

2. 瀬戸口靖弘、河野雄太 心不全 COPD のすべて 永井厚志 一ノ瀬正和編 文光堂 318-321、2008
3. 瀬戸口靖弘 呼吸器系 成人から老年 からの年齢事典 鈴木隆雄、衛藤隆 編 朝倉書店 2008
4. 河野雄太 瀬戸口靖弘 ヘルマンスキーパドック症候群 日本臨床(0047-1852) 2008.12;別冊(呼吸器症候群 I);355-359
5. 中井美智子 瀬戸口靖弘 平滑筋腫、平滑筋肉腫 呼吸器症候群 新領域別症候群シリーズ 日本臨床別冊 10 144-146、2009
6. 大久保仁嗣、瀬戸口靖弘 胸水検査 チャート内科診断学 富野康日己編 中外医学社 91-95、2009
7. 瀬戸口靖弘 抗アレルギー薬 93-97 呼吸器疾患最新の治療 2010-2012 貫和敏博、杉山幸比古編 南江堂 東京 2010
4. Setoguchi Y., Tamaoki F, Nakai, M, Kono, Y The Frequency of Mutations in the Surfactant Protein C Gene (SFTPC) Is Much Higher in Pediatric Interstitial Lung Disease (PILD) Than Either Adult-Onset Familial or Sporadic Interstitial Pneumonia Am J Crit Care Med A2170 (In San Diego)2009.
5. Setoguchi Y. Surfactant protein C gene mutation associated interstitial pneumonia Sakura Lung Conference (In Tokyo) 2009
6. Kuwabara Rika, Tamaoki Fukami, Nakai Michiko, Kono Yuta, Setoguchi Yasuhiro Mutations in the surfactant protein C (SFTPC) are predicted to be high frequency in pediatric interstitial lung diseases (PILD) 日本呼吸器学会雑誌 47 巻増刊 343(2009.05)
7. Setoguchi Y. Kume S, Kono Y, Togashi Y. Mutations in the surfactant protein C (SFTPC) gene encoding non-BRICHOS domain could be linked to developing sporadic infant-onset interstitial lung disease, Am J Respir Crit Care A 181:2500, 2010

## 発表

1. Setoguchi Y. Kono Y, Sugiyama S. Clinico-Pathological Consequences of Novel Mutations in The Surfactant Protein C Gene (SFTPC) in Japanese Patients with Interstitial Pneumonia (IP) . Am J Crit Care Med A888 (In Toronto)2008.
2. Michiko Nakai, Yuta Kono, Tetsuya Abe, Norihiro Sugiyama, Yasuhiro Setoguchi Clinico-Pathological Consequences of Novel Mutations in The Surfactant Protein C Gene (SFTPC) in Japanese Patients with Interstitial Pneumonia (IP) English Mini symposium 48th JRS Meeting 2008 (in Kobe)
3. Fukami Tamaoki, Yuta Kono, Yasuhiro Setoguchi Nonspecific Interstitial Pneumonia and Alveolar Proteinosis Trafficking Resulting From A Novel Mutation in The Surfactant Protein C Gene (SFTPC) English Mini symposium 48th JRS Meeting 2008 (in Kobe)
4. Setoguchi Y. Kume S, Kono Y, Togashi Y. Mutations in the surfactant protein C (SFTPC) gene encoding non-BRICHOS domain could be linked to developing sporadic infant-onset interstitial lung disease, Am J Respir Crit Care A 181:2500, 2010
8. Abe T, Setoguchi Y. The combination therapy with inhaled tiotropium bromide and transdermal tulobuterol in COPD improves the peripheral airway function Eur Respir J 36:1181, 2010
9. 杉山伸也、金 禹王賛、河野雄太、大久保仁嗣、長手 聡、阿部哲也、杉山憲弘、吉田 強、中井美智子、瀬戸口靖弘 肺カボジ肉腫の1例 118 回日本呼吸器学会関東地方会 (平成 20 年 3 月 15 日 エーザイホール)
10. 河野雄太、杉山伸也、中井美智子、阿部哲也、杉山憲弘、金 禹王賛、大久保仁嗣、吉田 強、長手 聡、瀬戸口靖弘 胸腺原発の mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)

- lymphoma の一例 119 回日本呼吸器学会関東地方会 (平成 20 年 5 月 10 日 エーザイホール)
11. 阿部哲也, 河野雄太, 杉山伸也, 杉山憲弘, 中井美智子, 金禹攢, 大久保仁嗣, 吉田強, 長手聡, 瀬戸口靖弘 BMI 及び下着等による呼吸抵抗に及ぼす影響の検討 日本呼吸器学会雑誌 46 巻増刊 Page277(2008.05) 日本呼吸器学会総会 (神戸)
  12. 杉山憲弘, 杉山伸也, 阿部哲也, 河野雄太, 金禹攢, 大久保仁嗣, 吉田強, 長手聡, 佐野裕子, 瀬戸口靖弘 COPD 症例に対する吸気筋リハビリテーションの効果 日本呼吸器学会雑誌 46 巻増刊 Page261(2008.05) 日本呼吸器学会総会 (神戸)
  13. 河野雄太, 杉山伸也, 中井美智子, 阿部哲也, 金禹攢, 大久保仁嗣, 吉田強, 長手聡, 瀬戸口靖弘 サルコイドーシス(サ症)における閉塞性換気障害と VEGF・sFlt-1 の関連性の検討 日本呼吸器学会雑誌 46 巻増刊 Page107(2008.05) 日本呼吸器学会総会 (神戸)
  14. 渡辺雅貴, 深澤伸也, 迫田邦裕, 五関善成, 近森大志郎, 山科章, 阿部哲也, 瀬戸口靖弘 bepridil 投与中に認められた間質性肺炎の 2 症例 Circulation Journal 72 巻 Suppl.II Page941(2008.04)
  15. 富樫佑基, 宮原か奈, 根岸美帆, 岸本佳子, 田中館基親, 河野雄太, 阿部哲也, 杉山憲弘, 大久保仁嗣, 吉田強, 瀬戸口靖弘 肺内・肺外転移巣に対し、異なる効果を示したゲフィチニブ治療の肺腺癌の一例 第 180 回日本呼吸器学会関東地方会 平成 20 年 7 月 19 日 (東京 エーザイホール)
  16. 杉山伸也, 山越志保<sup>1)</sup>, 瀬戸口靖弘, 川畑雅照 約 2 か月の経過で空洞性病変より肺炎様の増悪を来した M.intracellulare の 1 例 第 180 回日本呼吸器学会関東地方会 平成 20 年 7 月 19 日 (東京 エーザイホール)
  17. 田中館基親, 河野雄太, 富樫佑基, 阿部哲也, 杉山憲弘, 大久保仁嗣, 吉田強, 瀬戸口靖弘 シクロスポリンが著効した MDS 合併器質化肺炎の一例 第 181 回日本呼吸器学会関東地方会 平成 20 年 9 月 20 日 (高崎ビューホテル)
  18. 山口公一, 大久保仁嗣, 田中館基親, 中井美智子, 井上智治, 富樫佑基, 河野雄太, 阿部哲也, 杉山憲弘, 吉田強, 長手聡, 瀬戸口靖弘 片肺優位な病変を認めた EGFR-TKI 薬剤性肺傷害の 3 例 第 182 回日本呼吸器学会関東地方会 平成 20 年 11 月 15 日 (東京 エーザイホール)
  19. 杉山憲弘, 河野雄太, 大久保仁嗣, 吉田強, 富樫佑基, 阿部哲也, 田中館基親, 井上智治, 瀬戸口靖弘 両上肺野多発性陰影を呈した Pneumocystis pneumonia の一例 第 183 回日本呼吸器学会関東地方会 平成 21 年 2 月 21 日 (東京 エーザイホール)
  20. 阿部哲也, 河野雄太, 杉山憲弘, 富樫佑基, 田中館基親, 藤原赤人, 久米聖子, 井上智治, 中井美智子, 杉山伸也, 大久保仁嗣, 長手聡, 吉田強, 瀬戸口靖弘, 郡司陽子, 瀬山邦明 急性骨髄性白血病を合併した Birt-Hogg-Dube 症候群の一例 第 184 回日本呼吸器学会関東地方会 平成 21 年 5 月 9 日 (東京 エーザイホール)
  21. 阿部哲也, 河野雄太, 杉山憲弘, 大久保仁嗣, 中井美智子, 吉田強, 富樫佑基, 田中館基親, 山口公一, 瀬戸口靖弘 肥満の坐位・仰臥位における呼吸抵抗に与える影響に関する検討 日本呼吸器学会雑誌 47 巻増刊 199 2009.05
  22. 河野雄太 玉置若巳, 瀬戸口靖弘 Pirfenidon 投与中断が肺線維芽細胞の線維化促進因子を発現促進させる可能性について 日本呼吸器学会雑誌 47 巻増刊 260 (2009.05)

23. 田中館基親 井上智浩, 富樫祐基, 瀬戸口靖弘 エンドセリン 1(ET-1)受容体拮抗薬は、間質性肺炎に影響を及ぼすか 日本呼吸器学会雑誌 47 巻増刊 227 (2009.05)
24. 杉山伸也 成井浩司, 笠木聡, 葛西隆敏, 角田篤郎, 瀬戸口靖弘, 川畑雅照 CPAP 治療下で中枢性無呼吸を呈する閉塞性睡眠時無呼吸症候群の頻度と特徴 日本呼吸器学会雑誌 47 巻増刊 182 (2009.05)
25. 丸茂一義, 手塚知子, 鈴木勉, 瀬戸口靖弘, 高橋和久, 壇原高, 福地義之助 スパイログラムにおける呼出開始の良否と Flow-Volume 曲線上行脚の形態の関係について 日本呼吸器学会雑誌 47 巻増刊 274 (2009.05)
26. 瀬戸口靖弘 肺サーファクタント遺伝子異常と間質性肺炎 日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌 40 巻 135 (2009.09)
27. 阿部哲也, 河野雄太, 杉山伸也, 杉山憲弘, 中井美智子, 大久保仁嗣, 吉田強, 長手聡, 瀬戸口靖弘 BMI による呼吸抵抗に及ぼす影響の検討 東京医科大学雑誌 67;100,2009
28. 高橋寛吉, 木苗優子, 白井眞美, 本郷輝明, 瀬戸口靖弘 ハイドロキシクロロキンにて治療を行った肺胞サーファクタント遺伝子異常を伴う間質性肺炎の 1 例 日本小児科学会雑誌 113;118,2009
29. 瀬戸口靖弘 禁煙治療における最新の話 企業内禁煙の取り組みとバレニクリンの効果 日本呼吸器学会雑誌 47 巻増刊 98(2009.05)
30. 藤原赤人, 河野雄太, 久米聖子, 杉山伸也, 井上智治, 富樫祐基, 阿部哲也, 杉山憲弘, 吉田 強, 瀬戸口靖弘 パクリタキセル薬剤溶出型冠動脈ステントによる薬剤性肺障害が疑われた 1 例 第 187 回 日本呼吸器学会関東地方会 2009 11/21 聖路加看護大  
学セントジョージホール
31. 瀬戸口靖弘 最新の禁煙事情 第 35 回日本診療情報学会総会 教育セミナー 平成 21 年 9 月 8 日 浜松
32. 阿部哲也, 瀬戸口靖弘 第 13 回呼吸病態研究会
33. 杉山憲弘, 杉山伸也, 阿部哲也, 河野雄太, 吉田強, 久米聖子, 横山智央, 大屋敷一馬, 瀬戸口靖弘 COPD 症例に対する吸気筋リハビリテーションの効果 東京医科大学雑誌 68 巻 1 号 116(2010.01)
34. 富樫祐基, 山口公一, 鯉登彩, 久米聖子, 藤原赤人, 杉山伸也, 中井美智子, 井上智治, 河野雄太, 阿部哲也, 杉山憲弘, 吉田強, 瀬戸口靖弘 非小細胞肺癌における上皮成長因子受容体(EGFR)の遺伝子変異と予後因子の検討 日本呼吸器学会雑誌 48 巻増刊 369(2010.03)
35. 阿部哲也, 河野雄太, 杉山憲弘, 富樫祐基, 杉山伸也, 井上智治, 藤原赤人, 田中館基親, 久米聖子, 山口公一, 鯉登彩, 井上雄一, 瀬戸口靖弘 睡眠時無呼吸症候群において呼吸抵抗の体位による変化に関する検討 日本呼吸器学会雑誌 48 巻増刊 332(2010.03)
36. 藤原赤人, 杉山伸也, 井上智治, 久米聖子, 田中館基親, 中井美智子, 富樫祐基, 河野雄太, 阿部哲也, 杉山憲弘, 吉田強, 瀬戸口靖弘 びまん性肺疾患 間質性肺炎合併肺癌の臨床的検討 日本呼吸器学会雑誌 48 巻増刊 111(2010.03)
37. 瀬戸口靖弘 COPD 長期管理における気管支拡張薬の活用法 COPD における末梢気道閉塞とその治療 日本呼吸器学会雑誌 48 巻増刊 93(2010.03)
38. 廣瀬彬(徳島赤十字病院 小児科), 東田栄子, 近藤梨恵子, 七條光市, 梅本多嘉子, 杉本真弓, 生越剛司, 渡邊力, 中津忠則, 吉田哲也, 瀬戸口靖弘 先天性肺胞蛋白症が疑わ

れた1例 日本小児科学会雑誌 114 巻 3 号  
Page575-576(2010.03)

39. 副島研造、梅里良正、吉森浩三、徳田均、  
山口哲生、溝尾朗、柏田建、瀬戸口靖弘、  
守純一、後藤重則、金子亨、神垣隆、藤本  
勝洋、工藤翔二、岩井和郎 非小細胞肺癌  
における症例対照研究による免疫細胞療法  
の遠隔成績 日本癌治療学会誌 45;737,2010

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

全肺洗浄にて加療した自己免疫性肺胞蛋白症 6 症例の長期臨床経過と  
抗 GM-CSF 自己抗体価の推移との関連に関する研究

研究分担者 一和多 俊男 東京医科大学八王子医療センター呼吸器内科

研究要旨

全肺洗浄 (WLL) を施行後 5 年間以上観察した aPAP 6 例における臨床経過と抗 GM-CSF 自己抗体価と、病勢マーカーとして有用な KL-6 の推移と提示し、抗 GM-CSF 自己抗体価と長期予後との関連性について検討した。6 症例の臨床経過と抗 GM-CSF 自己抗体価の関連性は、観察期間が最も短期間の症例 6 を除いて、他の 5 症例は抗 GM-CSF 自己抗体価が減少傾向にともなって自覚症状、病勢マーカーと画像所見の改善傾向を認めた。一方、症例 6 は抗 GM-CSF 自己抗体価は  $20 \mu\text{g/ml}$  前後で推移し、KL-6 値が高値で画像上も GGO が残存し、咳などの自覚症状が持続している。抗 GM-CSF 自己抗体価は aPAP の診断のほかに、今回の検討から aPAP 症例を長期間フォローアップする上で、1) 長期病勢、2) 治療施行のタイミング、3) 治癒を判断する上で有用なマーカーであることが示唆された。

A. 研究目的

自己免疫性肺胞蛋白症 (aPAP; Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis) は、抗 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 中和自己抗体により肺胞マクロファージの肺局所における終末分化が障害されるためにサーファクタント分解能が低下する結果、肺胞内にリポ蛋白質が集積して発症する<sup>1)</sup>。

aPAP は、Seymour ら<sup>2)</sup> は 303 例中 24 例 (7.9%)、Inoue ら<sup>3)</sup> は症状を有する本邦 105 例中 32 例

(30.4%) が自然軽快すると報告しているが、自然軽快しない aPAP は主に全肺洗浄 (WLL; whole lung lavage) より治療されている。WLL の効果は、肺胞内に蓄積したリポ蛋白質の除去といった物理学機序とともに、抗 GM-CSF 抗体や免疫学的効果を持つ細胞 (II 型肺胞上皮やマクロファ-

ジ) の除去といった免疫学的機序の関与も推測されている<sup>2)</sup>。aPAP に対する WLL の効果は、30~40% 症例は 1 回のみ WLL で軽快するが、60~70% の症例は 6~12 ヶ月後に再施行が必要となる<sup>4)</sup>。また初回 WLL 施行後の経過については、3 年間以上再発しなかった症例が 20% 未満であったとの報告<sup>2)</sup> から、7 年後の再燃率が 30% 以下であったとの報告<sup>5)</sup> まで多様である。

aPAP における血清パラメーターは、KL-6・SP-A・SP-B・CEA・LDH は重症度と相関関係を認めるが、抗 GM-CSF 自己抗体価は重症度とは相関しないため病勢マーカーとして有用ではないと考えられている<sup>6)</sup>。今回我々は、WLL を施行後 5 年間以上観察した aPAP 6 例における臨床経過と抗 GM-CSF 自己抗体価と、病勢マーカーとして有用な KL-6 の推移と提示し、抗 GM-CSF

**Table 1 Clinical characteristics of 6 patients with aPAP**

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
Age(yr)	47	56	49	52	56	34
Sex	Male	Male	Male	Male	Male	Male
Period from onset to 1st WLL (month)	9	2	1.5	31	7.5	10.5
Observation Period (month)	247	200	127	99	75	67
Smoking status (smoking index)	Curret smoker (540)	Curret smoker (720)	Curret smoker (580)	Curret smoker (640)	Ex-smoker (320)	Curret smoker (280)
Occupation	Driver	Driver	Worker in freezer	Banker	Driver	Plasterer
Symptoms	Dyspnea	Dyspnea	Dyspnea	Dyspnea	Dyspnea	Cough
fine crackles	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
Methods of Diagnosis	TBLB BAL	TBLB BAL	TBLB BAL	TBLB BAL	TBLB BAL	TBLB BAL

**Table 2 Serum biomarkers of 6 patients with aPAP**

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
GM-CSF Ab ( $\mu\text{g/ml}$ )	39.5(11yr)	3.1(8yr)	8.4(1yr)	28.0	44.9(9m)	39.8
Hg(g/dl)	17.7	12.4	15.2	14.6	16.0	16.5
LDH(U/ml)	1171	519	663	326	1458	533
CEA(ng/ml)	29.0	3.4	2.2	2.4	15.8	5.5
KL-6(U/ml)	1490(8yr)	1450(7yr)	24200	6100	>9000	5450
SP-D(ng/ml)	371(11yr)	181(8yr)	220	236	1680	325
T-Ch(mg/ml)	254	140	241	229	268	225
TG(mg/ml)	208	334	334	543	137	198
ESR(1hr)	3	8	17	5	28	3

\* ( ) Period from 1st WLL to measurement

自己抗体価と長期予後との関連性について検討した。

## B. 研究方法

対象は、獨協医科大学越谷病院呼吸器内科で WLL を施行し、初回 WLL 後 5 年間以上観察し得た aPAP6 例である。対象は全例男性で、初診時の平均年齢は  $49.0 \pm 8.2$  (34-56) 歳、発症 (検診発見) から初回 WLL までの期間は  $16.3 \pm 12.8$  (1.5-31) 月であった。症例 4 は他医療機関で PAP と診断され、気管支鏡下区域洗浄で加療された後に WLL 施行目的紹介となったが、他の 5 症例は獨協医科大学越谷病院での WLL が初回治療であった。初診後からの観察期間は平均  $135.8 \pm 72.6$  (67-247) 月であった (Table 1)。

抗 GM-CSF 自己抗体価は、症例 4、5 以外の症例は WLL 施行後に測定したデータで平均  $25.5 \pm 17.1$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) であった。LDH は平均  $754.2 \pm 459.2$  (U/ml)、CEA は平均  $12.9 \pm 11.2$  (ng/ml) で、KL-6 と SP-D は症例 1、2 は WLL 施行後に測定したデータであるが、それぞれ平均  $7481.7 \pm 8710.3$  (U/ml)、平均  $480.7 \pm 590.6$  (ng/ml) であった

**Table 3 Arterial BGA and PFTs of 6 patients with aPAP**

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
pH	7.382	7.397	7.437	7.401	7.451	7.411
PaO <sub>2</sub> (Torr)	46.0	62.0	67.7	77.8	57.5	66.3
PaCO <sub>2</sub> (Torr)	37.2	38.9	36.8	44.8	34.3	39.7
VC(L)	2.86	2.93	3.81	3.42	2.65	5.14
VC,% predicted	74.0	85.2	103.5	94.2	79.1	120.9
FEV <sub>1</sub> (L)	2.88	2.42	3.14	2.40	2.26	4.51
FEV <sub>1</sub> /FVC(%)	97.6	90.0	101.3	79.5	88.6	112.5
DLco (ml/min/mmHg)	NE	15.59	11.30	23.31	6.15	23.39
DLco, % predicted	NE	80.4	52.9	101.9	35.8	85.5

(Table 2)。

大気下の動脈血液分析は、PaO<sub>2</sub>  $41.3 \pm 27.2$  (46.0-77.8) Torr、PaCO<sub>2</sub>  $48.4 \pm 18.8$  (34.3-44.8) Torr で、呼吸機能検査は、%VC  $92.5 \pm 19.4$  (74.0-120.9) %、FEV<sub>1</sub>/FVC  $88.2 \pm 2.4$  (79.5-112.5) %、%DLco  $63.6 \pm 23.4$  (35.8-101.9) % であった (Table 3)。

Table 4 WLL (frequency, date, side) and disease progression of 6 patients with aPAP

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
Total WLL Frequency	6	2	2	8	6	6
Date/side of WLL	1, 91.4.17 R 2, 91.5.20 L 3, 91.6.3 L 4, 91.6.17 R 5, 94.7.14 L 6, 94.7.28 R	1, 94.7.7 L 2, 94.7.14 R	1, 99.12.8 L 2, 00.1.5 R	1, 02.10.1 R 2, 02.10.8 L 3, 05.1.13 R 4, 05.1.20 L 5, 05.12.1 R 6, 05.12.8 L 7, 08.1.29 L 8, 08.2.8 R	1, 04.3.2 L 2, 04.3.9 R 3, 04.5.11 L 4, 04.5.18 R 5, 05.5.16 L 6, 05.5.23 R	1, 06.3.9 R 2, 06.3.16 L 3, 07.10.9 L 4, 07.10.16 R 5, 09.4.14 L 6, 09.5.14 R
Disease progression	Condition gradually improved after last WLL, though Chest X-P & CT revealed slight GGO.	Condition gradually improved after last WLL and Chest X-P & CT didn't reveal GGO.	Condition gradually improved after last WLL and Chest X-P & CT didn't reveal GGO.	Condition gradually improved after last WLL and Chest X-P & CT didn't reveal GGO.	Condition gradually improved after last WLL and Chest X-P & CT didn't reveal GGO.	Condition didn't change after last WLL, and Chest X-P & CT revealed GGO.

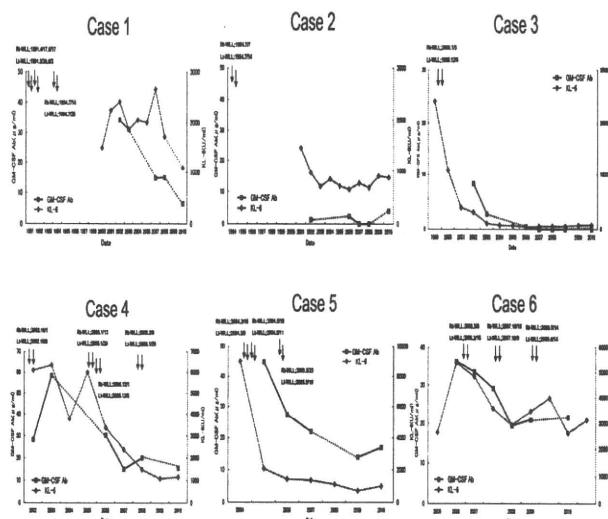


Fig.1 Clinical course since first medical examination

なお、血清抗 GM-CSF 自己抗体価は、凍結した血漿を新潟大学に郵送して ELISA 法に測定した<sup>7)</sup>。また、本研究は、獨協医科大学越谷病院倫理委員会において承認された。

### C. 研究結果

#### 1. 臨床経過と血清抗 GM-CSF 自己抗体価の推移 (Table 4、Fig. 1,2)

症例 1 は、初回 WLL は低酸素血症が高度であったため ECMO を併用し、1991 年に左右 2 回ずつ WLL を行った。1994 年再増悪したため WLL を行い、その後は両側上肺野に GGO が残存し、2000 年以降測定した KL-6 値は 1500U/ml で推移したが増悪傾向は認めなかった。2009 年に胃ガンにて胃全摘出術を施行し、誤嚥などの aPAP 以外の因子が関与して画像上増悪傾向を認めたが、2010 年に測定した抗 GM-CSF 自己抗体価と KL-6 値の低下傾向を認める。

症例 2 は、左右 1 回の WLL のみで寛解し、2002 年以降抗 GM-CSF 自己抗体価は 1.2~3.9 μg/ml で推移している。KL-6 値は 500~1000U/ml で推移しているが、胸部レントゲンおよび CT では GGO や線維化を示唆する陰影を認めない。

症例 3 は、左右 1 回の WLL のみで寛解し、

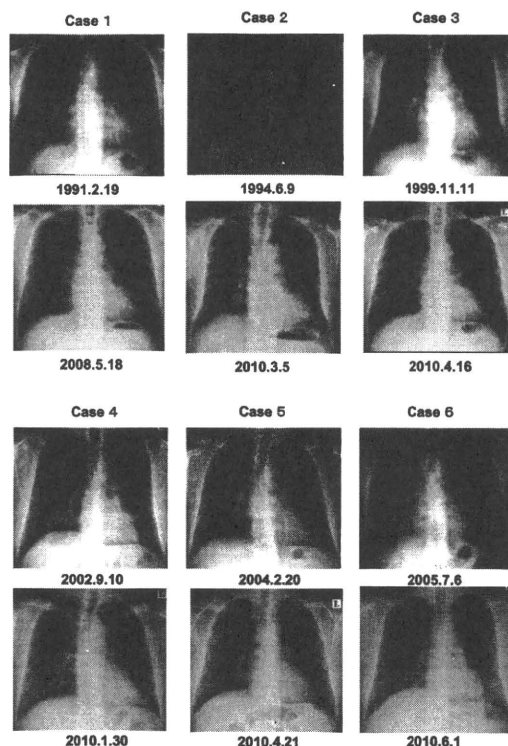


Fig.2 Chest X-ray films before first WLL (upper) and last Chest X-ray films(lower) of 6 patients with aPAP



WLL 施行3年目の2002年に測定した抗GM-CSF 自己抗体価は  $8.357 \mu\text{g/ml}$  であったが、4年以降は漸減して2007以降は検出されなくなった。KL-6 値も漸減して正常となり、胸部レントゲンおよびCTではGGOを認めない。

症例4は、2002年に第1回目のWLLを施行し、2005年まで左右3回ずつWLLを施行した。その間、KL-6 値は4000~6000U/mlで推移し、画像上もGGOが残存し改善傾向を認めなかった。2006年以降、KL-6 値は抗GM-CSF 自己抗体価とともに漸減し、画像上も改善傾向を認め経過良好であった。しかし、患者本人の希望により2008年にWLLを施行した。

症例5は、2004年に左右2回、2005年に左右1回ずつWLL施行し、KL-6 値は抗GM-CSF 自己抗体価は漸減した。2008年以降KL-6 値は1000U/ml前後、抗GM-CSF 自己抗体価は  $15 \mu\text{g/ml}$  前後で推移しているが、胸部レントゲンおよびCTではGGOを認めない。

症例6は、2006年、2007年と2009年に左右1回ずつWLLを施行した。KL-6 値は2500~4000U/ml、抗GM-CSF 自己抗体価は  $20 \mu\text{g/ml}$  前後で推移し、胸部レントゲンおよびCTではGGOが残存しているが著しい変化を認めない。

以上の6症例の臨床経過と抗GM-CSF 自己抗体価の関連性は、観察期間が最も短期間の症例6を除いて、他の5症例は抗GM-CSF 自己抗体価が減少傾向にともなって自覚症状、病勢マーカーと画像所見の改善傾向を認める。一方、症例6はKL-6 値が高値で画像上もGGOが残存し、咳などの自覚症状が持続している。

## 2. 左右1回にWLLにより寛解した症例と非寛解症例の比較 (Table 5)

左右各1回のWLLによって寛解した2症例と寛解しなかった4症例を比較すると、非寛解例は発症から初回WLLまでの期間が長く、血清LDHとCEA値が高い傾向を認めたが、両者に

Table 5 Comparison between cases of complete remission and non-complete remission by first WLL

	Complete Remission		mean±SD	Non Complete Remission				mean±SD
	2	3		1	4	5	6	
Case No.	2	3		1	4	5	6	
Age (yr)	56	49	52.5±4.9	47	52	56	34	47.3±9.6
Period from onset to 1st WLL (month)	2	1.5	1.75	9	31	7.5	10.5	15.0±11.1
GM-CSF Ab level ( $\mu\text{g/ml}$ )	NE	NE			28.0	44.9	39.8	37.6±8.7
LDH (U/ml)	519	663	591±102	1171	326	1458	533	872±531
CEA (ng/ml)	3.4	2.2	2.8±0.8	29	2.4	15.8	5.5	13.2±12.0
KL-6 (U/ml)		24200	24200		6100	>9000	2650	5917±3179
T-Ch (mg/ml)	140	241	190.5±71.4	254	228	168	225	218.8±36.2
TG (mg/ml)	311	334	322.5±16.2	208	543	137	198	271.5±183.7
PaO <sub>2</sub> (Torr)	82	67.7	64.9±4.0	48	77.8	57.5	39.7	55.3±16.7
%VC (%)	85.2	103.5	94.3±13.0	74.0	94.2	79.1	120.9	92.1±21.1
%DLco (%)	80.4	52.9	66.8±19.4	NE	101.9	35.8	85.5	74.4±34.4
Complication					Asthma			

血液ガス・呼吸機能検査では大きな差異を認めなかった。また、左右各1回のWLLによって寛解した2症例は、WLL前に抗GM-CSF 自己抗体価を測定できなかったため、その関与は不明である。

## D. 考察

aPAPにおける無治療で自然に軽快する頻度は報告によって異なっており、一般に有症状症例の病勢は45%が安定、30%が軽快、25%が増悪し、罹病期間が長い程、進行性である考えられている<sup>4)</sup>。また、aPAPの30~40%症例は1回のみWLLで軽快するが、60~70%の症例は6~12ヶ月後に再施行が必要となり、PAPに対して行われるWLLは平均2回(1~22回)で、フォローアップ期間に比例してWLL施行回数が増加する<sup>2)</sup>。WLLの適応基準の1つとして、組織学的にPAPの診断が確定して、1) PaO<sub>2</sub><65Torr、2) A-aDO<sub>2</sub>≥40Torr、3) シヤント率>10-12%、4) 労作時、安静時に重篤な呼吸困難、低酸素血症の4項目のうち1項目を満たすことが報告されている<sup>4)</sup>。また、WLL効果基準は確立されていないが、84%の症例で有効であり、WLLの平均



有効期間は15ヶ月で、WLL施行後3年間にPAPの再燃徴候を認めない症例は20%未満である<sup>2)</sup>。PAPに対するWLLの有効性は、性別・病変部位・有症状期間・喫煙、診断からWLLまでの期間・A-aDO<sub>2</sub>・血清LDH値などから予測することはできず、若年者ほど有効性が低下する(20歳以下;58%、21-39歳;84%、40歳以上;90%、P=0.03)と報告されている<sup>2)</sup>。

KL-6・CEA・SP-A・SP-B・LDHなどのバイオマーカーは、aPAPの重症度や呼吸機能と相関して病勢マーカーとして有用である。一方、抗GM-CSF自己抗体価はaPAPの診断には有効であるが、重症度を反映しないために病勢マーカーとしては有用ではない<sup>3)</sup>。aPAPは、抗GM-CSF中和自己抗体により肺胞マクロファージの肺局所における分化が障害され、サーファクタント分解能が低下するためにサーファクタントが蓄積する<sup>1)</sup>。抗GM-CSF自己抗体価が重症度と相関しない理由としては、抗GM-CSF自己抗体価が抗GM-CSF中和抗体量と非中和抗体量の両者を反映しているため、抗GM-CSF自己抗体価が必ずしもGM-CSF中和能を反映せず、GM-CSF中和能の定量化が病勢マーカーとなる可能性がある<sup>8)</sup>。

抗GM-CSF自己抗体価は、横断的疫学調査<sup>3)</sup>やGM-CSF吸入療法6コース(24週間)における検討<sup>8)</sup>において、重症度やKL-6・SP-A・SP-B・CEA・LDHなどの病勢マーカーとは相関関係を認めなかった。一方、WLLを施行後5年間以上観察したaPAP症例の長期臨床経過と抗GM-CSF自己抗体価との関連性について検討した報告はなされていない。今回検討した観察期間が最も短期間(67ヶ月)であった症例6を除いて、他の5症例は抗GM-CSF自己抗体価の減少傾向にともなって、自覚症状、病勢マーカーと画像所見の改善傾向を認めた。

## E. 結論

抗GM-CSF自己抗体価はaPAPの診断のほかに、今回の検討からaPAP症例を長期間フォローアップする上で、1)長期病勢、2)治療施行のタイミング、3)治癒を判断する上で有用なマーカーであることが示唆された。

## 参考文献

1. Trapnell BC, Whitsett JA, Nakata K. Pulmonary Alveolar Proteinosis. *N Engl J Med* 2003; 349:2527-2539
2. Seymour JF, Presneil JJ. Pulmonary Alveolar Proteinosis Progress in the First 44 Years *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 215-35
3. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R. et al. Characteristics of a Large Cohort of Patients with Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis in Japan. *Am J Respir. Crit. Care Med.* 2008; 177: 752-762
4. Chan E & King TEJ. Diagnosis and treatment of pulmonary alveolar proteinosis in adults. *Up to Date* 2009; 17.1
5. Beccaria M, Luisetti G, Corsico A. Long-term durable benefit after whole lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir J* 2004; 23: 526-531
6. 中田 光、井上義一、高田俊範他；わが国のaPAPの病勢、予後、GM-CSF吸入療法のUP-to-date *分子呼吸器病* 2007 11: 72-74
7. Kitamura T, Uchida K, Tanaka N, et al. Serological Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 658-662
8. 大橋和政、金澤裕子、渡辺雅人他；aPAPの血清GM-CSF中和能と病勢との相関解析 *分子呼吸器病* 2007 11: 68-71

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことなし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

自己免疫性肺胞たんぱく症GM-CSF吸入療法後の長期経過の検討  
～長期緩解を目標とした吸入療法追加の目安について～

研究分担者 海老名雅仁 東北大学大学院医学系研究科 呼吸器病態分野

研究要旨

自己免疫性肺胞たんぱく症 (aPAP) に対する治療として GM-CSF 吸入療法が導入されてから既に 10 年が経過し、aPAP に対する GM-CSF 吸入療法の有用性が確立されつつある。従来の GM-CSF 療法プロトコールは最初の 12 週間、高用量吸入 (High, 250ug, Days 1-8, none, Days 9-14)、続く 12 週間、低用量吸入 (Low, 125ug, Day 1-4, none, Day 5-14) を行うものである。田澤らは第二相臨床試験に参加した aPAP 39 名のうち 35 名が上記プロトコールを完遂し、29 名が追加治療を 1 年間は必要としなかったと報告している。しかしながら我々は、1 年以上経過してから増悪をきたし数年の低用量 GM-CSF 吸入療法を追加したところ長期緩解を得た症例を 2 例経験した。これら 2 例は CT の陰影がほぼ完全に軽快し ‘完全緩解’ に近い状況であった。そのため我々は長期的な予後をより改善させるためには、従来のプロトコールに基づいた治療を行った後に GM-CSF 療法の追加を行うことが必要と考えた。そのため追加治療を行う場合の判断基準を明らかにするため、本研究を行った。当院で初回 GM-CSF 療法を施行し 1 年以上経過観察が可能であった 5 例の予後を解析し、上記について検討した。

A. 研究目的

肺胞たんぱく症 GM-CSF 療法における追加治療の意義および追加治療を必要とする基準を明らかにすること。

B. 研究方法

レトロスペクティブに画像所見、血液ガスデータ (AaDO<sub>2</sub>)、肺機能データ (%DLco)、血液検査値 (KL6、CEA、LDH、SpD、SpA) を抽出し検討した。

C. 研究結果

治療中に KL6、CEA、AaDO<sub>2</sub>、%DLco などの改善がはっきりと認められ、検査値の変動が安

定した症例が長期緩解を維持していた。画像的に陰影がほぼ完全に消失した患者 3 名のうち 2 名は当初予定された 6 か月のプロトコールに加え、1-2 年の少量の追加吸入を追加した事例であった。これら 2 名の 1 回目治療では KL6、CEA、AaDO<sub>2</sub>、%DLco の改善は認められなかったが、追加吸入を施行することにより著明な改善を認めた。なお CEA は CT 画像著明改善例では全例正常化した。その他の検査値は正常値には戻らなかった。

D. 考察と結論

上記の結果より、GM-CSF 療法は肺胞洗浄無効例、重症例にも有用であること、いったん無

効とされても追加治療が奏功する場合もあることが明らかになった。そのため症例によっては従来の6ヶ月間の治療に加え、維持療法を積極的に追加する必要があると考えた。維持療法追加の目安としてCT画像、KL-6、CEA、AaDO<sub>2</sub>、%DLcoを総合的に勘案して決定することが必要であるが、特にCT画像の軽快が不十分かつCEAの正常値逸脱は追加治療の指標として適するのではないかと考えた。本研究はわずか5例のまとめなので、これら事項をさらに多くの事例で検証する必要があると考えた。

#### E. 研究発表論文

1. Ohkouchi S, Block GJ, Katsha AM, Kanehira M, Ebina M, Kikuchi T, Saijo Y, Prockop DJ, Nukiwa T. Mesenchymal Stromal Cell (MSC) Derived Stanniocalcin-1 Promotes Survival of Injured Lung Cancer Epithelial Cells by Upregulation of Uncoupling Protein 2. Proc Nat Acad Sci USA, 2011, in press
2. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier J-F, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE, Jr., Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schunemann HJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence Based Guidelines for Diagnosis and Management: A Joint ATS/ ERS/JRS/ALAT Statement. Am J Respir Crit Care Med. 2011 (in press)
3. Tamada T, Nara M, Murakami K, Muramatsu S, Ebina M, Nukiwa T. Acute Eosinophilic pneumonia associated with the inhalation of phosgene gas under the presence of cigarette smoking. Respir Med 2011 (in press)
4. Murakami K, Tamada T, Abe K, Nara M, Hisata S, Mitsuishi Y, Muramatsu S, Gomi K, Ebina M, Nukiwa T. Rapid improvement of asseous sarcoidosis after the treatment of pulmonary aspergillosis by itraconazole Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2011, in press.
5. Daito H, Kikuchi T, Sakakibara T, Gomi K, Damayanti T, Zaini J, Tode N, Kanehira M, Koyama S, Fujimura S, Ebina M, Ishii KJ, Akira S, Takai T, Watanabe A, Nukiwa T. Mycobacterial hypersensitivity pneumonitis requires TLR9-MyD88 in lung CD11b+CD11c + cells. Eur Respir J. 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]
6. Ebina M, Taniguchi H, Miyasho T, Yamada S, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Hirota N, Nishimura H, Ishizaka A, Maruyama I, Takashi K, Nukiwa T. Gradual increase of high mobility group protein B1 (HMGB1) in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Pulmonary Med 2011 Article ID 916486, doi:10.1155/2011/916486 1-9
7. Hisata S, Kimura Y, Shibata N, Ono S, Kobayashi T, Chiba S, Ohta H, Nukiwa T, Ebina M. A normal range of KL-6/MUC1 independent elevated SP-D indicates a better prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. Pulmonary Med 2011, Article ID 806014, doi: 10.1155/2011/806014: 1-7.
8. Ebina M, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Tamada T, Ono M, Okaya K, Kondo T, Nukiwa T. The disappearance of subpleural and interlobular lymphatics in idiopathic pulmonary fibrosis. Lymphat Res Biol. 2010 8:199-207
9. Koyama S, Murakami K, Sakakibara T, Muramatsu S, Watanabe M, Miki M, Ebina M,

- Nukiwa T. Massive pleural effusion and bronchopleural fistula in Wegener's granulomatosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 27:76-9, 2010.
10. Satoh H, Moriguchi T, Taguchi K, Takai J, Maher JM, Suzuki T, Winnard PT Jr, Raman V, Ebina M, Nukiwa T, Yamamoto M. Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung. *Carcinogenesis.* 31:1833-43, 2010.
11. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, Arai T, Takada T, Nasuhara Y, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ishii H, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Morimoto K, Akira M, Terada M, Otsuka J, Ebina M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Akazawa K, Nakata K. Inhaled Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor as Therapy of Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 181(12):1345-54.
12. Tanaka K, Ishihara T, Azuma A, Kudoh S, Ebina M, Nukiwa T, Sugiyama Y, Tasaka Y, Namba T, Ishihara T, Sato K, Mizushima Y, Mizushima T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010 298:L348-60.
13. Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, Ogura T, Azuma A, Suga M, Taguchi Y, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Takeuchi M, Raghu G, Kudoh S, Nukiwa T; Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis: A phase III clinical trial in Japan. *Eur Respir J.* 2010 35(4):821-9.

F. 特許取得等

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

肺胞蛋白症におけるGM-CSF吸入治療と気管支肺胞洗浄液所見に関する解析

研究分担者 田澤 立之 新潟大学生命科学医療センター

大橋和政、佐藤篤靖、高田俊範、新井徹、笠原靖紀、放生雅章、根井貴仁、中山秀章、元井奈都紀、浦野真也、江田良輔、横場雅典、土橋佳子、南須原康之、海老名雅仁、山口悦郎、Jacqueline Kirchner、井上義一、中田光 日本稀少肺疾患コンソーシアム

研究要旨

自己免疫性肺胞蛋白症（aPAP）は、肺の GM-CSF 抗体により生ずる。2005 年に我々のグループは、GM-CSF 吸入治療を 3 人の aPAP 患者に試み、酸素化が改善したことと、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の GM-CSF 抗体濃度が減少したことを報告したが、BALF 中の GM-CSF 抗体濃度の減少の機序は不明である。そこで GM-CSF 吸入治療による aPAP 患者の BALF 中の GM-CSF 抗体濃度の減少が、抗体産生の減少によるのか、肺内の GM-CSF 抗体の除去の亢進によって生じるのかを明らかにするため、GM-CSF 吸入治療研究（吸入総量 10.5-21mg、吸入期間 12-24 週）に参加した 19 例の aPAP 患者から得られた BALF を retrospective に検討した。BALF はあらかじめ定めた共通手順書に沿って、GM-CSF 吸入治療の前後に、各患者の同一気管支から採取した。評価にあたって、高反応群 ( $\Delta AaDO_2 \geq 13$  mmHg、 $n=10$ )と低反応群 ( $\Delta AaDO_2 < 13$  mmHg、 $n=9$ )に分けて比較した。BALF 中の総蛋白量、SP-A、総 IgG は高反応群では有意に低下したが ( $p<0.05$ )、低反応群では変わらず、高反応群で肺胞マクロファージによるサーファクタント物質の除去が改善したことが示唆された。BALF 中の GM-CSF 抗体濃度と GM-CSF に対する中和能も、高反応群で有意に減少したが ( $p<0.05$ )、全 IgG に対する GM-CSF 抗体の比率は変化がなかった。さらに、血清中の GM-CSF 抗体の全 IgG に対する比率も治療前後で変化がなかった。BALF 中の IL-17—一部は肺胞マクロファージより分泌される—高反応群で、治療後有意に増加した。aPAP 患者の GM-CSF 吸入治療後の BALF 中の GM-CSF 抗体濃度の低下は、GM-CSF 抗体産生の低下によるのではなく、気管支肺胞腔のクリアランスの改善によると考えられた。

A. 研究目的

肺胞蛋白症 (PAP) は肺胞腔内にサーファクタント物質の過剰な蓄積をみる稀少疾患である<sup>(1)</sup>。自己免疫性 PAP の患者の血清および気管支肺胞洗浄液 (BALF) では顆粒球マクロファージ

コロニー刺激因子 (GM-CSF) に対する自己抗体が検出される<sup>(2)</sup>。GM-CSF 抗体は GM-CSF の生物活性を中和し<sup>(3-5)</sup>、肺胞マクロファージによるサーファクタント除去を障害する<sup>(6-9)</sup>。最近、PAP 患者から精製された GM-CSF 抗体が、カニ

クイサルに輸注され PAP 発症に至ったことが報告され、GM-CSF 抗体が直接、PAP を引き起こすことが示された<sup>(10)</sup>。本邦における自己免疫性 PAP の罹病率と有病率は、人口 100 万人あたり、それぞれ、0.49、6.04 である<sup>(11)</sup>。

GM-CSF ノックアウトマウスでの研究および GM-CSF 吸入治療第 I 相研究で GM-CSF の吸入投与が PAP を改善させたこと<sup>(12-14)</sup>に基づいて、我々は、以前に、全国多施設前向き第 II 相研究を行い、自然寛解のみられない PAP 患者での GM-CSF 吸入治療を評価した<sup>(15)</sup>。臨床徴候、生理学的検査、画像検査、生化学的検査で改善がみられ、重篤な有害事象はみられなかった。驚くべきことに、この研究では、血清中の GM-CSF 抗体は、治療中変化のなかったことが明らかにされ、GM-CSF 吸入治療は、GM-CSF 抗体産生には影響しなかったことが示唆された。

GM-CSF 抗体は、BALF 中でも検出されるが、その濃度は血清中よりも相当低い。カニクイサルへの GM-CSF 抗体投与で PAP 発症をみた最近の報告では、GM-CSF 抗体は肺の上皮細胞被覆液中でも検出され、その濃度は血清中の濃度と比例していた<sup>(10)</sup>。エアゾル化した GM-CSF の気腔への直接の投与は、BALF 中の GM-CSF 抗体濃度に影響する可能性がある。GM-CSF 吸入のパイロット研究では、肺胞蛋白症患者 3 例で、BALF 中の GM-CSF 抗体は著明に低下していた<sup>(14)</sup>。血清中では GM-CSF 抗体が変化しないのに、BALF 中では低下がみられることから、我々は、GM-CSF 吸入治療中の BALF での GM-CSF 抗体濃度の低下は、気腔内での除去能回復による、との仮説を立てた。この仮説を検証するために、上述の臨床研究で GM-CSF 吸入治療を受けた患者から採取された BALF の後向き研究を行った。我々の研究では、GM-CSF 吸入治療により、BALF 中の GM-CSF 抗体濃度が IgG 濃度と比例して低下する一方、CA125 や IL17 などのマーカーが上昇することが明らかに

なった。

## B. 研究方法

### 患者と GM-CSF 吸入

本研究は、GM-CSF 吸入治療の臨床研究に参加した PAP 患者でオプションな評価項目として施行された BALF をレトロスペクティブに利用して行われた。患者は、パイロット研究より 1 例、早期第 II 相研究より 6 例、多施設第 II 相研究 (ISRCTN18931678、JMA-IIA00013) より 12 例の全 19 例である<sup>(14, 15)</sup>。患者は、肺生検あるいは細胞学的所見および血清 GM-CSF 抗体濃度高値で肺胞蛋白症と診断され、12 週間の無治療観察で改善がなかった場合に治療期間に入った。ヒトリコンビナント GM-CSF 製剤 (全投与量: 10.5-21mg 投与期間 12-24 週) は、生理食塩水 2ml に溶解され、携帯型コンプレッサーにバルブとともに接続された LC plus ネブライザーで吸入された (ドイツ・パリ社)。BALF 解析の結果は、それぞれの治療期間の臨床情報と比較解析された。

本研究は、各施設の IRB の承認を受け、BALF は書面での同意を得て行われた。本研究は、参加各研究施設の主任研究者により構成される研究実行委員会で計画され監査を受けて行われた。

### 気管支肺胞洗浄 (BAL)

研究実行委員会では本研究での BAL の標準実施手順を策定し、各施設はこれに従って BAL を行った。通常の気管支鏡検査の手順にそって、右中葉の気管支より、生理食塩水 50ml の注入・回収を 3 回行った。各患者は、GM-CSF の吸入治療の前後に、右中葉の同じ気管支から同じ術者により BAL を受けた。BALF は新潟大学医歯学総合病院に送られ解析された。細胞は Wright-Giemsa 染色で観察され 400 個の細胞をカウントして細胞分画を得た。肺胞マクロファージの大きさを評価するため 200 個の肺胞マクロ



ファージの写真が画像解析ソフトウェア Image J (NIH) により解析された。

#### GM-CSF 抗体

BALF および血清中の GM-CSF 抗体はサンドウィッチ ELISA を用いて、先行研究で記載された方法で行われた<sup>(3, 16, 17)</sup>。

#### GM-CSF の中和能

BALF 中の GM-CSF 中和能は GM-CSF 依存性細胞株 TF-1 を用いて、GM-CSF の生物活性を定量化により評価された<sup>(3)</sup>。

#### 全 GM-CSF

BALF 中の全 GM-CSF (すなわち自己抗体結合 GM-CSF+遊離 GM-CSF) の濃度は、新しいサンドウィッチ ELISA で側体した<sup>(18)</sup>。

#### BALF のバイオマーカーの解析

BALF は 94 種類のヒトのマーカーを含む Multi-Analyte Profile (MAP) を用いて解析された (Antigen Immunoassay; 米国 Rules-Based Medicine 社)。この測定方法は、少量の検体で多種類のケモカインおよびサイトカインを同時に定量することが可能である。IL-17 濃度は、Quantikine ヒト IL-17 Immunoassay kit (米国 R&D Systems 社) でも測定された。

#### 統計解析

数値は平均±標準誤差または中央値±4 分位値で示した。高反応群・低反応群での評価項目の比率の差の検定にはカイ 2 乗検定が用いられた。正規分布に沿った分布のデータの比較には対応のある t 検定が用いられた。ノンパラメトリックなデータの比較には Wilcoxon の符号付順位検定が用いられた。群間比較には、対応のない t 検定と Wilcoxon の順位和検定が用いられた。解析は JMP ソフトウェア (Version

8.0.2) を用いて行った。

### C. 研究結果

#### 治療前の患者の臨床プロフィール

本研究で BALF が解析された 19 例の患者の年齢、性別、徴候、喫煙歴、粉塵暴露歴、肺機能、GM-CSF 抗体濃度などの臨床情報については、多施設第 II 相の GM-CSF 吸入治療研究に参加の 39 例の患者と同様であった<sup>(15)</sup>。19 例の徴候、酸素投与状況、6 分間歩行試験、AaDO<sub>2</sub> などの酸素化指標は有意に改善した。LDH、KL-6、CEA などの血清マーカーも有意に改善した一方で、SP-A、SP-D は変化しなかった。19 例の血清 GM-CSF 抗体濃度は治療期間中同様の値であった。これらの結果は、本研究での患者は、先行研究の多施設第 II 相研究<sup>(15)</sup> の患者と同様の背景をもち、GM-CSF 吸入により同様の改善をみたことを示す。

19 例の患者の AaDO<sub>2</sub> 改善の中央値が 13 mmHg であったので、我々は、19 例の患者を AaDO<sub>2</sub> 改善に基づいて高反応群 ( $\Delta$  AaDO<sub>2</sub> > 13 mmHg、n=10) と低反応群 ( $\Delta$  AaDO<sub>2</sub> < 13 mmHg、n=9) の 2 群にわけて治療効果と臨床的な評価項目の相関を調べた。

#### BALF 所見

GM-CSF 吸入治療前後での BAL の回収率の有意差はなかった。GM-CSF 吸入が BALF に与える影響を評価するために、まず、細胞数を調べた。自己免疫性 PAP の BALF 中の無構造の物質の過度の蓄積により、19 例のうち 16 例でのみ治療前の細胞数を評価することができた。全細胞数は治療期間中に増加しなかった。しかし、マクロファージは治療後に全体では有意に増加した ( $p < 0.05$ , n=16) が (表 1)、高反応群では有意の増加はみられなかった (n=8)。治療前の高反応群でのリンパ球と好中球はともに有意に高いが、低反応群では有意差はみられ

項目	治療前		治療後		P 値
	n	Mean ± SE	n	Mean ± SE	
BALF 所見					
150 ml 生食の回収量(ml)	15	92.7 ± 6.1	15	94.8 ± 5.4	0.78 <sup>†</sup>
細胞数(X10 <sup>4</sup> cells/ml)	16	19.1 ± 3.2	17	29.0 ± 4.8	0.098 <sup>†</sup>
マクロファージ(X10 <sup>4</sup> cells/ml)	16	11.3 ± 2.0	17	20.9 ± 3.7	0.029 <sup>†</sup>
リンパ球(X10 <sup>4</sup> cells/ml)	16	6.5 ± 1.5	17	7.6 ± 2.0	0.64 <sup>†</sup>
好中球(X10 <sup>4</sup> cells/ml)	16	0.47 ± 0.12	17	0.44 ± 0.15	0.84 <sup>†</sup>
好酸球(X10 <sup>4</sup> cells/ml)	16	0.039 ± 0.021	17	0.063 ± 0.035	0.54 <sup>†</sup>
マクロファージ値(μm <sup>2</sup> )					
高反応群	6	545 ± 76	6	531 ± 83	0.90 <sup>†</sup>
低反応群	8	555 ± 60	8	715 ± 79	0.13 <sup>†</sup>
GM-CSF(pg/ml)/protein(μg/dl)	19	0.28 ± 0.09	18	0.78 ± 0.65	0.44 <sup>†</sup>

表1: 治療前後のBALF所見

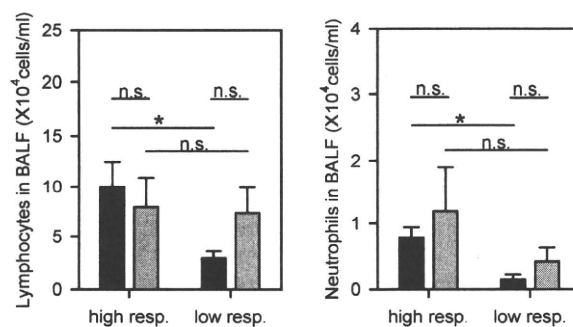


図1: 治療前(黒色)のBALFのリンパ球数と好中球数は、低反応群に比べて高反応群で多かった。

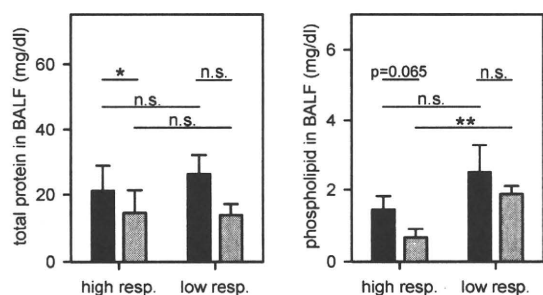


図2: 総蛋白量は高反応群で治療後(灰色)に低下した。リン脂質も治療後低下傾向にあった。

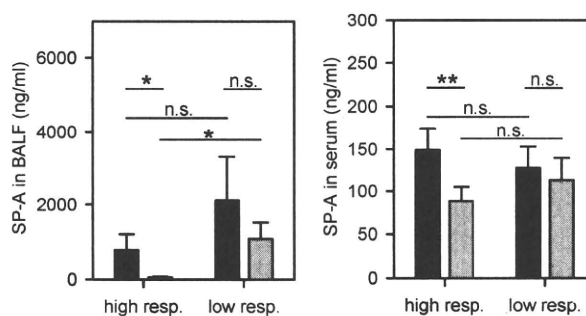


図3: BALF中のSP-Aは高反応群で治療後(灰色)に低下した。血清中のSP-Aも高反応群で治療後に低下した。

なかった(図1)。しかし、好中球とリンパ球は、治療中は変化なかった。好酸球は治療期間中、治療前の値にとどまり、高反応群・低反応群で差はみられなかった。

引き続き、サーファクタント物質の蓄積の状況について、BALF中の総蛋白、リン脂質、SP-Aなどの種々のマーカーの解析を行った。総蛋白は高反応群で有意に減少した(図2)。BALF中のリン脂質は、高反応群で減少する傾向を示したが、低反応群では治療後も高値のままだった(図2)。同様に、SP-Aも治療後、高反応群に比して、低反応群では高値であった(図3)。興味深いことに、SP-AはBALF中では高反応群で治療後優位に減少したのに、血清中では、高反応群・低反応群間で差がみられなかった(図3)。

これらの結果は、サーファクタント蓄積状況を示すマーカーが酸素化の改善と関連していることを示した。

### BALF中のGM-CSF抗体

BALF中のGM-CSF抗体は、治療後、高反応群では有意に減少したが、低反応群では減少しなかった(図4)。低反応群のGM-CSF抗体濃度は、高反応群に比して高いままだった。BALFの総IgGは治療期間中、高反応群・低反応群ともに減少した(図4)。その結果、総IgGに対するGM-CSF抗体の比率は、高反応群では変化せず、低反応群では、この比率は増えた(図5)。注目すべきことに血清中の総IgGに対するGM-CSF抗体の比率は、BALF中と同レベルで、GM-CSF吸入治療中も変化せず、全身の

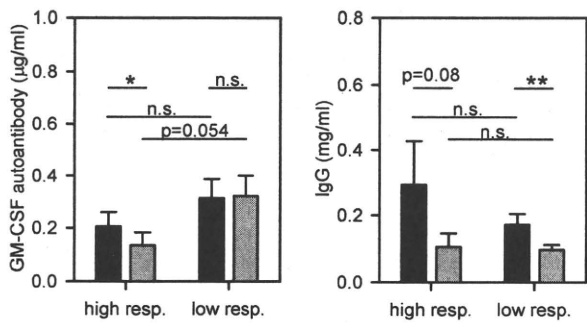


図4: BALF中のGM-CSF抗体濃度は高反応群で治療後(灰色)に低下した。BALF中の総IgG濃度も低下傾向にあった。

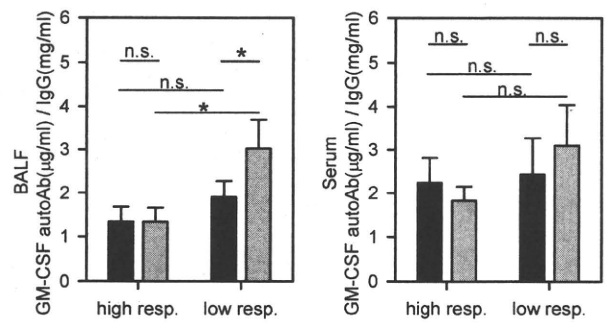


図5: 高反応群のBALF中のGM-CSF抗体/IgG濃度比は治療前後で変化せず、血清中の比率も変わらなかった。

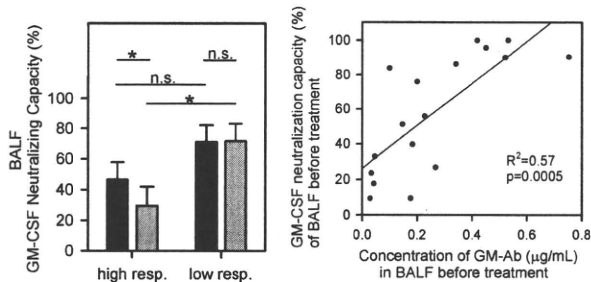


図6: BALF中のGM-CSF中和能の変化も、GM-CSF濃度と同様の变化であり、両者の間には相関がみられた。

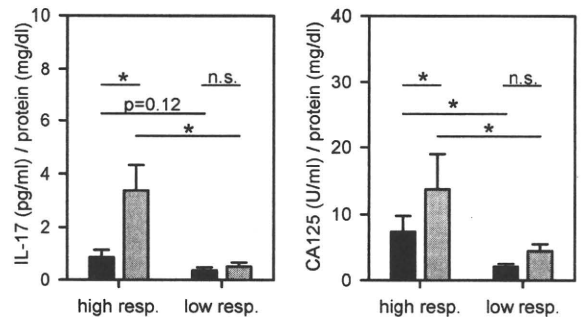


図7: BALF中のIL-17とCA125は、治療前(黒色)高反応群で高い傾向があり、治療後(灰色)有意に増加した。

GM-CSF 抗体の産生とその肺への分布は、GM-CSF 吸入治療によって変化しないことが示された(図5)。これらの所見から、高反応群でのGM-CSF 抗体の減少は、自己抗体の産生の減少によるのではなく、クリアランスの回復の結果によるものと考えられた。

BALF 中の GM-CSF 中和能も治療後、高反応群で減少した(図6)。中和能は、GM-CSF 依存性細胞株を用いて GM-CSF 生物活性の定量により評価したが、GM-CSF 抗体濃度と相関する(図6)ことから、その減少は、BALF 中の GM-CSF 抗体の減少によるものと思われた。

通常、GM-CSF は血清中および組織中では検出できないレベルであるが、これは99%以上が

GM-CSF 抗体と結合して中和されていることによる(18)。我々は、SDS を含む緩衝液で処理して GM-CSF を GM-CSF 抗体から遊離させることで BALF 中の総 GM-CSF (すなわち自己抗体結合 GM-CSF+遊離 GM-CSF) 濃度を調べた。その結果、総 GM-CSF 濃度は GM-CSF 吸入治療中、変化しないことが明らかになった。GM-CSF 濃度は、BALF 中の GM-CSF 抗体濃度に比して相対的に低いことも注目になる。

#### その他のバイオマーカー

BALF 中のサイトカインやケモカインなどの他のマーカーへの GM-CSF 吸入の影響を評価するため、我々は、94 のバイオマーカーについてのマイクロアナライトシステムを用いて、10

例の患者から得られた BALF を用いて、予備的なスクリーニングを行い、GM-CSF 吸入の治療効果を予測しうる候補を得た。さらに種々のアッセイを行ってこの結果を確認した。IL-17 濃度は治療前、高反応群で、低反応群と比して高い傾向があり、治療後は有意に高値となった(図7)。同様に、CA125 濃度も、治療前、高反応群で、低反応群と比して有意に高値で、治療後はさらに増加した(図7)。

#### D. 考察

##### GM-CSF 吸入治療での BALF 解析

本研究は、初めて GM-CSF 吸入治療の前後での肺胞蛋白症患者の BALF 中の GM-CSF 抗体と種々の評価項目の変化を調べたものである。我々は、臨床的な治療効果と、BALF 中の総蛋白、SP-A、IgG など気腔内のサーファクタント物質のマーカーが相関することを示した。

GM-CSF 治療を受けた PAP 患者の BALF についての報告は数少ない。GM-CSF 皮下注射による治療を受けた PAP 患者の 1 例報告では、BALF 中の GM-CSF 抗体が減少したと報告された。しかし、PAP 患者の GM-CSF 皮下注射オープンラベル試験の先行 3 研究のいずれにおいても、BALF 内の GM-CSF 抗体は検討されていない<sup>(19-21)</sup>。GM-CSF 吸入治療についても、小児の症例報告<sup>(22)</sup> や 12 例の後向き研究<sup>(23)</sup> では、BALF 中のマーカーの変化は検討されていない。我々は先行研究として、GM-CSF 吸入治療において改善した 3 例の患者の BALF で GM-CSF 抗体が減少したことを示した<sup>(14)</sup>。

##### GM-CSF 抗体と GM-CSF 吸入治療

本研究で、我々は、BALF 中の IgG に対する GM-CSF 抗体の比率が変化しないことを明らかにした。このことは GM-CSF 抗体の産生が GM-CSF 吸入治療によって変化しないことを示している。これは、GM-CSF 吸入治療中に血清

の GM-CSF 抗体濃度が変化しないことから支持される。これらの所見から、我々は、高反応群での BALF 中の GM-CSF 抗体の減少は、下気道のクリアランスの回復によると結論した。

GM-CSF 吸入治療中、GM-CSF 抗体産生は変化しないが、酸素化指標とクリアランスのマーカーは有意に改善した。酸素化改善の機序を考える上で、吸入 GM-CSF の総量は、GM-CSF 抗体の総量に比して相当に少ないことに注目する必要がある。パリ社の LC プラスネブライザーを用いた場合、吸入した GM-CSF の 10-20% が肺の末梢気腔に到達するとされる(12.5-25mcg/日)<sup>(24)</sup>。自己免疫性 PAP の BALF 中の GM-CSF 抑制活性は、 $24.9 \pm 16.4 \text{ ng/ml}$ <sup>(3)</sup> とされ、これは両肺では 150mcg をこえる GM-CSF に相当すると考えられる。従って、吸入 GM-CSF 量は、PAP 患者の肺内の GM-CSF 抗体すべてを中和できると想定される GM-CSF 量よりはるかに少ないことになる。この点に関して、本研究は、BALF 中の総 GM-CSF 量が、BALF 中の GM-CSF 抗体よりはるかに少ないことを示した。

PAP の病変が、HRCT でのスリガラス影の地図状の分布で示されるように、肺内で不均等に分布していることは注目に値する。この不均一な分布は、肺内での GM-CSF 抗体の不均一な出現による可能性がある。吸入された GM-CSF は、まず、肺内で障害が重い部分より先に、障害の軽い部分に到達し、その部位のマクロファージの機能を改善させる可能性がある。これらのマクロファージの機能の改善が、隣接する部位のクリアランスの改善に貢献する可能性があり、コーン孔のような肺の微小構造がこうした過程を可能にすることも考えられる。

本研究は、BALF 中の IL-17 が、GM-CSF 吸入の臨床効果に関連する可能性を示唆した。この点について、肺胞マクロファージが気管支喘息において IL-17 の分泌源であるとの報告がある<sup>(26)</sup>。この報告は、気管支喘息に関する炎症反応

では、Th17 細胞ではなく、マクロファージが IL-17 を主に産生することを示唆している。GM-CSF 吸入は、マクロファージを刺激して IL-17 の産生を促す可能性があり、これにより、IL-17 がマクロファージ機能のマーカーとして使える可能性がある。リンパ球も肺内の IL-17 のもう一つの分泌源として知られており<sup>(27)</sup>、高反応群の BALF 中では、低反応群に比べ、治療前にリンパ球が多く観察された。さらに、上皮細胞が、肺泡マクロファージの分化と機能を刺激することで間接的にサーファクタント物質の除去に関与している可能性がある。この根拠として、気道上皮細胞で産生される CA125<sup>(28)</sup> が酸素化の改善に関連していたことがあげられる。あるいは、再生中の気管支上皮細胞が、下気道におけるサーファクタント物質の除去に関連しているため、CA125 が治療有効性と関連している可能性も考えられる。

我々のパイロット研究では、GM-CSF 吸入治療後、酸素化の指標は改善し、BALF 中の総細胞数も増加した。貪食能や PU.1 および表面マーカーのマンノース受容体の発現は GM-CSF 吸入治療後、回復した<sup>(14)</sup>。これと対照的に、本研究では、細胞数とくに肺泡マクロファージ数は、高反応群で治療後も変化がなかった。先行研究と本研究の結果の差は、GM-CSF 吸入量が、先行研究 (総量 21mg) に比べて、本研究 (総量 10.5-21mg) では少ないことによる可能性がある。将来、高用量群と低用量群の無作為比較試験を行う際に、マクロファージ機能を評価することは、意義あることと考えられる。

## E. 結論

我々は、GM-CSF 吸入治療により、高反応群の BALF 中で、サーファクタント蓄積のマーカーが減少することを確認した。BALF 中における GM-CSF 抗体の減少は、クリアランスの回復によると考えられる。本研究でのデータは、

GM-CSF 吸入治療による効果の機序の解明に有用であると考えられた。

## 参考文献

1. Rosen SH, Castleman B, Liebow AA. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 1958;258:1123-42.
2. Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, Uchida, Kanegasaki S, Yamada Y, Nakata K. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1999;190:875-80.
3. Uchida K, Nakata K, Trapnell BC, Terakawa T, Hamano E, Mikami A, Matsushita I, Seymour JF, Oh-Eda M, Ishige I, Eishi Y, Kitamura T, Yamada Y, Hanaoka K, Keicho N. High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood.* 2004;103:1089-98.
4. Seymour JF, Presneill JJ. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:215-35.
5. Trapnell BC, Whitsett JA, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 2003;349:2527-39.
6. Ikegami M, Ueda T, Hull W, Whitsett JA, Mulligan RC, Dranoff G, Jobe AH. Surfactant metabolism in transgenic mice after granulocyte macrophage-colony stimulating factor ablation. *Am J Physiol.* 1996;270:L650-58.
7. Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, Dickersin GR, Bachurski CJ, Mark EL, Whitsett JA, Mulligan