

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

## 新規体外循環システムの創製と評価技術の開発

所 属 国立療養所川棚病院  
研究者 渋谷 統寿

分担研究者

(1) 旭メディカル(株)開発研究所 吉田 一

### 要旨

T細胞介在性の免疫性神経疾患を治療するために、病因となるCD4+T細胞を全血フロー系で効率よく除去する体外循環治療システムの開発を行った。ヒト臨床用CD4+T細胞カラムを試作し、医療用具及び医療材料の基礎的な生物学的試験のガイドラインに従った安全性試験を実施した。カラムのプライミング条件を十分検討し、細胞毒性に留意する必要性を認めたが、その他の検討ではウイルス否定試験を含めて臨床試用に向けて安全性の面で問題のないことが確認された。

活性化したCD4+T細胞の除去性能をミニスケールカラムを用いてin vitroで検討し、活性化状態でもCD4(+)細胞を特異的に除去することを確認した。さらに、より選択的な細胞吸着を行うために活性化T細胞を標的としたカラムの開発とその評価法について検討した。

### 1. 研究目的

免疫性神経疾患は神経組織(中枢神経、末梢神経、神経筋接合部、筋肉)を標的として免疫応答異常が生じ発症する。発症機序の面から(1)主として自己抗体や補体による組織傷害が主因と考えられている重症筋無力症やLambert-Eaton筋無力症候群などと、(2)主に自己反応性T細胞の神経組織への侵入と免疫系の細胞の相互作用によって発症する多発性硬化症やギラン・バレー症候群などに区分される。

免疫性神経疾患に対する治療手段として、①薬剤によるin vivoでの免疫抑制や免疫調節、②体外循環で液性因子を除去するex vivoでの免疫調節などが行われている。T細胞介在性の免疫性神経疾患である多発性硬化症などでは抗原特異的CD4陽性T細胞が病因に強く関わっている。我々は、病因となるCD4+T細胞をex vivoで除去し免疫治療を行う目的で、全血フロー系でCD4+T細胞を効率よく除去する体外循環治療システムの開発を行ってきた。

昨年度までに、ポリスチレンを基材として用い、抗CD4モノクローナル抗体を材料表面に固定した特異的細胞除去材の検討を実施、in vitroでヒト新鮮血液を用いて灌流条件下でCD4+T細胞を特異的にかつ効率よく除去することに成功した。さらに、臨床試用に向けて、滅菌技術の開発やより汎用性の高いポリプロピレン不織布の使用を可能にした。ヒト臨床用のカラムを試作し、安全性・吸着性能を確認し、臨床に試用できる可能性が示唆された。一方、選択的CD4+T細胞除去カラムによる受動的実験的アレルギー性脳脊髄炎ラットでの体外循環治療で、この治療法により病因となる脳炎惹起CD4+T細胞の臓器内への浸潤する数が減少し、疾患モデルの重症度を軽症化し、回復を促進させることが示唆され、免疫性神経疾患の治療戦略としての本治療法の有用性が示された。

今年度は、臨床試用をめざして実用スケールでの除去器の試作および安全性に関する検討を実施した。安全性に関しては、医療用具の生物学的ガイドラインに加え、使用する抗体のウイルス否定試験も施行した。また、血液をin vitroで活性化させ、活性化したCD4+T細胞を除去する検討を行った。近年、CD4+T細胞の一部には疾患の発症を抑制するようなT細胞も含まれていることが明らかになった。このため、CD4+T細胞の中で、病因となる自己反応性T細胞をより選択的に除去する吸着剤の開発するために活性化マーカー(CD25、CD40Lなど)に対する抗体を固定した活性化細胞除去カラムの試作を行い、ミニスケールカラムにより評価を行った。

### 2. 研究方法

(1) 治療器の開発および試作

①ポリプロピレン不織布への活性基導入

ガラス製ビーカーに、硫酸 15ml、ニトロベンゼン 20ml、パラホルムアルデヒド 0.098g を入れマグネチックスターラーで攪拌した。これに 2-ヒドロキシメチルヨードアセトアミド 1.59g を加え攪拌しながら溶解した。この反応液にポリプロピレン製不織布 0.8g をそれぞれ湿潤させ 2 4 時間、室温で反応した。反応後の不織布をメタノールで洗浄し、更に水で十分洗浄し、活性化不織布を得た。

## ②抗体固定

これら活性化不織布に、リガンドとして抗ヒト CD4IgG1 抗体 (mouse IgG, clone: NU-T, ニチレイ社製) を用い、モノクローナル抗体 PBS(-) 溶液に活性化不織布を室温で浸し固定化反応を行った。非固定化活性基を Tween20 (東京化成製) でブロッキングし、モノクローナル抗体固定除去材を作成した。

## ③ミニスケールカラムの調製

モノクローナル抗体固定除去材を、内径 6.8mm、容量 1ml のカラムに充填し、抗体の滅菌保護材として、1%キトサン PBS(-) 水溶液を充填液として添加しミニスケールカラムとした。ミニスケールカラムをコバルト 60 $\gamma$ 線照射装置にて、照射線量 25kGy を照射し滅菌を行った。

## ④ミニスケール活性化血液評価

血液の活性化は、ヘパリン(1000U/L)採血した健常人新鮮血液に、Phorbol 12-Myristate 13 acetate(PMA) (Calbiochem Novabiochem 社製), Ionomycin (Sigma 社製), 10%FCS(Hyclone 社製)-RPMI1640(日本製薬社製)溶液を加え、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で4時間インキュベーションした。これに活性化停止液として冷PBS(-)液を加え、活性化血液を作成し、これを処理検体とした。ミニスケールカラムに流速 1ml/min で生理食塩液を 5ml を流し、プライミングを行った。プライミング液を空気で押し出した。処理検体 5ml を流速 1ml/min で、シリンジポンプを用いて灌流した。カラム処理前後の血液をサンプリングし、白血球数はチュルク液染色により顕鏡によりカウントし、白血球の回収率を求めた。赤血球及び血小板数はマイクロセルカウンター (Sysmex 社製) にて求め、赤血球及び血小板の回収率を求めた。更に、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー分析より、リンパ球分画を CD4 及び CD8 の 2 カラーで分析し、CD4(+)細胞除去率(%)及びCD4(-)細胞回収率(%)を求めた。

## ⑤臨床スケールカラムの調製

モノクローナル抗体固定除去材を、96.5mm 角に切断し、容量 60ml のカラムに充填し、臨床スケールカラムを作成した。1%キトサン PBS(-)水溶液を同時に充填し、本カラムをコバルト 60 $\gamma$ 線照射装置にて、照射線量 25 k G y を照射し滅菌を行った。

## ⑥臨床スケールカラムの医療用具及び医療材料の基礎的な生物学的安全性の確認

### 6-1 発熱性試験、急性全身毒性試験、血液適合性試験、皮内反応試験

実用量の濾材を充填したカラムを回路に接続し、生理的食塩水 3000ml でプライミングした後、血液回路の両端を日局注射用ガラス容器試験法(3)アルカリ溶出物試験に適合する内容量 500ml のガラス容器に入れた。血液回路内に循環可能で、かつ試験液として 300ml を採取しうる量の生理的食塩水を入れ、液温 37°C に保ち汚染をさせて、血液ポンプを用いて 50ml/min の流速で 72 時間循環を行った。循環後ガラス容器内の液を集めて室温になるまで放置し、試験液とした。

試験液を用いて、医療用具及び医療材料の基礎的な生物学的試験のガイドラインに定められた方法で、発熱性試験、急性全身毒性試験、血液適合性試験、皮内反応試験を実施した。

### 6-2 感作性試験

実用量の濾材を充填したカラムを回路に接続し、生理的食塩水 3000ml でプライミングし、カラムより濾材をクリーンベンチ内で取り出した。試験は、溶剤による濾材の変性等を考慮し、Adjuvant and Patch Test に従い濾材 2.4×4cm をモルモットへの直接貼り付けによる方法にて財団法人化学物質評価研究機構にて実施した。

### 6-3 細胞毒性試験

実用量の濾材を充填したカラムを回路に接続し、生理的食塩水 6000ml でプライミングし、カラムより濾材をクリーンベンチ内で無菌的に取り出した。濾材を 15×20mm に切断し、乾燥重量 1 g につき 10ml となるように 10%FBS 含有 EMEM を 42ml 加えた後、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C・24 時間抽出した。

医療用具及び医療材料の基礎的な生物学的試験のガイドラインに従い、マウス皮下組織由来の L-929 細胞株を用い、細胞毒性試験を実施した。

### 6-4 固定抗体のウイルス否定試験

固定している抗体液を検体として、マウス由来のウイルス否定試験を、チャールス・リーバー社にて実施した。試験項目は、Points To Consider Testing for the Presence of Agar-Cultivable and Non-Cultivable

Mycoplasma, Mouse Antibody Production (MAP) Test with LCMV Challenge Testing for 16 murine viruses, Ultrastructural Evaluation of Ultracentrifuged Fluid for Viral Particles, with Tabulation of Retrovirus-like Particles, In vivo Detection (Adult suckling mice, egg safety, and guinea pigs) について実施した。

さらに、実用量の濾材を充填したカラムにて日本薬局方に従い無菌試験を実施し、細菌及び真菌を測定した。

## (2) 活性化T細胞除去カラムの開発

### ① 活性化T細胞マーカーを標的としたミニスケールカラムの作成

活性化細胞除去用として、CD25IgG2a 抗体 (mouse IgG, Clone: B1.49.9, COULTER 社製), CD40LIgG1 抗体 (mouse IgG, Clone: TRAP1, COULTER 社製)、抗 CD45RO 抗体および抗 CD95 抗体をそれぞれ用いて CD4 陽性 T 細胞除去カラムと同様の方法により容量 1ml のミニスケールカラム作成した。ミニスケールカラムは $\gamma$ 線を 25kGy 照射して滅菌した。

### ② 活性化T細胞を用いたカラムの性能評価

正常ヒト末梢血中には標的とする活性化T細胞の頻度少ないため、次の方法で活性化T細胞を得た。① PPD 特異的T細胞ラインを樹立し、抗原刺激後のT細胞、②HLA の異なる2人の供血者の末梢血より単核球を分離し、72時間混合培養 (Mixed lymphocyte reaction)、③末梢血より単核球を分離し、抗ヒトCD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激後の細胞をそれぞれ活性化T細胞として同一の供血者の全血に混入しカラムの評価を行った。抗凝固剤としてACD-Aを加えた(血液:ACD-A=8:1)。ミニスケールカラムに流速 1ml/分で生理食塩水 10ml を流してプライミングを行った後、シリンジポンプを用いて検体 5ml を流速 1ml/分で灌流した。カラム処理前後の血液をサンプリングして分析した。白血球の回収率は、白血球をチュルク液で染色して顕鏡下でカウントして求めた。血小板数はマイクロセルカウンター (Sysmex 社製) を用いてカウントし、血小板の回収率を求めた。更に、リンパ球分画をフローサイトメトリーによってCD25、CD40L、CD45RO、CD95、CD4、CD8の陽性率を求め、各細胞分画の除去率(%)を算出した。

## 3. 研究成果

### (1) 治療器の試作と安全性評価

治療器10本を作成し、医療用具の生物学的ガイドラインに従い、安全性試験を実施した。発熱性試験、急性全身毒性試験、血液適合性試験、皮内反応試験、皮膚感作性試験を実施した結果、合格であり、本試験において特に異常を認めなかった。

また、細胞毒性試験を実施した結果、弱から中程度の毒性が認められた。ただし、これは充填液の残留によるものと推測された。

原材料として用いる抗体のウイルス否定試験を実施し、実施した全ての項目でウイルス存在は否定された。加えて、治療器での無菌試験を実施し、細菌および真菌の検出なく、作成した除去器のウイルスの関する安全性が確認された。(表1)

### (2) ミニスケールカラムによる活性化細胞でのCD4+T細胞除去能の検討

健常人新鮮血液をPMAを用いて、Tリンパ球を活性化したところ活性化によりCD4抗原のダウンレギュレーションが確認された。(Fig.1) この活性化血液をCD4+T細胞除去カラムで処理した結果、CD4+T細胞の除去率  $95.3 \pm 3.25\%$  ( $n=3$ , mean  $\pm$  S.T.D.)、CD4-T細胞の回収率  $79.4 \pm 14.6\%$  で、これまで報告した非活性化血液でのCD4+T細胞の除去率  $89.7 \pm 7.17\%$  ( $n=50$ )、CD4-T細胞の回収率  $84.1 \pm 12.3\%$  と同等の値であり、選択的な除去が可能であった。(Fig.2)

活性化血液の血球成分の回収率は、それぞれ白血球の回収率  $48.1 \pm 9.6\%$  ( $n=4$ )、赤血球の回収率  $98.3 \pm 1.7\%$ 、血小板回収率  $91.8 \pm 30.74\%$  ( $n=4$ )であった。(Fig.3)

白血球分画の回収率はそれぞれ、リンパ球の回収率  $51.2 \pm 12.9\%$  ( $n=4$ )、顆粒球の回収率  $21.9 \pm 63.2\%$ 、単球の回収率  $53.6 \pm 45.2\%$  ( $n=4$ )、であった。(Fig.4)

リンパ球分画の回収率は、CD4+T細胞除去率  $95.3 \pm 3.3\%$  ( $n=4$ )、CD8+T細胞回収率  $83.8 \pm 11.55\%$  ( $n=4$ )で、CD4+T細胞が選択的に除去されていた。(Fig.5)

### (3) 活性化T細胞除去カラムの開発

活性化T細胞除去カラムの性能を評価するためには、まず、活性化T細胞が増加した状態の血液を調整して、その血液を用いて活性化T細胞の除去率を求める必要がある。PPD 特異的T細胞ラインを用いた場

合の混合血液（処理前）中の CD25, CD45RO, CD95, 陽性細胞の頻度は、やや増加していたが、CD40L の頻度の変化はなかった（表 2）。Mixed lymphocyte reaction を用いた系でもほぼ同じ傾向が得られた。抗ヒト CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激した系では CD25 は 5.5-7.3%まで増えており、これらの方法でカラムの評価が行える可能性が示された。しかし、CD40L 陽性細胞の頻度は低く（0.1%）、それぞれの活性化 T 細胞マーカーの間でかなりの差が認められた。

比較的陽性率の高かった CD25, CD45RO, CD95 を標的としたそれぞれの抗体固定カラムで灌流実験を行ったが、それぞれのマーカー陽性細胞の除去率は最大でも 46-60%程度で、CD4+T 細胞除去カラムに比べると低い値であった（Fig6、表 2）。

#### 4. 考察

医療用具及び医療材料の基礎的な生物学的試験のガイドラインに基づいた生物学的安全性試験の結果では、細胞毒性試験で弱から中程度の細胞毒性が確認された点を除き、臨床スケールカラムの安全上の問題点は特に認めず、臨床への応用の可能性が示唆された。プライミング量依存で毒性が変化することより細胞毒性は充填液の残留に基づく可能性が高く、今後プライミング方法の検討が必要である。さらに、原材料として用いる抗体のウイルス否定試験を実施し、評価した全ての項目でウイルスの存在が否定された。これより、滅菌後の治療器においてもウイルス混在の危険性は低いことが示された。今後は抗体産生細胞のウイルスバリデーションについての検討も必要と考えられる。

ミニスケールにて、PMA にて *in vitro* で血液を活性化した場合、フローサイトメーターでの表面観察により、CD4 表面抗原発現量の減少傾向が認められた。このように CD4 抗原発現量の減少による CD4 除去器の除去性能の低下に結びつくと考えられたが、フロー後には CD4+T 細胞が除去できることが確認された。本検討により、CD4 抗原の発現量が減少しても CD4+T 細胞が除去可能であると考えられた。疾患における細胞の活性化により CD4 抗原発現量が減少した場合であっても、選択的除去が可能であり、CD4/CD8 比を効果的に調節できることが可能である。

一方、病因となる T 細胞は CD4+T 細胞の一部に過ぎないことやそれらの多くが活性化した CD4+T 細胞であることから、これらをより選択的に除去するためのカラムの開発を行った。今回は、いくつかの活性化 T 細胞の表面マーカーを標的としてカラムを試作し、評価法とあわせて検討した。循環血液中の活性化 T 細胞の頻度がかかなり低い（1%以下）場合もあり、カラムの性能を評価するには適当な方法で活性化 T 細胞を増加させた血液を調整する必要があると考えられる。今回用いた方法である程度の評価が可能と考えられるが、活性化 T 細胞マーカーの間で頻度に差があることから、どのマーカーが疾患の活動性と関連するかなどの検討が必要と考えられた。例えば、CD4+CD25+ T 細胞の一部は疾患の発症を抑制する機能を持つことが報告されており、活性化 T 細胞であっても病因となっていない可能性も考えられる。今回の検討では、CD25, CD45RO, CD95 を標的としたカラムでの除去率はいずれもやや低かったが、この原因は用いた抗体のアフィニティが低かったことによる。今後、適切な抗体を選択することで改良することが可能である。

#### 5. まとめ

ヒト臨床用 CD4+T 細胞カラムを試作し、医療用具及び医療材料の基礎的な生物学的試験のガイドラインに従った安全性試験を実施した。カラムのプライミング条件を十分検討し、細胞毒性に留意する必要性を認めたが、その他の検討ではウイルス否定試験を含めて臨床試用に向けて安全性の面で問題のないことが確認された。

活性化した CD4+T 細胞の除去性能をミニスケールカラムを用いて *in vitro* で検討し、活性化状態でも CD4(+)細胞を特異的に除去することを確認した。さらに、より選択的な細胞吸着を行うために活性化 T 細胞を標的としたカラムの開発とその評価法について検討した。

#### 6. 研究発表

- 1) 中根俊成、松尾秀徳、後藤公文、吉永 恵、福留隆泰、吉田 一、澁谷統壽. 選択的 CD4 陽性 T 細胞吸着カラムの実験的アレルギー性脳脊髄炎への応用. 神経免疫学, 9(1), 68-69, 2001
- 2) Goto H, Matsuo H, Nakane S, Izumoto H, Fukudome T, Kambara C, Shibuya N. Plasmapheresis affects T helpertype-1/T helper type-2 balance of circulating peripheral lymphocytes. Therapeutic Apheresis, 5(6), 494-496, 2001



Fig.1 Flow cytometry Analysis

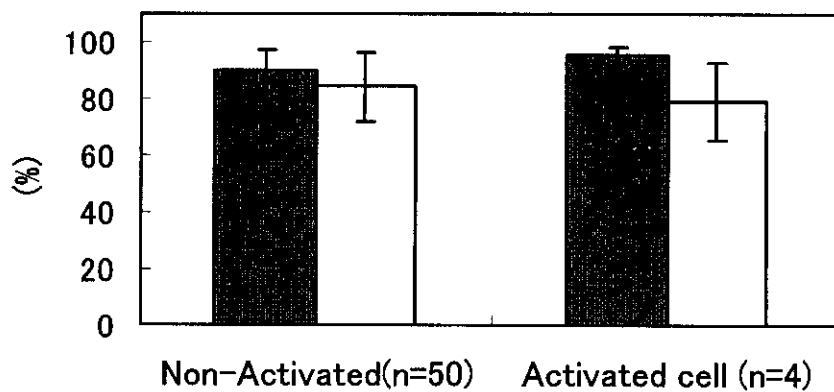


Fig.2 in vitro Cell Removal Tests  
(Activated Cells vs Non-Activated Cells)

■ CD4(+) Cells Removal Rate    □ CD4(-) Cells Recovery Rate

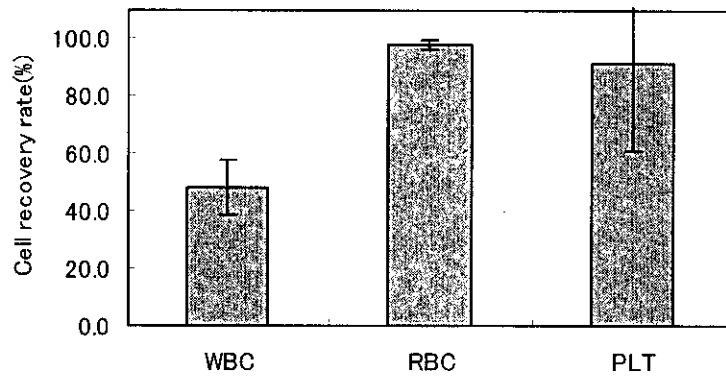


Fig.3 In vitro Cell Removal Tests (n=4)  
Flow Rate 1ml/min, Activated Blood(Heparin):5mL

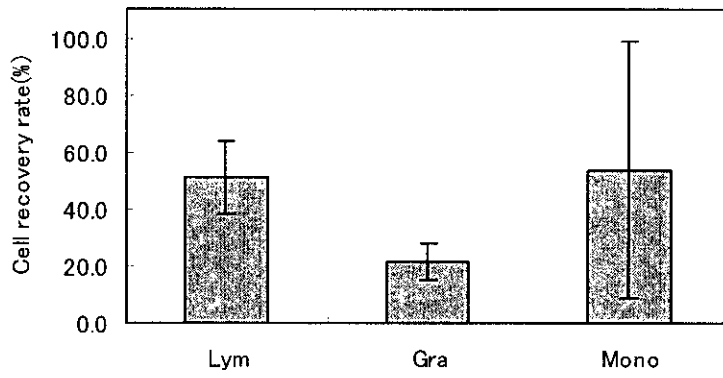


Fig.4 In vitro Cell Removal Tests (n=4)  
Flow Rate 1ml/min, Activated Blood(Heparin):5mL

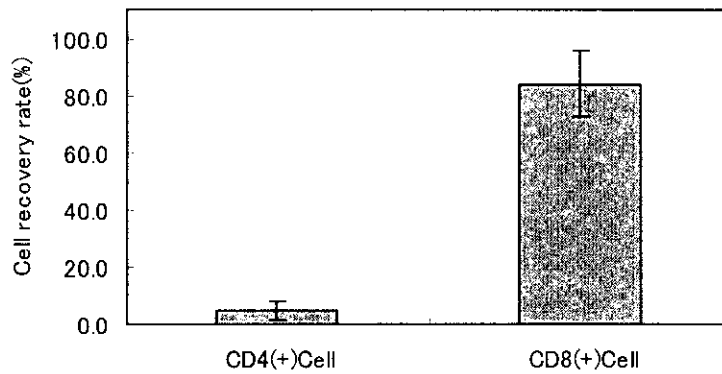


Fig.5 In vitro Cell Removal Tests (n=4)  
Flow Rate 1ml/min, Activated Blood(Heparin):5mL

元血液

処理後血液

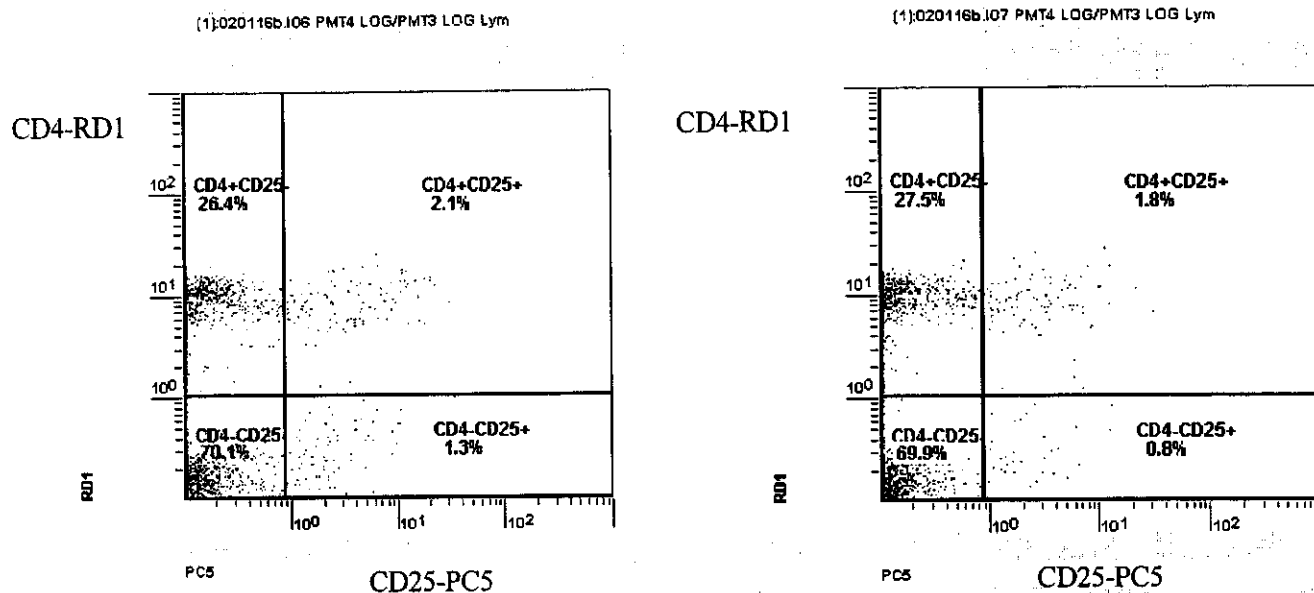


Fig.6 Flow cytometry analysis of blood in treatment with anti-CD25 antibody fixed column

表1 治療器使用抗体のウイルス否定試験

サンプル：抗CD4精製抗体液（抗体含量：カラム固定量の2倍量で評価）

\*試験委託先：日本チャールス・リバー株式会社

試験	試験結果
Points To Consider Testing for the Presence of Agar-Cultivable and Non-Cultivable Mycoplasma*	Not Detected
Bulk Sterility Testing Direct Inoculation Total Aerobic Count Bacteria, Yeast and Mold	Not Detected
Mouse Antibody Production (MAP) Test with LCMV Challenge Testing for 16 murine viruses - This test is performed at Charles River Laboratories, Wilmington, MA facility.*	Not Detected
Ultrastructural Evaluation of Cell Cultures for Viral Particles, With Characterization and Tabulation of Retrovirus-like Particles*	Not Detected
Tissue Culture Safety Testing (Consult technical staff for specific protocol numbers, if cell lines are specified by sponsor, the General Protocol List may be used as a reference.) 14 Day Tests anything but Human, In vitro detection, 3 cell lines*	Not Detected
In vivo Detection * Adult & suckling mice, egg safety, and guinea pigs	Not Detected



表2. 活性化T細胞除去カラムの評価

処理量(ml)	混合前血液		PPD混合		MLR混合	
	処理前	処理後	処理前	処理後	処理前	処理後
細胞分布(%)						
Lym	27.0	21.1	24.9	25.1	28.8	23.1
Gra	49.0	56.9	51.2	52.5	49.0	56.6
Mono	3.0	2.5	4.1	3.8	4.3	3.0
CD2 × CD19						
CD2+CD19-(T)	76.4	80.5	79.9	83.5	76.2	78.5
CD2+CD19+	0.2	0.2	0.8	0.5	0.2	0.3
CD2-CD19-	4.5	3.7	3.8	3.9	5.5	5.3
CD2-CD19+(B)	18.9	15.6	15.4	12.1	18.2	15.9
CD4 × CD8						
CD4+CD8-(H/I)	26.2	27.6	28.6	29.2	27.7	27.2
CD4+CD8+	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3
CD4-CD8-	28.3	26.2	25.7	24.4	30.8	29.8
CD4-CD8+(S/K)	45.1	45.9	45.3	46.2	41.1	42.7
CD4 × CD25						
CD4+CD25-	26.2	27.7	26.7	27.5	27.3	26.9
CD4+CD25+	0.3	0.3	2.3	1.9	0.7	0.6
CD4-CD25-	73.4	72	69.7	69.8	71.8	72.4
CD4-CD25+	0.1	0.0	1.4	0.8	0.1	0.1
CD45RO × CD4						
CD4+ × CD45RO-	13.2	15.1	13.8	14.7	12.6	13.1
CD4+ × CD45RO+	12.9	1.4	14.1	12.6	15.4	12.4
CD4- × CD45RO-	59.1	59.8	56.6	56.7	57.5	60.8
CD4- × CD45RO+	14.7	13.8	15.6	16.0	14.6	13.7
CD95 × CD4						
CD4+ × CD95-	15.1	6.4	6.0	6.1	8.7	6.3
CD4+ × CD95+	11.6	20.8	24.2	22.8	18.9	22.0
CD4- × CD95-	7.1	7.3	6.4	6.6	7.5	6.4
CD4- × CD95+	66.3	65.5	63.4	64.5	64.9	65.3
CD40L × CD4						
CD40L+ × CD4-	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CD40L+ × CD4+	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1
CD40L- × CD4-	73.5	72.0	71.1	72.1	72.5	72.0
CD40L- × CD4+	26.4	27.9	28.7	27.8	27.5	27.9

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社