

多くの症例は酸素化装置が使用されていないが、高度な低酸素血症は EMMO や体外循環などの使用により回避でき、安全に WLL を施行することができる。ECMO は 33 施設中 11 施設 (33.3%) で使用されていたが、ECMO の使用基準は施設によって異なっていた。ECMO の使用基準としては、Claypool ら⁸⁾ は両側肺 100% O₂ 換気時の PaO₂ が 100 Torr 以下と報告している。しかし、この報告は 1984 年になされており、当時より ECMO が容易に使用することが可能であるため、各施設の判断で高度な低酸素血症を回避するために ECMO がより多く使用されていた。

WLL が普及しない要因としては経験不足が最も多く、次に人員不足、麻酔医が上げられていた。経験不足を WLL 方法の指針で解消しても、他の障害因子により普及しないことが予測され、今回のアンケート調査においても、33 施設中 23 施設 (69.7%) が“WLL 方法の指針が作成されても WLL が施行できない。”と回答していた。WLL に普及に必要な条件としては麻酔医の存在が最も多く、その他に ICU やオペ室の確保、人員と呼吸器内科医などのマンパワー、WLL の経験などが上げられていた。

そこで、第二次アンケート調査で、“WLL 施行の拠点病院になれますか？”との問いに対して、“なれる。”との回答であった 19 医療機関に参加を要請し、次の 17 施設が参加して WLL 方法に関する検討会を開催した。検討会では、3 つの文献^{5,6,9)}の WLL 方法を提示して討論した (表 4)。

本邦と欧米との WLL 方法で最も異なっていたのは、洗浄時の体位であった。洗浄肺を上にした側臥位での WLL は、洗浄液の換気肺へのリークのリスクが高くなると考えて、Ramirez²⁾ や Rogers ら^{3,4)} の報告に従って洗浄肺を下にした側臥位で WLL を施行してきた。しかし、Beccaria ら⁵⁾ や Michaud ら⁶⁾ は換気肺を下に

表 4 WLL 方法の比較

	Ichiwata ⁴⁾	Beccaria ⁵⁾	Michaud ⁶⁾
WLL 適応	1.病状の進行 2.広範な病変 3.患者の希望	1,A-aDO ₂ 上昇 2,ADL低下	1,PaO ₂ <65Torr 2,A-aDO ₂ >40Torr 3,Shunt Ratio>10~12%
最初の洗浄肺	病変が高度な肺	左肺	未記載
気管チューブ	左ブロンコキヤス	左ブロンコキヤス	ブロンコキヤス
体位 (側臥位)	洗浄肺を下	洗浄肺を上	洗浄肺を上
Degassing	-	+	+
注入液	37°C生食	37°C生食	37°C生食
注入量	洗浄肺FRC+VT	VT	1L
注入方法	30cmの高さから	未記載	未記載
洗浄回数	清明になるまで	清明になるまで	清明になるまで
パーカッション	WLL中(5分)	WLL中	注入時(4~5分)
対側肺WLL間隔	1週間	同日1時間後	1~2日後
ECMO適応	PaO ₂ <100torr (100%O ₂)	未記載	殆ど不要

して血流を増加させることによって WLL 中の低酸素血症の軽減を図っている。

従来の洗浄肺を下にした側臥位においても、換気肺に洗浄液がリークするリスクがあるため、次の様な対応をしてきた。

- 1)気管支鏡で挿管チューブの位置を確認する。
- 2)カフを膨らませて洗浄側の挿管チューブを加圧して、換気肺側の挿管チューブからのエアリークがないこと確認する。
- 3)過剰注入が防止するために 30cm の高さから生食を注入する。
- 4)洗浄液の注入量と排液量を記録して、肺内に残存する生理食塩水量を把握する。

洗浄肺を上にした側臥位でも、上記と同様な対応をしたが、換気肺への洗浄液のリークを認めなかった。

しかし、洗浄効率は低下するが、従来の WLL より注入する洗浄液量を少なくした。洗浄肺を下にした側臥位での WLL では、洗浄液の注入量を洗浄肺の機能的残気量 (両側の機能的残気量の右肺は 55%、左肺は 45%) +1 回換気量 (約 500ml) としてきたが⁹⁾、多くの症例の注入量は 1L を超えていた。注入量が多いほど換気肺への洗浄液のリークのリスクが高くなると考えられるため、Michaud ら⁶⁾ の報告に準じて注入量を 1L とした。洗浄肺の機能的残気量 +1 回換気量

が IL 以上であれば、過剰注入は生じないと考えられる。

今回は最初に左肺を洗浄したが、以前に左肺を下にした側臥位で WLL を行った症例と PaO₂ を比較検討した (表 5)。

患者背景が異なるため単純に比較することは出来ないが、WLL 前の大気下の PaO₂ は、右側臥位で左肺洗浄を施行した今回の 2 症例 (51.2、51.3 Torr) は、左側臥位で左肺を洗浄した以前の症例 (67.7 Torr) より低値であったが、WLL 中の最低 PaO₂ は、今回の 2 症例の方が高値であった。(73.3、59.8 vs 57.0 Torr)

両側肺 100%O₂ 換気時の PaO₂ は、右側臥位とした今回の 2 症例 (404、383 Torr) は、左側臥位とした以前の症例 (351.7 Torr) より高値であった。側臥位では重力の影響で下方の肺の血流が増加するが、右肺は左肺より肺気量が大きいいため、右側臥位での PaO₂ が左側臥位より高値であったことが示唆された。病変に著しい左右差がない場合には、Beccaria ら⁵⁾ の報告のように、洗浄肺を上にした WLL を施行する時は、最初に左肺を洗浄した方が低酸素血症は軽減されると思われる。

洗浄肺を上にした側臥位での WLL は低酸素血症が軽減するが、degassing 時に気管チューブの位置がずれること懸念した。しかし、図 6 が示すように気管はほぼ正中に位置していた。洗浄肺を上にして degassing しても、重力により洗浄肺が下方に移動するために気管はほぼ正中に位置することが示唆された。洗浄肺を下にした側臥位で degassing すると、容積の減少とともに重力の影響で洗浄肺は下方に移動するため、気管は著しく偏位すると思われる。

最後に、今回の WLL を含む自験例、2 回のアンケート調査結果などに基づいて、安全で有効性が高い WLL 方法指針の試案を表 6 に示す。

1) WLL の適応

多くの報告がなされているが一定の基準はな

表 5 初回左肺 WLL 時の PaO₂ の比較
(右側臥位で左肺洗浄、左側臥位左肺洗浄)

	右側臥位	左側臥位
症例	66歳、男性	81歳、女性
合併症(高血圧症以外)	DM	DM・MR 耳聾
IL-G(I/II)	10696	9505
LDH(U/L)	344	508
WVC	67.3	66.8
WDLco	70.8	46.7
PaO ₂		
PaO ₂ (RA)(Torr)	51.2	51.3
PaO ₂ (100%O ₂)(Torr)	404	383
PaO ₂ mini during WLL	73.3	59.8

表 6 WLL 方法指針の試案

項目	試案
1 適応	BGA値・進行度・病変・合併症・希望などで総合的に判断
2 観察期間	3~6ヶ月間
3 最初のWLL選択	左肺
4 挿管チューブ	左側用ダブルルーメンチューブ
5 体位	洗浄肺を上にした側臥位
6 100%O ₂ で換気	15分間
7 Degassing	洗浄肺側気管チューブを10分間クランプ
8 注入液	37℃に加熱した生理食塩水
9 注入方法	1) 回目は10分間で注入 2) 回目は15分間で注入
10 注入時	2分間バイブレーションしてから挿入
11 注入回数	清明になるまで
12 BGMの適応	BGA値・合併症などで総合的に判断
13 対側肺洗浄期間	1週間

く、動脈血液ガス値・進行度・病変の範囲・合併症・患者の希望などで総合的に判断する。

2) 観察期間

aPAP は自然軽快することも多く、診断 (発症) から 3~6 ヶ月間観察してから WLL を施行すべきである。

3) 最初に WLL 施行する肺

著しい病変の左右差がなければ、左肺から洗浄する。

4) 挿管チューブ

左側用ダブルルーメンチューブを挿管する。右肺用チューブより構造的に固定が容易であるためチューブの位置がずれるリスクが小さいため、洗浄液が換気肺にリークする可能性が低い。

側臥位にする際に気管チューブの位置がずれる可能性があるため、側臥位にした後に細径の気管支鏡で気管チューブの位置を確認する。

カフを膨らませて洗浄側の気管チューブを40～50cmH₂O で加圧し、換気肺側の気管チューブからのエアリークがないこと確認する。

5)100%O₂で両側肺を15分間換気する。

6)degassing

洗浄側の気管チューブを10分間クランプし
てする。

7)注入と排液

30cmの高さから37℃に加温した生食1Lを200～300ml/minの速度で注入する。生食1Lでは過剰注入の可能性は低い、30cmの高さから注入すると過剰注入が防止できる。

洗浄液の注入量と排液量を記録して、肺内に残存する生理食塩水量を把握しておく。2回目以降は1Lから肺内に残存した生理食塩水量を引いた量を注入するが、生理食塩水を1側肺に満たすと350ml/hrの速度で吸収されるため⁷⁾、注入する生理食塩水を適時増量する。

8)バイブレーション

バイブレーターで胸部と背部から洗浄中バイブレーションする。

9)洗浄回数

洗浄は、排液が清明になるまで繰り返す。

10)洗浄後の処置

洗浄液を十分に吸引後、両側肺を100%O₂換気してからシングルルーメンチューブに交換する。

11)EMMOの適応

一定の基準はなく、動脈血液ガス値や合併症などで総合的に判断する。なお、Michaudら⁶⁾はECMOは殆ど不要と報告している。

12)対側肺洗浄間隔

Beccariaら⁵⁾や同日の1時間後、Michaudら⁶⁾は1～2日後と報告しているが、安全性を考慮すると1週間後に対側肺の洗浄を施行すべきだと思うが、今後の検討が必要である(表6)。

E. 結論

WLLが普及するには、全国にWLL施設基準を満たした拠点医療機関を作り、今回提示したWLL方法指針の試案をもとにしてWLLを施行し、本邦の医療事情に適した安全で効果的なWLL方法の確立が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

参考文献

1. 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
2. Ramirez RJ. Pulmonary Alveolar Proteinosis, Treatment by massive Bronchopulmonary lavage. *Arch Intern Med* 1967; 119: 147-156.
3. Rogers RM, Tantum KR. A "New" Approach to old problems. *Med Clin North Amer* 1970; 53: 755-771.
4. 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.
5. Beccaria M, Luisett M, Rodi G, et al. Long-term durable benefit after whole lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir J* 2004;223:526-531.
6. Michaud G, Reddy C, Ernst A. Whole-Lung Lavage for Pulmonary Alveolar Proteinosis. *CHEST* 2009;136:1678-1681.
7. Ioachimescu OC, Kavura MS. Pulmonary alveolar proteinosis. *Chron Respir Dis* 2006; 3: 149-159.

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.
9. 一和多俊男、時田心吾、相馬亮介、他.肺胞
蛋白質症に対する片側全肺洗浄の経験と洗浄
手順を選択するためのアルゴリズムについ
て 日本呼吸会誌 2009 ; 47 :185-195.
10. Blenkarn GD, Lanning CF, Kylstra J,
Anesthetic Management of Volume
Controlled nilateral Lung Lavage.
Canada Anaesth Soc J 1975;22:154-163.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

A. 国際学会 (1件)

1. T. Ichiwata, S. Oh-ishi, K. Uchida, Y.
Inoue, T. Arai, H. Ishii, K. Nakata ;
Surveillance of whole lung lavage for
autoimmune pulmonary alveolar
proteinosis in Japan European
Respiratory Society Annul Congress
Barcelone (Spain) 2013.9.7~9.11

B. 国内学会

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
特記すべきこと無し

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担総合研究報告書

抗GM-CSF抗体陰性肺胞蛋白症の臨床例と2つの動物モデルの解析

研究分担者 海老名雅仁 東北薬科大学病院

研究要旨

日常臨床で経験する肺胞蛋白には思いもかけない症例が混在する。抗 GM-CSF 抗体陰性の肺胞蛋白症は MDS を中心とした骨髄病変を伴う続発性、および粉塵吸入後に出現する「その他」の PAP も少なくない。東北大の異なる基礎の研究室が、それぞれ異なる遺伝子操作であるのに、肺胞蛋白類似病変で死亡する。Runx-1 欠損マウス肺では全身に強烈な炎症を引きおすモデルだが、最終的には肺胞腔にエオジン陽性でサーファクタント陽性の物質が充満し、呼吸不全で死亡する。B細胞だけではなく様々な免疫細胞の分化に関係することが知られるようになった転写因子 Bach2 の欠損マウスの肺胞蛋白類似病変は、二次性肺胞蛋白症の動物モデルとの関連も考えさせる上に、Bach2 産生細胞を骨髄移植することで病変が改善したことは、これからの新しい治療法開発にも期待される。

1. 抗 GM-CSF 抗体陰性肺胞蛋白症の臨床例

MDS などの血液疾患によらない、いわゆる未分類 PAP の臨床例と病態に関する機序を考察した。東日本大震災後の津波や火災による粉塵暴露を受けた患者における肺胞蛋白症は、全肺洗浄によって治癒することができた。血清中の抗 GM-CSF 抗体は陰性であったが、その全血を用いた解析において、GM-CSF 刺激による STAT5 のリン酸化レベルが低下し、GM-CSF 阻害因子の存在が推測された。このような病態機序に関しても今後の検討が必要であることが示唆された。

2. Runx 1 欠損マウスにおける PAP 類似病変

Runx 1 はナイーブ T 細胞に豊富に含まれるが、活性化の際に急速に減少することから活性化せずにナイーブの状態にあるのに重要な因子であると考えられている。Runx 1 欠損 CD4 + T 細胞をもつ Runx12/2Bcl2tg マウスでは肺

における自己免疫が激化し、当初は気道周辺に Runx1 欠損 CD4 + T 細胞が集簇しているのみであるが、時間がたつにつれて肺内に IL-17 や IL-21 を含む様々なサイトカインを炎症性細胞が増殖し、最終的には肺胞腔内に肺胞蛋白を含む液状物が充満し、死亡にいたる。このマウスにおいては抗 GM-CSF 抗体は陰性であった。

(J. Immunology, 2012, 188: 5408–5420)

3. Bach 2 欠損マウスにおける PAP 類似病変

転写因子 Bach2 はリンパ球や血球細胞で必須の役割を有することが知られている。Bach2 欠損マウスにおいて、GM-CSF 経路が正常であるにも関わらず肺胞サーファクタント陽性液性物質が肺胞腔に貯留し、肺胞蛋白症様の病態を示すことを発見した。Bach2 欠損肺胞マクロファージでは脂質の取り込み能亢進と、コレステロール輸送・脂質代謝を司る遺伝子の発現変化を認め、これらが肺胞サーファクタントの異常貯

留の原因と考えられた。また、Bach2 欠損肺胞マクロファージにおいては、Chemotaxis 関連遺伝子や M2 マクロファージ関連遺伝子の発現亢進が見られた。以上の結果より、Bach2 は肺胞マクロファージの機能の成熟に必要であり、過剰な細胞遊走や M2 マクロファージへの分極を抑え、肺胞の恒常性を維持していると考えられる。さらに興味深いことに、Bach2 欠損マウスの肺病変は野生型 (Bach2 陽性) マウスの骨髄を移植することにより改善することを示した。このことから、Bach2 欠損マウスは、血液疾患と肺胞蛋白症の関連を示唆するモデルマウスになると考えられる。

(J. Exp. Med. 2013, ;210(11):2191-204.)

研究発表

1. 論文発表

1. Hisata S, ..., Ebina M. Development of pulmonary alveolar proteinosis following exposure to dust after the Great East Japan Earthquake. *Respir Investig*. 2013 212-6.
2. Tazawa R, ..., Ebina M, Akira M, Ichiwata T, Tatsumi K, Yamaguchi E, Nakata K. Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy. *Chest*. 2013 Oct 24. doi: 10.1378/chest.13-0603. PMID: 24158247
3. Nakamura A, Shibuya R, ... Ebina M, Nukiwa T, Igarashi K. Transcription repression of BACH2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function. *J. Exp. Med*. 2013, 210(11):2191-204.

4. Wong WF, ..., Ebina M, ...Satake M. Runx1-deficiency in CD4+ T Cells Causes Fatal Autoimmune Inflammatory Lung Disease due to Spontaneous Hyperactivation of Cells. *J. Immunol*. 188: 5408-20, 2012.
 5. Sato H, ..., Ebina M, Nakata K, Nukiwa T. Bilateral peripheral infiltrates refractory to steroid therapy were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor. *Internal Med*. 51:1737-42, 2012.
 6. Ohashi K, ...Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Incue Y, Nakata K, Tazawa R. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir Dis*. 39:777-80, 2012.
 7. Ohashi K, ...Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis. *Respiration Res*, 106:284-93, 2012.
- ### 2. 学会発表
1. 渋谷里紗、ほか Requirement of Bach2 for pulmonary homeostasis through functional development of alveolar macrophages and a new prospect of Bach1 in complementing of Bach 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013.12. 11-13, 千葉

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担総合研究報告書

遺伝性間質性肺疾患の診断に関する研究

研究分担者 長 和俊 北海道大学病院周産母子センター

研究要旨

遺伝性間質性肺疾患(HILD)の診断システムを構築し、遺伝子検査を含む診断支援を行った。SP-C 異常症 4 例、ABCA3 異常症 1 例、*FOXF1* 遺伝子異常による ACD/MPV1 例を診断し、間質性肺疾患症例の 67%で原因を同定した。日本において SP-C 異常症と ACD/MPV は HILD の主要な原因であり、SP-B 欠損症は極めて稀であることを確認した。稀で難治である HILD に対して適切な治療法の選択が可能となるよう診断支援の継続が必要である。

A. 研究目的

小児の間質性肺疾患は、さまざまな難治性疾患を含む稀な疾患群であり、胸部 X 線写真あるいは CT 画像上のびまん性間質性陰影と呼吸障害を呈する。間質性肺疾患のうち、遺伝子変異などの遺伝性原因によるものを遺伝性間質性肺疾患 (hereditary interstitial lung disease, HILD) と呼ぶ。これまでに HILD に含まれる疾患として、SP-B 欠損症、SP-C 異常症、ABCA3 異常症、GM-CSF 受容体異常症、alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins (ACD/MPV)、thyroid transcription factor -1 (TTF-1) 異常症が知られている。診断は間質性肺疾患であることの診断と、原因となり得る遺伝子変異の同定による。発生頻度が低いこと、原因が多岐にわたること、新生児期に発症すると急速に重篤な呼吸不全に陥ることが多く診断を目的とした HRCT、気管支肺泡洗浄 (BAL)、肺生検などの検査を行うことが困難であること、診断補助となる遺伝子検査を行える施設が少ないことなどから、診断が困難である。

本研究の目的は、日本における HILD の頻度

の推定、遺伝子検査等による診断の支援、および症例の蓄積により診断の手順を確立することである。

B. 研究方法

電子メールを用いて国内の小児科診療施設、周産母子センター等新生児診療施設に対して遺伝性間質性肺疾患の診断支援の周知を行った。また、日本未熟児新生児学会の新生児稀有疾患（病態）前方視的サーベイランス事業を通して症例の集積を開始すると同時に、同学会のホームページ、学会誌にて診断支援の周知を行った。対象は、1 歳未満で発症した治療抵抗性の呼吸不全の症例、または 16 歳未満の小児で肺胞蛋白症、間質性肺炎などの間質性肺疾患が疑われたあるいは診断された症例のうち、本研究の診断支援システムで紹介された症例とした。既知の原因により説明可能な呼吸不全を除外した。症例の紹介があった場合に、当センターにおいて、診断に有用な検査、検査結果の解釈、鑑別診断などについての相談を受け、遺伝性間質性肺疾患の可能性があり家族の同意が得られた場合に以下の検査を提供した。1) 同意が得られた症例

全例に *SFTPC* 遺伝子、*ABCA3* 遺伝子のシーケンスを行った。2) SP-B 欠損症の可能性のある症例に BAL 液または気道吸引液を用いた SP-B 蛋白の検出と *SFTPB* 遺伝子のシーケンスを行った。3) 肺胞マクロファージの異常の可能性のある症例に末梢血単球を用いた GM-CSF-受容体機能を反映する STAT-5 のリン酸化測定を行った。4) 治療抵抗性の重度の肺高血圧が遷延する症例に *FOXF1* 遺伝子のシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

研究実施に係る試料は連結可能匿名化を行い個人識別情報管理者が管理し、被験者の秘密保護に十分配慮する。試料等を関連機関に送付する場合、また、研究の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにする。研究の目的以外に、研究で得られた被験者の試料等を使用しない。

C. 研究結果

研究期間内において本研究の診断支援システムに 50 例の紹介があり、48 例に研究への参加を依頼し全例で家族の同意が得られた。48 例の最終的な臨床診断は、間質性肺炎 4 例、肺胞蛋白症 3 例、ACD/MPV 2 例、歌舞伎症候群 1 例、重症複合免疫不全症 1 例、胃食道逆流症 1 例、先天性副腎低形成 1 例であり、35 例は原因が特定されなかった。

SFTPC 遺伝子、*ABCA3* 遺伝子の遺伝子検査を 48 例全例で施行した。*SFTPC* 遺伝子検査にて、1 例に 1 つの既報変異(p.Leu45Arg)と、3 例に 4 つの新規変異 (p.Gln145fs, p.Ser72Asn/p.Gly100Ala, p.Lys63Glu) を検出し、4 例を SP-C 異常症と診断した。*ABCA3* 遺伝子検査では、3 例で新規変異のヘテロ接合を認めた。臨床経過などから 2 例は *ABCA3* 異常症が否定的であり (p.Pro73Leu/ p.Gly1205Arg, p.Thr761

Met/ p.Ala1362Val)、1 例を *ABCA3* 異常症と診断した (p.Arg1583Trp/ p.Val1495Cysfs21X)。*SFTPB* の遺伝子解析を 21 例に、SP-B 蛋白の解析を 17 例に行い、解析を行った全例において異常は認められず、SP-B 欠損症が否定された。GM-CSF 刺激による STAT-5 リン酸化の解析の対象は 2 例あり、異常は認められなかった。*FOXF1* の遺伝子解析を治療抵抗性の肺高血圧症の 5 例に行い、ACD/MPV の 1 例に遺伝子変異(p.Leu300ArgfsX79)を認めた。

D. 考察

臨床的に間質性肺疾患と診断された 9 例 (間質性肺炎 4 例、肺胞蛋白症 3 例、ACD/MPV 2 例) のうち 6 例 (67%) において原因となる遺伝子変異を特定し HILD と診断した。HILD の原因となる 6 つの新規遺伝子変異 (*SFTPC* p.Gln145fs, p.Lys63Glu, p.Ser72Asn, p.Gly100Ala, *ABCA3* p.Arg1583Trp, p.Val1495Cysfs21X) を同定した。

間質性肺疾患 9 例のうち SP-C 異常症が 4 例、*ABCA3* 異常症が 1 例、ACD/MPV が 2 例であった。日本において SP-C 異常症と ACD/MPV は間質性肺疾患の主要な原因であり、*ABCA3* 異常症は欧米諸国に比して少ないことがわかった。新生児期発症の間質性肺疾患 5 例のうち、SP-C 異常症は 3 例であった。欧米諸国における SP-C 異常症は新生児期以降の発症がほとんどであるが、日本における新生児期発症の間質性肺疾患に対しては SP-C 異常症を第一に考えるべきである。SP-B 異常症は日本において過去にも報告はなく、日本人には極めて稀であることが確認された。

稀で難治な疾患群である HILD に対して、遺伝子検査を含む診断システムを構築し、それにより効率的に HILD を抽出できた。さらに診断の確定により、適切な治療法選択のための助言、肺移植が有効である根拠の提示が可能となった。

今後は診断・治療法の向上のためにもシステムの維持が不可欠であると考えられる。

E. 結論

HILD の診断システムを構築した。HILD 6 例を診断し、6つの新規遺伝子変異を同定した。日本において SP-C 異常症と ACD/MPV は HILD の主要な原因であり、SP-B 欠損症は極めて稀である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takuma Akimoto, Kazutoshi Cho, Itaru Hayasaka, Keita Morioka, Yosuke Kaneshi, Itsuko Furuta, Masafumi Yamada, Tadashi Ariga, Hisanori Minakami. : Hereditary interstitial lung diseases manifesting in early childhood in Japan. *Pediatric Research* (投稿中)

2. 学会発表

A. 国際学会

1. Takuma Akimoto, Kazutoshi Cho, Itaru Hayasaka, Keita Morioka, Yosuke Kaneshi, Masafumi Yamada, Tadashi Ariga, Hisanori Minakami : Diagnostic support including genetic testing for hereditary interstitial lung disease in Japan. Hot Topics in Neonatology 2013, Dec 8, 2013, Washington D.C., USA

B. 国内学会

1. 秋元琢真、早坂 格、森岡圭太、兼次洋介、長 和俊 : 新生児遺伝性間質性肺疾患の診断支援、第 12 回肺サーファクタント分子

病態研究会、2013 年 6 月 22 日・札幌

2. 秋元琢真、早坂 格、森岡圭太、兼次洋介、長 和俊 : 「先天性間質性肺疾患」の診断支援：新生児希有疾患（病態）前方視的サーベイランス事業中間報告、第 58 回日本未熟児新生児学会学術集会、2013 年 11 月 30 日・金沢

3. 秋元琢真、森岡圭太、兼次洋介、盛一享徳、長 和俊 : 新生児間質性肺疾患に対する診断支援、第 25 回北海道新生児談話会 2012 年 10 月 21 日・札幌

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

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担総合研究報告書

オスラー病の遺伝子解析

研究分担者 森崎裕子 国立循環器病研究センター研究所 分子生物学部室長

研究要旨

我々は、2005年より臨床的に診断された遺伝性出血性毛細血管拡張症（HHT）の遺伝子解析を施行しているが、今期の班研究では、さらに59家系121名の解析をおこない、合わせて121家系232例について遺伝子解析を終了した。その結果、*ENG*変異（HHT1）66家系（55%）106例、*ACVRL1*変異（HHT2）32家系（26%）48例、*SMAD4*遺伝子変異2家系（1.7%）4例、その他2家系（1.7%）2例 計102家系（84%）161例において、原因遺伝子変異を同定した。

発端者における遺伝子変異の型別の検討では、*ENG*変異では、NMDが予測されるナンセンス変異やフレームシフト変異などの早期翻訳停止型の変異が全体の60%を占めていたことより、発症機序としてはハプロ不全がもっとも考えやすい。一方、*ACVRL1*変異では、HHT2では早期翻訳停止型の変異は全体の31.2%にすぎず、ミスセンス・インフレーム欠失変異ではキナーゼ領域変異が67%、リガンド結合領域が19%、GSドメイン領域が14%であったことより、ハプロ不全だけでなくドミナントネガティブ機序で働く可能性も否定できない。

臨床所見の得られた遺伝子変異陽性者154名について、遺伝子型と臨床型との関連を解析した。まず、*ENG*変異（HHT1）例と*ACVRL1*変異（HHT2）例の比較においては、HHT1において肺AVF、脳AVMの合併が有意に多く、HHT2では、肝AVMの合併が有意に多かった。また、変異陽性者の約75%では内臓病変や重度貧血など治療を要する合併症を認めた。若年性ポリポース症候群を伴うHHT（JP-HHT）の原因遺伝子である*SMAD4*変異を認めた症例の検討では、2家系4例のうち、1例はde novo変異であったが臨床的にJPSの所見は認められず、一方、他の1家系3例においては、全員に大腸ポリポースを認めたが、臨床的にHHTの所見を認めたのは2例のみで、1例に大動脈病変を認めるなど、*SMAD4*遺伝子変異による臨床像の多様性が示唆された。

臨床症状のうち、皮膚毛細血管拡張の出現時期は比較的遅く、小児期には鼻血のみしか認めない場合が多いこと、その場合でも内臓臓器の罹患は小児期から認められること、鼻出血は加齢とともに改善する場合もあり、内臓病変があっても看過されている場合もあること、内臓AVMは時に脳出血・塞栓・膿瘍などの重篤な合併症をもたらす危険性があること、などより、小児だけでなく非罹患と考えられる家族についても、遺伝子解析により診断を確定することが、合併症の予防に効果的であると考えられた。

A. 研究目的

遺伝性出血性末梢血管拡張症 (HHT) は、先天性動静脈奇形による皮膚・粘膜および内臓の多発性末梢血管拡張とそこからの出血を特徴とする常染色体優性遺伝性疾患であり、責任遺伝子として、これまでに、*ENG*(Endoglin)、*ACVRL1*(ALK1)、*SMAD4* が知られており、それぞれ HHT1、HHT2、JP-HHT として分類されている。病型ごとの分布は地域により異なり、北欧や北米では HHT1 が多いが、地中海地域では HHT2 が比較的多いとされている。本邦においては、HHT に対する大規模遺伝子研究はこれまでなされておらず、病型ごとの分布は明らかにされてこなかったため、まず、本邦における原因遺伝子別の病型分布と明らかにすることを第一の目的とした。さらに、原因遺伝子による臨床症状の違い (Genotype-Phenotype Correlation) については、いくつかの先行研究があるが、それについても再検討を行い、また、原因遺伝子の同定されない症例について、新たな原因遺伝子の探索を行った。

B. 研究方法

1) 遺伝子解析

今年度の解析対象：2012.4 月～2013.12 月の間に、臨床所見より HHT (確定・疑い) と診断され、関連機関あるいは本班研究分担研究者より国立循環器病研究センターに遺伝子解析を依頼された患者 121 名(うち発端者 59 名、患者家族 62 名)。

解析方法：末梢血リンパ球より抽出したゲノム DNA を用いた遺伝子解析を行った。

まず、*ENG*、*ACVRL1* 遺伝子の全 exon について、exon -intron 境界を含むゲノム領域について PCR 法にて増幅し、直接シーケンス法にて変異解析を行った。これにて変異の同定できなかった症例については、同遺伝子の MLPA 解析および *SMAD4* 遺伝子の追加解析を行った。

この時点で、遺伝子変異の同定されなかった症例のうち、エクソーム解析の同意の得られた 18 名について次世代シーケンサー (HiSeq1000) を用いたエクソーム解析を行った。なお、家族例については、発端者で同定された変異についてのみ解析を行った。

2) 遺伝子型・臨床型 相関解析

解析対象：これまでの当院での遺伝子解析により遺伝子変異の同定された 161 名のうち、本班研究分担研究者および研究協力者より得られた臨床情報 (匿名化済み) の得られた変異陽性者 154 名について、遺伝子型・臨床型の相関解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における患者検体を用いた遺伝子解析については、既に国立循環器病センター倫理委員会の承認を得ており、施設および国などの指針を遵守し、書面によりインフォームドコンセントを受けて研究を実施するなど、倫理面への配慮を十分に行う。また、解析はすべて連結可能匿名化の上で行われた。

C. 研究結果

1) 遺伝子解析

HHT 発端者 121 例について変異解析をおこない、66 例 (55%) で *ENG* 変異、32 例 (26%) で *ACVRL1* 変異、2 例 (1.7%) で *SMAD4* 変異、2 例 (1.7%) で *BMP2* 変異を同定した。全体の変異同定率は 84% (102/121) であった。この結果、本邦では、*ENG* 変異が 66% (46/70) を占めており、北欧や北米と同じ傾向を認めた。家族も含む解析では、*ENG* 変異 106 例 (66%)、*ACVRL1* 変異 48 例 (30%)、*SMAD4* 遺伝子変異 4 例 (2.5%)、*BMP2* 遺伝子変異 2 例 (1.2%) 計 161 例において、原因遺伝子変異が同定されている (表 1)。

発端者における遺伝子変異の型別の検討では、

*ENG*変異では、NMDが予測されるナンセンス変異やフレームシフト変異などの早期翻訳停止型の変異が全体の60%を占めていたことより、発症機序としてはハプロ不全がもっとも考えやすい。一方、*ACVRL1*変異では、HHT2では早期翻訳停止型の変異は全体の31.2%にすぎず、ミスセンス・インフレーム欠失変異ではキナーゼ領域変異が67%、リガンド結合領域が19%、GSドメイン領域が14%であったことより、ハプロ不全だけでなくドミナントネガティブ機序で働く可能性も否定できない。

エクソーム解析をおこなった18例については、新規遺伝子である*BMP9 (GDF2)*およびTGF- β シグナル伝達系を中心とした227候補遺伝子について解析を行ったが、原因と考えられる変異は同定できなかった。

2) 遺伝子型・臨床型 相関解析

1. HHT1 vs HHT2

遺伝子変異の同定された患者のうち、臨床情報の得られたHHT1患者(*ENG*変異 102例)とHHT2患者(*ACVRL1*変異 46例)について臨床症状の比較検討を行った。診断基準である、鼻出血、毛細血管拡張症 telangiectasia (TA)、内臓AVM(肺、脳、肝、消化管)のうち、何らかの症状を認めたのは、HHT1で96.1%、HHT2で91.3%であり、16才以上の症例に限定した場合は、HHT1で98.7%(76/77)、HHT2で95.3%(41/43)であり、成人例では3例を除く117例で何らかの所見を認めた。また、内臓AVMを認めたのはHHT1で75.5%、HHT2で71.7%であった。

内臓AVMを部位別に検討したところ(精査症例のみ)、肺AVMの合併率は、HHT1で84%、HHT2で35%、脳AVMの合併率は、HHT1で26%、HHT2で7%と、いずれもHHT1で有意に高かった($p=3 \times 10^{-7}$ および $p=0.040$)。一方、肝AVMの合併率は、HHT1で18%、HHT2で

表1

遺伝子	発端者数	患者数
<i>ENG</i>	65	105
<i>ACVRL1</i>	32	48
<i>SMAD4</i>	2	4
<i>BMPR2</i>	2	2
計	101	159

79%であり、HHT2で有意に高かった($p=3 \times 10^{-7}$)。肺高血圧症の合併はHHT2のみで認めルなど、原因遺伝子による臨床症状の違いが明らかになった。

また、15才以下でTAを認めたのは28例中5例(18%)のみであり、最年少例は8才であった。一方、鼻出血は15才以下では19例(68%)、PAVFは15例(54%)に認め、TAより早期に認められる傾向があった。

なお、HHT1/HHT2家族の解析では、57名中9名(うち成人4名)は、HHTではないと考えられ、フォローされていなかった。

2. その他の遺伝子変異

*SMAD4*変異を同定した2家系4例のうち、1例はde novo変異であったが臨床的にJPSの所見は認められず、一方、他の1家系3例においては、全員に大腸ポリポシスを認めたが、臨床的にHHTの所見を認めたのは2例のみで、1例に大動脈病変を認めるなど、*SMAD4*遺伝子変異による臨床像の多様性が示唆された。

D. 考察

本邦におけるHHT原因遺伝子の分布は、北欧や北米と同様に、*ENG*変異によるものが約3分の2を占めていた。ただし、研究協力者に脳外科、呼吸器科の医師からの症例が多いため、解析症例に偏りがあった可能性も考えられる。特にHHT1とHHT2の比較で、HHT1において肺AVF、脳AVMの合併が有意に多かったこ

とも考え合わせると、脳外科、呼吸器科からの症例では、これらの部位に病変を認めやすい HHT1 症例がより多くリクルートされていた可能性は十分考えられる。

遺伝子型による臨床症状の違いについては、遺伝子型と AVM 罹患臓器との間に可なり強い相関はみとめたが、排他的には分類されず、遺伝子型のみから罹患臓器は特定できなかったことより、HHT1 では脳・肺、HHT2 では、肝/消化管を重点的に解析するべきではあるものの、全部位についてのスクリーニングも必要であることが示された。

また、特に TA の出現時期は比較的遅く、小児期には鼻血のみしか認めない場合が多いこと、その場合でも内臓臓器の罹患は小児でも認められること、鼻出血は加齢とともに改善する場合もあり、内臓病変があっても看過されている場合もあること、内臓 AVM は時に脳出血・塞栓・膿瘍などの重篤な合併症をもたらす危険性があることより、小児だけでなく非罹患と考えられる家族についても、遺伝子解析により診断を確定することが、合併症の予防に効果的であると考えられた。

E. 結論

本邦における HHT 原因遺伝子の分布は、北欧や北米と同様に、*ENG* 変異によるものが約 3 分の 2 を占めていた。

また、HHT1 と HHT2 の比較では、遺伝子変異の変異型および臨床的合併症において、有意な違いを認めた。

また、臨床診断の難しい場合もある一方、変異陽性者のほとんどは、最終的には何らかの臨床症状を呈していることより、効果的な患者管理のためにも、遺伝子診断は有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Komiyama M, Ishiguro T, Yamada O, Morisaki H, Morisaki T: Hereditary hemorrhagic telangiectasia in Japanese patients. *J Hum Genet* (in press)
2. 森崎裕子, 森崎隆幸, 特発性/遺伝性肺動脈性高血圧症の遺伝子解析. *Cardiac Practice*. 24(1): p. 31-36. (2013)
3. 森崎裕子, 森崎隆幸: 「肺高血圧症の遺伝子解析」; 肺高血圧症の臨床 (中西宣文 編). 大阪, 医薬ジャーナル, 2013, p 53-62

2. 学会発表

A. 国際学会

1. Morisaki H., Komiyama M., Yamada O., Osuga K. and Morisaki T.; “Mutation analysis of TGF β pathway genes in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia patients in Japan: Genotype -phenotype correlations in 119 cases” in *European Human Genetics Conference 2013*, Paris;2013.6.8-11.
2. Morisaki H., Komiyama M., Yamada O., Osuga K. and Morisaki T.: “Mutation analysis of TGF β pathway genes in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia patients in Japan: Genotype -phenotype correlations in 119 cases” in *10th HHT Scientific Conference, Cork*;2013.6.12-15.

B. 国内学会

1. 森崎裕子, 小宮山雅樹, 大須賀慶悟, 山田修, 森崎隆幸: 「日本人遺伝性出血性毛細血管拡張症の病因遺伝子変異とその臨床的特徴」第 58 回日本人類遺伝学会 (仙台) 2013

年 11 月 21 日

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）
分担総合研究報告書

肺胞蛋白症のGM-CSF吸入治療に関する研究
—治療後の予後の解析と吸入治療薬開発の前臨床試験に関する検討—

研究分担者 田澤立之 新潟大学医歯学総合病院准教授

井上義一、新井 徹、高田俊範、笠原靖紀、放生雅章、大河内眞也、土橋佳子、横場正典、
江田良輔、中山秀章、石井晴之、根井貴仁、伊藤祐子、橋本淳史、田中崇裕、中垣和英、
森本浩之輔、南須原康行、審良正則、海老名雅仁、巽浩一郎、一和多俊男、山口悦郎、
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）の顆粒球マクロファージ刺激因子（GM-CSF）の吸入治療は安全生・有効性は本邦の多施設第Ⅱ相臨床研究で示されているが、吸入治療終了後の長期の予後は不明である。また、本邦では GM-CSF 製剤は未承認であり、吸入治療薬として開発するには、前臨床試験として動物での吸入毒性試験が必要である。本研究では、GM-CSF 吸入治療後の aPAP の再増悪の危険因子を明らかにするために、GM-CSF 吸入治療を受けた 35 例の患者で、治療終了後 30 カ月間にわたって追加治療の有無と 6 カ月ごとの重症度を調べ、①12 例が追加治療を要し（AT 群）、②治療前%VC が AT 群で有意に低く、③追加治療までの期間は、%VC 高値群（%VC ≥ 80.5）で有意に長い（ $p < 0.0005$ ）、等の結果を得た。また、ヒト GM-CSF は種特異性が高いため、カナクイザルでの気管内噴霧投与での実験モデルを検討し、GM-CSF の経気道的投与により①白血球増加等の全身的影響を評価できる、②細径気管支鏡で採取した気管支肺胞洗浄液解析より肺局所での影響を評価できる、③血中の GM-CSF 濃度の推移を評価できる、等の結果を得た。

A. 研究目的

自己免疫性肺胞蛋白症は、肺胞内のサーファクタント物質の貯留により呼吸不全を来す稀少肺疾患であり、その標準治療法は全肺洗浄であるが、全身麻酔下に手術室で行う処置であり、より簡便な治療法が望まれている。本症の病因は、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過度に産生されることによると考えられており、GM-CSF 吸入療法は、本症に対する有望な新規治療である。

2004 年～2008 年に本コンソーシアムが行った全国 9 施設による第Ⅱ相試験で本治療を受けた患者のおよそ 60-70%がこの治療に反応し、重篤な副作用なく、酸素化の改善、血清マーカーの改善、CT 所見の改善をみたことが報告され、その安全性と有効性が示された。

しかし、GM-CSF 吸入治療後の予後についての詳細は不明で、治療後の再増悪を予測する臨床所見についても知られていない。そこで、上記の研究での治療完遂例 35 例に対して終了後

30 か月までの経過観察を行い、追加治療を要した患者群と要しなかった患者群での臨床所見を比較しその差異をあきらかにすることを試みた。

また、本邦では GM-CSF 製剤は未承認であり、吸入治療薬として開発するには、前臨床試験として動物での吸入毒性試験が必要である。そこで吸入動物モデルの解析の具体的な手法についての検討を行った。

B. 研究方法

①GM-CSF 吸入治療後の予後解析。

2005 年～2008 年に GM-CSF 吸入治療全国多施設第 II 相試験（高用量導入治療—250 μ g/日吸入 8 日間+休薬 6 日間 6 サイクル→低用量維持治療 125 μ g/日吸入 4 日間+休薬 10 日間の 6 サイクル、総 GM-CSF 用量 15mg、全治療期間 24 週）に参加し治療を完遂した 35 例について、各施設の担当医に、予後調査表を定期的に配布して、追加治療の有無、および治療後 6 か月ごとの重症度を記載していただき、回収して解析した（図 1）。

35 例の 30 ヶ月間の観察結果より追加治療を要した群（追加治療群）と無治療のまま経過しえた群（追加治療なし群）とに分け、各患者の治療前後の動脈血ガス分析、CT、肺機能、血算、血清学的検査所見、気管支肺胞洗浄液(BALF)の細胞分画所見等の臨床所見を比較検討した。

再治療群・無治療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。

②GM-CSF 吸入治療薬の前臨床試験の検討

ヒト GM-CSF は種特異性が高く、マウス等

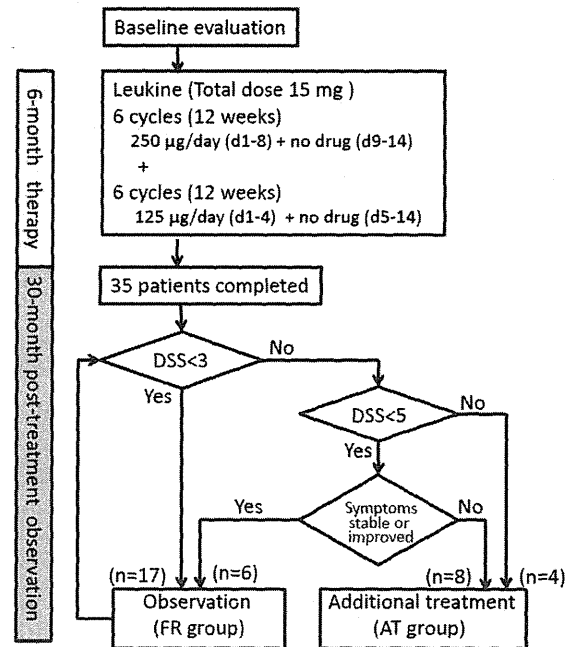


図 1. GM-CSF吸入治療後の30か月間の予後観察

の齧歯類では生理活性を示さない。そこで、本研究では、専門飼養施設で、獣医師の指導のもとで、ヒトに近いカニクイザルでの GM-CSF 吸入実験の方法を検討した。吸入用量を確実にするため、マイクロスプレーカニューレ (PennCentury 社) で、カニクイザルに、GM-CSF 製剤を 3 日間気管内投与し、投与終了翌日と 1 週間後の細径気管支鏡による気管支肺胞洗浄液採取で評価した。

さらに、血中薬物動態の解析のため、投与前、単回投与後 0 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、時間、24 時間の時点での採血を行い、GM-CSF 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

上記の治療研究は参加各施設での倫理委員会承認され、観察結果は、本研究班の定例の班会議で報告・検討された。

上記の動物実験については、専門飼養施設イナリサーチ社の動物実験審査委員会ならびに新潟大学動物実験委員会に実験計画書を提出して

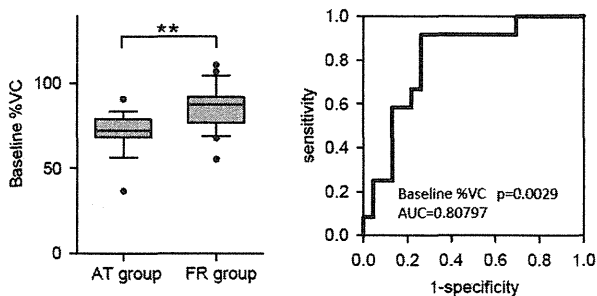


図2. 治療前肺活量と追加治療との関連とROC曲線

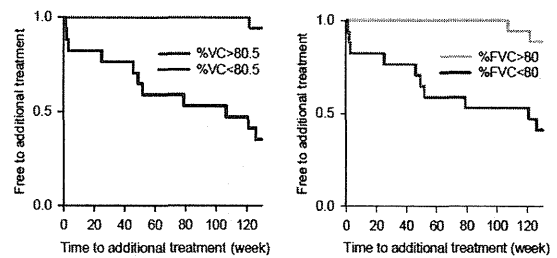


図3. 治療前%VCと%FVCの高値群と低値群間での無治療期間の比較

承認を受けた。実施にあたっては、飼養施設の獣医師が立ち会い、実験操作が苦痛の軽減に配慮して倫理的に行われていることを確認した。

C. 研究結果

①M-CSF 吸入治療後の予後解析。

観察期間中、23例は追加治療なく経過し（FR群）、12例は追加治療を要した（AT群）。両群間で、治療前の年齢、性別、徴候、酸素化指標、血清GM-CSF抗体価に有意差はなかったが、治療前%VCがFR群で有意に高かった（図2）。

FR群では、治療後改善した重症度が観察期間終了時まで維持された。追加治療までの期間のKaplan-Meier分析では、%VC高値群（%VC > 80.5）と%VC低値群で有意差がみられた（ $p < 0.0005$ ）（図3）。

これらの結果は、吸入治療開始前のPaO₂、奏効性、血清マーカー等での層別解析でも、同じ結果がみられた。治療前の%FVCに関しても同様に、FR群で有意に高く、追加治療までの期間も%FVC高値群で有意に長い結果であった。また（図3）、治療後の%DLcoでも、同様の結果がみられた。以上の結果から、GM-CSF吸入治療の効果が半数以上の患者で維持され、治療前の%VCが再発の予測因子となりうることが示唆された。

また、GM-CSF吸入治療終了後2年以上を経た検体を取り得た18例の血中抗GM-CSF抗体

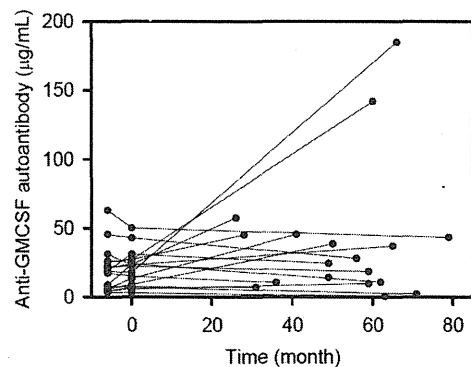


図4. GM-CSF抗体価の推移. 治療後2年以上経た時点での血清抗体価は、治療直後の抗体価と有意の差がみられなかった(n=18).

価は、治療直後の抗体価と比し、有意差はみられなかった（図4）。

②GM-CSF 吸入治療薬の前臨床試験の検討

3日間連続スプレー投与による吸入予備実験では、投与後、全身状況に変化はなく、投与終了翌日の気管支肺胞洗浄液・血漿中から、GM-CSF投与群でのみGM-CSF活性が検出された。

末梢血白血球数の増加および気管支肺胞洗浄液中の総細胞数の増加をみとめた（図5、6）。

これらよりGM-CSF製剤の気管内スプレー投与により生理学的変化を、血液学的検査や細径気管支鏡での気管支肺胞洗浄液で評価できることが示唆された。

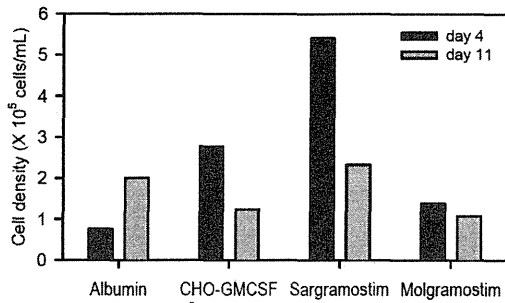


図5. GM-CSFスプレー3日間投与(day1-3)後のBALF中の細胞密度

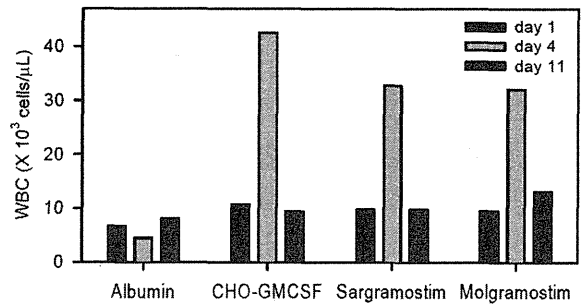


図6. GM-CSFスプレー3日間投与(day1-3)後の血中の白血球数

スプレー単回投与での血中 GM-CSF 濃度推移曲線の検討では、マイクロスプレーによる気管内単回投与を、0.5mg/body、0.05mg/body、0.005mg/body の3群で行ったところ、最小用量での0.005mg/bodyでも検出限界(3pg/mL)を越える濃度がみられ、用量に依存して血中濃度の上昇がみられた(図7)。

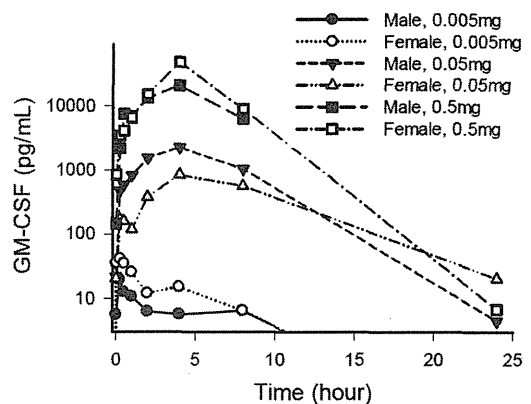


図7. GM-CSFスプレー単回投与後の血中のGM-CSF濃度の推移

D. 考察

本研究は、GM-CSF吸入治療を完遂した肺胞蛋白症患者35例の治療後経過を30カ月間観察した初めての報告である。23例が追加治療なく経過し、GM-CSF吸入治療の効果が持続していることが示された。また治療前の肺活量が治療後の再治療の必要性との関連する可能性があることが示された。

本症における肺活量の低下の機序としては、①肺内サーファクタント物質の貯留、および②肺の線維化が考えられる。前者は、本症における換気血流不均等の増加や肺活量と比べて不釣り合いに低下しているDLcoと関係がある可能性がある。この点に関して、GM-CSF皮下注射治療を受けた14例の検討で、治療前の血清SP-Aが、肺活量と相関することが報告されており、本研究でも、治療前後のSP-Aは肺活量と相関し、治療後のSP-Aのみ追加治療の必要性と関連がみられた。サーファクタント物質自体は、肺胞内のクリアランスの改善に伴って除去され

るので、追加治療に関係するような肺組織の障害とは関連がない可能性がある。

肺組織の線維化は、GM-CSF吸入治療や肺洗浄のあとも引き続き存在しうる。本症における肺の線維化については、酸素への暴露や肺洗浄の繰り返しなどが、線維化につながることを示唆されている。不可逆的な癒痕化は、本症では稀であるが、本症患者中には、肺活量が低下し、予想以上に予後の悪い例が少数存在する。本研究でも、FR群ではGM-CSF吸入により%VCは85.9%から93.4%に改善したが、AT群では71.6%から74.2%とほぼ変わらなかった。この差は、肺活量低下の機序としてのサーファクタント物質の沈着と線維化の関与のバランスによる可能性がある。

今後、肺活量が低下している本症患者の治療方法を考える必要がある。GM-CSF 吸入治療は、血清の GM-CSF 抗体価を変化させない。しかし、気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF 抗体価は奏効例では減少する。これは肺胞内のクリアランスの改善による可能性が高い。将来の治療法として、GM-CSF 吸入治療と肺洗浄の併用治療や全身的な GM-CSF 抗体産生を減少させるためのリツキマブ投与との併用などが考えられる。

本研究で、ヒト GM-CSF 製剤をマイクロスプレーカニューレを用いてカニクイザルに経気道的に投与することで、①血中での GM-CSF 濃度を確認できること、②動物での末梢血中白血球上昇等の全身的な生理学的効果を確認できること、③細径気管支ファイバースコープを用いた気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取により、局所での GM-CSF の検出が可能であること、④ BALF 中の細胞数上昇等の、GM-CSF 投与による局所での生理学的効果を確認できること、⑤一定以上の投与量であれば単回投与での薬物血中濃度推移曲線を描けること、が示唆された。これまで、肺胞蛋白症の GM-CSF 吸入治療の臨床研究で用いられている吸入装置は、ジェットネブライザーであり、今後、各種ネブライザーの吸入効率を評価しながら、ネブライザーでの動物実験を進める必要がある。

E. 結論

本研究では、GM-CSF 吸入治療を受けた肺胞蛋白症患者において、追加治療の必要性を予想する上で、肺活量が臨床的に有用である可能性があることが示された。

マイクロスプレーによるカニクイザルへの GM-CSF 製剤の気管内投与により、血中、気管支肺胞洗浄液中の GM-CSF も検出可能であり、薬物動態推移曲線を得られる可能性が示唆された。今後、吸入効率を評価しながらネブライザーでの動物試験を進める基盤となると考えられる。

F. 健康危険情報

上記の GM-CSF 吸入治療を完遂した 35 例の肺胞蛋白症例の治療終了後 30 カ月間の観察期間中に、重篤な遅発性有害事象はみられなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, Kaneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med* 106:284 – 293, 2012.
2. Nei T, Urano S, Motoi N, Takizawa J, Kaneko C, Kanazawa H, Tazawa R, Nakagaki K, Akagawa KS, Akasaka K, Ichihata T, Azuma A, Nakata K. IgM-type GM-CSF autoantibody is etiologically a bystander but associated with IgG-type autoantibody production in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 302:L959-64, 2012.
3. 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 Respir J*. 39:777-780,

2012.

4. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, Satake M. Runx1 Deficiency in CD4+ T Cells Causes Fatal Autoimmune Inflammatory Lung Disease Due to Spontaneous Hyperactivation of Cells. *J Immunol.* 188:5408-20, 2012.
 5. Satoh H, Tazawa R, Sakakibara T, Ohkouchi S, Ebina M, Miki M, Nakata K, Nukiwa T. Bilateral peripheral infiltrates refractory to immunosuppressants were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *Intern Med.* 51(13):1737-42, 2012.
 6. Tazawa R, Inoue Y, Arai T, Takada T, Kasahara Y, Hojo M, Ohkouchi S, Tsuchihashi Y, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Ishii H, Nei T, Morimoto K, Nasuhara Y, Ebina M, Akira M, Ichiwata T, Tatsumi K, Yamaguchi E, Nakata K. Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy. *Chest* in press.
 7. Hisata S, Moriyama H, Tazawa R, Ohkouchi S, Ichinose M, Ebina M. Development of pulmonary alveolar proteinosis following exposure to dust after the Great East Japan Earthquake. *Respir Investig.* 51(4):212-6, 2013.
 8. Nei T, Urano S, Itoh Y, Kitamura N, Hashimoto A, Tanaka T, Motoi N, Kaneko C, Tazawa R, Nakagaki K, Arai T, Inoue Y, Nakata K. Light chain (κ/λ) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol.* 2013 in press.
2. 学会発表
 - C. 国際学会
 1. Tazawa R, Arai T, Takada T, Kasahara Y, Tsuchihashi Y, Nei T, Hojo M, Nakayama H, Yokoba M, Ohkouchi S, Ishii H, Eda R, Nasuhara Y, Ebina M, Akira M, Yamaguchi E, Inoue Y, Nakata K. Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP) And Inhaled Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) Therapy--Clinical Features Predicting Recurrence. American Thoracic society International conference 2012, San Francisco, 2012.5.
 2. Nakata K, Nei T, Motoi N, Tazawa R, Urano S, PAP Study Group in Japan. Repertoire Analysis Of GM-CSF Autoantibody Mrna By Next Generation Sequencing In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic society International conference 2012, San Francisco, 2012.5.
 3. Nei T, Urano S, Kaneko C, Tazawa R, Inoue Y, Arai T, Hirose M, Nakagaki K,