすること、試験の目的以外に、試験で得られたデータを使用しないこととする。被験者の検体は、各試験責任医師が採血時に匿名化し、国際医療センター及び近畿中央病院に送付、極低温冷凍庫あるいは液体窒素ボンベ内に保管する。保管場所は施錠可能な部屋にする。本試験期間終了後5年間保存し、その後廃棄する。

### 2. 安全性・不利益への配慮

被験者の有害事象の発生時は、すみやかに適切な診察と処置を行う。被験者の健康被害に対する補償は、別項参照。

## 19. 患者の費用負担

基本的にGM-CSF製剤および吸入用ネブライザー購入・輸入は研究費負担とする。後述する特殊検査料以外は通常の保険診療とし、入院費用を含めて被験者に保険の範囲内での負担をお願いする。治験に参加することで、被験者の費用負担が増えないように、検査の回数、項目は必要最小限に抑えるなど最大限の配慮をする。検査の中で特殊検査（SP-A, SP-D, CEA, 抗GM-CSF自己抗体、気管支肺胞洗浄液リンパ球解析）等の測定費用は研究費負担とする。その他の検査については通常の診療の範囲内にとどめる。

## 20. 健康被害の補償および保険への加入

健康被害にともなう賠償責任に備え、

本治験の医療行為による健康被害については試験責任医師が通常の医師賠償責任保険に各自加入する。

## 21. GCP及びヘルシンキ宣言への対応

本試験は可能な限りGCPを準拠するものとする。また、ヘルシンキ宣言（2000年改訂）を遵守し

て実施する。

## 22. モニタリング・記録の保存

試験責任医師は、試験等の実施に係わる必須文書（申請書類の控え、病院長からの通知文書、各種申請書・報告書の控え、同意書、症例報告書等の控え、その他データの信頼性を保証するのに必要な書類または記録など）を試験終了後5年間保存し、その後廃棄する。

## 23. 研究成果の発表

本研究の研究成績は、国外英文雑誌に投稿することを目標とする。論文、学会発表は原則として症例数に応じて行うが、各施設の症例についての報告は、本研究班の承諾を得て行うことができる。

## 24. 組織

### 主任研究者

新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

センター長・教授 中田 光

〒951-8520 新潟市旭町通1番町754番地

電話・FAX：025-227-0847

e-mail: [knak@med.niigata-u.ac.jp](mailto:knak@med.niigata-u.ac.jp)

### (登録管理センター)

新潟大学医歯学総合病院

生命科学医療センター

ちけんセンター

担当：増田寛樹

〒951-8520

新潟市旭町通り1番町754番地

TEL：025-227-0730 FAX：025-227-0729

[mhiroki@med.niigata-u.ac.jp](mailto:mhiroki@med.niigata-u.ac.jp)

### 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/

東北大学医学部附属遺伝子・呼吸器内科

貫和 敏博

国立国際医療センター

呼吸器科 副院長

工藤宏一郎

国立国際医療センター研究所

呼吸器疾患研究部

慶長直人

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

井上義一

### 研究協力者

北海道大学医学部

第一内科

檜澤伸之

東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野

東北大学医学部附属遺伝子・呼吸器内科

田澤立之

愛知医科大学呼吸器アレルギー内科

山口悦郎

国立療養所山陽病院

呼吸器内科

江田良輔

長崎大学熱帯病研究所

内科

大石和徳

## 参加施設及び試験責任医師

北海道大学医学部	第一内科	山口悦郎、 西村正治
東北大学加齢医学研究所	呼吸器腫瘍研究分野	田澤立之、 貫和敏博
国立国際医療センター	呼吸器科	工藤宏一郎、 中田 光、 放生雅章
国立療養所近畿中央病院	臨床研究センター内科	井上義一 新井徹
国立療養所山陽病院	呼吸器内科	江田良輔
長崎大学熱帯病研究所	内科	大石和徳

## 25. 研究資金及び利益の衝突

本試験は平成14年度より16年度までの3年間、厚生労働省基礎研究成果の臨床応用推進事業の研究助成を得て実施する。本試験の計画・実施・報告において、試験の結果および結果の解釈に影響を及ぼすような「起こり得る利益の衝突」は存在しないこと、および試験の実施が被験者の権利・利益を損ねることがないことを確認する。

## 26. 実施計画書等の変更

実施計画書や同意説明文書の変更を行う場合は予め各医療機関の治験審査委員会あるいは倫理委員会の承認を必要とする。また、各医療機関で試験実施計画書の変更を求められた場合は、試験責任医師は、研究代表者と合意の上、当該機関での試験実施計画書を変更することができる。

## 27. 文献

- ① schoch OD, Schanz U, Koller M, Nakata K, Seymour JF, Russi EW, Boehler A. Bronchoalveolar lavage findings in pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with GM-CSF, *Thorax*, 2002. 57, 277-280
- ② Seymour JF, Presneill JJ, Schoch OD, Downie GH, Moore PE, Doyle IR, Vincent JM, Nakata K, Kitamura T, Langton D, Pain MC, Dunn AR : Therapeutic efficacy of Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients with Idiopathic Acquired Alveolar Proteinosis, *Am J Respir Crit Care Med* 2001 163, 524-531
- ③ Kitamura T, Uchida K, Tanaka N, Watanabe J, Kanegasaki S, Yamada Y, and Nakata K Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162, 658-662
- ④ Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, Uchida K, Kanegasaki S, Yamada Y, and Nakata K Idiopathic Pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J Exp Med* 1999. 190(6), 875-880
- ⑤ Tanaka N, Watanabe J, Kitamura T, Yamada Y, Kanegasaki S, and Nakata K Lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis express a factor which neutralizes granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *FEBS Lett* 1999. 442 (2-3):246-252

⑥ Osamu Ishimoto 石本 大。 Efficacy of aerosolized granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in a Japanese female patient with pulmonary alveolar proteinosis (PAP). 11th Annual ERS Congress Berlin 2001 September 22 - 26, 2001 Berlin, Germany)

# V. 分担研究報告



研究報告書

GM-CSF と特発性肺胞蛋白症患者の肺内の免疫学的微小環境

東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野 貫和敏博 田澤立之  
国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 濱野栄美  
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 井上義一 新井 徹  
新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 中田 光

研究要旨： 抗 GM-CSF 抗体は GM-CSF を中和し、肺胞マクロファージの分化を障害して、特発性肺胞蛋白症を引き起こすと考えられている。GM-CSF の投与は、本研究でも確認されたように、特発性肺胞蛋白症患者の呼吸機能を改善する。この機序を明らかにするため、GM-CSF 吸入治療により改善した特発性肺胞蛋白症患者 3 名から得られた、気管支肺胞洗浄液 (BALF) と肺胞マクロファージを解析した。細胞数、細胞表面のマンノース受容体の発現、転写因子 PU.1 の発現、肺胞マクロファージの貪食能はすべて正常化した。治療により、BALF 中の GM-CSF 活性中和能は著明に低下し、抗 GM-CSF 抗体価も減少した。興味深いことに、GM-CSF-抗体複合体量も減少した。複合体を解析し得た 1 例では、複合体に結合した GM-CSF のほとんどが内在性の GM-CSF で、GM-CSF-抗体複合体は治療後に速やかに除去されることが示唆された。本研究は、GM-CSF 投与が、肺内の GM-CSF に対する中和能の減少を起こし、これにより、GM-CSF 投与は肺胞マクロファージの機能の回復をもたらすことを示すものである。

A. 研究目的

[研究背景] 肺胞蛋白症は気道終末と肺胞を満たすサーファクタント物質の蓄積により、ガス交換を障害し、呼吸不全を起こすまれな肺疾患である。臨床所見および病因の面から、先天性、二次性、特発性の 3 つの型に分けられるが、90%以上の例が特発性である。特発性肺胞蛋白症では、呼吸器症状は、慢性・進行性に生じ、急性発症することはない。特発性肺胞蛋白症患者の肺胞マクロファージは、走化性の低下、ガラス接着性の減少、貪食能の障害を示す。肺胞マクロファージのサーファクタント除去能の障害が、特発性肺胞蛋白症の原因と考えられる。造血細胞の成長因子である GM-CSF、あるいはその受容体のノックアウトマウスで、肺胞蛋白症類似の組織学的変化が、偶然に観察されたことが、GM-CSF の信号伝達の異常と特発性肺胞蛋白症の病因との関係を示唆するきっかけとなった。マウスでは GM-CSF は肺胞マクロファージの分化の終末を制御する。肺胞マクロファージの分化はサーファクタント脂質および蛋白の正常代謝に不可欠である。GM-CSF あるいはその受容体の遺伝子異常が先天性肺胞蛋白症の少数の患者で報告されたが、特発性肺胞蛋白症患者では見出されなかった。そのかわり、

これまで調べられたすべての特発性肺胞蛋白症患者で GM-CSF に対する中和自己抗体が高値であり、先天性・二次性肺胞蛋白症患者、ならびに正常者では、この抗体は検出されなかった。以上の結果から、自己抗体による GM-CSF 活性の消失が肺胞マクロファージの正常機能を障害し、これによりサーファクタント物質の除去が減じると考えられる。

ヒトリコンビナント GM-CSF 製剤は、骨髄移植後や好中球減少症の患者で骨髄の回復を刺激するために使用される。これまで、肺胞蛋白症患者に GM-CSF を皮下注射で投与した報告が散見されるが、効果は様々である。また GM-CSF 吸入治療により改善した 1 例報告がある。近年、肺胞蛋白症患者で、外在性の GM-CSF 投与が、肺胞マクロファージでの転写因子 PU.1 の発現を回復させ、これにより肺胞マクロファージの分化が改善した、との報告がある。すでに自己抗体が存在すること、しかもこの自己抗体は高い特異性と吸着性をもって GM-CSF に結合することを考慮すると、投与された GM-CSF が直接、未分化の肺胞マクロファージの GM-CSF 受容体に結合してその分化を促す可能性は低いと考えられる。

[研究目的] 投与された GM-CSF の作用機序

を調べるため、GM-CSF で治療された患者 3 名の BALF 中の自己抗体の量および GM-CSF 活性中和能の変化とあわせて、肺胞マクロファージの機能の変化を解析した。えられた結果は、吸入された GM-CSF は BALF の GM-CSF 活性中和能を低下させ、これに伴って BALF 中の自己抗体および免疫複合体の濃度も減少することを示唆するものだった。結果として、吸入された外在性 GM-CSF が肺胞内の微小環境に影響して、肺胞マクロファージの機能と蛋白様物質の除去を回復させた可能性が考えられた。

## B. 研究方法

[患者と GM-CSF 投与] 施設内倫理委員会の承認のもとで、各々の臨床試験参加者から書面での説明と同意を得て、本研究を行った。一連の 3 名の特発性肺胞蛋白症患者（男性 1 名、女性 2 名、51-57 歳）GM-CSF 吸入で治療した（表 1）。BALF 所見と経気管支肺生検 (TBLB) な りに血清中の抗 GM-CSF 抗体により特発性肺胞蛋白症の診断を確認した。患者は 2ml の生理食塩水に溶解した 125  $\mu$ g のリコンビナント GM-CSF 製剤 (Leukomax, Novartis 社) を 1 日 2 回 7 日間隔週で 24 週間、ネブライザー (Pari 社 LC プラス) で吸入した。この方法は、Anderson らの方法に拠った。彼らは、転移性肺癌患者 7 名に GM-CSF 製剤を吸入投与し、毒性の低いことを確認した。治療効果の定義として AaDO<sub>2</sub> 10torr 以上の低下を有効とした。

[BALF の処理] 気管支鏡下で、右中葉に、1 回 50ml の生理食塩水を 3 回注入し吸引回収し、ただちに処理した。細胞は Giemsa 変法で染色し、サイトスピン標本で 400 個の細胞の細胞分画を測定し、200 個肺胞マクロファージの長径を測定し、Iyonaga らの方法で、非泡沫-単球様細胞と、泡沫細胞の 2 種類に分類した。

[肺胞マクロファージの電子顕微鏡での観察] BALF をプラスチック培養皿中で、37°C で 1 時間培養し、非接着細胞を除去した後、接着細胞 (肺胞マクロファージを固定しエボン包埋で切り出し透過型電子顕微鏡下に観察した。

[肺胞マクロファージの貪食能]

上述のごとく分離された肺胞マクロファージを RPMI/10%FCS 培地で懸濁し、4-well chamber slide に蒔き、37°C 2 時間静置後、0.5% の PE 標識ラテックスビーズとともに 30 分間培養し、洗浄し、4% パラフォルムアルデヒドで 4°C 15 分固定し、3000 倍希釈のサイバグリーンで染色した。貪食したビーズを含む肺胞マクロファージを共焦点レーザー顕微鏡で算定した。

[免疫組織染色]

4% パラフォルムアルデヒドで固定した肺胞マクロファージを抗マンノース受容体抗体および HRP ラベル抗マウス IgG 抗体で染色し、マンノース受容体 (マクロファージの分化のマーカー) 発現を調べた。ウサギ抗 PU.1 抗体とアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体、および HRP 標識抗 CD68 モノクローナル抗体を用いた二重染色で PU.1 の発現を調べた。さらに PU.1 の局在を観察するため、肺胞マクロファージをウサギ抗 PU.1 抗体と PE 標識抗ウサギ抗体、および 3000 倍希釈のサイバグリーンで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

[抗 GM-CSF 抗体の定量]

精製自己抗体を用いて、BALF と血清中の自己抗体濃度を測定した (Thorax 57:277)。

[BALF 中の GM-CSF に対する中和能]

GM-CSF 依存性の細胞株 TF-1 を用いて、GM-CSF の生物活性を定量した (Blood 103:1089)。

[GM-CSF-自己抗体免疫複合体中の GM-CSF の検出]

特発性肺胞蛋白症患者と正常者の BALF からプロテイン A セファロースを用いて得られた蛋白検体を ELISA とウェスタンブロット法を用いて、既出のごとく測定した (Blood 103:1089)。

## C. 研究結果

[GM-CSF 治療中の肺胞マクロファージの細胞数、形態、機能の変化]

24 週間の GM-CSF 吸入治療は、副作用なしに動脈血酸素化を改善した。3 名の患者とも、治療後 AaDO<sub>2</sub> の 10mmHg 以上の低下を示した。血清中の SP-D, LDH, CEA も改善した。表 1 に BALF 中の細胞の解析結果をまとめた。

肺胞マクロファージは 24 週の GM-CSF 吸入後増加し ( $p < 0.05$ )、細胞外の蛋白様物質と破壊細胞片は著明に減少した (図 1, 2A)。泡沫マクロファージは治療後減少した (図 2B)。非泡沫肺胞マクロファージは、治療前には正常対照より小型であったが ( $p < 0.01$ )、GM-CSF 治療後、正常の大きさになった (図 2C)。肺胞マクロファージは治療前に比し、治療後微絨毛や明らかな細胞内小器官等成熟したマクロファージの持つ超微細構造を示した (図 1D)。

次に治療前後での、肺胞マクロファージの貪食能と 2 つの分子の発現を調べた。貪食能は、ビーズを含む細胞数を調べた結果、治療後、増加した (図 3)。マクロファージが微生物を取

表1. 患者プロフィール

	症例 1	症例 2	症例 3
年齢/性	51歳 女性	56歳 男性	57歳 女性
喫煙歴	なし	あり	現在喫煙**
診断方法	BALF, TBLB, Ab	BALF, TBLB, Ab	BALF, TBLB, Ab
前治療	左全肺洗浄	酸素投与 免疫抑制剤*	酸素投与
GM-CSF 治療後 A-aDO2 減少 (torr)	17	20	27

BALF; 気管支肺胞洗浄, TBLB; 経気管支肺生検, Ab; 血清抗-GM-CSF抗体

\*症例 2 は特発性肺胞蛋白症の発症の17ヶ月前に診断されたWegener 肉芽腫症に対しプレドニゾンとシクロフォスファミドの投与を受けていた.

\*\*症例 3 は特発性肺胞蛋白症の診断時に禁煙.

表 2. GM-CSF治療前後のBALF 解析

	症例 1		症例2		症例 3	
	前	後	前	後	前	後
回収率 (% of 150 ml)	69	60	53	48	40	70
細胞数 ( $\times 10^4$ /ml)	2.9	15.9	4.0	16.2	7.5	27.1
マクロファージ (%)	62	76	66	95	47	24
リンパ球 (%)	29	21	32	4	40	76
好中球 (%)	9	3	2	1	12	0
好酸球 (%)	0	0	0	0	0	0
CD4/8 比	2.2	2.2	3.2	1.9	1.7	5.0

表 3. GM-CSF 吸入が 抗GM-CSF抗体とその中和能に及ぼす影響

		抗GMCSF 抗体 ( $\mu\text{g/ml}$ )		中和能 (IC50 GMCSF ng/BALF ml)
		BALF	血清	
症例 1	前	1.38	30.54	4.13
	後	0.10	21.85	0.47
症例 2	前	0.58	57.40	1.33
	後	0.03	33.70	0.32
症例 3	前	5.40	n.a.	10.27
	後	0.19	n.a.	0.21

n.a.: not available

表 4. BALF中の自己抗体への結合/非結合GM-CSFの濃度(pg/ml)

	治療前		治療後	
	結合	非結合	結合	非結合
症例 1	71.3	n.d.	54.1	n.d.
症例 2	24.0	n.d.	n.d.	n.d.
症例 3	10.7	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.:検出できず. GM-CSF EIA キットの検出下限は 2.8 pg/ml.

