

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

GM-CSF自己抗体はどのように造られ、どのように肺に現れ、
またどのように病勢を決定するか？

研究分担者 中田 光、田澤 立之

研究協力者 根井貴仁、金子千夏、元井奈都紀、浦野慎也

新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

研究要旨

私は1999年に特発性肺胞蛋白症の血液及び肺に存在するGM-CSF自己抗体が病因であると唱えた。その後、患者由来の同抗体をサルに静脈注射すると発症することが確認され、仮説が実証された。

A. 研究の背景と目的

①背景

肺胞蛋白症は、肺胞や終末気管支にサーファクタントの老廃物が貯留し、呼吸不全が進行する希少疾患である。長年原因が不明であったが、申請者は、肺胞蛋白症の患者の肺や血清中に抗GM-CSF自己抗体が高濃度に存在することを発見し(*J. Exp. Med.*1999)、血清診断法を開発した(*Am. J. Respir. Med. Crit. Care Med.*,2000, 特許4372904号)。

GM-CSF やその受容体欠損マウスが肺胞蛋白症を発症することや、同症の自己抗体の質的量的研究 (申請者ら、*BLOOD*,2004)から、自己抗体が肺のGM-CSF活性を中和し、肺胞マクロファージの分化を障害することが病因であり自己免疫性肺胞蛋白症と呼ぶことを提唱してきた(申請者ら、*New Engl.J.Med.* 2003)。最近、米国のグループがカナクイザルに患者自己抗体を投与し、発症させることに成功し、自己抗体説を裏付けた。残された最大の課題は、『何故、患者で抗GM-CSF自己抗体の過剰産生が起こるのか？』であるが、これまでに以下のことが明らかとなっている。

① 223例の疫学研究から、家系内発症がなく、

他の自己免疫疾患との合併や他の自己抗体の出現がほとんどない(申請者ら、*Am. J. Respir. Med. Crit. Care Med.*,2008)。

② 患者の抗GM-CSF自己抗体は、GM-CSF分子上の様々なエピトープと強く結合することから、抗原は、GM-CSFそのものである(申請者ら、*BLOOD*,2004)。

③ 抗GM-CSF自己抗体には、量的には少ないが、IgG型以外にIgM型抗体も存在しており、GM-CSFに対する結合力や中和能や特異性はIgG型に比べて著しく低く、クラススイッチを経る前のプロトタイプ抗体が血中に出てきていると思われる(申請者ら、投稿中)。

②目的

患者の抗GM-CSF自己抗体はGM-CSF上の複数のエピトープを認識しているポリクローナル抗体であり、非常にavidityが強いことがわかっている(申請者ら、*BLOOD*, 2004)。血中リンパ球をEB virusで刺激して、ELISPOT assayを用いて抗体産生細胞を検出したところ、IgM型GM-CSF自己抗体を産生しうるB細胞クローンが健常者

と患者間で同頻度に存在しているが、IgG型同抗体を産生しうるB細胞クローンは患者で特に増加していることを見いだした。また、後述するように抗体可変領域の遺伝子配列の予備的検討から、GM-CSF自己抗体を産生するB細胞の抗体遺伝子重鎖の体細胞変異は、健常者に比べて亢進していることが示唆された。以上のことから、次の様な仮説を立てた。

仮説

低親和性のIgM型GM-CSF自己抗体を表面受容体にもつnaive B細胞は、患者でも健常者でも同頻度に存在するが、患者ではこの細胞が濾胞中心に入り、繰り返し抗原刺激を受けることにより、体細胞突然変異が高頻度に起こり、クラススイッチを経て、親和性の高いIgG抗体を産生するB細胞が増加する。

主要研究目的

上記仮説を証明するために、本研究では次世代型シーケンサーの活用によりGM-CSF自己抗体を受容体にもつB細胞の抗体H鎖、L鎖可変領域のDNA配列解析から、利用レパトアのプロファイリングと体突然変異の頻度を患者と健常者の間で比較し、親和性の高いIgG抗体が産生される機構を解明する。

副次研究目的

30～40名の患者の抗GM-CSF自己抗体可変部遺伝子配列変異の頻度と部位のデータ、及び抗体濃度、患者重症度（動脈血の酸素分圧）、臨床情報を含めたデータベースを作成し、多変量解析により重症度と抗体可変部遺伝子情報との相関性を検討する。

B. 研究方法と結果

【方法】

多数の患者が新潟大学病院及び分担施設の近

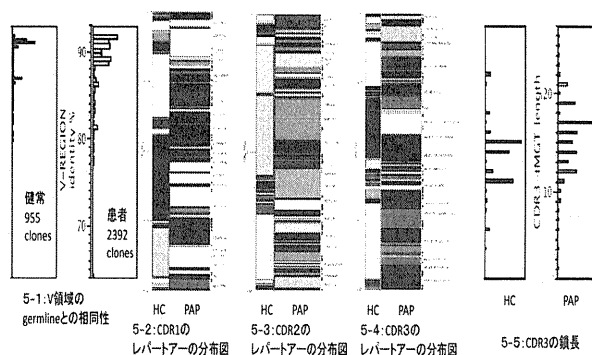


図5: 患者と健常者の抗体重鎖の次世代シーケンス解析結果 (IMGTソフト使用)

畿中央胸部疾患センターに通院しており、連絡も密で検体提供の面で研究協力が得られやすい。患者5人、健常者5人より、末梢血20mlを採取し、以下のステップを経て膜結合型GM-CSF自己抗体陽性B細胞のH鎖-IgG、-IgM及びL鎖のcDNA-PCR ampliconを得る。

1. 単核球 1×10^7 cells を biotin-GM-CSF と反応させる。
2. streptavidin-MACS beads(磁気ビーズ)と反応させる。
3. MACS midi column により、GM-CSF に結合した細胞をソートする。
4. FACS で細胞表面マーカーを確認。通常 98% が単球であり、2% が CD19 陽性のB細胞である。
5. RNA 抽出。吸光度で純度、濃度を測定。
6. 直ちに、cDNA 生成。定量
7. 図5に示した個人識別コードを含む primer を用いてPCRを行う。
8. PCR amplicon をアガロースゲル電気泳動し、バンド切り出し、forward、reverse primer によりシーケンスを行い、抗体可変部の遺伝子が取れているかを確認。
9. 患者、健常者の PCR amplicon の濃度を測り、等モルずつ混合する。次世代シーケンスは次の手順で実施する。

- ① single-stranded template DNA library の

作製

② ①の library の emulsion-based クローン増幅 ③得られたクローンのシーケンス ④複数の bioinformatics tools によるシーケンスデータの解析 ⑤さらに④の元データを抗体解析ソフト (international ImMunoGeneTics information system)により解析する。

【結果】

末梢血単核球より memory B 細胞を純化し、単球とともに EB virus 感染させ、IgM 型及び IgG 型抗 GM-CSF 自己抗体産生 memory B 細胞を ELISA 法、ELISPOT 法により検出した。それによると、IgM 型クローンは、健常者と患者で同程度の頻度で存在するが、IgG 型クローンは、圧倒的に多く患者に存在した (図 3)。以上から、患者では、抗原刺激が繰り返され、class switch が亢進していると考えられる。患者末梢血 T 細胞のサブクラスを健常と比較したところ、Treg の減少が見られた(図 4 A, B)。患者では、Treg による自己抗体産生抑制が解除されている可能性がある。

1. 次世代型シーケンサーを用いた抗 GM-CSF 自己抗体産生 B 細胞 H 鎖の可変部の変異解析を予備的に行った。健常者 1 名、患者 1 名から末梢血単核球を得て、biotin 化 GM-CSF を用いて、膜型抗 GM-CSF 自己抗体陽性の B 細胞を含む細胞の cDNA を生成し、個人識別のためのバーコード配列を含むプライマーを用いて抗体 H 鎖可変部の PCR amplicon(350~400bp)を得た。次世代シーケンスシステム(GS FLX and GS Junior Systems, Rosche)により、合計 6 万クローンの遺伝子配列を得て、得られた塩基配列の生データを THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM® に入力し、抗体重鎖可変部各領域のレパートアー分類を行った。V 領域の germ line からの相同性が低いクローン (memory B cell を想

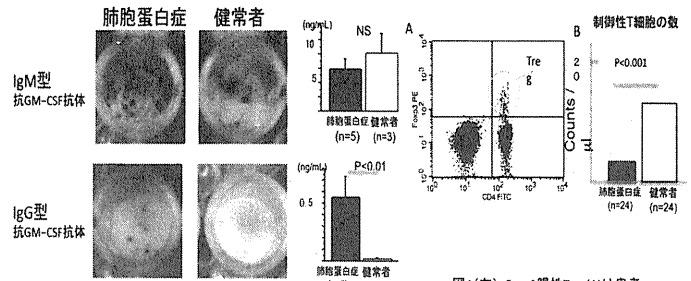


図3(上): EBV transformしたmemory B cell(1x10⁶/well)から産生される IgM型(上段)とIgG型抗GM-CSF抗体。ELISPOT法(左)、ELISA法(右) IgM型抗体産生クローンは患者と健常者に差がないが、IgG型抗体産生クローンは患者に圧倒的に多い。

図4(左): Foxp3陽性Treg(A)は患者末梢血で有意に減少している(B)。患者末梢血T細胞は、GM-CSFに反応して増殖する(C)。

定) を解析したところ、図 5 のように、患者では germ line sequence との相同性が低いクローンが健常者に比べて頻度が増え(5-1)、可変部の CDR1,2,3 領域のレパートアーの variety が増し(5-2,3,4)、かつ CDR3 領域に insertion 配列が入る(5-5)ことにより、鎖長が長くなることが確認された。

C. 健康危険情報

特記すべきことはありません。

D. 研究発表

論文

1. 中田光. リンパ脈管筋腫症(LAM)の新展開 大規模臨床試験の現状と展望. 呼吸と循環 Vol.58 No.12 2010. P.1233-1240
2. Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y, Tazawa R, (8 人略) Nakata K, Morimoto K. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J. Med. Genetics*,2010.
3. Ishii H, Tazawa R(10 人略),Nakata K. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis: pre-mortem cases in Japan. *European Respir. J.*, in press
4. Watanabe M, Uchida K, Nakagaki K, Trapnell BC, Nakata K(corresponding author) High avidity cytokine autoantibodies in health and

disease: Pathogenesis and Mechanisms.

Cytokine & Growth Factor Reviews. 2010, 21:263-273

5. Sakagami T,(6 人略) Nakata K, (5 人略), Trapnell BC. Patient-derived GM-CSF Autoantibodies Reproduce Pulmonary Alveolar Proteinosis in Non-human Primates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 182(1):49-61
6. 中田光, 田澤立之. 稀少疾患をどう克服するか? -国際コンソーシアムの試み-. THE LUNG perspectives 別冊 Vol.18 No.2 2010. P.129-132
7. Costabel U, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis associated with dust inhalation: not secondary but autoimmune? *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 181(5):427-8
8. Tazawa R, Trapnell BC, (23 人略), Nakata K(corresponding author). Inhaled Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor as Therapy of Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 181(12):1345-54
9. Urano S, (8 人略), Nakata K(corresponding author). A cell free assay to estimate the neutralizing capacity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies. *J Immunol. Methods* 2010, 360(1-2):141-8

著書

1. 垣下榮三, (34 人略) 中田光, (72 人略) 吉矢和久. T. 肺胞タンパク症, 疾病と治療 I, 南江堂, 2010, 96
2. Trapnell BC, Nakata K, Kavuru M, Pulmonary Alveolar Proteinosis, Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine, 2010, 63, 1516-36
3. 安保徹, (18 人略) 中田光, (5 人略) 渡辺雅

人. 病態のしくみがわかる免疫学. 8. 肺疾患 P.176-18. 株式会社 医学書院. 2010 年 10 月

4. 藤田次郎, 久保恵嗣, (69 人略) 中田光, (3 人略) 岸本卓巳. 間質性肺疾患 診療マニュアル. IV 間質性肺疾患の病態と治療マニュアル E. 肉芽腫形成性疾患・その他の間質性肺疾 6, 肺胞蛋白症 (PAP) P.309-311. 株式会社 南江堂. 2010 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

自己免疫性肺胞蛋白症における自己抗体の疾患特異性と、
Molgramostimの効果に関する研究

研究分担者 山口悦郎 愛知医科大学呼吸器・アレルギー内科 教授

研究要旨

血清の抗 GM-CSF IgG 抗体は、低いながらも種々の呼吸器疾患、特に塵肺と間質性肺炎患者で上昇している。その臨床的意義は今後の課題である。大腸菌由来ヒト遺伝子組み換え GM-CSF である Molgramostim は、自己免疫性肺胞蛋白症において、毎日 1 回 150 μ g の連日吸入により、Sargramostim とほぼ同等な効果を示すことが示唆された。

A. 研究目的

研究 1：自己免疫性肺胞蛋白症(APAP)で、中核的所見である血清抗 GM-CSF 抗体濃度上昇の、疾患特異性を検討するために、塵はじめとした種々の呼吸器疾患で検討すること。

研究 2：大腸菌由来遺伝子組み換えヒト GM-CSF 製剤であり、安価に入手できる Molgramostim (Amoytop Biotech, Xiamen) を、APAP 患者に対して固定用量で 24 週間連日吸入した際の効果について検討すること。

B. 研究方法

研究 1：血清の抗 GM-CSF IgG 抗体濃度は、中田らの方法にならい、ELISA 法により測定した。測定された抗体濃度の GM-CSF 特異性を確かめるために、競合的阻止試験を行った。

研究 2：増悪中あるいは改善のない 4 名の APAP 患者で、1 日 1 回 150 μ g の Molgramostim (Topleucon®)を PARI 社の LC ネブライザーを用いて 24 週間吸入させた。主要評価項目は以前の試験同様に、吸入前後の A-a DO₂ の変化で、10 Torr 以上の改善を有効とした。

(倫理面への配慮)

両研究とも本学の倫理委員会で承認されている。

研究 1：受付番号 11-037

研究 2：受付番号 11-002

C. 研究結果

研究 1：健常者と比較して血清抗 GM-CSF IgG 抗体濃度は塵肺、間質性肺炎、サルコイドーシス、自己免疫性肺胞蛋白症で有意に高値であった。APAP と時に鑑別が必要な塵肺、間質性肺炎、サルコイドーシス、肺抗酸菌症を対照とした ROC 解析を行うと、cut off 値 5.8×10^6 AU (人為単位) で、APAP とそれらの疾患を鑑別する上での感度は 97%、特異度は 99%であった。

競合的阻止試験では概ね 10^6 AU 以上の試料で、ELISA における吸光度の低下が観察された。

研究 2：主要評価項目に関して、4 名中 2 名で有効と判定された。VC は 2 名で、DLco、MRC grade、KL-6 濃度は 3 名で改善した。CT score は軽度改善を含めると、すべての患者で改善した。

D. 考察

研究 1：塵肺患者をはじめ、間質性肺炎、サル

コイドーシスといった他の炎症性肺疾患においても、低いながら抗体濃度の上昇があり、何らかの機序で病態と関連している可能性がある。

一方 APAP では著明に抗体濃度が上昇しているので、他の肺疾患との鑑別のための至適 cut off 値を設定することは容易である。今後診断キット等を開発する上では有利に働くであろう。

研究 2：APAP に対する吸入療法は Sargramostim を使用することが多かったが、今回使用した Molgramostim も同様に有効であることが示唆された。当面は自由診療に際して、有用な製剤と位置付けられる。また固定用量を毎日継続吸入するという分かりやすい吸入方法は、その普及を促進すると考えられる。今後は用量相関の検討を踏まえて、より速やかに効果が発現しかつ副作用のない吸入方法の探索が必要であろう。

E. 結論

研究 1：今後 GM-CSF に限らず種々のサイトカインやケモカインを含む免疫活性物質に対する自己抗体が見いだされる可能性があり、広範な炎症性、感染性肺疾患の病態の理解が新しい視点で進むことが期待される。

研究 2：4 名という少数例の検討であるが、固定用量の Molgramostim 吸入は、APAP に対して Sargramostim の変動用量吸入とほぼ同等の効果を発揮することが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Levels of autoantibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) are elevated in the sera of pneumoconiosis patients. Takahashi A, Yamaguchi E, et al., Second Joint Meeting of WASOG and the International Conference on BAL. June 16, 2011, Maastricht, The Netherlands.
2. GM-CSF 吸入療法を施行した自己免疫性肺胞蛋白症 4 例の検討. 高橋 歩, 山口悦郎 他. 第 100 回日本呼吸器学会東海地方会, 2011 年 10 月 29 日, 浜松市
3. サルコイドーシスにおける血清抗 GM-CSF IgG 自己抗体濃度の検討. 高橋 歩, 山口悦郎 他. 第 31 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 2011 年 10 月 21 日, 名古屋市

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
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

本邦における自己免疫性肺胞蛋白症に対する全肺洗浄に関するアンケート調査

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

アンケート用紙を郵送した 211 施設中 86 施設から回答があり、APAP 352 症例（71 施設）のうち 80 症例（34 施設）に WLL が施行されていた。WLL を選択した理由は、呼吸不全の進行（13 施設）、他の治療が無効（6 施設）、広範囲な病変（5 施設）などであり、標準的な基準はなかった。WLL を施行した症例数別施設数は、1 症例が 19 施設、2 症例が 8 施設であり、約 80%の施設が 2 症例以下であった。初回 WLL 施行前の大気下 PaO₂ は 61.7±12.5Torr で、気管挿管 100% O₂ 換気時 PaO₂ は 298.9±121.8Torr であり、ECMO は 10 施設、21 症例に使用されていたが、標準的な使用基準はなかった。気管挿管チューブは 85.3%の施設が左用ダブルルーメンチューブを使用し、洗浄時体位は洗浄肺を下にした側臥位(52.9%)、仰臥位(32.3%)であった。洗浄液は 67.6%の施設が生食単独であり、Degassing は 41.2%の施設で施行されていた。洗浄液は 61.8%の施設が容量規定法で、26.5%の施設が圧規定法で注入され、バイブレーションは 76.5%の施設で施行されていた。WLL214 回において、低酸素血症で 6 回、非洗浄肺への洗浄液のリークにより 5 回中止され、WLL 術後に心不全 4 回、水胸 2 回などの合併症を認めた。

A. 研究目的

全身麻酔下全肺洗浄 (whole lung lavage: WLL) は、肺胞蛋白症(pulmonary alveolar proteinosis: PAP)に対する標準的治療法の一つである。

WLL の方法に関する報告は、1967 年に Ramrez-R¹⁾ が massive pulmonary lavage 法を発表し、1970 年代に WLL 中の低酸素血症を防止するために、Rogers らは degassing をせずに洗浄液を注入する方法²⁾ と volume controlled lavaged 法³⁾ を発表し、また Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) を併用する WLL 法⁴⁾ が報告された。しかし、今日においても PAP 症例が少ないために、標準的な WLL 法が確立していないのが現状である。

今回、我々は PAP に対する WLL 法のガイドラインを作成する目的で、本邦における WLL の実態を明らかにするため WLL 法に関するアンケート調査を行った。

B. 研究方法

WLL 手技が基礎疾患によって影響を受けることを考慮して二次性 PAP を除外し、自己免疫性肺胞蛋白症 (autoimmune pulmonary alveolar proteinosis: APAP) のみを対象とした。

APAP の大規模コホート研究⁵⁾に参加した 214 施設(該当者不在であった 3 施設から返送)にアンケート用紙を発送して 86 施設から回答があり、その結果を解析した。

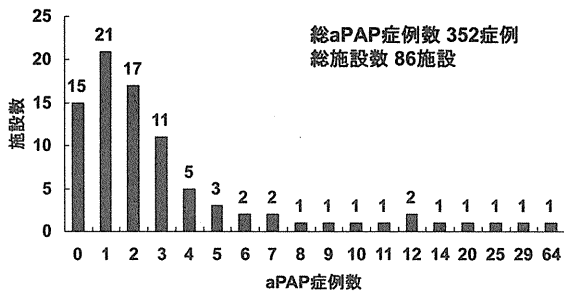


図1 APAP 症例数別施設数

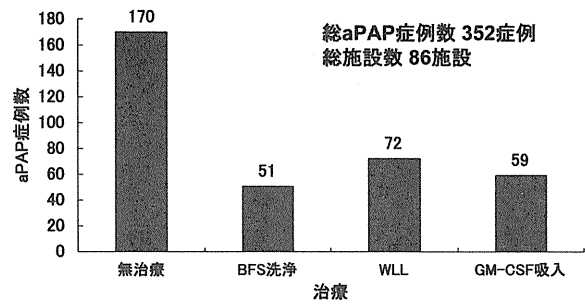


図2 初回治療別症例数

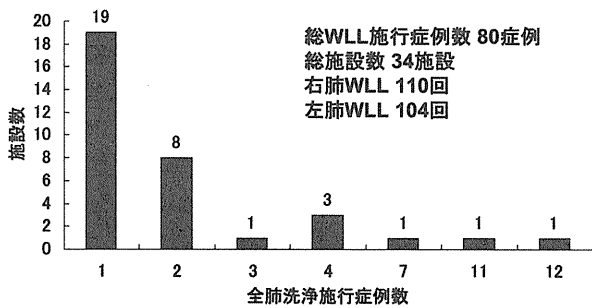


図3 WLL 施行した症例数別の施設数

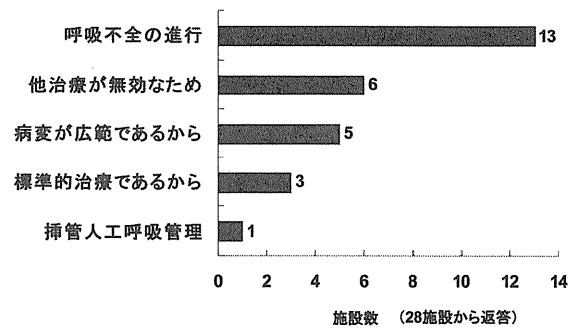


図4 WLL を施行した理由

C. 研究結果

①APAP 症例数、WLL 施行症例数と回数

APAP 症例数は、15 施設は APAP の診療経験がなく 71 施設で 352 症例が診療され、そのうち 1~2 症例の施設が 53.5%を占めていた。WLL は 80 症例 (34 施設) に対して右肺 WLL が 110 回、左肺 WLL が 107 回施行されていた(図 1)。

②初回治療の内訳

APAP 352 症例のうち 170 症例が無治療で経過観察され、51 症例が気管支鏡(BFS)による区域洗浄、72 症例が WLL、59 症例が GM-CSF 吸入療法が施行されていた(図 2)。

③WLL 施行した症例数別の施設数

初回治療として WLL が施行された 72 症例の

他に、BFS による区域洗浄および GM-CSF 吸入療法が無効であった 8 症例に対して WLL が施行され、34 施設で合計 80 症例に WLL が施行されていた。

WLL を施行した症例数別の施設数は、1 症例 19、2 症例 8、3 症例 1、4 症例 3、7 症例 1、11 症例 1、12 症例 1 施設であった。WLL を施行した症例数が 1~2 症例であった施設が、79.4%を占めていた。また、左右肺別の WLL 回数は、右肺が 110 回、左肺 104 回であった(図 3)。

④WLL を施行した理由

WLL が施行された 34 施設のうち 28 施設から回答があり、呼吸不全の進行 (13 施設)、他の治療が無効 (6 施設)、広範囲な病変 (5 施設)、WLL が標準的治療との認識 (3 施設)、挿管人工

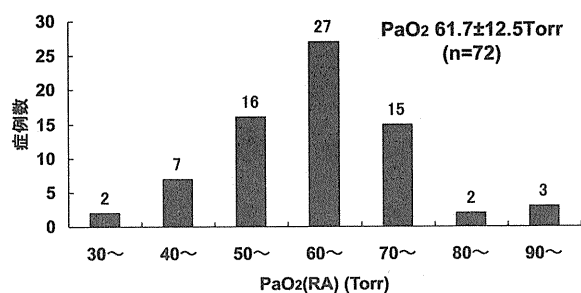


図5 初回 WLL 施行前の大気下 PaO₂

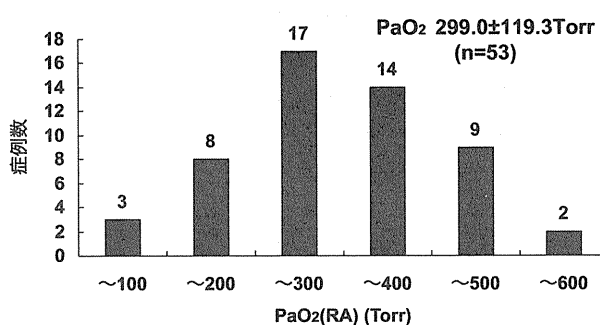


図6 初回 WLL 施行前の挿管 100% O₂ 換気時 PaO₂

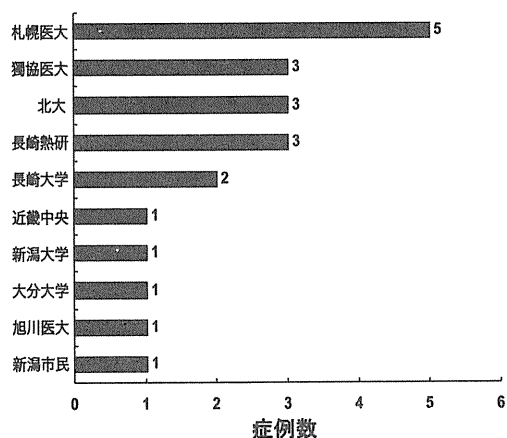


図7 ECMO 併用 WLL を施行した施設別症例数

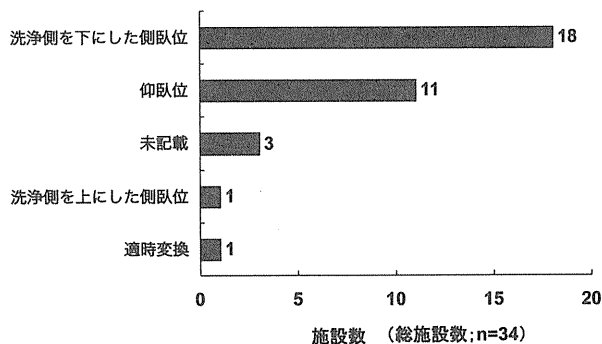


図8 洗浄時体位別施設数

呼吸管理中 (1 施設) との理由により WLL が施行されていたが、WLL を選択した標準的基準は認めなかった(図4)。

⑤初回 WLL 施行前の PaO₂

初回 WLL 施行前の大気下平均 PaO₂ は、61.7±12.5Torr (72 症例) で、PaO₂ が 60~70Torr が 27 症例で最も多かった。また、気管内挿管下の 100% O₂ 換気時 PaO₂ は、平均 298.9±121.8 Torr (53 症例) で、PaO₂ が 200~300Torr が 17 症例で最も多かった(図5、6)。

⑥ECMO の併用

ECMO は、10 施設で 21 症例に使用されていた。ECMO 使用の基準は、2 施設が挿管下 100%O₂ 換気時の PaO₂<100Torr、1 施設は大気下 PaO₂<70Torr などであり、施設によって異なり標準的な基準はなかった(図7)。

⑦気管挿管チューブ

34 施設中 29 施設が左用ダブルルーメンチューブを使用し、右用ダブルルーメンチューブ・ダブルルーメンチューブ (左右不明) ・9F 気管チューブが各 1 施設で、2 施設が未記載であった。

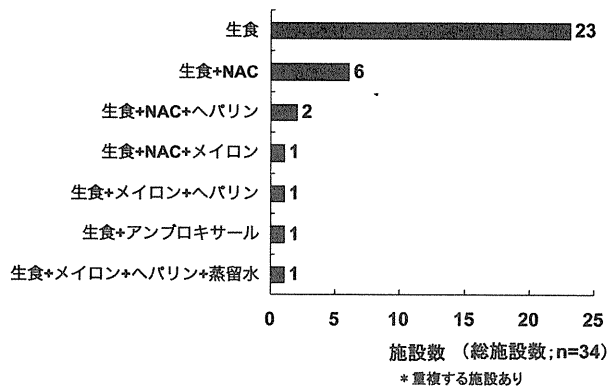


図9 洗浄液別施設数

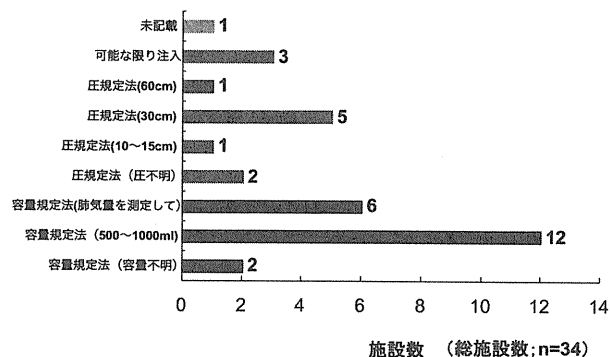


図10 洗浄液注入法別施設数

⑧洗浄時体位

34 施設のうち 18 施設が洗浄肺を下にした側臥位、11 施設が仰臥位、1 施設が洗浄肺を上にした側臥位、1 施設が WLL 時に体位を随意時変換し、3 施設が未記載であった(図 8)。

⑨洗浄液

34 施設のうち 23 施設が生食のみ、6 施設が生食+NAC、2 施設が生食+NAC+ヘパリン、その他が各 1 施設であった。なお、全施設とも洗浄液を加温していた(図 9)。

⑩Degassing

34 施設のうち 17 施設は Degassing を施行せず、14 施設は Degassing を施行し、3 施設は未記載であった。

⑪洗浄液注入法

34 施設のうち 21 施設が、容量規定法により注入量を決定していた。6 施設は肺気量を測定して注入量を決定し、12 施設は 500~1000ml 注入し、2 施設は注入量に関する記載はなかった。

一方、9 施設が圧規定法により、注入量を決定していた。注入する高さは 30cm が 5 施設で最も多く、60cm が 1 施設、10~15cm が 1 施設

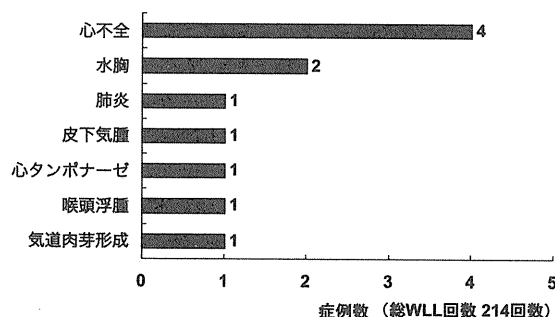


図11 WLL 合併症

で、2 施設は圧に関する記載はなかった。

その他の 3 施設は可能な限り洗浄液を注入し、1 施設は洗浄液注入法に関する記載はなかった(図 10)。

⑫バイブレーション

34 施設のうち 25 施設がバイブレーター、1 施設は用手法 26 施設でバイブレーションが施行され、6 施設は施行せず、2 施設が未記載であった。

⑬WLL 中止理由

合計 214 回の WLL において、低酸素血症で 6 回、非洗浄肺への洗浄液のリークにより、WLL

が5回中止された。

⑭WLL 術後併発・合併症

合計214回のWLLにおいて、心不全4回、水胸2回、肺炎・皮下気腫・心タンポナーゼ・喉頭浮腫・気道肉芽腫が各1回ずつ認められた(図11)。

D. 考察

APAP 352 症例において、72 症例が初回治療として、8 症例が BFS による区域洗浄と GM-CSF 吸入量法が無効であったため、合計 80 症例に対して 34 施設で WLL が施行 (右肺 110 回、左肺 107 回) されていた。34 施設のうち 27 施設 (79.4%) は WLL 施行した APAP 症例数が 1~2 症例であり、WLL を未経験ないし経験不足な状況下で施行したことが推察された。そのため、未経験ないし経験不足の医療機関でも、安全かつ効率的な WLL を施行するためのガイドラインの作成が必要と考えられた。

WLL の適応基準は、Kavura ら⁶⁾ は a) 日常生活が支障をきたす呼吸困難、b) 大気下の $\text{PaO}_2 < 60 \text{ Torr}$ 、c) 生理学的シャント率 $> 10 \sim 12\%$ とし、Michaud ら⁷⁾ は、a) 高度な呼吸困難、b) $\text{PaO}_2 \leq 65 \text{ mmHg}$ 、c) $\text{AaDO}_2 \geq 40 \text{ mmHg}$ または生理学的シャント率 $> 10 \sim 12\%$ と報告している。今回のアンケートの調査において、初回 WLL 施行前の大気下の平均 PaO_2 は $61.7 \pm 12.5 \text{ Torr}$ (72 症例) であり、 $60 \sim 70 \text{ Torr}$ が 27 症例で最も多かった。しかし、 PaO_2 は $30 \sim 90 \text{ Torr}$ 台に幅広く分布し、20 症例 (27.8%) は $\text{PaO}_2 \geq 70 \text{ mmHg}$ であり、今回のアンケートの調査において、WLL 適応基準となるような PaO_2 値は示唆されなかった。

WLL の各手技と器具については、挿管チューブは 29 施設 (85.3%) が左用ダブルルーメンチューブを使用しており、施設間での差異は認めなかった。洗浄時体位は、18 施設 (52.9%) が非洗浄肺への洗浄液のリークを防止するために

洗浄肺を下にした側臥位、11 施設 (32.3%) が体位変換時の挿管チューブの位置がずれることを避けるために仰臥位で WLL が施行されていた。

洗浄液は 23 施設 (67.6%) が生食のみ、6 施設 (17.6%) が生食+NAC で、生食のみでも十分な洗浄効果が得られると考える施設が多く、また全施設とも洗浄液を約体温に加温していた。

degassing は洗浄肺を吸収性無気肺として洗浄効率を高める手技であるが、シャント効果の増加による高度な低酸素血症と、吸収性無気肺によりチューブの位置がずれる可能性がある。100% O_2 換気後に安静時酸素摂取量 (約 250 ml/min) の 50%以下 (片側肺洗浄のため) の速度で洗浄液を注入すると、air pocket を発生せずに洗浄液を注入することが可能である²⁾。

洗浄液注入量は、21 施設 (61.8%) が容量規定法により注入量を決定し、そのうち 6 施設は肺気量を測定して注入量を決定し、12 施設は $500 \sim 1000 \text{ ml}$ 注入しており一定の基準はなかった。一方、9 施設 (26.5%) が圧規定法により注入量を決定し、注入する高さは 30 cm が 5 施設で最も多かった。また、3 施設 (8.8%) は可能な限り洗浄液を注入しており、洗浄液の過剰投与による水胸発生のリスクに対する意識が少ない施設も存在した。

洗浄効果を高めるバイブレーションは、25 施設 (73.5%) がバイブレーター、1 施設は用手法で施行されていた。

ECMO の使用基準としては、Claypool ら⁸⁾ は両側肺 100% O_2 換気時の PaO_2 が 100 Torr 以下と報告している。この報告は 1984 年になされており、現在は ECMO が当時より ECMO が普及しているため、より緩い基準で使用される傾向がある。

214 回の WLL において、低酸素血症で 6 回、非洗浄肺への洗浄液のリークにより 5 回中止された。また、WLL 術後の合併症としては、心不全 4 回、水胸 2 回、肺炎・皮下気腫・心タンポ

ナーゼ・喉頭浮腫・気道肉芽腫が各 1 回ずつ認められた。しかし、死亡した症例は認めず、各施設によって WLL 手技は多様であったが、モニタリング、薬剤や機器などの向上により、比較的 safely WLL が施行されていることが示唆されたが、各施設、症例の洗浄効率については不明である。

E. 結論

211 施設にアンケートを送付し、34 施設で APAP80 症例に対して左右別 WLL が 217 回施行されていた。34 施設のうち、1 症例 19 施設、2 症例 8 施設と 2 症例以下の施設が約 80% を占めていた。WLL 方法は、29/32 施設で左用ダブルルーメンチューブが使用されていたが、ECMO 使用基準・Degassing 有無・洗浄時の体位・洗浄液・注入方法は施設によって多様であった。

本邦における WLL ガイドライン作成には WLL を施行した個々の症例の患者背景によって WLL の手技が影響を受けることが予想されるため、患者背景や各医療機関の設備などを含み、二次調査が必要と思われる。

参考文献

1. Ramires-R J. Pulmonary Alveolar Proteinosis, Treatment by massive bronchopulmonary lavage. Arch Intern Med 1967 ; 119 : 147-156.
2. Rogers RM, Tatum KR. A "New" Approach to old problems. Med Clin North Amer 1970 ; 53 : 755-771.
3. Rogers RM, Szindon JP, Shelburne J, et al. Hemodynamics response of the pulmonary circulation to bronchopulmonary lavage in man. New Engl J Med 1972 ; 286 : 1230-1233.
4. Altose MD, Hicks RE, Edwards MW. Extracorporeal membrane oxygenation during Bronchopulmonary lavage. Arch Surg 1976 ; 111 : 1148-1153.
5. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, et al. Characteristics of a large cohort of patient with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. Am J Respi Crit Care Med 2008 ; 177 : 752-762.
6. Ioachimescu OC, Kavura MS. Pulmonary alveolar proteinosis. Chron Respir Dis 2006 ; 3 : 149-159.
7. Michaud G, Reddy C, Ernst A. Whole-lung lavage for pulmonary alveolar proteinosis. CHEST 2009 ; 136 : 1678-1681.
8. Claypool WD, Rogers RM, Matuschak GM. Update on the clinical diagnosis, management, and pathogenesis of pulmonary alveolar proteinosis (phospholipidosis). Chest 1984 ; 85 : 550-558.

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 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

重症自己免疫性肺胞蛋白症患者における
全肺洗浄・GM-CSF吸入療法併用の有用性

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学
研究協力者 大河内真也 東北大学病院呼吸器内科
田澤 立之 新潟大学医歯学総合病院 生命科学医療センター
赤坂 圭一 獨協医科大学越谷病院呼吸器内科
一和多俊男 東京医科大学八王子医療センター

研究要旨

当初 GM-CSF 吸入療法に抵抗性であったが、全肺洗浄試行後に GM-CSF 吸入療法が著効した自己免疫性肺胞蛋白症(APAP)症例を経験した。本症例の呈示を通して全肺洗浄・GM-CSF 吸入療法併用が APAP の治療成績を改善させ得る可能性について考察する。

A. 研究目的

本邦における自己免疫性肺胞蛋白症(APAP)に対する GM-CSF 吸入療法の標準的治療期間は 24 週間であるが、この間に十分な寛解を得られない場合も GM-CSF 吸入療法を延長することで、多くの場合は寛解導入できることを今年の班会議で報告した。しかしながら、その後、GM-CSF 吸入療法継続中に、APAP が急速に増悪し全肺洗浄を施行せざるを得なかった症例を 2 例経験した。興味深いことに、全肺洗浄後に残存した陰影に対して追加した GM-CSF 吸入療法が奏功した。本研究班の活動を通して、APAP に対する GM-CSF 吸入療法の有効性は確立されつつあると考えるが、本症例の呈示を通して全肺洗浄・GM-CSF 吸入療法併用が APAP の治療成績をさらに改善させ得る可能性について考察することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

症例報告

C. 研究結果

1 例目は 45 歳男性である。2007 年 4 月より咳嗽、喀痰、健診で異常を指摘されたことより総合病院受診。気管支鏡・画像所見と血清・BAL の抗 GM-CSF 抗体陽性より自己免疫性肺胞たんぱく症と診断された。2007 年 10 月より GM-CSF 吸入療法に参加。酸素化は改善するも画像所見に十分な変化を認めなかった。2010 年 3 月ごろより陰影の増悪および咳嗽の急激な増悪があり 2010 年 7 月に独協医大越谷病院に転院。全肺洗浄を行った。咳嗽は著明に改善したが画像上陰影は残存した。本人の希望より 2011 年 2 月から GM-CSF 療法を開始したところ陰影の著明な改善を見た。

2 例目は 65 歳男性である。2009 年 1 月ごろより咳嗽が出現し総合病院受診。気管支鏡・画像所見と血清 GM-CSF 抗体陽性より自己免疫性肺胞蛋白症と診断される。徐々に悪化するため当院に紹介となり、2010 年 6 月 GM-CSF 吸入開始（24 週）。いったん軽快するも再度悪化。

2011年6月から2回目のGM-CSF吸入再開するも増悪止まらず10週で中止。2011年10月4日に獨協医大越谷病院に転院、全肺洗浄を施行し軽快するも、再度悪化の兆しあり11月28日GM-CSF吸入療法再開。1週間で陰影の改善を見た。今後もGM-CSF吸入療法を継続し観察する予定である。

以上、肺胞洗浄後にGM-CSF吸入療法への反応性が改善した2例を経験した。

D. 考察

全肺洗浄後に残存した陰影に対して追加したGM-CSF吸入療法が奏功した理由は不明だが、全肺洗浄後に肺胞内貯留物が減少したことにより、肺胞内マクロファージへのGM-CSF到達効率が改善されたためではないかと考えている。

以上より、APAP重症例に対する早期全肺洗浄とそれに続くGM-CSF吸入療法併用の有用性が示唆された。

E. 結論

本研究班の研究などを通して、APAPに対するGM-CSF吸入療法の有効性は確立されつつあると考えるが、今後はさらなる治療成績向上のため、より効果的なGM-CSF吸入療法プロトコルの創出や、全肺洗浄等を含めた集学的治療についての検討が必要になると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

今後発表予定

2. 学会発表

今後発表予定

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

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吸入治療の効果とBAL液中および血清中の
GM-CSF抗体の推移に関する研究

研究分担者 田澤 立之 新潟大学医歯学総合病院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、横場正典、土橋佳子、南須原康行、石井晴之、
海老名雅仁、山口悦郎、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)に対する GM-CSF 吸入治療研究で、我々①気管肺胞洗淨液中の GM-CSF 抗体が減少すること、②治療期間中に血清の GM-CSF 抗体濃度は変わらないことを見出した。エアゾル化 GM-CSF は、全身の GM-CSF 抗体の産生には影響を及ぼさないが、下気道に到達し、未分化な肺胞マクロファージを直接刺激して分化を促し、蓄積したサーファクタント物質と GM-CSF 抗体の局所での除去機能を改善する可能性がある。この仮説を検証するため、我々は、GM-CSF 吸入治療研究に参加した患者からオプシオンの評価として得られて保存されていた BAL 液と血清検体を用いて後向き研究を行った。我々は、GM-CSF 吸入治療に良く反応した APAP 患者肺の BAL 液中で GM-CSF 抗体が減少することを確かめた。BALF 中の総 IgG の減少を伴うことから、この GM-CSF 抗体の減少は、肺胞内のクリアランス能の回復によると考えられる。さらに GM-CSF 吸入治療は自己抗体産生には影響しない可能性が高い。この研究で示されたデータは、GM-CSF 吸入治療の効果の機序の理解を広げるだけでなく、吸入方法を定める上で重要な情報をもたらすと考えられる。

A. 研究目的

肺胞蛋白症は、肺胞腔内のサーファクタント物質の過度の蓄積を特徴とする稀な肺疾患である⁽¹⁾。肺胞蛋白症患者では、血清および気管支肺胞洗淨 (BAL) 液中に顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)抗体が高濃度で存在する⁽²⁾。GM-CSF 抗体は、肺内の GM-CSF の生物活性を中和して⁽³⁾、肺胞マクロファージの分化と、マクロファージによる肺サーファクタントの除去を障害する⁽⁴⁾。

この病態に基盤をおいて、外からの GM-CSF の補充療法の臨床試験が、多くのグループでな

されており、その奏効率は 40 - 62%と様々である⁽⁵⁻⁹⁾。先に我々は、GM-CSF 吸入療法のパイロット研究に参加した 3 例で、酸素化が改善し、BAL 液内の GM-CSF 抗体濃度が減少したことを報告した⁽⁹⁾。Bonfield らも、GM-CSF 皮下注射療法を受け改善した自己免疫性肺胞蛋白症患者で血清の GM-CSF 抗体価が減少したことを報告した⁽⁸⁾。しかし、我々の最近の GM-CSF 吸入治療第 II 相試験 (35 例が治療完遂) では、治療全期間を通じて、血清の GM-CSF 抗体の濃度は変化せず、GM-CSF 吸入治療は GM-CSF 抗体の産生に影響を及ぼさないことが示唆された⁽⁹⁾。この

ように、GM-CSF 投与が血清の GM-CSF 抗体濃度に及ぼす影響については、議論の余地がある。この乖離は、投与経路の違いや、GM-CSF 投与量による可能性がある。エアゾル化 GM-CSF は、全身の GM-CSF 抗体の産生には影響を及ぼさないが、下気道に到達し、未分化な肺胞マクロファージを直接刺激して分化を促し、蓄積したサーファクタント物質と GM-CSF 抗体の局所での除去機能を改善する可能性がある。

この仮説を検証するため、我々は、GM-CSF 吸入治療研究に参加した患者からオプションの評価として得られて保存されていた BAL 液と血清検体を用いて後向き研究を行った。

B. 研究方法

参加患者は参加患者は、GM-CSF 吸入臨床試験のパイロット研究⁽⁷⁾の1例、早期第Ⅱ相試験⁽⁹⁾の6例、そして多施設第Ⅱ相試験⁽⁹⁾(ISRCTN18931678、JMA-IIA00013)の12例の計19例である。患者は、前に報告された統一プロトコルに沿って⁽⁹⁾、治療開始前1週間以内と治療終了後1週間以内の2回、同一施設で同一術者により同一の中葉気管支より BAL 検査を受けた。BAL 液は、新潟大学医歯学総合病院に送られ、中央集中管理下で解析された。この19例の AaDO₂ の中央値が 13 mmHg であったので、我々は被験者を2つのグループすなわち

AaDO₂ が 13mmHg 以上改善した高反応群 (N=10)、と改善が 13mmHg 未満なもの (N=9) に分けて治療効果と血清や BAL 液中の GM-CSF や GM-CSF 抗体の濃度の変化との相関を評価した。この2群間で、患者プロフィール、咳、痰などの臨床徴候、AaDO₂ を除く肺機能検査、そして BAL の回収率に有意差は見られなかった。
(倫理面への配慮)

本研究は、各施設の IRB の承認を受け、気管支肺胞洗浄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。

C. 研究結果

吸入治療中の GM-CSF の量的変化を明らかにするために、BAL 液中の総 GM-CSF(つまり抗体結合 GM-CSF+遊離 GM-CSF)濃度を、前に報告した方法⁽¹⁰⁾で測定し、GM-CSF 吸入が肺内の内在性の GM-CSF の産生を促す可能性を除外できるかどうか調べた。総 GM-CSF 濃度は高反応群、低反応群ともに、治療期間中変化しなかった(図 1A)。このように、GM-CSF 吸入は肺内の GM-CSF の増加には関連していない。なお、低反応群の BAL 液中では GM-CSF 濃度が高い傾向にあるのは注目すべきことで、この GM-CSF は、血清中の GM-CSF は 99%以上が GM-CSF 抗体に結合している⁽¹⁰⁾ のと同様、肺胞腔内にある GM-CSF 抗体-GM-CSF 複合体に由来する可能性がある。GM-CSF 抗体-GM-CSF 複合体は、自己免疫性肺胞蛋白症で著明に減っている Fc 受容体⁽¹¹⁾ を介して肺胞マクロファージに取り込まれる可能性があり、抗原-抗体複合体の除去も高度に障害されていると考えられた。

我々の多施設第Ⅱ相試験⁽⁹⁾と同様、ELISA で測定した血清 GM-CSF 抗体濃度⁽¹⁰⁾ は高反応群、低反応群ともに治療期間中変化がなかった(図 1B)。しかし BAL 液中の GM-CSF 濃度は、低反応群では有意の変化がなかったものの、高反応群で有意に減少しており、(図 1C)。BAL 液中の GM-CSF 濃度は、高反応群にくらべ低反応群で高い傾向にあったが有意差はなかった。BAL 液中の GM-CSF 抗体の GM-CSF に対するモル比の平均値は、GM-CSF 吸入前が 2.6×10^4 、吸入後が 4.9×10^4 で、このことは、肺内のほとんどの GM-CSF 抗体は、GM-CSF 結合に結合できることを示している。

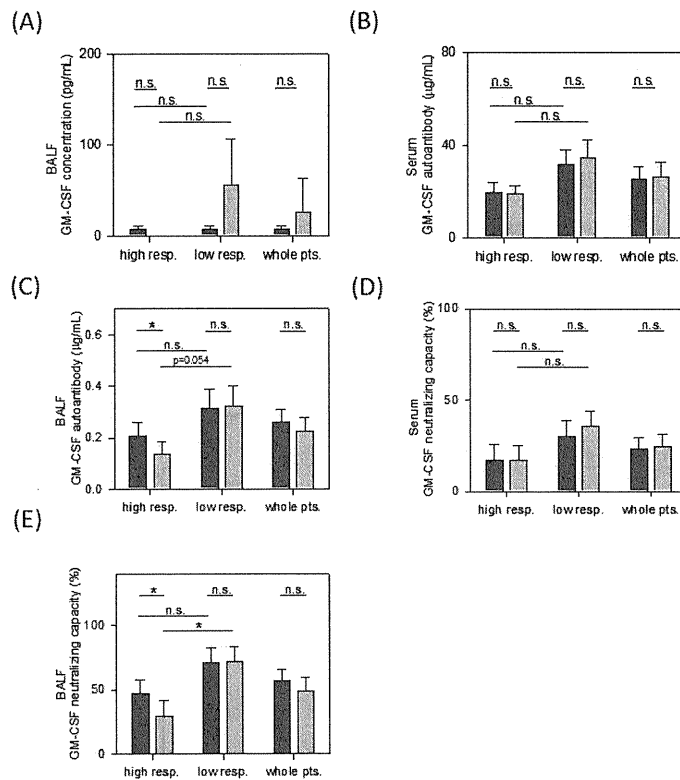


図1: 治療前(黒色)および治療後(灰色)の高反応群(high resp.), 低反応群(low resp.), および全患者(whole pts.)より得たBALFおよび血清中のGM-CSFとGM-CSF抗体の濃度. BALF中のGM-CSF(A), 血清中(B)およびBALF中(C)のGM-CSF抗体, 血清中(D)およびBALF中(E)のGM-CSF中和能を示す. [$p < 0.05$ (asterisk); Studentのt検定で計算]. それぞれの棒グラフは平均(±標準誤差)を示す.

血清のGM-CSF中和能を、GM-CSF依存性細胞株TF-1⁽¹⁰⁾で評価したところ、高反応群と低反応群の両群で治療中の変化は見られなかった(図1D)。しかし、高反応群でBAL液のGM-CSF中和能はGM-CSF吸入治療後に減少した(図1E)。BAL液のGM-CSF中和能の低下は、BAL液中のGM-CSF抗体濃度の減少による可能性が高い。その理由は、GM-CSF中和能とGM-CSF抗体濃度は治療前後とも相互に有意の相関を示しているからである(表1)。ところが、BAL中のGM-CSF抗体濃度とGM-CSF中和能は、血清中のそれらと治療前後ともよく相関するため、肺

のGM-CSF抗体は血流中のGM-CSF抗体に依存すると考えられる(表1)。さらに、BAL液中のGM-CSF抗体価の治療後/治療前比は、BAL液中の総IgGのそれと強い相関($R=0.708$, $P=0.0021$)を示し、総IgGはGM-CSF吸入治療後、有意に減少する($p < 0.02$)。以上の所見および血清中のGM-CSF抗体価はGM-CSF吸入治療前後で変化しないことを考えると、高反応群でのBAL液中のGM-CSF抗体価の減少は、肺のマクロファージの分化による局所性でのクリアランス能の回復による可能性が強い。

D. 考察

GM-CSF 吸入治療は、用量や投与経路の点で皮下注射とは異なるため、治療効果の機序も異なる可能性がある。この研究で示されたように、BAL 液中では、GM-CSF 量は、GM-CSF 抗体よりはるかに少ないので、吸入した GM-CSF が GM-CSF 抗体と結合して、直接 GM-CSF 抗体濃度の減少に寄与しているとは考えにくい。むしろ、①自己免疫性肺胞蛋白症では、HRCT 上のスリガラス影の地図状の分布で示されるように、その肺内の病変は斑状の分布をとるのが典型的であるので、吸入 GM-CSF は、肺内の軽度な病変の領域にまず到達し、②この部分の肺胞マクロファージの障害を改善し、③機能が改善した肺胞マクロファージは、蓄積されたサーファクタント物質の除去・拡散障害やシャントあるいは換気血流不均等の改善に寄与する、という機序が考えやすい。その一方、皮下注射で投与された GM-CSF については、①その大部分が GM-CSF 抗体に結合してしまい、肺にはごく少量しか直接には到達せず、②大部分は、リンパ球や骨髄に GM-CSF 抗体—GM-CSF 複合体の形で到達し、③この複合体が抗体産生の抑制などの免疫の調節に関係する、という機序が考えられる。

E. 結論

我々は、GM-CSF 吸入治療が、それにより改善した肺の BAL 液中の GM-CSF 抗体の減少と関連することを確かめた。この GM-CSF 抗体の減少は、肺胞内のクリアランス能の回復による可能性が高い。さらに GM-CSF 吸入治療は自己抗体産生には影響しない可能性が高いことを確かめた。この研究で示されたデータは、GM-CSF 吸入治療の効果の機序の理解を広げるだけでなく、吸入方法を定める上で重要な情報をもたらすと考えられる。

Variable	Before treatment		After treatment	
	R*	P value†	R*	P value†
BALF GMNC and BALF GMAb	0.7556	0.0005	0.8430	<0.0001
BALF GMAb and Serum GMAb	0.8616	<0.0001	0.7780	0.0002
BALF GMNC and Serum GMNC	0.5345	0.0271	0.6087	0.0073

*Pearson's correlation coefficient

†Values calculated using the Pearson's correlation test

表1. 血清およびBALF中のGM-CSF抗体およびGM-CSF中和能の相関

参考文献

- Rosen SH, Castleman B, Liebow AA,. Pulmonary alveolar proteinosis,. N Engl J Med,. 1958;258:1123-42,.
- 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,.
- Seymour JF, Presneill JJ,. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years,. Am J Respir Crit Care Med,. 2002;166:215-35,.
- Sakagami T, Beck D, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Nakata K, Keller G, Wood RE, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Luisetti M, Davies S, Krischer JP, Brody A, Ryckman F, Trapnell BC,. Patient-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor autoantibodies reproduce pulmonary alveolar proteinosis in nonhuman primates,. Am J Respir Crit Care Med,. 2010;182:49-61,.
- 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;163:524-31,.
6. Venkateshiah SB, Yan TD, Bonfield TL, Thomassen MJ, Meziane M, Czich C, Kavuru MS,. An open-label trial of granulocyte macrophage colony stimulating factor therapy for moderate symptomatic pulmonary alveolar proteinosis,. *Chest*., 2006;130:227-37,.
 7. 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;171:1142-49,.
 8. Bonfield TL, Kavuru MS, Thomassen MJ,. Anti-GM-CSF titer predicts response to GM-CSF therapy in pulmonary alveolar proteinosis,. *Clin Immunol*., 2002;105:342-50,.
 9. 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 for pulmonary alveolar proteinosis,. *Am J Respir Crit Care Med*., 2010;181:1345-54,.
 10. Uchida K, Nakata K, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe M, Koch DE, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey BC, Keicho N, Krischer JP, Yamada Y, Trapnell BC,. Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects,. *Blood*., 2009;113:2547-56,.
 11. Bonfield TL, Raychaudhuri B, Malur A, Abraham S, Trapnell BC, Kavuru MS, Thomassen MJ,. PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*., 2003;285:L1132-L1136,.
- F. 健康危険情報**
- 本研究は、平成 21 年度報告書に記載の GM-CSF 吸入を受けた患者の BAL 液および血清の検体を用いた後向き研究であり、GM-CSF 吸入に関する健康危険情報は平成 21 年度報告書ならびに関連の参考文献に記載している。
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 1. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Kasahara Y, Hojo M, Nei T, Nakayama H, Motoi N, Urano S, Eda R, Yokoba M, Tsuchihashi Y, Nasuhara Y, Ishii H, Ebina M, Yamaguchi E, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R,. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis,. *Eur Resp J*., in press,.
 2. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Ishii H, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nasuhara Y, Tsuchihashi Y, Kneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirschner JK, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R,. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in

pulmonary alveolar proteinosis,. Resp Med,.
2011 in press,.

- 3 . Ishii H, Tazawa R, Kaneko C, Saraya T, Inoue Y,
Hamano E, Kogure Y, Tomii K, Terada M,
Takada T, Hojo M, Nishida A, Ichiwata T,
Trapnell BC, Goto H, Nakata K,. Clinical
features of secondary pulmonary alveolar
proteinosis: pre-mortem cases in Japan,. Eur
Respir J,. 2011;37:465-468,.

2 . 学会発表

- 1 . R. Tazawa, K,. Ohashi, A,. Sato, T,. Arai, Y,.
Kasahara, M,. Hojo, M,. Yokoba, Y,.
Tsuchihashi, H,. Ishii, Y,. Nasuhara, M,. Ebina,
T,. Takada, E,. Yamaguchi, Y,. Inoue1, K,.
Nakata,. Effect Of Granulocyte-Macrophage
Colony Stimulating Factor (GM-CSF)
Inhalation On Bronchoalveolar Lavage Fluid
And Serum In Pulmonary Alveolar Proteinosis,.
Am J Respir Crit Care Med 183;2011:A1618,.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1 . 特許取得
特記すべきことなし
- 2 . 実用新案登録
記載すべきことなし
- 3 . その他
記載すべきことなし