

# 自己免疫性肺胞蛋白症の血清診断のための新規イムノクロマトグラフィーLine Check APAPの開発

**Development of a Novel Immunochromatographic Line Check APAP for Serological Diagnosis of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis**

なか た こう  
中 田 光  
Koh NAKATA

## はじめに

自己免疫性肺胞蛋白症(APAP)は、肺胞や呼吸細気管支などの末梢気道にタンパク、リン脂質、コレステロールからなる老廃物が貯留し、徐々に呼吸困難が進行する希少肺疾患<sup>1,2)</sup>で、わが国の年間新発生は、211人と推定されている<sup>3)</sup>。1999年、筆者らは本症の患者血液と肺に抗GM-CSF自己抗体(GMAb)があることを発見した<sup>4)</sup>。GM-CSFやその受容体欠損マウス<sup>5,6)</sup>が同症を発症することから病因物質であると提唱したが、後年サルへの患者由来自己抗体輸注により肺胞蛋白症モデル<sup>7)</sup>が坂上らにより作製され、病因として確立した。

GMAbは筆者らが開発し、2020年にMBL社から発売となったELISA kitを用いて、健常血清中にわずかに検出されるが( $0.15 \pm 0.11 \text{ U/ml}$ , n=90)、APAPでは、600倍以上の濃度( $90.95 \pm 123.0 \text{ U/ml}$ , n=78)で存在するため、血清診断が可能である<sup>8)</sup>(図1A, B)。ロジスティック回帰分析からカットオフ値は、1.65 U/mlである(図1C)。外注検査が可能となり、肺胞蛋白症ガイドラインでは、APAP診断のために、血清GMAbの測定は必須である<sup>9)</sup>。

一方、APAPに対するGM-CSF吸入療法は、2000年に重症APAPに試されてから、臨床試験が繰り返され、2016～2017年のPAGE試験で有効性と安全性が確立した<sup>10)</sup>。混合診療を避けるという当局の要請もあり、ノーベルファーマ社がGM-CSFばかりでなく、体外診断薬も薬事承認申請することとなった。しかし、ELISA法は高価だったので、安価なイムノクロマト法による血清診断薬を急遽開発することとなり、イム

ノクロマト法の開発・販売で実績があったコーポレートバイオ社に試作品開発を要請した。

イムノクロマト法は、臨床現場で短時間に判定できるという利点をもつ。受診日に結果ができるから、重症度判定までの時間を短縮でき、医療費助成制度申請を早められる。反面、多数検体の測定には向きであり、なによりも定量性がない。しかしながら、安価で感度のよいGMAb判定のイムノクロマトグラフィーが上市されれば、GM-CSF吸入療法の普及に拍車がかかるであろう。そのような意図から、GM-CSF吸入推進機構とコーポレートバイオ社との共同開発によるイムノクロマト血清診断薬が開発された<sup>11)</sup>。

## I. 方法

### 1. 対象者

文献8で用いた420血清検体から、APAP 211検体と他の肺疾患171検体を年齢、性別を一致させて抽出し、試作品の評価に用いた。標準ポリクローナル抗体は、文献8のSupplementに記載したものを用いた。検体使用は、新潟大学およびコーポレートバイオ社の倫理委員会に申請を行い、承認を得た上で、倫理指針に基づきオプトアウトで使用し、研究目的を公開した。

### 2. 試作品の製作

マウス抗ヒトIgG抗体(Sigma-Aldrich社)を金コロイド粒子で標識し、試作品のGMAb検出抗体としてグラスファイバー製結合パッド(Merck社)に浸漬後、乾燥させた。ニトロセルロース膜のテストライン位置に

GMAb が結合する大腸菌由来組換えヒト GM-CSF (Amoytop 社) を、コントロールライン位置にウマ由来抗マウス IgG 抗体 (Vector 社) を固相化した。試作品 (図 2A) の [S] に検体 5 $\mu$ L を滴下し、次に展開液 100 $\mu$ L を滴下部 [D] に滴下すると、予め結合パッドに含浸された金コロイド標識抗ヒト IgG 抗体は、血清中 IgG と免疫複合体を形成する。滴下された血清中に GMAb が存在する場合、この複合体は、固相化された組換えヒト GM-CSF [T] に捕捉され、赤紫色のラインとなって現れる。一方、組換えヒト GM-CSF に捕捉されなかった免疫複合体は結合パッド内をさらに移動し、コントロール判定部 [C] に固相化された抗マウス免疫グロブリン抗体に捕捉され、赤紫色のラインが現れる (図 2A, B)。

### 3. テストライン検出下限の調整

さまざまな量の固相化組換え GM-CSF および含浸金コロイド標識抗ヒト IgG 抗体を用いた試作品のセットを用意し、標準ポリクローナル抗体の希釈系列 (200、100、……、0.78、0.39、0 U/ml) をアプライしてテストラインの出現を観察した。試作品セットの中から、検出下限が ELISA のカットオフ値 1.65 U/ml に最も近くなるような最適な試作品を選んだ。

### 4. 最適化した試作品の臨床性能試験

血清 100 検体の陽性・陰性の判定は、上記のように調整し最適化された試作品を用いて 5 名の判定者による二重盲検法で行った。判定順序は、Fisher の実験計画法に基づくランダム化ブロック法を用いて、判定者ごとにランダムとした。血清と展開液を試作キットに滴下後 15 分経過後に、5 名の判定者が独立して目視判定した。判定の結果、コントロールラインとテストラインの両方が出現した場合を APAP 陽性、コントロールラインのみが出現した場合を陰性と判定した。結果は、各自のフォーマットに記入した後、新潟大学医療学総合病院臨床研究推進センターに送付され、APAP 群とその他の肺疾患群ごとに判定結果が集計された。

### 5. 血清 GMAbs 力価の測定

血清サンプルを希釈液 (PBS/1% BSA/0.1% ポリオ

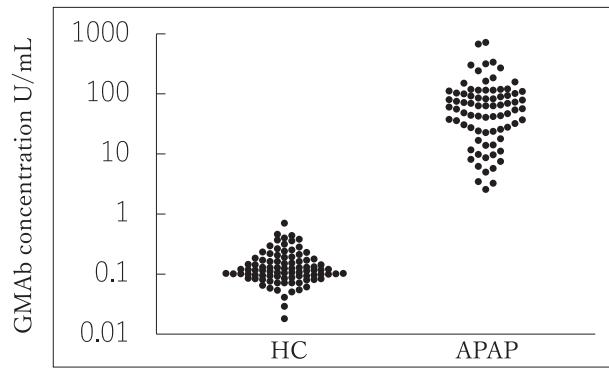


図 1A

健常者 90 名、自己免疫性肺胞蛋白症 78 名の血清抗 GM-CSF 自己抗体濃度の分布。MBL 社と開発した ELISA による測定結果。縦軸は、対数表示の抗 GM-CSF 自己抗体濃度で、単位は U/ml である。

文献8) より改変

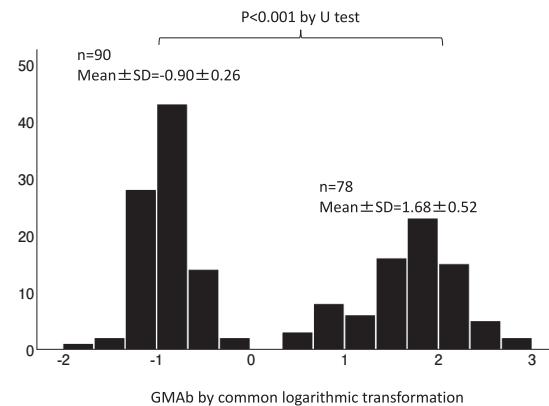


図 1B

Aと同じデータの度数分布。縦軸を人数、横軸は血清抗 GM-CSF 自己抗体濃度として表した。

文献8) より改変

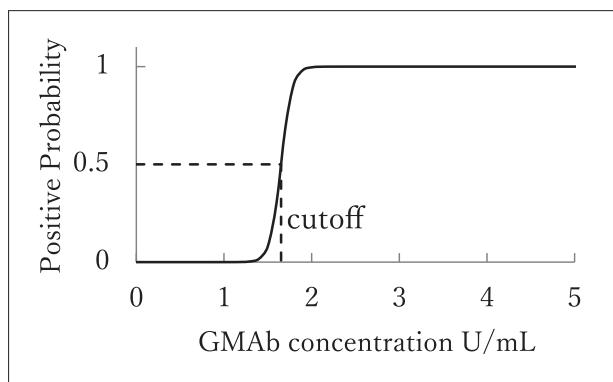


図 1C

Aと同じデータを用いた健常者と患者間のロジスティック回帰曲線によるカットオフ値の推定。

文献8) より転載、一部改変

キシエチレン) で 201 倍に希釈し、さらに 1、2、4、…、1,024、2,048 倍に段階希釈し、最適化した試作品を用いて最終希釈倍数を測定した。力価は最終希釈倍数と定義した。また、GMAbs 濃度が 60 U/mL 未満の血清サンプルについては、血清サンプルを 1、2、4、8、…、8,192 倍に直接希釈し、最適化した試作品にアプライした。判定ラインが陰性の血清の力価を 0 と定義した。

## 6. 統計

各カットオフ値について、ROC 曲線解析を実施した。GMabs 濃度と抗体価の相関は、スペアマンの相関分析により評価した。

## II. 結果

### 1. 評価用血清および GMabs 濃度

APAP211 例、二次性肺胞タンパク症 (SPAP) 38 例、遺伝性肺胞タンパク症 (HPAP) 5 例、その他の肺疾患 128 例の血清を用いた。APAP 患者の血清中 GMabs 濃度の中央値は 66.8U/mL、最大値 899.9U/mL、最小値 5.59U/mL であり、他の肺疾患患者では中央値 0.12/mL、最大値 48.57U/mL、最小値 0.01U/mL であった。



図 2A ラインチェック APAP の構造と各部の名称

[S] 検体滴下部 [D] 展開液滴下部 [T] テストライン出現部位 [C] コントロールライン出現部位

テストストリップ断面図

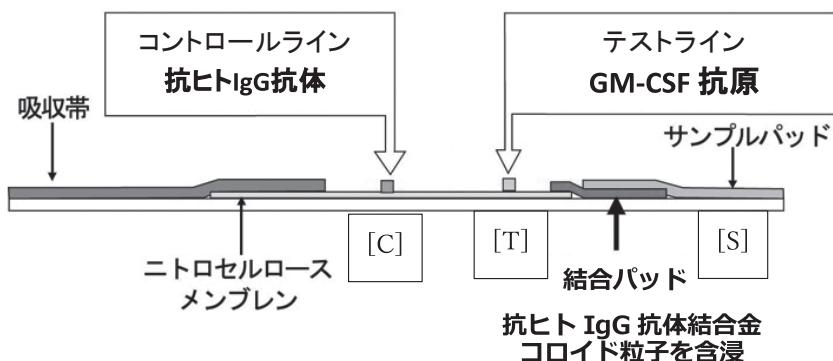


図 2B

血清をテストデバイスの検体滴下部 [S] へ滴下した後に、展開液を展開液滴下部 [D] に滴下する。血清は、展開液とともに毛細管現象により、左方向に移動する。あらかじめ結合パッドに含浸された金コロイド標識抗ヒト IgG モノクローナル抗体（マウス）は、検体中の IgG と免疫複合体を形成しながら展開部を移動する。免疫複合体の中に抗 GM-CSF 自己抗体複合体が存在すれば、ニトロセルロース膜上の抗 GM-CSF 抗体判定部 [T] に固定化された遺伝子組換えヒト GM-CSF に捕捉され、テストライン出現位置に集積し赤紫色のラインが出現する。自己抗体以外の IgG はさらに左方に移動し、コントロールラインの抗ヒト IgG 抗体と結合し、赤紫色のラインが出現する。

(図2A、図2B は巻末カラーで掲載しています)

## 2. 試作品の検出下限の調整

テストライン位置に固定化された GM-CSF の量と、結合パッドに含浸された金コロイド標識抗ヒト IgG 抗体の量は、段階希釈された標準ポリクローナル GMAb 溶液の濃度が 0.78U/ml 未満で陰性、1.56U/ml 以上で陽性となるように調整された。4名の検査官全員が 1.56U/ml で陽性、0.78U/ml で全員が陰性と判断したため、検出下限は 1.56U/ml であることが確認された。しかし、67例の APAP 検体のうち、観認できる最低値は 3.5U/ml だった。

## 3. 感度、特異度、陽性予測値(PPV)、陰性予測値(NPV)の推定

APAP 患者 211 名の血清を試作品に適用したところ、全検体が陽性となり、APAP 以外の肺疾患患者 171 名の血清は 2 例で陽性となった。5 名の検者による判定結果は、すべての試験において一致した。感度 (211/211) および特異度 (169/171) は、100%、98.8% であった。陽性サンプルの下限濃度は 3.5 U/ml であった。

## 4. GMAbs 濃度とエンドポイント希釈力値の相関

APAP および APAP 以外の肺疾患患者血清中の抗体価と、従来の ELISA 法で測定した GMAbs 濃度との相関関係を調べた。全体で強い相関が認められた ( $\rho=0.93$ 、 $P<0.001$ )。GMAbs 濃度が 60 U/mL 未満の検体では相関は弱くなった ( $\rho=0.67$ 、 $P<0.001$ )。高濃度検体は回帰直線から外れる傾向があったが、そのほとんどは 1 管 (2 倍) 以内だった。

## III. 考察

本研究では、従来の ELISA のカットオフ値と同等の感度に設定することで、臨床現場において迅速に血清診断を行うことができるイムノクロマトアッセイキットの試作品を開発することに成功した。これまで、APAP の血清診断にイムノクロマトアッセイを用いた報告はなかった。本開発キットの実用化により、臨床現場における迅速診断の普及が期待される。

本研究では、試作品の検出下限が従来の ELISA

法のカットオフ値 1.65 U/mL<sup>8)</sup> に近い 1.56 U/mL に調整した。この試作品を用いて、従来の ELISA 法で既に診断されている APAP 患者 211 名と APAP 以外の肺疾患患者 171 名をアプライして評価したところ、感度 100%、特異度 98.8% であった。ELISA 法では、検体中の GMAb 以外の非特異的 IgG の GM-CSF への結合は、ブロッキングおよび洗浄操作によってある程度抑制できる。一方、イムノクロマトグラフィーではこれらの操作がないため、血清中の非特異的 IgG の固相化 GM-CSF への結合の影響が懸念された。しかし、ELISA でのカットオフ値近くに試作品の検出下限を合わせることができたことから、検体として血清を用いる限り、その懸念は杞憂だったと思う。

211 名の陽性検体において偽陰性率、すなわち GMAb が存在するにもかかわらず陰性となる割合はゼロだった。本研究で用いた陽性検体の最低濃度は 3.5 U/ml であったため、それ以下の濃度ではどのような結果になるかは不明である。カットオフ値に近い 2 ~ 5 U/ml で GMAb が検出された検体があれば、精査する価値がある。その場合、検者間の一致率も低下する可能性がある。これは今後の検討課題である。一方、GMAb の濃度が低い気管支肺胞洗浄液のテストでは、リン脂質やコレステロールなどと結合している IgG が GM-CSF に非特異的に結合する可能性があり、イムノクロマトグラフィーによる気管支肺胞洗浄液中 GMAb の検出が必要な場合は、あらかじめ妨害物質を除去した上で検出する必要があるかもしれない。

イムノクロマト法は臨床現場で有用である一方、定量評価ができないという欠点がある。GMAb 濃度が変動する症例の経過評価においては、定量評価が必要となる場面は少なくないと考える。われわれはかつてラテックスビーズ凝集法で測定した抗体価と ELISA 法で測定した濃度の相関を試みた<sup>12)</sup>。この際、目視判定によるエンドポイントの不正確さから、低濃度検体では相関が弱かった。本研究においても低濃度の GMAb では、end point 抗体価と ELISA 法による濃度との相関性は弱くなることが確認されている。したがって、GMAb 濃度が低い、あるいは経時的に変動する検体を測定する場合には、ELISA 法を用いる方が安全である。

血清 GMAb の検出が APAP の診断に不可欠であることは論を待たないが、逆に血清 GMAb が陽性となっても APAP であるとは断定できない。GMAb は

多くの疾患において、血清中に検出される。Nylund らは、GM-CSF Ab レベルが高いクローニー病 (CD) 患者は GM-CSF Ab レベルの低い CD 患者よりも腸の透過性が高かったと報告している<sup>13)</sup>。また、Salvator らは、STAT5 リン酸化阻害を指標として、クリプトコッカス症患者とノカルジア症患者の血漿中の抗 GM-CSF 自己抗体による中和能を調べたところ、それぞれ  $3.9 \pm 6\%$  と  $1.8 \pm 2.2\%$  の血漿で中和能が検出されたと報告している<sup>14)</sup>。Toullec は、深部子宮内膜症患者の血清中に高濃度の GMAb が含まれており、これが病変の重症度および数と相関していると報告した<sup>15)</sup>。イムノクロマトグラフィーによるアッセイは、GMAb が検出される自己免疫性肺胞蛋白症以外の疾患の病勢マーカーとして有用である可能性がある。

GMAbs 検出用イムノクロマトグラフィーが、APAP の血清診断キットとして承認・発売された。GM-CSF 吸入療法が普及するにつれ、本キットの重要性はますます高まると考えられる。臨床現場における APAP の診断が容易になるだけでなく、鑑別診断に用いられることにより APAP と鑑別を要する他の肺疾患の診断にも貢献することが期待される。

## 文 献

- 1) Trapnell BC, Whitsett JA, Nakata K. Pulmonary Alveolar Proteinosis. *N Engl J Med.* 2003; 349(26): 2527-2539.
- 2) Trapnell BC, Nakata K, Bonella F, et al. Pulmonary alveolar proteinosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019; 5(1): 16.
- 3) Nobutaka K, Ohkouchi S, Tazawa R, et al. Incidence of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis estimated using Poisson distribution. *ERJ Open Res.* 2019; 5(1): 00190-2018.
- 4) Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, et al. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1999; 190(6): 875-880.
- 5) Dranoff G, Crawford M, Sadelai B, et al. Involvement of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science.* 1994; 264(5159): 713-716.
- 6) Nishinakamura R, Nakayama Y, Hirabayashi T, et al. Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while beta IL-3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity.* 1995; 2(3): 211-222.
- 7) Sakagami T, Uchida K, Suzuki T, et al. Human GM-CSF autoantibodies and reproduction of pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 2009; 361(27): 2679-2681.
- 8) Nakata K, Sugi T, Kuroda K, et al. Validation of a new serum granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibody testing kit. *ERJ Open Res.* 2020; 6(1): 00259-2019.
- 9) 日本呼吸器学会肺胞蛋白症診療ガイドライン 2022 作成委員会編. 肺胞蛋白症診療ガイドライン 2022. メディカルレビュー社. 2022.
- 10) Tazawa R, Ueda T, Abe M, et al. Inhaled GM-CSF for Pulmonary Alveolar Proteinosis. *N Engl J Med.* 2019; 381(10): 923-932.
- 11) Narita C, Shima K, Sekiguchi J, Ozeki Y, et al. Rapid serological detection of anti-GM-CSF autoantibodies in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis using a move immunochemical test. *Respirology* in press.
- 12) Kitamura T, Uchida K, Tanaka N, Tsuchiya T, Watanabe J, Yamada Y, et al. Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(2Pt1): 658-662.
- 13) Nylund CM, D'Mello S, Kim MO, Bonkowski E, Däbritz J, Foell D, et al. Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and increased intestinal permeability in Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011; 52(5): 542-548.
- 14) Salvator H, Cheng A, Rosen LB, Williamson PR, Bennett JE, Kashyap A, et al. Neutralizing GM-CSF autoantibodies in pulmonary alveolar proteinosis, cryptococcal meningitis and severe nocardiosis. *Respir Res.* 2022; 23(1): 280.
- 15) Toullec L, Batteux F, Santulli P, Chouzenoux S, Jeljeli M, Belmondo T, et al. High Levels of Anti-GM-CSF Antibodies in Deep Infiltrating Endometriosis. *Reprod Sci.* 2020; 27(1): 211-217.

臨床検査アップデート 108  
自己免疫性肺胞蛋白症の血清診断のための  
新規イムノクロマトグラフィー Line Check APAP の開発 中田 光



図 2A ラインチェック APAP の構造と各部の名称

[S] 検体滴下部 [D] 展開液滴下部 [T] テストライン出現部位 [C] コントロールライン出現部位

テストストリップ断面図

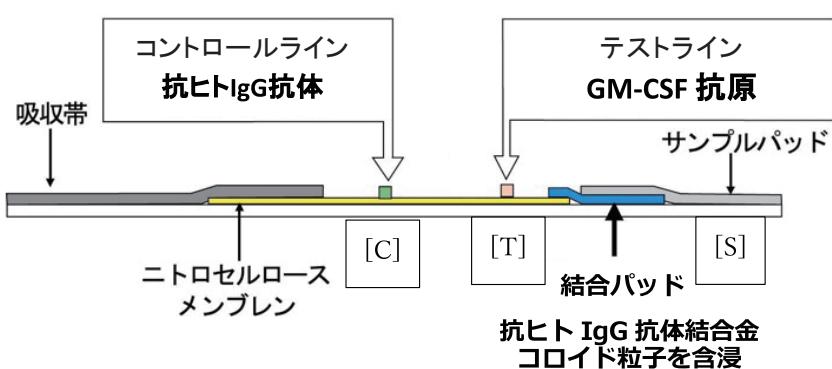


図 2B

血清をテストデバイスの検体滴下部 [S] へ滴下した後に、展開液を展開液滴下部 [D] に滴下する。血清は、展開液とともに毛細管現象により、左方向に移動する。あらかじめ結合パッドに含浸された金コロイド標識抗ヒト IgG モノクローナル抗体（マウス）は、検体中の IgG と免疫複合体を形成しながら展開部を移動する。免疫複合体の中に抗 GM-CSF 自己抗体複合体が存在すれば、ニトロセルロース膜上の抗 GM-CSF 抗体判定部 [T] に固定化された遺伝子組換えヒト GM-CSF に捕捉され、テストライン出現位置に集積し赤紫色のラインが出現する。自己抗体以外の IgG はさらに左方に移動し、コントロールラインの抗ヒト IgG 抗体と結合し、赤紫色のラインが出現する。