

201409004A(1/2)

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験

（H24- 臨研推 - 一般 - 003）

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

（1/2 冊）

研究代表者 田澤 立之

平成 27 (2015) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験

(H24-臨研推一般 - 003)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

(1/2 冊)

研究代表者 田澤 立之

平成 27 (2015) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告

- 肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験----- 1
田澤立之

II. 分担研究報告

1. サル肺胞マクロファージを用いた、in vitro での PAP 患者肺胞内の再現の試み----- 11
中田 光
2. GM-CSF 薬理試験の検討----- 14
湯尾 明
3. 指定難病肺胞蛋白症の認定基準紹介と
GM-CSF 吸入治療開発の海外の動向に関する報告----- 17
井上 義一
4. 生体における GM-CSF 生物活性測定に関する研究----- 20
内田寛治
5. 種間での GM-CSF 薬理効果の検討に関する研究----- 24
中垣和英
6. 「肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験」に関する研究----- 27
井上 彰

III. 項目別研究報告

1. 生体における GM-CSF 生物活性測定に関する研究----- 31
内田寛治
2. 種間での GM-CSF 薬理効果の検討に関する研究----- 34
中垣和英, 布村由香
3. カニクイザルでの GM-CSF 吸入単回投与による薬物動態解析の検討----- 37
田澤立之, 中垣和英, 伊藤祐子, 橋本淳史, 田中崇裕, 赤坂圭一, 中田光
4. カニクイザルでのヒト GM-CSF 製剤反復気管内投与による抗 GM-CSF 抗体産生----- 42
田澤立之, 中垣和英, 伊藤祐子, 橋本淳史, 田中崇裕, 赤坂圭一, 中田光

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 51

V. (資料) 動物実験報告書----- 60

I . 総括研究報告

肺胞蛋白症の吸入治療のための新規GM-CSF製剤の非臨床試験

研究代表者 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 准教授

研究要旨：自己免疫性肺胞は、蛋白症顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）に対する自己抗体による肺胞マクロファージのサーファクタント除去能の低下により呼吸不全を生じる稀少肺疾患で、新規治療薬として本邦未承認のリコンビナントヒト（rh）GM-CSF 製剤の吸入薬開発に向けた非臨床試験の方法を考えるため、CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤を開発中の国内企業および酵母由来製剤を製造している企業と連携して、その薬理学的特性と哺乳動物を用いた吸入毒性試験の方法を検討してきた。今年度は以下の結果を得た。①サル肺胞マクロファージを *in vitro* で rhGM-CSF 製剤と GM-CSF 抗体存在下で培養しサーファクタントを加えるとサーファクタント処理能が低下し泡沫状マクロファージとなりうることを示唆された、②GM-CSF 製剤のコロニーアッセイでは、各製剤とも 1 ng/ml の濃度においてほぼ最大の活性を有し、大腸菌由来の GM-CSF の活性がやや高い傾向にあった。③GM-CSF の生物活性評価のための好中球表面に発現する接着因子 CD11b を測定する CD11b stimulation index の開発では、Intra-individual variation が有意に小さく、異なるサンプル同士の比較が可能なが分かった、④カニクイザルへの GM-CSF 製剤の単回吸入投与を、気管内噴霧、膜型ネブライザー、ジェットネブライザーを用いて行い、いずれの方法でも血中 GM-CSF 濃度推移・薬物動態解析が可能であった。⑤大腸菌製剤および CHO-GMCSF のカニクイザルへ 12 週間の間欠的経気道反復投与を 3 コース行い、血中で抗 GM-CSF 抗体が検出され、泡沫状マクロファージの出現等がみられ、⑥この抗体の中和活性については個体差が大きいたことが示された、⑦以上の結果および酵母由来製剤の製造企業の協力を得て、医薬品・医療機器総合機構との薬事戦略相談での事前相談、対面助言を経て、6 カ月間反復吸入投与毒性試験計画、検証試験実施計画、健常成人での薬物動態試験計画を策定し、日本医療研究開発研究費へ分担研究者の中田を研究代表者として応募し、幸いに採択され、次年度よりこれらの試験を開始の予定である。

研究分担者
中田 光
新潟大学医歯学総合病院
生命科学医療センター・教授
湯尾 明
国立国際医療研究センター研究所・部長
井上 義一
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・部長
中垣 和英
日本獣医生命科学大学獣医学部・准教授
内田 寛治
東京大学医学部・講師
井上 彰
東北大学病院・特任准教授

A. 研究目的

肺胞蛋白症は、肺胞の表面張力を減じるのに重要なサーファクタント物質が末梢気腔内に異常に蓄積して呼吸不全に進む稀少肺疾患である。その 9 割が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原因と考えられる自己免疫性肺胞蛋白症である。手術室での全身麻酔下での全肺洗浄が標準治療とされるが侵襲が大きいため、本研究グループではより簡便な治療として GM-CSF 吸入の治療研究を 2000 年より開始し、2005 年—2008 年に本邦 9 施設による多施設第 2 相試験を世界に先駆けて実施し、その有効性と安全性を示した。

本研究では、本邦未承認の GM-CSF 製剤の吸入薬としての開発のため、CHO 細胞由来 GM-CSF 製

剤（以下 CHO-GM-CSF）を開発中の国内企業および酵母由来 GM-CSF 製剤の提供を製造販売する企業と連携して、薬理学的特性と哺乳動物を用いた吸入毒性試験の方法の検討をしている。本年度は、①GM-CSF とその抗体の肺胞マクロファージの *in vitro* での効果、②各種 GM-CSF 製剤のコロニーアッセイによる正常ヒト造血前駆細胞に対する増殖分化誘導作用の評価、③シグナル伝達系のモニター方法としての好中球表面の CD11b の発現量測定系の開発、④気道内投与方法としてマイクロスプレー、膜型ネブライザー、ジェットネブライザーによる GM-CSF 製剤の単回投与実験、⑤GM-CSF 製剤のマイクロスプレーによる経気道反復投与での抗体産生観察実験、⑥8 出現抗体の解析、⑦6 カ月反復吸入投与毒性試験と検証試験実施計画案の策定の 7 項目について検討・実施した。

B. 研究方法

GM-CSF 製剤

1. CHO 細胞由来ヒト GM-CSF (JCR ファーマ株式会社提供) 1mg/mL
 2. 酵母由来ヒト GM-CSF (一般名サルグラモスチム, 商品名ルーカイン, Genzyme 社提供) 40mg/6mL
 3. 大腸菌由来ヒト GM-CSF (一般名モルグラモスチム, Amoytop 社) 0.15mg/vial
1. および 2. については PBS に溶解された状態で提供され、3. については、凍結乾燥品の製剤を購入した。

①GM-CSF とその抗体の肺胞マクロファージの *in vitro* での効果

細胞形態観察

サル肺胞マクロファージを、MEM 培地を用いて、GM-CSF(10pM) または GM-CSF(10pM)/GM-CSF auto antibody(GM/Ab 1mcg/ml) で培養を行い、5 日目に形態観察を行った。

マンノースレセプターの発現

培養 7 日目に、抗 Mannose-receptor 抗体 (Beckman Coulter, USA) で染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

ウシサーファクタントを用いた、サーファクタント分解能の測定

サル肺胞マクロファージを、MEM 培地を用いて、GM-CSF(10pM) または GM-CSF(10pM)/GMAn(1mcg/ml) で培養を行い。5 日目にウシサーファクタント (Teijin, Japan) を添加し 2 時間暴露させる。その後サ

ーファクタントを洗浄しメディウムを再度入れ、2 日間培養した後に、ライトギムザ染色、位相差顕微鏡、Oil-Red O 染色で確認をした。

②コロニーアッセイ

対象細胞は、健常成人由来のヒト骨髓血液細胞で、半固形培地は、メチルセルロースを用いた市販の培地 (MethoCult4230) を使用した。細胞培養密度は、 3×10^4 / ウェルで、GM-CSF の段階濃度希釈は、10 ng/ml、1 ng/ml、0.1 ng/ml、0.03 ng/ml、0.01 ng/ml、0.001 ng/ml、とした。14 日間の培養の後にウェルごとのコロニー数を目視にて算定した。

③好中球表面の CD11b の発現量測定系

健常ボランティアより採取されたヘパリン血を用い、血液 200 μ l 中に、GM-CSF および各種サイトカイン、ケモカインを最終濃度 10 ng/mL となるよう投与し、37°C 30 分培養し、その後 FITC-CD11b 抗体を混和して、氷上 15 分培養することで得られる、CD11b 値の基礎値からの上昇率を比較した。また GM-CSF 10ng/mL による刺激を行う、CD11b stimulation index (CD11bSI) を各サンプルでそれぞれ 5 回測定し、各検体の繰り返し測定のみならず (Intra-individual variation) と、それらの平均で得られる各サンプルの代表値の、健常者全体平均値からのばらつき (Inter-individual variation) を比較した。

④GM-CSF 製剤の経気道の単回投与実験

中等用量雌雄各 1 匹のカニクイザルに酵母由来 GM-CSF 製剤を単回気管内投 (0.05 mg/body) 又は 2 種のネブライザー (膜型/ジェット) を用いて単回吸入投与 (0.5 mg/body) し、投与前および投与後 24 時間まで経時的に血漿を採取した。GM-CSF の作用を確認するため、一般状態観察、体温測定、血液検査及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取を行った。

⑤GM-CSF 製剤経気道反復投与での抗体産生

昨年度、CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤および大腸菌由来 GM-CSF 製剤の 2 種類の製剤を用いて、マイクロスプレーによる気管内噴霧投与 (15 μ g/body/回, 2 回/週, 12 週) を施行した各製剤オス 2 例のカニクイザルに対し、今年度、3 ヶ月の休薬期間を置いて、2 コース目のマイクロスプレーによる気管内噴霧投与 (15 μ g/body/回, 2 回/週, 12 週) を施行し一般状態観察、定期的に採血での抗体の検出と血液検査及び 12

週後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取を行った。さらに2カ月の休薬期間を置いて、3コース目のマイクロスプレーによる気管内噴霧投与 (15 μ g/body/回, 2回/週, 12週) を施行し同様の観察を行い、剖検で肺の所見を確認した。

⑥GM-CSF抗体中和活性の測定

血漿の GM-CSF 中和活性は、血漿を系列希釈し、molgramostim または CHO-GM と反応を行い、中和されずに残存した GM-CSF 活性を TF-1 の増殖によって測定した。すなわち、ヒト型 GM-CSF 0.1ng/ml と系列希釈した血漿とを等量混合し、37C で1時間反応させた後、2 x 104 個の TF-1 細胞に加え、CO2 インキュベータ内で3日培養した。68時間目に WST-8 試薬(同仁化学)を加え、さらに4時間培養した後、マイクロプレートリーダーで、450nm の吸光度を測定した。GM-CSF のみの培養を0%、GM-CSF を加えない培養を100%抑制として、各希釈血漿で得られた吸光度から、減少した吸光度の割合を計算し、プロビット法によって、中和活性力価 IC50 を算定した。さらに、新潟大学より提供された各血漿の抗体量のデータから、血漿中の抗体 1 μ g の力価、すなわち比活性を計算した。

⑦6カ月間反復吸入投与毒性試験ならびに検証試験の実施計画策定

本課題を進め、慢性毒性試験計画を策定するため、PMDA の薬事戦略相談を受けた、事前相談として2012年9月7日、2013年7月30日、2014年3月28日の3回実施した結果をもとに2014年8月に対面助言を申し込み、10月24日に対面助言を受けた。さらに動物試験での策定のため2014年3月30日に事前相談を受けた。本年度の対面助言ならびに事前相談での相談事項を以下の通りである。

対面助言 (2014年10月24日)

- ・非臨床試験の項目の充足性について
- ・第I相試験の要否及びその実施時期について
- ・第III相試験 (検証的試験) の試験デザインについて

- 1) 目標例数の設定について
- 2) 用法・用量の設定について
- 3) 主要評価項目及び評価時期について
- 4) その他の評価項目について

事前相談 (2015年3月30日)

26週間反復吸入投与毒性試験での3用量での試験計画 (用量, 吸入器, 製剤) について

(倫理面への配慮)

①④⑤⑥については、専門飼養施設 (株式会社イナリサーチ) の動物実験審査委員会ならびに新潟大学動物実験倫理委員会により審査・承認された試験計画書に沿って実施され、採取された検体を用いた。

②については、患者検体は使用せず、動物実験も含まれない。正常ヒト骨髄細胞は幅広く流通する市販のものを用いるので「臨床研究に関する倫理指針」の適応は無い。

③については、健常者血液採取は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。被験者の同意を文書で取得したのち採血した。データは連結可能匿名化され、個人情報とは公開されない。

C. 研究結果

①GM-CSFとその抗体の肺胞マクロファージのin vitroでの効果

カニクイザルでの気管支肺胞洗浄で得られた肺胞マクロファージを rhGM-CSF と GM-CSF 抗体存在下で培養すると、細胞増殖生存活性が減少し、マンノースレセプターの発現が増えることが分かった。さらにウシ由来サーファクタント製剤を添加して培養すると、細胞内に分解されないサーファクタン様物質がみられ、泡沫状マクロファージも一部でみられ、サーファクタント分解能の減少が示唆された。脱シアリル化処理後の CHO-GMCSF による TF-1 細胞の長時間刺激細胞増殖/生存活性は脱シアリル化前の同濃度の CHO-GM-CSF に比べて顕著に減少し、大腸菌由来製剤、酵母由来製剤の活性と同等レベルになった。以上から、シアリル基が低濃度の CHO-GMCSF の細胞増殖/生存活性にプラスに作用していることが明らかとなった。

②各種GM-CSF製剤のコロニーアッセイによる正常ヒト造血前駆細胞に対する増殖分化誘導作用の評価

CHO 細胞由来、大腸菌由来、酵母由来のいずれの GM-CSF も 1 ng/ml の濃度においてほぼ最大の活性を有していた。Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF の活性が他の2製品よりやや高い傾向が認められた。

③シグナル伝達系のモニター方法としての好中球表面のCD11bの発現量測定系の開発

CD11bは接着因子として炎症反応の第一段階として鋭敏な指標であるが、複数のサイトカインでも活性化した好中球では細胞表面の発現量が増加する。このため、GM-CSFの特異性がどの程度であるかを検討したところ、一般的な炎症性、抗炎症性サイトカインの中では、GM-CSFによる刺激がもっとも強い反応を示す事があきらかとなった。また昨年度開発した方法で、健常者血液を用いてCD11b stimulation indexを測定したところ、同じサンプルの複数回測定によるばらつき(Intra-individual variation)と異なるサンプルのばらつき(Inter-individual variation)で、Intra-individual variationが有意に小さく、異なるサンプル同士の違いを比較検討しうることが証明された。

④マイクロスプレー、膜型ネブライザー、ジェットネブライザーによるGM-CSF製剤の単回投与実験

いずれの投与方法でも末梢血中の白血球数、好中球及び好酸球数、CRPの上昇が認められ、血中GM-CSFが検出可能で、24時間の濃度推移を測定できた。ネブライザーでの0.5mg投与とスプレーでの0.05mg投与はほぼ同等の血中濃度を示した。一般状態、体温及び一般細菌及び真菌検査に異常は認められなかった。中等量用量での血中濃度薬物推移濃度曲線をn=4として作成でき、薬物動態解析が可能であることが示された。

⑥GM-CSF製剤のマイクロスプレーによる経気道反復投与での抗体産生観察実験、

昨年度、CHO細胞由来GM-CSF製剤および大腸菌由来GM-CSF製剤の2種類の製剤を用いて、マイクロスプレーによる気管内噴霧投与(15 μ g/body/回、2回/週、12週)を施行した動物(各製剤オス2例)に、今年度、3ヶ月の休薬期間を置いて、同じ投与による抗体観察を12週行った。休薬期間直後には低値であった抗体価は、投与継続により、前回と同様のレベルの抗体価に達し、気管支肺胞洗浄液では一部に泡沫状マクロファージが見られた。さらに2カ月の休薬期間を置いて、週1回のGM-CSF気管内噴を12週間行ったところ、治療直前のGM-CSF抗体価は前回より高く、速やかに抗体価レベルは前回レ

ベルに達した。BALFでは、一部に泡沫状マクロファージがみられた。動物の一般状態観察、血算、血液生化学検査については、著しい変化はみられず推移した。

⑦6カ月間反復吸入投与毒性試験ならびに検証試験の実施計画策定

6カ月間反復吸入投与毒性試験案についてPMDAに对面助言で示して、①被験物質は3用量設定することが望ましい、②米国で実施予定の28日反復吸入毒性試験の結果を踏まえて用量を設定すべき、③実際に試験を計画する場合には、投与量の設定を含めて、事前に機構に相談することを勧める、との意見が示され、3月30日の事前相談で再度相談し、修正したGM-CSFのカニクイザルを用いた26週間反復吸入投与毒性試験計画案は次の通りである。

- ・試験系：カニクイザル 24匹(雌雄各12例)
- ・群構成：4群(対照群+被験物質3用量)、3例/群
- ・投与経路：検証試験で使用するネブライザーでの吸入投与
- ・用量：対照薬とGM-CSF 5mcg/kg/day(第Ⅲ相試験の用量に相当)を含む3用量

第Ⅰ相試験については、健康成人を対象とした単回投与による薬物動態の検討について、第Ⅲ相試験と同時期に可能な限り早い段階で薬物動態データが入手可能となるよう計画するよう機構の見解が示されたため、薬物動態試験の概要を作成し、機構に示してコメントを求めたところ、①健康成人における血中GM-CSF濃度の背景値が入手可能であればプラセボ対照群省略も一案、②用量漸増試験ではなく3用量並行実施で可とのコメントが示された。これらの意見をもとに以下のような概要の第Ⅰ相試験計画を策定した。

1 スキーム(次頁)

2 目的

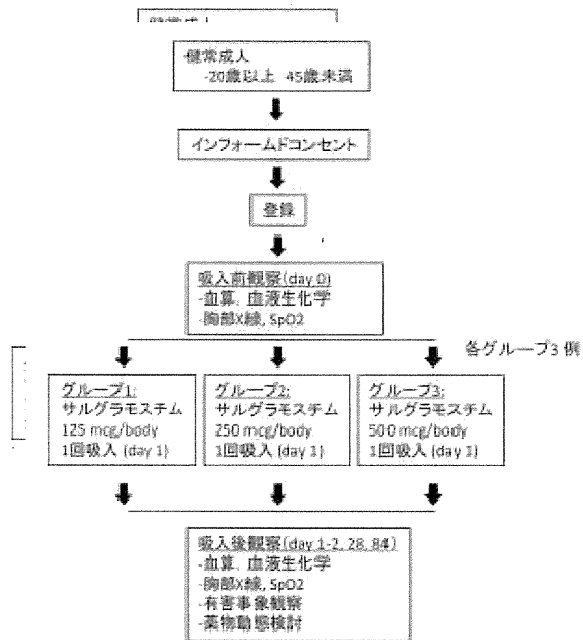
自己免疫性肺胞蛋白症を適応とするGM-CSF吸入製剤の、健常成人での薬物動態の解析を行い、有害事象発現割合を評価し、安全性の評価を行う。

- ・主要評価項目：薬物動態パラメータ
- ・副次評価項目：有害事象発現割合

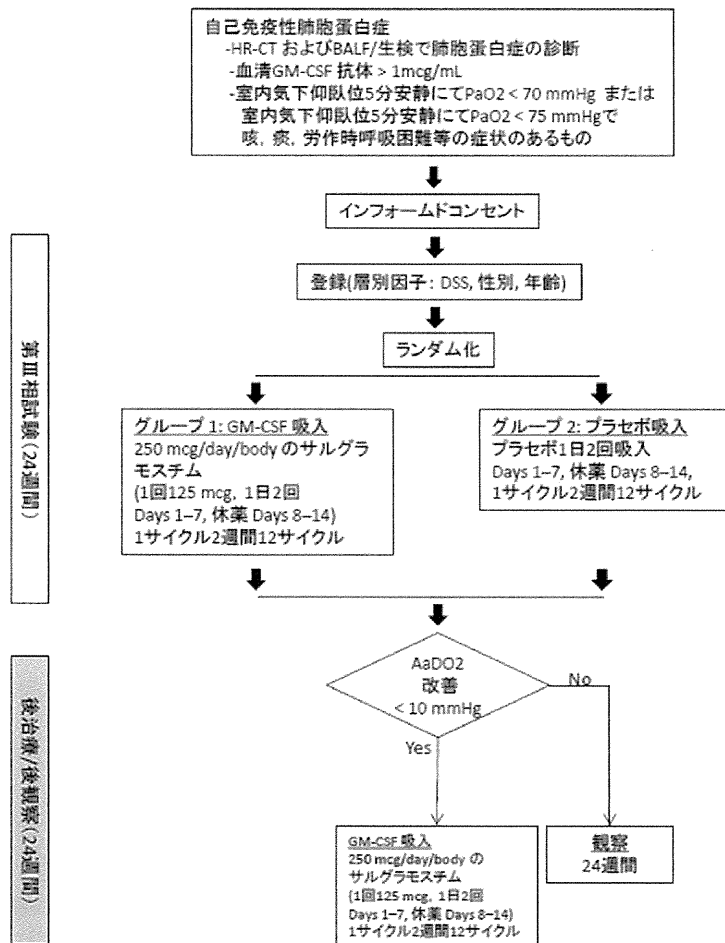
3 対象

登録時 20歳以上 45歳未満の 健常成人男性

薬物動態試験スキーム



検証試験スキーム



4 治療

- ・グループ1：GM-CSF 吸入製剤 125mcg/body を1回吸入，予定症例：実薬3例
 - ・グループ2：GM-CSF 吸入製剤 250mcg/body を1回吸入，予定症例：実薬3例
 - ・グループ3：GM-CSF 吸入製剤 500mcg/body を1回吸入，予定症例：実薬3例
- 5 予定登録数と登録期間
- ・予定登録参加者 9例
 - ・登録期間：3か月 予定例数に達しないときさらに3か月延長する

検証試験について、治験実施計画案を策定し、対面助言で示して、以下の概要で概ね受け入れ可能とのコメントで、さらに

1. スキーム（前頁）
 2. 目的：自己免疫性肺蛋白症患者におけるGM-CSF 吸入の安全性およびAaD02改善における有効性の確認
 3. 目標例数：60例（実薬30例 偽薬30例）
 4. 用法・用量：（125 μ g/回、1日2回、7日間吸入投与後、7日間休薬を1コースとして、12コース）
 5. 主要評価項目：ベースラインからのAaD02の改善量
 6. 評価時期：治験薬投与開始後24週時点
- その他の評価項目：徴候（QOL，息切れ，咳），酸素療法の必要性，肺機能（%VC，%DLCO，PaO₂），画像所見（CTスコア），血清マーカー（KL-6，CEA，CYFRA 21-1，SP-A，SP-D，LDH，抗GM-CSF抗体。）

D. 考察

肺胞マクロファージのGM-CSF製剤とGM-CSF抗体の両方の刺激により患者肺胞内のマクロファージの再現実験を試みた今回の研究では、M2マクロファージのマーカーであるマンノースレセプターの発現が上がることから、GM-CSF単独での細胞とは別の分化傾向をしめし、その結果、サーファクタント分解能の減少が見られることが示唆された。

本研究では、大腸菌由来のGM-CSFはコロニーアッセイでは、他製剤に比して有意差はないものの活性がやや高い傾向がみられた。一方、CHO細胞由来GM-CSFは、低濃度においては、大腸菌あるいは酵母由来のGM-CSFに比べて、細胞の増殖や生存をより強く促進することが明らかになっており、シアル酸付加による、細胞への結合や細胞内への内在化・分解が遅れ、結果としてGM-CSFの効果が長時間持続するためであるとの

仮説を検証する必要がある。

好中球表面上のCD11bが好中球の活性化度の鋭敏なマーカーであり、適切な実験環境管理下であれば、再現性が高く、GM-CSF生物活性を簡便に短時間で測定できることが昨年の研究で示され、今年度、サンプル内での誤差が小さいことが示され、十分にサンプル間の比較ができることが示された。さらに抗原抗体複合体の定量系も考慮中である。

カニクイザルへの気道内投与の方法の検討として、マイクロスプレー、膜型ネブライザー、ジェットネブライザーによるGM-CSF製剤の単回投与実験を行ったが、ネブライザー投与では、投与薬剤の相当量が呼気中に放出され、臨床的にはネブライザーの吸入効率率は、10-15%程度とされるため、本研究では、マイクロスプレーでの投与量の10倍量をネブライザーでの投与量とした。今年度の中等用量での試行でも、この投与量設定は概ね妥当だったと考えられ、ネブライザーでの0.5mg投与とスプレーでの0.05mg投与はほぼ同等の血中濃度を示した。また膜型ネブライザーとジェットネブライザーは同様の血中濃度を示した。しかし、この中等用量でも体重換算したヒトでの用量の30倍以上でありヒトでの薬物動態試験ではより鋭敏な測定方法の検討も必要と考えられた。

CHO-GMCSF、大腸菌由来製剤のいずれの経気道的な反復投与によっても、血中抗GM-CSF抗体が出現し、休薬期間をおいた再投与では抗体出現が早期になり、一部の個体では中和活性も上昇する場合があることが分かった。BALF中の一部に泡沫マクロファージの出現がみられた。さらに反復投与を続けた場合の抗体の特性の変化には個体差があることが示唆された。

本研究での結果および、酵母由来製剤を米国で製造販売しているジェンザイム社の意向より、酵母由来製剤での、製造販売承認を目標とした医師主導治験および非臨床試験の可能性が考えられるようになった。PMDAとの薬事戦略相談を繰り返し懇切なコメントをいただき、新潟大学病院プロトコルデータセンターの統計解析担当者の支援を得て検証試験の実施計画書案を作り、同社からの資料も添付して本年度は対面助言を受けることができた。対面助言での機構の意見・見解をもとに、26週反復吸入投与毒性試験、検証試験ならびに薬物動態試験の計画を策定し、日本医療研究開発機構研究費への応募につながることができた。

E. 結論

GM-CSF とその抗体の共刺激によりすでに分化した肺胞マクロファージのクリアランス能や分化の方向が変わる可能性が示された。顆粒球の CD11b 発現の測定系は実験条件を維持すればサンプル間の比較も可能なことが示された。カニクイザルへの気道内投与の方法の検討として、マイクロスプレーによる気管内噴霧は、ネブライザーに比べ、1/10 程度の用量で同等の効果が得られ、膜型とジェット型のネブライザーはほぼ同等の用量でよいことが明らかとなった。また、GM-CSF 製剤の経気道的反復投与により、常用量 (5 μ g/kg/回) 週 2 回投与で抗 GM-CSF 抗体を検出できるようになることが明らかになり、さらに抗体の中和活性等の解析をする必要がある。

これまでの検討結果および薬事戦略相談を通じた PMDA のコメントを得て、本研究の目的である、6 カ月間反復吸入投与試験の計画を立てることができ、さらに医師主導治験の形で行う検証試験と薬物動態試験の計画を策定し、分担研究者の中田を研究代表者として AMED 研究費に応募し、幸いに採択通知を受け、次年度よりこれらの試験を開始の予定である。

謝辞

CHO 細胞由来 GM-CSF のご提供と情報の提供をしてくださった JCR ファーマ株式会社に感謝いたします。酵母由来 GM-CSF 製剤を提供してくださった Genzyme 社に感謝いたします。また動物実験計画において貴重なご助言をいただき実施に際して多大なご支援をいただいた株式会社イナリサーチ に感謝いたします。

F. 健康危険情報

本研究は、in vitro および動物での解析であるため、ヒトでの該当する情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表 (4件)

1. Akasaka K, Tanaka T, Maruyama T, Kitamura N, Hashimoto A, Ito Y, Watanabe H, Wakayama T, Arai T, Hayashi M, Moriyama H, Uchida K, Ohkouchi S, Tazawa R, Takada T, Yamaguchi E, Ichiwata T, Hirose M, Arai T, Inoue Y, Kobayashi H, Nakata K. A mathematical model to predict protein wash out kinetics during whole-lung lavage in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Physiol Lung Cell*

Mol Physiol. 2015;308(2):L105-17.

2. Nakagaki K, Nunomura Y, Uchida K, Nakata K, Tazawa R. Up-regulation of cluster of differentiation (CD) 11b expression on the surface of canine granulocytes with human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Vet Med Sci.* 2014;76(8):1173-6.
3. Hashimoto A, Tanaka T, Itoh Y, Yamagata A, Kitamura N, Tazawa R, Nakagaki K, Nakata K. Low concentrations of recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor derived from Chinese hamster ovary cells augments long-term bioactivity with delayed clearance in vitro. *Cytokine.* 2014;68(2):118-26.
4. 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 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy. *Chest.* 2014;145(4):729-37. (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

II. 学会発表

A. 国際学会 (5件)

1. R. Tazawa, K. Ito, T. Ogi, H. Ishii, T. Sakagami, Y. Ito, A. Hashimoto, T. Tanaka, K.-I. Akasaka, J. Tohyama, K. Nakata. Adult-Onset Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis Caused By CSF2RA Deletion. Annual Meeting of American Thoracic Society, May 18, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
2. H. Ishii, R. Tazawa, Y. Inoue, T. Nishizawa, T. Inui, T. Nagatomo, M. Yomota, S. Mikura, K. Hashimoto, T. Handa, K. Tomii, K. Nakata. Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis Complicating Myelodysplastic Syndrome Results In A Worsening Of Prognosis. Annual Meeting of American Thoracic Society, May 18, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
3. K. Nakata, K. Akasaka, T. Tanaka, T. Maruyama, R. Tazawa, E. Yamaguchi, T. Ichiwata. A Differential Equation For Permeation Of Antibody From Blood To

The Lung. Annual Meeting of American Thoracic Society, May 21, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA

4. Tazawa R, Nakagaki K, Ito Y, Hashimoto A, Tanaka T, Akasaka K-I, Nakata K. A Preclinical Study for Development of a New GM-CSF Inhalation Drug as a Treatment of Pulmonary Alveolar Proteinosis. 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, November 14, 2014, Bali International Convention Centre, Nusa Dua, Bali, Indonesia
5. Tazawa R. Rare Lung Diseases. 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, November 15, 2014, Bali International Convention Centre, Nusa Dua, Bali, Indonesia (招請講演)

B. 国内学会 (1件)

1. 田澤立之, 伊藤健一郎, 荻喬博, 石井晴之, (5名略)中田光. 成人発症遺伝性肺胞蛋白症と GM-CSF 受容体 α 鎖変異. 第54回日本呼吸器学会学術講演会. 2014年4月25日・大阪国際会議場・大阪
2. 田澤立之, 中垣和英, 伊藤祐子, 橋本淳史, 田中崇裕, 赤坂圭一, 中田光. GM-CSF 吸入製剤開発のための前臨床試験の検討. 第54回日本呼吸器学会学術講演会. 2014年4月25日・大阪国際会議場・大阪

3.

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

Ⅱ. 分担研究報告

サル肺胞マクロファージを用いた、*in vitro* での PAP 患者肺胞内の再現の試み

研究分担者 中田 光 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター教授

○橋本淳史¹、田中崇裕¹、伊藤祐子¹、田澤立之¹、中田光¹

1) 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

肺胞蛋白症は、患者肺胞内で異常産生された抗 GM-CSF 自己抗体が GM-CSF の作用を阻害し、肺胞マクロファージの成熟および活性が阻害される、それにより肺胞内にサーファクタント様物質が貯留し、呼吸不全等の症状を呈する。本課題では、PAP 患者肺内での、肺胞マクロファージと GM-CSF およびその抗体の関連について、*in vitro* で再現を試みた。カニクイザルでの気管支肺胞洗浄で得られた肺胞マクロファージを rhGM-CSF と GM-CSF 抗体存在下で培養すると、細胞増殖生存活性が減少し、マンノースレセプターの発現が増えることが分かった。さらにウシ由来サーファクタント製剤を添加して培養すると、細胞内に分解されないサーファクタン様物質がみられ、泡沫状マクロファージも一部でみられ、サーファクタント分解能の減少が示唆された。

A. 目的

自己免疫性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入療法は、同疾患に対する非侵襲的治療として、全肺洗浄法に代わりうる新治療として期待されている。本研究では、ヒトに類似した霊長類である、カニクイザルの肺胞マクロファージを使用することで、患者の肺胞内でどのようにして、肺胞マクロファージの機能障害がおき、肺胞蛋白症が発症するのかが *in vitro* で再現し原因の詳細な解明を目指すものである。

B. 対象と方法

B.1. 細胞

本課題に関連してカニクイザル飼養実験施設の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医学部動物実験倫理委員会で承認されたカニクイザルにおける気管支肺胞洗浄実験により得られた肺胞マクロファージを使用した。

B.2. rhGM-CSF

酵母由来のリコンビナントヒト GM-CSF 製剤の Sargramostim (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) を使用した。

B.3. 細胞形態観察

サル肺胞マクロファージを、Macrophage Serum Free Medium (GBCO BRL, Palo Alto, CA, USA) を用いて、GM-CSF(10pM) または GM-CSF(10pM)/GM-CSF auto antibody(GM/Ab 1μg/ml) で培養を行い、5 日目に形態観察を行った。

B.4. マンノースレセプターの発現

サル肺胞マクロファージを、Macrophage Serum Free Medium (GBCO BRL, Palo Alto, CA, USA) を用いて、GM-CSF(10pM) または GM-CSF(10pM)/GMAb(1μg/ml) で培養を行い、7 日目に、抗 Mannose-receptor 抗体((Beckman Coulter, USA)で染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

B.5. 細胞増殖生存活性の測定

サル肺胞マクロファージを、Macrophage Serum Free Medium (GBCO BRL, Palo Alto, CA, USA) を用いて、GM-CSF(10pM) または GM-CSF(10pM)/GMAn(1μg/ml) で培養を行い。

その後、培養液 100 μl に対して (5-[2,4-bis(sodiooxysulfonyl)phenyl]-3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazole-3-ium]) ; CCK-8, Doujindo, Kumamoto, Japan) を 10 μl を各ウェルに添加した。添加後さらに 37 °C、5% CO₂ の条件下で 4 時間培養を行い、各ウェルのホルマザン形成を OD_{450nm} として、吸光度計 (Bio-Rad, CA, USA) を用いて測定した。

B.6. ウシサーファクタントを用いた、サーファクタント分解能の測定

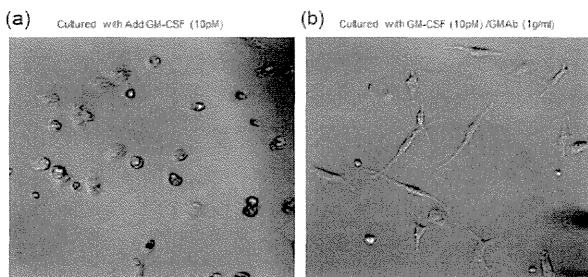
サル肺胞マクロファージを、Macrophage Serum Free Medium (GBCO BRL, Palo Alto, CA, USA) を用いて、GM-CSF(10pM) または GM-CSF(10pM)/GMAn(1μg/ml) で培養を行い。5

日にウシサーファクタント(Tejin, Japan)を添加し2時間暴露させる。その後サーファクタントを洗浄しメディウムを再度入れ、2日間培養した後に、ライトギムザ染色、位相差顕微鏡、Oil-Red O染色で確認をした。

C.結果

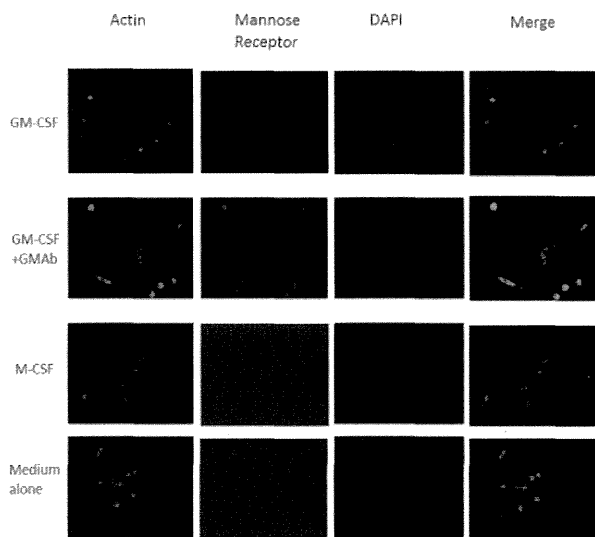
C.1. 位相差顕微鏡による細胞形態変化の観察

サル肺胞マクロファージを5日間、GM-CSFのみで培養したところ、細胞質の増大が見られたが(a) GM-CSF/GMAbで培養を行うと、細胞形態がスピンドルに変化した。(b)



C.2. マンノースレセプターの発現

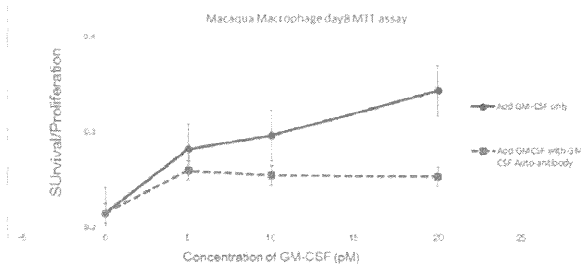
サルの肺胞マクロファージを、GM-CSF(10pM), GM-CSF(10pM)/GMAb(1µg/ml), M-CSF(10³unit), 培養液のみで7日間培養を行い、マンノースレセプターの発現を調べた、その結果、GM-CSF/GMAbで培養をしたマクロファージは他のマクロファージに比べて、このレセプターの発現が増強させていることがわかった。



C.3. 細胞増殖生存活性の測定

TF-1細胞を0-20 pMの濃度でGM-CSFまたはGM-CSF/GMAbを添加して、7日間培養後の細胞増殖/生存活性を測定した結果、GM-CSF/GMAbで培養したマクロファージは死滅はしなかったが、

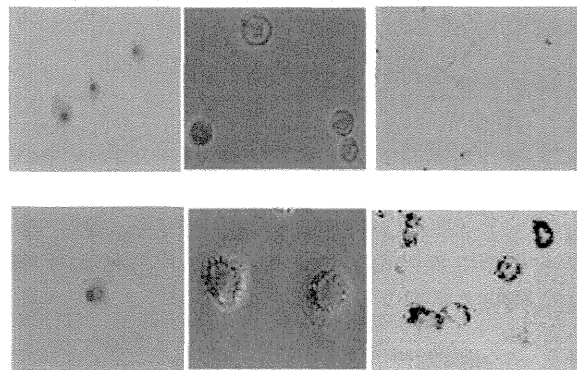
GM-CSF 単独で培養したマクロファージよりも低い活性を示した。



C.4. ウシサーファクタントを用いた、サーファクタント分解能の測定

サルの肺胞マクロファージを、GM-CSF(10pM), GM-CSF(10pM)/GMAb(1µg/ml)の2つの条件下で5日間培養した後、サーファクタントを添加し、さらに2日間培養を行った。この後に位相差顕微鏡、ライトギムザ染色、オイルレッドO染色を行ったところ、GM-CSF/GMAbで培養を行ったマクロファージには、細胞内に分解されていない、サーファクタント様物質が認められ、これはオイルレッドO染色陽性細胞が多数見られることで確認できた。また泡沫状マクロファージの存在も確認した。

(a) Wright-Giemsa (b) Phase Contrast (c) Oil Red O + DAPI



D.考察

本研究において我々は、サル肺胞マクロファージを用いた、*in vitro*における患者肺胞内の再現実験を行った。今回の研究により、GM-CSFおよびGMAbの両方が存在している場合、マクロファージは死滅することはないが、生存活性は減少する。また、M2マクロファージのマーカであるマンノースレセプターの発現が亢進することから、GM-CSF単独での細胞とは別の分化傾向をしめし、

その結果、サーファクタント分解能の減少が見られることが示唆された。

E. 結論

本研究において、我々は、*in vitro* での患者肺胞内の再現実験を行い、泡沫状マクロファージの作成を行った。

G. 健康危険情報

特記すべきことはありません。

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Akasaka K, Tanaka T, Maruyama T, Kitamura N, Hashimoto A, Ito Y, Watanabe H, Wakayama T, Arai T, Hayashi M, Moriyama H, Uchida K, Ohkouchi S, Tazawa R, Takada T, Yamaguchi E, Ichiwata T, Hirose M, Arai T, Inoue Y, Kobayashi H, Nakata K. A mathematical model to predict protein wash out kinetics during whole-lung lavage in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(2):L105-17.
2. Nakagaki K, Nunomura Y, Uchida K, Nakata K, Tazawa R. Up-regulation of cluster of differentiation (CD) 11b expression on the surface of canine granulocytes with human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Vet Med Sci.* 2014;76(8):1173-6.
3. Hashimoto A, Tanaka T, Itoh Y, Yamagata A, Kitamura N, Tazawa R, Nakagaki K, Nakata K. Low concentrations of recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor derived from Chinese hamster ovary cells augments long-term bioactivity with delayed clearance *in vitro*. *Cytokine.* 2014;68(2):118-26.
4. 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 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy. *Chest.* 2014;145(4):729-37.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

2. 学会発表

A. 国際学会 (5件)

1. R. Tazawa, K. Ito, T. Ogi, H. Ishii, T. Sakagami, Y. Ito, A. Hashimoto, T. Tanaka, K.-I. Akasaka, J. Tohyama, K. Nakata. Adult-Onset Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis Caused By CSF2RA Deletion. Annual Meeting of American Thoracic Society, May 18, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
2. H. Ishii, R. Tazawa, Y. Inoue, T. Nishizawa, T. Inui, T. Nagatomo, M. Yomota, S. Mikura, K. Hashimoto, T. Handa, K. Tomii, K. Nakata. Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis Complicating Myelodysplastic Syndrome Results In A Worsening Of Prognosis. Annual Meeting of American Thoracic Society, May 18, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
3. K. Nakata, K. Akasaka, T. Tanaka, T. Maruyama, R. Tazawa, E. Yamaguchi, T. Ichiwata. A Differential Equation For Permeation Of Antibody From Blood To The Lung. Annual Meeting of American Thoracic Society, May 21, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
4. Tazawa R, Nakagaki K, Ito Y, Hashimoto A, Tanaka T, Akasaka K-I, Nakata K. A Preclinical Study for Development of a New GM-CSF Inhalation Drug as a Treatment of Pulmonary Alveolar Proteinosis. 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, November 14, 2014, Bali International Convention Centre, Nusa Dua, Bali, Indonesia
5. Tazawa R. Rare Lung Diseases. 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, November 15, 2014, Bali International Convention Centre, Nusa Dua, Bali, Indonesia

B. 国内学会

○中田 光、稀少肺難病の克服に向けて、第53回日本呼吸器学会総会特別講演、2013年5月19日、東京国際フォーラム

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

GM-CSF薬理試験の検討

研究分担者 湯尾 明 独立行政法人国立国際医療研究センター部長

研究要旨

肺胞蛋白症という疾患は、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原因であり、その治療においては、体内（特に肺胞内）での GM-CSF の活性の復活が重要であり、適切な遺伝子組換え型ヒト GM-CSF の投与が有効である。その目的のために、新規 GM-CSF 製剤を開発中の国内企業と連携して、製剤の特性を検討して生物活性（正常ヒト造血前駆細胞に対する増殖・分化誘導作用）を評価するための研究を行った。用いた GM-CSF は、日本ケミカルリサーチ社製の CHO 細胞由来の GM-CSF、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF、Genzyme 社製の酵母 (sacchalomyces) 由来の GM-CSF (Leukine) であった。正常人由来のヒト骨髓血液細胞を作用対象細胞として、メルセルロースを用いた半固形培地でのコロニーアッセーを実施し、各濃度の GM-CSF を用いて容量依存曲線を作成した。その結果、いずれの GM-CSF も 1 ng/ml の濃度においてほぼ最大の活性を有していた。Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF の活性が他の 2 社製品よりやや高い傾向が認められた。

A. 研究目的

肺胞蛋白症は、肺胞内にサーファクタント物質が蓄積して呼吸不全にいたる疾患で、その 9 割が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) に対する自己抗体が原因である。本研究班の研究代表者らは、本症に対し 1 日 20 分程度の GM-CSF 吸入治療の有効性と安全性を、国内 9 施設による世界初の多施設第 2 相臨床研究で示した。しかし GM-CSF 製剤は本邦未承認で、入手に不安がある。本研究課題は、新規 GM-CSF 製剤を開発中の企業と連携して、製剤の特性を検討し、非臨床試験、特に哺乳動物を用いた毒性試験の方法について検討・企画立案する。

本分担研究者の分担課題は、複数の GM-CSF 製剤の培養系での生物活性を詳細に検討して、非臨床試験、特に哺乳動物を用いた毒性試験のための基礎データを集積することである。

B. 研究方法

半固形培地でのコロニーアッセーにより、GM-CSF の造血促進活性を定量的に検討した。用いたヒト GM-CSF は、日本ケミカルリサーチ (JCR) 社製の CHO 細胞由来の GM-CSF、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF、Genzyme 社製の酵母 (sacchalomyces) 由来の GM-CSF (Leukine) の 3 種類である。コロニーアッセーの対象細胞は、健常成人由来のヒト骨髓血液細胞で、半固形培地は、メチルセルロースを用いた市販の培地 (MethoCult4230) を使用した。コロニーアッセーのための細胞培養に際しての細胞培養密度は、 3×10^4 / ウェルで、GM-CSF の段階濃度希釈は、10 ng/ml、1 ng/ml、0.1 ng/ml、0.03 ng/ml、0.01 ng/ml、0.001 ng/ml、とした。14 日間の培養の後にウェルごとのコロニー数を目視にて算定した。コロニーの形態は、目視にて CFU-G (顆

粒球コロニー)、CFU-GM (顆粒球マクロファージコロニー)、CFU-M(マクロファージコロニー)に分類した。有意差の統計検定は、Standard t-testを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究には、患者検体は使用せず、動物実験も含まれない。正常人骨髄細胞は幅広く流通する市販のものを用いるので「臨床研究に関する倫理指針」の適応は無い。

C. 研究結果

正常人骨髄血液細胞を用いた半固形培地コロニーアッセーにより、GM-CSF の培養系での生物活性 (白血球系のヒト血液細胞に対する造血促進作用) を定量的に検討した。

用いた3種類のGM-CSF (JCR社製のCHO細胞由来のGM-CSF、Amoytop社製の大腸菌由来のGM-CSF、Genzyme社製の酵母由来のGM-CSF (Leukine)) はいずれも、様々の骨髄系のコロニーの形成を概ね容量依存的に誘導した。形成されたコロニーの形態は、典型的で過去の文献合致するものであった。

今回用いた3種類の遺伝子組換え型ヒトGM-CSFは、いずれも用量依存的にLarge CFU-Gを誘導した。いずれのGM-CSFも1 ng/mlの濃度においてほぼ最大の活性を有していた。ただし、Amoytop社製の大腸菌由来のGM-CSFの活性が他の2社よりやや高い傾向が認められたが、有意差は認められなかった。

D. 考察

本分担研究者らは従来より健常成人由来のヒト好中球などの白血球を用いて、遺伝子組換え型ヒトGM-CSFの生物活性評価をin vitroの測定系を駆使して行ってきた。具体的には、ヒト好中球活性酸素産生能に対するGM-CSFの増強効果を、様々の段階希釈濃度のGM-CSFの検討に

より容量依存曲線を求めて評価。検定してきた。その結果、大腸菌由来のGM-CSFとCHO細胞由来のGM-CSFは、その生物活性の最大値において同等で有る事を示してきた。ただし、濃度依存性においてCHO細胞由来のGM-CSFの方がやや高濃度を必要とする傾向も認められた。すなわち、CHO細胞由来のGM-CSFにおいては容量依存曲線が下ではなく右にシフトしている可能性が示唆された。一方、今回の班研究において、他の分担研究者によって、ヒト白血病細胞株の増殖刺激活性において、CHO細胞由来のGM-CSFの活性がむしろ上にシフトしていることを示唆する結果も得られている。

そのような中で、本分担研究者は、ヒト正常造血細胞への増殖分化に対する遺伝子組換え型ヒトGM-CSFの作用をコロニーアッセーという古典的で正当な手法により検討し、どの遺伝子組換え型ヒトGM-CSFもほぼ同等の活性を有することを明らかにした。ただし、ヒト好中球の場合と同様に、今回の検討でも、CHO細胞由来のGM-CSFの方がやや高濃度を必要とする傾向も認められた。

E. 結論

今回検討した3種類のGM-CSFは、いずれも1 ng/mlの濃度においてほぼ最大の活性を有していた。大腸菌由来のGM-CSFの活性が他の2製品(CHO細胞由来、酵母由来)よりやや高い傾向が認められたが、有意差は無かった。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

1. 西尾美和子、中原正子、湯尾 明、佐伯久美子：動脈狭窄の新規治療開発に向けた新しい細胞モデル系の開発。日本内分泌学会第32回内分泌代謝学サマーセミナー、2014年7月、山梨。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称：多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞、多能性幹細胞由来細胞凝集物と、その製造方法及び細胞療法、内科療法

発明者：佐伯久美子、湯尾 明、西尾美和子、川崎正子、佐伯晃一、長谷川護

出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター、ディナベック株式会社

国際出願番号 PCT/JP2012/61212

現在、欧州、米国など各国移行中

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

指定難病肺胞蛋白症の認定基準紹介と
GM-CSF吸入治療開発の海外の動向に関する報告

研究分担者 井上義一 NHO近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター長

研究要旨：肺胞たんぱく症（PAP）の指定難病を目指し、認定基準（案）が作成された（他研究班）。GM-CSFには酵母由来の sargramostim と、大腸菌由来の molgramostim の2種類あるが、両薬剤の臨床応用を目指して医師主導治験、企業治験の準備が進められている。

A. 研究目的

GM-CSF 吸入療法の承認後は、肺胞蛋白症(PAP)患者が医療費の補助を得る事は重要である。我々は肺胞蛋白症の指定難病化を目指してきたが、他研究費により指定難病の認定基準案を作成し、最近厚労省に提出した。認定基準案を紹介し、かつ GM-CSF 吸入療法の海外での現状を報告する。

B. 研究方法

肺胞蛋白症指定難病の認定基準案を紹介する（びまん性肺疾患に関する調査研究卵班、肺胞蛋白症、遺伝性間質性肺疾患に関する研究：重症難治化要因とその克服研究班）。GM-CSF 吸入療法は、インターネットで公開されている情報を紹介する。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

(1) PAP 指定難病の診断と認定基準（案）

PAP 診断アルゴリズムに従い自己免疫性 PAP（抗 GM-CSF 自己抗体未測定の場合は、特発性 PAP）、続発性 PAP、先天性 PAP、未分類 PAP を診断する。自己免疫性 PAP（特発性 PAP）及び先天性 PAP（遺伝性 PAP）を指定難病の対象とする。

(2) PAP 重症度と認定基準（案）

PAP 重症度に従い、難治例を考慮し管理区分重症度を計算する。管理区分重症度Ⅲ以上を対象とする。

【管理区分重症度】

以下の場合、難治例として、重症度を1度加えて管理区分重症度とする（Ⅰ～Ⅵで表記）。その場合、管理区分重症度の後に（ ）を附記し詳細を記入。

- 1) 明らかな肺線維症の合併
- 2) 反復、継続する感染症合併
- 3) CPAP の場合

※なお、症状の程度が上記の重症度分類等で一定以上に該当しないが、高額な医療を継続することが必要な者については、医療費助成の対象とする。

(3) GM-CSF 吸入治療開発の海外の動向

GM-CSFには酵母由来の sargramostim と、大腸菌由来の molgramostim の2種類について報告がされてきた。わが国でも両剤の使用報告がある。Sargramostim は本研究班で用いている薬剤であり、米国でも医師主導治験が準備されている。Molgramostim は欧州で共同企業治験の準備が進められ、わが国を含めた国際共同治験の準備が進められている。詳細は不明であるが中国でも開発が進められている。

D. 考察

GM-CSF 吸入療法の薬事承認後、使用できる薬剤があっても指定難病になっていなければ患者は治療を受ける事は困難であろう。PAP は2015年指定難病のリストに入っており、認定基準の固定、診療ガイドライン等の整備が前述の研究班を中心に進められている。

Sargramostim と molgramostim は糖鎖、アミノ酸配列が両剤は異なり、わが国でもともに使用できるようになれば患者にとりメリットがあると